

乳腺癌术后方通过SDF-1/CXCR4生物轴对MDA-MB-453 乳腺癌细胞增殖和转移的影响

李艳敏, 吴雪卿*, 万华*, 邵士珺, 丁思奇
(上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200021)

[摘要] 目的:以基质细胞衍生因子-1(Stromal cell-derived factor-1, SDF-1)/趋化因子受体4(Chemokine receptor, CXCR4)生物轴为基础,探讨乳腺癌术后含药血清对乳腺癌细胞MDA-MB-453增殖和侵袭能力的影响。方法:建立SDF-1诱导的CXCR4高表达MDA-MB-453细胞模型,制备乳腺癌术后含药血清及空白大鼠血清。实验分空白组,空白大鼠血清组,SDF-1+空白大鼠血清组,SDF-1+乳腺癌术后方组,AMD3100+SDF-1+空白大鼠血清组和AMD3100+SDF-1+乳腺癌术后方组。干预48 h,采用cell counting kit-8(CCK-8)法检测细胞增殖情况,transwell小室实验检测细胞侵袭能力,分别用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞CXCR4,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-2, MMP-9 mRNA及蛋白表达情况。结果:与空白血清组比较,SDF-1为 $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,MDA-MB-453细胞增殖明显,CXCR4 mRNA表达明显增加($P<0.05$);与SDF-1+空白大鼠血清组比较,乳腺癌术后方能抑制SDF-1诱导的MDA-MB-453细胞增殖、侵袭行为,下调CXCR4, MMP-2, MMP-9 mRNA和蛋白表达水平($P<0.05$);经AMD3100预处理24 h,乳腺癌术后方对MDA-MB-453细胞增殖的抑制作用明显增强($P<0.05$);同时,乳腺癌术后方下调CXCR4, MMP-2, MMP-9 mRNA和蛋白表达的作用明显增加($P<0.05$)。结论:乳腺癌术后可通过调控SDF-1/CXCR4生物轴,降低MDA-MB-453细胞MMP-2, MMP-9表达,减少细胞外基质(extracellular matrix, ECM)降解,进而抑制乳腺癌细胞转移的发生;与CXCR4抑制剂AMD3100具有协同效应。

[关键词] 乳腺癌; 乳腺癌术后方; 基质细胞衍生因子-1(SDF-1)/趋化因子受体4(CXCR4)生物轴; 基质金属蛋白酶

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)23-0106-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201977

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200724.1411.002.html>

[网络出版日期] 2020-7-24 14:56

Effect of Ru'ai Shuhou Prescription on Proliferation and Metastasis of Breast Cancer MDA-MB-453 Cells Through SDF-1/CXCR4 Biological Axis

LI Yan-min, WU Xue-qing*, WAN Hua*, SHAO Shi-jun, DING Si-qi

(Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200021, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Ru'ai Shuhou prescription (RSR) drug-containing serum on the proliferation and invasion ability of breast cancer cells MDA-MB-453 based on the biological axis of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/chemokine receptor 4 (CXCR4). **Method:** A model of MDA-MB-453 cells with SDF-1-induced high expression of CXCR4 was established, and the rat drug-serum containing RSR and blank rat serum were prepared respectively. The cells were divided into fetal bovine serum control group (Blank), blank rat serum group, SDF-1+blank rat serum group, SDF-1+RSR group, AMD3100+ SDF-1+blank rat serum group, and AMD3100+ SDF-1+RSR group. After intervention for 48 h, cell proliferation was detected

[收稿日期] 20200309(009)

[基金项目] 上海市科学技术委员会科研计划项目(18ZR1440300)

[第一作者] 李艳敏, 在读博士, 从事中西医结合治疗乳腺疾病研究, E-mail: xinyue112233@yeah.net.

[通信作者] * 吴雪卿, 博士后, 主任医师, 硕士生导师, 从事中医药治疗乳腺疾病的临床及实验研究, E-mail: snow_zi@hotmail.com;

* 万华, 主任医师, 教授, 博士生导师, 从事中西医结合治疗乳腺疾病研究, E-mail: drwanhua@163.com

by cell counting kit-8 (CCK-8) assay, cell invasion ability was detected by transwell assay, and mRNA and protein expressions of CXCR4, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 were detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot, respectively. **Result:** As compared with the blank serum group, the proliferation of MDA-MB-453 cells was promoted and expression of CXCR4 mRNA was increased significantly when SDF-1 was $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P<0.05$). As compared with SDF-1+ blank rat serum group, RSR inhibited the proliferation and invasion of MDA-MB-453 cells induced by SDF-1, and at the same time, down-regulated the mRNA and protein expressions of CXCR4, MMP-2 and MMP-9 ($P<0.05$). After pre-treatment with AMD3100 for 24 h, the inhibitory effect of RSR to cell proliferation was significantly increased ($P<0.05$), and meanwhile, the decreases in mRNA and protein expression of CXCR4, MMP-2 and MMP-9 were more obvious, with statistically significant differences ($P<0.05$). **Conclusion:** Through SDF-1/CXCR4 biological axis, RSR could down-regulate the expression of MMP-2 and MMP-9, reduce the degradation of extracellular matrix (ECM), and then inhibit the metastasis of MDA-MB-453 cells. In addition, it has a synergistic effect with CXCR4 inhibitor AMD3100.

[Key words] breast cancer; Ru'ai Shuhou prescription; biological axis of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) / chemokine receptor 4 (CXCR4); matrix metalloproteinases

乳腺癌是全球女性最常见的恶性肿瘤之一,发病率和死亡率均居女性恶性肿瘤之首^[1]。据统计,2018年全球新增女性乳腺癌发病率和死亡率分别为46.3/10万和13.0/10万^[2]。我国女性乳腺癌发病率呈逐年上升趋势^[2-3],尽管各种形式的治疗方法不断完善,复发和转移仍是导致乳腺癌患者治疗失败的重要原因。近年来研究发现,肿瘤细胞转移受趋化因子(CKs)及其受体调控^[4]。其中,对趋化因子12(CXCL12)/基质细胞衍生因子-1(SDF-1)及其受体趋化因子受体4(CXCR4)的研究比较深入^[5-6]。研究发现,CXCR4在乳腺癌中的阳性率高达60%,介导了乳腺癌转移中细胞的浸润^[7]。

中医认为,正气亏虚而引起邪客于乳络是乳腺癌发生的内因,余毒未尽是复发转移的重要条件。上海市名中医陆德铭教授根据数十年临床经验,总结出乳癌术后方,方中淫羊藿、山萸肉、黄芪、白术等温肾健脾,先后天同补,又调摄冲任,以扶正固本;又配伍以莪术、蜂房等活血化瘀、清热解毒,防余毒旁窜,扶正祛邪,标本同治,又以治本为主,补肾健脾、活血解毒,临床应用疗效显著。前期研究发现,该方既能够提高患者无病生存率,降低死亡率,延迟患者的复发转移时间^[8-9],又能抑制4T1乳腺癌高转移小鼠及HER2/neu转基因自发乳腺癌小鼠肺转移的发生^[10-11]。本实验拟基于SDF-1/CXCR4生物轴对基质金属蛋白酶-2(MMP-2),MMP-9的调控作用,从减少细胞外基质(ECM)降解的角度,进一步阐释乳癌术后方抗乳腺癌复发转移的作用机制,为临床提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞及动物 人乳腺癌细胞MDA-MB-453购自中国科学院上海细胞库。SPF级SD大鼠,雌性,30只,体质量190~220 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司,合格证编号20170005006407,合格证号SCXK(沪)2017-0005。饲养于上海中医药大学实验动物中心。实验方案通过了上海中医药大学实验动物福利与伦理委员会的批准(编号PZSHUTCM18120716)。

1.2 药物和试剂 乳癌术后方由黄芪10 g,白术6 g,茯苓6 g,淫羊藿10 g,山萸肉6 g,莪术10 g,蜂房10 g组成,均由上海中医药大学附属曙光医院中药房购自上海康桥药业有限公司,经上海上药华宇药业有限公司宋嫵副主任药师鉴定为正品。胎牛血清(FBS),DMEM培养基(美国Gibco公司,批号分别为10099-141,10567014);青-链霉素(美国Invitrogen公司,批号15140148);Matrigel基质胶,transwell侵袭小室(6.5 mm,聚碳酸酯膜微孔直径为8 μm)(美国Corning公司,批号分别为3464,356234);SDF-1(北京博奥森公司,批号bs-4938P);AMD3100(美国Sigma公司,批号A5602);逆转录试剂盒,定量PCR试剂盒(日本Toyobo公司,批号分别为FSQ-201,QPK-212);人甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)内参引物[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号B662104];山羊anti-CXCR4抗体(美国Abcam公司,批号ab1670);MMP-2, MMP-9, GAPDH兔单克隆抗体(美国CST公司,批号分别为40994,13667,5174);细胞增殖检测(CCK-8)试剂,

辣根过氧化物酶(HRP)标记驴抗山羊,山羊抗兔抗体(碧云天生物公司,批号分别为C0037, A0181, A0208)。

1.3 仪器 DP73型倒置显微镜(日本Olympus公司), Centrifuge 5417R型高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司), SpectraMax i3x型多功能酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司], CFX96型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Bio-Rad公司), EPS 200型电泳仪(上海天能科技有限公司), iBright CL1000型蛋白印迹智能成像系统(美国Invitrogen公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 人乳腺癌MDA-MB-453细胞,培养液为DMEM(加入100 mg·L⁻¹青-链霉素,10%FBS),培养条件为37℃,无CO₂,相对饱和湿度。隔日更换培养液,细胞呈贴壁生长及悬浮生长混合,融合至80%~90%时传代。

2.2 SDF-1诱导的CXCR4高表达乳腺癌MDA-MB-453细胞模型的建立 取对数生长期的细胞,用0.25%胰蛋白酶消化细胞,收集细胞,计数,约5×10³个接种于96孔板中,细胞贴壁后吸弃培养液,更换为含有不同质量浓度(0, 25, 50, 100, 200, 400 μg·L⁻¹)SDF-1的培养液, CCK-8法检测24, 48, 72 h细胞存活率;并检测CXCR4 mRNA表达,确定SDF-1作用最佳条件用于后续实验。

2.3 乳腺癌术后含药血清制备 参照乳腺癌术后方HPLC特征图谱所示标准^[12],按比例称取相应中药,置于1 000 mL圆底烧瓶中,分别加入10, 8倍体积水,回流提取2次,每次煎煮30 min,提取液合并后过滤,减压浓缩,调整至相当于含生药1.0 g·mL⁻¹, 4℃保存,临用前稀释至所需浓度。30只SD大鼠随机分为乳腺癌术后方组及空白大鼠血清组,给药剂量按成人(体质量按60 kg计)每1 kg体质量6.3倍剂量等效换算。用法为2 mL,每日2次灌胃,空白大鼠血清组给予等体积纯净水。连续给药3 d,禁食不禁水12 h,第4天一次性给药1 h后,25%乌拉坦静脉注射麻醉,腹主动脉取血,分离血清,0.22 μm过滤器过滤灭菌,56℃灭活后分装,-20℃保存备用。

2.4 分组处理 取对数生长期细胞,接种于96孔或6孔培养板中,分别按照用(或不用)SDF-1(CXCR4配体)^[5]诱导,以及经(或未经)AMD3100(CXCR4抑制剂)^[13]预处理,分为空白组(10%FBS),空白大鼠血清组,SDF-1+空白大鼠血清组,SDF-1+乳腺癌术后方组,AMD3100+SDF-1+空白

大鼠血清组,AMD3100+SDF-1+乳腺癌术后方组。AMD3100预处理的时间是24 h。

2.5 CCK-8法检测细胞增殖能力 将对数生长期的细胞接种到96孔板中,每孔约5×10³个细胞。加入10%,15%,20%的乳腺癌术后方含药血清及空白大鼠血清,分别于作用24, 48, 72 h,更换为含10% CCK-8的完全培养基,100 μL/孔,37℃培养箱中继续培养2 h,450 nm波长处测吸光度A,计算细胞存活率,筛选出对细胞抑制作用最强的条件,即浓度为15%乳腺癌术后方及空白大鼠血清组作用48 h。后将对数期生长的细胞按2.4项分组,培养48 h后重复上述步骤,计算细胞存活率。细胞存活率=(A_{给药孔}-A_{调零孔})/(A_{空白孔}-A_{调零孔})×100%。

2.6 transwell小室检测侵袭能力 transwell小室上室铺稀释后基质胶(基质胶-DMEM 1:3),置于细胞培养箱中,待其充分凝固后,分别收集正常培养和经AMD3100预处理24 h的MDA-MB-453细胞,用无血清DMEM混悬,显微镜下进行分别计数,并取5×10³个/孔,接种于transwell小室上室,下室按上述组别进行干预,继续培养48 h后取出小室,固定,染色,显微镜下随机5个视野,计数并评价细胞侵袭能力。

2.7 Real-time PCR检测相关mRNA表达 将细胞接种到6孔板中,每孔约5×10⁵个细胞。按组别加入相应药物培养48 h,弃上清,trizol提取总RNA,反转录为cDNA,进行PCR反应,反应条件:95℃ 30 s, 95℃ 5 s, 55℃ 10 s, 72℃ 15 s, 40个循环。运用相对表达量2^{-ΔΔC_t}法进行数据分析。ΔC_t=C_t目的基因-C_t内参基因,ΔΔC_t=ΔC_t给药组-ΔC_t空白组,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成,见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
CXCR4	上游 TGTCATCTACACAGTCAACCTC	137
	下游 CAACATAGACCACCTTTTCAGC	
MMP-2	上游 ATTGTATTTGATGGCATCGCTC	202
	下游 ATTCATTCCCTGCAAAGAACAC	
MMP-9	上游 CAGTACCGAGAGAAAGCCTATT	111
	下游 CAGGATGTCATAGGTCACGTAG	

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达 将细胞接种到6孔板中,每孔约5×10⁵个细胞。按2.4项分组及加药,干预48 h,弃培养基,磷酸

盐换缓冲液(PBS)洗2次,RIPA裂解工作液200 μL提蛋白,BCA法测蛋白浓度,5×蛋白上样缓冲液灭活,SDS-PAGE电泳,转膜,封闭2 h,一抗MMP-2, MMP-9(1:1 000),一抗CXCR4(1:500)4 °C过夜, TBST洗涤,二抗(1:1 000)慢摇2 h, TBST洗涤,显影。测条带灰度值,对蛋白表达量进行定量分析。

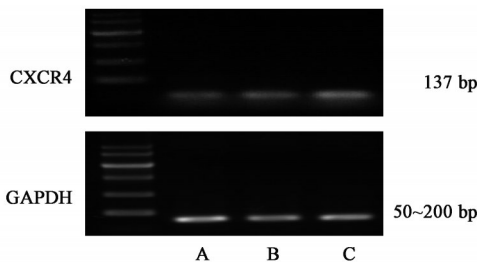
2.9 统计学方法 采用SPSS 25.0软件进行统计分析,数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素的方差分析,多重比较采用LSD法, $P<0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

表2 SDF-1对MDA-MB-453细胞存活率的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 2 Effect of SDF-1 on cell viability of MDA-MB-453 cells ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞存活率/%		
		24 h	48 h	72 h
空白	-	98.06±8.49	100.04±4.72	100.03±5.17
SDF-1	25	115.75±7.29 ¹⁾	125.80±6.43 ¹⁾	103.49±3.79
	50	120.67±9.81 ¹⁾	122.20±5.90 ¹⁾	107.82±3.12 ¹⁾
	100	120.15±3.21 ¹⁾	122.98±3.01 ¹⁾	108.21±3.07 ¹⁾
	200	106.11±10.37	118.07±8.87 ¹⁾	113.42±1.44 ¹⁾
	400	113.88±14.01 ¹⁾	99.15±3.55	110.26±6.48 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$ 。



A. 空白组; B. SDF-1($50\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)组; C. SDF-1($100\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)组

图1 SDF-1作用MDA-MB-453细胞CXCR4 mRNA表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of SDF-1 on CXCR4 mRNA in MDA-MB-453 cells

3.2 乳腺癌术后方含药血清对SDF-1诱导的MDA-MB-453细胞增殖能力的影响 与空白大鼠血清组比较, SDF-1+空白大鼠血清组细胞存活率明显增加($P<0.05$); 与SDF-1+空白大鼠血清组比较, SDF-1+乳腺癌术后方组, AMD3100+SDF-1+空白大鼠血清组细胞存活率均明显降低($P<0.05$); 与AMD3100+SDF-1+空白大鼠血清组比较, AMD3100+SDF-1+乳腺癌术后方组细胞存活率明显降低($P<0.05$)。见表3。

3.3 乳腺癌术后方含药血清对SDF-1诱导的MDA-MB-453细胞侵袭能力的影响 与空白大鼠血清组比较, SDF-1+空白大鼠血清组细胞穿膜数明显增多($P<0.05$), 侵袭能力增强; 与SDF-1+空白大

3 结果

3.1 SDF-1诱导CXCR4高表达MDA-MB-453细胞模型的建立 随着作用时间的延长, 相同SDF-1浓度处理的细胞存活率均呈现出先升后降的作用趋势。与空白组比较, SDF-1 50, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理不同时间的细胞存活率均有明显增加($P<0.05$); 48 h, SDF-1促进细胞增殖的作用较强。见表2。SDF-1 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 与空白组比较, CXCR4 mRNA表达量明显升高。见图1。因此, SDF-1 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 作用48 h作为后续研究所用条件。

表3 乳腺癌术后方含药血清对MDA-MB-453细胞存活率的影响($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 3 Effect of RSR drug-containing serum on cell viability of MDA-MB-453 cells ($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	浓度	细胞存活率/%
空白	FBS 10%	100.00±3.66
空白大鼠血清	15%	92.25±2.20
SDF-1+空白大鼠血清	100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +15%	97.93±2.32 ¹⁾
SDF-1+乳腺癌术后方	100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +15%	89.65±2.69 ²⁾
AMD3100+SDF-1+空白大鼠血清	500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +15%	82.64±6.48 ²⁾
AMD3100+SDF-1+乳腺癌术后方	500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +15%	74.21±4.47 ^{2,3,4)}

注:与空白大鼠血清组比较¹⁾ $P<0.05$; 与SDF-1+空白大鼠血清组比较²⁾ $P<0.05$; 与SDF-1+乳腺癌术后方组比较³⁾ $P<0.05$; 与SDF-1+AMD3100+空白大鼠血清组比较⁴⁾ $P<0.05$ (表4~6同)。

鼠血清组比较, SDF-1+乳腺癌术后方组, AMD3100+SDF-1+空白大鼠血清组, AMD3100+SDF-1+乳腺癌术后方组细胞穿膜数明显减少($P<0.05$), 侵袭能力减弱。见表4。

3.4 乳腺癌术后方含药血清对SDF-1诱导的MDA-MB-453细胞CXCR4, MMPs mRNA表达的影响 与空白大鼠血清组比较, SDF-1+空白大鼠血

表4 乳腺癌术后含药血清对MDA-MB-453细胞穿膜数的影响
($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 4 Effect of RSR drug-containing serum on Nnumber of MDA-MB-453 cells penetrating membrane ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	浓度	穿膜细胞数 /个/HP
空白	FBS 10%	30.00±10.39
空白大鼠血清	15%	31.00±5.52
SDF-1+空白大鼠血清	100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +15%	44.40±12.30 ¹⁾
SDF-1+乳腺癌术后方	100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +15%	14.20±5.89 ²⁾
AMD3100+SDF-1+空白大鼠血清	500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +15%	16.00±4.18 ²⁾
AMD3100+SDF-1+乳腺癌术后方	500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +15%	10.00±6.21 ²⁾

清组细胞 CXCR4, MMP-2, MMP-9 mRNA 表达水平明显升高 ($P<0.05$); 与 SDF-1+空白大鼠血清组比较, SDF-1+乳腺癌术后方组, AMD3100+SDF-1+空白大鼠血清组, AMD3100+SDF-1+乳腺癌术后方组细胞 CXCR4, MMP-2, MMP-9 mRNA 表达水平明显降低 ($P<0.05$); 与 SDF-1+乳腺癌术后方组, AMD3100+SDF-1+空白大鼠血清组比较, AMD3100+SDF-1+乳腺癌术后方组细胞 CXCR4, MMP-2, MMP-9 mRNA 表达水平明显降低 ($P<0.05$)。见表5。

3.5 乳腺癌术后含药血清对 SDF-1 诱导的 MDA-MB-453 细胞 CXCR4 及 MMPs 蛋白表达的影响

表5 乳腺癌术后含药血清对MDA-MB-453细胞CXCR4, MMPs mRNA表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

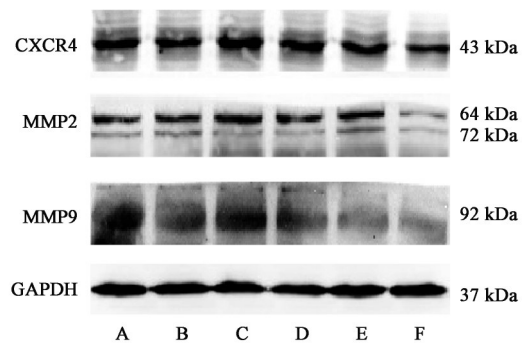
Table 5 Effect of RSR drug-containing serum on CXCR4 and MMPs mRNA expression levels inMDA-MB-453 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度	CXCR4	MMP-2	MMP-9
空白	FBS 10%	1.00±0.02	1.01±0.16	1.00±0.06
空白大鼠血清	15%	0.31±0.04	0.70±0.23	0.75±0.02
SDF-1+空白大鼠血清	100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +15%	0.91±0.05 ¹⁾	3.60±0.24 ¹⁾	2.17±0.08 ¹⁾
SDF-1+乳腺癌术后方	100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +15%	0.77±0.07 ²⁾	2.44±0.75 ²⁾	1.95±0.11 ²⁾
AMD3100+SDF-1+空白大鼠血清	500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +15%	0.47±0.02 ²⁾	1.83±0.39 ²⁾	2.44±0.07 ²⁾
AMD3100+SDF-1+乳腺癌术后方	500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +15%	0.24±0.05 ^{2,3,4)}	1.09±0.09 ^{2,3,4)}	0.88±0.03 ^{2,3,4)}

4 讨论

CKs 是一类由组织细胞或炎性细胞分泌的, 能够趋化细胞定向移动的可溶性的细胞因子, 其相对分子质量较小, 为 8~12 kDa, 可分为 CXCR, CC, C 及 CX3C 4 类^[14]。2001 年, MÜLLER 等^[15]首次报道乳腺癌恶性肿瘤原发灶高表达 CXCR4, 而其常见转移部位, 如肺、骨骼、肝脏等高表达其配体 CXCL12 (SDF-1), 由此揭开了趋化因子学研究史上新的

一页。CXCR4 在许多细胞表面表达, 是 SDF-1 最主要的受体^[5]。SDF-1 在淋巴结、肝、肺等中高表达, 对表达其相应的受体 CXCR4 的肿瘤细胞具有趋化作用, 使肿瘤特定转移形成转移灶。研究发现, CXCR4 在乳腺癌中的高表达与患者预后不良相关, 是乳腺癌复发和转移的一个独立的标志^[16-17]。AMD3100 为 SDF-1/CXCR 4 轴的小分子抑制剂, 可抑制 SDF-1 与其受体 CXCR4 结合, 能够逆转 SDF-1



A. 空白组; B. 空白大鼠血清组; C. SDF-1+空白大鼠血清组; D. SDF-1+乳腺癌术后方组; E. AMD3100+SDF-1+空白大鼠血清组; F. AMD3100+SDF-1+乳腺癌术后方组

图2 MDA-MB-453细胞CXCR4及MMPs蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of CXCR4, MMPs protein expression in MDA-MB-453 cells

。CXCR4 在许多细胞表面表达, 是 SDF-1 最主要的受体^[5]。SDF-1 在淋巴结、肝、肺等中高表达, 对表达其相应的受体 CXCR4 的肿瘤细胞具有趋化作用, 使肿瘤特定转移形成转移灶。研究发现, CXCR4 在乳腺癌中的高表达与患者预后不良相关, 是乳腺癌复发和转移的一个独立的标志^[16-17]。AMD3100 为 SDF-1/CXCR 4 轴的小分子抑制剂, 可抑制 SDF-1 与其受体 CXCR4 结合, 能够逆转 SDF-1

表6 乳癌术后含药血清对MDA-MB-453细胞CXCR4及MMPs蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of RSR drug-containing serum on CXCR4 and MMPs protein expression levels in MDA-MB-453 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度	CXCR4/GAPDH	MMP-2/GAPDH	MMP-9/GAPDH
空白	FBS 10%	1.00±0.02	1.00±0.09	1.00±0.05
空白大鼠血清	15%	0.95±0.04	1.30±0.04	0.77±0.03
SDF-1+空白大鼠血清	100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +15%	1.28±0.04 ¹⁾	2.13±0.06 ¹⁾	1.06±0.05 ¹⁾
SDF-1+乳癌术后方	100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +15%	1.19±0.04 ^{1,2)}	1.81±0.12 ^{1,2)}	0.77±0.07 ²⁾
AMD3100+SDF-1+空白大鼠血清	500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +15%	0.83±0.02 ^{1,2)}	0.77±0.05 ^{1,2)}	0.36±0.02 ^{1,2)}
AMD3100+SDF-1+乳癌术后方	500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +15%	0.64±0.03 ^{1,2,3,4)}	0.69±0.07 ^{1,2,3,4)}	0.28±0.02 ^{1,2,3,4)}

对MMP组织抑制因子-3(TIMP-3)的抑制作用^[13]。AMD3100能通过特异性抑制三阴性乳腺癌MDA-MB-231细胞SDF-1, CXCR4表达, 阻断SDF-1/CXCR4信号传导, 从而抑制细胞增殖、侵袭, 诱导其凋亡^[18]。

研究发现, SDF-1/CXCR4生物轴可以诱导MMPs的分泌, 与胞外基质(ECM)降解有关^[19]。MMPs因具有降解ECM与基底膜的活性, 乳腺癌转移中发挥重要作用^[20], 也是肿瘤侵袭和转移的开始^[21]。MMP-2, MMP-9作为肿瘤侵袭和转移的相关因子^[22], 在这一过程中起关键的作用。下调MMP-2, MMP-9的表达, 可以抑制三阴性乳腺癌HCC1937细胞的侵袭和迁移^[23]。课题组前期研究发现, 乳癌术后方能够延迟HER2/neu转基因自发乳腺癌小鼠原发肿瘤的生长, 降低肺转移发生率, 可下调MMP-2, MMP-9及其诱导因子EMMPRIN的表达, 减少肿瘤细胞对ECM的降解; 同时上调基质金属蛋白酶抑制因子TIMP1, TIMP2的表达, 增加对ECM的保护作用^[24]。

本实验结果表明, SDF-1可以促进MDA-MB-453细胞增殖及侵袭能力, 增加CXCR4, MMP-2, MMP-9 mRNA及蛋白表达, 这一过程可被AMD3100抑制。乳癌术后方能够抑制SDF-1诱导的MDA-MB-453细胞增殖及侵袭; 经AMD3100干预后, 乳癌术后方的抑制作用增强。因此, 乳癌术后方抗乳腺癌复发转移的作用可能是通过作用于SDF1/CXCR4生物轴, 调控MMP-2, MMP-9分泌, 进而减少ECM降解实现的。这一结果为临床应用提供了一定的实验支持。但是, 乳腺癌发病机制复杂, 涉及多条通路、多靶点的共同作用, 则需要进一步探讨。

[参考文献]

[1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates

of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.

[2] 王宁, 刘硕, 杨雷, 等. 2018全球癌症统计报告解读[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2019, 5(1): 87-97.

[3] CHEN W, SUN K, ZHENG R, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2014 [J]. Chin J Cancer Res, 2018, 30(1): 1-12.

[4] 欧周罗. 趋化因子与乳腺癌[J]. 中国癌症杂志, 2013, 23(8): 618-623, 636.

[5] PAWIG L, KLASSEN C, WEBER C, et al. Diversity and inter-connections in the CXCR4 chemokine receptor/ligand family: molecular perspectives [J]. Front Immunol, 2015, 6(8): 429-452.

[6] KIM B, MIN Y H, PARK B. Minocycline modulates cell invasion via regulation of CXCR4 expression in breast and colon cancer cells [J]. Planta Med, 2020, 86(5): 331-337.

[7] HERNANDEZ L, MAGALHAES M A, CONIGLIO S J, et al. Opposing roles of CXCR4 and CXCR7 in breast cancer metastasis [J]. Breast Cancer Res, 2011, 13(6): R128-R145.

[8] 高晴倩, 万华, 李欣荣, 等. 乳癌术后方对乳腺癌术后患者无病生存期的影响[J]. 上海中医药杂志, 2011, 45(10): 49-52.

[9] 瞿文超, 吴雪卿, 冯佳梅, 等. 中药复方对乳腺癌患者5年无病生存率及总生存率的影响[J]. 中国医药导报, 2012, 9(36): 120-122.

[10] 万华, 吴雪卿, 董佳容, 等. “乳癌术后方”抗高转移小鼠乳腺癌作用机制的研究[J]. 肿瘤, 2007, 27(9): 691-693, 709.

[11] 吴雪卿, 邵士珺, 瞿文超, 等. 乳癌术后方对HER2阳性乳腺癌复发转移中基质金属蛋白酶及其抑制因子的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(11): 1526-1530.

[12] 邵士珺, 吴雪卿, 万华, 等. 乳癌术后方HPLC特征图谱研究[J]. 中国医药导报, 2017, 14(13): 4-7, 12.

[13] LU W, HE Z, SHI J, et al. AMD3100 attenuates post-

- traumatic osteoarthritis by maintaining transforming growth factor- β_1 -induced expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 via the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 10(1):1554-1565.
- [14] JANSSENS R, STRUYF S, PROOST P. The unique structural and functional features of CXCL12 [J]. *Cell Mol Immunol*, 2018, 15(4): 299-311.
- [15] MÜLLER A, HOMEY B, SOTO H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis [J]. *Nature*, 2001, 410(6824): 50-56.
- [16] BOUYSSOU J M, GHOBRIAL I M, ROCCARO A M. Targeting SDF-1 in multiple myeloma tumor microenvironment [J]. *Cancer Lett*, 2016, 380(1): 315-318.
- [17] GUO K, FENG G, YAN Q, et al. CXCR4 and CXCR3 are two distinct prognostic biomarkers in breast cancer: Database mining for CXCR family members[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(6):4791-4802.
- [18] 杨萍,涂志全,张莲,等. CXCR4拮抗剂对三阴性乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖和凋亡的影响及机制研究[J]. *中国药师*, 2019, 22(12):2218-2223.
- [19] MOUSAVI A. CXCL12/CXCR4 signal transduction in diseases and its molecular approaches in targeted-therapy[J]. *Immunol Lett*, 2020, 217(1):91-115.
- [20] CUI N, HU M, KHALIL R A. Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017, 147(3): 1-73.
- [21] CHAFFER C L, WEINBERG R A. A perspective on cancer cell metastasis [J]. *Science*, 2011, 331(6024):1559-1564.
- [22] GIGANTI M G, TRESOLDI I, SORGE R, et al. Physical exercise modulates the level of serum MMP-2 and MMP-9 in patients with breast cancer[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(3):2119-2126.
- [23] 孙学然,杨克,吕玲玲,等. 莪术二酮对乳腺癌HCC1937细胞迁移和侵袭的影响及机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(3):66-73.
- [24] 邵士珺,吴雪卿,冯佳梅,等. 乳癌术后对HER2过表达乳腺癌小鼠复发转移中HER2信号传导通路及相关基质蛋白表达的影响[J]. *上海中医药杂志*, 2013, 47(6):89-92.

[责任编辑 张丰丰]