

安庆玲,谭邓旭,师长宏. 结直肠癌基因工程小鼠模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5): 660-667.

An QL, Tan DX, Shi CH. Genetically engineered mouse models of colorectal cancer [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 660-667.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.05.013

结直肠癌基因工程小鼠模型研究进展

安庆玲,谭邓旭,师长宏*

(空军军医大学实验动物中心,西安 710032)

【摘要】 结直肠癌(colorectal cancer,CRC)是我国发病率排名第二的恶性肿瘤,其发病机制复杂,预防和治疗研究需要持续深入。为深入揭示结直肠癌发生机制,建立相应的临床前体内模型非常重要。相比较于致癌诱导模型和异种移植模型,基因工程动物模型是模拟结直肠癌患者基因突变的一种有力实验工具。自发性结直肠癌模型 *Apc*^{Min/+} 小鼠制备成功以来,研究者不断地尝试构建与临床相似性更高的结直肠癌基因工程小鼠模型。本文综述了以抑癌基因结直肠腺瘤性息肉病(adenomatous polyposis coli,*Apc*)基因为代表的各种基因突变在结直肠癌发生和进展中的作用,重点关注了不同基因突变组合构建的小鼠结直肠癌模型在病理形态和侵袭转移能力方面的特征,以便为结直肠癌的研究提供理想的实验工具。

【关键词】 结直肠癌;小鼠模型;基因突变;侵袭性;临床相似性

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 05-0660-08

Genetically engineered mouse models of colorectal cancer

AN Qingling, TAN Dengxu, SHI Changhong*

(Laboratory Animal Center, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China)

Corresponding author: SHI Changhong. E-mail: changhong@fmmu.edu.cn

【Abstract】 Colorectal cancer has the second highest incidence in China. The pathogenesis of colorectal cancer is complex, and prevention and treatment require improvement. To reveal the tumorigenesis mechanism of colorectal cancer, a preclinical animal model should be established. Compared with carcinogenic induction and xenograft models, the genetically engineered animal model is a powerful experimental tool to simulate the genetic mutations of colorectal cancer patients. Since establishment of *Apc*^{Min/+} mice, the most representative spontaneous colorectal cancer model, researchers have been attempting to establish genetically engineered mouse models of colorectal cancer with high clinical similarity. In this review, we discuss the role of *Apc* gene mutations in tumorigenesis of colorectal cancer, and focus on the characteristics of mouse colorectal cancer models established by various combinations of genetic mutations in terms of pathological morphology, invasion, and metastasis. This will provide a reference for colorectal cancer research to select ideal experimental models.

【Keywords】 colorectal cancer; mouse model; genetic mutation; invasiveness; clinical similarity

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

国家癌症中心于2022年2月发布的全国癌症统计数据显示,我国结直肠癌(colorectal cancer,CRC)发病人数40.8万,恶性肿瘤发病率中排名第二,死亡人数19.6万,死亡率在恶性肿瘤中排名第四。随着国人饮食习惯趋于西方化,CRC的发病率呈现上升趋势^[1]。由于CRC发病机制的复杂性,预防和治疗研究需要持续深入,对深入揭示CRC发生机制,建立相应的动物模型非常重要。

【基金项目】 国家自然科学基金(31572340),陕西省创新能力支撑计划(2021PT-037)。
Funded by National Natural Science Foundation of China (31572340), Shaanxi Innovation Capability Support Plan (2021PT-037).
【作者简介】 安庆玲(1994—),女,硕士,研究方向:肿瘤免疫治疗。Email: 821543157@qq.com
【通信作者】 师长宏,男,教授,博士生导师,研究方向:人类疾病的动物模型。Email: changhong@fmmu.edu.cn

CRC 动物模型通常包括致癌诱导模型、异种移植模型和基因工程模型。常用的致癌诱导模型是通过氧化偶氮甲烷 (azoxymethane, AOM) 或葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 等化学诱导剂诱发结肠炎发生,进而再发展成结肠癌,此方法需持续诱导,作用时间长,且少有转移灶形成^[2]。异种移植模型是用肿瘤细胞或者患者来源的肿瘤组织块进行皮下或者原位移植,造模时间短、成瘤率高^[3],皮下移植便于观察肿瘤生长情况,适合评价药物治疗效果,但是缺乏肿瘤发生原位的肿瘤微环境和侵袭转移条件;原位移植虽然满足这两个条件,但是操作难度大,难以监测肿瘤生长,适合肿瘤侵袭转移机制与阻断研究。基因工程模型是通过现代生物技术将外源基因导入受体基因组中,并且可稳定遗传,其特点是高度模仿了结直肠癌患者常见的基因突变,这种模型适用于基因在 CRC 发生发展中的功能研究。

随着对 CRC 发生机制的深入了解,其相应的基因工程动物模型的肿瘤形态和分布位置与临床患者的相似性越来越高。同时,由于 CRISPR-Cas9 技术不断成熟与完善,制备基因工程动物模型的成本降低、周期缩短,从而推动了 CRC 基因工程动物模型的应用研究。本文综合探讨各种基因突变在结直肠癌发生和进展中的作用,重点关注不同基因突变组合构建的 CRC 基因工程小鼠模型,期望为结直肠癌的研究提供理想的实验工具。

1 基于 *Apc* 单基因突变的基因工程小鼠模型

Apc 基因位于 5 号染色体长臂 2 区 2 带 2 号亚带,编码一种多功能蛋白,可能参与细胞粘附和迁移、信号转导、微管组装和染色体分离等多个细胞过程^[4]。超过 80% 的 CRC 表现出 *Apc* 突变,*Apc* 突变在腺瘤癌序列的早期阶段被发现,被称为异常隐窝病灶^[5]。APC 是 WNT 途径的重要负调节因子,是 Axin-APC 降解体复合物的一个组成部分,促进 WNT 效应子 β -catenin 的蛋白酶体降解,若该复合物由于 *Apc* 突变失活而存在缺陷,则过量的 β -catenin 会积聚在细胞质内并易位到细胞核中,操作转录开关,导致 *Myc* 和许多其他基因的激活^[6]。

Moser 等^[7] 1990 年发现诱变剂 N-乙基-N-亚硝基脒 (N-ethyl-N-nitrosourea, ENU) 可以诱导小鼠 *Apc* 基因在 850 位氨基酸处发生点突变,由 TTG 转变成

终止密码子 TAG,丧失其抑癌功能,这种 *Apc*^{Min/+} 小鼠 15 周龄就在整个肠道中发展出多发性腺瘤,突变基因具有优势表达和完全渗透性。30 年来,*Apc*^{Min/+} 小鼠被广泛用于化学预防、肠道肿瘤发生的基因功能测试和肿瘤治疗等研究,但是与人类 *Apc* 基因突变导致的疾病表型有明显区别,人类 *Apc* 基因突变主要发生结肠病变,并且可能进展为浸润性癌;而小鼠的突变只是在小肠中发展出更多的息肉。因此,1997 年,Shibata 等^[8] 基于 Cre-loxP 重组系统,在 *Apc* 基因 13 和 14 号内含子两侧插入 loxP 位点,并将所得突变等位基因 (*Apc*^{580S}) 引入小鼠种系中,构建 *Apc*^{580S/580S} 小鼠,再将腺病毒 Cre (AxCANCre) 递送到结肠,完成在结肠中第 1 次条件性的 *Apc* 缺失,小鼠最终在 4 周内发生腺瘤。整个肠道中 *Apc* 的急性缺失导致隐窝祖细胞表型,其中整个隐窝被转化。该模型规避了 *Apc* 完全敲除的胚胎致死性,并将 *Apc* 失活特异性地引导到结直肠上皮,在此之后许多结肠特异性 Cre (如 Villin-Cre) 被用来删除结直肠的相关基因从而促进结肠腺瘤发生,改善了 *Apc*^{Min/+} 小鼠肿瘤分布与临床差异的问题^[9]。为了使 *Apc*^{Min/+} 小鼠息肉的恶性程度更相似于临床患者,研究者们尝试将 *Apc*^{Min/+} 小鼠联合化学诱导,如 AOM、DSS 或其他致癌化合物,最终证实可以增加所得肿瘤的恶性程度,同时缩短肿瘤进展时间^[10]。除联合化学诱导剂,还构造了许多其他 *Apc* 等位基因截断的模型,包括 *Apc*^{1322T} 小鼠,非常接近于人类癌症 *Apc* 基因 1309 处密码子中发生的突变,APC 蛋白完全丧失,相比较 *Apc*^{Min/+} 小鼠息肉明显更严重,发病较早、息肉更大、数量更多,甚至可以发育为不良腺瘤,肿瘤也具有更明显的潘氏细胞分化和更高的隐窝裂变频率^[11]。这些突变的另一个值得提起的例子是 *Apc*^{1638N},其在 15 号外显子内以反义方向携带新霉素盒,导致密码子 1638 处密码子对应的蛋白质被不稳定截断,虽然这种小鼠最终形成的肿瘤数量较少 (< 10),且潜伏期较长,但是可能随着粘膜和粘膜下层的浸润而发展为腺癌^[12]。直接删除 14 号外显子的 *Apc* ^{Δ 14/+} 小鼠肿瘤分布转移,表型更严重,伴有肌肉侵袭、致死性增加和结肠肿瘤负荷更高^[13]。

2 联合 *Apc* 基因突变的基因工程小鼠模型

2.1 *Kras* 突变相关动物模型

Kras 是所有恶性肿瘤中最常突变的癌基因之一。在 CRC 病例中, *Kras* 突变的患病率约为

40%^[14]。一旦发生 *Kras* 突变, GTP 的水解被破坏和/或核苷酸交换增强, 然后 *Kras* 以活性状态积累, 有助于下游信号通路的持续激活, 从而促进肿瘤细胞增殖。携带 *Kras* 突变的结直肠肿瘤与患者的晚期疾病状态、肿瘤分化不良、远处转移和较差生存率相关^[15]。

AhCre Apc^{fl/+} Kras^{+/LSLV12} 小鼠证明 *Apc* 丢失后 *Kras* (V12) 的激活导致肿瘤发生增加, 动力学明显, 说明 *Kras* (V12) 的表达加速了肠道肿瘤的发生, 并长期赋予 *Apc* 丢失后的侵袭性^[16]。*Kras^{G12V} Apc^{1638N/+}* 小鼠的肿瘤多样性增加 10 倍, 肿瘤增殖更快、进展加速, 导致发病率和死亡率显著提高并显示出细胞凋亡水平降低^[17]。在表达 *Kras* (G12D) 的小鼠中去除 *Ink4a/Arf* 的 *VillinCre Kras^{G12V/+} Ink4a/Arf^{-/-}* 可防止衰老并在 12 周就以 76% 的概率导致侵袭性转移性癌, 其形态和分子改变可与人类 *Kras* 突变锯齿状肿瘤相似, 但仅位于近端结肠中。2018 年, Sakai 等^[18] 构建了肠上皮细胞中关键的结直肠癌驱动突变 (*Apc*、*Kras*、*Tgfb2*、*Trp53*、*Fbxw7*) 的不同组合的小鼠模型, *Apc^{Δ716} Kras^{G12D}* 组合增加肠道肿瘤的多重性, *Apc^{Δ716} Kras^{G12D} Fbxw7^{-/-}* 小鼠的肿瘤分布显著增加。这些结果表明, *Kras* 活化和 *Fbxw7* 破坏的组合除了诱导上皮-间质转化外, 还加速了肿瘤生长, 并且这些性质与侵袭能力无关, *Apc^{Δ716} Kras^{G12D} Tgfb2^{-/-}* 组合实现高效肝转移, 这些结果表明, Wnt 激活、*Kras* 激活和 AKT 突变抑制 TGFβ 是有效肝转移的核心组合。

2.2 p53 突变相关动物模型

p53 是一个关键的肿瘤抑制基因, CRC 的 *p53* 突变发生在 34% 的近端结肠肿瘤和 45% 的远端结直肠肿瘤中^[19]。研究证明, *p53* 突变在肿瘤病理过程中的腺瘤-癌转化中起关键作用。不同类型的 *p53* 突变在确定 CRC 的生物学行为中起着关键作用, 如侵袭深度、转移部位甚至患者的预后。*p53* 突变与近端结肠癌的淋巴浸润有关, 并与远端 CRC 的淋巴和血管浸润有显著相关性^[20]。

早期, 将 *Apc* 突变与纯合 *p53* 敲除相结合的 *Apc^{Min/+} p53^{-/-}* 小鼠胃肠道恶性肿瘤略有增加^[21]。2017 年, Nakayama 等^[22] 证明 *p53* 的另一个核积累的突变体 *p53^{R270H}* 通过复杂的肿瘤腺体形成和获得侵袭性从而诱导肠道肿瘤的恶性进展, 基质中肌原纤维细胞数量增加。*p53* 活化后 FBXW7 蛋白表达增加, 经常在各种人类癌症中显示 *Fbxw7* 突变和等

位基因丢失, FBXW7 蛋白的缺失会抑制细胞分裂、干细胞分化、增强染色体不稳定性, 并可能导致造血细胞癌变^[23]。另外, 有研究显示 *Fbxw7* mRNA 在结直肠癌中的表达显著降低, 采用比较基因组杂交阵列, 超过 20% 的 CRC 患者 ($n = 130$) 的 *Fbxw7* 拷贝数丢失, 证明这与疾病进展相关^[24]。与野生型 *Fbxw7* 患者相比, *Fbxw7* 错义突变的转移性 CRC 患者的总生存期更短^[25]。*Fbxw7* 的单独缺失不会引起肠道肿瘤发生, 但是 *Fbxw7^{-/-} p53^{-/-}* 小鼠可引起高度渗透性、侵袭性和转移性腺癌 (淋巴结和肝脏)^[26]。*Trim67* 在大约 80% 的结直肠癌中表观遗传沉默, 其沉默与预后不良相关。Wang 等^[27] 证实 *Trim67* 具有肿瘤抑制因子的功能, *TRIM67* 能够抑制结直肠癌细胞生长, 并通过激活 *p53* 途径诱导细胞凋亡, 其敲除促进 *Apc^{Min/+}* 小鼠的结直肠肿瘤发生, 肿瘤多重性和肿瘤负荷显著更高。

2.3 Pik3ca/Pten 突变相关动物模型

磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) 通路主要是通过磷脂酰肌醇-4, 5-二磷酸 (phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate, PIP2) 转化为磷脂酰肌醇-3, 4, 5-三磷酸 (phosphatidylinositol-(3, 4, 5)-trisphosphate, PIP3) 磷酸化磷脂酰肌醇, 参与细胞增殖、分化和存活的调节, *PIK3CA* 和 *PTEN* 是该通路关键激酶^[28]。*Pik3ca* 基因编码 *PI3K p110* 催化亚基, 它的突变被认为是诱导致癌 *PI3K* 信号通路的创新机制^[29]。*Pik3ca* 基因在 10% ~ 20% 的 CRC 肿瘤中发生突变, 与 *Pik3ca* 野生型肿瘤患者相比, *Pik3ca* 突变肿瘤患者的结肠癌特异性死亡率增加^[30]。*PTEN* 是一种通过去磷酸化 *PIP3* 抑制过活化 *AKT*, 以拮抗 *PI3K/AKT* 通路的磷酸酶, 可以防止基因组不稳定。在 CRC 中, *Pten* 基因发生各种等位基因丢失, 增强子区域的高甲基化, 失活突变^[28]。

在成体或胚胎上皮细胞群中特异性的 *Pten* 丢失不会影响肠道上皮的正常结构或体内平衡。然而, 在 *Apc* 缺乏的基础上, *Pten* 的丢失可以通过增加 *Akt* 的活化加速肿瘤发生, 从而导致腺癌的快速发展^[31]。*Pten* 丢失和 *Kras* 激活导致 *VillinCreER^T-Apc^{fl/+} Pten^{fl/fl} Kras^{LSL/+}* 小鼠肠上皮稳态紊乱以及增生性息肉, 促进发育不良的无柄锯齿状腺瘤和具有锯齿状特征的转移性腺癌的发展^[32]。Leystra 等^[33] 通过 FC *PIK3ca* * 小鼠证明 *PI3K* 蛋白在小鼠肠道中显性活性形式的表达导致上皮细胞增生和晚期肿瘤, 在小肠远端和结肠的上皮细胞中表达组成性活性

PI3K 的小鼠在结肠中迅速发展为侵袭性腺癌,并扩散到肠系膜和邻近器官。*Apc^{fl/fl} Pik3ca^{p110*}* 小鼠, *Apc^{fl/fl} Kras^{G12D/+} Pik3ca^{p110*}* 小鼠中位生存期约 200 d, 肿瘤从小的息肉样病变发展为浸润性腺癌,其填充了大部分结肠管腔,这些小鼠中 80% 的肿瘤是浸润性腺癌,其中许多肿瘤有很大一部分延伸到固有肌层之外,累及浆膜,还发现了转移到腹膜后主动脉旁淋巴结和肝内的转移性癌症^[34]。

2.4 Smad/Tgfr 突变相关动物模型

在正常细胞中,转化生长因子- β (transforming growth factor-beta, TGF- β) 信号通路成员, TGF- β I 型和 II 型受体 (TGFBR1、TGFBR2) 以及这些受体的底物 SMAD 蛋白,能够促进细胞分化、凋亡,抑制细胞非正常增殖,被视为肿瘤抑制因子,83% 的结肠癌至少有一个 TGF- β 信号通路成员突变^[35]。相比较 *Apc^{+/-}* 小鼠, *Smad2^{+/-} Apc^{+/-}* 小鼠息肉在数量、大小或组织病理学上没有差异,这说明在人类染色体 18q21 上, *Smad2* 杂合性丢失不足以引起结肠息肉的恶性进展^[36]。*Apc^{Min/+} Smad3^{-/-}* 导致高多重性和快速发作的侵袭性肿瘤发生,发生位置几乎完全在远端结肠中^[37]。*Apc^{+/-} Smad4^{+/-}* 小鼠肿瘤多发性增加,恶性程度升高,表现出广泛的基质细胞增殖、粘膜下侵袭、细胞异质性和体内转移^[38]。Oshima 等^[39] 证实炎症微环境中抑制上皮再生中的 TGF β 信号传导足以引起浸润性肠癌, *Apc^{Δ716} Tgfr2^{ΔIEC}* 小鼠发展具有黏膜下浸润的腺癌,而简单的 *Apc^{Δ716}* 小鼠仅具有无侵袭性腺瘤。另外, TGF- β 受体失活伴随 *Kras* 突变的 *LSL-Kras^{G12D} Tgfr2^{IEKO}* 小鼠通过 β -catenin 非依赖性途径诱导小鼠肠道肿瘤^[40]。*Tgfr2^{E2flx/E2flx} Villin-Cre Apc^{1638N}* 小鼠转化生长因子 β 受体 II 型失活诱导由 *Apc* 突变引发的肠道肿瘤恶性转化^[41]。

2.5 细菌相关动物模型

越来越多的研究证明,口腔和肠道微生物对结直肠癌的发生发展有着不可或缺的作用^[42],研究者将基因工程小鼠与微生物联合以探索结直肠癌发生进展。在结直肠癌发生过程中,具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*, *F. nucleatum*) 的丰度逐渐增加,口服 *F. nucleatum* 的 *Apc^{Min/+}* 小鼠可以通过体内和体外的自噬途径促进肿瘤转移,相较于对照组的肿瘤数量增加、侵袭性更强^[43]。结直肠癌患者牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*) 的丰度较高,并且与结直肠癌患者的总生

存期呈负相关,将 *P. gingivalis* 引入 *Apc^{Min/+}* 小鼠中可以招募肿瘤浸润的骨髓细胞,激活 NLRP3 炎症小体并产生促炎微环境,增加了结肠肿瘤的发作次数,这些小鼠表现出更高的多重性结肠肿瘤和较大的总结肠肿瘤体积^[44]。

3 其它类型的基因工程小鼠模型

3.1 Braf 突变相关动物模型

MAPK 级联反应是人类癌细胞存活、传播和对药物治疗耐药性的关键途径^[45]。BRAF 属于细胞外信号调节 MAPK/ERK 途径下游激酶,基因突变可导致蛋白质扩增并改变肿瘤微环境,从而过度激活该途径^[46]。2013 年 Rad 等^[47] 首先构建了 *VillinCre Braf^{LSL-V637E/+}* 小鼠,发展出终生持续的全身性隐窝增生,几乎影响每个隐窝,导致小肠和大肠明显伸长和增厚,启动肠道肿瘤发生的锯齿通路。后又分别加入 *p53* 和 *p16* 失活,56% 的 *Vil-Cre Braf^{Δ637E/+} p53^{LSL-R172H/+}* 小鼠在 10 ~ 20 月龄患癌,肿瘤平均数量比 *Vil-Cre Braf^{Δ637E/+}* 小鼠高出 5.2 倍,容易转移到局部淋巴结、胰腺或肺。*Vil-Cre Braf^{Δ637E/+} p16^{Ink4a*}* 同样加速高级别浸润性肿瘤的发生。

3.2 炎症相关动物模型

慢性炎症在几种癌症的发生和恶性进展中起着关键作用,miRNA 可以调节炎症反应的大小,miRNA 中的多态性 miR-146a 与 CRC 的易感性有关^[48]。*miR-146a^{-/-}* 小鼠给予 AOM 和 DSS 诱导的结肠肿瘤数量更多、体积更大,在结肠中向近端延伸得更远^[49]。N-myc 下游调节基因 2 (N-myc downstream-regulated gene 2, *NDRG2*) 是一种新的肿瘤抑制基因,在调节多种类型恶性肿瘤的增殖、分化和转移方面发挥作用,肠上皮细胞特异性敲除的 *Ndr2^{ΔIEC}* 小鼠发展为轻度自发性结肠炎,再给予 DSS 或 AOM 处理,促进炎症细胞浸润,趋化因子和细胞因子表达以及脂多糖通透性,破坏了正常上皮的粘附连接完整性并增加结肠通透性,从而促进结肠炎和结肠炎相关肿瘤进展。趋化因子受体 4 (chemokine (c-x-c motif) receptor 4, *CXCR4*) 属于 G 蛋白偶联受体超家族,也称为 CXCL12,可以促进癌症转移, *CXCR4^{+/-}* 小鼠联合 AOM/DSS 处理通过增加炎症细胞因子、招募免疫抑制细胞、促进上皮间充质转变和 Wnt/ β -catenin 激活来增强 CRC 进展^[50]。

4 讨论与展望

随着精准医学的发展,越来越需要高度转化的实验动物模型辅助医学研究。相比较于化学诱导和肿瘤细胞移植模型,基因工程动物可以更好地模拟肿瘤细胞、基质和免疫系统之间的动态相互作用以及对治疗的反应,更适合基因功能的研究。基于 *Apc* 突变的小鼠在结直肠癌研究中最为常见,但该

类模型以息肉腺瘤为主,并且分布位置主要在小肠而不是结肠,这与大多数 *Apc* 突变的临床患者不同。另外,在 *Braf* 突变基础上叠加其它基因突变构建的小鼠可以发展为侵袭性更高的锯齿状结直肠癌,但是肿瘤形成时间非常长(表 1)。于是推测,如果肿瘤发展的潜伏期更长,允许小鼠获得进一步的突变来驱动肿瘤进展,则小鼠可能会发展出更接近人类 CRC 的肿瘤。

表 1 结直肠癌基因工程小鼠模型
Table 1 Genetically engineered mouse models of colorectal cancer

模型 Model	发病时间 Disease time	特征 Characteristics	生存期 Survival time	参考文献 Reference
<i>Apc</i> ^{Min/+}	15 周 15 weeks	模型成熟,多发性息肉腺瘤,恶性程度不高,主要分布在小肠 The model was mature with multiple polyposis adenoma, which was not highly malignant and mainly distributed in the small intestine	22 周左右 At around 22 weeks	[9]
<i>Apc</i> ^{1638N}	20 周 20 weeks	纯合子胚胎致死,肿瘤少(<10),潜伏期长,并且随着浸润到粘膜下面发展为腺癌 Homozygous embryos of this model are lethal. It have few tumors (<10), a long latency period, and develop adenocarcinoma with submucosal invasion	32 周 32 weeks	[14]
<i>Apc</i> ^{Min/+} <i>p53</i> ^{-/-}	90 d 以内 Within 90 days	致密的结缔组织,局部侵袭,肿瘤侵入潜在的肌肉粘膜 This mice has dense connective tissue, local invasion, tumor invasion into the underlying musculature	122 d	[18]
<i>AhCre</i> <i>Apc</i> ^{fl/+} <i>Pten</i> ^{fl/fl}	诱导后 7 d 7 days after induction	大多数为侵袭性腺癌,由严重发育不良的腺瘤引起,恶性侵犯粘膜下层明显 Most of them are invasive adenocarcinomas caused by severely dysplastic adenomas. Malignant invasion of the submucosa is obvious	99 d	[28]
<i>Apc</i> ^{fl/fl} <i>Pik3ca</i> ^{p110*} <i>Apc</i> ^{fl/fl} <i>Kras</i> ^{G12D/+} <i>Pik3ca</i> ^{p110*}	Cre 诱导后 3 周 3 weeks after Cre induction	80%的肿瘤是浸润性腺癌,其中许多肿瘤延伸到固有肌层之外,累及浆膜,出现少量腹膜后主动脉旁淋巴结和肝转移 80% of tumors in these mice were invasive adenocarcinomas, many of which extended beyond the muscularis propria to involve the serosa. There were few retroperitoneal para-aortic lymph nodes and liver metastases	中位生存期 200 d The median survival time was 200 d	[31]
<i>Apc</i> ^{Min/+} <i>Smad3</i> ^{-/-}	60 d	肿瘤侵袭通过粘膜下并进入局部肌肉 The tumor invades through the submucosa into the local muscle	10 个月 10 months	[34]
<i>Apc</i> ^{+/+1638N} <i>Smad4</i> ^{+/+E65ad}	反式模型最早 3 个月;顺式最早 3 周 Trans model as early as 3 months; Cis model at the earliest 3 weeks	反式模型肿瘤主要为绒毛状或管状绒毛状腺瘤,异型增生和恶性程度更强,主要分布在十二指肠;顺式模型明显贫血和脾肿大、肿瘤数量更多、生存期更短 The trans model tumors were mainly villous or tubular villous adenomas, with more severe dysplasia and malignancy, which mainly distributed in the duodenum. The cis-type model had obvious anemia and splenomegaly with more tumors, and shorter survival	反式模型 7 个月;顺式模型 5 周 The survival time of trans model was 7 months. The survival time in cis model was 5 weeks	[35]
<i>LSL-Kras</i> ^{G12D} <i>Tgfb2</i> ^{IEKO}	22 周以内 Within 22 weeks	大多为腺癌,大约 15%的小鼠在区域淋巴结或肺部中发展出明显转移性病变 Most of them were adenocarcinomas. Approximately 15% of mice develop significant metastatic lesions in regional lymph nodes or lungs	22 周以上 More than 22 weeks	[37]
<i>VillinCre</i> <i>Braf</i> ^{LSL-V637E/+}	10 个月 10 months	锯齿状腺瘤,包括隐窝伸长和锯齿状嗜酸性粒细胞腺瘤上皮 Serrated adenomas are predominant, including crypt elongation and serrated eosinophil adenoma epithelium	2 年 2 years	
<i>Vil-Cre</i> ; <i>Braf</i> ^{A637E/+} <i>p53</i> ^{LSL-R172H/+}	10 ~ 20 个月 10 ~ 20 months	锯齿状肿瘤,25%小鼠的癌症已经转移到局部淋巴结、胰腺或肺 Serrated tumors are predominant. Twenty-five percent of the mice had cancer that had metastasized to the local lymph nodes, pancreas or lung	2 年 2 years	[43]
<i>Vil-Cre</i> <i>Braf</i> ^{LSL-V637E/+} <i>p16</i> ^{Ink4a*}	10 ~ 20 个月 10 ~ 20 months	锯齿状肿瘤,12%的小鼠出现转移性肿瘤 This is a model of a serrated tumor. Metastatic tumors developed in 12% of the mice	2 年 2 years	

续表 1

模型 Model	发病时间 Disease time	特征 Characteristics	生存期 Survival time	参考文献 Reference
<i>Apc</i> ^{Δ716} <i>Kras</i> ^{G12D}		Kras 激活增加了肿瘤的多样性, 息肉数量显著增加, 未发现侵袭性肿瘤 Kras activation increases tumor diversity. The number of polyps increased significantly and no invasive tumor was found	160 d	
<i>Apc</i> ^{Δ716} <i>Kras</i> ^{G12D} <i>Fbxw7</i> ^{-/-}	13 ~ 16 周 13 ~ 16 weeks	发生上皮间质转化, 加速了肿瘤生长 Epithelial-mesenchymal transition occurs and accelerates tumor growth	150 d	[49]
<i>Apc</i> ^{Δ716} <i>Kras</i> ^{G12D} <i>Tgfb2</i> ^{-/-}		表达 αSMA 的肌成纤维细胞数量增加, 淋巴管浸润和肝脏转移的发生率和多样性显著更高 The number of αSMA expressing myofibroblasts increased. The incidence and diversity of lymphatic infiltration and liver metastasis were significantly higher	100 d	

动物疾病模型构建过程中,疾病的发生进展和预防治疗效果需要有可靠的评估技术。结直肠癌基因工程动物模型的肿瘤进展大多数是根据传统经验判断,或是处死动物后,解剖观察肿瘤数量和大小,再进行组织形态学染色以确定病理改变,这种依靠经验决定动物实验时间终点的方法不稳定,无法进行动态监测。小鼠内窥镜成像技术利于观察肠壁黏膜变化,直观地了解肿瘤生长情况,但是操作过程中容易对小鼠产生刺激或创伤,专业技术难度较高。小动物磁共振成像(Magnetic Resonance Imaging, MRI)技术适用于软组织病变的监测,能够无创、实时、动态地进行肿瘤监测和疗效评估,故对于动物模型中结直肠癌进展的评估优选 MRI 技术。

结直肠癌的发生与进展是不良生活习惯、化学物质诱导和基因突变多种因素综合作用的结果,本文主要关注基因突变在结直肠癌中的作用,不同基因突变组合构建出来的小鼠模型在病理形态和侵袭转移能力具有很大差异。尽管研究者们将结直肠癌相关突变基因进行不同组合,或者将基因突变与化学诱导相结合,不断尝试缩短造模时间,提高临床相似性,但由于多基因突变小鼠随着基因突变种类的增加,繁育难度也大幅度升高,从而限制了结直肠癌多基因突变动物模型的发展。综上所述,构建出造模时间统一,肿瘤分布位置与临床患者相似,肿瘤大小与数量均匀,具有侵袭性的结直肠癌模型仍然是转化医学需要探索的难题。

参 考 文 献(References)

[1] Zheng R, Zhang S, Zeng H, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2016 [J]. J National Cancer Center, 2022, 2(1): 1-9.

[2] Schepelmann M, Kupper N, Gushchina V, et al. AOM/DSS induced colitis-associated colorectal cancer in 14-month-old female Balb/C and C57/Bl6 mice-a pilot study [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(9): 5278.

[3] Yu T, Guo F, Yu Y, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes chemoresistance to colorectal cancer by modulating autophagy [J]. Cell, 2017, 170(3): 548-563.

[4] Fang X, Svitkina TM. Adenomatous Polyposis Coli (APC) in cell migration [J]. Eur J Cell Biol, 2022, 101(3): 151228.

[5] Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer [J]. Annu Rev Pathol, 2011, 6: 479-507.

[6] Raner M, Zaleska M, Sakalas S, et al. Reconstitution of the destruction complex defines roles of AXIN polymers and APC in β-catenin capture, phosphorylation, and ubiquitylation [J]. Mol Cell, 2021, 81(16): 3246-3261.

[7] Moser AR, Pitot HC, Dove WF. A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse [J]. Science, 1990, 247(4940): 322-324.

[8] Shibata H, Toyama K, Shioya H, et al. Rapid colorectal adenoma formation initiated by conditional targeting of the Apc gene [J]. Science, 1997, 278(5335): 120-123.

[9] Vu T, Datta A, Banister C, et al. Serine-threonine kinase receptor-associated protein is a critical mediator of APC mutation-induced intestinal tumorigenesis through a feed-forward mechanism [J]. Gastroenterology, 2022, 162(1): 193-208.

[10] Yang J, Wei H, Zhou Y, et al. High-fat diet promotes colorectal tumorigenesis through modulating gut microbiota and metabolites [J]. Gastroenterology, 2022, 162(1): 135-149.e2.

[11] Mieszczanek J, van Tienen LM, Ibrahim AEK, et al. Bcl9 and Pygo synergise downstream of Apc to effect intestinal neoplasia in FAP mouse models [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 724.

[12] Ecker J, Benedetti E, Kindt ASD, et al. The colorectal cancer lipidome: identification of a robust tumor-specific lipid species signature [J]. Gastroenterology, 2021, 161(3): 910-923.e19.

[13] Okumura S, Konishi Y, Narukawa M, et al. Gut bacteria identified in colorectal cancer patients promote tumourigenesis via butyrate secretion [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 5674.

[14] Yun J, Mullarky E, Lu C, et al. Vitamin C selectively kills KRAS and BRAF mutant colorectal cancer cells by targeting GAPDH [J]. Science, 2015, 350(6266): 1391-1396.

[15] Zhu G, Pei L, Xia H, et al. Role of oncogenic KRAS in the prognosis, diagnosis and treatment of colorectal cancer [J]. Mol Cancer, 2021, 20(1): 143.

- [16] Sansom OJ, Meniel V, Wilkins JA, et al. Loss of Apc allows phenotypic manifestation of the transforming properties of an endogenous K-ras oncogene *in vivo* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(38): 14122–14127.
- [17] Janssen KP, Alberici P, Fsihi H, et al. APC and oncogenic KRAS are synergistic in enhancing Wnt signaling in intestinal tumor formation and progression [J]. Gastroenterology, 2006, 131(4): 1096–1109.
- [18] Sakai E, Nakayama M, Oshima H, et al. Combined mutation of *Apc*, *kras*, and *Tgfb2* effectively drives metastasis of intestinal cancer [J]. Cancer Res, 2018, 78(5): 1334–1346.
- [19] Liebl MC, Hofmann TG. The role of p53 signaling in colorectal cancer [J]. Cancers (Basel), 2021, 13(9): 2125.
- [20] López I, P Oliveira L, Tucci P, et al. Different mutation profiles associated to P53 accumulation in colorectal cancer [J]. Gene, 2012, 499(1): 81–87.
- [21] Halberg RB, Katzung DS, Hoff PD, et al. Tumorigenesis in the multiple intestinal neoplasia mouse; redundancy of negative regulators and specificity of modifiers [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(7): 3461–3466.
- [22] Nakayama M, Sakai E, Echizen K, et al. Intestinal cancer progression by mutant p53 through the acquisition of invasiveness associated with complex glandular formation [J]. Oncogene, 2017, 36(42): 5885–5896.
- [23] Sancho R, Jandke A, Davis H, et al. F-box and WD repeat domain-containing 7 regulates intestinal cell lineage commitment and is a haploinsufficient tumor suppressor [J]. Gastroenterology, 2010, 139(3): 929–941.
- [24] Yeh CH, Bellon M, Nicot C. FBXW7: a critical tumor suppressor of human cancers [J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 115.
- [25] Fan J, Bellon M, Ju M, et al. Clinical significance of FBXW7 loss of function in human cancers [J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 87.
- [26] Grim JE, Knoblaugh SE, Guthrie KA, et al. Fbw7 and p53 cooperatively suppress advanced and chromosomally unstable intestinal cancer [J]. Mol Cell Biol, 2012, 32(11): 2160–2167.
- [27] Wang S, Zhang Y, Huang J, et al. TRIM67 activates p53 to suppress colorectal cancer initiation and progression [J]. Cancer Res, 2019, 79(16): 4086–4098.
- [28] Yang J, Nie J, Ma X, et al. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials [J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 26.
- [29] Mosele F, Stefanovska B, Lusque A, et al. Outcome and molecular landscape of patients with PIK3CA-mutated metastatic breast cancer [J]. Ann Oncol, 2020, 31(3): 377–386.
- [30] Jin J, Shi Y, Zhang S, et al. PIK3CA mutation and clinicopathological features of colorectal cancer: a systematic review and Meta-analysis [J]. Acta Oncol, 2020, 59(1): 66–74.
- [31] Howe C, Kim SJ, Mitchell J, et al. Differential expression of tumor-associated genes and altered gut microbiome with decreased *Akkermansia muciniphila* confer a tumor-preventive microenvironment in intestinal epithelial Pten-deficient mice [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018, 1864(12): 3746–3758.
- [32] Davies EJ, Marsh Durban V, Meniel V, et al. PTEN loss and KRAS activation leads to the formation of serrated adenomas and metastatic carcinoma in the mouse intestine [J]. J Pathol, 2014, 233(1): 27–38.
- [33] Leystra AA, Deming DA, Zahm CD, et al. Mice expressing activated PI3K rapidly develop advanced colon cancer [J]. Cancer Res, 2012, 72(12): 2931–2936.
- [34] Hadac JN, Leystra AA, Paul Olson TJ, et al. Colon tumors with the simultaneous induction of driver mutations in APC, KRAS, and PIK3CA still progress through the adenoma-to-carcinoma sequence [J]. Cancer Prev Res (Phila), 2015, 8(10): 952–961.
- [35] Itatani Y, Kawada K, Sakai Y. Transforming growth factor- β signaling pathway in colorectal cancer and its tumor microenvironment [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(23): 5822.
- [36] Takaku K, Wrana JL, Robertson EJ, et al. No effects of Smad2 (*madh2*) null mutation on malignant progression of intestinal polyps in *Apc* (Δ 716) knockout mice [J]. Cancer Res, 2002, 62(16): 4558–4561.
- [37] Sodir NM, Chen X, Park R, et al. Smad3 deficiency promotes tumorigenesis in the distal colon of *ApcMin/+* mice [J]. Cancer Res, 2006, 66(17): 8430–8438.
- [38] Takaku K, Oshima M, Miyoshi H, et al. Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both *Dpc4* (*Smad4*) and *Apc* genes [J]. Cell, 1998, 92(5): 645–656.
- [39] Oshima H, Nakayama M, Han TS, et al. Suppressing TGF β signaling in regenerating epithelia in an inflammatory microenvironment is sufficient to cause invasive intestinal cancer [J]. Cancer Res, 2015, 75(4): 766–776.
- [40] Trobridge P, Knoblaugh S, Washington MK, et al. TGF- β receptor inactivation and mutant *Kras* induce intestinal neoplasms in mice via a β -catenin-independent pathway [J]. Gastroenterology, 2009, 136(5): 1680–1688.
- [41] Muñoz NM, Upton M, Rojas A, et al. Transforming growth factor β receptor type II inactivation induces the malignant transformation of intestinal neoplasms initiated by *Apc* mutation [J]. Cancer Res, 2006, 66(20): 9837–9844.
- [42] Chen J, Domingue JC, Sears CL. Microbiota dysbiosis in select human cancers: evidence of association and causality [J]. Semin Immunol, 2017, 32: 25–34.
- [43] Chen Y, Chen Y, Zhang J, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes metastasis in colorectal cancer by activating autophagy signaling via the upregulation of CARD3 expression [J]. Theranostics, 2020, 10(1): 323–339.
- [44] Wang X, Jia Y, Wen L, et al. *Porphyromonas gingivalis* promotes colorectal carcinoma by activating the hematopoietic *NLRP3* inflammasome [J]. Cancer Res, 2021, 81(10): 2745

-2759.

[45] Hepworth EMW, Hinton SD. Pseudophosphatases as regulators of MAPK signaling [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(22): 12595.

[46] Subbiah V, Baik C, Kirkwood JM. Clinical development of BRAF plus MEK inhibitor combinations [J]. Trends Cancer, 2020, 6(9): 797-810.

[47] Rad R, Cadiñanos J, Rad L, et al. A genetic progression model of Braf(V600E)-induced intestinal tumorigenesis reveals targets for therapeutic intervention [J]. Cancer Cell, 2013, 24(1): 15-29.

[48] Chae YS, Kim JG, Lee SJ, et al. A miR-146a polymorphism

(rs2910164) predicts risk of and survival from colorectal cancer [J]. Anticancer Res, 2013, 33(8): 3233-3239.

[49] Garo LP, Ajay AK, Fujiwara M, et al. microRNA-146a limits tumorigenic inflammation in colorectal cancer [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 2419.

[50] Yu X, Wang D, Wang X, et al. CXCL12/CXCR4 promotes inflammation-driven colorectal cancer progression through activation of RhoA signaling by sponging miR-133a-3p [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 32.

[收稿日期] 2022-08-30

神经元特异性 Isca1 敲除多发性线粒体功能障碍综合征 大鼠模型建立和机制研究

线粒体是真核生物中至关重要的细胞器,当线粒体 DNA 或者由核 DNA 编码的线粒体相关蛋白的基因发生突变,就会导致一系列严重的临床疾病。多发性线粒体功能障碍综合征 (multiple mitochondrial dysfunction Syndrome, MMDS) 是一种在临床上死亡率极高的遗传性线粒体疾病,与线粒体铁硫簇合成缺陷相关,可造成线粒体结构、代谢、功能的损伤。临床症状为神经系统损伤、肌肉张力下降、呼吸功能不全等。MMDS 发病机制复杂且并未被阐明,目前没有有效的治疗方案。Isca1 基因编码蛋白参与线粒体铁硫簇生物合成中铁的募集和传递,该基因的纯合突变是 MMDS5 的致病突变,临床病例发现患者携带 Isca1 突变。

来自中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物资源研究中心基因工程技术课题组的研究人员,通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术建立 Isca1^{fllox/fllox} 与 NeuN-Cre 两种大鼠并进行杂交,繁育得到能在神经元中特异性敲除 Isca1 基因的 Isca1^{fllox/fllox}-NeuN-Cre (CKO) 大鼠。通过 Racine's scale 评价敲除大鼠的癫痫表型。通过步态分析、旷场实验、Y 迷宫实验和食物迷宫实验分析其行为异常和认知记忆障碍。核磁共振成像观察 CKO 大鼠的大小脑结构变化。通过 H&E 染色、尼氏染色、高尔基染色分析神经元结构和病理变化。通过透射电镜 (TEM)、免疫印迹和 ATP 含量检测判断线粒体结构和分子损伤情况。通过小麦胚芽凝集素的免疫荧光法标记神经元胞膜形态,检测神经元死亡情况。

结果显示,Isca1 缺失后导致大鼠发育迟缓,Isca1 缺失后导致大鼠在 4 周龄出现癫痫、痉挛,并随年龄恶化。Isca1 缺失后的大鼠出现运动障碍和记忆受损。MRI 显示小脑严重萎缩,侧脑室扩张明显。大、小脑切片中空泡数量明显增加,核固缩、胞体肿胀;Nissl 体减少,大量神经元丢失;神经元树突棘数量减少;线粒体超微结构异常,空泡化、膜碎裂、嵴断裂等病变。在线粒体中,呼吸链复合物蛋白 NDUFA9、NDUFS3、SDHB 含量降低、ATP 生成减少等症状。

综上,本研究建立了 MMDS5 神经系统症状的大鼠模型,可以较好地模拟临床病例中的痉挛、癫痫、发育迟缓、记忆受损、小脑萎缩等症状。同时,与人 MMDS5 相比,大鼠模型可存活至 8 周龄,有效延长了临床治疗的窗口期,也可用于其他线粒体疾病的神经症状的研究和治疗。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学 (英文)》期刊 (*Animal Model Exp Med.* 2023, 6(2): 156-167, doi: 10.1002/ame2.12318)。