

# 15Gy $^{137}\text{Cs}$ $\gamma$ 射线照射大鼠肾脏对骨代谢的影响

高林峰 王洪复 徐陪康 徐爱红 朱飞鹏  
(复旦大学放射医学研究所骨代谢研究室 上海 200032)

**摘要** 观察了 $\gamma$ 射线照射大鼠双侧肾脏对骨代谢的影响。6月龄雄性SD大鼠20只,随机分为对照组( $n=10$ )和双侧肾脏 $\gamma$ 射线照射组( $n=10$ )。应用 $^{137}\text{Cs}$  $\gamma$ 射线照射装置每侧肾脏照射15Gy,剂量率为0.91Gy/min,照射后饲养3个月。收集24h尿,处死动物,收集血、肾脏、腰椎、股骨、胫骨标本。测定血肌酐、尿素氮、钙、磷、25(OH) $\text{D}_3$ 、1,25(OH) $\text{D}_3$ 、PTH和尿蛋白、 $\beta_2$ 微球蛋白、钙、磷、PYD/肌酐等指标。肾脏标本作光镜和透射电镜观察。第1—4腰椎和右侧股骨作骨密度测定,第3腰椎和右侧股骨作成分分析,第4腰椎和左侧胫骨上段作形态计量学分析。结果表明,射线致肾小球、肾小管和肾间质病理性损伤。与假手术组比较,射线照射组血尿素氮、肌酐和尿 $\beta_2$ 微球蛋白分别升高26%( $p<0.05$ )、9%和29.6%( $p<0.05$ ),血清钙降低4%,血清磷升高2%,尿钙增加24%,尿磷减少35%( $p<0.05$ ),血清碱性磷酸酶活性提高17%( $p<0.05$ ),血清25(OH) $\text{D}_3$ 变化不明显,而1,25(OH) $\text{D}_3$ 降低54.9%( $p<0.05$ ),血清PTH升高27.3%( $p<0.05$ ),尿PYD/肌酐值增加31.7%( $p<0.05$ ),腰椎骨密度降低13.0%( $p<0.05$ ),第4腰椎骨矿盐含量降低13.1%( $p<0.05$ ),右侧股骨骨密度、干重和灰重分别降低3.5%( $p<0.05$ )、7.6%( $p<0.05$ )和11.6%( $p<0.05$ ),骨小梁体积、平均骨小梁厚度和结点末端比分别下降13.2%( $p<0.05$ )、18.2%( $p<0.05$ )和36.7%( $p<0.05$ ),矿化沉积率提高53.9%( $p<0.05$ )。15Gy $\gamma$ 射线照射大鼠双侧肾脏可致肾功能障碍,并继发以骨转换加速、骨量减少为特点的代谢性骨病。

**关键词** 辐射、肾脏、骨代谢  
**中图分类号** R81, Q1

肾脏是影响骨代谢的重要器官之一,它不仅可以调节机体内钙、磷平衡,而且是合成活性维生素D的主要场所。晚期肾脏病患者通常伴有骨代谢障碍,表现为骨骼纤维化、骨矿化不良、静止性骨病、骨质疏松症等,统称为肾性骨病<sup>[1]</sup>。肾性骨病发病机理因其表现的多样性和复杂性而没有完全阐明。与此同时,骨质疏松症等骨代谢疾病是影响老年人生活的常见病、多发病,而老年人通常有肾脏功能的减退。另外,放射治疗在肿瘤治疗中应用日益广泛,而射线照射肾脏对骨代谢究竟有何影响尚不明确,也未得到应有的重视。本研究通过 $\gamma$ 射线照射大鼠双侧肾脏,观察对骨代谢的影响,为放射治疗中对肾脏的防护提供依据为肾性骨病及老年人代谢性骨病的研究提供手段。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物与手术、照射方法

清洁级6月龄雄性Sprague-Dawley大鼠20只,体重 $380\pm 60\text{g}$ (复旦大学医学院动物中心提供,合格证号码:动卫字第02-22-2号),随机分为2组,每组10只,各组手术操作如下:

**对照组 (group A):** 大鼠经腹腔注射盐酸氯胺酮(0.2mL/100g体重)麻醉,取右侧卧位,消毒肋下皮肤,作长约1.5cm的纵向切口,将左侧肾脏轻轻挤出体外,生理盐水纱布覆盖;再取左侧卧位,同样方法暴露右侧肾脏。30min后将两侧肾脏送回腹腔,分层缝合切口。

**双侧肾脏照射组 (group B):** 麻醉状态下暴露大鼠两侧肾脏同A组,将动物侧卧位固定于模具上,铅板遮挡肾脏以外的组织。应用 $^{137}\text{Cs}$  $\gamma$ 射线照射装置(Gamma cell 40,加拿大)直接照射双侧肾脏。每只肾脏照射剂量为15Gy。剂量率为0.91Gy/min。

在清洁级动物实验室饲养A、B大鼠3个月。处死前14d和4d分别腹腔注射盐酸四环素30mg/kg体重。处死前2d将大鼠分别放入代谢笼内收集24h尿。处死动物,收集血、肾脏、腰椎、股骨、胫骨标本作以下测定。

### 1.2 肾损伤检测

自动生化分析仪测定血尿素氮、肌酐、尿蛋白、尿肌酐。放射免疫法测定尿 $\beta_2$ 微球蛋白(药盒购于北京市福瑞生物工程公司,批间CV<6.5%)。动物处死

第一作者:高林峰,男,1975年10月出生,2001年硕士毕业,现复旦大学医学院在读博士,研究方向骨代谢  
收稿日期:初稿2002-02-05,修回2002-03-20

后立即取 5—6 块约  $1\text{mm}^3$  大小的右侧肾皮质浸入 2.5% 戊二醛固定后作透射电镜观察, 其余部分浸入 Susa 固定液固定 12h 后用 95% 酒精洗涤, 常规石蜡包埋切片, HE 染色后作光学显微镜观察。

### 1.3 骨代谢相关指标检测

自动生化分析仪测定血清钙、磷及尿钙、磷。放射免疫法测定血清  $25(\text{OH})\text{D}_3$  (批间 CV  $<7.9\%$ )、 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (药盒购于 BioSource Europe S.A., 批间 CV  $<7.8\%$ )、PTH (药盒购于北京市福瑞生物工程公司, 批间 CV  $<6.8\%$ ) 和尿 PYD/肌酐 (药盒购于美国 Metra Biosystems 公司, 批间 CV  $<6.6\%$ )。

双能 X 射线骨密度仪 (LUNAR DPXMD 5966) 测定第 1—4 腰椎正位平均骨密度。在万分之一天平 (Sartorius 2004, Germany) 上根据阿基米德定律测定右侧股骨物理密度。根据已建立方法<sup>[2]</sup>分析第 3 腰椎和右侧股骨有机质和矿盐含量。

骨形态计量学测定: 10% 中性甲醛固定第 4 腰椎, 脱钙后 H-E 染色, 光学显微镜下拍照, Image-Pro-Plus 软件分析计算骨小梁体积、平均骨小梁厚度和结点末端比。Million's 液固定左侧胫骨上段, 乙醇梯度脱水, 甲基丙烯酸甲酯渗透包埋, 硬化后作  $20\mu\text{m}$  厚切片, 中性树脂封片后在荧光显微镜下拍照, 测量四环素双标记间距, 计算矿化沉积率 (矿化沉积率=四环素双

标记间距/间隔天数)。

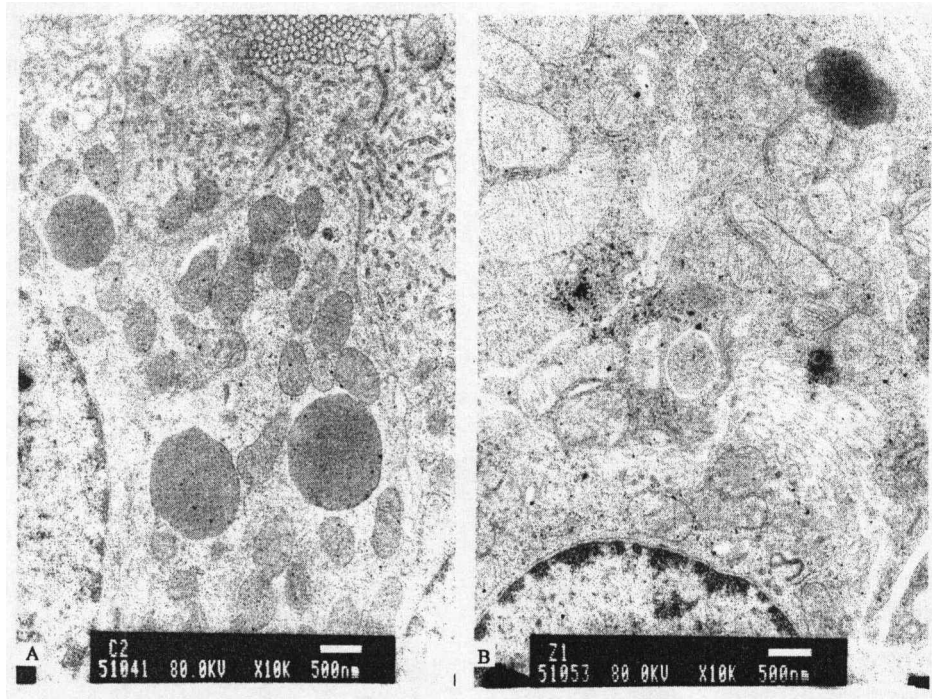
### 1.4 数据处理和表示

所有结果以均数±标准差的形式表示, 并用 SPSS 10.0 统计学软件作单因素方差分析 (One-Way-ANOVA)。组间比较,  $p < 0.05$  时视为有统计学意义。

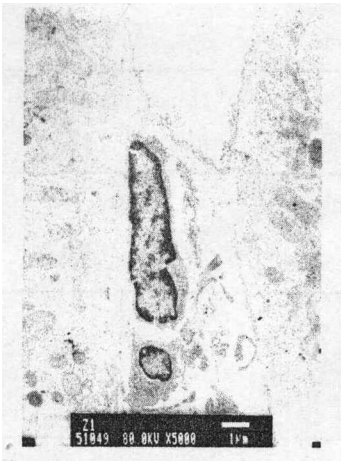
## 2 结果

### 2.1 肾脏病理改变

光镜观察可见照射组肾脏体积缩小, 皮质比例减小, 肾小球毛细血管腔扩大, 肾小管上皮细胞间隙增大, 部分上皮细胞肿胀、坏死。肾皮质扫描电镜 (图 1—3) 可见, 肾脏照射组肾小球基底膜不均匀改变, 局部增厚, 局部变薄。毛细血管腔扩大, 内含大量红细胞, 管外间隙明显压缩, 并有游走白细胞。毛细血管内皮细胞核染色质聚集于核膜下, 部分核膜断裂, 胞浆减少, 并出现空泡样结构, 部分内皮细胞窗孔消失。肾小球上皮细胞肿胀, 胞浆内出现大量颗粒样结构。在肾小管可见上皮细胞间隙增大, 出现炎症样细胞, 大量胶原纤维沉积, 基板明显增厚。肾小管上皮细胞线粒体肿胀, 体积增大, 基质变稀薄, 电子密度降低, 部分线粒体嵴变短、减少、排列紊乱。



**Fig.1** Transmission electron micrograph of renal tubular epithelial cells. Irradiation (B) resulted in changes of mitochondria, including swelling size, thinned matrix, reduced electronic density, shortened, decreased in number and deranged mitochondrial cristae.



**Fig.2** Intercellular space of renal tubule in group B. Inflammation cells can be seen in broadened intercellular spaces of renal tubules.



**Fig.3** Glomerulus of group B. A great deal of collagen fibers can be seen.

## 2.2 肾功能指标改变 (见表 1)

与假手术组比较, 双侧肾脏照射组血尿素氮升高 26% ( $p<0.05$ ), 肌酐升高 9%, 尿  $\beta_2$  微球蛋白升高 29.6% ( $p<0.05$ ), 而尿总蛋白无显著变化。

## 2.3 生化指标改变 (见表 2)

双侧肾脏照射可使血清碱性磷酸酶活性由 124.8U/L 提高到 146.2U/L, 使血清钙降低 4%, 血清磷提高 2%, 尿钙增加 24%, 尿磷减少 35% ( $p<0.05$ )。

## 2.4 血清 25 (OH) D<sub>3</sub>、1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>、PTH 和尿 PYD/肌酐 (见表 3)

与假手术组比较, 双侧肾脏照射组血清 25 (OH) D<sub>3</sub> 水平有的变化无统计学意义, 血清 1,25(OH)<sub>2</sub>D 降低 54.9% ( $p<0.05$ ), 血清 PTH 升高 27.3% ( $p<0.05$ ), 尿 PYD/肌酐值增加 31.7% ( $p<0.05$ )。

## 2.5 骨密度及骨骼成分分析结果 (见表 4 和表 5)

双侧肾脏照射可使腰椎骨密度降低 13.0% ( $p<0.05$ ), 第 4 腰椎湿重降低 10% ( $p<0.05$ ), 骨矿盐含量降低 13.1% ( $p<0.05$ ), 右侧股骨骨密度降低 3.5% ( $p<0.05$ )、干重降低 7.6% ( $p<0.05$ )、灰重降低 11.6% ( $p<0.05$ )。

**Tab.1** Results of renal functional markers

( $\bar{X} \pm s, n=10$ )

Groups	Blood urea nitrogen/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	Blood creatinine/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	Proteinuria/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Urinal $\beta$ -2MG/ $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
A	6.24 $\pm$ 0.98	48.20 $\pm$ 4.66	0.85 $\pm$ 0.60	0.27 $\pm$ 0.02
B	7.88 $\pm$ 0.67 <sup>(1)</sup>	52.78 $\pm$ 6.30	0.85 $\pm$ 0.38	0.35 $\pm$ 0.03 <sup>(1)</sup>

One-way analysis of variance, <sup>(1)</sup> $p<0.05$

**Tab.2** Biochemical parameters of serum and urine

( $\bar{X} \pm s, n=10$ )

Groups	Serum Ca/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	Serum P $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	Serum ALP/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	Urine Ca/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Urine P/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
A	2.87 $\pm$ 0.04	1.68 $\pm$ 0.08	124.80 $\pm$ 4.12	3.78 $\pm$ 2.79	9.93 $\pm$ 3.52
B	2.76 $\pm$ 0.07	1.72 $\pm$ 0.19	146.20 $\pm$ 6.37 <sup>(1)</sup>	4.70 $\pm$ 2.08	6.49 $\pm$ 4.10 <sup>(1)</sup>

One-way analysis of variance, <sup>(1)</sup> $p<0.05$

**Tab.3** Serum 25 (OH) D<sub>3</sub>, 1, 25 (OH) <sub>2</sub>D<sub>3</sub>, PTH and urine PYD/creatinine ( $\bar{X} \pm s, n=10$ )

Groups	25(OH)D <sub>3</sub> /ng·mL <sup>-1</sup>	1,25 (OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> /pg·mL <sup>-1</sup>	PTH/ng·dl <sup>-1</sup>	Urine PYD/creatinine /nmol·mmol <sup>-1</sup>
A	9.76 ± 1.19	57.35 ± 13.94	17.55 ± 4.50	49.27 ± 9.69
B	13.03 ± 4.30	25.84 ± 7.41 <sup>(1)</sup>	22.34 ± 3.03 <sup>(1)</sup>	64.89 ± 9.24 <sup>(1)</sup>

One-way analysis of variance, <sup>(1)</sup>*p*<0.05

**Tab.4** BMD and components of No.4 lumbar vertebrae ( $\bar{X} \pm s, n=10$ )

Groups	BMD/g·cm <sup>-2</sup>	Total weight/g	Mineral weight/g
A	0.340 ± 0.023	0.301 ± 0.030	0.221 ± 0.008
B	0.296 ± 0.027 <sup>(1)</sup>	0.271 ± 0.020 <sup>(1)</sup>	0.192 ± 0.005 <sup>(1)</sup>

One-way analysis of variance, <sup>(1)</sup>*p*<0.05

**Tab.5** BMD and components of right femurs ( $\bar{X} \pm s, n=10$ )

Groups	BMD/g·cm <sup>-3</sup>	Total weight/g	Dry weight/g	Ash weight/g
A	1.25 ± 0.03	0.82 ± 0.06	0.80 ± 0.05	0.52 ± 0.03
B	1.21 ± 0.03 <sup>(1)</sup>	0.76 ± 0.04	0.74 ± 0.04 <sup>(1)</sup>	0.46 ± 0.03 <sup>(1)</sup>

One-way analysis of variance, <sup>(1)</sup>*p*<0.05

## 2.6 骨形态计量学结果(见表 6)

双侧肾脏照射使骨小梁体积、平均骨小梁厚度和

结点末端比分别下降 13.2% (*p*<0.05)、18.2% (*p*<0.05) 和 36.7% (*p*<0.05), 矿化沉积率提高 53.9% (*p*<0.05)。

**Tab.6** Results of bone histomorphometry ( $\bar{X} \pm s, n=10$ )

Groups	Volume of bone trabecula/%	Mean depth of bone trabecula / μ m	Nodes/distal ends	Rate of mineral disposition/ μ m·d <sup>-1</sup>
A	25.01 ± 3.18	36.67 ± 5.30	1.28 ± 0.57	3.17 ± 0.35
B	21.71 ± 4.08 <sup>(1)</sup>	29.97 ± 1.58 <sup>(1)</sup>	0.81 ± 0.36 <sup>(1)</sup>	4.88 ± 1.59 <sup>(1)</sup>

One-way analysis of variance, <sup>(1)</sup>*p*<0.05

## 3 讨论

放射治疗作为肿瘤治疗的常规治疗方法之一, 其应用日益广泛。与此同时, 这种治疗方法的并发症也

受到越来越多的重视。照射野包括肾脏的放射治疗常导致肾脏功能损伤, 通常称为放射性肾病。虽然对放射性肾病已有较多的研究<sup>[3]</sup>, 但很少有人注意到射线致肾脏功能损伤对骨代谢的病理改变。本研究通过射

线直接照射大鼠双侧肾脏导致肾脏的放射性损伤, 测定骨代谢的血、尿、骨组织指标, 将射线—肾脏—骨骼三者结合起来研究, 为代谢性骨病及肾脏在代谢性骨病中的作用的研究提供新的实验方法, 并为肿瘤放射治疗过程中对肾脏的防护提供了实验依据。

肾脏光镜和透射电镜观察发现, 射线对肾小球、肾小管和肾间质均可造成明显损伤, 但肾脏各个部位和各种细胞对射线的敏感性存在明显差异。内皮细胞, 尤其是毛细血管的内皮细胞是血管壁内对放射性最敏感的细胞, 为肾脏放射性损伤的靶点<sup>[4]</sup>。内皮细胞的损伤可以修复, 但基底膜的损伤则是进行性的, 表现为细胞增生和/或肥大, 基底膜基质增厚, 系膜硬化, 最终导致肾小球硬化<sup>[5]</sup>。与肾小球损伤相比, 肾小管变化较轻且呈局灶性。肾皮质内肾小球和间隙所占比例明显增加, 说明肾小管减少。异常和正常肾小管的比例与照射剂量明显相关, 即照射剂量越大, 异常的肾小管越多<sup>[6]</sup>。本研究揭示射线照射可导致肾脏明显纤维化。纤维化可以解释为细胞成分和细胞外基质正常调节过程的过度反应。

肾脏功能的降低与上述病理改变相一致, 表现为血清尿素氮、肌酐的增加。值得注意的是, 双侧肾脏照射后尿总蛋白改变不明显, 而 β<sub>2</sub> 微球蛋白显著增加, 说明在肾脏照射后前 3 个月内对肾小管功能影响更显著。

有多种病理途径可导致肾性骨病, 肾脏 1α 羟化酶活性降低是其主要病理机制之一。维生素 D 是调节机体钙、磷和骨代谢的重要类固醇激素。维生素 D 前体需经过两次羟化作用才能形成活性形式[1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>], 其中第 1 次是在肝脏 25 羟化酶催化下形成 25(OH)D<sub>3</sub>, 第 2 次是在肾脏 1α 羟化酶的催化下形成 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>。1α 羟化酶是一种细胞色素 P450 酶, 它主要表达于肾脏近端小管线粒体内膜。双侧肾脏照射组大鼠血清 25(OH)D<sub>3</sub> 无显著变化, 而 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 却明显降低, 说明由于 1α 羟化酶活性降低引起 25(OH)D<sub>3</sub> 向 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 的转化能力明显障碍。肾脏扫描电镜所见肾小管上皮细胞线粒体的病理变化有力支持了上述观点。研究发现, 慢性肾功能衰竭大鼠 1α 羟化酶基因表达水平降低<sup>[7]</sup>。1α 羟化酶活性降低导致 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 合成减少, 继而肠钙吸收功能障碍, 血钙水平下降。低钙血症刺激甲状旁腺分泌 PTH, 而 PTH 可加快骨吸收以补充血钙, 骨量减少, 这与骨密度和骨形态计量分析结果一致。PTH 主要通过其 1 型受体 (PTHR1) 对骨骼产生作用。研究表明, PTHR1 的 mRNA 主要表达于成骨细胞, 但在活性破骨细胞也有表达, 说明 PTH 对这两种细胞有直接刺激作用。基因表达的半定量分析显示肾性骨病患者成骨细胞 PTHR1 的 mRNA 水平降低,

这是肾性骨病患者骨骼对 PTH 抗性增加的重要发病机理<sup>[8]</sup>。代谢性酸中毒在肾性骨病中也起一定作用。它可直接诱导骨溶解, 刺激破骨细胞介导的骨吸收, 抑制成骨细胞介导的骨形成, 并改变甲状旁腺激素和维生素 D 的血清浓度和生物活性<sup>[9]</sup>。免疫系统也参与肾性骨病的病理过程, 研究表明, β<sub>2</sub> 微球蛋白在肾性骨病中通过 T 细胞介导的免疫应答起重要作用<sup>[10]</sup>。

血清碱性磷酸酶、磷、甲状旁腺素等非创伤性指标可作为肾性骨病的诊断依据。但是, 骨组织形态计量学测定仍然是诊断的金指标<sup>[11]</sup>。本研究发现, 双侧肾脏照射可使骨小梁体积、平均骨小梁厚度减小, 说明骨量减少, 这与骨密度及骨成分分析结果相一致; 结节末端比的降低说明骨小梁正常结构受到破坏; 矿化沉积率提高, 说明骨转换加速。甲状旁腺切除术可显著减缓肾性骨病患者桡骨中段骨量的减少<sup>[12]</sup>, 故骨转换的加速可部分归因于血清 PTH 的升高, 但也有研究表明 PTH 升高对骨量和骨小梁结构无破坏性作用<sup>[13]</sup>。

总之, 本研究表明射线照射大鼠双侧肾脏可导致以骨量减少、骨结构破坏、骨转换加速为特点的骨代谢障碍, 其机制有待进一步研究。

## 参考文献

- 1 Keith A, Hruska M D, Steven L *et al.* *New Eng J Med*, 1995, **333**(3):166-173
- 2 冯坤, 高子范, 张灵菊等. *中国骨质疏松杂志*, 1996, **2**(3):34-38  
Feng K, Gao Z F, Zhang L J *et al.* *Chinese J Osteoporosis(in Chinese)*, 1996, **2**(3):34-38
- 3 Robbins M E, Bonsib S M. *Scanning Microsc*, 1995, **9**(2):535-560
- 4 Jaenke R S, Robbins M E C, Bywaters T *et al.* *Laboratory Investigation*, 1993, **68**(4):396-405
- 5 Robbins M E, Bonsib S M. *Scanning Microsc*, 1995, **9**(2):535-560
- 6 Stephens L C, Robbins M E, Johnston D A *et al.* *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1995, **31**(4):865-873
- 7 Murayama A, Takeyama K I, Kitanaka S *et al.* *Endocrinology*, 1999, **140**(5):2224-2231
- 8 Hoyland J A, Picton M L. *Kidney Int*, 1999, **73** (Suppl):S8-S13
- 9 Kraut J A. *Adv Ren Replace Ther*, 1995, **2**(1): 40-51
- 10 Balint E. *Semin Dial*, 2001, **14**(2): 113-116
- 11 Pecovnik Balon B, Bren A. *Clin Nephrol*, 2000, **54**(6): 463-469
- 12 Copley J B, Hui S L, Leapman S *et al.* *J Bone Miner Res*, 1993, **8**(4): 415-422

## EFFECTS OF 15Gy $^{137}\text{Cs}$ $\gamma$ -RAYS RADIATION OF RAT KIDNEYS ON BONE METABOLISM

GAO Linfeng WANG Hongfu XU Peikang XU Aihong ZHU Feipeng

(*Department of Bone Metabolism, Institute of Radiation Medicine, Fudan University, Shanghai 200032*)

**ABSTRACT** The work was to observe the effects of  $\gamma$ -rays radiation of rat kidneys on rat bone metabolism. Ten male SD rats aged 6 months were irradiated at their kidneys with 15Gy  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$ -rays( 0.91 Gy/min) and were raised for 3 months after the radiation. On collecting 24h urine of rats they were sacrificed for serum, kidney, spine, femur and tibia exams. Results show that the  $\gamma$ -ray irradiation could induce the pathological injuries of renal glomeruli, tubules and mesenchyme. Comparing to the control group, significant changes were found in the irradiated group in terms of their blood urea, nitrogen creatinine, urinal  $\beta$ -2 microglobulin, serum Ca and P, urine Ca and P, activity of serum alkaline phosphatase,  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ , serum PTH, urine PYD/creatinine, bone mineral density(BMD) of lumbar vertebrae, mineral mass of No.4 lumbar vertebra, BMD, dehydrated weight and ash weight of right femur. Marked changes were also found in bone trabeculae volume, average bone trabeculae thickness and the ratio of nodes/points, and rate of mineralization deposition. It was concluded that renal dysfunction and metabolic bone disease might occur with the character of accelerated bone turnover and decreased bone mass.

**KEYWORDS** Radiation, Kidney, Bone metabolism

**CLC** R81, Q1