

# 全反式维甲酸诱导分化大鼠 C6 脑胶质瘤的实验研究

付锐<sup>1</sup>, 王伦长<sup>2</sup>, 涂汉军<sup>2</sup>, 李新建<sup>2</sup>, 黄宽明<sup>2</sup>, 何跃<sup>3</sup>, 黄敏<sup>2</sup>, 徐航<sup>2</sup>

The Experimental Study of Differentiation in the Rat C6 Glioma with all Trans Retinoic Acid

FU Rui, WANG Lun-chang, TU Han-jun, LI Xin-jian, HUANG Kuan-ming, HE Yue, HUANG Ming, XU Hang

1. Department of Neurosurgery, Taihe Hospital affiliated to Yunyang Medical College, Shiyang 442000, China; 2. Department of Neurosurgery, Shiyang Taihe Hospital; 3. Department of Neurosurgery, Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology

**Abstract:** **Objective** To evaluate the effect and mechanism of the inducing differentiation of all trans retinoic acid in the rat C6 glioma. **Methods** By establishing rat C6 glioma brain tumour model, after delivering all trans retinoic acid via syringe injection into the peritoneal cavity, MRI and flow cytometer were employed to inspect tumour volume and cell cycle respectively. **Results** Tumour volume in the treatment group was smaller than that in the control group ( $P < 0.05$ ), the ratio of the cells at G<sub>1</sub> phase relatively increased ( $P < 0.05$ ) and S phase relatively decreased ( $P < 0.05$ ) in the treatment group as compared with that of the control group. **Conclusion** All trans retinoic acid can induce differentiation and inhibit proliferation on rat C6 glioma, its mechanism is concerned with the changes of the cell cycle.

**Key words:** Glioma; All trans retinoic acid; Inducing differentiation; MRI; Cell cycle

**摘要:** **目的** 探讨全反式维甲酸对大鼠 C6 脑胶质瘤的诱导分化效应及其机制。 **方法** 建立大鼠 C6 脑胶质瘤模型, 腹腔注射全反式维甲酸后, MRI 检测胶质瘤的体积变化及流式细胞仪检测细胞增殖时相变化。 **结果** 治疗组较对照组 MRI 检测显示肿瘤体积减小 ( $P < 0.05$ ), 流式细胞仪检测显示 G<sub>1</sub> 期细胞比例增加 ( $P < 0.05$ ), S 期细胞比例减少 ( $P < 0.05$ )。 **结论** 全反式维甲酸可诱导 C6 胶质瘤分化, 显著抑制胶质瘤细胞增殖, 且其机制与改变细胞周期有关。

**关键词:** 胶质瘤; 全反式维甲酸; 诱导分化; MRI; 细胞周期

中图分类号: R730.264 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2005)02-0073-03

## 0 引言

脑胶质瘤预后差, 易复发, 故探索有效的新疗法, 提高生存率, 已成为脑胶质瘤治疗的迫切课题。诱导分化治疗是肿瘤化学治疗的一个新领域, 已成为国际肿瘤治疗的新热点。本实验应用诱导分化剂全反式维甲酸在实体瘤领域对 C6 大鼠脑胶质瘤进行作用, 探讨其抗肿瘤效应, 以便为其临床应用提供实验依据。

## 1 材料与方

### 1.1 细胞培养

#### 1.1.1 细胞来源 C6 细胞是一种经 N-亚硝基甲

胺诱发的高度恶性的大鼠脑胶质瘤(购于中科院上海细胞所)。

1.1.2 培养方法 C6 细胞在含有 10% 的新生小牛血清, 青霉素 100U/ml, 链霉素 100μg/ml 的 DMEM 培养基中, 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 条件下培养。

### 1.2 动物模型建立

1.2.1 动物 健康 Wistar 大鼠, 雌雄不限, 鼠龄 4~6 周, 体重 150~200g, 常规喂养, 共 40 只。

1.2.2 方法 Wistar 大鼠经 10% 的水合氯醛 3ml/kg 麻醉后, 固定于立体定向仪上, 于大鼠右顶叶皮质 S1 区(前囟后 1mm, 矢状缝旁 3mm) 接种 C6 胶质瘤细胞  $1 \times 10^6 / 10\mu\text{l}$ , 微量注射器注入<sup>[1]</sup>。

### 1.3 动物分组及治疗的实施

接种 C6 细胞后第 7 天, 将荷瘤鼠随机分为对照组和维甲酸治疗组, 每组 20 只。对照组无水乙醇和磷酸盐缓冲液按 1:9 配制, 每天 1ml 腹腔注射,

收稿日期: 2004-06-03; 修回日期: 2004-08-05

作者单位: 1. 442000 邵阳医学院附属太和医院神经外科(武汉大学医学院硕士研究生); 2. 十堰市太和医院神经外科; 3. 华中科技大学同济医院神经外科

连续两周。全反式维甲酸治疗组 无水乙醇和磷酸盐缓冲液按 1:9 配制后,加入全反式维甲酸(购自美国 Sigma 公司),浓度为 1mg/ml,每天 1ml 腹腔注射,连续两周<sup>[2]</sup>。

1.4 肿瘤体积测定 接种 C6 细胞后第 22 天,每组随机取 10 只瘤鼠,经 10% 的水合氯醛 3ml/kg 麻醉后,俯卧,进行 MRI 检测,应用 80mm 环形线圈行矢状位、冠状位、横断位 T<sub>1</sub>WI 及 T<sub>2</sub>WI 扫描,层厚 3.0mm,层间距 1.0mm,常规扫描后,大鼠腹腔注射 Gd-DTPA (2ml/kg) 30 分钟后,行 SE T<sub>1</sub>WI 三平面增强扫描。矢状位测量肿瘤的长径(a),冠状位测肿瘤的横径(b,c),肿瘤体积的计算公式为  $V = a \times b \times c \times \pi / 6$ 。

1.5 流式细胞仪检测细胞周期 将每组剩余 10 只荷瘤鼠,经 10% 的水合氯醛 3ml/kg 麻醉后,开颅取新鲜脑组织,制成单细胞悬液,调细胞浓度为  $4 \times 10^8/L$ ,10μg/ml 碘化丙啶(美国 Sigma 公司)室温下染色 30 分钟后,上机检测。Multicycle 分析软件分析细胞周期。

1.6 统计学分析 采用 SPSS10.0 统计分析软件,对照组和治疗组肿瘤体积、细胞周期采用 t 检验比较其差异,  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

2.1 肿瘤体积测定 MRI 检查显示肿瘤组织呈长 T<sub>1</sub>、长 T<sub>2</sub> 信号,增强呈均匀或环状强化,治疗组肿瘤体积明显小于对照组,见表 1。

表 1 接种后第 22 天对照组和治疗组肿瘤体积大小的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数(只)	体积(mm <sup>3</sup> )
对照组	10	292.97 ± 19.13
治疗组	10	161.74 ± 9.53

治疗组肿瘤体积明显小于对照组 ( $P < 0.05$ )

2.2 细胞周期分析 流式细胞仪检测显示维甲酸能引起胶质瘤细胞周期发生 G<sub>1</sub>/S 期阻滞,治疗组 G<sub>1</sub> 期细胞多于对照组,而 S 期细胞则减少,见图 1、表 2。

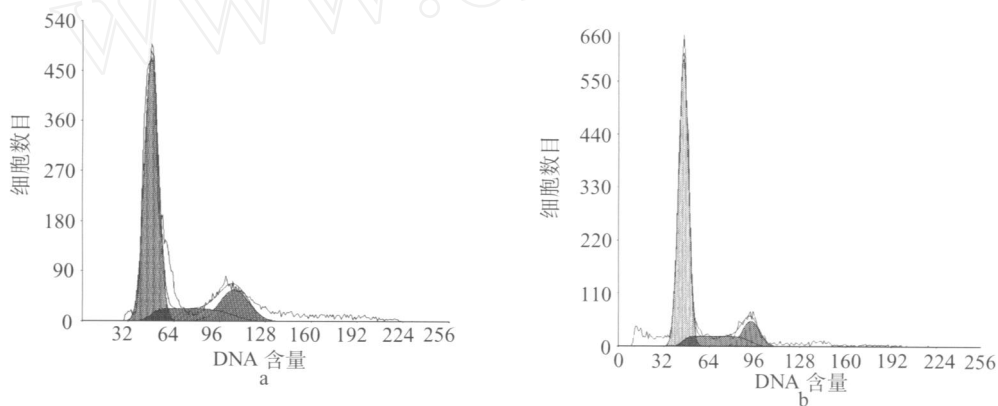


图 1 接种后第 22 天 Wistar 大鼠 C6 脑胶质瘤流式细胞仪检测图

(a 图为对照组, b 图为维甲酸治疗组)

表 2 接种后第 22 天对照组和治疗组肿瘤细胞周期的变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数(只)	G <sub>1</sub> 期 (%)	S 期 (%)
对照组	10	67.52 ± 2.54	15.60 ± 1.60
治疗组	10	74.92 ± 2.22	12.57 ± 1.55

治疗组 G<sub>1</sub> 期细胞多于对照组 ( $P < 0.05$ ), 而 S 期细胞则减少 ( $P < 0.05$ )

## 3 讨论

全反式维甲酸是维生素 A 的重要衍生物,研究表明它可使多种胶质瘤细胞发生分化,但多局限于离体细胞实验<sup>[3,4]</sup>。在实体瘤领域进行研究,国内外尚不多。肿瘤(特别是恶性肿瘤)最基本的生物学特征是瘤组织的无限增殖和细胞的分化异常,众多资

料表明细胞分化与增殖呈负相关<sup>[5]</sup>,细胞增殖减慢是细胞分化的结果。我们通过建立 C6 大鼠脑胶质瘤模型,将全反式维甲酸作用于 Wistar 荷瘤大鼠, MRI 检测肿瘤体积大小显示治疗组肿瘤体积明显小于对照组, t 检验  $P < 0.05$ , 差异有显著性。这表明全反式维甲酸具有抑制 C6 脑胶质瘤细胞增殖,促其分化的作用。

目前,维甲酸对胶质瘤的作用机理尚不明确,它涉及到与增殖分化调节有关的一个大的网络系统<sup>[6]</sup>。本实验流式细胞仪分析结果显示,治疗组 G<sub>1</sub> 期细胞多于对照组,而 S 期细胞则相应减少, t 检验  $P < 0.05$ , 差异有显著性,这表明维甲酸能引起胶质瘤细胞周期发生 G<sub>1</sub>/S 期阻滞, G<sub>1</sub> 期即 DNA 合成

前期,是细胞进入分裂期的重要阶段,G<sub>1</sub>期增加则进入分裂相的细胞减少;S期是DNA合成期,S期减少则DNA合成减少。这提示我们全反式维甲酸抑制C6脑胶质瘤细胞增殖、促其分化的作用机理之一是由于它改变了肿瘤细胞周期的分布,减少了DNA合成和有丝分裂。

上述实验为全反式维甲酸应用于临床治疗脑胶质瘤提供了一定的理论基础,然而其诱导分化的机理、最佳用药等仍需实验进一步深入探讨。

#### 参考文献:

- [1] 黄宽明,涂汉军,李新建,等.大鼠皮层C6脑胶质瘤模型的建立[J].肿瘤防治杂志,2003,10(5):449-451.
- [2] Gerald E,Keith L. Trans retinoic acid inhibits in vivo tumour growth of C6 glioma in rats: Effect negatively influenced by

nerve growth factor[J]. Neurological Research,1994,16(6):184-186.

- [3] Ohno S, Nishi T, Kojima Y, et al. Combined stimulation with interferon alpha and retinoic acid synergistically inhibits proliferation of the glioblastoma cell line GB12 [J]. Neurol Res, 2002,24(7):697-704.
- [4] Zhang XF, Ren ZY, Fang FD, et al. Synergistic effect of all trans retinoic acid and herpes simplex virus thymidine kinase gene on glioma [J]. Ai Zheng, 2002,21(5):473-479.
- [5] Thier M, Roeb E, Breuer B, et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 in glial and neuronal tumor cell lines: inverse correlation with proliferation rate [J]. Cancer Lett, 2000,149(1-2):163-170.
- [6] Langlois A, Lee S, Kim DS, et al. P16 (ink4a) and retinoic acid modulate rhoA and GFAP expression during induction of a stellate phenotype in U343MGA astrocytoma cells [J]. Glia, 2002,40(1):85-94.

[编辑:刘红武;校对:周永红]

## 中华医学会第六届全国细胞病理学 学术会议征文通知

由中华医学会病理学分会细胞专业委员会主办、中华医学会武汉分会及湖北省肿瘤医院承办的中华医学会第六届全国细胞病理学学术会议拟定于2005年9月在湖北省宜昌市举行。会议将邀请国内、外著名的细胞病理学专家做专题报告,并就细胞病理学领域中的新方法、新技术展开学术研讨。这将是一次高水平的学术会议,又是一次普及、提高的研讨会。欢迎全国细胞病理学工作者踊跃投稿参会。

#### 征文内容及要求:

1. 有关细胞病理学新进展的专题报告。
2. 细胞病理学的新技术、新方法的研究及应用。
3. 细针穿刺细胞学、妇科细胞学、体腔脱落细胞学等有关论文。论文须未公开发表及未曾在全国会议上交流;每篇论文一律寄全文及500~800字摘要各一份。
4. 来稿请注明会议征文,写清作者姓名、通讯地址、联系电话、工作单位及邮政编码,并附软盘或用E-mail投稿及报名。征文请自留底稿,恕不退稿。
5. 征文截稿日期:2005年7月30日。

来稿请寄:武汉市汉口胜利街155号中华医学会武汉分会

邮政编码430014 顾欣主任收

E-mail:hsing620@126.com Tel:027-82835616

联系人:毛永荣(湖北省肿瘤医院病理科)

Tel:027-62313503(小灵通) 027-87670097(办公室)

顾欣(中华医学会武汉分会) Tel:027-82835616

中华医学会病理学分会细胞专业委员会  
2005年1月