

中空纤维测试法：抗肿瘤药物筛选

随着体外高通量筛选的进行，所获得的潜在抗肿瘤药物数量远远超过了传统移植瘤模型所能测试的容量，故而，美国国家癌症研究所（NCI）开发了新型体内中空纤维测试模型。越来越多的中空纤维测试数据显示，药物的中空纤维测试值越高，其在移植瘤模型测试中具有活性的可能性越高。除原始的 12 个中空纤维测试细胞系外，现已补充有更多的组织特异性肿瘤细胞系，使测试结果更有价值。中空纤维模型的主要目的是降低药物初步活性筛选的成本及实验动物用量。

1. 为什么使用中空纤维？

新抗肿瘤药物的发现主要有两种方法：针对体外或体内细胞增殖模型的经验性筛选可获得具有一定程度体内活性或可抗特定细胞系的先导结构，然后再对其进行进一步的研发；而定向筛选则测试先导结构对特定分子靶标的活性，其使用体外生化筛选、细胞分析及体内组织培养模型。先导结构在体内环境下的活性对其下一步的优化具有更为重要的指导意义。

从 90 年代开始，美国国家癌症研究所开始使用 60 种肿瘤细胞系作为新型抗增殖药物体外筛选的基础，不久，筛选工作就开始获得了一系列抗增殖候选药物，但进行进一步的研发之前，需在体内实验模型内确认其活性。而传统移植瘤测试所需的成本和时间问题，大大降低了药物的体内测试速度。

为解决这个问题，NCI 研发了一种短期的体内测试方法。在这种方法中，细胞生长于聚偏氟乙烯（PVDF）中空纤维内，然后纤维植入小鼠身体的不同部位。纤维截留分子量为 500kD，允许小分子物质渗透。植入体内后，待测化合物按一定的时间间隔和剂量给药 4-5 天，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。NCI 已使用标准活性药物对该方法进行验证，并建立了完整的计分系统。

使用已确认活性的化合物分别进行中空纤维测试和无胸腺小鼠移植瘤模型测试，所获得的数据基本一致。总体上讲，使用针对植入腹膜（i.p.）和

表 1
中空纤维测试细胞系

标准	白血病/淋巴瘤	黑色素瘤	前列腺癌	肾癌	
乳腺癌	结肠癌				
MDA-MB-231	COLO-205	HL-60	MALME-3M	JCA-1	RXF-393
MDA-MB-435	SW-620	MOLT-4	M14	DU-145	A498
神经胶质瘤	黑色素瘤				
U251	LOX-IMVI	AS-283	SK-MEL-2	PC-3	CaKi-1
SF-295	UACC-62	KD488	SK-MEL-5		
卵巢癌	肺癌				
OVCAR-3	NCI-H23	SR	SK-MEL-28		
OVCAR-5	NCI-H522	RPMI-8226	UACC-257		

皮下 (s.c.) 的 12 个细胞系的计分算法所获得的结果表明, 显示抗增殖活性的纤维数越多, 化合物具有抗移植瘤活性的可能性就越高。

最初, 科研人员认为中空纤维测试法不能替代可获得更多深入信息的生物模型, 如转基因或敲除模型, 也不能将宿主的基质或免疫反应纳入计分算法, 但近期的实验显示, 只需延长纤维在宿主体内的保留时间, 即有明显的血管生成反应, 从而可进行机制性研究。中空纤维的主要价值在于对候选化合物进行初步分类, 以确定需要进行进一步体内模型研究的化合物结构。相比移植瘤体内评估方法, 中空纤维测试法可高通量地对待筛化合物进行初步评估。此外, 从药物处理的宿主体内取出纤维后, 纤维内的细胞可进行多种不同的生物学分析, 以发现药物作用的分子终点。根据纤维内的药物浓度, 也可以推测药物的有效灵敏浓度。最简单地讲, 中空纤维测试法可获得化合物在特定给药策略下的抗增殖活性, 即可快速获得先导结构从给药部位穿过各种生理及膜屏障进行体内分布后的作用数据。

2. 中空纤维测试法的操作和计分

进行中空纤维测试时, 将肿瘤细胞装入内径 1mm 的 PVDF 中空纤维内, 纤维剪成 2cm 的小段, 两端热密封。纤维先体外培养 24-48h, 然后植入无胸腺 (nu/nu) 小鼠体内。虽然, 中空纤维测试法原则上可使用非免疫缺陷小鼠, 但是进一步的体内评估需使用无胸腺小鼠移植瘤模型, 所以使用相同规格的实验动物, 可避免药理及代谢差异,

表 2

中空纤维测试法计分系统

	标准测试	白血病或黑色素瘤测试	前列腺癌或肾癌测试
(a) 细胞系数量	12	6	3
(b) 植入位点数量 (i.p., s.c.)	2	2	2
(c) 剂量水平	2	2	2
(d) 每根纤维得分	2	2	2
最高可能得分 (a x b x c x d)	96 (48 i.p. + 48 s.c.)	48 (24 i.p. + 24 s.c.)	24 (12 i.p. + 12 s.c.)

从而简化中空纤维测试结果的解读。每只小鼠最多可植入 6 根纤维, 3 根皮下 (s.c.), 3 根腹膜 (i.p.)。

植入前, 需使用 MTT 法分析纤维内的活细胞数, 以确定每个细胞系的起始细胞数。对实验小鼠按预定计划进行待测药物给药处理。一般推荐待测药物至少按两种剂量腹膜内给药。植入后 6-8 天, 取出纤维, 使用 MTT 法分析纤维内的活细胞数。通过比较药物处理组和稀释液对照组纤维内活细胞数量的差异, 得出候选药物的抗肿瘤活性。如特定纤维内的净细胞生长降低量比对照组高 50% 或以上, 即可认为化合物对该纤维内细胞有效。

中空纤维测试法使用特定的待测细胞系组, 以涵盖可能的药物活性 (表 1), 标准的中空纤维测试使用 12 种人体肿瘤细胞系, 代表 6 种不同的组织学特性, 与其相应的移植瘤模型行为一致。此外, 代表特定组织学特性的特定细胞系也可按非常规方式测试特殊化合物的活性。为简化中空纤维测试法的评估, 研究人员建立了一套计分算法, 如化合物对某根纤维内的净细胞生长降低值与对照组相比达到或超过 50%, 即计 2 分。按照该计分方法, 一个化合物的最高计分为 96 分, 但有时也将 i.p. 纤维计分与 s.c. 纤维计分分开, 各为 48 分。虽然化合物的细胞杀伤数未纳入该计分算法, 但一般也将该指数作为考量标准。

当使用经临床验证的活性抗肿瘤药物建立标准中空纤维测试法后, 即可得出确认药物活性的标准, 并进行统计学认证。如化合物满足以下标准, 则认为可进行下一步的移植瘤测试:

总分 (i.p. + s.c.) 达20 或以上;
s.c. 计分达8 或以上;
某一给药剂量水平的化合物对任一细胞系有明显杀伤作用。

3. 如何将中空纤维数据用于决策判断

按照上述标准得出的抗肿瘤效力数据可作多种用途, 且这些后续的步骤也在随时间不断地演变。最初, 阳性中空纤维结果是否是进行相应移植瘤研究的重要参考, 即根据纤维内有反应的细胞系类型, 选择其直接联系的肿瘤类型。但这种方法单纯依靠药物在人体肿瘤移植模型内的经验性活性筛查, 而不鉴定分子靶标或药物活性相关生物指标。阳性中空纤维结果继而也开始用于选择化合物以进行进一步的药理及机制研究, 特别是, 中空纤维内的活性与抗增殖药理作用相关。这种模型的建立, 可用于联系假定的药物作用靶标, 或构建药物作用的药动学系数, 以用于进一步的研发或早期临床实验结果的评估。此外, 中空纤维测试信息也可以用于预测同类化合物的最可能体内活性, 或调节在药物耐受情况下的药物“细胞毒性”。将中空纤维测试数据与从动物给药实验获得的初步药动学信息相结合, 可建立正式的移植瘤研究模型, 理想的模型需表达药物作用分子靶标, 并在特定给药策略下, 目的靶标或细胞端点可被药物影响。

对于确需进一步研发的化合物, 可进行毒理学评估, 包括使用可产生移植瘤模型活性的给药策略, 结合待测物种的已知药理学特性, 以及记录可能影响抗增殖机制的分子及生物作用。总之, 中空纤维测试法是后续体内评估的“把关”步骤。

4. 中空纤维预测数据

之前, 有实验结果显示, 如果药物对 1/3 以上的移植瘤模型有活性, 则其在二阶段的实验中, 与

没有移植瘤活性的药物相比, 更有可能有活性。由于 NCI 使用中空纤维数据来确定药物是否需要移植瘤模型测试, 所以有必要确定中空纤维测试法对药物活性的预测能力。为解决这个问题, 科研人员分别使用中空纤维测试法和移植瘤模型测试了 690 个化合物, 结果显示, 化合物的中空纤维 i.p. 计分越高, 则其在至少 1/3 的移植瘤模型测试中显示活性的可能性越高, 在 i.p. 计分为 14 及以上的化合物中, 有 27% 在移植瘤模型测试中有活性, 而 i.p. 计分为 0-6 的化合物中, 该比例仅为 9.5%。

表 3
i.p. 中空纤维活性 vs. 至少 1/3 测试移植瘤模型活性

IP 计分	移植瘤药物活性比例%		总数	33% 移植瘤药物活性比例%
	< 33%	≥ 33%		
0-6	295	31	326	9.5%
8-12	148	35	183	19%
14+	132	49	181	27%
总数	575	115	690	

P < 0.0001

表 4
i.p. 中空纤维活性 vs. 至少 1/3 测试移植瘤模型活性, 其中, 药物对至少一种移植瘤有活性

IP 计分	移植瘤药物活性比例%		总数	33% 移植瘤药物活性比例%
	< 33%	≥ 33%		
0-6	62	31	93	33%
8-12	32	35	67	52%
14+	43	49	92	53%
总数	137	115	252	

P = 0.011

在上述实验中, 大多数化合物 (438/690) 在移植瘤模型测试中没有活性, 为排除这部分化合物对实验结果造成的偏差, 科研人员将其剔出实验, 并重新测试, 结果显示, 中空纤维测试法对于化合物在移植瘤模型中活性仍有较高的预测性。i.p. 计分为 14 及以上的化合物中, 有 53% 在 1/3 以上

的测试移植瘤模型中有活性，而 i.p. 计分为 0-6 的化合物中，该比例仅为 33%。

表 3 及表 4 数据可有效用于预测某一药物是否能获得一定水平的移植瘤活性，以及与之相应的临床活性。对于早期的决策判定，确认中空纤维测试数据是否能有效预测化合物在至少一种移植瘤模型中具有活性非常重要。

以上分析基于比较 i.p. 给药在 i.p. 中空纤维与任意类型移植瘤模型内的活性差异，那么，另一个值得考虑的问题是，药物在 i.p. 植入中空纤维测试中的活性是否对其在 i.p. 移植瘤内的活性具有预测性？表 6 的实验数据显示，药物具有活性的 i.p. 中空纤维数越高，其在 i.p. 移植瘤中具有活性的可能性越高。

表 6

i.p. 中空纤维活性 vs. 至少一种移植瘤模型活性

IP 计分	任一移植瘤药物活性	无移植瘤药物活性	总数	活性%
0-6	93	232	325	29%
8-12	67	116	183	37%
14-18	41	47	88	47%
20+	51	42	93	55%
总数	252	437	689	

$P < 0.0001$

表 6

i.p. 中空纤维活性 vs. i.p. 移植瘤模型活性

IP 计分	i.p. 移植瘤药物活性	无 i.p. 移植瘤药物活性	总数	活性%
0-6	35	219	254	14%
8-12	29	104	133	22%
14-18	22	44	66	33%
20+	25	40	65	38%
总数	111	407	518	

$P < 0.0001$

考虑到 i.p. 部位给药对 i.p. 植入中空纤维的测试结果

是否对药物在其它生物部位的活性具有预测性，科研人员在实验设计是增加了 s.c. 植入中空纤维的测试，其目的就是为了检测待测药物从给药部位分布到肿瘤所在部位的能力。结果显示，s.c. 计分有助于预判药物移植瘤模型活性。有实验分析了 i.p. 计分在 14-20 之间的 102 种化合物，发现其中 s.c. 计分亦在 8 或以上的 58% 化合物至少对一种移植瘤模型有活性，而 s.c. 计分在 6 或以下的化合物，该比例仅为 35%。

表 7

s.c. 中空纤维活性 vs. 移植瘤模型活性，其中，i.p. 中空纤维计分为 14-20

SC 计分	任一移植瘤药物活性	无移植瘤药物活性	总数	活性%
0-6	17	32	49	35%
8+	31	22	53	58%
总数	48	54	102	

$P = 0.016$

表 8

白血病/淋巴瘤 (LL) HF IP 计分 vs. 白血病/淋巴瘤 (LL) 模型移植瘤活性

LL HF IP 计分	任一移植瘤药物活性	无 LL 移植瘤药物活性	总数	活性%
0-4	3	24	27	11%
6+	7	15	22	32%
总数	10	39	49	

$P = 0.076$

对于 i.p. 计分为 0 或高于 22 的化合物，s.c. 计分不会改变对药物移植瘤活性的预测性。对于 i.p. 给药至 i.p. 肿瘤、且无任何中空纤维活性的化合物，其在 s.c. 纤维内的活性不会有助于预测移植瘤活性，因其极有可能是非特异性的毒性作用所致。而对于 i.p. 计分在 22 及以上的化合物，s.c. 纤维计分也不会明显增加预测的准确性。如前文所述，i.p. 计分在 14-20，且 s.c. 计分在 8 以上的化合物，有 58% 具有移植瘤活性，但从表 5 数据可知，仅考虑 i.p. 计分，即可推测 55% i.p. 计分在 20 以上的

化合物对至少一种移植瘤模型有活性。

5. 对不同肿瘤类型的预测性

如前文所述，可使用代表特殊组织学特性的中空纤维测试细胞组，检测化合物对特定肿瘤类型的活性。通常，该化合物在对具有组织特异性的体外细胞测试中有选择性活性，或在特定组织的体外生物学测试中具有活性。

在标准中空纤维测试中，某一给定组织只测试 2 个细胞系，所以很难分析给定组织的中空纤维活性与相同组织的移植瘤活性之间的潜在相关性。但是，使用特定的中空纤维测试细胞组即有可能揭示这种相关性。对于黑色素瘤、肾及前列腺癌，已有足够的可以确定此类细胞系组中的中空纤维活性与相应组织移植瘤活性之间的相关性，同样，对于白血病/淋巴瘤中空纤维测试细胞系组也已有数据来解释这一问题，但这部分数据并非来源于实际的移植瘤模型，而是小鼠白血病/淋巴瘤模型，所以可能需要进一步确证。此外，对于生物学特性差异较大的造血性疾病，常规使用的中空纤维测试细胞系，可能不能非常准确地预测药物对其它造血性疾病的活性，而需进行一对一测试。尽管如此，对于白血病/淋巴瘤纤维 i.p. 计分为 6 或以上的化合物，32% 对至少一种传统血液病体内模型有活性，而 i.p. 计分为 0-4 的化合物，该比例仅为 11%。

6. 展望

使用中空纤维测试法的主要目的是降低化合物体内活性初步评估的成本，包括实验器具的使用和实验动物的数量。中空纤维测试法筛选所得的化合物在传统移植瘤模型中具有活性的可能性相对较高，相应地，在临床实验中也具有较高的活性可能性。而将标准中空纤维测试法扩展到其它组织特异性细胞系的测试结果亦显示，该方法具有较好的扩展灵活性。

结合对处理后纤维内细胞的免疫组化、蛋白组学、基因组学以及可能酶学分析，可进一步阐释药物对特定分子靶标的作用，而对处理后纤维内液体的药理学分析，可了解药物在组织间的扩散能力。此外，使用细胞荧光成像系统，可“实时”记录给药后的药物作用过程，即药物作用的速度和功效。

资料来源：

Decker, S., Hollingshead, M., Bonomi, C. A., et al., The Hollow fibre model in cancer drug screening: the NCI experience. *European Journal of Cancer* 40 (2204): 821-826.