

益气活血方对放射性肺损伤大鼠内皮素-1, γ-干扰素表达的影响

刘欣¹,王炳胜^{2*},刘秀芳²,张海²,李凤玉²

(1. 河北北方学院,河北 张家口 075000; 2. 解放军第 251 医院肿瘤科,河北 张家口 075000)

〔摘要〕 目的:观察益气活血方对放射性肺损伤大鼠血清及肺组织内皮素-1(ET-1)、γ-干扰素(γ-IFN)表达的影响。方法:将 66 只 Wistar 大鼠随机分为照射加益气活血方组(益气活血方组)30 只、单纯照射组(模型组)30 只、正常对照组(对照组)6 只。于受照当天开始,益气活血方组每天予益气活血中药 10 g·kg⁻¹,ig,模型组及对照组予蒸馏水 10 g·kg⁻¹,ig,直至动物被处死取材。益气活血方组与模型组均于首次照射后第 4、6、8、12、26 周末各取 6 只,对照组 6 只于第 8 周末处死,均取血清及右肺组织,检测 ET-1、γ-IFN 的表达。结果:益气活血方组及模型组 ET-1 的肺组织表达及血清值均于照射后第 4 周升高,8 周达到高峰,26 周下降,益气活血方组各时相 ET-1 的表达肺组织及血清值均低于模型组($P<0.05$)。而 γ-IFN 值于第 4 周开始降低,12 周至低谷,26 周回升。益气活血方组 γ-IFN 的表达肺组织及血清值均高于模型组($P<0.05$)。结论:益气活血方能调控 ET-1、γ-IFN 的表达及分泌,对放射性肺损伤具有较好的防治作用。

〔关键词〕 益气活血方;放射性肺损伤;内皮素-1;γ-干扰素

〔中图分类号〕 R285.5 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2012)24-0205-04

〔网络出版地址〕 <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121012.0914.012.html>

〔网络出版时间〕 2012-10-12 9:14

Effect of Yiqi Huoxue Recipe on expression of ET-1/γ-IFN in Rats with Radiation-induced Lung Injury

LIU Xin¹, WANG Bing-sheng^{2*}, LIU Xiu-fang², ZHANG Hai², LI Feng-yu²

(1. Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China;

2. 251 Hospital of PLA, Zhangjiarou 075000, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To observe the effect of the Yiqi Huoxue recipe on the expression of endothelin (ET-1) /interferon-γ (γ-IFN) in radiation-induced lung injury model rats. **Method:** 66 Wister rats were randomly divided into irradiation plus Chinese herbs group (Yiqi Huoxue Recipe group), the purely irradiated group (model Group), normal control group. From the exposure day, the Yiqi Huoxue Recipe group received ig Yiqi Huoxue Recipe 10 g·kg⁻¹, the model Group and the control group received ig distilled water 10 g·kg⁻¹ everyday, until the rats were killed. At the 4th, 6th, 8th, 12th, 26th weekend after irradiation, six rats were randomly selected from the Yiqi Huoxue Recipe group and model group. At the same time, six rats in normal group were executed at the 8th weekend. After executing the rats, the serum and right lung tissue were collected for examination. **Result:** The expression and serum levels of the ET-1 in Yiqi Huoxue Recipe group were lower than those in model Group ($P<0.05$). γ-IFN began to decrease at the 4th week, and drop at the 12th week and rose again by the 26th week. The expression and serum levels of γ-IFN in Yiqi Huoxue Recipe group were higher than those in model group ($P<0.05$). **Conclusion:** Yiqi Huoxue Recipe can regulate and control the expression and

〔收稿日期〕 20120524(011)

〔基金项目〕 全军“十二五”中医药重点项目(10ZY105)

〔第一作者〕 刘欣,在读研究生,医师,从事放射性损伤研究, Tel:15324337516, E-mail:1528329124@qq.com

〔通讯作者〕 * 王炳胜,研究生,主任医师;从事肿瘤放疗化疗研究, Tel:18803130081, E-mail:bingshengw@126.com

secretion of ET-1, γ -IFN, and has good effect on the prevention of radiation-induced lung injury.

[Key words] Yiqi Huoxue recipe; radiation-induced lung injury; ET-1; γ -IFN

放射性肺损伤是胸部肿瘤放疗最常见的并发症,多数研究表明,当受照肺组织所接受放射线的剂量超过某一生物阈值时,损伤毛细血管内皮细胞、肺泡Ⅱ型上皮细胞等靶细胞,这些细胞分泌内皮素-1(ET-1)、 γ -干扰素(γ -IFN)等各种细胞因子,并激活机体免疫机制。这些细胞因子和免疫细胞会引起照射区同侧或对侧非照射区发生无菌性炎症,同时激活胞内信号转导途径,进而刺激细胞增殖和细胞外基质成分过度沉积,肺纤维化形成^[1]。前期临床及动物实验表明益气活血方能降低放射性肺损伤的发生率,减轻其症状持续时间,能防治放射性肺损伤的发生^[2-4],但其具体作用机制并不明确。本实验通过采用小剂量多次照射,制造大鼠放射性肺损伤模型,并应用益气活血方药进行干预,观察不同时相大鼠血清及肺组织 ET-1, γ -IFN 表达的动态变化,探讨益气活血方药在放射性肺损伤发生过程中的作用及其机制。

1 材料

1.1 动物 66 只 SPF 级雌性 Wistar 成年大鼠,体重(200 ± 20)g,许可证号 SCXK(京)2012-0001,购于北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 试剂及仪器 ET-1 检测试剂盒、 γ -IFN 检测试剂盒(R&D 公司,美国),ET-1, γ -IFN 兔多克隆抗体试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司提供)。CMIAS-II 多功能真彩色病理图像分析仪(北京航空航天大学图像中心开发),TDL80-2B 离心机,EL301srip Reader 酶标仪(均为美国 Bio Tek 公司),BX-50 型欧林巴斯光学显微镜,6MV-X 线直线加速器(山东新华医疗器械有限公司)。

2 方法

2.1 分组 大鼠在 SPF 级实验室正常饲养 3 d,无异常者入组进行实验。饲养条件:温度 21 ~ 24 ℃,相对湿度 40% ~ 67%。随机分为照射加益气活血方组 30 只(益气活血方组)、单纯照射组 30 只(模型组)、正常对照组(对照组)6 只。

2.2 动物造模 益气活血方组及模型组均采用 6MV-X 直线加速器照射右肺,照射前使用戊巴比妥钠 0.04 g·kg⁻¹ ip 麻醉,俯卧于平台,模拟机下定位,铅块遮挡左肺及纵膈,照射野面积 3 cm × 3 cm,每次 5 Gy,每周 1 次,总量 30 Gy,照射后大鼠自然清醒。对照组大鼠只进行麻醉,不予照射。于受照当天开始,益气活血方组 ig 益气活血中药 10 g·

kg⁻¹,模型组及对照组 ig 蒸馏水 10 g·kg⁻¹,直至动物被处死取材。

2.3 方剂组成 黄芪 30 g,党参 25 g,白术 15 g,茯苓 15 g,丹参 30 g,鸡血藤 30 g,地龙 15 g,川芎 15 g,当归 20 g,苦参 30 g,香附 30 g,麦冬 15 g,枇杷叶 15 g,紫金牛 10 g,水煎、醇沉、浓缩、分装、消毒备用,生药含量 2 g·mL⁻¹。

2.4 标本留取 益气活血方组及模型组分别于首次照射结束后第 4,6,8,12,26 周末,各随机抽取 6 只大鼠,戊巴比妥钠 0.04 g·kg⁻¹ ip 麻醉。大鼠麻醉后,迅速切开胸腔用 5 mL 注射器从右心房抽取血液 5 mL 缓慢注入离心管,室温下静置 30 min 后,3 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,收集上清液置入冻存管中, -80 ℃ 冻存。取右肺置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h,常规石蜡包埋。为了排除 6 次麻醉对实验结果的影响,我们选择全部照射结束后的第 8 周末用同样的方法处死对照组 6 只大鼠,并取其血清及右肺组织。

2.5 检测

2.5.1 血清检测 用 ELISA 方法,按 ET-1, γ -IFN 检测试剂盒说明书进行,每组设 6 个平行孔,同时作对照孔^[5]。

2.5.2 组织检测 石蜡块 5 μ m 厚连续切片,采用过氧化物酶标记的链酶卵白素法(SP 法),按照 ET-1, γ -IFN 试剂盒操作程序进行免疫组化染色,光镜下观察胞浆中出现棕黄色颗粒为阳性。在 200 倍显微镜下取 5 个视野,用 CMIAS-II 多功能真彩色病理图像分析仪对免疫组化染色的积分吸光度(integrated absorbance, IA)进行定量分析,其值代表切片中相应抗原性的相对强度。

2.6 统计学方法 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用 SPSS 17.0 统计分析软件对实验数据进行统计学处理。采用单因素方差分析(F 检验和 q 检验)进行各组间比较。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 血清因子 ET-1, γ -IFN 含量 自第 4 周始,益气活血方及模型组血清及肺组织 ET-1 的含量明显增高并高于对照组,于第 8 周达到高峰,12 周下降,26 周继续下降。两组变化趋势相同,但益气活血方组在各时间点 ET-1 的水平均低于模型组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。益气活血方组及模型组

γ-IFN的表达自第4周始明显降低并低于正常组,至12周达低谷,26周回升。两组变化趋势相同,但益气活血方组各时间点 γ-IFN 的表达水平均高于模型组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表1~2。

表1 各组大鼠不同时相血清 ET-1 的测定 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	ET-1/ng·L ⁻¹				
		4周	6周	8周	12周	26周
对照	-	-	-	48.31 ± 5.86	-	-
模型	-	78.08 ± 11.37 ¹⁾	89.87 ± 11.21 ¹⁾	210.05 ± 12.93 ¹⁾	172.07 ± 13.03 ¹⁾	134.61 ± 24.40 ¹⁾
益气活血方	10	62.95 ± 8.96 ²⁾	77.48 ± 3.31 ²⁾	190.43 ± 10.85 ²⁾	145.06 ± 10.52 ²⁾	120.49 ± 9.20 ²⁾

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;与同期模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表2~4同)。

表2 各组大鼠不同时相血清 IFN-γ 的测定 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

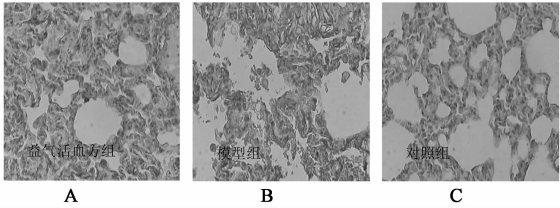
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	IFN-γ/ng·L ⁻¹				
		4周	6周	8周	12周	26周
对照	-	-	-	21.65 ± 3.20	-	-
模型	-	14.07 ± 2.90 ¹⁾	11.87 ± 3.45 ¹⁾	7.43 ± 1.30 ¹⁾	7.45 ± 1.39 ¹⁾	13.10 ± 2.04 ¹⁾
益气活血方	10	18.96 ± 1.90 ²⁾	14.90 ± 2.05 ²⁾	12.80 ± 3.05 ²⁾	10.01 ± 2.01 ²⁾	19.72 ± 2.14 ²⁾

3.2 肺组织检测

3.2.1 肺组织 ET-1 阳性表达产物主要分布 镜下可见益气活血方组及模型组受照肺组织 ET-1 阳性表达产物主要分布在肺泡上皮细胞、细支气管上皮细胞、巨噬细胞、间质细胞等细胞胞浆中,颜色越深表达越强。益气活血方组表达强度比模型组弱,对照组呈弱表达或不表达,益气活血方组及模型组阳性表达,益气活血方组表达较模型组弱。见图1。

3.2.2 肺组织 γ-IFN 阳性表达产物分布 对照组受照肺组织 γ-IFN 阳性表达产物主要分布在肺泡隔及支气管黏膜细胞胞浆中,颜色越深表达越强。对照组 γ-IFN 蛋白阳性表达,益气活血方组及模型组 γ-IFN 呈弱表达,且益气活血方组表达程度比模型组强。见图2。

3.2.3 真彩色病理图像分析仪分析大鼠肺组织各因子相应抗原性的相对强度显示 益气活血方组及模型组 ET-1 阳性细胞反应物质的平均 IA 自第4周始增高并高于对照组,第8周达高峰,12周有所下降,26周再次下降。两组变化趋势相同,但益气活血方组各时间点平均 IA 均低于模型组,差异具有统



A. 益气活血方 10 g·kg⁻¹组;B. 模型组; C. 对照组(图2同)

图1 各组第8周时受照肺组织中 ET-1 蛋白的表达(SP×200)

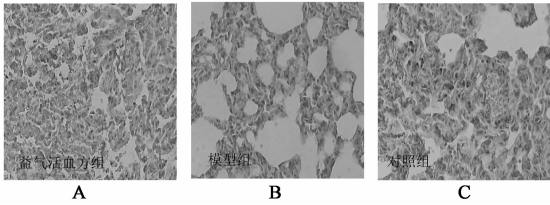


图2 各组第8周时受照肺组织中 γ-IFN 蛋白的表达(SP×200)

计学意义($P < 0.05$)。见表3。
益气活血方组及模型组 γ-IFN 阳性细胞反应物质的平均 IA 自第4周始下降并低于对照组,12周达低谷,26周有所回升。两组变化趋势相同,但益气

表3 不同时相肺组织 ET-1 表达的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	ET-1/IA				
		4周	6周	8周	12周	26周
对照	-	-	-	89.01 ± 6.50	-	-
模型	-	113.46 ± 8.13 ¹⁾	133.63 ± 10.81 ¹⁾	170.35 ± 11.55 ¹⁾	154.31 ± 14.12 ¹⁾	144.71 ± 12.38 ¹⁾
益气活血方	10	99.94 ± 8.53 ²⁾	120.32 ± 12.10 ²⁾	160.43 ± 11.53 ²⁾	142.15 ± 10.66 ²⁾	133.67 ± 11.25 ²⁾

表 4 不同时相肺组织 IFN- γ 表达的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	IFN- γ /IA				
		4 周	6 周	8 周	12 周	26 周
对照	—	—	—	118. 01 $\pm$ 6. 33	—	—
模型	—	93. 46 $\pm$ 8. 13 ¹⁾	87. 67 $\pm$ 10. 22 ¹⁾	75. 35 $\pm$ 12. 53 ¹⁾	55. 31 $\pm$ 11. 12 ¹⁾	78. 71 $\pm$ 14. 38 ¹⁾
益气活血方	10	110. 94 $\pm$ 8. 62 ²⁾	99. 36 $\pm$ 11. 19 ²⁾	87. 49 $\pm$ 11. 24 ²⁾	67. 16 $\pm$ 10. 66 ²⁾	93. 67 $\pm$ 9. 25 ²⁾

活血方组各时间点平均 IA 均高于模型组,差异具有统计学意义($P < 0. 05$),见表 4。

4 讨论

多数学者认为,当受照射肺组织所接受放射线的剂量超过某一生物阈值时,靶细胞分泌 ET-1, γ -IFN 等各种细胞因子诱导的早期炎症反应和后期纤维化是放射性肺损伤发生的主要机制^[1]。研究发现 ET-1 水平能反映放射性肺损伤的严重程度^[6],而阻断 ET-1 或磷脂酰肌醇(-3)激酶的级联反应可以明显降低大鼠肺纤维化的生成^[7]。 γ -IFN 既可作为炎症介质,促进早期放射性肺炎反应的发生,又可作为晚期介质,调节肺成纤维细胞增殖、分化和细胞外基质沉积,诱导细胞表型的转化。有研究表明 γ -IFN 能够降低 TGF- β_1 , FN 等前纤维化因子,调节失衡的 T 细胞亚群,从而减轻博莱霉素所引起的肺纤维化^[8]。李启生等发现 γ -IFN 在放射性肺损伤发生过程中能够抑制 I 型及 III 型胶原的合成,有效缩短放射性肺损伤的发生时间,减轻放射性肺损伤^[9]。

中医学认为,放射线是热毒之邪。肺组织受到射线辐照后,热毒袭肺,肺热内壅,损伤肺脏血络耗气灼血,脉络瘀阻。因此,放射性肺损伤之病机以气虚血瘀为主,治疗以益气活血为主,佐以养阴。本方剂是以辨证与辨病相结合,经过 10 余年临床经验总结出的防治放射性肺损伤的方药。本方中黄芪、党参、当归、川芎益气补血活血,白术、茯苓益气健脾,丹参、鸡血藤活血养血补血,地龙通络平喘,苦参清热燥湿,香附理气,麦冬、枇杷叶养阴清肺,紫金牛镇咳祛痰。本实验显示自第 4 周始,模型组血清及肺组织 ET-1 的表达显著增高并高于对照组,于第 8 周达到高峰,益气活血方组与模型组变化趋势相同,但益气活血方组在各时间点 ET-1 的表达水平均低于模型组,差异具有统计学意义($P < 0. 05$)。相反,模型组 γ -IFN 的表达自第 4 周始显著降低并低于正常组,至 12 周达低。益气活血方组与模型组变化趋势相同,但各时间点 γ -IFN 的表达水平均显著高于模型组。其中 ET-1 值在第 8 周末其值达到高峰,

γ -IFN 值在第 12 周时至低谷,可能是因为 8 周末机体处于急性肺损伤阶段,12 周之后大鼠机体肺纤维化开始形成所致。综上所述,放射性肺损伤发生时 ET-1 表达及分泌升高, γ -IFN 的表达及分泌降低,益气活血方能降低放射性肺损伤大鼠 ET-1 的表达及分泌,促进 γ -IFN 的表达及分泌,具有减轻早期放射性肺炎和后期放射性肺纤维化的作用,对放射性肺损伤具有较好的防治作用。但其作用的分子生物学机制尚不明确,有待我们进一步研究。

[参考文献]

[1] 王炳胜,刘秀芳,张海,等. 中西医结合防治肿瘤放射损伤[M]. 北京:人民卫生出版社,2009:65.
[2] 王炳胜,吕国士,张海,等. 益气活血养阴方对放射性肺损伤的影像疗效观察[J]. 中国肺癌杂志,2007,10(3):240.
[3] 刘秀芳,李凤玉,王炳胜,等. 益气活血中药对肺癌放疗患者肺功能的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2008,15(8):16.
[4] 雒书朋,王炳胜,王丽玲,等. 益气活血养阴方对放射性肺损伤剂量体积直方图的分析[J]. 中国中医急症,2008,17(6):738.
[5] 闻平,张建琴,温旺荣,等. 细菌内毒素对成纤维细胞合成 IL-6、IL-8 的诱导作用[J]. 上海免疫学杂志,2000,20(2):123.
[6] 戚好文,叶江枫,宋立强,等. 血清内皮素-1 作为早期放射性肺损伤标志物的探讨[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2005,21(3):356.
[7] Shi-Wen X, Chen Y, Denton C P, et al. Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile phenotype of fibrotic fibroblasts[J]. Am J Mol Biol Cell,2004,15(6):2707.
[8] 高晓方,崔社怀. 干扰素 γ 对实验性肺纤维化大鼠血清 IL-4、SP-A 含量的影响[J]. 重庆医学,2004,33(11):1657.
[9] 李启生,刘来显,官键,等. 干扰素- γ 在放射性肺损伤发生过程中的作用研究[J]. 实用医学杂志,2008,24(21):3654.

[责任编辑 聂淑琴]