文章编号:1000-5404(2010)12-1301-04

论著

AMD3100对Lewis肺癌进展及荷瘤鼠脾脏髓源抑制性细胞积聚的影响

董伯升,解瑞玲,庞 慧,卞俊杰,郭伟华,成 媛,李醒亚 (450052 郑州,郑州大学第一附属医院肿瘤科)

[摘要] **目的** 观察趋化因子受体CXCR4拮抗剂AMD3100对Lewis肺癌进展及荷瘤鼠脾脏髓源抑制性细胞(myeloid derived suppressor cells,MDSCs)积聚的影响。**方法** 60只荷Lewis肺癌C57BL/6小鼠分为2组:PBS组(腹腔只注射PBS液,0.2 ml/只)、AMD3100组[腹腔注射溶解有2 mg/(kg·d) AMD3100的PBS液,0.2 ml/只,1次/d,共26 d],每组30只。隔日测2组小鼠体质量,记录成瘤时间。26 d随机处死2组荷瘤鼠各15只,剥离瘤体称量,观察肺转移灶数目,用免疫组化法计数瘤组织微血管密度(microvessel density,MVD),流式细胞仪测小鼠脾脏MDSCs比例;统计2组剩余小鼠自然生存天数。**结果** PBS组、AMD3100组小鼠Lewis肺癌成瘤时间分别为(8.03±1.47)、(9.97±1.50) d,接种瘤细胞后26 d瘤质量分别为(3.54±0.93)、(2.09±0.66)g,MVD值分别为(41.40±6.44)、(32.47± 5.33)个/HP,肺癌肺转移灶数目分别为(18.27±9.78)、(7.40± 5.83)个/只,MDSCs比例分别为(19.57±3.59)%、(31.42±5.04)%,中位生存时间分别是第29、34天,2组各项指标比较差异均有统计学意义($P<0.01$)。**结论** AMD3100可延缓Lewis肺癌进展,但可能对荷Lewis肺癌小鼠免疫产生一定的抑制作用。

[关键词] 受体,趋化因子;AMD3100;癌,Lewis肺;髓源抑制性细胞;免疫;生存期;小鼠,近交C57BL
[中图法分类号] R322.21; R392.5; R734.2 **[文献标志码]** A

Effects of AMD3100 on progression of Lewis lung carcinoma and accumulation of myeloid derived suppressor cells in tumor-bearing mice's spleen

Dong Bosheng, Xie Ruiling, Pang Hui, Bian Junjie, Guo Weihua, Cheng Yuan, Li Xingya (Department of Oncology, First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan Province, 450052, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of AMD3100, a specific antagonist of chemokine receptor-4, on the progression of Lewis lung carcinoma and the accumulation of myeloid derived suppressor cells (MDSCs) in tumor-bearing mice's spleen. **Methods** Sixty C57BL/6 mice, inoculated subcutaneously Lewis lung carcinoma cell line LLC, were separated into 2 groups ($n=30$), the PBS and AMD3100 group. The mice in the 2 groups were intraperitoneally injected with 0.2 ml PBS solution or 0.2 ml PBS solution dissolved with AMD3100 [2 mg/(kg·d)] separately. All the mice were injected once per day, and the injection was lasted for 26 d. The mice's weight were measured every other day and the time of oncogenesis was recorded. In 26 d later, 15 mice in every group were randomly sacrificed to count the number of pulmonary metastatic nodules and the weight of Lewis lung carcinoma. Flow cytometry and immunohistochemistry were used to detect the percentage of MDSCs in mice's spleen and the tumor's microvessel density (MVD) separately. Survival time of the remaining mice in the 2 groups were recorded. **Results** The time of oncogenesis in PBS and AMD3100 group were (8.03±1.47) and (9.97±1.50) d separately. The tumor's weight, MVD, number of pulmonary metastatic nodules and percentage of MDSCs in PBS group were (3.54±0.93)g, (41.40±6.44)/HP, (18.27±9.78) nodules/animal, and (19.57±3.59)% respectively. But, in AMD3100 group, these indexes were (2.09±0.66)g, (32.47±5.33)/HP, (7.40±5.83) nodules/animal, and (31.42±5.04)% separately. The median survival time in PBS and AMD3100 group was 29 and 34 d separately. All the indexes between the 2 groups were significant($P<0.01$). **Conclusion** AMD3100 inhibits the progression of Lewis lung carcinoma, but it may also have some negative impacts on the immune of the mice bearing Lewis lung carcinoma.

[Key words] receptors, chemokine; AMD3100; carcinoma, Lewis lung; myeloid derived suppressor cells; immune; survival time; mice, inbreeding C57BL

Supported by the National Nature Science Foundation of China (30672423). Corresponding author: Li Xingya, Tel: 86-371-66295093, E-mail: zlzjonline@yahoo.com.cn

[基金项目] 国家自然科学基金(30672423)
[通信作者] 李醒亚,电话:(0371)66295093,E-mail:zlzjonline@yahoo.com.cn

目前,至少在23种不同类型的恶性肿瘤中检测到瘤细胞表达CXCR4,CXCR4与其唯一配体CXCL12(SDF-1)结合,促进肿瘤进展[1]。AMD3100为CXCR4受体拮抗剂[2],具有动员鼠和人骨髓造血干/祖细胞出髓的作用[3]。AMD3100靶向作用于CXCR4分子阻断CXCR4/CXCL12轴可能会延缓这些肿瘤的进展;也可能会动员骨髓造血干/祖细胞出髓,使外周积聚大量的髓源抑制性细胞(myeloid derived suppressor cells,MDSCs),抑制机体免疫,促进肿瘤进展,机制尚不清楚。本研究以荷瘤鼠及高表达CXCR4的Lewis肺癌为研究对象,观察向荷瘤鼠腹腔注射AMD3100后对Lewis肺癌进展及荷瘤鼠脾脏MDSCs积聚的影响,为临床试验提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

C57BL/6纯系小鼠60只,雌性,6~8周龄,体质量16~18 g(上海斯莱克实验动物有限责任公司)。Lewis肺癌细胞株(Lewis lung carcinoma,LLC,上海市肺科医院肺癌免疫研究室惠赠)。DMEM高糖培养基(美国Hyclone公司),胎牛血清(杭州四季青公司)。AMD3100(美国Sigma公司)。CD31多克隆抗体(美国Thermo公司)。CXCL12(SDF-1α)多克隆抗体(美国Santa Cruz公司)。PE-anti-CD11b抗体、FITC-anti-Gr1抗体、纯化抗小鼠CD16抗体、大鼠IgG2b k同型对照及流式细胞缓冲液、红细胞裂解液(美国Biolegend公司)。流式细胞仪(美国BD公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 荷瘤动物模型的建立 LLC细胞株接种于含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基中培养。取0.2 ml(密度为5×10^6/ml)接种于C57BL/6小鼠右腋部背侧皮下,建立第1代荷瘤鼠模型。2周后处死荷瘤鼠,无菌剥离Lewis肺癌制瘤细胞悬液,取0.2 ml(密度为2.5×10^6/ml)接种C57BL/6小鼠皮下建立第2代荷瘤鼠模型。依次连续6次体内传代。剥离第7代荷瘤鼠瘤体制瘤细胞悬液,同样方法接种C57BL/6小鼠皮下建立荷Lewis肺癌小鼠模型。

1.2.2 分组及给药方法 将60只荷Lewis肺癌的C57BL/6纯系小鼠按完全随机分组法分为PBS组、AMD3100组2组($n=30$)。PBS组小鼠腹腔只注射PBS液,0.2 ml/只;AMD3100组小鼠腹腔注射溶解AMD3100[2 mg/(kg·d)]的PBS液,0.2 ml/只,均1次/d,共26 d。

1.2.3 Lewis肺癌进展指标观察 从皮下接种Lewis肺癌细胞后隔日测2组小鼠体质量;每日触摸小鼠接种瘤细胞处皮肤,记录成瘤时间。26 d后每组完全随机分组法各处死荷瘤鼠15只,剥离瘤体称量,计数肺转移灶数目。记录剩余荷瘤鼠自皮下接种Lewis肺癌细胞至自然死亡时间。

1.2.4 免疫组化染色及结果判定 剥离瘤体,10%甲醛固定。S-P法检测瘤组织内CXCL12(SDF-1α)及CD31表达。用已知的阳性切片作阳性对照,PBS代替一抗作阴性对照。瘤组织局部染色呈棕黄色为阳性表达。CD31阳性染色定位于血管内皮细胞,低倍镜(×100)下寻找血管密度最密集的5个区域,高倍镜(×200)下计数取平均值为微血管密度(microvessel density,MVD)值。

1.2.5 流式细胞仪检测小鼠脾脏MDSCs的比例 取处死小鼠新鲜脾脏制单细胞悬液,裂解悬液中红细胞;离心、洗涤调整脾细胞悬液浓度,加抗小鼠CD16抗体阻断细胞表面Fc受体,加荧光标记的$CD11b^+$、$Gr1^+$抗体与相应受体结合,再洗涤细胞,悬液避光孵育后上机检测。

1.3 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示。采用SPSS 16.0统计软件对两样本均数进行独立样本t检验;生存率及单因素生存分析分别采用Kaplan-Meier和Log-rank法检验。

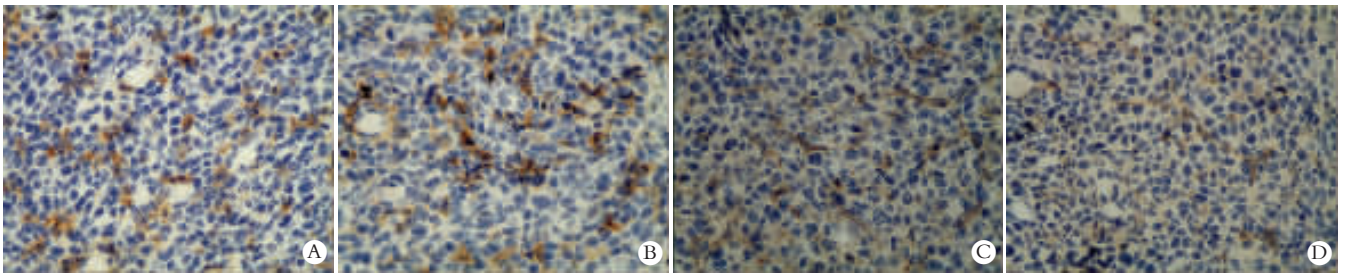
2 结果

2.1 小鼠Lewis肺癌组织CXCL12、CD31表达及MVD值比较

CXCL12(SDF-1α)在2组Lewis肺癌瘤组织中均高表达。主要分布在血管周围,瘤组织间质细胞及部分瘤细胞细胞质和细胞膜;CD31定位于瘤组织微血管内皮细胞。PBS组Lewis肺癌剥离后表面红润、质脆、剖开后出血较多;AMD3100组Lewis肺癌剥离后表面苍白、质韧、剖开后几乎无出血。2组小鼠Lewis肺癌MVD值分别为(41.40±6.44)、(32.47±5.33)个/HP。AMD3100组小鼠Lewis肺癌血管生成较PBS组少($P<0.01$)。见图1。

2.2 小鼠成瘤时间及26 d后瘤质量

2组小鼠Lewis肺癌成瘤时间分别为(8.03±1.47)、(9.97±1.50) d;接种瘤细胞后26 d瘤质量分别为(3.54±0.93)、(2.09±0.66) g。AMD3100组小鼠Lewis肺癌成瘤时间延迟且生长受到抑制($P<0.01$)。



A:PBS组小鼠CXCL12(SDF-1α)表达;B:AMD3100组小鼠CXCL12(SDF-1α)表达;C:PBS组小鼠CD31表达;D:AMD3100组小鼠CD31表达

图1 2组小鼠Lewis肺癌组织CXCL12(SDF-1α)、CD31的表达 (S-P ×400)

2.3 小鼠成瘤前体质量变化情况

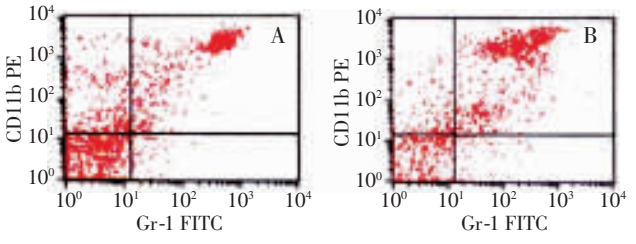
2 组小鼠接种 Lewis 肺癌细胞后体质量分别为(17.36 ± 0.51)、(17.43 ± 0.53) g,2 组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。成瘤前 8 d,2 组小鼠进食量无减少,体质量无减轻,均较机敏、活泼,无精神萎靡表现。第 8 天,PBS 组、AMD3100 组小鼠体质量分别为(17.26 ± 0.53)、(17.32 ± 0.59) g,2 组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 小鼠 Lewis 肺癌肺转移灶数目

Lewis 肺癌肺转移灶在肺脏表面为类圆形凸起结节,大结节多红润,小结节如"水泡"状。PBS 组、AMD3100 组小鼠 Lewis 肺癌肺转移灶数目分别为(18.27 ± 9.78)、(7.40 ± 5.83)个/只。AMD3100 组小鼠 Lewis 肺癌肺转移灶数目较 PBS 组少($P < 0.01$)。

2.5 荷瘤小鼠脾脏 MDSCs 细胞比例

PBS 组荷瘤鼠脾脏 MDSCs 比例为(19.57 ± 3.59)%,AMD3100 组荷瘤鼠脾脏 MDSCs 比例为(31.42 ± 5.04)%。与 PBS 组相比,AMD3100 组荷瘤鼠脾脏 MDSCs 比例较高($P < 0.01$)。见图 2。



A:PBS 组;B:AMD3100 组

图 2 流式细胞术检测 2 组荷瘤小鼠脾脏 MDSCs 比例

2.6 2 组荷瘤鼠生存情况

26 d 后 PBS 组荷瘤小鼠精神状态不如 AMD3100 组,表现出精神萎靡、活动度减少、反应迟钝;AMD3100 组小鼠则很少有精神萎靡表现、活动度稍减少、反应尚敏捷。2 组荷瘤小鼠最初出现死亡时间分别为皮下接种瘤细胞后第 27、29 天,中位生存时间分别是第 29、34 天。AMD3100 组荷瘤小鼠生存期较 PBS 组延长($P < 0.01$)。见图 3。

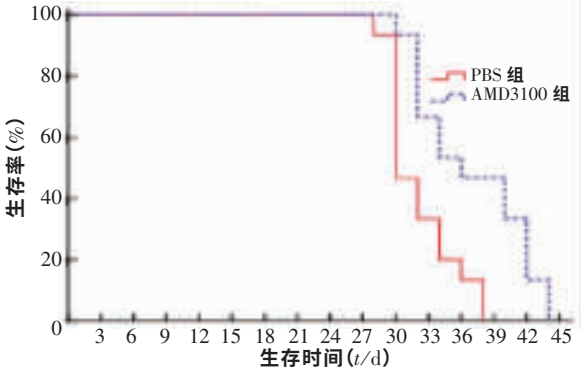


图 3 2 组荷瘤小鼠生存曲线

3 讨论

CXCR4 是一高度保守的 G 蛋白偶联的跨膜蛋白受体,在人体实体瘤上普遍表达,高表达 CXCR4 多提示预后较差。探索靶向作用 CXCR4 的分子靶向药物抑制肿瘤进展,具有重要的实践意义。

Lewis 肺癌细胞高表达 CXCR4[4],本研究发现其唯一配体 CXCL12(SDF-1α)在 Lewis 肺癌组织中也高表达。既往研究[5]发现 SDF-1/CXCR4 通路是调节血管新生的一个分子枢纽。肿瘤组织分泌的 SDF-1 能够使 $CXCR4^+$ 的内皮前体细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)向肿瘤部位发生趋化迁移[6]。微血管周壁纤维细胞上表达的 SDF-1 具有存留 $CXCR4^+$ 的 EPCs 的作用,而这些 EPCs 能够促进微血管内皮增值进而促进血管新生[7]。体外研究[8]发现 AMD3100 可完全阻断 SDF-1 对 EPCs 的促迁移和增殖作用。本研究发现 AMD3100 组 Lewis 肺癌 MVD 值较 PBS 组小,可能是 AMD3100 阻断 SDF-1/CXCR4 分子通路,抑制了 EPCs 参与瘤组织血管生成的结果。AMD3100 组小鼠 Lewis 肺癌成瘤时间延迟可能是 AMD3100 靶向作用于 Lewis 肺癌细胞 CXCR4 分子,阻断了 CXCL12 对 Lewis 肺癌细胞的促增殖作用,另外也可能与 AMD3100 组 Lewis 肺癌血管生成受到抑制有关。

既往研究[9]发现抗 CXCR4 抗体抑制了 $CXCR4^+$ 的乳腺癌细胞向高表达其配体的小鼠肺脏发生趋化运动,肺转移受到抑制。本研究 AMD3100 组小鼠 Lewis 肺癌肺转移灶较 PBS 组少,可能是由于 AMD3100 靶向作用于 CXCR4 抑制了 Lewis 肺癌细胞向小鼠肺脏发生趋化性迁移的缘故;也可能是 AMD3100 靶向作用于肺转移灶微环境中 $CXCR4^+$ 瘤细胞及部分 EPCs,瘤细胞增殖及转移灶血管生成受到抑制,最终不能形成肉眼可见的转移灶。

临床上部分分子靶向药物在抑制肿瘤增长的同时并没有使患者生存期延长。Yasumoto 等[10]发现向裸鼠腹腔连续注射 AMD3100 抑制了 $CXCR4^+$ 腹腔胃转移癌的进展,但不知裸鼠生存是否获益。本研究发现 AMD3100 组小鼠生存期较 PBS 组延长,提示 AMD3100 应用于临床可能使患者生存获益,具有潜在的优势。另外,与 Yasumoto 等的研究结果一致,本研究也没发现 AMD3100 的毒性,成瘤前 8 d,2 组小鼠体质量变化无差异。既往研究[11]也发现 AMD100 对人体无严重的副反应和剂量限定性的毒性。这说明 AMD3100 应用于人体治疗 CXCR4 阳性的实体瘤可能不会出现严重的毒性反应。

MDSCs 是一群由不同分化阶段的髓系来源的非成熟细胞构成,在小鼠体内表达 Gr1、CD11b 分子[12]。随着 Lewis 肺癌增长,其分泌的一些细胞因子会动员骨髓幼稚细胞出髓,使 MDSCs 在荷瘤鼠脾脏日渐积聚[13]。荷瘤鼠外周异常积聚的 MDSCs 对机体免疫起着抑制作用,而选择性去除荷瘤鼠脾脏异常积聚的 MDSCs 后荷瘤鼠抗瘤能力增强[14]。本研究发现

AMD3100组荷瘤鼠Lewis肺癌较PBS组轻,但脾脏MDSCs积聚却较PBS组增加,其机制可能是AMD3100通过动员骨髓造血干/祖细胞出髓使小鼠外周非成熟髓系细胞积聚增多的缘故。AMD3100组荷瘤鼠脾脏MDSCs积聚较PBS组荷瘤鼠多,提示AMD3100组荷瘤鼠免疫抑制会较PBS组严重。但本研究发现AMD3100组荷瘤鼠生存期延长,推测主要原因可能是AMD3100对AMD3100组小鼠Lewis肺癌的生长和转移的抑制作用较强,小鼠肿瘤负荷较少的缘故。

总之,本研究发现向荷Lewis肺癌小鼠腹腔注射AMD3100后,Lewis肺癌进展受到抑制,脾脏MDSCs积聚增多。推测AMD3100作为分子靶向药物应用于临床可能对表达CXCR4的实体瘤进展有一定的抑制作用,但也可能使患者外周脾脏积聚大量的MDSCs抑制患者免疫。更深层的作用机制及实际结果如何,还有待进一步研究。

参考文献:

[1] Balkwill F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4[J]. Semin Cancer Biol, 2004, 14(3): 171-179.

[2] Fricker S P, Anastassov V, Cox J, *et al*. Characterization of the molecular pharmacology of AMD3100: a specific antagonist of the G-protein coupled chemokine receptor, CXCR4[J]. Biochem Pharmacol, 2006, 72(5): 588-596.

[3] Broxmeyer H E, Orschell C M, Clapp D W, *et al*. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist[J]. J Exp Med, 2005, 201(8): 1307-1318.

[4] 蔡卫斌, 程锐, 徐祖敏 等. Lewis肺癌细胞趋化因子受体CXCR4表达的研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2008, 15(17): 1281-1284.

[5] Petit I, Jin D, Rafii S. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis[J]. Trends Immunol, 2007, 28(7): 299-307.

[6] Orimo A, Gupta P B, Sgroi D C, *et al*. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion[J]. Cell, 2005, 121(3): 335-348.

[7] Grunewald M, Avraham I, Dor Y, *et al*. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells[J]. Cell, 2006, 124(1): 175-189.

[8] 尹扬光, 黄岚, 赵晓辉, 等. SDF-1对内皮祖细胞增殖迁移的影响及AMD3100对其的干预[J]. 第三军医大学学报, 2006, 29(6): 475-478.

[9] Muller A, Homey B, Soto H, *et al*. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis[J]. Nature, 2001, 410(6824): 50-56.

[10] Yasumoto K, Koizumi K, Kawashima A, *et al*. Role of the CXCL12/CXCR4 axis in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer[J]. Cancer Res, 2006, 66(4): 2181-2187.

[11] Hendrix C W, Flexner C, MacFarland R T, *et al*. Pharmacokinetics and safety of AMD-3100, a novel antagonist of the CXCR-4 chemokine receptor, in human volunteers[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(6): 1667-1673.

[12] Gabrilovich D I, Bronte V, Chen S H, *et al*. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells[J]. Cancer Res, 2007, 67(1): 425-426.

[13] 李和权. CD11b$^+$/Gr-1$^+$髓系抑制性细胞通过膜结合型TGFβ抑制NK细胞杀伤活性的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2007.

[14] Suzuki E, Kapoor V, Jassar A S, *et al*. Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1$^+$/CD11b$^+$ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(18): 6713-6721.

(**收稿**:2009-12-07;**修回**:2010-03-05)

(编辑 汪勤俭)

(上接1300页)

2 讨论

West综合征又称为婴儿痉挛,是一种严重的年龄依附性癫痫综合征,几乎只发生于婴儿。具有典型的临床表现:反复痉挛发作、脑电图高度失律、明显的精神运动发育落后,诊断并不困难[1]。West综合征并不是一种单独的疾病,很多因素包括产前因素、围产期因素、产后因素、代谢性疾病与中枢神经系统感染都可以引起本病。随着检查手段的发展,症状性West综合征的比例越来越高。本例患者的原因很可能是出生时窒息缺氧,进而引起海马硬化造成的。

儿童癫痫中婴儿痉挛属于药物难治性,早期手术不仅有利于控制癫痫发作,还可改善患者的大脑功能发育和神经心理功能的恢复。癫痫手术的疗效取决于术前准确的癫痫灶定位与完善的术前评估[2]。视频脑电图是最常用的检查方法,它记录的是神经细胞外电信号,作为致痫灶的定位手段,其准确性不高。脑磁图是最新出现的一种癫痫灶定位方法,它记录的是神经元活动所产生的磁信号变化,能探测极其微弱的脑磁信号,信号无变形、失真与衰减,具有良好的时间分辨率与空间分辨率[3]。本例在影像学发现左颞叶异常的基础上,联合采用视频脑电图与脑磁图进行癫痫灶定位:双侧颞、枕有异常脑电发放,以左侧为主。考虑到婴儿痉挛常有全面性与多灶性起源的特点,我们在行颞叶前部切除病灶的基础上,再次行胼胝体前部切开术来防止异常电活动在半球间的传导。经2年随访证实:术后患者癫痫发作停止,语言能力提高,能简单对话,智力较术前明显好转。我们认为准确的术前评估与癫痫灶定位是保证West综合征手术疗效的关键。

参考文献:

[1] 任志伟,张国君,王玉平. 婴儿痉挛的手术治疗[J]. 中国微侵袭神经外科杂志,2009,14(11):520-522.

[2] Ramachandrannair R, Ochi A, Imai K, *et al*. Epileptic spasms in older pediatric patients: MEG and ictal high-frequency oscillations suggest focal-onset seizures in a subset of epileptic spasms[J]. Epilepsy Res, 2008, 78(2/3): 216-224.

[3] Hattori H, Yamano T, Tsutada T, *et al*. Magnetoencephalography in the detection of focal lesions in West syndrome[J]. Brain Dev, 2001, 23(7): 528-532.

(**收稿**:2010-04-25;**修回**:2010-05-26)

(编辑 栾 嘉)