

王峥,苗晋鑫. 黑色素瘤小鼠模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(2): 120-127.

Wang Z, Miao JX. The current state of mouse modeling in melanoma research [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(2): 120-127.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.02.019

黑色素瘤小鼠模型研究进展

王 峥,苗晋鑫*

(河南中医药大学,中医药科学院,郑州 450000)

【摘要】 黑色素瘤占皮肤恶性肿瘤的第三位,由于其发病率和死亡率增加迅速,已成为全球健康负担。与其他恶性肿瘤相比,黑色素瘤治疗的总体成功率仍然是最差的之一。动物模型是研究其发病机制、预防、治疗方案并鉴定潜在治疗靶点及生物标志物的重要工具。黑色素瘤小鼠动物模型可以分为诱发性模型、移植性模型、转基因模型。然而,没有一种黑色素瘤小鼠模型与人类疾病一致。本文总结近 20 年黑色素瘤小鼠模型研究,总结和比较黑色素瘤小鼠模型的制备、优缺点及适用范围,为优化黑色素瘤小鼠模型与药物和疫苗评价提供了有价值的资料,可资借鉴。

【关键词】 黑色素瘤;动物模型;诱发性;转基因;移植性

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 02-0120-08

The current state of mouse modeling in melanoma research

WANG Zheng, MIAO Jinxin*

(Academy Chinese of Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

【Abstract】 Melanoma accounts for a third of all malignant skin tumors. The morbidity and mortality of melanoma have rapidly increased in recent decades, creating a global health burden. The overall success rate of melanoma treatment is poor compared with other malignant tumors. Animal models are an important tool for studying the pathogenesis, prevention, and treatment options of a disease and for identifying potential therapeutic targets and biomarkers. Mouse models of melanoma can be divided into induction, transplantation, and transgenic models. However, no mouse model of melanoma is fully consistent with the human disease. This article summarizes of use of mouse models in melanoma research over the past 20 years. We summarize and compare the preparation, advantages, disadvantages, and scope of application of melanoma mouse models, and we discuss their optimization for the evaluation of drugs and vaccines.

【Keywords】 melanoma; animal model; induced; transgenesis; transplantability

黑色素瘤是皮肤中产生色素的黑素细胞的恶性肿瘤,其特征是高度侵袭和远端器官转移^[1]。黑色素瘤的发病率逐年上升,远超其他癌症^[2]。尽管黑色素瘤治疗方法取得了进展,但预后仍然很差,转移的患者生存期仅 6~9 个月,5 年的生存期不及 5%^[3]。研究肿瘤发病机制、浸润转移及药物的治疗

反应对改善肿瘤患者预后至关重要^[4]。小鼠模型是临床前应用最广泛的动物模型,其为研究黑色素瘤的发病机制、转移及药物评价的重要工具。黑色素瘤小鼠模型可分为诱发性模型、移植性模型、转基因模型^[5-7]。通过紫外线或致癌物诱发小鼠模型,确定黑色素瘤发生的易感性和风险因素。同种

【基金项目】 河南中医药大学科研启动经费(RSBSJJ2018-36);河南中医药大学实验室建设与人才培养(38103009-2020-2);河南省高等学校重点科研项目(21A360021)。

【作者简介】 王峥(1996—),女,硕士研究生,主要从事过敏性疾病及动物模型的研究。E-mail:15038001835@163.com

【通信作者】 苗晋鑫(1986—),男,博士,助理研究员,主要从事转基因动物及肿瘤防治研究。E-mail:jinxin.miao@yahoo.com

移植模型将黑素瘤细胞移植到相同的物种和遗传背景中,由于动物在这种模型中具有功能性免疫系统,用于评估癌症与免疫细胞之间免疫疗法以及相互作用。异种移植模型将人黑素瘤细胞植入免疫缺陷小鼠中,以快速识别造成恶性肿瘤的关键途径。基因表达经过修饰的转基因小鼠来确定黑素瘤的发生机制,用于阐明基因功能并确定治疗的关键靶点。每种模型都揭示了黑素瘤的独特见解,本文总结近 20 年黑素瘤小鼠模型研究,总结和比较分析黑素瘤小鼠模型的制备、表型、优缺点及适用范围,为优化黑素瘤小鼠模型及增进我们对疾病的了解并推动治疗的发展提供科学依据。此外,小鼠黑素瘤模型仍需要更广更深的拓展,对已报道的模型结合其本身特点及多学科知识的叠加运用,建立更加符合人类临床的动物模型并获取更准确的研究结果。

1 诱导性模型

1.1 紫外线诱导的小鼠模型

通过紫外线照射获得的黑素瘤模型被认为是临床上可靠的模型^[8]。UV 在黑素瘤小鼠中为强诱导剂,在黑素存在的情况下,可导致更早和更多的肿瘤形成。除直接诱变作用外,UV 可诱导角质细胞损伤导致暴露于 UV 小鼠的 Myd88 TLR4⁺ 中性粒细胞增加。Myd88/TLR4 中性粒细胞可在体内和体外增强小鼠或人黑素瘤细胞的血管养分,通过影响微环境来增强黑素瘤的产生^[9]。但暴露于紫外线(短期或较低剂量)的成年小鼠表皮是很难形成黑素细胞特征^[10]。最近的研究表明 DNA 损伤需要存在其他失调的基因(通过表观遗传事件)来启动紫外线诱导的黑素生成^[11]。Noonan 等^[12]将 HGF/SF cDNA 表达的小鼠置于日光灯下用不同剂量(6.24 kJ/m² UVB、3.31 kJ/m² UVA、0.03 kJ/m² UVC)进行紫外诱导 15 min。诱导后的小鼠出现皮肤发红,偶有浅表皮脱屑,在组织病理学中观察到小鼠产生的大多数皮肤黑素瘤中具有真皮成分,病变显示具有垂直生长期或浸润性恶性黑素瘤以及淋巴结转移,这些病变与人类患者黑素瘤页面状扩散的表皮内病变特征相似^[13]。这种实验性小鼠模型中黑素细胞瘤病因、组织病理学和分子排列等方面类似于人黑素瘤。单独和协同作用的遗传和环境等危险因素的评估提供了研究

平台,有望利用这种模型有效促进防晒策略和黑素瘤治疗^[14]。但野生型或正常型小鼠一般不易发生 UV 诱导的黑素瘤,因此 UV 诱导的黑素瘤小鼠模型往往需要联合免疫缺陷小鼠,其操作技术较难、成本较高。

1.2 化学诱导

化学致癌物诱导黑素瘤小鼠模型大多采用 DMBA 和 TPA 诱导。DMBA 是一种免疫抑制多环芳烃,其致癌机理是其活性代谢物被 CYP450 代谢成致癌物 1,2-环氧化物-3,4-二醇 DMBA,进而损伤 DNA^[15]。TPA 是通过激活蛋白激酶 C 充当肿瘤启动子,进而使一些生长因子受体磷酸化^[16]。Elmets 等^[17]用 100 μL 的 0.1%、0.5%、1% 的 DMBA 的丙酮溶液涂抹于 6 周龄雌性 C3H/He 小鼠已剃毛的背部皮肤。在 DMBA 涂抹一周后,每周两次将 TPA(40 nmol)施用到相同部位。几周后,小鼠背部皮肤上出现色素沉着斑点。组织学研究表明,小鼠真皮组织中色素细胞积累,某些色素细胞表现出嵌套的形态学模式。此类模型可用于研究阳光对黑素细胞转化为侵袭性的黑素瘤的过程中起的作用。由于小鼠模型的免疫系统功能全面,因此也可以用于研究免疫治疗策略。但是,化学诱导黑素瘤小鼠模型缺乏与人类疾病的临床相关性。

2 移植性模型

移植模型是目前应用最多的肿瘤模型,即用肿瘤组织或细胞(动物或人)移植到动物体内所形成的肿瘤动物模型^[18]。我们根据移植来源,即同种移植模型和异种移植模型进行总结分析(表 1)。

2.1 同种移植模型

同种移植模型是将小鼠黑素瘤细胞接种到具有相同遗传背景的小鼠中获得小鼠黑素瘤模型^[19]。此模型包括 ICR 小鼠的 Harding-Passey 黑素瘤模型、DBA 小鼠的 S91 黑素瘤模型、C57BL/6 小鼠的 B16 黑素瘤模型,其中 C57BL/6 小鼠的 B16 黑素瘤是最常用模型^[20]。同种移植模型具有免疫能力,可通过黑素细胞与免疫细胞之间固有的相互作用来研究黑素瘤与微环境的关系。然而,该移植模型的原发肿瘤出现与转移发生之间时间间隔短,不利于药物药效研究;且肿瘤细胞为鼠源,与人类肿瘤有一定的差异^[21]。

表 1 黑色素瘤小鼠动物模型比较
Table 1 Comparison of mouse animal models of melanoma

动物模型 Animal model	优点 Advantages	缺点 Disadvantages	适用范围 Application	参考文献 References
诱导性模型 Induce model				
紫外线诱发的黑色素瘤小鼠模型 UV-induced melanoma mouse model	恶性黑色素瘤和淋巴结转移;模型类似人类皮肤 Malignant melanoma and lymph node metastasis; The model resembles human skin	病变模型部分不符合人类黑色素瘤发展模式 The lesion model partly does not conform to the human melanoma development model	可用于评估遗传、环境等方面的影响程度 Assess the genetic and environmental impact	[8-14]
化学物质诱导的黑色素瘤小鼠模型 Chemical-induced melanoma mouse model	实验成本低,操作简单 Low experiment cost, Simple operation	病变模型与人类黑色素瘤的临床相关性较少 The lesion model has less clinical relevance to human melanoma	可用于研究 UV 对黑色素瘤发生发展进程的影响 Used to study the effect of UV on the occurrence and development of melanoma	[15-17]
移植性模型 Portability model				
C57BL/6J 小鼠移植 B16-OVA 黑色素瘤细胞模型 C57BL/6J mouse transplanted B16-OVA melanoma cell model	肿瘤发生时间可控;实验材料易获得;操作简便 Controllable tumor onset time; Easy access to experimental materials; Simple operation	细胞为鼠源,与人类病理有差异;肿瘤发生与转移时间间隔短 The cells are of mouse origin, which is different from human pathology; The interval between tumor occurrence and metastasis is short	可用于肿瘤与免疫研究 Used for tumor and immune research	[22-24]
C57BL/6 小鼠不同注射方式接种 B16F10 细胞 C57BL/6 mice were inoculated with B16F10 cells by different injection methods	与人类黑色素瘤临床转移相似,操作简单,重现性好;尾静脉注射可建立肺部肿瘤转移模型 Similar to the clinical metastasis of human melanoma, simple operation and good reproducibility; Tail vein injection can establish lung tumor metastasis model	细胞为鼠源,与人类病理有差异 The cells are of murine origin and differ from human pathology	可用于转移研究 Metastasis studies	[25-27]
CDX 模型 CDX model	保持原肿瘤的组织学和生物学特征;高转移特性稳定表达 Maintain the histological and biological characteristics of the original tumor; High transfer characteristics stable expression	细胞为鼠源,与人类病理有差异;可能失去某些转移促进标志物 The cells are of murine origin and differ from human pathology; Some transfer promotion markers may be lost	可用于转移、侵袭研究 Metastasis and invasion research	[32-35]
PDX 模型 PDX model	与人类临床特征相似度高;模型可维持肿瘤异质性;模型寿命长 High similarity with human clinical features; The model can maintain tumor heterogeneity; Long model life	实验成本高;基质替代;移植率可变;免疫细胞和系统缺乏及受损 High experimental cost; Matrix replacement; Variable transplantation rate; Lack and damage of immune cells and system	可用于新药及治疗方法研究 New drugs and treatment methods research	[36-39]
转基因模型 Transgenic model				
<i>Lum</i> ^{-/-} 基因敲除小鼠 <i>Lum</i> ^{-/-} gene knockout mice	Lumican 可促进黑色素瘤细胞粘附,抑制其迁移能力 Lumican can promote melanoma cell adhesion and inhibit migration ability	成本较高,对生殖能力有影响 Higher cost; Impact on reproductive capacity	可用于基因与免疫细胞研究 Used for genetic and immune cell study	[44-45]

2. 1. 1 同种移植皮下模型

将 C57BL/6J 小鼠皮下移植 5×10^5 的 B16-OVA 黑色素瘤细胞,成功建立黑色素瘤皮下移植瘤模

型,用于评价 VSV-GP-GFP 的治疗效果^[22]。姚香利等^[23]分别采用从小鼠中提取原代肿瘤细胞及体外培养的 B16 细胞植入 C7BL/6 小鼠体内,接种后小

鼠均出现了精神萎靡、食物摄入量减少、毛发粗糙等特征。该研究表明,原代细胞接种的小鼠黑色素实体瘤生长速度较快,成瘤率较高,可用于体内筛选和评价特定化合物抗肿瘤活性。Soica 等^[24]对 8 周大的 C57BL/6J 雌性小鼠皮下接种 B16A5 细胞,并给予 GCDG 复合物治疗。研究发现,治疗组在肿瘤体积和重量方面明显降低。组织病理观察发现,未治疗组肿瘤病变较重,具有高度增殖性。B16A5 细胞系是可导致色素沉着过度的彩色鼠黑色素瘤细胞类型之一,可引起小鼠模型产生红斑。因此,此模型也可用于研究皮肤血红蛋白水平与肿瘤发展的相互关系。

2.1.2 同种移植转移模型

孟星君等^[25]比较了尾静脉注射、腹腔注射和皮下注射等不同方式给 C57BL/6 小鼠接种 B16 F10 细胞,结果发现只有尾静脉注射方法接种肿瘤的小鼠出现了肺部转移现象。Gheorgheos 等^[26]向 C57BL/6 小鼠腹膜内接种 B16 黑色素瘤细胞,接种后小鼠的皮肤、肺、肝和脾等不同器官出现肿瘤转移现象。皮肤病理学显示肿瘤由圆形和椭圆形的肿瘤细胞组成。肺部血管出现大量肿瘤增殖并伴随支气管炎,肝出现了中度瘀滞和点状肿瘤。因此不同接种部位通常会改变肿瘤的生长特性^[27]。此小鼠模型与人类黑色素瘤临床转移十分相似,操作简单,重现性好,可用于评估药物抗黑色素瘤转移作用。但与人类黑色素瘤相比,小鼠细胞系的黏附蛋白和生长因子有较大不同,因此无法完全代表人类疾病^[21]。

2.2 异种移植模型

异种移植模型是将人类的肿瘤细胞或组织移植入免疫缺陷型实验动物体内^[28]。此模型一般采用免疫缺陷型小鼠,例如无胸腺裸鼠、CB17-SCID 小鼠、NOD/SCID 小鼠、NSG 小鼠。一般来说,免疫缺陷程度越高,成瘤性越好。癌症的相关研究中,人源细胞系异种移植 (cell-line-derived xenograft, CDX) 模型和患者肿瘤组织异种移植 (patient-derived xenograft, PDX) 模型已得到广泛应用^[29-30]。异种移植模型的建立依赖于受体动物免疫功能的缺失。异种移植的优势在于肿瘤与皮肤转移发展时间较长,允许人类黑色素瘤细胞与鼠基质、淋巴管相互作用,便于评估肿瘤的生长行为及抗癌药的体内反应。但是,这类模型有一些限制,因为小鼠免疫功能低下,不能用于检查免疫疗法的功效^[31]。

2.2.1 CDX 模型

将 5×10^6 的人 A375 黑色素瘤细胞皮下注射 NOD/SCID 小鼠腹侧的双侧,成功构建黑色素瘤 CDX 模型,用于评价 VSV-GP-GFP 的治疗效果^[32]。Liang 等^[33]向无胸腺裸鼠皮下接种人 A375 黑色素瘤细胞,并给予伊曲康唑口服溶液治疗。研究发现,伊曲康唑可以抑制肿瘤细胞增殖和肿瘤扩散。Gowda 等^[34]将 1×10^6 的 UACC 903 细胞或 1205 Lu 细胞皮下注射 4~6 周龄雌性 Athymic-Foxn1nu 裸鼠,并给予 CelePluM-777 治疗。研究发现, CelePluM-777 可通过 COX-2 和 STAT3 协同抑制异种移植的黑色素瘤肿瘤生长并对其它细胞无毒性。Hubmann 等^[35]采用具有 BRAF V600E 突变和 CDKN2A 外显子 2 缺失的黑色素瘤细胞系 518A2,皮下接种雌性无胸腺裸鼠,建立异种黑色素瘤小鼠模型并给予胶质毒素治疗。小鼠治疗后发现肿瘤体积明显减小并发现胶质毒素治疗恶性肿瘤与 NOTCH2 相关。

2.2.2 PDX 模型

Hoffman 等^[36]将 75 岁女性患者胸壁中 BRAF-V600E 突变片段的黑色素瘤组织移植到裸鼠的胸壁以模仿从患者身上切除的部位。此模型是通过将人类肿瘤组织异种移植到免疫功能低下的小鼠体内而开发的,以解决各种恶性肿瘤的病因和药物研究。模型由于可以维持肿瘤异质性、基因维持,整体通路活性和突变状态的能力及较长模型寿命,因此可以发展为大型临床试验样研究来研究新药和抗癌疗法^[37]。Yan 等^[38]将 93 个新鲜的患者肿瘤组织切成 $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$ 碎片的大小,皮下接种 6 周大的 NOD/SCID 雌性小鼠,建立 PDX 模型。实验结果发现,模型成功植入率为 26.9%,保留了病人的肿瘤组织学和遗传学特征,可模拟溃疡状态对人类黑色素瘤预后的影响。通过优化方法,PDX 模型可以保留突变特征并保留其亲代肿瘤对应物的组织学特征,应将这些模型视为其他临床前模型的补充并用于开发个性化靶向疗法。研究发现肿瘤样品的来源和原发肿瘤的临床分期是成功建立 PDX 模型的两个重要因素。然而,此模型移植后的潜伏期长,连续传代后鼠基质被人类基质替代,移植率可变,免疫系统受损,有移植物抗宿主病的可能性以及某些免疫细胞功能的缺乏^[39]。

3 转基因小鼠模型

人类黑色素瘤中已发现许多遗传和表观遗传异

常^[40-41]。致癌基因或抑癌基因的突变导致肿瘤的发生和发展。小鼠基因编辑技术较成熟,容易获得基因工程小鼠。可以通过异位表达癌基因,引入特定的致癌突变或灭活肿瘤抑制基因来对小鼠进行转基因黑色素瘤模型的构建。转基因小鼠对黑色

素瘤发生的分子途径的理解有重要意义^[42]。此外,转基因小鼠是可靠且可重现的模型,用来评估受损基因对黑色素瘤生物学的影响。此类模型较多,本文主要探讨以下几种常用模型,并对其病理特征、稳定性及造模时应注意的问题进行总结(表 2)。

表 2 黑色素瘤小鼠模型病理表现、模型稳定性及注意事项总结

Table 2 Summary of pathological manifestations, model stability and precautions of melanoma mouse models

动物模型 Animal model	病理表现 Pathological manifestations	模型稳定性 Model stability	造模注意事项 Precautions for modeling	参考文献 References
诱导性模型 Induce model				
紫外线诱发的黑色素瘤小鼠模型 UV-induced melanoma mouse model	皮肤发红、表皮脱屑;垂直生长期或浸润性黑色素瘤;淋巴转移 Skin redness; Epidermal desquamation; Vertical growth phase or invasive melanoma; Lymphatic metastasis	易形成黑色素细胞痔,特定条件下形成黑色素瘤 Easy to form melanocyte hemorrhoids, formation of melanoma under certain conditions	应选用免疫缺陷小鼠;成年和一般小鼠不易造模 Use immunodeficient mice; Adult and general mice are not easy to model	[8-14]
化学物质诱导的黑色素瘤小鼠模型 Chemical-induced melanoma mouse model	色素斑点沉着、色素细胞积累并出现嵌套模式 Pigmentation; Pigment cells accumulate and appear in a nested pattern	稳定性良好 General stability	可结合其他造模技术,减少黑色素瘤发展的潜伏期 Combine with other modeling techniques, reduce the incubation period of melanoma development	[15-17]
移植性模型 Portability model				
C57BL/6J 小鼠移植 B16-OVA 黑色素瘤细胞模型 C57BL/6J mouse transplanted B16-OVA melanoma cell model	精神萎靡,食物摄入量减少,毛发粗糙;肿瘤重量增加,高度增殖 Listless; Reduced food intake, Rough hair; Increased tumor weight; High proliferation	成瘤率高,模型稳定 High tumor formation rate; Model stable	接种部位不同会影响肿瘤的生长特性 Different inoculation sites will affect the growth characteristics of tumors	[22-24]
C57BL/6 小鼠不同注射方式接种 B16F10 细胞 C57BL/6 mice were inoculated with B16F10 cells by different injection methods	肿瘤转移至其它器官;肺部炎症;肝出现点状瘤 Tumor metastasis to other organs; Lung inflammation; Punctate tumors in the liver	成瘤率高,模型稳定 High tumor formation rate; Model stable	接种部位不同会影响肿瘤的生长特性 Different inoculation sites will affect the growth characteristics of tumors	[25-27]
CDX 模型 CDX model	黑色素瘤重量增加、体积增大 Melanoma weight gain; Increased tumor size	成瘤率高,模型稳定 High tumor formation rate; Model stable	选择合适的致瘤细胞;选择适宜的免疫缺陷小鼠类型 Choose the right tumor cells and immunodeficient mice	[32-35]
PDX 模型 PDX model	黑色素瘤重量增加、体积增大 Melanoma weight gain; Increased tumor size	成瘤率高,模型稳定 High tumor formation rate; Model stable	选择合适的致瘤细胞;选择适宜的免疫缺陷小鼠类型 Choosing the right tumorigenic cells and immunodeficient mice	[36-39]
转基因模型 Transgenic model				
<i>Braf</i> ^{V600E} 转基因小鼠 <i>Braf</i> ^{V600E} transgenic mice	局灶型转移黑色素瘤;真皮中黑色素瘤浸润到皮下组织;肿瘤易扩散至淋巴结 Focal metastatic melanoma; Melanoma in the dermis infiltrates into the subcutaneous tissue; The tumor easily spreads to the lymph nodes	成瘤率高,模型稳定 High tumor formation rate; Model stable	选择合适的基因改变模式 Choose the right genetic modification model	[52-53]

3.1 *Lum*^{-/-} 基因敲除小鼠

Lumican 是一种富含亮氨酸的小蛋白聚糖 (small leucine-rich proteoglycan, SLRP), 为胶原原纤维形成的关键调节剂。黑色素瘤中 Lumican 表达降低与浸润相关^[43]。Chakravarti 等^[44]利用 BamHI 建立的克隆衍生物导入胚胎干细胞, 建立 *Lum*^{-/-} 转基因小鼠。此小鼠模型证明 Lumican 是黑色素瘤肿瘤生长的内源性抑制剂, 可促进黑色素瘤细胞粘附, 同时抑制其迁移能力^[45]。该模型可提供与肿瘤发生和转移相关机制及可见性肿瘤病变的进展, 以及确定负责的黑色素瘤进展的基因。

3.2 *Tyr::N-RasQ^{61K}* 转基因小鼠

Ackerman 等^[46]使用突变的人 *N-RasQ^{61K}* 和 SV40 剪接以及聚腺苷酸化序列生成 *Tyr::N-RasQ^{61K}* 构建体, 并注射到卵母细胞中, 建立 *Tyr::N-RasQ^{61K}* 转基因小鼠。研究发现, 小鼠具有表皮增生, 过度角化和黑色素沉积等特征并伴随有肺、肝及淋巴结肿瘤转移。当 *Tyr::N-RasQ^{61K}* 转基因小鼠进入到 *Ink4a / Arf-null* 背景时, 能明显促进黑色素瘤的发生。这是由于 INK4a/ARF 基因功能失活是人类黑色素瘤的最常见因素之一, 其编码产物为 P16INK4a 和 P19ARF^[47-48]。但只有当缺乏 P16INK4a 和保留 P19ARF 的小鼠才显示出致癌物对转移性黑色素瘤的易感性^[49-50]。转基因小鼠中的黑素细胞中 H-ras 基因突变, 可促进黑素细胞的增生、皮肤色素沉着。在 *Tyr::N-RasQ^{61K}* 转基因小鼠中抑制 INK4a/ARF 活性可促使结节性黑色素瘤的产生^[51]。

3.3 *Braf^{V600E}* 转基因小鼠模型

Dhomen 等^[52]使用 LoxP-stop-LoxP (LSL)/Cre 重组酶技术从内源性 *Braf* 基因中诱导 *BrafV600E* 表达, 建立 *BrafV600E* 转基因黑色素瘤小鼠模型。*BrafV600E* 表达可诱导小鼠形成由色素上皮样或树突状黑素细胞组成的痣, 其中大约有 70% 的 *BrafV600E* 小鼠会发展成黑色素瘤。此模型可模拟人类黑色素瘤的组织及分子特征。附加基因改变可使 *BrafV600E* 小鼠发展为黑色素瘤, 沉默 *PTEN* 基因可使黑色素瘤发生转移。Dankort 等^[53]建立 *BrafV600E* 与 *PTEN* 沉默协同诱导的黑色素瘤小鼠模型, 小鼠出现局灶型转移黑色素瘤, 真皮中的黑色素瘤有浸润到皮下组织的迹象, 并且所有小鼠的黑色素瘤都已扩散到淋巴结中。此模型可用于研究关键基因的信号转导, 并评估靶向相关途径的药物影响, 有助

于开发治疗黑色素瘤的靶向药物。

4 讨论

黑色素瘤的发病率逐年上升, 其发病机制复杂, 并且发现时多已转移, 尚无有效的治疗手段。黑色素瘤小鼠模型在研究黑色素瘤发生发展机制和治疗药物研究中起着关键作用^[54]。目前已有三种不同的黑色素瘤小鼠模型, 但由于实验动物与人类基因组、基因调控、细胞类型、器官结构与组成等方面是有一定差别, 这些模型预测药物治疗临床疗效的能力有限。因此, 要根据各种动物模型的特点、适用范围及研究目的来考量, 以选择和建立理想的动物模型^[55]。诱导的小鼠模型模拟人类受外界因素影响获得的黑色素瘤, 常用于研究预防黑色素瘤形成。移植接种的黑色素瘤小鼠模型概括了黑色素瘤原位发展、转移的一些特点, 多用于抗肿瘤和转移药物评估。基因工程小鼠模型可用于研究特定基因组改变在黑色素瘤的发生和发展的重要性及药物的靶向治疗。根据实验目的并结合模型优缺点选择合适小鼠模型。通过深入研究和不断完善建立良好的黑色素瘤小鼠模型, 以便对黑色素瘤发病机制和相关治疗药物的研究。此外, 在构建黑色素瘤小鼠模型研究中小鼠和人之间的差异性也应当考虑, 例如小鼠的免疫系统及代谢等方面与人类有一定的差距, 提示我们可以进一步研究人源化小鼠模型用于黑色素瘤模型的构建。总之, 继续探究合适黑色素瘤小鼠模型, 人们将逐渐发现肿瘤的发展机制、与宿主之间的关系、侵袭和转移的过程, 进而找到有效的治疗方法。

参考文献:

- [1] Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, et al. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification [J]. In Vivo, 2014, 28(6): 1005-1011.
- [2] Lens MB, Dawes M. Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma [J]. Br J Dermatol, 2004, 150(2): 179-185.
- [3] 曹水, 杜伟娇, 宋鑫, 等. 恶性黑色素瘤生物治疗进展 [J]. 实用肿瘤杂志, 2010, 25(2): 113-117.
- [4] 苗晋鑫, 宋韶鹤, 李秀敏. 结直肠癌小鼠模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(2): 267-272.
- [5] 亓翠玲, 曹静桦, 何亚军, 等. 心房钠尿肽在基因敲除小鼠黑色素瘤肺转移中的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(6): 1-3.
- [6] 张永慈, 周圆, 杨铭, 等. 人黑色素瘤细胞裸鼠肺转移模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2009, 17(1): 1-4, 87.

- [7] 任敏, 李东霞. 黑色素瘤动物模型治疗相关机制研究进展 [J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25(9): 1021-1024.
- [8] Kuzu OF, Nguyen FD, Noory MA, et al. Current state of animal (mouse) modeling in melanoma research [J]. Cancer Growth Metastasis, 2015, 8(1): 81-94.
- [9] Day CP, Marchalik R, Merlino G, et al. Mouse models of UV-induced melanoma: genetics, pathology, and clinical relevance [J]. Lab Invest, 2017, 97(6): 698-705.
- [10] Walker GJ, Hayward NK. Pathways to melanoma development: lessons from the mouse [J]. J Invest Dermatol, 2002, 119(4): 783-792.
- [11] Coricovac D, Dehelean C, Moaca EA, et al. Cutaneous melanoma-a long road from experimental models to clinical outcome: a review [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(6): 1566.
- [12] Noonan FP, Recio JA, Takayama H, et al. Neonatal sunburn and melanoma in mice [J]. Nature, 2001, 413(6853): 271-272.
- [13] Noonan FR, Dudek J, Merlino G, et al. Animal models of melanoma: an HGF/SF transgenic mouse model may facilitate experimental access to UV initiating agents [J]. Pigment Cell Res, 2003, 16(1): 16-25.
- [14] Recio JA, Noonan FP, Takayama H, et al. Ink4a/arf deficiency promotes ultraviolet radiation-induced melanomagenesis [J]. Cancer Res, 2002, 62(22): 6724-6730.
- [15] 刘楠, 王傲, 白彦萍. 高剂量 7,12-二甲苯并[a]蒽诱发的小鼠皮肤鳞状细胞癌模型建立及评价 [J]. 海南医学院学报, 2020, 26(2): 92-96.
- [16] Blumberg PM. Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters: sixth Rhoads memorial award lecture [J]. Cancer Res, 1988, 48(1): 1-8.
- [17] Elmetts CA, Yusuf N, Hamza S, et al. Topical application of dimethylbenz[a]anthracene results in the generation of multiple melanocytic nevi in C3H/HeN mice [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2004, 15, 195(3): 355-360.
- [18] 曹卉, 金桂花, 金美兰, 等. BALB/c 小鼠黑色素瘤 B16 移植肿瘤模型的建立 [J]. 延边大学医学学报, 2007, 3: 160-163.
- [19] Patrawala S, Maley A, Greskovich C, et al. Discordance of histopathologic parameters in cutaneous melanoma: Clinical implications [J]. J Am Acad Dermatol, 2016, 74(1): 75-80.
- [20] Saleh J. Murine models of melanoma [J]. Pathol Res Pract, 2018, 214(9): 1235-1238.
- [21] Liu Q, Das M, Liu Y, et al. Targeted drug delivery to melanoma [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2018, 127: 208-221.
- [22] Galivo F, Diaz RM, Wongthida P, et al. Single-cycle viral gene expression, rather than progressive replication and oncolysis, is required for VSV therapy of B16 melanoma [J]. Gene Ther, 2010, 17(2): 158-170.
- [23] 姚香利, 苗旭光, 魏茜茜, 等. 黑色素瘤模型的建立与评价 [J]. 河北科技大学学报, 2018, 39(4): 343-348.
- [24] Soica C, Danciu C, Savoiu-Balint G, et al. Betulinic acid in complex with a gamma-cyclodextrin derivative decreases proliferation and *in vivo* tumor development of non-metastatic and metastatic B16A5 cells [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(5): 8235-8255.
- [25] 孟星君, 李孝东, 刘俊, 等. C57BL/6J 小鼠黑色素瘤肺转移模型的构建 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(2): 139-144.
- [26] Gheorgheosu D, Dehelean C, Cristea M, et al. Development of the B16 murine melanoma model [J]. Annals of RSCB, 2011, 16(2): 148-156.
- [27] Fowlkes N, Clemons K, Rider PJ, et al. Factors affecting growth kinetics and spontaneous metastasis in the B16F10 syngeneic murine melanoma model [J]. Comp Med, 2019, 69(1): 48-54.
- [28] 李日飞, 袁娜, 冶冬阳, 等. 乳腺癌实验动物模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(2): 113-118.
- [29] 李克娟, 黄昊, 高蓓. 人源肿瘤异种移植模型在精准肿瘤医学中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(1): 91-98.
- [30] 乔大伟, 李玉芳, 张蕾, 等. 结直肠癌肝转移原代肿瘤组织的异种移植动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(4): 545-548.
- [31] Clark AG, Vignjevic DM. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment [J]. Curr Opin Cell Biol, 2015, 36: 13-22.
- [32] Kimpel J, Urbila C, Koske I, et al. The Oncolytic Virus VSV-GP is effective against malignant melanoma [J]. Viruses, 2018, 10(3): 108.
- [33] Liang G, Liu M, Wang Q, et al. Itraconazole exerts its anti-melanoma effect by suppressing Hedgehog, Wnt, and PI3K/mTOR signaling pathways [J]. Oncotarget, 2017, 8(17): 28510-28525.
- [34] Gowda R, Kardos G, Sharma A, et al. Nanoparticle-based celecoxib and plumbagin for the synergistic treatment of melanoma [J]. Mol Cancer Ther, 2017, 16(3): 440-452.
- [35] Hubmann R, Sieghart W, Schnabl S, et al. Gliotoxin targets nuclear NOTCH2 in human solid tumor derived cell lines in vitro and inhibits melanoma growth in xenograft mouse model [J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 319.
- [36] Hoffman R. Patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) models of melanoma [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(9): 1875.
- [37] Harris AL, Joseph RW, Copland JA. Patient-derived tumor xenograft models for melanoma drug discovery [J]. Expert Opin Drug Discov, 2016, 11(9): 895-906.
- [38] Yan J, Wu X, Yu J, et al. Establishment and characterization of melanoma patient-derived xenograft models for preclinical evaluation of novel therapeutics [J]. Melanoma Res, 2018, 28(6): 527-535.
- [39] DeRose YS, Wang G, Lin YC, et al. Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes [J]. Nat Med, 2011, 17(11): 1514-1520.
- [40] Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Malignant melanoma: genetics

- and therapeutics in the genomic era [J]. *Genes Dev*, 2006, 20 (16): 2149–2182.
- [41] Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy [J]. *Nature*, 2007, 445 (7130): 851–857.
- [42] Becker JC, Houben R, Schrama D, et al. Mouse models for melanoma: a personal perspective [J]. *Exp Dermatol*, 2010, 19 (2): 157–164.
- [43] Brézillon S, Venteo L, Ramont L, et al. Expression of lumican, a small leucine-rich proteoglycan with antitumour activity, in human malignant melanoma [J]. *Clin Exp Dermatol*, 2007, 32 (4): 405–416.
- [44] Chakravarti S, Magnuson T, Lass JH, et al. Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican [J]. *J Cell Biol*, 1998, 141 (5): 1277–1286.
- [45] Stasiak M, Boncela J, Perreau C, et al. Lumican inhibits SNAIL-Induced melanoma cell migration specifically by blocking MMP-14 activity [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0150226.
- [46] Ackermann J, Fruttschi M, Kaloulis K, et al. Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(10): 4005–4011.
- [47] Chin L. The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(8): 559–570.
- [48] Sharpless NE, Kannan K, Xu J, et al. Both products of the mouse Ink4a/Arf locus suppress melanoma formation *in vivo* [J]. *Oncogene*, 2003, 22(32): 5055–5059.
- [49] Krimpenfort P, Quon KC, Mooi WJ, et al. Loss of p16Ink4a confers susceptibility to metastatic melanoma in mice [J]. *Nature*, 2001, 413(6851): 83–86.
- [50] Sharpless NE, Bardeesy N, Lee KH, et al. Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis [J]. *Nature*, 2001, 413(6851): 86–91.
- [51] Bardeesy N, Bastian BC, Hezel A, et al. Dual inactivation of RB and p53 pathways in RAS-induced melanomas [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(6): 2144–2153.
- [52] Dhomen N, Reis-Filho JS, da Rocha Dias S, et al. Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice [J]. *Cancer Cell*, 2009, 15(4): 294–303.
- [53] Dankort D, Curley DP, Carlidge RA, et al. Braf (V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma [J]. *Nat Genet*, 2009, 41(5): 544–552.
- [54] 张燕, 郭伶俐, 赵发, 等. B16 黑色素瘤动物模型制备方法探讨 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2009, 18(34): 4206–4207.
- [55] 罗板鑫, 朱文科, 周中. 冻结肩动物模型的建立及研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(3): 121–128.

[收稿日期]2020-05-30