论著

文章编号:1000-5404(2007)01-0074-04

环磷酰胺对人腺泡状横纹肌肉瘤细胞裸鼠移植瘤生长和形态结构的影响

刘 斌[1],米 粲[1],卞修武[2],陈代伦[2] ([1]重庆医科大学基础医学院病理学教研室,重庆 400016;[2]第三军医大学西南医院病理学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 检测环磷酰胺(cyclophosphamide,CTX)对人腺泡状横纹肌肉瘤细胞株PLA-802裸鼠移植瘤生长和形态结构的影响。**方法** 16只裸鼠右腋皮下接种PLA-802移植瘤细胞悬液后分成空白对照组(5只)、生理盐水对照组(5只)和20 mg/kg CTX治疗组(6只)。接种后第7天开始,经腹腔注射给药,隔日1次,共注射10次。每2天测量1次肿瘤大小绘制移植瘤生长曲线。接种后第26天杀鼠摘取移植瘤称重,组织经制片染色后用光镜和电镜检查。**结果** ①CTX治疗组移植瘤生长被明显抑制($P<0.05$),抑瘤率85.55%。②治疗后瘤细胞疏松排列成腺泡状,由纤维间质分隔,血管稀少;瘤细胞椭圆形、网拍状或短梭形;核椭圆或类圆形,大小不一;核分裂相减少。电镜见瘤细胞质内有不等量肌(微)丝,甚至有横纹肌肌原纤维结构形成。**结论** CTX对人腺泡状横纹肌肉瘤PLA-802移植瘤生长具有一定程度的抑制作用,治疗后瘤组织形态结构改变。

关键词:环磷酰胺;横纹肌肉瘤;移植瘤;生长;形态

中图法分类号:R730.23;R730.53;R738.7 **文献标识码**:A

Effects of cyclophosphamide on proliferation and morphology of human alveolar rhabdomyosarcoma cell xenografted tumor in nude mice

LIU Bin[1], MI Can[1], BIAN Xiu-wu[2], CHEN Dai-lun[2] ([1]Institute of Pathology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, [2]Department of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of cyclophosphamide (CTX) on proliferation and morphology of human alveolar rhabdomyosarcoma cell-line PLA-802 xenografted tumor in nude mice. **Methods** Sixteen nude mice which had been implanted PLA-802 by subcutaneous injection into the right armpit were divided into control group (5 mice), normal saline group (5 mice) and 20 mg/kg CTX group (6 mice). They were given CTX or normal saline intraperitoneally once every two days, starting on the 7th day after tumor cell transplantation. Tumor volumes were measured every two days for drawing the growth curve. Animals were anesthetized on the 26th day after tumor cell transplantation to get weight and specimens of the tumors. Specimens were stained of HE or EM, and then examined with light microscope and electron microscope. **Results** The proliferation of xenografted tumors was inhibited significantly ($P<0.05$). The inhibition rate of the tumors was 85.55%. The morphology of xenografted tumor was changed after CTX treatment. It appeared that neoplastic cells arranged in alveolar form, which were comparted by fibrous tissue and were of fewer blood vessels. Neoplastic cells were oval, racket-shape or short fusiform, and nucleus were oval or round-like in various sizes. Karyokinesis was less. There were various amount of myofilament, even muscle myofibril in cytoplasm. **Conclusion** CTX can inhibit the proliferation and change the morphology of PLA-802 xenografted tumor.

Key words: cyclophosphamide; rhabdomyosarcoma; xenograft; proliferation; morphology

环磷酰胺(cyclophosphamide,CTX)是临床常用药物,可用于治疗多种疾病,但也有诸如导致畸形和癌变等作用。CTX用于多种肿瘤的治疗已有多年的历史,也是治疗横纹肌肉瘤(rhabdomyosarcoma,RMS)的常用药物。然而,有关CTX单独使用对肿瘤生长和形态结构影响的研究却报道甚少。本研究以人腺泡状RMS细胞株PLA-802[1]进行裸鼠移植建立模型,单独应用CTX对移植瘤进行治疗,观察CTX对移植瘤生长和形态结构的影响,为RMS的诊断和治疗提供参考。

作者简介:刘 斌(1966-),男,四川省米易县人,博士研究生,讲师,主要从事肿瘤病理学方面的研究。电话:(023)68485789,E-mail:my0216@126.com

通讯作者:卞修武,电话:(023)68752247,E-mail:bianxiuwu@263.net

收稿日期:2006-02-17;修回日期:2006-05-10

1　材料与方法

1.1　动物实验

1.1.1　实验动物、细胞和主要试剂　　PLA-802 细胞是国内建立的一种人腺泡状 RMS 细胞株[1]，由北京 301 医院病理科陈乐真教授惠赠。BALB/c nu/nu 裸鼠由中国医学科学院上海实验动物研究所提供，雌性，鼠龄 4 ~ 6 周，体质量 17 ~ 19 g，SPF 环境饲养。CTX（200 mg/支，江苏恒瑞医药股份有限公司，批号 0011292）用生理盐水配成 5 mg/ml 溶液，4 ℃冰箱保存备用。

1.1.2　PLA-802 细胞裸鼠移植传代　　体外培养生长良好的 PLA-802 细胞生长至 80% 融合时收集细胞，制成 1×10^7/ml 细胞悬液，注射于裸鼠右腋皮下 0.2 ml。待移植瘤生长至直径约 1.0 cm 时断颈杀鼠取下瘤体，用研磨器研磨并加入 DMEM 完全培养液制成细胞悬液后注射于裸鼠右腋皮下 0.2 ml 进行裸鼠体内传代，以此法建立稳定的裸鼠皮下移植瘤模型。正式实验用第 5 代移植瘤。

1.1.3　动物分组　　将 16 只已接种肿瘤的裸鼠分为 3 组，A 组（实验组）为 CTX 治疗组 6 只，B 组为生理盐水对照组 5 只，C 组为空白对照组 5 只。

1.1.4　给药　　于裸鼠右腋皮下接种 0.2 ml 稳定传代的第 5 代移植瘤细胞悬液后第 7 天开始，经腹腔注射给药，每 2 天给药 1 次，共 10 次。每次给药前称取裸鼠体质量，按体质量调整药量。CTX 按 20 mg/kg 给药，约 0.2 ml/只。生理盐水对照组给等体积等 pH 值的生理盐水。空白对照组不作任何注射。

1.2　标本取材、固定、染色和观察

于接种后第 26 天，即最后 1 次给药后第 2 天脱椎处死裸鼠并迅速解剖取下瘤体，称取移植瘤重量后快速切取电镜标本，用 2.5% 戊二醛固定，常规电镜包埋、制样，透射电镜观察；剩余组织用 10% 甲醛固定后作常规石蜡切片、HE 染色，普通光学显微镜观察。

1.3　疗效评定

每 2 天于用药时测量移植瘤最长径（L）和最宽径（W）并依据公式计算移植瘤的体积：V（体积）= L（长径）× W^2（宽径^2）/2，用所得数据绘制移植瘤生长曲线。于最后 1 次给药第 2 天杀鼠后完整取出移植瘤称取质量，依据公式计算抑瘤率。

抑瘤率（%）=（1 - 实验组平均瘤质量/对照组平均瘤质量）×100%

1.4　统计学处理

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 统计软件进行两样本间 t 检验。

2　结果

2.1　移植瘤生长曲线的变化

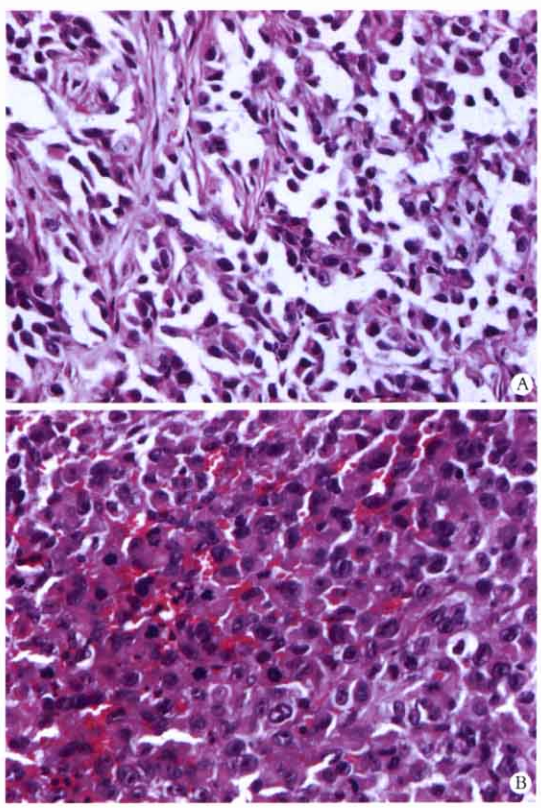
用移植瘤体积大小变化数据绘制生长曲线。经 CTX 治疗，接种第 17 天以后，A 组移植瘤平均瘤体积明显小于 B、C 组（$P<0.05$），而 B 组和 C 组移植瘤平均瘤体积大小的差异无统计学意义（$P>0.05$）。接种后第 25 天，A 组移植瘤平均瘤体积为（0.338 ± 0.014）cm^3，B 组为（2.261 ± 0.136）cm^3，C 组为（2.34 ± 0.202）cm^3。

2.2　抑瘤率

实验摘取的移植瘤瘤质量 A 组为（371.94 ± 15.90）mg，B 组为（2487.10 ± 149.60）mg，C 组为（2574.13 ± 222.20）mg，A 组的抑瘤率为 85.55%。

2.3　移植瘤组织形态结构的观察

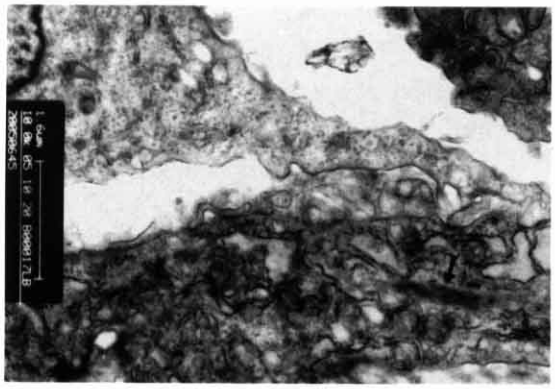
2.3.1　光镜观察　　A 组瘤细胞疏松排列成腺泡状，多有腺腔形成，由纤维间质分隔；瘤细胞椭圆形、网拍状或短梭形，大小不一，细胞质较丰富，淡红色；散在分布有少量瘤巨细胞及多核或核固缩瘤细胞；核椭圆形或不规则形，大小不一，染色较淡；核分裂相（35 ± 9）个/10HP；瘤组织血管稀少，有散在的淋巴细胞和中性粒细胞浸润（图 1A）。B、C 组瘤细胞丰富，密集排列成片分布，难见腺泡状排列；纤维间质稀少，微血管和细小血管丰富；瘤细胞圆形或卵圆形，细胞质红色或淡红色；核质比大；核圆形、类圆形或不规则形，常染色质丰富；核仁大，1 ~ 3 个，呈红色；核分裂相（160 ± 17）个/10HP（图 1B）。



A：CTX 治疗组；B：对照组

图 1　移植瘤的形态观察　（HE ×400）

2.3.2　电镜观察　A 组瘤细胞排列疏松，血管稀少；瘤细胞呈椭圆形、网拍状或短梭形，细胞突起较丰富而粗大；椭圆形和球拍状瘤细胞细胞质内肌（微）丝含量少，短梭形瘤细胞细胞质内肌（微）丝含量较丰富，并可有横纹肌肌原纤维结构形成；瘤细胞核椭圆形或不规则形，大小不一（图 2）。B、C 组瘤细胞丰富，纤维间质少，血管丰富；瘤细胞主为卵圆形或不规则形，细胞突起少而短，胞质内难见肌（微）丝；部分瘤细胞有较丰富的短小线粒体；核质比大；核仁多而大。



→:短梭形瘤细胞质内有横纹肌肌原纤维结构形成

图2 CTX治疗组移植瘤的形态观察 (TEM×10 000)

3 讨论

RMS是常见的软组织恶性肿瘤,恶性程度高,可发生于任何年龄,儿童最多见。RMS来源于横纹肌细胞或向横纹肌细胞分化的间叶细胞,病理上可分为胚胎型、葡萄簇型、腺泡状、梭形细胞和多形性5型[2]。腺泡状RMS的瘤细胞排列成不规则的实体状细胞巢及腺泡状结构,若实体区占极大多数,则可称为实体型腺泡状RMS[2]。Hahlin等[3]观察到青春期后女性下生殖道胚胎型RMS经长春新碱、阿霉素和CTX治疗后瘤组织形态学发生了改变。本研究以人腺泡型RMS细胞株PLA-802细胞接种于裸鼠皮下建立移植瘤模型,用CTX进行治疗。结果显示,PLA-802移植瘤对照组呈实体型腺泡状RMS组织像,瘤细胞丰富,密集排列成片分布,血管丰富,纤维间质稀少;瘤细胞圆形或卵圆形,核质比大;核圆、类圆或不规则形,常染色质丰富;核仁大;核分裂像多。电镜见瘤细胞质内肌(微)丝稀少。实验组经CTX治疗后,瘤组织及细胞形态结构明显改变,表现为:瘤细胞疏松排列成腺泡状,由纤维间质分隔,血管稀少;瘤细胞椭圆形、网拍状或短梭形;核椭圆或不规则形,大小不一;有少量巨核或多核瘤细胞;核分裂像少。电镜见瘤细胞细胞质内有不等量肌(微)丝,短梭形瘤细胞细胞质内可有横纹肌肌原纤维结构形成。

对照组移植瘤组织血管丰富,瘤细胞增殖活跃,可能是瘤组织形成细胞丰富并密集排列成实体状结构的部分原因。CTX治疗后瘤组织及细胞形态结构明显改变,我们推测其机制可能是:①用药后瘤组织内不同细胞周期的瘤细胞组成比例改变。CTX主要是通过对核酸复制的影响而发挥细胞毒作用,对增殖旺盛的细胞作用较强,对静息期细胞无明显作用。②CTX是一种氮芥类烷化剂,烷基易通过共价键与DNA结合[4],导致核酸结构异常。本实验组经CTX治疗后,移植瘤组织内形成了少量多核和巨核瘤细胞。③文献[5,6]报道,一些化疗药物可抑制肿瘤血管生成。本研究CTX治疗后移植瘤组织血管明显减少,显示CTX对腺泡型RMS血管生成具有抑制作用。血管减少导致血供不充分,瘤细胞生长受影响。④其他:如CTX诱导了瘤细胞分化等。但确切的机制有待研究。

形态学表现是病理诊断的重要依据。CTX可用于多种肿瘤性疾病以及非肿瘤性疾病的治疗,是临床常用药物。本研究CTX的使用导致了PLA-802异种移植瘤组织形态学发生明显改变,提示对CTX是否也会导致人体内RMS形态学改变以及改变的机制应进行研究,以便指导病理诊断。

对于RMS,目前临床多采取化疗、手术以及放疗相结合进行综合治疗。美国横纹肌肉瘤研究协作组(intergroup rhabdomyosarcoma study, IRS)的研究结果提示,化疗对RMS的治疗具有重要性[7-9]。作为治疗RMS的VAC等化疗方案常用药物,本研究选用CTX单独对荷瘤裸鼠进行治疗,结果肿瘤生长受到明显抑制,抑瘤率达85.55%,证实CTX具有抑制腺泡型RMS生长的作用。从实验获得的移植瘤生长曲线显示,虽然实验组移植瘤生长受到明显抑制,但仍然存在并缓慢长大,提示对荷瘤鼠隔日给予20 mg/kg剂量的CTX治疗不能完全杀灭肿瘤,也不能完全抑制瘤细胞增殖。本研究未进行不同剂量的CTX治疗实验,但我们认为,增加CTX用药量对腺泡型RMS进行治疗可能并不适宜。理由是:①文献[10,11]报道,CTX脉冲式静脉给予的量从0.9 g/m^{2}加大至1.2 g/m^2,甚至2.2 g/m^2,胚胎型RMS 4年生存率从68%提高到78%,但腺泡型的生存率却仍然为56%。②CTX有诸如抑制免疫、导致畸形甚至癌变等作用,加大药量会造成严重的不良反应。③本研究结果显示,CTX治疗后仍然存活的瘤组织形态学表现,与治疗前相比较有明显的差异,而后者对CTX的敏感性显然比前者差。

参考文献:

[1] 陈乐真,黄靖香,游连璧,等. 人喉腺泡型横纹肌肉瘤细胞系(PLA-802)的建立及其生物学特性[J]. 解放军医学杂志, 1983, 8(4): 249-245.

[2] 张仁元. 横纹肌肿瘤[M]//武忠弼,杨光华. 中华外科病理学. 下卷. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 2463-2471.

[3] Hahlin M, Jaworski R C, Wain G V, *et al*. Integrated multimodality therapy for embryonal rhabdomyosarcoma of the lower genital tract in postpubertal females[J]. Gynecol Oncol, 1998, 70(1): 141-146.

[4] Matalon S T, Ornoy A, Lishner M. Review of the potential effects of three commonly used antineoplastic and immunosuppressive drugs (cyclophosphamide, azathioprine, doxorubicin on the embryo and placenta)[J]. Reprod Toxicol, 2004, 18(2): 219-230.

[5] Bocci G, Nicolaou K C, Kerbel R S. Protracted low-dose effects on human endothelial cell proliferation and survival in vitro reveal a selective antiangiogenic window for various chemotherapeutic drugs[J]. Cancer Res, 2002, 62(23): 6938-6943.

[6] Miller K D, Sweeney C J, Sledge G W, Jr.. Redefining the target:

chemotherapeutics as antiangiogenics[J]. J Clin Oncol, 2001, 19(4): 1195-1206.

[7] Baker K S, Anderson J R, Link M P, *et al*. Benefit of intensified therapy for patients with local or regional embryonal rhabdomyosarcoma: results from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Ⅳ[J]. J Clin Oncol, 2000, 18(12): 2427-2434.

[8] Sandler E, Lyden E, Ruymann F, *et al*. Efficacy of ifosfamide and doxorubicin given as a phase Ⅱ "window" in children with newly diagnosed metastatic rhabdomyosarcoma: a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group[J]. Med Pediatr Oncol, 2001, 37(5): 442-448.

[9] Raney R B, Stoner J A, Walterhouse D O, *et al*. Results of treatment of fifty-six patients with localized retroperitoneal and pelvic rhabdomyosarcoma: a report from The Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Ⅳ, 1991-1997[J]. Pediatr Blood Cancer, 2004, 42(7): 618-625.

[10] Breitfeld P P, Lyden E, Raney R B, *et al*. Ifosfamide and etoposide are superior to vincristine and melphalan for pediatric metastatic rhabdomyosarcoma when administered with irradiation and combination chemotherapy: a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group [J]. J Pediatr Hematol Oncol, 2001, 23(4): 225-233.

[11] Raney R B, Anderson J R, Barr F G, *et al*. Rhabdomyosarcoma and undifferentiated sarcoma in the first two decades of life: a selective review of intergroup rhabdomyosarcoma study group experience and rationale for Intergroup Rhabdomyosarcoma Study V[J]. J Pediatr Hematol Oncol, 2001, 23(4): 215-220.

(编辑 汪勤俭)

文章编号:1000-5404(2007)01-0077-01

个案与短篇

大龄近视患者行LASIK手术后近距离视觉满意度分析

罗启惠,汪 释,任 茜,胡春明 (第三军医大学西南医院全军眼科中心,重庆 400038)

准分子激光原位角膜磨镶术(excimer laser in situ keratomileusis, LASIK)是目前备受瞩目的角膜屈光手术,但是年龄对手术效果的影响已逐渐引起人们的关注[1]。在临床上我们发现对于年龄较大的近视患者,屈光手术后的近距离用眼往往不是很理想,为此,我们对在我院接受LASIK治疗的240例480眼大龄近视患者进行了回顾性分析。

1 资料与方法

1.1 对象

240例480眼行LASIK手术矫治的近视患者,随访时间2年。其中男性122例(244眼),女性118例(236眼),年龄30~50岁。术前等效球镜值为-2.00~-12.00(-5.77±2.51)D;柱镜为0.00~-6.00(-1.22±0.91)D,术前矫正视力为(1.05±0.11)(0.8~1.5)。

1.2 方法

所有病例按年龄分为Ⅰ,Ⅱ,Ⅲ组:Ⅰ组200眼,年龄30~35岁;Ⅱ组200眼,年龄36~40岁;Ⅲ组80眼,年龄41~50岁。

所有病例按是否预留屈光度分为A,B组:A组 预留屈光度组:AⅠ组,100眼(预留-0.25 D);AⅡ组,100眼(预留-0.50 D);AⅢ组,40眼(预留-0.75 D)。B组 对照组:BⅠ组,100眼(全矫);BⅡ组,100眼(全矫);BⅢ组,40眼(全矫)。

1.3 主要观察指标

手术前后的裸眼远、近视力、术前屈光度、预留屈光度以及术后小瞳、散瞳验光结果,进行近距离工作疲劳症状调查,所有病例均于术后24个月进行视觉满意度问卷调查,并进行统计学分析。

1.4 统计学处理

采用SPSS 10.0统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 术后远视力、近视力、屈光度

各组术后裸眼远视力与术前比较均显著提高($P<0.01$),AⅠ组(1.05±0.16)与BⅠ组(1.04±0.10)、AⅡ组(0.98±0.10)与BⅡ组(1.00±0.08)比较在统计学上无显著性差异($P>0.05$),而AⅢ组(0.88±0.09)则明显低于BⅢ组(0.99±0.03),在统计学上有显著差异($P<0.05$)。术后各组裸眼近视力与术前比较有所下降,在统计学上有显著差异($P<0.01$),预留组(1.01±0.17)高于对照组(0.89±0.18),差异显著($P<0.05$)。术后实际残留屈光度预留组(AⅠ:-0.04±0.20,AⅡ:-0.17±0.19,AⅢ:-0.20±0.42)低于术前预留屈光度(-0.25,-0.5,-0.75),在统计学上有显著差异($P<0.01$)。

2.2 术后近距离工作疲劳症、视觉满意度

近距离工作疲劳症状见表1,术后视觉满意度调查见表2。

表1 各组近距离工作疲劳症状的比较

术后时间	AⅠ	AⅡ	AⅢ	BⅠ	BⅡ	BⅢ
术后12月	4.40±1.58[a]	5.18±3.49[a]	8.20±2.05[a]	8.90±3.54	10.60±3.44	11.80±1.79
术后24月	3.70±0.67[a]	4.36±2.66[a]	7.00±1.41[a]	8.00±3.53	9.20±3.03	11.20±2.28

a:$P<0.05$,与B组比较

表2 各组术后24个月视觉满意度分布情况[眼数(%)]

组别	眼数	满意	一般	不满意
AⅠ	100	(96,96.0)	(4,4.0)	0
AⅡ	100	(92,92.0)	(8,8.0)	0
AⅢ	40	(34,85.0)	(6,15.0)	0
BⅠ	100	(88,88.0)	(12,12.0)	0
BⅡ	100	(84,84.0)	(16,16.0)	0
BⅢ	40	(28,70.0)	(10,25.0)	(2,5.0)

3 讨论

为改善视觉质量,提高患者术后的视敏度和对比敏感度,

(下转89页)

作者简介:罗启惠(1980-),女,重庆重大,护师,主要从事眼屈光方面的研究 电话:(023)68754126, E-mail:lqh320@sina.com

收稿日期:2006-02-22;修回日期:2006-06-08