

早期肺癌动物模型的研究进展

肖时满 综述 强金伟 审校

【摘要】 肺癌模型在研究人类肺癌的诊断和治疗等方面发挥着非常重要的作用。肺癌模型研究范围涉及到各个医学学科和领域,其中逐渐受到大家关注的是早期肺癌模型的构建。本文对早期肺癌动物模型的构建及其应用进展进行综述。

【关键词】 早期肺癌;动物模型;诊断;实验研究

【中图分类号】 R735.7; R814.42 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2013)12-1291-03

肺癌发病率和死亡率居癌症首位,目前肺癌的早期发现率和诊断率尚未有效提高,临床就诊的大部分肺癌患者为中晚期,治疗效果差,生存时间很短。非小细胞肺癌的 5 年生存率仅为 10%~15%,小细胞肺癌则仅约 5%;而早期肺癌如原位癌、微浸润癌的治愈率近 100%,手术切除的 I 期肺癌生存率也可达 90%以上^[1]。因此,目前的研究者均主要关注早期肺癌的发生、发展机制及形态学和功能学变化特点,旨在充分理解其癌生物现象,找到诊断早期肺癌的特异性指标和征象,为早期干预、提高生存率奠定基础。所以,构建早期肺癌的动物模型对肺癌的研究显得尤为重要。

一个理想的动物模型应符合以下几项要求:①动物容易获得;②包含肿瘤发生、发展的全过程;③诱发机制与人类致癌因子的作用机制相同或相似;④操作容易,定位准确,重复性好,并且与剂量相关;⑤诱发的新生物组织类型与人类相似,尽可能再现所要求的人类疾病;⑥所需时间短,成功率高,有利于临床研究。

肺癌模型的动物种类

模型动物的选择应为结构、机能、代谢与人类相似的动物。一般来说,动物进化阶段越高,其结构、功能越复杂,反应也越接近于人类。目前,肺癌动物模型多选择小鼠、大鼠、地鼠、兔、羊和狗等动物。

小鼠:小鼠是目前应用最为广泛的肺癌模型动物,也是肺腺癌的重要模型载体,可以诱发出包括小细胞肺癌在内的各种组织学类型的肺癌。小鼠的肺癌在组织学、形态学、分子学特点上与人类肺癌比较接近,而小鼠与人类基因之间具有同源性,其基因容易操控^[2],所以小鼠模型在肺癌研究中应用较多。但仍存在两个问题:一是人类肿瘤在小鼠体内生长相对较快,提示小鼠和人类对肿瘤的敏感性有显著差异;二是小鼠肺癌具有散发性和异源性的特点^[3]。但关于后者,人类也有相似点,如 Madeline 等^[4]的研究发现高达 18%的早期肺腺癌为多发性肺癌。

大鼠:大鼠是鳞癌的好发宿主,也可诱导出多种非小细胞型肺癌的组织学类型。但是目前学者们认为人类肺泡和下呼吸道的上皮组织是支气管肺癌的好发部位,致癌物的吸收取决于气道上皮的厚度以及与胞浆面积有关的核浆比,而大鼠的支气管上皮厚度与人类有明显的差异,因而诱发机制也可能不同,也被质疑为非理想的动物模型^[5]。

地鼠:地鼠原发性肺癌(主要为腺癌)的发生率很低,其支气管结构与人类相似,抗感染能力强,同时又具有与人类相似的经鼻甲呼吸、过滤的功能,因而被认为是较好的肺癌研究模型,如叙利亚金黄地鼠对诱发肺癌较敏感^[6]。但其个体较小,限制了在介入方面的应用。

犬:犬的生活方式和生存环境比其它动物更接近于人类,机体反应也更接近于人类,因此很适合于肺癌的研究,主要病理类型为非小细胞肺癌。犬的原发性肺癌与人类相似,尤其是其支气管动脉更接近于人类,可用于影像学研究如 X 线、CT 检查等,以及应用于介入治疗、内外科治疗的研究,是较为理想的制备肺癌模型的实验动物^[7]。

兔:兔较适宜于对急性肺损伤的实验研究^[8],而在肺癌模型制备方面不是非常成熟,目前主要研究的是原位移植肺癌组织块和细胞悬液注射法进行移植性建模^[9]。

羊:羊的自发性肺癌与人类极为相似^[10],起源于肺的周围组织,呈向肺内生长的趋势,有相似的组织学和超微结构学特征,可提供癌细胞起源方面的研究信息,较适合于早期肺癌的研究。羊支气管癌和细支气管肺泡癌具有相同的临床、巨检、组织学和超微结构特点,可以提供很多肺泡癌的信息。Palmarini 等^[10]运用羊肺腺癌反转录病毒转导入羔羊,成功的诱发肺腺癌,是很好的研究细支气管肺泡癌的研究材料。该模型的优点是肺癌的发生接近自然过程,而缺点是对致癌物的异质性反应,部分模型肿瘤发生率较低,培养时间长。

肺癌模型的分类及应用

根据操作方法的不同,诱发型模型又可以分为以下几种类型。

1. 吸入致癌物法诱发肺癌

通过气管切开造瘘术或直接将动物长期持续暴露于粉尘或烟雾中,如烟草烟雾^[11]、含 NNK[4-(甲基亚硝胺基)-1-(3-吡啶)-1-丁酮]的烟雾等^[12],使用影像学设备来观察肿瘤的发生,再经病理证实,从而证实粉尘和烟雾可引起肺癌。张朝晖等^[13]让小鼠暴露于烹调油烟 8 个月,得到小鼠肺组织癌前病变及癌变模型,主要为腺癌;Witschi 等^[14]用烟草等将 A/J 小鼠暴露于烟草中 5 个月,每天暴露 6h,然后恢复 4 个月,发癌率均在 85%以上,成功建立了吸烟肺癌模型。这种方法常用于病因学、早期发生学的研究,因此适用于早期肺癌的研究。但由于发生的时间和部位的不确定性,所以这一模型应用不多。

2. 肺内或支气管灌注致癌物诱发肺癌

多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH)及含苯化合物的致癌作用已经众所周知,并且环境中的 PAH 与人

作者单位:201508 上海,上海复旦大学附属金山医院放射科
作者简介:肖时满(1985—),男,湖南邵阳人,博士研究生,主要从事肺癌影像诊断工作。
通讯作者:强金伟, E-mail: dr. jinweiqiang@163.com

类的肺癌发生有关。煤焦沥青(coal tar pitch, CTP)这一致癌物主要含 PAH。吴逸明等^[15]设计了用 CTP 支气管灌注诱发大鼠肺癌,构建大鼠肺癌发生、发展全过程[正常支气管上皮组织→鳞状上皮化生→不典型增生→原位癌→浸润癌(鳞癌)]的动物模型。运用 PAH 诱发肺癌动物模型,有助于深入探讨人类肺癌的发病机制。通过对致癌物的灌注量和动物肺鳞癌各病理阶段的发生时间的准确记录,有助于推算人类接触类似致癌物可能发生肺癌的剂量以及出现各种病理阶段的时间,为人类肺癌(鳞癌)的预防和早期诊断提供可靠的实验依据。

张玉霞等^[16]用含 NNK 的碘油溶液经支气管内灌注,107 天后建立了稳定的癌前病变,成功率达 100%,病理改变从轻度到重度不典型肺泡细胞增生,其中后者比例为 67%。该模型定位性好,成瘤数单一,是较好的研究早期肺癌的动物模型。

3. 口服致癌物诱发肺癌

有科研团队用黄曲霉毒素类物质给 NIH 小鼠长期灌胃,证实了该类毒物可诱发小鼠支气管上皮增生、肺泡上皮增生和肺腺癌^[17]。这种模型经历了肺腺癌的癌前病变到肺癌的全过程,处于某个病理阶段的时间较长,比较适合早期肺癌各阶段的形态学和分子生物学的研究,但是总的试验周期比较长(58 周)。

4. 皮下或腹腔注射诱癌剂诱发肺癌

有学者用甲基硝基亚硝基胍皮下注射昆明小鼠诱发肺肿瘤^[18]。此法的特点是操作简单、诱发率高(肿瘤发生率 92.3%,腺癌发生率 53.8%)、周期短(仅 82 天),肿瘤病理类型为肺腺瘤和肺腺癌,包括乳头状、腺管状、实体状等类型。

乌拉坦是一种较好的致肺部肿瘤药物^[19],一般经腹腔注射。一般来说乌拉坦诱发的肿瘤均为肺腺瘤,对于 A/J 系小鼠(敏感系)3 个月就可以见到肺腺癌,个体肺癌发生率 100%。

总的来说,诱发型肺癌模型多经过肺癌的各个不同的病理阶段,组织学特点也与人类较为相似,是研究早期肺癌的较好选择,但不足是尚无小细胞肺癌的报道。

人类肺癌异种异位移植,或动物肺癌同位或异位移植可使一群动物同时接受相当数量的肿瘤细胞或组织,生长速度较为一致,个体差异较小,成活率高,试验周期短。用于移植型肺癌研究的实验动物一般是免疫缺陷动物,包括裸鼠、SCID 小鼠及 NOD-SCID 小鼠等。因移植部位差异分为原位和异位移植两种类型。

Kondo 等^[20]分别将人肺腺癌细胞系 A549 和 Ma2 植入 SCID 小鼠肺部,制备原位移植肺癌模型,结果前者出现多样性转移,后者出现单一转移。Wang 等^[21]通过肺穿刺和支气管穿刺将甲基胆蒎(3-methylcholanthrene, MCA)诱发的同品系癌细胞系注入大鼠支气管内,结果 5 天即有肉眼可见的瘤体出现,成功率接近 100%。

Lewis 肺癌是已被广泛应用于化疗药物测试的一种肺腺癌细胞株,最初来源于 C57 小鼠,其成瘤性强,在小鼠体内转移性较弱^[22]。最近有学者^[23]用不同癌细胞浓度的 Lewis 肺癌细胞经皮肺穿刺进行肺部原位种植,获得不同程度的成瘤率(最高可达 100%),在第 3~9 天开始成瘤,但第 22 天就开始出现死亡。

从以上可以看出,移植瘤肺癌模型瘤体生长迅速,成功率高,主要用于抗癌药物的药效测试和药物筛选;由于缺乏肺癌

的早期发生事件,又缺少与正常免疫环境的相互作用,肿瘤血管形成机制也大有不同,因而不适用于肺癌发生及早期事件方面的研究。

运用转基因技术将人肺癌中发现的癌基因(目的基因)敲入鼠或其它动物受精卵基因组,或者将受精卵基因组内抑癌基因的敲除来制造肺癌模型。但这些经典的基因工程不能复制散发肺癌经历的生长事件,这可能是由于大量转基因癌细胞的微环境与散发肿瘤过程中仅少量突变细胞包围在正常细胞的情况严重不符。改良运用癌基因或抑癌基因的等位基因突变技术可使鼠肺癌的生长过程更接近于散发肿瘤,即在肺已经完全发育的成年鼠内仅一个亚群的细胞获得突变。

在人类肺腺癌中 K-ras 基因突变是常见的突变,占 1/4~1/2。有学者用重组腺病毒表达 Adeno Cre(一种重组酶)诱导 K-ras 突变基因在肺的表达,从而达到肿瘤发生的时间顺序性和多样性,出现了不典型腺瘤样增生(AAH, 2w)、支气管上皮不典型增生(EH, 2w)、支气管腺瘤(12w)和为数较少的腺癌(16w)^[24]。这种模型能更好地研究不同早期阶段的肺癌的发生发展,缺点是缺少进展期肿瘤的特征,如间质沉积、局部浸润及转移的潜能,其可能原因是需要联合其它基因改变。因此有学者将条件控制表达的 K-ras 基因导入 Trp53 或其它有抑癌基因缺失的小鼠中制造更加进展期的肺癌模型获得了成功^[25]。另外有学者用化学诱导剂诱导基因改造小鼠也能获得相对晚期的肿瘤^[26]。Alain 等^[27]在建立 K-ras 肺癌模型的基础上,成功复制了人类细支气管肺泡癌进展为浸润性腺癌的病理过程,证实了临床上的一个假设:阻遏 TGF- β II 型受体可能是原位腺癌到浸润性腺癌的一个很重要的环节。

相对于诱发型肺癌模型,基因改造模型具有时间优先性的优点。一般第 3 周即可见到与人类不典型腺瘤样增生相似的病变。另外它还有另一个优势,就是发现了少数神经内分泌癌的癌变过程,尤其是与人类小细胞肺癌(SCLC)相似的肿瘤。Meuwissen 等^[28]在 Cre-loxP 介导的联合 Rb 基因和 p53 基因失活的情况下建立了与人类 SCLC 相似的鼠肺癌模型。

肺癌治疗失败的主要原因是由于未能早期诊断,基因改造小鼠肺癌模型提供了足够时长的各期癌组织,利用基因组学和蛋白组学的技术对每个早期癌组织的特异性基因及其特异性蛋白表达谱进行分析,筛选出最好的早期病变的癌组织分子标记物表达谱,从而可能做到早期诊断^[29]。

近期的小动物影像技术如微型 CT、微型 MRI、超声及荧光探针成像的发展,也为肿瘤的早期诊断提供了线索^[30]。Namati 等^[31]用微型 CT 检测到非常早期的浸润前期病变,最小肿瘤仅 0.11 mm,并用之纵向观察不同时期病变的变化特点,主要观察了大小的变化。但其它形态学方面的研究还未见报道。最新的微型 CT 分辨率可达 9 μ m,可用于小动物早期肺癌的形态学研究。与分子探针技术相结合可用于肺癌早期特异性分子探针的开发研究。Olson 等^[32]用 7T 微型 MRI 定量追踪肺部肿瘤的进展情况,可以观察 0.1~4.0 mm 的肿瘤。

基因改造型肺癌模型还可以用于与早期基因事件及基因后事件相关的治疗研究。因此,有效基因定位的模型不仅有利于对肺癌病理过程的理解,还能用于靶向治疗的临床前期实验^[33],包括阻止癌前病变发展到浸润性癌变。

综上所述,诱发型和基因改造型肺癌模型为我们提供了良

好的早期肺癌的研究工具,尤其是条件性表达鼠模型及其与诱发型联合模型的建立,不仅有助于我们研究早期肺癌的发病机制,也为早期诊断和治疗提供了很好的研究平台。相信随着基因组学、蛋白组学以及小动物影像等新理论、新技术的发展,我们能更好地建立更多的与人类肺癌更接近的、适合于特定实验目的的动物模型,从而为更好地研究早期肺癌创造条件。

参考文献:

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Malkinson AM. Primary lung tumors in mice as an aid for understanding, preventing and treating human adenocarcinoma of the lung[J]. Lung Cancer, 2001, 32(3): 265-279.
- [3] 李永明, 张敏, 夏长友, 等. 肺肿瘤畜牧兽医科技信息模型的构建[J]. 实验动物, 2008, 2(11): 35-37.
- [4] Madeline V, Darryl C, Elizabeth B, et al. Solitary and multiple resected adenocarcinomas after CT screening for lung cancer: histopathologic features and their prognostic implications[J]. Lung Cancer, 2009, 64(2): 148-154.
- [5] Pepekko WE, Chen C. Quantitative assessment of cancer risk from exposure to diesel engine emissions[J]. Regul Toxicol Pharmacol, 1993, 17(1): 52-65.
- [6] Amo H, Kubota H, Lu J, et al. Adenomatous hyperplasia and adenomas in the lung induced by chronic feeding of butylated hydroxyanisole of Japanese house musk shrew[J]. Carcinogenesis, 1990, 65(4): 835-840.
- [7] Macewen EG. Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment[J]. Cancer Metastasis Rev, 1990, 9(2): 125-136.
- [8] Hua YM, Liu TY, Lien SH, et al. A decremental PEEP trial for determining open-lung PEEP in a rabbit model of acute lung injury[J]. Pediatr Pulmol, 2008, 43(4): 371-380.
- [9] 刘德森, 倪才方, 秦涌, 等. 兔 VX2 肺癌模型的建立和螺旋 CT 评价[J]. 介入放射学杂志, 2007, 16(4): 266-268.
- [10] Palmarini M, Sharp JM, Heras MD, et al. Jaagseikte sheep retrovirus is necessary and sufficient to induce a contagious lung cancer in sheep[J]. J Virol, 1999, 7(3): 6964-6972.
- [11] Kim Y, Liu XS, Liu C, et al. Induction of pulmonary neoplasia in the smoke exposed ferret by NNK: a model for human lung cancer[J]. Cancer Lett, 2009, 234(2): 209-219.
- [12] Witschi H. A/J mouse as a model for lung tumorigenesis caused by tobacco smoke: strengths and weaknesses[J]. Exp Lung Res, 2005, 31(1): 3-18.
- [13] 张朝晖, 陈峰, 谭佑铭, 等. 烹调油烟致 BALB/C 小鼠肺癌的病理变化[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(12): 1455-1457.
- [14] Witschi H, Espiritu I, Maronpot RR. Lung tumors in 2 year old strain A/J mice exposed for 6 months to tobacco smoke[J]. Cancer Lett, 2010, 241(1): 64-68.
- [15] 吴逸明, 李卫民, 李卓炜, 等. 三种大鼠肺癌发生发展动物模型的构建[J]. 河南医科大学学报, 2000, 35(3): 232-235.
- [16] 张玉霞, 赖百塘, 陈洪雷, 等. 烟草致癌原 NNK 诱发大鼠肺癌前病变的实验研究[J]. 中国肺癌杂志, 2006, 9(2): 152-156.
- [17] 黄向华, 张祥宏, 李月红, 等. 黄曲霉毒素 G1 诱发 NIH 小鼠肺癌的实验研究[J]. 中华病理学杂志, 2004, 33(3): 260-263.
- [18] 王修杰, 罗德元, 王朝俊. 甲基硝基亚硝基胍诱发小鼠肺腺癌的病理观察[J]. 华西医科大学报, 1988, 19(4): 376-379.
- [19] Kreisel D, Gelman AE, Higashikubo R, et al. Strain-specific Variation in murine natural killer gene complex contributes to differences in immunosurveillance for urethane-induced lung cancer[J]. Cancer Res, 2012, 72(17): 4311-4317.
- [20] Kondo K, Fujino H, Miyoshi SD, et al. Experimental rat lung tumor model with intrabronchial tumor cell implantation[J]. Acta Cir Bras, 2008, 23(1): 84-92.
- [21] Wang HY, Ross HM, Ng B, et al. Establishment of an experimental intrapulmonary tumor nodule model[J]. Oncol Rep, 2004, 12(5): 991-999.
- [22] Bertram JS, Janik P. Establishment of a cloned line of lewis lung carcinoma cells adapted to cell culture[J]. Cancer Lett, 1980, 11(1): 63-73.
- [23] 刘馨, 伍治平, 左曙光, 等. 小鼠 lewis 肺癌原位模型的构建[J]. 中国肺癌杂志, 2010, 13(1): 42-47.
- [24] Jackson EL, Willis N, Mercer K, et al. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras[J]. Genes Dev, 2001, 15(24): 3242-3248.
- [25] Fisher GH, Wellen SL, Klimatra D, et al. Induction and apoptotic regression of lung adenocarcinomas by regulation of a K-Ras transgene in the presence and absence of tumor suppressor genes[J]. Genes Dev, 2001, 15(24): 3249-3262.
- [26] Jonkers J, Berns A. Conditional mouse models of sporadic cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(4): 251-265.
- [27] Borczuk AC, Sole M, Lu P, et al. Progression of human bronchioalveolar carcinoma to invasive adenocarcinoma is modeled in a transgenic mouse model of K-ras-induced lung cancer by loss of the TGF- β II receptor[J]. Cancer Res, 2011, 71(21): 6665-6675.
- [28] Meuwissen R, Linn SC, Linnoila RI, et al. Induction of small cell lung cancer by somatic inactivation of both Trp53 and Tbx1 in a conditional mouse model[J]. Cancer Cell, 2003, 4(3): 181-189.
- [29] Hansen K, Khanna C. Spontaneous and genetically engineered animal models: use in preclinical cancer drug development[J]. Eur J Cancer, 2004, 40(6): 858-880.
- [30] Lewis JS, Achilefu S, Garbow JR, et al. Small animal imaging: current technology and perspectives for oncological imaging[J]. Eur J Cancer, 2002, 38(16): 2173-2188.
- [31] Namati E, Thiesse J, Sieren JC, et al. Longitudinal assessment of lung cancer progression in the mouse using in vivo micro-CT imaging[J]. Med Phys, 2010, 37(9): 4793-4805.
- [32] Olson JD, Walb MC, Moore JE, et al. A gated-7T MRI technique for tracking lung tumor development and progression in mice after exposure to low doses of ionizing radiation[J]. Radiat Res, 2012, 178(4): 321-327.
- [33] Dutt A, Wong KK. Mouse models of lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(14): 4396-4402.

(收稿日期: 2013-03-05)