

利用 PC-3M-1E8 细胞亚系建立人前列腺癌淋巴道转移模型

储剑虹, 吴建辉, 朱 焰, 蒋秀蓉, 刘桂明, 何桂林, 孙祖越*

(上海市计划生育科学研究所药理毒理学研究室; 中国生育调节药物毒理检测中心, 上海 200032)

摘要: **目的** 建立裸鼠人前列腺癌淋巴道转移模型以便用于转移机制和控制方法的研究。**方法** 分别采用原位接种及皮下接种两种方法将高转移性前列腺癌细胞亚系 PC-3M-1E8 接种于裸小鼠体内, 40 d 后检测其成瘤情况及局部淋巴结自发性转移情况。**结果** 原位接种法的裸小鼠成瘤率及淋巴结转移率均达 12/12, 皮下接种法的裸小鼠成瘤率也达 12/12, 但未检测到任何淋巴结转移。**结论** 对该细胞株采用原位接种法建立裸鼠人前列腺癌淋巴结转移模型获得成功, 为前列腺癌转移机制的研究及试验性药物治疗提供了模型。

关键词: 前列腺癌; 肿瘤细胞; 肿瘤转移模型; 原位接种

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2005)02-0140-06

前列腺癌是欧美国家最常见的男性恶性肿瘤, 在美国男性病人中死亡率仅次于肺癌^[1], 在我国随生活方式改变及寿命提高发病率日益增高, 已成为威胁男性健康的一大杀手。尽管诊断及治疗水平不断提高, 大部分病人仍因发生转移而死亡^[2]。因而研究前列腺癌转移机制, 找出控制转移方法对于癌症治疗具有非常重要意义, 而这主要依赖于建立理想的实验动物转移模型对其进行科学的研究。

目前, 应用较多的前列腺癌转移动物模型是其淋巴道转移模型, 而建立此模型运用最广泛的是原位接种法, 即将人前列腺癌细胞接种于免疫缺陷动物体内的前列腺组织, 该模型与肿瘤的组织来源具有一致性, 能较好地模拟人体内前列腺癌转移环境。

收稿日期: 2004-06-14 接受日期: 2004-11-10

作者简介: 储剑虹(1980-), 男, 安徽省潜山县人, 复旦大学医学硕士, 主要从事前列腺疾病药理毒理学研究。

* 联系作者 E-mail: sunzy64@163.com Tel: (021) 64043044, 64229909

研究表明, 前列腺癌细胞能否在免疫缺陷小鼠体内发生转移及转移率高低, 在一定程度上依赖于肿瘤细胞本身的转移能力, 因而探寻原位接种于免疫缺陷小鼠体内后能否产生高转移行为的细胞株对于前列腺癌转移研究尤为关键。PC-3M 是一种人前列腺癌细胞株, 国外报道用裸鼠体内反复接种法, 从其中分离出一种亚系 PC-3M-LN4, 原位接种到裸鼠体内淋巴结转移率达 80%^[3]。刘宇欣等^[4]报道运用倍比稀释法从其中分离出一种亚系 PC-3M-1E8, 并用裸鼠皮下瘤块接种法证实其具有较高转移性。作者运用原位接种法, 将此亚系直接接种到裸小鼠体内, 并检测其成瘤及淋巴结转移能力, 结果发现, 采用原位接种途径时成瘤率及淋巴结转移率均达到 100%, 与国外报道的 PC-3M-LN4 的成瘤及转移能力相当(考虑到本实验所用细胞数较多), 标志着利用该细胞系的原位接种法建立高淋巴道转移性前列腺癌模型获得成功。

1 材料和方法

1.1 动物

6~8 周龄 BALB/c 雄性裸小鼠, 体重 15~20 g, 由中国科学院上海实验动物中心提供, SPF 级, 动物合格证号: SCXK(沪)2003-0003, 饲养于恒温(25~27℃)、恒湿(40%~60%) SPF 层流架中, 用高压灭菌的标准饲料和水供动物自由取用。

1.2 细胞培养

前列腺癌细胞株 PC-3M 的亚系 PC-3M-1E8 由北京大学医学部病理学教研室提供, 于含 10% 胎牛血清、青链霉素各 100 kU·L⁻¹ 的 F-12 培养基, 37℃, 5% CO₂ 的饱和湿度下培养, 细胞成贴壁生长, 用 0.25% 的胰酶消化传代。

1.3 肿瘤细胞原位接种

参照文献[5]建立方法。取对数期生长的 PC-3M-1E8 细胞以 0.25% 的胰酶消化后, 加入新鲜培养液重悬制成细胞悬液, 1000 × g 离心 5 min 后重悬于

PBS 溶液中,调整细胞密度,用台盼蓝法检验细胞存活率大于 90% 的细胞悬液可用。以 2% 戊巴比妥钠 ip 麻醉 12 只 BALB/c 雄性裸小鼠,使其成仰卧位并固定,沿腹中线做低位切口。循膀胱及两侧的储精囊找出前列腺后叶,用棉签压在膀胱和储精囊的背侧表面,暴露前列腺后叶,从右侧后叶部位将 30 G 针头斜向插入前列腺底部,在其被膜下缓慢注入 40 μ L 含 2×10^6 个细胞的细胞悬液,要防止瘤细胞悬液漏出导致腹腔内播散转移,被注射的前列腺后叶内形成隆起小泡标志结果满意。随后小心将前列腺返回腹腔内,以 4-0 丝线缝合伤口,注意消毒其皮肤。

1.4 肿瘤细胞皮下接种

取上述方法制备的细胞悬液以 2×10^6 个细胞,每只 0.2 mL 接种至 12 只 BALB/c 雄性裸小鼠的颈背部皮下,形成一小皮丘表明接种成功。

1.5 解剖取材及组织学研究

自接种日起 40 d 后,以颈椎脱臼法处死全部裸鼠,取出肝、肺、肾、皮下肿瘤及前列腺称重后同局部淋巴结(颈部、腋窝、纵隔、腹股沟及主动脉旁淋巴结)一起固定于 10% 福尔马林中,制成石蜡切片后行 HE 染色,由病理医生观察后判断是否发生肿瘤及转移。

2 结果

2.1 原位接种大体及组织学检查

将含 2×10^6 个前列腺癌细胞悬液接种于裸鼠前列腺 40 d 后,解剖发现在接种 PC-3M-1E8 细胞的裸鼠前列腺部位均形成灰白色的瘤块(图 1A),质韧,组织学检查发现肿瘤细胞已几乎完全取代正常前列腺组织,仅可见几个残存的正常前列腺腺腔结构(图 2A)。在这些裸鼠腹主动脉旁均可见肿大的淋巴结,直径约 2 mm(图 1A),HE 染色后镜检发现在这些淋巴结内有肿瘤细胞存在(图 2B),且这些细胞与前列腺内的肿瘤细胞形态一致,表明已发生淋巴结转移。由于进行的是腹腔内手术,因而常发现有腹腔内粘连现象,多为肠间粘连及储精囊、膀胱相粘连,因而解剖时要注意分离以免损伤,但在所提供的图片中,未发生粘连,因而容易分辨相关组织结构。在所有原位接种肿瘤细胞裸鼠的肝、肺、肾大体标本未发现转移灶,病理切片中亦未发现有肿瘤细胞存在,表明并未发生这些脏器的转移。

2.2 皮下接种大体及组织学检查

将含 2×10^6 个前列腺癌细胞悬液接种于裸鼠皮下 7 d 左右,所有裸鼠颈背部皮下均长出突起的小瘤块(图 1B),接种后 40 d 时予以解剖分离皮下组织后发现瘤体亦呈灰白色,制成石蜡切片 HE 染色后,行组织学检查发现与原位接种瘤细胞的裸鼠前列腺内肿瘤细胞具有形态上的一致性(图 3B)。同样,在肝、肺、肾等器官及所有淋巴结病理切片中均未发现任何肿瘤细胞(图 3B),表明未发生这些器官的转移。

2.3 成瘤及转移能力比较

无论是采取原位接种还是皮下接种法,裸鼠成瘤率都达到 12/12(100%),就肿瘤重量而言,皮下接种法所形成肿瘤要明显大于原位接种法,可能因为皮下组织比前列腺组织提供更多肿瘤“发展空间”。但考虑到正常裸小鼠前列腺组织重量仅为 0.05 g,由于 PC-3M-1E8 肿瘤细胞而导致前列腺体积的增大已是相当显著的。就局部淋巴结转移来说,转移部位由解剖生理决定,原位接种法产生转移主要部位是腹腔内淋巴结(主动脉旁淋巴结为主),颈背部皮下接种法主要向腋窝、颈部等部位转移。以此为据,采用原位接种法 PC-3M-1E8 细胞产生的淋巴结转移率为 12/12,而采用皮下接种法未检测到任何淋巴结转移。在这两种情况下均不能产生肝、肺、肾等脏器的转移,因而原位接种法可以用来建立前列腺癌的单一直结转移模型。主要结果如表 1 所示。

Tab 1. Tumorigenicity and metastasis in lymph node of PC-3M-1E8 injected into different sites after 40 d

	Injection site	
	Prostate	Subcutis
Tumorigenicity incidence	12/12	12/12
Tumor weight range *	0.10 – 0.34 g	0.16 – 0.79 g
Tumor weight median *	0.16 g	0.51 g
Metastasis incidence(LN)	12/12	0/12
Metastasis incidence(OR)	0/12	0/12

LN: lymph node, OR: other organs. * Normal nude mouse prostate weight is 0.05 g^[5].

3 讨论

建立肿瘤转移动物模型是研究人类肿瘤转移的重要手段,肿瘤细胞能否在动物宿主中生长及发生

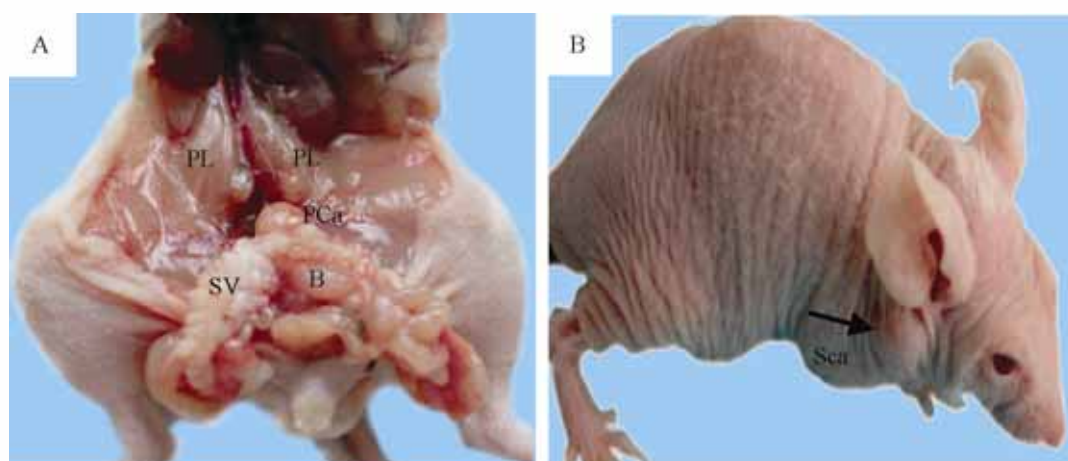


Fig 1. Gross examination of prostate tumor and pre-aortic lymph nodes 40 d after prostate and subcutis implantation in nude mice. A: Prostate tumor and pre-aortic lymph nodes after prostate implantation of PC-3M-1E8 cells in nude mice. B: Subcutaneous tumor after subcutaneous implantation of PC-3M-1E8 cells in nude mice (SV: seminal vesicles, B: bladder, PCa: prostate tumor, PL: pre-aortic lymph nodes, Sca: subcutaneous tumor).

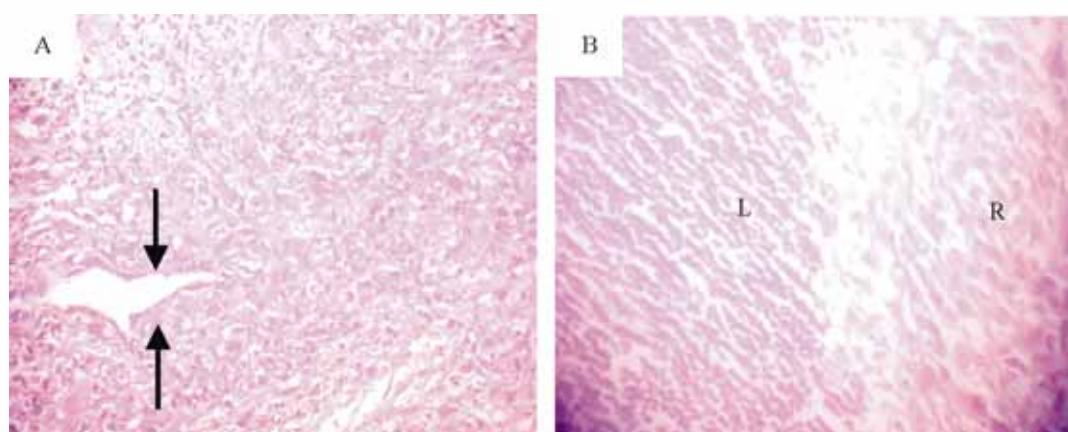


Fig 2. Histologic examination of prostate tumor and pre-aortic lymph nodes 40 d after prostate implantation in nude mice. A: PC-3M-1E8 cells in the prostate, tumor cells almost replaced the normal tissue. Note remaining normal acinus (arrow) ($\times 200$). B: Metastatic PC-3M-1E8 cells in a pre-aortic lymph node. Note normal lymphocytes (L) and tumor cells (R) ($\times 200$).

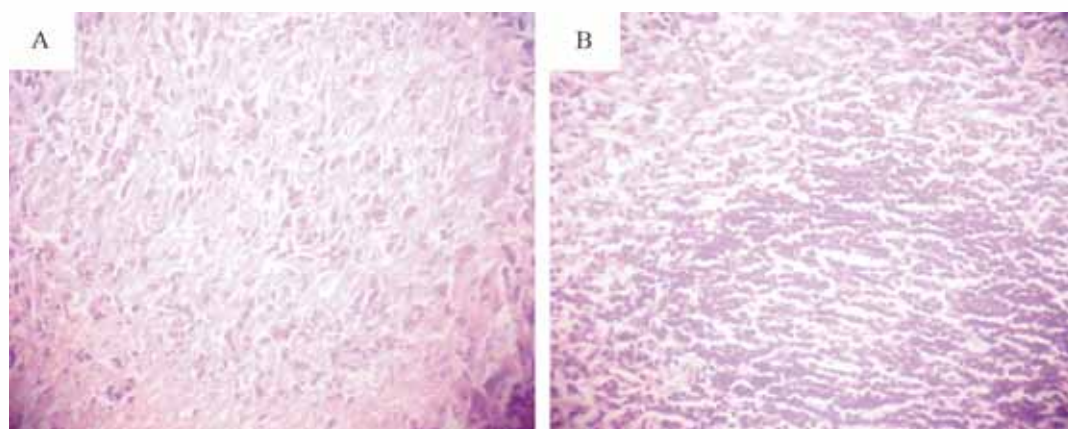


Fig 3. Histologic examination of subcutaneous tumor and lymph node 40 d after subcutis implantation in nude mice. A: PC-3M-1E8 cells in subcutaneous tumor, tumor cells almost replaced normal tissue ($\times 200$). B: No tumor cells are visible in lymph node ($\times 200$).

转移取决于肿瘤细胞(种子)本身特性即转移能力及所处的器官组织环境(土壤)^[5]。首先肿瘤细胞本身的转移能力对于能否产生转移极其重要,因肿瘤转移是一个相当复杂的过程,肿瘤细胞要在宿主体内生长并发生侵袭转移需要具备破坏基底膜、浸润结缔组织间质及侵入小血管和淋巴管基底膜的能力,另外还要突破宿主机体的免疫屏障,因而并非所有肿瘤细胞均能在宿主体内发生侵袭和转移,只有那些具备高转移性且达到一定数目的癌细胞才可以。这在人前列腺癌细胞中尤为明显,直接从前列腺癌患者体内分离出来的前列腺癌细胞株如 PC-3, DU145 和 LNCap 细胞接种到裸鼠体内均不能产生淋巴结转移或仅有极低的转移率,不能建立理想的前列腺癌转移模型只有用通过克隆技术或体外筛选的方法分离出的高转移性亚系才能在动物体内产生很高的转移率^[6~8]。

不同宿主免疫状况对肿瘤细胞发生转移的影响也不一样。一些细胞如肝癌细胞株 Hca-F、宫颈癌细胞株 U27 在接种至有正常免疫功能的动物体内即能产生近 100% 的高转移率。相比而言,前列腺癌细胞 PC-3, DU145 和 LNCap 细胞,对宿主免疫状况要求较高,要使之发生体内转移必须接种至免疫缺陷动物体内,尤其 LNCap 细胞必须在联合免疫缺陷(SCID)小鼠体内才表现出一定的转移能力^[8]。

肿瘤细胞接种部位对肿瘤细胞是否能在宿主中产生转移具有重大意义。在作者的实验中,将同样数目的 PC-3M-1E8 细胞接种到裸鼠的前列腺,成瘤率与淋巴结转移率均达到 12/12,当将其接种到皮下部位时,尽管成瘤率达 12/12,却未发生淋巴结转移。已证实另两种前列腺癌细胞株 DU145 和 LNCap 具有同样的特性。这表明,皮下接种肿瘤细胞虽然容易操作,但并不是前列腺癌细胞生长和转移的适合“土壤”。而原位接种法能为人前列腺癌细胞在动物体内生长转移提供最合适的“温床”,它能较好的模拟人类前列腺癌生长及转移方式,毕竟前列腺癌原发部位是前列腺而非皮下,这也是它能为广泛接受并应用于建立肿瘤体内转移模型的原因。对于原位接种法能大大提高癌细胞转移能力的机制至今仍未明,有研究认为可能与前列腺内的间质细胞特别是成纤维细胞诱导前列腺癌细胞产生降解细胞外基质的胶原酶有关^[9]。另外,虽然 PC-3M-1E8 在瘤块皮下接种法时能在裸鼠体内获得很高的淋巴结高转移率^[4],但它与癌细胞皮下接种法一样,与人体内发

生的前列腺癌转移情况差别太大,因而不能作为理想的前列腺癌转移模型,目前局限用作前列腺癌生长方面的研究,如筛选抗肿瘤生长药物和评价放疗治疗的效果。对于瘤块接种法产生转移率远高于瘤细胞接种法,可能是因为接种组织学完整的瘤块至裸鼠体内能提供大量的起支持作用的间质细胞来保持肿瘤组织的三维结构,而后者对于肿瘤细胞能表现的转移能力有重要影响^[10,11]。

应该指出的是,将肿瘤细胞接种于前列腺内建立转移模型也是有其局限性和不足之处的。首先,模型的成功建立要求有较高的个人操作技术。因为操作不慎、注射过快或拔出针头过快均会导致肿瘤细胞从前列腺内溢出或者前列腺被膜破裂,从而可能会产生腹腔内播种或其他影响实验结果的行为,因此在运用此方法前一定要多练习。由于裸小鼠比较昂贵,而且各种小鼠前列腺结构几乎无差异,所以可以拿其他价钱便宜的小鼠的前列腺来练习。为防止肿瘤细胞溢出,注射细胞及拔出针头时一定要慢,另外,由于残存的细胞可能会堵住针头,因而在不同裸鼠前列腺内接种时换用不同的针头。还有在拔出针头时用酒精棉球轻轻擦拭接种的前列腺部位可以减少可能溢出的细胞。

其次,An 等^[10]报道将一些肿瘤细胞接种至裸鼠体内部位(即使不是直接注入血管内)后产生的转移灶可能是由于人为造成的肿瘤细胞非自发性播散而并非都是自发性的。在这种情况下所产生的转移灶将会与实际发生的转移情况不完全一样,因为已证实肿瘤要发生转移首先要形成瘤块,然后一部分脱落的癌细胞突破周围基底膜组织继而完成其他的步骤,而人为的非自发性播散因缺乏这些步骤不能较好的反应转移过程。对于前列腺癌细胞可否通过淋巴道直接扩散到达腹主动脉旁淋巴结内形成转移灶,作者认为这种可能性不大。因为如果存在这种情况,那么任何前列腺癌细胞都能表现很高的“转移”性,而研究证实在其他条件均相同的情况下,不同前列腺癌细胞原位接种后主动脉旁淋巴结转移率差异性很大,有些转移率极低^[6,9]。另有研究证实^[3,12]通过这种方法产生的淋巴结转移灶内的癌细胞与接种的癌细胞及原发灶内的癌细胞在基因表达及生物学特性方面具有较大差异性,这些都从一定程度上支持了淋巴结内的癌细胞并非直接来源于原先接种的癌细胞。由于不可能进行大量标本的比较研究,也不能完全排除有部分转移灶是人为非自发

性播散引起的可能性,但这种几率很小不至于影响实验结果。有人对这种方法进行改进,即将瘤细胞先接种到裸鼠皮下形成瘤块,再将瘤块切分成小块接种到前列腺^[11]。虽然能解决非自发性播散的问题,可这种方法对技术的要求非常高,一般实验室根本无法开展,而且存在接种瘤块无法保证大小相等的问题,因而不成熟,这也是肿瘤细胞原位接种法目前广泛应用的原因之一。

总之,人类癌转移的原位移植战略是目前普遍接受的抗人癌浸润和转移研究的重要理论基础,利用原位接种法建立人类肿瘤动物体内转移模型是当前研究肿瘤体内转移的最有效的工具。作者使用了原位接种法将 PC-3M 高转移性亚系 PC-3M-1E8 接种至裸鼠前列腺内,结果产生 12/12 成瘤率及淋巴结转移率,标志着该细胞系可用于原位接种法建立高转移性前列腺癌转移模型,且具有单一淋巴结转移特性。这是国内首次报道以原位接种法成功建立前列腺癌裸鼠体内淋巴结转移模型,对今后前列腺癌转移的机制研究及抗前列腺癌转移的药物筛选具有重大意义。

致谢:感谢曹霖教授给予的帮助。

4 参考文献:

- [1] Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1997[J]. *CA Cancer J Clin*, 1997, **47**(1):5-27.
- [2] Zhong EH, Sun ZY, Gu Z, Wu JH, Zhu Y, He GL, *et al*. Inhibitory effect of epristeride on the expression of prostate specific antigen and Bcl-2 protein in human prostatic carcinoma LNCap cells *in vitro* [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*(中国药理学与毒理学杂志), 2003, **17**(1):29-33.
- [3] Pettaway CA, Pathak S, Greene GF, Ramirez E, Wilson MR, Killion JJ, *et al*. Selection of highly metastatic variants of human prostatic carcinomas using orthotopic implantation in nude mice[J]. *Clin Cancer Res*, 1996, **2**(9):1627-1636.
- [4] Liu YX, Zheng J, Fang EG, You JF, Wang JL, Cui XL, *et al*. Isolation and characterization of human prostate cancer cell sublines with different metastatic potential[J]. *Chin J Pathol*(中华病理学杂志), 1999, **28**(5):361-364.
- [5] Huang SF, Kim SJ, Lee AT, Karashima T, Bucana C, Kedar D, *et al*. Inhibition of growth and metastasis of orthotopic human prostate cancer in athymic mice by combination therapy with pegylated interferon-A-2b and docetaxel [J]. *Cancer Res*, 2002, **62**(20):5720-5726.
- [6] Bex A, Wullich B, Endris V, Otto T, Rembrink K, Stockle M, *et al*. Comparison of the malignant phenotype and genotype of the human androgen-independent cell line DU-145 and a subline derived from metastasis after orthotopic implantation in nude mice[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2001, **124**(2):98-104.
- [7] Balbay MD, Pettaway CA, Kuniyasu H, Inoue K, Ramirez E, Li E, *et al*. Highly metastatic human prostate cancer growing within the prostate of athymic mice overexpresses vascular endothelial growth factors[J]. *Clin Cancer Res*, 1999, **5**(4):783-789.
- [8] Sato N, Gleave ME, Bruchovsky N, Rennie PS, Beraldi E, Sullivan LD. A metastatic and androgen-sensitive human prostate cancer model using intra-prostatic inoculation of LNCap cells in SCID mice[J]. *Cancer Res*, 1997, **57**(8):1584-1589.
- [9] Stephenson RA, Dinney CP, Gohji K, Ordonez NG, Killion JJ, Fidler IJ. Metastatic model for human prostate cancer using orthotopic implantation in nude mice[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1992, **84**(12):951-957.
- [10] An Z, Wang X, Geller J, Moossa AR, Hoffman RM. Surgical orthotopic implantation allows high lung and lymph node metastatic expression of human prostate carcinoma cell line PC-3 in nude mice[J]. *Prostate*, 1998, **34**(3):169-174.
- [11] Wang X, An Z, Geller J, Hoffman RM. High-malignancy orthotopic nude mouse model of human prostate cancer LNCaP[J]. *Prostate*, 1999, **39**(3):182-186.
- [12] Greene GF, Kitadai Y, Pettaway CA, von Eschenbach AC, Bucana CD, Fidler IJ. Correlation of metastasis-related gene expression with metastatic potential in human prostate carcinoma cells implanted in nude mice using an *in situ* messenger RNA hybridization technique[J]. *Am J Pathol*, 1997, **150**(5):1571-1582.

Establishment of a lymph node metastatic model with human prostate cancer cell subclone PC-3M-1E8

CHU Jian-Hong, WU Jian-Hui, ZHU Yan, JIANG Xiu-Rong, LIU Gui-Ming, HE Gui-Lin, SUN Zu-Yue

(Department of Pharmacology and Toxicology, Shanghai Institute of Planned Parenthood Research, National Evaluation Center for Toxicology of Fertility and Regulating Drugs, Shanghai 200032, China)

Abstract: **AIM** To establish a lymph node metastatic model for studying the metastatic mechanism and experimental therapy of prostate cancer. **METHODS** After human prostate cancer cell subclone PC-3M-1E8 was inoculated under orthotopic or ectopic environments in nude mice, we employed gross and histological examinations to determine tumorigenicity and the production of lymph node metastasis. **RESULTS** PC-3M-1E8 cells were equally tumorigenic with 12/12 frequency in the prostate and subcutis. They exhibited highly metastatic potentiality with 12/12 lymph node metastasis after orthotopic implantation in nude mice for 40 d, whereas showed no lymph

node metastasis after ectopic implantation in nude mice. **CONCLUSION** The results demonstrated that establishment of a lymph node metastatic model using orthotopic implantation in nude mice is successful, and it may become a valuable model for the study of metastatic mechanism and experimental therapy of prostate cancer.

Key words: prostate neoplasms; tumor cells; neoplasms metastatic model; orthotopic implantation

* Corresponding author.

(本文编辑 石 涛)

2005 年国家食品药品监督管理局信息中心中国药学文摘编辑部图书征订启事

《中国非处方药用药指南》该书是反映我国非处方药基本情况,指导合理用药、方便药品购销的工具书。系统地介绍了国家食品药品监督管理局公布的国家非处方药的名称(包括通用名称和商品名称)、药物组成、适应证、性状、作用类别、药理作用、用法用量、禁忌证、注意事项、不良反应、药物相互作用、贮藏条件、规格、有效期、包装、生产企业等基本情况。分西药和中药两部分,其中西药部分有 25 类 598 个品种,中药部分有 58 类 1902 个品种,共计 2500 个品种。为方便使用,特设药品名称索引和生产单位名称索引等多种查阅方式。该书为精装国标大十六开版本。2004 年 3 月出版,360 元/册。

《全国医药系统电话簿》是全国医药系统通讯类工具书。收录范围为:● 全国县级以上药品监督管理部门;● 全国县级以上药品检验单位;● 各医药科研、教育、信息机构;● 各大药品、生物生化制品、制药中间体、药用辅料及卫生材料生产厂家;● 医疗器械、制药机械、药品包装厂家;● 县级以上医药公司及连锁机构、药房、药品批发市场、大型药店;● 国外医药机构驻华办事机构;● 县级以上医院及部队团级以上医院药、械供应等。内容包括:单位名称、邮编、地址、联系电话、传真、网址、经营范围及主要产品等信息。该号簿 2003 版,2003 年 8 出版,提供信息 4 万多条,大 16 开,1200 页,每册 186 元。该号簿 2005 版,预计 2005 年 2 月出版,大 16 开,收录内容比 2003 版有所增加,每册 286 元。

订阅者可直接与国家食品药品监督管理局信息中心《中国药学文摘》编辑部联系。

编辑部:北京市海淀区文慧园南路甲 2 号(邮编:100088)

电话:(010)62214715, 62214665, 68313344-3803

传真:(010)68313344-3803, 62214866

联系人:郭媛媛 刘 琪