

## 大鼠脊髓近距离放射损伤后细胞凋亡规律及其意义

沈进稳 童培建 吴承亮 郭建友 殷俊 肖鲁伟

本研究旨在观察不同剂量的<sup>192</sup>Ir 近距离照射后大鼠脊髓的损伤程度、细胞凋亡的变化规律,寻求保护神经系统的调控点,为进一步探讨保护性干预措施提供依据。

### 一、材料和方法

1. 动物及分组:选清洁级 SD 大鼠 128 只,雄性,体重 270~300 g,随机分为正常对照组、模型 1、2、3 组,每组 30 只,每组根据实验要求在 8、24 h 及 4 周时间点又分 3 小组。

2. 模型建立 模型 1、2、3 组均采用后装技术在大鼠脊髓 T<sub>11</sub> 水平部位进行<sup>192</sup>Ir 近距离照射损伤大鼠脊髓实验。照射剂量分别为 8、16、22 Gy,放射源采用<sup>192</sup>Ir。照射时剂量参考点设在距放射源中心 3 mm 处。

3. 苏木素-伊红(HE)染色:大鼠分别在照射后按 8、24 h 及 4 周时间点麻醉,采用 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液灌注固定 30 min,切取范围在 T<sub>11</sub> 水平节段长约 0.5 cm 脊髓,标本 HE 染色观察。

4. 凋亡细胞的检测:采用 TUNEL,按试剂说明书操作。设立阳性及阴性对照,结果细胞核呈棕色为 TUNEL 染色阳性。

5. 透射电镜标本制备:单独取 8 只大白鼠,6 只制成脊髓损伤模型,2 只作对照。取新鲜 T<sub>11</sub> 水平节段脊髓组织块大小 0.2 cm × 0.2 cm × 0.2 cm;柠檬酸铅染色;透射电镜下(Philips Tacnai 10)观察、照相。

6. 统计学方法:利用 SPSS 10.0 统计软件分析。各组数据采用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,进行方差分析和 *q* 检验。

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(302606)

作者单位:310006 杭州,浙江省中医药大学附属第一医院 浙江省中医院骨伤科(沈进稳、童培建、吴承亮、殷俊、肖鲁伟);中国科学院心理研究所(郭建友);

### 二、结果

1. HE 染色结果:模型 1、2 组大鼠与正常对照组比较,大鼠脊髓无明显的病理学改变;模型 3 组大鼠在<sup>192</sup>Ir 近距离照射放射后 8、24 h 亦无明显的病理学改变,但在放射后 4 周,大鼠脊髓白质区出现明显的疏松,部分可见出血灶,而灰质区均未见病理性改变。

2. 超微结构观察:与正常对照组比较,模型 1、2、3 组大鼠在<sup>192</sup>Ir 近距离照射放射后 8、24 h、4 周均出现 T<sub>11</sub> 水平脊髓节段在电镜下显现出明显的早期凋亡细胞核特征,可见凋亡细胞主要为胶质细胞;在 4 周后电镜下仍可见胶质细胞的凋亡,同时可见髓鞘的肿胀等,未见神经元及血管内皮细胞的凋亡。

3. TUNEL 染色的观察:TUNEL 染色观察发现,模型 1、2、3 组在<sup>192</sup>Ir 近距离照射放射后 8 h,大鼠 T<sub>11</sub> 水平脊髓节段白质区出现大量的棕黄色颗粒,均位于胶质细胞的细胞核内,而放射后 24 h、4 周棕黄色颗粒数量明显减少,棕黄色颗粒为凋亡细胞 DNA 片段末端标记的阳性信号,但大鼠脊髓的神经元及血管内皮细胞未见棕黄色颗粒;其中模型 3 组阳性信号最强,颜色深;而正常对照组大鼠 T<sub>11</sub> 水平脊髓节段白质区未见棕黄色颗粒。

### 三、讨论

作为手术中放疗的一种扩展,目前临床应用近距离放射治疗脊柱转移瘤发展迅速,积累了较多资料<sup>[1]</sup>。但对于外周神经、血管、脊髓等多种正常组织的放射生物学效应研究甚少。放射生物学研究表明,近距离放疗的高强度放射源与传统的低剂量率治疗大不相同<sup>[2]</sup>;在脊柱肿瘤近距离放疗中,脊髓还不可避免受到照射而引起放射性损伤,脊柱肿瘤近距离放疗治疗方案仍受脊髓耐受量限制<sup>[3]</sup>。因此,需要对近距离放射后脊髓组织学改变规律进一步了解。

本项实验中观察的结果,表明了不

同剂量的近距离放射引起的大鼠脊髓胶质细胞凋亡主要发生在损伤早期。这与常规的外照射实验研究报道相一致<sup>[4]</sup>。实验结果还表明,放射剂量与凋亡相关,在放射性脊髓损伤 8 h(凋亡的高峰期)影响不大,但在高峰期后高剂量(22 Gy)放射引起的细胞凋亡明显高于低剂量(8 Gy),提示高放射剂量所致脊髓神经胶质细胞的大量凋亡不仅是一过性的。同时,本研究中只是一个特定时间点的细胞凋亡,而不是一个动态积累的过程,综合起来计算,凋亡的细胞数量是非常大的,而大量的胶质细胞死亡无疑会影响到脊髓功能的恢复。本研究 HE 染色结果亦显示,早期神经胶质细胞的凋亡情况,可反映后期的神经损伤情况;本研究结果也证明神经胶质细胞作为脊髓内数量最多的细胞,对近距离放射性脊髓损伤产生很大影响<sup>[5]</sup>。所以控制脊髓近距离放射损伤早期的胶质细胞凋亡,对保护脊髓近距离放射损伤具有一定的临床意义。

### 参 考 文 献

- [1] 杨祚璋,黄云超,许建波,等.经皮椎体成形术联合<sup>125</sup>I 粒子植入治疗脊柱转移性瘤.中华实验外科杂志,2007,24:500-502.
- [2] 张建国,孟凡刚,刘阿力,等.伽玛刀照射培养大鼠海马神经元的放射生物学作用.中华实验外科杂志,2007,24:345-347.
- [3] Narayan A, Cohen GN, Zaider M, et al. High-dose-rate interstitial brachytherapy and previously irradiated head and neck cancers-preliminary results. Brachytherapy, 2007, 6:157-163.
- [4] Atkinson SL, Li YQ, Wong CS, et al. Apoptosis and proliferation of oligodendrocyte progenitor cells in the irradiated rodent spinal cord. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005, 62:535-544.
- [5] Li YQ, Chen P, Jain V, et al. Early radiation-induced endothelial cell loss and blood-spinal cord barrier breakdown in the rat spinal cord. Radiat Res, 2004, 161:143-152.

(收稿日期:2007-12-04)