

塞来昔布对大鼠急性放射性脑损伤的保护作用

杨美玉 徐晓婷 涂 彧 马辰莺

(苏州大学医学部放射医学与防护学院, 江苏省放射医学与防护重点实验室 苏州 215123)

摘要 为探讨塞来昔布对电离辐射诱发的急性脑组织损伤的脑保护作用, 将成熟的 SD 大鼠随机分为对照组、照射组 (6 MeV 电子线全脑单次垂直照射, 吸收剂量为 10 Gy) 和照射加药物组 (6 MeV 电子线全脑单次垂直照射, 吸收剂量为 10 Gy+塞来昔布 30 mg/kg 体重灌胃给药)。实验大鼠分别在不同时间点处死、取脑组织。应用干-湿重法测定脑组织含水量, 病理切片观察大鼠脑组织形态变化, 免疫组化法观察脑组织中胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 的表达。结果显示: 与对照组相比, SD 大鼠照射后脑组织含水量明显升高, 照射加药物组大鼠各时间点脑组织含水量较照射组显著减少, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。全脑照射后, 照射组大鼠脑组织切片呈现典型脑水肿表现, 照射加药物组脑水肿程度较照射组轻。照射加药物组大鼠各时间点脑组织中 GFAP 阳性细胞的数量较照射组显著减少, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 两组全脑照射后大鼠脑组织中 GFAP 阳性表达均较对照组明显升高。塞来昔布能有效地降低脑组织含水量, 减轻脑组织水肿的程度, 保护脑组织, 并能减轻胶质细胞的损伤程度, 起到保护神经元的作用。

关键词 塞来昔布, 放射性脑损伤, 大鼠, 脑水肿, 6 MeV 电子线

中图分类号 R811.5, R815.6

放射性脑损伤是颅内肿瘤、脑血管畸形、头颈部恶性肿瘤治疗后产生的一种常见的并发症。塞来昔布 (Celecoxib) 是一种高效低毒的 COX-2 选择性抑制剂, 于 1999 年经 FDA 批准在美国上市, 由于塞来昔布是选择性抑制剂, 在正常脑组织表达量低, 因此对正常脑组织影响较小, 并且有报道^[1]表明它具有减轻放射性脑损伤的作用。本文旨在通过对大鼠急性放射性脑损伤后脑水肿程度及 GFAP 表达的观察, 探讨塞来昔布在放射防护中的影响机制, 为放射治疗过程中发生的放射性脑损伤提供一种可能的保护手段。

1 实验材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康成熟的 SD 大鼠, 由苏州大学动物实验中心提供, 体重 (200±20) g, 雌性。

1.1.2 主要试剂和仪器 塞来昔布为辉瑞制药有限公司生产, 取其药粉用灭菌蒸馏水稀释, 置于洁净的容器中, 确定浓度为 2 mg/mL。直线加速器型号为西门子 KD22 型。指形电离室为 Farmer-FC23-C 型。剂量仪为 Scanditronix-Wellhofer 公司的 DOSE-1

型。电子天平型号为 FA1004 型。恒温干燥箱型号为 DHG-9070 型。ABC 试剂盒、DAB 与胶质细胞纤维酸性蛋白 (GFAP) 单克隆均为武汉博士德公司提供。山羊抗兔 IgG 由北京中山科技有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 动物及分组 健康成熟的 SD 大鼠于安静、温暖 (22℃)、光线柔和的环境中饲养 48 h, 共 45 只, 随机分为对照组、照射组 (只给予全脑照射) 和照射加药物组 (给予全脑照射并加用塞来昔布灌胃处理), 每组 15 只, 分别于照后第 1 d、第 4 d、第 7 d 每组取 5 只进行相关指标的检测。大鼠在照前经 20% 乌拉坦 (5.0 mL/kg) 腹腔注射麻醉, 对照组同样麻醉后放入相似的环境中, 不予照射。观察期间均给予正常饮食。

1.2.2 照射方法及剂量确认 照射的 SD 大鼠麻醉后, 俯卧固定于自制的“工”型木架上, 直线加速器予 6 MeV 电子线全脑垂直照射, 吸收剂量率为 2 Gy/min, 源皮距为 100 cm, 在 10 cm×10 cm 的限光筒特制的铅模中, 照射野大小为 2.0 cm×2.0 cm (模拟机下透视定位见图 1), 射野中心轴深度剂量的 R_{100} 、 R_{50} 值分别为 12 mm 和 22 mm。照射前应

江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD)

第一作者: 杨美玉, 女, 1985 年 10 月出生, 2011 年 6 月毕业于苏州大学医学部临床医学 (放射医学方向) 七年制

通讯作者: 涂彧, Email: tuyu@suda.edu.cn

收稿日期: 初稿 2011-09-16, 修回 2011-10-17

用指形电离室在 30 cm×30 cm 的水模中水下 1 cm 作吸收剂量的测量。用剂量仪于照射之前校正, 保证大鼠脑部的吸收剂量为 10 Gy (照射野见图 2)。



Fig.1 X-rays simulative localization

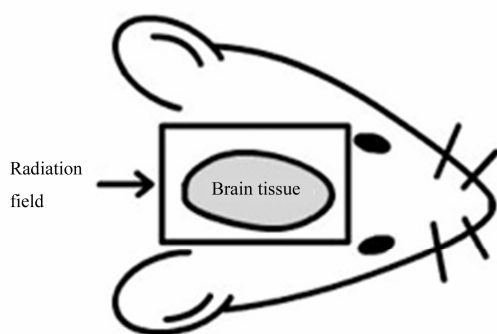


Fig.2 Schematic diagram of radiation field of total brain irradiation

1.2.3 给药条件 照射加药物组动物均于照射前连续 3 d (时间点固定, 1 次/d)、照射前 0.5 h、照射

后即刻和照射后连续 3 d (时间点固定, 1 次/d) 分别给予灭菌蒸馏水稀释处理后的塞来昔布 (2mg/mL) 缓慢灌胃, 给药剂量为 30 mg/kg 体重。对照组和照射组给予同等量生理盐水灌胃。

1.2.4 脑组织含水量的测量 在各时间点, 每组随机取大鼠 5 只, 脱臼处死, 快速取出脑组织, 电子天平称湿重 (W) 后, 置于处理过的器皿中, 105℃ 恒温干燥箱, 烘至恒重 (D), 按 Elliotl 等的公式计算: 脑组织含水量 = $[(W-D) / W] \times 100\%$ 。

1.2.5 脑组织病理观察 ①大体观察: 取材时观察脑组织外观, 如水肿等。②脑切片苏木素-伊红 (HE) 染色观察: 将一侧脑组织放入 4% 的多聚甲醛溶液中, 在冰冻切片机上行冠状位切片, 片厚 5 μ m, 常规 HE 染色, 镜下观察。

1.2.6 GFAP 免疫组化染色 切取大脑前极至视交叉的脑片, 采用免疫组化方法进行 GFAP 染色: 脑组织经冷冻、脱水、切片, 具体步骤参考博士德公司提供的试剂盒说明书。

1.2.7 统计学处理 应用 SPSS 13.0 统计软件包对数据分析处理, 组间分析采用单因素方差分析, 数据均采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑组织含水量的变化

本实验结果表明 (见表 1), 脑组织 10 Gy 电子线照射后 1 d 即有脑水肿的发生, 随照射后时间的延长, 脑组织水肿持续存在, 较对照组显著增高 ($P < 0.05$); 照射加药物组大鼠脑组织含水量虽然高于对照组, 但各时间点的含水量较照射组相应时间点的含水量显著降低 ($P < 0.05$)。说明塞来昔布可有效减轻辐射引起的脑组织水肿。

Table 1 The change of brain water content

($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Group	Percentages of brain water content / %		
	1 d	4 d	7 d
Control	36.27±0.58	36.65±0.53	36.67±0.76
10 Gy	39.72±0.67*	39.31±0.63*	39.29±0.35*
10 Gy+Celecoxib	38.38±0.42**	38.53±0.48**	37.97±0.59**
F	46.97	30.98	24.60

Note: compared with the control group * $P < 0.05$; compared with the 10 Gy group ** $P < 0.05$

2.2 脑组织病理观察结果

对照组：外观显示大鼠脑组织无肿胀。光镜下显示脑各部位结构及层次清楚，细胞形态结构清晰完整，见图 3。照射组：照射后第 1 d 起从外观即可观察到大鼠脑组织肿胀，脑回宽而扁平，脑沟浅而

窄。照射后第 4 d 和第 7 d 镜下显示脑组织疏松，细胞和血管周围空隙变大，其中白质中的变化较灰质明显，也可见细胞肿胀，血管内膜反应性增生，分别见图 4 和图 5。照射加药物组：外观显示大鼠脑组织轻度肿胀。镜下显示脑各部位结构和层次较照射组清楚，细胞轻度水肿，见图 6。

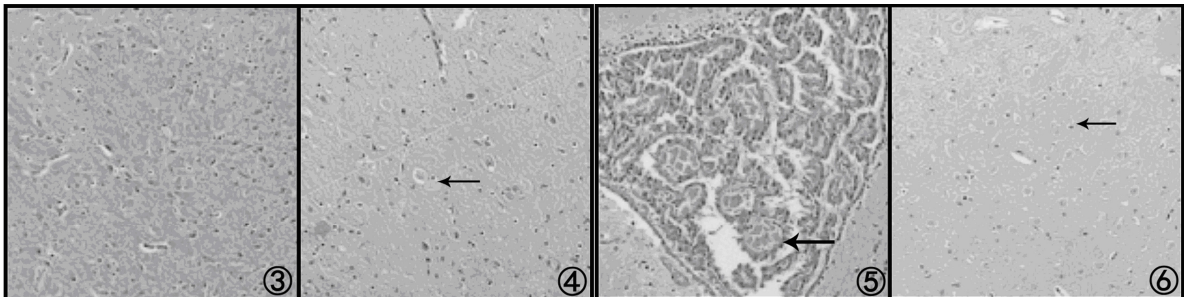


Fig.3 The control group (magnification: 40×10)
Fig.4 The 10 Gy group after irradiation, 4 d (magnification: 40×10, arrow shows the swelling cells)
Fig.5 The blood vessels changes of the 10 Gy group after irradiation, 7 d (magnification: 40×10, arrow shows the hyperplasia blood vessels)
Fig.6 The 10 Gy+Celecoxib group after irradiation, 4 d (magnification: 40×10, arrow shows the swelling cells)

2.3 GFAP 的阳性表达变化

实验结果表明（见表 2），SD 大鼠脑组织经电子线照射后第 1 d 即有明显的 GFAP 阳性表达，随照后时间的延长，GFAP 的阳性表达逐渐增高。在对照组的各时间点上，GFAP 的染色呈弱阳性，阳性细胞染色淡，数目少，突起较细，见图 7。照射组：照射后第 1 d 起即可观察到 GFAP 阳性数明显升高（ $P<0.05$ ），阳性表达增加，阳性细胞的形态开

始变化，染色稍深，突起较粗长，照射后第 4d 和第 7d GFAP 表达较前进一步增大，胞质染色加重，突起变粗变长，见图 8。照射加药物组各时间点 GFAP 的表达较对照组均有所增强，阳性细胞数量较多，染色较深，突起较粗，但较照射组 GFAP 阳性表达稍有下降（ $P<0.05$ ），阳性细胞染色稍浅，突起粗短，见图 9。

Table 2 The change of positive expression of GFAP ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Group	Positive expression of GFAP / mm ²		
	1 d	4 d	7 d
Control	5.38±1.25	5.36±1.40	5.22±0.97
10 Gy	13.37±1.81 [*]	27.07±4.80 [*]	45.76±6.07 [*]
10Gy+Celecoxib	8.96±1.33 ^{*#}	21.57±3.29 ^{*#}	36.69±5.24 ^{*#}
F	36.51	53.40	104.05

Note: compared with the control group ^{*} P 0.05; compared with the 10Gy group [#] P <0.05

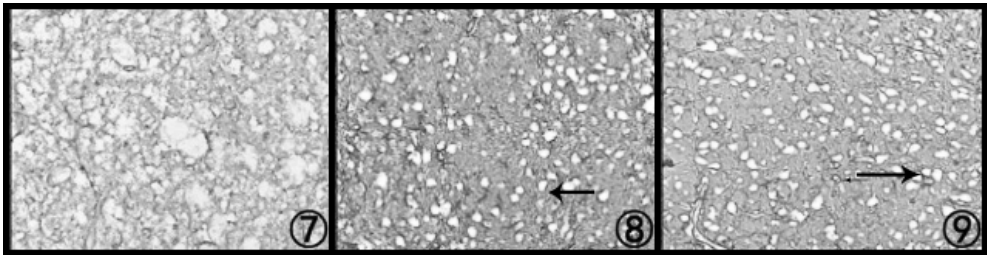


Fig.7 The control group (magnification: 40×10)
Fig.8 The 10 Gy group after irradiation, 1 d (magnification: 40×10, arrow shows the positive cells of GFAP)
Fig.9 The 10 Gy+Celecoxib group after irradiation, 7 d (magnification: 40×10, arrow shows the positive cells of GFAP)

3 讨论

环氧合酶 (Cyclooxygenase, *cox*) 是花生四烯酸转化为前列腺素族 PGs 的关键限速酶, 存在 COX-1 和 COX-2 两种同工酶, 研究表明, COX-2 的表达与人类多数肿瘤关系密切, 它参与了肿瘤细胞的转化、生长、凋亡过程, 同时也参与细胞的运动、转移、肿瘤新生血管的形成。COX-2 抑制剂联合化疗药物在对结肠癌、肺癌、乳腺癌的体外和体内研究中取得良好的效果。但对于 COX-2 抑制剂与放疗联合作用, 目前的研究还不多。国外有学者认为 COX-2 抑制剂具有放射增敏及放射防护作用, 在体外细胞培养和在体移植瘤实验中, 均取得了初步的成果^[1]。

本实验结果显示, 大鼠大脑 10 Gy 照射后, 出现脑组织内明显水肿。对大鼠行塞来昔布灌胃干预后, 可有效地降低脑组织含水量, 减轻脑组织水肿的程度。这一结果显示脑组织受到电离辐射后, 脑水肿是最主要的脑损伤病理改变之一, 严重影响脑损伤后病情的转归及预后。另外, 病理切片观察的结果也证实了塞来昔布对放射性脑损伤有减轻脑水肿, 抗血管生成作用。陈小平的研究表明^[2], COX-2 可能参与脑水肿形成, 应用 COX-2 抑制剂可抑制 COX-2 蛋白的表达, 减少和阻止继发性损伤过程, 减轻脑水肿, 从而达到保护脑细胞的作用。因此, 早期使用塞来昔布可以有效减轻大鼠受辐射后引起的脑水肿程度和脑组织的损害程度, 具体机制可能为, COX-2 参与了脑水肿的形成, 可通过对 NO 通路的调节诱导诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) mRNA 表达, 增加氧自由基 NO 的产生^[3]。塞来昔布作为 COX-2 选择性抑制剂能有效抑制脑损伤后 COX-2 的增加, 起到减轻脑水肿的脑保护作用。

胶质纤维酸性蛋白 (Glial fibrillary acidic protein, GFAP) 是星形细胞胞质内特异性蛋白, 其表达量的多少可以反映星形胶质细胞的功能状态^[4], GFAP 在肿瘤病理学中的意义已远远超出了它的鉴别诊断作用。几乎所有类型的脑损伤后反应性星形细胞中 GFAP 的表达都增强。有关 GFAP 的其他功能及机制尚不清楚。近年来的研究显示, 星形胶质细胞通过调节神经细胞内外离子浓度, 抑制钙超载, 拮抗兴奋性氨基酸细胞毒性作用, 抗氧化和自由基, 释放生物活性物质, 提供能量等对神经元起保护作用^[5]。近年还发现, GFAP 上存在 cdc2 和 Ca^{2+} 钙调素依赖性激酶作用的磷酸化位点。在 Ca^{2+} 存在的条件下, 谷氨酰胺可促进 GFAP 的磷酸化。光化学刺

激、脑老龄化时均可使 GFAP 的表达上调。周期素依赖性激酶 (CDKs) 与 GFAP 型中间丝之间亦存在相互作用。这些现象的详尽机制与意义都值得深入研究。

放射性损伤是一个动态进展的过程, 包括引起细胞的直接死亡和反应性的神经炎症被认为最终导致选择性的细胞丢失、组织损伤和功能障碍^[6-7]。已有不少研究发现, 放射性脑损伤后少突胶质细胞的损伤是发生脱髓鞘性改变和白质萎缩的重要原因, 少突胶质细胞是脑损伤的重要靶细胞。快速分裂细胞对放射线尤为敏感。Chiang^[8]用 20–30 Gy 照射小鼠后的 120–180 d 中, 胼胝体、海马等区域中作为少突胶质细胞标记物的环核苷酸磷脂水解酶 (CNPase) 和髓磷脂碱性蛋白 (MBP) 的减少呈剂量依赖性, 并且与组织学上观察到的脱髓鞘变化相关联; 免疫组化法观察胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 阳性的细胞数、脑组织中的 GFAP 量均有明显增加; 用 3H-TdR 来标记的增殖细胞数逐步上升, 约 2 月时达 2 倍左右, 作者认为脱髓鞘的原因是少突胶质细胞的缺失, 受照后早期就使具有增殖能力的非成熟细胞丢失和有明显的胶质细胞反应性增生。Fike 的近距离照射模型实验中照射后 2–6 个月内, 大鼠脑组织中 BrdU 标记增殖细胞数, VII 因子抗体标记的血管内皮细胞数、GFAP 阳性细胞数和 PMNs、MAC387 标记的多形核白细胞数的明显增加, 说明在该时间内脑细胞的放射反应表现为细胞的增殖, 新血管的形成、星形细胞的浸润以及炎症反应的存在^[9]。

同时, 本实验结果还证明 SD 大鼠在 6 MeV 电子线照射后 GFAP 的阳性表达显著升高, 而对于塞来昔布处理过的大鼠脑组织来说, GFAP 的阳性表达有所下降, 阳性细胞的染色较淡, 数目减少, 突起稍细短。这一结果表明大鼠全脑照射后 GFAP 的表达明显增加, 即星形胶质细胞浸润明显, 早期应用塞来昔布后可改善此过程。详尽机制尚不清楚, 需要做进一步研究。但此研究已证明塞来昔布能有效减轻放射性脑损伤后胶质细胞的损伤, 起到保护神经元的作用。

本研究的结果表明塞来昔布能有效地降低脑组织含水量, 减轻脑组织水肿的程度, 保护脑组织, 并能减轻胶质细胞的损伤程度, 起到保护神经元的作用, 具体机制目前尚有待于进一步的实验研究。

参考文献

- 1 Khan R, Krasin M, Kasow K, *et al.* Cyclooxygenase-2 inhibition to treat mdiation_induced brain necrosis and

- edema [J]. *Pediatr Hematol Oncol*, 2004, **26**(4): 253-255
- 2 陈小平, 李小刚. COX-2 在大鼠脑出血损伤机制中的实验研究. *中国实用神经疾病杂志*, 2008, **11**(5): 70-73
CHEN Xiaoping, LI Xiaogang. The experiment on the mechanisms of ICH-induced brain injury by using COX-2 in rat model. *Chinese Journal of Practical Nervous Diseases*, 2008, **11**(5): 70-73
- 3 Muhl H, Kunz D, Pfeilshifter J. Expression of nitric oxide synthase in rat glomerular mesangial cells mediated by cyclic AMP[J]. *Br J Pharmacol*, 1994, **112**(1): 1-8
- 4 宋锐锋, 唐一鹏, 洪庆涛. 抗呆 I 号对脑缺血再灌注小鼠海马星形胶质细胞 GFAP 表达的影响. *北京中医药大学学报*, 2002, **25**: 45-47
SONG Ruifeng, TANG Yipeng, HONG Qingtao. Effects of kangdai No.1 on the expression of GFAP of hippocampal astrocytes in the mice undergone forebrain ischemia and reperfusion. *Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine*, 2002, **25**: 45-47
- 5 韩冬, 冯加纯. 星形胶质细胞对脑缺血后神经元的保护作用. *中国卒中杂志*, 2006, **1**: 644-646
HAN Dong, FENG Jiachun. the neuroprotection of astrocytes on neurons after cerebral ischemia. *Chinese Journal of Stroke*, 2006, **1**: 644-646
- 6 Kim J H, Brown S L, Jenrow K A, *et al*. Mechanisms of radiation-induced brain toxicity and implications for future clinical trials. *Neurooncol*. 2008, **87**(3): 279-286
- 7 Wong C S, Van der Kogel A J. Mechanisms of radiation injury to the central nervous system: implications for neuroprotection. *Mol Interv*, 2004, **4**(5): 273-284
- 8 Chiang C S, McBride W H, Wither H R. Radiation-induced astrocytic and microglial responses in mouse brain. *Radiother Oncol*, 1993: 29-60
- 9 Fike J R, Gobbel G T, Chou D, *et al*. Cellular proliferation and infiltration following intracranial irradiation of normal dog brain is altered by an inhibitor of polyamine synthesis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1995, **32**: 1095

Neuroprotective effect of Celecoxib on radiation-induced acute brain injury

YANG Meiyu XU Xiaoting TU Yu MA Chenying

(Soochow University Institute of Radiation Medicine and Public Health, Suzhou 215123, China)

ABSTRACT In order to explore the effect of Celecoxib on the neuroprotective function of acute radiation-induced brain injury, the mature Sprague-Dawley rats were divided randomly into 3 groups: the control group, the 10 Gy group (a dose of 10 Gy by using 6 MeV electrons) and the 10 Gy+Celecoxib group (a dose of 10 Gy by using 6 MeV electrons combined with 30 mg/kg of Celecoxib). The brain tissues of rats were taken at the different points of time after irradiation and the wet-dry weight formula was applied to calculate the percentage of brain water content. Pathomorphology investigation was used to detect the morphological changes of brains. Immunohistochemistry staining was performed on the brain tissue samples to investigate the glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression. Consequently, the percentage of brain water content in the 10 Gy group was significantly higher than that in the control group. And the percentage of brain water content in the 10 Gy+Celecoxib group was relatively lower compared with that in the 10 Gy group. There were significant differences among the three groups ($P < 0.05$ and $P < 0.05$). Pathologic identification of the brain tissue samples suggests that typical cerebral edema was detected in the 10 Gy group, and the extent of brain edema was less in the 10 Gy+Celecoxib group compared with that in the 10 Gy group, meanwhile the positive expression of GFAP in the 10 Gy+Celecoxib group was lower significantly than that in the 10 Gy group at the different time points ($P < 0.05$). The positive expression of GFAP in both the 10 Gy group and the 10 Gy+Celecoxib group were higher than that in the control group. As a conclusion, Celecoxib can obviously decrease the percentage of brain water content, cut down the level of cerebral edema to protect brain organization, reduce the glial cells injury and protect neurons.

KEYWORDS Celecoxib, Radiation brain injury, Rats, Cerebral edema, 6 MeV electron beam

CLC R811.5, R815.6