

综述

DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2024.02.004

胆管癌实验模型研究进展

张雄 贺慧华 高绪照

【摘要】 胆管癌是肝脏第二大常见的恶性肿瘤，早期症状不典型、恶性程度高、病死率高是其特点，目前全球范围内胆管癌的总发病率逐年递增，且多数胆管癌患者的预后较差，迫切需要有效的诊断、治疗策略来改变这一现状。肿瘤建模是癌症研究的一大热点，建立胆管癌实验模型有助于深入了解、研究胆管癌的发生、发展、药物治疗效应等，对胆管癌的早期诊断及治疗具有重要意义。

【关键词】 胆管癌；体外模型；3D打印；体内模型；CRISPR/Cas9；基因工程

Progress in experimental models of cholangiocarcinoma Zhang Xiong[△], He Huihua, Gao Xuzhao. [△] Jishou University, Jishou 416000, China

Corresponding author, Gao Xuzhao, E-mail: zjgzh@126.com

【Abstract】 Cholangiocarcinoma is the second most common malignant tumor of the liver, which is characterized by atypical early symptoms, high malignancy and high mortality. Currently, the overall incidence of cholangiocarcinoma has been increased year by year worldwide and a majority of cholangiocarcinoma patients obtain poor prognosis. Effective diagnosis and treatment strategies are urgently required to change this situation. The establishment of disease models is a hot topic in cancer research. The establishment of experimental models of cholangiocarcinoma contributes to in-depth understanding and study of the incidence, development and drug therapeutic effect of cholangiocarcinoma, which is of significance for early diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma.

【Key words】 Cholangiocarcinoma; In vitro model; 3D printing; In vivo model; CRISPR/Cas9; Genetic engineering

生物建模作为一种研究复杂生物系统的实验方法，在揭示癌症分子机制和开发治疗上发挥了巨大作用，但目前良好的模型设计及其实验应用方面仍存在部分不足，在本综述中，我们将探讨建模的基本理论，常用实验模型，并探讨胆管癌基因组学和建模的进展。

一、胆管癌体外模型

常见的胆管癌体外模型包括细胞系模型、球状体模型、类器官模型、3D生物打印模型等。体外模型一直是胆管癌研究的重要工具，因其具有实验可重复性高、维护成本较低、可进行高通量药物筛选、长期扩增稳定性好等优点而备受学者的青睐，但它们也有一些局限性，如模型与体内肿瘤微环境及其他细胞、生物介质信号的脱离，模型建立初期成本较高且成功率低等缺点。只有熟知各体外模型优缺点并结合自身实验的特点，

扬长避短，才能充分发挥模型的优势。

1. 胆管癌细胞系模型

细胞系是基础研究中最常用，且特征明确、遗传学稳定的二维模型，成本较低、易于培养、可进行基因改造、可重复性高且实验结果获取较快均是其显著优点，但由于细胞系的二维分布以及易脱离肿瘤周围环境，导致其无法真实还原原发肿瘤的异质性。Xue等^[1]使用了QBC939和HuCC-T1 2种人胆管癌细胞，证实了Tweety家族成员3基因在2种胆管癌细胞中表达的上调不仅促进了胆管癌细胞的增殖、转移和侵袭性，还可能通过Wnt/ β -catenin信号通路促进胆管癌的上皮-间质转化(EMT)。细胞系模型推动了学者们在细胞分子水平上对胆管癌的发生、发展等内在机制方面的深入研究与理解。

2. 球状体模型

球状体模型是细胞系培养中自发建立的三维

基金项目：湖北陈孝平科技发展基金(CXPJH122002-037)

作者单位：416000 吉首，吉首大学(张雄)；416000 长沙，湖南师范大学(贺慧华)；427000 张家界，张家界市人民医院肝胆外科(高绪照)

通信作者：高绪照，E-mail: zjgzh@126.com

细胞系聚集体。众所周知，多数癌症源于具有类似干细胞自我更新和多向分化能力的癌细胞，而这类细胞常被称为癌症干细胞（CSC），也被认为是化学治疗耐药和肿瘤复发的重要因素，对癌症耐药研究具有重要意义^[2]。球状体模型是一种常用的CSC富集方法，Correnti等^[3]研究了人丝氨酸蛋白酶抑制剂B3基因在胆管癌干细胞球状体模型中的表达情况，并将其认定为预后不良患者的标志物。此模型同样表现出类似细胞系模型的脱离肿瘤微环境的局限性。

3. 类器官模型

类器官模型是由多能干细胞增殖、分化形成的具有一定自组织能力的三维细胞复合体。肿瘤类器官模型具有原发肿瘤特有的多种细胞类型和相似的组织学和基因学特性，能在体外培养体系中稳定扩增，可较好地再现原发肿瘤的异质性^[4]。有研究者评估了患者来源的肿瘤类器官（PDO）在预测临床患者对于抗癌药物反应的潜力，结果显示灵敏度达100%，特异度为93%，阳性和阴性预测值分别为88%和100%^[56]。另外，胆管癌PDO和免疫细胞的共培养系统，可用于预测对患者有效的免疫检查点抑制剂^[6]。基于此，患者来源的肿瘤类器官模型可能是临床前期及体外预测患者对抗癌药物敏感性的理想模型，但目前存在成本较高、手工操作繁琐、无法进行微环境调控等局限性。

4. 3D生物打印模型

3D打印技术以数字模型文件为基础，结合可粘合材料，通过打印设备逐层、立体构造物体。与细胞相关的打印技术称为3D生物打印，通过使用生物材料、细胞和（或）细胞因子等作为生物印刷墨水来构建人体组织或器官^[7]。依据不同成型原理和打印材料，可分为基于喷墨的生物打印、基于挤压的生物打印、光辅助生物打印、光固化生物打印四大类。现有文献中暂时只见挤压式模型被应用于胆管癌模型报道，故只对其进行讨论。

基于挤压的生物打印是目前使用最广的生物打印方法，它通过挤压生物墨水使其从喷嘴中连续挤出纤维细丝沉积物来打印，其优点是具有较广的生物印刷墨水相容性，但其产生的机械压力和剪切力也会使细胞活性降低或死亡^[8]。Mao等^[9]使用挤压打印建立了患者来源的胆管癌3D打印模型，并与初代细胞系进行了同步培养和对比评估，结果显示3D打印模型的干性特征、纤维化程度和

侵袭转移能力等恶性指标均较细胞系模型显著增强，且在随后的抗癌药物测试中表现出更强的耐药性。3D生物打印模型在肿瘤进展、肿瘤微环境、药物筛选评估中显示出广阔的前景，通过此项技术可以在体外重现原生的组织和血管结构，不仅可用于肿瘤建模研究，还可构建类器官模型及仿生组织^[10-13]。

二、胆管癌体内模型

胆管癌体内模型常使用实验鼠建立，常用模型包括肿瘤移植模型、基于化学致癌物的诱发模型、基因工程小鼠模型（GEMM）等。理想的胆管癌体内模型应具有肿瘤微环境及免疫力才能较好地还原人类肿瘤病理学特征和分子生物学改变。然而，现有动物模型存在不同的局限性，没有完美的模型可以满足胆管癌研究的所有需求，因此为不同实验目的选择合适的模型是关键，需考虑到肿瘤生物学特点、宿主免疫活性、肿瘤微环境、基因改变等多个因素，权衡利弊。

1. 肿瘤移植模型

肿瘤移植模型是肿瘤体内研究常用的模型，一般使用不同品类及遗传背景的实验鼠建模，其使用便捷、可重复性好、成本适中、肿瘤形成时间短，常用于评估体内抗肿瘤药物的疗效及耐受性。由于胆管在肝脏内的存在环境独特，因此原位移植模型比异位移植更适合模拟人类胆管癌的发展及演变，但原位移植常需超声、微型CT、MRI等方法评估肿瘤大小及转移情况。

异种移植模型常通过皮下注射将肿瘤细胞、组织移植于免疫缺陷小鼠或裸鼠中建立，建模成功后可较简便地观测到肿瘤体积、生长情况及完成肿瘤标本切取。在长期、连续的传代培养中，由于特异性突变、亚克隆、选择压力以及缺乏肿瘤微环境等缘由，通常会使异种移植模型逐渐丧失肿瘤异质性^[10]。针对上述缺点，有研究者使用PDO异种移植模型证实了即使在体内或体外经过长期扩增培养，PDO异种移植模型也可保留与初代胆管癌细胞相同的组织学结构和基因表达谱^[11]。由于异种移植模型只能用于免疫缺陷宿主，不适合进行肿瘤免疫学研究，且肿瘤移植与宿主不同物种之间微环境的不匹配可能会对实验结果产生影响，因此异种移植模型的应用受到了限制。

同种移植模型使用同源实验鼠建立，可在一定程度上避免宿主的免疫缺陷导致的实验误差。

Aoki 等^[12]使用同基因型小鼠胆管癌细胞原位植入于同源小鼠的肝脏中,证实了阻断胎盘生长因子基因可通过减少磷酸激酶 B (AKT) 的活化和胆管癌细胞的增殖及侵袭来抑制原位肿瘤的生长,为胆管癌治疗提供了靶向方案。

2. 基于化学致癌物的诱发模型

经口服、注射等途径进入实验鼠体内的化学致癌物通过破坏细胞 DNA 完整性、破坏细胞膜、诱导炎症反应等产生基因毒性效应,从而诱发小鼠肝脏慢性炎症,引起胆管的纤维化,使其进一步进展为胆管癌^[13-14]。常用的化学致癌物有:二乙基亚硝胺 (DEN)、二甲基亚硝胺 (DMN)、呋喃、硫代乙酰胺或四氯化碳 (CCl₄) 等^[15]。虽然基于化学致癌物的诱发模型给药简便,具有良好的可重复性,但是除了诱导产生胆管癌之外,还有可能会诱发肝癌或其他全身性肿瘤,影响实验结果,因此学者们常将该模型与胆汁淤积、吸虫感染等模型联用来提高胆管癌建模成功率^[16]。

3. 胆汁淤积模型

胆汁淤积模型,例如左胆管结扎 (LMBDL) 模型,通过产生慢性胆汁淤积来促使胆管癌病变的发生,目前已知原发性硬化性胆管炎、原发性胆汁性肝硬化和胆道闭锁均为胆管癌前病变的高危因素,且均与胆汁淤积症相关。Yang 等^[17]使用化学药物 LMBDL 和 DEN 联合建模,结果显示可使 50% 的小鼠模型在第 28 周时形成胆管癌,而单独接受 LMBDL 或 DEN 的动物胆管癌发生率为 0%。胆汁淤积模型需行胆管结扎手术,对操作者的技能要求相对较高,且实验鼠易受麻醉和手术风险因素的影响导致实验失败。

4. 吸虫感染模型

肝吸虫感染模型是通过肝吸虫感染诱导胆管产生慢性炎症以及胆管上皮的损伤和对肝吸虫抗原的免疫病理反应促使胆管癌的发生。Thamavit 等^[18]使用了肝吸虫感染和 DMN 的组合建模,给实验鼠喂食并感染肝吸虫后再服用 DMN,能使 100% 的实验鼠发生胆管癌,该联合模型建模成功率较高,能进一步节省实验成本。需注意的是,由于小鼠的个体差异,在经受感染后,感染模型的潜伏期各不相同,会导致实验可控性欠佳。

5. GEMM

GEMM 是癌症研究的重要工具,通过基因编辑、转基因或基因转导等技术使常见的致癌相关基因发生缺失 (敲除)、过表达或突变等改变诱

导实验鼠产生肿瘤,常用于在特定基因水平上分析致癌基因、肿瘤抑制基因,以及复杂的生物信号途径在肿瘤的发生、进展和治疗转归等阶段中的作用机制,是有效地识别预后的生物学标志物,并可用于临床前评估靶向药物的治疗反应^[19]。由于肿瘤是在拥有完全免疫力的 GEMM 中自发发生的,能较好地模拟还原人类胆管癌的形成过程,但 GEMM 造价较高,且常无法还原胆管癌相关的慢性肝损伤、炎症特征环境。

CRISPR/Cas9 基因编辑系统是从细菌中发现的保护自身基因完整性的防御性机制,主要由 RNA 介导的 Cas9 核酸酶和单链引导 RNA (sgRNA) 组成,sgRNA 按碱基互补配对原则引导 Cas9 与目标 DNA 靶点结合,由 Cas9 蛋白切割、断裂双链 DNA,在随后的 DNA 修复过程中,在存有修复模板或非同源末端连接的情况下进行基因重组修复^[20]。Gao 等^[21]使用 CRISPR/Cas9 基因编辑系统建立了异柠檬酸脱氢酶 (IDH) 突变的胆管癌细胞系模型,并证实了 IDH1 突变诱导的 R-2- 羟基戊二酸 (R-2HG) 基因可以通过调节 FTO/m6A-methylated ER α /miR16-5p/YAP1 信号通路来抑制胆管癌生长。CRISPR/Cas9 已成为目前基因组工程中重要的基因编辑工具之一,具有快速、高效、操作简便、成本相对较低、精准的基因编辑与调控能力等诸多优点,已经被成功应用于生物基因修饰与人类疾病的治疗,对胆管癌诊治有广泛的应用前景,根据目的基因是否需要激活条件可分为条件激活型转基因模型和非条件型基因转导模型。

5.1 条件激活型转基因小鼠模型

条件激活型转基因模型常借助 Cre-LoxP 重组酶系统,并联合实验鼠杂交来建立启动子激活下的 Cre 重组酶特定基因改造小鼠^[22]。Zhao 等^[23]借助 Cre-LoxP 系统及小鼠杂交,建立了白蛋白启动子激活的携有 Cre 重组酶的 SMAD4 及 PTEN 共敲除实验鼠,证实抑癌基因 CULLIN 3 缺失后可间接诱导双调蛋白 Areg 分泌,从而促进炎症因子的产生以形成肿瘤微环境,这就是肝脏特异性 SMAD4 基因和 PTEN 基因缺失模型。Ikenoue 等^[24]使用白蛋白启动子激活的特异性 KRAS 基因和 PTEN 基因敲除的实验鼠建立肝脏特异性 KRAS 基因激活和 PTEN 基因缺失模型,该模型肿瘤进展较快且只诱导肝内胆管癌发生,中位生存期仅为 46 d,均有肝大、血性腹水以及黄疸和体质量减轻等症状,在实验中也观察到 MAPK 和 PI3K-mTOR 信号通

路的激活,是研究肝内胆管癌发生机制的有效模型。多数胆管癌条件激活型转基因模型无法模拟慢性肝损伤、炎症及远处转移等肿瘤环境,可能适用于非晚期胆管癌的研究。

5.2 非条件基因转导小鼠模型

非条件基因转导模型的建立常通过在小鼠肝脏、胆管局部注射转座子和(或)特异性启动子介导的相关癌基因来建立。转座子可以携带外源基因片段在动物体内进行高效转位,是基因工程动物建模领域的重要工具,其中较常用的是睡美人转座子。Hu等^[25]通过水流动力学尾静脉注射睡美人转座子转染 AKT 和 NICD 致癌基因至实验小鼠,成功建立了 Akt-NICD 基因模型,并证实了抑制 DNA 甲基转移酶 (TEAD) 或转录增强结构域蛋白可终止 Akt-NICD 轴驱动的由肝细胞向肝内胆管癌细胞的转化,为胆管癌提供了新的靶向治疗思路。与蛋白激酶 B (AKT) 相似, Yes 相关蛋白 (YAP) 是一种与癌症发展有关的转录共激活因子相关蛋白^[26]。将携有 AKT/YAP 基因质粒的睡美人转座子混合物直接注射于小鼠胆管中可建立 AKT/YAP 基因模型。通过此模型, Zhang 等^[27]证实了 YAP 通过转录增强相关结构域 (TEAD) 依赖性转录激活并与 β -Catenin 通路相互作用诱导胆管癌的发生,而敲除 Catenin Beta1 基因后可显著抑制其发生过程及胆管癌细胞的生长,该研究的发现对制定胆管癌治疗策略具有重要意义。

三、总结与展望

胆管癌是一类预后较差的疾病,且目前致病机制尚未完全明确,癌症实验模型在癌症的发病机制研究、疾病进展及治疗评估中举足轻重。本文介绍了不同类型的胆管癌模型和相关建模技术,以及部分模型的特点及不足,单个胆管癌模型存在一定的局限性,多种模型系统的组合联用也将成为癌症模型发展中取长补短的必由之路。这些模型可基于患者或动物样本来源的基因组、表观基因组、转录组和蛋白质组学等进行深入研究并解析胆管癌的致病机制、分子基础、肿瘤转移、与宿主的相互作用、肿瘤微环境的作用以及胆管癌的内在异质性,可为预测新的治疗靶点、癌症标志物以及促进药物研发提供极大的帮助,对提高胆管癌早期防治水平意义重大。

参 考 文 献

- [1] Xue W, Dong B, Zhao Y, et al. Upregulation of TTYH3 promotes epithelial-to-mesenchymal transition through Wnt/ β -catenin signaling and inhibits apoptosis in cholangiocarcinoma [J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2021, 44 (6): 1351-1361.
- [2] Tamai K, Fujimori H, Mochizuki M, et al. Cancer stem cells in intrahepatic cholangiocarcinoma; their molecular basis, and therapeutic implications [J]. *Front Physiol*, 2022, 12: 824261.
- [3] Correnti M, Cappon A, Pastore M, et al. The protease-inhibitor SerpinB3 as a critical modulator of the stem-like subset in human cholangiocarcinoma [J]. *Liver Int*, 2022, 42 (1): 233-248.
- [4] Saito Y, Muramatsu T, Kanai Y, et al. Establishment of patient-derived organoids and drug screening for biliary tract carcinoma [J]. *Cell Rep*, 2019, 27 (4): 1265-1276.e4.
- [5] Vlachogiannis G, Hedayat S, Vatsiou A, et al. Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers [J]. *Science*, 2018, 359 (6378): 920-926.
- [6] Zhou G, Lieshout R, van Tienderen G S, et al. Modelling immune cytotoxicity for cholangiocarcinoma with tumour-derived organoids and effector T cells [J]. *Br J Cancer*, 2022, 127 (4): 649-660.
- [7] Daly A C, Prendergast M E, Hughes A J, et al. Bioprinting for the biologist [J]. *Cell*, 2021, 184 (1): 18-32.
- [8] Placone J K, Engler A J. Recent advances in extrusion-based 3D printing for biomedical applications [J]. *Adv Healthc Mater*, 2018, 7 (8): e1701161.
- [9] Mao S, He J, Zhao Y, et al. Bioprinting of patient-derived in vitro intrahepatic cholangiocarcinoma tumor model: establishment, evaluation and anti-cancer drug testing [J]. *Biofabrication*, 2020, 12 (4): 045014.
- [10] Ben-David U, HaG, Tseng Y Y, et al. Patient-derived xenografts undergo mouse-specific tumor evolution [J]. *Nat Genet*, 2017, 49 (11): 1567-1575.
- [11] Broutier L, Mastrogianni G, Versteegen M M, et al. Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening [J]. *Nat Med*, 2017, 23 (12): 1424-1435.
- [12] Aoki S, Inoue K, Klein S, et al. Placental growth factor promotes tumour desmoplasia and treatment resistance in intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Gut*, 2022, 71 (1): 185-193.
- [13] Maronpot R R, Giles H D, Dykes D J, et al. Furan-induced hepatic cholangiocarcinomas in Fischer 344 rats [J]. *Toxicol Pathol*, 1991, 19 (4 Pt 2): 561-570.
- [14] 夏彦昊, 刘慧玲, 江洁, 等. β -arrestin1 通过活化 p38 信号转导通路激活肝星状细胞促进肝纤维化 [J]. *新医学*, 2023, 54 (1): 59-65.
Xia Y H, Liu H L, Jiang J, et al. β -arrestin1 activates hepatic stellate cells to promote liver fibrosis via activating p38 signaling pathway [J]. *J New Med*, 2023, 54 (1): 59-65.

- [15] Mohr R, Özdirik B, Knorr J, et al. *In vivo* models for cholangiocarcinoma-what can we learn for human disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (14): 4993.
- [16] Henderson J M, Zhang H E, Polak N, et al. Hepatocellular carcinoma: mouse models and the potential roles of proteases [J]. *Cancer Lett*, 2017, 387 : 106-113.
- [17] Yang H, Li T W H, Peng J, et al. A mouse model of cholestasis-associated cholangiocarcinoma and transcription factors involved in progression [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141 (1): 378-388, 388.e1-388.e4.
- [18] Thamavit W, Bhamarapravati N, Sahaphong S, et al. Effects of dimethylnitrosamine on induction of cholangiocarcinoma in *Opisthorchis viverrini*-infected Syrian golden hamsters [J]. *Cancer Res*, 1978, 38 (12): 4634-4639.
- [19] Kersten K, de Visser K E, van Miltenburg M H, et al. Genetically engineered mouse models in oncology research and cancer medicine [J]. *EMBO Mol Med*, 2017, 9 (2): 137-153.
- [20] Janik E, Niemcewicz M, Ceremuga M, et al. Various aspects of a gene editing system-CRISPR-Cas9 [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (24): 9604.
- [21] Gao Y, Ouyang X, Zuo L, et al. R-2HG downregulates ER α to inhibit cholangiocarcinoma via the FTO/m6A-methylated ER α / miR16-5p/YAP1 signal pathway [J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2021, 23 : 65-81.
- [22] Andrusaitė A, Milling S. Should we be more cre-tical? A cautionary tale of recombination [J]. *Immunology*, 2020, 159 (2): 131-132.
- [23] Zhao M, Quan Y, Zeng J, et al. Cullin3 deficiency shapes tumor microenvironment and promotes cholangiocarcinoma in liver-specific Smad4/Pten mutant mice [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17 (15): 4176-4191.
- [24] 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.
- [25] Hu S, Molina L, Tao J, et al. NOTCH-YAP1/TEAD-DNMT1 axis drives hepatocyte reprogramming into intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2022, 163 (2): 449-465.
- [26] Garcia K, Gingras A C, Harvey K F, et al. TAZ/YAP fusion proteins: mechanistic insights and therapeutic opportunities [J]. *Trends Cancer*, 2022, 8 (12): 1033-1045.
- [27] Zhang Y, Xu H, Cui G, et al. β -catenin sustains and is required for YES-associated protein oncogenic activity in cholangiocarcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2022, 163 (2): 481-494.

(收稿日期: 2023-02-25)

(本文编辑: 洪悦民)

