

健脾疏肝抗毒汤对裸鼠 MDA-MB-231-pAcGFP 异种移植瘤生长及转移能力的影响

谢淮冰¹, 王瑞平², 胡守友², 胡玥², 张力², 房良华^{2*}

(1. 南京中医药大学附属医院, 南京 210029; 2. 江苏省中医院, 南京 210029)

[摘要] 目的:观察健脾疏肝抗毒汤对荷 MDA-MB-231-pAcGFP 裸鼠移植瘤生长及转移能力的影响,并探讨其作用机制。方法:应用 Fugene HD Transfection Reagent 转染三阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 细胞,经 G418 筛选获得稳定表达绿色荧光蛋白的乳腺癌细胞(MDA-MB-231-pAcGFP)。流式细胞仪检测荧光细胞百分率。采用皮下接种法建立 MDA-MB-231-pAcGFP 细胞异种移植瘤裸鼠,观察移植瘤的生长情况,荧光成像技术观察各脏器转移瘤的数目和大小。结果:流式细胞仪检测乳腺癌细胞转染率高达 96.5%,表达有绿色荧光蛋白的 MDA-MB-231-pAcGFP 细胞成瘤率为 100%。模型组(A组),健脾疏肝抗毒汤组(B组),趋化因子基质细胞衍生因子-1(CXCL12)特异受体(CXCR4)抑制剂组(C组)、健脾疏肝抗毒汤联合 CXCR4 抑制剂组(D组)瘤体质量分别为(1.30±0.11),(0.75±0.12),(0.48±0.09),(0.44±0.07)g,瘤体体积分别为(6.635±0.500),(4.017±0.466),(2.664±0.700),(2.323±0.492)cm³,与模型组比较,3组瘤体质量及体积均明显降低(P<0.05)。3组的抑瘤率分别为42.18%,62.95%,66.28%。A、C组肝脏可见散在荧光转移结节,B组及D组肝脏未见有荧光结节。结论:健脾疏肝抗毒汤具有抑制 MDA-MB-231-pAcGFP 移植瘤生长及肝转移的能力,可为健脾疏肝抗毒汤防治三阴性乳腺癌的生长转移提供实验依据。

[关键词] 健脾疏肝抗毒汤;三阴性乳腺癌;MDA-MB-231 细胞;荧光成像

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)08-0149-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017080149

Effect of Jianpi Shugan Kangdu Decoction on Growth and Metastasis of MDA-MB-231-pAcGFP Xenograft Tumors in Nude Mice

XIE Huai-bing¹, WANG Rui-ping², HU Shou-you², HU Yue², ZHANG Li², FANG Liang-hua^{2*}

(1. *Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;*

2. *Jiangsu Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China*)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Jianpi Shugan Kangdu decoction (JSKD) on the growth and metastasis of MDA-MB-231-pAcGFP xenograft tumors in nude mice, and explore its mechanism. **Method:** Human triple-negative breast cancer cells (MDA-MB-231) were transfected with pAcGFP-C1 by fugene HD transfection reagent, and then the breast cancer cells with stable expression of green fluorescent protein (MDA-MB-231-pAcGFP) were obtained by geneticin (G418) screening. The percentage of MDA-MB-231-pAcGFP was detected by flow cytometry (FCM). The mice bearing MDA-MB-231-pAcGFP cells were obtained with subcutaneous inoculation, and then the volume and the weight of the xenograft tumors were observed by using fluorescence imaging technology. **Result:** The transfection rate of the MDA-MB-231-pAcGFP cells was 96.5% and the rate of tumor formation of these cells was 100%. The average weight of the xenograft tumors was (1.30±0.11) g

[收稿日期] 20160830(008)

[基金项目] 江苏省中医药管理局科技项目(LZ13051);江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20141034);江苏省中医院科技项目(Y13018)

[第一作者] 谢淮冰,硕士,从事中西医结合临床肿瘤内科基础及临床研究,Tel:15150518216,E-mail:Camilla121@163.com

[通讯作者] *房良华,博士,副主任医师,从事肿瘤的中西医结合治疗及分子靶向治疗的研究,Tel:025-8661741-90902,E-mail:675713760@qq.com

(group A, model group), (0.75 ± 0.12) g (group B, JSKD group), (0.48 ± 0.09) g (group C, CXCR4 inhibitor group) and (0.44 ± 0.07) g (group D, JSKD + CXCR4 inhibitor group), respectively, and their tumor volumes were (6.635 ± 0.500), (4.017 ± 0.466), (2.664 ± 0.700), (2.323 ± 0.492) cm³, respectively. The tumor weight and volume were changed in three treatment groups as compared with the model group ($P < 0.05$). The tumor inhibition rates were 42.18%, 62.95%, 66.28% in three treatment groups, respectively. Fluorescent metastatic nodules were found in liver of group A and group C, however, fluorescent metastatic nodules were not found in liver of group B and group D. **Conclusion:** Jianpi Shugan Kangdu decoction could significantly inhibit the growth of the MDA-MB-231-pAcGFP xenograft tumors and prevent tumor metastasis in liver, providing experimental basis for the prevention and treatment of triple-negative breast cancer by Jianpi Shugan Kangdu decoction.

[**Key words**] Jianpi Shugan Kangdu decoction; triple-negative breast cancer (TNBC); MDA-MB-231 cell; fluorescence imaging

乳腺癌是危害女性健康的第一大肿瘤,2013 年美国癌症协会统计数字显示 2012 年美国女性乳腺癌患病人数占女性所有肿瘤发病的首位,死亡人数仅次于支气管肺癌^[1]。即使通过手术、化疗、内分泌治疗和分子靶向治疗等综合治疗后,每年仍有高达 40% 的乳腺癌患者出现复发转移。三阴性乳腺癌 (triple-negative breast carcinoma, TNBC) 是乳腺癌中预后最差的一种类型^[2],其组织学分级高,恶性程度高,且无法进行内分泌治疗和分子靶向治疗控制病情进展,因此更容易出现复发转移,肺、骨和肝脏占乳腺癌转移的 80% 以上^[3],其中内脏(肺和肝)转移的危害性更大,预后更差。转移性 TNBC 患者如果仅接受化疗,其中位无进展生存期 < 4 个月^[2]。因此,防治三阴性乳腺癌的复发转移是目前乳腺癌研究的热点和难点。我国女性乳腺癌发病率和美国相似,居女性肿瘤发病首位,且发病有年轻化的趋势^[4]。据报道,中国女性乳腺癌患者 80% 以上在肿瘤治疗过程中使用中药^[5]。但我国乳腺癌的总体复发、转移率并未有明显降低,生存期也无延长。因此,亟需从新的视角,探索中医药防治乳腺癌复发转移的思路和方法。近年研究多为中药提取物或中药单体成分对乳腺癌细胞凋亡或细胞信号通路的影响^[6-7],临床应用中医药降低复发、转移及延长生存期的相关报道暂缺。因此,本课题致力于应用中医药防治乳腺癌转移的研究,并选择三阴性乳腺癌为研究重点。

健脾疏肝抗毒汤是南京中医药大学附属医院临床经验方,方中党参、黄芪、白术、茯苓、山药补气健脾,柴胡、郁金、白芍、香附疏肝理气,佐以夏枯草、半枝莲清肝解毒,全蝎解毒抗毒,清除余邪,诸药合用共奏健脾疏肝抗毒作用,从而发挥抑制乳腺癌生长

及转移作用。本实验选择人三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞,稳定转染带有绿色荧光质粒后成为 MDA-MB-231-pAcGFP,将其接种至皮下制作异种移植瘤模型,应用中药健脾疏肝抗毒汤进行干预,观察其抑制肿瘤生长及脏器转移的情况。

1 材料

1.1 药物 健脾疏肝方由党参 20 g,黄芪 15 g,白术 15 g,茯苓 12 g,山药 20 g,柴胡 6 g,郁金 15 g,白芍 10 g,香附 10 g,夏枯草 15 g,半枝莲 15 g,全蝎 6 g,甘草 6 g 组成,购自江苏省中医院中药房,由江苏省中医院祁乃喜主任药师鉴定为正品。趋化因子基质细胞衍生因子-1 (CXCL12) 特异受体 (CXCR4) 抑制剂 ADM3100 (Sigma 公司,批号 A5602-5MG)。

1.2 动物 SPF 级 BALB/c 裸小鼠,雌性各半,体重 18 ~ 22 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,合格证号 SCXK(沪)2007-0005。饲养于南京先声药业有限公司,由南京百家汇科技创业社区有限公司实验动物管理和使用委员会(编号 BSK-046-00)批准,符合实验动物伦理委员会指导原则。

1.3 瘤株 人 MDA-MB-231 乳腺癌细胞株由复旦大学附属肿瘤医院馈赠,培养使用含 10% 胎牛血清,1% 链/青霉素的 RPMI 1640 培养基,置 37 °C 5% CO₂ 培养箱培养。

1.4 试剂和仪器 10% 胎牛血清 (ExCell Biology 公司,批号 FSS500); 1% 链/青霉素的 RPMI 1640 培养基,0.25% 胰蛋白酶(南京凯基生物科技发展有限公司,批号分别为 2014708,20140612); 质粒 pAcGFP1-c1 (Clontech 公司,批号 632470); 质粒提取试剂盒 (Ab-land Scientific 公司,批号 20140602); 遗传霉素 G418 (Calbiochem 公司,批号 108321-42-2)。

XD-101 型 CO₂ 培养箱(日本 Sanyo 公司), IX51 型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司), FACS Calibur 型流式细胞仪(美国 Becton-Dickinson 公司), Maestro 2 Maestro EX-RR0 型荧光成像系统(美国 CRI 公司)。

2 方法

2.1 质粒转染 细胞转染和筛选转染前 18 h, 取处于对数生长期的 MDA-MB-231 细胞, 常规胰酶消化后接种于 6 孔培养板中, 每孔 1×10^5 个细胞。待细胞融合至 70% ~ 80% 时, 准备进行转染。取 pAcGFPI-cl 真核表达质粒 2 μ L, 加入无血清 RPMI1640 98 μ L 中, 直接加入 Fugene HD[®] Transfection Reagent 3 μ L, 弹击混匀, 室温放置 15 min, 然后将其逐滴加入到 6 孔板中, 最后将培养板置于培养箱中继续培养。转染 MDA-MB-231 细胞 24 h 后, 在倒置荧光显微镜下, 部分 MDA-MB-231 细胞中可见到绿色荧光较为均匀地分布于整个细胞内。此后每隔 24 h, 于倒置荧光显微镜下观察 pAcGFPI-cl 的表达情况, 随着时间的延长, 发射绿色荧光的 MDA-MB-231 细胞数量增多。转染 72 h 后, 大约 50% 的 MDA-MB-231 细胞内均可见绿色荧光, 用含 600 mg·L⁻¹ G418 的细胞培养液筛选细胞 2 周, 贴壁细胞中发光细胞数大大增加。继而采用有限稀释法, 获得高表达 pAcGFP 的单克隆细胞株, 扩大培养并传至 10 代以上命名为 MDA-MB-231-pAcGFP。

2.2 流式细胞仪检测 pAcGFPI-cl 转染率 将对数生长期的 MDA-MB-231 和 MDA-MB-231-pAcGFP 经胰蛋白酶消化后, 收集细胞悬液, 于室温下 1 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 1 次, 各取 1×10^6 个细胞用流式细胞仪检测 pAcGFPI-cl 转染率, 重复 3 次。

2.3 模型制备 取对数生长期的 MDA-MB-231-pAcGFP 细胞, 调整细胞悬液密度为 1×10^7 个/mL, 以每只 0.1 mL 接种于裸小鼠右侧腋窝皮下。接种后在无菌层流棚内常规饲养。

2.4 分组及给药 用游标卡尺测量裸鼠移植瘤直径, 肿瘤体积 50 ~ 75 mm³ 时, 随机分为 4 组, 每组 6 只。模型组灌胃(ig)生理盐水 0.2 mL/次, 健脾疏肝抗毒组 ig 健脾疏肝抗毒汤 20 g·kg⁻¹, CXCR4 抑制剂(ADM3100)组腹腔注射 ADM3100 1.25 mg·kg⁻¹, 联合组 ig 健脾疏肝抗毒汤联合腹腔注射 CXCR4 抑制剂组, 均 2 次/d, 共 14 d。观察各组裸鼠一般生长状况, 包括体重、进食、精神状态等。

末次给药后 24 h, 脱臼处死裸鼠, 并手术剥取瘤块称重, 手术分离肺脏、肝脏、肾脏。

2.5 抑瘤率计算 用游标卡尺测量裸鼠移植瘤长径和横径, 计算肿瘤体积(V), $V = 1/2 \times \text{长径} \times \text{短径}^2$ 。计算其体积, 绘制肿瘤生长曲线, 游标卡尺测量肿瘤末次给药后 24 h, 颈椎脱臼法处死裸鼠, 肿瘤标本取样并称重。肿瘤生长抑制率 = (给药组平均瘤重 - 模型组平均瘤重)/模型组平均瘤重 $\times 100\%$ 。

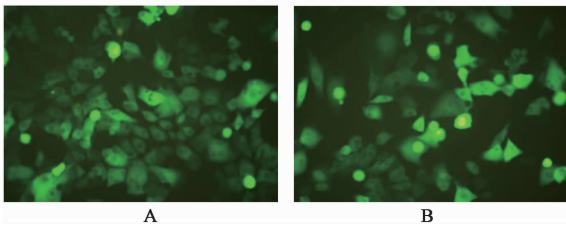
2.6 中药提取 健脾疏肝抗毒汤(党参 20 g, 黄芪 15 g, 白术 15 g, 茯苓 12 g, 山药 20 g, 柴胡 6 g, 郁金 15 g, 白芍 10 g, 香附 10 g, 夏枯草 15 g, 半枝莲 15 g, 全蝎 6 g, 甘草 6 g)10 倍量的药材共 1 650 g, 经粉碎至 40 目, 用蒸馏水提取 2 次, 第 1 次加入 10 倍量蒸馏水回流提取 2 h, 第 2 次加入 8 倍量蒸馏水回流提取 1.5 h, 合并 2 次提取物。将水提液浓缩至含生药 2 g·mL⁻¹, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。根据人鼠剂量转换系数^[8]换算裸鼠每日剂量为 20 g·kg⁻¹。

2.7 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 数据间两两比较用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 稳定高表达 pAcGFPI-cl 细胞株的筛选 转染 MDA-MB-231 细胞 24 h 后, 随着时间的延长, 发射绿色荧光的 MDA-MB-231 细胞数量增多, 转染 72 h 时, 大约 50% 的 MDA-MB-231 细胞内均可见绿色荧光。此后, 随着 G418 的使用和培养时间的延长, 经 14 d 后, 贴壁细胞中发光细胞数增加。继而采用有限稀释法, 获得高表达 pAcGFP 的单克隆细胞株, 扩大培养并传至 10 代以上命名为 MDA-MB-231-pAcGFP。于倒置荧光显微镜下可见绿色荧光均匀分布于表达 pAcGFPI-cl 的 MDA-MB-231-pAcGFP 细胞中。见图 1。采用流式细胞仪检测荧光细胞转染率, 重复 3 次, 荧光细胞转染率约为 96.45%。

3.2 健脾疏肝抗毒汤对各组小鼠一般状态的影响 随着实验时间的延长, 荷瘤鼠精神状态、食欲均不同程度地下降, 无腹泻、呕吐等症状, 各组体重增长缓慢, 与模型组比较, 健脾疏肝抗毒汤组, CXCR4 抑制剂组, 联合组体重无显著增加趋势。实验结束时模型组体重(25.5 \pm 0.9)g, 健脾疏肝抗毒汤组荷瘤鼠平均体重为(25.1 \pm 0.7)g, CXCR4 抑制剂组体重为(24.1 \pm 0.8)g, 联合组平均体重(25.0 \pm 0.7)g。实验结束时各组裸鼠体重无明显差异。见图 2。



A. 转染后 72 h; B. 转染后 14 d

图 1 表达 pAcGFPI-cl 的 MDA-MB-231 细胞 (荧光显微镜, $\times 200$)
Fig. 1 MDA-MB-231 cells with pAcGFPI-cl (LSCFM, $\times 200$)

3.3 健脾疏肝抗毒汤对各组小鼠瘤体质量、体积及抑瘤率的影响 药物干预 14 d 后,健脾疏肝抗毒汤组, CXCR4 抑制剂组及联合组荷瘤小鼠平均瘤质量及瘤体体积均明显低于模型组 ($P < 0.05$), 3 组

表 1 健脾疏肝抗毒汤对各组小鼠瘤体质量、体积及抑瘤率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

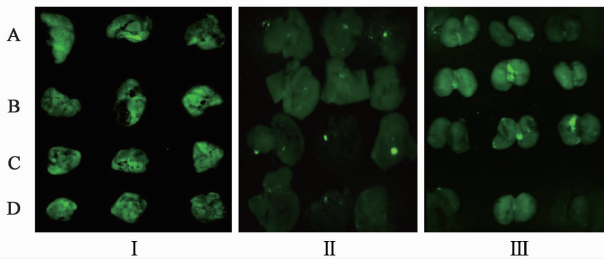
Table 1 Effect of JSKD on tumor volume, tumor weight and tumor inhibition rate of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	瘤质量/g	瘤体积/ cm^3	抑瘤率/%
模型	-	1.30 ± 0.11	6.635 ± 0.500	-
健脾疏肝抗毒汤	20	$0.75 \pm 0.12^{2)}$	$4.017 \pm 0.466^{1)}$	42.18 ²⁾
CXCR4	$1.25^{3)}$	$0.48 \pm 0.09^{2)}$	$2.664 \pm 0.700^{2)}$	62.95 ²⁾
联合	$20 + 1.25^{3)}$	$0.44 \pm 0.07^{2)}$	$2.323 \pm 0.492^{2)}$	66.28 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; ³⁾ 表示 CXCR4 的剂量单位为 $mg \cdot kg^{-1}$ 。

3.4 健脾疏肝抗毒汤对各组小鼠脏器转移的影响

采用 CRI Maestro 活体荧光成像系统观察移植瘤的大小及脏器转移瘤的数目和大小,激发波长为 455 nm,质粒波长为 480 ~ 560 nm。各组肺组织,未见发荧光的转移灶。模型组及 CXCR4 抑制剂组肝脏均可见散在的荧光转移灶,健脾疏肝抗毒汤组肝脏则未见任何荧光聚集灶。各组肾脏未见有任何转移灶。见图 3。



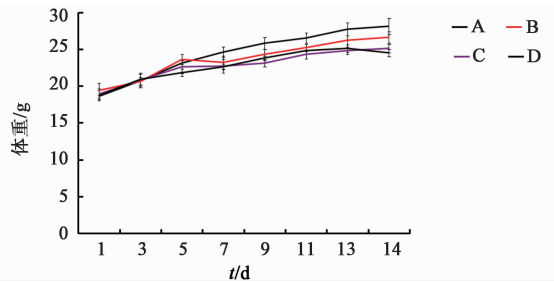
I. 肺脏; II. 肝脏; III. 肾脏

图 3 健脾疏肝抗毒汤对各组小鼠脏器转移的影响 (荧光成像)

Fig. 3 Effect of JSKD on metastases in organs of mice (fluorescence imaging)

4 讨论

三阴性乳腺癌除了手术和化疗,无针对性的内分泌治疗和分子靶向治疗可以控制病情进展,因此,应用中医药防治三阴性乳腺癌的复发转移受到越来越



A. 模型组; B. 健脾疏肝抗毒汤组; C. CXCR4 抑制剂 (ADM3100) 组; D. 联合组 (图 3 同)

图 2 健脾疏肝抗毒汤对各组小鼠体重的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effect of Jianpi Shugan Kangdu decoction (JSKD) on weight of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

的抑瘤率均显著高于模型组 ($P < 0.01$)。见表 1。

越多的重视。

《金匱要略·脏腑经络先后病脉证》谓:“夫治未病者,见肝之病,知肝传脾,当先实脾”,强调掌握疾病传变规律,运用多种手段防止疾病的发展和传变,即“既病防变”。“经络所过,主治所及”,经络是病邪侵入体内,传变的依托。乳腺癌发生的部位在乳腺,在发病过程中“肝”的功能失调如肝气郁结,肝气不舒对其发生发展有重要的作用^[9],同时乳房也是足厥阴肝经,足阳明胃经的巡行位点^[10]。基于此理论基础,制定了健脾疏肝抗毒汤防治乳腺癌生长及转移。应用疏肝与健脾相结合,使肝气得疏,脾得健运,经络畅通,痰瘀自然消散从而抑制乳腺癌的发生发展。乳癌既已发生,癌毒必定蛰伏体内,癌毒之邪为最毒之邪,其性走窜,易乘虚鸱张而余薪复燃,四行旁窜。因此,务求清除毒邪以达“祛邪以扶正”之目的。本研究将“健脾”、“疏肝”、“抗毒”相结合,从不同的途径去控制乳腺癌的生长和转移。健脾疏肝抗毒汤是临床经验方,为进一步证实,本研究采取动物实验观察健脾疏肝抗毒汤的体内抗肿瘤活性。本研究建立转染有绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 标记的三阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 移植瘤鼠,观察健脾疏肝抗毒汤对移植瘤生长及脏器转移的抑制作用。裸鼠异种移植

瘤模型与临床有一定的相关性,对临床疗效有重要的参考价值。

GFP 标记技术是近年来迅速发展的一种新型细胞示踪技术,GFP 可在多种异源生物中表达且无细胞毒性。GFP 荧光强度高、信号强、受外界环境影响小、显影相对简单等优点,GFP 表达的肿瘤细胞与亲代细胞的转移性相比没有差别,利用 GFP 显影研究肿瘤的生物特性,器官转移十分可靠^[11]。本研究将 pAcGFPI-cl 真核表达载体转染人乳腺癌细胞 MDA-MB-231,经过 G418 抗性筛选、克隆及扩增后,获得稳定表达 pAcGFPI-cl 的人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231-pAcGFPI-cl,流式细胞检测其转染率高达 95.6%。在正式实验开展之前,根据相关文献检索的结果^[12-13],本实验选择裸鼠皮下移植瘤模型预实验,将稳定表达 pAcGFPI-cl 的 MDA-MB-231-pAcGFP 株注射至裸鼠腋窝皮下,并观察其生长情况,预实验显示肿瘤生长情况较好,造模成功,证明腋下种植肿瘤是可行的,可以形成 MDA-MB-231-pAcGFP 移植瘤模型鼠,成瘤率为 100%。给予健脾疏肝抗毒汤干预后,移植瘤生长受到显著抑制,健脾疏肝组移植瘤体积及质量明显低于模型组。

研究表明 CXCR4^[3]在人类乳腺癌细胞系,乳腺癌原发灶及其转移灶的表达水平显著高于正常乳腺细胞,而其配体 SDF-1 (CXCL12),在乳腺癌常见转移器官肺、肝、骨髓、淋巴结中高水平表达 CXCR4,与 SDF-1 相互作用支配乳腺癌细胞进行多步骤、有序的转移模式^[5,14-16]。CXCR4 抑制剂可以抑制三阴性乳腺癌的转移并能增强化疗的疗效^[17]。在本实验中发现 CXCR4 抑制剂具有抑制三阴性乳腺癌细胞株移植瘤的生长,同时还可增强健脾疏肝抗毒汤的抗肿瘤作用。荧光检测发现健脾疏肝抗毒汤肝脏未见任何荧光聚集灶即转移灶,而在单纯 CXCR4 抑制剂组,模型组均可见散在的荧光聚集灶,说明健脾疏肝抗毒汤不仅具有抑制移植瘤的生长,还可以抑制乳腺癌肝转移的作用。从而也进一步证实根据脏腑传变理论,制定防治乳腺癌肝转移策略的可行性。当然,肿瘤的生长及转移是一个极其复杂的过程,对于中医药防治肿瘤的相关机制尚需更深入的研究。

【参考文献】

[1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013[J]. CA Cancer J Clin,2013,63(1):11-30.
[2] Nabi M G, Ahangar A, Wahid M A, et al. Clinicopathological comparison of triple negative breast cancers with non-triple negative breast cancers in a

hospital in North India[J]. Niger J Clin Pract,2015,18(3):381-386.
[3] 邵志敏. 乳腺癌肺转移:机制研究和临床转化[J]. 中华乳腺病杂志:电子版,2011,5(4):392-395.
[4] 段纪俊,严亚琼,杨念念,等. 中国恶性肿瘤发病与死亡的国际比较分析[J]. 中国医学前沿杂志,2016,8(7):21.
[5] CHEN Z, GU K, ZHENG Y, et al. The use of complementary and alternative medicine among Chinese women with breast cancer[J]. J Altern Complement Med,2008,14(8):1049-1055.
[6] Muller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis[J]. Nature,2001,410(6824):50-56.
[7] LIANG Z, Brooks J, Willard M, et al. CXCR4/CXCL12 axis promotes VEGF-mediated tumor angiogenesis through Akt signaling pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun,2007,359(3):716-722.
[8] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2002:202-203.
[9] 胡金萍. 中医药治疗乳腺癌浅述[J]. 中国中医药,2015,13(9):120-122.
[10] 王兵,侯炜,赵彪,等. 朴炳奎教授辨治乳腺癌临床经验探析[J]. 环球中医药,2013,6(8):627-629.
[11] 龙鼎新,李小玲,温元武. 稳定表达绿色荧光蛋白的 COS7 细胞系的筛选和鉴定[J]. 中南医学科学杂志,2012,40(1):11-14.
[12] 曹让娟,翟艳华,卿旭,等. 乳腺癌细胞 MDA-MB-231 肺转移模型的建立及其评价[J]. 吉林大学学报:医学版,2011,37(3):403-405.
[13] 薛敬礼,李小民,毕红征,等. 人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞裸鼠移植瘤模型的建立及生物学特性研究[J]. 四川动物,2006,25(3):635-636.
[14] HOU X, YUAN X, ZHANG B, et al. Screening active anti-breast cancer compounds from Cortex Magnolia of ficinalis by 2D LC-MS[J]. J Sep Sci,2013,36(4):706-712.
[15] WANG X F, ZHOU Q M, DU J, et al. Baicalin suppresses migration, invasion and metastasis of breast cancer via p38 MAPK signaling pathway[J]. Anticancer Agents Med Chem,2013,13(6):923-931.
[16] Mukherjee D, ZHAO J. The role of chemokine receptor CXCR4 in breast cancer metastasis[J]. Am J Cancer Res,2013,3(1):46-57.
[17] XIANG J, Hurchla M A, Fontana F, et al. CXCR4 protein epitope mimetic antagonist POL5551 disrupts metastasis and enhances chemotherapy effect in triple-negative breast cancer[J]. Mol Cancer Ther,2015,14(11):2473-2485.

【责任编辑 张丰丰】