

方权,郑晓光,孙越,等. 可实时监测的小鼠原发性肝癌模型建立及应用 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(3): 346–354.

Fang Q, Zheng XG, Sun Y, et al. Establishment and application of a mouse model of HCC in real-time [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(3): 346–354.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.03.009

可实时监测的小鼠原发性肝癌模型建立及应用

方权¹, 郑晓光¹, 孙越², 陈倪静¹, 骆境怡¹, 王琦轩¹, 康蓉¹, 吴佳琪¹,
何小柏^{1*}, 陈林洁^{1,3,4*}

(1. 杭州医学院检验医学院, 杭州 310053; 2. 朔州市大医院输血科, 山西 朔州 036000;

3. 浙江省生物标志物与体外诊断转化重点实验室, 杭州 310053;

4. 检验诊断关键技术浙江省工程研究中心, 杭州 310053)

【摘要】 目的 构建可实时监测的小鼠原发性肝癌(HCC)模型。**方法** 通过高压水动力学转染技术, PB转座子系统和小鼠活体成像技术建立可实时监测的、由特定癌基因驱动的小鼠原发性肝癌模型。**结果** YAP5SA基因诱导表达的小鼠原发性肝癌可以成功模拟 Hippo 信号通路失活的肝癌亚型; 通过每隔 1 周连续检测, 整合 YAP5SA-IRES-Fluc 的小鼠荧光峰值信号在早期逐渐降低, 于 3 周左右, 荧光峰值信号与对照组相比, 出现明显差异; PTEN⁻YAP5SA⁺模型组的荧光信号峰值与 YAP5SA⁺对照组的荧光信号峰值相比, 整体均值偏高; 索拉菲尼给药 1 周后, 本模型小鼠的荧光信号停止上升, 呈现平稳的趋势。**结论** 成功构建了一种可实时监测的小鼠原发性肝癌模型, 可以进行不同肝癌亚型的分子表征, 并以此为基础, 为临床筛选肝癌靶向药物提供新方法。

【关键词】 肝癌亚型; 实时监测; 肿瘤驱动基因; PB 转座子

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2023) 03-0346-09

Establishment and application of a mouse model of HCC in real-time

FANG Quan¹, ZHENG Xiaoguang¹, SUN Yue², CHEN Nijing¹, LUO Jingyi¹,
WANG Qixuan¹, KANG Rong¹, WU Jiaqi¹, HE Xiaobai^{1*}, CHEN Linjie^{1,3,4*}

(1. School of Laboratory Medicine, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053, China. 2. Blood Transfusion Department, Grand Hospital of Shuozhou, Shuozhou 036000. 3. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biomarkers and In Vitro Diagnostics Translation, Hangzhou 310053. 4. Zhejiang Engineering Research Centre for Key Technology of Diagnostic Testing, Hangzhou 310053)

Corresponding author: CHEN Linjie. E-mail: chenlinjie686@163.com; HE Xiaobai. E-mail: shining0206@163.com

【Abstract】 Objective To establish a real-time monitoring mouse model for primary liver cancer (HCC) research. **Methods** We applied an approach for stable gene expression in mouse hepatocytes by hydrodynamic injection in combination with PiggyBac transposon system-mediated somatic gene integration. We fused an oncogene with a luciferase reporter gene for live imaging of mouse hepatocytes. **Results** Mouse hepatocytes integrated with a YAP1 mutant gene (YAP5SA) were used to form liver tumors with characteristics similar to the Hippo signaling pathway-inactivated HCC subclass. Live imaging of the liver showed strong a fluorescence signal from hepatocytes integrated with the oncogene and

【基金项目】 浙江省自然科学基金(LQ21H200006), 浙江省医药卫生科技项目(2020KY107)。

Funded by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LQ21H200006), the Project of Zhejiang Medicine and Health Science and Technology (2020KY107).

【作者简介】 方权(1998—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 分子诊断。Email: fangquan0504@163.com

【通信作者】 陈林洁(1986—), 男, 讲师, 研究方向: 分子检验医学。Email: chenlinjie686@163.com;

何小柏(1987—), 女, 讲师, 研究方向: 分子检验医学。Email: shining0206@163.com。

* 共同通信作者

luciferase. The peak fluorescence signal decreased rapidly in the early stage after hydrodynamic injection because of hepatocyte apoptosis. The fluorescence signal was significantly increased after tumor initiation and progression. We applied this real-time monitoring model to confirm that *PTEN* was a HCC tumor suppressor gene by an additionally fused oncogene with shRNA expression elements. We also validated small molecular targeted drug sorafenib by oral administration.

Conclusions A real-time monitoring mouse HCC model was successfully established. This method can be applied to molecular characterization of HCC subtypes and targeted drug screening.

【Keywords】 HCC subtype; real-time monitor; driver gene; PB transposons

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

原发性肝癌(hepatic cell carcinoma, HCC)是我国第四位高发的恶性肿瘤,是排名第二位的肿瘤致死病因,一直严重威胁我国人民的生命和健康^[1-2]。HCC 的发病因素复杂,包含遗传、肝硬化、酒精性肝损伤、肥胖、代谢性疾病引起的非酒精性脂肪肝炎以及黄曲霉素暴露等^[3],因此缺乏明确的早期标志物,导致大部分患者错过早期治疗的机会,并且不同因素导致的 HCC 机制,信号途径及分子特征也各不相同,也为临床的精准治疗带来困难。因此急需寻找新的 HCC 早期肿瘤标志物和有效的治疗靶点。

利用 DEN 等药物给药处理诱发小鼠原发性肝癌,是应用较多的一种原发性肝癌模型,但研究表明,该种小鼠原发性肝癌模型与临床肝癌各项指征存在较大差异,无法覆盖大部分临床肝癌特征^[4-5]。而利用转基因技术构建的原发性肝癌小鼠模型能够较好地反映部分临床肝癌特征,但这种模型制备周期长,技术要求较高,因此使用相对受限。

近年,国际上有研究小组利用转座子技术结合高压水动力尾静脉注射技术,实现了规模化临床肝癌细胞驱动基因特异性诱导原发性肝癌小鼠模型的构建^[6-7]。该技术建立的原发性肝癌小鼠模型可靠、灵活且成本低,通过尾静脉注射重组质粒混液,可以实现目的基因在小鼠肝中的长期稳定表达,并且肿瘤的形成更类似于人类肝癌的形成,是研究与肝癌发生发展相关癌基因的有力工具。

Hippo 通路是肝等组织脏器大小的关键信号通路。Hippo 通路失活导致 YAP1 的去磷酸化(YAP5SA)并进入细胞核,转录调控一系列肿瘤相关蛋白的表达。Hippo 通路的失活和 YAP1 的激活许多肿瘤中均有发现^[8-9];在肝中,YAP1 可以促使成熟分化的肝细胞转化成前体细胞^[10-11]。这促使我们去调查 Hippo 信号通路在肝细胞癌中是否存在失活情况,以及在这一类肝癌亚型中,其潜在的诊疗靶点和特有的分子调控机制。本研究通过尾静

脉注射方式将 YAP5SA 与萤火虫荧光素酶基因(firefly luciferase)重组质粒注入小鼠体内,以构建一个高效且稳定的可实时监测的 Hippo 信号通路失活亚型的小鼠原发性肝癌模型,并进行模型的有效性评估,以期为后续开展 HCC 研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

48 只 SPF 级雄性 ICR 小鼠,4 周龄,体重 16 ~ 20 g,购自浙江省实验动物中心【SCXK(浙)2019-0002】,饲养于杭州医学院 SPF 级动物实验室【SYXK(浙)2019-0011】。饲养期间各组小鼠自由饮水,饲喂普通维持饲料由杭州医学院实验动物中心提供。12 h/12 h 昼夜交替,相对湿度 40% ~ 60%,温度控制在 22 ~ 25℃。所有操作均符合杭州医学院实验动物伦理委员会的审核(ZJCLA-IACUC-20050035)。

1.1.2 主要试剂与仪器

YAP1 质粒(Addgene),PB 转座子相关质粒干粉(武汉淼灵生物技术有限公司),D-luciferin potassium salt, Bio-LumiTMII 萤火虫荧光素酶报告基因检测试剂盒, RIPA 裂解液, Alexa Fluor 488 抗兔(上海碧云天生物技术有限公司, ST196, RG043 S, P0013B, P0176),琼脂糖凝胶回收试剂盒,无内毒素质粒大提试剂盒和质粒小提试剂盒(北京天根生化科技有限公司, DP209, DP117, DP103), Sorafenib (Target Mol, T0093 L), KOD-Plus-Neo 高保真酶(TOYOBO, 016500), TRIzol (ThermoFisher, 15596026), Lip2000(Bio sharp, BL623B), BCA 检测试剂盒(TaKaRa, T9300A), beta actin mouse、GAPDH mouse(武汉三鹰生物技术有限公司, 66009, 60004), HRP Goat anti-Rabbit、HRP Goat anti-Mouse、Rabbit anti-YAP1(杭州华安生物技术有限公司, HA1001, HA1006, ET1608-30), luciferase (Santa

Cruz, sc-74548), qRT-PCR 相关试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司), 异氟烷(深圳瑞沃德生命科技有限公司, R510-22)。

共聚焦显微镜(Nikon A1⁺, 尼康, 日本), 多功能酶标仪(spectra max, Molecular Devices, 美国), 小鼠活体成像仪(IVIS Lumina LT Series III, PerkinElmer, 美国), PCR 仪(C1000 Touch, BIO-RAD, 美国), 实时荧光定量 PCR 仪(CFX96, BIO-RAD, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建

重组质粒及相关引物(表 1)通过 Snapgene 软

件设计, 引物由浙江尚亚公司合成。目的片段利用 KOD-Plus-Neo 高保真酶扩增。重组质粒经无内毒素质粒提取试剂盒提取, 通过 NaNo drop 微量分光光度计检测以确保质粒提取符合要求, Sanger 测序验证。

1.2.2 细胞培养和重组质粒转染

HEK293 细胞(本实验室冻存株)在 DMEM 高糖培养基中(10% FBS + 1% 青霉素 + 链霉素), 于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养。我们采用 lip2000 转染试剂将重组质粒按照说明书转染进细胞中, 最后放入 37℃, 5% CO₂ 培养箱中孵育 48 h。

表 1 用于 PCR 扩增构建小鼠 HCC 模型质粒的引物序列

Table 1 Primer sequences of plasmids in mouse HCC model for PCR amplification	
引物名称 Primer names	引物序列(5'-3') Primer sequences(5'-3')
YAP-Seamless-F	GAAGATTCTAGAGCTAGCGAATTCATGGAACAAAACATCATCTCAGAAG
YAP-Seamless-R	CGGATCCGATTTAAATTCGAATTCCTATAACCATGTAAGAAAGCTTTCTTTATC
seamless-YAP-IRES-F	GCTGTGACCGGCGCCTACTCTAGAATGGAACAAAACATCATCTCAG
seamless-YAP-IRES-R	GGGAGAGGGGCGGGATCCGCGGCCGCTATAACCATGTAAGAAAGCTTTCTTTATC
seamless-Fluc-F	CCACAACCCACAAAAATGGAATTCATGGAAGACGCCAAAAAC
seamless-Fluc-R	GTAATCCAGAGGTTGATTGTCGACTTACACGGCGATCTTTCC
U6shRNA-F	CGGCCAAGGATCTGCGATCGCGAGGGCCTATTTCCCATGATTC
U6shRNA-R	GACGGGCACCGGAGCGATCGCGAATTCGACCGGTGTTTCC
Pten-F	CCGGCGACTTAGACTTGACCTATATCTCGAGATATAGGTCAAGTCTAAGTCTTTTTC
Pten-R	AATTCAAAAACGACTTAGACTTGACCTATATCTCGAGATATAGGTCAAGTCTAAGTCCG

1.2.3 Western Blot 分析 YAP5SA 和 Luciferase 的表达

细胞培养至 80% ~ 90%, 采用 RIPA 裂解液冰上裂解细胞, 组织样品利用 RIPA 裂解液进行低温匀浆, 获得蛋白样本后采用 BCA 法测量样品蛋白浓度。配制 12% 的 SDS-PAGE 凝胶, 取 30 μg 蛋白样品上样进行电泳, 转移至 PVDF 膜上, 用 5% BSA 摇床封闭 2 h。以 YAP1 和 Luciferase 作为一抗分别孵育, 内参蛋白选取 Actin 或 GAPDH; 最后使用 BioRad 化学发光成像仪观察结果。

1.2.4 细胞免疫荧光检测 YAP5SA 进入细胞核

采用 Lip2000 转染试剂将 YAP5SA 重组质粒转染至 24 孔板细胞爬片中, 质粒转染后的细胞在爬片上汇合至 70% ~ 80%, 弃去培养液, 4% 多聚甲醛固定液于 37℃ 固定细胞爬片; 0.2% TritonX-100 (PBS 稀释) 室温孵育固定; 10% 山羊血清的 PBS 室温封闭 30 min; 以 Rabbit anti-YAP1 作为一抗, Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔作为二抗, 分别孵育细胞爬片; 取出细胞爬片, 添加一滴抗荧光淬灭封片液(含 DAPI) 染色并固定爬片于载玻片上; 共聚焦检测。

1.2.5 荧光定量 PCR 分析

细胞或组织样品使用 TRIzol 试剂按照说明书提取总 RNA。使用 qRT-PCR 相关试剂盒逆转录得到 cDNA。用合成的引物(表 2)和 SYBR GREEN 试剂盒进行 PCR 扩增。小鼠内参基因选取 GAPDH。

表 2 GAPDH、CTGF、PTEN、ANKRD1、TGFB2 和 AXL 基因引物序列

Table 2 Primer sequences of GAPDH, CTGF, PTEN, ANKRD1, TGFB2 and AXL genes	
基因名称 Gene name	引物序列(5'-3') Primer sequences(5'-3')
GAPDH	上游(Forward): GCAAGTTCACGGCACAG
	下游(Reverse): CCAGTAGACTCCACGAC
CTGF	上游(Forward): AGAACTGTGTACGGAGCGTG
	下游(Reverse): GTGCACCATCTTTGGCAGTG
ANKRD1	上游(Forward): TGGAGGAAACGCAGATGTCC
	下游(Reverse): CATCATGCAGTGGGGTGTCT
TGFB2	上游(Forward): TTTTGCTCCAGACAGTCCCA
	下游(Reverse): TCAGTCTGTAGGAGGGCAA
AXL	上游(Forward): TTCAACTGTGCTACGTCCCC
	下游(Reverse): GGGTCCCTCTAGGTAAGCCA
PTEN	上游(Forward): AAGTCCAGACCCATTTCC
	下游(Reverse): AATATAGGTCAAGTCTAAGTCG

1.2.6 萤火虫荧光素酶活性检测

采用碧云天的 Bio-LumiTMII 萤火虫荧光素酶检测试剂盒检测荧光素酶活性。以 6 孔板为例,取 20 μL Passive lysis buffer 裂解液裂解转染 24 ~ 48 h 后的细胞,12 000 r/min,离心 10 min,弃沉淀。设置实验组与对照组:(1)实验组:100 μL Bright-LumiTMII 萤火虫荧光素酶检测试剂和 20 μL 上清;(2)对照组:100 μL Bright-LumiTMII 萤火虫荧光素酶检测试剂。混合后室温孵育 5 min,微孔板发光检测仪检测 luciferase 的活性。

1.2.7 高压水动力学转染技术

以 20 g 的小鼠为例,Ringer's solution 稀释 50 μg 重组质粒+10 μg PB 转座酶质粒至 2 mL。小鼠由异氟烷麻醉后放入固定器中。注射前温水孵育小鼠尾巴,使静脉充盈清晰可见。吸取 2 mL 稀释后的重组质粒混液,选取小鼠尾巴左右静脉的下 1/3 的位置进行注射,于 7 s 内将重组质粒混液全部注入小鼠体内,标记小鼠,并持续监测小鼠 24 h。

1.2.8 小鼠活体荧光成像分析

用无菌的 D-PBS (不含 Mg^{2+} 和 Ca^{2+}) 溶解 D-luciferin potassium salt,配置成 15 mg/mL 的 D-萤光素钾盐溶液,0.2 μm 滤膜过滤除菌。按照 10 $\mu\text{L}/\text{g}$ 的体重浓度,将 D-萤光素钾盐通过腹腔注射进入小鼠体内。注射入体内 10 ~ 20 min 后,荧光信号达到最强稳定平台期,使用 IVIS Lumina LT Series III 进行成像分析。

1.2.9 YAP5SA 诱导的小鼠 HCC 模型差异表达基因的分析及 KEGG 通路富集分析

使用 TRIzol 试剂从样品中提取总 RNA,并进行 RNA 测序。本研究中,每个转录本的差异表达水平以 $|\log_2(\text{fold-change})| > 1$ 和 $P < 0.05$ 为标准,以确定实验组和对照组之间的差异表达基因(DEGS),并对 DEGS 进行 KEGG 信号通路富集分析。

1.2.10 索拉菲尼给药处理

小鼠活体成像荧光信号值出现上升时,将小鼠按体重随机分为两组,每组 8 只。对照组每天灌胃 PBS,实验组每天灌胃索拉菲尼,剂量为 15 mg/kg,灌胃体积为 10 mL/kg,连续灌胃 4 周,每周进行小鼠活体成像分析。

1.3 统计学分析

应用 GraphPad Prism 8.0 统计软件对数据进行整理和统计分析,实验数据均以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用独立样本 t 检验分析两组间比较,结果 $P < 0.05$ 表明所比较组之间有统计学差异。

2 结果

2.1 Hippo 信号通路失活肝癌亚型 YAP5SA 质粒的构建和功能验证

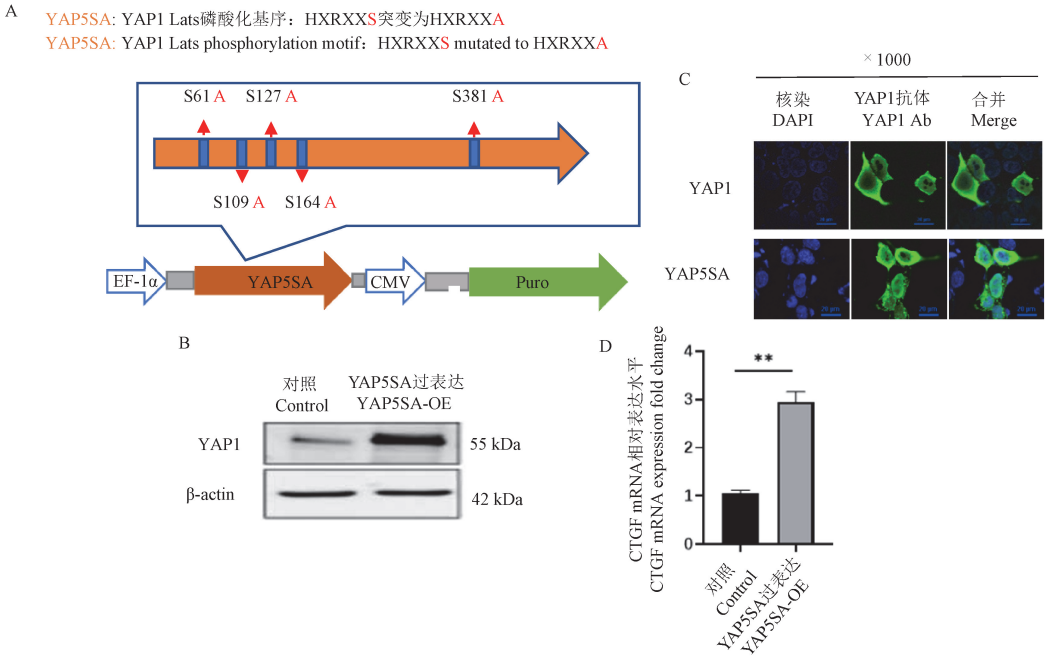
采用分子克隆方法构建 piggybac-EF1 α -YAP5SA-Puro 重组质粒,来模拟 Hippo 信号通路失活(图 1A)。重组质粒转染至 HEK293 细胞中,Western Blot 结果所示,实验组细胞中表达的 YAP5SA 能够被特异性抗体检测到,并相较于对照组有明显提升(图 1B);此外,实验组 YAP5SA 成功在细胞核内表达(图 1C);并且 YAP 调控的下游因子 CTGF mRNA 水平显著性上升(图 1D),证明 YAP5SA 可以模拟 Hippo 信号通路失活后,激活调控下游因子的作用。

2.2 可实时监测的原发性肝癌小鼠模型 luciferase 质粒的构建和功能验证

引入 IRES 元件构建 piggybac-EF1 α -YAP5SA-IRES-Fluc 重组质粒(图 2A),以实现原癌基因 YAP5SA 和荧光素酶基因(Firefly luciferase)的稳定共表达。Western Blot 结果显示,重组质粒转染组(YAP5SA-FLuc-OE)较空白对照组,在 55 kDa 处,出现明显条带(图 2B)。并且经化学发光检测试剂盒检测显示,YAP5SA-FLuc-OE 组 luciferase 活性显著提高(图 2C)。

2.3 可实时监测的 YAP5SA 诱导的小鼠原发性肝癌模型的构建

利用高压水动力学和 PB 转座酶技术将 piggybac-EF1 α -YAP5SA-IRES-FLuc 和 PB 转座酶质粒同时打入小鼠尾静脉。YAP5SA-IRES-Fluc 基因片段在肝细胞内可以持续表达 YAP5SA 和 luciferase(图 3A)。通过腹腔注射 luciferin 底物,小鼠活体荧光成像仪实时跟踪小鼠体内 luciferase 的变化(图 3B)。48 h 显示出极高的荧光素酶活性,通过每隔 1 周连续检测,整合 YAP5SA-IRES-Fluc 的小鼠荧光峰值信号在早期逐渐降低,于 3 周左右,荧光峰值信号与对照组相比,出现明显差异(图 3B),提示小鼠体内存活的肝细胞转化为肝癌细胞,并进入增殖期。后续小鼠解剖中发现,ICR 小鼠肝表面均已出现瘤组织(图 3C),证明本项目已实现小鼠原发性肝细胞癌的成功造模。

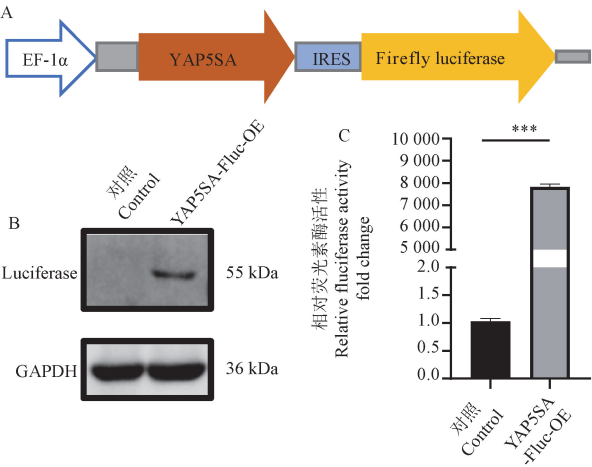


注:A:YAP1 突变体(YAP5SA)及 piggybac-EF1α-YAP5SA-Puro 重组质粒示意图;B:HEK293 细胞中,YAP5SA 过表达(YAP5SA-OE)的蛋白质免疫印迹;C:HEK293 细胞中,YAP5SA 在细胞核内的表达;D:HEK293 细胞中,YAP5SA-OE 后,激活下游因子 CTGF 的 mRNA 水平,与对照组相比,** $P < 0.01$ 。

图1 Hippo 信号通路失活肝癌亚型 YAP5SA 质粒的构建的功能验证

Note. A. Diagram of the YAP1 mutant (YAP5SA) and piggybac-EF1α-YAP5SA-Puro. B. Western Blot of YAP5SA-OE in HEK293. C. The expression of YAP5SA in nucle of HEK293. D. The expression of CTGF in YAP5SA-OE in HEK293. Compared with control group, ** $P < 0.01$.

Figure 1 Functional validation of the plasmid YAP5SA of the HCC in inactivated Hippo signaling pathway



注:A:YAP5SA,Fluciferase 稳定共表达(YAP5SA-Fluc-OE)质粒示意图;B:HEK293 细胞中,YAP5SA-Fluc-OE 后的蛋白质免疫印迹;C:HEK293 细胞中,YAP5SA-Fluc-OE 组,细胞表达的荧光信号;与对照组相比,*** $P < 0.001$ 。

图2 Fluciferase 质粒的构建和功能验证

Note. A. Diagram of plasmid of YAP5SA-Fluc-OE. B. Western Blot of YAP5SA-Fluc-OE in HEK293. C. The luciferase activity in YAP5SA-Fluc-OE in HEK293. Compared with control group, *** $P < 0.001$.

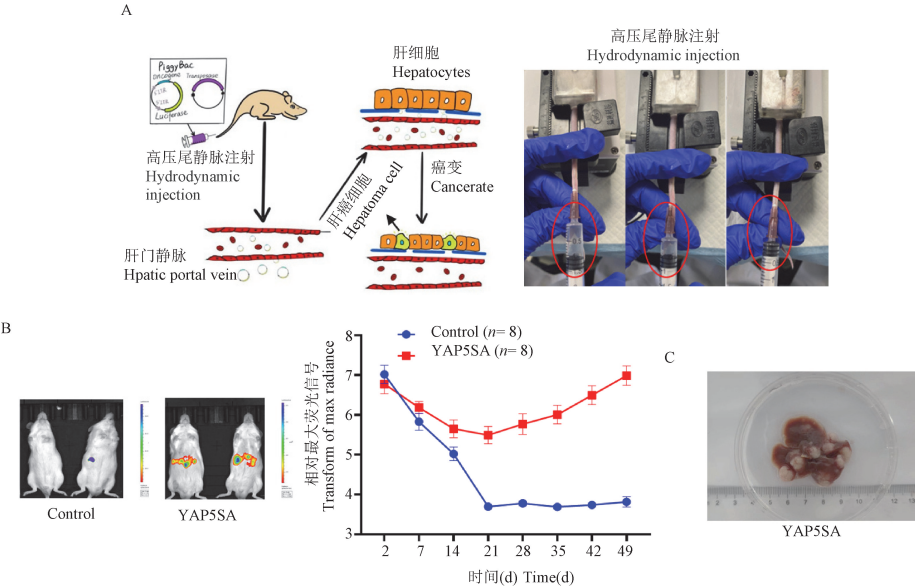
Figure 2 Construction and functional validation of the plasmid Fluciferase

2.4 YAP5SA 诱导的小鼠原发性肝癌组织的 DEGS 分析

取得各组小鼠肝样本后,对 YAP5SA 肿瘤组织进一步进行转录组学分析,并构建火山图(图 4A)。结果所示(图 4B),与对照组织相比,YAP5SA 肿瘤组织发现了 5622 个差异表达基因(DEGS),其中上调基因 3273 个,下调基因 2349 个。我们针对 Hippo 信号通路失活会出现上调的相关基因进行了 RT-PCR 分析,结果显示,YAP5SA 调控的下游因子 mRNA 水平均出现不同程度的提升(图 4C),这与我们肿瘤组织转录组学分析的结果较一致(图 4D)。除此以外,DEGS 中,PD-L1 等免疫检查点的转录水平出现提升(图 4E),提示本模型可以应用于免疫检查点靶向药物的筛选分析。

2.5 KEGG 富集分析

进一步针对 YAP5SA 肿瘤组织中 DEGS 进行 KEGG 富集分析,结果显示,上调差异表达基因主要富集到 P13K-AKT 信号通路、MAPK 信号通路、Ras 信号通路、癌症信号通路等(图 5),说明 Hippo 信号通路失活在诱导肿瘤形成的过程中与这些通路可

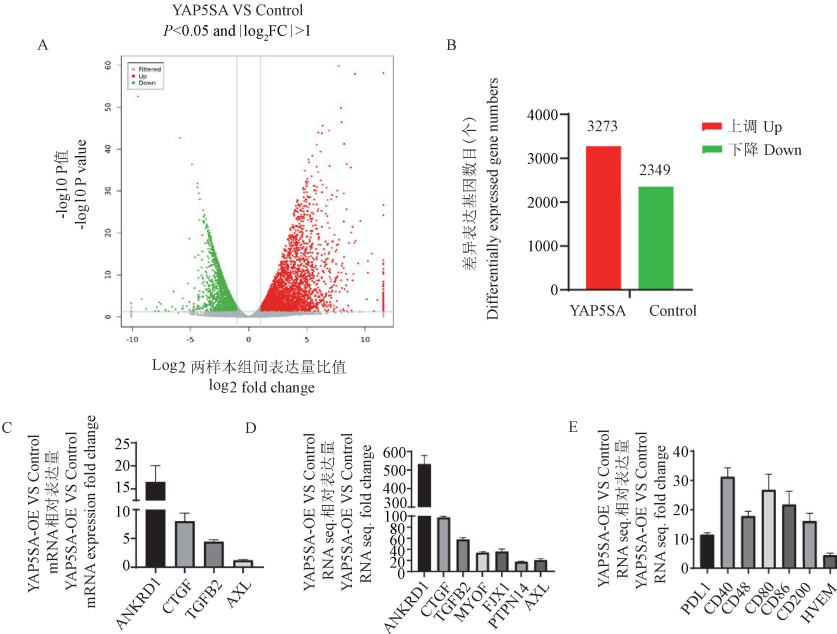


注:A:基于尾静脉注射和PB转座子技术的小鼠原发性肝癌模型操作示意图;B:小鼠活体荧光成像图,以及连续监测荧光信号值曲线图;C:HCC模型的肝解剖图。

图3 可实时监测的YAP5SA诱导的小鼠原发性肝癌模型构建

Note. A. Diagram of a mouse HCC model based on tail vein injection and PB transposon. B. *In vivo* imaging of mice and continuous monitoring of fluorescence signal. C. The liver of HCC.

Figure 3 Construction of a real-time monitorable HCC model induced by YAP5SA



注:A:YAP5SA 肿瘤组织的差异表达基因火山图;B:YAP5SA 肿瘤组织的差异表达基因的柱状统计图;C:YAP5SA 肿瘤组织 Hippo 信号通路的下游因子 mRNA 水平;D:YAP5SA 肿瘤组织 Hippo 信号通路的转录组学分析;E:YAP5SA 肿瘤组织免疫检测点的转录组学分析。

图4 YAP5SA 诱导的小鼠原发性肝癌组织的 DEGS 分析

Note. A. Volcano plot of DEGS in YAP5SA tumors. B. Histogram of DEGS in YAP5SA tumors. C. The mRNA expression of Hippo signaling pathway in YAP5SA tumors. D. The RNA-seq of Hippo signaling pathway in YAP5SA tumors. E. The RNA-seq of immune checkpoint molecules in YAP5SA tumors.

Figure 4 Analysis of DEGS in HCC model induced by YAP5SA

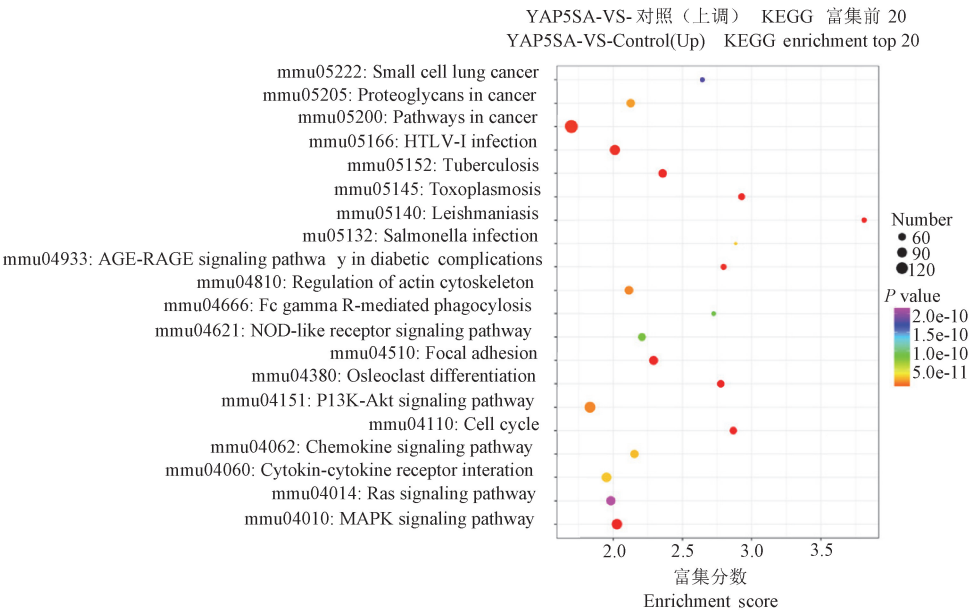
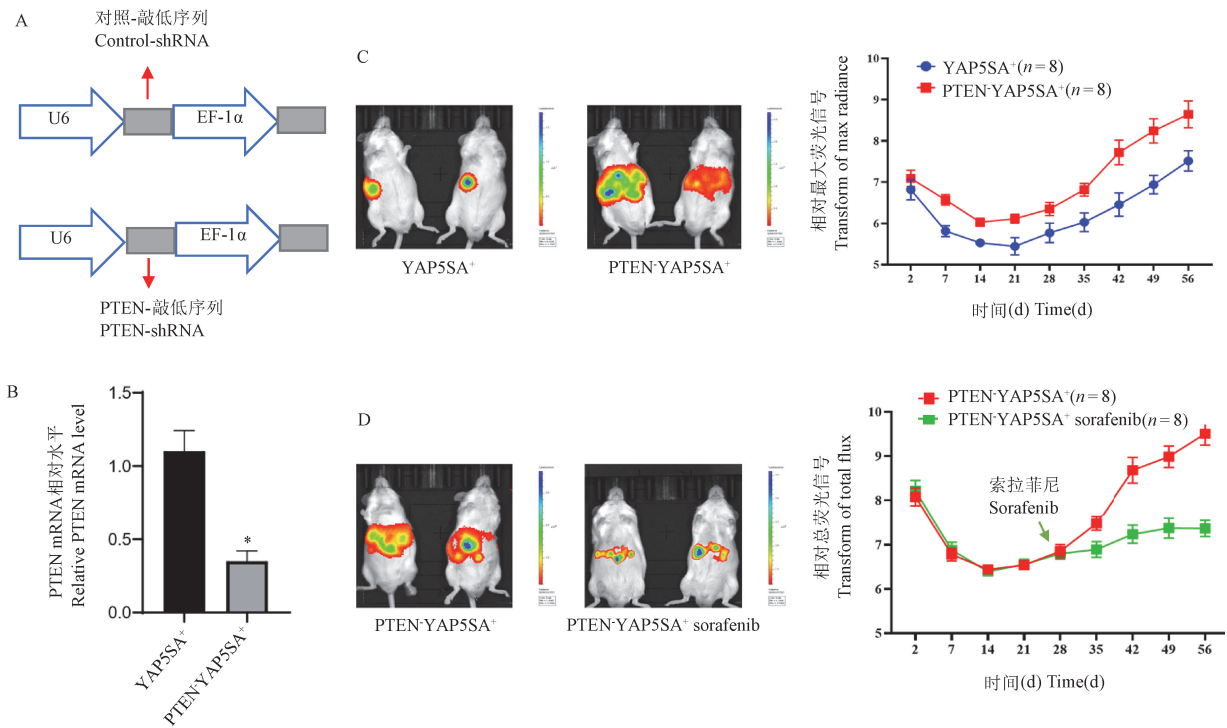


图 5 KEGG 信号通路富集分析
Figure 5 Enrichment analysis in KEGG



注:A: PTEN 敲低,YAP5SA 过表达的 PB 转座子系统质粒示意图;B: PTEN⁻YAP5SA⁺小鼠模型中 PTEN 的 mRNA 水平,与 YAP5SA⁺相比,**P* < 0.05; C: PTEN⁻YAP5SA⁺小鼠活体荧光成像以及连续监测荧光信号值曲线图;D: 索拉菲尼模型组小鼠活体荧光成像以及连续监测荧光信号值曲线图。

图 6 抑癌基因 PTEN 和索拉菲尼靶向治疗在 YAP5SA 诱导的小鼠原发性肝癌模型中的应用

Note. A. Diagram of plasmid PTEN-YAP5SA⁺. B. The mRNA expression of PTEN in the PTEN⁻YAP5SA⁺ HCC model. Compared with YAP5SA⁺, **P* < 0.05. C. *In vivo* imaging of mice and continuous monitoring of fluorescence signal in PTEN⁻YAP5SA⁺. D. *In vivo* imaging of mice and continuous monitoring of fluorescence signal in PTEN⁻YAP5SA⁺ sorafenib HCC model.

Figure 6 Applicaion of PTEN and sorafenib in HCC model induced by YAP5SA

能发生了交互作用。

2.6 抑癌基因 *PTEN* 和药物靶向治疗在 *YAP5SA* 诱导的小鼠原发性肝癌模型中的应用

结合以上转录水平的分析结果,我们选取了 *P13K-AKT* 通路中核心抑癌基因 *PTEN* 以及目前临床上靶向该通路治疗肝癌的一线药物索拉菲尼应用于本模型。

分子水平上,我们在 piggybac-EF1 α -*YAP5SA*-IRES-Fluc 质粒的基础上,重新构建了包含 U6 启动子和 *PTEN* shRNA 序列的重组质粒(图 6A)。

动物水平上,我们利用本实验中 PB 转座酶和高压水动力转染的方法建立 *PTEN* 敲低同时 *YAP5SA* 过表达(*PTEN*⁻*YAP5SA*⁺)的小鼠原发性肝癌模型。*PTEN*⁻*YAP5SA*⁺ 模型组的 *PTEN* 基因 mRNA 水平被成功敲低(图 6B)。*PTEN*⁻*YAP5SA*⁺ 模型组的荧光信号峰值与 *YAP5SA*⁺ 对照组的荧光信号峰值相比,整体均值偏高(图 6C)。结果提示,*PTEN*⁻*YAP5SA*⁺ 组小鼠成瘤速度快于对照组。

除此以外,为了验证靶向肝癌的药物在本模型的应用性,在 *PTEN*⁻*YAP5SA*⁺ 模型组 5 周时,对小鼠给予索拉菲尼治疗,结果显示,在索拉菲尼给药一周后,小鼠的荧光信号停止上升,呈现平稳的趋势(图 6D)。这一结果提示药物治疗后,本模型中肝癌的发生发展能被索拉菲尼抑制。

3 讨论

本项目以 Hippo 信号通路失活的典型突变原癌基因 *YAP5SA* 为例,构建可以进行实时跟踪的特定原癌基因驱动的原发性肝癌小鼠模型。为实现该小鼠模型,我们主要采用了 PB 转座子系统,高压水动力学尾静脉注射,以及活体成像三大技术。PB 转座子是一类可以高效整合基因进入哺乳动物基因组的真核转座子系统,利用该系统,我们可以将原癌基因整合进入基因组,诱导癌基因的发生发展。高压水动力学尾静脉注射是一种有效的活体转染方式,通过尾静脉在短时间内注入大剂量液体,可以把绝大部分核酸导入肝组织^[12]。我们的活体成像数据显示,腹腔注射的 luciferin 最终导致肝部位有明显的生物发光,证明了该技术的可行性。通过持续的活体成像监测,约 3 周左右,可观测到差异性的荧光信号,表明 PB 转座子系统成功将原癌基因导入到肝细胞中,并诱导肝细胞的癌化,并于第 7 周左右肿瘤组荧光信号迅速上升,提示肝癌细胞进入

快速增殖期。本模型的成功建立,可以通过动态监测小鼠原发性肝癌发生发展的过程,完成筛选组织或血清中的候选标志物,为 Hippo 信号通路失活亚型的肝癌早期诊断标志物的确定提供依据。并且,本项目的小鼠模型,不仅仅局限在 Hippo 信号通路失活这一类肝癌亚型,其它肝癌亚型的原癌基因或抑癌基因的突变,同样可以用本方法进行构建。

另外,根据《“健康中国 2030”规划纲要》^[13],我国拟将肝癌患者 5 年生存率提高 15%。可是治疗 HCC 的靶向药选择十分有限,索拉菲尼等为数不多的酪氨酸激酶通路小分子抑制剂是主要的临床一线或二线药物^[14-16]。靶向免疫抑制点的单克隆抗体,比如国产卡瑞利珠单抗、信迪利单抗等,均是靶向 PD-1/PD-L1,是 HCC 仅有的一线或二线免疫靶向治疗药物^[17-19]。目前处于临床试验期的 HCC 治疗方法,大部分仍旧集中在免疫抑制点抗体疗法联合上述提及的酪氨酸激酶的小分子或单克隆抗体药物^[20]。然而研究表明,尽管酪氨酸激酶通路抑制剂和 PD-1/PD-L1 抗体药获得了较好的效果,但统计数据显示仅部分 HCC 患者获得了临床客观缓解,提示原发性肝癌存在异质性,需要针对肝癌异质性进行深入研究,鉴定各类 HCC 亚型的致病机理并筛选更多潜在药物靶点^[21-22]。在我们的模型中,我们使用了索拉菲尼对 Hippo 失活亚型的小鼠原发性肝癌进行了灌胃处理,研究结果显示,索拉菲尼对该亚型肝癌的发生发展仅可以部分起到抑制效果,提示,在 Hippo 信号通路失活的该类肝癌亚型,需要进一步开发更为高效的小分子药物。我们的实时监测模型,为开展靶向药物的筛选治疗,提高患者生存率,提供了一个有效的研究手段。

因此,总的来说,本实验成功构建了一种可实时监测的小鼠原发性肝癌模型,可以用于不同肝癌亚型的分子表征,并可以此为基础,进一步进行反映实际临床特征的肝癌靶向药物的筛选。

参 考 文 献(References)

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [3] El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma [J]. N Engl J Med, 2011, 365(12): 1118-1127.
- [4] Cu CY, Lee TKW. Preclinical mouse models of hepatocellular carcinoma: an overview and update [J]. Exp Cell Res, 2022,

- 412(2): 113042.
- [5] Friemel J, Frick L, Unger K, et al. Characterization of HCC mouse models; towards an etiology-oriented subtyping approach [J]. Mol Cancer Res, 2019, 17(7): 1493–1502.
- [6] Molina-Sánchez P, Ruiz de Galarreta M, Yao MA, et al. Cooperation between distinct cancer driver genes underlies intertumor heterogeneity in hepatocellular carcinoma [J]. Gastroenterology, 2020, 159(6): 2203–2220.
- [7] Tang M, Zhao Y, Zhao J, et al. Liver cancer heterogeneity modeled by *in situ* genome editing of hepatocytes [J]. Sci Adv, 2022, 8(25): eabn5683.
- [8] Song X, Wei C, Li X. The signaling pathways associated with breast cancer bone metastasis [J]. Front Oncol, 2022, 12: 855609.
- [9] Nishina H. Physiological and pathological roles of the Hippo-YAP/TAZ signaling pathway in liver formation, homeostasis, and tumorigenesis [J]. Cancer Sci, 2022, 113(6): 1900–1908.
- [10] Yimlamai D, Christodoulou C, Galli GG, et al. Hippo pathway activity influences liver cell fate [J]. Cell, 2014, 157(6): 1324–1338.
- [11] Guo X, Zhao Y, Yan H, et al. Single tumor-initiating cells evade immune clearance by recruiting type II macrophages [J]. Genes Dev, 2017, 31(3): 247–259.
- [12] 朱传龙, 宁琴, 严伟明, 等. 尾静脉高压注射质粒 DNA 后体内表达的规律 [J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(4): 226–229.
- Zhu CL, Ning Q, Yan WM, et al. Plasmid DNA distribution and gene expression generated via tail vein hydrodynamic injection [J]. Chin J Comp Med, 2006, 16(4): 226–229.
- [13] 中国共产党中央委员会, 中华人民共和国国务院. “健康中国 2030” 规划纲要 [J]. 中国实用乡村医生杂志, 2017, 24(7): 1–12.
- CPC Central Committee, the State Council of the People's Republic of China. Outline of “healthy China 2030” [J]. Chin Pract J Rural Dr, 2017, 24(7): 1–12.
- [14] Han KH. Treatment of hepatocellular carcinoma with lenvatinib [J]. Gastroenterol Hepatol (NY), 2018, 14(11): 662–664.
- [15] Bruix J, Qin S, Merle P, et al. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial [J]. Lancet, 2017, 389(10064): 56–66.
- [16] Abou-Alfa GK, Meyer T, Cheng AL, et al. Cabozantinib in patients with advanced and progressing hepatocellular carcinoma [J]. N Engl J Med, 2018, 379(1): 54–63.
- [17] El-Khoueiry AB, Sangro B, Yau T, et al. Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial [J]. Lancet, 2017, 389(10088): 2492–2502.
- [18] Zhu AX, Finn RS, Edeline J, et al. Pembrolizumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma previously treated with sorafenib (KEYNOTE-224): a non-randomised, open-label phase 2 trial [J]. Lancet Oncol, 2018, 19(7): 940–952.
- [19] Qin S, Ren Z, Meng Z, et al. Camrelizumab in patients with previously treated advanced hepatocellular carcinoma: a multicentre, open-label, parallel-group, randomised, phase 2 trial [J]. Lancet Oncol, 2020, 21(4): 571–580.
- [20] Cheng AL, Hsu C, Chan SL, et al. Challenges of combination therapy with immune checkpoint inhibitors for hepatocellular carcinoma [J]. J Hepatol, 2020, 72(2): 307–319.
- [21] Sun C, Mezzadra R, Schumacher TN. Regulation and function of the PD-L1 checkpoint [J]. Immunity, 2018, 48(3): 434–452.
- [22] Finn RS, Ryoo BY, Merle P, et al. Pembrolizumab As second-line therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma in KEYNOTE-240: a randomized, double-blind, phase III trial [J]. J Clin Oncol, 2020, 38(3): 193–202.

[收稿日期] 2022-11-14