

· 基础研究 ·

不同归经补益中药对骨转移癌 CXCR4 表达的影响

林荔钦 朱世杰

摘要 目的 观察不同归经补益中药对骨转移癌骨趋化因子受体 4 (CXCR4) 的抑制及机制。方法 采用转移性大鼠乳腺癌细胞,按 Medhurst 方法复制骨转移癌模型。40 只大鼠按照体重分层,采用随机数字表法分为假手术组、模型组、肾经组、肺经组和肝经组,每组 8 只。造模后肾经组(补骨脂、肉苁蓉及益智仁)、肝经组(熊胆粉)、肺经组(党参、黄芪及百合)给药量为 10 mL/(kg·d),相当于生药 45 g/(kg·d)灌胃,假手术组及模型组给予去离子水灌胃,持续 20 天。观察不同归经补益中药的作用,通过影像学方法进行评分、测量肿瘤体积,HE 染色观察形态,免疫组化法检测 CXCR4 表达并进行半定量分析。结果 骨转移癌模型出现骨质破坏和肿瘤生长等表现。与假手术组比较,模型组肿瘤体积增大($P < 0.01$),模型组骨质破坏严重,评分升高($P < 0.01$),CXCR4 表达升高($P < 0.01$)。与模型组比较,肾经组肿瘤体积缩小($P < 0.05$),骨质破坏明显减轻,评分降低($P < 0.05$),CXCR4 表达明显下降($P < 0.01$);肺经组和肝经组上述指标与模型组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论 归肾经中药对骨转移癌灶的生长具有一定的抑制作用,其机制可能通过阻断 SDF-1/CXCR4 生物学轴及下游信号通路,达到抗肿瘤定向侵袭和增殖的目的。归肺经、归肝经药物不存在类似作用,不同归经中药对机体的作用存在靶向特异性。

关键词 骨趋化因子受体 4;补益中药;归经

Effects of Different Channel Tropism Tonic Herbs on CXCR4 Expression in Bone Metastasis Cancer
LIN Li-qin and ZHU Shi-jie Oncology Department, Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medicine Sciences, Beijing (100102)

ABSTRACT Objective To observe inhibition and mechanisms of different channel tropism tonic herbs on CXCR4 expression. **Methods** Bone metastatic carcinoma model was established according to Medhurst method with metastatic breast cancer cells in rats. Forty rats were stratified by body weight. Then, the rats were divided into 5 groups according to random digit table, i.e., the sham-operated group, the model group, Shen channel group (*Fructus Psoraleae*, *Cistanche deserticola*, *Fructus Alpiniae oxyphyllae*), Fei channel group (*Codonopsis pilosula*, *Astragalus mongholicus*, *Lilium brownii*), and Gan channel group (Bear Bile Powder), 8 in each group. After modeling rats in Shen channel group, Fei channel group, and Gan channel group were administered with corresponding decoctions (10 mL·kg⁻¹·d⁻¹) by gastrogavage (equivalent to 10 times that 45 g·kg⁻¹·d⁻¹ crude drugs). Equal volume of deionized water was administered to rats in the sham-operated group and the model group by gastrogavage. All medications lasted for 20 days. Effects of different channel tropism tonic herbs were observed. Imaging methods were applied to score and measure the tumor volume, and morphological changes were observed by HE staining. In addition, expressions of CXC chemokine receptors (CXCR4) were semi-quantitatively detected using immunohistochemistry. **Results** In bone metastatic carcinoma model bone destruction and tumor growth occurred. Compared with the sham-operated group, tumor volume were increased significantly ($P < 0.01$), bone destruction were severer and scores increased ($P < 0.01$), as well as CXCR4 expression levels were significantly higher in the model group ($P < 0.01$). Compared with

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81173374)

作者单位:中国中医科学院望京医院肿瘤科(北京 100102)

通讯作者:朱世杰, Tel:13381058340, E-mail:zhushijie@hotmail.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20170315. 039

the model group, bone destruction was obviously attenuated, and scores decreased ($P < 0.05$), tumor volume was reduced ($P < 0.05$), and CXCR4 expression level was obviously lowered ($P < 0.01$) in Shen channel group. However, there was no significant difference in aforesaid parameters between Fei channel group and Gan channel group ($P > 0.05$). Conclusions Shen channel tropism tonic herbs had certain inhibition on bone metastatic cancer foci. It might fight against oriental proliferation and invasion possibly by blocking SDF-1/CXCR4 biological axis and downstream signaling pathways. Fei and Gan channel tropism tonic formulas had no similar effects. Different channel tropism tonic formulas had specific targeting functions.

KEYWORDS CXC chemokine receptor4; channel tropism tonic formulas; channel tropism

骨转移是肿瘤晚期常见并发症之一,其中以前列腺癌、肺癌、乳腺癌最为常见。这些肿瘤的患者中,75%的患者出现骨转移,严重影响患者生活质量和生存期^[1]。中医学认为“肾主骨生髓”,归肾经药物抗骨转移的疗效亦得到现代药理研究证实,归肾经药物通过调节 OPG-RANKL-RANK 系统的平衡,从而改善骨组织的微环境^[2,3]。本研究同为补益药的归肺经药与归肝经是否有类似作用,以期探寻可行的验证中药归经理论的现代研究方法,对临床应用中药治疗骨转移癌提供用药依据。

材料与方法

1 动物 40 只雌性 SD 大鼠,SPF 级,体重(160 ± 10 g),购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2012-0001;饲养环境:中日友好医院临床研究所动物实验室,许可证号:SYXK(京)2010-0011。MRMT-1 转移性大鼠乳腺癌细胞株,自日本东北大学加龄医学研究所医用细胞资源中心引进,在液氮中保存。

2 药物 归肾经(补骨脂 30 g,生产批号:300104403;肉苁蓉 30 g,生产批号:1312017;益智仁 30 g,生产批号:306031)、归肺经(党参 30 g,生产批号:308181;黄芪 30 g,生产批号:130929;百合 30 g,生产批号:1310002)生药均购自中日友好医院药房,归肝经熊胆粉由归真堂提供(批号:Z10980024)。

3 主要试剂及仪器 主要试剂:骨趋化因子受体 4(CXCR4)抗体购自 Santa Cruz Biotechnology(生产批号:SC-9046)、Santa Cruz Biotechnology RPMI 1640 培养基、抗体稀释液购自美国 Dako 公司,二步法抗兔/鼠通用型免疫组化检测试剂(生产批号:GK500705)购自基因科技(上海)有限公司。主要仪器:KXO-32R 医用 X 光诊断系统(日本 Toshiba 公司),Prodigy 双能 X 线骨密度仪(美国 General E-

lectric 公司),IX71 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司),SIGMA 3-18K 低温离心机(德国 Sartorius 公司)

4 动物分组与模型制备 动物适应性饲养 1 周后,大鼠按照体重分层,通过随机数字表法分为假手术组、模型组、肾经组、肺经组和肝经组,共 5 组,每组 8 只。其中除假手术组外在造模前仍然混养,以避免造模时出现选择性偏倚。使用 0.45%戊巴比妥钠溶液按照 1 mL/100 g 体重对大鼠腹腔注射进行麻醉。

参照参考文献[4]方法造模。按照之前分组将全部大鼠腹部向上置于鼠板上,将左后肢皮毛用生理盐水湿润后剪毛,75%医用酒精消毒;用手术刀片切开胫骨上部的皮肤和肌肉,切口长度约 1 cm,暴露出左侧胫骨内侧;在膝关节以下约 5 mm 处的胫骨内侧,先用 21G 或 22G 针头穿刺打孔,针头穿透骨皮质进入骨髓腔后,假手术组使用微量注射器吸取生理盐水 3 μ L,缓慢注射于假手术组大鼠骨髓腔内(假手术组);手术组使用微量注射器吸取配制好的癌细胞悬液 3 μ L(细胞数约为 3×10^3),缓慢注射于各模型组大鼠骨髓腔内;撤出微量注射器后迅速用骨蜡(在 50~52 $^{\circ}$ C 水浴中保温)密封针孔,以防癌细胞悬液从骨髓腔溢出;造模过程中未有大鼠死亡。

5 动物给药 肾经组和肺经组的生药于 18 倍清水中浸泡 30 min,煮沸后文火煎煮 1 h,过滤留取滤液,剩余中药加入等量清水煮沸后文火煎煮 1 h,弃去药渣。两次滤液合并,水浴中浓缩,调节浓度至 4.5 g/mL,每周煎药 1 次。肝经组的熊胆粉溶解于适量蒸馏水中,调节浓度至 4.5 g/mL,每周调配 1 次。根据《中药药理研究方法学》^[5]描述的方法计算,3 组按临床常用剂量,根据体表面积换算为大鼠给药量,大鼠用药剂量为 45 g/(kg·d)。造模后 1~20 天灌胃,10 mL/(kg·d),相当于生药 45 g/(kg·d),成人每千克体重的生药用量的 10 倍。假手术组及模型组给

予去离子水。各组均持续灌胃 20 天。每 3 天监测体重,根据体重随时调整药量。

6 检测指标及方法

6.1 肿瘤体积 造模第 21 天进行,取材前禁食 10 h。0.45%戊巴比妥钠(10 mL/kg 静脉注射)麻醉下,腹主动脉取血,剪下左后肢。将大鼠的左后肢直接置于 4%多聚甲醛中进行固定,待 X 线检查后再剥离皮肤和肌肉,用游标卡尺测定肿瘤长径和短径。按下列公式计算肿瘤体积:肿瘤体积 = [肿瘤长径 × (肿瘤短径)²]/2。

6.2 影像学评价 将 4%多聚甲醛固定的大鼠左侧胫骨排列在 KXO-32R 医用 X 光诊断系统的拍摄台上进行 X 线摄片,电压 50 kV,曝光时间 2 ms。根据所拍摄影像对骨质破坏程度并进行评分,标准如下^[4]:0 分:正常的骨结构,无任何骨质破坏的征象;1 分:在胫骨注射部位附近见小的骨质缺损病灶(数量 <3 个);2 分:髓质骨缺损,病灶增多(>3 个);3 分:髓质骨缺失,同时皮质骨受侵;4 分:单面的骨皮质完全缺损;5 分:双面的骨皮质缺失,移位性骨折。

6.3 镜下观察肿瘤生长及骨破坏 大鼠胫骨取材后在 4%多聚甲醛固定 24 h 后,0.1 mol/L PBS (pH 7.2~7.4)充分漂洗,后用 10%EDTA/0.1 mol/L PBS (pH 7.2~7.4)4℃脱钙,隔天换液 1 次,4 周后脱钙结束。取大鼠左侧胫骨上段 1/3(病灶组织),依次用梯度酒精脱水,二甲苯透明,浸蜡,石蜡包埋。切片前在载玻片上涂布蛋白甘油以增强其黏附性能。将石蜡包埋的标本切成 4 μm 厚,于温水(约 45℃)中展平后,捞至载玻片上铺正,用滤纸吸除多余水分,将载玻片放入 45℃温箱烤片 24 h。HE 染色后在镜下观察病灶组织的形态结构,包括肿瘤细胞在骨髓腔的浸润程度、骨皮质的破坏、骨小梁的缺失等组织病理学改变。

6.4 免疫组化检测 CXCR4 对骨趋化因子受体 4(chemokine receptor4,CXCR4)进行免疫组化染色,镜下观察免疫阳性染色的组织及细胞分布,采用 IPP 图像分析软件进行检测,随机检测骨髓腔内(CXCR4)5 个以上高倍视野(×200),计算每个视野的阳性面积比(IOD 值),取其平均值。

7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用方差分析进行组间比较,LSD 法进行两两比较。方差不齐的计量资料、等级资料及频数资料,采用秩和检验进行分析:先用 Kruskal-Wallis H 法确定各组样本间是否确实存在差异,再进一步 Mann-Whitney U 法进行两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠肿瘤体积比较(表 1) 与假手术组比较,模型组肿瘤体积增大($P < 0.01$);与模型组比较,肺经组、肝经组肿瘤体积未见缩小($P > 0.05$),肾经组肿瘤体积缩小($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠肿瘤体积比较 (mm³, $\bar{x} \pm s$)

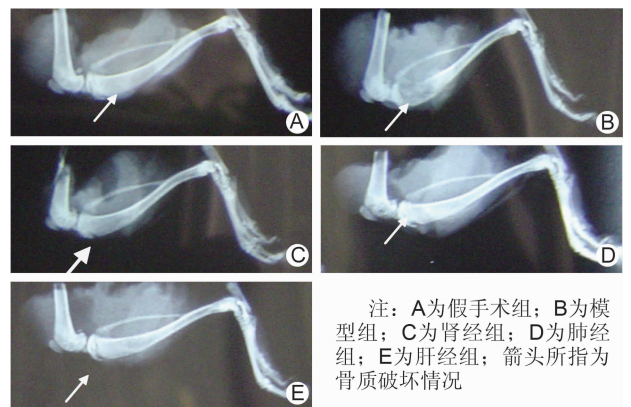
组别	n	肿瘤体积
假手术	8	0.00 ± 0.00
模型	8	55.91 ± 39.07 *
肾经	8	6.97 ± 5.84 [△]
肺经	8	54.86 ± 24.95
肝经	8	35.37 ± 21.86

注:与假手术组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$

2 各组大鼠左侧胫骨影像学评分比较(表 2,图 1) 假手术组骨皮质完整;模型组本例骨皮质侵蚀严重,已发生病理性骨折;肾经组皮质受损较轻;肺经组和肝经组,单侧骨皮质均出现不同程度受损。与假手术组比较,模型组骨质破坏严重,评分升高($P < 0.01$);与模型组比较,肾经组骨质破坏明显减轻,评分降低($P < 0.05$),肺经组和肝经组骨质破坏情况差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠左侧胫骨影像学评分比较 (只)

组别	n	影像学评分(分)					
		0	1	2	3	4	5
假手术	8	8	0	0	0	0	0
模型	8	0	0	0	3	5	0
肾经	8	1	6	1	0	0	0
肺经	8	0	1	5	1	1	0
肝经	8	1	3	3	1	0	0



注:A为假手术组;B为模型组;C为肾经组;D为肺经组;E为肝经组;箭头所指为骨质破坏情况

图 1 各组大鼠左侧胫骨影像学结果

3 各组大鼠形态学观察(图 2) 假手术组骨皮质结构完整清晰,可见大量排列均匀的哈弗系统

(Haversian system), 哈弗管中可见毛细血管或神经穿过。在哈弗系统之间有大量排布均匀的骨陷窝, 内壁光滑, 陷窝内可见椭圆形的骨细胞, 骨小梁伸入骨髓腔, 骨髓腔内充满血细胞; 模型组可见大量肿瘤细胞浸润, 骨皮质受损, 残存的骨皮质中哈弗管和骨陷窝成为空泡状; 肾经组大量肿瘤细胞浸润, 骨皮质受损, 可见新生的骨样组织和编织骨; 肺经组、肝经组大量肿瘤细胞浸润, 骨皮质受损, 可见少量新生的骨样组织和编织骨。

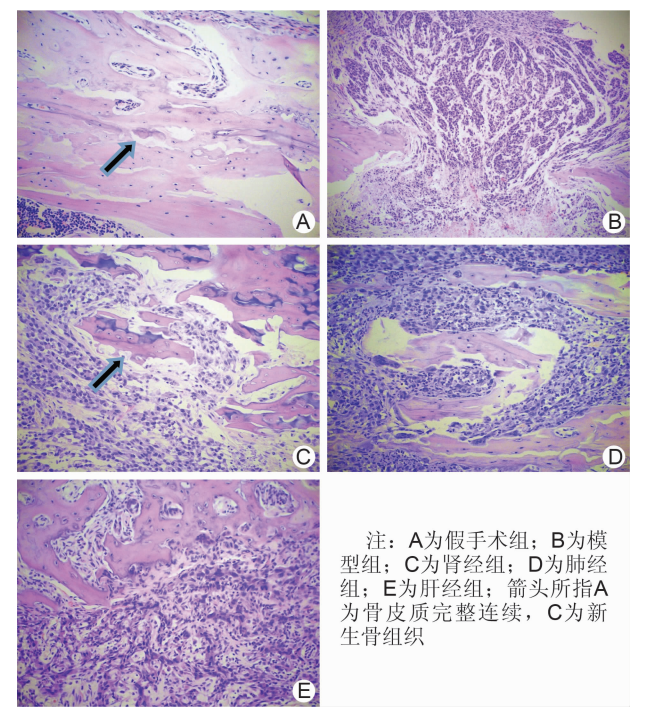


图2 各组大鼠左侧胫骨纵截面病理结果 (HE, ×200)

4 各组大鼠 CXCR4 免疫组化染色变化及蛋白表达比较 (表 3, 图 3) 染色 (+) 呈现黄褐色。假手术组骨髓腔中有极少部分的细胞胞浆呈现浅黄褐染色, 细胞形态呈圆形。模型组可见成片的 CXCR4 (+) 细胞, 胞浆呈黄褐色; 肾经组 CXCR4 (+) 细胞数量少, 而且染色较浅; 肺经组、肝经组可见散在的 CXCR4 (+) 细胞, 胞浆呈黄褐色。

表 3 各组大鼠左侧胫骨 CXCR4 蛋白 IOD 值比较 ($\bar{x} \pm s$)		
组别	n	CXCR4 蛋白表达 (IOD 值)
假手术	8	7.96 ± 0.16
模型	8	49.13 ± 1.50 *
肾经	8	12.08 ± 0.71 Δ
肺经	8	38.85 ± 2.36
肝经	8	34.54 ± 2.07

注: 与假手术组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

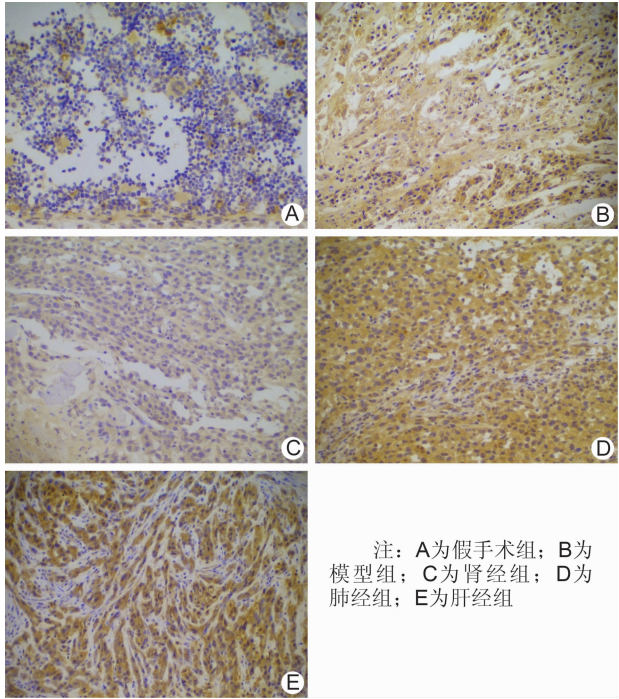


图3 各组大鼠左侧胫骨 CXCR4 蛋白表达 (免疫组化 EnVision 法, ×200)

与假手术组比较, 模型组 CXCR4 蛋白表达升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 肾经组 CXCR4 蛋白表达明显降低 ($P < 0.01$), 肺经组和肝经组 CXCR4 蛋白表达比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

讨 论

中药归经理论在中医药抗肿瘤转移临床与基础研究方面有着重要的指导意义。总结全国名老中医李佩文教授抗肿瘤治疗经验时发现转移患者有针对性地选用归肾经补益中药, 可降低骨转移发生率, 对有骨转移的患者可减缓骨破坏、减轻症状的疗效^[6]。鉴于中药作用的多效性、作用方式上的多成分、多靶点、多环节的特点, 目前的中药归经理论的实验研究仍存在一定的局限性^[7]。

本研究借助成熟的骨转移动物模型, 比较不同归经补益药的疗效差异, 证明归肾经中药对骨转移癌有特异性治疗作用, 验证了中医学肾主骨的理论, 在中医学“肾主骨”理论的指导下, 历代医家以扶正补虚为基本治则, 从肾论治骨转移癌, 探索研制出诸多治疗骨转移癌的有效方药。补骨脂、益智仁、肉苁蓉为归肾经补益类中药的代表。补骨脂、益智仁皆味辛性温热, 功善补肾助阳, 益精髓, 暖腰膝, 逐冷除顽痹而止痛; 肉苁蓉味甘能补, 甘温助阳, 咸以入肾, 为补肾阳、益精血之佳品, 《神农本草经》谓其“主五劳七伤, 补中, 除寒热

痛”。三药皆归肾经,且功用专注,可作为引经药,为补肾壮骨之佳品。对以“肾精不足不能濡养于骨”为根本致病原因的骨转移癌有一定的治疗作用。

SDF-1/CXCR4 生物学轴在包括肺癌^[8]、乳腺癌^[9]、结肠癌^[10]、黑色素瘤^[11]等多种肿瘤的发展和转移中起重要作用,至少有 23 种不同类型的恶性肿瘤表达 SDF-1 及其受体 CXCR4。肿瘤的转移并非随意,有一定的脏器转移特异性。近年的研究发现,SDF-1/CXCR4 生物学轴在肿瘤脏器特异性转移中发挥重要作用。SDF-1/CXCR4 生物学轴是指由趋化因子 SDF-1 与其特异性受体 CXCR4 相互作用而构成的一个与细胞间信号转导、细胞迁移有密切关系的偶联分子对,其实质在于 CXCR4 对其配体 SDF-1 的高度亲和力和特异性,即 CXCR4 是 SDF-1 的唯一受体^[12]。肿瘤可以自主分泌或者旁分泌 SDF-1 并表达其受体 CXCR4,二者结合产生多种生物学效应,包括血管生成,细胞迁移,增殖,依附炎症反应,其中在肿瘤生长和转移中起重要作用^[13]。

本项研究中,在光镜下观察免疫组化切片可以发现,CXCR4 在模型组中高表达($P < 0.01$),在肾经组中低表达($P < 0.01$),而肺经组和肝经组较模型组差异无统计学意义。上述结果说明了不同归经中药可能对机体具备一定的选择性,由于作用的靶点不同,抑制 CXCR4 表达情况则不一致。归肾经药物进入机体后,由于受 CXCR4 受体性质的限制,作用于骨转移癌灶,通过阻断 SDF-1/CXCR4 生物学轴及下游信号通路,从而达到抗肿瘤定向侵袭和增值目的。而肺经和肝经药物则不存在类似的作用,进而证实不同归经中药对机体的作用存在靶向特异性。

本研究为临床使用归肾经药物防治骨转移癌提供了实验依据。此外,本实验的阳性对照组归肺经药物及归肝经药物并不存在类似的作用,进而证实不同归经中药对机体的作用存在靶向特异性。目前中药归经理论研究尚缺乏统一、明确、有价值的研究结果,通过本实验肿瘤转移模型研究中药归经理论具有以下几方面的优势:一则肿瘤转移具备脏器转移特异性,利于探讨不同归经中药对机体的作用是否存在靶向性;再则肿瘤转移的研究较为深入,机理相对成熟。本实验从不同的机制,进一步观察不同归经中药在治疗骨转移癌的疗效差异,分析其抗肿瘤机制,完善了现代中药归经理论体系。

参 考 文 献

- [1] McGrath EE. OPG/RANKL/RANK pathway as a therapeutic target in cancer[J]. J Thorac Oncol, 2011, 6(9): 1468 - 1473.
- [2] Balkwill F. Chemokine biology in cancer[J]. Semin Immunol, 2003, 15(1): 49 - 55.
- [3] Kulbe H, Levinson NR, Balkwill F, et al. The chemokine network in cancer—much more than directing cell movement[J]. Int J Dev Biol, 2004, 48(5 - 6): 489 - 496.
- [4] Crazzolara R, Kreczy A, Mann G, et al. High expression of the chemokine receptor CXCR4 predicts extramedullary organ infiltration in childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. Br J Haematol, 2001, 115(3): 545 - 553.
- [5] 陈奇主编. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 1262.
- [6] 朱世杰. 李佩文治疗乳腺癌经验撷英[J]. 北京中医药, 2008, 27(3): 173 - 175.
- [7] 田能, 隋峰, 林娜. 归经理论的现代研究概况[J]. 中国中医基础医学杂志, 2009, 15(9): 718 - 720.
- [8] Sterlacci W, Saker S, Huber B, et al. Expression of the CXCR4 ligand SDF-1/CXCL12 is prognostically important for adenocarcinoma and large cell carcinoma of the lung[J]. Virchows Arch, 2016, 468(4): 463 - 471.
- [9] Price TT, Burness ML, Sivan A, et al. Dormant breast cancer micrometastases reside in specific bone marrow niches that regulate their transit to and from bone[J]. Sci Transl Med, 2016, 8(340): 340ra73.
- [10] Amara S, Chaar I, Khiari M, et al. Stromal cell derived factor-1 and CXCR4 expression in colorectal cancer promote liver metastasis[J]. Cancer Biomark, 2015, 15(6): 869 - 879.
- [11] Bi J, Li P, Li C, et al. The SDF-1/CXCR4 chemokine axis in uveal melanoma cell proliferation and migration[J]. Tumour Biol, 2016, 37(3): 4175 - 4182.
- [12] Müller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis[J]. Nature, 2001, 410(6824): 50 - 56.
- [13] Sekula M, Miekus K, Majka M. Down-regulation of the CXCR4 receptor inhibits cervical carcinoma metastatic behavior *in vitro* and *in vivo* [J]. Int J Oncol, 2014, 44(6): 1853 - 1860.

(收稿:2015-08-11 修回:2017-02-09)

责任编辑: 白 霞

英文责编: 张晶晶