Primary evaluation in nude mouse model with human breast cancer by thermal texture maps

LI Qi[1], *YUAN Yun-e*[2], *HAN Wei-dong*[1*], *HAO Hao-jie*[1], *WU Zhi-qiang*[1], *ZHAO Ya-li*[1]

(1. *Department of Molecular Biology*, 2. *Department of Infection Management & Disease Control*, *Institute of Basic Medicine*, *Chinese PLA General Hospital*, *Beijing* 100853, *China*)

[**Abstract**] **Objective** To explore the diagnostic feasibility of thermal texture maps (TTM) for breast cancer in sub-clinical stage by using nude mouse model. **Methods** Two MCF-7 human breast cancer cell lines with different LRP16 expression level by retrovirus-mediated siRNA strategy, pL374/MCF-7 (suppressive rate 90%) and pGFPi/MCF-7 (negative control) were used as model cells. Twenty BALB/C female nude mice were divided into two groups randomly. Cells were inoculated subcutaneously into the nude mice. Six weeks later, nude mice were examined by TTM, then were killed and anatomized. Mini-nodule and lung tissue were dissected for HE staining. **Results** The relative heat radiation intensity in 13 mice was higher than others. Whereas, 11 of 13 cases have less than 3 mm mini-nodule. By HE staining, the results show that 11 cases positive in mini-nodule and 4 cases positive in lung tissue. There was high correlation between TTM and HE staining. **Conclusion** Our results indicated that TTM technology might provide powerful screening for breast cancer in early stage, which can only be diagnosed by pathological analysis. In addition, TTM can be a useful tool for tumor-carried mouse research.

[**Key words**] Thermal texture maps; Nude mouse; Breast cancer

热断层成像技术用于乳腺癌裸鼠模型实验初探

李　琦[1]，袁云娥[2]，韩为东[1*]，郝好杰[1]，伍志强[1]，赵亚力[1]

(1. 解放军总医院基础医学研究所分子生物室，2. 感染与疾病控制科，北京　100853)

[**摘　要**] **目的**　探讨热断层成像技术(TTM)应用于乳腺癌裸鼠模型扫描的可行性。**方法**　采用既往实验中用逆转录病毒介导 RNA 干扰的方法，已构建的能不同程度抑制人的乳腺癌细胞 MCF-7 中 LRP16 基因表达的两株细胞 pL374/MCF-7(抑制率 90%)和对照细胞系 pGFPi/MCF-7(阴性)；选取 BALB/c 雌性裸小鼠共 20 只，随机分为两组，10 只/组。分别接种 pL374/MCF-7 及对照细胞系 pLGFPi /MCF-7。接种细胞 6 周后，用 TTM 观察裸鼠成瘤情况。将 20 只裸鼠处死，解剖观察，取形成的小结节和相应的肺组织进行 HE 染色。**结果**　TTM 值异常升高的裸鼠有 13 只。11 只裸鼠有≤3 mm 小结节。HE 结果显示，以上 11 只裸鼠体内形成的小结节为阳性肿瘤组织，4 只肺部组织显示有阳性肿瘤细胞。TTM 值异常升高与 HE 染色阳性高度相关。**结论**　TTM 技术可能在肿瘤的动物模型研究中发挥一定的作用。

[**关键词**] 热断层成像技术；裸鼠；乳腺癌

[**中图分类号**] R737.9；R445.7　[**文献标识码**] A　[**文章编号**] 1003-3289(2006)06-0819-03

热断层成像技术(thermal texture maps，TTM)是近年来迅速发展起来的一门医学影像技术。它的原理是利用红外热扫描器接收人体细胞新陈代谢过程中的红外线辐射信号，并根据正常细胞与非正常细胞代谢的热辐射差，经计算机专用软件分析处理后，在屏幕上以不同的色彩显示出人体组织相对新陈代谢强度的分布情况，通过分析测量人体某一部位温度变化的程度来判断该部位的病变性质。它不仅开辟了以功能为主的全新医学影像技术领域，而且对人体无伤害又无公害，故开始被医学临床应用。

医学研究领域中常应用实验动物建立具有人类疾病模拟表现的疾病动物模型，这是人类认识自身疾病发生、发展规律和研究防治措施的重要途径。裸鼠就是随着近代医学发展，特别是肿瘤学和免疫学研究的需要，在近十几年中发展起来的动物模型。

LRP16 是 1999 年从正常人外周血淋巴细胞中克隆的一个基因[1,2]。已往研究表明，该基因是乳腺癌相关基因，具有雌激素反应性，并发现变构激活的雌激素受体 α(ERα)上调

[**作者简介**] 李琦(1968－)，女，北京人，本科，主管技师。

E-mail：qiqil5760@sina.com

[**通讯作者**] 韩为东，解放军总医院基础医学研究所分子生物室，100853。

[**收稿日期**] 2006-03-09　[**修回日期**] 2006-04-23

LRP16 基因转录增强[3,4]。为进一步探讨抑制 LRP16 基因表达对乳腺癌细胞增殖状况的影响及其分子机制，我们采用小干扰 RNA 技术构建了 LRP16 基因被转录后稳定抑制的两个细胞株：pL374/MCF-7、pL668 /MCF-7，二者抑制率分别为 90%、60%，同时构建对照细胞系 pLGFPi /MCF-7[5]。细胞水平发现有效抑制 LRP16 基因 mRNA 水平将明显限制 MCF-7 瘤细胞的增殖和锚定非依赖性生长活性，但没有消除对雌二醇反应效应，提示该基因在乳腺癌的发生发展进程中可能有重要作用。基于细胞水平的研究基础，我们欲在体外构建 LRP16 基因被稳定抑制的乳腺癌裸鼠体外模型，同时引进 TTM 技术监测裸鼠的体外成瘤情况，从而进行乳腺癌生长增殖的相关机理研究。

1 材料与方法

1.1 实验标本及分组 BALB/c 裸小鼠（T 淋巴细胞功能缺陷），雌性，3～4 周龄，体重 15～17 g，共 20 只，10 只/组。SPF 级饲养，自购买之日起，于新的生长环境中适应 2 天后进行实验。

1.2 实验仪器 TTM 检测使用贝亿集团研制的 TSI-21 型热断层成像系统，扫描时间：每幅≤5 s，测量精度：±0.05℃，扫描距离 1～3 m 处。

1.3 细胞培养 pL374/MCF-7、pLGFPi/MCF-7 细胞于 37℃，5%CO_2 分别培养，DMEM 培养基（含 10%FBS，1 mM 丙酮酸钠，1%胰岛素，1%青-链霉素）。待细胞生长至 80%铺满单层，消化细胞，计数，调整细胞浓度。每只裸鼠分别于乳垫处注射瘤细胞，注射剂量为：0.2 ml/只裸鼠，共 2×10^6/只。

1.4 检测方法

1.4.1 称重 未实验前，称量裸鼠体重，在每只鼠上做记号。接种肿瘤细胞后分别称量每只裸鼠的重量，以后每周称量一次。

1.4.2 观察 注射前后观察裸鼠的生活状态、进食情况，注射细胞后肉眼观察注射部位情况变化，每周称重。

1.4.3 TTM 检测活体裸鼠体外成瘤情况 注射瘤细胞后第 6 周，两组裸鼠体重均明显下降，但仍未触及有效包块，此时，行 TTM 扫描。取两组裸鼠，待其适应检测环境并逐渐安静下来后，将其放入自制的检测装置进行 TTM 扫描。

1.4.4 病理学检测 将已进行 TTM 检测的裸鼠处死，解剖，肉眼观察肿瘤生长情况及转移。然后将解剖到的肉眼可见的小结节及相应的肺组织常规甲醛固定，行 HE 染色。

2 结果

2.1 乳腺癌细胞的接种引起裸鼠体重变化 两组裸鼠未实验前及接种肿瘤细胞后 10 天，处于生活状态好，进食欲望强烈且体重有明显增长。第 4 周末，pLGFPi /MCF-7 组有一只裸鼠开始急剧消瘦，其他受试裸鼠未见异常。两组裸鼠肉眼观察及触摸，并没有明显的包块出现。第 6 周，两组裸鼠体重均明显下降，其中 pLGFPi /MCF-7 组裸鼠体重下降更明显，但仍未触及有效包块（图 1）。

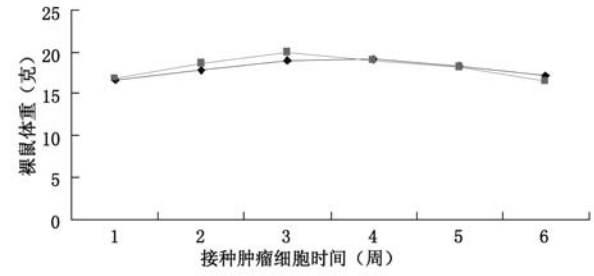

图 1 肿瘤接种时间与裸鼠体重变化关系

2.2 TTM 扫描检测裸鼠与临床病理相关性 TTM 扫描 20 只裸鼠，其中 TTM 值异常升高的有 13 例（13/20，65%）。发现有一类圆形异常热区（图 2）与周边温差 1.6～1.9℃。全部裸鼠经处死后，解剖观察，有 11 只裸鼠有≤3 mm 小结节组织，其中 pLGFPi/MCF-7 组 7 例，pL374/MCF-7 组 3 例（表 1）；pLGFPi /MCF-7 组有 4 例肺部组织状态有明显改变。HE 染色结果显示，以上 10 只裸鼠体内形成的小结节为恶性肿瘤组织（图 3A），而 4 例肺部组织明显改变的 HE 染色结果显示为恶性肿瘤肺转移（图 3B）。TTM 与 HE 染色两种方法相关性达 84.61%。

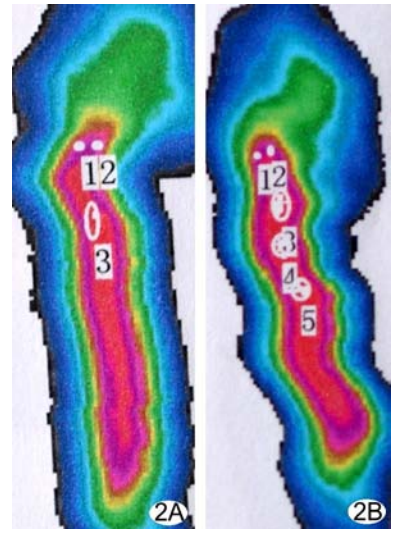

图 2 TTM 扫描结果显示热区

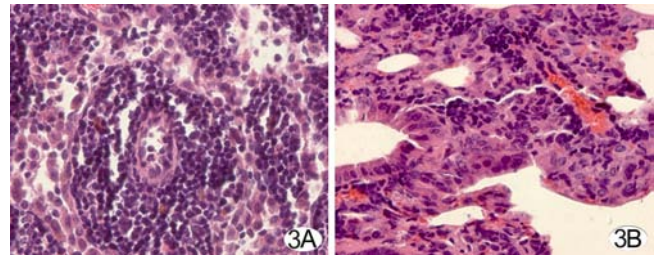

图 3 HE 染色结果（×200） A. 裸鼠接种乳腺癌细胞后 6 周解剖，观察有结节形成，HE 染色为肿瘤组织；B. 裸鼠接种乳腺癌细胞后 6 周解剖，经 HE 染色形成肺转移

表 1　TTM 扫描与 HE 染色阳性相关性

	总例数	TTM 阳性	HE 阳性
pLGFPi /MCF-7 组	10	8	7
pL374/MCF-7 组	10	5	3
阳性例数		13	10

2.3　抑制 LRP16 基因的表达减弱了 MCF-7 细胞在裸鼠体内成瘤　既往实验证明，LRP16 基因是乳腺癌相关基因，本实验两组裸鼠分别接种 pL374/MCF-7、pLGFPi /MCF-7 细胞，pL374/MCF-7 细胞系采用小干扰 RNA 技术稳定抑制 LRP16 的表达，pLGFPi /MCF-7 为对照组细胞。实验结果初步观察到，两组均有体外成瘤，但 pL374/MCF-7 组细胞体外成瘤率低，且在相同的饲养时间内，没有形成肺转移。

3　讨论

3.1　构建 LRP16 基因被转录后稳定抑制乳腺癌模型方法及意义　本研究中通过体外接种乳腺癌相关 LRP16 基因表达抑制的 MCF-7 细胞，观察抑制效率不同的 MCF-7 细胞体外成瘤，获得了与既往细胞水平研究一致的结论[5]，表明 LRP16 基因与乳腺癌增殖密切相关，提示该基因通过影响乳腺癌的增殖状况参与肿瘤的发生与进展。

乳腺癌是女性常见的肿瘤性疾病，严重威胁着女性的健康。目前关于乳腺癌细胞生长增殖的分子机制尚不完全清楚，因此，建立乳腺癌体外动物模型，进行乳腺癌相关机理的研究，解决诊断、治疗、及时评价治疗效果，对提高患者生存率，改善预后具有重要意义。

3.2　TTM 技术应用于实验动物模型的可行性　TTM 技术是一门崭新且具有临床应用前景的影像诊断技术。它一改传统影像学基于解剖结构改变诊断疾病的模式，而是依据正常组织与异常组织的热辐射差值来诊断，为生物体定性诊断提供依据。当生物体内器官发生恶性病变时，由于癌细胞代谢异常活跃，血液循环丰富，癌组织可释放出多种血管活性物质，通过组织进行热传导，并传导到皮肤表面，形成高温热区[6]。TTM 对人体早期组织细胞的微小病理变化诊断率高达 80%，反映出组织代谢的变化先于肿块的形成和血管的变化。

本研究内容首次采用 TTM 技术，使其参与肿瘤生物学的基础医学研究中。考虑裸鼠个体较小，之前也未曾有标准进行参照，TTM 值异常升高的标本我们进行常规病理诊断来鉴定，以临床病理 HE 染色实验对照，两者吻合率达 84.61%。

据统计，医学生物学的科研课题有 60%以上需要用到实验动物。无胸腺小鼠的培育为人类恶性肿瘤的体外研究带来了生机。但裸鼠个体较小，相对于已初步建立人类 TTM 扫描标准来说，难以分辨热值产生的具体组织，因此，选用病理学诊断技术与其对应检测，初期可以不断完善 TTM 技术应用于实验动物研究的经验。利用 TTM 技术用于医学实验动物研究时，有以下几点体会：首先要使实验动物熟悉检测环境，并安静下来，这需要技术操作人员的耐心；其次，针对不同的实验动物制作合适的检测设备，使获得的图像清晰、数据尽可能准确；再次，如用于大型医学实验动物，可以明确热值在各组织器官的分布；第四，建立 TTM 对应于常用实验动物检查部位的细胞新陈代谢强度分布图，依据正常组织与异常组织的热辐射差值标准范围，为进一步用于实验动物定性诊断提供科学依据。

[参考文献]

[1]　Yu L, Han WD, Luo FD, et al. Cloning of leukemia associated gene LRP16 in acute myeloid leukemia[J]. Acad J PLA Postgrad Med Sch, 2000, 21(2): 81-84.
于力，韩为东，楼方定，等. 新的白血病基因 LRP16 的克隆[J]. 军医进修学院学报，2000，21(2)：81-84.

[2]　Han WD, Yu L, Lou FD, et al. Cloning and expression characterization of the full length cDNA for a novel leukemia2 associated gene LRP16[J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2001, 17(2): 209-214.
韩为东，于力，楼方定，等. 一个新的白血病相关基因 LRP16 全长 cDNA 的克隆、序列分析及表达特征[J]. 中国生物化学与分子生物学报，2001，17(2)：209-214.

[3]　Han WD, Li XL, Lu XC, et al. Effect of LRP16 on breast cancer MCF-7 cell proliferation[J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2003, 19(5): 672-676.
韩为东，李雪岭，卢学春，等. LRP16 对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响[J]. 中国生物化学与分子生物学报，2003，19(5)：672-676.

[4]　Han WD, Mu YM, Lu XC, et al. Up regulation of LRP16 mRNA by 17βestradiol through activation of estrogen receptorα(ERα), but not estrogen receptor β(ERβ), and promotion of human breast cancer MCF-7 cell proliferation: A preliminary report[J]. Endoc-Relat Cancer, 2003, 10(2): 217-224.

[5]　Han WD, Li Q, ZHao YL, et al. Inhibition of cell proliferation by small interference RNA against LRP16 gene in human breast cancer MCF-7 cells[J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2005, 21(1): 113-119.
韩为东，李琦，赵亚力，等. 小干扰 RNA 抑制 LRP16 基因表达限制了 MCF-7 乳腺癌细胞增殖[J]. 中国生物化学与分子生物学报，2005，21(1)：113-119.

[6]　Yuan YE, Wang Q, Li R, et al. Thermal texture maps in differential diagnosis of breast tumors[J]. Chin J Med Imaging Technol, 2004, 20(12): 1803-1805.
袁云娥，王清，李容，等. 热断层成像系统鉴别诊断乳腺块[J]. 中国医学影像技术，2004，20(12)：1803-1805.