

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00960

## 大鼠脊髓髓内胶质瘤模型的构建及评价

曹依群, 张煜辉, 李亚楠, 陈鑫, 吴曦, 韩国胜, 岳志健\*, 刘建民\*

第二军医大学长海医院神经外科, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 优化大鼠脊髓髓内胶质瘤模型的构建方法, 并对模型进行评估。 **方法** Fischer大鼠髓内注射9L胶质瘤细胞悬液, 对肿瘤细胞的植入量、植入部位、植入深度等进行筛选优化, 根据筛选好的指标构建大鼠脊髓髓内胶质瘤模型, 采用BBB(Basso, Beattie, and Bresnahan)评分量表评估大鼠下肢神经功能, 采用高分辨率MRI检查及病理免疫组化方法检查模型大鼠肿瘤形成情况, 评估模型构建效果。 **结果** 大鼠脊髓内植入9L胶质瘤细胞悬液构建大鼠髓内胶质瘤模型的优化指标为: 植入平面在脊柱T<sub>10</sub>水平, 植入量为6 μL(1.0×10<sup>5</sup>/mL)细胞悬液, 植入位置在硬脊膜平面下3 mm。植入9L胶质瘤细胞后2周左右大鼠出现明显的下肢神经功能障碍。影像学和病理学检查证实髓内有肿瘤细胞生长。 **结论** 成功构建大鼠髓内胶质瘤模型, 为后续研究奠定了基础。

**[关键词]** 脊髓肿瘤; 神经胶质瘤; 动物模型; 9L胶质瘤细胞

**[中图分类号]** R 739.42 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)09-0960-05

### Establishment and evaluation of intramedullary spinal cord glioma model in rats

CAO Yi-qun, ZHANG Yu-hui, LI Ya-nan, CHEN Xin, WU Xi, HAN Guo-sheng, YUE Zhi-jian\*, LIU Jian-min\*

Department of Neurosurgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To modify the establishment of intramedullary spinal cord glioma model in rats and to evaluate the established model. **Methods** Fischer rats were injected with 9L glioma cell suspension into the spinal cord. The optimal amount of implanted tumor cells, implantation sites, and depth were selected for establishment. Basso, Beattie, and Bresnahan (BBB) scale were used to evaluate the neuronal function of lower limbs of the rats; high resolution MRI and immunohistochemistry method were used to examine the tumor forming, so as to evaluate the established model. **Results** Our optimization parameters for establishing rat intramedullary spinal cord glioma models included: the amount of implanted 9L glioma cells was 6 μL (1.0×10<sup>5</sup>/mL); the implantation site was at T<sub>10</sub> level and the depth was 3 mm under the dural. The rats developed obvious lower limb neuronal dysfunction 2 weeks after implantation of 9L glioma cells. Pathological and MRI examination confirmed growth of intramedullary tumor cells. **Conclusion** Intramedullary spinal cord glioma models can be successfully established by implanting 9L glioma cells into the spinal cord of Fischer rats, which paving a way for future studys.

**[Key words]** spinal cord neoplasms; glioma; animal models; 9L glioma cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(9):960-964]

脊髓髓内胶质瘤在中枢神经系统肿瘤中占到了6%~8%, 由于其部位的特殊性, 治疗效果也较颅内胶质瘤差<sup>[1]</sup>。目前对于髓内胶质瘤的首选治疗方法仍为手术治疗, 但由于脊髓本身体积较小, 代偿能力有限, 较小的肿瘤即可引起严重的神经功能障碍, 手术难度高, 治疗效果不佳。如切除范围过大, 功能损

伤严重, 而切除范围较小则肿瘤很快会复发<sup>[2]</sup>。目前辅助的治疗方法包括化疗和放疗, 但由于脊髓部位深在, 血液供应局限, 放化疗的效果均不尽如人意<sup>[3-4]</sup>, 亟待探索新的治疗方法。有效的动物模型是进行各种研究的基础, 而目前国内外关于脊髓髓内胶质瘤的动物模型报道较少, 对于模型制备的方法、

**[收稿日期]** 2013-05-02 **[接受日期]** 2013-06-27

**[基金项目]** 上海市科委实验动物专项基金(11140903802), 上海市科委纳米专项基金(12nm0501201)。Supported by the Fund for Experimental Animal of Shanghai Science and Technology Committee (11140903802) and the Fund for Nano-research of Shanghai Science and Technology Committee (12nm0501201).

**[作者简介]** 曹依群, 博士, 副教授、副主任医师。E-mail: gem23@163.com

\* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-31161789, E-mail: yuezj638@163.com; Tel: 021-31161789, E-mail: liu118@vip.163.com

动物模型的评估缺乏规范的标准和客观的评价体系。因此,本研究将9L胶质瘤细胞株注射入大鼠髓内,尝试构建脊髓髓内胶质瘤动物模型,并优化模型制备的技术和评估方法。

## 1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 Fischer成年雄性大鼠(第二军医大学实验动物中心提供),平均体质量400~450 g。饲养在标准设施中,自由摄水取食。9L胶质瘤细胞(由长海医院中心实验室提供)。仪器:10  $\mu$ L微量注射器,江湾II型动物用立体定向仪。试剂:DMEM(Gibco公司),FCS(胎牛血清,Hyclone公司),GFAP、S-100蛋白一抗试剂(福州迈新生物技术开发有限公司),EnVision检测试剂盒(Dako公司)。

### 1.2 实验分组及处理

1.2.1 动物模型技术参数的筛选及优化 植入深度实验:动物分为3组,每组6只,植入深度分别在脊髓硬脊膜下3 mm(A1组)、2 mm(A2组)和1 mm(A3组),植入节段位于T<sub>10</sub>水平,植入细胞数为6  $\mu$ L( $1.0 \times 10^5$ /mL)细胞悬液。植入量实验:动物分为4组,每组6只,植入细胞悬液密度为 $1.0 \times 10^5$ /mL,各组注射量分别为4  $\mu$ L(B1组)、6  $\mu$ L(B2组)、8  $\mu$ L(B3组)、10  $\mu$ L(B4组)。脊髓硬脊膜下植入深度为3 mm,植入节段位于T<sub>10</sub>水平。植入节段实验:动物分为2组,每组6只,植入节段分别在脊髓T<sub>5</sub>(C1组)和脊髓T<sub>10</sub>(C2组),植入深度为硬脊膜下3 mm,植入细胞量为6  $\mu$ L( $1.0 \times 10^5$ /mL)细胞悬液。

1.2.2 髓内胶质瘤动物模型的制备 根据前期筛选的结果,动物分为2组,D1组动物在T<sub>10</sub>节段硬脊膜下3 mm,植入细胞量为6  $\mu$ L( $1.0 \times 10^5$ /mL)细胞悬液;D2组为对照组,相同节段深度植入空白培养液DMEM 6  $\mu$ L。

1.3 胶质瘤细胞体外培养及接种前准备 9L胶质瘤细胞在含10%FCS、100 U/mL青霉素、100  $\mu$ g/mL链霉素的DMEM完全培养液中,5%CO<sub>2</sub>、37℃、饱和湿度条件下单层培养,肿瘤细胞对数生长期时收集细胞。倒除培养液,PBS清洗。室温下加入2 mL 0.25%胰蛋白酶消化液浸泡细胞,显微镜下观察,大部分细胞变成圆球形,胞质回缩,细胞间隙

增大时,加入培养液终止消化;吸管吹打,移入离心管,2 000 r/min( $r=8$  cm)低速离心5 min,去上清,加入PBS,计数细胞。经PBS再漂洗2次后,准确加入PBS调整细胞密度,制成细胞悬液。抽样行锥虫蓝染色,检测拒染细胞>95%。将细胞悬液移入2 mL无菌冻存管,反复离心沉淀,使密度最终达到 $2.0 \times 10^7$ /mL,用锥虫蓝对浓缩液中的活细胞进行染色并计数。然后,稀释成待植入的悬浮液( $1.0 \times 10^5$ /mL)。

1.4 胶质瘤细胞髓内植入 大鼠称量后腹腔注射2%戊巴比妥钠麻醉(0.04 g/kg)。固定于大鼠专用手术平台上,后背备皮,碘伏消毒。标记脊柱最高点为T<sub>12~13</sub>棘突,确认脊柱T<sub>5</sub>或T<sub>10</sub>节段,纵向切开1.5 cm长切口。分离暴露棘突及椎板,咬除棘突后暴露硬脊膜,将10  $\mu$ L微量注射器固定于立体定向架上,垂直脊髓表面穿刺,进入预定深度后进行缓慢髓内注射,注射时长超过1 min。注射后逐层严密缝合,苏醒后回笼继续28℃室温下饲养。

### 1.5 观察指标

1.5.1 下肢神经功能评估 实验大鼠在术后每日进行1次评估。采用BBB(Basso, Beattie, and Bresnahan)评分量表对大鼠术前及术后每日进行神经缺损评估,对后肢进行功能测试,观察其5 min连续行走能力。BBB评分从21~0共22个等级,其中21分为步态协调一致、步幅均匀、爪趾方向平行,躯干平稳,尾向上;0分为大鼠后肢没有可观察到的运动。

1.5.2 高分辨率MRI检查 大鼠在术后神经功能评估结束后对手术区域进行1.5 T的高分辨率MR扫描,扫描厚度及扫描空间分别为矢状位1.0、0.1 mm;轴位2.0、0.2 mm。大鼠腹腔注射2%戊巴比妥钠(0.04 g/kg)麻醉,然后进行矢状位和轴位T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>扫描。增强扫描时通过尾静脉注射钆喷酸葡胺(500  $\mu$ L/250 g)。

1.5.3 组织病理学分析 结合BBB评分结果于2周后处死实验鼠进行组织病理学检查(当大鼠的BBB评分为0或50 d内仍未发生瘫痪者,大鼠也将被处死进行组织病理学检查,作为对照)。通过腹腔内注射2%戊巴比妥钠(0.04 g/kg)麻醉,迅速打开胸腔,切入右心房。通过插管,依次将生理盐水和4%的多聚甲醛注入左心室。当从右心室流出的灌

注液变为清亮时,以手术平面为中心的3个脊髓水平可从髓内分离并置于10%的多聚甲醛中固定2 d,然后切成5  $\mu\text{m}$ 切片进行H-E染色和免疫组化染色。

1.6 统计学处理 采用SPSS 13.0进行统计分析,将BBB评分以 $\bar{x}\pm s$ 表示,对两组BBB评分的平均值进行 $t$ 检验。将两组的生存时间进行Cox检验。检验水准( $\alpha$ )为0.05。

## 2 结果

2.1 大鼠模型技术参数筛选结果 脊髓植入深度实验:A1组大鼠4只在术后2周左右均出现下肢神经功能障碍,病理结果显示髓内均有肿瘤细胞生长;A2组大鼠仅有1例髓内有胶质瘤生长,另有1例为突出脊髓表面的瘢痕肉芽组织,未见明确肿瘤细胞;A3组大鼠在观察期内均未出现下肢功能障碍,病理检查证实植入节段未见明确髓内肿瘤细胞生长。结果表明植入深度为3 mm的A1组效果较好。

植入量实验:B1组有2只大鼠植入后有明确髓内肿瘤生长;B2组和B3组4只大鼠均有髓内肿瘤生长,并且在2周左右出现下肢功能障碍;B4组1只大鼠在细胞植入后3 d死亡,余3只大鼠均有脊髓髓内肿瘤生长,但其中有1只髓外也有明显肿瘤生长。脊髓植入节段实验:C1组大鼠在植入术后出现下肢功能障碍与C2组无明显差别,但平均生存期明显短于C2组。在以上实验基础上确定植入参数在T<sub>10</sub>节段、植入深度硬脊膜下3 mm、植入量为6  $\mu\text{L}$  ( $1.0\times 10^5/\text{mL}$ )为理想的模型制作条件。

### 2.2 大鼠脊髓髓内胶质瘤模型的评价

2.2.1 下肢神经功能评估结果 实验组动物术后第7天,大鼠BBB评分为(15.1 $\pm$ 1.1)分,对照组为(21 $\pm$ 0)分,实验组大鼠在髓内注射9L肿瘤细胞后(14 $\pm$ 0.6) d出现后肢瘫痪。而对照组在研究期内均未出现神经功能障碍。平均出现下肢功能障碍的时间为2周,平均生存期超过45 d。

2.2.2 高分辨率MRI评估结果 实验组大鼠在MRI T<sub>1</sub>加权像上呈低信号影(图1A),在T<sub>2</sub>加权像上呈高信号影(图1B),脊髓周边蛛网膜下隙变小,肿瘤上下节段脊髓中央管扩张,增强时可见肿瘤有明显强化;而对照组大鼠MRI扫描未见明显肿瘤生长。

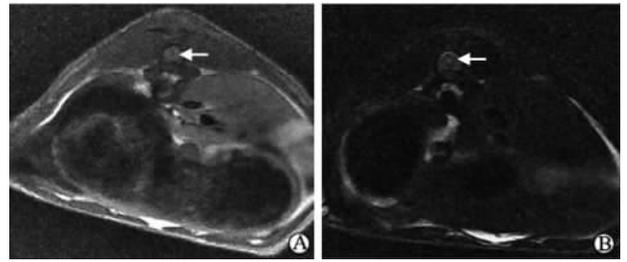


图1 实验组大鼠MRI影像特征

Fig 1 MRI images of rats in the experimental group

A: MRI T<sub>1</sub> weighted image of intramedullary tumors was of low signal intensity (arrow); B: T<sub>2</sub> weighted image of intramedullary tumors was of slightly high signal intensity (arrow)

2.2.3 病理学检查结果 H-E染色结果表明:实验组大鼠脊髓植入部位均发现有肿瘤细胞,而对照组切片中未发现肿瘤。肿瘤组织表现为有明确边界的病灶,对周围正常的灰质和白质有指样浸润和压迫。在肿瘤内,可见核呈多形性,可见有丝分裂像和多核瘤细胞,内皮增生伴随血管增生和坏死(图2)。免疫组化染色:GFAP和S100标记阳性(图3A、3B);NeuN免疫组化染色可见肿瘤细胞密集排列,核大,深染,异型明显(图3C);Vimentin免疫组化染色阳性(图3D)。

## 3 讨论

胶质瘤是神经系统最常见的原发性肿瘤之一,多呈现一种侵袭性的恶性生长方式,患者的平均生存期小于2年<sup>[5-6]</sup>。目前国内外对于髓内胶质瘤动物模型的研究较少,1984年,Salzman等<sup>[7]</sup>报道了利用成年的杂交犬髓内植入犬神经胶质细胞构建动物模型的初步研究,虽然证实了胶质瘤细胞株植入脊髓后可以存活并形成肿瘤,但缺乏对模型构建后神经功能的详细评价和其他方面的评估。在此后的很长时间内未见此类模型的进一步研究和应用。2005年,Mavinkurve等<sup>[8]</sup>报道了髓内注射VX2细胞制备兔的髓内肿瘤模型,VX2细胞株是一种鳞癌细胞株,非神经胶质来源的细胞株,与人类髓内胶质细胞来源的肿瘤差别较大,对于需要进行分子和组织病理学研究而言缺乏有效性,影像学检查对肿瘤和周边正常脊髓的关系显示不清,因而也限制了此动物模型的应用。随后该研究小组的Caplan等<sup>[9]</sup>于2006年报道采用了9L神经胶质瘤细胞株和F98胶质瘤

细胞株植入 Fischer 鼠脊髓内制备髓内肿瘤动物模型,但是没有进行 MRI 影像学检查和相关病理和免疫组化的评估。该研究认为利用 9L 神经胶质瘤细胞与 Fischer 大鼠可以构建理想的髓内胶质瘤动物模型。2008 年, Pennant 等<sup>[10]</sup> 利用 9L 神经胶质瘤细胞与 Fischer 大鼠构建的髓内胶质瘤大鼠模型进行了显微手术切除的实验研究。2010 年, 国内 Ren 等<sup>[11]</sup> 利用 9L 神经胶质瘤细胞与 Fischer 大鼠构建了髓内胶质瘤的动物模型, 在 T<sub>10</sub> 节段髓内植入 9L 神经胶质瘤细胞, 术后对神经功能进行了评估, 每周行高分辨率 MRI 检查, 处死动物后进行病理学检查。结果显示实验组动物在平均(16±0.4) d 出现后下肢截瘫症状。但是该研究并没有对模型制作的技术细节进行对比研究, 也未见在此模型上的进一步应用研究报道。目前仍缺乏对该模型统一的制作

规范和评估标准, 也没有形成特定的知识产权, 这将极大地限制髓内胶质瘤动物模型在新的治疗方法基础研究中的应用。

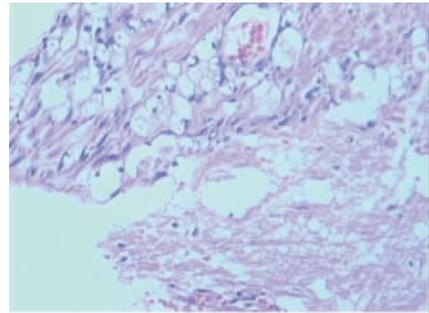


图2 肿瘤组织 H-E 染色结果

Fig 2 H-E staining results of tumor tissue

At the border of tumor and normal spinal cord tissues, 9L glioma cells could be seen in the intramedullary, with invasive growth and vascular proliferation. Original magnification: ×400

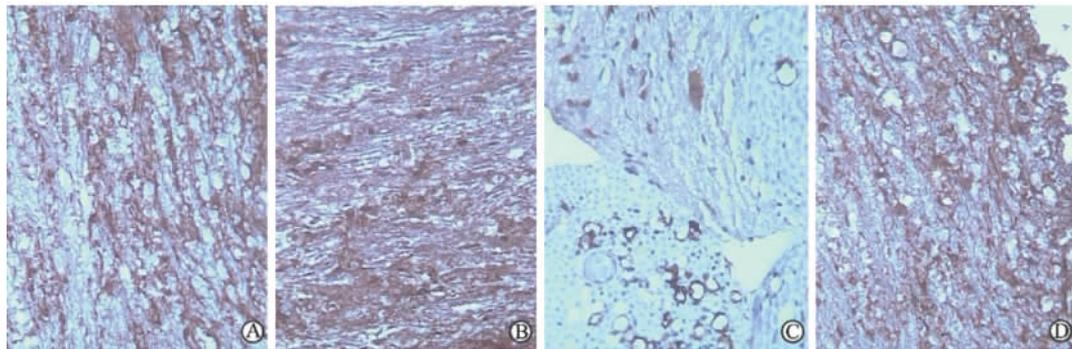


图3 肿瘤组织免疫组化染色结果

Fig 3 Immunohistochemical staining of the tumor tissue

A: Positive GFAP immunohistochemical staining; B: Positive S100 immunohistochemical staining; C: NeuN immunohistochemical staining showed densely arranged tumor cells, enlarged nuclei, hyperchromatic and marked atypia; D: Positive Vimentin immunohistochemical staining. Original magnification: ×400

本研究选择了 9L 神经胶质瘤细胞和 Fischer 大鼠来构建髓内胶质瘤大鼠模型。由于目前成熟的胶质瘤细胞株多由鼠培育而来, 鼠的脑移植胶质瘤模型已经有较为成熟的经验和广泛的应用, 而且大鼠相对于大动物更加经济, 饲养管理等方面也更方便。因此, 本研究决定选用大鼠作为实验动物。9L 神经胶质瘤细胞广泛应用于建立鼠脑肿瘤模型, 它通过 F344 大鼠连续静脉注射 26 周 N-甲基亚硝胺诱导而来, 与 Fischer 大鼠具有基因同源性, 尤其是用于免疫或基因免疫治疗研究。且前期的实验研究已经成功地将 9L 神经胶质瘤细胞植入到大鼠脊髓中, 并观察到有肿瘤细胞的生长。因此, 结合前期的文献研究, 本研究采用 Fischer 大鼠和 9L 胶质瘤细

胞株建立脊髓髓内胶质瘤动物模型。

目前对于髓内胶质瘤大鼠动物模型建立的方法尚无统一的规范, 包括植入部位、植入肿瘤细胞株的数量以及植入过程中为保证肿瘤存活、提高模型制备成功率的方法。本研究结果表明, 脊髓植入节段在 T<sub>10</sub> 节段较好, 节段过高将导致实验动物神经功能障碍过重, 存活时间较短, 无法进行后续研究, 而且 T<sub>10</sub> 节段易于定位, 下肢出现神经功能障碍可以进行有效的神经功能评估。植入深度在硬脊膜下 3 mm, 植入数量 6 μL(1.0×10<sup>5</sup>/mL) 为理想的模型制作条件, 可以保证髓内植入肿瘤细胞的有效存活, 避免过多的肿瘤细胞悬液溢出于脊髓外, 在髓外或硬脊膜外形成肿块, 造成模型制作失败。在动物模型建立

以后,本研究从5个方面对所建立的模型进行全面评估,包括术前术后神经功能评估(BBB评估法)、影像学评估(MRI)、病理学评估(H-E染色)以及肿瘤细胞恶性程度免疫组化评估,通过建立一套完善的评估体系,可以确认髓内胶质瘤动物模型的有效性,还可以对所建立的模型进行不同的等级分类,从而适用于不同方面的研究。

通过大鼠髓内植入9L胶质瘤细胞可以建立稳定的脊髓胶质瘤动物模型,其行为学、影像学 and 病理学表现均较好地模拟了髓内胶质瘤患者的临床特征,为髓内胶质瘤的临床诊治研究提供了稳定可靠的动物模型。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Aghayev K, Vrionis F, Chamberlain M C. Adult intradural primary spinal cord tumors [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2011, 9: 434-447.
- [2] Harrop J S, Ganju A, Groff M, Bilsky M. Primary intramedullary tumors of the spinal cord [J]. *Spine*, 2009, 34(22 Suppl): S69-S77.
- [3] Scheinemann K, Bartels U, Huang A, Hawkins C, Kulkarni A V, Bouffet E, et al. Survival and functional outcome of childhood spinal cord low-grade gliomas [J]. *Neurosurg Pediatr*, 2009, 4: 254-261.
- [4] Garcés-Ambrossi G L, McGirt M J, Mehta V A, Sciubba D M, Witham T F, Bydon A, et al. Factors associated with progression-free survival and long-term neurological outcome after resection of intramedullary spinal cord tumors: analysis of 101 consecutive cases [J]. *J Neurosurg Spine*, 2009, 11: 591-599.
- [5] Schneider T, Mawrin C, Scherlach C, Skalej M, Firsching R. Gliomas in adults [J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2010, 107: 799-807.
- [6] Lanzetta G, Minniti G. Treatment of glioblastoma in elderly patients: an overview of current treatments and future perspective [J]. *Tumori*, 2010, 96: 650-658.
- [7] Salzman M, Botero E, Rao K C, Broadwell R D, Scott E. Intramedullary canine spinal cord tumor model [J]. *J Neurosurg*, 1984, 61: 761-766.
- [8] Mavinkurve G, Pradilla G, Legnani F G, Tyler B M, Bagley C A, Brem H, et al. A novel intramedullary spinal cord tumor model: functional, radiological, and histopathological characterization [J]. *J Neurosurg Spine*, 2005, 3: 142-148.
- [9] Caplan J, Pradilla G, Hdeib A, Tyler B M, Legnani F G, Bagley C A, et al. A novel model of intramedullary spinal cord tumors in rats: functional progression and histopathological characterization [J]. *Neurosurgery*, 2006, 59: 193-200.
- [10] Pennant W A, Sciubba D M, Noggle J C, Tyler B M, Tamargo R J, Jallo G I. Microsurgical removal of intramedullary spinal cord gliomas in a rat spinal cord decreases onset to paresis, an animal model for intramedullary tumor treatment [J]. *Childs Nerv Syst*, 2008, 24: 901-907.
- [11] Ren T J, Wang Z C, Zhang Y Z, Li D, Wang H Y, Li Z Z. Establishment of intramedullary spinal cord glioma model in rats [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2010, 123: 2580-2585.

[本文编辑] 贾泽军