脂糖代谢研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001346

代谢相关通路在人肺癌细胞系 A549 原位移植瘤模型中的表达

卢 蕾[1],魏思宇[2],徐 彩[1],蔺晓菁[1],何芸芸[2],练雪梅[1]

（重庆医科大学 1. 脂糖代谢性疾病重庆市重点实验室、感染性疾病分子生物学教育部重点实验室,重庆 400016;
2. 公共卫生与管理学院、医学与社会发展研究中心、健康领域社会风险预测治理协同创新中心,重庆 400016）

【摘 要】**目的**:近年来,代谢与肿瘤发病的病因学研究已经成为热点,同时肺癌仍居恶性肿瘤发病率和死亡率榜首,本研究拟构建一个稳定易操作的肺癌原位移植瘤模型,并初步探讨代谢相关通路在该原位移植瘤模型中的表达。**方法**:选取雄性 6~8 周龄 BABL/c 裸鼠 10 只,优化麻醉用药及手术操作步骤,经气管移植 5×10^6 个细胞的 A549 肺癌细胞成瘤,观察移植瘤形成率、形成部位、大体形态、增殖分化程度。另取 4 只相同条件裸鼠进行手术空白对照。同时检测代谢相关通路蛋白 STAT3、AKT 和mTOR 的表达情况等。**结果**:手术最佳麻醉条件为 75 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射;改进操作后经气管移植的小鼠肺癌形成率为 80.0%;肿瘤形成以右肺上叶居多,呈明显腺癌结构,分化程度较低,移植瘤组织增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)的表达高于肺组织,呈高表达状态。肿瘤负荷肺组织代谢相关通路蛋白信号传导与转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3,STAT3)、蛋白激酶 B(protein kinase B,PKB 即 AKT)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR)的磷酸化水平即 pSTAT3/STAT3、pAKT/AKT、p-mTOR/mTOR 比值均高于正常肺组织,差异具有统计学意义(t=-4.381,-4.462,-4.951;P=0.041,0.011,0.038)。**结论**:通过改良经气管移植手术方式,可以构建一种操作简单、低成本、高效稳定的 A549 细胞肺癌移植瘤模型;代谢相关通路在肺癌的发生发展中也发挥了一定作用。

【关键词】肺癌;A549;原位移植;信号传导与转录激活因子 3;蛋白激酶 B;哺乳动物雷帕霉素靶蛋白
【中图分类号】R-734 【文献标志码】A 【收稿日期】2017-02-05

Expression of metabolic pathway in A549 endotracheal orthotopic transplantation lung cancer model

Lu Lei[1], Wei Siyu[2], Xu Cai[1], Lin Xiaojing[1], He Yunyun[2], Lian Xuemei[1]

(1. Center for Lipid Research, Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases Founded by Ministry of Education; 2. School of Public Health and Management, Research Center for Medicine and Social Development, Innovation Center for Social Risk, Chongqing Medical University)

【Abstract】***Objective***: To build a moderate lung cancer orthotopic transplantation tumor model, and to investigate the expression of metabolic pathway in the this model. ***Methods***: After optimizing the dose of anesthetic medicine and operation procedures of endotracheal orthotopic transplantation, 5×10^6 of A549 cells were planted into male nude mice(6-8 weeks old, n=10) lungs. And the blank control (only PBS transplant) was carry out on the same condition mice(n=4). Then the tumor formation rate, location, anatomy and the expression of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), protein kinase B (AKT) and mammalian target of rapamycin (mTOR) were studied. ***Results***: The best surgical anaesthesia condition was by intraperitoneal injection of 75 mg/kg body weight pentobarbital sodium. After the improvement of the operation procedure, the total tumor formation rate was 80.0%, and mainly located in the upper lobe of the right lung. The tumor showed a significant glandular cancer structure with poor differentiation degree, and more proliferating cell nuclear antigen(PCAN)-positive cells compared with normal lungs. The levels of phosphorylation of STAT3, AKT and mTOR and the ratio of pSTAT3/STAT3, p-AKT/AKT, p-mTOR/mTOR in lung tumors were significantly higher than those in normal lung tissues, the difference was statistically significant differences(t=-4.381, -4.462, -4.951; P=0.041, 0.011, 0.038 respectively). ***Conclusion***: The improved endotracheal orthotopic transplantation lung cancer model is a simple, low cost, stable model, and metabolic pathways play a role in the development and progression of lung cancer.

【Key words】lung cancer; A549; orthotopic transplantation; signal transducer and activator of transcription 3; protein kinase B; mammalian target of rapamycin

作者介绍:卢 蕾,Email:luleishiny@163.com,
研究方向:营养与食品卫生学硕士研究生。
通信作者:练雪梅,Email:xuemeilian@ cqmu.edu.cn。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81071907);教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目(编号:NCET-10-0997)。
优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170626.1144.014.html (2017-06-26)

据最新全国肿瘤登记中心的数据报告[1]，在我国，肺癌发病率已居恶性肿瘤榜首，每年新发病例为 70.5 万。同时肺癌也是恶性肿瘤死因第一顺位，每年死亡病例约为 56.9 万。肺癌的病因尚未明确，同时早期诊断的难度较大，因此加强病因学研究具有十分重要的意义。

作为研究疾病发生发展的重要手段，肺癌动物模型的构建对于其病因学研究尤其重要。肺癌模型构建主要有自发性、诱导性、移植性以及转基因动物模型，根据研究目的和内容的不同，各实验组采用的肺癌模型不尽相同，目前最常见的为诱导性和移植性肺癌模型。诱导性肺癌又以化学诱导性的为主，如陈婷[2]以及 Zhou 等[3]以乌拉坦诱导小鼠肺癌，但其造模时间较长，应用较为局限。移植性肺癌模型则采用免疫缺陷性动物为载体，分为原位、皮下移植以及转移瘤。比较于皮下移植，原位移植更能够模拟肿瘤微环境，因而其应用越来越广泛。

近年来，脂代谢异常的多器官损伤学说目前已经得到学界的共识，代谢与肿瘤病因学的研究也已成为热点。脂代谢异常所致心脑血管、胰腺、肝脏、肾脏等器官损伤已经得到了深入的研究[4-5]。但有关脂代谢尤其是胆固醇代谢异常与肺损伤的研究，国内外才刚刚起步[6]。随着胆固醇代谢相关基因敲除小鼠的不断建立，近年来不断有研究发现肺组织胆固醇代谢异常也会导致异常的脂质蓄积和慢性炎症反应。

为深入研究脂代谢异常所致肿瘤微环境改变在肺癌发生中的作用，本研究拟构建一个稳定易操作的肺癌原位移植瘤模型，并初步探讨代谢相关通路在该原位移植瘤模型中的表达，为后续研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 BABL/c 裸鼠 21 只，雄性，6~8 周龄；C57BL/6J 小鼠 10 只，雄性，6~8 周龄，均购于重庆医科大学动物实验中心，饲养于独立通风盒（indipendent vebtilation cage，IVC）动物房中，自由摄食饮水。饲养室相对湿度均为 40%~50%，温度为 22 ℃~25 ℃，光照 12 h 明暗交替。

1.1.2 细胞株 人肺癌细胞株 A549 购于 ATCC，培养于含 10% 小牛血清（Gibco，16010159）以及 1%青霉素和链酶素双抗溶液（Hyclone，SV30010）的 RPMI-1640（Hyclone，SH30809.01B），孵育在 37.5 ℃、相对湿度 95%、5%CO_2 恒温箱中。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养收集 将人肺癌细胞系 A549 细胞株复苏后传代扩增，4~6 代后，于移植使用前 12 h 更换新鲜培养基，保证细胞的生长活力。融合率 80%~90%时，0.05%胰酶消化收集细胞，用 PBS（Hyclone，SH30256.01B）重悬细胞，并按 5×10^6/50 μL，0.01 mol/L EDTA 配置移植所需细胞悬液，细胞悬液室温（20 ℃~25 ℃）保存备用。细胞悬液配置前使用台盼蓝（Solarbio，C0040）染色计数，判定活细胞率，活细胞率≥95%的细胞被采用。

1.2.2 手术分组 选取雄性，6~8 周龄 BABL/c 裸鼠 14 只，随机抽取 4 只作空白手术对照组（仅有手术操作以及含 0.01 mol/L EDTA 的 PBS 注入，无细胞）。另 10 只裸鼠进行手术肿瘤原位移植操作。

1.2.3 肿瘤移植步骤 选取雄性，6~8 周龄 BABL/c 裸鼠，参考 Mclemore[7]和 Fulzele 等[8]的移植方法，设计实验步骤如下：①将裸鼠按照最适宜浓度的戊巴比妥钠麻醉剂量麻醉，并充分固定，以便暴露气管。②消毒皮肤后，于颈部气管正上方剪开一个约 1 cm 的小口，钝性分离气管周围肌肉，暴露气管，穿一白线备用。③微量进样器准确吸取 50 μL 均一的细胞悬液。④微量进样器穿入事先开好小口的气管 0.5~1.0 cm，竖立裸鼠，缓慢注入细胞。⑤复原气管周围组织，缝合伤口，暖灯下至苏醒。正式实验改进：首先，准确吸取悬液后吸入一段空气，并用 75%酒精消毒针头。其次，注入细胞时改为迅速将细胞悬液推入气管内部，回抽微量进样器后确认无液体后拔出，并保持竖立姿势 2~3 min。以上手术操作均由同一人完成。

1.2.4 组织的留取与处理 裸鼠手术后继续喂养 6 周，达 6 周后或出现明显的体重下降且≥3 g，精神倦怠，皮肤变的粗糙等恶病质表现时予以麻醉处死。游标卡尺测量肿瘤长（a，cm）短径（b，cm），并计算肿瘤体积（tumor volume，TV，cm^3；$TV=(a\times b^2)/2$）。4%多聚甲醛吹肺并固定，石蜡包埋切片，HE 染色并观察形态。

1.2.5 炎症代谢相关通路检测 采用免疫组化检测组织肿瘤增殖抗原（proliferating cell nuclear antigen，PCNA）的表达量。以及蛋白质免疫印迹（Western blot，WB）检测组织蛋白中的信号传导与转录激活因子 3（signal transducer and activator of transcription 3，STAT3）、蛋白激酶 B（protein kinase B，PKB 即 AKT）、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR）等的表达情况。

1.3 统计分析

采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析，均值的两两比较采用 t 检验，检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 裸鼠瘤体形成情况

麻醉用药测试结果显示：采用戊巴比妥钠麻醉时，以 75 mg/kg 体质量腹腔注射其手术耐受优于同等情况下的 50 mg/kg 体质量给药。建立的经气管原位移植瘤模型裸鼠成瘤 8/10(80.0%)，其中肺部成瘤 6/10(60.0%)，气管成瘤 6/10(60.0%)，气管和肺部均有瘤体形成 4/10(40.0%)，死亡和处死解剖均未发现胸腔移植。移植瘤体多位于右肺，为 6/8，左肺成瘤 2/8，左右肺叶均有瘤体者 2/8。且右肺以右肺上叶居多。荷瘤小鼠瘤体总体积为(0.072 ± 0.083) cm^3，体积分布如图 1 所示。

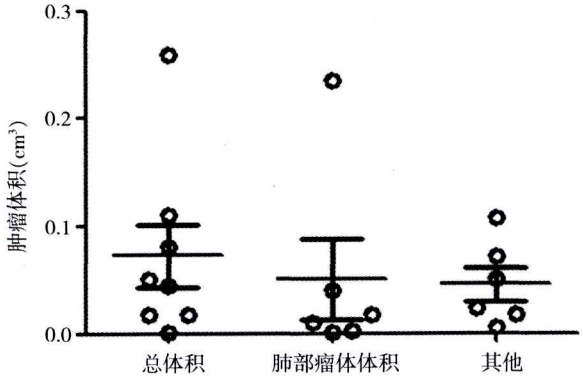


图 1 移植瘤体积大小

Fig.1 Tumor volume (TV) in different locations

2.2 瘤体形态学

肿瘤的大体轮廓如图 2 所示，其中箭头所指为肿瘤结节。HE 染色(图 3A、B)结果表明移植瘤呈明显的肺腺癌特征，呈腺体样结构，但无明显黏液，分化程度较低，恶性程度较高[9]。增殖细胞核抗原(PCNA)免疫组化(图 3C、D)染色结果显示，移植瘤 PCNA 阳性细胞(染色呈现棕色颗粒状)率高于正常肺组织，呈高表达，表明肿瘤细胞增殖明显。



图 2 裸鼠肺大体背面观

Fig.2 Gross specimen of lungs in nude mice

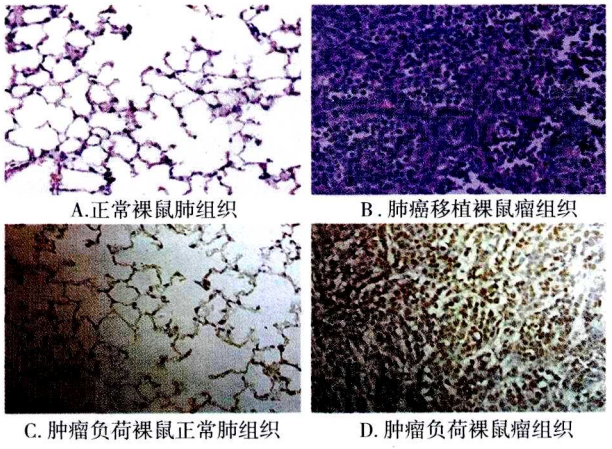


图 3 H&E 染色(A,B)和 PCAN 免疫组化(C,D)结果 (400×)

Fig.3 Results of H&E staining (A,B)and immunohistochemistry study of PCNA antibody(C,D)(400X)

2.3 代谢相关通路蛋白

肿瘤负荷裸鼠肺组织蛋白中信号传导与转录激活因子(STAT3)以及活化的 STAT3(p-STAT3)的表达量均高于正常裸鼠肺组织(图 4A)，差异具有统计学意义(t=-8.076，P=0.014；t=-7.306，P=0.018)，p-STAT 在总 STAT3 中所占的比例也存在差异(t=-4.462，P=0.041)。同时，肿瘤负荷小鼠其蛋白激酶 B(AKT)的表达量虽未显示出差异，但磷酸化的 AKT(p-AKT)的表达有明显的上升(t=-5.059，P=0.037)，如图 4B 所示，p-AKT 在总 AKT 中所占的比例也存在差异(t=-4.381，P=0.011)。随后对 AKT 的重要下游靶点哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)做相应的检测，发现其在移植瘤蛋白中有表达，在正常肺组织中未检测到表达(图 4C)，结果无统计学差异(t=-2.513，P=0.120)。在移植瘤中 mTOR 的活化形式 p-mTOR 也呈现高表达(t=-5.079，P=0.037)，同时 p-mTOR 和总mTOR 比值较高，即在移植瘤中 mTOR 信号通路存在活化(t=-4.951，P=0.038)。综上，移植模型中代谢相关通路信号蛋白的磷酸化水平均高于正常肺组织。

3 讨 论

肺癌常用的原位移植方式有穿胸肺内注射、开胸包埋以及经气管植入 3 种方式。穿胸注射创伤最小，但通道内移植和胸腔移植率较高且不易于准确控制细胞量，且形成瘤体部位较为固定，不利于模仿肿瘤自身生长情况，目前多用于肺癌的转移和扩散相关研究[10]。开胸直接包埋肺组织，手术操作复杂不利于重复。相比较而言，经气管移植为最早使用的原位移植方式，手术较简单，通道内残留较少，不

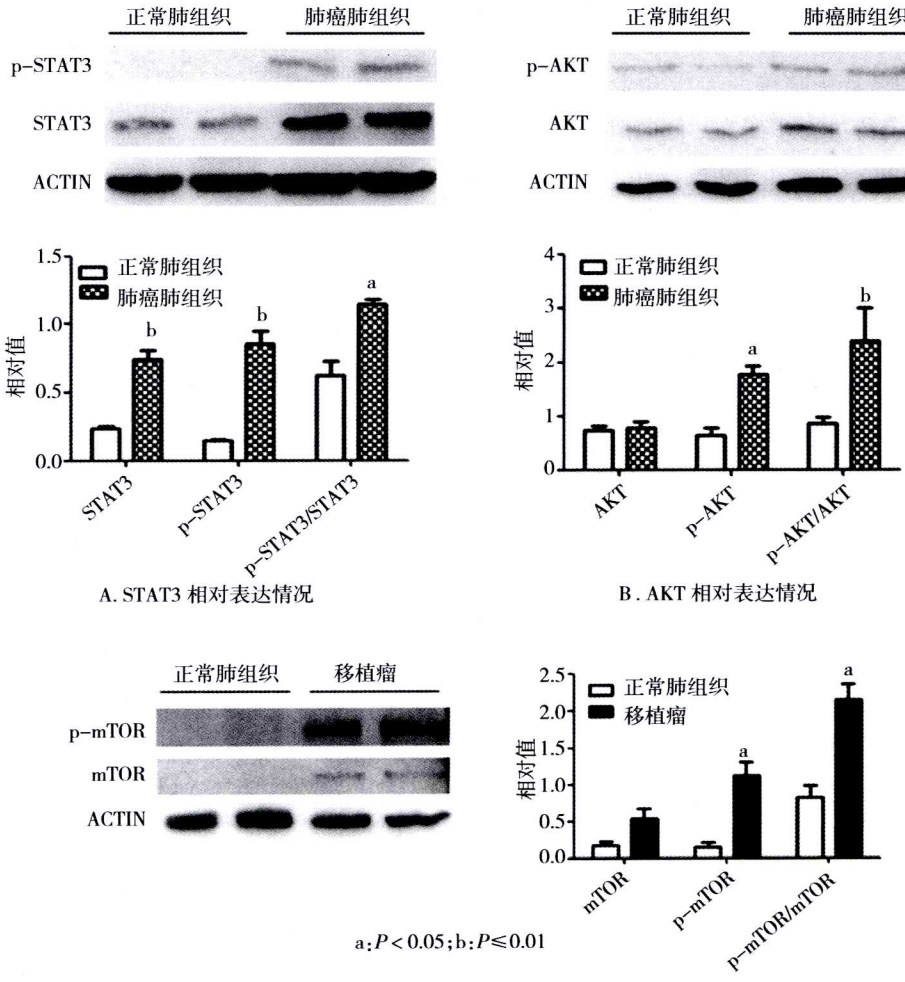


图 4　STAT3、AKT 和 mTOR 的表达情况

Fig.4　Expression of STAT3, AKT and mTOR in different tissues

易于形成胸腔移植对肺部产生影响，且可以精确控制进样量，以上优点对探究肺癌病因及其发展具有重要意义。文献报道肺癌经气管原位移植最先见于 Mlemore[7]建立的基本方法，国内柯昌庶和李维华[11]参考其方法，成瘤 26/36(72%)，而张贺龙等[12]经气管移植却未在肺部形成瘤体。本研究成模型建立较其成功，肿瘤形成率达 80%。

在本移植模型构建中，戊巴比妥钠 75 mg/kg 体质量麻醉用药麻醉效果优于常规的 50 mg/kg，且此结果与冯盈等[13]用于肝移植的戊巴比妥钠麻醉 70 mg/kg 结果相似。细胞植入时采用迅速注射可使细胞具有喷射力并可减少针管的气道占用时间，从而帮助细胞沉淀且有效降低裸鼠经气管手术的死亡率。使用 50 μL 的 24G 微量进样器，而不选同针头型号的普通针管[12,14]、胰岛素针[15]或者气管插管[7,16]更有利于精确控制进样量，能保证每只小鼠细胞移植量均等，有利于后续实验的开展。同时参考 Kang[14]、Iochmann[16]等的经验于细胞悬液中加入0.01 mol/L EDTA。因 EDTA 可以阻断 Ca^{2+}依赖的细胞间连接，以及使肺实质细胞间基质暴露，使得植入细胞不易排出，与基质粘附更加稳固，同时缩小瘤细胞移植粘附后与宿主细胞间隙，有效提高移植瘤体的形成率[14]。

经本移植方式所得移植瘤体组织学特征与 Onn 等[17]的结果相符合，病理分型呈腺癌，肿瘤分化程度较低，且 PCNA 阳性率较正常肺组织高，具有较强增殖能力(图 3)。同时肿瘤代谢相关通路中的信号分子，如 STAT3、AKT 以及 mTOR 在本移植模型中

也呈现高表达(图 4)。STAT3 和 AKT 都是关于肺癌以及其他肿瘤的预防和治疗研究的重要靶点[18-19]，目前关于 STAT3 对于肺癌的发生和发展的研究结论并不一致[3]，仍待进一步研究。同时肿瘤微环境中许多生长因子的表达量上升(表皮生长因子、血管内皮生长因子等)会导致 PI3K 的活化，引起下游 AKT/mTOR 信号通路的活化，而 AKT 的激活在众多与非小细胞肺癌发生相关的信号分子变化里面是很常见的[20]，也与抑癌基因 PTEN 缺失致癌紧密联系。mTOR 具有 2 种形式，分别为 mTORC1 和mTORC2，其中 mTORC1 通过对 S6K 和 4EBP1 的活化调节，实现对帽依赖性翻译(cap-denpendent translation)和延长的调控[21]，是重要的增殖调节因子，也是目前研究 mTOR 的主要关注点。mTOR 过度激活将导致肿瘤细胞持续的增殖和生长[22]；也有研究[23]提示 AKT/mTOR 信号通路在肿瘤干细胞自我更新和抗化疗或者放疗中也起重要作用，被认为是肿瘤复发和转移的重要原因之一。

本实验通过改良经气管移植手术方式，构建了一种操作简单、低成本、高效稳定的肺癌原位移植瘤模型；并初步探讨了代谢相关通路在该原位移植瘤模型中的表达，为后续深入开展脂代谢异常所致肿瘤微环境改变在肺癌发生中的作用奠定了基础。

参 考 文 献

[1] 陈万青，郑荣寿，张思维，等. 2012 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤，2016，25(1)：1-8.

[2] 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.

[3] Zhou J，Qu Z，Yan S，et al. Differential roles of STAT3 in the initiation and growth of lung cancer[J]. Oncogene，2015，34(29)：3804-3814.

[4] Hansson GK. Inflammation，atherosclerosis，and coronary artery disease[J]. N Engl J Med，2005，352(16)：1685-1695.

[5] Cannon CP. Mixed dyslipidemia，metabolic syndrome，diabetes mellitus，and cardiovascular disease：clinical implications[J]. Am J Cardiol，2008，102(12A)：5L-9L.

[6] Gowdy KM，Fessler MB. Emerging roles for cholesterol and lipoproteins in lung disease[J]. Pulm Pharmacol Ther，2013，26(4)：430-437.

[7] Mclemore TL，Liu MC，Blacker PC，et al. Novel intrapulmonary model for orthotopic propagation of human lung cancers in athymic nude mice[J]. Cancer Res，1987，47(19)：5132-5140.

[8] Fulzele SV，Chatterjee A，Shaik MS，et al. Inhalation delivery and anti-tumor activity of celecoxib in human orthotopic non- small cell lung cancer xenograft model[J]. Pharm Res，2006，23(9)：2094-2106.

[9] 李维华，纪小龙. 呼吸病理学[M]. 北京：人民军医出版社，2011：272-279.

[10] Sakamoto S，Inoue H，Ohba S，et al. New metastatic model of human small-cell lung cancer by orthotopic transplantation in mice[J]. Cancer Sci，2015，106(4)：367-374.

[11] 柯昌庶，李维华. 人肺癌细胞株经裸鼠支气管肺内原位移植的初步建立[J]. 解放军医学杂志，1990，15(4)：271.

[12] 张贺龙，矢野圣二，三木丰和. 经气管接种肺癌细胞建立肺癌动物模型的经验教训[J]. 第四军医大学学报，2002，23(17)：1586.

[13] 冯 盈，薛万江，倪 侃，等. 戊巴比妥钠用于雄性裸鼠皮下肝原位移植人肝细胞癌模型麻醉的方法[J]. 南通大学学报，2012，32(1)：13-15.

[14] Kang Y，Omura M，Suzuki A，et al. Development of an orthotopic transplantation model in nude mice that simulates the clinical features of human lung cancer[J]. Cancer Sci，2006，97(10)：996-1001.

[15] 李 宁，张晓晔，蒋中秀，等. 小鼠 Lewis 肺癌原位模型的建立[J]. 中国实验动物学报，2014，22(5)：79-83.

[16] Iochmann S，Lerondel S，Bléchet C，et al. Monitoring of tumour progression using bioluminescence imaging and computed tomography scanning in a nude mouse orthotopic model of human small cell lung cancer[J]. Lung cancer，2012，77(1)：70-76.

[17] Onn A，Isobe T，Itasaka S，et al. Development of an orthotopic model to study the biology and therapy of primary human lung cancer in nude mice[J]. Clin Cancer Res，2003，9(15)：5532-5539.

[18] Peyser ND，Grandis JR. Critical analysis of the potential for targeting STAT3 in human malignancy[J]. Onco Targets Ther，2013，6：999-1010.

[19] Malanga D，De Marco C，Guerriero I，et al. The Akt1/IL-6/STAT3 pathway regulates growth of lung tumor initiating cells[J]. Oncotarget，2015，6(40)：42667-42686.

[20] Xu CX，Jin H，Shin JY，et al. Roles of protein kinase B/Akt in lung cancer[J]. Front Biosci(Elite Ed)，2010，2：1472-1484.

[21] Siddiqui N，Sonenberg N. Signalling to eIF4E in cancer[J]. Biochem Soc Trans，2015，43(5)：763-772.

[22]Moschetta M，Reale A，Marasco C，et al. Therapeutic targeting of the mTOR-signalling pathway in cancer：benefits and limitations[J]. Br J Pharmacol，2014，171(16)：3801-3813.

[23] Brotelle T，Bay JO. PI3K-AKT-mTOR pathway：description，therapeutic development，resistance，predictive/prognostic biomarkers and therapeutic applications for cancer[J]. Bull Cancer，2016，103(1)：18-29.

（责任编辑：张辉洁）