

顺铂诱导三阴性乳腺癌 4T1 耐药小鼠模型的建立

盛佳钰, 陈红凤*

(上海中医药大学附属龙华医院 乳腺科, 上海 200032)

【摘要】 目的 建立一种耐药性稳定的三阴性乳腺癌 4T1 耐药小鼠模型, 为研究体内肿瘤耐药机制和逆转药物的筛选奠定实验基础。**方法** 采用顺铂(DDP)低剂量诱导及体内外交叉致瘤结合的方法建立三阴性乳腺癌耐药小鼠模型; MTT 法检测细胞耐药特性; 实时荧光定量 PCR 法分析耐药相关基因 MDR1、BCRP、MMP7 及 GST- π 表达差异; 免疫组化分析耐药相关蛋白 P-gp、BCRP、MMP7 表达差异; 蛋白印迹法检测磷酸化 Akt (phosphorylated-Akt, p-Akt) 和总 Akt (total-Akt, t-Akt) 蛋白表达; 小动物成像检测观察肿瘤生长情况。**结果** MTT 显示建立的三阴性乳腺癌耐药 4T1 小鼠模型的耐药指数为 12.84; 耐药小鼠肿瘤组织中 MDR1、BCRP、MMP7、GST- π 基因 mRNA 的表达量及 P-gp、BCRP、MMP7 蛋白的表达量均高于非耐药小鼠 ($P < 0.01$); Western blot 显示, 耐药小鼠肿瘤组织的 p-Akt 蛋白表达明显高于非耐药小鼠, t-Akt 蛋白表达没有差异。非耐药小鼠与耐药小鼠肿瘤组织生长速度未见明显区别 ($P > 0.05$)。分别给予这两种模型小鼠相同剂量的 DDP 治疗后, 耐药小鼠对 DDP 的敏感性明显低于非耐药小鼠 ($P < 0.01$)。**结论** 初步建立了三阴性乳腺癌耐药 4T1 小鼠模型, 为三阴性乳腺癌临床个体化治疗及耐药逆转研究等提供了良好的实验动物平台。

【关键词】 三阴性乳腺癌; 肿瘤抗药性; 顺铂; 动物模型; 小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 05-0466-08

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2015.05.005

Establishment of a cisplatin-resistant mouse model of 4T1 triple negative breast cancer

SHENG Jia-yu, CHEN Hong-feng*

(Department of Breast Surgery, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 Objective To establish a cisplatin-resistant 4T1 mouse model of triple negative breast cancer. **Methods** A drug resistant mice model was established with cisplatin (DDP) induction and in-vivo/in-vitro tumorigenic approach. Its resistance characteristics were identified by MTT assay. Changes of drug resistance gene (MDR1, BCRP, MMP7, GST- π) and protein (P-gp, BCRP, MMP7) expression, and phosphorylated-Akt and total-Akt protein expression were evaluated by real-time PCR, immunohistochemistry and western blot method, respectively. Small animal live imaging technology was applied to detect tumor growth. **Results** Resistance fold (RF) of cisplatin-resistant 4T1 mouse model was 12.84. The expression of MDR1, BCRP, MMP 7, GST- π mRNA and P-gp, BCRP, MMP 7 proteins in the resistant mice were higher than that in the non-resistant mice. The result of western blot showed that a statistically higher expression of p-Akt in resistant mice than that in non-resistant mice at protein levels ($P < 0.01$). No significant difference of tumor growth rate was observed between non-resistant and resistant mice ($P > 0.05$). Given same dose of DDP, resistant mice showed lower sensitivity than non-resistant mice significantly ($P < 0.01$). **Conclusions** We have successfully established a cisplatin-resistant triple negative breast cancer model in mice, which provides a new platform for further study on chemoresistant reversal strategy and individualized clinical treatment of this disease.

【Key words】 Triple negative breast cancer; Neoplasm drug resistance; Cisplatin; Animal models; Mice

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81373647)。

[作者简介] 盛佳钰(1983-), 女, 博士研究生, 主治医师, 研究方向: 中医药防治乳腺癌研究。E-mail: shengjiayu@gmail.com

[通讯作者] 陈红凤。E-mail: chhfluk@126.com

目前认为乳腺癌是一种高度异质性肿瘤,不同的病理特点和分子特征导致其对治疗的反应和预后明显不同。临床上根据免疫组化检测的雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)、人表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor-2, HER-2)表达均阴性者被称为三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)。该亚型乳腺癌对内分泌治疗及抗 HER-2 的靶向治疗均不敏感,因此化疗是其主要的治疗手段。近年来研究发现, TNBC 这类与乳腺癌易感基因 1(breast cancer susceptibility gene-1, BRCA1)相关的乳腺癌亚型对铂类药物表现出较高的敏感性^[1]。然而,事实证明对化疗相对敏感的 TNBC 患者并不意味着拥有更高的生存率。与其他化疗药物一样,在临床应用过程中多数患者经铂类药物化疗缓解后,即会产生耐药性而使后续治疗效果受到严重影响。本实验以顺铂(cisplatin, DDP)为诱导药物,三阴性乳腺癌细胞株 4T1 为诱导对象,采用化疗药物诱导耐药及体内外交叉致瘤的方式建立三阴性乳腺癌耐药小鼠模型,并对三阴性乳腺癌 4T1 耐药小鼠模型产生顺铂耐药性的机制进行初步探讨,为耐药逆转研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

注射用顺铂(冻干粉)购自齐鲁制药有限公司(批号:ZWA2A1305034A), RPMI-1640 液体培养液、胎牛血清、胰酶、磷酸盐缓冲液(PBS)均为 Gibco 公司产品;四甲基氮唑蓝(methylthiazolyl tetrazolium, MTT)及 DMSO 均购自上海生工生物有限公司。TRIZOL 提取试剂盒、反转录试剂盒和实时荧光定量 PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;实时荧光定量 PCR 所用引物均由宝生物工程(大连)有限公司合成;抗磷酸化 Akt(phosphor-Akt, p-Akt)、总 Akt(total-Akt, t-Akt)、内参 GAPDH(均为抗兔单克隆抗体)及其相应的二抗均购自美国 Cell Signaling 公司;P-gp、BCRP、MMP7 抗体均购自美国 ABCAM 公司;EliVision plus 试剂盒、DAB 试剂盒均购自福州迈新生物科技有限公司,D-luciferin 购自上海乐辰生物科技有限公司。

1.2 细胞培养及动物饲养

鼠三阴性乳腺癌细胞株 4T1 购自中国科学院上海细胞库,用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基

培养,培养基中加入 100 U/L 青霉素和 10 mg/mL 链霉素。置于 37℃、CO₂ 体积分数为 5% 的恒温培养箱中培养,次日观察细胞贴壁情况并换液。贴壁生长良好的乳腺癌细胞经 0.25% 胰蛋白酶消化,选用对数生长期细胞进行实验。

SPF 级 BALB/c 雌性小鼠 56 只,体重 16~18 g,其中 24 只小鼠用于耐药动物模型的建立(每轮 6 只,共 4 轮),余 32 只小鼠用于后续分组研究。小鼠均来源于上海斯莱克实验动物有限责任公司[SCXK(沪)2012-0002],适应性喂养 1 周,饲养在恒温(23±2)℃,湿度 50%~60%,人工照明暗各 12 h 的饲养室内,标准饲料和自来水自行取用。

1.3 模型的建立

采用化疗药物诱导耐药及体内外交叉致瘤的方式建立三阴性乳腺癌耐药小鼠模型。将 4T1 细胞体外培养至对数生长期后按 10⁵ 个/只,接种于 6 只小鼠的第二乳房垫处,随机均分为 2 组。待肿瘤组织长至 0.5 cm×0.5 cm 时(约 5 d),模型组(3 只)荷瘤小鼠给予腹腔注射 0.3 mg/mL DDP,对照组(3 只)小鼠给予同等剂量的 NS 腹腔注射。每周 1 次,连续 4 周,给药结束后,在无菌条件下取出各组肿瘤组织,行原代细胞培养。将组织块置于培养皿内,剪碎成米粒样大小,用胰酶反复消化瘤块,将消化下来的肿瘤细胞,按 4T1 细胞培养条件进行培养。各组原代培养细胞经稳定传代 2 次后,再接种于小鼠第二乳房垫,每次原代培养细胞均用采用 MTT 的方法计算耐药倍数。反复 4 轮体内外交叉致瘤,至耐药倍数达到中度耐药时(耐药倍数 5~15 倍)为止。最后一轮小鼠给药结束后,2 组小鼠各取部分肿瘤组织置于 4% 多聚甲醛溶液及 -80℃ 冰箱保存用于免疫组化、real-time PCR 及 western blot 检测;剩余肿瘤组织分别行原代细胞培养。

取上述第 4 轮达中度耐药的原始培养 4T1/DDP 细胞,培养至对数生长期,接种于 6 孔板中,继续培养 24 h,当细胞达到 70%~80% 融合时,进行转染。转染按照 Lipofectamine TM 2000 试剂操作指南进行操作。转染 48 h 后, G418 筛选抗性细胞及其单克隆化,得到稳定表达荧光素酶的 4T1/DDP-luc 细胞。取对数生长期的 4T1/DDP-luc 细胞接种到 96 孔黑板中,常规培养 24 h。第 2 天采用活体成像仪进行 luc 发光信号的观察,检测 luc 的表达,用 Living Imaging 软件分析处理数据。

取 32 只小鼠,将上述经鉴定能稳定表达 Luc 质

粒的耐药细胞株 4T1/DDP-luc 及非耐药细胞株 4T1-luc 体外培养至对数生长期后,按 10^5 个/只,分别接种于 4 组小鼠的第二乳房垫处,分别建立三阴性乳腺癌耐药及非耐药小鼠模型各 16 只。待各小鼠肿瘤组织均长至 $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$ 时(约 5 d),16 只三阴性乳腺癌小鼠模型随机分组为:Model-A 组及 DDP-A 组,每组各 8 只小鼠;16 只三阴性乳腺癌耐药小鼠模型随机分组为:Model-B 组、DDP-B 组,每组各 8 只小鼠。各组小鼠均按 $0.2\text{ mL}/20\text{ g}$ 剂量腹腔注射相应药物,给药频次为,给药周期为 4 周,具体给药为:DDP-A 及 DDP-B 组小鼠给予 0.3 mg/mL DDP;模型组-A 及模型组-B 组小鼠给予 0.9% 生理盐水。

1.4 MTT 法检测细胞药物敏感

分别取对数生长期原代培养 4T1 细胞 (Control 组) 和 4 批原代培养的 4T1/DDP 细胞 (Model-1、2、3、4 组),调整细胞密度为 5×10^4 个/mL,接种于 96 孔培养板中,每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$ 。置 37°C 、 CO_2 体积分数为 5% 的恒温培养箱中培养。培养 24 h 后,加药组更换为含不同浓度药物的完全培养液继续培养。每组都设 6 个复孔,并设置调零孔(只含相应培养液,无细胞)和对照孔(只含细胞、培养液)。待药物组作用 24 h 后,每孔加入 MTT(5 mg/mL) $15\text{ }\mu\text{L}$,继续

培养 4 h,小心吸弃培养液和 MTT 溶液,每孔加入 DMSO $150\text{ }\mu\text{L}$,振荡 10 min 使充分溶解显色。用全波长酶标仪测定吸光度值(A490),实验重复 3 次,取平均值,按下式计算细胞生长抑制率。

$$\text{生长抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{药物组 A490}}{\text{对照组 A490}}\right) \times 100\%$$

根据生长抑制率,采用 SPSS16.0 软件计算药物半数抑制浓度 (IC_{50}),并按下式计算耐药倍数 (RF)。

$$\text{耐药倍数(RF)} = \frac{\text{耐药细胞 IC}_{50}}{\text{亲本细胞 IC}_{50}}$$

1.5 Real-time PCR 检测耐药相关基因

采用 TRIZOL 法分别提取第 4 批耐药模型 Model-4 组以及对照模型 Control-4 组小鼠肿瘤组织的总 RNA,分光光度法测定其纯度及浓度。用反转录试剂盒将各组细胞总 RNA 反转录,生成 cDNA,进一步用 MDR1、BCRP、MMP7、GST- π 引物及内参 GAPDH 引物扩增(引物相关信息见表 2)。Real-time PCR 结果由 Rotor-Gene 6 软件分析,确定各反应样本的 Ct 值,采用相对定量的 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因的相对表达量,分析各样本之间基因的表达差异。每组取三个样本,取均数。

表 1 引物合成表

Tab.1 List of primers for the real-time PCR

基因 Genes	引物 Primers	产物长度 Product length/pb
MDR1	Forward primer: 5'-ATCATCAGCAACAGCAGTCTGGA-3' Reverse primer: 5'-GGCACCAGAAAGTGAAACCTGGA-3'	112
BCRP	Forward primer: 5'-ACGACTGGTTTGGACTCAAGCAC-3' Reverse primer: 5'-AAAGATGGAATACCGAGGCTGATG-3'	114
MMP7	Forward primer: 5'-CAGACTTACCTCGGATCGTAGTGG-3' Reverse primer: 5'-TGCGAAGGCATGACCTAGAGTG-3'	191
GST- π	Forward primer: 5'-CTCTGTCTACGCAGCACTGAATC-3' Reverse primer: 5'-CAAGCCTTGCATCCAGGTATC-3'	166
GAPDH	Forward primer: 5'-AAATGGTGAAGGTGCGGTGTGAAC-3' Reverse primer: 5'-CAACAATCTCCACTTTGCCACTG-3'	90

1.6 免疫组化法检测耐药相关蛋白

取出第 4 批耐药模型 (Model-4 组) 及对照模型 (Control-4 组) 小鼠肿瘤组织经石蜡包埋, $5\text{ }\mu\text{m}$ 切片,常规脱蜡至水, PBS 洗 3 次, 每次 3 min; 用 pH 8.0 0.01 mol/L TE 热诱导修复 (100°C , 15 min), 室温自然冷却, PBS 洗 3 次, 每次 3 min; 0.3% H_2O_2 抑制内源性过氧化酶 10 min; 室温, PBS 洗 3 次, 每次 3 min; 20% 正常羊血清室温孵育 30 min, 不洗, 适当稀释特异性一抗 (P-gp、BCRP、MMP7 抗体以 1:5000 稀释) 37°C 孵育 2 h, PBS 洗 3

次, 每次 3 min; EnVision 试剂 (HRP-M/R) 37°C , 30 min; PBS 洗 3 次, 每次 3 min; DAB 显色 8~12 min; 苏木素衬染色, 热水蓝化; 吹干后, 树脂封片; 镜下观察, 核紫蓝色, 阳性呈棕黄色。每组随机选取 5 张切片, 在 200 倍视野下, 每张切片随机选择阳性细胞表达明显的 3 个视野作为测定目标。采用 Image Pro Plus 6.0 软件进行图像分析, 比较各组平均吸光度值。

1.7 Western blot 检测 Akt 磷酸化相关蛋白

提取出第 4 批耐药模型 (Model-4 组) 及对照模

型(Control-4 组)小鼠肿瘤组织的蛋白,并定量样本后,将等量的蛋白样品(30 μg)加入聚丙烯酰胺凝胶,常规电泳、转膜。用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 封闭硝酸纤维素膜,室温 60 min,分别加入 1:8000 稀释的 P-gp、MDR1 及 BCRP 抗体及 1:5000 稀释的 GAPDH(内参照)抗体。置于 4℃ 摇床过夜,用含 0.05% Tween 20 的 PBS(PBST)洗 3 次,每次 5 min,加入 1:8000 稀释的二抗室温培育 1 h, TBST 洗涤 3 次,加入化学底物发光液结合显影、定影和扫描。用 Photoshop Image J 软件分析各条带灰度值。以目的条带灰度值/GAPDH 条带灰度值的比值表示目的条带的相对表达量。

$$\text{相对灰度值} = \frac{\text{量的蛋白灰度值}}{\text{GAPDH 灰度值}}$$

1.8 动物活体成像检测

取材处理前 1 d,所有 4 组小鼠均行活体成像检测。具体方法如下:实验前 10 min 将每组老鼠称重,按 0.2 mL/20 g 体重的量腹腔注射 D-luciferin 试剂(PBS 配比,最终使其浓度为 15 mg/mL),用异氟烷将小鼠放入麻醉盒中麻醉,将小鼠安放于成像暗箱内,调整体位为仰卧位,当时间到达注射 D-荧光素酶后的 15 min,使用精诺真 Xenogen IVIS 成像向

导完成图像拍摄,应用 Living Image 4.3 (Lumina XR) 软件对小鼠体内区域信号进行数据分析。选择反应单位弧度、单位体积、单位时间从体内发出的光子数的 Radiance (photons) 作为定量单位,即 Radiance ($\text{p/s/cm}^2/\text{sr}$),计算肿瘤灶数目。

1.9 统计学处理

所有实验均平行重复 3 次,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用 SPSS 16.0 软件,两两比较采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 形态学观察

将在无菌条件下取出各组肿瘤组织行原代细胞培养,约 24 h 后几乎所有的细胞都沉积于瓶底,轻晃培养瓶约 2/3 的细胞随培养液晃动,另 1/3 细胞贴壁。用 PBS 冲洗细胞后,显微镜下观察可见,原代培养 24 h 后细胞呈三角形或多角形,并聚集生长成团块;经 1 次传代培养后,细胞分散程度较前改善,细胞形态趋于一致;经 2 次传代培养后,贴壁细胞增殖迅速,形态均一,以多角形为主,胞体饱满(见图 1)。



图 1 4T1/DDP 细胞形态变化($\times 200$)

Fig. 1 Morphology of 4T1/DDP cells($\times 200$)

2.2 耐药程度测定

MTT 法检测原代培养的 4T1 细胞(Control 组)以及 4 批原代培养的 4T1/DDP 细胞(Model-1、2、3、4 组)对 DDP 的 IC_{50} 分别为 5.73、9.50、17.16、36.03 $\mu\text{g/mL}$ 及 73.63 $\mu\text{g/mL}$, 4 批原代培养的 4T1/DDP 细胞对 DDP 的 RF 分别为 1.66、2.99、6.29 及 12.84,第 4 批原代培养的 4T1/DDP 细胞已达中等耐药程度,可用以后续获得性多药耐药小鼠模型建立(见图 2)。

2.3 鉴定 4T1/DDP-luc 细胞荧光素酶活性

将已获得的稳定表达 luc 荧光素酶的 4T1/DDP

细胞置于 96 孔黑板中,加入底物 D-luciferin 并轻轻混匀后,运用活体成像系统对贴壁培养的细胞进行成像和图像采集。图 3(左图)显示,4T1/DDP-luc 细胞于 96 孔黑板中检测到的生物发光信号。体内检测,将 4T1/DDP-luc 细胞接种于小鼠后 1 周,运用活体成像系统对小鼠进行图像采集。图 3(右图)显示,接种了 4T1/DDP-luc 细胞的小鼠检测到的生物发光信号。

2.4 耐药相关基因表达

Real-time PCR 检测结果显示,第 4 批耐药模型(Model-4 组)肿瘤组织中 MDR1、BCRP、MMP7 及

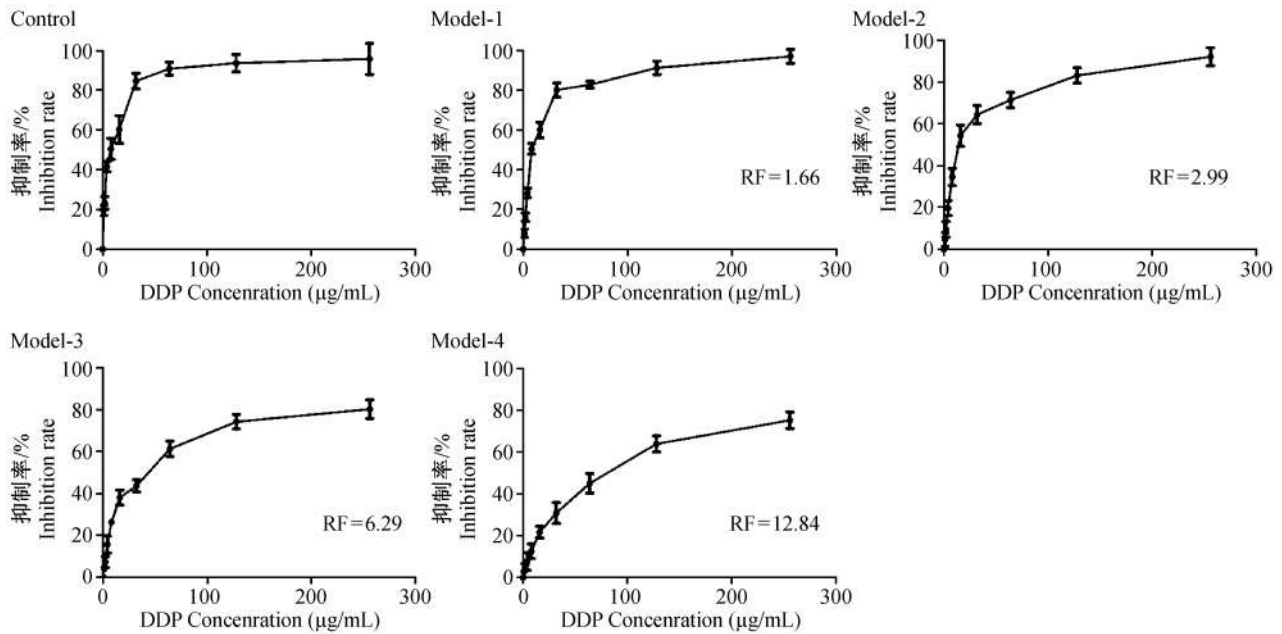


图2 顺铂对 4T1 和 4T1/DDP 细胞增殖的影响

Fig.2 Effect of DDP on proliferation of the 4T1 and 4T1/DDP cells

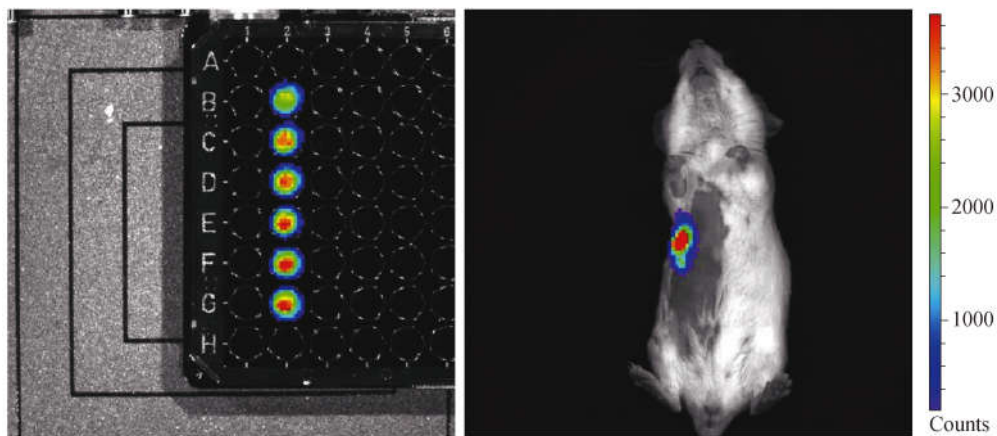


图3 荧光素酶活性鉴定

Fig.3 Identification of the luciferase activity

GST- π 基因 mRNA 的表达量均高于 control 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 分别是 control-4 组肿瘤组织的 2.05 倍、3.85 倍、3.58 倍及 3.66 倍 (见图 4)。

2.5 耐药相关蛋白表达

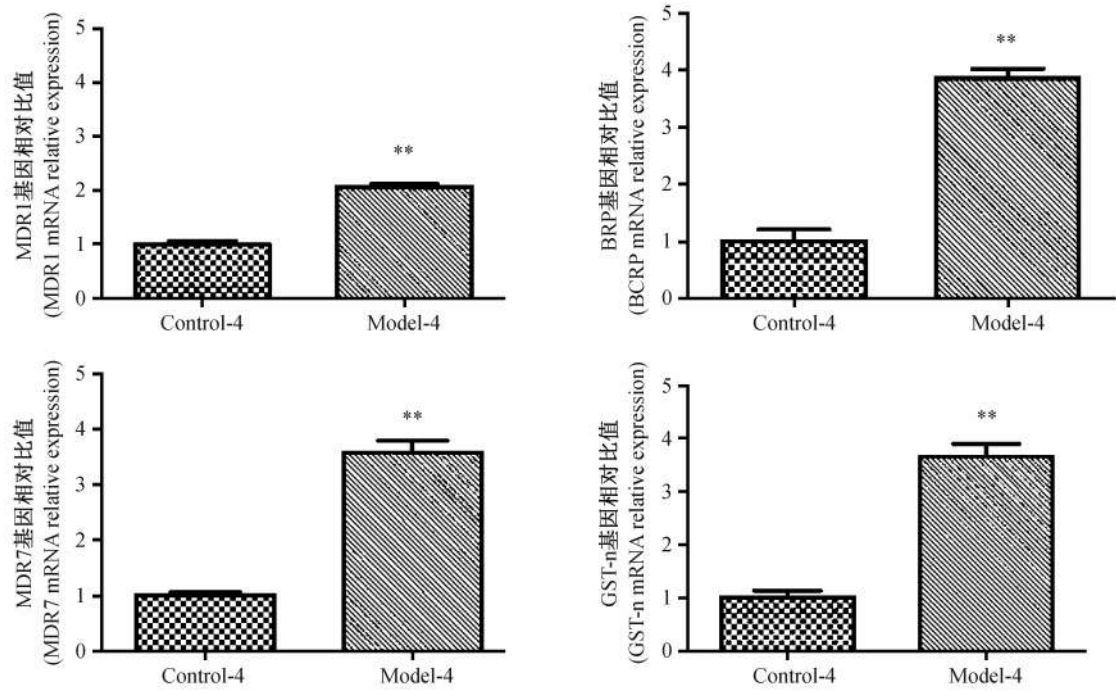
免疫组化检测结果显示, P-gp、BCRP、MMP7 蛋白在第 4 批耐药模型 (Model-4 组) 肿瘤组织中均较强 (棕黄色颗粒为阳性产物), 分别为 (4.34 ± 0.56)、(0.98 ± 0.50)、(1.08 ± 0.27); 而在 Control-4 组中表达均较低, 分别为 (14.93 ± 1.18)、(10.95 ± 1.62)、(15.66 ± 1.11), 差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$) (见图 5)。

2.6 Akt 磷酸化相关蛋白表达

Western blot 检测结果显示, 在基础状态下第 4 批耐药模型 (Model-4 组) 肿瘤组织内磷酸化 Akt (p-Akt) 水平显著高于 control-4 组, 两组 t-Akt 蛋白表达无明显差异。上述 western blot 研究结果证实了三阴性乳腺癌获得性多药耐药小鼠模型顺铂诱导三阴性乳腺癌耐药 4T1 小鼠模型中存在着 PI3K/Akt 通路改变 (见图 6)。

2.7 肿瘤动态观察

第 4 周, 通过活体成像系统对采集到的图像进行分析, 以 radiance (photons) 为计量单位, 计算各组小鼠体内光子通量。如图 7, Mode-A 组与 Model-B



注: ** 为与 control-4 组比较差异有显著性 ($P < 0.01$)。

图 4 MDR1、BCRP、MMP7 和 GST- π 的基因在 control-4 和 model-4 组肿瘤组织的表达

Note. ** $P < 0.01$ compared with the control-4 group.

Fig. 4 The mRNA expression of MDR1, BCRP, MMP7 and GST- π in the tumor tissues of control-4 and model-4 groups

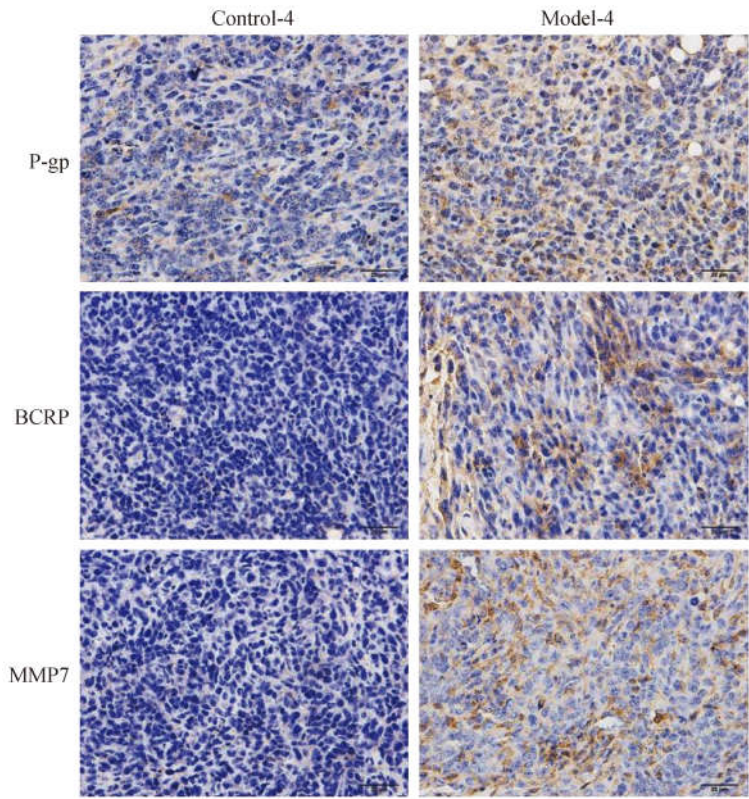


图 5 Control-4 和 model-4 组肿瘤组织中 P-gp、BCRP 和 MMP7 的蛋白表达 ($\times 200$)

Fig. 5 The protein expression of P-gp, BCRP and MMP7 in the tumor tissues of control-4 and model-4 groups ($\times 200$)

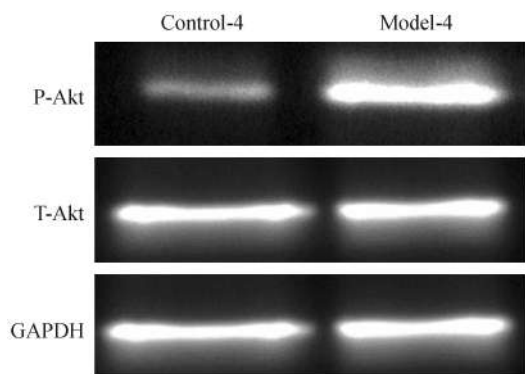


图 6 Control-4 和 Model-4 组肿瘤组织中 p-Akt, t-Akt 的蛋白表达

Fig. 6 The protein expression of p-Akt and t-Akt in the tumor tissues of control-4 and model-4 groups

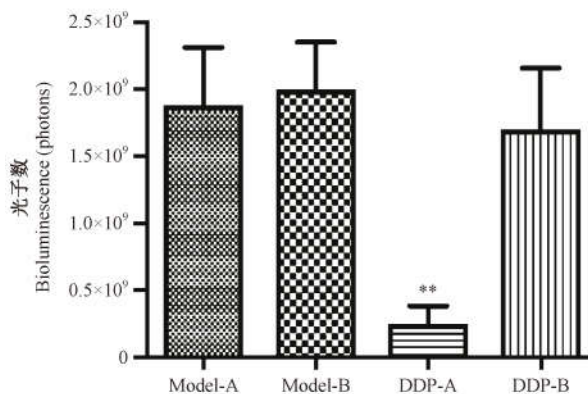
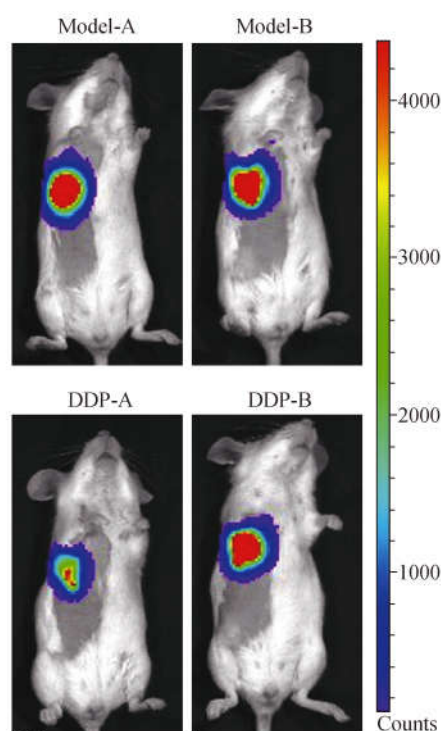
组无明显差异 ($P > 0.05$)。与 Model-A 组相比, DDP-A 组光子通量数减少 ($P < 0.01$); 而与 Model-B 组相比, DDP-B 组光子通量数无明显差异 ($P > 0.05$)。可见, DDP 对耐药模型小鼠肿瘤的抑制效果明显低于非耐药模型小鼠。

3 讨论

顺氯氨铂 (cisplatin, DDP), 简称顺铂, 其抗肿瘤谱广泛、活性高, 且骨髓抑制等副作用较轻^[2]。DDP 的作用部位是 DNA, 它与 DNA 碱基产生链内及链间交叉连结, 阻止 DNA 的转录和复制, 从而抑制肿瘤细胞的分裂^[3]。三阴性乳腺癌存在一定的 DNA 损伤修复障碍, 因此该类型乳腺癌对铂类药物敏感性较高。DDP 物美价廉, 治疗效果好, 但应用中却发现其容易产生耐药性, 部分患者先天和后天对铂类药物具有耐药性^[4], 严重降低该药物的治疗效果, 使其抗肿瘤谱降低, 限制了该药物的临床使用。

开发耐药肿瘤模型对于耐药相关基础研究和药物评价意义重大。当前国内外对耐药机制的认识和逆转剂的研究主要来自体外细胞实验的研究成果, 研究对象是体外诱导的耐药细胞, 并不能很好地反映体内肿瘤耐药形成的情况。肿瘤动物模型水平的研究比肿瘤细胞培养水平的研究更能模拟人体内的肿瘤生长情况。目前常用的耐药肿瘤的动物模型建立方法有三种: 转基因法^[5]、耐药性肿瘤细胞悬液移植法^[6]及药物诱导法^[7]。

但随着研究的深入, 我们发现药物耐药的形成机制众多, 主要包括外排蛋白的表达增加或活性提高、细胞解毒系统活力增强、抗肿瘤靶点改变以及凋



注: ** 为与 model-A 组比较差异及其显著 ($P < 0.01$)。

图 7 小鼠体内光子通量数测定

Note. ** $P < 0.01$ compared with the model-A group.

Fig. 7 Determination of the number of photons in vivo

亡应答失敏等。这些因素并非独立存在, 往往相互关联, 共同介导了耐药的发生^[8,9]。因此, 类似转基因法这种借助单一因素建立的多药耐药肿瘤动物模型难以模拟真实情况。而另两种方法相比较, 耐药性肿瘤细胞悬液移植法简单易行, 在已有耐药细胞株的前提下实验周期短, 应用较广; 而药物诱导法则相对周期较长, 但却更能模拟临床实际情况。目前, 乳腺癌耐药研究中应用较多的是激素受体阳性乳腺癌, 针对三阴性乳腺癌的较少, 且主要集中于阿霉素诱导耐药, 尚未有顺铂诱导的耐药细胞模型。此外, 由于耐药细胞株构建时间较长, 一般需要 9 ~ 12 个

月,因此,本研究采用了药物诱导法建立三阴性乳腺癌耐药 4T1 小鼠模型,并在传统的化疗药物单纯诱导的基础上进行了改进,增加了体内外交叉致瘤的方法。将体外培养的对数生长期的三阴性乳腺癌 4T1 细胞接种在小鼠第二乳房垫,形成肿瘤后,低剂量 DDP 体内持续给药 4 周诱导耐药发生,采用肿瘤组织块行体外原代培养细胞,再将此原代培养细胞分别于新一批小鼠第二乳房垫接种致瘤;反复 4 次。采用此种体内外交叉进行致瘤的方法,逐步提高耐药性,不仅模拟临床耐药形成条件,还提高了耐药细胞的致瘤率和缩短致瘤时间,并在诱导过程中做到对耐药性的实时监测,且整个建模时间缩短为 4 个月。

经测定第 4 批原代培养 4T1/DDP 细胞对 DDP 的 RF 为 12.84,已达中等耐药程度。通过 real-time PCR 及免疫组化鉴定该耐药细胞的特性,MDR1、BCRP、MMP7 及 GST- π 基因及 P-gp、BCRP、MMP7 蛋白均显示其在三阴性乳腺癌 4T1 耐药小鼠模型的肿瘤组织中呈现高表达,而在非耐药小鼠模型的肿瘤组织中均呈现阴性表达。此外,通过 western blot 检测还发现,通过此种方法建立的三阴性乳腺癌获得性多药耐药小鼠模型中存在着 Akt 磷酸化的改变。通过小动物活体成像仪对各组小鼠体内肿瘤生长状态进行直观观测发现,经过 4 周生长非耐药小鼠与耐药小鼠肿瘤组织大小未见明显区别 ($P > 0.05$)。而给予这两种模型小鼠相同剂量的 DDP 治疗后,耐药小鼠对 DDP 的敏感性明显低于非耐药小鼠 ($P < 0.01$),提示接种了 4T1/DDP-luc 细胞的模型小鼠体内发生了耐药。良好的耐药模型的建立是进行下游实验的基础,该耐药动物模型的建立,为三

阴性乳腺癌临床个体化治疗及耐药逆转研究等提供了良好的实验动物平台。

参 考 文 献

- [1] Rottenberg S, Nygren AO, Pajic M, et al. Selective induction of chemotherapy resistance of mammary tumors in a conditional mouse model for hereditary breast cancer [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(29): 12117–12122.
- [2] 杨乐,刘文超,李蓉. 顺铂水针剂与粉针剂体外细胞毒作用的差异研究[J]. 现代肿瘤医学, 2008, 16(5): 1101–1102.
- [3] 郭青龙. 肿瘤药理学[M]. 北京化学工业出版社, 2008, 第 1 版: 140–141.
- [4] Lieder B, Matema V, Schadendorf D, et al. Over-expression of cMOAT(MRP2/ABCC2) is associated with decreased formation of platinum-DNA adducts and decreased G2-arrest in melanoma cells resistant to DDP[J]. Invest Dermatol, 2009, 121(1): 172–176.
- [5] Van de Vrie W, Marquet RL, Stoter G, et al. In vivo model in P-glycoprotein-mediated multidrug resistance[J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 1998, 35(1): 1–57.
- [6] Satta T, Isobe K, Yamauchi M, et al. Establishment of drug resistance in human gastric and colon carcinoma xenograft lines [J]. Jpn J Cancer Res, 1991, 82(2): 593–598.
- [7] Ihnat MA, Nervi AM, Anthony SP, et al. Effects of mitomycin C and carboplatin pretreatment on multidrug resistance-associated P-glycoprotein expression and on subsequent suppression of tumor growth by doxorubicin and paclitaxel in human metastatic breast cancer xenografted nude mice[J]. Oncol Res, 1999, 11(7): 303–310.
- [8] 岑娟,李运曼. 多药耐药肿瘤的联合用药[J]. 国外医药: 抗生素分册, 2009, 30(5): 224–228.
- [9] Filipits M. Mechanisms of cancer: multidrug resistance[J]. Drug Discov Today: Dis Mech, 2004, 1(2): 229–234.

[收稿日期] 2015-04-14