

陈薛, 谭邓旭, 赵宁宁, 等. 前列腺癌人源性异种移植裸鼠模型的建立与治疗 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(5): 38-43.
Chen X, Tan DX, Zhao NN, et al. Establishment and treatment of a nude mouse model of prostate cancer patient-derived xenograft [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(5): 38-43.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.05.006

前列腺癌人源性异种移植裸鼠模型的建立与治疗

陈 薛¹, 谭邓旭², 赵宁宁², 赵 勇², 张彩勤², 白 冰², 师长宏^{1, 2*}

(1. 成都医学院基础医学院, 成都 610500; 2. 第四军医大学实验动物中心, 西安 710032)

【摘要】 目的 建立前列腺癌人源性异种移植 (patient-derived xenograft, PDX) 模型, 评价不同治疗方案的抗肿瘤效果。**方法** 将人新鲜的前列腺癌手术标本与基质胶混合后移植入补充有外源性雄激素的裸鼠皮下, 连续监测肿瘤生长, 评估其保真度并连续传代; 将荷瘤鼠分为四组: 多西他赛组、去势组、多西他赛联合去势组以及对照组, 治疗期间测量肿瘤体积及小鼠体重变化, 治疗结束后, 检测血清中总前列腺特异性抗原 (total prostate specific antigen, tPSA) 浓度及组织病理学变化, 评估治疗效果。**结果** 成功建立了前列腺癌 PDX 模型, 包括激素敏感型 (D17225) 和去势抵抗型 (C40019) 肿瘤, 病理学分析发现移植瘤较好的保持了患者原发瘤的主要特征; 病理组织学及血清 tPSA 检测发现多西他赛组及多西他赛联合去势组在 D17225 模型中显示出良好的治疗效果, 且后者抑瘤效果更为明显。**结论** 成功建立了前列腺癌 PDX 模型并稳定传代, 多西他赛单药或联合去势处理对激素敏感型 (D17225) 前列腺癌 PDX 模型具有显著治疗效果。

【关键词】 前列腺癌; 人源性异种移植模型; 雄激素; 多西他赛; 裸鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 05-0038-06

Establishment and treatment of a nude mouse model of prostate cancer patient-derived xenograft

CHEN Xue¹, TAN Dengxu², ZHAO Ningning², ZHAO Yong², ZHANG Caiqin², BAI Bing², SHI Changhong^{1, 2*}

(1. College of Basic Medicine, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China.

2. Laboratory Animal Center, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

【Abstract】 Objective To establish a nude mouse model of prostate cancer patient-derived xenograft (PDX) and using this model to evaluate the anti-tumor effects of different treatment regimens. **Methods** Fresh prostate cancer surgical specimens were mixed with Matrigel and transplanted into nude mice supplemented with exogenous androgens. Tumor growth was continuously monitored, the fidelity was evaluated, and serial passage was performed. Tumor-bearing mice were divided into four groups: docetaxel, castration, docetaxel combined with castration and control groups. The tumor volume and mouse body weight were measured during treatment. After treatment, serum total prostate specific antigen (tPSA) level and histopathological changes of the tumors were detected. **Results** The PDX model of prostate cancer was successfully established, including hormone-sensitive (D17225) and castration-resistant (C40019) tumors, which retained the main features of primary tumors. Serum tPSA and other test results showed that docetaxel and docetaxel combined castration inhibited the D17225 tumor growth significantly. **Conclusions** The PDX model of prostate cancer is successfully established and can be stably passaged. Docetaxel or combined castration therapy show significant therapeutic effects on the

[基金项目] 国家自然科学基金 (31772546, 31572340); 军队实验动物专项 (SYDW2016-006)。

[作者简介] 陈薛 (1990—), 女, 硕士生, 研究方向: 肿瘤动物模型。E-mail: chenxuefamily6@163.com

[通信作者] 师长宏 (1973—), 男, 教授, 博士生导师。E-mail: changhong@fmmu.edu.cn

hormone-sensitive (D17225) prostate cancer PDX model.

【Keywords】 prostate cancer; patient-derived xenograft (PDX) model; androgen; docetaxel; nude mouse

前列腺癌在病程的不同阶段表现出相当大的异质性,包括不同患者之间肿瘤分类和组织学特征的差异,以及同一患者不同病灶之间的生长速度和转移能力的差异,因此,需根据每个患者的实际情况选择适当的治疗方案^[1-2]。目前,迫切需要模拟前列腺癌多样性和进展的动物模型进行临床前研究。利用新鲜的肿瘤标本建立的病人异种移植(patient-derived xenograft, PDX)模型可有效展示前列腺癌的异质性,用于药物筛选和发病机制研究展示出良好的应用前景,可为前列腺癌临床治疗提供理论依据。本文针对前列腺癌的临床特征,成功建立了激素敏感型和去势抵抗型前列腺癌 PDX 模型,并对其治疗效果进行了研究。

1 材料和方法

1.1 实验动物

6~8 周龄雄性裸鼠 35 只,体重约 20~22 g,由常州卡文斯实验动物有限公司提供[SCXK(苏)2016-0010],饲养于空军军医大学(第四军医大学)实验动物中心 SPF 级屏障设施中[SYXK(陕)2014-001],动物房环境温度和相对湿度分别维持在 22℃~26℃和 40%~60%,饲料及饮用水均经无菌处理,允许自由摄食和饮水。伦理审查及肿瘤标本:根据西京医院医学伦理委员会批准的方案,在获得患者本人及其家属知情同意后使用患者肿瘤标本及临床资料,批准编号:2015432;本研究所有动物实验均通过了空军军医大学(第四军医大学)实验动物福利及伦理委员会批准,编号:17013。

1.2 主要试剂与仪器

基质胶(美国 BD 公司);苏木精和伊红染色液(北京雷根(Leagene)生物技术有限公司);SP Rabbit HRP Kit(DAB)试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司);Anti-Prostate Specific Antigen 抗体和 Anti-Androgen Receptor 抗体(Abcam);组织基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司)。多西他赛注射液(Docetaxel, DCTX, 商品名称:泰索帝/Taxotere)购自赛诺菲(杭州)制药有限公司。十一酸睾酮软胶囊(商品名:安特尔,40 mg/粒)购自 N.V.Organon(The Netherlands)。

移植用手术器械(上海医疗器械有限公司,中国),普通离心机(Eppendorf,德国),高速分散机

(IKA,德国),电子游标卡尺(Masterproof,德国),电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司,中国),显微镜(Olympus,日本),电热恒温水槽(上海精宏实验设备有限公司,中国)。

1.3 实验方法

1.3.1 PDX 模型的建立和 STR 分析

前列腺癌患者术后标本经病理学家评估后剔除脂肪和坏死组织,然后切成大小 1~3 mm³ 的肿瘤碎片,与适量基质胶混合后移植小鼠右侧背部皮下,同时在另一侧皮下包埋一粒十一酸睾酮软胶囊(40 mg/粒)。待肿瘤生长至约 800 mm³ 时,异氟烷麻醉裸鼠,取出肿瘤组织并将一部分肿瘤传代到新的裸鼠皮下。每一阶段均收集肿瘤样品并冷冻或包埋于石蜡中用于后续实验,连续传代 3 次,确定 PDX 模型建立成功。提取肿瘤组织中的基因组 DNA,送西京医院司法鉴定中心进行 STR 分析(short tandem repeat profiling)。实验过程中严格遵守实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

1.3.2 实验分组及治疗

选取激素敏感型(D17225)和去势抵抗型(C40019)两种不同类型的前列腺癌 PDX 模型进行后续研究。待皮下肿瘤生长至 80~100 mm³ 时, D17225 随机分为四组,如下:1)多西他赛组(docetaxel, DCTX):DCTX 剂量为 2 mg/kg,每周两次,尾静脉注射;2)去势组(castration, CAS):手术切除双侧睾丸及其附件;3)多西他赛联合去势组(CAS+DCTX);和 4)对照组(CON),每组 5 只;C40019 随机分为三组,如下:1)DCTX, 2 mg/kg,每周两次,尾静脉注射;2)CAS 组和 3)CON 组。每周两次测量荷瘤鼠体重及肿瘤的最大长度(l)及宽度(w),并计算肿瘤体积: $V=1/2 \times (w^2 \times l)$ 。治疗 28 d 后实验结束,次日将荷瘤鼠放入 CO₂ 容器内处死,取得的每个肿瘤样本分为两份,一份提取组织 DNA,一份做组织 4%多聚甲醛固定,包埋并石蜡切片。

1.3.3 HE 及免疫组织化学染色

取患者肿瘤标本及治疗前后 PDX 肿瘤组织,分别进行 HE 及免疫组织化学染色。通过间接免疫过氧化物酶程序进行免疫组织化学染色,一抗前列腺特异性抗原(PSA)和雄激素受体(AR)均为兔抗人单克隆抗体,工作均为浓度 1:100,二抗为生物素标

记羊抗兔二抗工作液。光学显微镜下观察出现背景清晰的棕色或棕黄色颗粒判为阳性染色。

1.3.4 血清 tPSA 检测

治疗结束后,各组前列腺癌荷瘤鼠心脏采血,静置 4℃ 过夜,4500 r/min 离心 10 min,收集上层血清并送西京医院检验科检测总前列腺特异性抗原(tPSA)含量。

1.4 统计学方法

统计方法采用 SPSS 18.0 软件分析数据,计量资料以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验。

2 结果

2.1 不同类型前列腺癌 PDX 模型的表征

前期,我们实验室收集了 20 名患者的前列腺癌手术样本,并将它们植入到雄性裸小鼠皮下,初代 PDX 模型的建立时间从 2 个月到 12 个月以上不等。其中 3 个成功传代>3 代,总体建模率约为 15%。而后,我们在裸鼠皮下包埋鞣酐软胶囊,探索了雄激素对前列腺癌生长及病情进展的影响,在补充外源性雄激素期间,动态监测小鼠体内雄激素水平,根据雄激素代谢变化情况,适时补充以保持与正常男性相似水平,确保模型成功。在本研究中,我们选择激素敏感型(D17225)和去势抵抗型(C40019)两种不同类型的前列腺癌 PDX 模型,连续测量皮下肿瘤体积,最终绘制 PDX 肿瘤的生长曲线,相比于 C40019,雄激素依赖型 D17225 生长速度较快,呈现指数生长趋势(图 1)。我们通过 STR 分析证实了它们与患者原始肿瘤组织的遗传学一致性,其同源率为 99.99%(表 1)。患者前列腺癌手术样本及 PDX 移植瘤组织石蜡切片进行 HE 和组织化学染色,结果显示移植瘤与患者原发肿瘤组织形态基本一致(图 2)。

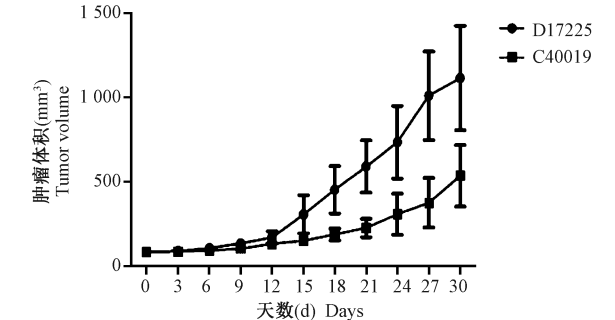
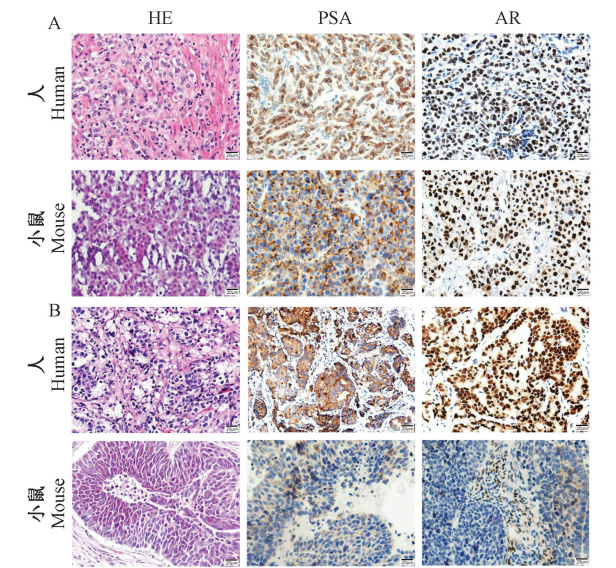


图 1 PDX 肿瘤生长曲线
Figure 1 Growth curve of PDX tumors

表 1 PDX 模型的 STR 检测 Table 1 STR detection in the PDX models		
基因座 Gene locus	D17225	C40019
AMG	X, Y	X, Y
D8S1179	14, 15	14
D21S11	29, 32.2	29, 32.2
D7S820	8, 10	12
CSF1PO	12, 14, 15	12
D3S1358	14, 16	15, 17
D5S818	11, 14	13
D13S317	8, 10	9
D16S539	9, 12	11
D2S1338	20, 24	23
D19S433	13, 15.2	13, 14
D12S391	16, 19	20
D18S51	14, 16	15
D6S1043	13	11
vWA	14, 15	16, 18
FGA	22, 30	20, 23



注: A: D17225; B: C40019。标尺=20 μm。
图 2 患者原发肿瘤与相应 PDX 肿瘤的组织学特征(×40)
Note. A, D17225. B, C40019. Bars=20 μm.

Figure 2 Histology of the primary human tumors and matched PDX tumors

2.2 治疗效果评价

2.2.1 肿瘤体积和荷瘤鼠体重变化

治疗 28 d 后,通过测量肿瘤体积和荷瘤鼠体重的变化以及病理组织学评价治疗效果。如图所示,在 D17225 PDX 模型组,DCTX 治疗及 CAS+DCTX 联合治疗均显著抑制了肿瘤生长($P=0.0104$, $P=0.0045$),且联合治疗组抑瘤效果更为明显($P=0.0045$);而在 C40019 PDX 模型组,DCTX 治疗后,肿瘤体积虽有所下降,但与对照组相比差异无显著性($P=0.1897$),且小鼠体重明显下降(图 3)。在这

两例 PDX 模型中,CAS+DCTX 和 DCTX 治疗均导致荷瘤小鼠体重下降,能是由于化疗药物毒副作用及肿瘤恶病质所致。在这期间,监测荷瘤鼠体重变化情况,当体重下降 20%时停止药物治疗。

2. 2. 2 抑瘤率

治疗结束时,计算每组治疗方案的抑瘤率 (inhibitory rate, IR), $IR = (\text{对照组平均体积} - \text{治疗组平均体积}) / \text{对照组平均体积} \times 100\%$ (见表 2)。激素敏感型 D17225 肿瘤各组抑瘤效果明显,而去势抵抗型 C40019 肿瘤恶性程度较高,DCTX 治疗组抑瘤率不足 50%。

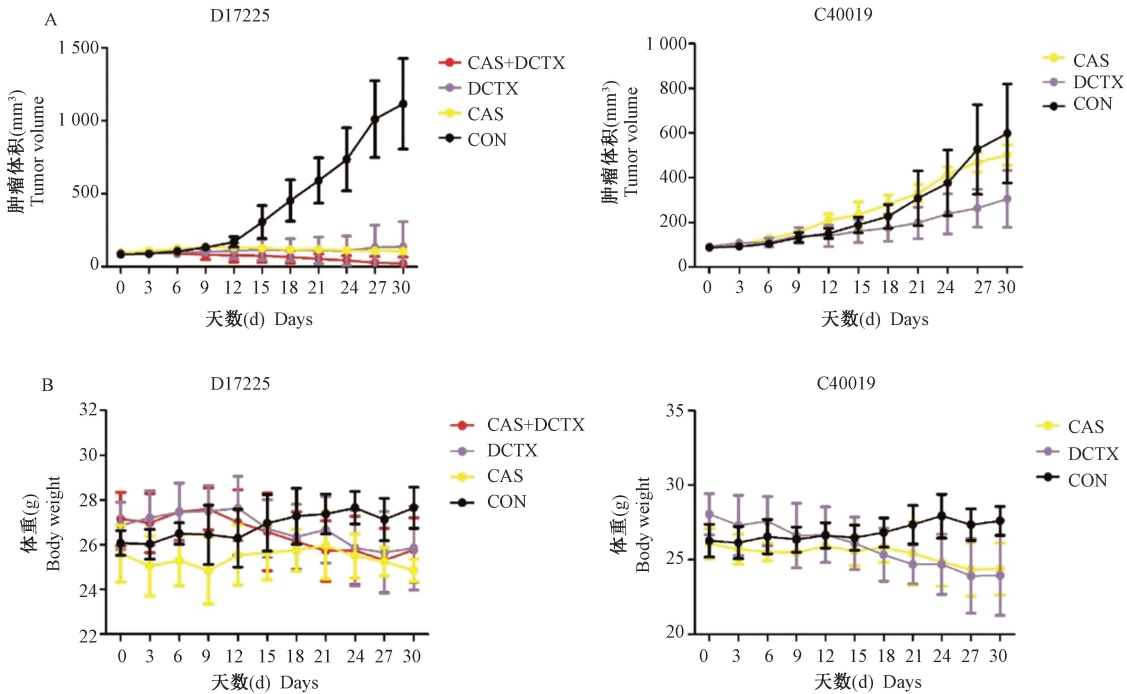
2. 2. 3 组织形态学

取各组肿瘤组织进行 HE 及免疫组化染色 (图

4)。D17225 模型中,对照组肿瘤细胞丰富且大小不一,细胞核形态多变;CAS 组及 DCTX 组肿瘤细胞减少,恶性程度有所下降;CAS+DCTX 组肿瘤细胞逐步被正常组织细胞替代,肿瘤特征已经不明显。而 C40019 DCTX 组治疗前后形态变化不明显。

2. 2. 4 血清 tPSA 检测结果

血清 tPSA 含量是前列腺癌临床诊断及治疗效果评价的重要指标之一。本实验中, D17225 模型中 CON 组血清 tPSA 含量 > 100 ng/mL, DCTX + CAS 组血清 tPSA 最低,平均含量为 2. 58 ng/mL, CAS 组次之,平均含量为 3. 65 ng/mL, DCTX 组平均含量为 30. 92 ng/mL (图 5), 而 C40019 模型中, 所有组均未检测到血清 tPSA, 该结果与病理组织学评估结果保持一致。

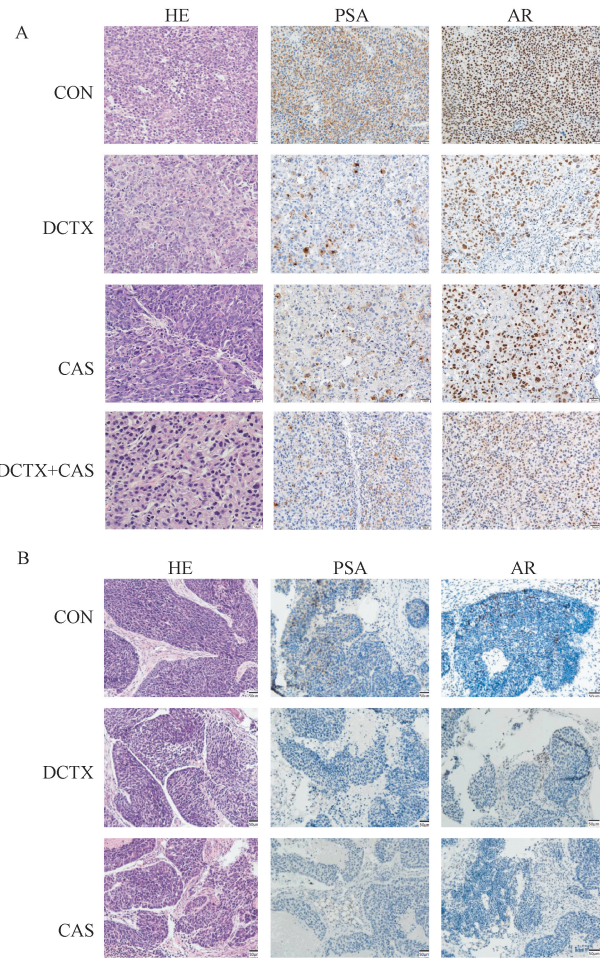


注:A:肿瘤体积变化趋势;B:小鼠体重变化趋势。
图 3 治疗期间肿瘤体积及小鼠体重的变化
Note. A, Variation tendency of tumor volume. B, Body weight during treatment.
Figure 3 Changes of the tumor volume and body weight during treatment

表 2 不同治疗方法的抑瘤率($\bar{x} \pm s, n=5$)
Table 2 Inhibitory rate of different treatment methods

组别 Groups	D17225		C40019	
	肿瘤体积 (mm ³) Tumor volume	抑瘤率 (%) Inhibitory rate	肿瘤体积 (mm ³) Tumor volume	抑瘤率 (%) Inhibitory rate
CON	1114. 85±267. 71	NA	598. 16±192. 19	NA
DCTX	137. 74±125. 36 [△]	87. 65	305. 48±110. 79 *	48. 93
CAS	108. 45±16. 14 [△]	90. 27	501. 22±39. 28 *	16. 20
DCTX+CAS	35. 96±22. 78 [△]	96. 77	—	—

注:与对照组 (CON) 比较, [△] $P<0. 01$, * $P>0. 05$; NA: 无法使用。
Note. Compared with the control group (CON), [△] $P<0. 01$, * $P>0. 05$. NA: Not available.



注:A;D17225 治疗组;B;C40019 治疗组。标尺= 50 μm。

图 4 各组肿瘤组织的组织学变化
(HE 及免疫组化染色,× 20)

Note. A, D17225 group. B, C40019 group. Bars = 50 μm.

Figure 4 Histological changes in the tumor tissues of the different groups. HE and immunohistochemical staining

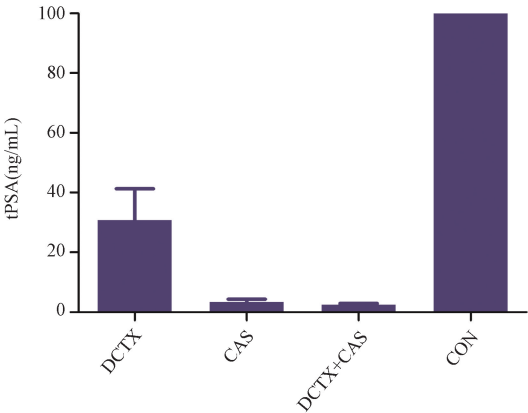


图 5 D17225 各组肿瘤的血清 tPSA 检测结果

Figure 5 Serum tPSA levels in the mice bearing D17225 tumors

3 讨论

前列腺癌 PDX 模型较好地重现了患者原发性肿瘤特征,使人们能够在免疫缺陷小鼠体内观察疾病进展,模拟患者对治疗方案的反应性。长期以来,研究者们多次改进模型的建立方法,提高了该种模型的建成率,从而促进了前列腺癌基础医学相关研究。目前,比较有效的方法包括:1)提高体内雄激素水平:小鼠体内雄激素(特别是睾酮)水平远低于成年男性,而一定剂量的雄激素刺激对肿瘤组织的生长至关重要,因此需要定期为宿主小鼠补充外源性雄激素,以促进人源性异种移植物的生长^[3-4];2)选择合适的肿瘤标本移植位点:本研究前期,我们采用单纯皮下移植,模型建立率仅约 15%,与其他研究结果相似。而有报道显示,肾包膜是更适合前列腺癌组织异种移植的位点,它具有丰富的血管和淋巴系统,能够在早期为肿瘤组织提供充分的营养物质,该位点的成功率甚至高达 90%以上^[5-7];3)确保肿瘤组织的新鲜程度:从手术室获得的患者标本应精确修剪并尽快移植入免疫缺陷小鼠体内,以减少由于组织缺血缺氧而导致组织液化、坏死等情况的发生^[8]。

前列腺癌的临床分型主要包括激素依赖型和去势抵抗型^[9]。因此,我们分别选择这两类病人手术标本建立相应的 PDX 模型,通过去势的方法证实了它们与原发瘤激素依赖状态的一致性。去势抑制了激素依赖性 D17225 肿瘤的生长,而对去势抵抗性 C40019 肿瘤无效。使用临床一线化疗药物 DCTX 处理两种 PDX 模型,结果显示,DCTX 对激素依赖型 D17225 治疗效果明显,而激素非依赖型 C40019 不仅疗效不显著,还出现了宿主小鼠体重持续下降的情况,这可能是化疗药物的毒副作用和肿瘤化疗后对宿主的影响,也可能是 C40019 肿瘤本身是转移性去势抗性前列腺癌,该肿瘤侵犯右侧精囊腺及膀胱组织,恶性程度较高。另外,这种化疗期间宿主小鼠体重明显下降的情况,提示在临床患者的后续治疗中应引起重视,体重减轻是化疗的高危信号,肿瘤可能趋向更高的恶性程度,且预后不良,需适时调整用药剂量和治疗方案。

基于 PDX 模型的药效评价与临床患者的治疗反应相似,已有多项研究表明,利用 PDX 模型开展的个体化治疗药物筛选,可为临床医生提供最佳治疗方案的参考,从而指导临床用药,使患者受

益^[10-13]。然而,由于前列腺肿瘤的 PDX 模型成瘤率较低^[14-15],且在肿瘤传代中可能缺乏肿瘤标志物,例如 AR 和 PSA 表达,因此,关于前列腺癌的个体化用药治疗鲜有报道。基于上述原因,如何提高前列腺癌 PDX 模型的成功率,创建不同分型的前列腺癌 PDX 模型,建立前列腺癌转移模型、模拟临床雄激素依赖性到非依赖性的转化,以及腺癌到神经内分泌癌的转分化等都对于前列腺癌的转化研究具有重要意义。这些模型不仅有助于研究疾病进展和治疗抗性的机制,并且对药物及肿瘤标志物的开发和肿瘤的个体化治疗都具有重要价值。

参考文献:

- [1] Lin D, Bayani J, Wang Y, et al. Development of metastatic and non-metastatic tumor lines from a patient's prostate cancer specimen-identification of a small subpopulation with metastatic potential in the primary tumor [J]. Prostate, 2010, 70(15): 1636-1644.
- [2] Lin D, Wyatt A W, Xue H, et al. High fidelity patient-derived xenografts for accelerating prostate cancer discovery and drug development [J]. Cancer Res, 2014, 74(4):1272-1283.
- [3] 田锦成. 雄激素对大鼠精囊腺和前列腺组织水通道蛋白表达的影响 [D]. 四川医科大学, 2015.
- [4] Inoue T, Terada N, Kobayashi T, et al. Patient-derived xenografts as *in vivo* models for research in urological malignancies [J]. Nat Rev Urol, 2017, 14(5): 267-283.
- [5] Wang Y, Revelo MP, Sudilovsky D, et al. Development and characterization of efficient xenograft models for benign and malignant human prostate tissue [J]. Prostate, 2005, 64(2): 149-159.
- [6] Zhao H, Nolley R, Chen Z, et al. Tissue slice grafts: an *in vivo* model of human prostate androgen signaling [J]. Am J Pathol,

- 2010, 177(1):229-239.
- [7] Wang Y, Wang JX, Hui X, et al. Subrenal capsule grafting technology in human cancer modeling and translational cancer research [J]. Differentiation, 2016, 91(4-5):15-19.
- [8] Nguyen HM, Vessella RL, Morrissey C, et al. LuCaP prostate cancer patient-derived xenografts reflect the molecular heterogeneity of advanced disease and serve as models for evaluating cancer therapeutics [J]. Prostate, 2017, 77(6):654-671.
- [9] Mclean DT, Strand DW, Ricke WA. Prostate cancer xenografts and hormone induced prostate carcinogenesis [J]. Differentiation, 2017, 97:23-32.
- [10] Cassidy JW, Caldas C, Bruna A. Maintaining tumor heterogeneity in patient-derived tumor xenografts [J]. Cancer Res, 2015, 75(15):2963-2968.
- [11] Tung WL, Wang Y, Gout PW, et al. Use of irinotecan for treatment of small cell carcinoma of the prostate [J]. Prostate, 2011, 71(7):675-681.
- [12] Risbridger GP, Taylor RA, Clouston D, et al. Patient-derived xenografts reveal that intraductal carcinoma of the prostate is a prominent pathology in BRCA2 mutation carriers with prostate cancer and correlates with poor prognosis [J]. Eur Urol, 2015, 67(3):496-503.
- [13] Garralda E, Paz K, Lopez-Cases P, et al. Integrated next-generation sequencing and Avatar mouse models for personalized cancer treatment [J]. Clin Cancer Res, 2014, 2476-2484.
- [14] Huang Y, Cheng C, Zhang C, et al. Advances in prostate cancer research models: From transgenic mice to tumor xenografting models [J]. Asian J Urol, 2016, 3(2):64-74.
- [15] Rea D, Vecchio VD, Palma G, et al. Mouse models in prostate cancer translational research: From xenograft to PDX [J]. Biomed Res Int, 2016, 2016:9750795.

[收稿日期] 2018-11-16