

· 实验研究 Experiment research ·

经胆管 ^{192}Ir 内照射对胆管、肝脏放射损伤的实验研究

曹贵文, 王 滨, 孙业全, 邵学叶, 宁厚法, 隋守光, 王秀春, 白旭明

【摘要】 目的 探讨经胆管 ^{192}Ir 内照射的安全性、可行性以及有效治疗范围, 为肝门部胆管癌经胆管 ^{192}Ir 内照射提供理论依据。方法 取雄性健康杂种犬 16 只, 据照射剂量随机分成 4 组, 每组 4 只。内照射前从犬肝边缘切取 1 cm^3 大小肝组织作对照研究。术中将近距离治疗施源器经胆囊送入胆总管与肝总管汇合处并用金属夹固定, 根据预先设定的剂量进行胆管内照射。10 d 后处死动物, 取被照射胆管中央部分长约 5 mm 胆管, 及距离胆管壁由近及远按设计距离分别取 1 mm^3 大小肝组织, 制备光镜切片, 作 HE 染色, 同时用 2.5% 戊二醛固定后常规制备电镜切片。光镜下观察胆管及周围肝组织的放射损伤并对损伤程度评分。电镜下观察肝组织超微结构损伤变化并计数凋亡肝细胞。结果 经胆管 ^{192}Ir 内照射 30 Gy 时, 胆管损伤达部分肌层; 50 Gy 时, 胆管仅存外膜; 60 Gy 时, 胆管出现全层坏死。胆管周围肝组织放射损伤随剂量增加而加重。在胆管最大安全耐受剂量 50 Gy 时, 距胆管 0 ~ 15 mm 处肝细胞核出现不可逆性改变。结论 正常胆管对 ^{192}Ir 内照射有良好的耐受性。在胆管最大安全耐受剂量 50 Gy 时, 经胆管 ^{192}Ir 内照射有效的治疗范围可达 15 mm。

【关键词】 ^{192}Ir 内照射; 放射损伤; 凋亡; 肝脏; 胆管

中图分类号 R 文献标识码 A 文章编号: 1008-794X(2007)01-0053-04

The experimental study of radiation injury on bile duct and liver tissue CAO Gui-wen, WANG Bin, SUN Ye-quan, SHAO Xue-ye, NING Hou-fa, SUI Shou-guang, WANG Xiu-chun, BAI Xu-ming. Interventional Radiology Department, Medical Imaging Centre, the Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Weifang 261031, China

【Abstract】 Objective To investigate the safety, acceptance and the effective extent of ^{192}Ir -internal irradiation, providing theoretical guidelines for HC. **Methods** Sixteen male healthy hybrid dogs enrolled in the experiment were divided into 4 groups of 4 each. The brachytherapy applicator was introduced from gall bladder into the convergence of cystic duct with common hepatic duct during the operation and a small chip of 1 cm^3 liver tissue was cut off and taken for control later on. The animals in group A-D were irradiated by ^{192}Ir -internal irradiation with 30 Gy, 40 Gy, 50 Gy and 60 Gy at the correlative dose points respectively. Animals were put to death after 10 days subsequently, with sampling specimens obtained from radiation cystic duct and the in between liver tissue with the distant cystic duct. The radiation injury of the cystic duct and liver tissue near bile ducts were observed and studied by light microscope and transmission electron microscope. **Results** By the limit of the safest endurance dose(50 Gy) of bile duct, unreversed injury of the nuclei of liver cells occurred at 0 to 15 mm from bile duct revealed by transmission electron microscope and light microscope. The whole biliary duct wall would be undergone necrosis with irradiation dose over 60 Gy. **Conclusions** Normal bile duct possesses good endurance to ^{192}Ir -internal irradiation. Within the safest endurance limit of 50 Gy the effective irradiation field could reach 15 mm from the involved bile duct. (J Intervent Radiol, 2007, 16: 53-56)

【Key words】 ^{192}Ir -internal irradiation; Radiation injury; Apoptosis; Liver; Bile duct

基金项目: 山东省卫生厅计划课题

作者单位: 261031 潍坊医学院附属医院影像中心介入科

通讯作者: 曹贵文

肝门部胆管癌(hilar cholangiocarcinoma, HC)约占胆管癌总数的 58% ~ 75%, 是各类胆管癌中最常见、预后最差和治疗最困难者。近年来的发病率有增多趋势^[1]。本研究以犬为实验对象, 将犬胆管接受 30 ~ 60 Gy 不等剂量的 ¹⁹²Ir 单次内照射, 旨在探讨经胆管 ¹⁹²Ir 内照射对胆管周围肝组织的损伤, 正常胆管的耐受性, 探讨该方法的安全性及有效治疗范围, 为临床上经胆管 ¹⁹²Ir 内照射治疗 HC 提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

雄性杂种犬 16 只, 体重为 25 ~ 30 kg, 由潍坊医学院动物试验中心提供。所有实验动物按照射剂量随机分成 4 组(每组 4 只), 接受 ¹⁹²Ir 照射剂量分为: A 组 30 Gy, B 组 40 Gy, C 组 50 Gy, D 组 60 Gy。

1.2 动物实验方法

1.2.1 麻醉动物 施源管置入、定位 实验犬用 0.5% 硫贲妥钠静脉给药, 将麻醉动物固定于实验台上, 手术下将施源管末端送到胆囊管与肝总管汇合处时用金属夹固定。内照射前从犬肝边缘切取 1 cm × 1 cm × 1 cm 大小肝组织作对照研究。

1.2.2 ¹⁹²Ir 内照射

应用 HY-HDR 18 后装治疗机, 放射源采用 ¹⁹²Ir, 源活度为 3.12 Ci, 设置驻留位 20 mm, 步长 2 mm。A、B、C、D 4 组实验动物分别接受总剂量为 30、40、50 和 60 Gy 单次内照射。内照射结束后撤出施源管, 胆囊底切口作荷包缝合。术后肌注青霉素 40 万 u, 硫酸庆大霉素 8 万 u。待实验犬清醒后送返动物房饲养。

1.3 病理标本处理和观察

1.3.1 标本处理 内照射 10 d 后处死动物, 取被照

射胆管中央部分长约 5 mm 胆管, 常规制备光镜切片; 被照射胆管外距离胆管壁由近及远 3、5、7、9、11、13、15 和 17 mm 处肝组织分别取材和内照射前切取的正常肝组织制备光镜切片和电镜切片。

1.3.2 标本观察

1.3.2.1 病理 HE 染色结果判定: 在光镜下观察胆管损伤, 并对损伤程度打分。黏膜层: 根据损伤严重程度分为 +、++、+++、++++, 总计 4 分; 黏膜下层: 观察有无出血、固有腺体的破坏程度、炎细胞浸润及破坏程度, 也分 +、++、+++、++++, 总计 4 分; 肌层: 观察肌层的破坏程度分 +、++、+++、++++, 总计 4 分; 外膜: 根据外膜的损伤程度分 +、++、+++、++++, 总计 4 分。

1.3.2.2 病理电镜结果判定: 在高倍电镜下以染色质边集、核浓缩、核碎裂、核溶解、线粒体肿胀、空泡化、髓鞘样变为标准判断为细胞凋亡后, 在低倍电镜下记数约 100 个肝细胞中凋亡细胞的数量, 对所得数据进行统计分析。

1.4 统计学处理

实验数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。所有资料的统计学分析均由计算机完成, 统计软件为 CS 2000, 统计分析方法采用 *t* 检验、*f* 检验, 检验水准为 0.05(双侧)。

2 结果

2.1 经胆管 ¹⁹²Ir 内照射后胆管的变化

经胆管 ¹⁹²Ir 内照射剂量为 30 Gy 时, 见胆管部分上皮呈灶状坏死, 伴有出血, 可见正常固有腺体; 剂量为 40 Gy 时, 胆管广泛坏死, 无正常固有腺体, 肌层成片状坏死; 剂量为 50 Gy 时, 胆管肌层广泛坏死, 仅存外膜; 剂量为 60 Gy 时, 胆管壁出现全层坏死, 部分外膜脱落。图 1 显示不同剂量下胆管的

表 1 电镜下不同剂量、距照射胆管不同距离凋亡肝细胞计数统计结果($\bar{x} \pm s$)

剂量 (Gy)	n	正常组织	不同距离					
			7 mm	9 mm	11 mm	13 mm	15 mm	17 mm
30	4	1.20 ± 0.10	22.13 ± 2.11	19.13 ± 1.25	5.21 ± 1.02	1.21 ± 0.07	1.20 ± 0.09	1.21 ± 0.10
		<i>t</i>	19.82	28.92	7.83	0.17		0.14
		<i>P</i> 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01	> 0.05		> 0.05
40	4	1.31 ± 0.14	0	18.25 ± 1.62	18.81 ± 1.10	5.36 ± 1.10	1.30 ± 0.10	1.31 ± 0.11
		<i>t</i>		19.93	31.82	7.36	0.12	
		<i>P</i> 值		< 0.01	< 0.01	< 0.01	> 0.05	
50	4	1.10 ± 0.23	0	0	20.31 ± 1.13	20.11 ± 1.25	15.21 ± 1.23	1.12 ± 0.18
		<i>t</i>			33.70	30.17	22.76	0.13
		<i>P</i> 值			< 0.01	< 0.01	< 0.01	> 0.05
60	4	1.12 ± 0.11	0	0	22.19 ± 1.37	20.13 ± 1.15	16.06 ± 1.11	1.12 ± 0.08
		<i>t</i>			30.54	33.35	26.68	
		<i>P</i> 值			< 0.01	< 0.01	< 0.01	

损伤程度及剂量效应曲线。

2.2 经胆管 ^{192}Ir 内照射后胆管周围肝组织的变化

2.2.1 电镜下不同剂量、距照射胆管不同距离凋亡

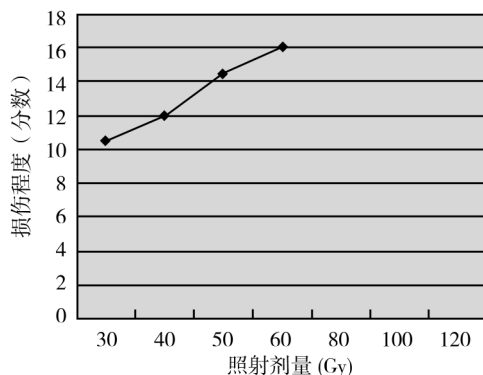


图 1 不同剂量内照射对胆管的损伤程度

肝细胞计数统计结果 见表 1

2.2.2 距照射胆管不同距离肝组织的照射剂量分布曲线图 见图 2

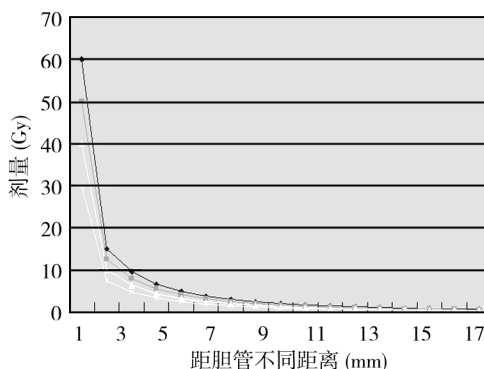


图 2 距照射胆管不同距离肝组织的照射剂量分布曲线图

3 讨论

^{192}Ir 是人工放射性核素,半衰期为 74 d,其通过 ^{191}Ir 在原子反应堆中经热中子轰击而生成不稳定放射性核素。在衰变过程中,释放出平均能量为 380 keV 的 γ 射线,能够破坏肿瘤细胞核 DNA 双链,使肿瘤细胞失去增殖能力。 ^{192}Ir 比较适用于高剂量率组织间插植和腔内放疗,是目前胆管腔内放射治疗常用的放射源^[2]。

自 1981 年 Herskovic 经胆管 ^{192}Ir 内照射治疗用于治疗 HC 以来,国内外许多学者不断报道经胆管 ^{192}Ir 内照射治疗效果。Milella 等^[3]报道 12 例失去手术机会的 HC 患者经上述方法治疗后,平均生存期 23 个月,1、2 年生存率分别为 61%、43%。Dvorak 等^[4]对不能手术的 8 例 HC 患者行 PTCD 并经胆管 ^{192}Ir 内照射治疗,中位生存期为 275 d。经胆管 ^{192}Ir 内照射治疗效果已得到众多学者的认可,但是同时也不可避免地存在一定的不良反应,临床上如何达到最佳治疗剂量,既最大限度地杀灭肿瘤细胞又避免严重并发症尚有待进一步研究。本研究以犬为实验对象,将犬胆管接受 30 ~ 60 Gy 不等剂量的 ^{192}Ir 单次内照射。研究胆管的损伤、肝功能影响和胆管周围肝组织的损伤,以探讨该法的安全性及有效治疗范围,为临床上经胆管 ^{192}Ir 内照射治疗肝门部胆管癌提供理论依据。

临床上经胆管 ^{192}Ir 内照射治疗多数是在 PTCD 基础上置入金属内支架进行。本实验在设计时曾考虑经胆管 ^{192}Ir 内照射前,在实验犬胆管内置入金属内支架,使实验更接近于临床条件。但孙坚^[5]等报道金属内支架对放射线衰减 < 1.2%,在胆管内照射时

可以不考虑金属内支架对射线的影响。所以,在不影响实验效果的前提下,没有置入金属内支架。

本实验观察到:随着放射剂量的增加,胆管壁放射损伤从黏膜表面到肌层再到胆管壁外膜层逐渐加重。经胆管 ^{192}Ir 内照射在剂量为 30 Gy 时,可见胆管部分上皮呈灶状坏死,伴有出血,并可见正常固有腺体;剂量为 40 Gy 时,肌层成片状坏死,无正常固有腺体;在剂量为 50 Gy 时,胆管肌层广泛坏死,仅存外膜;剂量为 60 Gy 时,胆管壁出现全层坏死,外膜脱落。剂量与效应成正相关,呈现明显的剂量效应关系。实验显示正常胆管对经胆管 ^{192}Ir 单次内照射有良好的耐受性,为今后胆管肿瘤近距离治疗提供了初步的实验室依据。

本课题设计用凋亡这一指标来研究经胆管 ^{192}Ir 内照射的有效治疗范围,在电镜下观察细胞核超微结构变化判断肝细胞凋亡,并作统计分析。肿瘤细胞对放射线比正常肝组织更为敏感,更容易发生凋亡。所以,我们认为用凋亡这一指标来研究经胆管 ^{192}Ir 内照射的有效治疗范围更为灵敏。

本课题显示:放射剂量为 30 Gy 时,胆管周围肝组织距胆管 0 ~ 5 mm 范围肝细胞光镜下完全坏死,电镜下凋亡肝细胞计数正常组织与 7、9 和 11 mm 比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$),剂量为 40 Gy 时,胆管周围肝组织距胆管 0 ~ 7 mm 范围肝细胞光镜下完全坏死,电镜下凋亡肝细胞计数正常组织与 9、11 和 13 mm 比较差异均有显著性 ($P < 0.01$),剂量为 50 Gy 时,胆管周围肝组织距胆管 0 ~ 9 mm 范围肝细胞光镜下完全坏死,电镜下凋亡肝细胞计数正常组织与 11、13 和 15 mm 比较差异均有显著性 ($P < 0.01$),在放射剂量为 60 Gy 时,胆管周围肝组织距胆

管 0 ~ 9 mm 范围肝细胞光镜下完全坏死,电镜下凋亡肝细胞计数正常组织与 11、13 和 15 mm 比较差异均有显著性($P < 0.01$),可以认为:在放射剂量为 30、40、50 和 60 Gy 时,经胆管 ^{192}Ir 内照射的有效治疗范围分别是距胆管 11、13、15 和 15 mm。实验中我们观察到:剂量为 60 Gy 时,胆管出现全层坏死,尽管没有出现胆汁漏,但存在潜在危险;剂量为 50 Gy 时,肌层大部分坏死,外膜存在。可以看出放射剂量为 50 Gy 时更为安全。尽管在放射剂量为 50 和 60 Gy 时,相关数据上存在差别,但有效治疗范围都是 15 mm。所以,15 mm 可作为经胆管 ^{192}Ir 内照射在胆管最大安全耐受剂量时的有效治疗范围。

用 HC 犬动物模型来研究 ^{192}Ir 内照射的治疗范围最为理想,但该动物模型制作相当困难,周期长,成功率极低^[6]。目前,有关 HC 的动物模型多用小鼠制作,用于研究该病的发病机制及发生发展过程^[7]。未发现应用 HC 犬动物模型的相关报道。但是,与正常肝组织相比肿瘤细胞对放射线更为敏感,更容易发生凋亡,可以推测我们课题得出的结论更为安全可靠。

[参 考 文 献]

- [1] 郭仁宣,主编.胆道肿瘤外科学[M].沈阳:辽宁科学技术出版社,2002:258-259.
- [2] 王迎选,王所亭,主编.现代立体放射治疗学[M].北京:人民军医出版社,1999,137-140.
- [3] Milella M, Salvetti M, Cerrotta A, et al. Interventional radiology and radiotherapy for inoperable cholangiocarcinoma of the extrahepatic bile ducts[J]. Tumori, 1998, 84:467-471.
- [4] Dvorak J, Jandik P, Melichar B, et al. Intraliminal high dose rate brachytherapy in the treatment of bile duct and gallbladder carcinomas[J]. Hepatogastroenterology, 2002, 49:916-917.
- [5] 孙 坚,何贵金,张申众,等. Pd 放射性支架持续性照射犬胆管放射性损伤的动物实验研究[J]. 中国实验动物学杂志, 2002, 12:276-278.
- [6] Jiao W, Yakushiji H, Kitajima Y, et al. Establishment and characterization of human hilar bile duct carcinoma cell line and cell strain[J]. J Hepatobiliary Pancreat Sugg, 2000, 7:417-425.
- [7] Yamada N, Chung Y S, Arimoto Y, et al. Establishment of a new human hilar bile duct carcinoma cell line and experimental liver metastatic model[J]. Br J Cancer, 1995:543-548.

(收稿日期 2006-10-12)

· 消 息 ·

欢迎订阅 2007 年《中国神经再生研究(英文版)》杂志

《中国神经再生(英文版)》(Nerve Regeneration Research)杂志,是一本令神经再生研究与专业人员感兴趣的,有特色、有品位、高层次、高水平、高质量的全英文版的学术期刊。2006 年创刊, CN11-5422/R, ISSN 1673-5374, 国内外公开发行,月刊, A4 开本, 96 页/期。

本刊关注国际神经再生研究方面的热点和重大应用性课题,跟踪国际神经再生研究方面高科技的前沿成果。创刊后便被世界著名出版商荷兰 Elsevier Science 出版集团的 Science Direct On Site (SDOS) 数据库全文收录,并被中国核心期刊遴选数据库、中国学术期刊全文数据库、中文科技期刊数据库、《中国学术期刊文摘(英文版)》、中文生物医学文献数据库收录。

本刊重视神经再生研究领域具有前瞻性、创造性和较高学术水平的基础研究、应用基础研究以及相关临床研究,力求每一篇文章都清楚阐述与他人、他篇的不同之处。

从投稿至接到录用通知 30 天。一般稿件作者修回到发表为 90 天,欢迎投稿。

本刊订阅 沈阳 1234 邮政信箱

邮编:110004, 15 元/册

2007 年邮发代号 8-585

投稿电邮: sjzs101@163.com sjzs102@163.com

咨询电邮: sjzs100@163.com

电话: +86 24 23381085

传真: +86 24 23394178

更多信息详见 www.sjzsyj.com