

磁共振示踪法定量测量大鼠 C6 胶质瘤模型 细胞外间隙扩散参数

左 龙^{1,2}, 赵 越³, 李怀业³, 李 凯⁴, 卢嘉宾^{1,2}, 韩鸿宾^{1,2},

(1. 北京大学第三医院放射科, 北京 100191; 2. 磁共振装备与技术北京市重点实验室, 北京 100191;
3. 大连大学化学与化学工程学院, 大连 116622; 4. 北京积水潭医院放射科, 北京 100035)

【摘要】 目的 应用磁共振示踪技术定量比较了不同时期的大鼠 C6 胶质瘤的细胞外间隙扩散参数。并对影响细胞外间隙扩散的细胞外基质成分进行了分析。**方法** 将示踪剂钆喷酸葡胺 (gadolinium-diethylene triamine pentaacetic acid, Gd-DTPA) 作为示踪剂导入大鼠脑细胞外间隙内, 采用磁共振示踪法动态监测示踪剂在大鼠脑内的扩散与清除, 利用已建立的数学模型, 计算有效扩散系数 (D^*), 清除速率常数 (k') 和半衰期 ($t_{1/2}$)。对细胞外基质的主要成分, 如硫酸软骨素蛋白多糖 (CSPGs)、腱生蛋白 C、胶原蛋白 IV 型进行免疫组化和蛋白质印记分析。**结果** 与 10 d C6 胶质瘤相比, 20 d 胶质瘤有效扩散系数 ($(6.67 \pm 1.78) \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$ vs. $(1.26 \pm 0.27) \times 10^{-4} \text{ mm}^2/\text{s}$; $t = 4.265$; $P < 0.01$) 及清除速率常数 ($(7.67 \pm 2.29) \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$ vs. $(1.46 \pm 0.36) \times 10^{-4} \text{ mm}^2/\text{s}$; $t = 3.87$; $P < 0.05$) 减小, 迂曲度增大 ((3.99 ± 0.57) vs. (2.83 ± 0.29) ; $t = 4.11$; $P < 0.01$), 半衰期延长 ($(0.86 \pm 0.23 \text{ h})$ vs. $(1.64 \pm 0.12 \text{ h})$; $t = 5.91$; $P < 0.01$)。20 d 胶质瘤的细胞外基质的硫酸软骨素蛋白多糖 ((0.48 ± 0.07) vs. (0.32 ± 0.09) ; $t = 4.663$; $P < 0.01$)、腱生蛋白 C ((0.29 ± 0.04) vs. (0.58 ± 0.11) ; $t = 6.50$; $P < 0.01$) 和胶原蛋白 IV 型 ((0.24 ± 0.07) vs. (0.33 ± 0.06) ; $t = 3.81$; $P < 0.05$) 的含量较 10 d 胶质瘤明显增加。**结论** 随 C6 胶质瘤进展, 细胞间隙扩散参数发生变化; 细胞外基质的含量影响细胞外间隙扩散; 我们相信本研究有助于我们更好地认识神经胶质瘤微环境, 并将为经间质途径治疗神经胶质瘤提供参考。

【关键词】 磁共振成像, 细胞外间隙, C6 胶质瘤模型

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 12-0001-07

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.012.001

Extracellular space diffusion during progression of rat C6 glioma quantificated by magnetic resonance imaging

ZUO Long^{1,2}, ZHAO Yue³, LI Huai-ye³, LI Kai⁴, LU Jia-bin^{1,2}, HAN Hong-bin^{1,2},

(1. Department of Radiology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China;

2. Beijing Key Lab of Magnetic Resonance Imaging Device and Technique, Beijing 100191;

3. Department of Chemistry and Chemical Engineering, Dalian University, Dalian 116622,;

4. Department of Radiology, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035)

【Abstract】 Objective To compare the extracellular space diffusion at different stages of rat C6-gliomas determined by MRI tracer method and analyze the influencing effect of extracellular matrix (ECM) on the diffusion process. **Methods**

【基金项目】 国家自然科学基金 (编号 30972811, 81171080, 81071148); 国家科技支撑计划项目 (编号 2012BAI15B09); 国家重大科学仪器设备开发专项科研合作项目 (编号 2011YQ030114); 北京大学第三医院临床学科重点项目 (编号 BYSY201301) 的资助。

【作者简介】 左龙 (1988 -), 男, 硕士研究生在读, E-mail: zuolonglotus@bjmu.edu.cn。

【通讯作者】 韩鸿宾 (1971 -), 男, 教授、主任医师、研究员、博士, 研究方向: 磁共振成像新技术及临床应用, E-mail: hanhongbin@bjmu.edu.cn。

Introducing adolinium-diethylene triaminepentaacetic acid (Gd-DTPA) into extracellular space (ECS) as a tracer. The diffusion parameters and half-life time were quantified according to mathematical model of diffusion. The main ECM components (e. g. chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs), collagen IV tenascin C) were detected by immunohistochemical and immunoblot analysis. **Results** Gd-DTPA introduced into 20-day glioma in the rats diffused more slowly [$(6.67 \pm 1.78) \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$ vs. $(1.26 \pm 0.27) \times 10^{-4} \text{ mm}^2/\text{s}$; $t = 4.265$; $P < 0.01$], deriving a larger tortuosity [(3.99 ± 0.57) vs. (2.83 ± 0.29) ; $t = 4.11$; $P < 0.01$], localized within the tumor with a smaller clearance rate [$(7.67 \pm 2.29) \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$ vs. $(1.46 \pm 0.36) \times 10^{-4} \text{ mm}^2/\text{s}$; $t = 3.87$; $P < 0.05$], and a longer half-life time $((0.86 \pm 0.23 \text{ h})$ vs. $(1.64 \pm 0.12 \text{ h})$; $t = 5.91$; $p < 0.01$) compared with 10-day gliomas in the rats. The increased levels of extracellular matrix of glioma were associated with different diffusion and clearance parameters of 20-day gliomas in the rats in comparison with those in the 10-day rat gliomas, in which the chondroitin sulfate proteoglycans [(0.48 ± 0.07) vs. (0.32 ± 0.09) ; $t = 4.663$; $P < 0.01$], tenascin C [(0.29 ± 0.04) vs. (0.58 ± 0.11) ; $t = 6.50$; $P < 0.01$] and collagen IV [(0.24 ± 0.07) vs. (0.33 ± 0.06) ; $t = 3.81$; $P < 0.05$] were tested. **Conclusions** The ECS parameters are changed with the C6 glioma progression due to the increased ECM content. The results of our study may help us to better understanding the glioma micro-environment and provide beneficial references for the brain interstitial drug delivery to treat gliomas.

【Key words】 Magnetic resonance imaging, Extracellular space, C6 glioma model; Rats

胶质瘤是最常见的原发性脑肿瘤,占恶性脑肿瘤的81%^[1]。胶质瘤通常会导致显著的致残率和死亡率。在过去的几十年中,治疗方法不断改进。目前,放疗联合化疗是手术后的一线辅助治疗^[2]。然而,几乎所有的胶质母细胞瘤患者在7~10个月无进展生存期中位期后都会出现病情进展^[3]。因此,胶质母细胞瘤总体上难治且预后差。实际上大多数化疗药物不能通过血脑屏障,因而药物到达肿瘤靶点的效率低下^[4]。研究人员相继发明了诸多新的治疗策略,其中局部给药可以直接绕过血脑屏障。局部给药具体包括,局部注射、对流增强给药和各种埋置多聚物。局部给药可以将高生物利用度的制剂直接作用于靶点,而且几乎没有药物损耗^[5]。然而,溶液回流和水肿等多种副作用阻碍了对流增强给药(CED)发展成一个用于神经胶质瘤的标准治疗系统^[6]。

为克服上述缺陷,人们建立了一种磁共振实时成像的方法来监测给药过程^[7-9],但却没有定量计算局部扩散和清除参数。本课题组首先应用磁共振示踪技术定量测量了正常大鼠脑尾状核、丘脑、枕叶皮质和黑质的扩散和清除参数^[10,11]。本研究首次应用磁共振示踪技术定量比较了C6胶质瘤10 d模型和20 d模型扩散和清除参数的差异,并且对影响扩散和清除的细胞外基质成分进行了免疫组化和蛋白质印迹分析比较。

1 材料和方法

1.1 溶液制备和实验动物

用双蒸水稀释钆二乙三胺五乙酸(Gd-DTPA,马根维显,拜耳先灵制药,德国)至10 mmol/L。本研究方案获得了北京大学医学部动物伦理委员会的批准(批号 No. LA2012-016)。16只成年雄性SD大鼠,清洁级,体重(250~300)g,北京大学医学部实验动物科学部提供,实验动物生产许可证号SCXK(京)2011-0012。实验动物使用许可证号:SYXK(字)2011-0039。随机分为两组:10 d胶质瘤组($n=8$)和20 d胶质瘤组($n=8$)。C6大鼠胶质瘤细胞系(ATCC No. CCL 107)培养如以往报道。大鼠($n=8$)经腹膜内注射戊巴比妥钠、乙醇、水合氯醛、硫酸镁和丙二醇混合物(3 mL/kg)麻醉后,固定于立体定位仪(Stoelting, 美国)。在头皮沿矢状缝从两耳间区域至两眼间区域做正中切口,小心分离脑膜暴露前囟。右侧颅骨表面定位钻孔(前囟前,1 mm;右旁开,3.5 mm)。C6细胞悬液(5×10^6 cells in 10 μL)经颅骨孔缓慢注入(10 min)右侧尾状核(前囟前,1 mm;右旁开,3.5 mm;深,5.0 mm)。微量进样器停针5 min。颅骨孔用骨蜡封闭,头皮缝合。

1.2 MRI示踪法示踪大鼠C6胶质瘤模型细胞外间隙扩散

大鼠麻醉如前所述,实验过程中适时追加保持麻醉状态(约为0.7 mL/kg/h)。大鼠置于加热垫(38 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 上保持体温。预扫描将大鼠置于西门子磁共振成像(Magnetom Trio, Germany)系统腕线圈中,用T1加权三维磁化准备快速采集梯度回波序列(T1 3D MP-RAGE)扫描^[12]。获得用于图像

后处理的预扫描图像并用于确定穿刺位点。大鼠颅顶备皮,碘伏消毒。沿矢状缝从两耳间区域至两眼间区域开头皮,小心分离脑膜暴露前囟。将大鼠置于立体定位仪上,根据 MRI 预扫描结果显示的肿瘤生长情况在颅骨表面重新定位钻孔,向肿瘤中心区域微量注射 10 mmol/L Gd-DTPA 溶液 2 μ L(注射时间 10 min)。注射 Gd-DTPA 后不同时间点,15min、30 min、第 1、2、3、4、5、6 小时行磁共振扫描成像。成像序列和参数如前所述。

1.3 图像后处理和参数计算

用 MATLAB7.8 软件(MathWork, 美国)将注射后扫描图像与预扫描图像配准后获得减影图像^[13]。本课题组前期研究中,已经发现了 3.0T 磁共振机应用 T1 加权 3D MP-RAGE 序列扫描的 Gd-DTPA 浓度与信号强度增量(ΔSI)的线性关系^[12]。与以往的 $1/T_1$ 值与 Gd-DTPA 浓度关系相比更有利于实时成像计算^[14-16]。MRI 示踪法定量细胞外间隙扩散的主要参数包括自由扩散系数(D),有效扩散系数(D^*),迂曲度(λ)和清除速率常数(k')。根据本课题组已经报道的方法进行参数计算^[17]。为测量脑组织间液流动参数半衰期($t_{half-life}$),将高于背景噪音两个标准差的信号强度作为阈值,逐层提取感兴趣区内的所有像素得到各扫描时间点 Gd-DTPA 总量(Gd_{sum})。由于 Gd-DTPA 在脑内按一级动力学常数清除,Gd-DTPA 的半衰期可以通过曲线拟合得到($Gd_{sum} = e^{-kt}$),其中半衰期($t_{half-life}$)根据 $t_{half-life} = \ln(2/k)$ 进行计算。

1.4 免疫组化

选取典型的细胞外基质大分子进行免疫组化分析^[18-20]。5 μ m 石蜡切片脱蜡后,3%过氧化氢避光浸泡,抗原热修复。分别滴加抗硫酸软骨素蛋白多糖、腱生蛋白 C、IV 型胶原蛋白一抗(兔抗大鼠;1:200;博奥森),4℃过夜;加二抗常温孵育 30 min。DAB 显色,苏木素复染细胞核。

1.5 蛋白质印迹(Western blotting)

将上述大分子用蛋白质印迹法进行检测^[21-23]。肿瘤组织取材,加入裂解液匀浆后离心,各取上清液 50 μ g 点样于 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,转印至硝酸纤维素膜,用 5% 脱脂牛奶封闭。分别用硫酸软骨素蛋白多糖抗体、腱生蛋白 C 抗体、抗 IV 型胶原蛋白(兔抗大鼠;1:1 000;博奥森)或抗 GAPDH(1:10 000;博奥森)4℃孵育过夜,二抗室温孵育 1 h,洗膜后加入免疫印迹化学发光检测试剂(enhanced

chemiluminescence, ECL),X 光胶片曝光,ImageJ 软件(国立卫生院,美国)分析。以 GAPDH 蛋白作为系统内参,测定条带进行灰度值,以目的/内参比值来比较表达的差异。

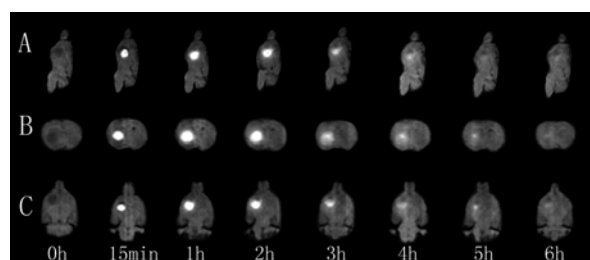
1.6 统计学方法

统计分析采用 SPSS 软件 19.0 版本进行(IBM, 美国)。所有结果均用均值 $\pm$ 标准差(SD)的形式表示。用独立样本 t 检验比较两组样本的有效扩散系数(D^*),迂曲度(λ),清除速率常数(k')和半衰期($t_{half-life}$)。用配对样本 t 检验比较两组样本的蛋白印迹分析。 P 值小于 0.05($P < 0.05$)为有统计学差异。

2 结果

2.1 胶质瘤 10d 模型和胶质瘤 20 d 模型 Gd-DTPA 扩散参数和半衰期的比较

MRI 矢状位、横轴位和冠状位三个方向显示不同时间点 Gd-DTPA 的扩散过程(图 1 和 2); Gd-DTPA 导入细胞外间隙后,局部信号强度增高,随后信号强度随时间衰减至示踪剂从细胞外间隙中清除。20 d 胶质瘤有效扩散系数(D^*)明显小于 10 d 胶质瘤($(6.67 \pm 1.78) \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$ vs. $(1.26 \pm 0.27) \times 10^{-4} \text{ mm}^2/\text{s}$; $t = 4.265$; $P < 0.01$),导致迂曲度(λ)增大($\lambda = (D/D^*)^{1/2}$)((3.99 ± 0.57) vs. (2.83 ± 0.29) ; $t = 4.11$; $P < 0.01$)(图 3A)。测量清除速率常数(k'),20 d 胶质瘤($(7.67 \pm 2.29) \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$)小于 10 d 胶质瘤($(1.46 \pm 0.36) \times 10^{-4} \text{ mm}^2/\text{s}$),差异有统计学意义($t = 3.87$; $P < 0.05$)(图 3A)。10d 胶质瘤半衰期($0.86 \pm 0.23 \text{ h}$)显著小于 20 d 胶质瘤($1.64 \pm 0.12 \text{ h}$)($t = 5.91$; $P < 0.01$)(图 3B)。



注 1:(A)矢状位;(B)横轴位;(C)冠状位

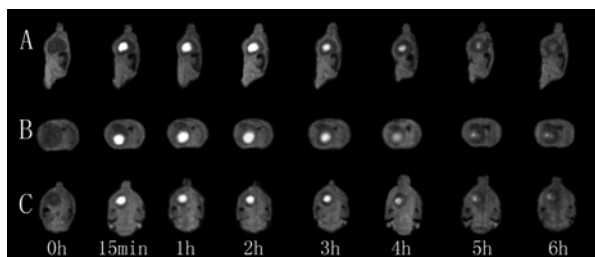
图 1 Gd-DTPA 在 10 d 胶质瘤中的时空分布。

Note1:(A) Sagittal views over time before and after injection of Gd-DTPA.

(B) Axial views over time before and after injection of Gd-DTPA.

(C) Coronal views over time before and after injection of Gd-DTPA.

Fig. 1 Spatiotemporal distribution of Gd-DTPA injected into the 10-day glioma.



注 2: (A) 矢状位; (B) 横轴位; (C) 冠状位。

图 2 Gd-DTPA 在 20d 胶质瘤中的时空分布。

Note2. (A) Sagittal views over time before and after injection of Gd-DTPA. (B) Axial views over time before and after injection of Gd-DTPA. (C) Coronal views over time before and after injection of Gd-DTPA.

Fig. 2 Spatiotemporal distribution of Gd-DTPA injected into the 20-day glioma.

2.2 胶质瘤 10 d 模型和 20 d 模型细胞外基质表达的差异

为了更好地理解上述扩散参数 (D^* , λ 和 k') 和半衰期 ($t_{1/2}$) 的差异, 我们用免疫组化法观察到 20 d 胶质瘤中硫酸软骨素蛋白多糖、腱生蛋白 C 和 IV 型胶原蛋白的表达 (图 4B, 4D 和 4F) 均较 10 d 胶质瘤的表达 (图 4A, 4C 和 4E, 图 4 见封三) 增高。Western blotting 的定量结果进一步证实了这些发现。硫酸软骨素蛋白多糖 (CSPGs/GAPDH) (图 5A) 在 20 d 胶质瘤中 (0.48 ± 0.07) 的表达均高于在 10 d 胶质瘤中 (0.32 ± 0.09) 的表达 ($t = 4.663$; $P < 0.01$), 腱生蛋白 C (Tenascin-C/GAPDH) 亦然 (0.29 ± 0.04) vs. (0.58 ± 0.11); $t = 6.50$; $P <$

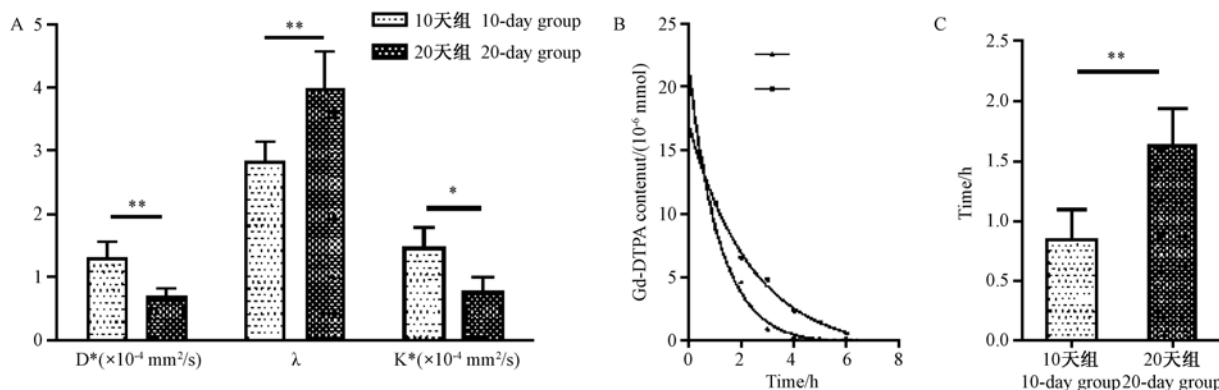
0.01) (图 5B)。20 d 胶质瘤中 IV 型胶原蛋白 (collagen IV/GAPDH) (图 5C) 的含量也高于 10 d 胶质瘤 (0.24 ± 0.07) vs. (0.33 ± 0.06); $t = 3.81$; $P < 0.05$)。

3 讨论

众所周知, 磁共振扩散加权成像 (diffusion-weighted MRI) 是一种能够测量组织内水分子扩散的成像技术, 是脑肿瘤分级和判断放化疗疗效方面的研究热点^[24-27]。但是由于扩散加权成像并不能区分细胞内和细胞外的扩散且空间分辨力低, 因而难以用于指导脑内局部给药^[28], 实时磁共振示踪技术应运而生。

本研究应用磁共振示踪法定量研究了胶质瘤模型在生长的第 10 天和第 20 天肿瘤细胞外间隙的有效扩散系数 (D^*), 清除速率常数 (k') 和半衰期 ($t_{1/2}$) 等方面表现出了显著的差异。这两个时期的胶质瘤细胞外扩散和清除的所具有的不同特征与胶质瘤细胞外基质的不同相关。20 d 胶质瘤细胞外基质成分如硫酸软骨素蛋白多糖, 腱生蛋白 C 和 IV 型胶原蛋白的增多, 与 20 d 胶质瘤有效扩散系数、清除速率常数的较小和半衰期的延长相对应。

通常, 肿瘤体积的增大是肿瘤进展的重要标志^[29]。肿瘤细胞植入后, 肿瘤体积随时间逐渐增大, 即为肿瘤进展^[30]。肿瘤细胞外间隙的扩散对于肿瘤细胞摄取营养物质, 和抗肿瘤药物到达治疗靶点作用于肿瘤都至关重要^[31]。细胞外基质成分是



注 3: (A) 扩散参数定量分析 (D^* , λ , k') (B) Gd-DTPA 的半衰期拟合曲线图。

(C) 胶质瘤 10 d 模型半衰期与胶质瘤 20 d 模型半衰期统计分析 ($t_{1/2}$), $** P < 0.01$ 。

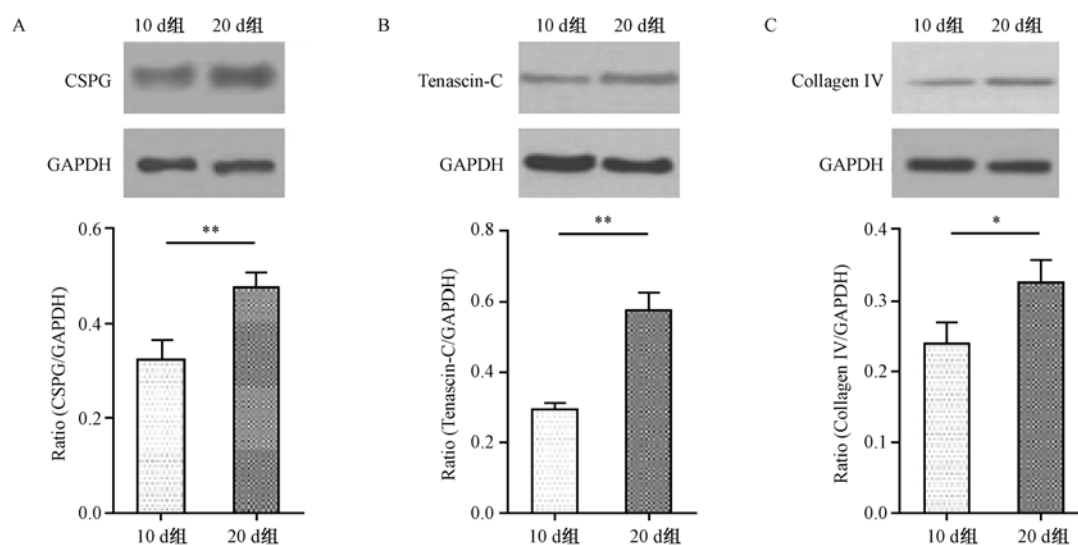
图 3 胶质瘤 10d 模型 ($n=8$) 和胶质瘤 20 d 模型 ($n=8$) 细胞外间隙扩散参数和半衰期。

Note. (A) Quantitative analyses of diffusion parameters (D^* , λ , k') (B) The total amount of remanent

Gd-DTPA in gliomas attenuated following an exponential decay.

(C) Statistical analysis of the half-life time. Data are presented as the mean $\pm$ SD ($n=8$). $** P < 0.01$.

Fig. 3 Diffusion parameters and half-life time of Gd-DTPA in the 10-day ($n=8$) and 20-day ($n=8$) gliomas.



注 5: (A) 硫酸软骨素蛋白多糖 Western blot 分析; (B) 腱生蛋白 C Western blot 分析;

(C) IV 型胶原蛋白 Western blot 分析; ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

图 5 胶质瘤 10 d 模型 (n = 6) 和胶质瘤 20 d 模型 (n = 6) 细胞外基质蛋白质印迹 (Western blotting) 分析。

Note. (A) Representative result of Western blotting for CSPGs in the 10-day (n = 6) and 20-day glioma (n = 6).

(B) Representative result of Western blotting for tenascin-c in the two stage models. (C) Representative result of

Western blotting for collagen IV in the two stag models. Data are presented as the mean $\pm$ SD (n = 6). ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

Fig. 5 Expression of CSPGs in the extracellular matrix in the 10-day and 20-day glioma models.

影响脑肿瘤细胞外间隙扩散的重要因素之一^[32, 33], 可以增加细胞外间隙粘滞度,降低扩散速率^[34]。细胞外基质的存在增加了分子运动的粘滞阻力,使细胞外间隙不再是自由扩散介质^[35]。以往文献报道,硫酸软骨素蛋白多糖、腱生蛋白 C 和 IV 型胶原蛋白在胶质瘤细胞外间隙中高表达,并随着肿瘤生长进展含量逐渐升高^[22, 36-40]。本研究的结果与以往文献报道一致。脑细胞外间隙占脑容积的 20%,脑细胞间约 50 nm 的空隙内含细胞外基质^[41, 42]。目前认为细胞外基质成分可降低溶质分子或膜相关分子的扩散^[34]。胶质瘤细胞外基质分子种类较多,主要包括蛋白多糖、糖蛋白、胶原纤维等成分^[43]。本研究中的硫酸软骨素蛋白多糖,腱生蛋白 C 和 IV 型胶原蛋白分别是上述三种主要成分的典型代表分子,在 ECS 中含量较高,参与构成胶质瘤细胞生长的微环境,并影响胶质瘤细胞的进展转移等生物学行为,而受到广泛关注^[36]。另外由于几种成分之间往往相互连接构成复合结构^[43],所以选取典型细胞外基质分子有助于对于胶质瘤细胞外间隙的分析。本研究局限性在于只是选取了典型的细胞外基质分子,未来需要对于细胞外基质的各种分子对扩散的影响进行更全面的研究,并进一步对不同类型胶质瘤扩散参数和细胞外基质的表达进行定量

研究。

肿瘤分期是肿瘤学研究的基本内容之一。国际抗癌联盟 (UICC) 美国癌症联合会 (AJCC) 的 TNM 分期系统^[44]是五十多年来评估肿瘤患者预后的参考^[45]。但是自第五版以来,TNM 分期已不再包含原发性脑肿瘤的内容^[44]。目前使用的是世界卫生组织 (WHO) 分类标准,将原发性脑肿瘤分为星形细胞瘤、少突神经胶质瘤、室管膜瘤和混合型胶质瘤^[46]。有学者认为将肿瘤体积、浸润情况和淋巴结转移等考虑在内可将肿瘤进一步分期^[47],并认为 T 分期 (肿瘤大小) 是制定各期神经胶质瘤治疗方案的重要参考^[48]。在我们的研究中发现两个时期的胶质瘤扩散参数明显不同,提示局部给药参数应根据肿瘤进展情况进行调整。

局部给药是治疗恶性胶质瘤的新方法和新希望。实时 MRI 示踪技术将有助于我们更好地研究胶质瘤细胞外间隙扩散的生物学基础,有助于恶性胶质瘤局部治疗的发展。

参考文献:

- [1] Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, et al. The epidemiology of glioma in adults; a "state of the science" review [J]. Neuro Oncol, 2014, 16(7):896-913.
- [2] Omuro A, Deangelis LM. Glioblastoma and other malignant

- gliomas: a clinical review[J]. *JAMA*, 2013, 310(17): 1842 – 1850.
- [3] Omuro AM, Faivre S, Raymond E. Lessons learned in the development of targeted therapy for malignant gliomas[J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(7): 1909 – 1919.
- [4] Neuwelt EA. Mechanisms of disease: the blood-brain barrier [J]. *Neurosurgery*, 2004, 54(1): 131 – 40; discussion 141 – 142.
- [5] Allhenn D, Boushehri MA, Lamprecht A. Drug delivery strategies for the treatment of malignant gliomas [J]. *Int J Pharm*, 2012, 436(1–2): 299 – 310.
- [6] Jagannathan J, Walbridge S, Butman JA, et al. Effect of ependymal and pial surfaces on convection-enhanced delivery [J]. *J Neurosurg*, 2008, 109(3): 547 – 552.
- [7] Krauze MT, Vandenberg SR, Yamashita Y, et al. Safety of real-time convection-enhanced delivery of liposomes to primate brain: a long-term retrospective[J]. *Exp Neurol*, 2008, 210(2): 638 – 644.
- [8] Heiss JD, Walbridge S, Asthagiri AR, et al. Image-guided convection-enhanced delivery of muscimol to the primate brain [J]. *J Neurosurg*, 2010, 112(4): 790 – 795.
- [9] Sampson JH, Brady M, Raghavan R, et al. Colocalization of gadolinium-diethylene triamine pentaacetic acid with high-molecular-weight molecules after intracerebral convection-enhanced delivery in humans[J]. *Neurosurgery*, 2011, 69(3): 668 – 676.
- [10] Han H, Shi C, Fu Y, et al. A novel MRI tracer-based method for measuring water diffusion in the extracellular space of the rat brain[J]. *IEEE J Biomed Health Inform*, 2014, 18(3): 978 – 983.
- [11] Han H, Li K, Yan J, et al. An in vivo study with an MRI tracer method reveals the biophysical properties of interstitial fluid in the rat brain[J]. *Sci China Life Sci*, 2012, 55(9): 782 – 787.
- [12] Xu F, Han H, Zhang H, et al. Quantification of Gd-DTPA concentration in neuroimaging using T(1) 3D MP-RAGE sequence at 3.0 T[J]. *Magn Reson Imaging*, 2011, 29(6): 827 – 834.
- [13] Liu B, Bai XZ, Zhou FG, et al. Mutual information based three-dimensional registration of rat brain magnetic resonance imaging time-series[J]. *Comput Electr Engineer*, 2013, 39(5): 1473 – 1484.
- [14] Brady M, Raghavan R, Chen ZJ, et al. Quantifying fluid infusions and tissue expansion in brain[J]. *IEEE Trans Biomed Eng*, 2011, 58(8): 2228 – 2237.
- [15] Tweedle MF, Wedeking P, Telser J, et al. Dependence of MR signal intensity on Gd tissue concentration over a broad dose range [J]. *Magn Reson Med*, 1991, 22(2): 191 – 4; discussion 195 – 196.
- [16] Morkenborg J, Pedersen M, Jensen FT, et al. Quantitative assessment of Gd-DTPA contrast agent from signal enhancement: an in-vitro study[J]. *Magn Reson Imaging*, 2003, 21(6): 637 – 43.
- [17] Li K, Han H, Zhu K, et al. Real-time magnetic resonance imaging visualization and quantitative assessment of diffusion in the cerebral extracellular space of C6 glioma-bearing rats[J]. *Neurosci Lett*, 2013, 543: 84 – 89.
- [18] Matsuoka K, Matsuzaka K, Yoshinari M, et al. Tenascin-C promotes differentiation of rat dental pulp cells in vitro[J]. *Int Endod J*, 2013, 46(1): 30 – 9.
- [19] Flynn E R, Marbury DC, Sawyer RT, et al. Amlodipine reduces inflammation despite promoting albuminuria in the streptozotocin-induced diabetic rat [J]. *Nephron Extra*, 2012, 2(1): 205 – 218.
- [20] Miyata S, Shinga I, Taguchi K, et al. Chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan/RPTPbeta in the hypothalamic magnocellular nuclei[J]. *Brain Res*, 2002, 949(1–2): 112 – 121.
- [21] Abe T, Mori T, Kohno K, et al. Expression of 72 kDa type IV collagenase and invasion activity of human glioma cells[J]. *Clin Exp Metast*, 1994, 12(4): 296 – 304.
- [22] Sim H, Hu B, Viapiano MS. Reduced expression of the hyaluronan and proteoglycan link proteins in malignant gliomas [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(39): 26547 – 26556.
- [23] Fujimoto M, Suzuki H, Shiba M, et al. Tenascin-C induces prolonged constriction of cerebral arteries in rats[J]. *Neurobiol Dis*, 2013, 55: 104 – 109.
- [24] Chu HH, Choi SH, Ryoo I, et al. Differentiation of true progression from pseudoprogression in glioblastoma treated with radiation therapy and concomitant temozolomide: comparison study of standard and high-b-value diffusion-weighted imaging [J]. *Radiology*, 2013, 269(3): 831 – 840.
- [25] Kang Y, Choi SH, Kim YJ, et al. Gliomas: histogram analysis of apparent diffusion coefficient maps with standard- or high-b-value diffusion-weighted MR imaging—correlation with tumor grade[J]. *Radiology*, 2011, 261(3): 882 – 890.
- [26] Castillo M, Smith JK, Kwok L, et al. Apparent diffusion coefficients in the evaluation of high-grade cerebral gliomas[J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2001, 22(1): 60 – 64.
- [27] Murakami R, Hirai T, Sugahara T, et al. Grading astrocytic tumors by using apparent diffusion coefficient parameters: superiority of a one- versus two-parameter pilot method [J]. *Radiology*, 2009, 251(3): 838 – 845.
- [28] Vorisek I, Sykova E. Measuring diffusion parameters in the brain: comparing the real-time iontophoretic method and diffusion-weighted magnetic resonance[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2009, 195(1): 101 – 110.
- [29] Zhai H, Heppner FL, Tsirka SE. Microglia/macrophages promote glioma progression [J]. *Glia*, 2011, 59(3): 472 – 485.
- [30] Beljebbar A, Dukic S, Amharref N, et al. Monitoring of biochemical changes through the c6 gliomas progression and invasion by Fourier transform infrared (FTIR) imaging[J]. *Anal Chem*, 2009, 81(22): 9247 – 9256.
- [31] Netti PA, Hamberg LM, Babich JW, et al. Enhancement of fluid

- filtration across tumor vessels; implication for delivery of macromolecules[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(6): 3137–3142.
- [32] Vargova L, Homola A, Zamecnik J, et al. Diffusion parameters of the extracellular space in human gliomas[J]. *Glia*, 2003, 42(1): 77–88.
- [33] Pluen A, Boucher Y, Ramanujan S, et al. Role of tumor-host interactions in interstitial diffusion of macromolecules; cranial vs. subcutaneous tumors[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(8): 4628–4633.
- [34] Dityatev A, Seidenbecher CI, Schachner M. Compartmentalization from the outside: the extracellular matrix and functional microdomains in the brain [J]. *Trends Neurosci*, 2010, 33(11): 503–512.
- [35] Sykova E, Nicholson C. Diffusion in brain extracellular space [J]. *Physiol Rev*, 2008, 88(4): 1277–1340.
- [36] Zamecnik J. The extracellular space and matrix of gliomas[J]. *Acta Neuropathol*, 2005, 110(5): 435–442.
- [37] Alvarez-Dolado M, Gonzalez-Sancho JM, Navarro-Yubero C, et al. Retinoic acid and 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibit tenascin-C expression in rat glioma C6 cells[J]. *J Neurosci Res*, 1999, 58(2): 293–300.
- [38] Herold-Mende C, Mueller MM, Bonsanto MM, et al. Clinical impact and functional aspects of tenascin-C expression during glioma progression[J]. *Int J Cancer*, 2002, 98(3): 362–369.
- [39] Mammoto T, Jiang A, Jiang E, et al. Role of collagen matrix in tumor angiogenesis and glioblastoma multiforme progression[J]. *Am J Pathol*, 2013, 183(4): 1293–1305.
- [40] Noreen R, Chien CC, Chen HH, et al. FTIR spectro-imaging of collagen scaffold formation during glioma tumor development[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(27): 8729–8736.
- [41] Verkman AS. Diffusion in the extracellular space in brain and tumors[J]. *Phys Biol*, 2013, 10(4): 045003.
- [42] Nicholson C, Sykova E. Extracellular space structure revealed by diffusion analysis [J]. *Trends Neurosci*, 1998, 21(5): 207–215.
- [43] Gladson CL. The extracellular matrix of gliomas; modulation of cell function[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1999, 58(10): 1029–1040.
- [44] Cuccurullo V, Mansi L. AJCC Cancer Staging Handbook; from the AJCC Cancer Staging Manual (7th edition) [J]. *E J Nucl Med Mol Imag*, 2011, 38(2): 408–408.
- [45] Webber C, Gospodarowicz M, Sobin LH, et al. Improving the TNM classification; findings from a 10-year continuous literature review[J]. *Int J Cancer*, 2014, 135(2): 371–378.
- [46] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system[J]. *Acta Neuropathol*, 2007, 114(2): 97–109.
- [47] Jovcevska I, Kocivar N, Komel R. Glioma and glioblastoma - how much do we (not) know? [J]. *Mol Clin Oncol*, 2013, 1(6): 935–941.
- [48] Zimmerman RA. Imaging of adult central nervous system primary malignant gliomas. Staging and follow-up[J]. *Cancer*, 1991, 67(4 Suppl): 1278–1283.

〔修回日期〕2014-10-13