

左归丸抗乳腺癌转移及其作用机制

邹乐兰¹, 刘红宁², 吕红³, 徐焕军⁴, 朱小翠⁴, 张舟妙⁴, 付剑江^{4*}

(1. 南昌大学医院, 南昌 330031; 2. 江西中医药大学中医基础理论分化发展研究中心, 南昌 330004;
3. 江西中医药大学网络与教育技术中心, 南昌 330004; 4. 江西中医药大学药学院, 南昌 330004)

[摘要] **目的:**观察左归丸的抗乳腺癌转移作用,探讨其作用机制。**方法:**采用股骨内注射法建立人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 骨转移裸鼠模型,受试裸鼠随机分为空白组(蒸馏水),左归丸低、高剂量(21,42 g·kg⁻¹)组。连续给药 8 周后,采用巢式聚合酶链式反应(PCR)检测裸鼠骨髓组织中人细胞角蛋白(ck19)基因的表达,确定肿瘤转移情况;采用 Oris 法,检测左归丸含药血清对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 体外迁移能力的影响;采用重组基底膜侵袭法,观察左归丸含药血清的体外抗侵袭作用;采用 Alexa Fluor488[®] 标记的鬼笔环肽(Phalloidin)进行荧光染色,观察左归丸含药血清对乳腺癌细胞纤维型肌动蛋白(F-actin)聚合的影响;采用蛋白质印迹法(Western blot)检测左归丸含药血清对 MDA-MB-231 细胞甲状旁腺激素相关蛋白(PTHrP)和 4 型趋化因子受体(CXCR4)表达的影响。**结果:**与空白组比较,左归丸高、低剂量均可显著抑制小鼠骨髓组织中人 ck19 基因表达($P < 0.01$)。Oris 迁移表明,左归丸含药血清可显著抑制转化生长因子- β (TGF- β)诱导的 MDA-MB-231 细胞迁移;重组基底膜侵袭实验显示,左归丸含药血清也可显著抑制乳腺癌细胞对重组基底膜的侵袭能力。给药组侵袭细胞数较空白组显著降低($P < 0.01$)。Phalloidin 荧光染色结果显示,左归丸含药血清可显著抑制 F-actin 聚合,抑制 F-actin 聚合体的形成。Western blot 结果表明,左归丸含药血清可显著抑制乳腺癌细胞 PTHrP, CXCR4 蛋白表达。**结论:**左归丸具有明显的抗乳腺癌骨转移作用,其机制与抑制肿瘤细胞 PTHrP, CXCR4 表达,从而直接抑制其体外运动活性相关。

[关键词] 左归丸; 破骨性骨转移; 乳腺癌; 甲状旁腺激素相关蛋白

[中图分类号] R284.1; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)23-0085-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2017230085

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170906.1412.062.html>

[网络出版时间] 2017-09-06 14:12

Anti-metastatic Effect of Zuoguiwan on Breast Cancer Cells and Its Mechanisms of Action

ZOU Le-lan¹, LIU Hong-ning², LYU Hong³, XU Huan-jun⁴, ZHU Xiao-cui⁴,
ZHANG Zhou-miao⁴, FU Jian-jiang^{4*}

(1. Nanchang University Hospital, Nanchang 330031, China; 2. Research Center for Differentiation and Development of Traditional Chinese Medicine (TCM) Basic Theory, Jiangxi University of TCM Nanchang 330004, China; 3. Network and Education Technology Center, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China; 4. School of Pharmacy, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-metastatic effect of Zuoguiwan and its mechanisms of action. **Method:** The bone marrow metastasis mode of nude mice was established by intra-femoral injection. The tumor-bearing mice were randomly divided into three groups: control group, low-dose Zuoguiwan (21 g·kg⁻¹ per day) treatment group and high-dose Zuoguiwan (42 g·kg⁻¹ per day) treatment group. After successive administration for 8 weeks, the expression of human ck19 gene was detected by nest polymerase chain reaction

[收稿日期] 20170331(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81560639,81660680);江西省自然科学基金项目(20171BAB205097)

[第一作者] 邹乐兰,主治医师,从事临床内科工作, Tel:0791-87118901, E-mail:jianghong_6666@126.com

[通讯作者] *付剑江,博士,教授,从事中药抗肿瘤药理工作, Tel:0791-87118919, E-mail:jianjiang_fu@yeah.net

(PCR) assay to determine the metastatic foci of MDA-MB-231 cells in bone marrow. Oris migration assay was performed to determine the effect of Zuoguiwan-containing sera on the migration of MDA-MB-231 cells. Reconstituted basement membrane invasion assay was conducted to decide the effect of Zuoguiwan-containing sera on the invasion of MDA-MB-231 cells. F-actin polymerization was detected with Alexa Fluor® 488 phalloidin and fluorescence microscopy. The effect of Zuoguiwan-containing sera on parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4) expressions in MDA-MB-231 was determined by Western blot assay. **Result:** Compared with control group, both low-dose Zuoguiwan group and high-dose Zuoguiwan group exhibited a significant suppression on the expression of ck19 gene in bone marrow of tumor-bearing mice ($P < 0.01$). Data from Oris migratory assay showed that Zuoguiwan-containing sera inhibited transforming growth factor-beta ($TGF-\beta$)-induced migration in MDA-MB-231 cells significantly. It was also found that the invasive ability of MDA-MB-231 cells through reconstituted basement membrane was inhibited by Zuoguiwan-containing sera in reconstituted basement membrane invasion assay. The amount of invaded cells in Zuoguiwan-containing sera treatment groups was less than that in control group obviously ($P < 0.01$). Data from fluorescence assay showed that Zuoguiwan-containing sera inhibited F-actin polymerization of breast cancer cells. It was also showed that Zuoguiwan-containing sera suppressed the expressions of PTHrP and CXCR4 in Western blot assay, significantly. **Conclusion:** Zuoguiwan has a significant anti-metastatic effect on breast cancer cells. Its mechanism of action is correlated with the suppression on motility of breast cancer cells, and the down-regulation of PTHrP and CXCR4 expressions.

[**Key words**] Zuoguiwan; osteolytic metastasis; breast cancer; parathyroid hormone-related protein

转移性骨肿瘤是晚期癌症常见并发症之一,常见于乳腺癌、肺癌和前列腺癌^[1-2]。骨转移常预示患者生活质量的下降和生存期的缩短,同时引起骨相关事件(SRE)概率也显著增高,常见的如骨痛、病理性骨折、脊髓压迫、高钙血症及相关治疗带来的痛苦等,严重影响患者的生活质量^[3]。因此,在控制原发疾病的同时,积极预防和治疗骨转移也显得特别重要。

依据其临床表现,转移性骨肿瘤可归属中医学“骨瘤”、“骨痹”、“骨蚀”等范畴^[4]。依据“肾主骨”理论,骨转移癌的发病多为肾气衰微、生髓乏源、不能养髓生骨所致。因此,补肾壮骨是其主要治疗法则。左归丸是滋阴补肾法的代表方剂,出自明代温补名家张景岳的《景岳全书》^[5]。左归丸对于骨质疏松等骨吸收异常类疾病具有较好的疗效,但对于同属骨吸收异常的破骨性骨转移癌则未见相关研究报道。为了解左归丸的抗骨转移作用,本文就左归丸的抗乳腺癌骨转移作用做了探索。

1 材料

1.1 药物 左归丸方药组成和用量参照《景岳全书》中的药味组成及用量折算,详细方药配比及煎煮方法参照文献[6]。

1.2 试剂 QIAshredder, RNeasy Protect Mini 试剂盒, OneStep RT-PCR 试剂盒, Multiplex PCR 试剂盒

(德国 Qiagen 公司,批号分别为 79656, 74124, 210210, 206143); ProteoPrep® 总蛋白提取试剂盒, 鬼笔环肽 (Phalloidin) (美国 Sigma-Aldrich 公司,批号分别为 414077, 15282); Oris 迁移试剂盒 (美国 Platypus 公司,批号 15717); matrigel (美国 BD 公司,批号 214087); 小鼠甲状旁腺激素相关蛋白 (PTHrP), 4 型趋化因子受体 (CXCR4) 单克隆抗体, HRP 标记的山羊抗小鼠免疫球蛋白 (Ig) G (美国 Santa Cruz 公司,货号分别为 sc-53936, sc-12764, sc-2005)。β-肌动蛋白 (β-actin, 美国 Affinity Biologicals 公司,批号 T0022)。

1.3 仪器 Mastercycler gradient 型 PCR 仪 (德国 Eppendorf 公司); EC3 型凝胶成像系统 (美国 UVP 公司); ELx800 型酶标仪 (美国 BioTek 公司); BX63 型正置显微镜 (日本 Olympus 公司); DMI3000B 型荧光倒置显微镜 (德国 Leica 公司); PowerBasic 型基础性电源, MiniPROTEAN3 小型垂直电泳槽以及小型 Trans-blot 转印槽 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.4 细胞株及细胞培养 人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 细胞,购自中国医学科学院基础医学研究所细胞库。人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 细胞培养于含 10% 胎牛血清、青霉素 ($100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和链霉素 ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 DMEM 培养基中培养,置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 培养箱内,3~4 d 传代 1 次。

1.5 动物 体重 18 ~ 22 g 的雌性 BALB/c Nu 裸鼠购自于北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2012-0001。所有动物实验操作均严格按照江西中医药大学实验动物伦理委员会批准的实验方案(批准号 20150033)执行。

2 方法

2.1 乳腺癌骨转移动物模型 收集对数生长期的 MDA-MB-231 细胞,调整细胞密度为 5×10^8 个/mL。取 BALB/c Nu 裸鼠 30 只,用 1% 戊巴比妥钠进行腹腔注射麻醉。动物麻醉后取仰卧位固定在小鼠固定板上,酒精棉球常规消毒小鼠左腿,0.1 mL Hamilton 注射器抽吸细胞悬液 20 μ L 刺入股骨近段骨髓腔。1 周后,重复上述股骨内注射过程。最后 1 次注射 4 周后开始给药。上述股骨注射后的小鼠随机分为空白组、左归丸低剂量组(灌胃给予左归丸 $21 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,相当于人用剂量)和左归丸高剂量组(灌胃给予左归丸 $42 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,相当于人用剂量的 2 倍),空白组则给予同体积蒸馏水,每天 1 次,连续给药 8 周。末次给药 24 h 后,处死裸鼠,无菌剥离双侧股骨,用无菌 RNALater 将骨髓冲出。参考文献[6]方法,采用巢式 PCR 检测裸鼠骨髓组织中人源 ck19 的表达量,以确定骨转移程度。ck19 (GenBank number: BC010409)目标引物采用 Primer Designer (Scientific & Educational Software Version 2.0)设计,外引物:上游 5'-CCACGTCGTCCTTCGGAGGCC-3' (64 ~ 84 bp),下游 5'-GTTCTCAAACCTGGTTC-3' (529 ~ 549 bp);内引物:上游 5'-TACAGCCACTACTACACGACCATCC-3' (432 ~ 456 bp),下游 5'-GGACAA TCCTGGAGTTCTCAATG-3' (488 ~ 510 bp); β -肌动蛋白(β -actin) (54 bp):上游 5'-GTGGGGCGCC CCAGGCACCA-3',下游 5'-CTTCCTTAATGTCAVGC ACGATTTC-3'。均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

2.2 左归丸含药血清制备 取雌性 SD 大鼠 20 只,随机分为正常组和左归丸组,每组 10 只。参照文献[6]方法制备左归丸含药血清和正常大鼠血清, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

2.3 乳腺癌细胞体外迁移 利用 OrisTM 细胞迁移检测试剂盒检测左归丸对 MDA-MB-231 细胞体外迁移能力的影响。在 OrisTM 细胞培养板中插入 Stopper。取对数生长期的细胞用胰酶消化后配制成密度为 8×10^4 个/mL 的悬液,并加入 OrisTM 培养板中,每孔 100 μ L。随后将培养板置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 温箱内孵育 5 h。待细胞贴壁后,将培养板中的

Stopper 拔出,并小心更换含有不同浓度含药血清以及 TGF- β 的培养液,溶剂组,10% 胎牛血清;空白组,10% 正常大鼠血清;模型组,TGF- β ($10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) + 10% 正常大鼠血清;BB-94 组,TGF- β ($10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) + 10% 正常大鼠血清组 + BB-94 ($20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$);左归丸低浓度组,TGF- β ($10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) + 5% 正常大鼠血清 + 5% 左归丸含药大鼠血清;左归丸高浓度组,TGF- β ($10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) + 10% 左归丸含药血清;继续培养 48 h。样品处理结束后,所有孔中均加入 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 结晶紫溶液,染色 30 min, PBS 洗涤后,倒置显微镜下拍照并观察细胞的迁移情况。

2.4 乳腺癌细胞体外侵袭实验 参照文献[6]方法,利用 AP48 Chamber (Neuro Probe Inc., Gaithersburg, MD) 进行重组基底膜体外侵袭实验。用 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ matrigel 包被 PVPF 滤膜。在 AP48 chamber 的下孔内加入含 0.1% BSA 的无血清 DMEM 培养基,每孔 30 μ L。装好 chamber,收集对数生长期的肿瘤细胞,以 0.1% BSA 无血清 DMEM 培养基重悬细胞,并将细胞调整至 2×10^6 个/mL。在上述 chamber 的上孔中加入含有适当浓度含药血清的细胞悬液。细胞加药,溶剂组,10% 胎牛血清;空白组,10% 正常大鼠血清;BB-94 组,10% 正常大鼠血清 + $20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ BB-94;左归丸低浓度组,5% 正常大鼠血清 + 5% 含药大鼠血清;左归丸高浓度组,10% 含药大鼠血清,每孔 100 μ L,并置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 温箱内继续孵育 14 h。培养结束后,将 chamber 取出,拆下滤膜,用甲醇固定 10 min, $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 结晶紫溶液染色 30 min,水洗,用棉签擦除未穿膜的细胞,并固定于载玻片上,于 200 倍正置显微镜下拍照并计数侵袭细胞数,每孔计数上、中、下、左、右 5 个不同视野的透过细胞数,计算平均值,每组平行设 3 孔。

2.5 对细胞骨架蛋白(F-actin)的影响 对数生长期的 MDA-MB-231 细胞,经胰酶消化后,定容至 2×10^6 个/mL。取上述细胞悬液 200 μ L,加入 8 孔 chamber slide 中,并置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 温箱内培养 24 h。培养结束后,小心更换含有不同浓度的含药血清以及 TGF- β ,细胞加药同 2.4 项,继续培养 3 d。待细胞生长融合至 50% 左右时,弃去培养基, PBS 洗涤后,加入含 0.1% FBS 培养基继续培养 2 h,以剥夺各组细胞血清。培养结束后,拔除 chamber slide 上的 chamber,在 slide 上加入 Alexa Fluor488[®] Phalloidin,避光孵育 15 min,荧光正置显微镜下观察左归丸对 F-actin 形态的影响。

2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测蛋白表达

细胞进行培养和加药,空白组,10% 正常大鼠血清;左归丸低浓度组,5% 空白大鼠血清 + 5% 含药大鼠血清;左归丸高浓度,10% 含药大鼠血清。参照蛋白提取试剂盒操作说明,依次提取各处理组的 MDA-MB-231 细胞和培养上清液中的总蛋白,并测细胞裂解产物的蛋白含量,取等量蛋白在 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳,经转膜、封闭后,加入一抗 ($1:500 \sim 1:1\ 000$), $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。一抗孵育结束后,经 TTBS 缓冲液洗涤,加入二抗,室温孵育 1 h。孵育抗体后的硝酸纤维素膜经 TTBS 洗涤后,加入 3,3-二氨基联苯胺 (DAB) 显色剂显色,并在 EC3 型凝胶成像系统中拍照,以目的蛋白灰度值/内参灰度值表示蛋白相对表达量。

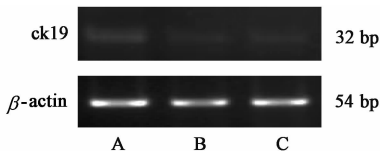
2.7 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件包进行分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析,方差齐性采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 左归丸对裸鼠骨转移的影响

人乳腺癌细胞股骨内注射模型动物给予左归丸后,与空白组比较,左归丸可显著降低裸鼠骨髓组织中 *ck19* 基因表达 ($P < 0.01$),提示左归丸可显著抑制乳腺癌细胞在骨髓组织中形成转移灶的能力。见图 1,表 1。



A. 空白组; B, C. 左归丸 ($21, 42 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组

图 1 乳腺癌细胞骨转移裸鼠骨髓组织中 *ck19* 基因表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of *ck19* gene expression in breast cancer bone marrow metastatic foci

表 1 左归丸对乳腺癌细胞骨转移动物骨髓组织中 *ck19* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Zuoguiwan on *ck19* mRNA expression in breast cancer bone marrow metastatic foci ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

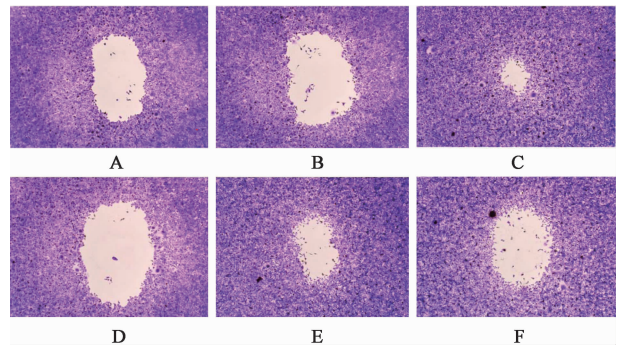
组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	<i>ck19</i> / β -action
空白	-	$1.300\ 0 \pm 0.009\ 1$
左归丸	21	$0.849\ 3 \pm 0.027\ 1^{1)}$
	42	$0.613\ 4 \pm 0.017\ 3^{1)}$

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ (表 2, 3 同)。

3.2 左归丸含药血清对 MDA-MB-231 细胞体外迁移能力的影响

TGF- β 可显著促进 MDA-MB-231 细胞向中央空白区迁移, BB-94 和左归丸含药血清均可抑制 TGF- β 诱导的这种迁移作用,且左归丸含药

血清存在明显的浓度依赖性。见图 2。



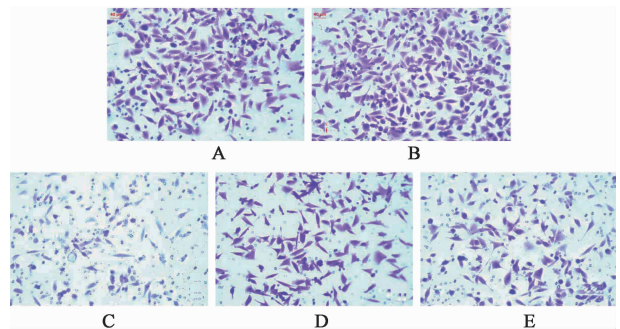
A. 溶剂组; B. 空白组; C. 模型组; D. BB-94 组; E. 左归丸低浓度组; F. 左归丸高浓度组

图 2 左归丸含药血清对 MDA-MB-231 细胞体外迁移能力的影响 (结晶紫, $\times 200$)

Fig. 2 Inhibitory effect of Zuoguiwan on *in vitro* migration of MDA-MB-231 cells (crystal violet, $\times 200$)

3.3 左归丸含药血清对 MDA-MB-231 细胞体外侵袭能力的影响

与空白组比较, BB-94 组和左归丸低、高浓度组侵袭细胞数均有显著下降 ($P < 0.01$)。见图 3, 表 2。



A. 溶剂组; B. 空白组; C. BB-94 组; D. 左归丸低浓度组; E. 左归丸高浓度组 (图 4 同)

图 3 左归丸对 MDA-MB-231 细胞体外侵袭能力的影响 (结晶紫, $\times 400$)

Fig. 3 Inhibitory effect of Zuoguiwan on *in vitro* invasion of MDA-MB-231 cells (crystal violet, $\times 400$)

表 2 左归丸对 MDA-MB-231 细胞体外侵袭能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Inhibitory effect of Zuoguiwan on *in vitro* invasion of MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	浓度	侵袭细胞数/个
溶剂	10% 胎牛血清	395.8 ± 27.4
空白	10% 正常大鼠血清	378.1 ± 49.2
BB-94	10% 正常大鼠血清 + $20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ BB-94	$22.2 \pm 9.4^{1)}$
左归丸	5% 正常大鼠血清 + 5% 含药大鼠血清	$99.7 \pm 26.4^{1)}$
	10% 含药大鼠血清	$45.6 \pm 12.7^{1)}$

3.4 左归丸含药血清对 MDA-MB-231 细胞 F-actin

形成的影响 溶剂组和空白组细胞的 F-actin 聚合良好,排列规则、整齐,细胞生长舒展。与空白组比较,BB-94 组和左归丸组均可显著抑制 F-actin 的聚集,排列不规则,细胞皱缩。见图 4。

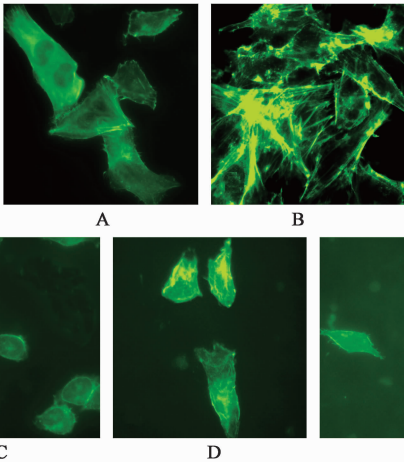
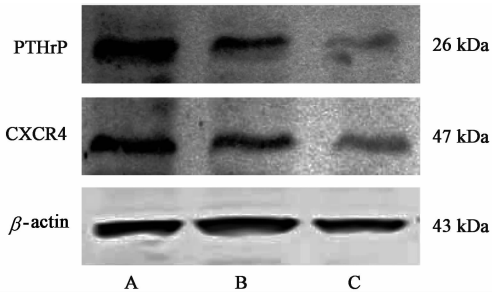


图 4 左归丸含药血清对 MDA-MB-231 细胞 F-actin 形成的影响 (Phalloidin, ×630)

Fig. 4 Inhibitory effect of Zuoguiwan on F-actin formation in MDA-MB-231 cells(Phalloidin, ×630)

3.5 左归丸含药血清对 MDA-MB-231 细胞 PTHrP 和 CXCR4 蛋白表达的影响 与空白组比较,5%,10%左归丸含药血清组的 PTHrP,CXCR4 蛋白相对表达均有显著下降($P < 0.01$)。提示 5%,10%左归丸含药血清均可显著抑制 PTHrP 和 CXCR4 蛋白表达。见图 5,表 3。



A. 空白组;B. 左归丸低浓度组;C. 左归丸高浓度组

图 5 乳腺癌细胞 PTHrP,CXCR4 蛋白表达电泳

Fig.5 Electrophoresis of expression of PTHrP,CXCR4 in MDA-MB-231 cells

4 讨论

恶性肿瘤的骨转移按其病变特征可分为 3 种类型:成骨性、破骨性和混合性,其中破骨性骨转移约占 70%,常见于乳腺癌和肺癌^[7-8]。破骨性骨转移的主要特征是破骨细胞导致的骨吸收异常,表现为破骨性病变,属骨吸收类疾病范畴^[8-9]。近年来,对于破骨性骨转移的发病机制,肿瘤细胞、成骨细胞和

表 3 左归丸对 MDA-MB-231 细胞 PTHrP,CXCR4 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Inhibitory effect of Zuoguiwan on PTHrP, CXCR4 expression of MDA-MB-231 cells($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	浓度	PTHrP / β -actin	CXCR4 / β -actin
空白	10% 正常大鼠血清	3.01 ± 0.09	1.40 ± 0.10
左归丸	5% 正常大鼠血清 + 5% 含药大鼠血清	0.98 ± 0.06 ¹⁾	0.55 ± 0.06 ¹⁾
	10% 含药大鼠血清	0.21 ± 0.03 ¹⁾	0.18 ± 0.02 ¹⁾

破骨细胞之间相互作用的“恶性循环”学说越来越被人们所接受。肿瘤细胞表达的 PTHrP,白细胞介素(IL)-2,IL-6 等蛋白刺激成骨细胞的分化、成熟,后者可通过影响破骨细胞前体细胞的功能,诱导破骨细胞分化、成熟,导致骨吸收异常。而骨吸收的增加则导致更多的储存于骨髓基质中的 TGF- β ,胰岛素样生长因子 1,血小板衍生生长因子以及成纤维细胞生长因子等的释放,这些细胞因子则可进一步刺激肿瘤细胞在骨髓组织内的生长,并直接促进肿瘤细胞释放包括 PTHrP 在内的众多细胞因子,使骨吸收进一步加剧^[9-10]。

左归丸出自明代温补名家张景岳的《景岳全书·新方八阵》,是滋阴补肾法的代表方剂,临床用于骨质疏松等各种骨吸收异常疾病的治疗。然而,对于同样具有骨吸收性异常特点的破骨性骨转移,则未见相关实验室研究报道。因此,课题组前期对左归丸治疗乳腺癌破骨性骨转移的药效做了初步研究,证实了左归丸对乳腺癌细胞诱导的破骨性骨转移的治疗作用及其对破骨细胞活化的抑制作用^[6]。鉴于肿瘤细胞本身在破骨性骨转移中的重要作用,本文考察了左归丸对乳腺癌细胞转移活性的影响,并探讨其作用机制。

本研究显示,左归丸可显著抑制免疫缺陷小鼠股骨内注射乳腺癌细胞诱导的骨转移活性;也可直接在体外抑制乳腺癌细胞的迁移和侵袭,并抑制细胞骨架 F-actin 的聚集。这些结果提示,左归丸可显著抑制乳腺癌诱导的骨转移灶形成,而对乳腺癌细胞体外运动能力的直接抑制可能是其作用环节之一。进一步机制研究提示,左归丸含药血清可显著抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的 PTHrP 和 CXCR4 蛋白表达。

PTHrP 是一种可由多种组织细胞分泌的一种活性因子,它通过自分泌、旁分泌以及细胞内分泌等方式广泛参与机体发育过程和各项生理功能,例如

乳腺和骨骼的发育等^[11-12]。近年来的研究发现,乳腺癌、肺癌、前列腺癌、肾癌等多种肿瘤组织均过度表达 PTHrP, 血浆 PTHrP 水平通常与肿瘤的发展程度密切相关^[13-14]。研究显示,作为重要的破骨细胞活化因子,PTHrP 与恶性肿瘤破骨性骨转移密切相关^[15]。首先,PTHrP 可诱导破骨细胞分化和成熟,促进溶骨性骨吸收。PTHrP 可通过刺激成骨细胞合成和分泌核转录因子- κ B 活化剂(RANKL),后者通过与破骨细胞表面的核转录因子- κ B 激活剂(RANK)结合,诱导破骨细胞成熟和活化,并抑制基质细胞分泌的骨保护素(OPG)与 RANK 结合,从而抑制 OPG 对破骨细胞活化的负调控作用^[16]。另一方面,PTHrP 还可能通过增强乳腺癌细胞的黏附、趋化和迁移能力,促进肿瘤细胞远处转移。乳腺癌细胞通过其表面表达的细胞因子受体(例如 CXCR4)与骨基质细胞分泌的细胞因子(例如 CXCL12)结合,一方面可介导肿瘤细胞与骨基质细胞的黏附,同时也可通过促进 F-actin 聚合和伪足的形成,增强肿瘤细胞的侵袭能力^[17]。而一项来自于骨转移乳腺癌患者的研究表明,骨转移患者的 PTHrP 和 CXCR4 表达具有高度一致性,这一结果也得到了 LI 等^[14]的证实。他们发现,PTHrP 可影响 CXCR4 的表达,并且二者的共同表达对于乳腺癌细胞的转移扩散非常关键。本研究显示,左归丸含药血清可显著抑制 MDA-MB-231 细胞 PTHrP 和 CXCR4 蛋白表达,并具有浓度依赖关系。因此,左归丸的体内抗骨转移作用以及左归丸含药血清的体外抗迁移、侵袭能力可能与其抑制肿瘤细胞表达 PTHrP 和 CXCR4 相关。

综上所述,左归丸可在体内抑制乳腺癌细胞股骨内注射诱导的骨转移灶形成;在体外,左归丸含药血清还可通过抑制细胞骨架 F-actin 的聚合,从而降低其运动能力,其机制可能与左归丸含药血清抑制肿瘤细胞 PTHrP 和 CXCR4 表达有关。

[参考文献]

[1] Tsuzuki S, Park S H, Eber M R, et al. Skeletal complications in cancer patients with bone metastases [J]. *Int J Urol*, 2016, 23(10): 825-832.
[2] Shiozawa Y, Eber M R, Berry J E, et al. Bone marrow as a metastatic niche for disseminated tumor cells from solid tumors [J]. *Bonekey Rep*, 2015, doi: 10.1038/bonekey.2015.57.
[3] Pulido C, Vendrell I, Ferreira A R, et al. Bone metastasis risk factors in breast cancer [J]. *Ecancermedicallscience*, 2017, doi: 10.3332/

ecancer.2017.715.

[4] 冯宇,崔艺馨,徐睿鑫,等. 中医药治疗骨转移癌研究进展[J]. *环球中医药*, 2014, 7(8): 652-655.
[5] 张介宾. 景岳全书[M]. 海口:海南国际新闻出版中心, 1995: 89.
[6] 付剑江,刘婷,墨啸箏,等. 左归丸抗乳腺癌破骨性骨转移机制探讨[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(12): 123-127.
[7] Loftus L S, Edwards-Bennett S, Sokol G H. Systemic therapy for bone metastases [J]. *Cancer Control*, 2012, 19(2): 145-153.
[8] Ren G, Esposito M, Kang Y. Bone metastasis and the metastatic niche [J]. *J Mol Med: Berl*, 2015, 93(11): 1203-1212.
[9] David Roodman G, Silbermann R. Mechanisms of osteolytic and osteoblastic skeletal lesions [J]. *Bonekey Rep*, 2015, doi: 10.1038/bonekey.2015.
[10] Mundy G R. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(8): 584-593.
[11] LI J, DONG S. The signaling pathways involved in chondrocyte differentiation and hypertrophic differentiation [J]. *Stem Cells Int*, 2016, doi: 10.1155/2016/2470351.
[12] Martin T J. Parathyroid hormone-related protein, its regulation of cartilage and bone development, and role in treating bone diseases [J]. *Physiol Rev*, 2016, 96(3): 831-871.
[13] Horseman N D, Hernandez L L. New concepts of breast cell communication to bone [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2014, 25(1): 34-41.
[14] LI J, Karaplis A C, HUANG D C, et al. PTHrP drives breast tumor initiation, progression, and metastasis in mice and is a potential therapy target [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(12): 4655-4669.
[15] Nishihara M, Ito M, Tomioka T, et al. Clinicopathological implications of parathyroid hormone-related protein in human colorectal tumours [J]. *J Pathol*, 1999, 187(2): 217-222.
[16] Karaplis A C, Luz A, Glowacki J, et al. Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone related peptide gene [J]. *Genes Dev*, 1994, 8(3): 277-289.
[17] Kremer R, LI J, Camirand A, et al. Parathyroid hormone related protein (PTHrP) in tumor progression [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2011, doi: 10.1007/978-1-4614-0254-1_12.

[责任编辑 张丰丰]