

屈芷馨,李宪美,张峰华. 斑马鱼肝细胞癌模型研究的最新进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(8): 1061-1069.

Qu ZX, Li XM, Zhang FH. Recent advances of research in hepatocellular carcinoma models using zebrafish [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(8): 1061-1069.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.08.012

斑马鱼肝细胞癌模型研究的最新进展

屈芷馨¹,李宪美²,张峰华^{1*}

(1. 福建医科大学基础医学院 消化道恶性肿瘤教育部重点实验室,福州 350122;

2. 福建中医药大学中西医结合研究院 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室,福州 350122)

【摘要】 肝细胞癌是全球最常见的恶性肿瘤之一,目前已成为肿瘤相关死亡的第二大病因。随着其发病率和死亡率的逐年攀升,关于其发病机制、进展过程、肿瘤免疫微环境、新药开发等一系列相关研究亟待推进。斑马鱼因其基因组及组织结构与人类高度相似,目前已成为一种不可替代的模拟人类疾病的良好模式生物。利用斑马鱼构建的肝细胞癌模型,包括遗传学模型及异种移植模型,已在揭示肝细胞癌的遗传学病因、疾病的进展过程、肿瘤微环境中免疫细胞的功能以及药物筛选等方面发挥了重要作用。本文系统梳理了斑马鱼肝细胞癌模型的发展历程,比较了不同模型的优缺点,指出了现有模型的不足,并展望了本研究领域未来可能的发展方向。本文综述了近年来利用斑马鱼肝细胞癌模型取得的重要研究进展,从而为肝细胞癌相关研究提供参考。

【关键词】 斑马鱼;肝细胞癌;转基因;异种移植;药物筛选

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 08-1061-09

Recent advances of research in hepatocellular carcinoma models using zebrafish

QU Zhixin¹, LI Xianmei², ZHANG Fenghua^{1*}

(1. Key Laboratory of Gastrointestinal Cancer (Fujian Medical University), Ministry of Education, School of Basic Medical Sciences, Fujian Medical University, Fuzhou 350122, China. 2. Fujian Key Laboratory of Integrative Medicine on Geriatrics, Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122)

Corresponding author: ZHANG Fenghua. E-mail: zfh0606@fjmu.edu.cn

【Abstract】 Hepatocellular carcinoma is one of the most common malignancies and has become the second leading cause of tumor-related death. With its morbidity and mortality increasing annually, studies on its pathogenesis, progression, tumor immune microenvironment, and new drug development need to be advanced. Zebrafish has become an irreplaceable model organism to simulate human diseases because of its high similarity in the genome, tissues, and organs. Zebrafish hepatocellular carcinoma models, including genetic and xenotransplantation models, have played an important role in revealing the genetic etiology of hepatocellular carcinoma, disease progression, functions and interactions of immune cells in the tumor microenvironment, and drug screening. This article systematically reviewed the development history of zebrafish hepatocellular carcinoma models, compared the advantages and disadvantages of various models, highlighted the shortcomings of existing models, and proposed the possible development direction of this research field in the future. This article reviews the important research progress of zebrafish hepatocellular carcinoma models in recent years to provide a reference for hepatocellular carcinoma related research.

【Keywords】 zebrafish; hepatocellular carcinoma; transgene; xenotransplantation; drug screening

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

【基金项目】福建省自然科学基金项目(2023J01541)。

Funded by Fujian Provincial Natural Science Foundation (2023J01541)。

【作者简介】屈芷馨(2000—),女,在读硕士研究生,研究方向:细胞生物学。Email:quzx164@163.com

【通信作者】张峰华,男,博士,副研究员,硕士生导师,研究方向:斑马鱼肝癌模型及药效评估。Email:zfh0606@fjmu.edu.cn

据世界卫生组织统计,肝癌已成为威胁人类健康的第六大癌症类型,其死亡率高居第二^[1]。随着世界人口的不断增长,人类对环境的破坏日益严重,肝癌的发病率及死亡率仍在持续上升。肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种原发性肝癌,占有肝癌病例的 90% ~ 95%^[2]。由于病人早期不会表现出明显症状,极少主动就诊,往往晚期才被确诊,但已错失最佳治疗时期。早期诊断的肝癌肿瘤标志物包括甲胎蛋白、凝血酶原等,但二者的升高也不排除是由妊娠、肝炎、肝硬化等原因导致的,这给 HCC 的早期诊断带来了一定的挑战。

目前,针对 HCC 患者的治疗手段比较有限,且存在一定的局限性。一般认为手术切除、肝移植以及局部消融等方式对于早期 HCC 患者具有一定的临床治疗潜力。然而,手术切除可能无法清除所有的肝癌细胞,肝移植也会受到供体肝数量的限制。对于直径较小或位于肝深部的肝癌组织,局部射频消融技术比较常用,该技术可在超声或 CT 引导下通过电极传递电磁能量,最终导致肿瘤热坏死,但该技术对于组织较大或邻近血管的肿瘤并不适用。中晚期肝癌患者一般需要通过放射性治疗或化学药物治疗来维持一定的生活质量并提高生存率,但这也仅仅是一种非治愈性疗法,且常伴有严重的副作用,同时还存在耐药性问题。临床上,有 4 种较新的肝细胞癌化疗药物,包括一线药物乐伐替尼,二线药物瑞戈菲尼、雷莫芦单抗及卡博替尼。但不同患者对药物的敏感性不一,因此建立合适的人源肿瘤异种移植(patient-derived tumor xenograft, PDX)模型用于评估不同患者的药物敏感性对于指导 HCC 患者的临床用药十分必要。

不论是新技术手段还是新药开发,均需要利用动物模型来验证其有效性或测试其毒副作用。通常,利用小鼠模型可以获得致癌基因诱导细胞恶性转化的分子机制,并揭示肿瘤微环境下癌细胞的动力学变化及对药物的治疗响应情况。但小鼠模型不可避免地会存在以下缺点和不足,如饲养成本高、可用于实验的动物数量有限、活体实时成像较为困难、不适合高通量筛选等。斑马鱼因其独特的优势,可以克服小鼠模型的不足,现已成为生物医药研究领域不可或缺的一种模式生物,其在胚胎发育、毒理学、肿瘤生物学、遗传育种以及药物筛选等领域发挥着重要作用。本文综述了近年来利用斑马鱼模型进行肝细胞癌相关研究的最新成果,为肝

癌研究提供参考。

1 斑马鱼用于构建肝细胞癌模型的独特优势

斑马鱼(*Danio rerio*)是一种小型热带淡水鱼,迄今为止已被用于构建各种人类疾病模型,包括心血管系统疾病、免疫系统疾病、神经系统疾病、消化系统疾病以及包括肝细胞癌在内的各种癌症模型。相对于其他模式动物而言,其被广泛应用于肝细胞癌模型研究的主要原因包括以下 3 个方面。

首先,斑马鱼的肝发育过程、组织结构及功能与人类高度相似。斑马鱼的肝发生过程主要包括 3 个阶段:肝母细胞特化、出芽/分化以及肝生长^[3]。在结构上可形成与人类肝相似的左右肝叶及肝内胆管。在功能上同样发挥调节必需营养素的消化和代谢、维生素的储存、红细胞的分解、血浆蛋白(如凝血酶原、纤维蛋白原等)的合成、白蛋白及荷尔蒙的产生,以及解毒等作用。

其次,调控斑马鱼肝发育及肿瘤发生的关键基因及信号通路是保守的。如 FGF、BMP 和 WNT 等信号通路均在斑马鱼肝发生中起关键作用^[4-5]。而人 HCC 的致癌基因如 *KRAS*、*MYC*、*UHRF1* 等同样能够诱导斑马鱼 HCC 的发生^[6-8]。与人类高度相似的遗传背景及组织器官发育模式,使得斑马鱼逐渐成为能够模拟包括 HCC 在内的各种人类疾病的良好模式生物。

最后,斑马鱼超强的繁殖能力、小巧的体积、快速的发育过程、低廉的养殖成本等均是它能够快速成为“科研新星”的重要原因。而且,研究者已开发出无色素的全透明 *Casper* 品系^[9],利用该品系可以活体全程追踪内源或外源基因表达变化,以及肿瘤细胞在体内的增殖、迁移情况,这是哺乳类模式动物无法比拟的优势。此外,斑马鱼学界已在 *Casper* 背景下开发出多种免疫缺陷突变体^[10-11],这使得利用斑马鱼成鱼进行肿瘤细胞移植,甚至构建 PDX 模型用于肿瘤精准治疗成为可能。

综上所述,利用斑马鱼构建 HCC 遗传模型或者异种移植模型优势非常明显,如实验成本低、周期短、便于活体观察、适用于高通量药物筛选等。基于这些优点,国内外已有大量关于斑马鱼肝细胞癌模型研究的相关成果。

2 斑马鱼的遗传学肝细胞癌模型

近年来,通过全基因组或者全外显子组测序,

可以鉴定出 HCC 患者体内与肿瘤形成可能相关的遗传变异^[12],对这些变异进行深入的功能研究将有助于揭示新的驱动 HCC 发生发展的基因突变,这是实现 HCC 个性化治疗的重要前提。

起初,研究者通过已知的化学致癌物,如 7,12-二甲苯并蒽 (DMBA) 来诱导斑马鱼 HCC 的形成^[13]。但这种方法建模周期长、个体差异大,不利于进行相关机制的深入研究。于是研究者们开始利用遗传学方法来建立斑马鱼 HCC 模型,从而模拟人类 HCC 中的突变^[14]。

2.1 斑马鱼突变体相关的肝细胞癌模型

斑马鱼 HCC 的形成过程与人类相似,都要经过肝炎、脂肪变性、纤维化、畸形增生、癌变等步骤。2005 年, Sadler 等^[14]通过遗传筛选的手段从 297 个斑马鱼突变体中筛选到了 7 个突变体,其在发育至 5 d 时肝明显增大。其中, *vps18* 突变体会出现肝肿大、空泡化,并伴有溶酶体缺失;肿瘤抑制基因 *nf2* 的突变体会出现胆总管囊肿; *fgr* 突变体会出现肝细胞增大、脂肪变性。这些突变体均可作为良好的肝疾病模型或者潜在的 HCC 模型。

TP53 是调控细胞增殖与凋亡的关键转录因子,其功能缺失与多种癌症相关,而肝特异性缺失 TP53 会导致人 HCC 的形成^[15-17]。斑马鱼中, *tp53* 突变体虽然不会自发发生 HCC,但其在继发性损伤存在时更易发展为 HCC^[18]。乙肝病毒 X 抗原 (HBx) 与 HCC 的发生密切相关, Lu 等^[19]发现在野生型斑马鱼肝中特异性过表达 HBx 会导致脂肪变性、纤维化及糖原积累。值得注意的是,如果在 *tp53* 突变体中过表达 HBx 却能够诱导 HCC 的发生,且该过程与 *src* 酪氨酸激酶通路的激活有关。与该机制相一致的是,在 *tp53* 基因突变的背景下过表达 *src* 也会导致肝畸形增生、HCC 以及肉瘤样 HCC。2021 年, Luo 等^[20]利用 CRISPR/Cas9 技术在斑马鱼肝中特异性敲除了 *tp53* 和 *pten*,同样证实了 *tp53* 单一突变无法诱导 HCC,而 *pten* 的缺失足以触发 HCC。值得注意的是,与单突变的斑马鱼相比, *pten* 和 *tp53* 双突变的斑马鱼 HCC 发生率及组织学分级更高、且生存期更短。该研究表明,虽然 *tp53* 突变并非斑马鱼 HCC 的起始因子,但其突变使得斑马鱼对 HCC 致病因子更为敏感,在 HCC 的进一步发展过程中扮演着至关重要的角色。

Wnt/ β -catenin 信号通路的异常激活与 HCC 的发生有关,肿瘤抑制因子 APC 的功能缺失会持续性

激活 Wnt/ β -catenin 信号通路^[21-22]。小鼠肝特异性剔除 *Apc* 基因会导致 Wnt/ β -catenin 通路异常激活,从而发生 HCC^[23]。斑马鱼中其同源基因 *apc* 的杂合突变体会出现自发性肝腺瘤。若利用 DMBA 处理 *apc* 杂合突变体,其 HCC 的发生率将从 20.5% 提高至 70.8%^[24]。这些结果表明 *apc* 突变在触发斑马鱼 HCC 过程中发挥着重要作用,与小鼠和人的基因功能保守性较强。

因此,对于不同 HCC 患者,若临床上筛查到新的可能导致 HCC 的致癌突变,可利用斑马鱼进行同源基因敲除,制备相应突变体,从而快速验证其是否与 HCC 的发生发展有关。

2.2 持续表达型转基因斑马鱼肝细胞癌模型

除了构建基因功能缺失的突变体,研究者们还建立了多种转基因斑马鱼 HCC 模型,用于研究特定基因过表达对 HCC 发生发展的影响,研究者们大多通过转入突变型致癌基因来建立 HCC 模型^[6,25-27]。

Ras 原癌基因是参与癌细胞内信号转导的核心调节因子,在多种类型的癌症中会发生突变^[28-30]。Nguyen 等^[6]构建了肝稳定过表达致癌基因 *kras*^{V12} 的转基因斑马鱼 HCC 模型,该模型中 *kras*^{V12} 的高表达激活了肝中 Ras-Raf-MEK-ERK 及 Wnt/ β -catenin 信号通路,触发了 HCC 的发生。值得注意的是该转基因斑马鱼模型的 HCC 潜伏期相对较长,在 9 月龄的成鱼中, HCC 的发生率也不到 30%。此外, *tp53* 缺失可加速 *kras*^{V12} 转基因斑马鱼 HCC 的发生,但肿瘤发病率并没有增加,这同样证实 *tp53* 突变并非斑马鱼 HCC 的触发因子,而在 HCC 的发展过程中发挥重要作用。

极光激酶 A (Aurora A, AURKA) 是有丝分裂进程的主要调节因子,对中心体成熟和纺锤体的稳定起重要作用^[31-32]。近年来又发现其可通过激活上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 以及细胞干性重编程来促进肿瘤细胞转移^[33]。2019 年, Su 等^[25]构建了 AURKA (V352I) 和 AURKA (WT) 两种转基因斑马鱼,发现 AURKA (V352I) 转基因斑马鱼在 3 个月时便诱导出了纤维化标志基因 *col1a1* 的表达,7 个月形成 HCC,而 AURKA (WT) 转基因斑马鱼则需要 9 个月才能进展到 HCC 阶段。该研究表明,突变型的 AURKA (V352I) 可能对于 HCC 的早期发生具有重要作用。

β -catenin 是经典 Wnt 信号通路的重要组成部分, β -catenin 突变可能与 HCC 的起始有关^[34]。

2015 年, Evason 等^[26]在斑马鱼肝中特异性过表达爪蟾突变型 β -catenin, 在 4 ~ 5 月龄时斑马鱼生存率显著降低, 部分个体表现出肝体积增大、肝细胞核膨大以及核轮廓不规则等组织学异常。在 6 月龄时斑马鱼肝结构被严重破坏, 表现出与人类 HCC 相似的病理学特征, 因此, 该品系可作为临床上 β -catenin 突变诱导的 HCC 模型, 用于相关药物筛选或机制研究。

持续的病毒感染是 HCC 形成的主要原因。HBx 是乙型肝炎病毒 (HBV) 的 X 抗原, 其过表达可诱导小鼠出现 HCC 的表型, 且 *src* 可作为共同调节因子参与 HBx 诱导的小鼠 HCC 的发生^[35-36]。在 TP53 缺失突变的背景下, 同时过表达 HBx 和 *src* 能够诱导斑马鱼在 5 月龄时出现 HCC, 高脂饮食饲养时, HCC 比例增加^[27]。值得注意的是, 单独过表达 HBx 或 *src*, 仅能诱导斑马鱼肝细胞增生或畸形, 但无法直接诱导出 HCC 的表型。这可能是因为斑马鱼并非 HBV 的宿主, 体内不存在相关受体。

持续表达型转基因斑马鱼 HCC 模型可很好地模拟人类 HCC 的发生, 并用于测试药物的抗癌效果, 也可作为潜在精准医疗的药物筛选平台。但持续过表达致癌基因, 易导致胚胎缺陷, 这将使研究长期的癌症进展以及维持转基因品系变得较为困难。

2.3 诱导型转基因斑马鱼肝细胞癌模型

为了克服上述持续表达型 HCC 模型的缺点, 研究者进一步开发出了诱导型转基因 HCC 模型, 可控制致癌基因表达时间及表达量, 从而随时控制肿瘤的起始及进展。

Nguyen 等^[37]、Emelyanov 等^[38]尝试使用米非司酮诱导的 LexPR 系统控制 *kras*^{V12} 在斑马鱼肝中特异性过表达。研究者通过调整米非司酮的浓度可控制 *kras*^{V12} 基因的表达水平, 同时, 通过控制何时加入米非司酮, 可实现在斑马鱼任意发育阶段启动肿瘤的发生^[37]。研究发现, 利用 2 μ mol/L 米非司酮处理 *kras*^{V12} 转基因斑马鱼 1 个月后, 可 100% 诱导出 HCC。值得注意的是, 撤除米非司酮后, HCC 的表型可恢复。除了 *kras*^{V12} 转基因斑马鱼, 研究者们还建立了其他基因的米非司酮诱导表达品系, 如 *tgfb1a* 转基因品系、*myca* 和 *mycb* 转基因品系^[39-40]等。

四环素诱导的 Tet-on 系统是斑马鱼 HCC 模型中另一个常用的诱导表达系统, 被用于控制 *kras*^{V12}、*xmrk* 和小鼠 *Myc* 等基因在斑马鱼肝中特异性表

达^[7,41-43]。*Xmrk* 是剑尾鱼黑色素瘤受体激酶, 其蛋白结构与人表皮生长因子受体 (EGFR) 高度相似, 在肝癌发生中起着重要作用^[44]。癌基因 *Myc* 与 HCC 不良预后相关, 被认为是人类肝肿瘤恶性转化的关键^[45]。在四环素诱导后, 上述 3 种转基因品系均表现出肝迅速肿大, 以及肝肿瘤形成。其中 *kras*^{V12} 和 *xmrk* 品系诱导的大部分肿瘤可进展为 HCC, 而小鼠 *Myc* 诱导的则大多是肝细胞腺瘤。

单一致癌基因过表达的转基因模型可以稳定地诱导斑马鱼 HCC, 但肿瘤转移现象甚少发生。Twist 是一种碱性的螺旋-环-螺旋转录因子, 与癌症患者的低生存率相关, 在诱导 EMT 过程中发挥重要作用^[46]。2020 年, Nakayama 等^[47]构建了米非司酮诱导的 *Twist1-ER*^{T2}/*xmrk* 双转基因斑马鱼, 在三苯氧胺处理时, 约 80% 的双转基因斑马鱼通过诱导 EMT 在 5 d 内发生肝癌细胞扩散, 甚至长距离迁移到躯干和尾部, 在部分鱼中, 甚至还观察到了继发性肿瘤的建立。类似地, *twist1a* /*kras*^{V12} 双转基因斑马鱼也表现出自发的肿瘤转移, 脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 处理可增加肿瘤细胞转移^[48]。

结合上述两种诱导型转基因表达系统可有选择性地激活不同的致癌基因, 这种策略不但可以研究多种候选基因的致癌功能, 还可以有效规避诱导物对下游实验的可能干扰。值得注意的是, 单一的诱导表达系统依赖于诱导物的持续暴露, 这通常会诱导斑马鱼所有的肝细胞全部发生恶性转化, 与人类癌症发生的实际情况不符。结合米非司酮诱导的 *kras*^{V12} 模型和 Cre/loxP 系统, 只需短暂暴露于米非司酮, 便可诱导 Cre-loxP 介导的永久性基因组重组^[49]。由于 Cre 酶介导的基因组重组往往是不完全的, 可使 *kras*^{V12} 在肝部分细胞中特异性表达。在这个诱导系统中, 斑马鱼肝会出现不同的肿瘤结节, 肿瘤病变过程与经致癌物处理的斑马鱼十分相似, 能够更好地模拟人类 HCC 的形成过程。因此, 在进行实验设计时需要明确实验目的, 选择合适的诱导表达系统来建立斑马鱼 HCC 模型。

3 斑马鱼的肝细胞癌异种移植模型

构建肿瘤异种移植模型是研究肿瘤进展和测试新疗法的重要途径。相较于遗传学模型, 异种移植模型的造模周期更短, 且供体细胞多为人源肿瘤细胞系或来自于患者的肿瘤组织, 更利于测试人的

肿瘤细胞对药物的敏感性,因此临床应用前景更广阔。

大多数斑马鱼 HCC 异种移植模型使用永生化细胞系作为供体,评估肿瘤细胞增殖、转移、血管新生、肿瘤微环境等。

3.1 斑马鱼幼鱼的肝细胞癌异种移植模型

斑马鱼受精后 1 个月左右后天免疫系统才完全发育成熟^[50]。所以,异种移植肿瘤细胞到斑马鱼幼鱼体内,可免受免疫系统排斥,移植成功率较高。

目前,多数研究选择将人肝癌细胞系注射到受精后 2 d(days post fertilization, dpf)的幼鱼卵黄囊以评估其体内增殖能力,并测试药物对肝癌细胞的抑制能力^[51-53]。2016 年, Tseng 等^[51]将 Huh7 细胞注射到 2 dpf 的斑马鱼幼鱼卵黄囊,并用不同浓度的茚[1,2-b]喹啉衍生物处理,结果发现其能够在斑马鱼体内发挥良好的抗肿瘤效果。采用类似的方法, Liu 等^[52]和 Xu 等^[53]又分别发现苦豆碱和茶褐素对 HCC 细胞的生长均有一定的抑制作用。

研究者也可通过对 HCC 细胞系进行目的基因敲降或过表达后,再构建异种移植模型,从而评估基因对肿瘤转移能力的影响^[54-56]。甲硫氨酸腺苷转移酶 2 β (*MAT2B*)基因在肝癌组织中高表达,并且在临床上与肝癌患者的不良预后相关。2019 年, Wu 等^[54]在多种 HCC 细胞系中敲降 *MAT2B* 基因,然后构建斑马鱼 HCC 异种移植模型。结果发现沉默 *MAT2B* 可通过部分抑制 EGFR 信号通路抑制 HCC 细胞在体内的转移和侵袭,提示 *MAT2B* 可以作为 HCC 新的预后标志物和治疗靶点。2021 年, Akbari 等^[55]构建了过表达 G 蛋白偶联受体 5(*LGR5*)的 Huh7 细胞系,并将其植入斑马鱼卵黄囊,结果发现过表达 *LGR5* 时 Huh7 细胞转移率更高。采用类似方法,研究者发现在人肝癌细胞系 SNU-449 中过表达 HOX 转录物反义基因间 RNA(*HOTAIR*)基因会促进肝癌细胞在斑马鱼体内的转移^[56]。

除了评估肝癌细胞在体内的增殖与转移能力,斑马鱼异种移植模型同样适用于评估肿瘤细胞引起的血管新生。2016 年, Tonon 等^[57]将具有较强侵袭性的人 HCC 细胞株 JHH6 注射到 2 dpf 的血管绿色荧光品系斑马鱼幼鱼卵黄囊,通过荧光观察及血管染色,并对血管内皮生长因子及其受体基因进行定量分析,发现该模型可重现肝细胞癌的促血管生成能力,且该模型可用于测试血管新生相关药物如

硼替佐米的抗 HCC 效果。

斑马鱼幼鱼异种移植模型还可用于进行规模化药物筛选。2020 年, Nakayama 等^[47]利用转移性 HCC 斑马鱼模型从 67 种 FDA 批准的药物中筛选出一种 HSD11 β 1 的抑制剂——肾上腺甾酮,并证实肾上腺甾酮的确可通过抑制 HSD11 β 1 的表达来抑制 HCC 的体内转移。

虽然利用斑马鱼幼鱼构建肿瘤异种移植模型已经取得了一定的成效,但该模型仍存在一定的局限性。首先,注射到卵黄囊的肿瘤细胞无法与周围的组织细胞进行交互,难以模拟体内肿瘤生长的真实环境。因此,迫切需要评估斑马鱼胚胎不同移植部位对肿瘤细胞增殖、迁移以及血管新生的影响,以确定合适的研究方法。其次,斑马鱼后天免疫系统发育成熟后,移植的肿瘤细胞终将被杀死。因此,针对幼鱼肿瘤移植模型的研究只能局限在较短时间内,不利于研究肿瘤发展的长期过程。最后,斑马鱼幼鱼体积较小,每次只能植入几十到几百个细胞,往往这些细胞是不包含肿瘤干细胞的,这使得移植的肿瘤细胞难以持续生长。在优化斑马鱼幼鱼肿瘤细胞移植方法的基础上进行 PDX 模型的构建,并测试特定患者对临床药物的敏感性,将会推动斑马鱼 PDX 模型的临床应用。

3.2 斑马鱼成鱼的肝细胞癌异种移植模型

为了克服上述幼鱼模型的局限性,研究者们开发了斑马鱼成鱼的肿瘤异种移植模型,此模型必须使用免疫抑制或免疫缺陷的成鱼作为受体^[10,58-65]。构建免疫抑制或免疫缺陷成鱼常用的物理化学方法包括利用 γ 射线或地塞米松等药物抑制免疫细胞功能,遗传学方法主要是通过敲除免疫相关功能基因,构建免疫缺陷斑马鱼突变品系。

斑马鱼对 γ 射线的生物反应与哺乳动物非常相似,研究发现,在大约 20 Gy 的辐照剂量下,斑马鱼淋巴组织内的细胞在 1 周内大部分会被消融,但这并不是永久性的,所有造血细胞会在 1 个月内恢复。接受辐照处理的斑马鱼在仅移植 5×10^3 个白血病细胞时便可出现明显的恶性转化,而未接受辐照处理的斑马鱼在植入高达 5×10^6 个白血病细胞后也未出现白血病表型,提示植入的白血病细胞可能遭到受体免疫系统排斥并被清除^[58]。

除了利用物理射线抑制免疫系统功能,有研究者使用化学药物地塞米松处理斑马鱼,发现其淋巴细胞功能可被显著抑制,在植入人乳腺癌细胞

(MDA-435)、纤维肉瘤细胞(HT1080)以及小鼠黑色素瘤细胞(B16)后,出现了不同程度的细胞侵袭、血管新生及致死效应^[59]。2019年,Khan等^[60]尝试使用白消安抑制斑马鱼成髓系系统,发现可以提高肝细胞癌和急性髓系白血病细胞的移植成功率,在移植 15 d 后,肿瘤细胞依然可以正常存活。

相对于通过物理方式或化学药物抑制斑马鱼免疫系统,直接构建免疫缺陷突变体更具有应用前景。2014年,Tang等^[61]构建了斑马鱼 *rag2*^{E450s} 突变体,该突变体缺乏成熟的功能性 T 细胞,且 B 细胞数量显著减少,但其生存能力和繁殖能力基本不受影响。不但造血干细胞、肌肉细胞等正常细胞可以在 *rag2*^{E450s} 突变体中稳定存活,包括白血病细胞、横纹肌肉瘤细胞以及黑色素瘤细胞等多种肿瘤细胞同样可在其体内稳定生长。

Prkdc 基因编码 DNA 依赖性蛋白激酶催化亚基,其在 DNA 非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)修复中发挥重要作用。2016年,Jung等^[62]利用 TALENs 技术敲除了斑马鱼 *prkdc* 基因,发现 *prkdc* 缺失突变体的 V(D)J 重排缺陷,导致 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞分化停滞,该模型可用于移植人的多种肿瘤细胞。2016年,Sertori等^[63]发现敲降斑马鱼白细胞介素-2 受体 γ 链基因 *il2rga* 会影响幼鱼早期 T 淋巴细胞的成熟,但不会影响 B 细胞的成熟,且敲降下游酪氨酸激酶编码基因 *jak3* 会出现类似的结果。2022年,Sertori等^[64]和 Basheer等^[65]分别利用 TALENs 和 CRISPR/Cas9 技术敲除了斑马鱼 *il2rga* 及 *jak3* 基因,证实二者的缺失突变均可影响 T 淋巴细胞及 NT 细胞的成熟,将人结肠癌细胞 HCT116 移植到 *il2rga* 突变体中,18 d 后仍能观察到大量的肿瘤细胞。

2019年,Yan等^[10]在缺乏色素细胞的 Casper 品系的背景下构建了 *prkdc* 及 *il2rga* 的双敲除突变体,该品系同时缺失了 T、B 及 NT 细胞,通过驯化使其能够适应 37℃ 的饲养环境。该品系不但可以用于构建多种人类肿瘤细胞系移植模型,而且适用于构建患者来源的肿瘤移植(PDX)模型。通过病理学检测发现,该模型中肿瘤细胞的生长动力学及组织学特征与移植到 NSG 小鼠中十分相似。2020年,Lv等^[11]构建了 *foxn1*/Casper 突变体斑马鱼品系,其表现出 T 细胞缺陷,允许包括造血干细胞、肌肉等多种细胞类型的同种异体及异种移植,但其是否适用于人的肿瘤细胞移植尚未经过验证。

4 斑马鱼肝细胞癌模型的应用

HCC 是一种复杂的、异质性较强的肿瘤,常常存在多种遗传变异。这些变异会导致细胞信号网络调控异常,触发肝细胞发生恶性转化和增殖。斑马鱼的遗传背景及肝结构与人类高度相似,且易于进行转基因和基因突变等功能研究,是研究 HCC 发生发展具体机制以及开发 HCC 新疗法的良好模型。基于斑马鱼开发的 HCC 模型存在但不限于以下 4 个方面的应用。

第一,斑马鱼 HCC 模型可用于评估相关物质的致癌能力。4-氨基联苯(4-ABP)是一种人类致癌物,会引起 DNA 氧化损伤,抑制 DNA 修复。2022年,Lin等^[66]用 *Tg(fabp10a: HBx, src, p53^{-/-})* 斑马鱼 HCC 模型,发现低剂量反复暴露于 4-ABP 可激活肝中 Ras-ERK 通路,诱导或促进肝细胞癌的发生。

第二,通过构建斑马鱼遗传学 HCC 模型可以进行 HCC 的发病机制研究,挖掘新的治疗靶点。2019年,Yang等^[67]在 *TO(kras^{G12V})* 诱导型斑马鱼 HCC 模型的背景下敲除了瘦素受体基因 *lepr*,发现敲除 *lepr* 的斑马鱼经诱导 HCC 后的存活率显著提高,且肌肉萎缩的水平显著降低,提示瘦素信号可作为 HCC 患者肌肉萎缩的一个新的治疗靶标。

第三,斑马鱼 HCC 模型可用于评估药物对肝癌细胞生长和转移的影响,进行药物筛选。斑马鱼模型是高通量的体内研究模型,可以将肿瘤新药的体外实验和体内实验相结合,提高临床前药物开发的成功率,降低筛选过程所需的时间和成本。二甲双胍(metformin)是治疗糖尿病的一种药物,de Oliveira等^[68]利用 *Tg(fabp10a: pt- β -cat)* 斑马鱼模型发现,高脂饮食会促进 HCC 的进展,而二甲双胍可以调节肝微环境中的免疫应答,进而抑制饮食诱导的 NASH 相关 HCC 进展。

第四,利用斑马鱼构建患者来源的肿瘤细胞移植模型,可加快精准医疗的进程。体外培养的肿瘤细胞系容易丢失肿瘤异质性和原发性肿瘤的基因特征,而 PDX 模型使用患者来源的肿瘤细胞,可以保留原代肿瘤的大部分特征,具有较为精确的临床疗效预测性。2022年,Ali等^[69]构建了 39 例非小细胞肺癌患者的斑马鱼 PDX 模型,并测试了其对于埃罗替尼及紫杉醇等药物的响应情况,结果发现该模型不但可以在 3 d 内给出准确的疗效评估,还可以准确预测肿瘤细胞的淋巴管转移。

5 总结与展望

肝细胞癌是一种原发性恶性肿瘤,早期诊断比较困难,患者化疗效果较差,且其高复发、高转移率的特点常导致患者预后不良。因此,迫切需要开发并建立良好的 HCC 动物模型用于新药筛选及抗肿瘤药效评估。斑马鱼繁殖能力强、易于饲养、胚胎透明、体外发育、后天免疫系统成熟较晚、遗传背景以及组织器官的发育与人类高度相似等优点使其成为构建各种人类疾病模型的良好模式生物。通过在肝中过表达 *xmrk*、*HBx*、*myc*、*kras*^{G12V} 等基因,结合米非司酮/四环素诱导系统或 Cre-loxP 系统,已经建立了多种组成型或诱导型斑马鱼 HCC 模型^[7,36,43,49]。斑马鱼后天免疫系统在 30 d 左右才发育成熟,且目前基于 Casper 背景已开发出多种免疫缺陷突变体,利用斑马鱼进行肿瘤细胞移植,甚至构建 PDX 模型用于肿瘤精准治疗已成为可能^[10-11,69]。构建斑马鱼 HCC 模型已经成为研究肝细胞癌发生发展机制、开发新的治疗靶点以及进行新药筛选的强有力手段。

尽管利用斑马鱼 HCC 模型已经取得了许多研究进展,但该模型仍存在一定的局限性。第一,斑马鱼肝与人类肝虽然功能相似,但结构上存在一定的差异。例如,斑马鱼肝中不存在 Kupffer 细胞,且门静脉、肝动脉和大胆管在肝实质内随机分布,不像哺乳动物肝那样归为门管区。因此,在今后的研究中需更加关注斑马鱼肝的微结构,明确其功能分区或异质性,以更加准确地模拟人类 HCC。第二,斑马鱼的肝很小,可用于实验分析的组织较少。这就要求研究人员需要充分整合优化现有技术或者开发出更加精确、可针对微量样本的新技术进行相关指标的检测。第三,在斑马鱼中,基于抗体的检测结果有时无法重复验证。这可能是由于能够识别斑马鱼抗原的抗体十分有限,而在一些研究中使用了非斑马鱼特异性的抗体来进行检测。因此,持续开发斑马鱼特异性的抗体仍然是一项任重道远的任务,联合相关企业进行共同开发或许会更快解决制约斑马鱼研究发展的这一瓶颈。

斑马鱼 HCC 异种移植模型存在以下问题亟待优化:首先,斑马鱼适宜的饲养温度是 28.5℃,这与人体生理温度有较大差距,肿瘤细胞在斑马鱼体内的增殖速度和组织学特征亦与人类不完全相同。当前的大部分研究都是在非生理温度下进行的,因

此将斑马鱼驯化至适应 37℃ 饲养环境或许能够更好地模拟 HCC 细胞的生存条件;其次,斑马鱼血管无法完全模拟人 HCC 的动脉血供应。目前,通过生化/显微成像/免疫学分析可以模拟 HCC 细胞发育的微环境特征,但尚无有效手段模拟 HCC 的动脉样供血。因此,在进行 HCC 血管生成相关研究时,建议使用至少 2 种细胞系,以提高研究结论的准确性。最后,斑马鱼 HCC 异种移植的注射部位通常是胚胎卵黄囊或成鱼腹腔,而非肝。这使得 HCC 细胞在非肝环境中生长,无法排除斑马鱼体内其他因素的干扰,实验结论的可靠性有待提升。因此,如何改善实验技术,实现斑马鱼肝肿瘤细胞原位移植是值得相关研究者关注的重点方向之一。

参 考 文 献(References)

- [1] Ferlay JEM, Lam F, Et Al, Eds. Global cancer observatory: cancer today [M]. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2020.
- [2] Lu JW, Ho YJ, Yang YJ, et al. Zebrafish as a disease model for studying human hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(42): 12042-12058.
- [3] Chu J, Sadler KC. New school in liver development: lessons from zebrafish [J]. Hepatology, 2009, 50(5): 1656-1663.
- [4] Niu X, Shi H, Peng J. The role of mesodermal signals during liver organogenesis in zebrafish [J]. Sci Chin Life Sci, 2010, 53(4): 455-461.
- [5] Shin D, Shin CH, Tucker J, et al. Bmp and Fgf signaling are essential for liver specification in zebrafish [J]. Development, 2007, 134(11): 2041-2050.
- [6] Nguyen AT, Emelyanov A, Koh CH, et al. A high level of liver-specific expression of oncogenic Kras (V12) drives robust liver tumorigenesis in transgenic zebrafish [J]. Dis Model Mech, 2011, 4(6): 801-813.
- [7] Li Z, Zheng W, Wang Z, et al. A transgenic zebrafish liver tumor model with inducible Myc expression reveals conserved Myc signatures with mammalian liver tumors [J]. Dis Model Mech, 2013, 6(2): 414-423.
- [8] Mudbhary R, Hoshida Y, Chernyavskaya Y, et al. UHRF1 overexpression drives DNA hypomethylation and hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Cell, 2014, 25(2): 196-209.
- [9] White RM, Sessa A, Burke C, et al. Transparent adult zebrafish as a tool for *in vivo* transplantation analysis [J]. Cell Stem Cell, 2008, 2(2): 183-189.
- [10] Yan C, Brunson DC, Tang Q, et al. Visualizing engrafted human cancer and therapy responses in immunodeficient zebrafish [J]. Cell, 2019, 177(7): 1903-1914.
- [11] Lv P, Ma D, Gao S, et al. Generation of foxn1/Casper mutant zebrafish for allograft and xenograft of normal and malignant cells [J]. Stem Cell Reports, 2020, 15(3): 749-760.
- [12] Lee JS. The mutational landscape of hepatocellular carcinoma [J]. Clin Mol Hepatol, 2015, 21(3): 220-229.

- [13] Spitsbergen JM, Tsai HW, Reddy A, et al. Neoplasia in zebrafish (*Danio rerio*) treated with 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene by two exposure routes at different developmental stages [J]. *Toxicol Pathol*, 2000, 28(5): 705–715.
- [14] Sadler KC, Amsterdam A, Soroka C, et al. A genetic screen in zebrafish identifies the mutants vps18, nf2 and foie gras as models of liver disease [J]. *Development*, 2005, 132(15): 3561–3572.
- [15] Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, et al. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53 [J]. *Science*, 1990, 249(4971): 912–915.
- [16] Sherr CJ. Principles of tumor suppression [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 235–246.
- [17] Katz SF, Lechel A, Obenaus AC, et al. Disruption of Trp53 in livers of mice induces formation of carcinomas with bilineal differentiation [J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(5): 1229–1239.
- [18] Berghmans S, Murphey RD, Wienholds E, et al. tp53 mutant zebrafish develop malignant peripheral nerve sheath tumors [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(2): 407–412.
- [19] Lu JW, Yang WY, Tsai SM, et al. Liver-specific expressions of HB_x and src in the p53 mutant trigger hepatocarcinogenesis in zebrafish [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76951.
- [20] Luo J, Lu C, Feng M, et al. Cooperation between liver-specific mutations of pten and tp53 genetically induces hepatocarcinogenesis in zebrafish [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 262.
- [21] Miyoshi Y, Iwao K, Nagasawa Y, et al. Activation of the beta-catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon 3 [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(12): 2524–2527.
- [22] Bian J, Dannappel M, Wan C, et al. Transcriptional regulation of Wnt/ β -catenin pathway in colorectal cancer [J]. *Cells*, 2020, 9(9): 2125.
- [23] Colnot S, Decaens T, Niwa-Kawakita M, et al. Liver-targeted disruption of Apc in mice activates β -catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(49): 17216–17221.
- [24] Haramis AP, Hurlstone A, van der Velden Y, et al. Adenomatous polyposis coli-deficient zebrafish are susceptible to digestive tract neoplasia [J]. *EMBO Rep*, 2006, 7(4): 444–449.
- [25] Su ZL, Su CW, Huang YL, et al. A novel AURKA mutant-induced early-onset severe hepatocarcinogenesis greater than wild-type via activating different pathways in zebrafish [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(7): 927.
- [26] Evason KJ, Francisco MT, Juric V, et al. Identification of chemical inhibitors of β -catenin-driven liver tumorigenesis in zebrafish [J]. *PLoS Genet*, 2015, 11(7): e1005305.
- [27] Yang WY, Rao PS, Luo YC, et al. Omics-based investigation of diet-induced obesity synergized with HB_x, src, and p53 mutation accelerating hepatocarcinogenesis in zebrafish model [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(12): 1899.
- [28] Valtorta E, Misale S, Sartore-Bianchi A, et al. KRAS gene amplification in colorectal cancer and impact on response to EGFR-targeted therapy [J]. *Int J Cancer*, 2013, 133(5): 1259–1265.
- [29] Favazza LA, Parseghian CM, Kaya, et al. KRAS amplification in metastatic colon cancer is associated with a history of inflammatory bowel disease and may confer resistance to anti-EGFR therapy [J]. *Mod Pathol*, 2020, 33(9): 1832–1843.
- [30] Karachaliou N, Mayo C, Costa C, et al. KRAS mutations in lung cancer [J]. *Clin Lung Cancer*, 2013, 14(3): 205–214.
- [31] Giet R, Prigent C. The *Xenopus laevis* aurora/Ip11p-related kinase pEg2 participates in the stability of the bipolar mitotic spindle [J]. *Exp Cell Res*, 2000, 258(1): 145–151.
- [32] Fu J, Bian M, Jiang Q, et al. Roles of aurora kinases in mitosis and tumorigenesis [J]. *Mol Cancer Res*, 2007, 5(1): 1–10.
- [33] D’Assoro AB, Haddad T, Galanis E. Aurora-A kinase as a promising therapeutic target in cancer [J]. *Front Oncol*, 2015, 5: 295.
- [34] Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1653(1): 1–24.
- [35] Kim CM, Koike K, Saito I, et al. HB_x gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice [J]. *Nature*, 1991, 351(6324): 317–320.
- [36] Lu JW, Hsia Y, Yang WY, et al. Identification of the common regulators for hepatocellular carcinoma induced by hepatitis B virus X antigen in a mouse model [J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(1): 209–219.
- [37] Nguyen AT, Emelyanov A, Koh CH, et al. An inducible Kras (V12) transgenic zebrafish model for liver tumorigenesis and chemical drug screening [J]. *Dis Model Mech*, 2012, 5(1): 63–72.
- [38] Emelyanov A, Parinov S. Mifepristone-inducible LexPR system to drive and control gene expression in transgenic zebrafish [J]. *Dev Biol*, 2008, 320(1): 113–121.
- [39] Yan C, Yang Q, Shen HM, et al. Chronically high level of *tgfb1a* induction causes both hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma via a dominant Erk pathway in zebrafish [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(44): 77096–77109.
- [40] Sun L, Nguyen AT, Spitsbergen JM, et al. Myc-induced liver tumors in transgenic zebrafish can regress in tp53 null mutation [J]. *PLoS One*, 2015, 10(1): e0117249.
- [41] Loew R, Heinz N, Hampf M, et al. Improved Tet-responsive promoters with minimized background expression [J]. *BMC Biotechnol*, 2010, 10: 81.
- [42] Chew TW, Liu XJ, Liu L, et al. Crosstalk of Ras and Rho: activation of RhoA abates Kras-induced liver tumorigenesis in transgenic zebrafish models [J]. *Oncogene*, 2014, 33(21): 2717–2727.
- [43] Li Z, Huang X, Zhan H, et al. Inducible and repressible oncogene-addicted hepatocellular carcinoma in Tet-on xmrk transgenic zebrafish [J]. *J Hepatol*, 2012, 56(2): 419–425.
- [44] Monroe JD, Basheer F, Gibert Y. Xmrks the spot: fish models for investigating epidermal growth factor receptor signaling in cancer research [J]. *Cells*, 2021, 10(5): 1132.

- [45] Kaposi-Novak P, Libbrecht L, Woo HG, et al. Central role of c-Myc during malignant conversion in human hepatocarcinogenesis [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(7): 2775–2782.
- [46] Yang J, Mani SA, Donaher JL, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis [J]. *Cell*, 2004, 117(7): 927–939.
- [47] Nakayama J, Lu JW, Makinoshima H, et al. A novel zebrafish model of metastasis identifies the HSD11 β 1 inhibitor adrenosterone as a suppressor of epithelial-mesenchymal transition and metastatic dissemination [J]. *Mol Cancer Res*, 2020, 18(3): 477–487.
- [48] Lu JW, Lin LI, Sun Y, et al. Effect of lipopolysaccharides on liver tumor metastasis of twist1a/krasV12 double transgenic zebrafish [J]. *Biomedicine*, 2022, 10(1): 95.
- [49] Nguyen AT, Koh V, Spitsbergen JM, et al. Development of a conditional liver tumor model by mifepristone-inducible Cre recombination to control oncogenic Kras V12 expression in transgenic zebrafish [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 19559.
- [50] Lam SH, Chua HL, Gong Z, et al. Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*; a gene expression profiling, *in situ* hybridization and immunological study [J]. *Dev Comp Immunol*, 2004, 28(1): 9–28.
- [51] Tseng CH, Chen YR, Tzeng CC, et al. Discovery of indeno[1,2-b]quinoxaline derivatives as potential anticancer agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 108: 258–273.
- [52] Liu JS, Huo CY, Cao HH, et al. Aloperine induces apoptosis and G2/M cell cycle arrest in hepatocellular carcinoma cells through the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2019, 61: 152843.
- [53] Xu J, Yan B, Zhang L, et al. Theabrownin induces apoptosis and tumor inhibition of hepatocellular carcinoma Huh7 cells through ASK1-JNK-c-Jun pathway [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 8977–8987.
- [54] Wu L, Chen P, Ying J, et al. MAT2B mediates invasion and metastasis by regulating EGFR signaling pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Exp Med*, 2019, 19(4): 535–546.
- [55] Akbari S, Kunter I, Azbazar Y, et al. LGR5/R-Spo1/Wnt3a axis promotes stemness and aggressive phenotype in hepatoblast-like hepatocellular carcinoma cell lines [J]. *Cell Signal*, 2021, 82: 109972.
- [56] Topel H, Bagirsakci E, Comez D, et al. lncRNA HOTAIR overexpression induced downregulation of c-Met signaling promotes hybrid epithelial/mesenchymal phenotype in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Cell Commun Signal*, 2020, 18(1): 110.
- [57] Tonon F, Zennaro C, Dapas B, et al. Rapid and cost-effective xenograft hepatocellular carcinoma model in zebrafish for drug testing [J]. *Int J Pharm*, 2016, 515(1–2): 583–591.
- [58] Traver D, Winzeler A, Stern HM, et al. Effects of lethal irradiation in zebrafish and rescue by hematopoietic cell transplantation [J]. *Blood*, 2004, 104(5): 1298–1305.
- [59] Stoletov K, Montel V, Lester RD, et al. High-resolution imaging of the dynamic tumor cell vascular interface in transparent zebrafish [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(44): 17406–17411.
- [60] Khan N, Mahajan NK, Sinha P, et al. An efficient method to generate xenograft tumor models of acute myeloid leukemia and hepatocellular carcinoma in adult zebrafish [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2019, 75: 48–55.
- [61] Tang Q, Abdelfattah NS, Blackburn JS, et al. Optimized cell transplantation using adult rag2 mutant zebrafish [J]. *Nat Methods*, 2014, 11(8): 821–824.
- [62] Jung IH, Chung YY, Jung DE, et al. Impaired lymphocytes development and xenotransplantation of gastrointestinal tumor cells in prkdc-null SCID zebrafish model [J]. *Neoplasia*, 2016, 18(8): 468–479.
- [63] Sertori R, Liongue C, Basheer F, et al. Conserved IL-2R γ c signaling mediates lymphopoiesis in zebrafish [J]. *J Immunol*, 2016, 196(1): 135–143.
- [64] Sertori R, Jones R, Basheer F, et al. Generation and characterization of a zebrafish IL-2R γ c SCID model [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(4): 2385.
- [65] Basheer F, Lee E, Liongue C, et al. Zebrafish model of severe combined immunodeficiency (SCID) due to JAK3 mutation [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(10): 1521.
- [66] Lin HD, Tseng YK, Yuh CH, et al. Low concentrations of 4-ABP promote liver carcinogenesis in human liver cells and a zebrafish model [J]. *J Hazard Mater*, 2022, 423: 126954.
- [67] Yang Q, Yan C, Wang X, et al. Leptin induces muscle wasting in a zebrafish *kras*-driven hepatocellular carcinoma (HCC) model [J]. *Dis Model Mech*, 2019, 12(2): dmm038240.
- [68] de Oliveira S, Houseright RA, Graves AL, et al. Metformin modulates innate immune-mediated inflammation and early progression of NAFLD-associated hepatocellular carcinoma in zebrafish [J]. *J Hepatol*, 2019, 70(4): 710–721.
- [69] Ali Z, Vildevall M, Rodriguez GV, et al. Zebrafish patient-derived xenograft models predict lymph node involvement and treatment outcome in non-small cell lung cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 58.