



# SPC-CRE-Kras 双阳性转基因小鼠自发肺部肿瘤模型的建立

高 昆,刘学丽,高 珊,高 凯,董 伟,张 旭,刘 宁,徐艳峰,张连峰

(中国医学科学院 北京协和医学院医学实验动物研究所,卫生部人类疾病比较医学重点实验室,北京 100021)

**【摘要】** 目的 构建一种利用 Cre 重组酶体内低表达诱导 K-ras G12D 在小鼠肺部活化的慢性自发性肺部肿瘤模型。方法 首先构建一种肺脏特异性低表达 Cre 重组酶的 SPC-CRE 转基因小鼠,利用 SPC-CRE 转基因小鼠与 LSL K-ras G12D 转基因小鼠杂交,获得 SPC-CRE-Kras 双阳性转基因小鼠。对4月龄、5月龄、7月龄、9月龄 SPC-CRE-Kras 双阳性转基因小鼠肺部进行取材,固定并进行常规石蜡切片及 HE 染色,镜下观察小鼠肺部病理特征。使用 micro-CT 对7月龄、9月龄 SPC-CRE-Kras 双阳性转基因小鼠肺部肿瘤结节进行检测。结果 获得了 SPC-CRE-Kras 双阳性转基因小鼠,该小鼠在肺组织特异性低表达 Cre 重组酶,并诱导 K-ras G12D 在肺组织的表达,由 K-ras G12D 引起肺组织肿瘤的发生。SPC-CRE-Kras 双阳性转基因小鼠4月龄肺部出现轻度炎症反应,5月龄开始肺部可见散在腺瘤样的结节,成瘤率为100%(雌6/6,雄6/6)。随着月龄增加,小鼠肺腺瘤结节呈增大趋势,病理变化呈进展状态,9月龄时通过 micro-CT 可以检测到肺部少量散在孤立的肿瘤结节。结论 利用肺组织特异性低表达 Cre 重组酶的方式,建立了一种从肺部炎症反应到肺腺瘤进展时程较长的慢性自发性肺部肿瘤小鼠模型,为肺癌发生的研究提供了更长的窗口期。

**【关键词】** Cre/Loxp 重组酶系统; 转基因小鼠; K-ras 基因; 小鼠肿瘤模型

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2013) 07-0011-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2013.007.003

## The establishment of SPC-CRE-Kras double transgenic spontaneous pulmonary tumor mouse model

GAO Kun, LIU Xue-li, GAO Shan, GAO Kai, DONG Wei, ZHANG Xu, LIU Ning, XU Yan-feng, ZHANG Lian-feng  
(Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

**【Abstract】 Objective** To establish a spontaneous pulmonary tumor mouse model in which the K-Ras gene was activated by Cre/loxP recombinant enzyme system. **Methods** SPC-CRE transgenic mice were generated that lowly express lung-specific Cre recombinant enzyme. The SPC-CRE transgenic mice were mated with LSL K-ras G12D transgenic mice to produce SPC-CRE-Kras double transgenic mice. The 4, 5, 7 and 9 month-old SPC-CRE-Kras double transgenic mice were sacrificed and the lung tissues were extracted, fixed, embedded in paraffin and sliced. Hematoxylin-eosin (HE) staining was performed and observed under light microscope. Micro-CT was used to test the pulmonary nodules of SPC-CRE-Kras double transgenic mice. **Results** The SPC-CRE-Kras double transgenic mice were generated. The expression of K-ras G12D in the SPC-CRE-Kras double transgenic mice could be induced by the Cre/Loxp recombinant enzyme system. Mild pulmonary inflammation could be found in the 4 month-old SPC-CRE-Kras double transgenic mice. The sporadic adenoma

[基金项目]国家科技支撑计划课题(2012BA139B02)、国家“重大新药创制”科技重大专项课题(课题编号2011ZX09307-302)。

[作者简介]高昆(1983-),女,博士研究生,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail: gaokun28@126.com。

[通讯作者]张连峰, E-mail: zhanglf@enilas.org。

could be found in the lung of 5 month-old mice, with 100% of the mice developing pulmonary adenoma (female 6/6, male 6/6). The size and progression of the adenoma is time dependent. The pulmonary nodules could be determined by micro-CT in the 9 month-old. **Conclusions** A chronic spontaneous pulmonary tumor mouse model was established by hybridization. Longer progressive period from inflammation to adenoma in this model will provide enough time for the investigation of pulmonary tumorigenesis.

**【Key words】** Cre/Loxp recombinant enzyme system; Transgenic mice; K-ras gene; Tumor mouse model

肺癌是威胁人类健康的第一大肿瘤性疾病<sup>[1]</sup>。根据肺癌临床表现不同一般可以将其分为小细胞肺癌 (SCLC) 和非小细胞肺癌 (NSCLC)。其中, NSCLC 约占 80%, 根据其病理特征分为三类: 腺癌 (20% ~ 40%), 鳞状细胞癌 (20% ~ 40%), 大细胞癌 (10% ~ 20%)<sup>[2]</sup>。虽然肺腺癌的发病率较高, 但因其细胞来源及肿瘤进程均不明确, 使得针对肺腺癌的临床前研究更加困难。因此建立一种高度模拟人类肺腺癌发生的动物模型是十分有必要的。近期研究人员利用重组腺病毒载体表达 Cre 重组酶诱导 K-ras G12D 在小鼠肺部表达, 建立了一种新型的小鼠肺腺癌模型<sup>[3]</sup>, 该小鼠模型可以很好模拟人类肺癌散发性发生的特征, 然而, 使用腺病毒载体的诱发方式建模并不稳定, 并且使用大量病毒诱发基因突变为瞬时过程, 也不能模拟小鼠体内肿瘤慢性自发的过程。本研究的目的是利用转基因小鼠杂交的方式建立一种慢性自发肺部肿瘤的小鼠模型。

## 1 材料和方法

### 1.1 SPC-CRE 表达载体的构建及转基因小鼠的制备

CRE 质粒购自美国 Origene 公司, SPC 质粒由本室构建并保存。以 CRE 质粒为模板, PCR 扩增获得 CRE 全长基因, 然后将该片段插入到我室构建并保存的 SPC 载体中 SPC 启动子的下游, 测序选择正向连接且无突变的 SPC-CRE 转基因载体, 并将其线性化。用显微注射法将线性化的转基因载体 (浓度为 5 ng/L), 注射到 C57BL/6J 小鼠的受精卵中, 用 ICR 小鼠作假孕受体, 制备转基因小鼠 (TE2000-U 显微注射仪)。实验中使用的限制性内切酶、连接酶和 Taq 酶均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。质粒提取及胶纯化回收试剂盒购自德国 Qiagen 公司。SPF 级 C57BL/6J 及 ICR 小鼠购自北京维通利华实验动物有限公司, 许可证号【SCXK(京) 2010-0002】。实验中涉及动物的操作程序已经得到中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用与管理委员会的批准, 批准号为【ILAS-GC-2012-001】。

### 1.2 RT-PCR 检测 SPC-CRE 转基因小鼠肺部 CRE 表达情况

对 2 月龄 SPC-CRE 转基因及同窝阴性 (NTG)

小鼠进行肺部取材, 用美国 Invitrogen 公司的 Trizol 试剂提取肺部组织总 RNA。利用美国 Fermentas 公司 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis 试剂盒的说明书方法将总 RNA 用随机引物逆转录合成 cDNA, 进行 PCR 检测 CRE 的表达情况。

### 1.3 SPC-CRE-Kras 双阳性转基因小鼠的建立及鉴定

将 SPC-CRE 转基因小鼠与美国 Jackson 实验室引进的 LSL K-ras G12D 转基因小鼠杂交, 筛选 SPC-CRE-Kras 双阳性转基因小鼠用于实验。转基因小鼠在 9 ~ 14 日龄时用剪趾法标记, 收集剪下的组织, 用碱裂解法提取基因组 DNA [4], 利用特异性引物通过 PCR 法鉴定子代转基因小鼠的基因型。DNA 模板量为 10 ~ 100 ng, 鉴定 CRE 的上游引物为 5'-TACTGACGGTGGGAGAATG-3', 下游引物为 5'-CTGTTTCACTATCCAGGTTACG-3', PCR 反应条件: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 30 s, 59℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 40 s, 扩增 35 个循环。鉴定 Kras 的上游引物为 5'-AGCTAGCCACCATGGCTTGAGTAAGTCTGCA-3', 下游引物为 5'-CCTTTACAAGCGCACGCAGACTGTAGA-3', PCR 反应条件: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 50 s, 扩增 35 个循环。PCR 反应体系 20 μL。PCR 试剂购自宝生物工程 (大连) 有限公司。引物购自英潍捷基 (上海) 贸易有限公司。

### 1.4 HE 染色检测 SPC-CRE-Kras 双阳性转基因小鼠肺部病理变化

选用 4、5、7、9 月龄 SPC-CRE-Kras 双阳性转基因小鼠及对照组 LSL K-ras G12D 转基因小鼠, 颈椎脱臼法牺牲小鼠, 打开胸腔取出肺脏, 将肺脏组织固定在 10% 中性福尔马林 48h 后进行修块、脱水、包埋、切片、HE 染色, 镜下观察。

### 1.5 Micro-CT 检测小鼠肺部肿瘤结节

利用 Micro-CT 扫描分析 7 月龄和 9 月龄 SPC-CRE-Kras 双阳性转基因小鼠及 LSL K-ras G12D 对照组转基因小鼠肺部肿瘤结节的形成情况。正式扫描标本前, 先扫描标准模体, 进行 CT 值校正。2% 异氟烷, 98% 氧气条件下对小鼠进行呼吸麻醉, 选择胸腔视野进行 CT 扫描。扫描参数: 电压 60 kV, 电流 400 μA, 360° 旋转扫描, 角度增益 1°, 持续旋转扫描 284 s, 有效体素 10.34 μm, 视野 10.58

mm × 10.58 mm, 每只小鼠扫描时间约 30 min。扫描完成后, 使用系统附带 COBRA 软件, 完成体素 10.34 μm × 10.34 μm × 10.34 μm 的扫描区整体结构重建。使用 IRW( Inveon research workplace) 软件进行图像分析。

## 2 结果

### 2.1 SPC-CRE 表达载体的构建及转基因小鼠基因型的鉴定

以 CRE 质粒为模板, PCR 扩增获得 CRE 全长基因, 然后将该片段插入到我室构建并保存的 SPC 载体中 SPC 启动子的下游, 测序选择正向连接的 SPC-CRE 转基因载体(图 1)。

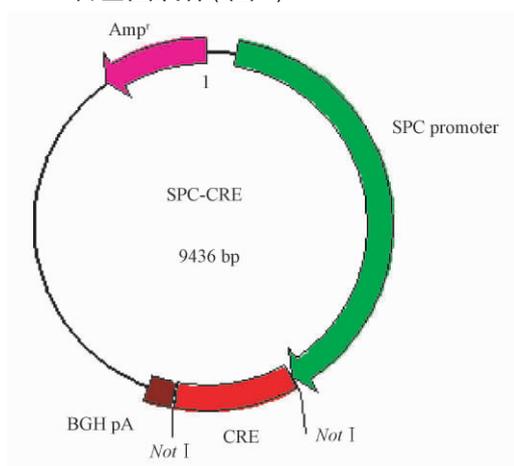


图 1 SPC-CRE 转基因表达载体

Fig. 1 SPC-CRE transgenic expression construct

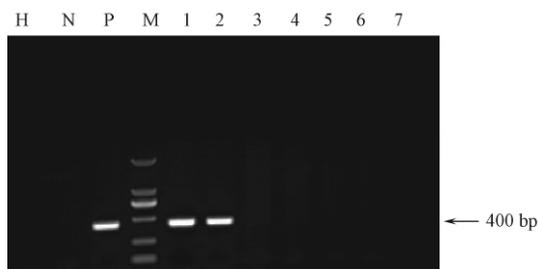
用显微注射法将线性化的转基因载体注射到 C57BL/6J 小鼠的受精卵中, 转入到假孕受体 ICR 小鼠中, 小鼠出生后 9d 剪鼠尾从中提取基因组 DNA, 用 PCR 扩增 CRE 目的基因 400bp 的片段来鉴定 SPC-CRE 转基因小鼠(图 2), 共得到 2 只首建鼠, 均可传代。

### 2.2 SPC-CRE 转基因小鼠肺脏中 CRE 表达量的检测

Trizol 法提取 2 月龄 SPC-CRE 转基因小鼠及同窝阴性(NTG)小鼠肺脏组织总 RNA, 逆转录制备 cDNA, 进行 RT-PCR, 检测 SPC-CRE 转基因小鼠 Founder 1(F1), Founder 2(F2) 和 NTG 小鼠肺脏中 CRE 的表达量。结果发现 CRE 在 2 个转基因品系的肺脏中皆有高表达, 选取其中表达较好的 F1 进行传代并进行后续实验(图 3)。

### 2.3 SPC-CRE-Kras 双阳性转基因小鼠基因型的鉴定

将 SPC-CRE 转基因小鼠与 LSL K<sub>ras</sub> G12D 转基因小鼠杂交, 用 PCR 扩增鉴定子代转基因小鼠的基因型, 筛选同时表达 CRE 和 K<sub>ras</sub> 基因的 SPC-

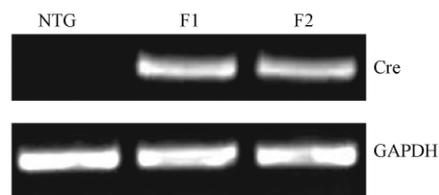


注: H: 空白对照; N: 阴性对照; P: 阳性对照; M: DNA 分子量标记(DL2000); 1, 2: F1 代阳性转基因小鼠; 3, 4, 5, 6, 7: F1 代阴性转基因小鼠。

图 2 PCR 分析 SPC-CRE 转基因小鼠基因型

Note: M: DNA molecular weight marker (DL2000); H: Blank control; N: Negative control; P: Positive control; 1, 2: Positive transgenic mice; 3, 4, 5, 6, 7: Negative transgenic mice.

Fig. 2 Genotyping SPC-CRE transgenic mice by PCR



注: NTG: 同窝阴性; F1: 首建鼠 1 号; F2: 首建鼠 2 号; 内参: GAPDH。

图 3 CRE 基因在转基因小鼠肺脏中的表达

Note: NTG: Nontransgenic; F1: Transgenic mice of Founder 1; F2: Transgenic mice of Founder 2; Loading control: GAPDH.

Fig. 3 The expression of CRE in the lung of the transgenic mice

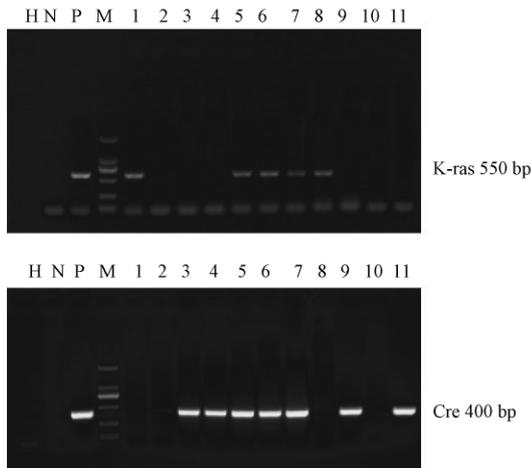
CRE-Kras 双阳性转基因小鼠(图 4)。

### 2.4 SPC-CRE-Kras 双阳性转基因小鼠肺部 HE 染色结果

取 4 月龄 5 月龄 7 月龄 9 月龄 SPC-CRE-Kras 双阳性转基因小鼠(DTG) 和对照组 LSL K<sub>ras</sub> G12D 转基因小鼠(TG), 颈椎脱臼法牺牲小鼠, 打开胸腔取出肺脏, 将肺脏组织固定在 10% 中性福尔马林 48 h 后进行修块、脱水、包埋、切片、HE 染色, 镜下观察肺部肿瘤结节形成情况。结果发现 4 月龄 SPC-CRE-Kras 双阳性转基因小鼠肺部尚未发现肿瘤结节形成, 但肺组织中的血管周围有少量白细胞渗出, 提示有轻度炎症反应(图 5, 彩插 2)。5 月龄开始 SPC-CRE-Kras 双阳性转基因小鼠肺部开始出现腺瘤样结节, 并且随着月龄增加小鼠肺腺瘤样结节呈增大趋势, 病理变化呈进展状态(图 6, 表 1, 彩插 2)。

### 2.5 Micro-CT 成像检测 SPC-CRE-Kras 双阳性转基因小鼠肺部肿瘤

利用 micro-CT 成像检测 7 月龄和 9 月龄 SPC-CRE-Kras 双阳性转基因(DTG) 小鼠及对照组 LSL



注: H: 空白对照; N: 阴性对照; P: CRE/K-ras 阳性对照; M: DNA 分子量标记 (DL2000); 1, 8: LSL K-ras G12D 阳性转基因小鼠; 3, 4, 9, 11: SPC-CRE 阳性转基因小鼠; 5, 6, 7: SPC-CRE-Kras 双阳性转基因小鼠; 2, 10: 阴性转基因小鼠。

图 4 PCR 分析 SPC-CRE-Kras 转基因小鼠基因型

Note: H: Blank control; N: Negative control; P: Positive control of CRE/K-ras; M: DNA molecular weight marker (DL2000); 1, 8: Positive transgenic mice of LSL K-ras G12D; 3, 4, 9, 11: Positive transgenic mice of SPC-CRE; 5, 6, 7: Positive transgenic mice of SPC-CRE-Kras; 2, 10: Negative transgenic mice.

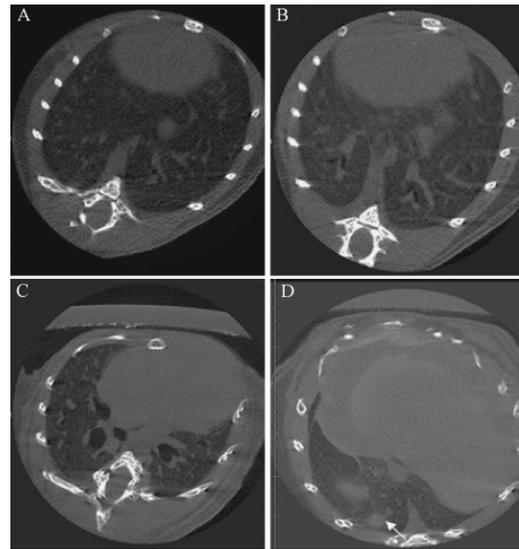
Fig. 4 Genotyping SPC-CRE-Kras transgenic mice by PCR

K-ras G12D 转基因 (TG) 小鼠肺部肿瘤生成情况。虽然通过 HE 染色结果发现 7 月龄 SPC-CRE-Kras 双阳性转基因小鼠的肺部已经可以观察到肿瘤结节,但是利用 micro-CT 成像在 7 月龄 SPC-CRE-Kras 双阳性转基因小鼠的肺部尚不能检测到肿瘤结节 (图 7 A, B)。而在 9 月龄 SPC-CRE-Kras 双阳性转基因小鼠肺部的 CT 检测结果中可以清晰的观察到肺部肿瘤结节 (图 7 C, D)。

表 1 SPC-CRE-Kras 双阳性转基因小鼠时程性病理变化

Tab. 1 Time-course analysis of the stages of tumor progression in SPC-CRE-Kras double transgenic mice

月龄 (age)	肺部病理观察 (Pulmonary pathological observation)
4 月龄	血管周围有少量炎性细胞浸润
5 月龄	可观察到 1 到 2 个腺瘤样结节,边界较清晰,无包膜,瘤细胞排列成腺管状或小梁状,细胞多为立方形,大小较一致,胞浆丰富红染,核圆形,大小一致,位于细胞中央。
7 月龄	可观察到 1 到 2 个腺瘤样结节,肿瘤结节大小较 5 月龄略大,边界较清晰,无包膜,瘤细胞排列成腺管状或小梁状,细胞多为立方形,大小较一致,胞浆丰富红染,核圆形,大小一致,位于细胞中央。
9 月龄	可观察到 2 到 3 个腺瘤样结节,肿瘤结节大小较 7 月龄略大,分散在各肺叶,无包膜,边界较清晰,腺腔样结构不明显,瘤细胞大小不一,形态不规则,大细胞较多,细胞核不规则,大小不等,核浆比例增大。



注: A, 7 月龄 LSL K-ras G12D 转基因小鼠肺部 micro-CT 扫描结果; B, 7 月龄 SPC-CRE-Kras 双阳性转基因小鼠肺部 micro-CT 扫描结果; C, 9 月龄 LSL K-ras G12D 转基因小鼠肺部 micro-CT 扫描结果; D, 9 月龄 SPC-CRE-Kras 双阳性转基因小鼠肺部 micro-CT 扫描结果。

图 7 Micro-CT 扫描对比分析 7 月龄和 9 月龄 SPC-CRE-Kras 双阳性转基因小鼠肺部肿瘤结节

Note: A, Micro-CT scanning for the lungs of the 7 month-old LSL K-ras G12D transgenic mice; B, Micro-CT scanning for the lungs of the 7 month-old SPC-CRE-Kras double transgenic mice; C, Micro-CT scanning for the lungs of the 9 month-old LSL K-ras G12D transgenic mice; D, Micro-CT scanning for the lungs of the 9 month-old SPC-CRE-Kras double transgenic mice.

Fig. 7 The pulmonary micro-CT analysis of 7 and 9 month-old SPC-CRE-Kras transgenic mice

### 3 讨论

小鼠肺癌模型的建立有几种方式,包括:(1)诱发性肺癌模型,例如用氩、砷、黄曲霉素诱发小鼠肺腺癌及支气管肺泡癌。用乌拉坦、乙酰胺基氟诱发小鼠肺腺癌。Wattenberg 等人采用苯并芘成功诱发小鼠形成原发性肺癌,诱癌率达 90% 以上<sup>[5]</sup>。但诱发性肺癌模型的肿瘤发生情况参差不齐,不易同时获得大量病程一致的动物,且肿瘤生长缓慢,实验周期相对较长。(2)移植性肺癌模型,包括同种原位/异位移植肺癌模型或者异种移植肺癌模型,此类模型成瘤率高,易监视肿瘤生长情况,是目前最常用的模型。(3)转基因小鼠肺癌模型,是指运用转基因技术将人肺癌中发现的癌基因导入小鼠体内,或者运用基因敲除技术将抑癌基因敲除来制造肺癌模型<sup>[6-8]</sup>。但在这些传统转基因小鼠中肺部肿瘤的生长并不能完全复制肿瘤散发性生长的微环境。于是,研究人员利用重组腺病毒载体表达 Cre

重组酶诱导 K-ras G12D 在小鼠肺部表达,建立了一种新型的小鼠肺腺癌模型,可以在小鼠成年后诱导,引发肿瘤的发生,可以很好模拟人类肺癌发生的散发性特征,然而使用重组腺病毒载体表达 Cre 的方式在小鼠体内是个瞬时的过程,并不能模拟人体内肿瘤生成慢性自发性的特征。并且,使用腺病毒感染小鼠的稳定性不够,形成肿瘤进程快,个体之间有差异。肺部结节产生个数相对较多,即使使用低病毒滴度感染时也会出现平均 87.5 个肿瘤结节,与人类肿瘤形成一个或较少的数量瘤灶的特点有差距<sup>[3]</sup>。因此建立一种散发性,肿瘤发展进程长,形成一个或少量肿瘤灶的慢性小鼠自发性肺癌模型,对于肺癌发生的研究十分必要。

人类肺癌的发生主要是由于一系列癌基因与抑癌基因的突变引起的。K-Ras 是一种跨膜 GTP 酶信号蛋白,能够调控细胞的增殖,分化及存活。在肺腺癌中 30% 的遗传突变为 K-ras 的活化,在化学诱导或自发性小鼠肺癌中,90% 为 K-ras 的突变。大约 20% 人类肿瘤例如肺腺癌,结肠癌,胰腺癌中存在 K-ras G12D 的突变<sup>[9-15]</sup>。为了研究 K-ras 体内自发突变,研究人员构建了一种新型的包含一个潜在 K-ras G12D 突变位点的小鼠 K-ras G12D,前期研究结果发现该小鼠能够发生多种肿瘤,且早期肺癌发生率为 100%,该小鼠早期可死于肺损害引起的呼吸衰竭,早期致死性影响了研究其肿瘤生成能力<sup>[16]</sup>。

在本研究中我们首先成功构建了肺部特异性低表达 CRE 的 SPC-CRE 转基因小鼠,转基因载体使用的为肺脏特异性的 SPC 启动子,SPC 启动子可以使基因特异性表达于肺泡 II 型细胞<sup>[17]</sup>。而后将 SPC-CRE 转基因小鼠与 LSL K-ras G12D 转基因小鼠杂交,筛选出 SPC-CRE-Kras 双阳性转基因小鼠,并对其肺部组织进行病理学观察。结果发现 4 月龄的 SPC-CRE-Kras 双阳性转基因小鼠肺部尚未形成肿瘤结节,但肺部血管周围出现少量淋巴细胞浸润,提示肺部的轻度炎症反应。5 月龄开始 SPC-CRE-Kras 双阳性转基因小鼠肺部开始出现腺瘤样结节,并且随着月龄增加小鼠肺腺瘤样结节呈增大趋势,病理变化呈进展状态。9 月龄时肿瘤结节可以被 micro-CT 检测到。

本研究中构建的这种 Cre-lox 介导的体内重组诱导 K-Ras 活化的小鼠肺腺瘤模型,经过一定的潜伏期肺部生成 1 至 3 个腺瘤样结节,成瘤率可达 100%,且该肿瘤的形成是一个随着时间进展的慢性自发性过程,能够为肺部肿瘤发生的研究提供更长的窗口期。

(本文图 5,图 6 见彩插 2)

#### 参考文献:

- [1] Kerr, K. M. Pulmonary preinvasive neoplasia [J]. J. Clin. Pathol, 2001, 54: 257-271.
- [2] 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.
- [3] 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): 3243-3248.
- [4] 吕丹, 鲍丹, 董伟, 等. 心脏特异性表达 KCNQ1V180L 转基因小鼠的建立及表型分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(11): 16-22.
- [5] Estensen RD, Wattenberg LW. Studies of chemopreventive effects of myo-inositol on benzo[a]pyrene-induced neoplasia of the lung and forestomach of female A/J mice [J]. Carcinogenesis, 1993, 14(9): 1975-1977.
- [6] Shaw A T, Kirsch DG, Jacks A T. Future of early detection of lung cancer: the role of mouse models [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(13 Pt 2): 4999s-5003s.
- [7] Jonkers J, Berns A. Conditional mouse models of sporadic cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(4): 251-265.
- [8] Fisher G H, 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.
- [9] Lubet RA, Zhang Z, Wiseman RW, et al. Use of p53 transgenic mice in the development of cancer models for multiple purposes [J]. Exp Lung Res, 2000, 26(8): 581-593.
- [10] 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, 15(2001): 3243-3248.
- [11] Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review [J]. Cancer Res, 1989, 49: 4682-4689.
- [12] Croce CM. Oncogenes and cancer [J]. N Engl J Med, 2008, 358: 502-511.
- [13] Rodenhuis S. Ras and human tumors [J]. Semin Cancer Biol, 1992, 3: 241-247.
- [14] Marchetti A, Milella M, Felicioni L, et al. Clinical implications of KRAS mutations in lung cancer patients treated with tyrosine kinase inhibitors: an important role for mutations in minor clones [J]. Neoplasia, 2009, 11: 1084-1092.
- [15] Sasaki H, Okuda K, Kawano O, et al. Nras and Kras mutation in Japanese lung cancer patients: Genotyping analysis using Light Cycler [J]. Oncol Rep, 2007, 18: 623-628.
- [16] Johnson, L., Mercer, K., Greenbaum, D., et al. Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice [J]. Nature, 2001, 410: 1111-1116.
- [17] Thomas Rodt, Christian von Falck, Sabine Dettmer, et al. Lung tumour growth kinetics in SPC-e-Raf-1-BB transgenic mice assessed by longitudinal in-vivo micro-CT quantification [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2012, 31(1): 15.

(修回日期) 2013-04-21