

## · 论著 ·

## 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

邓晶晶, 纪圣君, 陈 焯, 林晓琳, 王 蕊, 徐利锋 (辽宁大学药学院, 辽宁 沈阳 110036)

**[摘要]** 目的 应用中空纤维测定法评价藤甲酰苷(garcinia glycosides, GG)对8种人癌细胞的体内生长的抑制作用,通过裸鼠体内异位移植瘤实验,验证中空纤维测定法在抗肿瘤药效学研究中的可靠性。方法 采用中空纤维测定法,将载有肿瘤细胞的中空纤维管植入NOD/SCID小鼠背部皮下,给药结束后取出中空纤维管,应用二苯基溴化四氮唑蓝(MTT)比色法检测GG对各种肿瘤细胞在体内的抑瘤率;选取HL-60及B16人癌细胞,异位移植于BALB/c裸鼠右下肢外侧皮下,以环磷酰胺(CTX)为阳性对照,各组连续给药10d,于给药结束24h后解剖小鼠,取出瘤块,计算CTX及GG的抑瘤率。结果 应用中空纤维测定法及裸鼠体内异位移植瘤法测得GG高剂量组8mg/(kg·d)、中剂量组4mg/(kg·d)能明显抑制HL-60及B16人癌细胞在裸鼠体内的生长,实验测得结果与溶剂对照组比较,有显著性差异( $P < 0.01$ )。结论 应用中空纤维测定法测定样品GG对肿瘤细胞的生长抑制作用,实验结果与裸鼠体内异位移植瘤实验结果基本一致。该模型节约成本、效率提高、实验结果准确可靠,为GG的后续研究提供了指导和可靠证据。

**[关键词]** 藤甲酰苷; 中空纤维测定法; HL-60; B16; MTT比色法

**[中图分类号]** R979.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2014)04-0266-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2014.04.007

## Evaluation of the inhibitory effect of garcinia glycosides on growth of human tumor cells by hollow fiber assay

DENG Jingjing, JI Shengjun, CHEN Ye, LIN Xiaolin, WANG Rui, XU Lifeng (School of Pharmacy, Liaoning University, Shenyang 110036, China)

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the inhibitory effect of garcinia glycosides on growth of 8 kinds of human tumor cells *in vivo* by hollow fiber assay and confirm the reliability of hollow fiber assay in anticancer effect by the nude mice xenograft test. **Methods** Hollow fibers containing tumor cells were inserted underneath the skin of the NOD/SCID mice. The fibers were collected from the mice on the day after the administration and subjected to the stable endpoint MTT assay. The tumor cells of HL-60 and B16 were subcutaneously implanted into the right flank of BALB/c nude mice. The positive control group was treated with cyclophosphamide. Each group was administered for 10 days. 24 hours after the last administration, the mice were sacrificed and the tumors were excised and weighed, the inhibition rate of tumor growth was calculated. **Results** The high-dose group of 8 mg/(kg·d), middle dose group of 4 mg/(kg·d) of garcinia glycosides were measured by hollow fiber assay and nude mice test significantly inhibited the *in vivo* growth of HL-60 and B16 comparing with those in the solvent control group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** As a new model by hollow fiber assay to evaluate the inhibitory effect of garcinia glycosides, the test results were basically the same with nude mice test results. It made the experiment more rapidly, accurately and economically. An instruction and reliable evidence for follow-up study of garcinia glycosides was provided in this study.

**[Key words]** garcinia glycosides; hollow fiber assay; HL-60; B16; MTT

藤甲酰苷(garcinia glycosides, GG)为藤黄酸类似物,应用二苯基溴化四氮唑蓝(MTT)比色法测定GG对8种人癌细胞的体外作用,GG能明显抑制HL-60及B16人癌细胞的体外生长。根据细胞毒类抗肿瘤药物非临床研究技术指导原则<sup>[1]</sup>要求,经体

外实验初步了解受试物的作用机制、敏感肿瘤类型和作用强度后,需进行动物体内实验。但由于传统的动物体内移植瘤实验对实验动物和待测样品的量、时间及人力的投入都较大,并且某些肿瘤细胞株在动物体内无成瘤性,限制了抗肿瘤药物的筛选和研究进展。因此,本实验采用Hollingshead等<sup>[2]</sup>于1995年首先提出的中空纤维测定法,并在此法的基础上改进,测定GG对8种人癌细胞的体内生长抑制作用,同时选取HL-60及B16人癌细胞进行裸鼠

**[基金项目]** 国家“十一五”规划“重大新药创制”重大科技专项(2009ZX09103-030)。

**[作者简介]** 邓晶晶,硕士研究生。Tel: 15524246219, E-mail: lotusdj@126.com。

**[通讯作者]** 陈 焯。Tel: 13998821581, E-mail: sy-chenye@163.com。

体内腋下移植瘤实验,以评价中空纤维测定法模型用于药效学筛选的可靠性,为GG的后续研究提供更有力的实验支持。

中空纤维测定法已被美国国立癌症研究所(NCI)使用多年,用于高通量筛选抗肿瘤药物,并且已被美国FDA认可,但我国尚未广泛应用,本实验将对该方法的推广与使用起到积极作用。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料

**1.1.1 药物与试剂** GG(含量>98.5%,辽宁大学药学院自制);CTX(山西普德药业有限公司);聚丙烯乙烷中空纤维(内径600 μm,厚度200 μm,孔径0.64 μm,德国Membrana公司);MTT(沈阳宝信生物科技有限公司);IMDM培养基(Gibco)、F-12培养基(Gibco)、DMEM培养基(Gibco)、RPMI-1640培养基(Gibco)、FBS(Gibco)和二甲基亚砷(DMSO)均购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

**1.1.2 细胞株** 白血病细胞HL-60(ATCC)、结肠癌细胞LoVo(ATCC)、黑色素瘤细胞B16(ATCC),均购自上海拜力生物科技有限公司;人肝癌细胞SMMC-7721(ATCC)、人乳腺癌细胞T-47D(ATCC)、人结肠癌细胞HCT-8(ATCC)、人肺癌细胞A549(ATCC)均购自中国科学院上海生命科学研究院;人胃肠道间质瘤细胞GIST882(ATCC)购自上海众华生物科技有限公司。

**1.1.3 实验动物** 免疫缺陷小鼠NOD/SCID,雌性4~5周龄,体重18~22 g。BALB/c胸腺免疫缺陷小鼠(裸鼠),雄性4~5周龄,体重18~22 g,均饲养于SPF级环境,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

**1.2 仪器** 超净工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司);CO<sub>2</sub>培养箱(Thermo SCIENTIFIC);荧光倒置显微镜(Olympus CKX41);Sunrise酶标仪(奥地利Tecan公司)。

## 2 方法与结果

**2.1 用中空纤维测定法测定GG对8种人癌细胞的生长抑制作用**

**2.1.1 细胞培养** 将白血病细胞HL-60于IMDM完全培养基(含20%FBS)中培养;结肠癌细胞LoVo培养于F-12K完全培养基(含10%FBS);黑色素瘤细胞B16培养于DMEM完全培养基(含10%FBS);人肝癌细胞SMMC-7721、人结肠癌细胞HCT-8、人肺癌细胞A549及人胃肠道间质瘤细胞GIST882均培养于RPMI-1640培养基(含10%FBS);人乳腺癌

细胞T-47D培养于DMEM完全培养基(含20%FBS)。各种肿瘤细胞置于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育备用。

**2.1.2 实验方法**<sup>[3-5]</sup> 分别取对数生长期的上述8种人癌细胞,贴壁细胞胰酶消化成单细胞,用各自培养基调节细胞浓度为1×10<sup>6</sup>/ml,无菌注射器注入2 cm长的无菌中空纤维管中,止血钳将中空纤维管两端热封。将待移植的中空纤维管放入盛有培养基的培养瓶中,于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱孵育24 h。取4~5周龄NOD/SCID小鼠,按每20 g体重尾部静脉注射10%水合氯醛60 μl,背部脱毛,碘酒擦拭脱毛部位,75%乙醇脱碘,于无菌操作台中将孵育了24 h的中空纤维管埋入小鼠背部一侧皮下,每只小鼠植入4支中空纤维管(图1),接种后将小鼠伤口缝合,在伤口部位涂拭青霉素溶液,以防细菌感染。

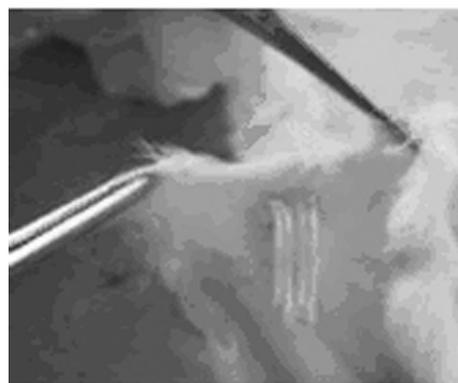


图1 中空纤维管包埋图

实验设溶剂对照组(1% DMSO水溶液)、GG高剂量组8 mg/(kg·d)、中剂量组4 mg/(kg·d)及低剂量组2 mg/(kg·d),每组各6只鼠,接种3 d后随机分组,开始于小鼠尾部静脉注射给药,连续给药4 d。

给药结束24 h后处死小鼠,取出中空纤维管。用PBS缓冲液将中空纤维管外壁洗净,放入24孔培养板中,每孔放入一支,加入300 μl培养基,每孔加入20 μl MTT溶液,37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱孵育4 h(图2)。孵育结束后将中空纤维管从中间剪断,挤压去除内壁及外壁的培养基,转入另一24孔培养板中,室温晾干,加入250 μl DMSO,室温脱色摇床振荡1 h,使MTT孵育生成的蓝色结晶甲臞充分溶于DMSO中(图3),移取150 μl该溶液于96孔培养板中,酶标仪490 nm检测各组OD值(图4),计算肿瘤生长抑制率。

抑制率=(1-给药组OD值/溶剂对照组OD值)×100%。

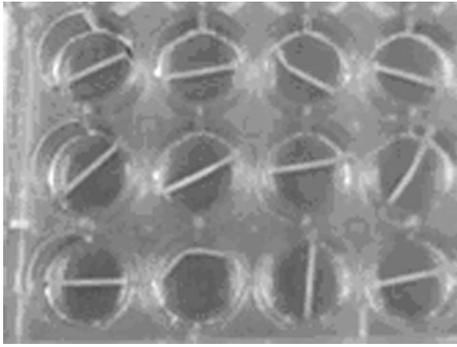


图2 中空纤维管 MTT 孵育

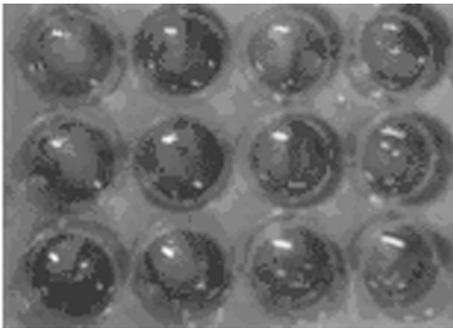


图3 DMSO 溶解中空纤维管中甲贇

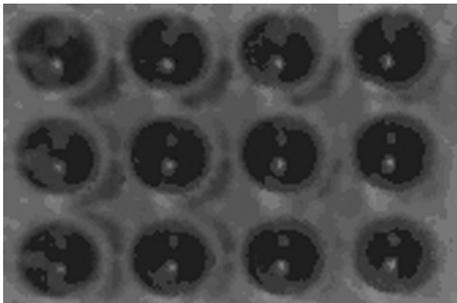


图4 96孔板中酶标仪检测

**2.1.3 统计学方法** 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析法对实验结果进行统计学分析,以  $P < 0.05$  为有统计学意义,抑瘤率  $> 50\%$  为阳性结果。

**2.2 应用裸鼠体内异位移植模型测定 GG 对 HL-60 及 B16 人癌细胞的生长抑制作用**

**2.2.1 实验方法**<sup>[6,7]</sup> 按“2.1.1”项下培养方法收集足够的细胞,重悬于无血清培养基中,分别接种于 4~5 周龄的 BALB/c 裸鼠右下肢外侧皮下(HL-60 细胞浓度为  $8 \times 10^6$ /只, B16 细胞浓度为  $3 \times 10^6$ /只),分别接种 55~60 只。2 种细胞各设 5 组: GG 高剂量组  $8 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 、中剂量组  $4 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 、低剂量组  $2 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 、阳性对照组[CTX  $15 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ]及溶剂对照组(1% DMSO 水溶液),每组 8~10 只鼠。待肿瘤长至黄豆大小时开始腹腔给药,连续给药

10 d。给药结束 24 h 后处死小鼠,取出瘤块,测量肿瘤重量 G,计算肿瘤生长抑制率。

$$\text{抑制率} = (1 - G_{\text{给药组}}/G_{\text{溶剂组}}) \times 100\%$$

**2.2.2 统计学方法** 试验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,方法同本文“2.1.3”项。

### 2.3 结果

**2.3.1 中空纤维测定法测定 GG 对 8 种人癌细胞的生长抑制作用结果** 实验结果表明,GG 高剂量、中剂量能明显抑制 HL-60 及 B16 人癌细胞在体内的生长,各组 OD 值与溶剂对照组比较,均有显著性差异( $P < 0.01$ )。GG 高、中剂量组对 HL-60 癌细胞的抑瘤率  $> 50\%$ ,  $P < 0.01$ ; GG 高、中剂量组对 B16 癌细胞的抑瘤率  $> 50\%$ ,高剂量组  $P < 0.01$ 、中剂量组  $P < 0.05$ 。GG 对其他 6 种人癌细胞的抑瘤率均在 50% 以下,表明 GG 对它们的生长无抑制作用。实验结果见表 1。

表1 中空纤维测定法测定 GG 对 8 种人癌细胞的生长抑制作用结果

组别	剂量 [mg/(kg·d)]	OD 值 ( $\bar{x} \pm s$ )	生长抑制率 (%)
溶剂对照	0	0.578 ± 0.04	...
HL-60	8	0.168 ± 0.04	70.93 <sup>2)</sup>
	4	0.204 ± 0.08	64.71 <sup>2)</sup>
	2	0.352 ± 0.05	39.10
溶剂对照	0	0.597 ± 0.02	...
LoVo	8	0.411 ± 0.03	31.16
	4	0.426 ± 0.03	28.64
	2	0.559 ± 0.02	6.37
溶剂对照	0	0.631 ± 0.02	...
B16	8	0.250 ± 0.14	60.38 <sup>2)</sup>
	4	0.293 ± 0.07	53.57 <sup>1)</sup>
	2	0.429 ± 0.04	32.01
溶剂对照	0	0.552 ± 0.04	...
SMMC-7721	8	0.328 ± 0.04	40.58
	4	0.412 ± 0.16	25.36
	2	0.502 ± 0.04	9.06
溶剂对照	0	0.602 ± 0.06	...
T-47D	8	0.369 ± 0.03	38.70
	4	0.419 ± 0.06	30.40
	2	0.474 ± 0.03	21.26
溶剂对照	0	0.611 ± 0.04	...
HCT-8	8	0.488 ± 0.11	20.13
	4	0.534 ± 0.08	12.60
	2	0.575 ± 0.12	5.89
溶剂对照	0	0.579 ± 0.03	...
A549	8	0.343 ± 0.06	40.76
	4	0.385 ± 0.03	33.51
	2	0.495 ± 0.17	14.51
溶剂对照	0	0.550 ± 0.05	...
GIST882	8	0.491 ± 0.14	10.73
	4	0.504 ± 0.08	8.36
	2	0.521 ± 0.19	5.27

<sup>1)</sup>  $P < 0.05$  与溶剂对照组比较; <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  与溶剂对照组比较

**2.3.2 裸鼠体内异位移植模型测定 GG 对 HL-60 及 B16 人癌细胞的生长抑制作用** 实验结果表明, GG 高剂量、中剂量能明显抑制 HL-60 及 B16 人癌细胞在体内的生长,各组瘤重与溶剂对照组比较,均有显著性差异( $P < 0.01$ ),低剂量组及 CTX 组的瘤重也小于溶剂组,但无显著性差异( $P > 0.05$ )。GG 高、中剂量组对 HL-60 癌细胞的抑瘤率  $> 50%$ ,  $P < 0.01$ ; CTX 组  $P > 0.05$ 。GG 高、中剂量组对 B16 癌细胞的抑瘤率  $> 50%$ ,  $P < 0.01$ ; CTX 组  $P > 0.05$ 。实验结果见表 2。

表 2 裸鼠体内异位移植模型测定 GG 对人癌细胞的生长抑制作用结果

组别	剂量 [mg/(kg·d)]	瘤重 (g)	生长抑制率 (%)
溶剂对照	0	1.32 ± 0.14	...
CTX	15	0.91 ± 0.04	31.06
HL-60	8	0.40 ± 0.09	69.70 <sup>2)</sup>
	4	0.48 ± 0.12	63.64 <sup>2)</sup>
	2	1.12 ± 0.02	15.15
溶剂对照	0	1.26 ± 0.01	...
CTX	15	0.85 ± 0.07	32.54
B16	8	0.49 ± 0.04	61.11 <sup>2)</sup>
	4	0.58 ± 0.02	53.97 <sup>2)</sup>
	2	1.01 ± 0.06	19.84

<sup>1)</sup>  $P < 0.05$  与溶剂对照组比较; <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  与溶剂对照组比较

### 3 讨论

中空纤维测定法由 Hollingshead 等<sup>[2]</sup>于 1995 年首先发明并应用,是目前唯一体内高通量筛选抗肿瘤药物的模型,已被 NCI 使用多年,并已得到美国 FDA 的认可,我国目前尚未推广应用。中空纤维管为氟化聚乙烯制成的半透膜中空管,其分子截留值为 500 000,它耐有机溶剂、酸、碱和高温,具有良好的生物相容性和稳定性<sup>[8]</sup>。与传统的动物移植瘤模型相比,该法使用动物量及受试药量少、实验周期短(7~8 d)、一次可筛选多种细胞(3~4 个)、各细胞株之间无干扰、可提供全真的体内环境、均一性好、稳定性强,大大提高了传统移植瘤实验的效率,节省了时间和费用。

中空纤维测定法测得 GG 高、中剂量组对 HL-60 及 B16 人癌细胞的生长抑制率  $> 50%$ ,表明 GG 对 2 种人癌细胞有较好生长抑制作用;GG 对其他 6 种人癌细胞生长抑制率均  $< 50%$ ,表明 GG 对其他 6 种人癌细胞无生长抑制作用。因此,选择 HL-60 及 B16 人癌细胞进行裸鼠体内异位移植瘤实

验,进一步验证 GG 对这两种人癌细胞的生长抑制作用。

本试验采用中空纤维测定法这一新型的药物筛选模型,评价 GG 对人癌细胞的生长抑制作用,并采用裸鼠体内异位移植瘤实验对其结果进行验证。结果显示,中空纤维测定法检测到的 GG 高、中剂量对 HL-60 及 B16 人癌细胞的抑瘤率与采用裸鼠体内异位移植瘤实验检测的结果基本一致,验证了中空纤维测定法用于体内高通量筛选抗肿瘤药物的可靠性。与传统体内移植瘤实验比较,该法具有简便、经济、省时、省力、快速、均一性良好及高通量等优点,作为从体外实验到传统体内移植瘤实验的过渡环节,中空纤维测定法为 GG 这一创新药物的抗肿瘤筛选提供了更好的选择和实验证明,使大规模动物体内药效学评价成为可能。GG 高、中剂量对 HL-60 及 B16 人癌细胞有明显的生长抑制作用,且药效明显优于 CTX,显示出 GG 的抗肿瘤优越性,为继续研究 GG、寻找抗肿瘤替代药物指明了方向。

### 【参考文献】

- [1] 郭青龙. 肿瘤药理学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 274-279.
- [2] Hollingshead MG, Alley MC, Camalier RF, et al. *In vivo* cultivation of tumor cells in hollow fibers[J]. Life Sci, 1995, 57(2): 131-141.
- [3] Lee KH, Rhee KH. Correlative effect between *in vivo* hollow fiber assay and xenografts assay in drug screening[J]. Cancer Res Treat, 2005, 37(3): 196-200.
- [4] Zhang GJ, Chen TB, Bednar B, et al. Optical imaging of tumor cells in hollow fibers: evaluation of the antitumor activities of anti-cancer drugs and target validation[J]. Neoplasia, 2007, 9(8): 652-661.
- [5] Veiga JP, Cooper PA, Pors K, et al. Use of the hollow fiber assay for the evaluation of DNA damaging agents[J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2011, 64(3): 226-232.
- [6] 郑静, 胡建达, 黄毅, 等. 黄芩苷对高致瘤 HL-60 细胞裸鼠移植瘤模型的体内抑瘤作用和机制探讨[J]. 中国实验血液学杂志, 2012, 20(5): 1066-1071.
- [7] 曾世彬, 徐萌, 潘兰红, 等. bFGF 单抗联合放疗对小鼠 B16 移植瘤的协同抑制作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2011, 18(2): 175-180.
- [8] 刘晓霓, 杨庆, 李玉洁, 等. 中空纤维测定法在抗肿瘤药物研究中的应用[J]. 中国试验动物学报, 2009, 17(5): 392-395.

[收稿日期] 2013-03-22 [修回日期] 2013-09-14

[本文编辑] 李睿旻