

## 脑干胶质瘤模型的建立及其 MRI 特征的观察

## Establishment of glioma model of brain stem and its MRI characteristics

李祖晟\*, 吴 惺, 吴学海

(1. 浙江省宁波市第六医院神经外科, 宁波 315040; 2. 复旦大学上海医学院附属华山医院神经外科, 上海 200040)

**[摘要]** **目的:**观察 3 种脑干胶质瘤模型的 MRI 特征,探讨应用 1.5 T MRI 研究脑干胶质瘤模型的可行性。**方法:**将 F98 鼠胶质瘤细胞系种植于 Fischer344 大鼠脑干, U87MG 和 U251MG 人胶质瘤细胞种植于裸小鼠脑干, 1.5 T MRI 观察脑干组织肿瘤生长情况, 分析 MRI 影像检测的肿瘤体积与实际病理体积的相关性, 以及肿瘤病理检测与 MRI 图像的依从性; 观察 3 种模型下动物存活情况分析模型稳定性。**结果:**18 只种植 F98 鼠胶质瘤细胞的大鼠形成脑干胶质瘤, 成瘤率为 94.7% (18/19); 12 只裸小鼠接种 U87MG 胶质瘤细胞后形成肿瘤, 成瘤率为 92.3% (12/13); 3 只裸小鼠接种 U251MG 后形成肿瘤, 成瘤率为 23.1% (3/13)。图像融合分析发现肿瘤病理图像与 MRI 图像基本一致。大鼠肿瘤 MRI 检测体积( $\text{mm}^3$ )比病理肿瘤体积增加约 14.7% ( $95.9 \pm 17.8$  vs  $81.8 \pm 20.5$ ,  $P < 0.01$ ), 两者相关 ( $r = 0.631$ ,  $P = 0.005$ ); U87MG 裸鼠 MRI 肿瘤体积( $\text{mm}^3$ )比病理肿瘤体积增加约 8.0% ( $9.49 \pm 0.91$  vs  $8.79 \pm 1.15$ ,  $P = 0.01$ ), 两者亦明显相关 ( $r = 0.526$ ,  $P < 0.001$ )。F98 脑干胶质瘤模型大鼠生存期 10~19 d, 50% (9/18) 大鼠在 13~15 d 死亡; U87MG 脑干胶质瘤模型裸小鼠生存期 21~41 d, 75% (9/12) 裸小鼠在 24~31 d 死亡。**结论:**F98 鼠胶质瘤细胞系和 U87MG 人胶质瘤细胞可建立稳定的脑干胶质瘤模型, 而 U251MG 人胶质瘤细胞不适合建立此模型; 1.5 T MRI 可用于观察脑胶质瘤模型肿瘤的生长。

**[关键词]** 脑干; 神经胶质瘤; 模型, 动物; 磁共振成像**[中图分类号]** R 730.264**[文献标识码]** B**[文章编号]** 0258-879X(2007)04-0446-04

脑干是机体生命中枢, 此部位肿瘤具有浸润生长、病死率高、生存期短的特点, 手术切除困难, 放疗及化疗效果并不明显, 不能有效延长患者生存期。脑干肿瘤的研究依赖于建立稳定、可行的脑干肿瘤动物模型。但长期以来, 由于脑干区组织结构复杂, 手术操作困难, 相关检查设备及仪器较昂贵, 一直未能建立适合 MRI 研究的稳定动物模型。我们在前期工作<sup>[1]</sup>中, 采用立体定向肿瘤细胞种植法, 选用高侵袭性低免疫原性的异体致瘤细胞, 建立了稳定的适合 1.5 T MRI 研究的 F98 脑干胶质瘤大鼠模型。本研究在前期研究基础上制备了 3 种脑干胶质瘤模型, 并进行 1.5 T MRI 检查, 进一步探讨便于研究的脑干胶质瘤模型。

## 1 材料和方法

1.1 动物来源 雄性 Fischer344 大鼠 20 只, 体质量 180~220 g; 雄性裸小鼠 30 只, 体质量 18~25 g, 购于上海中科院实验动物中心。

1.2 材料及试剂 F98 鼠胶质瘤细胞系和 U87MG 人胶质瘤细胞系来自复旦大学上海医学院附属华山医院神经外科实验室; U251MG 人胶质瘤细胞系购于上海中科院实验动物中心。细胞培养液为含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液。在种植细胞前以 0.25% 胰酶消化细胞, 计数后重悬于 DMEM 培养液中。

1.3 脑胶质瘤模型的制备 以含 2.5 mg/ml 赛拉嗪和 25 mg/ml 氯胺酮的麻醉存储液 0.65 ml 和 0.20 ml 分别麻醉 Fischer344 大鼠和裸小鼠。手术区备皮, 安尔碘消毒后, 将动物固定于立体定位头架上。Fischer344 大鼠脑干定位坐标为: 矢状缝左侧旁开 2 mm, 人字缝后 2 mm, 深度距骨窗缘

7 mm; 裸小鼠脑干定位坐标为: 矢状缝左侧旁开 1.5 mm, 人字缝后 1 mm, 深度距骨窗缘 4 mm。手术显微镜下于种植点钻一直径约 2 mm 的骨孔后, 在立体定向仪的帮助下将 Hamilton Gastight 1701 显微注射器沿骨孔插入预定部位, 5 min 内缓慢注入  $10^5$  肿瘤细胞悬液 2  $\mu\text{l}$ 。缓慢拔出显微注射器后, 骨蜡封闭骨孔, 逐层缝合切口。

1.4 脑胶质瘤模型的 MRI 观察 MRI: GE 公司 Sigma 1.5 T MR 机, 3 英寸表面线圈, FOV 8 cm  $\times$  4 cm, 矩阵 512  $\times$  256。扫描序列  $T_1$  WI (TR 500 ms, TE 15 ms, 3 次激励);  $T_2$  WI (TR 3 000 ms, TE 78 ms, 3 次激励); 增强扫描经鼠尾静脉注射 0.2 mmol/kg 钆喷替酸葡甲胺 (Gd-DTPA)。在矢状定位像以嗅沟为标志作鼠脑冠状面定位; 冠状、矢状位扫描层厚 1 mm。MRI 检查两批次, 大鼠于接种肿瘤细胞后 10 d、裸小鼠于接种后 21 d 进行检查第 1 次, 动物濒死前再检查 1 次。注射 Gd-DTPA 后于  $T_1$  像上测定肿瘤体积, 体积测量取强化病灶的最大冠状和矢状面, 测量最大前后径 (L)、宽径 (W) 和高径 (H), 并按下式计算肿瘤体积 (V):  $V = (4/3 \times \pi \times L \times W \times H) \times 1/8$ 。

1.5 脑胶质瘤组织的病理学观察 动物濒临死亡时, 以 4% 多聚甲醛心脏灌注后, 连同脑干和颈髓取下完整大脑, 置于 4℃ 4% 多聚甲醛中保存。冠状将脑组织分割成 3 块, 石蜡固定, 切片厚度为 5  $\mu\text{m}$ , 常规 H-E 染色。病理切片, 根据公式  $= a^2 \times b/2$  计算肿瘤体积, a 代表肿瘤短径, b 代表长径, 单位为 mm。

**[作者简介]** 李祖晟, 硕士, 主治医师。

\* Corresponding author. E-mail: lizusheng1969@126.com

1.6 MRI检测与病理观察结果的相关性分析 对动物濒死前MRI图像结果与病理观察结果进行对照分析;对MRI检测的肿瘤体积与肿瘤病理体积进行比较。

1.7 动物生存情况分析 采用生存分析观察动物生存情况,比较各模型间生存率。

1.8 统计学处理 使用SPSS11.0统计软件包, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 脑胶质瘤模型的制备情况及MRI检测结果 20只Fischer344大鼠接种F98胶质瘤细胞,有1只术后第3天死于脑干出血。10d后MRI检查,19只大鼠有18只在脑干区域可见肿瘤。肿瘤呈类圆形,占位效应明显,有脑干受压表

现,冠状位上几乎不见四脑室,有梗阻性脑积水表现(图1A)。T<sub>1</sub>像可分辨出低信号肿瘤边界,肿瘤实质为略低信号(图1B);T<sub>2</sub>像显示明显的高信号肿瘤,并可见瘤周水肿(图1C);T<sub>1</sub>增强像可见均匀增强的高信号肿瘤,肿瘤无坏死,无囊变(图1D)。

15只裸小鼠接种U87MG胶质瘤细胞,3只死于麻醉意外。21d后行MRI检查,12只接种U87MG胶质瘤细胞的裸小鼠脑干区域发现肿瘤。肿瘤呈不规则形,向四脑室及小脑生长,可见明显的梗阻性脑积水表现(图2A)。在T<sub>1</sub>像可见近于等信号,肿瘤边界模糊(图2B);T<sub>2</sub>像可见高信号肿瘤,无法区分瘤周水肿带(图2C);增强时T<sub>1</sub>像可见均匀增强的高信号肿瘤(图2D)。

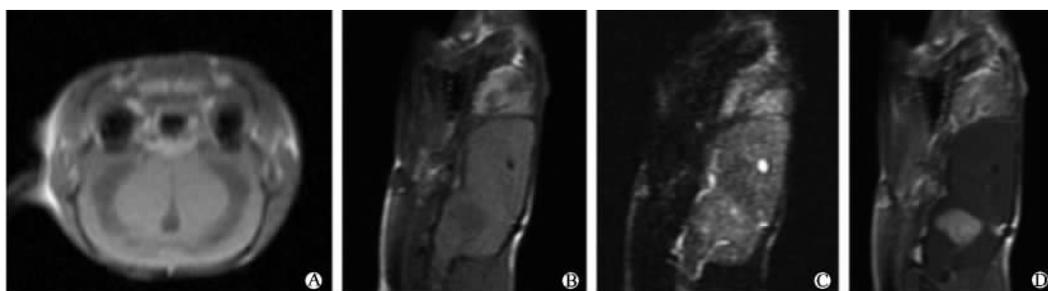


图1 Fischer344大鼠接种F98胶质瘤细胞后10dMRI观察结果

A:梗阻性脑积水;B:T<sub>1</sub>显示低信号肿瘤;C:T<sub>2</sub>显示高信号肿瘤;D:T<sub>1</sub>增强像可见均匀增强的高信号肿瘤

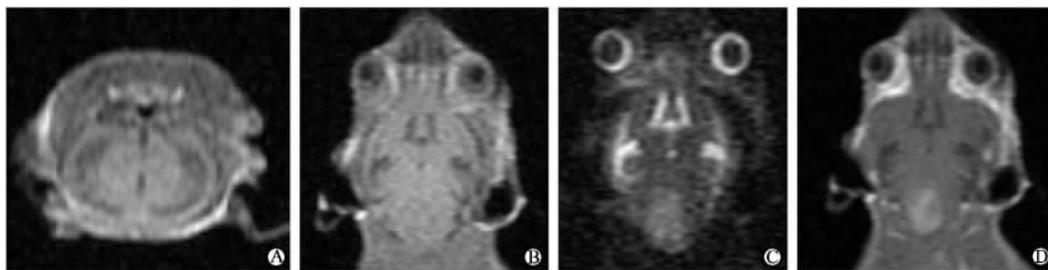


图2 裸小鼠接种U87MG胶质瘤细胞后21dMRI检测结果

A:梗阻性脑积水;B:T<sub>1</sub>显示近于等信号,肿瘤边界模糊;C:T<sub>2</sub>显示高信号肿瘤;D:T<sub>1</sub>增强像可见均匀增强的高信号肿瘤

15只裸小鼠接种U251MG胶质瘤细胞,2只死于术后保暖时温度过高。21d后行MRI检查,13只裸小鼠均未见肿瘤信号,有3只在33、37和44d濒临死亡前脑干区域T<sub>2</sub>像可见高信号肿瘤,肿瘤均无坏死,无囊变。

2.2 MRI影像学观察与H-E染色图片的依从性分析 H-E染色示肿瘤细胞呈假栅栏状排列,新生血管活跃,瘤内无出血和坏死,与正常脑组织有明显的边界,无包膜,并向正常脑组织浸润生长。采用图像融合分析发现肿瘤H-E染色结果基本与MRI图像一致(图3,图4)。

2.3 肿瘤MRI测定体积与病理检测体积的相关性分析 MRI肿瘤体积均大于病理检测体积,大鼠MRI肿瘤体积

为 $(95.9 \pm 17.8) \text{ mm}^3$ ,比病理肿瘤体积 $(81.8 \pm 20.5) \text{ mm}^3$ 增加约14.7%( $P < 0.01$ ),二者呈线性相关( $r = 0.631, P = 0.005$ ,图5A)。裸鼠MRI肿瘤体积为 $(9.49 \pm 0.91) \text{ mm}^3$ ,比病理肿瘤体积 $(8.79 \pm 1.15) \text{ mm}^3$ 增加约8.0%( $P = 0.01$ ),二者呈线性相关( $r = 0.526, P < 0.001$ ,图5B)。

2.4 脑干胶质瘤模型的生存情况分析 F98脑干胶质瘤模型中Fischer344大鼠生存期较短,为10~19d,并且约有50%(9/18)大鼠在第13~15日时死亡。而U87MG脑干胶质瘤模型中裸小鼠的生存期为21~41d,其中75%(9/12)的裸小鼠生存期为24~31d,明显长于F98脑干胶质瘤大鼠模型(图6)。

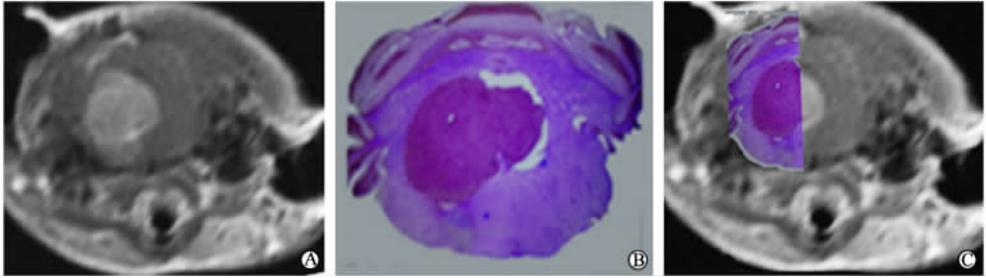


图3 Fischer344大鼠脑干胶质瘤MRI图像与H-E染色的一致性分析

A: MRI; B: H-E; C: MRI、H-E染色图像融合分析



图4 U87MG裸鼠脑干胶质瘤MRI图像与H-E染色的一致性分析

A: MRI; B: H-E; C: MRI、H-E染色图像融合分析

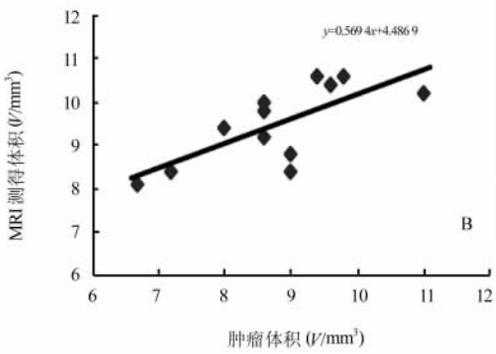
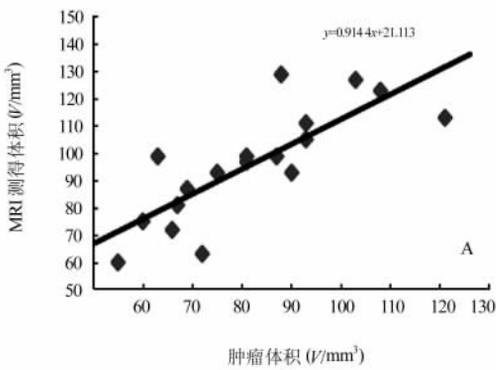


图5 大鼠(A)、裸小鼠(B)脑干胶质瘤MRI检测体积与病理体积相关性分析

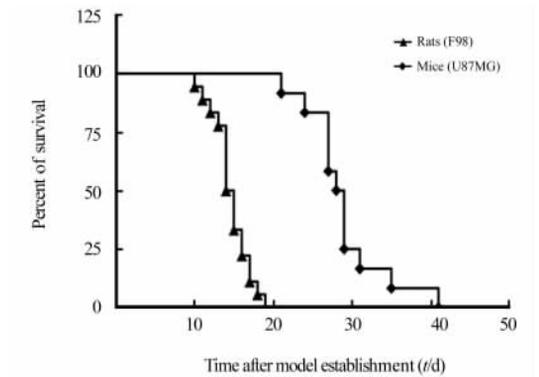


图6 F98和U87MG脑干胶质瘤模型中Fischer344大鼠和裸小鼠的生存分析

### 3 讨论

脑干肿瘤约占儿童中枢神经系统肿瘤的10%~20%,约占后颅凹肿瘤的25%。75%~85%的脑干肿瘤为恶性程度高、浸润性生长的肿瘤,其2年生存者仅占10%~15%<sup>[2]</sup>。对于这类浸润性生长的肿瘤手术切除困难,放疗及化疗疗效不佳<sup>[3]</sup>。因此,建立稳定的脑干肿瘤模型,探索各种新的治疗方案,加强基础实验研究大有必要。虽然立体定向肿瘤细胞种植法已广泛用于建立半球脑肿瘤模型,然而脑干区复杂

的组织结构、精细的手术操作和昂贵的特殊研究设备大大限制了脑干肿瘤的动物研究。因此,如何建立稳定而简便易行的脑干肿瘤模型仍是值得探讨的问题。

目前国外的脑干胶质瘤模型主要是以C6胶质瘤细胞系种植于大鼠尾状核头部而建立的<sup>[4]</sup>。由于C6来源于远交系Wistar大鼠,无同系宿主,因此在异体种植时存在免疫原性,从而限制了其在胶质瘤治疗模型研究中的运用。F98细胞系是用单剂ENU(50 mg/kg)诱导妊娠20 d的CD Fischer孕大鼠而产生的。这一胶质瘤细胞在脑内具有侵袭性生长的方式,免疫原性极低,颅内种植数十个肿瘤细胞即可致死动物,这些特征与人类胶质母细胞瘤非常相似,因此是一种理想的胶质瘤模型,广泛用于硼-中子俘获治疗、肿瘤的化疗、基因治疗、肿瘤细胞代谢的磁共振波谱分析、定量弥散MRI成像等研究<sup>[5]</sup>。

本研究以F98胶质瘤细胞系建立大鼠脑干胶质瘤模型,以U251MG和U87MG人胶质瘤细胞系模拟人脑干胶质瘤,接近人脑干胶质瘤的生物学特征。本研究表明从背侧入路,按以上坐标建立脑干胶质瘤模型是安全可靠的,20只Fischer344大鼠中仅有1只在术后第3日死于脑干出血,30只裸小鼠中除3只死于麻醉意外,2只死于术后保暖时体温过高外,无一因手术并发症死亡,较好地解决了脑干区结构复杂、操作必须精准的问题。从生存曲线中可以发现F98脑干胶质瘤模型中Fischer344大鼠生存期在10~19 d这一狭窄的时间范围内,并且约有50%(9/18)的Fischer344大鼠在第13~15日死亡,这表明F98脑干胶质瘤模型具有极好的可预测性和重复性。而U87MG脑干胶质瘤模型中裸小鼠的生存期在21~41 d之间,其中75%(9/12)的裸小鼠生存期为24~31 d,这表明U87MG细胞系生物学行为明显与F98细胞系存在差异,其致瘤性和稳定性可能受多种因素影响。13只接种U251MG胶质瘤细胞的裸小鼠仅3只裸小鼠在脑干区形成增强MRI所能观察到的较小的胶质瘤,其生存期分别为33、37和44 d,对于其他10只接种U251MG胶质瘤细胞的裸小鼠,在脑干区U251MG不能达到一定的占位容积,说明其致瘤性较弱且浸润生长不够,提示U251MG胶质瘤细胞并不适于建立脑干胶质瘤模型。

通常用组织切片的病理研究来观察啮齿类动物脑肿瘤的生长和浸润情况,然而这种方法无法监测肿瘤生长的动态特征以及某一段时间内的治疗效果。MRI不仅能提供肿瘤生长的动态变化和治療前后的对照,更能发现无症状的肿

瘤。绝大多数脑肿瘤模型的MRI研究是用动物专用的小型高场强MRI系统,这一系统价格昂贵,未能广泛应用。本研究用医用1.5 T MRI系统成功的实现对脑干胶质瘤模型的动态监测,证实医用1.5 T MRI系统监测脑肿瘤模型具有可行性。MRI图像的质量取决于信噪比、空间分辨率和对比度,为了获得高分辨率的图像,本研究T<sub>1</sub>和T<sub>2</sub>序列采用的voxel值为0.08 mm<sup>3</sup>,因此本研究能清晰分辨出如脑室、白质和灰质等解剖结构。F98肿瘤细胞系在T<sub>1</sub>WI时为低信号,而U87MG和U251MG细胞系在T<sub>1</sub>WI时近于等信号,这表明大鼠F98胶质瘤细胞系在影像学表现上与U87MG和U251MG细胞系是存在差异的。在T<sub>2</sub>WI时,肿瘤均呈现高信号,与瘤周水肿带不易区分。当给予造影剂后,肿瘤均匀强化,易于观察,这表明肿瘤新生血管丰富,血脑屏障改变,并与病理切片结果相一致。T<sub>1</sub>增强像上肿瘤体积大于肿瘤的病理体积,这可能是因为增强剂渗出肿瘤边缘、部分容积效应或脑组织在固定过程中缩小所造成的<sup>[6]</sup>。

总之,F98鼠胶质瘤细胞系和U87MG人胶质瘤细胞可建立稳定的脑干胶质瘤模型;1.5 T MRI可用于监测肿瘤生长的动态特征及治疗效果,MRI肿瘤体积与病理肿瘤体积呈线性相关。

#### [参考文献]

- [1] 张冬,吴惺,冯晓源,等.适于MRI研究的脑干胶质瘤模型的建立[J].临床放射学杂志,2005,24:357-360.
- [2] Guillamo J S, Doz F, Delattre J Y. Brain stem gliomas[J]. Curr Opin Neurol, 2001,14: 711-715.
- [3] Guillamo J S, Monjour A, Taillandier L, et al. Brainstem gliomas in adults: prognostic factors and classification [J]. Brain, 2001,124(Pt 12): 2528-2539.
- [4] Peterson D L, Sheridan P J, Brown W E Jr. Animal models for brain tumors: historical perspectives and future directions[J]. J Neurosurg,1994, 80: 865-876.
- [5] Barth R F. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 gliomas[J]. J Neurooncol,1998,36: 91-102.
- [6] 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.

[收稿日期] 2007-01-10

[修回日期] 2007-03-30

[本文编辑] 贾泽军