

放射性心脏损伤动物实验研究进展

顾静, 吴红彦*, 张雪燕, 刘润, 李海龙, 郭超

(甘肃中医药大学, 兰州 730000)

【摘要】 胸腹部肿瘤放疗时,位于纵隔的心脏不可避免受到照射而引起的心脏损伤,统称为放射性心脏损伤(radiation-induced heart damage, RIHD),该病已被认为与传统的放射性肺纤维化损伤同等重要,是严重的放疗副反应。近年来,学者们对RIHD方面的研究逐渐升温。目前该领域临床观察较多,基础研究不足,病因机制尚不明确,还处于以“认知”为主的阶段,缺乏有效干预措施。因此利用动物实验进行RIHD基础研究,深入探索射线引起心脏损伤的病理分子机制,积极尝试可能的干预手段具有迫切的现实意义。本文对实验研究中动物造模、指标检测、病理机制、药物干预及其药理作用等方面的RIHD基础研究结果进行综述,以期今后RIHD研究提供一定参考。

【关键词】 放射性心脏损伤;基础研究;动物实验

【中图分类号】 Q95-33

【文献标识码】 A

【文章编号】 1005-4847(2018) 05-0667-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.05.021

Progress in animal experimental research on radiation-induced heart damage

GU Jing, WU Hongyan*, ZHANG Xueyan, LIU run, LI Hailong, GUO Chao

(Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

Corresponding author: WU Hongyan. E-mail: 120233234@qq.com

【Abstract】 Radiation-induced heart damage (RIHD) is unavoidable in the mediastinal heart during radiotherapy for chest and abdominal tumors. This condition has been considered to be important in conventional radiation-induced pulmonary fibrosis. It is a severe side effect of radiotherapy. In recent years, research on RIHD has gradually increased in intensity. At present, many clinical observations are being undertaken in this field, but the basic research is insufficient, the etiological mechanism is not clear, and there is a lack of effective intervention. Therefore, there is an urgent need to carry out animal experiments as basic research on RIHD, to explore the pathomolecular mechanisms of cardiac injury induced by radiation and to actively develop potential intervention measures. This paper reviews the result of basic research on RIHD in terms of animal modeling, index detection, pathological mechanism, drug intervention, and pharmacological action in order to provide a reference for future RIHD research.

【Keywords】 radiation-induced heart damage; basic research; animal experiment

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

在进行胸腹部肿瘤如:乳腺癌、肺癌、霍奇金病、食管癌、贲门癌、胸腺瘤等恶性肿瘤的放射治疗时,位于纵隔的心脏不可避免受到照射而引起的心

脏损伤,统称为放射性心脏损伤(radiation-induced heart damage, RIHD)^[1]。以往认为心脏是对射线不敏感的器官,但随着胸部肿瘤放疗的广泛应用,放

【基金项目】 国家自然科学基金(81660742);甘肃省中医药管理局科研课题(GZK-2015-43);中国博士后科学基金面上资助(2017M620477)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81660742), Research Subject of Gansu Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine (GZK-2015-43), and China Postdoctoral Science Fund (2017M620477).

【作者简介】 顾静(1980—),女,副教授,博士,主要从事心血管药理生理学研究。Email: 120233234@qq.com

【通信作者】 吴红彦,(1963—),男,教授,博导,主要从事心脑血管中医药研究。Email: 120233234@qq.com

射性心脏损伤发生率已达 20%~68%^[2],是严重的放疗副反应。2015 年, Cella L 在《Radiother Oncol》发表的研究中指出“胸腹部放疗引起的放射性心脏损伤已经与传统的放射性肺纤维化损伤同等重要”^[3]。

研究认为射线电离组织产生活性氧自由基,氧化应激引起心脏局部产生无菌性炎症反应^[4], RIHD 被初步认为是一个不断渐进的炎症反应和纤维化综合作用的病理发展过程^[5]。然而该病因机制不明确,缺乏有效干预措施,本文就 RIHD 在动物实验方面的研究结果进行综述。

1 RIHD 动物造模

1.1 造模动物种类

用于 RIHD 研究的模型动物常见的有大鼠^[6-7]、小鼠^[8-9]、犬^[10-11]、兔^[12]等。PET/CT 心肌代谢显像发现 20Gy 单次照射比格犬心肌前壁后^[10-11],照射区与非照射区存在病理差异,核磁共振扫描图像分析也有一致结果,提示造模成功^[10-11]。15Gy 和 20 Gy X 线照射 SD 大鼠心脏,病理发现心肌细胞排列紊乱,出现变性坏死,核排列不规则,胶原增多,纤维化明显^[6]。新西兰兔分别接收多剂量(10,14,18,22,30,40,54 Gy)单次照射后 4 个月病理学检查认为兔可作为 RIHD 模型动物^[12]。病理学检查还提示 C57BL/6 小鼠经 18 Gy 和 25 Gy 照射后,心脏早期以急性炎症改变为主,后期以进行性纤维化为特征^[8]。还有学者在实验中让雄性恒河猴接受单次全身辐射(6.5-8.4Gy),恒河猴心肌纤维化发生率增高、左室内径减少、全身炎症反应升高^[13]。可见放射性心脏损伤可发生于多种动物,射线对心脏的损伤是明确且普遍的。

RIHD 基础实验建模在动物选择上,应首先考虑动物心脏的解剖结构、病理生理功能变化是否尽可能接近临床放疗后病人的心脏变化,从这点来说犬和猪等大型动物应该会比较理想的造模对象,但一方面,考虑到实验动物应该经济、便于繁殖、饲养和取才方便的特点;另一方面,动物实验学中通常多认为大鼠适合心肌病研究,该模型组织病理改变包括心肌退行性变化和纤维化,这符合放射性心脏损伤的炎症——纤维化病理改变特点,因此开展 RIHD 动物实验建议首选大鼠为造模对象。

1.2 造模方法

就照射源来说,国内外曾用⁶⁰Co γ 射线照射动

物,而现在多用医用直线加速器进行 X 线照射,其优点是照射野剂量较均匀,对心脏组织损伤较小,适合大鼠和小鼠等小动物心脏照射。

就照射次数来说,包括单次照射造模和多次照射造模,绝大多数研究选用的造模方法为单次照射,而多次照射造模的研究较少。据分析认为,多次小剂量照射造模虽然符合临床患者长时间、反复照射的放疗实际,但在基础研究中多次照射在动物实验实施中困难较大。一方面,固定一致的胸前壁照射部位确定难度大,不便把控,这可能造成较大的实验误差,降低实验数据的准确性和实验的可行性;另一方面,放射性损伤有显著的迟发效应,单次照射后的损伤能较长时间影响心脏,促使其发生渐进性炎症——纤维化病理改变,鉴于这样的病理变化特点,有理由认为单次大剂量照射可以满足实验研究的目的和要求,且单次照射在大规模动物试验中简单易行,节省人力、物力、财力,是多数 RIHD 基础研究者的首选造模方法。

1.3 造模剂量

国内外 RIHD 研究中,动物造模剂量变化较大,有报道 10 Gy^[13]以内的,但大多数都在 10 Gy 以上,以 15 Gy^[6,14]、18 Gy^[8,12,15-16]、20 Gy^[6,10-11,14,17-21]、25 Gy^[8,14]、30 Gy^[12,22-23]照射剂量造模的研究较多,尤以 20 Gy 为最常见造模剂量。

经汇总分析发现动物照射剂量差别较大,与照射方式有关;全身性照射时多组织器官均受到射线的损伤,动物不能耐受而大量死亡,故造模照射剂量较小;而“确定动物心前照射靶区^[11-12]”、“动物体表应用铅板防护”、“照射仪器自带铜局限照射野”等防护措施使得动物只进行心前区心脏局部照射时,动物全身受射线影响较小,能够耐受较大的照射剂量。相比于其他脏器,心脏是射线不敏感器官,因此对比全身性大面积小剂量照射,这种增加防护措施大剂量心脏局部照射对心脏的损伤更加显著,更适合于动物放射性心脏损伤研究中的模型构建。

1.4 造模指标及检测方法

研究显示造模指标包括:①心肌代谢显像^[10];②病理 HE 染色观察^[6-8,10,12-14,16,19-20,24-25]和 Masson 染色计算胶原纤维容积比^[6,13,14,16,20,24-25];③动物超声心动图检测射血分数(EF)^[13,16];④核磁检测 EF、左心室舒张期容积(EDV)、左心室收缩期容积(ESV)^[11]等心功能指标;⑤ELISA 心肌酶检

测血清肌钙蛋白 I (c Tn I)^[8,13,17-18]、肌酸激酶同工酶 (CK-MB)^[17,21]、内皮素 1 (ET-1)^[18]、超氧化物歧化酶 (SOD)^[25] 和丙二醛 (MDA)^[25] 活性等;⑥免疫组化检测核因子- κ B (NF- κ B)^[6,19]⑦PCR 检测 TGF- β 1^[14,17,24]、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)^[22]、IL-10^[23]、IL-1^[24]、血管紧张素 II 1 型受体 (AT1)^[16]、NF- κ B^[16,20]、Bax^[26]、细胞色素 C (Cyt-C)^[26]、BH₃ 结构域凋亡诱导蛋白截断体 (t-Bid)^[26]、低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)^[20]、结缔组织生长因子 (CTGF)^[14,20]、I 型胶原 (COL-1)^[20] 等;⑧蛋白免疫印迹检测 IL-10^[23]、AT1^[16]、NF- κ B^[16,20]、Bax^[26-27]、Bcl-2^[27]、Cyt-C^[26]、t-Bid^[26]、HIF-1 α ^[20]、CTGF^[20]、COL-1^[20]、p53^[7]、过氧化物酶体增殖激活受体 (PPAR)^[9]、TGF- β 1^[9] 和 Smad3^[14] 等;⑨TUNNEL 法检测大鼠心肌细胞凋亡等^[26];⑩心电图检测心率和 ST 段^[14]。此外,还有电镜检测线粒体^[14]等方法应用于 RIHD 的动物实验中。

综上所述,RIHD 基础实验的实验技术和检测手段只停留在几种常规的实验方法上,最常用的实验方法包括:病理 HE 染色和 Masson 染色,免疫组化、PCR 和蛋白免疫印迹等。最常用的检测指标是组织病理观察、心肌酶、炎症反应和纤维化相关的细胞因子等。特别值得关注的是 cTnI 对心脏早期放射损伤有一定的诊断价值^[18]。

2 机制研究

RIHD 基础实验研究中,在机制探索方面涉及 cTnI、NF- κ B、TGF- β 1、血管紧张素系统、过氧化物酶体增殖物活化受体 PPAR- γ 、内皮素-1、p53、自噬、TNF- α 、IL-1、IL-10 等病理分子,但绝大多数研究只有 1-2 篇相关文献,研究不够深入。

2.1 炎症纤维化病变

根据上述检测的病理性分子可以初步认为放射性心脏损伤机制,目前的研究主要集中在射线引起的炎症反应和纤维化病变方面。早期以急性炎症为主,后期以进行性纤维化为特征;随着受照剂量的增加,炎症反应和纤维化程度加重,病变时间提前^[8]。射线照射可启动 NF- κ B 炎症反应调控通路^[9,20],同时 TNF- α ^[22]、IL-1^[24]、IL-10^[23] 等炎症介质高表达,引起心肌细胞水肿,炎症细胞浸润,随后心肌纤维化改变,成纤维细胞增多,胶原纤维增多。纤维化病变可能与 TGF- β 1^[15,17-18]、HIF-1 α ^[20]、CTGF^[20]、PPAR- γ ^[9,15] 在基因和蛋白水平表达上调

有关。

RIHD 的研究中报告 TGF- β 1 高表达的文献较多^[9,15,17,24],但都没有深入探索 TGF- β 1 信号通路的活化及调节在放射性心脏损伤中的作用机制。前期课题中我们曾以心脏纤维化的主要效应细胞——心肌成纤维细胞作为研究对象观察 X 线的促纤维化损伤效应,也初步发现 X 线的这种损伤效应与 TGF- β 1 有密切关系,实验中应用 PCR 芯片技术观察到 X 线诱导 TGF- β 1 高表达的促纤维化效应与 Smad2、Smad3、Smad4、Smad7、MMP14、TIMP1 等分子的异常表达有关^[12]。可见,放射性心脏纤维化损伤是该放疗副反应有价值的研究方向,可能是未来用药干预的靶点,值得进一步深入探索。

2.2 肾素-血管紧张素-醛固酮系统

此外,血管紧张素 II (Ang II) 和醛固酮通过刺激血管收缩因子及其它生长因子的生成而起着先导炎症介质的作用,血管紧张素 II 和醛固酮可诱导细胞肥大、增殖或迁移、细胞外基质增生。放射性心脏疾病的病理生理表现与上述血管紧张素-醛固酮引起的心血管病变是相似的,先是微血管损伤,接着是心肌缺血炎症反应,最后是纤维化损伤。

2.3 氧化应激

氧化应激在 RIHD 的发生、发展中扮演重要角色^[14,16,25],直接证据是放射线照射早期引起线粒体肿胀,中后期出现线粒体嵴缺失,并呈现空化现象,甚至髓样变,辐射直接损伤线粒体引起代谢异常、氧化应激及 DNA 损伤^[14]。

2.4 凋亡和自噬

X 射线局部照射心脏引起 RIHD 早期出现心肌细胞凋亡,例如:随着放射剂量的升高 Bcl-2 的表达降低,而 Bax 的表达升高^[27];另外,线粒体介导促凋亡蛋白 Bax 激活且发生转位,Bax 可能在 t-Bid 蛋白的协助下与线粒体膜融合形成特异性通道,介导 Cyt-C 的释放^[26],引起心肌细胞凋亡的发生。

自噬也参与放射性心脏损伤,研究显示 X 射线照射损伤大鼠心肌线粒体功能并诱导自噬发生,但自噬可能是心肌启动自我保护的机制。关于自噬在 RIHD 中的意义有待进一步探讨。

3 干预药物

RIHD 基础实验研究已经开始药物干预方面的探索,涉及的干预措施包括 PPAR- γ 激动剂吡格列酮、HMG-CoA 还原酶选择性抑制剂氟伐他汀和阿托

伐他汀、重组人神经调节蛋白 1 β 、辅酶 Q-(10)、曲美他嗪、血管紧张素 II 1 型受体拮抗剂氯沙坦、磷酸化的硫醇阿米非司汀、左旋肉碱等,中药干预药物有加味炙甘草汤、红景天等。

总体来说药物干预 RIHD 处于实验尝试阶段,机制研究不全面不深入。相对于有限的中医药(加味炙甘草汤、红景天)干预 RIHD 的动物实验^[27]来说,临床运用中医药干预病患的研究较多。在中医医理中,放射性心脏损伤属于“心悸”“胸痹”等范畴,主要是由于射线这种热邪侵袭机体引发血瘀、气滞等,造成痹阻胸阳,阻滞心脉,损伤气血而致患者气阴两虚。临床使用的中草药及复方制剂,大多都体现出益气养血、益气活血或滋阴养血兼解毒的治则治法,中医药防护 RIHD 有极大的优势,但动物实验开展不足,相关药理和药物有效部位、安全性等有待深入研究和评价,这急需大量中医药干预的动物实验来筛选和指导临床用药。

4 小结与展望

我国乃至全球恶性肿瘤和心血管疾病的发病率居高不下,成为疾病致死的两大首要原因,据推测本世纪内放疗可能仍是肿瘤治疗的有效手段。RIHD 的发生率短期内不会有下降的趋势。本文通过对动物实验研究的回顾分析可以见得,RIHD 的研究有限,中医药的干预研究也很少,深入探索放射性心脏损伤的病理分子机制,积极开展中医药的干预具有迫切的现实意义。

参 考 文 献(References)

- [1] 顾文栋,冯炎. 放射线诱发心脏损伤的病理学机制[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2004, 13: 110-112.
- [2] Somjen D, Knoll E, Vaya J, et al. Estrogen-like activity of licorice root constituents: glabridin and glabrene, in vascular tissues in vitro and in vivo[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2004, 91(3):147-155.
- [3] Cella L, D'Avino V, Palma G, et al. Modeling the risk of radiation-induced lung fibrosis: Irradiated heart tissue is as important as irradiated lung[J]. Radiother Oncol, 2015, 117(1):36-43.
- [4] Hatoum OA, Otterson MF, Kopelman D, et al. Radiation induces endothelial dysfunction in murine intestinal arterioles via enhanced production of reactive oxygen species[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(2): 287-294.
- [5] Darby SC, Cutter DJ, Boerma M, et al. Radiation-related heart disease: current knowledge and future prospects[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2010, 76(5): 656-665.
- [6] 姜敏,曾越灿,高嵩,等. 核因子- κ B 在放射性心脏损伤中的表达[J]. 医学研究杂志, 2016, 45(8):36-40.
- [7] Zhou Q, Hu W, Fei X, et al. Recombinant human neuregulin-1 β is protective against radiation-induced myocardial cell injury[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(1):325-330.
- [8] 符天晓,周菊英,焦肠. C57BL/6 小鼠放射性心脏损伤动物模型的建立及血清标志物的探讨[J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(7):922-925.
- [9] Subramanian V, Seemann I, Merl-Pham J, et al. Role of TGF beta and PPAR alpha signaling pathways in radiation response of locally exposed heart: integrated global transcriptomics and proteomics analysis[J]. J Proteome Res, 2017, 16(1):307-318.
- [10] 宋建波. 实验犬放射性心脏损伤心肌代谢—灌注显像及超微结构损伤研究[D]. 山西医科大学, 2017.
- [11] 武瑞凤,苏晋生. 核磁研究犬心放射性损伤早期改变[J]. 实用医学影像杂志, 2015, 16(3): 215-217.
- [12] 郭建锋,黄敏,郑凯,等. 兔单次照射后早期心脏放射性损伤的组织学研究[J]. 南通大学学报(医学版), 2012, 32(2): 107-109.
- [13] DeBo RJ, Lees CJ, Dugan GO, et al. Late effects of total-body gamma irradiation on cardiac structure and function in male rhesus macaques[J]. Radiat Res, 2016, 186(1):55-64.
- [14] 刘力坤. 大鼠低剂量放射性心脏损伤及其机制研究[D]. 贵州医科大学, 2017.
- [15] 杜红梅. PPAR- γ 激动剂吡格列酮能减轻大鼠放射性心脏损伤[D]. 中国医科大学, 2013.
- [16] 吴荣,马天馨,曾越灿. 血管紧张素 II 1 型受体拮抗剂在大鼠放射性心脏损伤中保护作用的研究[J]. 中国医科大学学报, 2015, 44(1):20-26.
- [17] Song JB. Myocardial metabolism-perfusion imaging and ultrastructural damage in experimental dogs with radiation-induced heart injury[D]. Shanxi Medical University, 2017.
- [18] Wu RF, Su JS. Nuclear magnetic field study, early changes of cardiac radiation injury in dogs[J]. J Appl Med Imaging, 2015, 16(3): 215-217.
- [19] Guo JF, Huang M, Zheng K, et al. Histological study of early radiation injury after single irradiation in rabbits [J]. Nantong Uni (Med Sci), 2012, 32(2): 107-109.
- [20] Liu LK. Study on low dose radiation induced cardiac injury and its mechanism in rats [D]. Guizhou Medical University, 2017.
- [21] Du HM. PPAR- γ agonist pioglitazone can attenuate radiation-induced cardiac injury in rats [D]. China Medical University, 2013.
- [22] Wu R, Ma TX, Zeng YC. Protective effect of angiotensin II

- receptor antagonist on radiation-induced cardiac injury in rats [J]. J Chin Med Univ, 1995, 44(1): 20–26.
- [17] 刘慧, 熊迈, 戎铁华, 等. 大鼠心脏组织 TGF- β 1 mRNA 表达水平与放射性损伤关系的实验研究[J]. 癌症, 2008, 27(1): 18–24.
- Liu H, Xiong M, Rong TH, et al. Experimental study on the relationship between TGF- β 1 mRNA expression and radiation injury in rat heart [J]. Cancer, 2008, 27(1): 18–24.
- [18] 范风云, 张丙芳, 叶江枫, 等. 心脏辐射损伤对心肌钙蛋白 I 和内皮素-1 的影响及氟伐他汀的防治作用[J]. 解放军医学杂志, 2005, 30(5): 403–404.
- Fan FY, Zhang BF, Ye JF, et al. Effects of radiation injury on cardiac troponin I and endothelin-1 and the preventive and therapeutic effects of fluvastatin on cardiac troponin I and endothelin-1 [J]. Med J Chin PLA, 2005, 30(5): 403–404.
- [19] 叶江枫, 蒙育林, 杜志强. 放射性心脏损伤初期核因子 κ B 的变化及氨溴索的影响[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2007, 1(5): 49–51.
- Ye JF, Meng YL, Du ZQ. Changes of nuclear factor- κ B and the effect of ambroxol in the early stage of radiation-induced cardiac injury [J]. Chin J Clinicians (Electronic Edition), 2007, 1(5): 49–51.
- [20] 刘丽娜. PDTC 阻断炎症通路减轻大鼠放射性心脏损伤的机制研究[D]. 河北医科大学, 2016.
- Liu LN. Study on the mechanism of PDTC blocking inflammatory pathway to attenuate radiation-induced cardiac injury in rats [D]. Hebei Medical University, 2016.
- [21] 马金柯, 高世乐, 胡宗涛, 等. 大鼠放射性心脏损伤机制的比较医学意义[J]. 实验动物与比较医学, 2018, (3): 188–193.
- Ma JK, Gao SL, Hu ZT, et al. Comparative medical significance of radiation-induced cardiac injury in rats [J]. Lab Anim Comp Med, (3): 188–193.
- [22] 周游, 李浪, 陈绘颖, 等. 大鼠放射性心脏损伤后肿瘤坏死因子 α 表达的变化及阿托伐他汀对其的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2014, 16(7): 751–753.
- Zhou Y, Li L, Chen HY, et al. Changes of tumor necrosis factor α expression and the effect of Attoorv vastatin on the expression of tumor necrosis factor α after radiation-induced cardiac injury in rats [J]. Chin J Geriatr Heart Brain Ves Dis, 2014, 16(7): 751–753.
- [23] 周游, 陈绘颖, 王江友, 等. 曲美他嗪对大鼠放射性心肌损伤后 IL-10 表达的影响[J]. 中国当代医药, 2013, 20(36): 7–10.
- Zhou Y, Chen HY, Wang JY, et al. Effects of trimetazidine on IL-10 expression after myocardial radiation injury in rats [J]. Chin Mod Med, 2013, 20(36): 7–10.
- [24] 张玉彪, 柳云恩, 佟昌慈, 等. 蓝莓花色苷对放射性心脏损伤的保护机制研究[J]. 临床急诊杂志, 2014, 15(11): 647–650.
- Zhang YB, Liu YE, Tong CC, et al. Study on the protective mechanism of blueberry anthocyanin on radiation heart injury [J]. J Clin Emerg, 2014, 15(11): 647–650.
- [25] 刘阳, 高世乐, 胡宗涛, 等. 不同剂量单次照射下大鼠急性放射性心脏损伤模型的构建与评价[J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(5): 716–721.
- Liu Y, Gao SL, Hu ZT, et al. Construction and evaluation of acute radiation-induced cardiac injury model in rats with different doses of single irradiation [J]. Acta Univ Med Anhui, 2018, 53(5): 716–721.
- [26] 张洪明. X 射线心脏局部照射致心肌细胞凋亡的分子机制[D]. 山西医科大学, 2016.
- Zhang HM. Molecular mechanism of cardiomyocyte apoptosis induced by X ray cardiac irradiation [D]. Shanxi Medical University, 2016.
- [27] 刘子宁, 陈凡, 殷麟, 等. 红景天苷对放射性心脏损伤小鼠 Bcl-2 和 Bax 表达的影响[J]. 中国高原医学与生物学杂志, 2018, 39(1): 57–61.
- Liu ZN, Chen F, Yin L, et al. The effect of salidroside on the expression of Bcl-2 and Bax in mice with radiation-induced heart damage [J]. Chin J High Alt Med Biol, 2018, 39(1): 57–61.

[收稿日期] 2018–06–22