DOI:10.16016/j.1000-5404.201410185

论著

缺氧对C57小鼠脑胶质瘤模型肿瘤形成及生存期的影响

赵秀文,汪 攀,兰 川,吴 南 (400038 重庆,第三军医大学西南医院神经外科,全军神经外科研究所,全军神经创伤防治重点实验室)

[摘要] **目的** 探讨缺氧对C57小鼠胶质瘤肿瘤形成及生存期的影响。**方法** ①培养GL261胶质瘤细胞系,转染荧光素酶基因,制备GL261-Luc细胞。②42只清洁健康级雌性C57小鼠[6周龄,体质量(17.5±2.3)g]脑内注射GL261-Luc细胞荷瘤,分成常氧饲养组(21% O_2)和低氧饲养组(10% O_2),每组21只,其中6只分别于7、14、21 d后行活体成像图像采集以观察小鼠肿瘤形成能力;另外15只用于生存期观察,时限30 d。③取材并HE染色观察肿瘤形成情况,免疫组化GFAP鉴定胶质瘤。**结果** 活体成像显示缺氧饲养组小鼠有明显肿瘤形成,而常氧饲养组无肿瘤形成,计算颅内荷瘤细胞病毒活性并统计分析得缺氧饲养组肿瘤形成能力强于常氧饲养组($P<0.05$);生存期分析显示缺氧饲养组小鼠平均生存期为22.5 d,生存率明显低于常氧饲养组($P<0.01$);脑组织大体标本和HE染色发现缺氧组小鼠共18只有脑肿瘤形成,常氧组仅2只形成肿瘤,免疫组化GFAP胶质瘤鉴定示肿瘤内高表达。**结论** GL261胶质瘤细胞系C57小鼠成瘤模型缺氧饲养后肿瘤形成能力明显强于常氧饲养组,且生存率较常氧组更低,提示缺氧可以增加肿瘤恶性。

[关键词] 缺氧;胶质瘤;肿瘤种植;肿瘤形成;生存期
[中图法分类号] R364.4; R730.23; R730.264 [文献标志码] A

Hypoxia improves tumor formation but reduces survival time in C57 mice implanted with glioma GL261 cells

Zhao Xiuwen, Wang Pan, Lan Chuan, Wu Nan (Institute of Neurosurgery, Key Laboratory of Neurotrauma Prevention and Treatment, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of hypoxia on tumor formation and survival time in tumor-bearing C57 mice implanted with glioma GL261 cells. **Methods** Cultured glioma GL261 cells were transduced to express luciferase under blasticidin selection (5 μg/mL) to produce GL261-Luc cells. Then SPF C57 mice ($n=42$, female, 6 weeks old, weighing 17.5±2.3 g) implanted with GL261-Luc cells in the brain were randomized into 2 groups equally, fed under hypoxia condition (10% O_2), or normoxia (21% O_2). The tumor growth was observed by bioluminescence imaging (bli) in the days 7, 14 and 21 after injection ($n=6$ per group). The remaining tumor-bearing mice ($n=15$ per group) were observed for their survival within 30 d, and then the results were analyzed by Kaplan-Meier curve. HE staining was used to observe the tumor formation for those dead mice and survived mice within 30 d. **Results** Bioluminescence imaging showed that obvious tumor masses were developed in hypoxia-treated group, whereas no tumor was formed under normoxia. Measuring viral activity in the brain tumor cells indicated that the hypoxia-treated group had stronger capacity in tumor formation than the normoxia group ($P<0.05$). The survival time of mice in hypoxia group was 22.5 d, significantly lower than that of normoxia group ($P<0.01$). Gross and

[基金项目] 国家自然科学基金(81272784)
[通信作者] 吴 南,电话:(023)68765265, E-mail:wunan881@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150319.0952.014.html(2015-03-19)

morphological observation found that there were 18 tumor masses in the mice of hypoxia group, but only 2 in the other group. Immunohistochemical staining showed that glial fibrillary acidic protein (GFAP) was highly expressed in the tumor masses. **Conclusion** Hypoxia promotes tumor formation and declines survival rate in glioma-bearing mice, when compared with the tumor-bearing mice living under normoxia, which indicating hypoxia improves malignancy in the implanted tumor.

[**Key words**] hypoxia; glioma; neoplasm seeding; tumor formation; survival time

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81272784). Corresponding author: Wu Nan, Tel: 86-23-68765265, E-mail: wunan881@163.com

胶质瘤作为颅内最常见的肿瘤,约占颅内肿瘤的35% ~50%[1]。尽管目前胶质瘤的治疗方式包括有手术、放疗及化疗在内的多种手段,但仍是颅内肿瘤中治愈率最低的肿瘤[2]。据研究,超过50%的高度恶性胶质瘤患者会在术后1年内复发,究其原因,主要是胶质瘤细胞对放化疗的高度抵抗性[3-4]。为解决这一科学难题,研究者着手研究术后高压氧联合放化疗对胶质瘤患者生存率的影响。传统观点认为高压氧可以增加氧弥散量及弥散距离,使得肿瘤内血液氧浓度提高,进而促进肿瘤快速生长。然而,最新研究发现术后高压氧联合放化疗可以明显增强放化疗的敏感性并显著延长患者生存期[5],而这些研究成果是建立在肿瘤内部的缺氧微环境[6]。缺氧微环境下的肿瘤细胞可以通过自身改变来适应外部环境进而成为肿瘤复发及治疗失败的根本原因[7]。关于缺氧,最新研究证实缺氧微环境可以促进肿瘤干细胞干性持续,进而增强肿瘤恶性[8]。为了更进一步了解缺氧微环境对胶质瘤患者的影响,我们拟采用小鼠胶质瘤成瘤模型,通过体外缺氧模拟肿瘤内缺氧微环境来探讨缺氧对小鼠肿瘤形成及生存期的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用GL261胶质瘤细胞系由第三军医大学西南医院高压氧实验室赠送。DMEM/F12培养基、0.25%胰蛋白酶(100 mL)和胎牛血清均购于美国HyClone公司。脑立体定位仪[精度(0.10 ±0.01)mm]由深圳瑞沃德生命科技有限公司提供。5 μL微量注射器购自宁波镇海玻璃仪器厂。Luc慢病毒由第三军医大学西南医院高压氧实验室赠送,慢病毒基因序列:上游5′-GAAGATCTCACCATGGAAGACGCCAA-3′,下游:5′-GCGTCGAC TTACACGGCGATCTTTCCGC-3′。活体成像底物D-虫荧光素钾盐购自北京泛博生物化学科技有限公司。

1.2 实验动物

清洁健康级雌性6周龄C57小鼠45只,体质量(17.5 ±2.3)g,购自第三军医大学西南医院实验动物中心,自由进食、饮水。荷瘤后小鼠通过SPSS 17.0统计软件随机分为缺氧及常氧饲养2组。常氧饲养条件:21% O_2,5% CO_2,74% N_2;缺氧饲养条件:10% O_2,5% CO_2,85% N_2;缺氧饲养采用12/12 h昼夜循环方式,缺氧时间具体为:早8:00 - 晚20:00。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 GL261胶质瘤细胞系置于完全培养基(DMEM/F12 + 10% FBS + 100 U/mL青霉素 + 100 μg/mL链霉素,pH = 7.2)中,于37 ℃,5% CO_2恒温孵箱内培养。每日于倒置相差显微镜(奥林巴斯I×71)下观察细胞密度及形态改变,待细胞密度80%时予细胞传代,取对数生长期细胞行相关实验处理。

1.3.2 GL261-Luc细胞制备及活性检测 GL261细胞按每孔 2×10^5 接种到6孔板内培养,待细胞密度60% ~70%时,换液并加入Luc慢病毒液(MOI = 50),继续培养2 d后换成筛选培养基(内含Blasticidin,终浓度5 μg/mL)。以后每天细胞用筛选培养基换液,筛选14 d后镜下见大量死细胞,移除死亡细胞并将剩下活细胞行单克隆生长。每日观察细胞生长状况,每隔3 ~4 d传一次代。培养1周后,检测GL261-Luc荧光素酶活性。

1.3.3 小鼠GL261-Luc胶质瘤颅内种植 5%的水合氯醛腹腔内注射麻醉小鼠(0.7 mL/100 g),然后予立体定位仪上俯卧位固定。75%酒精消毒后剪开小鼠头部中部皮肤,长约1 cm,显示前囟及矢状缝。前囟外后0.15 mm,往右2 mm处行颅骨转孔。用微量注射器抽取GL261-Luc单细胞悬液5 μL(共计 10^4 细胞),然后沿针孔垂直缓慢进针,进针深度4 mm,后退1 mm,重复该步骤10次后缓慢注射荷瘤细胞,速度1 μL/min。细胞颅内注射并维持5 min后缓慢退出微量注射器样针,75%酒精消毒伤口,骨蜡骨孔封闭,缝合

头皮切口。由于麻醉意外死亡小鼠 3 只，剩余 42 只小鼠通过 SPSS 17.0 统计软件随机分为 2 组：常氧饲养组和低氧饲养组，每组 21 只，其中 6 只用于活体成像观察肿瘤形成，另外 15 只用于小鼠生存期观察，时限 30 d。

1.3.4　小鼠活体成像　分别于荷瘤 7、14、21 d 后行活体成像观察肿瘤形成。异氟烷气体麻醉动物，每只腹腔注射 200 μL 活体成像底物 D-虫荧光素钾盐（15 mg/kg），注射 15 min 后开始 NightOWL Macro 显像系统（LB983 NC320，Berthold Technologies，Germany）图像采集。依据活体成像活细胞“GL261-Luc-底物”氧化反应发光原理，图像中有荧光者记为肿瘤形成，无荧光者记为无肿瘤形成[9]。根据颅内荷瘤细胞病毒活性强度，通过 NightOWL Macro 分析软件计算并得到肿瘤体积。

1.3.5　小鼠肿瘤大体标本取材、HE 染色及 GFAP 胶质瘤鉴定　尸检全部死亡小鼠。对于所有 30 d 仍存活小鼠予麻醉处死后再行解剖。剪开小鼠颈部中部皮肤，沿头皮中线剪开皮肤及肌肉层，轻轻打开颅顶骨，取出脑组织，观察有无肿瘤形成。脑组织固定于 4% 多聚甲醛内，常规石蜡包埋后切片，片厚 5 μm，脱蜡后行 HE 染色及免疫组化 GFAP 胶质瘤鉴定。

1.3.6　小鼠生存期分析及计入标准　以成功颅内荷瘤后麻醉苏醒作为生存期计入起点，每日观察小鼠有无偏瘫、走路不稳、体质量消瘦、食欲下降等异常症状，待出现上述相关症状后密切观察小鼠生存情况，小鼠死亡后记下时间值作为生存期观察终点。小鼠死亡前期出现偏瘫、走路不稳两者之一症状且经解剖及 HE 染色验证有肿瘤形成者计为肿瘤所致小鼠死亡；小鼠死亡但解剖或 HE 验证无肿瘤形成者考虑为缺氧致小鼠死亡，不计入生存期观察。

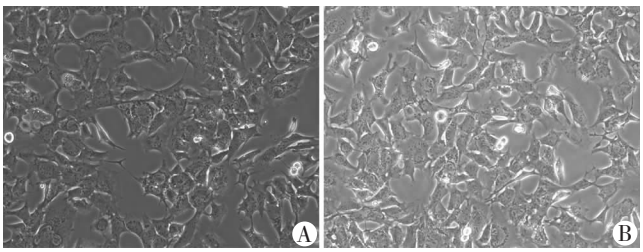
1.4　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 17.0 统计软件分析。不同组活体成像肿瘤体积比较采用配对样本 t 检验；生存率分析采用单因素方差分析，生存曲线采用 Kaplan-Meier 法，并用 Log-rank Test 对各组生存曲线予以调整并进行比较。

2　结果

2.1　GL261 及 GL261-Luc 胶质瘤细胞培养

Luc 慢病毒转染成功后细胞培养 3 代，于倒置相差显微镜下（奥林巴斯 I×71）观察细胞形态，GL261-Luc 胶质瘤细胞与 GL261 细胞形态相似，均贴壁生长，呈长梭形。细胞生长状态好，无明显悬浮死细胞。检测荧光素酶活性示该病毒活性大于 3×10^5，可以作为荷瘤细胞行小鼠颅内种植（图 1）。



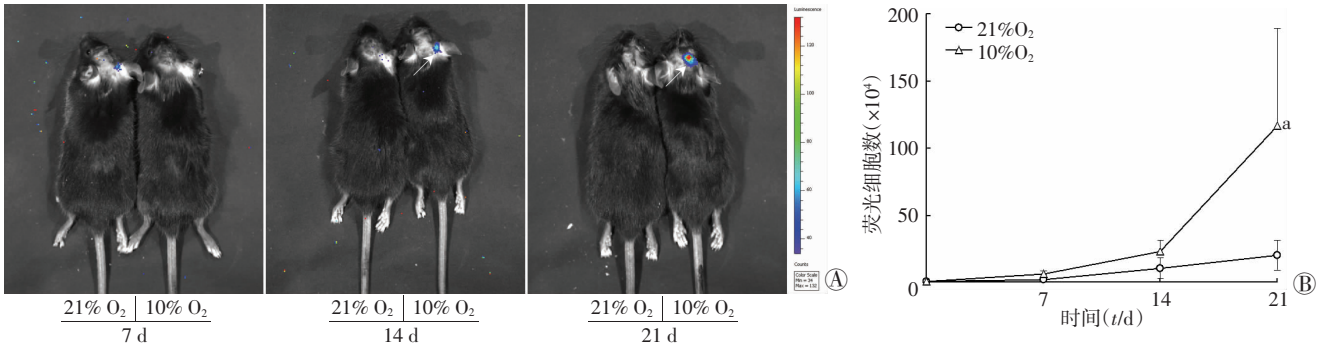
A：GL261 胶质瘤细胞；B：GL261-Luc 胶质瘤细胞

图 1　GL261 及 GL261-Luc 胶质瘤细胞形态学观察

（奥林巴斯 I×71）

2.2　C57 小鼠活体成像图像采集

C57 小鼠分别荷瘤 7、14、21 d 后，予活体成像观察肿瘤形成。根据荧光强度肉眼可见分别缺氧、常氧饲养 7 d 后均无肿瘤形成；14 d 后缺氧饲养组有肿瘤形成，常氧饲养组无肿瘤形成；21 d 后缺氧饲养组肿瘤体积进一步增大，常氧饲养组仍未形成肿瘤。通过 NightOWL Macro 分析软件得到肿瘤体积，经统计学分析，差异具有统计学意义（$P < 0.05$），表明与常氧相比，缺氧饲养可以加快肿瘤形成（图 2）。



A：常氧-缺氧组活体成像　↑示肿瘤部位；B：常氧-缺氧组肿瘤体积统计分析（$n=6$，$\bar{x} \pm s$，a：$P<0.05$，与 21% O_2 比较）

图 2　荷瘤小鼠条件饲养后活体成像及肿瘤体积统计分析

2.3 生存期分析

缺氧饲养组于荷瘤后1 d死亡小鼠1只,考虑急性缺氧所致,不计入生存期观察;其余14只死亡第1只小鼠为荷瘤后11 d,最后1只死亡时间为荷瘤后27 d,根据生存期计入标准,共有12只小鼠计为肿瘤致死。经GraphPad Prism 5计算后得缺氧组小鼠平均生存期22.5 d。常氧饲养组仅在荷瘤后23 d死亡小鼠1只,解剖后可见肿瘤,计入生存期观察组,其余小鼠饲养30 d未死亡。经Kaplan-Meier法生存率分析,并用Log-rank Test对各组生存曲线予以调整后比较得$P<0.01$,具有统计学意义,表明缺氧饲养组小鼠生存率低于常氧组(图3)。

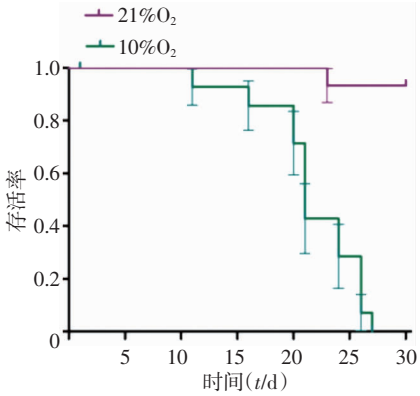


图3 不同饲养组荷瘤鼠生存曲线 ($n=15$, $\bar{x}\pm s$)

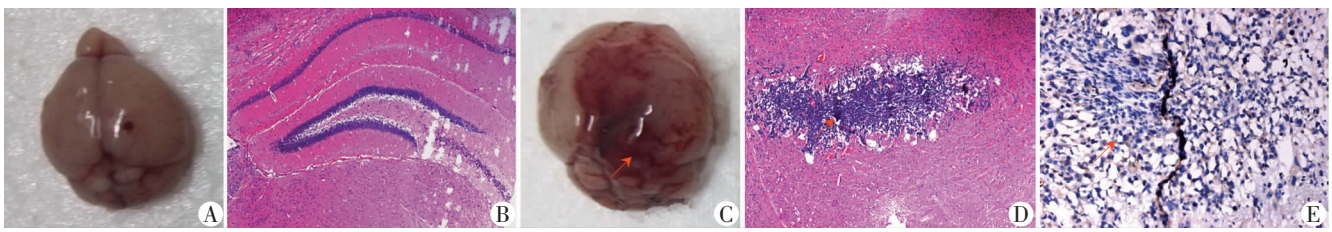
2.4 小鼠肿瘤大体观察及HE染色结果

大体观察及HE染色可见缺氧饲养组21只小鼠中有18只(活体成像组6只,生存分析组12只)有肿瘤形成,位于额顶叶,边界不清,浸润样生长,正常脑组织未明显受压,中线结构无移位。常氧饲养组仅2只有肿瘤形成。免疫组化GFAP鉴定示肿瘤内高表达,证明该肿瘤为胶质瘤(图4)。

3 讨论

作为颅内恶性程度最高的肿瘤,胶质瘤特征性的特点为浸润性生长且边界不清,因此常规外科手术不能彻底清除肿瘤细胞,从而使得大多数患者预后不良[10]。目前研究者认为胶质瘤的这种高度恶性与肿瘤内缺氧微环境密切相关。事实上,颅内肿瘤生理状态下即为一缺氧微环境,平均氧浓度范围波动在0.5% ~7%[11]。研究者将氧浓度范围2.5% ~7%定义为轻度缺氧,0.5% ~2.5%为中度缺氧,0.1% ~0.5%为重度缺氧,严重缺氧或无氧则被认为是氧浓度少于0.1%[8]。其中Ⅱ级胶质瘤表现为轻度缺氧(2.5% ~7%),Ⅲ级胶质瘤表现为中度缺氧(0.5% ~2.5%),Ⅳ级胶质瘤表现为严重缺氧或无氧(<0.1%)[8]。既往研究主要着力于解决缺氧与肿瘤干细胞之间的相关关系并进而发现缺氧可以通过增强肿瘤干细胞干性而表达更高程度的耐药性。2009年,Li[12]通过研究发现肿瘤缺氧可以加快肿瘤干细胞自我更新并促进肿瘤细胞增殖,其他一些报道也得到了类似结果[13]。

为了改善肿瘤内部缺氧并提高肿瘤血管的血流灌注力及通透性,研究者开始研究高压氧在这方面的可能性。理论依据基于高压氧可以增加血流中物理溶解的氧含量,从而增加活性氧自由基的产生并进一步杀死肿瘤细胞。2007年,Raa[14]发现高压氧治疗后可以明显减缓肿瘤的形成速度,肿瘤细胞凋亡率也低于常氧组,通过光学显微镜还发现肿瘤组织内的缺氧坏死区域也明显下降。其他一些研究也证实了高压氧联合放化疗可以明显提高患者生存率[15-17]。基于此,我们认为肿瘤缺氧微环境本身会增强肿瘤细胞恶性并影响患者生存期,本实验通过GL261胶质瘤C57小鼠成瘤模型缺氧环境下饲养模拟颅内肿瘤缺氧微环境,探讨缺氧对小鼠胶质瘤形成及生存期的影响,发现小鼠在缺氧环境下饲养14 d就有肿瘤形成,21 d后肿瘤体积进一步增大,而常氧饲养21 d后仍未见肿瘤形成。在缺氧环境下,小鼠的生存期也明显低于常氧饲养组,其平均生存期仅为22.5 d,而常氧饲养组饲养30 d后仅



A-B:常氧脑组织;A:脑组织标本;B:脑内HE(无肿瘤形成);C-E:低氧脑组织;C脑组织标本;D:脑内HE(有肿瘤形成);E:组化GFAP鉴定 ↑:示肿瘤部位

图4 GL261荷瘤C57小鼠脑标本、HE染色及免疫组化鉴定

死亡小鼠1只。这些研究结果再次证明了缺氧微环境可以促进胶质瘤恶性进展,从而为高压氧联合放化疗治疗胶质瘤提供了新的理论依据。

参考文献:

[1] Li P, Zhou C, Xu L, *et al*. Hypoxia enhances stemness of cancer stem cells in glioblastoma: an *in vitro* study[J]. Int J Med Sci, 2013, 10(4): 399-407.

[2] Wen P Y, Kesari S. Malignant gliomas in adults[J]. N Engl J Med, 2008, 359(5): 492-507.

[3] Cong Z X, Wang H D, Zhou Y, *et al*. Temozolomide and irradiation combined treatment-induced Nrf2 activation increases chemoradiation sensitivity in human glioblastoma cells [J]. J Neurooncol, 2014, 116(1): 41-48.

[4] Ahmed A U, Auffinger B, Lesniak M S. Understanding glioma stem cells: rationale, clinical relevance and therapeutic strategies[J]. Expert Rev Neurother, 2013, 13(5): 545-555.

[5] Suzuki Y, Tanaka K, Negishi D, *et al*. Pharmacokinetic investigation of increased efficacy against malignant gliomas of carboplatin combined with hyperbaric oxygenation[J]. Neurol Med Chir (Tokyo), 2009, 49(5): 193-197.

[6] Soeda A, Park M, Lee D, *et al*. Hypoxia promotes expansion of the $CD133^{-}$ positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha[J]. Oncogene, 2009, 28(45): 3949-3959.

[7] Yeh W L, Lin C J, Fu W M. Enhancement of glucose transporter expression of brain endothelial cells by vascular endothelial growth factor derived from glioma exposed to hypoxia [J]. Mol Pharmacol, 2008, 73(1): 170-177.

[8] Bar E E, Lin A, Mahairaki V, *et al*. Hypoxia increases the expression of stem-cell markers and promotes clonogenicity in glioblastoma neurospheres[J]. Am J Pathol, 2010, 177(3): 1491-1502.

[9] Maguire C A, Bovenberg M S, Crommentuijn M H, *et al*. Triple bioluminescence imaging for *in vivo* monitoring of cellular processes[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2013, 2: e99.

[10] Oike T, Suzuki Y, Sugawara K, *et al*. Radiotherapy plus concomitant adjuvant temozolomide for glioblastoma: Japanese mono-institutional results[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e78943.

[11] Jensen R L. Brain tumor hypoxia: tumorigenesis, angiogenesis, imaging, pseudoprogression, and as a therapeutic target[J]. J Neurooncol, 2009, 92(3): 317-335.

[12] Li Z, Bao S, Wu Q, *et al*. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells[J]. Cancer Cell, 2009, 15(6): 501-513.

[13] Bar E E. Glioblastoma, cancer stem cells and hypoxia[J]. Brain Pathol, 2011, 21(2): 119-129.

[14] Raa A, Stansberg C, Steen V M, *et al*. Hyperoxia retards growth and induces apoptosis and loss of glands and blood vessels in DMBA-induced rat mammary tumors[J]. BMC Cancer, 2007, 7: 23.

[15] Ogawa K, Ishiuchi S, Inoue O, *et al*. Phase II trial of radiotherapy after hyperbaric oxygenation with multiagent chemotherapy (procarbazine, nimustine, and vincristine) for high-grade gliomas: long-term results[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2012, 82(2): 732-738.

[16] Abe M, Shioyama Y, Terashima K, *et al*. Successful hyperbaric oxygen therapy for laryngeal radionecrosis after chemoradiotherapy for mesopharyngeal cancer: case report and literature review[J]. Jpn J Radiol, 2012, 30(4): 340-344.

[17] Karakullukcu B, van-der-Vlies D, Hoebers F J. A rare late complication after concomitant chemoradiation of an oropharyngeal tumor: cervical necrotizing fasciitis[J]. Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg, 2012, 22(2): 105-108.

(**收稿**:2014-10-30;**修回**:2014-12-20)

(编辑 栾 嘉)