doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.08.004

## SD 大鼠急性放射性皮炎模型的建立\*

张倩玉<sup>1,2</sup> 许 斌<sup>1</sup> 张惠博<sup>1</sup> 陈罗军<sup>1</sup> 宋启斌<sup>1</sup> (1武汉大学人民医院肿瘤—科 湖北武汉 430060;2 安徽省立医院 安徽 合肥 230000))

摘要目的:建立安全的 SD 大鼠急性放射性皮炎模型。方法:将 28 只雄性 SD 大鼠随机分为 7 组,分别为空白对照组,电子线照射 组(60 Gy,45 Gy,30 Gy),X 线照射组(45 Gy,30 Gy,15 Gy),每组 4 只。选择臀背部皮肤,去毛后照射。放疗后第一天起开始观察 动物皮肤表现,采用 Douglas and Fowler 评分方法记录每只动物皮炎情况,并定期测量动物体重,观察动物一般情况并记录死亡 情况。于放疗后第 28 天处死动物,取照射区域皮肤行 HE 染色及免疫组化染色(CD3,CD11c,CD68,IV 型胶原),以通过光镜分析 射线照射后皮肤组织变化情况、真皮层内炎症细胞浸润类型及胶原形成情况。结果:至放疗后第 28 天 X 线照射组动物出现大量 死亡,电子线照射组动物均存活,电子线各组均出现不同程度的放射性皮炎反应,镜下可见局部组织不同程度的表皮层坏死、炎 症细胞浸润、毛囊及附属器减少等表现,以电子线照射 60 Gy 及 45 Gy 组表现明显。免疫组化结果显示放射线照射可使真皮层内 以 CD68 为表面标志的巨噬细胞浸润增加,并促进以 IV 型胶原为标志胶原细胞形成。结论:电子线 60 Gy 及 45 Gy 照射 SD 大鼠 臀背部皮肤可建立一种安全有效的急性放射性皮炎动物模型,其临床表现及病理表现可用于实验研究。

关键词:急性放射性皮炎;SD 大鼠模型;电子线;X 线

中图分类号: R-33; R758.13 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2018) 08-1419-06

## Establishment of a SD Rat Model of Acute Radiation-induced Skin Reaction\*

ZHANG Qian-yu<sup>1,2</sup>, XU Bin<sup>1</sup>, ZHANG Hui-bo<sup>1</sup>, CHEN Luo-jun<sup>1</sup>, SONG Qi-bin<sup>1</sup>

(1 Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei, 430060, China; 2 Anhui Provincial Hospital, Hefei, Anhui, 230000, China)

**ABSTRACT Objective:** To establish a pre-clinical SD rat model of acute radiation-induced dermatitis. Methods: 28 male SD rats were divided into 7 groups randomly, including control group, electron irradiation groups receiving 60 Gy × 1f, 45 Gy × 1f or 30 Gy × 1f respectively, and X-ray irradiation groups receiving 45 Gy × 1f, 30 Gy × 1f or 15 Gy × 1f respectively. Each group composed 4 rats. All animals were irradiated in shaved dorsal areas  $(3 \text{ cm} \times 3 \text{ cm})$ . The cutaneous damage was assessed during 1-28 days after irradiation using Douglas and Fowler scores. Meanwhile, the weight change and survival of rats were recorded. Irradiated skin tissues were collected for H&E staining and IHC examinations (CD3, CD11c, CD68 and Type IV-collagen) to analyze the pathological change of skin structure, infiltration of immune cells, as well as collagen deposition. **Results:** High mortality occurred in X-ray irradiation groups. H&E staining showed necrosis in epidermis, inflammatory immune cells infiltration, loss of hair follicle and other skin adnexal, especially in 60 Gy × 1f and 45Gy × 1f groups. IHC results suggested radiation promoted both infiltration of macrophages marked with CD68 in dermis and collagen formation marked with type IV-collagen. **Conclusion:** Irradiating with 60 Gy and 45 Gy electron on SD rats successfully established a practically pre-clinical animal model. The clinical and pathological features could be employed in future research.

Key words: Acute radiation-induced skin reaction; SD rat model; Electron irradiation; X-ray irradiation Chinese Library Classification(CLC): R33; R758.13 Document code: A Article ID: 1673-6273(2018)08-1419-06

### 前言

恶性肿瘤作为我国发病率及死亡率最高的疾病之一,其治 疗方法包括手术、化疗、放疗、靶向治疗及免疫治疗等。放射治 疗作为一种局部治疗手段,常单独或与其他治疗手段联合使 用,约有 50-60%的患者在治疗的某一阶段会接受放射治疗<sup>[1]</sup>。 然而,放射线在作用于肿瘤组织的同时会对照射野及周围正常 组织产生损伤,如:局部皮肤是外照射无法避免的正常组织。急 性放射性皮炎(acute Radiation-induced Skin Reaction, a-RISR) 是常见的放疗并发症,约 95%<sup>[2]</sup>的患者会在放疗期间或完成后 出现脱发、红斑、脱屑、渗出、溃疡等急性放射性皮炎的典型表 现<sup>[3]</sup>。急性放射性皮炎(a-RISR)是指在放疗开始后 90 天内由 β,γ,X 等射线所导致的局部皮肤组织反应<sup>[4]</sup>,其导致的疼痛、瘙 痒、烧灼感等不适轻可影响患者生存质量,重则影响放射治疗

<sup>\*</sup>基金项目:国家自然科学基金项目(81372407)

作者简介:张倩玉(1992-),临床医学七年制研究生,研究方向:放射性损伤,电话:18919634028,E-mail: 1030307946@qq.com

<sup>△</sup> 通讯作者:宋启斌(1962-),研究方向:恶性肿瘤的综合治疗,电话:13517281931

<sup>(</sup>收稿日期:2017-07-31 接受日期:2017-08-23)

的顺利进行。因此,对于放射性皮炎发病机制以及防治措施的 研究越来越受到关注,此类研究的首要步骤是建立稳定的动物 模型。已有的研究显示,急性放射性皮炎的造模方式可使用电 子线或X线,剂量为单次大剂量的照射方式,剂量10-60 Gy不 等,但暂未统一规范的造模方式。本研究采取不同类型的射线 类型及放射剂量诱导尝试建立急性放射性皮炎的大鼠模型,为 进一步机制的探究及防治研究奠定基础。

#### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

动物来源:健康清洁级 SD 雄性大鼠 28 只,质量 240-260 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 随机分为7组,分别为空白对照组,电子线 照射组(60 Gy,45 Gy,30 Gy),X线照射组(45 Gy,30 Gy,15 Gy),每组4只,对照组不接受放射,其余各组接受臀背部皮肤 照射。照射前所有动物(包括对照组动物)使用电推刀局部去 毛。照射时采用异氟烷吸入麻醉。

1.2.2 照射方法 电子线:采用 6 MV 电子线,照射野 3×3 cm,剂量率 300 MU/min,单次照射源皮距 100 cm,使用 1.5 cm 补偿膜,每次照射一只。X 线:采用 6 MV X 线,照射野 3×3 cm,剂量率 300 MU/min,单次照射,源皮距 100 cm,使用 1.5 cm 补偿膜,每次照射 2 只。对照组:仅麻醉,局部去毛,不进行照射 1.2.3 观察指标与评分标准 照射后每天观察照射区域(臀背部)皮炎情况并评分,采用 Douglas and Fowler 评分方法<sup>15</sup>(见表 1)。监测大鼠体重变化并记录死亡情况。

1.2.4 病理学检测 观察 4 周后使用 2%戊巴比妥钠腹腔麻 醉,取照射区域皮肤大小约 1 cm× 1 cm,使用 4%多聚甲醛固 定,石蜡包埋后进行切片,行 HE 染色及免疫组化染色(检测 CD3,CD11c,CD68,IV 型胶原在皮肤组织的表达分布情况,以 证明在放射 4 周后,放射野皮肤组织内 T 细胞,DC 细胞,巨噬 细胞浸润及胶原形成情况)。

#### 表 1 Douglas and Fowler 放射性皮炎评分

Table	1	Douglas	and I	Fowler	scores	of rac	liation	dermat	itis
		0							

Score	Dermatitis performance
0	Normal
0.25	50/50 doubtful if there is any difference from normal
0.5	Very slight reddening
0.75	Definite but slight reddening
1	Severe reddening
1.25	Severe reddening with white scale, "papery" aspect of the skin
1.5	Moist breakdown in one very small area with scaly or crusty appearance
1.75	Moist desquamation in more than one small area
2	Moist desquamation of larger area : 25% of the irradiated area
2.25	Moist desquamation of larger area : 33% of the irradiated area
2.5	Moist desquamation of larger area : 50% of the irradiated area
2.75	Moist desquamation of larger area : 66% of the irradiated area
3	Moist desquamation of most of the irradiated area
3.25	Moist desquamation of most of the irradiated area with slight moist exudate
3.5	Moist desquamation of the irradiated area with moist exudates. Necrosis

#### 1.3 统计学方法

分析动物体重变化情况及皮炎评分情况。使用 SPSS20.0 软件进行重复测量的方差分析。

#### 2 结果

#### 2.1 动物一般情况

对照组及电子线照射组共 16 只大鼠均未死亡。X 线照射 组 12 只大鼠自照射后第 6 天开始出现死亡(死亡情况见表 2。):0 X 线 45Gy 组 4 只大鼠分别于第 6、7、9、11 天死亡,4 周 内死亡率 100%; 0 X 线 30Gy 组 4 只大鼠分别于 6、12、14、18 天死亡,4 周内死亡率 100%; 0 X 线 15Gy 组中 1 只大鼠于第 9天出现死亡,4周内死亡率25%。

X 线照射组死亡大鼠存活期内及存活大鼠 4 周内未出现 肉眼可见的放射性皮炎。X 线照射组大鼠生存情况如图 1。

由于每组动物数量有限,无法进行有效的统计。大鼠死亡 前2天出现精神状态下降、腹泻症状。大鼠体重情况如图2。

对比对照组,电子线照射 60 Gy 组、45 Gy 组、30 Gy 组体 重无显著性差异,P 值分别为 0.389、0.317、0.964 (统计结果见 表 3)。

#### 2.2 放射性皮炎特征

2.2.1 **外观特征** 电子线各组大鼠于第 8-10 天开始出现肉眼可见的放射性皮炎:红斑、脱毛,进而出现薄纸样改变、痂皮样

Table 2 The mortality of all rats					
Groups	Death	Mortality	Remarks		
Electron ray 60Gy	0	0			
Electron ray 45Gy	0	0			
Electron ray 30Gy	0	0			
X ray 45Gy	4	100%	On the 6th, 7th, 9th, 11th day		
X ray 30Gy	4	100%	On the 6th, 12th, 14th, 18th day		
X ray 15Gy	1	25%	On the 9th day. No obvious performance occurred.		
0Gy	0	0			

表 2 各组大鼠死亡情况



表 3 电子线各组动物体重统计结果

Table 3 Weighs statistical result of all electron ray treated anima	tistical result of all electron ray treated anir	nals
---	--	------

(i)Padiation dosa	(j)Radiation dose	i-j	Standard error	Sig	95%CI	
(I)Radiation dose					Upper limit	Lower limit
0Gy	60Gy	13.05	14.682	.389	-18.44	44.54
	45Gy	-15.23	14.682	.317	-46.71	16.26
	30Gy	0.68	14.682	.964	-30.81	32.16

注:Sig:Significance 显著性;CI:Confidence Interval 置信区间

改变,并伴随渗液,于第 22-24 天达高峰。后皮炎逐渐好转,痂 皮剥脱,电子线 30 Gy 组可见毛发重新生长。

各组放射性皮炎表现如图 3。

4周内皮炎评分结果如图 4。

皮炎评分统计学结果如表 4。

2.2.2 镜下特征 于放疗后第 28 天处死动物,取放射野皮肤, 经 4%多聚甲醛固定后,石蜡包埋、切片、HE 染色,光镜下观察。 对照组:表皮、真皮大致正常,真皮内可见丰富的毛囊结构,可 见皮肤褶皱;电子线 30 Gy 组:表皮层全层、真皮层结构完整, 毛囊及皮脂腺结构清晰可见,炎症浸润现象不明显,皮肤褶皱 存在,但较对照组不明显且数量减少;电子线 45 Gy 组:表皮层 各层结构分界未见,结构紊乱,出现坏死,真皮层内可见明显炎 性细胞浸润,表皮层与真皮层分离,毛囊及皮脂腺未见,皮肤褶 皱未见;电子线 60 Gy 组:部分动物表皮层完全坏死,镜下未见 明确表皮层组织,其余表皮层各层结构分界未见,结构紊乱,出 现坏死,真皮层内大量炎性细胞浸润,毛囊及皮脂腺结构未见, 皮肤褶皱未见。HE结果见图 5。

鉴于 HE 染色可见真皮层内大量炎性细胞浸润,为探究浸 润细胞类型,行 CD3、CD11c、CD68 免疫组化染色,分别分析 T 淋巴细胞、树突状细胞及巨噬细胞浸润情况,并行四型胶原免 疫组化染色对比各组胶原形成情况。免疫组化结果见图 6-9。结 果显示 CD3 及 CD11c 在电子线照射的 3 组大鼠及对照组大 鼠皮肤组织内均未见明显阳性。电子线 60Gy 及 45Gy 两组可 见 IV 胶原及 CD68 明显阳性染色,而该指标在电子线 30Gy 组 及对照组未见阳性染色。说明 60Gy 及 45Gy 电子线照射可使 真皮内大量巨噬细胞浸润并促进胶原形成。



图 3 电子线照射组大鼠放疗后 D12、15、20、25、28 皮炎表现 Fig.3 The skin reaction of electron ray treated rats on the 12th, 15th, 20th, 25th, 28th day



group rats

放射治疗作为肿瘤治疗中的常用方法,其副作用急性放射 性皮炎是常见并发症,临床上对于急性放射性皮炎的预防、治 疗尚未有统一标准,因此,研究者多使用动物模型研究其发生 机制及治疗手段。

对于放射性皮炎动物模型的建立,在动物种属选择上多选 用大鼠<sup>[69]</sup>或小鼠<sup>[12-14]</sup>,也有研究者使用猪建立该模型<sup>[15]</sup>。在大鼠 或小鼠放射性皮炎模型建立中,放射区域为四肢或背部皮肤。 鉴于背部皮肤面积大,利于每日观察,且与周围物体摩擦较四 肢少,本实验选用背部皮肤作为照射区域,为减少对周围组织 造成的副作用,控制区域大小为 3× 3 cm。

在放射线类型选择上,研究者多选择单一射线类型进行造模,Doctrow SR等<sup>[10]</sup>等使用单次剂量 30 Gy 的 X 线(源皮距 37 mm,剂量率 0.68 Gy/min)照射大鼠背部皮肤。Jourdan MM<sup>[11]</sup>等使用单次剂量 10-40 Gy 的 X 线(源皮距 37 mm,剂量率 0.68 Gy/min)照射大鼠背部皮肤制作模型。Takikawa M<sup>[9]</sup>等使用 150kVX 射线,单次剂量 15、20、30 Gy(剂量率 1 Gy/min)在大鼠背部皮肤造模。Watanabe S等<sup>[8]</sup>使用单次剂量 20 Gy 的 150 kV X 线(源皮距 35 cm,剂量率 1 Gy/min)在大鼠的背部皮肤上进行照射。Holler V等<sup>[13]</sup>使用单次剂量为 8.5-45 Gy 的 Co60 射

Table 4 Skin scores statistical result of all electron ray treated animals

(i)Padiation dose	(j)Radiation dose	i-j	Standard error	Sig	95%CI	
(I)Radiation dose					Upper limit	Lower limit
0Gy	60Gy	34	.051	.000	45	23
	45Gy	39	.051	.000	50	28
	30Gy	.88	.051	.000	.77	.99
30Gy	60Gy	34	.051	.000	45	23
	45Gy	39	.051	.000	50	28
45Gy	60Gy	.05	.051	.352	06	.16

Note: Sig: Significance; CI: Confidence Interval.



图 5 放疗后第 28 天电子线照射组及对照组照射区域皮肤 HE 染色结果(40×)





图 7 放疗后第 28 天电子线照射组及对照组照射区域皮肤 CD11c 染色 结果(100×)

Fig.7 The CD11c IHC stains of electron ray treated and control group rats' local skin on the 28th day(100× )

线(1.5 Gy/min)照射小鼠背部皮肤。Zhang S 等阿使用 6MeV 的 电子线,单次剂量 45 Gy(剂量率 7.5 Gy/min)在大鼠臀部皮肤 上制作放射性皮炎的模型。Mei K<sup>II</sup>等使用 Co60 射线单次剂量 15、20、25 Gy 或 3× 10 Gy 的照射方式在 SD 大鼠的头颈部制 造放疗模型。Okunieff P 等<sup>[12]</sup>在研究姜黄素对急性放射性皮炎 的保护作用时使用单次剂量 50 Gy 的 6000 Ci 137Cs 源的射线 造模。由上试验方式可知,实验者大多使用单次大剂量的方式 进行造模,安全方便,避免多次照射对动物造成麻醉所致的以 外死亡,X线及电子线均被选择,但暂无将不同类型射线在同 一动物实验中进行对比的报道。电子线穿透力较弱,对内脏器 官损伤较少,X线是临床上患者治疗上最常使用的射线类型, 穿透力较前者强。本研究发现,对于6 MeV 电子线与6 MeV X 线进行大鼠背部急性放射性皮炎模型的建立,造模动物安全性 电子线远高于 X 线,动物精神状态及体重较对照组未见明显 改变。因X线穿透性强造成动物腹腔脏器损伤,动物出现明显 体重下降,腹泻,精神状态差等表现,继而出现大量死亡。仅



图 6 放疗后第 28 天电子线照射组及对照组照射区域皮肤 CD3 染色 结果(100×)

Fig.6 The CD3 IHC stains of electron ray treated and control group rats' local skin on the 28th day(  $100\times$  )



图 8 示放疗后第 28 天电子线照射组及对照组照射区域皮肤 CD68 染 色结果(100×)(左下角放大图片为 400× 放大倍数)

Fig.8 The CD68 IHC stains of electron ray treated and control group rats' local skin on the 28th day. (  $100 \times$  )(the left bottom figures are  $400 \times$  )



图 9 示放疗后第 28 天电子线照射组及对照组照射区域皮肤 IV 型胶原 染色结果(100×)

Fig.9 The Type- IV collagen IHC stains of electron ray treated and control group rats' local skin on the 28th day

15Gy 组大鼠生存良好,但并未出现肉眼可见的放射性皮损。电子线 45 Gy、60 Gy 均可产生明显的放射性皮损且安全性良好。综合考虑,45 Gy 电子线为良好的射线、剂量选择。

大鼠背部的急性放射性皮炎表现为脱毛、红斑、薄纸样改 变及结痂,光镜下可见皮肤表皮层坏死,真皮层内皮肤附属器 消失,结构紊乱,大量炎性细胞浸润。符合放射性皮炎皮肤表 现。免疫组化结果显示急性放射性皮炎的发生中会出现巨噬细 胞浸润及胶原形成,而T淋巴细胞及DC细胞浸润不明显。鉴 于HE染色及免疫组化染色均可见大量分叶核细胞浸润,今后 试验可加做CD15染色以证实中性粒细胞在其中的作用。

本研究结果推荐使用 45 Gy 电子线进行大鼠背部急性放射性皮炎模型的建立,具有安全性高、耐受性好、表现明显、易于观察、方便取材等特点,可作为研究该疾病发生机制及治疗方法的研究。

#### 参考文献(References)

- Porock D, Kristjanson L. Skin reactions during radiotherapy for breast cancer: The use and impact of topical agents and dressings [J]. European journal of cancer care, 1999, 8(3): 143-153
- McQuestion M. Evidence-based skin care management in radiation therapy:Clinical update [J]. Seminars in oncology nursing, 2011, 27 (2): e1-17
- [3] Singh M, Alavi A, Wong R, et al. Radiodermatitis: A review of our current understanding [J]. American journal of clinical dermatology, 2016, 17(3): 277-292
- [4] Cox JD, Stetz J, Pajak TF. Toxicity criteria of the radiation therapy oncology group (rtog) and the european organization for research and treatment of cancer (eortc) [J]. International journal of radiation oncology, biology, physics, 1995, 31(5): 1341-1346
- [5] Douglas BG, Fowler JF. The effect of multiple small doses of x rays on skin reactions in the mouse and a basic interpretation. 1976 [J]. Radiation research, 2012, 178(2): AV125-138
- [6] Zhang S, Song C, Zhou J, et al. Amelioration of radiation-induced skin injury by adenovirus-mediated heme oxygenase-1 (ho-1)

overexpression in rats [J]. Radiation oncology (London, England), 2012, 7(4)

- [7] Mei K, Zhao S, Qian L, et al. Hydrogen protects rats from dermatitis caused by local radiation[J]. The Journal of dermatological treatment, 2014, 25(2): 182-188
- [8] Watanabe S, Fujita M, Ishihara M, et al. Protective effect of inhalation of hydrogen gas on radiation-induced dermatitis and skin injury in rats[J]. Journal of radiation research, 2014, 55(6): 1107-1113
- [9] Takikawa M, Sumi Y, Tanaka Y, et al. Protective effect of prostaglandin e (1) on radiation-induced proliferative inhibition and apoptosis in keratinocytes and healing of radiation-induced skin injury in rats[J]. Journal of radiation research, 2012, 53(3): 385-394
- [10] Doctrow SR, Lopez A, Schock AM, et al. A synthetic superoxide dismutase/catalase mimetic euk-207 mitigates radiation dermatitis and promotes wound healing in irradiated rat skin [J]. The Journal of investigative dermatology, 2013, 133(4): 1088-1096
- [11] Jourdan MM, Lopez A, Olasz EB, et al. Laminin 332 deposition is diminished in irradiated skin in an animal model of combined radiation and wound skin injury[J]. Radiation research, 2011, 176(5): 636-648
- [12] Okunieff P, Xu J, Hu D, et al. Curcumin protects against radiation-induced acute and chronic cutaneous toxicity in mice and decreases mrna expression of inflammatory and fibrogenic cytokines
  [J]. International journal of radiation oncology, biology, physics, 2006, 65(3): 890-898
- [13] Holler V, Buard V, Gaugler MH, et al. Pravastatin limits radiationinduced vascular dysfunction in the skin [J]. The Journal of investigative dermatology, 2009, 129(5): 1280-1291
- [14] Ryu SH, Kim YH, Lee SW, et al. The preventive effect of recombinant human growth factor (rhegf) on the recurrence of radiodermatitis[J]. Journal of radiation research, 2010, 51(5): 511-517
- [15] Fang T, Gao ZM, Wang YF, et al. The establishment of minipig stage II acute radiation induced skin reaction [J]. Chinese Journal of Laboratory Animal Science, 1998, 8(1): 29-30

## ・重要信息・

# 《现代生物医学进展》2018年封面设计说明

本次封面设计使用了两张图片并做了切割处理,照片其一是参照意大利艺术家达芬奇的著名素描作品《维特鲁威人》所做的 人体骨骼和形态示意图,图中的人体形态与时钟有相似之处,图二为时钟与人脑的组合,这两幅图片都在强调人体与时间的联 系。长久以来人们便认识到:包括人类在内的生物有一个内部生物钟,能帮助生物预测和适应外界节奏规律。当外部环境和内部 生物钟出现不不匹配,就会出现相应紊乱,并增加许多疾病的风险。2017年10月2日,诺贝尔生理学或医学奖授予了美国生物学 家 Jeffrey C. Hall, MichaelRosbash 和 Michael W. Young,以奖励他们在发现 "昼夜节律控制分子机制 "方面的贡献。他们找到了 一个能控制日常生物节律的基因,这种基因所编码的蛋白在细胞中会随时间变化,就像是细胞内部生物节律时钟的发条。本年度 的杂志封面选择生物节律为主题,凸显了《现代生物医学进展》随时关注着生物医学发展的脚步,时刻保持在该研究领域的前沿。