

口腔癌动物模型研究进展

续国强,卫佳宁,宋国华*

(山西医科大学实验动物中心,实验动物与人类疾病动物模型山西省重点实验室,太原 030001)

【摘要】 口腔癌严重威胁人类的健康和生活,而且发病率也逐年增高。应用口腔癌动物模型进行临床口腔癌的诊断和治疗研究,具有不可替代的作用。因此,建立与人类口腔癌自然发生较为相似的疾病动物模型并进行致病机理、预防和治疗等方面的研究十分重要。目前,口腔癌动物模型主要有自发性动物模型、诱发性动物模型和基因修饰动物模型。本文总结概括了近年来口腔癌动物模型的研究进展、目前面临的问题以及今后的发展前景。

【关键词】 口腔癌;动物模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 06-0111-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.06.020

Advances in research on animal models of oral cancer

XU Guoqiang, WEI Jianing, SONG Guohua*

(Shanxi Medical University, Laboratory Animal Center, Shanxi Key Laboratory of Experimental Animal Science and Human Disease Animal Models, Taiyuan 030001, China)

【Abstract】 Oral cancer is not only a serious threat to human health and life but also its incidence rate has been increasing year by year. Oral cancer animal model is indispensable for the research of clinical diagnosis and treatment of oral cancer. Therefore, it is of great importance to establish an animal model of disease which is similar to the natural occurrence of human oral cancer and to study its pathogenesis, prevention and treatment. At present, animal models of oral cancer mainly include spontaneous animal model, induced animal model and genetically modified animal model. The research progress, current problems and the future development perspectives of animal models of oral cancer in recent years are summarized in this paper.

【Key words】 oral cancer; animal models

口腔癌是头颈部最常见的恶性肿瘤。有关研究报道,口腔癌中约有90%为鳞状细胞癌^[1]。由于存在预后较差、易转移、复发率高^[2]且口腔鳞状细胞癌(OSCC)发生、发展的具体病理机制尚未充分明确等问题,使得临床上OSCC的治疗效果仍未有明显改善。因此,建立一种较为完善的动物模型对人类口腔癌的预防、发生、转移及预后的研究十分重要。目前,许多学者建立了化学诱导、移植肿瘤及基因修饰等口腔癌动物模型,在抗肿瘤药物的药代动力学、实验性治疗方

法的评价及部分原癌、抑癌基因的作用等方面进行了研究。本文就口腔癌动物模型研究进展进行综述。

1 自发性口腔癌动物模型

该模型中动物肿瘤的发生、发展过程与人类肿瘤的过程很相似,但由于自发性动物模型存在饲养量大、周期长、耗资大的缺点,目前还未有关自发性口腔癌动物模型的报道。因此,在实际操作过程中我们常用诱发动物模型来展开相应研究。

【基金项目】 国家自然科学基金(31772551);山西省自然科学基金(201701D121087);山西省研究生教育创新项目(2017SY037)。

【作者简介】 续国强(1994—),男,硕士研究生,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail: 924119365@qq.com

【通信作者】 宋国华(1973—),女,教授,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail: ghsongg@hotmail.com

2 诱发性口腔癌动物模型

2.1 化学诱导口腔癌动物模型

2.1.1 利用二甲基苯并蒽(9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene, DMBA)诱导

二甲基苯并蒽为黄色粉末,是一种直接致癌剂,会使黏膜上皮细胞的遗传物质突变,黏膜细胞异常增生进而发生癌变。使用 DMBA 诱导建立口腔癌动物模型时,有涂抹法、直接注射法及 DMBA 局部植入三种方法。皇甫冰等^[3]将 0.5% DMBA 丙酮溶液以每周 3 次的频率用小头棉签涂抹于中国地鼠双侧颊囊,第 6 周时发生非典型增生,第 9 周时有炎症反应并产生溃疡,第 12 周诱发原位癌,第 15 周便产生了鳞状细胞癌和浸润癌。Vijayalakshmi 等^[4]将 0.5% 的 DMBA 石蜡溶液涂抹于金黄色叙利亚地鼠颊囊,以每周三次的频率持续涂抹 14 周。与对照组相比,涂抹 DMBA 的地鼠全部成瘤且具有高肿瘤体积,肿瘤负荷以及突变型 p53, PCNA 和细胞周期蛋白 D1 的过度表达等特点。全知怎等^[5]将 DMBA 溶液涂抹于地鼠颊黏膜,持续 14 周后诱癌组 30 只地鼠全部产生了鳞状细胞癌组织。李志革等^[6]将 DMBA 丙酮溶液依次配置成 0.1%~0.5% 5 个浓度梯度后分别注射入五组金黄色地鼠的颊囊黏膜下,每周 2 次连续注射 12 周,最终 0.3% 组的诱癌率最高。曹选平等^[7]将 DMBA 含量为 2%、体积为 1 mm³ 的明胶海绵块植入 SD 大鼠的颌下腺进行口腔癌诱发实验,诱癌率为 42%。

利用 DMBA 诱导的动物模型肿瘤位置比较浅、重复性好、切取稳定且易于观察,与人类口腔肿瘤的生物学行为和生长特性很相似,也与人类口腔黏膜上皮癌变的病理变化过程很相似。正因如此,诸多学者认为 DMBA 诱导建立的口腔癌动物模型是目前较为理想的口腔癌实验动物模型之一。

2.1.2 利用 4-硝基喹啉-1-氧化物(4-nitroquinoline-1-oxide, 4NQO)诱导

4-硝基喹啉-1-氧化物呈淡黄色粉末状,是一种由人工合成的芳香杂环类水溶性致癌物,溶于水后在 4NQO 还原酶的作用下可形成遗传物质的加成物,该加成物可引起碱基丢失或碱基 G 到 A 之间的序列发生改变等不同突变从而诱发口腔癌。4NQO 诱导法有直接饮水法和涂抹法。谢友群等^[8]用四硝基喹啉氧化物(4NQO)水溶液饲养大鼠,在 8 周后大鼠舌背部出现轻度异常增生的白斑,16 周后白斑可发展为重度不典型增生,24 周后解剖大鼠的舌背部黏膜并于显微镜下观察可见浸润癌以及原位癌。葛丽华等^[9]用 1,2-丙二醇溶液配置浓度为 50 μg/mL 的

4NQO 溶液给小鼠饮用,持续 16 周后发现该组小鼠舌黏膜均表现出异常增生或上皮单纯增生。王勇等^[10]将 0.5% 的 4NQO 以每周 3 次的频率涂抹于 50 只 SD 大鼠腭部,持续涂抹 18~26 周,共有 13 只大鼠发生异常增生,21 只产生鳞癌。孔杰等^[11]用 0.5% 的 4NQO 溶液涂抹处于麻醉状态的 SD 大鼠舌侧后缘,涂抹 24 周后部分大鼠形成原位癌,部分形成早期浸润性癌并在固有层中可见有癌巢形成。相比于涂抹法,饮水法操作简便、更易于控制、诱癌方式自然且温和,因而这种模型已标准化。

与 DMBA 致癌模型相比,4NQO 模型的诱癌过程避免了在用药初期引起的黏膜坏死和炎症,但局部涂抹 4NQO 溶液诱癌方式不自然,诱癌过程中会伴随有涂抹所产生的机械刺激且劳动强度相对较大。

2.2 移植性口腔癌动物模型

建立移植性口腔癌动物模型常用的实验动物有裸鼠以及新西兰大白兔等;常用的细胞株系有 Tca8113 人舌癌细胞系、CAL-27 人舌鳞状癌细胞系、SCC9 细胞系和 VX2 细胞系等。Zhao 等^[12]将 100 μL 培养基中的 Tca8113 细胞(2×10^6)以 1560 r/min 常温消化 5 min,采用 60 只 SPF 级的 BALB/cnu/nu 雌性小鼠,皮下注射于小鼠足背,最终所有小鼠全部成瘤。Chen 等^[13]将 200 μL 生长培养基中的 2×10^6 个 CAL-27 细胞,皮下注射于 6~8 周龄时体重约 20 g 的雌性 BALB/c-nude 小鼠的背部皮肤中,结果显示,所有 BALB/c-nude 小鼠背部均成功诱癌。Wu 等^[14]将荧光标记的 SCC9 细胞分为 CD44+, CD44-和 CD44±三组,并将它们分别注入随机分成三组的 NOD/SCID 小鼠舌侧缘;20 d 后对所有小鼠进行分析并处死,接种 CD44+细胞的小鼠在注射部位的成瘤率为 100%,而在 CD44-组中则为 80%。此外,CD44+组中 80% 的小鼠发生颈部淋巴结转移,而 CD44-组中只有 30% 的小鼠表现出颈部转移。李方龙等^[15]利用中国海洋大学医药学院提供的 VX2 细胞系和低温冻存的 VX2 肿瘤组织块成功建立 VX2 荷瘤兔模型;并将该荷瘤兔的肿瘤用改良的穿刺植入法植入实验兔的舌体左侧建立兔 VX2 舌癌移植瘤模型。

与体型较小的啮齿类动物相比,用体型较大的新西兰大白兔建立口腔癌动物模型有明显优势,对于研究口腔癌的浸润及转移机制、影像学表现、发病机制、生物学特性以及评价实验性治疗方法的疗效等方面具有重要价值。与其它细胞株系相比,VX2 肿瘤细胞株具有诱导所需时间短、种植成功率高、生物学性质稳定、转移与侵袭性强、在新西兰大白兔体内成瘤率高等优点。因此,目前有许多学者

尝试采用这种细胞来研究口腔癌。

3 基因修饰动物模型

基因修饰动物模型是上世纪 90 年代新发展起来的将外源基因导入实验动物生殖细胞、胚胎干细胞或早期胚胎后,在受体细胞染色体基因组中稳定地整合并表达和传递给后代的一类动物模型。转基因技术可通过在发育过程中精确激活、沉默等位基因,将基因表达控制在各个发育阶段。尽管长期以来大多数常见的肿瘤都出现了多种基因修饰动物模型,但发生于头颈部的肿瘤基因修饰动物模型却很罕见,而且是在最近才逐渐兴起^[16]。全球第一例口腔癌的转基因实验动物模型—小鼠口腔—食管癌实验动物模型是由 Oliver 等^[17]将启动子 Epstein-Barr virus ED-L2 与细胞周期素 D1 的 cDNA 相结合并使用显微注射法将外源基因导入受精卵的雄原核,随后又利用回交纯化基因来建立的。在 K14-CreERTam/LSL-K-rasG12D 转基因鼠中将基因 ras 激活、基因 p53 失活后口腔黏膜上产生了不继续恶化癌变的乳头状瘤;但当该转基因鼠与基因 p53 表达缺陷的转基因鼠杂交后,产生的子代转基因鼠被化学药物他莫昔芬连续处理 14 d 后便会产生口腔癌^[18],从而成功建立他莫昔芬诱导的口腔癌变模型。Ocadiz-Delgado 等^[19]研究表明,牛角蛋白 6 介导形成的 Tg 转基因鼠在 27 周龄左右时位于其舌中部的上皮发生增生;并预测在此基础上辅以如化学致癌剂等其他外界致癌因素刺激会建立一种新型的口腔癌实验动物模型。近期,余佐亚等^[20]采用单独 4NQO 诱导和 4NQO 联合槟榔碱共同诱导的方式分别诱导 Babl/c 和 C57BL/6 绿色荧光蛋白转基因小鼠产生口腔癌,并比较这两品系小鼠对 4NQO 的敏感性以及它们在不同时间段时的各项病理变化;这种绿色荧光蛋白转基因小鼠口腔癌模型成为了活体荧光影像系统的一种重要的动物模型。

目前,新型的 CRISPR/Cas9 技术以一段 RNA 序列为导向来识别靶基因与传统的编辑技术相比,该系统定位更加准确、操作更加简洁、可控性更高,而且得到的突变可遗传给下一代。2017 年 Ping 等^[21]用张峰教授开发的在线工具(<http://crispr.mit.edu/>)选择合适的靶位点后,利用新型的 CRISPR/Cas9 技术在舌鳞状癌细胞系 SCC-9 中产生 p75 神经生长因子受体(p75NTR)基因组缺失的突变体,来研究 p75NTR 基因被敲除后对 SCC-9 细胞生物学功能的影响,从而为人类口腔癌在基因层面的治疗和防御提供了一个新的潜在靶标。Ping 等虽然只是在细胞水平上利用 CRISPR/Cas9 技术构

建了口腔癌的细胞模型,但这也提示我们,可以将细胞水平的基因编辑模型和移植模型结合起来,通过 CRISPR/Cas9 技术构建口腔癌细胞,利用手术将其移植到符合要求的实验动物体内,建立基因编辑的移植性口腔癌动物模型。还可将该技术应用于合适的实验动物受精卵中或直接在实验动物体内,利用该技术进行基因编辑以建立更符合需要的基因修饰口腔癌实验动物模型。

转基因口腔癌实验动物模型不但可以在整体组织器官水平上对动物进行研究,而且可以深入研究肿瘤在分子水平和细胞水平上的发生发展机制,为口腔癌临床治疗研究、治疗药物筛选以及口腔癌发病机制研究提供了一个理想的实验体系。利用转基因法建立的口腔癌动物模型,可以准确地增强或失活某些基因的表达,可在分子水平上研究口腔癌形成过程中的各种病变。但利用转基因法建立实验动物模型时,被导入的外源基因在宿主基因组中的行为难控制、表达混乱,甚至不表达、转录效率低、无法遗传给后代、转基因鼠不能形成多个突变以及成活率不高等缺点。新一代的 CRISPR/Cas9 基因编辑技术虽然操作性更强、可控性更高,但在实际应用的过程中也具有“脱靶”等问题亟待我们解决。

4 几种模型的比较

口腔癌动物模型主要有自发性口腔癌动物模型、诱发性口腔癌动物模型、基因修饰口腔癌动物模型。其中自发性口腔癌动物模型由于其耗资巨大、费时且过程繁琐,故而现今还未有该模型的相关报道。

目前,较为成熟且使用较多的是诱发性口腔癌动物模型。化学诱导口腔癌动物模型具有可严格控制各种条件,在较短的时间能复制出大量的口腔癌动物模型,能够较好地模拟人类口腔癌的发生过程等优点。但同时也具有动物意外死亡率较高,进行局部治疗性实验比较困难,与人类口腔癌的某些特征有较大差异,不适合在进展研究及肿瘤治疗等领域应用的缺点。其中 DMBA 涂抹法诱癌率接近 100%,DMBA 直接注射法由于注射浓度的不同其诱癌结果也不同,最高为 87%,最低为 25%。移植性口腔癌动物模型适用于短时间内需要得到大量相同肿瘤模型的实验,这种模型所产生的肿瘤具有个体差异较小、移植部位选择灵活、生长速率较一致、可观察到肿瘤浸润和转移过程、保留人类口腔癌部分病理学、生物学特性以及高接种成活率等优点。但该方法也存在每次接种耗时较长、需无菌条件、对实验动物创伤较大、术后感染率较高以及无法研

究组织由正常状态逐渐发展为癌症的完整过程等不足。该法的诱瘤率也接近于 100%, 其中 VX2 肿瘤细胞株与其它口腔癌细胞株相比在诱导时间, 成功率, 稳定性等方面有着独到优势。

基因修饰口腔癌动物模型既可在整体组织器官水平对动物进行研究, 又可在分子和细胞水平深入研究肿瘤的发生发展机制; 可较为完整的观测肿瘤的浸润、侵袭、转移等过程, 是目前构建口腔癌动物模型的发展趋势。但在基因敲除的所有细胞中以及在转基因的许多细胞中都存在突变, 而在人肿瘤发展期间, 突变仅在由正常细胞包围的少数肿瘤细胞中出现, 并且早期遗传改变可能影响胚胎发育, 从而混淆肿瘤的发生。转基因小鼠和敲除小鼠通常不具有多重突变, 也不发展转移, 而这正是人类肿瘤发生的标志。此外, 该模型也存在转录效率低或外源基因表达效率低、基因导入位置不稳定、脱靶问题较为严重等问题。

5 展望

动物模型不仅是研究疾病的发生发展、预防以及治疗的重要材料, 而且是测试临床新技术的重要平台。目前, 化学诱导口腔癌动物模型的研究已步入相对成熟的阶段, 特别是 4NQO 模型和 DMBA 模型已经被广泛应用于癌变以及癌前病变等研究中。近年来因 CRISPR/Cas9 基因编辑技术设计简洁高效、使用方便快捷以及适用范围广等优势被快速应用于各种基因修饰动物模型的建立中^[22]。在未来的研究中, 将高通量测序技术与新型的 CRISPR 基因编辑技术相结合, 可以更加高效的利用所构建的动物模型来深入研究口腔癌的发病机制、探索新的治疗方案, 有利于将实验研究结果快速转化到临床应用中, 具有广阔的发展前景。

参考文献:

- [1] Naghavi M, Wang H, Lozano R, et al. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 [J]. *Lancet*, 2015, 385 (9963): 117–171.
- [2] Polednak AP. Inaccuracies in oral cavity-pharynx cancer coded as the underlying cause of death on U.S. death certificates, and trends in mortality rates (1999–2010) [J]. *Oral Oncol*, 2014, 50(8): 732–739.
- [3] 皇甫冰, 庞文彪, 张锐虎, 等. 中国地鼠口腔颊囊黏膜癌模型的建立及癌变的动态观察[J]. *癌变·畸变·突变*, 2016, 28(01): 56–59, 65.
- [4] Vijayalakshmi A, Sindhu G. Dose responsive efficacy of umbelliferone on lipid peroxidation, anti-oxidant, and xenobiotic metabolism in DMBA-induced oral carcinogenesis [J]. *Biomed*

- Pharmacother*, 2017, 88: 852–862.
- [5] 全知怎, 陈盈哲, 汪大林. 生物钟基因 *Per1* 和细胞周期基因 *p53*、*CyclinD1*、*B1*、*CDK* 在金黄地鼠口腔颊黏膜癌变不同阶段昼夜节律表达变化及与癌变发生的相关性分析 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2017, 16(18): 1772–1776.
- [6] 李志革, 张宝平, 张红, 等. 两种建立金黄地鼠颊囊癌模型方法的对照研究 [J]. *肿瘤防治研究*, 2012, 39(3): 267–271.
- [7] 曹选平, 郝志芳. 颌下腺鳞状细胞癌动物模型的建立 [J]. *华西口腔医学杂志*, 2000, 18(3): 156–158.
- [8] 谢友群, 王钊, 储伟明, 等. 4-硝基喹啉-1-氧化物诱导大鼠舌癌过程中 *Notch1* 的表达特点 [J]. *口腔生物医学*, 2014, 5(3): 135–139.
- [9] 葛丽华, 齐墨词, 王春晓, 等. *Prx1* 敲除对 4NQO 诱导的小鼠舌癌前病变细胞增殖及转录因子 *Ets1* 表达的影响 [J]. *北京口腔医学*, 2017, 25(4): 181–185.
- [10] 王勇, 沈想, 邱嘉旋. 4NQO 诱导大鼠口腔黏膜癌变过程中 *Bcl-2*、*Bax* mRNA 和蛋白的表达 [J]. *实用口腔医学杂志*, 2013, 29(6): 779–783.
- [11] 孔杰. 4NQO 诱导 SD 大鼠口腔白斑模型的建立及树突状细胞在模型中的表达 [D]. 安徽医科大学, 2016.
- [12] Zhao J, Liu N, Hao X, et al. Association between integrin linked kinase and hyperthermia in oral squamous cell carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(6): 7705–7714.
- [13] Chen S, Hu H, Miao S, et al. Anti-tumor effect of cisplatin in human oral squamous cell carcinoma was enhanced by andrographolide via upregulation of phospho-p53 in vitro and in vivo [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(5): 1010428317705330
- [14] Wu TF, Chen L, Bu LL, et al. CD44⁺ cancer cell-induced metastasis: A feasible neck metastasis model [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 101: 243–250.
- [15] 李方龙. Dextran-DTPA-Gd 兔 VX2 舌癌哨位淋巴结间质磁共振造影的实验研究 [D]. 青岛大学, 2015.
- [16] Méry B, Rancoule C, Guy JB, et al. Preclinical models in HNSCC: A comprehensive review [J]. *Oral Oncol*, 2017, 65: 51–56.
- [17] 孙晓爽, 何虹, 刘巍, 等. 常见口腔黏膜病动物模型研究进展 [J]. *口腔医学*, 2018, 38(4): 380–384.
- [18] Lei ZG, Ren XH, Wang SS, et al. Immunocompromised and immunocompetent mouse models for head and neck squamous cell carcinoma [J]. *OncoTargets Ther*, 2016, 9: 545–555.
- [19] Ocádiz-Delgado R, Marroquín-Chavira A, Hernández-Mote R, et al. Induction of focal epithelial hyperplasia in tongue of young bk6-E6/E7 HPV16 transgenic mice [J]. *Transgenic Res*, 2009, 18(4): 513–527.
- [20] 余佐亚. 绿色荧光蛋白转基因小鼠舌癌模型的建立和荧光表达观察 [D]. 广西医科大学, 2013.
- [21] Huang P, Tong D, Sun J, et al. Generation and characterization of a human oral squamous carcinoma cell line SCC-9 with CRISPR/Cas9-mediated deletion of the p75 neurotrophin receptor [J]. *Arch Oral Biol*, 2017, 82: 223–232.
- [22] 李莉红, 续国强, 卫佳宁, 等. 新一代基因组编辑技术在人类疾病动物模型中的应用 [J]. *实验动物科学*, 2017, 34(3): 76–80.

[收稿日期] 2017–10–26