

转基因小鼠胃癌模型的研究进展

谢华夏 程向东 徐志远

摘要 在研究建立胃癌小鼠模型的初期,研究者利用幽门螺杆菌(Hp)感染、化学致癌等方式诱导近郊品系小鼠胃发生癌变。然而,该系小鼠胃癌模型产生的肿瘤多为鳞状细胞胃癌,不同于人常见的胃腺癌。近年来,基因工程技术的快速发展促进了转基因小鼠胃癌模型的出现。转基因小鼠胃癌模型是直接调控胃癌发生的相关基因转染到小鼠胚胎中而形成肿瘤的一种新技术,其形成肿瘤的形态特征与人肿瘤的自然发生极为相似,且发生于特定组织,特异性较高。因此,转基因动物在胃癌形成、发展机制,尤其是信号通路研究中具有独特的优势,对研究基因突变而引起的遗传疾病发病机制十分有效,是一种极为理想的胃癌模型。

关键词 胃癌 小鼠模型 转基因 INS - GAS 小鼠

[中图分类号] R735 [文献标识码] A

胃癌的发生率在全世界癌症发生率中排名第4位,其病死率在所有肿瘤中排名第2位,在我国的发生率也非常高,总的5年生存率不到25%^[1]。构建一个可靠的权威的胃癌动物模型对于研究胃癌的发病机制,预防和治疗方法具有至关重要的意义。在初期的实验方法都集中在通过化学致癌物质(如MNU、MNNG等),幽门螺杆菌(Hp)感染等方式来诱导胃癌在小鼠前胃发生鳞状细胞癌,并不是人体常见的腺癌,造成这一现象的原因是由于人与小鼠解剖结构的差异^[2]。近年来,基因工程技术的快速发展为新的胃癌小鼠模型的开发提供了基础技术支持,使得各种转基因小鼠模型不断涌现。本研究对目前常见的几种转基因小鼠模型做一综述。

一、胰岛素 - 胃泌素小鼠

胰岛素 - 胃泌素(INS - GAS)转基因小鼠起初只是用于研究胃泌素对胰岛细胞形成的作用。INS - GAS转基因序列由人胃泌素编码序列的胰岛素启动子上游组成,转基因后引起转基因小鼠的胰腺 β 细胞中酰胺化胃泌素(主要为G - 17)出现过度表达,导致血清中酰胺化胃泌素比正常表达水平高2倍。月龄较小的INS - GAS小鼠出现了最大胃酸分泌量和胃壁细胞总量的增加,不过后期又出现了胃壁细胞的减少(胃萎缩),高胃泌素血症加重,以及胃黏膜上皮细胞增生。随着时间的推移,INS - GAS小鼠(FVB

为其遗传背景)表现出向胃黏膜肠上皮化生和异型增生发展,小鼠20个月龄时发展为胃体侵袭性肿瘤^[3]。INS - GAS小鼠在感染幽门螺杆菌(Hp)后会加快黏膜内癌的发生(12个月龄内),并伴随着向胃黏膜下和血管内的转移^[4]。

Hp对于INS - GAS小鼠是一个高效的致癌物,多项研究实验已证实人属Hp感染INS - GAS小鼠会加速胃癌的发生。近年来,INS - GAS小鼠这一模型已被广泛运用与多个领域,特别是检验多种重要基因的表达,以及拮抗剂或抑制剂,细菌因素或者共生生物,性别或性激素,凋亡因素在致胃癌中的作用等^[3,5-9]。

二、TFF1 基因敲除小鼠

TFF包括乳腺癌相关肽(the breast cancer - associated peptide, pS2/TFF1),解痉多肽(spasmolytic polypeptide, SP/TFF2)和肠三叶因子(intestinal trefoil factor, ITF/TFF3)。TFF1主要表达于胃小凹表面黏液细胞或胃小凹胃壁细胞中,人和小鼠的TFF1蛋白(原名pS2)都属于三叶草形多肽家族,TFF1异常表达于胃肠疾病和多种肿瘤中。为了进一步了解TFF1的功能,Lefebvre等^[10]通过同源重组构建TFF1^{-/-}小鼠(F2 129/Svj杂交遗传背景)的方法干扰小鼠的TFF1基因的表达,其中30%的TFF1表达缺陷小鼠表现出胃上皮细胞增生并伴随明显的胃小凹处病变,和上皮内多发的大病灶甚至浸润癌。最近一项通过利用TFF1转基因小鼠模型的研究发现TFF1沉默会导致调节NF - κ B转录因子的NF - κ B激活,引起胃癌形成过程中NF - κ B调节的炎症加强^[11]。

TFF2表达于远端胃深层腺上皮细胞和十二指肠

基金项目:浙江省中医药重点研究计划(2012ZZ002)

作者单位:310022 杭州,浙江中医药大学(谢华夏、徐志远);浙江中医药大学附属第一医院胃肠外科(程向东)

通讯作者:程向东,电子信箱:chengxd516@126.com

腺的 Brunners 腺泡细胞, TFF2 缺陷的转基因小鼠胃黏膜在诱导后仅表现出轻微的增生, 但是 Hp 感染 TFF2 缺陷的小鼠后会出现比野生型 (WT) 小鼠更为严重的胃萎缩性癌前病变损伤、化生、异型增生^[12]。这些结论说明 TFF2 对胃癌前病变的进展以及接下来胃肿瘤的进展起着负性调节的作用。

三、Gp130 突变小鼠

Gp130 是细胞因子 IL-6 和 IL-11 的一个普通共同受体, Gp130 突变小鼠 (Gp130^{F/F} 小鼠) 即为 Gp130 受体突变的小鼠 (通过去除了与 Gp130 衔接的 SHP2-Ras-ERK 信号通路), Gp130^{F/F} 小鼠在 3 个月内即可发展为胃腺癌^[13]。Gp130 受体的突变还会使得 TFF1 基因的下调, Gp130^{F/F} 表型的小鼠在很多方面模拟了 TFF1^{-/-} 小鼠。在胃中 Gp130 信号通路的主要细胞因子传递者是 IL-11, 还包括胃窦部的 IL-6, 也有微弱的活性效应^[14]。IL-11 不仅能够促进胃慢性炎症, 还通过过度激活 STAT3 和 STAT1 与肿瘤的发生联系在一起^[15]。

四、H/K-ATPase-IL-1 β 转基因小鼠

白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 是第 1 个被发现的白细胞介素, 最初发现其主要功能是作为内生性致热源参与炎症反应。近年来的研究表明, IL-1 β 与肿瘤转移的关系也很密切。在 IL-1 β 结构的多样性引起了其信号通路的多样性, 这种多样性会增加患多种肿瘤的风险, 特别是胃癌^[16]。Tu 等^[17] 通过利用鼠 H/K-ATPase 的启动子直接使小鼠特异性的表达出具有人体内同样结构活性的 IL-1 β , 这种小鼠即为 H/K-ATPase-IL-1 β 转基因小鼠。H/K-ATPase-IL-1 β 转基因小鼠 (C57BL/6 为其遗传背景) 表现出自发性的胃炎, 慢性进展的胃萎缩 (时间超过 1.5 年)、化生, 直至进展为胃癌。另外, 这些在感染 Hp 后有强烈的协同效应, 并迅速进展为胃癌 (时间在 1 年内)。因此, H/K-ATPase-IL-1 β 转基因小鼠证实了在患者的 IL-1 β 的表达提高会提高患胃癌的风险, 而且能够协同 Hp 的感染效应促使肿瘤的形成。

IL-1 β 转基因小鼠进展为胃癌的分子机制早已被提出。在一项研究中发现, IL-1 β 转基因小鼠的确表现出了骨髓来源的抑制细胞 (MDSCs) 的聚集现象^[18]。最近的一个研究中发现部分细胞中通过抑制胃酸分泌和细胞内钙离子的释放能抑制 Shh (Sonic Hedgehog) 基因的表达, 并伴随胃萎缩^[19]。H/K-ATPase-IL-1 β 小鼠模型的出现, 对研究基质细胞、肿瘤相关纤维母细胞 (CAFs) 和炎症细胞在形成肿瘤

的微环境中的重要地位具有重要意义。Quante 等^[20] 报道称, 至少 20% 的 CAFs 来源于骨髓 (BM) 的间充质干细胞 (MSCs), 来源于 CAFs 的 MSCs 被召集到异型增生的胃表达 IL-6, Wnt5a 和 BMP4, 并表现出 DNA 的低甲基化, 这对于肿瘤生长有促进作用。而且, CAFs 在依赖基质细胞衍生因子的过程中涉及到一个壁龛的形成, 这个壁龛用来促进肿瘤的形成过程^[21]。因此, IL-1 β 转基因小鼠模型结合其他的转基因小鼠的研究, 应该有助于进一步阐明肿瘤早期启动机制及胃黏膜上皮与基质各组成成分之间的相互作用机制。

五、K-ras 转基因小鼠

K-ras 在多种人体肿瘤中最普通的变异原癌基因之一。过去, 研究者为了进一步分析小鼠中致肿瘤基因 K-ras 在胃癌进展中的功能, 常将定向表达于胃颈/峡部的 K19 启动子用来介导调节 K-ras-V12 变异基因的表达。K19-K-ras-V12 转基因小鼠 (F2 mixed C57BL/6 $\times$ DBA 为遗传背景) 出现了早期的趋化因子 (如 CXCL1) 的上调和源于骨髓的炎症细胞及成纤维细胞的聚集, 伴随壁细胞的逐渐丢失, 化生和异性增生。在某种意义上, K19-K-ras-V12 转基因小鼠与 H. felis (猫属 Hp) 诱导的致胃癌作用和胃肿瘤的形成的机制是非常相似的^[22]。因此, 这些研究表明具有 K-ras 依赖效应的慢性炎症可引起骨髓源细胞的聚集 (形成了基质微环境), 进而启动了致胃癌效应。

在一项研究中, 研究者在 K19 阳性的成熟小鼠中通过基因敲入 K19-CreERT, 形成 LoxP-STOP-LoxP-KrasG12D 小鼠, 从而引入一个条件性的 K-ras G12D 变异, 这些小鼠的表现出胃中多发异性增生、化生、腺癌, 而这些表现同样出现在口腔、结肠、肺^[23]。另一组研究为了判断 K-ras 激活后效应的广泛性和系统性, 将 UBC9-CreERT 转基因小鼠与 LoxP-STOP-LoxP-KrasG12D 小鼠进行了杂交, 得到的小鼠体内激活的 K-ras 广泛存在, 并表现出前胃和胃腺的重度炎症、化生、异型增生、祖细胞激活现象^[24]。这些后面的结果表明在所有组织中, K-ras 是处于激活状态的, 而 K-ras 的变异使胃更易发生感染或者炎症反应, 这说明 K-ras 在胃的癌前改变中可能起着关键性的作用。

六、胃癌的其他转基因小鼠模型

下面将会讨论已被报告的其他转基因小鼠模型, 它们包括对 TGF- β /Smad 通路, RUNX3、p53 和

CDH1 进行的基因改变。在胃癌中,TGF-β/Smad 信号通路普遍出现改变,敲出 TGF-β1 的小鼠(混有 C57BL/6/Sv/129 的遗传背景)的胃出现严重的上皮异型增生和化生^[25]。然而,最近有研究指出通过细胞因子的诱导使 T 细胞特异性的删除 Smad4,这不仅会诱导胃癌的发生、结肠肿瘤、十二指肠肿瘤、口腔肿瘤也会出现^[26]。RUNX3 是 RUNX 基因家族的成员之一,RUNX3 调节 Smad 基因家族的转录和 TGF-β 信号通路。RUNX3 基因敲出的小鼠(第 2 子代)表现出胃黏膜中胃腺细胞增多,且细胞的增生力增强^[27]。Ito 等^[28]最近报道称 RUNX3 基因敲除小鼠(Balb/c 为其遗传背景)表现出主细胞的缺失和 SPEM 型化生出现,也显示出对 MNU 诱导腺癌更高的敏感度。

最近 Shimada 等^[29]通过 H/K-ATPase 启动子研究出针对性的 CDH1 和 p53 双基因敲出小鼠。在这些双基因敲出的小鼠中,浸润性和由印戒细胞组成的侵袭性肿瘤出现在小鼠 6~9 个月龄时,而仅仅只敲出 CDH1 的小鼠没有进展为肿瘤。这些现象支持了

CDH1 在上皮弥漫性胃癌中起着至关重要的作用的观点,但是小鼠进展为胃癌不仅仅需要 CDH1 的缺失,还需要其他突变或者致癌因子的作用。

七、展 望

在研究肿瘤发生的分子机制、病理机制及肿瘤浸润、转移以及抗癌药物筛选的过程中,选择和建立一个稳定成熟的胃癌小鼠模型至关重要。研究人员可以根据自己研究的需要,从不同特点的模型中选择出适合自己实验的模型(表 1)。

转基因胃癌模型是直接调控胃癌的相关基因转染到动物胚胎中而形成肿瘤,其形成肿瘤的形态特征与人类肿瘤的自然发生极为相似,且发生于特定组织,特异性高,因此转基因动物在胃癌形成、发展机制尤其是信号通路研究中具有独特的优势。然而,转基因动物模型也有其缺点,即制作成本较高,技术难度较大,在许多的实验室仍难以普及。但随着现代分子生物学的不断发展,转基因模型因其独特的优势使其必将成为未来研究胃癌的主要动物模型。

表 1 主要胃癌转基因动物模型对比

模型	致瘤率(%)	诱发时间	肿瘤发生部位	表型
INS-GAS	75	20 个月	胃体	腺癌,化生,异型增生,增加 Hp 的致瘤率,胃萎缩 ^[3]
TFF1 ^{-/-}	30	5 个月	胃窦	黏膜内癌,异型增生,NF-κB 被激活 ^[10,11]
Gp130 ^{F/F}	100	6 个月	胃窦	腺癌,TFF1 表达降低 ^[13]
IL-1β	<70	12 个月	交界处	腺癌,化生,异型增生,增加 Hp 的致瘤率,胃萎缩 ^[17]
K-ras	37.5	16 个月	胃体	异型增生,化生,萎缩 ^[22]
Smad ^{-/-}	100	12~18 个月	胃窦	腺癌 ^[26]
RUNX3 ^{-/-} +MNU	71	52 周	胃体,胃窦	腺癌,化生,异型增生 ^[30]
p53/CDH1	100	12 个月	胃体	低分化腺癌,印戒细胞癌 ^[31]

参考文献

1

Jemal A,Bray F,Center MM,*et al.* Global cancer statistics[J]. Cancer J Clinic. 2011,61 (2):69-90

2

Binato M,Kruel Schmidt M, Silveira Volkweis B,*et al.* Mouse model of diethylnitrosamine-induced gastric cancer[J]. J Surgical Research,2008,148 (2):152-157

3

Lee CW,Rickman B,Rogers AB,*et al.* Combination of sulindac and antimicrobial eradication of Helicobacter pylori prevents progression of gastric cancer in hypergastrinemic INS-GAS mice[J]. Cancer Res, 2009,69:8166-8174

4

Fox JG,Wang TC,Rogers AB,*et al.* Host and microbial constituents influence Helicobacter pylori-induced cancer in a murine model of hypergastrinemia[J]. Gastroenterology,2003,124:1879-1890

5

Steele IA,Dimaline R,Pritchard DM,*et al.* Helicobacter and gastrin stimulate Reg1 expression in gastric epithelial cells through distinct promoter elements[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,2007, 293:G347-G354

6

Yin Y,Grabowska AM,Clarke PA,*et al.* Helicobacter pylori potenti-

ates epithelial:mesenchymal transition in gastric cancer: Links to soluble HB-EGF gastrin and matrix metalloproteinase-7[J]. Gut, 2010,59:1037-1045

7

Okabe S,Kodama Y,Cao H,*et al.* Topical application of acetic acid in cytoresduction of gastric cancer. A technical report using mouse model[J]. Gastroenterol Hepatol,2012,27:40-48

8

Fox JG,Rogers AB,Ihrig M,*et al.* Helicobacter pylori-associated gastric cancer in INS-GAS mice is gender specific[J]. Cancer Res, 2003,63:942-950

9

Cui G,Takaishi S,Ai W,*et al.* Gastrin-induced apoptosis contributes to carcinogenesis in the stomach[J]. Lab Invest,2006,86:1037-1051

10

Lefebvre O,Chenard MP,Masson R,*et al.* Gastric mucosa abnormalities and tumorigenesis in mice lacking the pS2 trefoil protein[J]. Science,1996,274:259-262

11

Soutto M,Belkhiri A,Piazuelo MB,*et al.* Loss of TFF1 is associated with activation of NF-κB-mediated inflammation and gastric neoplasia in mice and humans[J]. J Clin Invest,2011,121:1753-1767

- 12 Fox JG, Rogers AB, Whary MT, *et al.* Accelerated progression of gastritis to dysplasia in the pyloric antrum of TFF2^{-/-} C57BL6 × Sv129 helicobacter pylori – infected mice [J]. *Am. J. Pathol*, 2007, 171: 1520 – 1528
- 13 Tebbutt NC, Giraud AS, Inglese M, *et al.* Reciprocal regulation of gastrointestinal homeostasis by SHP2 and STAT – mediated trefoil gene activation in gp130 mutant mice [J]. *Nat. Med*, 2002, 8: 1089 – 1097
- 14 Judd LM, Ulaganathan M, Howlett M, *et al.* Cytokine signalling by gp130 regulates gastric mucosal healing after ulceration and indirectly antral tumour progression [J]. *Pathol*, 2009, 217: 552 – 562
- 15 Ernst M, Najdovska M, Grail D, *et al.* STAT3 and STAT1 mediate IL – 11 – dependent and inflammation – associated gastric tumorigenesis in gp130 receptor mutant mice [J]. *Clin Invest*, 2008, 118: 1727 – 1738
- 16 El – Omar EM, Carrington M, Chow WH, *et al.* The role of interleukin – 1 polymorphisms in the pathogenesis of gastric cancer [J]. *Nature* 2001, 412: 99
- 17 Tu S, Bhagat G, Cui G, *et al.* Overexpression of interleukin – 1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid – derived suppressor cells in mice [J]. *Cancer Cell*, 2008, 14: 408 – 419
- 18 Song X, Krelin Y, Dvorkin T, *et al.* CD11b + /Gr – 1 + immature myeloid cells mediate suppression of T cells in mice bearing tumors of IL – 1beta – secreting cells [J]. *Immunol*, 2005, 175: 8200 – 8208
- 19 Waghay M, Zavros Y, Saqui – Salces M, *et al.* Interleukin – 1beta promotes gastric atrophy through suppression of Sonic Hedgehog [J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(2): 562 – 72, 572. e1 – 2
- 20 Quante M, Tu SP, Tomita H, *et al.* Bone marrow – derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth [J]. *Cancer Cell*, 2011, 19: 257 – 272
- 21 Shibata W, Ariyama H, Westphalen CB, *et al.* Stromal cell – derived factor – 1 overexpression induces gastric dysplasia through expansion of stromal myofibroblasts and epithelial progenitors [J]. *Gut*, 2012, 62: 192 – 200
- 22 Okumura T, Ericksen RE, Takaishi S, *et al.* K – ras mutation targeted to gastric tissue progenitor cells results in chronic inflammation an altered microenvironment and progression to intraepithelial neoplasia [J]. *Cancer Res*, 2010, 70: 8435 – 8445
- 23 Ray KC, Bell KM, Yan J, *et al.* Epithelial tissues have varying degrees of susceptibility to Kras(G12D) – initiated tumorigenesis in a mouse model [J]. *PLoS One*, 2011, 6(2): e16786
- 24 Matkar SS, Durham A, Brice A, *et al.* Systemic activation of K – ras rapidly induces gastric hyperplasia and metaplasia in mice [J]. *Cancer Res*, 2011, 1: 432 – 445
- 25 Wu MS, Lee CW, Shun CT, *et al.* Distinct clinicopathologic and genetic profiles in sporadic gastric cancer with different mutator phenotypes [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2000, 27: 403 – 411
- 26 Hahn JN, Falck VG, Jirik FR. Smad4 deficiency in T cells leads to the Th17 – associated development of premalignant gastroduodenal lesions in mice [J]. *Clin Invest*, 2011, 121: 4030 – 4042
- 27 Li QL, Ito K, Sakakura C, *et al.* Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer [J]. *Cell*, 2002, 109: 113 – 124
- 28 Ito K, Liu Q, Salto – Tellez M, *et al.* RUNX3 a novel tumor suppressor is frequently inactivated in gastric cancer by protein mislocalization [J]. *Cancer Res*, 2005, 65: 7743 – 7750
- 29 Shimada S, Mimata A, Sekine M, *et al.* Synergistic tumour suppressor activity of E – cadherin and p53 in a conditional mouse model for metastatic diffuse – type gastric cancer [J]. *Gut*, 2012, 61: 344 – 353
- 30 Ito K, Chuang L S, Ito T, *et al.* Loss of Runx3 is a key event in inducing precancerous state of the stomach [J]. *Gastroenterology*, 2011, 140: 1536 – 1546. e8
- 31 Shimada S, Mimata A, Sekine M, *et al.* Synergistic tumour suppressor activity of E – cadherin and p53 in a conditional mouse model for metastatic diffuse – type gastric cancer [J]. *Gut*, 2012, 61: 344 – 353

(收稿日期: 2014 – 04 – 15)

(修回日期: 2014 – 04 – 22)

恶性间皮瘤的分子生物学研究进展

姚银丽 徐伟珍 毛伟敏

[中图分类号] R393

[文献标识码] A

恶性间皮瘤(malignant mesothelioma, MM)是一种高侵袭性的肿瘤,预后极差。石棉暴露是目前认为

与间皮瘤发生、发展较为密切的致病因素。由于 20 世纪 50 ~ 70 年代石棉材料的广泛应用,我国间皮瘤的发生率有上升趋势,为(0.1 ~ 0.6)/10 万,由于我国的人口基数庞大,总的发病人数多于其他国家。目前治疗恶性间皮瘤的疗效不佳,大部分患者发现时已无手术机会。肿瘤的快速进展以及目前尚无明确有

作者单位:310053 杭州,浙江中医药大学(姚银丽);310022 杭州,浙江省肿瘤医院、浙江省胸部肿瘤(肺、食管)诊治技术研究重点实验室(毛伟敏、徐伟珍)

通讯作者:毛伟敏,电子信箱:MaoWM@163.com