

癌痛平胶囊抑制肿瘤转移及其作用机制探讨

程海波, 卢伟, 徐长亮, 姚志华, 孙东东, 沈卫星*

(南京中医药大学第一临床医学院, 江苏省中医药防治肿瘤协同创新中心, 南京 210023)

[摘要] **目的:**观察癌痛平胶囊对 H22 荷瘤小鼠肿瘤生长转移的抑制作用,探讨其作用机制。**方法:**ICR 小鼠接种 H22 肝癌细胞株,建立 H22 荷瘤小鼠模型。将 H22 荷瘤小鼠随机分为模型组、顺铂组、癌痛平高、低剂量组,模型组每日 *ig* 等容积生理盐水,癌痛平高、低剂量组每日 *ig* 癌痛平(36,18 g·kg⁻¹),顺铂组每日 *ip* 顺铂(2 mg·kg⁻¹)。各组连续给药 7 d,处死荷瘤小鼠,剥离瘤体称重,按公式计算抑瘤率。采用免疫组化检测肿瘤组织中血管内皮生长因子(VEGF)蛋白表达,使用实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)以及免疫印迹法(Western blot)检测肿瘤组织中 C-X-C 趋化因子配体 12(CXCL12)及 C-X-C 趋化因子受体 4(CXCR4)基因以及蛋白表达的改变。**结果:**癌痛平高、低剂量显著抑制小鼠 H22 荷瘤小鼠肿瘤的生长,癌痛平高剂量显著降低肿瘤组织中 VEGF 蛋白表达,并抑制 CXCL12 和受体 CXCR4 的基因及蛋白表达($P < 0.01$)。**结论:**癌痛平胶囊对 H22 荷瘤小鼠肿瘤生长转移具有一定的抑制作用,其作用机制可能是通过降低肿瘤组织 VEGF 蛋白表达以及干预 CXCL12/CXCR4 生物轴抑制肿瘤转移。

[关键词] 癌痛平胶囊; 肿瘤转移; 作用机制; C-X-C 趋化因子配体 12; C-X-C 趋化因子受体 4

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)11-0107-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016110107

Inhibitory Effect of Aitongping Capsules on Tumor Metastasis and Its Molecular Mechanism

CHENG Hai-bo, LU Wei, XU Chang-liang, YAO Zhi-hua, SUN Dong-dong, SHEN Wei-xing*

(The First Clinical Medical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Province Collaborative Innovation Center of Chinese Medicine Prevention and Treatment of Cancer, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the inhibitory effect of Aitongping capsules on tumor growth and metastasis in H22 tumor bearing mice, and explore its mechanism. **Method:** The ICR mice were inoculated with hepatoma cell line H22 to establish H22 tumor-bearing mice models. The H22 tumor-bearing mice were randomly divided into model group, cisplatin group, Aitongping high and low dose groups. The mice in the model group received the same volume of normal saline by *ig* daily, mice in Aitongping high-dose and low-dose group received 36, 18 g·kg⁻¹ Aitongping by *ig* daily, and the mice in cisplatin group received 2 mg·kg⁻¹ cisplatin by *ip* daily. All the groups received continuous administration for 7 d, and then the mice were sacrificed. The tumor was peeled off for weighing, and the tumor inhibition rate was calculated according to the formula. Protein expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in tumor tissues was detected by immunohistochemistry, gene and protein expressions of C-X-C chemokine ligand 12 (CXCL12) and its receptor C-X-C chemokine receptor 4 (CXCR4) in tumor tissues by using Real-time PCR and Western blot method. **Result:** Aitongping high and low dose groups significantly inhibited the growth of tumors in H22 tumor-bearing mice. Aitongping high dose group significantly decreased the protein expression of VEGF in the tumor tissues, and inhibited the gene and protein expressions of

[收稿日期] 20151110(012)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373511,81403079,81573910);江苏省自然科学基金项目(BK20131416,BK20141467);江苏省科技支撑计划(社会发展)资助项目(BE2012763)

[第一作者] 程海波,博士,副教授,从事中医药防治肿瘤研究,Tel:025-85811005,E-mail:chb7197@163.com

[通讯作者] *沈卫星,博士,副教授,从事中医药防治肿瘤研究,Tel:025-85811005,E-mail:nzymyf@163.com

CXCR4 ($P < 0.01$). **Conclusion:** Aitongping capsules have a certain inhibitory effect on tumor growth and metastasis in H22 tumor-bearing mice, and its mechanism may be associated with reducing protein expression of VEGF in tumor tissues and intervening CXCL12/CXCR4 biological axis.

[Key words] Aitongping capsule; tumor metastasis; mechanism; C-X-C chemokine ligand 12; C-X-C chemokine receptor 4

恶性肿瘤是严重危害人类生命和健康的主要疾病之一,癌性疼痛是中晚期恶性肿瘤患者经常出现的症状,缓解癌性疼痛已成为在肿瘤治疗中需要优先考虑解决的问题^[1]。目前对于癌性疼痛的治疗,主要以世界卫生组织(WHO)推荐的三阶梯药物止痛疗法为主。虽然其在缓解癌性疼痛方面具有确切的疗效,但也具有不良反应、成瘾性及耐受性等问题。近年来,众多中医专家开展了中医药治疗癌性疼痛的研究探索,积累了丰富的经验,取得了较好的疗效^[2]。我国著名中医学家、国医大师周仲瑛教授根据 60 余年临床实践提出了中医肿瘤“癌毒”学说^[3],本课题组继承创新周仲瑛教授“癌毒”学术思想,构建了癌毒病理理论体系^[4]。在癌毒病理理论体系的指导下,针对癌性疼痛“癌毒内郁、痰瘀互结、经络雍塞”的核心病机病证,创制了治疗癌性疼痛的中药复方——癌痛平胶囊。癌痛平胶囊由蚤休、鼠妇、制南星、制白附子、制乳香、萆薢等药物组成,共奏“抗癌解毒、化痰祛瘀、通络止痛”之功^[5]。前期临床研究表明,癌痛平胶囊治疗癌性疼痛能够缩短疼痛时间,减少疼痛强度,提高患者的生存质量^[6]。癌痛平胶囊有较好的镇痛效果,并具有一定的抗肿瘤、增强免疫作用^[7-9],其可能通过影响中枢系统单胺神经递质、减少 c-Fos 基因及 P 物质的释放、降低 NO 的释放和升高 β -内啡肽(β -EP)在中枢神经系统内的含量等途径缓解癌性疼痛^[10-12]。目前研究认为癌性疼痛的发生机制主要与肿瘤的生长、浸润及转移有关^[13],本实验拟观察癌痛平胶囊对 H22 荷瘤小鼠肿瘤生长转移的抑制作用,并探讨其作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 ICR 小鼠 40 只,雌雄各半,体重 18 ~ 22 g,购自上海斯莱克实验动物责任有限公司,合格证号 SCXK(沪)2007-0005。

1.2 药物及试剂 癌痛平胶囊(由蚤休、鼠妇、制南星、制白附子、制乳香、萆薢等药物组成,含生药量 6.375 g·g⁻¹,由江苏省植物药深加工工程中心制备成棕褐色浸膏,批号 20150327),顺铂冻干粉(齐鲁制药有限公司,批号 9090212DB),血管内皮生长因

子(VEGF),C-X-C 趋化因子配体 12(CXCL12),C-X-C 趋化因子受体 4(CXCR4), β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国 Abcam 公司,编号分别为 ab46154, ab25117, ab2074, ab8227),辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗(7074s)(美国 CST 公司,批号 07/2012),即用型快速免疫组化 DAB 显色试剂盒(中国全辉公司,批号 13101701),全蛋白抽提试剂盒(中国 Biosharp 公司,批号 6503595),Bradford 蛋白含量检测试剂盒(美国 Thermo 公司,批号 PB-200138)。

1.3 仪器 RM2235 型石蜡切片机及 DM1000 型光学显微镜(德国 Leica 公司),164-5051 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 造模 H22 肝癌细胞株接种于 ICR 小鼠腹腔,待生长旺盛时,抽取腹水,计数,调整细胞密度为 2×10^7 个/mL 接种于小鼠腋下,每只 0.2 mL,成模率为 100%。

2.2 分组及给药 40 只 ICR 小鼠分别接种 H22 肝癌细胞株 24 h 后,将 H22 荷瘤小鼠随机分为模型组,顺铂组($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),癌痛平高、低剂量($36, 18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)组,每组 10 只。模型组 ig 等容积生理盐水,癌痛平高、低剂量组 ig 相应剂量癌痛平胶囊,顺铂组 ip 顺铂。各组连续给药 7 d。

2.3 瘤重测定及计算抑瘤率 荷瘤小鼠连续给药 7 d 后处死,剥离瘤体称重,并按公式计算抑瘤率。

$$\text{抑瘤率} = (\text{平均瘤重}_{\text{模型组}} - \text{平均瘤重}_{\text{用药组}}) / \text{平均瘤重}_{\text{模型组}} \times 100\%$$

2.4 免疫组化测定肿瘤组织 VEGF 蛋白表达 将小鼠肿瘤组织用 10% 中性甲醛固定,石蜡包埋。石蜡切片脱蜡水化,微波抗原修复。正常山羊血清封闭。滴加 VEGF 抗体(1:100),37 °C 孵育 1 h。滴加二抗,37 °C 孵育 15 min。DAB 显色,苏木素复染,梯度脱水,封片。各组随机取 5 个视野,采用 MiniSee 图像采集系统分析阳性面积占总面积的比值,取平均值。

2.5 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测肿瘤组织 CXCL12, CXCR4 mRNA 表达 将小鼠肿瘤组织研碎,使用 Trizol 法提取组织中的 mRNA,并使用

Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 定量 mRNA 浓度。选取适量 mRNA, 通过逆转录试剂盒将其逆转录为 cDNA, 使用 SYBR-Green 法检测 CXCL12 及其受体 CXCR4 基因表达变化。最终计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。引物序列由上海 Invitrogen 公司合成, GAPDH (136 bp): 上游 5'-CATGTTCCAGTATGACTCCACTC-3', 下游 5'-GGC CTCACCCCATTTGATGT-3'; CXCL12 (125 bp): 上游 5'-GTCAGCCTGAGCTACCGATG-3', 下游 5'-TTCTT CAGCCGTGCAACAATC-3'; CXCR4 (249 bp): 上游 5'-TGGTGTTTCAATTCCAGCAT-3', 下游 5'-CGATG CTCTCGAAGTCACAT-3'。PCR 扩增条件: 50 °C 2 min, 95 °C 15 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 40 个循环, 72 °C 7 min。

2.6 免疫印迹法 (Western blot) 检测肿瘤组织 CXCL12, CXCR4 蛋白表达 将小鼠肿瘤组织研碎, 用 PARP 裂解液提取组织蛋白, BCA 试剂盒测定样品蛋白含量。蛋白定量后, 分别取蛋白 70 μg 加入上样缓冲液, 95 °C 以上变性 10 min。电泳, 转膜, 5% 脱脂牛奶封闭后加入一抗 (CXCL12, 1:400; CXCR4, 1:500) 4 °C 孵育过夜。加入二抗 (辣根过氧化物酶标记羊抗兔, 1:5 000) 室温孵育 2 h, 加入化学发光剂后用凝胶成像系统拍照成像。以目的蛋白/β-actin 蛋白表示蛋白相对含量。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 选用方差分析或 *t* 检验进行组间差异分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 癌痛平胶囊对 H22 荷瘤小鼠瘤重及抑瘤率的影响 与模型组比较, 癌痛平 (36, 18 g·kg⁻¹) 组及顺铂组的瘤重显著下降 ($P < 0.01$), 癌痛平 (36, 18 g·kg⁻¹) 组及顺铂组的抑瘤率分别为 55.3%, 31.3%, 63.7%。见表 1。

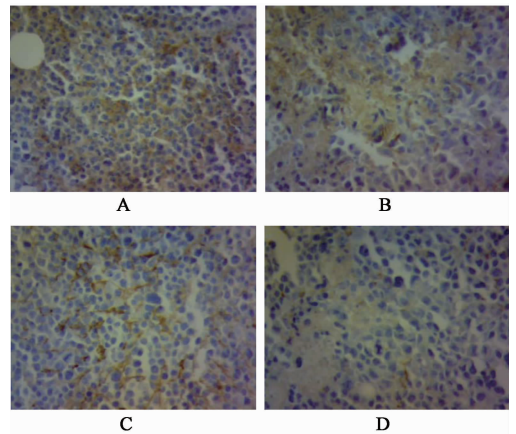
表 1 癌痛平胶囊对 H22 荷瘤小鼠瘤重的影响 ($n = 10$)
Table 1 Effect of Aitongping capsule on tumor weight in H22 tumor-bearing mice ($n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	瘤重 ($\bar{x} \pm s$)/g	抑瘤率/%
模型	-	0.698 ± 0.114	-
顺铂	2 × 10 ⁻³	0.114 ± 0.067 ¹⁾	63.7
癌痛平	18	0.479 ± 0.101 ¹⁾	31.3
	36	0.312 ± 0.089 ¹⁾	55.3

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

3.2 癌痛平胶囊对 VEGF 蛋白表达的影响 癌痛平 (36 g·kg⁻¹) 组、顺铂组的阳性面积比分别为 13.84%, 17.34%, 较模型组显著降低 ($P < 0.01$);

癌痛平 (18 g·kg⁻¹) 组的阳性面积比 27.77%, 与模型组无明显差异。见图 1, 表 2。



A. 模型组; B. 顺铂组; C~D. 癌痛平低、高剂量组 (图 2 同)
图 1 癌痛平胶囊对 VEGF 蛋白表达的影响 (免疫组化, ×400)

Fig. 1 Effect of Aitongping capsule on protein expression of VEGF (IHC, ×400)

表 2 癌痛平胶囊对 VEGF 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Table 2 Effect of Aitongping capsule on protein expression of VEGF ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	VEGF 阳性面积/总面积 %
模型	-	35.13 ± 3.16
顺铂	2 × 10 ⁻³	17.34 ± 2.70 ¹⁾
癌痛平	18	27.77 ± 4.93
	36	13.84 ± 2.81 ¹⁾

3.3 癌痛平胶囊对 CXCL12, CXCR4 mRNA 及蛋白表达的影响 与模型组比较, 癌痛平 (18 g·kg⁻¹) 组及顺铂组干预后, 荷瘤小鼠肿瘤组织中 CXCL12 的 mRNA 表达有少量下调, 癌痛平 (36 g·kg⁻¹) 组可显著降低 CXCR4 的基因表达 ($P < 0.01$)。见表 3。与模型组比较, 癌痛平 (18 g·kg⁻¹) 组及顺铂组干预后, 荷瘤小鼠肿瘤组织中 CXCL12 的蛋白表达有少量下调, 癌痛平 (36 g·kg⁻¹) 组可显著降低 CXCR4 的蛋白表达 ($P < 0.01$)。见图 2, 表 4。

表 3 癌痛平胶囊对 CXCL12, CXCR4 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 3 Effect of Aitongping capsule on mRNA expressions of CXCL12 and CXCR4 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CXCL12 mRNA	CXCR4 mRNA
模型	-	1.03 ± 0.066	1.09 ± 0.057
顺铂	2 × 10 ⁻³	0.92 ± 0.064	0.89 ± 0.076
癌痛平	18	0.94 ± 0.073	0.91 ± 0.043
	36	0.98 ± 0.067	0.62 ± 0.021 ¹⁾

4 讨论

肿瘤新生血管的生成是肿瘤生长、浸润和转移的必要条件, 是影响肿瘤治疗预后的重要因素之一。

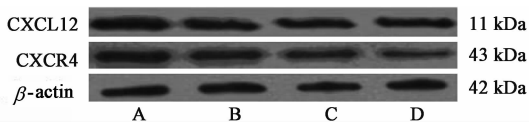


图 2 癌痛平胶囊对 CXCL12, CXCR4 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of Aitongping capsule on protein expressions of CXCL12 and CXCR4

表 4 癌痛平胶囊对 CXCL12, CXCR4 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 4 Effect of Aitongping capsule on protein expressions of CXCL12 and CXCR4 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	CXCL12/ β -actin	CXCR4/ β -actin
模型	-	1.02 \pm 0.083	0.98 \pm 0.037
顺铂	2×10^{-3}	0.98 \pm 0.083	0.93 \pm 0.051
癌痛平	18	0.97 \pm 0.091	0.95 \pm 0.027
	36	0.99 \pm 0.076	0.66 \pm 0.019 ⁽¹⁾

新生的肿瘤血管可以在肿瘤与循环之间建立桥梁,可为肿瘤增殖提供营养物质并带走代谢产物,同时也为肿瘤的转移提供了理想通道,肿瘤细胞借此可以从原发部位脱落向远端转移。目前研究认为肿瘤新生血管的生成与多种细胞因子密切相关,其中以 VEGF 最为重要^[14]。VEGF 可以通过增加内皮细胞的渗透性,促进内皮细胞增殖活化与转移,参与肿瘤新生血管生成及淋巴管的形成^[15]。CXCL12 是一种小分子的细胞因子,属于趋化因子蛋白家族,其功能主要是对淋巴细胞有强烈的趋化作用, CXCR4 是 CXCL12 的特异性受体。CXCL12/CXCR4 生物轴 (CXCL12/CXCR4 axis) 是目前研究最多的化学趋化因子受体-配体信号轴,大量研究表明 CXCL12/CXCR4 生物轴在多种肿瘤的生长、浸润、转移中发挥着重要的作用^[16-17]。目前有研究报道,通过抑制 CXCL12/CXCR4 生物轴可以抑制肿瘤转移,如 CXCR4 单克隆抗体可以抑制小鼠 B16 恶性黑色素瘤肺转移^[18],因此抑制 CXCL12/CXCR4 生物轴已成为抑制肿瘤转移新的治疗靶点。

本实验结果表明,癌痛平胶囊能够抑制 H22 荷瘤小鼠肿瘤生长,降低与肿瘤转移密切相关的细胞因子 VEGF 的蛋白表达,这可能是癌痛平胶囊抑制肿瘤转移的作用机制。同时,首次研究发现癌痛平胶囊对 CXCL12 的受体 CXCR4 的基因以及蛋白表达具有良好的抑制作用,提示癌痛平胶囊可能通过干预 CXCL12/CXCR4 生物轴从而抑制肿瘤转移。本实验研究在整体动物水平上证明了癌痛平胶囊具有一定的抑制肿瘤生长转移作用,其作用机制可能是通过降低 VEGF 的蛋白表达以及干预 CXCL12/CXCR4 生物

轴从而发挥抑制肿瘤转移作用。

[参考文献]

[1] Paice J A, Ferrell B. The management of cancer pain [J]. Ca Cancer J Clin, 2011, 61 (3): 157-182.

[2] 周之毅, 刘慧, 施志明. 癌性疼痛的中医药治疗进展 [J]. 辽宁中医杂志, 2007, 34 (4): 534-536.

[3] 程海波, 吴勉华. 周仲瑛教授“癌毒”学术思想探析 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25 (6): 866-869.

[4] 程海波. 癌毒病机理论探讨 [J]. 中医杂志, 2014, 55 (20): 1711-1714.

[5] 程海波, 吴勉华. 癌性疼痛的中医理论探讨 [J]. 中华中医药杂志, 2008, 23 (1): 50-52.

[6] 吴勉华, 周学平, 程海波, 等. 癌痛平胶囊治疗癌性疼痛的临床研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25 (3): 218-221.

[7] 吴勉华, 许惠琴, 周红光, 等. 癌痛平胶囊镇痛作用的实验研究 [J]. 江苏中医药, 2004, 25 (11): 55-56.

[8] 吴勉华, 许惠琴, 周红光. 癌痛平胶囊抗癌作用的实验研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2004, 20 (3): 162-164.

[9] 吴勉华, 许惠琴, 周红光. 癌痛平胶囊免疫增强作用的实验研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2005, 21 (3): 159-160.

[10] 陈敏敏, 程海波, 张颖, 等. 癌痛平对甲醛致痛模型大鼠单胺类神经递质的影响 [J]. 中药药理与临床, 2008, 24 (5): 60-63.

[11] 陈敏敏, 程海波, 张颖, 等. 癌痛平对福尔马林致痛模型大鼠脊髓背角 c-fos 表达及 P 物质含量的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2009, 26 (1): 63-66.

[12] 程海波, 陈敏敏, 许惠琴, 等. 癌痛平胶囊对福尔马林致痛大鼠下丘脑、垂体、脊髓中 NO、 β -EP 含量的影响 [J]. 南京中医药大学学报, 2009, 25 (2): 123-124.

[13] Falk S, Dickenson A H. Pain and nociception: mechanisms of cancer-induced bone pain [J]. J Clin Oncol, 2014, 32 (16): 1647-1654.

[14] 吴华英, 向德兵. 血管内皮生长因子在肿瘤血管生成的研究进展 [J]. 中国肿瘤临床与康复, 2012, 19 (5): 470-471.

[15] 李京佳, 林相国, 许涛, 等. VEGF 家族及其在肿瘤生长中作用的研究 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 12 (4): 777-779.

[16] Iwasa S, Yanagawa T, Fan J, et al. Expression of CXCR4 and its ligand SDF-1 in intestinal-type gastric cancer is associated with lymphnode and liver metastasis [J]. Anticancer Res, 2009, 29 (11): 4751-4758.

[17] Müller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis [J]. Nature, 2001, 410 (6824): 50-56.

[18] Kami T, Maki W, Cardones A R, et al. Expression of CXCR4 chemokine receptor 4 enhances the pulmonary metastatic potential of murine B16 melanoma cells [J]. Cancer Res, 2002, 62 (24): 7328-7334.

[责任编辑 张丰丰]