

Avasimibe 对 Lewis 肺癌小鼠抗肿瘤作用研究

乔旭旭, 毕明宏, 张浩然, 梁伟晨, 郭建路

(蚌埠医学院第一附属医院 蚌埠医学院组织移植安徽省重点实验室, 安徽 蚌埠 233000)

摘要: [目的] 观察 Avasimibe 对 Lewis 肺癌小鼠模型肿瘤生长及转移的抑制作用, 探索其可能的作用机制。[方法] 选择 24 只 C57BL/6 小鼠, 左前肢腋下接种 Lewis 肺癌细胞(LLC)构建 Lewis 肺癌小鼠模型, 随机分成对照组、环磷酰胺(CTX)组、Avasimibe 组、CTX+Avasimibe 四组, 每组 6 只。于接种肿瘤后第 10d 分别向 Lewis 肺癌小鼠模型腹腔注射生理盐水、CTX 溶液、Avasimibe、CTX+Avasimibe 溶液。至造模后 35d, 观察各组小鼠生存状态及移植瘤生长情况, 称量小鼠体重、瘤重、胸腺重, 计算抑瘤率、胸腺指数, 观察肝肺转移情况, Western blot 检测瘤组织 ACAT-1 的表达。[结果] 与对照组比较, 小鼠未出现体重减轻, 各组瘤重均降低, CTX+Avasimibe 组瘤重低于 CTX 组及 Avasimibe 组。四组抑瘤率分别为 0、53.45%、51.51% 和 62.22%, 与对照组比较, 其余三组抑瘤率升高; 与 CTX 组及 Avasimibe 组比较, CTX+Avasimibe 组抑瘤率升高; 与对照组比较, CTX 组胸腺重显著性降低, Avasimibe 组胸腺重显著性升高, CTX 组胸腺指数显著性降低, 与 CTX 组相比, Avasimibe 组及 CTX+Avasimibe 组的胸腺重及胸腺指数均显著性增加。对照组小鼠出现肝肺转移, CTX 组、Avasimibe 组及 CTX+Avasimibe 组未见肝肺转移情况; 与对照组和 CTX 组比较, Avasimibe 组及 CTX+Avasimibe 组 ACAT-1 蛋白表达降低。[结论] Avasimibe 在 Lewis 肺癌小鼠体内可有效发挥抑制肿瘤生长及转移的作用, 而且还可以提高小鼠的免疫功能, 这为肺癌治疗提供一个新靶点。

关键词: avasimibe; ACAT-1; Lewis 肺癌; 抗肿瘤

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2019)05-0413-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.05.B007

Anti-tumor Effect of Avasimibe on Lewis Lung Cancer Mice

QIAO Xu-xu, BI Ming-hong, ZHANG Hao-ran, LIANG Wei-chen, GUO Jian-lu

(The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Anhui Province Key Laboratory of Tissue Transplantation, Bengbu 233000, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effect of Avasimibe on Lewis lung carcinoma in mice. [Methods] Lewis lung carcinoma cells were subcutaneously inoculated in 24 C57BL/6 mice, then the mice were randomly divided into 4 groups with 6 animals in each group: control group, cyclophosphamide (CTX) group, avasimibe group and CTX+ avasimibe group. On d10 after inoculation, the normal saline, CTX solution, avasimibe solution, or CTX plus avasimibe solution were intraperitoneally injected in 4 groups, respectively. On d35 after inoculation, the survival status of the mice, the growth of the transplanted tumor and the liver and lung metastasis were observed, the tumor weight, thymus weight were measured, the tumor inhibition rate, thymus index were calculated, and the expression of ACAT-1 in tumor tissue was detected. [Results] Compared with the control group, the tumor weight of 3 treatment groups was significantly lower, that of the CTX+ avasimibe group was the lowest. The tumor inhibition rates of the control group, CTX group, avasimibe group and CTX+ avasimibe group were 0, 53.45%, 51.51%, and 62.22%, respectively. The tumor inhibition rate of CTX+ avasimibe group was significantly lower than that of CTX group and the avasimibe group ($P<0.05$). Compared with the control group, the thymus weight and thymus index of CTX group were significantly decreased, while that of avasimibe group were significantly increased. Compared with the CTX group, the thymus weight and thymus index in the avasimibe group and the CTX+ avasimibe group were significantly increased. The metastatic lesions in the liver and lung were observed in the control group, while there was no liver and lung metastasis in the three treatment groups. Compared with the control group and the CTX group, the expression of ACAT-1 protein in avasimibe group and CTX+ avasimibe was significantly decreased. [Conclusion] Avasimibe can effectively inhibit tumor growth and metastasis, and improve the immune function in mice with Lewis lung carcinoma.

Subject words: avasimibe; ACAT-1; Lewis lung carcinoma; anti-tumor

基金项目: 安徽省卫生厅医学科研项目(09C171); 安徽省高校自然科学研究项目(KJ2016A483); 蚌埠医学院研究生创新课题(Byycxz1722)。

通信作者: 毕明宏, 科室副主任, 主任医师, 硕士; 蚌埠医学院第一附属医院肿瘤内科, 安徽省蚌埠市长淮路 287 号(233000); E-mail: bmh2003@126.com

收稿日期: 2018-09-29; **修回日期:** 2018-12-15

Avasimibe 是胆固醇酰基转移酶 1 (acyl-CoA cholesterol acyltransferase 1, ACAT-1) 的抑制剂。研究发现在多种癌症包括前列腺癌、胰腺癌、白血病、神经胶质瘤、乳腺癌及结肠癌中 ACAT-1 表达异常增高,其介导的胆固醇酯(CE)异常积聚^[1-4]。使用小分子抑制剂 Avasimibe 抑制 ACAT-1 可有效去除胆固醇酯积聚并抑制肿瘤生长。本研究观察 Avasimibe 对 Lewis 肺癌模型小鼠体重、抑瘤率、胸腺指数以及 ACAT-1 表达的影响,观察 Avasimibe 对 Lewis 肺癌的抗肿瘤作用及探讨其机制。

1 材料与方 法

1.1 动物及瘤株

SPF 级 C57BL/6 小鼠 24 只,雄性,体重 18~22 克,购自蚌埠医学院实验动物中心。Lewis 肺癌瘤株购自中科院上海细胞库保藏中心。

1.2 主要试剂及仪器

Avasimibe 购自 MCE 公司;注射用环磷酰胺购自大连美仑公司;标准胎牛血清和胰蛋白酶(杭州四季青公司)、DMEM 高糖培养基和 PBS (美国 HyClone 公司)、兔抗鼠 ACAT-1 多克隆抗体(美国 Cell Signaling 公司)、 β -actin 抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(中国 Biosharp 公司)、抗苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)、增强型 RIPA 裂解液(武汉博士德生物工程有限公司)、倒置显微镜、细胞孵育箱(美国 Thermo 公司);台式离心机(德国 Eppendorf 公司);全自动酶标仪(美国 BioTek 公司);凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 动物造模及给药

取对数生长期 Lewis 肺癌细胞,用无菌 PBS 稀释成 2×10^7 /ml 单细胞悬液,取 0.2ml 细胞悬液皮下接种于小鼠左前肢腋下。

小鼠接种后第 10d,当肿瘤体积达到 $0.05 \sim 0.1 \text{cm}^3$ 后,将 24 只造模成功小鼠随机分成 4 组:对照组、CTX 组、Avasimibe 组、CTX+Avasimibe 组,每组 6 只。CTX 组于接种肿瘤后第 10d 开始腹腔注射 CTX 溶液 0.2ml (20mg/kg),每隔 1d 注射 1 次^[5];Avasimibe 组于接种肿瘤后第 10d 开始腹腔注射 Avasimibe 溶液 0.4ml (15mg/kg),每隔 2d 注射 1 次^[6];CTX+Avasimibe 组于接种肿瘤后第 10d 开始腹腔注

射 CTX 溶液 0.2ml (20mg/kg) 和 Avasimibe 溶液 0.4ml (15mg/kg),对照组同步给予腹腔注射生理盐水。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 小鼠生存状态

每 d 观察小鼠的进食、活动、成瘤、转移灶等情况。

1.4.2 小鼠体重、抑瘤率、胸腺指数测定

于接种 Lewis 肺癌细胞第 35d 处死各组小鼠,称取小鼠体重,取瘤称重,计算抑瘤率;取小鼠胸腺,计算胸腺指数。

抑瘤率($\%$)=(对照组平均瘤重-实验组平均瘤重)/对照组平均瘤重 $\times 100\%$,胸腺指数(mg/g)=胸腺重量(mg)/小鼠重量(g)^[5]。

1.4.3 Western blot 检测 ACAT-1 表达

将少量肿瘤组织块(100mg 左右)置于 $1 \sim 2 \text{ml}$ 匀浆器中球状部位,用干净的剪刀将组织块尽量剪碎。加 1ml 单去污剂裂解液(含 PMSF)于匀浆器中,进行匀浆,然后置于冰上,重复碾几次使组织尽量碾碎。裂解 30min 后,即可用移液器将裂解液移至 1.5ml 离心管中,然后在 4°C 下 $12\,000 \text{r/min}$ 离心 15min,取上清分装于 $200 \mu\text{l}$ 离心管中并置于 -80°C 保存,用时取出,直接溶解上样。每组取 $60 \mu\text{g}$ 蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳,转膜至 PVDF 膜;使用 5% 脱脂牛奶封闭 2h, TBST 洗膜 3 次,每次 10min;加一抗 4°C 冰箱孵育过夜, TBST 洗膜 3 次;加二抗孵育 2h; TBST 洗膜 3 次, ECL 发光试剂盒暗室发光显影, Bio-Rad 凝胶成像系统获取图像,并使用 Image J 软件进行灰度值扫描。实验重复 3 次。

1.5 统计学处理

采用 SPSS16.0 软件处理实验数据,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用完全随机设计的单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Lewis 肺癌小鼠生存状态及转移灶观察

接种 Lewis 肺癌细胞后第 7d, 各组小鼠左前肢腋下可触及黄豆大小瘤块,第 10d 瘤体生长明显加快,可达到 $0.05 \sim 0.1 \text{cm}^3$, 随后小鼠出现进食水量减少,活动减弱。Avasimibe 组一般情况优于其他各组,对照组及 CTX+Avasimibe 组一般情况较差,CTX 组

一般情况最差。对照组小鼠出现肉眼可见的肝肺转移灶,CTX组、Avasimibe组及CTX+Avasimibe组未出现肉眼可见肝肺转移灶(Figure 1)。

2.2 Lewis肺癌小鼠体重变化测定

与对照组比较,Avasimibe组小鼠体重增加($P=0.021$),其余各组未见明显增加或减轻(Figure 2, Table 1)。

2.3 Lewis肺癌小鼠瘤重及抑瘤率

Lewis肺癌小鼠瘤体质量比较差异有统计学意义($F=95.393, P=0.000$)。进一步经LSD-*t*检验可知:与对照组比较,其他各组瘤重均显著性降低(P 值均为0.000);与CTX组比较,CTX+Avasimibe组瘤重降低($P=0.044$);与Avasimibe组比较,CTX+Avasimibe组瘤重降低($P=0.017$)。

CTX组、Avasimibe组、CTX+Avasimibe组抑瘤率分别为53.45%、51.51%、62.22%($F=247.244, P=0.000$)。进一步经LSD-*t*检验,与对照组相比,其他各组抑瘤率均显著性增高(P 值均0.000),与CTX组相比,CTX+Avasimibe组抑瘤率升高($P=0.003$),与Avasimibe组相比,CTX+Avasimibe组抑瘤率升高($P=0.000$)(Figure 3, Table 2)。

2.4 Lewis肺癌小鼠胸腺重及胸腺指数测定

四组小鼠胸腺重比较差异有统计学意义($F=22.857, P=0.000$),进一步经两两比较LSD-*t*检验,与对照组比较,CTX组胸腺重显著性降低($P=0.001$),Avasimibe组胸腺重显著性升高($P=0.001$);与CTX组相比,Avasimibe组胸腺重显著性升高($P=0.000$),CTX+Avasimibe组胸腺重显著性升高($P=0.001$);与Avasimibe组相比,CTX+Avasimibe组胸腺重显著性降低($P=0.001$)。

四组小鼠胸腺指数比较差异有统计学意义($F=5.713, P=0.005$),进一步经两两比较LSD-*t*检验,与对照组比较,CTX组胸腺指数显著性降低($P=0.006$),与CTX组相比,Avasimibe组胸腺指数显著性升高($P=0.001$),与Avasimibe组相比,CTX+Avasimibe组胸腺指数降

低($P=0.044$)(Figure 4, Table 3)。

2.5 Lewis肺癌小鼠肿瘤组织ACAT-1表达测定

四组Lewis肺癌小鼠肿瘤组织ACAT-1蛋白表达水平比较差异有统计学意义($F=7.406, P=0.005$),

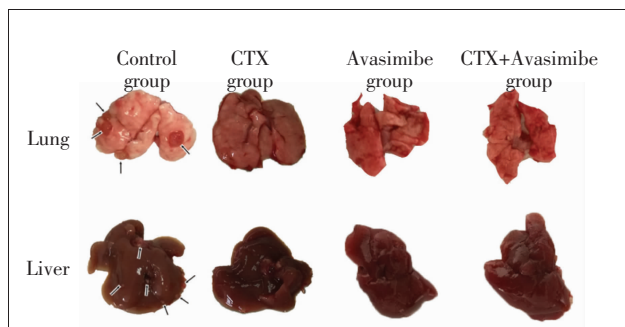


Figure 1 Liver and lung metastasis in four groups

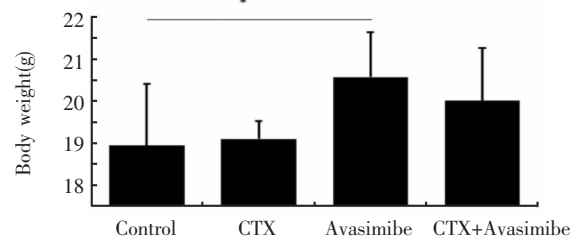


Figure 2 Body weight of Lewis lung cancer mice in four groups

Table 1 Comparison of body weight of Lewis lung cancer mice in four groups ($\bar{x}\pm s$)

Group	N	Body weight (g)
Control group	6	18.94±1.47
CTX group	6	19.10±0.42
Avasimibe group	6	20.57±1.07
CTX+ Avasimibe group	6	20.01±1.25
<i>F</i>		2.826
<i>P</i>		0.065

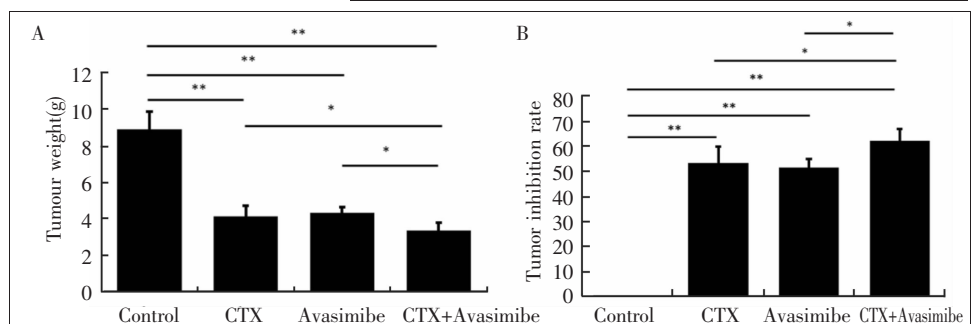


Figure 3 Tumor weight and tumor inhibition rate of Lewis lung cancer mice in four groups

进一步经组间两两比较 LSD-*t* 检验, Avasimibe 组和 CTX+Avasimibe 组瘤组织 ACAT-1 蛋白表达均低于对照组(*P* 值分别为 0.004、0.002)(Figure 5, Table 3)。

3 讨论

近年来, 肿瘤的代谢途径越来越受到众多学者

的关注, 糖代谢异常被视为肿瘤发生的始动因素。早在 20 世纪 50 年代德国科学家就提出沃伯格效应: 和正常细胞的氧化磷酸化代谢不同, 肿瘤细胞在富氧环境下仍进行有氧糖酵解代谢来提供生长所需的能量。丙酮酸脱氢酶复合物(PDC)是连接糖酵解和氧化磷酸化的重要纽带^[7]。PDC 含量降低可增强肿瘤细胞糖酵解作用, 这为肿瘤生长提供代谢优势^[8]。

ACAT-1 是丙酮酸脱氢酶(PDH)和丙酮酸脱氢酶磷酸酶(PDP)的上游基因, 它可使 PDHA-1 和 PDP-1 乙酰化进而下调 PDC 的含量^[9], A-CAT-1 可以促进肿瘤细胞的糖代谢。

ACAT-1 除了促进肿瘤细胞的糖代谢过程外, 在胆固醇代谢中也起关键调节作用, 它催化游离胆固醇转变成胆固醇酯^[10]。过去主要认为 ACAT-1 与心血管疾病关系密切, 许多 ACAT 抑制剂已被开发用于预防或治疗心血管疾病、阿尔兹海默症等疾病^[11,12]。目前研究发现 ACAT-1 与癌症发生发展关系密切。与正常细胞相比, 许多肿瘤细胞 ACAT-1 表达和活性均上调, ACAT-

Table 2 Comparison of tumor weight and tumor inhibition rate in four groups($\bar{x}\pm s$)

Group	N	Tumor weight(g)	Tumor inhibition rate(%)
Control group	6	8.89±0.99	-
CTX group	6	4.14±0.58	53.45±6.54
Avasimibe group	6	4.31±0.31	51.51±3.44
CTX+ Avasimibe group	6	3.36±0.42	62.22±4.78
<i>F</i>		95.393	247.244
<i>P</i>		0.000	0.000

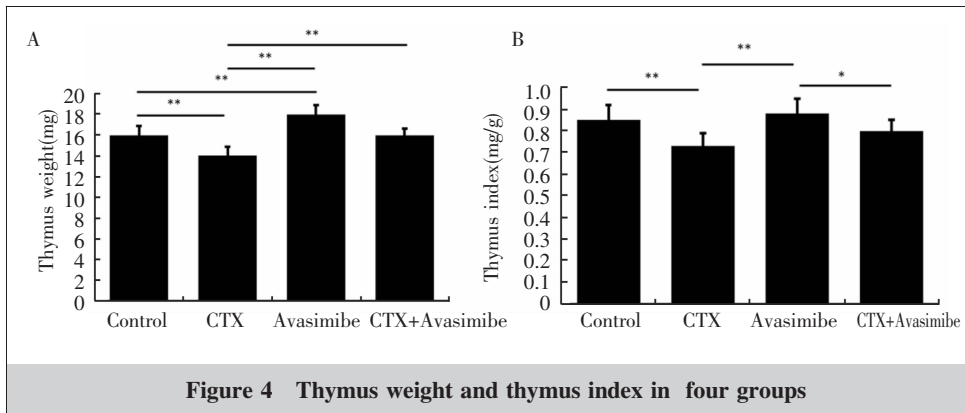


Figure 4 Thymus weight and thymus index in four groups

Table 3 Comparison of thymus weight and thymus index in four groups($\bar{x}\pm s$)

Group	N	Thymus weight(g)	Thymus index(mg/g)	ACAT-1 protein
Control group	6	16±0.89	0.85±0.07	0.59±0.16
CTX group	6	14±0.89	0.73±0.06	0.49±0.15
Avasimibe group	6	18±0.89	0.88±0.07	0.29±0.07
CTX+ Avasimibe group	6	16±0.63	0.80±0.05	0.24±0.07
<i>F</i>		22.857	5.713	7.406
<i>P</i>		0.000	0.005	0.005

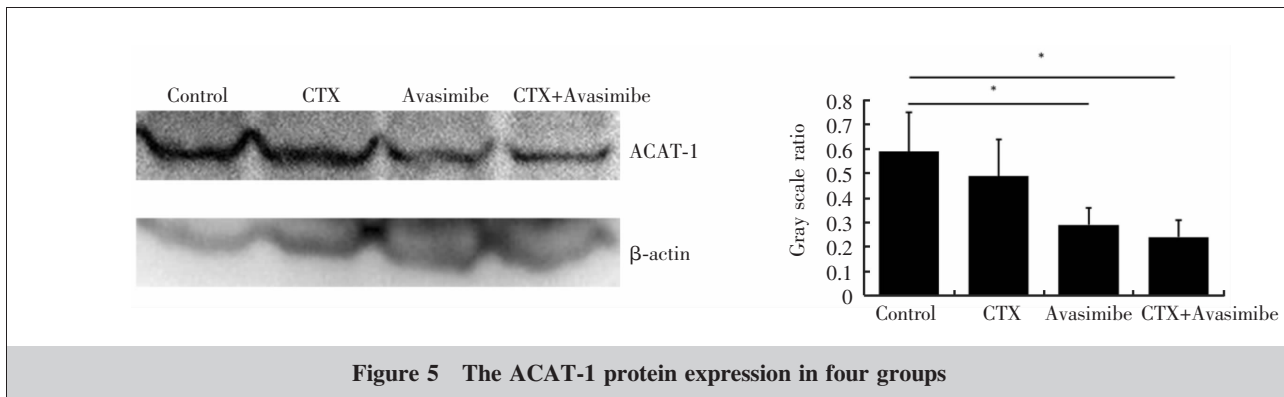


Figure 5 The ACAT-1 protein expression in four groups

1 抑制剂在体内和体外各种实验模型中显示出抗肿瘤活性。研究证明 ACAT-1 在人胰腺癌中高细胞及组织中高表达,ACAT-1 表达与患者生存率差相关^[13]。使用 ACAT-1 抑制剂阻断胆固醇酯化抑制慢性粒细胞白血病细胞增殖^[14]。研究报道可通过抑制 ACAT-1 可抑制三阴乳腺癌细胞的生长^[15],可以看出,ACAT/胆固醇酯化是一种有助于肿瘤细胞增殖和侵袭的新途径,靶向 ACAT-1 在治疗人类癌症中是一种有希望的治疗策略。

为探明 ACAT-1 与肺癌发生发展的关系,本实验通过动物移植性肿瘤实验法探讨 ACAT-1 抑制剂 Avasimibe 对 Lewis 肺癌模型小鼠肿瘤生长及转移的影响。研究发现,Avasimibe 组小鼠进食水量减少和行动迟缓现象较其他组明显较少,而且,通过比较小鼠体重变化发现 Avasimibe 不会减轻小鼠体重,说明 Avasimibe 对动物没有明显的不良影响。与对照组比较,各给药组对移植瘤均有抑制作用,而且 CTX+Avasimibe 组抑瘤作用优于环磷酰胺组,表明 Avasimibe 不仅单独使用具有抗肿瘤作用,而且与化疗药物环磷酰胺合用具有协同增效作用。与 CTX 组胸腺重、胸腺指数相比,Avasimibe 组小鼠胸腺重、胸腺指数明显升高,CTX+Avasimibe 组胸腺重升高,表明 Avasimibe 可以减轻 Lewis 肺癌模型小鼠免疫功能抑制,提高动物的免疫功能。与对照组及 CTX 组比较,Avasimibe 组和 CTX+Avasimibe 组瘤组织 ACAT-1 蛋白表达降低,可以说明 Avasimibe 抗肿瘤作用与 ACAT-1 蛋白表达量下调有关。

综上所述,Avasimibe 能够改善肺癌模型小鼠的生存质量,增加小鼠的胸腺重、胸腺指数,提高肿瘤细胞对免疫系统及抗癌药物的敏感性,抑制肿瘤细胞生长和转移,ACAT-1 可能可作为肺癌治疗的一个新靶点。

参考文献:

- [1] Allott EH,Masko EM,Freedland AR,et al. Serum cholesterol levels and tumor growth in a PTEN-null transgenic mouse model of prostate cancer [J]. Prostate Cancer Prostatic Dis,2018,21(2):196-203.
- [2] Li J,Gu D,Lee SS,et al. Abrogating cholesterol esterification suppresses growth and metastasis of pancreatic cancer[J]. Oncogene,2016,35(50):6378-6388.
- [3] Ohmoto T,Nishitsuji K,Yoshitani N,et al. K604,a specific acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 1 inhibitor,suppresses proliferation of U251-MG glioblastoma cells [J]. Mol Med Rep,2015,12(4):6037-6042.
- [4] Zhang L, Kim SB, Luitel K, et al. Cholesterol depletion by TASIN-1 induces apoptotic cell death through the ER stress/ROS/JNK signaling in colon cancer cells[J]. Mol Cancer Ther,2018,17(5):943-951.
- [5] Wu YP, Deng J, Ouyang SH, et al. Immune regulation effect of lienal polypeptides extract in Lewis lung carcinoma-bearing mice treated with cyclophosphamide [J]. Experimental Biology and Medicine,2018,243(1):66-77.
- [6] Yang W, Bai Y, Xiong Y, et al. Potentiating the antitumour response of CD8 (+) T cells by modulating cholesterol metabolism[J]. Nature,2016,531(7596):651-655.
- [7] Park S, Jeon JH, Min BK, et al. Role of the pyruvate dehydrogenase complex in metabolic remodeling:differential pyruvate dehydrogenase complex functions in metabolism [J]. Diabetes & Metabolism Journal,2018,42(4):270-281.
- [8] Zhao H, Jiang H, Li Z, et al. 2-Methoxyestradiol enhances radiosensitivity in radioresistant melanoma MDA-MB-435R cells by regulating glycolysis via HIF-1 α /PDK1 axis [J]. Int J Oncol,2017,50(5):1531-1540.
- [9] Fan J, Shan C, Kang HB, et al. Tyr phosphorylation of PDP1 toggles recruitment between ACAT1 and SIRT3 to regulate the pyruvate dehydrogenase complex[J]. Mol Cell,2014,53(4):534-548.
- [10] Rogers MA, Liu J, Song BL, et al. Acyl-CoA:cholesterol acyltransferases (ACATs/SOATs): enzymes with multiple sterols as substrates and as activators [J]. J Steroid Biochem Mol Biol,2015,151:102-107.
- [11] Zononi P, Khetarpal SA, Larach DB, et al. Rare variant in scavenger receptor BI raises HDL cholesterol and increases risk of coronary heart disease [J]. Science,2016,351(6278):1166-1171.
- [12] Chang TY, Yamauchi Y, Hasan MT. Cellular cholesterol homeostasis and Alzheimer's disease[J]. Journal of Lipid Research,2017,58(12):2239-2254.
- [13] Li J, Gu D, Lee SS, et al. Abrogating cholesterol esterification suppresses growth and metastasis of pancreatic cancer [J]. Oncogene,2016,35(50):6378-6388.
- [14] Bandyopadhyay S, Li J, Traer E, et al. Cholesterol esterification inhibition and imatinib treatment synergistically inhibit growth of BCR-ABL mutation-independent resistant chronic myelogenous leukemia[J]. PLoS One,2017,12(7):e0179558.
- [15] Shim SH, Sur S, Steele R, et al. Disrupting cholesterol esterification by bitter melon suppresses triple-negative breast cancer cell growth [J]. Molecular Carcinogenesis,2018,57(11):1599-1607.