论著

文章编号:1000-5404(2008)20-1940-04

大鼠C6脑胶质瘤生长规律的影像学与病理学观察

王 博,王 毅,陈金华,谭 勇,李 雪,张伟国 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所放射科,重庆 400042)

摘 要:目的 建立Wistar大鼠C6胶质瘤模型,采用MRI、CT灌注(CT perfusion, CTP)成像观测肿瘤体积的动态变化,探讨大鼠C6脑胶质瘤的生长规律。**方法** 成年Wistar大鼠40只,采用立体定向仪进行C6细胞脑内接种,建立大鼠C6脑胶质瘤模型。每次随机抽取10只接种鼠分别对应于5~9 d、10~14 d、15~19 d 3个时间段行CTP、MRI及病理学检查,观测大鼠C6脑胶质瘤的生长规律,并评价影像学与病理学结果之间的相关性。**结果** 15~19 d时间段CTP、MRI观测结果分别与病理学结果比较均有显著性差异($t=3.131$, $P<0.01$;$t=2.566$, $P<0.05$),但CTP与MRI观测结果差异无统计学意义($P>0.05$)。5~9 d和10~14 d时间段3种技术观测结果比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。Pearson线性相关分析表明CTP、MRI与病理学三者测量结果间均有显著正相关,病理学与CTP、病理学与MRI、CTP与MRI的$r=0.998$, 0.998, 1.000($P<0.01$)。回归分析表明,肿瘤体积随时间呈指数规律增长($r_{patho}=0.990$, $r_{CTP}=0.987$, $r_{MRI}=0.990$, $P<0.01$)。**结论** 影像学活体观测的准确性高,更真实反映肿瘤的实际大小,适于对肿瘤动物模型的生长观测和试验性治疗的疗效评价。

关键词: 胶质瘤;动物模型;灌注成像;磁共振成像
中图法分类号: R730.23;R739.41;R816.1 **文献标识码:** A

Growth pattern of rat C6 brain gliomas: imaging and histopathologic observation

WANG Bo, WANG Yi, CHEN Jin-hua, TAN Yong, LI Xue, ZHANG Wei-guo (Department of Radiology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To establish a Wistar rat model of C6 brain glioma and explore the growth pattern in C6 brain glioma rats by MRI and CT perfusion (CTP) imaging. **Methods** Rat model of brain glioma was established by implanting C6 cells into 40 adult Wistar rats with stereotactic technique. CTP, MRI and pathologic examination were performed in 10 implanted rats randomly sampled at the time periods of 5 – 9 d, 10 – 14 d, 15 – 19 d after tumor implantation. The growth pattern of C6 brain glioma in rats was observed and the correlation between imagings and histopathologic results was evaluated. **Results** There had significant difference at 15 – 19 d ($t=3.131$, $P<0.01$; $t=2.566$, $P<0.05$) between CTP, MRI and histopathologic results, but no significant difference ($P>0.05$) between CTP and MRI; and no significant difference ($P>0.05$) at 5 – 9 d, 10 – 14 d. Pearson linear correlation analysis revealed a significant positive correlation among the growth of tumor shown on CTP and MRI and by pathologic methods ($r=0.998$, 0.998, 1.000; $P<0.01$). Regression analysis indicated the tumor volume was in exponential growth with time ($r_{patho}=0.990$, $r_{CTP}=0.987$, $r_{MRI}=0.990$, $P<0.01$). **Conclusion** Imaging observation *in vivo* can accurately reflect the practical tumor volume, and is suitable for the growth pattern of tumor in animal model and to evaluate the efficiency of experimental therapy.

Key words: glioma; animal model; perfusion imaging; magnetic resonance imaging

采用影像学方法对病变进行观测,已广泛应用于临床病情及其治疗效果的评价,是活体量化评估病变大小及范围的有效手段,与术后病理学观测结果之间具有很好的一致性。尽管如此,影像学用于小型动物肿瘤模型观测结果与病理学之间的一致性还存在一些争议,并有文献[1]报道MRI对鼠脑胶质瘤的观测与病理学测量结果存在较大差异。因此,影像学对小型动物肿瘤模型观测结果的准确性还需要进一步验证。本研究通过建立Wistar大鼠C6胶质瘤模型,采用MRI、CT灌注(CT perfusion, CTP)成像观测肿瘤体积

基金项目: 重庆市科技攻关项目(2007AC5014)
Supported by the Foundation for Sci & Tech Research Project of Chongqing (2007AC5014)
作者简介: 王 博,女,河南省禹州市人,硕士研究生,医师,主要从事神经放射学方面的研究。E-mail:wangbo0374@yahoo.cn
通信作者: 张伟国,电话:(023)68757621
收稿日期: 2008-07-20;**修回日期:** 2008-08-18

随时间的变化规律,并与组织病理学结果进行比较,以评价影像学对小型动物疾病模型观测的准确性,及其探讨 Wistar 大鼠 C6 脑胶质瘤的生长规律。

1　材料与方法

1.1　动物模型的建立

1.1.1　动物来源及分组　　成年健康 Wistar 大鼠 40 只,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供,雌雄各半,体质量 200 ~ 250 g。C6 细胞脑内接种后,每次随机抽取 10 只接种鼠分别对应于 5 ~ 9 d、10 ~ 14 d、15 ~ 19 d 3 个时间段行 CTP、MRI 及病理学检查,每一时间段取 2 个时间点各检查 5 只,对应时间点为 7、9、12、14、17 d 和 19 d。一旦影像学无阳性发现,立即补充接种鼠,补齐每个时间点影像学阳性样本数相同。

1.1.2　模型制作　　3.5% 水合氯醛于大鼠腹腔内注射(1 ml/100 g)麻醉后,采用立体定向架固定,头顶双侧眼裂连线后大约 1.5 cm 处纵向切开头皮,暴露前囟颅骨标志,前囟中点后 1 mm,矢状缝右侧旁开 3 mm 处用牙科钻钻一骨孔。利用 50 μl 微量注射器抽取 C6 细胞悬液 10 μl(细胞数 $1 \times 10^5/\mu l$),垂直固定于立体定向架上,经骨孔处进针硬脑膜下 6 mm,后退 1 mm,于 10 min 内将细胞悬液注完(1 μl/min),注射完毕后留针 5 min,缓慢退针,骨蜡封闭骨孔,1 号丝线缝合头皮切口,对接种的大鼠在动物中心进行单笼常规饲养。

1.2　CT 灌注成像

采用 GE LightSpeed 64 层螺旋 CT,腹腔注射 3.5% 的水合氯醛 1 ml/100 g 麻醉大鼠平稳后,于尾静脉安置 24G × 19 mm 静脉留置针。以涵盖大鼠全脑行 CT 灌注扫描,用 CT 自动高压注射器经大鼠尾静脉注射欧乃派克(Omnipaque, 350 mg/ml),注射速度 0.2 ml/s,总剂量 2 ml。注射对比剂的同时启动扫描,FOV 9.6 cm × 9.6 cm,层厚 2.5 mm、1 层/s、扫描时间 40 s。将 CT 灌注原始数据传送至 AW 4.2P 工作站,利用 Perfusion 3 软件进行灌注分析,流入动脉选择颈总动脉,流出静脉选择上矢状窦。最后计算得到反映肿瘤灌注功能状态的伪彩功能图:脑血流量(cerebral blood flow, CBF)、脑血容量(cerebral blood volume, CBV)、平均通过时间(mean transit time, MTT)和表面通透性(permeability surface, PS)图。肿瘤体积计算:在 CBV 图肿瘤显示最大层面分别测量瘤体最大长径(a)和与其垂直的最大宽径(b)(mm),肿瘤体积(mm^3) = $a \times b^2/2$。

1.3　MRI 检查

每只大鼠 CT 灌注扫描后次日行 MRI 检查。采用西门子 1.0-T 磁共振成像系统,腹腔注射 3.5% 的水合氯醛 1 ml/100 g 麻醉大鼠平稳后,俯卧位置于 MRI 机扫描床,表面线圈(3 英寸)安置于大鼠头部。扫描参数:SE T_1WI 为 TR = 450 ms,TE = 15 ms,FS T_2WI 为 TR = 1 800 ms,TE = 70 ms,层厚 2.0 mm,矩阵 256 × 256,扫描野 7.0 cm × 7.0 cm。增强扫描经腹腔注入 Gd-DTPA,总剂量 1.5 ml,10 ~ 15 min 后行 T_1WI 增强扫描。肿瘤体积计算:在增强 T_1WI 横断面图像肿瘤显示最大层面测量瘤体最大长径(a)和与其垂直的最大宽径(b),肿瘤体积(mm^3) = $a \times b^2/2$。

1.4　病理学观测

在 HE 染色切片上,选取肿瘤显示最大层面测量瘤体最大长径(a)和与其垂直的最大宽径(b),肿瘤体积(mm^3) = $a \times b^2/2$。

1.5　统计学处理

组间比较采用配对 t 检验。采用回归分析判断肿瘤随时间的增长规律,并计算相关系数。病理、CTP、MRI 3 种技术对肿瘤体积测定结果之间采用 Pearson 相关分析,计算其相关系数,并进行 t 检验。

2　结果

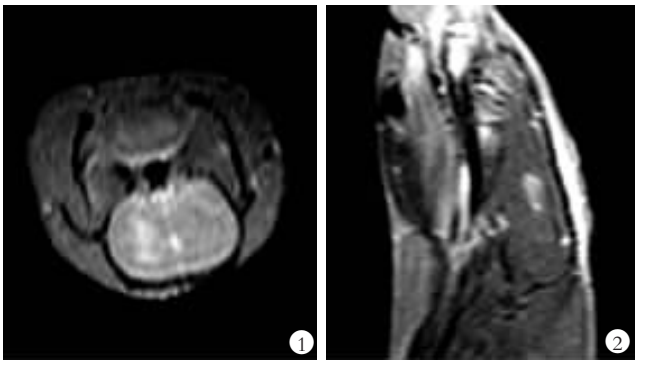
2.1　Wistar 大鼠 C6 脑胶质瘤影像学特征

MRI 和 CTP 显示肿瘤均位于右侧尾壳核,接种第 5 ~ 9 天肿瘤较小,表现为结节状或梭形生长,边界清楚,有轻度占位效应。接种后 10 ~ 14 d 肿瘤生长加快,直径可达 3 ~ 5 mm,呈椭圆形,境界仍较清楚。15 ~ 19 d 肿瘤进行性增大,常突破边界向周围组织呈树枝状浸润,可见中线结构移位,最大可占据右侧半球 1/2 以上,并经胼胝体向对侧半球浸润。

MRI 表现为 T_1WI 信号改变多不明显或呈稍低信号,境界不清;T_2WI 呈不均匀高信号,境界不清,并可见水肿区显示;注入 Gd-DTPA 后肿瘤实质明显均匀强化,界限比较清楚,但肿瘤无包膜,呈浸润性生长(图 1,2)。在 CT 灌注伪彩图像上按照组织血流灌注的高低,肿瘤在 CBF、CBV 图像上均表现为明显高灌注,表现为红色与绿色不均匀混杂色彩,境界比较清楚,而 PS 图上显示肿瘤高灌注区域呈以红色为主的红绿混杂色彩,提示 PS 值增大(图 3)。所有肿瘤在 MTT 图像上色彩改变均不明显,提示 MTT 值无明显变化,与人脑自发性胶质瘤相似。

2.2　CTP、MRI 及病理学肿瘤体积观测结果

在 MRI、CTP 和病理切片上肿瘤体积观测结果有一定差别,病理测得肿瘤体积的平均值均小于 MRI 和 CTP 观测结果,肿瘤体积以 CTP 观测最大,其次是 MRI 观测结果。15 ~ 19 d 时间段 CTP、MRI 观测结果分别与病理学结果比较均有显著性差异($t = 3.131$, $P < 0.01$; $t = 2.566$, $P < 0.05$),但 CTP 与 MRI 观测结果差异无统计学意义($P > 0.05$)。5 ~ 9 d 和 10 ~ 14 d 时间段 3 种技术观测结果比较均无统计学意义($P > 0.05$,表 1)。

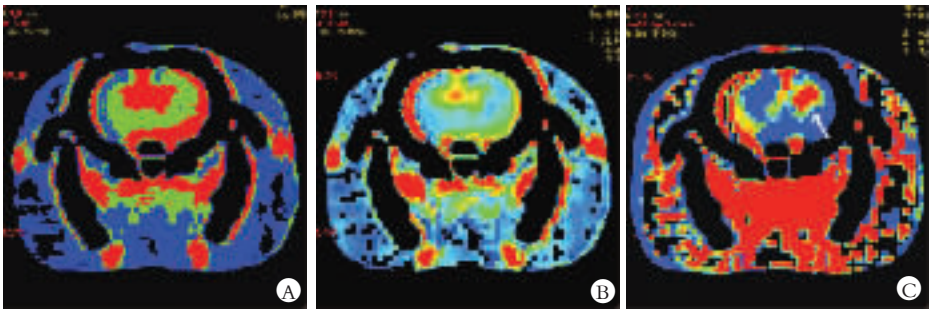


右侧尾壳核有一片状不均匀高信号区,境界不清楚

图 1　大鼠 C6 脑胶质瘤 MR 扫描 T_2WI

右侧尾壳核有一梭形明显强化瘤灶,肿瘤无细胞膜,呈浸润性生长

图 2　大鼠 C6 脑胶质瘤 Gd-DTPA 增强 T_1WI



A:CBF 图,见右侧尾壳核一片状红色高灌注区;B:CBV 图,见右侧尾壳核一片状黄绿混杂色彩高灌注影区;C:PS 图,见病变区 PS 值明显增高,表现为红、黄、绿 3 层色彩

图 3 大鼠 C6 脑胶质瘤 CT 灌注成像表现

表 1 CTP、MRI 及病理学于不同时间段对肿瘤体积的观测结果

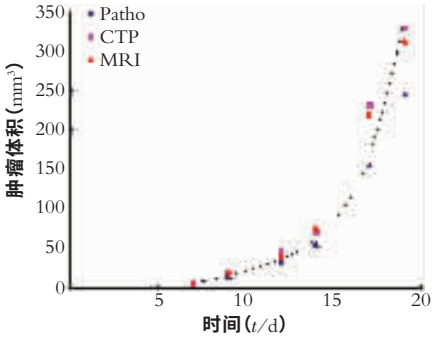
(mm^3, $\bar{x} \pm s$)

观测技术	5 ~ 9 d	10 ~ 14 d	15 ~ 19 d
CTP	12.398 ± 8.341	59.109 ± 14.558	280.044 ± 58.499[a]
MRI	10.949 ± 7.383	56.818 ± 18.850	264.856 ± 56.909[b]
病理	9.048 ± 5.527	44.466 ± 14.669	201.075 ± 54.233

a: $P<0.01$, b: $P<0.05$, 与病理学观测结果比较

2.3 CTP、MRI 及病理学肿瘤体积观测结果之间的相关性

对 3 种技术第 7、9、12、14、17、19 天观测结果的平均值进行 Pearson 线性相关分析,结果表明 3 种技术的测量结果间呈显著正相关,病理学与 CTP、病理学与 MRI、CTP 与 MRI 的 r = 0.998、0.998、1.000($P<0.01$)。进一步对肿瘤随时间变化的回归分析表明,肿瘤体积随时间呈指数规律增长($r_{patho}=0.990$, $r_{CTP}=0.987$, $r_{MRI}=0.990$, $P<0.01$)(图 4)。



($r_{patho}=0.990$, $r_{CTP}=0.987$, $r_{MRI}=0.990$, $P<0.01$)

图 4 时间 - 肿瘤体积曲线图

3 讨论

关于大鼠 C6 胶质瘤的生长,病理学研究表明,自 C6 细胞接种后即开始生长,2 d 左右在镜下可见到球形病灶,10 d 左右即可进入迅速增长阶段[12]。由于影像学技术分辨率的限制,CT、MRI 一般不能显示 5 d 以前的大鼠 C6 脑胶质瘤,因此影像学对其生长特征的观察应选择在 5 d 以后。以往基于 MRI 观测表明,C6 胶质瘤在 2 周左右可占据冠状面上右侧大脑半球的 1/3,T_2WI 及增强 T_1WI 均可清晰显示肿瘤,此时大鼠仅表现为神萎、运动减少等。而 3 周左右肿瘤可占据冠状面上超过右侧大脑半球的 1/2,并向周围正常组织呈树枝样浸润,此时大鼠精神萎靡进一步加重,还可表现为行走不稳、偏瘫等症状。自然死亡前,肿瘤已占据右半球大部,并向对侧侵犯,此时大鼠极度萎靡,偏瘫进一步加重,球结合膜有血性液体渗出[2,3]。

本研究在 5 ~ 9 d、10 ~ 14 d 和 15 ~ 19 d 3 个时间段各取 2 个时间点进行了观测,结果表明肿瘤体积随时间呈指数规律增长,在 5 ~ 9 d 期间肿瘤生长缓慢,10 ~ 14 d 肿瘤生长明显加快,而 15 ~ 19 d 肿瘤增长十分迅速。研究报道 C6 细胞接种大鼠 20 d 以后,大多数大鼠处于濒死状态[2-5],与本研究肿瘤的生长规律一致,本实验 20 d 以后的 5 只接种鼠也分别于 23、25 d 和 26 d 相继处于濒死状态,也进一步提示 C6 细胞接种后大鼠出现临床症状的时间与肿瘤的生长规律密切相关。

尽管如此,本研究结果显示 2 只接种大鼠在 30 d 以后仍然存活,而且再度变得活跃,影像学检查发现肿瘤明显缩小或消失。这种情况在文献[6 - 9]也有报道,王晓刚等[6]于 Wistar 大鼠皮下接种 C6 细胞后对肿瘤生长进行观察,发现肿瘤在皮下生长有自限性,在接种后 5 ~ 25 d 生长稳定,从第 25 天起肿瘤停止生长并逐渐缩小,接种后 40 d 皮下肿瘤完全坏死,仅见肿瘤包膜及大量炎细胞。

李明等[7]报道了 3 例 C6 细胞在 SD 大鼠颅内接种后长期存活,第 50 天 MRI 观察 2 只肿瘤明显缩小,1 只完全消失。Badie 等[8]采用体外实验从分子水平上证明 C6 胶质瘤细胞具有强免疫原性的原因,异源基因性的 C6 大鼠胶质瘤模型自身能够产生强烈的免疫排斥反应,导致了该类模型中出现肿瘤自行消退、荷瘤大鼠长期存活的现象。因此,Vince 等[9]认为,由于大鼠可能存在由于自身免疫活性而导致 C6 胶质瘤自然消退,利用该模型进行治疗研究时必须慎重选择试验时间点和观察时段。

本研究采用了 3 种不同的技术测定肿瘤的体积,结果表明 MRI、CTP 和病理学测量结果存在一定差异,以 CTP 测量结果最大,其次是 MRI,病理学测量结果最小,但 CTP 与 MRI 测量结果之间的差异无统计学意义。MRI、CTP 与病理学测量结果在肿瘤较小时无统计学意义,当肿瘤较大(15 ~ 19 d)时存在显著性差异。Blanchard 等[1] 利用 MRI 和病理学 HE 染色切片对 F98 鼠脑胶质瘤进行了测量,也得出类似的结果,并认为 MRI 测量存在高估肿瘤大小的现象。

产生这种差异有多种原因,其中最主要的因素与组织学检查标本处理过程有关,标本在固定、脱水和包埋过程中要发生皱缩,并相应缩小肿瘤的体积。文献[10,11]报道标本处理过程发生皱缩的程度在 7% ~ 33%,不同的处理过程存在较大的变异。其他的因素,如肿瘤周围血管增生,也是影像学测量结果大于组织学 HE 染色测量结果的原因。本研究 CTP 测量结果略大于 MRI 测量结果可能与肿瘤周围血管增生有关,由于 CTP 对新生血管的检测较 MR 增强扫描敏感,这一因素可能导致 CTP 图像上肿瘤的范围大于 MR 增强扫描。另外,CTP 图像的几何变形也许会产生测量偏差。

尽管如此,当采用 Pearson 相关分析比较 3 种技术的测量结果,发现 3 组测量值之间存在显著的线性正相关,表明 CTP、MRI 对肿瘤体积的测量具有很高的准确性。从活体观测角度考虑,影像学测量结果不仅更真实代表肿瘤的实际大小,而且其观测所受干扰因素较少,不同研究间的可比性较强。而病理学观测受标本处理过程中皱缩程度变异的影响,可能给不同研究的比较带来困难。基于影像学测量优势,本研究认为影像学活体测量更真实反映肿瘤的实际大小,适于对肿瘤动物模型的生长观测和试验性治疗的疗效评价。

参考文献:

[1] Blanchard J, Mathieu D, Patenaude Y, *et al*. MR-pathological comparison in F98-Fischer glioma model using a human gantry[J]. Can J Neurol Sci, 2006, 33(1): 86 - 91.

[2] 陈　骏, 余永强, 钱银锋, 等. 大鼠 C6 脑胶质瘤生长的动态观察和 MR 灌注成像可行性研究[J]. 中华神经医学杂志, 2004, 3(1): 18 - 21.

[3] 刘　健, 刘　洋, 杨　华, 等. 大鼠 C6 胶质瘤模型的建立及 MRI 影像学特征[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2004, 3(3): 258 - 259.

[4] 张华蓉, 陈飞兰, 陈剑鸿, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(10): 957 - 960.

[5] 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.

[6] 王晓刚, 魏学忠, 周定标. Wistar 大鼠 C6 胶质瘤动物模型的肿瘤生长特点[J]. 军医进修学院学报, 2001, 22(4): 300 - 302.

[7] 李　明, 冯　华, 李　飞, 等. 大鼠 C6 脑胶质瘤模型的病理特征与 MRI 的观察[J]. 中华神经外科杂志, 2005, 21(5): 279 - 282.

[8] Badie B, Schartner J M. Flow cytometric characterization of tumor-associated macrophages in experimental gliomas [J]. Neurosurgery, 2000, 46(4): 957 - 961.

[9] Vince G H, Bendszus M, Schweitzer T, *et al*. Spontaneous regression of experimental gliomas——an immunohistochemical and MRI study of the C6 glioma spheroid implantation model[J]. Exp Neurol, 2004, 190(2): 478 - 485.

[10] Wree A, Goller H J, Beck T. Local cerebral glucose utilization in perfusion-fixed rat brains[J]. J Neurosci Methods, 1995, 58(1 - 2): 143 - 149.

[11] Prabhu S S, Broaddus W C, Oveissi C, *et al*. Determination of intracranial tumor volumes in a rodent brain using magnetic resonance imaging, Evans blue, and histology: a comparative study[J]. IEEE Trans Biomed Eng, 2000, 47(2): 259 - 265.

(编辑　王　红)

本刊 2007 年度评价指标有了较大幅度提升

9 月 28 日,中国科学技术信息研究所信息资源中心通报我刊编辑部《2007 年度期刊引证报告》有关数据,《第三军医大学学报》2007 年评价指标与 2006 年相比,有了较大提高。经统计,《学报》总被引频次为 2 982 次(2006 年为 1 767 次),影响因子为 0.593(2006 年为 0.428),他引率为 0.846(2006 年为 0.82),基金论文比为 0.487(2006 年为 0.41)。

本刊 2007 年期刊引证报告中被引频次最高的前 5 篇文章

[1] 张绍祥, 刘正津, 谭立文, 等. 首例中国数字化可视人体完成. 第三军医大学学报, 2002, 24(10): 1231 - 1232.

[2] 徐　智, 吴国明, 钱桂生, 等. 大鼠衰老模型的初步建立. 第三军医大学学报, 2003, 25(4): 312 - 315.

[3] 张绍祥, 刘正津. 数字化可视人体研究. 第三军医大学学报, 2003, 25(7): 561 - 562.

[4] 蔡曦光, 许爱霞, 葛　斌, 等. 菟丝子多糖抑制衰老小鼠模型中氧自由基域的作用. 第三军医大学学报, 2005, 27(13): 1326 - 1328.

[5] 代方国, 罗　仁, 王宇光, 等. 甘遂配伍甘草对大鼠肝脏 CYP2E1 表达及活性的影响. 第三军医大学学报, 2005, 27(8): 742 - 744.