

力达霉素抑制人纤维肉瘤肺转移的裸鼠活体成像观察

张胜华¹, 钟根深², 何红伟¹, 程 昕³, 甄永苏^{1*}

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050;

2. 新乡医学院第一附属医院神经病学研究所, 河南 新乡 453003;

3. 中国医学科学院、北京协和医学院血液学研究所血液病医院实验血液学国家重点实验室, 天津 300020)

摘要: 观察力达霉素 (LDM)、LDM 与甲氨蝶呤 (MTX) 联合用药对人纤维肉瘤 HT-1080^{LUC} 实验性肺转移的抑制作用。构建稳定表达荧光素酶的 HT-1080 细胞株并扩增培养, 检测 HT-1080^{LUC} 细胞的荧光素酶的表达。建立裸鼠人纤维肉瘤 HT-1080^{LUC} 实验性肺转移模型, 并采用活体动物成像系统监测肿瘤的生长情况, 观察 LDM 和 MTX 的体内抗肺转移瘤活性。结果表明, HT-1080^{LUC} 细胞荧光光子量与细胞数呈线性相关, 最小可检测的细胞数量为 100 个/孔。活体成像结果显示, 治疗组裸鼠的肺部荧光强度较对照组明显减弱。单独给予 LDM 0.025 mg·kg⁻¹、LDM 0.05 mg·kg⁻¹ 或 MTX 0.5 mg·kg⁻¹ 的肺转移抑制率分别为 53.9%、75.9% 和 70.2%; LDM 0.025 mg·kg⁻¹ 与 MTX 0.5 mg·kg⁻¹ 联合应用的肺转移抑制率为 88.7%, 两药相互作用指数 CDI = 0.82。研究表明, LDM 对人纤维肉瘤肺转移有明显抑制作用, 与 MTX 联合用药对肺转移瘤的疗效明显优于单独给药。

关键词: 力达霉素; 甲氨蝶呤; 人纤维肉瘤 HT-1080^{LUC} 细胞; 实验性肺转移; 肿瘤联合化疗

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 01-0045-05

Bioluminescence imaging evaluation of the inhibitory effect of lidamycin on lung metastasis of human fibrosarcoma in athymic mice

ZHANG Sheng-hua¹, ZHONG Gen-shen², HE Hong-wei¹, CHENG Xin³, ZHEN Yong-su^{1*}

(1. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050,

China; 2. Institute of Neurology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China;

3. State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology & Hospital of Blood Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

Abstract: This study is to investigate the inhibitory effect of lidamycin (LDM) and its combination with methotrexate (MTX) on lung metastasis of fibrosarcoma by bioluminescence imaging in athymic mice. A stable luciferase transfected HT-1080 cell line was constructed and the capability to establish experimental lung metastasis in athymic mice was confirmed. The optical imaging system was applied to evaluate the formation of lung metastasis *in vivo*. In addition, metastatic nodules were counted for the evaluation of inhibition rates. As shown, the fluorescent intensity of luciferase-transfected HT-1080 cells was colinear with the cell population and the minimal detected cell population was 100 cells/well. Optical imaging showed that the fluorescent intensity of treated group was apparently lower than that of the control. The inhibition rates of lung metastasis by LDM alone at 0.025 mg·kg⁻¹ and 0.05 mg·kg⁻¹ were 53.9% and 75.9%, respectively, while that of MTX alone at 0.5 mg·kg⁻¹ was 70.2%. The combination of LDM at 0.025 mg·kg⁻¹ and MTX at 0.5 mg·kg⁻¹ showed an

收稿日期: 2010-08-12.

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2008ZX09101-013, 2009ZX09301-003).

*通讯作者 Tel: 86-10-83158065, Fax: 86-10-63131808, E-mail: zhenys@public.bta.net.cn

inhibition rate of 88.7%. The coefficient of drug interaction (CDI) was 0.82. The results herein demonstrated that LDM alone had strong anti-metastasis effect on human fibrosarcoma HT-1080 and the inhibition efficacy is strengthened when combined with MTX.

Key words: lidamycin; methotrexate; human fibrosarcoma HT-1080^{LUC} cell; experimental lung metastasis; tumor combination chemotherapy

力达霉素 (lidamycin, LDM) 是从我国湖北省潜江县土壤中分离得到的一株链霉菌 (*Streptomyces globisporus* C-1027) 代谢产物中筛选得到的一种烯二炔类大分子抗肿瘤抗生素^[1]。LDM 对体外培养的多种肿瘤细胞有强烈的杀伤作用, 按 IC₅₀ 值进行比较, 比丝裂霉素和阿霉素强 1 000 倍以上^[2]; 动物体内实验表明, LDM 对一些小鼠移植性肿瘤如白血病 L1210、肝癌 22、结肠癌 26、肉瘤 S180、移植于裸鼠的人肝癌 Bel-7402 和胃癌 BGC823 等均有显著疗效^[3-6]; 实验研究表明, 多药耐药细胞对 LDM 仍高度敏感, 未显示抗药性^[7]。此外, 对小鼠 Lewis 癌肺转移也有明显的抑制作用^[8]。

肿瘤转移相关动物模型受到体内检测困难的限制, 因而体内评价肿瘤转移的方法并不常见。活体动物体内光学成像系统可以观测活体动物体内肿瘤的生长及转移、感染性疾病发展过程、特定基因的表达等生物学过程^[9]。将肿瘤细胞标记荧光素酶 (fire fly luciferase) 后, 通过活体动物体内光学成像检测, 可以直接观测转移灶的生长过程^[10]。该方法具有操作简单、所得结果直观、灵敏度高等特点。

本研究选用荧光素酶标记的人纤维肉瘤 HT-1080 细胞株 (HT-1080^{LUC}), 观察 LDM 及其与甲氨蝶呤 (methotrexate, MTX) 联合应用治疗对 HT-1080^{LUC} 实验性肺转移的影响, 为 LDM 的临床研究与应用提供实验依据。

材料与方 法

药品及试剂 LDM 由中国医学科学院医药生物技术研究所金莲舫教授提供; 甲氨蝶呤 (MTX) 为上海华联制药有限公司产品。新生牛血清为 Hyclone 产品; RPMI-1640 和胰酶为 Gibco 产品。

实验仪器 显微镜和图像处理系统购于德国 Leica 公司; 活体成像系统 (IVIS 200) 购于美国 Xenogen 公司。

实验动物和细胞系 BALB/c (*nu/nu*) 雌性裸鼠, 6~8 周龄, 体重 18~22 g, SPF 级, 购自北京维通利华实验动物中心, 动物合格证号: SCXK (京) 2007-0001。

人纤维肉瘤细胞株 HT-1080 购于美国 ATCC, 中国医学科学院医药生物技术研究所肿瘤室保种, 培养于含 10% 新生牛血清的 RPMI-1640 培养液中, 常规传代培养。

稳定表达荧光素酶的 HT-1080 细胞株的构建

含荧光素酶报告基因质粒 pGL4.17/HT-1080 细胞的转染 用脂质体法将 pGL4.17 转染 HT-1080 细胞, 参照 Invitrogen 公司 Lipofectamine 2000 说明书进行: ① 取对数生长期的 HT-1080 细胞铺 6 孔板 24 h, 至汇合度 60%~80%; ② 取 Opti-MEM I 250 μ L, 加入 pGL4.17 质粒 1 μ g, 混匀。另取 Opti-MEM I 250 μ L, 加入脂质体 2 μ L, 混匀, 室温放置 5 min。5 min 后将脂质体和质粒 DNA 两两混合, 轻轻混匀后室温放置 20 min, 同时将细胞的旧培养液换为 Opti-MEM I 500 μ L; ③ 将脂质体-DNA 复合物 500 μ L 加入细胞中, 轻轻混匀; ④ 37 $^{\circ}$ C 培养 4~6 h 后, 将上述复合物吸出, 然后每孔加入含 10% FBS 的 MEM 2 mL; ⑤ 48 h 后, 将细胞铺于 96 孔板, 同时加入含 4 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 嘌呤霉素和 10% FBS 的培养液筛选阳性细胞; ⑥ 3 天换一次筛选培养液, 持续筛选 13~15 天后, 可见阳性细胞克隆形成。

转染后阳性克隆的鉴定 在具有阳性细胞单克隆的 96 孔板中加入荧光素 luciferin 至终质量浓度 60 μ g $\cdot$ mL⁻¹, 30 min 内用 Xenogen 活体动物成像系统拍摄, 检测荧光表达强度, 挑选荧光最强的克隆, 扩大培养并冻存。

HT-1080^{LUC} 的荧光素酶的体外检测 将 HT-1080^{LUC} 细胞进行梯度稀释于 96 孔板中, 细胞数分别为 1 000、500、200、100、50 及 media/孔, 加入荧光素酶底物 D-luciferin, 将平板置于检测仪暗箱中检测其发光强度。

动物模型的建立 裸鼠随机分成 5 组, 每组 5 只, 从尾静脉注射 HT-1080^{LUC}, 细胞数为 1×10^6 /只。用 Xenogen 活体动物成像系统将动物于细胞移植后 10、31 天, 通过腹腔注射荧光素酶底物 D-luciferin (150 mg $\cdot$ kg⁻¹) 后, 将动物置于 Xenogen 活体动物成像系统检测仪密闭的暗箱中成像观察肿瘤的生长状况^[11]。接

种后第 31 天结束实验。裸鼠处死后取完整的肺组织, 于 Bouin's 液 (饱和苦味酸 75 mL + 40% 甲醛 25 mL + 冰醋酸 5 mL) 中固定。24 h 后, 正常肺组织呈棕黄色, 而癌灶呈白色隆起。用解剖显微镜观察并记录肺转移灶的数目和大小, 并按转移灶的大小分级。I 级转移灶: 直径小于 0.5 mm; II 级转移灶: 直径 0.5~1 mm; III 级转移灶: 直径 1~2 mm; IV 级转移灶: 直径大于 2 mm。按下面公式计算: 总转移灶数 = I 级转移灶数 + II 级转移灶数 $\times 2$ + III 级转移灶数 $\times 3$ + IV 级转移灶数 $\times 4$ 。由两名研究者独立计数肺表面转移灶, 计算平均值。将肺组织经常规石蜡包埋、切片、HE 染色, 光镜下观察。

动物体内疗效观察 裸鼠从尾静脉注射 HT-1080^{LUC}, 细胞数为 1×10^6 /只。接种后第 10 天将动物随机分为 5 个实验组: 对照组 (生理盐水注射组)、LDM $0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组、LDM $0.025 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、MTX $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组及 LDM $0.025 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 与 MTX $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 联合治疗组。LDM、MTX 尾静脉注射给药, 每周 1 次, 共给药 2 次, 联合治疗组先注射 MTX, 6 h 后再注射 LDM。每组 5 只动物。31 天处死动物, 统计肺表面的转移瘤结节数, 计算抑制率。抑制率 = [(对照组肺表面的转移瘤结节数 - 给药组肺表面的转移瘤结节数)/对照组肺表面的转移瘤结节数] $\times 100\%$ 。

药物联合作用评价 两药相互作用指数 (coefficient of drug interaction, CDI) $\text{CDI} = \text{AB}/(\text{A} \times \text{B})$ 。AB 为两药联合作用组的 T/C 比值, A 和 B 是药物单独作用组的 T/C 比值 (T : 治疗组的结节数; C : 对照组的结节数)。理论上当 $\text{CDI} < 1$ 时两药有协同作用^[12]。

统计学分析 实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $\alpha = 0.05$ 。组间差异显著性分析采用 t 检验。

结果

1 HT-1080^{LUC} 细胞的荧光素酶的表达

HT-1080^{LUC} 稳定表达荧光素酶, 而且生物荧光光子量与细胞数量呈线性相关, 最小可检测的细胞数量为 100 个细胞/孔, 表明 pGL4.17 质粒已稳定转染 HT-1080 细胞 (图 1)。

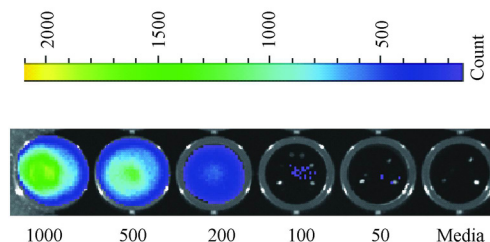


Figure 1 HT-1080^{LUC} bioluminescence was linear correlated with tumor cell number. The luciferase-transfected human fibrosarcoma cells were planted on the 96-well plate and the D-luciferin was added, then the image was captured using the IVIS 200 system. The photon counts of tumor cells are indicated by the color scales

2 活体动物成像系统观察 HT-1080^{LUC} 肺转移灶生长情况

通过活体动物成像系统观察肿瘤的生长情况, 细胞移植后 10 天裸鼠肺部可检测到生物荧光, 表明肿瘤细胞在肺部已形成转移灶 (图 2)。10~31 天对照组裸鼠肺部荧光强度明显增加, 表明肿瘤逐渐增大, 而治疗组裸鼠肺部荧光强度明显减弱, 与对照组比较有明显差异, 两者相差一个数量级以上的荧光光子量。

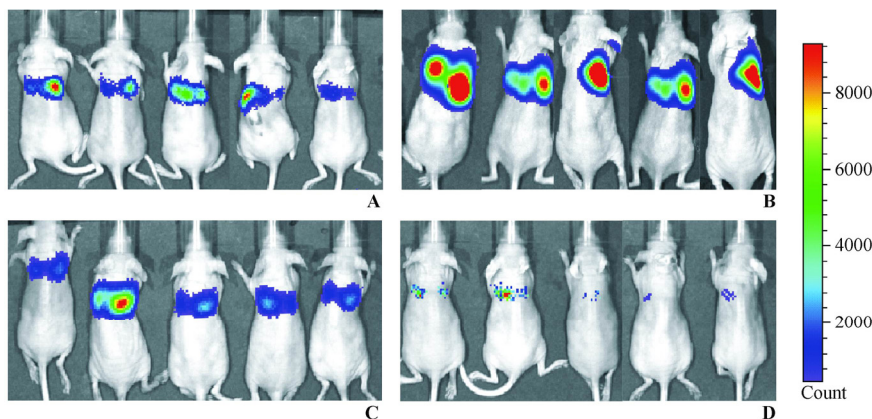


Figure 2 Optical imaging of HT-1080^{LUC} experimental lung metastasis model. Photon emissions of HT-1080^{LUC} cells of the control and the LDM $0.025 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ + MTX $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ treated mice on day 10 and 31. The combination of LDM and MTX significantly inhibited the growth of metastatic nodules. The photon counts of mice are indicated by the color scales. A: Control (10 d); B: Control (31 d); C: LDM $0.025 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ + MTX $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (10 d); D: LDM $0.025 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ + MTX $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (31 d)

3 LDM 与 MTX 联合应用对 HT-1080^{LUC} 实验性肺转移的抑制作用

单独给予 LDM 0.025 mg·kg⁻¹、LDM 0.05 mg·kg⁻¹ 或 MTX 0.5 mg·kg⁻¹ 的肺转移抑制率分别为 53.9%、75.9% 和 70.2%; LDM 0.025 mg·kg⁻¹ 与 MTX 0.5 mg·kg⁻¹ 联合应用的肺转移抑制率为 88.7%, 两药相互作用指数 CDI = 0.82, 表明两药有协同作用 (表 1)。联合用药对肺转移瘤的抑制作用明显优于单独给药 ($P < 0.05$)。联合给药对动物体重无影响。

Table 1 Inhibitory effect of LDM alone and its combination with MTX on lung metastasis of HT-1080^{LUC} in mice. Treatment was started on day 10 after the establishment of experimental lung metastasis model. Drugs were administered iv×2. Lung metastasis were counted on day 31. * $P < 0.05$ vs MTX alone; CDI = 0.82; $n = 5$

Drug	Dose /mg·kg ⁻¹	Body weight change/g	Total metastasis foci	
			$\bar{x} \pm s$	Inhibition /%
Control		+0.49	76.4 ± 14.6	—
LDM	0.025	+0.54	35.2 ± 17.3	53.9
	0.05	-0.02	18.4 ± 12.5	75.9
MTX	0.5	+0.20	22.8 ± 6.0	70.2
LDM + MTX	0.025 + 0.5	-0.13	8.6 ± 3.0*	88.7

4 HT-1080^{LUC} 实验性肺转移病理切片分析

HT-1080^{LUC} 实验性肺转移病理切片观察, 对照组有广泛转移灶, 瘤细胞核膜清晰、核仁明显, 分裂相多见; 联合给药组转移灶减少 (图 3)。

讨论

MTX 是人纤维肉瘤化疗国际上公认的一线治疗

药物, 其作用机制主要是抑制二氢叶酸还原酶而使二氢叶酸不能还原成有生理活性的四氢叶酸, 从而使嘌呤核苷酸和嘧啶核苷酸的生物合成过程中一碳基团的转移过程受阻, 导致 DNA 的生物合成受到抑制。

烯二炔类抗肿瘤抗生素是迄今已知的具有强烈细胞毒作用的抗肿瘤抗生素。LDM 是典型的色素蛋白型烯二炔类抗肿瘤抗生素。LDM 能直接引起 DNA 断裂, 对多种肿瘤细胞的 DNA 合成具有快速、强烈的抑制作用。LDM 破坏 DNA 链状结构的能力主要表现在双链 DNA 断裂、单链 DNA 断裂以及脱碱基断裂。LDM 断裂 DNA 的作用机制主要是 LDM 发色团通过与双螺旋 DNA 分子的小沟结合并嵌入其中, 烯二炔发色团分子结构发生改变, 形成苯环型的双自由基中间体, 双自由基可夺取核苷酸核糖骨架 C-4'、C-1' 和 C-5' 位的氢原子导致 DNA 断裂^[13]。崔大鹏^[14]等用 cDNA 阵列、Northern 杂交、RT-PCR 技术在基因表达水平上研究 LDM 对人结肠癌 HCT-8 细胞侵袭调节基因表达的作用, 结果显示, LDM 可促进 TIMP-1 基因表达, 抑制 MMP-9 表达, 推测 LDM 可能通过抑制 IV 型胶原酶的产生, 同时诱导组织金属蛋白酶抑制因子的产生而表现出抗肿瘤侵袭和转移活性。

临床治疗恶性肿瘤, 采用联合化疗的方法能有效降低毒副作用。本研究将 LDM 与 MTX 联合应用, 体内实验表明有协同抑瘤作用。这可能是 MTX 抑制 DNA 生物合成、LDM 直接引起 DNA 断裂及改变肿瘤侵袭、调节基因表达的共同作用, 从而提高 LDM

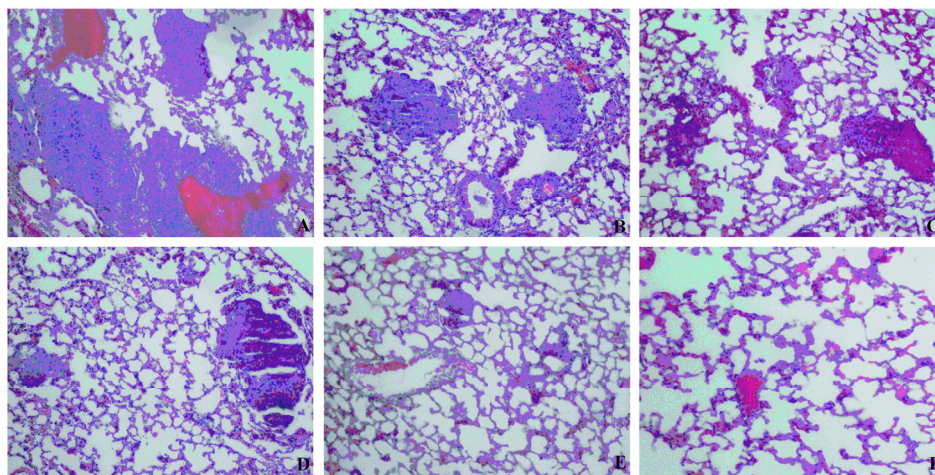


Figure 3 Representative graphs of the pathological examination on different treated groups. Lung histological sections were observed using a Leica microscope, and quantitative analysis was done by using the Leica software system. There were numerous metastatic nodules in the control group, while the number of nodules was significantly reduced in the group of combination. A: Control; B: LDM 0.025 mg·kg⁻¹; C: LDM 0.05 mg·kg⁻¹; D: MTX 0.5 mg·kg⁻¹; E: LDM 0.025 mg·kg⁻¹ + MTX 0.5 mg·kg⁻¹; F: Normal. Magnification, 200×

对 HT-1080^{LUC} 肺转移瘤的抑制作用。

实验性肺转移动物模型, 是目前常用的移植性肿瘤实验模型之一, 与临床手术切除肿瘤后可能的血行转移相似。本研究应用 Xenogen 活体动物成像系统, 观察 HT-1080^{LUC} 实验性肺转移过程, 可以准确地对动物模型的建立、给药时间的确定及治疗过程进行监测。弥补了传统动物模型难以在活体观察肿瘤侵袭转移动态过程的不足。本实验结果表明, LDM 对人纤维肉瘤 HT-1080^{LUC} 肺转移有明显抑制作用, 与 MTX 联合用药可增加疗效, 为 LDM 的临床试验和开发提供了实验依据。

References

- [1] Hu JL, Xue YC, Xie MY, et al. A new macromolecular antitumor antibiotics, C-1027, I. Discovery, taxonomy of producing organism fermentation and biological activity [J]. J Antibiot (Tokyo), 1988, 41: 1575-1579.
- [2] Zhen YS, Ming XY, Yu B, et al. A new macromolecular antitumor antibiotics. C-1027, III. Antitumor activity [J]. J Antibiot (Tokyo), 1989, 42: 1294-1298.
- [3] Xu YJ, Li DD, Zhen YS. Mode of action of C-1027, a new macromolecular antitumor antibiotic with highly potent cytotoxicity, on human hepatoma Bel-7402 cells [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1990, 27: 41-46.
- [4] Jiang B, Li DD, Zhen YS. Induction of apoptosis by enediyne antitumor antibiotic C-1027 in HL-60 human promyelocytic leukemia cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 208: 238-244.
- [5] Sugimoto Y, Otani T, Oier S, et al. Mechanism of action of a new macromolecular antitumor antibiotic, C-1027 [J]. J Antibiot (Tokyo), 1990, 43: 417-421.
- [6] Zhang SH, Chen J, Jiang M, et al. Lidamycin induces apoptosis of human gastric carcinoma BGC823 cells and inhibits xenograft growth in nude mice [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2008, 43: 601-604.
- [7] Shi YK, Wu SY, Huang YH, et al. Chemosensitivity of *mdr1* gene overexpressed multidrug resistant cancer cells to lidamycin [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2006, 41: 1146-1151.
- [8] Zhen HY, Xue YC, Zhen YS. Inhibition of angiogenesis by antitumor antibiotic C1027 and its effect on tumor metastasis [J]. Natl Med J China (中华医学杂志), 1997, 77: 657-660.
- [9] Hilderbrand SA, Weissleder R. Near-infrared fluorescence: application to *in vivo* molecular imaging [J]. Curr Opin Chem Biol, 2010, 14: 71-79.
- [10] Jiang S, Gnanasammandhan MK, Zhang Y. Optical imaging-guided cancer therapy with fluorescent nanoparticles [J]. J R Soc Interface, 2010, 7: 3-18.
- [11] Nishitsuji H, Ikeda T, Miyoshi H, et al. Expression of small hairpin RNA by lentivirus-based vector confers efficient and stable gene-suppression of HIV-1 on human cells including primary non-dividing cells [J]. Microbes Infect, 2004, 6: 76-85.
- [12] Zhang SH, Su J, Zhen YS. Salvianolic acid A inhibits nucleoside transport and potentiates the antitumor activity of chemotherapeutic drugs [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2004, 39: 496-499.
- [13] Sugiura Y, Matsumoto T. Some characteristics of DNA strand scission by macromolecular antitumor antibiotic C-1027 containing a novel enediyne chromophore [J]. Biochemistry, 1993, 32: 5548-5553.
- [14] Cui DP, Wang Z, Li DD. Effect of lidamycin on the expression of genes involved in invasion regulation in HCT-8 human colon cancer cells [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2001, 36: 246-249.