

[文章编号] 1671-587X(2009)05-0798-03

氯化三乙基锡对体内大鼠 C6 胶质瘤增殖抑制作用及病理学改变

张 适¹, 张 悦², 毕晓颖³, 李志超³

(1 北华大学基础医学院病理学教研室, 吉林 吉林 132013; 2 厦门大学附属厦门眼科中心, 福建 厦门 361001;
3 吉林大学公共卫生学院毒理学教研室, 吉林 长春 130021)

[摘要] 目的: 探讨氯化三乙基锡 (TETC) 对体内大鼠 C6 胶质瘤的增殖抑制作用及病理学改变。方法: 16 只 Wistar 大鼠皮下同种移植 C6 胶质瘤细胞后, 随机分为实验组和对照组, 实验组按 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 给予腹腔注射 TETC, 连续给药 4 d; 对照组腹腔注射等量生理盐水。处理 14 d 后测量胶质瘤重量, 计算增殖率。HE 染色及电镜观察 TETC 作用下大鼠体内 C6 胶质瘤病理学变化。结果: 与对照组比较, TETC 实验组大鼠皮下 C6 胶质瘤重量减轻 ($P < 0.01$), 增殖率下降 ($P < 0.01$)。HE 染色及电镜观察到实验组胶质瘤细胞排列松散、细胞数目减少, 可见到核染色质边集的早期凋亡改变。结论: TETC 可抑制体内同种移植大鼠皮下 C6 胶质瘤增殖, 细胞凋亡可能参与其中。

[关键词] 氯化三乙基锡; 胶质瘤; 细胞增殖; 细胞凋亡

[中图分类号] R739.4; R-332 [文献标识码] A

Inhibitory effects of triethyltin chloride on proliferation of rat C6 glioma cells *in vivo* and morphological changes

ZHANG Shi¹, ZHANG Yue², BI Xiaoying³, LI Zhichao³

(1. Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Beihua University, Jilin 132013, China;
2 Xiamen Eye Center, Xiamen University, Xiamen 361001, China;
3 Department of Toxicology, School of Public Health, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract Objective To study the inhibitory effects of triethyltin chloride (TETC) on proliferation and the morphological changes of rat C6 glioma cells *in vivo*. **Methods** C6 glioma cells were autotransplanted into 16 Wistar rats, and the rats were divided into experiment group and control group. TETC was injected into each rat through intraperitoneal route at the dose of $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ and the injection lasted 4 d in experiment group, and the physiological saline was injected into each rat in the same way as experiment group in control group. The weights of C6 glioma were measured and the proliferation rate of the tumor was calculated after 14 d. The morphological changes of C6 glioma cells were observed by HE staining and electron microscope. **Results** The weight of C6 glioma in TETC group was lighter than that in control group ($P < 0.01$), and the proliferation rate was decreased compared with control group ($P < 0.01$). The cell number and cell density in TETC group were lower than those in control group observed by HE staining and the chromatin margination could be observed in TETC group. **Conclusion** TETC can inhibit the proliferation of rat C6 glioma cells *in vivo* and the mechanism of which may be involved in apoptosis.

Key words: triethyltin chloride; glioma; cell proliferation; apoptosis

[收稿日期] 2009-01-17

[基金项目] 国家自然科学基金资助课题 (30070645)

[作者简介] 张 适 (1970-), 男, 吉林省吉林市人, 医学博士, 副教授, 主要从事重金属生物学效应及肿瘤病理学研究。

[通讯作者] 李志超 (Tel: 0431-85619458; E-mail: lizhichao@jlu.edu.cn)

目前脑胶质瘤的治疗方法主要包括手术治疗、放疗和化疗。恶性胶质瘤弥漫性、浸润性生长, 手术难以完全切除, 切除后易复发, 为预防术后复发, 化疗是一种重要手段, 但其对传统化疗药物的敏感性较低, 化疗疗效不理想。化疗耐药是化疗药物疗效偏低的主要原因, 也是胶质瘤综合治疗失败的一个重要原因^[1,2], 因此找到敏感有效的化疗药物是当务之急。氯化三乙基锡 (triethyltin chloride, TETC) 是中枢神经系统毒物, 具有脂溶性且易透过血脑屏障, 可能是抗胶质瘤敏感药物。目前国内外未见 TETC 抗脑胶质瘤的相关报道。本实验旨在通过研究 TETC 抗体内同种移植大鼠 C6 胶质瘤细胞增殖抑制作用, 为抗脑胶质瘤治疗及深入理论研究提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 试剂 TETC (美国 Alfar Aesar 公司), IMDM 细胞培养基 (Gibco 公司), 胎牛血清 (中国医学科学院生物工程研究所)。

1.2 细胞培养 C6 胶质瘤细胞株, 购自上海细胞所, 为贴壁细胞。C6 胶质瘤细胞在含有 10% 胎牛血清的 IMDM 培养基中, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养。用 0.25% 胰酶 (PBS 配制) 消化传代, 传代浓度为 $5 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$, 传至 3 代后细胞用于实验。

1.3 TETC 抗同种移植大鼠皮下 C6 胶质瘤增殖作用 选用雄性健康 Wistar 大鼠 16 只, 体重 180~200 g, 全部购于吉林大学白求恩实验动物部, 常规饲料喂养, 饮用自来水, 环境温度 20~25℃。收集对数生长期生长状态良好的 C6 胶质瘤细胞, 调整细胞浓度为 $1.0 \times 10^{10} \cdot \text{L}^{-1}$, 按每只鼠 5×10^6 个细胞的细胞数接种于右后肢皮下。肿瘤细胞种植后, 大鼠随机分为两组, 每组 8 只。实验组 (每只鼠腹腔注射 TETC $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 连续 4 d); 对照组 (腹腔注射生理盐水 5 mL)。16 只 Wistar 大鼠全部于肿瘤接种后当天给予腹腔注射。全部大鼠在 C6 胶质瘤细胞接种 14 d 后, 切除瘤体观察大小并称重, 按公式计算肿瘤增殖率。对照组肿瘤增殖率设定为 100%。肿瘤增殖率 = (实验组肿瘤重量 / 对照组肿瘤重量) × 100%。

1.4 HE 染色观察 TETC 作用下体内 C6 胶质瘤病理学变化 切除 C6 胶质瘤体置于 4% 多聚甲醛固定, 常规脱水透明石蜡包埋制备标本。标本切片 HE 染色, 100 倍光学显微镜镜下观察。

1.5 透射电镜观察 TETC 作用下体内 C6 胶质瘤细胞超微结构 切取约 1 mm^3 大小对照组与 TETC 实验组 C6 胶质瘤组织, 常规透射电镜标本的固定脱水包埋, LKB-8000 型超薄切片机半薄切片定位后做超薄切片, 切片厚度为 70 nm, 醋酸双氧铀及柠檬酸铅双重染色, JEM-1200EX 型透射电镜观察、摄片。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件包进行数据统计学分析, 胶质瘤重量及增殖率以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间样本均数比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 荷瘤鼠给药后的一般情况及肿瘤重量和增殖率的测定 TETC 腹腔注射后可见大鼠活动正常, 未见活动迟缓及四肢肌力降低, 其活动表现同生理盐水对照组。对照组于注射 4 d 后皮下可触及呈米粒大小肿块, 肿块表面光滑边界清楚, 质地较硬, 皮肤表面无红肿、破溃及皮毛脱落现象。TETC 实验组于 C6 细胞接种后 7 d, 部分大鼠皮下可触及米粒大小肿物。接种后 14 d 所有大鼠皮下可触及肿物, 肿物表皮无红肿、破溃及皮毛脱落现象。所有实验动物于接种肿瘤细胞后 14 d 麻醉下切除瘤体, 观察瘤体大小, 可见 TETC 实验组 C6 胶质瘤体积小于对照组 (图 1A 和 B)。对照组大鼠皮下 C6 胶质瘤重量为 $(1.42 \pm 0.12) \text{ g}$, 实验组肿瘤重量为 $(0.48 \pm 0.07) \text{ g}$, 实验组肿瘤重量明显低于对照组 ($P < 0.01$)。实验组肿瘤增殖率为 $(33.8 \pm 4.03)\%$, 与对照组相比肿瘤增殖率显著降低 ($P < 0.01$)。

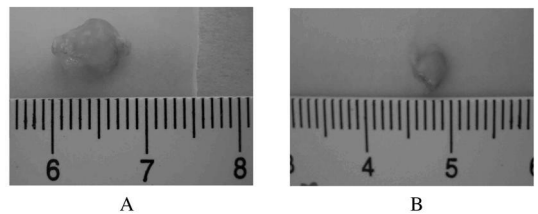


图 1 TETC 作用下大鼠体内 C6 胶质瘤增殖抑制

Fig 1 The inhibitory effect of TETC on proliferation of rat C6 glioma *in vivo*

A: Control group; B: TETC treated group

2.2 HE 染色观察 TETC 作用下体内 C6 胶质瘤病理学变化 对照组 C6 胶质瘤细胞排列密集, 细胞数目多而坏死少见 (图 2A, 见封二)。治疗组

C6 胶质瘤细胞排列松散, 细胞数目减少(图 2B, 见封二)。

2.3 透射电镜观察 TETC 作用下大鼠体内 C6 胶质瘤细胞超微结构 对照组 C6 胶质瘤细胞核大, 核形不规则, 可见核切迹, 染色质均匀分布于核内(图 3A)。TETC 治疗组 C6 胶质瘤细胞核染色质边集呈早期凋亡改变(图 3B)。

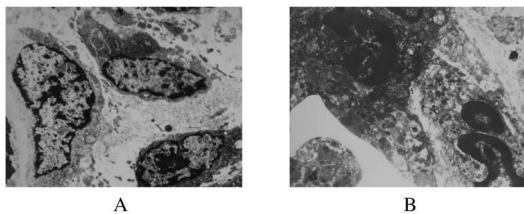


图3 透射电镜观察对照组(A)与 TETC 实验组(B) C6 胶质瘤超微结构改变

Fig. 3 Ultrastructure changes of rat C6 glioma in control group (A) and TETC group (B) by electron microscope

A: Control group($\times 4\ 000$); B: TETC group($\times 5\ 000$)

3 讨论

脑胶质瘤是严重威胁人类健康和生命的中枢神经系统恶性肿瘤, 目前首选手术治疗, 然而脑胶质瘤的重要特性之一是呈弥漫性、侵袭性向周围脑组织浸润生长, 故手术难以完全切除, 多于瘤床 2 cm 范围内复发, 治疗效果较差^[3]。化疗是脑胶质瘤治疗的另一重要手段, 由于机体存在诸如血脑屏障、脑肿瘤屏障和药物代谢改变等外在的耐受机制, 使之成为脑胶质瘤对化疗药物产生耐药性的原因之一。通过改变化疗药物的一些物理特性, 如脂溶性、弱的蛋白结合等来促进其通过血脑屏障和血肿瘤屏障, 以减少耐药性^[4]。我国学者应用以三氧化二砷为主要成分的“癌灵 1 号”治疗急性早幼粒细胞性白血病取得了显著的临床效果^[5], 这提示本文作者尝试应用有毒重金属进行抗肿瘤治疗研究。TETC 是中枢神经系统重金属毒物, 具有脂溶性, 可通过血脑屏障, 在脑内无代谢改变^[6], 有研究表明, C6 胶质瘤细胞对 TETC 的敏感性高于人神经元和星型细胞、大鼠星型胶质细胞和小脑颗粒细胞^[7-9]。因此, TETC 可能成为潜在的抗胶质瘤药物。

本研究体内实验结果表明, 大鼠皮下移植 C6 胶质瘤细胞, 在皮下可形成 C6 胶质瘤瘤体, 腹腔注射 TETC 没有引起大鼠行为异常等中毒表现。

TETC 可以降低同种移植 C6 胶质瘤增殖率, 显示出 TETC 具有抑制同种移植大鼠皮下 C6 胶质瘤细胞增殖作用。HE 染色显示对照组 C6 胶质瘤细胞排列密集, 细胞数目多而坏死少见。TETC 实验组 C6 胶质瘤细胞排列松散和细胞数目较对照组减少, 此种表现同检测 TETC 抑制 C6 胶质瘤增殖率结果相一致。通过透射电镜观察到对照组 C6 胶质瘤细胞核大, 核形不规则, 可见核切迹, 染色质均匀分布于核内。TETC 治疗组 C6 胶质瘤细胞核染色质边集, 呈早期凋亡改变。因此本文作者认为, TETC 可抑制同种移植大鼠皮下 C6 胶质瘤增殖, 细胞凋亡可能参与其中, 具体机制还有待于进一步实验研究。

[参考文献]

- [1] Bandres E, Andion E, Escalada A, et al. Gene expression profile induced by BCNU in human glioma cell lines with differential MGMT expression [J]. *J Neurooncol*, 2005, 73 (3): 189-198.
- [2] Aoki T, Takahashi JA, Ueba T, et al. Phase III study of nimustine, carboplatin, vincristine, and interferon- β with radiotherapy for glioblastoma multiforme: experience of the Kyoto Neuro-Oncology Group [J]. *J Neurosurg*, 2006, 105 (3): 385-391.
- [3] 李飞, 李梅, 卢佳友, 等. 甲基- β -环糊精干扰脂质微区影响脑胶质瘤细胞系 C6 侵袭和迁移的体外研究 [J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2008, 8 (5): 471-475.
- [4] 王明. 恶性脑胶质瘤个体化治疗的研究进展 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2008, 35 (6): 548-552.
- [5] 夏之柏, 吴新建, 齐铁伟, 等. 三氧化二砷治疗大鼠 C6 脑胶质瘤的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2008, 33 (17): 2150-2153.
- [6] Watanabe K, Yanase K, Ohhira S. Comparative study of five trialkyltin compounds: their metabolites in rat organs 24 hours after single oral treatment [J]. *Nippon Eiseigaku Zasshi*, 2007, 62 (1): 58-63.
- [7] Cookson MR, Mead C, Austwick SM, et al. Use of the MTT assay for estimating toxicity in primary astrocyte and C6 glioma cell cultures [J]. *Toxicol In Vitro*, 1995, 9 (1): 39-48.
- [8] Rosa M, Cristofol SG, David V, et al. Neurotoxic effects of trimethyltin and triethyltin on human fetal neuron and astrocyte cultures: A comparative study with rat neuronal cultures and human cell lines [J]. *Toxicol Letter*, 2004, 152 (1): 35-46.
- [9] Seibert H, Morchel S, Gulden M. Cytotoxic potency of trialkyltins to C6 glioma cells in vitro: impact of exposure conditions [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2004, 20 (5): 273-283.

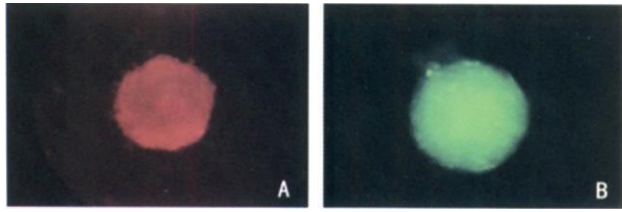


图1 免疫荧光染色观察 BTSCs 中 CD133 和 MDR1 的表达 (× 100)

Fig. 1 The expressions of CD133 and MDR1 in BTSCs observed with immunofluorescence staining (× 100)

A: CY-conjugated second antibody; B: FITC-conjugated second antibody

(seen on page 771 in paragraph)

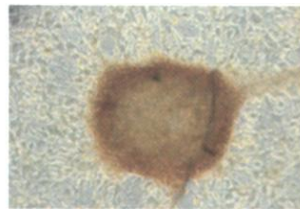


图2 MDR1 染色阳性的肿瘤干细胞球(免疫组织化学 ABC 法, × 100)

Fig 2 MDR1-positive BTSCs sphere (Immunohistochemistry ABC, × 100)

(seen on page 771 in paragraph)



图3 Dispase 消化后的肿瘤干单细胞 (倒置显微镜, × 200)

Fig 3 The single BTSC digested by Dispase (Inverted microscope, × 200)

(seen on page 771 in paragraph)

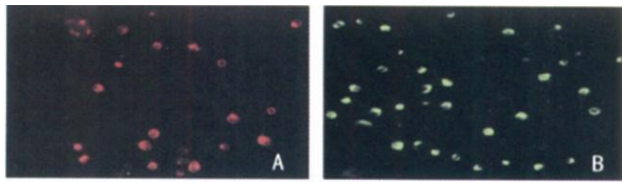


图4 免疫荧光染色观察肿瘤干单细胞 CD133 和 MDR1 的表达 (× 200)

Fig. 4 The expressions of CD133 and MDR1 in single brain tumor stem sphere observed with immunofluorescence staining (× 200)

A: CY-conjugated second antibody; B: FITC-conjugated second antibody

(seen on page 771 in paragraph)

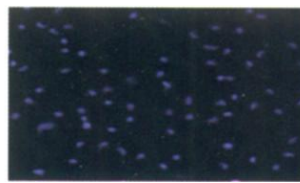


图5 荧光显微镜观察肿瘤干单细胞 DAPI 染色细胞核 (× 200)

Fig 5 The nuclear stained by DAPI in single cells observed with immunofluorescence staining (× 200)

(seen on page 771 in paragraph)

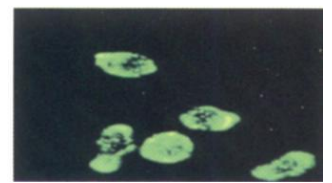


图5 pEGFP-PTEN 荧光显色结果

Fig 5 The fluorescent staining result of pEGFP-PTEN

(seen on page 819 in paragraph)

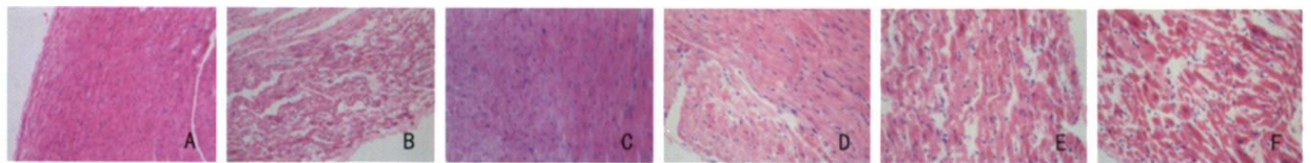


图1 GSTT 作用下缺血再灌注大鼠心肌组织病理学变化(× 200)

Fig 1 Pathological changes of myocardium tissue in I/R rats treated with GSTT (× 200)

A: Sham group; B: Model group; C: GSTT (30 mg • kg⁻¹) group; D: GSTT (15 mg • kg⁻¹) group; E: GSTT (7.5 mg • kg⁻¹) group; F: Xue-Sai Tong (20 mg • kg⁻¹) group

(seen on page 796 in paragraph)

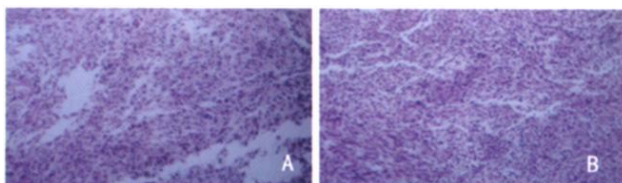


图2 HE 染色观察对照组(A) 与 TETC 实验组(B) C6 胶质瘤形态学改变(× 100)

Fig. 2 Morphological changes of rat C6 glioma in control (A) and TETC group(B) by HE staining (× 100)

(seen on page 799 in paragraph)



图1 化学去细胞肌肉支架的组织学结构(HE, × 200)

Fig 1 The histological structure of CEAM (HE , × 200)

(seen on page 803 in paragraph)

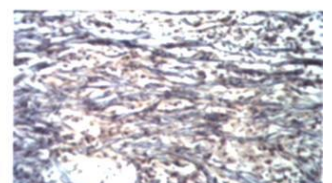


图2 术后4周 CEAM 中的再生神经轴突(Holmes 银染, × 400)

Fig 2 The regenerating axons in CEAM 4 weeks after operation (Holmes silver staining, × 400)

(seen on page 803 in paragraph)