

申明,陈彦文,李杨,等. 肿瘤转移前微环境动物模型的构建与评价方法研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 839-847.

Shen M, Chen YW, Li Y, et al. Research progress on the construction and evaluation methods of pre-metastatic niche animal models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 839-847.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.06.017

肿瘤转移前微环境动物模型的构建与评价方法研究进展

申明^{1,2}, 陈彦文¹, 李杨¹, 杨玲玲¹, 梁乾坤¹, 明海霞^{1,2*}

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 甘肃中医药大学中西医结合研究所, 兰州 730000)

【摘要】 肿瘤转移是一个庞杂的过程, 转移前微环境(PMN)概念的提出, 揭示了肿瘤转移的关键因素。实验动物模型在模拟人类的疾病进程、开发新型药物及疗法和临床试验等方面有着巨大的贡献, 现已被广泛用于研究肿瘤行为学相关研究, 其中肿瘤的肺转移微环境模型具有操作性强、成功率高、实验效果良好等优点。基于肿瘤转移前微环境这一概念, 本文围绕肿瘤的肺转移前微环境实验动物模型的构建方法及评价指标展开综述。

【关键词】 肿瘤转移前微环境; 肺转移前微环境模型; 小鼠; 构建与评价方法

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 06-0839-09

Research progress on the construction and evaluation methods of pre-metastatic niche animal models

SHEN Ming^{1,2}, CHEN Yanwen¹, LI Yang¹, YANG Lingling¹, LIANG Qiankun¹, MING Haixia^{1,2*}

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China. 2. Institute of Integrative Medicine with Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000)

Corresponding author: MING Haixia. E-mail: 18909429885@163.com

【Abstract】 Tumor metastasis is a complicated process. The concept of the pre-metastatic niche (PMN) reveals the essential factors of tumor metastasis. Experimental animal models have made significant contributions to simulating the process of human diseases, developing new drugs and therapies and clinical trials. In particular, they have been widely used in the study of tumor behavior. The pulmonary metastasis tumor models have the advantages of high reproducibility, high success rates and promising experimental result. Based on the concept of PMN, this article summarizes the method and evaluation indicators of pulmonary metastasis animal models.

【Keywords】 pre-metastatic niche; pre-metastatic niche of lung model; mice; construction and evaluation methods
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

【基金项目】 甘肃省科技厅自然科学基金项目(20JR5RA178, 20JR10RA320), 甘肃省中医药研究中心开放课题(zyzx-2020-zx2), 甘肃中医药大学科学研究与创新基金项目(2020KCZD-4, 2021KCZD-1), 甘肃中医药大学中西医结合基础学科科研培育项目(2020-2021-12), 兰州市科技计划项目(2020-ZD-55, 2021-1-96), 甘肃省教育科技创新项目(2021CXZX-745)。

Funded by the Natural Science Foundation of Gansu Province(20JR5RA178, 20JR10RA320), Open Project of Gansu Research Center of Traditional Chinese Medicine(zyzx-2020-zx2), Scientific Research and Innovation Fund Project of Gansu University of Chinese Medicine(2020KCZD-4, 2021KCZD-1), Scientific Research and Cultivation Project of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine in Gansu University of Chinese Medicine(2020-2021-12), Science and Technology Project in Lanzhou(2020-ZD-55, 2021-1-96), Gansu Educational Science and Technology Innovation Project(2021CXZX-745).

【作者简介】 申明(1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 肿瘤生物学性状及肺系疾病的中医药防治基础研究。Email: 1245264324@qq.com

【通信作者】 明海霞(1976—), 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 肿瘤生物学性状及肺系疾病的中医药防治基础研究。

Email: 18909429885@163.com

根据世界卫生组织国际癌症研究机构 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 全球最新癌症数据统计^[1]:2020 年全球新发癌症病例 1929 万例,死亡 996 万例。尽管目前随着靶向治疗及免疫治疗逐渐完善,但癌症死亡率仍居高不下,导致肿瘤患者死亡的主要原因就是转移。自 Paget^[2]1889 年初次提出“种子和土壤”假说用于解释肿瘤的转移,在此基础上,Kaplan 等^[3]提出了转移前微环境 (pre-metastatic niche, PMN) 这一概念,认为原发性肿瘤来源的分泌因子在转移前特异性的到达待转移组织器官中,通过相互作用适应性的改变其微环境,从而构建一个适合原发性肿瘤转移的生长环境,诱使循环中漂浮的原发性肿瘤细胞在此处定植、聚集、增殖,最终形成转移病灶。目前,转移前微环境的研究模型以肺为主^[4]。本文将围绕肿瘤微环境形成机制及肺转移前微环境模型构建与评价进行概述。

1 肿瘤转移前微环境的形成

肿瘤转移前微环境的形成机制比较复杂,主要与肿瘤细胞分泌因子 (tumor-derived secreted factors, TDSFs)、抑制性免疫细胞的动员募集以及该组织部位基质成分炎性极化三个因素的相互作用有关。而 TDSFs、髓源性抑制细胞 (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs) 是肿瘤转移的关键^[3,5-6]。

TDSFs 可通过直接动员和招募 MDSCs 来促进转移前微环境形成,其中包括促炎因子,如肿瘤细胞坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)、血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGF-A), 它们会特异性地诱导肺部钙结合炎性蛋白 S100A8/A9 (S100 calcium binding protein A8/A9, S100A8/A9) 的高表达,形成肺转移前微环境。目前作用明确的细胞主要有 VEGFR1+造血祖细胞、CD11b+MDSCs。CD11b+MDSCs 可以通过表达整合素、多功能蛋白聚糖 (Versican)、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 及在 TDSFs 作用下分泌多种趋化、炎症因子来动态重塑、建立转移前微环境,促进肿瘤干细胞特性和上皮间质转化 (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT), 从而促进肿瘤发展^[7]。

原位肿瘤细胞产生趋化因子-2 (C-C motif

chemokine ligand 2, CCL2) 可招募肿瘤相关巨噬细胞和 Treg, 同时, CCL2 通过与表面的 CCR2 相互作用增加 MDSCs 向转移前微环境迁移^[8]。肿瘤细胞还通过分泌巨噬细胞迁移抑制因子 (macrophage migration inhibitory factor, MIF)、白细胞介素 (interleukin, IL)-8 以及纤溶酶原激活物抑制因子 1, 激活星形胶质细胞进而分泌 IL-6、TNF- α , 参与肿瘤血管的构建。在 CCL2 作用下, CD11b+Ly6C+ 单个核细胞被招募到肺转移前微环境中对局部组织微环境进行改造从而增加肺转移。CD11b+Ly6C+ 粒细胞还可通过产生铃蟾多样性肽 8 (bombina variegata peptide, Bv8) 蛋白促进肺转移前微环境形成, 这些 MDSCs 是转移前微环境形成过程中的关键细胞成分^[7-8]。由此可见, 肿瘤细胞分泌的多种细胞因子, 如 TNF- α 、TGF- β 、VEGF-A 等, 可通过直接动员和招募骨髓中的 MDSCs, 促进转移前微环境的形成。

2 肿瘤的肺转移微环境模型

根据临床数据显示, 肺是肿瘤转移常见的器官。大约 30% 的胃癌患者在中后期阶段会出现肺转移, 骨肉瘤患者在远处转移器官中发生在肺部的概率高达 90%, 乳腺癌、结肠癌、黑色素瘤等均可表现出肺部高转移率^[9-10], 因此建立肺转移前微环境模型符合临床环境。该模型的建立能够更好的体现在转移前微环境中, 多种细胞因子对肿瘤转移过程中不同的调控作用, 有助于新型靶向抗肿瘤药物的设计、开发。此外, 肺转移前微环境模型具有操作简便、成功率高等优点, 可便于观察原发性肿瘤转移的发生率及后续发展, 为临床抗肿瘤治疗提供了现实依据, 有助于制定可行化方案。

肺转移前微环境模型主要包括自发性转移模型和实验性转移模型。目前, 人类肿瘤异种移植模型在临床前环境中帮助预测抗肿瘤功效最为常用, 通过利用哺乳动物体内微环境所培养的人源性肿瘤细胞来模拟人类肿瘤的进展, 动物的基质细胞、血管网和生长因子为肿瘤细胞提供了天然的异质微环境^[11]。自发性与诱发性动物模型通常是由人工诱导的癌症动物组成, 这些模型易于构建, 但会存在较大的不确定性。通过移植人肿瘤组织或注射肿瘤细胞系来产生移植的动物模型能够显示出更高的可控性和致瘤效率, 但不能反应肿瘤转移的整个生物学进程。

3 动物的选择及方法

建立实验动物模型,以试图捕捉人类肿瘤发展中复杂的病理过程为目的,长期以来,在临床前环境中提供了评估新型抗肿瘤药物潜力。动物模型能够较好的阐明哺乳动物生物过程的基本原理,而实验室小鼠通常是首选的模式生物,由于具有的高度遗传同源性和特定的无病原体(specific pathogen-free, SPF)维持条件,科学结果的再现性较高,现已在肿瘤定植和转移模型中广泛的使用^[12]。

3.1 裸鼠

1969年,Rygaard等^[13]首次成功地建立了裸鼠-人肿瘤异种移植模型,此模型很大程度上保留了人类肿瘤细胞在组织病理特征以及对抗肿瘤剂的敏感性,降低了实验和临床研究之间的差距。选择裸鼠建立转移模型,一方面,该小鼠无毛发覆盖,能够可视化观察肿瘤的发展,另一方面,由于存在先天性无胸腺、T淋巴细胞的功能缺乏等特点,裸鼠表现出明显的免疫功能受损,有利于肿瘤细胞的生长、定植和转移,建立肿瘤模型具有较高的成功率^[14]。但其灵敏度较低,而Naomoto等^[15]基于这一局限,将BALB/c裸鼠通过尾静脉注射人结肠癌细胞系RPM14788建立肺转移前微环境模型,在注射后的第2天,可在肺间质中观察到中性粒细胞浸润形成的炎性微环境,21d的小鼠肺组织形成多发性转移灶,提示造模成功。该模型具有高度的肺转移率和可重复性,有助于研究肺转移途径且能够更加方便的评估药物疗效。裸鼠作为标准受体现已被广泛用于人源肿瘤异种移植模型(patient-derived xenograft, PDX),尤其体现在胃肠癌的高移植率。Wang等^[16]通过BALB/c裸鼠尾静脉注射含人胃腺癌细胞系MGC80-3成功建立肺转移模型,指出MMP-2、MMP-9在胃癌细胞转移过程中过度活化,转移前的微生境中诱发EMT,其标记物 β -连环蛋白、E-钙粘蛋白的基因水平降低,而纤连蛋白、波形蛋白和Snail蛋白的表达水平增加。王洁等^[17]将临床所获胃癌标本移植到BALB/c裸鼠中建立异种移植模型,之后将荧光染料MHI-148进行腹腔注射,经检测,微环境中转移瘤趋化因子CXCL12、MMP-2和转移相关IGF1R信号通路等表达上调,最终在小鼠肺组织中可观察到转移灶。Li等^[18]选择BALB/c裸鼠,分别通过尾静脉注射和腹腔注射COL10A1敲除的MKN45胃癌细胞建立了胃癌肺转移模型,证

明敲除COL10A1可降低EMT,下调MMP-2、MMP-9的表达,从而抑制转移前微环境的形成,以上两种方法均成功地建立了胃癌肺转移前微环境模型。

3.2 SCID小鼠

Bosma在1993年首次定义了同时缺乏功能性T、B淋巴细胞的严重联合免疫缺陷(Server Combined Immune-deficiency, SCID)小鼠。Knips等^[19],首次采用动物模型来研究Merkel细胞多瘤病毒感染对MCC皮肤癌发生、转移作用,选择SCID小鼠肩胛骨皮下注射WaGa和MKL-1皮肤癌细胞,结果显示与MKL-1细胞相比,WaGa肿瘤在转移前微环境中参与炎症反应、生长因子活性及上调Wnt信号通路,更具有侵袭性,在肺中表现出了更高数量的自发性转移。Otani等^[20],通过选择SCID小鼠分别原位注射A549人肺腺癌细胞、FT821人大细胞肺癌细胞和PC-9人肺腺癌细胞建立肺癌肺转移前微环境模型,给予抗癌药物CDDP和埃罗替尼进行干预。结果仅检测到A549模型小鼠存在肺转移,且经CDDP治疗后肺部转移情况并未改善,可能与观察到的强烈的氟代脱氧葡萄糖(fludeoxyglucose, FDG)摄取有关,此研究中的异种原位移植模型有潜力成为开发抗癌新疗法的基本工具,可用于许多非小细胞肺癌细胞系和抗癌药物。大量研究表明与裸鼠相比,选择SCID小鼠建立的肿瘤转移模型成功率更高,但存在着T、B淋巴细胞渗露的局限性^[21]。

3.3 NOD-SCID小鼠

NOD/SCID小鼠是由NOD和SCID小鼠杂交而成,该小鼠患有由T淋巴细胞浸润和胰岛破坏引起的糖尿病,由于小鼠中成熟T、B淋巴细胞的缺失,NK细胞功能受损等先天和适应性免疫的多种缺陷,使它们成为人类造血干细胞和实体瘤移植更好的受体。然而,在NOD/SCID小鼠中仍存在残留的NK细胞活性^[22]。外周血中的循环肿瘤细胞(circulating tumor-cell, CTC)在适合的局部微环境下进入次级或远端器官组织形成转移灶,微环境中的免疫细胞可经历表型变化变成促肿瘤表型,协助肿瘤细胞免疫逃逸以及向远处的组织器官迁移。阙祖俊等^[23],在前期实验中成功建立了非小细胞肺癌循环肿瘤细胞系(CTC-TJH-01),通过尾静脉注射法,将GFP/Luc双标的CTC-TJH-01细胞系在NOD-SCID小鼠中成功地构建了肺癌肺转移前微环境模型,尽可能模拟临床术后肿瘤转移过程,将转移前

微环境免疫因素归入评估系统,可用于研究免疫疗法对肿瘤转移的抑制作用。Chiou 等^[24]将 A549 肺癌细胞通过尾静脉注射植入 NOD-SCID 小鼠建立转移模型,以评估卵泡刺激素在器官转移中的作用,所有小鼠肺中均可检测到转移瘤的形成,发现卵泡刺激素可能通过肿瘤细胞和器官微环境之间的相互作用抑制转移前微环境中的血管生成。NOD/SCID 小鼠现常用于结直肠癌肺转移前微环境模型构建。Hite 等^[25]选择 NOD-SCID 小鼠,通过将荧光素酶标记的 HT-29 结肠癌细胞采用直肠注射、盲肠壁注射、酸性灌肠等方法成功建立结肠肺转移模型,结果相较其余两组,直肠注射组小鼠肺转移较高且死亡率低,能较好的模拟患者结肠癌的转移进程,是目前用于患者结肠癌转移评估最理想的原位转移模型。实验室在 NOD-SCID 小鼠的基础上,将其与 IL-2 受体 γ 缺陷小鼠或 Jak3 缺陷小鼠杂交,建立了 NK 细胞功能性缺失的 NOD-SCID-IL2rg^{-/-} (NOG/NSG) 小鼠^[22]。该小鼠主要体现出对人源化组织的高移植率,有研究显示,将 TMD231 人乳腺癌细胞分别植入 NOD/SCID 和 NSG 小鼠的乳腺脂肪垫中建立乳腺癌肺转移模型,结果显示 NSG 小鼠的成瘤率更稳定,且更早发现肺转移^[26]。Armacki 等^[27]将 Panc1 人胰腺癌细胞皮下注射至 NSG 小鼠中建立胰腺癌肺转移模型,得出外泌体可调控 S100 A mRNA 向肺成纤维细胞中转移,肺转移灶纤维化增强,粘连蛋白表达增加,从而促进肺转移前微环境的形成。为阐明肿瘤干细胞(CSCs)在转移中的潜在作用,Matsuda 等^[28]选择 NOG 小鼠,将 PDAC 人胰腺癌细胞通过尾静脉注射建立了胰腺癌肺转移模型,且发现肺中 CSC 标记物高表达,证实 PDAC 转移潜能与 CSC 和 EMT 相关。但由于 NOG/NSG 小鼠饲养环境严格且价格相对高昂,故目前在肿瘤转移前微环境的动物模型中鲜少使用。而其他品系在不同癌症类型中都存在各自的优势,因此仍是建立肿瘤转移模型重要的资源。

3.4 BABL/c 小鼠

BABL/c 小鼠对小鼠乳腺肿瘤病毒诱发的乳腺癌具有高度敏感性,是建立乳腺癌转移最常用的动物模型。骨肉瘤的胫内原位注射模型,在过去通常被认为是自发转移的模型,Maloney 等^[29]对此提出质疑,通过将 K7M2 骨肉瘤细胞系胫骨内注射至 BALB/c 小鼠中,注射后 1 周,通过肉眼观察及 HE 染色均发现全部小鼠肺部表面有明显转移灶,而在

第 4 周,93% 的小鼠在骨髓内形成肿瘤组织。并建立了截肢组模型以确定转移细胞的来源,所得结果均指向该模型应为实验型转移模型。胫内注射模型提供了一种可行的造模方法,但存在注射时肿瘤细胞栓塞这一局限。尽管如此,该模型可用于检查转移后期阶段,如肿瘤细胞外渗及在肺转移前微环境中的过度增殖。Warren 等^[30]通过细胞转染技术获得 ZsGreen/Luc 双标的 4T1 细胞和 YAP/TAZ 敲除细胞分别经尾静脉注射至 BALB/c 小鼠中,以测试转肿瘤是否需要 Yes 相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)和具有 PDZ 结合序列的转录共活化因子 TAZ(transcriptional coactivator with PDZ-binding motif, TAZ)。经用荧光显微镜观察到发光信号,提示造模成功,结果显示对照细胞的小鼠的转移负荷增加速度明显快于 YAP/TAZ 敲除小鼠。为探讨乳腺癌肺转移前微环境中免疫因子的动态变化,朱文文等^[31]通过尾静脉注射和皮下注射两种方法,分别将 4T1 乳腺癌细胞接种到 BABL/c 小鼠中,两种方法均成功建立了乳腺癌肺转移前微环境模型,相较于皮下注射法,尾静脉注射法的转移过程较为迅速,并测得肺组织中的 Th1 型细胞因子在尾静脉组中表现出先升后降的趋势,在皮下注射组处于较低水平,而 Th2 型细胞因子在两组中均表现出升高的趋势,提示随着癌症发展,可形成免疫抑制微环境促进肿瘤细胞的转移。Rashid 等^[32]将表达荧光素酶基因的 4T1-luc2 乳腺癌细胞系对 BABL/c 小鼠分别进行原位移植法与尾静脉注射法来比较其中的差异,两种造模方式均可达到理想的成瘤率,并对转移瘤进行了基因组微阵列分析以评估不同方法所致转移瘤的基因组图谱,结果提示尾静脉法与术后转移瘤的基因表达没有显著差异。这也是尾静脉法的一大优势,值得一提的是,尾静脉注射法由于不能实现从原发肿瘤到转移病灶的全过程,故此造模方法仅适用于肿瘤发展的中后期阶段的临床研究。

3.5 C57BL/6 小鼠

C57BL/6 小鼠是一种最常用的近交系小鼠,由于其在遗传方面较为稳定,往往是转基因动物模型构建的首选。Hou 等^[33]将非靶向基因 LLC-sgNTC 和 Atrx 缺陷型 Lewis 细胞系(LLC-sgAtrx)通过尾静脉注射到 C57BL/6 小鼠中,结果显示小鼠肺中均产生了转移灶。并证明 Atrx 缺陷促进了转移前微环境中 T 细胞的浸润,提高了细胞程序性死亡-配体 1

(programmed cell death 1 ligand1, PD-L1) 和抗原肽-MHC 分子复合物 I 类 (peptide-major histocompatibility complex class I, pMHCI) 在 Lewis 细胞表面的表达,并增强了 T 细胞的体外细胞毒性。Zhang 等^[34]为探讨 RGDV-吉西他滨对肿瘤转移的作用途径,同样选择 C57BL/6 小鼠,将 Lewis 肺癌细胞注入右腋下皮肤成功建立肺癌肺转移前微环境模型。经检测治疗组小鼠血清中肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor) TNF- α 、IL-8、MMP-2 和 MMP-9 的表达水平降低,提示 RGDV-吉西他滨对转移前微环境有抑制作用。该小鼠也是作为研究黑色素瘤经常选择的动物模型^[35]。Fu 等^[36]尾静脉注射 B16F10-Fluc 黑色素瘤细胞与体外活化的 Pmel-1 CD8+Teff 细胞至 C57BL/6 小鼠中,对照组小鼠检测到肺表面有大量转移结节,而由于免疫记忆,Teff 组中 CD69、CD25 的高表达说明了 CD8+T 细胞被充分激活。王佳等^[37]采用尾静脉注射将 B16F10 黑色素瘤细胞分别注射到 C57BL/6 和巨噬细胞 Act1 表达被靶向抑制的小鼠 (anti-Act1) 中成功建立黑色素瘤肺转移前微环境模型。相较 C57BL/6 模型组,anti-Act1 小鼠肺组织中的 CD45 和 CD68 表达明显降低,转移前微环境中炎症细胞的浸润能力被抑制。孟星君等^[38]分别采用腹腔注射、皮下注射及尾静脉注射法将 C57BL/6 小鼠接种 B16F10 黑色素瘤细胞,结果显示尾静脉组肺部转移率最高,说明肿瘤细胞主要通过血液循环途径实现转移,转移前微环境中血管的生成是主要推动因素。Sohn 等^[39]将 B16F10-shControl 细胞和 B16F10-shAhnak 细胞通过尾静脉注射至 C57BL/6 小鼠中,探讨桥粒联结蛋白 (recombinant desmoyokin, AHNAK) 在肿瘤转移过程中的作用,成功建立了黑色素瘤肺前微环境模型,证明了 AHNAK 参与 TGF- β 诱导的 EMT,有助于肿瘤细胞的迁徙。关于肿瘤肺转移前微环境模型常见的动物选择及方法如表 1 所示。

4 肺转移前微环境模型的评价方法

模型构建是实验研究进行的前提,现如今随着技术不断完善,多种方法可供选择作为评价模型构建是否成功的指标。当选择模型时,应当尽可能地选择与人类癌症相似的模型为其设计干预疗法。例如,动物肿瘤模型发病机制、进展和分期、病理因素、转移潜能、肿瘤负荷程度、激素反应

性和免疫抑制等与人类是否相似,能否适合针对治疗术后环境中的转移性疾病的测试疗法。在肺转移前微环境模型构建中,HE 染色法 (hematoxylin and eosin stain) 是常见的评价手段,所得成功率为 100%^[40]。荧光素酶 (luciferase) 和绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 现已被广泛用于细胞生物学、肿瘤学等多种研究,其可作为一种细胞标记物为研究人员提供了检测基因表达和细胞跟踪的方法^[41]。生物发光成像是一种高度敏感、高通量的技术,其能够使实验动物的疾病进程呈现可视化并对治疗效果进行纵向评估,检测到的光信号作为肿瘤负荷的定量指标,已在许多肿瘤模型中得到验证^[42]。使用荧光作为检测和量化转移的方法,能够更直观地分析候选基因如何影响肿瘤细胞的转移、定植,可以给研究人员提供独立的数据,提高结果的可信度,然而由 GFP 转染引起的细胞损伤可能会导致对实验结果有一定的误差,因此在实验过程中应仔细考虑 GFP 对细胞的毒性作用。

正电子发射断层显像 (positron emission tomography, PET) 是近几年发展迅速的诊断技术,现已被用于评估肿瘤发生发展、转移过程中的代谢途径,其原理为放射性标记的正电子发射断层扫描底物在生理浓度下进行追踪,从而可以对肿瘤模型和肿瘤异质性进行无创成像^[43]。另外,对肿瘤转移相关的目标基因及特异性生物标记的定性分析也可作为模型建立的评价指标,通常涉及免疫组化、蛋白印迹分析、实时定量 PCR 等多种方法。

5 总结和展望

癌症是目前危害人类健康的主要疾病,其转移是导致死亡的主要原因之一,“肿瘤转移前微环境”的提出无疑是一个突破点,抑制 PMNs 的形成,对肿瘤的复发和转移会有一定的积极作用。癌症发展到中后期,原发性肿瘤不断增值,器官和组织发生病理性改变,形成以低氧、低 pH、组织高压为特点的微环境,在适合的局部微环境下,存在于外周血中的循环肿瘤细胞才能“播散”、“定植”、进入次级或远端器官组织,从而发展为转移灶。因此能否对转移前微环境进行干预来达到抗肿瘤作用,从而发现新型药物及疗法,现已成为热门的研究问题。

表 1 肿瘤肺转移前微环境模型动物选择及造模方法

Table 1 Selection of animals and modeling method of the pre-metastasis niche of lung model

小鼠 Mice	癌症类型 Types of cancer	方法 Method	细胞浓度 Cell concentration	成功率 Success rate	成瘤时间 Tumor formation time	评价方法 Evaluation method
	RPM14788 人结肠癌 RPM14788 human colon carcinoma	尾静脉注射 Tail-vein injection	$2 \times 10^6 / 100 \mu\text{L}$	100%	21 d	HE 染色法 HE staining
	MGC80-3 人胃腺癌 MGC80-3 human gastric adenocarcinoma	腹腔注射 Intraperitoneal injection	$2 \times 10^6 / 200 \mu\text{L}$	50%	45 d	HE 染色法、免疫组化分析、 显微镜观察 HE staining, immunohistochemistry methods
裸鼠 Nude mice	MKN45 胃癌 MKN45 gastric cancer	原位移植 Orthotopic transplantation	$5 \times 10^6 / 100 \mu\text{L}$	/	21 d	HE 染色法、免疫组化分析、 实时荧光定量 PCR HE staining, immunohistochemistry methods, Quantitative Real-time PCR
	临床胃癌标本 Clinical specimens of gastric cancer	/	$1 \times 10^7 / 200 \mu\text{L}$	/	28 d	HE 染色法、免疫组化分析、 实时荧光定量 PCR HE staining, immunohistochemistry methods, Quantitative Real-time PCR
	/	/	/	90%	30 d	HE 染色法 HE staining
	MCC 皮肤癌 Skin neoplasms	皮下注射 Subcutaneous injection	$1 \times 10^6 / 200 \mu\text{L}$	/	/	HE 染色法、实时荧光定量 PCR HE staining, immunohistochemistry methods, Quantitative Real-time PCR
SCID 小鼠 SCID mice	A549 人肺腺癌 A549 human lung adenocarcinoma	原位注射 Situ injectable	$2 \times 10^6 / \text{mL}$	100%	50 d	PET-CT 系统 Integrated PET-CT system
	CTC-TJH-01 非小细胞肺癌 CTC-TJH-01 non-small cell lung cancer	尾静脉注射 Tail-vein injection	$1 \times 10^7 / \text{mL}$	100%	50 d	生物发光成像 Bioluminescent imaging
NOD-SCID 小鼠 NOD-SCID mice	A549 肺腺癌 A549 lung adenocarcinoma	直肠注射 Rectal injection	$1 \times 10^6 / \mu\text{L}$	100%	10 周 10 weeks	生物发光成像 Bioluminescent imaging
	HT-29 结肠癌 HT-29 colorectal carcinoma	/	$4 \times 10^4 / 10 \mu\text{L}$	56%	3 ~ 6 周 3 ~ 6 weeks	生物发光成像、HE 染色 Bioluminescent imaging, HE staining
	TMD231 人乳腺癌 TMD231 human breast adenocarcinoma	原位移植 Situ injectable	$1 \times 10^6 / \text{mL}$	100%	7 d	HE 染色法 HE staining
NSG 小鼠 NSG mice	Panc1 人胰腺癌 Human pancreatic carcinoma	皮下注射 Subcutaneous injection	$2 \times 10^6 / \text{mL}$	/	/	免疫组化分析、定量 PCR Immunohistochemistry methods, Quantitative PCR
NOG 小鼠 NOG mice	PDCA 人胰腺癌 Human pancreatic carcinoma	尾静脉注射 Tail-vein injection	$1 \times 10^5 / \text{mL}$	/	8 周 8 weeks	定量 PCR Quantitative PCR

续表 1

小鼠 Mice	癌症类型 Types of cancer	方法 Method	细胞浓度 Cell concentration	成功率 Success rate	成瘤时间 Tumor formation time	评价方法 Evaluation method
	K7M2 骨肉瘤 K7M2 osteosarcoma	骨髓注射 Intra-bone marrow injection	$1 \times 10^6 / \mu\text{L}$	100%	7 d	HE 染色法 HE staining
	4T1 乳腺癌 4T1 breast cancer	尾静脉注射 Tail-vein injection	$2.5 \times 10^4 / \mu\text{L}$	/	3 ~ 6 周 3 ~ 6 weeks	生物发光成像 Bioluminescent imaging
BABL/c 小鼠 BABL/c mice	/	皮下注射 Subcutaneous injection	$1 \times 10^5 / 100 \mu\text{L}$	>70%	/	生物发光成像、HE 染色法 Bioluminescent imaging, HE staining
	/	原位移植 Situ injectable	$1 \times 10^6 / 100 \mu\text{L}$	/	7 d	HE 染色法 HE staining
	/	/	$1 \times 10^6 / 100 \mu\text{L}$	/	21 d	HE 染色法 HE staining
	/	/	$1 \times 10^5 / 100 \mu\text{L}$	>70%	/	生物发光成像、HE 染色法 Bioluminescent imaging, HE staining
	Lewis 肺癌 Lewis lung cancer	尾静脉注射 Tail-vein injection	$1 \times 10^6 / \mu\text{L}$	100%	30 d	生物发光成像 Bioluminescent imaging
	B16F10 黑色素瘤 B16F10 melanoma	皮下注射 Subcutaneous injection	$2 \times 10^7 / 200 \mu\text{L}$	100%	/	肺结节计数 Pulmonary nodules
C57BL/6 小鼠 C57BL/6 mice	/	尾静脉注射 Tail-vein injection	$2.5 \times 10^5 / 100 \mu\text{L}$	100%	24 d	生物发光成像 Bioluminescent imaging
	/	/	/	100%	14 d	免疫组化分析、肺结节计数 Immunohistochemistry methods, pulmonary nodules
	/	/	$3 \times 10^6 / 100 \mu\text{L}$	100%	2 周 2 weeks	肺结节计数 Pulmonary nodules
	/	/	$1 \times 10^5 / 200 \mu\text{L}$	/	20 d	HE 染色 HE staining

尽管多数研究人员认为动物模型能够提供关于新型免疫疗法和药物等有价值的临床前信息,但部分肿瘤模型并不能很好地预测人类临床试验,存在着因模型建立不充分而导致多种不可控因素的存在,从而影响结果可行性,这也是为什么实验效果不能在临床中得到体现。因此,无论采用何种模型来评估新疗法,理解每种方法的局限性都是至关重要的。

参 考 文 献(References)

[1] International Agency for Research on Cancer, Latest global cancer data: Cancer burden rises to 19.3 million new cases and 10.0 million cancer deaths in 2020 [EB/OL]. [2020-12-15]. <https://www.iarc.fr/faq/latest-global-cancer-data-2020-qa/>.

[2] Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889 [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 1989, 8(2): 98-101.

[3] Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-

metastatic niche [J]. *Nature*, 2005, 438(7069): 820-827.

[4] 魏华民, 花宝金. 髓源性抑制细胞在构筑转移前微环境促肿瘤转移中的作用 [J]. *中国癌症杂志*, 2017, 27(6): 516-520.

Wei HM, Hua BJ. Role of myeloid-derived suppressor cells in premetastatic niche formation and tumor metastasis promotion [J]. *Chin Oncol*, 2017, 27(6): 516-520.

[5] Lederer DJ, Martinez FJ. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(19): 1811-1823.

[6] Akhtar M, Haider A, Rashid S, et al. Paget's "Seed and Soil" theory of cancer metastasis: an idea whose time has come [J]. *Adv Anat Pathol*, 2019, 26(1): 69-74.

[7] Kyung SY, Kim DY, Yoon JY, et al. Sulforaphane attenuates pulmonary fibrosis by inhibiting the epithelial-mesenchymal transition [J]. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2018, 19(1): 13.

[8] Ramani V, Teshima T, Tamura K, et al. Melanoma-derived soluble DC-HIL/GPNMB promotes metastasis by excluding T-lymphocytes from the pre-metastatic niches [J]. *J Invest Dermatol*, 2018, 138(11): 2443-2451.

[9] 苏锐良, 李玉民, 张凡. 胃癌常见器官转移规律的研究进展

- [J]. 中国临床研究, 2020, 33(1): 106-109.
- Su RL, Li YM, Zhang F. Research progress on metastasis of common organs in gastric cancer [J]. Chin J Clin Res, 2020, 33(1): 106-109.
- [10] 白磊鹏, 吕家兴, 李哲宏, 等. 一种建立骨肿瘤肺转移模型的方法研究 [J]. 医学研究杂志, 2020, 49(11): 104-107.
- Bai LP, Lv JX, Li ZH, et al. A method of establishing lung metastasis model of bone tumor [J]. J Med Res, 2020, 49(11): 104-107.
- [11] 刘宏飞, 陈晓红, 黄志刚, 等. 类器官和人源性肿瘤组织异种移植模型在肿瘤研究中的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(3): 103-108, 122.
- Liu HF, Chen XH, Huang ZG, et al. Application of organoids and patient-derived xenograft models in cancer research [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(3): 103-108, 122.
- [12] Martinov T, McKenna KM, Tan WH, et al. Building the next generation of humanized hemato-lymphoid system mice [J]. Front Immunol, 2021, 12: 643852.
- [13] Rygaard J, Povsen CO. Heterotransplantation of a human malignant tumour to "nude" mice. 1969 [J]. APMIS, 2007, 115(5): 604-606.
- [14] Szadvari I, Krizanova O, Babula P. Athymic nude mice as an experimental model for cancer treatment [J]. Physiol Res, 2016, 65(4): S441-S453.
- [15] Naomoto Y, Kondo H, Tanaka N, et al. Novel experimental models of human cancer metastasis in nude mice: Lung metastasis, intraabdominal carcinomatosis with ascites, and liver metastasis [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 1987, 113(6): 544-549.
- [16] Wang X, Wang B, Zhan W, et al. Melatonin inhibits lung metastasis of gastric cancer *in vivo* [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 117: 109018.
- [17] 王洁, 赵宁宁, 张彩勤, 等. 基于临床肿瘤标本的胃癌转移模型建立 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(1): 7-12.
- Wang J, Zhao NN, Zang CQ, et al. Establishment of a nude mouse model of gastric cancer metastasis model derived from clinical tumor specimens [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(1): 7-12.
- [18] Li T, Huang H, Shi G, et al. TGF- β 1-SOX9 axis-inducible COL10A1 promotes invasion and metastasis in gastric cancer via epithelial-to-mesenchymal transition [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(9): 849.
- [19] Knips J, Czech-Sioli M, Spohn M, et al. Spontaneous lung metastasis formation of human Merkel cell carcinoma cell lines transplanted into scid mice [J]. Int J Cancer, 2017, 141(1): 160-171.
- [20] Otani T, Kondo K, Takizawa H, et al. Noninvasive monitoring of cisplatin and erlotinib efficacy against lung cancer in orthotopic SCID mouse models by small animal FDGPET/CT and CT [J]. Oncol Rep, 2019, 41(1): 447-454.
- [21] 曾洁, 谢栓栓, 王昌惠. 肺癌小鼠转移模型研究进展 [J]. 肿瘤防治研究, 2017, 44(11): 769-773.
- Zeng J, Xie SS, Wang CH. Research progress of mice metastasis models for lung cancer [J]. Cancer Res Prev Treat, 2017, 44(11): 769-773.
- [22] Okada S, Vaeteewoottacharn K, Kariya R. Application of highly immunocompromised mice for the establishment of Patient-Derived Xenograft (PDX) models [J]. Cells, 2019, 8(8): 889.
- [23] 阙祖俊, 罗斌, 董昌盛, 等. "正虚伏毒" 肺癌研究平台的构建 [J]. 上海中医药杂志, 2019, 53(4): 11-16.
- Que ZJ, Luo B, Dong CS, et al. Construction of lung cancer research platform under the theory of "hidden toxicity due to vital qi deficiency" [J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2019, 53(4): 11-16.
- [24] Chiou J, Chang YC, Tsai HF, et al. Follistatin-like protein 1 inhibits lung cancer metastasis by preventing proteolytic activation of osteopontin [J]. Cancer Res, 2019, 79(24): 6113-6125.
- [25] Hite N, Klinger A, Hellmers L, et al. An optimal orthotopic mouse model for human colorectal cancer primary tumor growth and spontaneous metastasis [J]. Dis Colon Rectum, 2018, 61(6): 698-705.
- [26] Tonsing-Carter E, Bailey BJ, Saadatzaheh MR, et al. Potentiation of carboplatin-mediated DNA damage by the Mdm2 modulator Nutlin-3a in a humanized orthotopic breast-to-lung metastatic model [J]. Mol Cancer Ther, 2015, 14(12): 2850-2863.
- [27] Armacki M, Polaschek S, Waldenmaier M, et al. Protein Kinase D1, reduced in human pancreatic tumors, increases secretion of small extracellular vesicles from cancer cells that promote metastasis to lung in mice [J]. Gastroenterology, 2020, 159(3): 1019-1035.
- [28] Matsuda Y, Yoshimura H, Ueda J, et al. Nestin delineates pancreatic cancer stem cells in metastatic foci of NOD/Shi-scid IL2R γ (null) (NOG) mice [J]. Am J Pathol, 2014, 184(3): 674-685.
- [29] Maloney C, Edelman MC, Kallis MP, et al. Intratibial injection causes direct pulmonary seeding of osteosarcoma cells and is not a spontaneous model of metastasis: a mouse osteosarcoma model [J]. Clin Orthop Relat Res, 2018, 476(7): 1514-1522.
- [30] Warren JSA, Feustel PJ, Lamar JM. Combined use of tail vein metastasis assays and real-time *in vivo* imaging to quantify breast cancer metastatic colonization and burden in the lungs [J]. J Vis Exp, 2020, 11: 149.
- [31] 朱文文, 赵娜, 刘北星. 乳腺癌肺转移过程中 Th1/Th2 型细胞因子的动态变化 [J]. 微生物学杂志, 2020, 40(1): 52-57.
- Zhu WW, Zhao N, Liu BX. Dynamic change of Th1/Th2 cytokines during lung metastasis of breast cancer [J]. J Microbiol, 2020, 40(1): 52-57.
- [32] Rashid OM, Nagahashi M, Ramachandran S, et al. Is tail vein injection a relevant breast cancer lung metastasis model? [J]. J Thorac Dis, 2013, 5(4): 385-392.
- [33] Hou T, Jiang S, Wang Y, et al. Alpha thalassemia/intellectual

- disability X-linked deficiency sensitizes non-small cell lung cancer to immune checkpoint inhibitors [J]. *Front Oncol*, 2021, 10: 608300.
- [34] Zhang XY, Zhang JH, Liu WC, et al. Exploring the action of RGDV-gemcitabine on tumor metastasis, tumor growth and possible action pathway [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 2045–2322.
- [35] 王峥, 苗晋鑫. 黑色素瘤小鼠模型研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(2): 120–127.
Wang Z, Miao JX. The current state of mouse modeling in melanoma research [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(2): 120–127.
- [36] Fu J, Yu A, Tang J, et al. Adoptive CD8+ T cell therapy generates immunological memory to inhibit melanoma metastasis [J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(11): 7262–7274.
- [37] 王佳, 李丽, 黎冰林, 等. 抑制巨噬细胞 Act1 表达对黑色素瘤肺转移的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(4): 1–6.
Wang J, Li L, Li BL, et al. Targeted suppression of macrophage Act1 inhibits the lung metastasis of melanoma cells in mice [J]. *Chin J Comp Med*, 2019, 29(4): 1–6.
- [38] 孟星君, 李孝东, 刘俊, 等. C57BL/6J 小鼠黑色素瘤肺转移模型的构建 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(2): 139–144.
- Meng XJ, Li XD, Liu J, et al. Establishment of a C57BL/6J mouse model of metastatic melanoma in the lung [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2018, 26(2): 139–144.
- [39] Sohn M, Shin S, Yoo JY, et al. Ahnak promotes tumor metastasis through transforming growth factor- β -mediated epithelial-mesenchymal transition [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 14379.
- [40] Grosset AA, Loayza-Vega K, Adam-Granger É, et al. Hematoxylin and eosin counterstaining protocol for immunohistochemistry interpretation and diagnosis [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2019, 27(7): 558–563.
- [41] Lan Q, Chen Y, Dai C, et al. Novel enhanced GFP-positive congenic inbred strain establishment and application of tumor-bearing nude mouse model [J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(10): 3626–3638.
- [42] Ravoori MK, Margalit O, Singh S, et al. Magnetic resonance imaging and bioluminescence imaging for evaluating tumor burden in orthotopic colon cancer [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 6100.
- [43] Liu F, Zhao B, Xia XT, et al. Al18F labeled sulfonamide-conjugated positron emission tomography tracer *in vivo* tumor-targeted imaging [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(10): 17006–17014.

[收稿日期] 2021-05-17