DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.02.027

高剂量率近距离辐射正常食管的组织学改变与 DNA含量变化的研究

李德志* 徐维邦 张哉根 (第三军医大学附属新桥医院肿瘤中心)重庆, 400037

提 要 目的: 研究高剂量率(HDR)腔内近距离辐射正常食管的组织学改变及与食管上皮细胞 DNA含量变化的关系,探讨其临床价值。方法: 选用家兔49只,分 10 Gy组、15 Gy组和对照组,分别于接受照射后不同时间检查组织病理学改变及食管上皮 DNA含量变化。结果: 10 Gy组仅有粘膜和粘膜下层充血和浅溃疡,7 d炎症明显,2周即可见上皮修复表现。15 Gy组在7~14 d出现了严重的上皮及肌层损伤,持续6周以上,损伤后的修复均有明显的纤维增生。未发现受照射后食管上皮 DNA倍性(DI)的改变,S期细胞比例(SPF)改变与组织病理学改变相一致,急性炎症期 SPF减少,恢复期 SPF回升并增高。结论: 为保证正常食管免受过量照射,HDR近距离治疗食管癌时单次剂量应在10 Gy以下。HDR辐射对正常食管上皮的 DNA含量无明显改变,放射损伤及修复中上皮细胞周期中 SPF变化与组织病理学改变一致。

关键词 放射损伤;近距离治疗; DNA含量;流式细胞术;病理学;食管
中图法分类号 R73-354

近10年来,高剂量率(HDR)后装治疗,即 HDR腔内近距离放射治疗食管癌在我国广泛应用。在提高了食管癌局部控制率的同时,放疗中的并发症也有所增加。本实验着重研究单次剂量的腔内 HDR辐射对食管上皮细胞 DNA含量和细胞周期的影响及其与辐射引起食管损伤、修复的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康成熟家兔49只,选自本院动物室的检疫动物。体重2.1~3.1 kg,雌雄不拘,随机分3组。10 Gy(A组)、15 Gy(B组)、对照组(C组),分别于照射后4、7、10 d,2、4、6、26周 7个时相点检测,每个时相点 A、B两组各3只,对照组各1只。

1.2 主要仪器设备

荷兰核通公司产 Micro-selectron HDR后装治疗机。放射源为(Ir192),美国 Becton Dickinson公司生产的 FAC StarPlus型流氏细胞仪。

1.3 实验程序

麻醉动物、插管、定位、照定位片,作治疗计划、打印剂量曲线图,然后行腔内照射。单次剂量选择为 10 Gy和 15 Gy,参考点距离为点源外 5 mm,设置剂量点长 30 mm。

1.4 组织学标本的制备

1.4.1 光镜标本的制备 动物麻醉后,取照射区内一段食管,先纵行切开观察大体标本,然后切取反应最明显的一处,固定,取材,石蜡包埋,切片,HE染色。

1.4.2 VG染色(胶原纤维染色)程序 用10%的甲醛溶液固定,脱水,透明沉蜡,石蜡包埋切片。将石蜡切片成5 μm,脱蜡至水洗。然后用蒸馏水充分水洗,再用 Van gieson氏液染色1~5 min。倾去染液,直接用95%的酒精急速分化约数秒钟,无水酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。结果观察: 胶原纤维呈红色,肌肉,神经胶质,胞浆,红血球呈黄色。

1.5 流氏细胞仪(FCM)检测

1.5.1 单细胞悬液的制备(石蜡包埋组织) 采用陈秀鉴等[1]的方法。组织块消化使用胰蛋白酶,单细胞悬液制备好后加70%的乙醇,置于4℃冰箱备用。

1.5.2 FCM检测 测定前用鸡红细胞校正仪器,使其变异系数(*CV*)稳定在3%以内,用专用的 HP-9000/340型计算机及 CELL-FIT程序(2.0版本)进行细胞周期分析,得出细胞周期各阶段的比例,用 *t*检验和相关分析进行统计学处理,选择未进行照射的正常食管粘膜标本进行 FCM检测,以作为对照。

2 结果

2.1 HDR近距离辐射引起实验动物正常食管的组织学改变

10 Gy组4~10 d为急性炎症期,仅见粘膜和粘膜下炎症充血;部分出现浅肌层水肿。2~4周即开始进入修复期,粘膜上皮增厚,粘膜下纤维成分增多,伴少量炎细胞浸润,肌层亦可见炎细胞浸润,血管壁无明显改变,6周时除粘膜下纤维化明显外,肌层炎症消失。6个月以上观察,放射线引起的损伤已基本恢复,可见肌层纤维萎缩。

15 Gy组急性炎症反应出现在7~14 d,均有不同程度的粘膜溃疡,炎细胞浸润已波及浅肌层,纵行肌细胞水肿。4周时,仍可见部分粘膜坏死和溃疡,溃疡脱落后的上皮开始出现新生。6

* 李德志,男,40岁,主治医师,讲师,学士

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

周时,上皮增生明显,粘膜下炎性浸润仍存在且粘膜下胶元纤维增生,肌纤维萎缩,血管壁增厚,部分出现退行性变。6个月观察仍可见局部粘膜坏死,但大部分表现为上皮增生,粘膜下尚有少许炎细胞浸润,肌纤维萎缩。

VG染色结果:正常肌层可见肌纤维间有少许胶原纤维作为结缔组织成分存在。放射后纤维增生与照射剂量和时间均相关,随着单次照射剂量的增加,纤维增生情况依次加重。相同剂量照射后,时间越长,纤维增生越明显。

2.2 食管上皮细胞周期及 DNA含量的改变

2.2.1 DNA指数(DNA index, DI)　DI= 样品细胞 G_1峰道数均值 /正常食管上皮 G_1峰道数均值,本组正常食管上皮细胞 G_1峰道数均值为放射前未受辐射的正常食管上皮细胞道数均值,样品细胞为腔内放射 10 Gy和 15 Gy后不同时间的正常食管上皮细胞。10 Gy组的 DI值为 0.85~1.16,均数为 0.96;15 Gy组的 DI值为 0.85~1.16,均数为 0.99,见表 1

表 1　10 Gy组和 15 Gy组 DNA含量改变情况

Tab 1　Changes of DNA content in 10 Gy(A) and 15 Gy group (B)

	Control	4 d		7 d		10 d		14 d		4 w		6 w		27 w	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
SPF	245	208	280	284	283	282	208	208	286	208	274	208	208	208	208
DI		0.85	1.14	1.16	1.15	1.15	0.85	0.85	1.16	0.85	1.12	0.85	0.85	0.85	0.85

2.2.2 细胞增殖指数(Proliferative index, PI)　为细胞周期中 S期和 G_2+ M期占整个细胞周期的比例。PI= S+ G_2+ M/ G_0+ G_1+ S+ G_2+ M。PI反映的是细胞的增殖水平,见表 2

表 2　10 Gy组和 15 Gy组 PI及 SPF改变情况

Tab 2　Proliferation index and S-phase fraction in 10 Gy (A) and 15 Gy group (B)

	Control	4 d		7 d		10 d		14 d		4 w		6 w		27 w	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
SPF	12.1	8.8	7.8	5.8	6.2	5.3	6.0	14.9	6.5	15.7	9.7	19.0	16.6	28.4	19.0
PI	13.1	9.6	8.9	6.6	6.5	5.7	6.7	15.9	6.9	16.3	10.2	22.0	17.7	32.5	20.0

2.2.3 S期细胞比例(S-Phase fraction, SPF)　代表处于 DNA合成期细胞的比例,是细胞增殖活跃程度的反映,是决定 PI的主要成份,从表 2中可见,对照组 SPF为 12.1,10 Gy组 SPF均数为 13.98,略高于对照组。15 Gy组 SPF均数为 10.21,低于对照组。

3 讨论

与远距离外照射和低剂量率放射治疗不同,高剂量率腔内放射治疗食管癌时,由于其单次剂量高,又贴近食管粘膜,放射引起的急性粘膜损伤出现早,发生的严重[2,3]。HDR近距离辐射引起的急性食管损伤主要表现为粘膜和粘膜下层以及肌层的损伤。本实验 HDR腔内近距离辐射引起食管的急性损伤主要表现在放射后的 4~14 d,随单次剂量增加,损伤加重。修复表现为 10 Gy组 2周开始出现,6周有明显恢复;15 Gy组 4周才有 2/3的标本出现修复表现,6周时仍有 1/3尚未出现上皮增生,6个月以上部分标本中仍见上皮的坏死和变性以及肌层萎缩。VG染色见个别食管壁在修复后几乎被胶原纤维填充,失去正常的管壁结构。这种放射性损伤的修复在临床上就会出现食管狭窄,使患者生存质量下降。作者体会,在使用 HDR腔内放射食管癌时,为减少并发症的发生,应保持单次剂量在一定范围内,以避免产生严重的并发症,当参考点距离为 5 mm时单次剂量应在 10 Gy以内,相应地 10 mm参考点距离时,单次剂量应在 5 Gy左右。

资料证实,肿瘤细胞中 DNA的含量对放疗和预后均有重要的影响作用[4]。非整倍体 DNA的肿瘤细胞其 S期细胞的比例高,增殖活性强,对放射治疗的敏感性较二倍体细胞高 10%~15%,放疗后局部控制率亦较高[5]。近年来,对食管癌细胞及食管上皮的 DNA含量分析报道较少,刘洪祥等[6]报告了 60例食管癌患者的癌组织、食管上皮和健康人食管脱落上皮的 DNA分布情况。发现患者的癌周食管上皮和正常健康人食管脱落上皮均为正常的二倍体单峰或附有 8%的 G_2+ M期小峰,而食管癌组织有多种直方图型,DNA指数为 0.47~2.25且非整倍体出现率为 61%。本实验 FCM

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

结果见: 正常食管上皮在接受 HDR近距离辐射后的 DI值在 0. 85~ 1. 16之间,均为 DNA二倍体, G2+ M峰值在 B组均数为 1. 07% , C组为 2. 0%。10 Gy组的 SPF值在急性炎症期减少,低于正常对照组, 2周后回升并超过对照组,反应出新生上皮增殖能力增强。15 Gy组的 SPF在急性炎症期同样受抑制, 4周以后开始回升, 6周后才达到对照值,以后缓慢上升,反应出受照射大于 15 Gy时,粘膜生长受抑制时间长,修复慢,与临床观察一致。

参考文献

1 陈秀鉴,左连富.基底细胞癌 DNA的流式细胞术分析.中华放射肿瘤学杂志, 1988; 10(2): 99

2 李德志,徐维邦,张哉根.高剂量率腔内辐射正常食道损伤与修复的实验研究.四川肿瘤防治, 1997;增刊: 2

3 Hisikawa Y, Kurisu K, Taniguchi M *et al*. High-dose-rate intraluminal brachy therapy for esophageal cancer: 10 years experience in Hyogo College of Medicine. Radiotheropy and Oncology, 1991; 21: 107

4 韩 春,高献春,陈秋立等.食管癌 DNA分析与不同分割照射对预后的影响.中华放射肿瘤学杂志, 1997; 6(2): 118

5 周菊英,许昌韶.放射敏感性的预测及治疗方案的选择(综述).国外医学: 临床放射学分册, 1994; 1: 55

6 刘洪祥.食管癌单细胞悬液流式细胞光度分析.中华物理学杂志, 1987; 9(1); 28

(收稿: 1997-12-12;修回: 1998-03-25)

(编辑 张大春)

Effects of high-dose-rate intracavitary irradiation on histology and epithelial DNA content of the esophagus in rabbits

Li Dezhi, Xu Weibang, Zhang Zaigen (Cancer Center of PLA, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037)

Abstract **Objective**: To explore the effects of high-dose-rate (HDR) intracavitary irradiation on histology and epithelial DNA content of the esophagus. **Methods**: Forty-nine rabbits were randomized into 10Gy-ray-irradiated, 15Gy-ray-irradiated and the control groups. The changes of histology and epithelial DNA content of the esophagus were observed at several time phases after the irradiation. **Results**: ① In the 10Gy-ray-irradiated group, there were mucosal and submucosal congestion and superficial ulcer. ② In the 15Gy-ray-irradiated group, severe mucosal injury was seen from the 7th to 14th day after irradiation. In the 6th week after irradiation, chronic injuries such as necrosis and degeneration of the epithelium and degeneration of the blood vessels were found. ③ In both the two groups, no significant changes of the DNA index (DI) were seen in the esophageal mucosa after irradiation and S-phase fraction (SPF) was closely related to the histological changes of the esophagus. SPF was lower in the acute period of mucosal injury than in the recovering period. **Conclusion**: To induce the serious damage of the esophagus, HDR intracavitary irradiation with a dose lower than 10Gy is recommended to be used to treat esophageal carcinoma.

Key words irradiation injury; DNA; esophagus; rabbit

(上接 157页)

讨论

洛汀新 (苯那普利)是一种新型血管紧张素转换酶抑制剂[1],对严重肾损害患者,其代谢产物苯那普利拉的消除缓慢,反复给药后造成蓄积,可出现副作用[2]。本组 2例尿毒症患者在口服洛汀新 3月后出现白细胞减少, 1例还出现血小板减少。我们有如下体会:① 尿毒症患者服用洛汀新剂量不宜过大,日用量应 < 20 mg;② 定期复查血象,尤其是在用药 3个月之后,最好每周复查 1次;③ 出现白细胞和 /或血小板减少应立即停药,同时加用升白细胞和 /或血小板药物,并据病情适时输新鲜全血或成分白细胞,能收到较好的效果。洛汀新引起白细胞和血小板减少可能与其造成骨髓抑制有关。

关键词 洛汀新;尿毒症;白细胞减少

中图法分类号 R692. 5

参考文献

1 Gastone Lenetti. Choosing the right ACE inhibitor a guild to selection. Drugs, 1995; 49(4): 516

2 江一帆.苯那普利.见 江一帆编.世界最新药物手册.北京:中国医药科技出版社, 1995: 200~ 203

(收稿: 1997-02-10;修回: 1997-12-05)

(编辑 刘 鹏)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net