

# 鼠脑胶质瘤模型制作方法的改良

李承晏<sup>1</sup>,李 涛<sup>1</sup>,李玲莉<sup>2</sup>,吴国祥<sup>1</sup>

**摘要:**目的 建立简单易行、稳定的鼠 C6 脑胶质瘤模型。方法 SD 鼠 20 只,脑立体定向仪定向注射 C6 细胞至鼠脑尾状核,接种后 1、2、3、4 周 MRI 测量肿瘤大小,每日观察鼠体重变化,处死后大体解剖和病理组织学检查。结果 MRI 平扫见脑组织水肿明显,MRI 增强可见肿瘤组织明显强化,中线移位,侧脑室受压或消失。颅内接种后星形细胞胶质瘤呈 1、2、3、4 级不等。结论 静脉注射套管针接种 C6 细胞,取材方便,简单易行,腹腔注射造影剂可获得较好的增强效果。

**关键词:**胶质瘤;动物模型;C6 细胞

中图分类号:R73-35<sup>1,2</sup> 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2001)06-0432-02

## Animal Models for Brain Tumor

LIChen g-yan, LITao, LILin g-li, et al

Neurology Department, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

**Abstract:** Objective To establish the brain glioma model of rats. **Methods** C6 cells were implanted in brains of twenty rats by stereotaxic direction. The volume of the glioma was measured by MRI after one, two, three, and four weeks and the weight was measured every day. When the rats were sacrificed, the general anatomic and pathological changes were observed. **Results** Gliomas grew in the brain presented different types. **Conclusion** Trocar form main line is easy to get and also very convenient for implanting C6 cells. Intra-peritoneal injection of GDPA can obtain good enhancement effect. The growth characters of brain glioma of rats were basal accorded with human brain glioma, the growth is steady, and no extracranial shift has been opened.

**Keywords:** Glioma; Animal model; C6 cells

在进行各类脑胶质瘤治疗研究时,如何能简便、经济、快捷的制作鼠脑胶质瘤模型成为研究的基础,本方法对以往的模型制作方法进行了改进,并观察了其生长特性,MRI 影像学特征及病理学特点,现报道如下:

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 大鼠神经胶质瘤细胞 C6 购自上海细胞所,DMEM 培养基为 GIBICO/BRL 公司产品,新生小牛血清为亚法公司产品。

1.1.2 雄性 SD 大鼠 20 只,体重(100~150)克,购自湖北省医药工业研究所。

1.1.3 仪器 江湾 立体定向仪(上海产),Philips GyroscanT5-NT0.5T 磁共振机。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 C6 细胞在含 10% 新生小牛血清的 DMEM 培养基中,5% CO<sub>2</sub>,37% 条件下培养。

1.2.2 模型制作 SD 大鼠经 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(35mg/kg)后,固定于立体定向仪上,沿头正中略偏右纵向切开头皮,暴露颅骨标志,在矢状缝右旁开 3mm, 前后囱中点前 1mm 处用牙钻钻一骨孔。用静脉注射套管针抽取 50ul C6 细胞悬液,垂直固定于立体定向仪上,经骨孔垂直于颅骨外板进针 6mm, 回退 1mm<sup>[1]</sup>, 待细胞基本沉淀后(细胞与培养基之间界限清楚),以 1ul/min 的速度推注 20ul, 留置 15min, 拔出内芯,再留置 5min, 塞住套管口, 缓慢拔出套管, 缝合头皮, 肌注青霉素 1 万 U。

1.2.3 鼠脑 MRI 检查 术后 1、2、3、4 周分别作 MRI, 用 TMJ 环行表面线圈, 距阵 512 × 256, T<sub>2</sub>WI 采用 TSE 序列 (TR3000ms, TE120, 层厚 1mm, 层间距 0), T<sub>1</sub>WI 采用 TFE 序列 (TR30ms, TE13ms, 翻转角 30°, 层厚 1mm, 层间距 0), 腹腔注射钆喷替酸葡甲胺(1ml 含钆喷替酸葡甲胺 0.469 g)后作增强扫描, 均 3D 采集, 容积成像。

1.2.4 观察体重 种植肿瘤细胞日起每日测量体

收稿日期:2001-01-09;修回日期:2001-10-22

基金项目:湖北省自然科学基金资助项目(SJ-97J069)

作者单位:430060 武汉大学人民医院神经内科,2. 急诊科

重观察其变化。

1.2.5 病理学检查 濒死鼠经过量戊巴比妥钠处死后取脑,固定在 10% 甲醛溶液中 1~2 个月,完全固定后制成 2mm 厚的冠状切片,部分 HE 染色,常规病理检查。

## 2 结果

2.1 肿瘤大小与生长时间的关系 见表 1, MRI 平扫见脑组织水肿明显,MRI 增强可见肿瘤组织明显强化,中线移位,侧脑室受压或消失(图 1)。20 只鼠均未发生颅外转移。

表 1 20 只不同时间(周)与瘤体变化及生存率的分析

观察时间(周)	瘤体直径(cm)	平均直径(cm)	病死鼠数(只)	病死率(%)	生存概率(%)
1	1~2	1.5	0	0	100
2	3~6	4.5	1	5.00	95.00
3	4~9	6.5	6	35.00	65.00
4	6~11	8.5	9	80.00	20.00
5	9~13	11	4	100.00	0.00
合计		5.25	20	100.00	

直线相关与回归分析结果如下:

时间与瘤体大小的关系:  $r = 0.99$ , 呈高度正相关;  $Y = -0.5 + 2.3X$ ,  $t_r = 13.28$ ,  $P < 0.01$ , 差异有高度显著性。

瘤体大小与生存率的关系:  $r = -0.9826$ , 呈高度负相关;  $Y = 160.92 - 15.202X$ ,  $t_r = 7.468$ ,  $P < 0.05$ , 差异有显著性。

2.2 生存期 第 2 周死亡 1 只,第 3 周死亡 6 只,第 4 周死亡 9 只,余 4 只在第 5 周内死亡,最短生存期 14 天,最长生存期 32 天。

2.3 鼠体重变化与生存期的关系 植入肿瘤细胞后,5 只体重下降,并于 3 周内死亡,余 15 只体重先下降 1~2 天,后上升,再下降,并于再下降后 3~8 天内死亡。另外,3 只鼠死亡前出现偏瘫症状。

2.4 病理检查 10% 甲醛溶液固定后鼠脑整体观见种植肿瘤细胞侧大脑半球较对侧大,沿接种点冠状切开后肉眼能区分肿瘤组织与正常脑组织并见到不同分化程度的肿瘤细胞。星形细胞胶质瘤 级:瘤细胞较稀疏,分布不均,胞浆较少,核大小不一,形状不规则,未见核分裂像。胶质纤维较少,可见有囊性变。血管较多,内皮细胞不增生;星形细胞胶质瘤 级:瘤细胞密集,大小不一致,核染色深,个别区域见有少许核分裂像。胶质纤维少,可见有增生的血管。未见明显的出血坏死;星形细胞胶质瘤 级:瘤细胞密集,有明显的异形性,部分细胞呈圆形,部分细胞呈梭型,细胞核较大,核仁清楚,可见有瘤巨细胞及明显病理性核分裂像,胶质纤维少,细胞有灶性坏死,血管明显增生;星形细胞胶质瘤 级:瘤细

胞密集,有明显的异形性,大部分细胞呈梭型,细胞大小不等,形状不一,有小灶性坏死,可见有胶质纤维,血管增生,血管壁玻璃样变(图 2~5)。

## 3 讨论

C6 细胞是经 N- 亚硝基甲脲 (N-nitrosomethylurea) 诱发的鼠脑胶质瘤细胞,与大鼠脑组织有很好的相容性,种植成功率高,肿瘤生长快,其生长特点与人脑胶质瘤较为接近,是制作大鼠脑胶质瘤模型的理想细胞。

理想的脑肿瘤动物模型应具备以下特点:(1)模型的肿瘤必须由该脑肿瘤细胞组成;(2)肿瘤的生长率和恶性特征应可预测和可复制;(3)肿瘤的诱导时间较短时间标准化;(4)应有与自发生长的脑肿瘤一样的生长和浸润特性,有新生血管形成,没有囊包裹,无皮下、硬膜外和硬膜下转移;(5)肿瘤体外培养能生长,且对实验人员无害;(6)脑肿瘤模型对治疗的反应必须模仿人类脑肿瘤<sup>[2]</sup>。

本实验采用静脉注射套管针,取材方便,细胞在内芯上管内沉淀后的浓度较恒定,约为  $1 \times 10^8/\text{ml}$ ,每只鼠注射 10ul,约为  $2 \times 10^6$  个细胞,从而可避免调节细胞浓度,缩短操作时间,并保持植入细胞数基本相同。肿瘤细胞沿进针道向颅外转移是该模型的不足之处,国内外学者多采用留置永久性不锈钢导管或聚乙烯导管的方式。本实验采用细胞沉淀后再注射的方法,能量大程度的浓缩细胞,减小注射体积,并适时延长注射时间和注射后留针时间,先拔出内芯,塞住套管后再拔出套管,不需在颅内留置导管,也能有效防止肿瘤颅外转移,从而更符合脑胶质瘤的自然生长状态。本实验表明 C6 细胞种植 1 周时,MRI 即可观察到瘤体。

尾静脉注射钆喷替酸葡甲胺操作较困难,成功率不高。本实验采用腹腔注射钆喷替酸葡胺的方法,操作方便,可重复多次注射,比较腹腔注射 1ml/kg、2ml/kg、2.5ml/kg、3ml/kg、4ml/kg 钆喷替酸葡甲胺后的增强效果,发现注射 2~3ml/kg 时增强效果较好,与尾静脉注射比较无差异。

本实验鼠大部分自然生存期为 3~4 周,少数可存活近 5 周,较其它学者报道的生存期略长。我们发现鼠种植肿瘤细胞后体重变化与生存期有一定的关系,种植肿瘤细胞后体重先开始下降者自然生存期短,而体重下降 1~2 天后再上升者,自然生存期较长。这可能与鼠免疫能力、代偿能力的个体差异有关。

C6 细胞植入鼠脑后,瘤细胞的分化程度不一,表现为 、 、 、 级星形细胞瘤等,这与胶质瘤患者复发时胶质瘤的分化程度与首发时的分化程度可

(下转第 453 页)

TGF- RI 表达阳性组的胃癌患者术后累计生存率显著高于表达阴性组。

### 3 讨论

TGF- 受体是存在于细胞表面上的一种跨膜糖蛋白,广泛存在于正常细胞表面<sup>[1]</sup>。PCNA 是真核细胞 DNA 聚合酶的辅助蛋白,合成于晚 G1 期和 S 期,对 DNA 复制起重要作用<sup>[3]</sup>。TGF- 对人的多种类型上皮细胞及其所发生的肿瘤多表现为抑制作用<sup>[4]</sup>。其抑癌信号通过细胞表面的受体传导。而癌细胞的生物学特性之一也正是由于受体缺失或性质改变,失去 TGF- 的生长抑制反应。故 TGF- 受体可被看作是一种抑癌基因<sup>[5]</sup>。

#### 3.1 TGF- RI 与胃癌发生的关系

本研究结果表明:正常胃粘膜 TGF- RI 表达阳性,癌前病变有较低的低表达率,而一旦胃粘膜发生癌变(早癌),阳性表达率逐渐下降,至进展期胃癌表达率跌入最低谷。同时检测胃癌 TGF- RI 表达与胃癌组织中 PCNA 表达有明显相关,其强度随着 PCNA 染色分级的升高而降低。上述这两种趋势显示:随着胃粘膜由良性向恶性转变,同时随着胃癌增殖程度增高,细胞表面逐步丧失功能性 TGF- RI,从而 TGF- 抑制信号不能传入细胞内,导致细胞增殖、恶变,可能在形成胃癌中发挥重要的作用。

#### 3.2 TGF- RI 与老年胃癌生物学行为的关系

Ito 等<sup>[4]</sup> 报告 82% 胃癌显示 TGF- RI 减少和低水平的 TGF- RI 受体抑制成分结合蛋白,这些常与肿瘤浸润深度有关,而与组织学类型无关。本文对 61 例老年胃癌的研究结果显示:随着胃癌组织浸润胃壁深度的进展,TGF- RI 表达阳性率逐渐降低,我们的结果与文献报道基本相符。伴有区域淋巴结

转移的胃癌原发灶癌组织 TGF- RI 表达阳性率显著低于淋巴结无转移者。原发灶 TGF- RI 表达与临床病理分期呈负相关。尽管 TGF- RI 表达与远处转移无关,统计学检验未达到显著性意义( $P > 0.05$ ),可能与病例数不够有关,如增加病例或许能说明此问题。结果提示:TGF- RI 在老年胃癌浸润和淋巴结转移中发挥重要作用。

#### 3.3 TGF- RI 的表达在老年胃癌预后判断方面的价值

本研究结果显示:TGF- RI 表达与老年胃癌患者术后预后密切正相关。TGF- RI 表达阳性组患者术后 3 年、5 年累计生存率分别为 86.31%、53.68%;TGF- RI 表达阴性组患者术后 3 年、5 年累计生存率分别为 37.21%、18.21%,经统计学检验均具有显著性意义,说明 TGF- RI 表达阳性的胃癌患者预后较好。

#### 参考文献:

- [1] LinHY,LodishHF.Receptors for the TGF- $\beta$  superfamily: multiple ploypeptides and serine/threonine kinases[J].Trends Cell Biol,1993,3:14-19.
- [2] 官国先,张祥福,杨发端,等.TGF- $\beta$  R 在直肠癌中的表达及其临床意义[J].中国肿瘤临床,1998,25(12):893-895.
- [3] WaseemNH,laneDP.Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA): structural conservation and the detection of anucleolar form[J].J Cell Pathol,1990,96:121-124.
- [4] ItoM,YasuiW,NakayamaH,etal.Reduced levels of transforming growth factor- $\beta$  type I receptor in human gastric carcinomas[J].Cancer Res,1992,52:295-300.
- [5] Marshall,CJ.Tumorsuppressor genes[J].Cell,1991,64:313-326.

(李奇明校对)

#### (上接第 433 页)

能不一样甚为相似。考虑与鼠的个体差异有关,其机制有待于进一步研究。

与急性脑梗塞脑内血肿模型不同,仅 3 只鼠在死亡前出现偏瘫,即使肿瘤体积较大,水肿明显、中线移位时也少有偏瘫症状。除了病因的差异以外,可能与胶质瘤逐渐长大,鼠脑的代偿能力强有关。

静脉注射套管针接种 C6 细胞取材方便,简单易行,腹腔注射造影剂可获得较好的增强效果,建立的鼠脑胶质瘤模型基本符合人脑胶质瘤的生长特

性,生长稳定,无颅外转移。荷瘤鼠体重变化与生存期有一定的关系。(本文图见封 2)

#### 参考文献:

- [1] Morreale VM,herman B,Hand D,Minassian V,etal.A brain tumor model utilizing stereotactic implantation of permanent cannula[J].J Neurosurg,1993,78(6):959-965.
- [2] Peterson DL,Sheridan PJ,Brown WE,etal.Animal models for brain tumor,historical perspective and future directions[J].J Neurosurg,1994,80(5):865-876.

(贺文校对)

## 三氧化二砷对人肝癌细胞增殖和超微结构的影响

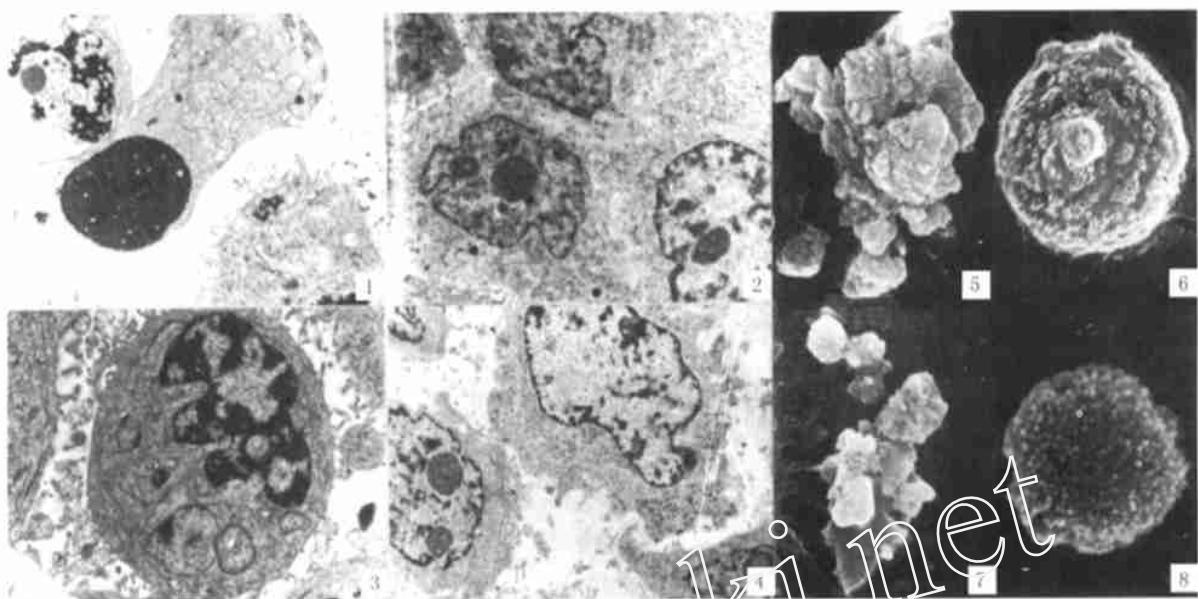


图1 透射电镜下观察 (×7500倍), 2 $\mu$ g/ml As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>注射液作用48h后的QGY-7701细胞, 细胞凋亡, 可见核固缩

图2 透射电镜下观察 (×7500倍), QGY-7701细胞对照组, 细胞核大, 核仁清楚

图3 透射电镜下观察 (×7500倍), 2 $\mu$ g/ml As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>注射液作用48h后的QGY-7703细胞, 细胞凋亡, 可见核固缩聚集于核膜内侧

图4 透射电镜下观察 (×6000倍), QGY-7703细胞对照组, 细胞核大, 核仁清楚, 表面微绒毛丰富

图5 扫描电镜下观察 (×6000倍), 2 $\mu$ g/ml As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>注射液作用48h后的QGY-7701细胞, 细胞凋亡, 可见细胞外形不规则, 表面有塌陷破损, 微绒毛消失

图6 扫描电镜下观察 (×14000倍), QGY-7701细胞对照组, 细胞成规则球形, 有丰富微绒毛

图7 扫描电镜下观察 (×6000倍), 2 $\mu$ g/ml As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>注射液作用48h后的QGY-7703细胞, 细胞凋亡, 可见细胞体积肿胀, 外形不规则, 表面有塌陷破损, 微绒毛消失

图8 扫描电镜下观察 (×25000倍), QGY-7703细胞对照组, 细胞成球形, 表面完整, 有丰富微绒毛

## 鼠脑胶质瘤模型制作方法的改良

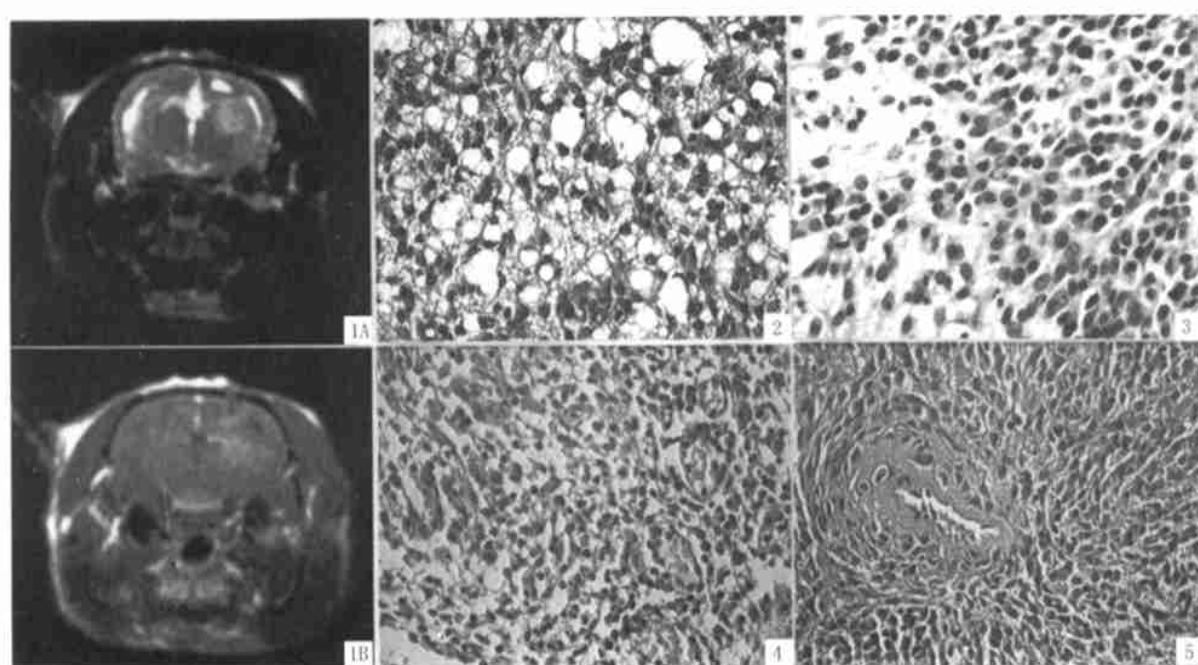


图1 T<sub>1</sub> (A): 增强 (B)

图3 星形细胞胶质瘤Ⅱ级 (HE × 400)

图5 星形细胞胶质瘤Ⅳ级 (HE × 400)

图2 星形细胞胶质瘤Ⅰ级 (HE × 400)

图4 星形细胞胶质瘤Ⅲ (HE × 400)