

中空纤维测试法 (Hollow Fiber Assay): CELLMAX® 体内植入膜

定义

中空纤维测试法 (HFA) 是一种快速的体内分析技术, 可用于评估药物的细胞毒性效应, 而通过将人体肿瘤细胞封装培养于中空纤维内并植入裸鼠皮下或腹腔, 即可以用于评估待测化合物的药效。

特性

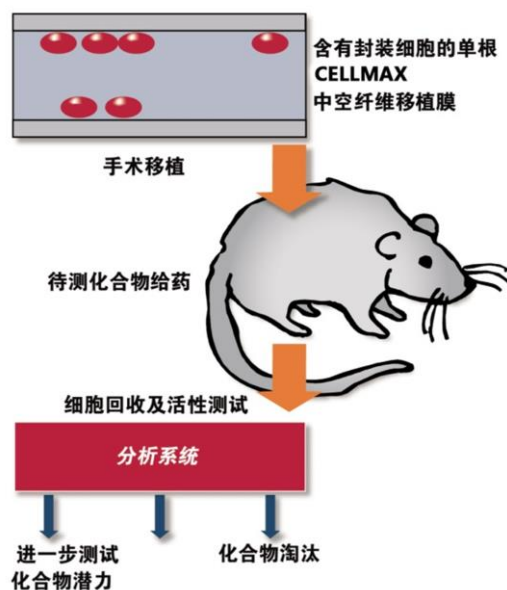
评估潜在抗肿瘤药物的活性可通过多种体内模型, 包括异种移植、原位模型和 HFA。HFA 方法经美国国家癌症研究所 (NCI) 改良, 已成为一种独特的药物研发体内模型。HFA 可在同一实验动物的 2 个不同部位评估抗肿瘤药物对多个不同细胞系的效力。HFA 使用具有良好生物相容性的半透纤维膜, 纤维内腔可封装肿瘤细胞, 适用于不同组织源性和细胞特性的肿瘤细胞。纤维采用聚偏氟乙烯 (PVDF) 材质, 内径 0.5-1mm, 长 2cm, 截留分子量 500,000Da。因此, 可溶性生物活性物质 (如蛋白质, 包括肿瘤细胞或宿主所产生的生长因子) 可透过纤维膜壁, 而肿瘤细胞和宿主细胞不会直接相互接触。纤维通常植入裸鼠, 也可以植入大鼠或其它实验动物, 以用于抗肿瘤药物的临床前研究。一只小鼠最多可接受 6 种肿瘤细胞系植入, 因而, 可在同一实验动物上同时进行多种细胞系的检测。因为宿主的免疫细胞不会渗入中空纤维内腔引起免疫反应而妨碍肿瘤细胞生长, 所以纤维可用于植入到免疫功能不全或免疫功能完全的小鼠品系。纤维可植入腹腔 (i.p.) 或皮下 (s.c.), 所以经静脉 (i.v.)、口腔、i.p. 及 s.c. 给药有助于评估肝通过效果, 为进一步的细胞毒性和抗血管形成化学治疗体内测试提供给药剂量、给药周期的评估信息。给药处理完成后, 可研究分析活细胞增殖和细胞特性, 包括细胞周期分布、DNA 损伤诱导、细胞死亡诱导 (凋亡)、蛋白质表达水平以及细胞形态等。此外, 也可以分析体内药代动力学参数, 包括药物运输、pH、pO₂。

NCI 推荐 12 个肿瘤细胞系用于常规抗肿瘤药物活性中空纤维筛选检测。对于在体外抗肿瘤药物筛选中已确认有可重复活性的药物, 这可作为确定药物潜在活性的初步体内评估。HFA 有助于选择可优先用于进一步移植瘤模型筛选的化合物, 大大减少直接进行移植瘤检测所需活性化合物的用量。NCI HFA 检测一种化合物对 12 个肿瘤细胞系的作用只需要 24 只小鼠, 而在 NCI 移植瘤模型中, 一种化合物对应一种移植瘤模型, 整个实验约需要 50 只小鼠。使用 HFA 进行早期临床前药物筛选, 符合实验动物替换、改善、优化 (3Rs) 的原则, 有助于控制实验动物的使用。

自其成功开发以来, 已有多个科研小组通过 HFA 进行药物活性筛选。HFA 已成功用于化合物对原始人体肿瘤细胞以及定性肿瘤细胞系效力的研究。HFA 体内分析不仅可成功用于抗肿瘤活性的定量研究, 其应用也在不断得到扩展。HFA 已经用于抗病毒药物的评估, 也适用于其它医疗领域。

体内 HFA 可用于预测药物对移植瘤的活性。在移植瘤模型中, 抗肿瘤活性通常通过肿瘤体积的相对降低来确认。而在 HFA 中, 活性可通过活细胞数量的降低来确认, 后者可通过 MTT 分析来检测。在移植瘤模型中具有活性的化合物通常在 HFA 中也具有活性。

移植瘤模型一般不能简单地阐释化合物在肿瘤中作用机制。从移植瘤模型中收获肿瘤细胞进行药效学研究通常由于宿主细胞的干扰而非常困难。生长于中空纤维内的细胞是独立的细胞悬液, 而无宿主细胞污染, 可轻松地回收, 用于机制研究。使用 HFA 进行临床前研究, 可缩短将药用化合物用于临床研究的时间。但在某些情况下可能需要获得更多关于肿瘤细胞-基质相互作用的数据, 这将对 HFA 模型进行优化的新要求。



相比传统动物模型，HFA 具有诸多优势。首先，HFA 可以最短的时间（低于 2 周）和最少的材料（如待测化合物）得出药效的定量指标，而不会受到移植瘤模型大规模动物实验的成本限制。其次，在动物模型中进行研究需要大量的时间和精力进行检测操作，特别是当待测化合物只具有极弱的抗肿瘤活性时。采用 HFA，可免去在移植瘤模型中检测无活性化合物的过程。第三，在组织培养研究中具有良好效果的肿瘤治疗方式，在实体瘤中往往效果欠佳，原因可能是肿瘤在三维结构的生长过程中，其增殖性能和微环境异质性会有差异，而细胞在中空纤维中可以三维结构方式生长。第四，这种检测方法可将药物的药效动力学以及潜在的生物转化纳入考量范围。第五，HFA 是进行联合用药初步体内实验的绝佳方法，因为化合物会有一个动态的体内相互作用过程。第六，HFA 可以使实验小鼠免受移植瘤诱导的恶病质影响。

HFA 尚不能完全替代传统的移植瘤模型。移植瘤细胞在生长以及与宿主组织的相互作用时复杂的反应不能分析。细胞不能转移到动物的其它器官，因为纤维防止了细胞的迁移。尽管使用纤维时不会诱导肿瘤血管的生成，新血管的形成仍可供给

纤维营养物质，这可能由纤维内肿瘤细胞释放的生长因子所诱导。中空纤维可用于评估化合物到达不同生理部位（s.c.和 i.p.）肿瘤细胞的能力，并评估药物在肿瘤细胞内是否可以达到药物活性浓度。使用现代生物发光技术，可观察细胞在纤维内的动态生长过程。

方法

HFA 可按以下步骤操作：从处于对数期的体外培养中按所需细胞密度收获肿瘤细胞。将细胞悬液注入中空纤维，两端热密封，防止细胞流出。密度取决于待测细胞系，从 $1-100 \times 10^5$ cells/fiber 不等。植入宿主前，将纤维置于组织培养基，于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下孵育 24-48hr。植入当天，可使用 MTT 法对每个肿瘤细胞系样品进行活细胞计数。纤维植入后数日，按所需剂量和周期给予实验小鼠抗肿瘤药物处理，最长可持续 2 周。给药结束后，从宿主回收纤维，进行 MTT 分析。计算每个细胞系的净生长百分比，与对照组净生长百分比比较。此外，也可以进行其它细胞学分析。

参考文献

- Hollingshead MG, Alley MC, Camalier RF et al (1995) In vivo cultivation of tumor cells in hollow fibers. *Life Sci* 57:131-141
- Suggitt M, Bibby MC (2005) 50 years of preclinical anticancer drug screening: empirical to target-driven approaches. *Clin Cancer Res* 11:971-981
- Decker S, Hollingshead M, Bonomi CA et al (2004) The hollow fibre model in cancer drug screening: the NCI experience. *Eur J Cancer* 40:821-826
- Temmink OH, Prins HJ, van Gelderop E et al (2007) The hollow fibre assay as a model for in vivo pharmacodynamics of fluoropyrimidines in colon cancer cells. *Br J Cancer* 96:61-66
- Suggitt M, Cooper PA, Shnyder SD et al (2006) The hollow fibre model - facilitating anti-cancer pre-clinical pharmacodynamics and improving animal welfare. *Int J Oncol* 29:1493-1499

