

吉非替尼在小鼠肺照射后不同时段给药对肺损伤影响

林白桦, 贾勇士, 毕爱红, 詹文明, 刘化新, 李国栋

(浙江省人民医院, 浙江 杭州 310014)

摘要: [目的] 观察不同时段给予吉非替尼对 C57BL 小鼠放射性肺损伤的影响。[方法] 将 128 只 C57BL 雌性小鼠随机分组分为 8 组: (1) 照射+早期予生理盐水组 (A 组) 16 只, 全肺单次照射 13Gy, 在照射后立即第一次给生理盐水, 以后每天均灌胃给药至第 15d; (2) 照射+晚期予生理盐水组 (B 组) 16 只, 全肺单次照射 13Gy, 在照射后第 15d 第一次给生理盐水, 以后每天均灌胃给药至第 30d; (3) 早期给予生理盐水组 (C 组) 16 只, 在照射组照射后立即第一次给生理盐水, 以后每天均灌胃给药至第 15d; (4) 晚期给予生理盐水组 (D 组) 16 只, 在照射组照射后第 15d 第一次给生理盐水, 以后每天均灌胃给药至第 30d; (5) 早期给药组 (E 组) 16 只, 在照射组照射后立即第一次给药, 以后每天均灌胃给药至第 15d, 给药剂量 200mg/kg·d; (6) 晚期给药组 (F 组) 16 只, 在照射组照射后第 15d 第一次给药, 以后每天均灌胃给药至第 30d, 给药剂量 200mg/kg·d; (7) 照射+早期给药组 (G 组) 16 只, 全肺单次照射 13Gy 后立即第一次给药, 以后每天均灌胃给药至第 15d, 给药剂量 200mg/kg·d; (8) 照射+晚期给药组 (H 组) 16 只, 全肺单次照射 13Gy 后第 15d 第一次给药, 以后每天均灌胃给药至第 30d, 给药剂量 200mg/kg·d。在照射后 30d、60d 处死小鼠后取部分肺组织 HE 染色, 检测血清转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 水平、以及部分肺组织羟脯氨酸 (hydroxyproline, HYP) 水平。[结果] 病理学检查显示, 照射+晚期给药组 (H 组) 在照射后 60d 时较其他照射组肺部损伤反应较轻。统计分析提示, 各组之间 TGF- $\beta 1$ 和 HYP 水平比较有统计学差异 ($P < 0.01$)。照射、给药、时间因素对小鼠血清中 TGF- $\beta 1$ 和 HYP 水平有统计学差异 ($P < 0.05$)。[结论] 200mg/kg·d 给药剂量情况下吉非替尼未显示明显的与照射累加的肺损伤, 照射后晚期给予吉非替尼具有减轻放射性肺损伤作用。

关键词: 吉非替尼; 肺损伤; 羟脯氨酸; 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(2017)01-0013-07

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.01.B003

Effect of Gefitinib on Radiation-Induced Lung Injury in C57 Mice after Different Time Administration

LIN Bai-hua, JIA Yong-shi, BI Ai-hong, et al.

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

Abstract: [Objective] To explore the effect of gefitinib on radiation-induced lung injury by administered it to C57 mice which had whole lung irradiation at different time periods postirradiation. [Methods] One hundred twenty-eight mice C57/BL (female) were divided into 8 groups by random digits table method. There were 16 mice in every groups. Irradiation + normal saline group at early phase (A), irradiation + normal saline group at late phase (B), irradiation + gefitinib group at early phase (G) and irradiation + gefitinib group at late phase (H) were irradiated first. Irradiation method: 10MV-X ray, via the anterior chest, whole lung irradiation with 13Gy by single dose. Drug delivering method: Group A and G were given saline or gefitinib (200mg/kg·d) by gavage after irradiation on day 0 to day 15. Group B and H were given saline or gefitinib (200mg/kg·d) after irradiation on day 15 to day 30, once a day. Normal saline group at early phase (group C), normal saline group at late phase (group D), gefitinib group at early phase (group E) and gefitinib at late phase (group F) were given saline or gefitinib (200mg/kg·d) by gavage after other groups were irradiated at corresponding time periods. [Results] The inflammation in group H was lighter than that in the other groups which had been irradiated at 60 days. Gefitinib, irradiation and time factor had significant effect about TGF- $\beta 1$ levels of serum ($P < 0.05$). Time and irradiation factor had significant effect about HYP levels of lung tissue ($P < 0.01$). [Conclusions] It doesn't shown additive lung injury when given gefitinib (200mg/kg·d) after irradiation. Gefitinib could lighten radiation-induced lung injury when it is given at right time after irradiated.

Subject words: gefitinib; lung injury; hydroxyproline; transforming growth factor- $\beta 1$

基金项目: 浙江省医药卫生一般研究计划 (2013KYB027)

通讯作者: 林白桦, 副主任医师, 浙江省人民医院放疗科, 浙江省杭州市上塘路 158 号 (310014);

E-mail: linbaihua1@163.com.

收稿日期: 2016-09-18; **修回日期:** 2016-12-15

吉非替尼是一种选择性表皮生长因子受体(EGFR)酪氨酸激酶抑制剂,是治疗局部晚期或转移性非小细胞肺癌的重要的靶向药物。吉非替尼副作用较小,主要体现为皮疹、腹泻等,而且多数服用者可耐受。但近年也不断有散发病例提示其与肺纤维化的发生相关^[1,2]。并且有回顾性研究显示既往胸部放疗史是其导致的间质性肺炎的高危因素^[3]。对放疗与吉非替尼的合并应用是否可行、是否会引起严重的肺纤维化、或合并应用的时机进行研究,将对临床工作起到有益的指导。在本次研究中,拟在制定放射性肺损伤小鼠模型的基础上于不同时段介入吉非替尼对肺损伤的机制进行一定探讨。

1 材料与方法

1.1 动物分组及处理方法

近交系雌性 C57/BL 小鼠(SPF 级) 128 只(购自上海斯莱克实验动物有限公司,许可证号:SCXK(沪)2007-0005),6~8 周龄,体重 18~22g,4~6 只一笼,普通饲料、饮水喂养。随机分 8 组:(1)照射组+早期予生理盐水组(A 组)16 只,全肺单次照射 13Gy,在照射后立即第一次给生理盐水,以后每天均灌胃给药至第 15d;(2)照射组+晚期予生理盐水组(B 组)16 只,全肺单次照射 13Gy,在照射后第 15d 第一次给生理盐水,以后每天均灌胃给药至第 30d;(3)早期给予生理盐水组(C 组)16 只,在照射组照射后立即第一次给生理盐水,以后每天均灌胃给药至第 15d;(4)晚期给予生理盐水组(D 组)16 只,在照射组照射后第 15d 第一次给生理盐水,以后每天均灌胃给药至第 30d;(5)早期给药组(E 组)16 只,在照射组照射后立即第一次给药,以后每天均灌胃给药至第 15d,给药剂量 200mg/kg·d;(6)晚期给药组(F 组)16 只,在照射组照射后第 15d 第一次给药,以后每天均灌胃给药至第 30d,给药剂量 200mg/kg·d;(7)照射+早期给药组(G 组)16 只,全肺单次照射 13Gy 后立即第一次给药,以后每天均灌胃给药至第 15d,给药剂量:200mg/kg·d;(8)照射+晚期给药组(H 组)16 只,全肺单次照射 13Gy 后第 15d 第一次给药,以后每天均灌胃给药至第 30d,给药剂量 200mg/kg·d。所有小鼠均在 P3 实验室屏障系统中饲养。

1.2 照射方法

将清醒状态下小鼠仰卧于自制木质固定装置

上,胸部正上方覆盖 23 mm 厚固体水以调整剂量分布,使用直线加速器 MLC 光栅使设野包括小鼠全肺。采用 SIEMENS Primus Hi 高能直线加速器,单次照射全肺,使小鼠肺中平面受量达 13Gy。实验用 10MV-X 射线,吸收剂量率=550cGy/min,SSD=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 给药方法

将吉非替尼以淀粉溶液调配成 0.05g/ml 匀浆后予每日灌胃给药,每日吉非替尼剂量 200mg/kg·d。

1.4 标本制备

于照射后 30d、60d 每次级组取 8 只分别取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。

1.5 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;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。

1.6 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。

1.7 统计学处理

采用 SPSS15.0 统计软件包进行统计学分析,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方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠一般情况

实验中全部小鼠均无意外死亡。在照射后约 50d 所有参与照射组(A 组、B 组、G 组、H 组)小鼠照射野内被毛变白;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

早期给予生理盐水组(C)、晚期给予生理盐水组(D)、早期给药组(E 组)、晚期给药组(F 组)肺组织均未出现明显炎症反应;而所有与照射相关的组

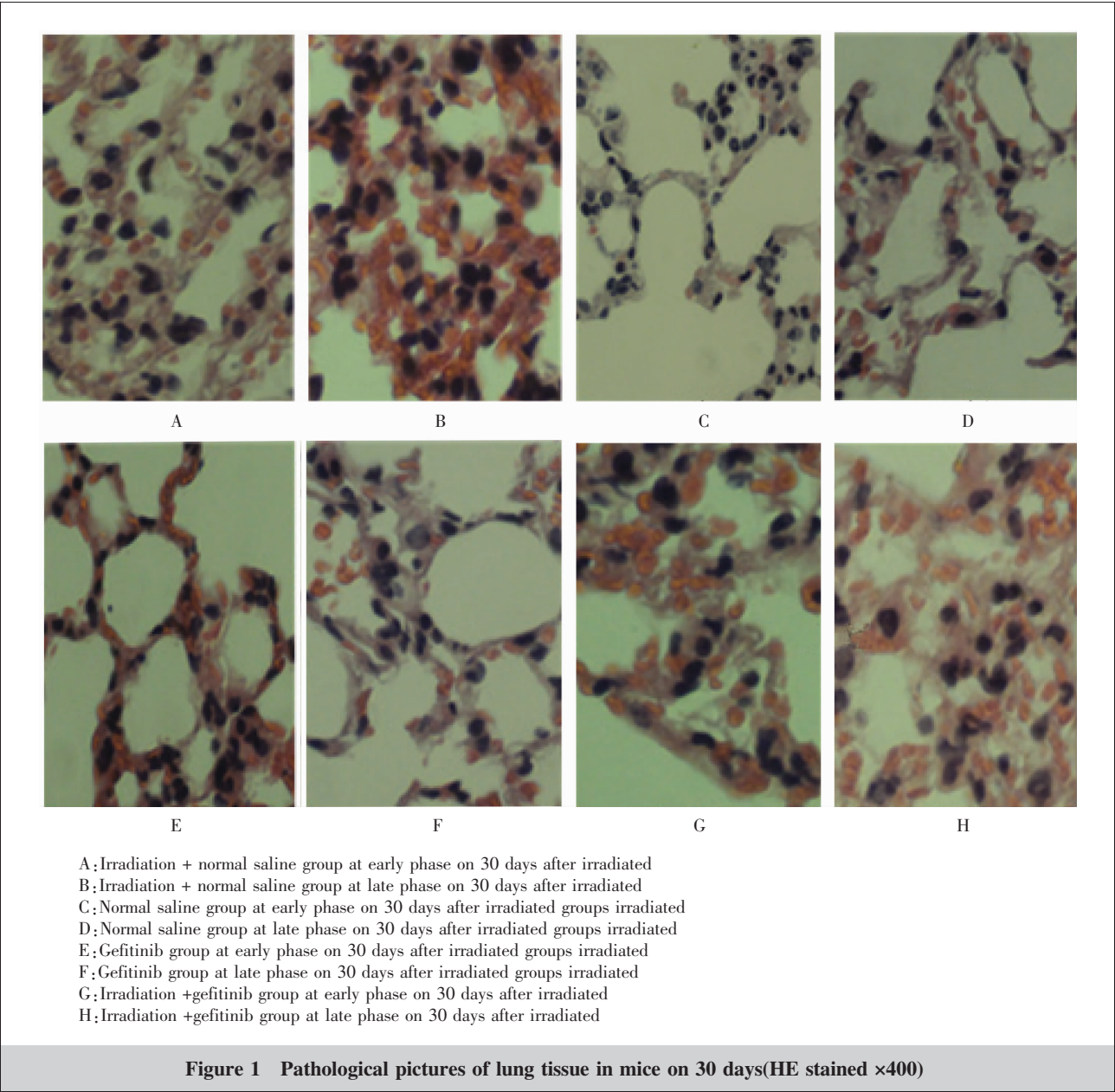
别(A组、B组、G组、H组)小鼠在照射后 30d 出现局灶性肺泡壁水肿增厚,巨噬细胞、中性粒细胞浸润,部分肺泡充血(Figure 1);A组与B组、G组在照射后 60d 较前出现加重的炎症反应,3组之间炎症反应无明显差别,H组在照射后 60d 虽然也表现出存在肺部炎症,但较其照射后 30d 表现出的炎症并未明显加重(Figure 2)。

2.3 血清中 TGF-β1 及肺组织 HYP 水平

血清 TGF-β1 水平见 Table 1, 方差分析显示各组之间数值比较有统计学差异($P<0.01$)。在进行各因素(给药、时间、照射)相互作用分析提示:照射、给

Table 1 TGF-β1 levels in different time after irradiation(ng/L)

Group	30d	60d
Group A	249.90±11.03	261.11±6.45
Group B	252.03±10.82	263.75±8.12
Group C	142.83±8.11	144.82±6.96
Group D	139.49±6.35	139.47±3.89
Group E	144.78±7.20	147.04±6.04
Group F	141.54±8.99	143.72±8.96
Group G	260.10±9.11	272.15±6.09
Group H	255.27±6.93	261.47±7.92
F	379.15	691.82
P	< 0.01	< 0.01



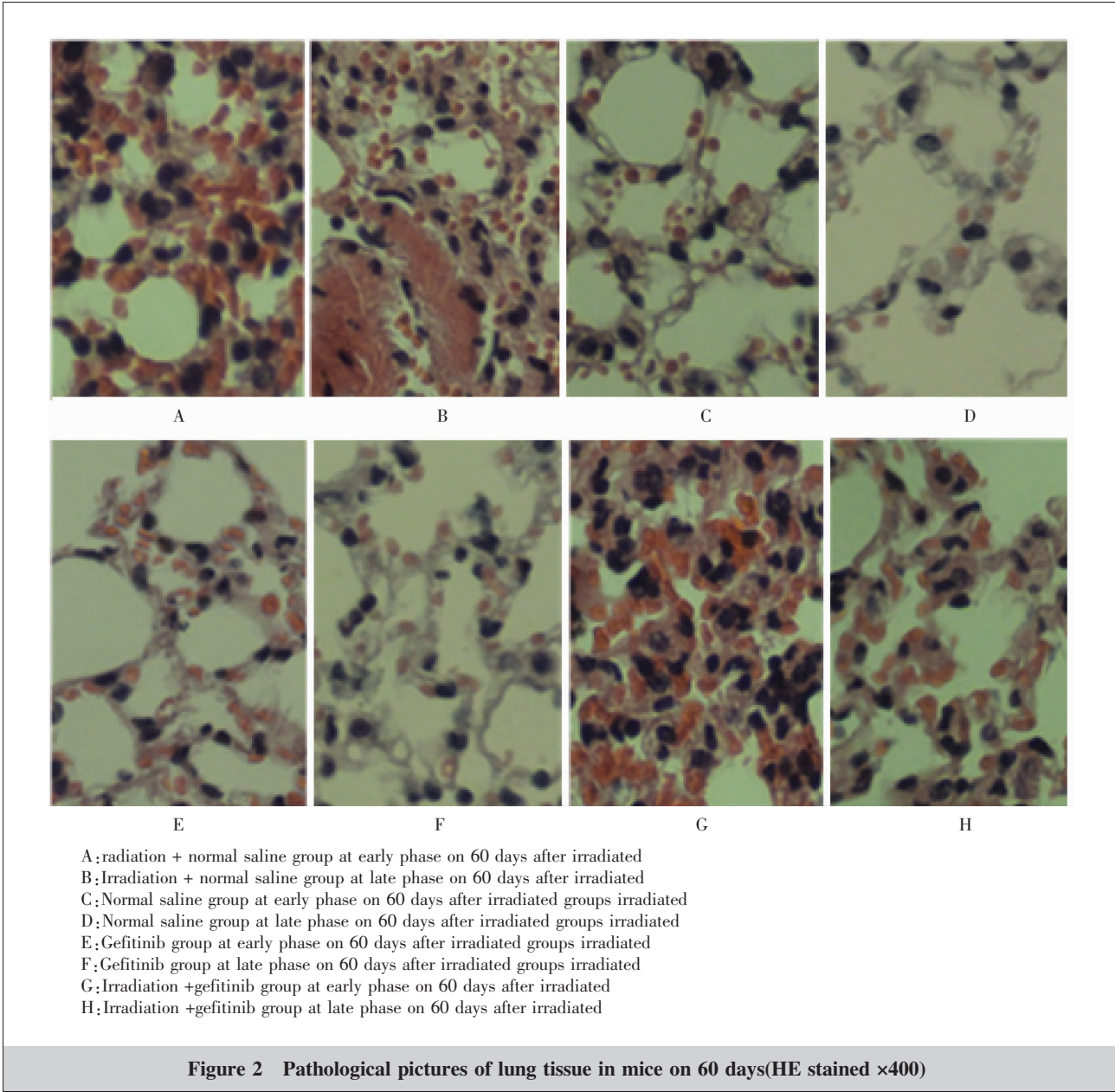


Table 2 HYP levels of lung tissue in different time after irradiation(μg/mg)

Group	30d	60d
Group A	0.62±0.06	0.80±0.05
Group B	0.59±0.09	0.79±0.08
Group C	0.31±0.04	0.33±0.03
Group D	0.29±0.04	0.34±0.04
Group E	0.39±0.07	0.35±0.07
Group F	0.37±0.08	0.35±0.04
Group G	0.83±0.09	0.88±0.08
Group H	0.58±0.04	0.68±0.04
F	60.27	148.84
P	<0.01	<0.01

药、时间三个因素累加情况下(即给药×时间×照射情况)对小鼠血清中 TGF-β1 水平有统计学差异 ($F=230.84, P<0.05$),而除此情况下仅照射对小鼠血清中 TGF-β1 水平有统计学差异 ($P<0.01$)。

在实验观察的时间内,即总观察时间 60d 内,就血清中 TGF-β1 水平而言,E 组和 F 组(即单纯给予吉非替尼早期组与晚期组)在照射后 30d 较 C 组和 D 组(即单纯给予生理盐水的早期组与晚期组)有轻度升高,G 组(照射+早期给药组)数值水平无论是在照射后 30d 还是照射后 60d 均高于同时期的其他照射组(A 组、B 组、H 组);H 组(照射+晚期给药组)较

其他未受照射组 TGF- β 1 水平升高, 但较相对应的 B 组(即照射+晚期予生理盐水组)并没有明显升高。在不同的时段给予吉非替尼导致了血清中 TGF- β 1 水平在照射后 30~60d 内持续升高, 其中 G 组升高幅度较大(Figure 3)。

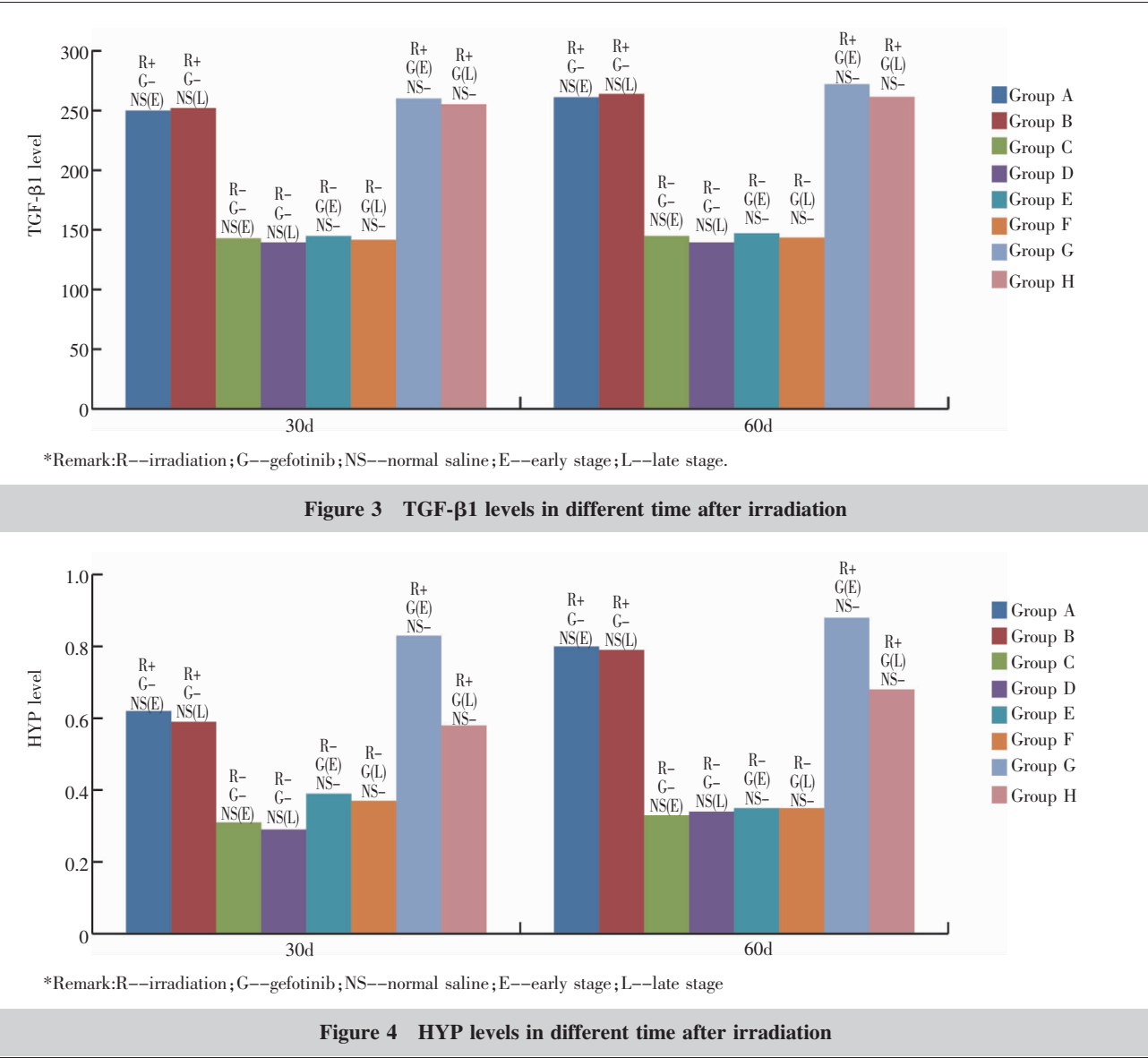
肺组织 HYP 水平见 Table 2。照射、给药、时间三个因素累加情况下对小鼠肺组织 HYP 水平有显著性影响($P<0.01$), 其中照射本身对 HYP 的影响有统计学差异($P<0.01$); 给药对 HYP 的影响因给药时间不同而产生显著性差异($P<0.01$); 照射对 HYP 的影响也因时间因素而产生显著性差异($P<0.01$)。结果显示对于肺纤维化的形成, 存在放射治疗的治疗方案中确实以射线的给予为主导, 但随着观察时间

的延长, 给予吉非替尼的时期早晚, 将对最终结果产生有效的影响。

肺组织中 E 组和 F 组 HYP 水平在照射后 30d 较 C 组和 D 组升高。E 组、F 组在照射后 30~60d 内其水平无升高趋势。值得注意的是, G 组 HYP 水平和其 TGF- β 1 水平一样也高于其他照射组 (A 组、B 组、H 组)。还可以看出, H 组小鼠肺组织 HYP 水平虽然也在照射后 60d 较照射后 30d 升高, 但较同时期的 A 组、B 组、G 组的相应检测指标相比是较低的(Figure 4)。

3 讨论

吉非替尼是一种小分子 TKI 类药物, 目前广泛



应用于局部晚期与转移性非小细胞肺癌的治疗。它通过抑制细胞内酪氨酸激酶的自磷酸化和相应靶分子的继发磷酸化以阻断表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的信号传导途径从而达到控制肿瘤的效果。吉非替尼导致间质性肺炎并不多见,但一旦发生,致死率可达到 30%左右^[4]。有研究认为服用吉非替尼产生间质性肺炎和既往胸部放疗史相关^[5]。如果胸部放疗后应用吉非替尼确实会对间质性肺炎的产生起到累加效用,那么对于晚期非小细胞肺癌的综合治疗的方案选择将起到重要的指导作用。

在既往的研究中,显示 EGFR-TKI 抗肿瘤同时具有抑制气管上皮细胞 EGFR 表达功能,影响其受损后的修复,导致免疫反应失控,产生间质性肺炎^[6]。Harada 等^[7]的研究提示吉非替尼会导致 C57 小鼠肺炎导致的肺部急性炎症加剧。但 Wang 等^[8]的研究提示在照射后一段时间给予小鼠吉非替尼存在减轻放射性肺损伤的作用,但这个研究并未设立相应的关于时间因素的对照组;Keiko 等^[9]的研究显示照射后给予大鼠吉非替尼存在双向性调节,即反应出加重的早期放射性肺损伤(放射性肺炎)与减轻的晚期放射性肺损伤(放射性肺纤维化),也未考虑给药时间对实验结果的影响。我们考虑肺损伤的发生是一个复杂的过程,并与多种因子、酶的水平变动相关^[10],而且在具体的临床工作中,不同治疗方法结合有可能产生的交互作用。

在本次研究中,我们试图通过在建立放射性肺损伤动物模型的基础上介入吉非替尼,并参考时间因素的影响,探讨胸部放疗与吉非替尼如何合理地应用于临床治疗。

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 可以诱导人或实验动物成纤维细胞和肺泡上皮细胞向肌成纤维细胞转化^[11-14],其作用于整个放射性肺损伤的过程,被认为具有预测放射性肺损伤发生的作用^[15]。对 TGF- β 1 的影响可能会影响放射性肺损伤发生的程度^[16]。HYP 是机体胶原蛋白的主要成分之一,其含量测定可以间接反映胶原含量,HYP 含量测定常被用于肺纤维化研究。我们发现单纯给予吉非替尼并未引起明显的放射性肺损伤,这也表明了吉非替尼虽然可能导致严

重的肺损伤,但发生率并不大。而当其与照射累加,并参考累加时间因素在内,发现在照射后 30d,与照射相关的组别均显示出了肺部炎症的表现,其肺部病理炎症表现程度与给药与否、给药时间早晚均未显示出明显的关系。即在本实验条件下,吉非替尼是否给药、给药早晚都没有从本质上影响放射性肺损伤的发生与程度。当在照射后 60d,照射后晚期给予吉非替尼则显示出了对放射性肺损伤从肺部病理角度上的减轻,其血清指标、肺组织指标也较其他相同时段的照射组指标低。这个结论与既往的研究是一致的,显示了吉非替尼可能具有减轻晚期放射性肺损伤即放射性肺纤维化的作用。而在对血清 TGF- β 1 因子与肺组织 HYP 水平的观察中,照射、给药、时间三个因素均对小鼠血清中 TGF- β 1 水平有显著性影响,照射、时间因素对小鼠肺组织 HYP 水平具有显著性影响。鉴于 TGF- β 1 和 HYP 在放射性肺损伤中的重要地位,这样的分析结果提示我们给药与否、给药时间的早晚确实会对放射性肺损伤的发生发展到不可忽视的影响。吉非替尼的介入升高了相对应组别的 TGF- β 1 因子,其中 G 组(照射+早期给药组)水平明显高于其他照射组;G 组的肺组织中 HYP 水平也体现出了与血清 TGF- β 1 因子水平一样的趋势。H 组(照射+晚期给药组)虽然在照射后 30~60d 内 TGF- β 1 和 HYP 指标也有所升高,但其数值水平较 G 组低。从 TGF- β 1 因子、HYP 变化趋势这个角度,提示我们在放疗后早期给予吉非替尼可能不安全的,有可能促进放射性肺损伤的发生发展。

在胸部照射后的早期,即放射性肺损伤的各种启动因素最为活跃的时期给予吉非替尼可能是不够谨慎的,而放疗后一段时间予以序贯的方式给予吉非替尼,不仅能更大程度地控制肿瘤,很可能也具有抑制放射性肺纤维化发生的效果。

参考文献:

- [1] Chen J, Ye GS. Analysis of 49 cases of interstitial lung disease induced by gefitinib based on literature review[J]. Chinese Journal of New Drugs and Clinical Remedies, 2016, 35(2): 145-148. [程军, 叶根深. 吉非替尼致间质性肺病 49 例文献分析 [J]. 中国新药与临床杂志, 2016, 35(2): 145-148.]
- [2] Liu XX, Yang M. Clinical characteristics and prognosis of patients with interstitial lung disease induced by gefitinib

- or erlotinib [J]. *Adverse Drug Reactions Journal*, 2015, 17(2):121-124.[刘晓琦, 杨敏. 吉非替尼/厄洛替尼致间质性肺疾病患者的临床特点及预后 [J]. *药物不良反应杂志*, 2015, 17(2):121-124.]
- [3] Okamoto I, Takahashi T, Okamoto H, et al. Single agent gefitinib with concurrent radiotherapy for locally advanced non-small cell lung cancer harboring mutations of the epidermal growth factor receptor [J]. *Lung Cancer*, 2010, 72(2):199-204.
- [4] Kataoka K, Taniguchi H, Hasegawa Y, et al. Interstitial lung disease associated with gefitinib[J]. *Resp Med*, 2006, 100(4):698-704.
- [5] Nakagawa M, Nishimura T, Teramukai S, et al. Interstitial lung disease in gefitinib-treated Japanese patients with non-small cell lung cancer-a retrospective analysis: JMTO LC03-02[J]. *BMC Res Notes*, 2009, 2:157.
- [6] Min JH, Lee HY, Lim H, et al. Drug-induced interstitial lung disease in tyrosine kinase inhibitor therapy for non-small cell lung cancer; a review on current insight[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2011, 68(5):1099-1109.
- [7] Harada C, Kawaguchi T, Ogata-Suetsugu S, et al. EGFR tyrosine kinase inhibition worsens acute lung injury in mice with repairing airway epithelium[J]. *Am J Res AND Criti Care Med*, 2011, 183:743-751.
- [8] Wang C, Abe S, Matsuda K, et al. Effects of gefitinib on radiation-induced lung injury in mice[J]. *J Nippon Med Sch*, 2008, 75(2):96-105.
- [9] Miyake K, Tani K, Kakiuchi S, et al. Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (gefitinib) augments pneumonitis, but attenuates lung fibrosis in response to radiation injury in rats[J]. *J Med Inves*, 2012, 59(1-2):174-185.
- [10] Wang T, Mathew B, Wu X, et al. Nonmuscle myosin light chain kinase activity modulates radiation-induced lung injury[J]. *OPulmo Cir*, 2016, 6(2):235-239.
- [11] Luo F, Zhuang Y, Sides MD, et al. Arsenic trioxide inhibits transforming growth factor- β 1-induced fibroblast to myofibroblast differentiation in vitro and bleomycin-induced lung fibrosis in vivo[J]. *Respir Res*, 2014, 15(1):51.
- [12] Boerma M, Wang J, Sridharan V, et al. Pharmacological induction of transforming growth factor- β 1 in rat models enhances radiation injury in the intestine and the heart [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7):e70479.
- [13] Li L, Huang WT, Li KL, et al. Metformin attenuates gefitinib-induced exacerbation of pulmonary fibrosis by inhibition of TGF- β signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(41):43065-43619.
- [14] Wang L, Liu M, Xiong CX, et al. Inhibition of EGF receptor blocks the development and progression of peritoneal fibrosis[J]. *J Am Nephrol*, 2015, 27(9):1-15.
- [15] Boothe DL, Coplowitz S, Greenwood E, et al. Transforming-growth factor B-1(TGF-131) is a serum biomarker of radiation induced fibrosis in patients treated with intracavitary accelerated partial breast irradiation: preliminary results of a prospective study[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2013, 87(5):1030-1036.
- [16] Flechsig P, Dadrich M, Bickelhaupt S, et al. LY2109761 attenuates radiation-induced pulmonary murine fibrosis via reversal of TGF- β and BMP-associated proinflammatory and proangiogenic signals[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(13):3616-3627.