

肌肽对 C57 小鼠放射性肺损伤保护作用的机理研究

林白桦, 贾勇士, 詹文明, 毕爱红, 李国栋
(浙江省人民医院, 浙江 杭州 310014)

摘要: [目的] 观察肌肽(carnosine)对 C57BL 小鼠放射性肺损伤(RILI)的防护效果, 并探讨其机制。[方法] 将 120 只 C57BL 雌性小鼠随机分为对照组、给药组、辐照组和辐照+给药组, 治疗后检测血清转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、丙二醛(MDA), 以及部分肺组织羟脯氨酸(HYP)水平。[结果] 除辐照后第 7d 血清中 MDA 水平各处理组间无明显差异 ($P > 0.05$), 其余不同组间各时间段 TGF- $\beta 1$ 、MDA 以及肺组织 HYP 水平差别均具有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 < 0.01)。给药组较对照组未出现明显副作用。[结论] 肌肽能降低血清、肺组织中 TGF- $\beta 1$ 、MDA、HYP 含量, 并具有减轻放射性肺损伤的作用, 且几乎无副作用, 在防治放射性肺损伤中显示出良好前景。

关键词: 肌肽; 肺损伤; 保护作用; 转化生长因子- $\beta 1$

中图分类号: R818.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)12-0954-05
doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2013.12.B010

The Protected Effect of Carnosine on Radiation-induced Lung Injury in C57 Mice

LIN Bai-hua, JIA Yong-shi, ZHAN Wen-ming, et al.

(Zhejiang Province People's Hospital, Hangzhou 310014, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the intervention of carnosine on radiation-induced lung injury in C57 mice. [Methods] A total of 120 mice C57/BL (female) were divided into 4 groups: control group, carnosine group, irradiation group and irradiation plus carnosine group. After treatment, serum transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), malondialdehyde (MDA) were detected by ELISA assay and thiobarbituric acid colorimetric method respectively, while hydroxyproline (HYP) in parts of lung tissues was detected by spectrophotography. [Results] After irradiation for 7d, MDA levels of serum had no significant difference in the 4 groups ($P > 0.05$). However, TGF- $\beta 1$ levels of serum, MDA levels of serum and HYP levels of lung tissue had significant difference at different time periods ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). [Conclusions] Carnosine is able to reduce the level of TGF- $\beta 1$, MDA, HYP and improve radiation-induced lung injury in mice. Carnosine is less toxicity and shows a good prospect in the treatment for radiation-induced lung injury.

Subject words: carnosine; lung injury; prevention; TGF- $\beta 1$

放射治疗是胸部恶性肿瘤最重要的治疗手段之一。因为肺部的呼吸运动, 以及考虑到肿瘤的侵袭性因素, 正常肺组织受照无法避免。放射性肺损伤的高发, 严重影响患者的生活质量, 并成为影响肿瘤靶区足够给量和降低肿瘤局控率的主要因素之一。如何以安全、有效的方法降低放射性肺损伤的发生, 是临

床工作者亟待解决的问题。近年的研究中, 发现在肺部辐照中过氧化、氧自由基的大量生成是放射性肺损伤发生的最重要因素之一。

肌肽是一种从动物肌肉中提取的水溶性天然二肽, 具有抗氧化、提高免疫力等作用, 多被用于食品添加剂。在以往的研究中, 它显示的直接捕获活性氧成分和自由基的能力使其在放射性肺损伤的防治中具备可期待的前景。本研究旨在通过动物模型探讨肌肽防治放射性肺损伤的可行性以及相关机制。

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目(2010KYA017, 2013KYB027)
通讯作者: 贾勇士, 主任医师, 学士; 浙江省人民医院放疗科, 浙江省杭州市上塘路 158 号(310014); E-mail: jyssmnyy@163.com
收稿日期: 2013-09-29; **修回日期:** 2013-10-28

1 材料与方法

1.1 动物分组及药物

近交系雌性 C57/BL 小鼠(SPF 级)120 只购自上海斯莱克实验动物有限公司,许可证号:SCXK(沪)2007-0005,7~8 周龄,体重 18~22g,4~6 只一笼,普通饲料、饮水喂养。随机分 4 组:①对照组(A 组)30 只,与给药组同期予以生理盐水灌胃;②给药组(B 组)30 只,在照射组辐射前 30min 以及以后每天均灌胃给药(给药至每次级组提取血、肺组织标本当日,即辐照后 7、28 或 56d),给药剂量:75mg/(kg·d);③辐照组(C 组)30 只,全肺单次照射 13Gy,并与给药组同期予以生理盐水灌胃;④辐照+给药组(D 组)30 只,与 C 组同期照射,给药时间以及给药剂量同 B 组。所有小鼠均在杭州赫贝科技有限公司实验动物中心 P3 实验室屏障系统中饲养。

1.2 照射方法

使用自制固定装置将清醒状态下小鼠仰卧于固定板上,胸部覆以 23mm 厚固体水以调整剂量分布,使用 MLC 光栅使设野包括小鼠全肺。采用 SIEMENS Primus Hi 高能直线加速器,经前胸单次照射,使小鼠肺脏中平面受量达 13Gy。实验用 10MV X 射线,吸收剂量率为 550cGy/min,SSD 为 100cm,照射野面积 3cm×2cm。照射前予以小鼠 CT 扫描明确设野范围。

1.3 标本制备

于照射后 7、28、56d 每次级组取 10 只小鼠,以眼球采血法采取小鼠全血,后脱颈椎法处死,获取小鼠肺组织。

1.4 血清及肺组织标本检测

血清 TGF-β1(transforming growth factor-β1)检测采用 ELISA 法。ELISA 试剂盒购自上海雅吉生物科技有限公司;丙二醛(malondialdehyde,MDA)硫代巴比妥酸比色法检测,检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。肺组织羟脯氨酸(hydroxyproline,HYP)测定采用分光光度法,检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。严格按说明书进行操作。

1.5 病理组织学观察

左肺部分组织置于 10%中性甲醛溶液中固定 24h,常规脱水、浸蜡、包埋、切片(5μm),行 HE 染色。

1.6 统计学处理

文中数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间总的趋势比较采用重复测量数据的 2×2 方差分析;采用 SPSS15.0 统计软件包进行统计学分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 小鼠一般情况观察

实验中全部小鼠无意外死亡情况发生。在照射后 50d 左右所有的辐照组(C 组)、辐照+给药组(D 组)小鼠照射野内被毛变白,局部脱落(Figure 1)。其余组别小鼠被毛无明显变化。所有小鼠在观察过程中无明显的呼吸急促,摄食、饮水情况基本正常,各组小鼠体重无明显差别。

2.2 病理学结果

在此次研究中,辐照后 7d 各组小鼠肺组织均未出现明显炎症反应;辐照组(C 组)小鼠在照射后



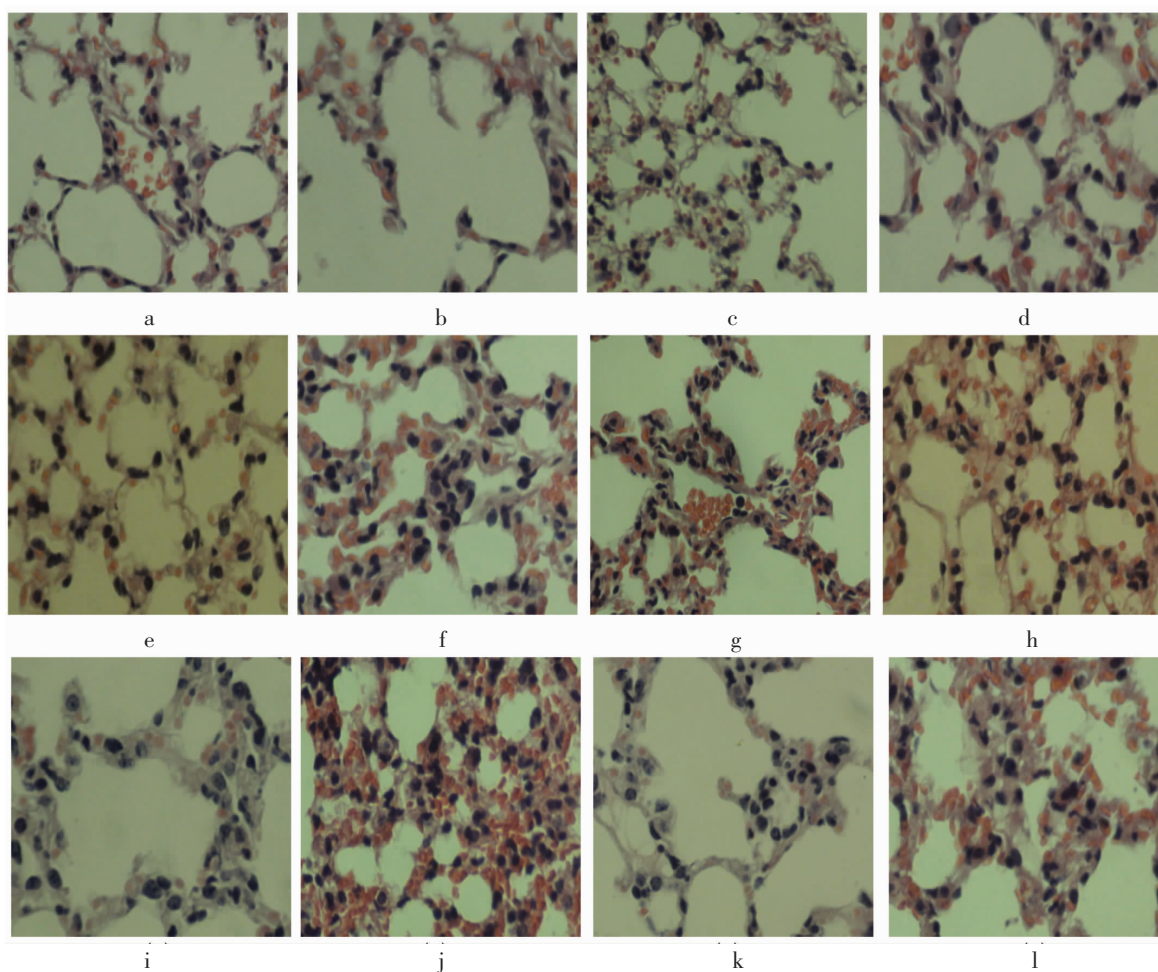
Figure 1 Mice irradiated after 50d

28d 出现局灶性肺泡壁水肿、增厚,巨噬细胞、中性粒细胞浸润,肺泡充血,并于照射后 56d 明显加重;而辐照+给药组(D 组)在照射后 28d 未出现较明显的炎症表现,照射后 56d 出现相对 A 组较明显的肺炎反应表现,但相比同期的 C 组肺部炎症程度明显较轻;对于 A 组和 B 组,则在整个观察过程中未表现出明显的肺部炎症表现(Figure 2)。

2.3 血清及肺组织各项检测结果

方差分析显示除辐照后第 7d 血清中 MDA 水

平各组处理间无明显差异($P>0.05$),其余各处理间均有显著差异($P<0.01$ 或 <0.05)(Table 1、2)。从数据上看,辐照+给药组较单纯辐照组各时间段 3 个检测指标均低,提示肌肽在肺部辐照中具有降低 TGF- β 1、MDA、HYP 的能力。MDA 作为脂质过氧化的最终分解产物之一,是放射性肺损伤是否发生的一种标志,本次研究中出现辐照后第 7d 血清中 MDA 水平处理间无明显差异,且该时段处理 1(给药)之间差异较明显($F=1.0, P<0.05$),考虑该组出现一定个



a: The lung tissue of control group 7d after irradiation; b: The lung tissue of simple irradiation group 7d after irradiation; c: The lung tissue of simple drug group 7d after irradiation; d: The lung tissue of irradiation + drug group 7d after irradiation; e: The lung tissue of control group 28d after irradiation; f: The lung tissue of simple irradiation group 28d after irradiation; g: The lung tissue of simple drug group 28d after irradiation; h: The lung tissue of irradiation + drug group 28d after irradiation; i: The lung tissue of control group 56d after irradiation; j: The lung tissue of simple irradiation group 56d after irradiation; k: The lung tissue of simple drug group 56d after irradiation; l: The lung tissue of irradiation + drug group 56d after irradiation. It showed that the lung tissue of simple irradiation group had some inflammation after irradiated for 28d and increased after 56d. While the lung of radiation + drug group shown inflammation after irradiated for 56d. It was significantly lighter than the inflammation of the simple irradiation group in the same time period. The rest of the secondary group had no obvious inflammation.

Figure 2 The pathological pictures of mouse lung tissue (HE staining $\times 400$)

Table 1 Serum TGF- β 1, MDA level of the mice after irradiated at different times

Groups	n	Serum level of TGF- β 1($\bar{x}\pm s$,mg/kg)			Serum level of MDA($\bar{x}\pm s$, nmol/ml)		
		7d	28d	56d	7d	28d	56d
Control group	10	145.66 $\pm$ 7.85	142.78 $\pm$ 7.32	156.60 $\pm$ 6.40	13.83 $\pm$ 1.07	13.65 $\pm$ 0.59	13.81 $\pm$ 0.87
Simple irradiation group	10	223.33 $\pm$ 8.63	249.88 $\pm$ 11.67	176.27 $\pm$ 9.80	15.16 $\pm$ 1.11	17.13 $\pm$ 2.20	18.51 $\pm$ 0.81
Simple carnosine group	10	140.03 $\pm$ 8.00	131.62 $\pm$ 6.86	158.33 $\pm$ 7.54	13.65 $\pm$ 1.37	13.27 $\pm$ 0.65	13.54 $\pm$ 0.48
Irradiation + carnosine group	10	213.09 $\pm$ 12.78	242.99 $\pm$ 14.52	176.45 $\pm$ 11.28	14.39 $\pm$ 1.14	15.82 $\pm$ 1.71	17.67 $\pm$ 0.81
F		133.15	363.77	13.87	2.04	7.74	21.31
P		< 0.01	< 0.01	< 0.01	>0.05	< 0.01	< 0.01

Table 2 HYP activity of lung tissue after irradiated at different times

Groups	n	The level of HYP($\bar{x}\pm s$, μ g/mg)		
		7d	28d	56d
Control group	10	0.32 $\pm$ 0.05	0.32 $\pm$ 0.04	0.33 $\pm$ 0.03
Simple irradiation group	10	0.48 $\pm$ 0.12	0.62 $\pm$ 0.05	0.79 $\pm$ 0.05
Simple carnosine group	10	0.31 $\pm$ 0.05	0.29 $\pm$ 0.03	0.32 $\pm$ 0.03
Irradiation + carnosine group	10	0.43 $\pm$ 0.13	0.56 $\pm$ 0.07	0.73 $\pm$ 0.06
F		5.03	64.02	79.28
P		<0.05	<0.01	<0.01

体因素产生的干扰。方差分析中显示,处理 1(给药)之间大多无统计学差异($P>0.05$),显示给药不会对机体产生不良反应,产生副作用较小。

3 讨 论

放射性肺损伤是胸部放疗最常见的副作用之一,包括早期的放射性肺炎和晚期的放射性肺纤维化。临床上表现为咳嗽、胸闷、发热,甚至出现致死性后果。目前的研究证实,多种细胞因子参与了放射性肺损伤的形成,TGF- β 1 在其中起至关重要的作用^[1,2]。TGF- β 1 在放射性肺损伤的早期是重要的炎症启动因子,在放射性肺损伤晚期则是重要的纤维化形成因子。TGF- β 1 具有强大的免疫功能,还在多条信号传导通路中起重要作用^[3,4]。当射线作用于正常肺组织,可致使肺组织产生大量活性氧自由基(reactive oxygen species,ROS),ROS 还可以直接作用于 TGF- β 1,促进其生成;并诱发肺组织产生脂质过氧化物,使肺组织生物膜功能丧失产生损伤性后果^[5-7]。MDA 是脂质过氧化的最终分解产物之一。辐照后血清中 MDA 活性测定以及 TGF- β 1 检测,可以反应放射性肺损伤程度。

肌肽是一种天然二肽,是一种提取技术简易,纯度高,价格低廉并被广泛应用的食品添加剂。近几年的研究发现肌肽具有强大的抗氧化能力,可以起到

保护超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)的作用^[8-10]。超氧化物歧化酶能够降低 TGF- β 1 在肺受到照射后的产量。根据上述机理,肌肽很有可能可以在放射性肺损伤中通过其强大的抗氧化作用,减少部分重要的致炎、致纤维化因子并降低过氧化物产量达到减轻放射性肺损伤的最终结果。在

本次研究中,根据病理学检测情况(照射+给药组小鼠肺组织病理检测相对于单纯辐照组小鼠显示出炎症反应明显减轻的变化)以及在不同时段进行血清 TGF- β 1、MDA 检测并对比、分析的结果显示,肌肽在小鼠体内显示出强大地降低 TGF- β 1、MDA 的作用,并减轻放射性肺炎。

C57 小鼠是一类易发生纤维化小鼠,在本次研究中,我们的最长观察时间为 56d,尚不可能出现明显的肺纤维化情况。但在放射性肺损伤的分子生物学过程中,肺炎至肺纤维化是一个连续的过程。HYP 是机体胶原蛋白主要成分之一,它的含量测定可以间接反映胶原含量,测定 HYP 含量常被用于肺纤维化研究。为研究肌肽对放射性肺纤维化的作用,我们测定了肺组织中 HYP 水平的变化,得出的研究结果显示肌肽同样可以显著地降低 HYP 水平。若可延长研究时间,很可能发现肌肽具有减轻放射性肺纤维化的作用。

本次研究证明肌肽通过降低 TGF- β 1、MDA、HYP 减轻了小鼠放射性肺损伤;且单纯给药组与对照组比较,无论是各项检测指标,还是小鼠体重、摄食等均无明显差别,显示出肌肽副作用小的优点。脑苷肌肽已经被用于脑动脉硬化等治疗,显示了较好的疗效,具有临床应用的可行性。由于 TGF- β 1 在信号传导通路中的作用,以及具有的免疫功能,并可以通过上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition,

EMT)促进肿瘤的转移侵袭,肌肽对于 TGF- β 1 的作用尤其值得深入研究,肌肽很可能不仅具有减轻放射性肺损伤的作用,同时具有抗肿瘤的功效,具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Paul C, Seok JK, Sandhya T, et al. Oxidative stress and pulmonary fibrosis [J]. Biophys Acta, 2013, 18 (32): 1028-1040.
- [2] Mao Y, Liu WQ. The progress in the research on the prevention and protection of radiation-induced lung injury[J]. Tumor, 2012, 32(5): 389-394. [毛艳, 刘文其. 放射性肺损伤防护的研究进展[J]. 肿瘤, 2012, 32(5): 389-394.]
- [3] Zhan Y, Silvia F, Ding CG, et al. TGF- β IL-6 axis mediates selective and adaptive mechanisms of resistance to molecular targeted therapy in lung cancer[J]. PNAS, 2010, 107 (35): 15535-15540.
- [4] Sandbo N, Lau A, Kach J, et al. Delayed stress fiber formation mediates pulmonary myofibroblast differentiation in response to TGF- β [J]. Am J Phys, 2011, 301 (5): L656-L666.
- [5] Kliment CR, Oury TD. Oxidative stress, extracellular matrix targets, and idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Free Radical Biol & Med, 2010, 49(5): 707-717.
- [6] Bakkal BH, Gultekin FA, Guven B, et al. Effect of ozone oxidative preconditioning in preventing early radiation-induced lung injury in rats[J]. Braz J Med Biol Res, 2013, 46(9): 789-796.
- [7] Pan JR, Su YH, Xiao J, et al. Protective effect of recombinant protein SOD-TAT on radiation-induced lung injury in mice[J]. Life Sci, 2012, 91(3-4): 89-93.
- [8] Arnal N, de Alaniz MJ, Marra CA. Carnosine and neocuproine as neutralizing agents for copper overload-induced damages in cultured human cells[J]. Chem Biol Inter, 2011, 192(3): 257-263.
- [9] Iovine B, Iannella ML, Nocella F, et al. Carnosine inhibits KRAS-mediated HCT116 proliferation by affecting ATP and ROS production[J]. Cancer Lett, 2012, 315(2): 122-128.
- [10] Mong M, Chao C, Yin M, et al. Histidine and carnosine alleviated hepatic steatosis in mice consumed high saturated fat diet[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 653(1-3): 82-88.

《肿瘤学杂志》投稿须知

1. 文稿务必材料可靠,数据准确,论点清楚,论据充足,结论明确。
2. 文字通顺、准确和简练,重点突出,层次清楚。论著需附结构式摘要,包括目的、方法、结果、结论四部分。中文摘要 200~300 字;英文摘要务必与中文摘要一一对应翻译。英文摘要前加英文文题、作者姓名汉语拼音、单位英文全称、所在城市名及邮政编码。
3. 图表请附中英文各一份,包括图表的题目、内容及注释。
4. 所列参考文献限作者亲自阅读的已发表的近 3 年文献为主,按文内引用先后顺序列于文末,并在正文内引文处右上角以[]号注明序号。具体格式举例如下:
期刊:[序号]作者(3 位以下全部写出,不同作者姓名中间加逗号,英文文献作者为姓全称,加名缩写;3 位以上时只写前 3 位,于后加“,等.”或“,et al.”)文题[J].刊名(英文为缩写),年,卷(期):起页-止页。
书籍:[序号]作者.书名[M].版本.出版地(即城市名):出版者,出版年.起页-止页。
学位论文:[序号]作者.学位论文名[D].城市:培养单位,年。
电子文献:[序号]作者.题名[电子文献类型].可获得的网址,发表或更新的日期。
其中,电子文献类型,是网上期刊时,用[J/OL];是网上电子公告时,用[EB/OL];是网上联机数据库时,用[DB/OL]。
特别注意的是,从 2013 年起,所有中文文献,需同时附对应的英文翻译。
5. 有通讯作者的文稿,请在文章首页左下角注明通讯作者职务、职称、学位、工作单位(详细到科室)、详细通讯地址(邮编)和 E-mail。
6. 本刊启用稿件远程处理系统,只接受网上投稿,网址 <http://www.chinaoncology.cn>。不再接收电子邮件投稿和纸质稿。
网上投稿成功 1 周内,请将稿件处理费 20 元通过邮局汇款至编辑部(务必注明第一作者姓名、稿号和详细地址);并将单位介绍信邮寄至编辑部。若文稿内容受国家或省、校级项目资助,请附上基金项目批文的复印件,并在正文首页脚注中说明。
7. 编辑部对来稿有文字修改权,凡涉及内容的修改,则提请作者考虑,文责自负。文稿一般不退,请作者自留底稿。来稿一经录用,收取一定版面费,发表后寄赠当期杂志 2 册并酌付稿酬。