

马钱子碱对乳腺癌骨转移相关因子表达的影响

孙 鑫,李 平,张 梅,马文静

(安徽医科大学第一附属医院,安徽 合肥 230022)

摘 要:[目的] 探讨马钱子碱对乳腺癌骨转移相关因子的影响。[方法] 建立裸鼠乳腺癌骨转移模型,并用马钱子碱干预后用逆转录聚合酶链反应法(RT-PCR)检测各组肿瘤组织中骨转移相关因子 MMP-2、CXCR4、RANKL、OPG mRNA 表达量。[结果] 马钱子碱经腹腔给药的半数致死量(Medial lethal dose, LD₅₀)为 69mg/kg。根据 LD₅₀ 的 1/10、1/20 和 1/40 的量,设三个剂量组:高剂量组 6.90mg/kg、中剂量组 3.45mg/kg 和低剂量组 1.73mg/kg,同时与空白对照组比较。马钱子碱各剂量组 MMP-2、CXCR4、RANKL mRNA 的表达量随着马钱子碱剂量的增加逐渐下降($P<0.05$),而 OPG mRNA 的表达量则随着马钱子碱剂量的增加逐渐增加($P<0.05$)。[结论] 马钱子碱可以抑制乳腺癌骨转移,主要以调节 MMP-2、CXCR4、RANKL、OPG 等骨转移相关因子的表达为主要手段。

主题词:马钱子碱;MMP-2;CXCR4;RANKL;OPG mRNA

中图分类号:R737.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-170X(2017)12-01093-05

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2017.12.B009

Effects of Brucine on Correlated Factors Expression in Breast Cancer with Bone Metastasis

SUN Xin, LI Ping, ZHANG Mei, et al.

(The First Affiliated Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230022, China)

Abstract: [Objective] To explore the effect of brucine on bone metastasis factors in breast cancer. [Methods] Model of breast cancer bone metastasis in nude mice was made, bone metastasis correlation factors expression of MMP-2, CXCR4, RANKL, OPG mRNA after Brucine intervention were detected by RT-PCR method. [Results] The median lethal dose (LD₅₀) of brucine by intraperitoneal administration was 69mg/kg. According to LD₅₀ and 1/10, 1/20 and 1/40, the experiment group was divided into high dose group (6.90mg/kg), middle dose group (3.45mg/kg), low dose group (1.73mg/kg) and control group. The MMP-2, CXCR4, RANKL mRNA expression decreased with Brucine dose increased ($P<0.05$), While the expression of OPG mRNA increased with Brucine dose increased ($P<0.05$). [Conclusion] Brucine can inhibit bone metastasis of breast cancer, mainly in regulating bone metastasis-associated factors such as MMP-2, CXCR4, RANKL, OPG as the main means of expression.

Subject words: brucine; MMP-2; CXCR4; RANKL; OPG mRNA

乳腺癌是女性发病率最高的恶性肿瘤^[1],骨是乳腺癌最常见的转移部位,约占晚期转移患者的70%,即使在早期切除肿块的乳腺癌患者中,仍有13.6%的患者不可避免地出现骨转移^[2]。研究显示金属蛋白酶(matrix metallo proteinases, MMPs)是能在细胞转移过程中降解细胞外的基质的一类蛋白酶,

与肿瘤转移有关^[3],其中 MMP-2 和乳腺癌的生长浸润及骨质破坏相关度最高^[4]。近年来研究发现趋化因子受体 4 (CXC chemokine receptor-4, CXCR4) 为乳腺癌骨转移必须因子,主要为协同骨桥蛋白、结缔组织生长因子等共同促进乳腺癌细胞骨转移^[5]。此外,由于乳腺癌骨转移的特点为溶骨性骨破坏,破骨细胞有着关键作用,骨保护素(osteoprotegerin, OPG)和核因子- κ B 受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor kappa beta ligand, RANKL)在破骨细胞

基金项目:安徽省卫生计生委中医药科研课题(2014zy18)

通讯作者:李 平,主任医师,博士生导师,博士;安徽医科大学第一附属医院中西医结合肿瘤中心,安徽省合肥市绩溪路 218 号(230022);E-mail:1964liping@sina.com

收稿日期:2017-01-15; **修回日期:**2017-03-04

分化及激活过程中起相当重要的作用。OPG 主要作用是抑制破骨前体细胞的分化和成长。所以 OPG 表达强弱可以一定程度反映骨吸收程度:OPG 增多可以抑制骨的吸收。肿瘤细胞通过破坏 OPG 的平衡,抑制成骨细胞,这也是乳腺癌发生骨转移的重要机制之一^[6]。

马钱子为植物马钱的成熟种子,在中医学中具有散结消肿、通络止痛的功效。马钱子碱(Brucine)为其主要化学成分之一,在多种肿瘤中被证实具有类似细胞毒作用,同时也有报道可以促进骨质修复等作用^[7,8]。本实验在成功构建裸鼠乳腺癌骨转移模型的基础上,研究了马钱子碱对 MMP-2、CXCR4、RANKL、OPG mRNA 表达量的影响,从而进一步阐明马钱子碱抑制乳腺癌骨转移瘤生长的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

Balb/c-nu/nu 裸鼠(安徽医科大学实验动物研究所);马钱子碱(中国药品生物制品检定所);人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231(上海中科院细胞库);逆转录试剂盒(Fermentas life science);Trizol 试剂(Invitrogen);DEPC(BD 公司);dNTP Mixture(BD 公司);TaqDNA 聚合酶;DNA 标志物 DL2000(安科生物公司);待测因子 MMP-2、CXCR4、RANKL、OPG 的引物和内参由安徽省立医院血液病学重点实验室合成。

1.2 实验方法

1.2.1 乳腺癌细胞培养和传代

细胞株 MDA-MB-231 放在 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中培养,置于 37℃、5% 二氧化碳(CO₂)培养箱中,根据细胞生长情况用 0.25% 胰酶消化,同时进行换液、传代。分瓶装好。

1.2.2 裸鼠乳腺癌骨转移模型的建立^[9]及分组

将 0.2ml 瘤细胞悬液接种于裸鼠右后肢股骨皮质中。接种之后的荷瘤裸鼠模型随机分为 4 组,每组 5 只。用酒精来溶解马钱子碱(20mg/瓶),加生理盐水稀释并配成溶液,分为高、中、低三个浓度级别,分别为 0.4mg/ml、0.2mg/ml、0.1mg/ml。接种 24h 后开始给药。实验组:腹腔注射马钱子碱。根据半数致死剂量(medial lethal dose, LD₅₀)的 1/10、1/20 和 1/40 的

量,设三个剂量组(马钱子碱经腹腔给药的半数致死量为 69mg/kg):高剂量组(A 组)6.90 mg/kg、中剂量组(B 组)3.45 mg/kg 和低剂量组(C 组)1.73mg/kg;对照组(D 组):腹腔按计划注射灭菌生理盐水,实验组和对照组均每日 1 次,连续 8 天。

1.2.3 RT-PCR 检测 MMP-2、CXCR4、RANKL、OPG mRNA 表达

接种 7 周后颈椎脱臼处死裸鼠,无菌操作下剥离肿瘤组织,Trizol 法提取肿瘤组织 RNA,后逆转录合成 cDNA 作为模板,进行 PCR 的扩增。以此进一步检测 MMP-2、CXCR4、RANKL、OPG mRNA 表达情况。

1.3 统计学处理

实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 13.0 统计软件对计量资料进行分析,用 *q* 检验进行组内及组间两两比较。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 马钱子碱对 MMP-2 mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果如图 1 所示,以 β -actin 作为内对照。与对照组进行比较,马钱子碱明显降低乳腺癌组织中 MMP-2 mRNA 的表达水平,随着马钱子碱剂量的增加逐渐下降(*P* < 0.05)(Table 1)。

2.2 马钱子碱对 CXCR4 mRNA 表达的影响

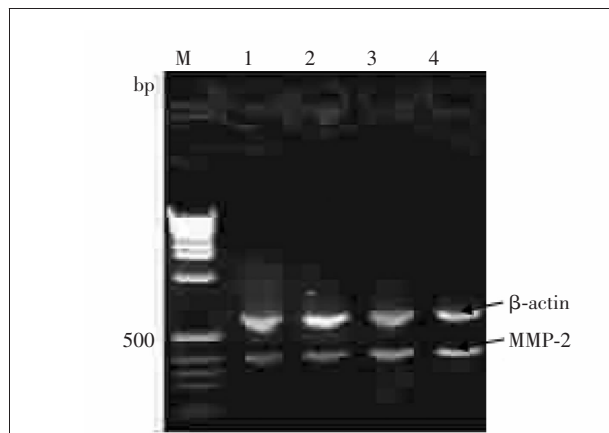
RT-PCR 结果如图 2 所示,以 β -actin 作为内对照。与对照组进行比较,马钱子碱明显降低乳腺癌组织中 CXCR4 mRNA 的表达水平,随着马钱子碱剂量的增加逐渐下降(*P* < 0.05)(Table 1)。

2.3 马钱子碱对 RANKL、OPG mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果如图 3,以 β -actin 作为内对照。与对照组比较,马钱子碱下调乳腺癌组织中 RANKL mRNA 表达,且随着马钱子碱剂量的增加逐渐下降(*P* < 0.05),OPG mRNA 的表达量则逐渐增加,OPG/RANKL 比值也在增加(*P* < 0.05)(Table 1)。

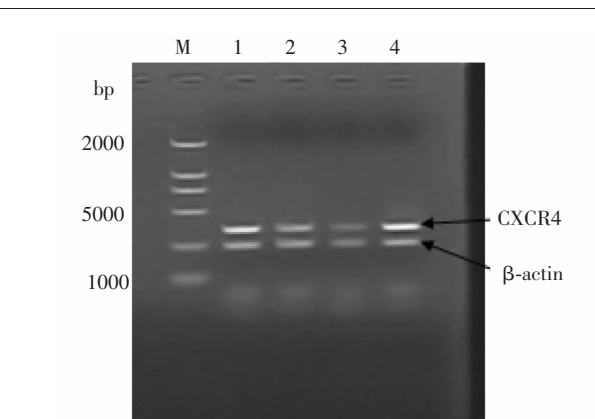
3 讨论

乳腺癌骨转移机制复杂,其发生与乳腺癌细胞的生物特性有相关性,也与转移部位的组织特性有关^[10]。乳腺癌骨转移是非常复杂的过程,具体有肿瘤



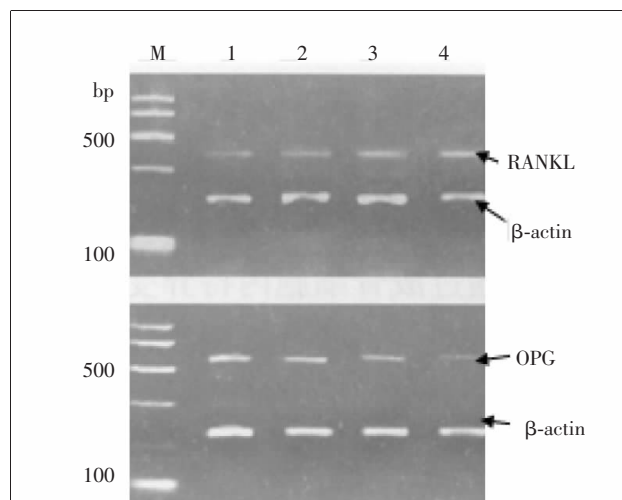
M:Marker;1:High dose brucine group;2:Middle dose brucine group;3:Low dose brucine group;4:Control group

Figure 1 Effect of brucine on MMP-2 mRNA



M:Marker;1:Low dose brucine group;2:Middle dose brucine group;3:High dose brucine group;4:Control group

Figure 2 Effect of brucine on CXCR4 mRNA



M:Marker;1:High dose brucine group;2:Middle dose brucine group;3:Low dose brucine group;4:Control group

Figure 3 Effect of brucine on OPG/RANKL mRNA

Table 1 Effect of brucine on MMP-2, CXCR4, OPG/RANKL mRNA

Group	Brucine(mg/kg)	MMP-2	CXCR4	OPG /RANKL
High dose	6.90	0.15±0.02	0.45±0.05	3.68±0.21
Middle dose	3.45	0.26±0.06	0.69±0.07	3.22±0.59
Low dose	1.73	0.53±0.08	0.85±0.03	2.87±0.49
Control	NS	0.67±0.13	0.94±0.06	2.13±0.35

细胞穿透生物基质屏障、血管基膜以及穿过血管壁迁移到具体转移器官微环境等一系列过程。

在乳腺癌转移过程中,乳腺癌细胞首先要脱离原发灶,然后突破细胞外基质和基底膜屏障。肿瘤

细胞从原发灶脱离的同时,自身能分泌或诱导宿主分泌一系列降解基底膜和间质的溶解酶,只有多途径来降解细胞外基质,才能使肿瘤细胞越过基质屏障发生迁移。MMPs 即是一组能降解细胞外基质的内肽酶家族,MMPs 几乎可分解细胞外基质的各种成分,如纤维胶原蛋白、弹性蛋白等。自 1962 年人类首次发现第一种间质胶原酶并命名为 MMP-1,至今在 MMP 家族中至少发现 20 余种。在乳腺癌中有多种 MMPs 的过度表达,其中研究较多的是 MMP-2、MMP-9 等。MMP-2 属于 MMPs 家族中的明胶酶类,主要降解层黏连蛋白等,与肿瘤的生长、浸润、转移及骨破坏密切相关^[11]。目前已经发现了 MMP-2 在乳腺癌转移灶中高表达。Kim 等^[12]通过沉默 MMP-2 基因在乳腺癌 MCF-7 细胞株中的表达,发现乳腺癌细胞侵袭能力明显下降。出现脑、肝、骨转移的概率显著性降低,而上调 MMP-2 的表达,则肿瘤侵袭性明显增强^[13],说明了 MMP-2 与肿瘤的远处转移密切相关。

乳腺癌细胞在突破基质屏障后,发生转移也并非随机的,而是一个主动的、具有器官选择的过程。研究发现肿瘤细胞能分泌特定的趋化因子受体,而转移器官则高表达对应配体,从而使肿瘤转移具有一定的趋向性。趋化因子是一类具有 40~50 种蛋白质的家族,因为蛋白质相对位置的不尽相同,一般分为 CXC、CC、C、CX3C 四大类,其受体也相应地分为 CXCR、CCR、CR、CX3CR。其中 CXC 类又分

为 ELR+ 和 ELR- 趋化因子。基质细胞衍生因子 1 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1) 属于趋化因子 ELR- CXC 亚家族, 又名 CXCL12。趋化因子受体 4 (CXC chemokine receptor-4, CXCR4) 是 SDF-1 唯一受体。CXCR4 是乳腺癌骨转移的必须因子之一, SDF-1 可以与 CXCR4 相互作用, 产生的 SDF-1/CXCR4 在乳腺癌等肿瘤的转移中起到很大影响, 是检测肿瘤转移的重要标志。近年来的研究表明, SDF-1 及其受体 CXCR4 相互作用而形成的 SDF-1/CXCR4 在乳腺癌等肿瘤的转移中发挥重要作用。李德全等^[14]研究发现, 通过影响乳腺癌细胞基因 CXCR4 转录水平, 可以减少乳腺癌转移的概率。Haralabos 等^[15]在临床上观察了 SDF-1/ CXCR4 表达阳性的乳腺癌患者, 骨转移概率明显增高。

病理表明乳腺癌骨转移以溶骨性破坏为主, 特点为由破骨细胞直接作用并破坏骨组织。大量研究表明, 骨保护素、核因子- κ B 受体活化因子配体、核因子- κ B 受体活化因子 (receptor activator of nuclear factor kappa beta, RANK) 即 OPG/ RANKL/ RANK 系统, 在破骨细胞分化和激活过程中起主要作用。研究发现体内由成骨细胞或间质细胞分泌 OPG。成骨细胞或间质细胞同时还分泌 RANKL, 其与破骨细胞前体或破骨细胞分泌的 RANK 结合并经细胞内信号转导途径刺激破骨细胞激活分化。OPG 与 RANKL 结合后, 可抑制 RANKL 与 RANK 的结合, 从而起到抑制破骨细胞前体的分化和成熟, 减少骨吸收的作用^[16]。

马钱子在中医中常用于消痞块, 解除肿痛等作用, 作为主要成分的马钱子碱具有抗肿瘤、镇痛、促进骨修复等作用^[17], 广泛用于各种风湿顽痹、骨病和肿瘤以及癌性疼痛的治疗。实验研究发现, 马钱子碱对实体瘤有抑制作用, 副作用不大, 如抑制骨髓造血系统、免疫系统和肝肾功能损害等^[18]。本课题组建立了裸鼠乳腺癌骨转移的模型并用马钱子碱进行干预, 用 RT-PCR 方法检测马钱子碱对乳腺癌骨转移的相关因子 MMP-2、CXCR4、RANKL、OPG mRNA 表达的调节作用, 观察马钱子碱对乳腺癌骨转移的抑制效果, 来初步探讨马钱子碱抑制乳腺癌骨转移瘤生长的作用机制。本研究显示, 与对照组相比, 马钱子碱各剂量组 MMP-2、CXCR4 mRNA 表达量均有所降低, 随着剂量增加, 降低越明显, 提示马钱子碱

可能通过降低乳腺癌 MMP-2 和 CXCR4 的水平, 抑制肿瘤生长, 降低其远处转移的能力。降低 MMP-2 和 CXCR4 表达量可能是马钱子碱抑制乳腺癌骨转移的机制之一。因此, 降低乳腺癌细胞的侵袭和转移能力, 从而抑制乳腺癌细胞向靶器官的趋向性转移。

本实验还通过 RT-PCR 方法检测 OPG 和 RANKL 的表达, 我们观察到马钱子碱呈剂量依赖性促进 OPG mRNA 的表达, 抑制 RANKL mRNA 的表达, 使 OPG/RANKL 比值增加, 高剂量组增加最明显。OPG 和 RANKL 是成骨细胞和破骨细胞之间信号传递的调控分子, RANKL 和 OPG 的分泌水平可反映破骨细胞的分化即骨吸收的程度; RANKL 过多将增加骨吸收; OPG 过多则抑制骨吸收。马钱子碱可能通过调节 OPG 和 RANKL 的比值, 从而抑制破骨细胞生长成熟。

综上所述, 从裸鼠模型可以确定马钱子碱对乳腺癌骨转移的相关因子如 MMP-2、CXCR4、RANKL、OPG mRNA 表达均有着较好的调节作用, 明确证明马钱子碱能起到抑制乳腺癌骨转移的作用, 从而为进一步为研究马钱子碱治疗乳腺癌骨转移患者奠定了一定的理论及实验基础。

参考文献:

- [1] Chen WQ, Zheng RS, Zhang SW, et al. Analysis of the incidence and mortality of malignant tumors in China in 2012 [J]. China Cancer, 2016, 25(1): 1-8. [陈万青, 郑荣寿, 张思维, 等. 2012 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析 [J]. 中国肿瘤, 2016, 25(1): 1-8.]
- [2] Liede A, Jerzak KJ, Hernandez RK, et al. The incidence of bone metastasis after early-stage breast cancer in Canada [J]. Breast Cancer Res Treat, 2016, 156(3): 587-595.
- [3] Tauro M, Shay G, Sansil SS, et al. Bone seeking matrix metalloproteinase-2 inhibitors prevent bone metastatic breast cancer growth [J]. Mol Cancer Ther, 2017, 16(1): 25-34.
- [4] Zajkowska M, Szmitkowski M. Plasma levels and diagnostic utility of M-CSF, MMP-2 and its inhibitor TIMP-2 in the diagnostics of breast cancer patients [J]. Clin Lab, 2016, 62(9): 1661-1669.
- [5] Irawan C, Atmakusumah D, Siregar NC, et al. Expression of biomarkers CXCR4, IL11-RA, TFF1, MLF1P in advanced breast cancer patients with bone metastatic; a diagnostic Study [J]. Acta Med Indones, 2016, 48(4): 261-268.
- [6] Ibrahim T, Ricci M, Scarpi E, et al. RANKL: a promising

- circulating marker for bone metastasis response [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(4):2970–2975.
- [7] Ruijun W, Wenbin M, Yumin W, et al. Inhibition of glioblastoma cell growth in vitro and in vivo by brucine, a component of Chinese medicine [J]. *Oncol Res*, 2014, 22(5):275–281.
- [8] Serasanambati M, Chilakapati SR, Manikonda PK, et al. Anticancer effects of brucine and gemcitabine combination in MCF-7 human breast cancer cells [J]. *Nat Prod Res*, 2015, 29(5):484–490.
- [9] Wright LE, Ottewell PD, Rucci N, et al. Murine models of breast cancer bone metastasis [J]. *Bonekey Rep*, 2016, 5(3):1–11.
- [10] Bahrami T, Mokmeli S, Hossieni H, et al. The molecular signature of breast cancer metastasis to bone [J]. *Anti-cancer Drugs*, 2016, 27(9):824–831.
- [11] Chen Y, Wang X, Chen G, et al. The impact of matrix metalloproteinase 2 on prognosis and clinicopathology of breast cancer patients: a systematic meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3):1–16.
- [12] Kim D, Rhee S. Matrix metalloproteinase-2 regulates MDA-MB-231 breast cancer cell invasion induced by active mammalian diaphanous-related formin 1 [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(1):277–282.
- [13] Cao YB, Yu T, Hui LP, et al. LOXL2 promotes the invasion of human breast cancer cell line MCF-7 [J]. *Modern Oncology*, 2015, 23(6):749–751. [曹宇勃, 于涛, 惠林萍, 等. LOXL2 促进乳腺癌 MCF-7 细胞侵袭研究 [J]. *现代肿瘤医学*, 2015, 23(6):749–751.]
- [14] Li DQ, Han LL, Liu JL, et al. Effects of RSK4 on cell proliferation, invasion and adherence related genes in breast cancer cells [J]. *Journal of Chinese Oncology*, 2013, 19(9):665–670. [李德全, 韩璐璐, 刘剑仑, 等. RSK4 对乳腺癌细胞增殖侵袭黏附相关基因表达水平的影响 [J]. *肿瘤学杂志*, 2013, 19(9):665–670.]
- [15] Papatheodorou H, Papanastasiou AD, Sirinian C, et al. Expression patterns of SDF1/CXCR4 in human invasive breast carcinoma and adjacent normal stroma: correlation with tumor clinicopathological parameters and patient survival [J]. *Pathol Res Pract*, 2014, 210(10):662–667.
- [16] Le Pape F, Vargas G, Clézardin P. The role of osteoclasts in breast cancer bone metastasis [J]. *J Bone Oncol*, 2016, 5(3):93–95.
- [17] Zhang F, Xu CL, Wang XM, et al. Based on anti-tumor activity study of nux-vomica with strychnine and brucine as the main active components [J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2014, 29(11):3491–3493. [张芳, 徐春蕾, 王筱喙, 等. 基于土的宁和马钱子碱为主要活性成分的马钱子抗肿瘤活性研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(11):3491–3493.]
- [18] Luo WJ, Wang XL, Zheng L, et al. Brucine suppresses colon cancer cells growth via mediating KDR signaling pathway [J]. *J Cel Mol Med*, 2013, 17(10):1316–1324.