

食管造影在诊断原位食管癌动物模型成功建立中的作用

尹子豪¹, 张红芳², 唐荣军³, 莫墨³, 赵江³, 张珂³, 俞青青³

(1. 浙江中医药大学第四临床医学院, 浙江 杭州 310053; 2. 杭州市肿瘤医院, 杭州肿瘤研究所, 浙江 杭州 310002; 3. 杭州市肿瘤医院, 浙江 杭州 310002)

摘要: [目的] 评估食管造影在辅助诊断食管癌原位动物模型成功建立中的作用。 [方法] 采用饲喂致癌物 4-硝基喹啉-1-氧化物(4-NQO)法建立 C57BL/6 小鼠食管鳞癌原位模型。28 周后采用食管造影检查对模型小鼠的食管进行摄片并影像分析。分离获取模型小鼠的食管组织, 采用 HE 染色及免疫组化法进行病理诊断, 以评估食管造影的准确性及实用性。 [结果] 饲喂致癌物 4-NQO 法成功建立了食管癌小鼠原位模型。成功对 4 只模型小鼠完成食管造影检查。4 只模型小鼠的食管均呈现食管变粗、造影剂流通受阻及“充盈缺损”现象, 提示了食管病变位置。通过 HE 染色及食管鳞癌标志物 CK14 免疫组化分析明确其中 2 只模型小鼠的食管病变为食管鳞癌, 另外 2 只食管鳞状乳头状瘤, 肿瘤显示率 100%。 [结论] 食管造影可以辅助诊断小鼠食管癌原位模型的成功建立。

关键词: 食管造影; 食管癌原位动物模型; 食管鳞癌; 诊断

中图分类号: R735.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2024)02-0118-09

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2024.02.B005

Application of Esophagography for Diagnosis of Esophageal Cancer in Established Mouse Model

YIN Zihao¹, ZHANG Hongfang², TANG Rongjun³, MO Mo³, ZHAO Jiang³, ZHANG Ke³, YU Qingqing³

(1. The Fourth Clinical Medical College of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. Hangzhou Cancer Institute, Hangzhou Cancer Hospital, Hangzhou 310002, China; 3. Hangzhou Cancer Hospital, Hangzhou 310002, China)

Abstract: [Objective] To evaluate the application of esophagography for the diagnosis of esophageal carcinoma in established animal model. [Methods] C57BL/6 mice were fed with carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO) to establish an orthotopic model of esophageal squamous cell carcinoma. After 28 weeks of modelling, the mice underwent esophagography; then the animals were sacrificed and the esophageal tissues were examined by HE staining and immunohistochemistry. [Results] An orthotopic mouse model of esophageal cancer was successfully established after 28 weeks of feeding 4-NQO. Esophagography was performed in 4 model mice, showing thickening of the esophagus, obstruction of the contrast agent flow and filling defect in the tumor lesions. HE staining and immunohistochemical CK14 staining confirmed the esophagographic diagnosis in 2 mice with esophageal squamous cell carcinoma, and other 2 mice with esophageal squamous papilloma. [Conclusion] Esophagography can assist the diagnosis in the establishment of orthotopic mouse esophageal cancer model.

Subject words: esophagography; orthotopic esophageal cancer model; esophageal squamous cell carcinoma; diagnosis

动物模型,尤其是小鼠模型,在连接各种类型肿瘤的基础研究和临床研究中扮演着不可替代的角

色,这些模型可用于评估治疗方案的抗肿瘤效果。对于食管癌小鼠模型,主要包括基因工程小鼠模型、致癌物或饮食诱导的小鼠模型以及肿瘤异种移植模型^[1]。其中,食管癌原位模型可以克服免疫缺陷和缺乏异质性的局限性,更准确地模拟肿瘤微环境,适合研究肿瘤与间质的相互作用,且原位肿瘤模型能更好地

基金项目: 浙江省医学会临床科研基金项目(2021ZYC-Z05); 杭州市农业与社会发展科研项目(2020ZDSJ0552); “大医精诚”肿瘤防治研究及学术交流公益项目

通信作者: 俞青青, E-mail: yuqq1983@163.com

收稿日期: 2023-11-01; **修回日期:** 2024-01-14

反映原发肿瘤的疾病进展情况^[2]。Yang等^[3]成功利用食管癌的原位模型证明了阻断 CCL2-CCR2 轴通过阻碍肿瘤相关巨噬细胞募集而增强 CD8 T 细胞在肿瘤微环境中的抗肿瘤功效。

对于食管癌原位模型的建立,Tang等^[4]使用 4-硝基喹啉-1 oxide (4-NQO,一种 DNA 加合形成致癌物),口服给药(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)小鼠,证明可导致 100%的食管鳞状细胞癌病变发生率。但是食管癌原位小鼠模型肿瘤形成的时间和大小并不一致,无法保证所有小鼠能像 Tang 等的实验中 100%食管鳞状细胞癌造模成功,进一步影响后续评估抗肿瘤治疗效果的准确性和说服力,这是目前亟待解决的问题。

临床上,食管造影作为食管癌患者的首选检查方法,影像上可出现食管壁增厚、中断及管腔形成不规则充盈缺损现象等。计算机断层扫描(computed tomography,CT)、磁共振成像(magnetic resonance imaging,MRI)及 PET/CT^[5]检查,也作为辅助诊断食管癌的影像学方法^[6]。先前的研究中,MRI^[7-8]及 PET/CT^[9]检查在小鼠食管成像中发挥一定的作用,但对于机器的成像水平要求高,不能普遍应用。因此,本研究建立了原位食管癌小鼠模型,探讨食管造影在辅助诊断小鼠原位模型成功建立中的作用。

1 材料与方法

1.1 小鼠

为建立食管癌原位模型,选用 6 周龄雌性 C57BL/6 小鼠,体重 18~20 g,购自中国上海斯莱克公司。这些小鼠被喂以商业食物,并在实验前适应了 1 周。实验在可控的条件下进行,温度(23 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度 50% $\pm$ 10%,光照(12 h 明/暗周期)。

1.2 原位食管癌小鼠模型的建立

使用致癌物 4-硝基喹啉 N-氧化物 ($\text{C}_9\text{H}_6\text{N}_2\text{O}$,纯度 $\geq$ 98%,CAS No.56-57-5,Sigma Aldrich,4-NQO)诱导食管鳞癌。每周用丙二醇配制原液(2 mg/mL),使用去离子水稀释至工作浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存,每周更换新鲜配制含致癌物 4-NQO 的饮用水,装在遮光水瓶中,经过 16 周的致癌物治疗后,饮用水改为去离子水,继续观察 16 周(Figure 1A)。小鼠被允许随时获得饮用水,实验组饮水中含有 4-NQO,对照组饮水水中不含 4-NQO,丙二醇量两组

相同。实验组共 18 只小鼠,对照组共 6 只小鼠。每天监测所有动物的一般行为异常、中毒、疾病或不适的迹象。在长达 26 周或 32 周的不同时间对小鼠进行食管造影检查以及食管癌前病变和癌病变进行了分析。实验程序经浙江中医药大学动物实验伦理委员会批准(批号:1ACUC-202305-27)。

1.3 磁共振成像

随机选取实验组体重明显降低小鼠进行 MRI 检查,共 3 只,固定小鼠四肢,于检查前尾静脉注射磁共振专用造影剂。机械参数:使用德国西门子 MAGNETOM Aera XJ 1.5T 核磁共振仪,只做 PD(质子成像)序列进行小鼠矢状面与冠状面的扫描。由于小鼠体积过小,为在磁体间引出小鼠体内含水信号,在小鼠下方放置 500 mL 生理盐水 1 袋,使用膝关节专用(接受带射频发射)线圈;FOV:16 mm;层厚 3.0 mm;层间隔为层厚的 20%;TR:2 810.0 ms,TE:47.0 ms。

1.4 食管造影

随机选取体重明显下降小鼠进行食管造影,共 5 只实验组小鼠进行食管造影。将小鼠四肢固定于塑料平板,进行麻醉,对比剂碘海醇 100 mL(含碘 300 mg/mL)用蒸馏水稀释(稀释比例 1:3),使用灌胃针将造影剂从下至上缓慢注入小鼠食管内,动态观察记录造影剂在食管内流动情况,分别从正侧位、斜位对小鼠进行摄片,直至造影剂完全排至肠道,造影结束后小鼠腹腔注射 200~400 μL 生理盐水促进造影剂排出。机器参数:使用日本岛津 D-VISION PLUS 50 型数字胃肠机,透视曝光条件:管电压 50 Kv,自动管电流 50 mAs;使用最小 FOV(照射野)。

1.5 组织解剖和切片

麻醉后颈椎脱臼法处死小鼠,分离获取小鼠食管,全食管纵向切开,计数直径 >0.5 mm 的肿瘤。将食管横切成上、中、下三区,用缓冲甲醛水溶液固定,石蜡包埋,切成 5 μm 切片,-4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,用于 HE 染色病理检查和关键蛋白的免疫组织化学(immunohistochemistry,IHC)分析。

1.6 病理检查

取自每个食管的切片脱蜡,在分级酒精系列中重新水化,并进行组织病理学的 HE 染色。显微镜(Nikon ECLIPSE Ci)下观察,使用 3D 扫描仪(nno-ramic SCAN,3D HISTECH)扫描成像。组织切片中鳞

状瘤的组织学鉴定由两位病理学家双盲进行。观察到的病变分为四种类型:上皮增生、不典型增生、乳头状瘤和浸润性癌。累及整个上皮厚度的病变被认为是原位癌。乳头状瘤定义为肿瘤细胞的非侵袭性外生长,浸润性癌定义为侵袭上皮组织的病变^[4],临床上,乳头状瘤存在恶性转化潜力^[10-11],可以视为癌前病变的一种^[12]。

1.7 免疫组化

取小鼠的食管标本进行切片,采用 IHC 方法对小鼠上皮细胞中的中间丝等鳞癌标志物进行研究,如细胞角蛋白 14(cytokeratin 14,CK14)和 Ki-67。CK14 升高是人和小鼠食管癌发生的生物标志物,无论起源或分化程度如何,CK14 在整个上皮细胞中都有高表达^[13-14]。Ki-67 是癌症中细胞增殖最广泛使用的标志物^[15],在癌症进展中也具有关键作用。将载玻片去烷化并重新水化,在高压锅中于抗原去掩蔽液中进行抗原修复 2 min。内源性过氧化物酶用 3% H_2O_2 猝灭后,用 1.5%山羊血清或载体特异性封闭试剂(一抗为小鼠免疫球蛋白)封闭组织切片。K14 (1:20)和 Ki-67(1:200)抗体与组织在 22℃下孵育 30 min,所有稀释液均为 0.5%牛血清白蛋白磷酸盐缓冲液(PBS),然后将切片与适当的生物素化二抗和链霉亲和素-辣根过氧化物酶孵育。用 3,3'-二氨基联苯四胺盐酸盐孵育切片,苏木素轻度反染色,观察单个蛋白质的染色情况。显微镜下观察,使用 3D 扫描仪扫描成像。

2 结果

2.1 使用化学药物诱导方法成功建立食管癌小鼠原位模型

与对照组相比,4-NQO 药物诱导的小鼠体重 12 周后开始减轻(Figure 1B),实验组小鼠体型消瘦,生长迟缓,毛发脱落(Figure 1C),进食能力明显下降。在致癌物作用 22 周后的不同时间点检查食管病变,药物诱导 25 周时病理首次诊断为食管癌变,解剖小鼠食管发现,与对照组相比,实验组食管直径明显变粗(Figure 1D),组织切片病理显示食管下段组织食管鳞状细胞癌诊断明确,癌细胞占比 80%,食管壁明显增厚,正常的基质细胞消失,对照组小鼠的食管显示清晰的上皮细胞和单层基底细胞 (Figure 1E~

1F)。随后对小鼠食管组织进行 Ki-67 和 CK14 免疫组化染色(Figure 1G),两位病理学家观察免疫组化结果均认为 4-NQO 诱导的食管肿瘤 CK14 和 Ki-67 染色符合食管鳞癌特征。

2.2 增强 MRI 影像检查平台对小鼠食管癌原位模型成功建立的辅助诊断作用

25 周死亡的另外 2 只实验组小鼠食管病理诊断为轻中度异型增生,未出现癌变(Table 1),这可能归因于小鼠模型的异质性。相对于直接处死小鼠获取食管组织进行病理诊断,是否存在无创检查可以辅助诊断食管癌原位小鼠模型成功建立引起思考。先对原位食管癌小鼠模型进行 MRI 检查,采用 1.5T 检查仪器,人用膝关节线圈,结果显示 MRI 对小鼠整体显像不佳,食管与周边器官密度太接近无法分辨,无法准确定位小鼠食管位置,无法观察到食管狭窄程度以及肿瘤区域的强化(Figure 2A),实验鼠 1(26 周)病理检查明确下段食管存在癌变病灶(Figure 2B),癌细胞占比 50%。随后,进一步使用小鼠专用线圈,并使用 3.0T 检查仪器,但 MRI 检查仍无法清晰显示实验鼠 2 食管位置(Figure 2C),实验鼠 2(26 周)食管病理明确食管上中下段食管鳞状细胞癌癌变,全层浸润,其中上段为高分化鳞癌(Figure 2D)。以上结果说明,在我们的实验当中,使用 1.5T/3T 临床增强 MRI 影像检查未能诊断食管癌原位小鼠模型造模成功。

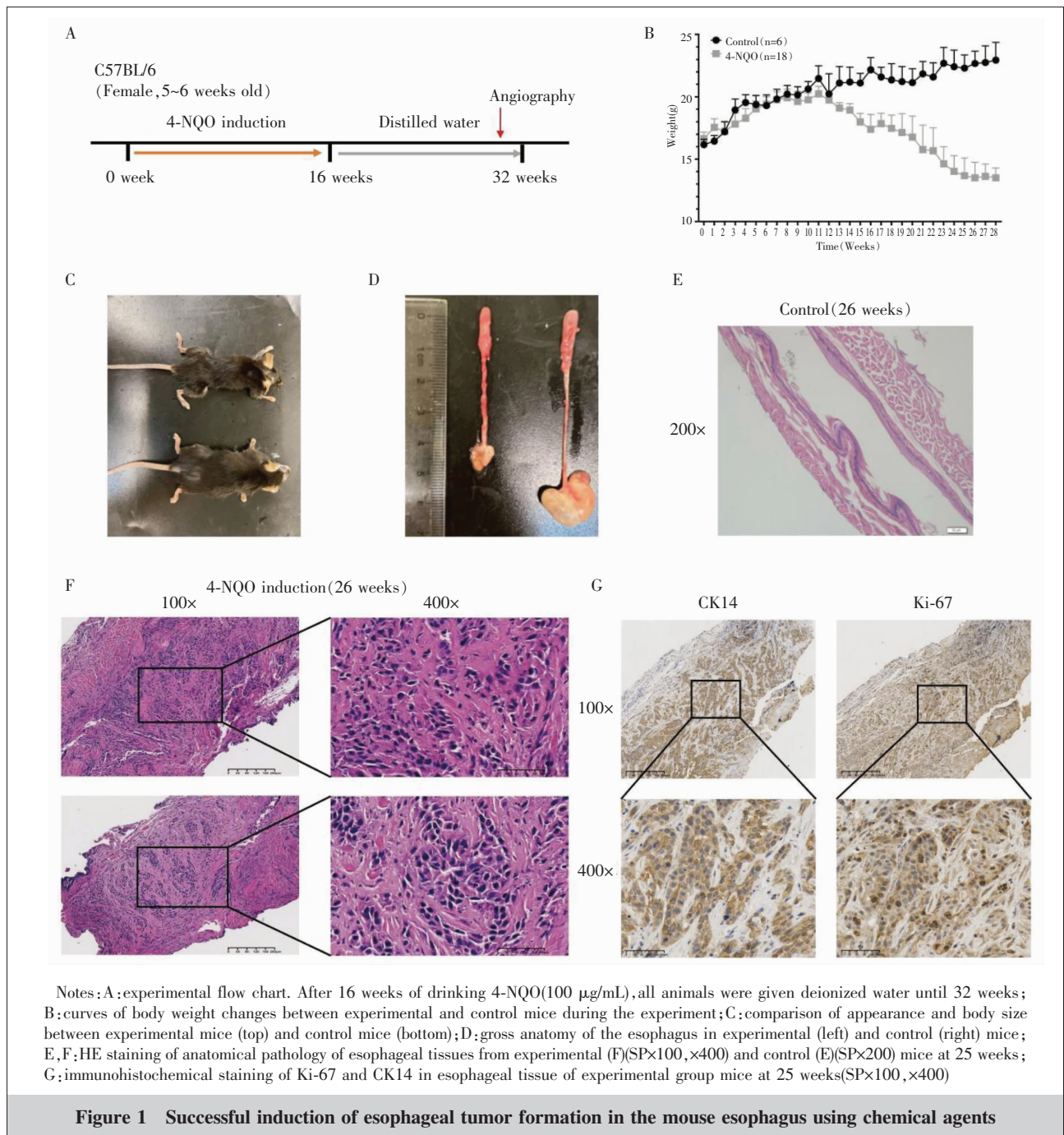
2.3 小鼠自行吞咽造影剂(钡剂)方法无法完成食管造影检查

由于增强 MRI 影像检查未能诊断食管癌原位小鼠模型造模成功,本研究探索了食管造影在食管癌原位小鼠模型辅助诊断中的作用。首先,使用注射器将稀释过的造影剂注入小鼠口腔中,让小鼠自行吞咽,同时进行动态摄片,选择最优成像结果。结果发现:①小鼠很难自行吞咽造影剂,从而导致造影剂

Table 1 4-NQO induction of esophageal tumors in C57BL/6 mouse (%)

Weeks of induction	No. of mice	Incidence of hyperplasia	Incidence of papilloma	Incidence of invasive SCC
25	3	100.00	0	33.33
26	3	100.00	0	33.33
27	1	100.00	100.00	100.00
28	6	100.00	66.67	83.33
29	3	100.00	100.00	66.67

Notes:4-NQO:4-nitroquinoline 1-oxide;SCC:squamous cell carcinoma

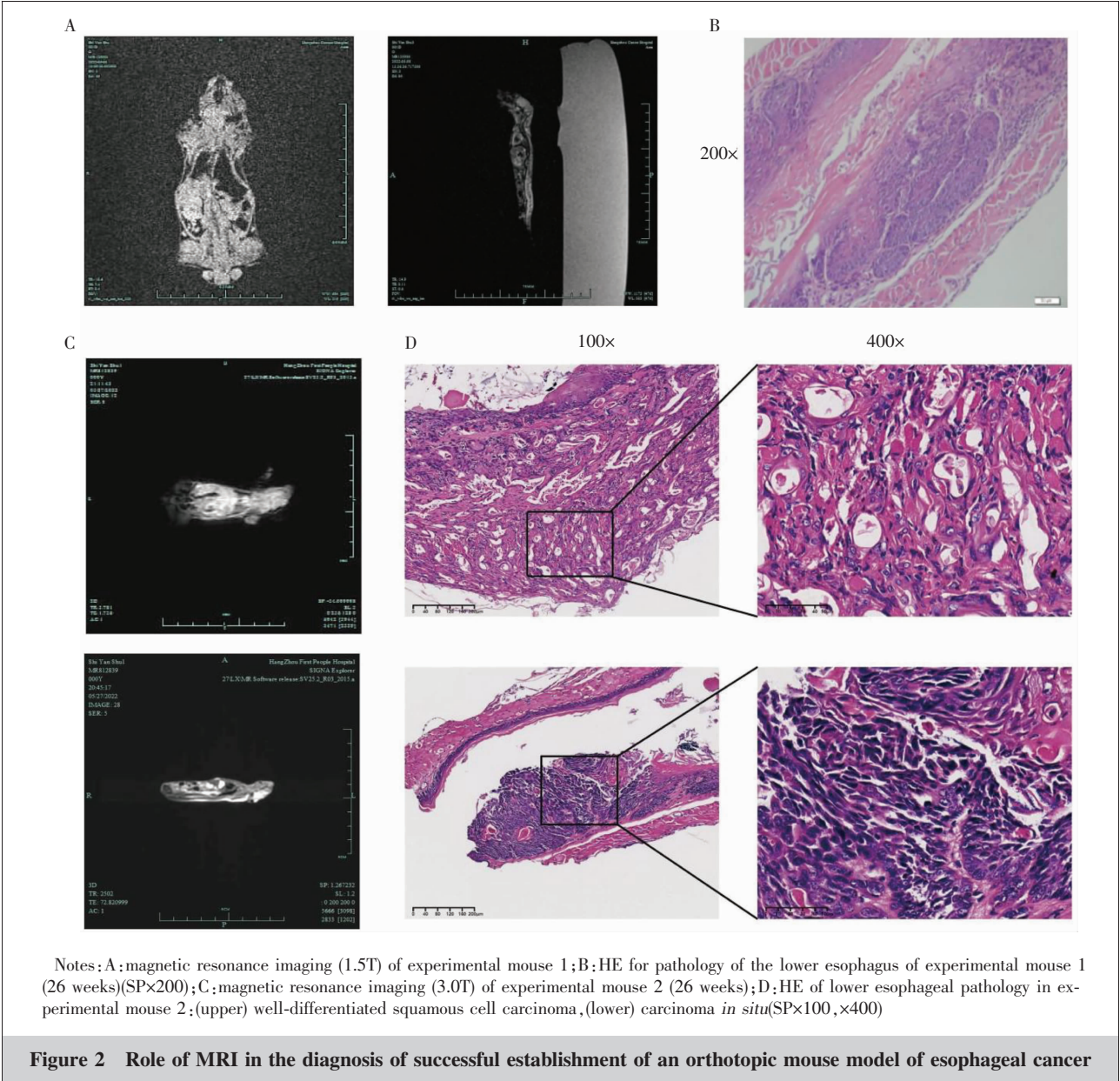


积聚在小鼠口腔中,无法保证整个食管被造影剂充盈,因此无法进一步评估食管管腔是否存在狭窄以及是否存在“充盈缺损”现象(Figure 3A 左);②留置针前端较为锋利,会导致食管或其他部位的损伤现象发生,比如造影剂注射到小鼠皮下(Figure 3B)。最后,造影剂检查完成半小时后再次拍片,发现钡剂积蓄在小鼠肠道,无法排除(Figure 3A 右)。实验鼠3食管中段的病理结果提示明确存在原位癌病灶

(Figure 3C)。

2.4 使用灌胃针注入造影剂(碘海醇)方法成功完成食管造影成像并发现“充盈缺损”图像

由于钡剂较浓稠,易导致实验鼠脱水死亡,因此将造影剂由钡剂更换为碘海醇(一种水性造影剂),同时改进注入造影剂方法:使用灌胃针将造影剂注入并充盈食管(具体详见方法部分)。首先,对照组小鼠进行食管造影,结果显示造影剂流通顺利,显像清



楚,正侧位片均可以看到清晰成像(Figure 4A),随后对实验鼠 4(28 周)进行食管造影检查,影像结果显示实验组小鼠食管较对照组明显变粗,且流通受阻,侧位片中食管可见多处缺损(Figure 4B),不排除受到小鼠反射性呼吸气流影响,可能是由于小鼠未经麻醉、活动能力较强引起。综合阅读影像后,正位片食管中下段考虑存在癌变,后经病理证实为中重度异型-食管原位癌(Figure 4C)。

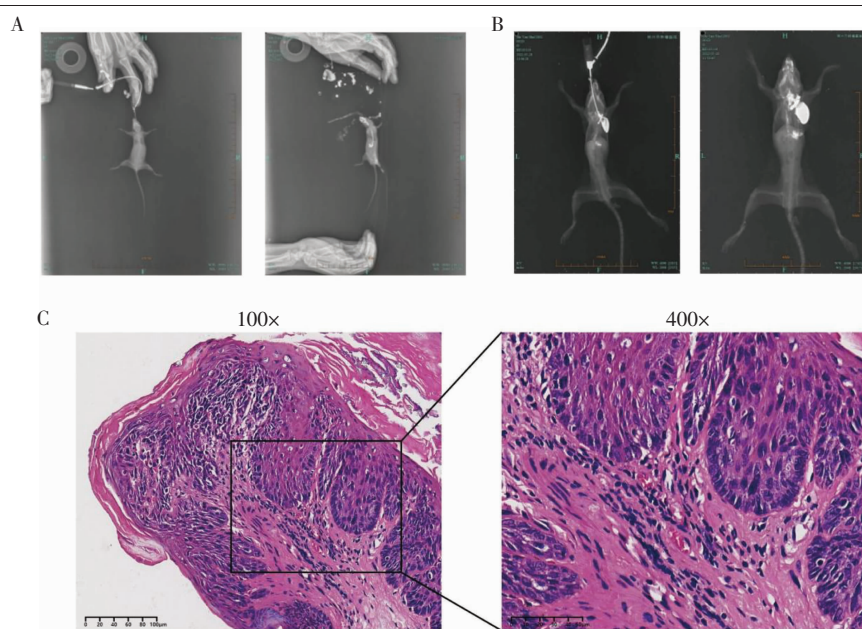
2.5 食管造影检查(碘海醇)成功诊断小鼠食管癌原位模型建立

为排除小鼠反射性呼吸气流影响,在食管造影

前对小鼠进行麻醉。实验鼠 5(28 周)麻醉后进行食管造影检查,动态观察到食管下段 1/5 距贲门处可见一充盈缺损,造影剂通过受阻,管腔狭窄(Figure 5A),解剖小鼠食管组织发现,食管下段存在明显肿块(Figure 5B 红色箭头),病理证实食管下段存在食管原位鳞癌癌变(Figure 5C),并与影像中充盈缺损的位置一致。以上结果证实了食管造影在辅助诊断食管癌模型建立成功中的可行性。

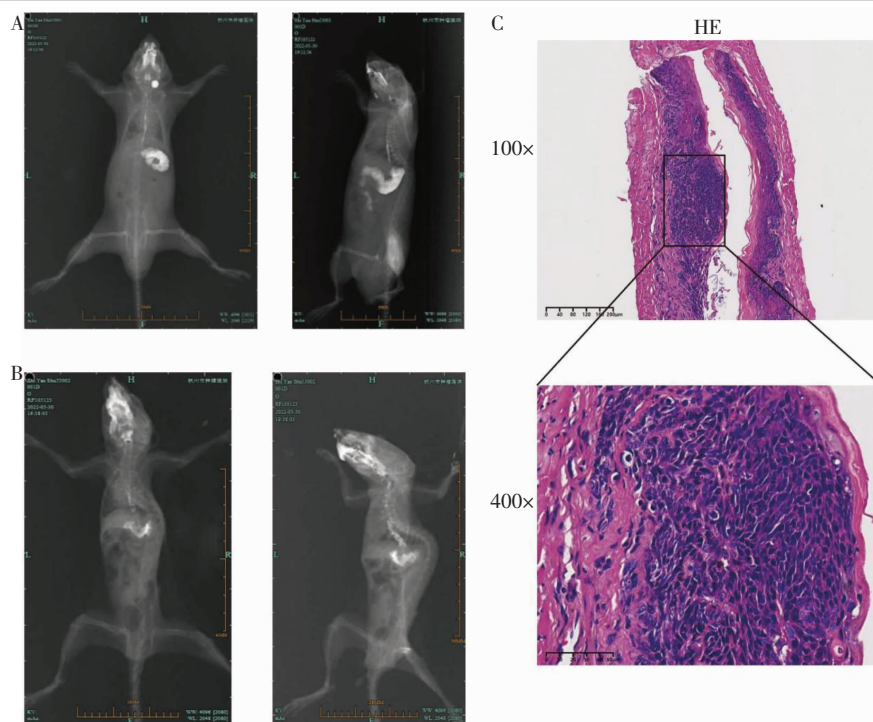
2.6 食管造影检查出现充盈缺损可诊断小鼠食管癌原位模型成功建立

对食管癌原位小鼠模型进行食管造影检查。实



Notes: A: images of contrast agent in control mice injected by indwelling needle method; B: experimental mouse 3 (28 weeks) was injected with contrast agent by indwelling needle method; C: histopathological HE of middle esophageal carcinoma tissues from experimental mouse 3: carcinoma *in situ* (SPx100, x400)

Figure 3 Indwelling needle injection of contrast agent method is not feasible in the successful establishment of diagnostic mouse esophageal cancer model



Notes: A: Iohexol contrast image results of control mice; B: Iohexol contrast images of experimental mouse 4 (28 weeks); C: pathological HE of the middle esophagus of experimental mouse 4: moderate-severe dysplasia - carcinoma *in situ* (SPx100, x400)

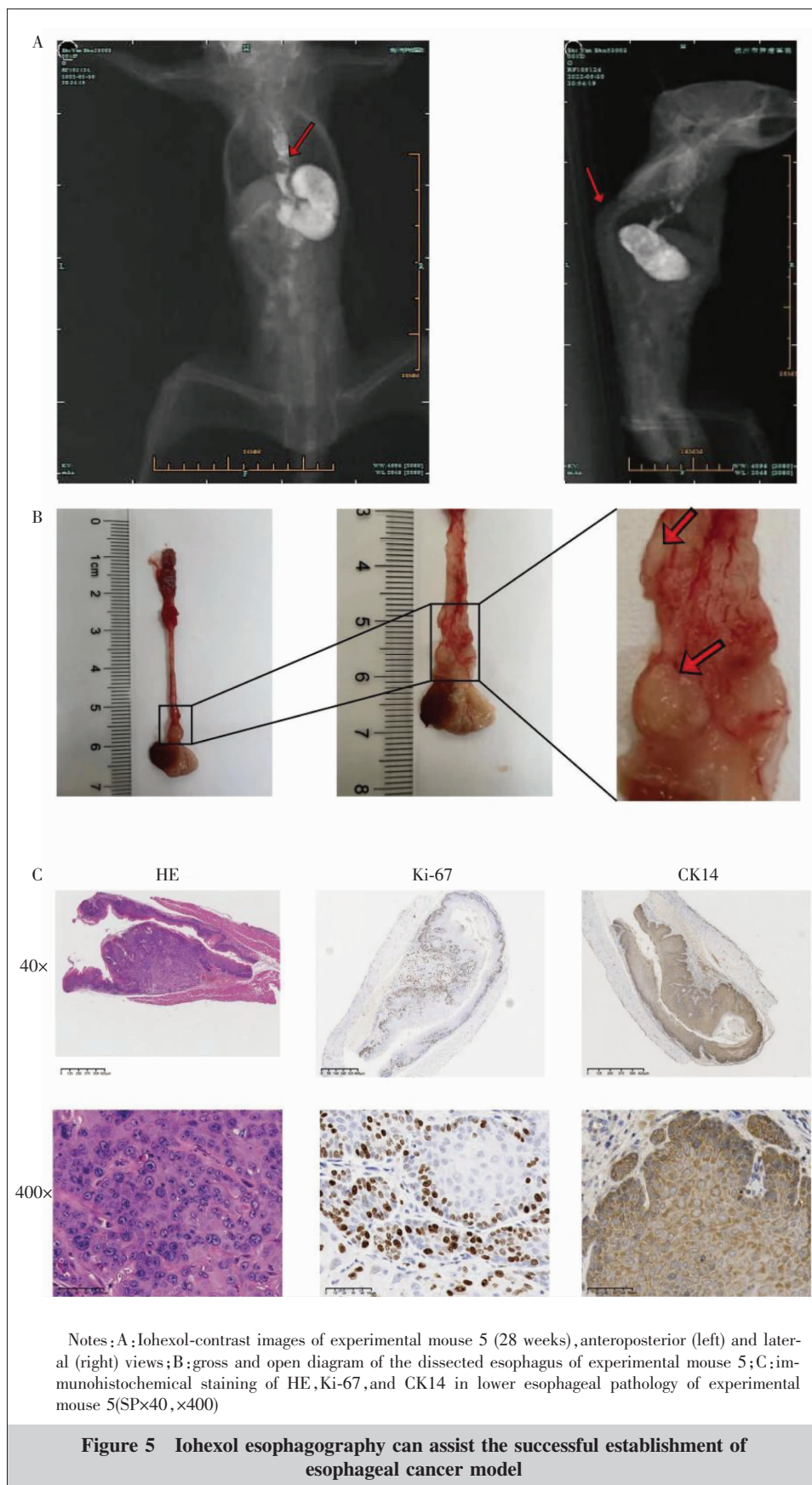
Figure 4 Preliminary confirmation that esophagography using Iohexol may have a role in the successful establishment of the diagnostic esophageal cancer model

实验鼠 6(29 周)食管造影检查发现,在正侧、左右侧位摄片影像中食管下段呈现明显的充盈缺损(Figure 6A),食管管腔增粗、管壁增厚,病理诊断为食管下段乳头状瘤(Figure 6B)。实验鼠 7(29 周)食管造影检查提示中下段充盈缺损(Figure 6C),食管管腔增粗、管壁增厚,经病理证实为乳头状瘤(Figure 6D)。说明食管造影可以辅助诊断小鼠食管癌原位模型的成功建立。

3 讨论

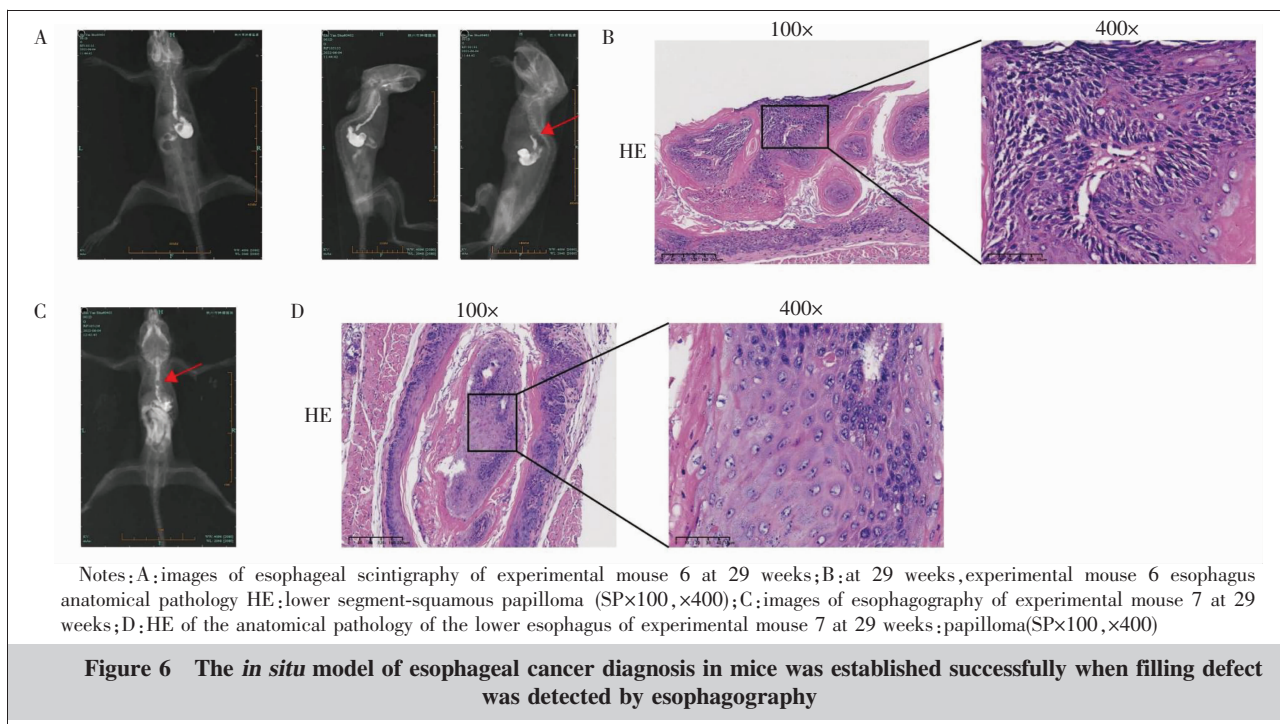
本研究发现可以通过食管造影来辅助诊断原位食管癌模型成功建立,通过影像中的“充盈缺损”定位食管癌癌变,这在原位食管癌临床前研究非常重要。另外,本研究发现临床上使用的 1.5T/3T MRI 平台无法评估小鼠食管癌模型是否成功建立。

最近的食管癌原位癌模型的研究中,对于 4-NQO 诱导的原位模型,随机分组是较为常见的方式^[16-18]。Sui 等^[19]对 4-NQO 喂养 16、28 和 32 周小鼠的整个食管组织进行 HE 染色,以检测食管鳞状细胞癌诱导过程,后随机分组接受干预治疗。Chen 等^[20]的研究中,对 4-NQO 诱导的自发性食管鳞状细胞癌小鼠模型,在第 28 周随机分为 3 组接受包括 PD-1/PD-L1 免疫检查点抑制剂在内的抗肿瘤治疗。Wiles 等^[21]在 G1TR 激动性刺激增强食管鳞状细胞癌小鼠模型的



抗肿瘤免疫应答的研究中,默认 28 周药物诱导治疗之后,成瘤率为 100%。Wang 等^[22]和 Chen 等^[23]在药物诱导 22~24 周左右处死一定数量的小鼠,获取食管组织,进行病理诊断,以检测食管鳞状细胞癌诱导过程,随后对小鼠进行随机分组及干预治疗。但在本研究中,食管癌原位小鼠模型在接受药物诱导 28 周后成瘤率未达 100%,这可能是由于小鼠模型异质性引起,从而影响对小鼠模型抗肿瘤治疗效果评价的准确性及说服力。

使用食管造影的方法辅助诊断食管癌原位模型的成功建立是一种新颖的方法,食管造影检查能够保证在尽可能无创的情况下辅助诊断食管癌模型建立成功,这对于后续食管癌原位模型抗肿瘤治疗效果的评估非常重要。本研究发现实验组小鼠在药物诱导 28 周后体重下降 20% 以上,进食明显受限,部分小鼠在 28 周前死亡,通过食管造影的方法,可以动态评估小鼠食管管腔的变化(比如充盈缺损,管腔狭窄程度等),在无创的条件下评估食管癌原位模型的建模进度,通过造影成像结果选择出建模成功可能性大的小鼠提前随机分配,进行后续抗



肿瘤治疗。值得一提的是,也可以通过对治疗前后食管造影影像结果的对比(如充盈缺损的直径以及面积大小、食管的狭窄程度等),在某种程度上作为一种评估不同治疗方案的抗肿瘤效应的方法。而且,造模成功的小鼠模型中,食管癌变并不是都发生于食管下段,因而会影响局部抗肿瘤治疗(如放疗)的治疗疗效,但是,可以通过观察食管造影的影像结果,联合相关体表标志物来确定食管病灶的位置,这为评估局部放疗联合其他抗肿瘤治疗在食管癌原位模型中的抗肿瘤效应创造了机会,更加贴近于临床患者接受放疗的操作环境。

本实验仍然存在许多不足。①样本量较少,需要更多数量的模型去验证食管造影检查的有效性;②造影仪器的改进,本次实验中使用的是用于临床患者的设备仪器,对于小鼠成像的质量以及效果会有一定的影响,进而影响食管造影检查的准确性;③本实验使用的是泛影葡胺造影剂,是否有更加适合小鼠的造影剂还待进一步确定。可以在注射造影剂之前对灌胃针前端进行定位,以防造影剂注射的位置过浅或过深,影响最后的造影效果,需要保证在最有效的次数内得到最佳的图像,以免造成实验鼠食管损伤。

对于其他的影像检查,应用于小动物的 MRT 设备主磁场强度大多是 7.0T、9.4T 及 11.7T 等,磁共振

设备的场强越高,扫描速度越快、图像分辨率越高,对于细节的显示越清晰,高强度的 MRI 已经应用于前列腺癌、乳腺癌等动物模型对于治疗的疗效评估及预测^[24-26]。另外, Micro-CT 对于小动物模型也有更优的成像结果,这在肺癌、肝癌等小鼠模型中已经得到应用^[27]。但无论是高强度 MRI 还是 Micro-CT,至今还没有文献使用这两种方法辅助诊断食管癌原位模型的成功建立,是否适用于原位食管癌模型建立成功的辅助诊断仍然需要进一步探究。此外,小动物 PET/CT 已经成为一种评估肿瘤模型是否建立成功的重要影像学手段^[25]。由于 PET/CT 对于实验仪器的要求以及对于实验试剂的消耗要远高于食管造影检查,本次研究没有对小鼠模型进行 PET/CT 检查,无法评估其与食管造影检查在诊断原位食管癌动物模型成功建立中的作用差异。

综上,食管造影检查联合食管癌原位模型相关实验研究是一种可以尝试的组合,在后续的实验当中,我们会将这种组合应用于实践,进一步优化食管造影检查的操作细节,探究化疗药物、放疗以及免疫治疗等联合抗肿瘤治疗对于食管原位癌的疗效,以提供更多的临床前基础研究数据。

参考文献:

[1] OLSON B, LI Y, LIN Y, et al. Mouse models for cancer

- immunotherapy research [J]. *Cancer Discov*,2018,8(11):1358–1365.
- [2] CEKANOVA M,RATHORE K. Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations [J]. *Drug Des Devel Ther*,2014,8:1911–1921.
- [3] YANG H,ZHANG Q,XU M,et al. CCL2-CCR2 axis recruits tumor associated macrophages to induce immune evasion through PD-1 signaling in esophageal carcinogenesis[J]. *Mol Cancer*,2020,19(1):41.
- [4] TANG X H,KNUDSEN B,BEMIS D,et al. Oral cavity and esophageal carcinogenesis modeled in carcinogen-treated mice[J]. *Clin Cancer Res*,2004,10(1 Pt 1):301–313.
- [5] WATERS J K,REZNIK S I. Update on management of squamous cell esophageal cancer[J]. *Curr Oncol Rep*,2022,24(3):375–385.
- [6] THRUMURTHY S G,CHAUDRY M A,THRUMURTHY S S D,et al. Oesophageal cancer: risks,prevention,and diagnosis[J]. *BMJ*,2019,366:l4373.
- [7] JELVEHGARAN P,STEINBERG J D,KHMELINSKII A,et al. Evaluation of acute esophageal radiation-induced damage using magnetic resonance imaging: a feasibility study in mice[J]. *Radiat Oncol*,2019,14(1):188.
- [8] MESENS E,DE VLEGHER E,DESCAMPS B,et al. Improved xenograft efficiency of esophageal adenocarcinoma cell lines through in vivo selection[J]. *Oncol Rep*,2017,38(1):71–81.
- [9] MESENS E,DE VLEGHER E,DESCAMPS B,et al. Hypoxia imaging with (18)F-FAZA PET/CT predicts radiotherapy response in esophageal adenocarcinoma xenografts [J]. *Radiat Oncol*,2018,13(1):39.
- [10] CHO J Y,CHEUNG D Y,KIM T J,et al. A case of esophageal squamous cell carcinoma in situ arising from esophageal squamous papilloma[J]. *Clin Endosc*,2019,52(1):72–75.
- [11] ERGENÇ M,GÜLŞEN T,BAHADIR F. Esophageal squamous cell papilloma: a report of three cases [J]. *Cureus*,2022,14(5):e25115.
- [12] SAVANT D,ZHANG Q,YANG Z. Squamous neoplasia in the esophagus[J]. *Arch Pathol Lab Med*,2021,145(5):554–561.
- [13] CHU P G,LYDA M H,WEISS L M. Cytokeratin 14 expression in epithelial neoplasms: a survey of 435 cases with emphasis on its value in differentiating squamous cell carcinomas from other epithelial tumours[J]. *Histopathology*,2001,39(1):9–16.
- [14] VIAENE A I,BAERT J H. Expression of cytokeratin-mRNAs in squamous-cell carcinoma and balloon-cell formation of human oesophageal epithelium[J]. *Histochem J*,1995,27(1):69–78.
- [15] ANDRÉS-SÁNCHEZ N,FISHER D,KRASINSKA L. Physiological functions and roles in cancer of the proliferation marker Ki-67[J]. *J Cell Sci*,2022,135(11):jcs258932.
- [16] JING C,LI X,ZHOU M,et al. The PSMD14 inhibitor Thiolutin as a novel therapeutic approach for esophageal squamous cell carcinoma through facilitating SNAIL degradation[J]. *Theranostics*,2021,11(12):5847–5862.
- [17] ZHAO Y,SUN J,LI Y,et al. Tryptophan 2,3-dioxygenase 2 controls M2 macrophages polarization to promote esophageal squamous cell carcinoma progression via AKT/GSK3 β /IL-8 signaling pathway[J]. *Acta Pharm Sin B*,2021,11(9):2835–2849.
- [18] AHSAN A,LIU Z,SU R,et al. Potential chemotherapeutic effect of selenium for improved canceration of esophageal cancer[J]. *Int J Mol Sci*,2022,23(10):5509.
- [19] SUI X,CHEN C,ZHOU X,et al. Integrative analysis of bulk and single-cell gene expression profiles to identify tumor-associated macrophage-derived CCL18 as a therapeutic target of esophageal squamous cell carcinoma [J]. *J Exp Clin Cancer Res*,2023,42(1):51.
- [20] CHEN C,SUI X,NING H,et al. Identification of natural product 3,5-diiodotyrosine as APOBEC3B inhibitor to prevent somatic mutation accumulation and cancer progression[J]. *J Immunother Cancer*,2022,10(11):e005503.
- [21] WILES K N,TSIKRETSIS L E,ALIOTO C M,et al. G1TR agonistic stimulation enhances the anti-tumor immune response in a mouse model of ESCC[J]. *Carcinogenesis*,2022,43(9):908–918.
- [22] WANG S,DU Z,LUO J,et al. Inhibition of heat shock protein 90 suppresses squamous carcinogenic progression in a mouse model of esophageal cancer[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*,2015,141(8):1405–1416.
- [23] CHEN P T,HSIEH C C,WU C T,et al. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits esophageal squamous cell carcinoma progression by reducing IL6 signaling [J]. *Mol Cancer Ther*,2015,14(6):1365–1375.
- [24] ZHANG X,GREISER S,ROY U,et al. Evaluation of a developed MRI-guided focused ultrasound system in 7 T small animal MRI and proof-of-concept in a prostate cancer xenograft model to improve radiation therapy[J]. *Cells*,2023,12(3):481.
- [25] TAYLOR E N,WILSON C M,FRANCO S,et al. Monitoring therapeutic responses to silicified cancer cell immunotherapy using PET/MRI in a mouse model of disseminated ovarian cancer[J]. *Int J Mol Sci*,2022,23(18):10525.
- [26] TATUM J L,KALEN J D,JACOBS P M,et al. A spontaneously metastatic model of bladder cancer:imaging characterization[J]. *J Transl Med*,2019,17(1):425.
- [27] FAN Z,TIAN Y,CHEN Z,et al. Blocking interaction between SHP2 and PD-1 denotes a novel opportunity for developing PD-1 inhibitors[J]. *EMBO Mol Med*,2020,12(6):e11571.