

不同动物大肠癌造模方法的研究进展

谢璐, 张莉莉, 李玲, 徐本亮, 王冰*, 可燕*
(上海中医药大学, 上海 201203)

[摘要] 大肠癌是目前临床上最常见的消化道恶性肿瘤之一,迄今全球的发病率仍在持续上升并趋于年轻化,因此临床上迫切需要提高大肠癌诊断的灵敏性,充分了解大肠癌的病因和发病机制,寻求有效的治疗和预防措施。大肠癌动物模型能有效地模拟大肠癌发生、发展和转归,是研究发病和转移机制的重要方式之一,用于简化实验步骤和探究实验机制。已有大量的研究表明,在不同遗传背景的动物上进行大肠癌的复制,并在人为控制条件下进行各种实验研究,有利于缩短实验周期,观察大肠癌发生、发展和转化的全过程。目前实验中常用4~6周龄的裸鼠、小鼠、大鼠做为模式生物。斑马鱼肿瘤和人类肿瘤在组织学水平上具有高度相似性,随着显微技术的发展,斑马鱼作为模式生物在肿瘤学的研究中逐渐兴起。不同模式生物的生物特性不同,选择的造模方法也存在差异。根据实验目的、实验周期、实验技术等因素,选择合适的模式生物和对应的造模方法是大肠癌实验成功的关键。近年来,有关大肠癌模型的研究成果不断涌现,但多以造模方法为分类依据,缺乏对不同类别的造模动物的探讨。本文结合国内外相关文献,对近10年不同动物大肠癌造模方法的研究进展做一综述,以把握发展动向,为大肠癌进一步的研究发展提供思路与方法。

[关键词] 大肠癌; 动物模型; 发病机制; 造模方法

[中图分类号] R22;R242;R285.5;R273;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)17-0227-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181325

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180412.1534.031.html>

[网络出版时间] 2018-04-13 9:12

Research Progress on Different Animal Models for Colorectal Carcinoma

XIE Lu, ZHANG Li-li, LI Ling, XU Ben-liang, WANG Bing*, KE Yan*
(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] Colorectal carcinoma is currently one of the most common gastrointestinal cancers, so far, the global incidence is still rising and the patients tend to be younger. As a result, it's urgent in clinical practice to improve the sensitivity of colorectal carcinoma diagnosis, fully understand the etiology and pathogenesis of colorectal carcinoma, and seek for effective treatment and preventative measures. Animal models for colorectal carcinoma can validly simulate the occurrence, development and outcome of colorectal carcinoma, which can be used as one of the most important methods to explore pathogenesis and mechanism of metastasis and simplify the experimental steps and explore the mechanism. Many researches have shown that, the replication of colorectal carcinoma in animals with different genetic backgrounds and the various experimental studies under the artificial control condition are conducive to shortening the experimental periods and observing the whole process of colorectal carcinoma; occurrence, development and outcome. At present, nude mice, mice and rats in the age of 4-6 weeks are often used as model animals. Tumors of zebrafish and human have a high degree of similarity at the histological level. With the development of microsurgery, zebrafish is gradually emerging as a model in the study of oncology. As

[收稿日期] 20171026(026)

[基金项目] 上海中医药大学科研预算内项目(2014YSN28);上海中医药大学探索性中医药综合实验课程项目

[第一作者] 谢璐,在读硕士,从事中医药治疗肛肠疾病研究,Tel:021-51322352,E-mail:13162993573@163.com

[通信作者] *王冰,博士,教授,从事中药纳米给药系统研究,Tel:021-51323123,E-mail:annabel_cn@163.com;

*可燕,博士,教授,从事中药资源与质量、中药活性成分筛选研究,Tel:021-51322539,E-mail:keyantcm163.com

different model organisms have various biological characteristics, their modeling methods are also different. According to the experimental objectives, periods and techniques, appropriate model organisms and corresponding modeling methods are the key to the success of colorectal carcinoma experiments. Recently, researches about colorectal carcinoma models are constantly springing up, however, the classification is based on modeling methods in most of researches, lacking the exploration of different types of model animals. On the basis of the combination of literature both at home and abroad, this paper provides a review on the nearest decade research progress of different animal models for colorectal carcinoma, and proposes some references for further studies on colorectal carcinoma.

[Key words] colorectal carcinoma; animal models; mechanism; modeling method

大肠癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一,包括结肠癌和直肠癌,其病死率在所有癌症中位居第 3 位^[1],近年来发病率持续上升并趋于年轻化^[2],严重威胁人类的生命健康。为了在动物体内探究大肠癌发病机制、验证新的治疗方案以及检验新的化学预防策略,建立具有客观性、重复性较好的动物实验模型尤为重要^[3]。近年来,关于大肠癌造模的文献不断涌现。邹瑜等^[4]分类讨论了现阶段实验最常用的 5 类大肠癌造模方法包括原位种植法、皮下移植法、转移瘤建立法、化学诱导法、转基因法,并提出了给药途径、操作方法等影响造模成功的因素。郭蒙等^[5]从致癌剂、给药途径、实验动物及作用机制 4 个因素着重探讨大肠癌化学造模方法,提出该方法有利于研究大肠癌化学预防的措施。随着遗传工程的兴起和推广,转基因动物模型有利于深入大肠癌的机制研究。江海丽等^[6]简述了现阶段常用的转基因技术,并综合介绍了涉及肿瘤组织中腺瘤样息肉蛋白(APC)基因、细胞分裂周期(CDC)基因等多种转基因动物及应用范围。临床上,大肠癌最主要的死亡原因是肿瘤复发或转移,最常见的转移途径为血道和淋巴转移^[7]。1980 年代后广大研究学者开始依据大肠癌转移途径建立大肠癌转移动物模型。丁忆远等^[8]重点讨论通过血道和淋巴道转移的大肠癌动物模型建立方法,提出转移瘤模型有利于评估人大肠癌的各种特征。臧怡雯等^[9]分别论述了实验性转移模型和自发性转移模型的造模方法及优缺点,提出两种方法的选择取决于实验的研究目的。

当前,大肠癌模型的论述多以造模方法分类,缺乏系统地不同类别的动物大肠癌模型的讨论。致癌的实际效果具有种数特异性和器官特异性,因此根据研究内容不同,选择合适的模式生物和造模方法也存在差异。目前大肠癌的实验研究中,多选用 4~6 周龄的裸鼠、小鼠和大鼠做为模式生物。斑马鱼和人类在基因上有高度同源性^[10],因此近年来逐渐兴起对斑马鱼的癌症模型研究。根据实验目的、实

验周期、实验技术等影响因素,选择合适的模式生物及对应的造模方法是大肠癌实验成功的关键。本文总结了近 10 年来国内外临床实验中大肠癌常用的模式生物及造模方法,为临床候选药物药效筛选及机制研究提供实验设计思路及方法。

1 裸鼠

裸鼠是目前大肠癌实验研究中最常用的动物种类,其繁殖能力强,易于动态观察肿瘤的生长过程,多选用 BALB/c-nu 裸鼠。裸鼠对肿瘤生长的免疫反应较弱,致癌方法简单,肿瘤成功率高,因此应用最为普遍^[11]。但裸鼠皮肤较为松弛,细胞悬液流动性较大,易形成畸形肿瘤,且存在免疫缺陷,饲养要求较高。现阶段大肠癌实验,裸鼠多建立皮下移植瘤、原位移植瘤和转移瘤模型。

1.1 皮下移植瘤模型 皮下移植瘤模型是将手术活检标本、癌性胸水或腹水标本、体外培养的癌细胞系注入鼠类皮下而成,多应用于裸鼠和小鼠。其优点是操作简单,成瘤率高,缺点是在化疗药物个体化反应的研究中存在缺陷^[4]。裸鼠相比小鼠,皮肤组织更为松弛,因此一般 30 d 左右才可明显观察到肿瘤的生长,且肿瘤形态较为不规则,不利于瘤体体积测量和计算,影响结果的统计和分析^[12]。叶晔等^[13]实验发现将人结肠癌 LoVo 细胞悬液接种于裸鼠左侧腋下后,肿瘤生长不规则且速度缓慢。为了缩短造模周期,减少肿瘤畸形率,实验中可把大肠癌细胞重悬于基质胶中,降低细胞悬液的流动性。张胜行等^[12]用基质胶与大肠癌 SW480 细胞的混合悬液接种裸鼠,得到形状规则且具有典型癌变特征的肿瘤组织。赵永江等^[14]用 Matrigel 基质胶和细胞悬液 1:1 混合接种以减少细胞倒流,4 周可在裸鼠皮下触及肿块。因此,在建立裸鼠皮下移植瘤模型时,考虑其皮肤松弛、结肠浆膜层与肌层之间空间小等生物特性,需要尽可能减少细胞流动性,从而降低肿瘤畸形率。

1.2 原位移植瘤模型 原位移植瘤模型是通过外

科手术将肿瘤组织移植在裸鼠的相应部位,从而在裸鼠体内产生类似于肿瘤的生物特性^[4]。其优势包括肿瘤成功率高,肿瘤的病理、生理特性类似于人类大肠癌等。造模方法主要有包埋法和粘贴法,包埋法即把新鲜瘤块包埋缝合在大肠浆膜层下,粘贴法是用医用生物胶将瘤块粘贴在浆膜层上。朱琰等^[15]比较了包埋法和粘贴法形成的瘤体。实验可得,两组肿瘤外形没有明显差异,但包埋组的瘤质量明显高于粘贴组,且包埋组所有小鼠发生肿瘤转移,转移率高于粘贴组。王杰等^[16]取传代稳定的第 3 代裸鼠瘤块进行浆膜包埋,第 10 天在腹部触及肿瘤。陶丽等^[17]同样选择包埋法,术后 7 周裸鼠出现恶病质、血便,较符合人类晚期大肠癌的特征。从上述实验分析可得,包埋法建立的大肠癌模型成功率高,易转移,但对手术和操作人员要求高,耗时长,动物死亡率高。粘贴法操作较包埋法简单易行,对操作人员要求低,但是大肠癌成功率低,瘤质量较差,多用于胃癌,少见于大肠癌^[15]。

1.3 转移瘤模型 转移瘤模型是大肠癌细胞在动物体内发生血行、淋巴转移至肝、肺、腹腔等部位形成肿瘤,移植部位和方法直接影响癌细胞转移表现,裸鼠和小鼠是研究大肠癌转移的优势模式生物。大肠癌在发生发展的过程中极易发生转移,肝脏是大肠癌常见的转移部位,肝转移是大肠癌患者主要的死亡原因^[18],此外还有为肺转移、腹腔转移、肾转移等。裸鼠多用于研究肝转移,建立裸鼠大肠癌肝转移模型的方法有门静脉注射法、经脾注射法、盲肠原位种植法、肝脏注射法等(表 1),且需要选择有高转

移潜能的细胞株,如 CT26, HCT-116 等。

当前实验研究中,多选用经门静脉注射瘤细胞形成实验性肝转移模型或经脾包膜下注射脾内移植性肝转移模型。虽然两者较不符合临床大肠癌转移、生长的规律,并不是研究大肠癌转移机制的最佳选择,但两者操作简单,肝转移率高且发展较快^[19],因此在大肠癌肝转移研究中广泛应用。袁岱岳等^[20]比较了经脾注射法和肝脏注射法 2 种方法的肝转移模型差异,发现两组均有肝脏成瘤,且 100% 腹腔种植转移。肝脏注射组集中在注射部位形成单一巨大瘤块,而脾脏注射组肝脏表面及切面可见大小不等的灰黄色转移灶,比较可得经脾注射组更符合大肠癌体内血行转移的过程。Hasegawa 等^[21]将荧光蛋白转染 HCT-116 细胞从脾极注入,28 d 后通过荧光显微系统在脾、肝、腹腔发现荧光物质,即形成肝转移伴有腹腔转移模型。目前,盲直肠原位种植法是最符合临床体内大肠癌肝转移过程的造模方法。郑阳春等^[22]比较了直肠黏膜下瘤细胞注射、盲肠浆膜下瘤细胞注射和盲肠浆膜下包埋种植 3 种方法形成的肝转移模型,实验可得盲肠浆膜下包埋成瘤效果最稳定且肝转移率较高,操作简单,成瘤率高,与人类大肠癌生长环境、生长方式相近。而瘤细胞直接注射于浆膜下,注射要求高,成瘤率低但更符合人类大肠癌的转归。盲直肠原位移植模型转移率低于实验性转移模型,易造成肠梗阻、腹水、恶病质等,死亡率高^[23],但更符合临床大肠癌的发展,因此两者的选择取决于实验目的和研究内容。

表 1 裸鼠大肠癌肝转移瘤模型建立方法

Table 1 Methods to establish liver metastatic colorectal carcinoma models of nude mice

造模方式	具体造模方法	造模周期/周
脾脏注射	裸鼠乙醚麻醉,从脾下极进针约 1.0 cm,缓慢注射 Lovo 大肠癌细胞悬液(5×10^6 个/mL)0.3 mL,脾包膜迅速鼓起,变白。注射结束,待脾脏颜色转红,快速拔针,迅速用碘伏棉球压迫针眼至少 5 min,纳脾脏回腹腔,关腹	3~4
肝脏注射	裸鼠乙醚麻醉,从肝脏下极进针约 1.0 cm,缓慢注射 Lovo 大肠癌细胞悬液(5×10^6 个/mL)0.3 mL,拔针后迅速用碘伏棉球压迫针眼至少 5 min,全层关腹	3~4
直肠黏膜下瘤细胞注射	裸鼠腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,顺着肛门将直肠粘膜外翻。距肛缘 1~2 cm 处,在肛门直肠交界处上方直肠粘膜下缓慢注入 HCT-116 瘤细胞悬液 0.1 mL(2×10^7 个/mL),观察 1 min 后用棉签按摩肛门,使外翻的直肠黏膜回纳	4~10
盲肠浆膜下瘤细胞注射	裸鼠腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,开腹将盲肠拉出体外,在盲肠壁浆膜下缓慢注入 HCT-116 瘤细胞悬液 0.1 mL(2×10^7 个/mL),见盲肠浆膜肿胀,拔出针尖,用棉球于近处压迫注射部位,全层缝合腹壁	4~10
盲肠浆膜下瘤块包埋种植	裸鼠腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,开腹将盲肠拉出体外,将备用的瘤块置于盲肠浆膜刮破处,包埋缝合,全层缝合关腹。术前瘤块准备,裸鼠胸背部左、右侧皮下分别注射 HCT-116 大肠癌细胞悬液 0.2 mL,0.3 mL(2×10^7 个/mL),长出直径 1 cm 左右的实体瘤后处死,将瘤块剪成直径 2 mm 备用	4~10

2 小鼠

小鼠作为模式生物在癌症研究中已有100多年的历史,具有个体差异小,生产性能好,繁殖周期短,易于群养等多种优势,大量的遗传变异可作为研究人类癌症的借鉴^[24]。大肠癌研究多选用BALB/c小鼠,造模方法多选用皮下移植法、转移瘤建立法。近20多年来遗传工程小鼠相继培养成功,且发现几乎所有人类基因都可在小鼠找到同源基因^[25],因此通过杂交建立小鼠转基因癌症易感模型也逐渐成为研究热点。

2.1 皮下移植瘤模型 小鼠皮下移植瘤模型建立操作简单且易成瘤,可建立大肠癌单一或者复合模型。单一模型多把大肠癌细胞悬液接种于小鼠腋下皮肤。阮善明等^[26]用CT-26大肠癌细胞接种于小鼠右侧腋下皮肤,造模7d即成瘤。邹俊波等^[27]取人大肠癌HCT-116细胞悬液注入小鼠右腋下皮肤,次日就可接受化疗药物灌胃或者腹腔注射治疗。复合模型的建立是在其他模型的基础上再建立大肠癌模型。刘虹等^[28]用10%的四氧嘧啶注射液建立糖尿病模型后,再用CT26细胞悬液注射于小鼠左侧颈背部皮下建立大肠癌模型,第3周皮下注射部位可见明显肿块,呈浸润性生长。李妍等^[29]首次以尾静脉注射,20h后从腹腔注射脂多糖(LPS)2周建立热毒血瘀模型,第15天于小鼠右侧腋下接种Colon-26大肠癌细胞建立热毒血瘀大肠癌复合模型。实验过程中,可根据小鼠的体质量、实验需要瘤体的大小以及模型的单一或者复合,调整细胞接种的浓度、体积和时间。

2.2 转移瘤模型 小鼠是研究肺转移、肝转移的优势模式生物之一。肺脏是大肠癌血行转移高发器官,仅次于肝脏,常提示预后较差。大肠癌肺转移模型的建立多选用尾静脉注射,形成大肠癌后,再形成人工血行实验性转移模型^[30],皮下和原位移植模型自发转移率低。王炼等^[31]用CT26细胞悬液从尾静脉注射接种,解剖后发现模型小鼠肺转移肿瘤较多,肺湿重较重。邓珊等^[32]同样选择CT26细胞悬液从尾静脉注射,2~3周后模型小鼠肺组织表面可见明显转移灶,且生成较多转移灶血管。大肠癌发生肺转移的概率要小于肝转移,可能与大肠癌的血流回流主要是通过肝脏进入体循环有关,因此肝转移更为常见,肺转移则少见^[33]。小鼠大肠癌肝转移模型的建立以脾注射瘤细胞为多,该法模拟了大肠癌血行转移至肝脏的途径和过程,且造模成功率较高。肿瘤细胞经脾注射后根据是否保留脾脏分为保脾和

切脾两种方法,各有优劣。杨扬等^[34]比较了经脾注射保脾法和切脾法的肝转移模型。从实验结果来看,切脾小鼠平均生存期长于保脾小鼠,且肝脏各叶完全被肿瘤占据,能获得较多的肿瘤组织。保脾小鼠多为散在癌结节多死于脾内肿瘤。因此,切脾肝转移模型更适用于实验需要,可以满足多个时间点以及多组织的取材。

2.3 转基因模型 大肠癌相关的转基因动物模型有30多种,在改造物种和动物性质上具有发展潜力。以转基因技术建立的动物模型具有繁殖成性、更接近人体大肠癌自然发展过程等优势,因此成为了研究大肠癌病理、生理的理想动物模型^[35]。但是现阶段转基因技术还不够成熟,实验中存在着很高的致死率和基因沉默^[36]。目前转基因小鼠模型的建立多使用显微注射法、体细胞克隆法、胚胎干细胞介入等方法^[6],主要集中在APC, Cdc, 结直肠癌缺失/deleted in colon cancer (DCC)基因、紧密连接蛋白-7(Claudin-7)基因等几个涉及大肠癌发生、发展的基因^[37]。冯聚玲等^[38]通过杂交得到Cdc20^{loxP/+} APC^{min/+} villin-cre^{+/-}基因突变小鼠和APC^{min/+}基因突变小鼠,发现APC^{min/+}模型小鼠Cdc20基因突变促进了结肠癌的发生和发展,并加快了肿瘤恶变。另有研究表明人体大肠癌组织中Claudin-7表达明显降低,因此Claudin-7基因缺失小鼠模型可用于研究大肠癌前病变^[39]。李腾雁等^[40]用Cre-Loxp系统通过子代交配得到Claudin-7在肠道可诱导性条件性基因敲除小鼠。在他莫昔芬药物诱导后,小鼠肠道上皮细胞Claudin-7基因表达缺失,初步形成了肠道炎症模型。模型小鼠出现了肠道炎症和肠上皮细胞不典型增生,模拟了人类溃疡性结肠炎疾病模型,随着病程的延长,癌变风险增加。转基因动物模型在大肠癌研究中取得了一定的进展,其中APC^{min/+}小鼠最为常见。其他一系列与大肠癌相关基因有关的动物模型也不断地被用于研究和发展,利用基因工程建立小鼠肿瘤模型是当今肿瘤研究的新趋势,为实验研究开拓了新道路。

3 大鼠

与小鼠相比,大鼠生长环境要求低,饲养简单。大肠癌研究以SD大鼠和Wistar大鼠为主,两种大鼠对传染病的抵抗力高,且自发性肿瘤的发生率较低。大鼠多使用1,2-二甲基肼(DMH)和氧化偶氮甲烷(AOM)化学诱导造模。为缩短实验周期,稳定大肠癌肿瘤情况,可配合葡聚糖硫酸钠(DSS)使用,以肠道炎症加速诱发大肠癌模型的建立(表2)。癌症流行病学相关研

究证实,化学致癌剂是癌症的主要诱因之一^[41],因此大肠癌化学造模方法逐渐成为业内的热点。

表 2 大鼠大肠癌化学诱导模型建立方法

Table 2 Methods to establish chemistry-induced colorectal carcinoma models of rats

造模方式	具体造模方法	造模周期/周
DMH 化学法	DMH 溶解于 0.9% NaCl 溶液配制质量浓度至 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 大鼠给予 DMH 溶液 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射, 每周 1 次, 连续 20 周	20
	DMH 溶解于 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 并用 NaOH 调整 pH 6.5, 大鼠给予 DMH $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射, 连续 15 周	15
AOM 化学法	AOM 溶解于 0.9% NaCl 溶液配制质量浓度至 $1.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。大鼠饲养至第 5 周, 给予 AOM $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射, 每周 1 次, 连续 2 周	2
DMH 联合 DSS 化学法	大鼠第 1 周给予 DMH $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔皮下注射, 隔天 1 次, 共 3 次; 第 2 周给予含 1% DSS 水自由饮用; 第 3 周自由饮用自来水和摄食普通饮料	3
	DMH 溶解于 0.9% NaCl 溶液并用 NaHCO_3 调整 pH 至 6.5。大鼠饮用 1% DSS 1 周后, 第 2 周给予 DMH $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射, 每周 1 次, 连续 8 周	8
AOM 联合 DSS 化学法	大鼠饮用 2% DSS 1 周后, 给予 AOM $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射, 每周 1 次, 连续 2 周	2

3.1 DMH/AOM 化学法诱发大肠癌模型 在化学诱导动物模型中, 多用 DMH 或 AOM 做为诱导剂, 这两种化学试剂具有便宜、有效、方便的特点。DMH 本身不致癌, 必须经过氧化脱烷基才具有致癌作用。AOM 是 DMH 在肝脏的代谢产物, 通过 DNA 烷基化产生, 相比 DMH 致癌效果增强且更稳定^[42]。王先坤等^[43]对 Wistar 大鼠腹腔注射 DMH 连续 20 周, 模型组大鼠大肠黏膜出现不同程度的迂曲、褶皱, 有息肉样肿瘤。Venkatachalam 等^[44]用 DMH 皮下注射 15 周, 实验发现模型组大鼠生成大量异常隐窝灶 (ACF), 肿瘤生长速度较快且表现出肿瘤多样性。孙红亚等^[45]用 AOM 腹腔注射, 第 34 周 SD 大鼠大肠组织结构发生变化, 出现大量大肠黏膜 ACF, 证实动物模型构建成功。实验证明, DMH 和 AOM 两种化学致癌物质都可诱发大肠肿瘤, 在组织学表现上类似于人类散发性结肠癌。

3.2 DMH/AOM 联合 DSS 化学法诱导炎症性肠病模型 DMH/DSS 模型或者 AOM/DSS 模型是在 DMH 或 AOM 诱发突变的基础上, 使造模大鼠持续暴露在外源性化学致炎剂 DSS 中, 通过大鼠炎症性肠病发展导致大肠癌^[45-46]。DSS 可引起大鼠免疫功能异常, 多个循环的用药后可诱发急性肠炎转变为慢性肠炎, 有一定癌变的概率。DSS 在促癌过程中, 呈剂量依赖性, 当 DSS > 1%, 才能促进肿瘤形成, 但浓度过高会引起严重的肠道应激反应^[47]。吴柯等^[48]对 Wistar 大鼠腹腔注射 DMH, 并饮用含 1% DSS 的水, 第 6 周部分大鼠出现肛周溃疡伴有稀便

和便血, 病理切片可见严重的不典型增生。金晟剑等^[49]给大鼠饮用 1% DSS 后皮下注射 DMH, 解剖后发现大肠瘤块以腺瘤为主, 出现了少量腺癌。由于 AOM 比 DMH 更稳定, 因此 AOM/DSS 模型是目前使用最广泛的大肠癌化学诱导模型。钟海平等^[50]研究发现饮用 2% DSS 配合腹腔注射 AOM 的大鼠肿瘤发生率比单用 AOM 的大鼠高。DMH 或者 AOM 联合 DSS 化学法诱导大肠癌模型重现了人类结直肠癌隐窝病灶-腺瘤-腺癌的发展顺序^[51], 诱导大鼠溃疡性结肠炎相关性结直肠癌的发生, 具有较好的模拟性。

4 斑马鱼

斑马鱼是一种器官、系统发育完善的实验模式生物^[52], 具有饲养条件简单、突变种多、胚胎透明、遗传学工具成熟等优点。作为连接非脊椎动物 (小模式生物体) 和哺乳动物 (大模式生物体) 的“纽带”, 其独特的生物学、基因学、遗传学优势使其成为研究人类疾病相关病理、生理学和活体内筛选药物的最佳模式生物之一^[53], 近年来已成为研究人类遗传疾病、肿瘤机制的热点。Paquette 等^[54]通过 10 年多实验研究发现, 斑马鱼自发性大肠癌的概率非常低, 且雌雄成癌率相似。因此, 为了促进斑马鱼大肠癌研究, 实验室通过转基因、瘤细胞移植、化学诱变等造模方法加速构建斑马鱼肿瘤模型^[55]。斑马鱼肝内转移形成较快且稳定, 可通过荧光显微系统观察大肠癌肝转移情况。Marques 等^[56]将荧光染色标记的大肠癌细胞悬液移植入斑马鱼 2 dpf 胚胎卵黄囊后, 荧光显微系统观察到移植瘤细胞在 24 h 内

发生了侵袭及肝转移。崔戈等^[57]用重组质粒的方法构建骨形成蛋白和激活素跨膜抑制剂基因(BAMBI)过表达结肠癌细胞株 SW620 组和空载体红色荧光蛋白基因转染结肠癌细胞株 SW620 组,分别显微注射到受精后 2 dpf 转基因斑马鱼 Tg(Apo14: GFP)胚胎卵黄囊中。通过荧光系统观察后分析发现,BAMBI 基因可促进斑马鱼的结肠癌细胞发生肝转移。Shelton 等^[58]实验发现 Cyp26A1 在 APC^{mcr}基因突变斑马鱼中高表达,引起下游基因表达抑制和维果酸调节失常,从而诱发大肠癌的发生和发展。因此,BAMBI,APC 等多个大肠癌相关基因位点是建立斑马鱼转基因大肠癌模型的有效突破口。斑马鱼体积小,受精卵发育迅速,具有强大的再生能力,模型可大批量复制,每组可平行 200 条以上,为理想的模式生物^[59]。斑马鱼大肠癌模型的建立可选用显微注射以及荧光显微系统观察和测量,因此相较其他动物原位或者异位移植更简便、更直观。

5 展望

大肠癌的发病率逐年升高,临床上迫切需要缓解大肠癌症状、提高大肠癌临床疗效的治疗和用药方案。根据当前的实验研究,在不同遗传背景的动物上复制大肠癌模型,有利于研究大肠癌的发生、发展、转归以及生理、病理、组织学特征。裸鼠对肿瘤生长的免疫反应低,成瘤率高,但皮肤组织松弛,细胞悬液流动性大,易形成畸形肿瘤,适用皮下移植法、原位种植法和转移瘤建立法。小鼠个体差异小,易于群养,适用皮下移植法和转移瘤建立法。随着遗传工程技术的成熟,小鼠因含有大量与人类同源的基因,可用于建立转基因模型,但存在较高致死率和基因沉默。大鼠饲养简单,个体较大,适用化学诱导法,但造模周期较长。裸鼠、小鼠和大鼠作为脊柱模式生物虽然应用广泛,但繁育较慢,化学诱导、基因敲除、转基因构建都易导致鼠类的死亡,限制了鼠类模式生物的应用。虽然斑马鱼具有肿瘤发生率较低、肿瘤生成延迟等缺点^[60],但作为新兴模式生物和高效的“生物反应器”,其体积小、遗传工具成熟、可大批量平行复制、受精卵发育迅速等独特的生物学优势符合当下大肠癌实验研究的要求。不同的模式生物和造模方法各有优缺点,结合实验的特点选择合适的动物和方法是大肠癌实验成功的关键。期待通过不断地探索,发展新技术,减少各种方法的劣势,建立更好的大肠癌模型,以更好地指导大肠癌分子机制和生理、病理、组织学研究。

[参考文献]

- [1] Schreuders E H, Ruco A, Rabeneck L, et al. Colorectal cancer screening: a global overview of existing programmes [J]. Gut, 2015, 64 (10): 1637-1649.
- [2] SUN D, YU F, MA Y, et al. MicroRNA-31 activates the RAS pathway and functions as an oncogenic microRNA in human colorectal cancer by repressing RAS p21 GTPase activating protein 1 (RASA1) [J]. J Biol Chem, 2013, 288(13):9508-18.
- [3] Heyer J, YANG K, Lipkin M, et al. Mouse models for colorectal cancer [J]. Am J Cancer Res, 2013, 3(3): 240-50.
- [4] 邹瑜,殷佩浩. 大肠癌动物模型的研究状况 [J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32(14): 1337-1340.
- [5] 郭蒙,叶华,朱宇珍,等. 结肠癌化学造模方法研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(2): 303-306.
- [6] 江海丽,刘宣,李琦. 转基因大肠癌动物模型应用的研究进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2015, 23(10): 1603-1608.
- [7] 顾晋. 下消化道肿瘤学 [J]. 北京:北京大学医学出版社, 2004: 2-7.
- [8] 丁忆远,杨玉琴,鲁立文. 大肠癌转移动物模型研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2014, 22(4): 921-924.
- [9] 臧怡雯,陈宗祐. 构建大肠癌转移动物模型的研究进展 [J]. 医学综述, 2012, 18(16): 2587-2590.
- [10] 刘晨,陈斌,徐又佳. 斑马鱼疾病模型 [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2014, 7(3): 277-280.
- [11] 李卓. 三种建立裸小鼠人乳腺癌细胞移植模型方法的比较 [J]. 中国医药导刊, 2011, 13(6): 1040-1041.
- [12] 张胜行,张诗兰,兰小鹏. 人结肠癌 SW480 细胞裸小鼠皮下移植瘤模型的建立 [J]. 东南国防医药, 2012, 14(2): 108-110.
- [13] 叶晔,阮善明,沈敏鹤,等. 中医补益法优化干预结肠癌辅助治疗阶段的实验研究 [J]. 世界中医药, 2011, 6(5): 440-443.
- [14] 赵永江,朱淼鑫,袁立新,等. 人结肠癌原位移植瘤裸小鼠模型的活体成像观察 [J]. 实验动物与比较医学, 2016, 36(3): 174-179.
- [15] 朱琰,刘静,史勤,等. 人大肠癌 HT-29 原位移植瘤裸小鼠模型建立方法的比较 [J]. 中国药房, 2013, 24(37): 3463-3465.
- [16] 王杰,奉典旭,陈超,等. 蟾毒灵对裸鼠结肠癌原位移植瘤凋亡基因 Caspase-3 表达的影响 [J]. 外科理论与实践, 2013, 18(1): 58-63.

- [17] 陶丽, 顾缨, 吴斌, 等. 复方胃肠安对人大肠癌裸鼠原位移植瘤生长和肝转移的影响[J]. 上海中医药杂志, 2013, 47(4): 79-84.
- [18] Lintoiu-Ursut B, Tulin A, Constantinoiu S. Recurrence after hepatic resection in colorectal cancer liver metastasis-review article [J]. J Med Life, 2015, 8 (Spec Issue): 12-14.
- [19] 周鑫, 张铃福, 谢海艇, 等. 不同途径裸小鼠大肠癌肝转移模型的比较[J]. 中华普外科手术学杂志: 电子版, 2016, 10(2): 140-144.
- [20] 袁岱岳, 郭忠英, 赵任, 等. 人结肠癌裸鼠肝转移模型的建立[J]. 肿瘤防治研究, 2011, 38(1): 28-30.
- [21] Hasegawa K, Suetsugu A, Nakamura M, et al. Imaging nuclear-cytoplasmic dynamics in primary and metastatic colon cancer in nude mice[J]. Anticancer Res, 2016, 36(5): 2113-2117.
- [22] 郑阳春, 陈廷清, 张文彬, 等. 大肠癌裸小鼠原位移植肝转移模型的建立与比较[J]. 肿瘤预防与治疗, 2011, 24(3): 137-140.
- [23] Siegel R, MA J, ZOU Z, et al. Cancer statistics, 2014 [J]. Ca Cancer J Clin, 2014, 64(1): 9-29.
- [24] 王硕, 苏杭, 袁经权, 等. 实验小鼠在癌症研究中的应用及其进展[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(9): 63-67.
- [25] 林兆宇, 高翔. 小鼠的遗传学研究[J]. 生命科学, 2006, 18(5): 437-441.
- [26] 阮善明, 缪昊均, 严卿莹, 等. 解毒三根汤调节肿瘤相关成纤维细胞 Sirt1-NF- κ B 途径抗结肠癌侵袭转移[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(9): 3082-3086.
- [27] 邹俊波, 熊永爱. 康复新液与顺铂、伊立替康联用对大肠癌 HCT116 荷瘤小鼠肿瘤生长和造血系统的影响[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2016, 18(5): 854-862.
- [28] 刘虹, 龚志军, 卿笃桔, 等. 糖尿病对直结肠癌小鼠生存的影响[J]. 系统医学, 2016, 1(2): 56-59.
- [29] 李妍, 钱丽燕, 唐朋林, 等. 热毒血瘀证结肠癌荷瘤小鼠模型的建立及清热解毒活血化瘀法对其的影响[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(3): 1336-1339.
- [30] 郭青戈, 郭勇. 复方藤梨根制剂抑制小鼠结肠癌人工转移实验研究[J]. 浙江中西医结合杂志, 2014, 24(10): 858-861, 945.
- [31] 王炼, 杨莉, 吴扬, 等. 重组人内皮抑素腺病毒联合顺铂对小鼠结肠癌肺转移治疗作用研究[J]. 四川大学学报: 医学版, 2011, 42(5): 616-620.
- [32] 邓珊, 安红梅, 胡兵. 藤龙补中汤对大肠癌肺转移及肿瘤相关巨噬细胞作用[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2016, 24(7): 515-519.
- [33] 金秉巍, 徐子平. 老年患者结肠癌发生部位与肺转移关系探讨[J]. 实用临床医药杂志, 2011, 15(7): 120-122.
- [34] 杨扬, 李乃卿. 小鼠结肠癌肝转移模型的构建[J]. 中国医药指南, 2010, 8(17): 53-54.
- [35] 邹移海, 张永斌, 连至诚. 实验性大肠癌动物模型研究述评[C]//首届中国中医药实验动物科技交流会议论文集, 广州, 2002: 251-254.
- [36] 林红英, 殷润婷, 奚涛, 等. 在肿瘤研究中转基因小鼠模型的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(1): 4-8.
- [37] 杨红军, 丁彦青. 转基因动物在大肠癌研究中的应用[J]. 医学综述, 2001, 7(12): 736-737.
- [38] 冯聚玲, 赵磊, 陈雯, 等. Cdc20 基因突变促进 APC^{min/+} 小鼠结肠癌的发展[J]. 肿瘤研究与临床, 2016, 28(3): 150-153.
- [39] 丁磊, 高宏, 陈奕至, 等. Claudin-7 基因敲除诱导小鼠肠道炎症及其致癌机制的研究[J]. 中华普通外科杂志, 2013, 28(2): 120-124.
- [40] 李腾雁, 王晓楠, 李文晶, 等. Claudin-7 可诱导性条件性基因敲除小鼠模型的构建和鉴定[J]. 世界华人消化杂志, 2015, 23(31): 5017-5023.
- [41] 杨扬, 李乃卿, 李兰芳, 等. 两种小鼠结肠癌肝转移造模方法的比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(4): 53-55.
- [42] Neufert C, Becker C, Neurath M F. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression[J]. Nat Protoc, 2007, 2(8): 1998-2004.
- [43] 王先坤, 王雪, 黄建. 大蒜素对大鼠实验性大肠癌的作用及其机制研究[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(6): 943-948, 985.
- [44] Venkatachalam K, Gunasekaran S, Namasivayam N. Biochemical and molecular mechanisms underlying the chemopreventive efficacy of rosmarinic acid in a rat colon cancer[J]. Eur J Pharmacol, 2016, 791: 37-50.
- [45] 孙红亚, 唐军民, 唐岩, 等. 硒对 AOM 所致结肠癌模型大鼠肾上腺皮质束状带细胞组织化学的影响[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2009, 18(1): 84-88.
- [46] 何真, 柯嘉, 何小文, 等. 炎症反应促进小鼠炎性肠病癌变的研究[J]. 中华胃肠外科杂志, 2014, 17(7): 706-710.
- [47] Suzuki R, Kohno H, Sugie S, et al. Dose-dependent promoting effect of dextran sodium sulfate on mouse colon carcinogenesis initiated with azoxymethane [J]. Histo Histopathol, 2005, 20(2): 483-492.
- [48] 吴柯, 杨俊霞, 周岐新. 小檗碱对实验性大鼠结肠癌的防治作用与环氧化酶 2 关系的研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(20): 2768-2773.

- [49] 金晟剑, 左晓旭, 李皓, 等. 乳铁蛋白在 DMH-DSS 诱导大鼠大肠癌中的抑制作用[J]. 华夏医学, 2016, 29(3):18-21.
- [50] 钟海平, 郑红斌. 溃疡性结肠炎相关性结直肠癌大鼠模型的制作[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2011, 18(21):1669-1671.
- [51] 高玉艳, 赵琦, 鹿晓麟, 等. 大肠炎促进大肠癌发生发展的实验研究[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2017, 51(2):118-122.
- [52] 彭蕴茹, 韦英杰, 丁永芳, 等. 基于斑马鱼模型的药物毒性研究进展与中药毒性研究新策略[J]. 中草药, 2017, 48(1): 17-30.
- [53] Shin J T, Fishman M C. From Zebrafish to human: modular medical models. [J]. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2002, 3(3):311-340.
- [54] Paquette C E, Kent M L, Buchner C, et al. A retrospective study of the prevalence and classification of intestinal neoplasia in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Zebrafish, 2013, 10(2):228-236.
- [55] 刘敬弢, 佟侃, 崔景荣. 斑马鱼在肿瘤药理学研究中的应用[J]. 中国药学杂志, 2010, 45(23): 1800-1804.
- [56] Marques I J, Weiss F U, Vlecken D H, et al. Metastatic behaviour of primary human tumours in a zebrafish xenotransplantation model [J]. BMC Cancer, 2009, 9(1): 128.
- [57] 崔戈, 谢珊珊, 张婷, 等. BAMBI 基因过表达人结肠癌细胞移植斑马鱼致肝转移模型的构建[J]. 中华临床医师杂志:电子版, 2015, 9(21):3939-3945.
- [58] Shelton D N, Sandoval I T, Eisinger A, et al. Up-regulation of CYP26A1 in adenomatous polyposis coli-deficient vertebrates via a WNT-dependent mechanism: implications for intestinal cell differentiation and colon tumor development [J]. Cancer Res, 2006, 66(15): 7571-7577.
- [59] 王新娟. 斑马鱼作为肝癌模型的应用进展[J]. 临床肝胆病杂志, 2016, 32(7): 1425-1428.
- [60] 赵广宁, 韩瑞发. 斑马鱼微肿瘤模型的建立及其在抗血管生成研究中的应用[J]. 肿瘤, 2013, 33(3): 289-293, 298.

[责任编辑 张丰丰]