

韩靓,刘殿峰,祁明辉,等. TETs 蛋白在乌拉坦诱导小鼠肺癌模型中的表达模式 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(1): 1-6.
Han L, Liu DF, Qi MH, et al. Analysis of the expression pattern of TET proteins in lung cancer mouse model induced by urethane [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(1): 1-6.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.01.001

TETs 蛋白在乌拉坦诱导小鼠肺癌模型中的表达模式

韩 靓^{1,2}, 刘殿峰², 祁明辉², 高 伟², 王 玲², 任文陟², 俞先峰²,
王东旭^{2*}, 林 超^{1*}

(1. 吉林工商学院, 长春 130507; 2. 吉林大学动物科学学院, 长春 130062)

【摘要】 目的 探讨 TET 家族蛋白在小鼠肺癌模型中的表达模式。方法 将小鼠分成 3 组, 每组 10 只。分别设为对照组 (Con), 乌拉坦诱导组 (Ure), 以及羟基脲给药组 (Ure-HU)。对 Ure 组和 Ure-HU 组连续 10 周给予 800 mg/kg 乌拉坦溶液, 诱导建立小鼠肺癌模型。10 周后对 Ure-HU 组给予 HU 药物 (500 mg/kg), 连续 21 d。观察肺部形态结节个数。利用 qPCR 和 Western blot 分析 TETs 在 3 组小鼠中的表达模式。结果 与 Con 组相比, Ure 和 Ure-HU 组体重下降明显。形态学观察显示, Ure 组和 Ure-HU 组均有肺组织病变。qPCR 结果显示, 在 Ure 组, TETs 表达显著降低 ($P < 0.05$)。经过 HU 处理后, Ure-HU 组 TET1 和 TET2 表达上升 ($P < 0.05$)。Western blot 与 qPCR 结果一致。结论 在乌拉坦诱导的小鼠肺癌模型中, TETs 蛋白表达模式异常, 证明在肺癌发生过程中, TET1 和 TET2 具有重要作用。

【关键词】 小鼠; 肺癌模型; 基因表达; TET 家族蛋白

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 01-0001-06

Analysis of the expression pattern of TET proteins in lung cancer mouse model induced by urethane

HAN Liang^{1,2}, LIU Dianfeng², QI Minghui², GAO Wei², WANG Ling², REN Wenzhi², YU Xianfeng²,
WANG Dongxu^{2*}, LIN Chao^{1*}

(1. Jilin Business and Technology College, Changchun 130507, China.

2. College of Animal Science, Jilin University, Changchun 130062)

【Abstract】 **Objective** The expression pattern of TET family proteins was investigated in a mouse lung cancer model. **Methods** The mice were divided into three groups (with 10 mice in each group): control group (Con), urethane-induced group (Ure), and HU-treated group (Ure-HU). Urethane (800 mg/kg) was injected intraperitoneally for 10 weeks to establish the mouse lung cancer model in the Ure and Ure-HU groups. After 10 weeks, the Ure-HU group was given the drug HU (500 mg/kg) for 21 days. The morphology was observed thereafter, while qPCR and western blotting were used to analyze the expression patterns of TET1, TET2, and TET3 in the three groups. **Results** Compared with that of the Con group, the weights of the Ure group and Ure-HU group decreased. Morphological observation revealed lung tissue lesions in the Ure and Ure-HU groups. qPCR result suggested that the expression of TETs was decreased in the Ure group

【基金项目】 吉林省科技条件与平台建设计划 (20180623023TC); 吉林省自然科学基金 (20180101254JC); 吉林省科技基础条件与平台建设计划 (20170623093-05TC)。

【作者简介】 韩靓 (1997—), 女, 本科, 研究方向: 实验动物模型构建。E-mail: 907470475@qq.com

【通信作者】 王东旭 (1985—), 男, 副教授, 博士, 研究方向: 实验动物模型构建。E-mail: wang_dong_xu@jlu.edu.cn

林超 (1985—), 讲师, 博士, 研究方向: 兽医公共卫生。E-mail: sara851109@hotmail.com * 共同通信作者

($P < 0.05$). After HU treatment, the expression of *TET1* and *TET2* was increased in the Ure-HU group ($P < 0.05$). The data from western blotting were consistent with the qPCR result. **Conclusions** The expression of TETs was abnormal in a mouse lung cancer model induced by urethane. These result suggest that *TET1* and *TET2* play important roles in lung cancer.

[Keywords] mouse; lung cancer model; gene expression; TET proteins

肺癌是威胁人类健康的重要恶性肿瘤^[1-2]。目前,应用于构建肺癌的动物有小鼠,大鼠,地鼠和狗等^[3-4]。其中,小鼠是目前应用最多的肺癌模型动物^[5]。在诱导小鼠发生肺癌的过程中,通常选择一些常见的致癌物质,例如,苯并芘、煤焦沥青、乌拉坦、氧化钬等^[6]。在肺癌防治相关研究中,乌拉坦诱发性肺癌模型已得到了较为广泛的应用,乌拉坦是一种化学致癌物质,由醇与尿素反应形成,主要存在于烟草、烟雾以及发酵食品,如面包、奶酪中。乌拉坦可以促进小鼠无纤毛呼吸道上皮及 II 型上皮细胞形成肺癌细胞,并且其诱导的肺腺癌病理学特征与人肺腺癌极其相似,从而乌拉坦是作为诱导小鼠肺癌模型较常见的一种药物^[7]。TET 蛋白家族(ten-eleven-translocation protein)是 DNA 甲基化过程中的重要调节因子,包括 *TET1*、*TET2* 和 *TET3*,属于 α -酮戊二酸(α -KG)和 Fe^{2+} 依赖的双加氧酶。TET 蛋白家族的发现开辟了表观遗传与恶性肿瘤关系研究的新道路,3 种 TET 蛋白均可催化 5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5mC)生成 5-羟甲基胞嘧啶(5-hydroxymethylcytosine, 5hmC),基因突变等因素导致的 *TET2* 蛋白表达量及其催化产物 5hmC 含量减少与恶性肿瘤的发生发展密切相关^[8-9]。研究发现,肿瘤组织中 *TET1* 蛋白表达水平与 5hmC 含量都有下调的趋势,这提示增加肿瘤组织中 *TET1* 蛋白表达,以去甲基化激活抑癌基因,或可为肿瘤治疗提供新的思路^[10-11]。羟基脲为作用于细胞周期 S 期的特异性抗恶性肿瘤药物,近年来其临床应用范围的不断扩大^[12]。本实验对乌拉坦诱导的小鼠肺癌模型在给予羟基脲药物干预后,观察 TETs 蛋白表达对小鼠肺癌模型的影响,为深入研究其机制及寻找肺癌新的治疗靶点提供基础理论和科研实践。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雌性 ICR 小鼠 30 只,6~8 周龄,体重 22~26 g,购买并饲养于吉林大学实验动物中心[SCXK(吉)2016-0001]。饲养环境温度为 25℃,相对湿度在 40%~70%,每日光照为 12 h。小鼠组

织取材于吉林大学实验动物中心[SYXK(吉)2016-0001]。实验获得吉林大学实验动物伦理委员会的批准(伦理审查证号:201705007),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

乌拉坦(Urethane, Ure, 瑞永生物科技有限公司,批号:51-79-6,中国),羟基脲(Hydroxyurea, HU, Sigma-Aldrich, 批号:127-07-1,美国),TRIzol reagent(Life Technologies,批号:248204,美国),反转录试剂盒(天根,批号:KR116,中国),荧光定量试剂盒(天根,批号:R6508,中国);Western 及 IP 细胞裂解液(碧云天,批号:P0013C,中国),PMSF(博士德,批号:AR0162,中国),蛋白定量试剂盒 BCA Protein Assay Kit(天根,批号:MA0082-1-Jul-09D,中国),*TET1*, *TET2* 和 *TET3* 抗体(Abcam,批号:CC19062119693, CC1712115422, CC1712115423, 美国),山羊抗兔,山羊抗鼠二抗(博士德,批号:BST14E05A54, BST14C19B50, 中国),切片机(莱卡,批号:RM2015, 德国),显微镜(奥林巴斯 IX71,批号:4M42164, 日本),荧光定量 PCR 仪(Eppendorf AG,批号:Z237868 J, 德国),生物安全柜(上海力申科技有限公司,批号:0117PSQB0186, 中国),电子分析天平(梅特勒-托利多,批号:AB204-N, 美国),离心机(Thermo,批号:LR56495, 美国),电泳仪(君意,批号:JY600C, 中国),凝胶成像仪(天能科技,批号:13T12NPFL1-921, 中国)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组及造模后给药

参照文献^[13]构建小鼠肺癌模型。随机将 30 只雌性 ICR 小鼠分成 3 组,每组 10 只。分别设立 Con 组, Ure 组和 Ure-HU 组。其中, Ure 组和 Ure-HU 组腹腔注射 800 mg/kg 乌拉坦溶液,每周 2 次,连续 10 周。Con 组注射等量的生理盐水。10 周后,停止注射乌拉坦溶液。对 Ure-HU 组腹腔注射 500 mg/kg 的 HU 药物,连续 21 d。Con 组和 Ure 组注射等量的生理盐水。第 13 周处死取材。

1.3.2 HE 染色

小鼠处死后,取出肿瘤样本,进行初步的形态

学鉴定。将肿瘤样本进行固定、脱水、透化、浸蜡、石蜡包埋,制备石蜡切片。石蜡切片进行脱蜡、水洗,并利用苏木精和伊红染料进行 HE 染色。最后封片并在镜下观察并成像。

1.3.3 基因表达分析

按照说明书,利用 TRIzol reagent 提取正常肺组织、肿瘤组织和给药后肿瘤组织的 RNA, RNA 样品置于 -80°C 保存。采用天根快速反转录试剂盒将 RNA 反转成 cDNA, -20°C 保存。根据 GeneBank 中基因的原始序列设计下列 qPCR 引物,并由吉林省库美生物科技有限公司合成。*TET1*, F: AGCTGGATTGAAGGAACAGG, R: GTCTCCATGAGCTCCCTGAC; *TET2*, F: AGAGCCTCAAGCAACCAAAA, R: ACATCCCTGAGAGCTCTTGC; *TET3*, F: TGCGATTGTGTCGAA CAAATAGT, R: TCCATACCGATCCTCCATGAG; *HPRT*, F: CAGTACAGCCCCAAAATGGT, R: CAAGG GCATATCCAACAACA。

采用荧光定量试剂盒进行实时荧光定量 PCR, 反应条件按照 95°C 3 min, (95°C 10 s, 60°C 20 s, 72°C 30 s) 40 个循环, 72°C 10 min, 添加溶解曲线。在实验中,每一个检测样品都设有三个重复。选择 *HPRT* 为内参基因。计算相对表达量时采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 公式,样品数目各为 3 个。

1.3.4 蛋白表达分析

利用 IP 细胞裂解液对组织进行裂解,BCA 比色法测定蛋白质浓度,取相同质量的蛋白质样品,加入蛋白质加样缓冲液, 95°C 水浴 8 min 变性。配置 12% 分离胶和 5% 的浓缩胶,上样后跑电泳。利用电转膜仪进行转膜。将转移了蛋白印迹的 PVDF 膜浸泡于 5% BSA 溶液中,室温,摇床上封闭 1 h。贴膜孵育相应稀释的抗体, 4°C 过夜。加入相应的稀

释二抗(山羊抗兔或者山羊抗鼠), 37°C 孵育 1 h。配置显色液,采用凝胶成像仪进行观察并成像。

1.3.5 ELISA 分析

参照《白头翁总皂苷改善肺癌小鼠肺部微环境的作用及机制研究》,检测小鼠瘤体中 VEGF、IL-6 和 TNF- α 水平。小鼠处死后,提取正常肺组织、肿瘤组织和给药后肿瘤组织,采用 ELISA 法检测小鼠瘤体中 VEGF、IL-6 和 TNF- α 的水平变化。

1.3.6 小鼠自主活动检测

将小鼠放入主活动记录仪中,适应 2 min。正式实验开始后,记录小鼠 5 min 内活动次数,连续 4 d。

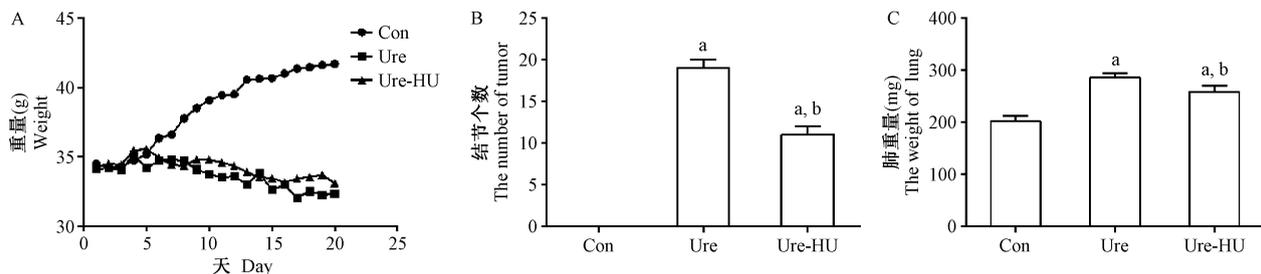
1.4 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析小鼠重量,结节个数,肺重量,生存曲线,自主活动次数以及荧光定量 PCR 数据,独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 小鼠肺癌模型的建立

与 Con 组相比,连续给予乌拉坦的 Ure 组合 Ure-HU 组,在第 10 周开始出现体重下降。其中,与 Ure 组相比,Ure-HU 组在进行 HU 给药后,体重下降明显降低(图 1A)。第 13 周处死小鼠后,收集肺组织,其中 Ure 组和 Ure-HU 组均发现不同数目的结节(图 1B)。每组随机统计 3 只小鼠肺组织重量,结果显示,Ure 组和 Ure-HU 组与 Con 组相比,显著上升($P < 0.05$)。与 Ure 组相比,Ure-HU 组肺组织重量下降,差异显著($P < 0.05$)(图 1C)。生存曲线结果显示,实验结束前,Ure 组有 2 只小鼠死亡,Ure-HU 组有 1 只小鼠死亡(图 2A)。自主活动结果显示,Ure 组和 Ure-HU 组自主活动次数明显下降(图



注:A:小鼠肺癌模型体重;B:小鼠肺组织结节个数;C:小鼠肺组织重量。a,与 Con 组相比,差异显著($P < 0.05$);b,与 Ure 组相比,差异显著($P < 0.05$)。

图 1 小鼠肺癌模型体重、结节个数、肺重量情况

Note. A: The weight of the mouse lung cancer model. B: The number of tumors in mouse lung. C: The weight of mouse lung. a, indicated statistically significant differences compare to Con group ($P < 0.05$); b, indicated statistically significant differences compare to Ure group ($P < 0.05$).

Figure 1 The weight, number of tumors, and lung weight of the mouse lung cancer model

2B)。ELISA 结果证明,与 Con 组相比,Ure 组和 Ure-HU 组 VEGF,IL-6,和 TNF- α 水平明显上升(图 3)。

2.2 形态学观察

观察小鼠肺组织,Ure 组结节个数多于 Ure-HU 组(图 4A~4C)。与 Con 组相比,Ure 组和 Ure-HU 组,肺部肿大(图 4D)。HE 染色结果显示,与 Con 相(图 5A)比,Ure 组和 Ure-HU 组出现明显肺腺癌病理特征,可见明显腺圈。其中 Ure 组腺圈内部浸满肿瘤细胞,排列密集杂乱(图 5B),Ure-HU 组,腺圈内肿瘤细胞较少(图 5C)。

2.3 TETs 蛋白表达模式

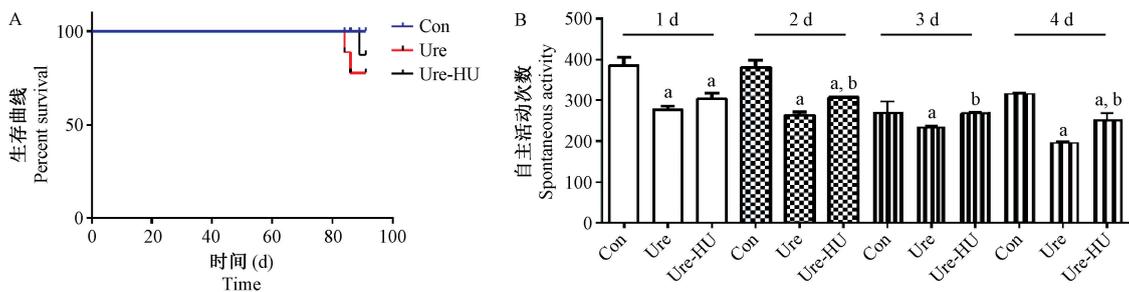
荧光定量 PCR 结果显示,与 Con 组相比,Ure 组和 Ure-HU 组 *TET1*,*TET2* 和 *TET3* 的 mRNA 表达水平显著降低($P < 0.05$)。经过 HU 药物处理后,*TET1* 和 *TET2* 的 mRNA 水平显著提高($P < 0.05$) (图 6)。Western blot 结果显示,Ure 和 Ure-HU 组,

TET1,*TET2* 和 *TET3* 蛋白表达显著下降(图 7)。

3 讨论

化学致癌试剂乌拉坦诱导的小鼠肺癌模型,是研究肺癌发病机制和药物治疗最常见的动物模型^[14-15]。之前有文献报道,利用 C57BL/6 小鼠,腹腔注射乌拉坦,连续 15 周,获得致癌率达到 100% 的小鼠肺癌模型^[16]。本研究采用 ICR 小鼠,每周注射 2 次乌拉坦溶液,连续 10 周,所有小鼠肺部均产生病变,表现为结节出现,肺部肿大,符合小鼠肺癌特征。

之前有研究显示,乌拉坦诱导的小鼠肺癌模型,肺组织产生明显腺圈,且随着肿瘤进程,腺圈内逐渐被肿瘤细胞侵占,腺圈会逐渐消失,肿瘤细胞凝集成团,这与人类临床晚期肺腺癌病例相似^[7, 17]。在本实验中,病理学切片显示小鼠肺癌模型中肿瘤细胞成团且腺圈明显。

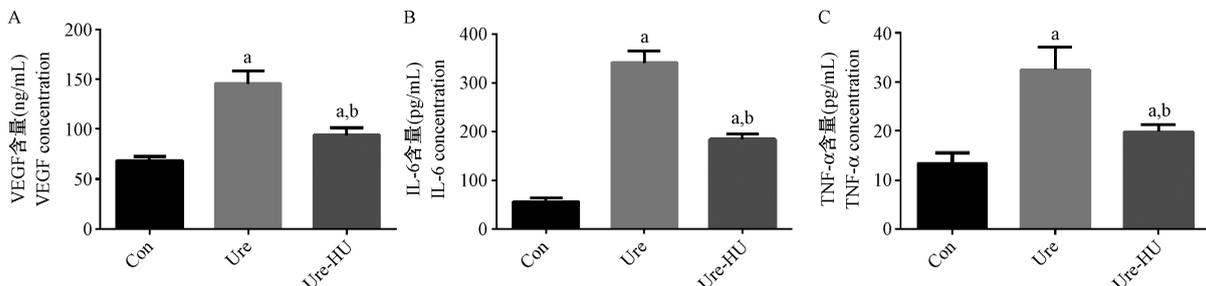


注:A:生存曲线;B:小鼠自主活动次数。a,与 Con 组相比,差异显著($P < 0.05$);b,与 Ure 组相比,差异显著($P < 0.05$)。

图 2 小鼠生存曲线和自主活动情况

Note. A: The survival rate. B: The spontaneous activity. a, indicated statistically significant differences compare to Con group ($P < 0.05$); b, indicated statistically significant differences compare to Ure group ($P < 0.05$).

Figure 2 The survival rate and spontaneous activity of mouse

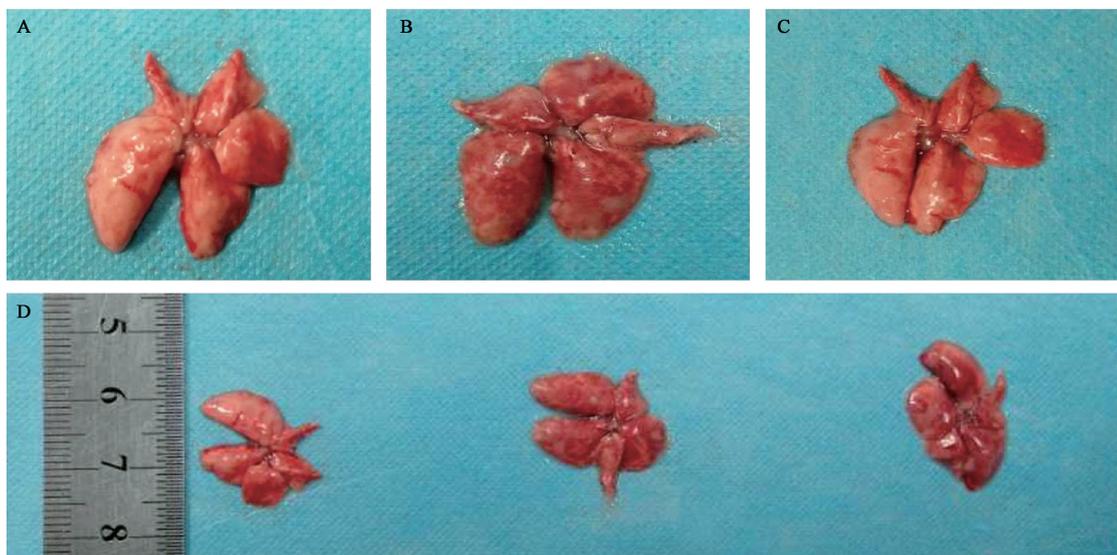


注:A:VEGF 含量;B:IL-6 含量;C:TNF- α 含量。a,与 Con 组相比,差异显著($P < 0.05$);b,与 Ure 组相比,差异显著($P < 0.05$)。

图 3 小鼠肺癌相关因子的检测

Note. A: The concentration of VEGF. B: The concentration of IL-6. C: The concentration of TNF- α . a, indicated statistically significant differences compare to Con group ($P < 0.05$); b, indicated statistically significant differences compare to Ure group ($P < 0.05$).

Figure 3 The detection of lung cancer-related factors in mice

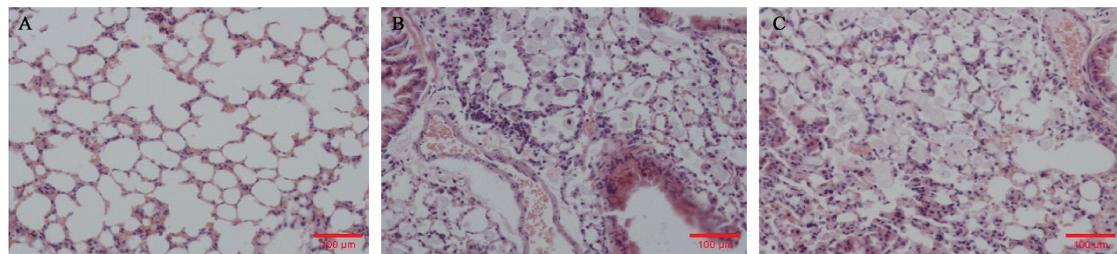


注:A:Con 组肺组织;B:Ure 组肺组织;C:Ure-HU 组肺组织;D:肺组织形态。

图 4 小鼠肺组织形态学观察

Note. A: The lung tissue of the Con group. B: The lung tissue of the Ure group. C: The lung tissue of the Ure-HU group. D: Morphology of lung tissue.

Figure 4 Morphological observation of mouse lung tissue

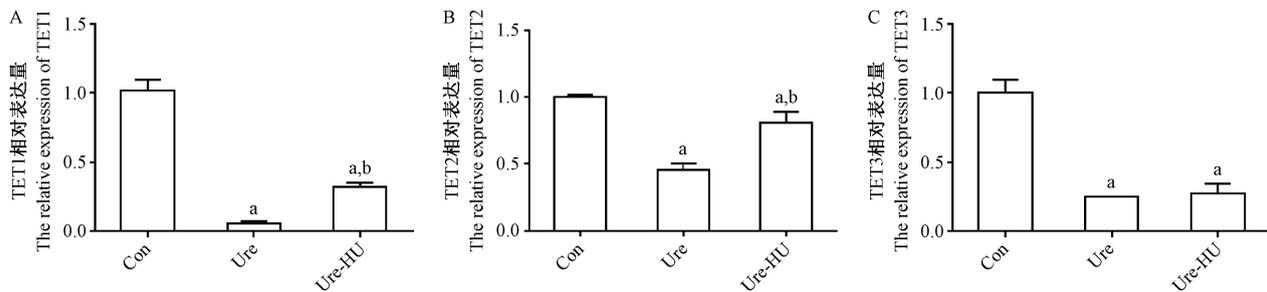


注:A:Con 组肺组织;B:Ure 组肺组织;C:Ure-HU 组肺组织。

图 5 小鼠肺组织病理学观察(HE 染色)

Note. A: The lung tissue of the Con group. B: The lung tissue of the Ure group. C: The lung tissue of the Ure-HU group.

Figure 5 Histopathological observation of mouse lung tissue. HE staining



注:A: *TET1* 相对表达量;B: *TET2* 相对表达量;C: *TET3* 相对表达量。a, 与 Con 组相比, 差异显著 ($P < 0.05$); b, 与 Ure 组相比, 差异显著 ($P < 0.05$)。

图 6 *TET1*, *TET2* 和 *TET3* 的 mRNA 表达模式

Note. A: The relative expression of *TET1*. B: The relative expression of *TET2*. C: The relative expression of *TET3*. a, indicated statistically significant differences compare to Con group ($P < 0.05$); b, indicated statistically significant differences compare to Ure group ($P < 0.05$).

Figure 6 The mRNA expression patterns of *TET1*, *TET2*, and *TET3*

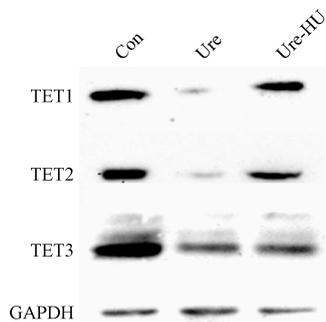


图 7 TETs 的蛋白表达模式

Figure 7 The protein expression patterns of TETs

HU 作为一种抗癌药物,广泛应用于胃癌,肝癌,白血病等恶性肿瘤中^[18-19]。因此,本研究采用 HU 作为治疗小鼠肺癌的药物,观察小鼠肺部的形态学变化。与预期结果相一致,肺癌模型小鼠在经过 HU 处理后,结节个数下降,肿瘤细胞成团个数减少,证明 HU 对于小鼠肺癌有抗肿瘤作用。

本实验进一步分析了 TET 家族蛋白在小鼠肺癌的表达模式。之前有研究表明,TETs 蛋白的表达模式在癌症中具有重要作用^[20]。例如,TET1 蛋白高表达可以抑制乳腺癌细胞迁移^[21]。也有报道证明 TET2 蛋白在血液恶性肿瘤中表达缺失^[22-23]。另外,有证据显示 TET3 在鳞状上皮细胞癌中可以介导表观遗传学修饰失活^[24]。在本实验中,TET1, TET2 和 TET3 在小鼠肺癌样本中,均呈现低表达的模式,提示 TET 家族蛋白在肺癌形成的过程中相关表达水平受到影响。在经过 HU 处理后,TET1 和 TET2 蛋白表达上升,这一结果暗示 TET 家族蛋白,尤其是 TET1 和 TET2,在抗肿瘤过程中具有重要作用。

本研究利用抗肿瘤药物 HU 对小鼠肺癌模型进行处理,分析了 TET 家族蛋白在体内肿瘤形成后的表达模式。综上,提示 TETs 蛋白的表达模式及其调控机制在肺癌中具有重要作用。

参考文献:

[1] 刘伟杰. 皂角刺对肺癌的防治作用及其机制初步探讨 [D]. 河南大学, 2014.

[2] 邵国光. 非小细胞肺癌相关基因的多态性研究 [D]. 吉林大学, 2005.

[3] 余琛琳, 崔淑芳. 肺癌动物模型的制备与应用 [J]. 中国实验动物学报, 2008, 16(6): 470-474.

[4] 肖时满, 强金伟. 早期肺癌动物模型的研究进展 [J]. 放射学实践, 2013, 28(12): 1291-1293.

[5] 胥孜杭, 胡洁森, 陈晓, 等. 小鼠肺癌模型研究进展 [J]. 中国医药导报, 2016, 13(9): 63-67.

[6] 成泽东, 陈以国. 肺癌模型研究进展 [J]. 辽宁中医杂志, 2006(4): 507-508.

[7] 孙婷. 乌拉坦诱导小鼠肺癌模型的研究 [D]. 河南大学, 2013.

[8] Wossidlo M, Nakamura T, Lepikhov K, et al. 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming [J]. Nat Commun, 2011, 2:241.

[9] 汪涛, 黄映辉. DNA 羟甲基化酶基因 TET1 在肿瘤发生中的作用 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2018, 25(3): 305-309.

[10] Huang Y, Rao A. Connections between TET proteins and aberrant DNA modification in cancer [J]. Trends Genet, 2014, 30(10): 464-474.

[11] Abdel-wahab O, Mullally A, Hedvat C, et al. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies [J]. Blood, 2009, 114(1): 144-147.

[12] 甘涛泉. TNFAIP1 通过与 HBO1 相互作用影响宫颈癌发生的研究 [D]. 湖南师范大学, 2016.

[13] 陈晨, 盛云华, 王宇, 等. 乌拉坦致 C57BL/6J 小鼠肺腺瘤动物模型方法研究 [J]. 中国药理学杂志, 2018, 53(9): 701-706.

[14] 侯西栋. 川楝子对肺癌的治疗作用及其机制初步研究 [D]. 河南大学, 2015.

[15] 郭宁飞. TNF- α 相关炎症介导的肺腺瘤中树突状细胞免疫抑制功能的研究 [D]. 河北医科大学, 2017.

[16] 陈婷, 王双, 张恋, 等. 多次注射乌拉坦诱导的 BALB/C 及 C57BL/6J 小鼠肺癌模型的比较 [J]. 四川动物, 2014, 33(2): 275-278.

[17] 邱波, 王艳, 陈凯, 等. 人类和啮齿类动物肺肿瘤比较 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(8): 1369-1373.

[18] 陆小三. 羟基脲生物的合成及其抗肿瘤活性研究 [D]. 南昌大学, 2007.

[19] 刘五梅. 羟基脲生物体外抗肿瘤作用的初步研究 [D]. 南昌大学, 2012.

[20] 田宜平. TETs 表达与结直肠癌发生发展的关系及 TET1 表达对结直肠癌细胞生物学行为的影响 [D]. 浙江大学, 2016.

[21] Lu HG, Zhan W, Yan L, et al. TET1 partially mediates HDAC inhibitor-induced suppression of breast cancer invasion [J]. Mol Med Rep, 2014, 10(5): 2595-2600.

[22] Tefferi A, Lim KH, Levine R. Mutation in TET2 in myeloid cancers [J]. N Engl J Med, 2009, 361(11): 1117; author reply 1117-8.

[23] Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes [J]. Nat Genet, 2009, 41(7): 838-842.

[24] Misawa K, Imai A, Mochizuki D, et al. Association of TET3 epigenetic inactivation with head and neck cancer [J]. Oncotarget, 2018, 9(36): 24480-24493.