中空纤维测定法在胃癌临床前药效研究中的应用

白吉明[1],张 勃[2],李建华[1],王 翔[1],侯志伟[1]
(1.承德医学院第二临床医院承德市中心医院肿瘤科,河北 承德 067000;
2.承德医学院附属医院呼吸科,河北 承德 067000)

摘要:目的 探讨中空纤维测定法在胃癌临床前药效研究中的应用。**方法** 将胃癌细胞株SNU-16、SNU-484、SNU-668分别通过中空纤维管移植于裸鼠的皮下和腹腔,随后用标准的抗癌药物紫杉醇制剂给予治疗,将每个细胞株的中空纤维的活性与异种移植物的活性进行比较。**结果** 使用优化的接种密度和时间表,紫杉醇治疗在胃癌细胞株SNU-16和SNU-484有效,经紫杉醇处理后的SNU-16和SNU-484胃癌细胞株减少大于50%,但在SNU-668无效。与中空纤维测定结果一致,胃癌细胞株SNU-16和SNU-484在异种移植模型中紫杉醇治疗后也表现出肿瘤消退。**结论** 本实验研究表明中空纤维测定法对于筛选具有抗胃癌活性的小分子物质是有效的。

关键词:中空纤维测定法;异种移植模型抗肿瘤试验;胃癌
中图分类号:R96 **文献标识码:**A DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2019.07.027
文章编号:1006-1959(2019)07-0093-04

Application of Hollow Fiber Assay in Preclinical Efficacy Study of Gastric Cancer

BAI Ji-ming[1],ZHANG Bo[2],LI Jian-hua[1],WANG Xiang[1],HOU Zhi-wei[1]
(1.Department of Oncology,Chengde Central Hospital,the Second Clinical Hospital,Chengde Medical College, Chengde 067000,Hebei,China;
2.Department of Respiratory,Affiliated Hospital of Chengde Medical College,Chengde 067000,Hebei, China)

Abstract: **Objective** To investigate the application of hollow fiber assay in the study of preclinical efficacy of gastric cancer. **Methods** Gastric cancer cell lines SNU-16, SNU-484 and SNU-668 were transplanted into the subcutaneous and peritoneal cavity of nude mice through hollow fiber tubes, respectively, and then treated with the standard anticancer drug paclitaxel. The hollow fibers of each cell line were treated. The activity was compared to the activity of the xenograft. **Results** Using optimized seeding density and schedule, paclitaxel treatment was effective in gastric cancer cell lines SNU-16 and SNU-484, and the SNU-16 and SNU-484 gastric cancer cell lines treated with paclitaxel were reduced by more than 50%, but at SNU-668 invalid. Consistent with the results of hollow fiber assays, gastric cancer cell lines SNU-16 and SNU-484 also showed tumor regression after paclitaxel treatment in a xenograft model. **Conclusion** This experimental study shows that the hollow fiber assay is effective for screening small molecules with anti-gastric cancer activity.

Key words: Hollow fiber assay;Xenograft model anti-tumor test;Gastric cancer

近年来人类癌细胞株的一些临床前体外和体内肿瘤模型被广泛应用于开发和评价新的抗癌药物。但研究显示体外肿瘤模型不能完全复制复杂的肿瘤微环境以及药物在体内的药代动力学,在体外筛选之后仍需进行体内试验筛选[1]。中空纤维测定法,最初是由美国国家癌症研究所(NCI)开发,以促进药物的筛选和开发,用于在异种移植之前对有机小分子的体内活性特征进行测试[2]。中空纤维测定法是基于对中空纤维渗透物质的分子量<500 KD的哺乳动物细胞的培养技术,然后将纤维植入小鼠的不同部位。植入体内后,待测化合物按一定的时间间隔和剂量给药,然后从小鼠体内取出纤维,再对纤维内细胞进行细胞学分析,即可初步获得化合物的体内活性数据[3]。本研究主要探讨中空纤维测定法在胃癌细胞株模型中的应用价值。

1 材料和方法

1.1 小鼠 选择7周龄的雌性裸小鼠Balb/C(nu/nu)和非肥胖型糖尿病/重症联合免疫缺陷(NOD/SCID)小鼠18只,所有小鼠由上海斯莱克实验动物有限公司提供。置于室温环境(22~26℃),每6个小鼠一组,共三组,每组均给与12 h的光/暗循环。中空纤维测定法、异种移植测定法各6只,设为紫杉醇组,余6只小鼠设为对照组,在预定的时间将小鼠采取颈椎脱位法处死。

1.2 细胞株 人胃癌细胞株SNU-16、SNU-484和SNU-668从广州吉妮欧生物科技有限公司购买。所有的癌细胞株均由含有10%胎牛血清的RPMI1640(韩国)培养基培养,选用单层培养,温度保持在37℃,置于含5% CO_2 的湿润环境。

1.3 药物 抗肿瘤药物紫杉醇(CAS号:33,069-62-4,规格:20 mg/瓶)购买自上海吉至生化科技有限公司;黄酮类抗肿瘤药物(CAS号:146426-40-6 规格:10 mg)购买自厦门研科生物技术有限公司,将药物溶于10%二甲基亚砜(DMSO)中,中空纤维测定法小鼠每天接受4次腹腔内注射紫杉醇(30 mg/kg)或黄酮类抗肿瘤药物(5 mg/kg);异种移植物测定法小鼠每天接受5次腹腔内注射紫杉醇(30 mg/kg)或黄酮类抗肿瘤药物(5 mg/kg)。对照组的小鼠给予腹腔内注射含10% DMSO的生理盐水。EW7197是一个新的小分子有机化合物,口服剂量为40 mg/kg,采用灌胃法。中空纤维测定法4次/d;异种移植物测定法5次/d。

作者简介:白吉明(1984.1-),男,山西吕梁人,硕士研究生,主治医师,主要从事胃肠道肿瘤、乳腺、甲状腺肿瘤外科的研究

1.4 中空纤维测定法 每个小鼠接受 3 个含聚偏二氟乙烯(PVDF)的中空纤维(上海摩速科学器材有限公司),分别置入皮下或腹腔。紫杉醇组给予 3 只小鼠;对照组给予 3 只小鼠。具体方法:将具有 1.0 mm 内径和截留分子量为 500 KDa 的中空纤维单独冲洗后在 70%乙醇的室温下培养,至少放置 72 h。将纤维用去离子水冲洗,高压灭菌,再用含 20%胎牛血清的 RPMI 1640 液进行冲洗。细胞株用胰蛋白酶/乙二胺乙酸培养,通过离心沉淀,使其重新悬浮在条件培养基,并用含有 20%胎牛血清的 RPMI1640 液稀释 10 倍。将细胞悬浮液用 20 号针头填充于纤维。每个纤维管沿其长轴每 2 cm 进行夹闭后热封闭。每个样品需要培养 24~72 h,具体时间主要取决于每个纤维中的细胞株在 37℃,5%的 CO_2 环境中的生长速度。最佳的细胞悬浮密度表示在试验期间纤维中的每个细胞株的生长的线性关系,见表 1。

表 1 接种密度和时间表

细胞株	细胞密度(细胞/ml)	时间表(植入纤维后)			
		准备	植入	药物处理	收获
SNU-16	$1×10^6$	-1 d	0 d	4~7 d	8 d
SNU-484	$1×10^6$	-3 d	0 d	4~7 d	8 d
SNU-668	$1×10^6$	-3 d	0 d	4~7 d	8 d
HepG2	$5×10^6$	-2 d	0 d	3~6 d	7 d
HepG3B	$3×10^6$	-1 d	0 d	3~6 d	7 d
SK-Hep-1	$2×10^6$	-2 d	0 d	3~6 d	7 d

在异氟醚麻醉下将培养合格的含胃癌细胞株的纤维植入 7~10 周龄的雌性裸小鼠 Balb/C(nu/nu),三个皮下纤维包含三个胃癌细胞株。在裸鼠的颈背部做皮肤切口,通过套管针将三个皮下纤维通过该切口植入。三个腹膜腔纤维含有三个胃癌细胞株,通过腹壁切口按头尾方向插入相同小鼠的腹膜腔。腹壁切口用两层缝合线进行缝合。以植入第 5 天的纤维中的活细胞量来确定细胞株的生长潜力。同时准备好立体对照纤维,在试验过程中将其培养在相同的介质。

根据植入纤维后的细胞株的生长情况,在植入纤维后的 3~4 d 给予药物处理,1 次/d,连续 4 d,最后 1 次给药后将小鼠处死。用 MTT(3-[4,5-二甲基噻唑-2]-2,5-二苯基四氮唑溴盐)染料转换法进行测定,确定纤维中有活性的细胞数。试验组和对照组小鼠中空纤维活细胞数的变化代表待测试剂中空纤维的活性。

分别通过灌胃和腹腔注射给药法用人胃癌细胞株 SNU-16 测试了两种化合物 EW7197 和黄酮类抗肿瘤药物,确定中空纤维的条件是否进行了优化。

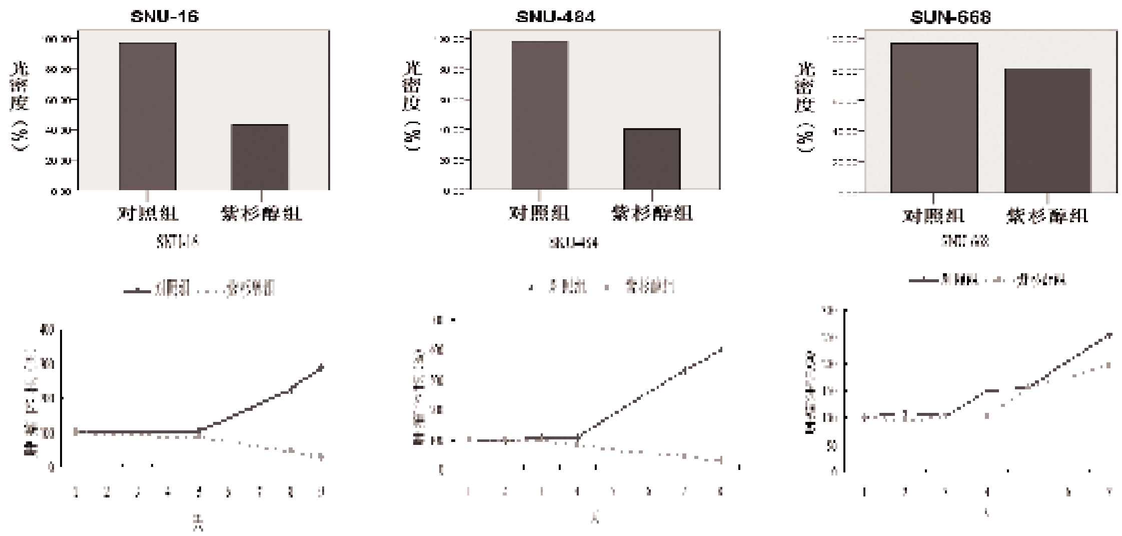
1.5 异种移植试验 癌细胞株(每 100 μl 的无血清 RPMI 液中含有 107 个细胞)和等量的基质胶(上海浩然生物技术有限公司)混合后注入 NOD/SCID 小鼠的皮下组织。形成肿瘤之后,将其分割成 3 mm 的组织切片,序贯植入更大数量的 NOD/SCID 小鼠的皮下组织,用于对药品异种移植活性的检测。肿瘤体积 $V=1/2×a×b^2$,其中 a 和 b 分别是肿块的最长和最短直径[5](单位为 mm)。当肿瘤体积达到 100 mm^3 时,将小鼠体内类似大小的肿瘤用 SPSS17.0 软件生成随机数字进行分期。之后均连续 5 d 给予相同剂量的处理,后续处理同中空纤维测定法。肿瘤对药物的反应通过治疗组肿瘤的平均体积/对照组肿瘤的平均体积(T/C%)来进行评价,如果肿瘤呈回归模型,T/C%的值为测量日治疗组肿瘤体积的中位数下降的百分数是相对于基线体积的,在治疗的最初 7 d,T/C%的最小值用来量化每个细胞株中药物的异种移植活性。由于纤维中的每个细胞株的增长潜力存在差异,因此需要确定适当的密度来保证试验期间纤维的持续增长。

1.6 统计学分析 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,不成对资料采用双尾 Student's *t* 检验,中空纤维和异种移植活性间的关系采用 Pearson 相关性分析。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 中空纤维和异种移植法对胃癌的测定结果 在生理盐水治疗组的小鼠,第 7 天和第 8 天纤维中的活细胞数量比第 5 天显著增加。图 1 表示中空纤维和异种移植法对胃癌的测定结果。经紫杉醇治疗后,小鼠腹腔中空纤维内的 SNU-16 和 SNU-484 与活细胞团块比较减少明显大于 50%。

2.2 胃癌细胞株经腹腔和皮下注射的中空纤维活性与异种移植活性比较 所有的细胞株都很容易在 NOD/SCID 小鼠的皮下侧面组织形成异种移植肿瘤。经紫杉醇治疗后,SNU-16 和 SNU-484 细胞株未显示出明显的肿瘤消退,其阳性异种移植活性分别为-60%和-70%。表 2 显示的是中空纤维测定法和异种移植测定的相关性,与腹腔中空纤维测定结果一致,经紫杉醇治疗后,SNU-16,SNU-484 均表现出阳性的中空纤维活性,以及有效的肿瘤反应。而 SNU-668 细胞株未表现出显著地异种移植活性。在



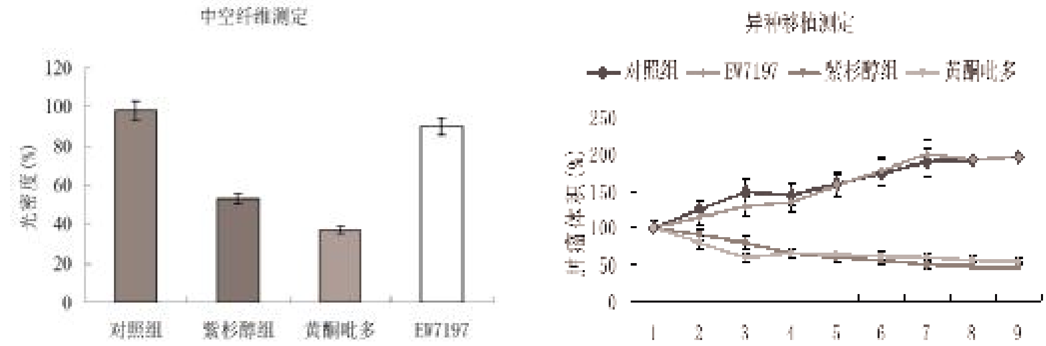
注:柱状图代表中空纤维测定,线型图代表异种移植测定,误差线代表标准差

图 1 紫杉醇在腹腔中空纤维和异种移植瘤的活性

表 2 胃癌细胞株经腹腔和皮下注射的中空纤维活性与异种移植活性比较

项目	SNU-484	SNU-16	SNU-668
腹腔中空纤维活性(减少%)	-69	-53	-12
皮下中空纤维活性(减少%)	-27	-25	-2
异种移植(最佳 T/C%)	-60	-70	76

注:T/C:紫杉醇组/对照组



注:误差线代表标准差

图 2 在胃癌细胞株 SNU-16 中,EW7197 及黄酮类化合物在腹腔内中空纤维及异种移植瘤的活性

胃癌细胞株紫杉醇的异种移植活性与中空纤维活性显示出良好的相关性(r=0.94,P=0.001),见图 2。

3 讨论

在常规的中空纤维筛查中,本研究使用的是 12 种标准的肿瘤细胞株[4],代表 6 种不同的组织学类型，根据其相应的异种移植的预期活性进行选择。这些细胞株包括 NCI-H23 和 NCIH522(非小细胞肺癌);MDA-MB-231 和 MDA-MB-435（乳腺癌);SW-620 和 COLO 205（结肠癌);LOX 和 UACC-62（黑色素瘤);OVCAR-3 和 OVCAR-5（卵巢癌);U251 和 SF-295(胶质瘤)。这些细胞根据其在中空纤维中的生长潜力的不同，密度波动在 2×10^6~10×10^6/ml,将中空纤维插入小鼠的腹腔或皮下组织。在小鼠体内注入试验化合物的其中一个剂量。本研究使用标准的抗癌剂进行验证,与对照组比较,这些药物在中空纤维的活性明显增加。由于其广泛的抗癌活性,紫杉醇作为阳性对照应用于中空纤维测定[5]。与对照组比较,如果 50%以上的缩小,则认为试验化合物有效。在后续的异种移植试验显示该化合物在中空纤维有明显的活性。

研究显示，与对照组比较，经紫杉醇处理后的 SNU-16 和 SNU-484 胃癌细胞株减少大于 50%。这些细胞形成裸鼠移植瘤模型，紫杉醇在这些细胞中的异种移植活性与中空纤维的活性表现出良好的相关性。简单地说,SNU-16 生长成为漂浮的细胞同时含有 MYC 基因的扩增,SNU-484 生长成为单层并且含有突变型的 p53。

EW7197 是另外一个小的有机化合物，和黄酮类抗肿瘤药物一起用于对中空纤维测定法的校验[6]。EW7197 是一种 2-吡啶基取代的咪唑，是 ALK5 抑

制剂，用于肿瘤转移的靶向治疗。由于 EW7197 可以抑制转化生长因子-β 信号转导通路，故在中空纤维中不会表现任何活性。与此相反，黄酮类抗肿瘤药物[7]是细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂，靶向抑制肿瘤细胞增殖，由于其显著的抗肿瘤活性，作为阳性对照应用于中空纤维测定法。在生物学有效剂量内，EW7197 在 SUN-16 细胞株中并不表现任何中空纤维活性，也不表现出异种移植活性，而黄酮类抗肿瘤药物在 SUN-16 细胞株则表现出显著的中空纤维活性剂异种移植活性。这表明胃癌中空纤维法是实用且可行的。

本研究显示优化了的中空纤维测定可用于胃癌细胞株，中空纤维测定法可用于新型小分子化合物和紫杉醇疗效的比较，与异种移植实验比较，中空纤维测定法节省时间和资源，同时还可预测待测小分子的异种移植活性。因此，中空纤维测定法可用于筛选与胃癌有关的小分子化合物。尽管胃癌是目前世界范围内最常见的恶性肿瘤，也是癌症相关死亡的主要原因，但标准的中空纤维测定板并未包括该疾病。我们采用良好特征的胃癌细胞株为该实验建立了最佳的条件。中空纤维测定活性与异种移植物活性有较高的相关性，因此，中空纤维测定法可用于筛选与胃癌有关的小分子化合物。

参考文献：

[1]石然，徐铭恩，周青青，等.基于细胞 3D 打印技术的体外肿瘤模型构建研究[J].中国生物医学工程学报，2015，34(5):618-622.

[2]邓晶晶，纪圣君，陈烨.应用中空纤维测定法评价藤甲酰苷对人癌细胞生长的抑制作用[J].药学实践杂志，2014，32(4):266-269.

[3]赵敏，师霞.黄芪对急性呼吸窘迫综合征大鼠模型肺组织中 SP-A 的影响[J].中国临床研究，2013，5(8):1-3.

[4]张映城，颜兵，施俊，等.胃癌细胞中 CD44 阳性细胞具有肿瘤干细胞特征[J].中国肿瘤生物治疗杂志，2016，23(4):492-497.

[5]戚欣，张琳，李静.中空纤维法在昆明小鼠中应用——一种体内抗肿瘤药物筛选技术[J].中国海洋药物，2013，32(4):29-34.

[6]Son JY，Park SY，Kim SJ，et al.EW-7197，A Novel ALK-5 Kinase Inhibitor，Potently Inhibits Breast to Lung Metastasis.Mol Cancer Ther，2014，13(7)1:1704-1716.

[7]王丽萍，王新春.黄酮类化合物的代谢研究进展[J].中国实验方剂学杂志，2014，20(11):234-237.

收稿日期：2019-1-19；修回日期：2019-2-13
编辑/肖婷婷