

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2024.03.0200

论著

胫骨注射和左心室注射乳腺癌细胞小鼠骨定植模型的研究

黄玉凡, 李晓青

(天津医科大学肿瘤医院肿瘤研究所生物化学与分子生物化学研究室; 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: 探讨胫骨注射和左心室注射乳腺癌细胞构建小鼠骨定植模型的方法。方法: 通过对野生型 MDA-MB-231 乳腺癌细胞进行慢病毒感染, 构建稳定表达绿色荧光蛋白(GFP)和荧光素酶(LUC)的细胞株。将 GFP⁺/LUC⁺标记的处于对数生长期的 MDA-MB-231 乳腺癌细胞分别以 6×10^3 个/只和 1×10^5 个/只接种 BALB/c-nu/nu 小鼠和 NOD/SCID 小鼠, 构建胫骨注射模型和左心室注射模型。采用活体成像观察肿瘤细胞在活体小鼠体内的定植部位及分布情况; X 线检测观察骨损伤的位置及程度; 苏木素-伊红(HE)染色和广谱角蛋白(Pan CK)免疫组化染色定位骨中的肿瘤细胞。结果: 经荧光显微镜及活细胞成像检测, 表达 GFP 和 LUC 的慢病毒对 MDA-MB-231 细胞感染效率高达 95%, 且继续传代后 GFP 和 LUC 表达效率无明显减退, 可用于后续实验。胫骨注射 4 h 后进行活体成像观察, 结果显示小鼠右下肢胫骨出现 LUC 信号; 左心室注射后立即进行活体成像观察, 发现肿瘤细胞已循环至全身, 表明已成功构建胫骨注射模型及左心室注射模型。30 d 进行活体成像观察发现, 胫骨注射模型和左心室注射模型腿部出现 LUC 信号, 表明腿部有定植灶形成。X 线结果也表明存在骨损伤。HE 染色和 Pan CK 免疫组化染色证实胫骨注射 MDA-MB-231 乳腺癌细胞小鼠模型 100% 出现骨定植灶, 定植率高, 而左心室注射 MDA-MB-231 乳腺癌细胞小鼠模型仅 20% 出现骨定植灶。结论: 运用活体成像、X 线等检测技术联合病理学分析评估胫骨注射及左心室注射乳腺癌细胞骨定植小鼠模型, 可提高结果分析的准确性, 能为乳腺癌转移机制研究、抗转移治疗等提供实验和理论依据。

关键词 胫骨注射; 左心室注射; 骨定植

中图分类号 R737.9

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2024)03-0200-05

Tibial injection and left ventricular injection of breast cancer cells in a mouse model of bone colonization

HUANG Yufan, LI Xiaoping

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

Abstract **Objective:** To investigate the methodology of constructing bone colonization model in mice by tibial injection and left ventricular injection of breast cancer cells. **Methods:** Cell lines stably expressing green fluorescent protein (GFP) and luciferase (LUC) were constructed by lentiviral infection of wild type MDA-MB-231 breast cancer cells. The GFP⁺/LUC⁺-labeled MDA-MB-231 breast cancer cells in logarithmic growth phase were inoculated into BALB/c-nu/nu mouse and NOD/SCID mouse at 6×10^3 /pc and 1×10^5 /pc, respectively, to construct tibial injection model and left ventricular injection model. *In vivo* imaging was used to observe the colonization site and distribution of tumor cells in living mouse; X-ray detection was used to observe the location and extent of bone damage; HE staining and pancytokeratin (Pan CK) immunohistochemical staining were used to localize tumor cells in bone. **Results:** As detected by fluorescence microscopy and live cell imaging, the lentivirus expressing GFP and LUC had an infection efficiency of up to 95% on MDA-MB-231 cells, and there was no obvious decrease in the expression efficiency of GFP and LUC after continued passaging, which could be used for subsequent experiments. *In vivo* imaging 4 hours after tibial injection showed that LUC signals appeared in the right lower limb tibia of the mouse; *in vivo* imaging immediately after left ventricular injection showed that the tumor cells had circulated throughout the body, which indicated that the tibial injection model and the left ventricular injection model had been successfully constructed. *In vivo* imaging at 30 days showed that LUC signals appeared in the legs of the tibia-injected model and the left ventricle-injected model, which indicated that there was a foci of colonization formed in the legs. X-rays also showed bone damage. HE staining and Pan CK immunohistochemical staining confirmed the presence of foci of bone colonization in 100% of the tibial-injected MDA-MB-231 mouse model with a high rate of colonization, whereas only 20% of the left ventricle-injected MDA-MB-231 breast cancer cells mouse model showed foci of bone colonization. **Conclusion:** The use of *in vivo* imaging, X-ray and other detection techniques

基金项目 天津市医学重点学科(专科)建设项目(TJYXZDXK-009A)

作者简介 黄玉凡(1999-), 女, 硕士在读, 研究方向: 肿瘤分子生物学; 通信作者: 李晓青, E-mail: xqli@tmu.edu.cn.

combined with pathological analysis to evaluate the tibial-injected and left ventricle-injected breast cancer cells bone colonization mouse models can improve the accuracy of the result analysis, and can provide experimental and theoretical basis for the study of metastatic mechanism and anti-metastatic treatment of breast cancer.

Key words tibial injection; ventricular injection; bone model

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤^[1]。转移是导致肿瘤患者死亡的主要原因^[2-5]。乳腺癌发生远处转移呈现为器官选择性,最常见的是骨,其次是肺、肝脏和脑^[6]。乳腺癌骨转移是一个多步骤、多基因参与调控的复杂过程^[7-11]。为进一步研究乳腺癌骨转移的机制和筛选相关基因,本研究采用两种方法构建人乳腺癌骨定植模型,并通过联合活体成像、X线及组织病理分析等方法共同评价两种动物模型的科研应用价值,为乳腺癌转移机制的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物 6周龄雌性 BALB/c-nu/nu 小鼠、雌性 NOD/SCID 小鼠购于江苏南京集萃药康生物科技股份有限公司,生产许可证号:SCXK(苏)2023-0009。小鼠饲养于天津医科大学肿瘤医院 SPF 级实验动物中心,生产许可证号:SCXK(苏)2023-0009,动物批号(202333064)。环境温度 20~26℃,日温差 $\leq 4^{\circ}\text{C}$,相对湿度 40%~70%,12 h 交替明暗灯光。本研究通过天津医科大学肿瘤医院实验动物伦理委员会审查(伦理编号:AE-2022093),依据动物伦理的相关规定实施。

1.2 试剂和仪器 RPMI-1640 培养基、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶-EDTA、青霉素、链霉素购于 Invitrogen 公司;野生型 MDA-MB-231 细胞系购于 ATCC 公司;表达 Luciferase 和 GFP 的慢病毒、Enhanced Infection Solution 购于上海吉凯基因化学技术有限公司;Vivo Glo™ Luciferin 购于 Promega 公司;三溴乙醇、叔戊醇购于 Aladdin 公司;1 mL 无菌注射器购于 BD Bioscience 公司;EDTA 脱钙液购于生工生物工程(上海)股份有限公司;GFP 抗体购于 Abcam 公司;Pan CK 抗体购于北京中杉金桥生物技术有限公司;免疫组化显色试剂盒购于迈新生物技术有限公司;倒置显微镜 Axio Observer 购于 Zeiss 公司;X 线系统购于 Hologic Trident 公司;化学发光成像仪购于 Tanon 公司;倒置荧光显微镜购于 Nikon 公司;Xenogen IVIS 200 成像系统仪购于 Caliper Life Sciences 公司。

1.3 方法

1.3.1 慢病毒感染 将野生型 MDA-MB-231 乳腺癌细胞按照 2.5×10^4 个/孔密度接种于 24 孔板中,摇匀后置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。12 h 后,将

细胞培养液换为 1×助感染试剂 Enhanced Infection Solution。MDA-MB-231 细胞的感染复数(MOI)为 20,根据 MOI 值计算病毒使用量,加入 LUC 慢病毒进行感染,混匀。感染 24 h 后换为常规 1640 完全培养基,继续培养。感染 72 h 后,可加入 150 $\mu\text{g/mL}$ Luciferase 底物,曝光仪下观察感染效率。GFP 慢病毒转染步骤同上,待细胞扩增后,观察 GFP 表达情况。

1.3.2 胫骨注射模型构建 GFP⁺/LUC⁺ MDA-MB-231 乳腺癌细胞经胰酶消化后 PBS 清洗 3 次备用。200 μL 30% 三溴乙醇(1 g/mL)经腹腔注射麻醉小鼠,以小鼠脚趾对有齿镊钳夹无反应为麻醉满意指标。酒精消毒后,用 1 mL 胰岛素针将 6×10^3 个/只 GFP⁺/LUC⁺ MDA-MB-231 乳腺癌细胞自 6 周龄雌性裸鼠骨髓腔处注射入右侧胫骨。术后继续饲养,密切观察小鼠的精神状态及身体状况。

1.3.3 左心室注射模型构建 GFP⁺/LUC⁺ MDA-MB-231 乳腺癌细胞经胰酶消化后 PBS 清洗 3 次,用于左心室注射。用 200 μL 30% 三溴乙醇(1 g/mL)经腹腔注射麻醉小鼠,将小鼠仰卧固定于泡沫板上,酒精消毒小鼠前胸壁。用 1 mL 胰岛素针于胸骨左旁第二、三肋骨间的位置进入小鼠左心室,确定位置后回抽,针管内涌进红色血液即表示位置无误。随后慢慢将 1×10^5 个/只 GFP⁺/LUC⁺ MDA-MB-231 乳腺癌细胞往左心室内注射,拔出胰岛素注射器,按压止血。术后继续饲养,密切观察小鼠的精神状态及身体状况。

1.3.4 小鼠活体成像 每只小鼠注射 200 μL Vivo Glo™ Luciferin 底物,异氟烷吸入麻醉小鼠,胫骨注射模型构建 4 h 后,置于 Xenogen IVIS 200 成像系统仪进行活体成像观察,左心室注射模型手术后立即进行活体成像观察,确定建模情况。后续 30 d 进行活体成像观察,以便了解肿瘤分布及其生长状况。

1.3.5 X 线 待小鼠出现行动迟缓、弓背、精神萎靡和消瘦等恶病质状态后,处死并进行解剖。对小鼠上下肢进行 X 线检测,观察骨损伤情况。

1.3.6 组织病理分析 4% 福尔马林溶液固定取材组织后,浸泡于 10% EDTA 脱钙液中处理脱钙,间隔 2 d 换液,待针刺组织无阻力时,脱钙结束。随后进行组织的包埋、切片和 HE 染色(由武汉长衍病理科技有限公司完成)。切片后采用 Pan CK 免疫组化

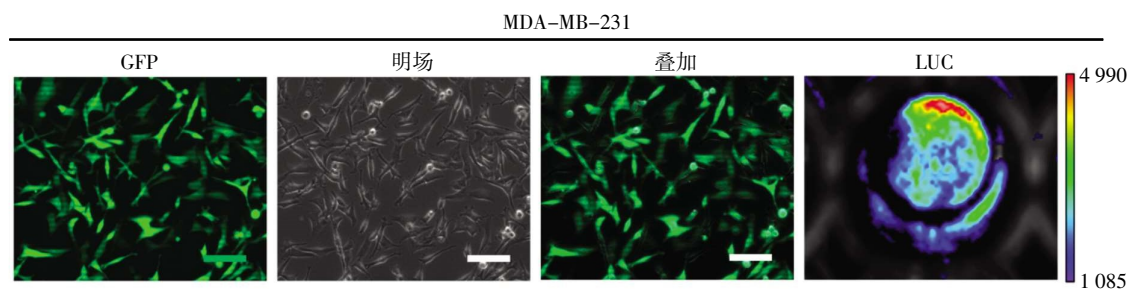
染色法对片子进行脱蜡、高压修复、封闭、一抗、二抗、DAB 显色、复染、脱水以及封片,定位腿部肿瘤细胞,鉴定肿瘤细胞定位。

2 结果

2.1 GFP 和 LUC 标记的肿瘤细胞验证

GFP⁺/LUC⁺标记的人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞为梭形上

皮样细胞,贴壁生长。加入 LUC 底物,活细胞成像检测可见信号较强,效率接近 90%,荧光显微镜下观察可见细胞 GFP 荧光信号较强,感染率为 95%。体外稳定传代后,荧光信号无明显消退(图 1)。这说明 GFP⁺/LUC⁺标记的人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞在体外可稳定表达 GFP 和 LUC,可用于后续实验。



注:GFP、明场和叠加图片于荧光显微镜明暗场拍摄,200 \times ,标尺=100 μ m;LUC 图片于成像系统明暗场拍摄

图 1 体外构建稳定高表达 GFP 和 LUC 的 MDA-MB-231 乳腺癌细胞

Fig.1 Construction of MDA-MB-231 breast cancer cells stably overexpressing GFP and LUC *in vitro*

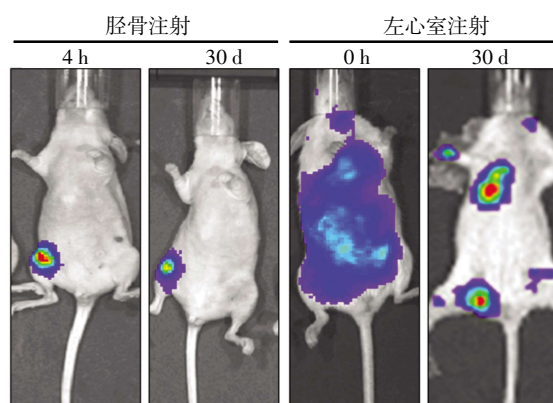
2.2 小动物活体成像观察

BALB/c-nu/nu 小鼠和 NOD/SCID 小鼠分别以胫骨注射和左心室注射两种方法注射 MDA-MB-231 细胞后,动物全部存活。胫骨注射 4 h 后进行活体成像观察,结果显示全部小鼠右腿出现 LUC 信号,左心室注射后,全部小鼠全身出现了 LUC 发光信号(图 2),表明建模成功。30 d 时用小动物活体成像系统再次进行肿瘤检测,目的是观察乳腺癌细胞在动物体内的定植情况(图 2)。结果显示,胫骨注射后全部小鼠右腿出现 LUC 发光信号,左心室注射后,20%的小鼠下肢骨或上肢骨出现 LUC 发光信号,表明胫骨注射骨内定植情况较好,而左心室注射后部分细胞定植于小鼠下肢骨,

出现了骨转移。

2.3 X 线观察

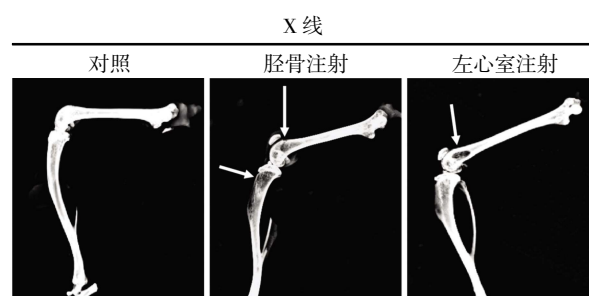
X 线检测发现,两种模型部分小鼠的胫骨和股骨骨髓腔内呈不均匀局灶性骨密度降低。胫骨注射模型小鼠 100%股骨内近端骨质缺失,胫骨骨质缺损明显,骨质破坏极其严重,骨病变明显(图 3)。左心室注射模型 20%股骨骨髓腔内出现椭圆形病变,胫骨近端骨质不均,骨损伤较为严重(图 3)。这与临床上乳腺癌骨转移表现有较好的一致性。



注:胫骨注射人乳腺癌细胞骨定植小鼠模型 4 h 及 30 d 活体成像(左),左心室注射人乳腺癌细胞骨定植小鼠模型 4 h 及 30 d 活体成像(右)

图 2 胫骨注射及左心室注射人乳腺癌细胞骨定植小鼠模型的动物活体成像

Fig.2 *In vivo* imaging of tibia-injected and left ventricle-injected breast cancer cells bone colonization mouse models



注:无骨质破坏对照组(左),胫骨注射人乳腺癌细胞骨定植小鼠模型 X 线(中),左心室注射人乳腺癌细胞骨定植小鼠模型 X 线(右);白色箭头处显示为骨缺损破坏

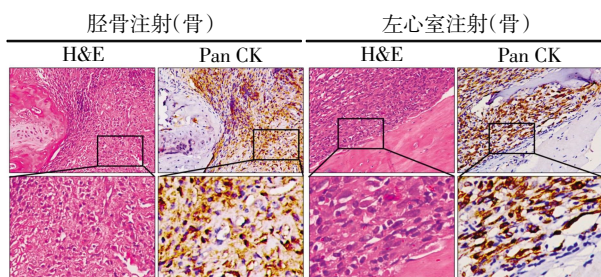
图 3 胫骨注射和左心室注射人乳腺癌细胞小鼠的 X 线观察

Fig.3 X-ray observations of tibial-injected and left ventricular-injected mouse with breast cancer cells

2.4 组织病理分析

HE 结果显示,光学显微镜下可见两种动物模型的骨组织中肿瘤细胞均穿破了骨皮质,侵犯进入软组织,细胞排列杂乱无章,分化能力差,形态不规则,细胞核较大。用 Pan CK 进行免疫组化定位肿瘤细胞,结果与 HE 染色结果一致,胫骨注射模型小鼠 100%出现骨定植灶,左心室注

射模型小鼠 20% 出现骨定植灶(图 4)。此外,也发现 NOD/SCID 小鼠经左心室接种人源性 MDA-MB-231 细胞后,肿瘤细胞在小鼠骨组织中富集,其中有一部分小鼠胫骨内出现骨髓播散肿瘤细胞(DTCs)集落(图 5)。



注:胫骨注射人乳腺癌细胞骨定植小鼠模型 HE 染色及 Pan CK 免疫组化染色结果(左),左心室注射人乳腺癌细胞骨定植小鼠模型 HE 染色及 Pan CK 免疫组化染色结果(右);HE 染色,200 \times ;免疫组化,200 \times

图 4 胫骨注射和左心室注射人乳腺癌细胞小鼠模型的病理学观察
Fig.4 Pathologic observations of tibial-injected and left ventricle-injected breast cancer cells mouse model

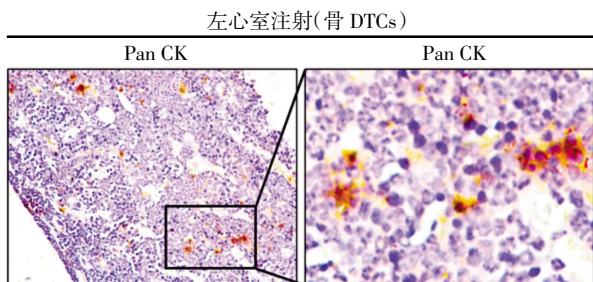


图 5 左心室注射人乳腺癌细胞小鼠骨髓播散肿瘤细胞(Pan CK 免疫组化,200 \times)

Fig.5 Bone marrow disseminated tumor cells from mouse injected with breast cancer cells in the left ventricle(Pan CK immunohistochemistry, 200 \times)

3 讨论

近年来,随着对乳腺癌研究的不断深入,人们对乳腺癌有了更深层次的了解,但远处转移仍然是需要解决的难题。骨骼是乳腺癌细胞转移最常见的部位^[12]。骨微环境是动态的,在正常和病理条件下都经历重塑^[13-14]。这种重塑是否影响肿瘤细胞播散和骨转移尚不清楚^[15]。动物模型是研究肿瘤转移机制、靶向治疗等的工具之一^[16-18]。采用免疫缺陷小鼠将肿瘤细胞移植入体内,是目前最常见建立的骨研究动物模型的方法^[19]。根据不同的肿瘤细胞移植部位可分为原位接种模型、胫骨注射接种模型、左心室注射模型和尾静脉注射模型 4 类。本研究主要采用左心室注射模型和胫骨接种模型进行骨定植研究。胫骨注射主要是将癌细胞注入小鼠胫骨进行实验,胫骨骨髓腔较大,采用细小针头进行实验,操作

过程中产生的创伤相对较小,不会对小鼠的日常活动产生影响,所以此方法最受研究者的青睐^[20-21]。此方法建模成功率高,且定植的部位准确具体,结果明显,动物生存期较长,但不能代表血行转移的发生^[22]。左心室注射则直接将肿瘤细胞移植于小鼠左心室,随着血液循环可到达全身各处,模拟了血行播散过程。这两种方法也存在一定的局限性,由于小鼠体积较小,建模时极易出现肿瘤细胞泄漏,且不易察觉^[23]。本研究基于基本操作步骤,优化实验方法,选用胰岛素针进行操作,避免暴露皮肤,减轻实验动物造模创伤,并结合活体成像进行建模分析,有利于把握进针位置,避免注射盲目性,提高建模成功率。X 线检查系统可以准确判断骨组织中的钙化点病变、组织结构的紊乱以及肿瘤病变等^[24]。笔者利用这一技术,通过观察骨密度,准确直观地观察到两种注射模型均存在骨损伤情况。免疫组化是一种常用于研究生物组织中蛋白质表达情况的方法^[25-26]。其能通过使用特异性抗体来检测蛋白质是否存在于组织样本中,并能确定其在组织中的位置^[27]。角蛋白(CK)是表皮细胞的主要蛋白质成分。因上皮源性肿瘤细胞中普遍表达 CK^[28],所以它可用于骨组织中上皮源性肿瘤细胞的鉴定。本研究利用 Pan CK 抗体进行免疫组化,结果显示骨组织 Pan CK 表达阳性,结合 HE 染色结果说明骨组织中有肿瘤细胞定位,发现胫骨注射的骨定植率为 100%,骨定植率高,左心室注射的骨定植率仅为 20%。本研究优化了胫骨注射及左心室注射研究方法,利用活体成像、X 线这类对于动物实验研究十分有价值的设备共同进行实验,能从功能代谢及其解剖结构等方面帮助研究者进行诊断,增加了实验结果的准确性。

结合本研究,笔者也发现以下几个原因会影响建模:(1)本研究选用 1 mL 胰岛素注射器进行实验,是目前较易获得的针头,小鼠心脏体积小,骨纤细,导致造模难度增加,因此选用较小针头进行实验,能减少实验造成的组织损伤。(2)胫骨注射穿刺成功的标志为针尖扎入后有突破感,阻力减少。因此在实验时,针头应平行于胫骨,动作幅度不宜过大,避免因幅度过大造成穿刺位置错误,细胞泄漏,甚至骨头破裂,造成组织损伤。左心室注射则是再回抽血液,判断穿刺是否成功时,动作放慢,不可过度用力,血液容易凝固,如与肿瘤细胞悬液混合凝固后注入左心室,容易造成栓塞,致小鼠死亡。(3)造模时应把控肿瘤细胞数量,肿瘤细胞过少会使成瘤率大大减少,影响建模的成功率。总之,在建模时,应查阅相关文献,预实验确定建模细胞数量,

避免进针位置偏移或进针太浅,导致肿瘤细胞漏出,应多练习实验技术,通过加强注射方法的练习以增加建模成功率。

研究发现,胫骨注射骨定植率高,对于研究骨转移有重大意义,但不能代表血行转移的发生。心室注射骨定植率为20%,相对胫骨注射较低,但其模拟了血行播散至骨的过程。对于两种方法的应用,研究者可根据实验要求,自行选择动物模型。近年来,随着动物模型的多样化,X线、Micro-CT等的应用越来越广泛。目前因研究者对医学设备及其技术手段了解不充分,较少有人联合多种设备进行实验,所以这些设备及其先进技术在辅助基础研究中有很大的拓展空间。实验过程中可联合多种先进设备和技术手段构建接近人类肿瘤特性的骨肿瘤模型,这是未来研究的重中之重。

参考文献:

- [1] HARBECK N, GNANT M. Breast cancer[J]. *Lancet*, 2017, 389(10074): 1134–1150.
- [2] GUNDEM G, VAN LOO P, KREMEYER B, et al. The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer[J]. *Nature*, 2015, 520(7547): 353–357.
- [3] KIM M Y, OSKARSSON T, ACHARYYA S, et al. Tumor self-seeding by circulating cancer cells[J]. *Cell*, 2009, 139(7): 1315–1326.
- [4] GERSTBERGER S, JIANG Q, GANESH K. Metastasis[J]. *Cell*, 2023, 186(8): 1564–1579.
- [5] LUO X, LI Y, HUA Z, et al. Exosomes-mediated tumor metastasis through reshaping tumor microenvironment and distant niche[J]. *J Control Release*, 2023, 353: 327–336.
- [6] FORNETTI J, WELM A L, STEWART S A. Understanding the bone in cancer metastasis[J]. *J Bone Miner Res*, 2018, 33(12): 2099–2113.
- [7] LIU S J, DANG H X, LIM D A, et al. Long noncoding RNAs in cancer metastasis[J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(7): 446–460.
- [8] HEBERT J D, NEAL J W, WINSLOW M M. Dissecting metastasis using preclinical models and methods[J]. *Nat Rev Cancer*, 2023, 23(6): 391–407.
- [9] KIM M Y. Breast cancer metastasis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2021, 1187: 183–204.
- [10] WANG K, CHEN Q, SHAO Y, et al. Anticancer activities of TCM and their active components against tumor metastasis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133: 111044.
- [11] MEGINO-LUQUE C, BRAVO-CORDERO J J. Metastasis suppressor genes and their role in the tumor microenvironment[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2023, 42(4): 1147–1154.
- [12] HUANG Y, WANG H, YUE X, et al. Bone serves as a transfer station for secondary dissemination of breast cancer[J]. *Bone Res*, 2023, 11(1): 21.
- [13] SADU L, KRISHNAN R H, AKSHAYA R L, et al. Exosomes in bone remodeling and breast cancer bone metastasis[J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2022, 175: 120–130.
- [14] XU Y, ZHANG S, LIAO X, et al. Circular RNA circIKKB promotes breast cancer bone metastasis through sustaining NF- κ B/bone remodeling factors signaling[J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 98.
- [15] ZHANG W, XU Z, HAO X, et al. Bone metastasis initiation is coupled with bone remodeling through osteogenic differentiation of NG2+ cells[J]. *Cancer Discov*, 2023, 13(2): 474–495.
- [16] LI F, LIANG H, YOU H, et al. Targeting HECTD3-IKK α axis inhibits inflammation-related metastasis[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 264.
- [17] TU J, XU H, MA L, et al. Nintedanib enhances the efficacy of PD-L1 blockade by upregulating MHC-I and PD-L1 expression in tumor cells[J]. *Theranostics*, 2022, 12(2): 747–766.
- [18] JIANG T Y, SHI Y Y, CUI X W, et al. PTEN deficiency facilitates exosome secretion and metastasis in cholangiocarcinoma by impairing TFEB-mediated lysosome biogenesis[J]. *Gastroenterology*, 2023, 164(3): 424–438.
- [19] BERISH R B, ALI A N, TELMER P G, et al. Translational models of prostate cancer bone metastasis[J]. *Nat Rev Urol*, 2018, 15(7): 403–421.
- [20] ROBINSON T, ESCARA-WILKE J, DAI J, et al. A CXCR4 inhibitor (balixafortide) enhances docetaxel-mediated antitumor activity in a murine model of prostate cancer bone metastasis[J]. *Prostate*, 2023, 83(13): 1247–1254.
- [21] ZHANG W, BADO I L, HU J, et al. The bone microenvironment invigorates metastatic seeds for further dissemination[J]. *Cell*, 2021, 184(9): 2471–2486.
- [22] SHOJI R, TSUCHIE H, NAGASAWA H, et al. Development of new mouse breast cancer model of local bone metastasis and verification using bisphosphonates[J]. *In Vivo*, 2022, 36(2): 667–671.
- [23] CUI Y Q, GENG Q, YU T, et al. Establishment of a highly metastatic model with a newly isolated lung adenocarcinoma cell line[J]. *Int J Oncol*, 2015, 47(3): 927–940.
- [24] KUMMER B, LÖCK S, GURTNER K, et al. Value of functional in-vivo endpoints in preclinical radiation research[J]. *Radiother Oncol*, 2021, 158: 155–161.
- [25] TAN W C C, NERURKAR S N, CAI H Y, et al. Overview of multiplex immunohistochemistry/immunofluorescence techniques in the era of cancer immunotherapy[J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2020, 40(4): 135–153.
- [26] SUKSWAI N, KHOURY J D. Immunohistochemistry innovations for diagnosis and tissue-based biomarker detection[J]. *Curr Hematol Malig Rep*, 2019, 14(5): 368–375.
- [27] BONACHO T, RODRIGUES F, LIBERAL J. Immunohistochemistry for diagnosis and prognosis of breast cancer: a review[J]. *Biotech Histochem*, 2020, 95(2): 71–91.
- [28] DUAN W R, GARNER D S, WILLIAMS S D, et al. Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts[J]. *J Pathol*, 2003, 199(2): 221–228.

(2023-12-13 收稿)