

γ 刀单次大剂量(200Gy)照射所致 脑损伤的病理研究

陈肖华¹ 王德文¹ 于新² 孙薇¹ 高亚兵¹ 谷庆阳¹ 毛秉智¹

¹(军事医学科学院放射医学研究所 北京 100850)

²(海军总医院神经外科 北京 100037)

摘要 采用普通病理检查、原位杂交、透射电镜方法,观察了使用旋转式头部 γ 刀以4mm直径准直器单次200Gy剂量定点照射正常大鼠右侧尾状核头部后长达1年的不同时间点的靶区和靶周围区的病理改变。结果表明, γ 刀照射后脑损伤病变经历4个阶段:1.急性水肿阶段(照射后立即至14d),2.坏死形成阶段(21d至2个月),3.吸收阶段(3至6个月),4.增生阶段(9至12个月);照射后2h血脑屏障通透性即开始增加,其程度在一定时间内与照射后生存时间呈正相关;血管内皮细胞和胶质细胞超微结构的改变先于神经元;照射引起TNF- α 、IL-1 β mRNA表达增加,照射前给予地塞米松可以抑制其表达。

关键词 γ 刀, 放射, 大鼠, 脑坏死

中图分类号 R818.02

立体定向照射是当前治疗颅内器质性病变和功能性疾病较好的方法之一,有广泛应用前景。但由于可引起急性脑水肿和迟发性脑坏死,在一定程度上限制了其应用和发展。目前国内外对其规律的研究较少,而且多集中于低剂量模型和光镜水平上,特别是关于单次大剂量(200Gy)照射后,脑损伤发生发展规律的神经病理学、分子病理学研究极少。所以深入研究以阐明单次大剂量 γ 刀照射后,靶区及其周围区域脑组织的损伤规律,特别是急性脑水肿和迟发性脑坏死的发生、发展特点,提出预防和治疗措施,对指导临床放疗,特别是对于 γ 刀治疗功能性疾病有着重要意义。为此,采用普通病理检查、原位杂交、电镜观察等方法对上述问题进行了探讨,同时也进行了某些防治方面的研究。

1 材料和方法

1.1 实验动物分组与照射方法

清洁级Wistar大鼠164只,体重 $260\pm 20\text{g}$,其中光镜检测组动物64只,电镜检查组动物16只,核酸杂交组动物24只(照射前12h腹腔注射地塞米松 5mg/kg),对照组动物60只。在戊巴比妥钠(30mg/kg)腹腔麻醉下,动物被固定于定位头架上,用磁共振成像仪(MRI)进行冠状面连续扫描,经计算机治疗系统测算确定靶区,即右侧尾状核头部的X, Y, Z轴坐标数值。将头架固定在 γ 刀定位架上,用4mm准直器对靶区实施照射。中心剂量为200Gy,靶区吸收剂量率为 $3\text{Gy}\cdot\text{min}^{-1}$ 。照射后每天观察动物的摄食、排泄、外观、行为和运动情况,并定期测量体重。

第一作者:陈肖华,男,1958年9月出生,1983年毕业于中国医科大学医疗系,副研究员,放射医学专业
收稿日期:初稿 2000-08-08, 修回 2001-02-12

1.2 病理检查

动物分别于照射后 2、4、6、12h 和 1、3、5、7、14、21、30、60、90、180、270、360d 活杀。每一时间组包括照射动物 3—4 只, 对照动物 2 只。用含 4% 多聚甲醛的固定液灌流固定后, 开颅取脑。石蜡包埋, 4mm 厚切片。H·E 染色观察脑损伤的发展过程。

1.3 硝酸镧(Lanthanum·nitrate)示踪电镜标本

于照射后 2、6、12h 和 1、3、5、7、14d 各取照射动物 2 只, 对照动物 2 只。麻醉后, 先经股静脉注入 2% 伊文氏蓝液 2mL, 借以判定血脑屏障是否开放和确定取材部位, 然后用含 4% 硝酸镧的固定液灌流固定, 开颅取脑。在靶区及靶周围区取材, 常规电镜制片, 醋酸铀和柠檬酸铅双重染色, 透射电镜观察血—脑屏障及脑组织超微结构的改变。

1.4 核酸分子原位杂交

1.4.1 试剂及探针 地高辛精标记的 rTNF- α cDNA 探针及杂交液购自北京医科大学分子病理实验室; 地高辛精标记及检测试剂盒购自德国宝灵曼公司; rIL-1 β 寡核苷酸探针采用 oligo5.0 软件自行设计, 其序列为 5' GGCAAGACATAGGTAGCTGCCACAGCTTCTCCACAGCCAC-3', 由院生物制剂发展中心合成并用地高辛精进行 3' 末端标记。

1.4.2 实验步骤 动物于照射后 2、4、6、8、12、24h 分别灌流固定(每组 4 只照射动物, 2 只对照动物), 取脑制成 20 μ m 厚冠状位冰冻切片。TNF- α mRNA 检测: 按照文献[1]方法, IL-1 β mRNA 检测: 按照文献[2]方法进行。

1.4.3 结果判定 阳性杂交信号为细胞浆内出现深蓝色—深褐色颗粒。杂交信号的反应程度用符号“—”、“±”、“+”和“++”来表示; 其中“—”为阴性, “±”为弱阳性, “+”为阳性, “++”为强阳性。

2 实验结果

2.1 动物一般状况

实验动物在存活期间内无明显障碍、行为丧失和神经系统症状, 除个别动物照射后一周出现食欲不振, 毛蓬松、头颈部毛呈红黄, 体重略有下降(无统计学意义)外, 无其它异常所见。

2.2 病理形态改变

2.2.1 剖检肉眼观察 照射后 1d 脑膨满, 脑膜紧张, 血管充盈; 照射后 5d 脑肿胀明显, 照射侧半球脑表面血管数较对侧略有增加; 照射后 7d 靶区冠状切面伊文氏蓝明显外溢; 照射后 21d 冠状切面可见靶区形成直径约 4mm 的坏死空腔(见图 1); 照射后 30d 坏死区扩大至 6mm; 照射后 90d 靶区脑表面呈浅蓝色; 照射后 180d 脑肿胀明显, 表面呈暗蓝色, 发脆, 可见坏死塌陷灶; 照射后 270、360d 靶侧脑体积较对侧略小, 坏死空腔壁光滑与对侧脑室融合。

2.2.2 组织学改变 照射主要引起脑血管损伤、水肿、放射性坏死和胶质细胞增生。基本病变过程经历 4 个阶段: (1) 急性水肿阶段 照射后 2h—14d, 靶区和靶周围区胶质细胞增生, 内皮细胞、神经元变性(见图 2A—1, 2), 毛细血管明显扩张, 伊文氏蓝外溢和中枢性水肿(见图 2A)。并可见脱髓鞘变性; (2) 坏死形成阶段 照射后 21d—2 个月, 靶区出现大小约为 4mm 的局灶性坏死, 并形成空洞(见图 2B)。靶周围区见有微小血栓、小出血灶(见图 2B—1)及小动脉壁增厚和脱髓鞘变性; (3) 吸收阶段 照射后 3—6 个月, 靶区坏死灶扩大至 6.5mm 左右, 空洞壁出现大量吞噬细胞(见图 2C—2)。靶周围区小动脉壁增厚导致管腔狭窄加重(见图 2C)。靶远隔区出现迟发性、局灶性神经元坏死(见图 2C—1)和脱髓鞘变性; (4) 增生阶段 照射后 9—12 个月, 靶区内坏死灶大小稳定于 6mm 左右, 空洞壁变光滑, 出现大量胶原纤维、

小胶质细胞和新生毛细血管。靶周围区组织水肿明显,胶质细胞核变细长,细胞轮廓不清,伴大量纤维组织增生(见图 2D)。



Fig. 1 A 4mm diameter necrotic cavitation region was observed on the 21st day after irradiation
2mm per small division

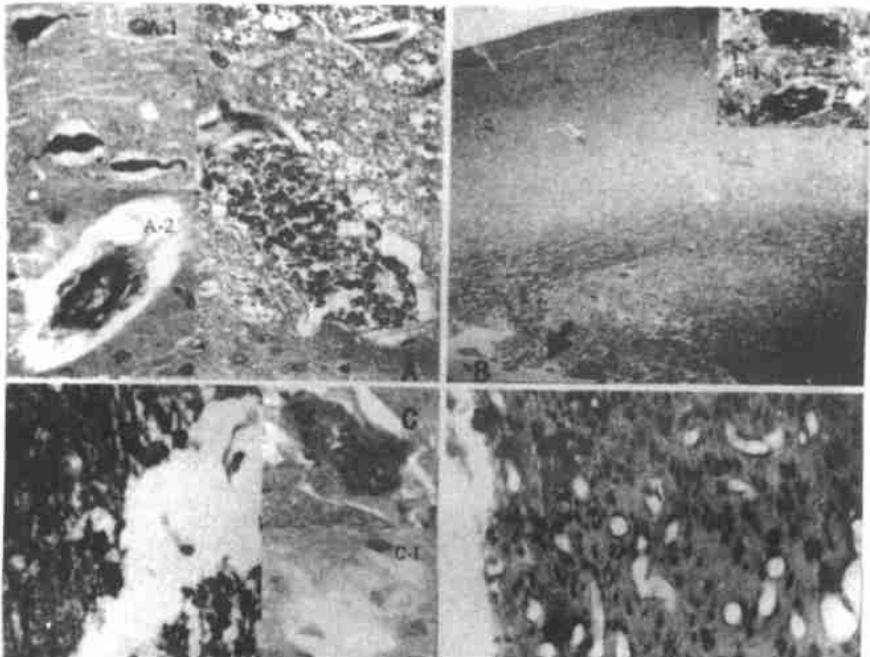


Fig. 2 The pathological changes went through 4 stages:

A·Cerebral edema, B·Necrosis of the injured tissue, C·Scavenging of the necrotic tissue, D·Hyperplasia stage Hematoxylin and Eosin; A, C and D $\times 400$, B $\times 200$

2.3 超微结构改变

照射后 2h 靶区和靶周围区即可见微血管内皮细胞明显肿胀,微绒毛及小凹明显增多,胞饮小囊泡明显增加,基膜增厚(见图 3A),血管周围间隙扩大;照射后 6h 靶区内星状胶质细胞及其突起轻度肿胀;照射后 24h 靶区可见内皮细胞紧密连接开放,镧颗粒通过血脑屏障,少突胶质细胞线粒体轻度肿胀(见图 3B);照射后 3d 靶区内镧颗粒大量进入脑组织并定位于神经元线粒体上,星状胶质细胞核膜不清。靶周围区微血管内皮细胞严重损伤,血管周围水肿明显,少突胶质细胞染色质浓集边移(见图 3C);照射后 5d 靶区内毛细血管内皮及其周围星状胶质细胞胞浆空泡化,髓鞘板层分离松解(见图 3D)。靶周围区内出现凋亡细胞(见图 3E);照射后 7d 靶区毛细血管内皮细胞肿胀并突向管腔内,使管腔狭窄扭曲(见图 3F),基底膜断裂,大量镧颗粒进入髓鞘内和细胞内。神经元、神经胶质细胞空泡化;照射后 14d 靶区神经元、神经胶质细胞核浓染,核膜破裂,细胞器消失,形成细胞碎片。靶周围区胶质细胞、胞浆内水肿,出现微小出血灶及小血栓(见图 3G)。

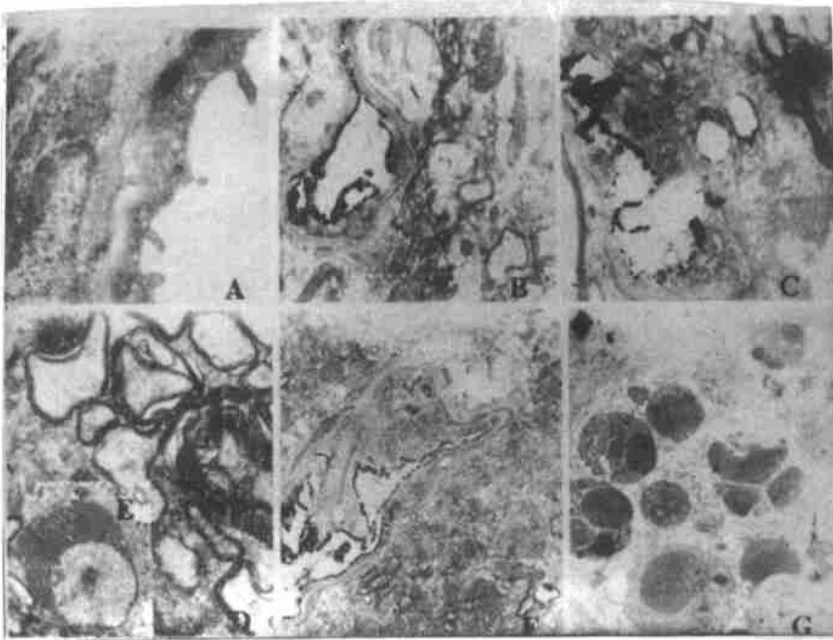


Fig.3 Ultrastructural changes of the focused irradiation on normal brain

A. Endothelial degeneration at 2h($\times 35000$), B. Evans blue leakage and central edema on 1d($\times 13000$), C. Glia degeneration on 3d($\times 17000$), D、E Apoptotic neuron and demyelination on 5d($\times 17000, 8000$), F. Vascular wall thickening on 7d($\times 13000$), G. Necrotic neurons on 14d($\times 6300$)

2.4 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ mRNA 表达的变化

照射后靶区脑组织 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ mRNA 表达明显增强, $TNF-\alpha$ mRNA 在照射后 4h 表达开始增强,8-12h 达高峰(见图 4A-2),24h 明显减弱; $IL-1\beta$ mRNA 表达也在照射后 4h 开始明显增强,但表达高峰出现在照射后 6-12h(见图 4B-2),以后逐渐减弱;照射前给予地塞米松组表达呈极弱阳性或阴性(见图 4A-3,4B-3)。

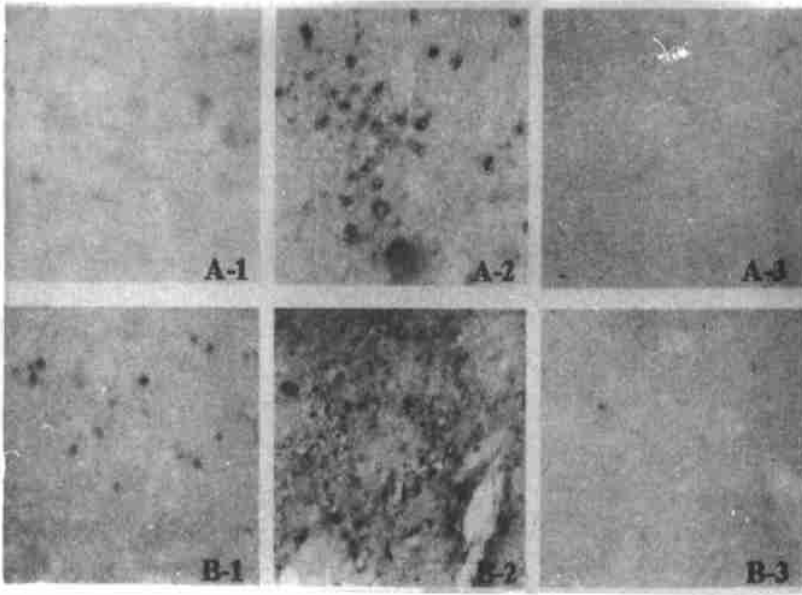


Fig. 4 TNF- α and IL-1 β mRNA transcription in the rat brain tissue irradiated with 200Gy γ rays
 A-1. TNF- α Control, A-2. TNF- α mRNA expression was increased at 8h after irradiation, A-3.
 reatment of rats with dexamethasone before irradiation could inhibit the expression of TNF- α mRNA at 12h
 after irradiation. B-1. IL-1 β Control, B-2. IL-1 β mRNA expression increased at 6h after irradiation,
 -3. Treatment of rats with dexamethasone before irradiation could inhibit the expression of mRNA at 12h
 after irradiation in situ hybridization $\times 200$

3 结果和讨论

3.1 关于共聚焦放射性脑损伤的动物模型

建立适宜的动物模型是伤病研究的基础。一个理想的放射性立体定向脑损伤模型要既能出现典型的损伤改变,又不能明显影响动物正常的行为和功能。以往共聚焦放射性脑损伤的研究,以大鼠为模型的为数不多,而且均以短观察时间($\leq 120d$)、较小照射剂量($\leq 120Gy$)及皮质靶点(额叶、顶叶)为主^[3]。以尾状核头部为靶点,大剂量(200Gy),长观察期(1年)的大鼠动物模型尚未见报道。由于额叶主要与随意运动、植物神经和小脑的调节有关,而顶叶主要参与综合各种感觉和调控锥体外系,故上述两区域的损伤,势必产生一系列相应症状。而尾状核属于古皮质,主要起协调运动作用。即使发生坏死也不会明显影响动物的正常生理功能。临床上治疗功能性疾病所使用的治疗剂量一般为 160-200Gy,因此我们选用大鼠尾状核头部和 200Gy 照射剂量,作为 γ 刀治疗功能性疾病时放射性脑损伤研究的动物模型。结果表明,大鼠脑右侧尾状核单次 200Gy 照射后 3 周,靶区出现直径约 4mm、边缘清晰的坏死区,镜下可见典型病变。这与 Kondziolka 等^[4]的以大鼠额叶为靶点,用 200Gy 照射后坏死出现的时间以及镜下改变一致。同时照射后 1 年内存活动物,外观、摄食、排泄、行为和运动等均无明显异常。上述结果提示我们, γ 刀照射大鼠尾状核头部,可作为大剂量共聚焦放射性脑损伤研究的模型之一。

3.2 关于大鼠脑组织单次大剂量 γ 刀照射后脑损伤发生的规律

大量临床资料表明,立体定向放射性脑损伤主要表现为血管源性水肿和放射性坏死,约 25% 的患者在接受 γ 刀或 X 刀照射后出现脑水肿,近 3% 的患者发生永久性脑坏死。特别是在治疗功能性疾病时,其脑坏死的发生率要高于 3%^[5]。放射性脑损伤的发生主要取决于两个因素,即“剂量”和“时间”。高剂量短时间内即可产生坏死,而低剂量则需更长时间后才能出现坏死。临床上通常用“早期或急性期”、“晚期或迟发期”来描述放射性脑损伤过程。根据本研究结果我们认为分为 4 个阶段也许更能客观地反映脑损伤的病理过程。过去的研究结果认为,靶中心剂量为 200Gy 时,靶点在照射后一个月必定会产生放射性坏死^[6],但尚未见到关于此剂量下长观察时间脑损伤规律的相关报道。结果证明,在急性水肿阶段和坏死形成阶段,微血管、血脑屏障和星状细胞的改变,先于神经元;照射后 21d 即可肉眼观察到组织坏死。放射性坏死的特征为:靶区一定范围内形成神经细胞及神经胶质细胞的破坏区,伴微小血栓的形成和微小出血灶,靶周围区出现水肿、微血管损伤和胶质细胞反应性增生。以上改变是由于放射线的直接和间接作用所致。远隔区迟发性坏死和脱髓鞘改变出现在吸收阶段,主要病变特点是组织缺损。发生部位多见于白质,常伴有皮层的皱缩和塌陷,血管上皮细胞异形或缺失,血管壁增厚,毛细血管增生、扩张,胶质瘢痕形成。迟发性损伤是由多方面因素决定的,目前较流行的有 3 种学说:①血管损伤;②射线直接杀伤神经细胞;③免疫反应^[7]。我们的研究结果证明,200Gy 照射后局灶性迟发脑坏死虽发生于白质,但多位于病变微血管周围。镜下亦未发现血管和血管周围呈套袖状浸润的淋巴细胞和浆细胞,血管改变在照射后 5d 就已经出现并持续存在。这一结果提示我们,在 200Gy 照射剂量下的迟发性坏死可能主要是由于血管损伤,导致局部神经组织缺血、缺氧所致。

3.3 关于大鼠脑组织单次大剂量 γ 刀照射后脑水肿的发生规律

脑组织受到照射后血管系统的主要变化为内皮细胞损伤、血脑屏障破坏和血管源性水肿等。它们与晚期损伤的发生有密切的关系,甚至有启动作用^[8]。血脑屏障结构的损伤、功能的障碍都可使血浆大分子物质由血管腔内通透到细胞间隙,是血管源性水肿的病理基础。Trnovec^[8]指出,使血脑屏障产生明显改变的单次照射剂量应超过 15Gy。Rubin 等^[7]对大鼠单次 60Gy 全脑照射后发现,受照射 2 周后脑内就有散在的通透性增加区域,微血管的渗漏明显早于胶质细胞的变化。我们采用伊文氏蓝示踪法和硝酸镧透射电镜技术观察的结果表明,照射后 2h 血脑屏障的通透性即已见增强,而且在一定范围内随照射后时间的延长而增加,并伴有血管周围的白质水肿。照射 72h 以后由于毛细血管内皮细胞、星状胶质细胞超微结构的损伤和基底膜的断裂进一步加重了细胞间的水肿,并形成细胞内水肿。照射 14d 以后靶区内大量毛细血管内皮细胞增厚凸向血管腔使血管管腔狭窄、扭曲,加之微小血栓的形成,使血管内压增加,亦加剧了脑水肿。这种现象存在于整个观察期。总之, γ 刀 200Gy 照射后脑水肿发生的特点是:水肿出现早(照射后 2h),维持时间长(1a);细胞间水肿先于细胞内水肿出现;水肿产生的原因早期主要是由于血脑屏障的结构破坏与功能的障碍,晚期可能主要是由于细胞代谢障碍和脑微循环障碍所致。

3.4 关于大鼠脑组织单次大剂量 γ 刀照射后 TNF- α 、IL-1 β mRNA 表达的变化

TNF- α 和 IL-1 β 均为多功能早期应答的细胞因子,分子量分别为 2.78KD 和 1.7KD。中枢神经系统内的星状胶质细胞、小胶质细胞、内皮细胞都能合成和分泌这两种细胞因子,以维持正常中枢神经系统的发育和对各种损伤的应答。Hong 等^[9]报道,对小鼠无论是全脑还是中脑,经 25Gy 照射后,脑组织内 TNF- α 、IL-1 β 、IL-1 α 、GFAP 等 mRNA 均有明显增加,该

反应与照射剂量及照射后的检查时间有关。结果显示, 单次 200Gy 照射后 4h TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达开始明显升高, 6-12h 达高峰。而照射前 12h 腹腔注射地塞米松(5mg/kg) 可以抑制这些细胞因子基因的表达。文献[10]的结果表明, 照射后 TNF- α 与 IL-1 β 的持续存在可能是氧化作用下机体适应性反应的一部分, 具有有益和有害双重作用。在体外, TNF 可保护神经元免遭由于糖缺失所引起的损伤及兴奋性氨基酸的毒性, 促进神经细胞的增殖分化, 刺激小胶质细胞及星状细胞增殖, 对少突胶质细胞具有细胞毒性。至于 TNF 及 IL-1 在体内的作用还很难评估。有研究证明照射所致的 TNF- α 的增加可引起少突胶质细胞标记物 CNPase 下降 15%, 而 TNF 及 IL-1 能提高血管及血脑屏障通透性, 与急性期的临床症状有正相关[11]。地塞米松在临床上常用以降低颅内压, 减轻照射后的脑水肿, 其作用可能是抑制了早期炎症反应[12]。在体外实验中, 地塞米松可以抑制巨噬细胞和小胶质细胞释放 TNF- α , 是通过转录和非转录两条途径来发挥这一作用的[13]。虽然地塞米松可以减轻放射诱导的细胞因子反应, 然而可能有几种类型的细胞参与放射诱导的基因表达, 对地塞米松起反应的细胞可能与诱导产生 mRNA 的细胞不同。所以需要进一步研究以搞清楚放射诱导反应细胞的特性, 地塞米松对反应细胞及血脑屏障通透性的作用, 以便为临床放射性脑水肿的治疗提供一个坚实的理论基础。

参 考 文 献

- 1 蔡文琴, 王伯云. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术. 成都: 四川科学技术出版社, 1994, 401-427
CAI W Q, WANG B Y. Practical immunocytochemistry and nucleic acid hybridization techniques. Chengdu: Sichuan Science and Technology Press, 1994, 401-427
- 2 苏慧慈. 原位杂交. 北京: 中国科学技术出版社, 1994, 59-84
SU H C. In situ hybridization. Beijing: China Science and Technology Press, 1994, 59-84
- 3 Fike J R, Gobbel G T. Radiat injury to the nervous system. New York: Raven, 1991, 113-134
- 4 Kondziolka D, Lunsford D, Claassen D *et al.* Neurosurgery, 1992, **31**: 271-279
- 5 Remler M P, Marcussem W H, Tiller-Borsich J. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1986, **12**: 1965-1969
- 6 Law M P. Adv Radiat Biol, 1981, **9**: 37-73
- 7 Rubin P, Gash D M, Hansen J T *et al.* Radiother Oncol, 1994, **31**: 51
- 8 Trnovec T, Kallay Z, Bezek S. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1990, **19**: 1581
- 9 Hong J H, Chiang C S, Campbell *et al.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1995, **33**(3): 629-626
- 10 Merrill J E. Dev Neurosci, 1991, **13**: 130-137
- 11 Chao C C, Hu S, Close K *et al.* J Infect Dis, 1992, **166**: 847-853
- 12 Janssen Y M, Van H B, Borm P J *et al.* Lab Invest, 1993, **69**: 261-274
- 13 Han J, Thompson P, Beutler B. J Exp Med, 1990, **172**: 391-394

PATHOLOGICAL STUDY ON RATS BRAIN INJURY INDUCED BY A SINGLE DOSE OF 200Gy γ RAY IRRADIATION

CHEN Xiaohua¹ WANG Dewen¹ YU Xin² SUN Wei¹

GAO Yabing¹ GU Qingyang¹ MAO Bingzhi¹

¹(Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850)

²(General Hospital of Navy, Beijing 100037)

ABSTRACT In order to improve the treatment of functional disorders with result from the clinical radiotherapy of encephalic diseases with rotate head γ knife, the pathological changes and expression of $\text{TNF-}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$ mRNA in the right caudate nucleus of the rat brain irradiated locally with a single dose of 200Gy γ rays were studied by general and electron microscopical observation and in situ hybridization respectively. The results showed that the pathological changes develop through 4 stages: (1) cerebral edema (0–14 days after irradiation); (2) necrosis of the injured tissue (21d–2 months); (3) scavenging of the necrotic tissue (3–6 months) and (4) hyperplasia stage (9–12 months). It was also found that the permeability of the blood–brain barrier began to increase 2 hours after irradiation, and the degree of increase showed a positive correlation with the survival period of the animals. The ultrastructural changes in endotheliocytes and the gliocytes occurred prior to that of neurons. In this study, the expression of $\text{TNF-}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$ mRNA was found increased in irradiated brain tissue, and treatment of rats with dexamethasone before irradiation could inhibit this expression.

KEYWORDS Gamma knife, Radiation, Rat, Brain necrosis

CLC R818.02