



# 小鼠肝癌模型研究进展

李顺<sup>1</sup>, 陈丽香<sup>1</sup>, 彭秀华<sup>1</sup>, 诸蒋鸣<sup>2</sup>, 周晓辉<sup>1</sup>

(1. 上海市公共卫生临床中心, 上海 201508; 2. 苏州大学基础医学与生物科学学院, 江苏 215123)

**【摘要】** 肝癌至今仍是全球高死亡率癌症之一。动物模型特别是小鼠模型是研究肝癌生物学特性、发病机制、新药筛选和治疗的重要工具。近年来, 各种小鼠肝癌模型的发展在一定程度上促进了肝癌的相关研究, 但是现有模型都有一定不足。缺乏与人类肝癌高度相似且经济适用的动物模型严重制约着对肝癌的深入研究。随着基因修饰技术的发展, 小鼠肝癌模型的构建更加快速、容易和方便。本文拟对用于肝癌研究的各种小鼠模型进行概述, 并着重强调基因修饰小鼠肝癌模型的构建, 以期对相关癌症基因功能研究、应用基因编辑技术研发肝癌模型提供新思路 and 方向。

**【关键词】** 肝癌; 基因修饰; 小鼠模型

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016) 02-0213-04

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.02.020

## A brief review on the progress of mouse models of liver cancer

LI Shun<sup>1</sup>, CHEN Li-xiang<sup>1</sup>, PENG Xiu-hua<sup>1</sup>, ZHU Jiang-ming<sup>2</sup>, ZHOU Xiao-hui<sup>1</sup>

(1. Shanghai Public Health Clinical Center, Shanghai 201508, China, 2. School of Basic Medical and Biological Sciences, Soochow University, Suzhou Jiangsu 215123, China)

**【Abstract】** Liver cancer remains one of the leading cause of cancer death in the world. Animal models, especially mouse models, are important tools for studying the biological characteristics, pathogenesis, new drug screening and therapy of liver cancer. Up to now, although the development of various animal models accelerates the research of liver cancer, all the existing models have their own disadvantages. Lacking of economical and applicable animal models that can mimic the human liver cancer seriously restrict the further study of liver cancer. With the development of genetically modified technologies, it provides a fast, easy and reliable method to establish liver cancer models. In this review, we describe the different types of mouse models used in liver cancer research, with emphasis on genetically engineered mice used in this field, which may open an avenue for functional cancer genomics and generation of liver cancer models by using gene editing technologies.

**【Key words】** Liver cancer; Genetical modification; Mouse model

Corresponding author: ZHOU Xiao-hui, Email: zhouxiaohui@shaphc.org

世界范围内, 肝癌在男女性中分别位居第三和第六大死亡率癌症, 已经严重威胁到人类健康和生命<sup>[1]</sup>。全球每年约有 700 000 新发肝癌患者和近 600 000 患者死于肝癌<sup>[2]</sup>。我国是全球肝癌发病率最高和死亡数最多的国家, 其肝癌患者约占全球的 55%。肝癌患者的 5 年平均存活率低于 11%<sup>[3]</sup>。虽然流行病学研究表明, 乙型肝炎病毒 (hepatitis B

virus, HBV) 和丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 感染、黄曲霉素、酒精、亚硝胺类物质等都与肝癌发病有关<sup>[4]</sup>。然而, 具体的肝癌发生的分子机制和通路仍尚未清楚, 构建更加合适的可用于人类肝癌研究的动物模型有助于解决该问题。小鼠的遗传物质和人非常相似, 且构建小鼠模型成本较低、周期较短、基因修饰技术更容易实现, 因此小鼠是可用

**【基金项目】** 国家重点基础研究 973 发展计划项目 (2012CB519005); 上海市科技发展基金实验动物研究项目 (15140904000); 上海市卫生和计划生育委员会科研课题项目 (20154Y0075)。

**【作者简介】** 李顺 (1986 -), 男, 助理研究员, 博士, 从事基因修饰动物模型研究, E-mail: lishun86@126.com。

**【通讯作者】** 周晓辉 (1973 -), 男, 研究员, 博士, E-mail: zhouxiaohui@shaphc.org。

于人类肝癌研究较好的模型动物<sup>[5]</sup>。构建可准确模拟人类肝癌症状、又易于获取、经济适用的小鼠模型不仅有助于深入探究肝癌发生和发病的分子机制,还可用于检测和评估新的肝癌治疗方法和手段,开发新的肝癌医学影像技术和相关药物等,进而促进将实验室的肝癌研究成果转化到临床应用上的目标。现将有关小鼠肝癌模型研究进行概述。

## 1 致癌物诱发的小鼠肝癌模型

致癌物诱发的肝癌小鼠模型经常被用于肝癌的研究中。人类致肝癌物可分为两类:遗传毒性和非遗传毒性的致癌物。遗传毒性致癌物是指能够与 DNA 反应,引发 DNA 损伤而致癌的化学致癌物;非遗传毒性致癌物则不直接与 DNA 反应,通过诱导宿主细胞内某些关键性病损(如控制细胞增殖、细胞凋亡和细胞分化)而导致肿瘤的化学致癌物<sup>[6]</sup>。遗传毒性致癌物二乙基亚硝胺(DEN)是最常用的肝癌诱发化合物。研究表明,对 12~15 d 的 B6C3F1 雄性小鼠腹腔注射(5  $\mu\text{g}/\text{g}$  体重)DEN,平均 44 周后,100% 的 B6C3F1 雄性小鼠患有肝癌<sup>[7]</sup>。此外,也有利用高剂量 DEN(80~90  $\mu\text{g}/\text{g}$  体重)腹腔注射 4~5 周龄小鼠,但该方法无前述方法有效。DEN 诱导的小鼠肝癌模型不仅可用于研究肝癌发生的分子机制,还可用于评估和评价治疗肝癌的化学药物。然而,化学物诱导的小鼠肝癌模型虽然可以建立具体的遗传物质改变与致癌物之间的关系<sup>[8]</sup>,但是小鼠的性别、年龄、品系和遗传背景对肝癌发生的影响一直是用该方法构建模型的瓶颈。

## 2 肝癌移植性的小鼠肝癌模型

由于肝癌移植小鼠模型适用对抗癌药物临床前评价的研究,因此构建肝癌移植小鼠模型得到了长足的发展。早期的移植模型主要是通过同基因品系小鼠肿瘤的移植。随后,通过移植人的肝癌细胞或组织块到免疫缺陷小鼠中构建肝癌模型<sup>[9]</sup>。例如:无胸腺和毛发的裸鼠(缺乏 T 淋巴细胞和 T、B 细胞功能削弱)<sup>[10]</sup>;重度联合免疫缺陷小鼠(severe combined immunodeficient, SCID)<sup>[11]</sup>被广泛用来构建移植瘤模型。1963 年, Tang 等<sup>[12]</sup>首次报道建立人肝癌细胞系用于移植瘤模型构建,随后 HepG2、Hep3B、SMMC-7721 和 HuH7 等细胞系也被广泛应用于肝癌移植瘤模型中。上述这些肝癌的移植小鼠模型可以通过异位和原位移植。异位移植的实现主要是通过移植肿瘤细胞和组织到小鼠皮下;人肝癌细胞通过异位移植到小鼠皮下已经广泛大量地用

于抗肝癌药物的临床前评估。肿瘤形成速度快、劳动力要求小、成本相对较低、可无创性检测到肿瘤大小是异位移植的主要优势。而原位移植主要是通过浆膜下注射和外科原位移植(surgical orthotopic implantation)肿瘤块。外科原位移植肿瘤块通常大小约为 1  $\text{mm}^3$ ,来源于人肝癌患者手术切除标本或者来源于皮下生长的肝癌细胞块。有许多研究报道微环境在恶性肿瘤细胞的生物学行为中有着非常重要的影响<sup>[13]</sup>。例如:通过皮下移植的许多肿瘤细胞系并不能自发的发生肿瘤转移,而通过原位移植时它们可发生肿瘤转移,提示肿瘤细胞与器官特异性因子(成纤维细胞、内皮细胞和炎症细胞)的相互作用对肝癌的发生非常重要。由于该原因,基于异位模型的治疗结果必须要经过原位移植模型进行下一步验证。因此,这些原位移植的模型在肿瘤形态、微环境、转移性和对抗癌药物的反应等方面很好地模拟了人肝癌发生的情况。但肝癌原位移植模型的缺点是外科移植手术程序较为复杂并且价格昂贵,此外,对于肿瘤生长和药物反应的检测没有异位移植模型容易。尽管通过异位和原位移植方法构建的肝癌模型可以用于临床前检测和评价抗癌药物,但是这些模型在病人实际抗肿瘤效果上的预测价值较差。这些严重限制了肝癌的移植小鼠模型的用途和价值。

## 3 HBV 和 HCV 感染的小鼠肝癌模型

人类的肝癌 80% 以上是由于乙肝病毒和(或)丙肝病毒感染所致<sup>[14]</sup>。因此,在过去的十几年中,多种乙肝和丙肝病毒性感染的动物模型被建立并研究。由于人的 HBV 和 HCV 不能诱发鼠的肝细胞发生肝炎,建立这些 HBV 和 HCV 的动物模型时通常需要嵌入人肝细胞。Chisari 等<sup>[15]</sup>在 1985 年通过转基因的方法把 HBV 的 DNA 序列整合到小鼠的宿主基因组 DNA 中,从而构建 HBV 感染慢性携带者的转基因小鼠模型。随后,携带由 HBV 启动子或肝脏特异性启动子启动的 HBV 基因组和单个 HBV 基因(如:表达表面膜蛋白, X 蛋白(HBx),核心蛋白和前核心蛋白)的多转基因小鼠模型被大量建立<sup>[16]</sup>。利用同样的方法,表达 HCV 多蛋白,单独的核心蛋白或结合包膜蛋白的转基因小鼠模型随后也被建立<sup>[17]</sup>。这些模型可以用来研究体内肝脏损伤和细胞的恶性转化,并为病毒基因可以起始和促进肝肿瘤的发生提供了确凿的证据。进一步研究发现,乙肝病毒外膜大蛋白和 X 蛋白, HCV 的核心蛋白是肝癌发生的核心因子。然而由于已报道的 HBV 和

HCV 小鼠模型可以引发自身对 HBV 和 HCV 的免疫耐受,因此这些模型对肝癌发生的影响的研究是在缺乏免疫应答的情况下进行。此外,这些 HBV 和 HCV 小鼠模型的肝癌发生相对不可预测性,且受小鼠品系影响较大,这些方面大大阻碍了用 HBV 和 HCV 感染小鼠作为研究肝癌的模型。

#### 4 基因修饰性的小鼠肝癌模型

随着小鼠基因打靶技术和基因编辑工具的发展(如:ZFN(zinc finger nucleases)<sup>[18]</sup>、TALENs(transcription activator-like effector nucleases)<sup>[19]</sup>和 CRISPR/Cas9(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated endonuclease cas9)<sup>[20]</sup>,利用这些技术构建相应的基因修饰肝癌小鼠模型已经有了相应报道。Dubois 等<sup>[21]</sup>构建了人的抗凝血酶启动子 III(antithrombin-III)启动的 SV40 T-Ag(simian virus 40 T-antigen)的小鼠模型,这些小鼠模型在 8 月龄时 100% 检测到有肝癌的发生,其中 10% 有肝癌转移的发生。Murakami 等<sup>[22]</sup>构建出在肝脏中同时过表达 c-myc 和 TGF- $\alpha$  的双转基因小鼠模型(Alb-c-myc/MT-TGF- $\alpha$ )。Santoni-Rugiu 等<sup>[23]</sup>证实了该双转基因小鼠模型在 8 月龄中,100% 的雄性和 30% 的雌性个体中检测到有肝癌的发生,并且该双转基因小鼠模型比仅过表达 c-myc 或 TGF- $\alpha$  的小鼠要更早、更快地发生肝癌。Fan 等<sup>[24]</sup>报道了酰基辅酶 A 氧化酶(Aox)敲除小鼠模型,该模型表现出重度脂肪肝,最终导致分散的细胞死亡,脂肪性肝炎,脂肪瘤和癌症。此外,Mdr2 敲除小鼠模型也有报道<sup>[25]</sup>。该模型缺乏可跨膜转运卵磷脂到胆小管膜上的肝脏特异性的 P-糖蛋白,最终导致炎症引发的肝癌的发生。Lou 等<sup>[26]</sup>构建了肝脏特异性条件表达的 SV40 T-Ag 小鼠模型,在该小鼠模型中,两翼带有 loxP 位点的终止信号位于 SV40 T-Ag 基因的前面,因此该 SV40 T-Ag 基因可以被能够特异性地在肝脏中表达 Cre 重组酶的腺病毒载体启动表达。Cre 重组酶诱导 SV40 T-Ag 在肝脏中表达 5 个月后,该模型能够观察到明显的肝肿瘤。随后,有些研究团队采用条件性启动原癌基因突变策略构建了相应的小鼠肝癌模型。Colnot 等<sup>[27]</sup>通过基因修饰方法,在 APC(adenomatous polyposis coli)双等位基因 14 号外显子两翼上添加 loxP 位点,通过在肝脏中特异表达 Cre 重组酶后可以使得 APC 基因在肝脏中缺失,进而构建基于 APC 缺失的小鼠肝癌模型。在该模型中,67% 的小鼠在 Cre 重组酶处理后的 8~9 个月可以观察到明显的

肝肿瘤。此外,miRNAs 的异常表达在肝癌中也被证实<sup>[28]</sup>,由于 miRNA 可能是潜在的肝癌治疗方法<sup>[29]</sup>,与 miRNA 相关的基因修饰肝癌模型也被相应地建立。全敲除 MiR-122(KO)和肝脏特异性敲除(LKO)MiR-122 小鼠模型分别在 5 周和 8~10 周开始出现炎症,89% 的雄性和 23% 的雌性小鼠(KO)在 10 月龄出现肝癌肿瘤,而 50% 雄性和 10% 雌性小鼠(LKO)在 12 月龄出现肝肿瘤<sup>[30]</sup>。Zhang 等<sup>[31]</sup>利用 TALENs 技术成功在 H2.35 细胞系中敲除肝癌细胞中常见发生突变的  $\beta$ -catenin(Cttnb1)和 APC,进而通过高压水动力法运送  $\beta$ -catenin(Cttnb1),并结合腺病毒包裹 APC TALENs,成功在活体小鼠内敲除该两基因,构建肝癌模型。Xue 等<sup>[32]</sup>利用高压水动力法运送 CRISPR/Cas9 系统在活体小鼠肝脏中同时敲除抑癌基因 Pten 和 p53 成功构建小鼠肝癌模型,该研究表明利用 CRISPR/Cas9 系统可以在活体小鼠肝脏中敲除抑癌和原癌基因。此外,Wnt 信号通路中的转录因子 Cttnb1 基因,它表达  $\beta$ -catenin,在肝癌中经常发生突变,该研究团队结合高压水动力法运送 Cttnb1 sgRNAs, Cas9,长度为 200 个核苷酸的 ssDNA 到 FVB 小鼠肝脏,成功使得 Cttnb1 基因在 4 个位点上从丝氨酸/苏氨酸突变到丙氨酸。这些研究表明,基因修饰技术(特别是 TALENs 和 CRISPR/Cas9)为建立肝癌模型提供了快速、简单和可靠的方法,为相关基因功能研究提供了新思路。

#### 5 结论和展望

理想的肝癌模型应能准确反映癌症生物特性和行为,充分模拟人类肿瘤微环境,且容易操作和获取。虽然目前尚无最理想的小鼠肝癌模型存在,但现有的动物模型在研究人类癌症的发生和发展上仍是非常宝贵的资源和工具。通常,异位移植物和原位移植小鼠肝癌模型可用于检测新的治疗方法,且原位移植小鼠模型非常适用于研究肝癌的转移;而基因修饰肝癌动物模型拥有较高的癌症转移率,在研究肝癌发生的分子机制方面是非常好的模型。随着基因编辑技术的迅速发展,高质量的小鼠肝癌模型将会有利于提高和改善对肝癌的研究和综合治疗方法的研发。现已有通过高压水动力法运送 CRISPR/Cas9 质粒到成年小鼠肝脏敲除原癌基因和抑癌基因;后面可结合腺病毒或慢病毒包裹 CRISPR/Cas9 系统在活体小鼠中敲除肝癌相关的原癌和抑癌基因,以期提高活体组织中的编辑效率。在利用 CRISPR/Cas9 系统构建小鼠肝癌模型中,也

可采用 Cas9-FokI 和 Cas9D10A 系统来编辑小鼠肝癌相关的原癌和抑癌基因,以降低脱靶效应。此外,在构建小鼠肝癌模型研究中小鼠和人之间的差异性在研究过程中也应该被考虑,如小鼠的代谢特征和免疫系统与人有着较大差异,下一步可以探索研究人源化小鼠模型用于肝癌模型的构建。总之,继续研发更适合的小鼠肝癌模型,对于探讨肝癌发生的分子机制、癌症信号通路、新型生物标记物、靶向药物的开发等方面可提供必要工具,以期最终加速将实验室的肝癌研究成果转化到临床应用。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] He L, Tian DA, Li PY, He XX. Mouse models of liver cancer: Progress and recommendations [J]. *Oncotarget*. 2015, 6: 23306 - 23322.
- [ 2 ] Bakiri L, Wagner EF. Mouse models for liver cancer [J]. *Mol Oncol*. 2013, 7: 206 - 223.
- [ 3 ] Chen JG, Zhang SW. Liver cancer epidemic in China: Past, present and future [J]. *Semin Cancer Biol*. 2011; 21: 59 - 69.
- [ 4 ] Nordenstedt H, White DL, El-Serag HB. The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma [J]. *Dig Liver Dis*, 2010, 42(Suppl 3): S206 - 214.
- [ 5 ] Mou H, Kennedy Z, Anderson DG, et al. Precision cancer mouse models through genome editing with CRISPR-Cas9 [J]. *Genome Med*. 2015, 7: 53.
- [ 6 ] Rieswijk L, Brauers KJJ, Coonen MLJ, et al. Evaluating microRNA profiles reveals discriminative responses following genotoxic or non-genotoxic carcinogen exposure in primary mouse hepatocytes [J]. *Mutagenesis*. 2015, 30: 771 - 784.
- [ 7 ] Vesselinovitch SD, Koka M, Mihailovich N, et al. Carcinogenicity of diethylnitrosamine in newborn, infant, and adult mice [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1984, 108: 60 - 65.
- [ 8 ] Hirst GL, Balmain A. Forty years of cancer modelling in the mouse [J]. *Eur J Cancer* 2004, 40(13): 1974 - 1980.
- [ 9 ] Troiani T, Schettino C, Martinelli E, et al. The use of xenograft models for the selection of cancer treatments with the EGFR as an example [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008, 65: 200 - 211.
- [ 10 ] Clarke R. Human breast cancer cell line xenografts as models of breast cancer. The immunobiologies of recipient mice and the characteristics of several tumorigenic cell lines [J]. *Breast Cancer Res Treat*. 1996, 39: 69 - 86.
- [ 11 ] Bankert RB, Egilmez NK, Hess SD. Human-SCID mouse chimeric models for the evaluation of anti-cancer therapies [J]. *Trends Immunol*. 2001, 22: 386 - 393.
- [ 12 ] Tang ZY, Sun FX, Tian J, et al. Metastatic human hepatocellular carcinoma models in nude mice and cell line with metastatic potential [J]. *World J Gastroenterol*. 2001, 7: 597 - 601.
- [ 13 ] Crassini K, Mulligan SP, Best OG. Targeting chronic lymphocytic leukemia cells in the tumor microenvironment: A review of the in vitro and clinical trials to date [J]. *World J Clin Cases*. 2015, 3: 694 - 704.
- [ 14 ] Li L, Wang H. Heterogeneity of liver cancer and personalized therapy [J]. *Cancer Lett*. 2015, 7: S0304 - 3835.
- [ 15 ] Chisari FV, Pinkert CA, Milich DR, et al. A transgenic mouse model of the chronic hepatitis B surface antigen carrier state [J]. *Science*. 1985, 230: 1157 - 1160.
- [ 16 ] Li Y, Tang ZY, Hou JX. Hepatocellular carcinoma: insight from animal models [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012, 9: 32 - 43.
- [ 17 ] McGivern DR, Lemon SM. Virus-specific mechanisms of carcinogenesis in hepatitis C virus associated liver cancer [J]. *Oncogene*. 2011, 30: 1969 - 1983.
- [ 18 ] Carbery ID, Ji D, Harrington A, et al. Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases [J]. *Genetics*. 2010, 186: 451 - 459.
- [ 19 ] Wefers B, Panda SK, Ortiz O, et al. Generation of targeted mouse mutants by embryo microinjection of TALEN mRNA [J]. *Nat Protoc*. 2013, 8: 2355 - 2379.
- [ 20 ] Young SAM, Aitken RJ, Ikawa M. Advantages of using the CRISPR/Cas9 system of genome editing to investigate male reproductive mechanisms using mouse models [J]. *Asian J Androl*. 2015, 17: 623 - 627.
- [ 21 ] Dubois N, Bennoun M, Allemand I, et al. Time-course development of differentiated hepatocarcinoma and lung metastasis in transgenic mice [J]. *J Hepatol*. 1991, 13: 227 - 239.
- [ 22 ] Murakami H, Sanderson ND, Nagy P, et al. Transgenic mouse model for synergistic effects of nuclear oncogenes and growth factors in tumorigenesis: interaction of c-myc and transforming growth factor alpha in hepatic oncogenesis [J]. *Cancer Res*. 1993, 53: 1719 - 1723.
- [ 23 ] Santoni-Rugiu E, Nagy P, Jensen MR, et al. Evolution of neoplastic development in the liver of transgenic mice co-expressing c-myc and transforming growth factor-alpha [J]. *Am J Pathol*. 1996, 149: 407 - 428.
- [ 24 ] Fan CY, Pan J, Chu R, et al. Hepatocellular and hepatic peroxisomal alterations in mice with a disrupted peroxisomal fatty acyl-coenzyme A oxidase gene [J]. *J Biol Chem*. 1996, 271: 24698 - 24710.
- [ 25 ] Pikarsky E, Porat RM, Stein I, et al. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer [J]. *Nature*. 2004, 431: 461 - 466.
- [ 26 ] Lou DQ, Molina T, Bennoun M, et al. Conditional hepatocarcinogenesis in mice expressing SV 40 early sequences [J]. *Cancer Lett*. 2005, 229: 107 - 114.
- [ 27 ] Colnot S, Decaens T, Niwa-Kawakita M, et al. Liver-targeted disruption of Apc in mice activates beta-catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004, 101: 17216 - 17221.
- [ 28 ] Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues [J]. *Oncogene*. 2006, 25: 2537 - 2545.
- [ 29 ] Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, et al. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model [J]. *Cell*. 2009, 137: 1005 - 1017.
- [ 30 ] Tsai WC, Hsu SD, Hsu CS, et al. MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis [J]. *J Clin Invest*. 2012, 122: 2884 - 2897.
- [ 31 ] Zhang S, Li L, Kendrick SL, et al. TALEN-mediated somatic mutagenesis in murine models of cancer [J]. *Cancer Res*. 2014, 74: 5311 - 5321.
- [ 32 ] Xue W, Chen S, Yin H, et al. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver [J]. *Nature*. 2014, 514: 380 - 384.