DOI:10.16016/j.2097-0927.202307077

两种小鼠结直肠癌动物模型的特点比较与应用

冯建华[1],柳向军[1],黄宇君[1,2],屠思雨[1,2],徐 璐[1],徐珍妮[1],雷旭丹[1],黄灵潇[1],阴 骏[1],刘登群[1] 610041 成都,电子科技大学附属肿瘤医院,放射肿瘤学四川省重点实验室,四川省肿瘤医院·研究所,四川省癌症防治中心,四川省肿瘤临床研究中心[1];610075 成都,成都中医药大学基础医学院[2]

[摘要] **目的** 建立炎症诱导和基因突变诱导结直肠癌小鼠模型并比较其特点。**方法** 采用氧化偶氮甲烷(azoxymethane,AOM)联合葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulfate,DSS)建立炎症诱导结直肠癌小鼠模型,使用 KPC 小鼠建立携带 Kras 基因突变和 Apc 条件敲除的转基因结直肠癌小鼠模型。观察小鼠体质量、粪便性状和便血等大体状况,根据建模时间点取材小鼠结直肠标本并观察其成瘤情况。HE 染色及 Ki67 免疫组化评估病理变化。使用 tdTomato 标记 CDX2 阳性上皮细胞。培养并比较两种结直肠癌类器官与正常结肠类器官的差异。**结果** AOM/DSS 建模周期约 50 d,其结直肠癌主要位于远段近肛门处和结肠中段;KPC 模型形成结直肠癌约需 8 d,肿瘤主要位于结肠近段。AOM/DSS 模型中远段肿瘤部位组织结构紊乱,KPC 模型中近段结肠黏膜层增厚且组织紊乱,存在大量未分化上皮细胞。AOM/DSS 模型肿瘤组织内 Ki67 阳性细胞较癌旁组织中明显增多,KPC 模型内近段结肠癌中存在大量 Ki67 阳性肿瘤细胞,远段结肠增殖水平正常。表达 CDX2 的 tdTomato 阳性上皮细胞主要位于结肠近段。两种模型均能培养得到增殖旺盛的肿瘤类器官。**结论** AOM/DSS 结肠癌模型具有慢性炎症所致结直肠癌特点,适用于慢性炎症相关结直肠癌的研究;KPC 模型产生肿瘤的肠段及细胞增殖活性可能与 CDX2 高表达密切相关,适合 Kras 基因突变结直肠癌研究,两种结直肠癌模型可互为补充。

[关键词] 结直肠癌;动物模型;氧化偶氮甲烷;葡聚糖硫酸钠;Kras;Apc
[中图法分类号] R-332; R735.35; R735.37 [文献标志码] A

Comparison of 2 different mouse models of colorectal cancer and their application

FENG Jianhua[1], LIU Xiangjun[1], HUANG Yujun[1,2], TU Siyu[1,2], XU Lu[1], XU Zhenni[1], LEI Xudan[1], HUANG Lingxiao[1], YIN Jun[1], LIU Dengqun[1] [1]Sichuan Clinical Research Center for Cancer, Sichuan Provincial Key Laboratory of Radiation Oncology, Sichuan Cancer Hospital & Institute, Sichuan Cancer Center, Cancer Hospital Affiliated to University of Electronics Science and Technology of China, Chengdu, Sichuan Province, 610041; [2]School of Basic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan Province, 610075, China

[**Abstract**] **Objective** To establish and compare the characteristics of mouse models of colorectal cancer (CRC) induced by inflammation and gene mutation. **Methods** Inflammation-induced colorectal cancer mouse model was established using azoxymethane (AOM) combined with dextran sodium sulfate (DSS). The transgenic CRC mouse model carrying Kras gene mutation and Apc conditional knockout mutation was established by intraperitoneal injection of 100 mg/kg tamoxifen into KPC mice. The changes of body weight, fecal appearance and blood feces were observed during the modeling period. Colonic tissue samples were collected during the time points of CRC modeling, and then embedded and sectioned to observe tumor formation. HE and immunohistochemical staining of Ki67 were used to observe the pathological changes.

[基金项目] 四川省科技计划科技创新人才项目(2023JDRC0019);四川省中央引导地方科技发展专项(2022ZYD0091);四川省卫生健康委员会医学科技重点研发项目(21ZD008)

[通信作者] 刘登群,E-mail:dengqunliu@163.com

2097-0927/Copyright © 2024,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Tandem dimer Tomato (tdTomato) was employed to determine the CDX2 expression in the colonic epithelial cells. CRC crypts were isolated and cultured to get tumor organoids, then compared with healthy colonic enteroids. **Results** It took about 50 d to establish AOM/DSS-induced CRC model, and the visible tumors were mainly observed at the distal colon close to the anus and at the middle section of colon. However, only about 8 d was needed for KPC mice to develop CRC, with the masses mostly locating in the proximal colon. In AOM/DSS model, disordered structure was observed in the distal tumor sites, and the KPC model had thickened and disrupted proximal mucosa and irregularly arranged tissues, with many undifferentiated epithelial cells. There were more $Ki67^+$ proliferative cells in the tumor tissues than the para-tumor tissues in AOM/DSS model, and larger amount of these cells were seen in the tumor in proximal section, but the distal colonic epithelium remained healthy proliferation. In addition, $tdTomato^+$ CDX2-expressing colonic epithelia cells were observed mainly at the proximal colonic epithelium. Both AOM/DSS and KPC mice were capable to culture organoids of CRC. **Conclusion** AOM/DSS-induced CRC model presents the inflammatory process of CRC development, and it is suitable to the CRC study concerning chronic inflammation. The KPC CRC model is due to higher proliferative capacity of proximal colonic segment, in which CDX2 expressing higher than in the distal segment, so it is more convenient to Kras mutation related CRC study. These 2 CRC models can be alternatively adopted depending on different aims.

[**Key words**] colorectal cancer; animal model; azoxymethane; dextran sodium sulfate; Kras; Apc

Supported by the Sci & Tech Innovative Talent Project of Science and Technology Plan of Sichuan Province (2023JDRC0019), the Special Project of Sichuan Central Guiding Sci & Tech Development Program (2022ZYD0091), and the Key R&D Project of Medical Science and Technology of Sichuan Health Commission (21ZD008). Corresponding author: LIU Dengqun, E-mail: dengqunliu@163.com

结直肠癌(colorectal cancer,CRC)是严重危害人类健康的恶性肿瘤,我国结直肠癌的发病率和死亡率分别居第2位和第4位,且发病率仍不断上升[1]。阐明结直肠癌的发病机制是提高结直肠癌防治效果的理论基础,国内外科研人员从临床和基础开展了大量研究,本课题组曾报道人结肠癌细胞株建立类器官模型[2]。由于临床试验具有伦理限制等局限性,目前结直肠癌的基础研究仍需要动物模型来进行。在研究过程中,不同课题组需综合考虑建模周期、成瘤效率和实验成本等多方面因素。

目前结直肠癌的动物模型以小鼠结直肠癌模型应用最为广泛,其中原位结直肠癌小鼠模型较移植瘤模型更能准确模拟结直肠癌的发病过程。氧化偶氮甲烷(azoxymethane,AOM)/葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulfate,DSS)小鼠模型是通过致癌剂AOM联合DSS诱导炎症性结直肠癌的常用模型[3-4],KPC($Kras^{LSL\text{-}G12D}$ APC^{fl} $CDX2^{CreERT2}$)结直肠癌小鼠模型是首个携带Kras、结肠癌腺瘤性息肉(adenomatous polyposis coli,APC)基因突变的结直肠癌动物模型,在他莫昔芬(tamoxifen,TAM)诱导下条件性敲除Apc基因,同时诱导突变型癌基因Kras表达[5-6]。本研究拟比较上述两种结直肠癌小鼠模型在建模周期、成瘤部位和病理特点等方面的差别,同时结合肿瘤类器官培养技术进行了初步应用,为开展小鼠结直肠癌相关研究提供一定的实验理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性C57BL/6J小鼠购自北京华阜康生物科技股份有限公司,6~8周龄,体质量18~22 g。KPC、$CDX2^{CreERT2}$和tdTomato小鼠购自美国杰克森实验室。实验小鼠饲养于四川省肿瘤医院动物房,动物实验相关操作符合实验动物福利和伦理要求。

1.2 主要试剂和仪器

氧化偶氮甲烷(AOM)和他莫昔芬(TAM)购自Sigma公司,葡聚糖硫酸钠(DSS)购自MP Biomedicals公司。胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)购自BI公司。Biocoat Matrigel购自Corning公司,重组兔抗Ki67抗体购自Abcam公司,免疫组化染色试剂盒购自北京中杉公司,小鼠基因型鉴定试剂盒购自Bimake公司。肿瘤类器官培养基为本课题组制备。组织染色图像主要使用蔡司三维光切成像系统和奥林巴斯BX53显微镜拍摄。

1.3 AOM/DSS诱导结直肠癌模型

40只C57BL/6J小鼠用于AOM/DSS模型建立。小鼠称量后经腹腔注射AOM,浓度1 mg/mL,剂量12 mg/kg。间隔1 d将饮用水替换为浓度2%的DSS溶液,饮用6 d、停饮10 d为1个周期,期间监测小鼠

体质量和一般状态,在饮用 DSS 第 2、3 周期结束及第 96 天取材观察成瘤情况[3],绘制该模型小鼠在建模过程中的生存曲线。

1.4 转基因小鼠鉴定

75%酒精消毒剪刀后,采集 KPC 小鼠脚趾放至八连管中,加入 Buffer L 和 Protease plus(50:1)的消化液进行组织裂解提取 DNA。使用裂解产物 DNA 分别加入 CDX2、Kras 和 Apc 基因对应引物进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR),扩增所得 PCR 产物进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳及紫外成像。CDX2、Kras 和 Apc 基因对应片段大小分别为 200、295 bp 和 400 bp。

1.5 KPC 基因突变诱导结直肠癌建模

通过 PCR 鉴定得到符合基因型要求的 KPC 小鼠,待小鼠生长至 6~8 周龄后用于实验。20 只 KPC 小鼠用于建立转基因结直肠癌模型。经腹腔注射浓度 10 mg/mL 的他莫昔芬油溶液,注射剂量为 2 mg/20 g,他莫昔芬诱导 KPC 小鼠产生肿瘤呈剂量依赖,剂量越高,产生肿瘤时间越短,生存期也越短[6]。此后每天监测小鼠一般状态及体质量,诱导后 8 d 取材,绘制该模型小鼠在建模过程中的生存曲线。

1.6 组织取材与染色

颈椎脱臼法处死小鼠,75%酒精消毒腹部皮肤,打开腹腔迅速取出结肠冰浴,使用预冷 PBS 冲洗肠腔,用 4%多聚甲醛固定 1 周后进行组织脱水和石蜡包埋。常规苏木精-伊红(HE)染色,光镜下观察拍照。免疫组化染色时,切片经二甲苯脱蜡至水后,使用 1% EDTA 进行抗原修复,封闭液室温封闭 30 min,兔抗 Ki67 抗体(1:200)4 ℃孵育过夜,PBS 清洗未结合一抗后加入 HRP 标记山羊抗兔二抗,室温避光孵育 30~50 min,清洗二抗后进行 DAB 显色并用苏木精复染细胞核,中性树脂封片后于光学显微镜下观察拍照。免疫荧光染色时,切片脱蜡至水后进行抗原修复,封闭液室温封闭 30 min,兔抗 Ki67 抗体(1:200)4 ℃孵育过夜,PBS 清洗未结合一抗后加入 AlexFluo594 标记的山羊抗兔二抗(1:500),室温条件下避光孵育 30 min,洗去未结合二抗并复染 DAPI,使用抗荧光淬灭封片剂进行封片。$CDX2^{CreERT}$tdTomato 小鼠结肠固定后,经 30%蔗糖脱水后,制备冰冻切片并进行 DAPI 染色,直接观察 tdTomato 自发荧光。

1.7 结直肠癌类器官培养

取材正常小鼠和结直肠癌小鼠的结直肠组织后,迅速于冰浴中分离 AOM/DSS 模型肿瘤组织和 KPC 小鼠近段结直肠癌组织,反复清洗去除粪便残渣和黏附的肠道菌群,剪碎组织样本并于浓度为 5 mmol/L 的 EDTA 溶液中浸泡 30 min。剧烈振荡样本释放结直肠隐窝,根据沉降速度不同收集纯化结直肠隐窝。使用 Matrigel 接种结直肠癌隐窝并进行培养类器官,类器官生长过程中使用 Cytation5 活细胞工作站进行拍照。

1.8 统计学分析

使用 Image J 软件对小鼠结直肠大体形态和组织切片进行形态学测量,使用 GraphPad Prism 9 进行数据统计分析。2 组数据间比较采用 t 检验,$P<0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

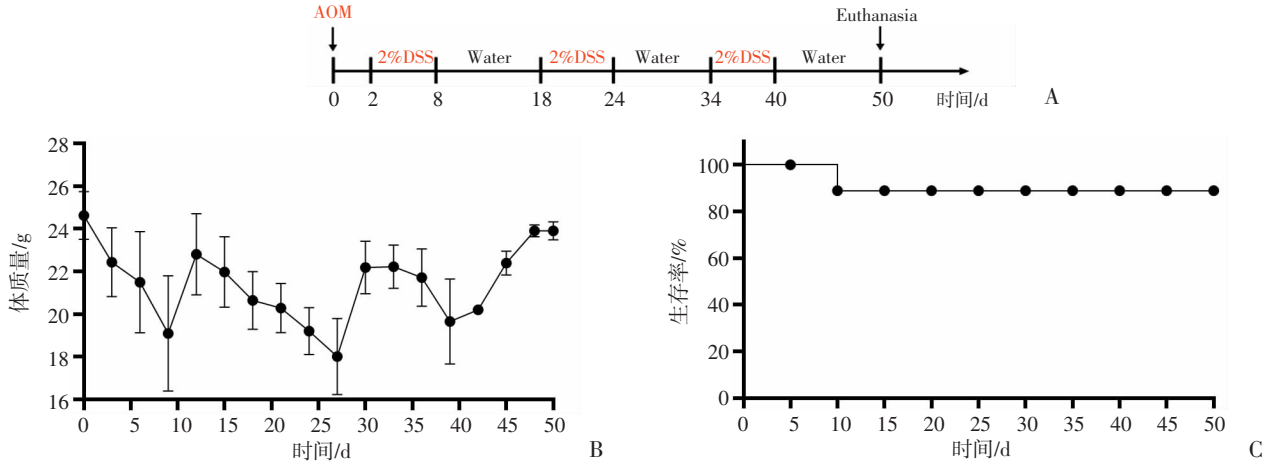
2.1 两种结直肠癌小鼠模型的建模周期、成瘤率及大体状况比较

使用 AOM/DSS 建立炎症诱导结直肠癌小鼠模型时,首先对小鼠腹腔注射 12 mg/kg AOM,第 3 天开始给予小鼠 3 个周期 DSS 反复炎症刺激,在建模开始后 50 d 左右可观察到明显的息肉样结直肠癌(图 1)。对 AOM/DSS 诱导结直肠癌小鼠模型的最长观察时间为 120 d,结果表明每个 DSS 饮用周期内小鼠体质量明显下降,恢复正常饮水后间歇期内体质量逐渐回升。其中约 10%小鼠可在第 1 轮饮用 DSS 结束后死于重度腹泻,可能与 DSS 联合 AOM 短期联合作用可加重腹泻有关,其余处理期间内无小鼠死亡。建模结束后存活小鼠结肠中段和远段均可见数量不等的散在肿瘤组织,终点时总体存活率可达 90%,成瘤比例为 100%。

KPC 小鼠通过诱导基因突变导致结直肠癌,他莫昔芬激活后 8 d 左右即可观察到明显的肠道损伤症状,解剖可见盲肠和近段结肠的肠管明显增粗,因此 KPC 小鼠模型的成瘤时间较 AOM/DSS 模型明显缩短(图 2)。KPC 小鼠在他莫昔芬激活后第 6 天体质量急剧下降,直至出现严重腹泻、血便和体质量降低等恶病质症状而死亡。他莫昔芬注射后,KPC 小鼠的结直肠癌建模成功率为 100%。在本实验所用他莫昔芬诱导剂量下,KPC 小鼠可出现严重稀便,导致 KPC 小鼠在 11 d 时全部死亡。

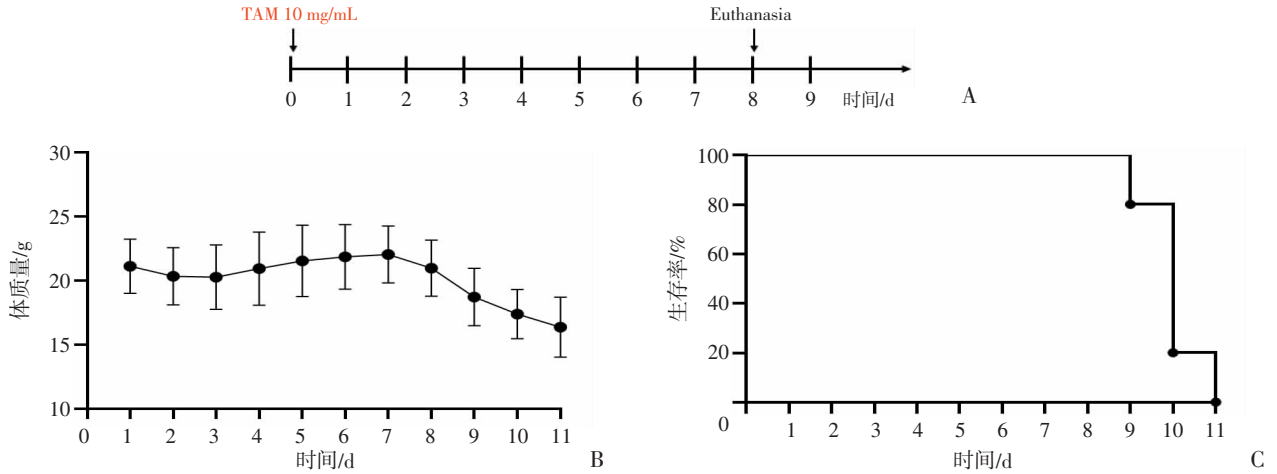
2.2 两种结直肠癌小鼠模型建模期间大体状况比较

与正常小鼠相比,两种模型在建模期间均出现大便性状改变,AOM/DSS 建模组小鼠先后出现稀便及肉眼可见血便,而 KPC 结直肠癌小鼠模型在注射他莫昔芬后很快就会出现稀便,较少出现血便(图 3A)。建模结束后取材时可见与正常小鼠结肠相比,AOM/DSS 建模组小鼠结肠末端膨大,而 KPC 小鼠回肠末端、盲肠及近段结肠外观呈现明显肿胀,结肠组织质地变硬,近段结肠黏膜褶皱更加粗糙,结肠中段和远段形态无明显改变(图 3B)。



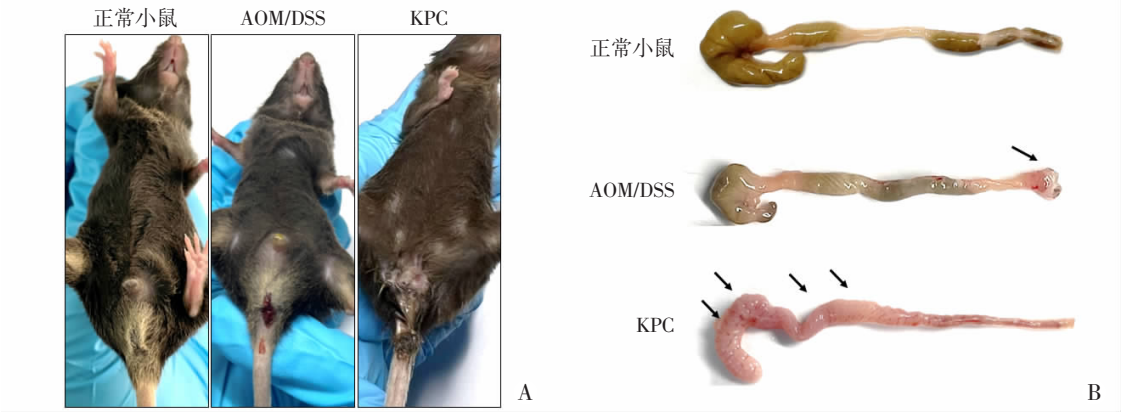
A:AOM/DSS 诱导结直肠癌小鼠模型实验流程图;B:AOM/DSS 诱导结直肠癌过程中小鼠体质量变化曲线;C:AOM/DSS 诱导结直肠癌小鼠模型的生存曲线($n=30$)

图 1 AOM/DSS 诱导小鼠结直肠癌模型



A:他莫昔芬激活 KPC 小鼠诱导结直肠癌实验流程图;B:他莫昔芬激活 Cre 重组酶后小鼠模型体质量变化曲线;C:KPC 小鼠建立结直肠癌期间实验组小鼠生存曲线($n=15$)

图 2 KPC 小鼠建立基因突变结直肠癌小鼠模型



A:正常小鼠、AOM/DSS 建模第 6 天小鼠及 KPC 小鼠建模第 10 天便血情况比较;B:正常小鼠结肠、AOM/DSS 建模第 57 天结肠及 KPC 小鼠激活后第 8 天结肠大体形态 箭头示结直肠癌区域

图 3 AOM/DSS 模型和 KPC 模型所致结直肠癌的大体形态比较

2.3 AOM/DSS 建模期间小鼠结直肠癌成瘤分析

C57BL/6J 小鼠在腹腔注射 AOM 及饮用 DSS 6 d 后出现肉眼可见血便，在饮用 DSS 第 2、3 周期结束后和第 96 天取材小鼠，解剖观察结肠大体及内部。结果证实建模第 25 天，结肠远段类圆形肿瘤，平均长径约 2.15 mm，突向肠腔，表面光滑无溃烂，边界清晰，余肠黏膜未见出血。建模结束后取材，结肠远 2/3 节段可见大小不一的多发结直肠肿瘤，平均长径约 2.08 mm。第 96 天取材可见结肠远段及近肛门处数个结节样肿瘤，部分肿瘤融合，肿瘤平均体积较前期明显增大，平均长径约 2.98 mm，而结肠近段未见明显肿瘤生长（图 4）。

2.4 两种结肠癌模型的组织病理学特征

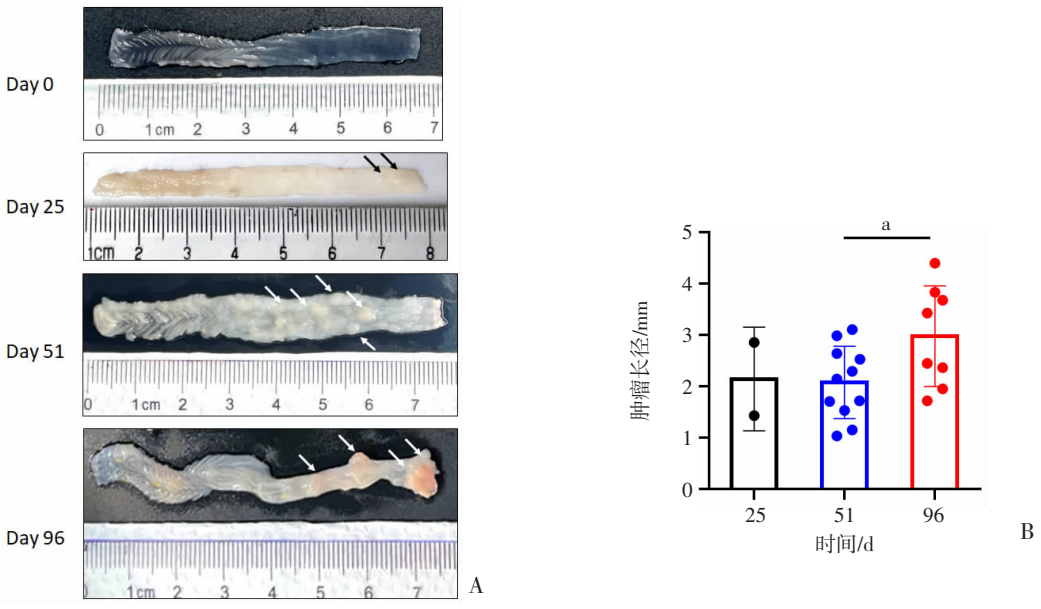
HE 染色观察建模结束后所取结肠组织，结果显示，AOM/DSS 结直肠癌模型小鼠结肠近段黏膜厚度显著增加，隐窝和绒毛弯曲错乱，丧失直立排列结构，杯状细胞比例无显著改变；黏膜底层巢样隐窝结构明显增多。结肠中段黏膜厚度和隐窝结构正常，黏膜下层炎症细胞增多。结肠远段肿瘤部位处组织结构紊乱，隐窝结构破坏极性消失，呈分支状畸形，同时可见大量异型性细胞及炎细胞浸润，高倍镜下核仁增大，多形性，但并未浸润黏膜下层和肌层。KPC 结直肠癌小鼠结肠近段黏膜上皮层明显增厚，绒毛高度明显增加，与小肠绒毛相似，排列基本正常；杯状细胞比例明显减少；黏膜下半部分巢样隐窝明显增多，增生组织未浸润黏膜下层和肌层。结肠中段与近段结肠类似，黏膜层增厚，黏膜底部可见巢样隐窝。结肠远段结构清晰，隐窝形态正常（图 5）。

2.5 两种结直肠癌模型中细胞增殖情况比较

使用 Ki67 免疫组化染色观察结直肠癌模型的细胞增殖情况，结果显示，两种模型中上皮细胞的增殖水平明显升高，其中 AOM/DSS 小鼠 Ki67 染色显示阳性细胞连续排列成典型的梭形隐窝性状，间有阴性的非杯状细胞（图 6），说明以隐窝细胞增殖为主。KPC 结直肠癌小鼠的结肠近段黏膜上皮层 Ki67 阳性细胞连续排列成巢样的隐窝结构（图 6），提示这些新生的隐窝细胞增殖旺盛。

2.6 CDX2 基因在近段结肠中高表达

在成年哺乳动物的胃肠道组织中，CDX2 是一种重要的转录因子，主要表达于肠上皮中，对维持肠上皮细胞的正常形态和功能具有重要作用。KPC 小鼠使用 $CDX2^{CreERT}$ 来驱动 $Kras^{G12D}$ 表达和 Apc 基因敲除，结果发现其肿瘤主要位于盲肠和近段结肠（图 3），因此推测 CDX2 可能并不在全部结肠上皮中表达。使用繁殖所得的 $CDX2^{CreERT}$ tdTomato 小鼠进行谱系示踪，发现 tdTomato 荧光信号主要位于近段结肠，中段和远段结肠的 tdTomato 阳性上皮细胞数量明显减少（图 7）。该结果证实 CDX2 基因在近段结肠组织中高表达。



A：AOM/DSS 诱导结直肠癌不同时间点大体形态　箭头所指部位为肿瘤；B：AOM/DSS 诱导结直肠癌不同时间点肿瘤大小比较
a：$P<0.05$

图 4　AOM/DSS 诱导结直肠癌模型的动态过程和成瘤情况分析

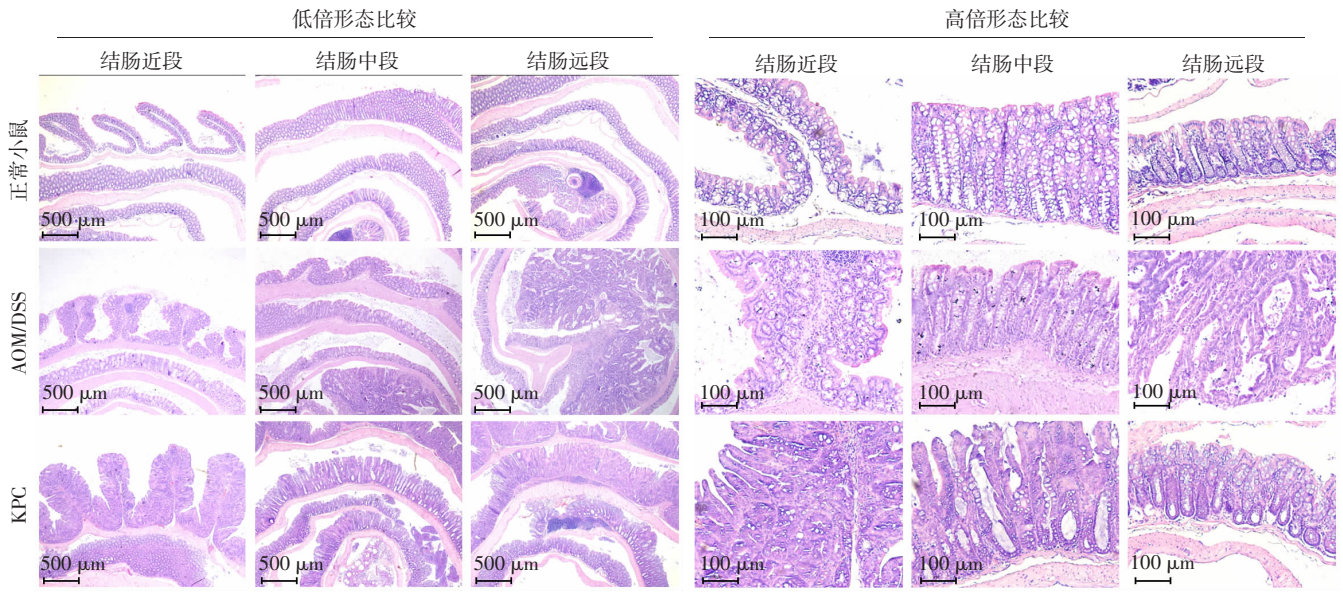


图 5　不同建模方法之间各结肠节段组织形态比较　（HE）

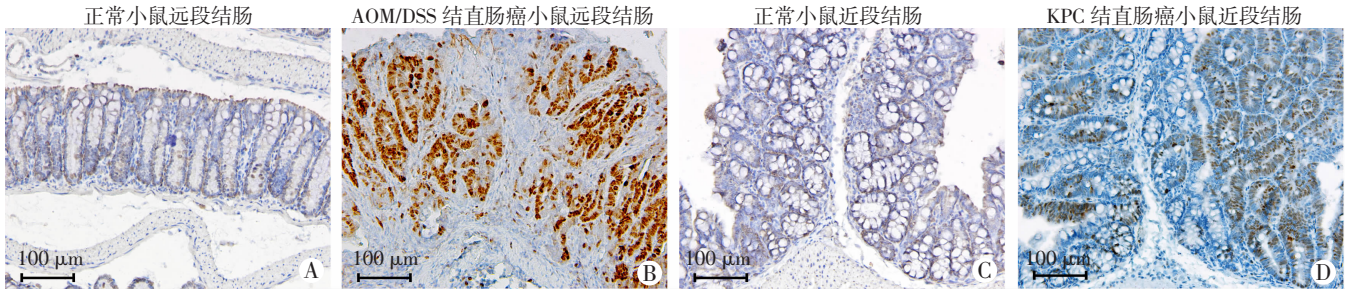
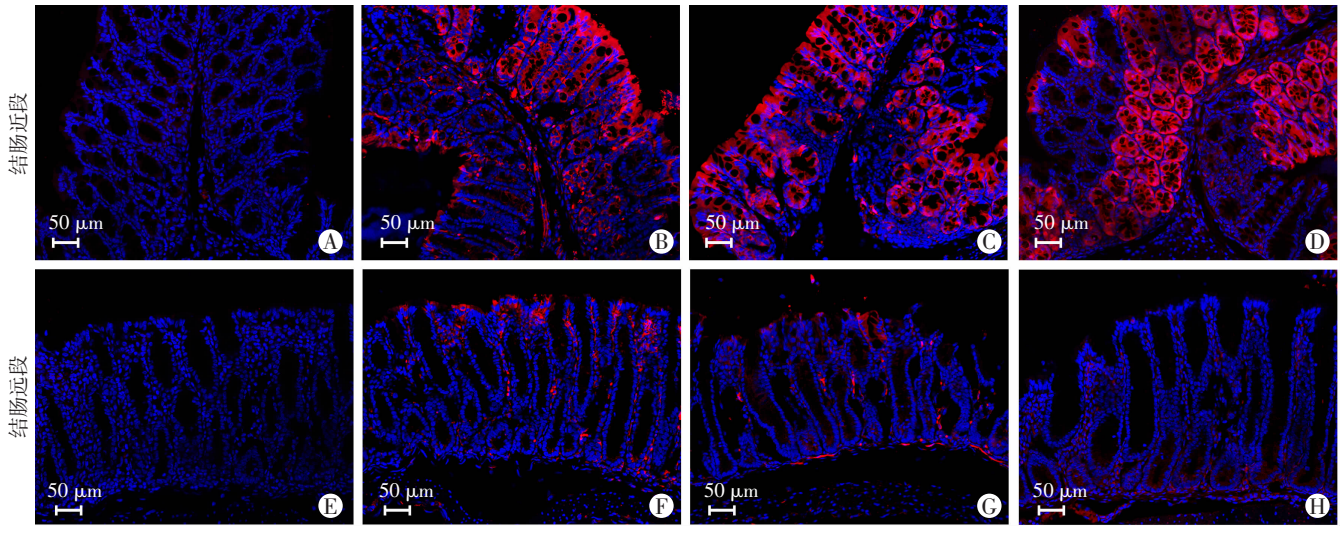


图 6　不同结直肠癌小鼠模型的结肠组织 Ki67 免疫组化染色



A、E：野生小鼠结肠无荧光信号；B、F：腹腔注射他莫昔芬 100 mg/kg 第 3 天；C、G：腹腔注射他莫昔芬 300 mg/kg 第 3 天；D、H：腹腔注射他莫昔芬 300 mg/kg 第 10 天

图 7　荧光谱系示踪证实 CDX2 主要表达于结肠近段组织

2.7 使用两种结直肠癌模型培养肿瘤类器官

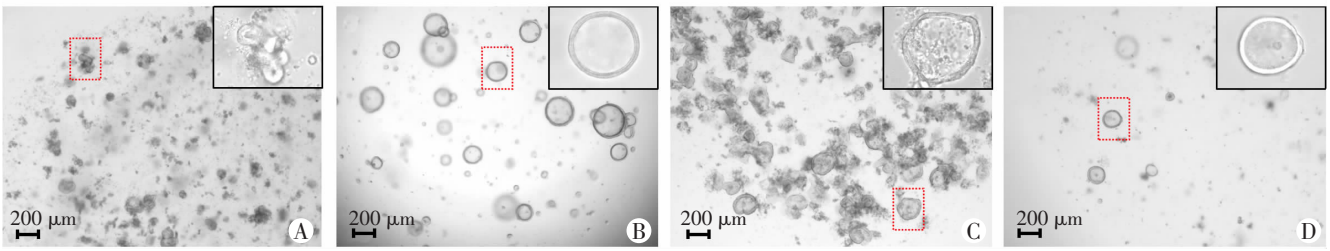
在比较两种结直肠癌小鼠模型差异的基础上,分别提取两种模型小鼠的肿瘤组织进行肿瘤类器官实验。培养过程中,选取正常小鼠结肠的近段和远段组织作为对照,同步培养正常类器官,可见正常小鼠结肠近段和远段来源的类器官在接种后 5 d 形成正常的类器官并伴随有少量隐窝样结构形成,而 AOM/DSS 和 KPC 结直肠癌来源类器官均为圆形外观,且没有隐窝凸起形成(图 8)。

2.8 正常结肠类器官与结直肠癌类器官的组织形态特点和增殖能力比较

利用正常结肠类器官、AOM/DSS 结直肠癌类器官和 KPC 结直肠癌类器官进行石蜡包埋切片,HE 染色显示正常结肠类器官体积较小,可见上皮细胞呈柱状紧密排列,细胞核位于基底部,腔内面细胞质丰富;AOM/DSS 模型和 KPC 模型来源结直肠癌类器官的体积较大,组成细胞较扁平,单层排列,胞核小且细胞质少。进一步使用 Ki67 免疫荧光染色比较不同类器官的增殖能力差异,结果显示,正常结肠类器官中 Ki67 阳性增殖细胞较少,AOM/DSS 和 KPC 来源的结直肠癌类器官含有大量 Ki67 阳性增殖细胞(图 9),提示两种结直肠癌类器官的增殖能力较正常结肠类器官明显增强。

3 讨论

结直肠癌是全球范围内的高发恶性肿瘤,不同地区和种族发病率和发生部位呈现较大差异,其中早发性结肠癌(50 岁之前诊断为结直肠癌)的发病率越来越高,超过 70%的早发性结直肠癌位于结肠远段和直肠[7]。恰当的动物模型是探究不同类型结直肠癌的基础。由于原发性肿瘤模型更接近于临床患者的发病过程,因此以往的移植瘤模型逐渐被原位结直肠癌模型所取代。近年来多种 CRC 原位肿瘤模型研发成功,包括原位炎性结肠癌模型、APC^{min} 模型等[8]。本研究使用的两种小鼠均能建立起稳定的结直肠癌模型。AOM/DSS 模型是构建慢性炎症结直肠癌的标准模型,



A:正常小鼠近段结肠类器官;B:KPC 小鼠近段肿瘤来源类器官;C:正常小鼠远段结肠类器官;D:AOM/DSS 小鼠远段肿瘤来源类器官

图 8 正常小鼠和结直肠癌小鼠类器官形态比较

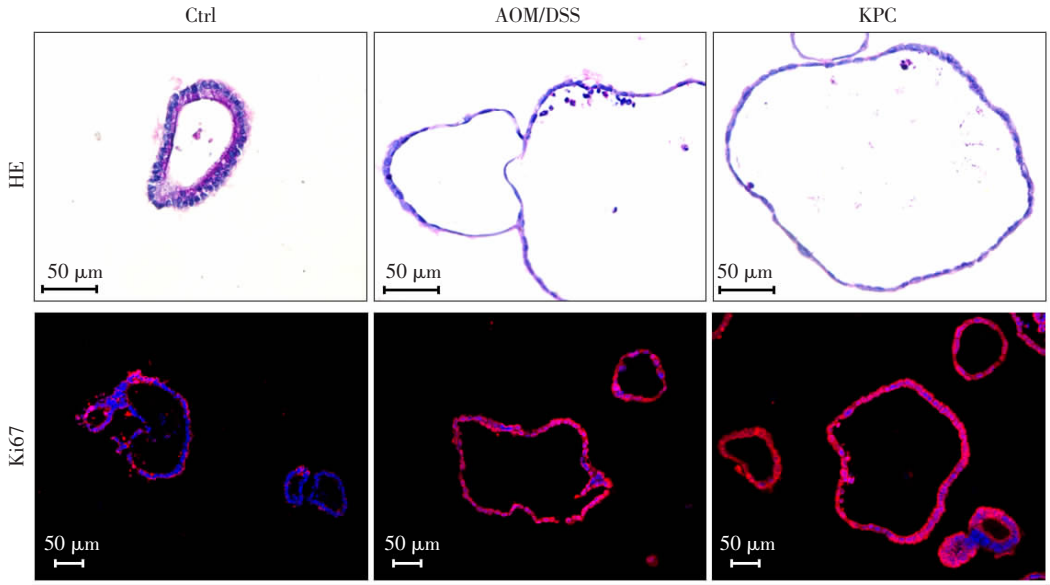


图 9 正常结肠类器官和 AOM/DSS、KPC 结直肠癌类器官 HE 和 Ki67 免疫荧光染色

而 KPC 模型是在条件性敲除 Apc 基因的同时,诱导突变型 Kras 表达,从而极大提高了成瘤效率,也缩短了建模周期。该品系小鼠含有 2 个带有 Apc^{flox} 的等位基因和 1 个 $Kras^{G12D}$ 转基因,是首个携带 Apc 及 Kras 基因突变的结肠癌小鼠模型。KPC 小鼠的结直肠癌发病过程严格受他莫昔芬诱导 Cre 重组酶的控制,为 Kras 和 Apc 突变相关结直肠癌的发病机制和肿瘤微环境及治疗策略等方面研究提供了很大便利。另外,KPC 结直肠癌模型在病理组织学改变、微卫星稳定性及分子特征等多个方面与人类结直肠癌非常相似[5-6]。APC^{min} 模型被称为家族性腺瘤性息肉病(familial adenomatous polyposis,FAP)动物模型,该模型中 APC 双等位基因表达降低,小鼠的小肠容易出现多个管状腺瘤。而在 APC^{min} 激活的基础上给予 DSS 后结直肠可形成多发性肿瘤[8]。KPC 小鼠在双等位 APC 基因敲除的同时进一步诱导 Kras 基因突变表达,将良性肿瘤转变为恶性。本研究比较 AOM/DSS 与 KPC 两种结直肠癌小鼠模型,主要在建模方法、稳定性、肿瘤特点等方面进行了对比,同时观察两种结直肠癌模型来源肿瘤类器官与正常结肠类器官的形态差别,为今后开展结直肠癌研究时如何选择小鼠模型提供了参考和借鉴。

本研究发现 AOM/DSS 模型形成肿瘤时间较长,主要在远段近肛门处和结肠中段,病理染色显示近段结肠黏膜层增厚,隐窝结构错乱,可见巢状隐窝;远段结肠肿瘤处正常组织结构消失,大量来源于黏膜上皮的异型细胞形成腺样结构,炎症细胞突破基底膜浸润至黏膜下层,Ki67 染色可见隐窝细胞增殖显著。而 KPC 模型建模周期明显缩短,肿瘤主要发生在近段结肠,其盲肠和近段结肠肿胀,病理染色显示近段结肠黏膜上皮层增厚,绒毛高度明显增加,杯状细胞明显减少,大量巢样隐窝产生,Ki67 染色示新生隐窝细胞增殖旺盛。由于 AOM/DSS 模型诱导结直肠癌周期较长,因此可在建模不同阶段对应临床患者的低级别上皮内瘤变和高级别上皮内瘤变,可用于不同程度上皮内瘤变的相关研究。

研究发现包括克罗恩病(Crohn's disease,CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis,UC)等炎症性肠病(inflammatory bowel disease,IBD)可增加患结肠癌的风险 2~3 倍,被认为是 CRC 的癌前病变[9-10]。AOM 是一种致癌物,主要通过细胞色素 P450、同工酶 CYP2E1 的代谢,将其转化为甲基嘧啶甲醇,诱导 DNA 中 O^6-甲基鸟嘌呤加合物的致癌物导致 G→A 转变,最终导致肿瘤形成[11]。DSS 是硫酸葡聚糖的聚阴离子衍生物,可溶解于水中,饮用后可造成类似 IBD 的肠道损伤。AOM 与 DSS 联合使用可促使动物产生结肠肿瘤,形成类似人类 IBD 所致的结直肠癌[12-13]。早期 AOM/DSS 模型由于肠道不断损伤,黏膜上皮增生过度出现体积较小的腺瘤样息肉,伴轻中度不典型增生,属于结直肠癌的癌前病变;而在晚期主要为高级别上皮内瘤变及早期浸润癌。本研究发现 AOM/DSS 诱导模型存在明显的炎细胞浸润,可能与 AOM/DSS 能诱导严重的炎症反应有关,解剖小鼠未发现肿瘤向其他脏器转移。AOM/DSS 模型的建模周期较长,在慢性炎症所致结直肠癌发病相关研究中更具优势。从成瘤部位来看,AOM/DSS 模型肿瘤倾向于远段结肠近肛门处,可能与 DSS 所构建的溃疡性结肠炎的病变部位主要从肛门向近段肠道蔓延有关。

统计数据表明,80%散发性结肠癌患者携带 APC 基因突变,而 45%~50%患者携带 Kras 基因突变[14]。抗 EGFR 单克隆抗体如西妥昔单抗和帕尼单抗等能延长 Kras 野生型患者的生存期,但对 Kras 突变患者疗效较差,说明 Kras 基因突变可能对肿瘤生长有显著影响[15]。KPC 模型肿瘤部位的炎细胞浸润较少,其主要原因可能与 KPC 模型是直接通过遗传操作诱导 Kras 突变和敲除 Apc 从而缺乏炎症反应阶段有关。本研究还发现 KPC 模型中结直肠癌病变从盲肠和近段结肠逐渐向结肠远段发展,同时未见 KPC 模型中出现肿瘤向其他脏器转移现象。由于 CDX2 是驱动突变基因表达的唯一因素,因此我们推测其可能与 CDX2 的表达水平相关。研究报道 CDX2 与结直肠癌的发生相关,CDX2 敲除的纯合子小鼠不能存活,而 CDX2 敲除的杂合子小鼠具有多种表型,包括在结肠近段形成多个肠腺瘤样息肉甚至肿瘤[16]。本研究使用 $CDX2^{CreERT}$ tdTomato 小鼠进行谱系示踪实验,发现近段结肠上高表达 CDX2 基因,而中段结肠和远段结肠则很少表达 CDX2,从绒毛顶端向下表达水平逐渐降低,隐窝细胞基本没有表达。他莫昔芬诱导隐窝增生,而且巢样隐窝细胞呈现 CDX2 强阳性。肿瘤发生的肠段以及近段结肠含有大量 Ki67 阳性增殖细胞都与 CDX2 的高表达特点相一致,这一结果很好地解释了为何 KPC 模型中结直肠癌病变主要发生于结肠近段。

综上所述,本研究比较慢性炎症和基因突变所致两种结直肠癌小鼠的建模过程、发病特点,初步探讨两种模型所致结直肠癌的发病机理,证实两种模型均能培养得到肿瘤类器官。该研究为今后开展原位结直肠癌研究提供了新的实验参考,有助于进一步阐明不同类型结直肠癌的发病机理,筛选新型结直肠癌临床治疗药物。

参考文献:

[1] 郑荣寿, 张思维, 孙可欣, 等. 2016年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2023, 45(3):212-220. DOI: 10.3760/cma.j.cn112152-20220922-00647.
ZHENG R S, ZHANG S W, SUN K X, *et al*. Cancer statistics in China, 2016[J]. Chin J Oncol, 2023, 45(3): 212-220. DOI: 10.3760/cma.j.cn112152-20220922-00647.

[2] 欧静, 徐珍妮, 刘登群, 等. 3D培养体系中不同肠上皮细胞株形成肠类器官潜能的比较及应用[J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(1): 31-38. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201907198.
OU J, XU Z N, LIU D Q, *et al*. Potential capacities of different intestinal epithelial cell lines to form enteroids in 3D culture system: comparison and application[J]. J Third Mil Med Univ, 2020, 42(1): 31-38. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201907198.

[3] PARANG B, BARRETT C W, WILLIAMS C S. AOM/DSS model of colitis-associated cancer[J]. Methods Mol Biol, 2016, 1422: 297-307. DOI: 10.1007/978-1-4939-3603-8_26.

[4] NEUFERT C, HEICHLER C, BRABLETZ T, *et al*. Inducible mouse models of colon cancer for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression and lymph node metastasis[J]. Nat Protoc, 2021, 16(1): 61-85. DOI: 10.1038/s41596-020-00412-1.

[5] KAWAGUCHI Y, HINOI T, SAITO Y, *et al*. Mouse model of proximal colon-specific tumorigenesis driven by microsatellite instability-induced Cre-mediated inactivation of Apc and activation of Kras[J]. J Gastroenterol, 2016, 51(5): 447-457. DOI: 10.1007/s00535-015-1121-9.

[6] MAITRA R, THAVORNWATANAYONG T, VENKATESH M K, *et al*. Development and characterization of a genetic mouse model of KRAS mutated colorectal cancer[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(22): 5677. DOI: 10.3390/ijms20225677.

[7] CHAWENGSAKSOPHAK K, JAMES R, HAMMOND V E, *et al*. Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice[J]. Nature, 1997, 386(6620): 84-87. DOI: 10.1038/386084a0.

[8] SINICROPE F A. Increasing incidence of early-onset colorectal cancer[J]. N Engl J Med, 2022, 386(16): 1547-1558. DOI: 10.1056/NEJMra2200869.

[9] TANAKA T. Development of an inflammation-associated colorectal cancer model and its application for research on carcinogenesis and chemoprevention[J]. Int J Inflam, 2012, 2012: 658786. DOI: 10.1155/2012/658786.

[10] LUTGENS M W, VAN OIJEN M G, VAN DER HEIJDEN G J, *et al*. Declining risk of colorectal cancer in inflammatory bowel disease: an updated meta-analysis of population-based cohort studies[J]. Inflamm Bowel Dis, 2013, 19(4): 789-799. DOI: 10.1097/MIB.0b013e31828029c0.

[11] EADEN J A, ABRAMS K R, MAYBERRY J F. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis[J]. Gut, 2001, 48(4): 526-535. DOI: 10.1136/gut.48.4.526.

[12] SOHN O S, FIALA E S, REQUEIJO S P, *et al*. Differential effects of CYP2E1 status on the metabolic activation of the colon carcinogens azoxymethane and methylazoxymethanol[J]. Cancer Res, 2001, 61(23): 8435-8440.

[13] HEICHLER C, SCHEIBE K, SCHMIED A, *et al*. STAT3 activation through IL-6/IL-11 in cancer-associated fibroblasts promotes colorectal tumour development and correlates with poor prognosis[J]. Gut, 2020, 69(7): 1269-1282. DOI: 10.1136/gutjnl-2019-319200.

[14] NEUFERT C, BECKER C, TÜRECI Ö, *et al*. Tumor fibroblast-derived epiregulin promotes growth of colitis-associated neoplasms through ERK[J]. J Clin Invest, 2013, 123(4): 1428-1443. DOI: 10.1172/JCI63748.

[15] BOS J L, FEARON E R, HAMILTON S R, *et al*. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers[J]. Nature, 1987, 327(6120): 293-297. DOI: 10.1038/327293a0.

[16] WU C C, WANG J H, LIN P C, *et al*. Tumor sidedness and efficacy of first-line therapy in patients with RAS/BRAF wild-type metastatic colorectal cancer: a network meta-analysis[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2020, 145: 102823. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2019.102823.

(收稿:2023-07-16;修回:2023-09-04)
(编辑 汪勤俭)