

亲细胞非均质分子脂质对鼠脑胶质瘤局部治疗的研究

顾宇翔 陈衍城 徐宏志 王宇倩

复旦大学附属华山医院神经外科(200040)

关键词 亲细胞非均质分子脂质 C6 胶质细胞瘤模型 瘤内治疗

摘要 **目的:**探讨亲细胞非均质分子脂质(CHML)对脑胶质瘤动物模型瘤内局部用药的效果。**方法:**建立SD大鼠脑内C6胶质细胞瘤模型,应用立体定向技术瘤内局部注射CHML-6.0浓度为500和200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的CHML复合液,观察生存状态、饮食状况、体重变化、肢体活动情况及对刺激的反应,行鼠脑MRI和病理学检查以检测药物的疗效。**结果:**用药后,大鼠的摄食活动等生存状态保持正常,用药组的肿瘤生长受到抑制,其生存期明显高于对照组($P < 0.05$)。两种浓度组间无显著差别。**结论:**CHML-6.0浓度为500、200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的CHML复合液瘤内局部治疗脑胶质瘤细胞安全有效。

The Inhibitory Effect of Local Infected CHML to Intracranial Glioma in Rat GU Yu-Xiang, CHEN Xian-Cheng, XU Hong-Zhi, WANG Yu-Qian Department of Neurosurgery, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai, 200040, China

KEY WORDS cytotropic heterogenous molecular lipid(CHML) C6 glioma model intratumoral chemotherapy

ABSTRACT **Aim:** To study the inhibition of local infection CHML to intracranial glioma in rats. **Methods:** The C6 glioma model in rat was established for intratumoral chemotherapy with CHML of 500, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ concentration by stereotactic operation. The effect of CHML was observed by living condition, feeding, weight, activity, response to stimulation, MRI scanning and histological examination. **Results:** The rat could remain normal state after treatment and the growth of tumor were inhibited apparently in CHML groups which has been testified by MRI scan of rat brain and histological examination. The group of intratumor chemotherapy with CHML resulted in a significant longer survival time in the C6 glioma rat model, compared with III group treated with 5% GNS and IV controlled group ($P < 0.05$). There was no apparent difference between CHML of 500, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ concentration groups. **Conclusion:** It was safe and effective for CHML of 500, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ concentration to treat the C6 glioma in rat.

神经胶质细胞瘤是中枢神经系统的恶性肿瘤,其治疗目前仍是神经外科的难题之一。手术切除是主要的方法,但术后复发是致命的主要原因,现有的放疗、免疫治疗的效果难以令人满意。本实验拟建立大鼠脑内C6胶质瘤模型,并瘤内局部治疗两种浓度的(Cytotropic heterogenous molecular lipid, CHML)复合液,以求观察和证实CHML对体内胶质瘤细胞的抑制作用。

材料和方法

实验动物分组 雄性SD大鼠(体重230~250g)48只,中国科学院上海分院实验动物中心提供。随机分成4组,每组12只(表1)。

SD大鼠C6胶质瘤模型的制作 C6胶质瘤细胞

准备:C6胶质瘤细胞系购自中科院上海生物研究所。接种前用胰酶消化C6胶质瘤细胞,离心后将其悬浮于APMI 1640培养液并用血球计数仪计数,将细胞悬液的浓度调整至 1×10^{11} 个/L,置于37℃水浴保存。将大鼠麻醉后,取俯卧位,头部固定在立体定向仪上,作头顶部矢状正中切口,于冠状前1mm,中线右旁3mm处钻孔1枚,插入脑组织5mm达尾状核,将10 μL 含 1×10^6 C6胶质瘤细胞的悬液以 $1 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度缓慢注射到尾状核区。

给药方法 肿瘤细胞接种后1周,将荷瘤大鼠(第4组除外)麻醉后用同样的方法于原位穿刺后分别注入浓度为500, 200 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的CHML复合液或5%GNS 50 μL 。CHML由美国高立食品药品有限公司提供,包括CHML-6.0和CHML-6.1两种针剂,用5%GNS配制

[文章编号] 1008-0678(2003)04-0367-04 [中图分类号] R730.264 [文献标识码] A

[作者简介] 顾宇翔,男(1972-),江苏南通人,复旦大学附属华山医院神经外科,主治医师,在职博士生,从事脑肿瘤及脑血管疾病研究。

成各种浓度的复合液。复合液中 CHML-6.0 和 CHML-6.1 的浓度比恒定,因而复合液的浓度以 CHML-6.0 的浓度来表示。

一般状况观察 每日一次观察 SD 大鼠的生存状态、饮食状况、体重变化、肢体活动情况及对刺激的反应。

鼠脑 MRI 扫描:于肿瘤细胞接种后的 10、28、100 d (即用药后 3、21、93 d)作鼠脑冠状、水平、矢状位三维 MRI 扫描,并按 $1 \mu\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量经鼠尾静脉注射造影剂(磁葡显胺)做增强扫描。

组织学检查 于穿刺给药后的 24、72 h、1 周,将给药组及对照组各随机取出 2 只和濒死前的 SD 大鼠行麻醉后予主动脉插管,4%多聚甲醛持续灌注固定,开颅取出脑组织,行全脑冠状切片,观察大体标本及制成石蜡切片,行 HE 染色,观察肿瘤生长及在药物作用后的变化情况。

生存期观察 第 I ~ IV 组剩余的 SD 大鼠在相同条件下饲养 3 个月以上。

统计方法 采用生存资料的非参数统计方法。

表 1 实验动物分组

组别	例数	药 物
I	12	500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ CHMI
II	12	200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ CHMI
III	12	5% GNS
IV	12	-

结 果

一般状况观察 肿瘤细胞接种后第 1、2 周内 4 组大鼠摄食、饮水、活动均正常,对外界刺激反应灵敏,无不正常叫声和躁动不安。自第 3 周起 III、IV 对照组大鼠陆续出现对侧或双侧的放置反射损害,以后肢较明显;第 4 周起进食减少而饮水增多,体重渐减轻;在后阶段,表现为鼠毛零乱、不洁,对刺激反应缓慢,爬行时共济失调;并在对照组有 2 只观察到癫痫发作。第 I ~ II 组大鼠(用药组)摄食、饮水、活动仍正常,体重稳定,对外界刺激反应灵敏。

鼠脑 MRI 检查显示 第 28 天,第 III 组大鼠已全部死亡,第 IV 组存活的大鼠可见肿瘤明显增大,可达 7 mm × 8 mm 大小,中线受压左移,双侧侧脑室受压明显,部分肿瘤跨过胼胝体长至对侧,表现为长 T₁ 和长 T₂ 信号,瘤周脑组织水肿,增强后肿瘤强化明显。而第 I、II 组的大鼠肿瘤明显小于第 IV 组,且出现肿瘤坏死后的信号,周边水肿较第 IV 组表现轻。到第 100 天,

分别仅有第 I、II 组的 3 只和 4 只大鼠存活, MRI 片可见右尾状核区局部穿刺所造成的软化灶,增强后无强化(图 1,2)。

组织学检查 第 IV 组切片可见 C6 肿瘤细胞在接种后的 10 ~ 20 d 生长缓慢,3 周后生长加快。肿瘤呈小圆细胞密集栅状或集团状排列,核异型及核分裂相明显,向周围脑组织及蛛网膜下腔广泛浸润,并可沿胼胝体浸润对侧半球(图 3)。第 I ~ II 组用药 24 ~ 72 h 内即可见局部穿刺反应,给药中心处坏死,并有少量已分化为梭形的肿瘤细胞。1 周后,出现较大的坏死软化灶,内无肿瘤细胞,泡沫细胞浸润明显;坏死灶周围的肿瘤细胞形态变圆,核染色质密度增加、分离,胞核变形。100 d 后,存活的鼠脑切片中可见在肿瘤细胞种植局部有坏死组织、胶质增生及泡沫细胞,无肿瘤细胞生长(图 4)。

生存期观察 I 组:生存时间 27 ~ 100 d 以上,其中 50% 超过 100 d; II 组:生存时间 24 ~ 100 d 以上,其中 67% 超过 100 d; III 组:生存时间 17 ~ 26 d 以上,平均 21.5 d; IV 组:生存时间 22 ~ 33 d 以上,平均 27.3 d。

I 和 II 组之间生存期差异无明显意义 ($P > 0.05$), I 与 III、IV 组以及 II 与 III、IV 组之间生存期差异有极显著意义 ($P < 0.01$)。

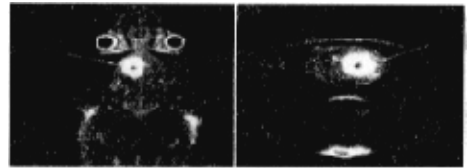


图 1 C6 胶质瘤细胞种植后 28 d 鼠脑 MRI 增强扫描:肿瘤明显增大,增强后强化明显

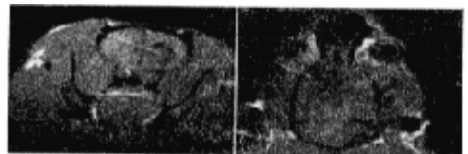


图 2 瘤内局注 CHML 后 100 d 鼠脑 MRI 增强扫描:局部无强化灶

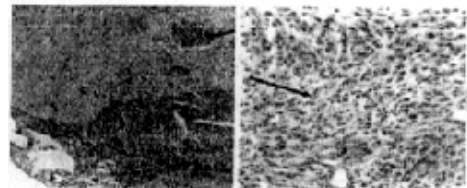


图 3 C6 胶质瘤细胞种植后 20 d 鼠脑切片 HE 染色:肿瘤呈集团状排列(左)放大倍数 10 × 10,核异形及核分裂相明显(右)放大倍数 10 × 20

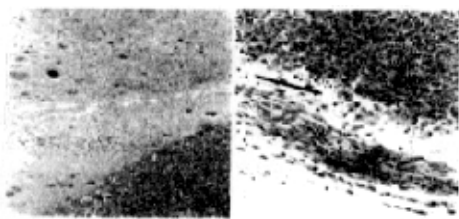


图4 瘤内局注CHML后100 d鼠脑切片HE染色:种植局部有坏死组织,胶质增生,无肿瘤细胞生长(左)放大倍数10×10,(右)放大倍数10×20

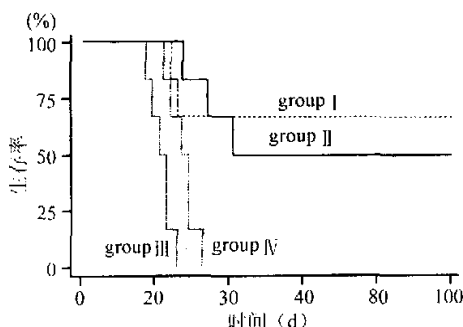


图5 不同浓度CHML治疗荷瘤鼠的生存率

讨论

Qimin Z等^[1,2]研究表明,CHML能够选择性进入多种恶性肿瘤细胞,促使胞质内细胞器的分解和细胞膜的破坏,并通过激活P⁵³通道诱导恶性肿瘤细胞的凋亡。CHML对恶性胶质瘤细胞的作用还未深入研究。我们前期对脑胶质瘤细胞株和胶质瘤患者的肿瘤标本的离体实验表明:CHML-6.0浓度为500、200 μg·mL⁻¹的CHML复合液对脑胶质瘤细胞有高度的抑制作用^[3,4]。

胶质瘤动物模型是胶质瘤实验研究的基础,建立可靠的模型是观察药物疗效的关键。目前,国内外的多种胶质瘤的模型,以C6胶质瘤细胞通过立体定向注射于大鼠尾状核建立的模型较为理想。许多学者利用此模型进行胶质瘤治疗的研究。文献报道^[5-8]接种1×10⁶C6胶质瘤细胞后2~3周,肿瘤直径可达5 mm,接种的成功率接近100%。我们建立的实验动物模型经组织学和鼠脑MRI扫描证实与其相符。据研究,种植1周后鼠脑内的肿瘤细胞生长进入稳定的指数生长期,通常选择这一时机进行肿瘤内局部治疗。

多数作者认为接种1×10⁶C6的胶质瘤细胞后,大鼠生存期为21~33 d,平均26~27 d^[5,7,8]。本实验动物平均生存期27.3 d。注射5%GNS组的荷瘤鼠,GNS不仅对肿瘤无杀伤作用,而且可能由于再次穿刺加重脑组织损伤和水肿,生存期低于空白对照组。国内外

文献报道^[6,8]瘤内局部注射适当浓度和剂量的化疗药物或免疫制剂,均可延长荷瘤动物的平均生存期,Weingert^[9]等应用EVAC载体的Camptothecin缓释剂瘤内治疗,59%的实验大鼠生存超过120 d,而对照组都在32 d内死亡。本实验采用以CHML-6.0浓度为500、200 μg·mL⁻¹的CHML复合液瘤内给药能显著提高荷瘤大鼠的生存期和生存质量,有50%~67%的生存期>100 d,经鼠脑MRI和组织学检查其肿瘤生长明显受到抑制。而且未发生药物引起的全身和脑组织局部的不良反应,这与我们所作的脑内局部注射CHML对脑组织毒性反应实验相符^[10]。两种不同浓度组的CHML复合液瘤内给药对荷瘤大鼠的生存期无明显差别,这与离体实验结果也相一致。

近年来,国内外临床和实验研究利用储液囊直接瘤腔内给药及利用缓释载体,植入肿瘤间质内化疗等方法提高颅内化疗药物的浓度,但由于肿瘤药物都有强烈的细胞毒性作用,而且无法通过肿瘤周边完整的花脑屏障,在边缘区达不到有效浓度,在临床上的推广应用受到限制。因此,CHML复合液以其安全和有效的特点有望在颅内局部治疗胶质瘤。

参考文献

1. Qimin Z, Zheng X. Chml suppresses cell growth and induces apoptosis in multiple human tumor lines[J]. Anticancer research, 1999, 19: 2893-2899
2. Zhan Q, Zhao SC, Xu Z. Antitumor activity of cytotoxic heterogeneous molecular lipids (CHML) on human breast cancer xeno-graft in nude mice [J]. Anticancer Research, 2001, 21: 2477-2482
3. 顾宇翔,陈衍城,王宇倩. 亲细胞非均质分子脂质对人脑胶质瘤细胞的作用[J]. 中国临床神经科学, 2001, 9: 256-258
4. 顾宇翔,陈衍城,王宇倩. 胶质瘤对亲细胞非均质分子脂质和几种药物敏感性的比较[J]. 复旦大学学报(医学版), 2003, 30: 147-150
5. Peter DL, Sheoidan PL, Brown WE. Animal model for brain tumors: historical perspectives and future directions[J]. J Neurosurg, 1994, 80: 865-869
6. Gen J, Strobel HW. Expression, induction and regulation of the cytochrome P450 monoxygenase system in the rat: glioma C6 cell line [J]. Brain Research, 1998, 784: 276-283
7. 吴景文,章翔,高大宽等. 建立大鼠C6脑胶质瘤模型与观察颅内肿瘤生长[J]. 第四军医大学学报, 2000, 21: 307-310
8. 关良,张纪,刘晔. 顺铂缓释剂瘤内治疗大鼠C6胶质瘤实验观察[J]. 中华神经外科杂志, 2000, 16: 91-93
9. Weingert J, Thompson R, Tyler B, et al. Local delivery of the topoisomerase I inhibitor camptothecin prolongs survival in the rat intracranial 9L gliosarcoma model[J]. Int J Cancer 1995, 62: 605-609
10. 顾宇翔,陈衍城,王宇倩. CHML脑内局部给药对大鼠脑组织的影响. 中华临床医药杂志, 2002, 8: 7743-7744

(2003-05-26 收稿 2003-10-07 修回)