

耐三苯氧胺乳腺癌异种移植瘤动物模型建立与评价*

谌海燕¹ 侯 丽¹ 陈信义²

(1 北京中医药大学东直门医院 北京 100700 2 北京市与教育部重点实验室(中医内科学) 北京 100700)

摘要 目的 :建立耐三苯氧胺(TAM)人乳腺癌的裸鼠移植瘤模型 ,为研究和治疗乳腺癌对 TAM 耐药提供研究工具。**方法 :**采用雌激素受体阳性 ,对 TAM 耐药的人乳腺癌细胞系 LCC2 接种于 BALB/c 裸鼠皮下 ,观察肿瘤生长趋势 ,用免疫组化方法进行鉴定。**结果 :**在接种细胞数大于 5×10^6 只时 ,Matrigel 能够显著促进移植瘤的生长。肿瘤组织病理学检测证实为浸润性导管癌 ,且 Pgp 和 Her-2 为阳性表达。**结论 :**该方法建立的耐 TAM 人乳腺癌移植瘤模型 ,周期短 ,成瘤率高 ,保留了与细胞系相同的肿瘤生物学特征。

关键词 :乳腺癌 移植瘤 三苯氧胺

中图分类号 :R737.9 **文献标识码 :**A **文章编号 :**1673-6273(2011)05-841-03

Establishment of xenograft model in nude mice of tamoxifen -resistant human breast cancer*

CHEN Hai-yan¹, HOU Li¹, CHEN Xin-yi²

(1Dongzhimeng Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China;2The Key Laboratory of Beijing (Traditional Chinses Physician),Beijing 100700,China)

ABSTRACT Objective: This study aims to establish the xenograft model of human breast cancer resistant to tamoxifen (TAM)so as to provide a research tool for the study and treatment of breast cancer resistant to TAM.**Methods:** This study employs the method of inoculating the human breast cancer cells LCC2 which is estrogen receptor positive and resistant to TAM into BALB/c nude mice.Then it observes the trends of tumor growth,and identifies by immunohistochemistry methods. **Results:** When the number of inoculation cells is more than 5×10^6 ,Matrigel can significantly promote tumor growth.Pathology confirms that the xenograft is invasive ductal carcinoma, and Pgp,Her-2 are positively expressed.**Conclusions:** The method of establishing the xenograft model of human breast cancer resistant to TAM has short cycle,high rate of tumor formation, and retains the same characteristics of tumor biology with cell lines.

Key words: Breast Cancer;Xenograft;Tamoxifen

Chinese Library Classification: R737.9 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)05-841-03

近年来 ,乳腺癌上升为女性恶性肿瘤发病率的首位或第二位^[1] ,已成为严重危害城市女性健康的重大疾病。目前 ,内分泌治疗是人类雌激素受体(ER)阳性乳腺癌患者的主要措施^[2]。其中 ,三苯氧胺(tamoxifen ,TAM)以疗效确切、副作用少而被广泛应用 ,其主要机理是与雌二醇在靶器官内争夺雌激素受体^[3]。但越来越多的临床实践证明 ,长期使用 TAM 会产生耐药性而限制了临床疗效的提高^[4,5]。因此 ,研究 TAM 耐药机制 ,寻找有效的解决方法 ,对于提高临床疗效具有重要价值。我们以耐 TAM 的人乳腺癌细胞系(LCC2)为研究对象 ,建立了耐 TAM 乳腺癌的动物移植瘤模型 ,同时检测了与乳腺癌多药耐药性密切相关的 P 糖蛋白(Pgp)及人表皮生长因子受体(Her-2)在移植瘤中的表达特征。我们开展本实验的研究目的主要有两个方面 ,其一是通过建立耐 TAM 动物模型为研究中药抗耐药效应机制提供研究工具 ;其二是探讨乳腺癌内分泌治疗产生的耐药性与化疗药物导致的耐药性是否存在着共同的耐药机制。

1 材料与方法

- 1.1 材料
- 1.1.1 细胞和动物 耐 TAM 的人乳腺癌细胞系(LCC2)由美国乔治敦大学 Clarke 博士惠赠 ,细胞系生物学特征为 ER 阳性 ,雌激素非依赖性^[6]。清洁级 BALB/c-nu 裸小鼠 12 只 ,4-6 周龄 ,雌性 ,购于中国医学科学院实验动物研究所 ,SPF 级动物房饲养。
- 1.1.2 试剂 TAM 为美国 Sigma 公司产品 ;即用型不含酚红的 IMEM 培养基购自迈晨科技有限公司 ;活性炭处理过的胎牛血清系 Bioind 公司产品 ,BD Matrigel 购自上海前尘生物科技有限公司 ;多克隆抗体 Pgp 和 Her-2 均购自武汉博士德生物科技有限公司。
- 1.1.3 仪器 CO₂ 培养箱为 SANYO 公司产品 ;倒置显微镜为 OLYMPUS 公司产品 ;图像分析系统为 OLYMPUS 产品 ,型号

* 基金项目 北京中医药大学自主创新课题(2009TYBZZ-XS057)

作者简介 谌海燕 (1982-) 女 ,博士研究生 ,研究方向 :中药治疗乳腺癌应用研究。E-mail: chenhaiyan590@163.com

△通讯作者 陈信义 教授 ,博士研究生指导教师。E-mail: chenxinyi0729@126.com

(收稿日期 2011-01-06 接收日期 2011-01-31)

为 BX60。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 耐 TAM 的人乳腺癌细胞系(LCC2)用不含酚红的 IMEM 培养基 +5 %活性炭处理过的血清,在 37℃ 5 % CO₂ 饱和湿度培养箱内长期培养 2-3 天换液,70 %-80 %时传代^[7]。平时用 5× 10⁻⁷ mol/L TAM 维持耐药性,实验前两周撤药培养。

1.2.2 建立动物模型 将 12 只 BALB/c-nu 裸小鼠随机分为四组,每组 3 只。收集对数生长期 LCC2 细胞,1000 rpm,离心 5 min,用无血清的 IMEM 培养基稀释,制成细胞悬液 0.1 ml,在 4℃ 与 0.1 ml Matrigel 等体积混匀,接种于雌性裸小鼠右侧胸壁皮下。接种细胞分别为 5× 10⁶/只、5× 10⁶/只 +Matrigel、1× 10⁷/只、1× 10⁷/只 +Matrigel。观察肿瘤增长情况。

1.2.3 观察指标 观察肿瘤出现时间及生长速度,出瘤后用游标

卡尺每隔 4 天测量肿瘤的长径(a)和短径(b),计算肿瘤体积 $V=4/3\pi\times a\times b^2/8$,并绘制生长曲线。

1.2.4 病理学检查 接种后第 24 天脱颈椎法处死小鼠,剥离瘤体,去除周围脂肪组织,放入 4 %的多聚甲醛中固定,常规将肿瘤组织制成石蜡切片,行 HE 染色和 Pgp、Her-2 免疫组化检测。免疫组织化学检测方法采用 SP 法检测。

2 结果

2.1 肿瘤生长状况

接种后 5-7 天皮下可见灰白色结节,呈圆形或椭圆形生长。于接种后第 10 天开始测量肿瘤大小,每隔 4 天测量一次,绘制生长曲线。其中,不加 Matrigel 的两组有 1 只裸鼠未成瘤,加 Matrigel 的 3 只均成瘤。各组肿瘤体积测量结果与生长曲线见表 1、图 1。

表 1 肿瘤体积测量结果
Tab.1 Tumor volume measurement results

Days post-inoculum	Tumor volume(mm ³)			
	5× 10 ⁶ cells	1× 10 ⁷ cells	5× 10 ⁶ cells +Matrigel	1× 10 ⁷ cells + Matrigel
10	25.06	227.56	443.96	517.11
14	25.06	297.54	716.08	1287.69
18	25.23	299.00	1274.72	2283.29
22	27.90	301.46	1606.63	2400.49

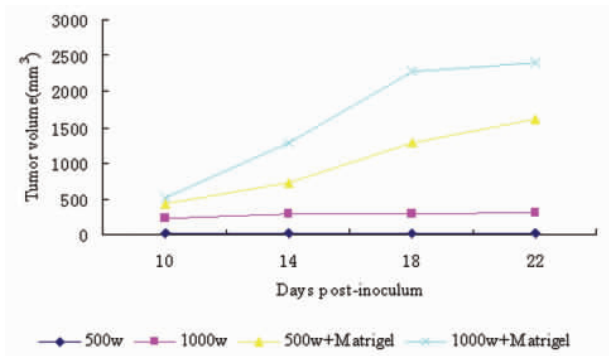


图 1 实验各组肿瘤生长曲线

Fig.1 Tumor growth curve in each group

2.2 病理学检查

切除的瘤块呈圆形或椭圆形,包膜完整。经对肿瘤临近组织、淋巴结以及重要脏器(肺、肝)解剖发现,无淋巴结和其他脏

器的转移。HE 染色显示癌细胞大,胞质丰富,核大,核仁清晰,多形性明显,经组织病理学观察为浸润性导管癌(图 2、图 3)。

2.3 免疫组化检测结果

Pgp 和 Her-2 在移植瘤组织中均为阳性表达,二者均表达在细胞膜上(图 4、图 5)。

3 讨论

乳腺癌动物模型的建立方法有自发性、诱发性和移植性三种^[9]。相对而言,建立移植性乳腺癌动物模型具有周期短、成瘤率高、可使实验动物带有与细胞系相同肿瘤生物学特征。目前,国内建立乳腺癌移植瘤多以敏感的细胞系或对化疗药物耐药的细胞系为靶点细胞,探讨某种药物抗肿瘤效应或抗耐药机制。而针对 TAM 耐药建立动物模型,特别是建立 LCC2 移植瘤动物模型,国内尚未见文献报道。

我们采用的 LCC2 细胞系起源于人源性 MCF-7 细胞系,

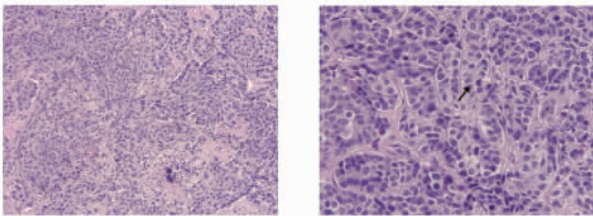


图 2 移植瘤组织切片(HE 染色,200×)

Fig2.Xenograft biopsy(HE staining,200×)

图 3 移植瘤组织切片(HE 染色,400×)

Fig3.Xenograft biopsy(HE staining,400×)

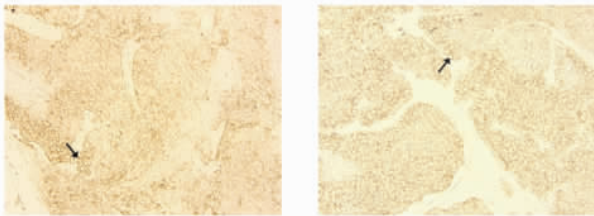


图 4 移植瘤组织的 Her-2 阳性表达(200×)

Fig4.Her-2 positive expression of xenograft (200×)

图 5 移植瘤组织的 Pgp 阳性表达(200×)

Fig5.Pgp positive expression of xenograft (200×)

接种后的成瘤率与接种细胞数成正比。所用的 Matrigel 是由层粘连蛋白、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,在 37℃ 则聚合成一种凝胶^[10],在成瘤过程中发挥了重要作用。Matrigel 混合物能够增加异种移植瘤的成活率,可能与该混合物能够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而增加移植瘤成活率^[11]。乳腺癌异种移植瘤模型的成功建立,能够为开展中药抗 TAM 耐药机制研究提供稳定的动物模型、缩短研究周期、节约研究经费。

Pgp 是一种能量依赖性跨膜糖蛋白,它具有“药泵”的作用,能将细胞内的药物主动转运到细胞外,使细胞内药物浓度下降或定量丧失而产生耐药^[12,13]。Pgp 与肿瘤细胞的多药耐药发生关系极为密切,Pgp 高表达是肿瘤细胞多药耐药的经典途径,也是研究肿瘤细胞耐药机制与抗耐药效应的重要检测指标之一。Her-2 在多种肿瘤细胞中均有表达,其信号通路活性提高是乳腺癌内分泌治疗过程中产生耐药的机制之一^[14]。研究发现,乳腺癌患者中 Her-2 高表达者对 TAM 治疗不敏感^[15]。Johnston 等以 Her-2 信号通路抑制剂作用于内分泌耐药的乳腺癌细胞,结果发现 Her-2 信号通路抑制剂能够克服或延迟乳腺癌细胞对内分泌治疗的耐药性^[16]。我们的研究结果显示,在建立的耐 TAM 乳腺癌模型中,Pgp、Her-2 均为阳性表达,提示乳腺癌细胞对 TAM 的耐药性可能与二者高表达有相关性,其耐药机制可能为多种因素的综合,并非单一机制。但鉴于 Pgp 在那些经常接触毒物的正常组织中也有表达,故推测 Pgp 的表达可能为正常组织的防御性反应机制。因此,在该模型的进一步研究中,我们会选择多种指标,进一步研究 TAM 耐药性与化疗药物耐药性之间的耐药机制差异,以便为指导临床治疗提供实验研究依据。

参考文献(References)

- [1] 李树玲.乳腺癌肿瘤学[M].北京:科学技术文献出版社,2000.32-71
Li Shu-ling.Breast Oncology [M].Beijing:Science and Technology Document Press,2000.32-71
- [2] 程晔.乳腺癌的内分泌药物治疗[J].中华实用中西医杂志,2006,19(1):69-70
Cheng Ye.The endocrine of the breast cancer treat[J].Chinese Journal of the Practical Chinese With Modern Medicine, 2006,19(1):69-70
- [3] Jordan VC,Tamoxifen:a most unlikely pioneering medicine[J].Nat Rev Drug Discov,2003,2(3):205-213
- [4] Johnston SR,Dowsett M,Smith IE.Towards a molecular basis for tamoxifen resistance in breast cancer [J].Ann Oncol,1992,3 (7):

503-511

- [5] Osborne CK.Tamoxifen in the treatment of breast cancer [J].N Engl J Med,1998,339(22):1609-1618
- [6] Clarke R,Brü nner N,Katzenellenbogen BS,et al.Progression of human breast cancer cells from hormone-dependent to hormone-independent growth both in vitro and in vivo [J].Proc Natl Acad Sci USA,1989,86(10):3649-3653
- [7] Brü nner N,Frandsen TL,Holst-Hansen C,et al.MCF7/LCC2: A 4-hydroxytamoxifen resistant human breast cancer variant that retains sensitivity to the steroidal antiestrogen ICI182,780 [J].Cancer Res, 1993,53(14):3229-3232
- [8] Berstein LM,Wang JP,Zheng H,et al.Long-term exposure to tamoxifen induces hypersensitivity to estradiol [J].Clin Cancer Res,2004,10(4): 1530-1534
- [9] 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
Yu Wei-bo,Gu Jun-chao.Establishment of animal model for breast cancer[J].International Journal of Surgery Volume, 2005,32(1):63-66
- [10] 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(11):769-774
- [11] 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(1):69-86
- [12] Pastan I,Gottesman M.Multiple-drug resistance in human cancer[J].N Engl J Med,1987,316(22):1388-1393
- [13] Rosenberg MF,Callaghan R,Modok S,et al.Three-dimensional structure of P-glycoprotein:the transmembrane regions adopt an asymmetric configuration in the nucleotide-bound state [J].J Biol Chem, 2005,280(4):2857-2862
- [14] Osborne CK,Schiff R.Growth factor receptor cross-talk with estrogen receptor as a mechanism for tamoxifen resistance in breast cancer[J].Breast,2003,12(6):362-367
- [15] Witters L,Engle L,Lipton A.Restoration of estrogen responsiveness by blocking the HER-2/neu pathway [J].Oncol Rep,2002,9 (6): 1163-1166
- [16] Johnston SR,Lu B,Dowsett M,et al.Comparison of estrogen receptor DNA binding in untreated and acquired antiestrogen-resistant human breast tumors[J].Cancer Res,1997,57(17):3723-3727

(上接第 829 页)

- [14] 吴晓东,李振虎,孙兵.滤泡辅助性 T 细胞分化和功能的研究进展 [J].生命科学,2010,22(6):529-533
WU Xiao-dong,LI Zhen-hu,SUN Bing.The progress on differentiation and function of T follicular helper cells [J]. Chinese Bulletin of Life Science. 2010,22(6):529-533

- [15] Schaerli P,Willmann K,Lang AB, et al.CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function[J]. J Exp Med, 2000, 192:1553-62
- [16] Weyand CM, Goronzy JJ. Ectopic germinal center formation in rheumatoid synovitis[J]. Ann N Y Acad Sci, 2003, 987:140-149