

文章编号 1006-8147(2018)04-0281-03

论 著

# 小鼠乳腺癌细胞 4T1 对不同品系小鼠乳腺癌模型的影响

王 硕

(天津医科大学肿瘤医院生物化学与分子生物学研究室, 国家肿瘤临床医学研究中心, 乳腺癌防治教育部重点实验室, 天津市“肿瘤防治”重点实验室, 天津市恶性肿瘤临床医学研究中心, 天津 300060)

**摘要** 目的: 将小鼠乳腺癌细胞 4T1 接种到两种不同品系的小鼠脂肪垫, 观察植瘤小鼠的生物学状态、成瘤大小、转移情况以及生存周期等指标, 为建立不同品系小鼠的乳腺癌模型提供参考。方法: 将小鼠乳腺癌细胞 4T1 胰酶消化去除上清, 用 PBS 洗两遍, 最后用生理盐水调整细胞数量为  $1 \times 10^6$  个, 分别接种到裸鼠和 BALB/c 小鼠的脂肪垫。比较各组老鼠的成瘤率、成瘤时间以及生存期等实验指标。结果: 原位注射  $1 \times 10^6$  个 4T1 细胞时两组均能成瘤, 但是裸鼠的成瘤率高于 BALB/c 小鼠; 裸鼠的成瘤大小明显大于 BALB/c 小鼠; 裸鼠的生存期明显短于 BALB/c 小鼠; 裸鼠出现肺转移结节明显多于 BALB/c 小鼠。结论: 不同免疫能力的小鼠对接种相同数量的细胞数可能会产生不同的实验结果, 在选择构建小鼠乳腺癌模型的时候一定要综合考虑所选用品系的小鼠是否会对实验结果带来影响。

**关键词** 4T1 细胞; 乳腺癌; 成瘤; 生存; 转移; 小鼠

中图分类号 R73

文献标志码 A

## Effects of mouse breast cancer cell line 4T1 on breast cancer animal model in different types of mice

WANG Shuo

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Cancer Institute and Hospital, Key Laboratory of Breast Cancer Prevention and Therapy, Ministry of Education, Tianjin Medical University, National Clinical Research Center for Cancer, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin, Tianjin's Clinical Research Center for Cancer, Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China)

**Abstract Objective:** To establish different types of breast cancer animals models by observing the biological status of tumor-bearing mice, tumor size, metastasis, survival and other indicators. **Methods:** The mouse breast cancer cell line 4T1 was trypsinized and the supernatant was removed, washed twice with PBS, and finally  $1 \times 10^6$  cells were adjusted with physiological saline and injected into the fat pads of nude mice and BALB/c mice, respectively. The tumor formation rate, tumor formation time and survival time of mice in each group were compared. **Results:** In situ injection of  $1 \times 10^6$  4T1 cells could induce tumor formation in both groups, but the tumor formation rate in nude mice was higher than that in BALB/c mice; the tumor formation size in nude mice was significantly larger than that in BALB/c mice. The survivals of BALB/c mice was significantly shorter than those of BALB/c mice. The number of lung metastatic nodules in BALB/c mice was significantly higher than that of BALB/c mice. **Conclusion:** Mice with different immune capacity may produce different experimental results when injected with the same number of cells. When building a mouse breast cancer model, it is necessary to consider that different types of mice may bring different experimental results.

**Key words** 4T1 cells; breast cancer; tumorigenesis; survival; metastasis; mice

在女性人群中乳腺癌是一种常见的恶性肿瘤, 每年将近有 160 万患者被确诊为乳腺癌, 其中 30%~40% 的乳腺癌患者会发生转移, 而超过 90% 死亡患者发生乳腺癌转移<sup>[1]</sup>。我国女性乳腺癌的发病率和死亡率在世界范围内处于中低水平, 但是乳腺癌仍然是我国女性最常见的癌症之一, 发病仅次于肺癌<sup>[2]</sup>。近年来乳腺癌的发病呈现年轻化的趋势, 因此对于乳腺癌的研究也越来越多。在研究乳腺癌的过程中动物模型的构建是研究的关键所在。肿瘤细胞

与小鼠品系的选择也是建立乳腺癌动物模型的基础所在, 这些选择都会对小鼠的生物学活性、成瘤率、生存期、肿瘤的恶化情况起着决定性的作用<sup>[3]</sup>。目前的报道多为人的乳腺癌细胞系异种移植到裸鼠的动物模型并且成瘤率也比较低, 但是对于小鼠的乳腺癌细胞系 4T1 接种到裸鼠以及 BALB/c 小鼠身上相互对比的报道研究比较少。因此使用 4T1 细胞建立裸鼠以及 BALB/c 小鼠动物模型对于乳腺癌的研究有十分重要的作用<sup>[4-7]</sup>。本文就对相同浓度的 4T1 细胞分别接种到裸鼠和 BALB/c 小鼠身上产生的不同影响进行对比, 从而为乳腺癌动物模型的建

作者简介 王硕(1993-), 男, 硕士在读, 研究方向: 生物化学与分子生物学, E-mail: 1018579850@qq.com。

立起到一个选择性的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞系和试剂 雌性裸鼠以及 BABL/c 小鼠各 30 只, 周龄 3~5 周, 体质量 15~18 g, 购于南京大学动物模式研究所, 饲养于天津医科大学肿瘤医院 SPF 动物房; 4T1 乳腺癌细胞株购于中科院细胞库; RPMI-1640 培养基购于美国 Gibco 公司; 胎牛血清和 0.25% 胰酶购于美国 Gibco 公司; PBS 溶液用 1 L 超纯水加入 NaCl 8 g、KCl 0.2 g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  3.48 g 浓度配置。

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞的培养 4T1 细胞(中科院细胞库)培养于含有 10% 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco, 美国) 的 RPMI-1640 培养基(Gibco, 美国), 细胞培养均加入 100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素, 于 37℃, 5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度培养箱中培养, 对数期细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

1.2.2 细胞计数 首先将计数板以及盖玻片擦拭干净, 将盖玻片盖在计数板上; 然后将细胞悬液吸出 20  $\mu\text{L}$ , 滴加在盖片边缘, 使细胞悬液充满计数板与盖玻片之间(主意盖玻片与计数板之间不能有气泡, 也不可将细胞悬液流出); 最后将计数板静止 2~3 min 后, 计算计数板四大格细胞总数, 压线的细胞只计左侧和上方的, 公式计算: 细胞数/mL=四大格细胞总数/ $4 \times 10^4$ 。

1.2.3 乳腺癌 4T1 细胞悬液的制备 传代培养的小鼠乳腺癌细胞系 4T1, 收集处于对数生长期的 4T1 细胞, 用 PBS 清洗 1 次后, 吸干残余液体, 加入 0.25% 消化, 离心, 然后再用 PBS 润洗两次, 吸去 PBS 后再加入生理盐水制备  $1 \times 10^6$  的细胞悬液备用。

1.2.4 动物模型的分组以及构建 将新到的 10 只裸鼠以及 10 只 BABL/c 小鼠给予正常饮食饲养 5 d 后, 分别随机分为 4 组每组 5 只, 从而得到两组每组 5 只的裸鼠(一组进行正常实验, 一组观察生存期)以及两组每组 5 只的 BABL/c 小鼠(一组进行正常实验, 一组观察生存期)。将  $1 \times 10^6$  个 4T1 细胞用生理盐水稀释后, 用注射器注射到小鼠的第四脂肪垫上。

1.3 观察指标 注射 4T1 细胞后, 每天观察小鼠的生活饮食以及接种部位的肿瘤生长情况, 包括肿瘤出现的时间, 肿瘤形成的大小, 成瘤率以及远期的存活率。每间隔 5 d 用游标卡尺测量肿瘤的长径(a)和短径(b), 并且根据  $V=ab^2/2$  计算肿瘤的体积, 绘制生长曲线。第 30 天时颈椎脱臼处死一组裸鼠一组 BABL/c 小鼠, 取出肿瘤组织, 用游标卡尺测量肿

瘤的长短径, 计算体积, 然后 4% 甲醛固定备用做 H&E 切片。取出小鼠的肺组织观察记录肺部表面的结节数量, 然后用 4% 甲醛固定备用做 H&E 切片。

1.4 统计学方法 所得数据采用 SPSS25.0 统计软件处理, 组间比较采用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  ( $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ) 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 不同组别小鼠的成瘤率以及成瘤时间 接种 4T1 细胞后裸鼠出现肿瘤的时间要早于 BABL/c 小鼠, 由于 BABL/c 小鼠存在免疫能力使得裸鼠的成瘤率要高于 BABL/c 小鼠, 具体成瘤率与肿瘤形成时间见表 1。

表 1 成瘤率及成瘤时间

Tab 1 Tumor growth rate and tumor formation time

组别	成瘤率/%	成瘤时间/d
裸鼠	10/10(100)	5.1±0.95
BALB/c 鼠	8/10(80)	8.0±0.75

2.2 肿瘤大小统计以及病理观察 实验结果表明在相同细胞浓度的条件下裸鼠形成肿瘤的大小明显比 BABL/c 小鼠形成的肿瘤大(图 1)。两组原位瘤用 4% 的甲醛固定 3 d 后做 HE 染色, 比较两组模型鼠形成的原位瘤组织学是否有区别, 发现 BABL/c 组与裸鼠组形成的原位瘤都存在大量的血管结构, 没有明显的组织学差异(图 2)。

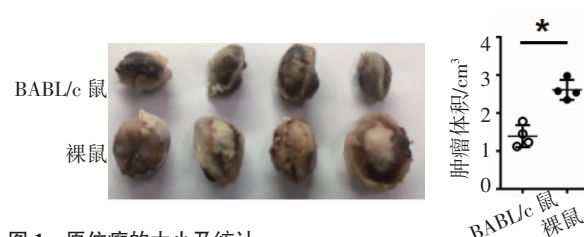


图 1 原位瘤的大小及统计

Fig 1 Size and statistics of primary tumor

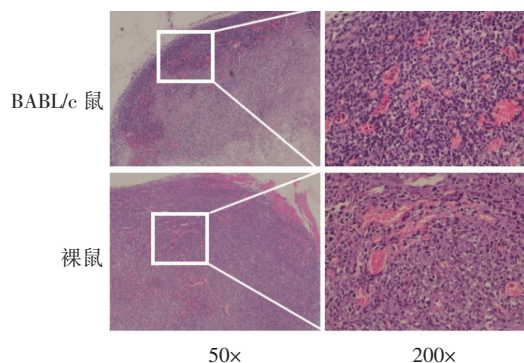


图 2 原位瘤 HE 染色

Fig 2 HE staining of primary tumor

2.3 小鼠肺转移 在 30 d 颈椎脱臼处死小鼠取原位瘤的同时取肺器官, 然后用 4% 甲醛固定后观察发现在肺表面都会有肺结节的存在, 并且在 30 d 时

裸鼠肺部正反双面形成转移结节的数量明显多于 BABL/c 小鼠(图 3)。HE 染色组织学分析发现在两组实验小鼠肺转移灶的肿瘤细胞并没有明显差异(图 4)。

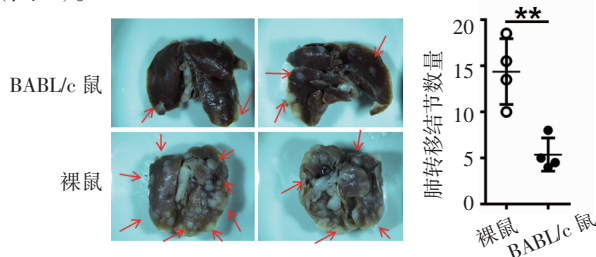


图 3 形成的肺转移结节及数量统计

Fig 3 Lung metastasis nodules and the statistics of nodules number

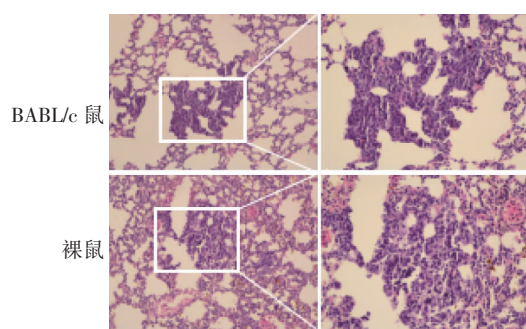


图 4 肺转移 HE 染色

Fig 4 HE staining of lung metastasis

2.4 小鼠生存期 剩余两组小鼠用于观察生存期,发现在相同的饲养条件下 BABL/c 小鼠的生存期明显比裸鼠的生存期长(图 5)。

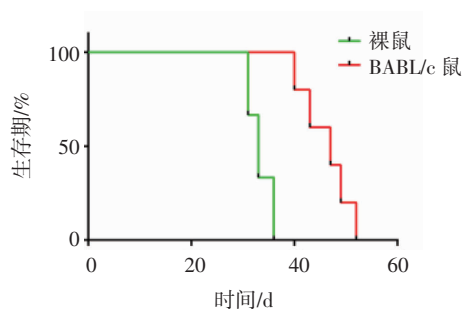


图 5 小鼠的生存期

Fig 5 Survival of mice

### 3 讨论

乳腺癌动物模型的构建与选取对于乳腺癌的研究来说一直是重点所在,由于大家对乳腺癌的研究方向不同,所选取的乳腺癌动物模型也不都是相同的<sup>[6,9]</sup>。在进行乳腺癌相关实验时,细胞系的选择以及小鼠品系的选择是进行体内实验的基础,如果细胞系和小鼠品系的选择不合适可能会耽误实验进程影响实验结果。现如今技术所能构建的乳腺癌模型主要有自发性乳腺癌动物模型,诱发性乳腺

癌动物模型,移植性乳腺癌动物模型,基因工程乳腺癌动物模型以及远处转移乳腺癌动物模型<sup>[10]</sup>。

本文通过研究小鼠乳腺癌细胞 4T1 对不同品系小鼠乳腺癌模型的影响,发现在注射相同数量小鼠的乳腺癌细胞 4T1 时,裸鼠的成瘤速度快于 BABL/c 小鼠,成瘤率要高于 BABL/c 小鼠,裸鼠的成瘤大小大于 BABL/c 小鼠,裸鼠的生存期比 BABL/c 小鼠要短。两种小鼠在 4T1 细胞构建的乳腺癌模型中都会发生肺转移,但是在相同时间内裸鼠形成的肺转移结节数量明显比 BABL/c 小鼠多。

综上实验结果,如果实验要求观察短时间内某基因对肿瘤的大小的影响,可以选择 4T1 细胞注射裸鼠;如果实验要求动物模型的生存期较长,可以选择 4T1 细胞注射 BABL/c 小鼠;如果实验要求观察某基因对动物模型肺转移存在的影响,可以选择裸鼠。因此,我们在选择乳腺癌动物模型的时候要根据实验具体的需求而定。

#### 参考文献:

- [1] 饶子亮,黄威,郑佳琳,等.两种人乳腺癌裸鼠移植模型的建立[J].中国比较医学杂志,2012,22(5):6
- [2] 陈万青,郑荣寿,曾红梅,等.1989-2008 年中国恶性肿瘤发病趋势分析[J].中华肿瘤杂志,2012,34(7):517
- [3] Zhang L, Bi L J, Shi J N, et al. A quantitative diagnostic method for oral mucous precancerosis by Rose Bengal fluorescence spectroscopy[J]. Lasers Med Sci, 2013, 28(1):241
- [4] Gao J L, Ji X, He T C, et al. Tetrandrine suppresses cancer angiogenesis and metastasis in 4T1 tumor bearing mice[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013:265061
- [5] McCarthy M, Auda G, Agrawal S, et al. In vivo anticancer synergy mechanism of doxorubicin and verapamil combination treatment is impaired in BABL/c mice with metastatic breast cancer[J]. Exp Mol Pathol, 2014, 97(1):6
- [6] Bao L L, Haque A, Jackson K, et al. Increased expression of P-Glycoprotein is associated with doxorubicin chemoresistance in the metastatic 4T1 breast cancer model[J]. Am J Pathol, 2011, 178(2): 838
- [7] 严丽,李莉,郝芳,等. BABL/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
- [8] Yu H X, Hendrikx J J, Rottenberg S A, et al. Development of a tumour growth inhibition model to elucidate the effects of ritonavir on intratumoural metabolism and anti-tumour effect of docetaxel in a mouse model for hereditary breast cancer[J]. AAPS J, 2016, 18(2): 362
- [9] Lewis K M, Harford-Wright E, Vink R, et al. NK1 receptor antagonists and dexamethasone as anticancer agents in vitro and in a model of brain tumours secondary to breast cancer[J]. Anticancer Drugs, 2013, 11(3):118
- [10] 庞华,司玉玲,蔡振家,等.耐药乳腺癌裸鼠模型免疫治疗初探[J].天津医药,2011,39(12):1136

(2018-01-09 收稿)