

文章编号 1006-8147(2018)01-0029-03

论著

## 小鼠小细胞肺癌模型的建立

王子乔,张雪茜,孟凡荣,刘喆

(天津医科大学医学检验学院,天津 300070)

**摘要** 目的:建立小鼠小细胞肺癌动物模型,为进一步研究小细胞肺癌的发展进程以及化疗药物的筛选提供实验平台。方法:采用  $Trp53^{loxP/loxP}; Rb1^{loxP/loxP}$  小鼠肺部插管吸入 Adeno-Cre (Ad-Cre) 重组腺病毒的方法建立小鼠小细胞肺癌模型,通过对模型小鼠肺组织进行石蜡切片以及 HE 染色,并通过免疫组化等方法检测肺组织中神经内分泌特异性标记蛋白 CgA、Cgrp 的表达情况。结果:成功建立了小鼠小细胞肺癌的模型,模型小鼠肺组织中 TTF-1、CgA、Cgrp 的表达水平显著升高。结论:成功建立小鼠小细胞肺癌动物模型,为后续研究人的小细胞肺癌发病机制以及相关化疗药物的筛选提供了实验手段。

**关键词** Ad-Cre;  $Trp53^{loxP/loxP}; Rb1^{loxP/loxP}$  小鼠;小细胞肺癌;动物模型

**中图分类号** R734.2

**文献标志码** A

### Establishment of a mouse model of pulmonary small cell lung cancer

WANG Zi-qiao, ZHANG Xue-xi, MENG Fan-rong, LIU Zhe

(School of Medical Laboratory, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract Objective:** To establish a model of small cell lung cancer in mice to study the progression of small cell lung cancer and to provide an experiment platform for the screening of chemotherapy drugs. **Methods:** The small cell lung cancer model was established by intratracheal injection of Adeno-Cre (Ad-Cre) into  $Trp53^{loxP/loxP}; Rb1^{loxP/loxP}$  mice. The lung tissues of model mice were sectioned and stained with HE. Immunohistochemistry of neuroendocrine cell-specific markers CgA and Cgrp was performed on lung sections. **Results:** The small cell lung cancer model was successfully established and a significant increase was observed in the expression of TTF-1, CgA and Cgrp. **Conclusion:** This mice model provides an experiment method for the study of pathogenesis of human small cell lung cancer and the screening of chemotherapy drugs.

**Key words** Ad-Cre;  $Trp53^{loxP/loxP}; Rb1^{loxP/loxP}$  mice; small cell lung cancer; mouse model

肺癌占全世界肿瘤发病率的 12.7%、死亡率的 18.2%,是目前最常见的引发死亡的疾病之一<sup>[1]</sup>。在临床和组织病理学上,肺癌分为两大类,小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 和非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC)。小细胞肺癌大约占肺癌的 20%,而更具有肿瘤异质性的非小细胞肺癌大约占 80%<sup>[2]</sup>。小细胞肺癌与非小细胞肺癌相比恶性程度较高,转移早而广泛,尽管小细胞肺癌对化疗、放疗敏感,但很快出现复发或病情进展<sup>[3]</sup>,目前尚无有效的靶向治疗药物,因此小细胞肺癌是研究肿瘤转移很好的模型。由于人小细胞肺癌中肿瘤抑制基因  $Trp53$  和  $Rb1$  的高突变率,所以  $Trp53$  和  $Rb1$  基因的缺失可能为建立小鼠小细胞肺癌模型提供了合理的手段<sup>[4]</sup>,我们利用 Cre-loxP 系统来特异性敲除  $Trp53^{loxP/loxP}; Rb1^{loxP/loxP}$  小鼠肺上皮细胞中  $Rb1$  和  $Trp53$ ,其 Ad-Cre 重组腺病毒是通过气管插管来感染小鼠。因此体内气道上皮和肺泡 II 型细胞中敲除  $Rb1$  和  $Trp53$ ,诱发小鼠的小细胞肺癌。

**作者简介** 王子乔 (1996-),女,本科在读,研究方向:肺癌转移;通信作者:刘喆, E-mail:zheliu@tmu.edu.cn。

### 1 材料和方法

**1.1 材料**  $Trp53^{loxP/loxP}; Rb1^{loxP/loxP}$  小鼠由中科院上海生化细胞研究所季红斌教授馈赠,所用腺病毒 Ad-Cre 来自 VECTOR BIOLABS (The Gene Delivery Company, 货号 1045)。

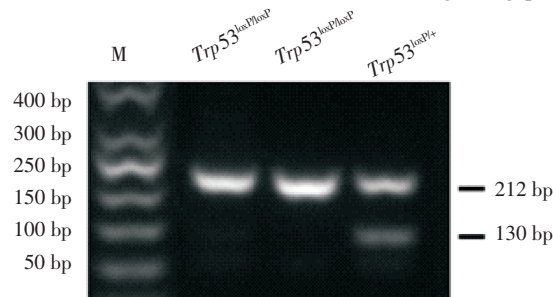
**1.2 试剂** PCR 试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司。DAB 显色试剂购自北京中杉金桥。CgA 抗体购自美国 ABcam 公司 (货号 ab15160)。Cgrp 抗体购自 Milipore (货号 AB5920)。TTF-1 抗体购自迈新试剂 (货号 MAB-0599)。小鼠麻醉剂购自美国 Sigma 公司 (货号 T48402)。

**1.3 小鼠的鉴定**  $Trp53$  基因型鉴定引物: 5'-CGCAATCCTTTATTCTGTTTCG-3', 5'-AGCACATAGGAGGCAGAGAC-3', 5'-TGAGACAGGGTCTTGCTATTG-3'。  $Rb1$  基因型鉴定引物: 5'-GAAAGGAAAGTCAGGGACATTGGG-3', 5'-GGCGTGTGCCATCAATG-3'。

**1.4 小鼠小细胞肺癌动物模型的建立** 首先腹腔注射麻醉剂麻醉 2 月龄小鼠,再以 Ad-Cre CaPi (Ad-Cre CaPi: 滴度为  $10^7$  PFU 的 Ad-Cre 2  $\mu$ L 加入到 246.8  $\mu$ L

的 MEM 中,再加入 1.2  $\mu\text{L}$  的 2 mol/L  $\text{CaCl}_2$  的共沉淀物插管吸入小鼠气管,每只小鼠吸入约 100  $\mu\text{L}$ 。病毒诱导 7 个月后收集死亡小鼠的肺、肝等组织进行石蜡包埋、切片、HE 染色以及相关病理分析。

1.5 免疫组化检测 通过对小鼠肺组织切片进行 TTF-1、CgA、Cgrp 等特异性标记蛋白的免疫组化染色,可确定肿瘤细胞是否表达 TTF-1、CgA、Cgrp,从



A. *Trp53*<sup>loxP/loxP</sup> 小鼠基因型鉴定 (Floxed allele: 212 bp, WT allele: 130 bp); B. *Rb1*<sup>loxP/loxP</sup> 小鼠基因型鉴定 (Floxed allele: 283 bp, WT allele: 235 bp); M: marker

图 1 小鼠基因型鉴定

Fig 1 PCR result of mouse genome DNA

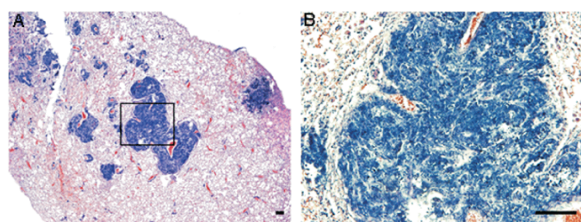
2.2 小鼠小细胞肺癌模型的建立 17 只 *Trp53*<sup>loxP/loxP</sup>; *Rb1*<sup>loxP/loxP</sup> 小鼠成功给予 Ad-Cre 病毒,病毒处理后小鼠质量逐渐降低,最终有 11 只 (65%) 小鼠造模成功。约 7 个月后,小鼠开始死亡,解剖死亡小鼠后肺部可观察到大量结节,暗示肺部肿瘤的形成是小鼠致死的主要原因。肺癌发生小鼠肺部表型见图 2。



图 2 小鼠肺部形成结节 (黑色箭头所示为结节)

Fig 2 Pulmonary nodules in mouse lung (Black arrow indicates pulmonary nodules)

2.3 小鼠肺组织切片病理染色 收集小鼠肺组织石蜡切片并进行 HE 染色,发现肺部有大量肿瘤灶的形成,且肿瘤细胞较小,挤压变形,核浆比增大,呈现明显的小细胞肺癌的特性。小鼠肺部切片 HE 染色结果见图 3。



A. 小鼠肺组织 HE 染色显示肿瘤形成; B. A 图区域放大。标尺: 100  $\mu\text{m}$

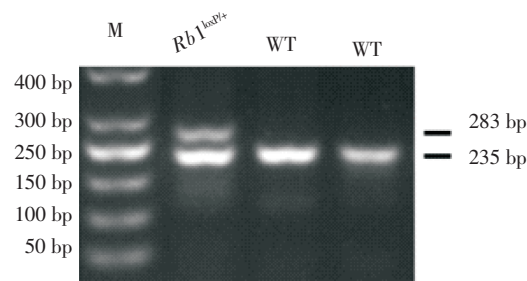
图 3 小鼠肺组织切片 HE 染色

Fig 3 Representative HE stain of lungs from mice

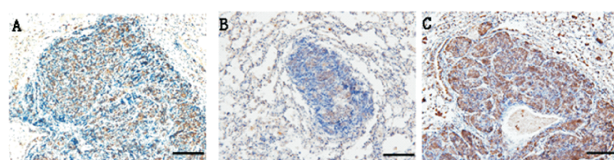
而确定是否为小细胞肺癌。

## 2 结果

2.1 小鼠的鉴定 取小鼠尾部组织消化并提取基因组 DNA,以基因组 DNA 为模板进行聚合酶链式反应,扩增得到 *Trp53*<sup>loxP/loxP</sup> 和 WT 对照小鼠的产物以及 *Rb1*<sup>loxP/loxP</sup> 和 WT 对照小鼠的产物,鉴定产物见图 1。



2.4 小鼠肺组织切片免疫组化染色 将上述肿瘤组织切片分别进行 TTF-1、CgA、Cgrp 免疫组化染色 (图 4),发现在肺部肿瘤灶中 TTF-1、CgA、Cgrp 的表达水平显著升高,大部分肿瘤细胞呈现 TTF-1、CgA 阳性以及 Cgrp 阳性,说明小鼠肺部肿瘤为小细胞肺癌。

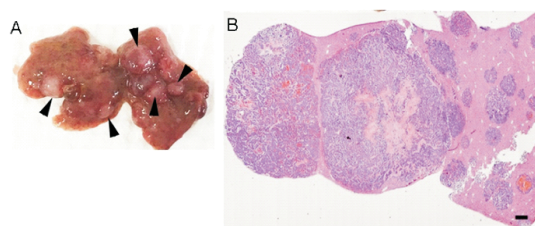


A. TTF-1; B. CgA; C. Cgrp。标尺: 100  $\mu\text{m}$

图 4 小鼠肺组织 TTF-1、CgA、Cgrp 免疫组化染色

Fig 4 IHC staining with anti-TTF-1, anti-CgA, anti-Cgrp performed on lung tissues

2.5 小鼠小细胞肺癌模型的肝转移 对死亡小鼠进行解剖分析,发现小鼠的肝组织上出现大量结节 (图 5),通过石蜡切片及病理染色,肝组织中肿瘤细胞形态与肺部肿瘤细胞病理染色结果相似,说明小鼠肺部小细胞肺癌发生了肝转移。



A. 小鼠肝组织形成肿瘤转移灶 (箭头所示为转移灶); B. 小鼠肝组织 HE 染色显示肿瘤转移。标尺: 500  $\mu\text{m}$

图 5 小鼠小细胞肺癌的肝转移

Fig 5 Liver metastasis of small cell lung cancer in mice

### 3 讨论

肺癌是目前世界上致死率最高的主要疾病之一,它是一个庞大的疾病分类,包含了多种不同的表型以及遗传突变,暗示着肺癌是一种高度异质性的疾病<sup>[5]</sup>。因此肺癌被分为多个不同的类型,其中最广泛应用的分类是小细胞肺癌和非小细胞肺癌。非小细胞肺癌是肺癌中最常见的一种,又可以分为腺癌、鳞癌和大细胞肺癌<sup>[6]</sup>。小细胞肺癌约占所有肺癌中的15%,具有神经内分泌细胞的特性<sup>[1]</sup>。根据2004年世界卫生组织的分类,小细胞肺癌是神经内分泌型肺癌的一种,代表了侵袭能力最高的一类肺癌<sup>[7]</sup>。在近10年中,对小细胞肺癌的治疗仍然没有新的手段,5年的生存率仍保持在7%以下。基因组学分析发现,在小细胞肺癌中存在多种重要基因突变,这些突变在小鼠小细胞肺癌模型中也得到了验证<sup>[5]</sup>。为了给小细胞肺癌的临床诊治提供新的依据,加深对小细胞肺癌的起始、进展、转移和抗药性的细胞以及分子机制的理解显得至关重要,但是到目前为止,仍然缺乏小细胞肺癌的小鼠模型。

由于人小细胞肺癌中肿瘤抑制基因 *Trp53* 和 *Rb1* 的高突变率,所以 *Trp53* 和 *Rb1* 基因的缺失可能为建立一个小鼠小细胞肺癌模型提供了合理的手段<sup>[4]</sup>。根据已有的研究,在小鼠神经内分泌型肿瘤的形成过程中,单独缺失 *Rb1* 或者 *Trp53* 并不会引起细胞凋亡<sup>[8]</sup>,*Rb1* 和 *Trp53* 是以一种协同作用的方式来发挥肿瘤抑制作用的,因此 *Rb1* 和 *Trp53* 的缺失是神经内分泌型肿瘤形成的先决条件<sup>[9]</sup>。

*Trp53* 或 *Rb1* 缺失小鼠对于研究肿瘤进程有相当重要的价值,在小鼠肺组织中敲除 *Trp53* 会产生肺腺癌<sup>[10]</sup>。而 Ad-Cre 病毒诱导的 *Rb1* 在肺上皮中缺失直到第18个月都不会产生任何肺肿瘤,同时在这些小鼠中也不能检测到神经内分泌细胞的异常增生。因此单独的 *Rb1* 缺失并不足以诱导神经内分泌肿瘤的形成,进一步的肿瘤进程可能还需要抑制 *Trp53* 介导的细胞凋亡<sup>[9]</sup>。根据已有的报道,*Rb1* 与 *Trp53* 同时缺失会使得人肺腺癌更易向小细胞肺癌转化<sup>[11]</sup>。在本研究中,我们利用 *Trp53*<sup>loxP/loxP</sup>, *Rb1*<sup>loxP/loxP</sup> 小鼠,通过肺部气管插管给予 Ad-Cre 重组腺病毒来诱导小鼠肺上皮细胞中 *Trp53* 以及 *Rb1* 的特

异性缺失,从而建立了小鼠肺癌模型,并通过病理染色及 TTF-1、CgA、Cgrip 的免疫组化染色进一步确定了该肺癌模型为小细胞肺癌模型。

对肝组织的病理分析发现,小鼠肺组织的癌细胞已经扩散到肝脏等组织中,说明构建的小鼠小细胞肺癌模型具有高度侵袭性,也进一步证实了该小鼠小细胞肺癌模型<sup>[12]</sup>与人小细胞肺癌有高度的相似性,它也具有向其他功能器官,如脑、肾上腺、骨、卵巢转移的潜能。该模型为研究小细胞肺癌的起始和早期提供了实验工具,为临床上小细胞肺癌化疗策略以及化疗药物的筛选提供了实验手段。

#### 参考文献:

- [1] Van Meerbeeck J P, Fennell D A, De Ruyscher D K. Small-cell lung cancer [J]. Lancet, 2011, 378(9804): 1741
- [2] Rom W N, Hay J G, Lee T C, et al. Molecular and genetic aspects of lung cancer [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 161(4 Pt 1): 1355
- [3] Fischer B, Arcaro A. Current status of clinical trials for small cell lung cancer [J]. Rev Recent Clin Trials, 2008, 3(1): 40
- [4] Sattler M, Salgia R. Molecular and cellular biology of small cell lung cancer [J]. Semin Oncol, 2003, 30(1): 57
- [5] Semenova E A, Nagel R, Berns A. Origins, genetic landscape, and emerging therapies of small cell lung cancer [J]. Genes Dev, 2015, 29(14): 1447
- [6] Kamangar F, Dores G M, Anderson W F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world [J]. J Clin Oncol, 2006, 24(14): 2137
- [7] Linnoila R I. Functional facets of the pulmonary neuroendocrine system [J]. Lab Invest, 2006, 86(5): 425
- [8] Huun J, Lonning P E, Knappskog S. Effects of concomitant inactivation of p53 and pRb on response to doxorubicin treatment in breast cancer cell lines [J]. Cell Death Discov, 2017, 3: 17026
- [9] Meuwissen R, Linn S C, Linnoila R I, et al. Induction of small cell lung cancer by somatic inactivation of both Trp53 and Rb1 in a conditional mouse model [J]. Cancer Cell, 2003, 4(3): 181
- [10] Donehower L A. The p53-deficient mouse: a model for basic and applied cancer studies [J]. Semin Cancer Biol, 1996, 7(5): 269
- [11] Lee J K, Lee J, Kim S, et al. Clonal history and genetic predictors of transformation into small-cell carcinomas from lung adenocarcinomas [J]. J Clin Oncol, 2017, 12: JCO2016719096
- [12] Abe R, Donnelly S C, Peng T, et al. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites [J]. J Immunol, 2001, 166(12): 7556

(2017-07-20 收稿)