

依帕司他对放射性肺炎小鼠线粒体氧化应激损伤的保护作用

李泽朋¹, 顾文强¹, 陈晓¹, 王银华², 李先伟¹

¹皖南医学院药学院药理学教研室, 芜湖 241002, 安徽;

²芜湖市第二人民医院肿瘤放疗科, 芜湖 241000, 安徽

摘要 目的:探讨依帕司他(Epa)对放射性肺炎(RP)小鼠线粒体氧化应激损伤的影响及其机制。方法:C57BL/6小鼠随机对照(CON)组、放射(IR)组、IR联合10 mg/kg Epa处理组及IR联合20 mg/kg Epa处理组,每组各16只。采用6MV X线直线加速器全胸单次照射15 Gy建立放射性肺炎模型。照射后连续灌胃给药6~8周。HE染色观察肺组织病理变化。透射电镜观察肺组织线粒体结构。ELISA检测血浆白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及转化生长因子- β 1(TGF- β 1)的水平。免疫组化检测肺组织醛糖还原酶(AR)的表达。比色法检测肺组织丙二醛(MDA)及4-羟基壬烯醛(4-HNE)含量。制备肺组织单细胞悬液,使用DCFH-DA探针检测细胞内活性氧(ROS)水平。实时定量PCR检测AR、IL-6、TNF- α 和TGF- β 1 mRNA的表达。Western blot法检测AR、IL-6、TNF- α 、TGF- β 1、BAX、Bcl2、Cleaved Caspase-3、8-氧鸟嘌呤DNA糖基化酶1(OGG1)及沉默信号调节因子3(SIRT3)的蛋白水平。结果:与CON组相比,IR组肺泡水肿,肺泡间隔增厚并伴大量炎症细胞浸润;炎症因子IL-6、TNF- α 和TGF- β 1的水平明显升高($P<0.01$);Bcl2的表达明显下调而BAX、Cleaved Caspase-3的表达明显上调($P<0.05$, $P<0.01$)。与IR组相比,Epa

连续给药6~8周后,小鼠肺组织炎症损伤明显减轻,炎症因子IL-6、TNF- α 和TGF- β 1的水平明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),细胞凋亡程度明显减轻(Bcl2的表达上调而BAX、Cleaved Caspase-3的表达下调)。与CON组相比,IR组AR的表达明显升高,ROS、MDA及4-HNE的水平明显增加($P<0.01$),OGG1和SIRT3的表达明显降低($P<0.01$),线粒体损伤明显加剧。而与IR组相比,Epa连续给药6~8周后,IR组AR的表达明显下调($P<0.05$, $P<0.01$),ROS、MDA及4-HNE的水平明显降低,OGG1和SIRT3的表达明显增加,线粒体损伤明显减轻($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:Epa对放射性肺炎具有保护作用,其作用可能与其抑制AR的表达,减轻线粒体氧化应激损伤,抑制炎症反应和细胞凋亡有关。**关键词** 依帕司他;放射性肺炎;醛糖还原酶;线粒体;氧化应激;小鼠

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1009-2501(2024)07-0809-10

doi: 10.12092/j.issn.1009-2501.2024.07.011

放射诱导的肺损伤(irradiation-induced lung injury, IRLI)是胸部恶性肿瘤放疗患者常见的并发症^[1]。IRLI早期以放射性肺炎(radiation pneumonitis, RP)为主,但如果放射性肺炎没有及时改善,可能会引起放射性肺纤维化或肺衰竭,危及生命^[2]。目前放射性肺炎的治疗主要以糖皮质激素为主,同时辅以支气管扩张剂、抗生素和呼吸支持治疗,但长期使用糖皮质激素可引起免疫抑制、向心性肥胖、骨质疏松、消化性溃疡等副作

2023-05-23 收稿 2023-06-24 修回

安徽省高校自然科学研究重大项目(KJ2021ZD0106);安徽省卫生健康委科研重点项目(AHWJ2021a033)

李泽朋,男,硕士在读,研究方向:分子药理学和呼吸系统药理学。

E-mail: zepengli2022@163.com

李先伟,通信作者,男,教授,硕士生导师,研究方向:分子药理学和呼吸系统药理学。

E-mail: wnmclxianwei69@163.com

用,影响患者的生活质量;如果放射性肺炎发展为放射性纤维化,糖皮质激素的疗效将大大降低^[3]。因此,寻找一种安全有效的防治放射性肺炎的药物迫在眉睫。

放射会造成线粒体功能受损,功能异常的线粒体会产生大量的活性氧(ROS),ROS在肺组织内蓄积,导致氧化应激、炎症反应和细胞凋亡,最终导致放射性肺炎的发生^[4]。血清中高水平的炎症因子,如白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及转化生长因子- β 1(TGF- β 1)通常被认为是放射性肺炎的标志物^[5]。依帕司他(Epalrestat, Epa)是一种醛糖还原酶(aldose reductase, AR)抑制剂,临床上主要用于糖尿病神经病变^[6]。但研究发现Epa还可减轻高糖诱导的心肌细胞氧化应激、线粒体损伤并抑制高糖诱导的细胞凋亡^[7];另外Epa通过抗炎、抗氧化对利血平诱导的帕金森小鼠具有明显的缓解作用^[8]。而我们前期研究发现,Epa通过抑制AR对输尿管梗阻诱导的大鼠肾间质纤维化及博来霉素诱导的大鼠肺纤维化都具有一定的缓解作用^[9-10]。最新研究发现异氟醚能通过抑制AR的表达,减轻线粒体功能损伤,从而改善小鼠脑缺血/再灌注损伤^[11]。基于以上研究背景,本研究以放射性肺炎小鼠模型为研究对象,探讨Epa是否通过抑制醛糖还原酶介导的线粒体氧化应激损伤来发挥放射性肺炎的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物 雄性C57BL/6小鼠(SPF级,8周龄,体质量22~24 g)购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2019-0010。

1.2 药物试剂 依帕司他片(国药准字H20040012,扬子江药业集团南京海陵药业有限公司)。小鼠IL-6(货号ab222503)、TNF- α (货号ab208348)、TGF- β 1(货号ab119557)、4-羟基壬烯醛(4-hydroxynonenal, 4-HNE)(货号ab238538)ELISA试剂盒及兔抗AR抗体购于美国Abcam公司。戊二醛磷酸缓冲液(美国Sigma公司)。链酶亲和素生物素复合物-碱性磷酸酶(SABC-AP)免疫组织化学染色试剂盒及辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠IgG购自福州迈新生物技术开发有限公司。PrimeScript™ RT reagent Kit(货号RR037A)

和TB Green® Premix Ex Taq™ II(货号RR820B)(北京宝日医生物技术有限公司)。Minute™新鲜/冷冻组织单细胞悬液分离试剂盒(货号CS-031)购自北京英文特生物技术有限公司。兔抗IL-6抗体(货号bs-0782R)、兔抗TNF- α 抗体(货号bs-10802R)及兔抗TGF- β 1抗体(货号bs-0086R)购自北京博奥森生物技术有限公司。ROS检测试剂盒(货号S0033S)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(货号S0131S)、兔抗Bcl2抗体(编号AF6285)、兔抗BAX抗体(编号AF5120)、兔抗Cleaved Caspase-3抗体(货号AC033)及小鼠抗GAPDH抗体(货号AF0006)购于上海碧云天生物技术有限公司。小鼠抗8-氧鸟嘌呤DNA糖基化酶1(8-oxoguanine DNA glycosylase 1, OGG1)抗体及兔抗沉默信号调节因子3(silent information regulator 3, SIRT3)抗体购自美国Santa Cruz公司。聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜和增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ELC)液购自Merck Millipore公司。

1.3 主要仪器 Clinac iX直线加速器(美国Varian公司);石蜡切片机(德国Leica公司);荧光倒置显微镜(德国ZEISS公司);荧光定量PCR仪、透射电镜(美国ThermoFisher公司);多功能酶标仪(瑞士TECAN公司);化学发光凝胶成像系统(美国Cytiva公司);核酸浓度测定仪(美国伯乐公司)

1.4 实验动物分组与处理 C57BL/6小鼠64只,随机分为对照(control, CON)组、放射(irradiation, IR)组、irradiation联合10 mg/kg Epa处理组及irradiation联合20 mg/kg Epa处理组,每组各16只。小鼠腹腔注射三溴乙醇(400 mg/kg)麻醉后,根据参考文献采用高能直线加速器6MV X射线进行全胸照射(单次总照射剂量为15 Gy,剂量率500 cGy/min)制备放射性急性肺损伤动物模型^[12]。照射后第2天开始连续灌胃给药8周,CON和IR组给予等体积的0.3%羧甲基纤维素钠溶液。给药后第6周和第8周末每组分别随机处理动物各8只,进行相关指标检测。

1.5 血清细胞因子水平分析 第6周和第8周末,分别麻醉小鼠(三溴乙醇,400 mg/kg)后眼球摘除取血,分离血清后根据ELISA试剂盒说明书进行IL-6、TNF- α 和TGF- β 1的水平测定。

1.6 透射电子显微镜观察线粒体超微结构 取

左肺上叶用 2.5%戊二醛磷酸缓冲液和 1%锇酸固定后,根据参考文献进行切片、脱水、包埋和染色(3%醋酸铀和柠檬酸铅)后^[13],用透射电子显微镜观察并捕捉图像。

1.7 HE 染色和免疫组织化学染色检测肺组织病理变化及 AR 蛋白表达 取左肺下叶用 40 g/L 多聚甲醛固定后,根据我们前期实验方法进行 HE 染色^[9],光镜下观察肺组织病理学变化情况。根据 SABC-AP 免疫组织化染色法检测肺组织 AR 蛋白表达。切片常规脱蜡至水,抗原修复后用 50 g/L BSA 封闭液室温封闭 20 min,滴加兔抗 AR 抗体(1:400),4℃过夜;充分洗涤后,滴加 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1:2 000),室温孵育 60 min;充分洗涤后,滴加 SABC-AP(1:100),室温孵育 60 min;BCIP/NBT 室温显示 10 min。肺组织 AR 蛋白阳性表达呈深褐色。

1.8 肺组织单细胞悬液制备及 ROS 水平检测 取 30 mg 右肺上叶,按照单细胞悬液分离试剂盒

说明书制备细胞悬液。加入 10 μmol/L DCFH-DA 荧光探针,37℃培养箱内孵育 20 min,先用激光共聚焦显微镜观察活性氧变化情况,再用荧光酶标仪检测活性氧水平。

1.9 肺组织 4-HNE 和 MDA 水平检测 取剩余右肺上叶制备成组织匀浆,根据 4-HNE ELISA 试剂盒及 MDA 检测试剂盒说明书检测 4-HNE 和 MDA 水平。

1.10 实时定量 PCR 检测肺组织 AR、IL-6、TNF-α 和 TGF-β1 的 mRNA 表达 无酶环境下提取右肺中叶 RNA,测定浓度后将其逆转录成 cDNA。20 μL 反应体系组成:TB Green Fast qPCR Mix 10 μL;PCR Forward Primer 0.8 μL;PCR Reverse Primer 0.8 μL;ROX 参比染料 0.4 μL;cDNA 模板 2 μL;灭菌水 6 μL。用 StepOnePlus™ Real-Time PCR System 进行 PCR 扩增。PCR 反应条件参照我们前期的研究结果^[9]。以 GAPDH 为内参,用^{2-ΔΔCt}法计算各基因 mRNA 的相对表达量(Tab.1)。

Tab.1 Primer sequence

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Length (bp)
AR	Forward CAAGCCTGAAGATCCGCTCTC-	205
	Reverse CACCCTCCAGTTCTCTGTTGT	
IL-6	Forward ATGAGCTCCTTCTCCACAAGCGC	97
	Reverse GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG	
TNF-α	Forward ATGTCTCAGCCTCTTCTCATTC	179
	Reverse GCTTGCTACTCGAATTTTGAGA	
TGF-β1	Forward CCAGATCCTGTCCAAACTAAGG -	169
	Reverse CTCTTTAGCATAGTAGTCCGCT	
GAPDH	Forward ACCCAGAAGACTGTGGATGG	71
	Reverse CACATTGGGGGTAGGAACAC	

1.11 Western blot 法检测肺组织 AR、IL-6、TNF-α、TGF-β1、BAX、Bcl2、Cleaved Caspase-3、SIRT3 和 OGG1 的蛋白表达 低温条件下提取右肺下叶总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。参照本课题组前期的研究方法进行 Western blot 检测^[9]。相关一抗稀释度分别为兔抗 AR 抗体(1:1 000)、兔抗 IL-6 抗体(1:1 000)、兔抗 TNF-α 抗体(1:1 000)、兔抗 TGF-β1 抗体(2:1 000)兔抗 Bcl2 抗体(1:2 000)、兔抗 BAX 抗体(1:2 000)、兔抗 Cleaved Caspase-3 抗体(1:2 000)、小鼠抗 OGG1 抗体(1:1 000)、兔抗 SIRT3 抗体(1:1 000)及小鼠抗 GAPDH 抗体(1:3 000)。加 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(1:2 000)或 HRP 标

记的山羊抗兔 IgG(1:3 000),室温孵育 1 h;ECL 显色液作用后,用发光凝胶成像系统曝光、拍照。用 Image J 1.43 软件进行吸光度值测量并统计分析蛋白相对表达量。

1.12 统计学处理 数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,使用 GraphPad Prism 8.0 进行统计图制作。用 SPSS 24.0 统计软件中的 one-way ANOVA 及 SNK-*q* 检验方法进行统计分析,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Epa 减轻急性放射性肺损伤的病理改变 与 CON 组相比,照射 6 周和 8 周后,IR 组肺组

织可见肺间质增生,肺泡水肿,肺泡间隔增厚并伴大量炎症细胞浸润(如箭头所示)。而Epa给药

6周或8周后,肺组织损伤均有不同程度减轻,且Epa高剂量组的作用优于低剂量组(Fig.1)。

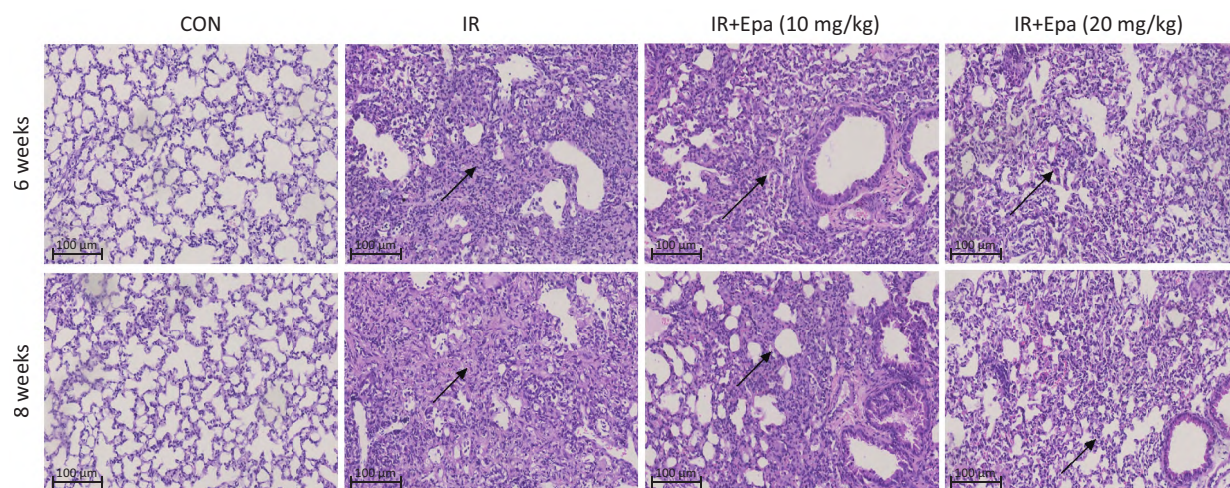


Fig.1 Epalrestat (Epa) ameliorates radiation-induced lung injury in mice (HE staining, $\times 200$)

2.2 Epa抑制放射诱导的炎症因子的表达 与CON组相比,IR组小鼠胸部照射X射线6周或8周后,血清和肺组织炎症因子IL-6、TNF- α 和TGF- β 1的表达水平明显升高($P<0.01$)。而Epa给药6周

或8周后,炎症因子IL-6、TNF- α 和TGF- β 1的表达水平均有不同程度降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且Epa高剂量组的抗炎作用明显优于低剂量组(Tab.2~3, Fig.2)。

Tab.2 Effect of Epalrestat (Epa) on IL-6, TNF- α and TGF- β 1 levels in serum after irradiation ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Group	6 W			8 W		
	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	TGF- β 1 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	TGF- β 1 (pg/mL)
CON	94.67 $\pm$ 25.90	188.3 $\pm$ 74.09	170.3 $\pm$ 44.90	81.39 $\pm$ 24.47	172.8 $\pm$ 66.01	190.6 $\pm$ 48.90
IR	314.3 $\pm$ 61.09 ^c	672.4 $\pm$ 129.2 ^c	875.9 $\pm$ 138.3 ^c	337.2 $\pm$ 52.22 ^c	851.6 $\pm$ 157.4 ^c	1079 $\pm$ 149.8 ^c
IR+Epa (10 mg/kg)	251.1 $\pm$ 21.35 ^f	508.5 $\pm$ 108.9 ^f	731.4 $\pm$ 70.92 ^f	206.4 $\pm$ 27.37 ^f	442.3 $\pm$ 112.4 ^f	555.1 $\pm$ 76.83 ^f
IR+Epa (20 mg/kg)	208.5 $\pm$ 31.68 ^{fh}	388.8 $\pm$ 90.36 ^{fh}	642.6 $\pm$ 67.13 ^f	169.7 $\pm$ 18.45 ^{fh}	319.7 $\pm$ 93.95 ^{fh}	449.5 $\pm$ 55.23 ^{fh}

^c $P<0.01$, compared with CON group; ^f $P<0.01$, compared with IR group; ^h $P<0.05$, compared with Epa 10 mg/kg group.

Tab.3 Effect of Epalrestat (Epa) on IL-6, TNF- α and TGF- β 1 mRNA expression in lung tissues after irradiation ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Group	6 W			8 W		
	IL-6 mRNA level	TNF- α mRNA level	TGF- β 1 mRNA level	IL-6 mRNA level	TNF- α mRNA level	TGF- β 1 mRNA level
CON	1.025 $\pm$ 0.203	1.047 $\pm$ 0.244	1.010 $\pm$ 0.224	1.024 $\pm$ 0.253	1.011 $\pm$ 0.279	0.999 $\pm$ 0.251
IR	4.230 $\pm$ 0.749 ^c	5.571 $\pm$ 0.818 ^c	4.768 $\pm$ 0.749 ^c	5.164 $\pm$ 0.792 ^c	4.577 $\pm$ 0.887 ^c	5.926 $\pm$ 0.792 ^c
IR+Epa (10 mg/kg)	3.041 $\pm$ 0.707 ^f	4.266 $\pm$ 0.746 ^f	3.578 $\pm$ 0.707 ^f	3.859 $\pm$ 0.866 ^f	3.317 $\pm$ 0.627 ^f	4.621 $\pm$ 0.866 ^f
IR+Epa (20 mg/kg)	2.882 $\pm$ 0.605 ^f	3.474 $\pm$ 0.622 ^{fh}	3.420 $\pm$ 0.605 ^f	3.296 $\pm$ 0.716 ^f	2.801 $\pm$ 0.551 ^f	4.058 $\pm$ 0.716 ^f

^c $P<0.01$, compared with CON group; ^f $P<0.01$, compared with IR group; ^h $P<0.05$, compared with Epa 10 mg/kg group.

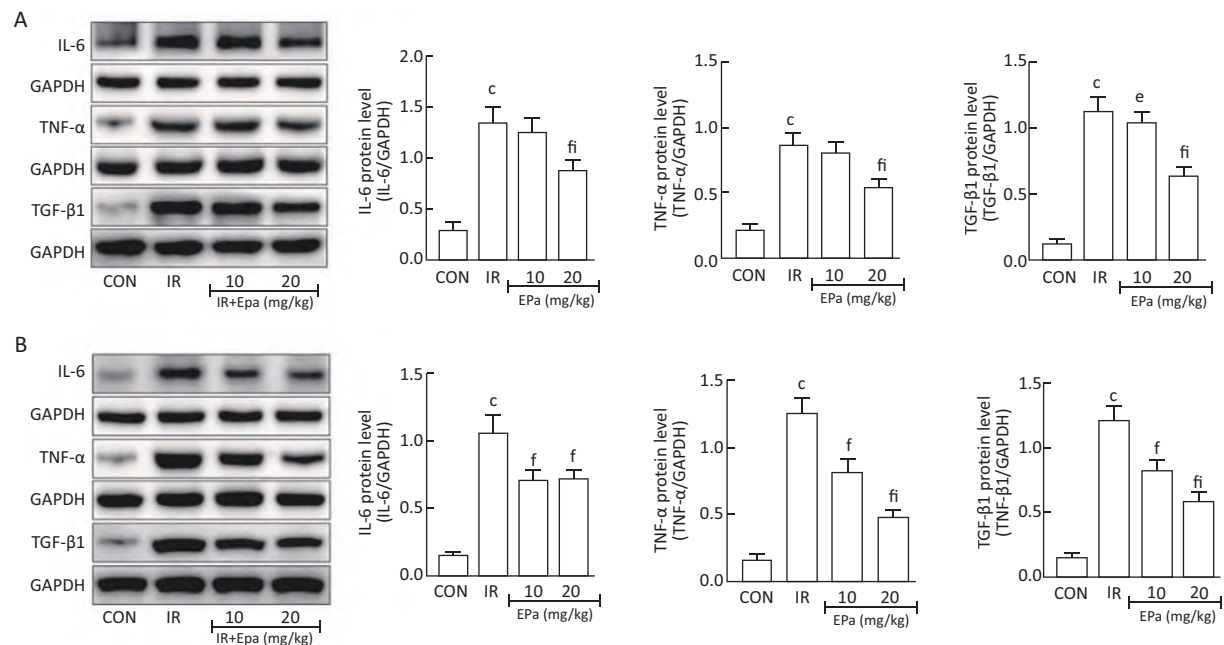


Fig.2 Effect of Epalrestat (Epa) on the expression of IL-6, TNF-α and TGF-β1 in lung tissues after irradiation ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)
^c $P<0.01$, compared with CON group; ^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$, compared with IR group; ^{fi} $P<0.01$, compared with Epa 10 mg/kg group. A: 6 weeks; B: 8 weeks.

2.3 Epa 抑制放射诱导的细胞凋亡 与 CON 组相比,IR 组小鼠胸部照射 X 射线 6 周或 8 周,促凋亡相关蛋白 BAX 和 Cleaved Caspase-3 的表达明显上调而抗凋亡蛋白 Bcl2 的表达明显下调($P<$

0.01)。而 Epa 给药 6 周或 8 周后,BAX 和 Cleaved Caspase-3 的表达明显下调而 Bcl2 的表达明显上调($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且 Epa 高剂量组的抗凋亡作用明显优于低剂量组(Fig.3)。

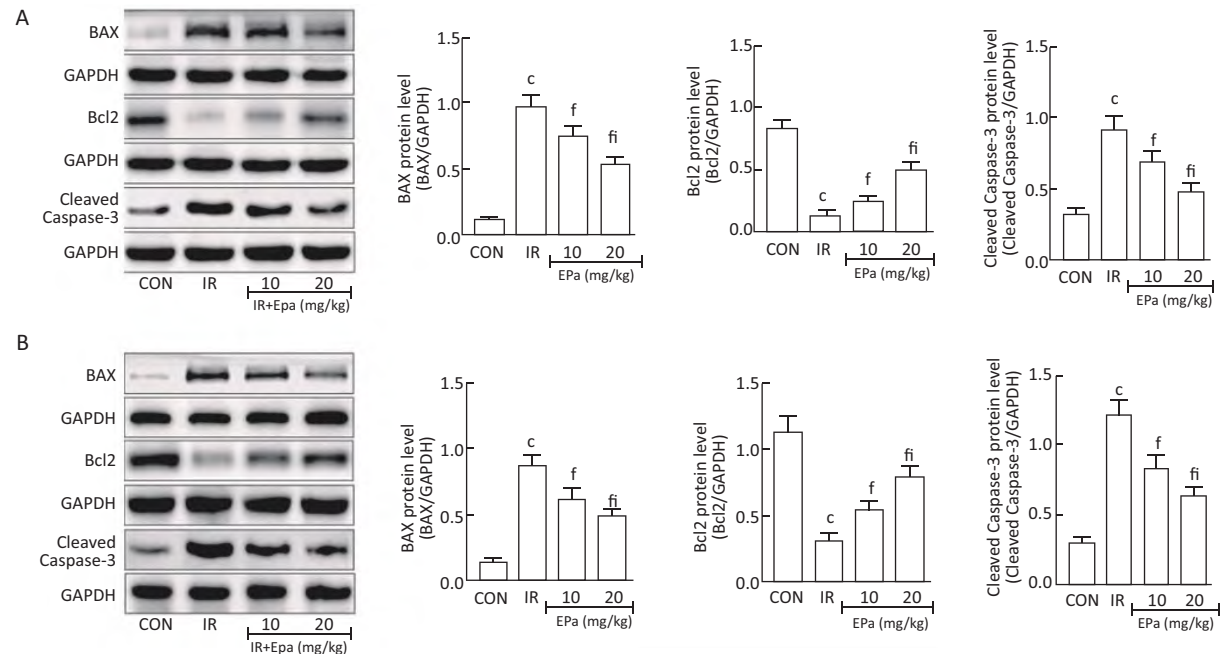


Fig.3 Effect of Epalrestat (Epa) on the expression of BAX, Bcl2 and Cleaved Caspase-3 in lung tissues after irradiation ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)
^c $P<0.01$, compared with CON group; ^f $P<0.01$, compared with IR group; ^{fi} $P<0.01$, compared with Epa 10 mg/kg group. A: 6 weeks; B: 8 weeks.

2.4 Epa 抑制放射诱导的AR的表达 与CON组相比,IR组小鼠胸部照射X射线6周或8周,肺组织AR的表达明显升高($P<0.01$)。而Epa给药6周

或8周后,肺组织AR的表达明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且Epa高剂量组的抑制作用优于低剂量组(Fig.4-5)。

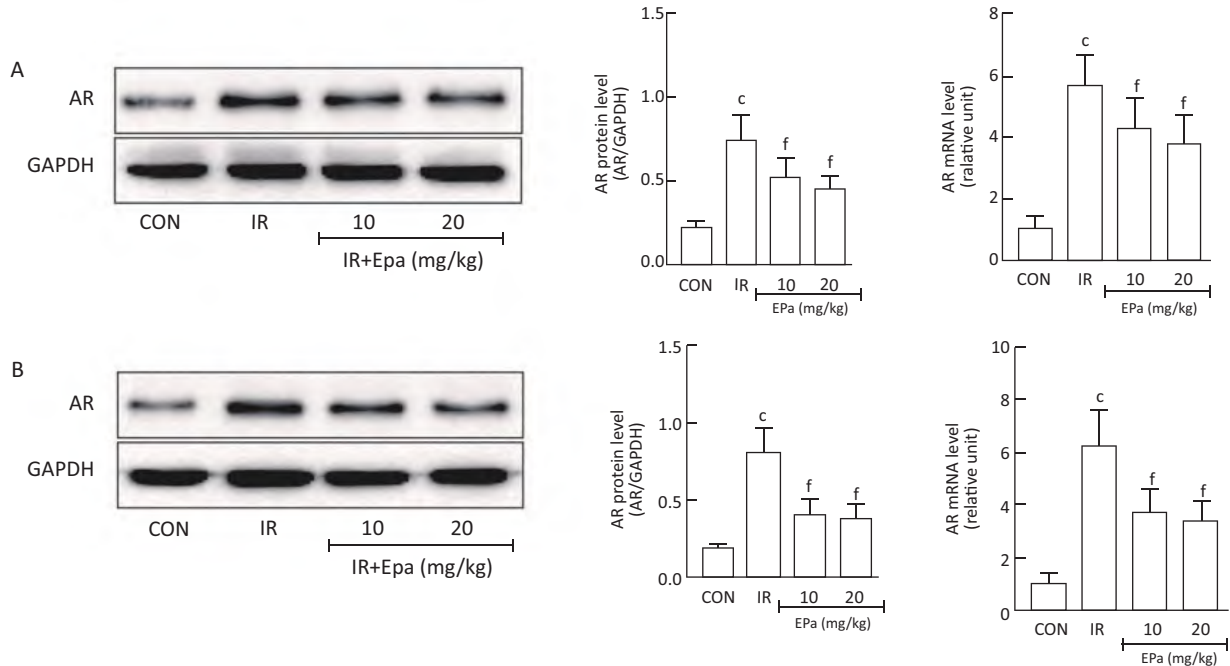


Fig.4 Effect of Epalrestat (Epa) on AR expression after irradiation ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)
^c $P<0.01$, compared with CON group; ^f $P<0.01$, compared with IR group. A: 6 weeks; B: 8 weeks.

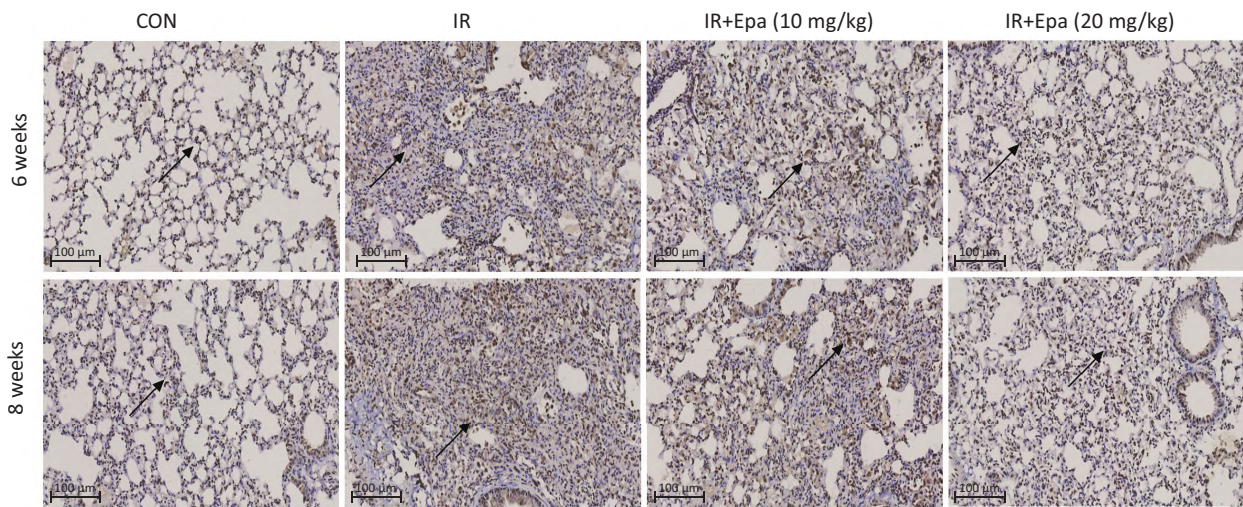


Fig.5 Representative micrographs of the immunostaining for AR in lungs (Arrows indicate AR immunostaining positive, $\times 200$)

2.5 Epa 抑制放射诱导的肺组织线粒体损伤 与CON组相比,IR组小鼠胸部照射X射线6周或8周后肺组织细胞线粒体大多畸形且明显肿胀、嵴显著减少。而Epa给药6周或8周后,肺组织细胞线粒体损伤均有不同程度减轻,且Epa高剂量组的作用明显优于低剂量组(Fig.6)。另外,

与CON组相比,IR组组小鼠照射X射线6周或8周,肺组织线粒体损伤修复蛋白SIRT3和OGG1的表达明显下降($P<0.01$)。而Epa给药4周或6周后,肺组织SIRT3和OGG1的表达明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且Epa高剂量组的升高作用优于低剂量组(Fig.7)。

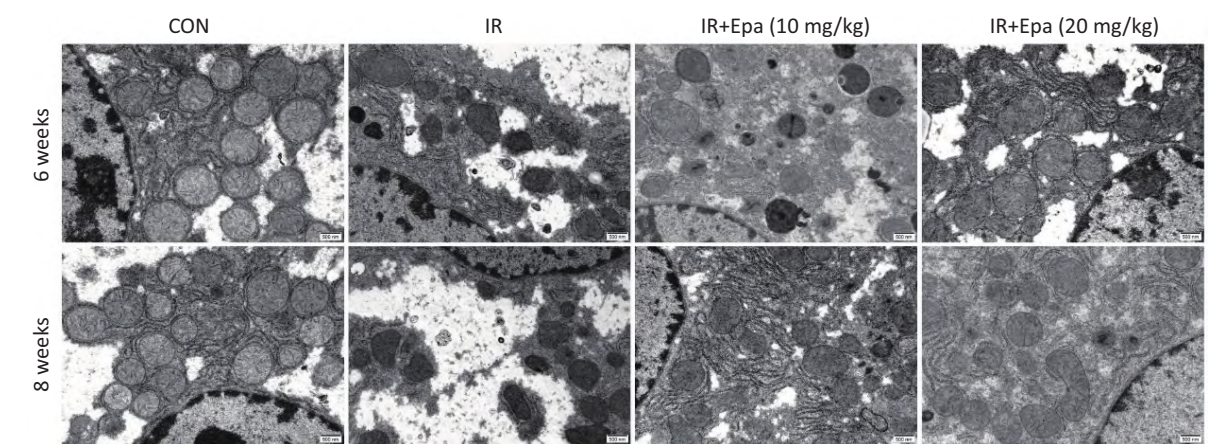


Fig.6 The mitochondrial ultrastructure of cells through transmission electron microscopy in lungs (×10000)

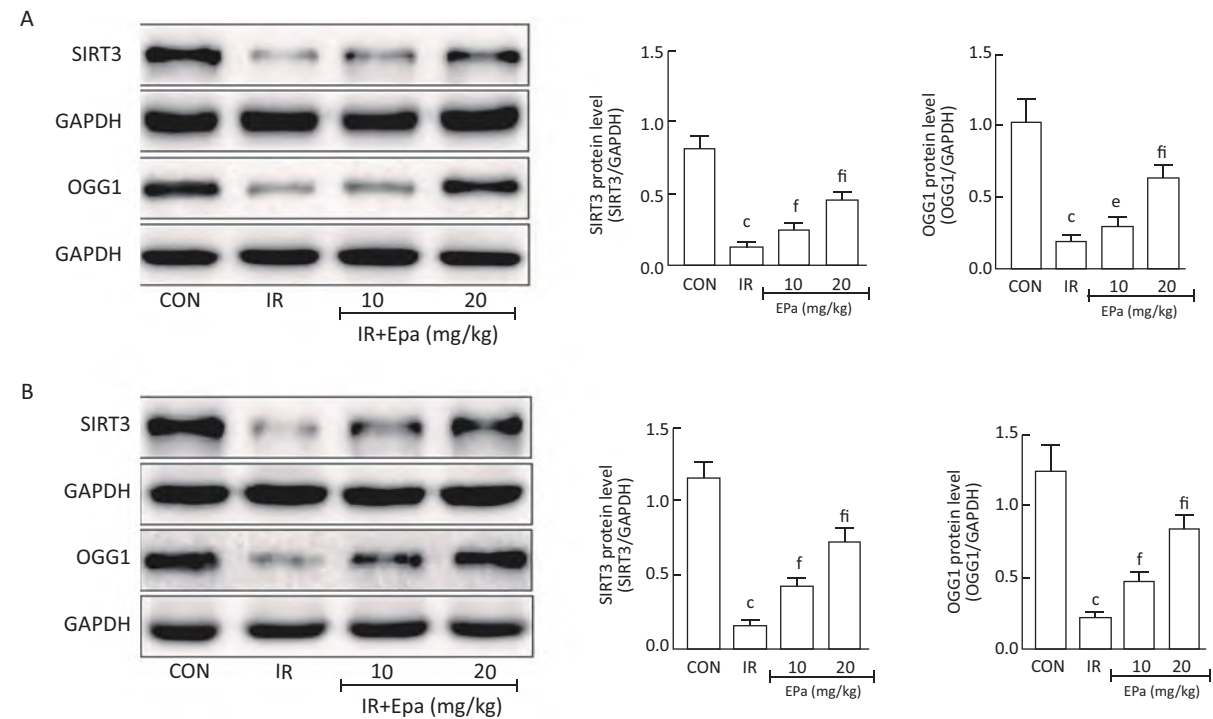


Fig.7 Effect of Epalrestat (Epa) on the expression of SIRT3 and OGG1 in lung tissues after irradiation ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)
^c $P<0.01$, compared with CON group; ^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$, compared with IR group; ^{fi} $P<0.01$, compared with Epa 10 mg/kg group. A: 6 weeks; B: 8 weeks.

2.6 Epa 缓解了放射诱导的肺组织氧化应激损伤 与 CON 组相比,IR 组小鼠胸部照射 X 射线 6 周或 8 周,肺组织 ROS、MDA 和 4-HNE 的水平明显升高($P<0.01$)。而 Epa 给药 6 周或 8 周后,ROS、MDA 和 4-HNE 的水平明显降低($P<0.01$),且 Epa 高剂量组的抗氧化作用明显优于低剂量组 (Fig.8, Tab.4)。

3 讨论

放射性肺炎是胸部肿瘤立体定向放疗后肺

部的典型炎症,发生机制不明且缺乏有效、安全的治疗方法^[14]。氧化应激、炎症反应、细胞凋亡等在放射性肺炎的发生发展中起作用^[15]。与研究报道一致,本研究也发现小鼠胸部照射 15Gy X 射线 6~8 周后,肺组织肺泡水肿,肺泡间隔增厚并伴大量炎症细胞浸润,血清或肺组织炎症因子 IL-6、TNF- α 、TGF- β 1 及 MDA、4-HNE 的水平明显升高,促凋亡相关蛋白 BAX 和 Cleaved Caspase-3 的表达明显上调而抗凋亡蛋白 Bcl2 的表达明显下调。研究发现,非布司他通过抗凋亡、抗氧化减

轻了放射诱导的放射性肺炎^[16];另外,槲皮素、黄芩苷等通过抗炎、抗氧化对放射性肺炎也有一定的缓解作用^[17-18]。上述结果提示,通过抗氧化、抗炎、抗凋亡等作用对放射性肺炎能够起到一定的保护作用。研究表明,Epa除了可以改善糖尿病神经病变之外,还具有抗氧化、抗炎和抗凋亡等作用^[19-21]。本研究发现,Epa给药6~8周后,小

鼠肺组织充血、水肿明显减轻,炎症细胞浸润明显减少,炎症相关指标IL-6、TNF- α 、TGF- β 1的水平明显下降,肺组织凋亡程度明显下降(BAX和Cleaved Caspase-3的表达明显下调、Bcl2的表达明显上调)。提示Epa可能通过抗炎症和抗凋亡等作用缓解了放射性肺炎的发生发展。

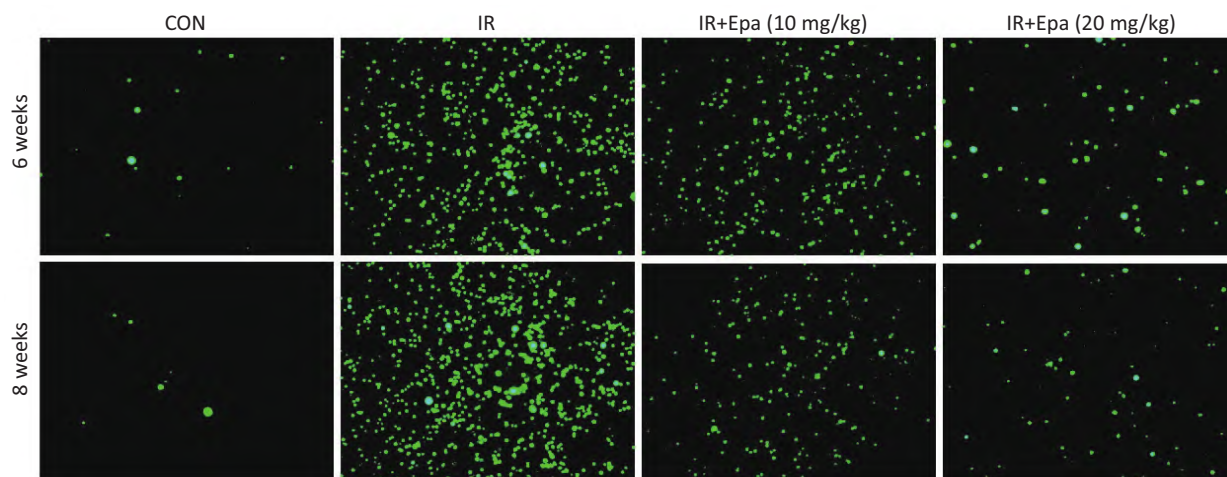


Fig.8 Representative images of ROS fluorescence in lungs (x200)

Tab.4 Effect of Epalrestat (Epa) on the level of ROS, MDA and 4-HNE after irradiation in lungs ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Group	6 W			8 W		
	ROS fluorescence intensity (Arbitrary units, $\times 10^4$)	MDA (nmol/ mg tissue)	4-HNE ($\mu\text{g}/\text{mg}$ tissue)	ROS fluorescence intensity (Arbitrary units, $\times 10^4$)	MDA (nmol/ mg tissue)	4-HNE ($\mu\text{g}/\text{mg}$ tissue)
CON	8.31 ± 1.69	0.308 ± 0.057	0.112 ± 0.035	7.27 ± 1.54	0.332 ± 0.070	0.111 ± 0.042
IR	20.88 ± 2.49^c	1.217 ± 0.134^c	0.843 ± 0.094^c	23.42 ± 2.52^c	1.326 ± 0.151^c	0.929 ± 0.096^c
IR+Epa (10 mg/kg)	15.43 ± 2.55^f	0.962 ± 0.092^f	0.659 ± 0.078^f	14.02 ± 2.14^f	0.873 ± 0.095^f	0.601 ± 0.067^f
IR+Epa (20 mg/kg)	12.41 ± 1.89^{fh}	0.775 ± 0.088^{fi}	0.515 ± 0.063^{fi}	11.02 ± 1.71^{fi}	0.701 ± 0.083^{fi}	0.472 ± 0.054^{fi}

^c $P<0.01$, compared with CON group; ^f $P<0.01$, compared with IR group; ^h $P<0.05$, ⁱ $P<0.01$, compared with Epa 10 mg/kg group.

除了直接的DNA损伤外,60%~70%的辐射引起的细胞损伤是由自由基介导的^[22]。已知辐射会增加ROS水平,导致抗氧化防御的消耗并最终诱导氧化应激。线粒体是细胞内ROS产生的主要场所,辐射诱导的线粒体DNA损伤进一步刺激更多ROS的产生,导致线粒体功能障碍^[2]。醛糖还原酶是NADPH依赖性氧化还原酶,除了主要催化多种醛和羰基化合物(包括单糖)的还原外,还参与了氧化应激反应^[23]。而最近的研究发现,醛糖还原酶抑制剂菲达司他通过抗氧化、增强线粒体生

物合成和减少线粒体DNA损伤而抑制了结肠癌细胞的增殖^[24];另外研究还发现菲达司他通过调节线粒体功能,降低氧化应激损伤而对溃疡性结肠炎起到了保护作用^[25]。本研究发现,放射性肺炎小鼠肺组织AR的表达明显上调,线粒体损伤明显加剧,线粒体损伤修复蛋白SIRT3和OGG1的表达明显下降,肺组织ROS水平和MDA及4-HNE的含量明显升高。而给予Epa抑制AR的表达后,线粒体损伤程度明显减轻,SIRT3和OGG1的表达明显上调,ROS水平和MDA及4-HNE的含量明显降低。

提示,Epa可能通过减轻线粒体氧化应激损伤而对放射性肺炎产生了保护作用。

综上所述,Epa对放射性肺炎具有一定的保护作用,其作用可能与其抑制AR的表达,减轻线粒体氧化应激损伤,抑制炎症反应和细胞凋亡有关。然而对于Epa发挥抗放射性肺炎的详细机制,特别是调节线粒体内信号传导通路方面的具体机制有待进一步深入的研究。

参考文献

- [1] Rahi MS, Parekh J, Pednekar P, et al. Radiation-induced lung injury-current perspectives and management [J]. Clin Pract, 2021, 11(3): 410-429.
- [2] Käsman L, Dietrich A, Staab-Weijnitz CA, et al. Radiation-induced lung toxicity-cellular and molecular mechanisms of pathogenesis, management, and literature review [J]. Radiat Oncol, 2020, 15(1): 214-230.
- [3] Yan Y, Fu J, Kowalchuk RO, et al. Exploration of radiation-induced lung injury, from mechanism to treatment: a narrative review [J]. Transl Lung Cancer Res, 2022, 11(2): 307-322.
- [4] Zhan B, Shen J. Mitochondria and their potential role in acute lung injury (Review) [J]. Exp Ther Med, 2022, 24(1): 479-493.
- [5] Bledsoe TJ, Nath SK, Decker RH. Radiation pneumonitis [J]. Clin Chest Med, 2017, 38(2): 201-208.
- [6] Ramirez MA, Borja NL. Epalrestat: an aldose reductase inhibitor for the treatment of diabetic neuropathy [J]. Pharmacotherapy, 2008, 28(5): 646-655.
- [7] Wang X, Yu F, Zheng WQ. Aldose reductase inhibitor Epalrestat alleviates high glucose-induced cardiomyocyte apoptosis via ROS [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(3 Suppl): 294-303.
- [8] Rahman MM, Chakraborti RR, Poto MA, et al. Epalrestat improves motor symptoms by reducing oxidative stress and inflammation in the reserpine induced mouse model of Parkinson's disease [J]. Animal Model Exp Med, 2019, 3(1): 9-21.
- [9] 高云星, 汤娟, 张倩, 等. 依帕司他对单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化的干预作用及其机制 [J]. 中国应用生理学杂志, 2019, 35(1): 79-84.
- [10] Li X, Shen Y, Lu Y, et al. Amelioration of bleomycin-induced pulmonary fibrosis of rats by an aldose reductase inhibitor, epalrestat [J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2015, 19(5): 401-411.
- [11] 蒋雯, 李杰, 黄燕, 等. 异氟醚通过醛糖还原酶改善线粒体功能保护脑缺血/再灌注损伤 [J]. 中山大学学报(医学科学版), 2021, 42(5): 721-728.
- [12] Zhou X, Bao WA, Zhu X, et al. 3,3'-Diindolylmethane attenuates inflammation and fibrosis in radiation-induced lung injury by regulating NF- κ B/TGF- β /Smad signaling pathways [J]. Exp Lung Res, 2022, 48(3): 103-113.
- [13] Li X, Zhuang X, Qiao T. Role of ferroptosis in the process of acute radiation-induced lung injury in mice [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 519(2): 240-245.
- [14] Zheng L, Zhu Q, Xu C, et al. Glycyrrhizin mitigates radiation-induced acute lung injury by inhibiting the HMGB1/TLR4 signalling pathway [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(1): 214-226.
- [15] Citrin DE, Mitchell JB. Mechanisms of normal tissue injury from irradiation [J]. Semin Radiat Oncol, 2017, 27(4): 316-324.
- [16] Raeispour M, Talebpour Amiri F, Farzipour S, et al. Febuxostat, an inhibitor of xanthine oxidase, ameliorates ionizing radiation-induced lung injury by suppressing caspase-3, oxidative stress and NF- κ B [J]. Drug Chem Toxicol, 2022, 45(6): 2586-2593.
- [17] Qin M, Chen W, Cui J, et al. Protective efficacy of inhaled quercetin for radiation pneumonitis [J]. Exp Ther Med, 2017, 14(6): 5773-5778.
- [18] Bao WA, Wang YZ, Zhu X, et al. Baicalin ameliorates radiation-induced lung injury by inhibiting the CysLTs/CysLT1 signaling pathway [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 2765354.
- [19] Tanawattanasuntorn T, Rattanaburee T, Thongpanchang T, et al. Trans-($\pm$)-Kusunokinin binding to AKR1B1 inhibits oxidative stress and proteins involved in migration in aggressive breast cancer [J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11(12): 2347.
- [20] Sato K, Tatsunami R, Wakame K. Epalrestat suppresses inflammatory response in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells [J]. Allergol Immunopathol (Madr), 2021, 49(5): 1-8.
- [21] Zhang T, Wu J, Yao X, et al. The aldose reductase inhibitor epalrestat maintains blood-brain barrier integrity by enhancing endothelial cell function during cerebral ischemia [J]. Mol Neurobiol, 2023. doi: 10.1007/s12035-023-03304-z.
- [22] Wei J, Wang B, Wang H, et al. Radiation-induced normal tissue damage: oxidative stress and epigenetic mechanisms [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 3010342.
- [23] Singh M, Kapoor A, Bhatnagar A. Physiological and pathological roles of aldose reductase [J]. Metabolites, 2021, 11(10): 655.

- [24] Shukla K, Sonowal H, Saxena A, et al. Aldose reductase inhibitor, fidarestat regulates mitochondrial biogenesis via Nrf2/HO-1/AMPK pathway in colon cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2017, 411: 57-63.
- [25] El-Deeb OS, Elesawy RO, Eltokhy AK, et al. Moderat-

ing gut microbiome/mitochondrial axis in oxazolone induced ulcerative colitis: the evolving role of β -glucan and/or, aldose reductase inhibitor, fidarestat [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 2711.

Protective efficacy of epalrestat on mitochondrial oxidative stress damage for radiation pneumonitis in mice

LI Zepeng¹, GU Wenqiang¹, CHEN Xiao¹, WANG Yinhua², LI Xianwei¹

¹Department of Pharmacology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China; ²Department of Oncology, Wuhu No.2 People's Hospital, Wuhu 241000, Anhui, China

ABSTRACT **AIM:** To investigate the effects of epalrestat (Epa) on the mitochondrial oxidative stress damage of radiation pneumonitis (RP) mice and to explore its possible mechanism. **METHODS:** C57BL/6 mice were randomly divided into control (CON), Irradiation (IR), IR combined with Epa (10 mg/kg) and IR combined with Epa (20 mg/kg) group, 16 mice in each group. Mouse models of RP were established by whole thorax irradiation at a dose of 15Gy using a 6-MV linear accelerator. Continuous intragastric administration after IR for 6 or 8 weeks. Lung histopathology was analyzed by HE staining. The expression of aldose reductase (AR) was determined by immunohistochemistry. Mitochondrial morphology of lung tissues was observed by transmission electron microscopy. The levels of inflammatory cytokines (IL-6, TNF- α and TGF- β 1) in plasma were detected by ELISA. The contents of Malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (4-HNE) in lung tissues were determined by colorimetry. Single cell suspension of lung tissues was prepared and reactive oxygen species (ROS) levels in the cells was examined using a DCFH-DA fluorescent probe. Real-time quantitative PCR was used to determine the expression of AR, IL-6, TNF- α and TGF- β 1. The protein levels of AR, IL-6, TNF- α , TGF- β 1, BAX, Bcl2, Cleaved Caspase-3, 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1) and silent information regulator 3 (SIRT3) were detected by Western blot analysis. **RESULTS:** Compared with the CON group, the alveolar hyperplasia, alveolar septum thickening and inflammato-

ry cell infiltration were observed in the IR group. Moreover, the content of inflammatory factors such as IL-6, TNF- α and TGF- β 1 and the expression of BAX and Cleaved Caspase-3 were significantly increased, and the expression of Bcl2 was obviously decreased after irradiation. Compared with the IR group, Epa robustly alleviated RP. Meanwhile, Epa down-regulated inflammatory cells infiltration and the expression of inflammatory cytokines, such as IL-6, TNF- α and TGF- β 1. In addition, Epa could down-regulate the expression of BAX and Cleaved Caspase-3, and up-regulate Bcl2 in lung tissues. Compared with the CON group, the expression of AR, the levels of ROS, MDA and 4-HNE were significantly increased, the expression of OGG1 and SIRT3 were significantly decreased, and mitochondrial damage was aggravated in the IR group. Compared with IR group, the expression of AR was significantly down-regulated, the levels of ROS, MDA and 4-HNE were significantly decreased, the expressions of OGG1 and SIRT3 were significantly increased, and the mitochondrial damage was significantly alleviated in IR group after 6 to 8 weeks of Epa administration. **CONCLUSION:** Epa has a protective effect on RP, which may be related to the inhibition of AR expression, the reduction of mitochondrial oxidative stress injury, and the inhibition of inflammatory response and cell apoptosis.

KEYWORDS epalrestat; radiation pneumonitis; aldose reductase; mitochondria; oxidative stress; mouse