

## 综述

## 胆管细胞癌动物模型的研究进展

沙 膜, 夏 强

上海交通大学医学院附属仁济医院肝脏外科, 上海 200127

**[摘要]** 胆管细胞癌(CCA)是一种起源于胆管上皮细胞的恶性肿瘤,其发病率仅次于肝细胞癌,位列肝脏恶性肿瘤第2位。CCA患者预后不良,大部分患者在明确诊断后的几个月内死亡。CCA的发生与多种危险因素相关,包括原发性硬化性胆管炎、肝硬化、化学物质接触和肝吸虫感染等。建立合适的动物模型有助于了解CCA的发生和发展机制,并为开发新型治疗方法奠定基础。常见的CCA动物模型包括致癌物诱发模型、种植瘤模型、手术模型以及转基因模型。

**[关键词]** 胆管细胞癌; 动物模型; 致癌物诱发模型; 转基因模型; 综述文献

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2017.03.026 **[中图分类号]** R735.8 **[文献标志码]** A

## Research progress in animal models of cholangiocarcinoma

SHA Meng, XIA Qiang

Department of Liver Surgery, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China

**[Abstract]** Cholangiocarcinoma (CCA) is a malignant neoplasm derived from cholangiocytes. The incidence of CCA is only lower than that of hepatocellular carcinoma and ranked the second in liver malignant cancers. The prognosis of CCA patients is poor and most patients will die within a few months after diagnosis. CCA is related to various risk factors, including primary sclerosing cholangitis, cirrhosis, certain chemical agents and liver fluke. Establishment of proper animal models of CCA can not only be helpful for understanding the mechanisms of incidence and development, but also lay a solid foundation for developing novel treatment strategies. Common animal models of CCA include carcinogen-induced models, implantation models, operation models, and genetically engineered models.

**[Key words]** cholangiocarcinoma; animal models; carcinogen-induced models; genetically engineered models; review

胆管细胞癌(cholangiocarcinoma, CCA)是一种起源于胆管上皮细胞的恶性肿瘤,其发病率仅次于肝细胞癌,位列肝脏恶性肿瘤第2位,占肝脏原发恶性肿瘤的10%~15%,近年来,其患病率和死亡率呈逐年升高的趋势<sup>[1]</sup>。由于缺乏合适的早期诊断方法和有效的治疗手段,因此CCA患者往往预后不良,大部分患者在明确诊断后的几个月内死亡<sup>[2-3]</sup>。CCA的发生与多种危险因素相关,包括原发性硬化性胆管炎、肝硬化、化学物质接触和肝吸虫感染等<sup>[4-5]</sup>。建立合适的动物模型不仅可以进一步认识CCA的发生和发展机制,同时也为临床早期诊断和治疗CCA提供新的策略。本文对各类CCA动物模型包括致癌物诱发模型、种植瘤模型、手术模型以及转基因模型作一综述。

## 1 致癌物诱发模型

致癌物诱发模型是目前较为常用的CCA模型,其原

理是利用单一或混合致癌物长期作用于动物,刺激胆管上皮细胞异常增生,从而形成CCA。

## 1.1 硫代乙酰胺诱发模型

硫代乙酰胺是目前建立胆管癌动物模型最常用的致癌物,通过连续向大鼠喂养含0.03%硫代乙酰胺的供水后,分别在第9、12和16周发现了胆管细胞不典型增生、癌变以及实体肿瘤形成,并且所有大鼠模型均存活至第40周以后<sup>[6]</sup>。最近的研究<sup>[7]</sup>显示,酪氨酸激酶受体c-Met和c-erb-B2在硫代乙酰胺诱导的CCA大鼠模型中显著升高,从而提示这2个癌基因可作为CCA治疗的靶点。此外,Ling等<sup>[8]</sup>在硫代乙酰胺诱发模型中发现转化生长因子β(TGF-β)的中和抗体ID11可显著减轻肝纤维化程度并降低大鼠胆管癌发生率。

## 1.2 二乙基亚硝胺诱发模型

二乙基亚硝胺是目前诱发肝细胞癌模型最常见的致癌

[基金项目] 国家自然科学基金(81472243) (National Natural Science Foundation of China, 81472243)。

[作者简介] 沙 膜(1992—),男,博士生;电子信箱: simonsha23@163.com。

[通信作者] 夏 强,电子信箱: xiaqiang@medmail.com.cn。



物, 它通过烷基化DNA结构造成DNA损伤以及形成氧自由基来发挥作用<sup>[9]</sup>。Liu等<sup>[10]</sup>利用二乙基亚硝胺诱发形成肝细胞癌和CCA并存的大鼠模型, 并发现在肿瘤不同时期表达的碘化钠共输送水平与人类CCA相似, 该动物模型经<sup>131</sup>I放疗后肿瘤生长完全抑制。

### 1.3 麻后睾吸虫混合二甲基亚硝胺诱发模型

麻后睾吸虫是一类侵袭胆管结构的寄生虫, 其引起的纤维沉积和胆管上皮细胞异常增生是CCA发生的诱因。Plengsuriyakarn等<sup>[11]</sup>向仓鼠胃内灌注含50个囊蚴的麻后睾吸虫使其感染, 4周后再给予含二甲基亚硝胺的供水持续喂养8周, 之后所有仓鼠均形成了CCA, 从而证实麻后睾吸虫与CCA发生有关。Thanee等<sup>[12]</sup>在类似模型中发现了肿瘤干细胞标志物CD44高表达, 而CD44可通过稳定胱氨酸—谷氨酸转运体来抑制氧自由基活性, 由此开发针对转运体的靶向药物可抑制胆管癌细胞的生长。

除了以上致癌物外, 常见诱发物质还包括呋喃<sup>[13]</sup>、二氧丙基胺<sup>[14]</sup>和3'-甲基-4-甲氨偶氮苯<sup>[15]</sup>等。致癌物诱发模型因便于操作、价格低廉的优点而被广泛应用, 但其缺点为诱导肿瘤形成时间较长, 肿瘤大小及形态不统一; 此外, 致癌物往往缺乏特异性从而导致肝细胞癌等不同类型肿瘤的形成, 限制了其进一步使用。因此, 获得高效、特异的致癌物将是未来此类模型的发展方向。

## 2 种植瘤模型

自1985年, Hudd等<sup>[16]</sup>首次将人源胆管癌细胞注射至裸鼠皮下形成种植瘤起, 种植瘤CCA模型逐渐获得了广泛应用, 相关模型有助于我们进一步研究CCA的发生、发展机制以及相应治疗。其原理是将人源或鼠源胆管癌细胞或癌组织移植入小鼠体内, 从而获得具有相似生物学特性的肿瘤模型。

### 2.1 肿瘤组织块种植模型

Cavalloni等<sup>[17]</sup>将17例人类原发肝内胆管癌组织块分别种植于裸鼠皮下, 其中1例肿瘤组织块成功种植, 同时发现成功种植的肿瘤具有和原发肿瘤高度相似的组织学类型和基因特点(*K-RAS G12D*变异)并且能连续传代, 生长迅速。此模型有助于我们了解肿瘤的生物学特点并制定个性化的治疗方法。

### 2.2 肿瘤细胞系种植模型

#### 2.2.1 异位瘤模型

目前, 许多学者将人源肿瘤细胞系种

植于裸鼠皮下建立异位瘤模型, 同时将肿瘤细胞系过表达miRNA或利用siRNA沉默特异基因来研究CCA的具体分子机制以及抗肿瘤治疗。Zhang等<sup>[18]</sup>将稳定表达miR-26a的CCLP1细胞系种植于裸鼠体内, 发现miR-26a通过抑制糖原合成酶激酶-3β(GSK-3β)并激活β-链蛋白(β-catenin)促进了CCA的生长。相反, 在HuCCT1细胞中稳定转入miR-494则可通过抑制细胞从G1期进入S期而抑制小鼠肿瘤的生长<sup>[19]</sup>。此外, Zhang等<sup>[20]</sup>研究发现, 利用siRNA沉默转录因子Slug(p53上调凋亡调控因子的抑制子, 参与肿瘤凋亡)的表达可抑制QBC939细胞移植瘤的生长, 同时还可使相关肿瘤细胞对化疗药物顺铂的敏感性上升。此外, CypA以及Beclin-1被沉默也可抑制移植瘤的生长, 这些结果均对CCA的靶向治疗具有重要意义<sup>[21-22]</sup>。

**2.2.2 原位瘤模型** 由于肝脏内肿瘤生长的微环境与皮下完全不同, 因此, 有学者尝试将肿瘤细胞直接种植于肝脏或胆管。Sirica等<sup>[23]</sup>从大鼠胆管上皮中获取的鼠源肿瘤细胞系BDEneu接种于大鼠的肝左叶包膜下和肝左管中, 并在操作后第21~26日观察到所有大鼠均出现了胆管细胞肿瘤; 同时, 随着肿瘤不断增大, 大鼠模型还出现了体重明显下降、胆道梗阻和广泛腹腔转移。这一模型更好地模拟了肿瘤在肝脏微环境的进展过程, 但其缺点在于胆管接种操作比皮下接种复杂、困难并且耗时。

CCA种植瘤模型尤其是皮下瘤模型的优点在于观察方便、生长速度一致、组织学类型稳定、肿瘤大小易测并且相关靶基因研究可指导相应的抗肿瘤治疗, 缺点在于皮下瘤模型无法完全模拟肿瘤生长的微环境, 而原位瘤模型则操作困难并且耗费时间。

## 3 手术模型

自20世纪90年代起, 有学者尝试通过单纯手术方法建立CCA动物模型, 之后研究者在手术的基础上联合各种致癌物优化了这一模型。手术模型多用于模拟人类CCA发病过程和组织学特征的研究, 目前比较成功的模型有以下2种。

### 3.1 胆管结扎联合肿瘤细胞注射模型

Sirica等<sup>[23]</sup>首先将大鼠胆管进行结扎操作, 并在这之后将大鼠肿瘤细胞BDEneu注射于肝左叶包膜下建立模型, 同时设立仅注射肿瘤细胞无胆管结扎大鼠的对照组。结果发现, 21 d后接受胆管结扎的大鼠形成明显的CCA, 并且肿瘤明显大于对照组。此外, 胆管结扎大鼠还可观察



到肝外和腹腔肿瘤结节。使用此模型还发现, 索拉非尼可使 22% 的实验动物达到完全缓解, 明显延缓了肿瘤的进展<sup>[24]</sup>。这一手术模型可在短期内形成稳定肿瘤生长, 并且模拟了胆道梗阻对肿瘤进展的影响, 对开发临床新型药物提供了新的思路。

### 3.2 二乙基亚硝胺联合左中胆管结扎模型

Yang 等<sup>[25]</sup>于 2011 年首先建立了该模型, 具体方法为 Balb/c 小鼠首先接受 2 周二乙基亚硝胺腹腔注射, 2 周后结扎小鼠的左中胆管, 1 周后再使用二乙基亚硝胺对实验小鼠进行每周灌胃, 实验总长为 28 周。结果显示, 小鼠肝脏在第 8、12、16 和 28 周时分别出现了多灶性囊性增生、胆管上皮细胞异型增生、胆管瘤和 CCA; 研究还发现, 癌基因 *c-Myc* 阳性表达的细胞在实验组动物中显著上升并且维持高水平, 而下调 *c-Myc* 表达则抑制了肿瘤的进展。这一模型是目前在野生型小鼠中唯一的标准化手术模型<sup>[26]</sup>, 同时也阐明慢性胆管炎和癌基因 *c-Myc* 在 CCA 进展中的重要作用<sup>[27-28]</sup>。

手术模型的优点在于能模拟人 CCA 形成过程, 尤其是胆道梗阻和慢性胆管炎对肿瘤进展的作用, 有助于新型治疗药物的早期临床试验。但手术模型的建立过程相对复杂和耗时, 需要精细的腹腔操作, 故沿用手术模型者较少。

## 4 转基因模型

近年来, 转基因动物模型因其利于探讨肿瘤发生、发展机制的特点而逐渐成为研究的热点。转基因动物模型的原理是通过导入或敲除某些基因, 从而诱导动物发生 CCA。此模型对揭示 CCA 的具体分子机制以及靶向药物的研究具有重要意义<sup>[29]</sup>。

### 4.1 *SMAD4-Pten* 基因敲除模型

Xu 等<sup>[30]</sup>将抑癌基因 *SMAD4* 和 *PTEN* 基因分别敲除

的小鼠杂交后构建了此模型, 其中 *PTEN* 的缺失可以使抗凋亡以及促增殖的 PI3K 通路激活<sup>[31]</sup>。结果发现, 杂交后的小鼠模型在 2~3 个月时出现胆管上皮细胞多灶性增生, 在 7 个月时均出现 CCA。该模型也与人类 CCA 样本中 71% 的 *PTEN* 失活和 48% 的 *SMAD4* 表达缺失的现象相符, 从而提示 *PTEN* 和 *SMAD4* 基因可能是未来新型药物作用的靶点。

### 4.2 *p53* 基因敲除联合四氯化碳处理模型

抑癌基因 *p53* 突变是人肝内胆管癌中常见的基因变异之一<sup>[32-33]</sup>。该模型由 Farazi 等<sup>[34]</sup>建立, 主要方法是对 *p53* 基因敲除小鼠予以连续 4 周、每周 3 次的四氯化碳注射。结果显示, 仅有 *p53* 基因缺失 (*p53*<sup>-/-</sup> 和 *p53*<sup>+/-</sup>) 小鼠经四氯化碳处理后先后出现了肝脏损伤、纤维化、胆管上皮细胞异型增生并最终形成 CCA (*p53*<sup>-/-</sup> 和 *p53*<sup>+/-</sup> 小鼠成瘤率分别为 54% 和 18%)。该模型结合了 *p53* 基因敲除与慢性肝损伤物质四氯化碳, 更好地模拟了人类胆管癌中基因与慢性损伤共同致病的过程, 但成瘤率较低以及成瘤时间过长的缺点仍有待于进一步改进。

### 4.3 *Kras* 基因激活 -*Pten* 基因敲除模型

最新的转基因 CCA 动物模型由 Ikenoue 等<sup>[35]</sup>在 2016 年创建。该模型将癌基因 *Kras* 激活小鼠与 *Pten* 基因敲除纯合小鼠杂交后发现特异性肝内 CCA 形成, 同时研究者利用细胞谱系示踪技术证明肿瘤细胞来源于胆管上皮细胞而非肝细胞, 为开发针对胆管细胞的特异性药物奠定了基础。

除了以上转基因动物模型外, 类似的还有 *Kras* 基因激活 *p53* 基因敲除模型<sup>[36]</sup> 等。转基因动物模型有助于研究者从基因层面探讨 CCA 的分子机制并制定针对特异靶点基因的治疗方法。但由于转基因技术制备过程复杂, 成本较高, 且某些模型成瘤时间长, 成瘤率低, 因此大规模应用仍需要不断改进。

## 参·考·文·献

- [1] Moeini A, Sia D, Bardeesy N, et al. Molecular pathogenesis and targeted therapies for intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2016, 22(2): 291-300.
- [2] Spolverato G, Kim Y, Alexandrescu S, et al. Management and outcomes of patients with recurrent intrahepatic cholangiocarcinoma following previous curative-intent surgical resection[J]. Ann Surg Onco, 2016, 23(1): 235-243.
- [3] Raggi C, Invernizzi P, Andersen JB. Impact of microenvironment and stem-like plasticity in cholangiocarcinoma: molecular networks and biological concepts[J]. J Hepatol, 2015, 62(1): 198-207.
- [4] Zhang H, Yang T, Wu M, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: epidemiology, risk factors, diagnosis and surgical management[J]. Cancer Lett, 2016, 379(2): 198-205.
- [5] Chaiteerakij R, Yang JD, Harmsen WS, et al. Risk factors for intrahepatic cholangiocarcinoma: association between metformin use and reduced cancer risk[J]. Hepatology, 2013, 57(2): 648-655.
- [6] Yeh CN, Maitra A, Lee KF, et al. Thioacetamide-induced intestinal-type cholangiocarcinoma in rat: an animal model recapitulating the multi-stage progression of human cholangiocarcinoma[J]. Carcinogenesis, 2004, 25(4): 631-636.
- [7] Mansuroglu T, Ramadori P, Dudás J, et al. Expression of stem cell factor and its receptor c-Kit during the development of intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. Lab Invest, 2009, 89(5): 562-574.



- [8] Ling H, Roux E, Hempel D, et al. Transforming growth factor  $\beta$  neutralization ameliorates pre-existing hepatic fibrosis and reduces cholangiocarcinoma in thioacetamide-treated rats[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e54499.
- [9] Walesky C, Edward G, Borude P, et al. Hepatocyte nuclear factor 4 alpha deletion promotes diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rodents[J]. Hepatology, 2013, 57(6): 2480-2490.
- [10] Liu B, Hervé J, Bioulac-Sage P, et al. Sodium iodide symporter is expressed at the preneoplastic stages of liver carcinogenesis and in human cholangiocarcinoma[J]. Gastroenterology, 2007, 132(4): 1495-1503.
- [11] Plengsuriyakarn T, Eursiththichai V, Labbunruang N, et al. Ultrasonography as a tool for monitoring the development and progression of cholangiocarcinoma in *Opisthorchis viverrini*/dimethylnitrosamine-induced hamsters[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(1): 87-90.
- [12] Thanee M, Loilome W, Techasen A, et al. CD44 variant-dependent redox status regulation in liver fluke-associated cholangiocarcinoma: a target for cholangiocarcinoma treatment[J]. Cancer Sci, 2016, 107(7): 991-1000.
- [13] Hickling KC, Hitchcock JM, Chipman JK, et al. Induction and progression of cholangiolibrosis in rat liver injured by oral administration of furan[J]. Toxicol Pathol, 2010, 38(2): 213-229.
- [14] Gi M, Fujioka M, Yamano S, et al. Modifying effects of 1, 2-dichloropropane on N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine-induced cholangiocarcinogenesis in male Syrian hamsters[J]. J Toxicol Sci, 2015, 40(5): 647-656.
- [15] Zhang F, Li L, Yang X, et al. Expression and activation of EGFR and STAT3 during the multistage carcinogenesis of intrahepatic cholangiocarcinoma induced by 3'-methyl-4 dimethylaminoazobenzene in rats[J]. J Toxicol Pathol, 2015, 28(2): 79-87.
- [16] Hudd C, Euhus DM, LaRegina MC, et al. Effect of cholecystokinin on human cholangiocarcinoma xenografted into nude mice[J]. Cancer Res, 1985, 45(3): 1372-1377.
- [17] Cavalloni G, Peraldo-Neia C, Sassi F, et al. Establishment of a patient-derived intrahepatic cholangiocarcinoma xenograft model with KRAS mutation[J]. BMJ Cancer, 2016, 16: 90.
- [18] Zhang J, Han C, Wu T. MicroRNA-26a promotes cholangiocarcinoma growth by activating b-catenin[J]. Gastroenterology, 2012, 143(1): 246-256.
- [19] Olaru AV, Ghiaur G, Yamanaka S, et al. MicroRNA down-regulated in human cholangiocarcinoma control cell cycle through multiple targets involved in the G1/S checkpoint[J]. Hepatology, 2011, 54(6): 2089-2098.
- [20] Zhang K, Chen D, Wang X, et al. RNA interference targeting slug increases cholangiocarcinoma cell sensitivity to cisplatin via upregulating PUMA[J]. Int J Mol Sci, 2011, 12(1): 385-400.
- [21] Obchoei S, Weakley SM, Wongham S, et al. Cyclophilin A enhances cell proliferation and tumours growth of liver fluke-associated cholangiocarcinoma[J]. Mol Cancer, 2011, 10: 102.
- [22] Hou YJ, Dong LW, Tan YX, et al. Inhibition of active autophagy induces apoptosis and increases chemosensitivity in cholangiocarcinoma[J]. Lab Invest, 2011, 91(8): 1146-1157.
- [23] Sirica AE, Zhang Z, Lai GH, et al. A novel ‘patient-like’ model of cholangiocarcinoma progression based on bile duct inoculation of tumorigenic rat cholangiocyte cell lines[J]. Hepatology, 2008, 47(4): 1178-1190.
- [24] Blechacz BR, Smoot RL, Bronk SF, et al. Sorafenib inhibits signal transducer and activator of transcription-3 signaling in cholangiocarcinoma cells by activating the phosphatase shatterproof 2[J]. Hepatology, 2009, 50(6): 1861-1870.
- [25] Yang H, Li TW, Peng J, et al. A mouse model of cholestasis-associated cholangiocarcinoma and transcription factors involved in progression[J]. Gastroenterology, 2011, 141(1): 378-388.
- [26] De Minicis S, Kissileva T, Francis H, et al. Liver carcinogenesis: rodent models of hepatocarcinoma and cholangiocarcinoma[J]. Dig Liver Dis, 2013, 45(6): 450-459.
- [27] Marquardt JU, Raggi C, Andersen JB, et al. Human hepatic cancer stem cells are characterized by common stemness traits and diverse oncogenic pathways[J]. Hepatology, 2011, 54(3): 1031-1042.
- [28] Yang H, Liu T, Wang J, et al. Deregulated methionine adenosyltransferase  $\alpha$  1, c-Myc, and Maf proteins together promote cholangiocarcinoma growth in mice and humans[J]. Hepatology, 2016, 64(2): 439-455.
- [29] Ko KS, Peng J, Yang H. Animal models of cholangiocarcinoma[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2013, 29(3): 312-318.
- [30] Xu X, Kobayashi S, Qiao W, et al. Induction of intrahepatic cholangiocellular carcinoma by liver-specific disruption of Smad4 and Pten in mice[J]. J Clin Invest, 2006, 116(7): 1843-1852.
- [31] Zou S, Li J, Zhou H, et al. Mutational landscape of intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. Nat Commun, 2014, 5: 5696.
- [32] Churi CR, Shroff R, Wang Y, et al. Mutation profiling in cholangiocarcinoma: prognostic and therapeutic implications[J]. PLoS One, 2014, 9(12): e115383.
- [33] Haga H, Patel T. Molecular diagnosis of intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2015, 22(2): 114-123.
- [34] Farazi PA, Zeisberg M, Glickman J, et al. Chronic bile duct injury associated with fibrotic matrix microenvironment provokes cholangiocarcinoma in p53-deficient mice[J]. Cancer Res, 2006, 66(13): 6622-6627.
- [35] Ikenoue T, Terakado Y, Nakagawa H, et al. A novel mouse model of intrahepatic cholangiocarcinoma induced by liver-specific Kras activation and Pten deletion[J]. Sci Rep, 2016, 6: 23899.
- [36] O'Dell MR, Huang JL, Whitney-Miller CL, et al. Kras(G12D) and p53 mutation cause primary intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. Cancer Res, 2012, 72(6): 1557-1567.

[收稿日期] 2016-08-15

[本文编辑] 朱宝渊

