



DOI:10.11714/j.issn.2095-6959.2014.04.009

http://www.lcbl.net/articles/518

人源化小鼠异位肺癌动物模型的构建

刘君¹, 刘翔², 崔飞¹, 黄丽燕¹, 唐海玲¹, 李慧灵³, 何建行¹

(1. 广州医科大学第一附属医院胸外科, 广州市呼吸疾病研究所, 广州 510515; 2. 南华大学附属第二医院胸心外科, 湖南 衡阳 421001; 3. 中国人民解放军总医院海南分院呼吸内科, 海南 三亚 572013)

[摘要] 目的: 探讨一种可用于研究肺癌免疫的人源化小鼠动物模型。方法: 采用人外周血单个核细胞输注非肥胖糖尿病/严重联合免疫缺陷小鼠体内建立人源化小鼠, 在此小鼠模型基础上再构建异位肺癌荷瘤模型。结果: 10只人源化小鼠异位荷瘤模型全部构建成功, 免疫重构的小鼠外周血及脾脏中均可检测到大量人CD3⁺T、CD4⁺T、CD8⁺T细胞。人源化荷瘤小鼠肿瘤组织内可发现人CD3⁺T、CD4⁺T、CD8⁺T淋巴细胞浸润。结论: 该模型为我们了解肺癌发生发展与免疫系统的关系, 也为研究免疫治疗干预措施等提供了有价值的工具。

[关键词] 人源化; 肺癌; 动物模型; 肿瘤浸润淋巴细胞

Establishment of humanized lung cancer heterotopic mouse model

LIU Jun¹, LIU Xiang², CUI Fei¹, HUANG Liyan¹, TANG Hailing¹, LI Huiling³, HE Jianxing¹

(1. Department of Cardiothoracic Surgery, Guangzhou Institute of Respiratory Disease, The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510515; 2. Department of Cardiothoracic Surgery, The Second Hospital Affiliated to University of South China, Hengyang Hunan 421001; 3. Department of Respiratory Medicine, Hainan Branch of Chinese PLA General Hospital, Sanya Hainan 572013, China)

Abstract **Objective:** To explore a lung humanized mouse model which can be used cancer immunization. **Method:** Human peripheral blood mononuclear cells through the were injected intraperitoneally into Non-obese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) chimeric mice to constructed humanized model. The re-construction of a mouse lung cancer heterotopic model on basis of the humanized model. **Results:** 100% success rate of 10 lung cancer heterotopic humanized mice. Human CD3⁺T, CD4⁺T, CD8⁺T cells were highly expressed in mouse spleen after immune reconstruction by immunohistochemical detection. Human CD3⁺T, CD4⁺T, CD8⁺T cells were found infiltrating in the tumor tissue of tumor-bearing humanized mice. **Conclusion:** The model provide a valuable tool for our understanding of the relationship between the development of lung cancer but also for the

收稿日期 (Date of reception): 2014-07-20

通信作者 (Corresponding author): 李慧灵, Email: lihuiling1975@126.com; 刘君, Email: liujun9707@sina.com

基金项目 (Foundation item): 广东省医学科研基金 (A2011246)。This work was supported by the Guangdong Province Medical Research Foundation (A2011246), P. R. China.

study of immunotherapy interventions.

Key words humanized; lung cancer; animal model; tumor infiltrating lymphocytes

肺癌是目前发病率和病死率恶性肿瘤最高的恶性肿瘤之一^[1-2]。在肺癌治疗过程中,我们往往过多关注于肿瘤细胞本身,而忽视了机体免疫系统的肿瘤免疫应答和免疫监视作用。肿瘤的发生、发展与机体免疫系统之间一直存在复杂关系而困惑于研究者。因此有必要寻找一种合适的载体来研究机体免疫机制与肿瘤的关系。肿瘤动物模型一直是研究肿瘤发生发展机制的重要工具之一。由于小鼠与人机体固有的基因及免疫系统的差异,在一定程度上限制了人类疾病在小鼠体内模型的研究。因此,建立一种具有类似人体免疫环境的实验动物模型显得尤为重要。人源化小鼠是将人外周血单个核细胞通过外周血液循环或腹腔输入小鼠体内构建的人鼠嵌合体模型。人源化小鼠联合体模型最常选用联合免疫缺陷(SCID)小鼠和非肥胖糖尿病/严重联合免疫缺陷(NOD/SCID)小鼠品系。在上述品系小鼠体内可重构人体内的免疫系统,较好地模拟人体液环境及细胞免疫功能。人源化鼠解决了长期以来动物模型不能确切反映人体免疫系统的特点及研究人体免疫应答仅限于体外实验的难题。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物

清洁级健康,无免疫渗(IgM<1 μg/mL)NOD/SCID小鼠11只。雌性,周龄6-8周,体质量18-20 g,SPF级饲养条件喂养。中山大学动物实验中心提供,实验动物合格证号:SCXK(粤2009-0011)。

1.1.2 Am 1010 细胞株

Am1010细胞株由中国南方人肺癌细胞系种子库提供。由广东省呼吸疾病研究所呼吸疾病国家重点实验室冻存。

1.1.3 人外周血

来自于健康献血自愿者,由广东省中心血站提供。

1.2 方法

CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PC5单克隆抗购自Beckman Coulter公司;兔抗人CD3单克隆抗体、兔抗人CD4单克隆抗体、兔抗人CD8单克隆抗体购自美国Abcam公司。

1.2.1 细胞培养

细胞常规培养于含20%胎牛血清、100 g/mL青霉素、100 g/mL链霉素的高糖(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)培养基,37℃、5% CO₂饱和湿度细胞培养箱中培养,培养3-4天后,胰酶+0.02% EDTA(HyClone)消化传代。

1.2.2 构建小鼠皮下异位移植瘤模型

从培养皿中收集Am1010细胞, PBS重悬至 4×10^6 /mL。取0.2 mL Am1010细胞悬液皮下注射于1只NOD/SCID小鼠背部皮下,待皮下肿瘤体积达到1.5 cm³。采用外科手术方法将瘤块钝性分离取出,并将瘤块剪成1 mm × 3 mm × 3 mm碎片。10只受体NOD/SCID小鼠采用1%戊巴比妥钠腹腔麻醉(10 mg/kg)。于每只受体小鼠双侧腋中线第6肋处切开一3 mm皮切口,撑开皮下组织,做一小口袋,往每一切口内塞入一块肿瘤碎片,0°丝线缝合皮肤切口。

1.2.3 生物学特性观察

小鼠一般特征观察每天观察精神状态、活动力、反应、饮食、体重、毛色、毛顺滑度及肿瘤组织的生长情况。大体解剖检查:荷瘤第4周处死小鼠解剖,观察移植瘤形态、直径、质地、活动度及脏器转移等情况。肿瘤体积计算方法: $V(\text{cm}^3) = \text{宽}^2(\text{cm}^2) \times \text{长}(\text{cm}) / 2$ ^[3]。

1.2.4 免疫学指标检测

小鼠在免疫重构后每周(连续4周)断尾采集尾静脉血100 μL,肝素抗凝后用流式细胞试剂检测CD3⁺T、CD4⁺T、CD8⁺T细胞数。

1.2.5 人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)提取及免疫重构

按说明书步骤提取人粒细胞后,将细胞调配成 5×10^8 /mL。用1 mL规格注射器分别向小鼠腹腔中注射0.2 mL PBMC悬液。免疫重建成功标准参考相关文献报道^[4]:人CD3⁺T细胞占小鼠外周血中所有有核细胞比例≥1%,被视为免疫重建成功。

1.2.6 流式细胞检测

流式细胞测定CD3⁺T、CD4⁺T、CD8⁺T细胞,免疫重构后每周(连续4周)A组及C组小鼠断尾取血100 mL肝素抗凝后分别加入流式检测管中。余同试剂盒说明步骤。

1.2.7 组织检测

小鼠麻醉后断颈处死,取出肿物、脾脏组

织,放入10%甲醛溶液中固定标本,石蜡包埋,作组织切片,备HE染色以及免疫组化,切片在显微镜下观察。

1.3 统计学处理

采用SPSS 13.0软件包处理,数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,生存期取中位数并绘制生存曲线。

2 结果

2.1 人源化荷瘤小鼠大体观察

小鼠皮下移植AM1010-GFP瘤块成瘤率为100%,图1示观察时间内小鼠体重变化趋势及荷瘤小鼠皮下肿瘤体积在观察时间段内均呈增长趋势。图2A、B为接种4周后荷瘤小鼠图片及手术摘除皮下瘤块实体照片。人源化小鼠皮下在接种人PBMC后的第3周,部分小鼠出现移植植物抗宿主反应(graft-vs-host disease, GVHD):精神状态差、

厌食、消瘦、毛发皱褶、弓背等症状^[4](图2A),加上肿瘤消耗原因,有3只小鼠在接种瘤块后23 d及25 d死亡。

2.2 人源化小鼠外周血人淋巴细胞检测

腹腔接种人PBMC(1×10^8 /只)1周后,所有小鼠外周血中即能检测出人CD3⁺T淋巴细胞,且CD3⁺T淋巴细胞占外周血所有有核细胞比例超过1%,免疫重建率100%。随后3周的免疫指标监测中,人的CD3⁺T细胞占小鼠外周血中所有有核细胞比例逐步上升,接种人PBMC后第4周,人的CD3⁺T细胞比例可达70%,与正常人外周血CD3⁺T细胞含量相当(61.1~77.0%)(图3)。荷瘤人源化小鼠体内的人T细胞亚群CD3⁺CD4⁺T/CD3⁺CD8⁺T比值在接种PBMC后1周为1.5左右,第2周开始出现下降,CD8⁺T细胞增多,CD3⁺CD4⁺T/CD3⁺CD8⁺T比值比出现倒置和明显下降趋势,到第4周CD3⁺CD4⁺T/CD3⁺CD8⁺T比值为0.4左右(图3)。

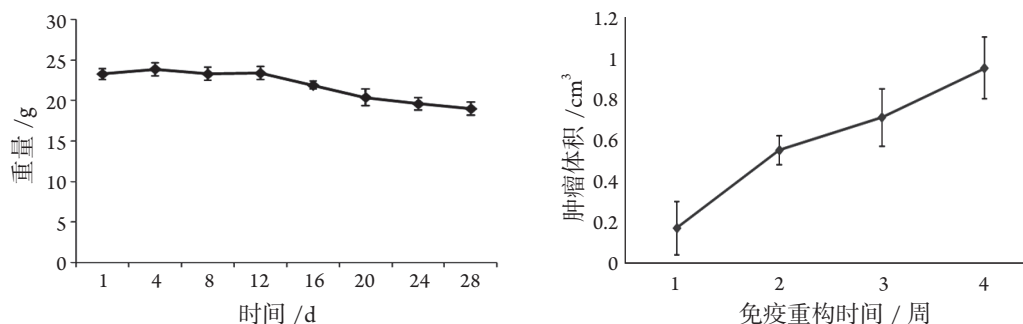


图1 人源化异位肺癌小鼠体重及皮下肿瘤生长曲线

Figure 1 Weight and Subcutaneous tumor growth curve of heterotopic lung cancer mouse model mice

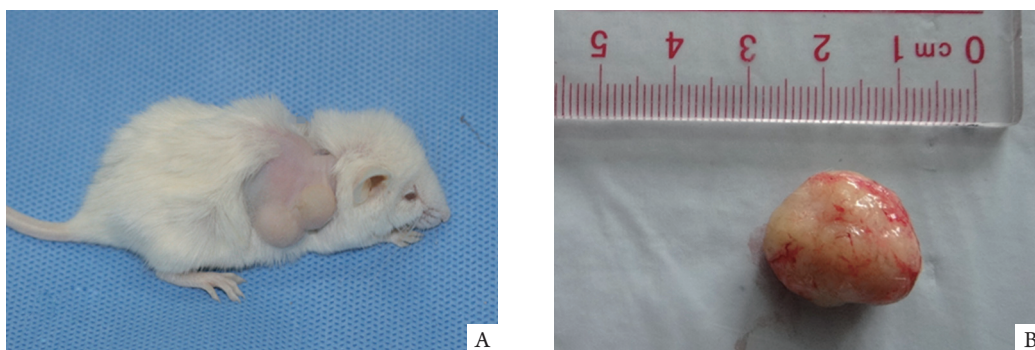


图2 接种瘤块4周后人源化荷瘤小鼠及皮下肿瘤图片

Figure 2 Pictures of heterotopic lung cancer mouse after engraftment Am1010 tumor piece four weeks

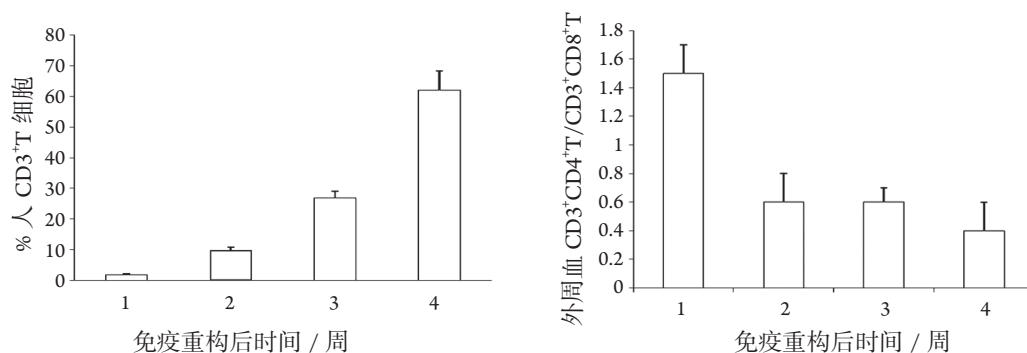


图3 人源化小鼠外周血中人T淋巴细胞的表达情况

Figure 3 Human T lymphocytes expression after engraftment in peripheral blood humanized mouse

2.3 人源化小鼠组织内人 T 淋巴细胞的表达情况

为了进一步了解免疫重构后小鼠主要免疫器官内人淋巴细胞嵌合情况, 我们通过免疫组化方法检测了免疫重建4周后小鼠脾脏内CD3⁺T表达情况。人CD3⁺T细胞大量表达于免疫重构后的小鼠脾脏组织中, T细胞膜染棕黄色, 成片状分布于小鼠脾脏中(图4)。同时免疫重构的小鼠脾脏中均表达人CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞。

2.4 肿瘤浸润淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocytes, TILs) 的检测

HE染色提示免疫重构小鼠肿瘤组织内可发现大量肿瘤淋巴细胞浸润(图5)。进一步对肿瘤组织进行T细胞亚群抗原标记染色检测发现, 人源化小鼠皮下肿瘤组织中有大量人CD3⁺T、CD8⁺T淋巴细胞浸润, 也存在少量CD4⁺T淋巴细胞浸润。

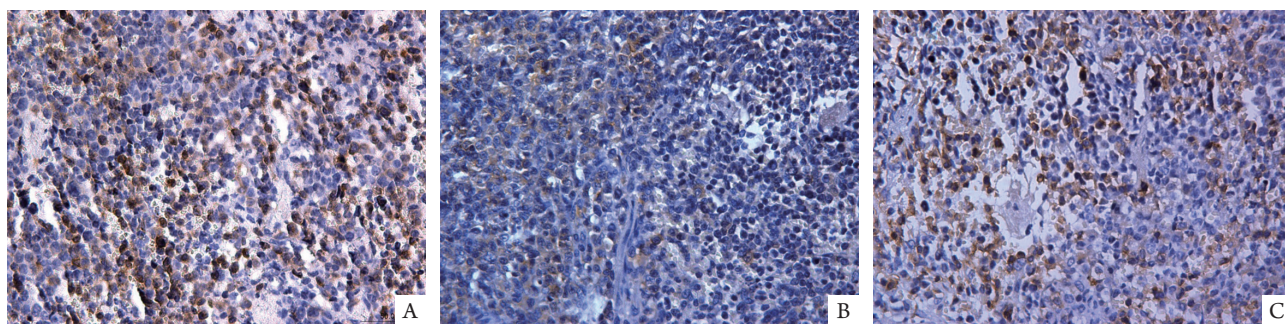


图4 人源化小鼠脾脏中人淋巴细胞的表达情况(SP, ×400)

Figure 4 The expression of human lymphocytes in humanized mouse spleens (SP, ×400)

A: HumanCD3⁺T monoclonal antibody staining; B: HumanCD4⁺T monoclonal antibody staining; C: HumanCD8⁺T monoclonal antibody staining

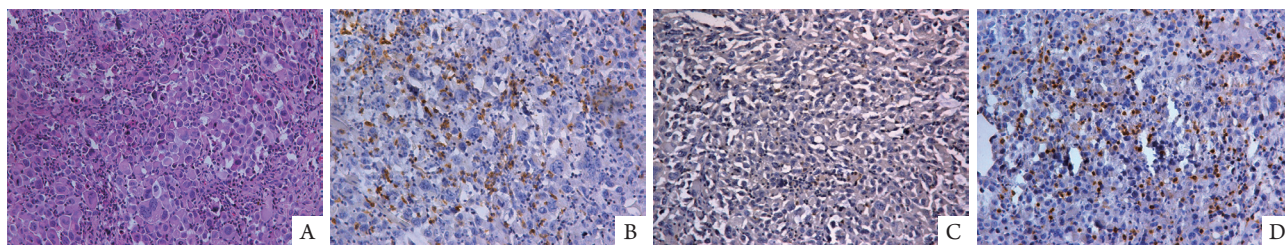


图5 肿瘤组织人免疫细胞浸润情况 (SP, ×400)

Figure 5 (SP, ×200) The expression of human lymphocytes in humanized mouse tumor tissues (SP, ×400)

A: The expression of TILs in tumor tissues (HE, ×200); B: Human CD3 monoclonal antibody staining (SP, ×200); C: Human CD4 monoclonal antibody staining (SP, ×200); D: Human CD8 monoclonal antibody staining (SP, ×200)

3 讨论

肺癌是发病率和病死率增长最快、对人类健康威胁最大的恶性肿瘤之一^[1-2]。肺癌对放化疗乃至靶向治疗的抵抗以及随之产生的侵袭转移是肺癌患者死亡的首要原因。虽然肺癌治疗抵抗与侵袭转移机制都是亟待阐明,但不可否认,肺癌发生与发展过程与机体免疫系统的相互作用是密不可分的。研究者围绕着肿瘤与免疫的关系做了大量的工作,例如有证据可证明肿瘤抗原能够引起机体产生特异性免疫应答^[5-6]。许多研究也报道了机体免疫系统对常规肿瘤治疗的潜在反应和预测作用之间的联系^[7-9]。但是这些多以临床研究为主,却鲜有研究通过构建人源化鼠肺癌模型来研究非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)与免疫系统之间的关系。

将人外周血单个核细胞通过血液循环或腹腔输入联合免疫缺陷小鼠体内,在联合免疫缺陷小鼠体内重建模拟人体液和细胞免疫功能的类人免疫系统,这种鼠称为人源化鼠。解决了长期以来动物模型不能确切反映人体免疫系统的特点及研究人体免疫应答仅限于体外实验的难题。Mosier最早报道利用人PBMCs在C.B-17 SCID小鼠体内成功构建人免疫系统^[10]。但C.B-17 SCID小鼠随着鼠龄增长易发生免疫渗漏现象加上本身较强的NK细胞活性和固有免疫活性限制了该品系小鼠在人源化小鼠模型中的应用。NOD/SCID鼠是C.B-17 SCID鼠与NOD鼠反交产生的,该系鼠既拥有C.B-17 SCID鼠的特征,缺乏适应性免疫系统,同时拥有NOD鼠具备的多种固有免疫缺陷,包括NK细胞活性低、骨髓功能发育不正常。重要的是,人外周血单个核细胞对NOD/SCID鼠的植入效率比C.B-17 SCID鼠要高5~10倍^[4,11-12]。相对于90% C.B-17 SCID鼠发生免疫渗漏的可能性,仅有不到10% NOD/SCID鼠会发生渗漏^[13]。本研究中免疫重构后的NOD/SCID小鼠外周血人CD3⁺T细胞占有核细胞比例随时间逐步递增,并在接种人PBMCs 4周后可达70%。而且CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺比值在接种肿瘤前达到(1.26±0.4 ~ 1.55±0.60)范围(图3),说明相关的免疫细胞数量及成分比例可达到正常人外周血免疫细胞的正常值范围。这说明小鼠外周血中复制了人免疫系统成分。我们通过免疫组化方法检测人源化小鼠脾脏内人CD3⁺T细胞含量非常高(图4),这说明淋巴细胞归巢趋势明显,同样也是一种人源化小鼠体内免疫系统构建成功的

体现。但是该模型也有不足之处,严重的GVHD会在PBMCs移植后会影响到受体小鼠的长期生存情况^[4],本研究中有数只小鼠在移植PBMCs 3周后陆续出现了不同程度GVHD症状,也导致其中一只小鼠在最后一周检测后死亡。虽然有文献报道可以给予一些干预措施治疗减轻或延缓GVHD带来的影响^[14-15],但是这些措施不可避免增加了研究的干扰因素,因此为了较好的避免这个问题,我们将PBMCs移植后的观察时间设置为4周。

我们在前期的研究中构建了中国南方人肺癌细胞系种子库,共培育建立不同肺癌细胞株15株,其中最为引人注意的是一株中国南方人放化疗及靶向治疗抵抗细胞--Am1010,来源于一位45岁女肺癌病人的上臂肌肉转移灶。病人在这个肌肉转移灶出现前接受了4周期化疗,放疗及靶向治疗。这株Am1010细胞表现出了对多种化疗药物、放射治疗和靶向药物易瑞沙的抵抗能力,和体内侵袭基质和血管的能力^[16]。因此本实验选择该细胞株建模同时可进一步观察该细胞株的侵袭与转移特性。该研究选择了从一只荷瘤的NOD/SCID小鼠体表获取瘤块碎片异位移植的方法构建异位荷瘤小鼠,该方法与注射肿瘤细胞悬液相比有以下几点优点: 1)建模前期准备工作简单,避免大规模细胞培养过程,从而节省了实验经费成本; 2)建模成功率高,通过对本次研究结果的观察,成瘤率达到100%; 3)建模步骤安全可靠,该方法只需将获取的碎瘤块直接植入另一受体小鼠颈背部皮下固定即可,可避免注射肿瘤细胞悬液可能导致瘤栓死亡风险。当然该方法也有不足之处,因为需要将瘤块剪成体积、重量等大小的瘤块碎片,操作中人为误差可能较大,可能相对于细胞悬液计数后肿瘤等量控制较差。

我们通过对人源化荷瘤小鼠肿瘤组织HE染色后可以发现肿瘤组织中存在大量的淋巴细胞浸润(图5A)。进一步免疫组化染色可以证实肿瘤内浸润的淋巴细胞为人的CD3⁺T细胞(图5B)。这说明了我们在NOD/SCID小鼠体内重构的人免疫系统在植入的肿瘤细胞免疫原性的刺激下产生肿瘤免疫应答反应。临床研究发现TILs也表达与其他多种肿瘤组织内,主要是因为肿瘤细胞表面抗原介导了这种特异性的免疫应答反应^[17]。许多研究提示在判定肿瘤预后意义方面,TILs的细胞类型比数量更关键。其中最重要的T细胞亚群CD8⁺T细胞即细胞毒性T细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTLs)。CD8⁺T主要是通过直接识别抗原提呈的肿瘤细

胞主要组织相容复合体(Major Histocompatibility Complex, MHC)I类分子, 启动对肿瘤靶细胞杀伤的过程来发挥抗肿瘤效应的。同时CD8⁺T通过表达Fas配体^[18], 释放穿孔素和IFN- γ ^[19,20], 并且与其他T相比于肿瘤细胞接触的更紧密等途径达到抑瘤效果^[21]。动物模型研究^[22-23]和临床研究^[24-26]都支持了CD8⁺T细胞是抗肿瘤作用中关键的效应细胞, 在我们的研究中, 通过在小鼠腹腔内注射人PBMCs构建的免疫系统也具备类似的肿瘤免疫应答, 人源化荷瘤小鼠外周血流式细胞结果显示CD3⁺CD8⁺T细胞淋巴细胞数量在接种肿瘤1周后明显增多, 且CD3⁺CD4⁺T/CD3⁺CD8⁺T比值出现倒置现象。我们进一步利用免疫组化方法对人源化荷瘤小鼠肿瘤组织做了淋巴细胞的抗原染色检测。我们观察到肿瘤组织内浸润的淋巴细胞以CD8⁺T细胞为主(图5D), 而CD4⁺T淋巴细胞数量较少(图5C), 这两种淋巴细胞的表达情况与外周血中流式结果一致。

肿瘤的发生、发展和宿主的抗肿瘤免疫有着密切, 机体免疫系统与肿瘤相互作用的确切机制仍然不清楚, 肿瘤免疫对肿瘤的正负面影响也一争论至今。本研究中我们采用了人源化小鼠模型, 并利用该模型研究肺癌肿瘤与免疫机制的关系尚属首次报道。该模型能在小鼠体内最大限度地复制人体内复杂的免疫环境, 为我们了解肺肿瘤发生发展与免疫系统的关系, 以及研究免疫治疗干预措施等提供了有价值的工具。该模型也为将来展开肺癌患者个体化免疫系统的人源化小鼠研究奠定了基础。

参考文献

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008[J]. *CA Cancer J Clin*, 2008, 58(2): 71-96.
2. Weir HK, Thun MJ, Hankey BF, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2000, featuring the uses of surveillance data for cancer prevention and control[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2003, 95(17): 1276-1299.
3. Naito S, von Eschenbach AC, Giavazzi R, et al. Growth and metastasis of tumor cells isolated from a human renal cell carcinoma implanted into different organs of nude mice[J]. *Cancer Res*, 1986, 46(8): 4109-4115.
4. Berney T, Molano RD, Pileggi A, et al. Patterns of engraftment in different strains of immunodeficient mice reconstituted with human peripheral blood lymphocytes[J]. *Transplantation*, 2001, 72(1): 133-140.
5. Sharma P, Shen Y, Wen S, et al. CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(10): 3967-3972.
6. Leffers N, Gooden MJ, de Jong RA, et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2009, 58(3): 449-459.
7. Morris M, Platell C, Iacopetta B. Tumor-infiltrating lymphocytes and perforation in colon cancer predict positive response to 5-fluorouracil chemotherapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(5): 1413-1417.
8. Yasuda K, Nirei T, Sunami E, et al. Density of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes in biopsy samples can be a predictor of pathological response to chemoradiotherapy (CRT) for rectal cancer[J]. *Radiat Oncol*, 2011, 6: 49.
9. Park JW, Lim SB, Kim DY, et al. Carcinoembryonic antigen as a predictor of pathologic response and a prognostic factor in locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiotherapy and surgery[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2009, 74(3): 810-817.
10. Mosier DE, Gulizia RJ, Baird SM, et al. Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency[J]. *Nature*, 1988, 335(6187): 256-259.
11. Hesselton RM, Greiner DL, Mordes JP, et al. High levels of human peripheral blood mononuclear cell engraftment and enhanced susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection in NOD/LtSz-scid/scid mice[J]. *J Infect Dis*, 1995, 172(4): 974-982.
12. Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL. Humanized mice in translational biomedical research[J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(2): 118-130.
13. Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice[J]. *J Immunol*, 1995, 154(1): 180-191.
14. Strober S. Protective conditioning against GVHD and graft rejection after combined organ and hematopoietic cell transplantation[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2008, 40(1): 48-54.
15. Goker H, Haznedaroglu IC, Chao NJ. Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management[J]. *Exp Hematol*, 2001, 29(3): 259-277.
16. Li HL, Xie SM, Zhang L, et al. Establishment and characterization of a new drug surviving cell line Am1010, derived directly from muscle metastases of a human lung adenocarcinoma patient with multi-drug-resistance to cisplatin, taxol, and gefitinib[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(5): 601-608.
17. Boon T, Coulie PG, Van den Eynde B. Tumor antigens recognized by T cells[J]. *Immunol Today*, 1997, 18(6): 267-268.
18. Koomägi R, Volm M. Expression of Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand in lung cancer, its prognostic and predictive relevance[J]. *Int J Cancer*, 1999, 84(3): 239-243.

19. Mocellin S, Wang E, Marincola FM. Cytokines and immune response in the tumor microenvironment[J]. *J Immunother*, 2001, 24(5): 392-407.
20. Mocellin S, Panelli MC, Wang E, et al. The dual role of IL-10[J]. *Trends Immunol*, 2003, 24(1): 36-43.
21. Cardi G, Mastrangelo MJ, Berd D. Depletion of T-cells with the CD4+CD45R+ phenotype in lymphocytes that infiltrate subcutaneous metastases of human melanoma[J]. *Cancer Res*, 1989, 49(23): 6562-6265.
22. Ward PL, Koepfen HK, Hurteau T, et al. Major histocompatibility complex class I and unique antigen expression by murine tumors that escaped from CD8+ T-cell-dependent surveillance[J]. *Cancer Res*, 1990, 50(13): 3851-3858.
23. Fearon ER, Pardoll DM, Itaya T, et al. Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response[J]. *Cell*, 1990, 60(3): 397-403.
24. Lin KY, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KE, et al. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen[J]. *Cancer Res*, 1996, 56(1): 21-26.
25. Rosenberg SA. A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens[J]. *Immunity*, 1999, 10(3): 281-287.
26. Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy[J]. *Nature*, 2001, 411(6835): 380-384.

本文引用: 刘君, 刘翔, 崔飞, 黄丽燕, 唐海玲, 李慧灵, 何建行. 人源化小鼠异位肺癌动物模型的构建 [J]. *临床与病理杂志*, 2014, 34(4): 364-370. DOI:10.11714/j.issn.2095-6959.2014.04.009

Cite this article as: LIU Jun, LIU Xiang, CUI Fei, HUANG Liyan, TANG Hailing, LI Huiling, HE Jianxing. Establishment of humanized lung cancer heterotopic mouse model[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2014, 34(4): 364-370. DOI:10.11714/j.issn.2095-6959.2014.04.009