

文章编号 1006-8147(2023)01-0009-06

论著

# MMTV-PyMT 转基因小鼠自发成瘤乳腺癌细胞的分离培养及鉴定

颜文欣, 冯玉梅

(天津医科大学肿瘤医院肿瘤研究所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; 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; 乳腺癌防治教育部重点实验室, 天津 300060)

**摘要** 目的: 分离培养小鼠乳腺肿瘤病毒介导多瘤病毒中间 T 抗原(MMTV-PyMT)转基因小鼠自发成瘤的乳腺癌细胞, 初步研究其生长特性、分子表型、体内成瘤和转移能力。方法: 取 MMTV-PyMT 小鼠自发成瘤的乳腺癌组织( $n=3$ ), 采用酶解贴壁培养法进行原代细胞分离并传代培养, 倒置显微镜下观察细胞形态特征; 采用 CCK-8 检测细胞的增殖能力; 通过 Western 印迹检测细胞的雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)和人表皮生长因子受体 2(HER2)表达以鉴定细胞分子亚型。将分离培养的细胞接种于 C57BL/6 雌性小鼠( $n=4$ )乳腺脂肪垫, 观察细胞成瘤能力和生长特性; 取肿瘤组织和内脏器官, 制备组织切片后采用苏木精-伊红(HE)染色, 观察组织形态学特点; 采用免疫组织化学(IHC)染色检测 ER、PR、HER2 及 Ki-67 蛋白表达, 分析分子分型。结果: 成功分离得到 MMTV-PyMT 转基因小鼠自发成瘤的乳腺癌细胞(MMTV-PyMT 细胞)并可稳定生长和传代, 细胞倍增时间为 56.0 h; MMTV-PyMT 细胞可在 C57BL/6 雌性小鼠乳腺脂肪垫成瘤并生长, 但未见远处内脏转移。该细胞在细胞学和组织学中的分子分型皆为 HER2 过表达亚型, 肿瘤组织中 Ki-67 阳性表达率为 34%。结论: 成功构建得到可体外稳定传代并具有体内成瘤能力的 HER2 过表达分子亚型小鼠乳腺癌细胞系, 该细胞可作为 HER2 过表达亚型乳腺癌体内、外实验研究的细胞模型。

**关键词** 小鼠乳腺癌细胞系; 原代培养; HER2 过表达分子亚型

中图分类号 R737.9

文献标志码 A

## Isolation and identification of spontaneously tumorigenic primary breast cancer cells from MMTV-PyMT transgenic mice

YAN Wen-xin, FENG Yu-mei

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

**Abstract Objective:** To isolate and identify primary breast cancer cells from MMTV-PyMT (mouse mammary tumor virus-polyoma middle T antigen) transgenic mice, explore its growth characteristics, molecular phenotype, tumorigenic and metastatic abilities *in vivo* preliminary. **Methods:** Breast cancer tissues from MMTV-PyMT transgenic mice ( $n=3$ ) were collected, and primary breast cancer cells were isolated and passaged by enzymatic-adherence-culture method. An inverted microscope was used to observe the morphological characteristics of cells; Cell-Counting-Kit 8 (CCK-8) was used to detect cell proliferation characteristics; Western blotting was used to detect estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) protein expression to identify its subtypes. The cells were orthotopic injected into the mammary fat pads of C57BL/6 female mice ( $n=4$ ), and the tumorigenic ability and growth characteristics of the cells were observed; tumor tissues and visceral organ tissues were taken and stained with hematoxylin-eosin staining (HE) to observe the morphological characteristics; Immunohistochemistry staining (IHC) was used to detect ER, PR, HER2 and Ki-67 protein expression, and the tumor molecular type was analyzed. **Results:** Tumor cells derived from MMTV-PyMT mice primary breast tumors (MMTV-PyMT cells) were successfully isolated, it could expand and be passaged stably *in vitro*, and the cell doubling time was 56.04 hours. It could grow in the mammary fat pad of C57BL/6 mice, but no distant visceral metastasis. The molecular subtype of MMTV-PyMT cells in both cytology and histology was HER2-overexpression subtype (ER-negative/PR-negative/HER2-positive), and the positive expression rate of Ki-67 in tumor tissue was 34%. **Conclusion:** A HER2-overexpressing molecular subtype mouse-derived breast cancer cell line that can be stably passaged *in vitro* and has tumorigenic ability *in vivo* is successfully constructed. It can be used as a HER2-overexpression cell model for breast cancer *in vitro* and *in vivo* experiments.

**Key words** mouse-derived breast cancer cell line; cell primary culture; HER2-over expression molecular subtype

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤。在乳腺癌的临床诊断和治疗中,根据雌激素受体(estrogen receptor $\alpha$ , 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, HER2) 以及 Ki-67 的表达状态,可将乳腺癌分为 luminal A、luminal B、三阴性和 HER2 过表达分子亚型<sup>[1-3]</sup>。不同分子亚型乳腺癌的治疗和预后不同,针对不同亚型乳腺癌发生、发展机制的研究有助于研发亚型特异性诊断和治疗方法<sup>[4-9]</sup>。乳腺癌细胞系和荷瘤动物模型是探索乳腺癌发病机制的必要实验对象<sup>[10]</sup>。人源性乳腺癌细胞系种类十分丰富,但小鼠源性细胞系种类非常有限<sup>[11-13]</sup>。因此,在对乳腺癌的研究中常用免疫缺陷的小鼠品系作为人源细胞异种移植的受体。由于免疫缺陷小鼠体内缺失与免疫功能相关的特定基因<sup>[14-15]</sup>,而肿瘤细胞的免疫调节和免疫逃逸在肿瘤发生、发展中有重要作用,该模型并不能真正模拟和准确反映乳腺癌发生、发展过程中的病理生理特点。目前小鼠源性细胞株主要是 BALB/c 小鼠来源的 4T1(三阴性亚型)和 EMT-6(三阴性亚型)以及 C57BL/6 小鼠来源的 E0771(luminal B 亚型),但缺乏临床预后较差的 HER2 过表达亚型和发病率最高的 luminal A 亚型的小鼠源性细胞模型<sup>[16-18]</sup>。小鼠乳腺肿瘤病毒介导多瘤病毒中间 T 抗原 (mouse mammary tumor virus-polyoma middle T antigen, MMTV-PyMT) 转基因小鼠是一种人类乳腺癌动物模型,该模型不仅填补了乳腺癌动物模型的空缺,且其自发成瘤的特性可模拟和准确反映乳腺癌发生、发展过程中的病理生理特点。该动物模型目前被广泛应用于研究乳腺癌发生、发展、转移以及临床肿瘤药物的筛选<sup>[19-23]</sup>。本实验旨在从 MMTV-PyMT 转基因小鼠自发成瘤乳腺组织分离构建原代细胞,以获得可作为乳腺癌体内、外实验研究的小鼠源性细胞模型。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 6 周龄雌性 MMTV-PyMT 转基因小鼠模型( $n=5$ )购自美国 Jackson Laboratory 公司,6 周龄雌性 C57BL/6 小鼠( $n=4$ )购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司(动物合格证号:SCXK 苏 202005468),饲料购自江苏协同医药生物工程有限公司。小鼠在天津医科大学肿瘤医院的 Specific Pathogen Free 级动物设施中饲养。本研究经天津医科大学肿瘤医院实验动物伦理委员会批准(批准编号:AE-2021130),依据动物伦理与福利的相关规定实施。

1.2 主要试剂和仪器 人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 和 MCF-7 购于美国模式培养物保藏所(American Type Culture Collection, ATCC);DMEM 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和 I 型胶原酶(货号:7100-017)购自 Gibco 公司;胰蛋白酶-ED-TA、青霉素、链霉素以及透明质酸酶(货号:H3506)购于 Invitrogen 公司;Cell-Counting-Kit 8(CCK-8)试剂盒购于 Dojindo 公司;抗 ER(货号:21244-1-AP)、抗 PR(货号:25871-1-AP)和抗 HER2(货号:18299-1-AP)抗体购于 Proteintech 公司;抗 Ki-67 抗体(货号:sc-15402)购于 Santa Cruz Biotechnology 公司;抗  $\beta$ -Actin 抗体(货号:6276)购于 Abcam 公司;抗兔 IgG(货号:7074)、抗鼠 IgG(货号:7076)抗体购于 Cell Signaling Technology 公司;增强酶标山羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物(货号:PV-9000)、抗体稀释液购于中衫金桥公司;ECL 发光液(货号:WBKLS0500)购于 Merck 公司;苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)和免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)染色试剂盒购于 Servicebio 公司;蛋白质分子量标准(货号:26616、26625)、酶标仪(型号:Multiskan FC)购于 Thermo Fisher Scientific 公司。

## 1.3 实验方法

1.3.1 原代细胞的分离 将 19 周龄 MMTV-PyMT 转基因小鼠颈椎脱臼法处死,酒精擦拭小鼠全身后无菌切取肿瘤组织放入预冷磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)。用含抗生素的生理盐水冲洗组织并剪碎,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清。加入组织消化液(160  $\mu$ g/mL I 型胶原酶与 25  $\mu$ g/mL 透明质酸酶按 1:1 体积混合)消化肿瘤组织。消化 2 h 后加入含 20% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 DMEM 培养基终止消化,用 75  $\mu$ m 孔径过滤器滤至离心管中,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入上述培养液后接种于培养瓶,置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。分离得到 MMTV-PyMT 转基因小鼠自发成瘤的乳腺癌细胞,命名为 MMTV-PyMT 细胞。

1.3.2 MMTV-PyMT 细胞的培养与传代 将体外分离得到的 MMTV-PyMT 细胞传代培养,弃培养基,用 0.25%胰蛋白酶消化液于 37 $^{\circ}$ C 消化 1~2 min 后,加入含 10% FBS 的 DMEM 培养液终止消化。1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入上述培养液接种于培养瓶,置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。

1.3.3 MMTV-PyMT 细胞形态的观察 倒置显微镜下观察原代及传代的细胞,在特定时间点拍照记录

细胞形态。

1.3.4 MMTV-PyMT 细胞生长曲线的制备 在 96 孔板中加入 100  $\mu\text{L}$  含  $2 \times 10^3$  个细胞的悬液,设 6 个复孔,置于  $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  培养箱中培养。在特定测量时间,每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 测定液。培养板在培养箱中孵育 2 h 后用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度值。使用 Graphpad Prism 5.0 软件以时间为横坐标,吸光度值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.3.5 MMTV-PyMT 细胞倍增时间的计算 待细胞可稳定培养和传代后制备细胞悬液,进行细胞计数,细胞总数记为  $N_0$ ,经过  $t$  时间培养后( $t > 48$  h),再次细胞计数,细胞总数记为  $N_t$ ,依据细胞倍增公式  $D_t = t \times (\frac{\lg 2}{\lg N_t - \lg N_0})$  得出细胞倍增时间  $D_t$ 。

1.3.6 Western 印迹 待细胞汇合约 80% 时采用细胞裂解液(20 mmol/L Tris-HCL、5 mmol/L EDTA、1% Triton-X 100、150 nmol/L NaCl、1% DTT、1% Protease inhibitor cocktail)裂解细胞收集细胞蛋白。40  $\mu\text{g}$  细胞蛋白经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后,转印至 PVDF 膜上;5% 脱脂牛奶温室封闭 1 h 后,加入抗目的蛋白抗体(稀释比例:抗 Ki-67 抗体 1:1 000;抗 ER 抗体 1:1 000;抗 PR 抗体 1:1 000;抗 HER2 抗体 1:2 000), $4^\circ\text{C}$  孵育过夜,等渗缓冲盐溶液(Tris buffered saline tween, TBST)清洗后,加入二抗(稀释比例:抗兔 IgG 抗体 1:2 000;抗鼠 IgG 抗体 1:8 000),室温孵育 1 h, TBST 清洗后用 ECL 显色,置于 X 射线胶片曝光后显影、冲洗、定影,晾干胶片。

1.3.7 移植瘤小鼠模型的构建和体内肿瘤生长特性的观察 于 8 周龄的 C57BL/6 小鼠乳腺脂肪垫接种  $1 \times 10^6$  个上述分离培养且稳定传代的细胞。以 MMTV-PyMT 转基因小鼠自发成瘤的乳腺肿瘤为对照,每天观察小鼠的生存及肿瘤生长情况,每周测量 1 次小鼠肿瘤大小(肿瘤体积计算公式为:长径 $\times$ 短径 $^2/2$ )。以肿瘤直径达到 1.5 cm 为实验终点,到达实验终点后使用颈椎脱臼法处死荷瘤小鼠,解剖小鼠,切取肿瘤及内脏器官。使用 Graphpad Prism 5.0 软件以时间为横坐标,肿瘤体积为纵坐标绘制小鼠肿瘤生长曲线。

1.3.8 HE 染色和 IHC 染色 取切取的肿瘤和内脏器官组织经 10% 福尔马林固定液固定、石蜡包埋、连续切片后分别进行 HE 染色和 IHC 染色。HE 染色:将上述处理好的组织切片  $65^\circ\text{C}$  烘烤 2 h 后经二甲苯脱蜡两次,每次 10 min,然后切片依次经 100%、100%、90%、75% 乙醇水化各 5 min,加入蒸馏水;伊

红染液染色 5 min,流水冲洗;苏木素染液染色 5 min,流水冲洗;然后切片依次经 70%、80%、95%、100%、100% 乙醇脱水各 5 min,二甲苯透明两次,每次 5 min 后用中性树脂封片。IHC 染色:将上述处理好的组织切片进行烘烤、脱蜡和水化后,置于 EDTA 抗原修复缓冲液(pH=8.0)中于微波炉内进行抗原修复;再经过氧化氢封闭 0.5 h 后一抗(稀释比例:抗 Ki-67 抗体 1:50;抗 ER 抗体 1:800;抗 PR 抗体 1:500;抗 HER2 抗体 1:1 500)孵育过夜;第 2 天二抗孵育 0.5 h, PBS 洗涤 3 次。经二氨基联苯胺显色后苏木素复染细胞核;脱水后用中性树脂封片观察。免疫组化结果由两位专业的病理科医师独立判定。通过在光学显微镜下对组织切片分别按染色强度(0~3 分为阴性着色、淡黄色、浅褐色、深褐色)和阳性范围(1~4 分为 0~25%、26~50%、51~75%、76~100%)进行评分,数值相乘得到染色总分值,理论分数范围为 0~3。总分值=0 为阴性、>1 为阳性。

1.3.9 Ki-67 阳性率的计算 Ki-67 IHC 染色阳性应定位于细胞核。通过计算核阳性的肿瘤细胞百分比来计算该组织 Ki-67 阳性率。通过随机选取 3 个视野计数,用平均值表示 Ki-67 阳性率。

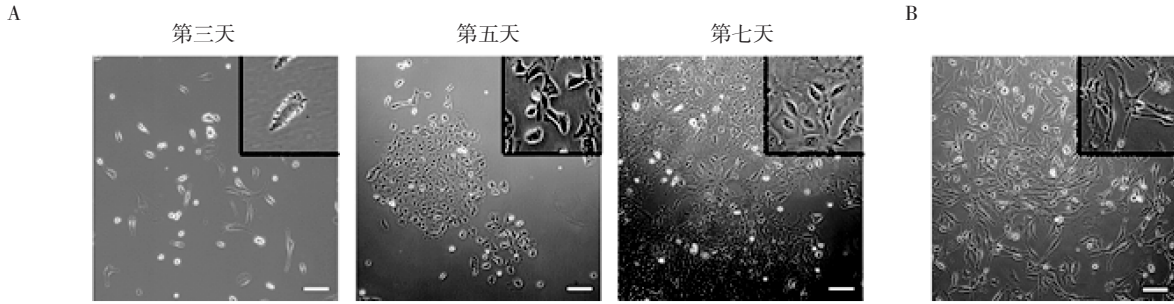
1.4 统计学处理 采用 Graphpad Prism 7.0 软件进行数据分析和做图,数据符合正态分布。SPSS20.0 软件用于统计学分析。采用单因素方差分析和 Student's  $t$  检验用于比较实验组和对照组之间的差异。 $P < 0.05$  认为有统计学意义。

## 2 结果

2.1 MMTV-PyMT 细胞体外培养形态的观察 体外培养的 MMTV-PyMT 细胞形态学观察结果显示:在细胞分离培养至 3 d 时,细胞呈圆形或短梭形,单个或小团簇贴壁生长;培养至 5 d 时,细胞开始增殖,呈短梭形团簇样生长;培养至 7 d 时,细胞集落汇合,呈成纤维样、漩涡式排列生长(图 1A)。细胞在体外可稳定生长和传代,稳定传至 8 代后的细胞形态均一,呈典型的长梭形(图 1B)。

2.2 MMTV-PyMT 细胞生长特性的测定 采用 CCK-8 检测法绘制细胞生长曲线结果显示,体外培养的 MMTV-PyMT 细胞持续增殖,生长稳定(图 2)。依据细胞倍增时间公式计算细胞倍增时间为 56.0 h。

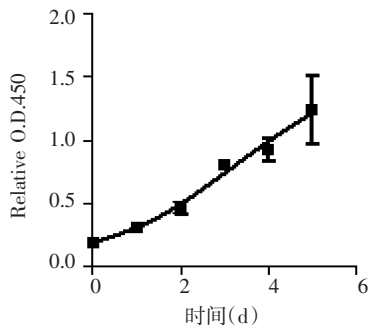
2.3 MMTV-PyMT 细胞分子亚型的鉴定 采用 Western 印迹检测 MMTV-PyMT 细胞中 ER、PR 和 HER2 蛋白的表达状态,以人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 和 MCF-7 为对照,结果显示该细胞 ER 和 PR 蛋白不表达,但 HER2 表达(图 3)。



注:A:从左至右分别为第3天、第5天和第7天细胞形态的代表性图像;B:稳定传代后细胞形态的代表性图像;右上角放大倍数为5倍;标尺:100 μm; MMTV-PyMT:小鼠乳腺肿瘤病毒介导多瘤病毒中间T抗原

图1 MMTV-PyMT细胞体外培养的形态学图像

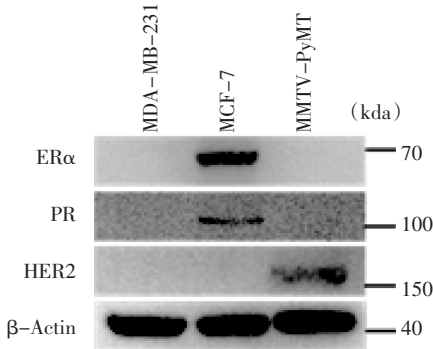
Fig 1 Morphological images of MMTV-PyMT cells cultured *in vitro*



注:MMTV-PyMT:小鼠乳腺肿瘤病毒介导多瘤病毒中间T抗原

图2 MMTV-PyMT细胞生长曲线

Fig 2 The cell growth curve of MMTV-PyMT cells



注:MMTV-PyMT:小鼠乳腺肿瘤病毒介导多瘤病毒中间T抗原

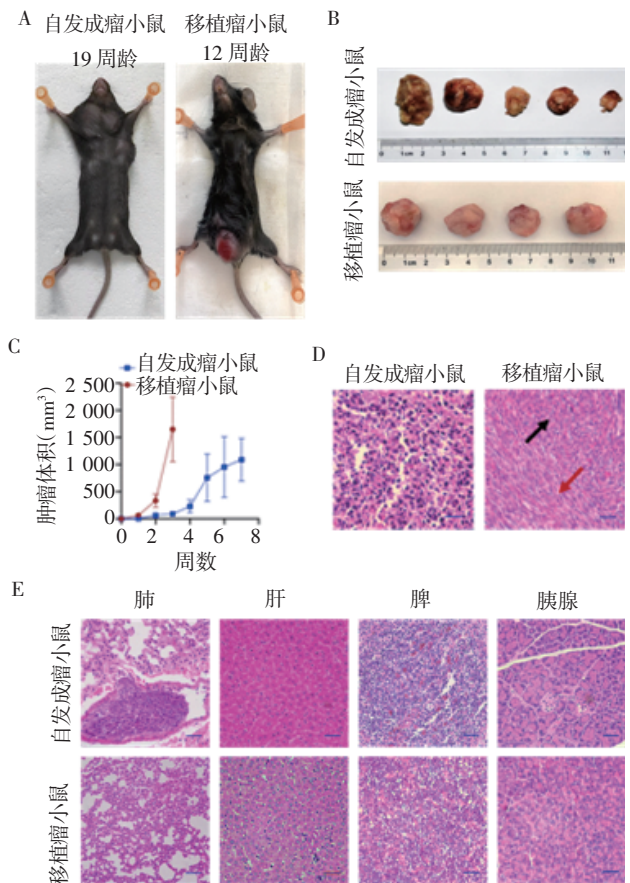
图3 Western印迹法分析MMTV-PyMT细胞分子亚型

Fig 3 The identification of molecular subtype of MMTV-PyMT cells by Western blotting

2.4 MMTV-PyMT细胞体内生长特性与转移能力的观察 自发成瘤小鼠平均9~10周龄时可触及乳腺肿瘤,19周龄到达实验终点;移植瘤小鼠在8周龄接种,9周龄成瘤,12周龄到达实验终点。到达实验终点时两组小鼠的外观照片如图4A所示,代表性肿瘤照片如图4B所示,小鼠肿瘤生长曲线如图4C所示。

对两组小鼠肿瘤通过HE染色观察分析形态学特征结果显示:自发成瘤小鼠肿瘤组织中癌细胞呈团巢状分散排列。移植瘤小鼠肿瘤细胞形态主要为两种,一种呈圆形,巢状式排列,类似于自发成瘤小鼠的肿瘤形态(黑色箭头所示);另一种呈长梭形,

纤维样极性排列,类似于MMTV-PyMT细胞的形态(红色箭头所示)。较对照组而言,移植瘤小鼠肿瘤细胞核小,细胞间排列紧密,呈异质性生长(图4D)。对两组小鼠内脏器官进行HE染色观察分析结果显示,自发成瘤小鼠在19周时均发生肺转移,但肝、肺、脾以及胰腺等其他内脏器官均未观察到转移灶点。移植瘤小鼠内脏器官均未观察到转移灶点(图4E)。



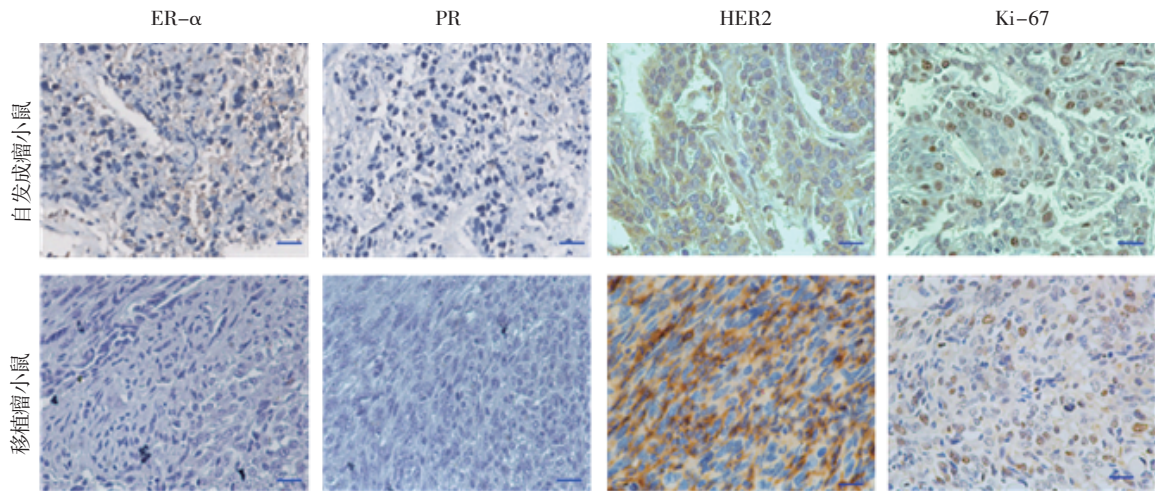
注:A:小鼠代表性照片(原发瘤小鼠模型:n=4;移植瘤小鼠模型:n=5);B:小鼠肿瘤照片;C:小鼠肿瘤生长曲线;D-E:HE染色结果代表性图像;标尺:200 μm; MMTV-PyMT:小鼠乳腺肿瘤病毒介导多瘤病毒中间T抗原

图4 MMTV-PyMT细胞体内生长特性与转移能力

Fig 4 Growth characteristics and metastatic ability of MMTV-PyMT cells *in vivo*

IHC 染色结果显示自发成瘤小鼠原发肿瘤与移植瘤小鼠原位肿瘤细胞组织皆为 ER 阴性、PR 阴性、HER2 阳性(图 5)。自发成瘤小鼠肿瘤组织中肿瘤细胞 Ki-67 阳性率约为 25%,高表达 Ki-67 阳性

的肿瘤细胞分布在组织边缘。移植瘤小鼠肿瘤组织中肿瘤细胞 Ki-67 阳性率约为 34%,高表达 Ki-67 阳性的肿瘤细胞在组织内以及组织边缘均有分布(图 5)。



注:标尺:200  $\mu\text{m}$ ; MMTV-PyMT:小鼠乳腺肿瘤病毒介导多瘤病毒中间 T 抗原

图 5 IHC 染色法分析 MMTV-PyMT 细胞体内实验的分子亚型

Fig 5 The identification of molecular subtype of MMTV-PyMT cells *in vivo* by IHC staining

### 3 讨论

本研究分离培养的 MMTV-PyMT 细胞倍增时间为 56.0 h,常用的人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 倍增时间为 23.0 h<sup>[24]</sup>,表明分离培养的 HER2 过表达亚型的 MMTV-PyMT 细胞较三阴性亚型乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖速度慢。生长曲线显示 MMTV-PyMT 细胞持续稳定增殖,表明细胞处于稳定生长状态<sup>[25-26]</sup>。

MMTV-PyMT 转基因小鼠乳腺肿瘤组织的分子分型与病理分级是不断变化的,从发病最初(4 周龄)至发病后期(10 周龄之后)ER 和 PR 表达不断降低,HER2 和 Ki-67 表达不断升高<sup>[27-28]</sup>。Shishido 等<sup>[27]</sup>研究结果显示,发病晚期(大于 10 周龄)MMTV-PyMT 转基因小鼠自发成瘤乳腺组织分子分型为 HER2 过表达亚型,本研究结果进一步表明处于晚期 MMTV-PyMT 转基因小鼠乳腺组织为 HER2 过表达亚型。对分离培养的 MMTV-PyMT 细胞和移植瘤小鼠乳腺组织的分子分型进行分析,结果显示其二分子分型皆为 HER2 过表达亚型,表明在分离培养过程中肿瘤细胞亚型并未发生改变。

本研究发现与自发成瘤小鼠相比,MMTV-PyMT 细胞体内成瘤后肿瘤生长迅速、Ki-67 表达高,但未观察到 MMTV-PyMT 细胞在体内发生血行

转移。Ki-67 的表达差异表明自发成瘤组织中肿瘤细胞可能坏死或处于缺氧环境,而移植瘤中肿瘤细胞处于快速增殖状态。此外,强侵袭和高转移性的细胞在晚期 MMTV-PyMT 转基因小鼠中已经发生播散,在原位聚集的细胞为增殖能力强但干性弱的细胞,分离培养得到的是增殖能力强的细胞的克隆。

总之,本研究构建了可体外稳定传代并具有体内成瘤能力的 HER2 过表达分子亚型小鼠乳腺癌细胞系,该细胞增殖能力强、成瘤率高。本研究构建的 MMTV-PyMT 细胞不仅可用于研究 MMTV-PyMT 转基因小鼠在发病过程中的特点,也可用于研究乳腺癌细胞体外培养特性,还可作为小鼠源性细胞模型在体内模拟和准确反映乳腺癌成瘤和转移过程中的病理生理特点,补充了临床预后较差的 HER2 过表达亚型小鼠源性细胞模型,为基础研究作出贡献。

#### 参考文献:

- [1] PASCHALL A V, LIU K. An orthotopic mouse model of spontaneous breast cancer metastasis[J]. *J Vis Exp*, 2016, (114): 54040.
- [2] GAO J J, SWAIN S M. Luminal A breast cancer and molecular assays: a review [J]. *Oncologist*, 2018, 23(5): 556-565.
- [3] GOLDHIRSCH A, WOOD W C, COATES A S, et al. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy

- of early breast cancer 2011[J]. *Ann Oncol*, 2011, 22(8): 1736–1747.
- [4] SZYMICZEK A, LONE A, AKBARI M R. Molecular intrinsic versus clinical subtyping in breast cancer: a comprehensive review[J]. *Clin Genet*, 2021, 99(5): 613–637.
- [5] HOLLIDAY D L, SPEIRS V. Choosing the right cell line for breast cancer research[J]. *Breast Cancer Res*, 2011, 13(4): 215.
- [6] TAKADA M, TOI M. Neoadjuvant treatment for HER2 –positive breast cancer[J]. *Chin Clin Oncol*, 2020, 9(3): 32.
- [7] HARBECK N, GNANT M. Breast cancer [J]. *Lancet*, 2017, 389(10074): 1134–1150.
- [8] SUGIE T. Immunotherapy for metastatic breast cancer[J]. *Chin Clin Oncol*, 2018, 7(3): 28.
- [9] NAGINI S. Breast cancer: current molecular therapeutic targets and new players [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2017, 17(2): 152–163.
- [10] PULASKI B A, OSTRAND–ROSENBERG S. Mouse 4T1 breast tumor model[J]. *Curr Protoc Immunol*, 2001, Chapter 20: Unit 20.2.
- [11] LE NAOUR A, KOFFI Y, DIAB M, et al. EO771, the first luminal B mammary cancer cell line from C57BL/6 mice[J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20: 328.
- [12] SEUNG E, XING Z, WU L, et al. A trispecific antibody targeting HER2 and T cells inhibits breast cancer growth via CD4 cells[J]. *Nature*, 2022, 603(7900): 328–334.
- [13] SINGH S, LEE N, PEDROZA D A, et al. Chemotherapy coupled to macrophage inhibition induces T–cell and B–cell infiltration and durable regression in triple–negative breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2022, 82(12): 2281–2297.
- [14] CHELI Y, TULIC M K, EL HACHEM N, et al. ITGBL1 is a new immunomodulator that favors development of melanoma tumors by inhibiting natural killer cells cytotoxicity[J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 12.
- [15] THOMSEN M, YACOUB–YOUSSEF H, MARCHEIX B. Reconstitution of a human immune system in immunodeficient mice: models of human alloreaction *in vivo*[J]. *Tissue Antigens*, 2005, 66(2): 73–82.
- [16] PARTRIDGE A H, HUGHES M E, WARNER E T, et al. Subtype–dependent relationship between young age at diagnosis and breast cancer survival[J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(27): 3308–3314.
- [17] CRONIN K A, HARLAN L C, DODD K W, et al. Population–based estimate of the prevalence of HER–2 positive breast cancer tumors for early stage patients in the US[J]. *Cancer Invest*, 2010, 28(9): 963–968.
- [18] LING Y, LIANG G, LIN Q, et al. circCDYL2 promotes trastuzumab resistance via sustaining HER2 downstream signaling in breast cancer [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 8.
- [19] MAO S P H, PARK M, CABRERA R M, et al. Loss of amphiregulin reduces myoepithelial cell coverage of mammary ducts and alters breast tumor growth[J]. *Breast Cancer Res*, 2018, 20(1): 131.
- [20] SUNDARAM S, YAN L. High–fat diet enhances mammary tumorigenesis and pulmonary metastasis and alters inflammatory and angiogenic profiles in MMTV–PyMT Mice[J]. *Anticancer Res*, 2016, 36(12): 6279–6287.
- [21] OWYONG M, CHOU J, VAN DEN BIJGAART R J, et al. MMP9 modulates the metastatic cascade and immune landscape for breast cancer anti–metastatic therapy[J]. *Life Sci Alliance*, 2019, 2(6): e201800226.
- [22] FU A, YAO B, DONG T, et al. Tumor–resident intracellular microbiota promotes metastatic colonization in breast cancer[J]. *Cell*, 2022, 185(8): 1356–1372.e26.
- [23] LIU Y, QI C, ZHENG L, et al. (1)H–NMR based metabolic study of MMTV –PyMT mice along with pathological progress to screen biomarkers for the early diagnosis of breast cancer[J]. *Mol Omics*, 2022, 18(2): 167–177.
- [24] LIU T L, UPADHYAYULA S, MILKIE D E, et al. Observing the cell in its native state: imaging subcellular dynamics in multicellular organisms[J]. *Science*, 2018, 360(6386): eaaq1392.
- [25] ZWICKER J I, PROFFITT R T, REYNOLDS C P. A microcomputer program for calculating cell population doubling time *in vitro* and *in vivo*[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1996, 37(3): 203–210.
- [26] ONG S E, BLAGOEV B, KRATCHMAROVA I, et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2002, 1(5): 376–386.
- [27] SHISHIDO S, DELAHAYE A, BECK A, et al. The MMTV –PyVT transgenic mouse as a multistage model for mammary carcinoma and the efficacy of antineoplastic treatment[J]. *J Cancer Ther*, 2013, 4(7): 1187–1197.
- [28] LIN E Y, JONES J G, LI P, et al. Progression to malignancy in the polyoma middle T oncoprotein mouse breast cancer model provides a reliable model for human diseases[J]. *Am J Pathol*, 2003, 163(5): 2113–2126.

(2022–05–06 收稿)