

两种人乳腺癌裸鼠移植模型的建立

饶子亮, 黄 威, 郑佳琳, 孙 侠, 黄红坤, 钟志勇, 王 刚

(广东省医学实验动物中心, 佛山 528248)

【摘要】 目的 建立简便的人乳腺癌裸鼠移植模型,并探讨其部分生物学特性。**方法** 采用雌激素受体阴性的 MDA-MB-231 和 SK-BR-3 人乳腺癌细胞株,分别接种于 10 只裸鼠左侧腋窝皮下,移植细胞总数为 1×10^7 /只。观察肿块生长情况,第 42 天处死荷瘤鼠,切除肿块作病理切片。**结果** MDA-MB-231 接种后第 5d 在接种部位可见结节,成瘤率为 90% (9/10),接种 42 d 肿瘤体积 426.6 ± 333.8 ,瘤重 0.417 ± 0.276 ,病理学检查为浸润性导管癌;SK-BR-3 接种后第 11 天在接种部位可见结节,成瘤率为 80% (8/10),接种 42 d 肿瘤体积 357.5 ± 246 ,瘤重 0.325 ± 0.167 ,病理学检查为浸润性导管癌。**结论** 该方法建立的人乳腺癌裸鼠移植模型,皮下移植方法简单,易于操作,成功率较高,肿瘤可部分保持人乳腺癌生物学特性,为研究人乳腺癌提供了重要工具。

【关键词】 人乳腺癌;裸鼠;模型

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)05-0005-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7856.2012.05.002

Establishment of Two Human Breast Cancer Model in Nude Mice

RAO Zi-liang, HUANG Wei, ZHENG Jia-lin, SUN Xia, HUANG Hong-kun, ZHONG Zhi-yong, WANG Gang
(Guangdong Medical Laboratory Animal Center, Foshan 528248, China)

【Abstract】 Objective To establish proper model of human breast cancer in nude mice and study their biological features. **Methods** MDA-MB-231 and SK-BR-3 cells (ER-) were implanted into the left axilla of 10 nude mice. Tumor growth was observed, and the tumor-bearing mice were killed on day 42. The tumor masses were removed, and pathologically examined by the microscope. **Results** The MDA-MB-231 tumor tubercles could be formed on day 5. The tumor-take rate was 90% (9/10), and average volume and weight of the tumor were $(426.6 \pm 333.8) \text{ mm}^3$ and $(0.417 \pm 0.276) \text{ g}$ reparatively. The SK-BR-3 tumor tubercles could be formed on day 11. The tumor-take rate was 80% (8/10), and average volume and weight of the tumor were $(357.5 \pm 246.4) \text{ mm}^3$ and $(0.325 \pm 0.167) \text{ g}$ reparatively. All of the specimens were infiltrating ductal carcinoma. **Conclusion** We succeeded in establishing two human breast cancer model in nude mice, which reserved certain biological features of human breast cancer, therefore it may be an available model for further research of breast cancer.

【Key words】 Human breast cancer; Nude mice; Model

乳腺癌是一种严重危害妇女健康的恶性肿瘤,其发病率在世界范围内呈上升趋势,居妇女恶性肿瘤的首位或第 2 位^[1]。在对其生物学行为的认识

及发展新的治疗方法上,乳腺癌动物模型起着举足轻重的作用^[2-4]。在实践中人们发现,由于乳腺癌细胞株自身的生物学特性所限,很多人乳腺癌细胞

[基金项目] 2009 年广东省医学科研基金 (A2009131)。

[作者简介] 饶子亮 (1983-), 男, 实验师, 从事抗肿瘤药物筛选研究。

[通讯作者] 王刚 (1966-), 男, 高级兽医师, 从事实验动物和比较医学研究工作, E-mail: gdm lac@gmail.com。

株在小鼠模型上成瘤率很低,大大影响了建模的稳定性和可靠性^[5]。目前国内报道的乳腺癌模型多数来源于动物或者需要手术,且缺少对人源性乳腺癌模型制作的报道。本研究的目的是建立简便的人乳腺癌裸鼠移植模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物与饲养条件

SPF 级 BALB/c 裸鼠 20 只,雌性,周龄 5 ~ 6 周,由广东省医学实验动物中心提供[SCXK(粤)2008-0002]。裸鼠饲养在广东省医学实验动物中心 SPF 级实验动物室 IVC 系统内,动物实验环境设施合格证号:SYXK(粤)2008-0002,室内保持 20 ~ 25 ℃,湿度 40 ~ 70 %,自由饮水、进食,水料充足,SPF 级饲料产自广东省医学实验动物中心。

1.2 细胞

MDA-MB-231 和 SK-BR-3 乳腺癌细胞来源于中科院上海细胞库。

1.3 主要试剂和仪器

RPMI 1640 培养基, GIBCO 公司生产,批号:8110164;胎牛血清: GIBCO 公司生产,批号:20091031;青/链霉素双抗,杭州吉诺生物医药有限公司生产,批号:10081201;胰酶,杭州吉诺生物医药有限公司生产,批号:10210302。

倒置显微镜,日本奥林巴斯产品,型号:CKX41;无菌超净台,苏州净化有限公司,型号:SW-CJ-2FD;恒温 CO₂ 孵箱,美国 Thermo,型号:311。

1.4 实验方法

取对数生长期的 MDA-MB-231 和 SK-BR-3 细胞,经胰酶消化后,用 Hank 液清洗 2 次,再用 1% 锥虫蓝染色,在细胞计数板上作细胞计数,并调节使活细胞浓度为 5 × 10⁷/mL,于裸鼠左侧腋窝皮下接种 0.2 mL/只,各接种 10 只。肿瘤细胞接种后,每 d 观察肿瘤生长情况,每周测量肿块的大小。按公式 V = 1/2 × 长 × 宽 × 宽,计算肿瘤大小,并绘制生长曲线。第 30 天脱颈处死荷瘤鼠,皮下剥离肿瘤称重,记录质地、浸润、血供情况,观察有无粘连,各脏器转移状况,将肿瘤组织置于 10% 的福尔马林固定液中待检。

1.5 病理学检测 上述标本常规石蜡包埋切片,HE 染色,光镜观察。

1.6 数据处理

所有数据均运用 SPSS11.0 进行 t 检验分析,各

组计算数据均采用($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 裸鼠体重

裸鼠接种 MDA-MB-231 和 SK-BR-3 乳腺癌细胞后,体重均缓慢增长。

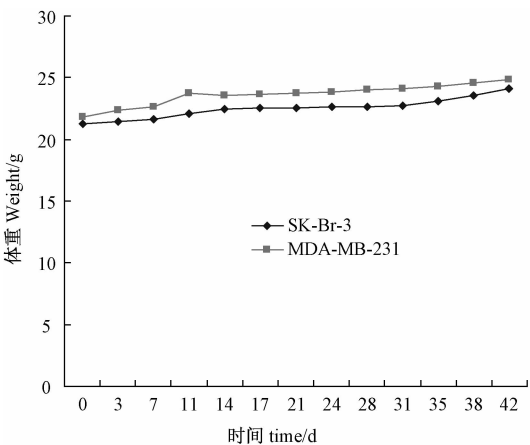


图 1 接种乳腺癌细胞后裸鼠体重变化情况

Fig. 1 Weight changes in nude mice after the inoculation of breast cancer cells

2.2 肿瘤生长状况

MDA-MB-231 移植瘤 5 d 潜伏期后,接种部位皮下可见灰白色结节,后呈圆形或椭圆形生长,自接种第 7 天肿瘤可测量开始,每周测量肿瘤体积大小,绘制生长曲线见图 2。肿瘤生长较缓慢,接种成功率为 90 % (9/10)。接种 42 d 后,肿瘤平均体积达到 426.6 mm³,瘤重 0.417 g,见表 1。

SK-BR-3 移植瘤 11 d 潜伏期后,接种部位皮下可见灰白色结节,后呈圆形或椭圆形生长,自接种第 14 天肿瘤可测量开始,每周测量肿瘤体积大小,绘制生长曲线见图 2。肿瘤生长缓慢,接种成功率为 80 % (8/10)。接种 42 d 后,肿瘤平均体积达到 357.5 mm³,瘤重 0.325 g,见表 1。

表 1 42 d 乳腺癌裸鼠移植瘤体积和重量
Tab.1 42 d Tumor volume and Weight in the breast tumor-bearing nude mice

乳腺癌细胞 Breast cancer cell	n	瘤体积 Tumor volume (mm ³)	瘤重量 Tumor weight (g)
MDA-MB-231	9	426.6 ± 333.8	0.417 ± 0.276
SK-BR-3	8	357.5 ± 246.4	0.325 ± 0.167

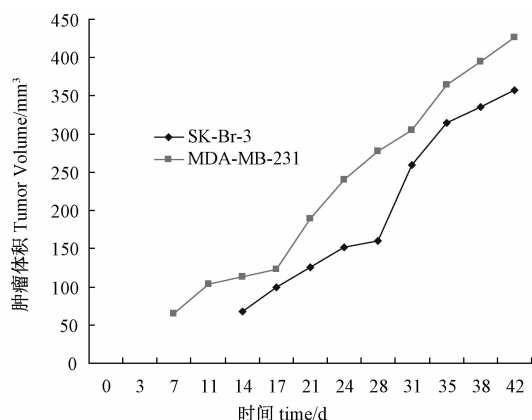


图 2 移植瘤生长曲线

Fig. 2 Growth curve of the transplanted tumors

2.3 尸检结果

肉眼观查,两种肿瘤呈椭圆形包块,包膜完整,中等硬度,切面呈灰白色。除个别有局部浸润外,大多与周围组织分界清楚,较易剥离,未见腹水生成及组织粘连,各脏器表面光滑,未见结节。

2.4 病理检查结果

MDA-MB-231 细胞株移植瘤组织,镜下见肿瘤细胞呈不规则的团块状及片状分布,分化程度低,肿瘤细胞异型性明显,细胞核呈圆形或卵圆形,细胞核大,核异型性明显,易见核分裂象。9 例组织中,4 例见坏死面积占切片总面积的 5% ~ 25%,记 1 分;5 例见坏死面积占切片总面积的 25% ~ 50%,记 2 分。(彩插 1 图 5)

SK-BR-3 细胞株移植瘤组织,镜下见肿瘤细胞呈不规则的团块状及片状分布,分化程度低,肿瘤细胞异型性明显,细胞核呈圆形或卵圆形,细胞核大,核异型性明显,易见核分裂象。8 例组织中(A1-4)均见坏死面积占切片总面积的 25% ~ 50%,记 2 分。(彩插 1 图 6)

3 讨论

小鼠模型一直是乳腺癌医学研究的一个重要基础,乳腺癌细胞的成瘤是建模的一个关键部分。然而,受某些生物学特性的影响,很多乳腺癌细胞株在小鼠模型上的成瘤率往往较低。一些研究在体外实验向体内实验的过渡中,往往因此而增加工作量,甚至受到阻碍^[6,7]。有学者推测,小鼠体内的雌激素水平远低于人类是导致这一现象的主要原因,由此需通过各种方法向实验鼠体内输入雌激素。但多数给药方法如灌胃或注射,操作重复繁琐,且不符合生理,剂量难以掌握,以至于收效甚

微。更重要的是,极为频繁的给药操作对小鼠造成了很大的伤害和扰动,将干扰实验结果。最为成功的皮下埋植缓释剂因价格过于昂贵和起效时间达不到实验要求而应用受到限制。值得注意的是,雌激素水平只是众多干扰因素的一种,不能解释所有细胞株的问题。

本研究结果显示:肿瘤细胞移植后,荷瘤裸小鼠在 SPF 级环境 IVC 系统中存活、生长良好,易于饲养。皮下移植方法简单,易于操作,成功率较高,MDA-MB-231 达到 90% (9/10),SK-BR-3 达到 80% (8/10)。肿瘤生长情况易于观察。肿块切除后行病理学切片检查拟诊为浸润性导管癌,说明移植的肿瘤细胞保持了人乳腺癌肿瘤细胞的部分病理学特点及生物学特性,为临床治疗及疗效判断提供了可靠的工具。实验过程中观察到,肿瘤细胞移植后 1 周左右,即有肿瘤存活生长征象,并逐渐长大,肿瘤生长缓慢。由于肿瘤生长在皮下,非常容易观察实验药物的疗效及肿瘤大小的变化,可用于乳腺癌生长观察及药物的疗效研究。

为了提高肿瘤的接种成功率应注意以下几个方面:①裸鼠周龄控制在 5 ~ 6 周,最好饲养于 SPF 级环境 IVC 系统内。②细胞状态要好,生长旺盛,无污染;接种时要取对数生长期细胞,活细胞数要 > 95%。③要确保细胞数量,本实验使用的是 1×10^8 /mL,可多次计数然后取均值确保计数准确。④皮下接种时,以近头侧成功率高,且以腋窝为佳^[8]。⑤注射器抽吸瘤细胞悬液时要混匀,注射时要使细胞积聚成团在皮下形成皮丘,抽针后要夹针孔防外溢。⑥进行批量接种时应在 1 h 内注射完毕,时间过长肿瘤细胞易死亡,导致接种失败^[9]。

参考文献:

- [1] 李树玲. 乳腺肿瘤学[M]. 北京:科学技术出版社,2000: 3-7.
- [2] 余微波,谷俊朝. 乳腺癌动物模型的建立[J]. 国外医学外科学分册,2005,32(1): 63-66.
- [3] Hutchinson JN, Muller WJ. Transgenic mouse models of human breast cancer[J]. Oncogene,2000,19: 6130-6137.
- [4] 白绍槐,赵扬冰,张旋波,等. 人乳腺浸润性导管癌裸鼠移植模型的建立[J]. 华西医科大学学报,1999,30(2): 220-221.
- [5] 夏添松,王珏,肇毅,等. 人源性乳腺移植模型:有效提高人源性乳腺癌细胞株在小鼠原位成瘤率的途径[J]. 外科理论与实践,2010,15(1): 47-50.
- [6] Kerbel RS. Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than

- commonly perceived-but they can be improved[J]. *Cancer Biol Ther*, 2003, 2(4 Suppl 1): S134 – S139.
- [7] Sausville EA, Burger AM. Contributions of human tumor xenografts to anticancer drug development[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(7): 3351 – 3354.
- [8] 龚张斌, 陈涛. 胃癌动物模型制作概况[J]. *肿瘤学杂志*, 2002, 8(5): 35 – 37.
- [9] 田庆锷, 李玛琳. 人肿瘤细胞悬液裸鼠皮下接种及影响移植成功的因素. *实验动物科学与管理*, 2004, 21(3): 47 – 50.
- [修回日期] 2012-03-09