

睡美人转座酶对小鼠肝内胆管癌动物模型成瘤率的影响^{*}

周万飞¹,黄银久²,秦中强¹,谈 兢^{1△}

(1.蚌埠医学院第一附属医院肝胆外科,安徽蚌埠 233000;2.蚌埠医学院生物科学系,安徽蚌埠 233000)

[摘要] **目的** 利用水流动力学质粒转染方法建立小鼠肝内胆管癌(ICC)动物模型,比较两种睡美人(SB)转座酶 SB100 与 SB13 对 ICC 动物模型成瘤率的影响。**方法** 利用水流动力学注射方法将表达 myr-Akt 基因的转座子,NICD1 转座子分别与 SB100(A组)、SB13(B组)质粒溶液通过小鼠尾静脉注射入肝脏。注射 NICD1 和 myr-Akt 质粒作为 C 组,注射等量生理盐水作为 D 组。注射 4 周后处死,行病理学检查。免疫组织化学检测 CK19 和 HA 作为胆管细胞性肝癌诊断指标。**结果** A 组小鼠成瘤率 100%(20/20),B 组小鼠成瘤率 70%(14/20),病理结果及免疫组织化学表明小鼠形成肿瘤为胆管细胞性肝癌,其中 A 组 CK19 强阳性表达率为 55%,HA 强阳性表达率为 60%;B 组 CK19 强阳性表达率为 60%,HA 强阳性表达率为 65%;C、D 组均无阳性表达。**结论** SB100 较 SB13 可显著提高成瘤率。

[关键词] 模型,动物;胆管肿瘤;水流动力学质粒转染方法;转座酶类

[中图法分类号] R735.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)02-0297-04

Effects of sleeping beauty transposase on the tumorigenesis rate of intrahepatic cholangiocarcinoma mouse model^{*}

ZHOU Wanfei¹,HUANG Yinjiu²,QIN Zhongqiang¹,TAN Yi^{1△}

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui 233000, China; 2. Department of Bioscience, Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui 233000, China)

[Abstract] **Objective** To establish animal model of intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) by hydrodynamic plasmid transfection, and to compare the effects of two transposable enzymes SB100 and SB13 on the tumorigenesis rate of intrahepatic cholangiocarcinoma animal models. **Methods** The transposons expressing myr-Akt gene and the NICD1 transposon were injected with the SB100 (group A) and SB13 (group B) transposase plasmid solution, respectively into the liver through the tail vein by hydrodynamic injection. Mice NICD1 and myr-Akt gene plasmids were injected as group C, injected with normal saline as control group D. Mice were sacrificed after 4 weeks, and cholangiocarcinoma tumor formation was determined by pathological examination and immunohistochemical detection of CK19 and HA-tag (the sequence tag of hemagglutinin surface antigen determinant of Influenza Virus). **Results** Group A had a cancer rate of 100%(20/20); group B had a cancer rate of 70%(14/20). Pathological results and immunohistochemistry indicated that the tumor was cholangio cellular carcinoma in group A, the strongly-positive expression rate of CK19 was 55%, the strongly-positive expression rate of HA was 60%, which in group B was 60% and 65% respectively. No positive expression in group C and D. **Conclusion** The transposase SB100 can significantly increase the tumor formation rate comparing with SB13.

[Key words] models, animal; bile duct neoplasms; hydrodynamic plasmid transfection methods; transposases

肝内胆管癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)是一种胆管上皮源性的、高度恶性的肿瘤^[1]。在世界范围内 ICC 作为肝胆系统第 2 常见的原发性恶性肿瘤,其发病率与病死率在我国持续增高^[2]。到目前为止,根治性手术切除是 ICC 惟一有效的方法。

研究 ICC 的发病机制及病理改变的前提是建立 ICC 的动物模型。迄今为止,构建 ICC 动物模型的方法为化学方法或通过肝内直接注射肿瘤细胞的方法,如以氨基比林和亚硝酸钠溶液作为叙利亚地鼠的饮用水,每周饮用 6 d,连续饮用 24 周,可诱发 ICC,成癌

^{*} 基金项目:安徽省教育厅重大项目(KJ2018ZD022)。 作者简介:周万飞(1991—),在读硕士,主要从事肝胆胰肿瘤研究。 △ 通信作者, E-mail: doctortanyi2007@sina.com。

率 50%^[3]。ZENDER 等^[4]研究发现利用含有致癌基因的慢病毒感染肝祖细胞,之后注射进小鼠肝脏内,8 周后诱发 ICC,成癌率 70%。但是以上两种方法用时长,成癌率低。BIAO 等^[5]研究表明,应用水流动力学质粒转染方法将两种质粒 NICD1 和 myr-AKT 通过尾静脉注射到体内可诱导 ICC 的发生,但是此方法无法稳定高效地建立起 ICC 模型。有文献报道睡美人(sleeping beauty,SB)转座酶结合水流动力学转染方法可以使靶基因在肝脏中长期稳定表达^[6-7]。本研究应用水流动力学方法并结合 SB100 或 SB13 将 NICD1 和 myr-AKT 质粒注射到小鼠体内,诱导 ICC 形成,进而比较两种转座酶对成癌率的影响,为研究 ICC 做好前期实验基础,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康昆明小鼠 80 只,6~8 周龄,体质量 20~24 g,采购自蚌埠医学院实验动物中心[动物许可证号:SCXK(苏)2017-0001;合格证编号:NO.201723468]。

1.2 试剂 无内毒素质粒大提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司(Lot:Q5331),Anti-HA tag 山羊单克隆抗体(Lot:CR138965-1)及 Anti-Cytokeratin19 兔单克隆抗体(Lot:GR1234768-1)购自英国 abcam 公司;驴抗山羊 IgG Alexa Fluor 488[®] Polyclonal (Lot:211346)及驴抗兔 IgG Alexa Fluor 594[®] Polyclonal (Lot:134523)购自美国 Jackson 公司。诱癌质粒: pT3-EF1a-NICD1, pT3-myr-AKT-HA (human AKT1),C-luc-SB13,pCMV(CAT)T7-SB100 由英国 addgene 公司馈赠。

1.3 方法

1.3.1 ICC 模型的构建 将实验小鼠分为 4 组,每组 20 只。A 组小鼠通过尾静脉注射 pT3-mry-AKT-HA 和 pT3-EF1a-NICD1 质粒联合 SB100。B 组小鼠通过尾静脉注射 pT3-mry-AKT-HA 和 pT3-EF1a-NICD1 质粒联合 SB13。C 组小鼠通过尾静脉注射 pT3-mry-AKT-HA 和 pT3-EF1a-NICD1 质粒。D 组小鼠通过尾静脉注射生理盐水。用无内毒素质粒大提试剂盒提取 pT3-EF1a-NICD1、pT3-myr-AKT-HA、SB100、SB13 4 种质粒。在 A 组中 3 种质粒分别取 25 μ g 与 2 mL 的 0.9% NaCl 溶液充分混合,通过尾静脉在 7 s 内将含有此 3 种质粒的 0.9% NaCl 溶液注射入小鼠体内;B 组和 C 组用上述同种方法将含有质粒的溶液注射入小鼠体内;D 组用上述同种方法将等量 0.9% NaCl 注射入小鼠体内。在实验期间,小鼠正常投喂饲料,随意饮水。观察 4 组小鼠生长情况,体质量变化,精神食欲等变化。4 周后小鼠全部处死。

1.3.2 组织病理学检测 ICC 将实验组中 ICC 组织

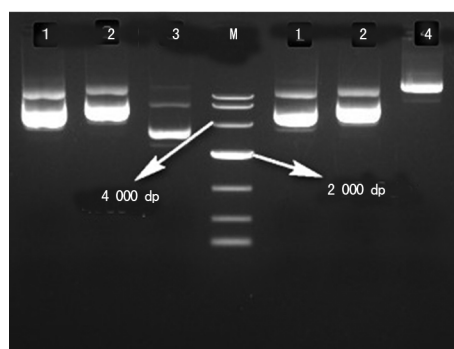
和对照组中正常肝组织取出,用 4% 多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,之后用病理组织切片机制成 10 μ m 的连续石蜡切片。然后将切片用苏木素-伊红(HE)染色,在光镜下观察。

1.3.3 采用免疫组织化学 SP 法检测 ICC 将石蜡组织块切成 5 μ m 厚切片,于二甲苯中脱蜡 2 次,水化,自来水冲洗。柠檬酸缓冲液 93 $^{\circ}$ C 抗原修复 30 min 后,室温下驴血清封闭 30 min 后磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗 3 次。除去 PBS 后,滴加一抗(1:200 稀释),孵化 4 $^{\circ}$ C 过夜,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。滴加反应增强液,室温下孵育 30 min,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。滴加抗兔/山羊 IgG 聚合物,室温下孵育 30 min,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。滴加新鲜配制的 3,3-二氨基联苯胺(DAB)显色试剂显色。自来水充分冲洗,苏木素复染,PBS 返蓝,乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。以细胞质和(或)细胞膜上见到棕黄色颗粒分布为阳性。采用半定量方法进行判断:无着色细胞为阴性,着色细胞小于 30% 为“+”(阳性),着色细胞 30%~60% 为“++”(中等阳性),着色细胞大于 60% 为“+++”(强阳性)。选择 5 个 400 倍视野,计数每个视野 100 个瘤细胞中 CK19 或者 HA 阳性细胞数。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件进行数据分析,计数资料以频数或百分率表示,比较采用 Fisher 精确概率法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

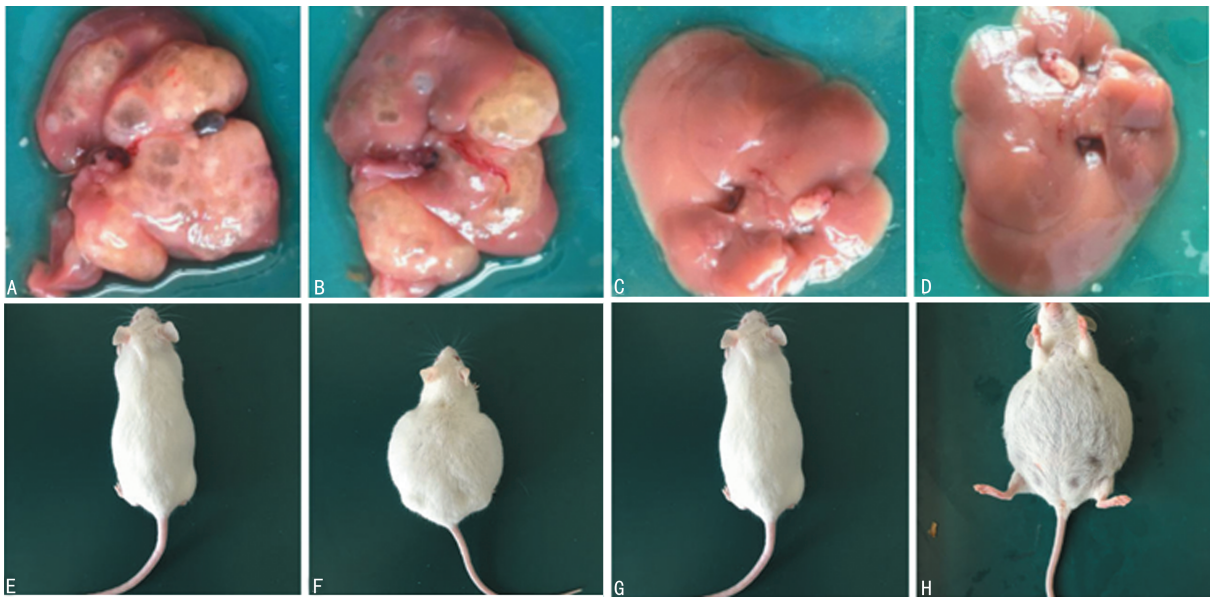
2.1 诱癌质粒提取结果 使用酶标仪测 4 种质粒浓度均在 1 μ g/ μ L 以上, A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0。分别取 1 μ L 诱癌质粒上样 1% 凝胶电泳,见图 1。



M: takara DL10000 DNA Marker; 1: pT3-myr-AKT-HA; 2: pT3-EF1a-NICD1; 3: pCMV(CAT)T7-SB100; 4: C-luc-SB13

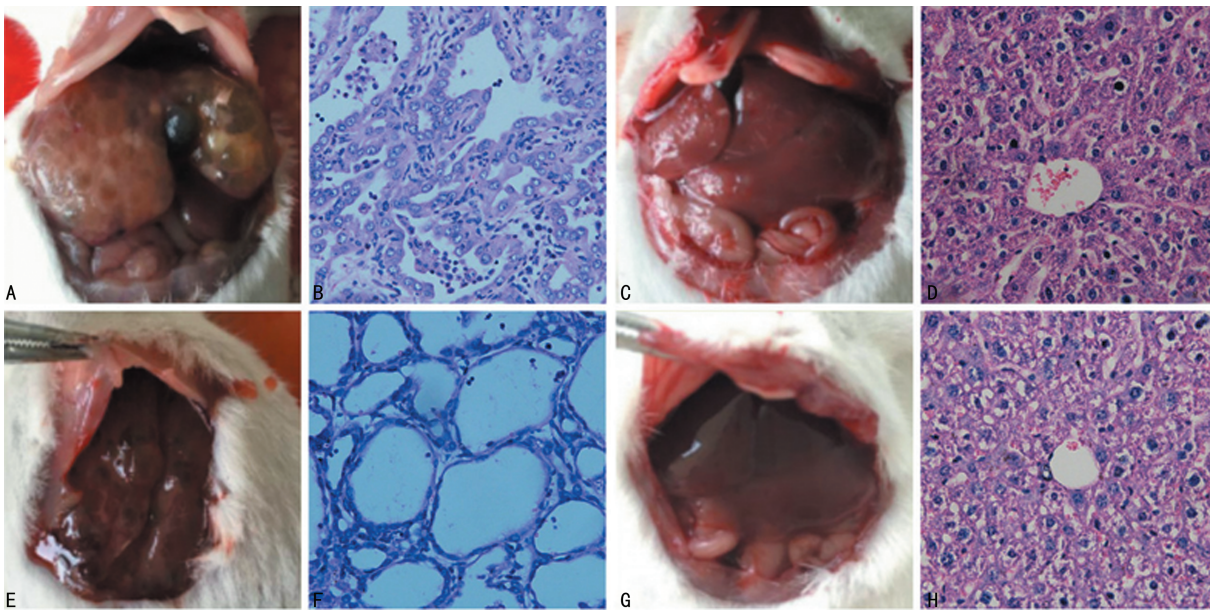
图 1 4 种诱癌质粒的 DNA 凝胶电泳

2.2 小鼠 ICC 发生情况 A、B 组小鼠在实验期间均未发生死亡,随着实验时间的延长,实验组小鼠逐渐出现精神萎靡,食欲减退,体质量减轻,毛发失去光泽,部分呈现出嗜睡状态。A 组中有 7 只腹水明显,B 组中有 4 只腹水明显,而对照组精神食欲正常,体质量无明显变化。4 周后处死全部小鼠,对照组肝脏无



A: A 组小鼠肿瘤生长情况;B: B 组小鼠肿瘤生长情况;C: C 组小鼠肿瘤生长情况;D: D 组小鼠肿瘤生长情况;E: C 组小鼠腹水情况;F: A 组小鼠腹水情况;G: D 组小鼠腹水情况;H: B 组小鼠腹水情况

图 2 ICC 病理及小鼠腹水情况



A: A 组肝脏组织呈多灶囊泡状改变;B: A 组肝脏组织镜下形态;C: C 组肝脏组织表面光滑未见异常改变;D: C 组肝脏组织镜下形态;E: B 组肝脏组织呈多灶囊泡状改变;F: B 组肝脏组织镜下形态;G: D 组肝脏组织表面光滑未见异常改变;H: D 组肝脏组织镜下形态

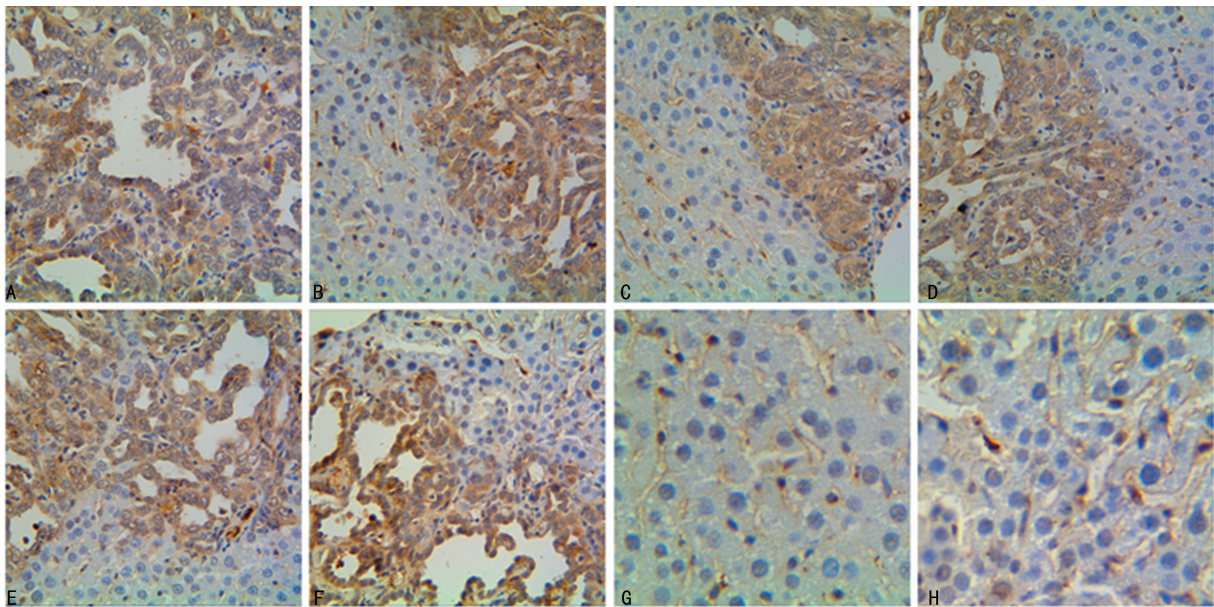
图 3 小鼠 ICC 肿瘤组织标本及石蜡切片 (HE, ×400)

明显变化。A 组小鼠全部成癌,成癌率 100%,B 组小鼠中 14 只成癌,成癌率 70%,两组成癌率比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。肝脏表面可见多结节状肿块,切面灰白质脆,呈鱼肉状,伴多囊形成,囊径 0.4~1.0 cm,内含清亮液体,见图 2。

2.3 组织病理学变化 经 HE 染色镜下实验组肿瘤组织呈弥漫性生长,部分呈小片状分布,累犯周边肝小叶。肿瘤组织中可见形状不规则的腺管样结构,部分呈乳头状生长。瘤细胞形状不一,大小不等,多呈低柱状或立方状单层排列,部分细胞呈复层排列。细胞核大,深染,部分可见核分裂。胞质少,染色深。局部瘤细胞间质血管丰富,肿瘤间质及腺管样结构内可

见炎性细胞浸润。肿瘤周围部分血管充血淤血明显。胃、胰腺、肾等器官未见肿瘤转移。对照组细胞结构完整,核型一致,见图 3。

2.4 免疫组织化学结果 CK19 免疫组织化学定位于细胞质,A 组中 ICC 瘤细胞 45%(9/20)中等阳性表达,55%(11/20)强阳性表达;B 组中 ICC 瘤细胞 40%(8/20)中等阳性表达,60%(12/20)强阳性表达;C 组、D 组无阳性表达。AKT-HA 定位于细胞质及细胞膜,A 组中 ICC 瘤细胞 60%(12/20)强阳性表达,40%(8/20)中等强阳性表达;B 组中 ICC 瘤细胞 35%(7/20)中等阳性表达,65%(13/20)强阳性表达;C 组、D 组中无阳性表达,见图 4。



A:A 组 ICC 肝脏组织 CK19 蛋白表达于肿瘤细胞细胞质中显示是胆管细胞分化;B:A 组 ICC 肝脏组织中 HA 蛋白表达于肿瘤细胞细胞膜、细胞质;C:B 组肝脏组织中 CK19 蛋白表达于肿瘤细胞细胞质中显示是胆管细胞分化;D:B 组肝脏组织中 HA 蛋白表达于肿瘤细胞细胞膜、细胞质;E:C 组肝脏组织中 CK19 免疫组织化学表达阴性;F:C 组肝脏组织中 HA 免疫组织化学表达阴性;G:D 组肝脏组织中 CK19 免疫组织化学表达阴性;H:D 组肝脏组织中 HA 免疫组织化学表达阴性

图 4 小鼠 ICC 实验组及对照组免疫组织化学结果(×400)

3 讨 论

EVERT 等^[8]研究发现单独激活 Notch 信号通路虽然可以单独促进 ICC 的发展,但周期较长,一般为 20~25 周。ZENDER 等^[9]发现 Notch 信号通路和 AKT 信号通路在 ICC 形成和发展中具有重要作用,二者结合可以加速 ICC 发展。水流动力学质粒转染方法是一种全新的体内基因转移技术。ZHANG 等^[10]认为,水流动力学注射是一个物理过程,肝内皮细胞窗在高压情况下增大,导致肝细胞膜产生了孔隙,从而质粒 DNA 可通过孔隙进入肝细胞。BIAO 等^[5]利用表达 NICD1 的转座子诱导小鼠 ICC 的形成,其周期为 5 个月。AMMRA 等^[11]发现 SB 转座酶是第 1 个可以在脊椎动物细胞中进行基因转移的转座子,并且支持脊椎动物全面遗传工程,包括转基因、插入突变和治疗性体细胞基因。HUDECEK 等^[6]发现 SB 转座酶结合水流动力学转染方法可以使靶基因在肝脏中长期稳定表达。因此本研究利用水流动力学质粒转染方法,将诱癌质粒 pT3-myr-AKT-HA (humanAKT1)、pT3-EF1a-NICD1,分别与 SB100 和 SB13 混合后通过尾静脉快速注射入小鼠体内,建立 ICC 模型。以此来观察结合两种转座酶后对 ICC 模型成瘤率的影响。实验发现结合 SB100 的成瘤率高于 SB13。对于未结合 SB 转座酶的 C 组,与文献报道一致^[9],D 组无明显异常改变。

综上所述,利用水流动力学质粒转染法并结合 SB 转座酶构建小鼠 ICC 动物模型具有以下优点:(1)操作简单,成瘤概率高,可以大量制备 ICC 动物模型。(2)癌变过程与人类 ICC 发生相似,可以用于 ICC 发

病机制,病因和治疗的研究。(3)由于是无创操作,实验动物耐受性好,病死率低,实用性强。本实验充分比较了两种 SB 转座酶对于构建 ICC 模型的影响,结果表明 SB100 在成瘤率上显著优于 SB13。

参考文献

[1] JÜTTE H,TANNAPFEL A. Tumor grading of the hepatobiliary system[J]. Pathologe,2016,37(4):299-303.
[2] TAO L Y,HE X D,QIANG Q,et al. Risk factors for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma; a case-control study in China[J]. Liver Int,2010,30(2):215-221.
[3] 梁平,庄大勇,陈海,等. 氨基比林和亚硝酸钠诱发的肝内胆管癌动物模型[J]. 第三军医大学学报,2001,23(8):963-964.
[4] ZENDER L,XUE W,CORDON-CARDO C,et al. Generation and analysis of genetically defined liver carcinomas derived from bipotential liver progenitors[J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol,2005,70:251-261.
[5] BIAO F,YANN M,DIEGO F C,et al. Cholangiocarcinomas can originate from hepatocytes in mice[J]. J Clin Invest,2012,122(8):2911.
[6] HUDECEK M,IVICS Z. Non-viral therapeutic cell engineering with the sleeping beauty transposon system[J]. Curr Opin Genet Dev,2018,52:100.
[7] HOU X,DU Y,DENG Y,et al. Sleeping beauty transposon system for genetic etiological research and gene therapy of cancers[J]. Cancer Biol Ther,2015,16(1):8-16.
[8] EVERT M,DOMBROWSKI F,FAN B,et al. On the role of notch1 and adult hepatocytes in murine(下转第 316 页)

- [10] SHAH S P, ROTH A, GOYA R, et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers[J]. *Nature*, 2012, 486(7403): 395-399.
- [11] BURGER J A, LANDAU D A. Clonal evolution in patients with chronic lymphocytic leukaemia developing resistance to BTK inhibition[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11589.
- [12] FUSCO N, BOSARI S. HER2 aberrations and heterogeneity in cancers of the digestive system; Implications for pathologists and gastroenterologists[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(35): 7926-7937.
- [13] GERLINGER M, ROWAN A J, HORSWELL S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(10): 883-892.
- [14] DUPONT J J, LAENKHOLM A V, KNOOP A, et al. PIK3CA mutations may be discordant between primary and corresponding metastatic disease in breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(4): 667-677.
- [15] VAKIANI E, JANAKIRAMAN M, SHEN R, et al. Comparative genomic analysis of primary versus metastatic colorectal carcinomas[J]. *J Clin Oncol*, 2012; 30(24): 2956-2962.
- [16] CHEN Z Y, ZHONG W Z, ZHANG X C, et al. EGFR mutation heterogeneity and the mixed response to EGFR tyrosine kinase inhibitors of lung adenocarcinomas[J]. *Oncologist*, 2012, 17(7): 978-985.
- [17] HOEFNAGEL L D, VAN DE VIJVER M J, VAN SLOOTEN H J, et al. Receptor conversion in distant breast cancer metastases[J]. *Breast Cancer Res*, 2010, 12(5): R75.
- [18] COUZIN J. Pharmacogenomics. Cancer sharpshooters rely on DNA tests for a better aim[J]. *Science*, 2004, 305(5688): 1222-1223.
- [19] KAJITANI T, MAKIYAMA A, ARITA S, et al. Anti-epidermal growth factor receptor antibody readministration in chemorefractory metastatic colorectal cancer[J]. *Anti-cancer Res*, 2017, 37(11): 6459-6468.
- [20] KADIOGLU O, CAO J, SAEED M E, et al. Targeting epidermal growth factor receptors and downstream signaling pathways in cancer by phytochemicals[J]. *Target Oncol*, 2015, 10: 337-353.
- [21] CERESA B P, PETERSON J L. Cell and molecular biology of epidermal growth factor receptor[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2014, 313: 145-178.
- [22] HUSSEINZADEH N, HUSSEINZADEH H D. mTOR inhibitors and their clinical application in cervical, endometrial and ovarian cancers: a critical review[J]. *Gynecol Oncol*, 2014, 133(2): 375-381.
- [23] MATULONIS U, VERGOTE I, BACKES F, et al. Phase II study of the PI3K inhibitor pilaralisib (SAR245408; XL147) in patients with advanced or recurrent endometrial carcinoma[J]. *Gynecol Oncol*, 2015, 136(2): 246-253.
- [24] ALVARADO Y, MITA M M, VEMULAPALLI S, et al. Clinical activity of mammalian target of rapamycin inhibitors in solid tumors[J]. *Target Oncol*, 2011, 6(2): 69-94.
- [25] OHTSU A, AJANI J A, BAI Y X, et al. Everolimus for previously treated advanced gastric cancer: results of the randomized, double-blind, phase III GRANITE-1 study[J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(31): 3935-3943.
- [26] DE MARCO C, LAUDANNA C, RINALDO N, et al. Specific gene expression signatures induced by the multiple oncogenic alterations that occur within the PTEN/PI3K/AKT pathway in lung cancer[J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0178865.
- [27] KOUTRAS A, KOTOULA V, FOUNTZILAS G. Prognostic and predictive role of vascular endothelial growth factor polymorphisms in breast cancer[J]. *Pharmacogenomics*, 2015, 16(1): 79-94.
- [28] OHTSU A, SHAH M A, VAN CUTSEM E, et al. Bevacizumab in combination with chemotherapy as first-line therapy in advanced gastric cancer: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(30): 3968-3976.
- (收稿日期: 2018-08-22 修回日期: 2018-10-06)
-
- (上接第 300 页)
- intrahepatic cholangiocarcinoma development[J]. *Hepatology*, 2013, 58(5): 1857-1859.
- [9] ZENDER S, NICKELEIT I, WUESTEFELD T, et al. A critical role for notch signaling in the formation of cholangiocellular carcinomas[J]. *Cancer Cell*, 2013, 23(6): 784-795.
- [10] ZHANG G, GAO X, SONG Y K, et al. Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery[J]. *Gene Ther*, 2004, 11(8): 675-682.
- [11] AMMAR I, IZSVÁK Z, IVICS Z. The sleeping beauty transposon toolbox[J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 859: 229-240.
- (收稿日期: 2018-05-18 修回日期: 2018-08-21)