

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.02.007

DMBA 诱导树鼩乳腺肿瘤(中缅树鼩)*

徐小珊^{1,3} 侯小明² 王伟¹ 郝佩琪¹ 朱克伦¹ 荆海阔³ 黄群山³ 杨世华^{1,3Δ}

(1 昆明理工大学生命科学与技术学院 云南 昆明 650500;

2 兰州大学第一附属医院肿瘤内科 甘肃 兰州 730000;3 华南农业大学兽医学院 广东 广州 510642)

摘要 目的:建立一个合适的乳腺癌动物模型将在研究人类乳腺癌的发生、发展、转移等方面中发挥着越来越重要的作用。7,12-二甲基苯并蒽(7, 12-dimethylbenz anthracene, DMBA)在实验中能诱导大鼠产生乳腺肿瘤。树鼩的基因的结构与人类的相似程度比啮齿类动物要高,而且树鼩的自发性乳腺癌已经有被报道,因而树鼩很有可能是研究乳腺肿瘤更合适的动物模型。因此我们想用致癌剂 DMBA 诱导树鼩产生乳腺肿瘤而建立树鼩的乳腺肿瘤模型。**方法:**在这个研究中,我们采用了十只在分娩之后失去幼崽的雌树鼩,其中一半的树鼩在腰部双侧乳房的脂肪垫注射 100 mg/kg 的 DMBA,其余的树鼩作为对照组没有作 DMBA 处理。对生成的肿瘤组织进行病理切片 HE 染色的形态特点分析以及免疫组化化学法测定 Ki-67、雌激素受体、孕酮受体、人表皮生长因子受体-2、E-钙粘蛋白、P120 连环蛋白的表达。**结果:**通过诊断在 DMBA 处理的树鼩中,5 分之 1 发展浸润性导管癌,其余发展成原位导管癌。结果还证明了诱导出来的乳腺肿瘤的形态学和病理学特征与人类的浸润性导管癌相似。**结论:**结果显示我们采用 DMBA 注射失去幼崽的雌树鼩的乳腺来诱导乳腺肿瘤是有效的,诱导出来的肿瘤组织学特征与人的乳腺癌相似,诱导的肿瘤组织表达目前人常用的乳腺癌相关分子生物学标记,并且表达情况与人的乳腺癌相似。这表明了 DMBA 诱导树鼩乳腺癌可以提供 一个适合于研究人类乳腺癌发生、发展、转移和治疗的动物模型。

关键词:树鼩; DMBA; 诱导乳腺癌

中图分类号:Q95-3;R737.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)02-228-05

DMBA Induced Breast Tumors in Tree Shrews (Tupaia Belangeri Chinese) *

XU Xiao-shan^{1,3}, HOU Xiao-ming², WANG Wei¹, HAO Pei-qi¹, ZHU Ke-lun¹, YAN Hai-kuo³, HUANG Qun-shan³, YANG Shi-hua^{1,3Δ}

(1 Lab of Regenerative Biology, Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan, 650500, China; 2 Department of Medical Oncology, First Affiliated Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu, 730000, China; 3 Collage of Veterinary Medicine, South China of Agriculture University, Guangzhou, Guangdong, 510642, China)

ABSTRACT Objective: The establishment of a suitable animal model for study of human breast cancer development, metastasis and other aspects is more crucial. 7, 12-dimethylbenz anthracene (DMBA) has potential to induce experimental breast tumors in rat. Tree shrew is a more appropriate animal for disease models due to its genetic makeup similarities with human as compared with rodent and spontaneous breast cancers in tree shrews were already reported. Therefore, we attempt to induce breast tumor in tree shrews by DMBA treatment. **Methods:** In the present study, ten female tree shrews lost their babies after delivery were employed and half of them received a single dose of 100 mg/kg DMBA by the lumbar bilateral mammary fatty pad injection, while the others were treated without DMBA as control. As a result of DMBA administration, one of five candidates had developed infiltrative ductal carcinoma (IDC), while others had developed into ductal carcinoma in situ, diagnosed with morphological features of pathological sections stained by H&E and immunohistochemistry to detect the expression of ki-67, estrogen receptor, progesterone receptor, human epidermal growth factor receptor-2, E-cadherin, and p120-catenin. **Results:** The results demonstrated that induced breast tumors in tree shrews have shown similar morphological and pathological characteristics with humans IDC. **Conclusion:** From the results of experiment, the approach we take mammary gland injection DMBA in female tree shrew who had lost their babies after delivery is feasible. Histological features of induced tumor are similar to human mammary tumor, the induced tumor expressed molecular biology markers of human breast cancer, and the expression is similar to human mammary tumor. It is suggested that DMBA-induced mammary tumor model in tree shrews may provide a proper animal model in research of its occurrence, progression, metastasis, recurrence and treatment.

Key words: Tree shrew; DMBA; Induced breast cancer

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R737.9 **Document Code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)02-228-05

* 基金项目:科技部重大科学研究计划重大科学问题导向项目(2012CBA01300);教育部"新世纪国家优秀人才"支持计划(NCET-12-1078);国家自然科学基金项目(31071279, 30871232);云南省科技创新人才计划项目(2011CI009)

作者简介:徐小珊(1987-),女,硕士研究生,研究方向:动物疾病模型的建立, E-mail:xuxiaoshangz@163.com

Δ通讯作者:杨世华(1963-),男,硕士生导师,教授,主要研究方向:非人灵长类动物疾病模型, E-mail:yshhm@163.com

(收稿日期:2014-06-26 接受日期:2014-07-22)

前言

乳腺癌是在全球范围内女性最常见的恶性肿瘤之一。与乳腺癌相关的最重要因素包括性别和年龄,遗传因素(例如 BRCA1/2 的突变)^[1],是否有生过小孩或喂过母乳^[2],性激素水平(例如雌激素)等。临床试验数据已经证明乳腺上皮中容易受到雌激素的直接作用来刺激细胞复制和让细胞离开细胞周期而趋向于突变^[3]。一个长期的研究表明在有乳腺癌家族史的女性中,曾经有过母乳喂养的女性具有比较低的乳腺癌的发生率^[4]。虽然关于哺乳对乳腺癌的保护作用被研究者的讨论已经有 20 多年的历史了,但是没有研究曾经说明哺乳是如何降低乳腺癌风险的动力机制。

建立灵长类动物模型是研究乳腺癌的关键。科学家们长期依赖啮齿类动物去研究诱导肿瘤。但是在某种程度上啮齿类动物不能精确的体现在人在急性炎症压力中基因和蛋白质组学反应。来自这个研究的发现不仅仅解释了炎症药物在鼠模型中高失效率的原因,而且对用鼠模型去研究一些免疫系统起主要作用的疾病提出质疑,譬如癌症和心脏病^[5]。树鼯有很多有价值的特征说明它有潜在在医学科学研究中作为一种理想的实验动物^[6],譬如它具有与人的亲缘关系比啮齿类要近,体型小,大脑占体重的比例高,繁殖周期和寿命短,在相当的繁殖率下比非人灵长类动物的生产成本要低得多。科学家成功的译解了中国树鼯的基因组,提高了遗传信息在树鼯作为生物医学研究的动物模型中的应用潜能^[7]。研究树鼯与免疫反应相关的基因的工作提出由于树鼯具有与人和其他灵长类更近的亲缘关系,树鼯是研究癌症的很有潜力的选择。

7,12-二甲基-1,2-苯并蒽(DMBA)是一个在很大程度上依赖激素的并且常用于诱导乳腺癌的致癌剂。当这种致癌剂被注入 8 只猕猴属的红面短尾猴时,在四年的观察期中,没有产生可察觉的乳腺癌^[9]。虽然不知道这个实验失败的原因还没弄清楚。但是有证据表明肿瘤生长的微环境影响它的血管生成、生长、侵袭和转移^[10]。而且通过激素受体状态来划分的不同的激素环境在乳腺癌病因学中发挥着主要作用^[11]。对关于雌激素受体(Estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)和人类表皮生长因子受体(human epidermal receptor 2, HER2)作为治疗和预后的生物标志的探讨在十年前就存在。雌激素被假定通过促进细胞的复制,减少细胞凋亡来增加随机基因错误积累的机会^[12]。复制标记 Ki-67 的免疫阳性细胞的比率提供了一个精确的衡量手段去评估乳腺癌的增殖。P120-连环蛋白(P120-catenin)和 E-钙粘蛋白(E-cadherin)常被用来区分浸润性导管癌和浸润性小叶癌^[13,14]。研究树鼯乳腺癌的这些相关蛋白的表达有助于评价树鼯是否能作为一个很好的乳腺癌动物模型。本实验采用 DMBA 注射失子雌树鼯的乳腺的方法来诱导乳腺肿瘤,并对诱导出来的肿瘤进行组织学和免疫组化分析,分析诱导出来的乳腺肿瘤的这些特征是否与人乳腺癌有相似性。根据实验结果来评价树鼯是否能作为一种研究乳腺癌的有潜力的动物模型。

1 材料和方法

1.1 动物及处理

雌树鼯(中缅树鼯,体重 130-150 g,通过牙齿状态估计 1-2 岁),在繁殖季节(3-6 月)从中国昆明的一个农村地区捕获。通过超声波检查法诊断为怀孕的树鼯被单笼单只的饲养在长 400 mm,宽 200 mm,高 300 mm 的笼子里,环境严格控制在温度为 20-25 ℃,湿度为 40-60%,8:00-20:00 为高日照。所有的动物饲喂特殊的软化饲料、鸡蛋、牛奶和新鲜水果。根据昆明理工大学实验动物中心标准操作规程及管理制度进行动物的饲养和繁殖。

产子一周就已经失去自己的幼崽的雌树鼯,在产子后一周被用于这个实验当中。它们被随机分为两个实验组。5 只一组,其中一组在腰部双侧乳房的脂肪垫里注射单剂量的以橄榄油作为媒介物的 100 mg/kg DMBA(7,12-dimethyl-1,2-benz[a]anthracene; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)。另外一组(n=5)另外一组则接受等总量但没有 DMBA 的橄榄油处理作为对照。动物每周被触摸检测是否有乳腺肿瘤。首次产生肿瘤的时间会被记录。实验的最后肿瘤会被分离,可见肿瘤的水平直径和垂直直径会被分别测量。根据公式: $V = (D \times d^2 \times \pi) / 6$ ^[15]来计算肿瘤的体积。D 代表较长的直径,d 代表较短的直径。然后进行组织病理学分类。

1.2 H&E 染色

根据已确立的程序,把乳腺组织和乳腺肿瘤被浸泡到含 10%福尔马林的 PBS 中。在酒精中脱水,在二甲苯中透明,然后包埋到石蜡中。每块乳腺组织连续切 3 片 5 μm 厚的薄片,用苏木精和伊红进行染色。然后用光学显微镜进行组织学评价。

1.3 免疫组化染色

免疫组织化学染色是依照即时快速免疫组织化学 MaxVisionTM(MAIXIN 集团,福州,中国)试剂盒方法进行的。简要地说,取乳腺肿瘤细胞组织和正常的乳腺组织进行福尔马林固定,石蜡包埋,5 μm 切片。兔源一抗和鼠源一抗购自 MAIXIN(福州,中国)可以直接使用,无需稀释。针对 anti-ER,anti-Ki67 和 anti-PR 使用兔抗单克隆抗体,而 anti-HER2, E-cadherin 和 P120-catenin 则使用鼠抗单克隆抗体。首先组织切片使用梯度酒精进行脱蜡和再水化,之后每张切片用 PBS 冲洗 3 次,每次 3 分钟。根据对应所需的一抗要求,切片在 EDTA (pH 9.0,1:50)沸水浴中抗原修复 20 分钟。滴加 50 μL 3%过氧化氢以阻断内源性过氧化物酶,室温下蕴育 10 分钟。滴加一滴对应的兔抗或鼠抗,室温(18-30 ℃)下孵育 60 分钟。随后滴加相应的二抗,羊抗兔或者羊抗鼠,室温下蕴育 10 分钟。滴加 DAB 工作液进行显色,显微镜下观察 3-5 分钟。苏木精复染,自来水冲洗返蓝。最后,切片梯度酒精脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封片。

2 结果

2.1 DMBA 乳腺致癌作用的效率

所有注射过 DMBA 的动物都渐渐的生成肿瘤。肿瘤的大小和树鼯在 DMBA 处理后存活的时间如表格 1 所示。所有的肿瘤在大约 8 周之后变得可察觉并且体积达到了 100-150 mm³。其中存活了 300 天的树鼯的肿瘤体积达到了 4250 mm³(图 1)。对照组直到在第 300 天处死都没有长出肿瘤。DMBA 处理的组有可能比对照组有着更短的寿命和更高的患乳腺癌风险。

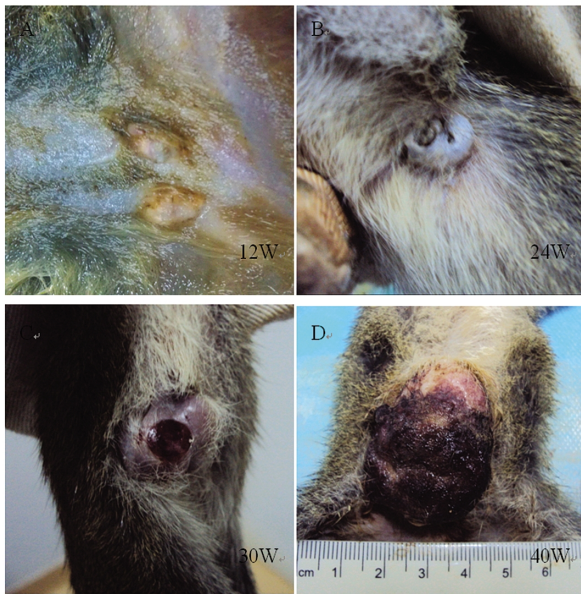


图 1 在树鼩(RZ004)中诱导产生渐进生长的肿瘤的外观

- A) 在 DMBA 处理之后的第 12 周,双侧乳腺出现可以被触摸到的结节;
- B) 在第 24 周,肿瘤长得比 12 周的时候大,两个赘生物接触生长并吻合到一起;
- C) 肿瘤在被诱导的第 30 周呈现急速生长的趋势,并出现伤口的破损感染;
- D) 扩大的肿瘤出现坏死,当肿瘤在第 40 周体积达到了 4.25 cm³ 时被分离用于之后的组织学分析

Fig.1 Gross appearances of a progressively growing tumor induced in a tree shrew (RZ004) were shown

- A) Bilateral mammary was palpated for nodules at 12 weeks after DMBA treatment;
- B) In 24 weeks, the growth of the tumor looked a little bit big than that in 12 weeks, and two neoplasms contacted and anastomosed together;
- C) The tumor was showed the trend of rapid growth and development with infected wound at 30 weeks after induction;
- D) The enlarged tumor caused necrosis and be terminated the development for analysis of histology, which volume reached 4.25 cm³ in 40 weeks

2.2 乳腺肿瘤的组织病理学分析

通过组织病理学检查,所有生成的肿瘤组织中含有乳腺特

有的乳腺终末导管结构和少量乳腺小叶结构,与非泌乳期的乳腺组织结构相似。每个肿瘤组织都含有乳腺导管上皮细胞出现恶性增殖的特征,由此诊断所有注射过 DMBA 的树鼩都生成了乳腺原位导管癌。然而来自 RZ004 的肿瘤除了具有乳腺导管上皮细胞恶性增殖的特征,恶性增殖细胞并没有局限在导管内而是大量的存在于导管外组织,在正常组织中存在的结缔组织由于大量恶性增殖细胞侵入破坏而减少到几乎不被察觉,由此诊断 RZ004 为浸润性导管癌(IDC)。如图 2 所示。

2.3 肿瘤的免疫组化分析

我们对取自 RZ002 和 RZ004 的乳腺肿瘤进行免疫组化检测,如图 3 所示。RZ002 的肿瘤中 Ki-67 阳性率为 20-25%,而且这些阳性细胞几乎都是分布在乳腺导管内的腔细胞。在 RZ004 的肿瘤中 Ki-67 阳性细胞的比率为 65-75%,而且这些 Ki-67 阳性细胞的密度在导管中要比在导管外高。实验中 ER 抗体对肿瘤组织不起作用。取自 RZ002 的乳腺肿瘤呈 PR, HER2 阴性。而取自 RZ004 的乳腺肿瘤呈 PR 和 HER2 阳性。更有趣的是这些阳性细胞也同样位于增生的乳腺导管中。间接证明了不同恶化程度的肿瘤有不同的预后结果。为了比较乳腺肿瘤和正常乳腺的区别,并且确认在树鼩中的浸润性乳腺导管癌,我们对它们的乳腺肿瘤进行了 P120-catenin 和 E-cadherin 的免疫组化染色。如图 3 所示。RZ002 的 P120-catenin 的阳性率约为 10%,为腔细胞的膜表达。但是 RZ002 呈 E-cadherin 阴性。而 RZ004 呈现 p120-catenin 和 E-cadherin 膜的高表达。p120-catenin 阳性表达细胞不仅仅位于增生导管内,也出现在导管外。而 E-cadherin 阳性细胞就只限制于增生导管内。

3 讨论

虽然自发的树鼩乳腺癌已经在 1966 年^[16]和 2012 年^[17]被报道,但是诱导的树鼩乳腺癌从来没被描述过。由于树鼩自发乳腺癌的几率很低而限制了树鼩自发乳腺癌模型的应用。而诱导肿瘤有着更高的发生率和易于控制和观察。我们的研究成功的用 DMBA 诱导的方法在树鼩上建立了乳腺癌的诱导模型。最近的报道证明我们的方法是可行的^[10,18]。这个方法是我们在长期的实验过程中演化出来的。我们曾经尝试采用随机挑选的树鼩去诱导肿瘤和尝试用腹腔注射、肌肉注射和灌胃的给药方法注射 DMBA。很不幸的是我们均未获得任何乳腺肿瘤(数据没有被显示)。因此用在腰部双侧乳房的脂肪垫注射 DMBA 的方

表 1 DMBA 诱导的树鼩乳腺肿瘤

Table 1 Mammary tumors in DMBA-treated tree shrews

Animal number	Treatment (Bilateral mammary fatty pad injection)	The time of appearance of the first tumor (day)	Survival time (day)	Tumor size*(mm ³)
RZ001	100 mg/kg DMBA	52	58	105
RZ002	100 mg/kg DMBA	50	115	226
RZ003	100 mg/kg DMBA	55	70	131
RZ004	100 mg/kg DMBA	58	300	4250
RZ005	100 mg/kg DMBA	60	190	384
Control (n=5)	4 ml/kg olive	—	Until 300	No tumor detected

注:* 肿瘤体积的计算是根据公式: $V=(D \times d^2 \times \pi)/6^{[15]}$, D 代表较长的直径, d 代表较短的直径。

Note:*Tumor size was calculated by the formula: $V=(D \times d^2 \times \pi)/6^{[15]}$, where D is the larger tumor diameter and d is the smaller diameter.

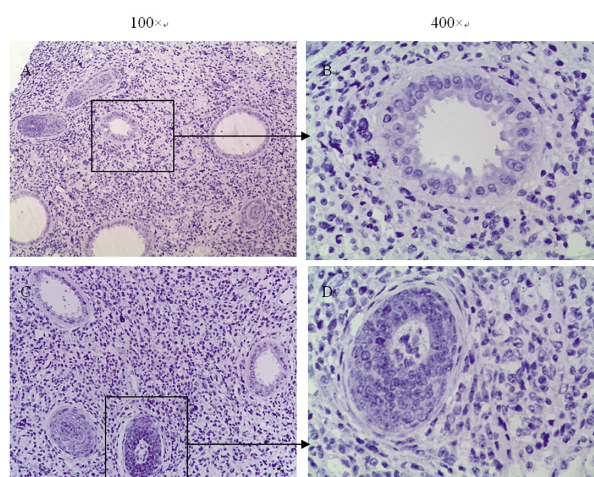


图 2 DMBA 处理诱导树鼩 RZ004 长成的浸润性导管癌的组织病理学图片

A) 和 B) 是浸润性导管癌组织切片的 H&E 图, 原始放大倍数为 100× ;
C) 在肿瘤中的一个正常的乳腺导管。

D) 图中的这个导管中的癌细胞不仅仅局限在导管内, 而且浸润到了周围的基质, 形成浸润性导管癌。原始放大倍数为 400×

Fig.2 Histopathological photographs of primary breast infiltrative ductal carcinoma in RZ004 tree shrew induced by DMBA treatment

A) and B) an infiltrating ductal carcinoma, hematoxylin and eosin histology, original magnifications 100× ;

C) a normal duct in the tumor;

D) This ductal carcinoma is not confined to just the duct, but infiltrates outward into the surrounding stroma as an infiltrating ductal carcinoma, original magnifications 400× .

法去诱导乳腺癌应该是有效的。

浸润性导管癌是最常见的乳腺癌类型, 约占乳腺癌 70% 左右^[19]。HE 染色显示出我们诱导的树鼩乳腺肿瘤的病理学结构与人类的浸润性乳腺导管癌非常相似。浸润性乳腺导管癌是有原位导管内癌发展过来的, 它们以癌细胞突破导管的基底膜而浸润到基质中为特征^[20]。而我们的实验呈现了这个疾病的整个过程。

我们用免疫组化技术来检测 ki-67, ER, PR, HER2, E-catenin, P120-catenin 在诱导的肿瘤中的表达, 来证明目前的实验可以提供有一个有用的方法去建立人类 IDC 的动物模型。复制标记 Ki-67 是在对乳腺癌病人进行治疗时一个重要的评价参数。恶化程度高的肿瘤比恶化程度低的肿瘤具有更高的 Ki-67 阳性率。而且这暗示着在肿瘤生长的过程中 ki-67 的表达是逐渐增加的^[21]。RZ002 的肿瘤的 ki-67 的阳性率大约是 20% -25%, 这与之前研究报道的泌乳期树鼩的乳腺约 5% 的阳性率要高得多^[17]。而且这些 Ki-67 阳性细胞的密度在导管中要比在导管外高。这结果暗示乳腺癌很有可能最初产生于乳腺导管。本实验中 ER 抗体对树鼩的癌组织不起作用, 与之前的报道的自发树鼩乳腺肿瘤一致^[17], 证明了人的 ER 抗体并不适用于树鼩。大家都知道 HER2 能有效介导正常细胞生长和发育^[22]。而孕激素最近被指出在生殖周期中激活成人乳腺干细胞包括乳腺干细胞的小生境, 在这个小生境中乳腺干细胞是细胞转化活动的公认目标从而导致乳腺癌发生^[23]。由于 PR 和 HER2 的阳性细胞都处于增生的导管中, 所以肿瘤起源的位置很可能在乳

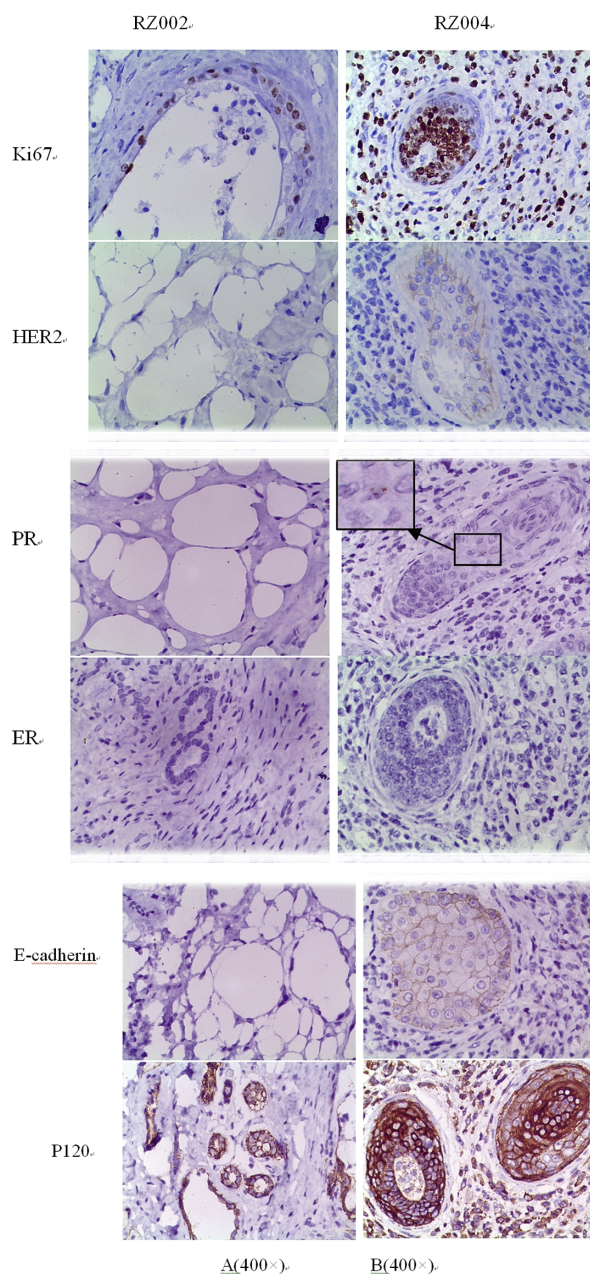


图 3 诱导的树鼩肿瘤的免疫组化染色

A) 树鼩 RZ002 乳腺肿瘤的免疫组化染色, 原始放大倍数(400×)

B) 树鼩 RZ004 乳腺肿瘤的免疫组化染色, 原始放大倍数(400×)

Fig.3 Immunostaining of induced mammary tumors in tree shrews

A) Immunohistochemistry staining of the tree shrew RZ002 mammary tumor. Original magnifications (400×)

B) Immunohistochemistry staining of the tree shrew RZ004 mammary tumor. Original magnifications (400×)

注: HER-2: 人表皮生长因子受体 2; ER: 雌激素受体; PR: 孕酮受体。
Note: HER2: Human epidermal growth factor Receptor 2; ER: Estrogen receptor; PR: Progesterone receptor.

腺导管中。这可能为肿瘤的靶向治疗提供基础。根据之前的研究提议 p120-catenin 和 E-cadherin 都在细胞膜上有阳性表达更常见于 IDC^[24], 所以我们认为 RZ004 是 IDC 而 RZ002 不是, 这与 H&E 染色的推论是一致的。

简而言之, 我们成功的建立了一个乳腺癌树鼩的诱导模型。并且通过 H&E 染色和免疫组化染色描述了诱导的乳腺导

管癌的特征。表明了诱导的树鼩乳腺肿瘤的组织学特征与啮齿类比起来与人更为相似。除了 ER, 目前常用于诊断乳腺癌的分子生物学标记抗体都能直接与诱导的乳腺肿瘤组织起作用, 并且表达状况也十分相似。这进一步说明了由于树鼩与人类更近的亲缘关系, 其乳腺癌的病理特征与人也更相似。成功的建立树鼩乳腺癌诱导模型即弥补了啮齿类乳腺癌模型与人相似度不高的缺点也可以减少使用灵长类动物做大规模实验周期长, 费用高造成的资源浪费。对乳腺癌相关的分子标志物的研究是近些年的热点, 在乳腺癌的发生发展过程中有多种分子标记物与其相关。但是目前许多针对乳腺癌相关分子标记的靶向治疗的研究由于缺乏合适的动物疾病模型而停滞不前。由于树鼩乳腺癌模型的建立方法简单易行以及病理学特征与人相似, 其可成为作为研究乳腺癌的靶向治疗有潜力的手段。

参考文献(References)

- [1] Diamond JR, Borges VF, Eckhardt SG, et al. BRCA in breast cancer: from risk assessment to therapeutic prediction [J]. *Drug News Perspect*, 2009, 22(10): 603-608
- [2] Jordan I, Hebestreit A, Swai B, et al. Breast cancer risk among women with long-standing lactation and reproductive parameters at low risk level: a case-control study in Northern Tanzania [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2013, 142(1): 133-141
- [3] Moi LL, Flageng MH, Gjerde J, et al. Steroid receptor coactivators, HER-2 and HER-3 expression is stimulated by tamoxifen treatment in DMBA-induced breast cancer[J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 247
- [4] Newcomb PA, Storer BE, Longnecker MP, et al. Lactation and a reduced risk of premenopausal breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 1994, 330(2): 81-87
- [5] Seok J, Warren HS, Cuenca AG, et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(9): 3507-3512
- [6] Ping S, Yue F, Wang C, et al. Effects of dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, propylene glycol, and glycerol on cryopreservation of wild tree shrew (*Tupaia belangeri* Chinese) cauda epididymal sperm [J]. *Zoological Research*, 2012, 11(19): 3568-3574
- [7] Fan Y, Huang ZY, Cao CC, et al. Genome of the Chinese tree shrew [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 1426
- [8] Inada K, Yamashita J, Matsuo S, et al. Hormone control of total plasminogen activator activity is specific to malignant DMBA-induced rat mammary tumours[J]. *Br J Cancer*, 1992, 65(4): 578-582
- [9] Lillie MA, Ambrus CM, Pickren JW, et al. Breast cancer in intraductal carcinogen-treated non-human primates[J]. *J Med*, 2004, 35(1-6):271-275
- [10] Jain RK, Munn LL, Fukumura D. Mammary fat pad tumor preparation in mice[J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2012, 2012(10):1115-1116
- [11] Hankinson SE. Endogenous hormones and risk of breast cancer in postmenopausal women[J]. *Breast Dis*, 2005, 24: 3-15
- [12] Foster JS, Henley DC, Ahamed S, et al. Estrogens and cell-cycle regulation in breast cancer[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2001, 12(7): 320-327
- [13] Tsang JY, Mendoza P, Putti TC, et al. E-cadherin expression in the epithelial components of mammary phyllodes tumors [J]. *Hum Pathol*, 2012, 43(12): 2117-2123
- [14] Schackmann RC, Klarenbeek S, Vlug EJ, et al. Loss of p120-catenin induces metastatic progression of breast cancer by inducing anoikis resistance and augmenting growth factor receptor signaling [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(15): 4937-4949
- [15] Raa A, Stansberg C, Steen VM, et al. Hyperoxia retards growth and induces apoptosis and loss of glands and blood vessels in DMBA-induced rat mammary tumors[J]. *BMC Cancer*, 2007, 7: 23
- [16] Elliot OS, Elliot MW, Lisco H. Breast cancer in a tree shrew (*Tupaia glis*)[J]. *Nature*, 1966, 211(5053): 1105
- [17] Xia HJ, Wang CY, Zhang HL, et al. Characterization of spontaneous breast tumor in tree shrews (*Tupaia belangeri* chinesis) [J]. *Zoological Research*, 2012, 33(1): 55-59
- [18] Monsky WL, Mouta Carreira C, Tsuzuki Y, et al. Role of host microenvironment in angiogenesis and microvascular functions in human breast cancer xenografts: mammary fat pad versus cranial tumors[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(4): 1008-1013
- [19] Moya Horno I, Fernandez Morales LA, Dalmau Portulas E, et al. Infiltrating ductal carcinoma: infiltrates at the exit site of a central venous access port device[J]. *Ann Oncol*, 2010, 21(6): 1377-1379
- [20] Cao S, Kang HG, Liu YX, et al. Synchronous infiltrating ductal carcinoma and primary extramedullary plasmacytoma of the breast [J]. *World J Surg Oncol*, 2009, 7: 43
- [21] Fasanella S, Leonardi E, Cantaloni C, et al. Proliferative activity in human breast cancer: Ki-67 automated evaluation and the influence of different Ki-67 equivalent antibodies[J]. *Diagn Pathol*, 2011, 6 Suppl 1: S7
- [22] Finkle D, Quan ZR, Asghari V, et al. HER2-targeted therapy reduces incidence and progression of midlife mammary tumors in female murine mammary tumor virus huHER2-transgenic mice [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(7): 2499-2511
- [23] Rivas MA, Venturutti L, Huang YW, et al. Downregulation of the tumor-suppressor miR-16 via progestin-mediated oncogenic signaling contributes to breast cancer development [J]. *Breast Cancer Res*, 2012, 14(3): R77
- [24] Li L, Bi XF, Xu X, et al. Expression pattern of E-cadherin and p120-catenin in infiltrating lobular carcinoma and ductal carcinoma of the breast and its significance [J]. *Chinese Journal of Oncology*, 2010, 32(4): 273-277