

放射自显影术在微剂量分布研究中的应用

中国医学科学院 放射医学研究所(天津,300192) 王明席综述 张良安审核
中国协和医科大学

摘要: 综述了近年来在核医学中利用微剂量学实验方法研究放射性药物在生物体内微剂量分布的工作,介绍了微观放射自显影术。这里的微剂量分布是指细胞与亚细胞水平的剂量分布。只有掌握了准确的微剂量分布信息,才能较好地预测及评价放射性药物的诊断和治疗效果。

关键词: 放射性药物 微观放射自显影术 微剂量学

掌握放射性药物的微剂量(即在细胞与亚细胞水平的剂量)分布信息,是制订临床核医学详细诊疗计划的一个重要环节^[1-4],尤其在核医学治疗时,其效果的评价及预测必须掌握放射性药物在细胞和亚细胞水平的分布情况^[5]。目前,国内尚未发现有关核医学微剂量分布研究的报道。本文介绍国外应用较多的一种,即微观放射自显影术。

1 微观放射自显影术

微观放射自显影术是用光学显微镜和电子显微镜放射自显影技术(简称光镜和电镜自显影)来观察与分析细胞及亚细胞水平的放射性药物分布及微剂量分布的一种方法^[6]。其简要程序为:把放射性药物引入生物体内后,取标本制成切片、涂片、敷加乳胶、曝光、显影、定影、水洗、染色、镜下阅读结果等^[6-8]。这里以切片银颗粒密度放射自显影为例,阐明此技术的几个重要方面。

1.1 医用放射性核素的自显影特性

放射自显影术之所以是实验核医学中研究微剂量的较好方法,在于它可以提供较准确的放射性药物空间分布信息,其空间分辨率(即自显影分辨率)可小于 $1\mu\text{m}$ ^[1],而自显影分辨率的好坏,主要是由核素的衰变特性决定的^[6]。

^3H 的 β 粒子最大能量为 0.0186MeV ,最大射程小于 $3\mu\text{m}$,自显影分辨率可达 $0.4\mu\text{m}$ ^[7]。而 ^{111}In 虽不直接发射 β 粒子,但能发射俄歇电子及内转换电子,其能量低,且射

程短,可获得 $0.6\mu\text{m}$ 的自显影分辨率^[7]。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 虽然衰变时同样产生俄歇电子及内转换电子,但它的内转换电子射程较长,会部分地降低自显影分辨率^[6],这时可以通过降低切片及乳胶厚度来改善分辨率,其自显影分辨率也可达 $1\mu\text{m}$ ^[6]。与 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 衰变特性相似的核素 ^{111}In ,经过同样的操作,其自显影分辨率可达到 $1.7\mu\text{m}$ ^[7]。

应当说明的是,核医学中应用的其它放射性核素,由于诊断与治疗的要求,它们发射的电子中,要么低能 β 粒子及俄歇电子或内转换电子数目较少^[9],要么这些电子的射程较长^[10],所以都较难得到好的自显影分辨率^[6]。

另外,利用放射性核素之间衰变特性的明显差异进行双示踪剂自显影,是核医学中非常有用的技术。例如, ^3H 与 ^{14}C (的射程差异($3\mu\text{m}$ 与 $13\mu\text{m}$)较大, Lear等^[11]用它们分别标记 ACE(血管紧张素转化酶)制作鼠心肌的双示踪剂自显影,通过观察二者在乳胶层的不同深度处分别形成的界限分明的银颗粒,发现两种核素标记的 ACE在心肌中的分布呈相关关系;同时,估算左心室的代谢率比右心室高 30%,这与临床上用 ^{11}C -ACE作示踪剂,运用 PET测量的结果相一致。再如, Kubota等^[12]利用 ^{14}C -蛋氨酸及 ^{18}F -苯丙氨酸注入荷人 AH109A瘤的裸鼠体内后进行双示踪剂自显影,通过对比二者在瘤内的微剂量分布状况可推测,对于腹部肿瘤显像, ^{18}F -苯丙氨酸比 ^{14}C -蛋氨酸更合适^[12]。这是运用

^{18}F 与 ^{14}C 半衰期(109.8min与5730a)的明显差异,可以于不同的时间进行曝光显影等操作,分别形成两种核素的银颗粒。

1.2 切片制作及乳胶敷加

原则上,切片及乳胶的厚度应尽可能薄一些,以减弱长射程电子对自显影分辨率的影响^[6]。应注意的是,对于不同扩散性能的放射性药物,应选择不同的操作方法

1.2.1 非扩散性放射性药物

可以选择传统的石蜡切片制作与浸乳胶等方法,因为此过程不仅不会影响此类药物的分布状况,而且可以获得高质量的组织学切片,图像分析时细胞核识别的准确度也较高^[6]。Morrel等^[7]利用此法制作鼠感染的股部肌肉组织的放射自显影,发现 ^{111}In 标记的多克隆抗体 IgG及人血清白蛋白主要分布在炎症水肿的组织间隙内,而与炎症细胞不相关,但此过程耗时,不适用于短半衰期核素的自显影^[6]。

1.2.2 易扩散性放射性药物

首先,将样本迅速冰冻以降低放射性药物重新分布的可能性,并在冰冻切片机上制成切片。其后的步骤将随方法而异,如:Brown等^[13]把切片干燥,接着敷加 X 射线胶片再曝光;Kubota等^[14]则是将切片直接裱贴在乳胶干板上,随后迅速降温至 -15°C ,并在干冰上速冻,最后放入含有干冰的曝光盒中曝光;而Puncher等^[14]则将冰冻切片直接转到涂有乳胶的盖玻片上,于 -20°C 曝光。但切片干燥、直接敷加乳胶等操作,不仅难以排除药物再分布的可能,而且可能造成切片与乳胶的结合不紧密^[6]。有一种解决方法是,先在切片上喷镀一层碳膜后再浸乳胶^[6]。

此外,应注意的是,乳胶的选择应具有针对性。对于长射程高能电子,应选择高敏感度的乳胶;而对于短射程低能量电子,宜选择低敏感度的乳胶^[6]。常用的乳胶制备方法有两种:①浸胶法,乳胶层的厚度可以通过稀释乳胶而改变;②揭膜法,如金属圈法和吹气泡法

等,都可获得较薄的乳胶。

1.3 图像分析

原理:在乳胶银颗粒未达到饱和的前提下,一定的曝光时间内,放射线形成的银颗粒数目与样品中放射性活度成正比^[6],通过计算银颗粒数目及分析其与细胞、细胞核的位置关系,结合适宜的数学模型,即可估算单个细胞和细胞核的剂量及了解微剂量分布情况^[5]。常用的图像分析方法有如下两种。

1.3.1 肉眼分析

此法是用肉眼在镜下直接分析计数银颗粒,不需要其它辅助仪器。由于此时难以分辨银颗粒密度的微小变化,需要在较高银颗粒密度下进行分析,因此易出现乳胶饱和的问题,不但分辨率较低,而且分析过程缺乏客观性,误差较大^[5,6]。

1.3.2 自动图像分析

它主要由显微镜、数字化摄像头相机(CCD)及计算机为基础的图像分析系统等组成^[1,5],CCD相机采集镜下自显影图像,将其进行平滑、膨胀等处理后,再用自动识别系统对细胞及银颗粒进行分析^[1]。它不仅能够准确地分析银颗粒的微小变化^[6],而且能够针对特定的感兴趣区进行分析^[4],因此,可以建立辐射点源与细胞核的平面坐标关系^[5],分析速度快而又可重复进行^[5],应该注意,切片染色质量及组织类型会影响结果分析^[1]。

1.4 电镜放射自显影技术

由于电镜的放大倍数很高,通过电镜自显影术,能够观察与分析放射性药物在细胞超微结构上的分布情况^[6,15]。但是,由于电镜观察视野小,电镜自显影要分析整个图像较困难;另外,其制备过程更为复杂,且很难防止易扩散性药物的重新分布^[6]。因而,此技术在微剂量分布研究方面的应用较少。

2 在微剂量分布研究中的应用

传统的医学内照射剂量(MIRD)估算模式假设放射性药物在器官内是均匀分布

的^[16],故用器官的平均剂量描述单个细胞^[17]及细胞核^[18]的剂量。然而,通过微观放射自显影,不仅可以发现放射性药物在细胞水平的非均匀性分布,而且发现在亚细胞水平(即细胞内)的非均匀性分布。很明显,MIRD的剂量估算假设是有缺陷的。

2.1 放射性药物的非均匀性分布

2.1.1 细胞水平的非均匀性分布

Chen等^[19]用¹²⁵I标记的TNT-1和Lym-1两种单克隆抗体,注入荷人Raji淋巴瘤或ME-180宫颈癌的裸鼠体内,分别于不同的时间作光镜自显影,发现¹²⁵I-TNT-1最后主要聚集在瘤中心的坏死细胞及其周围,而¹²⁵I-Lym-1则主要分布在肿瘤组织外周及瘤内血管周围的瘤细胞上。再如,Pedley等^[20]同样用光镜自显影观察¹²⁵I-17-1-A在裸鼠荷人MAWI移植瘤内的分布情况,发现这种抗体于24小时时主要分布在瘤内的维管组织核心及瘤组织基底膜周围,而于72小时时,除分布在基底膜上外,还分布在肿瘤细胞表面上。这些例子都说明细胞水平的放射性药物非均匀性分布现象的存在。

2.1.2 亚细胞水平的非均匀性分布

¹¹¹In是临床显像常用的核素^[7,21],但它的放射毒性很高,尤其对睾丸和骨髓^[21]。Jonsson等^[21]通过鼠睾丸的光镜自显影发现,睾丸细胞内含有高密度的银颗粒,而鼠睾丸及骨髓的电镜自显影又表明,¹¹¹In可以进入到细胞核中。Puncher等^[4]运用冰冻切片自显影观察¹¹¹In标记的8-羟基喹啉在白细胞中的分布情况,发现嗜中性粒细胞核内至少含有整个嗜中性粒细胞内放射性活度的52%,而细胞核的体积仅为细胞体积的39%。在这种情况下,若仍然用传统MIRD器官平均剂量值描述单个细胞及细胞核的剂量,必然是错误的。

Makrigiorgos等^[22]估算了载体为小颗粒或大颗粒白蛋白的^{99m}Tc对人肺细胞的剂量,发现92%细胞的剂量是平均剂量的%,

而其它8%细胞的剂量是平均剂量的3~7500倍;Gardin等^[23]估算了载体为硫化胶体的^{99m}Tc对人肝枯否氏细胞的剂量是平均剂量的1500倍。Puncher等^[4]计算¹¹¹In对白细胞细胞核的剂量是对细胞质的2倍。这些都说明,需要恰当的微剂量估算模式来弥补传统MIRD模式的不足。

2.2 微剂量的估算

通过自显影观察分析核素的分布情况后,即可建立、对比、选择恰当的剂量估算模式,弥补传统MIRD估算模式的不足,下面举例说明。

假设¹²⁵I与²¹¹At的物理、化学、生物学性质等相似,Humm等^[5]用¹²⁵I标记的抗Thy1.1抗体作为示踪剂,分别做鼠荷人肝细胞瘤、T细胞淋巴瘤、II型肺细胞肺癌的光镜自显影,通过分析银颗粒与细胞核的位置关系,推测²¹¹At标记的抗Thy1.1抗体的微分布情况,建立起²¹¹At与各细胞核平面坐标关系(即为真实分布),同时又通过银颗粒计数,转变成均匀分布模型,然后分别用以下两种估算模式计算单个细胞核的剂量^[5,18,24]。

①若放射性药物是均匀分布的,则单个细胞核的剂量D等于器官平均剂量D,估算公式(与MIRD估算公式类似)为^[18,24]:

$$\bar{D} = \frac{V_v \cdot \sum_{i=1}^N E_i}{m} = \frac{V_v \cdot N \cdot E}{m} \quad (1)$$

其中,假设在一定体积V的组织内有N个核素点源,每个核素点源只发生一次衰变,并假设在其中的第i个细胞膜上有N_i个核素点源,第j个核素点源的衰变能为E_j,每次平均衰变能为E,每个细胞核的平均质量为m,每个细胞核的平均体积与总体积之比为V_v。

②若放射性药物只位于细胞膜上,则第i个细胞的细胞核剂量D来源于该细胞膜上N_i个点源(设为D_{自我})及此细胞膜以外的其它N - N_i个点源(设为D_{邻近})两个方面^[18,24],即:

$$D = D_{\text{自我}} + D_{\text{邻近}} \quad (2)$$

其中,

$$D_{\text{自我}} = \frac{\sum_{i=1}^{N_i} (P \cdot L \cdot \text{LET})_i}{m} \quad (3)$$

$$D_{\text{邻近}} = \frac{V_v \cdot \sum_{k=1}^{N-N_i} E_k}{m} = \frac{V_v \cdot (N - N_i) \cdot E}{m} \quad (4)$$

公式(3)中, P是指细胞膜上的点源发生衰变时,其辐射能授予本细胞核的几率, L是指电离辐射作用于细胞核的平均内截面长度, LET是线能传递系数。公式(4)中,不对考察的第 i 个细胞的细胞膜上的 N_i 个点源求和, E_k 是细胞外的第 k 个点源衰变一次时对个体积 V 的辐射能。结果如下表:

表 1 单个细胞核的剂量

细胞类型	均匀分布 (Gy)	真实分布 (Gy)	百分比差异
肝细胞癌	1.29	1.15	- 12%
淋巴瘤	2.24	1.61	- 39%
肺癌	1.73	2.32	+ 34%

对比表 1 中结果发现,对于肝细胞癌,两种估算方式所得的结果差异不大,这与自显影观察到的整个肝癌组织内放射性药物均匀分布的情况相一致^[5];而对于淋巴瘤及肺癌,两组结果差异较大,光镜自显影发现这两种肿瘤内的放射性核素分布是不均匀的^[5],这种差异不仅说明传统的 MIRD 估算方法不适用于放射性药物在非均匀性分布情况下的微剂量估算,同时说明通过自显影观察分析放射性药物的实际分布情况后,能够建立、选择恰当的微剂量估算模型,从而弥补传统 MIRD 估算方法的不足。

另外,十分重要的一点是,通过微观放射自显影可以建立起细胞核的剂量-概率分布曲线,从而能够了解零剂量、低剂量细胞核在整个细胞、细胞核群体内的比例,这对于评估肿瘤

的放射性药物治疗效果是非常有价值的^[5]。

3 微剂量分布研究的其它方法

除上述的微观放射自显影技术外,在微剂量的实验研究中还有以下几种方法。

3.1 亚细胞破碎技术

简单地说,组织经匀浆、离心,获得所需的细胞片段,测定其放射性活度,即可了解药物在细胞中的分布位置及其数量^[4, 25]。此实验本身是一种破坏性过程,会得到错误的实验结果,因而对结果的解释应十分小心^[4, 25]。另外,此法既不能分辨同一组织的细胞类型,也不能解释细胞外的药物分布^[6]。

3.2 次级离子质量光谱测量术

其基本原理是,利用外来离子束电离激发样品表面的原子,使其产生具有元素特征的次级离子束,通过质量光谱测量仪对其聚焦、能量过滤、分离后进行定性及定量分析^[26]。它能够同时分析样品表面的稳定性元素及放射性核素^[26],特异性较高,但灵敏度较低^[6, 26]。

3.3 电子微探针分析技术

其基本原理与次级离子质量光谱测量术相类似^[6, 27],但其测量的是外来电子束与样品表面的原子相互作用而产生的具有特征性的 X 射线或反向电子。

4 展望

微观放射自显影技术不仅揭示了传统 MIRD 估算模式在微剂量估算方面的缺陷,而且能够建立和选择恰当的数学模型准确地进行微剂量估算^[5],甚至能够估算电离辐射对细胞核内 DNA 的剂量,再结合分子生物学的方法,如脉冲凝胶电泳 (PGE) 等^[28],进行 DNA 片段的分析,就可以建立分子水平的剂量-效应关系。这方面的深入研究必将使微剂量学与微观放射自显影的研究和应用进入一个更高的层次,从而大大推动核医学诊断、治疗和放射治疗学的发展。

参 考 文 献

- 1 Humm JL et al. J Nucl Med, 1994; 35: 1217
- 2 Prestwich WV et al. J Nucl Med, 1989; 30: 1036
- 3 Fisher DR. Cancer, 1994; 73(3) Suppl 905
- 4 Puncher MRB et al. J Nucl Med, 1995; 36: 499
- 5 Humm JL et al. J Nucl Med, 1993; 34: 1811
- 6 Puncher MRB et al. Eur J Nucl Med, 1994; 21: 1347
- 7 Morrel EM et al. J Nucl Med, 1989; 30: 1538
- 8 Lam ASK. Eur J Nucl Med, 1996; 23: 1575
- 9 Wessels BW et al. Med Phys, 1984; 11: 638
- 10 Jungerman JA. Int J Appl Radiat Isot, 1984; 35: 883
- 11 Lear JL et al. J Nucl Med, 1996; 37(5) Suppl 95
- 12 Kubota K et al. J Nucl Med, 1996; 37: 320
- 13 Brown RS et al. J Nucl Med, 1995; 36: 1854
- 14 Kubota R et al. J Nucl Med, 1992; 33: 1972
- 15 Brown RS et al. J Nucl Med, 1992; 33(5) Suppl 1021
- 16 Roberson PL. J Nucl Med, 1992; 33: 1833
- 17 Kassis AI. J Nucl Med, 1992; 33: 781
- 18 Humm JL et al. J Nucl Med, 1990; 31: 75
- 19 Chen FM et al. J Nucl Med, 1990; 31: 1059
- 20 Pedley RB et al. Br J Cancer, 1990; 61: 218
- 21 Jönsson BA et al. J Nucl Med, 1992; 33: 954
- 22 Makrigiorgos GM et al. JAMA, 1990; 264: 592
- 23 Gardin I et al. J Nucl Med, 1992; 33: 380
- 24 Humm JL et al. Radiat Prot Dosim, 1990; 31: 433
- 25 Carvalho PA et al. J Nucl Med, 1992; 33: 1516
- 26 Clerc J et al. J Nucl Med, 1993; 34: 1565
- 27 Pwnica-Worms D et al. J Nucl Med, 1990; 31: 748
- 28 Kellerer AM. Health Phys, 1996; 70: 832

(收稿日期: 1997-03-31)

⁹⁰Y玻璃微球治疗肝癌的吸收剂量及其估算方法*

中国医学科学院 放射医学研究所(天津, 300192) 孙福印 苑淑渝综述 张良安审校
中国协和医科大学

摘 要: 用⁹⁰Y玻璃微球(⁹⁰Y-GTMS)组织间介入法治疗癌症,对晚期或不宜手术治疗的肝癌是一种新的、很有希望的疗法,并显示出明显的疗效。瘤体内部及其周围正常组织中所吸收的剂量的量值及其分布都对治疗效果有明显影响。吸收剂量估算的准确程度及其分布状况,与剂量的估算方法密切相关,但在这方面尚缺乏统一规范的标准,需进一步加强研究。

关键词: ⁹⁰Y玻璃微球 肝癌治疗 吸收剂量

肝癌是一种严重危害人类健康和生命的疾病。曾经有人估计,原发性和转移性肝癌的致死率占所有癌症的 23%。虽然治疗肝癌的首选方法应当是手术,但是真正可以做手术治疗的原发性肝癌不到 10%、转移性肝癌不到 5%^[1]。其他疗法如全身化疗,收效甚微;外照射疗法因肝组织的耐受剂量限制,达不到根治,只能起到抑制肿瘤生长的姑息治疗作用。因此,各种肝癌局部内照射治疗方法受到人们的重视,近年来,⁹⁰Y玻璃微球(⁹⁰Y-GTMS)治疗肝癌成为这类研究的热点,进展

很快,其中包括对治疗效果有重要影响的剂量学方面的问题。

1 ⁹⁰Y-GTMS的基本特性

⁹⁰Y是一种发射纯 β 射线的核素,其 β 射线的最高能量 $E_0=2.26\text{MeV}$,平均能量 $E=0.937\text{MeV}$,半衰期 $T_{1/2}=64\text{h}$,组织内最大射程 $R_0=10.3\text{mm}$,平均射程 $R=2.5\text{mm}$,很适合用作内照射放射源。早在 60 年代末和 70 年代初,就有人将⁹⁰Y标记的陶瓷或树脂微球注入病人的肝动脉中,全肝剂量达到 5 000

* 国家自然科学基金资助课题