

V5 与兔放射性肺损伤发生相关性的实验研究

汪步海 王晓磊 金学英 花威

【摘要】 目的 建立放射性肺损伤兔动物模型,通过限定不同 V5 值,测定肺组织中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 的表达情况,考察其与放射性肺损伤发生的相关性。方法 健康新西兰种大白兔 30 只,实验组 25 只,共 5 组,每组 5 只,分别设定 V5 40%、50%、60%、70%、80%,对照组 5 只,假性照射,每只均进行 CT 模拟、靶区勾画、计划制作并进行照射,6 MV 能量射线,3 野调强适形放疗 (IMRT),等中心照射,全肺剂量 30 Gy/3F。观察至 8 周后解剖,分别进行 HE 染色、TGF- β 1、TNF- α 的检测。结果 病理染色提示自 V5 50% 开始出现放射性肺炎病理学改变。所有实验组 TGF- β 1、TNF- α 较对照组表达增强,且与 V5 正相关。TGF- β 1 表达情况:V5 40% 组与 70%、80% 组有统计学差异 ($P < 0.05$),但与 50%、60% 及对照组无统计学差异;除 V5 40% 外,所有实验组均与对照组有统计学差异 ($P < 0.05$)。TNF- α 表达情况:V5 80% 与 70% 和对照组有统计学差异,其余各组两两间均无统计学差异。结论 当 V5 控制在 40% 时可减少放射性肺损伤的发生,预测放射性肺损伤发生的 V5 “门槛值”在 50% 附近。

【关键词】 辐射损伤; 放射性肺炎; 肿瘤坏死因子 α ; 转化生长因子 β ; V5

Experiment research of correlation between v5 and rabbit radiation-induced lung injury Wang Buhai, Wang Xiaolei, Jin Xueying, Hua Wei. Department of Oncology, Northern Jiangsu People's Hospital, Yangzhou University, Yangzhou 225001, China
Corresponding author: Wang Buhai, Email: wbhself@sina.com

【Abstract】 Objective To establish the rabbit model of radiation-induced lung injury for the study of its relationship with V5 by measuring TNF- α and TGF- β 1 content. **Methods** Thirty New Zealand rabbits were randomly divided into six groups, every eight in V5 40%, 50%, 60%, 70%, 80% and control group. Each rabbit received CT scan, delineation of target region and went on radiation with DT 30Gy/3F by three-yeild IMRT. All rabbits were sacrificed at 8 week after irradiation. The pathological changes were observed with light microscopies and the expression of TNF- α and TGF- β 1 in local lung tissue were detected by immunohistochemistry. **Results** The expression of TNF- α and TGF- β 1 enhanced in each experimental group than control group. High expression were detected in higher V5 percentage group. The expression of TGF- β 1: V5 40% showed significantly different with 70%, 80%, respectively ($P < 0.05$). But no differences were found by comparing with V5 50%, 60% and control group. All but V5 40% group was statistically different with control group ($P < 0.05$). The expression of TNF- α : Only V5 70% and control group was statistically different related to V5 80% ($P < 0.05$). **Conclusion** When V5 is set by 40%, it could reduce the occurrence of radiation-induced lung injury, and the threshold of predicting radiation-induced lung injury could be near 50%.

【Key words】 Radiation injuries; Radiation pneumonitis; Tumor necrosis factor-alpha; Transforming growth factor beta; V5

放射性肺损伤是胸部恶性肿瘤放射治疗的严重并发症,一旦发生势必影响患者生存及生活质量,临床干预效果不佳,因此重在预防。随着精确放疗技术如三维适形放疗(3D-CRT)、调强适形放疗(IMRT)的革新,通过控制肺受照剂量的体积直方图参数,如V20、V30、MLD可降低致命性放射性肺损伤发生的风险^[1-5]。然而在临床实践中发现,即使上述参数被控制在安全阈值内,仍有一部分患者发生放射性肺损伤^[6]。近年来,肺的低剂量体积参数——V5越来越受到关注,已发表的回顾性分析初步显示V5是放射性肺炎发生的独立预测因子^[7-10]。

既往研究证实多种细胞因子的复杂作用即细胞因子瀑布学说,介导放射性肺损伤发生和发展^[11-13],而转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)及肿瘤坏死因子 α (TNF- α)是两种重要的细胞因子,其表达强度与放射性肺损伤的发生程度呈正相关。目前未有动物实验研究佐证V5对放射性肺损伤发生预测作用及无安全阈值。本研究旨在通过建立兔放射性肺损伤动物模型,控制V20、V30、MLD在安全阈值内,检测TGF- $\beta 1$ 、TNF- α 表达的变化与设定的不同V5值之间的关系,考察V5与放射性肺损伤发生的相关性,为临床设定V5安全阈值提供实验依据。

材料与方法

一、实验材料

1. 实验动物:健康新西兰种大白兔30只,体重2~2.5 kg,雌雄兼有,发育良好。年龄为3~4个月。由扬州大学动物实验中心提供。

2. 主要试剂与设备:GE 16排大孔径CT;Varian Eclipse计划系统及Varian网络系统;Varian 23EX直线加速器;TGF- $\beta 1$ 、TNF- α 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;免疫组化染色试剂盒购自福建迈新公司;浓缩型DAB显色剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

二、实验方法

1. 实验动物分组:利用随机数字表将动物分成6组:(1)实验组25只,分为五组,每组5只,分别设定V5为40%、50%、60%、70%、80%。(2)对照组5只,假性照射,麻醉固定后置于直线加速器平台,但不进行照射。

2. 建立动物模型:(1)动物麻醉采用速眠新II

(盐酸赛拉嗪注射液)0.12 ml/kg肌肉注射,待肌肉完全松弛后,取俯卧位将兔固定在自制亚克力面板固定装置上。(2)兔背部需贴铅点部分用备皮刀剔除皮毛,贴上铅点,于模拟CT上行全肺CT扫描定位,断层图像传输到Varian eclipse治疗计划系统,进行三维重建。(3)靶区勾画,物理师制作放疗计划,在确保V20 \leq 35%、V30 \leq 15%、MLD \leq 20 Gy,设定V5区间为40%、50%、60%、70%、80%,采用6 MV能量射线,3野IMRT,等中心照射,全肺剂量30 Gy/3 F^[14]。(4)每次照射完毕均送回动物房继续饲养,观察其生存状况,并于8周后解剖,留取左肺下叶予10%中性甲醛溶液中固定,备用病理检查,其余-20℃冰箱保存,留用TGF- $\beta 1$ 、TNF- α 含量的检测。

3. 病理检查和大体标本观察:置于10%中性甲醛溶液中固定24 h,常规脱水、浸蜡、包埋、切片(5 μ m)后进行HE染色光镜检查。

4. TGF- $\beta 1$ 、TNF- α 含量的检测:采用免疫组化法检测局部肺组织TGF- $\beta 1$ 、TNF- α 等细胞因子的表达。TGF- $\beta 1$ 、TNF- α 免疫组织化学染色物质主要定位于细胞质中,两者阳性染色均呈黄褐色。每张切片选取20个高倍视野。TGF- $\beta 1$ 、TNF- α 的表达定量指标为反应强度平均值(阳性染色区域占肺组织总面积的百分比与反应强度的乘积,取算术平均值^[15-16])。

三、统计学分析

使用SPSS 17.0进行统计分析。数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组均数比较行单因素方差分析,两两比较采用SNK检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

结 果

一、病理组织学变化

1. 肺大体标本观:实验组肺稍显暗红,无明显萎缩,质稍硬,各叶分界清晰。对照组肺淡红,光滑,质柔软,分叶清晰(图1)。

2. HE染色:对照组兔肺组织形态、结构正常。实验组V5 40%未见明显炎性反应,自V5 50%开始,出现放射性肺炎病理学改变(图2, 3)。

二、免疫组化分析

所有实验组TGF- $\beta 1$ 、TNF- α 较对照组表达增强,且与V5正相关。TGF- $\beta 1$ 表达情况:V5 40%组与70%、80%组有统计学差异($P < 0.05$),但与

50%、60%组及对照组无差异;除V5 40%组外,所有实验组均与对照组有统计学差异($P < 0.05$)。TNF- α 表达情况:V5 80%、70%组和对照组有统计学差异,其余各组两两间均无统计学差异。具体数值见表1~3。染色见图4~7。

讨 论

对于预测放射性肺炎发生,剂量体积(DHV)直方图是重要的工具,剂量体积参数是至关重要的因子。目前临床应用中,肺平均受量(MLD)、V20、V30(肺接受20 Gy、30 Gy照射体积占全肺体积百分比)是公认的放射性肺炎发生预测因子。不同的研究给出了不同的临界值限定,普遍认可但并非绝对临界值为 $MLD \leq 20$ Gy、 $V20 \leq 35\%$ 、 $V30 \leq 15\%$ ^[17]。临床诊疗中控制上述参数,放射性肺炎发

表1 实验组与对照组 TGF- β 1、TNF- α 阳性染色细胞反应强度平均值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TGF- β 1	TNF- α
实验组		
V5 40%实验组	0.30 \pm 0.18	4.06 \pm 2.76
V5 50%实验组	0.53 \pm 0.19	4.87 \pm 3.01
V5 60%实验组	0.65 \pm 0.28	5.30 \pm 3.25
V5 70%实验组	0.79 \pm 0.33	5.75 \pm 3.07
V5 80%实验组	0.80 \pm 0.35	6.32 \pm 3.30
对照组	0.25 \pm 0.19	0.70 \pm 0.70

生率下降,但仍有部分患者发生较严重的放射性肺损伤,这可能与大面积低剂量照射相关,即所谓低剂量致敏。V5(肺接受5 Gy照射体积占全肺体积百分比)引起了更多的关注。Yorker等^[7]的研究发现放射性肺炎的发生与低剂量区域相关,特别是V5~V13。MD. Anderson 肿瘤中心一项研究表明,对于接受同步化放疗的非小细胞肺癌患者,发生3

表2 实验组与对照组 TGF- β 1 SNK 检验

对比组	两均数之差	q 值	q 界值(+)	q 界值(*)	P 值
V5 40%实验组与 V5 50%实验组	-0.23	1.957	2.919	3.956	>0.05
V5 40%实验组与 V5 60%实验组	-0.35	2.978	3.532	4.545	>0.05
V5 40%实验组与 V5 70%实验组	-0.49	4.169	3.901	4.906	<0.05
V5 40%实验组与 V5 80%实验组	-0.50	4.254	4.166	5.168	<0.05
V5 40%实验组与对照组	0.05	0.425	2.919	3.956	>0.05
V5 50%实验组与 V5 60%实验组	-0.12	1.021	2.919	3.956	>0.05
V5 50%实验组与 V5 70%实验组	-0.26	2.212	3.532	4.545	>0.05
V5 50%实验组与 V5 80%实验组	-0.27	2.297	3.901	4.906	>0.05
V5 50%实验组与对照组	0.28	2.382	3.532	4.545	<0.05
V5 60%实验组与 V5 70%实验组	-0.14	1.191	2.919	3.956	>0.05
V5 60%实验组与 V5 80%实验组	-0.15	1.276	3.532	4.545	>0.05
V5 60%实验组与对照组	0.40	3.403	3.901	4.906	<0.05
V5 70%实验组与 V5 80%实验组	-0.01	0.085	2.919	3.956	>0.05
V5 70%实验组与对照组	0.54	4.595	4.166	5.168	<0.05
V5 80%实验组与对照组	0.55	4.680	4.373	5.373	<0.05

表3 实验组与对照组 TNF- α SNK 检验

对比组	两均数之差	q 值	q 界值(+)	q 界值(*)	P 值
V5 40%实验组与 V5 50%实验组	-0.81	0.640	2.919	3.956	>0.05
V5 40%实验组与 V5 60%实验组	-1.24	0.980	3.532	4.545	>0.05
V5 40%实验组与 V5 70%实验组	3.31	2.616	2.919	3.956	>0.05
V5 40%实验组与 V5 80%实验组	-2.26	1.786	3.901	4.906	>0.05
V5 40%实验组与对照组	3.36	2.655	3.532	4.545	>0.05
V5 50%实验组与 V5 60%实验组	-0.43	0.340	2.919	3.956	>0.05
V5 50%实验组与 V5 70%实验组	4.12	3.256	3.532	4.545	>0.05
V5 50%实验组与 V5 80%实验组	-1.45	1.146	3.532	4.545	>0.05
V5 50%实验组与对照组	4.17	3.295	3.901	4.906	>0.05
V5 60%实验组与 V5 70%实验组	4.55	3.595	3.901	4.906	>0.05
V5 60%实验组与 V5 80%实验组	-1.02	0.806	2.919	3.956	>0.05
V5 60%实验组与对照组	4.60	3.635	4.166	5.168	>0.05
V5 70%实验组与 V5 80%实验组	-5.57	4.401	4.166	5.168	<0.05
V5 70%实验组与对照组	0.05	0.040	2.919	3.956	>0.05
V5 80%实验组与对照组	5.62	4.441	4.373	5.373	<0.05

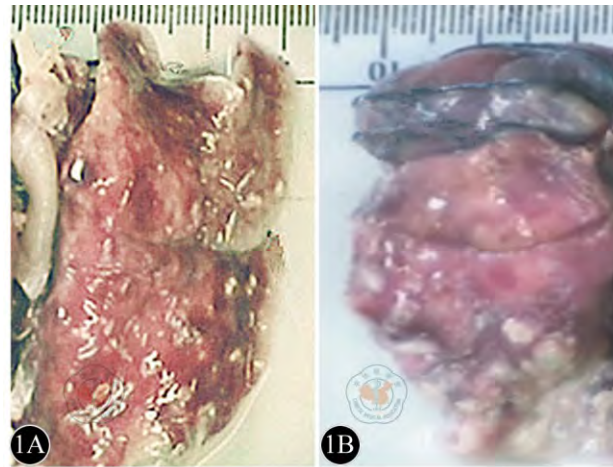


图1 1A: V5 80%实验组肺组织; 1B: 对照组肺组织

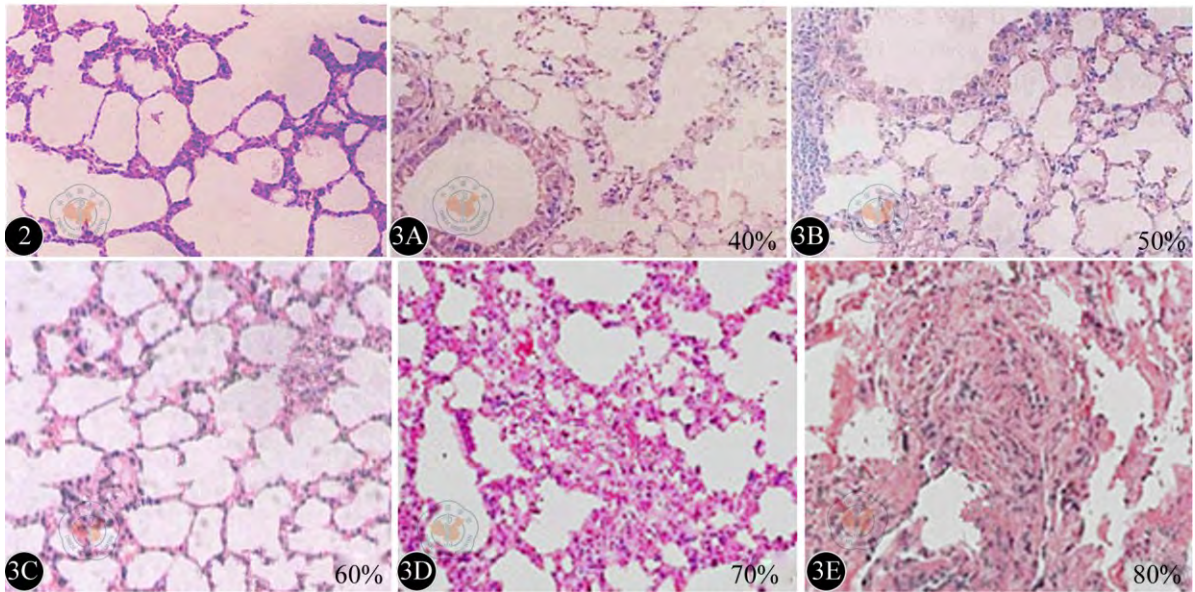


图2 对照组肺组织结构清晰, 肺泡腔完整, 肺泡、肺间质结构均正常 (HE ×200) 图3 3A~3E分别为V5 40%~80%实验组, 随着V5百分比增高, 肺泡隔增厚, 成纤维细胞增生活跃, 炎性细胞浸润, 高值组出现散在分布条索状、旋涡状淡红染色的纤维病灶 (HE ×200)

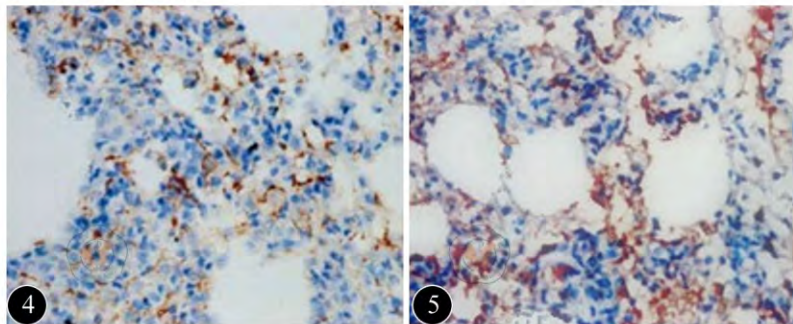


图4 TGF-β1阳性免疫组化结果: 肺泡间质显著增多, 阳性细胞呈深黄褐色 (×200) 图5 TNF-α阳性免疫组化结果: 肺泡明显增厚, 黄褐色阳性染色颗粒增多 (×200)

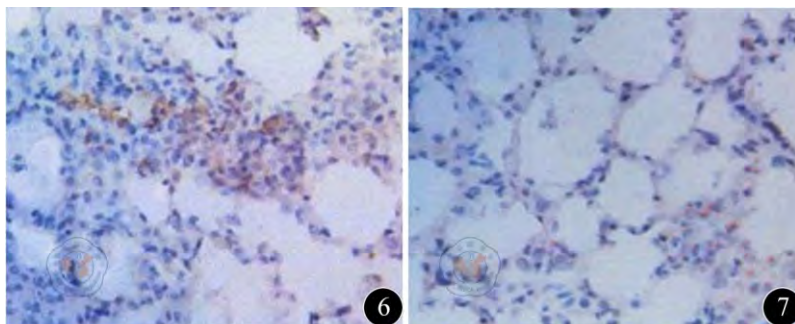


图6 对照组TGF- β 1免疫组化结果:肺泡间质增多,阳性染色细胞较少($\times 200$) 图7 对照组TNF- α 免疫组化结果:肺泡壁无明显增厚,阳性染色颗粒稍增多($\times 200$)

级以上放射性肺炎概率与V5显著相关,V5临界值为42%^[8]。Jo等^[9]的研究团队分析了接受断层放疗患者的肺剂量学参数,证实V5与2级以上放射性肺炎发生相关,V5临界值为65%。Song等^[10]报道了37例接受螺旋断层放疗的非小细胞肺癌患者,确定V5>60%为3级放射性肺炎发生的独立风险预测因子。这些临界值尽管不同,但相差范围不大,对临床有指导意义,NCCN NSCLC 2014第四版指南建议V5<65%,我单位通常限制在60%以内。

尽管有关建立放射性肺损伤模型的动物模型研究越来越多,但是大多是普通放疗、单次大剂量、单肺造模^[16,18]。我们希望建立更接近于临床实际的动物模型及为临床V5安全阈值的设定提供实验依据。很多放疗单位已常规开展3D-CRT、IMRT、旋转容积调强等精确放疗技术,且多采用分次照射。与单次大剂量照射相比,两种方式生物有效剂量差别很大。大鼠、小鼠作为常用实验动物因其肺体积小,无法进行靶区勾画及对V5设定,而新西兰大白兔双肺体积足够,分次照射重复性好,其本身对射线中度敏感,是较理想的实验对象。

放射性肺损伤的发生学说众多,目前普遍认可的是细胞因子瀑布学说,TGF- β 1、TNF- α 是此学说的主要两种细胞因子,其表达与放射性肺损伤的发生呈正相关^[19-20]。本实验免疫组化染色显示,V5高值组照射后TGF- β 1表达强度明显大于低值组及对照组,表明V5的数值越高,放射性肺损伤发生的程度越重。也提示我们可以通过限定V5的值来降低发生严重放射性肺损伤的风险。TNF- α 的表达与V5的相关性没有TGF- β 1明显,但总体上与TGF- β 1一致。在V5 50%时,病理提示已出现放射性肺损伤,TGF- β 1表达与对照组有统计学差异,

表明V5的安全阈值在50%附近。我们的研究结果与已有回顾性临床研究的阈值相比差异不大,为临床工作提供了实验依据,具有一定的指导意义。

综上所述,V5是除V20、V30、MLD之外的放射性肺损伤的另一独立预测因子。在临床实践中我们应该综合运用上述各指标预防严重放射性肺损伤的发生。

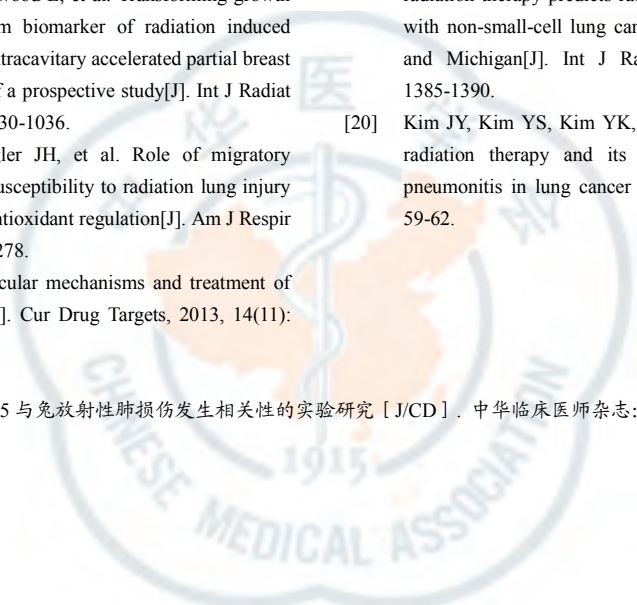
参 考 文 献

- [1] Gomez DR, Tucker SL, Martel MK, et al. Predictors of high-grade esophagitis after definitive three-dimensional conformal therapy, intensity-modulated radiation therapy, or proton beam therapy for non-small cell lung cancer[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2012, 84(4): 1010-1016.
- [2] Wang D, Shi J, Liang S, et al. Dose-volume histogram parameters for predicting radiation pneumonitis using receiver operating characteristic curve[J]. *Clin Transl Oncol*, 2013, 15(5): 364-369.
- [3] Baumann M, Herrmann T, Koch R, et al. Final results of the randomized phase III CHARTWEL-trial (ARO 97-1) comparing hyperfractionated-accelerated versus conventionally fractionated radiotherapy in non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. *Radiation Oncol*, 2011, 100(1): 76-85.
- [4] Kim B, Park HC, Oh D, et al. Development of the DVH management software for the biologically-guided evaluation of radiotherapy plan[J]. *Radiat Oncol J*, 2012, 30(1): 43-48.
- [5] Shen WB, Zhu SC, Gao HM, et al. Low dose volume histogram analysis of the lungs in prediction of acute radiation pneumonitis in patients with esophageal cancer treated with three-dimensional conformal radiotherapy[J]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 2013, 35(1): 45-49.
- [6] Tang C, Liao Z, Gomez D, et al. Lymphopenia association with gross tumor volume and lung V5 and its effects on non-small cell lung cancer patient outcomes[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2014, 89(5): 1084-1091.
- [7] Yorke ED, Jackson A, Rosenzweig KE, et al. Correlation of dosimetric factors and radiation pneumonitis for non-small cell lung cancer patients in a recently completed dose escalation study[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2005, 63(3): 672-682.
- [8] Wang SL, Liao ZX, Wei X, et al. Analysis of clinical and dosimetric

- factors associated with treatment-related pneumonitis (TRP) in patients with non-small-cell lung cancer (NSCLC) treated with concurrent chemotherapy and three-dimensional conformal radiotherapy(3D-CRT)[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2006, 66(5): 1399-1407.
- [9] Jo IY, Kay CS, Kim JY, et al. Significance of low-dose radiation distribution in development of radiation pneumonitis after helical-tomotherapy-based hypofractionated radiotherapy for pulmonary metastases[J]. *J Radiat Res*, 2013, 55(1): 105-112.
- [10] Song CH, Pyo H, Moon SH, et al. Treatment-related pneumonitis and acute esophagitis in non-small-cell lung cancer patients treated with chemotherapy and helical tomotherapy[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2010, 78(3): 651-658.
- [11] Boothe DL, Coplowitz S, Greenwood E, et al. Transforming growth factor β -1 (TGF- β 1) is a serum biomarker of radiation induced fibrosis in patients treated with intracavitary accelerated partial breast irradiation: preliminary results of a prospective study[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2013, 87(5): 1030-1036.
- [12] Mathew B, Jacobson JR, Siegler JH, et al. Role of migratory inhibition factor in age-related susceptibility to radiation lung injury via NF-E2-related factor-2 and antioxidant regulation[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 49(2): 269-278.
- [13] Ding NH, Li JJ, Sun LQ. Molecular mechanisms and treatment of radiation-induced lung fibrosis[J]. *Cur Drug Targets*, 2013, 14(11): 1347-1356.
- [14] Du ZZ, Ren H, Song JF, et al. Rabbit model of radiation-induced lung injury[J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2013, 6(3): 237-241.
- [15] Xue J, Li X, Lu Y, et al. Gene-modified mesenchymal stem cells protect against radiation-induced lung injury[J]. *Mol Ther*, 2013, 21(2): 456-465.
- [16] 方向明, 胡春洪, 胡晓云, 等. 兔放射性肺损伤模型的建立及鉴定[J]. *中华放射医学和防护杂志*, 2010, 30(4): 417-422.
- [17] Kharofa J, Gore E. Symptomatic Radiation Pneumonitis in Elderly Patients Receiving Thoracic Irradiation[J]. *Clin Lung Cancer*, 2013, 14(3): 283-287.
- [18] 郭岩, 杨海山, 丁文, 等. 实验性兔肺损伤的 CT 表现[J]. *中国实验诊断学*, 2007, 11(1): 105-108.
- [19] Zhao L, Wang L, Ji W, et al. Elevation of plasma TGF- β 1 during radiation therapy predicts radiation-induced lung toxicity in patients with non-small-cell lung cancer: a combined analysis from Beijing and Michigan[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2009, 74(5): 1385-1390.
- [20] Kim JY, Kim YS, Kim YK, et al. The TGF- β 1 dynamics during radiation therapy and its correlation to symptomatic radiation pneumonitis in lung cancer patients[J]. *Radiat Oncol*, 2009, 27(4): 59-62.

(收稿日期: 2014-06-25)

(本文编辑: 吴莹)

汪步海, 王晓磊, 金学英, 等. V5 与兔放射性肺损伤发生相关性的实验研究 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2014, 8 (19): 3495-3500.


中华医学会