

# 大鼠放射性口腔黏膜炎病损组织细胞因子检测及意义

李春阳<sup>1</sup>, 陈小华<sup>2</sup>, 陶小安<sup>3</sup>, 夏娟<sup>3</sup>, 程斌<sup>3\*</sup>

(中山大学 1. 附属第五医院口腔科, 广东 珠海 519000; 2. 光华口腔医学院·附属口腔医院病理科, 广东 广州 510060; 3. 光华口腔医学院·附属口腔医院黏膜科, 广东 广州 510060)

**摘要:**【目的】检测大鼠放射性口腔黏膜炎形成过程中病损局部组织内细胞因子, 探讨其动态变化规律及意义。【方法】获取接受单次 30 Gy X 线照射后 5 d、8 d、14 d 的大鼠口腔黏膜组织, 采用抗体芯片技术检测 19 种细胞因子; 荧光定量 PCR 检测 8 种炎症相关因子的 mRNA 水平; ELISA 定量检测 IL-1 $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、TIMP-1。【结果】抗体芯片技术检测到, 照射后 Frac、IL-4、IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$  5 种细胞因子水平下降; IL-1 $\beta$ 、LIX、VEGF、 $\beta$ -NGF 4 种细胞因子照射前后水平无明显差异; 照射后水平上升幅度 < 2 倍的有 CINC-2、GM-CGF、Leptin、MCP-1 和 MIP-3 $\alpha$  5 种细胞因子, 上升幅度  $\geq$  2 倍的有 CINC-3、INF- $\gamma$ 、IL-1 $\alpha$  和 TIMP-1 4 种细胞因子。Real-time PCR 检测到抗凋亡相关基因 Bcl-2, 以及 IL-6、TNF- $\alpha$ 、VEGF 及 IL-1 $\beta$  的 mRNA 表达水平下降; 而促凋亡相关基因 Bax、中性粒细胞局部募集相关基因 CINC 和 TLR-9 表达上升。IL-1 $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、TIMP-1 的 ELISA 检测结果与前两种检测结果一致。【结论】大鼠抗体芯片和荧光定量 PCR、ELISA 检测结果互相佐证了病损组织内的细胞因子在口腔黏膜炎发生、发展、演进中呈现分泌受阻和表达增加的动态变化并发挥调控作用。

**关键词:** 放射性口腔黏膜炎; 细胞因子; 抗体芯片

中图分类号: R78 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2010)02-0231-07

## Investigation and Significance of Cytokines in Local Tissues of Radiation-induced Oral Mucositis in a Rat Model

LI Chun-yang<sup>1</sup>, CHEN Xiao-hua<sup>2</sup>, TAO Xiao-an<sup>3</sup>, XIA Juan<sup>3</sup>, CHENG bin<sup>3\*</sup>

(1. Department of Stomatology, The Fifth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, China;  
2. Department of Oral Pathology, The Guanghua School of Stomatology//The Affiliated Hospital of Stomatology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China; 3. Department of Oral Medicine, The Guanghua School of Stomatology//The Affiliated Hospital of Stomatology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

**Abstract:** 【Objective】 This study was designed to explore the dynamic changes of cytokines in the local tissues of radiation-induced oral mucositis in a rat model. 【methods】 The rat oral mucosal tissues were obtained at 5 d, 8 d, and 14 d after irradiation, which were received single X-ray irradiation of 30 Gy locally. RayBio® Rat Cytokine Array was applied to analyze the 19 cytokines. The mRNA levels of the 8 inflammatory-related cytokines were analyzed by real time-PCR. ELISA was employed to detect IL-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and TIMP-1 protein levels. 【Results】 Cytokine array detection showed that cytokines such as Frac, IL-4, IL-6, IL-10, and TNF- $\alpha$  were down-regulated after irradiation. IL-1 $\beta$ , LIX, VEGF, and  $\beta$ -NGF were no obviously changed at the same time course. The elevate range less than 2 fold of the CINC-2, GM-CGF, Leptin, MCP-1, and MIP-3 $\alpha$  after irradiation were detected. The increasing range more than 2 fold of CINC-3, INF- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , and TIMP-1 post irradiation were detected. The mRNA levels of anti-apoptosis, such as Bcl-2, and TNF- $\alpha$ , IL-6, VEGF, and IL-1 $\beta$  were low down, while the levels of promoting apoptosis cytokine such as Bax, and neutrophil recruitment associated cytokines, CINC, and TLR-9 were up-regulated after irradiation. The ELISA results of IL-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and TIMP-1 were identical with the results of the two previous analyses. 【Conclusion】 The results of the three methods in the study should present evidences to prove each other. Some cytokines in the local lesion of oral mucositis during the initiate, development, and progression stages were blocked, while others were positively up-regulated to involving the control of the pathogenesis of oral mucositis.

**Key words:** radiation-induced oral mucositis; cytokines; antibody array

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(2): 231-237]

收稿日期: 2009-12-01

基金项目: 广东省科技计划项目(2005B50301004; 2006B36006010)

作者简介: 李春阳, 博士, 主治医师, E-mail: lichyang@mail.sysu.edu.cn; \*程斌, 通信作者, E-mail: chengbin@mail.sysu.edu.cn

放射性口腔黏膜炎(radiation-induced oral mucositis, ROM)是指各种放射引起的急慢性口腔黏膜损伤<sup>[1]</sup>。ROM是头颈部恶性肿瘤放射治疗的主要剂量限制因素,并成为临床亟待解决的重大课题<sup>[2-5]</sup>。到目前为止,ROM的发病机制尚不明确<sup>[4-5]</sup>。已有研究报道,核转录因子NF- $\kappa$ B是调节炎症介质生成的上游共享分子,活化的NF- $\kappa$ B进入细胞核与DNA链特定的序列结合,激活200多个下游基因表达,其中包括IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6等多种前炎症因子和COX-2等,在IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 相继被NF- $\kappa$ B激活后,这些因子又可反作用于NF- $\kappa$ B,导致局部组织发生炎症反应,这种正反馈扩大口腔黏膜的损伤<sup>[6]</sup>;与此同时,也有文献报道NF- $\kappa$ B过表达也可激活抗炎细胞因子,可保护口腔黏膜组织<sup>[7]</sup>。因此,有必要对放射性口腔黏膜炎局部病损组织的各类细胞因子进行深入研究。本课题组在已建立的ROM动物模型<sup>[8]</sup>观察到30 Gy单次照射后ROM发生、演进、归转过程中的分期为潜伏期(1~5 d)、溃疡出现期(5~8 d)、高峰期(8~21 d)、归转愈合期(21~35 d)。本研究选择充血红斑明显(5 d)、溃疡出现中期(8 d)、溃疡高峰期(14 d)作为研究时点,检测ROM局部组织的细胞因子的动态变化,以期探索炎症相关因子在ROM形成过程中的作用规律及其意义,为寻找防治ROM的关键分子靶标提供实验依据和线索。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物及标本取材

将24只SD大鼠,随机分成对照组6只,30 Gy单次实验组18只。按照本课题组建立的照射方法<sup>[8]</sup>进行30 Gy单次照射。在自制的铅质头罩上开一个缺口,自缺口将鼠舌牵拉出后,顺着舌的自然延伸,牵拉平铺于铅罩外侧,舌背面朝上用双面胶固定,将辅助的U形铅皮交叉于舌根、舌尖之间,形成舌背舌尖1 cm $\times$ 1 cm的照射区域,铅罩完全屏蔽大鼠的其余身体部位。照射机器为国产东方红牌深部X线机,型号F34-I。照射条件为电压210 kV,电流12 mA,源皮距为40 cm,照射野为10 cm $\times$ 15 cm,4 mm铅滤过系统,吸收剂量率为1.007 5 Gy/min,每次照射6只。

进一步随机分成照射后5 d组(黏膜充血红斑期)、8 d组(初步溃疡期)、14 d组(严重溃疡期)

各6只。对照组6只SD大鼠除不接受照射外,其余处理同实验组。

将上述24只SD大鼠,分别进行颈部脱臼处死后5 min内无菌条件下,沿舌根部切取舌体,对切为两半,以预冷的生理盐水清洗干净,其中一半直接置-80 $^{\circ}$ C冰箱保存备用;另一半切成小块并置于RNA保存剂(2 mL RNAlater)中4 $^{\circ}$ C浸泡12 h后,转移至-80 $^{\circ}$ C超低温冰箱保存备用。

### 1.2 组织蛋白质抽提

按照细胞及组织总蛋白抽提试剂盒(上海康成公司, KC-415)及鸡尾酒式蛋白酶-磷酸酶抑制剂(上海康成公司, KC-440)试剂说明书的方法进行。按250 mg组织,加入1 mL现配并已预冷的蛋白质抽提液。按说明书抽提后的上清液立刻转移入新的离心管中,经BSA蛋白质定量BCA蛋白质定量(上海康成公司, KC-430)后即用于大鼠细胞因子抗体芯片检测及大鼠细胞因子ELISA检测。

### 1.3 大鼠19种细胞因子抗体芯片检测

应用美国RayBiotech公司商品化的RayBio<sup>®</sup>大鼠细胞因子抗体芯片,由上海康成公司完成检测。用1 $\times$ 封闭缓冲液稀释样品裂解液使其1 mL的蛋白含量在50~500  $\mu$ g之间,按说明书完成实验操作;X线胶片曝光后,将使用过的膜置于-20 $^{\circ}$ C~-80 $^{\circ}$ C度保存。扫描图像后转换为灰度TIFF格式的图片文件保存。运行ScanAlyze软件,将灰度TIFF格式图片的点阵转化为数字型数据,原始数据储存为Microsoft Excel文件。

### 1.4 Real time-RCR检测细胞因子mRNA水平

1.4.1 RNA样品制备 按TRIZOL抽提RNA试剂盒说明书抽提RNA,视沉淀多少加入无RNase去离子水20~50  $\mu$ L,轻轻吹打促溶后立即置-80 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。

1.4.2 RNA纯度及浓度鉴定 琼脂糖电泳和微量分光光度仪检测RNA纯度及浓度。 $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$ 介于1.7~2.0之间则纳入后续研究,样品浓度/ $(\mu\text{g/mL})=D(260\text{ nm})\times$ 稀释倍数/1 000。

1.4.3 逆转录反应 配制退火混合物:RNA 3  $\mu$ g, 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L Oligo(dT) 18 1  $\mu$ L,加无RNA酶的H<sub>2</sub>O至总体积10  $\mu$ L,混合液在70 $^{\circ}$ C水浴3 min,降到37 $^{\circ}$ C放置10 min。RT反应液:5 $\times$ RT缓冲液4  $\mu$ L,2.5 mmol/L dNTP混合液4  $\mu$ L,RNA酶抑制剂1  $\mu$ L,MMLV反转录酶1  $\mu$ L,混合后37 $^{\circ}$ C恒温

1 min。加 10 μL 的 RT 反应液到 10 μL 退火混合物中, 37 °C 水浴 60 min, 加热到 95 °C 维持 5 min。得 RT 终溶液即为 cDNA 溶液, 置冰浴待用。

1.4.4 PCR 引物设计 根据 Genbank rat 的 GAPDH (NM\_017008.3)、Bcl-2(NM\_016993.1)、Bax (NM\_

017059.1)、TLR9(NM\_198131.1)、IL-1β(NM\_0315122)、IL-6 (NM\_012589.1)、TNF-α (NM\_012675)、VEGF (NM\_031836)、CINC (NM\_017183) 的 cDNA 基因序列, 采用加拿大 Primer 公司的 Primer 5.0 引物设计软件, 分别自行设计下列引物(表 1)。

表 1 Real-time PCR 使用引物  
Table 1 Primers of Real-time PCR

Genes	Sequences of primers	Annealing temperature(°C)	Product length (bp)
GAPDH	F: 5'AAGAAGGTGGTGAAGCAGGC 3' R: 5'TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'	58	203
Bcl-2	F: 5'CTGTGGATGACTGAGTACCT 3' R: 5'AGCCAGGAGAAATCAAACAG 3'	59	121
Bax	F: 5'TGCTACAGGGTTTCATCCAG 3' R: 5'ATCCACATCAGCAATCATCC 3'	59	175
TLR9	F: 5'TCCAAGACCTGAGAAGCCTGATT 3' R: 5'CCAGACTGCTCCAGTTAAAGAAAGA 3'	59	150
IL-1β	F: 5'CCCAAACAATACCCAAAGAA 3' R: 5'AGTCAACTATGTCCCGACCA 3'	59	175
IL-6	F: 5'TTGGGACTGATGTTGTTGAC 3' R: 5'GGCAAATTTCTGGTTATATCC 3'	59	285
TNFα	F: 5'CTCAGCCTCTTCTCATTCCT 3' R: 5'ATTTGGGAAGTTCTCCTCCT 3'	59	101
VEGF	F: 5'AGCATTGTTTGTCCAAGATCC 3' R: 5'CTAGTTCCCGAAACCCTGAG 3'	59	168
CINC	F: 5'CAAACCGAAGTCATAGCCAC 3' R: 5'CTAGTGTGTCAGAAGCCAG 3'	59	176

1.4.5 荧光定量 PCR 反应 将抽提的总 mRNA、上述引物序列寄给上海康成生物有限公司, 由其完成 Real Time PCR 反应, 几个梯度稀释的 DNA 模板以及所有待测 cDNA 样品分别配置 Realtime PCR 反应体系。体系配置如下: dNTP(2.5 mmol/L each)2.5 μL, 10 × PCR 缓冲液 2.5 μL, MgCl<sub>2</sub> 溶液 1.5 μL, Taq 聚合酶 1 u, Sybergreen I 终浓度 0.25 × 10 μmol/L 的 PCR 特异引物 F 1 μL, 10 μmol/L 的 PCR 特异引物 1 μL, cDNA(标准模板及待测模板) 1 μL, 加水至总体积为 25 μL, 短暂离心后置于 Rotor-Gene 3000 Real-time PCR 仪上进行 PCR 反应。反应条件分别如下: GAPDH: 95 °C, 5 min; 30 个 PCR 循环 (95 °C, 10 s; 58 °C, 15 s; 72 °C, 20 s; 84 °C 收集荧光, 5 s)。Bcl-2: 95 °C, 5 min; 35 个 PCR 循环 (95 °C, 10 s; 59 °C, 15 s; 72 °C, 20 s; 83.5 °C 收集荧光, 5 s)。Bax: 95 °C, 5 min; 35 个 PCR 循环 (95 °C, 10 s; 59 °C, 15 s; 72 °C, 20 s;

83.5 °C 收集荧光, 5 s)。TLR9: 95 °C, 5 min; 35 个 PCR 循环 (95 °C, 10 s; 59 °C, 15 s; 72 °C, 20 s; 82 °C 收集荧光, 5 s)。IL-1β: 95 °C, 5 min; 35 个 PCR 循环 (95 °C, 10 s; 59 °C, 15 s; 72 °C, 20 s; 81 °C 收集荧光, 5 s)。IL-6: 95 °C, 5 min; 35 个 PCR 循环 (95 °C, 10 s; 59 °C, 15 s; 72 °C, 20 s; 81 °C 收集荧光, 5 s)。TNF-α: 95 °C, 5 min; 35 个 PCR 循环 (95 °C, 10 s; 59 °C, 15 s; 72 °C, 20 s; 81 °C 收集荧光, 5 s)。VEGF: 95 °C, 5 min; 35 个 PCR 循环 (95 °C, 10 s; 59 °C, 15 s; 72 °C, 20 s; 81 °C 收集荧光, 5 s)。CINC: 95 °C, 5 min; 35 个 PCR 循环 (95 °C, 10 s; 59 °C, 15 s; 72 °C, 20 s; 81 °C 收集荧光, 5 s)。为了建立 PCR 产物的熔解曲线, 上述所有扩增反应结束后继续从 72 °C 缓慢加热到 99 °C (每 5 s 升高 1 °C)。

1.4.6 结果与计算 根据绘制的梯度稀释 DNA 标准曲线, 各样品目的基因和管家基因的浓度结

果直接由机器生成。每个样品的目的基因浓度除以其管家基因的浓度,即为此样品此基因的校正后的相对含量。在整个实验中样本的靶序列的量来自于标准曲线,最终必须除以参照物(对照组)的量,即参照物(对照组)是 1,其它的样本为参照物量的  $n$  倍。

### 1.5 ELISA 检测

采用美国 R&D 公司大鼠 ELSIA 试剂盒检测各样品 IL-1 $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、TIMP-1,按试剂盒说明书进行。采用奥地利 Tecan 酶标仪 450 nm 检测吸光度,该机所配备软件分析得到标准曲线,自动分析得到样品中的待测细胞因子含量。组织细胞因子相对含量:组织细胞因子相对含量=细胞因子(pg/

mL)/总蛋白(mg/mL)。

### 1.6 统计和分析

采用 SPSS16.0 统计软件包对各组正态分布资料进行 T-test 检验,多组间均数比较采用 One-way ANOVA;以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 抗体芯片结果

根据原始报告进一步分析得到待检的 19 种细胞因子水平比较结果(图 1),结果为:19 种细胞因子中,睫状神经元营养因子(CNTF),无论在正常对照还是在放射照射后的舌组织中均未检测到

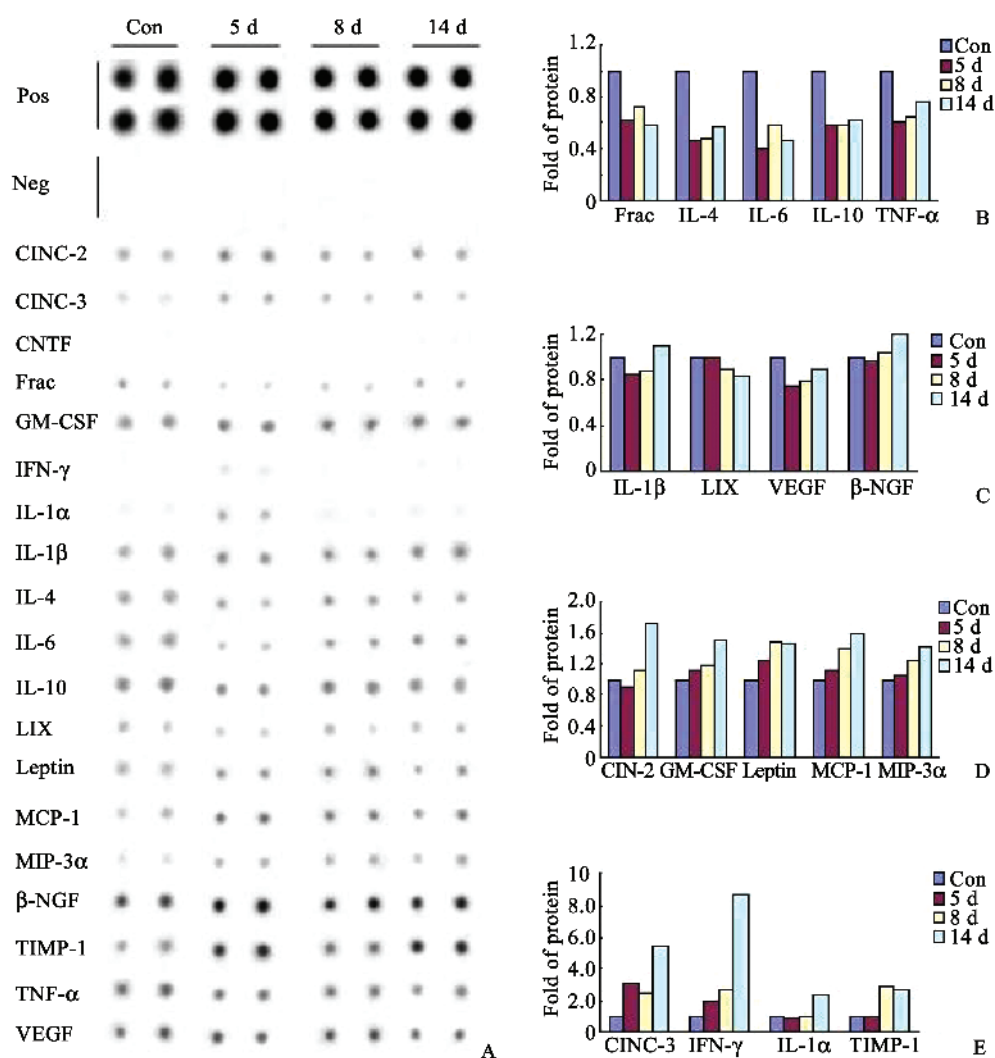


图 1 RayBio® 大鼠细胞因子抗体芯片检测 19 种细胞因子结果

Fig.1 Cytokines in the local tissues of radiation-induced oral mucositis were detected by RayBio® Rat Cytokine Array

A: the spots of 19 cytokines and exposures of the X-ray films; B,C,D,E: comparison of the grey levels for each spots respectively; Con: control; 5 d, 8 d, and 14 d: 5 day, 8 day, and 14 day after irradiation

其表达;其余 18 种细胞因子,与对照鼠比较,照射后蛋白水平下降的细胞因子,包括 Frac、IL-4、IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$  5 种细胞因子;照射前后蛋白水平相接近的细胞因子,包括 IL- $\beta$ 、LIX、VEGF、 $\beta$ -NGF 4 种细胞因子;照射后蛋白水平上升幅度小于 2 倍的细胞因子有 CINC-2、GM-CGF、Leptin、MCP-1 和 MIP-3 $\alpha$  5 种细胞因子,上升幅度大于 2 倍以上为 CINC-3、TIMP-1、IL-1 $\alpha$  和 INF- $\gamma$  4 种细胞因子。

### 2.2 样品总 RNA 提取情况

24 例舌组织 RNA 提取后,1.5%琼脂糖凝胶电泳及微量分光光度仪检测显示:所有样品 RNA 样品电泳条带清晰,28S 比 18S rRNA 条带亮度大于 1:1(图 2); $D(260\text{ nm}/280\text{ nm})$  比值位于 1.8 ~ 2.1 之间, $D(260\text{ nm}/230\text{ nm}) \geq 2.0$ ,含量  $\geq 2\ \mu\text{g}$ ,质量符合 Real-time PCR 实验要求。

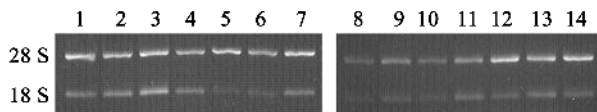


图 2 RNA 样品电泳结果

Fig.2 Electrophoresis of 1-14 RNA samples from the local tissues of radiation-induced oral mucositis

### 2.3 荧光定量 RT-PCR 检测

根据原始报告进一步分析得到 Bcl-2、IL-6、TNF- $\alpha$ 、VEGF、IL-1 $\beta$ 、Bax、CINC 和 TLR-9 等 8 种待检细胞因子相对表达水平比较结果,结果显示 Bcl-2、IL-6、TNF- $\alpha$ 、VEGF 及 IL-1 $\beta$  均表达下降; Bax、CINC 和 TLR-9 表达上升(图 3)。

### 2.4 ELISA 结果

Tecan 酶标仪配备软件分析得到标准曲线和由该机自动分析分别得到样品中的 IL-1 $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、TIMP-1 含量(表 2),可见 IFN- $\gamma$  自 5 d 起、TIMP-1 自 8 d 起、IL-1 $\alpha$  在第 14 天时含量皆比对照组高。

表 2 ELISA 检测细胞因子水平

Table 2 Cytokines detected by ELISA (pg/mg)

Groups	Cytokines		
	IL-1 $\alpha$	IFN- $\gamma$	TIMP-1
Control ( $n = 6$ )	336 $\pm$ 56	67 $\pm$ 34	247 $\pm$ 56
5 d ( $n = 6$ )	326 $\pm$ 68	138 $\pm$ 29 <sup>1)</sup>	256 $\pm$ 77
8 d ( $n = 6$ )	390 $\pm$ 84	287 $\pm$ 37 <sup>2)</sup>	584 $\pm$ 89 <sup>2)</sup>
14 d ( $n = 6$ )	676 $\pm$ 133 <sup>2)</sup>	490 $\pm$ 68 <sup>2)</sup>	577 $\pm$ 63 <sup>2)</sup>

Compared with control, 1)  $P < 0.05$ , 2)  $P < 0.01$

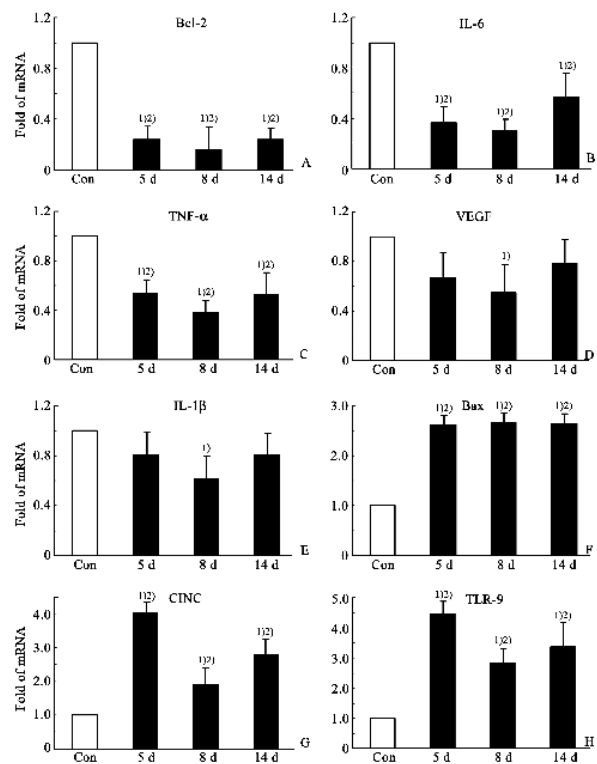


图 3 Real-time PCR 检测舌组织细胞因子 mRNA 的相对表达水平

Fig.3 Relative mRNA levels of 8 cytokines in the local tissues

After 5 d, 8 d, and 14 d received single X-ray irradiation of 30 Gy locally, and compared with control group (non-irradiation,  $n = 6$ ). The mRNA levels of anti-apoptosis, such as Bcl-2, and TNF- $\alpha$ , IL-6, VEGF, and IL-1 $\beta$  were low down, while the levels of promoting apoptosis cytokine such as Bax, and neutrophil recruitment associated cytokines, CINC, TLR-9 were up-regulated after irradiation.  $n = 6$ , 1)  $P < 0.05$ ; 2)  $P < 0.01$

## 3 讨论

抗体芯片技术是近年来发展起来的一种可以同时检测多种蛋白质表达水平的技术,大量不同的抗体按照预定的顺序排列并固定在支持物上且保留其抗原结合能力,制成抗体芯片膜,与蛋白质样品一起孵育,识别并捕捉抗原,通过标记物显色方法对抗原以及与抗原相连的蛋白质进行研究,是一种微型化,集成化,高通量化的蛋白质研究工具,而且在技术上已经日益成熟,为并行检测相关细胞因子(蛋白)从全局上把握系统变化提供了研究平台。我们设想采用抗体芯片技术,初步筛选出 ROM 相关细胞因子的动态变化,荧光定量 PCR 反

应检测炎症相关因子的 mRNA 水平,ELISA 定量检测 ROM 病损组织的细胞因子水平,以期探索炎症相关因子在 ROM 形成过程中的作用规律及其意义,为寻找防治 ROM 的关键分子靶标提供实验依据和线索。

### 3.1 本研究的细胞因子研究策略

本研究采用商品化的大鼠细胞因子抗体芯片技术,该技术的优势是可全面、快捷、并行和系统分析待测样本间 19 种细胞因子的差别,缺点是价格昂贵难以大规模、多样本检测,因此本研究仅在 5 d 组、8 d 组、14 d 组、正常对照组各随机抽取一个样本作筛选检测,得出线索后,再加入剩余各组的样本,进行后续的荧光定量 PCR 选择性检测 8 种细胞因子(mRNA,即比较转录水平)以及 ELISA 检测 IL-1 $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、TIMP-1(蛋白质水平,即比较翻译水平)。结果的数据表明,上述三种技术检测结果一致,是一个有效的研究策略。

### 3.2 放射照射后舌体局部病损组织内的细胞因子变化不一

总体来说,放射照射后 5~8 d 的细胞因子水平总体处于低水平,可能与此时的舌体组织、细胞处于损伤阶段,细胞功能受损,正常的细胞因子产生过程受阻,造成 Frac、IL-4、IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$  等细胞因子分泌下降,这里既包括促炎症细胞因子 IL-4、IL-6、TNF- $\alpha$ ,也有抗炎细胞因子 IL-10;在放射后 14 d,虽然临床上观察的上皮组织呈现溃疡最严重的阶段,但此时的细胞因子水平并不是处于最低水平,如 CINC-3、TIMP-1、IL-1 $\alpha$  和 INF- $\gamma$  等 4 种细胞因子水平并不下降,反而处于相对高水平,同样的变化也发生在 5 d、8 d;结合起来分析,推测舌体组织在放射照射后不仅损伤造成某些细胞因子合成受阻,也可使受到放射刺激的细胞被诱导产生细胞因子的水平明显上升。

### 3.3 局部炎症细胞促凋亡相关的细胞因子上调、抗凋亡因子下降

放射照射后 5 d、8 d、14 d 的 Bcl-2 mRNA 水平急剧下降为正常水平的 0.3 倍以下,与此相反,Bax 的 mRNA 水平维持在 2.5 倍以上。Bcl-2 是抗凋亡细胞因子,而 Bax 是促凋亡因子,与放射照射后 5 d、8 d、14 d 的 ROM 病损组织细胞损伤为主相一致。

### 3.4 与局部炎症细胞募集相关的细胞因子改变

炎症细胞募集过程是炎症反应在微血管动脉

局部作用的初始环节,尤其是单核细胞的黏附和游走更是局部炎症形成的最初条件。促进血管内皮细胞表达黏附分子,又是触发炎症形成的关键,这些因子能够强烈促进包括其自身在内的多种炎症介质的表达,又进一步造成了局部的炎性环境,从而引发了恶性循环,推动炎症向前发展。

分析本研究观测到 ROM 病损组织 5 d、8 d、14 d 的 IL-1 $\alpha$ 、CINC-2、CINC-3 变化,三者的时相变化基本一致。IL-1 $\alpha$  最直接的作用就是上调内皮细胞 E-selectin、ICAM-1、V-CAM 等粘附分子和刺激 CINC 等趋化因子的产生,CINC 与人类 IL-8 超家族成员 GRO- $\alpha$  同源,是大鼠 CXC 趋化因子家族的典型代表,特异性趋化粒细胞,二者在中性粒细胞表面有共同的受体,促进中性粒细胞与血管内皮的粘附并趋化粒细胞到组织中,于是,中性粒细胞与内皮细胞粘着并迁移至上皮下层而造成进一步的损伤。

### 3.5 血管形成相关的细胞因子等没有显著变化

虽然临床可观察到黏膜红斑、充血、黏膜出血,但此时 ROM 舌病损组织内 IL-1 $\beta$ 、IL-6、VEGF、GM-CSF 并没有像期待的那样明显增高,甚至还处于降低状态。很多研究证明 IL-1 $\beta$ 、IL-6 对于 RTOM 的发生具有重要作用,目前的研究认为 IL-6 在 RTOM 中的作用是相互矛盾的,即能促进口腔黏膜溃疡发展<sup>[10]</sup>,又被认为具有抗炎性质,因为有报道它能诱导 IL-1Ra 合成和可溶性 TNFR 释放<sup>[11]</sup>,而这两种分子可降低致炎因子的活性。虽然目前仍然把它归结为 RTOM 中的致炎因子,但对于 IL-6 在 RTOM 中究竟起到怎样的作用,对其它因子有什么样的影响尚需进一步研究。推测可能存在病变局部微环境和细胞因子之间的某些未知的网络作用造成这样的结果。VEGF 是血管通透和内皮细胞生长因子,是最强烈的血管形成刺激因子,本研究却观测到 VEGF 在各时点比较差别不大,甚至随时相呈下降趋势,说明此时的血管变化以损伤为主,没有新生血管的形成。

### 3.6 小结

大鼠抗体芯片结合荧光定量 PCR、ELISA 技术可有效检测出 ROM 舌病损组织内的细胞因子变化,促凋亡相关的细胞因子 Bax 的 mRNA 水平上调、抗凋亡因子 Bcl-2 的 mRNA 下降,促中性粒细胞募集相关因子 IL-1 $\alpha$ 、CINC-2、CINC-3 表达上

调,血管形成相关等细胞因子没有显著变化,变化剧烈的细胞因子是 IL-1 $\alpha$ 、CINC-3、INF- $\gamma$ 、和 TIMP-1 等4种细胞因子,其作用有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 陈谦明. 口腔黏膜病学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2008:77-78.
- [2] Berger JMF. Principles & Practice of Oncology[M]. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2008: 546-568.
- [3] Sonis ST, Fey EG. Oral complications of cancer therapy[J]. Oncology (Williston Park), 2002, 16(5): 680-686.
- [4] Alterio D, Jerezek-Fossa BA, Fiore MR, et al. Cancer treatment-induced oral mucositis[J]. Anticancer Res, 2007, 27(2): 1105-1125.
- [5] Vera-Llonch M, Oster G, Hagiwara M, et al. Oral mucositis in patients undergoing radiation treatment for head and neck carcinoma[J]. Cancer, 2006, 106(2): 329-336.
- [6] Sonis ST. The pathobiology of mucositis[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(4): 277-284.
- [7] Spehlmann ME, Eckmann L. Nuclear factor-kappa B in intestinal protection and destruction[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2009, 25(2): 92-99.
- [8] 冯崇锦, 郭俊兵, 李春阳, 等. 大鼠放射性口腔黏膜炎模型的建立[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2006, 26(4): 346-348.
- [9] Bennett CL, Lane D, Stinson T, et al. Economic analysis of amifostine as adjunctive support for patients with advanced head and neck cancer: preliminary results from a randomized phase II clinical trial from Germany[J]. Cancer Invest, 2001, 19(2): 107-113.
- [10] Borges L, Rex KL, Chen JN, et al. A protective role for keratinocyte growth factor in a murine model of chemotherapy and radiotherapy-induced mucositis [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006, 66(1): 254-262.

(编辑 刘清海)

(上接第224页 from page 224)

- [J]. Spine, 2006, 31(14): 1532-1538.
- [8] 崔力扬, 刘尚礼, 丁悦, 等. 大鼠腰椎间盘突出刺退变模型的建立[J]. 中国矫形外科杂志, 2007, 15(13): 1008-1011.
- [9] Wang J, Tang T, Yang H, et al. The expression of Fas ligand on normal and stabbed-disc cells in a rabbit model of intervertebral disc degeneration: a possible pathogenesis [J]. J Neurosurg Spine, 2007, 6(5): 425-430.
- [10] 吴叶, 侯树勋. 椎间盘退变动物模型研究进展[J]. 国外医学-骨科学分册, 2005, 26(6): 333-336.
- [11] Yorimitsu E, Chiba K, Toyama Y, et al. Long-term outcomes of standard discectomy for lumbar disc herniation: a follow-up study of more than 10 years [J]. Spine, 2001, 26(6): 652-657.
- [12] 戴春娟, 叶祖萍, 牛军, 等. 低浓度平阳霉素瘤体内注射治疗血管瘤的临床观察[J]. 临床小儿外科杂志, 2007, 6(5): 36-37.
- [13] Guillaume B, Francois J, Nelly B, et al. Macrophage activity in infected areas of an experimental vertebral osteomyelitis model: USPIO-enhanced MR imaging—feasibility study [J]. Radiology, 2008, 248(5): 114-123.

(编辑 王晓鹰)