



空军军医大学
Air Force Medical University

分类号 R730.4
U D C 616-006
密 级 公开

硕士学位论文

以 PSMA 为靶点的肿瘤分子影像诊断与免疫治疗初步研究

李 宇

培 养 类 别 全日制
学 位 类 型 专业学位
一级学科(专业类) 临床医学
二级学科(专业) 外科学(泌尿外)
研 究 方 向 泌尿系肿瘤的诊治
指 导 教 师 秦卫军 教授(主任医师)
培 养 单 位 西京医院泌尿外科

二〇一九年五月

目 录

缩略语表	1
中文摘要	4
ABSTRACT	7
前 言	11
文献回顾	13
正 文	23
第一部分 PSMA 在 6 种常见肿瘤组织中的表达情况	23
1 材料	24
1.1 肿瘤组织病理标本	24
1.2 主要试剂	24
1.3 主要仪器	24
1.4 其他材料	25
1.5 主要试剂配制	25
2 方法	25
2.1 患者病理标本收集	25
2.2 免疫组织化学染色	25
2.3 染色结果分析	26
3 结果	27
3.1 PSMA 在 6 种常见肿瘤组织中的表达情况	27
4 讨论	28
第二部分 以 PSMA 为靶点的小分子核素 PET/CT 显像对前列腺癌诊断效能的分析研究	30
1 材料	32
2 方法	32
2.1 患者一般资料	32
2.2 病理组织获取与分析	33
2.3 ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT 显像	33
2.4 多参数 MRI 扫描技术	34

2.5 图像分析	34
2.6 统计学分析	34
3 结果	35
3.1 患者一般资料	35
3.2 多参数 MRI 检查与 ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT 检查诊断效能的比较	36
3.3 SUVmax 值与临床参数之间的关系	38
4 讨论	41
第三部分 以 PSMA 为靶点的 PDTX 前列腺癌模型免疫治疗初步研究	45
1 材料	45
1.1 实验试剂和器材	45
1.2 主要试剂配制	46
1.3 肿瘤组织来源	46
1.4 实验动物	46
2 方法	46
2.1 收集 P0 代肿瘤组织	46
2.2 临床资料整理	47
2.3 建立前列腺癌 PDTX 模型 P1 代	47
2.4 建立泌尿系肿瘤 PDTX 模型 P2 代	47
2.5 瘤体的固定和冻存	47
2.6 PDTX 模型的肿瘤组织形态学检测	48
2.7 PDTX 模型的肿瘤组织溯源性 STR 检测	48
2.8 PDTX 模型的肿瘤组织 PSMA 抗原表达检测	49
2.9 基于 PDTX 前列腺癌模型体内实验检测 PSMAb 对 PSMA 阳性肿瘤生长的抑制	49
2.10 统计学分析	49
3 结果	50
3.1 前列腺癌 PDTX 模型的鉴定及成瘤率分析	50
3.2 前列腺癌 PDTX 模型建成情况比较	51
3.3 膀胱尿路上皮癌 PDTX 模型的鉴定及成瘤率分析	52
3.4 前列腺癌及膀胱尿路上皮癌 PDTX 模型生长情况	53
3.5 前列腺癌和膀胱尿路上皮癌 PDTX 模型 PSMA 抗原表达情况	54

3.6 PSMAb 抗体对 PSMA 阳性前列腺癌 PDX 模型肿瘤生长的抑制作用 ···	55
4 讨论 ·····	56
小 结 ·····	58
参考文献 ·····	59
个人简历和研究成果 ·····	66
致 谢 ·····	68

缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
ADT	Androgen deprivation therapy	雄激素剥夺治疗
AJCC	American Joint Committee on Cancer Staging	美国癌症分期联合委员会
AUC	Area under the ROC curve	曲线下面积
BC	Bladder cancer	膀胱癌
CFB	cognitive fusion biopsy	认知融合传穿刺
CRPC	Castration resistant prostate cancer	去势抵抗性前列腺癌
CTLA4	cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4	细胞毒 T 细胞相关抗原 4
DAB	Diaminobenzidine	二氨基联苯胺
DCE	Dynamic Contrast Enhanced	动态增强
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核苷酸
DRE	digital rectal exam	直肠指检
DWI	diffusion weighted imaging	扩散加权成像
EBRT	External beam radiotherapy	主要外照射放疗
EGFR	epidermal growth factor receptor	上皮生长因子受体
ERSPC	European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer	欧洲随机研究筛查前列腺癌试验
FDA	Food and Drug Administration	美国食品药品监督管理局

缩略词	英文全称	中文全称
FOLH-1	Folate hydrolase-1	叶酸水解酶-1
h	hour	小时
ISUP	International Society of Urological Pathology	国际泌尿病理协会
LDR	Low-Dose Rate	低剂量率
MIBC	Muscle-invasive bladder cancer	肌层浸润性膀胱癌
min	minute	分
mpMRI	multiparametric magnetic resonance imaging	多参数核磁共振
NCCN	National Comprehensive Cancer Network	美国国立综合癌症网络
NMIBC	Non muscle-invasive bladder cancer	非肌层浸润性膀胱癌
NOD	non-obese diabetes	非肥胖糖尿病
OS	Overall survival	总体存活率
PBS	Phosphate buffer solution	磷酸缓冲盐溶液
PCa	Prostate cancer	前列腺癌
PCPT	Prostate Cancer Prevention Trial	前列腺癌预防试验
PD-1	programmed cell death protein 1	程序性死亡受体 1
PD-L1	Programmed cell death 1 ligand 1	细胞程式死亡配体 1
PDTX	Patient Derived Tumor Xenograft	人类肿瘤异种移植模型
PLCO	The Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian	前列腺癌，肺癌，结肠直肠癌和卵巢癌
PLND	Pelvic lymph node dissection	盆腔淋巴结切除术
PSA	Prostate specific antigen	前列腺特异性抗原
PSMA	Prostate specific membrane antigen	前列腺特异性膜抗原

缩略词	英文全称	中文全称
RALRP	Robot assisted laparoscopic radical prostatectomy	机器人辅助腹腔镜前列腺根治性切除术
ROC	receiver operating characteristic curve	受试者工作特征曲线
RP	Radical prostatectomy	前列腺根治性切除术
s	second	秒
SCID	severe combined immun deficiency	重症联合免疫缺陷
SEER	Surveillance Epidemiology and End Results	流行病监测与最终治疗结果
SPF	Specific Pathogen Free	无特定病原体
SUVmax	Maximum Standardized Uptake Value	最大摄取值
tPSA	Total prostate specific antigen	总前列腺特异性抗原
TRUBT	Transurethral resection of bladder tumor	经尿道膀胱肿瘤电切术
UICC	Union for International Cancer Control	国际抗癌联盟
VEGF	vascular endothelial growth factor	血管内皮生长因子

以 PSMA 为靶点的肿瘤分子影像诊断与免疫治疗 初步研究

硕士研究生：李 宇

导 师：秦卫军 教授

辅 导 教 师：温伟红 副教授

康 飞 讲师

空军军医大学西京医院泌尿外科，西安 710032

资助基金项目：国家自然科学基金（81772734）

中文摘要

研究目的

1. 探究 PSMA 在 6 种常见肿瘤组织中的表达情况；
2. 分析研究以 PSMA 为靶点的小分子核素 PET/CT 显像检查对前列腺癌的诊断效能；
3. 分别建立膀胱尿路上皮癌和前列腺癌的 PDTX 模型，并基于两种肿瘤模型完成以 PSMA 为靶点的免疫治疗的初步研究。

研究方法

1. 随机选取 2016 年 3 月至 2017 年 3 月西京医院确诊为 6 种常见肿瘤的病理组织切片共 145 例，分别为乳腺癌 24 例，卵巢癌 25 例，肝细胞癌 25 例，肾透明细胞癌 26 例，膀胱尿路上皮癌 23 例，前列腺癌 22 例，分别以免疫组化方法初步分析 PSMA 在各肿瘤组织上的表达情况。
2. 回顾性分析 2017 年 6 月至 2018 年 7 月西京医院 93 例同期行 ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT 及 mpMRI 检查的疑诊前列腺癌患者的临床资料，分析该 93 例患者 ^{68}Ga -

PSMA-617 PET/CT 与多参数 MRI 对初诊前列腺癌原发灶诊断效能, 评估良恶性前列腺组织中放射性 PSMA 配体最大标准摄取值 SUV_{max} (Maximum Standardized Uptake Value) 的差异, 同时分析前列腺癌组织 SUV_{max} 与肿瘤分级的相关性。

3. 分别收集 2017 年 1 月至 2019 年 1 月共 55 例前列腺癌术后标本及 2017 年 6 月至 2018 年 11 月共 16 例膀胱尿路上皮癌术后标本, 建立前列腺癌和膀胱尿路上皮癌 PDTX 模型, 分析成瘤率与各标本临床病理特征之间的相关性。分别将两种肿瘤建成的 PDTX 模型 P1 代组织切片进行免疫组化染色分析 PSMA 表达情况。利用 PSMA 表达阳性的前列腺癌 PDTX 模型进行 PSMA_{Ab} 抗体免疫治疗研究。

研究结果

1. 6 种常见肿瘤的病理组织切片共 145 例, PSMA 表达阳性率分别为乳腺癌 37.5%, 卵巢癌 4.0%, 肝细胞癌 72.0%, 肾透明细胞癌 0, 膀胱尿路上皮癌 69.6%, 前列腺癌 100%。在 5 种有阳性表达的肿瘤组织中, 除前列腺癌外, 余 4 种肿瘤组织 PSMA 均表达于肿瘤血管, 前列腺癌肿瘤细胞和血管均有 PSMA 表达。
2. 在入组的 93 例前列腺癌病例中, 以病理结果为诊断金标准, 确诊前列腺癌 56 例, 非前列腺癌 37 例。多参数 MRI 检查的敏感度 87.50%, 特异度 56.70%, 阳性预测值 75.38%, 阴性预测值 75.00%; ⁶⁸Ga-PSMA-617 PET/CT 检查的敏感度 92.80%, 特异度 83.78%, 阳性预测值 89.60%, 阴性预测值 88.50%。以 SUV_{max} 值及 PI-RADS 评分作为 ⁶⁸Ga-PSMA-617 PET/CT 检查和多参数 MRI 检查的诊断参数, 绘制 ROC 曲线, 并确定最佳临界点, SUV_{max} 值的曲线下面积 AUC₁=0.928, PI-RADS 评分曲线下面积 AUC₂=0.816, $p=0.028$, 并确定 SUV_{max}=4.795 为最佳临界点。93 例入组疑似前列腺患者中, 血清总 PSA<20 ng/ml 共 67 例。有显著意义的前列腺癌共 30 例, 非显著意义的前列腺癌患者及阴性病例共 37 例。分别以 SUV_{max} 值及 PI-RADS 评分作为诊断参数绘制 ROC 曲线, 并确定最佳临界点, SUV_{max} 值的曲线下面积 AUC₁=0.909, PI-RADS 评分曲线下面积 AUC₂=0.695, $p=0.003$ 。并确定 SUV_{max}=5.05 为最佳临界点。93 例入组疑似前列腺癌患者中, 不同血清总 PSA 值患者 SUV_{max} 值的差异有统计学意义, 且 PSA 值与 SUV_{max} 呈正相关, 良性前列腺组织的 SUV_{max} 值低于前列腺癌组织的 SUV_{max} 值, 差异有统计学意义。56 例确诊前列腺癌患者中, 不同 Gleason 评分和 ISUP 分级分

组的前列腺癌组织的 SUV_{max} 值之间差异有统计学意义, 且 Gleason 评分、ISUP 分级分组与 SUV_{max} 值呈正相关。

3. 本研究分别于 2017 年 1 月至 2019 年 1 月和 2017 年 6 月至 2018 年 11 月, 共收集 55 例前列腺癌标本和 16 例膀胱尿路上皮癌标本, 截至 2019 年 3 月 1 日共建成 P1 代前列腺癌 PDTX 模型 14 例和膀胱尿路上皮癌 PDTX 模型 8 例。总成瘤率分别为 25.45%和 50.00%, HE 染色形态学检测和 STR 检测鉴定该建成的模型均为各自 P0 代同源肿瘤。分别分析两种肿瘤患者的临床病理参数发现, 对于前列腺癌, Gleason 评分 8-10 分组的成瘤率为 37.50%, 6-7 分组成瘤率为 8.70%, 差异有统计学意义 ($P=0.016$), 而对于膀胱尿路上皮癌, Ki-67 增值指数 $<50\%$ 分组的成瘤率为 22.22%, $\geq 50\%$ 分组成瘤率为 85.71%, 差异有统计学意义 ($P=0.041$)。将 14 例 PDTX 前列腺癌模型和 8 例膀胱尿路上皮癌模型 P1 代组织切片分别进行免疫组化染色分析 PSMA 表达情况。前列腺癌 PDTX 模型 13 例阳性表达 (8 例强阳性, 5 例弱阳性), 均在肿瘤细胞膜表达, 1 例阴性表达, 8 例膀胱尿路上皮癌 PDTX 模型均为阴性表达。利用 PSMA 表达阳性的前列腺癌 PDTX 模型进行 PSMAb 抗体免疫治疗研究。经过 8 次给药并停药观察 11 天后, 根据肿瘤生长曲线, 两组 PSMAb 治疗组的肿瘤体积明显小于 IgG 阴性对照组。以上结果说明, PSMAb 能够在体内抑制 PSMA 阳性前列腺癌的生长。

研究结论

1. PSMA 在前列腺癌的肿瘤细胞包膜和肿瘤血管均有阳性表达, 而对于乳腺癌、卵巢癌、肝细胞癌和膀胱尿路上皮癌, 只在肿瘤血管上有阳性表达。
2. 以 PSMA 为靶点的 ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT 显像检查对前列腺癌的诊断效能的特异度方面可能更优于多参数 MRI。PSA 值、Gleason 评分和 ISUP 分级分组与 SUV_{max} 值呈正相关关系, SUV_{max} 值可以作为有意义的参考指标诊断有临床意义的前列腺癌从而避免过度诊断。
3. PSMAb 抗体对 PSMA 表达阳性的前列腺癌 PDTX 模型有一定抑制作用, 提示 PSMA 可作为前列腺癌免疫治疗的有效靶点。

关键词: 前列腺特异性膜抗原; 膀胱尿路上皮癌; 前列腺癌; 正电子发射断层显像术; 同位素标记; 肿瘤靶向治疗

Preliminary study on molecular imaging diagnosis and immunotherapy of tumors targeting PSMA

Candidate for master: Li Yu

Supervisor: Qin Weijun

Tutor: Wen Weihong

Kang fei

Department of Urology, Xijing hospital, Air Force Medical University,

Xi'an 710032, China

Sponsored Programs: National natural science foundation of China (No. 81772734)

Abstract

Objectives

1. To explore the expression of PSMA in 6 common tumor tissues;
2. To analyze the diagnostic efficacy of small molecule radionuclide PET/CT imaging targeting PSMA for prostate cancer;
3. To establish PDTX models of bladder urothelial carcinoma and prostate cancer, respectively, and to complete a preliminary study of PSMA-targeted immunotherapy based on the two tumor models.

Methods

1. A total of 145 pathological sections of 6 common kind of tumors diagnosed by the hospital from March 2016 to March 2017 were randomly selected, including 24 cases of breast cancer, 25 cases of ovarian cancer, 25 cases of hepatocellular carcinoma, 26 cases of

renal clear cell carcinoma, 23 cases of bladder urothelial carcinoma and 22 cases of prostate cancer were analyzed by immunohistochemical method for the expression of PSMA protein on each tumor tissue.

2. We have made a retrospective analysis of clinical data of 93 patients with suspected prostate cancer who underwent ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT and mpMRI examination from June 2017 to July 2018 in the Hospital. The 93 patients were analyzed for ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT and mpMRI for the diagnosis of primary prostate cancer, with evaluation of the difference in the SUVmax value of radioactive PSMA ligand in the benign and malignant prostate tissue.

3. A total of 55 specimens of prostate cancer from January 2017 to January 2019 and 16 specimens of bladder urothelial carcinoma from June 2017 to November 2018 were collected to establish the PDX models which were used to analyze the correlation between the tumor formation rate and the clinicopathological information of each specimen. The P1 generation tissue sections of the PDX model of the two tumors were separately analyzed by immunohistochemical staining for PSMA expression. PSMA antibody immunotherapy was performed in the prostate cancer PDX model with positive PSMA expression.

Results

1. There were 145 cases of pathological tissue sections of 6 common kind of tumors. The positive rates of PSMA expression were 37.5% for breast cancer, 4.0% for ovarian cancer, 72.0% for hepatocellular carcinoma, 0 for renal clear cell carcinoma, and 69.6% for bladder urothelial carcinoma. Prostate cancer is 100%. Among the 5 tumor tissues with positive PSMA expression, except for prostate cancer, PSMA expression in the remaining 4 tumor tissues was correlated with tumor blood vessels, while PSMA expressed in both prostate cancer cells and tumor blood vessels.

2. Among the 93 cases of prostate cancer enrolled, pathological results were used as the diagnostic golden standard, 56 cases of prostate cancer and 37 cases of non-prostate cancer were diagnosed. The sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value of mpMRI were 87.50%, 56.70%, 75.38%, and 75.00%, respectively; the sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value of ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT

examination were 92.80%, 83.78%, 89.60%, and 88.50%. The SUVmax and the PI-RADS score were used as the diagnostic parameters of the ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT examination and the multi-parameter MRI examination. The ROC curves were drawn and the optimal critical points were determined. The area under the curve of the SUVmax value was $\text{AUC}_1=0.928$. The area under the PI-RADS score curve was $\text{AUC}_2=0.816$, $p=0.028$, and $\text{SUVmax}=4.795$ was determined to be the optimal critical point. Of the 93 patients with suspected prostate, 67 had total serum PSA <20 ng/ml. There were 30 significant cases of prostate cancer, 37 cases of non-significant prostate cancer and negative cases. The ROC curves were plotted with the SUVmax value and the PI-RADS score as diagnostic parameters, and the optimal critical point of SUVmax was determined. The area under the curve of the SUVmax value was $\text{AUC}_1=0.909$, and the area under the PI-RADS score curve was $\text{AUC}_2=0.695$, $p=0.003$. We determined $\text{SUVmax}=5.05$ as the best critical point. Among the 93 patients with suspected prostate cancer, the difference in SUVmax value of patients with different serum total PSA values was statistically significant, and the PSA value was positively correlated with SUVmax. The SUVmax value of benign prostate tissue was lower than that of prostate cancer tissue, with a statistical significance. Among the 56 patients with prostate cancer, the difference in the SUVmax values of prostate cancer with different Gleason scores and ISUP classification groups was statistically significant, and the Gleason score and ISUP classification group were positively correlated with SUVmax values.

3. From January 2017 to January 2019 and from June 2017 to November 2018, a total of 55 specimens of prostate cancer and 16 specimens of bladder urothelial carcinoma were collected respectively. Till March 1, 2019, a total of 14 cases of P1 prostate cancer PDTX models and 8 cases of bladder urothelial carcinoma PDTX models were established. The total tumor formation rate was 25.45% and 50.00%, respectively. The HE staining morphology and STR detection were performed to identify the established models as their P0 homologous tumors. The clinical pathological parameters of the two tumor patients were analyzed. For prostate cancer, the tumor formation rate of Gleason score 8-10 was 37.50%, and the tumor formation rate of 6-7 was 8.70% and the difference was statistically significant ($P=0.016$). For bladder urothelial carcinoma, the tumor formation rate of the Ki-

67 value-added index <50% group was 22.22%, and the $\geq 50\%$ group tumor rate was 85.71%, and the difference was statistically significant ($P=0.041$). PSMA expression was analyzed by immunohistochemical staining in 14 cases of PDTX prostate cancer model and 8 cases of bladder urothelial carcinoma model. 13 cases of prostate cancer PDTX model had positive expression (8 cases were strongly positive, 5 cases were weakly positive), and 1 case was negative. 8 cases of bladder urothelial carcinoma were negatively expressed in PDTX models. PSMAb antibody immunotherapy was performed in a prostate cancer PDTX model with positive PSMA expression. After 8 days of administration and 11 days of drug withdrawal, the tumor volume of the PSMAb-treated group was significantly smaller than that of the IgG-negative control group according to the tumor growth curve. The above results indicated that PSMAb might be able to inhibit the growth of PSMA-positive prostate cancer in vivo.

Conclusions

1. PSMA was positively expressed in the cell envelope and tumor blood vessels of prostate cancer, but it was only positively expressed in tumor neovascularization for breast cancer, ovarian cancer, hepatocellular carcinoma and bladder urothelial carcinoma.

2. The PSMA-targeted ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT imaging test might be superior to mpMRI in the diagnosis performance, especially in the specificity of prostate cancer. The PSA value, Gleason score and ISUP classification group were positively correlated with SUVmax value, and the SUVmax value was able to be used as a meaningful reference index to diagnose clinically significant prostate cancer to avoid overdiagnosis.

3. PSMAb antibody had a certain inhibitory effect on PSMA expression of positive prostate cancer PDTX model, suggesting that PSMA might be used as an effective target for prostate cancer immunotherapy.

Key words : Prostate-specific membrane antigen; bladder urothelial carcinoma; prostate cancer; positron emission tomography; isotope labeling; tumor targeted therapy

前 言

前列腺特异性膜抗原（PSMA）在正常前列腺组织以及其他正常组织中如小肠细胞，近端肾管和唾液腺有低表达，但在前列腺癌细胞膜上表达显著上调约 1000 倍，这种前列腺癌特异性表达上调特点使 PSMA 成为一种理想的诊疗靶点。近年的研究发现 PSMA 还在许多非前列腺癌实体恶性肿瘤的血管内皮细胞上表达上调。这为肿瘤研究尤其是肿瘤免疫治疗方面提供了新思路。

膀胱癌（Bladder cancer）是最常见的泌尿系统恶性肿瘤之一，是全球第十大常见肿瘤，90%以上的膀胱癌病理类型为尿路上皮癌。近 30 年来，传统膀胱癌治疗方法仍然为临床上最为常用的治疗手段，并无太多实质进展。这些有限的治疗手段尤其对于高级别或肌层浸润性膀胱癌的高复发率和低存活率的改善并不理想。因此需要新的膀胱癌诊疗方法来解决这一问题。找到合适的生物标志物用于早期检测，预后评估并进行具有较少副作用的靶向治疗是一个新的研究方向。

前列腺癌（Prostate cancer, PCa）是男性中第二大流行的恶性肿瘤，也是全球癌症死亡的第五大原因。前列腺癌的发病率在 2018 年美国男性中排名第一，其在我国男性中的发病率也明显上升，增速更是位居第一。根据流行病监测与最终治疗结果（Surveillance Epidemiology and End Results, SEER）数据库的结果显示，局限性前列腺癌的 5 年生存率可达 100%，而出现转移病灶尤其是远处转移时，生存率降至 34%。因此，前列腺癌的早期诊断对获得有效治疗和提高生存率至关重要。目前，临床上有很多方法应用于前列腺癌的早期诊断。前列腺特异性抗原（Prostate specific antigen, PSA）筛查，前列腺直肠指检（digital rectal exam, DRE）等作为早期筛查的主要手段，其较低的诊断效能并不能满足精确诊断的要求，而多参数核磁共振（multiparametric magnetic resonance imaging, mpMRI）检查作为目前临床诊断前列腺癌最常用的影像学手段，尽管在灵敏度方面有所提高，但仍受限于其较低的特异度而导致过度诊断。而具有核素标记的 PSMA 探针的 PET/CT 显像技术有可能克服以上限制并提高诊断效能。

本课题组前期从酵母展示 scFv 抗体库中筛选获得一株抗 PSMA 的单链抗体，后将其轻、重链可变区基因分别于对应的轻、重链恒定区基因拼接，从而得到完整的 PSMAb 抗体。可将此抗体用于 PSMA 表达阳性的肿瘤 PDTX 模型的治疗，并观察其抑制瘤效应，从而完成对靶向 PSMA 免疫治疗的初步探究。

文献回顾

1. PSMA 的研究现况

前列腺特异性膜抗原（prostate-specific membrane antigen, PSMA）又称叶酸水解酶-1（Folate hydrolase-1, FOLH-1），是一种前列腺癌相关抗原，因其较高的前列腺癌特异性及细胞膜结合特性，近年来越来越受到关注，同时其在肿瘤早期诊断，免疫显像、免疫治疗及评价预后等方面具有良好的应用前景。

1.1 PSMA 的分子结构

PSMA 由 Horoszewicz 等^[1]在来自雄激素依赖性前列腺癌细胞系 LNCaP 的膜提取物中鉴定的一种Ⅱ型跨膜糖蛋白，其相对分子量大小约 100000，共含 750 个氨基酸，其中包括 707 个胞外段，24 个跨膜段和 19 个胞内段。其胞内段和胞外段含有多 个抗原表位，可以结合多种抗体。人类 PSMA 基因长 62035 bp，定位于染色体 11 P， 包括 19 个外显子和 18 个内含子，cDNA 全长 2.65 kb。PSMA 的分子结构与人转铁 蛋白相类似，有较高的同源性，同时 PSMA 的胞外结构域还含有双核 Zn^{2+} 位点、催 化残基以及与底物相结合的精氨酸片段。PSMA 以二聚体形式存在时具有蛋白酶活 性，且二聚体形式可稳定维持其空间构型。

1.2 PSMA 的分布

在人体中，PSMA 由前列腺腺上皮细胞分泌，除在正常前列腺组织中有低表达 外，在其他正常组织中如小肠细胞，近端肾管和唾液腺也有低表达^[2]。而 PSMA 在前 列腺癌细胞膜上表达显著上调约 1000 倍，并且其表达程度随着前列腺癌的病理级别 逐渐增加，并与激素难治性和转移性前列腺癌相关^[3,4]。近年的研究发现 PSMA 还在 许多非前列腺癌实体恶性肿瘤的血管内皮细胞上表达上调。这些肿瘤主要包括乳腺 癌、卵巢癌、非小细胞肺癌，甲状腺癌和胰腺癌等，但在正常血管内皮细胞中不表达 ^[5-9]。

1.3 PSMA 的功能

PSMA 是一种多功能蛋白，其不仅具有多种蛋白酶活性并参与营养物质的摄取，

还通过内化作用参与了跨膜信号转导,同时因其与人的转铁蛋白同源,故还可能参与了肿瘤的增殖与转移。在中枢神经系统,参与脑神经递质 N-乙酰天冬氨酸谷氨酸的代谢,在近端小肠,参与水解多聚 γ 谷氨酸叶酸盐。两种代谢产物均为谷氨酸,从而参与机体的新陈代谢。被水解下来的谷氨酸与前列腺癌细胞膜表面的受体相结合,调节细胞 Ca^{2+} 和 K^{+} 通道的功能。与抗体结合后的 PSMA 可通过网格蛋白包被的凹坑内化以及随后内吞作用,使结合分子有效转运到细胞中^[10]。

2. 前列腺癌的研究现状

前列腺癌 (Prostate Cancer, PCa) 是男性中第二大流行的恶性肿瘤,也是全球癌症死亡的第五大原因^[11]。美国男性前列腺癌的发病率在 2018 年排名第一,死亡率排名第二,仅次于肺癌^[12]。近年来,随着我国经济水平的提高,人民生活方式的改变、寿命的延长及医疗保健和诊疗水平的提高,尤其是血清前列腺特异性抗原 (Prostate specific antigen, PSA) 筛查的逐渐普及,我国男性的前列腺癌增长率和发病率也显著上升,主要发生在 50 岁以上的男性,成为泌尿肿瘤里面最不可忽视的病人群体^[13]。

2.1 前列腺癌的诊断

早期前列腺癌多数患者无明显症状,有些患者出现排尿困难,尿路刺激症状,多为伴发的前列腺增生症状。临床上发现早期前列腺癌主要依靠血 PSA 的检查,血 PSA 升高则提示前列腺癌的可能性。PSA 作为丝氨酸蛋白酶是具有前列腺癌特异性的一种肿瘤标记物,由前列腺的腺上皮组织分泌。正常情况下,富含 PSA 主要富集于前列腺腺泡内,其与淋巴系统之间有屏障相隔可,该屏障主要由前列腺的基底膜、基底细胞层和内皮层所构成。当前列腺癌破坏该屏障时,PSA 等腺泡内容物就会漏入淋巴系统从而进入机体的血液循环中,进而造成外周血 PSA 水平升高的结果。临床上作为标准筛选前列腺癌的 PSA 正常范围为 0-4 g/ml,其敏感性 78.7%,特异性 59.2%,假阳性率为 25%,假阳性率为 38%-48%。前列腺直肠指诊同样是早期诊断前列腺癌的重要方法之一,以了解前列腺有无硬结,质硬的区域和范围,并评估肿瘤是否累及前列腺周围组织结构,如直肠、骨盆等,是前列腺癌临床分期的重要依据。

在影像学方面,临床上最常用的检查手段为多参数盆腔前列腺核磁共振 (multiparametric magnetic resonance imaging, mpMRI),以了解前列腺局部肿瘤,是否有淋巴结转移,骨盆是否有转移。因前列腺癌转移部位以骨骼最为常见,尤其是中轴骨,因此需要采用骨扫描检查以了解骨转移的可能性。前列腺癌的临床分期采用

TNM 分期，局部 T 和 N 分期需要结合 DRE 和 MRI，远处转移尤其是骨转移还要结合骨扫描检查的结果。

目前确诊前列腺癌的主要方法是经直肠超声引导下直肠前列腺穿刺活检术（Transrectal ultrasound biopsy, TRUSB）。目前多采用前列腺系统活检联合病变活检的方法以提高前列腺诊断的阳性率，以穿刺活检的组织病理结果作为诊断前列腺癌的金标准。目前病理学专家采用 Gleason 系统来进行前列腺癌病理分级。它以肿瘤腺体的分化程度及腺体基质的生长方式为依据。它主要将原发病变区和次要病变区分别分为 1-5 级，按照分化程度由高到低依次排序定级。主要分级和次要分级两者相加总和即为组织学评分，其中 8-10 分为低分化，7 分为中分化，6 分及以下为高分化。肿瘤恶性程度越高其评分也越高，预后越差。2014 年，国际泌尿病理协会（International Society of Urological Pathology, ISUP）将前列腺癌病理分级修订为 5 个等级。在这个新的病理评级框架之中主要有三个方面的改变。首先，它通过将 Gleason 评分为 3+3 分的肿瘤指定为 1 级从而重新校准评分量表。其次，它通过区分 3+4 分（2 级）和 4+3 分（3 级），以及 4+4 分、3+5 分和 5+3 分（4 级）之间更准确地匹配肿瘤病理分型。第三，Gleason 得分为 4+5 分、5+4 分和 5+5 分定为 5 级。这种新的分级系统被纳入 2016 年世界卫生组织的肿瘤分类，作为病理学的国际标准，即 ISUP 分级分组^[14, 15]。

2.2 前列腺癌的治疗

根据美国国立综合癌症网络（National Comprehensive Cancer Network, NCCN）2018 第四版前列腺癌指南^[16]，关于前列腺癌的治疗原则主要包括以下几个方面：

2.2.1 动态监测和观察原则

动态监测即对疾病进程进行主动的复查与管理，至少每 6 个月监测 1 次，并且包括监测性的前列腺活检，以便在癌症进展初期能及时采取根治性的干预措施。对于预期寿命远小于 20 年且为极低风险前列腺癌的患者，动态监测方法为首选。对于低风险前列腺癌以及预期寿命小于 10 年的患者，首选观察方法。预后良好的中度风险前列腺癌患者（即 Gleason 评分 3+4=7，活检阳性针数百分比<50%，有≤1 个 NCCN 中度风险因素）也可考虑动态监测^[16]。

2.2.2 手术治疗原则

手术治疗首选前列腺根治性切除术（Radical prostatectomy, RP）。其适应症为：

1) 临床局限性前列腺癌; 2) 预期寿命 ≥ 10 年; 3) 无手术禁忌症。机器人辅助腹腔镜前列腺根治性切除术 (Robot-assisted laparoscopic radical prostatectomy, RALRP)是目前最常用的手术方法。选用此种方法手术可避免出现大量失血, 并且可以进一步保留控尿功能, 从而减少尿失禁等并发症。术后勃起功能的恢复与手术时年龄、术前勃起功能、以及海绵体神经的保留程度直接相关^[16]。

可根据患者的局部情况选择是否行盆腔淋巴结切除术 (Pelvic lymph node dissection, PLND)。扩大 PLND 不仅能够增加发现肿瘤转移的可能性且有助于更加精准的确定肿瘤分期^[3], 并治愈微小的转移病变, 因此要首选扩大 PLND。PLND 可安全地采用开放手术、腹腔镜、或机器人技术来完成, 目前仍首选机器人辅助手术方法。

2.2.3 雄激素剥夺治疗 (Androgen deprivation therapy, ADT) 原则

可用于临床局限性前列腺癌。应用原则: 1) 强烈反对在临床试验外用新辅助 ADT 来替代 RP; 2) ADT 不应作为单一疗法用于临床局限性前列腺癌; 3) 为延长放疗患者的生存期, 可在放疗前后实施 ADT 治疗; 4) 采用完全雄激素阻断方法作为新辅助 ADT 的治疗方案^[16]。

可用于生化复发但无转移的前列腺癌。对于癌症证据仅为 PSA 水平升高的患者, 其使用 ADT 的时机受到 PSA 变化速度、患者焦虑程度、ADT 的短期和长期副作用以及患者潜在并发症的影响。对于 PSA 快速增加但预期寿命较长的患者, 应当鼓励其尽早接受 ADT 治疗。PSA 倍增时间较长 (>12 个月) 和年龄较大的患者则适合进行观察^[16]。

可用于转移性前列腺癌。ADT 治疗是转移性前列腺癌患者优选治疗方案, 治疗方案首选间歇性 ADT 方法, 并密切监测 PSA 和睾酮水平以及进行影像学检查, 若果患者出现疾病进展征兆时则立即转为连续性 ADT 治疗^[16]。

2.2.4 二线激素治疗

旁分泌或自分泌的雄激素合成与雄激素受体激活是前列腺癌在 ADT 治疗期间复发进展为去势抵抗性前列腺癌 (Castration resistant prostate cancer, CRPC) 的重要潜在机制, 因此应将睾酮维持在去势水平。治疗原则: 1) 对于未接受过多西他赛治疗的 CRPC 患者, 可给予二线激素治疗, 包括加用或改用不同的抗雄激素 (氟他胺、比卡鲁胺、恩杂鲁胺等), 并加用雄激素合成抑制剂 (阿比特龙和酮康唑等), 或考虑使用

雌激素。2) 对于已接受多西他赛治疗的 CRPC 患者, 恩杂鲁胺或阿比特龙+强的松为 1 类推荐^[16]。

2.2.5 放射性治疗

外照射放疗 (External beam radiotherapy, EBRT)。治疗原则: 1) 对于低风险的患者, 采用传统分割法照射前列腺及精囊; 2) 对于中等或高风险的患者, 可适当增加照射剂量; 3) 对于高风险和极高风险的患者可考虑予以盆腔淋巴结照射和 2-3 年的 ADT 治疗; 4) 对中度风险的前列腺癌患者可考虑给予盆腔淋巴结照射和 4-6 个月的 ADT 治疗; 5) 低风险癌症患者不应接受淋巴结照射或 ADT 治疗; 6) 为减少并发症, 应通过前列腺的定位检查以增强治疗的精确性^[16]。

近距离放疗。治疗原则: 1) 对于低风险和某些小体积中度风险患者, 采用近距离低剂量率 (Low-Dose Rate, LDR) 放疗; 2) 对于中度风险患者, 可采用 EBRT 结合 LDR 近距离放疗±ADT 治疗; 3) 对于高风险患者, 可采用 EBRT 结合近距离放疗±ADT 治疗^[16]。

前列腺根治性切除术后的放疗。对于具有不良病理类型且无肿瘤转移的患者, 可采用补救性或辅助性放疗。辅助性放疗通常在 RP 后 1 年内并且手术并发症已缓解或稳定时进行。辅助性放疗的指征包括: 1) pT₃ 期; 2) 切缘阳性; 3) Gleason 评分 8-10 分; 4) 精囊受累。其中, 切缘阳性的患者可能获益最大。补救性放疗的指征包括: 出现可检测的 PSA 水平并且在随后两次测定时 PSA 水平上升。当补救性放疗前 PSA 水平较低且 PSA 倍增时间较长时, 治疗更有效。辅助性或补救性放疗定义的靶区主要包括前列腺床, 在某些患者中也可包括整个盆腔^[16]。

2.2.6 化疗

转移性 CRPC 患者, 尤其是具有骨痛等临床症状的患者, 应继续接受全身系统性化疗。多西他赛被 FDA 批准用于转移性 CRPC 的治疗, 为 1 类推荐。标准方案是每三周一剂。对于有骨转移的 CRPC 患者, 可使用唑来膦酸防止因肿瘤转移造成的并发症, 包括脊髓压迫、骨折等^[16]。

3.膀胱癌的现况研究

膀胱癌 (Bladder cancer) 为原发于膀胱尿路上皮的恶性肿瘤, 多见于中老年人, 临床表现主要为无痛性肉眼血尿。膀胱癌的发病率和死亡率一直居高不下, 是全球十大常见癌症, 男性的发病率和死亡率分别为 9.6 和 3.2 / 100,000; 约为全球女性的

4 倍^[17]。在我国，男性病患人数约为女性的 3 倍，且恶性晚期的膀胱癌生存期仅以月计算。不同分期分级的膀胱癌患者生物学特征有明显差异。

3.1 临床表现及检查

膀胱癌患者最常表现的症状是镜下或肉眼血尿，但刺激性尿频或膀胱容量减低也会发生。比较少见的症状是尿路感染。上尿路梗阻或疼痛可发生在存在更晚期病灶的患者中。有这些症状表现的患者应接受影像学检查如腹部及盆腔的超声和 CT 扫描。若有异常患者推荐行膀胱镜评估以确定是否存在病灶，如果记录到病灶，患者应被安排进行经尿道膀胱肿瘤电切术(Transurethral resection of bladder tumor, TURBT)以确认诊断并查明膀胱内疾病的程度和范围。在膀胱镜检查同时还可进行尿细胞学检查。尿细胞学检查阳性可能表明有尿道任何位置的尿路上皮肿瘤。在存在细胞学阳性而膀胱镜检查正常的情形中，男性患者的上尿路和前列腺必须接受评估，且可考虑输尿管镜的检查。

3.2 病理组织学分型及分期

膀胱癌的病理类型主要包括尿路上皮癌，鳞癌，腺癌，小细胞癌，其中超过 90% 的病例类型为尿路上皮癌。超过 90% 的尿路上皮癌起源于膀胱，8% 起源肾盂，而剩下的 2% 起源于输尿管和尿道。尿路上皮癌按照细胞结构异常的程度定义分为低级别或高级别。高级别代表分化程度低，低级别代表分化程度高。膀胱癌好发部位分布在膀胱侧壁及后壁，三角区和顶部次之。

膀胱癌的分期是判断疾病预后的重要指标之一，分期的高低与预后的结果成反比。根据国际抗癌联盟(Union for International Cancer Control, UICC)，美国癌症分期联合委员会(American Joint Committee on Cancer Staging, AJCC)，膀胱癌采用 TNM 分期系统。非肌层浸润性膀胱癌(Non muscle-invasive bladder cancer, NMIBC)(T_{is}, T_a, T₁)和肌层浸润性膀胱癌(Muscle-invasive bladder cancer, MIBC)(T₂ 以上)是膀胱癌的主要组织学分型。原位癌虽然也属于非基层浸润性膀胱癌，但一般分化差，属于高度恶性的肿瘤，向肌层浸润进展的概率较高。膀胱癌分期如图 1 所示。

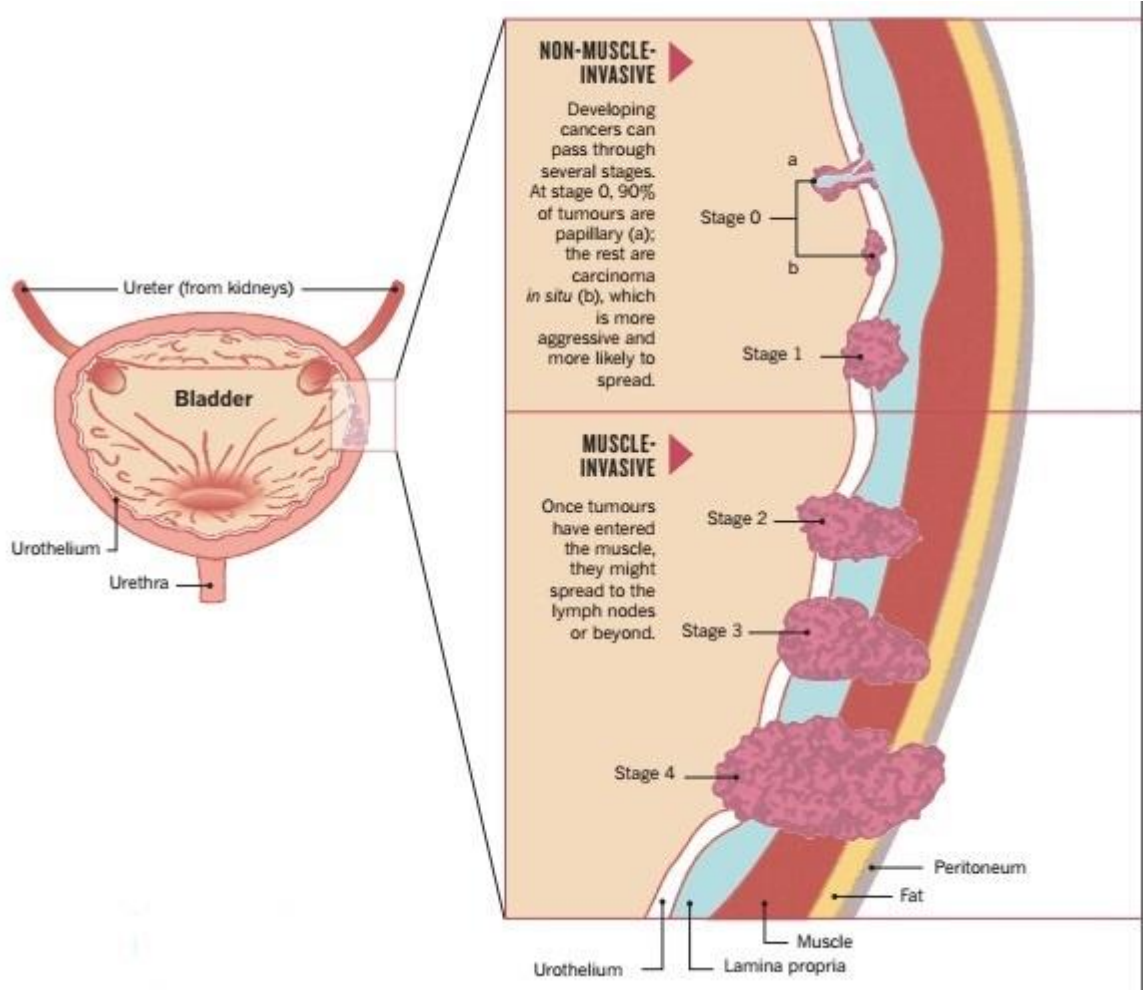


图 1. 膀胱癌分期示意图

3.3 膀胱癌的治疗

尿路上皮性膀胱癌的治疗原则：非肌层浸润性膀胱癌首次手术治疗多采取保留膀胱的经尿道膀胱肿瘤电切术，术后给予膀胱灌注治疗。膀胱灌注治疗无效的非基层浸润性膀胱尿路上皮癌（如肿瘤进展，肿瘤多次复发等）建议行根治性膀胱肿瘤切除术。高危非肌层浸润性膀胱癌患者立即行根治性膀胱切除术，可提高 5 年生存率。治疗肌层浸润性膀胱癌可采用根治性膀胱切除术+尿流改道术同时行盆腔淋巴结清扫术，术后辅以系统化疗。对于晚期且不具备手术指征的患者，可行姑息性膀胱切除术或全身系统化疗。

尿流改道术的常用方法：1）原位新膀胱术，多用一段回肠、乙状结肠制作成球形储尿囊作为代膀胱置入原膀胱部位。2）回肠通道术，取一段回肠做输出道，一段连接输尿管残端，一段作皮肤造口，尿液分流。3）输尿管皮肤造口术，输尿管皮肤造口术是一种简单、安全的术式。

膀胱灌注治疗包括膀胱灌注化疗和膀胱灌注免疫治疗。非肌层浸润性膀胱癌术后即刻进行膀胱灌注化疗，中高危非肌层浸润性膀胱癌还应当接受后续维持膀胱灌注化疗。术后 4-8 周，每周一次，之后维持每月一次，持续 6-12 个月。常用的灌注药物包括吡柔比星、表柔比星、吉西他滨、多柔比星以及丝裂霉素等。膀胱灌注免疫治疗通过膀胱内灌注免疫制剂，刺激局部免疫反应，控制肿瘤复发及进展。主要包括卡介苗（BCG）膀胱灌注治疗，其他还包括干扰素等。

尿路上皮癌细胞对于、吉西他滨、紫杉醇及铂类等化疗药物敏感，全身系统化疗作为重要的辅助治疗手段应用于肌层浸润性膀胱癌的膀胱根治术后，主要为新辅助及辅助化疗。新辅助化疗主要包括 MVAC 方案、GC 方案、CMV 方案和卡铂替代方案等。临床数据显示对于肌层浸润性膀胱癌患者新辅助化疗可以提高肿瘤完全反应率并延长患者的总体生存期。

4. 基于 PSMA 配体 PET/CT 显像诊断前列腺癌的研究现状

前列腺癌易发生局部侵犯、淋巴及骨转移，因此前列腺癌的早期诊断是改善治疗效果的前提。目前诊断前列腺癌的金标准仍是前列腺系统穿刺活检，如何提高穿刺活检的阳性率是前列腺诊断研究的热点问题。随着医学影像技术的不断发展进步，多种成像技术被用来定位肿瘤和引导穿刺，从而提高穿刺活检的阳性率。多参数核磁共振（Magnetic resonance imaging, MRI）用于前列腺癌的定位和辅助引导穿刺，提升了超声引导下前列腺穿刺活检的精准程度，和传统的影像学检查相比，多参数核磁共振（mpMRI）作为目前最常用的临床影像学检查手段，通过 T₁、T₂ 加权像、扩散加权成像（DWI），动态增强扫描（DCE）等功能序列的多重分析成像，既能精确的判断肿瘤的侵犯程度又清晰地显示出包膜的完整性，从而有助于确定肿瘤分期。但是，目前临床 MRI 检查无法同时完成全身的扫描，只能较好的反应局部情况，如胸、腹、盆腔等，对全身整体的评估存在局限性，使得临床检查不够全面、分期不够准确。此外，MRI 检查对患者要求较高，前列腺癌患者多为老年男性，在检查过程中，患者难以全程保持不动，容易形成运动伪影，并且带有金属植入物如起搏器、人工关节等是此检查的禁忌。同时，核磁共振检查仍受限于较低的特异性以及观察者们的主观判读差异。

放射性标记胆碱类似物的 PET/CT 在临床实践中广泛用于前列腺癌分期和诊断。在一项前瞻性研究中，¹⁸F-氟乙基胆碱 PET/CT 显示出比 MRI 更高的前列腺癌检测准

确性,然而,良性病变中的较多胆碱摄取限制了该检查的特异性^[18]。具有前列腺特异性膜抗原(PSMA)的配体的 PET/CT 检查可以克服特异性低这个限制。PSMA 在前列腺癌患者中水平上调,具有良好的前列腺组织器官特异性以及在前列腺癌组织中的明显高表达。这样,PSMA 成为了小分子靶向放射性药物的理想选择。特异性结合 PSMA 的放射性小分子配体经由网格蛋白包被的小室内化,随后被内吞,从而使放射性药物运输到肿瘤细胞中,提高了肿瘤细胞内的摄取量,进而用于显像诊断或局部放射性治疗(图 2 所示)。Glu-NH-CO-NH-Lys-(Ahx)-[⁶⁸Ga(HBED-CC)](⁶⁸Ga-PSMA-11)是 ⁶⁸Ga 标记的 PSMA 靶向放射性配体,也是近年来在临床上广泛使用的前列腺癌放射性靶向 PET/CT 显像探针,具有良好的生物学分布和代谢动力学特征。文献报道,⁶⁸Ga-PSMA-11 PET/CT 检查在欧美人群中对于前列腺癌比其他影像学手段具有更高的检出率^[19,20]。张骞等^[21]和臧士明^[22]等认为在我国人群中 ⁶⁸Ga-PSMA-11 PET/CT 检查对于高危前列腺癌转移灶的检出率与 MRI 相当,但研究病例数分别只有 14 例和 16 例,而对于国内患者原发灶的检测尚未经过系统的评估。⁶⁸Ga-PSMA-617 PET/CT 检查为全身显像,且患者易于接受,通过计算放射性 PSMA 配体最大标准摄取值并分析融合 PET/CT 图像,从而综合评估患者全身的肿瘤受累情况。

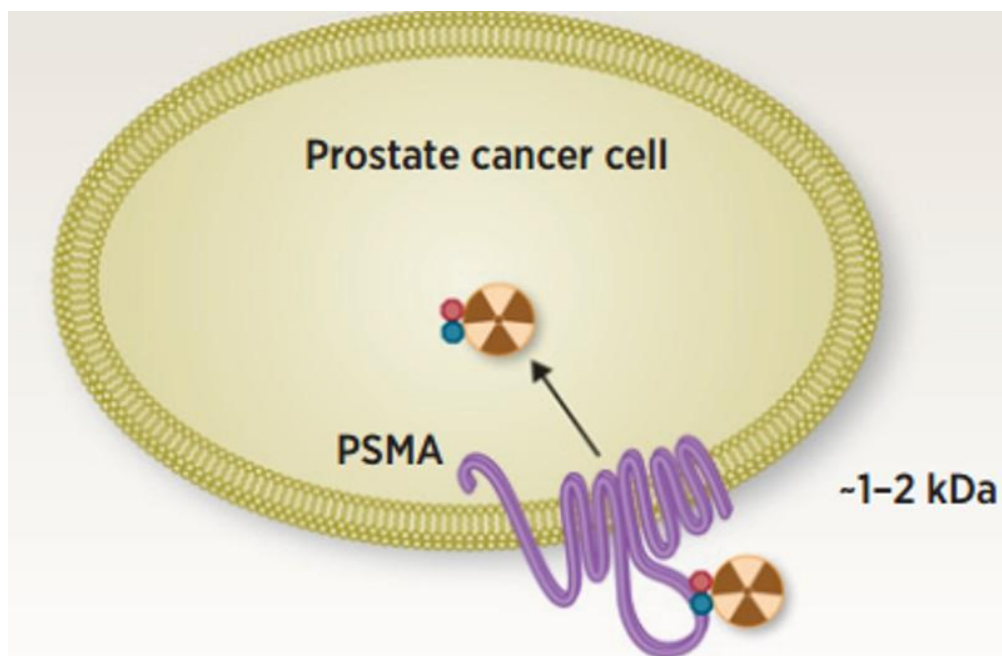


图 2 放射性小分子 PSMA 配体内化过程示意图

5. PDTX 模型的研究现状

临床前模型系统的使用对于肿瘤研究的每个阶段来说,无论从对肿瘤的基本生

物学研究到新治疗方式的发展都至关重要。关于药物开发和治疗研究，20 世纪 70 年代癌细胞系培养技术的出现推动了体外和体内抗癌剂临床前试验的快速加速和扩展。但肿瘤学中新药物高失败率的最常见原因之一是缺乏临床前模型，这些模型概括了患者肿瘤的异质性^[23]。传统的肿瘤模型首先在体外筛选人源性肿瘤细胞，再通过传代培养的方法建立稳定的细胞株，最后注射于免疫缺陷鼠体内从而建立模型（即细胞系模型）。该种模型使用连续传代的肿瘤细胞株，因适应了缺乏肿瘤微环境（如非肿瘤基质细胞、细胞外基质、肿瘤微环境因子等）的培养皿条件，使得这些细胞株在移植到免疫缺陷小鼠后形成了同质性的瘤体，丢失了原代肿瘤特征，特别是丢失了肿瘤异质性和分子学特性的体内模型，将导致许多肿瘤化疗药物临床前研究和临床试验实际疗效之间的相关性很差。将病人来源的肿瘤组织移植于免疫缺陷小鼠而建立的人类肿瘤异种移植模型（Patient Derived Tumor Xenograft, PDX）模型较好的解决了上述问题。利用免疫缺陷小鼠建立 PDX 模型，能够很好地保持患者肿瘤的遗传特性和异质性，该肿瘤模型保留了原发肿瘤的病理特性，组织学和表型特征，临床一致性高，具有抗肿瘤药物筛选的独特优势。PDX 模型的药物筛选结果可用于指导临床用药，从而避免无效化疗药物对患者的毒副作用，提高了治疗效率，节省时间和费用，为肿瘤的个体化治疗提供了新思路（图 3 所示）。

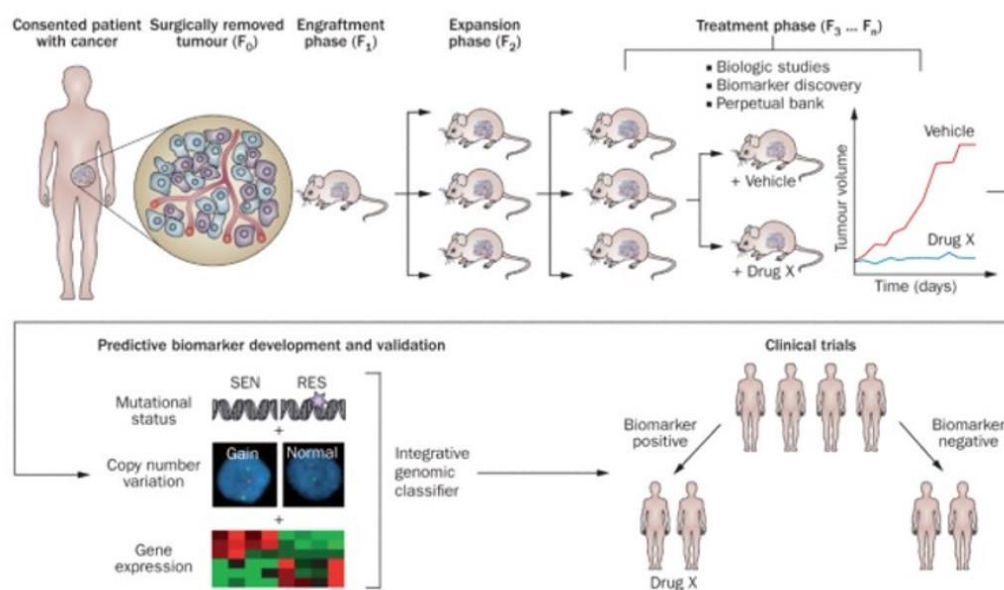


图 3 肿瘤 PDX 模型的建立和应用示意图

正文

第一部分 PSMA 在 6 种常见肿瘤组织中的表达情况

前列腺特异性膜抗原（PSMA）是相对分子量为 100000 的Ⅱ型跨膜糖蛋白，由 Horoszewicz 等^[1]在来自雄激素依赖性前列腺癌细胞系 LNCaP 的膜提取物中鉴定。在人体中，PSMA 由前列腺腺上皮细胞分泌，除在正常前列腺组织中有低表达外，在其他正常组织中如小肠细胞，近端肾管和唾液腺也有低表达^[2]。而 PSMA 在前列腺癌细胞膜上表达显著上调约 1000 倍，并且其表达程度随着前列腺癌的病理级别逐渐增加，并与激素难治性和转移性前列腺癌相关^[3,4]，这种前列腺癌特异性表达上调的特点使 PSMA 成为一种理想的诊疗靶点。近年的研究发现 PSMA 还在许多非前列腺癌实体恶性肿瘤的血管内皮细胞上表达上调。这些肿瘤主要包括乳腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌，甲状腺癌和胰腺癌等，但在正常血管内皮细胞中不表达^[5-9]，这为肿瘤研究尤其是肿瘤免疫治疗方面提供了新思路。

膀胱癌是最常见的泌尿系统恶性肿瘤之一，是全球第十大常见癌症，男性发病率是女性的 4 倍。90%以上的膀胱癌病理类型为尿路上皮癌，其容易复发和转移的特点给诸多患者带来了经济负担并严重影响着患者的生活质量。近 30 年来，传统膀胱癌治疗方法如经尿道膀胱肿瘤电切术、膀胱内灌注治疗、根治性膀胱切除术和全身系统化疗等仍然为临床上最为常用的治疗手段，但并无太多实质进展^[24]，并且这些有限的治疗手段尤其对于高级别或肌层浸润性膀胱癌的高复发率和低存活率的改善并不理想^[25]。因此需要新的膀胱癌诊疗方法来解决这一问题。找到合适的生物标志物用于早期检测、预后评估并进行具有较少副作用的靶向治疗是一个新的研究方向。

1 材料

1.1 肿瘤组织病理标本

前列腺癌、膀胱尿路上皮癌、肾透明细胞癌、乳腺癌、肝细胞癌、卵巢癌共计 145 例石蜡切块标本取自西京医院病理科。

1.2 主要试剂

二甲苯	天津富宇精细化工有限公司
柠檬酸抗原修复液	福州迈新生物技术开发有限公司
无水乙醇	天津富宇精细化工有限公司
动物非免疫血清（羊）	福州迈新生物技术开发有限公司
兔抗人 PSMA 抗体	美国 Cell Signaling Technology 公司
DAB 显色试剂盒	福州迈新生物技术开发有限公司
快捷型酶标羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物	福州迈新生物技术开发有限公司
苏木素体细胞快速染色液	福州迈新生物技术开发有限公司
即用型 EliVision 免疫组化试剂盒	福州迈新生物技术开发有限公司
浓盐酸	天津富宇精细化工有限公司
中性树胶	福州迈新生物技术开发有限公司
内源性过氧化物酶阻断剂	福州迈新生物技术开发有限公司
一抗稀释液	福州迈新生物技术开发有限公司

1.3 主要仪器

电压力锅	格兰仕公司
水平摇床	沃德生物医学仪器公司
层析柜	北京亚泰科隆有限公司
正置显微镜	日本 Olympus 公司
-20℃冰箱	海尔公司
Milli-Q 纯水器	德国 Millipore 公司
通风橱	陕西博思博科教装备有限公司
微量移液器	德国 Eppendorf 公司

1.4 其他材料

ImmEdge Hydrophobic Barrier Pen	美国 Vector 公司
免疫组化染色孵育盒	福州迈新生物技术开发有限公司
塑料染色缸	西安科昊生物工程有限责任公司
塑料晾片板	西安科昊生物工程有限责任公司
24×50mm 盖玻片	江苏世泰实验器材有限公司
塑料切片盒	福州迈新生物技术开发有限公司
LDPE 洗瓶	福州迈新生物技术开发有限公司

1.5 主要试剂配制

10×PBS	以配制 1 L 为例，称取氯化钾（KCl）2 g，氯化钠（NaCl）80 g，磷酸二氢钾（KH ₂ PO ₄ ）2.7 g 及磷酸氢二钠（Na ₂ HPO ₄ ）14.2 g，加入一定体积去离子水溶解，调整 pH 值为 7.4，定容至 1000 mL，室温保存。
PBS	以配制 1 L 为例，取 100 ml 10×PBS，加入 900 ml 去离子水，混匀，室温保存。
PBST	以配制 1 L 为例，取 1 mL Tween-20 加入至 1000 ml PBS 中，然后混匀，室温保存。

2 方法

2.1 患者病理标本收集

在西京医院病理科随机选取 2016 年 3 月至 2017 年 3 月确诊为 6 种常见肿瘤的病理组织切片共 145 例，分别为乳腺癌 24 例，卵巢癌 25 例，膀胱尿路上皮癌 23 例，肾透明细胞癌 26 例，肝细胞癌 25 例，前列腺癌 22 例，分别予以免疫组化分析 PSMA 在肿瘤组织上的表达情况。

2.2 免疫组织化学染色

- 1) 内源性过氧化物酶灭活。弃掉玻璃洗缸中 PBS 溶液，加入内源性过氧化物酶阻断液并使液面没过切片，于室温孵育 20 分钟后弃掉阻断液，在水平摇床上用

- 1×PBS 溶液清洗 5 分钟，共重复 3 次。
- 2) 抗原修复。使用酸修复法对抗原进行修复。取适量柠檬酸修复液加入高压锅，加热至沸腾后放入组织切片，确保切片完全没入在液体中。继续高压加热 2 分钟，断电后放气减压，开盖于室温冷却，转移切片至玻璃洗缸，用 1×PBS 溶液清洗 5 分钟于水平摇床，共重复 3 次。
 - 3) 内源性过氧化物酶灭活。弃掉玻璃洗缸中 PBS 溶液，加入内源性过氧化物酶阻断液并使液面没过切片，于室温孵育 20 分钟后弃掉阻断液，在水平摇床上用 1×PBS 溶液清洗 5 分钟，共重复 3 次。
 - 4) 抗原封闭。于湿盒中放置组织切片，将非免疫血清（羊）滴加于切片，室温 30 分钟孵育。
 - 5) 孵育一抗。甩弃组织切片上的非免疫血清，将组织切片平均分为两组，分别滴加兔抗人 PSMA 抗体（1:100）和鼠抗人 CD31 抗体（1:1600），放置在湿盒中，4℃过夜。
 - 6) 复温。于室温环境将组织切片复温 30 分钟，在水平摇床上用 1×PBS 溶液清洗 5 分钟，再用 PBST 溶液清洗 5 分钟。
 - 7) 孵育二抗。滴加辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠/兔 IgG 抗体，30 分钟室温孵育后，水平摇床上用 1×PBS 溶液清洗 5 分钟，重复 2 次，再用 PBST 溶液清洗 5 分钟。
 - 8) DAB 显色。配制 DAB 显色液，按照试剂盒说明书现用现配，并在显微镜下进行显色，于自来水中适时终止。
 - 9) 衬染。于苏木素染缸中衬染 2 分钟，盐酸酒精分化 20 秒，自来水返蓝 10 分钟。
 - 10) 脱水、透明、封片。将组织切片按顺序浸泡于：70%酒精、80%酒精、90%酒精、无水酒精I、无水酒精II、二甲苯I、二甲苯II，时间分别为：10 分钟、5 分钟、3 分钟、10 分钟、10 分钟、15 分钟、10 分钟；中性树胶封片完成。

2.3 染色结果分析

以肿瘤组织细胞包膜上出现棕褐色或者棕黄色即认为 PSMA 表达阳性。CD31 染色用于鉴定肿瘤相关血管和非肿瘤相关血管。首先，在低倍率（10×）下发现具有高密度脉管系统的热点区域，然后在高倍显微镜下随机选择 3 个视野。以半定量方式

评估血管中 PSMA 的表达水平。评估方式如下：(1)阴性：没有可检测到的内皮 PSMA 表达的病变评分为“0”；(2)弱阳性：在 1-50%的血管中用 PSMA 染色的病灶评分为“1”；(3)强阳性：在>50%的血管系统中显示 PSMA 阳性染色的病变评分为“2”。在结果分析时，将染色得分为 0 和 1 的样品分组为“低 PSMA 表达”，将具有染色得分 2 的样品分组为“高 PSMA 表达”。

3 结果

3.1 PSMA 在 6 种常见肿瘤组织中的表达情况

为初步探究和证实 PSMA 在 6 种常见肿瘤组织上的表达情况，我们于病理科随机选取确诊为 6 种常见肿瘤的病理组织切片共 145 例，分别为乳腺癌 24 例，卵巢癌 25 例，肝细胞癌 25 例，肾透明细胞癌 26 例，膀胱尿路上皮癌 23 例，前列腺癌 22 例，分别以免疫组化方法初步分析 PSMA 蛋白在各肿瘤组织上的表达情况。结果如表 1 所示，阳性率分别为 37.5%，4.0%，72.0%，0，69.6%和 100%。在 5 种有阳性表达的肿瘤组织中，除前列腺癌外，余 4 种肿瘤组织 PSMA 均表达与肿瘤血管，前列腺癌组织细胞和血管均有 PSMA 表达。免疫组化结果如图 4 所示。

表 1. 6 种常见肿瘤 PSMA 表达情况统计表

肿瘤类型	总例数	阳性例数	阳性率
前列腺癌	22	22	100%
膀胱尿路上皮癌	23	16	69.6%
肾透明细胞癌	26	0	0
乳腺癌	24	9	37.5%
肝细胞癌	25	18	72%
卵巢癌	25	1	4%

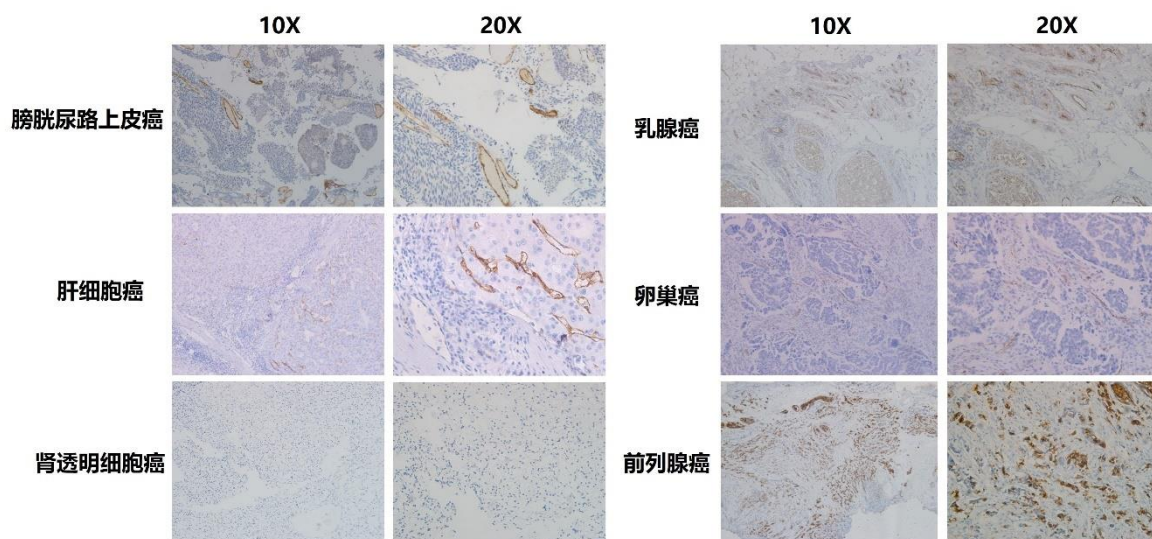


图 4. PSMA 在不同肿瘤组织中的阳性表达情况

4 讨论

自 20 世纪 90 年代以来，膀胱尿路上皮癌的诊断、治疗和五年生存率情况基本保持不变^[24]。细胞毒性化疗仍然是晚期或转移性膀胱尿路上皮癌的首选治疗方法，但因严重的不良反应和患者较差的依从性限制了其有效应用。为了克服晚期膀胱尿路上皮癌患者的不良预后，在诊断水平上改善患者的预后分层同时扩展我们的诊断思路和方法至关重要。在这种情况下，基于肿瘤相关抗原的分子靶向治疗是一种很有前景的方法，同时过去 5 年对膀胱尿路上皮癌的药物开发大幅增加。靶向成纤维细胞生长因子受 3, EGFR, VEGF, 雷帕霉素的机制靶标，信号转导和转录激活因子 3，雄激素受体和 CD24 的药物已显示出临床前活性^[26]，但很少有批准用于临床。Atezolizumab，作为一种检查点抑制剂（针对 CTLA4, PD-1 或 PD-L1 的抗体）已成为转移性膀胱尿路上皮癌的治疗选择^[27]，并已被 FDA 批准作为晚期膀胱癌的二线治疗药物，但在和化疗相比的 3 期 IMvigor211 试验中，却未能达到其改善生存率的主要终点^[28]。

在靶向治疗概念的合适候选者中，II 型跨膜糖蛋白 PSMA 可能是有前景的靶向抗原。近年来，研究人员发现 PSMA 具有在多种实体瘤的肿瘤相关血管中选择性表达，如乳腺癌^[29]，胃癌^[30]，胰腺癌^[9]，结肠癌^[31]，非小细胞肺癌等^[32]。本研究在不同肿瘤中也证实了 PSMA 在肿瘤相关血管中的表达。因为肿瘤生长严重依赖于血管形成，因此选择性靶向和抑制新血管形成可能是治疗实体瘤的有效方法，这使得

PSMA 成为膀胱尿路上皮癌治疗的潜在靶点。

越来越多的研究表明，PSMA 被认为是肿瘤特异性血管靶向的潜在候选者。此外，PSMA 具有可用于结合抗体和药物的细胞外结构域，使其成为血管靶向的理想分子^[33]。目前已经开发了许多靶向 PSMA 的方法，包括单克隆抗体^[34,35]、疫苗^[36]、RNA 适体^[37]和小分子配体等^[38]。利用这些成像和治疗实体瘤的方法，将有一种新的抗血管生成疗法途径。目前的研究结果进一步证实先前对膀胱尿路上皮癌肿瘤血管中 PSMA 表达的研究，并为 PSMA 作为治疗性血管靶标提供了证据。可以基于免疫组织化学分型或通过 PSMA 成像研究来鉴定 PSMA 血管靶向受益者。本研究证实了 PSMA 在膀胱尿路上皮癌中的表达，提示 PSMA 靶向免疫疗法有望成为晚期尿路上皮癌的有效治疗策略。

Mary K Samplaski 等报道其他亚型膀胱癌血管，包括腺癌，鳞状细胞癌和小细胞癌，也有不同程度的 PSMA 表达^[39]。本研究的膀胱肿瘤标本来源包括经尿道膀胱肿瘤电切术和膀胱肿瘤根治性切除术，经尿道电切标本的质量可能受到烧灼的限制，这可能会在一定程度上干扰免疫组化的结果。

第二部分 以 PSMA 为靶点的小分子核素 PET/CT 显像对前列腺癌诊断效能的 分析研究

前列腺癌（Prostate cancer, PCa）是男性中第二大流行的恶性肿瘤，也是全球癌症死亡的第五大原因。前列腺癌的发病率在 2018 年美国男性中排名第一，其在我国男性中的发病率也明显上升，增速更是位居第一。根据流行病监测与最终治疗结果（Surveillance Epidemiology and End Results, SEER）数据库的结果显示，局限性前列腺癌的 5 年生存率可达 100%，而出现转移病灶尤其是远处转移时，生存率降至 34%。因此，前列腺癌的早期诊断对获得有效治疗和改提高生存率至关重要。目前，临床上有很多方法应用于前列腺癌的早期诊断。

前列腺癌早期诊断的重要手段之一为血清总 PSA 的筛查，PSA 值越高，前列腺癌诊断的可能性越大，当总 PSA 值大于 20 ng/ml 时，诊断前列腺癌的准确率可达 87.2%，当总 PSA 值大于 50 ng/ml 时，准确率高达 98.5%^[40]。由于 PSA 具有器官特异性而不具备肿瘤特异性，在破坏前列腺基底膜上皮细胞的病变如前列腺炎，前列腺增生等均可使血清 PSA 水平提高，这样一来，对于总 PSA 值较低的患者 PSA 的诊断效能，尤其是特异度方面，就显得十分有限^[41]。特异度较低会带来假阳性增多的问题，因此接受不必要前列腺穿刺活检的病人数量也会相应增多，造成了过度诊断。欧洲随机研究筛查前列腺癌试验（ERSPC）和美国前列腺癌，肺癌，结肠直肠癌和卵巢癌（PLCO）癌症筛查试验结果表明，基于 PSA 的前列腺癌的过度诊断率分别为 16.4% 和 33.2%^[42]。为了减少假阳性的问题从而提高诊断效能，目前在前列腺癌的初步诊断方面综合了一些患者病史及临床数据，应用如欧洲随机研究筛查前列腺癌风险计算器（ERSPC-RC）和美国前列腺癌预防试验风险计算器（PCPT-RC）等统计算法程序。尽管扩大诊断率较单纯检测 PSA 值有所降低，但这些风险评估的方法仍然更多基于 PSA 值、体格检查如直肠指检结果或病史资料，总体诊断效能的提高还是有限，目前两种风险评估的方法的 AUC 值分别为 0.71（95%CI 0.688-0.733）和 0.637（95%CI

0.613-0.661), 显然是远远不够的。随着医学影像技术的不断发展进步, 多种成像技术被用来定位肿瘤, 并可用于引导穿刺活检, 从而提高了早期诊断的准确性。多参数盆腔核磁共振是目前临床上应用最为广泛的影像学检查手段, 也是判断前列腺癌临床分期的重要手段之一。一项系统评价和诊断荟萃分析报道, mpMRI 对于前列腺癌检测的平均灵敏度和特异性分别为 89%和 73%^[43], 提示 mpMRI 的特异度的优势并不是很明显, 而 Thompson 等^[44]和 Kim 等^[45]的研究显示, mpMRI 诊断特异度仅有 36%-58%。此外, mpMRI 还受限于观察者们的主观判读差异以及对患者较高的个体要求, 因此有必要推广用于诊断和定位前列腺癌的新成像技术。

具有核素标记且靶向 PSMA 的 PET/CT 显像技术有可能克服以上限制并提高诊断效能。PSMA 作为前列腺细胞膜上的II型跨膜糖蛋白, 在前列腺癌患者中水平上调, 具有良好的前列腺组织器官特异性以及在前列腺癌组织中的明显高表达。因此, PSMA 成为了小分子靶向放射性药物的理想选择。特异性结合 PSMA 的放射性小分子配体经由网格蛋白包被的小室内化, 随后被内吞, 从而使放射性药物运输到肿瘤细胞中, 提高了肿瘤细胞内的摄取量, 进而用于显像诊断或局部放射性治疗。PSMA-Glu-NH-CO-NH-Lys(Ahx)-HBED-CC (PSMA-11) 和 PSMA-Glu-NH-CO-NH-Lys-2-naphthyl-L-Ala-cyclohexane-DOTA (PSMA-617) 是两种已知商业上和技术上都稳定成熟的 PSMA 小分子配体。用镓-68 (⁶⁸Ga) 核素标记, ⁶⁸Ga-PSMA-11 在过去几年中已成为临床应用中最有前景的放射性示踪剂之一, ⁶⁸Ga-PSMA-11 PET/CT 检查应用于前列腺癌的诊断, 其诊断效能尤其是特异性方面可超过 80%^[46]。PSMA-617 是基于 PSMA-11 的研究开发出的新一代小分子配体^[47], 其显示出对 PSMA 的显著结合亲和力和对前列腺癌细胞的高效内化, 同时表现出了优异的肿瘤与背景摄取效能。此外, 其同时兼具显像和治疗的共同功能, 可将显像核素替换为治疗核素后直接使用, 真正做到了诊疗一体化。另外, 其快速肾清除放射性对于减少对机体的潜在辐射毒性也是十分重要的^[48]。然而, 作为一种新型有前景的放射性示踪剂, 目前对 PSMA-617 的显像研究仍比较有限, 本研究为回顾性分析 2017 年 6 月至 2018 年 7 月西京医院 115 例同期行 ⁶⁸Ga-PSMA-617 PET/CT 及 mpMRI 检查的疑诊前列腺癌患者的临床资料, 分析 ⁶⁸Ga-PSMA-617 PET/CT 与多参数 MRI 对初诊前列腺癌原发灶诊断效能, 评估良恶性前列腺组织中放射性 PSMA 配体最大标准摄取值 SUV_{max} (Maximum Standardized Uptake Value) 的差异, 同时分析前列腺癌组织 SUV_{max} 与肿瘤分级的

相关性。

1 材料

Biograph 40 PET/CT	德国西门子公司
$^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ 发生器	德国 ABX 公司
Siemens Avanto 3.0 T 超导型磁共振仪	德国西门子公司
Siemens MMWP 工作站	德国西门子公司
e.soft 软件	德国西门子公司
MegaCore 复用型活检装置	北京德迈特科技发展有限公司
彩色超声诊断仪	美国 TERATECH 公司
PSMA-617 配体	德国 ABX 公司

2 方法

2.1 患者一般资料

本研究共 115 例均为初诊的疑似前列腺癌的患者，同期接受 ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT 显像及 mpMRI 检查，未行任何手术或系统治疗。年龄 (68.70 ± 8.96) 岁 (40-88 岁)，其中 <60 岁 15 例，60-69 岁 46 例，70-79 岁 39 例， ≥ 80 岁 15 例。血清总 PSA 值为 3.76-1260.00 ng/ml，中位值为 17.43 (9.53, 34.10) ng/ml，其中 PSA 值 <10 ng/ml 29 例，10-20 ng/ml 38 例， >20 ng/ml 48 例。研究结果显示，当血清总 PSA ≥ 50 ng/ml 时，诊断前列腺癌的准确率高达 98.5%，且根据 ERSPC-RC 和 PCPT-RC 的纳入标准，血清总 PSA <50 ng/ml 是被作为一项重要的入组条件。我们依据中国泌尿外科疾病诊断治疗指南^[49]和美国国家综合癌症网络 (National Comprehensive Cancer Network, NCCN) 前列腺癌指南 (2018 年第 4 版)^[16]，制定了本研究的纳入排除标准如下。纳入标准：(1) 年龄 40-85 岁的患者，(2) 前列腺直肠指检触及可疑结节或血清总 PSA 值 ≥ 4 ng/ml 且 <50 ng/ml 的患者；排除标准：(1) 在 ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT 或 mpMRI 检查之前曾经接受过任何形式关于前列腺癌的综合治疗如雄激素去势治疗 (androgen deprivation therapy, ADT)、化疗、放疗等或接受过任何前列腺相关的手术或外科处理的患者；(2) 由于各种原因缺乏前列腺癌病理结果的患者。最终经筛选有 93 例患者符合条件进行入组研究，所有患者均签署知情同意书。

2.2 病理组织获取与分析

前列腺癌的诊断金标准为病理检查结果。根据中国泌尿外科疾病诊断治疗指南^[49]，病理组织获取过程如下：93 例入组疑似前列腺癌患者均接受经直肠前列腺穿刺活检术。穿刺方法：穿刺者回顾患者 MRI 影像学资料，采用认知融合（cognitive fusion biopsy, CFB）结合超声引导下经直肠前列腺穿刺术进行穿刺：优先对可疑区域穿刺 1-2 针后完成系统 12 针穿刺，以确保结果的准确性^[50]。若活检结果为阳性，具有手术指征的患者 4-6 周后接受机器人辅助腹腔镜下根治性前列腺切除术（RALRP），其病理结果以最终大体标本为准，不具备手术指征的患者以穿刺活检标本为准。若首次穿刺活检结果为阴性，则对接受二次穿刺的患者择期（4-6 周后）行饱和穿刺法（≥18 针），不接受二次穿刺的患者进行随访。若二次穿刺活检结果为阳性，病理结果的判定同首次穿刺阳性的患者，如果穿刺活检结果为阴性，仍不能排除前列腺癌，进行随访。随访时间至少 6 个月。随访的主要内容包括：每月至少复查一次血清 PSA，每三月复查一次 MRI 或 ⁶⁸Ga-PSMA-617 PET/CT 检查，若病情无进展，则可暂时排除前列腺癌。若病情进展，则建议进行第 3 次穿刺，穿刺方法仍为饱和穿刺。若病理活检结果为阳性，则结果的判定过程同前两次穿刺，如果病理结果仍为阴性，则暂时排除前列腺癌，但继续随访观察。对于病理结果阴性的患者，如伴随严重的尿路梗阻症状，行经尿道前列腺切除术（TURP），术中尽可能切至前列腺包膜，术后病理结果亦作为判断依据。穿刺活检组织、前列腺大体标本及电切标本均送西京医院病理科统一检验并依据泌尿系统和男性生殖器官肿瘤 WHO 分类及第八版 AJCC 癌症分期手册^[51, 52]明确病理诊断。

2.3 ⁶⁸Ga-PSMA-617 PET/CT 显像

检查机器采用德国西门子 Biograph 40 PET/CT，⁶⁸Ge/⁶⁸Ga 发生器由德国 ITG 公司提供，PSMA-617 配体由德国 ABX 公司提供，⁶⁸Ga-PSMA-617 药物制备合成标记过程参考 Martin 等^[53]标记方法，放射化学纯度>95%。将制备好的 ⁶⁸Ga-PSMA-617 于检查前 1h 经受检者肘静脉注射，剂量 5-8 mCi，药物注射完成后嘱患者休息、饮水及排尿，1h 后行 ⁶⁸Ga-PSMA-617 PET/CT 检查，扫描范围从头顶至大腿上段。低剂量 CT 取自动毫安秒 120kV 电压扫描，矩阵 512×512，层厚 5 mm，PET 图像采集取 4-5 个床位，每个床位 2-3 min，经 Syngo TrueX 重建 PET/CT 图像融合阅图。

2.4 多参数 MRI 扫描技术

根据 PI-RADS V₂ 前列腺影像报告及数据评分系统^[43], 采用 Siemens Avanto 3.0 T 磁共振仪配合腹部 8 通道相控阵线圈。动态增强经肘静脉予以钆喷酸葡胺 15 ml 注射, 流率为 2 ml/s, 后用生理盐水 10 ml 冲洗。多参数 MRI 各序列参数如表 6 所示。

表 2 多参数 MRI 各序列参数

参数 \ 序列	T ₂ 加权成像	动态增强	弥散加权成像
重复时间 (ms)	4000	5.8	5800
回波时间 (ms)	95	2.7	90
视野 (cm)	20×20	26.3×35	35.6×38
激励次数	4	-	4
矩阵	460×512	-	120×128
层厚 (mm)	4	3	4
层间距 (mm)	0.8	-	1
b 值	-	-	0 和 1000 mm ² /s

2.5 图像分析

⁶⁸Ga-PSMA-617 PET/CT 及 MRI 检查结果分别由 3 名核医学科及 3 名影像科资深医师对图像进行盲法阅片分析。通过使用具有相同标准的 Siemens MMWP 工作站和 e.soft (西门子) 软件分析 ⁶⁸Ga-PSMA-617 PET/CT 图像, 除腮腺、唾液腺、肾脏、小肠等可见生理性摄取的部位外, 将其他部位出现局部放射性异常摄取的浓聚灶判为阳性病灶并计算 SUV_{max} 值; MRI 阳性判断标准为异常的局灶性信号增高或减低, 审阅者根据第二版前列腺成像报告和数据系统 (PI-RADS) 的 5 分制方法^[43], 系统评价前列腺癌的可能性: 1, 极低可能性; 2, 较低可能性; 3, 中等可能性; 4, 较高可能性; 5, 极高可能性。在患者水平上, 使用每位患者的最高得分对数据进行二分法诊断: 得分 1-2 为前列腺癌阴性; 得分为 3-5 为前列腺癌阳性。

2.6 统计学分析

运用 SPSS 24.0, Graphpad Prism 7, SigmaPlot 14.0 和 MedCalc 等统计软件对数

据进行分析,以病理结果为金标准分别计算 ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT 和 MRI 的诊断效能。正态分布样本按均值 $\pm$ 标准差进行描述,非正态分布样本按中位数(Q1, Q3)进行描述。结合 SUVmax 值和 PI-RADS 评分绘制受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC curve),并计算曲线下面积(Area under the ROC curve, AUC),采用方差分析比较年龄、PSA 值、Gleason 评分、ISUP 分级分组、危险度分级及临床分期等参数与 SUVmax 值的关系,并采用 Pearson 相关法分析 SUVmax 值与 PSA 值, Gleason 评分和 ISUP 分级分组的关系。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 患者一般资料

根据纳入排除条件,本研究共纳入 93 例病例。(图 5) PSA<50 ng/ml 的前列腺癌疑似患者年龄(68.73 ± 8.86)岁(40-85 岁),血清总 PSA 值 3.15-47.99 ng/ml,中位值为 14.09 (8.28, 22.43) ng/ml 经病理检查确诊前列腺癌 56 例(首次穿刺确诊 51 例,二次穿刺确诊 5 例),前列腺增生症 37 例。其中 27 例穿刺确诊前列腺癌患者行机器人辅助腹腔镜下根治性前列腺切除术,术后病理与穿刺结果一致。37 例穿刺阴性患者后经随访未见病情进展,其中 9 例行经尿道前列腺电切术,术后病理均为前列腺增生症,与穿刺结果一致。入组患者的临床资料如表 3 所示。

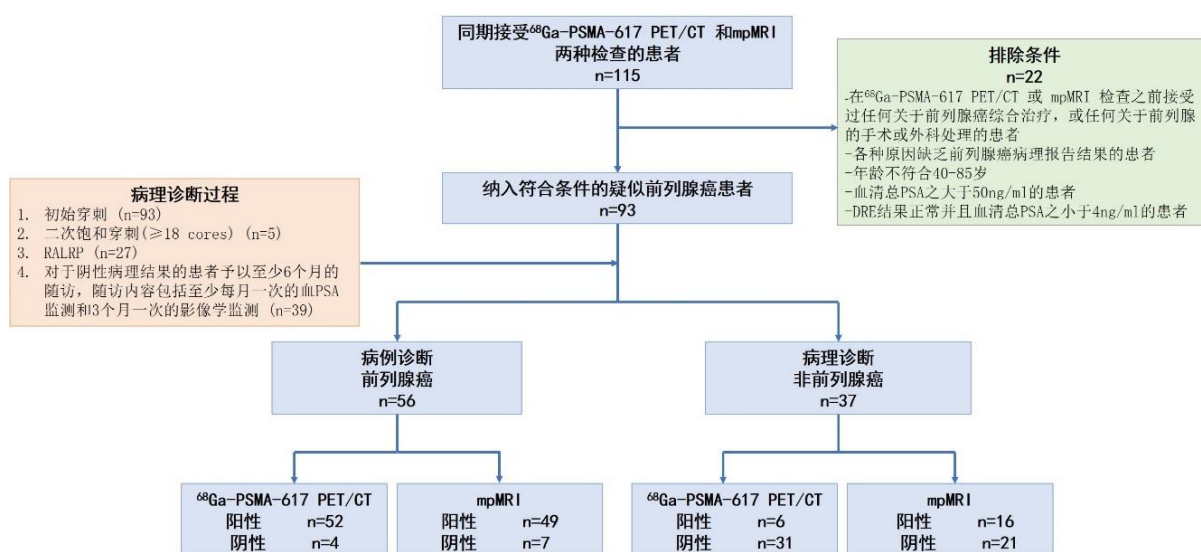


图 5 入组病例纳入流程图

表 3 93 例入组患者资料

患者资料	患者人数 (%)
年龄	
40-59 岁	11 (11.83)
60-69 岁	39 (41.94)
70-79 岁	31 (33.33)
80-85 岁	12 (12.90)
血清总 PSA ng/ml	
<10 ng/ml	29 (31.18)
10-20 ng/ml	38 (40.86)
20-50 ng/ml	26 (27.96)
前列腺直肠指检	
异常	62 (66.67)
正常	31 (33.33)
病理结果	
恶性	56 (60.22)
良性	37 (39.78)
PI-RADS 评分	
1-2	28 (30.11)
3	15 (16.13)
4	37 (39.78)
5	13 (13.98)
Gleason 评分	
0	37 (39.78)
6	5 (5.38)
7	16 (17.20)
8	23 (24.73)
9	9 (9.68)
10	3 (3.23)
ISUP 分级分组	
0	37 (39.78)
1	5 (5.38)
2	7 (7.53)
3	9 (9.68)
4	23 (24.73)
5	12 (12.90)

3.2 多参数 MRI 检查与 ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT 检查诊断效能的比较

多参数 MRI 与 ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT 检查检出前列腺癌例数如表 4, 以病理结果为金标准, 多参数 MRI 检查的敏感度 87.5% (49/56), 特异度 56.7% (21/37),

阳性预测值 75.38% (49/65), 阴性预测值 75.00% (21/28); ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT 检查的敏感度 92.8% (52/56), 特异度 83.78% (31/37), 阳性预测值 89.6% (52/58), 阴性预测值 88.5% (31/35)。根据两种检查患者频数结果绘制 ROC 曲线 (图 6A), 并计算曲线下面积, ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT 检查 $\text{AUC}_1=0.883$, 多参数 MRI 检查 $\text{AUC}_2=0.721$, 结果如表 5 所示。

表 4 MRI 检查与 ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT 检查诊断前列腺癌的四格表资料

		前列腺癌	非前列腺癌	合计
mpMRI	阳性	49	16	65
	阴性	7	21	28
	合计	56	37	93
		前列腺癌	非前列腺癌	合计
^{68}Ga -PSMA-617	阳性	52	6	58
	阴性	4	31	35
	合计	56	37	93

表 5 基于患者频数的 MRI 检查与 ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT 检查诊断效能分析表

	灵敏度%	特异度%	阳性预测值%	阴性预测值%	AUC (95%CI)	P 值
^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT	92.80	83.78	89.60	88.50	0.883 (0.800-0.941)	0.0043
mpMRI	87.50	56.70	75.38	75.00	0.721 (0.619-0.809)	

3.2.1 ROC 曲线分析

以 SUVmax 值及 PI-RADS 评分作为诊断参数, 绘制 ROC 曲线, 并确定最佳临界点, SUVmax 值的曲线下面积 $\text{AUC}_1=0.928$, PI-RADS 评分曲线下面积 $\text{AUC}_2=0.816$, $p=0.028$, 当 SUVmax 值取 4.795 时, 曲线下面积最大, (图 6B), 此时 ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT 检查灵敏度 83.93% (95%CI 74.67%-92.38%) 和特异度 89.19% (95%CI 74.58%-96.97%) 俱佳, 确定 SUVmax=4.795 为最佳临界点。当 PI-RADS 评分取 3.5 时, 曲线下面积最大, 但根据 PI-RADS 评分标准, 临界点仍选择 3 分。

3.2.2 两种检查对低 PSA 且具有显著意义的前列腺癌的诊断效能比较

93 例入组疑似前列腺患者中, 血清总 PSA<20 ng/ml 共 67 例。有显著意义的前列腺癌满足 Gleason 评分 ≥ 7 分条件^[54, 55]。根据病理结果提示, Gleason 评分 ≥ 7 共 30 例, 非显著意义的前列腺癌患者及阴性病例共 37 例。分别以 SUVmax 值及 PI-RADS 评分作为诊断参数绘制 ROC 曲线, 并确定最佳临界点, SUVmax 值的曲线下面积 $AUC_1=0.909$, PI-RADS 评分曲线下面积 $AUC_2=0.695$, $p=0.003$, 当 SUVmax 值取 5.05 时, 曲线下面积最大, (图 6C), 此时 ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT 检查灵敏度 83.33% (95%CI 65.28%-94.36%) 和特异度 91.89% (95%CI 78.09%-98.30%) 俱佳, 确定 SUVmax=5.05 为最佳临界点。

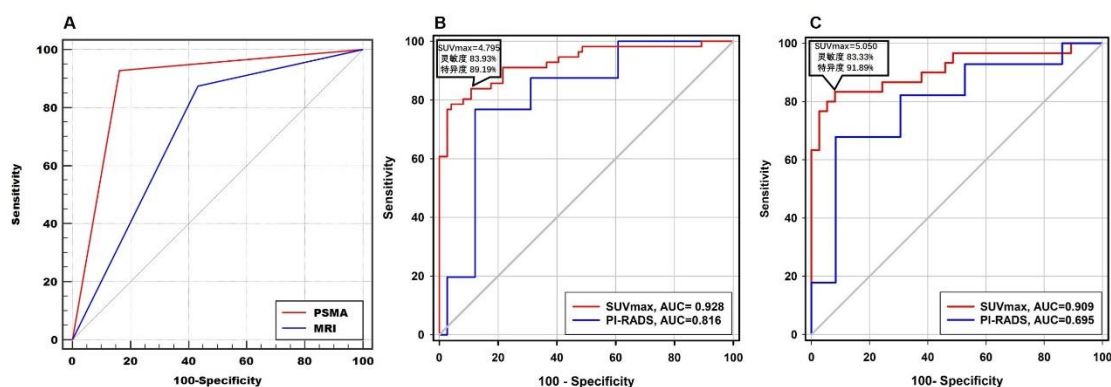


图 6 A 基于患者频数的 ROC 曲线图; B 93 例入组患者基于 SUVmax 和 PI-RADS 评分为参数的 ROC 曲线图; C 67 例 PSA<20 ng/ml 患者基于 SUVmax 和 PI-RADS 评分为参数的 ROC 曲线图。

3.3 SUVmax 值与临床参数之间的关系

93 例入组疑似前列腺癌患者中, 不同年龄 SUVmax 值的差异无统计学意义 ($P>0.05$, 表 6), 不同血清总 PSA 值患者 SUVmax 值的差异有统计学意义 ($P<0.01$, 表 6), 且 PSA 值与 SUVmax 呈正相关, ($r=0.3440$, $P<0.01$, 图 7), 良性前列腺组织的 SUVmax 值低于前列腺癌组织的 SUVmax 值, 差异有统计学意义 ($P<0.01$, 表 6)。56 例确诊前列腺癌患者中, 不同 Gleason 评分和 ISUP 分级分组的前列腺癌组织的 SUVmax 值之间差异有统计学意义 ($P<0.05$, 表 6, 图 7, 图 8), 且 Gleason 评分、ISUP 分级分组与 SUVmax 值呈正相关 ($r_1=0.6705$, $P<0.01$; $r_2=0.6704$, $P<0.01$, 图 7)

表 6 疑似前列腺癌患者 ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT 检查 SUVmax 值与各临床参数的关系

临床参数	SUVmax 值	F 值/t 值	P 值
年龄		0.99	0.43
40-59 岁	4.30 (3.70,9.90)		
60-69 岁	5.00 (3.10,9.70)		
70-79 岁	5.10 (3.53,12.81)		
80-85 岁	8.14 (3.89,20.11)		
PSA 值		10.88	<0.01
<10 ng/ml	3.30 (2.80,4.12)		
10-20 ng/ml	5.56 (3.50,15.16)		
20-50 ng/ml	9.80 (5.37,16.11)		
可疑病灶		6.35	<0.01
良性组织	3.20 (2.85,3.70)		
恶性肿瘤	9.99 (6.30, 16.99)		
Gleason 评分		17.79	<0.01
6	4.20 (3.72, 5.56)		
7	7.61 (4.96, 10.98)		
8	10.07 (7.85, 14.60)		
9	17.50 (14.05, 22.08)		
10	34.20 (22.18, 41.30)		
ISUP 分级分组		12.36	<0.01
1 组	4.20 (3.72, 5.56)		
2 组	7.14 (4.68, 10.13)		
3 组	7.92 (4.93, 12.76)		
4 组	10.07 (7.85, 14.60)		
5 组	20.26 (14.91, 41.30)		

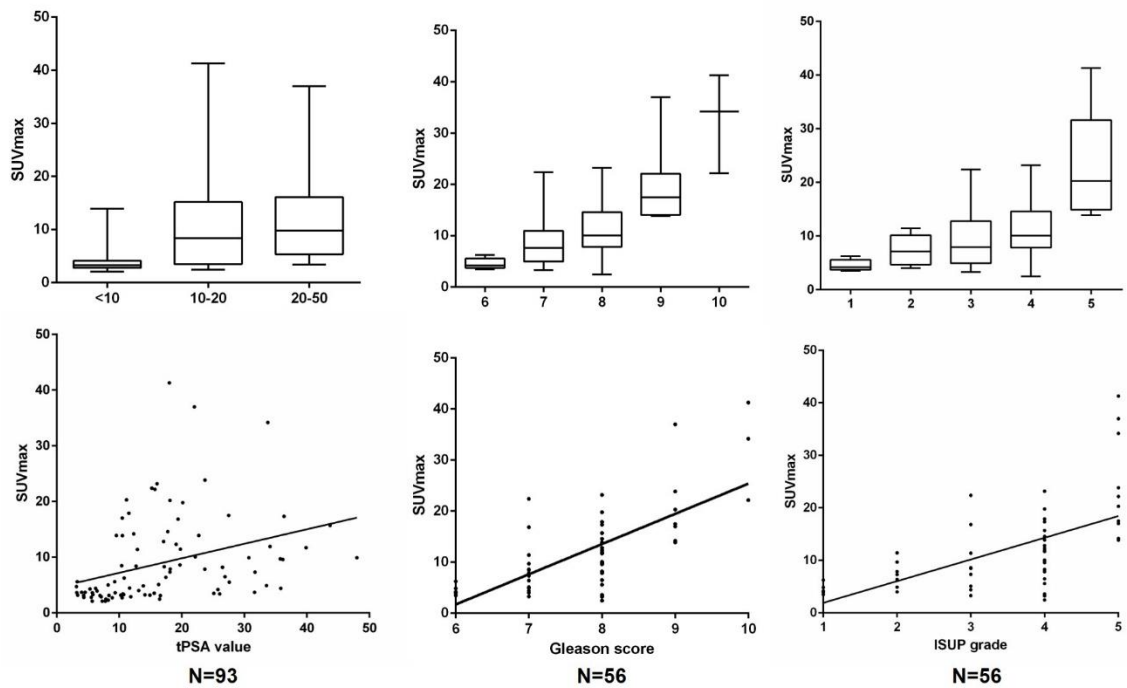


图 7. 根据不同 PSA 值, Gleason 评分, 和 ISUP 分级分组分别在 93 例疑似病例和 56 例前列腺癌病例中的 SUVmax 箱式图和线性回归图。

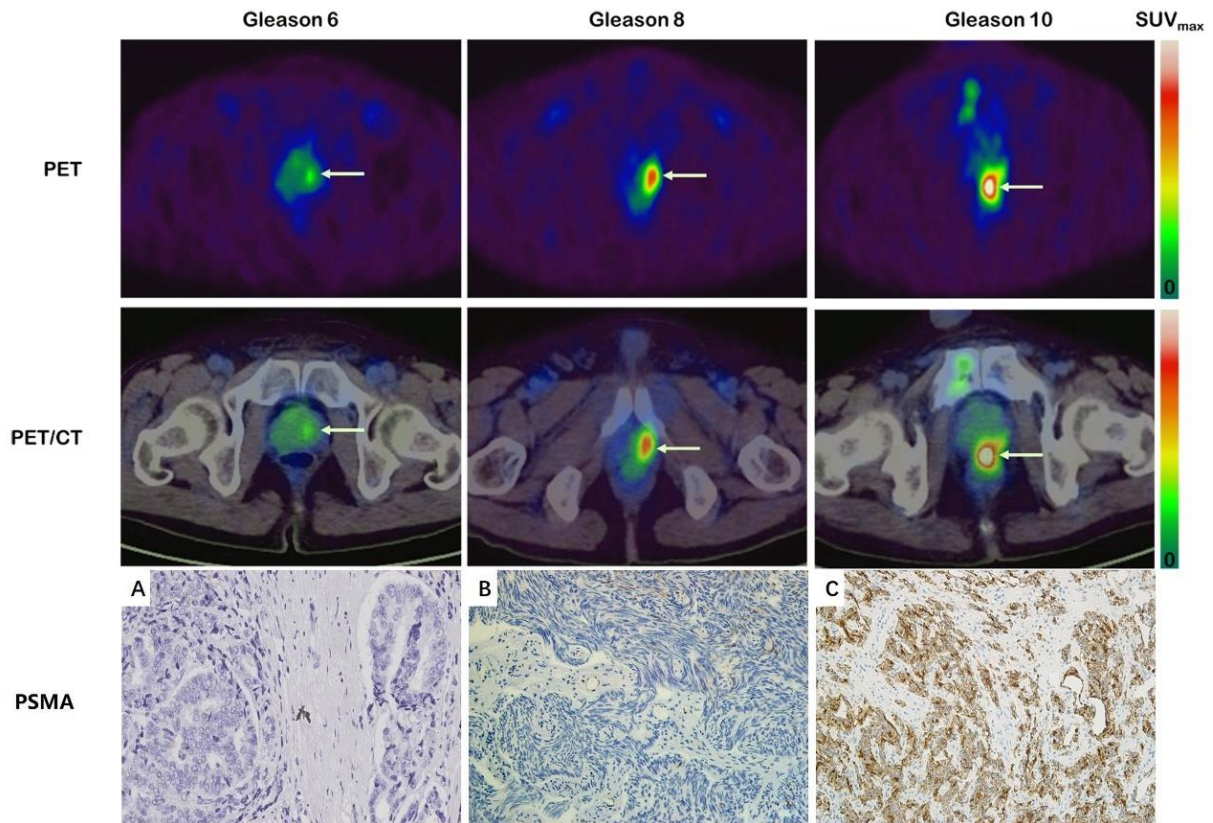


图 8 三例不同前列腺癌的 ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT 显像图（箭头所示的原发病灶）。SUV_{max} 值与 Gleason 评分的比较，Gleason 评分 6 分对应 SUV_{max} 值为 4.93；Gleason 评分 8 分对应 SUV_{max} 值为 13.06；Gleason 评分 10 分对应 SUV_{max} 值为 29.14。前列腺癌病理标本 PSMA 表达的免疫组化分析：PSMA 表达阴性（A），弱阳性（B）和强阳性（C），对应于不同的 Gleason 评分。

4 讨论

与传统的影像学检查相比，多参数 MRI 作为目前最常用的临床影像学检查手段，通过 T₁、T₂ 加权像、扩散加权成像（DWI），动态增强扫描等功能序列的多重分析成像，能够较好地显示前列腺包膜的完整性以及肿瘤是否侵犯前列腺周围组织和器官，同时也可显示盆腔淋巴结受侵犯的情况及骨转移的病灶，在临床分期上有较重要的作用^[56]。但是，目前临床 MRI 检查无法同时完成全身扫描，只能较好地反应局部情况，如胸、腹、盆腔等，对整体的评估存在局限性，使得临床检查不够全面、分期不够准确。此外，MRI 检查对患者要求较高，前列腺癌患者多为老年男性，在检查过程中，容易形成运动伪影，并且较多患者带有金属植入物如起搏器、人工关节等，是检查的禁忌。而 ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT 检查为全身显像，且患者易于接受，通过计算放射性 PSMA 配体最大标准摄取值 SUV_{max} 并分析融合 PET/CT 图像，从而综合评估患者全身的肿瘤受累情况。

PSMA-617 配体是在 PSMA-11 配体基础上研制的一种新型小分子 PSMA 配体，在临床前研究中，PSMA-617 显示出与 PSMA 受体更强的结合力和更高的内化进入前列腺癌细胞的能力^[48]。因此在前列腺癌组织中 ^{68}Ga -PSMA-617 的摄取相对更高。PSMA-617 可以被 ^{68}Ga ， ^{177}Lu ， ^{111}In 和 ^{90}Y 等多种核素标记，既可用来作为显像诊断探针，也可用于核素治疗，而 PSMA-11 只能用于显像诊断。 ^{68}Ga -PSMA-617 与 ^{68}Ga -PSMA-11 在正常组织中的摄取相比，除过在唾液腺和泪腺中的摄取略有增加外，在肝脏、脾脏、小肠和肾脏等重要脏器的摄取更低。 ^{68}Ga -PSMA-617 与 ^{68}Ga -PSMA-11 均通过肾脏排泄，但 ^{68}Ga -PSMA-617 的肾脏清除率显著高于 ^{68}Ga -PSMA-11，提示肾毒副作用更小^[47]。因此，PSMA-617 是一种特异性更好，毒副作用更小，同时兼具诊断显像和治疗功能的新型小分子探针。然而，鲜有研究将 ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT 的

诊断效能与临床上应用最广泛的多参数 MRI 做系统比较。

目前确诊前列腺癌的主要方法为前列腺穿刺活检术，本研究采用超声引导下经直肠前列腺穿刺活检术，为提高穿刺准确性，采用了影像学认知融合靶向可疑病灶结合系统穿刺的方法。文献报道，当 $\text{PSA} \geq 50 \text{ ng/ml}$ 时，检测血清 PSA 值诊断前列腺癌的准确率高达 98.5%，但 PSA 值越低，其诊断准确率也随之下降，当 $\text{PSA} \geq 20 \text{ ng/ml}$ 时，其阳性预测值降至 87.2%，而当 $\text{PSA} < 20 \text{ ng/ml}$ 时，阳性预测值低于 73.6%，这是由于 PSA 具备器官特异性而非肿瘤特异性，尤其对于低 PSA 的疑似患者来说，仅凭借 PSA 诊断会导致误诊可能。在欧美的两项基于血清 PSA 的前列腺癌临床研究中（ERSPC 研究和 PLCO 研究），前列腺癌的过度诊断率高达 16.4% 和 33.6%。而影像学检查尤其是多参数 MRI 检查的应用，其较高的敏感度极大地提高了穿刺前前列腺癌的检出率^[57, 58]，但较高的敏感度是建立在一定程度牺牲特异度的基础之上^[43]，这导致鉴别假阳性病例的能力不足，再加上 MRI 检查在无法准确鉴别前列腺中央带的微小病变^[59]，使得相对较高的过度诊断率问题无法很好的解决。而过度诊断带来的后果就是过度的有创穿刺检查和手术治疗，这会给患者带来不必要的经济和健康负担。随着前列腺癌诊疗水平的发展，越来越多的研究认为，提高具有显著意义的前列腺癌的检出率能够避免过度诊疗，将 Gleason 评分 $\geq 3+4$ 分作为判定标准^[55]，对于 Gleason 评分为 6 分的患者更多推荐观察和主动监测，而非手术或药物治疗^[16]。

文献报道，在欧美人群中 ^{68}Ga -PSMA-11 PET/CT 检查较其他影像学检查对前列腺癌有更高的检出率^[19, 60-62]，张骞等^[21]和臧士明等^[63]认为在我国人群中 ^{68}Ga -PSMA-11 PET/CT 检查对于高危前列腺癌转移灶的检出率与 MRI 相当，但研究病例数仅为 14 例和 16 例，而对于国内患者原发灶的检测尚未经过系统的评估。本研究结果显示，93 例可疑前列腺癌患者中 ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT 检查敏感度 92.8% (52/56)，特异度 83.78% (31/37)，阳性预测值 89.6% (52/58)，阴性预测值 88.5% (31/35)，而多参数 MRI 检查敏感度 87.5% (49/56)，特异度 56.7% (21/37)，阳性预测值 75.38% (49/65)，阴性预测值 75.00% (21/28)。在特异性和阴性预测值方面， ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT 检查较 MRI 更具有优势，提示 ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT 能够更好的避免过度诊断，以入组患者频数分析 ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT 检查和多参数 MRI 检查的 ROC 曲线发现，曲线下面积分别为 0.883 和 0.721，并有统计学差异，初步提示 ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT 有较高的诊断效能。以 SUV_{max} 值及 PI-RADS 评分作为诊断参

数分析两种检查的 ROC 曲线发现, AUC 值分别为 0.928 和 0.816, 有统计学差异, 进一步提示 ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT 检查的诊断效能更高。当 SUV_{max} 取值为 4.795 时, ROC 曲线下面积最大, 即 SUV_{max}=4.795 为最佳临界点, 此时敏感度和特异度分别为 83.93% (95%CI 74.67%-92.38%) 和 89.19% (95%CI 74.58%-96.97%), 显著优于 PI-RADS 评分为 3 时的诊断效能。当 SUV_{max}≥4.795 时, 考虑恶性诊断, SUV_{max}<4.795 时, 考虑良性诊断。

对 PSA<20 ng/ml 的 67 例入组患者进一步研究分析具有临床显著意义的前列腺癌, 分别以 SUV_{max} 值及 PI-RADS 评分作为诊断参数绘制 ROC 曲线, SUV_{max} 值的曲线下面积 AUC=0.909, PI-RADS 评分曲线下面积 AUC=0.695, 有统计学意义, 提示 ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT 检查可能有较高的诊断效能。最佳临界点为 SUV_{max}=5.05, 此时灵敏度 83.33% (95%CI 65.28%-94.36%), 特异度 91.89% (95%CI 78.09%-98.30%)。分析结果提示其较高的特异度能够很好的鉴别非显著意义的前列腺癌, 从而避免过度诊疗, 即当 SUV_{max}≥5.05 时, 考虑显著意义前列腺癌可能, 需要进一步行穿刺活检及治疗, SUV_{max}<5.05 时, 考虑非显著意义前列腺癌或阴性诊断, 可予以观察或主动监测。

本研究结果显示, 良性前列腺组织的 SUV_{max} 值低于前列腺癌组织, 差异有统计学意义。进一步分析 56 例前列腺癌组织的 SUV_{max} 值, 不同 Gleason 评分、ISUP 分组以及危险因素等级的 SUV_{max} 值的差异均有统计学意义。SUV_{max} 值与 Gleason 评分及 ISUP 分级分组呈正相关 ($r_1=0.6705$; $r_2=0.6704$), 提示肿瘤的恶性程度越高, SUV_{max} 值越高, 故 ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT 检查能精确定位更高 Gleason 评分的肿瘤病灶在前列腺内的位置, 这对于靶向前列腺穿刺活检及制定治疗方案有重要的指导意义。因此, SUV_{max} 值不仅是诊断前列腺癌的参考值, 更是判断肿瘤恶性程度及进展情况的重要参考依据, 同时也是 ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT 检查相较于 MRI 对前列腺癌诊断的优势之一。

本部分研究存在以下不足: 本研究的病理结果均为前列腺腺癌, 未涉及特殊病理类型的前列腺癌如前列腺内分泌癌或导管内癌等, 这部分患者 PSMA 表达水平常不高, ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT 检查容易出现假阴性结果。在确诊的 56 例前列腺癌患者中, 29 例患者未接受根治性手术, 未能获得前列腺大体标本, 以穿刺活检作为最终病理结果, 可能存在阳性区域不匹配的误差。另外, 本研究虽采用 ^{68}Ga -PSMA-617

PET/CT 与 mpMRI 认知融合穿刺, 并非 MRI 或 PET/CT 直接引导前列腺穿刺活检, 缺乏软件对 MRI 图像的融合, 且无法实时匹配, 因此可能出现潜在的人为错误, 具有较强的主观性, 穿刺时可能没有实际覆盖影像学检查可疑区域, 存在漏诊可能。

综上所述, PSMA 抗原作为特异性靶点, 在前列腺癌的临床诊断方面有着重要意义。和目前最常用的 MRI 检查相比, ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT 尤其对于低 PSA 患者, 既保证了高灵敏度, 又具备较高的特异度, 即在确保高确诊率的基础之上, 避免了过度诊断, 提高了诊断效能。它是目前极有潜力的新型前列腺癌诊断手段之一, 成为前列腺癌精准诊疗的基础。

第三部分 以 PSMA 为靶点的 PDTX 肿瘤模型免疫治疗初步研究

临床前模型系统的使用对于肿瘤研究的每个步骤来说，无论从对肿瘤的基本生物学研究到新治疗范式的发展都至关重要。关于药物开发和治疗研究，20 世纪 70 年代癌细胞系培养技术的出现推动了体外和体内抗癌剂临床前试验的快速加速和扩展。但肿瘤学中新药物高失败率的最常见原因之一是缺乏临床前模型，这些模型概括了患者肿瘤的异质性^[23]。PDTX 模型能够很好地保持患者肿瘤的遗传特性和异质性。本部分研究首先通过优化实验动物品系建立前列腺癌及膀胱尿路上皮癌 PDTX 模型，进而比较成瘤率与肿瘤患者临床参数间的关系，并总结提高成瘤率的方法。

课题组前期从酵母展示 scFv 抗体库中筛选获得的一株抗 PSMA 的单链抗体，将其轻、重链可变区基因分别于对应的轻、重链恒定区基因拼接，从而获得完整的 PSMAb 抗体^[64]。在此基础上，本研究基于前列腺癌及膀胱尿路上皮癌 PDTX 模型探究 PSMAb 抗体对 PSMA 阳性表达肿瘤的治疗效果，为日后临床研究奠定基础，同时为前列腺癌的创新治疗方法提供了新的思路。

1 材料

1.1 实验试剂和器材

PBS 液	美国 SIGMA 公司
人源性 PSMA 抗体（PSMAb）	课题组自备
RPMI1640 液体培养基	Hyclone 公司
Matrigel 基质胶	美国 BD 公司
抗生素	徐州莱恩有限公司
胎牛血清（FBS）	浙江天杭生物科技股份有限公司
DMSO	美国 SIGMA 公司

组织 DNA 提取试剂盒**常州 BIOG 公司**

液氮罐

美国 Thermo 公司

50ml 离心管

上海生工生物公司

冻存管

上海生工生物公司

套管针

嘉适科学仪器公司

培养皿

上海生工生物公司

移液器

美国 Eppendorf 公司

恒温水浴锅

北京科伟公司

制冰机

日本三洋公司

-80℃ 冰箱

美国 Biorad 公司

1.2 主要试剂配制

组织保存液（RPMI1640：抗生素溶液 99:1）

组织冻存液（FBS:DMSO 9:1）

组织固定液（甲醛：蒸馏水 35:65）

1.3 肿瘤组织来源

取自西京医院泌尿外科住院病人，术前诊断为膀胱癌或前列腺癌，并接受膀胱根治性切除术或机器人辅助腹腔镜下前列腺根治性切除术，术后标本送至西京医院病理科进行病理检查，术前术后诊断一致。所有患者病历资料完整。在西京医院手术室无菌条件下，于新鲜病理组织中取得原代肿瘤标本，立即放入组织保存液，冰盒运送。

1.4 实验动物

由空军军医大学实验动物中心提供 BALB/c-Nude 裸鼠及 NOD/SCID 小鼠，鼠龄 4-6 周，雄性，体重 18-22 g。饲养环境为空军军医大学实验动物中心 SPF 级（specific-pathogen free 级）屏障设施。12 h 昼夜交替，相对湿度 40%，温度 23-25 °C，饮用水经高压灭菌处理，饲料经辐照处理，动物自由摄食和饮水。

2 方法**2.1 收集 P0 代肿瘤组织**

收集者在西京医院手术室无菌条件下待肿瘤离体后，根据术前影像学资料及穿

刺活检结果,避开坏死组织,立即切取靠近前列腺外周带的肿瘤组织,肿瘤组织大小约为 $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$,可根据肿瘤组织多少适量增加切取量,前提必须保证术后前列腺标本切缘完整且不影响临床病理诊断。将切取下的肿瘤组织完全浸泡于组织保存液中,做好标识,迅速将盛有组织保存液和肿瘤组织的 50ml 离心管放入冰盒中保存,并尽快植入 NOD/SCID 小鼠皮下,时间不超过 4 小时。获取肿瘤标本必须经过患者本人或家属同意,并签署知情同意书,承诺仅供试验研究。

2.2 临床资料整理

依据西京医院病历系统详细记录并整理手术患者的信息及病历资料,主要包括住院号,手术时间,年龄等基本信息以及术前血清总 PSA 值,术后病理 Gleason 评分,ISUP 分级分组,肿瘤 TNM 分期等病历资料。

2.3 建立前列腺癌 PDTX 模型 P1 代

在实验动物中心实验室超净工作台进行肿瘤移植操作。用 75%酒精棉球擦拭工作台后,将离体 4 小时以内的肿瘤组织从 50 ml 离心管的保存液中转移到含有适量组织保存液的消毒培养皿中,清洗肿瘤组织 3 遍后,放入另一培养皿并在冰上处理肿瘤组织。使用灭菌眼科剪将肿瘤组织修剪成 $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ 的小块,同时混合适量的基质胶,将组织小块装填至套管针中。选取 4-6 周龄的 NOD/SCID 小鼠,用 75%酒精棉球消毒小鼠背部皮肤,用套管针将混合基质胶的肿瘤组织移植到 NOD/SCID 小鼠背部皮下,撤针后再次予以消毒,命名为 P1 代。每周观察小鼠基本生存情况及肿瘤生长情况,称量体重,用游标卡尺测量瘤体的最短径 $d(\text{mm})$ 和最长径 $L(\text{mm})$,并根据公式 $(L \times d^2) / 2$ 计算肿瘤体积。

2.4 建立泌尿系肿瘤 PDTX 模型 P2 代

待 P1 代瘤体生长至 800 mm^3 - 1000 mm^3 时,异氟烷麻醉 P1 代小鼠,消毒后剪开皮肤,分离瘤体,按 2.3 方法取部分瘤体进行处理传代至 4-6 周龄的裸鼠,成瘤后命名为 P2 代,其余瘤体可进行溯源性检测或冻存。处死 P1 代 NOD/SCID 小鼠。P2 代模型建成后,可重复此方法依次建立 P3、P4 代,选择裸鼠为模型小鼠。

2.5 瘤体的固定和冻存

取 P0-P3 代模型新鲜肿瘤组织各一块,加入 4%多聚甲醛固定,24 h 后分别用石

蜡包埋并制作 4 μm 组织切片，于 60℃ 恒温烤箱中加热 30 分钟烤干后备用。选取冻存的 P1-P3 代肿瘤组织，在冰上去除坏死和脂肪组织后，用组织保存液冲洗干净，剪碎后装入冻存管，加入冻存液后置于 -20℃ 冰箱内 2 小时后转至 -80℃ 冰箱过夜，再转存于液氮罐中。

2.6 PDTX 模型的肿瘤组织形态学检测

- 1) 脱蜡：将切片充分浸泡于二甲苯中，10 分钟后更换二甲苯继续浸泡 10 分钟。
- 2) 水化：依次将切片浸泡于无水乙醇、95%乙醇、85%乙醇、70%乙醇中，时间均为 5 分钟。
- 3) 苏木素染色、分化与反蓝：PBS 浸泡清洗切片 3 次，每次 5 分钟。每张切片滴加苏木素染色液 100 微升，染色 10 分钟，蒸馏水洗片后，用 1% 的盐酸乙醇进行分化，再用蒸馏水洗片。滴加促蓝液染细胞核反蓝。先后用清水和蒸馏水冲洗切片。
- 4) 伊红染色与脱水：滴加伊红染液充分染色 3 分钟后梯度脱水，使用 80% 的乙醇、95% 乙醇脱水、无水乙醇分别脱水 5 秒，2 分钟、2 分钟。
- 5) 切片风干与封片：二甲苯浸泡切片 2 次，每次 5 分钟，风干切片，中性树胶封片。
- 6) 显微镜下观察组织形态并拍照。

2.7 PDTX 模型的肿瘤组织溯源性 STR 检测

2.7.1 组织 DNA 提取

使用 BIOG 组织 DNA 提取试剂盒，按照说明书操作规程进行肿瘤组织 DNA 提取。

配制洗涤液 A 和洗涤液 B

洗涤液 A：21 毫升加入 9 毫升无水乙醇；洗涤液 B：9 毫升加入 21 毫升无水乙醇。

- 1) 取 20 毫克左右的组织，剪碎呈小块，放入 1.5 毫升离心管中，加入 100 微升生理盐水利用匀浆器将组织匀浆为细胞悬液，再加入 200 微升裂解液，20 微升消化液 A，振荡混匀，在室温放置 5 分钟。
- 2) 加入并充分混匀 20 微升消化液 B；水浴：56 摄氏度，60 分钟；离心：5000 转，5 分钟；吸上清并加入无水乙醇 200 微升，混匀。

- 3) 将上述溶液转入吸附柱再放入收集管内, 静置 2 分钟后离心: 4 摄氏度, 12,000 转, 1 分钟, 弃废液。
- 4) 加入洗涤液 A 500 微升并离心: 4 摄氏度, 12,000 转, 1 分钟, 弃废液。
- 5) 加入洗涤液 B 500 微升并离心: 4 摄氏度, 12,000 转, 1 分钟, 弃废液。
- 6) 再次离心: 4 摄氏度, 12,000 转, 2 分钟, 弃残余洗涤液。
- 7) 将吸附柱放入新离心管内同时加入洗脱液 50-200 微升静置, 时间 3 分钟, 离心: 4 摄氏度, 12,000 转, 2 分钟, 收集 DNA。

2.7.2 STR 基因分型检测

测量 DNA 浓度, 稀释至 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 进行 STR 基因分型检测, 检测地点为西京医院司法鉴定中心。

2.8 PDTX 模型的肿瘤组织 PSMA 抗原表达检测

采用免疫组化方法分析 PSMA 在前列腺癌和膀胱尿路上皮癌 PDTX 的表达情况, 方法参照第一部分方法 2.2。

2.9 基于 PDTX 前列腺癌模型体内实验检测 PSMAb 对 PSMA 阳性肿瘤生长的抑制

- 1) 选取病案号为 D17725 的前列腺癌的 P2 代 PDTX 模型按照 2.3 方法传至 20 只体重为 18-22 g, 4 周龄的裸鼠皮下。
- 2) 观察肿瘤生长情况并测量肿瘤体积, 接种后 7 天, 选择成瘤且大小一致的裸鼠 15 只, 按照随机分组原则分为 3 组, 即 IgG 组 5 mg/kg 组, PSMAb 1 mg/kg 组和 PSMAb 5 mg/kg 组, 每组 5 只。
- 3) 每次治疗给每只裸鼠注射 200 μl 相应的试剂, 给药方式为尾静脉注射, 每隔 3 天或 4 天给药一次 (每周给药 2 次), 并观察测量肿瘤体积。

2.10 统计学分析

分析前列腺癌和膀胱尿路上皮癌的 PDTX 模型的建成情况, 计算成瘤率, 并根据公式 $(L \times d^2) / 2$ 记录肿瘤体积, 绘制肿瘤生长曲线。采用 SPSS24.0 和 Graphpad Prism7.0 软件进行统计分析, 采用卡方检验或 Fisher 确切概率法检验分析是否成瘤与模型各项临床资料的关系, 判断各因素对成瘤的影响, 应用重复测量多因素方差分

析方法判断各组肿瘤体积的差异。以 $P < 0.05$ 视为有统计学意义。

3 结果

3.1 前列腺癌 PDTX 模型的鉴定及成瘤率分析

本研究共收集 2017 年 1 月至 2019 年 1 月共 55 例前列腺癌标本，截至 2019 年 3 月 1 日共建成 P1 代 PDTX 模型 14 例，总成瘤率为 25.45%。HE 染色形态学检测和 STR 检测鉴定该 14 例模型均为各自 P0 代同源前列腺腺癌（图 9）。如表 7 所示，将 55 例前列腺癌标本成瘤情况与临床病理信息进行统计分析提示，Gleason 评分 8-10 分组的成瘤率为 37.5%，6-7 分组成瘤率为 8.7%，差异有统计学意义 ($P=0.016$)，而不同年龄、PSA 值、原发肿瘤侵袭程度（T 分期）和区域淋巴结转移（N 分期）分组间的成瘤率均无明显统计学差异。

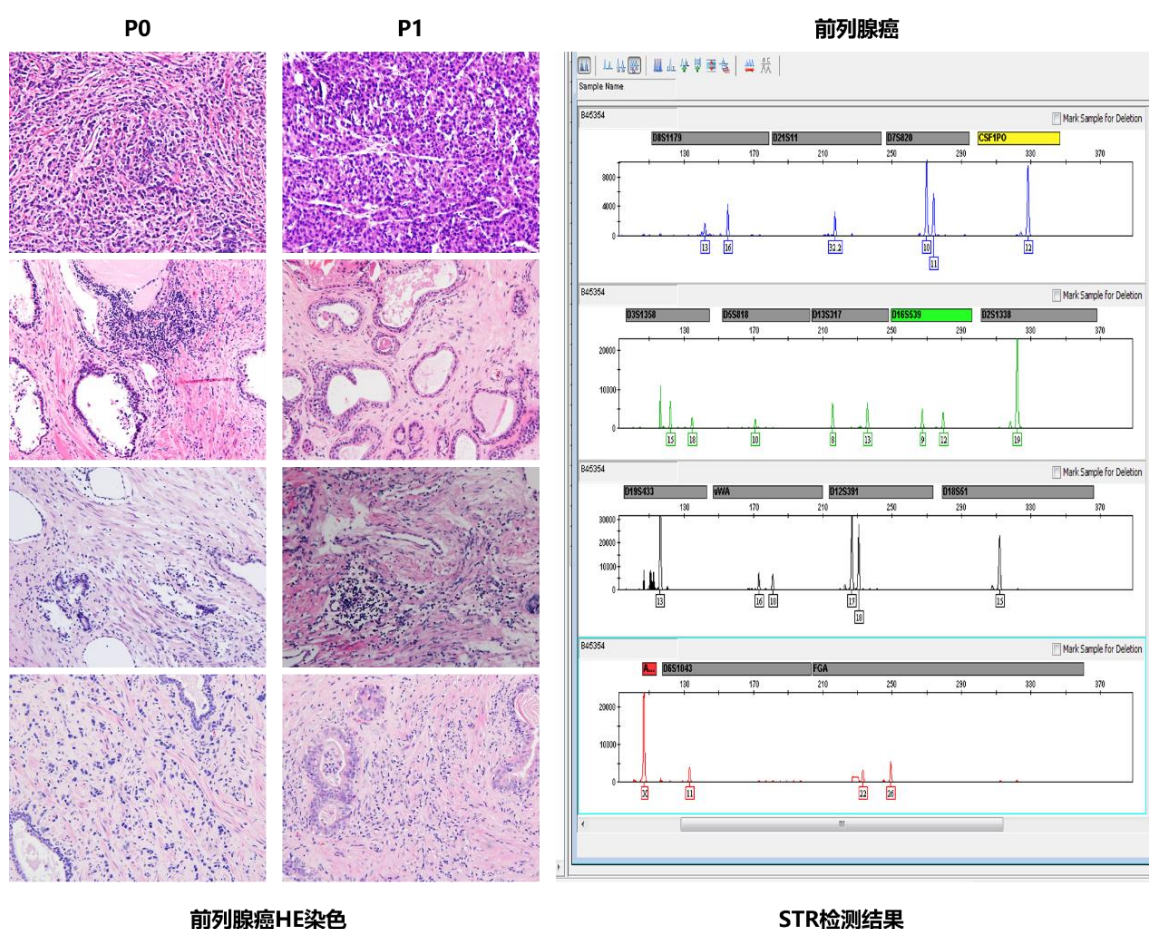


图 9 前列腺癌 PDTX 模型溯源性检测

表 7 前列腺癌标本成瘤情况与临床病理信息进行统计分析表

患者资料	标本例数	PDTX 模型建成情况		成瘤率	χ ² 值	P 值
		成瘤	未成瘤			
年龄						
<70 岁	22	6	16	27.27%	0.064	0.800
≥70 岁	33	8	25	24.24%		
PSA 值						
<10 ng/ml	8	1	7	14.29%	0.222	0.638
≥10 ng/ml	47	13	34	27.66%		
Gleason 评分						
6-7 分	23	2	21	8.70%	5.851	0.016
8-10 分	32	12	20	37.50%		
TNM 分期						
T 分期						
T ₂	29	6	23	20.69%	0.734	0.392
T ₃ -T ₄	26	8	18	30.77%		
N 分期						
N ₀	10	4	6	40.00%	0.587	0.444
N ₁	45	10	35	22.22%		

3.2 前列腺癌 PDTX 模型建成情况比较

和本研究相比,课题组在 2015 年 5 月至 2016 年 12 月共收集 44 例标本建立 PDTX 模型, P1 代小鼠使用 BALB/c 裸鼠而非 NOD/SCID 小鼠, 其余标本收集方法和试验条件情况均相同。如表 8 所示, 统计分析两组模型建成的情况提示, P1 代 BALB/c 裸鼠的成瘤率仅有 6.82%, 而换用 NOD/SCID 小鼠后成瘤率可达 25.45%, 差异有统计学意义, $P<0.05$, 即 P1 代模型小鼠选择 NOD/SCID 小鼠可能提高成瘤率。

表 8 不同 P1 代小鼠品系的 PDTX 模型建成情况统计分析表

分组	例数	PDTX 模型建成情况		成瘤率	χ^2 值	P 值
		建成	未建成			
BALB/c 裸鼠	44	3	41	6.8%	5.969	0.015
NOD/SCID 鼠	55	14	41	25.45%		

3.3 膀胱尿路上皮癌 PDTX 模型的鉴定及成瘤率分析

本研究共收集 2017 年 6 月至 2018 年 11 月共 16 例膀胱尿路上皮癌标本，截至 2019 年 3 月 1 日统计共建成 P1 代 PDTX 模型 8 例，总成瘤率为 50%。8 例经 HE 染色形态学检测和 STR 检测鉴定均为各自 P0 代同源膀胱尿路上皮癌（图 10）。如表 9 所示，将 16 例膀胱尿路上皮癌标本成瘤情况与临床病理信息进行统计分析提示，Ki-67 增值指数 $<50\%$ 分组的成瘤率为 22.22%， $\geq 50\%$ 分组成瘤率为 85.71%，差异有统计学意义（ $P=0.041$ ），而不同年龄、性别、病理分级、原发肿瘤侵袭程度（T 分期）和区域淋巴结转移（N 分期）分组间的成瘤率均无明显统计学差异。

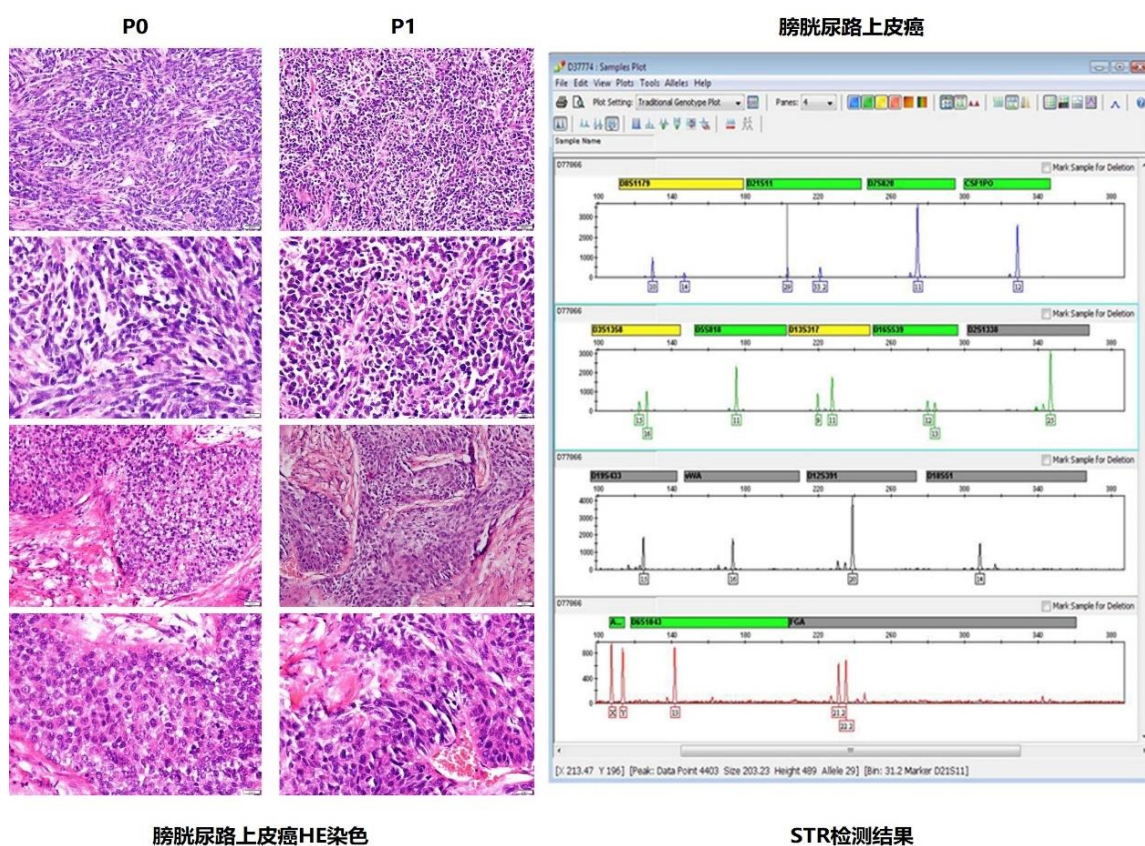


图 10 膀胱尿路上皮癌 PDTX 模型溯源性检测

表 9 膀胱尿路上皮癌标本成瘤情况与临床病理信息进行统计分析表

患者资料	标本例数	PDTX 建成	模型建成情况 未建成	成瘤率	Fisher 确切概率 P 值
年龄					
<60 岁	8	5	3	62.50%	0.619
≥60 岁	8	3	5	37.50%	
性别					
男	13	6	7	46.15%	1.000
女	3	2	1	66.67%	
病理分级					
高级别	13	7	6	53.84%	1.000
低级别	3	1	2	33.33%	
TNM 分期					
T 分期					
T ₂	8	2	6	25.00%	0.132
T ₃ -T ₄	8	6	2	75.00%	
N 分期					
N ₀	13	6	7	46.15%	1.000
N ₁	3	2	1	66.67%	
Ki-67 表达					
<50%	9	2	7	22.22%	0.041
≥50%	7	6	1	85.71%	

3.4 前列腺癌及膀胱尿路上皮癌 PDTX 模型生长情况

P1 代 NOD/SCID 鼠接种肿瘤后, 在 SPF 级环境中生长情况良好, 未出现感染或死亡等情况。如图 11 所示, 从 P1-P3 代移植肿瘤开始, 按照 2.3 的方法, 每 7 天测量一次皮下移植瘤体的最长径与最短径, 计算肿瘤体积, 并绘制出肿瘤生长曲线。两种 PDTX 模型生长特点为: P1 代肿瘤生长速度较慢, P2 代与 P3 代肿瘤生长速度增加, 且传代次数越多, 肿瘤生长速度越快 ($P_1 < 0.05$, $P_2 < 0.05$)。前列腺癌 PDTX 模型和膀胱尿路上皮癌 PDTX 相比肿瘤生长速度较慢 ($P < 0.05$)。

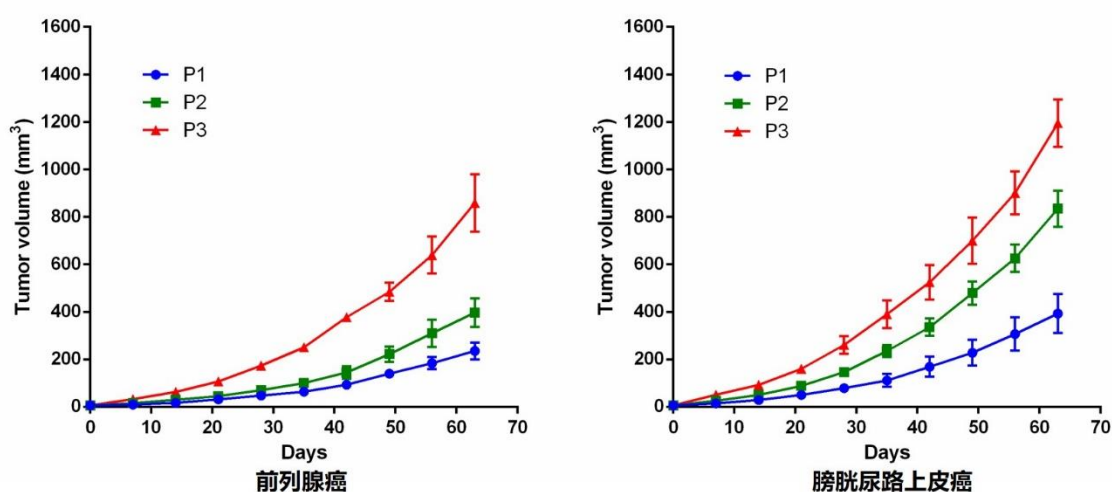


图 11 两种 PDX 模型肿瘤生长曲线图

3.5 前列腺癌和膀胱尿路上皮癌 PDX 模型 PSMA 抗原表达情况

将 14 例 PDX 前列腺癌模型和 8 例膀胱尿路上皮癌模型 P1 代组织切片分别进行免疫组化染色分析 PSMA 表达情况。前列腺癌 PDX 模型 13 例阳性表达（8 例强阳性，5 例弱阳性），均在肿瘤细胞膜表达，1 例阴性表达，8 例膀胱尿路上皮癌 PDX 模型均为阴性表达（图 12）。以上结果提示可将 PSMA 作为合适靶点基于表达阳性的前列腺癌 PDX 模型进行免疫治疗研究。

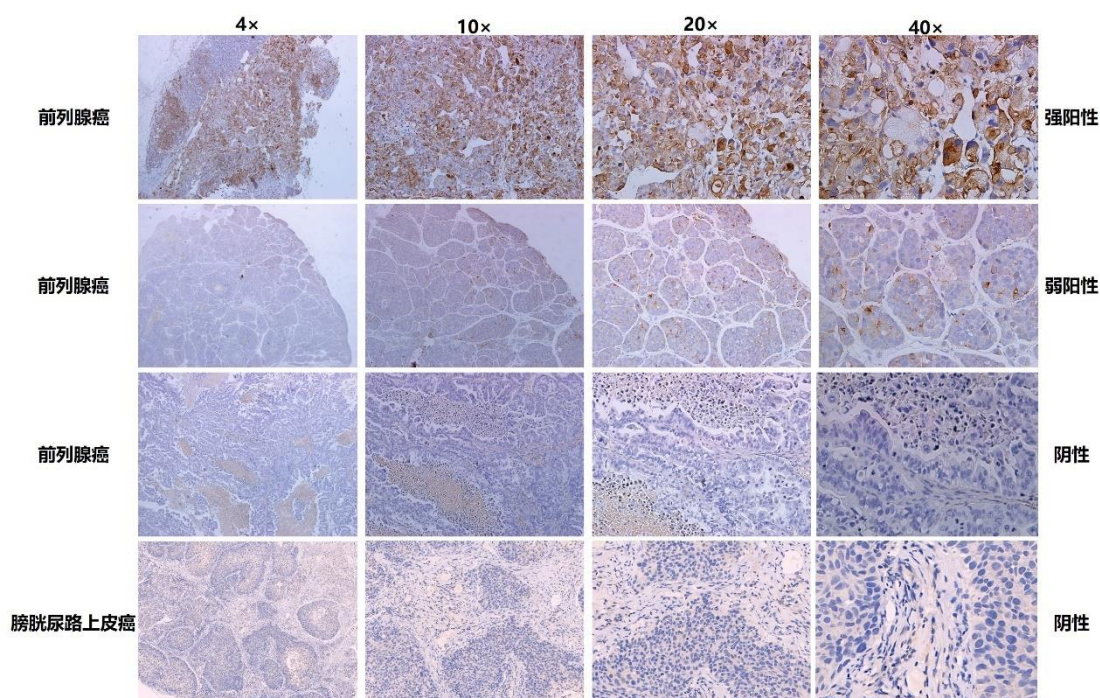


图 12 前列腺癌和膀胱尿路上皮癌 PDX 模型 PSMA 抗原表达情况图

3.6 PSMAb 抗体对 PSMA 阳性前列腺癌 PDTX 模型肿瘤生长的抑制作用

利用 PSMA 表达阳性的前列腺癌 PDTX 模型进行 PSMAb 抗体免疫治疗研究。如图 13 所示, 两组 PSMAb 治疗组的肿瘤体积明显小于 IgG 阴性对照组。在接种后第 14 天, 在给予 PSMAb 的 2 个剂量组中, 肿瘤体积较前明显虽小, 而 IgG 5 mg/kg 组肿瘤体积逐渐增长。在接种后 18 天, PSMAb 5 mg/kg 组肿瘤体积继续缩小, 而 PSMAb 1 mg/kg 组肿瘤体积略微增大, IgG 5 mg/kg 组肿瘤体积继续增大且在三组中体积最大。在接种后 22 天, 3 组肿瘤体积均较前增加, 但两组 PSMAb 治疗组的肿瘤体积明显小于 IgG 阴性对照组。在接种后 32 天, 最后一次给药, 给药后 PSMAb 5mg/kg 组肿瘤较前先有缩小后逐渐上升, 而 IgG 阴性对照组和 PSMAb 1 mg/kg 组未见肿瘤缩小。接种后 43 天, 此时停药第 11 天, 测量肿瘤体积提示 IgG 5 mg/kg 组肿瘤体积最大, PSMAb 1 mg/kg 组次之, PSMAb 5 mg/kg 组最小。运用重复测量多因素方差分析方法比较各实验组肿瘤体积大小, 提示 IgG 治疗组肿瘤大小较 PSMAb 5 mg/kg 组或 1 mg/kg 组有统计学意义 ($P_1=0.005$, $P_2=0.002$), 而 PSMAb 两治疗组间无统计学差异 ($P_3=0.1610$)。

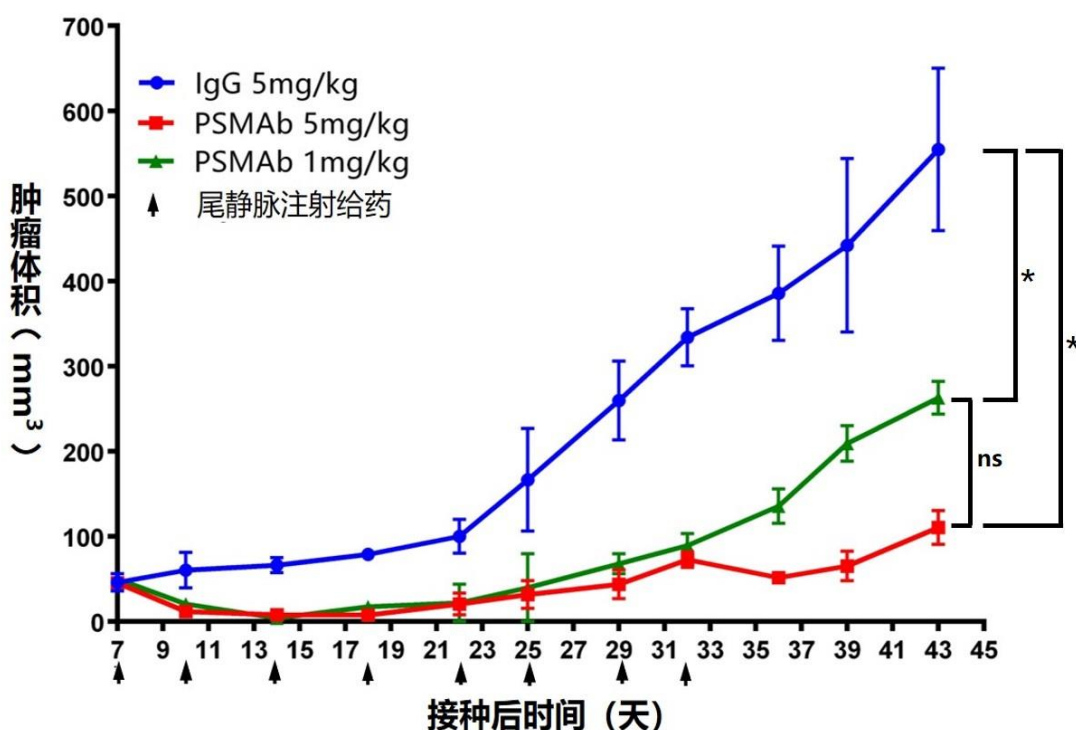


图 13 不同抗体组对前列腺癌 PDTX 模型治疗作用对比图

(*: $p<0.05$, ns: 无统计学意义)

4 讨论

导致抗肿瘤新型药物高失败率的最常见原因之一就是缺乏合适的临床前模型,而这些模型的必备条件之一就是要具有患者肿瘤的异质性^[23]。尽管肿瘤细胞系培养技术的进步推动了肿瘤生物学研究的发展,但细胞系模型使用连续传代的肿瘤细胞株,因适应了缺乏肿瘤微环境(如非肿瘤基质细胞、细胞外基质、肿瘤微环境因子等)的培养皿条件,使得这些细胞株在移植到免疫缺陷小鼠后形成了同质性的瘤体,丢失了原代肿瘤特征。这种丢失了肿瘤异质性和分子学特性的体内模型,导致许多新型抗肿瘤药物临床前研究和临床试验实际疗效之间的相关性较差^[65]。将病人来源的肿瘤组织移植于免疫缺陷小鼠而建立的人类肿瘤异种移植瘤(PDX)模型,能够很好地保持患者肿瘤的遗传特性和异质性。研究表明,该肿瘤模型保留了原发肿瘤的病例特性、组织学和表型特征,临床一致性高,具有抗肿瘤药物筛选的独特优势^[66, 67]。

本研究首先成功建立了前列腺癌 PDX 模型 14 例和膀胱尿路上皮癌 PDX 模型 8 例,成瘤率分别为 25.45%和 50.00%。分别分析两种肿瘤患者的临床病理资料发现,对于前列腺癌,Gleason 评分 8-10 分组的成瘤率为 37.5%,6-7 分组成瘤率为 8.7%,差异有统计学意义($P=0.016$),而不同年龄、PSA 值、原发肿瘤侵袭程度(T 分期)和区域淋巴结转移(N 分期)分组间的成瘤率均无明显统计学差异。提示前列腺癌的病例分级即肿瘤的恶性程度可能是影响成瘤率的关键因素,肿瘤的恶性程度越高,越易于成瘤。而对于膀胱尿路上皮癌,Ki-67 增值指数 $<50\%$ 分组的成瘤率为 22.22%, $\geq 50\%$ 分组成瘤率为 85.71%,差异有统计学意义($P=0.041$)。不同年龄、性别、病理分级、原发肿瘤侵袭程度(T 分期)和区域淋巴结转移(N 分期)分组间的成瘤率均无明显统计学差异。Ki-67 增值指数反映了肿瘤细胞增殖状态,研究结果提示当肿瘤增殖活性越高,越易于成瘤。

本研究还发现,除了移植瘤本身的异质性外,影响成瘤率的另一个重要因素是模型小鼠的品系。和本研究相比,课题组在 2015 年 5 月至 2016 年 12 月共收集 44 例标本建立 PDX 模型,P1 代小鼠使用 BALB/c 裸鼠而非 NOD/SCID 小鼠,其余标本收集方法和试验条件情况均相同。如表 8 所示,结果提示,P1 代 BALB/c 裸鼠的成瘤率仅有 6.82%,而换用 NOD/SCID 小鼠后成瘤率可达 25.45%,差异有统计学意义, $P<0.05$,即 P1 代模型小鼠选择 NOD/SCID 小鼠可能提高成瘤率。BALB/c 裸鼠胸腺

缺失,存在 T 细胞免疫缺陷,同时 B 淋巴细胞正常,但功能缺陷,抗体主要为 IgM,只有少量 IgG。而 NOD/SCID 小鼠是在 SCID 小鼠的基础上与非肥胖性糖尿病小鼠(NOD/Lt)品系回交的免疫缺陷鼠,既有先天免疫缺陷,又有 T 和 B 淋巴细胞缺乏,同时 NK 细胞活性低,且具有更低的免疫恢复几率。因此,和 BALB/c 裸鼠相比,NOD/SCID 小鼠具备更完全的免疫缺陷,其作为模型小鼠的成瘤率更高。

课题组前期研究结果提示:前列腺癌 PDTX 模型生长特点为:P1 代肿瘤生长速度较慢,P2 代与 P3 代肿瘤生长速度增加,且传代次数越多,肿瘤生长速度越快^[68]和本研究结果一致。本研究还发现,膀胱尿路上皮癌 PDTX 模型同样具有上述生长特点,且同代膀胱尿路上皮癌 PDTX 模型和前列腺癌 PDTX 模型相比生长速度较快。

本研究进一步将两种 PDTX 模型的 PSMA 表达情况进行免疫组化分析,前列腺癌 PDTX 模型 13 例在肿瘤细胞膜上阳性表达(8 例强阳性,5 例弱阳性),1 例阴性表达,8 例膀胱尿路上皮癌 PDTX 模型均为阴性表达。已证实膀胱尿路上皮癌血管内皮细胞上有 PSMA 阳性表达,但 PDTX 模型中均为阴性表达,结合文献分析免疫组化结果均为阴性的可能原因,PSMA 在膀胱尿路上皮癌的表达主要集中在肿瘤血管内皮细胞,但 PDTX 模型肿瘤组织的血管为鼠源性而非人源性,而根据 Steven Seaman 等的研究结果提示鼠源性的肿瘤血管可能不表达 PSMA 抗原^[69, 70],因此本研究只能基于 PSMA 表达阳性的前列腺癌 PDTX 模型来进行 PSMAb 抗体的免疫治疗研究。本研究发现经过 8 次给药并停药观察 11 天后,根据肿瘤生长曲线,两组 PSMAb 治疗组的肿瘤体积明显小于 IgG 阴性对照组,且肿瘤体积差异均有统计学意义。而 PSMAb 1 mg/kg 组肿瘤体积略大于 PSMAb 5 mg/kg 组,但两组肿瘤体积差异无统计学意义。以上结果说明,PSMAb 能够在体内抑制 PSMA 表达阳性前列腺癌的生长。

本研究通过建立肿瘤 PDTX 模型并对其 PSMA 表达情况进行研究,进而对 PSMA 阳性表达的前列腺癌 PDTX 模型进行 PSMAb 抗体的治疗研究证实,PSMA 可作为一个特异性靶点用于前列腺癌的免疫治疗,这为日后的肿瘤治疗的药物研究开辟了新的思路和方向,同时,本研究建立并使用 PDTX 模型,保持了肿瘤细胞的异质性,为今后肿瘤个体化治疗的进一步研究奠定了基础。

小 结

1. PSMA 在前列腺癌的肿瘤细胞包膜和肿瘤血管均有阳性表达，而对于乳腺癌、卵巢癌、肝细胞癌和膀胱尿路上皮癌，只在肿瘤血管上有阳性表达。
2. 以 PSMA 为靶点的 ^{68}Ga -PSMA-617 PET/CT 显像检查对前列腺癌的诊断效能可能更优于多参数 MRI。PSA 值、Gleason 评分和 ISUP 分级分组与 SUV_{max} 值呈正相关关系，SUV_{max} 值可以作为有意义的参考指标诊断有临床意义的前列腺癌从而避免过度诊断。
3. PSMAb 抗体对 PSMA 表达阳性的前列腺癌 PDTX 模型有一定抑制作用，提示 PSMA 可作为前列腺癌免疫治疗的有效靶点。

参考文献

- [1] Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, et al. LNCaP model of human prostatic carcinoma [J]. Cancer Res, 1983, 43(4): 1809-1818.
- [2] Elsasser-Beile U, Buhler P, Wolf P. Targeted therapies for prostate cancer against the prostate specific membrane antigen [J]. Curr Drug Targets, 2009, 10(2): 118-125.
- [3] Israeli RS, Powell CT, Fair WR, et al. Molecular cloning of a complementary DNA encoding a prostate-specific membrane antigen [J]. Cancer Res, 1993, 53(2): 227-230.
- [4] Bostwick DG, Pacelli A, Blute M, et al. Prostate specific membrane antigen expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a study of 184 cases [J]. Cancer, 1998, 82(11): 2256-2261.
- [5] Haffner MC, Laimer J, Chaux A, et al. High expression of prostate-specific membrane antigen in the tumor-associated neo-vasculature is associated with worse prognosis in squamous cell carcinoma of the oral cavity [J]. Mod Pathol, 2012, 25(8): 1079-1085.
- [6] Wernicke AG, Varma S, Greenwood EA, et al. Prostate-specific membrane antigen expression in tumor-associated vasculature of breast cancers [J]. Apms, 2014, 122(6): 482-489.
- [7] Wang HL, Wang SS, Song WH, et al. Expression of prostate-specific membrane antigen in lung cancer cells and tumor neovasculature endothelial cells and its clinical significance [J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0125924.
- [8] Taywade SK, Damle NA, Bal C. PSMA Expression in Papillary Thyroid Carcinoma: Opening a New Horizon in Management of Thyroid Cancer? [J]. Clin Nucl Med, 2016, 41(5): e263-265.
- [9] Ren H, Zhang H, Wang X, et al. Prostate-specific membrane antigen as a marker of pancreatic cancer cells [J]. Med Oncol, 2014, 31(3): 857.
- [10] Rajasekaran SA, Anilkumar G, Oshima E, et al. A novel cytoplasmic tail MXXXL motif

mediates the internalization of prostate-specific membrane antigen [J]. Mol Biol Cell, 2003, 14(12): 4835-4845.

[11] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.

[12] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.

[13] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.

[14] Epstein JI, Egevad L, Amin MB, et al. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System [J]. Am J Surg Pathol, 2016, 40(2): 244-252.

[15] Epstein JI, Zelefsky MJ, Sjoberg DD, et al. A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score [J]. Eur Urol, 2016, 69(3): 428-435.

[16] National Comprehensive Cancer Network. (NCCN) Clinical practice guidelines in oncology. Prostate Cancer, Version 4. 2018. [M].

[17] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.

[18] Pinaquy JB, De Clermont-Galleran H, Pasticier G, et al. Comparative effectiveness of [(18) F]-fluorocholine PET-CT and pelvic MRI with diffusion-weighted imaging for staging in patients with high-risk prostate cancer [J]. Prostate, 2015, 75(3): 323-331.

[19] Afshar-Oromieh A, Zechmann CM, Malcher A, et al. Comparison of PET imaging with a (68)Ga-labelled PSMA ligand and (18)F-choline-based PET/CT for the diagnosis of recurrent prostate cancer [J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2014, 41(1): 11-20.

[20] Afshar-Oromieh A, Avtzi E, Giesel FL, et al. The diagnostic value of PET/CT imaging with the (68)Ga-labelled PSMA ligand HBED-CC in the diagnosis of recurrent prostate cancer [J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2015, 42(2): 197-209.

- [21]Zhang Q, Zang S, Zhang C, et al. Comparison of (68)Ga-PSMA-11 PET-CT with mpMRI for preoperative lymph node staging in patients with intermediate to high-risk prostate cancer [J]. J Transl Med, 2017, 15(1): 230.
- [22]臧士明;王峰;黄悦;张川;姚晓晨;崔璨;张鹏俊;孙宏斌;贾瑞鹏;李天女. 68Ga-PSMA-11 PET/CT对去势抵抗性前列腺癌的诊断价值 [J]. 中华核医学与分子影像杂志[J], 2017, 37(33):142-146.
- [23]Johnson JI, Decker S, Zaharevitz D, et al. Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials [J]. Br J Cancer, 2001, 84(10): 1424-1431.
- [24]Berdik C. Unlocking bladder cancer [J]. Nature, 2017, 551(7679): S34-s35.
- [25]Kamat AM, Hahn NM, Efsthathiou JA, et al. Bladder cancer [J]. Lancet, 2016, 388(10061): 2796-2810.
- [26]Van Kessel KE, Zuiverloon TC, Alberts AR, et al. Targeted therapies in bladder cancer: an overview of in vivo research [J]. Nat Rev Urol, 2015, 12(12): 681-694.
- [27]Bellmunt J, Powles T, Vogelzang NJ. A review on the evolution of PD-1/PD-L1 immunotherapy for bladder cancer: The future is now [J]. Cancer Treat Rev, 2017, 54(58-67).
- [28]Powles T, Duran I, Van Der Heijden MS, et al. Atezolizumab versus chemotherapy in patients with platinum-treated locally advanced or metastatic urothelial carcinoma (IMvigor211): a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial [J]. Lancet, 2018, 391(10122): 748-757.
- [29]Kasoha M, Unger C, Solomayer EF, et al. Prostate-specific membrane antigen (PSMA) expression in breast cancer and its metastases [J]. Clin Exp Metastasis, 2017, 34(8): 479-490.
- [30]Haffner MC, Kronberger IE, Ross JS, et al. Prostate-specific membrane antigen expression in the neovasculature of gastric and colorectal cancers [J]. Hum Pathol, 2009, 40(12): 1754-1761.
- [31]Abdel-Hadi M, Ismail Y, Younis L. Prostate-specific membrane antigen (PSMA) immunoexpression in the neovasculature of colorectal carcinoma in Egyptian patients [J]. Pathol Res Pract, 2014, 210(11): 759-763.

- [32] Schmidt LH, Heitkotter B, Schulze AB, et al. Prostate specific membrane antigen (PSMA) expression in non-small cell lung cancer [J]. PLoS One, 2017, 12(10): e0186280.
- [33] Davis MI, Bennett MJ, Thomas LM, et al. Crystal structure of prostate-specific membrane antigen, a tumor marker and peptidase [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(17): 5981-5986.
- [34] Milowsky MI, Nanus DM, Kostakoglu L, et al. Phase I trial of yttrium-90-labeled anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody J591 for androgen-independent prostate cancer [J]. J Clin Oncol, 2004, 22(13): 2522-2531.
- [35] Bander NH, Nanus DM, Milowsky MI, et al. Targeted systemic therapy of prostate cancer with a monoclonal antibody to prostate-specific membrane antigen [J]. Semin Oncol, 2003, 30(5): 667-676.
- [36] Slovin SF. Targeting novel antigens for prostate cancer treatment: focus on prostate-specific membrane antigen [J]. Expert Opin Ther Targets, 2005, 9(3): 561-570.
- [37] Lupold SE, Hicke BJ, Lin Y, et al. Identification and characterization of nuclease-stabilized RNA molecules that bind human prostate cancer cells via the prostate-specific membrane antigen [J]. Cancer Res, 2002, 62(14): 4029-4033.
- [38] Foss CA, Mease RC, Fan H, et al. Radiolabeled small-molecule ligands for prostate-specific membrane antigen: in vivo imaging in experimental models of prostate cancer [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(11): 4022-4028.
- [39] Samplaski MK, Heston W, Elson P, et al. Folate hydrolase (prostate-specific membrane [corrected] antigen) 1 expression in bladder cancer subtypes and associated tumor neovasculature [J]. Mod Pathol, 2011, 24(11): 1521-1529.
- [40] Gerstenbluth RE, Seftel AD, Hampel N, et al. The accuracy of the increased prostate specific antigen level (greater than or equal to 20 ng./ml.) in predicting prostate cancer: is biopsy always required? [J]. J Urol, 2002, 168(5): 1990-1993.
- [41] Van Vugt HA, Roobol MJ, Kranse R, et al. Prediction of prostate cancer in unscreened men: external validation of a risk calculator [J]. Eur J Cancer, 2011, 47(6): 903-909.
- [42] Zhang J, Shao S, Wu P, et al. Diagnostic performance of (68)Ga-PSMA PET/CT in the detection of prostate cancer prior to initial biopsy: comparison with cancer-predicting

- nomograms [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2019,
- [43]Woo S, Suh CH, Kim SY, et al. Diagnostic Performance of Prostate Imaging Reporting and Data System Version 2 for Detection of Prostate Cancer: A Systematic Review and Diagnostic Meta-analysis [J]. *Eur Urol*, 2017, 72(2): 177-188.
- [44]Thompson JE, Van Leeuwen PJ, Moses D, et al. The Diagnostic Performance of Multiparametric Magnetic Resonance Imaging to Detect Significant Prostate Cancer [J]. *J Urol*, 2016, 195(5): 1428-1435.
- [45]Kim M, Choi SK, Park M, et al. Characteristics of Anteriorly Located Prostate Cancer and the Usefulness of Multiparametric Magnetic Resonance Imaging for Diagnosis [J]. *J Urol*, 2016, 196(2): 367-373.
- [46]Perera M, Papa N, Christidis D, et al. Sensitivity, Specificity, and Predictors of Positive (68)Ga-Prostate-specific Membrane Antigen Positron Emission Tomography in Advanced Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis [J]. *Eur Urol*, 2016, 70(6): 926-937.
- [47]Afshar-Oromieh A, Hetzheim H, Kratochwil C, et al. The Theranostic PSMA Ligand PSMA-617 in the Diagnosis of Prostate Cancer by PET/CT: Biodistribution in Humans, Radiation Dosimetry, and First Evaluation of Tumor Lesions [J]. *J Nucl Med*, 2015, 56(11): 1697-1705.
- [48]Benesova M, Schafer M, Bauder-Wust U, et al. Preclinical Evaluation of a Tailor-Made DOTA-Conjugated PSMA Inhibitor with Optimized Linker Moiety for Imaging and Endoradiotherapy of Prostate Cancer [J]. *J Nucl Med*, 2015, 56(6): 914-920.
- [49]那彦群, 叶章群, 孙颖浩, 孙光, 黄建, 孔垂泽, 孙则禹, 王建业. 中国泌尿外科疾病诊断治疗指南 2014 版, 北京:人民卫生出版社, 2013, 61-89. ISBN978-7-117-17997-3. [J].
- [50]郑雨潇, 张成, 吴杰, 等. 经直肠超声引导前列腺 12+1 针穿刺活检的临床研究 [J]. *中华泌尿外科科学杂志*[J], 2017, 38: 375-378.
- [51]赵明, 何向蕾, 张大宏, et al. WHO(2016)泌尿男性生殖系统肿瘤组织学分类解读 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2017, 33(02): 119-124.
- [52]Paner GP, Stadler WM, Hansel DE, et al. Updates in the Eighth Edition of the Tumor-Node-Metastasis Staging Classification for Urologic Cancers [J]. *Eur Urol*, 2018, 73(4):

560-569.

[53]Martin R, Juttler S, Muller M, et al. Cationic eluate pretreatment for automated synthesis of [(6)(8)Ga]CPCr4.2 [J]. Nucl Med Biol, 2014, 41(1): 84-89.

[54]Carlsson S, Maschino A, Schroder F, et al. Predictive value of four kallikrein markers for pathologically insignificant compared with aggressive prostate cancer in radical prostatectomy specimens: results from the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer section Rotterdam [J]. Eur Urol, 2013, 64(5): 693-699.

[55]Futterer JJ, Briganti A, De Visschere P, et al. Can Clinically Significant Prostate Cancer Be Detected with Multiparametric Magnetic Resonance Imaging? A Systematic Review of the Literature [J]. Eur Urol, 2015, 68(6): 1045-1053.

[56]李涛, 夏春潮, 高亮, 等. 多参数磁共振成像在前列腺癌诊疗中的应用[J]. 中华泌尿外科杂志, 2018, 7:556-558. [J].

[57]Moore CM, Robertson NL, Arsanious N, et al. Image-guided prostate biopsy using magnetic resonance imaging-derived targets: a systematic review [J]. Eur Urol, 2013, 63(1): 125-140.

[58]Siddiqui MM, Rais-Bahrami S, Truong H, et al. Magnetic resonance imaging/ultrasound-fusion biopsy significantly upgrades prostate cancer versus systematic 12-core transrectal ultrasound biopsy [J]. Eur Urol, 2013, 64(5): 713-719.

[59]Dianat SS, Carter HB, Macura KJ. Performance of multiparametric magnetic resonance imaging in the evaluation and management of clinically low-risk prostate cancer [J]. Urol Oncol, 2014, 32(1): 39.e31-10.

[60]Koerber SA, Will L, Kratochwil C, et al. (68)Ga-PSMA-11 PET/CT in Primary and Recurrent Prostate Carcinoma: Implications for Radiotherapeutic Management in 121 Patients [J]. J Nucl Med, 2018,

[61]Koerber SA, Utzinger MT, Kratochwil C, et al. (68)Ga-PSMA-11 PET/CT in Newly Diagnosed Carcinoma of the Prostate: Correlation of Intraprostatic PSMA Uptake with Several Clinical Parameters [J]. J Nucl Med, 2017, 58(12): 1943-1948.

[62]Budaus L, Leyh-Bannurah SR, Salomon G, et al. Initial Experience of (68)Ga-PSMA PET/CT Imaging in High-risk Prostate Cancer Patients Prior to Radical Prostatectomy [J].

Eur Urol, 2016, 69(3): 393-396.

[63]Zang S, Shao G, Cui C, et al. 68Ga-PSMA-11 PET/CT for prostate cancer staging and risk stratification in Chinese patients [J]. Oncotarget, 2017, 8(7): 12247-12258.

[64]吴介恒. 针对前列腺特异性膜抗原(PSMA)的人源性抗体偶联药物研究 [D]; 第四军医大学, 2016.

[65]Daniel VC, Marchionni L, Hierman JS, et al. A primary xenograft model of small-cell lung cancer reveals irreversible changes in gene expression imposed by culture in vitro [J]. Cancer Res, 2009, 69(8): 3364-3373.

[66]Jin K, Teng L, Shen Y, et al. Patient-derived human tumour tissue xenografts in immunodeficient mice: a systematic review [J]. Clin Transl Oncol, 2010, 12(7): 473-480.

[67]Morton CL, Houghton PJ. Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice [J]. Nat Protoc, 2007, 2(2): 247-250.

[68]朱越华. 前列腺癌 PDX 模型的建立及鉴定 [D]; 第四军医大学, 2017.

[69]Seaman S, Zhu Z, Saha S, et al. Eradication of Tumors through Simultaneous Ablation of CD276/B7-H3-Positive Tumor Cells and Tumor Vasculature [J]. Cancer Cell, 2017, 31(4): 501-515.e508.

[70]Huang X, Bennett M, Thorpe PE. Anti-tumor effects and lack of side effects in mice of an immunotoxin directed against human and mouse prostate-specific membrane antigen [J]. Prostate, 2004, 61(1): 1-11.

致 谢

三年一瞬，转眼已是毕业时分。回想刚踏进校园时的稚嫩与踌躇的自己，如今已站上了毕业答辩的讲台。三年前，当我脱颖于基层即将进入名校深造时内心充满着激动与憧憬；今天，当我站在这里即将完成学业并步入军旅新阶段时内心充满着感慨与满足。这弥足珍贵的三年不仅给予了我学识上的进步，使我更加明确了所学专业努力的方向与目标，同时也给予了我宝贵的人生经验，使我更加坚定了做一名优秀医生理想与追求。回望研究生的三年时光，我由衷的感谢所有指导、关心、帮助和支持过我的师长、同学、朋友和家人们，是你们的陪伴与鼓励让我真正的成长与成熟。

首先要衷心地感谢我的导师秦卫军教授。您高尚的为人与修养、精湛的业务水平以及低调踏实的作风深深的影响着我，让我真正感受到了榜样的力量。三年来，您让我看到了一名医生的品格，一名教授的风骨和一名师长的胸怀。在学习上，您不遗余力的为我们提供更高的平台与帮助，时刻关心并督促着我的成长进步。您的谆谆教诲与严格要求成为了我努力的动力源泉，使我格外珍惜这宝贵的三年时光，尽可能的在学校与医院汲取和积累知识与经验并取得了一定的进步。在生活中，您更像是一位兄长给予我们关怀和鼓励。您对我无微不至的关心与推心置腹的交流让我内心感到十分的温暖，面对各种挫折与考验，一想到您在我们背后的支持，便能够咬紧牙关努力克服，是您为我们解除了后顾之忧，使我能够全身心的投入到学习和工作之中。最让我难以忘怀的是您不忘初心，躬身临床的敬业精神与耐心诚恳，关爱患者的医者仁心。在门诊，您对待每一位患者都能够设身处地的为之考虑，耐心的解答每一个问题；在手术台上，您用高超的技术解除病痛，尽可能的使患者获益；在病房，您几十年如一日的落实查房制度，几乎每天都能听到您对患者暖心的关怀与鼓励。您的言传身教使我对医生这个职业有了更高的认识，对自己也有了更高的标准和要求，这是书本上学不到的品质和内涵，也是我从医路上最宝贵的财富之一。

感谢我的辅导老师温伟红副教授，您在实验上给予了我悉心的指导和帮助，为我原本懵懂的科研认识指明了道路和方向，您严格谨慎的治学态度和认真负责的工作

精神是我今后科研路上必须效仿和谨记的目标与追求。还记得您每周组会上都会细心的帮助课题组内的每一位师兄弟梳理科研思路，还记得您牺牲休息时间逐字逐句为我修改文章并提出宝贵意见，还记得您对我在实验上出现的问题仔细的分析与解决并对我沮丧与挫败的情绪予以及时的疏导与鼓励。

感谢我的辅导老师康飞讲师，作为老学长，您毫无保留的将工作经验以及核医学的专业知识传授于我，并对我的文章和课题提出了许多宝贵的建设性意见。尽管远在美国，您也不忘时刻关注我的文章发表，详细用邮件回复解答我提出的每一个问题。

感谢任静副教授，您不仅如师长般传授我临床影像学的知识与经验，更像大姐姐般关心我的个人发展和成长进步。

感谢课题组内的各位师兄弟，感谢魏铭师兄、韩东晖师兄、史圣甲师兄、焦点师兄、吴介恒师兄、杨发师兄、武鹏师兄、朱越华师兄、张智师兄、宋伟师弟、张景良师弟、焦建华师弟和曹康林师弟，和你们并肩三年让我真正感到了兄弟般的温暖，能和优秀的各位共同学习和进步是我的荣幸。

感谢西京医院泌尿外科的同学，感谢林笑宇同学、邢自宝同学、张斌同学，选择共同的专业让我们从全军各地聚集到一起，同窗三年拉近了彼此的关系，感谢你们对我的包容和帮助。

感谢西京医院泌尿外科的全体工作人员，尤其感谢袁建林主任、秦荣良教授、邵晨教授、刘贺亮教授、杨晓剑副教授、武国军副教授、王福利副教授、杨力军副教授、张云涛副教授、刘飞副教授、秦军副教授、于磊副教授、张更副教授、杨波副教授、王延柱副教授、孟平副教授、倪建鑫医生、马帅军医生、高学林医生、荆玉明医生、郑文峰医生、李友兰老师、陈莹老师、薛沁老师、陈美红老师、李园园护士、田春娟护士等等，是你们让我有一种优秀集体的归属感，感谢你们对我临床业务上予以的指导与帮助。

感谢空军军医大学实验动物中心全体工作人员，感谢师长宏主任、赵宁宁老师、张彩勤老师、吴鹏鹏老师、谭邓旭老师等等，是你们为我的实验提供了良好平台和环境，感谢你们对我的支持与帮助。

感谢我的父母，你们用勤劳无私的品格与甘于奉献的精神给予了我最大限度的包容和支持，我唯有不断的拼搏与奋斗才能无愧于你们默默的付出。感谢我的妻子刘茵，是你的陪伴和爱作为我最坚实的后盾，让我认识到作为一名丈夫的责任与使命，

感谢你对我一如既往的信任与鼓励，我也会不负期望，和你共同努力追求更大的幸福。

最后祝愿每一位关心和帮助过我的人平安、健康、快乐、幸福！