

魏永,李晓娟,姜棋予,等. 透明细胞肾癌裸鼠模型构建及靶向药物敏感性研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(6): 98-105.
Wei Y, Li XJ, Jiang QY, et al. Establishment of a clear-cell renal cancer cell tumor xenograft model using patient-derived cells to examine cell sensitivity to molecular-targeting agents [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(6): 98-105.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.06.015

透明细胞肾癌裸鼠模型构建及靶向药物敏感性研究

魏 永^{1,2}, 李晓娟³, 姜棋予³, 张 鹏⁴, 冯 帆³, 李瑞生^{3*}, 王 科^{1*}

(1.青岛大学附属医院,泌尿外科,青岛 266000; 2.中国人民解放军海军第 971 医院,泌尿外科,青岛 266071;
3.中国人民解放军总医院第五医学中心,临床研究管理中心,北京 100039;
4.中国人民解放军总医院第一医学中心,泌尿外科,北京 100853)

【摘要】 目的 利用患者来源 (patients-derived cells, PDCs) 的透明细胞肾癌 (clear cell renal cancer cell, ccRCC) 细胞建立肿瘤动物模型 (patient-derived tumor xenograft model, PDX model), 检测 ccRCC PDCs 对分子靶向药物的敏感性, 为临床诊疗提供理论和实验依据。**方法** 将 ccRCC PDCs 接种裸鼠皮下建立肿瘤模型, 使用分子靶向药物舒尼替尼 (Sunitinib)、索拉非尼 (Sorafenib)、乐伐替尼 (Lenvatinib)、瑞戈非尼 (Regorafenib)、阿帕替尼 (Apatinib) 以及安罗替尼 (Anlotinib) 口服灌胃给药, 确定药物对 ccRCC PDCs 在裸鼠皮下成瘤的抑制作用。收集细胞与肿瘤组织标本, 利用定量 PCR 技术检测分子靶向药物作用靶标 (VEGFR 等受体酪氨酸蛋白激酶以及 ERK、AKT 等 MAPK 信号通路所属蛋白激酶), 确定 ccRCC PDCs 在实验过程中的遗传背景是否保持稳定。**结果** 成功获得了 5 株 ccRCC PDCs 并利用上述 ccRCC PDCs 接种裸鼠获得了肾癌裸鼠皮下肿瘤模型; 在体外培养 PDCs 细胞过程中, 分子靶向药物作用靶标等的表达出现下降或丢失等现象, 而通过裸鼠成瘤对 PDCs 细胞进行扩增, 肿瘤组织中分子靶向药物作用靶标等的表达相对稳定; 分子靶向药物对 ccRCC PDCs 裸鼠皮下成瘤的抑制作用存在明确患者来源的个体差异, 在所选取的分子靶向药物中, Lenvatinib 的抗肿瘤活性强于其他几种分子靶向药物。**结论** 本研究利用患者来源的透明细胞肾癌细胞系成功建立了肾癌动物模型并检测了肾癌细胞对分子靶向药物的敏感性, 能够为相关临床诊疗提供理论和实验依据。

【关键词】 透明细胞肾癌; 患者来源肿瘤细胞; 分子靶向药物; 药物敏感性检测
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2020) 06-0098-08

Establishment of a clear-cell renal cancer cell tumor xenograft model using patient-derived cells to examine cell sensitivity to molecular-targeting agents

WEI Yong^{1,2}, LI Xiaojuan³, JIANG Qiyu³, ZHANG Peng⁴, FENG Fan³, LI Ruisheng^{3*}, WANG Ke^{1*}

(1. Department of Urology, Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266000, China.
2. Department of Urology, Navy 971 Hospital of the Chinese People's Liberation Army, Qingdao 266071.
3. Fifth Medical Center, General Hospital of Chinese People's Liberation Army Clinical Research Management Center, Beijing 100039.
4. Department of Urology, First Medical Center, General Hospital of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100853)

【Abstract】 Objective To examine the sensitivity of clear-cell renal carcinoma cells (ccRCCs) using patients-derived cells (PDCs) to molecular-targeted drugs in patient-derived tumor xenograft (PDX) models. **Method** PDCs from

[作者简介] 魏永 (1981—), 男, 在读硕士, 主治医师, 研究方向: 泌尿系统肿瘤。E-mail: 779550007@qq.com
[通信作者] 王科 (1969—), 男, 博士, 主任医师, 研究方向: 泌尿系统肿瘤。E-mail: wangke6910@sina.com
李瑞生 (1969—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 肿瘤实验动物学。 * 共同通信作者

ccRCCs were subcutaneously inoculated into nude mice to establish a tumor model. The molecular-targeting drugs, sunitinib, sorafenib, lenvatinib, regorafenib, apatinib and anlotinib, were orally administered to examine the inhibitory effect of the drug on the subcutaneous formation of PDC-derived ccRCCs in nude mice. Cell and tumor tissue samples were analyzed via qPCR. The targets of the molecular-targeting drugs (i.e., receptor tyrosine protein kinases, such as VEGFR, and protein kinases of the MAPK signaling pathway such as ERK and AKT) were examined. Result Five lines of PDC-derived ccRCCs were successfully established, and the nude mice were injected with PDC-derived ccRCC to obtain a subcutaneous tumor model of kidney cancer in nude mice. Expression of the target molecules of these drugs decreased during in vitro PDC culturing. Moreover, expansion of these molecules in the tumor tissues was relatively stable. The inhibitory rates of the molecular-targeting agents differed for each drug, and the antitumor activity of lenvatinib was stronger than that of several of the other drugs. Conclusion PDC-derived ccRCCs can be used to establish a mouse model of kidney cancer and test the sensitivity of renal cancer cells to molecular-targeted drugs. These models can provide a rational and experimental basis for relevant clinical diagnosis and treatment.

【Keywords】 clear-cell renal carcinoma, molecular-targeting agent, patient-derived cell, patient-derived tumor xenograft model, drug sensitivity test

肾癌是一种常见的泌尿系统肿瘤,其最为主要的病理类型是肾细胞癌 (renal cell carcinoma, RCC)^[1],其中透明细胞肾癌 (clear renal cell carcinoma, ccRCC) 是 RCC 的主要病理类型,约占 RCC 发病总数的 85% 以上^[2]。目前,外科手术切除虽然是原发性肾癌的首选方案,但罹患多发弥散肾癌以及肾癌复发的患者难以接受外科手术治疗,总体预后较差^[1-2]。对这些患者,分子靶向治疗 (服用各种口服小分子蛋白激酶抑制剂) 是其主要治疗策略^[3-4]。尽管如此,肾癌分子靶向治疗仍存在诸多问题^[3-4]: 存在个体差异、存在药物耐受 (drug-resistance) 现象、费用昂贵等。因此,研究和建立相关研究模型与研究方法,预测患者对分子靶向药物的敏感性具有重要的理论和实践意义。肾癌相关研究的主要模型包括利用现有的肾癌细胞系 (如 Caki-1、Caki-2 以及 786-O) 进行体外培养或接种免疫缺陷动物建立肿瘤抑制模型^[5]。最近的研究显示,收集肿瘤组织标本,从中分离出单个细胞建立患者来源的细胞系 (patients-derived cells, PDCs) 具有重要意义^[6]: (1) 与现有细胞系相比, PDCs 更为贴近临床实际; (2) 利用 PDCs 接种免疫缺陷动物能够获得患者来源的肿瘤细胞动物模型 (patient-derived tumor xenograft model, PDX model), 开展相应肿瘤学、肿瘤药理学研究工作; (3) 灵活运用 PDCs、PDXs 等模型能够对患者体内肿瘤细胞对药物的敏感性进行预测。因此,本研究着眼于 ccRCC 这一最为常见和有代表性获得与制备了 5 株 ccRCC 的 PDCs, 利用这 5 株 PDCs 接种建立了 PDX 模型,检测了这些 PDCs 对分子靶向药物舒尼替尼 (Sunitinib)、索拉非尼 (Sorafenib)、乐伐替尼

(Lenvatinib)、瑞戈非尼 (Regorafenib)、阿帕替尼 (Apatinib) 以及安罗替尼 (Anlotinib) 的敏感性。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 BALB/c 裸鼠, 4 周龄, 体重 13 ~ 15 g, 400 只, 雌性, 均购自北京斯贝福生物科技有限公司 [SCXK (京) 2016-0002]; 动物饲养于解放军总医院第五医学中心动物 [SYXK (军) 2017-0016]。动物饲养环境: 温度 22℃ ~ 25℃, 湿度 40%, 自由进食和饮水。本实验通过了解放军总医院第五医学中心动物伦理委员会审查 (IACUC-2017-009)。在实验过程中, 严格按实验动物使用的 3R 原则给予实验动物福利。

1.1.2 细胞系

5 例患者来源的 ccRCC 细胞系、现有肾癌细胞系 Caki-1 与 Caki-2 由中国人民解放军总医院第一医学中心泌尿外科张鹏博士惠赐。

1.2 主要试剂与仪器

分子靶向药物: 舒尼替尼 (Sunitinib, 产品编号为 S7781)、索拉非尼 (Sorafenib, 产品编号为 S7397)、乐伐替尼 (Lenvatinib, 产品编号为 S4371)、瑞戈非尼 (Regorafenib, 产品编号为 S1178)、阿帕替尼 (Apatinib, 产品编号 S5248) 以及安罗替尼 (Anlotinib, 产品编号为 S8726) 等均购买自美国 Selleck 公司; 细胞/组织样品总 RNA 提取、反转录 (reverse transcription) 以及 qPCR 等试剂盒均为美国 ABI 公司产品; 吸入麻醉剂异氟烷 (isoflurane) 购买自深圳瑞沃德公司; 手术的器械和材料等动物实验

常规材料由本实验室保存;实时定量 PCR 仪(qPCR 仪,美国 ABI 公司,ABI-7500 型号)等均由本实验室提供。

1.3 实验方法

1.3.1 分子靶向药物溶液配制

以有机溶剂 DMSO、吐温 80 以及 PEG400(国药集团北京公司)充分溶解药物粉末(得到药物母液),使用生理盐水对药物母液进行稀释(通过搅拌和超声震荡等以避免药物析出),最终溶液中的有机溶剂 DMSO 不超过 1‰、吐温 80 以及 PEG400 不超过 2‰^[7-8]。

1.3.2 定量 PCR 实验

收集 ccRCC 细胞样品(包括 ccRCC 现有细胞系、Caki-1、Caki-2、786-O 以及 ccRCC 的 PDCs)或肿瘤组织样品(将 ccRCC 的 PDCs 接种裸鼠形成皮下肿瘤,再收集皮下肿瘤样品),提取总 RNA 进行反转录,再进行 qPCR 实验检测 ccRCC 细胞中分子靶向药物目的作用靶标(包括各种受体酪氨酸蛋白激酶 VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、PDGFR-α、PDGFR-β 以及 c-Kit;以及 MAPK、PI3K/AKT 信号通路的主要蛋白激酶 AKT、ERK-1 以及 ERK-2)。qPCR 定量方法为 SYBR Green 染色法(2^{-ΔΔCT}法),以肌动蛋白 β-Actin 为参比,依据定量 PCR 实验中各目标基因的相对表达水平^[9-10]。引物序列见表 1。

目标基因在 ccRCC 细胞中的表达水平结果显示为其相对于内参 β-Actin 的相对表达水平对所得 qPCR 的数据进行分析:(1)以前述分子靶向药物作用靶标在 ccRCC PDCs 以及 ccRCC 细胞系中的表达水平(目标基因相对于内参 β-Actin 的相对表达水平)分别绘制热图(heatmap);(2)对于 ccRCCPDCs,分别检测在经过体外培养后的系列时间点(体外培养 1 周、培养 2 周和培养 3 周)时,ccRCCPDCs 中前述分子靶向药物作用靶标的表达量,依据其表达变化(与对照组,未经体外培养的 ccRCCPDCs 细胞相比,经过体外培养的 ccRCCPDCs 中基因的表达变化倍数(folds),其中表达增加为正值,表达下降为负值)绘制热图;(3)对于 ccRCCPDCs,分别检测在经过体内扩增(通过裸鼠成瘤作用实现体内扩增 1 次、扩增 2 次和扩增 3 次)后,ccRCCPDCs 中前述分子靶向药物作用靶标的表达量,依据其表达变化(与对照组,未经体内扩增 ccRCCPDCs 细胞相比,经过体内扩增的 ccRCCPDCs 中基因的表达变化倍数(folds),其中表达增加为正值,表达下降为负值)绘制热图。

1.3.3 ccRCC 细胞的体外培养及在裸鼠中的扩增

收集得到 ccRCC 的肿瘤组织(包括肿瘤组织以及少量外科手术切除中连带的癌旁组织),将肿瘤组织和癌旁组织进行分离后,取少许组织(包括肿

表 1 引物序列
Table 1 Sequences of the primers

基因 Gene	引物 Primers	序列(5'→3') Sequences
FLT1/VEGFR-1	上游 Forward	CCTGCAAGATTTCAGGCACCTATG
	下游 Reverse	GTTCGCGAGGAGGTATGCTGCT
KDR/VEGFR-2	上游 Forward	GGAACCTCACTATCCGCAGAGT
	下游 Reverse	CCAAGTTCGTCTTTTCCTGGGC
FLT4/VEGFR-3	上游 Forward	TGCGAATACCTGTCCTACGATGC
	下游 Reverse	CTTGTTGGATGCCGAAAGCGGAG
PDGFRA/PDGFR-α	上游 Forward	GACTTTCGCCAAAGTGAGGAGAG
	下游 Reverse	AGCCACCGTGAGTTCAGAACGC
PDGFRB/PDGFR-β	上游 Forward	TGCAGACATCGAGTCTCTCCAAC
	下游 Reverse	GCTTAGCACTGGAGACTCGTTG
KIT/c-Kit	上游 Forward	CACCGAAGGAGGCCACTTACACA
	下游 Reverse	TGCCATTACAGGCCTGTCGTA
AKT1/AKT	上游 Forward	TGGACTACCTGCACTCGGAGAA
	下游 Reverse	GTGCCGCAAAAGGTCTTCATGG
MAPK3/ERK-1	上游 Forward	TGGCAAGCACTACCTGGATCAG
	下游 Reverse	GCAGAGACTGTAGGTAGTTTCGG
MAPK1/ERK-2	上游 Forward	ACACCAACCT CTCGTACATCGG
	下游 Reverse	TGGCAGTAGGTCGTGTCTCAA

瘤组织和癌旁组织)做 HE 染色进行病理分析确证组织标本的特异性,再将所获得的肿瘤组织进行下一步实验。使用钢筛(200 目)对所得 ccRCC 肿瘤组织进行研磨,收集研磨所得的细胞悬液即获得 ccRCC 的 PDCs^[11]。对于所获得的 ccRCC 的 PDCs:(1)在液氮中冻存备用;(2)对 ccRCC PDCs 进行体外培养;(3)将 ccRCC PDCs 接种裸鼠皮下形成肿瘤组织。体外培养实验:使用添加有 10% FBS 的 DMEM 培养 ccRCC 细胞 Caki-1 等或 ccRCC PDCs,再收集细胞按照前述方法进行定量 PCR 检测;裸鼠皮下成瘤实验:制备前述 ccRCC PDCs 细胞悬液后,使用注射器将 ccRCC PDCs 细胞悬液接种于裸鼠皮下(每个接种点接种约 6×10^6 个细胞,体积约 0.3 mL)^[12]。3~4 周后,ccRCC PDCs 能够在裸鼠皮下形成肿瘤组织,剖取肿瘤组织表面性状较好的部分制备为肿瘤组织微块,将组织微块接种于裸鼠皮下,再次形成皮下肿瘤组织,此为利用裸鼠成瘤作用实现 1 次 ccRCC PDCs 的体内扩增。在此基础上,收集原始 ccRCC PDCs 以及经过 3 次体内扩增后的 ccRCC PDCs 肿瘤组织中的总 RNA 样品,依据前述方法进行定量 PCR 实验。对于患者来源的 ccRCC 细胞的保存,分别通过:(1)依据前述方法收集获 ccRCC 肿瘤组织,通过研磨的方法获得 ccRCC 细胞(I 代),直接在液氮中保存作为原始细胞库;(2)将直接从 ccRCC 组织标本中分离得到的 ccRCC 细胞(I 代)接种裸鼠形成肿瘤组织以实现扩增,再收集裸鼠皮下肿瘤组织研磨以大量的 ccRCC 细胞(II 代),将细胞在液氮冻存保存并进行后续实验。

1.3.4 分子靶向药物对肾肿瘤动物模型的治疗

将前述(1.3.3 部分所述)II 代的 ccRCC PDCs 接种裸鼠皮下,接种 3~4 d 后以口服灌胃给药方式给予裸鼠 2 mg/kg 的分子靶向药物,每 2 d 给药一次,经过 15 次治疗后,收集肿瘤组织标本,使用游标卡尺测量皮下肿瘤的长度与宽度,计算肿瘤体积=肿瘤长轴长度×肿瘤短轴长度×肿瘤短轴长度/2^[13]。同时对肿瘤组织进行称重,计算抑制率=(对照组肿瘤体积-药物治疗组肿瘤体积)/对照组肿瘤体积×100%或(对照组肿瘤重量-药物治疗组肿瘤重量)/对照组肿瘤重量×100%。

1.4 统计学方法

实验数据均采用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 19.0 统计学软件对各项指标数据进行正态性检验,应用进行 *t*-检验或单因素方差分析对实

验结果进行分析比较。以 $P < 0.05$ 表示为差异有统计学显著性。

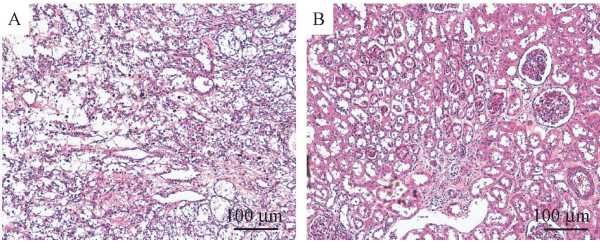
2 结果

2.1 ccRCC PDCs 的制备及其质量控制

首先获得 ccRCC 组织标本进行病理学确认(见图 1),确定收集的到的肿瘤组织的特异性,再利用 ccRCC 肿瘤组织制备得到了 ccRCC PDCs,在 PDCs 以及 ccRCC 细胞系中检测了分子靶向药物的作用靶标(包括系列受体酪氨酸蛋白激酶以及 MAPK、PI3K/AKT 信号通路的主要蛋白激酶)的表达量。结果显示:分子靶向药物的作用靶标在 ccRCC PDCs 中的表达量显著高于在 ccRCC 细胞系中的表达量(见图 2)。在此基础上,分别通过体外培养或体内扩增(在裸鼠体内通过成瘤作用实现扩增)的方法对 ccRCC PDCs 进行扩增,再检测不同扩增方法对分子靶向药物作用靶标的表达水平。结果显示:体外长期培养 ccRCC 的 PDCs(持续培养 1 周、2 周或 3 周),分子靶向药物的作用靶标表达出现明显下调,而通过裸鼠成瘤作用实现 ccRCC PDCs 的扩增(通过裸鼠成瘤的方法对 ccRCC PDCs 实现 3 次扩增),ccRCC PDCs 中分子靶向药物作用靶标的表达能够保持稳定(见图 3)。这表明,通过裸鼠成瘤作用实现 ccRCC PDCs 的扩增能够保持其自身特性的稳定,反映出其在患者体内的特征。

2.2 分子靶向药物对 ccRCC PDCs 裸鼠成瘤的抑制活性检测

结果显示:分子靶向药物能够抑制 ccRCC PDCs 细胞在裸鼠皮下的成瘤作用,不同患者来源的 PDCs 对分子靶向药物的敏感性存在患者的个体差异。进一步,在所选分子靶向药物中,舒尼替尼、索拉非尼、乐伐替尼、瑞戈非尼和安罗替尼对 ccRCC PDCs 裸鼠成瘤有明显的抗肿瘤活性(见图 4 和表 2),其中乐伐替尼的抗肿瘤活性优于其他几种分子靶向药物(见图 4 和表 2),而阿帕替尼的抗肿瘤活性稍弱(图 4,表 2)。在上述结果中(图 3,图 4,表 2),图 4 是所选 6 种分子靶向药物对其中 1 株 ccRCC PDCs(2 号 ccRCC PDCs)在裸鼠皮下成瘤的抑制活性,而图 5 则显示为 ccRCC 代表性的分子靶向药物(索拉非尼)对 5 株 ccRCC PDCs 在裸鼠中皮下成瘤的抑制活性。表 2 为所选 6 种分子靶向药物对 5 株 ccRCC PDCs 在裸鼠皮下成瘤的抑制活性(结果显示为药物分别对肿瘤大小与肿瘤体积的抑制率)。

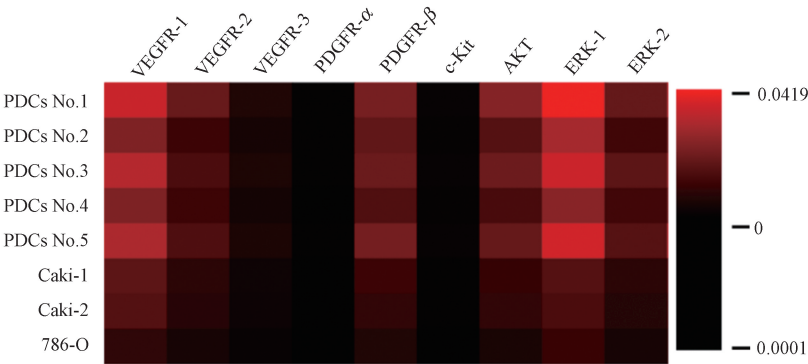


注:A:ccRCC 组织;B:癌旁组织。

图 1 ccRCC 组织标本的病理染色结果(HE 染色)

Note. A, ccRCC tissue. B, aired non-tumor tissue.

Figure 1 Pathological staining results of ccRCC tissue specimens(HE staining)

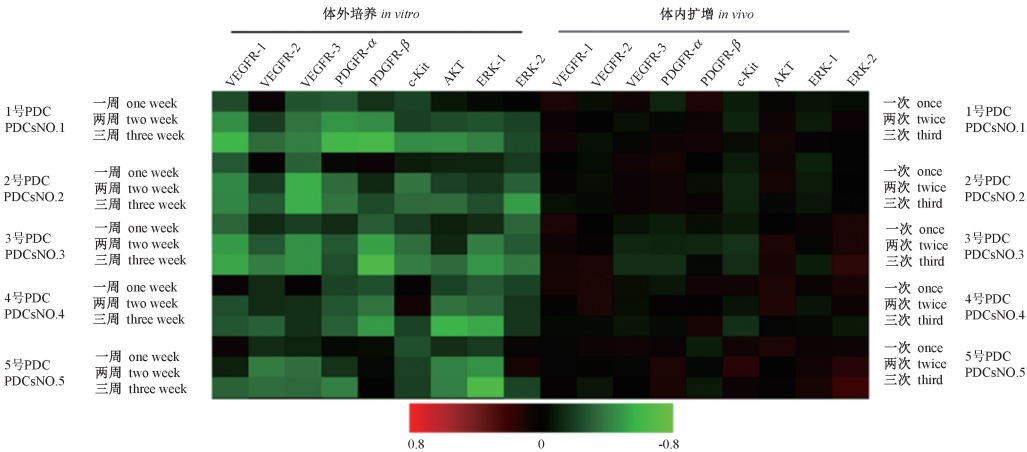


注:相对于内参 β -Actin 的表达水平。

图 2 分子靶向药物作用靶标热图

Note. Relative to the expression level of internal reference β -actin.

Figure 2 Thermogram of targets targeted by molecules targeted drugs



注:左侧为体外培养 ccRCC PDCs,右侧裸鼠成瘤的方法实现 ccRCC PDCs 的扩增。依据不同组中目标基因与对照
组中目标基因表达变化的倍数(folds,上调为正值,下调为负值)绘制热图。

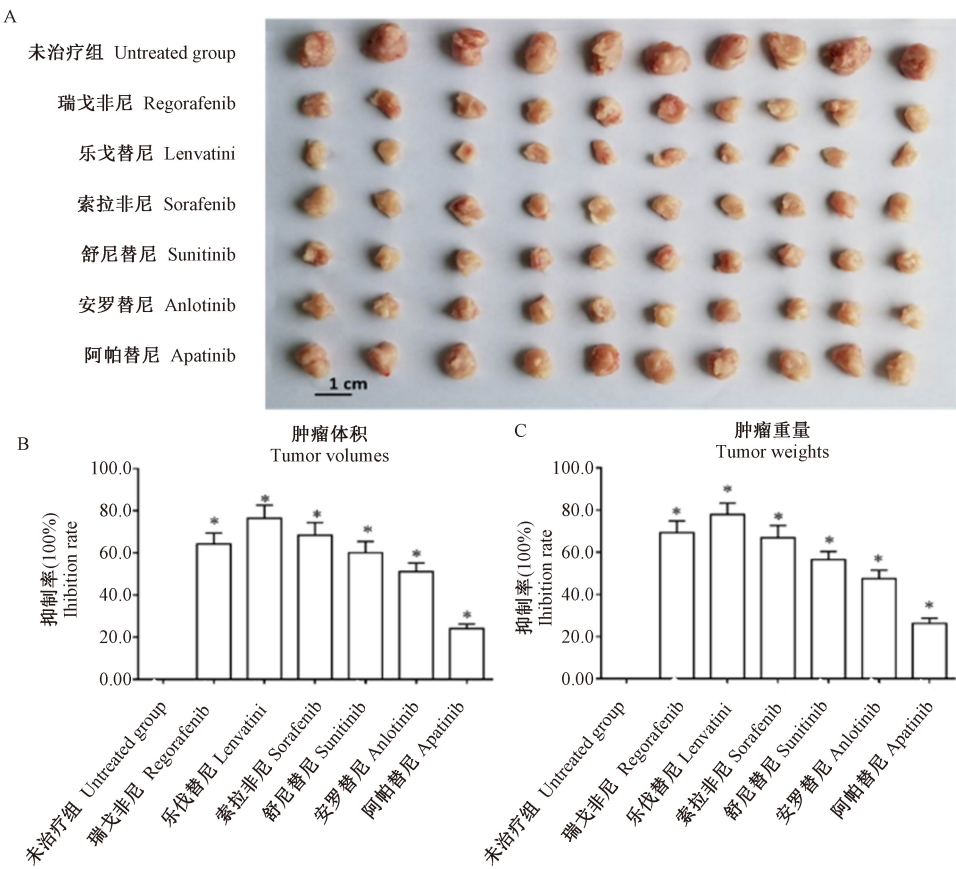
图 3 通过体外培养或裸鼠成瘤作用实现 ccRCC PDCs 的扩增以及不同扩增方法对 ccRCC PDCs 中
分子靶向药物作用靶标表达的影响

Note. The left part is amplification of ccRCC PDCs by *in vitro* culture. The right part is amplification of ccRCC PDCs in
nude mice. Heat maps were drawn based on folds of target genes' expression changes in the different groups and control
groups(folds, positive up/increasing, down negative/decreasing).

Figure 3 Amplification of ccRCC PDCs by *in vitro* culture or tumor formation in nude mice and the effect of different
amplification methods on target expression of the targets of molecular targeting agents in ccRCC PDCs

表 2 分子靶向药物对 ccRCC PDCs 皮下肿瘤抑制率($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The inhibitory rates of molecular targeting agents on five lines of ccRCC PDCs' subcutaneous growth in nude mice							
细胞系 Cell lines	检测指数 Detection index	药物对 ccRCC-PDCs 裸鼠皮下生长的抑制率($\bar{x} \pm s$)					
		Inhibitory rates of agents on ccRCC PDCs' subcutaneous growth in nude mice					
		瑞戈非尼 Regorafenib	乐伐替尼 Lenvatinib	索拉非尼 Sorafenib	舒尼替尼 Sunitinib	安罗替尼 Anlotinib	阿帕替尼 Apatinib
PDCs	肿瘤体积 Tumor volumes	51.93±7.66	60.91±4.66	52.27±5.09	43.86±4.68	54.55±5.84	25.40±2.85
No 1	肿瘤重量 Tumor weights	55.31±6.87	61.35±4.91	47.29±6.75	33.10±3.57	54.59±5.35	29.91±5.64
PDCs	肿瘤体积 Tumor volumes	64.21±6.03	76.44±6.95	68.33±4.92	60.15±5.53	51.10±3.73	24.17±1.80
No 2	肿瘤重量 Tumor weights	65.48±3.25	82.51±5.69	66.25±5.56	57.70±3.92	51.61±5.11	22.89±1.97
PDCs	肿瘤体积 Tumor volumes	61.81±5.88	70.67±7.71	48.51±5.94	49.85±5.11	50.55±6.17	21.33±4.93
No 3	肿瘤重量 Tumor weights	60.72±6.88	72.20±6.92	54.34±6.87	50.22±5.17	49.53±7.09	22.39±4.07
PDCs	肿瘤体积 Tumor volumes	46.58±4.53	60.36±3.73	38.46±4.26	35.61±6.74	40.86±6.41	11.51±2.18
No 4	肿瘤重量 Tumor weights	47.98±8.70	65.98±7.63	38.90±5.08	39.50±4.11	44.46±4.25	10.85±1.03
PDCs	肿瘤体积 Tumor volumes	50.02±3819	57.36±5.39	40.06±5.53	32.35±5.01	35.38±3.70	14.05±3.13
No 5	肿瘤重量 Tumor weights	46.86±6.67	58.49±5.45	39.81±4.44	35.92±5.08	33.45±4.80	12.42±2.18

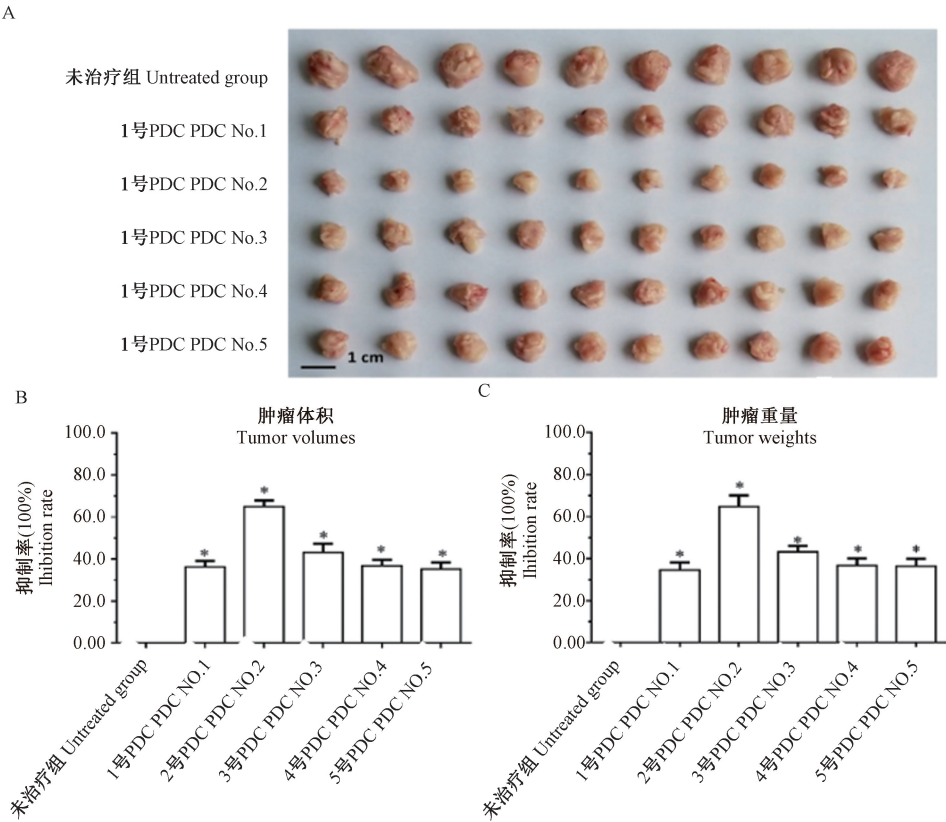


注:A:肿瘤组织照片(2号 ccRCC PDCs 的结果);B:基于肿瘤体积计算所得的药物作用的抑制率;C:基于肿瘤重量计算所得的药物作用的抑制率。与未治疗组比较, * $P<0.05$ 。

图 4 分子靶向药物对 ccRCC PDCs 在裸鼠皮下成瘤的抗肿瘤作用

Note. A, The results are shown as the represented images (from the No. 2 ccRCC PDCs) of subcutaneous tumor tissues. B, inhibition rate of drug action calculated based on tumor volume. C, inhibition rate of drug action calculated based on tumor weights. Compared with untreated group, * $P<0.05$.

Figure 4 The anti-tumor effect of molecularly targeted agents on the tumor formation of ccRCC PDCs in nude mice



注:A:肿瘤组织照片(1~5号ccRCC PDCs的结果);B:基于肿瘤体积计算所得的药物作用的抑制率;C:基于肿瘤重量计算所得的药物作用的抑制率。与未治疗组比较,* $P<0.05$ 。

图5 索拉非尼对5株ccRCC PDCs在裸鼠皮下成瘤的抗肿瘤作用

Note. A, Rrepresented images (from the No. 1 to No. 5 ccRCC PDCs) of subcutaneous tumor tissues. B, inhibition rate of drug action calculated based on tumor volume. C, inhibition rate of drug action calculated based on tumor weight. Compared with untreated group, * $P<0.05$.

Figure 5 The anti-tumor effect of Sorafenib on the tumor formation of the five lines of ccRCC PDCs in nude mice

3 讨论

目前,分子靶向治疗已成为各种无法接受外科手术切除的恶性肿瘤患者,如进展期肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)等的主要治疗策略^[14]。Sorafenib是由拜耳公司(Bayer Corporation)研发并出品的分子靶向药物,不仅能够作为进展期HCC的一线治疗药物,也广泛应用于肾癌的治疗^[15]。除Sorafenib外,舒尼替尼(Sunitinib)也被用于肾癌治疗^[16]。除此之外,一些新型分子靶向药物如Lenvatinib(日本卫材公司)^[14]、Regorafenib(拜耳公司)^[14];Anlotinib(正大天晴公司)与Apatinib(江苏恒瑞公司)等也具有类似的作用机制^[17-18]。本研究首先制备得到了患者来源的ccRCC细胞(PDCs),然后将PDCs接种裸鼠形成肿瘤细胞,通过灌胃给药进行分子靶向治疗。结果显示,本研究利用5例患者来源的ccRCC细胞成功建立了相关模型,所有5株细胞的数据均用表详细列出,其中2

号PDC作为代表性结果出示了肿瘤组织的照片。进一步,所选5种分子靶向药物对ccRCC PDCs的裸鼠成瘤作用有明确的抗肿瘤活性,其中Lenvatinib的抗肿瘤活性优于其他几种分子靶向药物,而Apatinib的抗肿瘤活性稍弱。同时,分子靶向药物的抗肿瘤活性依据ccRCC PDCs的患者来源具有患者个体差异。

一直以来,肾癌细胞系(ccRCC cell lines)是肾癌相关研究的常用和主要研究模型,但肿瘤细胞在患者体内的存活与增殖受到肿瘤微环境、肿瘤组织间质等的影响,与在体外培养存在巨大差距^[19]。现有肾癌细胞系在其建立和广泛应用过程中经历了体外长期培养,其自身特性已发生了诸多变化。例如文中选用了最为常用和代表性的Caki-1细胞,在PubMed数据库中检索最早对其使用的记录可上溯至1979年^[20],因此现有细胞系从其建立到使用至今已经历了漫长的时间(逾数十年),已经无法反映出现阶段患者体内ccRCC细胞的实际情况。为此,

本研究获得了 ccRCC 的 PDCs,并建立了动物模型。结果发现,经过较长期的体外培养,ccRCC PDCs 中分子靶向药物的作用靶标有明显下调,而通过将 PDCs 接种裸鼠形成肿瘤的方式能够实现 ccRCC 细胞在裸鼠体内的扩增,在这一过程中,分子靶向药物的作用靶标的表达基本稳定。这表明,使用常规体外培养的方法对 ccRCC PDCs 进行扩增,环境的改变(例如在体条件下肿瘤组织微环境等的缺失)会导致细胞逐渐丢失其原有的一些特性^[19],这体现在本研究中即为 ccRCC PDCs 细胞中,多种受体酪氨酸蛋白激酶以及 MAPK、PI3K/AKT 等信号通路下游的蛋白激酶等的表达水平的下降,最终导致 ccRCC PDCs 的特征特别是对分子靶向药物的敏感性会与其在患者体内的情况存在巨大差异,无法准确反映出实际情况。而在裸鼠体内建立 ccRCC PDCs 细胞的肿瘤模型,裸鼠体内的环境更易于保持 ccRCC PDCs 自身的原有特性,具有重要意义。

综上所述,本研究不仅建立了基于 ccRCC PDC 的动物模型并检测了不同分子靶向药物对 ccRCC PDCs 在裸鼠体内的抗肿瘤活性,还确定了不同扩增和保存方法对 ccRCC PDCs 自身生物学特性的影响。这不仅有助于发现和揭示受试分子靶向药物新的适应症,也能够为 ccRCC 分子靶向治疗提供新的实验依据和更为有效的动物模型。

参考文献:

- [1] Capitanio U, Montorsi F. Renal cancer [J]. Lancet, 2016, 387 (10021): 894-906.
- [2] Bex A, Mulders P, Jewett M, et al. Comparison of immediate vs deferred cytoreductive nephrectomy in patients with synchronous metastatic renal cell carcinoma receiving sunitinib: the SURTIME randomized clinical trial [J]. JAMA Oncol, 2019, 5(2): 164-170.
- [3] Haas NB, Manola J, Dutcher JP, et al. Adjuvant treatment for high-risk clear cell renal cancer: updated results of a high-risk subset of the ASSURE randomized trial [J]. JAMA Oncol, 2017, 3(9): 1249-1252.
- [4] Fernández-Pello S, Hofmann F, Tahbaz R, et al. A systematic review and meta-analysis comparing the effectiveness and adverse effects of different systemic treatments for non-clear cell renal cell carcinoma [J]. Eur Urol, 2017, 71(3): 426-436.
- [5] Zhang P, Ma X, Song E, et al. Tubulin cofactor a functions as a novel positive regulator of ccRCC progression, invasion and metastasis [J]. Int J Cancer, 2013, 133(12): 2801-2811.
- [6] Zhang Z, Hu K, Kiyuna T, et al. A patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) nude-mouse model precisely identifies

effective and ineffective therapies for recurrent leiomyosarcoma [J]. Pharmacol Res, 2019, 142: 169-175.

- [7] Xie H, Tian S, Yu H, et al. A new apatinib microcrystal formulation enhances the effect of radiofrequency ablation treatment on hepatocellular carcinoma [J]. Onco Targets Ther, 2018, 11: 3257-3265.
- [8] Wang Y, Tang Z. A novel long-sustaining system of apatinib for long-term inhibition of the proliferation of hepatocellular carcinoma cells [J]. Onco Targets Ther, 2018, 11: 8529-8541.
- [9] Ji Q, Xu X, Li L, et al. miR-216a inhibits osteosarcoma cell proliferation, invasion and metastasis by targeting CDK14 [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(10): e3103.
- [10] Liang Y, Xu X, Wang T, et al. The EGFR/miR-338-3p/EYA2 axis controls breast tumor growth and lung metastasis [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(7): e2928.
- [11] Zhang Y, Li D, Jiang Q, et al. Novel ADAm-17 inhibitor ZLDi-8 enhances the *in vitro* and *in vivo* chemotherapeutic effects of Sorafenib on hepatocellular carcinoma cells [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(7): 743.
- [12] Feng F, Jiang Q, Cao S, et al. Pregnane X receptor mediates sorafenib resistance in advanced hepatocellular carcinoma [J]. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2018, 1862(4): 1017-1030.
- [13] Jia H, Yang Q, Wang T, et al. Rhamnetin induces sensitization of hepatocellular carcinoma cells to a small molecular kinase inhibitor or chemotherapeutic agents [J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1860(7): 1417-1430.
- [14] Roskoski RJ. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors [J]. Pharmacol Res, 2019, 144: 19-50.
- [15] Nukui A, Masuda A, Abe H, et al. Increased serum level of soluble interleukin-2 receptor is associated with a worse response of metastatic clear cell renal cell carcinoma to interferon alpha and sequential VEGF-targeting therapy [J]. BMC Cancer, 2017, 17(1): 372.
- [16] Fang L, Zhang Y, Zang Y, et al. HP-1 inhibits the progression of ccRCC and enhances sunitinib therapeutic effects by suppressing EMT [J]. Carbohydr Polym, 2019, 223: 109-115.
- [17] Wang G, Sun M, Jiang Y, et al. Anlotinib, a novel small molecular tyrosine kinase inhibitor, suppresses growth and metastasis via dual blockade of VEGFR2 and MET in osteosarcoma [J]. Int J Cancer, 2019, 145(4): 979-993.
- [18] Ni Y, Ye X. Apatinib for hepatocellular carcinoma [J]. J Cancer Res Ther, 2019, 15(4): 741-742.
- [19] Hou J, Hong Z, Feng F. A novel chemotherapeutic sensitivity-testing system based on collagen gel droplet embedded 3D-culture methods for hepatocellular carcinoma [J]. BMC Cancer, 2017, 17(1): 729.
- [20] Leblanc PA, Taffet SM, Fried FA, et al. Staphylococcal protein A assay for detection of antibody directed at renal cancer cells [J]. J Urol, 1979, 121(6): 724-727.