

文章编号:1005-6947(2008)05-0484-04

· 文献综述 ·

乳腺癌实验动物模型的研究进展

仲雷 综述 张建国 审校

(哈尔滨医科大学附属第二医院 乳腺外科, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:实验动物模型在研究人类乳腺癌的生物学行为及治疗等方面起着非常重要的作用。根据制备方法及研究目的的不同,乳腺癌实验动物模型可分为自发性、诱发性、移植性、转基因或基因敲除性及乳腺癌远处转移等5大类,每种动物模型都有各自的特点和应用条件。笔者就各种乳腺癌实验动物模型的建立方法、模型特点及应用条件进行综述。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(5): 484-487]

关键词: 乳腺肿瘤; 模型; 动物; 综述文献

中图分类号: R 737.9

文献标识码: A

乳腺癌是一种严重威胁女性健康和生命安全的恶性肿瘤。全世界每年新发乳腺癌约100万例,死亡约60万例^[1]。近年来我国乳腺癌的患病率在女性各肿瘤中已跃居首位^[2]。乳腺癌的预防、诊断和治疗已成为当今医学科学研究的“热点”。实验动物模型是研究乳腺癌生物学行为重要工具之一。目前,根据制备方法及研究目的的不同,乳腺癌实验动物模型可分为自发性、诱发性、移植性、转基因或基因敲除性及乳腺癌远处转移等5大类,每种动物模型都有各自的建立方法、模型特点和应用条件,现综述于下。

1 自发性乳腺癌动物模型

自发性肿瘤是指实验动物种群中自然发生或通过遗传育种培养而形成的一类肿瘤。目前自发性乳腺

癌动物模型多采用的是近交系小鼠,但其发病率有很大差异,如C3H小鼠中繁殖雌鼠约为95%,处女鼠约为88%,雄鼠低于1%;DBA/2小鼠中繁殖雌鼠约为72%,处女鼠约为48%,雄鼠约为1%;BALB/c小鼠中繁殖雌鼠约为5%,处女鼠约为1%,雄鼠则为0。SHN小鼠,是由兄妹交配维持下来的自发性乳腺癌的一种动物模型,其特点是时间短、癌变率高,一般在出生后4个月开始出现症状,12个月时乳腺肿瘤的患病率可达100%。因此SHN小鼠已成为乳腺肿瘤多级预防、治疗及研究发病机制的良好模型。除了鼠类外,犬、猫等实验动物也能产生自发性乳腺癌。De Maria等^[3]的研究认为,猫的乳腺癌具有高侵袭性,且伴有癌基因Her-2的过表达,是一种更适用于研究人类Her-2过表达的乳腺癌,并可作为探讨高侵袭性乳腺癌新疗法的模型。Pena等^[4]对21只犬的自发性炎性乳腺癌的组织病理形态、免疫组织化学改变及临床特点等进行分析,发现它们呈现出多种癌组织结构类型,并且所有肿瘤的雌激素受体(ER)都是阴性,统计分析发现孕激素受体(PR)阴性与肺的转移呈相关性。据其他他们认为犬的炎性乳腺癌可作为进一步研究人类炎性乳腺癌的一个良好自发性模型。

自发性肿瘤模型可以为研究者提供回顾性和前瞻性研究,其优点首先是肿瘤的产生未经任何有意识的人工处理,发生条件比较自然,与人类肿瘤的发生更为相似,实验结果更易于扩展外推至人类,并且此种模型更有利于对肿瘤发生有影响的遗传因素及环境因素等的观察。但这种自发性模型中肿瘤发生、发展的时间不一致性较大,不能在短时间内获得大量肿瘤学资料,致使实验时间延长,实验所需动物数量多,实验耗费增大等等。这些都是自发性肿瘤模型的不利条件。

2 诱发性乳腺癌动物模型

诱发性肿瘤是指利用化学物质、物理条件或生物因素等在实验动物体内诱发获得的肿瘤。根据实验目的的要求,研究者还可以由剂量及观察时间长短的不同建立癌前期病变的动物模型。诱发性乳腺癌动物模型目前较多采用的是化学诱导方式^[5],诱导剂一般用二甲基苯蒽(DMBA)、甲基亚硝基脲(MNU)或甲基胆蒽。诱导方式可以采用经胃管灌注、局部涂抹或皮下注射等。Russo等^[6]研究发现,MNU和DMBA诱导的乳腺肿瘤在对激素的敏感程度及组织学等方面有很多相似之处,多为激素依赖性腺癌。不同之处在于:MNU作为致

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30672420)。

收稿日期:2007-12-17;

修订日期:2008-01-31。

作者简介:仲雷,男,黑龙江省哈尔滨医科大学附属二院住院医师,主要从事乳腺癌的基础和临床方面的研究。

通讯作者:仲雷 E-mail: zhongleiyd@hotmail.com

瘤物直接诱导乳腺肿瘤的发生,DMBA本身不直接致癌,而是通过代谢产生最终致癌物;MNU诱导的乳腺肿瘤中,恶性与良性肿瘤的比例高于DMBA所诱导的乳腺肿瘤,且所产生的恶性肿瘤侵袭性更高;MNU诱导的乳腺肿瘤多表现为雌激素依赖,DMBA诱导的乳腺肿瘤多表现为催乳素依赖。Costa等^[7]进一步分析了DMBA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。该模型与人类乳腺癌在形态学方面的有很多相似之处,并且某些特性和肿瘤侵袭性呈相关性。

诱发性实验肿瘤模型研究的开展,使研究得以有计划、有步骤地观察癌变的整个过程。建立此类乳腺癌动物模型,操作简单,靶器官和诱癌剂恒定,诱发形成癌变率高,肿瘤生长速度较慢,肿瘤细胞增殖比率低,倍增时间长,更类似于人体肿瘤细胞动力学特征,故可用于乳腺癌病因学研究、预防性研究以及综合化疗效果评估的研究^[8-9]。但诱导性乳腺癌动物模型的建立过程长,不易同时获得病程或癌块大小较均一的动物,成功率多数达不到100%,实验动物个体差异很大,肿瘤细胞的形态特征差别也很大,浸润和转移能力低,恶性行为表达有限。所以该种模型较少作为肿瘤药物筛选的动物模型。

3 移植性乳腺癌动物模型

移植性乳腺癌动物模型是指将乳腺癌组织或细胞移植于实验动物而培养出的模型。移植方式包括:肿瘤组织块接种、组织块悬液注射、细胞悬液注射等。移植部位分为原位移植和异位移植。根据移植体来源不同可分为同种移植和异种移植。

3.1 同种移植

利用已建立的同种乳腺癌细胞株进行同种或同品系动物移植,一般使用免疫功能正常的小鼠。目前已建立的鼠类乳腺癌细胞株有C127,

4T1, TM40等,其中4T1和TM40来源于近交系BALB/C小鼠。Shi等^[10]采用4~6周的BALB/C小鼠,选择对数生长期的TM40,在小鼠胸壁5~6肋间或腹壁第4对乳腺处皮下接种肿瘤细胞0.1mL,相当于105~107细胞/只小鼠;一般接种后1周,肉眼便可见皮下肿块,成瘤率为100%;在无任何治疗的情况下,荷瘤小鼠可存活12~15周。这种模型是目前抗癌药物筛选和药效学研究中使用的最多的模型。应用同种移植方法建立的乳腺癌动物模型的优点是,周期短、成本低、实验动物均带有同样的肿瘤、肿瘤生长速度较为一致、成功率可达到100%,并且可在实验动物中连续移植,长期保留供实验之用。但值得注意的是此类肿瘤的生长速度快,增殖比率高,体积倍增时间短;这些特点与人体肿瘤生物学特性是显著不同的。

3.2 异种移植

异种移植模型是指利用已建立的人类乳腺癌细胞株移植于免疫缺陷动物体内所建立的动物模型。裸鼠因先天性缺乏胸腺,T细胞免疫功能接近于零。所以当人体肿瘤移植到裸鼠体内时无排斥反应;移植后的人体肿瘤保持其原有的组织形态、免疫学特点以及特有的染色体组型和对抗肿瘤药的原有敏感性,且对培养条件等要求比SCID(severe combined immune deficient)鼠低,易于动态观察肿瘤的生长状态。同时人类恶性肿瘤的两大重要特征浸润和转移,在裸鼠上可以通过接种方式、部位的选择,达到较满意的表达效果。因此,裸鼠是目前进行人乳腺癌细胞异位移植最为常用的实验动物。邵志敏等^[11]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,并与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,认为此种动物模型是研究肿瘤转移机制的良好动物模型。甄林林等^[12]采用MCF-7细胞接种于6周龄雌性裸鼠右侧胸壁乳垫下,也成功建立了乳腺癌异种移植实

验动物模型,肿瘤移植成功率高达95%。在异种移植模型基础之上,有研究者开展了在细胞株中导入各种基因以进行基因功能的研究。如Liao等^[13]在MDA-MB-231细胞株的基础上,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,研究5型腺病毒E1A基因的功能。结果发现,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凋亡。

异种移植肿瘤模型的应用日益广泛,且是目前研究最多的肿瘤模型。容易人为操作,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,周期短,成瘤稳定,成功率常可达到100%,均一性好,患病率高,成瘤时间差异不大,容易施加干扰因素。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1cm时,中间有干酪样坏死,故其对成瘤、治疗、浸润和转移、药物敏感性等研究非常有用。但这种模型也存在一些缺点:首先,该模型费用高,寿命短,生长环境要求无菌,食物和水都需要严格的消毒;其次,它缺乏人类乳腺组织中的间质细胞,癌细胞周围的三维结构不明显,缺少对肿瘤细胞的免疫反应。因此,该模型不能用于病因学、癌前病变和癌变的研究。实际上,部分移植体仍会在裸鼠体内出现排斥,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。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又存在密切的关系。因此这样的处理容易影响到肿瘤的生物行为,也即限制了该模型的应用。

4 转基因或基因敲除乳腺癌动物模型

4.1 转基因乳腺癌动物模型

转基因动物是指用人工的方法将外源目的基因或特定的DNA片段

导入宿主动物体内,使之在宿主基因组中稳定整合而得以表达,并能遗传给后代的一类动物。利用转基因技术建立的乳腺癌动物模型,目前研究较多的是 MMTV-Wnt-1 转基因小鼠和 c-rel 转基因鼠。研究发现,在由鼠乳腺肿瘤病毒(MMVT)感染所致的小鼠乳腺癌中,MMVT 原病毒的插入位点位于 Wnt-1 基因编码区之外。MMVT-LTR(鼠乳腺肿瘤病毒长末端重复启动子)只是作为增强子,激活 Wnt-1 在乳腺上皮细胞中的表达。据此可利用 MMTV 增强子的作用建立了 MMTV-Wnt-1 转基因小鼠模型;并在分子水平证实了在 MMTV-Wnt-1 转基因小鼠的乳腺中有 Wnt-1 基因的高水平表达,而这种高表达可以激活自身及邻近细胞膜上的 Wnt 蛋白受体,引起乳腺上皮细胞的恶性转化^[14]。MMTV-Wnt-1 转基因小鼠,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,且其发生时间一般不受遗传背景的影响。它已广泛地应用于各种研究中^[15-16],是研究乳腺癌发病机制及抗乳腺癌药物良好的高发乳腺癌动物模型。c-rel 转基因鼠是在乳腺特异的启动子如 MMTV-LTR 作用下而表达癌基因的。Romieu Mourez 等^[17]将含鼠 c-rel 基因的 cDNA 插入含 MMTV-LTR 启动子的质粒中,并转染 FVB/N 鼠,成功构建了 c-rel 转基因鼠。然而,后期研究发现在这种转基因动物模型,妊娠期的激素会诱导特定癌基因的表达,导致经产动物肿瘤患病率的提高。这与人类乳腺癌发生中妊娠是保护因素正好是相反的^[18]。

4.2 基因敲除乳腺癌动物模型

基因敲除技术是指利用同源重组将具有同源序列的有功能基因置换出来,造成功能基因的缺失或失活的方法。运用该技术常规敲除实验动物基因组中的乳腺癌易感基因,即建立了基因敲除乳腺癌动物模型。p53 基因为抑癌基因,该基因的突变或缺失,可导致细胞过度增殖,进而发生癌变。Umesako 等^[19]利用基因敲

除技术抑制 p53 功能,成功建立了 p53 基因敲除鼠乳腺癌模型。但后续研究发现 p53 基因敲除鼠可产生乳腺癌,但同时也可产生其他多种恶性肿瘤,因而限制了该模型的应用。

近年来的研究发明了一种更为先进的基因敲除动物模型即条件性基因敲除鼠,利用噬菌体 P1 的 Cre 重组酶,催化切除两个 LoxP 识别位点之间的靶基因的目标片段进而建立的模型^[20]。该项技术能在任何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。例如转化生长因子 β 亚型(TGF- β)在正常生理活动中起生长因子作用,能调节机体生长发育、细胞增殖及免疫反应等。为了解 TGF- β 信号途径在乳腺肿瘤发生、发展、转移过程中的作用,Forrester 等^[21]将乳腺上皮中编码 TGF- β 受体 II 型(Tgfr2)的基因剔除,构建了 Tgfr2-MGKO 鼠。该鼠由于乳腺上皮 Tgfr2 的丢失,引起乳腺腺叶、腺泡增生及凋亡现象者增多,并且发生乳腺癌的中位潜伏期缩短及肺转移增多。因此认为,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。

转基因或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。因此主要用于肿瘤转化及肿瘤发生中基因生物学功能的研究。

5 乳腺癌远处转移动物模型

转移是恶性肿瘤的基本生物学特性之一,研究转移是肿瘤研究的一个重要领域。根据途径不同分为实验性转移和自发性转移模型。实验性转移适合研究肿瘤细胞转移后期阶段的着床、生长、血管生成等;自发性转移能再现肿瘤细胞转移的全过程,是较为理想的乳腺癌远处转移模型。细胞原位植入、尾静脉注入或左心室注射,实验鼠都可自发产生远处转移。骨是乳腺癌发生远处转移的最为常见的部位之一。乳腺癌骨转移动物模型是研究人乳腺癌骨转移的发病机制及其治疗措施的重要

工具。Hiraga 等^[22]将 4T1/luc 细胞原位植入实验鼠,建立了自发性的骨转移模型。在此基础上研究发现,口服优福定和唑来膦酸可增加 4T1/luc 细胞的凋亡并抑制破骨细胞样细胞形成,二者联合治疗对乳腺癌骨转移有较好的效果。Bauerle 等^[23]采用绿色荧光蛋白转染人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231,建立了仅在裸鼠后腿有溶骨性病变的动物模型,为有效研究乳腺癌的骨转移病变提供了更为可靠的动物模型。

乳腺癌远处转移动物模型的探索,是进行乳腺癌研究的重要内容之一。它能使人们更深入地理解肿瘤转移的复杂性,有利于寻找肿瘤转移抑制或促进因素,进一步为开发新的治疗药物和方法提供新的途径。

概言之,随着实验动物学和分子生物学的不断发展,乳腺癌动物模型的研究取得了很大的进步。在研究人类乳腺癌的发生、发展、转移、治疗等方面发挥着重要的作用。理想的乳腺癌动物模型应具备:(1)致癌方法简单、易行;(2)经济、快速;(3)指标客观、明确;(4)对癌变器官的特异性高;(5)重复性好;(6)诱发乳腺癌的病理类型、生物学行为、电镜下表现及组织化学等改变应具有与人体癌肿相似的条件。必须清醒地认识到,目前建立的各种乳腺癌动物模型尚未达到理想模型的全部条件,都有着其自身的优点和缺点。研究者只能根据不同的实验目的,选择与实验要求近似的动物模型进行研究。另外,特别值得注意的是,由于生活环境和遗传背景等因素的差异,动物模型所表现出来的乳腺癌不能等同于人类的乳腺癌,动物实验比较和推论出来的人类疾病,决不能等同于人类疾病。

参考文献:

- [1] Smigal C, Jemal A, Ward E, et al. Trends in breast cancer by race and ethnicity: update 2006 [J]. CA Cancer J Clin, 2006, 56(3):168-183.
- [2] 张嘉庆,王殊,乔新民. 乳腺癌

- 的现状与远景[J]. 中华外科杂志, 2002, 40(3): 161 - 163.
- [3] De Maria R, Olivero M, Iussich S, *et al.* Spontaneous feline mammary carcinoma is a model of HER2 overexpressing poor prognosis human breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(3): 907 - 912.
- [4] Pena L, Perez-Alenza MD, Rodriguez-Bertos A, *et al.* Canine inflammatory mammary carcinoma: histopathology, immunohistochemistry and clinical implications of 21 cases [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2003, 78(2): 141 - 148.
- [5] Wagner KU. Models of breast cancer: quovadis, animal modeling? [J]. *Breast Cancer Res*, 2004, 6(1): 31 - 38.
- [6] Russo IH, Russo J. Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies [J]. *Enviro Health Perspect*, 1996, 104(9): 938 - 967.
- [7] Costa I, Solanas M, Escrich E. Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesions induced with 7, 12 dimethylbenz (alpha) anthracene in the rat: a comparative analysis with human breast tumors [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2002, 126(8): 915 - 927.
- [8] Heffelfinger SC, Yan M, Gear RB, *et al.* Inhibition of VEGFR2 prevents DMBA-induced mammary tumor formation [J]. *Lab Invest*, 2004, 84(8): 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]. *J Nutr*, 2004, 134(12): 3445 - 3452.
- [10] Shi HY, Zhang W, Liang R, *et al.* Blocking tumor growth, invasion, and metastasis by maspin in a syngeneic breast cancer model [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(18): 6945 - 6951.
- [11] 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[J]. 中华外科杂志, 2001, 39(10): 796 - 798.
- [12] 甄林林, 武正炎, 范萍, 等. 人乳腺癌裸鼠移植模型的建立 [J]. 南京医科大学学报, 2001, (11): 509 - 510.
- [13] Liao Y, Zou YY, Xia WY, *et al.* Enhanced paclitaxel cytotoxicity and prolonged animal survival rate by a nonviral-mediated systemic delivery of E1 A gene in orthotopic xenograft human breast cancer [J]. *Canver Gene Ther*, 2004, 11(9): 594 - 602.
- [14] Tsukamoto AS, Grosschedl R, Guzman RC, *et al.* Expression of the intl gene intransgenic mice is associated with mammary gland hyperplasia and adenocarcinomas in male and femal mice [J]. *Cell*, 1998, 55(4): 619 - 625.
- [15] Hosokawa Y, Papanikolaou A, Cardiff RD, *et al.* In vivo analysis of mammary and non-mammary tumorigenesis in MMTV-cyclinD1 transgenic mice deficient in p53 [J]. *Transgenic Res*, 2001, 10(5): 471 - 478.
- [16] Rao GN, Ney E, Herbert RA, *et al.* Effect of melatonin and linolenic acid on mammary cancer intransgenic mice with c-neu breast cancer oncogene [J]. *Braest Cancer Res Treat*, 2000, 64(3): 287 - 296.
- [17] Romieu Mourez R, Kim DW, Shin SM, *et al.* Mouse mammary tumor virus c-rel transgenic mice develop mammary tumors [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(16): 5738 - 5754.
- [18] Kim JB, O, Hare MJ, Stein R. Models of breast cancer: is merging human and animal models the future? [J]. *Breast Cancer Res*, 2004, 6(1): 31 - 38.
- [19] Umesako S, Fujisawa K, Iigas S, *et al.* Atm heterozygous deficiency enhances development of mammary carcinomas in p53 heterozygous knockout mice [J]. *Breast Cancer Res*, 2005, 7(1): 164 - 170.
- [20] Deng CX, Xu X. Generation and analysis of brcal conditional knockout mice [J]. *Methods Mol Biol*, 2004, 280(1): 185 - 200.
- [21] Forrester E, Chytil A, Bierie B, *et al.* Effect of conditional knockout of the type II TGF-beta receptor gene in mammary epithelia on mammary gland development and polyomavirus middle T antigen induced tumor formation and metastasis [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(6): 2296 - 2302.
- [22] 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 [J]. *Int J Cancer*, 2003, 106(6): 973 - 979.
- [23] 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 [J]. *Int J Cancer*, 2005, 115(2): 177 - 186.