

人脑胶质母细胞瘤PDX模型的建立

方川¹, 黄凯¹, 檀艳丽², 康春生¹, 张建宁^{1*}

¹天津市神经病学研究所, 教育部中枢神经系统创伤修复与再生重点实验室, 天津 300052; ²河北大学基础医学院, 河北保定 071000

[摘要] **目的:**探讨患者来源的异种移植(patient derived xenograft, PDX)胶质母细胞瘤模型的建立方法, 为临床和生物学研究提供重要的理论依据和技术支持。**方法:**收集胶质母细胞瘤组织, 建立皮下肿瘤模型, 待皮下肿瘤生长取出肿瘤, 分散肿瘤细胞并种于小鼠颅内。HE染色比较原发肿瘤组织与PDX肿瘤形态学特点, 免疫组织化学染色方法检测Ki-67的表达, 比较肿瘤增殖能力。**结果:**成功建立人脑胶质母细胞PDX模型, 原发肿瘤和PDX肿瘤形态学特点相似, PDX肿瘤保留了原发肿瘤的增殖能力。**结论:**通过建立PDX模型, 可以将PDX作为胶质母细胞瘤患者个体化治疗的重要临床前研究工具。

[关键词] 胶质母细胞瘤; PDX; 个体化治疗; 临床前研究

[中图分类号] R739.41

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)01-0011-03

doi: 10.7655/NYDXBNS20180103

The establishment of patient derived xenograft of human glioblastoma multiforme

Fang Chuan¹, Huang Kai¹, Tan Yanli², Kang Chunsheng¹, Zhang Jianning^{1*}

¹Tianjin Neurological Institute, Key Laboratory of Post-neurotrauma, Neuro-repair and Regeneration in Central Nervous System, Ministry of Education, Tianjin 300052; ²College of Foundmental Medicine, Hebei University, Baoding 071000, China

[Abstract] **Objective:** To establish a method of patient derived xenograft (PDX) of human glioblastoma multiforme (GBM) for preclinical and biological research. **Methods:** GBM samples were freshly collected and planted subcutaneously. After the establishment of subcutaneous xenograft, tumor was taken out, dispersed and injected to the mice brain. HE staining was used to compare the morphological characteristics between primary tumor and PDX tumor, and Ki-67 was detected by immunohistochemistry to compare their proliferation activity. **Results:** We successfully established the PDX model, and found that the morphological characteristics of PDX by HE staining were similar with primary tumor, PDX remained the proliferation activity of primary tumor. **Conclusion:** The establishment of PDX model enabled us as preclinical tool for personalized treatment of GBM patients.

[Key words] glioblastoma multiforme; PDX; personalized treatment; preclinical research

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(01):0011-0013]

胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)是成人最常见且致死率最高的原发性中枢神经系统肿瘤。目前, 治疗GBM最有效的方法是手术切除辅以放化疗。几十年来, 虽然手术技巧和放化疗策略都有了长足的发

展, 但是GBM病死率没有显著改变, 仅仅约17%的GBM生存期大于2年^[1]。GBM的异质性^[2-3]和血脑屏障使很多化疗药物和免疫治疗不能对其有效治疗。为了更简便快捷地找到治疗GBM的最佳策略, 需要临床前研究对GBM的放化疗敏感性进行有效评估。

针对GBM患者治疗效果的临床前研究的关键是建立反映患者疾病的适当动物模型, 而传统胶质瘤模型对这些临床前研究是巨大的挑战。长时间多次传代的肿瘤细胞系, 由于克隆筛选而失去肿瘤异质性^[4], 而转基因小鼠模型常常不能复制人肿瘤

[基金项目] 国家重点研究和发展项目(2016YFC0902502); 国家自然科学基金(81772667); 天津市科委(15ZXJZSY00040); 河北省临床医学人才和基础研究项目培训(361007)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jianningzhang@hotmail.com

恶性度的关键方面,因此均不适合在临床前研究中作为预测药物反应的模型。近些年来,患者来源的异种移植(patient derived xenograft, PDX)模型已经成为生物学研究的重要工具,并且将对癌症患者的治疗提供更个体化的途径。PDX模型是指将患者的新鲜肿瘤组织直接接种至免疫缺陷小鼠体内,以模拟肿瘤在患者体内生长的过程。有研究使用比较基因组杂交显示患者的GBM和PDX有很大的相似性^[5]。到目前为止,已有很多研究显示,使用PDX模型在药物治疗上已经取得良好作用^[6-7],也能运用于影像学诊断^[8]。

但PDX模型仍存在构建时间过长、构建成功率不稳定、成瘤率低、成本高等局限性,限制了其进一步应用。本实验首先使用新鲜人胶质母细胞瘤组织通过皮下成瘤增加PDX的成功率,然后再传代进行原位PDX模型的建立。探讨人脑胶质瘤PDX模型行之有效的技术方法,为胶质瘤的个体化治疗提供重要途径。

1 材料和方法

1.1 材料

胶质母细胞瘤组织取自河北大学附属医院。经过当地伦理委员会批准和患者、家属的知情同意。DMEM培养液(Gibco公司,美国);免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,抗Ki-67抗体购自美国Abcam公司。

1.2 方法

1.2.1 PDX模型建立

新鲜肿瘤组织取下后直接泡在预冷的无血清DMEM培养液中,立即在实验室超净台中用PBS清洗3遍,在无血清培养基中将肿瘤用组织剪剪成 1 mm^3 大小,离心收集肿瘤组织。预先将5周大雌性BALB/C裸鼠用10%水合氯醛麻醉,在腋窝或腹股沟切约 $1.0\sim 1.5\text{ cm}$ 切口,用血管钳分离皮下形成囊腔,种入 0.4 mL 肿瘤组织,缝合伤口。每个肿瘤标本可种5只左右小鼠,确保PDX种植成功。

待皮下肿瘤生长达 1.5 cm^3 ,在无菌条件下取出肿瘤组织,将肿瘤切成 0.5 mm^3 大小碎块。加入含EDTA的胰蛋白酶 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 酶解 $1\sim 2\text{ h}$ 。收集细胞,并将细胞分散在含 25 mmol/L 葡萄糖的PBS中。 5×10^5 个细胞颅内注射建立原位PDX模型。

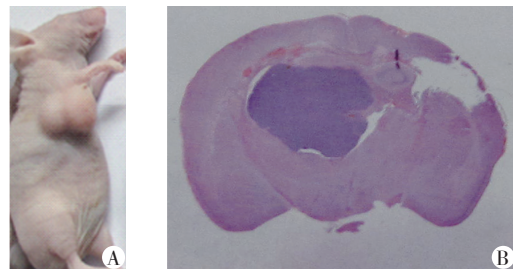
1.2.2 免疫组织化学分析

采用HE染色观察原发肿瘤和PDX肿瘤形态学异同,采用免疫组化SP法检测Ki-67表达比较肿瘤和PDX的增殖特点。

2 结果

2.1 PDX建模情况

由于PDX成瘤率较低,尤其直接原位成瘤的成功率更低,因此我们首先采用皮下肿瘤模型(图1A)。约4周后可见皮下肿瘤生长,待肿瘤生长至约 1.5 cm^3 时无菌条件下取出肿瘤,分散肿瘤细胞并种于小鼠颅内(图1B)。



A:皮下肿瘤模型;B:颅内原位肿瘤模型。

图1 PDX模型建立

Figure 1 The establishment of PDX model

2.2 患者原发肿瘤和PDX肿瘤的组织学比较

HE染色结果示,患者原发肿瘤和PDX肿瘤形态学特点相似(图2),PDX肿瘤保留了原发肿瘤的形态学特点;免疫组织化学比较Ki-67的表达(图3),发现肿瘤组织的异质性和增殖能力大致相同。

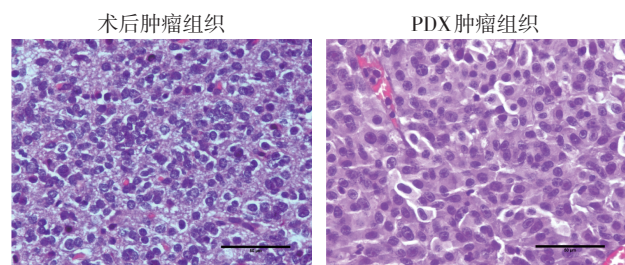


图2 术后肿瘤和PDX肿瘤HE染色比较(标尺:50 μm)

Figure 2 Comparison of HE staining between primary tumor and PDX tumor (bar: 50 μm)

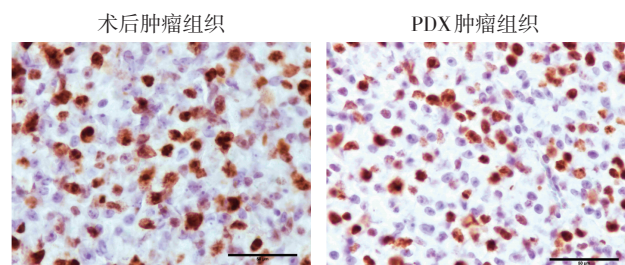


图3 术后肿瘤和PDX肿瘤Ki-67表达比较(标尺:50 μm)

Figure 3 Comparison of Ki-67 expression between primary tumor and PDX tumor (bar: 50 μm)

3 讨论

近些年来,PDX动物模型已经成为转化医学研究的重要工具,为患者个体化治疗的研究提供可能。与传统的肿瘤模型相比,PDX尽量多地保留了患者原发肿瘤的生理、生化和肿瘤学等方面的特征,是目前最理想的研究患者个体化治疗的肿瘤模型。然而,PDX动物模型目前尚存不足。高级别胶质瘤中,特别是胶质母细胞瘤如此难治疗,主要原因是肿瘤异质性使肿瘤对于化疗药抵抗。而因为这种异质性使胶质瘤不管培养原代细胞或是PDX模型都可能存在不能完全复原颅内肿瘤的问题。血脑屏障是目前化疗治疗的另一个障碍,使用PDX模型重建血脑屏障也是一大难题,并且PDX不适合研究抗PD-1或CTLA-4抗体的免疫治疗,因为建立PDX的小鼠是缺乏细胞毒性T淋巴细胞的免疫缺陷小鼠^[9]。因此,完美复原人胶质瘤的临床前模型并不存在。然而,PDX模型仍然能够模拟大多数的人脑肿瘤特征,为生物学研究、药物开发和对患者的个体化治疗提供帮助。

直接将肿瘤组织剪碎种于小鼠颅内不能成功建立颅内PDX模型^[10]。因此,我们使用两步法建模。第一步,使用刚切下来的新鲜肿瘤组织尽快种于裸鼠皮下,以保证肿瘤细胞的活性;第二步,将建立好的PDX肿瘤细胞通过剪碎,分散成肿瘤细胞,然后再原位种入裸鼠颅内。第一代PDX建模成功后,以后几代成瘤时间明显缩短,且成功率几乎是100%^[11]。我们的实验也显示,在第一代皮下PDX建模成功后,从第一代肿瘤传代的原位肿瘤成功率为100%。这可能与第一代肿瘤形成过程中对部分肿瘤细胞进行筛选,使得优势细胞得以生存,而正是这部分优势细胞能够在以后的建模中更好地生长。

为了增加PDX模型的成功率,我们认为,胶质瘤级别是一个重要因素,级别越高,其建模成功率也越大。为维持细胞活性,肿瘤组织应置于冰上保存并尽快种植,超过2h成瘤率将大大减低^[12]。在裸鼠选择上,裸鼠免疫力越低,越容易建模成功。研究表明,多重免疫缺陷的NOD/SCID/ γ cnul免疫缺陷小鼠是目前最成功的PDX受体动物,成功率可达95%^[13]。

PDX是目前最能重现颅内胶质瘤特征的模型,能很大程度代表原始肿瘤运用于生物学研究和患者个体化治疗等方面。今后可通过不断改进,使PDX更完善,以达到最大程度地与原始肿瘤一致。

【参考文献】

[1] Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, et al. CBTRUS statistical

report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2009-2013 [J]. *Neuro Oncol*, 2016, 18(suppl_5):v1-v75

[2] Kim H, Zheng SY, Amini SS, et al. Whole-genome and multisector exome sequencing of primary and post-treatment glioblastoma reveals patterns of tumor evolution [J]. *Genome Res*, 2015, 25(3):316-327

[3] Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma [J]. *Science*, 2014, 344(6190):1396-1401

[4] Gillet JP, Calcagno AM, Varma S, et al. Redefining the relevance of established cancer cell lines to the study of mechanisms of clinical anti-cancer drug resistance [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(46):18708-18713

[5] Keunen O, Johansson M, Oudin A, et al. Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(9):3749-3754

[6] Jain M, Gamage NH, Alsulami M, et al. Intravenous formulation of HET0016 decreased human glioblastoma growth and implicated survival benefit in rat xenograft models [J]. *Sci Rep*, 2017, 7:41809

[7] Han J, Chu J, Keung Chan W, et al. CAR-engineered NK cells targeting wild-type EGFR and EGFRv III enhance killing of glioblastoma and patient-derived glioblastoma stem cells [J]. *Sci Rep*, 2015, 5:11483

[8] Michelhaugh SK, Muzik O, Guastella AR, et al. Assessment of tryptophan uptake and kinetics using 1-(2-F-18-Fluoroethyl)-L-Tryptophan and alpha-C-11-Methyl-L-Tryptophan PET imaging in mice implanted with patient-derived brain tumor xenografts [J]. *J Nucl Med*, 2017, 58(2):208-213

[9] Lenting K, Verhaak R, Ter LM, et al. Leenders W glioma: experimental models and reality [J]. *Acta Neuropathol*, 2017, 133(2):263-282

[10] Kim KM, Shim JK, Chang JH, et al. Failure of a patient-derived xenograft for brain tumor model prepared by implantation of tissue fragments [J]. *Cancer Cell Int*, 2016, 16:43

[11] Bernardo C, Costa C, Sousa N, et al. Santos L patient-derived bladder cancer xenografts: a systematic review [J]. *Transl Res*, 2015, 166(4):324-331

[12] Choi YY, Lee JE, Kim H, et al. Establishment and characterization of patient-derived xenografts as preclinical models for gastric cancer [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:22172

[13] Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, et al. NOD/SCID/ γ cnul mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells [J]. *Blood*, 2002, 100(9):3175-3182

【收稿日期】 2017-10-20