研究报告

心房钠尿肽在基因敲除小鼠黑色素瘤肺转移中的作用

亓翠玲,曹静桦,何亚军,李倩明,李梦诗,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)对黑色素瘤肺转移的作用。**方法** 将体外培养的黑色素瘤 B16F10 细胞株通过尾静脉注射到心房钠尿肽敲除小鼠($ANP^{-/-}$小鼠)和 C57BL/6J 小鼠的体内,建立黑色素瘤肺转移模型,模型建立后第 21 天计数转移到肺表面的结节数目,并把肺组织包埋固定、切片、HE 染色后,确定肺转移结节并计数。**结果** ANP 敲除小鼠肺表面转移的黑色素瘤结节数明显比 C57BL/6J 小鼠少,差异有显著性;ANP 敲除小鼠肺微转移结节数目也明显比 C57BL/6J 小鼠少,差异有显著性。**结论** ANP 敲除显著抑制了黑色素瘤的肺转移。

【关键词】 心房钠尿肽;基因敲除小鼠;黑色素瘤;肺转移瘤
【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856(2018) 06-0001-03
doi: 10.3969/j.issn.1671 -7856. 2018.06.001

Effect of atrial natriuretic peptide (ANP) on pulmonary melanoma metastasis in ANP knockout mice and C57BL/6J mice

QI Cuiling, CAO Jinghua, HE Yajun, LI Qianming, LI Mengshi, YANG Yang, WANG Lijing*
(Vascular Biology Research Institute, School of Basic Course, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the role of atrial natriuretic peptide (ANP) in lung metastasis of melanoma. **Methods** Melanoma B16F10 cells were intravenously injected into ANP knockout mice and C57BL/6J mice. After three weeks, the mice were sacrificed, and the lungs were removed, embedded, and examined by pathology using HE staining. The numbers of metastatic foci on the lung surface and micrometastatic foci in the lung tissues were counted. **Results** The ANP knockout mice displayed fewer metastatic foci on the lung surface and less micrometastatic foci in the lung tissues of ANP knockout mice than in the C57BL/6J mice. **Conclusions** ANP deletion significantly suppresses the metastasis of melanoma in the lung of mice.

【Key words】 atrial natriuretic peptide, ANP; gene knockout mice; melanoma; lung metastasis

钠尿肽(atrial natriuretic peptide, ANP)家族是人们在心和脑中发现的一种与水钠代谢有关的肽类激素家族,包括心房钠尿肽[1]、脑钠肽(BNP)[2]、C-型尿钠肽(CNP)[3]和树眼镜蛇性利尿钠肽(DNP)[4]。心房钠尿肽是由心房合成并储存的的一种活性多肽,具有利钠利尿、扩张血管、降低血压等作用。心房钠尿肽与高血压、心和肾功能不全、妊娠相关疾病及肺水肿等疾病具有密切的关系。但是,关于 ANP 对肿瘤发生发展的作用报道不多,本文利用 ANP 敲除小鼠建立黑色素瘤肺转移模型,研究 ANP 对黑色素瘤肺转移的作用。

[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: qicuiling12345@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

1 材料和方法

1.1 实验动物

ANP 敲除纯合子小鼠(ANP$^{-/-}$),由耿建国教授惠赠,SPF 级,6 ~ 8 周龄,体重 18 ~ 20 g,雄性 2 只,雌性 4 只。SPF 级雌性 C57BL/6J 小鼠,6 ~ 8 周龄,体重 18 ~ 20 g,10 只,购自广东省医学实验动物中心[SCXK(粤)2008 - 0002]。小鼠饲养及操作均在广东药科大学实验动物中心进行[SYXK(粤)2012 - 0125],并严格遵守广东药科大学动物伦理的规定(福利伦理审查证:gdpulac2015014)。

1.2 细胞

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。

1.3 实验方法

1.3.1 肺转移小鼠模型建立

肺转移小鼠模型根据文献报道建立[5],简单概括为:把处于对数生长期的 B16F10 细胞用胰酶消化后,用无菌 PBS 调整细胞密度为 1×10^5/mL,用台盼蓝染色确定活细胞数在 95% 以上,通过尾静脉给每只小鼠注射 0.2 mL(1×10^5 个细胞)。B16F10 细胞接种后 21 d,安乐死处死小鼠,分离小鼠肺,在倒置显微镜下计数肺表面转移肿瘤的数目。

1.3.2 病理检查

肿瘤组织石蜡包埋后,切片。将切片脱蜡至水,自来水清洗,用苏木素染色,自来水冲洗,1% 盐酸乙醇酸化后返蓝,用伊红染色,脱水用中性树胶封片。在显微镜下计数转移到肺组织中的结节数目。

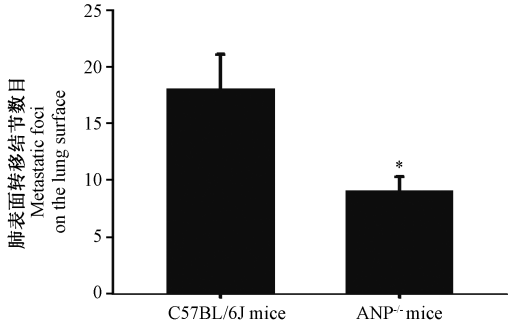
1.4 统计学方法

用 Graphpad Prism 5 软件和 SigmaPlot 软件处理所有数据,实验数据以平均数 ± 标准误($\bar{x} \pm s\bar{x}$)表示,各组间比较用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 ANP 敲除抑制了黑色素瘤 B16F10 细胞的肺转移

在肺转移小鼠模型建立的第 21 天,用安乐死法处死小鼠,分离肺组织,发现所有小鼠的肺表面都有黑色的转移瘤,计数转移到肺表面的肿瘤数目,ANP 敲除小鼠肺表面转移黑色素瘤的数目明显比 C57BL/6J 鼠少。



注:与 C57BL/6J 小鼠比,$^*P < 0.05$。

图 1 ANP 敲除对黑色素瘤的肺转移的作用

Note. Compared with the C57BL/6J mice, $^*P < 0.05$.

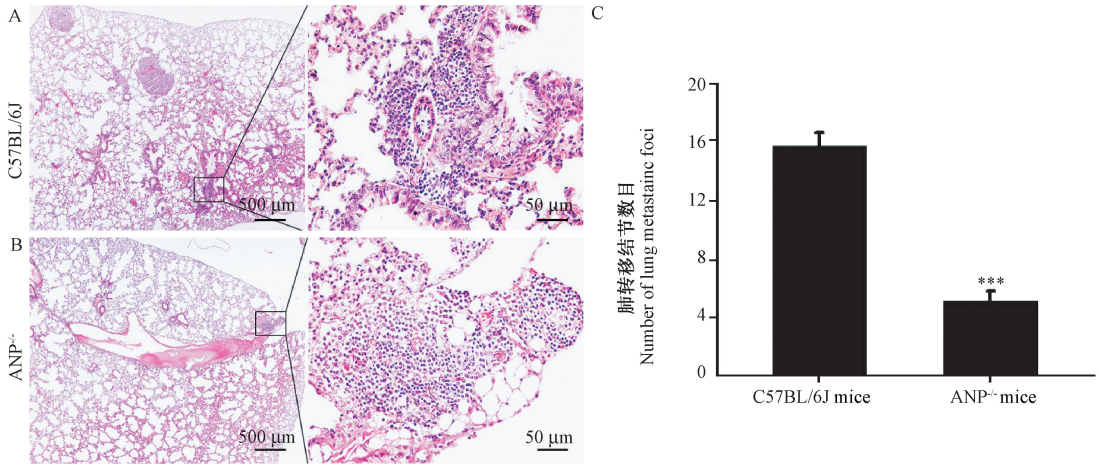
Fig. 1 Effect of ANP deletion on the number of metastatic foci on the mouse lung surface

2.2 ANP 敲除对肺组织中微转移结节数目的影响

转移模型建立后的第 21 天,处死小鼠,分离小鼠肺组织,固定、包埋、切片后,HE 染色,C57BL/6J 小鼠及 ANP 敲除小鼠的肺组织中都有黑色素瘤转移结节(见图 2A 和 2B),发现 ANP 敲除小鼠肺组织中微转移结节的数目明显比 C57BL/6J 少(见图 2C)。

3 讨论

心房钠尿肽作为一种经典的血管活性肽,在肿瘤中的作用研究甚少。本研究利用 ANP 敲除小鼠和 C57BL/6J 小鼠,通过尾静脉注射黑色素瘤 B16F10 细胞,建立黑色素瘤肺转移瘤小鼠模型。利用 ANP 敲除小鼠研究黑色素瘤对肺转移的作用,较其它模型具有一大优点:ANP 基因的作用在小鼠中被完全消除,更能明确证实 ANP 基因在黑色素瘤肺转移中的作用。本研究利用 ANP 敲除小鼠建立肺转移模型,此模型具有肿瘤发生率高、容易建立、时间短、肿瘤转移均一性好、个体差异小等优点。利用此小鼠模型,我们发现 ANP 敲除显著抑制了黑色素瘤的肺转移。但文献报道用 ANP 治疗 DMBA(initiator)/croton oil 诱导的小鼠皮肤癌,发现 ANP 通过激活 NF-κB 信号、肥大细胞及 MMP2/9 显著抑制了皮肤癌的生长[6]。Takashi 等[7]也报道 ANP 通过抑制肺癌 A549 细胞与内皮细胞粘附,进而抑制了肿瘤的肺转移。这些研究与我们的研究结果相反,需要进一步探讨。与我们研究不一致的原因可能如下:我们是利用 ANP 敲除小鼠研究 ANP 对黑色素瘤的肺转移的作用,主要观察 ANP 基因对肿瘤的作用,而 Takashi 等主要是用 ANP 蛋白治疗肿瘤



注:(A、B) C57BL/6J 小鼠及 ANP 敲除小鼠肺组织的 HE 染色图(Bar = 500 μm)及局部转移结节的放大图(Bar = 50 μm);与 C57BL/6J 小鼠比较, $^{***}P < 0.001$。

图 2　ANP 敲除显著抑制了肺组织中微转移结节数目

Note. Compared with the C57BL/6J mice, $^{***}P < 0.001$.

Fig. 2　Effect of ANP deletion on the number of micrometastatic foci in the mouse lung tissues revealed by histopathology. HE staining

小鼠模型,研究 ANP 蛋白对肿瘤的作用,ANP 在基因水平及蛋白水平对肿瘤的作用可能不一致。

综上所述,ANP 与黑色素瘤的肺转移有着密切的关系,在黑色素瘤的肺转移中发挥着正向调控的重要作用,但 ANP 对 B16F10 黑色素瘤细胞肺转移的作用机制还不明确,需要进一步的探讨。若进一步探讨 ANP 对肿瘤的作用,可为判断患者预后及寻找理想的抗肿瘤治疗靶点提供重要的理论依据。

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 K, 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] Qi CL, Wei B, Ye J, et al. P-selectin-mediated platelet adhesion promotes the metastasis of murine melanoma cells [J]. PLoS One, 2014, 9(3): e91320.

[6] Subramanian V, Vellaichamy E. Atrial natriuretic peptide (ANP) inhibits DMBA/croton oil induced skin tumor growth by modulating NF-κB, MMPs, and infiltrating mast cells in Swiss albino mice [J]. Eur J Pharmacol, 2014, 740: 388-397.

[7] Nojiri T, Hosoda H, Tokudome T, et al. Atrial natriuretic peptide prevents cancer metastasis through vascular endothelial cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(13): 4086-4091.

〔收稿日期〕2017-10-30