

变型星形细胞瘤与胶质母细胞瘤相比自然病程有更好的预后的现实,此研究中针对胶质母细胞瘤的结果仍值得商榷。本研究回顾性研究胶质母细胞瘤次全切除或全切除及放疗后替莫唑胺标准方案化疗的结果,有助于更进一步观察替莫唑胺对胶质母细胞瘤的疗效。结果显示,经过手术和放射治疗后的胶质瘤患者采用替莫唑胺标准治疗方案取得了半年有效率 64.5% 和 1 年有效率 35.5% 的疗效。证实替莫唑胺标准治疗方案在胶质母细胞瘤单病理研究组的结果也是十分有效的。

肿瘤细胞的化疗耐药性仍然是化学治疗最大的障碍之一。研究结果表明,替莫唑胺治疗的疗效与细胞内 O^6 -甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶(MGMT)的活性有关,若癌细胞的 MGMT 丧失活性,则替莫唑胺的治疗就有显著成效;反之,则治疗效果较差^[6,7]。MGMT 表达与肿瘤细胞对亚硝基脲类和 TMZ 的耐药有关,是产生耐药的主要原因。同时针对胶质瘤耐药基因替莫唑胺不同的给药方法的研究也逐步的深入, TMZ 和细胞 DNA 作用形成的 O^6 -甲基鸟嘌呤被 MGMT 修复,从而耗竭 MGMT 起到一定的自身克服耐药的作用, TMZ 低剂量连服 7 天或 21 天方案较常规 5 天用药可能更好地耗竭 MGMT 而自身增敏。在 TMZ 化疗前,先给予 DDP 或 PCZ,如 DDP + TMZ, TMZ 在首次 DDP 后 24h 开始服用; PCZ + TMZ, PCZ 在 TMZ 前 1h 给药可以耗竭 MGMT,也是克服 MGMT 耐药的措施之一。

恶性胶质瘤的化学治疗是胶质瘤手术和放射治疗的很好补充,替莫唑胺治疗原发性胶质母细胞瘤具有良好的疗效。胶质母细胞瘤术后可以选择替莫唑胺进行化疗。选择替莫唑胺不同的给药方式或联合其他化疗药物的方法是解决耐药胶质瘤的选择。

参考文献

- 1 Fine HA, Dear KB, Loeffler JS. Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults [J]. *Cancer*, 1993, 71(8): 2585-2597
- 2 Stewart LA. Chemotherapy in adult high-grade gliomas: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials [J]. *Lancet*, 2002, 359(9311): 1011-1018
- 3 Theeler BJ, Groves MD. High-grade gliomas [J]. *Curr Treat Options Neurol*, 2011, 13(4): 386-399
- 4 Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for newly diagnosed glioblastoma [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(10): 987-996
- 5 Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial [J]. *Lancet Oncol*, 2009, 10(5): 459-466
- 6 Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(10): 997-1003
- 7 Oh J, Sahgal A, Sanghera P, et al. Glioblastoma: patterns of recurrence and efficacy of salvage treatments [J]. *Can J Neurol Sci*, 2011, 38(4): 621-625

(收稿: 2012-05-13)

(修回: 2012-06-05)

大鼠煤工尘肺及其对认知功能的影响

吕敏丽 牛小媛

摘要 **目的** 建立煤工尘肺大鼠模型,并探讨其对认知功能的影响。**方法** 取体重为 180~200g 健康雄性 Wistar 大鼠 100 只,随机分为对照组和煤尘肺组。煤尘肺组经气管灌入煤尘生理盐水悬液 1ml,对照组灌入生理盐水 1ml。分别于 8 周和 20 周进行 Morris 水迷宫实验检测其学习和记忆能力,之后取腹主动脉血做血气分析,取肺、脑组织行 HE 染色观察形态学变化,并进行肺组织胶原纤维(van gieson, VG)染色观察纤维化程度。**结果** 血气分析发现,煤尘肺组大鼠随着染尘时间延长, PaO_2 逐渐降低, $PaCO_2$ 逐渐升高;肺组织纤维化指数随病程进展逐渐增高;煤尘肺组大鼠逃避潜伏期较对照组明显延长($F=51.879, P<0.05$), 20 周大鼠的逃避潜伏期较 8 周组明显延长($F=14.603, P<0.05$);煤尘肺组大鼠穿越平台次数和跨越目标象限时间占整个游泳时间的百分率较对照组大鼠明显减少($F=30.301, P<0.05; F=28.363, P<0.05$)。**结论** 煤工尘肺大鼠肺功能降低所引起的慢性缺氧,可能是导致神经组织损伤和认知功能障碍的重要机制。

作者单位: 030001 山西医科大学第一附属医院神经内科(吕敏丽、牛小媛); 037000 山西省大同市第五人民医院(吕敏丽)

通讯作者: 朱小媛, 电子信箱: niuxiaoyuan1958@163.com

关键词 煤工尘肺 慢性缺氧 认知功能

Coal Worker's Pneumoconiosis and Its Impact on Cognitive Functions in Rats. Lü Minli, Niu Xiaoyuan. Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Shanxi 030001, China

Abstract Objective To establish a model of coal workers pneumoconiosis (CWP), and to explore its impact on cognitive function in rats. **Methods** Male Wistar rats with weight of 180–200g were randomly divided into control group and CWP groups. Coal dust saline suspension (1ml) were poured into intra-trachea in CWP groups, while physiological saline in control group (1ml). Respectively, animals were detected learning and memory at the 8th and 20th week employing Morris water maze. Then, abdominal aortic blood was taken for gas analysis, and lung and brain for morphological observation with HE staining, lung for fibrosis with VG (van gieson) staining. **Results** With prolonged instillation or with CWP development, gradually reduced PaO₂ and increased PaCO₂ in blood gas analysis, and gradually increased pulmonary fibrosis index were found in pneumoconiosis rats. Escape latency was significantly longer in CWP groups than in control group ($F = 51.879$, $P < 0.05$), and in 20th week than in 8th week ($F = 14.603$, $P < 0.05$). Significant reductions were observed in number of traversing platform and in percentage of stepping across the target quadrant time and total swimming time in CWP rats compared with control ones ($F = 30.301$, $P < 0.05$; $F = 28.363$, $P < 0.05$). **Conclusion** Chronic hypoxia induced by reduced pulmonary function may be a leading pathogenesis of leading to nerve tissue damage and cognitive dysfunction.

Key words Coal workers' pneumoconiosis(CWP); Chronic hypoxia; Cognitive function

煤工尘肺(coal worker's pneumoconiosis, CWP)是尘肺病的一种类型,有研究显示,随着CWP的晋级,肺功能正常率降低,限制性及混合性通气功能障碍的发生率增加,肺功能障碍的危险性也依次增加,常常引起与肺脏损害不成比例的更加严重的肺功能障碍,导致低氧血症和高碳酸血症,进而引起呼吸系统以外各器官系统的损害,尤其是对中枢神经系统产生明显影响,早期常引起记忆力、计算力等认知功能的改变,晚期除引起肺性脑病以外,还极易发生各种缺血性脑血管疾病和出血性脑血管疾病^[1-5]。据统计,CWP的死因中脑血管病居第3位,而据2006年第3次全国死因调查情况结果,脑血管病高居城乡居民死因的第1位(22.45%)^[6,7]。因而,建立煤工尘肺对脑功能影响的动物模型,积极开展针对煤工尘肺对脑功能影响的研究具有重要的临床价值,同时也可以为国家制定疾病预防控制规划、预防保健策略提供依据,并为研究重点疾病与相关危险因素的关系奠定基础。本项研究旨在成功建立CWP及其对认知功能影响的大鼠模型,并且重点探讨CWP发病过程中学习和记忆功能的变化及其机制,为临床预防、诊断和治疗提供新思路。

材料与方法

1. 动物:雄性Wistar大鼠100只,体重180~200g,由河北医科大学动物中心提供。

2. 煤尘微粒制备:取山西晋煤集团生产的一级无烟煤,经研磨粉碎,200目钢网过滤、水选,用生理盐水配制成50g/L的悬液,高压灭菌后备用。

3. 实验分组与处理:大鼠经适应性饲养1周后,禁食12h,

随机分为生理盐水对照组(50只)和灌注煤尘组(50只)。用18号静脉套管针制备气管导管。用10%水合氯醛[300mg/(kg·w)]经腹腔麻醉动物后直接经口气管插管。煤尘肺动物组经气管灌入煤尘生理盐水悬液(50g/L)1ml,生理盐水对照组灌入生理盐水1ml。实验初始时灌注1次。全部实验动物在同等条件下饲养并自由饮食,之后实验分两部分进行:实验1:分别在实验8周、20周于实验组与对照组随机各抽取20只大鼠应用Morris水迷宫系统测定大鼠学习记忆能力。实验2:Morris水迷宫试验完成后麻醉动物,腹主动脉取血做血气分析;随后将肺、脑组织取出后直接10%中性甲醛浸泡固定,常规脱水、石蜡包埋,制成5μm切片行HE染色,光镜观察;同时通过VG染色观察肺组织纤维化情况,每张切片选取10个视野,用BI-2000医学图像分析软件半定量分析肺组织纤维化指数(胶原纤维面积/统计场总面积×100%)。

4. Morris水迷宫系统测定大鼠学习记忆能力:①定位航行实验(place navigation):反映大鼠的学习能力;②空间探索实验(spatial probe):反映大鼠的空间记忆能力^[8,9]。

5. 统计学方法:所有参数均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。所有数据应用统计软件SPSS 18.0进行单因素方差分析和组间LSD-t检验以及析因设计的方差分析进行比较分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. 煤工尘肺大鼠血气变化及肺组织纤维化指数变化:经气道灌注煤尘动物随着染尘时间延长,动脉血氧分压(PaO₂)逐渐降低,动脉二氧化碳分压(PaCO₂)逐渐升高,说明实验组动物染尘后肺功能逐渐降低,并且与染尘时间有关;肺组织纤维化指数随病程进展显示出明显增高性变化,说明染尘是引起肺组织纤维化的重要因素(表1)。

表1 煤工尘肺大鼠血气与肺组织纤维化
指数变化($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	PaO ₂ (mmHg)	PaCO ₂ (mmHg)	纤维化指数(%)
生理盐水对照组	95.21 ± 10.11	34.01 ± 3.52	1.05 ± 0.11
8周实验组	62.52 ± 12.38 [*]	45.78 ± 6.90	3.48 ± 0.23 [*]
20周实验组	49.92 ± 15.49 [#]	64.21 ± 3.68 [*]	5.06 ± 0.03 [#]

与生理盐水对照组相比, ^{*} $P < 0.05$; 与8周实验组相比, [#] $P < 0.05$; 1 mmHg = 0.133 kPa

2. Morris 水迷宫学习成绩(定位航行试验):析因设计的方差分析显示:①时间因素的的主效应有统计学意义,20周大鼠的逃避潜伏期长于8周大鼠($F = 14.603, P < 0.05$);②分组因素的的主效应有统计学意义,实验组大鼠逃避潜伏期长于对照组($F = 51.879, P < 0.05$);③时间因素和分组因素的交互效应亦有统计学意义($F = 5.246, P < 0.05$)。说明染尘明显影响大鼠的学习能力,且这种影响与染尘时间明显相关(表2)。

表2 不同时间各组大鼠逃避潜伏期比较($\bar{x} \pm s, n = 20, s$)

组别	8周	20周
对照组	15.23 ± 7.91	16.93 ± 9.15
实验组	20.67 ± 7.68	27.44 ± 12.74

3. Morris 水迷宫记忆成绩(空间探索试验):穿越平台次数析因设计的方差分析显示:时间因素($F = 9.520, P < 0.05$);分组因素($F = 30.301, P < 0.05$);时间因素 × 分组因素($F = 4.135, P < 0.05$)。跨越目标象限时间占整个游泳的时间百分率析因设计的方差分析显示:时间因素($F = 16.216, P < 0.05$);分组因素($F = 28.363, P < 0.05$);时间因素 × 分组因素($F = 4.767, P < 0.05$)。结果表明,实验组大鼠穿越平台次数和跨越目标象限时间占整个游泳的时间百分率较生理盐水对照组大鼠明显减少,说明染尘大鼠的记忆功

能明显受损,且与染尘时间明显相关(表3、表4)。

表3 跨越平台次数比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	8周	20周
对照组	7.00 ± 1.63	6.45 ± 1.92
实验组	5.20 ± 1.87	2.55 ± 1.21

表4 跨越目标象限时间占整个游泳的时间百分率
($\bar{x} \pm s, n = 10, \%$)

组别	8周	20周
对照组	45.44 ± 5.49	41.39 ± 6.64
实验组	38.53 ± 8.28	24.86 ± 7.73

4. 肺、脑组织病理形态学变化:(1)肺组织病理形态学观察:染尘8周大鼠可见肺组织中有大量煤尘沉积,主要分布在肺泡壁和血管周围;炎性反应明显,大量中性粒细胞和巨噬细胞聚集,少数动物发生严重肺间质炎和肺泡炎;部分动物间质有出血;部分肺泡腔中有均匀的蛋白水肿液,肺组织有破坏,间质纤维组织增生,部分区域可见代偿性肺气肿。染尘20周大鼠仍有大量煤尘沉积,水肿,可见吞噬了煤尘的巨大体积的巨噬细胞,病变区域肺泡壁增厚,间质纤维组织增生明显;代偿性肺气肿区域肺泡壁破坏,或者明显被挤压;可见多个煤尘结节(图1)。(2)脑组织病理形态学观察:8周时间点炎性反应明显,总体表现为血管扩张、充血,中性粒细胞和胶质细胞增多,间质疏松、神经细胞突起和核仁消失,提示脑组织有水肿和神经细胞变性;部分神经元核染色质浓缩。20周时间点可见间质有筛网状结构,提示有液化性坏死;神经细胞变性加重,核膜增厚,染色质凝集成块状,有的细胞发生核碎裂;核固缩更加明显,尚可见到凋亡小体(图2)。

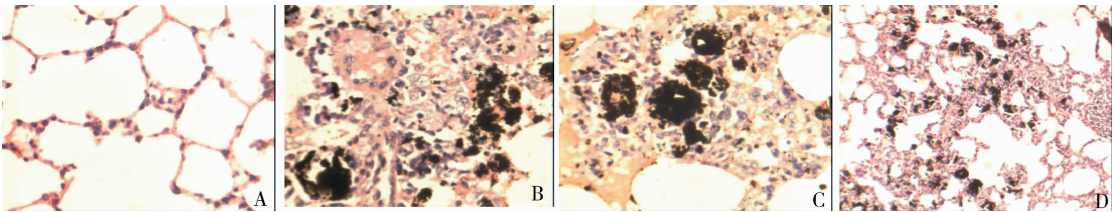


图1 煤工尘肺大鼠肺组织病理变化

A. 正常肺组织(×400);B. 煤斑(×400);C. 煤结节(×400);D. 代偿性肺气肿(×100)

讨 论

本项研究中,动物经染尘以后,随着病程进展,动脉血氧分压逐渐明显降低、二氧化碳分压逐渐明显升高,肺组织结构发生典型的病理改变,说明我们使用给动物经气道灌注煤尘的方法成功地复制出了煤工

尘肺的模型。

认知功能是指大脑接受外界信息、加工处理、转换成内在的心理活动、从而获取知识或应用知识的过程。认知功能损害是脑缺血、缺氧后精神心理变化最敏感的指标之一^[10,11]。学习和记忆是认知功能的重

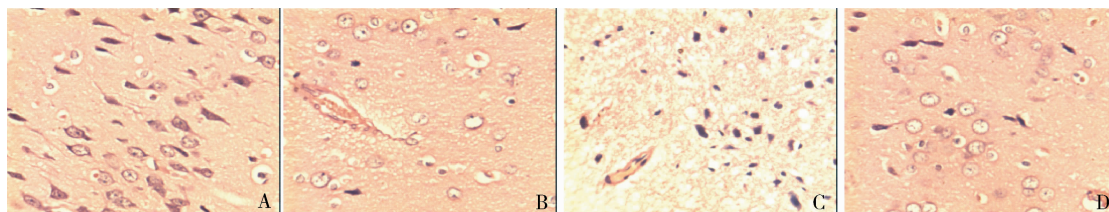


图2 煤工尘肺大鼠脑组织病理变化(×400)

A. 正常脑组织;B. 脑血管扩张,神经细胞变性;C. 神经细胞核固缩;D. 凋亡小体和脑软化灶形成

要组成部分,这两项能力对认知功能损害的影响相当敏感。定位航行实验和空间探索实验能很好地判断动物的认知能力。我们发现,染尘组大鼠整个定位航行实验的逃避潜伏期明显延长,提示染尘组大鼠通过训练获得有效经验的能力下降,且随着染尘时间的延长,其学习能力进一步下降;在空间探索实验中,染尘组大鼠由于空间记忆力减退,对隐藏平台位置不能产生记忆,其游泳轨迹分布于平台象限较少,提示实验组大鼠记忆能力受到一定程度的损害。这些结果表明,染尘动物的学习成绩和记忆成绩均显著下降,并随病程进展逐渐加重。证实动物在染尘后形成的煤工尘肺,导致了认知功能的障碍,说明我们成功复制出了煤工尘肺及其对学习记忆功能影响的动物模型。

实验中笔者还发现,染尘动物随病程进展,动脉血氧分压逐渐降低,二氧化碳分压逐渐升高,脑组织中神经元的数量随病程进展逐渐减少,很可能脑组织结构的变化是认知功能障碍的重要原因,而肺功能障碍引起的低氧血症和高碳酸血症则可能是导致脑组织形态和功能变化的重要机制。脑组织对缺氧十分敏感,长期慢性缺氧,由于能量生成不足和酸中毒的发生,可出现神经细胞膜电位和神经递质的改变、细胞内 Ca^{2+} 代谢紊乱、溶酶体酶释放等各种病理变化。缺氧还可通过能量生成减少、乏氧代谢增强、直接扩张脑血管等因素的综合作用,引起细胞内外脑水肿,后者进一步压迫脑血管,与脑缺氧之间形成恶性循环。高碳酸血症也是慢性呼吸功能障碍时引起脑损伤的重要因素,与缺氧共同作用,加重脑组织酸中毒,影响细胞功能代谢,严重时导致脑细胞变性坏死。前期笔者课题组选取了由职业病诊断组确诊的 290 例煤工尘肺患者,使用简易智能精神状态量表和日常生活能力量表对其认知功能进行了评定,结果表明,患者存在整体认知功能障碍和日常生活能力的下降^[12]。另一项对 COPD 患者的研究也表明,当 $\text{PaO}_2 < 60\text{mmHg}$ 时,学习、记忆、计算测验评分明显低于 $\text{PaO}_2 \geq 60\text{mmHg}$ 的患者,表明认知功能损害程度与低氧血症的严重程度相平行,稳定期患者认知功能损害

与肺功能下降的程度也存在明显的相关性^[13]。这些临床病例研究结果均可成为笔者实验室研究的重要佐证,说明煤工尘肺发生以后,随着呼吸功能障碍加重,认知功能障碍也必将随之发生。

本项研究的意义在于成功复制了煤工尘肺合并发生认知功能障碍的大鼠模型,并对认知功能障碍的机制进行了探讨,为针对尘肺病患者认知功能损害的研究提供了理想的模型与手段,也为临床预防、早期诊断和治疗奠定了理论基础。

参考文献

- 1 张海英,邹伟明,伍传仁,等. 煤工尘肺患者肺通气功能障碍的影响因素[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,2007,25(1):11-14
- 2 Wang XR, Yano E, Wang M, *et al.* Pulmonary function in long-term asbestos workers in China[J]. J Occup Environ Med, 2001, 43(7): 623-629
- 3 Pauwels RA, Buist AS, Calvedey PMA, *et al.* Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(5): 1256-1276
- 4 李军,蔡淑琪,卫小鹏,等. 50 例煤工尘肺并发腔隙性脑梗死临床分析[J]. 中国煤炭工业医学杂志,2004,7(11):1099-1100
- 5 王建国,田占鹏,蔡淑琪,等. 煤工尘肺并发脑血管病 65 例临床分析[J]. 中国煤炭工业医学杂志,2002,5(2):192-193
- 6 人民共和国卫生部. 全国尘肺流行病学调查资料(1949-1986)[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1992:16-48
- 7 McDonald JC, Liddell FD, Dufresne A, *et al.* The 1891-1920 birth cohort of Quebec chrysotile miners and millers: mortality 1976-1988[J]. Br J Ind Med, 1993, 50(12):1073-1081
- 8 胡镜清,温泽淮,赖世隆. Morris 水迷宫检测的记忆属性与方法学初探[J]. 广州中医药大学学报, 2000, 17(2):117-119
- 9 冯力民,吴真,佟也芒. 用水迷宫建立大鼠空间辨别性学习记忆模型[J]. 北华大学学报:自然科学版,2007,8(1):46-49
- 10 王伟,解恒革,王琪,等. 非痴呆老年人认知功能的差异性:从成功老化到轻度认知损伤[J]. 中国临床康复,2004,8(4):797-798
- 11 Antonelli-Incalzi R, Marra C, Giordano A, *et al.* Cognitive impairment in chronic obstructive pulmonary disease: A neuropsychological and spect study[J]. J Neurol, 2003, 250(3):325-332
- 12 吕建宁,牛小媛. 煤工尘肺患者轻度认知障碍及其相关因素的研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2009,7(4):496-498
- 13 赵松林,聂秀红,张威,等. 慢性阻塞性肺疾病患者的认知缺陷[J]. 中国心理卫生杂志,2008,22(1):32-36

(收稿:2012-02-23)

(修回:2012-04-13)