

卡托普利通过抑制 CCL-2 表达缓解大鼠急性放射性肺损伤的机制研究

王俊 卢宏达 雷章 吴洪斌 卢驰

430079 武汉,湖北省肿瘤医院肿瘤内科(王俊);430014 武汉市中心医院肿瘤内科(卢宏达、雷章、吴洪斌、卢驰)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1004-4221.2017.10.021

【摘要】 目的 研究卡托普利对大鼠急性放射性肺损伤的抑制作用及可能机制。**方法** 将 64 只雌性 Wistar 大鼠随机分为对照组、照射组和照射+卡托普利低/高剂量组。除对照组外,其余各组均给予右肺单次 20 Gy 照射建立大鼠急性放射性肺损伤模型。于第 1、2、4、8 周处死大鼠 HE 染色观察大鼠肺组织变化,RT-qPCR、蛋白印迹法分别检测肺组织中 CCL-2mRNA 水平及蛋白含量,免疫组化检测各组大鼠肺组织中巨噬细胞(CD₆₈)数量。采用单因素方差分析。**结果** 卡托普利能够减轻急性放射性肺损伤大鼠肺组织炎症反应($P<0.05$),抑制单核细胞在损伤肺组织中聚集($P<0.05$),降低 CCL-2 在大鼠肺组织中的含量($P<0.05$)。**结论** 卡托普利可能通过降低 CCL-2 的表达,从而抑制单核细胞在急性放射性肺损伤大鼠肺组织中的聚集,进而减轻炎症反应。

【关键词】 卡托普利; 大鼠; 急性放射性肺损伤; 趋化性细胞因子配体 2; 巨噬细胞

基金项目:国家自然科学基金(81372931、81101550);湖北省自然科学基金(2012FFB05904);武汉市科技攻关计划(2013060602010253)

Captopril attenuates lung inflammation through inhibiting the expression of CCL-2 in rats with acute radiation-induced lung injury Wang Jun, Lu Hongda, Lei Zhang, Wu Hongbin, Lu Chi

Department of Internal Oncology, Hubei Cancer Hospital, Wuhan 430079, China (Wang J); Department of Internal Oncology, Central Hospital of Wuhan, Wuhan 430014, China (Lu HD, Lei Z, Wu HB, Lu C)

【Abstract】 Objective To explore the inhibitory effect of captopril on acute radiation-induced lung injury in rats and the possible mechanism. **Methods** Sixty-four female Wistar rats were randomly divided into control group, irradiation group, irradiation + low-dose captopril group, and irradiation + high-dose captopril group. A single dose of 20 Gy was given to the right lung of all rats except those in the control group to establish a rat model of acute radiation-induced lung injury. These rats were sacrificed at 1, 2, 4, and 8 weeks. HE staining was used to observe the pathological changes in lung tissue; RT-PCR and Western blot were used to measure the mRNA and protein expression of CCL-2 in lung tissue; immunohistochemical assay was used to determine the number of monocytes (CD₆₈) in lung tissue. A one-way analysis of variance was performed. **Results** Captopril significantly reduced lung inflammation in rats with acute radiation-induced lung injury ($P<0.05$), inhibited the accumulation of monocytes (CD₆₈) in lung tissue ($P<0.05$), and decreased the content of CCL-2 in lung tissue ($P<0.05$). **Conclusions** For rats with acute radiation-induced lung injury, captopril can reduce the expression of CCL-2 to inhibit the accumulation of monocytes in lung tissue and thus attenuate lung inflammation.

【Key words】 Captopril; Rat; Acute radiation-induced lung injury; Chemoattractant cytokine ligand 2; Macrophage

Fund programs: National Natural Science Foundation of China (81372931, 81101550); Hubei Provincial Natural Science Foundation of China (2012FFB05904); Key Science and Technology Plan of Wuhan (2013060602010253)

RILI 又被称为放射性肺病,包括早期的放射性肺炎及晚期的放射性肺纤维化 2 个阶段,是一个无菌性炎症过程,涉及复杂的各种炎性细胞浸润和细胞因子的相互作用^[1]。目前通常使用抗氧化剂、激

素、细胞因子等药物治疗放射性肺炎,虽有一定疗效但不良反应较大^[2-3]。卡托普利(Captopril)作为一种血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI),能有效缓解放射引起的肺部炎症^[4]。本实验试以卡托普利治疗

急性放射性肺损伤大鼠,探讨其可能防护作用及机制,为临床防治放射性肺损伤提供实验依据。

材料与方 法

1.材料

(1)动物:健康成年 SPF 级雌性 Wistar 大鼠 64 只,180~200 g/只,购自湖北省实验动物研究中心[许可证号:SCXK(鄂)2008-0005]。实验前在清洁动物房常规饲养 7 d,观察无异常者入组实验。

(2)仪器:XIMATRON 模拟定位机(美国 Varian 公司);PRECISE 直线加速器(瑞典 Elekta 公司),S IX51 光学显微镜(日本 OLYMPUS 公司),C1000 Touch PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司),ChemiDoc XRS +凝胶成像仪(美国 BIO-RAD 公司),VICTORX2 全波长多功能酶标仪(美国 PerkinElmer 公司)。

(3)试剂:卡托普利(美国 Sigma 公司,批号 C4042),TRIzol(美国 Life Technologies 公司,批号 15596-026),RNA 逆转录试剂盒(日本 TOYOBO,批号 FSQ-101),实时定量 PCR 试剂盒(TOYOBO,批号 QPS-201),小鼠抗大鼠 CD₆₈ 单克隆抗体(Santa Cruz,批号 sc-59103),辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠二抗(Earthon,批号 E030110)。

(4)PCR 引物:大鼠 β -actin、CCL-2 引物经 PubMed 核酸数据库 BLAST 检索为基因特异性引物,由上海生工生物工程股份有限公司合成并纯化。其各自序列为 β -actin 引物,上游 5'-CTTCCTGGG-CATGGAGTCT-3',下游 5'-GGAGCAATGATCTT-GATCTT-3',产物大小 202 bp;CCL-2 引物,上游 5'-AGGAATGGGTCCAGAAGTAC-3',下游 5'-AAGT-GCTTGAGGTGGTTGTG-3',产物大小 177 bp。

2.方法

(1)实验分组:将实验大鼠按随机数字表法分为 4 组,空白对照组、单纯照射组、照射加卡托普利低剂量组、照射加卡托普利高剂量组,每组各 16 只。照射前 3 d 至照射后第 56 天对大鼠进行灌胃 2 ml,共 59 d。空白对照组及单纯对照组给予生理盐水灌胃,1 次/d;照射+卡托普利低/高剂量组给药剂量分别为 10 mg/(kg·d)、30 mg/(kg·d),1 次/d。

(2)模型制备:将大鼠用水合氯醛(350 mg/kg)麻醉后仰卧位固定在木板上,模拟定位机(Varian Ximatron)透视下确定照射野范围为右侧全肺,照射野大小约 2.8 cm×4.2 cm,在体表勾画出射野范围之后在直线加速器(医科达 PRECISE)上根据体表标志进行摆位,射野外部用多叶光栏遮挡,6 MV X 线

固定源皮距 100 cm 照射,剂量率为 400 cGy/min,单次 20 Gy。

(3)HE 切片:将处死大鼠的右侧肺组织于 10%甲醛固定液中固定 24 h,水洗 20 min 后梯度酒精脱水,二甲苯透明后石蜡包埋,切片 5 μ m,烤片后二甲苯脱蜡,脱水化后苏木精染色 5 min,分化后伊红染色 15 s,风干后树脂封片。

(4)RT-qPCR:TRIzol 法提取大鼠肺组织总 RNA 约 50 mg,提取总 RNA 在紫外分光光度仪上测定纯度($A_{260}/A_{280} = 1.8 \sim 2.0$)并定量,取 RNA 0.5 μ g 行逆转录反应,条件为 37 $^{\circ}$ C 15 min,98 $^{\circ}$ C 5 min;取 1 μ l 逆转录产物行定量 PCR 反应,每个模板重复 4 次,条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min,之后 95 $^{\circ}$ C 10 s、60 $^{\circ}$ C 45 s 共 40 个循环。将各模板所得的 Ct 值减去相应内参 β -actin 的 Ct 值得到 Δ Ct 值, $\Delta\Delta$ Ct = 实验组 Δ Ct - 对照组 Δ Ct,采用 $2^{-\Delta\Delta$ Ct} 法计算各基因相对内参的表达量。

(5)蛋白印迹法:在研磨器中加入 RIPA 蛋白裂解液研磨溶解组织后提取总蛋白,加样后在浓缩胶和分离胶中电泳分离蛋白,在转膜液中用 0.45 μ m 聚偏氟乙烯树脂膜 150 mA 转膜 100 min,5%牛奶封闭 1 h 后孵育一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜,孵育二抗 1 h 后行化学发光显色反应。结果用 Gel-Pro analyzer 软件读出内参、目的条带积分灰度值(IA),相对含量即为目的积分灰度值/内参积分灰度值。

(6)免疫组织化学法:将大鼠肺组织经甲醛溶液固定,石蜡包埋处理后切片,烤片过夜后脱蜡,柠檬酸修复液中高压 1 min,过氧化氢作用 10 min 后正常山羊血清封闭 20 min,洗片后加 1:100 稀释的一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗片后加 1:200 稀释的二抗室温孵育 30 min,洗片后二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色 2.5 min,苏木精复染 2 min 自来水冲洗后脱水、透明、封片。

3.统计方法:采用 SPSS 19.0 软件对数据进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1.照射后大鼠肺组织病理学观察:图 1 示例空白对照组中肺泡组织结构清晰,未见炎症细胞浸润。图 2 示例单纯照射组中照射后 1 周大鼠肺组织中可见少量炎症细胞浸润,照射后 2 周大鼠肺组织中可见轻度中度水肿及炎症细胞浸润,照射后 4 周大鼠肺组织中可见明显水肿及大量炎症细胞浸润,肺泡结构破坏,照射后 8 周大鼠肺组织中可见炎症稍减轻。

2. 卡托普利改善照射后大鼠肺组织炎症反应: 图 3 示例单纯照射组中照射后 4 周大鼠肺组织中可见明显水肿及大量炎症细胞浸润、肺泡结构破坏, 而照射+卡托普利低/高剂量组中照射 4 周后大鼠肺组织可见炎症明显减轻, 且卡托普利高剂量组略优于低剂量组。

3. 卡托普利降低急性放射性肺损伤肺组织中 CCL-2 表达: 单纯照射组中照射后 4 周大鼠肺组织中 CCL-2 mRNA 及蛋白水平与对照组相比明显升高; 与单纯照射组相比照射+卡托普利低/高剂量组中 CCL-2 mRNA 与蛋白水平明显降低, 详见表 1、表 2。

表 1 48 只雌性 Wistar 大鼠不同实验组的肺组织 CCL-2 mRNA 表达及比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	只数	CCL-2 mRNA	P 值
对照组	12	1.000±0.297	
20 Gy 单次照射组	12	7.347±0.623	<0.05
照射+卡托普利 10 mg 组	12	4.339±0.449	<0.05
照射+卡托普利 30 mg 组	12	3.082±0.588	<0.05

注: P 值为分别与对照组比较

表 2 48 只雌性 Wistar 大鼠不同实验组的肺组织 CCL-2 蛋白表达及比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	只数	CCL-2 蛋白	P 值
对照组	12	10.0±2.5	
20 Gy 单次照射组	12	48.0±5.6	<0.05
照射+卡托普利 10 mg 组	12	29.0±3.8	<0.05
照射+卡托普利 30 mg 组	12	18.0±2.9	<0.05

注: P 值为分别与对照组比较

4. 卡托普利减少巨噬细胞在急性放射性肺损伤肺组织中的聚集: 对照组大鼠肺组织中仅见少量巨噬细胞, 单纯照射组中照射后 4 周大鼠肺组织中可大量巨噬细胞聚集, 而照射+卡托普利低/高剂量组中照射 4 周后大鼠肺组织与单纯照射组相比巨噬细胞数目明显减少, 详见图 4、表 3。

表 3 48 只雌性 Wistar 大鼠不同实验组的肺组织巨噬细胞数量 (CD₆₈ 数量) 及比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

项目	只数	CD ₆₈	P 值
对照组	12	10.0±2.5	
20 Gy 单次照射组	12	48.0±5.6	<0.05
照射+卡托普利 10 mg 组	12	29.0±3.8	<0.05
照射+卡托普利 30 mg 组	12	18.0±2.9	<0.05

注: P 值为分别与对照组比较

讨 论

放射性肺损伤发生、发展机制和预防、治疗的方法一直是国内外研究的热点。较早研究认为无论急

性的放射性肺炎或慢性放射后肺纤维化均单一的起源于氧自由基的损伤。然而, 氧自由基损伤并不能贯穿放射性肺损伤始终, 炎症因子和组织因子在放射性肺损伤形成中起到了至关重要作用。Ghafoori 等^[5]研究表明放射损伤在放射早期就已发生, 射线产生大量自由基, 从而启动一系列级联反应。细胞因子级联效应由 Rubin 等^[6]首先提出, 他认为在肺放射损伤的临床剂量范围会诱导早期的、持续的炎症细胞因子产生。而炎症过程需要趋化因子和粘附分子的促进^[7], CCL-2 又名 MCP-1 是已知最重要的单核细胞趋化因子^[8]。单核细胞趋化至相应部位后, 在 CCL-2 作用下活化并成熟为巨噬细胞, 根据细胞微环境产生大量炎症介质并趋化更多单核细胞产生级联反应而致病变发生。

近年来, 有研究表明卡托普利对放射性肺损伤有着十分明显防护作用^[9-11], Shenoy 等^[12]研究认为 ACEI 减少肺动脉的压力从而减少了急性放射性肺炎的肺水肿, 也有认为含有巯基 ACEI, 通过降低炎症反应、减轻脉管炎、降低胶原沉积, 从而抑制放射性肺损伤^[13]。然而, 对于慢性肺纤维化阶段不存在组织水肿, 并且不含巯基的 ACEI 同样对放射性肺损伤具有保护作用, 上述理论解释不清。Molteni 等^[9]和 Zhang 等^[14]研究显示血管紧张素 II 有刺激成纤维细胞增殖、促进肺泡细胞凋亡、致炎以及介导氧化应激作用, 但关于 ACEI 如何调节此过程的作用机理尚不十分清楚。

本实验通过建立急性放射性肺损伤大鼠模型, 以探讨卡托普利防治急性放射性肺损伤的作用机制; 在病理学组织观察中发现, 在照射后 1、2、4、8 周大鼠肺组织均有炎症细胞浸润, 以照射后 4 周最为典型, 因此本实验将照射后 4 周大鼠作为急性放射性肺损伤的研究时间点; 在给予不同剂量卡托普利干预后发现卡托普利能减轻放射损伤肺组织炎症反应; 与单纯照射组比能降低 CCL-2 mRNA 与蛋白水平表达, 同时减少单核细胞数量。其可能机制是卡托普利通过作用受损内皮细胞或肺泡细胞减少 CCL-2 合成和分泌, 从而抑制巨噬细胞趋化、降低炎症因子释放, 最终达到保护放射肺损伤的目的。当然卡托普利通过何种信号通路的抑制肺巨噬细胞活化, 对主要炎症信号通路, 如 NF- κ B 和 Notch 信号通路是否有影响, 在今后研究中还需要进一步探讨, 以期全面阐明卡托普利防治放射性肺损伤的机理, 为卡托普利防治放射性肺损伤及其临床推广提供可靠的依据。

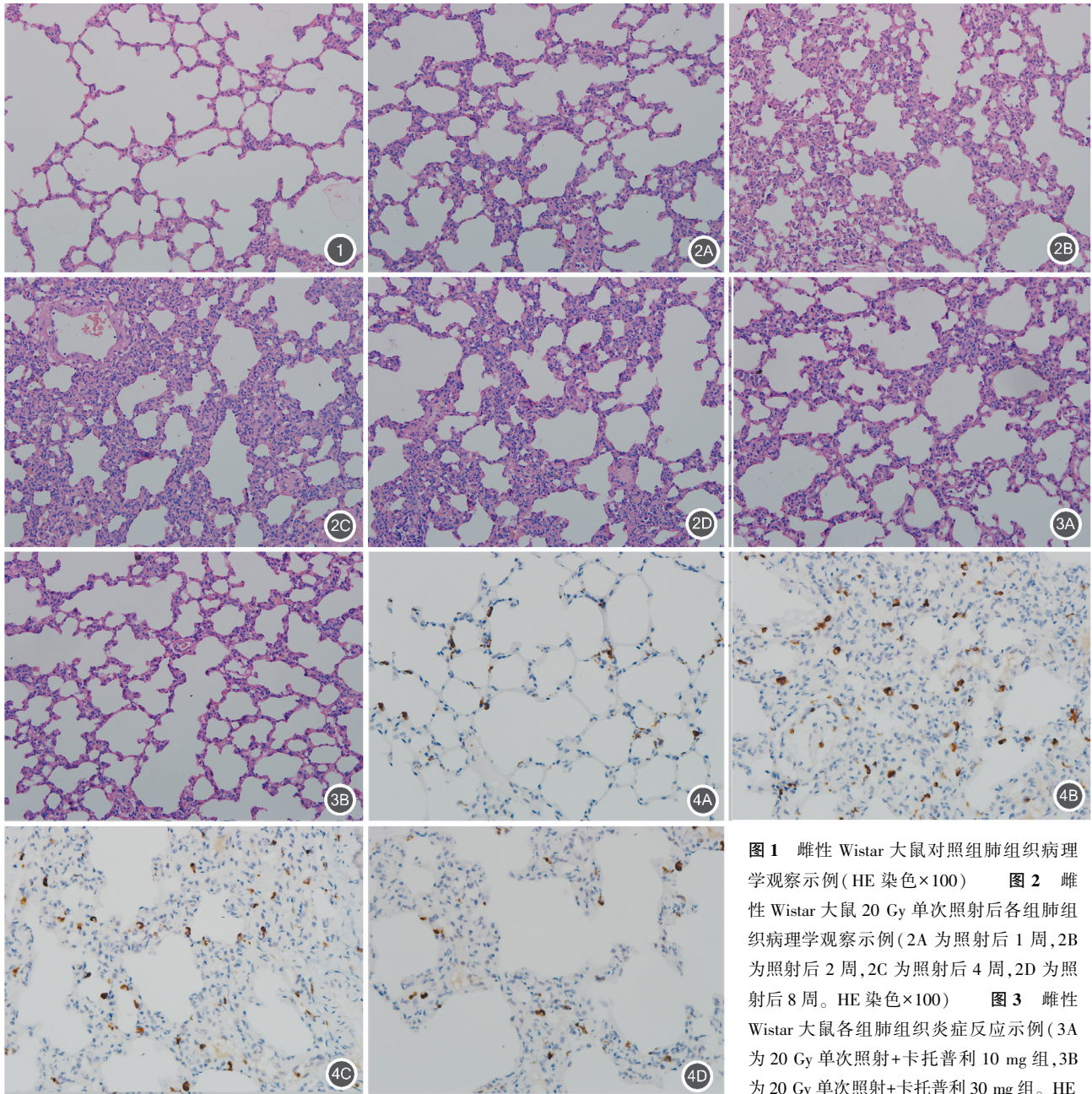


图 1 雌性 Wistar 大鼠对照组肺组织病理学观察示例 (HE 染色×100) 图 2 雌性 Wistar 大鼠 20 Gy 单次照射后各组肺组织病理学观察示例 (2A 为照射后 1 周, 2B 为照射后 2 周, 2C 为照射后 4 周, 2D 为照射后 8 周。HE 染色×100) 图 3 雌性 Wistar 大鼠各组肺组织炎症反应示例 (3A 为 20 Gy 单次照射+卡托普利 10 mg 组, 3B 为 20 Gy 单次照射+卡托普利 30 mg 组。HE 染色 ×100) 图 4 各组雌性 Wistar 大鼠肺组织免疫组织化学显示 CD₆₈ 的巨噬细胞示例 (4A 为对照组, 4B 为照射组, 4C 为照射+卡托普利低剂量组, 4D 为照射+卡托普利高剂量组。SP 染色×100)

参 考 文 献

[1] Down JD, Medhora M, Jackson IL, et al. Do variations in mast cell hyperplasia account for differences in radiation-induced lung injury among different mouse strains, rats and nonhuman primates? [J]. Radiat Res, 2013, 180(2): 216-221. DOI: 10.1667/RR3245. 1.

[2] Borst GR, Ishikawa M, Nijkamp J, et al. Radiation pneumonitis after hypofractionated radiotherapy: evaluation of the LQ (L) model and different dose parameters [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2010, 77(5): 1596-1603. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2009.10.015.

[3] Asakura H, Hashimoto T, Zenda S, et al. Analysis of dose - volume histogram parameters for radiation pneumonitis after definitive concurrent chemoradiotherapy for esophageal cancer [J]. Radiother Oncol, 2010, 95(2): 240-244. DOI: 10.1016/j.radonc.2010.02.006.

[4] Molthen RC, Wu QP, Fish BL, et al. Mitigation of radiation induced pulmonary vascular injury by delayed treatment with captopril [J]. Respiriology, 2012, 17(8): 1261-1268. DOI: 10.1111/j.1440-1843.2012.02247.x.

[5] Ghafoori P, Marks LB, Vujaskovic Z, et al. Radiation-induced lung injury: assessment, management, and prevention [J]. Oncology, 2008, 22(1): 37-47.

[6] Rubin P, Johnston CJ, Williams JP, et al. A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1995, 33(1): 99-109. DOI: 10.1016/0360-3016(95)00095-G.

[7] Chen Y, Okunieff P, Ahrendt SA. Translational research in lung cancer [J]. Semin Surg Oncol, 2003, 21(3): 205-219. DOI: 10.1002/ssu.10039.

[8] Jiao B, Wang YS, Cheng YN, et al. Valsartan attenuated oxidative

- stress, decreased MCP-1 and TGF- β_1 expression in glomerular mesangial and epithelial cells induced by high-glucose levels [J]. *BioSci Trends*, 2011, 5 (4): 173-181. DOI: 10.5582/bst.2011.v5.4.173.
- [9] Molteni A, Moulder JE, Cohen EF, et al. Control of radiation-induced pneumopathy and lung fibrosis by angiotensin-converting enzyme inhibitors and an angiotensin II type 1 receptor blocker [J]. *Int J Radiat Biol*, 2000, 76(4): 523-532. DOI: 10.1080/095530000138538.
- [10] Ghosh SN, Zhang R, Fish BL, et al. Renin-Angiotensin system suppression mitigates experimental radiation pneumonitis [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2009, 75(5): 1528-1536. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2009.07.1743.
- [11] Kma L, Gao F, Fish BL, et al. Angiotensin converting enzyme inhibitors mitigate collagen synthesis induced by a single dose of radiation to the whole thorax [J]. *J Radiat Res*, 2012, 53(1): 10-17. DOI: 10.1269/jrr.11035.
- [12] Shenoy V, Qi YF, Katovich MJ, et al. ACE2, a promising therapeutic target for pulmonary hypertension [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2011, 11(2): 150-155. DOI: 10.1016/j.coph.2010.12.002.
- [13] Medhora M, Gao F, Jacobs ER, et al. Radiation damage to the lung: mitigation by angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors [J]. *Respirology*, 2012, 17(1): 66-71. DOI: 10.1111/j.1440-1843.2011.02092.x.
- [14] Zhang LJ, Wang LH, Ji W, et al. Association between plasma angiotensin-converting enzyme level and radiation pneumonitis [J]. *Cytokine*, 2007, 37(1): 71-75. DOI: 10.1016/j.cyto.2007.02.019.

(收稿日期:2016-08-03)

中华医学会第十四次全国放射肿瘤治疗学学术会议暨中美放射肿瘤协作学会 (SANTRO) 研讨会征文通知

中华医学会学术会务部 中华医学会放射肿瘤治疗学分会

由中华医学会、中华医学会放射肿瘤治疗学分会主办,国家癌症中心中国医学科学院肿瘤医院、北京放射肿瘤学分会共同承办的中华医学会第十四次全国放射肿瘤治疗学学术会议将于 2017 年 11 月 9-12 日北京召开。会议期间将同时召开 2017 年中美放射肿瘤协作学会 (SANTRO) 放射治疗研讨会。届时将会有来自国内及欧美众多放射肿瘤学中心的放射肿瘤学医师,放射生物学研究人员,医学物理师,放射治疗技师,放射治疗护士及医学工程师等,以及特邀的国内外知名专家学者,相聚一堂,共同交流和展示放射肿瘤学各领域近几年所取得的成绩,共同探讨和展望放射肿瘤学的发展前景。参加注册的代表可获得国家 I 类继续医学教育学分 6 分。欢迎广大医技人员莅临参会。诚邀各位专家同道积极投稿参会。现将会议征文具体事宜通知如下:

论文截稿日期:2017 年 9 月 30 日

征文内容:(1)鼻咽癌放疗临床研究;(2)头颈部肿瘤放疗临床研究;(3)临床放射物理学研究;(4)妇科肿瘤放疗临床研究;(5)多模态影像与放疗临床研究;(6)放疗中的护理经验;(7)乳腺肿瘤放疗临床研究;(8)临床放射生物学研究;(9)神经系统肿瘤放疗临床研究;(10)术中放疗临床研究;(11)腹部-直肠及泌尿系统肿瘤放疗临床研究;(12)腹部-肝胆胰肿瘤放疗临床研究;(13)胸部-食管及纵隔肿瘤放疗临床研究;(14)胸部-肺癌放疗临床研究;(15)质子、重离子放疗临床研究;(16)立体定向(放射外科)放疗临床研究;(17)淋巴瘤放射治疗临床研究;(18)介入放疗与近距离治疗临床研究;(19)营养与免疫治疗临床研究;(20)多中心临床研究;(21)放射治疗技术研究。

投稿方式:本次大会采用网上投稿方式,不接收纸质和电子邮件投稿,敬请登陆大会网站 <http://www.csronet.org>,点击“网上论文投稿”按钮按提示进行网上论文投稿。

征文要求:(1)未在国内外公开刊物上发表的论文;须具有科学性、先进性、实用性,数据真实可靠,文字表达准确精炼;(2)提交 800 字以内的中文摘要一份,内容包括研究目的、方法、结果和结论四部分,请勿附图表。

联系人:王健仰,电话:13810095191,Email:pkucell@163.com;张烨,电话:13717635880,Email:drzyc1983@163.com。