论著

文章编号:1000-5404(2007)21-2034-04

大鼠肺放射性损伤的超微结构观察

肖桃元[1],王久惠[3],陶忠芬[1],韦 建[3],可金星[1],李 涛[3],路 菊[1],田 路[3],谭永红[2] (第三军医大学[1]:高原军事医学系中心实验室,重庆 400038,[2]大坪医院野战外科研究所肿瘤中心,重庆 400042;[3]四川省肿瘤医院内科,成都 610041)

提 要:目的 观察放射性肺损伤的超微病理变化,并探讨放射性肺炎和肺纤维化的发生机制。**方法** SD雄性大鼠77只,分实验组63只和正常对照组14只,实验组用8 MV直线加速器30、20、10 Gy 3个剂量一次性照射右半胸,左半胸作为实验对照,分7个时相点(1、3、7、14、28、90、180 d)活杀动物,取右肺中叶组织作光、电镜观察。**结果** 各实验组放射损伤早期(1~30 d)Ⅰ型上皮损伤,吞噬细胞增多、活跃;Ⅱ型上皮激活;肺泡隔毛细血管内皮损伤、增生,血小板、红细胞聚集,微血栓形成;间质水肿。后期(60~180 d)Ⅱ型上皮异常增殖,成纤维细胞/胶原增生,血管萎缩减少,肺泡纤维化。各实验组损伤病变程度与照射剂量相关。**结论** 肺泡隔血管内皮病变、血液循环障碍和间质水肿是放射性肺损伤早期的主要病理变化,是肺纤维化的始动因素;成纤维细胞激活、Ⅱ型上皮细胞异常增殖、吞噬细胞等分别参与肺纤维化进程,是多种因素综合作用的结果。

关键词:放射损伤;超微病理;肺;大鼠

中图法分类号:R322.35;R818.021 **文献标识码**:A

Ultrastructure of radiation-induced pulmonary injury in rats

XIAO Tao-yuan[1], WANG Jiu-hui[3], TAO Zhong-fen[1], WEI Jian[3], KE Jin-xing[1], LI Tao[3], LU Ju[1], TIAN Lu[3], TAN Yong-hong[2] ([1]Laboratory Center, College of High Altitude Military Medicine, Chongqing 400038, [2]Oncology Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042; [3]Medical Department, Oncology Hospital of Sichuan Province, Chengdu 610041, China)

Abstract: **Objective** To investigate ultrastructural pathology and pathogenesis of radiation-induced pulmonary injury. **Methods** Sixty-three adult male SD rats were divided in three groups randomly, receiving irradiation at dose of 10, 20, and 30 Gray at their right hemithorax. The irradiated rats of each group were killed at 1, 3, 7, 14, 28, 90, 180 d, and their lungs were observed by light and electron microscope. Another 14 rats served as normal control. **Results** In early phase of irradiation-induced injury (1 – 30 d), we observed type Ⅰ pneumocytes injury, increased and activated macrophages, the activation of type Ⅱ pneumocytes, the damage and proliferation of endothelial cells, the congregation of platelet and RBC, thrombosis, and interstitial edema. In the fibrotic phase (60 – 180 d), there were the abnormal proliferation of type Ⅱ pneumocytes, the proliferation of fibroblasts and collagens, the atrophy and depletion of capillary vessels, and finally lung fibrosis. **Conclusion** The pathological changes in endothelial cells of capillary vessels, the disturbance of blood circulation and interstitial edema are the early major pathological changes of irradiation-induced pulmonary injury, which may be the primal factors responsible for the development of irradiation-induced lung fibrosis. The process of lung fibrosis involves fibroblast activation, abnormal proliferation of type Ⅱ pneumocytes and increased macrophages, resulting from the combined effects of complex factors.

Key words: radiation injury; ultrapathology; lung; rat

胸/肺部肿瘤的放射治疗常常引起放射性肺损伤,临床通称放射性肺炎,损伤早期表现为肺泡炎性渗出水肿,结局是不同程度的肺纤维化,严重制约了肿瘤的放射治疗。虽然数十年来对本症研究甚多,但至目前为止对其发病机制仍不十分清楚,尚无有效防治措施,本研究通过大鼠肺放射损伤动物模型观察肺超微结构变化,探讨放射性肺炎和肺纤维化的发生机制,并为该病的防治提供理论基础。

基金项目:四川省重点科学技术研究项目(01 SG046-10);重庆市自然科学基金(2004BB5132)
Supported by the Key Science and Technology Research of Sichuan Province (01 SG046-10) and the Natural Science Foundation of Chongqing (2004BB5132)

作者简介:肖桃元(1951-),女,四川省宜宾市人,博士,教授,主要从事超微病理学、创伤病理学方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68752350,E-mail:xty@mail.tmmu.com.cn

通讯作者:谭永红,电话:(023)68757449,E-mail:yh_tan@sina.com

收稿日期:2007-05-29;**修回日期**:2007-08-30

1　材料与方法

1.1　动物及分组

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健康 SD 雄性大鼠 77 只，体质量 220～250 g，分实验组 63 只和正常对照组 14 只，实验组经 30、20、10 Gy 3 个剂量组一次性照射右半胸，左半胸作实验对照，照射后分 7 个时点（1、3、7、14、28、90、180 d）活杀动物，每时点每实验组 3 只，对照组 2 只，取右肺中叶及左肺下叶组织作光、电镜观察。

1.2　致伤方式

动物用速眠新Ⅱ（1.0 ml/kg）肌肉注射全身麻醉，仰面固定，经屏蔽，定位曝露右侧全胸，用 8 MV 直线加速器照射（X 射线），分 30、20、10 Gy 3 个剂量组一次性照射，对照组大鼠麻醉后佯装照射。

1.3　实验观察

照射后按以上 7 个时点处死动物（快速断头），开胸取右肺中叶和左肺下叶固定于 3% 戊二醛，随后修小块（1 mm^3 大小）继续固定，按常规程序制作电镜超薄切片，在 Philip-TECNAI-10 电镜 80 kV 观察。余下组织转入 10% 福尔马林液固定，按常规程序制作石蜡切片，HE 染色，光镜观察。

2　结果

2.1　光镜观察结果

正常对照组：无明显病理改变。各实验组照射后 24 h 肺泡出现轻微充血，余无明显病理改变。照射 3 d 后直至 4 周，见点状/片状淤血，肺泡腔有液体及单个核细胞渗出（图 1）。淤血范围随照射剂量高而增宽，更严重。照射后 2 个月后淤血水肿减轻，范围缩小，肺泡上皮增生，隔增厚，纤维化实变（图 2），并逐渐增宽。病变程度与剂量相关。对照侧肺组织早期有充血改变，以后病变不明显。

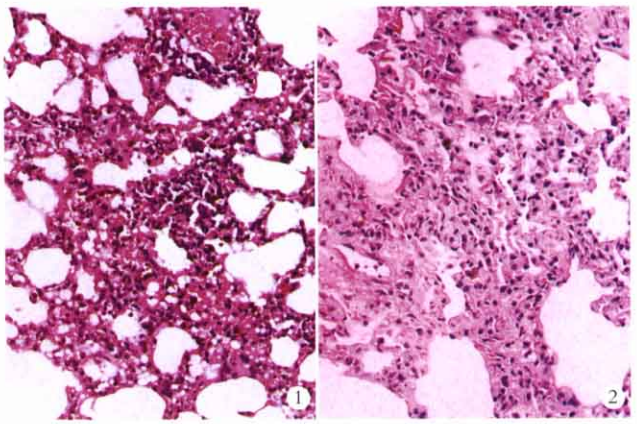


图 1　10 Gy 照射后 14 d，肺叶灶性淤血，伴液体及单个核细胞渗出　（HE×400）

图 2　30 Gy 照射后 6 个月，肺泡塌陷，纤维化实变　（HE×400）

2.2　电镜观察结果

正常对照组无明显病理改变。

10 Gy 组照射后 24 h 无明显病变，见Ⅱ型上皮细胞胞吐活跃，核周间隙、粗面内质网轻度扩张。照射后 3 d，见内皮细胞增生、核增大及分裂像，有的拥塞管腔，肺泡隔间质局部液体渗出（图 3），Ⅱ型上皮细胞核周间隙、粗面内质网、高尔基复合体囊泡扩张。照射后 7 d，见局部Ⅰ型上皮细胞高度肿胀，细胞质苍白，有的细胞器破碎脱落；Ⅱ型上皮细胞数目增多，可见双核细胞，个别显轻微肿胀；多见肺泡隔毛细血管腔内血小板聚集，并见到分叶核和单核白细胞，内皮细胞仍见增生现象，可见内皮细胞与基底膜分离，局部肺泡隔高度水肿，挤压毛细血管壁向管腔内凸成大泡；肺泡腔内大量吞噬细胞。2 周时，除上述病变外，见到肺泡隔成纤维细胞增生，双核细胞出现，单核、分叶核细胞浸润，Ⅰ型上皮细胞显肥胖、增厚、细胞器增多。4 周时，肺泡隔局灶严重水肿仍存在，成纤维细胞和胶原增生。3、6 个月时，肺泡腔塌陷，隔皱折，胶原增生，血管减少。仍可见到部分水肿区。

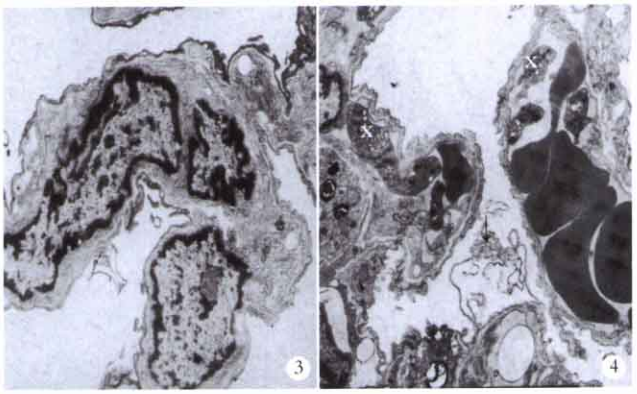
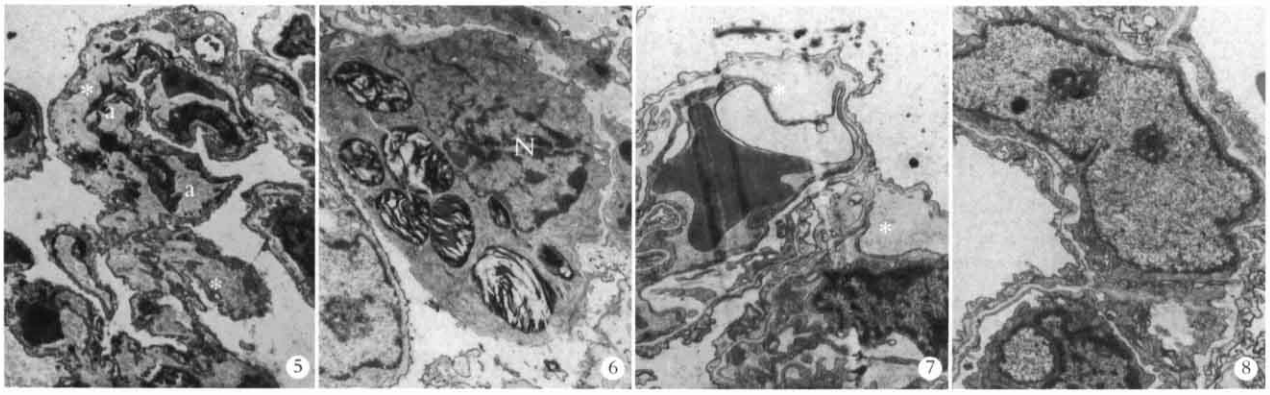


图 3　10 Gy 照射后 3 d 增生肥大肺泡血管内皮细胞　（TEM×7 000）

图 4　30 Gy 照射后 3 d 充血的肺泡隔毛细血管　x：血小板聚集；↓：肺泡Ⅰ型上皮细胞剥脱破碎　（TEM×7 000）

20 Gy 照射后 24 h 及 3 d 时，多见Ⅱ型上皮细胞排空空泡；血管内皮细胞增大，核大，核仁明显，细胞质内有肿胀空泡和破碎细胞器，管腔内多见细胞器破碎变性物及分叶核和单核白细胞；7 d 和 14 d 时，局部Ⅰ型上皮细胞破碎损伤，细胞器和裸核散落肺泡腔，吞噬细胞活跃；Ⅱ型上皮细胞核周间隙及粗面内质网扩张。肺泡壁血管扩张充血，管壁有破裂现象，血管腔内血小板聚集多见（图 4）；肺泡隔广泛严重水肿，挤压血管。至照射后 4 周仍能见到部分血管病变，肺泡隔水肿现象一直到 3 个月仍在局部见到。2 周时成纤维细胞明显增生活跃，照射后 4 周有胶原形成，2～3 个月，肺泡隔严重纤维化增厚，血管减少（图 5）。Ⅱ型上皮细胞肥大，可见到双核、三核细胞，嗜锇性小体集聚（图 6）。

30 Gy 照射后 3 d 即见肺泡隔毛细血管扩张充血，腔内堆积血小板和红细胞，中性粒细胞和单核细胞多见，并见到血管内皮破裂处，间质水肿，挤压血管，内皮与基膜剥脱，管壁向腔内凸起，凸起处切面成大泡状，这种状态在照射后 7 d 进一步加重（图 7），同时内皮细胞增生，阻塞管腔，局部Ⅰ型上皮细胞剥脱，飘于肺泡腔中（图 4），Ⅱ型上皮细胞肥大，核大，可见双核，嗜锇性小体聚集。14 d 时，肺泡隔间质水肿仍然存在，大量成纤维细胞增生，核大异型，胶原增多。肺泡Ⅱ型上皮细胞显得增多。照射后 4 周，肺泡隔水肿和胶原增生相间，血管受压变形，成纤维细胞肥大如肌成纤维细胞，核肥大核仁显著（图 8）。局部Ⅰ型上皮细肿胀呈空泡状。照射后 3 个月，肺泡隔严重胶原增生，纤维细胞成熟（瘢痕化），血管减少，细小。肥大细胞多见。6 个月时，肺泡拥挤，腔塌陷，隔血管减少，胶原增生，Ⅱ型上皮细胞多见。



a：血管减少；*：胶原纤维增生、纤维化；N：三个核的Ⅱ型上皮细胞

图5 20 Gy照射90 d后的肺泡隔 （TEM×2 900）

图6 30 Gy照射90 d后的肺泡Ⅱ型上皮细胞 （TEM×4 200）

图7 30 Gy照射7 d后的肺泡隔间质 （TEM×7 000）

图8 30 Gy照射28 d后的肺泡隔成纤维细胞 （TEM×7 000）

3 讨论

近年对放射损伤机制的分子生物学研究较多，形态学方面研究较少，早年Adamson等[1]作过肺放射损伤的超微结构描述，以后描述不多，提出各种动物放射损伤超微病理有所不同，但基本病变相似[2,3]。本研究以不同剂量一次性照射大鼠半胸动物模型，动态观察双肺超微病理变化，作了较为详细的描述，并对放射性肺损伤的发生机制作一些探讨，以期为该病的防治提供一点参考。

（1）本研究观察到肺泡Ⅰ型上皮细胞的损伤是明显的，与其他文献描述相似。20 Gy、30 Gy照射后3 d，10 Gy照射后1周见到肺泡Ⅰ型上皮细胞肿胀，破碎剥脱。30 Gy照射后1个月仍能见到肿胀的Ⅰ型上皮细胞。随之，肺泡腔内出现较多的吞噬细胞，且吞噬活跃。我们认为吞噬细胞活化和增多，是对细胞损伤破坏的反应，同时可能释放细胞因子和炎症介质参与刺激成纤维细胞增生和胶原分泌，是损伤早期启动肺纤维化的因素之一。

（2）肺泡Ⅱ型上皮细胞反应也较早，照射后24 h见到嗜锇颗粒脱失，细胞质内排空空泡。照射后3～7 d见到肺泡Ⅱ型上皮细胞活跃，细胞肥大、核增大、核仁明显及粗面内质网增生、腔扩张，微绒毛丰富等。照射后24 h至3个月，大多能见到双核、三核的肺泡Ⅱ型上皮细胞，同时细胞增多。

有人认为肺泡Ⅱ型上皮细胞是辐射损伤的靶细胞，自始至终都存在损伤和功能异常[4]。从我们观察到的肺泡Ⅱ型上皮细胞表现，认为该细胞在放射早期被激活，表面活性物质释放增多，合成增加，这与Willner等[5]观察到肺泡Ⅱ型上皮细胞的分泌增加相符合。以后一直表现为异常增殖，出现双核、三核Ⅱ型上皮细胞，细胞数也增多。我们知道，肺泡Ⅰ型上皮细胞易受损伤又无增殖能力，肺泡Ⅱ型上皮细胞则能增殖并分化为肺泡Ⅰ型上皮细胞，因此认为肺泡Ⅱ型上皮细胞的表现是照射后的异常增殖，其分泌功能可能并未受到很大影响。因此所谓肺泡Ⅱ型上皮细胞是辐射损伤的靶细胞的说法值得商酌。肺泡Ⅱ型上皮细胞的激活释放多种细胞因子参与激活胶原的分泌，促进纤维增生，也是参与肺纤维化的因素之一。

（3）肺泡隔血管及间质病变。光镜观察到照射后3 d，肺叶呈点/片状淤血。1个月后病变减轻缩小，代之肺泡实变、纤维化。电镜下观察到：血管内皮细胞病变出现最早，几个剂量组均在24 h见到内皮细胞核增大，细胞质肿胀，细胞器破碎，以后继续加重。照射后3 d见内皮细胞增生/肿胀，出现核分裂像。Novakova-Jiresova等[3]报道照射剂量低至9 Gy即出现血管病变，谭永红等[6]提到血管内皮细胞可能是辐射损伤最敏感的实质细胞，我们进一步提示由血管内皮细胞损伤引起一系列继发病变：表现为毛细血管腔内血小板拥塞，血栓形成，循环障碍，液体漏出，间质水肿。严重的间质水肿使血管壁与基底膜分离，同时炎细胞浸润，成纤维细胞增生，胶原逐渐增多，终至肺泡隔纤维化，血管萎缩、减少。

Fleckenstein等[7]最近研究提示，在众多因素中，放射早期血管病变导致的缺氧是一系列继发性肺损伤的主要始因，从本研究描述病变可以看出，肺泡隔血管内皮病变和血液循环障碍以至间质水肿是放射性肺损伤早期的主要病理变化。首先由内皮细胞损伤引起血小板粘集，内皮细胞反应性增生肿胀阻塞管腔，加重血小板和红细胞的凝集，血栓形成，导致血循环障碍、液体漏出、间质水肿，结果是肺泡缺氧，这是导致临床呼吸衰竭的病理基础。肺泡缺氧的持续刺激，以及微血

栓的机化，刺激成纤维细胞和胶原增生，致使血管闭塞、萎缩、减少，最终肺泡隔纤维化。类似病变在其他原因（如缺氧、感染、SARS…）引起的肺血液循环障碍/肺水肿也见到，肺纤维化是同样的结局。因此我们认为针对早期内皮细胞损伤及血液循环障碍采取适当防治措施，是从起始端阻止肺纤维化的发展[8]。

另外在其他部位，如鼻/鼻咽/咽部、乳腺等肿瘤的放射治疗中，电离辐射引起间质成纤维细胞激活，表现为间质假肉瘤样增生，以及后期胶原化[9,10]，那么，在肺照射时，电离辐射本身对成纤维细胞的激活，也是肺纤维化进程的重要因素。

综上所述，肺血液循环障碍及多种细胞参与肺纤维化的发生过程，那么多种因素如何相互作用是近年研究的热门话题。

参考文献：

[1] Adamson I Y, Bowden D H. Endothelial injury and repair in radiation-induced pulmonary fibrosis[J]. Am J Pathol, 1983, 112(2): 224 - 230.

[2] 白蕴红，王德文，徐在海，等. 放射性间质性肺炎的病变规律及其机制研究[J]. 解放军医学杂志，1993，18(1)：14 - 18.

[3] Novakova-Jiresova A, van-Luijk P, van-Goor H, *et al*. Changes in expression of injury after irradiation of increasing volumes in rat lung[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2007, 67 (5): 1510 - 1518.

[4] 邱　嵘，李　莎，周红梅，等. 放射性肺损伤防治的研究进展[J]. 中华放射医学与防护杂志，2005，25(3)：291 - 293.

[5] 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.

[6] 谭永红，王　东，肖桃元，等. 大鼠半胸照射致肺纤维化模型的病理学观察[J]. 第三军医大学学报，2006，28(2)：104 - 106.

[7] Fleckenstein K, Zgonjanin L, Chen L, *et al*. Temporal onset of hypoxia and oxidative stress after pulmonary irradiation[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2007, 68(1): 196 - 204.

[8] 潘金兵，侯宇虹，齐景宪，等. 氨茶碱对平阳霉素致大鼠肺纤维化的干预作用[J]. 郑州大学学报（医学版），2007，1:152 - 154.

[9] 李　坚，王仁生，甘浪舸，等. 鼻咽癌患者放疗后颈部纤维化及其影响因素[J]. 中华放射医学与防护杂志，2005，25(3)：253 - 255.

[10] 孔　琪，秦　川. 肺纤维化的发病机制及关键靶点[J]. 国外医学：呼吸系统分册，2005，25(5)：331 - 333，336.

[11] Trott, K R, Herrmann T, Kasper M. Target cells in radiation pneumopathy[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004, 58(2): 463 - 469.

（编辑　王　红）

（上接 2022 页）

合性占位，大小为 7.8 cm × 4.4 cm，盆腹腔积液，为进一步诊治，于 2 月 6 日，以持续性异位妊娠收入院。入院后复查血 β-hCG 为 192.33 mIU/ml，予以甲氨喋呤 50 mg/m² 治疗，2 月 8 日查血 β-hCG 为 178.56 mIU/ml，辅以口服中药治疗。2 月 11 日查血 β-hCG 为 163.5 mIU/ml，较前呈下降趋势，且无症状，于 2 月 22 日出院。出院后，患者阴道流血一直未净，量时多时少，2 月 27 日行盆腔 B 超见左附件区 9.8 cm × 5.4 cm 混合性占位。3 月 11 日，患者第 3 次入院治疗。

3 月 13 日查血 β-hCG 为 3.87 mIU/ml，给予抗感染和对症治疗，3 月 14 日，患者阴道排出一 6 cm × 4 cm × 2 cm 蜕膜管型样陈旧性机化组织，病检为蜕膜组织变性出血。复查 B 超见左附件区 5.2 cm × 2.9 cm 混合性回声块影，继续抗感染治疗，辅以中药治疗。4 月 15 日，患者阴道流血增多，似月经来潮，无其他症状，血 β-hCG 正常，遂出院。

2　讨论

本例患者在经腹腔镜下剖管取胚术后，表现不规则阴道出血，患侧附件区持续性包块，在第二次住院期间，有蜕膜组织排除，说明保守术后，仍然有滋养细胞在输卵管部位继续增殖，经甲氨喋呤及中药治疗后，患者血 β-hCG 恢复正常。

输卵管妊娠时，受精卵在输卵管内着床，滋养细胞往往向肌层浸润性生长，采用保守性手术治疗时，即使手术再精细也不可能去除所有的滋养细胞，这些残留的滋养细胞可能存在于输卵管管腔内、肌层或肌层与浆膜层之间持续增殖，从而造成 PEP。目前 PEC 的诊断并无统一标准，主要依靠异位妊娠术后的监测。Spandorfer 等[2]认为术后第 1 天血 β-hCG 水平下降 < 50%，则发生 PEP 的机会明显增高，相对危险性为 3.15（1.25 ~ 6.68）。另一些作者认为每 72 小时血 β-hCG 下降 < 20%[3]，则诊断可以成立。

PEP 的治疗方法可根据患者术后血清 β-hCG 监测情况、临床症状来选择，药物治疗主要为 MTX 全身化疗，也有应用 5-FU、米非司酮等药物的，中药治疗可作为辅助治疗方法，通常可获得较好的治疗效果。若患者有明显的临床症状，如出现腹腔内出血，则须尽快进行再次手术治疗，这种情况可由滋养细胞侵袭并穿透输卵管，使输卵管破裂而引起。

尽管少有因 PEP 导致患者死亡的报道，但其容易导致患者病程延长，病情不稳定，给患者带来较大的心理压力，因此需要临床医师引起注意，尽量预防，密切观测，及时治疗。

关键词：持续性异位妊娠；腹腔镜

中图法分类号：R714.22　　文献标识码：B

参考文献：

[1] Dunn R C, Taskin O. Chronic ectopic pregnancy after clinically successful methotrexate treatment of ectopic pregnancy[J]. Int J Gynaecol Obstet, 1995, 51(3): 247 - 249.

[2] Spandorfer S D, Sawin S W, Benjamin I, *et al*. Postoperative day 1 serum human chorionic gonadotropin level as a predictor of persistent ectopic pregnancy after conservative surgical management[J]. Fertil Steril, 1997, 68(3): 430 - 434.

[3] Vermesh M, Silva P D, Sauer M V, *et al*. Persistent tubal ectopic gestation: patterns of circulating beta-human chorionic gonadotropin and progesterone, and management options[J]. Fertil Steril, 1988, 50(4): 584 - 588.

（编辑　薛国文）