亓丁,艾文霞,韩布威,等. 宫颈上皮内瘤变小鼠模型构建的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(4): 147-152.
Qi D, Ai WX, Han BW, et al. Research progress in the establishment of mouse models of cervical intraepithelial neoplasia [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(4): 147-152.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.04.021

宫颈上皮内瘤变小鼠模型构建的研究进展

亓丁¹,艾文霞¹,韩布威¹,门昊¹,梁铭阁¹,张明书¹,刘宁¹,
刘丽^{1,2},孙一鸣^{3*}

(1.黑龙江中医药大学,哈尔滨 150036;2.黑龙江中医药大学附属第一医院,哈尔滨 150036;
3.黑龙江省中医药科学院,哈尔滨 150036)

【摘要】 现存关于宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)的治疗多以手术为主,临床诊治方面缺乏特效治疗药物。手术虽能清除已转化病灶,但残端在病毒及其他因素的持续作用下仍具有病变风险,因此CIN的预防与治疗研究仍需要合适的动物模型作为支撑。宫颈病变通常表现为一系列连续性过程,这种渐进性病变方式为构建动物模型带来一定困难。国内外关于CIN动物模型的构建研究近年来逐渐增加,本文通过论述CIN小鼠模型的研制方法及优缺点,以期对构建更为适合的动物模型提供思路,以及对宫颈上皮内瘤变的远期防治策略及用药研究提供助力。

【关键词】 宫颈上皮内瘤变;CIN;动物模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 04-0147-06

Research progress in the establishment of mouse models of cervical intraepithelial neoplasia

QI Ding¹, AI Wenxia¹, HAN Buwei¹, MEN Hao¹, LIANG Mingge¹, ZHANG Mingshu¹, LIU Ning¹,
LIU Li^{1,2}, SUN Yiming^{3*}

(1. Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150036, China.
2. the First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150036.
3. Heilongjiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150036)

【Abstract】 Cervical intraepithelial neoplasia is mostly treated by surgery, and clinically specific drugs are lacking. Although surgery can remove transformed lesions, the stump has the risk of lesions under the continuous action of viruses and other factors. Therefore, prevention and treatment of CIN require suitable animal models. Cervical lesions usually manifest as a series of continuous processes, and this progressive pathological process makes it difficult to replicate in animal models. Research on the establishment of CIN animal models at home and abroad has gradually increased in recent years. This review discusses the development method, advantages, and disadvantages of CIN mouse models to provide ideas for the establishment of more suitable animal models and long-term prevention and treatment of cervical intraepithelial neoplasia. Strategy and drug research to provide assistance.

【Keywords】 cervical intraepithelial neoplasia; CIN; animal model

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

【基金项目】 春晖计划(HLJ2019032);黑龙江省自然科学基金(H2015026)。

【作者简介】 亓丁(1995—),女,在读博士研究生,研究方向:输卵管炎性不孕及宫颈疾病的预防与治疗。E-mail: qiding0217@163.com

【通信作者】 孙一鸣(1966—),教授,主任医师,博士生导师,硕士生导师,研究方向:中医药治疗不孕症、宫颈疾病及妇科杂病。

E-mail: sym19660104@163.com

宫颈上皮内瘤变 (cervical intraepithelial neoplasia, CIN), 是与宫颈浸润癌密切相关的一种病变。根据细胞形态、排列方式及细胞核染色情况的不同, 可将 CIN 分为三级, 现在多采用二级分类方法, 即低级别病变 (low-grade squamous intraepithelial lesion, LSIL) 与高级别病变 (high-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL)。宫颈疾病的发展表现为连续性病变过程, 部分 CIN 1 或者 LSIL 患者, 在机体免疫功能的作用下, 病变呈可逆性消退, 但在部分诱因的作用下, 疾病持续性发展, 转变为 CIN 2、3 或 HSIL。研究表明高级别的宫颈病变是宫颈癌的前期表现, 又被称为“癌前病变”, 必须进行治疗。丰富以单一手术为主的治疗方式、开发创新性治疗手段及管理方式是热点, 也是难点^[1]。CIN 已知明确的病因包括人乳头瘤病毒 (human papilloma virus, HPV) 感染、慢性炎症、吸烟、长期口服避孕药等^[2], 其中以高危型 HPV 病毒感染关系最为密切。病毒的 E6 和 E7 癌基因在诱导宫颈癌变方面发挥着关键作用, 并以染色体或其他形式在转化细胞中持续存在, 作用于肿瘤抑制基因 p53 和视网膜母细胞瘤, 以维持在肿瘤进展中的持续作用^[3]。这种特殊的发病方式及病变过程, 为构建动物模型, 验证药物疗效及治疗手段的创新造成一定程度上的困难。因此, 成功构建一种符合宫颈连续性病变过程及女性 CIN 病理特点的动物模型, 对药物研发及丰富治疗手段具有重要意义。本文总结已发表的构建过程, 对 CIN 动物模型的构建进行归纳, 以期对宫颈癌前病变动物模型的建立与完善提供参考。

1 宫颈上皮内瘤变的诱发因素及病变特点

现有研究表明, HPV 病毒持续感染、吸烟、口服避孕药、性伴侣过多、初次性行为过早、早孕多产等均为 CIN 潜在的诱发因素, 因此 CIN 以及宫颈癌被认为是性传播引发的疾病^[4]。诱因包括: (1) HPV 病毒的持续感染: HPV 表达的 E6、E7 癌蛋白引发基底细胞 DNA 损伤, 导致微小病变的积累, 有助于病毒复制并躲避机体免疫系统的监测, 最终导致 CIN 及宫颈癌的发生。性生活频繁的女性 HPV 感染发生率约为 80%, 通过临床研究发现, 高等级宫颈癌前病变主要发生在 40~44 岁人群中, 病变的严重程度与 HPV 阳性检出率及病毒持续感染时间呈正比^[5]。(2) HPV 病毒载量: 病毒载量与不同程度宫颈病变之间具有相关性, 高风险 HPV DNA 载量可

用于评估疾病严重程度。高病毒载量表明感染的持续存在, 同时说明机体依靠自身免疫功能清除病毒的可能性较低, CIN 的发生率更高^[6]。(3) 口服避孕药等方式摄入外源性性激素: HPV 引发子宫颈转化区 CIN 的发生与性激素有关, 类固醇激素可能会增加 HPV E6 癌基因的转录, 导致 p53 基因产物的降解和 G1/S 细胞周期过度激活^[7], 从而诱导 CIN 的产生。雌激素和孕激素通过 HPV 基因组的转录调节区域促进病毒复制并改变宫颈黏液的分泌, 影响免疫球蛋白和细胞因子的表征, 增加异物渗透至基底细胞的可能性^[8], 增加 CIN 及宫颈癌发病风险。(4) 宿主免疫功能: 致病因素与免疫细胞的动态平衡关系影响疾病的产生。在肿瘤疾病的进展过程中, 免疫激活和免疫抑制都发生在癌症发展的癌前阶段, 而 HSIL 被认为宫颈癌变期间免疫逃逸的开始, 通过激活免疫抑制反应导致宫颈癌的发生^[9]。因此, 维持机体免疫功能的正常, 对预防疾病发生、阻断疾病发展具有重要意义。

基于 CIN 的发病因素及病变过程, 逐渐开发出多种 CIN 疾病动物模型, 以小鼠为例, 其分类包括转基因手段、异位种植、局部种植及病毒转染等。动物模型在新型治疗方法的研究和临床前测试中起着至关重要的作用, 本文拟将动物模型进行分类叙述, 阐明其优缺点, 以期对构建最优模型及动物实验研究提供相关参考。

2 模型分类

2.1 转基因小鼠 CIN 模型

基因的阶段性、特异性表达是研究疾病发生发展的分子学基础, 基因转移与体外诱变相结合的方式为改变负责基因转录模式的顺式作用 DNA 序列提供了机会, 通过这种改变基因表达的方式调节宿主的生长发育变化称之为转基因技术。目前创造转基因动物模型的方式一共有 3 种, 分别是线性 DNA 片段注射到单细胞胚胎的原核中、转基因胚胎干细胞注射到胚泡中以及植入前或植入后胚胎的逆转录病毒感染^[10]。

在 CIN 的研究过程中, 许多国外研究人员利用转基因技术, 成功构建出符合 CIN 发病特点及病变过程的动物模型。根据转染外源性基因数目的不同, 可将其分为单转基因组、双转基因组及多转基因组。HPV16 早期区域的表达受细胞角蛋白-14 (K14) 基因启动子的控制, 因此, Peixoto 等^[11]将

HPV16 的早期基因组区域插入小鼠基因组中构建出 K14-HPV16 转基因小鼠(HPV⁺),并通过放大每只小鼠的 E7 基因组区域来确认 HPV16 结构的存在。这种基因改变对角质化上皮的基底细胞更具亲和力。随着小鼠生存时间的延长及干预因素的诱导,角质化上皮表现出 HPV 病毒诱导的 CIN 至宫颈癌逐级病变过程。HPV 病毒的致癌编码蛋白 E6、E7 是诱发高级别病变的主要因素。K14E6/K14E7 双转基因小鼠是通过 K14E7 半合子和 K14E6 纯合子杂交产生。为保证繁殖后代的纯度及性别,需对小鼠的等位基因及性别决定区域进行调控,删除等位基因的种系。所有转基因后代小鼠需要进行鼠尾血清 DNA 基因组 PCR 分型检测以保证研究的可靠性^[12]。双转基因小鼠在雌激素的诱导下,宫颈表现出不同程度的病变。虽然 HPV 病毒感染是 CIN 显著诱发因素,但并非所有病毒检测阳性的女性都发生宫颈高级别病变。在疾病进展过程中,某些基因和细胞因子与 HPV 病毒结合,可以加速病变过程。K14- Δ N87 β cat 小鼠表达人类 Δ N87 β cat mRNA,能够诱导氨基末端截断的 β -儿茶素分子合成,该分子缺乏降解所需的四个磷酸化位点^[13],这种突变导致具有活性的 β -儿茶素表达,小鼠在基因的诱导下发生良性肿瘤病变,并通过激活 Wnt/ β -actin 信号传导促进 HPV 持续感染的宫颈上皮发生恶性转化,这种基因与病毒结合的双转基因小鼠表现出与人类宫颈相似的病变过程^[14]。

转基因小鼠具有基因表达的一致性,不仅为疾病研究提供新的动物模型,同时对剖析个体蛋白和细胞激活途径也具有独特作用。CIN 转基因小鼠模型病变部位在宫颈,且表现为自发性或诱发性病变,而不是外源性或移植性病变,这种模型对药物研发在内的多种研究更具准确性。但是转基因模型同时也具有局限性,通过基因诱导的小鼠模型与人类相比,更缺乏遗传突变的多样性^[15]。此外,HPV 病毒因感染的部位不同,表现为多种上皮黏膜易感,病变通常呈多样性,故该模型在表现出宫颈病变的同时,还伴有皮肤、阴茎及头颈部等部位病变^[16],与 CIN 的单纯研究具有差异,同时全身发病严重影响模型小鼠的存活率,对评估药物安全性及有效性造成一定程度的干扰。

2.2 异种植植小鼠 CIN 模型

异种植植模型的构建是指将人体组织或者人类细胞系种植于小鼠体内,为避免异种植物被宿

主免疫系统识别而影响移植物生长,所以通常选用存在免疫功能障碍小鼠品系。Young 等^[17]通过手术切除宫颈转化区,分离出正常宫颈组织样本,然后将这些含有基质和上皮细胞层的组织种植于免疫缺陷小鼠体内,部分小鼠在种植部位检测到分层鳞状上皮,具有活性的上皮细胞在雌激素的诱导下,逐渐发生病变。HPV 病毒阳性的尖锐湿疣病理组织也可被用于异种植植模型的构建。在免疫功能缺陷小鼠肾囊下植入种植组织后,继续饲养固定时间段,最后约 80% 的种植部位出现固体囊肿,组织病理检测发现肿块棘皮层的基底细胞增殖、角化障碍,并存在有丝分裂,导致类似 CIN 病变的发生^[18]。除移植正常鳞状上皮及其他病变组织,通过特定手段诱导 CIN 发生外,亦可以直接种植 CIN 组织。Tewari 等^[19]通过冷刀锥切获取 CIN 病变组织,术后 4 h 内,将新鲜组织种植于小鼠腹部皮下脂肪与腹膜之间。移植后病变组织仍在分层细胞中保持有丝分裂活跃状态,维护发育不良特征,并表现出不同程度的新生血管化。单纯 HPV 病毒移植,在没有其他因素诱导下,不能发生 CIN 或宫颈癌变。研究发现,防御素对宫颈上皮细胞具有趋化活性,刺激 HPV 病毒阳性的宫颈细胞迁移及入侵,防御素通过招募未成熟的树突状细胞,诱导感染病毒的宫颈细胞躲避宿主免疫监测,这种经防御素转染的角化细胞能够在免疫缺陷小鼠体内形成类似宫颈高级别病变的上皮组织,并且具有新生血管形成及肿瘤侵袭等特征^[20]。

异种植植模型具有独特的优点,其种植组织来自现成的人类标本,种植后保持分层鳞状上皮结构,可以作为宫颈上皮内肿瘤和宫颈癌的结缔组织诱发因素等方面的研究^[16]。但为提高移植成功率,避免小鼠免疫系统对移植物产生排斥反应,故多采用免疫缺陷性小鼠,因此异种植植模型不能作为 CIN 与免疫及局部微环境等方面研究的首选模型。

3 皮肤移植模型

将病变组织或符合病变组织特性的皮肤移植至小鼠皮肤表层,为研究表皮及上皮增殖、分化及构建病理学模型提供了一种新型研究方式,这种模型重要的是应确保移植物保留供体皮肤的生理及病理特征^[21]。Mittal 等^[22]开发了一个类似增生性癌前病变的皮肤移植模型。这个模型病变皮肤与表达其他非自身抗原皮肤不同,它包含由 K14 驱动

的 HPV16 E7 癌蛋白。为避免宿主免疫能力对移植皮肤产生排斥,通常选用存在免疫缺陷障碍的小鼠。主要操作方法为将含有癌蛋白的转基因小鼠耳部及内腹部皮肤取出移植于正常小鼠背翼侧,种植部位表现为增生性反应,局部免疫细胞浸润有所增加,并在宿主中产生局部免疫抑制环境,这种模型的构建为后续 HPV 相关病变的研究具有重要意义。明确 CIN 的诱发因素对成功构建 CIN 疾病动物模型具有重要作用,虽然在病毒持续感染的作用下,CIN 发病率增高,但这一过程必须重视免疫功能的作用,这也是构建动物模型时需要注意的因素。

将野生型 C57BL/6J 雌性小鼠与 HPV16 E7 转基因雄性小鼠进行繁殖,获取繁育后代小鼠的双耳,将双耳真皮和表皮进行分离,去除组织制备中释放的各种细胞因子,仅移植有效病变皮肤至观察小鼠的一侧耳部或腹部,与另一侧形成对比,最终在种植部分发现显著的 CIN2/3 级病变^[23]。

皮肤种植模型的构建为观察局部病变提供了一种更为直观的手段,便于局部用药治疗的观察,最新的模型进一步完善了移植后皮肤岛在模型鼠中病理特性的维持。但应考虑小鼠对手术创伤的耐受性较低及差异基因皮肤移植在模型鼠中愈合

表 1 CIN 模型小鼠品系信息及优缺点

Table 1 Strain information, advantages and disadvantages of CIN model mice

品系 Strain	免疫缺陷 Immunodeficiency	转基因、种植部位或病毒转染 Transgenic, planting site or virus transfection	优缺点 Advantages and disadvantages
FVB/n ^[11]	否 No	K14-HPV16 转基因小鼠 K14-HPV16 transgenic mice	优点:可以明确某个特定基因及蛋白对 CIN 甚至是 CC 的作用。 Advantages:It can clarify the effect of a specific gene and protein on CIN and even CC.
FVB/n ^[12]	否 No	K14E7 [FVB-Tg(KRT14-HPV16E7)2304Plam] 半合子和 K14E6 [FVB-Tg(KRT14-HPV16E6)5737Plam] 纯合子杂交产生 Cross between K14E7 [FVB-Tg(KRT14-HPV16E7)2304Plam] hemizygote and K14E6 [FVB-Tg(KRT14-HPV16E6)5737Plam] homozygote	缺点:通常表现为宫颈在内的全身多处上皮病变。 Disadvantages:Usually manifested as multiple epithelial lesions of the whole body including the cervix.
FVB/n ^[14]	否 No	K14-ΔN87βcat 小鼠与 K14-E7 或 K14-HPV16 小鼠杂交产生 K14-ΔN87β Generated by hybridization of cat mice with K14-E7 or K14-HPV16 mice	
SCID ^[17]	是 Yes	背翼侧 Dorsal flank	优点:异种植后仍保持人源的鳞状上皮特性,可以作为 CIN 和 CC 的结缔组织诱发因素等方面的研究。 Advantages:After xenotransplantation, it still maintains the characteristics of human squamous epithelium, which can be used as a study on the inducing factor of connective tissue of CIN and CC.
SCID (C. B-17/Icr Tac-scid)DF ^[18]	是 Yes	肾囊下 Subcapsular	缺点:移植成功率较低。 Disadvantages:Low success rate of migration.
SCID ^[19]	是 Yes	腹部皮下 Subcutaneous abdomen	
NOD/SCID ^[20]	是 Yes	背肌筋膜 Dorsal fascia	
C57BL/6 ^[22]	否 No	背侧翼 Dorsal flank	优点:病变部位在表层,易于观察,适合 CIN 局部用药的研究。 Advantages:Lesion is on the surface, easy to observe, and suitable for the study of CIN local medication.
C57BL/6J ^[23]	否 No	(1) C57BL/6J 与 HPV16 E7 转基因 C57BL/6J 杂交 (1) Cross between C57BL/6J and HPV16 E7 transgenic C57BL/6J (2) 种植部位在耳部及背侧 (2) Planting site is at the ear and back	缺点:易产生皮肤愈合不良而增加小鼠死亡率。 Disadvantages:It is easy to cause poor skin healing and increase the mortality of mice.
C57BL/6NTac ^[25]	否 No	Pkt2-Luc-T2a-E7-T2a-E6 质粒病毒转染 Pkt2-Luc-T2a-E7-T2a-E6 plasmid virus transfection	优点:仅宫颈局部病变,适合于 CIN 到 CC 的疾病进展因素、阻断用药等疾病及药物研发方面的研究。 Advantages:Only cervical lesions can be avoided, which is suitable for the study of disease progression factors from CIN to CC, drug blocking and other diseases and drug research and development.
C57BL/6 ^[26]	否 No	HPV16 E6、E7 表达的 TC-1 细胞转染 TC-1 cells transfected with HPV16 E6 and E7 expression	缺点:注意防护,避免造成实验室及人员污染。 Disadvantages: Pay attention to protection to avoid laboratory and personnel pollution.
FoxN1nu ^[27]	是 Yes	MmuPV1	

不良等情况的出现,这种操作在技术上对操作者的要求较高,且需要超级显微手术等设备及技术支持^[24]。

4 经阴道病毒感染模型的构建

经阴道感染高危型 HPV 病毒而诱发的 CIN 既符合疾病发病特点,同时具有与临床患者一致性的连续性宫颈病变过程。Henkle 等^[25]构建含有 HPV 病毒致癌蛋白 E6、E7 的 Pkt2-Luc-T2a-E7-T2a-E6 质粒,以 SB 转座酶为载体,结合电击阴道下 1/3 部的方式使 HPV 通过伤口感染基底上皮细胞,促进载体病毒与宫颈上皮层融合。SB 转座酶以切割和粘贴的方式调节转座子 DNA 的切除,插入宿主基因组 DNA 的 TA-二核苷酸,病毒进入宿主细胞并解开衣壳后,病毒 DNA 被转移到细胞核中,并保持持续复制状态,最终逐渐表现为不同级别的宫颈病变。HPV 病毒通过人为方式造成感染状态,均需要一定的载体,除上述的 SB 转座酶外,使用频次最高的为小鼠肺上皮 TC-1 细胞系。经 HPV 病毒及致癌基因转染的 TC-1 细胞稳定性较高,对宫颈上皮具有一定的亲和力。质粒转染后的细胞,在雌激素、紫外线照射及电击等因素作用下,可诱导 CIN 病变的发生。这种模型的构建对研究新型疫苗的有效性具有重要作用^[26]。以上两种模型构建过程中使用的均为人类易感乳头瘤病毒,经过转染及质粒包装后造成宫颈感染,随着研究不断深入,发现新型鼠类易感的鼠乳头瘤病毒 (murine papilloma virus, Mmupv 1),这种病毒与人类易感病毒相比更容易调控,并且仅鼠类感染皮肤和粘膜上皮,在操作过程中更为安全。野生型免疫功能雌性小鼠在人为宫颈损伤的情况下,病毒感染 4 个月后形成低等级癌前病变,在雌激素、紫外线等诱发因素作用下导致高等级的癌前病变甚至是癌症的发生^[27]。

这种经阴道转染的病毒模型具有多重优点:(1) HPV 癌基因 E6 和 E7 在小鼠女性生殖道肿瘤中的定向表达;(2) 通过高等级鳞状上皮内病变 (HSIL) 自发进展为癌症^[25];(3) 能够灵活地模拟不同高风险 HPV 基因型的癌症;(4) 模型小鼠应对免疫疗法做出适当反应并产生抗肿瘤免疫力;(5) 疾病病变过程符合从癌前状态至侵入性癌及转移状态的临床进展^[27]。但是在 HPV 病毒转染过程中应严格注意操作安全,做好防护措施,避免污染环境,造成人源感染。

5 总结与展望

宫颈病变表现为正常子宫颈、宫颈上皮发育不良、原位癌、局部侵袭性癌症和远处转移性癌症一系列明确过程,这个序列过程可以被分为癌前病变、原位癌及转移扩散阶段。高级别 CIN 被视为阻断癌症发生的有效治疗节点,积极治疗高级别病变对降低宫颈癌发病率、减轻家庭及社会医疗负担、提高生存质量具有重要作用。既往 CIN 的治疗多以手术治疗为主,临床特效药物研发较为缺乏,动物模型的成功构建为临床药物研究的开发及治疗方式的创新提供了验证方式。本文较为全面的介绍了 4 种动物模型的优缺点,详见表 1,其中转基因小鼠模型应用范围最广,但是其价格昂贵,折损率较高,且多表现为多点发病。异种植模型保持人源组织分层鳞状上皮结构,但需要小鼠免疫的充分耐受,应用的小鼠品系通常无法评估免疫系统的动态改变,且生长部位与 CIN 解剖部位无关,也无法完整模拟癌前病变的临床进展。皮肤移植模型更为直观,但病变部位易受到其他因素影响移植成功率且未表现出明显的连续性病变过程。经阴道病毒感染的模型与患者临床病变特征最为相似,且仅表现为宫颈局部病变,这种新兴模型可能存在更高的研究价值。

参考文献:

- [1] Petry KU. Management options for cervical intraepithelial neoplasia [J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2011, 25 (5): 641-651.
- [2] Wise LA, Willis SK, Perkins RB, et al. A prospective study of treatments for cervical intraepithelial neoplasia and fecundability [J]. Am J Obstet Gynecol, 2020, 223(1): 96.
- [3] Kisselov F, Sakharova O, Kondratjeva T. Cellular and molecular biological aspects of cervical intraepithelial neoplasia [J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2008, 271: 35-95.
- [4] Alrajjal A, Pansare V, Choudhury MSR, et al. Squamous intraepithelial lesions (SIL: LSIL, HSIL, ASCUS, ASC-H, LSIL-H) of uterine cervix and Bethesda system [J]. Cytojournal, 2021, 18: 16.
- [5] Ma X, Yang M. The correlation between high-risk HPV infection and precancerous lesions and cervical cancer [J]. Am J Transl Res, 2021, 13(9): 10830-10836.
- [6] Liu Y, Xu C, Pan J, et al. Significance of the viral load of high-risk HPV in the diagnosis and prediction of cervical lesions: a retrospective study [J]. BMC Womens Health, 2021, 21 (1): 353.
- [7] Oh HY, Kim MK, Seo SS, et al. Association of combined

- tobacco smoking and oral contraceptive use with cervical intraepithelial neoplasia 2 or 3 in Korean women [J]. J Epidemiol, 2016, 26(1): 22-29.
- [8] Chih HJ, Lee AH, Colville L, et al. Condom and oral contraceptive use and risk of cervical intraepithelial neoplasia in Australian women [J]. J Gynecol Oncol, 2014, 25(3): 183-187.
- [9] Wang Y, He M, Zhang G, et al. The immune landscape during the tumorigenesis of cervical cancer [J]. Cancer Med, 2021, 10(7): 2380-2395.
- [10] Wight DC, Wagner TE. Transgenic mice: a decade of progress in technology and research [J]. Mutat Res, 1994, 307(2): 429-440.
- [11] Peixoto da Silva S, Santos JMO, Mestre VF, et al. Human papillomavirus 16-Transgenic mice as a model to study cancer-associated *Cachexia* [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(14): 5020.
- [12] Baik S, Mehta FF, Chung SH. Medroxyprogesterone acetate prevention of cervical cancer through progesterone receptor in a human papillomavirus transgenic mouse model [J]. Am J Pathol, 2019, 189(12): 2459-2468.
- [13] Bulut G, Üren A. Generation of K14-E7/ Δ N87 β cat double transgenic mice as a model of cervical cancer [J]. Methods Mol Biol, 2015, 1249: 393-406.
- [14] Bulut G, Fallen S, Beauchamp EM, et al. Beta-catenin accelerates human papilloma virus type-16 mediated cervical carcinogenesis in transgenic mice [J]. PLoS One, 2011, 6(11): e27243.
- [15] Larmour LI, Jobling TW, Gargett CE. A review of current animal models for the study of cervical dysplasia and cervical carcinoma [J]. Int J Gynecol Cancer, 2015, 25(8): 1345-1352.
- [16] Medeiros-Fonseca B, Mestre VF, Estêvão D, et al. HPV16 induces penile intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma in transgenic mice: first mouse model for HPV-related penile cancer [J]. J Pathol, 2020, 251(4): 411-419.
- [17] Young RC, Schumann R. Maintaining squamous epithelial architecture in a human cervical epithelium to SCID mouse xenograft model system [J]. J Soc Gynecol Investig, 1999, 6(4): 208-212.
- [18] Bonnez W, DaRin C, Borkhuis C, et al. Isolation and propagation of human papillomavirus type 16 in human xenografts implanted in the severe combined immunodeficiency mouse [J]. J Virol, 1998, 72(6): 5256-5261.
- [19] Tewari KS, Taylor JA, Liao SY, et al. Development and assessment of a general theory of cervical carcinogenesis utilizing a severe combined immunodeficiency murine-human xenograft model [J]. Gynecol Oncol, 2000, 77(1): 137-148.
- [20] Hubert P, Herman L, Maillard C, et al. Defensins induce the recruitment of dendritic cells in cervical human papillomavirus-associated (pre) neoplastic lesions formed *in vitro* and transplanted *in vivo* [J]. FASEB J, 2007, 21(11): 2765-2775.
- [21] Krueger GG, Chambers DA, Shelby J. Epidermal proliferation of nude mouse skin, pig skin, and pig skin grafts. Failure of nude mouse skin to respond to the tumor promoter 12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate [J]. J Exp Med, 1980, 152(5): 1329-1339.
- [22] Mittal D, Kassianos AJ, Tran LS, et al. Indoleamine 2, 3-dioxygenase activity contributes to local immune suppression in the skin expressing human papillomavirus oncoprotein *e7* [J]. J Invest Dermatol, 2013, 133(12): 2686-2694.
- [23] Gosmann C, Mattarollo SR, Bridge JA, et al. IL-17 suppresses immune effector functions in human papillomavirus-associated epithelial hyperplasia [J]. J Immunol, 2014, 193(5): 2248-2257.
- [24] Fleissig YY, Beare JE, LeBlanc AJ, et al. Evolution of the rat hind limb transplant as an experimental model of vascularized composite allotransplantation: approaches and advantages [J]. SAGE Open Med, 2020, 8: 2050312120968721.
- [25] Henkle TR, Lam B, Kung YJ, et al. Development of a novel mouse model of spontaneous high-risk HPV E6/E7-expressing carcinoma in the cervicovaginal tract [J]. Cancer Res, 2021, 81(17): 4560-4569.
- [26] Peng S, Ferrall L, Gaillard S, et al. Development of DNA vaccine targeting E6 and E7 proteins of human papillomavirus 16 (HPV16) and HPV18 for immunotherapy in combination with recombinant vaccinia boost and PD-1 antibody [J]. mBio, 2021, 12(1): e03224-e03220.
- [27] Spurgeon ME, Uberoi A, McGregor SM, et al. A novel *in vivo* infection model to study papillomavirus-mediated disease of the female reproductive tract [J]. mBio, 2019, 10(2): e00180-e00119.

〔收稿日期〕2022-07-11