

· 综 述 ·

鼻咽癌动物模型研究进展*

柯 霞[#]综述,洪苏玲[△]审校

(重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科 400016)

关键词:鼻咽癌;动物模型;诱发性;移植性;转基因和基因敲除

中图分类号:R739.63

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)11-1367-03

鼻咽癌是中国最常见的头颈部肿瘤之一,发病率逐年增长,具有明显的地域性。在其多因素的发展过程中,遗传易感性、EB病毒和环境因素被认为是主要原因。鼻咽癌的发病机制、肿瘤的转移和浸润机制、中晚期及复发、转移患者更为有效的治疗方式的探寻等都成为广大研究者有待解决的问题。随着转基因、基因敲除等技术在实验动物模型中的广泛应用,建立理想的鼻咽癌动物模型,成为解决上述问题的关键之一。1969年Rygaard和Povlsen^[1]首次成功将人类结肠癌移植于裸鼠,开辟了利用动物研究人类肿瘤的广阔前景。到目前为止,针对多种疾病已积累了大量的动物模型,近年来还开始应用基因改变动物模型,并已用于肿瘤防治的研究。

已报道的研究鼻咽癌的动物模型主要分以下几类:诱发性鼻咽癌动物模型、移植性鼻咽癌动物模型、转基因和基因敲除鼻咽癌动物模型、鼻咽癌转移动物模型等。现介绍以上模型的生物学特性及在鼻咽癌研究中的应用情况。

1 诱发性鼻咽癌动物模型

诱发性鼻咽癌动物模型是指用化学、物理或生物的致癌因素作用于动物而形成的鼻咽癌模型。二甲基胆蒽(methylcholanthrene, MC)、二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN)、二亚硝基哌嗪(dinitrosopiperazine, DNP)都曾用于诱发大鼠鼻咽癌。MC诱发癌症概率可达60%以上,但是所需时间较长。陈主初^[2]利用DNP对鼻咽上皮的高组织亲和性,通过少量多次或短期大量皮下注射、鼻咽局部给药途径,均引起鼻咽上皮癌变,并2次作用于体外培养的人胚鼻咽上皮并使其恶性转化。孙宁等^[3]利用DNP进行皮下注射,诱导鼻咽上皮癌变,发现在化学诱癌过程中,不同阶段鼻咽上皮病变动态变化时,底层细胞、鳞状上皮细胞、柱状上皮细胞的非典型增生与癌变呈高度正相关,并随动物存活时间的延长而增多。

2 移植性鼻咽癌动物模型

移植性鼻咽癌动物模型是指将鼻咽癌组织或细胞移植于实验动物而培养出的模型。移植方式包括肿瘤组织块接种、组织块悬液注射、肿瘤细胞悬液注射等。实验动物多采用胸腺缺失裸鼠和严重联合免疫缺陷(severe combined immun deficiency, SCID)小鼠。这是近年来最常见的鼻咽癌模型,目前特征明确,广泛应用的鼻咽癌细胞株有多种,如CNE-1、CNE-2、5-8-EGFP等。移植部位常选择腋下或背部接种。李智等^[4]建立了鼻咽癌细胞株CNE-1、CNE-2移植瘤动物模型,发现肿瘤细胞的主要死亡途径是凋亡,这种凋亡可能是bax介导的,而

非p53依赖性的。唐慰平^[5]将CNE-2Z细胞株接种于裸鼠皮下成瘤,并观察其生物学特性,发现肿瘤具有易发生局部浸润、淋巴结、肺转移等特点。黄培根等^[6]将人鼻咽癌活检组织接种于裸小鼠,原代移植成功后,取瘤块进行鼠间移植,所得肿瘤保持了人低分化鼻咽鳞癌的组织学及超微结构特点,但此移植瘤生长较缓慢,肿瘤无明显局部浸润和远处转移等生长改变。文庆莲等^[7]比较了几种常用的皮下移植瘤的造模方法,发现新鲜组织块成瘤率最高,成瘤潜伏时间短,肿瘤体积倍增时间短,但由于种植的组织块大小很难保证一致,故成瘤后体积也欠均一;细胞悬液接种法成瘤率约为88%,成瘤潜伏时间较长,但是可以对接种细胞数进行定量,所得肿瘤体积均匀,适用于体积一致性要求较高的实验;冻存组织在复苏后仍能成瘤,其成瘤率高于组织细胞匀浆法,可用于需要保存标本的实验。

近年来将稳定表达荧光素酶的肿瘤细胞原位或异位移植到动物中,通过活体荧光成像技术,观察肿瘤的生长和早期转移情况,为肿瘤生长的示踪和治疗效果的评价奠定基础^[8-10]。Liu等^[11]将5-8F-GFP和6-10B-GFP细胞株直接注射到裸鼠鼻咽部或异位种植到裸鼠皮下,可视化观察原位肿瘤的生长情况以及血管生成和转移,发现与人鼻咽癌特性一致,具有高转移活性的5-8F株能引起脑、颈淋巴结、肺转移,而皮下移植瘤均未见转移发生,这一结果表明,如同“种子-土壤”假说那样,肿瘤的转移与细胞型别和宿主微环境密切相关,提示原位可视化鼻咽癌动物模型在阐明鼻咽癌生长、发生、转移和血管生成方面有着极其重要的意义。孙宝昌等^[12]将表达荧光素酶基因的真核表达载体转入肝癌细胞,再将稳定表达荧光素酶的肝癌细胞接种到裸鼠皮下成瘤,利用活体成像系统观察了肿瘤的生长过程。Mocanu等^[13]将荧光、生物发光和成像技术联合起来,系统检测了腺病毒在鼻咽癌移植瘤中的摄入情况,为监测肿瘤腺病毒基因治疗中的转移情况提供了新方法。但具体应用到人鼻咽癌的相关研究尚无相关文献报道,这将可能成为鼻咽癌动物模型研究的新方向。

3 转基因和基因敲除鼻咽癌动物模型

转基因动物是指用人工的方法将外源目的基因或特定的DNA片段导入宿主动物体内,使之在宿主基因组中稳定整合而得以表达,并能遗传给后代的一类动物。转基因动物建立的方法有多种,包括显微注射技术、逆转录病毒载体技术、胚胎干细胞技术、精子载体技术等。1990年Wilson等^[14]用EB病毒的LMP1与多瘤病毒或免疫球蛋白重链基因(E μ)的调控区构

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30672311)。 # 重庆医科大学在读博士生,电话:(023)89011020;E-mail:drkexia@163.com。

△ 通讯作者,电话:(023)89011020;E-mail:hsl-prof@163.com。

建转基因,建立了转基因模型,所产生的转基因小鼠在皮肤和黏膜(包括鼻黏膜)均出现过度角化。何迎春等^[15]利用分子克隆技术构建含突变型 p53 基因和 EB 病毒 LMP1 基因的真核表达载体 pLMP1-p53mt,采用显微注射法将线性化的表达载体注射至小鼠受精卵的雄性原核中,然后将注射存活的受精卵植入假孕母鼠的输卵管,取其产 3 周龄子代鼠进行筛选,成功构建了含突变型 p53 和 EB 病毒 LMP1 基因的双转基因小鼠模型,此模型表现出鼻咽黏膜上皮灶性增生特征,为鼻咽癌前病变机制的研究提供了新的手段。张玲等^[16]采用 EDL-2、PLUNC-p 双启动子调控鼻咽癌来源的 LMP1 的表达载体,成功构建转基因小鼠,在转基因小鼠的鼻咽、前胃、舌根等部位均检测到了外源基因的表达,但是未观察到鼻咽组织有明显的病理改变。蓝珂等^[17]利用显微注射技术,制备出鼻咽癌来源 LMP1 基因的转基因小鼠,在单一干预因素下导致鼻咽不典型增生,首次说明了 LMP1 扮演了癌变始动因素这一角色,为整体上研究 LMP1 在鼻咽癌变过程中的作用奠定了基础。吕丽春等^[18]将角质上皮特异性启动子 ED-L2 调控的多聚免疫球蛋白受体(pIgR)基因用显微注射方法将其导入受精卵中,使该基因能在 F0 代转基因鼠鼻咽部特异性表达,所构建的携带有 pIgR 的转基因鼠,使其能以近乎自然的状态感染 EBV,为研究 EBV 与鼻咽癌的关系提供了最直接的依据。转基因或基因敲除鼠模型中肿瘤生长和发展快速,可以比较方便地获得肿瘤发展的整个过程,因此主要用于肿瘤转化及肿瘤发生中基因生物学功能的研究。然而,基因敲除技术仍存在不少问题,如成功率低、敲除基因的功能可能被其他基因代偿性填补等,尚需进一步研究。

4 鼻咽癌转移动物模型

转移是恶性肿瘤的基本生物学特性之一,研究转移是肿瘤研究的一个重要领域,对临床治疗具有指导意义^[19]。根据途径不同分为实验性转移和自发性转移。实验性转移适合研究肿瘤细胞转移后期阶段的着床、生长、血管生成等;自发性转移能再现肿瘤细胞转移的全过程,是较为理想的鼻咽癌远处转移模型。由于鼻咽解剖部位的隐蔽性和鼻咽癌临床症状的多样性,尽管早期筛查已广泛应用于临床,但多数患者在就诊时已处于中、晚期,故针对鼻咽癌易出现淋巴结、肝、肺、骨转移的情况,建立鼻咽癌转移动物模型,同时,研究鼻咽癌的定向转移情况也尤为重要。目前,在肿瘤定向转移的研究中,利用免疫缺陷动物体内传代的方法筛选出不同器官亲和性的转移瘤细胞亚株,并通过观察转移的特异性及相关影响因素来探讨肿瘤特定器官转移的机制,是较重要的手段之一^[20]。韩春等^[21]用标记绿色荧光蛋白的鼻咽低分化鳞癌细胞株 5-8F-EGFP 作为母系,接种于裸鼠脾脏,观察肿瘤转移情况,并取肝脏转移灶做原代培养,得到了肝转移亚群 5-8F-H3B-EGFP,其侵袭性、运动性以及形成肝转移灶的能力均大于母系,具有较高的肝脏亲和性,为进一步研究鼻咽癌肝转移的机制、动态观察肿瘤生长和转移情况提供了良好的动物模型。黄剑等^[22]将鼻咽癌细胞株 CNE-2Z-H5 移植于裸鼠皮下,取淋巴结转移灶癌细胞再次移植于裸鼠皮下传代,连续传代,发现各代裸鼠淋巴结转移率不断升高,而肺转移率一直稳定在较低水平,成功建立了人鼻咽癌自发性高淋巴道转移模型,并筛选出单一淋巴道转移途径的肿瘤细胞亚群。李晓华等^[23]通过门静脉或肝包膜下注射鼻咽癌细胞株细胞悬液,建立了鼻咽癌细胞株肝异位种植瘤肺转移

裸鼠动物模型,发现门静脉及肝包膜下注射两种途径在成瘤率、腹水形成率、肺转移率上均无明显差别,两种方法都能成功构建鼻咽癌异位种植瘤模型。Leng 等^[24]用鼻咽癌细胞株 5-8F-EGFP 建立了稳定淋巴结转移可视化裸鼠模型,筛选获得了具有淋巴结转移潜能的细胞株 5-8F-LN,并证实了 IRF1 在鼻咽癌的演进过程中起重要作用,而 CAV1 在 5-8F-EGFP 中的高表达可能和其高转移特性有关。

黄江琼等^[25]将 VX2 瘤细胞株荷瘤新西兰兔剥离肿瘤,CT 引导下将瘤细胞悬液注入兔鼻咽部,建立了兔鼻咽 VX2 移植瘤动物模型,肿瘤形成后向周围迅速浸润性生长,颈部淋巴结转移率高,晚期可出现肺转移,这与人鼻咽低分化鳞癌的生长过程类似,是目前报道的研究人类鼻咽癌较理想的动物模型。

综上所述,现有的鼻咽癌动物模型都有其自身的优点和缺点,原位诱发性动物模型因成功率低、周期长而较少应用;皮下种植肿瘤建模具有操作简单、成瘤率高、易于观察等优点而应用较多,但也存在肿瘤易形成包膜、不容易转移、且肿瘤中央易缺血性坏死等缺点^[26]。动物实验是基础科研应用于临床的关键所在,在疾病的多因素、多阶段发展过程中,每种特定的动物模型都只能反映其极少一部分,因此,在实验过程中,应该针对实验目的,结合国内外研究现状,合理选择和利用动物模型。

参考文献:

- [1] Rygaard J, Povlsen CO. Heterotransplantation of a human malignant tumor to nude mice [J]. *Aeta Pathol Scand*, 1969, 77(4): 758.
- [2] 陈主初. 二亚硝基哌嗪诱发正常人鼻咽上皮细胞恶性转化成功 [J]. *医药动态*, 1987, 30: 1.
- [3] 孙宁, 唐慰平, 蔡琼珍, 等. 化学诱癌过程中大鼠鼻咽上皮非典型增生与癌变的相关性分析 [J]. *癌症*, 1994, 13(2): 112.
- [4] 李智, 傅茂福, 宗永生. 鼻咽癌细胞株裸鼠移植瘤中癌细胞的凋亡 [J]. *癌症*, 1999, 18(2): 172.
- [5] 唐慰平. 人低分化鼻咽癌上皮细胞系(CNE-2Z)裸小鼠移植模型的建立及其特性研究 [J]. *癌症*, 1989, 8: 247.
- [6] 黄培根, 唐慰平, 赵明伦. 人鼻咽癌裸鼠移植瘤(NCN-C1)建立的初步报告 [J]. *实用肿瘤杂志*, 1990, 8(1): 37.
- [7] 文庆莲, 吴敬波, 范娟, 等. 建立人鼻咽癌裸鼠皮下移植瘤模型不同方法的比较 [J]. *肿瘤防治研究*, 2007, 34(3): 229.
- [8] Mogawa M, Yuasa T, Kimura S, et al. Monitoring luciferase-labeled cancer cell growth and metastasis in different in vivo models [J]. *Cancer Lett*, 2005, 217(2): 243.
- [9] Douma S, Van Lanr T, Zevenhoven. Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB [J]. *Nature*, 2004, 430: 1034.
- [10] Jenkins DE, De Y, Horning YS, et al. Bioluminescent imaging (BLI) to improve and refine traditional murine models of tumor growth and metastasis [J]. *Clinical & Experimental Metastasis*, 2003, 20: 733.
- [11] Liu T, Ding Y, Xie W, et al. An imageable metastatic treatment model of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(13): 3960.

- [12] 孙宝昌, 靳宝锋, 佟冬青, 等. 荧光素酶标记的 BEL-7405 细胞体内外成像及肿瘤动物模型建立[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(1): 1.
- [13] Mocanu JD, Moriyama EH, Chia MC, et al. Combined in vivo bioluminescence and fluorescence imaging for cancer gene therapy[J]. *Mol Imaging*, 2004, 3(4): 352.
- [14] Wilson JB, Weinberg W, Johnson R, et al. Expression of the BNLFl oncogene of Epstein-Barr virus in the skin of transgenic mice induces hyperplasia and aberrant expression of keratin 6[J]. *Cell*, 1990, 61(7): 1315.
- [15] 何迎春, 田道法, 卢芳国, 等. 人突变型 p53 和 EB 病毒 LMP1 转基因小鼠的建立[J]. 第四军医大学学报, 2006, 27(1): 6.
- [16] 张玲, 蓝珂, 姚开泰, 等. 用鼻咽相对特异性调控区建立 N-LMP1 转基因小鼠[J]. 生物化学与生物物理学报, 2003, 35(12): 1072.
- [17] 蓝珂, 乔贵林, 沈新民, 等. 鼻咽癌来源 LMP1 转基因小鼠的制备[J]. 动物医学进展, 2002, 23(1): 69.
- [18] 吕丽春, 何英, 蓝珂, 等. 人多聚免疫球蛋白受体转基因鼠的建立[J]. 第一军医大学学报, 2003, 17(2): 127.
- [19] 张勇, 于斌. 鼻咽癌远处转移 63 例的临床分析[J]. 广西医学, 2008, 30(11): 1668.
- [20] Tanaka H. Differential gene expression screening between parental and highly metastatic pancreatic cancer variants using a DNA microarray[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2003, 22(2): 307.
- [21] 韩春, 王爽, 刘莉, 等. 鼻咽癌细胞肝转移亚株的建立[J]. 南方医科大学学报, 2006, 26(5): 654.
- [22] 黄剑, 唐慰平, 姚运红, 等. 人鼻咽癌自发性高淋巴道转移模型的建立及生物学特性研究[J]. 中华医学杂志, 1998, 78(10): 725.
- [23] 李晓华, 詹志荣, 孙建设, 等. 鼻咽癌细胞株裸鼠肝异位种植瘤肺转移动物模型的建立[J]. 江西医学院学报, 2008, 48(2): 32.
- [24] Leng L, Liu TF, Huang ZX, et al. Establishment of a nude mouse model of nasopharyngeal carcinoma lymph node metastasis and screening of the metastasis-related signature genes[J]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2008, 28(9): 1519.
- [25] 黄江琼, 王安宇, 朱小东, 等. 免鼻咽 VX2 移植瘤模型的建立及其生长转移特性[J]. 中国肿瘤临床, 2009, 36(4): 222.
- [26] 田庆镠, 李玛琳. 人肿瘤细胞悬液裸鼠皮下接种及影响移植成功的因素[J]. 实验动物科学与管理, 2004, 21(3): 47.

(收稿日期: 2009-08-11 修回日期: 2009-11-16)

(上接第 1366 页)

平明显高于 SA 组和对照组, LPA 与 LDL-C 水平呈正相关, 表明 LPA 可能参与了脂质过氧化反应的过程。LPA 系统有望成为冠心病和 AS 防治的新靶点, 冠心病患者 LPA 表达升高的分子机制及如何应用细胞因子对 LPA 系统进行干预尚有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Berg K, Svinland A, Smith AJ, et al. Spontaneous atherosclerosis in the proximal aorta of LPA transgenic mice on a normal diet[J]. *Atherosclerosis*, 2006, 163(1): 99.
- [2] Kishimoto T, Matsuoka T, Imamura S, et al. A novel colorimetric assay for the determination of lysophosphatidic acid in plasma using an enzymatic cycling method[J]. *Clin Chim Acta*, 2003, 333(1): 59.
- [3] Jenkins PJ, Harper RW, Nestel PJ. Severity of atherosclerosis related to lipoprotein concentration[J]. *Br Med J*, 1978, 2(6134): 388.
- [4] Celine P, Marie FS, Philippe V, et al. Lysophosphatidic acid synthesis and release[J]. *Prostaglandin Other Lipid Mediat*, 2001, 64(1-4): 1.
- [5] Yu HX, Terra CG, Kathryn EM, et al. Lysophosphatidic acid as an autocrine and paracrine mediator[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1582(1-3): 270.
- [6] Ceruti DR, Andrew C, Dreyer, et al. Lysophosphatidic acid modulates the healing responses of human periodontal ligament fibroblasts and enhances the actions of platelet-derived growth factor[J]. *J Periodontology*, 2007, 78(6): 201.
- [7] 石伟彬, 杨成明, 方玉强, 等. Cl-通道在溶血磷脂酸引起的血管平滑肌细胞增殖中的作用[J]. 重庆医学, 2008, 37(6): 580.
- [8] Gouni-Berthold I, Sachinidis A. Possible nonclassical intracellular and molecular mechanisms of LDL cholesterol action contributing to the development and progression of atherosclerosis[J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2004, 2(4): 363.
- [9] Rother E, Brandl R, Baker DL, et al. Subtype-selective antagonists of lysophosphatidic acid receptors inhibit platelet activation triggered by the lipid core of atherosclerotic plaques[J]. *Circulation*, 2003, 108(6): 741.
- [10] Wilson AM, Moller HJ, Bailey B, et al. The novel role of C-reactive protein in cardiovascular disease: risk marker or pathogen[J]. *Int J Cardiol*, 2006, 106(3): 291.

(收稿日期: 2009-09-13 修回日期: 2010-01-24)