

冰片对替莫唑胺抗大鼠脑胶质瘤促进作用的研究

范成普 陈才红 杜杭根 陈景南

【摘要】 目的 探讨冰片对替莫唑胺抗大鼠脑胶质瘤的促进作用。方法 建立 Wistar 大鼠 C6 脑胶质瘤模型,随机分为冰片联合替莫唑胺组、单用替莫唑胺组、单用冰片组、空白对照组并分别给药 10d。处死各组大鼠,取脑胶质瘤并制作石蜡切片,计算肿瘤最大横截面积,同时采用 HE 染色观察组织病理学改变,TUNEL 法染色观察并计算细胞凋亡率。结果 与单用冰片组、单用替莫唑胺组、空白对照组比较,冰片联合替莫唑胺组脑胶质瘤最大横截面积均较小(均 $P < 0.05$),细胞凋亡率均较高(均 $P < 0.05$);与单用冰片组、空白对照组比较,单用替莫唑胺组脑胶质瘤最大横截面积均较小(均 $P < 0.05$),细胞凋亡率均较高(均 $P < 0.05$)。空白对照组、单用冰片组脑胶质瘤细胞核呈高密度聚集,冰片联合替莫唑胺组细胞核密度降低,单用替莫唑胺组细胞核密度介于两者之间。空白对照组与单用冰片组均基本看不到凋亡细胞,单用替莫唑胺组可见少量凋亡细胞,冰片联合替莫唑胺组凋亡细胞明显增多。结论 冰片对替莫唑胺抗大鼠脑胶质瘤具有促进作用,可能与冰片开放血脑屏障、提高大鼠脑组织替莫唑胺浓度有关。

【关键词】 冰片 替莫唑胺 C6 胶质瘤细胞 血脑屏障 凋亡率

Borneol enhances effect of temozolomide against rat glioma FAN Chengpu, CHEN Caihong, DU Hanggen, et al. Department of Emergency, the Second Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, 310005 Hangzhou, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of borneol on temozolomide against rat glioma. Methods C6 glioma model was established in 20 adult Wistar rats, the tumor-bearing rats were randomly divided into 4 groups with 5 in each group. The animals were treated with borneol combined with temozolomide (B+T group), temozolomide alone (T group), borneol alone (B group) and normal saline (control group) for 10d, respectively. Gliomas samples were taken after animals sacrificed, and paraffin sections were made. The maximum cross-sectional area of the tumor was calculated, and histopathological changes were observed by HE staining. TUNEL staining was performed and the apoptosis rate calculated. Results The average cross-sectional area of cerebral glioma in B+T group was significantly lower than that in the other 3 groups ($P < 0.05$). HE staining and TUNEL staining showed that compared to other groups the density of tumor cells decreased significantly, the apoptotic cells increased significantly, and the apoptosis rate was significantly higher in B+T group ($P < 0.05$). Conclusion Borneol can enhance the effect of temozolomide against rat glioma, which may be related to its effect of open blood-brain barrier and the increase of temozolomide concentration in rat brain tissue.

【Key words】 Borneol Temozolomide C6 glioma cell Blood-brain barrier Apoptosis rate

神经胶质瘤是最常见的原发性中枢神经系统肿瘤,其发病率、复发率和病死率均较高。目前手术切除+放疗是神经胶质瘤的最佳治疗方式。由于血脑屏障的存在,化疗药物往往无法在脑内达到一定浓度并直接作用于神经胶质瘤。目前研究证实,新型烷化剂——替莫唑

胺具有良好的抗胶质瘤作用^[1],临床上广泛用于成人顽固多形性成胶质细胞瘤、复发或进展的多形性胶质母细胞瘤或间变性星形细胞瘤的治疗,但其在颅内的浓度仅为血液的 40%。冰片具有“芳香走窜、引药上行”的功效,能增加血脑屏障的通透性,促进其他物质在脑组织聚集,增加血药浓度^[2-3]。本研究在大鼠 C6 脑胶质瘤模型中联合应用冰片和替莫唑胺,以期通过冰片开放血脑屏障,从而促进替莫唑胺通过血脑屏障,提高脑组织内药物浓度,现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 动物与细胞 健康雄性 Wistar 大鼠 26 只(清洁、

DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.18.2019-1186

基金项目:浙江中医药大学科研基金项目(2019ZY11)

作者单位:310005 杭州,浙江中医药大学附属第二医院急诊科(范成普),神经外科(杜杭根、陈景南);杭州市大江东医院(陈才红)

通信作者:陈景南,Email: chen_jingnan0619@163.com

无特定病原级),体重 220~240g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司;C6 脑胶质瘤细胞购自中国科学院上海细胞库。

1.2 试剂与仪器 冰片(100g,批号 110743,杭州胡庆余堂);替莫唑胺(100mg,批号 H20130603,济宁泰诺化工有限公司);石蜡油 500ml/瓶(南昌白云制药公司);0.9%氯化钠溶液 250ml/瓶(杭州民生制药公司);含 10%FBS 的 RPMI1640 培养液(美国 Gibco 公司);TUNEL 试剂盒(德国 Roche 公司);3%戊巴比妥钠、苏木素染液、伊红染液、PBS(北京索莱宝科技有限公司);10%多聚甲醛(浙江中医药大学动物实验中心自行配制);切片石蜡(上海国药有限公司)。脑立体定向仪(上海奥尔科特生物科技有限公司);牙科钻(淮北正华生物仪器设备有限公司);轮转式切片机(RM2235 型,德国 Leica 公司);病理组织漂烘仪(TEC2500 型,常州市郝思琳仪器设备有限公司)。

1.3 细胞培养 取底面积 75cm² 的培养瓶数只,放入 C6 胶质瘤细胞,再加入适量 RPMI 1640 培养液,轻轻混匀后置于培养箱中,在 37℃、5%CO₂、饱和湿度的环境下培养。当细胞生长至贴壁率>80%时进行传代。取对数生长期细胞,以适量 0.25%胰蛋白酶处理 3~5min,弃消化液。用平衡盐溶液进行吹打,冲洗 1~2 次,形成细胞悬液。调整细胞浓度为 1.5×10⁵ 个/μl,并使用该浓度的细胞悬液进行接种。

1.4 模型制作 Wistar 大鼠称重后,以 3%戊巴比妥钠(1ml/100g)腹腔注射麻醉。取脑立体定向仪,固定大鼠头部。在内眦连线与头部正中矢状面交点处作一标记,由此向后纵向切开头皮约 1cm,分离暴露颅骨。根据 Batker 法,以冠状缝前 1mm、中线右旁开 3mm 为右尾状核点,使用牙科钻在颅骨上钻孔,直径约 1.2mm。使用微量注射器从培养基中抽取 C6 细胞悬液 10μl,调节针尖,待触及硬脑膜后沿钻孔垂直进针 5mm,后退 1mm,将细胞悬液缓慢、匀速注入到尾状核内,约 10min。注射完毕后,留针 5min 退出,用明胶海绵填塞骨孔,外面骨蜡封闭。待大鼠苏醒后,将其置于单笼环境饲养。造模第 7 天随机选取 6 只大鼠断头取脑并分离脑组织,肉眼观察脑组织表面未见明显肿瘤组织;10%甲醛溶液固定,作石蜡切片,HE 染色可见:肿瘤组织呈栅栏状紧密排列,细胞核深染,与周围的正常脑组织形成鲜明对比;正常脑组织与肿瘤组织之间可见一条较明显的界线,存在肿瘤细胞浸润及新生血管,见图 1(插页)。提示建模成功。

1.5 分组与给药 造模第 14 天按随机数字表法将大鼠随机分为 4 组,每组 5 只。(1)冰片联合替莫唑胺组:

每只大鼠按 3ml/kg 灌服 10%冰片石蜡油溶液,1h 后按 1ml/100g 腹腔注射替莫唑胺溶液(替莫唑胺 25mg/kg 溶于相应体积的 0.5%羧甲基纤维素溶液中),1 次/d,连续 10d。(2)单用替莫唑胺组:每只大鼠按 3ml/kg 灌服 0.9%氯化钠溶液,1h 后按上述方法腹腔注射替莫唑胺溶液,其余同上。(3)单用冰片组:每只大鼠按 3ml/kg 灌服 10%冰片石蜡油溶液,1h 后腹腔注射等量的 0.9%氯化钠溶液,其余同上。(4)空白对照组:每只大鼠按 3ml/kg 灌服 0.9%氯化钠溶液,1h 后腹腔注射等量的 0.9%氯化钠溶液,其余同上。

1.6 一般情况观察 每日观察并记录大鼠造模后精神、体重、饮食、活动量等一般情况,共观察 24d。

1.7 肿瘤最大横截面积测量 末次给药 24h 后处死大鼠,断头取脑,以 10%甲醛溶液固定后,取出脑胶质瘤。以肿瘤中心为切入点作冠状切面,测量每个切面肿瘤的最大横截面积。

1.8 组织病理学观察 取瘤组织制作石蜡切片、HE 染色,观察并比较各组大鼠脑胶质瘤组织病理学改变。

1.9 细胞凋亡率检测 采用 TUNEL 法。石蜡切片,常规脱蜡,PBS 冲洗;取 50μl 蛋白酶 K 消化,37℃下在湿盒中反应 30min,PBS 冲洗;吸干水份,每片加 30μl TUNEL 反应液,37℃在湿盒中反应 60min,PBS 冲洗;每片加 30μl 碱性磷酸酶抗体进行反应,37℃在湿盒中反应 30min,PBS 冲洗;吸干水份,每个载玻片上加一滴异硫氰酸荧光素,在室温避光条件下孵育 10min,PBS 冲洗;予甘油和 PBS 封片,置荧光显微镜下进行观察。然后用苏木精重新染色,树胶封片,置荧光显微镜下再次观察。在 40 倍镜下随机选择 5 个瘤区视野,计算瘤细胞总数,400 倍镜下计数阳性细胞(即凋亡细胞)。凋亡率=(凋亡细胞数/肿瘤细胞总数)×100%。

1.10 统计学处理 应用 SPSS 19.0 统计软件。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况比较 造模后第 2 天基本恢复到术前水平,能自行进食、饮水。造模后至第 18 天大鼠活动较活跃,精神良好,能正常进食、饮水,体重一直增加,无明显颅内高压症状。第 18~20 天大鼠突然出现颅内高压症状,表现为精神萎靡、反应迟钝、毛色晦暗、食欲不振、体重开始下降、身体虚弱、活动明显减少等症状,甚至出现偏瘫、全身抽搐,但无死亡。第 22 天空白对照组死亡 1 只;第 23~24 天空白对照组、单用冰片组各

死亡 1 只。

2.2 各组大鼠脑胶质瘤最大横截面积比较 冰片联合替莫唑胺组脑胶质瘤最大横截面积小于单用冰片组、单用替莫唑胺组、空白对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。单用替莫唑胺组脑胶质瘤最大横截面积小于单用冰片组、空白对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠脑胶质瘤最大横截面积比较($n=5$)

组别	肿瘤最大横截面积(mm^2)
单用冰片组	136.9267 \pm 4.5136
单用替莫唑胺组	112.3550 \pm 1.9081*
冰片联合替莫唑胺组	68.0750 \pm 2.5178 [△]
空白对照组	134.4567 \pm 3.3672
P 值	<0.05

注:与单用冰片组、空白对照组比较,* $P < 0.05$;与空白对照组、单用冰片组、单用替莫唑胺组比较,[△] $P < 0.05$

2.3 各组大鼠脑胶质瘤组织病理学观察结果 解剖大鼠可见右尾状核区有团块状肿瘤形成,呈圆形或椭圆形,向周围脑组织浸润性生长,瘤体较大时可见中线向对侧移位。HE 染色结果显示:空白对照组、单用冰片组呈典型的脑胶质瘤细胞特征,细胞核呈高密度聚集,表示细胞增殖活跃;冰片联合替莫唑胺组细胞核密度降低,表示细胞增殖受抑制;单用替莫唑胺组细胞核密度介于两者之间,见图 2(插页)。

2.4 各组大鼠脑胶质瘤细胞凋亡率比较 TUNEL 染色结果显示:空白对照组与单用冰片组相近,基本看不到凋亡细胞;单用替莫唑胺组可见少量凋亡细胞;冰片联合替莫唑胺组凋亡细胞明显增多,见图 3(插页)。冰片联合替莫唑胺组细胞凋亡率高于单用替莫唑胺组、单用冰片组、空白对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);单用替莫唑胺组细胞凋亡率高于单用冰片组、空白对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),见表 2。

表 2 各组大鼠脑胶质瘤细胞凋亡率比较($n=5$)

组别	细胞凋亡率(%)
单用冰片组	0.88 \pm 0.20
单用替莫唑胺组	7.93 \pm 0.81*
冰片联合替莫唑胺组	37.3 \pm 1.54 [△]
空白对照组	0.87 \pm 0.15
P 值	<0.05

注:与单用冰片组、空白对照组比较,* $P < 0.05$;与空白对照组、单用冰片组、单用替莫唑胺组比较,[△] $P < 0.05$

3 讨论

神经胶质瘤是最常见的原发性中枢神经系统肿瘤,

替莫唑胺是其主要化疗药物^[4],但血脑屏障的阻碍以及化疗的不良反均会降低化疗效果^[5]。目前主要采取手术切除+放化疗治疗,但患者术后中位生存期仅为 12~18 个月^[6]。因此,寻找一种治疗神经胶质瘤的更有效药物迫在眉睫。

血脑屏障是血浆与脑细胞之间的天然屏障,可阻碍外来物质经血液进入脑组织,起到保护大脑的作用。但同时也会限制药物的进入,使其在脑组织中难以达到有效浓度,不利于脑部疾病的治疗。因此,改变血脑屏障通透性是当前研究的热点。冰片味辛、苦,微寒,归心、脾、肺经,具有抗炎镇痛、促进药物吸收、芳香走窜、引药上行的功效。研究表明,冰片是一种小分子脂溶性单帖类物质,不仅自身能快速通过血脑屏障,还能增加血脑屏障通透性^[7]。Wu 等^[8]一项动物实验结果表明,冰片通过血脑屏障可能与细胞间黏附分子-1 表达增加有关。研究表明,C6 脑胶质瘤模型的移植瘤株繁殖力和生存力均较强,相对其他模型更易建立,与人脑胶质瘤的组织形态学、分子生物学及细胞生物学等特性相似,是目前研究脑肿瘤临床疗效的较好模型^[9]。C6 脑胶质瘤细胞接种到 Wistar 大鼠颅内后,肿瘤呈浸润生长且生长较快,与正常脑组织的界线较不明显,且有丰富的血管形成,与人脑胶质瘤的侵袭性生长相似;此外,Wistar 大鼠较 SD 大鼠更适合脑胶质瘤相关研究^[10]。

笔者所在团队既往建立 Wistar 大鼠的 C6 脑胶质瘤模型进行试验,结果发现冰片可通过提高血脑屏障通透性,从而增加对顺铂的摄入,使脑组织内顺铂浓度升高,进而提高对胶质细胞瘤的疗效^[11]。王南卜等^[12]通过体外培养 U251 细胞并联合冰片使用替莫唑胺,结果发现替莫唑胺抑制肿瘤细胞增殖的作用明显增强,同时促进了肿瘤细胞的凋亡。Han 等^[13]联合使用冰片与 ANG-PEG-PAMAM 聚合物,结果发现冰片能增强血脑屏障的通透性,提高 ANG-PEG-PAMAM 聚集体外抗神经胶质瘤的作用。亦有研究表明,冰片与 Pep-1 联合使用能靶向 IL-13 受体过度表达的胶质瘤,并穿透脑微血管内皮细胞相关的生理障碍,增强药物的穿透能力,与其他对照组比较,联合冰片组的药物在脑胶质瘤中具有更强的荧光信号和更长的保留时间^[14]。

本研究通过建立 Wistar 大鼠的 C6 脑胶质瘤模型,并联合应用冰片和替莫唑胺,结果发现冰片联合替莫唑胺组肿瘤最大横截面积明显小于其余各组,肿瘤细胞密度降低,增殖被明显抑制,肿瘤细胞凋亡率明显高于其余各组;而单用替莫唑胺组可见少量凋亡细胞。因此,笔

(下转第 1963 页)

- [17] Yao L, Shi Y, Zhao X, et al. Vitamin D attenuates hyperoxia-induced lung injury through downregulation of Toll-like receptor 4 [J]. *Int J Mol Med*, 2017,39 (6):1403–1408.DOI:10.3892/ijmm.2017.2961.
- [18] Zosky GR, Hart PH, Whitehouse AJ, et al. Vitamin D deficiency at 16 to 20 weeks' gestation is associated with impaired lung function and asthma at 6 years of age[J]. *Ann Am Thorac Soc*, 2014,11(4):571–577.DOI:10.1513/AnnalsATS.201312-423OC.
- [19] Papadopoulou A, Bountouvi E, Papaevaggelou V, et al. Maternal Vitamin D Status and Development of Asthma and Allergy in Early Childhood[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2015,15(11):900–912. DOI:10.2174/1389557515666150519105741.
- [20] Belderbos ME, Houben ML, Wilbrink B, et al. Cord blood vitamin D deficiency is associated with respiratory syncytial virus bronchiolitis[J]. *Pediatrics*, 2011,127(6):e1513–1520.DOI:10.1542/peds.2010–3054.
- [21] Mao X, Qiu J, Zhao L, et al. Vitamin D and IL-10 Deficiency in Preterm Neonates With Bronchopulmonary Dysplasia[J]. *Front Pediatr*, 2018,6:246.DOI:10.3389/fped.2018.00246.
- [22] Çetinkaya M, Çekmez F, Erener-Ercan T, et al. Maternal/neonatal vitamin D deficiency: a risk factor for bronchopulmonary dysplasia in preterms? [J]. *J Perinatol*, 2015,35 (10):813–817. DOI:10.1038/jp.2015.88.
- [23] Onwuneme C, Martin F, McCarthy R, et al. The Association of Vitamin D Status with Acute Respiratory Morbidity in Preterm Infants[J]. *J Pediatr*, 2015,166(5):1175–1180.DOI:10.1016/j.jpeds.2015.01.055.
- [24] Fort P, Salas AA, Nicola T, et al. A Comparison of 3-Vitamin D Dosing Regimens in Extremely Preterm Infants: A Randomized Controlled Trial[J]. *J Pediatr*, 2016,174:132–138.DOI:10.1016/j.jpeds.2016.03.028.
- [25] Bozkurt O, Uras N, Sari FN, et al. Multi-dose vitamin d supplementation in stable very preterm infants: Prospective randomized trial response to three different vitamin D supplementation doses[J]. *Early Hum Dev*, 2017,112:54–59.DOI:10.1016/j.earlhumdev.2017.07.016.

(收稿日期:2019-03-25)

(本文编辑:陈丹)

(上接第 1958 页)

者认为替莫唑胺不能高效地透过血脑屏障,而联合应用冰片对替莫唑胺抗大鼠胶质瘤具有促进作用。其作用机制可能与冰片开放血脑屏障、促进替莫唑胺通过、提高大鼠脑组织替莫唑胺浓度有关。但本研究局限于动物实验,具体给药方式和人体内药动学等问题尚需进一步研究。

4 参考文献

- [1] 朱迎君,赵培源,翟鹏云,等.扶正抑瘤方联合替莫唑胺抑制大鼠脑胶质瘤生长及调控血脑屏障相关蛋白的作用研究[J].*环球中医药*,2018,11(1):34–39. DOI:10.3969/j.issn.1674–1749.2018.01.008.
- [2] Zheng Q, Chen ZX, Xu MB, et al. Borneol, a messenger agent, improves central nervous system drug delivery through enhancing blood-brain barrier permeability: a preclinical systematic review and meta-analysis[J]. *Drug Deliv*,2018,25(1):1617–1633. DOI:10.1080/10717544.2018.1486471.
- [3] Liu YD, Rao L, Zhang HG, et al. Conjugation of vitamin E-TPGS and guar gum to carry borneol for enhancing blood-brain barrier permeability [J]. *J Biomater Appl*,2018,33(4):590–598. DOI:10.1177/0885328218799551.
- [4] Zhang X, Ni Q, Wang Y, et al. Synergistic Anticancer Effects of Formononetin and Temozolomide on Glioma C6 Cells[J]. *Biol Pharm Bull*,2018,41(8):1194–1202. DOI:10.1248/bpb.b18-00002.
- [5] Back M, Jayamanne D, Brazier D, et al. Tumour volume reduction following PET guided intensity modulated radiation therapy and temozolomide in IDH mutated anaplastic glioma[J]. *J Clin Neurosci*,2019,59:68–74. DOI:10.1016/j.jocn.2018.11.005.
- [6] Wen PY, Reardon DA. Neuro-oncology in 2015: Progress in glioma diagnosis, classification and treatment[J]. *Nat Rev Neurol*, 2016,12(2):69–70. DOI:10.1038/nrneurol.2015.242.
- [7] 吕旭潇,孙明江,孙凤志.冰片促进药物透过血脑屏障的研究进展[J].*中国中药杂志*,2012,37(7):878–881. DOI:10.4268/cjcmm.20120702.
- [8] Wu T, Zhang AQ, Lu HY, et al. The Role and Mechanism of Borneol to Open the Blood-Brain Barrier[J]. *Integr Cancer Ther*, 2018,17(3):806–812. DOI:10.1177/1534735418767553.
- [9] 张勇强,徐婷娟,金勤玉,等.C6 脑胶质瘤动物模型的研究进展[J].*广州化工*,2014,42(6):39–40.
- [10] 刘刚,孙国臣,李美容,等.建立大鼠 C6 胶质瘤模型及相关因素分析[J].*中国医学影像学杂志*,2014,22(5):329–330,335. DOI:10.3969/j.issn.1005–5185.2014.05.003.
- [11] 杜杭根,李宏宇,田勇.冰片联合顺铂对大鼠 C6 胶质细胞瘤的治疗作用[J].*浙江中医药大学学报*, 2010,34(1):35–36.
- [12] 王南卜,张芹欣,宁百乐,等.4 种开窍药促进替莫唑胺进入 U251 细胞及减低耐药性的对比研究[J].*中华中医药杂志*,2017,32(05):2206–2209.
- [13] Han S, Zheng H, Lu Y, et al. A novel synergetic targeting strategy for glioma therapy employing borneol combination with angiopep-2-modified, DOX-loaded PAMAM dendrimer [J]. *J Drug Target*,2018,26(1):86–94. DOI:10.1080/1061186X.2017.1344849.
- [14] Guo X, Wu G, Wang H, et al. Pep-1 & borneol-Bifunctionalized Carmustine-Loaded Micelles Enhance Anti-Glioma Efficacy Through Tumor-Targeting and BBB-Penetrating[J]. *J Pharm Sci*, 2019,108(5):1726–1735. DOI:10.1016/j.xphs.2018.11.046.

(收稿日期:2019-04-17)

(本文编辑:陈丹)