

氧自由基与脑胶质瘤周水肿关系的实验研究

赵心同 赵洪洋 姚东晓 王海均

(华中科技大学同济医学院附属协和医院神经外科 湖北 武汉 430022)

摘要 目的:探讨自由基和脑胶质瘤周水肿的关系。**方法:**体外培养大鼠 C6 脑胶质瘤细胞株,采用立体定向技术将细胞株接种在右侧尾状核,建立大鼠脑胶质瘤模型,共 60 只,术后 5 天将荷瘤大鼠随机分为 3 组(EDA 高剂量组,EDA 低剂量组和对照组),每组各 20 只,每组 10 只用来测定荷瘤大鼠瘤周脑组织含水量、SOD 活性及 MDA 含量,剩余 10 只用来观察荷瘤大鼠生存时间。**结果:**EDA 干预组荷瘤大鼠瘤周脑组织含水量下降,SOD 活性增高,MDA 含量下降,以 EDA 高剂量组更为显著。各组荷瘤大鼠瘤周脑组织含水量与 SOD 活性呈负相关,而与 MDA 含量呈正相关。且 EDA 组荷瘤大鼠生存时间延长。**结论:**由基参与大鼠脑胶质瘤周水肿的形成,自由基清除剂能够减轻大鼠脑胶质瘤周脑组织水肿。

关键词:脑胶质瘤;瘤周水肿;依达拉奉

中图分类号:R739.41 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)03-428-04

Relationship Between Oxygen Free Radical and Peritumor Edema in Glioma

ZHAO Xin-tong, ZHAO Hong-yang, YAO Dong-xiao, WANG Hai-jun

(Department of neurosurgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022 China)

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship between oxygen free radical and peritumor edema in glioma. **Methods:** The rat C6 glioma cells were cultivated in vitro. The suspension of C6 glioma cells was stereotactically injected into right caudate to establish rat C6 glioma model. After surgery, all rat glioma models were randomly classified into 3 groups (edaravone-treated group in high dose, edaravone-treated group in low dose and control group). Each group had twenty rats. Ten rats from each group were used to determine the moisture content in peritumor brain tissues, SOD activity and the content of MDA. The other 10 rats were used to detect the survival time after surgery. **Results:** The decreased moisture and MDA contents in peritumor brain tissues and increased SOD activity were found in edaravone-treated group, especially in high dose. The survival time was longer in edaravone-treated group than that of control group. **Conclusion:** Oxygen free radical is involved in the formation of peritumor edema in glioma, and the free radical scavenger may reduce the peritumor edema in glioma.

Key words: Glioma; Peritumor edema; Edaravone

Chinese Library Classification (CLC): R739.41 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)03-428-04

前言

脑胶质瘤是颅内最常见的恶性肿瘤,约占所有颅内肿瘤的 40%以上^[1]。5 年术后平均生存率不足 50%^[2],脑胶质瘤常常伴有瘤周水肿,瘤周水肿的产生对患者临床症状的产生、治疗和预后有很大的影响。EDA 是一种新型的氧自由基清除剂,在脑梗塞治疗中的作用已多有报道^[3,4],也有报道 EDA 在控制脑出血后血肿周围脑组织水肿有效^[5,6],然而其在瘤周水肿中的治疗作用尚未见报道。本文通过建立大鼠脑胶质瘤模型,并用自由基清除剂 EDA 进行干预,观察其对瘤周水肿及生存时间的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

EDA 由江苏先声药业提供(商品名:必存,生产批号:80-100205);小牛血清、0.25%胰酶和高糖 DMEM 培养基均购自 Gibco 公司;SOD 和 MDA 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;8 周龄的清洁级雄性 SD 大鼠 60 只,体重 180-250 克,购于华中科技大学同济医学院实验动物中心[实验动物许可证号:SCXK(鄂)2004-0007],立体定向仪由深圳瑞沃德公司提供,紫外/可见分光光度计型号为 UV751-GD

1.2 细胞培养

大鼠 C6 脑胶质瘤细胞株来自本实验室,C6 胶质瘤细胞复苏后接种于含 10%小牛血清的高糖 DMEM 培养基中,置于 37℃、5% CO₂ 的恒温恒湿培养箱中常规培养。

1.3 C6 脑胶质瘤动物模型的建立

在细胞处于对数生长期约 80%满时,以 0.25%的胰酶消化、离心、弃上清,以 Hanks 液将其调整成浓度为 1×10^6 /ml 的单细胞悬液(台盼蓝排斥实验检测细胞活力 >90%)备用。

大鼠以 10%的水合氯醛按 3.3 ml/kg 体重腹腔内注射麻醉

作者简介:赵心同(1980-),男,博士研究生,电话:15972127760

E-mail:zhaoxintong3@163.com,研究方向:脑胶质瘤的治疗

△通信作者:赵洪洋, E-mail:hyzhao750@sina.com

(收稿日期:2010-11-08 接受日期:2010-11-30)

后,立体定向仪固定,头部备皮,75 %酒精消毒,顶部中线切开头皮约 1 cm,暴露前囟,于冠状缝前 1 mm,旁开矢状缝 3 mm (为右侧尾状核位置),钻一直径 1 mm 的骨孔,微量注射器抽取 15 μ l 细胞悬液垂直进针,进针深度为硬膜下 6 mm,然后退针 1 mm,以 1 μ l/min 的速度缓慢注入,注射完毕后留针 5 min,使细胞充分沉积,缓慢退针,并用骨蜡封闭骨孔。缝合头部切口,术后大鼠单笼饲养。

1.4 动物分组及干预

大鼠脑胶质瘤模型建立 5 天后随机分为 3 组 (EDA 高剂量组、EDA 低剂量组、对照组),每组 20 只。EDA 高剂量组:EDA 用量为每次 3 mg/kg 体重,腹腔内注射,每天 2 次,持续 2 周;EDA 低剂量组:EDA 每次 1 mg/kg 体重,腹腔内注射,每天 2 次,持续 2 周;对照组:用等体积生理盐水腹腔内注射,每天 2 次,持续 2 周。每组有 10 只用来测定脑胶质瘤周脑组织的含水量、SOD 活性及 MDA 含量,其余用来观察记录荷瘤大鼠的生存时间。

1.5 瘤周脑组织含水量测定

瘤周脑组织含水量测定采用干湿重法,荷瘤大鼠快速断头取脑,取瘤周脑组织约 0.1g 称取湿重,置于烤箱中烘烤,至恒重后称取干重。瘤周脑组织含水量计算公式为:(湿重-干重)/湿重 $\times$ 100 %。

1.6 瘤周脑组织 SOD 活性及 MDA 含量测定

取瘤周脑组织约 0.2 g,加入 9 倍体积的冰生理盐水研磨,

制成 10 %的脑组织匀浆,4℃ 条件下 3500 r/min 离心 15 分钟后取上清,置于 -80 ℃ 冰箱备用。SOD 活性测定采用黄嘌呤氧化酶法测定,MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸法测定,组织蛋白含量测定采用 BCA 法,步骤按照试剂盒说明操作。

1.7 生存时间观察

记录每只大鼠从接种 C6 脑胶质瘤细胞至自然死亡的全部存活时间。

1.8 统计分析

所有数据采用 SPSS 13.0 软件包进行分析,计数资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组荷瘤大鼠瘤周脑组织含水量的比较、SOD 活性及 MDA 含量的比较采用单因素方差分析,各处理组间的两两比较采用 SNK 法,瘤周脑组织含水量与 SOD 活性和 MDA 含量的关系采用直线相关分析。生存曲线的绘制采用 Kaplan-Meier 法,生存曲线的比较采用 log-rank 检验,P<0.05 认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 三组荷瘤大鼠瘤周脑组织含水量

干湿重法测定荷瘤大鼠瘤周脑组织的含水量见表 1。单因素方差分析显示三组荷瘤大鼠瘤周脑组织含水量存在显著性差异(P<0.01)。SNK 法进行各处理组间两两比较显示,EDA 低剂量组较对照组含水量低(P<0.05),EDA 高剂量组瘤周脑组织含水量较 EDA 低剂量组低(P<0.01)。

表 1 各组组荷瘤大鼠瘤周脑组织含水量比较($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of moisture content in peritumor brain tissues

分组(groups)	含水量 (moisture content)
对照组(control)	80.37 $\pm$ 1.29
EDA 低剂量组(EDA-trteated group in low dose)	79.21 $\pm$ 1.19
EDA 高剂量组(EDA-trteated group in high dose)	77.74 $\pm$ 1.02

2.2 三组荷瘤大鼠瘤周脑组织 SOD 活性及 MDA 含量

荷瘤大鼠瘤周脑组织 SOD 活性及 MDA 含量检测结果见表 2。单因素方差分析显示,三组 SOD 活性及 MDA 含量存在显著差异 (P<0.01),SNK 法进行各处理组间两两比较显示,E-

DA 低剂量组较对照组 SOD 活性升高,MDA 含量降低(P<0.01),而较 EDA 高剂量组 SOD 活性降低,而 MDA 含量升高 (P<0.05)。

表 2 各组组荷瘤大鼠瘤周脑组织 SOD 活性及 MDA 含量比较($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of MDA content and SOD activity in peritumor brain tissues ($\bar{x} \pm s$)

分组(groups)	SOD 活性(SOD activity)	MDA 含量(MDA content)
对照组(control)	56.22 $\pm$ 8.92	2.93 $\pm$ 0.44
EDA 低剂量组(EDA-trteated group in low dose)	67.75 $\pm$ 7.50	1.95 $\pm$ 0.34
EDA 高剂量组(EDA-trteated group in high dose)	78.15 $\pm$ 10.89	1.46 $\pm$ 0.35

2.3 瘤周脑组织含水量与 SOD 活性、MDA 含量的相关分析

相关性分析显示:对照组荷瘤大鼠瘤周脑组织含水量与 SOD 活性呈负相关($r=-0.792$,P<0.01),与 MDA 含量成正相关($r=0.730$,P<0.05);EDA 低剂量组荷瘤大鼠瘤周脑组织含水量与 SOD 活性呈负相关($r=-0.730$,P<0.05),与 MDA 含量成正相关($r=0.794$,P<0.01);EDA 高剂量组荷瘤大鼠瘤周脑组织含水

量与 SOD 活性呈负相关($r=-0.736$,P<0.05),与 MDA 含量成正相关($r=0.660$,P<0.05)。

2.4 三组荷瘤大鼠生存时间比较

荷瘤大鼠的生存曲线如图 4 所示,各组生存时间存在显著差异(P<0.01)。依达拉奉低剂量组较对照组生存期延长(P<0.05),但较依达拉奉高剂量组低(P<0.05)。

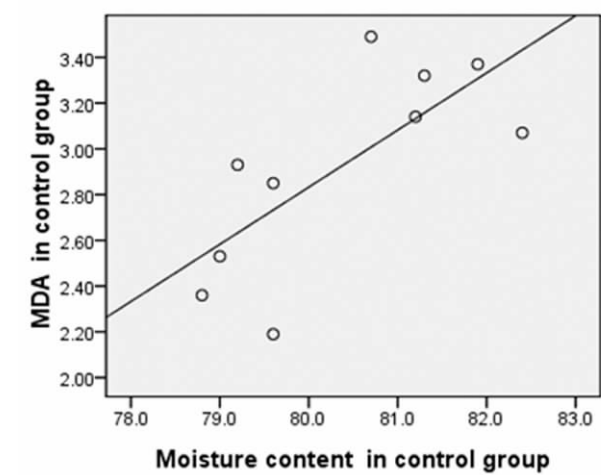


图 1 对照组荷瘤大鼠瘤周组织含水量与 MDA 含量关系的散点图
Figure 1 The scatter diagram shows the relationship between moisture content and MDA in control group

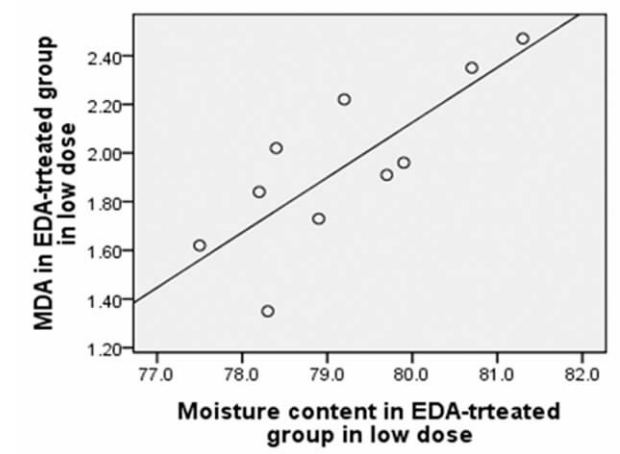


图 2 EDA 低剂量组荷瘤大鼠瘤周组织含水量与 MDA 含量关系的散点图
Figure 2 The scatter diagram shows the relationship between moisture content and MDA in EDA-trtreated group in low dose

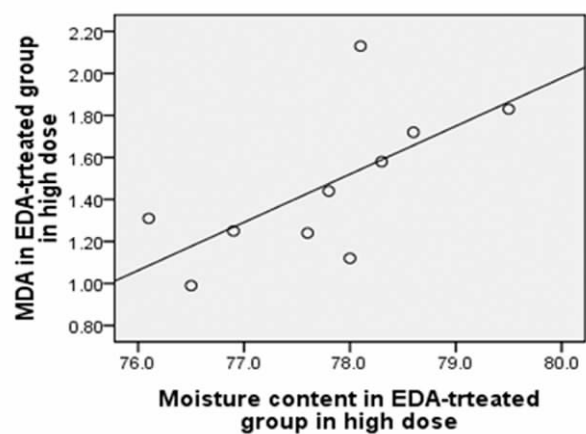


图 3 EDA 高剂量组荷瘤大鼠瘤周组织含水量与 MDA 含量关系的散点图
Figure 3 The scatter diagram shows the relationship between moisture content and MDA in EDA-trtreated group in high dose

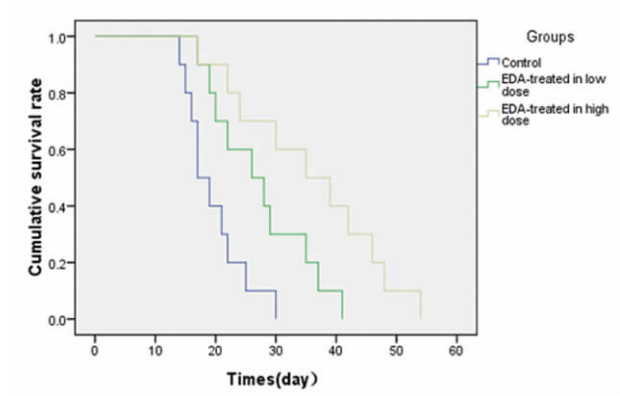


图 4 三组荷瘤大鼠生存曲线比较
Figure 4 Comparison of survival curve in three groups

3 讨论

脑胶质瘤是颅内最常见的恶性肿瘤，手术切除是第一选择。手术切除会导致相应部位神经功能缺失，而且手术后常常会复发，难以达到根治，患者生存率较短，一般在一年以内，且恶性程度越高患者生存期越短^[7]，因此综合治疗显得尤为重要。动物实验表明化疗可以延长荷瘤大鼠的生存时间^[8]，也有临床数据表明化疗能够提高患者术后生存率^[9]。放疗的应用也可以起到类似的效果。肿瘤和瘤周水肿是影响患者临床症状的产生、治疗和预后的主要因素。瘤周水肿常常随着肿瘤恶性程度的提高而加重^[10]，化疗在控制肿瘤生长及延长复发时间有一定作用，但在控制瘤周水肿方面无明显优势，放疗的应用常常会导致水肿加重。瘤周水肿的产生是脑胶质瘤的一个重要病理生理过程，是多种因素共同作用的结果，氧自由基与脑水肿的关系逐渐受到人们的关注，有报道自由基可以使脑水肿加重^[11]。

氧自由基性质极为活泼，氧化作用强，能够攻击生物膜中的不饱和脂肪酸，有强烈的脂质过氧化作用。而这种脂质过氧

化作用可通过链式或链式支链反应放大活性氧的作用。MDA 是脂质过氧化作用的一种产物，MDA 的含量间接反应机体细胞受脂质过氧化作用的严重程度。SOD 是机体防御氧化损害的重要的酶，SOD 的活性反应机体清除氧自由基的能力，两者常常配合来反应机体氧化和抗氧化平衡。EDA(3- 甲基 -1- 苯基 -2- 吡唑啉 -5- 酮)是一种新型自由基清除剂，是相对分子量为 174.20 的亲脂性基团，血脑屏障的通透率为 60 %^[12]，可以清除脑组织中具有高度细胞毒性的羟自由基，抑制脂质过氧化，从而抑制脑细胞、血管内皮细胞的氧化损伤，降低血脑屏障的通透性，从而抑制水肿。其在脑梗塞治疗方面的疗效已多有报道^[3,4]。也有动物实验及临床研究表明自由基清除剂 EDA 在控制脑出血后血肿周围水肿有效^[5,6]，但对瘤周水肿的治疗作用却鲜有报道。

本研究显示 EDA 组荷瘤大鼠肿瘤周围脑组织含水量及 MDA 含量较对照组低，而 SOD 活性较对照组高。相关性分析显示瘤周脑组织含水量与 MDA 含量呈正相关，而与 SOD 活性呈负相关。而且 EDA 组荷瘤大鼠的存活时间延长。以上结果表明脑胶质瘤瘤周水肿的形成可能与自由基有关，EDA 作为一种自由基清除剂，在胶质瘤瘤周水肿的病理损害中具有保护作用。

致谢:本课题得到了南京先声药业有限公司的支持。

参考文献(References)

- [1] 王忠诚. 神经外科学 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998: 512-518
Wang Zhong-cheng. Neurosurgery [M]. Wuhan: Hubei Science And Technology Press, 1998: 512-518
- [2] 毛捷, 黄军, 黄纯海, 等. 胶质瘤术后预后因素的分析 [J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(5): 902-904
Mao Jie, Huang Jun, Huang Chun-hai, et al. Analysis of prognostic factors for postoperative patients with glioma [J]. Progress in modern biomedicine, 2008, 8(5): 902-904
- [3] Suda S, Igarashi H, Arai Y, et al. Effect of edaravone, a free radical scavenger, on ischemic cerebral edema assessed by magnetic resonance imaging [J]. Neurol Med Chir (Tokyo), 2007, 47(5): 197-201
- [4] 顾晔, 戚辰, 刘振国, 等. 依达拉奉对脑梗死患者血清基质金属蛋白酶-9 及基质金属蛋白酶抑制剂-1 的影响 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2008, 25(6): 733-735
Gu Ye, Qi Chen, Liu Zhen-guo, et al. Influence of edaravone on the serum levels of MMP-9 and RIMP-1 in patients with acute cerebral infarction [J]. Journal of Apoplexy and Nervous Diseases, 2008, 25(6): 733-735
- [5] Nakamura T, Kuroda Y, Yamashita S, Zhang X, et al. Edaravone attenuates brain edema and neurologic deficits in a rat model of acute intracerebral hemorrhage [J]. Stroke, 2008, 39(2): 463-469
- [6] 尹泽黎, 许宏伟, 袁宁. 依达拉奉治疗急性脑出血后脑水肿变化及清除自由基的临床观察 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2008, 25(3): 313-315
Yin Ze-li, Xu Hong-wei, Yuan Ning. Clinical evaluation of edaravone in removal of free radicals and treatment for brain edema after intracerebral hem-orrhage [J]. Journal of Apoplexy and Nervous Diseases, 2008, 25(3): 313-315
- [7] 陈明振, 牟永告, 陈硕朗, 等. 胶质瘤患者长期生存的相关因素 [J]. 广东医学, 2000, 21(10): 812-813
Chen Ming-zhen, Mou Yong-gao, Chen Shuo-lang, et al. Factors related to long-term survival in glioma patients [J]. Guangdong Medical Journal, 2000, 21 (10): 812-813
- [8] 吴春明, 谢开友, 刘荣耀, 等. 噻啉亚硝胍小量多次给药治疗脑胶质细胞瘤实验研究 [J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2005, 4(4): 313-315
Wu Chun-ming, Xie Kai-you, Liu Rong-yao, et al. Experimental study of frequent low-dose treatment with nimustine [J]. Chinese Journal of Neurosurgical Disease Research, 2005, 4(4): 313-315
- [9] 邹燕梅, 熊华, 于世英. 恶性胶质瘤术后治疗疗效及预后因素分析 [J]. 实用癌症杂志, 2009, 24(2): 184-187
Zou Hai-yan, Xiong Hua, Yu Shi-ying. Clinical effect of postoperative radiotherapy and prognostic factors in 59 patients with malignant glioma [J]. Practical Journal of Cancer, 2009, 24(2): 184-187
- [10] 张煜, 崔尧元, 江瀛川. 血管内皮生长因子与星形细胞瘤病理分级和瘤周水肿的相关研究 [J]. 中国神经精神疾病杂志, 2002, 28(2): 115-117
Zhang Yu, Cui Yao-yuan, Jiang Ying-chuan. Expression of vascular endothelia growth factor in astrocytoma and its relation to peritumoral brain edema [J]. Chinese Journal of Nervous and Mental Diseases, 2002, 28(2): 115-117
- [11] Chan PH, Schmidley JW, Fishman RA, et al. Brain injury, edema, and vascular permeability changes induced by oxygen-derived free radicals [J]. Neurology, 1984, 34(3): 315-320
- [12] Takamatsu Y, Yuki S, Watnabe T. Studies on the concentration of 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one (MCI-186) in MCA occlusion and reperfusion model of rats [J]. Jpn Pharmacol Ther, 1997, 25: S1785