

· 论 著 ·

犬脊柱放疗对脊髓血管形态及血流量的影响*

徐万龙, 锡林宝勒日, 白靖平[△]

(新疆医科大学附属肿瘤医院骨与软组织肿瘤科, 乌鲁木齐 830011)

摘要:目的 观察成年比格犬脊柱放疗对脊髓血管形态及血流量的影响。方法 以随机数字表法将 24 只比格犬随机分为两组, 其中空白对照组 8 只, 放疗组 16 只。在 10~14 d 内, 对放疗组比格犬胸 9~10 椎体给予平均总剂量为 60 Gy 的放疗。放疗结束 3 个月后, 采用放射性生物微球技术对两组犬胸 9~10 椎体脊髓小血管血流量进行测定。将两组比格犬处死后, 取各组相同部位、相同位置脊髓, 用透射电镜观察两组犬血管超微结构变化; 血管免疫组化染色后, 测量脊髓血管平均管径和平均截面积。结果 放疗组脊髓组织的血管平均直径、平均截面积和血流量均显著低于空白对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。透射电镜观察显示放疗组的脊髓血管形态、内皮细胞超微结构同空白对照组相比均有明显的病理改变。结论 放疗可影响脊髓血管形态及血流量, 这可能是放疗所致脊髓功能障碍的重要因素之一。

关键词: 放疗; 脊髓; 血管; 放射性生物微球技术

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.23.007

中图分类号: R738.1; R73-361

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)23-3168-02

Effects of radio therapy for vertebral on vascular morphology and blood flow volume of beagle spinal cord*

XU Wan-long, Xilinbaoleri, BAI Jing-ping[△]

(Department of Bone and Soft Tissue Oncology, Affiliated

Tumor Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

Abstract: Objective To observe the ultrastructure of the blood vessel and the blood flow in beagle spinal cord after radiotherapy. **Methods** Select purebred beagles and 24 were divided into 2 groups randomly. Mimic a beagle clinical model of tumor in the ninth and tenth thoracic vertebrae. Then the second group beagles were irradiated by the radiotherapy, the total irradiation doses were 60 Gy in 10~14 d. Measured the blood flow in the spinal cord injury by the radiolabelling microsphere technique on third month after radiation. The samples of spinal cord were taken out from the same locum of the nine and tenth thoracic vertebrae. All the samples were observed by the electron microscope and evaluated by vessel staining assay. **Results** The results showed that the average diameter, average sectional area and the blood flow of the radiotherapy group were all lower than the blank group; The configuration and ultrastructure of vessels were also different between two groups. **Conclusion** The radiotherapy can affect the ultrastructure of the blood vessel and the blood flow in beagle spinal cord, which played an important role in the pathophysiological process of spinal cord injury induced by the radiotherapy.

Key words: radiotherapy; spinal cord; blood vessel; radiolabelling microsphere technique

放疗是治疗脊柱转移瘤的重要手段之一, 然而放疗在治疗脊椎转移瘤的同时也可以引起脊髓的血管损伤, 进而引起并加重脊髓的损伤。目前较少涉及对放疗后脊髓血管损伤的研究。本实验模拟临床放疗, 假设比格犬胸 9~10 椎体存在椎体转移瘤, 对比格犬脊柱实施放疗, 并对放疗后的胸 9~10 节段脊髓血管进行形态学观察, 并对其血流量、血管内径以及血管截面积进行计量研究, 为基础研究和临床防治放疗后脊髓损伤提供一定的科学依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与分组 选用四川省医学科学院实验动物研究所提供的纯种比格犬 24 只(许可证编号: SC×K 川 2004-15)。成年雄性, 年龄 1~1.5 岁, 体质量 (12 ± 1.5) kg, 身长 (60 ± 5) cm。比格犬均单笼喂养, 全价饲料饲养, 清洁饮水, 饲养环境卫生, 环境温度 20~23 °C, 湿度 40%~60%, 保证充足睡眠。将 24 只比格犬以随机数字表法随机分组, 其中放疗组 16 只,

空白对照组 8 只。确定比格犬脊柱放射椎体为胸 9~10 椎体, 在 CT 及计算机辅助下精确勾画放射靶区和制定放疗计划后, 将比格犬静脉麻醉后安置于固定模具中进行放疗。在 10~14 d 给予平均总剂量为 60 Gy 的放疗。放疗结束 3 个月后比格犬待用。

1.2 血流量的测定 取抗凝蛙血 1 mL, 用生理盐水离心法洗 1 次, 弃上清液, 加生理盐水 2 mL、亚锡焦磷酸钠溶液 60 μ L, 在 38 °C 保温并振动 45 min, 用生理盐水离心洗 3 次, 弃上清液, 加生理盐水 2 mL、^{99m}Tc 溶液 3.7 MBq, 在 38 °C 保温并振动 45 min, 制备成^{99m}Tc-微球, 待用。比格犬脊柱放疗后第 3 个月, 用 2% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 麻醉后, 切开颈部与左侧腹股沟部皮肤, 暴露颈动脉和股动脉, 从颈动脉插入一硅胶导管至左室内注射生物微球混悬液 2 mL, 同时以 2 mL/min 速度匀速从股动脉抽血 4 mL, 37 °C 4 000 r/min 离心 10 min, 弃去血浆备测。抽血完毕后 5 min 处死比格犬并取出胸 9~10

椎体脊髓,剥离硬膜,洗净,吸干水分,称重,放入计数管,用单道井型 γ 计数器测定。采用如下公式进行脊髓血流量计算:脊髓血流量(mL/min)=参考血标本流量(mL/min) \times 1g 脊髓放射性计数/2 mL 血弃去血浆后的放射性计数。

1.3 血管超微结构的观察 取两组犬相同部位、相同位置的胸 9~10 椎体脊髓标本约 1 mm \times 1 mm,用 2.0%戊二醛固定,常规制片,用透射电子显微镜观察放疗区脊髓血管超微结构的变化^[1-3]。

1.4 免疫组化血管染色法检测两组犬脊髓血管的平均管径、平均截面积 血管染色操作按照 SABC 试剂盒说明书进行,各步骤间严格控制时间和温度。染色的血管呈棕黄色,将血管染色病理切片扫描至 MPIAS 彩色病理图像分析仪中,在 \times 200 视野(70 000 μm^2)下进行血管平均管径、平均截面积的测量。每个切片随机选取 5 个视野,计数其平均数^[4-6]。

1.5 统计学处理 应用 SPSS17.0 统计软件进行处理,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间均数比较采用 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 电镜观察脊髓血管超微结构变化结果 空白对照组血管管腔内表面光滑,内皮细胞核占据细胞结构大部分,位于管壁一侧,外膜与周围界限清晰,细胞器结构清晰可见(封 2 图 1)。放疗组血管管腔变得明显不规则,管腔中可见血栓形成,管腔内膜凹凸不平,有内膜凸入其中,内膜变厚,层次不清,内皮细胞核体积缩小,染色质异常堆积,核膜间隙扩大,胞质内出现空泡样变性,内质网扩张,线粒体嵴消失,胞质伸出伪足样突起突入血管腔,管腔变窄(封 2 图 2)。

2.2 两组脊髓血流量比较 放疗组脊髓组织的血流量[(0.4 \pm 0.1)mL/min]显著低于空白对照组[(1.7 \pm 0.3)mL/min],差异有统计学意义($P=0.004$),见表 1。

2.3 两组放疗后血管平均管径、平均截面积比较 放疗后脊髓血管各项参数结果比较显示:放疗组脊髓组织的血管平均直径、平均截面积均显著低于空白对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 两组犬脊髓血流量及血管参数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	犬只数	脊髓血流量 (mL/min)	血管平均直径 (μm)	血管平均截面积 (μm^2)
空白对照组	8	1.7 \pm 0.3	4.31 \pm 0.54	14.69 \pm 2.67
放疗组	16	0.4 \pm 0.1	2.97 \pm 0.12	7.08 \pm 1.32
t		0.016	0.022	0.017
P		0.004	0.009	0.000

3 讨 论

放疗对机体的影响是多方面的,既往研究多侧重于放疗对器官细胞的直接损伤,近年来则比较重视其对实质组织器官周围环境变化的影响^[6-9]。虽然正常组织器官放射性损伤发病的机制目前仍不十分明确,然而多数学者认为,放疗后组织器官的微循环改变出现比较早,与病情的发展密切相关。在电离辐射作用下,微循环的改变与组织器官的病理变化有密切的关系。研究证实,小血管的放射损伤在机体许多重要器官的放射损伤发生、发展过程中起着重要的作用^[10-12]。

放射性微球技术近年来越来越多地用于某一组织器官血流测定,被认为是定量分析组织器官血流变化的重要手段之一。放射性核素一般要求无毒,易从体内消除,粒径大小满足静脉注射的要求,有丰富的放射谱,标记过程简单。最常用的医用放射性物质是^{99m}Tc 标记的化合物,^{99m}Tc 具有理想的物理性质,仅发射 γ 照相监测器范围内的 γ 射线,且半衰期为 6 h^[13]。研究脊髓血流量的变化可以在一定程度上反映微循环状况。虽然脊髓血流量测定并不能直接反应脊髓神经元受损状态,但脊髓血流量测定可作为衡量放疗后脊髓微循环功能的重要指标之一。

本实验模拟人体肿瘤的放疗过程,建立放疗脊髓损伤模型,直观地观察和研究放疗对犬脊髓血管的损伤,结果表明小血管的放射损伤在放疗后脊髓放射损伤发生、发展过程中起着至关重要的作用。

本实验结果显示,放疗结束后第 3 个月,放疗组脊髓血管形态及内皮细胞超微结构与空白对照组相比均有明显的损伤,表现为血管管腔变得明显不规则,甚至管腔中可见血栓形成,内膜变厚,层次不清,内皮细胞核体积缩小,染色质异常堆积,核膜间隙扩大,胞质内出现空泡样变性,内质网扩张,线粒体嵴消失,与徐万龙^[14]和锡林宝勒日等^[15]报道结果相似。为了进一步研究放疗后脊髓血管的变化,本实验应用放射性微球技术测定并观察到放疗组脊髓血流量明显低于空白对照组。结合血管染色后各项参数的形态计量研究,发现放疗组脊髓血管平均管径及平均截面积均低于空白对照组。提示放疗后脊髓血流量降低,血管管径缩窄,供血能力降低。放疗后脊髓组织局部微循环的改变,可能是造成脊髓功能障碍的重要因素之一。

本实验较好地模拟了临床上放疗后脊髓损伤的过程,为研究放疗后因脊髓血管损伤而引起的脊髓损伤的发病机制及治疗提供了一定的科学依据。

参考文献:

- [1] 肖占祥,谢瑶芸,郑日大,等. FK506 对损伤血管壁影响的电镜观察[J]. 海南医学,2009,20(4):1.
- [2] 楚能武,陈丽,章秋,等. 吡格列酮对糖尿病大鼠血管内皮功能的影响[J]. 安徽医药,2009,13(4):365.
- [3] 丁洋,万圣云. 肝素对大鼠骨髓基质干细胞来源的血管内皮细胞贴附 ePTFE 影响的实验研究[J]. 安徽医药,2008,12(8):682.
- [4] 李新,杨红莉,牛智祥,等. 胶质瘤 MRI 表现与微血管密度关系的研究[J]. 医药论坛杂志,2007,28(16):22.
- [5] 李慧. 免疫组化组织抗原修复之操作方法[J]. 海南医学,2008,19(2):125.
- [6] 吴文川,蔡仁桑. 影响免疫组化标准化染色的几个主要质控问题[J]. 海南医学,2005,16(12):149.
- [7] Monje ML, Palmer T. Radiation injury and neurogenesis [J]. Curr Opin Neurol,2003,16:129.
- [8] 李德志,李宁. 颈胸段早期放射性脊髓炎高压氧综合治疗分析[J]. 重庆医学,2006,35(19):1731.
- [9] Ernemann U, Herrmann C, Plontke S, et al. Pseudoaneurysm of the superior thyroid artery following radiotherapy for hypopharyngeal cancer [J]. Ann Otol Rhinol Laryngol,2003,112:188.

本实验结果显示乳腺癌组织中 Twist 和 VEGF 的表达阳性率分别为 57.14%、63.49%，明显高于对照组 ($P=0.001$, $P=0.025$)，Twist 和 VEGF 的表达阳性率与患者有无腋窝淋巴结转移及组织学分级显著相关 ($P<0.05$)，提示 Twist 和 VEGF 共同参与了乳腺癌的发生、发展，并与乳腺癌的恶性程度密切相关，肿瘤级别越高，Twist、VEGF 表达越强，越容易发生浸润、转移。本实验结果表明，乳腺癌组织中 Twist 表达，与 VEGF 表达呈显著正相关 ($P<0.01$)，二者关联可能源于 Twist 表达上调增强了 VEGF 的表达。有研究表明在乳腺癌细胞株中 Twist 过表达可增强 VEGF 表达、诱导血管生成，并且与染色体不稳定性密切相关^[14]。由此可见 Twist 和 VEGF 在乳腺癌发生、发展中发挥着重要作用，Twist 可能通过上调 VEGF 的表达，促进肿瘤组织血管生成，增强肿瘤细胞的侵袭力，从而成为其促进乳腺癌浸润、转移的可能途径之一，联合检测 Twist 和 VEGF 的表达状况，对于正确评估乳腺癌的恶性程度、发展和预后具有一定意义，对乳腺癌的诊断和治疗具有重要的临床参考价值。

参考文献:

- [1] Kang Y, Massague J. Epithelial mesenchymal transitions: twist in development and metastasis[J]. Cell, 2004, 118(3):277.
- [2] Yokoyama Y, Sato S, Futagami M, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor and its receptors in endometrial carcinoma[J]. Gynecol Oncol, 2000, 77:413.
- [3] 赵杰, 杨春雨, 王丽华, 等. Twist 蛋白、E-cadherin、VEGF 在食管鳞状细胞癌中的表达[J]. 辽宁医学院学报, 2008, 29(8):506.
- [4] 刘瑞鸣. Twist 与恶性肿瘤关系的研究[J]. 广西医科大学学报, 2009, 26(2):326.
- [5] Valsesia-Wittmann S, Magdeleine M, Dupasquier S, et al.

Oncogenic cooperation between H-Twist and N-Myc overrides failsafe programs in cancer cells[J]. Cancer Cell, 2004, 6(6):625.

- [6] Zhang X, Wang Q, Ling MT, et al. Anti-apoptotic role of TWIST and its association with Akt pathway in mediating taxol resistance in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Int J Cancer, 2007, 120(9):1891.
- [7] 陆虹曼. 上皮间质细胞转化的分子机制及其在肿瘤转移中的作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2009, 16(5):541.
- [8] Vesuna F, van Diest P, Chen JH, et al. Twist is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in breast cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 367(2):235.
- [9] Rosivatz E, Becker I, Specht K, et al. Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric[J]. Cancer Am J Pathol, 2002, 161(5):1881.
- [10] 李坤, 陈建明, 蒋耀光, 等. Twist 在食管鳞癌中的表达及其对预后的影响[J]. 重庆医学, 2008, 37(8):837.
- [11] 李启明, 李宁. 血管内皮生长因子与肿瘤转移[J]. 重庆医学, 2006, 35(22):2085.
- [12] 秦双, 来俊英. COX-2、VEGF 在乳腺癌组织中的表达及临床意义[J]. 医学信息手术学分册, 2007, 20(8):675.
- [13] Yang J, Mani SA, Donaher JL, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis[J]. Cell, 2004, 117(7):927.
- [14] Mironchik Y, Winnard PT, Vesuna F, et al. Twist overexpression induces in vivo angiogenesis and correlates with chromosomal instability in breast cancer[J]. Cancer Res, 2005, 65(23):10801.

(收稿日期:2010-06-06 修回日期:2010-07-21)

(上接第 3169 页)

- [10] Sonden A, Svensson B, Romman N, et al. Mechanisms of shock wave induced endothelial cell injury[J]. Lasers Surg Med, 2002, 31:233.
- [11] 傅重洋, 洪光祥, 刘敬军, 等. 血管内皮生长因子受体在大鼠脊髓组织中的表达与分布[J]. 重庆医学, 2004, 33(12):1831.
- [12] Kuin A, Kruse JJ, Stewart FA. Proteinuria and vascular changes after renal irradiation: the role of reactive oxygen species(ROS) and vascular endothelial growth factor (Vegf)[J]. Radial Res, 2003, 159:174.

- [13] 黄家君, 李霞辉, 谢娟, 等. ^{99m}Tc-ASON-EGF 在荷乳腺癌裸鼠体内分布及反义显像研究[J]. 重庆医学, 2006, 35(19):1770.
- [14] 徐万龙, 白靖平, 锡林宝勒日, 等. 犬脊柱适形调强放疗对脊髓中 Fas、FasL 和 HSP70 分布的影响[J]. 新疆医科大学学报, 2009, 32(5):549.
- [15] 锡林宝勒日, 徐万龙, 陈刚, 等. 脊柱 IMRT 和普通放疗脊髓生物安全性的比较[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2010, 30(1):17.

(收稿日期:2010-04-21 修回日期:2010-05-10)