

构建 $Kras^{LSL-G12D/-}$ 和 $Smad4^{loxp/loxp}$ 双转基因散发性结直肠癌小鼠模型



杨超, 郑勇斌, 宋丹, 肖旷, 童仕伦

武汉大学人民医院胃肠外科(武汉 430060)

【摘要】 目的 构建并验证一种与临床散发性结直肠癌类似的且同时表达 $Kras^{LSL-G12D/-}$ 和 $Smad4^{loxp/loxp}$ 的双转基因基因工程小鼠模型。方法 将 $Kras^{tm4Tyj/J}$ 小鼠与 $Smad4^{tm2.1Cxd/J}$ 小鼠转换遗传背景后进行杂交建系, 通过 PCR 技术鉴定子代小鼠基因型, 获得基因型为 $Kras^{LSL-G12D/-}+Smad4^{loxp/loxp}$ 的双转基因小鼠模型。通过向该模型小鼠的肠黏膜下注射 Lentivirus^{Cre-IRES-Luciferase}, 在 IVIS 系统下观察并统计模型小鼠成瘤情况, 对模型小鼠瘤变组织进行取样及行 HE 染色, 以验证模型小鼠成瘤能力。结果 经培育筛选获得了能够同时表达 $Kras^{LSL-G12D/-}$ 和 $Smad4^{loxp/loxp}$ 的双转基因小鼠模型; 通过构建的病毒载体利用 Cre 重组酶成功感染并诱导小鼠肠上皮细胞突变成癌灶。结论 本研究构建的双转基因小鼠模型结肠上皮细胞能在 Cre 重组酶作用下诱导癌变, 模拟了人类散发性结直肠癌的病理过程。

【关键词】 基因工程小鼠; 散发性结直肠癌; $Kras$; $Smad4$

Construction of sporadic colorectal cancer mouse model expressed simultaneously $Kras^{LSL-G12D/-}$ and $Smad4^{loxp/loxp}$ genes

YANG Chao, ZHENG Yongbin, SONG Dan, XIAO Kuang, TONG Shilun

Department of Gastrointestinal Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, P. R. China

Corresponding author: ZHENG Yongbin, Email: wqandzyb@163.com

【Abstract】 Objective To construct and verify a genetically engineered mouse model which is similar to clinical sporadic colorectal cancer, that model simultaneously expresses $Kras^{LSL-G12D/-}$ and $Smad4^{loxp/loxp}$ genes. **Methods** The $Kras^{tm4Tyj/J}$ mouse and $Smad4^{tm2.1Cxd/J}$ mouse were transformed into the genetic background, and the genotypes of the offspring mice were identified by the PCR to obtain the mice expressed simultaneously $Kras^{LSL-G12D/-}$ and $Smad4^{loxp/loxp}$ genes. The Lentivirus^{Cre-IRES-Luciferase} was injected into the submucosa of the model mice and the tumorigenicity was observed under the IVIS system. The tumor tissues of the model mice were sampled and the HE staining was used to verify the tumorigenicity of the model mice. **Results** The genetically engineered mouse model which could simultaneously express $Kras^{LSL-G12D/-}$ and $Smad4^{loxp/loxp}$ genes was obtained by the breeding and selection. The mouse intestinal epithelial cell carcinogenesis was successfully induced by the viral vector containing Cre recombinase. **Conclusion** Mouse model expressed simultaneously $Kras^{LSL-G12D/-}$ and $Smad4^{loxp/loxp}$ genes is capable of sporadic tumorigenicity by Cre recombinase and could simulate pathological process of human sporadic colorectal cancer.

【Keywords】 genetically engineered mice; sporadic colorectal cancer; $Kras$; $Smad4$

结直肠癌发生是多步骤的过程, $Kras$ 基因可以通过多种信号通路影响细胞不可控制地增殖和生长, 参与结直肠癌发生的初始阶段, 在约 50% 的原发性结直肠癌患者中可以检测到突变型 $Kras$ ^[1]。 $Smad4$ 基因是细胞内信号传递介质家族成员, 参与

细胞生长和转录调控, 扮演着肿瘤抑制因子的角色^[2]; $Smad4$ 表达缺失将导致结直肠上皮细胞增生活跃, 导致腺瘤高发并呈现出癌变趋势, 还通过包括上皮间质转化在内的机制表现出侵袭、转移倾向^[3-4]。基因工程小鼠模型作为一种近年来发展迅速的动物模型, 可以特异性地修饰感兴趣的基因, 模拟与临床类似的肿瘤, 为精确研究基因与疾病的关系提供了可能^[5]。本课题组构建了同时表达

DOI: 10.7507/1007-9424.201801070

基金项目: 国家自然科学基金项目(项目编号: 81372553)

通信作者: 郑勇斌, Email: wqandzyb@163.com

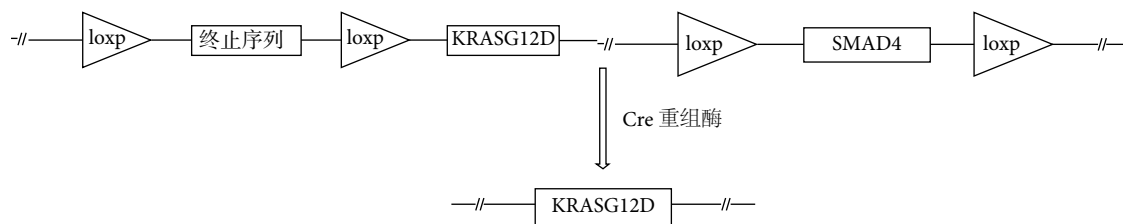


图1 Cre重组酶介导的基因重组模式图

Kras^{LSL-G12D/-}和Smad4^{loxp/loxp}的双转基因散发性结直肠癌小鼠模型,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要材料

1.1.1 实验动物 从美国杰克逊实验室(The Jackson Laboratory)购买的SPF级B6.129S4-Kras^{tm4Tyj}/J(008179)和Stock Smad4^{tm2.1Cxd}/J(017462)雌雄小鼠各1对,C57BL/6J小鼠来自本课题组前期保种。B6.129S4-Kras^{tm4Tyj}/J小鼠是在Kras基因上游插入了Loxp-stop-Loxp(LSL)序列,Stock Smad4^{tm2.1Cxd}/J小鼠是在Smad4基因上下游分别敲入了Loxp序列。Cre重组酶可特异性识别LSL序列,利用慢病毒载体将Cre基因转入双转基因小鼠结直肠隐窝上皮细胞内,Cre重组酶将对小鼠肠上皮细胞中Kras基因上游的终止序列及Smad4基因序列进行特异性识别并切除,导致原癌基因Kras激活表达,诱导肠上皮细胞瘤变进而成癌。基因重组模式见图1。

1.1.2 主要材料 小鼠结肠镜系统,由OLYMPUS BF-P260F改装,日本;聚合酶链式反应扩增仪,ABI公司,美国;凝胶成像系统,VILBER,法国;琼脂糖凝胶电泳仪,六一生物公司,北京;鼠尾DNA提取试剂盒,北京康为世纪生物科技有限公司,北京;IVIS系统,PE公司,美国;D-Luciferin,上海前生生物科技有限公司,上海;引物,上海生工生物工程有限公司,上海。

1.2 动物饲养环境

实验小鼠饲养于武汉大学动物实验中心独立通气笼具系统(苏州市苏杭科技器材有限公司,苏州),室温22~25℃,相对湿度60%~70%;小鼠饲养盒、垫料及饮用水均经过高温高压灭菌处理;小鼠繁殖饲料(北京华阜康生物科技股份有限公司,北京)经辐照灭菌。

1.3 双基因模型小鼠构建

1.3.1 双基因模型小鼠的培育与筛选 首先将B6.129S4-Kras^{tm4Tyj}/J小鼠与C57BL/6J小鼠杂交和反

复回交转换其遗传背景,以增强其存活和繁殖能力。利用普通PCR筛选出C57BL/6-Kras^{LSL-G12D/-}/J杂合子小鼠(由于该型纯合子小鼠在母体子宫内已死亡,故只能筛选出杂合子小鼠,简记为Kras^{LSL-G12D/-})。同时将Stock Smad4^{tm2.1Cxd}/J小鼠转化遗传背景后通过杂交和回交并利用普通PCR筛选出纯合子小鼠,简记为Smad4^{loxp/loxp}。最后将Kras^{LSL-G12D/-}和Smad4^{loxp/loxp}小鼠杂交形成双杂合子的Kras^{LSL-G12D/-}+Smad4^{loxp/-}小鼠,再将此种基因型的双杂合子小鼠自交,利用普通PCR和侧交最终筛选出Kras^{LSL-G12D/-}+Smad4^{loxp/loxp}品系小鼠,该小鼠即为本研究所构建的双基因模型小鼠。

1.3.2 小鼠组织DNA提取 为提取实验小鼠DNA进行基因型的鉴定与筛选,剪取2周龄实验小鼠尾尖4~6mm,剪碎置于1.5mLEP管中,使用鼠尾DNA提取试剂盒提取小鼠组织DNA,4℃保存备检。

1.3.3 Kras的检测 正向引物:5'-TGTCTTTCCCAGCACAGT-3'(针对野生型)、5'-GCAGGTCGAGGGACCTAATA-3'(针对突变型);反向引物均为:5'-CTGCATAGTACGCTATACCCTGT-3'。PCR扩增条件为:94℃变性2min;94℃15s,60℃15s,72℃10s,28个循环;72℃2min,4℃冷却保温。PCR产物1.5%琼脂糖凝胶电泳20min,凝胶荧光成像系统下观察,Kras^{LSL-G12D/-}小鼠应扩增出100bp和250bp的片段,而野生型小鼠仅扩增出250bp的片段。

1.3.4 Smad4^{loxp/loxp}的检测 正向引物:5'-TAAGAGCCACAGGGTCAAGC-3',反向引物:5'-TTCCAGGAAAAACAGGGCTA-3'。PCR扩增条件为:94℃预变性2min;94℃变性20s,65℃复性15s(每个循环温度降低0.5℃),68℃延伸10s,10个循环;接着94℃变性15s,60℃复性15s,72℃延伸10s,共28个循环;72℃延伸2min,4℃保存。PCR产物3%琼脂糖凝胶电泳30min,Smad4^{loxp/loxp}小鼠只扩增出500bp的片段,而野生型小鼠则扩增500bp和436bp的片段。

1.4 双基因模型小鼠验证

1.4.1 构建病毒载体 利用本课题组前期构建的 IRES-Luciferase 和 Cre-IRES-Luciferase 质粒 (其中 Luciferase 即荧光素酶基因用来示踪单个细胞, 以研究单个细胞的行为变化), 通过慢病毒系统转染 293T 细胞, 包装质粒为 PMD2G 和 PSPAX2, 48 h 后收取病毒, 将收取的病毒纯化, 测定病毒滴度并保存, 分别记为 $Lentivirus^{IRES-Luciferase}$ 和 $Lentivirus^{Cre-IRES-Luciferase}$ 。

1.4.2 体外验证 Cre 酶活性 取处于对数生长期状态良好的小鼠结肠癌细胞 MCA38 用于慢病毒感染, 在 12 孔板中接种 MCA38, 在 37 °C、体积分数为 5% CO₂ 的培养箱中培养。待细胞长至 60%~70% 的密度时, 用慢病毒感染细胞, 在 IVIS 系统下观察。

1.4.3 Cre 重组酶诱导小鼠结肠上皮细胞突变 生理盐水灌肠去除直肠及远端结肠内的肠内容物, 戊巴比妥钠 (10 mg/mL, 50 mg/kg) 腹腔注射麻醉小鼠, 小鼠结肠镜检查肠道清洁情况, 并确定感染部位, 利用微量注射器向小鼠肠黏膜下注射 $Lentivirus^{Cre-IRES-Luciferase}$ (10^8 pfu), 对照组注射 $Lentivirus^{IRES-Luciferase}$ (10^8 pfu)。感染 1 周后, 小鼠腹腔注射 D-Luciferin (150 μg/mL, 10 μL/g), IVIS 系统下观察荧光, 调整病毒滴度和感染频率以获得仅 1~2 处成瘤病灶的小鼠模型。然后每周利用 IVIS 系统监测小鼠成瘤情况。

1.4.4 组织病理学检查 待模型小鼠肿瘤形成后, 将小鼠麻醉, 解剖取出结肠并用 PBS 冲洗, 在新制备的甲醛中固定 24 h, 石蜡包埋切片后行 HE 染色, 显微镜下观察肿瘤组织病理学变化, 记录结肠上皮细胞瘤变情况。

1.5 统计学方法

统计分析使用 GraphPad Prism 6 软件。小鼠的繁殖学指标用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 双基因模型小鼠与 C57BL/6J 小鼠的差异比较用独立样本 *t* 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 双基因模型小鼠 $Kras^{LSL-G12D/-}+Smad4^{loxp/loxp}$ 的建系及鉴定结果

构建的双转基因模型小鼠与 C57BL/6J 小鼠相比外形无明显差别, 见图 2。与 C57BL/6J 小鼠比较, 双转基因模型小鼠的窝产仔数更多 ($P=0.038$)、胎间隔时间短 ($P<0.001$), 见表 1。双转基因模型小鼠的基因鉴定结果见图 3, 其中 1、2 和 3 号小鼠基



图 2 示第 8 周时双基因模型小鼠的外观, 与 C57BL/6J 小鼠 (左边) 相比外观无明显差别

表 1 两种小鼠繁殖学指标比较结果 ($\bar{x} \pm s$)

小鼠	<i>n</i>	窝产仔数 (只)	胎间隔 (d)	离乳成活率 (%)
C57BL/6J 鼠	48	5.500±0.500	32.8±0.6	93.5±4.3
双基因模型小鼠	69	8.625±1.267	25.8±0.6	88.0±5.2
<i>t</i> 值		2.295	4.278	1.020
<i>P</i> 值		0.038	<0.001	0.325

因型为 $Kras^{LSL-G12D/-}+Smad4^{loxp/loxp}$, 为本研究所构建的双转基因模型小鼠; 4 号小鼠是培育过程中另一种常见的基因型, 为 $Kras^{-/-}+Smad4^{loxp/loxp}$, 该型小鼠在实验过程中需剔除。

2.2 $Lentivirus^{Cre-IRES-Luciferase}$ 和 $Lentivirus^{IRES-Luciferase}$ 体外功能验证

体外验证病毒载体功能的 IVIS 下显像结果见图 4, $Lentivirus^{Cre-IRES-Luciferase}$ 和 $Lentivirus^{IRES-Luciferase}$ 均能顺利导入小鼠结肠癌细胞中并表现出荧光, 间接验证了 Cre 重组酶体外表达。

2.3 构建 $Kras^{LSL-G12D/-}+Smad4^{loxp/loxp}$ 双转基因小鼠散发结直肠癌模型情况

2.3.1 Cre 重组酶诱导小鼠结肠上皮细胞突变 用载体病毒感染双转基因模型小鼠结肠上皮细胞, 在注射后第 4 周时 2 组小鼠荧光信号基本相同, 在第 8 周至第 12 周时 $Lentivirus^{Cre-IRES-Luciferase}$ 组的荧光信号较前有明显增强, 而 $Lentivirus^{IRES-Luciferase}$ 组荧光信号出现衰减, 甚至在第 8 周后已完全检测不到。见图 5。

2.3.2 瘤变组织病理学检查结果 与正常的小鼠结直肠细胞相比, 经病毒感染瘤变的组织 HE 染色镜下可见细胞异型性增加, 细胞核大而深染, 核质比例增加, 并散在黏液空泡, 病理检查证实为腺癌, 见图 6。

3 讨论

散发性结直肠癌的进展过程遵循腺瘤—腺癌

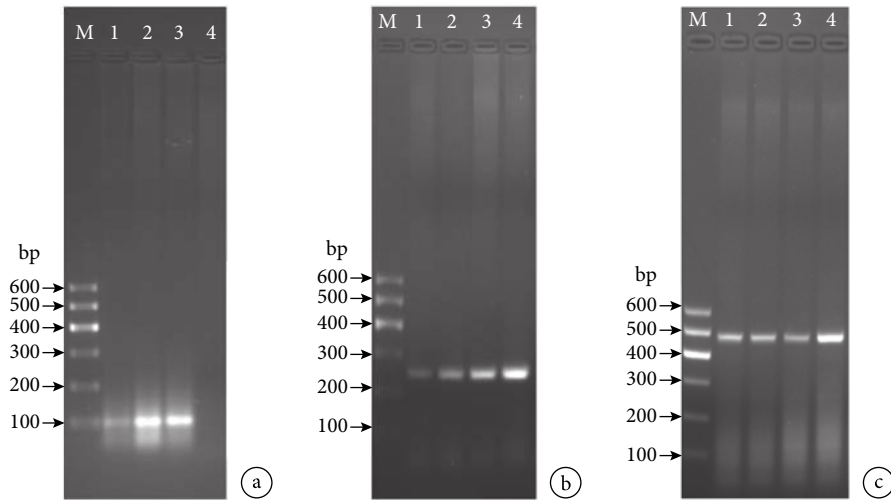


图3 示双转基因模型小鼠的基因鉴定图

a: 为加 Kras 突变型引物; b: 为加 Kras 野生型引物; c: 为加 Smad4 引物。1、2 和 3 号泳道为构建的双转基因模型小鼠; 4 号泳道为 Kras^{-/-}+Smad4^{loxp/loxp} 小鼠; M 为 Marker

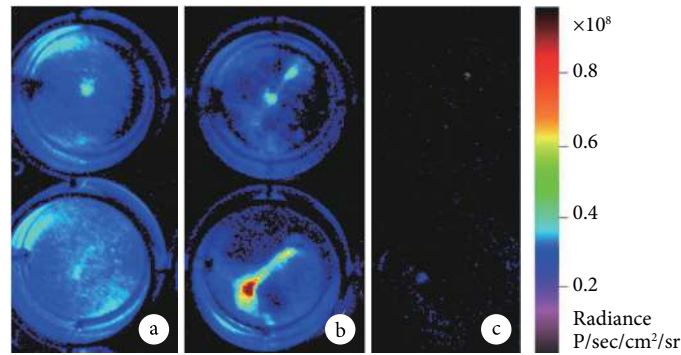


图4 示体外验证慢病毒载体功能在 IVIS 系统下的显像情况

a: 用 Lentivirus^{IRES-Luciferase} 感染 MCA38 细胞; b: 用 Lentivirus^{Cre-IRES-Luciferase} 感染 MCA38 细胞; c: 未用病毒载体感染的 MCA38 细胞作为阴性对照组

—转移的发展轴,其分子机制包括:染色体不稳定^[6]、微卫星不稳定^[7]及 CpG 岛甲基化表型^[8],由此可见,散发性结直肠癌发病机制的多样性使得单个动物模型难以模拟疾病进展全过程。

Hung 等^[9]认为,一个理想的结直肠癌动物模型至少应该满足:① 仅有一个或少数几个原发成瘤病灶并具有一定的远处转移能力;② 原发病灶必须局限于结肠上皮细胞和肌层之间;③ 具有较短的成瘤周期及可预知的时间轴。本研究所构建的双转基因模型小鼠利用病毒载体注射诱导肠上皮细胞癌变,通过注射的深度来控制原发病灶的位置,同时还能通过注射病毒的滴度和剂量保证仅有少量原发病灶产生;由于观察时间较短及多数成瘤小鼠因肠梗阻导致死亡影响了对远处转移能力的评估,在后期的实验中可以利用肠道支架等方式延长模型小鼠的生命周期,以观察肿瘤转移情况。

结肠上皮细胞的更新依赖于结肠隐窝基底部的多能干细胞维持,当隐窝干细胞基因发生突变后,细胞的自我更新、克隆、增殖及分化超过了正常肠上皮细胞凋亡速度,就将导致腺瘤的形成。基因工程小鼠模型的巨大优势在于利用相对简易的基因修饰,实现目的基因在某一时段只在特定的组织表达或者失活,使模型具有特定的生物表型或特性,提供与散发性结直肠癌相似的基因分子学改变,最大程度上模拟临床状态^[10-11],同时也减少基因重组对模型动物发育影响而导致的癌性损伤或胚胎死亡^[12],并且还能精确研究目的基因与疾病发生的关系^[13]。本研究利用了慢病毒介导 Cre-loxp 重组酶系统感染小鼠结直肠隐窝上皮干细胞,Cre 重组酶对结直肠隐窝-绒毛轴的上皮干细胞进行选择性基因修饰,激活致癌基因,诱导肠上皮细胞瘤变进而成癌。

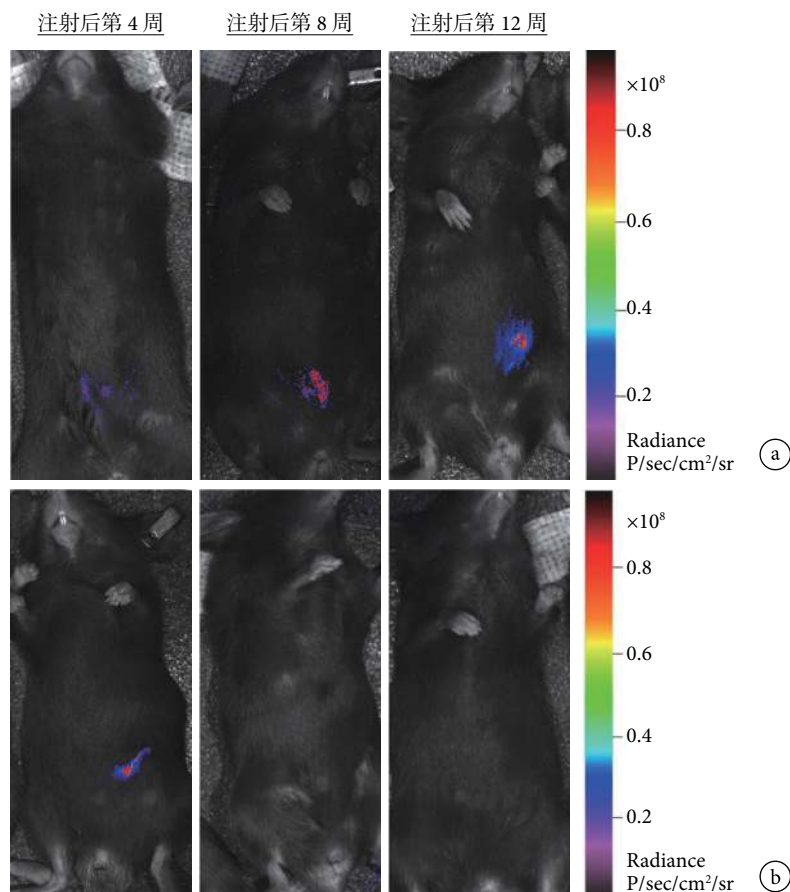


图 5 $Lentivirus^{Cre-IRES-Luciferase}$ 和 $Lentivirus^{IRES-Luciferase}$ 感染双转基因模型小鼠结肠上皮细胞后第 4 周、8 周、12 周时 IVIS 系统下的荧光情况

a: $Lentivirus^{Cre-IRES-Luciferase}$ 感染; b: $Lentivirus^{IRES-Luciferase}$ 感染

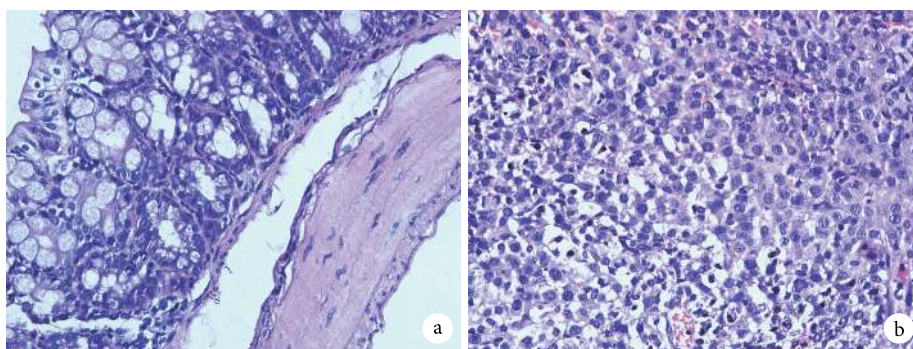


图 6 小鼠结肠上皮细胞 HE 染色结果

a: 为构建的未被诱导突变模型小鼠肠道结构镜下观 (HE $\times 200$); b: 为模型小鼠经 Cre 酶诱导成瘤后取出的肿瘤组织镜下观 (HE $\times 400$)

腺瘤的形成常常起始于抑癌基因 (如 APC 基因等) 失活, 通过 Wnt 信号的持续激活导致腺瘤的形成; 从腺瘤向腺癌的转变往往还需要额外的分子事件, 如原癌基因 Kras 的激活; 在散发性结肠癌中常可见到突变的 Kras, 并与肿瘤侵袭性及对化疗药物耐药相关, 常常预示着患者不好的预后^[14]。此外, 突变的 Kras 可以与失活的抑癌基因如

Smad4 协同作用, 以增强促进肿瘤生长和侵袭性的 Wnt 信号^[15]。Smad4 基因的表达缺失在早期胃肠道肿瘤中就可见到, 特别是在低分化肿瘤细胞及印戒细胞癌中更为普遍, 研究^[16]发现, 转化生长因子- β /Smad4 基因低表达将会导致结肠直肠癌具有更高的增殖和转移倾向。Luo 等^[17]研究发现, 在构建的 $LSL-Kras^{G12D}+Apc^{\Delta14/+}$ 双转基因小鼠中, Cre 诱导的成

瘤与那些单转基因 $Apc^{d14/+}$ 小鼠相比, 肿瘤细胞的分化程度更差, 侵袭性更强, 成瘤率也更高。本研究的前期预实验结果也证实了双转基因小鼠的成瘤率比单转基因高。需要注意的是, 本研究所构建的双转基因模型小鼠的基因型为部分杂合, 每一代小鼠均需用普通 PCR 进行基因检测; 有趣的是, 根据孟德尔遗传定律, 后代小鼠中杂合概率理论上为 50%, 但我们在研究过程中发现, 后代小鼠杂合概率稳定于 85% ~ 90%, 可能的机制有待进一步探究。

微型计算机断层扫描 (microCT)、微型正电子发射断层扫描 (microPET) 等技术已被用于小动物肿瘤的体内成像^[20], 但高成本和技术难度限制这些成像技术的应用, 因此, 更符合成本效益原则, 基于荧光和生物发光信号的光学成像技术得以广泛应用于肿瘤研究的各个领域。Qin 等^[21]更是将表达有绿色荧光蛋白-荧光素酶 2-铁蛋白的质粒转染肝癌细胞, 然后皮下注射到小鼠体内, 构建了一种既可定量分析又可空间定位的肝癌模型。本研究模型利用慢病毒向肠上皮干细胞内导入荧光素酶基因作为报告基因来示踪单个肠上皮干细胞, 使得可以在活体条件下研究单个干细胞的分化及转归。小动物活体显像技术使得人们可以在个体层面定量、无创及动态地观察动物体内的生理生化变化, 提供了传统动物模型无法获得的重要信息^[18]。在小鼠体内丰富的 ATP、氧气和外源性荧光素的条件下, 荧光素酶催化产生低背景和高信噪比的荧光信号, 可以在活体情况下定量分析肿瘤细胞的数量, 可以动态地观察肿瘤的发生、发展过程^[19]。

机体的免疫反应全程参与了结直肠癌的产生及进展过程, 浸润于肿瘤组织和肿瘤周围区域的免疫细胞也被视为是影响患者预后独立预测指标^[22]。本研究以 C57BL/6J 小鼠为遗传背景所构建的模型与传统的裸鼠种植模型相比完整保留了小鼠的免疫功能, 后期的进一步研究中可以利用结肠镜系统在肿瘤发生、发展及转移过程中分别对原发灶及周围组织多次取材, 用以探究局部免疫反应对结直肠癌发生、发展的影响。值得注意的是, 机体的免疫反应对结直肠癌的发生和发展具有双重作用^[23-25], 一方面, 机体的免疫细胞能够特异性及非特异性地杀灭肿瘤细胞, 从而发挥抑制肿瘤的作用; 另一方面, 肿瘤局部持续的免疫反应也可促进肿瘤生长、浸润及通过免疫逃避介导肿瘤转移。

总之, 本研究所构建的双转基因小鼠模型保留了完整的免疫功能, 能够在活体状态下动态研究机

体免疫状态与结直肠癌的发生、发展和转移关系, 同时该模型还进一步揭示了原癌基因 *Kras* 与抑癌基因 *Smad4* 之间的协同致癌作用。

参考文献

- 1 Rui Y, Wang C, Zhou Z, *et al*. K-Ras mutation and prognosis of colorectal cancer: a meta-analysis. *Hepatogastroenterology*, 2015, 62(137): 19-24.
- 2 Inamoto S, Itatani Y, Yamamoto T, *et al*. Loss of SMAD4 promotes colorectal cancer progression by accumulation of myeloid-derived suppressor cells through the CCL15-CCR1 chemokine axis. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(2): 492-501.
- 3 Wosiak A, Wodziński D, Kolasa M, *et al*. SMAD-4 gene expression in human colorectal cancer: Comparison with some clinical and pathological parameters. *Pathol Res Pract*, 2017, 213(1): 45-49.
- 4 Cheng D, Zhao S, Tang H, *et al*. MicroRNA-20a-5p promotes colorectal cancer invasion and metastasis by downregulating *Smad4*. *Oncotarget*, 2016, 7(29): 45199-45213.
- 5 Belmont PJ, Budinska E, Jiang P, *et al*. Cross-species analysis of genetically engineered mouse models of MAPK-driven colorectal cancer identifies hallmarks of the human disease. *Dis Model Mech*, 2014, 7(6): 613-623.
- 6 Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*, 2010, 138(6): 2059-2072.
- 7 Gelsomino F, Barbolini M, Spallanzani A, *et al*. The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer: A review. *Cancer Treat Rev*, 2016, 51: 19-26.
- 8 Fleet JC. Animal models of gastrointestinal and liver diseases. New mouse models for studying dietary prevention of colorectal cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2014, 307(3): G249-G259.
- 9 Hung KE, Maricevich MA, Richard LG, *et al*. Development of a mouse model for sporadic and metastatic colon tumors and its use in assessing drug treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(4): 1565-1570.
- 10 Roper J, Martin ES, Hung KE. Overview of genetically engineered mouse models of colorectal carcinoma to enable translational biology and drug development. *Curr Protoc Pharmacol*, 2014, 65: 14.
- 11 Abi-Ghanem J, Samsonov SA, Pisabarro MT. Insights into the preferential order of strand exchange in the Cre/loxP recombinase system: impact of the DNA spacer flanking sequence and flexibility. *J Comput Aided Mol Des*, 2015, 29(3): 271-282.
- 12 Puppa MJ, White JP, Sato S, *et al*. Gut barrier dysfunction in the *Apc* (Min/+) mouse model of colon cancer cachexia. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1812(12): 1601-1606.
- 13 Marecki JC, Parajuli N, Crow JP, *et al*. The use of the Cre/loxP system to study oxidative stress in tissue-specific manganese superoxide dismutase knockout models. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(10): 1655-1670.
- 14 Amankwatia EB, Chakravarty P, Carey FA, *et al*. MicroRNA-224 is associated with colorectal cancer progression and response to 5-fluorouracil-based chemotherapy by KRAS-dependent and -independent mechanisms. *Br J Cancer*, 2015, 112(9): 1480-1490.
- 15 Saud SM, Li W, Morris NL, *et al*. Resveratrol prevents tumorigenesis in mouse model of *Kras* activated sporadic colorectal cancer by suppressing oncogenic *Kras* expression.

- Carcinogenesis, 2014, 35(12): 2778-2786.
- 16 Voorneveld PW, Kodach LL, Jacobs RJ, *et al.* The BMP pathway either enhances or inhibits the Wnt pathway depending on the SMAD4 and p53 status in CRC. *Br J Cancer*, 2015, 112(1): 122-130.
 - 17 Luo F, Brooks DG, Ye H, *et al.* Mutated K-ras (Asp12) promotes tumorigenesis in Apc (Min) mice more in the large than the small intestines, with synergistic effects between K-ras and Wnt pathways. *Int J Exp Pathol*, 2009, 90(5): 558-574.
 - 18 Panza P, Maier J, Schmees C, *et al.* Live imaging of endogenous protein dynamics in zebrafish using chromobodies. *Development*, 2015, 142(10): 1879-1884.
 - 19 Kocher B, Piwnica-Worms D. Illuminating cancer systems with genetically engineered mouse models and coupled luciferase reporters in vivo. *Cancer Discov*, 2013, 3(6): 616-629.
 - 20 Koba W, Jelicks LA, Fine EJ. MicroPET/SPECT/CT imaging of small animal models of disease. *Am J Pathol*, 2013, 182(2): 319-324.
 - 21 Qin X, Hu X, Wu C, *et al.* Hepatocellular carcinoma cells carrying a multimodality reporter gene for fluorescence, bioluminescence, and magnetic resonance imaging *in vitro* and *in vivo*. *Acad Radiol*, 2016, 23(11): 1422-1430.
 - 22 Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet*, 2014, 383(9927): 1490-1502.
 - 23 Chen J, Chen Z. The effect of immune microenvironment on the progression and prognosis of colorectal cancer. *Med Oncol*, 2014, 31(8): 82.
 - 24 Patel SA, Gooderham NJ. IL6 mediates immune and colorectal cancer cell cross-talk via miR-21 and miR-29b. *Mol Cancer Res*, 2015, 13(11): 1502-1508.
 - 25 Maglietta A, Maglietta R, Staiano T, *et al.* The immune landscapes of polypoid and nonpolypoid precancerous colorectal lesions. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0159373.

收稿日期: 2018-01-17 修回日期: 2018-04-27
本文编辑: 蒲素清