

急性放射性肝损伤大鼠模型的建立与评价

吴戈,肖蕾,张瑞丽,艾尼瓦尔·艾木都拉,张华,毛睿,程纬,王云莲,杨颖,包永星*

(新疆医科大学第一附属医院肿瘤中心,乌鲁木齐 830054)

【摘要】 目的 探讨急性放射性肝损伤大鼠模型的建立及 TGF- β 1 动态变化的意义。方法 选用雄性 SD 大鼠 40 只,随机分为模型组(30 只)和对照组(10 只)。除对照组外,模型组大鼠右半肝均接受单次 6 MV X 线 25 Gy 照射,接受照射第 3、5、10 天,应用 HE 染色、透射电镜下观察大鼠右肝病理学变化,血清学检测 TGF- β 1、肝功能相关指标(ALT,AST,ALP),数据用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。结果 在照射第 3、5、10 天后,电镜下可观察肝脏早期病理学改变;TGF- β 1 的表达随时间延长而逐渐增加,模型组与对照组比较、不同时间段相比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);对照组和模型组的 HE 染色结果之间无明显差别,肝功能相关指标(ALT,AST,ALP)不同时间点比较无明显统计学意义($P > 0.05$)。结论 电镜下观察肝脏病理学改变早于光镜下的变化,可用于早期放射性肝损伤的评价;TGF- β 1 较肝功能更加敏感地反映出照射后肝脏的损伤状态,可作为预测急性放射性肝损伤程度的血清细胞因子。

【关键词】 放射性肝损伤;放射性肝纤维化;TGF- β 1,大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)02-0178-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.02.014

Establishment and evaluation of a rat model of acute radioation-induced liver injury

WU Ge, XIAO Lei, ZHANG Rui-li, AN Ni-wa-er. AI mu-du-la, ZHANG Hua, MAO Rui, CHENG Wei, WANG Yun-lian, YANG Ying, BAO Yong-xing

(Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang 830054, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the establishment of a rat model of acute radiation-induced liver injury and significance of the dynamic changes of TGF- β 1 expression. **Methods** Forty healthy 6-week old male SD rats were randomly divided into model group ($n=30$) and control group ($n=10$). The right liver of rats in the model group was given a single dose of 25 Gy 6 MV X-ray irradiation. Histopathological examination using HE staining and transmission electron microscopy were conducted to observe the liver pathological changes in rats at 3, 5, and 10 days after irradiation, serum TGF- β 1 was detected, and relevant indicators of liver function (ALT, AST, ALP) were determined. Statistical analysis was performed using SPSS 17.0 software. **Results** At 3, 5 and 10 days after irradiation, early pathological changes in the liver cells were observed by electron microscopy, the expression of TGF- β 1 was gradually increased with the time prolongation, and significant differences were found between the model group and the control group at different time points ($P < 0.05$). The light microscopic observation of liver tissues did not show significant differences between the control group and model group. The liver ALT, AST, ALP at different time points did not show significant differences between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Electron microscopy can be used to evaluate the early changes of radiation-induced liver injury, prior to the alterations visible by routine light microscopy. TGF- β 1 can be used to predict the degree of radiation-induced liver injury, and may be used as a sensitive serum cytokine in predicting the degree of radiation-induced acute liver injury.

【Key words】 Radiation-induced liver injury; Radiation-induced hepatic fibrosis; Transforming growth factor β 1; Rats.

【基金项目】新疆医科大学第一附属医院院内科研发奖励基金(2012YFY32);乌鲁木齐市感染与肿瘤重点实验室开放课题(WIT-2013-06)。

【作者简介】吴戈,女,硕士研究生,研究方向:恶性肿瘤的综合治疗。E-mail: 272967575@qq.com

【通讯作者】包永星,女,教授,主任医师,博士生导师,研究方向:恶性肿瘤的综合治疗。E-mail: baoyx@vip.sina.com。

近年来随着放疗技术的发展,放疗越来越多地应用于中晚期的肝癌患者^[1]。然而放射诱导的肝损伤(radiation-induced liver injury, RILI)却成为制约肝脏放射治疗疗效的瓶颈。放射性肝损伤又称放射性肝病(radiation-induced liver disease, RILD),是由于肝组织受到一定剂量的放射线照射后,肝细胞发生一系列生理、病理变化引起肝组织损伤,其损伤程度取决于肝脏受照体积、照射剂量及肝功能状态等综合因素^[2]。相关研究表明,RILD是继发于腹部肿瘤放射治疗最严重的、制约肝脏放射治疗剂量递增的致死性并发症^[3]。因此,对放射性肝损伤的早期防治成为减少晚期肝癌放射治疗并发症的关键。目前对各种肝脏疾病的治疗药物的筛选很大程度上依赖于实验动物模型的建立和应用,因此,建立较为既安全又完善的动物模型对肝脏疾病的研究有着重要的现实意义^[4]。本实验应用单次 25 Gy 剂量外照射 SD 大鼠右肝建立放射性肝损伤模型,分别将对对照组及在照射后 3、5、10 d 对照射后的肝脏组织进行 HE 染色、透射电镜检查,血清中检测 TGF- β 1 及大鼠肝功能的变化等检测对 SD 大鼠急性放射性肝损伤模型进行评价和分析,为放射性肝损伤的基础实验研究中模型的建造提供一定的参考,从而为临床早期放射性肝损伤的防治提供一定研究基础。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

清洁级雄性 SD 大鼠 40 只,6 周龄,体重 200 ~ 220 g。由新疆医科大学医学实验动物中心提供[SCXK(新)2011-0004]。随机数字表法分模型组和对照组,其中,模型组分三组,分别为单次 25 Gy 剂量外照射右肝后 3d 组、5d 组、10d 组,对照组 10 只。实验在新疆医科大学动物实验室进行[SYXK(新)2010-0003],对大鼠的处理符合 2006 年中国科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[5]。

1.2 主要试剂及仪器

TGF- β 1 ELISA 试剂盒(BMS623/3, 美国)。瓦里安 XIM-CX 型模拟定位机、瓦里安 2300C/D 直线加速器(美国 Varian 医疗器械公司)、日立-H600 型透射电镜等。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠放射性肝纤维化模型的建立

本模型的建立参照本课题组前期的实验方法^[6]并加以改进。随机分组后将氯胺酮、地西洋混

合液用生理盐水以 0.75 mL/100 g 体重进行腹腔注射麻醉后仰卧位,用自制鼠板固定,瓦里安模拟定位机定位后瓦里安直线加速器下行肝右叶照射。照射野面积为 2 cm \times 2 cm,其范围包括:内侧界脊柱右侧缘,外界开放,上界至膈顶,下界距离上界 2 cm。采用 6 MV-X 线源皮照射技术,源皮距(SSD)100 cm,照射深度在皮下 2 cm,吸收剂量率为 300 cGy/min,单次照射总量为 25 Gy 建立实验模型。

1.3.2 观察指标检测方法

在照射后 3、5、10d 随机抽取模型组大鼠 10 只、对照组大鼠 3 ~ 4 只,以下以一只大鼠为例来说明检测方法:(1)光镜:取大鼠右肝同一部位、同一位置组织,置入 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋后 3 μ m 切片,采用苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察大鼠肝组织病理形态学变化;(2)电镜:从对照组及各模型组中随机抽取 1 只,取非照射及照射后肝脏组织约 2.0 mm \times 0.5 mm \times 0.5 mm,经戊二醛及氧化锇溶液先后固定,包埋,超薄切片,经电子染色后在透射电镜下观察;(3)血清学检测:麻醉后腹主动脉采血,离心(3000 r/min)10 min 后取上清液,放 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。使用 ELISA 法批量检测血清 TGF- β 1 水平,实验步骤严格按照试剂盒说明书操作;肝功能相关指标 ALT,AST,ALP 等指标使用全自动生化分析仪检测大鼠血清。其余大鼠均采用同样操作方法进行检测。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,先进行正态性检验和方差齐性检验,满足方差齐性后多组样本均数之间的比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK 法, $P < 0.05$ 时差异有统计学意义,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 肝脏组织光镜下变化

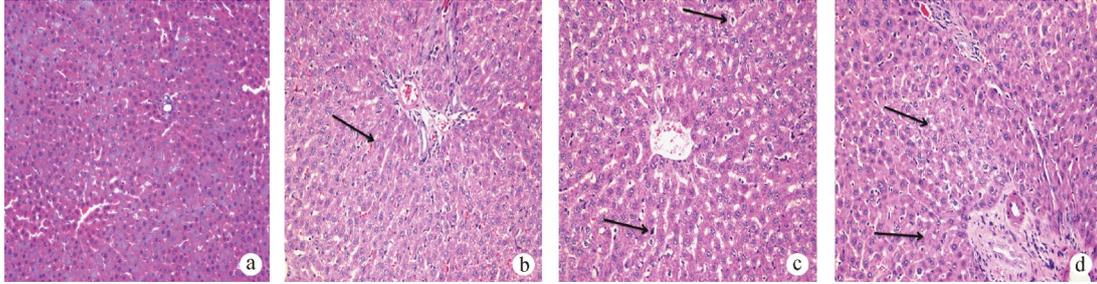
大鼠肝脏组织 HE 染色的观察结果:对照组大鼠肝组织经 HE 染色后,肉眼观察淡粉色,镜下肝小叶结构完整,可见中央静脉及放射状肝细胞索(见图 1a);模型组大鼠在照射 3d 后肉眼观察大体未见明显变化,镜下肝细胞肿胀(见图 1b 箭头所指);在照射 5d 后,肝脏大体形态较正常颜色稍红,大体肝脏颜色未见明显变化,可见肝脏细胞肿胀明显(见图 1c 箭头所指);在照射后 10d,肉眼可见肝脏明显暗红,光镜下可见肝脏细胞水肿,甚至可见明显脂肪

空泡(见图 1d 箭头所指)。由图可见随着照射后时间的延长,肝脏损伤逐渐加重。

2.2 肝脏组织电镜下的变化

大鼠肝脏组织电镜下的观察可见,滑面内质网扩张成大的囊泡状,其他正常(图 2a);肝细胞轻度水肿,基质密度降低,滑面内质网增生,肝细胞间可

见胶原纤维。部分线粒体可见损伤后轻度水肿(图 2b);肝细胞肿胀,滑面内质网增生(图 2c);肝细胞水肿明显,细胞基质密度降低,线粒体肿胀,线粒体基质密度降低,嵴排列松散(图 2d)。电镜下肝损伤的程度随时间的延长,损伤程度呈逐渐加深趋势。

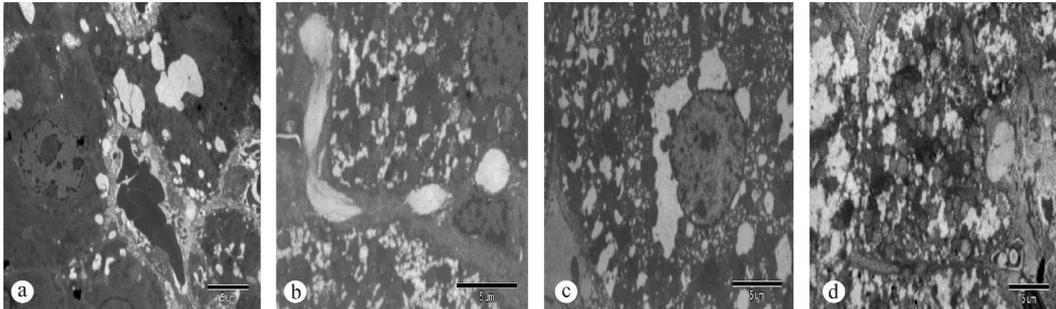


注:a. 正常肝脏对照组; b. 照射后 3 d; c. 照射后 5 d; d. 照射后 10 d。模型组未见肝脏组织损伤,在观察范围内,光镜下观察模型组与对照组无明显差别。

图 1 光镜观察放射性肝损伤大鼠肝脏组织变化($\times 200$)

Note. a. A normal rat; b. A rat at 3 days after irradiation; c. A rat at 5 days after irradiation; d. A rat at 10 days after irradiation. No significant difference is seen between the samples.

Fig. 1 Histological appearance of liver tissues of rats with radiation-induced liver injury ($\times 200$)



注:a. 正常肝脏对照组; b. 照射后 3 d, 可见肝细胞轻度水肿,基质密度降低; c. 照射后 5 d, 可见肝细胞肿胀,滑面内质网增生; d. 照射后 10 d, 肝细胞明显肿胀,线粒体普遍水肿,线粒体嵴排列松散。可见随照射后观察时间的延长,肝损伤程度逐渐加重。

图 2 电镜观察放射性肝损伤大鼠肝脏组织变化($\times 200$)

Note. a. A normal rat liver. b. A rat liver at 3 days after irradiation; c. A rat liver at 5 days after irradiation; d. A rat liver at 10 days after irradiation. The hepatocyte swelling and mitochondrial damages are progressing along with the time prolongation.

Fig. 2 Ultrastructural changes of the radiation-induced liver injury in the rats ($\times 200$)

2.3 血清学检测

利用血清学检测肝功能 ALT、AST、ALP 指标,分别在单次 25Gy 剂量外照射后不同时间点取血,即在照射后的 3、5、10 d 模型组大鼠的肝功能较正常对照组无明显变化,差异无显著性($P > 0.05$);用 ELISA 检测血清 TGF- $\beta 1$ 值,正常对照组中 TGF- $\beta 1$ 呈较模型组低表达,照射后 3、5、10d 的 TGF- $\beta 1$ 的表达值较正常对照组呈明显增高,即随观察时间的延长,血清中 TGF- $\beta 1$ 的表达逐渐增

强,且多组两两比较($P < 0.05$)说明差异有显著性(见表 1)。

3 讨论

Berthrong 等^[7]认为肝脏急性损伤效应(又称急性放射性肝炎)的主要病理学特征表现为肝小叶中央静脉闭塞性损伤(venous occlusive disease, VOD),在国内彭瑞云等^[8]通过大鼠模型动态观察肝脏照射后的病理组织改变,曾提出可分为四期:急

表 1 25 Gy 照射后血清 ALT、AST、ALP 值及 TGF- β 1 值($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)Tab. 1 Changes of serum ALT, AST, ALP and TGF- β 1 of the rats at different time points after 25 Gy X-ray irradiation

组别 Groups	血清肝功能			TGF- β 1 值
	ALT	AST	ALP	
对照组 Control	96.26 \pm 6.44	47.22 \pm 13.92	220.88 \pm 49.80	22732.2 \pm 5507.90
照射后 3 d (3 d after irradiation)	97.10 \pm 8.40	40.06 \pm 8.65	161.06 \pm 51.32	42075.06 \pm 10449.41 *
照射后 5 d (5 d after irradiation)	98.76 \pm 14.96	37.66 \pm 5.69	161.3 \pm 23.96	65186.59 \pm 9342.61 **
照射后 10 d (10 d after irradiation)	84.56 \pm 14.60	63.13 \pm 47.49	172.5 \pm 51.45	104567.62 \pm 13005.86 ** Δ
F 值 F value	0.32	0.88	1.58	37.53
P 值 P value	0.80	0.47	0.25	0.00

注:与对照组(0天)相比,模型组照射后3、5、10 d的肝功能指标ALT、AST、ALP分别进行多组比较后, $P > 0.05$ 说明各组数值变化差异无显著性。*与对照组(0天)相比, $P < 0.05$;#与3天模型组相比, $P < 0.05$; Δ 与5天模型组相比, $P < 0.05$,不用时间点的模型组与对照组比较($P < 0.05$)差异有显著性,多组两两比较($P < 0.05$)说明差异有显著性,即随观察时间的延长,血清中TGF- β 1的表达逐渐增强。

Note. Compared with the control group (0 days), the values of liver function parameters are not significantly changed in the rats after X-ray irradiation ($P > 0.05$). * $P < 0.05$, compared with the control group (0 days); # $P < 0.05$, compared with the model group at 3 days after irradiation; $\Delta P < 0.05$, compared with the model group at 5 days after irradiation. The expression of serum TGF- β 1 is increasing along with the time prolongation.

性放射性肝炎期、肝纤维化前期、肝纤维化期、肝硬化期。肝脏损伤急性期表现为肝细胞变性、中央静脉及肝窦充血扩张,而放射性肝损伤晚期则会向肝纤维化、肝硬化转归。本研究中,大鼠在单次剂量25 Gy照射后光镜下观察虽无病理形态异常,但从模型组中随机抽取一只大鼠进行的肝脏透射检查中发现,模型组大鼠的肝脏照射区已经出现了肝细胞水肿明显,细胞基质密度降低,线粒体普遍肿胀等肝脏损伤形态,正常对照组大鼠肝脏未见病理学改变,由电镜图(图2)已可见,模型组中随观察时间延长,肝脏损伤程度逐渐加重。这与沈钧康等^[9]研究结果一致,由此说明,在放射性肝损伤早期,电镜下超微结构变化能更早体现肝脏在辐射诱导后的损伤表现,从而能及早的防治放射性肝损伤的进展。

Anscher等^[10]报道了TGF- β 1蛋白水平在迟发型放射性肝损伤组织中显著高表达,临床前期及临床研究也都显示了TGF- β 1水平和放射诱导的纤维化密切相关。国内学者曾昭冲等^[11]首次应用AdT β RII Fc拮抗TGF- β 信号通路阻止大鼠肝脏放射性纤维化,也证实了TGF- β 是炎症损伤的关键因子这一观点。本实验中照射后大鼠血清中TGF- β 1水平随时间增加逐渐升高,各组之间相比较差异有显著性($P < 0.05$),与此同时,相同的时间点血清检测的模型组大鼠肝功与正常对照组大鼠的相比较,差异无显著性($P > 0.05$),由此说明在放射性肝损伤早期血清学检测TGF- β 1较肝功能更加敏感反映出照射后肝脏的损伤状态,可作为预测放射性肝损伤程度的血清细胞因子。

肝损伤属于放射治疗后的早期可逆病变^[12],及时的发现对于后期的治疗并预防并发症显得非常关键。本实验用单次剂量25 Gy右半肝照射SD大鼠,电镜下观察肝脏病理学改变早于光镜下的变化,可用

于早期放射性肝损伤的防治与评价;TGF- β 1较肝功能更加敏感反映出照射后肝脏的损伤状态,有望作为预测急性放射性肝损伤程度的血清细胞因子,从而为放射性肝损伤的防治及后期的临床研究提供一定的思路。

参 考 文 献

- [1] Whang-Peng J, Cheng AN, Hsu C, et al. Clinical development and future direction for the treatment of hepatocellular carcinoma [J]. J Exp Clin Med. 2010, 2(3): 93-103.
- [2] 赵增虎, 刘俊堂, 范青建. 放射性肝损伤研究及防治进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2011, 19(10): 2110-2113
- [3] Fickert P, Stoger U, Fuchsichler A, et al. A new xenobiotic-induced mouse model of sclerosing cholangitis and biliary fibrosis [J]. Am J Pathol, 2007, 171(2): 525-536.
- [4] 布秀娟. 肝损伤动物模型制作研究进展 [J]. 中国医药报. 2014, 11(12): 166-168.
- [5] 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见 [S]. 2006-09-30.
- [6] 包永星, 姜繁, 赵化荣, 等. 骨髓间充质干细胞对大鼠急性放射性肝损伤修复的研究 [J]. 中华放射医学与防护杂志, 2010, 30(1): 22-25.
- [7] Berthrong M, Fajardo LF. Radiation injury in surgical pathology: Part II. Alimentary tract. [J]. Am J Surg Pathol, 1981, 5(2): 153.
- [8] 彭瑞云, 王德文, 徐在海, 等. 放射性肝纤维化过程的动态观察 [J]. 中华放射医学与防护杂志, 1994, 14(4): 243-245.
- [9] 沈钧康, 蒋震, 张彩元, 等. 放射性肝损伤早期超微结构变化的初步观察 [J]. 江苏医药, 2004, 30(12): 922-923.
- [10] Anscher MS, Crocker IR, Jirtle RL. Transforming growth factor-beta 1 expression in irradiated liver [J]. Radiat Res 1990, 122(1): 77-85.
- [11] Du SS, Qiang M, Zeng ZC, et al. Radiation-induced liver fibrosis is mitigated by gene therapy inhibiting transforming growth factor- β signaling in the rat [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2010, 78(5): 1513-1523.
- [12] 王丽春, 赵连三. 肝纤维化的实验动物模型 [J]. 中国实验动物学报. 2014, 12(4): 246-249.