

刘燕, 彭梦薇, 刘高源, 等. 4T1 乳腺癌细胞株接种联合慢性束缚应激诱导乳腺癌合并抑郁小鼠模型构建探索 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(3): 36-44, 50.

Liu Y, Peng MW, Liu GY, et al. Exploration of mouse model of breast cancer complicated with depression induced using 4T1 breast cancer cell inoculation combined with chronic restraint stress [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(3): 36-44, 50.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.03.005

4T1 乳腺癌细胞株接种联合慢性束缚应激诱导 乳腺癌合并抑郁小鼠模型构建探索

刘 燕^{1,3}, 彭梦薇¹, 刘高源¹, 杨铁柱², 张文娴¹, 吴耀松¹, 陈玉龙^{1*}

(1. 河南中医药大学中医学院(仲景学院), 河南省中医方证信号传导重点实验室, 郑州 450046;

2. 河南省洛阳正骨医院(河南省骨科医院)重症医学科, 郑州 450000;

3. 河南中医药大学, 河南省豫药全产业链研发协同创新中心, 郑州 450046)

【摘要】 目的 研究 4T1 乳腺癌细胞株接种联合慢性束缚应激方法构建乳腺癌合并抑郁症小鼠模型核心行为症状、生物学指标、病理学等改变。**方法** BABL/c 小鼠随机分为正常(Control)组、束缚(Stress)组、移植瘤(Tumor)组和束缚移植瘤(Stress+Tumor, S+T)组, 将 4T1 细胞株接种于 Tumor 和 S+T 组小鼠腋下, 待成瘤后, 给予 Stress 和 S+T 组小鼠束缚应激 21 d。造模期间监测各组小鼠体重、摄食量。实验结束后, 采用糖水偏好、旷场、高架十字迷宫、强迫游泳等试验评价各组小鼠抑郁样行为。小鼠处死后, 测量小鼠瘤体重量和体积; 采用 ELISA 方法检测各组小鼠血清肿瘤标志物糖类抗原(CA199)、癌胚抗原(CEA)、血管内皮生长因子(VEGF)以及相关神经递质 5-羟色胺(5-HT)、去甲肾上腺素(NE)、皮质酮(CORT)的含量; 运用 HE 染色法观察小鼠肿瘤和海马组织病理学改变。**结果** S+T 组小鼠体重、摄食量显著降低, 瘤体重量和体积明显增大, 血清肿瘤标志物(CA199、CEA、VEGF)水平显著升高, 快感和对新环境的探索欲望减弱, 紧张和绝望行为显著增强, 血清神经递质 5-HT 和 NE 水平显著降低, CORT 水平显著升高; 另外肿瘤组织细胞排列松散, 间质减少, 病理性核分裂象增多, 海马 CA3 区神经元细胞排列和形态紊乱, 核内空泡化样改变明显。**结论** 4T1 乳腺癌细胞株接种联合慢性束缚应激诱导的乳腺癌合并抑郁小鼠模型出现了乳腺癌和抑郁症双重典型症状和生物学指标改变, 可为乳腺癌合并抑郁实验研究提供较好的模型参考。

【关键词】 乳腺癌合并抑郁; 移植瘤; 慢性束缚应激; 肿瘤标志物; 神经递质; 行为学

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 03-0036-09

Exploration of mouse model of breast cancer complicated with depression induced using 4T1 breast cancer cell inoculation combined with chronic restraint stress

LIU Yan^{1,3}, PENG Mengwei¹, LIU Gaoyuan¹, YANG Tiezhu², ZHANG Wenxian¹, WU Yaosong¹, CHEN Yulong^{1*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine(Zhoujing College), Henan Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Prescription and Syndrome Signaling, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China. 2. Intensive Care Unit, Luoyang Orthopedic Hospital of Henan Province (Orthopedic Hospital of Henan Province), Zhengzhou 450000.

【基金项目】 国家自然科学基金(82104717); 河南省“双一流”创建学科中医学科学研究专项(HSRP-DFCTCM-2023-1-11); 河南省科技厅河南省重点研发与推广专项(科技攻关)(232102310443, 202102310493); 河南省特色骨干学科中医学学科建设项目(STG-ZYXKY-2020028)。

【作者简介】 刘燕(1984—), 女, 博士, 高级实验师, 硕士生导师, 研究方向: 肝郁方证基础研究。E-mail: hnyan@163.com

【通信作者】 陈玉龙(1973—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中医方证基础研究。E-mail: cyl72621@163.com

3. Henan University of Chinese Medicine, Collaborative Innovation Center of Research and Development on the Whole Industry Chain of Yu-Yao, Henan Province, Zhengzhou 450046)

【Abstract】 Objective To study the core behavioral symptoms, biological indicators, and pathological changes of a mouse model of breast cancer complicated with depression induced using 4T1 breast cancer cell inoculation combined with chronic restraint stress (CRS). **Methods** BALB/c mice were randomly divided into Control, Stress, Tumor, and stress combined with tumor (S+T) groups. Mice in the tumor and S+T groups were inoculated under the front legs with breast cancer 4T1 cells. After tumor formation, mice in the stress and S+T groups were subjected to CRS for 21 days. The body weight and food intake of each group were monitored during modeling. After the experiment, the occurrence of depression-like behavior of mice in each group was evaluated by sucrose preference test, open field test, elevated plus-maze test, and forced swimming test. After the mice were decapitated, the weights and volumes of the tumors were measured. Concentrations of serum tumor markers, including carbohydrate antigen (CA199), carcinoembryonic antigen (CEA), and vascular endothelial growth factor (VEGF), and related neurotransmitters, including 5-hydroxytryptamine (5-HT), norepinephrine (NE), and corticosterone (CORT), were determined using ELISA. HE staining was used to observe histopathological changes to the hippocampus and tumor. **Results** In S+T group mice, body weight and food intake were significantly decreased, tumor weight and volume were significantly increased, serum tumor marker (CA199, CEA, VEGF) levels were significantly increased, enthusiasm and desire to explore a new environment were reduced, stress and despair behaviors were significantly increased, and levels of the serum neurotransmitters 5-HT and NE and levels of CORT were significantly increased. In addition, the cell arrangement in the tumor tissue was loose, the amount of intercellular substance decreased, the pathological nuclear classification phase was increased, the arrangement and morphology of neurons in the CA3 region of the hippocampus were disordered, and there were obvious nuclear vacuolation-like changes. **Conclusions** A mouse model of breast cancer complicated with depression induced by 4T1 breast cancer cell inoculation combined with CRS showed the typical dual symptoms and biological indicators of breast cancer and depression and can be used as a good reference model for experimental studies of breast cancer complicated with depression.

【Keywords】 breast cancer complicated with depression; transplanted tumor; chronic restraint stress; tumor marker; neurotransmitter; behavior

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

根据世界卫生组织国际癌症研究机构公布的 2020 年数据,乳腺癌最新诊断发病率首次超过肺癌,成为全球发病率第一的癌症^[1]。随着医疗策略的转变,人们逐渐意识到乳腺癌的发生不仅与生理因素有关,还与个人神经、心理因素和社会环境所造成的压力密切相关。与其他类型癌症相比,由于放化疗、乳房切除术、更年期等因素的副作用,乳腺癌患者的抑郁症发生率显著升高,而且抑郁情绪又可导致乳腺癌的复发和转移,从而直接影响乳腺癌患者的预后和生存率^[2]。因此,抑郁与乳腺癌之间的联系越来越受到研究者的重视,然而,目前关于乳腺癌合并抑郁症(breast cancer related depression, BCRD)的研究多倾向于临床,由于临床研究局限性较多,因此其深层分子机制研究的开展仍需要依靠动物模型来完成,故探索和构建乳腺癌合并抑郁症动物模型可为 BCRD 的防治研究,以及抑郁症和乳腺癌之间的关系研究等提供可靠的

模型参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

由北京华卓康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2019-0008]提供的 SPF 级 5 周龄,体重(13±2)g 的雌性 BALB/c 小鼠 40 只,饲养于河南中医药大学屏障动物房[SYXK(豫)2021-0015],饲养环境温度(22±2)℃,湿度 30%~40%,适应性喂养 1 周后进行造模。本实验中涉及的动物造模及相关操作程序得到河南中医药大学伦理委员会审核批准(DWLL202206003),实验设计及动物使用遵循 3R 原则。

1.1.2 细胞株

4T1 小鼠乳腺癌细胞株购于中国科学院典型培养物保藏委员会昆明细胞库(KCB200967YJ),以含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 (内含 2 mmol/L L-

glutamine)完全培养基,置于温度为 37 ℃,CO₂ 浓度为 5%的培养箱中常规传代培养。

1.2 主要试剂与仪器

小鼠 5-羟色胺酶联免疫吸附测定试剂盒 (Elabscience, 规格:48 T, 批号:E-EL-0033c);小鼠皮质酮酶联免疫吸附测定试剂盒 (Elabscience, 规格:48 T, 批号:E-OSEL-M0001);小鼠去甲肾上腺素 (NA/NE) 酶联免疫吸附测定试剂盒 (Elabscience, 规格:48 T, 批号:E-EL-0047c);小鼠血管内皮细胞生长因子 B (VEGF-B) 酶联免疫吸附测定试剂盒 (Elabscience, 规格:48 T, 批号:E-EL-M1229c);小鼠癌胚抗原 (CEA) 酶联免疫吸附检测试剂盒 (ELK Biotechnology, 48 T, 批号:ELK1130);小鼠 CA199 ELISA 试剂盒 (Fine Test, 规格:48 T, 批号:M0889I030);HE 染液 (索莱宝, 规格:500 mL, 批号:G1120);RPMI Medium1640 培养液 (Solarbio, 规格:500 mL, 批号:20221230);胎牛血清 (美国 Hyclone, 规格:500 mL, 批号:RK09403)。Tracking Master V3.1.59 型行为学分析系统 (北京众实科技有限公司);BioTek EPOCH 型多功能酶标仪 (美国伯腾仪器有限公司);全自动生物组织脱水和石蜡包埋机 (Thermo 公司);DM750 型生物显微镜 (德国 LEICA)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及造模

40 只 BALB/c 小鼠根据随机数字表法平均分为正常 (Control) 组、束缚 (Stress) 组、移植瘤 (Tumor) 组和束缚移植瘤 (Stress+Tumor, S+T) 组,每组 10 只。4T1 细胞传代培养后,调整细胞浓度为 2×10^7 /mL,除正常组和束缚组外,其余各组小鼠均进行皮下接种 0.1 mL,75%乙醇消毒 BALB/c 小鼠右腋下皮毛,1 mL 注射器轻轻刺入皮下,推入细胞悬液,为保证细胞活力,实验过程将 4T1 细胞悬液置于含冰块的烧杯中,整个接种过程于 1 h 内完成^[3-4]。待 7 d 左右成瘤后,除正常组和移植瘤组小鼠外,其余各组小鼠均接受 21 d 束缚应激造模。

1.3.2 动物一般情况观察

体重和摄食量监测:每周记录小鼠摄食量和体重的改变,并算出各组每只小鼠的平均体重和摄食量。

肿瘤体积和重量:剥离移植瘤小鼠瘤体,称取瘤体重量,游标卡尺测量肿瘤体积大小,肿瘤体积 (cm^3) = $1/2ab^2$ (a 为肿瘤长径, b 为肿瘤短径)。

1.3.3 动物行为学检测

糖水偏好试验 (sucrose preference test, SPT) 是评估动物快感缺失症状及抑郁程度的重要手段。将小鼠单笼饲养,第 1 天给予小鼠两个均装满 1% 蔗糖水的饮水瓶;第 2 天给予小鼠两个饮水瓶,一个装纯净水,一个装 1% 蔗糖水;第 3 天禁食禁水;第 4 天正式试验开始时同时给予小鼠 1 瓶纯净水和 1 瓶 1% 蔗糖水,1 h 后同时取走两个水瓶并称重,根据公式:糖水偏好 = 糖水消耗量/总耗水量 $\times 100\%$, 计算各组动物糖水偏好。

强迫游泳试验 (forced swimming test, FST) 过程中的不动时间为反映动物绝望行为的主要指标。将小鼠放入注水的强迫游泳桶中进行 15 min“前游泳”,24 h 后,将小鼠再次置于游泳桶中进行 5 min“测试游泳”并录像,评测小鼠游泳行为与不动行为。

旷场试验 (open field test, OFT) 主要用来评价动物的自主运动能力,探索紧张、抑郁等行为。将小鼠放入 40 cm $\times$ 40 cm $\times$ 40 cm 规格且内部和底部为灰色的旷场箱底部中心位置,计时的同时进行视频采集,观察 5 min 内小鼠的活动情况,运用 Tracking Master V3.1.59 行为学分析系统对每组小鼠活动情况和行为进行分析和评价。

高架十字迷宫试验 (elevated plus-maze test, EPM) 是一个简单、快速、结果重复性好的焦虑检测模型,由两条开放臂 (50 cm $\times$ 10 cm)、两条封闭臂 (50 cm $\times$ 10 cm $\times$ 35 cm) 和连接四臂的中央区 (10 cm $\times$ 10 cm) 组成,距离地面高 60 cm。在中央区正上方 1.5 m 处安置摄像头。将小鼠面向闭合臂放入迷宫中央格,计时的同时进行视频采集,记录 5 min 内小鼠的活动情况,运用 Tracking Master V3.1.59 行为学分析系统对每组小鼠开放臂、封闭臂进入次数和停留时间进行分析。

1.3.4 小鼠血清神经递质 (5-HT、CORT、NE) 和肿瘤标志物 (VEGF、CEA、CA199) 含量检测

将各组小鼠全血样品室温放置 1 h 后,4 ℃, 1000 r/min 离心 20 min,取上清进行检测。分别设定标准孔、空白孔和样本孔。标准孔内按要求加入 50 μL 倍比稀释的标准品,空白孔加入 50 μL 样本稀释液,样本孔加入 50 μL 待测样本 (每个样本设立 3~5 个复孔),然后按照要求分别加入生物素化抗体工作液,37 ℃ 孵育 45 min,洗板,加入加酶结合工作液 100 μL ,37 ℃ 孵育 30 min,洗板,加入底物溶

液 90 μL, 37 ℃ 孵育 15 min, 当标准孔出现明显梯度时(前 4 个显色孔出现明显蓝色梯度), 每孔加入终止液 50 μL, 立即用酶标仪在 450 nm 波长测量各孔的光密度(OD 值)。

1.3.5 小鼠海马和肿瘤组织病理改变观察

石蜡切片脱蜡、水化——苏木素染色 5 min——流水冲洗 1 min——1% 盐酸酒精分色——伊红染色——自来水冲洗 30 s——梯度乙醇脱水——二甲苯透明——封片——显微镜观察拍照。

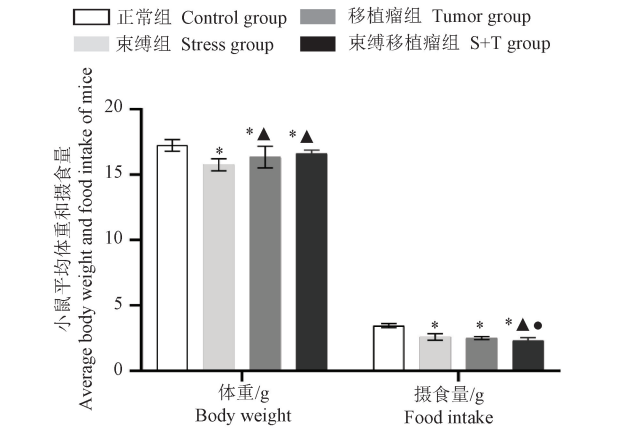
1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行分析, 计量资料以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)描述。方差齐性且符合正态分布数据时, 采用 One-Way ANOVA 方法对数据进行分析, 组间比较采用 LSD 检验, 数据不符合方差齐性组间比较采用 *T* 检验, *P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠体重和摄食量比较

如图 1 所示, 束缚组、移植瘤组和束缚移植瘤组小鼠体重和摄食量较正常组均显著下降(*P*<0.05); 束缚组和束缚移植瘤组小鼠体重较束缚组显著增加(*P*<0.05); 束缚移植瘤组小鼠摄食量较束缚组和移植瘤组显著减少(*P*<0.05)。



注: 与正常组比较, **P*<0.05; 与束缚组比较, ▲*P*<0.05; 与移植瘤组比较, ●*P*<0.05。

图 1 各组小鼠体重和摄食量比较

Note. Compared with Control group, **P*<0.05. Compared with Stress group, ▲*P*<0.05. Compared with Tumor group, ●*P*<0.05.

Figure 1 Comparison of body weight and food intake of mice in each group

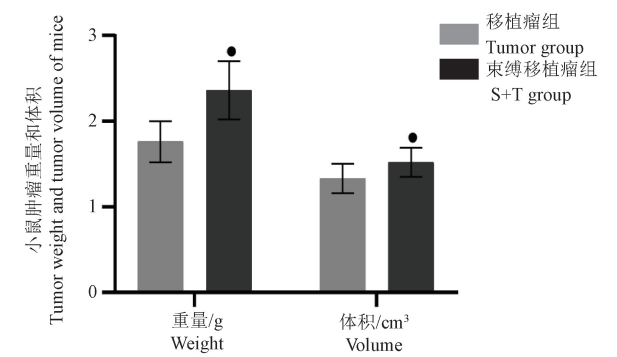
2.2 各组小鼠肿瘤重量和体积比较

如图 2 所示, 与移植瘤组比较, 束缚移植瘤组小鼠肿瘤重量和体积均显著增加(*P*<0.05)。

2.3 各组小鼠行为学检测结果

快感缺失变化如图 3 所示, 与正常组比较, 其余 3 组小鼠糖水消耗显著减少(*P*<0.05); 与束缚组和移植瘤组比较, 束缚移植瘤组小鼠糖水消耗量显著减少(*P*<0.05)。

绝望行为变化如图 4 所示, 与正常组比较, 其余 3 组小鼠 5 min 不动时间显著增加(*P*<0.05), 其中

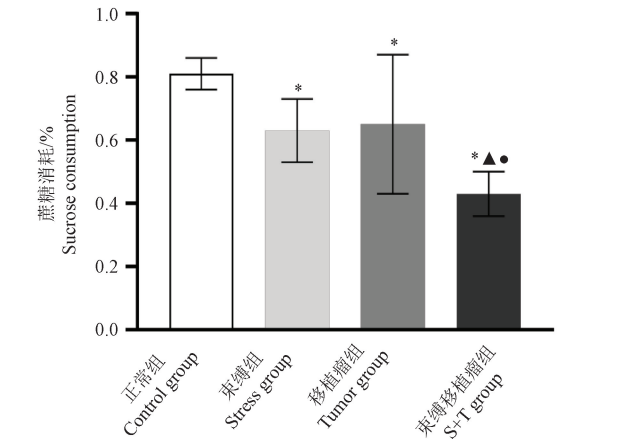


注: 与移植瘤组比较, ●*P*<0.05。

图 2 各组小鼠肿瘤重量和体积比较

Note. Compared with Tumor group, ●*P*<0.05.

Figure 2 Comparison of tumor weight and tumor volume of mice in each group



注: 与正常组比较, **P*<0.05; 与束缚组比较, ▲*P*<0.05; 与移植瘤组比较, ●*P*<0.05。

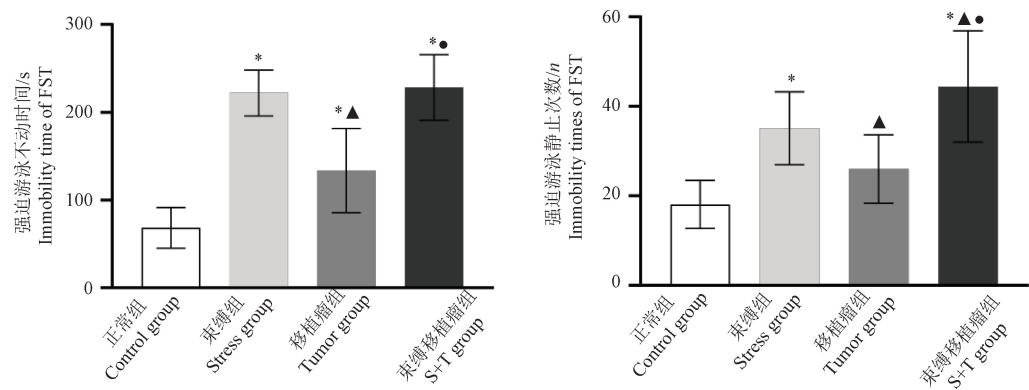
图 3 各组小鼠糖水偏好比较

Note. Compared with Control group, **P*<0.05. Compared with Stress group, ▲*P*<0.05. Compared with Tumor group, ●*P*<0.05.

Figure 3 Comparison of sucrose consumption of mice in each group

束缚组和束缚移植瘤组小鼠 5 min 不动次数也显著增加 ($P<0.05$) ;与束缚组比较,移植瘤组小鼠不动时间和次数显著增加 ($P<0.05$) ,束缚移植瘤组不动次数显著增加 ($P<0.05$) ;与移植瘤组比较,束缚移植瘤组小鼠不动时间和次数显著增加 ($P<0.05$) 。

自主运动和紧张意识的变化如图 5 所示,与正常组比较,其余 3 组小鼠总运动距离和中央区进入次数显著减少 ($P<0.05$) ,其中束缚和束缚移植瘤组小鼠中央区停留时间显著减少 ($P<0.05$) ;与束缚组比较,移植瘤组小鼠中央区停留时间显著增加 ($P<$

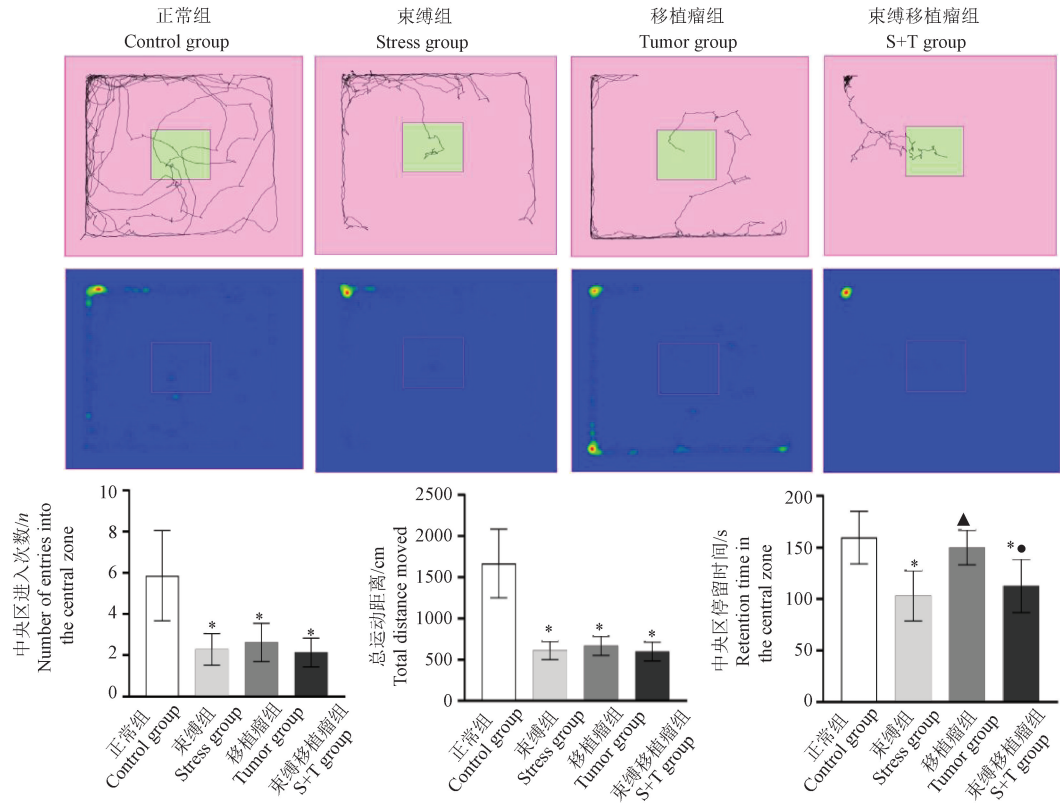


注:与正常组比较, * $P<0.05$;与束缚组比较, ^ $P<0.05$;与移植瘤组比较, • $P<0.05$ 。

图 4 各组小鼠 FST 过程中 5 min 不动时间和不动次数比较

Note. Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with Stress group, ^ $P<0.05$. Compared with Tumor group, • $P<0.05$.

Figure 4 Comparison of immobility time and immobility times in 5 min during FST in each group of mice



注:与正常组比较, * $P<0.05$;与束缚组比较, ^ $P<0.05$;与移植瘤组比较, • $P<0.05$ 。

图 5 各组小鼠 OFT 过程总运动距离、中央区进入次数和停留时间比较

Note. Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with Stress group, ^ $P<0.05$. Compared with Tumor group, • $P<0.05$.

Figure 5 Comparison of total distance moved, number of entries into the central zone, and retention time in the central zone of mice in each group

0.01);与移植瘤组比较,束缚移植瘤组小鼠中央区停留时间显著减少($P<0.05$)。

焦虑行为变化如图 6 所示,与正常组比较,其余各组小鼠开放臂停留时间比例显著减少($P<0.05$),束缚组和束缚移植瘤组小鼠开放臂进入次数比例显著减少($P<0.01$);与束缚组比较,移植瘤组小鼠开放臂进入次数显著增加($P<0.05$);与移植瘤组比较,束缚移植瘤组小鼠开放臂进入次数和停留时间比例显著减少($P<0.05$)。

2.4 各组小鼠血清神经递质含量

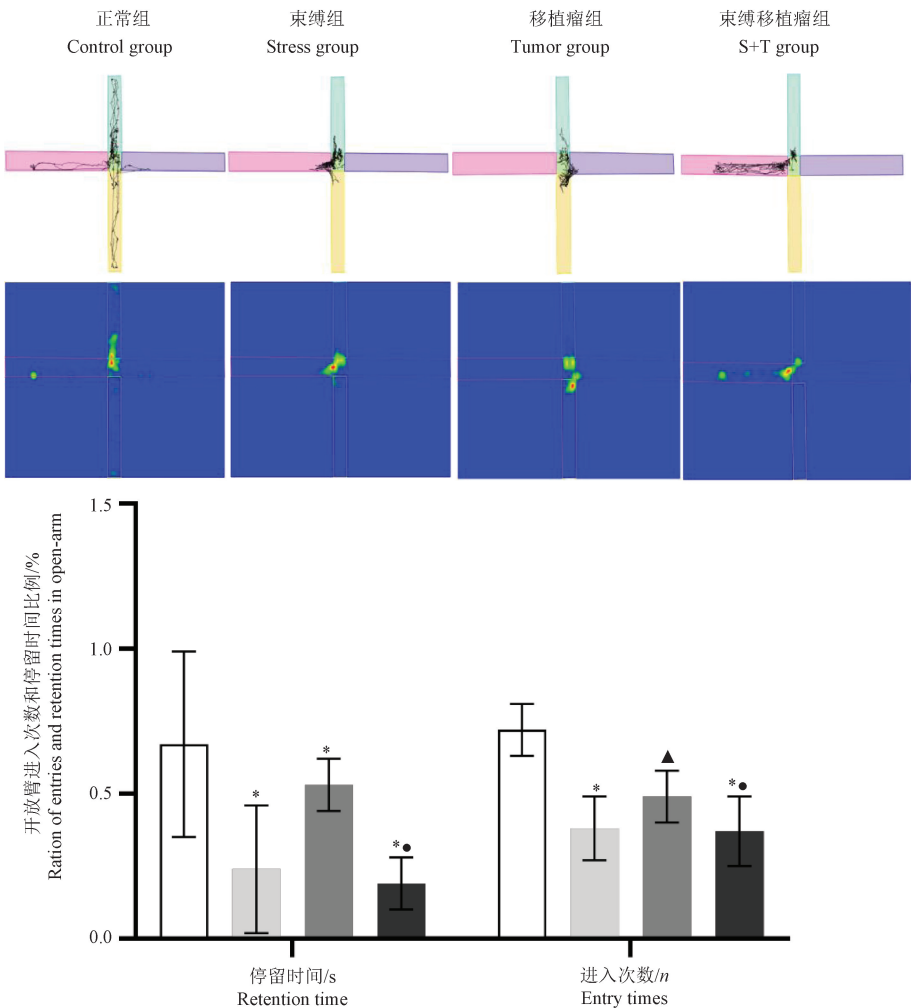
5-HT 含量如图 7A 所示,与正常组比较,其余各组小鼠血清 5-HT 含量显著减少($P<0.05$);与束缚组比较,移植瘤组 5-HT 显著升高($P<0.05$),而束缚移植瘤组显著降低($P<0.05$);与移植瘤组比较,束

缚移植瘤组 5-HT 显著降低($P<0.05$)。
CORT 含量如图 7C 所示,与正常组比较,其余各组小鼠血清 CORT 含量均显著升高($P<0.05$);与束缚组比较,移植瘤组小鼠血清 CORT 含量显著降低($P<0.05$),而束缚移植瘤组小鼠 CORT 含量显著升高($P<0.05$);与移植瘤组比较,束缚移植瘤组小鼠 CORT 含量显著升高($P<0.05$)。

NE 含量如图 7B 所示,与正常组比较,其余各组小鼠血清 NE 含量显著降低($P<0.05$);与束缚组比较,移植瘤组小鼠血清 NE 含量显著增加($P<0.05$),与移植瘤组比较,束缚移植瘤组小鼠血清 NE 含量显著减少($P<0.05$)。

2.5 各组小鼠血清肿瘤标志物含量

CEA 含量如图 8A 所示,与正常组和束缚组比



注:与正常组比较, * $P<0.05$;与束缚组比较, ▲ $P<0.05$;与移植瘤组比较, ● $P<0.05$ 。
图 6 各组小鼠 EPM 过程开放臂进入次数和停留时间比例比较
Note. Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with Stress group, ▲ $P<0.05$. Compared with Tumor group, ● $P<0.05$.
Figure 6 Comparison of ration of entries and retention time in the open-arm of EMP of mice in each group

较,移植瘤组和束缚移植瘤组小鼠血清 CEA 含量显著升高($P<0.05$);与移植瘤组比较,束缚移植瘤组小鼠血清 CEA 含量显著升高($P<0.05$)。

VEGF 含量如图 8B 所示,与正常组和束缚组比较,移植瘤组和束缚移植瘤组小鼠血清 VEGF 含量显著升高($P<0.05$);与移植瘤组比较,束缚移植瘤组小鼠血清 VEGF 含量显著升高($P<0.05$)。

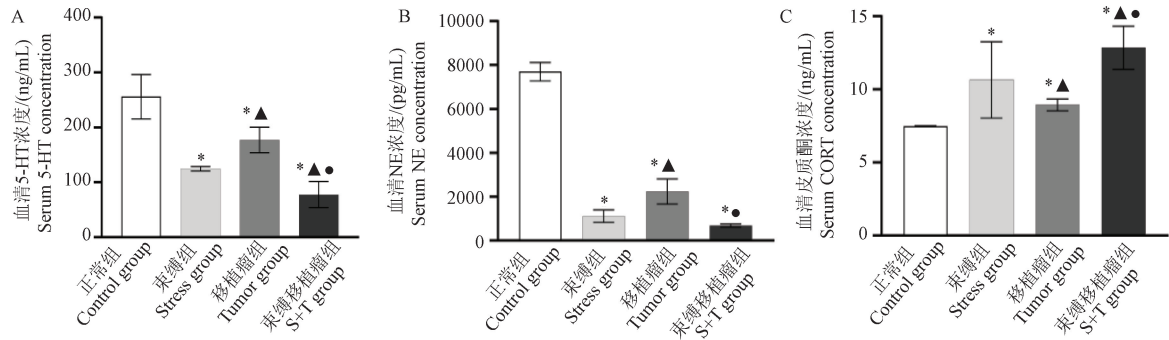
CA199 含量如图 8C 所示,与正常组比较,其余各组小鼠血清 CA199 含量显著升高($P<0.05$);与束缚组比较,移植瘤组和束缚移植瘤组小鼠血清 CA199 含量显著升高($P<0.05$);与移植瘤组比较,束缚移植瘤组小鼠血清 CA199 含量显著升高($P<0.05$)。

2.6 小鼠肿瘤和海马组织病理改变

肿瘤组织病理改变如图 9 所示,小鼠离体瘤呈

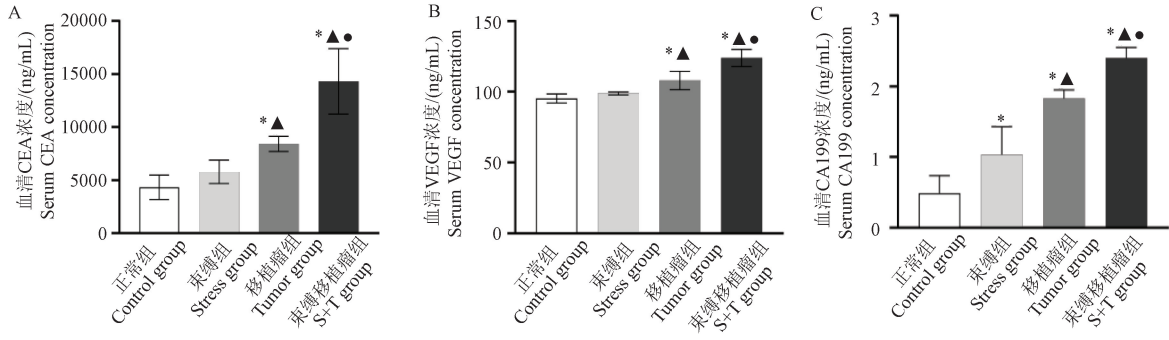
不规则球形或椭圆形,可见丰富的血管,呈肉样红色,部分瘤体有黑色的坏死区,质硬。HE 染色显示,移植瘤组小鼠移植瘤组织肿瘤细胞界限不清,细胞排列无规则,呈巢团状,间质细胞较少,可见较多病理性核分裂象;束缚移植瘤组小鼠移植瘤组织细胞排列较松散,间质细胞较移植瘤组减少,核大深染,病理性核分裂象较移植瘤组增多。

海马 CA3 区组织病理改变 HE 染色结果如图 10 所示,正常组小鼠海马 CA3 区神经元细胞排列整齐,细胞形态规则,间隙清晰;束缚组小鼠海马 CA3 区神经元细胞数量减少,细胞核内空泡样改变明显,细胞间隙增大,连接松散;移植瘤组小鼠和束缚移植瘤组小鼠海马 CA3 区神经元细胞排列紊乱,形态不规则,细胞间隙不清,核内空泡化样改变明显。



注:与正常组比较, * $P<0.05$;与束缚组比较, ▲ $P<0.05$;与移植瘤组比较, ● $P<0.05$ 。
图 7 各组小鼠血清神经递质 5-HT、NE 和 CORT 含量比较
Note. Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with Stress group, ▲ $P<0.05$. Compared with Tumor group, ● $P<0.05$.

Figure 7 Comparison of serum neurotransmitter 5-HT, NE and CORT concentration of mice in each group



注:与正常组比较, * $P<0.05$;与束缚组比较, ▲ $P<0.05$;与移植瘤组比较, ● $P<0.05$ 。
图 8 各组小鼠血清肿瘤标志物含量比较
Note. Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with Stress group, ▲ $P<0.05$. Compared with Tumor group, ● $P<0.05$.

Figure 8 Comparison of serum tumor marker concentration of mice in each group

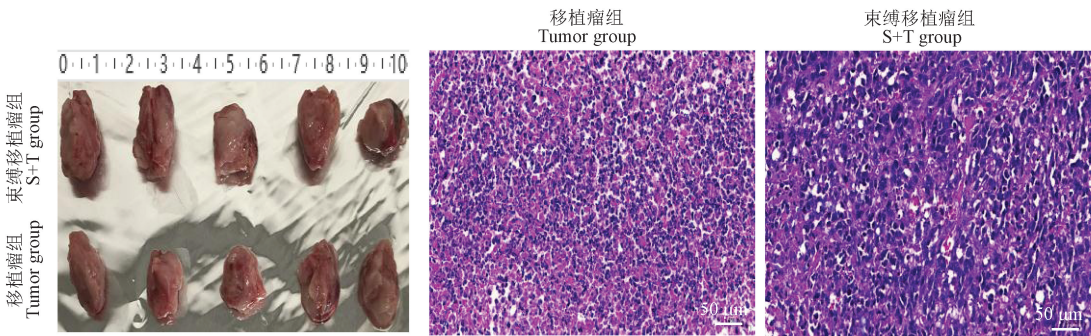


图 9 小鼠瘤块肉眼形态特征及肿瘤组织病理改变

Figure 9 Gross morphologic characteristics of tumor mass and pathological changes of tumor tissue in mice

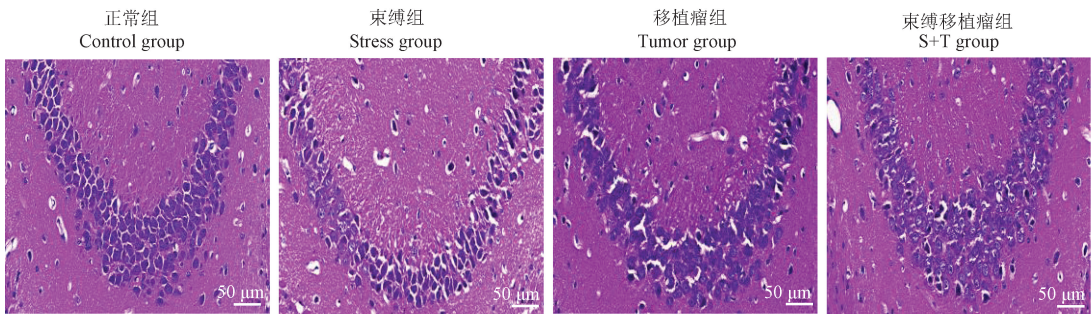


图 10 各组小鼠海马 CA3 区组织病理改变

Figure 10 Histopathologic changes in hippocampal CA3 region of mice in each group

3 讨论

随着乳腺癌合并抑郁症研究的不断深入,此两种疾病之间的密切关系被越来越多的研究所揭示。由于人体研究的局限性,动物模型成为了疾病研究中的重要载体。乳腺癌合并抑郁症动物模型的构建可为阐释乳腺癌和抑郁症之间的关系及相互影响机制研究起到重要的辅助作用。

基于此,本研究首先以 4T1 炎性乳腺癌细胞接种于 BALB/c 小鼠腋下的方式建立了经典的乳腺癌小鼠模型,该模型构建方法成熟,动物生存期较长,是临床乳腺癌药物筛选使用最多的一种动物模型^[5-6]。其次,在该经典乳腺癌小鼠模型的基础上采用慢性束缚应激方法进行抑郁症造模,慢性束缚应激是抑郁症常用的造模手段,可重复性好,能够模拟抑郁症兴趣缺失的核心症状^[7]。故本研究运用 4T1 乳腺癌细胞株接种联合慢性束缚应激方法构建 BALB/c 小鼠乳腺癌合并抑郁模型不失为一次有益的探索。

CA199 和 CEA 为较常见的肿瘤标志物,其中 CEA 为肿瘤细胞增殖活力敏感指标,当患者病情进入恶化阶段时,其水平可呈明显的上升趋势^[8]。CA199 是一种类粘蛋白的糖蛋白成分,消化系统、

呼吸系统和妇科等恶性肿瘤患者血清中均会出现异常的升高,是早期筛查恶性肿瘤的辅助指标^[9]。临床研究显示恶性乳腺癌患者血清 CA199 和 CEA 的水平显著高于良性和正常对照组^[10],另外在腋下接种 4T1 细胞株的乳腺癌小鼠血清中同样也观察到了 CEA 水平的显著升高^[11]。血管内皮生长因子 (VEGF) 作为血管生成的主要调控因子,在健康人组织和血清中 VEGF 呈低表达,而在肿瘤患者中其表达异常升高,与乳腺癌的发展、复发和转移密切相关^[12-13]。吕思琦等^[14]研究观察到恶性乳腺癌患者术前血清 VEGF 的表达显著高于良性患者和健康人。吴梓政等^[15]运用含二甲基苯蒽的芝麻油建立乳腺癌小鼠模型,并在其血清中检测到 VEGF 水平的显著升高。由此可见 CEA、CA199 和 VEGF 可作为乳腺癌诊断和评估的重要依据。据本研究结果可知,移植瘤组小鼠血清中 CA199、CEA 和 VEGF 水平升高,给予慢性束缚应激后小鼠血清中 3 种肿瘤标志物较单纯移植瘤组显著增加。此外结合对肿瘤重量、体积分析结果可知,慢性束缚应激联合移植瘤组小鼠肿瘤重量和体积均较单纯移植瘤组小鼠显著增加,同时结合肿瘤病理表现推测慢性束缚应激可能会促进乳腺癌的进展。

抑郁症动物模型构建中其症状须与抑郁病患

者具有相同的表现,例如食欲不振、体重下降、快感缺失、行为绝望及社交障碍等^[16]。故本试验主要针对抑郁症以上几个方面的行为改变选择强迫游泳、糖水偏好、旷场和高架十字迷宫试验对模型小鼠的行为学进行了评价。另外,本研究还针对与抑郁病变密切相关的神经递质 5-HT、CORT 和 NE 水平以及海马病理改变进行了观察,与行为学指标协同佐证,以评价各组小鼠的抑郁状态。研究结果显示,在造模 3 周后,乳腺癌小鼠出现快感缺失、绝望、恐惧心理增加和对新环境的探索欲望下降等行为学表现,而体内的神经递质水平也出现了不同程度的改变。而接受慢性束缚应激的乳腺癌小鼠,其抑郁样行为以及体内神经递质水平变化均较乳腺癌小鼠更为明显,其抑郁程度较单纯乳腺癌小鼠更为严重。另外该结果在食欲及海马病理改变上也得到了进一步验证,接受束缚应激的乳腺癌小鼠食欲较乳腺癌小鼠下降更为明显,且海马 CA3 区神经元排列、形态、空泡化等改变均较单纯乳腺癌组小鼠严重,虽然其体重改变与乳腺癌组小鼠无明显差异,但是接受束缚应激的乳腺癌小鼠的瘤体显著重于乳腺癌小鼠,因此两组小鼠体重无显著差异与瘤体重量影响有关。另外,根据实验结果可知,在本研究中观察到乳腺癌小鼠也表现出了部分抑郁样行为,这可能与移植瘤体造成小鼠身体机能和行动能力下降有关,但此时动物模型的抑郁程度个体差异较大,如在单纯的乳腺癌模型基础上开展抑郁研究,模型的可重复性较差。因此,只有在乳腺癌动物模型的基础上再施加一定的抑郁症造模措施,得到稳定的乳腺癌合并抑郁症动物模型后,其抑郁样行为、神经递质水平等才会出现显著而稳定的改变,更适合乳腺癌合并抑郁的深入机制研究。

因此,4T1 乳腺癌细胞株接种联合慢性束缚应激诱导的乳腺癌合并抑郁症小鼠模型不仅在乳腺癌标志物等方面表现出明显的异常,同时也出现了典型抑郁症症状和相应的神经递质改变,可为乳腺癌合并抑郁发病机制以及药物防治研究提供较好的模型参考。

参考文献:

[1] LIU H M, MA L L, LI C, et al. The molecular mechanism of chronic stress affecting the occurrence and development of breast cancer and potential drug therapy [J]. Transl Oncol, 2022, 15 (1): 101281.

[2] 卞绿, 臧娅, 赵丽华. 乳腺癌患者的焦虑、抑郁情绪和生存

质量的相关性研究 [J]. 实用预防医学, 2021, 28 (12): 1529-1532.

BIAN L, ZANG Y, ZHAO L H. Correlation of anxiety and depression with quality of life in patients with breast cancer [J]. Pract Prev Med, 2021, 28 (12): 1529-1532.

[3] XU X R, XIAO Q, HONG Y C, et al. Activation of dopaminergic VTA inputs to the mPFC ameliorates chronic stress-induced breast tumor progression [J]. CNS Neurosci Ther, 2021, 27 (2): 206-219.

[4] 孙丽华, 崔海峰, 彭博, 等. 4 种方法制备小鼠乳腺癌移植瘤模型的比较研究 [J]. 中国新药杂志, 2020, 29 (4): 449-455.

SUN L H, CUI H F, PENG B, et al. Comparative study of 4 methods for the establishment of mouse breast cancer xenograft model [J]. Chin J N Drugs, 2020, 29 (4): 449-455.

[5] 严丽, 李莉, 郝芳, 等. BALB/c 小鼠乳腺癌 4T1 细胞株移植模型的建立 [J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30 (6): 794-796.

YAN L, LI L, HAO F, et al. Establishment of mice breast cancer model in BALB/c mice with 4T1 cells [J]. Chin J Immunol, 2014, 30 (6): 794-796.

[6] 王硕. 小鼠乳腺癌细胞 4T1 对不同品系小鼠乳腺癌模型的影响 [J]. 天津医科大学学报, 2018, 24 (4): 281-283.

WANG S. Effects of mouse breast cancer cell line 4T1 on breast cancer animal model in different types of mice [J]. J Tianjin Med Univ, 2018, 24 (4): 281-283.

[7] 高杰, 张楠, 宋铭晶, 等. 慢性束缚应激模型对小鼠社交行为的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25 (3): 9-12.

GAO J, ZHANG N, SONG M J, et al. Effect of chronic restraint stress on sociability in mice [J]. Chin J Comp Med, 2015, 25 (3): 9-12.

[8] 梁劲文, 白剑, 苏少琴, 等. 卡培他滨与替吉奥对 HER-2 阳性乳腺癌抑癌基因表达及血清 CA125、CA199、CEA 水平的影响 [J]. 广东医科大学学报, 2021, 39 (4): 424-428.

LIANG J W, BAI J, SU S Q, et al. Effect of capecitabine versus tegafur-gimeracil-oteracil on tumor suppressor genes and serum CA125/199 and CEA levels in HER-2 positive breast cancer [J]. J Guangdong Med Univ, 2021, 39 (4): 424-428.

[9] 冯万锐, 苗立群. 乳腺癌患者血清肿瘤标志物的变化及意义 [J]. 临床医学研究与实践, 2018, 3 (8): 66-67.

FENG W R, MIAO L Q. Changes and significance of serum tumor markers in patients with breast cancer [J]. Clin Res Pract, 2018, 3 (8): 66-67.

[10] 雷田. 血清 CEA、AFP、CA199、CA125、CA153 检测诊断乳腺癌的临床价值 [J]. 医学理论与实践, 2020, 33 (23): 4012-4013.

LEI T. Clinical value of serum CEA, AFP, CA199, CA125 and CA153 in the diagnosis of breast cancer [J]. J Med Theory Pract, 2020, 33 (23): 4012-4013.

[11] 石国建, 顾蓓, 荣鸣, 等. 大蒜素辅助乳腺癌及对小鼠血清 CA153、CEA 及免疫功能的影响 [J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2018, 15 (6): 100-103.