

镧示踪法观察常规分割外照射后血脑屏障的超微结构改变

章龙珍 曹远东 董红燕 于红丽 庄明

【摘要】目的 观察 Sprague-Dawley (SD) 大鼠全脑常规外照射后血脑屏障 (BBB) 的超微结构变化特点及其规律。**方法** SD 大鼠 20 只, 分为 5 个实验组, ^{60}Co 射线全脑常规分割外照射, 各组受照后 16h 以硝酸镧为示踪剂, 用透射电镜观察 BBB 超微结构变化。**结果** 对照组镧颗粒分布在血管腔内, BBB 结构完整; 10Gy 组少量镧颗粒通过开放的毛细血管内皮细胞间的紧密连接, 沉积于基底膜, 但未入脑组织; 20Gy 组见大部分紧密连接开放, 镧颗粒弥漫性分布于神经细胞间隙, 细胞内无镧颗粒沉积; 30Gy 神经细胞质内见大量、核内见少量镧颗粒沉积; 40Gy 组部分毛细血管内皮细胞及神经细胞失去正常形态, 结构破坏, 大量镧颗粒沉积在细胞核内、外。**结论** 放射线具有降低及破坏 BBB 功能的作用, 且与照射剂量呈正相关; 30Gy 后 BBB 完全开放, 此时进行化疗为最佳时机; 照射 40Gy 后不易再全脑追加剂量, 否则会导致不可逆性放射性脑损伤。

【关键词】 血脑屏障; 放射疗法; 硝酸镧

【中图分类号】 R734.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-4114(2007)06-0373-04

Changes of ultrastructure of blood-brain barrier after whole brain irradiation treatment in rats with lanthanum

ZHANG Long-zhen¹, CAO Yuan-dong², DONG Hong-yan³, YU Hong-li³, ZHUANG Ming⁴

(1.Department of Radiation Oncology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou Jiangsu 221002, China; 2.Department of Radiation Oncology, Affiliated Hospital Dongnan University, Nanjing Jiangsu, 210009, China; 3.Laboratory of Research Center for Neurobiology, Xuzhou Medical College, Xuzhou Jiangsu 221002, China; 4.Experimental Animal Center of Xuzhou Medical College, Xuzhou Jiangsu 221002, China)

【Abstract】Objective A pilot study of ultrastructure of blood-brain barrier (BBB) after whole brain irradiation treatment in rats. **Methods** Twenty Sprague-Dawley rats were divided into 5 groups, To observe the changes of ultrastructure of BBB in 16 h after whole brain irradiation with ^{60}Co ray in rats, using lanthanum trace labeling with electron microscopy. **Results** 1.The lanthanum was only seen in the lumens of capillaries but not in the extravessels to the rats of unirradiation. 2.A few tight junctions of capillaries endothelial cell opened through which the lanthanum entering the outside of capillaries but not in the extravessels after irradiation 10Gy. 3.Most tight junctions of endothelial cell opened through which the lanthanum entering the extra cellular space but not enter into the neurons in 20Gy group. 4. The lanthanum through tight junctions of capillary vessel and basement membrane entered the plasma, mitochondria and endoplasmic reticulum of neurons after irradiation treatment 30Gy. 5.To the 40Gy group, Lanthanum nitrate particles existed in the brain tissue diffusely and a few endothelial cells and neurons lost normal configuration. **Conclusions** 1.The effect that radiation can directly damage the function and structure of BBB were enhanced proportionally with irradiation doses. 2.It is optimum time of chemotherapy after the whole brain irradiation in 30 gray. 3.The whole brain radiotherapy could not more than 40Gy, or it result in irreversible brain injure.

【Key words】 Blood-brain barrier; Radiotherapy; Lanthanum

基金项目: 江苏省卫生厅基金项目(H200534)

作者单位: 1. 221002, 徐州医学院附属医院放射治疗科(章龙珍); 2. 210009 南京, 东南大学附属医院放疗科(曹远东); 3. 221000, 徐州医学院神经生物学研究中心实验室(董红燕、于红丽); 4. 221000, 徐州医学院实验动物中心(庄明)

通讯作者: 章龙珍(E-mail: jsxzzlz@126.com)

血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 对维持脑功能及脑内环境的稳定起着极其重要的作用, 但是这层屏障同时也阻碍了许多有潜在价值的药物进入大脑, 从而在很大程度上影响了颅内疾病的治疗效果, 使颅内肿瘤的治疗效果近年来一直徘徊不

前。因此,如何提高BBB的通透性是日前研究的热点。放射线是打开BBB有效的方法之一^[1]。国内外文献对放射线照射后的BBB功能及结构的改变进行了一些相关研究,但是以往动物实验多采用单次大剂量、局部性的照射方式^[2],与临床常规治疗不相符合,无法进行准确的评价,在临床难以推广应用。本实验模拟临床全脑常规分割外照射方式,采用硝酸镧示踪法,用电镜细胞化学技术观察不同剂量放射线照射后BBB的超微结构的变化,为颅内肿瘤的放化综合治疗的序贯性和最佳化疗时机提供可靠的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

正常成熟SD大鼠(由徐州医学院实验动物中心提供)20只,雌雄不拘,体质量190g~300g,随机分为对照组、10Gy组、20Gy组、30Gy组和40Gy组,共5组,每组4只。所有实验动物均在同一条件下治疗和饲养。

1.2 照射方式

模拟定位:照射大鼠侧卧于模拟定位床上,源皮距75cm,全脑照射野的大小约2cm×2cm,上界位于双眼后毗连线,下界位于双耳后连线,左右露空,垂照。照射方式:2Gy/次,每日一野,每周5次。治疗设备:FHC-50型⁶⁰Co治疗机(上海医用合资仪器厂)。受照大鼠于每次照射前用0.4%的戊巴比妥钠(25mg/kg)腹腔注射麻醉。

1.3 主要试剂的配制^[3]

1.3.1 镧醛固定液

双蒸水25ml、250ml/L戊二醛10ml、0.2mol/L二甲基砷酸钠缓冲液15ml、多聚甲醛1g,配制成戊二醛-多聚甲醛混合固定液,用NaOH滴定至澄清,将1g硝酸镧加入配制好的固定液中,用0.1mol/L NaOH将pH滴定至7.4~7.6,即制成镧醛固定液。

1.3.2 0.1mol/L二甲基砷酸钠缓冲液

二甲基砷酸钠10.70g,蒸馏水500ml,震荡溶解后,用HCl调pH到7.4,即配制成0.1mol/L二甲基砷酸钠缓冲液。

1.3.3 2%含硝酸镧的二甲基砷酸钠缓冲液

二甲基砷酸钠1.07g,蒸馏水50ml,震荡溶

解后,用HCl调pH到7.4,再加入1g硝酸镧于上述配好的混合液中,即配制成2%硝酸镧的二甲基砷酸钠缓冲液,4℃冰箱保存。

1.3.4 1%四氧化锇固定液

取0.5g四氧化锇溶于25ml重蒸水,制成贮存液,避光保存于4℃冰箱中,用前用0.1mol/L、pH7.2的磷酸缓冲液配制成1%四氧化锇固定液。

1.4 电镜标本的制备

每组动物照射结束后16h,受照大鼠用0.4%戊巴比妥钠(40mg/kg)腹腔注射麻醉后迅速开胸,行左心插管,先用生理盐水100ml冲洗,然后再灌注镧醛固定液100ml,灌注压维持在16kPa(120mmHg)水平。灌注10min后开颅,取双侧顶叶皮层脑组织,并修成大小约1mm×1mm×1mm的脑组织若干块,立即置于4℃镧醛固定液中继续固定2h或过夜;然后用含硝酸镧的二甲基砷酸钠缓冲液漂洗3次,每次约15min;再于不含硝酸镧的1%四氧化锇固定液中固定2h,用0.1mol/L二甲基砷酸钠缓冲液漂洗2次,每次15min。最后,采用常规电镜梯度乙醇、丙酮脱水,环氧树脂618包埋,用LKB V型超薄切片机(瑞典LKB公司)切片(未经电子染色),置于透射电镜(日本日立H-600型)观察与拍照。

2 结果

电镜超微结构表明,照射前(即对照组)高电子密度的镧颗粒仅分布于毛细血管管腔内,附着在毛细血管内壁的表面,毛细血管内皮细胞间紧密连接处、基底膜及毛细血管外的组织间隙均未见镧颗粒沉积,毛细血管内皮细胞及脑组织细胞无肿胀(见图1);10Gy组见毛细血管内皮细胞间的紧密连接处镧颗粒呈线性沉积,但基底膜处及脑组织间隙未见镧颗粒沉积,细胞形态结构未见明显异常(见图2);20Gy组大部分毛细血管内皮细胞连接处及基底膜处可见线状镧颗粒高电子密度的镧颗粒沉积,内皮细胞肿胀,脑组织水肿,紧密连接开放,并见有细小的镧颗粒通过毛细血管基底膜进入到脑组织内,分布在神经组织细胞间隙和轴突周围,但未进入脑组织细胞内(见图3),与照射前相比,BBB的通透性明显增加,屏障功能遭到破坏;30Gy组毛细血管内、紧密连接处、基底膜及

脑组织内呈弥漫性细小钨颗粒沉积, 并见钨颗粒进入组织细胞内部, 分布于线粒体、内质网等细胞器的表面, 甚至进入部分线粒体内部, 沉积于线粒体嵴的表面, 部分核孔及核内亦见钨颗粒沉积, 但核内沉积量较核外沉积明显少, 染色质边聚, 内质网池扩大, 血管内皮细胞、脑组织细胞、核膜结构尚完整, 形态无明显异常(见图4); 40Gy组钨颗粒弥漫性分布在毛细血管内皮细胞、基底膜、脑组织细胞间及细胞内, 内皮细胞肿大, 管腔闭塞, 髓鞘分离, 部分毛细血管内皮细胞及神经细胞失去正常形态, 结构破坏并见髓鞘周围及内部钨颗粒沉积, 呈板层状表现(见图5和图6)。

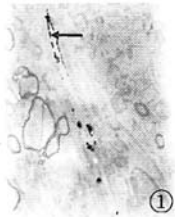


图1 正常大鼠全脑 BBB 电镜图($\times 10k$)



图2 大鼠全脑 10Gy 照射后 BBB 改变($\times 20k$)



图3 大鼠全脑 20Gy 照射后 BBB 改变 ($\times 10k$)

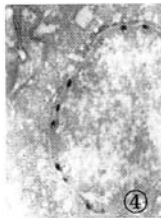


图4 大鼠全脑 30Gy 照射后 BBB 改变 ($\times 15k$)

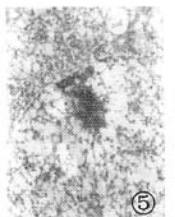


图5 大鼠全脑 40Gy 照射后 BBB 改变 ($\times 20k$)



图6 大鼠全脑 40Gy 照射后 BBB 改变 ($\times 30k$)

3 讨论

中枢神经系统内特殊毛细血管内皮细胞及其紧密连接是 BBB 的重要结构基础, 尚包括基底膜及包围在毛细血管周围的小胶质细胞和星形胶质质

胞。从生理的角度上看, BBB 对物质分子大小、所负的电荷及溶解性不同的物质通透性均有选择性, 特别是 BBB 中的酶屏障及其专一性很强的载体系统, 保证了脑内神经递质浓度的相对稳定性, 只有一些大脑必须的糖类、氨基酸类等分子才能穿越 BBB 到达脑细胞, 这就避免了大脑受到血液循环中有害物质如毒素和病毒的危害。但是, 这层屏障同时也阻碍了许多有潜在价值的药物进入大脑, 尤其是化疗药物。我们的以往研究结果表明, 照射前氨甲蝶呤几乎不能透过 BBB, 脑脊液中氨甲蝶呤平均浓度与血液中浓度相差 100 倍, 说明 BBB 在很大程度上影响颅内肿瘤的药物治疗效果^[4]。因此, 人们致力于各种影响 BBB 障通透性的因素及监测 BBB 通透性方法的研究。

硝酸钨颗粒溶液在碱性条件下形成氢氧化钨, 正常情况下不能通过完整的细胞膜与细胞间紧密连接处进入细胞内而沉积在细胞外, 因此本研究采用硝酸钨示踪电镜细胞化学技术观察射线对 BBB 通透性的影响。该方法简便、费用低, 并可取得与辣根过氧化物酶示踪法相同的结果。本组结果显示, 照射前(即对照组), 钨颗粒不能透过完整的 BBB; 照射 10Gy 后, 可见少量钨颗粒透过毛细血管内皮细胞间紧密连接但未能通过基底膜, 内皮细胞及脑组织结构正常, 与 Van Vulpen 等^[5] 研究的结果类似; 照射 20Gy 后, BBB 的完整性已破坏, 其通透性增加, 因此可以解释临床上颅内高压常在肿瘤吸收剂量达 15~20Gy 后发生, 同时亦说明基底膜是构成 BBB 的重要结构之一, 可以称为血脑的第二道屏障, 此结果与 Trnovec 等^[1] 的研究结果基本一致; 照射 30Gy 后, BBB 基本失去屏障功能; 照射 40Gy 后, 毛细血管内皮细胞及神经细胞受损较明显, 部分细胞失去正常形态, 髓鞘分离, 但整体轮廓尚存, 说明 BBB 功能的稳定性和照射剂量的限制性。

由于化学治疗药物主要作用于遗传物质和酶系统等, 药物必须进入细胞内才能有效地发挥药理作用, 因此从本组资料的病理形态学改变可以推断, 临床放化综合治疗的序贯性和化疗的最佳时机应为放疗 30Gy 后。Qin 等^[6] 临床研究结果表明, 放射治疗 20~40Gy 后为化疗最佳时机, 其病理形态学基础可以从这里得到很好的解释。若进一步进行全

脑放射治疗,有可能不仅不能改善预后,反而增加放射性脑损伤,缩短患者的生存期。另外可以看到,在照射 30Gy 后,核孔处钨颗粒大量聚集,核内钨颗粒分布较核外少,较细胞间钨颗粒沉积更少,说明核膜、细胞膜功能尚可,对外界不良刺激有着强大的抵御和防护作用。由此可以推断,神经细胞对放射线有较大的剂量耐受性。

放射线对 BBB 损伤的作用机制可能是非特异性的,它的本性类似于其他物理或化学毒性因素的反应。从本实验中可以看出,辐射导致的 BBB 的破坏与毛细血管内皮细胞肿胀和损伤、胞内囊泡增多、细胞间紧密连接的破坏、星形胶质细胞的异常等有关,但其确切的机制目前尚不十分清楚,下一步将在此基础上进行深入的分子生物学及病理生理学研究。

参 考 文 献

(收稿日期:2007-04-12)

1 Trnovec T, Kallay Z, Bezek S. Effects of ionizing radiation on the

blood brain barrier permeability to pharmacologically active substances. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1990, 19(6): 1581-1587.

- 2 钟强,于新,刘宗霖,等.伽玛刀照射正常大鼠后急性期血脑屏障通透性的改变. *第二军医大学学报*, 2003, 24 (3): 314-317.
- 3 王爽,李学荣,王晓峰.用硝酸镧示踪测定大鼠脑损伤后血脑屏障通透性改变的电镀技术. *第四军医大学学报*, 1999, 20(2): 171-172.
- 4 章龙珍,曹远东,陈勇,等.全脑常规分割外照射对大鼠血脑屏障药物通透性的影响. *中华放射肿瘤学杂志*, 2006, 15(3): 229-232.
- 5 Van Vulpen M, Kal HB, Taphoorn MJ, et al. Changes in blood-brain barrier permeability induced by radiotherapy: implications for timing of chemotherapy?. *Oncol Rep*, 2002, 9(4): 683-688.
- 6 Qin D, Zheng R, Ma J, et al. Influence of radiation on the blood-brain barrier and optimum time of chemotherapy. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*, 1999, 21(4): 307-310.
- 7 秦德兴,墨浩,欧广飞,等.脑胶质母细胞瘤放疗疗效观察. *中华肿瘤杂志*, 2001, 23(2): 168-169.

(上接第 372 页)

interstrand cross-link formation by a nucleotide radical. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(2): 485-491.

- 3 Cecchini S, Giroud S, Huels MA, et al. Interstrand cross-links; A new type of gamma-ray damage in bromodeoxyuridine-substituted DNA. *Biochemistry*, 2005, 44(6): 1932-1940.
- 4 Cecchini S, Masson C, La Madeleine C, et al. Interstrand cross-link induction by UV radiation in bromodeoxyuridine-substituted DNA: dependence on DNA conformation. *Biochemistry*, 2005, 44(51): 16957-16966.
- 5 Lambert S, Mason SJ, Barber LJ, et al. Schizosaccharomyces pombe checkpoint response to DNA interstrand cross-links. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(13): 4728-4737.
- 6 Sridharan D, Brown M, Lambert WC, et al. Nonerythroid alphaII spectrin is required for recruitment of FANCA and XPF to nuclear foci induced by DNA interstrand cross-links. *J Cell Sci*, 2003, 116 (Pt 5): 823-835.
- 7 D'Andrea AD, Grompe M. The Fanconi anaemia /BRCA pathway. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(1): 23-34.
- 8 Collis SJ, Barber LJ, Ward JD. C. elegans FANCD2 responds to replication stress and functions in interstrand cross-link repair. *DNA Repair (Amst)*, 2006, 5(11): 1398-1406.
- 9 Rothfuss A, Grompe M. Repair kinetics of genomic interstrand DNA cross-links: evidence for DNA double-strand break-dependent activation of the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Mol Cell Biol*,

2004, 24(1): 123-134.

- 10 Niedernhofer LJ, Odijk H, Budzowska M, et al. The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. *Mol Cell Biol*, 2004, 24 (13): 5776-5787.
- 11 De Silva IU, McHugh PJ, Clingen PH, et al. Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, 2000, 20 (21): 7980-7990.
- 12 Atanassov BS, Barrett JC, Davis BJ. Homozygous germ line mutation in exon 27 of murine Brca2 disrupts the Fancd2-Brca2 pathway in the homologous recombination-mediated DNA interstrand cross-links' repair but does not affect meiosis. *Genes Chromosomes Cancer*, 2005, 44(4): 429-437.
- 13 Sprong D, Janssen HL, Vens C, et al. Resistance of hypoxic cells to ionizing radiation is influenced by homologous recombination status. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2006, 64(2): 562-572.
- 14 Murray D, Prager A, Meyn RE, et al. Relationship between DNA damage and the survival of radiosensitive mutant Chinese hamster cell line exposed to gamma-radiation: Part 2. Effect of cellular redox status. *Int J Radiat Biol*, 1993, 63(1): 199-206.
- 15 Bindra RS, Schaffer PJ, Meng A, et al. Down-regulation of Rad51 and decreased homologous recombination in hypoxia cancer cells. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(19): 8504-8518.

(收稿日期:2007-05-25)