中空纤维测试法结合细胞光学成像：抗肿瘤药物活性评估和靶标验证

简介

体外先导化合物的体内活性评估是当前化学治疗药物研发的主要难点之一，传统的评估方法是将肿瘤细胞移植到免疫缺陷型宿主动物，然后测量形成肿瘤的大小，该方法可体现肿瘤细胞与宿主动物之间的相互作用，且测量过程无侵害性，有利于进行进一步的纵向研究，但是肿瘤生长至可测量尺寸需要较长时间，而某些人源性肿瘤细胞系在动物模型中亦无肿瘤源性。

近来，整合有生物荧光报告载体的基因工程肿瘤细胞系及新型光学成像技术的出现，使对移植瘤的测量可在其未明显成形时即可进行，而如加入特定转录因子的反应元件，则可进一步监测由该转录因子调节的信号通路，也可通过基因工程技术使荧光蛋白直接对特定分子过程起反应，该类技术大大增强了对肿瘤形成及演化过程中信号通路的“非侵入式”分子成像监测能力。

体内中空纤维测试法（HFA）是由美国国家肿瘤研究所研制的一种抗肿瘤药物体内活性预筛选技术，操作时，将肿瘤细胞封装入半透性中空纤维膜内腔，然后再将纤维植入实验动物皮下或腹膜，对实验动物进行给药处理后，取出纤维，测试细胞活性（MTT 实验），也可进行流式细胞、组织学及 Western Blot 分析。中空纤维测试法随不能完全替代移植瘤模型，因传统认为其不能完整体现宿主动物体内肿瘤细胞生长及其与宿主组织之间的复杂互作过程，且肿瘤的生长受纤维的“几何空间”限制，但与移植瘤技术相比，其仍具有诸多优势：1）回收细胞不受宿主细胞“污染”，有利后续分析；2）评估时间缩短，减少待测化合物用量；3）植入量或宿主动物体重无显著变化；4）无细胞类型限制，即可评估无肿瘤源性细胞；5）可进行“多重”分析，单个动物可植入多根纤维，每根纤维可含不同类型细胞，即可同时评估某一化合物对多种细胞系的体内活性。

本文旨在将体内中空纤维测试法与体内细胞成像技术相结合，从而快速、准确评估抗肿瘤药物的体内活性。实验显示，纤维内肿瘤细胞与周围宿主组织存在相互作用，且用药后可立即评估药物对肿瘤细胞的影响，而肿瘤细胞内特定信号通路的激活也可通过该技术研究。

实验

实验使用多烯紫杉醇及伊立替康为模式药物，MAT B III 大鼠乳腺癌细胞及 MCF7 乳腺癌细胞为测试细胞，并经质粒转染，使其高表达荧光素酶。

HFA 实验使用改良聚偏氟乙烯（mPVDF）中空纤维，纤维外径 1.2mm、内径 1mm、MWCO 500kD，装入细胞，每个 1.5cm 热密封，在热密封处剪断。内含细胞的中空纤维在 6 孔板内培养 24h 后，使用 11G 套管针从颈部切口植入裸鼠皮下。实验同时建立皮下移植瘤模型，作为对照。

实验使用近红外荧光标记血池探针结合荧光成像系统监测植入中空纤维裸鼠体内的血管生成情况，同时通过免疫组织化学检测 CD31 表达。

未评估抗肿瘤药物多烯紫杉醇和伊立替康的体内活性，对植入含肿瘤细胞中空纤维的裸鼠进行给药处理，腹腔注射 D-荧光素 15min 后，每隔 5min 采集荧光图像并分析。此外，为研究体内核因子κB（NFκB）激活，裸鼠腹腔注射脂多糖（LPS）或肿瘤坏死因子α（TNF-α），并于 D-荧光素注射后获取荧光图像。

结果

实验检测了体外/内中空纤维内的肿瘤细胞增殖，发现生物荧光强度与细胞数量线性相关，且纤维体内注入一周后，纤维内细胞快速增殖，与移植瘤生长

速度相当。如以实验肿瘤细胞系为例，HFA 可用于监测纤维植入 10d 内的肿瘤细胞生长，而在移植瘤模型中，此时肿瘤尺寸尚不可测量。

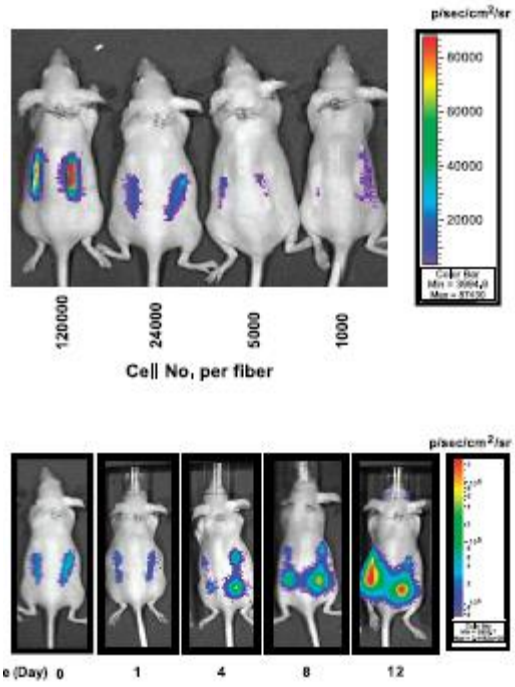

图 1. 中空纤维内的肿瘤细胞增殖。A）植入不同肿瘤细胞数量的裸鼠生物荧光成像； B）单个裸鼠植入肿瘤细胞后的生物荧光时间变化图像；

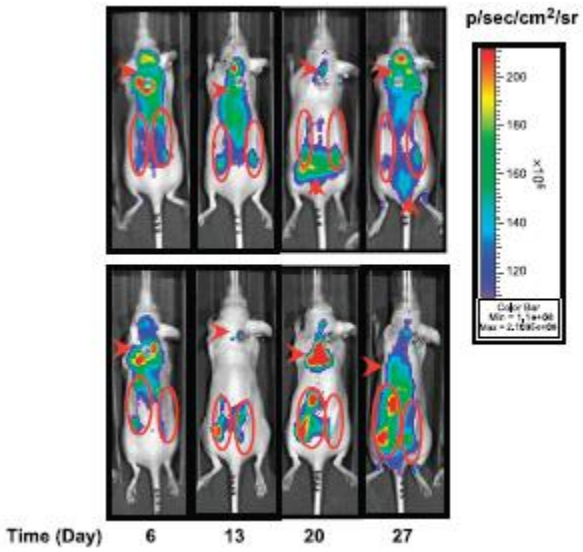

图 2. 静脉注射血池探针后 24h 的荧光图像。

尽管 HFA 不能完整体现肿瘤细胞与宿主组织之间的相互作用，但某些过程也可以此检测。实验检测了中空纤维植入部位邻近组织的血管生成情况。结果显示，植入后 6d 起，可检测到荧光信号，但之后，植入无细胞纤维对照组的信号逐渐降低，而植入含细胞纤维实验组的信号可继续维持两周，同时免疫组织化学分析显示纤维外具有较强的 CD31 免疫反应。

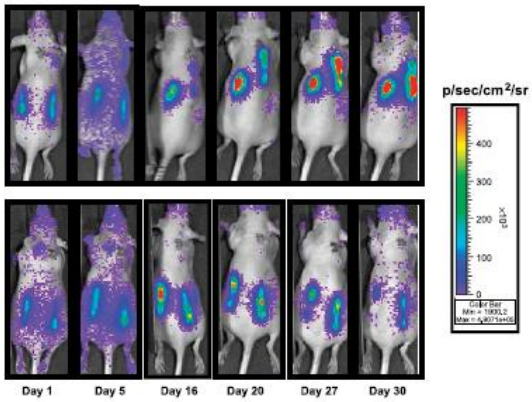

图 3. 多烯紫杉醇和伊立替康给药后荧光变化图。

实验使用两种商品化抗肿瘤药物作为 HFA 模式药物，结果显示，在植入 MAT III 细胞的实验中，两者均可抑制中空纤维内肿瘤细胞的增殖，且生物荧光成像检测显示，用药后 12d，细胞数量降低约 50%。而在 MCF7 细胞实验中，以获得相似结果。

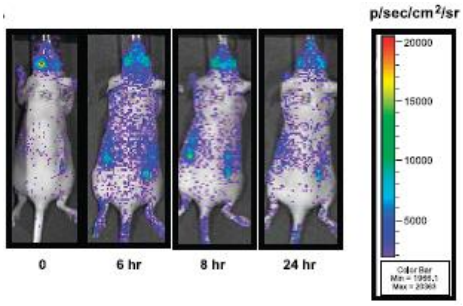

图 4. LPS 给药前后生物荧光变化图。

此外，在使用体内中空纤维/光学报告细胞系模型检测化合物对特定信号通路作用的实验中，构建了报告转录因子 NFκB 活性的细胞（稳定转染 NFκB 反应元件驱动性荧光素酶）。裸鼠腹腔注射 LPS 后成像检测，结果显示 LPS 注射后，NFκB 报告细胞生物荧光显著增强。实验同时使用 TNF-α进行验证，获得相似结果。

讨论

HFA 操作步骤包括短期体外细胞培养、纤维体内植入及短期药物体内效力评估，后续研究需从小鼠体内取出纤维。本文将此方法与光学成像技术相结合，从而提供了一种以 HFA 为基础的非侵害式体内肿瘤细胞生长评估方法。

中空纤维光学成像可对肿瘤细胞进行中期（持续数周）评估，在此期间，纤维内肿瘤细胞可与宿主组织相互作用，这点可由纤维周围组织内的血管生成进行验证，光学成像和组织学研究都观察到了相同的结果，其原因可能是肿瘤细胞分泌了促血管生成因子，后者从纤维内渗出，从而促进新血管形成，而血管生成又为纤维内细胞补给氧和营养物质，维持其生长和增殖。

中空纤维体内成像技术可用于新型抗肿瘤药物的快速、精确筛选，与传统移植瘤模型相比，非侵害式生物荧光成像技术可对纤维植入后数天内的细胞增殖情况进行监测。实验使用多烯紫杉醇伊立替康对该模型进行了验证，结果显示，给药后 4d 即可显著抑制纤维内肿瘤细胞的生长。此外，所用纤维的 MWCO 为 500kD，所以该技术可推广用于评估其它小分子、抗体或 siRNA 治疗的效力。

同时，实验通过评估 NFκB 信号，证实 HFA 可用于研究细胞内分子途径。与在正常小鼠组织内检测 NFκB 活性的转基因小鼠模型相比，HFA 可在人及小鼠/大鼠肿瘤细胞内快速评估 NFκB 活性，即该模型可用于测试 NFκB 抑制剂，如小分子或多肽。同理，如制备整合其它通路依赖性光学报告基因的细胞系，即可使用 HFA 模型对分子通路进行监测。

综上所述，对含有表达光学信号基因肿瘤细胞的中空纤维进行体内成像，可对抗肿瘤药物进行初步体内活性筛选，该技术无需等待肿瘤成形，可回收未被宿主细胞“污染”的肿瘤细胞以进行进一步分析，且无细胞类型限制。构建可表达光学报告基因的肿瘤细胞，方便了细胞植入后的非侵害式、可重复成像监测，也可用于监测特定分子通路，而一个实验动物可植入数根纤维，即可平行研究化合物对数个通路的选择性作用。

文献来源：

Zhang, G., Chen, T., Bednar B., et al., Optical Imaging of Tumor Cells in Hollow Fibers: Evaluation of the Antitumor Activities of Anticancer Drugs and Target Validation. Neoplasia, 2007, 9(8):652-661.