维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2003)03-0398-04

乳腺癌裸鼠移植模型的制作概况

汪 毅 综述,任国胜 审校

(重庆医科大学临床学院普外科,重庆 400016)

【中国图书分类法分类号】R737.9 【文献标识码】B 【收稿日期】2001-10-18

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,1999 年美国约新增 176300 例乳腺癌,约 43700 人死于该疾病[1]。近 30 年来,尽管各种各样的化疗和内分泌治疗手段不断涌现,但在晚期乳腺癌病人中,有明显治疗效果的病例仅占 30%~40%,显效时间仅 12~18 个月[1]。进一步了解乳腺癌发生、发展的机制,开发新的和有效的治疗方法具有重要的意义。人乳腺癌(Human breast cancer,HBC)异种移植模型可以在体内环境研究乳腺癌的生长和转移,是我们探讨乳腺癌恶性机制,发展和筛选新的治疗方法的有效手段之一,广泛用于乳腺癌的研究。本文就 HBC 裸鼠移植模型制作的相关方面作一综述。

1 裸鼠对移植模型建立的影响

裸鼠即纯合子 nu/nu 基因突变小鼠,全身形似无毛,呈裸体状,无胸腺,T 细胞不能正常分化,因此没有 IgG 和 IgA 反应,对来自异体的组织没有排斥作用,是目前应用最广泛的异种移植模型[2]。大多数肿瘤在裸鼠体内保持了自己的形态学和生物化学特征,移植模型对抗癌药物的反应常可提示临床肿瘤的反应,肿瘤的生物学行为在其自然宿主和裸鼠体内的一致性为裸鼠成为研究人类肿瘤的模型提供了充分的依据[3]。

裸鼠并不是完全免疫缺陷,其 NK 细胞约占外周淋巴细胞的 1%~2.5%,明显超过同一背景的正常和杂合子 nu/+ 小鼠[2],成年裸鼠(4~8 周)体内 NK 细胞活性比幼鼠(3~4 周)高[3]。NK 细胞不仅有抗肿瘤活性而且可以控制肿瘤转移,人类肿瘤裸鼠移植后其转移能力差部分原因就是因为 NK 水平较高。药理学浓度的 17β-雌二醇(E_2)可以抑制裸鼠的 NK 活性,给移植 ER^- 肿瘤的裸鼠一定量的 E_2 可以促进肿瘤的转移[2]。Matrigel 混合物增加异种移植瘤的成活率也可能是因为它形成一个有效的屏障,使肿瘤细胞免于局部免疫效应细胞的攻击[2]。

2 移植模型的建立

HBC 裸鼠移植模型的建立包括原代移植和细胞株移植,后者应用较广泛。

2.1 原代移植

将 HBC 活检标本切成细小的组织块(3~5mm)或制成匀浆植入裸鼠,但新鲜乳腺癌标本成瘤率较低,约为 6%~15%,为本模型不足之处[4]。与细胞株移植不同,原代移植细胞到达指数生长期和形成转移有一个较长的滞后期[5]。Rae-Venter 等[6]将 HBC 原代移植细胞在裸鼠体内的生长曲线分成三个期:①大部分组织降解期;②剩余组织存活期;③"适应"环境细胞的生长期。第一代形成血管需要 1 个月,第一代以后只需 3~4 天,移植之前用酶和机械的方法对组织进行解聚并不能使这种首代 1 个月的血管化期缩短,也不能减少一些肿瘤首次生长所需的长达 6 个月的"适应期"[6]。

2.2 细胞株移植

细胞株是由 HBC 恶性渗出液中的癌细胞建株,渗出液能提供大量分散、有活力的癌细胞,而且成纤维细胞污染少或没有污染[7]。细胞株能密切反映 HBC 的特性,如用 ZR-75-1 细胞株建立的移植瘤,其形态与亲代肿瘤一致,细胞培养明显呈上皮性,具有乳腺癌细胞的超微结构特征和人类染色体核型,对甾体类激素敏感[7]。Alpaugh 等[8]报道一炎性乳腺癌细胞株 MARY-X,主要在淋巴管和血管生长,表面皮肤出现明显红斑,肿瘤标记物 ER/

作者介绍:汪 毅(1966-),男,硕士研究生,主要研究方向:乳腺癌。

维普资讯 http://www.cqvip.com

PGR、P53、表皮生长因子及 E－钙粘着蛋白、MUC1 同来源肿瘤均一致。

大部分 HBC 细胞株在裸鼠体内可形成肿瘤，有些细胞株还可在裸鼠体内转移。HBC 细胞株移植后大多形成腺癌，ER^+ 细胞株形成的腺癌分化程度常常较高，而 ER^- 细胞株形成腺癌分化较差[2]。现在应用较广泛 ER^+ 细胞株的有 MCF－7、T47D 和 ZR－75－1，ER^+ 肿瘤在病人体内常有侵润和转移，而在裸鼠体内移植后局部浸润不多，转移也少见。在裸鼠模型中有转移能力的细胞株多为 ER^-，如 MDA－MB－231 和 MDA－MB－435 细胞株，不仅能局部浸润，还可转移到肺和其它器官[2]。

细胞株在研究乳腺癌细胞生物学，开发新的治疗方案等方面起了重大作用。

3 提高移植成功率的方法

如上所述，HBC 标本原代移植成瘤率常常很低，Giovaella 等[9]将 262 例乳腺浸润性导管癌标本植入裸鼠皮下，仅 16 例(6.1%)生长并传代，发现其中 8 例 C－$erbB_2$/neu 表达增高。实际上在人乳腺癌中仅 15%～30%的标本的 C－$erbB_2$/neu 表达增高，所以认为这一小部分在裸鼠体内生长的乳腺癌是一些恶性程度较高的肿瘤，不能代表所有乳腺癌。目前提高移植成功率的方法有以下几种：

3.1 将 HBC 细胞植入裸鼠的乳房脂肪垫(Mammary fad pat，mfp)，又称原位移植，不仅可以提高乳腺癌细胞的成瘤率而且可以增加转移的发生率。Price 等[10]利用细胞株 MDA－MB－231 和 MDA－MB－435 实验发现，与皮下注射比较，mfp 注射裸鼠产生肿瘤所需细胞数较少，将这两个细胞株以 10^5 的细胞量注射，mfp 途径成瘤率为 100%，而皮下途径为 40%，mfp 途径出现肿瘤几周后才见皮下途径产生肿瘤。mfp 明显的营养效果是乳腺癌细胞专有的，因为在同一个实验中用人的结肠癌、肾癌、黑色素瘤细胞重复实验发现，这些细胞 mfp 和皮下途径成瘤率相差不大。组织学检查证实皮下途径形成的肿瘤，形成的血管较差，坏死更广泛，mfp 途径形成的肿瘤纤维包裹较少。mfp 移植的方法是：麻醉裸鼠，切开一个约 5mm 的小口，暴露 mfp，以保证注射物在 mfp 内而不在皮下。

3.2 另一种促进肿瘤细胞在裸鼠体内形成肿瘤的方法是将癌细胞和 Matrigel 或成纤维细胞混合后注入裸鼠体内。

Matrigel 是由层粘连蛋白、Ⅳ型胶原纤维、硫酸乙酰肝素和巢蛋白组成的混合物，在 4℃ 为液体，而在 37℃ 则聚合形成一种凝胶[4,11]。Mehta 等[4]将 41 例 HBC 病人标本在裸鼠皮下原代接种，不加 Matrigel 成瘤率为 7.3%，没有远处转移，加 Matrigel 后成瘤率为 50%，并有肿瘤出现远处转移。从组织学上看，转移瘤与病人肿瘤和移植瘤一样。Matrigel 作为载体提高 HBC 标本原代移植瘤的发生率与提供标本病人的年龄、性别、诊断时的淋巴结状况无关。Bao[12]研究 MDA－MB－435 及其四个克隆细胞株 C1、C2、C3 和 C4(其中两个有转移能力)发现，Matrigel 能促进所有细胞株在局部的生长，但不能使没有转移能力的细胞株发生转移。原位移植和 Matrigel 在促进肿瘤生长和转移有协同作用。Fridman 等[11]认为 Matrigel 促进肿瘤细胞生长呈剂量效应关系，当肿瘤细胞数量很少如针吸活检标本与 Matrigel 混合后也是可行的。此外，Matrigel 不能促进正常细胞在裸鼠体内的生长，因而可淘汰标本中的正常细胞。Matrigel 提高成瘤率和促进转移，可能有两个原因[2]：①形成一个屏障，使癌细胞免于巨噬细胞、NK 和 LAK 前体细胞杀肿瘤细胞的作用；②提供一个自然的结构或立体空间，使瘤细胞接近一些粘附分子或促有丝分裂分子，如层粘连蛋白、纤维连接蛋白和Ⅳ型胶原纤维。

成纤维细胞也有提高癌细胞成瘤率和促进转移的作用[13,14]，其与成纤维细胞的来源和性质无关。成纤维细胞释放很多细胞因子，直接刺激肿瘤细胞的生长和促进血管形成，从而影响肿瘤的生长。

3.3 移植瘤的生长还与内分泌因素有关。

3.3.1 ER^+ 细胞株在裸鼠体内形成肿瘤需补充一定量的雌激素，常用 E_2 缓释丸，或每天皮下注射 E_2，使裸鼠血清 E_2 保持在一个较高水平，如 0.72mg 的缓释丸在 60 天内使 E_2 保持在 300～400pg/ml。Etreby 等[15]。认为，只有当动物补充一定量外源性 E_2 肿瘤才进行性生长，否则，即使在未切除卵巢的雌鼠内也无肿瘤生长。可能是动物雌激素水平太低，不能支持肿瘤的生长，如果取出 E_2 缓释丸除去它的作用，肿瘤就会消退。

3.3.2 抗雌激素和抗孕激素药物也能影响移植瘤的生长。抗雌激素药物三苯氧胺对 70% 以上的 ER^+ 肿瘤有抑制作用，但大多数最终形成三苯氧胺

维普资讯 http://www.cqvip.com

抵抗,它不是抑制而是促进肿瘤生长,这是因为三苯氧胺是一个具有雌激素和抗雌激素活性的混合物。目前出现一种称为 EM－800 的第三代选择性雌激素受体拮抗剂,具有高效、专一性的特点,它不仅抑制 ZR－75－1 移植瘤的生长,还具有很强的细胞毒性作用,使肿瘤细胞消失[1,16]。Etreby 等[15]利用 MCF－7 的裸鼠模型研究了抗孕激素药物(mifepristone 与 onapristone)对雌激素依赖肿瘤的作用,发现单用抗孕激素和三苯氧胺都有抗肿瘤作用,但二者联合应用不仅可以完全控制肿瘤的发生,而且可以防止肿瘤形成抗雌激素抵抗。

3.3.3 内分泌因素对移植瘤的作用也与细胞株有关。T61 是另一种 ER^+ 细胞株,与 MCF－7 不同,雌激素对其生长有明显抑制作用,这种抑制作用是由 IGF－Ⅱ负调节介导的。T61 肿瘤的生长同时也可被三苯氧胺抑制。雌激素的抑制作用与剂量有关,并可使肿瘤完全消失,而三苯氧胺仅使肿瘤细胞处于静止状态,二者之间无交叉抑制作用[17]。而对于 ER^- 细胞株,Miyazaki 等[18]发现铃蟾肽(bombesin)或胃泌素释放肽(GRP)拮抗剂 RC－3095 和 RC－3940－Ⅱ能抑制 MDA－MB－231 肿瘤的生长,二者使肿瘤体积分别减少 72.4% 和 57.7%,并大大降低肿瘤的重量,认为二者可用作 ER^- 乳腺癌的内分泌治疗。

4 转移模型的建立

4.1 同大多数实体瘤一样,乳腺癌病人死亡的主要原因是转移和复发,转移是肿瘤细胞最难复制的特性[13]。Hust 等[5]将一例 HBC 标本的碎片移植于裸鼠皮下,形成肺转移,这是原代移植成功形成肺转移唯一的报道。转移模型的建立与所用肿瘤细胞本身特性、接种的位置、裸鼠的状况(饮食、健康状况、体内 NK 细胞活性、鼠龄)有关[3,13,19]。

4.2 Price 等报道[10]将 HBC 细胞株 MDA－MB－435 注入裸鼠的 mfp,肿瘤在局部生长、侵润并转移,转移率为 80%～100%,主要转移部位是淋巴结和肺,也有肌肉、肾上腺、心脏转移,偶尔出现脑转移,形成的肿瘤的大小,与肺内形成的转移病灶数成正相关。皮下注射仅 20%～40% 的裸鼠出现转移。经静脉注入裸鼠体内,在肺内可形成很少的转移灶。MDA－MB－231 能在原位成瘤,但很少产生肉眼可见的转移灶。

肿瘤转移能力与 mfp 部位也有关。Mescher 等[20]发现将肿瘤细胞接种在裸鼠胸部 mfp 形成的肿瘤,比接种在腹股沟处 mfp 的肿瘤转移率高,转移瘤的体积也更大。组织学发现腹股沟 mfp 肿瘤经腹腔内淋巴结转移,而胸部 mfp 肿瘤主要经血道转移。

4.3 同一细胞株采用不同的接种途径,转移部位不同。尾静脉注射形成肺转移,门静脉和脾内注射形成肝转移,颈动脉注射或大脑内注射形成脑转移,左室内注射形成脑转移或骨转移[13]。Rye 等[21]报道 HBC 细胞株 MAll 经左心室注射 87% 裸鼠发生脑转移,具有明显的器官选择性。Wang 等[22]报道将 MDA－MB－435 细胞注入裸鼠股骨骨髓形成骨转移,能观察到乳腺癌病人骨转移的溶骨和成骨细胞活性。

5 不足之处

HBC 裸鼠移植模型在研究乳腺癌许多方面具有重要的价值,有很强的重复性和稳定性,模型与临床乳腺癌之间的相同点是客观存在的。尽管此模型具有肿瘤细胞来源于人类的优点,但细胞已经转化,因而在研究肿瘤的早期阶段(如启动阶段)价值就有限,当细胞株产生体外生长适应现象后,这种模型的价值就更小了[23]。

参 考 文 献

[1] Couillard S, Labrie C, Gauthire S, et al. Long－term inhibitory effect of the orally active and pure antiestrogen EM－800 on the growth of human breast cancer xenografts in nude mice[J]. Int J Cancer, 2000; 85:424－429.

[2] Clarke R. Human breast cancer cell line xenografts as models of breast cancer—The immunobiologies of recipient mice and the characteristics of several tumorigenic cell lines[J]. Breast Cancer Res Treat, 1996; 39:69－86.

[3] Kozlowski JM, Fidler I J, Campbell D et al. Metastatic behavior of human tumor cell lines grown in the nude mouse [J]. Cancer Research, 1984; 44:3522－3529.

[4] Mehta RR, Graves JM, Hart GD et al. Growth and metastasis of human breast carcinomas with Matrigel in athymic mice[J]. Breast Cancer Res Treat, 1993; 25:65－71.

[5] Hurst J, Maniar N, Tombarkiewicz J, et al. A novel model of a metastatic human breast tumour xenograft line[J].

维普资讯 http://www.cqvip.com

Br J Cancer, 1993; 68:274 - 276.

[6] Rae - Venter B, Reid LM. Growth of human breast carcinomas in nude mice and subsequent establishment in tissue culture[J]. Cancer Resarch 1980; 40:95 - 100.

[7] Engel LW, Young NA, Tralka TS et al. Establishment and characterization of three new continuous cell lines derived from human breast carcinomas[J]. Cancer Research, 1978; 38:3352 - 3364.

[8] Alpaugh ML, Tomlinson JS, Shao ZM, et al. A novel human xenograft model of inflammatory breast cancer[J]. Cancer Researsh, 1999; 59:5079 - 5084.

[9] Giovanella BC, Vardeman DM, Willams LJ, et al. Heterotransplantation of human breast carcinomas in nude mice. correlation between successful heterotransplants, poor prognosis and amplification of the Her - 2/neu oncogene[J]. Int J Cancer, 1991; 47:66 - 71.

[10] Price JE, Polyzos A, Zhang RD, et al. Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice [J]. Cancer Research, 1990; 50:717 - 721.

[11] Fridman R, Kibbey MC, Royce LS, et al. Enhanced tumor growth of both primary and established human and murine tumor cells in athymic mice after coinjection with Matrigel[J]. J Natl Cancer Inst, 1991; 83:769 - 774.

[12] Bao L, Matsumura Y, Badan D, et al. Effect of inoculation site and Matrigel on growth and metastasis of human breast cancer cells[J]. Br J Cancer, 1994; 70:228 - 232.

[13] Price JE. Metastasis from human breast cancer cell lines [J]. Breast Cancer Res Treat, 1996;39:93 - 102.

[14] Picard O, Rolland Y, Poupon MF. Fibroblast - dependent tumorigenicity of cells in nude mice: Implication for implantation of metastases[J]. Cancer Research, 1986:46:3290 - 3294.

[15] Etreby FE, Liang YY. Effect of antiprogestins and tamoxifen on growth inhibition of MCF - 7 human breast cancer cells in nude mice[J]. Breast Cancer Res Treat, 1998; 49:109 - 117.

[16] Couillard S, Gutman M, Labrie F, et al. Effect of combined treatment with the pure antiestrogen EM - 800 and radiotherapy on the growth of human ZR - 75 - 1 breast cancer xenografts in nude mice[J]. Cancer Research, 1999; 59:4857 - 4863.

[17] Brünner N, Spang - Thomsen M, Cullen K. The T61 human breast cancer xenograft: An experimental model of estrogen therapy of breast cancer[J]. Breast cancer Res Treat, 1996;39:87 - 92.

[18] Miyazaki M, Lamharzi N, Schally AV, et al. Inhibition of growth of MDB - MA - 231 human breast cancer xenografts in nude mice by bombesin/gastrin releasing peptide (GRP) antagonists RC - 3940 - II and RC - 3095[J]. Eur J Cancer, 1998; 34:710 - 717.

[19] Connolly JM, Liu XH, Ross DP. Effects of dietary menhaden oil, soy, and a cyclooxygenase inhibitor on human breast cancer cell growth and metastasis in nude mice[J]. Nutr Cancer, 1997;29:48 - 54.

[20] Meschter CL, Connolly JM, Rose DP. Influence of regional location of the inoculation site and dietary fat on the pathology of MDA - MB - 435 human breast cancer cell - derived tumors grown in nude mice[J]. Clin Exp Metastasis, 1992:10:167 - 173.

[21] Rye PD, Norum L, Olsen DR, et al. Brain metastasis model in athymic nude mice using a novel MUC1 - secreting human breast - cancer cell line, MA11[J]. Int J Cancer, 1996; 68:682 - 687.

[22] Wang CY, Chang YW. A model for osseous metastasis of human breast cancer established by intrafemus injection of the MDA - MB - 435 cells in nude mice[J]. Anticancer Res, 1997; 17:2471 - 2474.

[23] Clarke R. Animal models of breast cancer: their diversity and role in biomedical research[J]. Breast Cancer Res Treat, 1996;39:1 - 6.

(上接第 393 页)

[23] Singh I, Ramteke VK. The role of omental transfer in Buerger's disease: New Delhi's experience[J]. Aust N I J Surg, 1996;66(6):372 - 376.

[24] Isner JM. Baumgartner I, Rauh G, et al. Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's hisease) by intramuscular gene transfter of vascular endothelial growth factor: preliminary clinical result[J]. J Vasc Surg, 1998;28(6):964 - 973.

[25] Treska V, Cechura M. Surgical aspects of Buerger's disease[J]. Bratisl Lek Listy, 1995;96(10):570 - 572.