

# 结肠癌局部免疫模式动物研究进展

孙 伟 童仕伦 郑勇斌 秦凯迪 肖 旷 宋 丹

**摘 要** 结肠癌的癌组织局部免疫状态参与结肠癌的发生、发展以及转移关系密切,但缺乏合适的动物模型制约了结肠癌局部免疫的研究。因此,构建一个能模拟人体结肠癌散发性癌灶的,其肿瘤的发生、发展和转移过程可全程无损伤活体检测的,并方便反复取材的,能同时满足结肠癌原发灶与转移灶局部免疫状态监测的模型将促进结肠癌局部免疫研究进展。所构建的模型不仅可用于结肠癌局部免疫研究,同时可以在结肠癌发生、发展的研究过程中具有重要意义。本研究将对结肠癌局部免疫模式动物研究进展做一综述。

**关键词** 结直肠癌 干细胞 动物模型 免疫

**中图分类号** R73

**文献标识码** A

**DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.09.003

结肠癌(CRC)已成为全世界男性仅次于肺癌、前列腺癌,女性仅次于乳腺癌的高致死率的肿瘤<sup>[1]</sup>。结肠癌发生、发展涉及遗传,环境以及饮食等多种因素<sup>[2]</sup>。尽管其发病机制仍不清楚,近年来研究表明结直肠癌的发病与机体免疫机制关系密切。为明确发病机制,越来越多的研究者将研究重点放在局部免疫与肿瘤的关系上,但对CRC癌组织的局部免疫研究资料多来源于手术切除标本,多为中晚期的肿瘤,早期肿瘤很少见,因而收集资料多不系统,并且收集临床样本受到医学伦理学限制,同时临床样本不易反复取材,一定程度上限制该研究。因此建立一种可靠的结直肠癌模型不仅是研究疾病发病机制的重要途径,同时还可为本病研究及治疗提供良好的动物模型,并且可以为如何早期发现组织的腺瘤-腺癌-癌的发展规律提供现实理论依据。

## 一、结肠癌与免疫

肿瘤的发生、发展、转移是个缓慢的过程,免疫系统能及时识别和清除新出现体内细胞突变,防止肿瘤形成。肿瘤细胞通过某些机制逃避机体免疫系统对其的监视及杀伤,从而导致肿瘤的发生、发展、转移与复发,在肿瘤发展的过程中,局部免疫的作用不可忽视<sup>[3,4]</sup>。大量的临床资料显示结肠癌的发生、发展、转移及复发过程中与机体的免疫系统存在适应性改变。癌组织的局部免疫参与肿瘤进展过程中与机体免疫系统之间的相互作用,如免疫监视、免疫逃逸和

免疫抑制等,其局部免疫状态与结肠癌的发生、发展、转移和预后关系密切<sup>[5~8]</sup>。

在肿瘤发生、发展过程中,免疫反应是非常复杂的病理生理过程,涉及到先天性和获得性免疫系统与肿瘤发生、发展间的相互作用,由于年龄、性别、体重、遗传背景、肿瘤分期等差异,即使病情相同的患者,患者免疫功能不同。转移是结肠癌患者死亡和根治性手术失败的主要原因。癌细胞的转移需要逃脱免疫监视,避免被免疫细胞杀伤达新定植点,并在定植点通过与局部免疫系统非常复杂的相互作用,才能最终形成转移灶<sup>[9,10]</sup>。癌组织局部免疫功能不仅参与转移,而且直接控制转移灶的生长<sup>[11]</sup>。发生癌细胞转移时机体的免疫功能发生适应性改变,如乳腺癌在癌细胞到达肺部的转移灶之前,能预降低待转移器官的局部免疫保护功能,为即将到来的肿瘤细胞提供一个适宜的环境<sup>[12]</sup>。在部分肿瘤中还发现原发灶与转移灶局部浸润的免疫细胞并不相同<sup>[13]</sup>。临床观察也提示结肠癌患者癌组织局部浸润的淋巴细胞对癌细胞的免疫逃逸和转移的影响不可忽略<sup>[14]</sup>。这些现象均提示原发灶与转移灶局部的免疫状态对结肠癌的转移可能存在影响。但到目前为止,罕见报道。笔者认为一个主要的原因同样要归结于缺乏合适的动物模型来完成相关研究。尽管较多临床分析与报道关于局部结肠癌免疫功能变化,但研究结肠癌转移灶与原发灶的局部免疫状态动物实验却很少,其主要原因是缺少合适的动物模型,特别早期就能及时观察到癌变,并方便对癌灶与癌周进行取材。

## 二、结肠癌局部免疫模式动物优缺点

经过多年的发展,结肠癌动物模型取得了很大的

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81372553)

作者单位:430060 武汉大学人民医院

通讯作者:童仕伦,主任医师,教授,电子邮箱:tongshilun@163.

com

进步,当前小鼠模型可分为3类:致癌剂诱变模型,癌细胞原位或异位移植模型及基因工程学模型。致癌剂诱变模型癌变发生率低,其癌发生的部位不可预测、成瘤周期长,癌变时间不确定,且致癌剂诱导的不良反应多,部分致癌剂影响动物的免疫功能,因此这样的模型无法研究结肠癌组织的局部免疫功能。癌细胞原位或异位移植模型多为免疫功能缺陷小鼠,无法进行多数免疫学研究。

而使用同基因系小鼠移植则能克服上述缺点,由于同基因系移植模型中受体鼠的免疫功能正常且兼具有肿瘤移植模型的部分优点,所以这类模型目前是最适合进行癌组织局部免疫研究,但对于模型进行免疫学研究甚少,如 Grimm 等通过剖腹术将 CT26. WT 小鼠结肠癌细胞系经门静脉注入 BALB/c 小鼠,形成肝转移灶,然后分析转移灶癌组织中的 T 细胞分类和癌细胞的 FasL 等的表达,来研究结肠癌肝转移中的免疫逃逸现象<sup>[15]</sup>。但这类移植模型存在一些固有的缺陷。首先,通过手术的方式将肿瘤组织和癌细胞移植到受体小鼠,在分析受体小鼠免疫功能变化的时候无法排除和区分移植手术过程对机体免疫功能的影响;其次,从移植的癌细胞到肿瘤形成的过程中机体的免疫变化是否能模拟结肠上皮癌变到肿瘤形成过程中的免疫变化,到目前为止没有任何相关研究与证实;最后,该模型由于手术植入肿瘤,而取材同样也需要手术过程或处死动物,不利于反复取材等缺陷,限制了该类模型在免疫学研究中的应用。

基因工程学模型(GEM)是近来发展非常迅速的一类模型,但该模型常合并大量对小鼠免疫功能影响非常大的小肠肿瘤和淋巴细胞肿瘤,形成散发 CRC 比例非常低,肿瘤的形成部位与时间不确定,大多数小鼠 4~5 月龄时死于贫血或恶病质<sup>[16]</sup>,因此该模型很少应用于 CRC 的免疫学研究。GEM 模型突破性的进展来自于为克服该系列模型小鼠生命周期短的问题,而改进形成的条件性失活小鼠模型,如携带 APC<sup>loxP</sup> 等位基因的模型。Hung 等在其基础上通过外科手术的方式,控制 APC<sup>loxP</sup> 等位基因仅仅在远端结肠上皮内特异性被敲除,形成与临床类似的散发性结肠癌<sup>[17]</sup>。但是,Hung 等建立的模型中突变的细胞缺乏特异性标记,肿瘤发生、发展的进程不便观察,无法明确癌变时间,无法在癌变早期对癌或癌周取材,因而不能了解癌变早期的局部免疫状态,限制该模型应用于癌变早期事件的研究,如肿瘤发生时的免疫监视和免疫逃逸等。另外,该模型建立过程中需要手术操

作,腺瘤被确定为腺癌多为处死动物获取最终标本时等缺陷也限制了其在免疫学研究中的应用。

### 三、模式动物肠内肿瘤形成机制和检测

鼠结肠上皮为一单层细胞,结肠细胞大约每 3~5 天更新一次,这种更新由结肠隐窝基底部的多功能干细胞维持<sup>[18]</sup>。肠道结肠隐窝干细胞的增殖分化与肠道上皮细胞凋亡维持动态平衡,当干细胞突变后,其自我更新、克隆、增殖分化速度将超过了正常肠上皮组织细胞灭活的速度,将导致腺瘤形成<sup>[19]</sup>。敲除 Apc 基因的小鼠,结肠干细胞增生活跃,腺瘤高发且呈癌变倾向<sup>[20]</sup>。突变 Kras 基因的小鼠易致肿瘤发生,而活化突变干细胞的 Kras 基因将导致被突变干细胞的病理变化沿腺瘤-腺癌的轴向发展<sup>[21,22]</sup>。联合敲除 Apc 基因和突变 Kras 基因,将促进肿瘤形成,并利于自发性转移<sup>[17]</sup>。利用干细胞更新的特征,Snippert 等<sup>[23]</sup>和 Lopez-Garcia 等<sup>[24]</sup>二个相互独立的研究组设计了一种巧妙的方法,通过条件性激活干细胞内的颜色标记来示踪单个干细胞,研究单个干细胞的分化、转归,了解干细胞命运变迁过程。参照 Snippert 等<sup>[23]</sup>和 Lopez-Garcia 等<sup>[24]</sup>对单个干细胞标记的方法,因此我们可以对单个干细胞进行突变(通过非手术的方式,联合敲除其 Apc 基因和突变其 Kras 基因,体内选择性的突变 1~2 处结肠隐窝功能干细胞),并且在突变的同时对该细胞进行标记,以便观察突变干细胞增生、癌变和转移等事件,将可以构建一个与人结肠癌类似的散发性癌灶且带有特异性标记的、适合癌组织局部免疫研究的结肠癌模型。

### 四、模式动物成瘤部位选择和肿瘤形成梗阻的解决方法

结肠癌形成需很长周期,而在此期间随着原发肿瘤的生长很容易导致肠梗阻,而引起动物死亡。很多研究者将成瘤部位转移至延缓肠梗阻形成的直肠,但此种情况下很难形成自发性转移。直接将癌细胞悬液通过尾静脉、门静脉和脾注射来形成不同器官内转移与机体内正常的自发性转移区别明显,无法体现转移的特征。将结肠癌的癌细胞移植到盲肠来观察和研究转移,同样不适合结肠癌的局部免疫研究。因为该模型受体鼠多为免疫缺陷鼠并需要手术操作,且临床上盲肠部肿瘤与结肠癌的病理学类型、生物学特征区别明显,以小鼠的盲肠肿瘤模拟结肠癌缺乏足够的依据。更重要的是该模型的应用与设计本身就证明和利用了盲肠部位的肿瘤与结肠癌的病理变化不同,对机体的影响不同和转归不同的特征,盲肠部位肿瘤

一般不影响肠内容物通过,且小鼠的生命和实验周期更长。国内的研究者构建了结肠造口近端腹壁排便,远端移植肿瘤模拟结肠癌的模式,但该模型的受体鼠为免疫缺陷鼠,且造口为非正常生理状态,改变了远端肠道的正常生理功能,这样肿瘤局部的微环境同样有别于正常肠管,考虑到肿瘤微环境在肿瘤生长与转移中的作用,因此该模型也不宜应用于结肠癌的局部免疫研究,特别是涉及癌转移的局部免疫研究<sup>[25]</sup>。尽管原发于结肠的结肠癌的自发性转移模型为最接近临床患者的动物模型,但肠梗阻限制了此类模型的应用。因此缓解这类模型中原发肿瘤生长引起的肠梗阻将能延长实验小鼠生命和研究周期,增加自发性转移率,为研究转移灶的局部免疫提供更多机会。临床上缓解结肠癌的肠梗阻方法包括手术切除、放疗及化疗、结肠支架的置入等,而小鼠则很少进行类似尝试。近年来,小鼠结肠镜是对于肠内肿瘤观察具有很大应用价值的一种工具,研究者可直接看见结肠的病变和进行镜下操作。小鼠结肠镜为解决结肠癌肠梗阻问题提供一种方案,也可暂时置入类似于临床肠梗阻的结肠支架,可以在狭窄肠管处起到支撑作用,为结肠癌提供一种临时或永久治疗。结肠支架可使部分结肠肠癌伴梗阻局部状态恢复或恢复到无梗阻状态,对生长较快的肿瘤可考虑在结肠镜镜下切除肿瘤组织,该种治疗方案既可以治疗肠梗阻同时可反复取材。

## 五、展 望

总之,可以通过非手术方式构建一个适合结肠癌原发灶与转移灶局部免疫研究的模型,该模型具备以下特点:①特异性标记并显示突变的结肠隐窝功能干细胞,能无损性活体观察所突变细胞的发生、发展与癌变的过程;②形成模拟人体结肠癌的散发性癌灶,且病理变化遵循腺瘤-腺癌-转移的发展规律;③可通过非手术的方式对原发灶与癌周组织反复取材;④能动态监测该模型中肿瘤自发形成与自发转移的全过程,跟踪原发肿瘤的生长,观察是否转移和转移部位;⑤能动态跟踪原发癌灶局部的免疫状态和满足转移灶局部免疫研究;⑥能有效缓解结肠部位因肿瘤生长迅速导致的肠梗阻对后续研究及小鼠生命期和生理功能的影响;⑦该模型的小鼠免疫功能健全,构建模型和研究的过程不影响机体的免疫功能。如果使用免疫健全的小鼠构建此模型,由于存在受免疫排斥反应,限制该模型在其他种属瘤组织研究。但对不涉及种属特异性的,对于结肠癌的发生、发展、转

移和复发机制,以及在结肠癌进展与机体免疫系统的相互关系上将具有广阔的应用前景。

## 参考文献

- 1 Wu P F, Zhang F. Natural compounds from traditional medicinal herbs in the treatment of cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(12): 1523 - 1531
- 2 张慧, 曹海龙, 王邦茂, 等. 水飞蓟宾防治消化道肿瘤的研究进展 [J]. *国际消化病杂志*, 2012, 1: 48 - 53
- 3 Hamanishi J, Mandai M, Matsumura N, *et al*. Activated local immunity by CC chemokine ligand 19 - transduced embryonic endothelial progenitor cells suppresses metastasis of murine ovarian cancer [J]. *Stem Cells*, 2010, 28(1): 164 - 173
- 4 Hamanishi J, Mandai M, Abiko K, *et al*. The comprehensive assessment of local immune status of ovarian cancer by the clustering of multiple immune factors [J]. *Clin Immunol*, 2011, 141(3): 338 - 347
- 5 Nakanishi M, Menoret A, Tanaka T, *et al*. Selective PGE(2) suppression inhibits colon carcinogenesis and modifies local mucosal immunity [J]. *Cancer Prev Res: Phila*, 2011, 4(8): 1198 - 1208
- 6 Mlecnik B, Tosolini M, Charoentong P, *et al*. Biomolecular network reconstruction identifies T - cell homing factors associated with survival in colorectal cancer [J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(4): 1429 - 1440
- 7 Bindea G, Mlecnik B, Fridman WH, *et al*. Natural immunity to cancer in humans [J]. *Curr Opin Immunol*, 2010, 22(2): 215 - 222
- 8 郑勇斌, 龚文荣, 童仕伦, 等. B7 - H1 在直肠癌与镶嵌血管中的表达及意义 [J]. *中华实验外科杂志*, 2010, 27(3): 356 - 357
- 9 Lopez - Garcia C, Klein AM, Simons BD, *et al*. Intestinal stem cell replacement follows a pattern of neutral drift [J]. *Science*, 2010, 5, 330(6005): 822 - 825
- 10 Placke T, Orgel M, Schaller M, *et al*. Platelet - derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(2): 440 - 448
- 11 Liu Y, Komohara Y, Domenick N, *et al*. Expression of antigen processing and presenting molecules in brain metastasis of breast cancer [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2012, 61(6): 789 - 801
- 12 Eyles J, Puaux AL, Wang X. Tumor cells disseminate early, but immunosurveillance limits metastatic outgrowth, in a mouse model of melanoma [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(6): 2030 - 2039
- 13 Yan HH, Pickup M, Pang Y, *et al*. Gr - 1 + CD11b + myeloid cells tip the balance of immune protection to tumor promotion in the premetastatic lung [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(15): 6139 - 6149
- 14 Anichini A, Molla A, Vegetti C, *et al*. Tumor - reactive CD8 + early effector T cells identified at tumor site in primary and metastatic melanoma [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(21): 8378 - 8387
- 15 Maccalli C, Scaramuzza S, Parmiani G, *et al*. TNK cells (NKG2D + CD8 + or CD4 + T lymphocytes) in the control of human tumors [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2009, 58(5): 801 - 808
- 16 Grimm M, Gasser M, Bueter M, *et al*. Evaluation of immunological escape mechanisms in a mouse model of colorectal liver metastases [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10: 82

(下转第 13 页)

治疗,有望改善卵巢癌患者生存时间,但仍需进一步研究探索。

# 参考文献

- 1 Stewart BW, Wild CP. World cancer report[M]. France: International Agency for Research on Cancer, 2014: 681
- 2 Yan WH. HLA - G expression in cancers: potential role in diagnosis, prognosis and therapy. Immunogenetics[J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2011, 11(1): 76 - 89
- 3 Carosella ED, Gregori S, LeMaout J. The tolerogenic interplay(s) among HLA - G, myeloid APCs, and regulatory cells[J]. Blood, 2011, 118(25): 6499 - 6505
- 4 Menier C, Prevot S, Carosella ED, et al. Human leukocyte antigen - G is expressed in advanced - stage ovarian carcinoma of high - grade histology[J]. Hum Immunol, 2009, 70(12): 1006 - 1009
- 5 Lin A, Yan WH, Xu HH, et al. HLA - G expression in human ovarian carcinoma counteracts NK cell function[J]. Ann oncol, 2007, 18(11): 1804 - 1809
- 6 Zhang X, Han QY, Li JB, et al. Lesion HLA - G5/- G6 isoforms expression in patients with ovarian cancer[J]. Hum Immunol, 2016, doi: 10.1016/j.humimm.2015.12.003
- 7 Flajollet S, Poras I, Carosella ED, et al. RREB - 1 is a transcriptional repressor of HLA - G[J]. J Immunol, 2009, 183(17): 6948 - 6959
- 8 Menendez L, Walker LD, Matyunina LV, et al. Epigenetic changes within the promoter region of the HLA - G gene in ovarian tumors[J]. Mol Cancer, 2008, 7: 43
- 9 Castelli EC, Mendes - Junior CT, Deghaide NHS, et al. The genetic structure of 3' untranslated region of the HLA - G gene: polymorphisms and haplotypes[J]. Genes Immun, 2010, 11(2): 134 - 141
- 10 Svendsen SG, Hantash BM, Zhao L, et al. The expression and functional activity of membrane - bound human leukocyte antigen - G1 are influenced by the 3'- untranslated region[J]. Hum Immunol, 2013, 74(7): 818 - 827
- 11 Manaster I, Goldman - Wohl D, Greenfield C, et al. MiRNA - mediated control of HLA - G expression and function[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e33395

- 12 Tao SF, He HF, Chen Q, et al. GPER mediated estradiol reduces miR - 148a to promote HLA - G expression in breast cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 451(1): 74 - 78
- 13 Jasinski - Bergnera S, Stoehrb C, Bukur J, et al. Clinical relevance of miR - mediated HLA - G regulation and the associated immune cell infiltration in renal cell carcinoma[J]. Oncoimmunology, 2015, 4(6): e1008805
- 14 Wang XH, Li B, Wang J, et al. Evidence that miR - 133a causes recurrent spontaneous abortion by reducing HLA - G expression[J]. Reprod Biomed Online, 2012, 25(4): 415 - 424
- 15 Rodríguez JA, Galeano L, Palacios DM, et al. Altered HLA class I and HLA - G expression is associated with IL - 10 expression in patients with cervical cancer[J]. Pathobiology, 2012, 79(2): 72 - 83
- 16 Lin AF, Zhang X, Xu HH, et al. HLA - G expression is associated with metastasis and poor survival in the Balb/c nu/nu murine tumor model with ovarian cancer[J]. Int J Cancer, 2012, 131(1): 150 - 157
- 17 Lin AF, Xu HH, Xu DP, et al. Multiple steps of HLA - G in ovarian carcinoma metastasis: Alter NK cytotoxicity and induce matrix metalloproteinase - 15 (MMP - 15) expression[J]. Hum Immunol, 2013, 74(4): 439 - 446
- 18 Rutten MJ, Dijk F, Savci - Heijink CD, et al. HLA - G expression is an independent predictor for improved survival in high grade ovarian carcinomas[J]. J Immunol Res, 2014, 2014: 274584
- 19 Jung YW, Kim YT, Kim SW, et al. Correlation of human leukocyte antigen - G (HLA - G) expression and disease progression in epithelial ovarian cancer[J]. Reprod Sci, 2009, 16(11): 1103 - 1111
- 20 Zeng XC, Zhang T, Huang DH, et al. RNA interfering targeting human leukocyte antigen - G enhanced immune surveillance mediated by the natural killer cells on hepatocellular carcinoma[J]. ACSL, 2013, 43(2): 135 - 144
- 21 Zhang XM, Zheng YY, Wang ZG, et al. Methotrexate - loaded PLGA nanobubbles for ultrasound imaging and Synergistic Targeted therapy of residual tumor during HIFU ablation[J]. Biomaterials, 2014, 35(19): 5148 - 5161

(收稿日期:2016 - 02 - 01)

(修回日期:2016 - 02 - 02)

(上接第 10 页)

- 17 Puppa MJ, White JP, Sato S, et al. Gut barrier dysfunction in the ApcMin/+ mouse model of colon cancer cachexia[J]. Biochim Biophys Acta, 2011,1812(12):1601 - 1606
- 18 Hung KE, Maricevich MA, Richard LG, et al. Development of a mouse model for sporadic and metastatic colon tumors and its use in assessing drug treatment[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(4):1565 - 1570
- 19 Simons BD, Clevers H. Stem cell self - renewal in intestinal crypt[J]. Exp Cell Res, 2011,317(19):2719 - 2724
- 20 Chia LA, Kuo CJ. The intestinal stem cell[J]. Prog Mol Biol Transl Sci,2010,96:157 - 173
- 21 Leedham SJ, Rodenas - Cuadrado P, Howarth K, et al. A basal gradient of Wnt and stem - cell number influences regional tumour distribution in human and mouse intestinal tracts[J]. Gut, 2012,62(1): 1456 - 1461

- 22 White AC, Tran K, Khuu J, et al. Defining the origins of Ras/p53 - mediated squamous cell carcinoma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011,108(18):7425 - 7430
- 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 Snippert HJ, van der Flier LG, Sato T, et al. Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells[J]. Cell, 2010,143(1):134 - 144
- 24 Lopez - Garcia C, Klein AM, Simons BD, et al. Intestinal stem cell replacement follows a pattern of neutral drift[J]. Science,2010,330(6005):822 - 825
- 25 金黑鹰,刘秀芳,丁义江,等. 结肠造口结肠癌原位移植模型的建立[J]. 中华胃肠外科杂志,2009,12(3):294 - 296

(收稿日期:2016 - 01 - 11)

(修回日期:2016 - 02 - 19)