

罗宝花,刘晓秋,雷静玉,等. 胰腺癌免疫系统人源化小鼠模型的构建及评估 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 161-168.  
Luo BH, Liu XQ, Lei JY, et al. Construction and evaluation of humanized immune system mouse model with human pancreatic cancer [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 161-168.  
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.02.002

# 胰腺癌免疫系统人源化小鼠模型的构建及评估

罗宝花<sup>1,2</sup>, 刘晓秋<sup>1</sup>, 雷静玉<sup>2</sup>, 张彩勤<sup>2</sup>, 张永斌<sup>3\*</sup>, 师长宏<sup>2\*</sup>

(1. 广州中医药大学科技创新中心, 广州 510405; 2. 空军军医大学实验动物中心, 西安 710032; 3. 广州中医药大学实验动物中心, 广州 510405)

**【摘要】 目的** 构建并评估胰腺癌免疫系统人源化小鼠模型, 以为胰腺癌的免疫治疗研究提供理想的临床前模型。**方法** 应用 Ficoll 密度梯度离心法, 从健康人外周血中分离出新鲜的单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC), 经尾静脉注射植入重度联合免疫缺陷小鼠 NCG 体内, 以构建免疫系统人源化小鼠模型, 随后在小鼠皮下植入人胰腺癌细胞系 Asp1, 并定期监测肿瘤生长情况, 在 PBMC 植入后第 3 周, 应用断尾法采集小鼠外周血进行流式分析, 检测人 CD45<sup>+</sup> 细胞的水平, 当肿瘤生长至 100 ~ 200 mm<sup>3</sup> 时开始给予抗 PD-1 单抗治疗, 持续治疗 3 周后, 对小鼠施行安乐死并取材, 应用流式细胞术、免疫组化等方法分析胰腺癌免疫系统人源化小鼠外周血、脾、骨髓及肿瘤组织中免疫细胞的浸润及活化情况。**结果** 植入人 PBMC 3 周后, 在小鼠外周血、脾及骨髓中可检测到较高水平的人 CD45<sup>+</sup> 细胞; 重建的人源免疫系统能够显著抑制人胰腺癌肿瘤的生长 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ), 并被人抗 PD-1 单抗活化, 促进肿瘤组织中细胞毒性 CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润和 PD-L1 表达。**结论** 成功构建胰腺癌免疫系统人源化小鼠模型, 其免疫系统能够对入抗 PD-1 单抗作出反应, 抑制肿瘤生长, 可作为一种理想的临床前动物模型用于胰腺癌免疫治疗研究。

**【关键词】** 免疫系统人源化; 免疫治疗; PBMC; 胰腺癌

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 02-0161-08

## Construction and evaluation of humanized immune system mouse model with human pancreatic cancer

LUO Baohua<sup>1,2</sup>, LIU Xiaoqiu<sup>1</sup>, LEI Jingyu<sup>2</sup>, ZHANG Caiqin<sup>2</sup>, ZHANG Yongbin<sup>3\*</sup>, SHI Changhong<sup>2\*</sup>

(1. Science and Technology Innovation Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China.  
2. Laboratory Animal Center, Air Force Medical University, Xi'an 710032. 3. Laboratory Animal Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405)

Corresponding author: SHI Changhong. E-mail: changhong@fmmu.edu.cn; ZHANG Yongbin. E-mail: yongbinzhang@gzucm.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To construct a humanized-immune-system mouse model with human pancreatic cancer and evaluate its effectiveness in order to provide an ideal preclinical animal model for pancreatic cancer immunotherapy research. **Methods** Ficoll density gradient centrifugation was used to isolate fresh peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy people. The cells were injected into the tail vein of severe combined immunodeficiency NOD/Sh1tJ-

**【基金项目】** 国家自然科学基金 (32070532), 军队实验动物专项课题 (SYDW[2021]001)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (32070532), Special Project of Military Laboratory Animals (SYDW[2021]001).

**【作者简介】** 罗宝花 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药防治肿瘤及相关机制研究。Email: 2412190275@qq.com

**【通信作者】** 师长宏 (1973—), 男, 教授, 研究方向: 肿瘤模型的制备与评价。Email: changhong@fmmu.edu.cn;

张永斌 (1973—), 男, 正高级实验师, 研究方向: 动物模型研究。Email: yongbinzhang@gzucm.edu.cn。

\* 共同通信作者

Prkdc em26Cd52 Il2rg em26Cd22 (NCG) mice to construct a model with a humanized immune system. We then subcutaneously implanted human pancreatic cancer Aspc1 cells into the mice and regularly monitored tumor growth. Three weeks later, the peripheral blood of the reconstructed mice was collected for flow cytometric analysis to detect the levels of human CD45<sup>+</sup> cells. When the tumors grew to 100 ~ 200 mm<sup>3</sup>, immunotherapy with human anti-PD-1 monoclonal antibody was started. After continuous treatment for 3 weeks, the mice were euthanized, and samples taken. Flow cytometry, immunohistochemistry, and other method were used to analyze the infiltration and activation of human immune cells in the peripheral blood, spleen, bone marrow, and tumor tissues of the humanized-immune-system mice with human pancreatic cancer. **Results** Three weeks after implantation of human PBMC, high levels of human CD45<sup>+</sup> cells were detected in the peripheral blood, spleen, and bone marrow of the mice. The reconstructed humanized immune system inhibited the growth of human tumors ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ) and was activated by human anti-PD-1 monoclonal antibody to promote cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cell infiltration and PD-L1 expression in the tumor tissues. **Conclusions** A humanized immune system mouse model with human pancreatic cancer was successfully constructed. The reconstructed humanized immune system responded well to human anti-PD-1 monoclonal antibodies and restrained the growth of human pancreatic tumor cells. Thus, this study has provided an ideal preclinical animal model of immunotherapy for pancreatic cancer.

**【Keywords】** humanized immune system; immunotherapy; PBMC; pancreatic cancer

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

胰腺癌是一种恶性程度极高的肿瘤,其发病隐匿、进展迅速、预后极差,5 年生存率仅为 8.5%<sup>[1-3]</sup>。临床数据显示,胰腺癌对放疗不敏感,对化疗易耐药,手术切除是目前治疗胰腺癌的主要手段<sup>[4-6]</sup>。然而,多数患者在确诊时已存在局部血管的浸润或转移,术后的转移率和复发率很高,患者术后 5 年总生存率不超过 20% ~ 25%<sup>[7-8]</sup>。因此,迫切需要寻找新的治疗策略来提高胰腺癌的治疗效果。

近年来,肿瘤免疫疗法和免疫检查点抑制剂的诞生给肿瘤治疗带来了革命性的变化,针对细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4, CTLA-4) 和程序性死亡蛋白 1/程序性死亡蛋白配体 1 (programmed death protein 1/programmed death protein ligand 1, PD-1/PD-L1) 的免疫检查点抑制剂在非小细胞肺癌、黑色素瘤、肾癌等恶性肿瘤的治疗中取得了卓越疗效<sup>[9-11]</sup>,显示了人体免疫系统在抗肿瘤方面的巨大潜力。目前针对胰腺癌开展的免疫疗法包括免疫检查点抑制剂、CAR-T 疗法、溶瘤病毒、肿瘤疫苗、免疫因子调节剂等,大部分免疫治疗的疗效评估都是临床研究<sup>[12-15]</sup>,周期较长,进程缓慢,少数的临床前研究也是在自发胰腺癌小鼠模型上进行<sup>[16-18]</sup>,由于存在种间差异,临床前研究结果与肿瘤患者实际临床特点的一致性较差,难以实现临床转化,因此,亟需找到一个合适的临床前动物模型来推动胰腺癌免疫治疗策略的开发。近年来,随着重度联合免疫缺陷小鼠的不断改良,具有人免疫系统的人源化小鼠

模型得以建立,通过将患者来源的肿瘤细胞系或肿瘤组织移植入免疫系统人源化小鼠体内构建的肿瘤免疫双人源化小鼠模型,可以极大程度地模拟患者体内肿瘤组织与免疫系统的相互作用,可能成为推动肿瘤免疫治疗策略临床前研究的理想工具。

本研究通过将人外周血单个核细胞和人胰腺癌细胞系 Aspc1 同时植入重度联合免疫缺陷小鼠 NCG 体内以构建胰腺癌免疫系统人源化小鼠模型并进行模型的有效性评估,以期后续开展的胰腺癌免疫治疗研究提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

24 只 5 ~ 6 周龄 SPF 级雌性重度联合免疫缺陷 NCG 小鼠,体重 22 ~ 25 g,购自江苏集萃药康生物科技有限公司【SCXK(苏)2018-0008】,饲养在空军军医大学实验动物中心 SPF 级屏障设施内【SYXK(陕)2017-001】。环境温度 23 ~ 25℃,相对湿度 40% ~ 60%,12 h 昼夜交替,小鼠笼盒、垫料、饲料及饮用水等经高温高压灭菌处理,动物自由摄食和饮水。相关动物实验获得空军军医大学实验动物福利及伦理委员会批准(审批号:20180512)。

#### 1.1.2 细胞系

人胰腺癌细胞系 Aspc1 细胞购买于 ATCC,使用 DMEM 培养基(10%胎牛血清+1%青链霉素)于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。

### 1.1.3 主要试剂与仪器

4 份健康人新鲜外周血从西京医院输血科获取,获得医学伦理委员会批准(KY20193035),人淋巴细胞分离液、小鼠淋巴细胞分离液(天津市灏洋生物科技发展有限公司),抗人 hCD45 流式抗体(BD, 555482),抗鼠 mCD45 流式抗体(BD, 553082),IHC 试剂盒(康为世纪有限公司),抗人 PD-L1 抗体(Abcam, ab205921),抗人 CD45 抗体(CST, 13917 S),抗人 CD8 抗体(proteintech, 66868-1-Ig),抗人 CD4 抗体(Abcam, ab133616),抗人颗粒酶 B 抗体(Abcam, ab208586),胎牛血清、DMEM 培养基、0.05%胰酶(Gibco);人抗 PD-1 单抗帕博利珠单抗(K 药)购自 MSD;荧光正置显微镜(奥林巴斯 BX43)用于免疫组织化学染色分析,FC500(Beckman Coulter)和 Flow Jo 软件用于流式细胞采集与数据分析。

## 1.2 方法

### 1.2.1 动物分组

NCG 小鼠适应性饲养 1 周后,随机分为未重建组(Aspc1)、重建不治疗组(Aspc1+PBMC)及重建 K 药治疗组(Aspc1+PBMC+K),共 3 组,每组 8 只,所有动物均饲养在 SPF 级屏障设施内。

### 1.2.2 PBMC 的分离纯化

应用 Ficoll 密度梯度离心法 1750 rpm, 20℃, 20 min 获取第 2 层环状乳白色淋巴细胞层,即 PBMC,加入 3 ~ 5 倍体积的红细胞裂解液,4℃裂解 5 min,随后加入 3 ~ 5 倍体积 buffer 重悬细胞,750 rpm, 4℃, 10 min 低速离心以去除血小板,重复 3 次,最后用 PBS 重悬细胞计算细胞数量和活率。

### 1.2.3 免疫系统人源化小鼠模型的构建

获取新鲜纯化的 PBMC 后,用 PBS 重悬为  $5 \times 10^7$ /mL,并置于冰上,每只小鼠注射剂量为  $1 \times 10^7$ ,经尾静脉注射植入 NCG 小鼠体内,构建免疫系统人源化小鼠模型。

### 1.2.4 流式细胞术分析小鼠外周血中人免疫细胞的重建水平

PBMC 植入后第 3 周用断尾法采集小鼠外周血,并用 Ficoll 密度梯度离心法分离出 PBMC 制成单个细胞悬液,同时标记流式抗人 hCD45 和抗鼠 mCD45 荧光抗体后,进行流式分析,评估小鼠外周血中人免疫细胞的重建水平。计算方法:hCD45/(hCD45+mCD45),应用 FlowJo 7.6.1 软件进行分析及绘图。

### 1.2.5 胰腺癌免疫系统人源化小鼠模型的构建

PBMC 植入 NCG 小鼠体内后第 2 天,将处于对数生长期的 Aspc1 细胞经 0.05%的胰蛋白酶消化后,用无菌 PBS 缓冲液和 Matrigel 基质胶以 1:1 的比例将细胞重悬至  $2 \times 10^6$ /200  $\mu$ L,经皮下植入小鼠体内,构建胰腺癌免疫系统人源化小鼠模型。

### 1.2.6 肿瘤生长监测及 K 药治疗

在肿瘤细胞接种后,动态监测肿瘤生长情况,每周 2 次监测肿瘤体积并绘制肿瘤生长曲线,肿瘤体积计算方法: $V(\text{mm}^3) = \text{长}(\text{mm}) \times \text{宽}^2(\text{mm}^2)/2$ ,当肿瘤生长至 100 ~ 200  $\text{mm}^3$  时,重建 K 药治疗组(Aspc1+PBMC+K)开始给予 K 药治疗,经腹腔注射,每周 2 次,每次剂量为 10 mg/kg,持续治疗 3 周,未重建组(Aspc1)及重建不治疗组(Aspc1+PBMC)给予等剂量生理盐水。

### 1.2.7 免疫浸润情况分析

治疗 3 周结束后,终止实验,对荷瘤小鼠采用吸入 CO<sub>2</sub> 安乐死,收集各组小鼠肿瘤组织、脾及骨髓,固定于 4%多聚甲醛溶液中,石蜡包埋后做组织切片,进行免疫组织化学染色或免疫荧光染色,显微镜下观察染色结果并拍照,应用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行半定量分析。

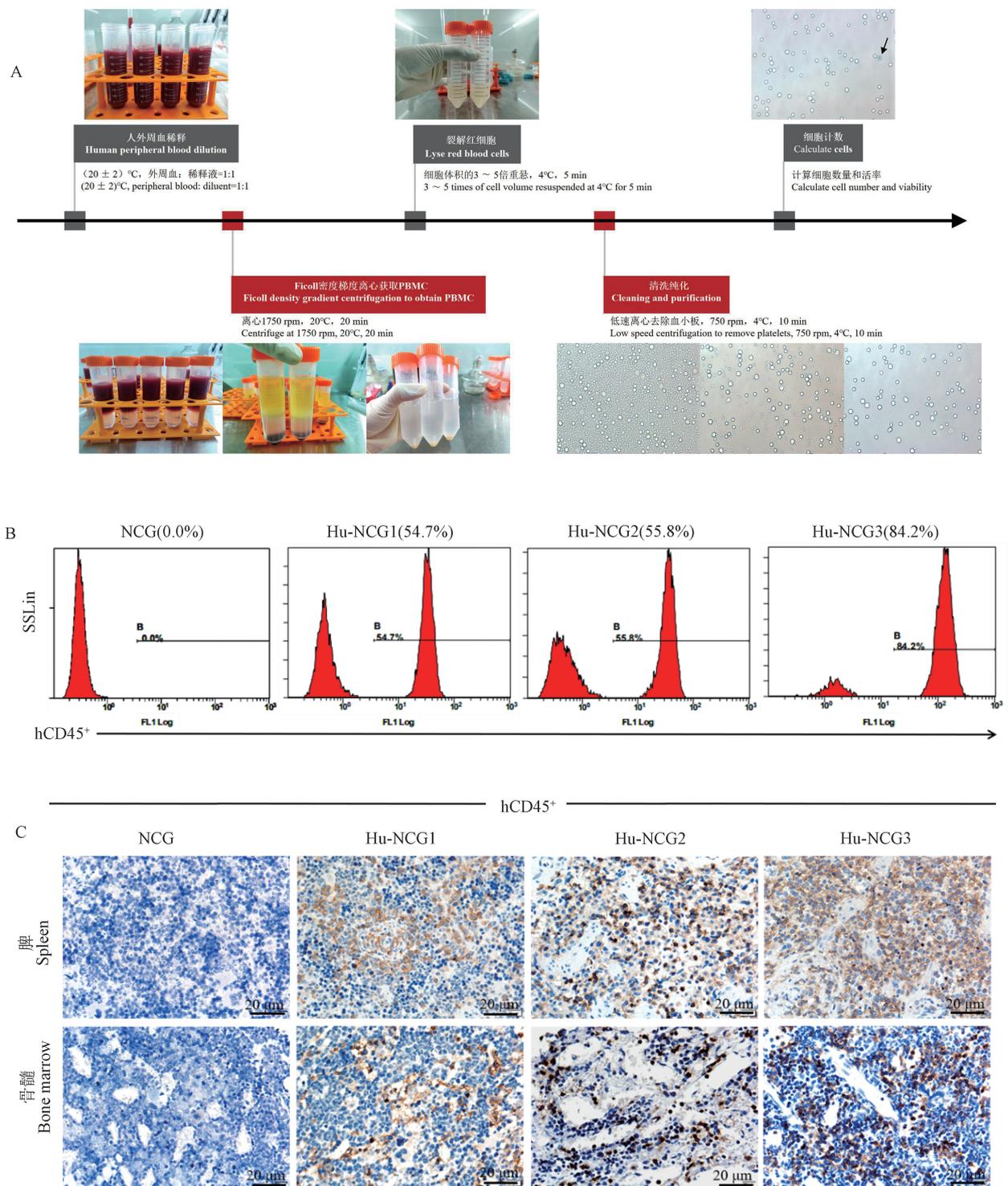
## 1.3 统计学分析

使用 Graphpad Prism 8.0 统计软件对数据进行统计分析,以平均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。采用 *t* 检验法进行组间差异性分析, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 成功构建免疫系统人源化小鼠模型

经过多次实验摸索,确定按照图 1A 指示的流程,应用 Ficoll 密度梯度离心法获得新鲜的纯度 > 94%,活率 > 98%的人 PBMC,然后经尾静脉注射植入重度联合免疫缺陷小鼠 NCG 体内,在 PBMC 植入 3 周后采集小鼠外周血,利用流式细胞术分析小鼠外周血免疫细胞中人 CD45<sup>+</sup>细胞比例,结果显示,小鼠外周血中 hCD45/(hCD45 + mCD45) > 25% (54.7% ~ 84.2%) (图 1B),待实验结束时,收集重建小鼠的脾及骨髓,用 4%多聚甲醛溶液固定后,石蜡包埋做组织切片,进行免疫组织化学染色,结果显示,脾和骨髓中也含有较高水平的人 CD45<sup>+</sup>细胞(图 1C),这些结果均提示免疫系统人源化小鼠模型构建成功。



注:A:PBMC 分离纯化操作流程;B:PBMC 植入 3 周后流式分析重建小鼠外周血免疫细胞中人 CD45<sup>+</sup> 细胞百分比;C:重建小鼠脾和骨髓中人 CD45<sup>+</sup> 细胞的表达情况。

图 1 成功构建免疫系统人源化小鼠模型

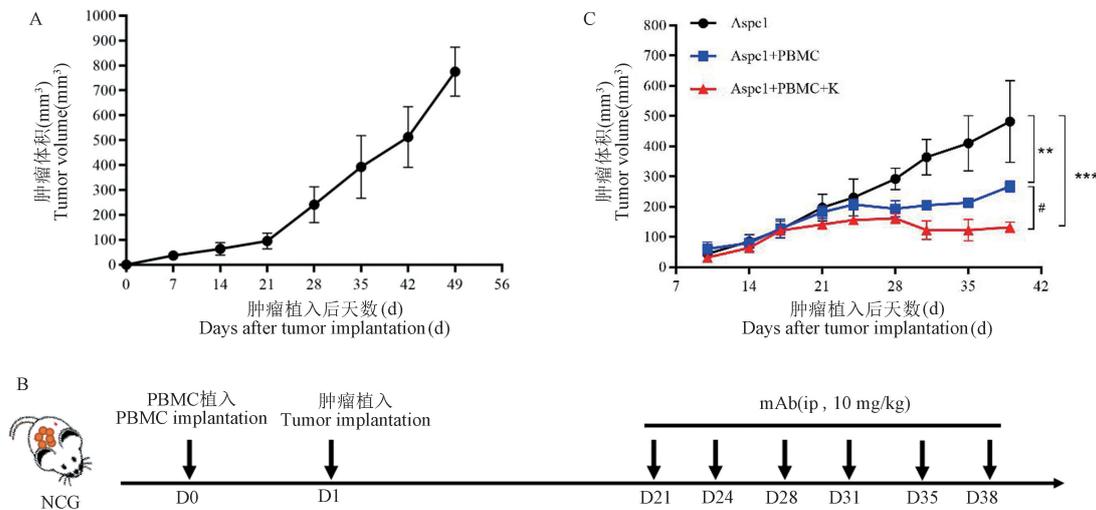
Note. A. PBMC separation and purification procedure. B. Flow cytometry analysis of the percentage of human CD45<sup>+</sup> cells in the peripheral blood immune cells of reconstructed mouse 3 weeks after PBMC implantation. C. The expression of human CD45<sup>+</sup> cells in spleen and bone marrow of mouse was detected.

Figure 1 Humanized immune system mouse model was successfully constructed

## 2.2 重建的人源免疫系统能够抑制人源胰腺癌生长

本研究在构建胰腺癌免疫系统人源化小鼠模型前,先在重度联合免疫缺陷小鼠 NCG 皮下植入  $2 \times 10^6$  Aspc1 细胞,并对其生长情况进行定期监测,结果显示,Aspc1 细胞在植入第 3 周时,肿瘤体积达  $100 \text{ mm}^3$  左右(见图 2A),可以开始治疗,而 Hu-PBMC 小鼠模型(humanized-peripheral blood mononuclear cells, Hu-PBMC)的重建时间一般为 3 周左右<sup>[19]</sup>,因此,本研究在后续进行胰腺癌免疫系

统人源化小鼠模型构建时,在相近的时间点分别将 PBMC 和 Aspc1 植入 NCG 体内,在 PBMC 植入后第 3 周,肿瘤体积达  $100 \sim 200 \text{ mm}^3$  时进行流式检测以评估人源免疫系统的重建效果,并开始 K 药治疗(图 2B)。结果显示,与未重建组(Aspc1)相比,重建不治疗组(Aspc1+PBMC)能够减缓肿瘤生长( $P < 0.01$ ),而重建 K 药治疗组(Aspc1+PBMC+K)减缓肿瘤生长的作用则更为显著( $P < 0.001$ )(图 2C),提示重建的人源免疫系统有功能,能够发挥抗肿瘤作用。



注:A:Aspc1 在 NCG 小鼠体内的生长曲线;B:胰腺癌免疫系统人源化小鼠模型的构建策略及 K 药治疗策略;C:未重建组(Aspc1)、重建不治疗组(Aspc1+PBMC)及重建 K 药治疗组(Aspc1+PBMC+K)的肿瘤生长曲线;与未重建组(Aspc1)相比, \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ;与重建不治疗组(Aspc1+PBMC)相比, #  $P < 0.01$ 。

图 2 重建的人源免疫系统能够抑制人源胰腺癌生长

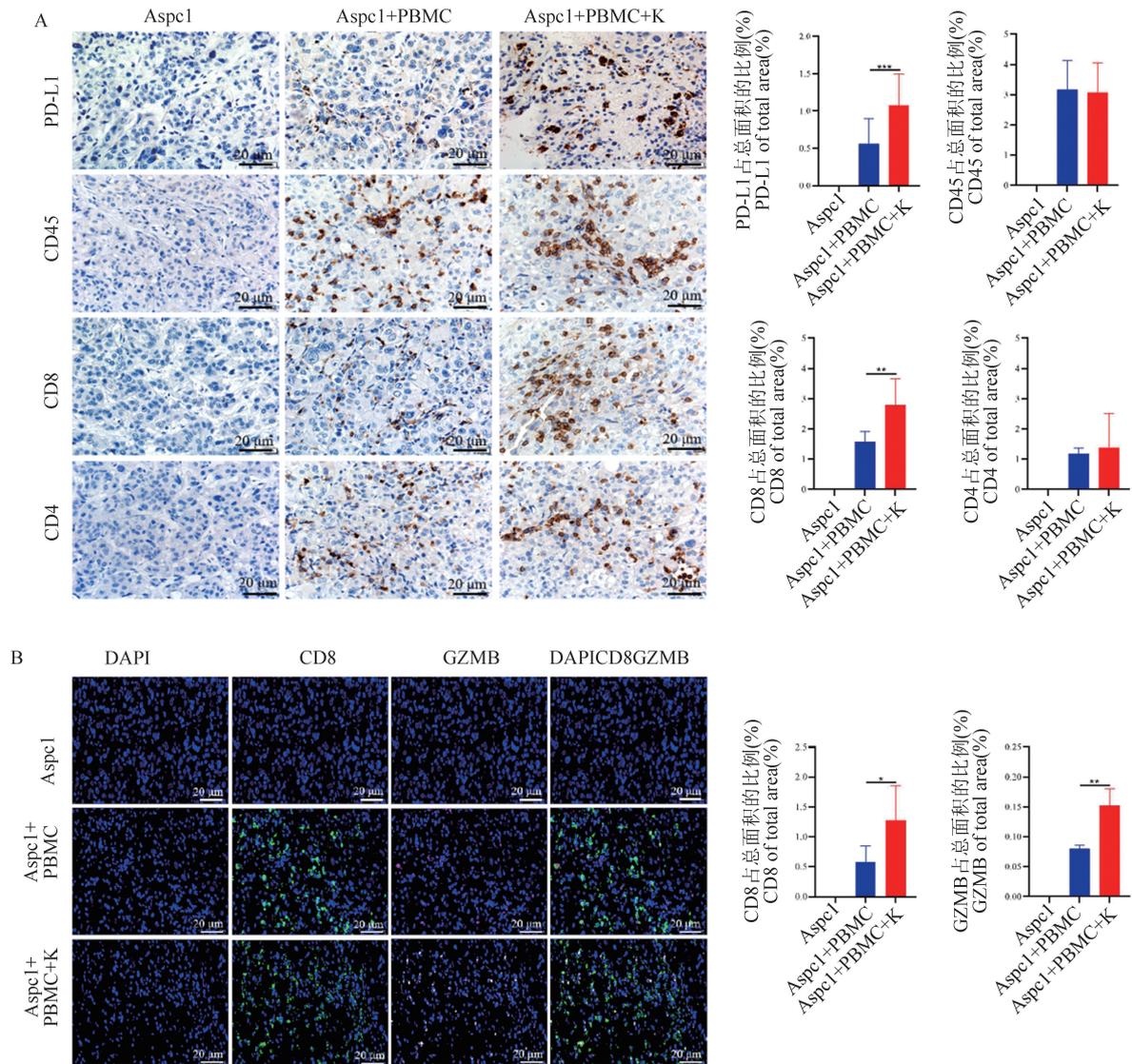
Note. A. Growth curve of Aspc1 in NCG mouse. B. Construction strategy of humanized immune system mouse model with human pancreatic cancer and treatment strategy of K drug. C. Tumor growth curves of the non-reconstruction group (Aspc1), reconstruction without treatment group (Aspc1+PBMC) and reconstruction of K drug treatment group (Aspc1+PBMC+K). Compared with non-reconstruction group (Aspc1), \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . Compared with reconstruction without treatment group (Aspc1+PBMC), #  $P < 0.01$ .

Figure 2 Reconstructed humanized immune system inhibits the growth of human pancreatic cancer

## 2.3 重建的人源免疫系统能够被人抗 PD-1 单抗活化

K 药治疗结束后,收集未重建组(Aspc1)、重建不治疗组(Aspc1+PBMC)及重建 K 药治疗组(Aspc1+PBMC+K)小鼠的肿瘤组织做免疫组织化学染色和免疫荧光染色,分析不同处理组之间肿瘤组织内人 PD-L1、CD45、CD8、CD4 和颗粒酶 B (Granzyme B, GZMB) 的表达差异,结果显示,未重建组(Aspc1)的肿瘤组织内无人 PD-L1、CD45、CD8、CD4 和 GZMB 表达,重建不治疗组(Aspc1+

PBMC)与重建 K 药治疗组(Aspc1+PBMC+K)组的肿瘤组织均有人 PD-L1、CD45、CD8、CD4 和 GZMB 表达,与重建不治疗组(Aspc1+PBMC)相比,重建 K 药治疗组(Aspc1+PBMC+K)的肿瘤组织中 CD45 和 CD4 的表达无显著性差异,而 PD-L1 ( $P < 0.001$ )、CD8 ( $P < 0.01$ ) 和 GZMB ( $P < 0.01$ ) 的表达显著性增多(图 3A,3B),这些结果表明重建的人源免疫系统能够被人抗 PD-1 单抗活化,而且人抗 PD-1 单抗治疗诱导的增强的抗肿瘤作用主要与 CD8<sup>+</sup>T 的活化有关。



注:未重建组(Aspc1)、重建不治疗组(Aspc1+PBMC)及重建 K 药治疗组(Aspc1+PBMC+K)肿瘤组织中人 PD-L1、CD45、CD8、CD4 和 GZMB 的差异表达情况;与重建不治疗组(Aspc1+PBMC)相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ 。

图 3 重建的人源免疫系统能够被人抗 PD-1 单抗活化

Note. Differential expression of human PD-L1, CD45, CD8, CD4 and GZMB in tumor tissues of the non-reconstruction group (Aspc1), reconstruction without treatment group (Aspc1+PBMC) and reconstruction of K drug treatment group (Aspc1+PBMC+K). Compared with the reconstruction without treatment group (Aspc1+PBMC), \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

Figure 3 Reconstructed humanized immune system can be activated by human anti-PD-1 monoclonal antibody

### 3 讨论

CD45 分子在所有白细胞上都有表达,称为白细胞共同抗原,是所有免疫细胞的共同标志物<sup>[20]</sup>。Hu-PBMC 小鼠模型是一种构建较为简单和经济的免疫系统人源化小鼠模型,当人 PBMC 植入重度联合免疫缺陷小鼠后第 3 周,小鼠外周血免疫细胞中人 CD45<sup>+</sup>细胞的比例大于 25%时,提示该模型构建成功<sup>[19]</sup>。Hu-PBMC 小鼠模型主要以重建人的 T 淋

巴细胞为主,比例可达 90%以上,因此该模型是研究成熟 T 细胞功能及其效应的理想模型,可用于研究人效应 T 细胞的活化过程或用于免疫治疗药物的评估等<sup>[21]</sup>。但是,该模型有一明显的局限性,由于重建的人源免疫细胞与鼠源细胞的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)不匹配,会出现致死性的移植物抗宿主反应(graft-versus-host disease, GVHD),通常在 PBMC 植入后 4 ~ 6 周开始出现,其严重程度与人 T 细胞的植入水

平直接相关,可以通过小鼠体重减轻、炸毛、弓背等症状来评估。由于 GVHD 的发生, Hu-PBMC 小鼠模型实验观察窗口期较短,在实验过程中需要充分利用免疫系统人源化小鼠模型的窗口期,以保证肿瘤免疫双人源化小鼠模型构建成功后还能有足够的时间窗口进行后续实验,因此,在进行肿瘤免疫双人源化小鼠模型的构建时,需要综合考虑免疫重建所需的时间以及人源肿瘤的生长情况。为了充分利用实验窗口期,本研究实施了在构建胰腺癌免疫系统人源化小鼠模型前,先在重度联合免疫缺陷小鼠皮下植入胰腺癌细胞并对其生长情况进行动态监测,以确定肿瘤植入与进行免疫重建的最佳时间,从而实现最长的免疫治疗窗口。

在对临床患者的肿瘤标本进行免疫药物筛选时,理想情况下应该使用患者自身的 PBMC 进行重建,但是由于肿瘤患者接受过化疗或自身免疫力下降等诸多原因,从肿瘤患者外周血中获取的 PBMC 数量非常有限,而 Hu-PBMC 小鼠模型构建的成功率与植入的 PBMC 的数量密切相关,多数情况下从肿瘤患者外周血中获取的 PBMC 数量不能满足实验要求,因此,在无法从患者上获取足量的 PBMC 的情况下,可以考虑使用正常人的 PBMC 进行重建并分组评估给予不同干预的治疗效果。但由于不同个体来源的 PBMC 可能会对免疫治疗药物产生不同的反应,因此,我们在进行免疫系统人源化小鼠模型的构建时会同时选用 3 个以上的 PBMC 供体,对同一种免疫治疗药物进行评估,以明确该药物在不同个体上是否具有普适性。根据本实验结果,不同的供体对帕博利珠单抗具有一致的反应性。

PD-1 是一种免疫负调控分子,能够在 T 细胞上表达,PD-L1 是其配体,在肿瘤微环境中,PD-1/PD-L1 的相互作用可促使肿瘤细胞逃避免疫监测,从而促进肿瘤进展。与正常组织相比,肿瘤组织中 PD-L1 的表达明显增多,大量研究认为这是由抗肿瘤免疫反应诱导的,肿瘤浸润淋巴细胞在识别肿瘤抗原后,释放  $\gamma$ -干扰素(interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )产生抗肿瘤免疫反应,与此同时,肿瘤细胞会表达 PD-L1 产生一种适应性免疫抵抗以逃避免疫细胞的杀伤<sup>[22-23]</sup>,因此,肿瘤组织中 PD-L1 的表达上调,可认为是一种肿瘤免疫反应活化的标志。CD8<sup>+</sup> T 细胞是细胞毒性 T 淋巴细胞,能够分泌各种细胞因子参与免疫反应,如 IFN- $\gamma$ 、GZMB 等,对肿瘤细胞具有直接杀伤作用,是机体发挥抗肿瘤作用的关键细胞<sup>[24]</sup>。在本

研究中,未进行免疫重建的小鼠体内肿瘤组织不表达 PD-L1,无 CD8<sup>+</sup> T 细胞浸润,而进行免疫重建后,肿瘤组织中有人源性 CD8<sup>+</sup> T 细胞的浸润和 PD-L1 的表达,表明小鼠体内的人源肿瘤组织能够诱导重建的人源免疫系统发挥抗肿瘤免疫反应,抑制肿瘤生长,即免疫系统人源化小鼠模型具有人免疫功能。在给予 K 药治疗后,与不治疗的免疫系统人源化小鼠相比,肿瘤组织中浸润的人源性 CD45<sup>+</sup>细胞、CD4<sup>+</sup> T 细胞的含量无明显变化,而 CD8<sup>+</sup> T 细胞、GZMB 和 PD-L1 的表达明显增多,表明抗 PD-1 单抗治疗诱导的增强的肿瘤抑制作用主要与 CD8<sup>+</sup> T 的活化有关,重建的人源性 CD8<sup>+</sup> T 细胞能够与抗 PD-1 单抗发生反应。

本研究构建的胰腺癌免疫双人源化小鼠模型具备人源肿瘤细胞和人源免疫系统,能够较好地模拟胰腺癌患者体内肿瘤组织与免疫系统之间的相互作用,可以作为临床肿瘤患者的“替身”用于评估临床前胰腺癌免疫疗法的有效性及其安全性,有望成为推动肿瘤免疫治疗策略临床前研究的理想工具。

#### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [ 2 ] Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, et al. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States [J]. Cancer Res, 2014, 74(11): 2913-2921.
- [ 3 ] Feng RM, Zong YN, Cao SM, et al. Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 global cancer statistics? [J]. Cancer Commun (Lond), 2019, 39(1): 22.
- [ 4 ] Wioletta MS, Karol RP, Magdalena S, et al. Surgical treatment of pancreatic cancer [J]. Pol Przegl Chir, 2018, 90(2): 45-53.
- [ 5 ] Goto Y, Nakamura A, Ashida R, et al. Clinical evaluation of intensity-modulated radiotherapy for locally advanced pancreatic cancer [J]. Radiat Oncol, 2018, 13(1): 118.
- [ 6 ] Conroy T, Hammel P, Hebbar M, et al. FOLFIRINOX or gemcitabine as adjuvant therapy for pancreatic cancer [J]. N Engl J Med, 2018, 379(25): 2395-2406.
- [ 7 ] Matsumoto I, Murakami Y, Shinzaki M, et al. Proposed preoperative risk factors for early recurrence in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma after surgical resection; a multicenter retrospective study [J]. Pancreatology, 2015, 15(6): 674-680.
- [ 8 ] Panizza A, Hosokawa P, Henderson W, et al. Characteristics of 10-year survivors of pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. JAMA Surg, 2015, 150(8): 701-710.

- [ 9 ] Suresh K, Naidoo J, Lin CT, et al. Immune checkpoint immunotherapy for non-small cell lung cancer: benefits and pulmonary toxicities [J]. *Chest*, 2018, 154(6): 1416-1423.
- [ 10 ] Willmore ZN, Coumbe BGT, Crescioli S, et al. Combined anti-PD-1 and anti-CTLA-4 checkpoint blockade: treatment of melanoma and immune mechanisms of action [J]. *Eur J Immunol*, 2021, 51(3): 544-556.
- [ 11 ] Gul A, Stewart TF, Mantia CM, et al. Salvage ipilimumab and nivolumab in patients with metastatic renal cell carcinoma after prior immune checkpoint inhibitors [J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(27): 3088-3094.
- [ 12 ] Patnaik A, Kang SP, Rasco D, et al. Phase I study of pembrolizumab (MK-3475; anti-PD-1 monoclonal antibody) in patients with advanced solid tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(19): 4286-4293.
- [ 13 ] Bear AS, Vonderheide RH, O' Hara MH. Challenges and opportunities for pancreatic cancer immunotherapy [J]. *Cancer Cell*, 2020, 38(6): 788-802.
- [ 14 ] Henriksen A, Dyhl-Polk A, Chen I, et al. Checkpoint inhibitors in pancreatic cancer [J]. *Cancer Treat Rev*, 2019, 78: 17-30.
- [ 15 ] Schizas D, Charalampakis N, Kole C, et al. Immunotherapy for pancreatic cancer: A 2020 update [J]. *Cancer Treat Rev*, 2020, 86: 102016.
- [ 16 ] Lau SP, van Montfoort N, Kinderman P, et al. Dendritic cell vaccination and CD40-agonist combination therapy licenses T cell-dependent antitumor immunity in a pancreatic carcinoma murine model [J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(2): e000772.
- [ 17 ] Lu SW, Pan HC, Hsu YH, et al. IL-20 antagonist suppresses PD-L1 expression and prolongs survival in pancreatic cancer models [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4611.
- [ 18 ] Zhang Y, Chandra V, Riquelme Sanchez E, et al. Interleukin-17-induced neutrophil extracellular traps mediate resistance to checkpoint blockade in pancreatic cancer [J]. *J Exp Med*, 2020, 217(12): e20190354.
- [ 19 ] De La Rochere P, Guil-Luna S, Decaudin D, et al. Humanized mice for the study of immuno-oncology [J]. *Trends Immunol*, 2018, 39(9): 748-763.
- [ 20 ] Altin JG, Sloan EK. The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation [J]. *Immunol Cell Biol*, 1997, 75(5): 430-445.
- [ 21 ] Lin S, Huang G, Cheng L, et al. Establishment of peripheral blood mononuclear cell-derived humanized lung cancer mouse models for studying efficacy of PD-L1/PD-1 targeted immunotherapy [J]. *MAbs*, 2018, 10(8): 1301-1311.
- [ 22 ] Chen L, Han X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(9): 3384-3391.
- [ 23 ] Taube JM, Anders RA, Young GD, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-H1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape [J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(127): 127ra37.
- [ 24 ] Xie YF, Xie F, Zhang L, et al. Targeted anti-tumor immunotherapy using tumor infiltrating cells [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, 8(22): e2101672.

[ 收稿日期 ] 2021-11-03