

胡诗恒, 宋昕昊, 林梦娟, 等. 常山酮和盐霉素协同抑制犬乳腺肿瘤细胞的增殖、迁移和克隆形成 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (2): 31-36.  
HU S H, SONG X H, LIN M J, et al. Halofuginone and salinomycin synergistically inhibit the proliferation, migration and clonal formation of canine mammary tumor cells [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (2): 31-36.

## 常山酮和盐霉素协同抑制犬乳腺肿瘤细胞的增殖、迁移和克隆形成

胡诗恒, 宋昕昊, 林梦娟, 郑玉玲, 王俊棋, 游凤, 吕英军,  
高修歌, 张军忍, 江善祥, 郭大伟\*  
(南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 旨在以犬乳腺肿瘤组织上分离所得的细胞 CMT-N7 为体外模型, 评估常山酮和盐霉素联用对犬乳腺肿瘤细胞增殖、迁移和克隆形成的影响。采用常山酮、盐霉素单独以及两药联合处理, 评估对犬乳腺肿瘤细胞的抑制作用, 使用 Chou-Talalay 方法计算联合指数, 确定最佳协同比例, 进一步使用划痕试验和克隆形成试验评估两药在协同比例下联用对犬乳腺肿瘤细胞迁移和克隆形成能力的影响。结果显示: 常山酮和盐霉素呈浓度依赖性地抑制 CMT-N7 细胞的增殖, 且两药联用具有协同抑制作用, 最佳协同比例为 1:1, 该比例下两药联用对犬乳腺肿瘤细胞的迁移和克隆形成的抑制作用比单药更显著 ( $P < 0.01$ )。因此, 常山酮和盐霉素联用能够协同抑制犬乳腺肿瘤细胞的增殖、迁移和克隆形成。本研究为兽医临床抗肿瘤药物的联合应用提供了依据。

**关键词:** 常山酮; 盐霉素; 协同抑制; 犬乳腺肿瘤细胞

中图分类号: S859 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)02-0031-06

## Halofuginone and salinomycin synergistically inhibit the proliferation, migration and clonal formation of canine mammary tumor cells

HU Shiheng, SONG Xinhao, LIN Mengjuan, ZHENG Yuling, WANG Junqi, YOU Feng, LÜ Yingjun,  
GAO Xiuge, ZHANG Junren, JIANG Shanxiang, GUO Dawei\*  
(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** In this study, the effects of the combination of genitone and salinomycin on the proliferation, migration and clonal formation of canine breast tumor cells were evaluated using CMT-N7 isolated from canine breast tumor tissue as an *in vitro* model. The combination of halofuginone, salinomycin and two drugs was used to evaluate the inhibitory effect of the two drugs on canine breast tumor cells, the combination index was calculated using the Chou-Talalay method to determine the optimal synergistic ratio, and scratch test and cloning formation test were further used to evaluate the effect of the combination of the two drugs on the migration and clonal formation abilities of canine breast tumor cells under the synergistic ratio. The results showed that the proliferation of CMT-N7 cells was inhibited in a concentration-dependent manner, the combination of the two drugs had a synergistic inhibitory effect, and the optimal synergistic ratio was 1:1. At this ratio, the combination of the two drugs had a more significant inhibitory effect on the migration and clonal formation of canine breast tumor cells than that of a single drug ( $P < 0.01$ ). Therefore, the combination of halofuginone and salinomycin synergistically inhibited the proliferation, migration and clonal formation of canine breast tumor cells. This study might serve as a basis and reference for the combined application of veterinary clinical antitumor drugs in the future.

**Keywords:** halofuginone; salinomycin; synergistic inhibition; canine mammary tumor cell

收稿日期: 2023-03-23; 修回日期: 2023-11-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32172918); 中央高校基本科研业务费项目 (KYGD202002)

第一作者: 胡诗恒, 女, 硕士研究生

\* 通信作者: 郭大伟, 博士, 副教授, 主要从事兽医药理和药剂学研究, E-mail: gdawei0123@njau.edu.cn.

随着人们生活水平的提升, 养宠观念不断推广与普及, 宠物犬和猫越来越成为人们生活中不可缺少的一部分, 关于如何提升宠物犬猫的生命和生活质量已成为关键科学问题。犬乳腺癌是母犬最常见的癌症之一<sup>[1-2]</sup>, 常自发性发展, 恶性率和死亡率较高, 且能够由良性向恶性发展<sup>[3-4]</sup>。犬乳腺癌与人乳腺癌在流行病学、组织病理学和临床特征等方面都具有相似性<sup>[5]</sup>, 因此被视为良好的人乳腺癌研究和药物评价模型<sup>[6]</sup>。目前兽医临床上治疗犬乳腺癌最主要的手段为手术和化疗, 手术治疗能有效切除肿瘤组织, 但是对远端转移和恶性肿瘤仍然有复发风险。因此, 化疗仍然是抗肿瘤必不可少的治疗手段。

常山酮 (halofuginone) 是一种从植物常山中提取的常山碱的衍生物, 最初被用作抗球虫, 近年来许多研究发现其对多种肿瘤具有抑制作用, 通过抑制肿瘤细胞增殖和诱导肿瘤细胞凋亡来发挥抗肿瘤作用<sup>[7-8]</sup>。盐霉素 (salinomycin) 是一种聚醚类离子载体抗生素, 可有效抑制癌干细胞<sup>[9]</sup>。目前宠物肿瘤的化疗药物较少, 多采用人用抗肿瘤药物, 但由于单一化疗药物对宠物机体的毒性作用使得疗效欠佳且易产生耐药性, 因此开发新的联合用药方案尤为重要。因此, 本研究拟采用常山酮和盐霉素共同作用于犬乳腺肿瘤细胞, 以评估两者间的协同抑制作用, 从而有效减少药物用量、降低毒副作用, 同时增强抗肿瘤效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 药物、组织与细胞

常山酮 (99%) 由山西美林制药有限公司馈赠, 盐霉素 (92%) 购自中国兽医药品监察所, 犬乳腺肿瘤细胞系 CMT-N7 由南京农业大学动物医学院药理与毒理实验室分离构建, 犬乳腺肿瘤组织样品来自南京农业大学教学动物医院。

### 1.2 主要试剂

DMEM 培养基、磷酸盐缓冲液 (PBS) 购自美国 Hyclone 公司, 胎牛血清 (FBS)、0.25% 胰蛋白酶消化液 (含 0.02% EDTA)、青霉素链霉素溶液 (100×)、II 型胶原酶、两性霉素 B 购自美国 Gibco 公司, 细胞活性检测试剂盒 (CCK-8) 购自南京善本生物科技有限公司, 无水乙醇、二甲基亚砜 (DMSO) 购自北京索莱宝科技有限公司。

### 1.3 犬乳腺肿瘤细胞的分离与培养

无菌条件下, 用含有青霉素、链霉素和两性霉素 B 的 PBS 充分洗涤犬乳腺组织样本。用眼科剪和眼科镊取 1 g 左右的组织小块, 尽量剪成小碎块, 在修剪过程中, 为了保持组织块的湿润, 向组织块上滴加

几滴培养液。然后将剪碎的组织块用眼科镊转移至无菌处理的三角烧瓶中, 加入 0.1% 的 II 型胶原酶溶液 20 mL, 同时放入几粒玻璃珠, 放入 37 °C 恒温振荡器中消化 1~2 h。消化完成后, 将细胞悬液用 70 μm 直径的细胞筛过滤 2 次, 转移至 50 mL 离心管中, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入含有 FBS 和青链霉素的 DMEM 培养基将细胞重悬接种到细胞培养瓶中, 放入 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养。每天观察生长状态, 2~3 d 换液 1 次。待细胞长至 80% 左右密度时, 用含有 EDTA 的胰蛋白酶进行消化, 传代培养。

### 1.4 CCK-8 法检测细胞活性

当细胞长势稳定后, 于第 36 代时, 用胰酶消化细胞, 分别以 5 000 个/孔的密度接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔 100 μL, 置于 37 °C 细胞培养箱中培养。待长至 80% 左右时, 用不同浓度常山酮 (0、15.625、31.25、62.5、125、250 和 500 nmol/L) 和盐霉素 (0、1、2、4、8、16 和 32 μmol/L) 分别处理细胞 48 h, 每组设计 6 个平行复孔, 置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中 37 °C 继续培养。48 h 后每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液, 在培养箱内继续孵育大约 1 h。用酶标仪测定 450 nm 波长处的 OD 值, 计算不同浓度下的细胞抑制率和半数抑制浓度 (50% inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)。

### 1.5 CCK-8 法检测常山酮和盐霉素联用对细胞增殖的影响

使用上述方法分别按照常山酮和盐霉素比例为 1:1、3:1、6:1、9:1、1:9、1:6 和 1:3 进行配制给药, 试验共分为 7 组。保持常山酮与盐霉素的药物总浓度为 0、31.25、62.5、125、250、500 和 1 000 nmol/L 不变, 根据不同的比例配制含药培养基。加入 CCK-8 后用酶标仪测定在 450 nm 波长处的 OD 值, 按照 Chou-Talalay 中位效应与联合指数 (combination index, CI)<sup>[10]</sup> 进行常山酮和盐霉素的联合效应分析, 试验数据以 CompuSyn 2.0 软件进行药物联合作用分析, 两药物的 CI < 1 说明药物之间存在协同效应。

### 1.6 细胞划痕试验

将细胞接种至 6 孔板中, 在含 10% FBS 的培养基中培养过夜。隔天取出 6 孔板, 用 200 μL 枪头垂直于细胞表面由孔一端划向另一端。随后吸掉旧培养基, 用 PBS 洗去划下的细胞, 加入含有 1% FBS 的培养液为阴性对照组 (CON), 含有不同浓度的 1% FBS 培养液配制成常山酮 125 nmol/L 单药处理组 (HF), 盐霉素 125 nmol/L 单药处理组 (SAL) 以及联合用药处理组 (常山酮 125 nmol/L + 盐霉素 125

nmol/L, HF+SAL), 放入 37 °C 细胞培养箱中培养。分别取 0 和 24 h 时间点于倒置显微镜下观察不同处理组的“划痕”宽度并拍照。

### 1.7 细胞克隆试验

将细胞按照 1 000 个/孔的密度均匀接种于六孔板中, 每孔加 2 mL 含 10% FBS 的完全 DMEM 培养液, 置于含有 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱培养。当细胞培养 24 h 后, 配置药物分组为阴性对照组、常山酮 125 nmol/L 单药处理组、盐霉素 125 nmol/L 单药处理以及联合用药组(常山酮 125 nmol/L+盐霉素 125 nmol/L) 处理, 每隔 2 d 更换 1 次培养基, 实时观察克隆形成情况。大约 14 d 后, 当对照组细胞形成较大克隆时, 弃去培养基, PBS 漂洗, 甲醇固定 5 min, 然后用 PBS 漂洗, 加入 0.5% 结晶紫 1 mL 染色 10 min, 弃去染液, 用超纯水漂洗, 拍照记录。利用细胞计数相关

软件 (Quantity One 4.62) 对细胞克隆数进行计数分析。

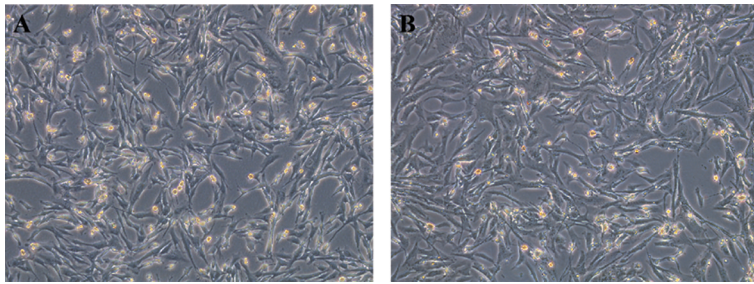
### 1.8 数据统计与分析

采用 GraphPad Prism 8 软件进行独立样本 *t* 检验和单因素方差分析 (One-way ANOVA) 并作图。所有数据以“平均值±标准差”表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 犬乳腺肿瘤细胞的分离与培养

犬乳腺肿瘤细胞分离培养成功且生长良好, 在光学显微镜下观察细胞普遍呈上皮样形态或纺锤形, 细胞核大而不规则, 且明显出现多核仁现象。随着传代次数的增加细胞形态没有明显改变, 说明细胞生长较稳定且均一。稳定传代超过 120 代, 命名为 CMT-N7, 取第 36 代进行试验 (图 1)。



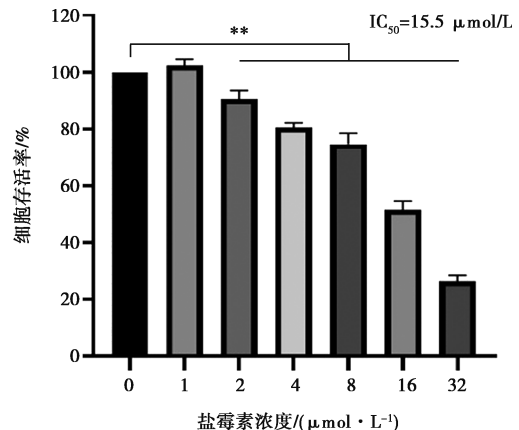
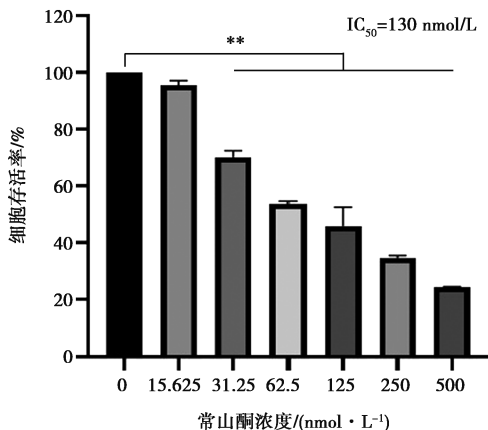
A. 第 36 代; B. 第 120 代。

图 1 犬乳腺肿瘤细胞 CMT-N7 形态学观察 (400×)

### 2.2 常山酮和盐霉素对 CMT-N7 细胞的毒性作用

使用 CCK-8 法检测不同浓度梯度常山酮和盐霉素处理后的犬乳腺肿瘤细胞 CMT-N7 活力, 结果显示, 常山酮和盐霉素均能有效抑制该乳腺肿瘤细胞的

增殖, 且抑制作用呈浓度依赖性 (图 2)。其中常山酮的 IC<sub>50</sub> 值为 130 nmol/L, 盐霉素的 IC<sub>50</sub> 值为 15.5 μmol/L。



\* \* 表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )。下同。

图 2 常山酮和盐霉素对犬乳腺肿瘤细胞活性的影响

### 2.3 常山酮和盐霉素联用协同抑制 CMT-N7 细胞的增殖

通过 CompuSyn 软件绘制常山酮和盐霉素的药物联合指数-药物作用效应曲线, 并计算出 CI 值。结果显示, 两药联合能够协同抑制犬乳腺肿瘤细胞增殖,

且当常山酮和盐霉素比例为 1 : 1 和 1 : 9 时, 在不同抑制率下二者的 CI 值均小于 1 (图 3), 且 1 : 1 时的 CI 值更小。因此选择最佳协同比例为 1 : 1 进行后续试验。

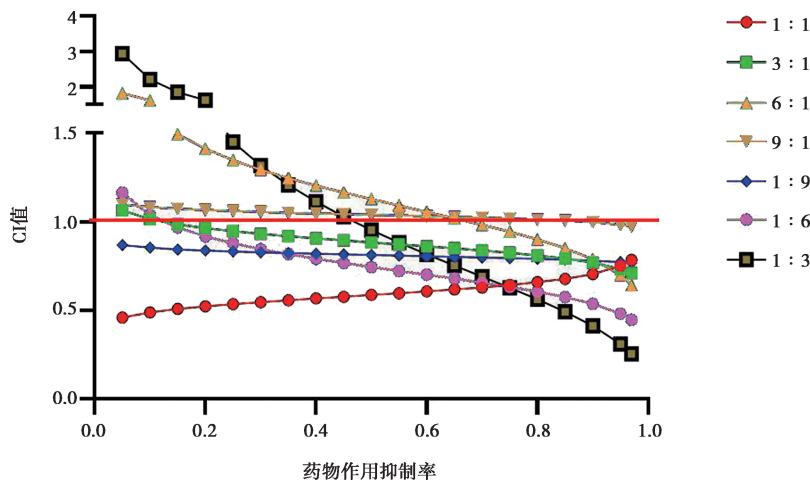
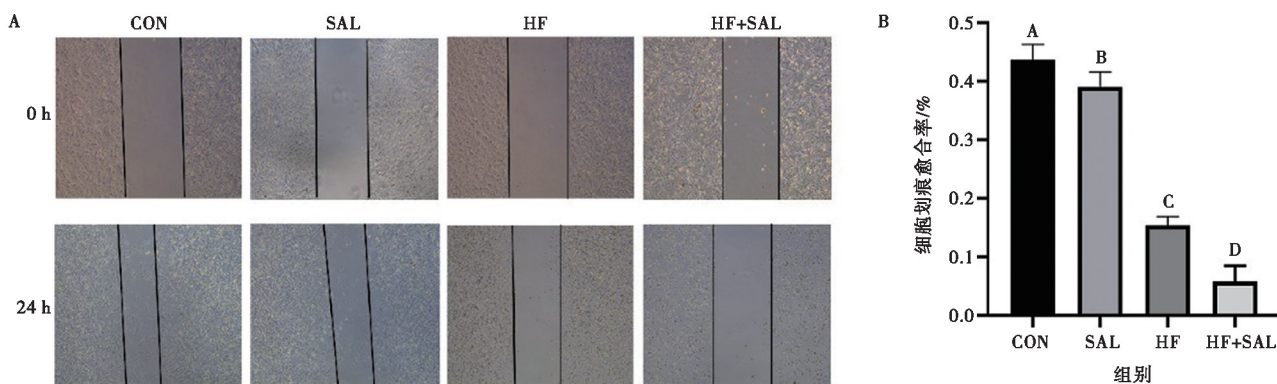


图 3 常山酮和盐霉素对犬乳腺肿瘤细胞协同抑制比例的筛选

### 2.4 常山酮和盐霉素联用对 CMT-N7 细胞迁移能力的影响

为了探究常山酮、盐霉素以及两药联用是否引起乳腺癌细胞迁移能力的变化, 采用细胞划痕试验检测

它们对细胞迁移的影响。结果显示, 常山酮处理组和盐霉素处理组与对照组相比, 划痕愈合速率都极显著降低 ( $P < 0.01$ ), 且常山酮和盐霉素联用比二者单用时抑制效果更显著 ( $P < 0.01$ ) (图 4)。



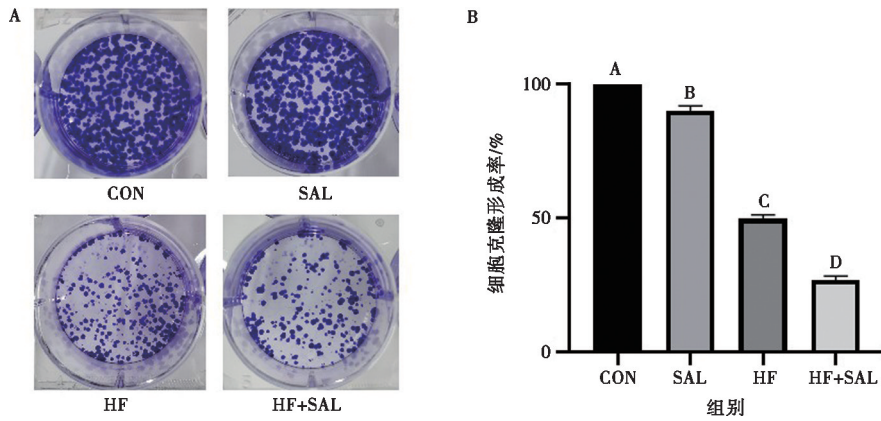
A. 细胞迁移结果 (100 ×); B. 伤口愈合率定量结果。大写字母不同表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )。下同。

图 4 常山酮和盐霉素联用对犬乳腺肿瘤细胞迁移能力的影响

### 2.5 常山酮和盐霉素联用对 CMT-N7 细胞克隆形成的影响

用常山酮、盐霉素以及两药联合处理细胞 14 d 后记录形成的细胞克隆, 结果表明, 常山酮和盐霉素

克隆形成率分别为  $(55.13 \pm 3.31)\%$  和  $(89.15 \pm 1.77)\%$ , 两药联用时抑制效果更显著 ( $P < 0.01$ ), 达  $(26.91 \pm 1.57)\%$  (图 5), 说明常山酮和盐霉素能够协同抑制犬乳腺肿瘤细胞的克隆形成能力。



A. 细胞克隆染色; B. 细胞克隆定量。

图5 常山酮和盐霉素联用对犬乳腺癌细胞克隆形成的影响

### 3 讨论

犬是一种自发性乳腺肿瘤几率较高的动物<sup>[11]</sup>,尤其是老龄雌犬,恶性率和死亡率较高<sup>[1-2,12]</sup>。犬乳腺肿瘤和人乳腺肿瘤在流行病学、组织形态学和病理生理学等多方面都具有相似特征,因此犬作为研究乳腺肿瘤的模式对后续研究人乳腺癌治疗方案具有重要意义。目前,兽医临床上治疗犬乳腺肿瘤的主要方法为手术和化疗,但犬乳腺肿瘤化疗药物的研究很少,大多采用人乳腺肿瘤的常用化疗药物<sup>[13]</sup>。盐霉素是一种聚醚类离子载体抗生素,最初用于防治球虫病。最近研究发现,盐霉素可特异性杀伤乳腺癌干细胞,使其受到广泛关注<sup>[14-18]</sup>。研究表明,盐霉素能有效提高传统抗肿瘤药物的细胞毒作用,与多种化疗药物在抗肿瘤细胞研究中表现为协同效应<sup>[19]</sup>。常山酮由中药植物常山中所提取出的有效成分常山碱衍生而得,可用于治疗鸡球虫病和犊牛隐孢子虫病<sup>[20-21]</sup>。研究发现,常山酮对多种肿瘤都具有抑制作用,可以抑制肿瘤血管新生、增殖、转移等多个肿瘤发展的重要环节<sup>[22-23]</sup>。此外,常山酮与其他抗癌药物联用能有效降低化疗药物的剂量,减轻癌症患者治疗压力<sup>[24]</sup>。随着肿瘤细胞对化疗药物的耐受增强,多药联合应用成为人肿瘤治疗上克服药物耐受最常见的手段,能够有效克服耐药性、降低药物用量、提升抗肿瘤效果<sup>[25-27]</sup>。但目前对犬乳腺癌联合用药的研究较少。因此,本研究采用常山酮和盐霉素联合用药,评估其协同作用,能够有效降低药物用量,减少化疗药物带来机体毒性的同时进一步提升抗肿瘤效果。综合细胞增殖、联合用药CI值的分析以及细胞克隆试验和迁移试验的结果,表明常山酮和盐霉素都具有抗犬乳腺肿瘤活性,且二者联用产生协同效应,筛选出最

佳协同比例为1:1,在该比例下不同抑制率的CI值均小于1,细胞克隆和迁移能力试验进一步证实两药的协同抗犬乳腺肿瘤作用。

综上所述,本研究表明常山酮和盐霉素联用对犬乳腺肿瘤细胞能够产生协同抑制效应,且二者的最佳协同比例为1:1,在此协同比例下两药联用能够协同抑制犬乳腺肿瘤细胞的增殖、迁移和克隆形成,为兽医临床抗肿瘤药物的体外研究以及抗肿瘤药物的联合应用提供了依据和参考。

### 参考文献:

- [1] SLEECKX N, DE ROOSTER H, VELDHUIS KROEZE E J, et al. Canine mammary tumours, an overview [J]. *Reprod Domest Anim*, 2011, 46 (6): 1112-1131.
- [2] HAMPE J F, MISDORP W. Tumours and dysplasias of the mammary gland [J]. *Bull World Health Organ*, 1974, 50: 111-133.
- [3] AMINI P, NASSIRI S, MALBON A, et al. Differential stromal reprogramming in benign and malignant naturally occurring canine mammary tumours identifies disease-modulating stromal components [J]. *Sci Rep*, 2020, 10 (1): 5506.
- [4] SORENMO K U, KRISTIANSEN V M, COFONE M A, et al. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence [J]. *Vet Comp Oncol*, 2009, 7 (3): 162-172.
- [5] ABDELMEGEED S M, MOHAMMED S. Canine mammary tumors as a model for human disease [J]. *Oncology Letters*, 2018, 15 (6): 8195-8205.
- [6] PINHO S S, CARVALHO S, CABRAL J, et al. Canine tumors; a spontaneous animal model of human carcinogenesis [J]. *Transl Res*, 2012, 159 (3): 165-172.
- [7] ABRAMOVITCH R, ITZIK A, HAREL H, et al. Halofuginone inhibits angiogenesis and growth in implanted metastatic rat brain tumor model—an MRI study [J]. *Neoplasia*, 2004, 6 (5): 480-489.

- [8] SPECTOR I, HONIG H, KAWADA N, et al. Inhibition of pancreatic stellate cell activation by halofuginone prevents pancreatic xenograft tumor development [J]. *Pancreas*, 2010, 39 (7): 1008-1015.
- [9] MAI T T, HAMAĪ A, HIENZSCH A, et al. Salinomycin kills cancer stem cells by sequestering iron in lysosomes [J]. *Nat Chem*, 2017, 9 (10): 1025-1033.
- [10] CHOU T C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method [J]. *Cancer Research*, 2010, 70 (2): 440-446.
- [11] 常宏建. 犬 271 例肿瘤流行病学分析及乳腺肿瘤血清/组织标记物的筛查 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2018.
- [12] TERME M, COLUSSI O, MARCHETEAU E, et al. Modulation of immunity by antiangiogenic molecules in cancer [J]. *Clinical & Developmental Immunology*, 2012, 2012: 492920.
- [13] 张茹梦. 化疗药物紫杉醇在犬乳腺癌中的应用 [J]. *中兽医学杂志*, 2022 (10): 85-87.
- [14] GUPTA P B, ONDER T T, JIANG G Z, et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening [J]. *Cell*, 2009, 138 (4): 645-659.
- [15] HUCZYNSKI A. Salinomycin: a new cancer drug candidate [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2012, 79 (3): 235-238.
- [16] NAUJOKAT C, FUCHS D, OPELZ G. Salinomycin in cancer: a new mission for an old agent [J]. *Mol Med Rep*, 2010, 3 (4): 555-559.
- [17] FUCHS D, HEINOLD A, OPELZ G, et al. Salinomycin induces apoptosis and overcomes apoptosis resistance in human cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 390 (3): 743-749.
- [18] 蒋嘉祺, 徐寒梅, 胡加亮. 盐霉素在肿瘤治疗中的研究进展 [J]. *药物生物技术*, 2022; 29 (1): 77-81.
- [19] 周明澍, 黄晓斌, 杨侃侃, 等. 盐霉素与抗肿瘤药物联合应用研究进展 [J]. *中南医学科学杂志*, 2016, 44 (5): 594-598.
- [20] 韩明政, 陈梓贤, 高力国, 等. 氢溴酸常山酮对肉鸡球虫病的防制作用研究 [J]. *中国家禽*, 2022, 44 (8): 28-34.
- [21] BRAINARD J, HAMMER C C, HUNTER P R, et al. Efficacy of halofuginone products to prevent or treat cryptosporidiosis in bovine calves: a systematic review and meta-analyses [J]. *Parasitology*, 2021, 148 (4): 408-419.
- [22] ISHII H, CHOUDHURI R, MATHIAS A, et al. Halofuginone mediated protection against radiation-induced leg contracture [J]. *Int J Oncol*, 2009, 35 (2): 315-319.
- [23] DE JONGE M J, DUMEZ H, VERWEIJ J, et al. Phase I and pharmacokinetic study of halofuginone, an oral quinazolinone derivative in patients with advanced solid tumours [J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42 (12): 1768-1774.
- [24] JUÁREZ P, FOURNIER P G J, MOHAMMAD K S, et al. Halofuginone inhibits TGF- $\beta$ /BMP signaling and in combination with zoledronic acid enhances inhibition of breast cancer bone metastasis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (49): 86447-86462.
- [25] PINES M, VLODAVSKY I, NAGLER A. Halofuginone: from veterinary use to human therapy [J]. *Drug Development Research*, 2000, 50: 371-378.
- [26] POMEROY A E, SCHMIDT E V, SORGER P K, et al. Drug independence and the curability of cancer by combination chemotherapy [J]. *Trends Cancer*, 2022, 8 (11): 915-929.
- [27] 李茂岚, 杨婧潇, 刘颖斌. 胆道恶性肿瘤联合用药的治疗进展与探索 [J]. *上海医药*, 2022, 43 (S2): 51-59.