

基于 mTOR/HIF-1 α /VEGF 通路研究红芪多糖防治放射性肺损伤的作用机制

王 强¹, 王 艺¹, 张 莉¹, 尚 芸¹, 李亮亮¹, 杜 彬¹, 李 爽¹, 蔺兴遥^{1,2*}

1. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000

2. 敦煌医学与转化教育部重点实验室, 甘肃 兰州 730000

摘要:目的 研究红芪多糖对放射性肺损伤(radiation-induced lung injury, RILI)的防治作用及其机制。方法 雌性 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、模型组、红芪水煎液(5 g/kg)组及红芪多糖低、中、高剂量(15、30、60 mg/kg)组和吡非尼酮(200 mg/kg)组, 每组 8 只。对照组佯装辐照, 其余各组均采用单次 16 Gy 全肺 X 线辐照建立 RILI 模型。自造模前 7 d, 各给药组 ig 相应药物, 1 次/d, 连续 5 周。所有小鼠均在取材前 1 d 进行肺功能检测; 分别在造模前 1 d 及肺功能检测后进行 CT 影像学检测; 采用苏木素-伊红(HE)染色观察小鼠肺组织病理变化; 采用 ELISA 检测小鼠血清中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)水平; 采用 Western blotting 检测小鼠肺组织中哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)、缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及 TNF- α 蛋白表达。结果 与对照组比较, 模型组小鼠肺泡炎症明显, 肺功能受损, 肺部 CT 值升高($P < 0.01$), 血清中 TNF- α 及 IL-6 水平升高($P < 0.01$), 肺组织中 mTOR、HIF-1 α 、VEGF 及 TNF- α 蛋白表达上调($P < 0.01$)。与模型组比较, 红芪多糖组明显减轻小鼠肺泡炎症, 改善肺功能, 降低肺部 CT 值($P < 0.01$), 抑制血清中 TNF- α 及 IL-6 水平($P < 0.05$ 、0.01), 下调肺组织中 mTOR、HIF-1 α 、VEGF 及 TNF- α 蛋白表达($P < 0.05$ 、0.01)。结论 红芪多糖能够减轻小鼠 RILI 前期炎症的损伤, 其机制可能与抑制 mTOR/HIF-1 α /VEGF 信号通路有关。

关键词: 红芪多糖; 放射性肺损伤; 肺功能; 炎症; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白/缺氧诱导因子-1 α /血管内皮生长因子信号通路
中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)21-6771-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.21.014

Mechanism of hedysarum polysaccharides on preventing and treating radiation-induced lung injury based on mTOR/HIF-1 α /VEGF signaling pathway

WANG Qiang¹, WANG Yi¹, ZHANG Li¹, SHANG Yun¹, LI Liang-liang¹, DU Xian-qin¹, LI Shuang¹, LIN Xing-yao^{1,2}

1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

2. Key Laboratory of Dunhuang Medicine, Ministry of Education, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To investigate the preventive effect and mechanism of hedysarum polysaccharides on radiation-induced lung injury (RILI). **Methods** Female C57BL/6J mice were randomly divided into control group, model group, *Hedysarum polybotrys* decoction (5 g/kg) group, hedysarum polysaccharides low-, medium-, high-dose (15, 30, 60 mg/kg) groups and pirfenidone (200 mg/kg) group, with eight mice in each group. Control group was feigned to be irradiated, other groups were accepted a single dose of 16 Gy X-ray irradiation to establish RILI model. Before 7 d of modeling, each administration group was ig corresponding drugs, once a day for five weeks. All mice were tested for pulmonary function at 1 d before sampling; CT imaging was performed before modeling and after pulmonary function test; Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes in lung tissue of mice; ELISA was used to detect levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in serum of mice; Western blotting was used to detect mammalian target of rapamycin (mTOR), hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), vascular endothelial growth factor (VEGF) and TNF- α protein expressions in lung tissue of mice. **Results** Compared with control group, model group showed significant alveolar inflammation, impaired pulmonary function, and lung CT value was increased ($P < 0.01$), TNF- α and IL-6 levels in serum were increased ($P < 0.01$), mTOR, HIF-1 α , VEGF and TNF- α protein expressions in lung tissue were up-regulated ($P < 0.01$).

收稿日期: 2022-07-16

基金项目: 甘肃省人才发展专项资金(40160401); 甘肃省中医药研究中心专项开放课题(zyzx-2020-zx19)

作者简介: 王 强, 硕士研究生, 研究方向为中西医结合防治肿瘤。E-mail: 1033618469@qq.com

*通信作者: 蔺兴遥, 硕士生导师, 教授, 从事中医药防治重大疾病基础与应用基础研究。E-mail: 878104134@qq.com

Compared with model group, hedysarum polysaccharides group reduced alveolar inflammation, improved pulmonary function, reduced lung CT value ($P < 0.01$), inhibited levels of TNF- α and IL-6 in serum ($P < 0.05, 0.01$), and down-regulated mTOR, HIF-1 α , VEGF and TNF- α protein expressions in lung tissues ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Hedysarum polysaccharides can effectively alleviate the inflammatory injury in early stage of RILI in mice, and its mechanism may be related to the inhibition of mTOR/HIF-1 α /VEGF signaling pathway.

Key words: hedysarum polysaccharides; radiation-induced lung injury; lung function; inflammation; mammalian target of rapamycin/hypoxia-inducible factor-1 α /vascular endothelial growth factor signaling pathway

放射性肺损伤 (radiation-induced lung injury, RILI) 包括前期放射性肺炎及后期放射性肺纤维化, 是胸部放疗最常见的剂量限制性并发症^[1]。由于 RILI 有许多促成因素和诊断环境, 其报告的发病率差异显著, 数据显示, RILI 发病率最高的是肺癌 (5%~25%), 其次是纵隔淋巴瘤 (5%~10%) 和乳腺癌 (1%~5%)^[2]。RILI 的发生不仅限制了放疗的最高剂量, 降低了肿瘤的控制率, 而且可导致呼吸困难等症状, 影响患者生活质量, 甚至后期可进展为呼吸衰竭, 威胁患者生命。目前 RILI 的发病机制尚未完全阐明, 国内外尚无针对 RILI 的特效药^[3]。吡非尼酮是美国胸科学会/欧洲呼吸学会/日本呼吸学会/拉丁美洲胸科学会 (ATS/ERS/JRS/ALAT) 2022 年更新的临床实践指南中, 推荐用于治疗特发性肺纤维化的药物之一, 具有抗炎、抗氧化和抗纤维化等特性^[4-6], 可用于治疗 RILI。然而, 长期应用吡非尼酮可能会使患者出现胃肠道症状、皮肤不良反应以及肝功能损伤等不良反应, 在美国的一项 III 期临床试验中, 14.4% 的患者因为其不良反应不得不停止用药^[7]。近年来, 中医药在干预 RILI 的发生发展上取得了较好的疗效^[8-9], 因此, 研究中医药防治 RILI 并探索其作用机制具有重要临床意义。

红芪多糖是甘肃省道地药材红芪 *Hedysarum polybotrys* Hand.-Mazz. 中提取出的主要活性物质, 具有抗炎、抗氧化、机体保护、免疫调节等多种药理作用^[10-14]。此外, 文献报道红芪多糖对内毒素诱导的急性肺损伤具有保护作用^[15]。本课题组前期研究发现, 红芪多糖可以明显改善博来霉素诱导的肺间质纤维化^[16-17], 而红芪多糖是否可以改善 RILI 目前尚未见报道。基于此, 本研究建立 RILI 小鼠模型, 通过小鼠肺功能检测、CT 影像学检测、组织病理学检测等手段初步探讨红芪多糖对 RILI 的防治作用及机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雌性 C57BL/6J 小鼠 56 只, 6~8 周龄,

体质量 (20 \pm 2) g, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 实验动物质量合格证号 SCXK (京) 2019-0010, 实验动物设施使用证号 SYXK (甘) 2020-0009。动物饲养于甘肃中医药大学实验动物中心, 室温 (23 \pm 2) $^{\circ}$ C, 相对湿度 40%~52%, 12 h 光照/12 h 黑暗交替, 动物自由进食饮水。动物实验经甘肃中医药大学动物实验伦理委员会批准 (批准号 2021-241)。

1.2 药材

红芪饮片购自甘肃省陇南市安化镇, 经甘肃省药品检验研究院马潇主任药师鉴定为豆科植物多序岩黄芪 *H. polybotrys* Hand.-Mazz. 的干燥根, 符合《中国药典》2020 年版规定。

1.3 药品与试剂

吡非尼酮胶囊 (国药准字 H20133376, 批号 20210414) 购自北京康蒂尼药业股份有限公司; D-无水葡萄糖 (质量分数 $\geq 98\%$, 批号 B21882) 购自上海源叶生物科技有限公司; 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒 (批号 2111M33)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒 (批号 2111M25) 购自江苏菲亚生物科技有限公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 B1501)、TNF- α 抗体 (批号 B7201)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 抗体 (批号 N1301)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (批号 B0201) 均购自美国 Immunoway 公司; 缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 抗体 (批号 GR3368586-5) 购自英国 Abcam 公司; 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 抗体 (批号 No.43866) 购自美国 GeneTex 公司。

1.4 仪器

MF-RO-10 型实验动物饮用水处理器 (杭州永洁达净化科技有限公司); X-RAD225 型生物辐照仪 (美国 Precision X-ray 公司); Inliew-3000B 型动物

PET/SPECT/CT (北京永新医疗设备有限公司); WPBPLT-UNR-RT-2 型动物肺功能仪 (德国 EMKA 公司); SpectraMax i3x 型多功能酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); UV-power 型紫外可见分光光度计 (北京瑞利分析仪器有限公司); SCIENTZ-48 型高通量组织研磨器 (宁波新芝生物科技股份有限公司); WD-9405F 型脱色摇床、DYY-60 型电泳仪 (北京六一生物科技股份有限公司); SFC-182 型生物显微镜 (麦克奥迪实业集团有限公司)。

2 方法

2.1 药物制备

2.1.1 红芪水煎液制备 红芪饮片加入 8 倍量纯水浸泡 6 h 后, 煎煮 1.5 h, 滤过, 再加入 6 倍量纯水煎煮 1.5 h, 合并 2 次滤液, 浓缩得红芪水煎液。

2.1.2 红芪多糖提取纯化 红芪水煎液离心取上清液, 进行 4 次醇沉 (分别加入无水乙醇使溶液乙醇体积分数达到 70%、80%、80% 及 90%), 每次醇沉后静置 24 h, 取沉淀加入纯水溶解, 离心, 取上清液进行下一次醇沉。90% 乙醇醇沉后滤过取沉淀, 用无水乙醇洗 3 遍, 50 °C 烘干后得红芪粗多糖。将红芪粗多糖用纯水配制为 15 mg/mL 多糖溶液, 加入 10% 三氯乙酸溶液 (多糖溶液与三氯乙酸溶液体积比为 4:1), 低温剧烈振荡 30 min, 离心, 取上清液, 加入 3 倍体积 95% 乙醇溶液醇沉, 滤过, 干燥后得红芪多糖, 1 kg 红芪饮片提取纯化得红芪多糖 6 g。

2.1.3 红芪多糖质量分数测定 以无水葡萄糖为标准品, 配制质量浓度分别为 0.024、0.035、0.047、0.059、0.071 mg/mL 的葡萄糖溶液, 苯酚硫酸法显色后通过紫外分光光度仪于 485 nm 处测得吸光度 (A) 值分别为 0.244、0.362、0.501、0.629、0.750, 以质量浓度为横坐标 (X), A 值为纵坐标 (Y) 进行回归分析, 得线性回归方程 $Y=10.808X-0.014$, $r=0.9997$ 。精密配制 0.042 mg/mL 红芪多糖溶液, 测得 A 值为 0.364, 代入回归方程得所提红芪多糖质量分数为 83.27%。

2.2 动物分组、模型制备及给药

将 56 只雌性 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、模型组、红芪水煎液 (5 g/kg) 组及红芪多糖低、中、高剂量 (15、30、60 mg/kg) 组和吡非尼酮 (200 mg/kg) 组, 每组 8 只。所有小鼠 ip 3% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉, 除对照组外, 其余各组小鼠均仰卧固定于动物台, 充分暴露肺部, 进行单次 16 Gy 全肺 X 线辐

照, 未照射部位用铅块屏蔽, 照射距离为 48 cm, 剂量率为 2 Gy/min, 照射时间 8 min; 对照组麻醉后佯装辐照。自造模前 7 d, 各给药组 ig 相应药物 (20 mL/kg), 对照组和模型组 ig 等体积 0.9% 氯化钠溶液, 1 次/d, 连续 5 周。

2.3 一般状况观察

观察小鼠毛发改变、精神状态、活动度等, 每周定时测量并记录小鼠体质量。于造模后 28 d 取材时测量肺组织质量并计算小鼠肺指数。

肺指数 = 肺质量 / 体质量

2.4 肺功能检测

于取材前 1 d 运用无约束全身体积描记仪对各组小鼠进行清醒状态下肺功能检测。将小鼠放入动物体积描记箱中, 待其呼吸状态平稳时记录肺功能指标, 包括吸气时间 (T_i)、呼气时间 (T_e)、潮气量 (T_V)、每分钟通气量 (MV)、吸气气流高峰 (PIF)、呼气气流高峰 (PEF)。

2.5 CT 检测

分别于造模 1 d 前及肺功能检测结束后, 对小鼠进行麻醉后 CT 检测。各组小鼠 ip 3% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉, 以俯卧位放置于小动物 PET/CT 床位, 勾选全肺进行 CT 扫描。采用 NMsoft-AIWS V1.7 图像处理软件将扫描结果断层重建后融合显示, 选用 3D 等值线限定 CT 值 $Min=-1000$ HU、 $Max=0$ 勾选全肺, 软件统计小鼠肺部平均 CT 值。

2.6 肺组织病理学检测

各组小鼠麻醉后, 股动脉取血, 脱颈椎处死, 取左肺, 以 10% 甲醛溶液固定, 经脱水、包埋、切片后, 进行苏木素-伊红 (HE) 染色。采用 Szapiel 法评价肺泡炎症程度^[18]: 无肺泡炎症, 记 0 分; 轻度肺泡炎, 肺泡间隔略微增宽, 其间有炎性细胞浸润, 病变面积小于全肺 20%, 记 1 分; 中度肺泡炎, 病变面积占全肺 20%~50%, 记 2 分; 重度肺泡炎, 病变面积占全肺 50% 以上, 记 3 分。

2.7 ELISA 检测血清中 TNF- α 和 IL-6 水平

各组小鼠全血常温静置 2 h 后, 4 °C、3000 r/min 离心 15 min, 分离血清。按照 ELISA 试剂盒说明书检测小鼠血清中 TNF- α 和 IL-6 水平。

2.8 Western blotting 检测肺组织中 TNF- α 、mTOR、VEGF 和 HIF-1 α 蛋白表达

取各组小鼠右肺组织, 加入蛋白裂解液, 低温匀浆裂解, 用高通量组织研磨器 (70 Hz) 充分研磨肺组织, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 分离上清

液。用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度，上清液加入蛋白上样缓冲液，沸水浴 10 min，蛋白样品于 -20 °C 保存备用。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h 后，以 TBST 洗涤 3 次，分别加入相应抗体，4 °C 孵育过夜；TBST 洗涤 3 次，加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体，室温孵育 2 h，TBST 洗涤后，均匀滴加 ECL 试剂，暗室曝光，用 Image J 1.48V 图像处理软件分析条带灰度值。

2.9 统计分析

实验数据均采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析，计量数据中符合正态分布的以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较进行单因素方差分析 (One-way ANOVA)，方差齐时多重比较采用 LSD 法检验，方差不齐时采用 Tamhane's T_2 法检验。

3 结果

3.1 一般状况观察

3.1.1 小鼠生存状况

如图 1 所示，对照组小鼠

在实验过程中动作敏捷、精神良好、皮毛光泽。其余各组小鼠在辐照后均出现不同程度的动作减缓、精神萎靡。各给药组小鼠在辐照后 7 d 左右动作、精神状态逐渐恢复，模型组及吡非尼酮组小鼠恢复较慢。小鼠在辐照后 21 d 左右出现辐照部位毛发脱落。

3.1.2 小鼠体质量变化

如图 2 所示，辐照后，除对照组小鼠体质量平缓上升外，其余各组小鼠体质量均在 7 d 内呈下降趋势，7 d 后小鼠体质量开始逐渐恢复并上升。其中，模型组及吡非尼酮组上升最慢，红芪多糖高剂量组上升最快。7~21 d，与对照组比较，模型组小鼠体质量显著降低 ($P < 0.01$)。14 d 时，与模型组比较，红芪多糖中、高剂量组小鼠体质量显著增加 ($P < 0.05, 0.01$)。21 d 时，除吡非尼酮组外，其余各给药组小鼠体质量均高于模型组 ($P < 0.01$)。

3.2 肺组织病理学观察

如图 3 所示，对照组小鼠肺组织无明显病理学

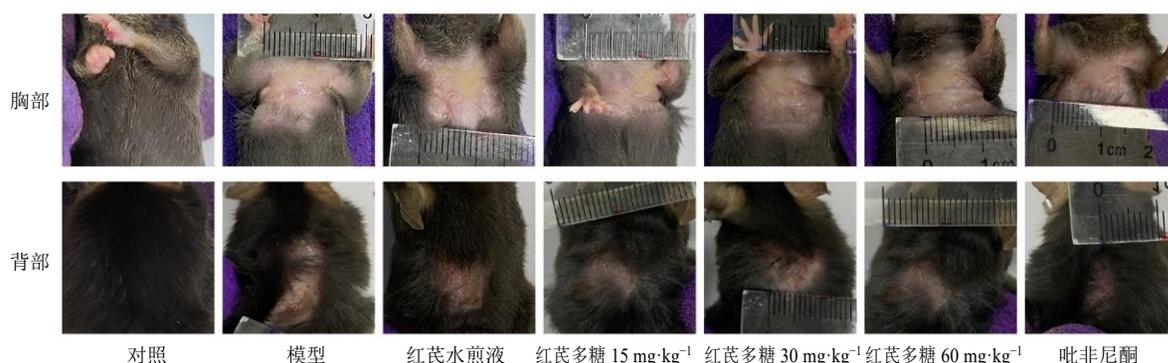
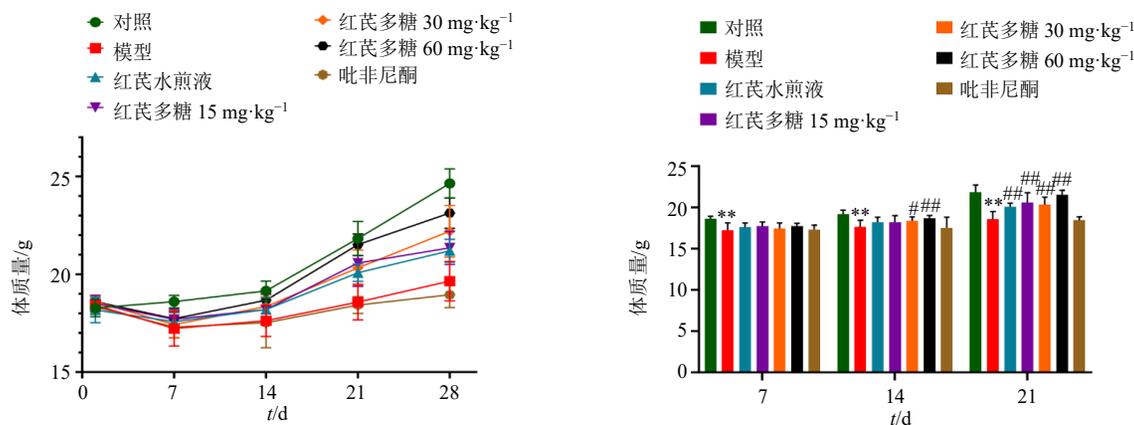


图 1 辐照后 21 d 各组小鼠脱毛情况

Fig. 1 Depilation of mice in each group at 21 d after irradiation



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 下图同
 ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as below figures

图 2 辐照后各组小鼠体质量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Body weight changes of mice in each group after irradiation ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

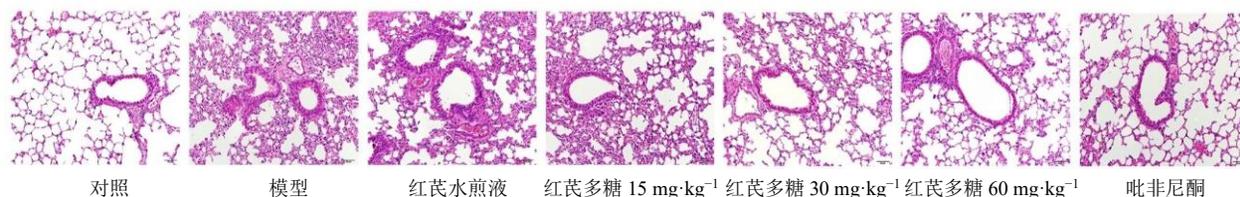


图 3 红芪多糖对 RILI 小鼠肺组织病理变化的影响 (HE, ×200)

Fig. 3 Effect of hedysarum polysaccharides on pathological changes in lung tissue of RILI mice (HE, ×200)

改变, 结构清晰, 轮廓完整。模型组小鼠肺组织破坏严重, 可见支气管上皮细胞坏死脱落, 肺泡间隔明显增宽, 肺间质有大量炎性细胞浸润, 血管肌层增厚, 周围水肿。与模型组比较, 各给药组均能在一定程度减轻小鼠肺组织炎症反应, 其中红芪多糖中、高剂量组及吡非尼酮组效果较为明显。

如表 1 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肺指

表 1 各组小鼠肺指数和肺泡炎评分 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Lung coefficients and alveolitis score of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肺指数	肺泡炎评分
对照	—	0.64 ± 0.03	0
模型	—	0.93 ± 0.07**	2.3 ± 0.7**
红芪水煎液	5000	0.89 ± 0.06	2.0 ± 0.5
红芪多糖	15	0.79 ± 0.05 [#]	1.9 ± 0.6
	30	0.79 ± 0.04 [#]	1.6 ± 0.5 [#]
	60	0.74 ± 0.06 [#]	1.1 ± 0.6 [#]
吡非尼酮	200	0.72 ± 0.04 [#]	0.9 ± 0.6 [#]

与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$, 下表同

** $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group, same as below tables

表 2 各组小鼠肺功能指标及 CT 值 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Pulmonary function index and CT value of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Ti/msec	TE/msec	PIF/(mL·s ⁻¹)	MV/mL
对照	—	53 ± 4	122 ± 9	7.6 ± 0.6	114 ± 9
模型	—	110 ± 7**	283 ± 20**	4.8 ± 0.5**	56 ± 7**
红芪水煎液	5000	105 ± 8	271 ± 18	5.0 ± 0.7	64 ± 10
红芪多糖	15	97 ± 8 [#]	259 ± 16 [#]	5.2 ± 0.6	72 ± 8 [#]
	30	85 ± 9 [#]	211 ± 30 ^{##}	5.3 ± 0.3	79 ± 10 ^{##}
	60	76 ± 7 [#]	204 ± 31 ^{##}	5.3 ± 0.8	86 ± 7 ^{##}
吡非尼酮	200	82 ± 11 [#]	210 ± 28 ^{##}	5.5 ± 0.5 [#]	88 ± 10 ^{##}

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	PEF/(mL·s ⁻¹)	TV/mL	辐照前 CT 值/HU	辐照后 CT 值/HU
对照	—	5.33 ± 0.19	0.38 ± 0.03	-331 ± 17	-343 ± 14
模型	—	3.26 ± 0.69**	0.20 ± 0.03**	-321 ± 15	-261 ± 9**
红芪水煎液	5000	3.26 ± 0.56	0.20 ± 0.02	-328 ± 20	-259 ± 11
红芪多糖	15	3.55 ± 0.27	0.22 ± 0.03	-319 ± 13	-261 ± 9
	30	3.91 ± 0.32 [#]	0.28 ± 0.03 ^{##}	-323 ± 21	-264 ± 8
	60	4.00 ± 0.53 ^{##}	0.26 ± 0.04 ^{##}	-321 ± 12	-278 ± 10 ^{##}
吡非尼酮	200	4.18 ± 0.77 ^{##}	0.29 ± 0.04 ^{##}	-318 ± 13	-284 ± 8 ^{##}

数和肺泡炎评分显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 红芪多糖低、中、高剂量组及吡非尼酮组小鼠肺指数显著降低 ($P < 0.01$), 吡非尼酮组和红芪多糖中、高剂量组小鼠肺泡炎评分显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。

3.3 小鼠肺功能检测

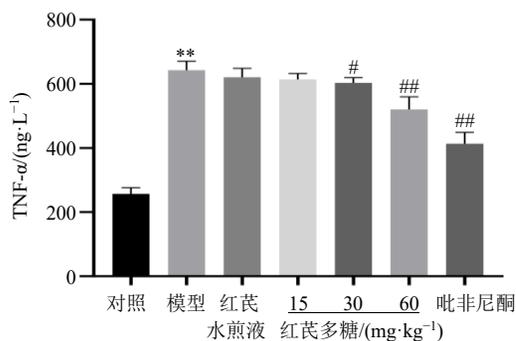
于辐照后 27 d 对小鼠进行清醒状态下肺功能检测, 如表 2 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠 Ti、TE 显著升高 ($P < 0.01$), PIF、PEF、TV 及 MV 显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 红芪多糖低、中、高剂量组及吡非尼酮组小鼠 Ti、TE 均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), MV 显著升高 ($P < 0.01$); 红芪多糖中、高剂量组及吡非尼酮组 TV 及 PEF 显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)。

3.4 小鼠肺组织 CT 值变化

如表 2 所示, 辐照前各组之间小鼠肺部 CT 值无明显差异。辐照后 27 d, 与对照组比较, 模型组小鼠肺部 CT 值升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 红芪多糖高剂量组及吡非尼酮组小鼠肺部 CT 值显著降低 ($P < 0.01$)。

3.5 血清中 TNF-α 和 IL-6 水平

如图 4 所示, 与对照组比较, 辐照 28 d 后模型组小鼠血清中 TNF-α 和 IL-6 水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 红芪多糖中、高剂量组及吡非尼酮组小鼠血清中 TNF-α 和 IL-6 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。



3.6 肺组织中 TNF-α、mTOR、VEGF 和 HIF-1α 蛋白表达

如图 5 所示, 与对照组比较, 辐照 28 d 后模型组小鼠肺组织中 TNF-α、mTOR、VEGF 及 HIF-1α 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 红芪多糖中、高剂量组及吡非尼酮组肺组织中

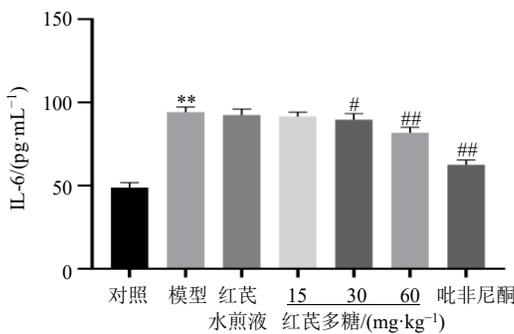


图 4 红芪多糖对 RILI 小鼠血清中 TNF-α 及 IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 4 Effect of hedysarum polysaccharides on levels of TNF-α and IL-6 in serum of RILI mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

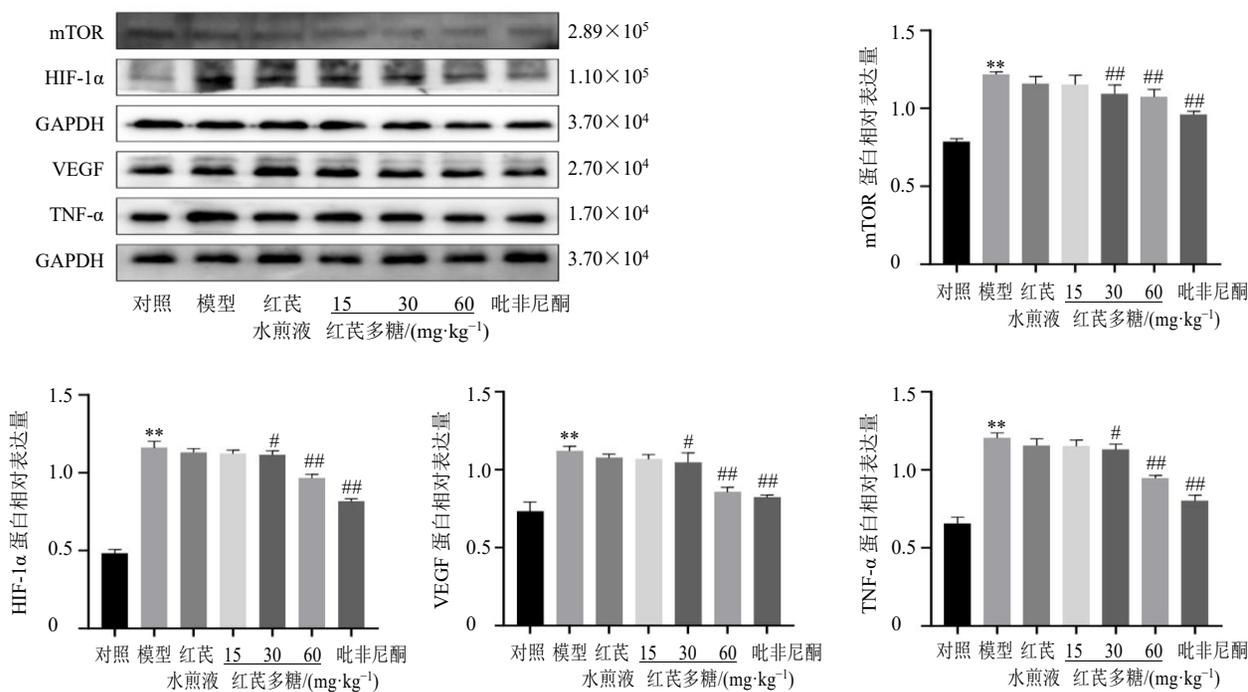


图 5 红芪多糖对 RILI 小鼠肺组织中 mTOR、HIF-1α、VEGF 和 TNF-α 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 5 Effect of hedystilbene polysaccharide on mTOR, HIF-1α, VEGF and TNF-α protein expressions in lung tissue of RILI mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

TNF-α、mTOR、VEGF 及 HIF-1α 蛋白表达均水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

4 讨论

RILI 从临床上主要分为炎症期和纤维化期, 炎症期常发生于 1~3 个月, 纤维化期常发生于 6~24 个月, 而从分子水平观察, RILI 则是一个连续进展

的过程。肺部辐照产生大量的活性氧和活性氮, 氧化损伤 DNA、脂质和蛋白质, 从而导致肺泡上皮细胞和血管内皮细胞的损伤或凋亡。随后, 许多炎性细胞被募集到损伤部位, 并分泌大量细胞因子, 进而产生一系列细胞因子级联反应, 介导炎症反应及后期的纤维化^[19]。由于肺纤维化的不可逆性及难治

性,在肺炎时期采取积极的干预措施对防治 RILI 具有重要意义。

组织病理学、肺功能及 CT 影像学检测在诊断 RILI 中发挥重要作用,可有效评价 RILI 程度及发展阶段^[20]。本研究根据文献调研及前期预实验结果综合分析,最终采用单次 16 Gy 全肺 X 线辐照建立 RILI 模型,于辐照后 28 d 取材。肺组织 HE 染色结果显示,模型组小鼠肺组织结构破坏严重,炎性细胞浸润明显;肺功能及 CT 检测结果显示,模型组小鼠肺功能明显受损,肺部 CT 值显著升高;而给予红芪多糖后可减少小鼠肺组织炎症细胞浸润,改善肺功能各项指标,降低肺部 CT 值。在肺功能检测结果中,红芪多糖组小鼠 PIF 虽较模型组有所提高,但差异不具统计学意义,可能是由于小鼠并没有自主用力吸气意识导致结果并不完全准确。RILI 前期炎症 CT 影像学表现在动物模型中并不明显,可表现为均匀的斑片状、小结节状磨玻璃影或实变影等,在后期纤维化时可出现条状、带状纤维条索影等^[21]。由于本研究只进行到辐照后 28 d,小鼠尚未出现明显的肺纤维化,故通过比较各组间辐照前后 CT 值来统计分析 CT 结果。肺部 CT 值是 X 线辐照衰减在 CT 图像上的量化指标,能客观地评价肺组织密度,反映肺组织损伤程度,可应用于辅助诊断 RILI^[22]。以上结果表明 RILI 小鼠模型成功建立且红芪多糖对 RILI 具有一定保护作用。

在肺部辐照早期, TNF- α 、IL-6 等细胞因子的过度表达对 RILI 的发生发展起到了重要作用。TNF- α 是 RILI 炎症阶段的启动因子,通过诱导黏附分子的表达,招募炎性细胞到组织损伤部位,启动炎性细胞产生氧化物,从而发挥促炎作用^[23]。IL-6 是下丘脑-垂体-肾上腺轴的内源性调节因子,在炎症过程中的免疫-神经内分泌调节中发挥重要作用^[24]。临床研究亦显示,循环 IL-6 早期变化可作为预测放射性肺炎的指标^[25]。因此,检测小鼠血清中 TNF- α 和 IL-6 水平可在一定程度反映 RILI 前期肺炎损伤情况,且在初始阶段对 TNF- α 和 IL-6 进行药理调控可能会阻止 RILI 的进展。本研究发现模型组小鼠辐照后血清中 TNF- α 及 IL-6 水平显著升高,而红芪多糖可下调 TNF- α 及 IL-6 水平,提示红芪多糖减轻 RILI 前期炎症损伤可能与抑制 TNF- α 及 IL-6 的释放有关。

Fleckenstein 等^[26]研究发现, RILI 炎症期、纤维化期与组织缺氧有关。肺部辐照后几周内就会发生

血管损伤,如内皮细胞肿胀导致毛细血管狭窄和闭塞、较大血管内纤维蛋白栓的形成及内皮细胞增生等,从而导致组织缺氧^[27]。而在缺氧条件下, HIF-1 α 激活 VEGF 过表达,从而促进血管内皮细胞增殖,诱导血管生成,增加血管通透性,导致肺高渗性水肿和毛细血管内皮细胞损伤,引起肺部炎症^[28-29]。mTOR 是 HIF-1 α 的上游基因, mTOR 激活可以使 HIF-1 α 入核,进而调控下游的 VEGF 表达,加重炎症损伤^[30]。本研究结果显示,辐照后小鼠肺组织 mTOR 蛋白表达显著增加,并伴随着 HIF-1 α 、VEGF 及 TNF- α 上调;而红芪多糖可以降低小鼠肺组织中 mTOR、HIF-1 α 、VEGF 及 TNF- α 蛋白表达,表明红芪多糖改善 RILI 的作用可能与抑制 mTOR/HIF-1 α /VEGF 信号通路有关。

综上所述,红芪多糖有明显改善 RILI 炎症的作用,其机制可能与下调 mTOR/HIF-1 α /VEGF 信号通路从而抑制 TNF- α 和 IL-6 等炎症因子的释放有关。吡非尼酮改善 RILI 前期炎症的总体效果优于红芪多糖,但从体质量变化趋势分析,吡非尼酮组小鼠辐照后体质量下降明显且恢复较慢,考虑为吡非尼酮诱发小鼠出现胃肠道反应甚至肝损伤所致。而红芪多糖中、高剂量组对前期肺炎也有较好的治疗作用,且辐照后体质量均快速回升,并未出现不良反应。由此可以考虑为红芪多糖的毒副作用低于吡非尼酮,需要进一步深入研究。本研究只进行到辐照后 28 d,病理上处于放射性肺炎阶段,关于红芪多糖对 RILI 后期肺纤维化阶段的作用效果及机制有待后续探索研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Madani I, de Ruyck K, Goeminne H, *et al.* Predicting risk of radiation-induced lung injury [J]. *J Thorac Oncol*, 2007, 2(9): 864-874.
- [2] Hanania AN, Mainwaring W, Ghebre Y T, *et al.* Radiation-induced lung injury: Assessment and management [J]. *Chest*, 2019, 156(1): 150-162.
- [3] Xia C C, Shi W Y, Zhang Y Y, *et al.* Prevention and treatment of radiation-induced lung injury [J]. *Future Med Chem*, 2020, 12(23): 2161-2173.
- [4] Raghu G, Remy-Jardin M, Richeldi L, *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis (an update) and progressive pulmonary fibrosis in adults: An official ATS/ERS/JRS/ALAT clinical practice guideline [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2022, 205(9): e18-e47.

- [5] Lopez-de la Mora D A, Sanchez-Roque C, Montoya-Buelna M, *et al.* Role and new insights of pirfenidone in fibrotic diseases [J]. *Int J Med Sci*, 2015, 12(11): 840-847.
- [6] 胡朝阳, 张小红, 常瑞, 等. 汉防己甲素片联合吡非尼酮治疗肺间质纤维化的临床研究 [J]. *现代药物与临床*, 2020, 35(4): 739-743.
- [7] King T E Jr, Jr B, Castro-Bernardini S, *et al.* A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(22): 2083-2092.
- [8] 张彦伟, 张志强, 吴丽贤, 等. 雷公藤内酯醇减少放射性肺纤维化中肌成纤维细胞活化与抑制 TGF- β 1/ERK/Smad3 通路相关 [J]. *中国药理学通报*, 2017, 33(5): 630-636.
- [9] 刘炜, 骆新, 沈静. 补肺汤通过 TGF- β /Smad3 信号通路抑制小鼠肺纤维化的研究 [J]. *医药导报*, 2020, 39(6): 747-752.
- [10] 张炎, 周尚儒, 燕玉奎, 等. 红芪杂多糖及其透明质酸水凝胶对大鼠骨关节炎的治疗作用 [J]. *免疫学杂志*, 2019, 35(1): 65-70.
- [11] Zhao L G, Chen T Q, Feng D M, *et al.* Structural characterization and antioxidant activity of a heteropolysaccharide isolated from *Hedysarum polybotrys* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2014, 16(6): 677-684.
- [12] 杨杰, 卫东锋, 李晓东, 等. 红芪多糖对脑微血管内皮细胞氧化损伤保护作用的差异蛋白质研究 [J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(2): 113-118.
- [13] 颜春鲁, 李钦, 姚贞宇, 等. 红芪多糖对免疫抑制大鼠免疫功能与细胞因子的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2017, 33(13): 1233-1236.
- [14] 赵良功, 方瑶瑶, 刘小花, 等. 红芪多糖对骨髓间充质干细胞和成骨细胞的影响 [J]. *中草药*, 2021, 52(2): 432-436.
- [15] 耿广琴, 谢晓蓉, 王雅莉, 等. 红芪总多糖对急性肺损伤小鼠细胞因子及抗氧化功能的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2017, 33(15): 1443-1446.
- [16] 苏韫, 张毅, 李娟, 等. 红芪有效部位对肺间质纤维化模型大鼠肺组织胶原面积、透明质酸及层黏连蛋白的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2016, 23(4): 72-76.
- [17] 王艺, 张毅, 李娟, 等. 红芪多糖、红芪黄酮和红芪皂苷抗博来霉素致大鼠肺间质纤维化的作用 [J]. *中成药*, 2022, 44(2): 573-578.
- [18] Szapiel S V, Elson N A, Fulmer J D, *et al.* Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1979, 120(4): 893-899.
- [19] Huang Y J, Zhang W Q, Yu F R, *et al.* The cellular and molecular mechanism of radiation-induced lung injury [J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 3446-3450.
- [20] 王绿化, 傅小龙, 陈明, 等. 放射性肺损伤的诊断及治疗 [J]. *中华放射肿瘤学杂志*, 2015, 24(1): 4-9.
- [21] 张安妮, 孙晶晶, 胡银琪. 放射性肺损伤影像学表现的研究进展 [J]. *肿瘤学杂志*, 2021, 27(3): 236-240.
- [22] Tao Q S, Zhu T, Ge X Q, *et al.* The application value of spiral CT lung densitometry software in the diagnosis of radiation-induced lung injury [J]. *Contrast Media Mol Imaging*, 2021, 2021: 9305508.
- [23] Rube C E, Wilfert F, Utte D, *et al.* Modulation of radiation-induced tumour necrosis factor α (TNF- α) expression in the lung tissue by pentoxifylline [J]. *Radiother Oncol*, 2002, 64(2): 177-187.
- [24] Dai C D, Imaki T, Suda T, *et al.* Involvement of corticotropin-releasing hormone- and interleukin (IL)-6-dependent proopiomelanocortin induction in the anterior pituitary during hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation by IL-1 α [J]. *Endocrinology*, 2005, 146(12): 5496-5502.
- [25] Arpin D, Perol D, Blay J Y, *et al.* Early variations of circulating interleukin-6 and interleukin-10 levels during thoracic radiotherapy are predictive for radiation pneumonitis [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(34): 8748-8756.
- [26] Fleckenstein K, Zgonjanin L, Chen L G, *et al.* Temporal onset of hypoxia and oxidative stress after pulmonary irradiation [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2007, 68(1): 196-204.
- [27] Yarnold J, Brotons M C V. Pathogenetic mechanisms in radiation fibrosis [J]. *Radiother Oncol*, 2010, 97(1): 149-161.
- [28] Zhang X J, Li J J, Li C F, *et al.* HSPA12B attenuates acute lung injury during endotoxemia in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 29(2): 599-606.
- [29] Lin F, Pan L H, Ruan L, *et al.* Differential expression of HIF-1 α , AQP-1, and VEGF under acute hypoxic conditions in the non-ventilated lung of a one-lung ventilation rat model [J]. *Life Sci*, 2015, 124: 50-55.
- [30] Hu Y, Liu J, Wu Y F, *et al.* mTOR and autophagy in regulation of acute lung injury: A review and perspective [J]. *Microbes Infect*, 2014, 16(9): 727-734.

[责任编辑 李亚楠]