

埃本膦酸钠对肺癌骨转移动物模型的干预作用

俞惠新,王铁生,林秀峰,齐效君,谭成,陈波,张莉,曹国宪,王博诚

Inhibiting Effects of Ibandronate on Skeletal Metastasis Model of Lung Cancer Cells

YU Hui-xin, WANG Tie-sheng, LIN Xiufeng, QI Xiaojun, TAN Cheng, CHEN Bo, ZHANG Li, CAO Guo-xian, WANG Bo-cheng

Jiangsu Institute of Nuclear Medicine The Key Laboratory of Nuclear Medicine, Ministry of Health, Wuxi 214063, China

Abstract :Objective To investigate the inhibiting ability of Ibandronate on a skeletal metastasis model of lung cancer. **Methods** A skeletal metastasis model of lung cancer was established by injection of small cell lung carcinoma line (SCLC) H446 cells into the right leg of nude mice proximally to the tibia, and Ibandronate (5 μ g/ animal/ day) was given subcutaneously (s. c.) to the animals after radiologically small but defined osteolytic metastases were observed. Both X-ray and histological assay were applied to evaluate effects of Ibandronate. **Results** Both X-ray detection and $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MDP imaging demonstrated that implant of H446 caused the development of bone lesions. Histological studies showed abnormal reacting bone formation preceded by tumor metastasizing and a number of cancer cells invading into bone marrow. But in the treated group, Ibandronate not only markedly suppressed the progression of established bone metastases lesions in nude mice, but also prevented the development of lung cancer cells in bone marrow. The reacting bone formation was limited locally. **Conclusion** These results suggest that Ibandronate may be a choice for the treatment of metastasis cancer in bone.

Key words: Ibandronate; Lung cancer; Skeletal metastasis; Animal models

摘要:目的 探讨埃本膦酸钠对肺癌细胞骨转移动物模型的干预作用。方法 通过贴骨接种人小细胞肺癌 H446 细胞制作骨转移动物模型,皮下注射埃本膦酸钠干预,利用放射学检查及病理分析等手段观察埃本膦酸钠对肺癌细胞骨转移的干预效果。结果 放射学检查显示裸鼠接种 H446 细胞后引起明显的肿瘤性骨损伤,骨病灶处的 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MDP 放射性浓聚,肿瘤细胞大量侵袭至骨髓腔中。经埃本膦酸钠干预后,此骨损伤病程被明显抑制。结论 埃本膦酸钠可明显地干预肿瘤细胞对骨的侵犯,减轻肿瘤引起的骨损伤,可作为一个治疗骨转移的选择药物。

关键词:埃本膦酸钠;肺癌;骨转移;动物模型

中图分类号:R73-35⁺4;R734.2 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2007)05-0331-03

0 引言

双膦酸盐(Bisphosphates, BPs)对钙和骨骼矿物质具有很强的亲和性,能紧密地吸附在羟基磷灰石的表面,是一类强有力的骨吸收抑制剂^[1,2],在临床上被广泛应用于骨质疏松症的治疗^[3,4]。近年来发现双膦酸盐通过抑制破骨细胞的活性阻遏肿瘤细胞在骨上的着床和发展,对肿瘤的骨转移具有抑制作用^[5]。双膦酸盐用于乳腺癌及前列腺癌骨转移的治疗已有较多报道^[6,7],而对同样易于发生骨转移的肺癌研究较少^[8]。我们采用一种简易方法制作了肺癌细胞 H446 骨转移动物模型,并评估了埃本膦

酸钠对该骨转移模型的干预作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂及材料

埃本膦酸钠(Ibandronate)为本室自制(用生理盐水配制,经0.22 μ m膜过滤除菌后,置4 $^{\circ}$ C备用);其他试剂均为国产分析纯。

亚甲基二双膦酸钠(Methylene Diphosphate, MDP)药盒由江苏省原子医学研究所江原药厂提供; ^{99}Mo - $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 发生器为中国核动力研究设计院产品。

小细胞肺癌细胞株 H446 由中国科学院上海细胞所提供,用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液(含 100IU/ml 青霉素,100 μ g/ml 链霉素)于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂及饱和湿度的培养箱中维持培养。

收稿日期:2006-04-03;修回日期:2006-07-06

作者单位:214063 江苏无锡,江苏省原子医学研究所,卫生部核医学重点实验室

作者简介:俞惠新(1966-),男,硕士,副研究员,主要从事核医学与生物化学研究

接种及给药用注射针为美国 B-D 公司医用 51/2 号针。

1.1.2 主要仪器

SPECT 为 Siemens DIACAM/VAX3300, 准直器为低能通用型; X 线机为日本 TOSHIBA KXO-8ON; 显微镜为日本 Nikon Eclipse E600; 层流架为江苏省苏州市吴县实验动物设施设备厂生产的 SEL-1 型。

1.1.3 实验动物

由上海肿瘤研究所实验动物中心提供六周龄 BALB/c-nu/nu 雄性裸鼠(约 20 克/只), 按 SPF 级标准饲养于江苏省原子医学研究所实验动物中心层流架内。

1.2 肺癌细胞骨转移动物模型的制作

取指数生长期的 H446 细胞, 经消化后, 用无血清培养液调整细胞浓度为 1×10^7 个/ml。无菌条件下, 每只裸鼠右后肢胫骨处肌肉下贴骨接种 200 μ l 细胞悬液(含 2×10^6 个细胞)。裸鼠继续饲养于层流架内, 每周 1~2 次观察裸鼠生存状态及接种部位肿瘤的生长情况。

1.3 肺癌细胞骨转移动物模型的鉴定

1.3.1 X 线摄片

细胞接种后两周, 取模型裸鼠腹腔注射硫喷妥钠(每只 1.5mg/300 μ l) 麻醉, 取其俯卧位行 X 线摄片(100mA, 42kV, 0.04s, 靶片距为 78 厘米)。

1.3.2 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MDP 显像

将 1ml $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4$ 新鲜淋洗液注入 MDP 瓶, 混匀, 置 37 反应 30min 后, 以每只 200 μ l(74MBq) 尾静脉注入裸鼠, 随后每小时用生理盐水灌胃(每次 0.5ml, 共 3 次)以减低膀胱显影。3h 后腹腔注射硫喷妥钠麻醉裸鼠, 取俯卧位行 SPECT 全身显像。

1.4 埃本膦酸钠对肺癌细胞骨转移的干预研究

在肿瘤细胞接种后两周, 经 X 线摄片等确定裸鼠右后肢胫骨发生骨损伤后, 将模型裸鼠随机分为模型对照组(A): 每天背部皮下注射 100 μ l 生理盐水; 干预组(B): 每天背部皮下注射埃本膦酸钠(5 μ g/100 μ l)。同时设正常对照组(C), 即不接种肺癌细胞及药物, 以相同条件饲养(每组动物数 $n=3$)。

1.5 裸鼠骨破坏的病理分析

给药 8 周后裸鼠处死, 分别取各裸鼠的右后肢, 置于用 10mmol/L PBS pH 7.2 配制的 10% 福尔马林中, 固定 72h。用水冲洗干净后, 浸泡于 14% EDTA 液中, 脱钙处理两周。其间每隔一天换 EDTA 液, 并用摇床振荡。脱钙结束, 流水冲洗 2h, 对本行常规病理分析。

2 结果

2.1 肺癌细胞骨转移的发生及鉴定

在肺癌细胞 H446 接种后 10 天, 肉眼可明显观察到裸鼠的右后肢接种处生长出实体瘤, 呈球状或不规则形状, 并随时间的延长而逐渐突出增大, 至一个月时已开始影响右后肢的活动功能。

接种后两周的 X 线摄片检查发现, 与自体左后肢胫骨比较, 右后肢胫骨表面开始模糊, 证明骨受到损伤。至 8 周时胫骨已接近溶断(图略)。

接种后 8 周(即处死前)将模型对照组裸鼠行 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MDP 全身显像。图 1 显示, 除膀胱及肝脏外, 接种肿瘤细胞的右后肢胫骨处有明显的放射性浓聚, 其对侧左后肢则无明显显影, 与 X 片结果完全相符, 证实有肿瘤性骨损伤的发生。

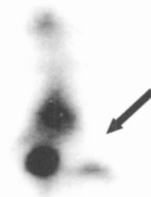


图 1 骨转移动物模型的 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MDP 显像

2.2 埃本膦酸钠对肺癌细胞骨转移的干预

2.2.1 X 片结果

在 X 片证实有肿瘤性骨损伤的发生后, 给予裸鼠埃本膦酸钠药物干预。其后的 X 片检查显示, 干预 3 周后, 干预组裸鼠右后肢胫骨骨损伤病程与模型对照组相比被明显抑制, 至接种后 8 周时, 差异更加显著(图略)。

2.2.2 病理分析

裸鼠右后肢经固定、脱钙等处理后, HE 染色分析埃本膦酸钠对肿瘤致骨损伤的影响, 见图 2。结果表明, 在模型对照组, 小细胞肺癌细胞 H446 引起明显的骨破坏, 甚至已没有明显的骨组织存在见图 2b, 原有的骨组织被破坏后, 在其周围有广泛的反应性骨生成, 而骨髓中发现已有多处肿瘤细胞侵入见图 2c。经埃本膦酸钠干预后, 骨破坏程度明显减轻, 原有骨组织结构基本保持, 仅在局部有反应性骨生成, 骨髓中仅能发现少量见图 2e, 甚至没有肿瘤细胞, 见图 2d。模型对照裸鼠见图 2b、c, 除了图 2b 由于肿瘤生长不受控制, 其细胞呈现坏死外, 骨周围的肿瘤细胞的生长、形态等方面与干预组裸鼠间无明显差异, 见图 2d、e。

3 讨论

研究肿瘤发生骨转移的原因及寻找相应的治疗

方案均需要合适的动物模型。目前常用的肿瘤骨转移动物模型是通过给裸鼠左心室注射肿瘤细胞制作而成,这种方法不仅需要操作者具备一定技术及相应的设施,而且在模型制作过程中动物死亡率也较高^[9,10]。我们采用了与文献^[11]类似的一种易于操作的肿瘤细胞骨转移动物模型的制作方法,即通过贴骨注射肿瘤细胞,利用肿瘤细胞向周围邻近组织侵袭的特性,制作了肺癌细胞 H446 骨转移动物模型,并将此模型用于评估埃本膦酸钠对肺癌细胞骨转移抑制作用的研究。

临床上诊断肿瘤骨转移的方法主要有 X 线摄片、CT 检查及⁹⁹Tc^m-MDP 全身骨显像等^[12],其中 X 线摄片操作最简便,而⁹⁹Tc^m-MDP 全身骨显像诊断骨转移的阳性率要明显高于前两者。我们利用 X 线摄片和⁹⁹Tc^m-MDP 骨显像鉴定了肺癌细胞 H446 骨转移的发生发展状况,并评估了埃本膦酸钠对其骨侵犯的干预。

肺癌细胞接种后在骨组织附近存活、增殖、成瘤而发展,并向骨组织侵袭,骨受损程度不断加重。经埃本膦酸钠干预后,骨破坏进程被明显延缓和抑制。

组织学检查发现,模型对照组中肿瘤细胞对骨的侵袭不仅破坏了骨的完整,而且发现有大量成骨细胞存在,引起广泛的反应性骨生成,而在肿瘤与骨组织之间的骨吸收腔内仅有少量多核巨细胞即破骨细胞存在。因此,虽也有溶骨发生,但小细胞肺癌 H446 细胞引起的骨损伤可能以成骨性为主。

组织学检查还显示骨周围软组织内肿瘤细胞数量及形态等在两组间无明显差异,裸鼠外观显示两组间瘤块大小及形态也无明显不同,这提示埃本膦酸钠并不影响肿瘤在软组织中的生长发展,即双膦酸盐对肿瘤细胞的抑制作用具有骨选择性。这是因为双膦酸盐类药物对肿瘤细胞的抑制需要一定的药物浓度,而双膦酸盐进入体内后浓聚于骨,在骨微环境中的浓度可高达 800 ~ 1000 μmol/L^[13],而在软组织中含量极微,所以它仅对在骨上生长的肿瘤细胞的生长增殖产生抑制作用。

文献报道,前列腺癌骨转移以成骨性为主,肺癌

与乳腺癌所发生的骨转移以溶骨性为主^[7],本研究结果揭示 H446 小细胞肺癌引起的骨转移以成骨性为主,同时伴有溶骨的发生,其确切原因有待进一步分析。

埃本膦酸钠在临床上的适应症主要为骨质疏松症,也有应用于恶性肿瘤骨转移引起的并发症(高钙血症、骨痛、骨折等)^[14]。综合本研究结果表明,埃本膦酸钠对肺癌细胞的骨转移引起的骨损伤具有明显的抑制作用,可作为治疗骨转移的一种选择药物。

(本文图 2 见插页 2)

参考文献:

- [1] Fleisch H. Development of bisphosphonates[J]. Breast Cancer Res[J]. 2002, 4(1): 30-34.
- [2] Nancollas GH, Tang R, Phipps RJ, et al. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: Differences in interactions with hydroxyapatite[J]. Bone, 2006, 38(5): 617-627.
- [3] Guay DR. Ibandronate: a new oral bisphosphonate for postmenopausal osteoporosis [J]. Consult Pharm, 2005, 20(12): 1036-1055.
- [4] Pfister AK, Welch CA, Lester MD, et al. Cost-effectiveness strategies to treat osteoporosis in elderly women [J]. South Med J, 2006, 99(2): 123-131.
- [5] R. Bell. Bisphosphonates for metastatic bone disease: a therapeutic rationale[J]. EJC Supplements, 2004, 2(5): 1-4.
- [6] R E Coleman. Bisphosphonates in breast cancer[J]. Annals of Oncology, 2005, 16(5): 687-695.
- [7] Bauss F, Body JJ. Ibandronate in metastatic bone disease: a review of preclinical data[J]. Anticancer Drugs, 2005, 16(2): 107-118.
- [8] 杭晓声,陈晓萍. 伊班膦酸钠治疗肺癌骨转移的疗效分析[J]. 现代医学, 2005, 33(4): 261-262.
- [9] Angelucci A, Gravina GL, Rucci N, et al. Evaluation of metastatic potential in prostate carcinoma: an in vivo model[J]. Int J Oncol, 2004, 25(6): 1713-1720.
- [10] Kuperwasser C, Dessain S, Bierbaum BE, et al. A mouse model of human breast cancer metastasis to human bone[J]. Cancer Res, 2005, 65(14): 6130-6138.
- [11] Corey E, Brown LG, Quinn JE, et al. Zoledronic acid exhibits inhibitory effects on osteoblastic and osteolytic metastases of prostate cancer[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(1): 295-306.
- [12] 高良辉,温必辉,陈光信,等. X 线平片、CT、ECT 诊断骨转移瘤的比较分析[J]. 中国临床医学影像杂志, 2001, 12(3): 201-204.
- [13] Adami S. Bisphosphonates in prostate carcinoma[J]. Cancer, 1997, 80(8 Suppl): 1674-1679.

[编辑:刘红武]

埃本膦酸钠对肺癌骨转移动物模型的干预作用

(正文见 331 页)

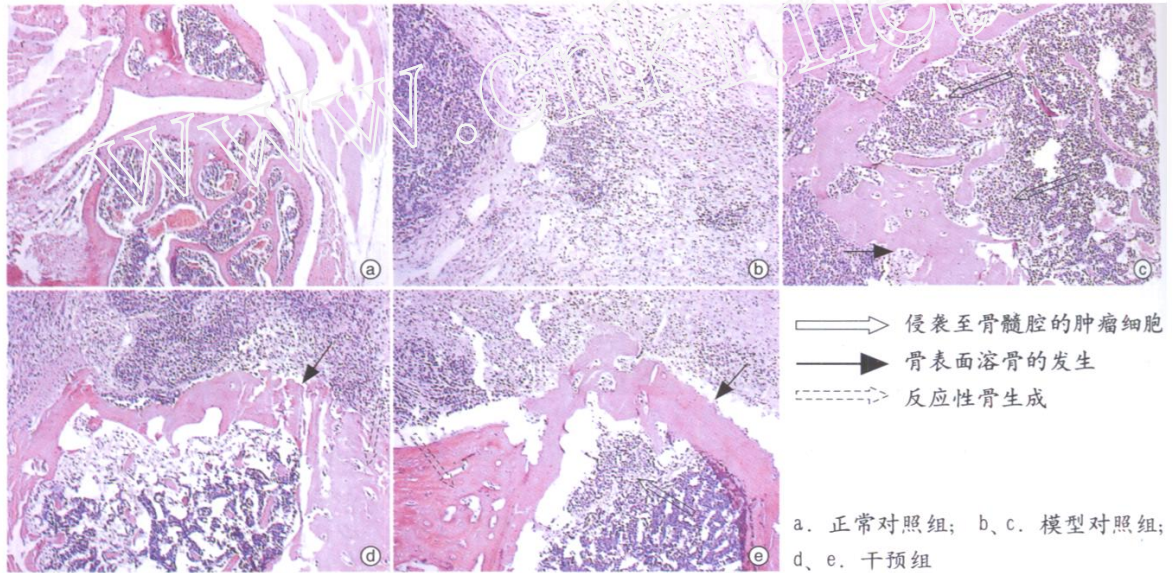


图2 肿瘤性骨损伤的病理分析

应用荧光原位杂交法检测乳腺癌石蜡样本中 HER-2 基的扩增

(正文见 345 页)

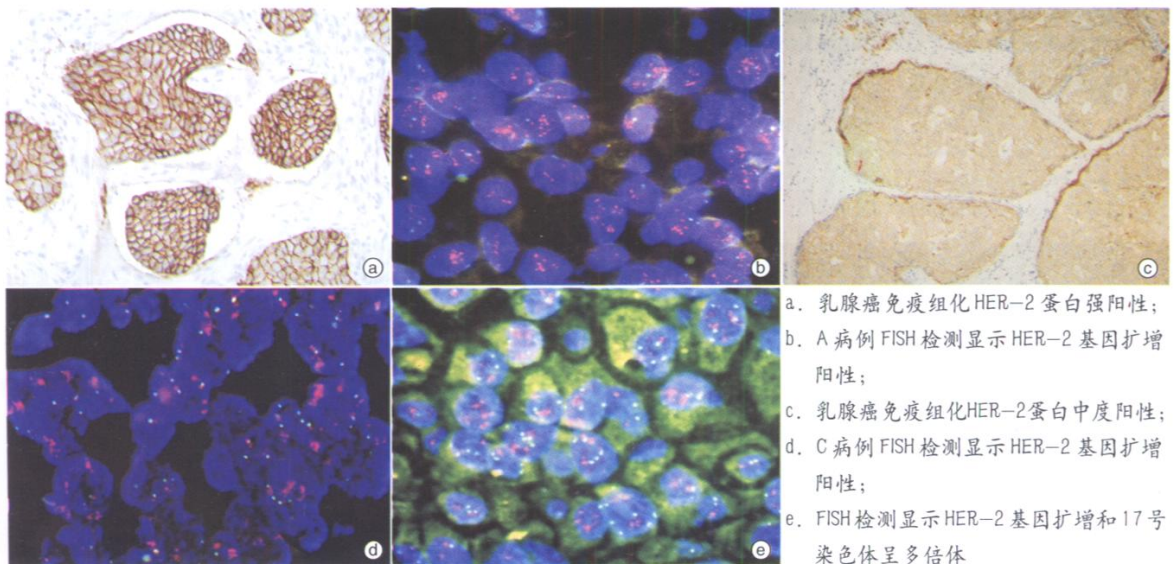


图1 乳腺癌免疫组化及荧光原位杂交检测结果(FISH)