

·基础研究·

可移植性人脑胶质瘤组织裸小鼠脑内移植 及其 MR 显像研究

李如军, 刁 艺, 黄 强, 沈钧康, 兰 青

Transplantation and Magnetic Resonance Imaging of Transplantable Human Glioma Tissue in the Brain of Nude Mice

LI Ru-Jun, DIAO Yi, HUANG Qiang, SHEN Jun-Kang, LAN Qing

苏州大学附属第二医院
神经外科暨脑肿瘤研究室,
江苏 苏州 215004

*Department of Neurosurgery,
The Second Affiliated Hospital,
Soochow University,
Suzhou, Jiangsu, 215004,
P. R. China*

通讯作者: 黄 强

Correspondence to: HUANG Qiang
Tel: 86-512-67783937
Fax: 86-512-68284303
E-mail: hq1936@163.com,
szqhdnah@pub.sz.jsinfo
.net

收稿日期: 2006-10-23

修回日期: 2006-12-20

[ABSTRACT] **BACKGROUND & OBJECTIVE:** In previous reports, orthotopic transplantation models of glioma were produced by injecting cell suspension into the brain of mice, which is complex, time-consuming, and nearly impossible to prepare in a large scale within a short period. This study was to establish human glioma orthotopic transplantation model in nude mice by transplanting tumor tissue in the brain, and investigate magnetic resonance imaging (MRI) of the transplanted tumors. **METHODS:** Human glioma cells were injected subcutaneously into nude mice to form human glioma. The transplantable human glioma tissues (2 mm^3) were put into trocar and directly injected into the caudate nucleus of nude mice. Thirty days later, the tumors were detected by 1.5T superconduct MR machine with micro-23 coil and measured by Dicomworks (V1.35) software. Tumor morphology was observed under light microscope with HE staining. Tumor volume was measured under stereomicroscope. The feasibility of measuring tumor volume according to MRI data was evaluated. **RESULTS:** MRI showed that in the 15 nude mice received orthotopic transplantation in the caudate nucleus, 14 developed glioma. Under microscope, glioma tissues were found at the same sites as where MRI indicated. Tumor volume was $(23.45 \pm 11.64)\text{ mm}^3$ as measured by MRI and $(23.19 \pm 10.18)\text{ mm}^3$ as detected under stereomicroscope ($P > 0.05$). The successful rate of tumor model preparation was 93% (14/15). The successful rate of tumor imaging by MRI was 100% (14/14). **CONCLUSIONS:** Tissue quantitative transplantation via trocar is simple, time-saving, and easy to construct tumor model in a large scale with high successful rate. The 1.5T MR machine with micro-23 coil can be used to observe tumor position and size of orthotopic transplantation models of human glioma in nude mice.

KEYWORDS: Brain neoplasm/glioma; Nude mouse; Orthotopic transplantation model; Magnetic resonance imaging

【摘 要】 背景与目的: 文献报道的胶质瘤动物原位移植模型, 大多数是将细胞悬液立体定向接种于鼠脑内, 操作繁杂, 耗时长, 难以在短时间内完成批量实验。本研究接种可移植性人脑胶质瘤组织于裸小鼠脑内, 探讨建立人脑胶质瘤裸小鼠原位移植模型及其 MR 活体成像的可行性。方法: 在套管针内, 置入位于裸小鼠皮下生长的可移植性人脑胶质瘤组织 2 mm^3 , 经微型颅钻颅孔后经套管针推入裸小鼠右尾状核内, 第 30 天在配有小鼠专用 micro-23 微线圈的 1.5T MR 机上进行头颅扫描和专用软件测量显像的肿瘤体积。继而取全脑作连续冰冻切片, HE 染色, 在光学显微镜下观察肿瘤病理特征, 在体视显微镜目镜下用测微尺测量肿瘤。然后将上述两种方法测得的数据进行统计学分析, 评价荷瘤鼠活体 MR 显像

计算肿瘤体积的可行性。结果:经MR扫描的15只颅内接种肿瘤的小鼠,有14只的尾状核区域见到肿瘤显像;在脑切片上,与MR像相同部位见到了肿瘤组织。经脑切片测得的肿瘤体积 $[(23.19 \pm 10.18) \text{ mm}^3]$ 和经MRI测得的肿瘤体积 $[(23.45 \pm 11.64) \text{ mm}^3]$ 比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。肿瘤模型制作成功率为93%(14/15),肿瘤模型MR显像成功率为100%(14/14)。结论:经套管针定量植入胶质瘤组织于裸小鼠尾状核,制作可移植性裸小鼠人脑胶质瘤原位模型,具有操作便捷、省时、便于批量制作、致瘤率高等优点。配有小鼠专用微型线圈的1.5T MR机可用于荷瘤裸小鼠的头颅成像、在活体上对移植瘤进行定位和体积测量等研究。

关键词:脑肿瘤/胶质瘤;裸小鼠;原位移植模型;MR活体显像

中图分类号:R734.2 文献标识码:A

文章编号:1000-467X(2007)09-0937-05

裸小鼠的问世,为人脑胶质瘤异种移植开创了新时代^[1]。当时的移植瘤都位于皮下,目的是便于观察。然而从血脑屏障、肿瘤侵袭性等方面考虑,移植至裸小鼠颅内的胶质瘤模拟性比皮下更好,但颅内不能直观其体积变化,因而使用较少。在MR可以动态观察人脑肿瘤的启发下,已有动物专用MR显像可用来观察大鼠颅内肿瘤生长情况。本研究采用人脑胶质瘤组织定量移植建立裸小鼠颅内移植瘤模型,并在配有micro-23微线圈的1.5T MR上扫描观察裸小鼠颅内移植瘤生长情况,并探讨其在MR图像上测量肿瘤体积的可行性。

1 材料与方法

1.1 实验动物

NC裸小鼠在NASA1000级生物净化室内育种和繁殖,按SPF级管理,动物合格证号为SYXK(苏)2001-0049。本实验用鼠18只,体重 $(26 \pm 2) \text{ g}$,鼠龄6~8周,纯合子鼠,两性兼用。实验所用胶质瘤组织块来自本室建立的人脑胶质瘤体外细胞系裸小鼠皮下移植瘤^[2]。肿瘤组织接种器为B. Braun Melsungen AG公司生产的Vasocan 22G安全型静脉留置针及自制的组织填塞棒。冰冻切片机为Leica公司生产的CM1900型。体视显微镜为泰克仪器有限公司生产的XTL20型。用于钻颅的颅钻为Fine Science Tools公司的显微钻Micro-drill 18000-17型。磁共振为Philips Achieva 1.5T超导磁共振成像仪。小鼠扫描线圈为Philips显微线圈micro-23,其内径为2.3 cm。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立 按我们先前报道的方法^[2]制作人脑胶质瘤裸小鼠皮下移植瘤模型,再取移植瘤组织,放入套管针,以自制组织填塞棒将组织压挤,使之进入并充满套管前端,插入套管针内芯排出多余肿瘤组织,保留针管远端6 mm长 (2 mm^3) 肿瘤组织。10%水合氯醛以200 mg/kg小鼠腹腔注射,麻醉后用安尔碘Ⅱ消毒头部皮肤,于小鼠头顶部正中切开皮肤,显露颅骨,用双氧水涂擦颅骨,显露前囟、矢状缝、冠状缝等结构,于前囟前1 mm、右侧2.5 mm处,用直径1 mm的颅钻钻颅至硬膜,然后将前述套管针经骨孔垂直进入3.5 mm,推进内芯,植入肿瘤组织,缓慢拔针。以丝线缝合头皮。待其自然苏醒。

1.2.2 MR显像操作 接种肿瘤的裸小鼠30天后行MR扫描。采用Philips公司Achieva 1.5T超导型MR机,micro-23微线圈,裸小鼠以水合氯醛麻醉后,取俯卧位,将其头部置于线圈中心,分别行TSE序列 $T_1\text{WI}$ 和 $T_2\text{WI}$ 横断面、矢状面和冠状面平扫,扫描参数如下:TSE序列 $T_1\text{WI}$,TR 260 ms(矢状面,519 ms),TE 24 ms,层厚1.5 mm, MATRIX 224×224,FOV 60 mm,翻转角90°。TSE序列 $T_2\text{WI}$,TR 1 025 ms,TE 100 ms,层厚1.5 mm, MATRIX 224×224,FOV 60 mm,翻转角90°。腹腔注入二乙三胺五乙酸钆(Gd-DTPA)0.05 ml,再行 $T_1\text{WI}$ 横断面、矢状面和冠状面扫描。观察小鼠脑内移植瘤成像情况及位置,并用Dicomworks(V1.35)软件测量其大小。

1.2.3 鼠脑病理切片 MR检查结束后,处死小鼠,取出全脑,立刻于-20℃速冻,于-13℃行冰冻切片。取冠状位和横断位各5个鼠脑,采用20 μm 和5 μm 层厚的连续切片。每隔100 μm 取20 μm 层厚片一张作HE染色,在配有目镜测量尺的体视显微镜下观察肿瘤大小和计算体积,随机取5 μm 层厚行HE染色,在光学显微镜下观察测量肿瘤细胞形态和病理学变化。其余鼠脑行常规冰冻病理切片。

1.2.4 MRI和脑切片上的肿瘤体积计算及统计学处理 以Dicomworks(V1.35)软件测量肿瘤于MRI横断位(a)、矢状位(b)、冠状位(c)三个方向上高信号灶的最大径,通过公式 $V = a \times b \times c / 2$ 计算出肿瘤在MR像上的体积。用体视显微镜目镜上的测量器分别测量肿瘤中位层面上两个方向最大直径,又通过计算肿瘤断层切片数(根据层厚)得到另一

个最长径,分别以 A、B、C 表示,通过公式 $V=A\times B\times C/2$ 计算出肿瘤在脑组织中的实际体积。肿瘤显像体积与实际体积相关性分析采用简明统计 2000 软件,采用配对 t 检验,以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 裸小鼠状态观察

小鼠移植肿瘤后当天死亡 3 只。围手术期死亡率为 16.7%(3/18)。存活裸鼠早期生存状态良好,无偏瘫等神经系统体征,饮食正常。术后 30 天后部分裸鼠开始出现精神萎靡、蜷缩、皮肤松弛、苍老、不愿进食。

2.2 MRI 分析

部分裸小鼠于移植后 30 天出现症状时即行 MRI 检查。对于肿瘤的成像,于 T_1WI 、 T_2WI 像中并不满意,接种侧肿瘤与周围脑组织分辨不清。腹腔注射 Gd-DTPA 后, T_1WI 增强像显示接种肿瘤显像

清楚,呈高信号,同周围正常脑组织有显著差异,大小、位置明确,并可正确测得其最长径,通过公式计算出肿瘤成像的体积(表 1)。15 只小鼠经 1.5T MR 机系统扫描,有 14 只观测到移植瘤图像。

2.3 鼠脑冰冻切片 HE 染色观察

MRI 检查后,处死全部荷瘤鼠,完整取出荷瘤鼠脑,部分鼠脑可见移植瘤向脑表面生长,于脑表面可见色泽苍白的肿瘤,正中裂被推向对侧。经 HE 染色后的脑切片,在体视显微镜下可以清楚地看到脑切面的全部和肿瘤所在部位。再根据目镜测微尺显示的数据和上述的公式,计算脑内肿瘤的实际体积(表 1)。15 只中有 14 只成瘤,成瘤率为 93%(14/15),结果与 MR 成像符合。移植瘤光镜下见肿瘤细胞呈圆、椭圆和星形,胞核大而圆,核深染、异形、分裂相多见,偶见双核,并可见坏死组织、肿瘤区染色较周围正常脑组织深,可见到相对的分界线(图 1)。

表 1 裸小鼠颅内肿瘤 MRI 和脑切片测定的肿瘤体积

Table 1 The volume of transplanted glioma in nude mice derived from MRI and brain slices

Mouse No.	MRI				Brain slices			
	a (mm)	b (mm)	c (mm)	V (mm ³)	a (mm)	b (mm)	c (mm)	V (mm ³)
1	3.8	3.9	2.0	14.82	3.8	4.0	2.1	15.96
2	4.5	4.2	4.5	42.53	5.0	4.1	3.9	39.98
3	3.3	3.8	3.5	21.95	3.5	3.7	3.7	23.96
4	2.6	2.0	2.6	6.76	2.7	2.0	2.5	6.75
5	3.8	3.8	3.3	23.83	3.9	3.7	3.6	25.97
6	2.2	5.6	6.0	36.96	2.0	5.9	6.0	35.40
7	3.0	2.8	2.7	11.34	3.3	2.9	2.5	11.96
8	3.3	3.7	3.5	21.37	3.4	3.5	3.7	22.02
9	4.0	5.7	3.0	34.20	3.9	3.0	5.0	29.25
10	3.1	3.3	4.0	20.46	3.3	3.5	3.8	21.95

a,b, c: the longest diameters at axial, sagittal, and coronal directions, respectively. Tumor volume is calculated using the formula $V = a\times b\times c/2$.

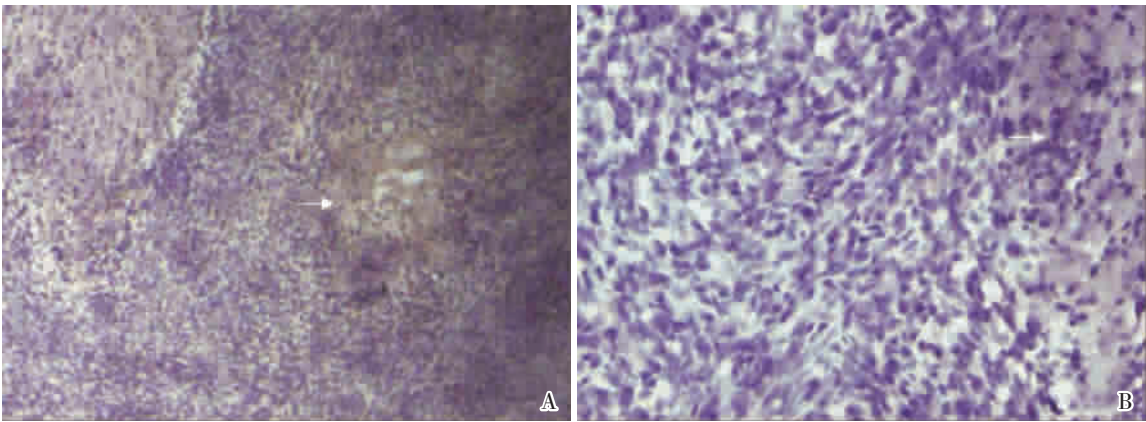


图 1 裸鼠脑内移植胶质瘤的病理形态

Figure 1 Morphology of transplanted glioma in nude mice

A: The tumor area is rich of tumor cells, and stained deeply, with necrosis (arrow) (HE $\times 40$).
B: Tumor cells are rich of cytoplasm, with nuclear pleomorphism, mitotic activity, and a few conjugate nuclei, and invade into surrounding brain parenchyma (arrow) (HE $\times 200$).

2.4 MR 显像与脑切片可比性分析

根据脑冰冻切片在体视显微镜下所见与 MRI 的矢状位、冠状位、和横断位一一对应比较,肿瘤所处的位置,大小以及与邻近结构的关系基本一

致(图 2)。MRI 计算的肿瘤体积 $[(23.45\pm11.64)\text{ mm}^3]$ 与脑切片计算的肿瘤体积 $[(23.19\pm10.18)\text{ mm}^3]$ 也基本吻合(表 1)。

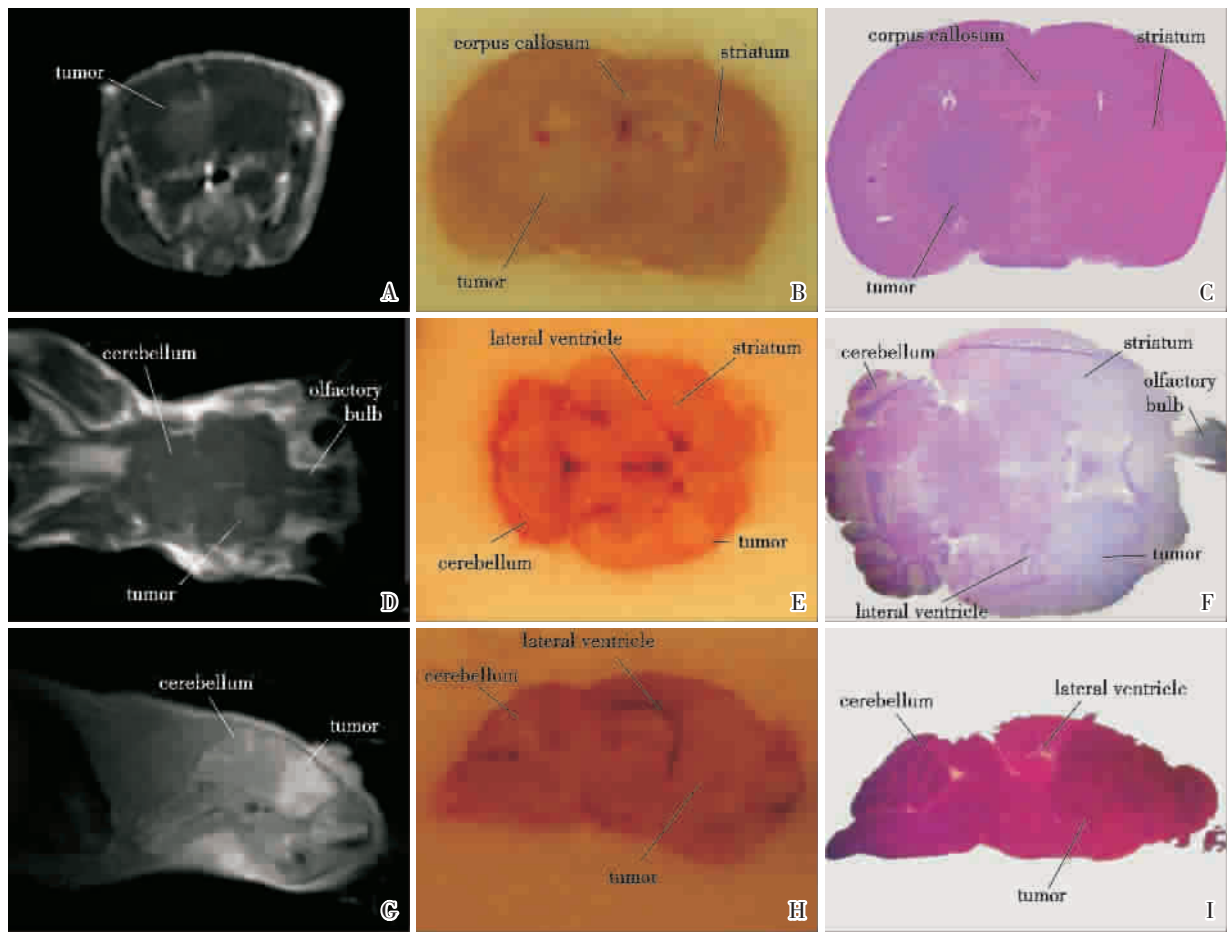


图 2 MRI 和脑切片中肿瘤所处的位置与邻近结构的比较

Figure 2 Comparison of tumor position showed on MRI and brain slice

A, D, G are MR images; B, E, H are brain slices; C, F, I are frozen section with HE staining (×1); A-C for transverse view; D-F for coronal view; H-I for sagittal view. The tumors shapes, positions, sizes showed on MRI are accordant with those in frozen section.

3 讨 论

建立稳定可靠的人脑胶质瘤动物模型是进行各种实验研究的基础,裸小鼠的问世对人脑胶质瘤异种移植瘤模型的建立是个机遇。我们在 20 世纪 80 年代就建立了人脑胶质瘤体外细胞系裸小鼠皮下移植实体瘤模型 NHG-1^[2]和人脑室管膜母细胞瘤组织裸小鼠皮下移植瘤模型 NHE-2^[3],并在化疗和生物导向诊治的临床前研究中得到广泛应用。此皮下模型优点是可直接观察肿瘤体积变化及评价相关干预治疗措施的效果。但是移植瘤并非长在脑内,有关血脑屏障、瘤细胞所处的宏观和微观环

境与临床差别较大。因此,从临床模拟性来说,建立人脑胶质瘤裸小鼠脑内原位移植瘤模型有更好的应用价值。

文献报道的人脑胶质瘤裸小鼠原位移植模型通常采用培养细胞悬液或肿瘤组织经消化后处理成的细胞悬液颅内注射法,其成功率仅为 70%^[4]。尽管步耀星等^[5]报道经改进后的成功率已高达 100%,但仍有较多的不尽人意之处,如除了需要立体定向操作耗时外,将含有 1×10^5 个细胞的 $1\text{ }\mu\text{l}$ 混悬液泵入脑内的时间就长达 20 min,批量实验时,在如此长的时间内,无论是动物麻醉时间过长还是接种用的细胞离开培养环境太久所带来的负面影响

都是显而易见的。本实验是在肿瘤组织离体后立即剪成小颗粒,直接置入套管针内,徒手操作,经钻过孔的颅骨,在位于脑皮层下 3.5 mm 处推入,不存在因推入速度过快而导致接种的液体外溢造成细胞流失,因此从麻醉到缝合头皮整个操作时间在 10 min 内就可以完成。与细胞悬液相比,本实验采用的总体积为 2 mm³ 组织颗粒(2×10^6 个细胞)直接注入脑内,不但保证了足够的细胞量,同时还将支持细胞生长的环境(间质成分)一并植入,无论从维持亲本肿瘤的原有组织结构、生物学特性还是分子表型上均较单细胞悬液为优,尽管需要进一步研究才能证实,但至少理论推断上是可以成立的。

当然,本研究也存在不足,主要有 16.7%(3/18)的围手术死亡率和未达到 100%(仅 93%)的移植成功率这两大缺点。分析原因,前者可能与完全徒手操作造成的脑损伤性水肿(尸检未见出血)及深麻醉状态下的小鼠未作保温有关。对此改进后,在后续的 40 余只鼠实验中,围手术期死亡率已降至 0%。至于未达到 100%的移植成功率的原因比较复杂,虽然植入的肿瘤组织已做到相对精确的定量(2 mm³),但做不到在相同体积的肿瘤组织中具增殖力细胞的定量,这与普遍存在的肿瘤细胞异质性有关。另外,裸小鼠虽然存在免疫缺陷(T 细胞缺乏),但并不是无免疫力(NK 细胞、巨噬细胞和 B 细胞功能正常),接种有增殖能力的细胞超过其免疫负荷才能致瘤。

针对不能活体观察位于裸小鼠颅内肿瘤的困境,研究者一直在寻找无创性观察动物脑内肿瘤的方法。1980 年,Hansen 等^[6]首先使用 MR 于大鼠脑成像的研究,得到的图像无解剖结构的显示。随着 MR 技术的进步,大鼠脑 MR 成像于 1987 年获得较清晰图像^[7],1995 年得到了小鼠脑的 0.1 mm × 0.1 mm × 0.9 mm 空间分辨率的图像^[8],于 2001 年又将空间分辨率提高到了 0.058 mm × 0.058 mm × 0.046 9 mm^[9]。然而上述图像的获得都是建立在高场强(3~17.6T)^[10,11] MR 基础之上,尚未见到国内有此类 MR 机。根据文献报道的方法^[12,13]要得到小鼠头颅清晰 MR 像,除了增强磁场强度(3~17.6T)外,还要增加扫描时间、采用小的射频线圈和使用增强剂等。虽然增加扫描时间可以提高图像分辨率,但两者之间是平方根的关系,即需长达数小时的扫描,才能得到相对清晰的图像,实际上是不可取的。本研究使用 Philips 公司 Achieva 1.5T 超导型 MR 机,随机配备了 micro-23 微线圈,用 Gd-

DTPA 作为增强剂,通过调整参数,于 T₁WI 增强扫描,较清楚地显示了鼠脑的基本结构、肿瘤的大小、形态及与邻近组织结构的关系。同实体脑的连续断层切片对应研究统计学分析结果显示二者的总体均数差异无统计学意义 ($P > 0.05$),表明本研究中 1.5T MR 机作为人脑胶质瘤在裸小鼠脑内原位移植瘤生长情况观察的检查手段是可行的。

[参 考 文 献]

- [1] 黄 强,兰 青. 胶质瘤动物模型及其应用 [M]// 黄 强,陈忠平,兰 青. 胶质瘤. 北京: 中国科学技术出版社, 2000:473-480.
- [2] 黄 强,杜子威,徐庚达,等. 人脑胶质瘤细胞系实体瘤模型 NHG-1 的建立及其特征的研究 [J]. 中华肿瘤杂志, 1987, 9(4):269-272.
- [3] 黄 强,杜子威,刘振延,等. 人脑室管膜瘤组织-小鼠模型 NHE-2 的研究 [J]. 中华神经外科杂志, 1989, 5(1):28-32.
- [4] Antunes L, Angioi-Duprez K S, Bracard S R, et al. Analysis of tissue chimerism in nude mouse brain and abdominal xenograft models of human glioblastoma multiforme: what does it tell us about the models and about glioblastoma biology and therapy? [J]. J Histochem Cytochem, 2000, 48(6):847-858.
- [5] 步耀星,章 翔,Laug W E. 人脑胶质瘤细胞裸鼠原位移植动物模型的建立 [J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2006, 5(2):100-105.
- [6] Hansen G, Crooks L E, Davis P, et al. *In vivo* imaging of the rat anatomy with nuclear magnetic resonance [J]. Radiology, 1980, 136(3):695-700.
- [7] Johnson G A, Thomson M B, Drayer B P. Three-dimensional MRI microscopy of the normal rat brain [J]. Magn Reson Med, 1987, 4(4):351-365.
- [8] Munasinghe J P, Gresham G A, Carpenter T A, et al. Magnetic resonance imaging of the normal mouse brain: comparison with histologic sections [J]. Lab Anim Sci, 1995, 45(6):674-679.
- [9] McDaniel B, Sheng H, Warner D S, et al. Tracking brain volume changes in C57BL/6J and ApoE-deficient mice in a model of neurodegeneration: a 5-week longitudinal micro-MRI study [J]. Neuroimage, 2001, 14(6):1244-1255.
- [10] Pirko I, Fricke S T, Johnson A J, et al. Magnetic resonance imaging, microscopy, and spectroscopy of the central nervous system in experimental animals [J]. NeuroRx, 2005, 2(2):250-264.
- [11] Beck B, Plant D H, Grant S C, et al. Progress in high field MRI at the University of Florida [J]. MAGMA, 2002, 13(3):152-157.
- [12] Nieman B J, Bock N A, Bishop J, et al. Magnetic resonance imaging for detection and analysis of mouse phenotypes [J]. NMR Biomed, 2005, 18(7):447-468.
- [13] Benveniste H, Blackband S. MR microscopy and high resolution small animal MRI: applications in neuroscience research [J]. Prog Neurobiol, 2002, 67(5):393-420.

[编辑及校对:庄爱华]