

### <sup>153</sup>钐-氯屈膦酸二钠在原位人骨肉瘤裸鼠模型中的疗效

罗旭耀<sup>1\*</sup>, 沈 茜<sup>2</sup>, 苗积生<sup>3</sup>, 陈 舰<sup>4</sup>, 徐建明<sup>5</sup>, 纪 方<sup>6</sup>

(1. 解放军第 411 医院骨科, 上海 200081; 2. 第二军医大学长海医院实验诊断科, 上海 200433; 3. 上海第一肺科医院免疫室, 上海 200433; 4. 上海市普陀区人民医院骨科, 上海 200060; 5. 第二军医大学药学院有机化学教研室, 上海 200433; 6. 第二军医大学长海医院骨科, 上海 200433)

**[摘要]** **目的:**观察<sup>153</sup>钐-氯屈膦酸二钠(<sup>153</sup>Sm-clodronate)在原位人骨肉瘤裸鼠动物模型中的疗效。**方法:**以人骨肉瘤细胞系 HOS-8603 接种 SCID 小鼠皮下, 成瘤后经 BALB/c 裸鼠胫骨移植传代, 再接种裸鼠胫骨建立原位人骨肉瘤裸鼠模型, 测定<sup>153</sup>Sm-clodronate 的生物分布, 并通过外观、瘤体质量、钼靶 X 线片、组织学观察和生存期与<sup>153</sup>Sm-EDTMP、clodronate 对照进行疗效观察。**结果:**注射后 24 h 生物分布示瘤骨分布远高于其他组织, 放射性计数比瘤骨/血=4 627.1 : 1, 瘤骨/正常骨=10.8 : 1, 正常骨/肝脏=8.4 : 1。<sup>153</sup>Sm-clodronate 治疗组较对照组溶骨反应轻, 生存期显著延长, 但是瘤体质量没有明显差异。**结论:**<sup>153</sup>Sm-clodronate 浓聚于瘤骨, 在原位人骨肉瘤裸鼠模型中的疗效较好, 有进一步实验研究和临床应用的前景。

**[关键词]** 钐-153; 氯屈膦酸二钠; 骨肉瘤; 移植; 模型; 动物

**[中图分类号]** R 738.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)10-1094-04

### Therapeutic effect of <sup>153</sup>sm-clodronate on nude mice orthotopically transplanted with human osteosarcoma

LUO Xu-yao<sup>1\*</sup>, SHEN Qian<sup>2</sup>, MIAO Ji-sheng<sup>3</sup>, CHEN Jian<sup>4</sup>, XU Jian-ming<sup>5</sup>, JI Fang<sup>6</sup> (1. Department of Orthopedics, No. 411 Hospital of PLA, Shanghai 200081, China; 2. Department of Laboratory Diagnosis, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433; 3. Department of Immunity, Shanghai First Pulmonary Hospital, Shanghai 200433; 4. Department of Orthopedics, People's Hospital of Putuo District, Shanghai 200060; 5. Department of Organic Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433; 6. Department of Orthopedics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To observe the therapeutic effect of <sup>153</sup>Sm-clodronate on nude mice orthotopically transplanted with human osteosarcoma. **Methods:** Severe combined immune deficiency (SCID) mice were subcutaneously inoculated with human osteosarcoma cell line HOS-8603. The formed tumors were then transplanted into BALB/c nude mice at the tibia for passage; the tumors were harvested for establishing orthotopical mice model of human osteosarcoma. Mice treated with <sup>153</sup>Sm-EDTMP and clodronate group served as controls. The distribution of <sup>153</sup>Sm-clodronate was determined 24 h later. The appearance, tumor weights, X-ray examination, histological observation, and survival of mice were compared between the 3 groups. **Results:** It showed that the distribution of <sup>153</sup>Sm-clodronate in the lesion bone was much higher than that in other organs, with the radioactive ratio of lesion bone to blood being 4 627.1 : 1, lesion bone to normal bone being 10.8 : 1, and normal bone to liver being 8.4 : 1. <sup>153</sup>Sm-clodronate treated mice had a slighter osteolytic reaction and a longer survival period, but the tumor mass was not significantly different compared with those of the control group. **Conclusion:** <sup>153</sup>Sm-clodronate gathers at the lesion bone and it has good therapeutic effect on the mice model of human osteosarcoma, making it a promising agent for treatment of bone tumor.

**[KEY WORDS]** samarium-153; clodronate; osteosarcoma; transplantation; models, animal

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(10):1094-1097]

控制癌性骨痛的常用方法有放射性核素和双膦酸盐治疗, 代表药物有<sup>153</sup>钐-乙二胺四甲撑膦酸(<sup>153</sup>Sm-EDTMP)和氯屈膦酸二钠(clodronate)<sup>[1]</sup>。Clodronate 能抑制破骨细胞活性, 防止羟基磷灰石晶体溶解, 改变肿瘤细胞的微环境, 减轻溶骨反应, 缓解骨痛。实验发现 clodronate 能整合放射性核素<sup>153</sup>Sm, 携带<sup>153</sup>Sm 进入骨肿瘤病灶, 其 β 射线能直接杀伤肿瘤细胞, <sup>153</sup>Sm-clodronate 应该可以从抑制骨溶解和肿瘤内照射放疗两方面发挥治疗作用。原

位人骨肉瘤裸鼠动物模型模拟骨肿瘤生长环境, 接近骨肿瘤患者实际<sup>[2]</sup>, 我们通过此模型来观察<sup>153</sup>Sm-clodronate 在体内的分布和疗效。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**[作者简介]** 罗旭耀, 硕士, 主治医师。

\* Corresponding author. E-mail: luoxuyao@hotmail.com

1.1.1 实验动物 重度联合免疫缺陷小鼠(SCID小鼠),4 周龄,12~15 g,雄性。BALB/c 裸鼠,4 周龄,12~15 g,雄性。由第二军医大学实验动物中心提供。

1.1.2 仪器和试剂 Clodronate 由第二军医大学基础部化学教研室提供。 $^{153}\text{SmCl}_3$  和  $^{153}\text{Sm-EDTMP}$  由北京市中国原子能科学研究院提供。RPMI 1640 培养液、胎牛血清、胰酶消化液及细胞培养仪器设备由第二军医大学长海医院实验诊断科提供。FMJ 单管  $\gamma$  计数器由上海市第一肺科医院免疫研究室提供。

1.1.3 肿瘤细胞 已体外建系,经过生物学特性鉴定的人骨肉瘤细胞系 HOS-8603<sup>[3]</sup>。

## 1.2 实验方法

1.2.1  $^{153}\text{Sm-clodronate}$  的制备 取 clodronate 溶液 5 ml(60 mg/ml)加入 1 ml  $^{153}\text{SmCl}_3$ (10 mg/ml,  $^{153}\text{Sm}$  放射性活度约 740 MBq/ml),调 pH 值为 4,100℃ 水浴加热 20 min,标记率可达 92% 以上。

1.2.2 传代人骨肉瘤细胞的培养和接种 以人骨肉瘤细胞悬液接种 SCID 小鼠背部皮下,成瘤后经 BALB/c 裸鼠胫骨移植传代,胫骨接种处骨质破坏,软组织瘤体达 0.5~1.0 cm 后,制成细胞悬液再次接种 BALB/c 裸鼠胫骨,建立原位人骨肉瘤裸鼠模型。

1.2.3  $^{153}\text{Sm-clodronate}$  在原位人骨肉瘤裸鼠模型体内的生物分布 取 6 只接种 4 周后的荷瘤裸鼠,尾静脉注入  $^{153}\text{Sm-clodronate}$  0.2 ml 24 h 后,摘眼球取血,颈椎脱臼处死动物,立即剖取心、肝、脾、肺、肾、肠、甲状腺、瘤骨和对侧正常骨,分别称量并在  $\gamma$  计数器上测定放射性计数,计算出每克组织的放射性计数(cpm/g)。

1.2.4  $^{153}\text{Sm-clodronate}$  对原位人骨肉瘤裸鼠模型的疗效观察 接种后裸鼠 18 只随机分 3 组,分别为  $^{153}\text{Sm-clodronate}$  治疗组和 clodronate 对照组、 $^{153}\text{Sm-EDTMP}$  对照组。第 1、2 组 clodronate 剂量 3 mg/只,第 1、3 组  $^{153}\text{Sm}$  放射性活度约为 7.4 MBq/只。接种后次日及每隔 2 周尾静脉注射用药一次。

接种后第 4 周和第 6 周摄钼靶 X 线片和外观彩照,并观察生存期至第 7 周末,记录每只动物的死亡日期,称取裸鼠体质量和瘤体质量。7 周后处死存活的实验动物,称取裸鼠体质量和瘤体质量,肿瘤标本固定脱钙后常规石蜡切片 H-E 染色。

1.3 统计学处理 荷瘤裸鼠注射  $^{153}\text{Sm-clodronate}$  后 24 h 各脏器中的放射性计数 cpm/g 呈对数正态分布,取  $x = \lg(X+1)$  行对数变换后再进行方差分析。各组荷瘤裸鼠的体质量和瘤体质量比较采用方差分析。生存期比较采用 log-rank 卡方法时序检验。

## 2 结果

2.1 模型建立情况 SCID 小鼠接种两周后皮下长出肿瘤,4 周后直径达 0.5~1.0 cm,将肿瘤移植入 BALB/c 裸鼠胫骨,4 周后瘤体达 0.5~1.0 cm,骨质明显破坏,再传代植入 BALB/c 裸鼠胫骨进行下一步实验。接种 3 周后软组织可见肿块,4 周后瘤体明显。

2.2  $^{153}\text{Sm-clodronate}$  在原位人骨肉瘤裸鼠模型体内的生物分布 荷瘤裸鼠注射  $^{153}\text{Sm-clodronate}$  后 24 h 各脏器中的放射性计数(cpm/g)呈对数正态分布,取  $x = \lg(X+1)$  行对数变换后,瘤骨、正常骨、肝、脾、肾、甲状腺和血的分布分别为  $3.73 \pm 0.09$ 、 $2.68 \pm 0.04$ 、 $1.77 \pm 0.08$ 、 $1.45 \pm 0.11$ 、 $1.08 \pm 0.11$ 、 $0.83 \pm 0.07$  和  $0.30 \pm 0.04$ ,放射性计数比瘤骨/血 = 4 627.1 : 1,瘤骨/正常骨 = 10.8 : 1,正常骨/肝脏 = 8.4 : 1,心、肺、肾等软组织分布极少。经方差分析可见,瘤骨浓聚极为明显,瘤骨、正常骨、肝、血中分布各组间相差均有显著性意义( $P < 0.01$ )。

2.3 荷瘤裸鼠外观 各组间软组织肿瘤体积未见明显差别,6 周时各组存活鼠外观照片如图 1 所示,7 周时以及动物死亡时的瘤体质量和裸鼠体质量如表 1 所示。各组瘤体质量差异无显著性意义( $F = 0.17$ ,  $P > 0.05$ ),各组裸鼠体质差异也无显著性意义( $F = 0.37$ ,  $P > 0.05$ )。



图 1 荷瘤裸鼠外观(接种 6 周后)

Fig 1 Appearance of nude mice 6 weeks after inoculation

A:  $^{153}\text{Sm-clodronate}$  group; B: Clodronate group; C:  $^{153}\text{Sm-EDTMP}$  group

表 1 荷瘤裸鼠的体质量和瘤体质量比较

Tab 1 Comparison of body weights and tumor weights

(n=6,  $\bar{x} \pm s, m/g$ )

Group	Body weight	Tumor weight
<sup>153</sup> Sm-clodronate	22.35 ± 2.37	6.56 ± 2.86
Clodronate	21.88 ± 2.96	6.14 ± 2.47
<sup>153</sup> Sm-EDTMP	20.95 ± 3.18	5.72 ± 2.06

2.4 钼靶 X 线片表现 接种 4 周后<sup>153</sup>Sm-clodronate 治疗组溶骨不明显,骨质尚完整。Clodronate 和<sup>153</sup>Sm-EDTMP 对照组均出现溶骨,以<sup>153</sup>Sm-EDTMP 组明显。接种 6 周后治疗组表现不一,不溶骨至中度溶骨,而对照组存活鼠溶骨严重,有的出现病理骨折,如图 2 所示。



图 2 钼靶 X 线片(接种 6 周后)

Fig 2 Radiography with molybdenum target tube 6 weeks after inoculation

A: <sup>153</sup>Sm-clodronate group; B: Clodronate group; C: <sup>153</sup>Sm-EDTMP group

2.5 组织学观察 接种 7 周后,<sup>153</sup>Sm-clodronate 治疗组 H-E 染色见肿瘤包裹下的骨皮质基本完整,肿瘤细胞部分坏死,clodronate 对照组肉眼见胫骨破坏,H-E 染色见肿瘤细胞无明显坏死,侵入骨皮质溶解骨基质,<sup>153</sup>Sm-EDTMP 对照组肉眼见胫骨破坏伴病理骨折,H-E 染色见溶骨明显,但肿瘤细胞、骨髓细胞大片坏死。

2.6 生存期比较 各组生存期如图 3 所示。经过 logrank 卡方法时序检验,治疗组生存期与两对照组生存期有显著差别(P<0.05),两对照组之间差别不显著(P>0.05)。

### 3 讨论

放射性核素<sup>153</sup>Sm 物理半衰期为 46.2 h,其发射的 β 射线能量为 810 keV,β 射线射程平均为 3 mm,对周围正常组织影响小。<sup>153</sup>Sm 还发射能量为 103 keV 的 γ 射线便于影像学观察,但也有一定量的辐射。<sup>153</sup>Sm-EDTMP 静脉注射后 2~3 h,约 60% 被骨组织吸收,病变骨与正常骨放射性摄取比值为 16 : 1<sup>[4]</sup>。<sup>153</sup>Sm-EDTMP 能有效缓解骨转移瘤患者的疼痛症状,增加患者的活动性,提高生活质量,而且骨髓抑制弱,不良反应不严重<sup>[5]</sup>。

双膦酸盐的生物活性结构是 P-C-P 核心,R1 和 R2 的侧链结构分别决定其对骨组织的亲和性和抑制骨吸收的活性<sup>[6]</sup>。双膦酸盐能干扰破骨细胞的附着,诱导破骨细胞凋亡,抑制破骨细胞对骨的吸附和重吸收。它具有体内外的抗肿瘤活性,影响肿瘤细胞的黏附、侵袭、增殖,以协同方式增强细胞毒药物的作用。文献报道双膦酸盐能显著降低癌症患者骨相关事件(SRE)的发生率<sup>[7]</sup>。目前新一代双膦酸盐不断出现,如 pamidronate、zoledronic acid、ibandronate 等,它们的确切作用还需要大样本的随机对照研究来证实。而 clodronate 临床应用时间长,能够减少多种癌症如乳腺癌的骨转移发生率,并延长生存期<sup>[7-8]</sup>。

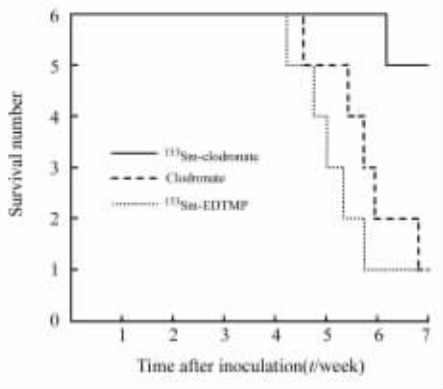


图 3 <sup>153</sup>Sm-clodronate 对荷瘤裸鼠生存时间的影响

Fig 3 Effect of <sup>153</sup>Sm-clodronate on survival rate of nude mice harboring human osteosarcoma

A: <sup>153</sup>Sm-clodronate group; B: Clodronate group; C: <sup>153</sup>Sm-EDTMP group

建立原位移植动物模型,即将肿瘤细胞移植到与肿瘤原发部位相似的组织或脏器中,动物体内肿瘤生长的微环境和生物学行为与患者体内相似,能够准确评价肿瘤的治疗效果。目前仅有少数报道建立了原位骨肉瘤动物模型<sup>[10-11]</sup>,国内陈永裕等<sup>[3,12]</sup>用人成骨肉瘤细胞 HOS-8603 悬液注射到裸鼠股骨髓腔内建立成功,其后进行了 $^{125}\text{I}$ -HOS McAb 单克隆抗体的显像研究。1997 年 Crnalic 等<sup>[13]</sup>将人胫骨骨肉瘤传代后取完整的瘤块植入裸鼠胫骨近端,结果两周内全部致瘤,肿瘤影像学、组织学及生物学特性与原供瘤者相似,肺转移率 100%,淋巴结转移率 48%,肝转移率 19%。王臻等<sup>[2]</sup>用人骨肉瘤细胞系 HOS-98 建立人骨肉瘤裸鼠胫骨原位移植模型,探讨宿主器官微环境对人骨肉瘤细胞侵袭及转移等生物学行为的影响,认为裸鼠胫骨原位移植模型的恶性生物学行为更接近临床骨肉瘤患者的体内侵袭及转移实际。但是国内未见在原位人骨肉瘤动物模型中进行疗效观察的报道。

本实验参照文献<sup>[3]</sup>方法建立原位人骨肉瘤裸鼠模型,用于 $^{153}\text{Sm}$ -clodronate 的疗效研究。生物分布结果显示放射性计数比瘤骨/血 = 4 627.1 : 1,瘤骨/正常骨 = 10.8 : 1,正常骨/肝脏 = 8.4 : 1,心肺肾等软组织分布极少,与 clodronate 的分布基本相符。本实验以 clodronate 和 $^{153}\text{Sm}$ -EDTMP 为对照,评价 $^{153}\text{Sm}$ -clodronate 对原位人骨肉瘤裸鼠模型的治疗作用,显示 $^{153}\text{Sm}$ -clodronate 能显著减轻肿瘤所致的溶骨破坏,延长动物生存期,但是对软组织内肿瘤生长抑制作用不明显。接种 7 周后三组动物组织切片 H-E 染色结果差异明显,治疗组肿瘤细胞部分坏死,骨质破坏少,可见骨髓细胞增生,clodronate 对照组见肿瘤细胞侵犯入骨,无明显坏死,而 $^{153}\text{Sm}$ -EDTMP 对照组见骨质破坏重,瘤区大片坏死,无论肿瘤细胞、骨细胞、骨髓细胞,可能与放射剂量较大(每次 $>370\text{ MBq/kg}$ )有关,而且骨质破坏后瘤骨内核素浓聚远高于其他组织,也是重要原因。

$^{153}\text{Sm}$ -clodronate 浓聚于瘤骨内,在原位人骨肉瘤裸鼠模型体内疗效明显,有进一步研究和临床应用的前景。

## [参考文献]

- [1] Serafini A N. Therapy of metastatic bone pain[J]. *J Nucl Med*, 2001, 42: 895-906.
- [2] 王臻, 李华林, 孙 崢. 人骨肉瘤原位移植模型的建立及生物学特征[J]. *中国骨肿瘤骨病*, 2002, 1: 38-42.
- [3] 陈永裕, 刘振华, 徐登仁, 等. 裸鼠人成骨肉瘤骨模型的建立[J]. *第二军医大学学报*, 1990, 11: 495-497.
- [4] 李镜发, 邹德环, 朱旭生, 等.  $^{89}\text{Sr}$  和 $^{153}\text{Sm}$ -EDTMP 治疗多发性骨转移癌止痛疗效的评价[J]. *广州医药*, 2006, 37: 12-14.
- [5] Etchebehere E C, Pereira Neto C A, Lima M C, et al. Treatment of bone pain secondary to metastases using samarium-153-EDTMP[J]. *Sao Paulo Med J*, 2004, 122: 208-212.
- [6] Bukowski J F, Dascher C C, Das H. Alternative bisphosphonate targets and mechanisms of action[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 328: 746-750.
- [7] Clezardin P, Ebetino F H, Fournier P G. Bisphosphonates and cancer-induced bone disease: Beyond their antiresorptive activity[J]. *Cancer Res*, 2005, 65: 4971-4974.
- [8] Paterson A H. The role of bisphosphonates in early breast cancer[J]. *Oncologist*, 2006, 11 Suppl 1: 13-19.
- [9] Ross J R, Saunders Y, Edmonds P M, et al. A systematic review of the role of bisphosphonates in metastatic disease[J]. *Health Technol Assess*, 2004, 8: 1-176.
- [10] 杨 宁, 范清宇, 殷剑宁, 等. 完整瘤组织块原位移植法建立人成骨肉瘤转移模型[J]. *癌症*, 2000, 19: 843-846.
- [11] 潘朝晖, 范清宇, 殷剑宁, 等. 人骨肉瘤自发性高肺转移模型的建立及其它生物学特性初探[J]. *第四军医大学学报*, 2000, 21: 509-511.
- [12] 陈永裕, 陈 舰, 宝建中, 等. 用 $^{125}\text{I}$ -HOSMcAb 在骨移植成骨肉瘤组织的裸鼠身上的放射免疫显像[J]. *中华骨科杂志*, 1994, 14: 669-671.
- [13] Crnalic S, Hakasson I, Boqnist L, et al. A novel spontaneous metastasis model human osteosarcoma developed using orthotopic transplantation of intact tumor tissue into tibia of nude mice[J]. *Clin Exp Metastasis*, 1997, 15: 164-172.

[收稿日期] 2007-03-05

[修回日期] 2007-07-30

[本文编辑] 孙 岩