

乔大伟,李玉芳,张蕾,等. 结直肠癌肝转移原代肿瘤组织的异种移植动物模型的研究进展[J].中国实验动物学报, 2019, 27(4):545 - 548.

Qiao DW, Li YF, Zhang L, et al. Progress in research on animal models of colorectal cancer with liver metastasis generated by patient-derived tumor xenograft [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4):545 - 548.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.04.019

结直肠癌肝转移原代肿瘤组织的异种移植 动物模型的研究进展

乔大伟^{1,2}, 李玉芳^{1,2}, 张蕾^{1,2}, 姜礼双^{1,2}, 孔桂美¹, 卜平^{1,2*}

(1. 扬州大学临床医学院消化内科, 江苏 扬州 225001; 2. 江苏省中西医结合老年病重点防治实验室, 江苏 扬州 225001)

【摘要】 肝是结直肠癌转移主要的靶器官,结直肠癌肝转移也是结直肠癌患者死亡的主要原因。近年来研究显示,结直肠癌肝转移原代肿瘤组织的异种移植(patient-derived tumor xenograft, PDX)动物模型能较好的复制临床肿瘤患者的特征,其建模方法主要分为异种原位与异种异位种植模型。本文综述结直肠癌肝转移 PDX 动物模型造模方法及其应用范围,以期实验建模提供参考。

【关键词】 结直肠癌;结直肠癌肝转移;原代肿瘤组织的异种移植;动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 04-0545-04

Progress in research on animal models of colorectal cancer with liver metastasis generated by patient-derived tumor xenograft

QIAO Dawei^{1,2}, LI Yufang^{1,2}, ZHANG Lei^{1,2}, JIANG Lishuang^{1,2}, KONG Guimei¹, BO Ping^{1,2*}

(1. Department of Gastroenterology, Clinical Medical College, Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu, China.
2. Jiangsu Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Treatment of Senile Diseases, Medical College, Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu)
Corresponding author: BO Ping. E-mail: boping@yzu.edu.cn

【Abstract】 Liver is the main target organ for colorectal cancer metastasis. Liver metastasis is also the main cause of death in patients with colorectal cancer. Recent studies have shown that liver metastasis of colorectal cancer patient-derived tumor xenograft (PDX) can better replicate the clinical characteristics of clinical tumors colon cancer. At present, the primary models used are the orthotopic tumor xenograft model and ectopic tumor xenograft model. To provide a reference for experimental modeling, this paper reviews PDX animal models for colorectal cancer liver metastasis and their application range.

【Keywords】 colorectal cancer; liver metastasis; patient-derived tumor xenograft; PDX; animal model

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是全球第三大癌症和癌症死亡的第四大原因^[1]。近年来由于生活方式和饮食习惯的变化,我国结直肠癌发病率和死亡率呈逐步上升趋势,结直肠恶性肿瘤在肿瘤发病率中占据第5位^[2]。肝是CRC最常见的远处转移部位,CRC患者中约有一半会发生肝转移。结直肠癌肝转移(colorectal cancer liver metastases, CRLM)也是CRC患者死亡的主要原因。尽管经过

【基金项目】 国家自然科学基金(81673736);江苏省研究生科研与实践创新计划项目(SJCX18_0808)。
Funded by National Natural Science Foundation of China (81673736) and Postgraduate Research & Practice Innovation Program of Jiangsu Province (SJCX18_0808).

【作者简介】 乔大伟(1993—),男,硕士,主要从事消化道肿瘤研究。Email: qiao_dawei@126.com

【通信作者】 卜平,男,博士,主任医师,教授,博士生导师,主要从事消化系统疾病研究。Email: boping@yzu.edu.cn

化疗后,患者存活率有所提高,但手术切除仍被认为是肝转移患者的唯一治疗选择。虽然根治性手术是标准治疗方式,但只有 10%~20% 的患者被认为有资格进行切除。即使在成功切除后,大多数患者仍然会复发^[3]。近年来,由于免疫缺陷小鼠的广泛应用,以及患者的个性化治疗越来越受到关注,源于患者原代肿瘤组织的异种移植(patient-derived tumor xenograft, PDX)的临床前模型研究火热。PDX 模型是指将手术期间获得患者肿瘤部分组织或者人源肿瘤细胞植入免疫缺陷小鼠。用于 PDX 模型的小鼠类型包括裸鼠,SCID 小鼠,NOD/SCID 小鼠和 NSG 小鼠^[4]。本文就目前常用的 CRLM-PDX 动物模型进行综述。

1 异种原位种植模型

异种原位植入,即在小鼠中与人类患者原始肿瘤部位相对应的部位植入人源肿瘤细胞,使小鼠肿瘤发生与发展的行为与临床患者相似。1984 年,Wang 等首次采用异种原位种植建模^[5],他们将人 CRC 细胞 Co115 注入裸鼠的降结肠,肿瘤在注射部位生长繁殖并发生转移。随后有学者^[6]利用裸鼠建立了首例人体肿瘤组织异种原位种植的模式(patient-derived orthotopic xenograft, PDOX)。从那时起,PDox 模型被用于肿瘤微环境研究,探索肿瘤发生发展的机制,包括自发转移形成^[7]。这些模型使研究人员能够研究药物疗效,如用各种化疗方案以预测患者的临床反应^[8],还用于研究新的肿瘤标志物抗性和易感性,并检测新的药物方案以克服抗性。Wang 等^[9]采用自制接种器将 0.1 mL 细胞浓度为 2×10^7 /mL 的人结肠癌细胞 HCT116 接种于 BALB/c 裸鼠直肠,成功建立异种原位种植模型,直肠原位接种组 18 只成瘤率为 100%,未发现肝转移。此法转移发生时间较长。Hite 等^[10]模拟了结直肠癌患者中原发肿瘤生长和自发性肝转移的模式,使用荧光素酶标记的 HT-29 细胞建立了异种原位小鼠直肠种植模型,结果发现直肠内注射的死亡率为 4.0%(1/25),60% 的小鼠有肝转移,56% 发生肺转移,证实直肠内注射建立异种原位种植模型能准确地模拟肠癌原发性肿瘤生长和自发转移的过程,具有安全性,可重复性及高模拟性。原位种植方法操作简单,能更好地模拟结直肠癌的临床生物学行为,比如肿瘤的局部生长、肿瘤的浸润、癌细胞原位脱落穿过血管壁进入门静脉循环血运转移等过程。但是因直肠壁较薄故种植成功率较低,远处转移时间较长,因此,为了能够监测转移的发生,该模型成像技术是必不可少的。

2 异种异位种植模型

异种异位种植模型按植入位置不同可以分为皮下种植、脾种植、门静脉/肠系膜种植、肝种植、腹腔扩散种植及尾静脉种植。

2.1 皮下种植模型

皮下植入模型可以直接测量肿瘤大小,发展成类似于人类肿瘤的结直肠癌,但几乎不会产生转移。Blomme 等^[11]收集患者手术时新鲜肿瘤样品,切成 60 mm^3 的细小片段并皮下移植到 NOD-SCID 小鼠的皮肤中。利用 MALDI 成像技术,对 6 名患者肿瘤组织与 PDX 第 4 代的肿瘤组织进行了代谢比较分析。首次研究发现 CRC/CRC-LM PDX 模型在代谢水平能够维持功能稳定性。证明人类癌细胞在 PDX 模型上,不仅能产生类似人类的肿瘤组织,且能对患者肿瘤组织保持高度的遗传性和转录的保真度。这将为新药物应用于临床前进行实验研究提供一个非常好的实验平台。Brown 等^[12]收集 16 名肠癌肝转移患者肝转移灶组织,并将肿瘤移植到 NOD.CB17-Prkdcscid/Arc 小鼠皮下。结果植入率达 81%,患者与 PDX 化疗敏感性概况之间的阳性匹配率为 67%。该试验研究证明了使用 CRLM 的 PDX 模型作为评估 PDX 化疗敏感性的平台的可行性。Lu 等^[13]将患者肿瘤组织约 2 mm 大小的碎片并植入 8~10 周龄 JAX.NOD.CB17-PrkdcSCID-J 小鼠的侧腹。使用基于基因的方法与结直肠癌的临床前模型的结合来鉴定可用于治疗结肠直肠癌肝转移的协同药物,即奥沙利铂和 mTOR 抑制剂联合应用可有效治疗结直肠癌肝转移患者。此法操作简单,植入成功率高,便于观察,重复性好。但是因皮下生长的肿瘤常易被纤维膜所包绕,不易表现恶性肿瘤浸润和转移的特性,故常常用于评价单纯针对原发灶或转移灶组织的保真性,化疗敏感性及治疗的有效性。

2.2 脾种植模型

脾种植法是目前大肠癌肝转移模型公认的最佳模式之一。由于肿瘤细胞从脾内种植细胞,植入的细胞逃逸大量免疫细胞的攻击,主要通过血管浸润发生肝转移。因此,能够更好模拟人体内 CRC 切除后的肝转移。根据是否切除脾分为脾保留法和脾切除法。

2.2.1 脾保留法

脾保留是指将人 CRC 细胞从脾上极或下极注入动物脾内,脾送回体内,瘤细胞经脾静脉进入肝。Fleten 等^[14]通过脾注射 HT 细胞株 HT29 和 HCT116,在裸鼠中建立肠癌肝转移模型。注射后,

HCT116 和 HT29 细胞在所有动物中产生肝肿瘤。Kawaguchi 等^[15]将人 HT29-RFP 细胞(5×10^5)注射到裸鼠的脾上极和下极。注射后 3 周,成功建立结肠癌肝转移模型。此法成功率高,应用最为广泛。最近, Kim 等^[16]在使用 CRC-PDIX 以及 CRLM-PDIX 模型基础上,证明了 CCSP-2 靶向探针可以鉴定结肠外 CCSP-2 阳性结肠肿瘤。这表明 CCSP-2 靶向分子成像能够检测转移性疾病。对于结肠癌的治疗,早期转移或复发检测,有望通过在疾病早期检测病变来挽救更多患者,延长生存期。此法保留了脾的部分免疫功能,保存宿主固有的抗肿瘤免疫力,且操作简单,易于实施。但是肝转移瘤形成的同时发生脾肿瘤,转移灶常为巨大癌结节,影响小鼠的存活时间,并且脾肿瘤通常在肝转移瘤前发生,会影响实验的准确性,不适于验证周期较长的药物实验。

2.2.2 脾切除术

脾切除是指将人 CRC 细胞从脾上极或下极注入实验动物脾内,待瘤细胞经脾静脉进入肝,切除脾。Oshima 等^[17]制作了用荧光素酶和 tdTomato 稳定标记的具有不同的生长特性的人结直肠癌 HCT116 细胞的单克隆衍生物,经脾注射入 6~8 周龄无胸腺裸鼠后,将脾切除,使用体内成像系统 (IVIS),可以通过体内发光和离体荧光成像,监视转移的发生发展,结果大部分能够产生肝转移。由于该模型与临床观察到的肝转移灶相似,因此它可作检测与肝转移相关基因,并用于肝转移灶局部消融或辅助治疗研究。此法虽然不能模拟肿瘤分泌降解酶降解细胞外基质,伪足形成,侵及血管,进入血液等关键步骤,而且在一定程度上令免疫系统受损,术后动物病死率高,操作较复杂,对试验者技术要求较高。但是很好地模拟了大肠癌根治术后因血行转移而发生肝转移的过程,肝转移率高,模型稳定,转移瘤向各个肝叶呈弥漫性转移。可以满足各种检测方法的取材需要。是研究肿瘤形成和分析新的治疗效果的理想模型。

2.2.3 半脾模型

半脾模型为脾保留和脾全切的改良造模方法,利用脾的解剖特点,将人 CRC 细胞注入脾下极,待瘤细胞经脾静脉进入肝,切除脾下极,保留脾上极,具有一定的创新性。Bai 等^[18]利用裸鼠脾的特殊解剖,建成半脾模型。脾中央利用一次性钛夹夹闭并切断,分成两个带血管蒂的半脾。将人 HT29 结直肠癌细胞接种于近端半脾被膜下,远端半脾埋入皮下备治疗所需,共分 6 组观察制模 30 d 后的肝转移评分、淋巴结

转移及血性腹水情况。结果人 HT29 结直肠癌细胞建立的肝转移半脾模型成瘤率为 100%。此法既保留了脾的部分免疫功能,又大大降低模型建立时脾肿瘤的干扰率。且此模型可以经静脉给药,更加贴近于临床,可应用于预防性肝转移治疗的实验设计。但是相比脾保留与脾全切,动物实验手术操作复杂,对试验者技术要求极高。该模型为研究结直肠癌肝转移的生物学机制和抗转移治疗提供了较为理想的实验模型,且该模型能应用于抗肿瘤药物的筛选,因此是目前造模的最有效方法之一。

2.3 门静脉/肠系膜种植模型

此法是将人 CRC 细胞注入门静脉/肠系膜静脉,经血流入肝。Thalheimer 等^[19]使用荧光素酶标记的人结肠癌细胞系 HCT-116Luc(pos) 的细胞(2.5×10^6),通过门静脉注射到免疫功能不全的裸鼠中。使用生物发光体内成像 (BLI) 技术,分析动物的肿瘤生长。注射后 4 d,即产生肝转移。该模型利用荧光素酶活性,通过非侵入性地成像技术,提供了关于肿瘤负荷和治疗有效性的有价值的信息。因此,所呈现的基于 HCT-116Luc(pos) 细胞生长的肝内转移模型适用于不同癌症治疗策略的体内测试。此法相比脾种植,肿瘤转移速度更快,肝转移率更高,适用于肿瘤药物的筛选。但是手术难度更大,存在一定风险,死亡率更高,而且不能模拟肿瘤转移的全过程,减少了原发瘤最初侵袭周围组织和穿入血管等步骤。

2.4 肝种植模型

肝种植是将人 CRC 细胞注射到肝中或者将临床上肿瘤组织直接植入肝发展转移性肿瘤。Roque-Lima 等^[20]将新鲜肿瘤组织磨成碎片,直接植入裸小鼠肝上,成功建立 PDIX 临床前模型,该模型准确地复制肿瘤内异质性,有望为 CRLM 患者测试各种治疗方案,包括疾病进展生物标志物和治疗反应性研究。此法肿瘤生长速度快,转移率较高。操作简单,易于实施,且相对廉价,重复性好。但是仅仅涉及转移的晚期过程,没有涉及结肠癌原位生长的演进过程,故与人体内结肠癌转移观察模拟度较差,不适合结肠癌这种通过血道及淋巴道为主要转移途径的肿瘤模型制作。而且大部分仅在实验部位成瘤,周围很少有转移的卫星结节,不符合临床上结肠癌肝转移常为多发转移的特点。此模型适用于个体肿瘤基础上测试各种化疗剂以帮助临床。

2.5 腹腔扩散种植模型

腹腔扩散种植是将人 CRC 细胞通过微型注射器直接注入动物腹腔内,使其播散性生长,引起

腹水(含有大量瘤细胞)。解剖小鼠后观察肝转移或其他脏器转移。如果再将这种带瘤腹水移植至下一代动物,便建立腹水瘤模型。Miyoshi 等^[21]用 miR-139-5p 转染的 3×10^6 个人 Caco-2 细胞腹膜内注射到裸小鼠中,建立 CRC 腹膜转移的小鼠模型,具有较高的肝及腹膜转移率。此法操作简单,肝转移率高。转移周期短,短期内可复制大量模型。但是没有专一性器官转移,仅仅模拟晚期肿瘤患者转移途径,对于淋巴转移及血行转移意义不大。该模型常用于 CRC 术后腹腔种植播散和癌症晚期腹腔广泛转移的病理生理研究。

3 展望

随着模拟癌症发生的免疫缺陷的动物模型不断升级,最近开发的 CRLM-PDTEX 模型,为 CRC 及 CRLM 的研究增添了新的内容。研究人员已经开发出非常准确的临床前模型。在更好地了解疾病过程以及未来研究人员可用的改进技术的同时,我们可以预期这些 CRLM-PDTEX 模型会有更多进展。这将有助于确保临床前动物研究结果与其临床对人结果保持一致。CRLM-PDTEX 模型主要用于生物标志物,药物,肿瘤生物学等研究。尽管存在可变的基质和缺乏合适的免疫系统的缺点,但该模型已经证明具有优异的预测能力,可以被认为是外部有效性的量度。这为 CRC 及 CRLM 患者带来了福音。

参 考 文 献(References)

- [1] Gong C, Long Z, Yu Y, et al. Dietary factors and polymorphisms in vitamin D metabolism genes: the risk and prognosis of colorectal cancer in northeast China [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 8827.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [3] Al Bandar MH, Kim NK. Current status and future perspectives on treatment of liver metastasis in colorectal cancer (Review) [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(5): 2553-2564.
- [4] Roque-Lima B, Roque CCTA, Begnami MD, et al. Development of patient-derived orthotopic xenografts from metastatic colorectal cancer in nude mice [J]. *J Drug Target*, 2018, 1-7.
- [5] Wang W, Sordat B, Paquet D, et al. Human colon tumors in nude mice: implantation site and expression of the invasive phenotype 1. In: Sordat B, editor. *Immune-deficient animals* [C]. 4th International Workshop on Immune-Deficient Animals in Experimental Research, Chexbres, October-November 1982; Sessions I-VI. Basel: Karger; 1984. p 239-245.
- [6] Fu XY, Besterman JM, Monosov A, et al. Models of human metastatic colon cancer in nude mice orthotopically constructed by using histologically intact patient specimens [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88(20): 9345-9349.
- [7] Byrne AT, Alf  rez DG, Amant F, et al. Interrogating open issues in cancer precision medicine with patient-derived xenografts [J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(4): 254 - 268.
- [8] Pauli C, Hopkins BD, Prandi D, et al. Personalized in vitro and in vivo cancer models to guide precision medicine [J]. *Cancer Discov*, 2017, 7(5): 462 - 477.
- [9] Wang J, Ren L, Yan L, et al. Establishment of animal model of transplanted human colorectal cancer [J]. *Cancer Res Clinic*, 2017, 29 (4): 223-226.
- [10] Hite N, Klinger A, Hellmers L, et al. An optimal orthotopic mouse model for human colorectal cancer primary tumor growth and spontaneous metastasis [J]. *Dis Colon Rectum*, 2018, 61 (6): 698-705.
- [11] Blomme A, Van Simaey G, Doumont G, et al. Murine stroma adopts a human-like metabolic phenotype in the PDX model of colorectal cancer and liver metastases [J]. *Oncogene*, 2018, 37 (9): 1237-1250.
- [12] Brown KM, Xue A, Julovi SM, et al. Using patient-derived xenograft models of colorectal liver metastases to predict chemosensitivity [J]. *J Surg Res*, 2018, 227: 158-167.
- [13] Lu M, Zessin AS, Glover W, et al. Activation of the mTOR pathway by oxaliplatin in the treatment of colorectal cancer liver metastasis [J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0169439.
- [14] Fleten KG, Bakke KM, M  landsmo GM, et al. Use of non-invasive imaging to monitor response to aflibercept treatment in murine models of colorectal cancer liver metastases [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2017, 34(1): 51-62.
- [15] Kawaguchi K, Murakami T, Suetsugu A, et al. High-efficacy targeting of colon-cancer liver metastasis with Salmonella typhimurium A1-R via intra-portal-vein injection in orthotopic nude-mouse models [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (12): 19065 -19073.
- [16] Kim J, Do EJ, Moinova H, et al. Molecular imaging of colorectal tumors by targeting colon cancer secreted protein-2 (CCSP-2) [J]. *Neoplasia*, 2017, 19(10): 805-816.
- [17] Oshima G, Stack ME, Wightman SC, et al. Advanced animal model of colorectal metastasis in liver: imaging techniques and properties of metastatic clones [J]. *J Vis Exp*, 2016, (117): e54657.
- [18] Bai JS, Wang J, Zhao XF. Nude mice hemispleen method in hepatic metastases of colon cancer model [J]. *J Dalian Med Univ*, 2015, 37(5): 447-450.
- [19] Thalheimer A, Korb D, B  nicke L, et al. Noninvasive visualization of tumor growth in a human colorectal liver metastases xenograft model using bioluminescence in vivo imaging [J]. *J Surg Res*, 2013, 185(1): 143-151.
- [20] Roque-Lima B, Roque CCTA, Begnami MD, et al. Development of patient-derived orthotopic xenografts from metastatic colorectal cancer in nude mice [J]. *J Drug Target*, 2018, 5: 1-7.
- [21] Miyoshi J, Toden S, Yoshida K, et al. MiR-139-5p as a novel serum biomarker for recurrence and metastasis in colorectal cancer [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 43393.