李艺,李永生. 静脉畸形动物模型建立的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(11): 128-134.
Li Y, Li YS. Research progress on the establishment of animal models of venous malformations [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32 (11): 128-134.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.11.017

静脉畸形动物模型建立的研究进展

李 艺[1,2],李永生[2*]

(1.昆明医科大学口腔医学院,昆明 650500;2.云南省第一人民医院口腔颌面外科,昆明 650032)

【摘要】 静脉畸形(venous malformations,VM)是先天性脉管畸形中最常见的类型,目前发病机制尚未完全阐明,治疗方法尚不成熟。动物模型在 VM 病理机制及治疗方法的研究中发挥了至关重要的作用。本文综述了 VM 基本发病机制及国内外 VM 动物模型研究现状,阐述了几种常见模型构建方法及结果,同时探讨了模型的优缺点,以期为研究者选用和建立实验动物模型提供参考。

【关键词】 静脉畸形;动物模型;*TIE2*;*PIK3CA*
【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856 (2022) 11-0128-07

Research progress on the establishment of animal models of venous malformations

LI Yi[1,2], LI Yongsheng[2*]
(1. School of Stomatology, Kunming Medical University, Kunming 650500, China.
2. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the First People's Hospital of Yunran Province, Kunming 650032)

【Abstract】 Venous malformations (VM) are the most common type of congenital vascular malformations. At present, their pathogenesis has not been fully elucidated, and treatment strategies are not yet mature. Animal models play important roles in the study of the pathological mechanisms and treatment of VM. This paper summarizes the basic pathogenesis of VM and the research status of VM animal models at home and abroad, expounds several common model construction method and result , and discusses the advantages and disadvantages of the models to provide a reference for researchers when selecting and establishing experimental animal models.

【Keywords】 venous malformation; animal model; *TIE2*; *PIK3CA*

静脉畸形(venous malformations,VM)是一种常见的脉管性疾病,主要由扩张迂曲的静脉构成;发病率为 1∶5000~1∶10000,无性别差异;可遍及全身,病变主要位于皮肤和粘膜,也可位于更深的结构组织如肌肉和内脏,在面颈部好发于颊、颈、眼睑、唇等[1]。VM 的临床表现以触之柔软且可被压缩的蓝色或深紫色血管团块为主,有时可触及静脉石,在组织病理学上 VM 的病变特征以被血管内皮细胞内衬的通道覆盖着稀疏且分布不规则的平滑肌细胞为主[2-3]。位于面部浅表的 VM 大多可通过临床检查诊断,而位于颈深处的病变则需借助穿刺检查或 B 超、MRI、MRA 等影像学检查[4-5]。由于对 VM 的发病机制认识不足,因此治疗长期以来仅局限于硬化注射、激光疗法及手术治疗等[6-8]。但是

[基金项目]云南省“万人计划”名医专项(YNWR-MY-2019-024);昆明医科大学研究生创新基金(2021S141)。
[作者简介]李艺(1994—),女,硕士,研究方向:口腔颌面部肿瘤及静脉畸形的基础研究。E-mail: 20190224@kmmu.edu.cn
[通信作者]李永生(1963—),男,博士,主任医师,教授,硕士生导师,研究方向:口腔颌面部肿瘤及脉管畸形的研究。
E-mail:liyongshengkm@yeah.net

硬化注射可导致炎症、组织纤维化甚至坏死,且通常需要多次才能充分缓解症状;手术治疗激光疗法等通常受病变的大小与位置所限,并且手术中常无法完全切除病变组织,往往导致复发给治疗带来困难;散发性和浸润性 VM 往往传统治疗方法受限且疗效不佳[3,9-11]。

近年来,人类遗传学和分子生物学在 VM 的病理机制方面取得了突破性进展。已有的研究显示,受体酪氨酸激酶与免疫球蛋白和表皮生长因子同源域-2(receptor tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains-2, *TIE*2)、编码磷酸肌醇 3-激酶 PI3K 的 p110α 催化亚基(*PIK*3*CA*)、丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinases,*MAPK*)等基因的体细胞突变从而导致 VM 发生[12-15]。临床中约一半以上的 VM 是由于 *TIE*2 的功能获得性突变导致。在 *TIE*2 突变阴性的 VM 中,约有一半是由于 *PIK*3*CA* 的激活突变[13,15-17]。基于以上基本发病机制,国内外学者不断探索建立及完善 VM 的动物模型以更深入的研究该疾病具体机制及治疗措施等。目前, VM 动物模型可根据疾病的基因突变类型分为 *TIE*2 突变的动物模型,*PIK*3*CA* 突变的动物模型及其他类型。本文通过总结这些动物模型建立的方法及结果,针对其优势,适用条件及不足进行了详细的评述,为研究者选择和建立动物模型提供参考(表 1、表 2)。

表 1 *TIE*2 突变的静脉畸形动物模型

Table 1 Animal model of venous malformation with *TIE*2 mutation

分类 Sort	动物 Animal	操作方法 Method	时间 Time	造模结果 Result	参考文献 References
基于 HUVEC 移植模型 Transplant model based on HUVEC	6~7 周龄雄性裸鼠 6~7 weeks old male nude mice aged	用 TIE2-L914F 突变的逆转录病毒感染 HUVECs 后加入基质胶混匀,将其注射于裸鼠下背两侧。 After HUVECs was infected with TIE2-L914F mutant retrovirus, matrix glue was mixed and injected into both sides of the lower back of nude mice.	7 d	鼠体重和对照组无差别;注射部位形成血管样团块并随时间增加团块不断增大;切片可见不规则管状内含红细胞且 CD31 及 αSMA 成阳性;超声示血流为静脉血。 There was no difference in body weight between the control group and the control group; vascular masses were formed at the injection site and increased with time; sections showed that the irregular channels contained red blood cells and CD31 and αSMA were positive; ultrasound showed that the blood flow was venous blood.	[18-20]
	6~8 周龄雌性重度联合免疫缺陷小鼠 6~8 weeks old female SCID	将静脉畸形 *TIE*2 突变中常见位点的逆转录病毒感染 HUVECs,将其只作为内皮细胞球体后加入低生长因子基质胶和凝血酶混合物后注射至鼠腹侧。 The retrovirus at the common site of *TIE*2 mutation in venous malformations was infected with HUVECs and injected into the ventral side of mice after adding a mixture of low growth factor matrix glue and thrombin as endothelial cell spheres.	10 d	鼠注射部位形成血管样团块;镜下可见异常增大的血管及平滑肌分层并不规则排列。 Vascular masses were formed at the injection site of mice, and abnormally enlarged blood vessels and smooth muscle layers were not arranged regularly under electron microscope.	[21]
基于人异种移植模型 Based on human xenotransplantation model	5~6 周龄雄性裸鼠 5~6 weeks old male nude mice aged	取患者静脉畸形组织及病变部位血液,分离培养并扩增内皮细胞后,基因测序确定突变类型后悬浮于基膜细胞外基质,于鼠背两侧注射。 The blood of the venous malformation tissue and lesion site of the patient was taken, and then the endothelial cells were isolated, cultured and amplified. The mutation type was determined by gene sequencing and suspended in the basement membrane extracellular matrix, and injected into the dorsal side of the mice.	9 d	注射部位形成蓝色血管样团块;镜下可见扩大的血管内衬较薄的内皮细胞层,免疫组织化学染色显示病变血管部位内皮细胞为人源。 A blue vascular-like mass was formed at the injection site, the enlarged blood vessels lined with thin endothelial cells could be seen under the light microscope, and immunohistochemical staining showed that the endothelial cells in the diseased vessels were human.	[22-24]

1 *TIE*2 突变动物模型

已有研究显示, *TIE*2 是血管生成素(angiopoietin,ANGPT)家族的受体,主要在内皮细胞中表达[27]。ANGPT1 和 ANGPT2 分别与 *TIE*2 结合,在调节血管生成、血管重塑和血管稳定及完整性方面发挥重要作用[18, 28-30]。临床中,大多数 VM 是由于酪氨酸激酶受体 *TIE*2 的体细胞功能获得性突变引起,并可能导致 VM 的所有 4 种亚型:VMCM,VM,MVM 和 BRBN,77%的基因突变阳性患者是由于体细胞 L914F 突变,也就是 *TIE*2 的第 914 位亮氨

表 2 *PIK3CA* 突变的静脉畸形动物模型

Table 2 Animal model of venous malformation with *PIK3CA* mutation

分类 Sort	动物 Animal	操作方法 Method	时间 Time	造模结果 Result	参考文献 References
基因工程动物模型 Genetically modified animal model	基因小鼠 Gene mouse	基因小鼠品系 LoxP-STOP-LoxP(LSL)-*PIK3CA*^{H1047R} 使其活化,最后与 Sprr2f-Cre 菌株杂交。 The transgenic mouse strain LoxP-STOP-LoxP (LSL)-*PIK3CA*^{H1047R} was activated and hybridized with Sprr2f-Cre strain.	4 周 4 weeks	*PIK3CA*$^{sprr2f\text{-}Cre}$ 小鼠同窝幼仔在 4-10 周内出现后肢麻痹;镜下可见脊柱病变血管异常扩张并有大量血池及出血;皮肤病变部位镜下可见内皮细胞异常增殖,内皮细胞衬里和血红素-蛋白沉积。 The offspring of *PIK3CA*$^{sprr2f\text{-}Cre}$ mice showed hindlimb paralysis within 4-10 weeks. Microscopically, abnormal dilatation of blood vessels and massive blood pool and bleeding could be seen in spinal lesions. Abnormal proliferation of endothelial cells, lining of endothelial cells and deposition of heme-protein could be seen in the site of skin lesions.	[13]
	基因小鼠 Gene mouse	*PIK3CA*^{H1047R} 与 T-CreERT2 小鼠杂交。当小鼠怀孕 7. 5 d 后向其腹腔胚胎注入高剂量的 4-OHT。 *PIK3CA*^{H1047R} was hybridized with T-CreERT2 transgenic mice. When the mice were pregnant for 7. 5 d, a high dose of 4-OHT was injected into their abdominal embryos.	3 周 3 weeks	胚胎小鼠部分致死,存活幼仔可见多灶性弥散性血管畸形病变;血管造影可见下腔静脉及门静脉血管异常扩张;镜下可见壁薄且不规则扩张血管。 Part of the embryonic mice died, and the surviving infants showed multifocal diffuse vascular malformations, angiography showed abnormal dilatation of inferior vena cava and portal vein, thin-walled and irregular dilated vessels could be seen under microscope.	[16]
	基因小鼠 Gene mouse	R26-*PIK3CA*^{H1047R} 与 Cdh5-CreERT2 转基因小鼠杂交,得到子代小鼠,然后在子代小鼠后腿肌肉注射 4-OH 诱导突变型 *PIK3CA* 蛋白的内皮细胞表达。 R26-*PIK3CA*^{H1047R} was hybridized with Cdh5-CreERT2 transgenic mice to obtain offspring, and then 4-OH was injected into the hind leg muscle of offspring mice to induce the expression of mutant PIK3CA protein in endothelial cells.	1 周 1 week	注射部位血管样改变;镜下可见由不规则排列的内皮细胞构成的异常扩张血管,并且有大小不一的血管团。 Vascular-like changes at the injection site; microscopically, the abnormally dilated blood vessels were composed of irregularly arranged endothelial cells and vascular clusters of different sizes.	[25]
移植模型 Transplant model	6~7 周龄雄性裸鼠 6 ~ 7 weeks old male nude mice aged	取患者静脉畸形组织及病变部位血液,分离培养并扩增内皮细胞后,基因测序确定突变类型后悬浮于基膜细胞外基质,在鼠背两侧注射。 After the endothelial cells were isolated, cultured and amplified from the venous malformation tissue and the blood of the diseased site, the type of mutation was determined by gene sequencing and suspended in the extracellular matrix of the basement membrane and injected into the dorsal and bilateral sides of the mice.	11 d	小鼠注射部位可见血管化组织形成;镜下可见具有扩大的淋巴管和充满血液的血管;免疫组化显示病变血管部位内皮细胞为人源。 Vascularized tissue formation can be seen at the injection site of mice, enlarged lymphatic vessels and blood-filled blood vessels can be seen under the microscope; immunohistochemistry shows that the endothelial cells of the diseased vessels are of human origin.	[13,26]

酸突变成苯丙氨酸[15,17]。所有 *TIE*2 突变的共同特征是 *TIE*2 受体的非配体依赖性磷酸化,这将导致其下游的 PI3K/AKT/mTOR 信号通路和 RAS/MAPK/ERK 信号通路被激活,最终导致 VM 的发生[21, 31-32]。

1.1　基于人脐静脉内皮细胞的移植模型

Boscolo 等[18]首先建立了基于 TIE2-L914F 的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells,HUVEC)移植模型,并用此模型探究了 mTOR 抑制剂雷帕霉素靶向作用于 VM 的效果,开辟了 VM 分子治疗的新篇章。随后 Li 等[19-20]用此方法建立鼠 VM 动物模型用于改善分子治疗的实验研究以及探究 VM 的发病机制。操作如下:首先分别用表达全长的 TIE2-WT 和 TIE2-L914F 的逆转录病毒感染 HUVECs,检测到 HUVEC-TIE2-L914F 中 TIE2 蛋白磷酸化增加后,将两组细胞以 2.5×10^6 个悬浮于 200 μL 基质胶中;然后将两组细胞分别皮下注射至 6~7 周龄的雄性无胸腺 nu/nu 鼠下背部两侧(TIE2-WT 组设置为对照组)后常规饲养;最后用卡尺测量每天观察测量鼠病灶面积。结果显示:在注射后的第 7 天,HUVEC-TIE2-L914F 实验组裸鼠形成血管样病变团块,并且随着时间的增加病变团块不断增加。用组织病理学方法检测到,血管团块样组织中可见不规则扩大的管腔内包含大量红细胞,人特异性抗 CD31 阳性且 αSMA^+ 血管内皮细胞薄而稀少。此外多普勒超声检查显示 VM 血流缓慢且无搏动,符合静脉血特征。此类模型是人内皮细胞产生的血管腔与鼠的脉管系统相连而形成,检测到的特征和婴儿血管瘤高度血管化组织不同,并且和人 VM 组织病变有一定的相似度。优点为建模过程较为简单并且时间周期较短,是目前使用最多的 VM 动物模型。缺点为此方法形成的病变为人工病变并非天然形成,与临床中人 VM 病变组织存在一定的差异,故常用于药物治疗效果的初步评估,更进一步研究 VM 发病的分子学机制需谨慎选择。

Nätynki 等[21]则是基于内皮移植法,将内皮细胞以球体形式移植到重度联合免疫缺陷小鼠(server combined immune-deficiency,SCID)中,操作如下:首先将携带 *TIE*2 中 R849W、L914F、Y897F 和 R915 L 及其 Y897F-R915 L 双突变形式的逆转录病毒感染的 HUVECs;然后将其制备为 1000 个细胞/内皮细胞球体培养;最后加入降低生长因子的基质胶和凝血酶混合溶液注射到 6~8 周龄雌性 SCID 小鼠腹侧,每侧 1000 个球状体(TIE2-WT 组设置为对照组)。结果显示:注射 10 d 后实验组小鼠形成血管团块。组织病理学可见异常扩张的血管,电子显微镜下观察可见内皮细胞形态发生变化,并且可见血管平滑肌细胞分层且排列紊乱。值得注意的是,Y897F 和 R915 L 双突变组形成的血管团块的血管周围的细胞外基质胶原蛋白随机排列,非常类似于在 Y897F-R915 L 突变阳性的 VM 患者中检测到的变化。此动物模型建模方法及效果和 Boscolo 等[18]类似,主要区别在于使用动物上的差别和细胞培养基的成分,建模过程略微复杂,故未见有研究者再次使用。

1.2　基于人异种移植模型

近年来,基于人异体移植的 VM 模型相继被开发,为研究 VM 形成和其分子机制提供了可靠的载体。异体移植模型取于患者 VM 组织或 VM 血液中分离和扩增培养内皮细胞,异体移植之前确定 VM 患者为 *TIE*2 体细胞突变[22-23]。

Goines 等[22,24]和 Schrenk 等[23]开发了基于人异体移植模型,操作如下:取患者 VM 组织和 VM 血液中分离的细胞并扩增培养;然后用内皮细胞特异性标记物 CD31 的磁珠标记筛选 VM 内皮细胞,基因测序确定 VM 的突变类型;最后将 CD31 标记阳性的内皮细胞进行扩增,然后将其以 2.5×10^6~3.5×10^6 个悬浮于 200 μL 预冷基质胶中,皮下注射到 5~6 周龄雄性无胸腺 nu/nu 鼠的下背部。结果显示由 TIE2 突变的内皮细胞产生的病变在注射 9 d 后可见蓝色的血管化病变部位。组织病理学检测可见扩大的血管内衬较薄且排列紊乱的内皮细胞,使用人类特异性凝集素 UEA-I 进行的免疫组织化学染色可以证实在血管病变处的细胞源自植入的人类细胞。此模型同样由人病变的内皮细胞产生的血管腔与鼠脉管系统链接,并且形成的血管样团块非常类似于人 VM 病变。突出的优点是可以高度概括人类基因突变导致 VM 的异质性。但是,此模型的缺点是建立比较困难,是因为建模所需的细胞来自有限的人病理组织标本,并且从人病理组织中提取出的细胞较容易衰老从而不宜大量获得。此类模型适用于可获得大量人疾病组织标本的医院研究者。

2　*PIK3CA* 突变动物模型

PIK3CA 是编码磷酸肌醇 3 激酶(PI3K)的 p110a 催化亚基的基因[33-34]。研究显示 *PIK3CA* 突变可诱导 VM 的发生,其突变位点主要在螺旋区的外显子 9 区域和激酶区的外显子 20 区域,最常见的突变形式为 E542K、E545K、H1047R 体细胞突变。

PIK3CA 突变导致 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的慢性激活,从而导致 VM 的发生[17,33,35-36]。

2.1 基因工程动物模型

Castel 等[13]建立了 *PIK3CA*$^{sprr2f\text{-}Cre}$ 突变的小鼠 VM 模型,并用此模型验证了 PI3K 抑制剂 BYL719 可有效治疗 *PIK3CA* 突变的胚胎小鼠中的 VM 及同种移植 VM 小鼠模型,为此基因突变的 VM 治疗提供了潜在的治疗方法。操作如下:用基因小鼠品系 LoxP-STOP-LoxP(LSL)-*PIK3CA*^{H1047R} 去除合成的转录/翻译 STOP 盒,然后使用 Cre-loxP 技术以组织特异性方式活化 *PIK3CA* 突变 H1047R 的表达,最后与 Sprr2f-Cre 菌株杂交。结果显示:作为对照组的 *PIK3CA*$^{sprr2f\text{-}WT}$ 小鼠未见异常,而 *PIK3CA*$^{sprr2f\text{-}Cre}$ 小鼠同窝幼仔在 4~10 周内出现后肢麻痹。组织病理学检查可见脊柱病变部位血管异常扩张似“海绵状”,并伴有大量血池和白质、灰质的出血。Micro CT 可见实验组小鼠脊髓中有缓慢流动的血液并外渗;皮肤的病变部位用组织病理学检查可显示内皮细胞异常增殖并可见血红素-蛋白沉积。此方法建立的动物模型优点为模型小鼠的脊髓和皮肤病变非常类似于人类 VM,可高度模拟人类 VM 发病机制。但是其明显缺点为建立基因工程小鼠价格较高,过程繁琐且建模周期较长,此外其模型并不能直观的观察到病变发生发展状况。此类模型可用于研究者探究 VM 发生发展的分子学机制。

Castillo 等[16]构建了 *PIK3CA*^{H1047R} 小鼠中胚层特异性嵌合体突变模型,并探究了 *PIK3CA* 突变的 VM 的相关机制。操作如下:用 *PIK3CA*^{H1047R} 与 T-CreERT2 小鼠杂交,获得 *PIK3CA*^{H1047R} 中胚层特异性嵌合表达。在小鼠怀孕第 7 天,向其腹腔注入高剂量的三苯氧胺从而诱导 Cre 激活,使得胚胎中胚层的嵌合体 *PIK3CA*^{H1047R} 表达。结果显示:*PIK3CA*^{H1047R} 胚胎小鼠具有一定胚胎致死性,但是部分成活的小鼠幼仔皮肤可见多灶性及弥散的异常扩张的静脉,计算机断层血管造影下可见泌尿生殖器下腔静脉和门静脉异常扩张,多普勒超声可证明病变部位的血流为静脉血。组织病理学检查可见病变部位由壁薄且不规则的血管组成,部分血管内含有组织性纤维蛋白血栓并伴有局灶性间质性出血,淋巴标记免疫染色可见零星分布的畸形淋巴管。以上特征表明 *PIK3CA*^{H1047R} 胚胎小鼠病变可诊断为 VM,与人类 VM 观察到的特征较相似。此基因小鼠模型和 Castel 等[13]建立的基因小鼠模型有相似的优缺点,除此之外还有明显的缺点为此模型建造过程中导致全身高度病理性血管形成而致使其早期胚胎致死率较高,故建模效率较低。此模型适合研究者探索 VM 相关复杂表型综合征。

Di Blasio 等[25]通过在内皮细胞中局部表达 *PIK3CA* 激活突变建立了 VM 小鼠模型,并使用 PI3K/mTOR 抑制剂证明可以消退鼠 VM 病变。操作如下:将 R26-*PIK3CA*^{H1047R} 与 Cdh5-CreERT2 转基因小鼠杂交,得到子代小鼠,然后在子代小鼠后腿肌肉注射三苯氧胺诱导突变型 PIK3CA 蛋白的内皮细胞表达,观察注射部位在肌肉中的局部表达情况。结果显示:诱导 1 周后,注射部位出现明显的出血点和血管异常。组织病理学分析显示血管扩张,血管由厚层的形态异常且不规则排列的内皮细胞构成,并存在大小不一的细胞聚集团。这些现象与人 VM 病变组织相似。此模型相比 Castel 等[13]和 Castillo 等[16]有所改进,突出优点为可直接观察到病变组织发生发展情况,并且周期有所缩短。此模型可用于 *PIK3CA* 突变的 VM 分子治疗研究。

2.2 移植模型

Le Cras 等[26]开发出毛细血管静脉畸形(CLVM)的异体移植模型,并且用此动物模型进行 CLVM 发病机制的研究。其方法与 Goines 等[22]类似,首先从 CLVM 患者的病变组织及硬化注射治疗期间收集的病变部位血液中分离出内皮细胞并进行免疫磁珠纯化、免疫荧光鉴定和单细胞克隆扩增;然后使用 DNA 测序以确定为 *PIK3CA* 突变;最后将 2.5×10^6 个内皮细胞在 200 μL 基质胶中混合均匀后其注入到 6~7 周龄的雄性无胸腺 nu/nu 小鼠腹部两侧。结果显示注射部位在 11 d 后可见血管化组织,组织病理学检查血管化组织中可见扩大的淋巴管和充满血液的血管,人泛内皮凝集素 Ulex europaeus 凝集素 I 表达阳性,与 CLVM 患者组织相似。Castel 等[13]也通过将 *PIK3CA* 突变的 VM 内皮细胞注射到免疫受损的裸鼠体内,细胞在注射后数周形成与原始病变组织学和外观相似的高度血管化和增生的肿块从而建立了 VM 动物模型。此模型与 *TIE2* 突变的人异种模型移植的 VM 建模方法及优缺点类似,适用于可获得大量人疾病组织标本的医院和进一步研究 CLVM 发病机制及治疗的研究者。

3 其他动物模型

在 VM 疾病治疗研究早期,研究者们使用兔正常静脉代替 VM 疾病血管用于药物治疗研究。白南[37]运用家兔颈静脉替代 VM 的血管进行平阳霉

素治疗 VM 的研究;Smithers 等[38]通过向家兔颈静脉注射乙醇来模拟 VM 硬化治疗后模型;Kulungowski 等[39]也通过向兔面静脉注射乙醇来建立面静脉硬化再狭窄的动物模型来证明贝伐单抗和干扰素减少硬化治疗后的静脉再通。由于兔正常静脉和 VM 疾病血管在组织病理方面存在较大差异,故使用兔正常静脉代替 VM 疾病血管用于实验研究没有较强的说服力,随着基因工程小鼠和基于内皮细胞移植模型的开发,此类模型已不再用于 VM 相关机制及治疗的研究。

在 VM 分子学机制探索初期,Wang 等[40]创建了使用鼠类病毒癌基因的转基因小鼠模型。在鼠类中,鼠多瘤病毒(*PyV*)会诱发多种肿瘤,包括淋巴瘤、海绵状血管瘤和肉瘤,鼠多瘤病毒中 T 抗原基因(*PyMT*)通过募集宿主未转化的内皮细胞使其迅速转化,继而使得鼠胚胎内皮细胞永生化,从而导致新生小鼠中血管肿瘤形成[41]。Wang 等[40]首先基于 Tet-on 系统构建了含有与 TetR 融合的 *NK*10 基因的条件转基因质粒载体;然后使用显微注射技术将目的片段注射到 C57BL/6J 小鼠卵中;最后将其目的基因小鼠与野生型 C57BL/6J 小鼠交配获得子一代小鼠,在鼠 6 周时加入强力霉素和蔗糖以诱导 *MT* 基因表达。结果显示:加入强力霉素及蔗糖后 2 个月,小鼠的胸部皮肤出现了血管异常的病变,似畸形的静脉病变。此模型可能因为启动子控制的转基因表达局限性而导致诱导的 VM 小鼠数量很少,并且未进行相关基因突变研究,故没有被多数研究者继续运用。

4　总结

VM 是口腔颌面部常见的一种先天性局限性血管发育异常,作用机制未完全明确。近年来,随着对 VM 分子学机制的探究发现 *TIE*2 或 *PIK*3*CA* 突变使其相应的受体非配体依赖性磷酸化从而导致其下游的 PI3K/AKT/mTOR 信号通路和 RAS/MAPK/ERK 信号通路被激活,最终导致 VM 的发生[21,31-32]。基于此机制研究者开发了不同基因突变的动物模型,研究者可根据研究基因的不同进行选择。除此之外,研究者还需进一步选择建模方法。根据建模方法不同可大致分为移植模型和基因工程小鼠模型。移植模型是人内皮细胞产生的血管腔与鼠脉管系统连接,优点是建模过程较为简单,缺点为模型病变是非天然形成,故此类方法仅适用于研究治疗方法及效果的初步评估。基因工程小鼠模型是在鼠内皮细胞中选择性表达突变体 $PIK3CA^{H1047R}$ 的鼠系,优点是可高度模拟人 VM 发病机制,缺点为过程繁琐并且造价高,故此方法更适用于探索 VM 发病机制相关研究。

目前,*TIE*2 功能获得性突变诱导 VM 的基因工程鼠模型尚未见报道,可能原因是 *TIE*2 为血管发育的关键基因,常规方法基因修饰后造成鼠在胚胎时期死亡。未来还需继续探索构建此基因突变动物模型的新方法,可比较不同方法建立的同一突变类型 VM 动物模型与人 VM 的异同,从而选择出最优的动物模型用于较常见突变基因导致 VM 的分子研究。基于 *MAP*3*K*3 突变导致的 VM 的动物模型也尚未报道,可能还需要探索大量的分子学基础以寻找建模方法。

标准的 VM 动物模型的缺失仍然是阻碍 VM 研究发展的关键原因之一,动物模型建立目前依然存在很大的挑战。因已有的 VM 动物模型还不够成熟或建立过程较为复杂,故并没有广泛用于 VM 的实验研究,未来还需继续寻找稳定可靠且更易于建立的动物模型方法,为 VM 的分子研究及靶向治疗提供实验基础。

参考文献:

[1] Vogel SA, Hess CP, Dowd CF, et al. Early versus later presentations of venous malformations: where and why? [J]. Pediatr Dermatol, 2013, 30(5): 534-540.

[2] Wassef M, Blei F, Adams D, et al. Vascular anomalies classification: recommendations from the International Society for the study of vascular anomalies [J]. Pediatrics, 2015, 136(1): e203-214.

[3] Dompmartin A, Vikkula M, Boon LM. Venous malformation: update on aetiopathogenesis, diagnosis and management [J]. Phlebology, 2010, 25(5): 224-235.

[4] 郑家伟, 赵怡芳, 秦中平, 等. 口腔颌面-头颈部静脉畸形诊治指南 [J]. 中国口腔颌面外科杂志, 2011, 9(6): 510-517.

[5] Kim H, Joh J, Labropoulos N. Characteristics, clinical presentation, and treatment outcomes of venous malformation in the extremities [J]. J Vasc Surg Venous Lymphat Disord, 2022, 10(1): 152-158.

[6] Johnin K, Mori Y, Nakagawa S, et al. Venous malformation of the glans penis: "Every-5-mm" neodymium: yttrium-aluminum-garnet laser irradiation [J]. Int J Urol, 2021, 28(11): 1189-1191.

[7] Lee WJ, Cho KR, Choi JW, et al. Stereotactic radiosurgery for orbital cavernous venous malformation: a single center's experience for 15 years [J]. Acta Neurochir, 2021, 163(2): 357-364.

[8] Song D, Guo L, Sheng H, et al. DSA-guided percutaneous sclerotherapy for children with oropharyngeal low-flow venous

malformation [J]. Exp Ther Med, 2020, 19(5): 3405-3410.
[9] Burrows PE. Endovascular treatment of slow-flow vascular malformations [J]. Tech Vasc Interv Radiol, 2013, 16(1): 12-21.
[10] Aronniemi J, Castrén E, Lappalainen K, et al. Sclerotherapy complications of peripheral venous malformations [J]. Phlebology, 2016, 31(10): 712-722.
[11] Boon LM, Vanwijck R. Medical and surgical treatment of venous malformations [J]. Ann Chir Plast Esthet, 2006, 51(4-5): 403-411.
[12] Seront E, Vikkula M, Boon LM. Venous Malformations of the Head and Neck [J]. Otolaryngol Clin North Am, 2018, 51(1): 173-184.
[13] Castel P, Carmona FJ, Grego-Bessa J, et al. Somatic PIK3CA mutations as a driver of sporadic venous malformations [J]. Sci Transl Med, 2016, 8(332): 332-342.
[14] Couto JA, Vivero MP, Kozakewich HP, et al. A somatic MAP3K3 mutation is associated with verrucous venous malformation [J]. Am J Hum Genet, 2015, 96(3): 480-486.
[15] Limaye N, Wouters V, Uebelhoer M, et al. Somatic mutations in angiopoietin receptor gene TEK cause solitary and multiple sporadic venous malformations [J]. Nat Genet, 2009, 41(1): 118-124.
[16] Castillo SD, Tzouanacou E, Zaw-Thin M, et al. Somatic activating mutations in PIK3CA cause sporadic venous malformations in mice and humans [J]. Sci Transl Med, 2016, 8(332): 332-343.
[17] Soblet J, Limaye N, Uebelhoer M, et al. Variable somatic TIE2 mutations in half of sporadic venous malformations [J]. Mol Syndromol, 2013, 4(4): 179-183.
[18] Boscolo E, Limaye N, Huang L, et al. Rapamycin improves TIE2-mutated venous malformation in murine model and human subjects [J]. J Clin Invest, 2015, 125(9): 3491-3504.
[19] Li X, Cai Y, Goines J, et al. Ponatinib combined with rapamycin causes regression of murine venous malformation [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2019, 39(3): 496-512.
[20] Li Y, Shang Q, Li P, et al. BMP9 attenuates occurrence of venous malformation by maintaining endothelial quiescence and strengthening vessel walls via SMAD1/5/ID1/α-SMA pathway [J]. J Mol Cell Cardiol, 2020, 147: 92-107.
[21] Nätynki M, Kangas J, Miinalainen I, et al. Common and specific effects of TIE2 mutations causing venous malformations [J]. Hum Mol Genet, 2015, 24(22): 6374-6389.
[22] Goines J, Li X, Cai Y, et al. A xenograft model for venous malformation [J]. Angiogenesis, 2018, 21(4): 725-735.
[23] Schrenk S, Goines J, Boscolo E. A patient-derived xenograft model for venous malformation [J]. J Vis Exp, 2020, (160): 61501.
[24] Goines J, Boscolo E. A xenograft model for venous malformation [J]. Methods Mol Biol, 2021, 2206: 179-192.
[25] Di Blasio L, Puliafito A, Gagliardi PA, et al. PI3K/mTOR inhibition promotes the regression of experimental vascular malformations driven by PIK3CA-activating mutations [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2): 45.
[26] Le Cras TD, Goines J, Lakes N, et al. Constitutively active PIK3CA mutations are expressed by lymphatic and vascular endothelial cells in capillary lymphatic venous malformation [J]. Angiogenesis, 2020, 23(3): 425-442.
[27] Santhosh D, Huang Z. A Tie2-driven BAC-TRAP transgenic line for in vivo endothelial gene profiling [J]. Genesis, 2016, 54(3): 136-145.
[28] Teichert M, Milde L, Holm A, et al. Pericyte-expressed Tie2 controls angiogenesis and vessel maturation [J]. Nat Commun, 2017, 8: 16106.
[29] Frye M, Dierkes M, Küppers V, et al. Interfering with VE-PTP stabilizes endothelial junctions *in vivo* via Tie-2 in the absence of VE-cadherin [J]. J Exp Med, 2015, 212(13): 2267-2287.
[30] Yu C, Sharma A, Trane A, et al. Myoferlin gene silencing decreases Tie-2 expression *in vitro* and angiogenesis *in vivo* [J]. Vascul Pharmacol, 2011, 55(1-3): 26-33.
[31] Limaye N, Kangas J, Mendola A, et al. Somatic activating PIK3CA mutations cause venous malformation [J]. Am J Hum Genet, 2015, 97(6): 914-921.
[32] Kennedy MA, Xu Z, Wu Y, et al. A Tie2 kinase mutation causing venous malformations increases phosphorylation rates and enhances cooperativity [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 509(4): 898-902.
[33] Yadav P, De Castro DK, Waner M, et al. Vascular anomalies of the head and neck: a review of genetics [J]. Semin Ophthalmol, 2013, 28(5-6): 257-266.
[34] Arai F, Hirao A, Ohmura M, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche [J]. Cell, 2004, 118(2): 149-161.
[35] Eklund L, Kangas J, Saharinen P. Angiopoietin-Tie signalling in the cardiovascular and lymphatic systems [J]. Clin Sci (Lond), 2017, 131(1): 87-103.
[36] Augustin HG, Koh GY, Thurston G, et al. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009, 10(3): 165-177.
[37] 白南. 海绵状静脉畸形的实验与临床研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2012.
[38] Smithers CJ, Vogel AM, Kozakewich HP, et al. An injectable tissue-engineered embolus prevents luminal recanalization after vascular sclerotherapy [J]. J Pediatr Surg, 2005, 40(6): 920-925.
[39] Kulungowski AM, Hassanein AH, Foster CC, et al. Bevacizumab and interferon reduce venous recanalization following sclerotherapy [J]. J Pediatr Surg, 2016, 51(10): 1670-1673.
[40] Wang YA, Zheng JW, Fei ZL, et al. A novel transgenic mice model for venous malformation [J]. Transgenic Res, 2009, 18(2): 193-201.
[41] Primo L, Roca C, Ferrandi C, et al. Human endothelial cells expressing polyoma middle T induce tumors [J]. Oncogene, 2000, 19(32): 3632-3641.

[收稿日期]2022-04-07