

## ·实验核医学·

## 冰冻切片放射自显影技术在微剂量研究中的应用

戴光复 金月英 田源 苑淑渝 张良安

**【摘要】** 目的 用放射自显影技术观察放射性核素在细胞水平的分布。方法 采用放射自显影和冰冻切片技术,建立银颗粒密度与放射性药物强度的刻度曲线,确定放射性药物  $^{131}\text{I}$  和  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  的微观分布,基于核素的微观分布数据,建立微剂量的剂量估算模式。结果 银颗粒密度与施入放射性药物比活度的相关系数分别为 0.9915 和 0.9963, 刻度系数分别为  $1.59 \times 10^{-4}\text{Bq}$  和  $6.48 \times 10^{-5}\text{Bq}$ 。结论  $^{131}\text{I}$  和  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  在细胞水平的分布是不均匀的,银颗粒多数分布在细胞质中,因此在计算细胞水平的剂量时应考虑到其分布的不均匀性。

**【关键词】** 辐射剂量; 冷冻超薄切片术; 放射自显影术; 碘放射性同位素; 锝

**【中图分类号】** R144.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-4114(2006)05-0264-04

### Application of study in microdosimetry with the frozen sectioning microautoradiography technique

DAI Guang-fu, JIN Yue-ying, TIAN Yuan, YUAN Shu-yu, ZHANG Liang-an

(Department of Health Physics, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China)

**【Abstract】 Objective** To survey the distribution of radionuclide in cell level by frozen sectioning microautoradiography technique. **Methods** The article will describe the micro distribution of  $^{131}\text{I}$  and  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  using autoradiography and frozen sectioning technique. **Results** To describe the relationship between argent grain density and nuclide radioactivity a regression curve of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  and  $^{131}\text{I}$  was depicted and the R value calculated to be 0.9915 and 0.9963 respectively. The scale coefficient of argent grain were  $1.59 \times 10^{-4}\text{Bq}$  and  $6.48 \times 10^{-5}\text{Bq}$  respectively. **Conclusion** The distribution of radiomedicament  $^{131}\text{I}$  and  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  at cellular level is nonuniform.

**【Key words】** Radiation dosage; Cryoultramicrotomy; Autoradiography; Iodine radioisotopes; Technetium

核医学中传统的医学内照射剂量 (medical internal radiation dose, MIRD) 估算方法是假设放射性药物在器官内均匀分布,用器官的平均剂量描述每个细胞及细胞核的剂量。然而,由于核素及其载体、器官/细胞等各方面的因素,这一假设难以满足。通过微剂量 (即在细胞及亚细胞水平的剂量) 分布研究,不仅可以发现放射性药物在器官内的非均匀分布,而且可发现亚细胞水平药物的非均匀分布<sup>[1,2]</sup>。

微观放射自显影技术与通常的放射自显影技术不同,它是采用快速冰冻和超薄切片等特殊技术之下的一种放射自显影技术。微观放射自显影

技术是实验核医学中研究微剂量分布的较好方法,其原因就在于它可以提供分辨率小于  $2 \mu\text{m}$  的放射性药物的分布信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 乳胶干板的制作

用 10% 重铬酸钾硫酸水溶液浸洗及去离子水冲洗过的载玻片插入经  $42^\circ\text{C}$  水浴熔化的核 4 型液体核乳胶 (中国原子能科学研究院物理研究所提供) 中,缓慢提起倒置,室温下晾干,1 h 后于  $4^\circ\text{C}$  条件下储存备用。使用前先在  $-20^\circ\text{C}$  冰箱内预冷 3~4 h。

### 1.2 小鼠肝脏或肾脏匀质物自显影冰冻切片的制作

将剪碎的小鼠肝脏或肾脏放入匀浆器内,加入 10 倍体积生理盐水后混匀制成匀浆物。假设其密度等同于正常小鼠肝脏的密度,取 6 份 1 ml 混匀

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (10375091)

作者单位: 300192 天津, 中国医学科学院放射医学研究所保健物理室

通讯作者: 戴光复 (E-mail: dg815@126.com)

的匀浆物与一定体积、不同比活度的  $^{99m}\text{Tc}$  洗脱液或  $^{131}\text{I}$  溶液混合, 混匀后取样称重, 用标定过的  $\gamma$  计数器测定活度, 经液氮冷冻后, 迅速用 Leica CM1850 型(德国)冰冻切片机进行冰冻切片, 切片厚度为  $2\ \mu\text{m}$ 。在暗室的安全红灯下, 切出的组织切片用预冷过的乳胶干板贴附, 放入暗盒内曝光 24 h, 显影 2~4 min 后在 Kodak F-5 定影液中定影 8~10 min。经过蒸馏水冲洗、干燥等步骤制成自显影切片, 此种切片无需染色。另外, 取无放射性的匀浆物同时制成切片, 贴附乳胶干板, 在同样条件下制成自显影切片作为对照。

### 1.3 自显影本底、乳胶线性响应关系的确定

选取含有不同比活度放射性药物的匀浆自显影切片, 并在镜下随机选取观察视野进行银颗粒统计, 并对无放射性的自显影切片统计周围银颗粒密度, 以扣除本底。经衰变校正后, 分析不同比活度的自显影切片的银颗粒密度与施入比活度的关系。

### 1.4 小鼠组织切片的制作

采用了  $^{99m}\text{Tc}$  和  $^{131}\text{I}$  二种核素(由天津医科大学第二附属医院核医学科提供)。 $^{99m}\text{Tc}$  的给药方式为小鼠尾静脉注射,  $^{131}\text{I}$  给药方式为口服。所用的小鼠为昆明种小鼠(中国医学科学院放射医学研究所动物室提供)共 120 只, 雌雄各半; 根据药代动力学特性甲氧基异丁基异脒( $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi,  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI)给药后 2 h 处死, 取肝脏组织,  $^{99m}\text{Tc}$ -二亚乙基三胺五乙酸( $^{99m}\text{Tc}$ -diethylenetriamine pentaacetic acid,  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA)给药后 2.5 min 处死, 取肾脏组织,  $^{131}\text{I}$  给药后 24 h 处死, 取甲状腺组织, 进行冰冻切片。切出的组织切片用预冷过的乳胶干板贴附, 放入暗盒内曝光 24 h。曝光后首先用 4% 甲醛溶液固定 10 min, 经显影 2~4 min 后, 在 Kodak F-5 定影液中定影 8~10 min, 再经过蒸馏水冲洗、干燥和用苏木素-伊红染液染色等步骤制成自显影切片。在显微镜下观察其银颗粒的分布。

## 2 结果

### 2.1 自显影刻度曲线

通过自显影可以观察放射性药物在细胞内外的分布情况。但若要对分布进行定量测定, 必须建立一条刻度曲线。在显微镜下观察并分析不同比活度的自显影切片的银颗粒密度与施入比活度的关系。扣除本底后建立一条刻度曲线, 一般来说它满足线

性方程。对  $^{99m}\text{Tc}$  和  $^{131}\text{I}$  这 2 种核素的刻度曲线其相关系数分别为 0.9915 和 0.9963, 刻度系数分别为  $6.48 \times 10^{-5}\text{Bq}$  和  $1.59 \times 10^{-4}\text{Bq}$ (见图 1, 图 2)。

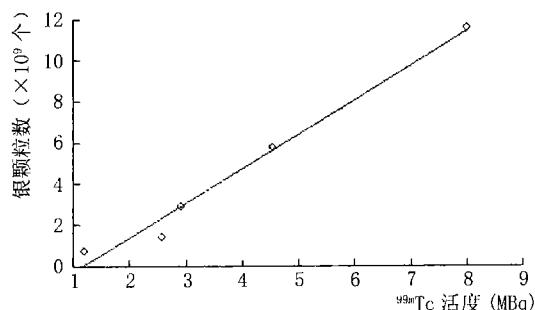


图 1  $^{99m}\text{Tc}$  的自显影刻度曲线

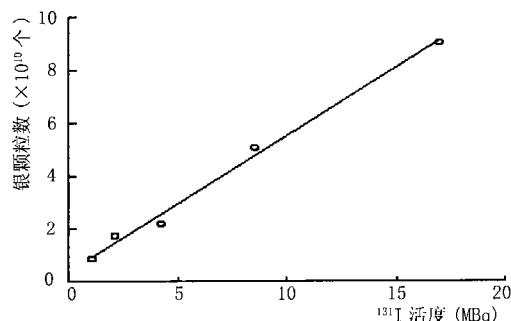


图 2  $^{131}\text{I}$  的自显影刻度曲线

### 2.2 放射性核素在细胞内分布的观察

通过观察小鼠肝脏、肾脏和甲状腺组织的自显影切片中银颗粒密度的变化情况, 就能推测出放射性核素在小鼠肝脏、肾脏和甲状腺组织内细胞水平分布的变化情况。观察了 40 只小鼠肾脏自显影切片的 103 个视野, 在细胞核中的放射性药物分布在 30% 至 40% 之间最多, 而在细胞质中放射性药物分布最多的是在 60% 至 80% 范围内。由以上的观察和统计结果来看放射性药物  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA 在肾脏细胞内的分布是不均匀的。同样  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI 在肝脏细胞内的分布也是不均匀的。研究同时观察了 40 只小鼠甲状腺自显影切片的 148 个视野, 观察结果可见  $^{131}\text{I}$  在细胞内分布也是不均匀的(见图 3,4)。结果显示, 银颗粒在细胞质中的分布高于在细胞核中的分布。按银颗粒在细胞核与细胞质中分布的百分率统计, 超过 60% 的细胞质占 67% 而细胞核仅占 33%。

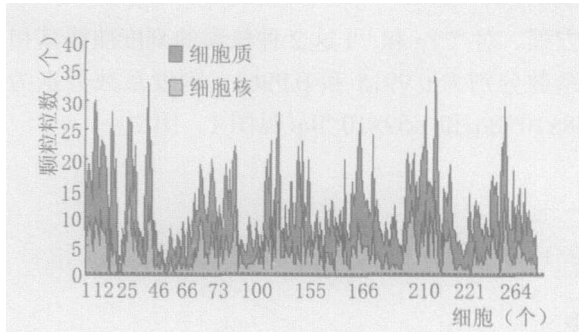


图3  $^{99m}\text{Tc}$  放射自显影银颗粒在细胞核及细胞质内的分布频率

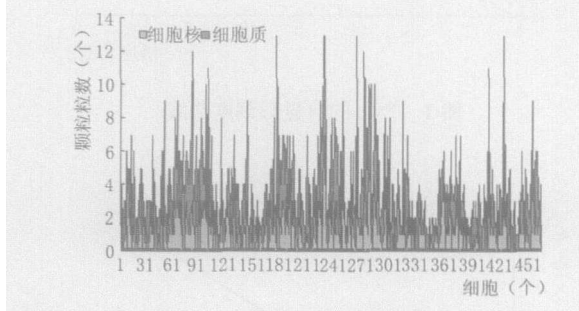


图4  $^{131}\text{I}$  放射自显影银颗粒在甲状腺细胞核及细胞质内的分布频率

### 3 讨论

对于特定的靶源组合,靶区的吸收剂量等于源区中累计活度与源区中单位累计活度对靶区平均吸收剂量(S因子)的乘积。根据实验所得的放射性药物在细胞中的分布信息,我们可以计算出核素在细胞水平非均匀分布的S值,进而能准确地计算出细胞水平的吸收剂量,进行微剂量学研究<sup>[9]</sup>。为准确地得到放射性药物在细胞水平的分布信息,利用冰冻切片放射自显影技术时有一些问题应特别注意,以保证能获得准确的信息。

(1) 应注意本底的影响。本底的存在会导致自显影切片中银颗粒分布的疏密变化不明显,计数不精确,不能反映药物的真实分布情况,这就必须增加施入放射性药物的量及比活度来提高信息与本底的比例,而这又有可能造成乳胶内银颗粒的饱和以及不必要的药物浪费,因此在实验中应设置对照组,以排除此因素的影响。本底的扣除方法,除利用实验中的对照组外,还可用切片自身周围乳胶中的银颗粒作为对照,因为在自显影制作的整个过程,每一张自显影切片上的组织与其周围的乳胶,都处于相同的曝光、显影、定影条件下,以及它们

由切片刀造成交叉污染的机会也是相同的,所以组织切片周围的银颗粒密度可以作为同一切片的本底密度而予以扣除。这种本底扣除法既方便又准确,而且,即使在本底稍微高的情况下,也不会影响银颗粒计数的准确度。当然,本实验中的本底都较低,可以忽略。

(2) 应注意冰冻切片条件的确定。基于所使用的放射性药物的化学特性及放射性核素的半衰期,针对此类药物应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,以确保所做的切片能满足自显影需要。为得到好的组织冰冻切片,对不同组织进行冰冻切片时应按照所取组织选用不同的最佳冰冻温度。如甲状腺需在 $-20^{\circ}\text{C}$ 下切片,而肝脏和肾脏则需在 $-30^{\circ}\text{C}$ 下切片才能获得理想的组织切片。值得注意的是,由于肾脏内有较多的水分,在冰冻过程中会有冰晶的形成从而破坏了组织形态,冰冻的速度越慢冰晶就越大。为消除冰晶的影响,在选取肾脏进行冰冻切片时必须先用液氮迅速冰冻,然后再放入冰冻切片机内进行切片。同时,还应注意每更换一次组织块须更换一次切片刀片,以减少交叉污染对自显影结果的影响。

(3) 最佳显影时间的确定。这也是一个影响自显影切片质量的重要因素,过度显影会使切片不清晰同时本底信号增加。因此要选择出最佳的显影时间以获得较高质量的自显影切片。

自显影技术的缺点和改进:虽然光镜放射自显影是一种能够对器官内放射性药物进行准确定位(可在 $1\mu\text{m}$ 以下范围内)的方法,但存在的一个缺陷是不能同时获得组织内药物的时间、空间分布信息,在运用到剂量估算时,只能获得某一时点的剂量率。因此,要把剂量率分布转变成吸收剂量分布,必须掌握药物的时间-活度分布曲线。有人试图把热释光剂量计(thermal luminescent dosimeter, TLD)植入组织,以获得随时间变化的累积剂量。但由于TLD元件尺寸一般都较大,不能反映核素点源与细胞结构的分布关系及细胞水平的剂量分布信息,此过程本身又是一种破坏性过程而影响药物的实际分布情况,以及TLD性能易受组织生理环境(如温度、pH)、植入时间、总剂量等因素影响,其校正过程较为复杂。也就是说,尽管TLD可作为自显影的一种互补技术,但也难弥补光镜自显影

在微剂量学研究中的这种不足。因而,需探索新的方法解决这一问题。另外,光镜下银颗粒肉眼分析过程不仅耗时,而且准确度受主观因素的影响,这需要自动的分析处理过程。

综上所述,通过微观放射自显影分析银颗粒与细胞核的位置关系建立放射性点源与细胞核的平面坐标关系,不仅可以进行准确估算细胞核的剂量,而且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和(或)低剂量细胞核在整个细胞/细胞核群体内的比例,这对于评估肿瘤放疗效果是非常有价值的<sup>[4,5]</sup>。

微剂量分布研究不仅揭示了传统 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微剂量估算。目前,关于肿瘤治疗的报道较多,所欠缺的是无准确的剂量数据作指导。用放射自显影技术进行剂量估算的重要

用途就在于为肿瘤的放射药物治疗提供准确的剂量数据,从而在尽量杀伤肿瘤细胞的同时,减少对瘤组织周围正常细胞的辐射损伤。

#### 参 考 文 献

- 1 戴光复,金月英,田源,等. <sup>131</sup>I 在细胞水平分布的实验研究. 中华放射医学与防护杂志, 2006, 26(4): 332-334.
- 2 戴光复,金月英,寇明英,等. <sup>99m</sup>Tc-DTPA 细胞水平分布的实验研究. 中华放射医学与防护杂志, 2005, 25(4): 319-321.
- 3 Flynn AA, Pedley RB, Green AJ, et al. The nonuniformity of antibody distribution in the kidney and its influence on dosimetry. Radiat Res, 2003, 159(2): 182-189.
- 4 Denardo GL, Siantar CL, DeNardo SJ. Radiation dosimetry for radionuclide therapy in a nonmyeloablative strategy. Cancer Biother Radiopharm, 2002, 17(1): 107-118.
- 5 戴光复,王明席,寇明英,等. 放射自显影术用于细胞水平微吸收剂量分布研究. 中华核医学杂志, 2002, 22(1): 55-56.

(收稿日期: 2006-05-15)

(上接第 263 页)

物质,既可促进各组织器官损伤的修复,又是一种辅助促癌剂。本实验提示,肺癌患者术前 EGF 水平较肺良性疾病者和正常人高,可能与肺癌的发生发展有关。EGFR 表达阳性的肺癌患者术前 EGF 的水平较 EGFR 表达阴性者高,术后下降可能系切除肿瘤及癌旁组织的结果,术后 12 d 左右最低,30 d 后开始恢复;一旦肺癌复发,又上升到术前水平。回顾性调查分析发现,EGF 术后升高与 EGFR 表达阳性的肺癌患者术后复发关系密切。这一切现象可为 EGFR 表达阳性的肺癌患者术后复发的早期诊断提供帮助。而 EGFR 表达阴性的肺癌患者术后 EGF 变化不明显。

### 3.3 EGF、EGFR 与肺癌术后生存,复发的关系

随访结果显示,EGFR 阳性组术后 6、12、18 个月等复发率明显高于 EGFR 阴性组,而且 EGFR 阳性的肺癌患者其 EGF 在术前、术后、术后复发变化明显。EGFR 主要在肺癌及癌旁组织表达,EGF 与之结合,形成自/旁分泌增殖环,使肿瘤生长<sup>[6]</sup>,因此 EGFR 与肺癌预后关系密切,也表明手术治疗肺癌最好切除一定范围的癌旁组织。

#### 参 考 文 献

- 1 Tiseo M, Loprevite M, Ardizzoni A, et al. Epidermal growth factor receptor inhibitors: a new prospective in the treatment of lung cancer. Curr Med Chem Anti Cancer Agents, 2004, 4(2): 139-148.
- 2 Chan SK, Gullick WJ, Hill ME, et al. Mutations of the epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung cancer search and destroy. Eur J Cancer, 2006, 42(1): 17-23.
- 3 Lee D. Phase II data with ZD6474, a small-molecule kinase inhibitor of epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor, in previously treated advanced non-small-cell lung cancer. Clin Lung Cancer, 2005, 7(2): 89-91.
- 4 Dazzi H, Hasleton PS, Thatcher N, et al. Expression of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in non-small cell lung cancer. Use of archival tissue and correlation of EGF-R with histology, tumour size, node status and survival. Br J Cancer, 1989, 59(5): 746-749.
- 5 Herbst RS, Bunn PA Jr. Targeting the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res, 2003, 9 (16 pt 1): 5813-5824.
- 6 Reddy GK, Lmaizumi M, Nishimura M, et al. Relevance of epidermal growth factor receptor genomic gain in predicting clinical response to kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. Clin Lung Cancer, 2005, 7(3): 163-165.

(收稿日期: 2006-03-21)