

心房钠尿肽对基因敲除小鼠移植黑色素瘤生长的抑制作用

亓翠玲, 曹静桦, 何亚军, 李梦诗, 李倩明, 杨 扬, 王丽京*

(广东药科大学, 基础学院血管生物学研究所, 广州 510006)

【摘要】 目的 探讨心房钠尿肽 (atrial natriuretic peptide, ANP) 对黑色素瘤生长的作用。**方法** 将体外培养黑色素瘤 B16F10 细胞分别接种于 ANP 敲除小鼠和 C57BL/6J 小鼠的皮下, 建立黑色素移植瘤模型, 从第 7 天开始测量肿瘤的长径和短径, 计算肿瘤的体积; 接种肿瘤后的第 12 天断颈处死小鼠, 分离移植瘤并称重。肿瘤组织石蜡包埋后, 用免疫组化检测肿瘤细胞增殖和微血管密度。**结果** ANP 敲除小鼠的肿瘤体积明显比 C57BL/6J 小鼠小, 肿瘤重量也明显轻。ANP 敲除小鼠的肿瘤组织中细胞增殖数目和微血管密度也明显比 C57BL/6J 小鼠少。**结论** ANP 缺失可能通过抑制肿瘤细胞增殖和微血管形成而明显地抑制了黑色素瘤的生长。

【关键词】 心房钠尿肽; 心房钠尿肽敲除小鼠; 黑色素瘤; 肿瘤细胞增殖; 肿瘤血管形成

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 04-0015-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.04.003

Inhibitory effect of atrial natriuretic peptide (ANP) on the tumor growth of ANP knockout mouse and C57BL/6J mouse models of subcutaneous xenotransplanted melanoma

QI Cuiling, CAO Jinghua, HE Yajun, LI Mengshi, LI Qianming, YANG Yang, WANG Lijing*

(Vascular Biology Research Institute, School of Basic Course, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of atrial natriuretic peptide (ANP) deletion on melanoma growth. **Methods** A subcutaneous xenotransplanted melanoma model was established in ANP knockout mice and C57BL/6J mice. The tumor volume was measured at the sixth day after establishment of the subcutaneous transplantation. Tumor cell proliferation and tumor-induced angiogenesis were detected by immunohistochemical staining. **Results** The volume and weight of xenotransplanted melanoma were significantly decreased in the ANP knockout mice compared with those in the C57BL/6J mice. The proliferative tumor cells and microvessel density were significantly decreased in the tumor tissues of ANP knockout mice compared with those in the C57BL/6J mice. **Conclusions** ANP deletion significantly suppresses xenotransplanted melanoma growth through inhibiting the tumor cell proliferation and angiogenesis.

【Key words】 atrial natriuretic peptide, ANP; ANP knockout mice; melanoma; proliferation; angiogenesis

【基金项目】 国家自然科学基金 (31500966, 81773095); 广州市科技计划项目 (201607010135); 广东省科技计划项目 (2015A020211029, 2014A020212314)。

【作者简介】 亓翠玲 (1979—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 肿瘤病理学。E-mail: qicuilin12345@163.com

【通信作者】 王丽京 (1962—), 女, 博士, 教授, 研究方向: 肿瘤病理学。E-mail: wanglijing62@163.com

心房钠尿肽(atrial natriuretic peptide, ANP)是 De Bold 等^[1]于 1981 年首次在心房肌细胞中发现的,是钠尿肽家族(NPs)被发现的第一个成员。之后发现了其他的成员,即脑钠肽(BNP)^[2]、C-型钠尿肽(CNP)^[3]和树眼镜蛇性钠尿肽(DNP)^[4]。ANP 与细胞膜上的受体鸟苷酸环化酶相互作用,发挥了重要的生物学功能。ANP 最主要的生物学作用是排钠利尿,调节血压及参与水盐平衡等。研究表明 ANP 还具有其他生物学功能,如通过减少自由基的生成和抵制氧化应激反应,从而起到保护心肌的作用;通过重塑心肌结构,从而改善心力衰竭的症状;还可通过对子宫血管重塑,对生殖等发挥重要作用。但是,ANP 对黑色素瘤生长的作用未见报道。作者利用 C57BL/6J 背景的 ANP 敲除小鼠建立黑色素瘤皮下移植瘤模型,研究 ANP 对黑色素瘤生长的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 ANP 杂合子小鼠(ANP^{+/-}),雄性 2 只,雌性 6 只,6~8 周龄,体重 18~20 g,由耿建国教授提供。C57BL/6J 小鼠,SPF 级,雌性,10 只,6~8 周龄,体重 18~20 g,购自广东省医学实验动物中心[SCXK(粤)2008-0002]。小鼠饲养于广东药科大学实验动物中心,动物实验操作也在此进行[SYXK(粤)2012-0125],并严格按照广东药科大学动物伦理要求进行动物实验(福利伦理审查证号:gdpulac2015014)。

1.2 主要试剂与仪器

B16F10 黑色素瘤细胞株购于中国科学院上海生命科学研究院细胞库,常规培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中;Rabbit anti-mouse Ki67 抗体及 rabbit anti-mouse CD31 抗体购自博士德生物工程有限公司;Mouse anti-rabbit IgG 购自北京中杉金桥生物有限公司。

主要仪器有 PCR 仪(美国应用生物系统公司);光学显微镜及照相系统(日本 Olympus 公司);全自动生物组织包埋机(PR 公司);烤片机(PR 公司);石蜡切片机和冰冻切片机(德国徕卡仪器公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 ANP 纯合子敲除小鼠的建立

ANP 纯合子敲除小鼠由 ANP 杂合子小鼠相互配种构建所得。本实验针对 ANP 基因设计了引物:引物 1: 5'- CCT TCT ATC GCC TTC TTG ACG -3'; 引物 2: 5'- CTG TCC AAC ACA GAT CTG ATG -3';

引物 3: 5'- CTG TTG CAG CCT AGT CCA CT -3'。反应条件为: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 30 s, 64℃ 1 s, 72℃ 1 s; 35 个循环;72℃ 充分延伸 2 min。扩增产物为 700 bp。

1.3.2 皮下移植瘤模型的建立

以 C57BL/6J 小鼠作为对照组,ANP 敲除小鼠为实验组。对数生长期的黑色素瘤 B16F10 细胞,用胰酶消化离心后,用无菌的 PBS 重悬细胞。用台盼蓝对细胞进行染色以确定死细胞数低于 5% 后,在小鼠的右上肢腋下皮下接种 0.2 mL 的黑色素瘤细胞(1×10^5 个细胞)。在接种后第 7 天每天用游标卡尺测量移植瘤的最大径(a)和最小径(b),移植瘤体积的计算公式为: $0.52 \times ab^2$ 。在肿瘤细胞接种 12 d 时,处死小鼠,分离小鼠肿瘤组织,并称重。

1.3.3 免疫组织化学染色

将小鼠的肿瘤组织石蜡包埋、切片后进行免疫组织化学染色。切片脱蜡、水化后,放于 3% H_2O_2 -甲醇液中,37℃ 浸泡 30 min 以消除内源性过氧化酶。PBS 清洗 3 次后,高压修复 10 min。血清封闭 50 min 后,加 rabbit anti-mouse Ki67 抗体或 rabbit anti-mouse CD31 抗体,4℃ 过夜。PBS 清洗 3 次后,加二抗,37℃ 孵育 50 min。PBS 清洗 3 次后,DAB 染色,苏木素复染后,常规脱水、透明、封片。

1.4 统计学方法

所有数据采用 Graphpad Pism 5 软件和 Sigmaplot 软件统计和做图,实验数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 *t* 检验确定各组间是否有统计学差异。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 ANP 敲除小鼠的鉴定与扩群

本实验所有小鼠均为 ANP 杂合子小鼠(ANP^{+/-}),用雄性 ANP^{+/-} 小鼠与雌性 ANP^{+/-} 小鼠杂交,子代有杂合子、纯合子和野生型三种基因型小鼠。1、2、4 和 6 号小鼠的电泳条带大小为 700 bp,为纯合子小鼠;3 号和 5 号小鼠电泳条带大小为 700 bp 和 434 bp,为杂合子小鼠。接着,用 ANP^{-/-} 小鼠与 ANP^{+/-} 小鼠配种,对 ANP^{-/-} 小鼠扩群。

2.2 ANP 敲除抑制了黑色素移植瘤的生长

在 ANP 敲除小鼠和 C57BL/6J 小鼠皮下接种黑色素瘤 B16F10 细胞建立黑色素移植瘤模型,7 d 后均形成明显的肿瘤结节。成瘤后,每天测量肿瘤的长径和短径,计算小鼠的肿瘤体积,发现在对应的时间内 ANP 敲除小鼠的肿瘤体积明显比 C57BL/6J 小鼠的肿瘤体积小(见图 2A)。在肿瘤接种 12 d

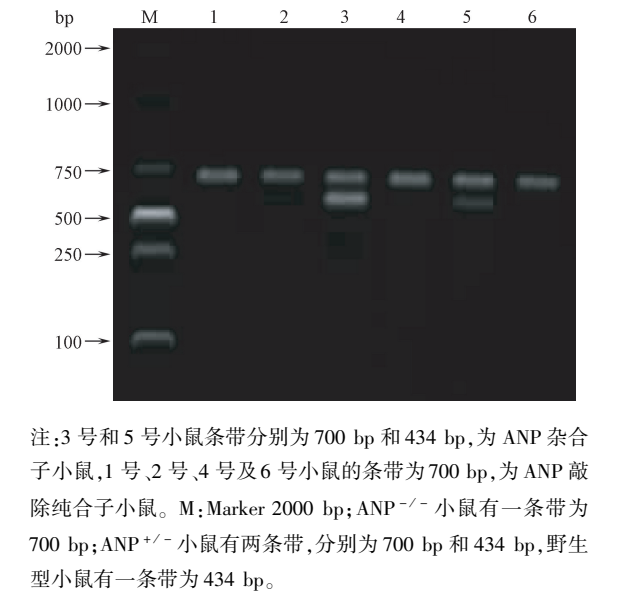


图 1 ANP 基因的鉴定图

Note. Lane 3,5: ANP^{+/-} mice; Lane1, 2,4,6: ANP^{-/-} mice.

Fig.1 Identification image of ANP gene

时,用断颈法处死小鼠,分离小鼠肿瘤组织并称重,发现 ANP 敲除小鼠的肿瘤重量明显比 C57BL/6J 小鼠的肿瘤重量轻(见图 2B)。

2.3 ANP 敲除对黑色素瘤肿瘤细胞增殖和肿瘤微血管密度的作用

小鼠肿瘤组织石蜡包埋、切片后,用 Ki67 及 CD31 抗体检测肿瘤组织中增殖的细胞及血管。对于增殖细胞的统计,每张切片在 400 倍光镜下拍照,每张切片随机记录 4~5 个视野,计数每个视野中阳性细胞数及全部细胞数,增殖指数为增殖细胞数占全部细胞数的比值。发现 ANP 敲除小鼠肿瘤组织中细胞增殖指数明显比 C57BL/6J 小鼠少(图 3A)。关于微血管密度,每张切片在 200 倍光镜下拍照,每张切片随机记录 4~5 个视野,计数每个视野中血管

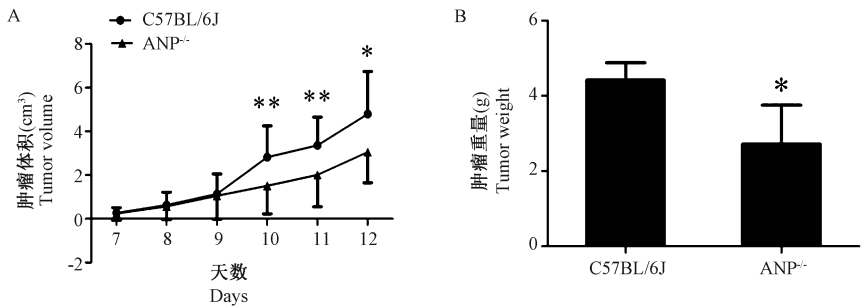
的数目,发现 ANP 敲除小鼠肿瘤组织中微血管数目明显比对照组少(图 3B)。

3 讨论

ANP 是广泛分布于心脏血管系统、中枢神经系统、免疫系统及肾脏组织中由心肌细胞合成和分泌的激素。ANP 主要与 NPRA 结合,激活 G 蛋白和鸟苷酸环化酶,进而促进细胞内环磷酸鸟苷的生成^[5-8],从而钠利尿、舒张血管、降低血压、参与脂质代谢及调节免疫等^[9-12]。近年研究表明 ANP 还对纤维化、心肌缺血再灌注损伤等具有重要作用^[13-14]。但是,ANP 对肿瘤生长的作用尚未见报道。

为了确定 ANP 对黑色素瘤的作用,本研究利用 ANP 敲除小鼠建立了黑色素瘤皮下移植模型。利用基因工程小鼠建立肿瘤移植瘤模型具有其它模型无法比拟的优势:可以在基因产物的作用完全消除的情况下,研究单个基因在动物体内对肿瘤的作用,更能模拟肿瘤在人类体内发生发展的过程。本实验所用的基因工程小鼠为 ANP 敲除小鼠,在 ANP 敲除小鼠体内 ANP 的功能完全缺失。利用 ANP 敲除小鼠及其对照 C57BL/6J 小鼠建立的黑色素瘤皮下移植瘤模型,每组小鼠的肿瘤成功率可达 100%,而且肿瘤生长速度较一致,个体差异也较小,而且肿瘤长于体表,易于观察及测量肿瘤,可以客观地判断 ANP 对肿瘤生长的作用。

本研究利用 ANP 敲除小鼠建立的黑色素瘤皮下移植瘤模型,发现 ANP 敲除显著抑制了黑色素瘤的生长。为了进一步确定 ANP 敲除抑制黑色素瘤的作用,我们用免疫组化检测了肿瘤组织中增殖的细胞及微血管密度,发现 ANP 敲除后显著抑制了肿瘤细胞的增殖及微血管的密度。所以,ANP 敲除可

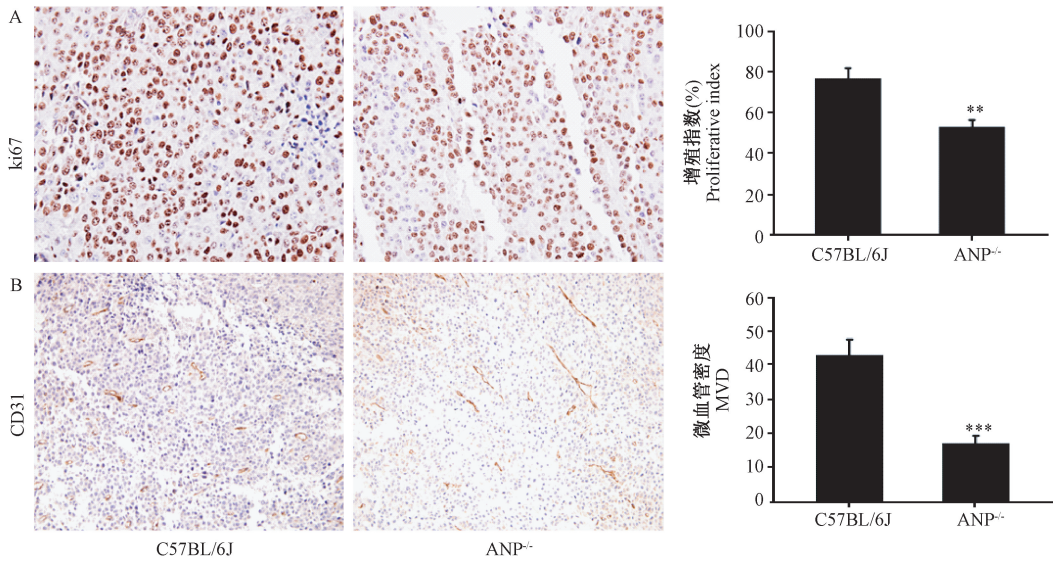


注:与 C57BL/6J 小鼠比较,**P* < 0.05,***P* < 0.01。

图 2 ANP 敲除对小鼠黑色素移植瘤的作用

Note. Compared with the C57BL/6J mouse,**P* < 0.05,***P* < 0.01.

Fig.2 The effect of ANP knockout on the transplanted melanoma in mice



注:与 C57BL/6J 小鼠比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.01$ 。

图 3 ANP 缺失抑制了肿瘤细胞增殖和肿瘤血管形成 (Bar = 100 μm)

Note. Compared with the C57BL/6J mouse, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Fig. 3 Deletion of ANP inhibits tumor cell proliferation and tumor angiogenesis in the mice.

能通过抑制肿瘤细胞的增殖及减少微血管的数目,从而抑制了黑色素皮下移植瘤的生长。

综上所述,ANP 缺失显著抑制了黑色素瘤的生长,但其分子机制尚不清楚,需进一步研究。进一步探讨 ANP 与肿瘤发生、发展的关系,将对于理想的抗肿瘤治疗靶点及判断患者预后具有重要意义,而且为 ANP 作为治疗肿瘤患者的新型药物提供了重要依据。

参考文献:

[1] de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, et al. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extracts in rats [J]. Life Sci,1981, 28(1):89-94.

[2] Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, et al. A new natriuretic peptide in porcine brain [J]. Nature, 1988, 332(6159): 78-81.

[3] Sudoh T, Minamino N, Kangawa W, et al. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1990, 168(2): 863-870.

[4] Schweitz H, Vigne P, Moinier D, et al. A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (dendroaspis angusticeps) [J]. J Biol Chem, 1992, 267(20): 13928-13932.

[5] Suga S, Nakao K, Hosoda K, et al. Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide [J]. Endocrinology, 1992, 130(1): 229-239.

[6] Calderone A, Thaik CM, Takahashi N, et al. Nitric oxide, atrial

natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts [J]. J Clin Invest, 1998, 101(4): 812-818.

[7] Vollmar AM, Kierner AK. Immunomodulatory and cytoprotective function of atrial natriuretic peptide [J]. Crit Rev Immunol, 2001, 21(6): 473-485.

[8] Lafontan M, Berlan M, Stich V, et al. Recent data on the regulation of lipolysis by catecholamines and natriuretic peptides [J]. Ann Endocrinol (Paris), 2002, 63(2 Pt 1): 86-90.

[9] Sonnenberg H, Cupples WA, de Bold AJ, et al. Intrarenal localization of the natriuretic effect of cardiac atrial extract [J]. Can J Physiol Pharmacol, 1982, 60(9): 1149-1152.

[10] Silberbach M, Roberts CT Jr. Natriuretic peptide signaling: molecular and cellular pathways to growth regulation [J]. Cell Signal, 2001, 13(4): 221-231.

[11] Schiebinger RJ, Cragoe EJ Jr. Ouabain. A stimulator of atrial natriuretic peptide secretion and its mechanism of action [J]. Circ Res, 1993, 72(5): 1035-1043.

[12] Lew RA, Baertschi AJ. Mechanisms of hypoxia-induced atrial natriuretic factor release from rat hearts [J]. Am J Physiol, 1989, 257 (1 Pt 2): H147-H156.

[13] Nishikimi T, Miura K, Minamino N, et al. Role of endogenous atrial natriuretic peptide on systemic heart and renal hemodynamics in failure rats [J]. Am J Physiol, 1994, 267 (1 Pt 2): H182-H186.

[14] Wada A, Tsutamoto T, Matsuda Y, et al. Cardiorenal and neurohumoral effects of endogenous atrial natriuretic peptide in dogs with severe heart failure using a specific antagonist for guanylate cyclase-coupled receptors [J]. Circulation, 1994, 89(5): 2232-2240.