

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.11.007

乳腺癌体外骨转移瘤 3D 模型的建立 *

赵一浦 叶威良 白少柏 张邦乐 周四元[△]

(第四军医大学药理学系药理学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的: 构建乳腺癌体外骨转移瘤 3D 模型。**方法:** 新生 CD-1 小鼠的颅骨单独孵育为正常组, 新生 CD-1 小鼠的颅骨与 MDA-MB-231 细胞低氧共孵育四天为模型组。通过扫描电镜(SEM)鉴定骨转移瘤模型, 中性红染色法鉴定骨组织中的破骨细胞, 硝酸银复染法观察骨的溶解, 结晶紫染色法观察骨转移瘤模型中肿瘤细胞的生长。**结果:** 正常组骨表面光滑完整; 模型组骨组织表面黏附大量肿瘤细胞, 破骨细胞活性增强, 产生严重的溶骨, 表面出现骨陷窝, 骨纤维发生断裂。**结论:** 成功建立了乳腺癌骨转移瘤体外 3D 模型, 该模型能够模拟体内骨转移瘤微环境。

关键词: 乳腺癌; 骨转移瘤; 3D 模型

中图分类号: R-33; R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2017)11-2028-04

Construction of Ex-vivo 3D Breast Cancer-bone Metastasis Model*

ZHAO Yi-pu, YE Wei-liang, BAI Shao-bo, ZHANG Bang-le, ZHOU Si-yuan[△]

(Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: This study aimed to construct an ex-vivo 3D breast cancer bone metastasis model. Calvaria which incubated with MDA-MB-231 cells for 4 days in a hypoxia systems as model group. **Methods:** Calvaria from neonatal CD-1 mice as normal group, which incubated with MDA-MB-231 cells for 4 days in a hypoxia systems model group. The bone morphology and bone resorption of advanced breast cancer with bone metastasis were detected by scanning electron microscope (SEM) to authenticate the success of model, NR staining to distinguish the osteoclast, silver nitrate counter staining to observe the osteolysis and crystal violet staining to observe the growth of tumor cells in bone metastases site. **Results:** The surface of bone tissue was smooth in normal group. After calvaria incubated with MDA-MB-231 cells for 4 days, the bone fiber was fractured, bone lacuna was developed, the activity of osteoclast was increased and the osteolysis was severe. **Conclusion:** The ex-vivo 3D breast cancer-bone metastasis model successfully simulated bone metastasis in-vivo micro-environment.

Key words: Breast cancer; Bone metastatic; 3D model

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.9 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)11-2028-04

前言

骨的生理环境能促进肿瘤细胞的黏附侵袭, 成为乳腺癌、前列腺癌、肺癌等癌症的好发转移部位, 其中 65 %-70 % 的乳腺癌晚期患者发生肿瘤骨转移^[1]。肿瘤骨转移患者会产生如疼痛、病理性骨折、脊髓压迫、高钙血症等一系列骨相关事件 (skeletal related events, SRE), 严重影响患者的生存质量, 降低患者生存率, 这一现象引起了临床和基础研究工作者的关注。

目前常用模型是通过肿瘤细胞系与动物共同建立的体内移植瘤模型^[2,3], 而在肿瘤发生转移部位细胞与细胞, 细胞与基质的相互作用对肿瘤形态的变化起着重要的作用, 体内移植瘤模型不能展现出所有的体内生理过程, 适用性差。另外建立体内骨转移瘤模型消耗费用多, 周期长。

3D 模型的微环境包含细胞外基质, 与体内的环境基本接近^[4], 从形态学、细胞学、生物学的角度, 将体内模型中无法直观

可见的生理过程清晰的展现在眼前。本研究运用在体骨与 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞系构建体外 3D 模型模拟体内乳腺癌骨转移瘤, 为临床和基础研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 HH.CP-01 二氧化碳恒温培养箱 (上海和呈仪器制造有限公司), 倒置差显微镜 (德国 LEICA 公司), DS-5M-ui80i 荧光显微镜 (尼康公司, 日本东京), 970CRT 荧光分光光度计 (上海精密仪器有限公司), S-4800 场发射扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) (日本日立公司)。

1.1.2 试剂 试剂均为分析纯, DMEM 培养液购自 Sigma 公司。胰酶购自科昊生物有限公司, MTT 购自北京鼎国生物技术有限责任公司, 胎牛血清购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司。中性红购自碧云天生物科技有限公司, 硝酸银购自上

* 基金项目: 陕西省自然科学基金项目 (2016JM8060)

作者简介: 赵一浦 (1992-), 硕士研究生, 主要研究方向: 乳腺癌骨转移瘤靶向递药系统, E-mail: zhaoyipu@fmmu.edu.cn

[△] 通讯作者: 周四元, E-mail: zhousy@fmmu.edu.cn, 电话: 15809272805

(收稿日期: 2016-10-19 接受日期: 2016-11-10)

海精细化工材料研究所, 结晶紫购自碧云天生物科技有限公司。

1.1.3 动物 人乳腺癌 MBA-MD-231 细胞购自中国科学院典型保藏委员会细胞库。CD-1 仔鼠 10 只, 新生两天内, 购自于第四军医大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 乳腺癌体外骨转移瘤 3D 模型的建立 将一天龄的 CD-1 小鼠处死后, 在无菌环境下剥离颅骨, 用生理盐水冲洗颅骨表面残留组织和血迹, 再用 PBS 清洗两遍并修剪成大约 $3\text{ mm} \times 3\text{ mm}$ 的骨片备用。取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞, 用 0.25 % 的胰蛋白酶消化, 悬浮于含 10 % 胎牛血清的 DMEM 培养液中, 使得细胞密度达到 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 。将上述 1 mL 的细胞悬浮液加入培养小瓶中, 每瓶放 2 片颅骨, 拧紧瓶盖, 置于 37°C , 5 % CO_2 的培养箱中孵育 4 天后, 即为模型组; 新鲜剥离的颅骨洗净后为正常组。

1.2.2 扫描电镜(SEM)鉴定骨转移瘤模型 将模型组、正常组分别用 2.5 % 的戊二醛固定 30 min, 然后分别在 50 %、70 %、95 % 的乙醇中梯度脱水 10 min, 最后在 100 % 的乙醇中脱水 30 min 后镀膜, 扫描电镜在不同放大倍数下观察颅骨的破坏程度, 肿瘤细胞以及骨陷窝。

1.2.3 中性红染色法鉴定骨组织中的破骨细胞 在活性骨组织中破骨细胞尺寸大且具有多核的特点, 与其他细胞比有明显的差别, 故中性红(NR)可快速吸附在破骨细胞上, 使其细胞核染成红色^[9]。将模型组、正常组的颅骨用 PBS 洗净后, 分别用中性红染色 10 min 后, 再用 10 % 福尔马林固定 12 h 以上, 显微镜拍照观察。

1.2.4 硝酸银复染法观察骨的溶解 骨头矿化基质中的磷酸钙、碳酸钙在硝酸银的作用下转变为磷酸银、碳酸银, 然后用日光、紫外线或还原剂可使其还原为黑色的金属银。故对于溶骨现象发生的部位, 利用硝酸银复染后并不会产生黑色, 而由于溶骨出现空洞, 出现硝酸银的亮斑^[7]。将上述中性红染色后的片子, 在 2 % 的硝酸银溶液中避光染色 15 min, 然后在紫外灯下照 20 min 后, 显微镜直接观察。

1.2.5 结晶紫染色法观察骨转移瘤模型中肿瘤细胞的生长 为观察肿瘤细胞对颅骨的黏附情况, 将无菌条件下新鲜分离的颅骨, 用 PBS 清洗两遍并修剪成大约 $3\text{ mm} \times 3\text{ mm}$ 的骨片, 胰酶消化上述骨片 30 min 备用以期消除骨细胞对实验的影响。取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞, 用 0.25 % 的胰蛋白酶消化, 悬浮于含 10 % 胎牛血清的 DMEM 培养液中, 使得细胞密度达到 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 。将上述 1 mL 的细胞悬浮液加入培养小瓶中, 每瓶放 2 片消化后的骨片, 拧紧瓶盖, 置于 37°C , 5 % CO_2 的培养箱中孵育 4 天后作为模型组; 消化后的骨片为正常组; 取出骨片, 95 % 酒精固定 10 min, PBS 洗 3 遍, 结晶紫 5 mg/mL 染色 15 min。将染色的骨片用 PBS 洗 3 遍后倒置显微镜下观察, 每个骨片随机取 10 个不同的视野计数黏附的细胞。

1.3 统计学分析方法

实验数据利用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)的方式表示, 采用 SPSS17.0 软件对实验数据进行分析, 组间均数比较用 t 检验。其检验水准为 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 扫描电镜(SEM)鉴定骨转移瘤模型

通过 SEM 观察模型组, 当放大倍数为 $\times 1.0\text{ k}$ 许多肿瘤细胞黏附在骨组织表面, 当放大倍数增大到 $\times 5.0\text{ k}$ 时可以看到肿瘤细胞黏附在陷窝处, 触角紧紧抓住周边骨纤维^[8]。将放大倍数继续增加至 $\times 10.0\text{ k}$ 甚至 $\times 50.0\text{ k}$, 其表面的骨纤维发生断裂, 而正常组的骨纤维光滑平整。(图 1)为进一步观察肿瘤细胞对骨组织的破坏, 对经胰酶消化过的骨进行 SEM 扫描, 发现模型组的骨表面出现大量空洞, 空洞的深浅不一, 而正常组表面光滑只有个别较浅的凹处。(图 2)随机挑选视野, 对表面骨陷窝进行统计, 正常组与模型组有显著性差异($P<0.05$)。

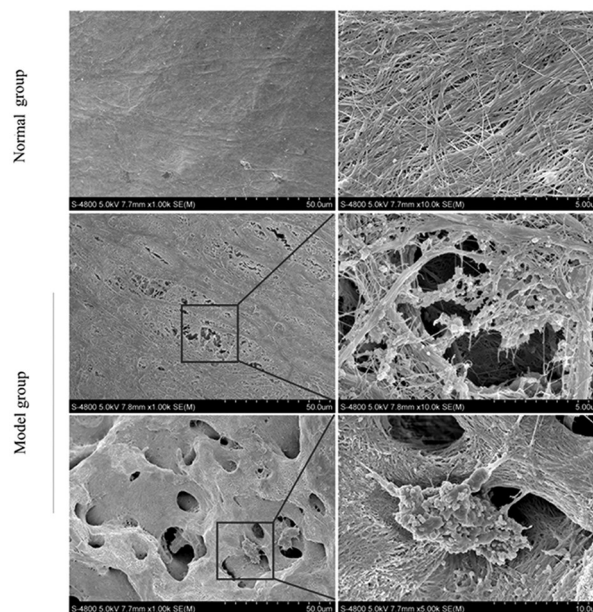


图 1 扫描电镜(SEM)观察对照组与模型组颅骨表面骨纤维及肿瘤细胞

Fig.1 Bone fibres of normal group and model group by SEM. The tumor cells on calvaria in model group detected by SEM.

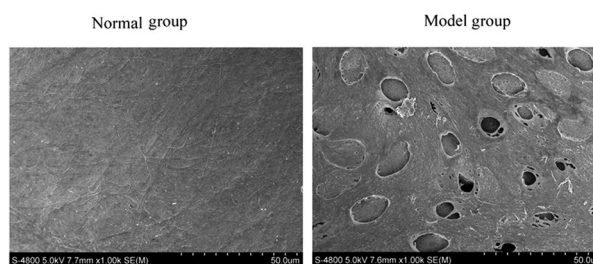


图 2 扫描电镜(SEM)观察对照组与模型组颅骨表面骨陷窝

Fig.2 Bone lacuna in normal group and model group detected by SEM

2.2 中性红染色法鉴定骨组织中的破骨细胞, 硝酸银复染法观察骨的溶解

经中性红染色后随机挑选视野观察, 模型组有大量多核细胞即破骨细胞, 而正常组视野下的细胞大多为单核, 多核的破骨细胞只有 1-2 个。中性红染色后的颅骨用硝酸银复染, 模型组由于破骨细胞大量激活产生严重的溶骨现象, 所以硝酸银复染后亮斑区域几乎覆盖整个视野, 而正常组的视野下只有个别颜色较暗的亮斑, 是正常骨在生理状态下的空洞, 此实验结果

与 SEM 观察, 经肿瘤细胞破坏过骨组织表面骨陷窝的结果一致。(图 3)。

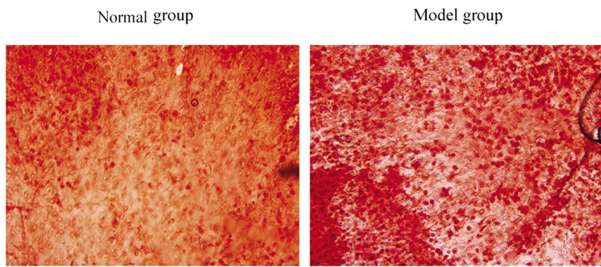


图 3 中性红染色观察正常组与模型组颅骨表面破骨细胞($\times 20$)

Fig.3 Osteoclast in normal group and model group (staining by neutral red, $\times 20$)

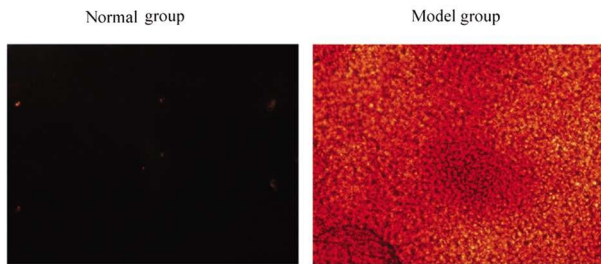


图 4 中性红 - 硝酸银复染观察正常组与模型组颅骨表面亮斑($\times 20$)

Fig.4 Bright spot area in normal group and model group. (staining by neutral red-silver nitrate, $\times 20$)

2.3 结晶紫染色法观骨转移瘤模型中肿瘤细胞的生长

从图 4 可以看出模型组中颅骨表面有大量的肿瘤细胞, 正常组的表面有少量的细胞是没有消化完全的残留骨细胞, 该实验证明正常的颅骨对肿瘤细胞有极强的黏附性, 在模型中黏附的肿瘤细胞对骨造成破坏。

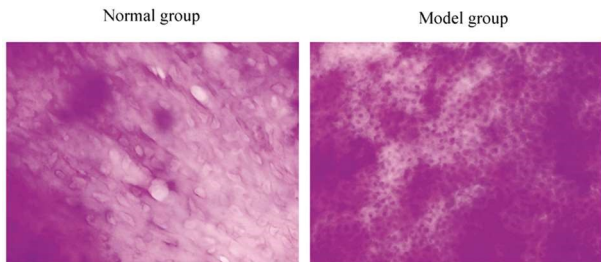


图 5 结晶紫染色观察正常组和模型组颅骨表面黏附的肿瘤细胞($\times 40$)

Fig.5 Tumor cells on calvarias in model group detected by crystal violet staining($\times 40$)

3 讨论

乳腺癌是女性最好发的肿瘤之一, 在我国, 乳腺癌发病率在近年来呈不断上升趋势对于乳腺癌晚期患者, 骨是其最常见的远端转移部位, 骨转移在乳腺癌转移病例中大约占到 80% - 90%^[10]。乳腺癌的骨转移不仅威胁到患者生命, 更重要的是它还带来的一系列骨相关事件, 包括病理性骨折、残疾、骨痛、神经压迫(包括脊髓压迫)、贫血和高钙血症等。目前虽然对乳腺癌原发灶的治疗取得了长足进步, 但相比之下, 乳腺癌骨转移的治疗却停滞不前。

乳腺癌发生骨转移是一个非常复杂的过程, 其中包括了乳腺癌细胞同原位乳腺微环境以及转移处骨微环境的相互作用。到目前为止, 没有一个明确的理论可以很好地阐述肿瘤 - 骨的细胞分子机制, 最主要的原因是缺乏一个理想的模型可以同时从生理、细胞、分子角度概括这个复杂的生理环境。目前常用体内移植瘤模型来研究肿瘤骨转移的发生机制, 但是由于肿瘤细胞到达骨组织处数量的不可控性, 以及肿瘤细胞无法像体内的真实情况那样产生变异性, 最终导致体内模型再现性差。其次, 体内移植瘤模型不能完整模拟骨转移瘤处的微环境(物种特异性或者异性细胞干扰)以及疾病的发展^[12], 导致适用性低。此外, 建立体内移植骨转移瘤模型需要大量裸鼠及细胞, 费用高且耗时。3D 模型很大程度上克服了上述不足, 这是由于 3D 模型拥有与组织本身相似的细胞外微环境, 模拟细胞 - 细胞以及细胞 - 基质之间的相互作用。近年来开展很多新的 3D 骨转移瘤模型, 包括将肿瘤细胞嵌入胶原蛋白 I 型凝胶与老鼠头盖骨直接共培养^[13], 将肿瘤细胞与头盖骨在正常条件中放入金属网格于培养皿底部共培养, 还有用转基因生物有机聚合物支架模拟 3D 系统产生关于细胞信号表型变化, 血管生成, 肿瘤细胞化学电阻, 肿瘤细胞与成骨细胞相互作用的重要信息^[15]。虽然类似上述的模型克服了很多体内模型的不足, 但是这些生物改造的 3D 模型没有完全模拟出在体骨的微环境, 且操作相对复杂。

本文选择新生 CD-1 小鼠颅骨, 是由于刚出生小鼠的颅骨取出后存活率最高可提供完整的骨生长环境。低氧的环境是为了反映恶性实体瘤和骨环境中低氧情况, 低氧环境可以促进肿瘤细胞产生前列腺素 E2 (PEG2)^[16,17], Goldhaber 曾用老鼠头盖骨组织研究过 PEG2 对骨重吸收有重要的影响^[18]。研究显示乳腺癌转移患者中溶骨性病变占 85 % 左右^[19], 所选用的人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 是一种常用具有溶骨性的细胞, 更加清晰的还原骨转移瘤处溶骨现象^[20,21]。骨转移瘤发生时, 能够激活病灶部位破骨细胞, 增加了骨重吸收, 使骨质遭到严重破坏, 并使骨基质中的生长因子释放到肿瘤组织, 促进肿瘤迅速生长, 这一 "肿瘤生长 - 溶骨 - 肿瘤生长" 的恶性循环促进溶骨和肿瘤边缘的不断扩大^[22]。通过 SEM 的结果可以看出, 骨转移发生后出现骨纤维断裂甚至骨表面出现陷窝, 中性红硝酸银复染实验结果同样证明, 骨转移有明显的溶骨行为。骨转移发生时产生的甲状旁腺激素相关肽 PTH, PEG2 以及肿瘤细胞等因子刺激破骨细胞过度激活, 骨吸收与骨形成不平衡, 破骨细胞由单核巨噬细胞分化而成, 一个活化的破骨细胞可以溶解 100 个成骨细胞所形成的骨组织^[23], 继而产生溶骨。本研究用 NR 染色比较破骨细胞的数量和活跃程度, 模型组破骨细胞数量明显多于正常组($P < 0.05$), 这与 SEM 检查后骨组织破坏一致。以上结果表明, 乳腺癌骨转移瘤 3D 体外模型成功建立, 该模型可进一步用于研究乳腺癌骨转移发生的分子机制, 是研发治疗肿瘤骨转移新药的重要工具。

参考文献 (References)

- [1] Nakajima K, Kho DH, Yanagawa T, et al. Galectin-3 Cleavage Alters Bone Remodeling: Different Outcomes in Breast and Prostate Cancer Skeletal Metastasis[J]. Cancer Res, 2016, 76(6): 1391-1402
- [2] Ampuja M, Alarino EL, Owens P, et al. The impact of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) on breast cancer metastasis in a mouse

- xenograft model[J]. *Cancer Lett*, 2016, 375(2): 238-244
- [3] Leblanc R, Lee SC, David M, et al. Interaction of platelet-derived autotaxin with tumor integrin $\alpha V\beta 3$ controls metastasis of breast cancer cells to bone[J]. *Blood*, 2014, 124(20): 3141-3150
- [4] Weigelt B, Bissell MJ. Unraveling the microenvironmental influences on the normal mammary gland and breast cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2008, 18(5): 311-321
- [5] Curtin P, Youm H, Salih E. Three-dimensional cancer-bone metastasis model using ex-vivo co-cultures of live calvarial bones and cancer cells[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(4): 1065-1078
- [6] Porter JR, Henson A, Popat KC. Biodegradable poly(ϵ -caprolactone) nanowires for bone tissue engineering applications[J]. *Biomaterials*, 2009, 30(5): 780-788
- [7] Alfred R, Taiani JT, Krawetz RJ, et al. Large-scale production of murine embryonic stem cell-derived osteoblasts and chondrocytes on microcarriers in serum-free media [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(26): 6006-6016
- [8] Addison WN, Nelea V, Chicatun F, et al. Extracellular matrix mineralization in murine MC3T3-E1 osteoblast cultures: an ultrastructural, compositional and comparative analysis with mouse bone [J]. *Bone*, 2015, 71: 244-256
- [9] Sosnoski DM, Norgard RJ, Grove CD, et al. Dormancy and growth of metastatic breast cancer cells in a bone-like microenvironment [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2015, 32(4): 335-344
- [10] Steinauer K, Huang DJ, Eppenberger-Castori S, et al. Bone metastases in breast cancer: Frequency, metastatic pattern and non-systemic locoregional therapy[J]. *J Bone Oncol*, 2014, 3(2): 54-60
- [11] Ju DG, Yurter A, Gokaslan ZL, et al. Diagnosis and surgical management of breast cancer metastatic to the spine [J]. *World J Clin Oncol*, 2014, 5(3): 263-271
- [12] Birgersdotter A, Sandberg R, Ernberg I. Gene expression perturbation in vitro—a growing case for three-dimensional (3D) culture systems [J]. *Semin Cancer Biol*, 2005, 15(5): 405-412
- [13] Ohshiba T, Miyaura C, Ito A. Role of prostaglandin E produced by osteoblasts in osteolysis due to bone metastasis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 300(4): 957-964
- [14] Nordstrand A, Nilsson J, Tieva A, et al. Establishment and validation of an in vitro co-culture model to study the interactions between bone and prostate cancer cells [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2009, 26 (8): 945-953
- [15] Reichert J C, Quent V M, Burke L J, et al. Mineralized human primary osteoblast matrices as a model system to analyse interactions of prostate cancer cells with the bone microenvironment [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(31): 7928-7936
- [16] Varasteh Z, Mitran B, Rosenstrom U, et al. The effect of macrocyclic chelators on the targeting properties of the ^{68}Ga -labeled gastrin releasing peptide receptor antagonist PEG2-RM26 [J]. *Nucl Med Biol*, 2015, 42(5): 446-454
- [17] Karau M J, Schmidt-Malan S M, Greenwood-Quaintance K E, et al. Treatment of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* experimental Osteomyelitis with bone-targeted Vancomycin [J]. *Springerplus*, 2013, 2: 329
- [18] Rabadjija L, Brown E M, Swartz S L, et al. H^{+} -stimulated release of prostaglandin E2 and cyclic adenosine 3',5'-monophosphoric acid and their relationship to bone resorption in neonatal mouse calvaria cultures[J]. *Bone Miner*, 1990, 11(3): 295-304
- [19] Buenostro D, Park SI, Sterling JA. Dissecting the role of bone marrow stromal cells on bone metastases[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 875305
- [20] Esposito M, Kang Y. Targeting tumor-stromal interactions in bone metastasis[J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 141(2): 222-233
- [21] Ren G, Esposito M, Kang Y. Bone metastasis and the metastatic niche[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2015, 93(11): 1203-1212
- [22] Hiraga T, Myoui A, Choi ME, et al. Stimulation of cyclooxygenase-2 expression by bone-derived transforming growth factor- β enhances bone metastases in breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2006, 66 (4): 2067-2073
- [23] Deng L, Wang Y, Peng Y, et al. Osteoblast-derived microvesicles: A novel mechanism for communication between osteoblasts and osteoclasts[J]. *Bone*, 2015, 79: 37-42