

[文章编号] 1007-385X(2002)04-0300-03

基因修饰小鼠肿瘤模型研究进展

王水良 综述, 傅继梁 审阅(第二军医大学医学遗传学教研室, 上海 200433)

[摘要] 动物模型在肿瘤病因的揭示、发病机理的探索以及治疗措施的评估中有着不可替代的重要作用。继常规转基因之后, 可诱导表达转基因、基因打靶和条件性基因打靶等技术革新及其在肿瘤模型建立中的应用为我们提供了大量能较好模拟人体相应肿瘤的动物模型。而对它们的分析极大地深化了我们对肿瘤生物学行为的认识, 并有助于人们找到攻克肿瘤的办法而造福人类。

[关键词] 肿瘤; 动物模型; 转基因; 基因打靶; 条件性打靶

[中图分类号] R730.23 **[文献标识码]** A

肿瘤是一类严重危害人类健康及生命的重大疾病, 而动物模型在肿瘤病因、发病机理的揭示以及治疗措施的评价中发挥着不可替代的作用。肿瘤动物模型最早源自小鼠自发突变系或经致癌剂诱变而得, 对它们的研究使我们对环境致癌物及其代谢活化机理有了一定的认识; 但自发突变频率在自然状态下通常很低, 而诱变模型也因其不可精确控制性而限制了它们的应用。在过去二十多年里, 随着人们对癌基因的激活和/或抑癌基因失活在肿瘤发生发展中的作用认识日益深入; 以及近年发展起来的在小鼠生殖系引入可诱导或精细调控突变技术的应用, 基于此肿瘤小鼠模型建立工作取得突破性进展, 本文就此作一综述。

1 常规转基因

上世纪 80 年代初发展起来的原核显微注射技术使得我们可以将外源 DNA 直接导入小鼠生殖系以构建转基因动物模型。目的基因在合适启动子驱动下表达可赋予转基因动物新的表型, 通过表型分析可识别基因功能。免疫球蛋白启动子调控的 *c-myc* 在转基因小鼠中的表达导致早期淋巴瘤的发生, 应用哺乳类肿瘤病毒 LTR/*c-myc* 融合基因造成的 *c-myc* 广谱表达转基因小鼠模型中也发现多组织如睾丸、乳腺和淋巴系肿瘤形成。通过不同转基因动物之间的杂交形成的多基因转基因动物, 可以藉以研究不同基因在肿瘤发生发展过程中的协同作用; 同时, 转基因动物也为环境因素与遗传背景相互作用的研究提供了很好的模型。此外, 转基因技术也用于肿瘤抑制研究, 如野生型抑癌基因(wild-type tumor suppressor gene)和 DNA 损伤修复酶 O^6 -甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶基因^[1]的转基因研究等。尽管相关的研究已经很多, 然而其本身固有的缺陷如基因拷贝数的不可控性以及整合位点的随机性还是在一定程度上限制了常规转基因技术的应用, 也增加了表型分析的难度。

2 可诱导表达转基因

常规转基因技术通过特定启动子的选择实现了转基因

的组织特异性表达, 在此基础上, 人们又开发了许多可诱导表达系统用以调控基因的时相表达。反式因子 rTA 与四环素类似物强力霉素结合后可激活四环素操纵子的表达, 而 tTA 与强力霉素结合则起抑制四环素操纵子表达的作用^[2]。这样, tet 操纵子-癌基因: rTA 双转基因小鼠可因强力霉素的摄入而激活癌基因的表达; tet 操纵子-癌基因: tTA 双转基因小鼠则将持续表达癌基因, 直至因强力霉素的摄入而被特异抑制。应用此系统已构建了可诱导性 Hras-G12V 小鼠黑色素瘤^[3]、*c-myc* 可诱导性表达 T 细胞淋巴瘤^[4]以及 bcr-abl 诱导性表达的急性髓系白血病^[5]等肿瘤模型。Fisher 等人^[6]用此系统构建的可逆性非小细胞肺癌模型表明, K-ras 的表达抑制可使瘤体缩小并伴肿瘤细胞凋亡。对 Hras-G12V 小鼠黑色素瘤模型的进一步分析发现, 肿瘤维持的一个关键因素是内皮细胞微环境, 它们从表达癌基因的黑色素细胞而不是 VEGF 接受生存信号。有趣的是, 在上述一些模型中, 有证据表明有些肿瘤细胞生长的维持可不依赖于癌基因的持续表达。这种癌基因依赖性逃逸表型很可能是新的突变所致, 而对这些新突变的鉴定将有助于我们对肿瘤抗治疗机制的了解。

3 基因打靶或基因剔除

1981 年 Evans 等人成功地从小鼠胚胎中分离得到胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES 细胞)并摸索出维持其全能性的体外培养条件, 在此基础上建立了胚胎干细胞技术。随后不久, 同源重组现象被发现并很快用于内源基因的精确修饰, 此即同源重组技术。两项技术的结合即基于同源重组的 ES 细胞打靶也应运而生。

第一个经 ES 细胞打靶技术建立的抑癌基因动物模型是 $p53^{-/-}$ 小鼠^[7]。令人惊讶的是, $p53^{-/-}$ 小鼠表型并不象预期的那样, 它可以正常发育直至成年, 随后的研究发现该品系小鼠易发神经管缺陷。 $p53^{-/-}$ 小鼠自发肿瘤发生早, 且经化学致癌物诱发的肿瘤进展速度明显加快, 这些结果强烈提示 p53 的抑癌功能。除 p53 基因外, 相继建立的抑癌基因剔除

小鼠模型还涉及 Rb, Apc, Nf1 和 Nf2, Brcal 和 Brca2 等基因^[8]。这些模型在应用于抑癌机理探索的过程中,也常有些结果出乎意料。以 Rb^{-/-}小鼠模型为例,虽然因 Rb 缺失而胚胎致死,但在前 12 d 胚胎却能正常发育,提示 Rb 并非在细胞周期进展中绝对必需。而且, Rb 缺乏小鼠好象并不能模拟人视网膜母细胞瘤的发生,因为杂合子 Rb^{+/-}小鼠并无视网膜肿瘤的发生,而是易发垂体肿瘤。这可能是由于人和小鼠之间许多基本的生物学差别所造成。

4 条件性基因打靶

基于普通打靶建立的抑癌基因动物模型通常难以真实再现人体内的分子事件,原因除了前述的人与鼠之间遗传背景不同外;所造成的嵌合体鼠其基因缺失的组织是随机的;在培育纯系鼠的过程中,有些基因补偿效应也常增加了表型分析的复杂性;最关键的一点是许多抑癌基因纯合缺失常易早期胚胎致死,这样就无从分析该基因在成体组织的功能。条件性打靶是基于重组酶能在模式生物中特定组织及特定发育阶段造成基因打靶的一项新技术,它有效地克服了普通打靶的上述缺点,因而也更能真实模拟体内抑癌基因的失活过程。

条件性打靶依赖于位点特异性重组酶对特定靶序列的识别并催化位点间 DNA 的重组,其结果是靶序列间 DNA 被删除或倒位。目前用得最为广泛的是噬菌体 P1 的 Cre 和酵母 F1p 重组酶,它们分别识别 34 bp 的 LoxP 和 48 bp 的 F1t 位点。条件性打靶载体一般在拟剔除的抑癌基因片段两侧装有 LoxP 或 F1t 盒,它通过同源重组置换体内野生型等位基因,造成的纯系小鼠能正常表达该抑癌基因,直至在该小鼠体内引入 Cre 或 F1p 的表达。通过特定启动子的选择可使 Cre 或 F1p 在特定细胞类型表达,该转基因鼠与携带条件性打靶抑癌基因的小鼠交配即可实现重组酶介导的 2 次打靶从而在特定组织或细胞造成目的基因纯合缺失;运用配体可调节的 Cre-雌激素受体融合蛋白系统还可控制 Cre 表达的时间^[9]。也可通过重组腺病毒感染在特定组织引入重组酶瞬时表达。

在 1994 年条件性打靶技术被用于 T 细胞特异性剔除 DNA 聚合酶 β 基因并获得成功之后,抑癌基因动物模型构建方面有垂体特异性 Rb 缺失的垂体腺瘤以及中枢神经系统 Rb 缺失的髓母细胞瘤模型^[10], Nf2 等位基因条件性剔除的雪旺氏细胞瘤模型^[11]、乳腺特异性 Brcal 和 Brca2 缺失的家族性乳腺癌模型^[12-13],以及中枢神经系统 Nf1 缺失的胶质瘤模型^[14]等。值得注意的是,最近有报道认为 Cre 重组酶的持续表达可能引致精子细胞和初级成纤维细胞核型^[15],这可能在一定程度上影响条件打靶肿瘤模型的分析。条件性打靶技术也可被用于癌基因动物模型的构建。在启动子和突变癌基因之间插入两侧翼含 LoxP 位点的转录沉默子,它可经重组酶介导被删除从而激活癌基因的表达,如 Meuwissen 等人^[16]报道的由单拷贝 K-ras-G12V 转基因造成的条件性肺癌动物模型。

5 抑癌基因作用网络模型

抑癌基因按功能可分为看门基因(gatekeepers)和看护基因(caretakers)两大类,看门基因通过抑制肿瘤细胞增殖或促进其凋亡而调控肿瘤的生长;看护基因则通过修复遗传改变以维持基因组的稳定性。看护基因的突变致使细胞全基因组突变频率增高,而突变的积累可能导致原癌基因的激活和/或其它抑癌基因如看门基因的失活进而引发肿瘤。

I 型神经纤维瘤是因 NF1 基因突变而致的遗传性综合征,其特征是易发恶性周围神经鞘肿瘤。NF1^{-/-}小鼠为胚胎致死,杂合子 NF1^{+/-}小鼠低发嗜铬细胞瘤但无人类中常见的恶性肿瘤发生。Cichowski 等人^[17]在研究了 NF1 结合其它抑癌基因突变后发现, NF1^{+/-} p53^{+/-}小鼠在其野生型 NF1 和 p53 等位基因丢失后恶性周围神经鞘肿瘤发生频率大为增高;3 基因突变即 NF1^{+/-} p53^{+/-} Smad3^{+/-}小鼠则不仅肿瘤发生加速,还易发大脑神经外胚层原基肿瘤。p53 是人类肿瘤中突变率最高的抑癌基因,参与 p53 激活的通路主要有两条:其一由有丝分裂信号所触发,即 Myc, Ras 或 E2F-1 等过表达诱导的 ARF 介导 p53 的稳定和激活;另一通路由 DNA 损伤所激发。激活的 p53 作为转录因子调控 p21 等下游靶基因的表达以使细胞休止于 G₁/S 或 G₂/M 限制点,此时细胞进行修复损伤的 DNA,若修复失败则进入凋亡。p53 活性主要通过蛋白稳定性调节,MDM2 与之结合可导致 p53 降解。电离辐射等引致的 DNA 损伤能迅速触发 p53 第 20 位丝氨酸残基的磷酸化使其对 MDM2 的降解不再敏感,研究表明这一过程起中心作用的是另一抑癌蛋白 ATM^[18]。ATM 能磷酸化 CHK2 第 68 位苏氨酸,活化的 CHK2 再使 p53 磷酸化以抑制其与 MDM2 的结合;此外,ATM 也可使 MDM2 磷酸化以抑制 p53 的核转移和降解。Atm^{-/-} p53^{-/-}小鼠肿瘤形成较之 p53^{-/-}或 Atm^{-/-}小鼠均快也说明了二突变间存在协同作用。

6 结语

众多新技术在肿瘤动物模型构建中的应用为肿瘤研究带来革命性的变化。大量肿瘤模型的建立使我们可以深入研究肿瘤生物学行为,如癌基因依赖性、基因组不稳定性和肿瘤微环境等。一个好的肿瘤动物模型与其模拟的人类肿瘤在分子、组织学以及生物学特性方面有许多共同性,但与人类肿瘤存在较大差异的动物模型也不应被一概忽视,因为它们可能在其它方面如肿瘤治疗措施评估中为有用。考虑到肿瘤的发生常常是靶细胞基因和表基因改变的进行性积累与微环境改变相互作用的结果,综合应用文中所述方法构建多个靶分子条件性或诱导性激活或抑制的动物模型应是以后肿瘤模型建立的努力方向。

[参考文献]

- [1] Zhou ZQ, Manguino D, Kewitt K, et al. Spontaneous hepatocellular carcinoma is reduced in transgenic mice overexpressing human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase[J]. Proc Natl Acad Sci

USA, 2001, 98(22): 12566-12571.

[2] Baron U, Bujard H. Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: Principles and advances[J]. *Methods Enzymol*, 2000, 327: 401-421.

[3] Chin L, Tam A, Pomerantz J, *et al.* Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance[J]. *Nature*, 1999, 400: 468-472.

[4] Felsher DW, Bishop JM. Reversible tumorigenesis by Myc in hematopoietic lineages[J]. *Mol Cell*, 1999, 4: 199-207.

[5] Huettnner CS, Zhang P, Van Etten RA, *et al.* Reversibility of acute B-cell leukaemia induced by BCR-ABL1[J]. *Nat Genet*, 2000, 24: 57-60.

[6] Fisher GH, Wellen SL, Klimstra 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.

[7] Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, *et al.* Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors [J]. *Nature*, 1992, 356: 215-221.

[8] Clarke AR. Manipulating the germline: Its impact on the study of carcinogenesis[J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(3): 435-441.

[9] Metzger D, Chambon P. Site- and time-specific gene targeting in the mouse[J]. *Methods*, 2001, 24: 71-80.

[10] Marino S, Vooijs M, van Der Gulden H, *et al.* Induction of medulloblastomas in p53-null mutant mice by somatic inactivation of Rb in the external granular layer cells of the cerebellum[J]. *Genes Dev*, 2000, 14: 994-1004.

[11] Giovannini M, Robanus-Maandag E, van der Valk M, *et al.* Conditional biallelic NF2 mutation in the mouse promotes manifestations of human neurofibromatosis type 2[J]. *Genes Dev*, 2000, 14: 1617-1630.

[12] Xu X, Wagner KU, Larson D, *et al.* Conditional mutation of Brca1 in mammary epithelial cells results in blunted ductal morphogenesis and tumour formation[J]. *Nat Genet*, 1999, 22: 37-43.

[13] Ludwig T, Fisher P, Murty V, *et al.* Development of mammary adenocarcinomas by tissue-specific knockout of Brca2 in mice[J]. *Oncogene*, 2001, 20: 3937-3948.

[14] Zhu Y, Romero MI, Ghosh P, *et al.* Ablation of NF1 function in neurons induces abnormal development of cerebral cortex and reactive gliosis in the brain[J]. *Genes Dev*, 2001, 15: 859-876.

[15] Loonstra A, Vooijs M, Berna Beverloo H, *et al.* Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 9209-9214.

[16] Meuwissen R, Linn SC, van der Valk M, *et al.* Mouse model for lung tumorigenesis through Cre/lox controlled sporadic activation of the K-ras oncogene[J]. *Oncogene*, 2001, 20: 6551-6558.

[17] Cichowski K, Shih TS, Schmitt E, *et al.* Mouse models of tumor development in neurofibromatosis type 1[J]. *Science*, 1999, 286: 2172-2176.

[18] Hakem R, Mak TW. Animal models of tumor-suppressor genes[J]. *Annu Rev Genet*, 2001, 35: 209-241.

[收稿日期] 2002 - 05 - 17

[修回日期] 2002 - 07 - 20

欢迎订阅《癌症》杂志

《癌症》是由中华人民共和国卫生部主管、中山大学肿瘤防治中心(世界卫生组织癌症研究合作中心)主办的肿瘤学专业性核心期刊,国内外公开发行。《癌症》已成为我国肿瘤学界重要的学术论坛,在国内外享有一定的信誉和影响;首批进入中国科技核心期刊、中国生物医学核心期刊、中国肿瘤学核心期刊。据中国科学引文数据库统计的“被引频次最高中国科技期刊 500 名排行榜”,《癌症》一直居国内同类杂志的领先地位;为“中国科学引文数据库”《中国科技期刊(光盘/网络版)》、“中国学术期刊综合评价数据库”来源期刊,并被美国 MEDLINE 系统数据库收录。可见《癌症》具有良好发展前景。

本刊在国内首先开设“快速报道”专栏,对优秀稿实行速审快发,承诺在 3 个月内发表,此举深得作者欢迎。

为了缩短发表周期和提高出版质量,《癌症》2000 年已改为月刊,用进口铜版纸印刷,封面过塑胶装,每期 112 页,随文排印彩色照片,在版式编排上与国际惯例接轨。

《癌症》每月 5 日出版,定价每册 12 元,每年 144 元。欢迎到当地邮局订阅。邮发代号 46-21。如果漏订,可汇款到本编辑部发行组邮购。另外,本刊库存少量 1999 年改版以来各期杂志,若需补订者,也可汇款本刊邮购。

联系地址:广州市东风东路 651 号中山大学肿瘤防治中心内,邮政编码:510060,电话/传真:020-87343336。

欢迎订阅《免疫学杂志》

《免疫学杂志》是由中国免疫学会和第三军医大学主办的、向国内外公开发行的国家级学术刊物。1985 年创刊以来,先后被确定为国家中文核心期刊、中国科技论文统计源期刊、中国科学引文数据库源期刊,并被美国化学文摘(CA)和国内 10 多家重要数据库及权威性文摘期刊作为核心期刊收录。

《免疫学杂志》主要栏目有免疫学进展,基础免疫学,临床免疫学,免疫学技术与方法,综述与讲座,短报道等,适合各级医务人员、医学生、免疫学工作和相关学科的人员阅读。欢迎订阅,欢迎投稿,欢迎刊登广告。

《免疫学杂志》为双月刊,国际流行大 16 开本,全铜版纸精美印刷,每期 80 页。邮发代号:78-32。每期定价 12.00 元,全年 72.00 元。欢迎广大订户前往当地邮局订阅。如错过邮局订阅时间,需要补订 2002 年以前各期的读者可直接与本编辑部联系。

编辑部地址:重庆市沙坪坝区高滩岩;邮编:400038,电话:(023)68752237;联系人:陈菁华,朱健利。