

医药卫生

三维适形放射治疗前列腺增生症对膀胱损伤的实验研究

邵秋菊¹ 齐宇红¹ 王旭霞² 王春梅³ 于得全¹

(第四军医大学唐都医院放疗科¹, 消化科², 基础部电镜中心³, 西安 710038)

摘要 观察三维适形放射治疗犬自发性前列腺增生中膀胱损伤,为临床提供依据。选择(7—15)岁雄性合格 BPH 动物模型 8 只。应用立体定向放射治疗前列腺。勾画整个前列腺为靶区,以 90% 的等剂量曲线包绕靶区,单次剂量 2 Gy,每周照射 5 次,共 7 次,总剂量 14 Gy。应用 DVH 图测定膀胱受照体积与剂量。照射后 1 月分别取与前列腺紧邻受到照射的膀胱、未照射区域的膀胱(作为对照)标本。分别应用光镜、扫描电镜和透射电镜观察膀胱组织形态的变化。结果照射后排尿无明显改变,未给予药物等处理,按照 RTOG 急性放射损伤标准评价,损伤为(0~1)级。与照射前比较,照射后膀胱切片 HE 染色光镜下可见:细胞坏死明显,排列紊乱,细胞悬浮脱落,局部有细胞脱落后遗留的空穴;平滑肌紊乱;纤维裸露。透射电镜下可见膀胱上皮细胞连接破坏,间距增大,细胞脱落,胶原原纤维增生,出现放射性成纤维细胞。结论 放射性膀胱炎的上皮细胞脱落、胶原增生、出现放射性成纤维细胞等组织病理改变。在低于目前公认的照射剂量阈值时即已经出现。

关键词 三维适形放射治疗 膀胱损伤 犬

中图分类号 R73-361; **文献标志码** B

前列腺增生症(benign prostatic hyperplasia, BPH)是常见的老年男性病。三维适形放射治疗(3 dimensional conformal radiotherapy, 3-DCRT)用于 BPH 治疗已有初步尝试^[1-5],其治疗 BPH 凸现出极大的优势,它的优越性体现在无创、疗程短、成本低、疗效显著、副作用小等方面。作者对 3-DCRT 治疗犬自发性 BPH 中的膀胱损伤进行了实验研究,报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

德国 Siemens M2 医用电子直线加速器 6MV—X 线;

美国 Topslane 立体定向放射治疗系统;

美国 GE Hispeed NX/i CT 机;

德国 Carl Zeiss Axioskop 光学显微镜;

日本 S—3400N 日立扫描电镜;

日本 JEM—2000EX 透射电镜。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的选择

选择(7—15)岁雄性老年家犬,肌内注射速眠新 I 注射液(0.08 mL/kg—0.1 mL/kg)麻醉,经导尿管向膀胱注入 200 mL 灭菌生理盐水,采用意大利 ESAOTE Casis B 超,由同一位超声诊断医师,应用直肠探头,从直肠内测量前列腺最大面积断面时的横径、前后径和矢状切面的最长径。根据《国家新药研究指南》相关章节的规范,前列腺三径的乘积 $>18\text{ cm}^3$ 者作为合格的 BPH 实验动物。前列腺三径的乘积乘以 0.52 为前列腺的体积。

选择合格 BPH 动物模型 8 只,年龄(7~15)岁,体重(13~23)kg。分别在照射前、照射后 1 月进行观测。

1.2.2 立体定向放射治疗

(1) 麻醉犬,应用 Topslane 立体定向系统 + 真空袋固定其体位。(2) 应用美国 GE Hispeed NX/i CT 机薄层(层厚 5 mm)扫描盆腔,其 CT 数字图像通过网络传入 Topslane 计算机工作站。(3) 在 3-DCRT 治疗计划系统(Treatment plan system,TPS)进行三维图像重建,建立坐标系。勾画整个前列腺为靶区,以 90% 的等剂量曲线包绕靶区,单次剂量 2 Gy,每周照射 5 次,共照射 7 次,总剂量 14 Gy。(4) 按照以上照射方案(图 1)应用 Siemens M2 型直线加速器 6 MV-X 线完成照射。

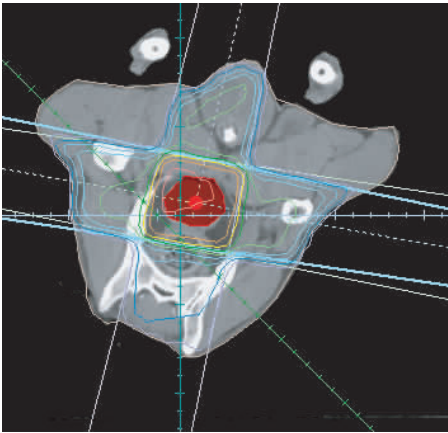


图 1 照射计划

1.2.3 观测指标及方法

照射后 1 月分别取与前列腺紧邻受到照射的膀胱、未照射区域的膀胱(作为对照)标本。分别应用光镜、透射电镜和扫描电镜观察膀胱微观形态的变化。

HE 样本制备:取处死狗的膀胱组织约 1 mm³ 小块,10 % 甲醛固定,石蜡包埋,做 4 μm 厚组织切片,苏木精-伊红染色,观察组织学特征。

扫描电镜样品制备:取材同上,放入 2.5% 戊二醛中固定,PBS 漂洗 3 次,每次 15 min,1% 锇酸固定 2 h,PBS 漂洗,脱水(50%、70%、80%、90%、95% 各 15 min,换叔丁醇 15 min),冷冻干燥,真空镀膜仪镀膜后扫描电镜观察、摄片。

透射电镜样品制备:取材同上,放入 2.5% 戊二醛中初固定,4 ℃ 冰箱保存。pH7.4 PBS 漂洗,1% 锇酸液固定 2 h,PBS 漂洗,脱水,浸透,Epon812 包埋。超薄切片,醋酸铀和柠檬酸铅双重染色,透射电镜下观察、摄片。

2 结果

2.1 临床表现

膀胱最大累积受照剂量 13.91 ± 0.4302 Gy,10%、20%、30%、40%、50% 体积累积受照剂量分别为 12.43 ± 0.59 、 8.43 ± 0.61 、 4.53 ± 1.60 、 3.48 ± 1.57 、 0.82 ± 0.21 Gy。按照 RTOG 急性放射损伤标准评价,照射后排尿及尿常规检查无明显改变,损伤为(0~1)级。

2.2 组织形态学改变

与照射前(图 2)比较,照射后膀胱切片 HE 染色光镜下(图 3)8 例均可见上皮细胞稍显紊乱,偶见细胞脱落,平滑肌紊乱;与照射前(图 4)比较,扫描电镜 1 K 下(图 5)8 例均可见细胞排列紊乱,细胞悬浮脱落,局部有细胞脱落后遗留的空穴。3 K 放大(图 6)可见细胞坏死明显,轮廓不清,排列紊乱,纤维裸露;透射电镜下(图 7)可见膀胱上皮细胞连接破坏,间距增大,细胞脱落,5 例可见胶原纤维增生(图 8)、3 例放射性成纤维细胞出现(图 9)。

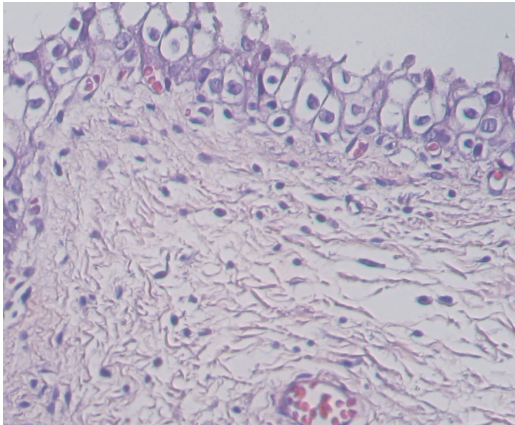


图 2 照射前 膀胱 400 ×

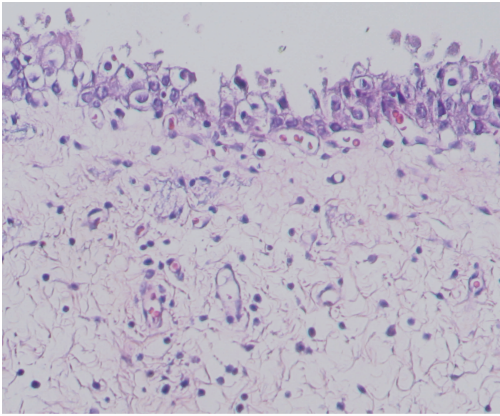


图3 照射后 膀胱 400 ×
与照射前比较,放射治疗对膀胱有轻度损伤,HE 染色可见上皮细胞稍显紊乱,偶见细胞脱落,基底膜完整,平滑肌紊乱。

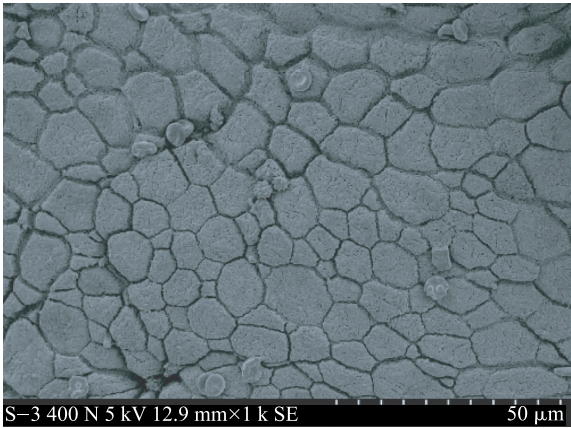


图4 照射前扫描电镜 膀胱 1 K

照射前:膀胱上皮表面平整,细胞轮廓清楚,细胞之间的间距基本一致。

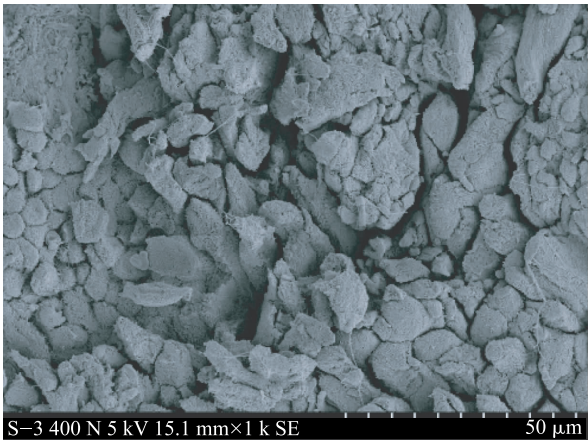


图5 照射后扫描电镜 膀胱 1 K

照射后:细胞排列紊乱,细胞悬浮脱落,局部有细胞脱落后遗留的空穴。

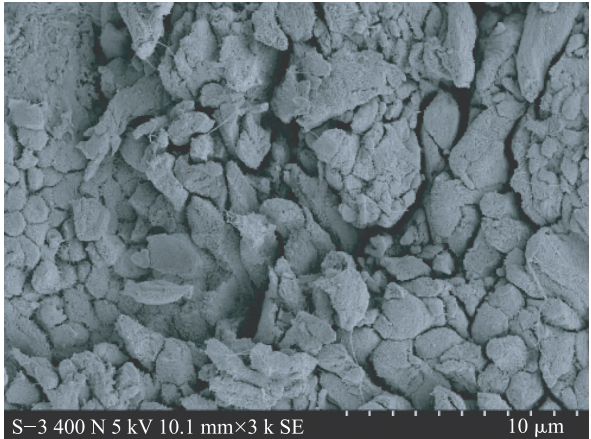


图6 照射后扫描电镜 膀胱 3 K

3 K 放大可见细胞坏死明显,轮廓不清,排列紊乱。纤维裸露。

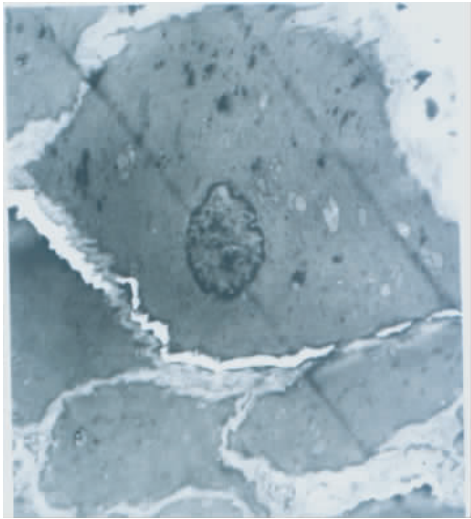


图7 照射后透射电镜 膀胱

上皮细胞连接破坏,间距增大,细胞脱落。

3 讨论

放射性膀胱炎是盆腔恶性肿瘤放射治疗时,膀胱局部遭受放射性损伤而发生的放疗并发症。放射性膀胱炎多见于子宫颈癌或前列腺癌治疗后,直肠或膀胱癌放射治疗后放射性膀胱炎主要表现为:移行上皮剥脱,黏膜溃疡,固有层内急性炎症反应,

血管内血栓形成;病变晚期可有膀胱壁纤维化,罕见情况下有黄色瘤病。组织病理上,急性型可在放射治疗后4~6周出现,慢性型出现在治疗后3个月至10年,通常见于治疗后4年。①急性型:移行上皮局灶性剥脱,残存的移行上皮有不同程度异型性;固有层充血水肿,毛细血管增生,血管内血栓形成,间质玻变及间质细胞不典型增生;严重者可发生坏疽性膀胱炎。②慢性型:慢性血管病变先有血管内皮细胞肿胀和坏死,渐发展为持续性炎细胞浸润,不愈合性溃疡;结合有上皮的增生,血管变化和纤维渗出,有助于与尿路上皮肿瘤鉴别^[6];固有层水肿、玻变及毛细血管扩张;肌层变性坏死可引起间质扩张和瘢痕;特征性的“放射性成纤维细胞”的出现是日后出现明显纤维化的指标。并发纤维化引起的膀胱挛缩以及输尿管狭窄均属晚期表现。

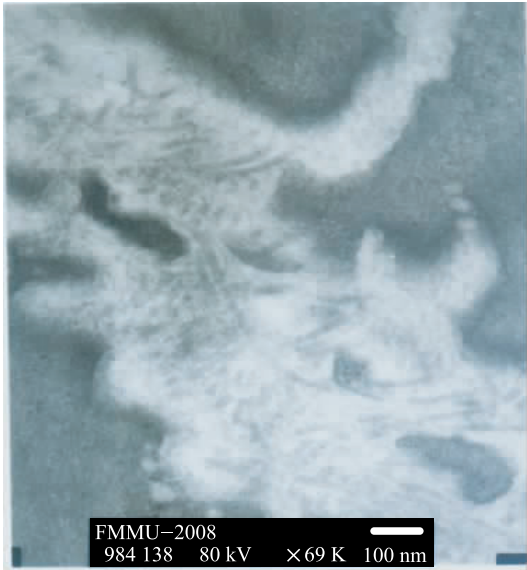


图8 上皮细胞间胶原原纤维

中华人民共和国国家职业卫生标准中,放射性膀胱炎的标准如下,膀胱受照剂量阈值:分次照射膀胱累积剂量>30 Gy,或一次照射和等效一次照射膀胱剂量>12 Gy,即可能出现放射性膀胱炎。主要症状是尿频、尿急、尿痛,有时出现血尿。膀胱镜检查:黏膜充血、水肿及毛细血管扩张。

宫颈癌、前列腺癌、直肠癌及膀胱癌等盆腔恶性肿瘤放射治疗后,可引起不同程度的急、慢性放射性膀胱

炎。其中宫颈癌放疗最常见。它的发生与放射剂量、放射持续时间直接相关,5%接受60 Gy照射的患者和50%接受70 Gy照射的患者会发生放射性膀胱炎^[7]。文献报道,放射性膀胱炎临床发病率一般不超过5%^[8],绝大多数学者认为是1%~2%^[9]。Takam R等^[10]应用文献来源的参数评价。对3D-CRT、近距离放疗等治疗技术的剂量体积和放射损伤进行研究发现,3D-CRT四野照射,2 Gy/次,总剂量74 Gy,膀胱NTCPs (Normal tissue complication probability) 为6.6%。Jerezek-Fossa BA,等^[11]对973例3D-CRT前列腺癌患者急性和晚期毒性反应间的关系研究发现,3D-CRT六野照射($p=0.0002$),剂量>70 Gy ($p=0.014$),和放疗持续时间 ($p=0.05$) 与尿路急性毒性正相关;尿路晚期毒性与急性毒性 ($p<0.0001$) 相关,但与应用salvage radiotherapy ($p=0.018$) 负相关;急性毒性的严重性预示晚期毒性的严重性。Ballare A,等^[12]对104个T1b-T3b期前列腺癌患者,应用3D-CRT治疗,2 Gy/次,74 Gy。治疗后跟踪中位时间30月(20月~50月),急性和晚期膀胱放射损伤发生率分别为12.5%和2.0%。国内外研究研究表明在较高剂量才会出现放射性膀胱损伤,研究局限于损伤的临床表现和病理改变,鲜有对低剂量下膀胱状况的观察,尤其是超微结构的观察。

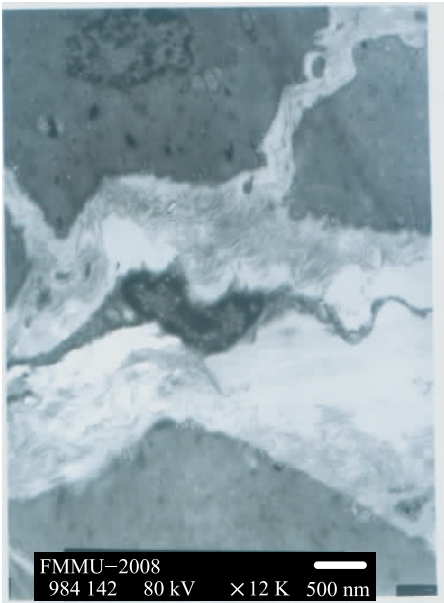


图9 上皮细胞间特征性放射性成纤维细胞

本研究采用 3D-CRT 四野照射, 单次剂量 2 Gy, 每周 5 次, 总剂量 14 Gy 的方案照射前列腺。膀胱最大累积受照剂量 (13.91 ± 0.4302) Gy, 10%、20%、30%、40%、50% 体积累积受照剂量分别为 (12.43 ± 0.59)、(8.43 ± 0.61)、(4.53 ± 1.60)、(3.48 ± 1.57)、(0.82 ± 0.21) Gy, 剂量显著低于放射性膀胱炎的剂量阈值。临床观察, 照射前、后排尿无明显改变, 未给予任何药物等处理, 根据 RTOG 急性放射损伤分级标准为 (0~1) 级放射损伤。膀胱组织 HE 染色光镜、扫描和透射电镜观察可见: 膀胱上皮细胞有脱落, 遗留空穴, 平滑肌紊乱, 部分纤维裸露, 胶原原纤维增生, 尤其是特征性放射性成纤维细胞出现预示膀胱纤维化。本研究结果提示, 在低于目前公认的膀胱损伤照射剂量阈值时, 不可逆的损伤已经出现。

放射性膀胱炎是一种难以逆转的放疗并发症, 临床治疗难以彻底治愈, 治疗方法无统一标准。研究膀胱损伤与剂量的关系, 预防放射损伤更为重要。

参 考 文 献

- 1 马景禄, 刘君丽. ^{192}Ir 尿道内放射治疗良性前列腺增生 31 例报道. 中华男科学杂志, 2005; 11(4): 303—305
- 2 吴月明. 放射治疗老年前列腺增生症排尿困难 3 例报告. 锦州医学院学报, 2002; 23(2): 44—45

- 3 郝树铭, 郝传国, 宋明山, 等. X 线立体定向放射治疗前列腺增生 (附 30 例报告). 中华男科学杂志, 2002; 16(3): 248
- 4 姜 萍. 60 例老年性前列腺增生症 X 线立体定向放射治疗研究. 中国医药指南, 2008; 6(16): 457—458
- 5 梁 军, 赵品婷, 邵秋菊, 等. 立体定向放射治疗技术在前列腺增生症治疗中的应用探索. 现代肿瘤医学, 2008; 16(10): 1735—1736
- 6 Chan T Y, Epstein J I. Radiation or chemotherapy cystitis with pseudo-carcinomatous features. Am J Surg Pathol, 2004; 28: 909—913
- 7 夏同礼. 现代泌尿病理学. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 243
- 8 Crew J P, Jephcott C R, Reynard J M. Radiation induced hemorrhagic cystitis. Eur Urol, 2001; 40(2): 111—123
- 9 Ferrer Puchol M D, Borrel P A, Gil R J, *et al.* Severe hematuria caused by radiation cystitis. Selective percutaneous embolization as an alternative therapy. Actas Urol Esp, 1998; 22(6): 519—523
- 10 Takam R, Bezak E, Yeoh E E, *et al.* Assessment of normal tissue complications following prostate cancer irradiation: comparison of radiation treatment modalities using NTCP models. Med Phys, 2010; 37(9): 5126—5137
- 11 Jereczek-Fossa B A, Zerini D, Fodor C, *et al.* Correlation between acute and late toxicity in 973 prostate cancer patients treated with three-dimensional conformal external beam radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2010; 78(1): 26—34
- 12 Ballare A, Di Salvo M, Loi G, *et al.* Conformal radiotherapy of clinically localized prostate cancer: analysis of rectal and urinary toxicity and correlation with dose-volume parameters. Tumori, 2009; 95(2): 160—168

The Study of the Bladder Injury in Three-dimensional Conformal Radiation Therapy for Benign Prostatic Hyperplasia

SHAO Qiu-ju¹, QI Yu-hong¹, WANG Xu-xia², WANG Chun-mei³, YU De-quan¹

(Department of Radiotherapy¹, Department of Gastroenterology², Department of Electron

Microscopy Center³, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, P. R. China)

[Abstract] To observe the bladder injury in the three-dimensional conformal radiation therapy of spontaneous canine benign prostatic hyperplasia, and to provide a basis for clinical, eight qualified BPH male canine models which were (7—15) year-old were chosen. The prostate directly exposed to 3-DCRT. The whole prostate of per animal was the target and surrounded by 90% isodose curve, and was subjected to irradiation of 6 MV X-ray by 2 Gy per time and the total dose of 14 Gy. The bladder volume and dose of irradiation were measured with DVH. 1

(下转第 6572 页)

研究. 实用肿瘤杂志, 2008; 23(4): 310—314

6 黄益玲, 黄力鸣, 等. 天花粉蛋白对人宫颈癌 HeLa 细胞增殖和细胞凋亡的影响. 中国药理学通报, 2005; 21(2): 253—254

7 代二庆, 张明华, 等. 中药调控肿瘤细胞凋亡机制研究进展. 武警医学院学报, 2008; 17(11): 1009—1011

8 朱艳琴. 苦参素诱导人胃癌细胞系 MGC—803 凋亡的研究. 中国社区医师, 2006; 8(20): 21—22

9 陈必新, 唐万和, 王 扬, 等. 央芪汤对胃癌凋亡的实验研究. 现代中西医结合杂志, 2010; 19(3): 272—274

Effect of Shengyangshiweiwan on Cell Apoptosis and Cell Cycle in Gastric Cancer

DENG Xiu-ling¹, WANG Dong² LIU Shu-ping¹

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Inner Mongolia Medical College¹, Hohhot 010059, P. R. China; Department of Neurology, Inner Mongolia People's Hospital², Hohhot 010017, P. R. China)

[Abstract] To studay the effect of Inner Mongolia Drug Shengyangshiweiwan on cell apoptosis and cell cycle in humand gastric cancer MGC—803 cell, MTT assay was used to examine the proliferation inhibitory effect of shengyangshiweiwan on MGC—803 cell, and calculate the inhibitory rate of growth. Morphologic changes of apoptosis were observed by reverse discrepancy and offluorescent light microscope; flow cytometry was used to analysis cell cycle. MTT assay showed that shengyang has proliferation inhibiting effect on MGC—803 cell in dose and time dependent manners. The cells treated with shengyang (2.5 mg/mL) for 48 hours showed characters of apoptosis under light microscope. An ‘sub-G₁ peak was detected by flow cytometry, the result analysis of cell cycle indicated that the number of cells of S phase increased, that of G₀/ G₁ and G₂/M phase decreased after treatment on MGC—803, it was arrested S phase. It is concluded that shengyang has proliferation inhibiting effect and may induce apoptosis in gastric cancer MGC—803 cell in a certain dose range, which may be one of the antitumor mechansim.

[Key words] Shengyangshiweiwan gastric cancer cell apoptosis cell cycle



(上接第 6568 页)

month after irradiation, the exposed bladder next to the prostate and non-irradiated regions of the bladder (as control) were taken as biopsy. The bladder biopsy for optical microscopy, scanning and transmission electron microscopy. It is resulted that after irradiation, no significant change of urinating occurred, and drugs, treatment were not given. According to RTOG acute radiation injury standard, the damage were evaluated as grade 0 to 1. Compared with the pre-irradiation, it could be seen by optical microscopy obvious necrosis, disorganization, suspension off of the epithelial cells and hole left behind the partial detachment of the epithelial cells, the disordered muscle and bare fiber. It could be seen by transmission electron microscope: the connection of damaged, epithelial cells detached, proliferation of collagen fibrils and radiation fibroblasts. It is concluded the pathological change of radio-cystitis such as necrosis and shedding of epithelial cells, collagen proliferation, and radiation fibroblasts occurred after irradiation in the dose lower than the currently accepted thresholds.

[Key words] three-dimensional conformal radiation therapy bladder injury canine