

## 亲细胞非均质分子脂质对人脑胶质瘤细胞的作用

顾宇翔 陈街城 王宇倩

复旦大学附属华山医院神经外科(200040)

关键词 胶质瘤细胞 亲细胞非均质分子脂质 脑

**摘要** 目的:检测不同浓度亲细胞非均质分子脂质(CHML)对人脑胶质瘤细胞的抑制效果。方法:将指数生长期的 SHG-44 胶质瘤细胞分 7 组,在 1~5 组分别加入浓度 CHML-6.0 为 500  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  的 CHML 复合液,第 6 组加 VM26,第 7 组加培养液作对照。于 24、48、72 h 加入 MTT 反应,测定 OD 值。结果:各药物组与对照组的 OD 值之间差别均有极显著的意义,其中两两比较检验表明 500  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  组的肿瘤抑制率优于 VM26 组。结论:CHML 对人脑胶质瘤细胞有显著抑制作用,并有一定剂量-效应关系,尤其是 500  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  和 200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  的药物组作用更为突出。

**Effect of Cytotropic Heterogenous Molecular Lipid in Human Gliocytoma** GU Yu-Xiang, CHENG Xian-Cheng, WANG Yu-Qian Department of Neurosurgery, Huashan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040

**KEY WORDS** gliocytoma cytotropic heterogenous molecular lipid (CHML) brain

**ABSTRACT** **Aim:** To detect the influence of CHML at different concentrations in human gliocytoma. **Methods:** OD values of human gliocytoma cell SHG-44, which were divided into 7 groups, were measured at 24,48,72 h after MIT. CHML-6.0 at the concentrations of 500  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  were methylated in the 1st~5th groups, VM26 methylated in the 6th group and inoculum methylated in the 7th group. **Results:** The OD values of the 1st~6th groups were statistically significant difference compared with the 7th group. The tumor suppression rates of 500  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  and 200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  groups were better than the rate of VM26 group. **Conclusion:** These data indicate that CHML caused suppression of gliocytoma growth and there was a correlation between the dose and effect. The growth suppression at the 500  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  and 200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  concentrations were evident especially.

亲细胞非均质分子脂质 (cytotropic heterogenous molecular lipid, CHML) 是脂质类抗癌新药。本实验应用 MTT(四氟甲基唑蓝)法检测 CHML 对体外人脑胶质瘤的作用效果。

### 材料与方 法

**胶质瘤细胞** 采用苏州医学院提供的人脑恶性胶质瘤体外细胞系 SHG-44,其材料来源于女性 32 岁患者,额叶星形 II~III 级,培养于 37℃,5% CO<sub>2</sub> 贺利 BB<sub>16</sub> 气体培养箱的含 20% 小牛血清 RPMI 1640 (GIBCO) 培养液中。

**药物** CHML 由美国高立食品药品有限公司提供,两种型号分别为 CHML-6.0 和 CHML-6.1。该两种型号需配制成复合液同时使用,以加强药效和减少抗药性,用 5% 葡萄糖生理盐水配制成各种浓度的

CHML-6.0 和 CHML-6.1 的复合液。因复合液中 CHML-6.0 和 CHML-6.1 的浓度比恒定,所以实验中所采用的复合液的浓度以 CHML-6.0 的浓度来表示。表鬼白毒噻吩糖苷(替尼泊昔 Teniposide, VM26)由百时美施贵宝公司生产,本试验所用浓度为其血浆峰浓度(plasma peak concentration, PPC) 30  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。

**试剂** 四氟甲基唑蓝[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] MTT, Sigma, 用 pH 7.2 的磷酸缓冲液(PBS)配成 4  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  的溶液,过滤除菌,-4℃避光保存。甲脂溶解液为含 0.01  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸的 10% SDS(Serva)。

**方法** 将指数生长期的 SHG-44 胶质瘤细胞用含血清的培养液将其配制成每毫升含 10<sup>5</sup> 数量级的细胞悬液,按每孔 100  $\mu\text{l}$  接种于 96 孔培养板中,共计 21 孔。接种 24 h 细胞贴壁后,将 21 孔分成 7 组,每组 3

[文章编号] 1008-0678(2001)03-0256-03 [中图分类号] R730.269 [文献标识码] A

[作者简介] 顾宇翔(1972-),男,江苏省南通市人,硕士,复旦大学附属华山医院神经外科主治医师,从事脑恶性肿瘤方面研究

个孔。第1~5组为不同浓度的CHML组,每孔分别加入CHML-6.0和SHML-6.1的复合液及相应量的培养液,共100 μl,以使1~5组的CHML-6.0浓度分别为500 μg·ml<sup>-1</sup>,200 μg·ml<sup>-1</sup>,100 μg·ml<sup>-1</sup>,50 μg·ml<sup>-1</sup>,20 μg·ml<sup>-1</sup>,第6组加入VM26及相应量的培养液,浓度为30 μg·ml<sup>-1</sup>,第7组加入培养液100 μl作为对照组。培养24 h后弃去上清液,每孔中加入20 μl的MTT,再培养4 h各加入100 μl甲脂溶解液。在37℃恒温下震荡5 min,待结晶充分溶解后置于BIO-RAD 318 MC型

酶标仪上,测定各孔在570 nm波长处吸光度OD值。按同法另制成2块培养板分别加入不同浓度CHML液后培养48,72 h再加入MTT反应,测定OD值,检测不同浓度药物在不同时间对SHG-44人脑胶质瘤细胞的作用。

**统计学处理** 不同药物组在不同时间的3孔OD值的平均值见表1,采用随机区组的方差分析,再进一步对各组作两两比较(Student-Newman-Keuls法)。

表1 不同时间不同浓度CHML液的OD平均值  $\bar{x} \pm s$

	500 μg·ml <sup>-1</sup> 组	200 μg·ml <sup>-1</sup> 组	100 μg·ml <sup>-1</sup> 组	50 μg·ml <sup>-1</sup> 组	20 μg·ml <sup>-1</sup> 组	VM26组	对照组
24 h	0.0060 ± 0.002647	0.0630 ± 0.008544	0.0817 ± 0.009074	0.0897 ± 0.004042	0.0957 ± 0.028589	0.0560 ± 0.005	0.1183 ± 0.004509
48 h	0.0080 ± 0.001732	0.0277 ± 0.008021	0.0800 ± 0.001723	0.0817 ± 0.004163	0.0890 ± 0.002	0.0410 ± 0.003606	0.4310 ± 0.062554
72 h	0.0263 ± 0.014503	0.0583 ± 0.032145	0.0977 ± 0.004042	0.0843 ± 0.003055	0.0947 ± 0.003055	0.0667 ± 0.003215	0.5633 ± 0.095259

### 结 果

实验表明24 h、48 h、72 h的各药物组与对照组的OD值之间差别均有极显著的意义( $P < 0.01$ )。随着药物浓度的增加肿瘤细胞生长抑制率有提高的趋势。两两比较检验表明500 μg·ml<sup>-1</sup>组与200 μg·ml<sup>-1</sup>组之间差异不显著( $P > 0.05$ ),500 μg·ml<sup>-1</sup>组与100 μg·ml<sup>-1</sup>,50 μg·ml<sup>-1</sup>,20 μg·ml<sup>-1</sup>组间差别有显著性( $P < 0.01$ )。与VM26组比较;500 μg·ml<sup>-1</sup>、200 μg·ml<sup>-1</sup>组OD值低于VM26组,其中500 μg·ml<sup>-1</sup>组在24 h OD值与其有显著差异( $P < 0.05$ ),在72 h  $P$ 值为0.0662略大于0.05。其余各CHML浓度组OD值高于VM26组。此外,同一浓度的不同用药时间的OD值相比,24 h与72 h点有极显著差异( $P < 0.01$ )。

### 讨 论

神经胶质瘤是成人颅内最常见的原发肿瘤,传统的治疗方法仍不能从根本上改变这一难治性肿瘤的自然转归,恶性胶质瘤的复发很难避免,而一旦复发在数月至数月内患者的病死率可达100%。因此,胶质瘤的生存率及中位生存期等预后指标近20年来几乎没有改善<sup>[1,2]</sup>。

CHML是针对增殖的癌细胞比正常细胞需要更多脂质维持其生长的特性设计的。已进行的研究表明,CHML是针对增殖的癌细胞比正常细胞需要更多脂质维持其生长特性设计的。CHML可选择性激活肿瘤细胞的P<sub>53</sub>通道,并由此促使各种肿瘤细胞(乳腺癌MCF-7,结肠癌RKO,白血病ML-1)的凋亡。同时CHML也可不经过P<sub>53</sub>通道促使肺癌细胞H1299凋亡。由于肿瘤细胞对CHML的敏感性远胜于非肿瘤细胞,因此

CHML较其他临床应用的抗肿瘤药物不良反应要小得多。虽然这种超敏感性和抗瘤性的确切机制并不十分明确,但它在临床上已表现出对乳腺癌、皮肤癌、直肠癌、肺癌的良好抗癌效果<sup>[3]</sup>。目前,国内外尚无CHML对人脑胶质瘤细胞作用的研究。

MTT比色法是一种能客观检测细胞活力的细胞生化方法,由于吸光度OD值与活性细胞数呈良好的线性正相关,故对化疗药物敏感性预测的准确率高<sup>[4-6]</sup>。本实验以MTT法检测体外培养的SHG-44人脑胶质瘤细胞对CHML的敏感性,结果表明CHML对人脑胶质瘤细胞有显著抑制作用,促使其凋亡,并有一定剂量-效应关系,尤其是500 μg·ml<sup>-1</sup>药物组作用更为突出。VM26是目前临床上较为常用的脑胶质瘤化疗药物,与亚硝胺类药物联合应用已经取得了较好的临床疗效。虽然VM26相对其他化疗药物安全、毒性低,但仍可能导致严重的骨髓抑制、感染或出血。因此对于严重白细胞减少或血小板减少患者应用即受到限制<sup>[7,8]</sup>。实验结果表明500 μg·ml<sup>-1</sup>、200 μg·ml<sup>-1</sup>组疗效要优于VM26组,由于CHML为非均质分子脂质,符合高脂溶性、分子量小、非离子化、作用时间短、能通过血脑屏障、对正常脑组织毒性小抗胶质瘤药物的理想要求。因为500 μg·ml<sup>-1</sup>与200 μg·ml<sup>-1</sup>组间无显著差别,我们认为可以选用500 μg·ml<sup>-1</sup>或200 μg·ml<sup>-1</sup>作为动物载瘤模型及临床脑胶质瘤的治疗浓度。药物作用24 h与72 h OD值有显著性差异可能是由于CHML半衰期短,动物试验表明其血浆半衰期为45 min,72 h有93.8%的CHML被代谢排出体外,提示药物的用药周期可为72 h。这为进一步研究CHML对实验动物和临床患者的胶质瘤浓度的选择提供了初步的理论依据。

### 参考文献

1. Lesser GJ, Grossman S. The chemotherapy of high-grade astrocytomas[J]. *Semin Oncol*, 1994; 21: 220-235
2. Mak M, Fung L, Strasser JF, et al. Distribution of drugs following controlled delivery to the brain interstitium[J]. *J Neuro Oncol*, 1995; 26: 91-102
3. Qimin Z, Zheng X. Chml suppresses cell growth and induces apoptosis in multiple human tumor lines[J]. *Anticancer Res*, 1999; 19: 1-7
4. Sargent JM, Taylor CC. Appraisal of the MTT assay as a rapid test of chemosensitivity in acute myeloid leukaemia[J]. *Br J Cancer*, 1989; 60: 206-211

5. Tonn JC, Schachenmayr W, Kraemer HP. In vitro chemosensitivity test of malignant gliomas; clinical relevance of test results independent of adjuvant chemotherapy[J]? *Anticancer Res*, 1994; 14: 1371-1376
6. 刘宇军, 王国民, 贾永锋, 等. MTT法在榄香烯乳对人膀胱癌 T<sub>24</sub>细胞体外实验中的应用[J]. *上海医科大学学报*, 1997; 24: 127-129
7. 史志东, 胡裕全, 单鸿, 等. 脑动脉灌注 VM26 联合口服 CCNU 治疗脑胶质瘤[J]. *中山医科大学学报*, 1998; 19: 217-219
8. 汪求精, 李铁林, 耿传志, 等. 替尼泊武-司莫司汀序列给药治疗恶性脑胶质瘤[J]. *第一军医大学学报*, 2000; 20: 329-330

(1999-11-29 收稿 2001-07-16 修回)

## 1 例罕见的睁闭眼“失用症”

韩杰\* 梁战华 雷征林 孙晓培

大连医科大学附属第一医院神经内科(116011)

\* 中山医科大学附属第一医院(510120)

**临床资料** 患者男性, 51岁, 右利手, 烧锅炉工人。以突发左侧肢体活动不灵, 言语不清 3 h 于 2000年 3月 5日收入院。该患者值一宿夜班, 晨 6 时许准备去洗脸时突然倒地, 左侧肢体活动不灵, 言语不清, 无头痛、头晕、恶心呕吐等。2 h 后来诊, 测血压为 16/12 kPa(120/90 mmHg), 行脑 CT、心电图检查未见异常。既往身体健康。查体: 神清, 智能佳; 不完全性运动性失语, 无感觉性失语; 左侧中枢性面、舌瘫; 左侧肢体偏身运动障碍, 肌力为 0 级, 无感觉障碍及体像障碍; 左侧病理征阳性。临床上根据病史、查体及辅助检查, 诊断为“急性缺血性脑血管病”明确。但是该患者入院后查体发现一罕见的体征, 既在无意识、智能障碍, 无感觉性失语的情况下, 出现睁闭眼运动异常。表现为让其闭眼时, 双眼未闭却自认为已闭; 让其睁眼, 不能进一步睁大, 有时双眼紧闭(甚至反拗)却自认为已睁, 仿佛不理解医生的语言。此体征从 2000年 3月 5日发病开始持续存在至 3月 10日后渐渐消失, 其间经过三级医生查房, 均确认此体征存在无误。3月 8日复查

脑 CT 检查, 显示右侧颞、顶叶低密度。

**讨论** 本病例是一典型的急性缺血性脑血管病, 为神经内科的常见病, 多发病。但患者病后出现一罕见的临床体征, 其特点为无意识、智能及感觉性失语; 能理解检查者的命令, 如闭嘴、伸舌、用右手(健侧)摸左右耳等, 但不能准确执行检查者要求的睁闭眼动作。表现为患者双眼可自然睁开, 但在闭眼时让其睁眼却不能睁开, 甚至反拗; 双眼可自然闭合, 但在睁眼时让其闭眼却不能闭合。在无眼周肌肉(如上睑提肌, 眼轮匝肌等)损害时, 患者双眼表现为能睁眼而不能睁, 能闭而不能闭, 这一现象临床罕见, 笔者认为其是一高级皮质功能受损表现, 该患者后来复查脑 CT 证实为右侧颞、顶叶病变。

病人无感觉或运动障碍或共济失调, 且能理解检查者的命令, 但不能准确执行有目的的动作, 其被定义为失用(或运用不能)。一般右利手者的目的性动作由左侧半球缘上回控制, 从此处发出纤维至同侧中央前回运动中枢, 且发出纤维经胛胝体至对侧运动中枢。故左缘上回病变和(或)其发出的联系纤维受损时, 会出现单个运动失用。而右侧顶叶病变常引起体像障碍和(或)结构性失用(如拼积木, 绘图等)。该患者为右利手右侧顶叶病变, 出现一罕见的睁闭眼运动障碍, 虽发生在体像障碍的病损区, 却符合单个运动失用症的特点, 故笔者暂且将其称为睁闭眼“失用症”。其为一罕见的临床体征。

(2000-04-03 收稿)

[文章编号] 1008-0678(2001)03-0258-01 [中图分类号] R742