

· 药理 ·

## 蛇床子-补骨脂配伍引经药对乳腺癌骨转移 裸鼠 CXCL12-CXCR4 轴的影响

程旭锋<sup>1</sup>, 张新峰<sup>2\*</sup>, 刘琦<sup>3</sup>, 乔翠霞<sup>4</sup>, 王伟<sup>1</sup>, 赵素贞<sup>3</sup>

(1. 河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450000; 2. 郑州大学附属肿瘤医院, 郑州 450000; 3. 河南中医药大学, 郑州 450008; 4. 河南省中医药研究院, 郑州 450000)

**[摘要]** 目的:观察蛇床子-补骨脂配伍引经药桔梗对裸鼠乳腺癌骨转移趋化因子 12-趋化因子受体 4 (CXCL12-CXCR4) 生物轴的影响,并探讨其机制。方法:采用左心室注射乳腺癌 MDA-MB-231BO 细胞法建立乳腺癌骨转移裸鼠模型,分别 ig“蛇床子(1.28 g)-补骨脂(1.28 g)”煎液、“蛇床子(1.28 g)-补骨脂(1.28 g)-桔梗(0.32 g)”煎液、“蛇床子(1.28 g)-补骨脂(1.28 g)-牛膝(0.32 g)”煎液,观察其对裸鼠模型上肢和下肢骨转移损伤、骨转移程度的影响,逆转录-PCR (RT-PCR) 和免疫印迹法 (Western blot) 检测上下肢骨转移灶中 CXCL12, CXCR4 mRNA 和蛋白的表达。结果:“蛇床子-补骨脂”对裸鼠上肢、下肢骨转移程度、骨损伤程度、骨转移组织中 CXCL12 和 CXCR4 mRNA 的表达均有一定的抑制作用 ( $P < 0.05$ ), 上行引经药桔梗可增强“蛇床子-补骨脂”对上肢骨转移程度、骨损伤程度、骨转移组织中 CXCL12 和 CXCR4 mRNA 和蛋白表达的抑制作用 ( $P < 0.05$ )。下行引经药牛膝对上述指标无明显影响。结论:桔梗可增强“蛇床子-补骨脂”对乳腺癌骨转移裸鼠上肢骨转移的治疗作用,其机制可能与其增强“蛇床子-补骨脂”下调上肢骨转移灶中 CXCL12, CXCR4 mRNA 和蛋白表达有关。

**[关键词]** 乳腺癌骨转移; 移趋化因子 12-趋化因子受体 4 生物轴; “蛇床子-补骨脂”药对; 引经药; 桔梗

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)16-0091-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016160091

## Effects of Platycodonis Radix Combined with Cnidii Fructus-Psoraleae Fructus on CXCL12-CXCR4 Axis in Nude Mice with Bone Metastasis of Breast Cancer

CHENG Xu-feng<sup>1</sup>, ZHANG Xin-feng<sup>2\*</sup>, LIU Qi<sup>3</sup>, QIAO Cui-xia<sup>4</sup>, WANG Wei<sup>1</sup>, ZHAO Su-zhen<sup>3</sup>

(1. The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Zhengzhou 450000, China;

2. Henan Cancer Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China;

3. Henan University of TCM, Zhengzhou 450008, China;

4. Henan Province Chinese Medicine Research Institute, Zhengzhou 450000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effects of Platycodonis Radix combined with Cnidii Fructus-Psoraleae Fructus on C-X-C chemokine ligand 12 (CXCL12) -C-X-C chemokine receptor 4 (CXCR4) axis in nude mice with bone metastasis of breast cancer. **Method:** The model of bone metastasis of breast cancer in nude mice were established by left ventricle injection of MDA-MB-231BO cells. The modeled mice were treated with traditional Chinese medicine decoction ‘Cnidii Fructus 1.28 g -Psoraleae Fructus 1.28 g’, ‘Cnidii Fructus 1.28 g-

**[收稿日期]** 20151111(008)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(U1304822);河南省科技攻关计划项目(162102310185,162102310331);河南省教育厅科学技术研究重点项目(2011A360004);郑州市科技局科技攻关计划项目(112PPTSf319-14,10PTGS486-3)

**[第一作者]** 程旭锋,博士,副主任医师,从事中西医结合防治乳腺疾病的临床与基础研究,Tel:13937189939,E-mail:cx9939@163.com

**[通讯作者]** \*张新峰,博士,主治医师,从事中西医结合防治恶性肿瘤的临床与基础研究,Tel:0371-65587091,E-mail:zhangxinfeng125@126.com

Psoraleae Fructus 1.28 g -Platycodonis Radix 0.32 g' and 'Cnidii Fructus 1.28 g -Psoraleae Fructus 1.28 g -Cyathulae Radix 0.32 g'. After the interventions, the nude mice models were observed for the effects of the treatment methods on upper limb and lower limb bone metastasis damages and degree of bone metastases, CXCL12 and CXCR4 mRNA expressions and protein expressions in bone metastasis lesions of upper and lower limbs were detected by RT-PCR and Western blot. **Result:** Cnidii Fructus-Psoraleae Fructus had certain inhibitory effects on bone metastasis degree, bone damage degree of upper limb and lower limb, as well as CXCL12 and CXCR4 gene expressions in bone metastases tissues ( $P < 0.05$ ). The upward medicinal guide drug Platycodonis Radix can enhance the inhibitory effect of Cnidii Fructus-Psoraleae Fructus on bone metastasis degree, bone damage degree of upper limb, as well as mRNA and protein expressions of CXCL12 and CXCR4 in bone metastasis tissues ( $P < 0.05$ ). The downward medicinal guide drug Achyranthes had no obvious effects on the above indexes. **Conclusion:** Platycodonis Radix can enhance the therapeutic effect of Cnidii Fructus-Psoraleae Fructus in nude mice with bone metastasis of breast cancer, and the mechanism may be associated with the enhancing effect of Cnidii Fructus-Psoraleae Fructus on down-regulating the mRNA and protein expressions of CXCL12 and CXCR4 in bone metastasis lesions of upper limb.

[**Key words**] bone metastasis of breast cancer; C-X-C chemokine ligand 12-C-X-C chemokine receptor 4 axis; Cnidii Fructus-Psoraleae Fructus; medicinal guide drug; Platycodonis Radix

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,国外报道 65% ~ 75% 的乳腺癌患者在自然病程中会发生骨转移<sup>[1-2]</sup>,骨转移引起的高钙血症、骨痛、病理性骨折、脊髓压迫等骨相关事件(SRE)可严重影响患者的生命质量;乳腺癌骨转移一旦发生,均不可治愈,死亡率很高,中位生存期仅为 2 年<sup>[3]</sup>。目前,乳腺癌骨转移多采用综合治疗方法,包括化疗、放疗、手术治疗、双磷酸盐、中医药治疗等<sup>[4-6]</sup>。趋化因子配体 12 (CXCL12) 和趋化因子受体 4 (CXCR4) 形成 CXCL12-CXCR4 生物学轴 (CXCL12-CXCR4 biological axis),在包括乳腺癌在内的多种恶性肿瘤的发生发展、浸润、转移及肿瘤免疫抑制中发挥着重要的作用<sup>[7-9]</sup>。在人乳腺癌骨转移过程中,CXCL12-CXCR4 生物学轴与人乳腺癌的远处转移关系密切<sup>[10]</sup>,阻断 CXCL12, CXCR4 的作用可能是控制乳腺癌转移的有效途径<sup>[11]</sup>。

本课题组前期研究发现,温肾药对“蛇床子-补骨脂”在抗乳腺癌骨转移方面效果确切<sup>[12-15]</sup>,而在临床实践中常根据转移灶位置的不同而配伍不同的引经药,从而增加疗效。桔梗具有“载药上行”的作用,可加强药物对上焦疾病的疗效,故本实验旨在观察蛇床子-补骨脂配伍桔梗对乳腺癌骨转移小鼠模型的影响,并从 CXCL12-CXCR4 生物轴途径探讨其疗效机制,为中医药防治恶性肿瘤骨转移提供实验依据。

## 1 材料

1.1 主要仪器与试剂 BS97MyCycler 型逆转录-

PCR (RT-PCR) 分析仪 (美国 Bio Rad 公司), Qwin V3 型病理图像分析系统 (德国 Leica 公司)。鼠抗人 CXCL12 单克隆抗体 (美国 Abgent 公司,批号 C20120326),鼠抗人 CXCR4 单克隆抗体 (美国 R&D 公司,批号 20130419), $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 抗体 (美国 Epitomics 公司,批号 20120601),RT-PCR 试剂盒 (大连 Takara 公司,批号 00130186),唑来膦酸 (江苏正大天晴药业股份有限公司,批号 121116204),DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS) (美国 Invitrogn 公司,批号分别为 13985-092, 1414426),RIPA 裂解液 (北京索莱宝科技有限公司,批号 20131209)。引物序列由上海生工生物工程有限公司设计、合成,CXCL12 (417 bp):上游 5'-CTCTGCT TCCCGCCACCAT-3',下游 5'-GCCACCGATCTTCC TTCCGA-3';CXCR4 (561 bp):上游 TTGTCCACGCC ACCAACAGTCA-3',下游 5'-CGTCGGCAAAGATG-AAGTCAGGT-3';甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) (250 bp):上游 5'-GGTCGGAGTCAACGGATTG-3',下游 5'-ACATGACTTCCAAGCTGGCCGT-3'。

1.2 药物 桔梗、川牛膝、蛇床子、补骨脂均由河南中医药大学第一附属医院中药房提供,经河南中医药大学第一附属医院药学部陈天朝主任药师鉴定,桔梗科植物桔梗 *Platycodon grandiflorum* 的干燥根,苋科植物川牛膝 *Cyathula officinalis* 的干燥根,伞形科植物蛇床 *Cnidium monnieri* 的干燥成熟果实,豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* 的干燥成熟果实。

1.3 动物 SPF 级雌性 BALB/c-nude mice 裸鼠,

6~8 周龄,体重(20±2)g,购于中国科学院上海实验动物中心,合格证号 SCXK(沪)2013-0016。

**1.4 细胞培养** 人乳腺癌骨高转移细胞株 MDA-MB-231BO 由美国德克萨斯州立大学医学系内分泌所 Toshiyuki Yoneda 博士惠赠。采用高糖型 DMEM 培养基(4.5 g·L<sup>-1</sup> 葡萄糖,10% 胎牛血清,3.7 g·L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>,1% L-谷氨酰胺,1×10<sup>5</sup> U·L<sup>-1</sup> 青霉素-链霉素),培养于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中,湿度 95%。

## 2 方法

**2.1 中药煎液的制备** 煎液 A:蛇床子 200 g,补骨脂 200 g;煎液 B:蛇床子 200 g,补骨脂 200 g,桔梗 50 g;煎液 C:蛇床子 200 g,补骨脂 200 g,川牛膝 50 g;以上中药按照 1:6 比例分别加水 2 400,2 700,2 700 mL,浸泡 2 h,文火煎煮,过滤,溶液浓缩,至 200 mL;药渣再分别加水 1 200,1 500,1 500 mL,文火煎煮至 200 mL;合并 2 次煎液,混匀,得到药物煎液 400 mL;分别得到 1.00 g·mL<sup>-1</sup> 的煎液 A,1.125 g·mL<sup>-1</sup> 的煎液 B,1.125 g·mL<sup>-1</sup> 的煎液 C。每 1 mL 蛇床子-补骨脂煎液相当于含蛇床子 0.50 g,补骨脂 0.50 g;每 1 mL 蛇床子-补骨脂药对+桔梗煎液相当于含蛇床子 0.50 g,补骨脂 0.50 g 和桔梗 0.125 g;每 1 mL 蛇床子-补骨脂药对+牛膝煎液相当于含蛇床子 0.50 g,补骨脂 0.50 g 和川牛膝 0.125 g。置 4℃ 冰箱保存备用。以上中药煎液均由河南中医药大学第一附属医院制剂室统一制备。

**2.2 人乳腺癌骨转移裸鼠模型的建立** 调整 MDA-MB-231BO 细胞密度为 0.8×10<sup>7</sup> 个/mL,根据改良的左心室注射 MDA-MB-231BO 细胞法建立乳腺癌骨转移裸鼠模型<sup>[16]</sup>。

**2.3 分组与给药** 裸鼠左心室注射 MDA-MB-231BO 细胞 2 周后,对小鼠进行骨扫描,然后根据骨转移灶部位将小鼠分为上肢转移组与下肢转移组(以胸椎为界限,胸椎以上者为上肢转移,胸椎以下者为下肢转移,转移至胸椎者剔除)。采用 Excel“随机数发生器”<sup>[17]</sup> 将上肢骨转移及下肢骨转移裸鼠分别随机分为模型组、唑来膦酸组、药对组、药对+桔梗组、药对+川牛膝组,每组各 8 只。

各组裸鼠于造模后第 4 天开始 ig 中药煎液。药对组 ig 煎液 A(每只裸鼠 0.40 g),药对+桔梗组 ig 煎液 B(每只裸鼠 0.45 g),药对+川牛膝组 ig 煎液 C(每只裸鼠 0.45 g),模型组在造模后第 4 天开始 ig 等体积生理盐水,ig 体积均为 0.4 mL/只,唑来膦酸组在造模后第 4 天皮下注射唑来膦酸注射液,

0.2 mg·kg<sup>-1</sup>。均每周 3 次,持续 6 周<sup>[12]</sup>。

**2.4 病理学观察** 取骨转移灶,多聚甲醛固定,盐酸脱钙,乙醇脱水,常规石蜡包埋,切片,苏木精伊红(HE)染色,显微镜下观察并判断骨转移组织病理改变。

**2.5 骨转移程度检测** 通过骨转移率及肿瘤细胞数/细胞总数检测裸鼠骨转移程度<sup>[17]</sup>,在 400 倍显微镜下,每张切片随机选取 3 个视野,对每 1 视野中的肿瘤细胞进行计数,计算同一视野中的细胞总数(红细胞除外)。

**2.6 RT-PCR 法检测骨转移组织中 CXCL12, CXCR4 mRNA 的相对表达** 提取骨转移组织总 RNA,检测所提 RNA 浓度和纯度,使用总 RNA 作为模板合成 cDNA。RT-PCR 反应条件:94℃ 5 min,94℃ 30 s,54℃ 45 s,72℃ 45 s,72℃ 10 min,40 个循环。PCR 产物琼脂糖凝胶电泳,扫描条带,以目的基因条带/GAPDH 条带表示其相对表达量。

**2.7 免疫印迹法(Western blot)检测骨转移组织中 CXCL12, CXCR4 蛋白相对表达** 提取裸鼠骨转移组织蛋白,进行蛋白定量,变性,取适量蛋白上样,电泳,转膜,封闭,加入 CXCL12, CXCR4 一抗(1:200)4℃ 反应过夜,封闭,加入生物素(HRP)标记的羊抗兔免疫球蛋白(IgG)(1:5 000),显色,显影,定影,曝光,扫描条带,以目的蛋白条带/ $\beta$ -actin 条带表示蛋白相对表达量。

**2.8 统计学方法** 采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间采用 *t* 检验或单因素方差分析,计数资料组间比较采用卡方检验,*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 药对配伍引经药物对各组小鼠骨转移程度的影响** 上肢骨转移裸鼠模型组骨转移率为 100%,其他各组骨转移率有不同程度的减小;唑来膦酸组和药对对各组裸鼠肿瘤细胞数/细胞总数均较模型组明显降低(*P* < 0.05);药对+桔梗组较药对组及药对+牛膝组明显降低(*P* < 0.05)。下肢骨转移裸鼠模型组裸鼠骨转移率为 100%,其他各组骨转移率较模型组有不同程度的减小(*P* < 0.05, *P* < 0.01)。见表 1。

**3.2 药对配伍引经药物对各组小鼠病理形态的影响** 正常组裸鼠骨组织结构完整,骨皮质结构连续,骨小梁排列规则有序;模型组、唑来膦酸组和药对对各组裸鼠骨髓腔内和骨皮质外可见大量肿瘤细胞浸润,骨皮质结构破坏,骨小梁排列紊乱。模型组骨结

表 1 药对配伍引经药物对各组小鼠骨转移程度的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 1 Comparison of bone metastasis degree of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ ) %

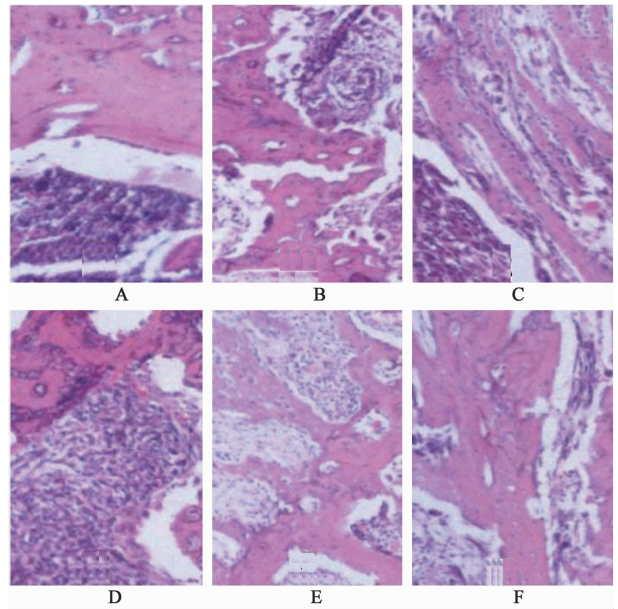
部位	组别	剂量	转移率	肿瘤细胞数 / 正常细胞数
上肢	模型	-	100.0	41.91 ± 15.44
	唑来膦酸	0.2 mg·kg <sup>-1</sup>	25 <sup>2)</sup>	24.66 ± 8.65 <sup>1)</sup>
	药对	0.40 g/只	50.0 <sup>1)</sup>	35.56 ± 11.32 <sup>1)</sup>
	药对 + 牛膝	0.45 g/只	50.0 <sup>1)</sup>	33.11 ± 9.34 <sup>1)</sup>
	药对 + 桔梗	0.45 g/只	37.5 <sup>2)</sup>	25.58 ± 6.06 <sup>1,3,4)</sup>
下肢	模型	-	100	47.52 ± 13.51
	唑来膦酸	0.2 mg·kg <sup>-1</sup>	37.5 <sup>2)</sup>	24.66 ± 8.65 <sup>1)</sup>
	药对	0.40 g/只	50.0 <sup>1)</sup>	35.43 ± 9.41 <sup>1)</sup>
	药对 + 牛膝	0.45 g/只	50.0 <sup>1)</sup>	28.81 ± 4.39 <sup>1)</sup>
	药对 + 桔梗	0.45 g/只	50.0 <sup>1)</sup>	34.23 ± 7.28 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与药对组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ;与药对加牛膝组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.05$ (表 2,3 同)。

构破坏最为明显,在部分视野中可见到大部分骨质被肿瘤组织所取代,仅残存少量正常组织;唑来膦酸组可见肿瘤细胞浸润,但骨结构相对完整;药对各组均存在不同程度的骨质破坏和肿瘤细胞浸润,其中上肢骨转移裸鼠中以药对 + 桔梗组损伤较轻,而下肢骨转移裸鼠中各中药组骨组织损伤差别不大。见图 1,2。

**3.3 药对配伍引经药物对各组乳腺癌骨转移裸鼠 CXCL12, CXCR4 mRNA 表达的影响** 上肢骨转移裸鼠,与模型组比较,药对组、药对 + 牛膝组、药对 + 桔梗组 CXCL12, CXCR4 mRNA 的相对表达量均明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ );与药对组比较,药对 + 桔梗组 CXCL12, CXCR4 mRNA 的相对表达量明显降低 ( $P < 0.05$ );与药对 + 牛膝组比较,药对 + 桔梗组 CXCL12, CXCR4 mRNA 的相对表达量明显降低 ( $P < 0.05$ )。下肢骨转移裸鼠,与模型组比较,药对组、药对 + 牛膝组、药对 + 桔梗组 CXCL12, CXCR4 mRNA 的相对表达量明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ );药对组、药对 + 牛膝组、药对 + 桔梗组 CXCL12, CXCR4 mRNA 的相对表达量均无显著差异。见表 2,图 3。

**3.4 药对各组对乳腺癌骨转移裸鼠 CXCL12-CXCR4 蛋白表达的影响** 上肢骨转移裸鼠:与模型组比较,药对组、药对 + 牛膝组、药对 + 桔梗组 CXCL12, CXCR4 蛋白相对表达量明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ );与药对组比较,药对 + 桔梗组



A. 正常组;B. 模型组;C. 药对组;D. 药对 + 桔梗组;E. 药对 + 牛膝组;F. 唑来膦酸组(图 2 同)

图 1 药对配伍引经药物对各组小鼠上肢骨转移病理学的影响 (HE, ×400)

Fig. 1 Pathological changes in bone metastasis of upper limb (HE, ×400)

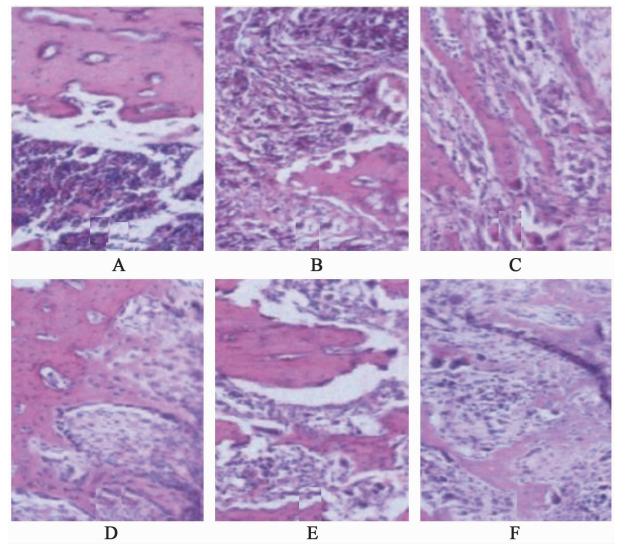


图 2 药对配伍引经药物对各组小鼠下肢骨转移病理学的影响 (HE, ×400)

Fig. 2 Pathological changes in bone metastasis of lower limb (HE, ×400)

CXCL12, CXCR4 蛋白相对表达量明显降低 ( $P < 0.05$ );与药对 + 牛膝组比较,药对 + 桔梗组 CXCL12, CXCR4 蛋白相对表达量明显降低 ( $P < 0.05$ )。下肢骨转移裸鼠:与模型组比较,药对组、药对 + 牛膝组,药对 + 桔梗组 CXCL12, CXCR4 蛋白相对表达量明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ );药对组、药对 + 牛膝

表 2 蛇床子-补骨脂配伍引经药物对骨转移小鼠 CXCL12, CXCR4 mRNA 相对表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 2 Effects of Cnidii Fructus-Psoraleae Fructus on CXCR4, CXCL12 mRNA expressions in mice with bone metastasis ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

部位	组别	剂量	CXCL12/ GAPDH	CXCR4/ GAPDH
上肢	模型	-	1.56 ± 0.57	0.97 ± 0.36
	唑来膦酸	0.2 mg·kg <sup>-1</sup>	1.48 ± 0.35	0.94 ± 0.31
	药对	0.40 g/只	1.06 ± 0.34 <sup>1)</sup>	0.90 ± 0.22 <sup>1)</sup>
	药对 + 牛膝	0.45 g/只	1.03 ± 0.35 <sup>1)</sup>	0.88 ± 0.26 <sup>1)</sup>
	药对 + 桔梗	0.45 g/只	0.75 ± 0.20 <sup>2,3,4)</sup>	0.68 ± 0.19 <sup>2,3,4)</sup>
下肢	模型	-	1.50 ± 0.71	1.09 ± 0.25
	唑来膦酸	0.2 mg·kg <sup>-1</sup>	1.54 ± 0.34	1.07 ± 0.23
	药对	0.40 g/只	0.102 ± 0.26 <sup>1)</sup>	0.87 ± 0.26 <sup>1)</sup>
	药对 + 牛膝	0.45 g/只	0.96 ± 0.31 <sup>1)</sup>	0.82 ± 0.16 <sup>1)</sup>
	药对 + 桔梗	0.45 g/只	0.98 ± 0.34 <sup>1)</sup>	0.84 ± 0.20 <sup>1)</sup>

表 3 蛇床子-补骨脂配伍引经药物对骨转移小鼠 CXCL12, CXCR4 蛋白相对表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 3 Effects of Cnidii Fructus-Psoraleae Fructus on CXCR4, CXCL12 protein expressions in mice with bone metastasis ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

部位	组别	剂量	CXCL12/ $\beta$ -actin	CXCR4/ $\beta$ -actin
上肢	模型	-	0.73 ± 0.27	0.69 ± 0.25
	唑来膦酸	0.2 mg·kg <sup>-1</sup>	0.70 ± 0.17	0.67 ± 0.22
	药对	0.40 g/只	0.50 ± 0.16 <sup>1)</sup>	0.64 ± 0.15 <sup>1)</sup>
	药对 + 牛膝	0.45 g/只	0.48 ± 0.17 <sup>1)</sup>	0.63 ± 0.18 <sup>1)</sup>
	药对 + 桔梗	0.45 g/只	0.35 ± 0.10 <sup>2,3,4)</sup>	0.49 ± 0.13 <sup>2,3,4)</sup>
下肢	模型	-	0.71 ± 0.34	0.71 ± 0.17
	唑来膦酸	0.2 mg·kg <sup>-1</sup>	0.73 ± 0.16	0.70 ± 0.15
	药对	0.40 g/只	0.48 ± 0.12 <sup>1)</sup>	0.57 ± 0.17 <sup>1)</sup>
	药对 + 牛膝	0.45 g/只	0.46 ± 0.15 <sup>1)</sup>	0.54 ± 0.11 <sup>1)</sup>
	药对 + 桔梗	0.45 g/只	0.47 ± 0.16 <sup>1)</sup>	0.55 ± 0.13 <sup>1)</sup>



A. 模型组; B. 药对组; C. 药对 + 桔梗组; D. 药对 + 牛膝组; E. 唑来膦酸组 (图 4 同)

图 3 蛇床子-补骨脂配伍引经药物对各组小鼠 CXCL12, CXCR4 mRNA 表达的影响

Fig. 3 Effects of Cnidii Fructus-Psoraleae Fructus on CXCR4 and CXCL12 mRNA expressions in each group

组、药对 + 桔梗组 CXCL12, CXCR4 蛋白相对表达量无显著差异。见图 4, 表 3。

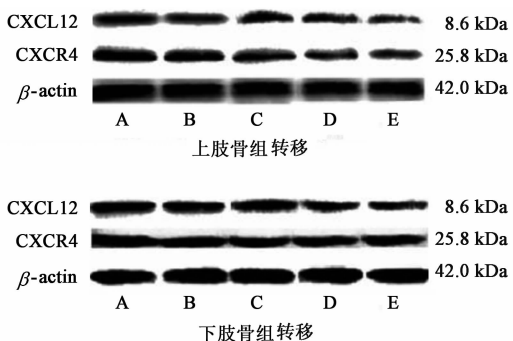


图 4 蛇床子-补骨脂配伍引经药物对骨转移小鼠 CXCL12, CXCR4 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effects of Cnidii Fructus-Psoraleae Fructus on CXCR4 and CXCL12 protein expressions in mice with bone metastasis

#### 4 结论

乳腺癌骨转移属中医“骨蚀”、“骨痹”、“骨疽”等范畴,根据中医“正气存内,邪不可干”,乳腺癌骨转移的发生应当是骨“正气不足”。《黄帝内经·素问》指出“阳化气,阴成形”,阳气具有化物于无形的功能,而阴气具有助物成形的功能,阴阳相生相克;恶性肿瘤骨转移的形成,当是“阳化气”功能不足,导致“阴成形”功能失去克制而致。《黄帝内经·素问》中指出:“肾主骨,生髓”、“肾其充在骨”,认为骨之健康与肾中精气密切相关。因此采用温肾药物恢复肾阳“化气”的功能是治疗骨转移癌的关键。蛇床子、补骨脂是临床常用的温肾药物,本课题组前期研究发现,蛇床子-补骨脂 1:1 具有确切的抗乳腺癌骨转移作用<sup>[12-15]</sup>。桔梗是临床常用的上行引经药物,能引导其他药物药力上行直达病所,增强其对应上部疾病的疗效。研究发现,桔梗可增强其他抗肿瘤中药乳腺癌侵袭、转移的作用<sup>[18-19]</sup>。本实验以下行引经药牛膝为对照,观察蛇床子-补骨脂配伍桔梗前后治疗小鼠乳腺癌骨转移效果的差异,并从 CXCL12-CXCR4 生物轴角度探讨桔梗引经作用的机制。

趋化因子是一类具有趋化活性的细胞因子,可选择性趋化和活化不同的细胞类型,参与多种病理生理过程,其中包括恶性肿瘤的生长、浸润、转移等。CXCL12 是 CXC 细胞因子亚家族成员, CXCR4 为 CXCL12 的唯一受体;人乳腺癌原发灶及转移灶中

癌细胞 CXCR4 都高表达,而在乳腺癌最常见的转移部位,如骨、肺则高表达 CXCL12<sup>[20]</sup>,高表达 CXCR4 的乳腺癌细胞进入循环系统,定植于高表达 CXCL12 的血管床,CXCL12 与 CXCR4 结合后激活 CXCR4,导致肿瘤细胞进入正常组织,促进细胞增生和新生血管生成,形成转移瘤。

本研究发现,蛇床子-补骨脂及唑来膦酸均具有减轻乳腺癌骨转移程度,抑制乳腺癌骨转移骨质损伤的作用;上行引经药桔梗可增强蛇床子-补骨脂对上肢骨转移的作用。上行引经药桔梗可增强该药对减轻乳腺癌上肢骨转移程度,抑制上肢骨转移骨质损伤的作用;桔梗对该药对在下肢骨转移中的作用影响较小。提示桔梗的引经作用可增强蛇床子-补骨脂对乳腺癌上肢骨转移的疗效。下行引经药牛膝对蛇床子-补骨脂治疗乳腺癌骨转移无明显影响。蛇床子-补骨脂可下调 CXCL12, CXCR4 mRNA 和蛋白的表达,从多个环节抑制乳腺癌骨转移骨质损伤。上行引经药桔梗可增强蛇床子-补骨脂对 CXCL12-CXCR4 生物轴的调节作用,从而增强蛇床子-补骨脂防治骨转移的疗效。

[参考文献]

[ 1 ] Akhtari M, Mensuri J, Newman K A, et al. Biology of breast cancer bone metastasis [J]. *Cancer Biol Ther*, 2008,7(1):3-9.

[ 2 ] Casas A, Llombart A, Martin M. Denosumab for the treatment of bone metastases in advanced breast cancer [J]. *Breast*, 2013,22(5):585-592.

[ 3 ] Kozlow W, Guise T A. Breast cancer metastasis to bone; mechanisms of osteolysis and implications for therapy [J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2005,10(2):169-180.

[ 4 ] 恶性肿瘤骨转移及骨相关疾病临床诊疗专家共识 [S]. 北京:北京大学医学出版社,2014:50.

[ 5 ] 江泽飞,陈佳艺,牛晓辉,等. 乳腺癌骨转移及骨相关性疾病临床诊疗专家共识(2014 版) [J]. *中华医学杂志*, 2015,95(4):241-247.

[ 6 ] 王如良,江泽飞. 乳腺癌骨转移治疗的若干热点问题思考和讨论:乳腺癌骨转移和骨相关疾病临床诊疗专家共识(2014 版)解读 [J]. *肿瘤研究与临床*, 2015,10(27):707-710.

[ 7 ] Iwasa S, Yanagawa T, Fan J, et al. Expression of CXCR4 and its ligand SDF-1 in intestinal-type gastric cancer is associated with lymph node and liver metastasis [J].

*Anticancer Res*, 2009,29(11):4751-4756.

[ 8 ] Valdivia-Silva J, Medina-Tamayo J, Garcia-Zepeda E A. Chemokine-derived peptides: novel antimicrobial and antineoplastic agents [J]. *Int J Mol Sci*, 2015,16(6):12958-12985.

[ 9 ] Passaro D, Irigoyen M, Catherinet C, et al. CXCR4 is required for leukemia-initiating cell activity in T cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *Cancer Cell*, 2015,27(6):769-779.

[ 10 ] 吉茹,刘易欣. CXCL12/CXCR4 在乳腺癌转移中的研究进展 [J]. *天津医科大学学报*, 2010,16(3):555-557.

[ 11 ] 刘凤磊,赵凤辉,王金穗,等. 乳腺癌 CXCL12 及其受体 CXCR4 的表达及意义 [J]. *诊断病理学杂志*, 2013,20(6):336-339.

[ 12 ] 程旭锋,刘胜,杨顺芳,等. 药对“蛇床子-补骨脂”对乳腺癌骨转移裸鼠体重变化与骨代谢的量效关系研究 [J]. *中医杂志*, 2011,52(24):1288-1292.

[ 13 ] 程旭锋,刘胜,张新峰,等. 蛇床子-补骨脂在乳腺癌骨转移裸鼠模型中吸收特征的研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012,18(6):175-180.

[ 14 ] 程旭锋,刘琦,刘胜,等. 药对蛇床子-补骨脂对乳腺癌骨转移裸鼠生存时间与骨损伤的影响 [J]. *北京中医药大学学报*, 2012,35(5):317-322.

[ 15 ] 刘胜,吴春宇,程旭锋,等. 从 OPG/RANKL/RANK 系统阐述补骨脂-蛇床子抑制乳腺癌骨转移的机制 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2011,31(5):684-689.

[ 16 ] 程旭锋,刘胜,杨顺芳,等. 放射性核素骨显像支持下建立乳腺癌骨转移裸鼠模型 [J]. *中华实验外科杂志*, 2011,28(9):1588-1590.

[ 17 ] 顾晓鸣,陆群,沈伟. 运用 Excel“随机数发生器”进行随机化分组 [J]. *中国医院统计*, 2007,14(3):287-288.

[ 18 ] 吴金娜,韩向晖,叶依依,等. 桔梗配伍不同治则中药对乳腺癌肺转移模型小鼠 Smad4, Samd7 及 TGF- $\beta$  的影响 [J]. *中国中医药科技*, 2013,20(3):247-249.

[ 19 ] 吴金娜,韩向晖,叶依依,等. 桔梗配伍不同治则中药对乳腺癌肺转移的影响 [J]. *癌症进展*, 2013,11(2):159-167.

[ 20 ] Hassan S, Baccarelli A, Salvucci O, et al. Plasma stromal cell-derived factor-1: host derived magker predictive of distant metastasis in breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2008,14(2):446-451.

[责任编辑 张丰丰]