论 著 文章编号:0253-3626(2008)10-1260-04

注射后留置时间对大鼠 C6 脑胶质瘤模型的影响

邱大胜[1],徐丽莹[2],尹明媛[1],熊 婷[1],郭小芳[2],孔祥泉[1]
(1.华中科技大学同济医学院协和医院放射科,武汉 430022;2.武汉大学中南医院放射科,武汉 430071)

【摘 要】目的:采用不同的留置时间建立大鼠 C6 胶质瘤模型,比较不同的留置时间对于模型成功率的影响,提高肿瘤种植成功率。方法:36 只 SD 大鼠按留置时间 3 min、5 min、10 min 分为 3 组,C6 细胞体积 10 μl 细胞悬液、注射时间 5 min。第一次未种植成功者再次种植。术后用骨蜡封骨窗并清创缝合。造模术后 2 周和 3 周分别行 MRI 平扫及增强证实模型肿瘤生长。统计学方法采用 Fisher 精确检验。结果:36 只大鼠,16 只第一次种植成功,20 只种植失败,改变条件再次种植,2 只死于麻醉意外,18 只成功。留置时间 3 min 与 5 min,其 $0.01<P<0.05$,留置时间对于肿瘤种植成功二者差异具有统计学意义,留置 5 min 肿瘤成功率高于 3 min;留置时间 5 min 与 10 min,其 $P<0.01$,留置 5 min 与 10 min 两种不同的留置时间对于肿瘤种植成功二者差异具有显著的统计学意义,留置 10 min,肿瘤成功率明显高于 5 min。结论:微量注射器的留置时间与肿瘤种植成功率有关,随着留置时间的延长,肿瘤种植成功率也会提高。

【关键词】C6 细胞;SD 大鼠;模型;胶质瘤
【中国图书分类法分类号】R445.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-08-17

作者介绍:邱大胜(1975-),男,主治医师,博士,研究方向:肿瘤影像学。
通讯作者:孔祥泉,男,教授,E-mail: dasheng_0929@yahoo.com.cn。

差太大,重建出的冠脉图像位置常会有偏差,出现阶梯状伪影[8,9];另外,由于心律不齐,心脏不能有规律地搏动,导致不同时相心脏运动幅度不一致,这也会产生严重的伪影。心电编辑软件就应运而生,本研究表明,心电编辑软件对心律不齐患者图像质量有明显提升作用($P<0.001$)。根据经验,这种提升作用对于偶发早搏及基线不稳患者作用更明显,对频发早搏及心律绝对不齐患者作用甚微。所以对于这两种心律不齐患者应列为相对禁忌症。

对于心率及心律谁对图像质量影响更大,据赵坤等报导[10]:如果病人心律整齐,即使是较高的心率(80~90 次/min),使用专门扫描方式及相应重建方式,也能得到较好图像质量;如果心律严重不齐,即便是较低心率(<50 次/min),也可能会出现严重的阶梯状伪影甚至冠脉断层现象。另外,王照谦等[11]认为,心率高于 70 次/min 采用双扇区或多扇区重建,可以提高时间分辨率,改善心率较高时的冠脉成像质量,但前提也是心率波动要保持在一个较低的范围内,否则重组扇区越多,反而图像质量就越差。所以扫描对心率的要求进一步放宽,而对心律的要求应更高。

参 考 文 献

[1] 邝平定,张敏鸣,朱建华,等.多层螺旋 CT 回顾性心电门控冠状动脉重建的最佳 R-R 时相及其临床应用[J]. 中华放射学杂志,2004,38(2):178-183.
[2] 纪承寅,姚 勇.现代心血管病显像诊断学[M]. 北京:人民军医出版社,2004.12-14.
[3] 刘 新,蔡祖龙,蔡幼铨,等.多层螺旋 CT 和三维屏气 MR 冠状动脉成像的对比研究[J]. 中华放射学杂志,2007,40(6):597-602.
[4] 赵 红,刘 斌,吴兴旺,等.64 层螺旋冠状动脉成像的心率变化及其对图像质量的影响 [J]. 实用放射学杂志,2007,23(2):145-149.
[5] Giesler T,Baum U,Ropers D,et al. Noninvasive visualization of coronary arteries using contrast-enhanced multi-detector CT:Influence of heart rate on image quality and stenosis detection [J]. AJR,2002,179(4):911-916.
[6] Hoffmann MH,Shi H,Manzke R et al. Noninvasive coronary angiography with 16-detector Row CT: Effect of Heart Rate[J]. Radiology,2005,234(1):86-97.
[7] 刘 斌,赵 红,吴兴旺,等.心率对 64 层螺旋 CT冠状动脉成像图像质量的影响[J]. 放射学实践,2007,22(5):444-447
[8] Benoit,Ella AK. Review ECG-gated cardiac CT[J]. AJR,2004,182(4):993-1010.
[9] 沈 君,李国照,梁碧玲,等.心电图编辑功能在 64 层螺旋 CT 冠状动脉成像中的初步应用 [J]. 中国医学影像技术,2007,23(4):516-519.
[10] 赵 坤,时季成,邵广瑞,等.64 层螺旋 CT 冠状动脉成像质量影响因素的分析[J].医学影像学杂志,2007,17(7):687-699.
[11] 王照谦,杨志强,朱 皓,等.16 层 CT 冠状动脉成像双扇区图像重建算法与相化窗的优选[J]. 放射学实践,2005,20:199-201.

(责任编辑:谭乐勤)

The effect of detaining time after injection in rat brain C6 glioma

QIU Da-sheng, et al

(*Department of Radiology, Xiehe Hospital, Tongji Medical College*)

【Abstract】 *Objective*: To compare different detaining time of the rat model by C6 gliomas implanted and to raise the achievement ratio of the model. *Methods*: 36 rats were divided into 3 groups, according to detaining time. Group 1: The detaining time was 3min; group 2 was 5min; and group 3 was 10min. The volume of C6 cell was 10μl and injection time was 5min for each group. The tresis vulnus was sealed with bone wax. Plain scan and enhanced MRI were performed from 2 weeks to 3 weeks after operation. Statistical analysis was performed by using Fisher analysis for comparison of three data, and P values were calculated for each comparison. $P \leq 0.05$ was considered to indicate a statistically significant difference. *Results*: Of the thirty-six rats glioma models, sixteen rats were modeled successfully in the first time; twenty rats were modeled again by changing condition; two rats were dead for anesthetic accident; eigteen rats were planted successfully. There was a significant difference in the achivement ratio among the three groups: ($0.01<P<0.05$), which showed the achievement ratio of group 3 (detaining time was 10 minutes) was highest. Detaining time of microinjector was very important in the rat model by C6 gliomas implanted and longer detaining time can raise the achievement ratio of the model.

【Key words】 C6 cell; SDRat; Model; Glioma

大鼠 C6 胶质瘤模型是目前临床研究脑胶质瘤常见的模型之一，建立成功的胶质瘤模型是进行胶质瘤基础研究和实验性治疗的基础，本文在 C6 胶质瘤模型建立过程中，采用相同的注射细胞体积、注射时间，探讨不同留置时间对模型成功率的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

SD 大鼠 36 只，180~250 g。雌雄不限，购自华中科技大学同济医学院医学实验动物中心。大鼠C6 胶质瘤细胞株由华中科技大学同济医学院生化教研室提供。细胞悬浮介质采用含 1%低熔点琼脂糖的无血清 2 倍 1640。

1.2 细胞培养

采用含 10%小牛血清的 1640 培养液(凌飞公司)行常规培养，每 2~3 d 行传代培养。采用血细胞计数板行细胞计数，连作 5 次，取平均值，收获指数期生长的细胞，加入细胞悬浮介质，使细胞浓度为 10^6 个/μl，置于冰水浴中保存。

1.3 动物模型制作

(1)大鼠以 10%水合氯醛 0.4 ml/100 g 腹腔注射，麻醉后将大鼠固定于深圳瑞沃德生命科技有限公司生产的立体定位仪上，10%Na_2S 脱去前囟附近的毛发，常规消毒，于中线处眼裂后作 1~1.5 cm 垂直切口，暴露前囟，于右侧冠状缝距中线 3 mm 处以电钻钻直径约 1.0 mm 小骨窗。(2)从冰水浴中取出配好的细胞悬液，微量注射器固定于立体定位仪上。调整移动架位置，使针尖位于右侧冠状缝上距中线 3 mm 处，缓慢垂直进针 5 mm(距硬膜)，后退 1.0 mm。36 只大鼠按留置时间 3 min、5 min、10 min 分为 3 组，注射时间 5 min，注射体积 10 μl。

1.4 模型的 MRI

Marconi1.5T 超导 MR 仪，2.5 英寸环形线圈，从术后 10 d 开始每间隔 2 d 对大鼠行 MRI 平扫及增强，层厚 3.0 mm，无间隔，FOV 8 cm，矩阵 256×256。横断位 T_1WI:TE 30 ms TR 400 ms、T_2WI:TE 120 ms TR 4000 ms，冠状位 T_2WI:TE 120 msTR 4 000 ms，矢状位 T_2WI:TE 120 ms TR 4 000 ms，NEX 15，采集时间 12~20 min。增强：腹腔注射 Gd-DTPA 0.1 ml/100 g，横断位、冠状位、矢状位 T_1WI:TE 30 ms TR 400 ms。术后 20dMRI 未见明显肿瘤生长，则按造模失败，拟行再次造模。

1.5 统计学处理

采用 Fisher 精确检验比较不同的造模操作对于模型成功率的影响。

2 结 果

2.1 不同留置时间模型成功率

36 只大鼠，第 1 次造模：留置时间 3 min 造模 18 只，成功 2 只，留置时间 5 min 造模 12 只，成功 9 只，留置时间 10 min 造模 6 只，成功 5 只。第一次模型成功 16 只，20 只再次造模，留置时间均改为 10 min，除 2 只因麻醉意未行造模外，其他 18 只均造模成功。具体见表 1。

留置时间 3 min 与 5 min，其故$0.01<P<0.05$，提示两种不同留置时间的肿瘤种植成功率差异具有统计学意义，留置 5 min 肿瘤成功率高于 3 min；留置时间 5 min 与 10 min，其 $P<0.01$，提示留置 5 min 与10 min 两种不同的留置时间的肿瘤种植成功率

表 1 10 μl 细胞悬液注射时间 5 min

留置时间(min)	造模例数(只)	成功例数(只)	成功率
3	18	2	11.1%
5	12	9	75.0%
10	24	23	95.8%

二者差异具有显著的统计学意义，留置 10 min，肿瘤成功率明显高于 5 min。

2.2 临床表现及体征

大鼠在术后 2 d 后逐渐恢复饮食及活动，术后10 d 主要表现为精神萎靡、活动减少；术后 21 d 以后，出现进食减少、毛发失去光泽、行走不稳，大鼠出现典型的偏瘫后约 2～3 d 死亡。

2.3 MRI 动态检测

造模成功荷瘤大鼠术后 10~14 d 即在 MRI 上显示病灶，大鼠 C6 胶质瘤在 T_1WI 上呈等信号，T_2WI 上病灶呈高信号影，与周围组织分界不清楚(图 1、3)。注射造影剂后肿瘤有显著强化(图 2、4)。图 3、4 与图 1、2 为一只大鼠：选模手术后 21 d，T_2WI 及状位 GD-DTPA 增强 T_1WI。

3 讨 论

C6 细胞来源于 N- 亚硝基甲脲(N-methylnitrosourea)诱导大鼠脑星形胶质细胞，与大鼠脑组织有很好的相容性，成瘤率高且生长快，动物死亡率低、具有与自发生长的脑胶质瘤一样的生长和侵润特征，是建立大鼠脑胶质瘤模型的理想细胞[1]。肿瘤血管丰富，肉眼可见瘤体呈暗红色，与脑组织分界清晰，瘤体表面可见细小血管，部分可见“手握球征”。本组动物总的成功率约 62.9%(34/54)，优化造模条件后，模型成功率约 95.8%(23/24)。成功建立大鼠脑胶质瘤模型主要与以下几个因素有关：(1)C6 细胞的活性和浓度；(2)C6 细胞悬液注射的量、注射时间；(3)微量注射器留置时间等。

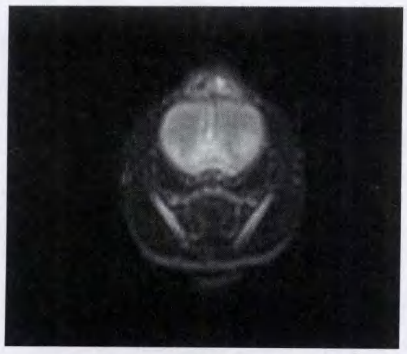
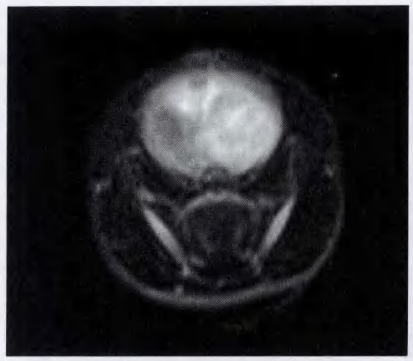


图 1 T_2WI 左侧大脑半球稍长 T2 信号结节



图 2 Gd-DTPA-增强 T_1WI 左侧大脑半球结节强化明显



左侧大脑半球稍长 T2 信号肿块，肿瘤越过中线累及对侧

图 3 模断位 T_2WI



左侧大脑半球肿块强化明显

图 4 矢状位

3.1 C6 细胞活性和浓度对模型的影响

在造模之前必须检测 C6 细胞活性和浓度，如

果活性差,则丢掉细胞,再次培养,直到检测活性符合造模需要为止。其次是细胞的浓度,细胞浓度不够,则要再次离心,丢弃上清后再次计数,直到细胞在 10^6 个/μl 以上。只要上述 2 个条件符合要求才可以进一步造模。另外,在造模过程中,C6 细胞的保存,文献报道多在 33~37℃水浴保存,本研究主要采用冰水浴保存。在抽吸之前先要用微量加样器吹打均匀,微量注射器针尖尽量没入悬浮液的深部。这些细节在模型制作过程中十分重要。

3.2 C6 细胞悬液注射量及注射时间对模型的影响

国内外学者制作 C6 脑胶质瘤动物模型接种的细胞数量各不相同,细胞数量在 10^5~10^7 个/μl 间[2,3],本研究采用细胞量是 10 μl (10^7 个),C6 细胞在注射过程中要求缓慢注射,文献报道注射时间约 3~5 min,本研究注射时间是 5 min。注射时间不能太快,太快会导致细胞悬浮液从脑内溢出,C6 细胞溢出一方面沿脑脊液播散,由于细胞数较少,肿瘤难以成长为实体瘤;另一方面,C6 细胞在头皮下生长,均会导致造模失败。

3.3 微量注射器留置时间对模型的影响

C6 细胞悬浮液注射完后,微量注射器留置的时间十分重要,文献报道留置时间 3~10 min,本研究按留置时间 3 mim、5 min、10 min 把大鼠分为 3 组,观察不同留置时间,肿瘤种植的成功率。其他条件相同,微量注射器不同的留置时间,造模成功率也不同。本研究中留置时间为 3 min 时,其成功率只有 11.1%,三者进行统计学分析,留置时间 3 min 与 5 min,其 $0.01<P<0.05$,提示留置 3 min 与 5 min 两种不同的留置时间对于肿瘤种植成功二者差异具有统计学意义,而留置时间 5 min 与 10 min,其 $P<0.01$,提示留置 5 min 与 10 min 两种不同的留置时间对于肿瘤种植成功二者差异具有显著的统计学意义,留置 10 min,肿瘤成功率明显高于 5 min。所以,留置时间宜在 10 min 以上。延长留置时间一方面有利于瘤细胞沉积在穿刺道的底部,减少因虹吸效应导致细胞沿注射针回流出脑外。另一方面有利于脑组织适应局部的压力增高,减少瘤细胞沿针道种植转移。

3.4 肿瘤的位置与临床症状

瘤细胞种植后 10 d 左右即可进入迅速增长阶段,14 d 左右于冠状面上可见肿瘤大小约0.2~0.3cm,约占右侧大脑半球的 1/4(如图 1、2),此时大鼠仅表现为神萎、运动减少等。而 21 d 左右肿瘤可占据冠状面上超过右侧大脑半球的 1/2(如图3),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。发病死亡前,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。大鼠症状发生的早晚与肿瘤种植的位置息息相关,肿瘤刚好位于尾状核的区域,大鼠早期出现症状,若肿瘤位置稍有外偏,肿瘤长到较大时才会出现症状,此时大鼠出现症状很快就死亡。所以,对于模型成功后进行治疗的实验研究,了解大鼠脑内有无肿瘤生长,以有无症状为判断的标准不够精确,因为只有肿瘤达到一定的体积时,大鼠才会出现典型神经症状,造模术后 10~14 d 进行 MRI 检查,T_2WI 及增强 T_1WI 可清晰显示肿瘤[4,5]。若有肿瘤生长,则应早期治疗,对于治疗疗效的判断更有利。

总之,大鼠 C6 胶质瘤模型是一个非常成熟的模型,在临床胶质瘤实验研究中应用非常广泛。建立稳定可靠的模型是所有动物实验的前提,本研究探讨不同的操作对大鼠 C6 模型的影响,其中微量注射器的留置时间及注射时间对于模型的成功率影响较大,延长微量注射器的留置时间有利于提高模型的成功率。

参 考 文 献

[1] Pelerson DL,Sheoilam PL,Brown W E,et al. Animal models for braintumors:historical perspectives and future directions[J]. J Neurosurg,1994,80(5):865-876.

[2] 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.

[3] Zhang Y,Wang Y,Zhang Y,et al. C6 glioma cells retrovirally engineered to express IL-18 and Fas exert Fas L-dependent cytoto xicity against glioma formation[J]. Biochem Biophys Res Conmmn,2004,325(4):1240-1245.

[4] 邱 弘,李 复,高元桂,等.大鼠 C6 胶质瘤 VEGF 表达与 MRI 对照研究[J]. 中国医学影像学杂志,2002,10(3):200-201.

[5] 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.

(责任编辑:冉明会)