

大鼠 C₆ 胶质瘤模型的磁共振成像及¹H 波谱研究

马明平, 吴光耀, 周义成, 王承缘

【摘要】 目的:评价磁共振成像及其波谱技术在大鼠胶质瘤模型研究中的应用价值。**方法:**大鼠 C₆ 脑胶质瘤细胞体外培养,应用立体定向架将肿瘤细胞注入大鼠脑尾状核区域,接种后 12~18 d 分别行磁共振成像及其波谱检查,观察大鼠脑 C₆ 胶质瘤的磁共振成像及其波谱表现,并与病理学变化进行对照分析。**结果:**24 只接种大鼠脑内有 16 只胶质瘤生长良好,磁共振成像表现为长 T₁、长 T₂ 信号,增强后肿瘤强化明显,呈均匀强化或环状强化;磁共振波谱表现为 NAA 峰明显下降甚至消失,Cho 升高为第一高峰,NAA/Cr 比值明显下降,Cho/Cr 比值明显上升,部分肿瘤出现乳酸峰(Lac)或脂质峰(Lip)。病理学显示肿瘤呈浸润性生长,边界不清。随着肿瘤增大,肿瘤内部坏死明显,乳酸峰(Lac)或脂质峰(Lip)出现率增加。**结论:**大鼠脑 C₆ 胶质瘤模型是一种生长稳定、较为理想的脑胶质瘤模型;磁共振成像(MRI)可以准确提供胶质瘤模型的病理形态学信息,磁共振波谱(MRS)则可以提供胶质瘤的代谢及生化信息。

【关键词】 脑肿瘤; 动物,实验; 磁共振成像; 磁共振波谱学

【中图分类号】 R445.2; R730.264 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2004)12-0913-04

Magnetic resonance imaging and ¹H magnetic resonance spectroscopy studies in rat brain C₆ glioma MA Ming-ping, WU Guang-yao, ZHOU Yi-cheng, et al. Department of Radiology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, P. R. China

【Abstract】 Objective: To observe manifestations of magnetic resonance imaging (MRI) and ¹H magnetic resonance spectroscopy (¹H MRS) in rat brain C₆ glioma, correlative studies were performed between the manifestations of MRI and ¹H MRS with histopathology. **Methods:** Rat C₆ glioma cells were cultured in vitro and prepared for intracerebral injection, cells were injected into the caudate nucleus of rat brain under guiding of stereotaxic apparatus to establish a rat brain glioma model. MRI and ¹H MRS were conducted 12~18 days after implantation. The manifestations of MRI and ¹H MRS were correlated with pathologic appearances. **Results:** 16 brain glioma were developed in 24 rats after C₆ cell implantation. All rat brain C₆ gliomas presented as long T₁ and long T₂ signals on MRI and demonstrated obvious homogeneous or annular enhancement after the administration of gadolinium. ¹H MRS showed that the NAA peak decreased or disappeared and NAA/Cr ratio decreased and Cho/Cr ratio increased obviously in C₆ glioma. Some of gliomas presented with Lac and/or Lip peak. Histopathologic analysis revealed that all the tumor grew invasively. As the volume of tumor increased, massive necrosis developed in the central area of tumor and the occurrence rates of Lac and/or Lip peak had increased in these lesions. **Conclusion:** Rat brain C₆ glioma is a very stable and ideal animal model for experimental glioma studies. MRI can provide its pathomorphologic information precisely and MRS can provide its metabolic and biochemical changes in vivo.

【Key words】 Brain neoplasms; Animals, laboratory; Magnetic resonance imaging; Magnetic resonance spectroscopy

在脑胶质瘤的研究中,建立理想的脑胶质瘤动物模型是胶质瘤实验研究的基础,如何在活体内观察胶质瘤模型生长情况及代谢变化也是研究者非常关注的问题,磁共振成像(Magnetic resonance imaging, MRI)具有良好的软组织分辨力,可以提供肿瘤的大体形态学信息。磁共振波谱(magnetic resonance spectroscopy, MRS)可以无创性观察肿瘤组织的代谢及生化变化,为了系统观察脑胶质瘤模型的形态学改变及代谢变化,我们以大鼠 C₆ 胶质瘤为模型观察了其磁共振成像及波谱表现,并与病理学改变进行对照分析。

作者单位: 430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院放射科(马明平、周义成、王承缘); 430071 武汉,武汉大学中南医院放射科(吴光耀)

通讯作者: 马明平, 350010 福州,福建省立医院放射科
作者简介: 马明平(1971-),男,湖北宜昌人,博士,主要从事神经系统影像诊断工作。

材料与方法

1. 大鼠 C₆ 胶质瘤模型的制作

冻存 C₆ 胶质瘤细胞株由本院神经外科提供,常规复苏后于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基中培养,单细胞培养法传代生长,取对数生长期单层细胞,0.25% 胰酶消化后离心收集细胞,用含 1% 琼脂糖的无血清培养基调节细胞的浓度至 10⁵/μl 左右。选取清洁级成年雄性 Wistar 大鼠(250~300 g,本校实验动物中心提供),1% 戊巴比妥钠腹腔麻醉后,用立体定向架固定大鼠头部,常规消毒铺巾后剪开头皮,暴露颅骨顶部,用牙钻于冠状缝后 1 mm,矢状缝旁 3 mm 处钻一直径约 2 mm 的小孔,用微量注射器抽取 10 μl 约

10^6 个细胞后缓慢经颅孔进针,进针深度约硬膜下 4 mm,进针后缓慢注射细胞悬液,种植部位位于尾状核区域,注完后颅孔用骨蜡封闭,切口常规缝合。

2. 大鼠胶质瘤模型的 MRI 检查

植入肿瘤细胞后 12~18 d 行 MRI,采用 GE 1.5T Signa MR 机。主要观察肿瘤的生长情况及 MRI 表现,采用 3in(7.62cm)表面线圈,3D-SPGR 定位后分别行 T_1 WI、 T_2 WI 及 Gd-DTPA 增强扫描;SE T_1 WI: TR 300 ms, TE 17 ms; T_2 WI: TR 4000 ms, TE 108 ms;层厚 3 mm,视野 8 cm×8 cm,4 次信号平均,采集时间分别为 4min57s、3min36s,增强扫描于腹腔注入 0.3 mmol/kg, Gd-DTPA 后 10 min 左右进行,扫描参数同 SE- T_1 WI。

3. 大鼠胶质瘤模型的 ^1H -MRS 检查

波谱采集于上述 MR 检查后次日在 Bruker 4.7T Biospec 47/30 磁共振成像及波谱仪上进行,30 mm 表面线圈, T_2 WI 定位, TR 2500 ms, TE 80 ms。层厚和层距分别为 1 mm,视野 3 cm×3 cm, ^1H 波谱采用 PRESS 序列, TR 1000 ms, TE 136 ms,采集次数 1024 次,采集体积 2 mm×2 mm×2 mm,采集时间 17min4s。采集区偏向病灶边缘以避免中心坏死区,水抑制采用 Gauss 256,宽度 10 ms,为比较肿瘤与正常大鼠脑组织 ^1H 谱的差异,同法采集 5 只正常 Wistar

大鼠尾状核区域,对采集得到的自由衰减信号进行傅立叶转换后得到 ^1H 波谱,进行相位、基线校正后观察 N-乙酰天门冬氨酸(NAA)、胆碱类化合物(Cho)、肌酸和磷酸肌酸(Cr+PCr)、脂质(Lip)及乳酸(Lac)等信号强度改变,以积分面积进行比较,计算 NAA/Cr、Cho/Cr 的比值,有 Lac 峰或 Lip 峰则分别记为“+”,无则记为“-”,分别观察 Lac 峰或 Lip 峰的出现率。

4. C_6 胶质瘤的病理学观察

大鼠于 MRS 检查后当日或次日麻醉,4%多聚甲醛灌注固定脑组织,掀开颅骨,取出完整的脑组织,将固定标本沿 MR 扫描层面切成约 2 mm 厚的薄片大体观察肿瘤生长情况,并用石蜡包埋后制成厚约 5 μm 的病理切片,HE 染色后镜下观察。

5. 统计学处理

正常大鼠与 C_6 胶质瘤 NAA/Cr、Cho/Cr 的比值比较采用 t 检验。

结 果

1. C_6 胶质瘤的生长情况及 MRI 表现

植入后 12~18 d,24 只大鼠中有 16 只(66.6%)肿瘤生长良好,平均直径约(5.3±1.6) mm,肿瘤呈长 T_1 、长 T_2 信号,灶周轻度水肿,伴有中线结构轻度移位(图 1),对侧脑室系统受压变形,注入 Gd-DTPA 后肿瘤强化明显,16 例肿瘤中 9 例均均匀强化(图 2),7 例呈明显环状强化(图 3)。

2. 正常大鼠及 C_6 胶质瘤的 ^1H 波谱

正常大鼠于尾状核区进行 ^1H -MRS 采集(图 4),分别于 2.0 ppm、2.3 ppm、3.0 ppm、3.2 ppm 位置显示 NAA、Glu+Gln、Cr+PCr、Cho 峰(图 5),其中 NAA 为第 1 高峰, Cr+PCr 次之, NAA/Cr 和 Cho/Cr 比值分别为 1.31 ± 0.14 和 0.92 ± 0.23 ; C_6 胶质瘤于近边缘部分进行 ^1H -MRS 采集(图 6), NAA 峰明显下降甚至消失, Cho 升高为第 1 高峰, Cr+PCr 轻度下降,部分肿瘤出现 Lac 峰或 Lip 峰,其中 NAA/Cr 和 Cho/Cr 比值分别为 0.53 ± 0.18 和 2.07 ± 0.40 ,与正常大鼠相比有显著性差异(t 值分别为 8.89 和 6.01, $P<0.01$)。16 例肿瘤灶中有 10 例(62.5%)于 1.33 ppm 处可见倒置的 Lac 峰,7 例(43.8%)于 1.2 ppm 处显示 Lip 峰(图 7)。

3. C_6 胶质瘤的病理改变

大体观察肿瘤呈圆形或椭圆形,灰白

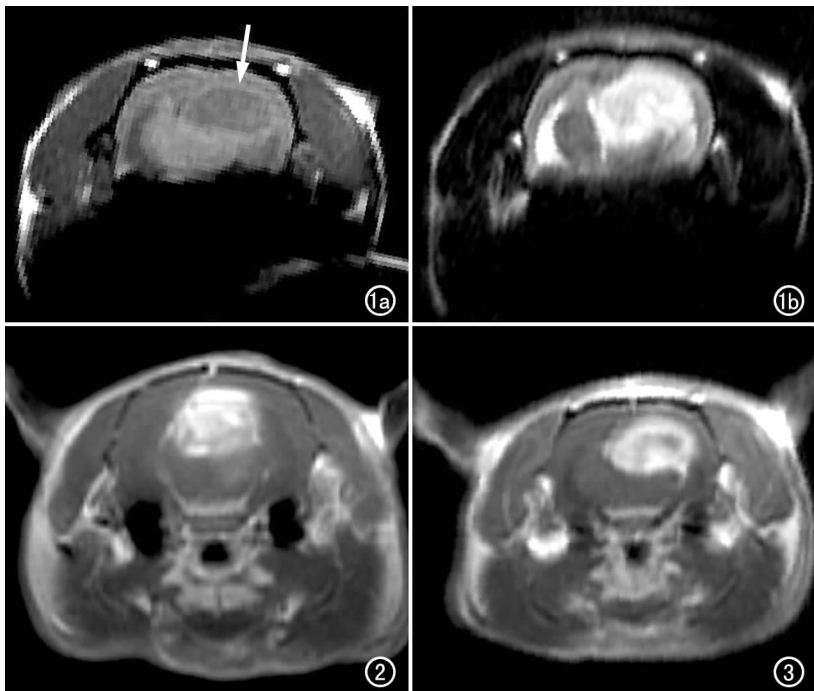


图 1 a) T_1 WI; b) T_2 WI。分别显示大鼠 C_6 胶质瘤呈长 T_1 (箭)、长 T_2 信号,灶周轻度水肿,伴有中线结构轻度移位,脑室系统受压变形。图 2 Gd-DTPA 增强肿瘤强化明显,部分强化均匀。图 3 Gd-DTPA 增强肿瘤灶呈环状强化,中心不强化。

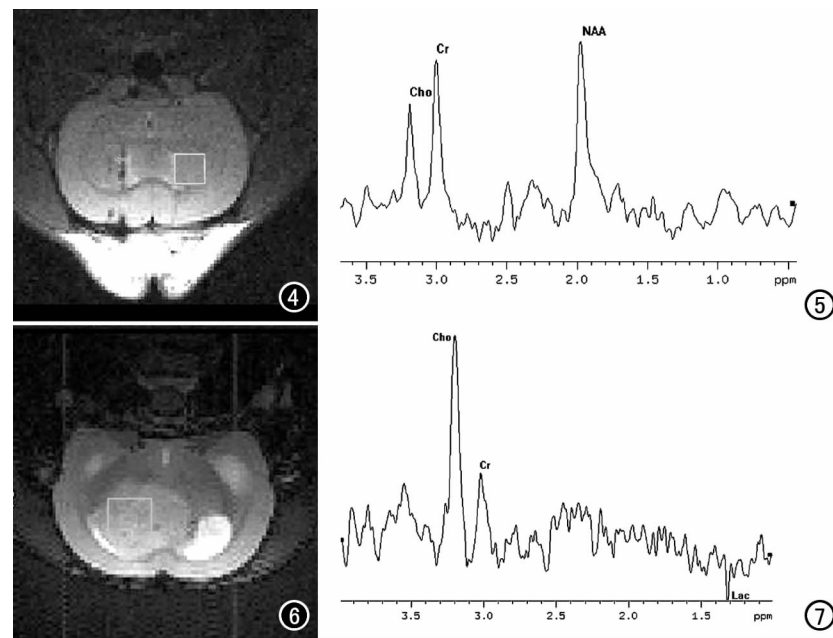


图 4 正常大鼠¹H 波谱采集 ROI 位于尾状核。图 5 正常大鼠¹H 波谱分别于 2.0、2.3、3.0 和 3.2 ppm 位置显示 NAA、Glu+Gln、Cr+PCr、Cho 峰,其中 NAA 为第 1 高峰,Cr+PCr 次之。图 6 C₆ 胶质瘤¹H 波谱采集 ROI 靠近肿瘤边缘。图 7 2.0 ppm NAA 峰基本消失,3.2 ppm Cho 升高为第 1 高峰,3.0 ppm Cr+PCr 轻度下降,1.33 ppm 可见倒置的 Lac 峰。

色,与周围组织间界限不清。16 例肿瘤灶中 7 例肉眼可见肿瘤中心苍白色无定形坏死区,镜下坏死区细胞崩解,细胞密度明显降低,残余部分细胞核结构及间质组织,坏死区周围见大量异形肿瘤细胞,排列紊乱,与 MR 增强对照发现 7 例病灶均显示环状强化,中心坏死区不强化。9 例肉眼不能确定肿瘤是否有坏死,镜下肿瘤中心可见微坏死灶,MR 增强表现为整个肿瘤灶强化较均匀。

讨论

大鼠 C₆ 胶质瘤由于起源于神经胶质细胞,病理学特性也接近人脑胶质瘤而广泛应用于放疗、化疗、基因治疗等各种实验研究中^[1-3]。该模型在脑内原位接种成功率高,本实验中成功率为 66.6%,低于其它文献报道^[4],可能与操作有关。接种成功后肿瘤围绕注射点呈球形生长,2 周后肿瘤直径约 4~5 mm, MRI 呈长 T₁、长 T₂ 信号,灶周轻度水肿,注入 Gd-DTPA 后肿瘤强化明显,随着肿瘤体积的增大,中心出现坏死,病灶呈环状强化,其 MR 表现与人脑胶质瘤非常接近。MRI 动态观察其生长特性具有重要意义,可以准确评价肿瘤存活及生长状况,是活体观察肿瘤形态学变化的理想方法。在 Gd-DTPA 增强扫描中我们根据大鼠腹腔吸收能力强,药物吸收快的特点,采用了经腹腔给药途径,经腹腔注入 0.3 mmol/kg 剂量的 Gd-DTPA

后 10 min 左右扫描,可以良好的显示肿瘤灶,肿瘤强化明显,可以避免经尾静脉给药穿刺难度大的困难。

¹H-MRS 是一种无创性观测组织的生化特性及代谢变化的方法,对脑肿瘤的诊断、鉴别诊断及观察肿瘤治疗后改变均具有重要意义^[5,6]。本实验中大鼠 C₆ 胶质瘤的¹H-MRS 与人脑胶质瘤非常类似,表现为 NAA 峰明显下降甚至消失,Cho 升高为第 1 高峰,Cr+PCr 轻度下降,其中 NAA 下降与脑内神经元逐渐被肿瘤组织破坏有关,Cho 升高可能与肿瘤增殖旺盛,细胞膜转换加快有关。Cr+PCr 轻度下降可能与细胞能量消耗增多,磷酸肌酸分解为肌酸释放 ATP,以补充肿瘤细胞的能量需要有关^[7,9]。另外,还有部分肿瘤内出现 Lac 峰或 Lip 峰,其中 Lac 峰的出现可能与肿瘤内部缺血缺氧,肿瘤细胞糖酵解增强,代谢终产物 Lac 增多有关^[10],而 Lip 峰出现目前认为与肿瘤细胞坏死有关。Hana 等对 C₆ 胶

质瘤研究后发现,脂质颗粒主要出现在肿瘤组织中心坏死区内,并分布广泛,最大颗粒约 10 μm,肿瘤周围区域存活的细胞内未见脂质颗粒^[11,12]。本实验中虽然我们尽量将采集区偏向病灶边缘以避免中心坏死区,但由于病灶体积较小,部分采集区仍位于中心坏死区,对照研究发现 7 例环状强化病灶¹H-MRS 均有 Lac 峰出现,5 例出现 Lip 峰。另外,9 例均匀强化病灶只有 3 例出现 Lac 峰,2 例出现 Lip 峰,也表明 Lac 峰和 Lip 峰的出现可能与肿瘤缺血缺氧后坏死有关。

大鼠脑 C₆ 胶质瘤模型具有制作简单,存活率高,所建模型稳定性和可靠性好,病理学特点接近人脑胶质瘤等特点,是一种较为理想的胶质瘤动物模型。磁共振技术在活体研究脑胶质瘤的生物学特性方面具有独特的优势, MRI 可以准确提供胶质瘤模型的病理形态学信息, MRS 则可以提供胶质瘤的代谢及生化信息,利用这些技术观察 C₆ 胶质瘤的生长变化规律及代谢信息,对今后开展胶质瘤的多方面实验研究具有重要意义。

参考文献:

- [1] Douglas K, Salvador S, Christopher C, et al. Radiosurgery and fractionated therapy: comparison of different techniques in vivo rat glioma model[J]. J Neurosurg, 1996, 84(6): 1033-1038.
- [2] Reyes S, Herrera LA, Ostrosky P, et al. Quinacrine enhances car-

- mustine therapy of experimental rat glioma[J]. Neurosurgery, 2001, 49(4): 969-973.
- [3] Namba H, Tagawa M, Miyagawa T, et al. Treatment of rat experimental brain tumors by herpes simplex virus thymidine kinase gene-transduced allogeneic tumor cells and ganciclovir[J]. Cancer Gene Ther, 2000, 7(6): 947-953.
- [4] Zhang X, Wu J, Gao D, et al. Development of a rat C6 brain tumor model. Chin Med J, 2002, 115(3): 455-457.
- [5] Lai PH, Ho JT, Chen WL, et al. Brain abscess and necrotic brain tumor: discrimination with proton MR spectroscopy and diffusion-weighted imaging[J]. Am J Neuroradiol, 2002, 23(8): 1369-1377.
- [6] Tarnawski R, Sokol M, Pieniazek P, et al. ^1H -MRS in vivo predicts the early treatment outcome of postoperative radiotherapy for malignant gliomas[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2002, 52(5): 1271-1276.
- [7] Leclerc X, Huisman TA, Sorensen AG, et al. The potential of proton magnetic resonance spectroscopy ^1H -MRS in the diagnosis and management of patients with brain tumors[J]. Curr Opin Oncol, 2002, 14(3): 292-298.
- [8] Kinoshita Y, Yokota A. Absolute concentrations of metabolites in human brain tumors using in vitro proton magnetic resonance spectroscopy[J]. NMR Biomed, 1997, 10(1): 2-12.
- [9] Herminghaus S, Pilatus U, Moller-Hartmann W, et al. Increased choline levels coincide with enhanced proliferative activity of human neuroepithelial brain tumors[J]. NMR Biomed, 2002, 15(6): 385-392.
- [10] Terpstra M, High WB, Luo Y, et al. Relationships among lactate concentration, blood flow and histopathologic profiles in rat C6 glioma[J]. NMR Biomed, 1996, 9(5): 385-392.
- [11] Rosi A, Luciani AM, Matarrese P, et al. ^1H -MRS lipid signal modulation and morphological and ultrastructural changes related to tumor cell proliferation[J]. Magn Reson Med, 1999, 42(2): 248-257.
- [12] Lahrech H, Zoula S, Farion Ret, et al. In vivo measurement of the size of lipid droplets in an intracerebral glioma in the rat[J]. Magn Reson Med, 2001, 45(3): 409-414.

(收稿日期: 2003-12-17 修回日期: 2004-03-03)

• 病例报道 •

内生软骨瘤病一例

高建华, 叶道斌, 崔英, 张如意, 金晶

【中图分类号】R445 【文献标识码】D 【文章编号】1000-0313(2004)12-0916-01

病例资料 患者, 女, 38 岁。5 岁时出现双手畸形改变, 右肩及胸骨有一红枣大小的硬性包块, 双手及右肩畸形变随生长发育变化, 无疼痛, 至 18 岁双手畸形变化停止, 右肱骨上段包块约鸡蛋大小。1996 年始右肱骨上段硬性包块渐增大, 遂来院就诊。入院后查体: 右肱骨上段近肩关节处可见大小约 20 cm×15 cm×12 cm 的硬性包块, 边界清楚, 无压痛, 局部凹凸不平。双侧掌骨及指骨畸形变, 左前臂向尺侧弯曲, 胸骨柄上端可及约 8 cm×8 cm 硬性包块, 局部无红肿、压痛, 边界清楚。双小腿远端畸形变, 右下肢较左下肢短缩 3 cm。

X 线检查: 双前臂及双手掌骨、指骨、右肱骨及双侧肩胛骨、胸骨、双胫骨远端见大小不等的膨胀样改变, 骨小梁结构消失, 密度增高(图 1)。CT 扫描: 双侧肩胛骨、肱骨、胸骨呈膨胀样改变, 以右侧为著, 其内骨小梁正常结构消失, 密度增高, 右侧肱骨骨皮质断裂, 可见软组织密度影及砂砾样钙化影, 病变范围较广泛(图 2)。考虑内生软骨瘤病, 右肱骨局部恶变。2004 年 2 月 25 日行肱骨上段软骨瘤切除术, 术后病理诊断符合内生软骨瘤病。

讨论 内生性软骨瘤是发生在骨髓腔内的良性软骨源性肿瘤, 分为单发与多发两类, 其中多发性的称为内生软骨瘤病, 是一种少见的疾病, 其发病原因至今尚不明确。一般认为是骨



图 1 X 线正位像显示双侧尺桡骨远端、腕骨、掌骨、指骨呈枣核样改变, 骨小梁结构消失, 密度增高。图 2 胸部 CT 平扫。a) 右侧肩胛骨、肱骨、胸骨呈膨胀样改变, 其内骨小梁正常结构消失, 密度增高; b) 右侧肱骨呈膨胀样改变, 骨小梁正常结构消失, 骨皮质断裂, 并见软组织影及砂砾样钙化影。

骼在发育过程中, 部分干骺端软骨不能经历正常的软骨化骨而停滞于软骨阶段, 并沉积在干骺端或逐渐转移至骨干继续发育形成畸形。因此, 该病最多见于青少年手足短管状骨, 其次为四肢长骨, 但累及肩胛骨、胸骨者十分少见。其畸形随青春发育而发展, 一般到达成年后肿瘤即停止生长, 少数病例可恶变为软骨肉瘤。大多数患者表现为单侧不对称性发病, 合并肢体畸形者称为 Ollier's 病, 合并皮肤、内脏血管瘤者称为 Maffucci's 综合征。本例为胸骨、双侧肩胛骨、四肢及手足骨多发性发病, 并伴有右下肢短缩畸形, 应符合 Ollier's 病。

(收稿日期: 2004-06-15 修回日期: 2004-07-20)

作者单位: 100039 北京, 武警总医院 CT 室

作者简介: 高建华(1955-), 女, 北京人, 副主任医师, 主要从事 CT 诊断工作。