研究报告

人前列腺癌骨转移裸鼠移植模型的建立及其循环肿瘤细胞的特性

张彩勤,张海,赵勇,白冰,刘佩娟,师长宏*

(第四军医大学实验动物中心,西安 710032)

【摘要】 **目的** 利用裸鼠移植模型研究雄激素阻断对人前列腺癌骨转移发生的影响,并初步探索肿瘤转移过程中循环肿瘤细胞(CTCs)的生物学特性。**方法** 将 40 只裸鼠随机平分为两组,一组裸鼠手术切除睾丸以阻断雄激素的分泌,另一组为正常对照。心脏注射绿色荧光蛋白和荧光素酶双标的人前列腺癌细胞 PC3-Luc-GFP,剂量为每只 1×10^6/50 μL,制备实验用骨转移模型。通过小动物活体成像系统检测人前列腺癌骨转移模型的建立;将发现转移的骨组织切片进行 HE 染色分析,并分离转移模型中 CTCs,通过 Western blot 检测 CTC 中转移相关分子 RANKL 和 TOPK 的表达。**结果** 成功建立了前列腺癌骨转移模型,切除睾丸组的骨转移发生率为 2/13(15.38%),而正常对照组的骨转移发生率为 5/14(35.71%);再次重复裸鼠移植模型的建立,合并两次动物实验结果得出:切除睾丸组的骨转移发生率为 3/26(11.54%),而正常对照组的骨转移发生率为 10/27(37.04%),两组间差异有显著性($P<0.05$);CTCs 中 RANKL 和 TOPK 表达量均明显高于原始的前列腺癌细胞。**结论** 在裸鼠移植模型中阻断雄激素能显著降低前列腺癌骨转移的发生率。CTC 的转移能力高于原始的前列腺癌细胞。

【关键词】 前列腺癌;骨转移模型;裸鼠模型;睾丸切除;循环肿瘤细胞

【中图分类号】Q95-33 【文献标识码】A 【文章编号】1005-4847(2016) 01-0014-06

Doi:10.3969/j.issn.1005 -4847.2016.01.003

Establishment of a nude mouse model of bone metastasis of human prostate cancer and the biological characteristics of circulating tumor cells

ZHANG Cai-qin, ZHANG Hai, ZHAO Yong, BAI Bing, LIU Pei-juan, SHI Chang-hong*

(Laboratory Animal Center of the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

【**Abstract**】 **Objective** To study the influence of androgen deprivation on prostate cancer bone metastasis in nude mouse models and to explore the biological characteristics of circulating tumor cells during tumor metastasis. **Methods** Forty male 6-7-week old nude mice were randomly divided into two groups: the castration group and untreated normal control group. All the nude mice were injected intracardially human prostate cancer PC3-Luc-GFPcells (labeled with GFP and Luc) in a dose of 1×10^6/50 μL/mouse to establish the bone metastasis models. The resulted cancer bone metastasis was confirmed by detection of Luc signal using a small animal optical imaging system. Bone tissue samples were fixed with 4% paraformaldehyde and pathological examination using HE staining was performed. Circulating tumor cells (CTCs) were isolated from the periphery blood collected by heart puncture. The expression of metastasis-associated molecules TOPK and RANKL of CTCs was detected by Western blot assay. **Results** The nude mouse model of human prostate cancer bone metastasis was successfully established. The incidence rate of bone metastasis in the castration group was 2/13(15.38%), while that of the normal control group was 5/14 = 35.71%. The xenograft models were prepared twice and the results of the two experiments were pooled together, showing a bone metastasis incidence rate of 11.54% (3/26) in the castration group and 37.04% (10/27) in the normal control group ($P<0.05$). The expressions of TOPK and RANKL of CTCs were signif-

[基金项目]国家自然科学基金项目(31572340);军队实验动物专项课题(SYDW2014-002)。

[作者简介]张彩勤(1981 -),女,讲师,研究方向:人类疾病动物模型。

[通讯作者]师长宏(1973 -),男,教授,博士生导师,Email: changhong@fmmu.edu.cn。

icantly higher than that in the original prostate cancer cells. **Conclusions** Castration can significantly reduce the incidence of prostate cancer bone metastases in nude mouse models. Metastatic potential of CTCs is significantly higher than that of the original prostate cancer cells.

【**Key words**】 Prostate cancer; Bone metastasis; Nude mouse model; Castration; Circulating tumor cells

Corresponding author: SHI Chang-hong, E-mail: changhong@fmmu.edu.cn

近年来,前列腺癌发病率在我国呈上升趋势[1],发生转移是前列腺癌(prostate cancer, Pca)的重要临床特征和致死原因[2],尤其是骨转移和淋巴结转移的发生,但确切的转移机制并不是十分清楚[7]。研究发现 Pca 的转移与雄激素-雄激素受体(AR)的调控失衡密切相关。自 Huggins 等[6]发现 Pca 具有雄激素依赖性后,雄激素阻断法(ADT)便成为治疗 Pca 的主要手段之一,但应用 ADT 疗法后,肿瘤细胞对雄激素去除的敏感性会逐渐消失,最终会发展为雄激素非依赖型前列腺癌(HRPC)。

在肿瘤转移的过程中,从原始的肿瘤细胞生成的血液循环中的肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs),能够随血液循环侵袭任何组织器官,使之发生癌变[3]。因此,在临床上进行病人 CTCs 的监测是非常重要的。进一步研究 CTCs 的特性,可能阐明在中、高危 Pca 患者中肿瘤发展的机制[4-5]。基于此,本实验室在建立人 Pca 裸鼠移植模型的基础上,研究雄激素阻断对 Pca 骨转移发生的影响,初步探索骨转移模型中 CTC 的生物学特性。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物

BALB/c 裸鼠,雄性,6 ~ 7 周,40 只,购于北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2012-0001],饲养于第四军医大学实验动物中心[SYXK(军)2012-0023]。

1.1.2　仪器设备

Olympus IX71 荧光显微镜;RC2 啮齿动物气体麻醉机(购于北京博益伟业仪器有限公司);Caliper Lumina II 小动物光学成像系统;X-Ray 小动物活体成像系统(Camrestream, in-vivo MS FX PRO);FC2 凝胶成像仪(美国,Alpha)。

1.1.3　试剂

人前列腺癌细胞系 PC3 由美国 Prof. Leland Chung(Cedars-Sinai Medical Center)馈赠。RPMI-1640 培养液、胎牛血清等购自 Hyclone。慢病毒介导的 Luc-GFP-Puro 转染细胞试剂盒由汉恒生物科技有限公司提供。β-actin、TOPK 和 RANKL 抗体由 Abcam 公司生产。BCA 蛋白浓度测定试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司,麻醉剂异氟烷由鲁南贝特制药有限公司提供。

1.2　方法

1.2.1　人前列腺癌细胞的标记与培养

将对数生长期的 PC3 细胞接种至 6 孔板,浓度为 1×10^5/mL,培养 24 h 后,弃去原有培养液,加入 1 mL 预先混匀的完全培养基和 Polybrene 混合物(终浓度 6 μg/mL),再将带有 Luc-GFP 基因的慢病毒原液(1×10^8TU/mL)按照 1∶100(细胞∶病毒)的比例加入细胞培养孔中,轻轻混匀,37℃感染 4 h 后补齐培养基至 3 mL。感染后第 2 天,弃去含病毒的培养液,换上新鲜的完全培养基,继续 37℃ 培养。感染 48 h 后换上含 puromycin(终浓度 1 μg/mL)的新鲜培养基,筛选获得稳定转染 Luc-GFP 的 PC3 细胞株,命名为 PC3-Luc-GFP 细胞。

1.2.2　裸鼠的睾丸切除手术

40 只雄性裸鼠随机分为两组,每组 20 只。其中一组进行睾丸切除手术,方法为使用小动物麻醉机将裸鼠麻醉后,在阴囊两侧分别剪开一个小口,挤出两侧的整个睾丸及附睾部分,在睾丸根部使用缝合线进行结扎并剪断,缝合手术切口。另一组为正常未处理对照。

1.2.3　人前列腺癌骨转移模型的建立

睾丸切除手术完成一周后,将 Pca 细胞 PC3-Luc-GFP 心脏注射两组所有裸鼠,剂量为每只 1×10^6/50 μL。心脏注射是在麻醉(使用小动物麻醉机)的状态下进行。

1.2.4　人前列腺癌骨转移模型的检测

心脏注射肿瘤细胞 3 周后,开始使用 Caliper Lumina II 小动物光学成像系统进行肿瘤转移影像检测一次。检测之前裸鼠腹腔注射 luciferase 的底物(每只 3 mg),作用 10 min 后,使用 Caliper Lumina II 小动物光学成像系统进行 luciferase 信号的影像检测,以确定是否发生骨转移,将发现转移信号的裸鼠通过小动物活体成像系统进行 X-线骨骼检测。

1.2.5　骨转移模型裸鼠血循环中肿瘤细胞(CTCs)

的分离培养

将小动物活体成像仪检测到 Pca 发生骨转移的裸鼠,通过心脏采集全血每只 100 μL,使用红细胞裂解液将全血中红细胞裂解 15 min,1000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,使用无菌 PBS 洗涤沉淀 3 次,最后将沉淀使用含 10% FBS 的 1640 培养基重悬,加入培养瓶中进行培养。大约培养 1 周后即可见到较明显的细胞克隆出现,再进行细胞扩增培养。

1.2.6 前列腺癌骨转移模型裸鼠的解剖及肿瘤病理形态学分析

将采用小动物活体成像仪检测到有 luciferase 信号的裸鼠安乐死后,进行大体解剖,观察各个脏器和组织有无病变。并将检测到 luciferase 信号的部位,剔除表皮和多余的肌肉组织,选取骨及附近组织,用 4% 多聚甲醛进行固定。将固定后的骨组织使用脱钙液进行 4 周的脱钙,再制备组织切片并进行 HE 染色。

1.2.7 Western blot 检测循环肿瘤细胞(CTCs)中的转移相关分子

将扩增培养的 CTCs 接种至 6 孔板中,培养 24 h,细胞生长至对数期后,弃去培养上清液,使用 PBS 清洗两遍,每孔加入 50 μL 的 RIPA 裂解液(含有蛋白酶抑制剂 PMSF),在冰上裂解 30 min,收集细胞裂解液,12 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液。使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测 CTCs 中总蛋白的含量,并进行 SDS-PAGE 电泳,转膜后使用 10% 的脱脂奶粉进行室温封闭 2 h,分别孵育抗 TOPK 和 RANKL 蛋白的抗体,4℃过夜后,使用 TBST 洗去一抗,室温孵育二抗 2 h,使用 TBST 洗去二抗,在 FC2 凝胶成像仪中进行目的条带的显影。

2 结果

2.1 人前列腺癌骨转移模型的建立及检测

裸鼠心脏注射 Pca 细胞 PC3-Luc-GFP 约 4 周后,通过活体成像检测体内 luciferase 信号,结果如图 1 所示。20 只正常对照组裸鼠中 5 只发现骨转移信号,9 只裸鼠在体内未发现 luciferase 信号,其余 6 只在心脏注射后短期内死亡,骨转移发生率为 5/14 (35.71%);切除睾丸组 20 只裸鼠中,只有 2 只裸鼠发现骨转移信号,11 只裸鼠在体内未发现 luciferase 信号,其余 7 只在心脏注射后短期内死亡,骨转移率为 2/13(15.38%)。对照组和实验组肿瘤活体成像持续观察 3 个月。肿瘤转移主要分布在裸鼠后肢和下颌部位。选择有转移信号的两只裸鼠,使用另外一套小动物活体成像系统进行 X-Ray 检测进一步明确前列腺癌骨转移瘤的发生部位,如图 2 所示,在裸鼠的后肢股关节处可见明显的破骨现象(见图 2A)以及 luciferase 信号(见图 2B)。

再次使用 40 只裸鼠重复人 Pca 骨转移裸鼠移植模型的建立实验,第 2 次得出结果为:切除睾丸组的骨转移发生率为 1/13(7.69%),而正常对照组的骨转移发生率仍为 5/13(38.46%)。将两次模型建立的数据进行合并后,通过医学统计学的四格表卡方检验,两组间骨转移率有显著差别($P<0.05$)。

2.2 前列腺癌骨转移模型裸鼠的解剖及肿瘤病理形态学分析

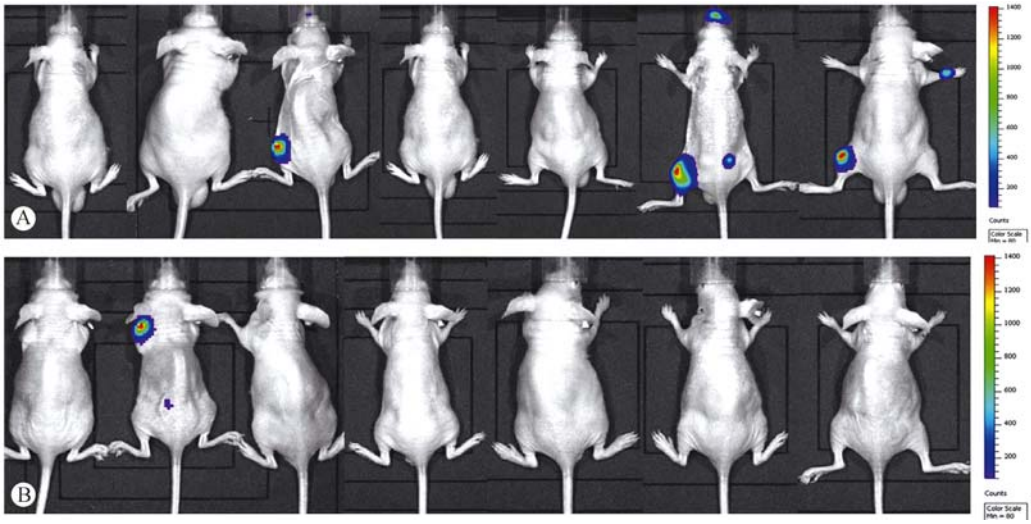
个别裸鼠在有 luciferase 信号的肢关节处形成肉眼可见的转移瘤(见图 3),处死后进行大体解剖依次观察心、肺、肝、脾等各个脏器组织均未发现明显的病理变化,所有脏器制备石蜡切片 HE 染色后未发现肿瘤细胞。将分离到有 luciferase 信号的后肢骨组织脱钙后石蜡包埋,切片后进行 HE 染色,光镜下可清晰观察到骨腔内充满了肿瘤细胞(见图 4),与原发的 PC3 肿瘤细胞形态相似。

2.3 Western blot 检测循环肿瘤细胞中的转移相关分子

Western blot 结果见图 5,无论是从对照组还是从睾丸切除组分离培养的 CTC 细胞中均检测到 RANKL 和 TOPK 蛋白的表达,且显著高于原始 PC3-Luc-GFP 细胞的表达量。

3 讨论

前列腺癌骨转移动物模型是探索前列腺癌转移发生机制和研究新型药物的重要基础。目前建立前列腺癌转移模型的方法主要是用建系的肿瘤细胞进行异种移植。常用三种前列腺癌细胞株,分别是 PC3、LNCaP 和 DU145,其中 PC3 是来自于前列腺癌病人的骨转移癌细胞,移植成瘤率相对较高。移植常选用免疫缺陷小鼠,包括裸鼠、SCID 小鼠等。按照移植方法的不同,可分为皮下接种、原位接种和血管内接种等[8]。本研究选用的细胞株为 PC3,接种方法是血管内心脏内注射肿瘤细胞,相比其他移植方法,具有较高的骨转移成功率。

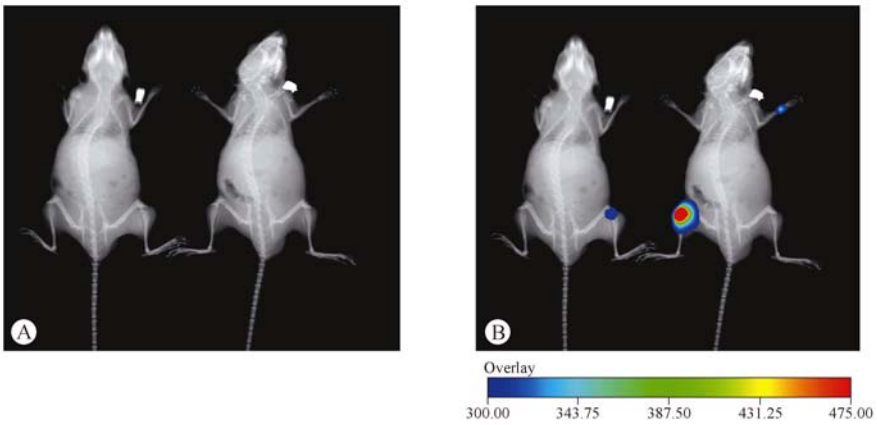


注：A. 正常对照组裸鼠；B. 切除睾丸组裸鼠。

图 1　人前列腺癌裸鼠骨转移模型活体成像 luciferase 信号检测结果

Note. A: Normal control group of nude mice; B: Castration group of nude mice.

Fig. 1　The luciferase signal of human prostate cancer bone metastasis model was detected by a small animal optical imaging system

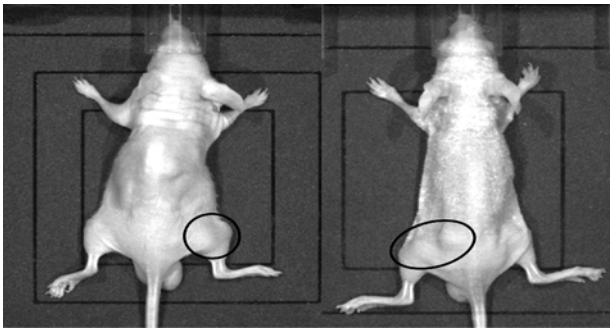


注：A：X-Ray 结果，在 Luc 信号处可见溶骨现象；B：X-Ray 和 Luc 信号的重叠结果。

图 2　正常对照组两只裸鼠的前列腺癌骨转移 X-Ray 和 Luc 信号检测结果

Note. A: The X-ray result of two bone metastasis models, showing osteolysis in the corresponding location with luciferase signal. B: The merge result of X-ray and luciferase signals.

Fig. 2　X-Ray and luciferase signals detected in two bone metastasis model mice of the normal group



注：图中黑色圈出的部位是眼观突起的部位。

图 3　前列腺癌骨转移模型裸鼠的外观

Note. The visible protruding metastatic tumor mass in the black circle.

Fig. 3　The gross appearance of prostate cancer bone metastasis in nude mice

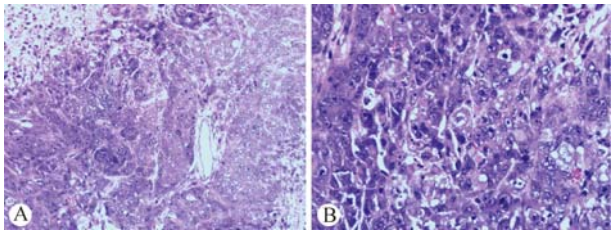
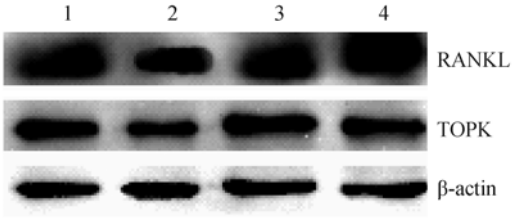


图 4　裸鼠后肢骨转移组织 HE 染色病理结果（A. ×10；B. ×20）

Fig. 4　The pathological changes of prostate cancer bone metastasis tissue in the hind legs of nude mice

裸鼠皮下注射前列腺肿瘤细胞很难发生骨转移，原位注射常常会在未发生骨转移前，由于局部肿



注:1. 睾丸切除组 Pca 骨转移模型 CTCs;
2. PC3-Luc-GFP 细胞对照;
3、4. 未切除睾丸组 Pca 骨转移模型 CTCs。

图 5 Western blot 检测转移相关分子 RANKL 和 TOPK 的表达

Note. 1. CTCs of bone metastasis models in the castration group. 2. The control of PC3-Luc-GFP cells. 3-4. The CTCs of bone metastasis models in the normal group.

Fig. 5 Expressions of RANKL and TOPK in the CTCs determined by Western blot analysis

瘤的形成而导致动物死亡。心脏注射是建立前列腺癌骨转移模型比较常用的方法,此方法能模拟肿瘤细胞通过血循环后形成转移灶的过程,与患者原发的骨转移灶无论生长状况还是扫描形态都非常相似[9]。但由于血液动力学和血管解剖学的问题,心脏注射瘤细胞制备的转移模型和自然情况下自发性转移有一定的不同。因此,我们在结果分析中一定要注意区别实验模型和自发模型的不同。本研究将标记的前列腺癌细胞 PC3-Luc-GFP 注射入裸鼠心腔内,肿瘤细胞会随血液循环流向全身,较快发生转移。采用小动物光学成像系统,能敏感地检测到肿瘤转移部位的 luciferase 信号,直观地反映 CTCs 在裸鼠体内的聚集点。再结合 X-Ray 活体成像,可监测到肿瘤转移部位骨组织的变化,进一步取骨组织进行 HE 染色确认肿瘤转移的发生[10]。但心脏注射也存在一定的风险,极易发生心脏穿透或空气栓塞后导致动物死亡,另外,心脏注射时常发生肿瘤细胞漏入胸腔,在胸腔内形成实体肿瘤,压迫裸鼠的心脏和肺脏造成死亡,因此,如果在三周内胸腔形成较强 luciferase 信号,可能是肿瘤细胞的漏入,注意与骨转移的鉴别。

骨转移模型裸鼠的大体解剖未见其他脏器的病变或肿瘤转移,只见在裸鼠的肢关节处或颌面部出现明显的突起,突起处骨组织的病理分析结果为肿瘤细胞的聚集。结果表明前列腺癌细胞 PC3-Luc-GFP 通过血循环并没有在心、肺、肝、脾等脏器组织出现富集而致转移灶。此结果也与其他 Pca 骨转移模型的制备基本相符[8-9]。

T-LAK 细胞起源的蛋白激酶(T-LAK cell-originated protein kinase, TOPK)属于双重特定的丝氨酸/苏氨酸激酶 MAPKK 家族[11],在结直肠肿瘤、乳腺肿瘤和黑色素瘤等组织中高表达,而在正常组织中低表达或不表达。研究发现 TOPK 在肿瘤的发生发展中发挥了重要作用[12-14],并已被证实是肺癌的转移促进激酶[15]。RANKL(receptor activator of nuclear factor-κB ligand)是肿瘤坏死因子超家族成员之一,属 II 型跨膜蛋白,主要存在于成骨细胞、骨髓基质细胞、树突状细胞和 T 淋巴细胞中,在骨组织中高表达。RANKL 和它的配体 RANK 结合,促进破骨细胞的分化和成熟[16]。研究显示骨髓微环境中 RANKL 的大量表达在肿瘤细胞特异性骨转移中发挥了重要作用,可作为肿瘤细胞骨转移的组织特异性因子[17-19]。本研究从前列腺癌骨转移模型中分离的 CTCs 检测到 TOPK 和 RANKL 的表达,且显著高于原始肿瘤细胞,这与文献报道[17-19]相符,说明 CTC 细胞的转移潜能进一步提升。

本研究中综合先后两次模型建立动物实验的结果,切除睾丸组的裸鼠模型骨转移发生率为 3/26(11.54%),而正常对照裸鼠组的骨转移发生率为 10/27 = 37.04%,使用四格表卡方检验得出两组间有显著差别($P < 0.05$),具有统计学意义。同时,骨转移发生时间快(3 周时即发生转移),转移广泛,遍及裸鼠后肢和上颌部,且具有明显的破骨现象。PC3 为雄激素非依赖性(AI)前列腺癌细胞,不含有内源性的雄激素受体,具有中等强度的转移潜能。AR 在雄激素非依赖型前列腺癌中的作用至今仍未明了。文献报道[20]前列腺癌细胞株 22Rv1 为雄激素非依赖型,但在雄激素缺乏时仍可增殖,在体内它们对雄激素仍有反应,雄激素存在时能更快增殖。本研究结果与 22Rv1 株的报道一致,分析原因可能是在体内实验中,内源性 AR 通过相关信号通路调控了 PC3 细胞的转移潜能,相关分子机制需要做进一步研究。

参 考 文 献

[1] Sim HG, Cheng CW. Changing demography of prostate cancer in Asia[J]. Eur J Cancer, 2005, 41(6):834-845.

[2] Gupta GP. Cancer metastasis: building a framework[J]. Cell, 2006, 127: 679-695.

[3] Marian L, Katarina K, Vladimir B. Essentials of circulating tumor cells for clinical research and practice[J]. Oncology/Hematology, 2013, 88:338-356.

[4] Ide H, Lu Y, Tanaka T, et al. Circulating tumor cell count during zoledronic acid treatment in men with metastatic prostate cancer: a pilot study[J]. Prostate Int. 2014; 2:147-151.

[5] Carvalho FL, Simons BW, Antonarakis ES, et al. Tumorigenic potential of circulating prostate tumor cells [J]. Oncotarget, 2013, 4:413 – 421.

[6] Huggins C, Hodges CV. Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate [J]. Cancer Res, 1941, 1:293 – 297.

[7] Clarke NW, Hart CA, Brown MD. Molecular mechanisms of metastasisin prostate cancer [J]. Asian J Androl, 2009, 11(1):57 – 67.

[8] 刘福英. 肿瘤骨转移动物模型研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(7):1 – 4.

[9] 廖辉, 陈安民, 郭风劲, 等. 人前列腺癌骨转移动物模型的建立[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2007,36(1):63 – 66.

[10] 李珂, 赵光, 高春芳, 等. 小动物活体成像技术的应用进展[J]. 实用医药杂志, 2012,29(01):81 – 83.

[11] Abe Y, Matsumoto S, Kito K, et al. Cloning and expression of a novel MAPKK-like protein kinase, lymphokine-activated killer T-cell-originated protein kinase, specifically expressed in the testis and activated lymphoid cells [J]. J Biol Chem, 2000, 275: 21525 – 21531.

[12] Zhu F, Zykova TA, Kang BS, et al. Bidirectional signals transduced by TOPK-ERK interaction increase tumorigenesis of HCT116 colorectal cancer cells [J]. Gastroenterology, 2007, 133:219 – 231.

[13] Eliane JP, Repollet M, Luker KE, et al. Monitoring serial changes in circulating human breast cancer cells in murine xenograft models[J]. Cancer Res, 2008, 68: 5529 – 5532.

[14] Ryu B, Kim DS, Deluca AM, et al. Comprehensive expression profiling of tumor cell lines identifies molecular signatures of melanoma progression[J]. PLoS ONE. 2007, 2:e594.

[15] Shi MC, Chen JY, Wu YC, et al. TOPK/PBK promotes cell migration via modulation of the PI3K/PTEN/AKT pathway and is associated with poor prognosis in lung cancer[J]. Oncogene, 2012, 31:2389 – 2400.

[16] Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation[J]. Nature, 2003, 423:33 – 342.

[17] Santini D, Perrone G, Roato I, et al. Expression pattern of receptor activator of NFB (RANK) in a series of primary solid tumors and related bone metastases [J]. J Cell Physiol, 2011, 226(3):780 – 784.

[18] Sabbota AL, Kim HR, Zhe X, et al. Sheckling of RANKL by tumor-associated MT1-MMP activates Src-dependent prostate cancer cell migration [J]. Cancer Res, 2010, 70(13):5558 – 5566.

[19] Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, et al. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL [J]. Nature, 2006, 440(7084):692 – 696.

[20] 王潇然,王伟华. 激素非依赖性前列腺癌分子机制进展 [J]. 中国老年学杂志. 2011, 4(31):1282 – 1284.

[收稿日期] 2015-10-22