

郭文文,师长宏,李苗苗,等. 前列腺癌免疫人源化小鼠模型的构建及鉴定[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 759-764.  
Guo WW, Shi CH, Li MM, et al. Establishment and identification of an immune-humanized mouse model of prostate cancer [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 759-764.  
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.06.004

## 前列腺癌免疫人源化小鼠模型的构建及鉴定

郭文文<sup>1,2</sup>,师长宏<sup>2</sup>,李苗苗<sup>2</sup>,乔天运<sup>2</sup>,赵菊梅<sup>1\*</sup>,张彩勤<sup>2\*</sup>

(1. 延安大学医学院,陕西 延安 716000; 2. 空军军医大学实验动物中心,西安 710032)

**【摘要】** 目的 构建免疫系统人源化的小鼠模型,并移植入人前列腺癌细胞系,以期用于前列腺癌免疫治疗药物研究。方法 利用 Ficoll 密度梯度离心法,从新鲜的人外周血中分离出单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC),经尾静脉注射 NPG 小鼠,构建具有人免疫系统的小鼠模型。注射后第 3、4、5、6 周分别采用断尾法采集小鼠外周血,并用流式细胞仪监测小鼠外周血中人 CD45 + CD3 + T 细胞的动态变化水平。在注射后第 3 周给予小鼠皮下移植  $1 \times 10^7$  个前列腺癌 22Rv1 细胞,每周两次监测肿瘤生长情况。当肿瘤生长至  $1000 \text{ mm}^3$  左右,对小鼠施行安乐死;利用流式细胞术、免疫组化、HE 染色等方法分析人源化小鼠外周血、脾及肿瘤组织中人免疫细胞的浸润情况。结果 模型小鼠在移植人 PBMC 后 3~6 周期间,外周血中检测到较高水平的 CD45 + CD3 + T 细胞。第 6 周时处死小鼠,HE 染色和免疫组化染色结果表明,模型小鼠的脾和肿瘤组织中具有人 CD4 + CD8 + T 细胞的浸润。结论 成功构建了前列腺癌免疫人源化小鼠模型,其外周血、脾及前列腺癌肿瘤组织中均有高水平的人源性 T 细胞浸润,为下一步构建良好的前列腺癌免疫治疗临床前模型奠定了基础。

**【关键词】** 外周血单个核细胞;免疫人源化;前列腺癌;小鼠

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)06-0759-06

## Establishment and identification of an immune-humanized mouse model of prostate cancer

GUO Wenwen<sup>1,2</sup>, SHI Changhong<sup>2</sup>, LI Miaomiao<sup>2</sup>, QIAO Tianyun<sup>2</sup>, ZHAO Jumei<sup>1\*</sup>, ZHANG Caiqin<sup>2\*</sup>

(1. Medical College of Yan'an University, Yan'an 716000, China.

2. Laboratory Animal Center, the Air Force Medical University, Xi'an 710032)

Corresponding author: ZHANG Caiqin. E-mail: zhangcai-qin-bei@163.com; ZHAO Jumei. E-mail: jzm2003.stu@163.com

**【Abstract】 Objective** An ideal animal model for the study of prostate cancer (Pca) immunotherapy is needed. We aimed to establish a mouse model humanized for the immune system and then transplant these mice with human Pca cells. **Methods** To humanize mice with a reconstructed human immune system, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated from fresh human peripheral blood by density gradient centrifugation and injected into NOD-scid *Il2rg*<sup>-/-</sup> mice via the caudal vein. Peripheral blood from these mice was collected at the 3rd, 4th, 5th and 6th weeks following injection, and dynamic changes in human CD45+CD3+ T cells were monitored using flow cytometry analysis. At the 3rd week after humanization, cells from the Pca cell line 22Rv1 were subcutaneously implanted into the right flank of humanized mice. Tumor growth was monitored twice a week. When the tumor grew to about  $1000 \text{ mm}^3$ , the mice were euthanized. The infiltration of human immune cells in the peripheral blood, spleen and tumor tissues of humanized mice was analyzed by flow cytometry, immunohistochemistry (IHC) and hematoxylin and eosin (HE) staining. **Results** High levels

**【基金项目】** 陕西省创新能力支撑计划(2020PT-005), 国家自然科学基金(31772546)。

Funded by Shaanxi Provincial Innovation Capability Support Program(2020PT-005), National Natural Science Foundation of China(31772546)。

**【作者简介】** 郭文文(1993—),女,硕士生,研究方向:肿瘤分子病理与药物研究。Email: 2399316897@qq.com

**【通信作者】** 张彩勤,女,副教授,研究方向:人类疾病动物模型。Email: zhangcai-qin-bei@163.com;

赵菊梅,女,教授,硕士生导师,研究方向:肿瘤分子病理与药物研究。Email: jzm2003.stu@163.com。

\* 共同通信作者

of CD45+CD3+ T cells were detected in the peripheral blood of mice from 3 to 6 weeks after PBMC transplantation. The mice were euthanized at the 6th week and the result of HE and IHC staining demonstrated that the spleen and tumor tissues of the mice were infiltrated by human immune cells CD4+ and CD8+ T cells. **Conclusions** The immune-humanized mouse model of Pca was successfully established. This model showed high levels of human immune T cells in the peripheral blood, spleen and Pca tissues, laying a foundation for the construction of an ideal preclinical model of immunotherapy for Pca.

**【Keywords】** peripheral blood mononuclear cells; humanization of immunity; prostate cancer; mouse

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

前列腺癌是男性泌尿生殖系统中最常见的恶性肿瘤之一,并且随着我国人口老龄化趋势不断明显,其发病率也呈逐年上升趋势<sup>[1-2]</sup>。由于前列腺癌的早期发展依赖于雄激素,主要治疗方法为根治性手术治疗、内分泌治疗及放射治疗等。然而,大多数患者经治疗产生一段时间反应后会复发,发展为去势抵抗性前列腺癌(castration-resistant prostate cancer, CRPC)<sup>[3]</sup>。而目前 CRPC 有效的治疗方法尚不明确,迫切需要探索新的治疗方法。近年来,免疫疗法在前列腺癌的治疗上取得了快速发展,它可通过激活宿主免疫细胞特异性攻击前列腺癌细胞产生特异性抗肿瘤免疫反应<sup>[4-5]</sup>。然而,传统的前列腺癌细胞系移植(cell derived xenograft, CDX)模型因缺乏完整的人免疫系统,无法用于免疫治疗研究。本研究主要目的是构建具有人免疫系统的人源化肿瘤小鼠模型,期望能够用于肿瘤免疫药物的研发及临床前评估。

NOD-Prkdcscid112rg<sup>tm1</sup>/Vst(NPG)小鼠是一种先天性 T、B 与 NK 细胞三重免疫缺陷动物。与国外的 NSG 或 NOG 一样,均为 NOD-Prkdcscid 112rg<sup>tm1</sup>小鼠,是目前国际公认的免疫缺陷程度最高的小鼠模型,同时也是最好的人源细胞移植的受体。将人外周血中分离的 PBMC 移植入 NPG 小鼠体内,可以重建以成熟 T 淋巴细胞为主的人免疫系统,在此基础上进一步移植人肿瘤细胞而构建的模型,即为人源化肿瘤模型。其模拟人体的生理、病理变化,可以给肿瘤提供与人体更相似的生长微环境。同时,肿瘤基质包含了人源免疫细胞成分,在阐明发病机制及肿瘤靶向治疗与肿瘤发生、发展、转移机制等研究方面具有重要的应用价值,尤其在研究肿瘤免疫治疗方面,是更理想的肿瘤模型<sup>[6-8]</sup>。但外周血中 PBMC 在 NPG 小鼠体内免疫重建时相及动态过程有待进一步研究。因此,本研究采用密度梯度离心法从新鲜人外周血中分离出 PBMC,通过尾静脉注射 NPG 小鼠,建立人源化小鼠模型;并植入前列腺癌细胞系 22Rv1 细胞,构建 Hu-CDX 模型,探讨

NPG 小鼠移植入人 PBMC 后免疫重建的水平及肿瘤生长情况,以期能为肿瘤免疫治疗药物的评估提供理想的临床前动物模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

12 只 4~5 周龄 SPF 级雄性 NPG 小鼠,体重 22~25 g,购买于北京维通达生物技术有限公司【SCXK(京)2019-0002】。饲养于中国人民解放军空军军医大学实验动物中心屏障环境【SYXK(陕)2019-001】。环境温度 20~26℃,相对湿度 40%~70%,12 h 光照/12 h 黑暗。饲料及饮水均经无菌处理,小鼠自由摄食和饮水。相关动物实验获得了空军军医大学实验动物福利伦理委员会批准(No. 16013)。

#### 1.1.2 细胞系

人前列腺癌细胞 22Rv1 细胞购买于 ATCC,该细胞培养于 RPMI-1640 培养基(10%胎牛血清+1%青链霉素)置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。

#### 1.1.3 主要试剂与仪器

2 份新鲜外周血供体取自空军军医大学第一附属医院输血科,并获得医学伦理委员会批注(KY20193035);胎牛血清、RPMI-1640 培养基和 0.25% 胰酶购自美国 Gibco 公司;人 Ficoll-PaqueTMPREMIUM 1.084 sterile solution 试剂购自美国 GE Healthcare;小鼠淋巴细胞分离液试剂购自天津市灏洋生物科技发展有限公司;抗人流式检测抗体:PE-CD3e 抗体, FITC-CD45 抗体为美国 BD Biosciences 产品;IHC 试剂盒购买于康为世纪有限公司;抗人 CD45、CD4 和 CD8 抗体购于英国 abcam 公司。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

NPG 小鼠适应性喂养 1 周后,随机分为供体 1

重建组、供体 2 重建组及未重建对照组,共 3 组,每组 4 只。

### 1.2.2 人源化小鼠模型的建立

采用 Ficoll 密度梯度离心法提取人新鲜外周血中 PBMC 备用。重建组每只小鼠通过尾静脉注射  $1 \times 10^7$  个 PBMC,未重建对照组给予等体积的生理盐水。所有动物均饲养在 SPF 级环境,动态监测每组小鼠各项指标的变化情况。

### 1.2.3 流式细胞术监测小鼠外周血中人免疫细胞的重建水平

移植后第 3、4、5、6 周分别用断尾法取两个免疫重建组小鼠尾静脉血,并分离出 PBMC 制成单个细胞悬液,分别标记抗人 CD3 +、CD45 + T 细胞荧光抗体后,进行流式细胞分析,动态监测小鼠外周血中人免疫细胞的重建水平。流式细胞仪所检测数据,采用 FlowJo 7.6.1 软件分析及绘图。

### 1.2.4 Hu-CDX 模型的建立

当供体 1 和供体 2 重建的小鼠外周血中人免疫细胞 CD45 + CD3 + T 细胞 > 25% 时,标志人源化小鼠模型构建成功。接下来我们将对数生长期的 22Rv1 细胞,用 0.25% 的胰蛋白酶消化后,最终用无菌 PBS 缓冲液和基质胶 Matrigel 基质胶以 1:1 将  $1 \times 10^7$  个 22Rv1 细胞重悬至 200  $\mu$ L,皮下接种于构建成功的免疫人源化小鼠。

### 1.2.5 肿瘤生长监测及免疫浸润分析

小鼠生物学特征观察:每天观察精神状态、饮食、活动力、体重、毛顺滑度及肿瘤的生长等情况。

肿瘤细胞接种后,一周 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:  $V(\text{mm}^3) = \text{长}(\text{mm}) \times \text{宽}^2(\text{mm}^2) / 2$ 。当肿瘤长至 1000  $\text{mm}^3$  左右,实验终止时小鼠采用吸入  $\text{CO}_2$  安乐死,收集模型鼠的肿瘤组织和脾组织,固定于 4% 多聚甲醛溶液中,作组织切片,进行 HE 染色以及免疫组化染色,在显微镜下观察染色结果。

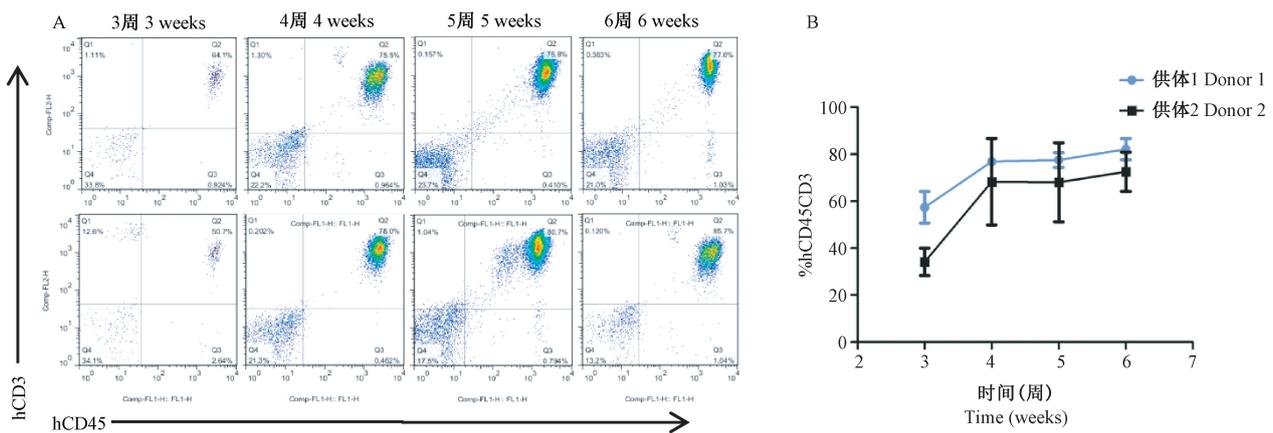
### 1.3 统计学分析

实验数据采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析,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

将供体 1 来源的人 PBMC 注射入重建移植组小鼠体内,于第 3、4、5、6 周流式细胞术动态监测小鼠外周血中人 CD45 + CD3 + T 细胞比例。如图 1A 显示,注射后第 3 周即可检测到人源免疫细胞 CD45 + CD3 + T 细胞 > 25%,标志着人源化小鼠模型构建成功。随着重建时间的延长,人 CD45 + CD3 + T 细胞明显上升,到第 6 周达到约 77.4% ~ 86.7%。此外,我们还用供体 2 来源的 PBMC 进行了免疫重建,流式数据分析发现两组供体免疫系统重建水平存在差异;人源化小鼠一般在重建第 6 周即出现包括体重下降、弓背、脱毛等移植抗宿主反应 (GVHD) (图 1B)。



注:A:在第 3、4、5、6 周流式监测供体 1 重建小鼠外周血中人 CD45 + CD3 + T 细胞百分比;B:供体 1 和供体 2 重建小鼠外周血中人 CD45 + CD3 + T 细胞的水平 ( $n=4$ )。

图 1 NPG 小鼠人源化重建后外周血中人免疫细胞的百分比

Note. A. The percentage of human CD45 + CD3 + T cells in the peripheral blood of donor 1 reconstructed mice was monitored by flow cytometry at the 3rd, 4th, 5th and 6th week. B. The level of human CD45 + CD3 + T cells in peripheral blood of mice reconstructed by donor 1 and donor 2 ( $n=4$ ).

Figure 1 Percentages of human immune cells in peripheral blood of NPG mice after humanization

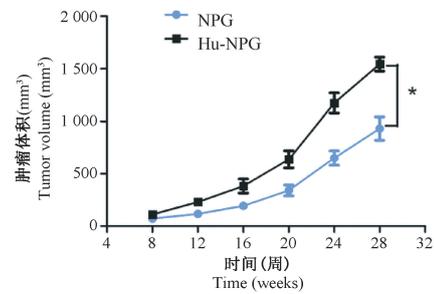
## 2.2 前列腺癌 Hu-CDX 模型的构建与评估

人源化小鼠模型于第 3 周重建成功后,进一步将人前列腺癌细胞 22Rv1 皮下移植入小鼠右侧腋下,并以正常的 NPG 小鼠为对照组。定期测量肿瘤的生长情况。结果如图 2 显示,两组小鼠中均有肿瘤生长,随着时间延长肿瘤体积增大,且 22Rv1 细胞系在人源化小鼠中生长速度缓慢,与正常的 NPG 小鼠相比有显著差别( $P < 0.05$ )。待肿瘤生长到  $1000 \text{ mm}^3$  左右后,对小鼠进行安乐死处理,进一步固定肿瘤组织,免疫组化染色后进行单位面积阳性细胞数量分析,观察到人免疫重建组中每只 CDX 模型鼠的肿瘤组织中均有 CD45 + 细胞及 CD4 +、CD8 + T 细胞的明显浸润,HE 染色发现免疫人源化与非人源化小鼠肿瘤组织的组织细胞形态没有显著性改变(见图 3A、3B)。综上,重建的人免疫系统可能具有抑制肿瘤生长的作用。

## 2.3 人源化小鼠免疫器官中人免疫细胞浸润情况

为了进一步研究人免疫系统重建后小鼠脾内

人源免疫细胞的浸润情况,我们利用免疫组织化学染色方法检测了免疫重建 6 周后小鼠脾内人 CD4 + 和 CD8 + T 细胞表达情况。结果显示,人 CD4 +、CD8 + T 细胞在重建小鼠脾组织中大量表达(T 细胞膜着染棕黄色);对照组小鼠脾中未见人源细胞表达(图 4A、4B)。

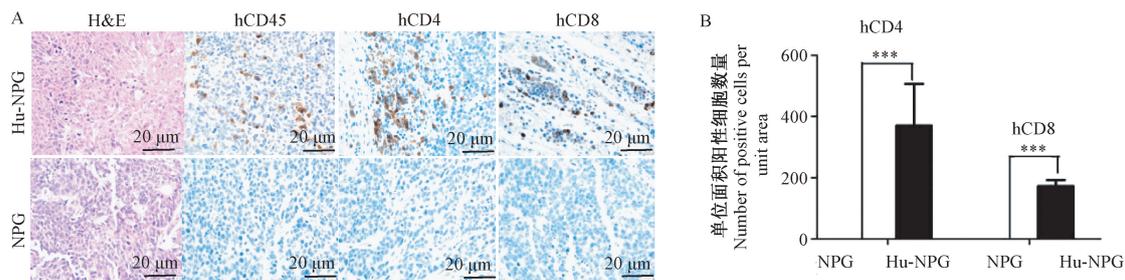


注:与对照组比较, \*  $P < 0.05$ 。

图 2 Hu-NPG 与 NPG 小鼠接种 22Rv1 细胞后肿瘤的生长曲线( $n = 4$ )

Note. Compared with control group, \*  $P < 0.05$ .

Figure 2 Growth curve of tumor in humanized mice after inoculated with 22Rv1 cells( $n = 4$ )

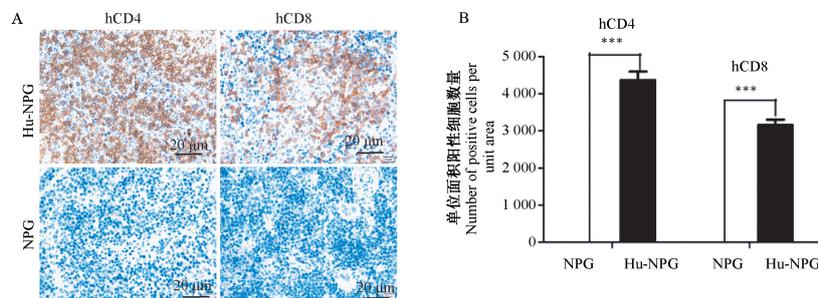


注:A;Hu-NPG 与 NPG 小鼠肿瘤组织 HE 染色及肿瘤浸润性淋巴细胞中人 CD45、CD4、CD8 的表达情况;B:肿瘤组织中人 CD4 和 CD8 免疫组化染色的半定量分析。与 NPG 相比, \*\*\*  $P < 0.001$ ,  $n = 4$ 。(下图同)

图 3 Hu-NPG 与 NPG 肿瘤组织中免疫细胞的表达及 HE 染色

Note. A. Expression of human CD45, CD4 and CD8 in tumor tissue and tumor infiltrating lymphocytes of Hu-NPG and NPG mice. B. Semi-quantitative analysis of human CD4 and CD8 immunohistochemical staining in tumor tissue. Compared with NPG, \*\*\*  $P < 0.001$ ,  $n = 4$ . (The same in the next figures)

Figure 3 Expression and HE staining of human immune cells in tumor tissues of Hu-NPG and NPG



注:A;Hu-NPG 与 NPG 小鼠脾组织中人 CD4、CD8 的表达情况;B:脾组织中人 CD4 和 CD8 免疫组化染色的半定量分析。

图 4 Hu-NPG 与 NPG 小鼠脾组织中免疫细胞的表达及 HE 染色

Note. A. Expression of human CD4 and CD8 in spleen tissue of Hu-NPG and NPG mice. B. Semi-quantitative analysis of human CD4 and CD8 immunohistochemical staining in spleen tissue.

Figure 4 Immunohistochemical staining and semi-quantitative analysis of human CD4 and CD8 in spleen tissue of Hu-NPG and NPG mice

### 3 讨论

肿瘤免疫治疗通过激活机体抗肿瘤免疫反应或阻断肿瘤免疫逃逸,以控制和杀伤肿瘤。自 2014 年 9 月, FDA 首次批准 PD-1 抑制剂 (pembrolizumab) 作为恶性黑色素瘤的一线治疗以来,免疫治疗已成为多种癌症的一线治疗方案,也为中晚期前列腺癌患者带来了曙光。以往的前列腺癌临床前研究模型是将前列腺癌细胞系或临床患者标本移植入免疫缺陷小鼠体内,然而这种模型由于缺乏人的免疫系统,无法模拟人类肿瘤与免疫微环境之间的相互作用,因而无法进行免疫检查点抑制剂等肿瘤免疫治疗研究。

通过在免疫缺陷小鼠体内植入人造造血干细胞或功能性的淋巴细胞,使其具有人的免疫功能,这样的小鼠模型称为免疫系统人源化模型。在此模型上移植肿瘤可模拟人体肿瘤与免疫系统之间的相互作用,因而在肿瘤免疫治疗药物(如新型免疫检查点抑制剂、疫苗等)的研发与临床前药物评估方面具有重要的应用前景<sup>[9]</sup>。依据人免疫系统重建方法的不同,可将免疫人源化小鼠模型分为 3 类:(1) Hu-BLT (humanized-bone marrow, liver, thymus) 小鼠模型,是人源免疫系统重建最为完善的小鼠模型,但其供体为人胚胎肝和胸腺,来源比较受限<sup>[10]</sup>; (2) Hu-HSCs (humanized-hematopoietic stem cells) 小鼠模型,是将人 CD34 + HSC 移植入免疫缺陷小鼠体内,虽然这种方法可使多系造血细胞发育,但构建模型较慢<sup>[6,11]</sup>; (3) Hu-PBL (humanized-peripheral blood mononuclear cells) 小鼠模型,是将完全分化成熟的人 PBMC 移植入免疫缺陷小鼠体内<sup>[6,12-13]</sup>,可产生效应性和记忆性 T 细胞。本研究中采用了第 3 种方法,不仅由于其构建方法快速简便,而且这种方式可以使 T 细胞移植效率高且稳定,更加准确的反应健康供体的免疫记忆状态。更为重要的是,以往很多研究中小鼠重建人免疫系统模型之前都要经过预处理,如未重建前进行化疗药环磷酰胺或亚致死性剂量的<sup>60</sup>Co  $\gamma$  射线辐照处理<sup>[14-15]</sup>,尾静脉注射抗 NK 细胞活性制剂<sup>[16]</sup>、IFN- $\gamma$ <sup>[17]</sup>等以提高重建的比例,但仍存在较高的重建失败率。而本研究中应用的 T、B、NK 重度联合免疫缺陷的 NPG 小鼠,在针对 Hu-PBMC 重建方面可以不进行辐照处理,直接用于对多个供体来源的 PBMC 进行筛选。

本研究结果显示,人源化小鼠外周血及免疫器

官中均监测到高水平的人源细胞的表达。供体 1 重建第三周外周血中即可监测到人 CD45 + CD3 + T 细胞 > 25%,第六周即可达到 77.4%~86.7%,并且重建小鼠脾中有高水平的人 CD4、CD8 + T 细胞浸润,表明人源化小鼠模型构建成功。此外,流式数据显示,不同供体来源的 PBMC 在小鼠体内免疫重建效果存在差异,这可能与供体的个体差异有关。人前列腺癌细胞系 22Rv1 中 PD-L1、AR 和 PSA 均高表达,是研究激素非依赖性前列腺癌免疫治疗理想的细胞系,因此我们选择 22Rv1 细胞系皮下移植入人源化小鼠体内,成功构建了人源化荷瘤小鼠模型。我们实验发现,肿瘤细胞移植前后人源化小鼠外周血液及脾中人 CD45 + CD3 + T 细胞维持恒定状态,且肿瘤组织中也有较高水平人 CD4 +、CD8 + T 细胞的浸润。值得指出的是,本研究发现人前列腺癌细胞 22Rv1 细胞系在人源化小鼠中较非人源化小鼠中肿瘤生长速度缓慢,提示,重建的人免疫系统可能具有抑制肿瘤生长的作用。

由于临床上前列腺癌是低免疫浸润的“冷”肿瘤,靶向免疫检查点的治疗方法在临床上的治疗效果差强人意。目前,研究者寻求通过联合化疗以提高前列腺癌的免疫浸润及免疫原性,使前列腺癌转化为对免疫治疗敏感的“热”肿瘤<sup>[18]</sup>,因此该模型不仅能够应用于免疫新药的疗效评估,还能作为免疫治疗联合化疗的临床前动物模型,这显然是人源化小鼠模型更具意义的应用方向。相关研究报道, Hu-PBL 模型由于 GVHD 出现较早,研究窗口期为 3~6 周,主要用于短期免疫治疗药物的评价,不适用于长期的肿瘤免疫机制研究<sup>[13]</sup>。因此,课题组后续将构建 Hu-HSCs 模型,以进行上述联合治疗的研究及开发新型免疫检查点抑制剂和抗肿瘤免疫机制的研究,以为临床实验提供依据。

#### 参 考 文 献 (References)

- [1] Dijkman GA, Debruyne FM. Epidemiology of prostate cancer [J]. Eur Urol, 1996, 30(3): 281-295.
- [2] 韩苏军. 中国前列腺癌发病及死亡现状和流行趋势分析 [D]. 北京:北京协和医学院, 2015.  
Han SJ. Analysis of the status and trends of prostate cancer incidence and mortality in China [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2015.
- [3] Terada N, Shimizu Y, Kamba T, et al. Identification of EP4 as a potential target for the treatment of castration-resistant prostate cancer using a novel xenograft model [J]. Cancer Res, 2010, 70(4): 1606-1615.
- [4] Noguchi M, Koga N, Igawa T, et al. Clinical development of

- immunotherapy for prostate cancer [J]. *Int J Urol*, 2017, 24(9): 675-680.
- [ 5 ] Boettcher AN, Usman A, Morgans A, et al. Past, current, and future of immunotherapies for prostate cancer [J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 884.
- [ 6 ] Lin SH, Huang GH, 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.
- [ 7 ] Zhao Y, Shuen TWH, Toh TB, et al. Development of a new patient-derived xenograft humanised mouse model to study human-specific tumour microenvironment and immunotherapy [J]. *Gut*, 2018, 67(10): 1845-1854.
- [ 8 ] Tu WW, Zheng J. Application of humanized mice in immunological research [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1371: 157-176.
- [ 9 ] Yao LC, Aryee KE, Cheng MS, et al. Creation of PDX-bearing humanized mice to study immuno-oncology [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1953: 241-252.
- [ 10 ] Wege AK, Melkus MW, Denton PW, et al. Functional and phenotypic characterization of the humanized BLT mouse model [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2008, 324: 149-165.
- [ 11 ] Lapidot T, Pflumio F, Doedens M, et al. Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice [J]. *Science*, 1992, 255(5048): 1137-1141.
- [ 12 ] Jr MK, Roychowdhury S, Bhatt D, et al. Anti-human CTLA-4 monoclonal antibody promotes T-cell expansion and immunity in a hu-PBL-SCID model: a new method for preclinical screening of costimulatory monoclonal antibodies [J]. *Blood*, 2005, 105(3): 1114-1120.
- [ 13 ] de La Rochere P, Guil LS, Decaudin D, et al. Humanized mice for the study of immuno-oncology [J]. *Trends Immunol*, 2018, 39(9): 748-763.
- [ 14 ] Li Z, Yang X, Zhang Y, et al. A human peripheral blood mononuclear cell (PBMC) engrafted humanized xenograft model for translational immuno-oncology (I-O) research [J]. *J Vis Exp*, 2019, 8(150).
- [ 15 ] 吴建红, 张飞, 赵炜, 等. 免疫重建荷人膀胱癌-SCID 鼠模型的建立 [J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(6): 1033-1035, 1047.
- Wu JH, Zhang F, Zhao W, et al. Establishment and identification of hu-PBL-SCID mice model of human bladder cancer model [J]. *Prog Modern Biomed*, 2014, 14(6): 1033-1035, 1047.
- [ 16 ] Pearson T, Greiner DL, Shultz LD. Humanized SCID mouse models for biomedical research [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2008, 324: 25-42.
- [ 17 ] Lin XY, Zeng T, Lin JX, et al. Establishment of humanized tumor microenvironment mouse models based on the injection of peripheral blood mononuclear cells and IFN- $\gamma$  to evaluate the efficacy of PD-L1/PD-1-targeted immunotherapy [J]. *Cancer Biol Ther*, 2020, 21(2): 130-138.
- [ 18 ] Duan QQ, Zhang HL, Zheng JN, et al. Turning cold into hot: firing up the tumor microenvironment [J]. *Trends Cancer*, 2020, 6(7): 605-618.

[ 收稿日期 ] 2020-07-13