

P-选择素敲除对自发肠道腺瘤Apc^{Min/+}小鼠中晚期肿瘤生长的作用

何亚军, 曹静桦, 李梦诗, 郭四美, 王丽京, 亓翠玲
(广东药科大学 基础学院血管生物学研究所, 广东 广州 510006)

摘要:【目的】研究P-选择素对自发肠道腺瘤Apc^{Min/+}小鼠中晚期肿瘤生长的作用。【方法】将P-选择素敲除小鼠与Apc^{Min/+}小鼠杂交,建立P-选择素敲除背景下的Apc^{Min/+}小鼠模型(A^{Min/+}Ps^{-/-}小鼠),将15周和24周的Apc^{Min/+}小鼠和A^{Min/+}Ps^{-/-}小鼠的肠道亚甲蓝染色后,用倒置显微镜计数肠道肿瘤的数目并测量肿瘤的体积。【结果】在15周时,A^{Min/+}Ps^{-/-}小鼠的肿瘤数目和肿瘤体积与Apc^{Min/+}小鼠相比没有明显差异。但在24周时,A^{Min/+}Ps^{-/-}小鼠的肿瘤数目比Apc^{Min/+}小鼠多,肿瘤体积比Apc^{Min/+}小鼠大,有显著统计学差异。而且A^{Min/+}Ps^{-/-}小鼠的生存时间与Apc^{Min/+}小鼠相比,也明显缩短, $P = 0.0004$ 。【结论】P-选择素的缺失对Apc^{Min/+}小鼠中期肿瘤生长没有明显影响,但是明显促进了Apc^{Min/+}小鼠晚期肿瘤的生长。

关键词: P-选择素; 肠道肿瘤; 基因工程小鼠

中图分类号: R73

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2017)04-0494-04

Effect of P-selectin Deletion on Intestinal Tumorigenesis in 15, 24-week-old Apc^{Min/+} Mice

HE Ya-jun, CAO Jing-hua, LI Meng-shi, GUO Si-mei, WANG Li-jing, QI Cui-ling

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

Corresponding to: Qi Cui-ling; E-mail: qicuilin12345@163.com

Abstract: 【Objective】 To investigate the effect of P-selectin on the intestinal tumorigenesis in the 15, 24-week-old Apc^{Min/+} mice. 【Methods】 Male Apc^{Min/+} mice were mated with female P-selectin knockout (P-sel^{-/-}) mice to generate A^{Min/+}Ps^{-/-} mice. The diameters and numbers of the intestinal tumors in the intestines of Apc^{Min/+} and A^{Min/+}Ps^{-/-} mice were measured using an inverted microscope. The tumor volumes were measured using the following equation: volume = 0.52 × (length × width²). 【Results】 There were no significant difference between the volume and number of intestinal tumor in 15-week-old Apc^{Min/+} mice and 15-week-old A+P- mice. The volume and number of intestinal tumor were significantly increased in 24-week-old A+P- mice compared to 24-week-old ApcMin/+ mice. P-selectin deletion significantly prolonged the survival time of ApcMin/+ mice. 【Conclusions】 P-selectin deletion promotes the intestinal tumorigenesis in the 24-week-old ApcMin/+ mice.

Key words: P-selectin; intestinal tumor; genetically engineered mice

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(4):494-497;544]

P-选择素(P-selectin, P-sel)是黏附分子选择素家族的重要成员,是一种典型的跨膜糖蛋白,主要由胞外区、跨膜区和胞浆区三个结构域构成。胞外区主要由补体调节蛋白重复序列、表皮生长因子结构域和凝集素结构域构成^[1-2]。P-选择素

主要储存在血小板的 α 颗粒及血管内皮细胞的韦伯小体中。血小板和血管内皮细胞激活后,P-选择素被释放出来,激活的血小板和血管内皮细胞就会表达P-选择素^[3]。P-选择素与白细胞表面的配体结合,导致白细胞异质性聚集,因此,P-选

收稿日期:2016-01-24

基金项目:国家自然科学基金青年项目(31500966);广东省科技计划项目(2013B021800082,2015A020211029,2014A020212314);广州市科技计划项目(201607010135)

作者简介:何亚军,在读硕士,研究方向:肿瘤病理学,E-mail: heyajun05@163.com,联系电话:15975634623;通信作者:亓翠玲,E-mail: qicuilin12345@163.com

择素在炎症、血栓形成和止血的过程中发挥了重要的作用^[4-6]。文献也已报道P-选择素在肿瘤的发生、发展过程中起了重要的作用。Kim等^[7]发现P-选择素敲除后明显抑制了结直肠癌皮下移植瘤的生长。我们利用P-选择素敲除小鼠,建立皮下黑色素瘤及肺转移瘤模型,发现P-选择素敲除后明显抑制了黑色素瘤的生长和转移^[8]。我们把P-选择素敲除小鼠与自发胰岛 β 细胞瘤小鼠杂交,发现P-选择素的敲除显著抑制了自发胰岛 β 细胞瘤的生长^[9]。把自发肠道腺瘤 $Apc^{Min/+}$ 小鼠与P-选择素敲除小鼠杂交建立了A+P-小鼠模型,发现P-选择素敲除也显著抑制了 $Apc^{Min/+}$ 小鼠早期肠道腺瘤的生长^[10],但是P-选择素敲除后对 $Apc^{Min/+}$ 小鼠中晚期肿瘤的作用尚未见报道,为此,我们利用 $A^{M/+}Ps^{-/-}$ 小鼠模型进一步观察了P-选择素缺失对 $Apc^{Min/+}$ 小鼠中晚期肿瘤生长的作用。

1 材料与方法

1.1 小鼠

$Apc^{Min/+}$ 小鼠:为自发肠道腺瘤小鼠,6~8周龄,雄性,购自南京大学模式动物中心。P-选择素敲除小鼠(P-sel^{-/-} mice):雌性和雄性,6~8周龄,纯合,为P-选择素全身敲除的小鼠,耿建国教授(美国密歇根大学,医学院生物和材料学系)惠赠。本实验符合实验动物伦理规定。

1.2 $A^{M/+}Ps^{-/-}$ 小鼠模型建立

用2只雄性 $Apc^{Min/+}$ 小鼠分别与2只雌性 P-sel^{-/-} 小鼠杂交,出生的第一代小鼠为P-选择素为杂合子的 $Apc^{Min/+}; P-sel^{+/-}$ 小鼠,共鉴定出6只雄性的 $Apc^{Min/+}; P-sel^{+/-}$ 小鼠。用此6雄性小鼠再与雌性 P-选择素敲除小鼠按照1:2的比例进行杂交,第二代出生小鼠就有P-选择素为纯合子 $Apc^{Min/+}$ 小鼠,即为P-选择素的敲除背景下的 $Apc^{Min/+}$ 小鼠,即A+P-小鼠,共得到5只雄性的 $A^{M/+}Ps^{-/-}$ 小鼠。继续用雄性 $A^{M/+}Ps^{-/-}$ 小鼠与雌性 P-选择素敲除小鼠继续交配,进行扩群。最终共获得28只 $A^{M/+}Ps^{-/-}$ 小鼠,其中5只用于15周时检测小鼠的肿瘤体积和数目,6只用于24周时检测小鼠的肿瘤体积和数目,17只用于观察小鼠的生存时间。

1.3 $A^{M/+}Ps^{-/-}$ 小鼠与 $Apc^{Min/+}$ 小鼠肠道腺瘤数目和体积的测量

选取15周与24周的 $Apc^{Min/+}$ 小鼠与 $A^{M/+}Ps^{-/-}$ 小

鼠(不分雌雄),用颈椎脱臼法处死小鼠后,分离整个肠道,首先分离小肠与结直肠,再把小肠平均分为远端、中段、近端3段。用PBS把肠道冲洗干净,直铺到滤纸上,然后沿纵轴将肠道剪开,再将肠组织铺到滤纸上。最后,将肠道组织固定于中性甲醛溶液,过夜。第2天,用0.4%亚甲蓝染色,在体视解剖显微镜下,将肠道组织的每个腺瘤拍照,并测量腺瘤的最长、短径,按照公式:体积= $4/3\pi ab^2$ (a 为长径的一半, b 为短径的一半),计算肿瘤体积。小肠腺瘤体积和大肠腺瘤体积分别按照半椭球和椭球计算^[11]。

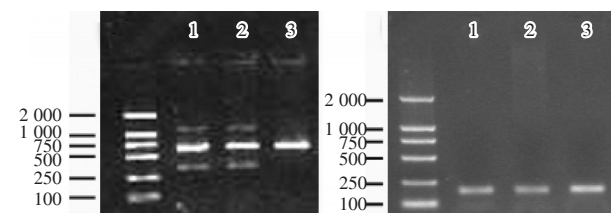
1.4 统计学方法

用SPSS软件及Sigmaplot软件做统计学分析和做图, t 检验用来确定是否有统计学差异。取 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 $Apc^{Min/+}$ 小鼠及P-选择素敲除小鼠的鉴定图

将 $Apc^{Min/+}$ 小鼠与P-选择素敲除小鼠杂交,四代后,所得子代1号和2号为Min基因阳性小鼠(图1A),1号、2号及3号小鼠为P-选择素敲除(P-sel^{-/-})基因型(图1B),因此,1号和2号小鼠为A+P-小鼠。此后再用1号和2号小鼠分别与P-选择素敲除小鼠杂交,进行扩群,此后P-选择素基因不需进行鉴定。



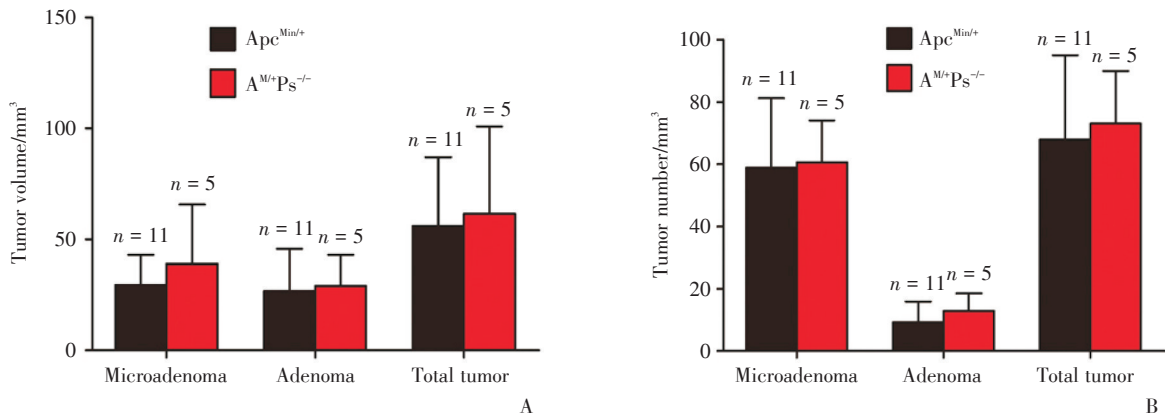
NO.1 and NO.2 mice were $A^{M/+}Ps^{-/-}$ mice. A: The image of Min gene identification. B: The image of P-selectin gene identification.

图1 $Apc^{Min/+}$ 和P-selectin敲除小鼠鉴定图

Fig.1 Identification of $Apc^{Min/+}$ and P-selectin knockout mice

2.2 P-选择素敲除对15周 $Apc^{Min/+}$ 小鼠腺瘤的生长没有明显影响

我们以前已经表明P-选择素敲除后可以抑制早期 $Apc^{Min/+}$ 小鼠腺瘤生长,为了确定P-选择素对 $Apc^{Min/+}$ 小鼠中期腺瘤生长的作用,把 $Apc^{Min/+}$ 小



A: There were no significant difference of tumor volumes between 15-week-old Apc^{Min/+} mice and 15-week-old A+P- mice. B: There were no significant difference of tumor numbers between 15-week-old Apc^{Min/+} mice and 15-week-old A^{M/+}Ps^{-/-} mice.

图2 P-选择素敲除对15周Apc^{Min/+}小鼠腺瘤生长的作用

Fig.2 Effect of P-selectin deletion on the intestinal tumor growth of Apc^{Min/+} mice

鼠与P-sel^{-/-}小鼠杂交,建立了P-sel敲除的Apc^{Min/+}小鼠模型,即A^{M/+}Ps^{-/-}小鼠。分离15周的Apc^{Min/+}与A^{M/+}Ps^{-/-}小鼠肠道,0.4%亚甲蓝染色后,体视解剖显微镜下观察并计数肠道肿瘤的数目及测量肿瘤的长、短径。15周Apc^{Min/+}小鼠与15周的A^{M/+}Ps^{-/-}小鼠相比,发现肿瘤体积(图2A)和肿瘤数目(图2B)都没有明显差异。

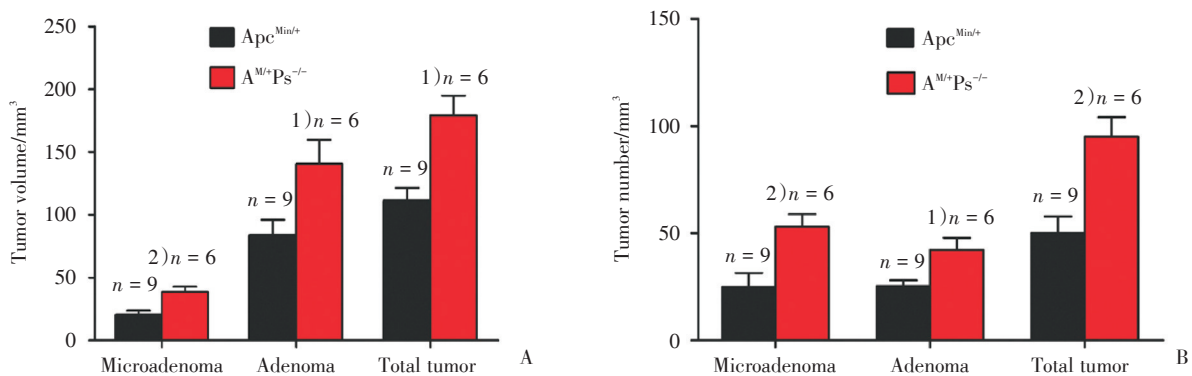
2.3 P-选择素敲除明显促进了24周Apc^{Min/+}小鼠肿瘤的生长

在Apc^{Min/+}小鼠和A^{M/+}Ps^{-/-}小鼠24周时,在体视显微镜下测量肿瘤的数目和体积,结果表明在24周,A+P-小鼠的微腺瘤体积、腺瘤体积和总的肿瘤体积分别比Apc^{Min/+}小鼠的微腺瘤体积($P = 0.005, t = 3.343$)、腺瘤体积($P = 0.022, t = 2.599$)和总的肿瘤体

积($P = 0.007, t = 3.15$)大(图3A),差异有统计学意义。而且在24周时,A^{M/+}Ps^{-/-}小鼠的微腺瘤、腺瘤和总的肿瘤的数目也明显比Apc^{Min/+}小鼠微腺瘤数目($P = 0.010, t = 3.033$)、腺瘤数目($P = 0.011, t = 2.986$)和总的肿瘤数目($P = 0.002, t = 3.753$)少(图3B),差异有统计学意义。以上结果表明P-选择素敲除明显地促进了晚期Apc^{Min/+}小鼠肠道腺瘤的生长。

2.4 P-选择素敲除对Apc^{Min/+}小鼠生存时间的影响

为了进一步证实P-选择素对Apc^{Min/+}小鼠肠道腺瘤的作用,观察了Apc^{Min/+}小鼠和A^{M/+}Ps^{-/-}小鼠的生存时间,比较两种小鼠的生存时间,发现A^{M/+}Ps^{-/-}小鼠的生存时间明显比Apc^{Min/+}小鼠短($P = 0.0004$) (图3)。以上结果表明P-选择素敲除明显促进了Apc^{Min/+}小鼠肠道腺瘤的生长。



A: The role of P-selectin deletion in the tumor volumes of microadenomas, adenomas and total tumors. B: The role of P-selectin deletion in the numbers of microadenomas, adenomas and total tumors. 1) $P < 0.05$; 2) $P < 0.01$.

图3 P-选择素缺失明显促进了24周Apc^{Min/+}小鼠肠道肿瘤的生长

Fig.3 P-selectin deletion significantly promoted the intestinal tumor growth in 24-week-old Apc^{Min/+} mice

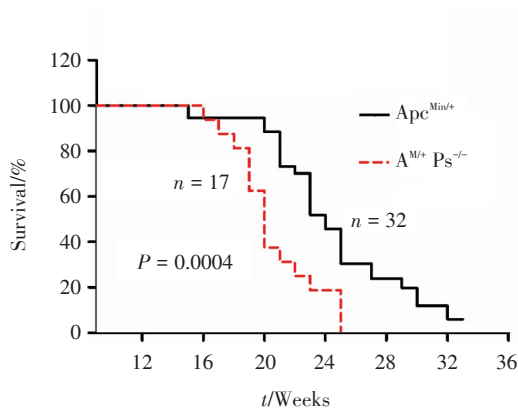


图4 P-选择素敲除促进了 $Apc^{Min/+}$ 小鼠肠道肿瘤的生长
Fig.4 P-selectin deletion significantly shortened the survival time of $Apc^{Min/+}$ mice

3 讨论

P-选择素是选择素家族的一个重要成员,在血栓形成、炎症及恶性肿瘤的发生发展过程中发挥了重要作用。我们以前用P-选择素敲除小鼠建立了黑色素瘤细胞的皮下移植瘤和肺转移模型,发现P-选择素通过抑制血小板在肿瘤组织中的聚集,从而抑制了黑色素瘤的生长和转移^[8]。另外,我们用P-选择素敲除小鼠与自发胰岛 β 细胞瘤 Rip1-Tag2 转基因小鼠杂交,建立了P-选择素敲除背景下的 Rip1-Tag2 小鼠,同样也发现P-选择素敲除后通过抑制血小板在胰岛 β 细胞瘤中的聚集,进而抑制了 Rip1-Tag2 小鼠肿瘤的生长^[9]。用发现可溶性P-选择素重组蛋白治疗裸鼠结直肠癌皮下移植瘤模型和 Rip1-Tag2 小鼠,可溶性P-选择素重组蛋白明显抑制了两种肿瘤的生长^[9]。

$Apc^{Min/+}$ 小鼠是由 Dove 实验室在 1990 年建系成功的,在小鼠同源 APC 基因第 850 位点发生无义突变导致 WNT 信号通路紊乱,从而使得小鼠肠道会多发腺瘤,很好地模拟了人类家族性腺瘤性息肉病,是研究结直肠肿瘤的经典转基因小鼠模型,被认为是一种良好的 FAP 小鼠模型^[12]。 $Apc^{Min/+}$ 小鼠肠道腺瘤的发生发展具有一定的规律性:腺瘤大概在小鼠 9 周时形成,腺瘤的体积不断长大,但是腺瘤的数目保持不变;在小鼠 15 周时属于腺瘤的快速生长期;大多数小鼠在 24 周时会由于贫血而死亡。为了研究 P-选择素对 $Apc^{Min/+}$ 小鼠肠道中晚期腺瘤的作用,把 P-选择素敲除小鼠与 $Apc^{Min/+}$ 小鼠杂交,建立了 P-选择素敲除背景下的

$Apc^{Min/+}$ 小鼠模型 ($A^{M/+} P_s^{-/-}$ 小鼠)。将 $Apc^{Min/+}$ 小鼠与 $A^{M/+} P_s^{-/-}$ 小鼠的肠道重新干净后,沿纵轴剖开,亚甲蓝染色后,在倒置显微镜下观察肿瘤的数目并测量肿瘤的体积。小肠的肿瘤根据其大小将其分为小肠微腺瘤(直径 $< 2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$)和腺瘤(直径 $> 2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$)。大肠肿瘤不区分微腺瘤和腺瘤。根据结果统计,我们发现 P-选择素敲除后对 15 周 $Apc^{Min/+}$ 小鼠腺瘤的生长没有明显的作用,但是在 24 周时,P-选择素明显促进了 $Apc^{Min/+}$ 小鼠肿瘤的生长,而且 $A^{M/+} P_s^{-/-}$ 小鼠的生存时间也明显比 $Apc^{Min/+}$ 小鼠短。但是我们以前的研究却表明 P-选择素敲除后抑制了 $Apc^{Min/+}$ 小鼠早期肿瘤的生长,机制主要是抑制了血小板在 $Apc^{Min/+}$ 小鼠肠道腺瘤中的聚集。因此,P-选择素敲除对 $Apc^{Min/+}$ 小鼠腺瘤的生长起了完全相反的作用,我们也发现在小鼠晚期, $A^{M/+} P_s^{-/-}$ 小鼠的一般状况明显比 $Apc^{Min/+}$ 小鼠差,P-选择素敲除后对小鼠的全身状况的影响比较大,具体的机制尚需进一步研究。

综上所述,P-选择素敲除对 $Apc^{Min/+}$ 小鼠中期腺瘤的生长没有明显影响,但是显著促进了 $Apc^{Min/+}$ 小鼠晚期肿瘤生长,其机制尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] Disdier M, Momssey JH, Fugare RD, et al. Cytoplasmic domain of P-selectin (CD62) contains the signal for sorting into the regulated secretory pathway [J]. *Mol Biol Cell*, 1992, 3(3): 309-321.
- [2] Fujimoto T, Stroud E, Whatley R, et al. P-selectin is acylated with palmitic acid and stearic acid at cysteine 766 through a thioester linkage [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(15): 11394-11400.
- [3] Mehta P, Patel KD, Laue TM, et al. Soluble monomeric P-selectin containing only the lectin and epidermal growth factor domains binds to P-selectin glycoprotein ligand-1 on leukocytes [J]. *Blood*, 1997, 90(6): 2381-2389.
- [4] Manka D, Collins RG, Ley K, et al. Absence of p-selectin, but not intercellular adhesion molecule-1, attenuates neointimal growth after arterial injury in apolipoprotein e-deficient mice [J]. *Circulation*, 2001, 103(7): 1000-1005.
- [5] Larsen TB, Nielsen JN, Fredholm L, et al. Platelets and anticoagulant capacity in patients with inflammatory bowel disease [J]. *Pathophysiol Haemost Thromb*, (下转第 544 页 to page 544)