文章编号:1000-5404(2005)10-0957-04

论著

立体定向接种胶质瘤细胞系 C6 形成大鼠脑内原位移植瘤的生长特性

张华蓉,陈飞兰,陈剑鸿,蒋雪峰,王清良,赵 雯,卞修武 (第三军医大学西南医院病理科,重庆 400038)

提 要: 目的 通过立体定向技术建立大鼠脑原位移植瘤模型,观察其生长特性。**方法** 在立体定向仪引导下,将体外培养的大鼠 C6 胶质瘤单细胞悬液(1×10^6/10 μl)接种于 27 只 Wistar 大鼠右尾状核区。以接种 C6 细胞后大鼠的允许生存期,将大鼠分成 2 组,观察大鼠生存状态、成瘤情况、肿瘤体积、脏器转移灶、组织学形态、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、血管内皮生长因子(VEGF)、兔抗人因子Ⅷ相关抗原免疫组化染色。**结果** 大鼠成瘤率为 100%,无颅外转移。荷瘤大鼠平均生存期为(25.50±5.75)d。肿瘤体积在第 3~4 周时肿瘤迅速增大。肿瘤呈浸润性生长,甚至侵袭颅骨;瘤细胞病理性核分裂像多见,GFAP 蛋白呈散在阳性表达,VEGF 蛋白强阳性表达;瘤组织内有典型的栅栏状坏死和丰富的微血管。**结论** C6 细胞在大鼠脑内原位移植瘤与人脑胶质母细胞形态和生长特性十分相似,具有分化程度低、微血管丰富、生长速度快且高度侵袭等特点。

关键词: 胶质瘤;脑;原位移植瘤;肿瘤血管生成
中图法分类号: R73-352; R730.264; R739.41 **文献标识码**: A

Growth characteristics of stereotactically orthotopic implantation of glioma cell line C6 in rat brain

ZHANG Hua-rong, CHEN Fei-lan, CHEN Jian-hong, JIANG Xue-feng, WANG Qing-liang, ZHAO Wen, BIAN Xiu-wu (Department of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish an orthotopic implantation model of C6 cells in Wistar rats with stereotactic technique and to study the growth patterns of the tumors formed in the rat brain. **Methods** The C6 cells (10^6/10 μl) were stereotaticallly implanted into the right caudate nuclei of 27 Wistar rats. All rats were divided into two groups according to their survival time. After C6 inoculation, the living and survival states of rats with glioma were observed and the formation and their volumes of tumors, metastasis, histopathology, expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), vascular endothelial growth factor (VEGF) and factor Ⅷ related antigen in the tumors were investigated. **Results** All the tested rats developed brain tumors without extracranial metastasis. The mean survival of the tumor-bearing rats was (25.50±5.75) d. The tumor volumes increased in a time-dependent manner and reached maximum between 3 to 4 weeks. The tumors were highly cellular, with remarkable cytoplasmic and nuclear polymorphism, intratumoral pseudopalisade necrosis, mitotic figures and abundant vessels which are immunostained with anti-factor Ⅷ related antigen polyclonal antibody. Immunohistochemical staining showed the distribution of VEGF protein was mainly in tumor cells of malignant glioma. The tumor margins displayed an invasive zone with tumor cells infiltrating the surrounding normal brain tissue matrix. The GFAP positive expression of glioma showed glial-derived tumor. **Conclusion** The orthotopic tumors formed by C6 cells in the rat brain shared similarities with human glioblastoma in morphology and differentiation, which could be used for experimental therapeutic studies on malignant gliomas.

Key words: glioma; brain; orthotopic implantation; tumor differentiation

基金项目:国家"863"计划引导项目(2002AA001010),国家自然科学基金资助项目(39970268),重庆市科技攻关项目(2003)
Supported by the National "863" Key Research Project of China (2002AA001010), the National Natural Science Foundation of China (39970268) and the Sci & Tech Research Project of Chongqing (2003)
作者简介:张华蓉(1978-),女,湖北省宜昌市人,硕士研究生,主要从事神经肿瘤病理方面的研究。电话:(023)68765459,E-mail: zhr9702@163.net
通讯作者:卞修武,电话:(023)68752247,E-mail: bianxiuwu@263.net
收稿日期:2005-03-06;**修回日期**:2005-04-30

恶性胶质瘤是中枢神经系统常见的肿瘤之一，由于其位置的特殊性和高度侵袭性，传统的手术治疗、化疗及放疗等治疗都难以达到根治的目的。因此建立一个理想可靠的脑胶质瘤动物模型，对深入研究脑胶质瘤的发病机制、生长特性、血管生成、治疗机制和疗效评估有重要意义。虽然大鼠 C6 的移植瘤模型已有较好的应用，但在制作方法上有所差异，有时成瘤率和生长特性不稳定，还需要摸索出更为稳定的脑原位移植的方法（包括接种细胞数和接种靶点的确定等），以利于胶质瘤实验性治疗的研究。本实验通过摸索 C6 细胞脑内移植瘤模型并观察其生长特性，为恶性胶质瘤的实验性治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株和实验动物 大鼠神经胶质瘤细胞 C6 购于中科院上海细胞生物学研究所细胞库。雄性 Wistar 大鼠 32 只，体质量 200～250 g，购于第三军医大学大坪医院实验动物中心，清洁级动物。动物分为两组：接种组（27 只），脑内接种瘤细胞悬液组，再以接种后取材时间分成 A、B 两组，其中 B 组（6 只）为自然死亡组；正常对照组（5 只）以 Hanks 液代替瘤细胞悬液。

1.1.2 仪器和试剂 SHEL-LAB2000 型 CO_2 孵箱（SHEL-LAB Sheldon 公司）；VS-1300-V 超净工作台（江苏苏净集团苏州安泰空气技术有限公司）；ZH-蓝星 B 型脑立体定位仪（安徽正华仪器厂）；307-2B 型牙科台式电钻车（宁波医疗器械厂）。小牛血清购于中美合资兰州民海生物工程有限公司。RPMI1640 培养粉为美国 Sigma 公司产品。兔抗人胶质纤维酸性蛋白（GFAP）多克隆抗体和 SABC 检测试剂盒购于武汉博士德公司。兔抗人血管内皮生长因子（VEGF）多克隆抗体购于美国 Sanda Cruz 生物公司。兔抗人因子Ⅷ相关抗原多克隆抗体购于北京中山生物公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 C6 细胞于 10% 小牛血清 RPMI1640 完全培养液中，单层培养法传代培养生长至所需的细胞数，在接种前再传代 1 次，24 h 后更换 1 次培养液。在细胞于对数生长期大约 80% 满时，以 0.25% 胰酶消化，收集消化液离心后去除上清液，Hanks 液吹打冲洗 2 次后以 Hanks 液制成细胞悬液，调节细胞浓度为 1×10^6/10 μl Hanks 液，置于 37 ℃水浴待接种。苔盼蓝排斥实验检测细胞活力 > 95%。接种的细胞量：1×10^6/只。

1.2.2 脑内原位接种方法 用 1% 戊巴比妥钠（60 mg/kg 剂量）腹腔注射麻醉大鼠后将大鼠头部固定在脑立体定向仪上，剪去头顶部毛发，碘酒、乙醇消毒后铺洞巾。内眦连线与头部正中矢状面交点向后纵向切开头皮约 1 cm，分离暴露颅骨。在立体定位仪引导下，根据 Batker 法确定右尾状核靶点，于冠状缝后 1 mm，中线右旁开 3 mm，用牙科钻钻一小孔，勿损伤硬脑膜。25 μl 微量注射器抽取 C6 细胞悬液 10 μl（1×10^6 C6 细胞），沿骨孔缓慢垂直进针至硬脑膜下 6 mm，再回退 1 mm（距硬脑膜下 5 mm）。注射速度为 1 μl/min，共注射 10 min，注射完毕后留针 5 min，缓慢拔针。骨孔用牙托粉封闭。生理盐水冲洗手术野，4 号线缝合切口后消毒皮肤。术后单笼饲养。整个接种过程在层流超净工作台进行，术后无需抗感染治疗。

1.2.3 实验观察指标 ①观察大鼠生活状态及生存周期。②病理解剖学检查：A 组于实验 1 周处死 3 只大鼠，实验 2、3、4 周各处死 6 只大鼠立即获取大鼠全脑标本，B 组大鼠于濒死前或死亡后立即取全脑；正常对照组于实验 4 周取全脑。所有大鼠均取心、肝、脾、肺、肾、脊髓等主要脏器。大体检查有无脏器的转移灶。将获取的全脑标本按大鼠脑表面的接种穿刺点做冠状切口，观察肿瘤生长情况，计算肿瘤体积 = $a\times b^2/2$（a 为肿瘤的最大径，b 为与最大径垂直的最宽径）。③组织病理学检查：所有脑标本和主要脏器经固定、脱水、石蜡包埋后取 4 μm 切片，HE 染色，光镜下观察。④免疫组织化学检查：肿瘤石蜡切片经脱蜡水化后与 GFAP、VEGF、Ⅷ相关抗原多克隆抗体做免疫组织化学检查，用 SABC 法显色。

2 结果

2.1 荷瘤鼠一般状况和生存期

接种组自接种后第 3 天起渐恢复正常觅食、饮水；接种后第 2 周大鼠均较兴奋，活动增多，体质量呈轻微的上升趋势，无偏瘫症状；但第 3、4 周部分大鼠精神不振，皮毛不整洁，毛色失去光泽，活动、觅食、饮水减少，体质量减轻，眶周出血，反应迟钝。第 3 周有 2 例（17、21 d）死亡，第 4 周有 2 例（26 d）死亡，其中有 1 只出现偏瘫症状，余 2 例于第 5 周（31、32 d）处于濒死状态并死亡，濒死前表现为极度恶液质，呼吸衰竭。荷瘤大鼠生存期为 17～32（25.50 ± 5.75）d。正常对照组术后 2 d 恢复正常觅食、饮水，兴奋、体质量呈明显上升趋势，存活，未见上述症状。

2.2 大体观察结果

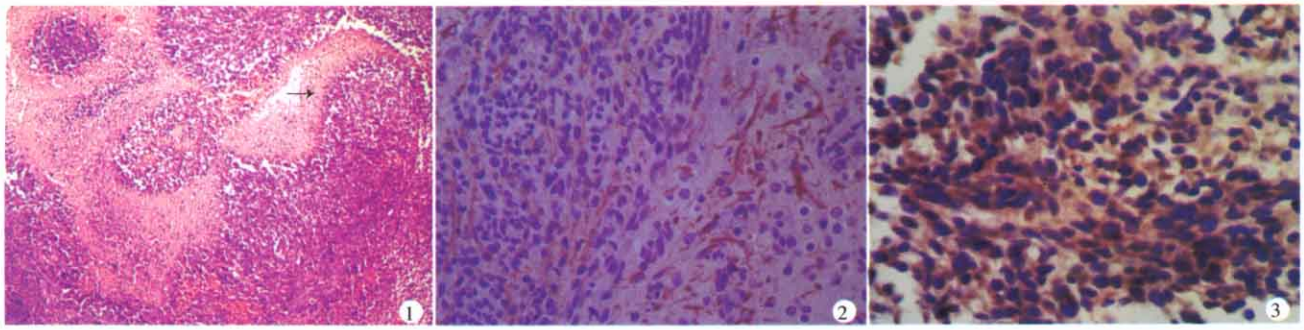
正常对照组均无肿瘤形成。接种瘤细胞组的 27 只大鼠脑内成瘤率为 100%。A 组于接种后 1 周即可见肿瘤生长于右侧尾状核处，肿瘤直径 1～2 mm，在第 2 周时肿瘤直径最大可达 5 mm，肿瘤平均体积为（20.75 ± 8.33）mm^3，在第 3、4 周时肿瘤迅速增大，直径最大可达 9 mm，肿瘤平均体积为（164.42 ± 74.49）mm^3。B 组均可见较大肿瘤生长。肿瘤呈圆形或椭圆形浸润生长，较周围正常组织颜色深，境界清楚，周边脑组织肿胀，中线结构向对侧移位，切面可见肿瘤内出血和坏死。

2.3 组织学观察结果

肿瘤细胞排列密集、呈浸润性生长，但脑组织与肿瘤交界处仍能见到一个较明显的界限。瘤细胞呈长梭形，核大深染，病理性核分裂象多见。有典型的栅栏状坏死（图 1），周边围绕着胶质瘤细胞。肿瘤有丰富的新生微血管。主要脏器均未见转移灶。

2.4 免疫组织化学结果

瘤组织内可见散在的 GFAP 呈阳性瘤细胞，瘤周浸润生长的区域见较多的反应性 GFAP 阳性细胞（图 2）。瘤组织内血管丰富，呈Ⅷ阳性表达。移植瘤组织 VEGF 蛋白呈强阳性表达（图 3）。



The tumor cells were massively necrotic, forming pseudopalisading necroses (black arrowhead)

图 1　C6 脑内移植瘤组织学形态　(HE × 200)

Fig 1　Histology of C6 orthotopic tumor in the rat brain　(HE × 200)

图 2　C6 移植瘤的 GFAP 免疫组化检测　(SABC × 400)

Fig 2　Wistar rat C6 glioma was stained by glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunohistochemistry　(SABC × 400)

图 3　C6 移植瘤的 VEGF 免疫组化检测　(SABC × 400)

Fig 3　Wistar rat C6 glioma was confirmed by vascular endothelial growth factor (VEGF) immunohistochemistry　(SABC × 400)

3　讨论

建立可靠的脑胶质瘤动物模型是进行各种实验研究的基础。脑胶质瘤动物模型的建立方法大致有 5 类：自发肿瘤模型、化学诱导模型、病毒诱导模型、肿瘤移植模型和基因转染模型，其中肿瘤移植模型是目前建立最多、研究最广泛的脑胶质瘤模型。肿瘤移植模型根据动物间种系关系可分为两种：一种是同种移植模型，另一种是异种移植模型。在同种移植模型中，又分为原位和异位移植两种。C6 细胞是经 N-亚硝基甲脲诱发的大鼠脑胶质瘤细胞系，大鼠 C6 脑胶质瘤原位同种移植瘤模型是脑胶质瘤实验研究中应用最为广泛的模型之一，建立此模型的常用方法有徒手法和立体定向法[1]。徒手法操作简单，省时省力，但定位不准确，操作不稳定，成功率低。采用立体定向法是较为理想的 C6 脑胶质瘤模型建立方法。本研究所采用的方法不但成瘤率高、颅内生长稳定、实验周期短，而且具有可重复性。有文献[1]报道，注入鼠脑的细胞悬液体积和细胞量均影响此模型的成功率。国内外学者制作 C6 胶质瘤模型接种的细胞数量和悬液体积各不相同，细胞数量在 $10^5 \sim 10^7$，悬液体积在 5 ~ 60 μl[2~6]。本实验接种的细胞数量和悬液体积为 $1 \times 10^6/10$ μl。

在脑内原位移植瘤建立过程中，多种因素影响移植瘤形成结果。在整个接种过程中保证细胞的活力也至关重要，我们采用了分批收集生长状态良好的细胞和收集细胞与动物接种同时进行的方式，即每批仅收集 2 ~ 3 只大鼠所需细胞量，在收集细胞的同时，进行动物的麻醉、消毒、固定、定位，以保证细胞悬液在较短时间内以良好的活力接种至大鼠颅内，使每次收集的细胞 37 ℃水浴保存不超过 1 h。另外将接种后剩余的细胞悬液返回到无菌条件下再培养，倒置显微镜下观察发现细胞贴壁好，呈树突状，胞浆透亮，表明整个细胞收集和接种过程中无污染，而且细胞活力好。瘤细胞易沿针道扩散是建立该模型时易出现的问题，所以使接种的瘤细胞能在靶点有足够的空间充分沉淀显得非常重要。我们采用进针后稍回退、严格控制注射和拔针的速度以及停针时间，封闭骨孔等措施确保模型的成功率和标准化。

本实验中 C6 细胞体外培养生长良好，借助立体定位将 C6 细胞接种至大鼠右侧尾状核后，皆有肿瘤生长。肿瘤在第 1、2 周生长较缓慢，到第 3、4 周时肿瘤迅速增大，大鼠开始出现体质量下降、眶周出血、甚至偏瘫等明显的症状，这与人脑胶质瘤的发展过程和临床表现相似。病理解剖见脑内肿瘤最大径达 9 mm。荷瘤大鼠平均生存期为 25.50 d，生存周期稳定，能满足胶质瘤实验治疗研究的要求。HE 染色见胶质瘤典型的栅栏状坏死，此为恶性胶质瘤的特征。GFAP 是神经胶质瘤特异的蛋白标志物[7]。本实验通过免疫组织化学检查可见所有大鼠肿瘤都有 GFAP 蛋白阳性表达，证实了形成的脑肿瘤具有星形胶质细胞起源，但分化程度低。血管内皮生长因子(VEGF)是诱导和调节肿瘤血管生成的重要因子之一[8,9]，它与血管内皮细胞上相应的 VEGF 受体结合，引起内皮细胞分裂和分化，并形成管腔样结构；增加血管通透性，在血管生成种发挥重要作用。本实验中 C6 移植瘤肿瘤细胞的 VEGF 蛋白呈强阳性表达，瘤组织内可见丰富的Ⅷ相关抗原

阳性的微血管，证实了瘤细胞表达的VEGF是有功能性的，而且该移植瘤也可作为抗肿瘤血管生成治疗的良好模型。

参考文献：

[1] 高大宽，章 翔，吴景文，等. 建立大鼠C6脑胶质瘤模型的有效方法[J]. 中华实验外科杂志，2000，17(1)：93.

[2] 姬西团，章 翔，费 舟，等. 颅内胶质瘤模型建立及肿瘤生长特征观察[J]. 中华神经外科疾病研究杂志，2004，3(1)：5－8.

[3] Watanabe K, Sakamoto M, Somiya M, *et al*. Feasibility and limitations of the rat model by C6 gliomas implanted at the subcutaneous region[J]. Neurol Res, 2002, 24(5): 485－490.

[4] 李维方，张光霁，朱 诚，等. VEGF反义寡核苷酸抑制荷瘤大鼠胶质瘤血管生成的作用和效果[J]. 解放军医学杂志，2003，28(2)：144－145.

[5] Zhang Y, Wang C, Zhang Y, *et al*. C6 glioma cells retrovirally engineered to express IL-18 and Fas exert FasL-dependent cytotoxicity against glioma formation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 325(4): 1240－1245.

[6] Li Y, Owusu A, Lehnert S. Treatment of intracranial rat glioma model with implant of radiosensitizer and biomodulator drug combined with external beam radiotherapy[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004, 58(2): 519－527.

[7] Utermark T, Schubert S J, Hanemann C O. Rearrangements of the intermediate filament GFAP in primary human schwannoma cells[J]. Neurobiol Dis, 2005, 19(1-2): 1－9.

[8] Bikfalvi A. Recent developments in the inhibition of angiogenesis: examples from studies on platelet factor-4 and the VEGF/VEGFR system[J]. Biochem Pharmacol, 2004, 68(6): 1017－1721.

[9] 孙慧勤，邹仲敏，卞修武，等. 生长因子在脑胶质瘤血管生成及其恶性进展中的作用[J]. 国外医学生理、病理科学与临床分册，2000，20(6)：501－504.

（编辑 王 红）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2005)10-0960-01

106例产褥早期哺乳促乳汁分泌的观察分析

Preliminary study of breast-feeding accelerating milk-secretion in 106 cases in early puerperium

邱清玉，张惠杰，郭冬丽 （河南大学淮河医院妇产科，开封 475000）

母乳是婴儿的最佳食品，为了证明产褥早期按需哺乳，对乳汁分泌有促进作用，从而提高母乳喂养成功率，我院于2003年2－8月对106例做到分娩后即按需哺乳的产妇（试验组），与同期未做到早哺乳即产后24 h内未哺乳或仅1－2次的119例（对照组）进行比较，观察血清泌乳素、产后乳量、产后出血量，乳房情况以及婴儿大小便次数等，现报告如下

1 资料与方法

选择2003年2－8月在我院分娩，产后30 min内即皮肤接触，按需哺乳的产妇为试验组106例，同期未做到早哺乳的产妇为对照组119例，进行观察对比。试验组年龄（27.4±0.3）岁，对照组年龄（26.7±1.2）岁。试验组剖宫产44例，占41.51%；自然分娩62例，占58.49%。对照组剖宫产49例，占41.18%，自然分娩70例，占58.82%。试验组8 A.M.－8 P.M.出生72例，占67.92%，8 P.M.－8 A.M.出生34例，占32.08%，对照组8 A.M.－8 P.M.出生79例，占66.39%，8 P.M.－8 A.M.出生40例，占33.61%。试验组与对照组225例均符合以下标准：①无妊娠合并症及产后并发症，健康宜哺乳；②初产妇；③37孕周以上；④新生儿体质量2 500－4 000 g，身长大于45 cm，Apgar's评分＞7分。两组差别无显著性意义（$P>0.05$）。

作者简介：邱清玉（1963－），女，河南省开封市人，主管护师，主要从事产科方面的研究。电话：03783256176

收稿日期：2005-12-30；修回日期：2004-11-09

统计学分析：采用χ^2检验

2 结果

2.1 产后24 h血清泌乳素比较

两组均于产后24 h抽血查血清泌乳素。实验组＞300 μg/L者占71.70%（76/106）；对照组＜300 μg/L者占84.03%（100/119），两组比较差异显著（$\chi^2=84.752$，$P<0.01$），说明产褥早期按需哺乳能促进人体泌乳素的分泌。

2.2 产后乳量比较

于产后12、24、48 h挤奶各1次，由专人负责，以世界卫生组织培训教材为标准手法挤压乳房，至有清亮乳汁溢出用一次性量杯接取，观察奶量，一次征手挤出5 ml乳汁为标准，试验组66.98%（71/106）于24 h内出奶；而对照组24 h出奶者只有7.56%（9/119）。两组比较差异显著（$\chi^2=106.816$，$P<0.01$），说明泌乳时间及乳量，试验组明显早于对照组

2.3 婴儿大小便情况比较

试验组婴儿出生24 h内小便6次以上者92例，占86.79%；对照组49例，占41.18%，$P<0.01$，两组间差别有非常显著性的意义。试验组无一例大便异常者；对照组出现消化不良者8例，喂糖过多者5例，大便干3例，进食不足者11例，脐炎1例。

诊断标准：采用《儿科学》第5版诊断[1]

（下转967页）