网络出版时间: 2018-4-27 9:39 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180426.1411.012.html

## 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

刘 阳<sup>1</sup> 高世乐<sup>1</sup> 胡宗涛<sup>1</sup> 冯金柯<sup>1</sup> 高 杉<sup>2</sup>

摘要 目的 评估不同剂量单次照射构建大鼠放射性心脏 损伤模型的科学性、合理性、可行性。方法 40 只 SD 雄性 大鼠随机分为正常、5 Gy、10 Gy、20 Gy、30 Gy 组。直线加速 器下照射大鼠心脏,剂量率为600 cGy/min,源皮距为100 cm 照射野 2.0 cm × 2.0 cm。照射后 1 周末和 4 周末 ,各组 分别随机取4只大鼠,经右颈总动脉插管,测量血流动力学 指标 后检测大鼠血清中心肌肌钙蛋白 I(cTnI)含量 以及超 氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)活性;取心尖部组织 行 HE、Masson 染色。结果 照射后1 周 心脏血流动力学参 数变化不明显,而 cTnI、SOD、MDA 指标差异明显(P <0.05)。照射后4周5 Gy、10 Gy 组心功能参数较正常组无 明显变化 ,20 Gy 和 30 Gy 组心功能指标变化明显(P < 0.05),但两组间差别不大, cTnI、SOD、MDA 指标与正常组 比较差异有统计学意义(P<0.05)。HE 染色结果显示 A 周 末各剂量照射组有不同程度的病理学形态改变,Masson结 果显示心肌间质和小血管周围有不同程度胶原纤维沉积改 变。结论 在构建大鼠急性放射性心脏损伤模型时 不同剂 量照射有其各自的特征。大鼠心脏在 20 Gy 单次剂量照射 后,可较好观察到急性放射性心脏损伤的变化。氧化应激在 RIHD 的发生、发展中扮演重要角色。

关键词 放射性心脏损伤; 大鼠; 模型

中图分类号 R 73

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2018) 05 - 0716 - 06 doi: 10. 19405/j. cnki. issn1000 - 1492. 2018. 05. 012

2018 - 01 - 30 接收 基金项目: 南京军区面上项目(编号: 15 MS049) 作者单位: <sup>1</sup> 解放军第 105 医院肿瘤中心, 合肥 230031 <sup>2</sup> 安徽医科大学药理学教研室, 合肥 230032 作者简介: 刘 阳 ,男 ,硕士研究生; 胡宗涛, 男, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: huxuyan@ 163. com

放疗是恶性肿瘤的综合治疗不可或缺的组成部 分,食管癌、肺癌、乳腺癌、纵膈淋巴瘤等肿瘤组织在 接受放射治疗时 与肿瘤组织毗邻的心脏也将受到 不同剂量体积的照射 引起无或有临床症状的放射 性心脏损伤(radiation - induced heart disease RIHD)<sup>[1]</sup>。射线可破坏血管内皮细胞、微循环系统 损伤、继而使心肌出现缺血性改变、炎性细胞浸润、 局灶性或片状心肌纤维化 ,最终导致心脏结构和功 能损伤<sup>[2]</sup>。虽然因为放射治疗技术的提高等因素, 使心脏受照的剂量大大减少,但是射线造成的心脏 损伤仍然不容忽视<sup>[3]</sup>。RIHD 的各种并发症对肿瘤 患者的生活质量和生存期产生很大影响。目前临床 上对预防和治疗 RIHD 尚无明确的共识。因此如何 模拟临床构建 RIHD 物实验模型,揭示放射性心脏 损伤发生的可能机制,对防治 RIHD 有非常重要的 作用。为构建急性 RIHD 的实验动物模型,该实验 通过不同剂量单次照射大鼠心脏,通过不同指标来 评价所构建模型的科学性、可操作性,并探讨大鼠氧 化应激在 RIHD 中的作用,从而为下一步试验提供 科学、可行的动物模型。

1 材料与方法

 1.1 实验动物 清洁级 SD(Sprague Dawley) 雄性 大鼠 40 只 8~12 周 200~250 g ,购自常州卡文斯 实验动物有限公司。
 1.2 主要实验试到 古鼠》即即每天 户 (1)

1.2 土安头短试剂 大鼠儿	M肌钙蛋白 I( cardiac
troponin I ,cTnI) 试剂盒( 批号	号: 2016-11-01) 、超氧化
物歧化酶( superoxide dismut	ase , SOD) 试剂盒( 批
号:2016-11-01) \丙二醛( mal	ondialdehyde , MDA) 试
剂盒( 批号: 2016-11-01) 购自	南京建成生物工程研

Real Time PCR and Western blot. **Results** HemSCs were successfully isolated from IH by CD133 immunomagnetic beads separation technique. The result of oil red O staining showed that the number of red lipid droplets in PRN group was more and larger than that in control group. Real Time PCR and Western blot showed that the expression level of lipid-related index in PRN group was higher than that in control group significantly (P < 0.05). **Conclusion** PRN promotes the adipose differentiation of HemSCs , *in vitro* experiments.

Key words hemangioma stem cell; propranolol; adipose differentiation

究所; Masson 三色染色液(批号: 616011) 购自珠海 贝索(BASO) 生物技术有限公司。

1.3 主要仪器与设备 ELEKTA SYNERGY 直线加 速器(瑞典 ELEKTA 公司); DL-BD 动脉留置针(比 迪医疗器械上海有限公司); 510 型酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 15M 低速冷冻离心机 (长沙湘仪离心机仪器有限公司); PT-100S 生物血 压传感器(成都泰盟软件有限公司); DHG-9123A 型 电热恒温鼓风干燥箱(嘉兴中新医疗仪器有限公 司)。

1.4 实验方法

1.4.1 实验大鼠分组 40 只 SD 雄性大鼠随机分为5 组:正常、5 Gy、10 Gy、20 Gy、30 Gy 组。

1.4.2 照射方法 各照射组大鼠用 10% 水合氯醛 (0.3 ml/100 g) 腹腔麻醉后,四肢固定,直线加速器 下照射大鼠心脏,剂量率为 200 cGy/min,源皮距为 100 cm,照射野 2.0 cm × 2.0 cm,照射后室温下大鼠 自然苏醒,正常组大鼠只腹腔麻醉不做照射处理。

1.4.3 一般状况观察 动态观察大鼠的毛发、体重、精神状态。

1.4.4 大鼠血流动力学指标测定 于照射后 1、4 周末,各组随机取 4 只大鼠。10% 水合氯醛(0.3 ml/100 g) 腹腔注射麻醉,固定后,将动脉留置针沿 右侧颈总动脉,插入左心室中,后通过生物血压传感 器连接至生物机能实验系统。记录左室收缩压 (LVSP)、左室舒张末压(LVEDP)、室内压最大上升 速率(dp/dtmax)、室内压最大下降速率(-dp/dtmax)等指标。采集大鼠血样本置于 EP 管中 3 500 r/min、4 ℃条件下离心 10 min,取上清液,-80 ℃条 件下备用;处死大鼠后分离心脏组织,将心尖部组织 置于 10% 中性福尔马林溶液中固定备用。

1.4.5 大鼠血清中 cTnl 含量的测定 严格按照试 剂盒说明书准备,加入样品和标准品 37 ℃水浴锅 温育 60 min; 重复洗板 5 次; 将底物 A、B 各 50 μl 加入每孔中, 37 ℃避光孵育 15 min。每孔加入终止 液 50 μl, 15 min 内 在 450 nm 波长处测定各孔的光 密度(optical density ,OD) 值。

1.4.6 大鼠血清中 SOD 和 MDA 活性测定 严格 按照试剂盒说明书准备 按其说明书步骤进行。

1.4.7 大鼠心脏组织 HE 染色 心尖部组织常规 脱水、透明、包埋、切片 厚 5 μm ,HE 染色 ,中性树胶 封片。

1.4.8 大鼠心脏组织 Masson 染色 取心脏组织, 经常规石蜡包埋, 切片后脱蜡至水。Weigert 铁苏木

素(A液和B液等比例混合)染5~10 min,流水稍 洗。1%盐酸酒精分化,流水冲洗数分钟。丽春红酸 性品红染液染5~10 min,流水稍冲洗。磷钼酸溶液 处理约5 min,不用水洗,直接用苯胺蓝染液复染5 min。1%冰醋酸处理1 min 95%酒精脱水多次。无 水酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

**1.5** 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件对实验数 据进行分析 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组数据间比较采 用单因素方差分析(ANOVA)。P < 0.05表示差异 有统计学意义。

2 结果

2.1 一般状况 实验期间,正常组大鼠进食饮水正 常、毛发无脱落、精神尚可。各照射组大鼠有精神不 佳、饮食减少、体重增加减慢等表现,其中20Gy、30 Gy组较5Gy、10Gy组严重,并且30Gy组大鼠在实 验期间死亡1只,30Gy组部分大鼠实验期间可观 察到照射野区域毛发减少,皮肤破溃后结痂等。见 图1。



图 1 30 Gy 剂量照射组大鼠皮肤外观变化情况 A:照射区域毛发脱落; B:照射区域皮肤破溃后结痂

2.2 心脏血流动力学参数 照射后 1 周,与正常组 比较,各照射剂量组心脏血流动力学指标无明显变 化(*P*>0.05);照射后 4 周,与正常组比较 5 Gy、10 Gy 组心脏血流动力学指标无明显变化 20 Gy 和 30 Gy 组心脏血流动力学指标变化明显(*P*<0.05),两 组间变化不明显。见图 2、3。

2.3 血清 cTnI 含量 照射后 1 周 与正常组比较, 各照射组大鼠血清中 cTnI 含量明显升高(*P* < 0.05);组间比较 20 Gy 和 30 Gy 组 cTnI 含量都较 5 Gy 和 10 Gy 组明显升高(*P* < 0.05)。受照 4 周后, 与对照组比较,血清中 cTnI 含量明显升高(*P* < 0.05);各组间比较显示 cTnI 含量随剂量升高而升 高(*P* < 0.05)。见表1。

2.4 血清 SOD、MDA 活性 照射后 1 周,与正常 组相比,各剂量组 MDA 指含量显升高(*P* < 0.05); SOD 活性明显降低(*P* < 0.05)。照射后 4 周,与正 常组比较,各剂量组 SOD 指标明显降低、MDA 指标 明显升高(*P* < 0.05);组间比较显示:20 Gy 和 30 Gy 组 SOD 活性较 5 Gy 和 10 Gy 组明显升高(*P* < 0.05);MDA 含量随剂量升高而升高(*P* < 0.05)。 见表 2。

2.5 心脏 HE、Masson 染色

2.5.1 HE 染色 光学显微镜 100 倍视野下正常组 大鼠心肌细胞呈长条有序排列,胞质淡红色,核深蓝 色,心肌结构无明显损伤。受照1周后,与正常组比 较,各照射组大鼠心肌改变不明显;受照4周后,与 正常组比较,各照射组均有不同程度的细胞水肿、炎 性细胞浸润、以及部分心肌细胞断裂。见图4、5。 2.5.2 Masson 染色 可观察到心肌纤维呈红色, 胶原纤维呈淡蓝色,细胞核呈蓝黑色。照射后4周 后,光学显微镜 200 倍视野,可见较正常组增多的胶 原纤维主要分布于心肌细胞间质和血管周围。见图 6。

表1	1和4	周末大	鼠血清中	cTnI	含量(	$\bar{x} \pm s$
----	-----	-----	------	------	-----	-----------------

时间	正常组	5 Gy 组	10 Gy 组	20 Gy 组	30 Gy 组	F 值
1 周	$2.71 \pm 0.27$	$4.58 \pm 0.04^{\#*}$	$4.96 \pm 0.09^{\#*}$	$5.62 \pm 0.50^{\#}$	$6.05 \pm 0.43^{\#}$	63.40
4 周	$2.63 \pm 0.23$	$3.30 \pm 0.22^{\#*}$	$3.65 \pm 0.18^{\#*}$	$3.96 \pm 0.05^{\#}$	$4.34 \pm 0.11^{#*}$	54.78





表 2 1 和 4 周末大鼠皿清甲 SOD、MDA 沽性( $x \pm s$ )						
项目	正常组	5 Gy 组	10 Gy 组	20 Gy 组	30 Gy 组	F 值
SOD( U/ml)						
1 周	$190.52 \pm 9.65$	$151.29 \pm 14.94^{\#}$	$145.69 \pm 18.80^{\#}$	$123.28 \pm 9.65^{\#}$	$108.33 \pm 40.69^{\#}$	7.28
4 周	$196.97 \pm 14.72$	$161.45 \pm 22.69^{\#*}$	$155.75 \pm 9.80^{\#*}$	$127.26 \pm 12.98^{\#}$	$106.36 \pm 34.53^{\#}$	10.94
MDA( nmol/ml)						
1 周	$4.15 \pm 0.28$	$4.94 \pm 0.22^{#*}$	$5.63 \pm 0.14^{#*}$	$7.22 \pm 0.40^{\#}$	$8.42 \pm 0.14^{#*}$	184.00
4 周	$4.03 \pm 0.24$	$4.56 \pm 0.28^{\#*}$	$5.24 \pm 0.16^{#*}$	$6.85 \pm 0.21^{\#}$	$7.54 \pm 0.28^{\#*}$	152.70

与正常组比较: #P < 0.05; 与 20 Gy 组比较: \* P < 0.05

![](_page_3_Figure_3.jpeg)

图 3 4 周末大鼠心脏血流动力学参数变化

A:4 周末 LVSP; B:4 周末 LVEDP; C:4 周末 dp/dtmax; D:4 周末 – dp/dtmax; 与正常组比较: <sup>#</sup>P < 0.05; 与 20 Gy 组比较: <sup>\*</sup>P < 0.05

![](_page_3_Picture_6.jpeg)

图 4 1 周末大鼠心脏病理组织学变化 HE × 100 A: 正常组; B: 5 Gy 组; C: 10 Gy 组; D: 20 Gy 组; E: 30 Gy 组

![](_page_4_Picture_2.jpeg)

图 5 4 周末大鼠心脏病理组织学变化 HE×100 A: 正常组; B: 5 Gy 组; C: 10 Gy 组; D: 20 Gy 组; E: 30 Gy 组

![](_page_4_Figure_4.jpeg)

图 6 4 周末大鼠心脏病理组织学变化 Masson × 200 A: 正常组; B: 5 Gy 组; C: 10 Gy 组; D: 20 Gy 组; E: 30 Gy 组

3 讨论

有文献<sup>[4]</sup>报道,心脏在遭受 20 Gy 剂量单次照 射后即可产生不可逆性损伤,因此本实验通过观察 不同剂量照射构建模型造成不同损伤的特点,从而 为下一步试验提供科学、可行的动物模型。

在构建大鼠 RIHD 模型的实际操作过程中如何 较为简易地确定大鼠心脏在体表的位置,尽可能缩 小照射野的范围,对后续实验举足轻重。本研究随 机抽取小部分大鼠(5只)利用心脏超声,来估测大 鼠心脏在体表定位,大致为以大鼠两上肢水平连线 和胸正中线交点下2~3 cm 处为中心点,做2 cm ×2 cm 正方形。

在照射后早期,心脏自身具有一定程度抵抗外 界刺激的代偿机制,心脏收缩和舒张功能改变不明 显。然而照射后心脏损伤始终存在,随着观察时间 增加,收缩和舒张功能明显降低,并且和剂量呈正相 关性。文献<sup>[4]</sup>报道,构建急性 RIHD 模型时,小于 10 Gy 剂量的照射不会导致心脏功能的变化,大于 20 Gy 的照射剂量更为适合。随着实验时间节点的 进一步延长,低剂量组是否会出现心脏损伤,有待于 进一步实验证实。

作为晚反应组织的心脏,心肌细胞更新较慢,可 以在一定程度上耐受射线直接或间接的照射<sup>[5]</sup>。 有文献<sup>[6-7]</sup>证实,急性 RIHD,一般多见于照射后1 个月内,以心肌细胞水肿、炎性细胞浸润、纤维蛋白 渗出为主,而心肌细胞纤维化发生缓慢。本实验病 理 HE 染色可观察到照射早期急性期心肌细胞病理 改变并不明显,照射4周后有不同程度的心肌细胞 损伤; Masson 染色结果同样也证实心肌纤维化的发 生具有时间相关性。

心肌酶中以 cTnI 对诊断早期放射性心脏损伤 的敏感性和特异性较高 心肌损伤后出现时间早 ,持 续时间长 ,优于 cTnT、CK、CK-MB<sup>[8-10]</sup>。本实验结 果显示 ,cTnI 含量的改变与照射剂量具有正相关 性。

机体内氧自由基与抗氧化物质始终处于相对的 动态平衡,是机体内机体内稳态的重要组成部 分<sup>[11]</sup>。SOD和 MDA 是检测机体内氧化和抗氧化水 平的重要指标<sup>[12]</sup>。电离辐射所致的氧化应激对心 肌细胞影响较大<sup>[13]</sup>,当大鼠心肌细胞受到电离辐射 刺激时,氧化及抗氧化失衡,导致 SOD 含量降低, MDA 含量升高,并且与照射剂量具有正相关性。

综上所述 心脏损伤的严重程度与剂量相关 不同剂量单次照射构建大鼠急性 RIHD 模型有不同特征。5 Gy 和 10 Gy 照射组,在氧化应激和心肌酶指标上差异明显,而心功能变化不明显,20 Gy 和 30 Gy 照射组在各检测指标上都有明显差异,30 Gy 照射组有一定死亡率,并且在某些指标和 20 Gy 相比改变不明显,综合考虑 20 Gy 照射可较好的评估急性 RIHD 情况。氧化应激在 RIHD 的发生、发展中扮演重要角色,但后续的信号传导通路有待实验进一步证实。

## 参考文献

[1] 姜 敏 吴 荣. 放射性心脏损伤的研究进展[J]. 医学综述,

2012,18(19):3228-31.

- [2] Adams M J, Lipshultz S E, Schwartz C, et al. Radiation associated cardiovascular disease: Manifest actions and management [J]. Sem in Radint Oncol , 2003 ,13(3): 346 – 56.
- [3] Prosnitz R G , Marks L B. Radiation-induced heart disease: vigilance is stillrequired [J]. Clin Oncol , 2005 23(30):7391-4.
- [4] 宋建波 闫 蕊 侯彦杰 等. 实验犬放射性心脏损伤模型建立
  与评价[J]. 中西医结合心脑血管病杂志 2013,11(4):463 4.
- [5] Allavena C , Conroy T , Aletti P. Late cardiopulmonary toxicity after treatment for Hodgkin's disease [J]. Br J Cancer ,1992 ,65 (6):908-12.
- [6] Gürses I, Ozeren M, Serin M, et al. Histopathological evaluation of melatonin as a protective agent in heart injury induced by radiation in a rat model[J]. Pathol Res Pract 2014 210(12): 863 – 71.
- [7] 武亚晶 汪雪峰 汪 军 等. 急性期放射性心肌损伤病理学表

现及损伤机制研究[J]. 中华放射肿瘤学杂志 2016 25(10): 1117-22.

- [8] 杨苏萍 涨 琴. 生化及物理指标联合评估放射性心脏损伤的 研究现状[J]. 江苏实用心电学杂志 2013 22(6):893-5.
- [9] 王 萍 房秀生. 心肌肌钙蛋白 I 对体外循环期心肌损伤的判 定价值[J]. 中华麻醉学杂志 2000 20(5):265-9.
- [10] 郭 玮 潘柏申. 心肌肌钙蛋白 心肌损伤的确定生化标志物
  [J]. 上海医学检验杂志 2000,15(1):8-10.
- [11] 朱庆磊,何爱霞,吕欣然. 葛根素对氧自由基的清除和抗氧化 性损伤作用[J]. 解放军药学学报,2001,17(1):1-3.
- [12] Przybyszewski W M, Widel M, Rzeszowska Wolny J. Cardiotoxic consequences of ionizing radiation and anthracyclines[J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2006 60: 397 – 405.
- [13] Antunes F , Han D , Cadenas E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H(2) O(2) detoxification in in vivo conditions [J]. Free Radic Biol Med ,2002 , 33(9):1260-7.

## Construction and evaluation of acute radiation heart injury rat model treated with different dosage and single irradiation

Liu Yang Gao Shile ,Hu Zongtao , et al (Center of Cancer ,The 105th Hospital of PLA , Hefei 230031)

Abstract Objective To evaluate the rationality, scientific and feasibility of acute radiation-induced heart disease caused by different single doses radiation in rats. *Methods* Forty SD male rats were randomly divided into normal, 5 Gy, 10 Gy, 20 Gy and 30 Gy groups. The rats were irradiated under the linear accelerator at heart, the dose rate: 600 cGy/min, the source skin distance: 100 cm, the radiation field: 2.0 cm × 2.0 cm. At the end of 1 week and 4 weeks after irradiation ,4 rats were randomly selected from each group and were intubated with the right common carotid artery to measure hemodynamic parameters. And the data of hemodynamic indicators were examined through biological function experiment system. The content of cardiac troponin I (cTnI), the content of malondialdehyde (MDA) and the activity of super oxide dismutase (SOD) was tested. Apical tissues were stained with HE and Masson. Results After 1 week of irradiated , there was no obvious change of cardiac hemodynamic parameters, while the indexes of cTnI, SOD and MDA were significantly different (P < 0.05). After 4 weeks of irradiated, the cardiac function parameters in 5 Gy and 10 Gy group had no significant changes compared with those in normal group, while the heart function in 20 Gy and 30 Gy group was significantly impaired (P < 0.05), but the difference of SOD and MDA between the two groups was statistically significant (P < 0.05). The results of HE staining showed that different degrees pathological changes were observed in each irradiated groups after 4 week. Masson's results showed that there were changes of collagen deposition in the myocardium and small vessels. Conclusion In constructing acute radiation-induced cardiac injury in rats , different doses of irradiation have their different characteristics. After exposure to a single dose of 20 Gy in rat hearts , changes in acute radiation-induced cardiac injury are better observed. Oxidative stress plays an important role in the occurrence and development of RIHD. Key words radiation-induced heart disease; rats; model