

· 专家论坛 ·

乳腺癌动物模型研究进展

张瑾

乳腺癌是严重危害女性健康的恶性肿瘤,其发病率逐年递增,可能跃居为女性恶性肿瘤的首位。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。乳腺癌动物模型的制作对进一步研究乳腺癌的病因、发病机理,从而对其进行有效预防、提高治疗效果将起到非常关键的作用,尤其在抗癌药物的药理研究中更为重要。一个理想的动物模型,首先应与人体内肿瘤病理生理过程相似,还要便于制作、观察及对各种处理方法进行监测和优选,目前关于乳腺癌动物模型的建立方法有以下几个方面。

1 自发性乳腺癌动物模型

实验动物种群中自然发生或通过遗传育种培养而保留下来的一类肿瘤称为自发性肿瘤,犬、猫、鼠类等实验动物均能产生自发性乳腺癌。这种模型最大的特点是实验动物未经任何有意识的人工处理,生存到一定年龄便自然发生乳腺肿瘤。自发性乳腺癌动物模型多采用近交系小鼠:(1)C3H/He 1920 年,斯特朗(Strong)用贝格(Bagg)白化雌鼠与乳腺肿瘤高发株 DBA 雄鼠杂交,再经近交培育而获得。其特性为乳腺癌发病率高,6~10 月龄雌鼠乳腺癌自然发生率达 85%~100%,乳腺癌通过乳汁而不是胎盘途径传播。(2)A 系 1921 年美国斯特朗(Strong)将冷泉港(Cold Spring Harbor)白化小鼠与贝格(Bagg)白化小鼠杂交而来。其特性为雌鼠乳腺肿瘤发生率,繁殖鼠为 30%,处女鼠低于 5%。(3)DBA 1909 年由立特(Little)在毛色分离实验中建立,为最古老的近交系小鼠。1929~1930 年,在亚系间进行杂交,建立了 DBA/1 和 DBA/2 两个亚系;目前常用的是 DBA/2。DBA/1 的主要特性为雌鼠乳腺癌的发生率,1 年龄以上繁殖鼠为 75%。DBA/2 的主要特性为雌鼠乳腺肿瘤发生率,繁殖鼠(经产母鼠)为 66%,处女鼠为 3%。(4)BALB/c 1913 年,贝格(Bagg)从美国商人欧希尔(Ohio)处购得的白化小鼠原种,以群内方法繁殖。麦克·多威尔(MacDowell)在 1923 年开始作近交系培育,至 1932 年达 26 代,命名为 BALB/c 品系。安德尔文特(Andervont)等使 BALB/c 广为传播和应用。其特性为乳腺肿瘤自然发生率低,但用乳腺肿瘤病毒诱发时发病率高。(5)C57BL 1921 年立特(Little)用艾比·拉特洛坡(Abby Lathrop)的小鼠株,雌鼠 57 号与雄鼠 52 号交配而得 C57BL。

1937 年从 C57BL 分离出 C57BL/6 和 C57BL/10 两个亚系。其特性为乳腺肿瘤自然发生率低,化学物质难以诱发乳腺和卵巢肿瘤。(6)C-1 1955 年中国医学科学院实验医学研究所将昆明种小鼠经全同胞兄妹交配 20 代以上而育成。其特性为肿瘤发病率低,繁殖力中等。(7)TA1(津白 1 号)和 TA2(津白 2 号) 天津医学院分别于 1955 年(TA1)和 1963 年(TA2)将昆明种小鼠经全同胞兄妹交配 20 代以上而育成。其特性为自发高乳腺癌,为乳腺癌 MA737 的宿主,繁殖力中等。

不同的品系在肿瘤的发病率及发生类型上有着很大的差异。选择好适合研究需要的实验动物是获得正确实验结果和实验成功的重要环节。应按照不同实验的要求选择合适的动物。如作肿瘤的研究工作,就必须了解哪种动物是高癌种,哪种是低癌种,各种动物自发性肿瘤的发生率是多少。如 A 系、C3H 系、AKR 系、津白 II 等小鼠是高癌品系小鼠,C3H/He 系经产雌鼠有 80% ~ 100% 的自发性乳腺癌。C57BL 系、津白 I 等小鼠是低癌品系小鼠。

引起小鼠乳腺肿瘤最重要的因素是乳腺肿瘤病毒鼠 MMTV。该病毒存在多个变种,作用于不同的品系,并可由母鼠乳汁传递。近年来利用转基因技术构建的 MMTV-Wnt-1 转基因小鼠已成为高发乳腺癌的动物模型,雌鼠在非妊娠状态、雄鼠在不发生雌化的情况下,均会发生乳腺上皮增生,雌鼠不能正常泌乳。处女鼠在 6 月龄时有 50% 发生乳腺肿瘤,余者在 1 年时死于肿瘤;成年转基因雄鼠到 1 年时,有 15% 发生乳腺肿瘤。肿瘤发生时间一般不受遗传背景的影响^[1]。然而,该转基因鼠发病与 MMTV 感染无关,在 MMTV-wnt-1 转基因构件中,MMTV 是作为增强子,激活了 wnt-1 基因的高表达,从而促进乳腺上皮的增生^[2]。利用 MMTV 增强子的作用建造的乳腺癌动物模型已广泛应用于各种研究中^[3,4]。

在乳腺癌发病机制的研究中发现,某些与乳腺癌发生相关的基因发生改变后,动物便会自发的产生乳腺癌。Lee 等^[5]为研究 CAV-1 基因突变在乳腺癌发病中的作用,构造了 CAV-1 基因敲除小鼠,发现该基因表达的失活直接导致了小鼠乳腺上皮细胞的过度增生,甚至在 6 周龄的处女鼠中也观察到这种现象。这不仅暗示了 CAV-1 功能的缺失与乳腺癌发病的关联,也表明了该小鼠可作为一种新型的研究乳腺上皮细胞过度增生的模型。

SHN 小鼠是由兄妹交配维持下来的自发乳腺癌动物模型,其特点为短时间内发癌率高。此小鼠在出生后 4 个月症状开始出现,生长至 12 个月时,乳腺肿瘤的发病率达 100%。目前,此动物已是乳腺肿瘤多级预防、治疗及研究发病机制的良好模型。有研究以不同的饲料组喂养该小鼠,结果肿瘤发生情况出现了显著差异。

自发性肿瘤从其发生来看,与人类肿瘤更相似,因此,在自发性肿瘤中,影响肿瘤发生发展的因素更有可能被发现。但其肿瘤发生、发展时间的不一致性,使

实验时间延长,实验所需动物数量多,耗费大。

2 诱发性乳腺癌动物模型

使用化学物质、物理、生物因素等可在实验动物中诱发乳腺癌的发生^[6],目前较多用的是化学诱导方式。化学诱导乳腺癌发生一般是用二甲基苯蒽(DMBA)或甲基胆蒽经胃管灌注或皮下注射 Wistar 雌性大鼠。由剂量及观察时间长短的不同可以建立乳腺癌前期病变动物模型和乳腺癌模型。有研究者采用 DMBA 以 0.1 mg/g 体质量于大鼠臀部皮下一次性注射,对其过程进行动态观察发现,大鼠注射致癌剂后乳腺上皮组织逐渐发生有规律的变化,乳腺导管上皮细胞首先发生上皮增生、不典型增生,并逐渐加重,在第 9 周时可见同一大鼠的多个乳腺出现不同程度的导管上皮增生和不典型增生。随着实验进程,第 13 周开始发现 >3 mm 的乳腺癌,至第 24 周时 70% 的大鼠发生乳腺癌,并可见一只大鼠同时发生多个乳腺癌,而同一大鼠的其他乳腺亦呈现出不同程度的上皮细胞增生和不典型增生,提示处于癌发生的不同进展阶段。而在整个观察过程中未发现乳腺有其他明显的病变存在,提示用二甲基苯蒽诱导 Wistar 大鼠乳腺癌发生的动态过程是通过乳腺导管上皮细胞增生、不典型增生、癌变、浸润性乳腺癌的逐渐演变过程。这与笔者在人体乳腺囊性增生病中观察到的癌变过程相似。Costa 等^[7]分析了二甲基苯蒽诱导的 SD 大鼠乳腺癌模型,发现在高分化肿瘤中超过 50% 的肿瘤分级为 I 级,核分级为 I 或 II 级,超过 85% 的肿瘤并未发现肿瘤坏死的现象,超过 70% 的肿瘤没有或很少淋巴细胞及浆细胞浸润,在低分化的肿瘤中大部分没有分泌的特性,缺乏肥大细胞的浸润,缺乏微筛状的结构($P < 0.05$)。他们认为该模型与人类乳腺癌还是有一些形态学方面的相似,并且有些特性和肿瘤侵袭性有关,是值得应用的。化学诱导乳腺癌发生的动物模型可用于乳腺癌的病因学研究及预防性研究^[8,9]。实验性肿瘤诱发研究的开展,能使人们得以有计划、有步骤地观察癌变的整个过程,成为研究肿瘤发生的基本方法之一^[10]。但由于化学诱导乳腺癌发生的动物模型建立的过程长,个体差异很大,而且肿瘤细胞的形态特征差别也很大,所以较少作为肿瘤药物治疗的动物模型。

3 移植性乳腺癌动物模型

它是指将乳腺癌组织或细胞移植于动物连续传代而培养出的模型。移植性乳腺癌模型的移植物来源于自发性或诱发性乳腺肿瘤细胞株或人类乳腺癌细胞株。根据肿瘤来源不同可分为同种移植和异种移植。根据移植方式不同分为肿瘤组织块移植、组织块悬液注射、培养细胞移植。根据移植部位不同可分为原位移植、皮下移植以及肾包膜下移植等。瘤株的建立过程,也是肿瘤在动物间反复传代的过程。大概经过 20 代以后,它的组织类型与生长特性已趋稳定,并能在同系或同种受体动物中继续传代,即成为一个可移植的瘤株。

3.1 同种移植

同种移植是利用已建立的同种乳腺癌细胞株进行同种动物种植所建立的模型。其来源于自发性或诱发性乳腺肿瘤细胞株的移植性模型,在同种或同品系动物中连续移植,目前已建立的鼠类乳腺癌细胞株有 C127、4T1 等。一般使用免疫功能正常的小鼠,此种移植的乳腺癌细胞或组织块有严格的种系特异性。文献报道应用移植法建立乳腺癌模型,周期短、成本低,可使实验动物均带有同样的肿瘤,其生长速度也较为一致,个体差异小,成功率常可达到 100%。移植瘤以浸润性生长为主,有包膜,外周有明显增粗的血管,肿瘤直径大于 1 cm 时,中间有干酪样坏死。当需要保存时,可将瘤细胞冻存于液氮中。这既有利于研究工作的阶段性进行,也可防止因连续传代而遭污染及瘤细胞变异。细胞的接种部位应根据实验的具体要求来选择。

3.2 异种移植

异种移植是利用已建立的人乳腺癌细胞株种植于免疫缺陷动物体内所建立的动物模型。随着带有裸基因的免疫缺陷小鼠品系的引入,人类肿瘤细胞移植模型得以广泛研究。现在特征明确、广泛应用的人乳腺癌细胞系有二十多种,其中较为常用的有 MCF-7 和 MDA-MB-231 两种。国内有学者应用雌激素受体阳性的 MCF-7 人乳腺癌细胞株,接种于裸小鼠右侧胸壁乳垫下,移植细胞总数为 1×10^6 /只。接种后第 10 天在接种部位可见结节,肿瘤移植成功率(成瘤率)为 95%,90 d 后处死动物,病理学检查为浸润性导管癌,RT-PCR 检测表达人角蛋白 19(KT19)、ER 阳性,提示移植的肿瘤细胞保持了人乳腺癌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。

然而,部分移植物仍会在裸鼠体内出现抵抗,而使其不能存活。这就要求在移植前对动物进行免疫抑制的预处理^[11],但是免疫抑制预处理常常作用于各种细胞因子,中断它们的级联反应,还会对肿瘤基质的各种类型的细胞产生强烈影响,而这些细胞与肿瘤实质细胞存在密切的关系,因此这样的处理往往会影响到肿瘤的生物学行为,从而限制了该模型对肿瘤转移机制的研究。1980 年美国 Bosma 首次在 BALB/c 系小鼠的同类系 C. B17Icr 近交系小鼠中发现了淋巴细胞发育分化严重受损的突变型小鼠即严重联合免疫缺陷(SCID)小鼠,该突变基因的纯合子缺乏 T 和 B 淋巴细胞,NK 细胞的功能也是缺乏的^[12],对体外移植物免疫排斥较低,比 BALB/c 裸鼠单一缺损 T 淋巴细胞更适于异体移植。邵志敏等^[13]将经病理诊断证实的女性炎性乳腺癌标本移植至雌性裸鼠皮下,并和非炎性乳腺癌移植瘤 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 进行了比较,证实该动物模型表现为人类炎性乳腺癌的生物学特征,认为炎性乳腺癌的裸鼠移植肿瘤动物模型为研究肿瘤转移机制提供了很好的研究模型。研究者在细胞株中导入各种基因以研究各种基因的功能。如 Liao 等^[14]在 MDA-MB-231 细胞株的基础上,研究 5 型

腺病毒 E1A 基因的功能。他们构建 MDA-MB-231-Vect 和 MDA-MB-231-E1A 的原位移植肿瘤模型,以 MDA-MB-231-Vect 为对照,通过联用 E1A 基因治疗和紫杉醇化疗,能明显地抑制肿瘤生长并诱导肿瘤细胞的凋亡。移植模型相对价廉,可利用 ER 阳性的癌细胞株,且成瘤期相对短,免疫排斥反应弱,肿瘤移植后生长良好,能保持肿瘤细胞的原有形态和生物学特性,可用于研究人体肿瘤对药物的敏感性。但其亦有些缺点:首先,它没有人类乳腺癌组织中的间质细胞;其次,它缺少癌细胞周围的三维结构;第三,如果使用的是免疫缺陷动物,还缺少对肿瘤细胞的免疫反应。为了解决上述缺点,Parmar 等^[15]研究了正常人乳腺上皮细胞在裸鼠中的生长情况,实验中同时植入乳腺上皮细胞和间质细胞,发现该模型中乳腺上皮细胞和间质细胞相互作用,间质细胞对乳腺上皮细胞生长和分化有一定的影响,然而,研究者认为在对癌细胞的研究中,仅在乳腺癌细胞生长需依靠局部微环境情况下才需要同时移植间质细胞。Beekhove 等^[11]应用 NOD/Scid 小鼠植入 MCF-7 细胞系,不经射线照射,成瘤率大于 90%,数天内即有新生血管形成,各项肿瘤标记物的表达良好,较好的模拟了肿瘤的生长环境,是检测新的抗癌治疗方式或药物的良好模型。裸鼠模型固然有其不可比拟的优点,但它们也表现出费用高、生长环境要求无菌、食物和水都需要严格的消毒、寿命短的缺点。

4 转基因乳腺癌动物模型

转基因动物(transgenic animal)是指用实验的方法,有目的地把外源基因(包括人的基因)或特定 DNA 片段导入动物受精卵中,外源基因与动物本身基因整合后,它就能随着动物细胞的分裂而增殖,并稳定地转给后代的一类动物。在 20 世纪 80 年代初发展起来的原核显微注射技术可以将外源 DNA 直接导入小鼠生殖细胞以构建转基因动物模型。在合适启动子的驱动下,目的基因可赋予转基因动物新表型,进而可以通过表型分析基因功能。严格意义上说,转基因动物是人工创造的新动物。

Wagner 等^[6]认为乳腺癌的转基因动物模型的发展可分为几个阶段:一是在乳腺特异的启动子如鼠乳腺肿瘤病毒长末端重复启动子(the mouse mammary tumor virus long terminal repeat promoter,MMTV-LTR)的作用下表达癌基因。目前较多研究还是采取该方法。二是基因打靶又称基因敲除,是指利用外源 DNA 与受体细胞染色体 DNA 上的同源序列之间发生重组,使之整合到预定位点上,并替代原有基因,从而改变细胞遗传性的方法。然而该种转基因动物仍有其缺点:如 *Rassfla*(-/-)鼠产生的肿瘤不仅有乳腺癌,还有肺腺瘤、淋巴瘤等;p53 缺失鼠先产生淋巴瘤,再产生乳腺癌。其次,一些重要的乳腺癌动物模型如乳腺癌易感基因(breast tumor suppressor gene, BRCA)敲除动物在胚胎早期即已死亡。为此,科学家研究发明了条件性基因敲除鼠。第 3 代转基因动物即为条件性基因敲除

鼠。该项技术能使我们在任何一种类型细胞的任何一个特定时间点剔除肿瘤易感基因,而且能用少数的体细胞模拟遗传性乳腺癌的细胞变化。例如转移生长因子 β (TGF- β) 在正终末芽体数目增多被认为是癌前病变的标志之一^[16-17]。也有学者报道用甲基亚硝基脲(MNU)也可一次性诱发乳腺癌^[18]。为了解 TGF13 信号途径在乳腺肿瘤发生、发展、转移过程中的作用,有学者将乳腺上皮中编码 TGF- β 受体 II 型基因敲除掉,构建了 Tgfr2MGKO 鼠。该鼠由于乳腺上皮 Tgfr2 的丢失,引起乳腺腺叶、腺泡的增生及凋亡现象的增多,认为 TGF- β 信号途径在乳腺肿瘤发生中起抑制肿瘤发生发展的作用。转基因和基因敲除鼠模型中肿瘤生长和进展快速,可以比较方便地获得肿瘤发展的整个过程,但不适于早期肿瘤预防的研究。

5 乳腺癌远处转移动物模型

乳腺癌远处转移动物模型的研究,是进行乳腺癌研究的重要内容之一。乳腺癌远处转移动物模型的建立首先有利于药物开发,其次可辨别肿瘤转移抑制或促进基因,使其作为一个新的靶点,用于开发新的治疗方法,并使人们更能理解肿瘤转移的复杂性。建立乳腺癌远处转移动物模型有各种方法。细胞原位植入实验鼠,可自发产生肺和骨转移,也可自尾静脉注入或注射入左心室。Hiraga 等^[19]将 4T1/luc 细胞原位植入实验鼠,可自发产生骨转移,并据此研究发现口服优福定和唑来膦酸(一种钙调节药)可增加 4T1/luc 细胞的凋亡并抑制破骨细胞样细胞形成,认为两种药物联合应用对治疗骨转移是有效的。为建立仅在裸鼠后腿有溶骨性病变的动物模型,Bauerle 等^[20]用绿色荧光蛋白转染人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231,之后取 1×10^5 的乳腺癌细胞注入实验鼠的腹壁浅动脉,再用 X 线、CT、免疫组织化学等方法检测,发现溶骨性病变仅发生于动物的股骨、胫骨和腓骨处,其发生率达 93%。他们认为这种模型能有效地研究乳腺癌的骨转移病变。

6 结语

总之,各种建模方法都有其自身的优点和缺点,在癌症发生的过程中各种生活条件甚至社会应激因素也会对肿瘤生长产生影响,目前尚未有一种完美的与人体内肿瘤完全一致的模型。随着对乳腺癌认识的不断深入,特别是实验动物学和分子生物学的发展,乳腺癌动物模型的研究取得一定的进展。研究者多根据实验目的需要,一方面致力于建构新的更方便、更符合实验要求的模型,另一方面对已有模型继续研究加以改进。合适的乳腺癌动物模型的建立将在研究人类乳腺癌的发生、发展、转移等方面中发挥着重要作用。

【关键词】 乳腺癌;动物模型

【中图法分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

参考文献

- [1] Li Y, Hively W P, Varmus H E. Use of MMTV-Wnt-1 transgenic mice for studying the genetic basis of breast cancer. *Oncogene*, 2000, 19:1002 – 1009.
- [2] Tsukamoto A S, Grosschedl R, Guzman R C, *et al.* Expression of the int-1 gene in transgenic mice is associated with mammary gland hyperplasia and adenocarcinomas in male and female mice. *Cell*, 1998, 55:619 – 625.
- [3] Hosokawa Y, Papanikolaou A, Cardif R D, *et al.* In vivo analysis of mammary and non-mammary tumorigenesis in MMTV-ey-clinD1 transgenic mice deficient in p53. *Transgenic Res*, 2001, 10:471 – 478.
- [4] Rao G N, Ney E, Herbert RA, *et al.* Effect of melatonin and linolenic acid on mammary cancer in transgenic mice with c-neu breast cancer oncogene. *Breast Cancer Res Treat*, 2000, 64:287 – 296.
- [5] Lee H, Park D S, Razalli B, *et al.* Caveolin-1 mutations (P132L and null) and the pathogenesis of breast cancer: caveolin-1 (P132L) behaves in a dominant-negative manner and caveolin-1 (–/–) null mice show mammary epithelial cell hyperplasia. *Am J Pathol*, 2002, 161:1357 – 1369.
- [6] Wagner K U. Models of breast cancer: quo vadis, animal modeling? *Breast Cancer Res*, 2004, 6:31 – 38.
- [7] Costa I, Solanas M, Escfich E. Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesions induced with 7,12 dimethylbenz (alpha) anthracene in the rat: a comparative analysis with human breast tumor. *Arch Pathol Lab Med*, 2002, 126:915 – 927.
- [8] Heffelfinger S C, Yan M, Gear R B, *et al.* Inhibition of VEGFR2 prevents DMBA induced mammary tumor formation. *Lab Invest*, 2004, 84:989 – 998.
- [9] Kim H, Hall P, Smith M, *et al.* Chemoprevention by grape seed extract and genistein in carcinogen-induced mammary cancer in rats is diet dependent. *J Nutr*, 2004, 134:3445S – 3452S.
- [10] Kim J B, O'Hare M J, Stein R. Models of breast cancer: is merging human and animal models the future? *Breast Cancer Res*, 2004, 6:22 – 30.
- [11] Beckhove P, Schutz F, diel I J, *et al.* Efficient engraftment of human primary breast cancer transplants in nonconditioned NOD/Sc mice. *Int J Cancer*, 2003, 105:444 – 453.
- [12] Schultz L D, Schweitzer P A, Christianson S W, *et al.* Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSc-seid mice. *J Immunol*, 1995, 154:180 – 191.
- [13] 邵志敏, 刘刚, 丁健, 等. 人类炎性乳腺癌移植肿瘤裸鼠动物模型的建立和生物学特性的研究. *中华外科杂志*, 2001, 39:796 – 798.
- [14] Liao Y, Zou Y Y, Xia W Y, *et al.* Enhanced paclitaxel cytotoxicity and prolonged animal survival rate by a nonviral-mediated systemic delivery of E1A gene in orthotopic xenograft human breast cancer. *Cancer Gene Ther*, 2004, 11:594 – 602.
- [15] Parmar H, Young P, Emerman J T, *et al.* A novel method for glowing human breast epithelium in vivo using ITIOL1Se and human mammary fibroblasts. *Endocrinology*, 2002, 143:4886 – 4896.
- [16] Parnell D M. The relationship of terminal duct hyperplasia to mammary carcinoma in 7,12-dimethylbenz (alpha) anthracene-treated LEW/Mai rats. *Am J Pathol*, 1980, 98:311 – 324.
- [17] 张帆. 大鼠化学诱发性乳癌的形态发生及其生物标记物的研究状况. *中国肿瘤临床*, 1999, 26:64 – 67.
- [18] Thompson H J, McGinley J N, Rothhammer K, *et al.* Rapid induction of mammary intraductal proliferations, ductal carcinoma in situ and carcinomas by the injection of sexually immature female rats with 1-methyl-1-nitrosourea. *Carcinogenesis*, 1995, 16:2407 – 2411.
- [19] Hiraga T, Ueda A, Tamura D, *et al.* Effects of oral UFT combined with or without zoledronic acid on bone metastasis in the 4T1/luc mouse breast cancer. *Int J Cancer*, 2003, 106:973 – 979.
- [20] Bauerle T, Adwan H, Kiessling F, *et al.* Characterization of a rat model with site-specific bone metastasis induced by MDA-MB-231 breast cancer cells and its application to the effects of an antibody against bone sialoprotein. *Int J Cancer*, 2005, 115:177 – 186.

(收稿日期:2007-04-22)

(本文编辑:范林军)