论著

文章编号:1000-5404(2006)02-0104-03

大鼠半胸照射致肺纤维化模型的病理学观察

谭永红[1],王 东[1],肖桃元[2],向德兵[1],杨晓霞[1],胡 南[1],钱桂生[3] (第三军医大学:[1]大坪医院野战外科研究所肿瘤中心,重庆 400042,[2]高原军事医学系中心实验室,重庆 400038,[3]新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

提 要:目的 观察辐射致鼠肺纤维化病变发生过程的病理特征及其规律。**方法** 35只雄性SD大鼠分为实验组21只和对照组14只。实验组用8MV直线加速器给予大鼠右半胸20 Gy单次照射,对照组佯装照射。在照射后1、3、7、14、28、84、164 d共7个时相点,分批活杀大鼠(照射组3只,对照组2只),观察其全肺大体形态改变,取右肺中叶组织进行光镜及电镜病理组织形态观察。**结果** 照射后1、3、7 d可见肺实质细胞的损伤,内皮细胞核损伤出现最早;照射后14、28 d肺泡间隔渐加宽,并有胶原和成纤维细胞的增生;照射后84、164 d出现典型的肺纤维化病灶,肺实变区域有新生的血管内皮细胞和较多的肺泡Ⅱ型上皮细胞,肺泡腔内可见大量吞噬细胞。**结论** 血管内皮细胞可能为辐射损伤最敏感的肺实质细胞。

关键词: 放射损伤;内皮细胞;纤维化;肺脏

中图法分类号: R-322;R563.190.2;R818.023 **文献标识码:** A

Pathologic observation of irradiation-induced pulmonary fibrosis in rats with a single dose irradiation to right hemithorax

TAN Yong-hong[1], WANG Dong[1], XIAO Tao-yuan[2], XIANG De-bing[1], YANG Xiao-xia[1], HU Nan[1], QIAN Gui-sheng[3] ([1]Tumor Center, Institue of Surgery Research, Daping Hospital, Chongqing 400042, [2]Electronic Microscope Staff Room, Chongqing 400038, [3]Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To observe the pathologic features and regularity of the irradiation-induced rat pulmonary fibrosis. **Methods** Thirty-five adult male Sprague Dawley rats were divided into 7 groups randomly. In every group 3 rats were irradiated with a single dose of 20 Gy to their right hemithoraxes with an 8 MV linear accelerator and 2 rats were received sham irradiation. On day 1, 3, 7, 14, 28, 84, or 164 after radiation, all animals were sacrificed and the total lungs were harvested for macrography and all middle lobes of the right lungs were resected as the specimens for light and electronic microscope examination. **Results** Pulmonary parenchyma cells in the irradiated rats showed damaging changes as compared with sham rats on day 1, 3, and 7 after-radiation, and the endothelial injury was ahead of other parenchyma cells. On day 14 and 28 after-irradiation, the major pathological changes of the irradiated lungs consisted of thickening and edema of the alveolar septum as well as the hyperplasia of collagen and fibroblasts. Typical fibrosis focus, renascent endothelium cells and more type Ⅱ pneumocyte, and a large number of phagocytes in alveolar lumen were seen in irradiated lung specimens on day 84 and 168 after-irradiation. **Conclusion** Endothelial cells may have the most sensitivity to irradiation in all of pulmonary parenchyma cells.

Key words: radiation injury; endothelium cell; fibrosis; lung

放射性肺纤维化病变是胸部肿瘤放射治疗后常见的肺损伤修复性改变,可导致受损肺功能的不可逆性损害,它限制了胸部肿瘤放射治疗的剂量及疗效,并严重影响患者的长期生存质量。虽然对于放射性肺间质性肺炎的研究已有100多年的历史,关于其发病机制提出了许多学说和观点,但其确切的发病机制和启动因素尚未完全阐明[1-4]。本研究对大鼠半胸照射后肺纤维化病变形成过程中的病理改变,进行了大体、组织结构及细胞超微结构的动态观察,为探讨其发病机制和寻找有效的临床防治手段提供理论依据。

基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目(2004BB5132)
Supported by the Natural Science Foundation of Scientific Committee of Chongqing (2004BB5132)

作者简介: 谭永红(1963-),女,重庆市人,博士,主治医师,主要从事肿瘤放射治疗基础与临床方面的研究。电话:(023)68757447

通讯作者: 钱桂生,电话:(023)68755603,E-mail:qiangs@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2005-07-21;**修回日期:** 2005-11-04

1　材料与方法

1.1　实验动物及分组

健康雄性 SD 大鼠 35 只由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供，体质量 220 ~ 250 g，分为实验组（21 只）和对照组（14 只），在放疗后的 1、3、7、14、28、84、168 d 共 7 个时相点，每个时相点活杀 2 只对照鼠和 3 只照射鼠进行病理学观察。

1.2　照射方法

速眠新Ⅱ（1.0 ml/kg）肌肉注射全身麻醉大鼠，将大鼠仰卧位固定于老鼠台上，模拟机下确定照射野边界为：上界至右肺尖，下界为右隔顶，左界为脊髓右侧缘，右界至右侧胸廓外缘。一般为 2 cm × 3 cm 大小。照射组大鼠用 8 MV 直线加速器，给予鼠右半胸 20 Gy 单次大剂量照射，SSD，400 Mu/min；对照组大鼠在给予麻醉后给予佯装照射。

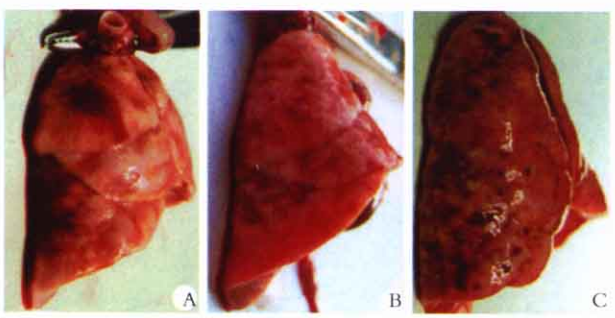
1.3　标本的取材及处理

于照射后的上述 7 个预定时间点麻醉大鼠，剖开胸腔分离主气管，并快速将气管及双肺剥离出胸腔，观察肺的大体结构改变。选取右肺中叶组织，切取 0.1 cm × 0.1 cm × 0.1 cm 大小组织 3 块用 3% 戊二醛固定，制作成电镜超薄切片，透视电镜观察组织超微结构改变；其余部分用 10% 中性缓冲甲醛液固定，常规石蜡包埋切片，HE 染色，光镜观察组织结构改变。

2　结果

2.1　大体标本观察结果（图 1）

照射后早期（1、3、7 d）的几个观察时相点见受照区域肺有较多的灶状及点状出血，随观察时间的延长，出血灶的颜色由鲜红转变为暗红，整个肺的外形无明显改变。照射后中期（14、28 d）可见出血灶的颜色进一步加深，与对侧肺比较受照侧肺组织明显肿胀。照射后晚期（84、168 d）见受照肺表面凹凸不平，弹性明显降低、质地较硬，部分肺叶塌陷，表面呈灰白色。

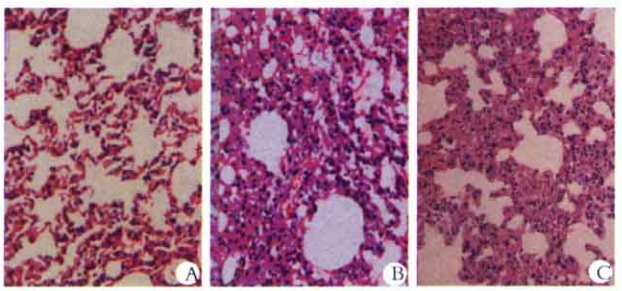


A：照射后早期（7 d）；B：照射后中期（28 d）；C：照射后晚期（84 d）

图 1　8 MV 直线加速器，20 Gy 右半胸单次照射后大鼠肺标本

2.2　光镜观察结果（图 2）

照射后早期（1、3、7 d）肺泡腔及间隔无明显渗出、充血和水肿，部分肺间隔和肺泡腔内可见出血性病变。照射后中期（14、28 d）肺泡间隔增宽，肺泡间隔及部分肺泡腔内可见纤维素样的渗出物。照射晚期（84、168 d）肺泡间隔进一步增宽，部分肺泡腔塌陷、不张，并有肺大泡形成，可见到由梭形成纤维细胞构成的成纤维病灶。肺内病变轻重不一，靠近脏层胸膜下及支气管、血管旁较易见到实变的肺组织，部分区域的肺泡腔内可见大量的泡沫状吞噬细胞。

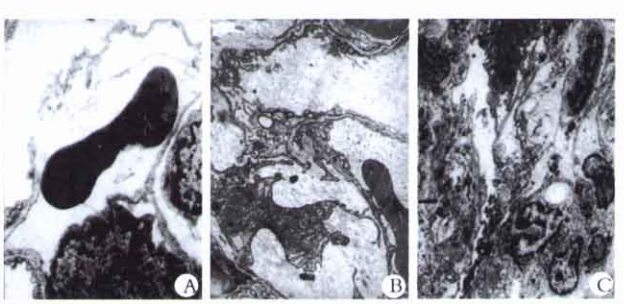


A：照射后早期（7 d）；B：照射后中期（28 d）；C：照射后晚期（168 d）

图 2　大鼠肺组织切片的光镜观察　（HE × 200）

2.3　电镜观察结果（图 3）

照射后 1 d 即可见到内皮细胞核的损伤性改变：细胞核形态不规则，染色质极性化并有核沟出现，细胞质内可见髓鞘样物质，内皮增生活跃。肺泡Ⅰ、Ⅱ型上皮细胞未见明显损害，肺泡Ⅱ型上皮细胞胞吐活跃，细胞质内板层体空泡化。照射后 3 d 可见血管内皮不连续、断裂，肺泡间隔和肺泡腔内有红细胞漏出，仍可见内皮增生活跃；Ⅱ型上皮细胞出现损伤性改变：核周间隙增宽，细胞质内高尔基器和线立体增多，有增生倾向。照射后7 d：血管腔明显扩张、充血、血小板增多；肺泡间隔水肿，肺泡腔内可见中性粒细胞和吞噬细胞渗出；部分Ⅰ型上皮细胞肿胀，细胞质内出现退变的细胞器，Ⅱ型上皮细胞增生活跃。照射后14 d：肺泡间隔血管密度减少，肺泡间隔增厚，可见胶元及成纤维细胞增生，肺泡腔内可见较多的渗出液及少量的吞噬细胞；内皮细胞及Ⅰ、Ⅱ型上皮细胞形态正常。照射后 28 d：肺泡间隔进一步增宽，间隔内主要是成纤维细胞及胶原增生，未见明显的淋巴细胞增生，间隔内血管密度进一步减少。照射后 84 d：肺泡间隔增宽，血管密度减少，间隔内仍以胶原和成纤维细胞增生为主，淋巴细胞少见。照射后 168 d：肺泡腔内大量的泡沫样吞噬细胞，出现细胞密度高的实变区，其中见增生的内皮细胞，Ⅱ型上皮细胞的数量显得较多。



A：照射后早期（3 d）（TEM × 7 000）；B：照射后中期（28 d）（TEM × 7 000）；③照射后晚期（168 d）（TEM × 2 200）

图 3　右半胸 20 Gy 照射后肺组织标本的透射电镜观察

3 讨论

纤维化是以大量的成纤维细胞聚集，细胞外基质沉积并伴有组织结构的破坏为特征。机体内复杂的细胞因子网络通路调控了细胞外基质的沉积和成纤维细胞的增生。一般认为构成组织器官的实质细胞的损伤是启动细胞因子网络通路的主要原因[1-3]。

在很长一段时间里，人们把注意力更多地集中在肺泡上皮细胞损伤上，认为肺纤维化过程起始于肺泡，肺泡上皮损伤和肺泡炎是疾病的早期事件[4]。大量的来源于石英、博来霉素经气道致肺纤维化动物模型的研究资料及特发性肺纤维化的临床病检资料表明，受损肺组织以弥漫性间质性肺泡损伤为特点，肺泡腔内大量的纤维素样渗出液和脱落的上皮细胞，较多的肺泡巨噬细胞和成纤维细胞[5-8]。在辐射致肺放射损伤的动物模型的研究实验中[9,10]，有许多研究者注意到血管内皮细胞和肺泡Ⅱ型上皮细胞都是辐射损伤的主要靶细胞，并在动物照射后3周内的肺泡灌洗液中收集到比对照组动物高2～3倍的肺泡巨噬细胞数，故认为辐射损伤导致放射性的肺间质性肺炎。

本研究观察到照射后1 d肺泡毛细血管内皮细胞即出现损伤性改变，核形态不规则，染色质极性化并有核沟出现，细胞质内可见髓鞘样物质；内皮细胞增生活跃。照射后3 d血管内皮出现断裂，肺泡腔内有红细胞的漏出。照射后7 d可见到明显的血管扩张、充血，管腔内血小板聚集，肺泡间隔水肿和肺泡腔内炎性细胞的渗出。肺泡Ⅱ型上皮细胞最早仅表现为胞吐活跃的功能性改变，照射后3 d才观察到肺泡Ⅱ型上皮细胞的损伤性改变和增生倾向。肺泡Ⅰ型上皮细胞的损伤似乎出现得更晚，在照射后7 d才见到部分Ⅰ型上皮细胞肿胀，细胞质内出现退变的细胞器。该结果提示在临床治疗剂量范围内内皮细胞是辐射最敏感肺实质细胞，而且随后出现的肺泡间隔进行性加重的水肿和肺泡腔内的红细胞漏出、中性粒细胞和吞噬细胞的渗出都与内皮损伤后毛细血管通透性增高或破裂密切关联，可能属于继发性改变。

本研究中各个观察时间点肺标本的肺泡腔内的渗出性改变均不明显，照射14 d后光镜下观察到的逐渐加宽的肺泡间隔，电镜证实是由间隔的水肿泡和增生的内皮细胞、肺泡Ⅱ型上皮细胞以及胶原和成纤维细胞组成，而肺泡巨噬细胞、中性粒细胞及淋巴细胞等炎性细胞的渗出却少见。分析导致这种现象的原因，可能与我们所采用的单次照射剂量偏小有关，由于使用的是8 MV的高能直线加速器，照射时没有使用建成材料，所取肺标本又是右侧中叶肺组织，故右肺中叶的实际受照剂量低于20 Gy，但在照射后84、164 d的受照鼠肺标本上仍有典型的肺纤维化病灶，表明肺泡炎不是辐射性肺纤维化病变形成的必须条件。

在照射后3个月的鼠肺标本上见到肺泡腔内大量的泡沫样吞噬细胞，肺实变区域内有新生的毛细血管内皮细胞的增生活跃，和较多的肺泡Ⅱ型上皮细胞，提示照射后3个月有肺结构重建改变。

虽然关于肺纤维化的确切发病机制目前还不十分清楚，特别是从损伤发生到成纤维细胞增生、聚集和细胞外基质沉积之间的信号通路和细胞因子的网络结构轮廓还十分模糊，但本研究结果提示内皮的损伤和血管内物质的外漏在辐射致肺纤维化的发生中发挥了重要作用。

参考文献：

[1] TROTT K R, HERRMANN T, KASPER M. Target cells in radiation pneumopathy[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004, 58(2): 463-469.

[2] BATALLER R, BRENNER D A. Liver fibrosis[J]. J Clin Invest, 2005, 115(2): 209-218.

[3] DELANIAN S, LEFAIX J L. The radiation-induced fibroatrophic process: therapeutic perspective *via* the antioxidant pathway[J]. Radiother Oncol, 2004, 73(2): 119-131.

[4] COOPER J A Jr. Pulmonary fibrosis: pathways are slowly coming into light[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000, 22(5): 520-523.

[5] DOSREIS G A, BORGES V M, ZIN W A. The central role of Fas-ligand cell signaling in inflammatory lung diseases[J]. J Cell Mol Med, 2004, 8(3): 285-293.

[6] OSTERREICHER J, PEJCHAL J, SKOPEK J, *et al*. Role of type Ⅱ pneumocytes in pathogenesis of radiation pneumonitis: dose response of radiation-induced lung changes in the transient high vascular permeability period[J]. Exp Toxicol Pathol, 2004, 56(3): 181-187.

[7] WILLNER J, VORDERMARK D, SCHMIDT M, *et al*. Secretory activity and cell cycle alteration of alveolar type Ⅱ cells in the early and late phase after irradiation[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2003, 55(3): 617-625.

[8] NOBLE P W, HOMER R J. Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights into pathogenesis[J]. Clin Chest Med, 2004, 25(4): 749-758, vii.

[9] MOLTENI A, MOULDER J E, COHEN E F, *et al*. Control of radiation-induced pneumopathy and lung fibrosis by angiotensin-converting enzyme inhibitors and an angiotensin Ⅱ type 1 receptor blocker[J]. Int J Radiat Biol, 2000, 76(4): 523-532.

[10] LEHNERT B E, DETHLOFF L A, FINKELSTEIN J N, *et al*. Temporal sequence of early alterations in rat lung following thoracic X-irradiation[J]. Int J Radiat Biol, 1991, 60(4): 657-675.

（编辑 薛国文）