

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.06.008

· 基础研究 ·

抑制 CXCR4 活性对乳腺癌骨转移影响的体内外研究

肖丹, 刘寿贵, 刘磊, 郭善禹(上海交通大学医学院附属第九人民医院 普外科, 上海 200011)

[摘要] **目的:**应用特异性抑制剂 AMD3100 抑制人乳腺癌骨高转移 MDA-MB-231SA-rfp 细胞中 CXCR4 的活性,探讨 CXCR4 在乳腺癌细胞体内、外增殖和迁移中的作用和机制。**方法:**CCK8 法和 Transwell 法检测 AMD3100 对 MDA-MB-231SA-rfp 细胞体外增殖和迁移能力的影响。构建 MDA-MB-231SA-rfp 细胞骨转移裸鼠模型,以不同质量浓度的 AMD3100 处理后,X 线影像观察骨转移情况,进一步利用 MicroPET 进行半定量分析,并应用 H-E 染色检测骨转移灶的定位。Western blotting 法检测 AMD3100 对 MDA-MB-231SA-rfp 细胞和移植瘤转移灶组织中 CXCR4 蛋白表达的影响。**结果:**AMD3100 能明显抑制 MDA-MB-231SA-rfp 细胞在 SDF-1 刺激下的增殖和迁移($P < 0.05$),较高质量浓度(2 000 ng/ml)的 AMD3100 效果更明显($P < 0.01$)。成功构建 MDA-MB-231SA-rfp 细胞裸鼠乳腺癌骨转移模型,不同质量浓度 AMD3100 处理后,小鼠下肢骨骨质破坏程度降低;MicroPET 分析发现,对照组、低剂量 AMD3100 组、高剂量 AMD3100 组 SUVmax 值分别为 9.44 ± 0.53 、 5.70 ± 0.25 、 2.18 ± 0.47 ($P < 0.01$);组织病理检测证实为乳腺癌骨转移灶。Western blotting 结果显示,AMD3100 作用前后 MDA-MB-231SA-rfp 细胞和骨转移灶标本中 CXCR4 蛋白表达无明显变化。**结论:**AMD3100 降低 CXCR4 的活性能抑制乳腺癌 MDA-MB-231SA-rfp 细胞体外增殖和迁移能力,并能抑制裸鼠体内乳腺癌骨转移灶的形成。

[关键词] CXC 趋化因子受体 4; AMD3100; 乳腺癌; 骨转移; MicroPET

[中图分类号] R737.9; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)06-0609-06

In vivo and in vitro studies of blocking CXC chemokine receptor-4 on bone metastasis of breast cancer

XIAO Dan, LIU Shou-gui, LIU Lei, GUO Shan-yu (Department of General Surgery, 9th People's Hospital Affiliated to School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200011, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of CXC chemokine receptor-4 (CXCR4) in the proliferation and migration of breast cancer MDA-MB-231SA-rfp cells *in vitro* and *in vivo* by a specific small CXCR4 inhibitor, AMD3100. **Methods:** MDA-MB-231SA-rfp cells were treated with AMD3100, and the proliferation and migration were detected by CCK-8 and Transwell assay. MDA-MB-231SA-rfp cells were inoculated into nude mice to establish a model of breast cancer bone metastasis xenograft. AMD3100 at different final concentrations were delivered to mice. X-ray was taken to observe breast cancer bone metastasis and MicroPET was used to perform a semiquantitative analysis of breast cancer bone metastasis. H-E staining was used to further determine the location of breast cancer bone metastasis. Western blotting was performed to determine CXCR4 protein expression in MDA-MB-231SA-rfp cells as well as in xenograft tissues before and after AMD3100 administration. **Results:** The cell proliferation and migration of MDA-MB-231SA-rfp cells line induced by SDF-1 were significantly inhibited by AMD3100 ($P < 0.05$) and 2 000 ng/ml AMD3100 showed much more significant inhibition of the cell proliferation and migration ($P < 0.01$). The model of breast cancer bone metastasis xenograft was successfully established. Bone erosion of the lower limb found by X-ray was decreased after AMD3100 treatment of different concentrations. MicroPET images demonstrated that SUVmax values of the control group, low concentration AMD3100 group and high concentration AMD3100 group were respectively 9.44 ± 0.53 , 5.70 ± 0.25 and 2.18 ± 0.47 ($P < 0.01$). H-E staining detection confirmed the bone metastasis of breast cancer. No significant difference was found in

[基金项目] 上海市教育委员会科研基金资助项目(No. 09yz79)。Project supported by the Research Foundation from Shanghai Education Committee (No. 09yz79)。

[作者简介] 肖丹(1986-),男,安徽省马鞍山市当涂县人,硕士生,主要从事乳腺癌骨转移基质研究。E-mail:tiolet@163.com

[通信作者] 郭善禹(GUO Shan-yu, corresponding author), E-mail: guoshuyu@sina.com

CXCR4 protein expression in MDA-MB-231SA-rfp cells and bone metastasis tissues before and after AMD3100 administration. **Conclusion:** Blocking the CXCR4 activity by AMD3100 can inhibit the proliferation and migration capacity of breast cancer MDA-MB-231SA-rfp cells *in vitro*, and also the bone metastasis in xenograft *in vivo* in nude mice.

[**Key words**] CXC chemokine receptor 4; AMD3100; breast cancer; bone metastasis; MicroPET

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(6): 609-614]

CXC 趋化因子受体 4(CXC chemokine receptor 4, CXCR4)是 CXC 趋化因子家族成员基质细胞衍生因子 1(stromal cell derived factor-1, SDF-1)的特异性受体,属于 G 蛋白偶联受体超家族成员之一,在维持胚胎发育、介导免疫及炎症反应、调控造血、人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染、干细胞活化等多种生理和病理过程中发挥重要作用^[1]。近年来研究^[2-7]发现,多种肿瘤细胞的发生、发展、转移与 CXCR4 密切相关, CXCR4 在肿瘤的生长和转移中扮演重要角色。本研究以乳腺癌 MDA-MB-231SA-rfp 细胞为研究对象,利用 CXCR4 高度特异性小分子抑制剂,从体内外两种实验途径观察抑制 CXCR4 活性对乳腺癌细胞骨转移能力的影响,为进一步深入研究乳腺癌骨转移机制提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231SA-rfp 由上海第九人民医院骨科实验室惠赠,为 MDA-MB-231 细胞经多代筛选后的亚型,具有完全骨转移的特点,无非骨组织转移。CXCR4 小分子抑制剂 AMD3100 粉剂用无菌 PBS 溶解稀释 1 000 倍,并根据需要稀释分装到实验用培养液中。AMD3100 购自 Sigma 公司, SDF-1 购自 Peprotech 公司。MicroPET 及^[18F]-氟脱氧葡萄糖(^{18F}-FDG)由上海交通大学医学院附属瑞金医院核医学科提供。BALB/c 雌性裸鼠由上海第九人民医院实验动物中心提供[实验动物合格证书 SYXK(沪)2007-0008],在无特异病原菌(specific pathogen-free, SPF)条件下饲养,鼠龄 4~6 周,体质量 17~22 g。MicroPET 扫描仪(microPET R4)是美国 CTI Concorde Microsystems 产品系列。

1.2 CCK8 法检测 AMD3100 对 MDA-MB-231SA-rfp 细胞增殖的影响

SDF-1 是 CXCR4 的配体,两者的结合能够激活细胞下游通路,促进细胞的增殖。利用外源性的 SDF-1,将实验分为 PBS 组(无 SDF-1)、单纯 AMD3100 组(仅添加 AMD3100,无 SDF-1)以及 SDF-1 组、1 000 ng/ml 的 AMD3100 组和 2 000 ng/

ml 浓度的 AMD3100 组(SDF-1 存在条件下),共 5 组。96 孔板每孔接种 1×10^5 个 MDA-MB-231SA-rfp 细胞,无血清条件下常规培养 24 h,之后各孔取出 100 μ l 培养液,分别加入 CCK8 10 μ l/孔,并于相应孔添加 AMD3100 或 PBS 处理,于 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 2 h。每天添加质量浓度为 20 ng/ml 的 CXCR4 配体 SDF-1。CCK8 法检测在 450 nm 波长处各孔光密度值,连续检测 4 d。每样品设 3 个平行孔,实验重复 3 次。每天添加 20 ng/ml CXCR4 配体 SDF-1。

1.3 Transwell 法检测 AMD3100 对 MDA-MB-231SA-rfp 细胞迁移的影响

实验分为 SDF-1 组、1 000 ng/ml AMD3100 组和 2 000 ng/ml AMD3100 组,共 3 组。在 Transwell 小室聚碳酸酯微孔下室面滴加质量浓度 25 μ g/ml 的 40 μ l FN 后风干。取各分组细胞 100 μ l (5×10^4 / ml)接种于上室,每组设 3 个复孔。迁移细胞固定,染色、风干后经 10% 乙酸脱色 20 min,洗脱液于酶标仪上 570 nm 波长处测光密度(D_{570})值,间接反映迁移细胞数目。实验重复 3 次。

1.4 乳腺癌骨转移动物模型的建立

18 只 BALB/c 雌性裸鼠按随机原则平均分为 3 组,每组 6 只,分为对照组、低剂量 AMD3100 组(4 mg/kg)和高剂量 AMD3100 组(6 mg/kg)。取对数生长期的 MDA-MB-231SA-rfp 细胞,消化并吹打成单细胞悬液,1 000 \times g 离心 5 min,弃上清,加入适量 DMEM 培养液,将细胞密度调整至 1×10^6 / ml,测细胞活力为 97%。

裸鼠经腹腔注射戊巴比妥麻醉(生理盐水 1:1 稀释,注射 0.12~0.14 ml/只),前胸壁 75% 酒精消毒,固定小鼠,呈仰卧位,头朝向实验者。再次反复吹打细胞悬液,以 26 G 针头的 1 ml 注射器抽吸上述悬液 0.1 ml,于胸骨左旁第 2 肋间、与胸廓成 45 $^{\circ}$ 夹角进针,深度约 5~6 mm,轻轻回抽,当针尖有自动持续的鲜红色动脉血不断进入针芯时提示左心室穿刺成功,保持空针稳定,在 40~60 s 内缓慢均一地向左心室注入细胞悬液。

1.5 X 线摄片观测 AMD3100 对 MDA-MB-231SA-rfp 细胞裸鼠移植瘤骨转移的影响

根据前述分组,建模后第 2 天开始按分组要求分

别腹腔注射 PBS 和 AMD3100, 1 次/d, 每次 0.1 ml。建模 2 周后, 每周进行一次实验用鼠全身骨骼 X 线摄片。裸鼠麻醉后俯卧位固定, X 线胶片置于裸鼠下方, 于 40 kV、2 mA、3 s、H28 cm 条件下摄片^[8]。

1.6 小动物 MicroPET 检测 AMD3100 对 MDA-MB-231SA-rfp 细胞裸鼠移植瘤骨转移的影响

小鼠实验前 8 h 禁食禁水。将小鼠放入吸气室内通过吸入混有 2% 异氟烷的纯氧实施麻醉。完全麻醉后经尾静脉注射放射性示踪剂¹⁸F-FDG, 40 min 后进行 10 min 的 MicroPET 图像采集。小鼠俯卧位固定于扫描床, 其头部长轴与扫描器长轴平行, 位于扫描器视野内。每个图像均由 MicroPET R4 自带分析软件 ASIPro 勾选出骨转移部位兴趣区(region of interest, ROI), 并取标准摄取值(standard uptake value, SUV)最大值(SUVmax)进行统计。所有 ROI 均有 1 名对实验方案不知情的研究人员绘制。

1.7 H-E 染色观察裸鼠骨转移组织灶内的情况

处死裸鼠, 根据 X 线及 MicroPET 影像结果, 无菌条件下取相应骨转移组织, 以 10% 甲醛溶液固定, 脱钙, 石蜡包埋, 切片, H-E 染色, 光学显微镜下观察。

1.8 Western blotting 检测 AMD3100 对 CXCR4 表达的影响

使用 RIPA 缓冲液抽提 AMD3100 作用前后的细胞和冰冻肿瘤组织总蛋白, BCA 法检测蛋白浓度。蛋白定量、变性后取 50 μg 样品以 SDS-PAGE 分离, 电转于 PVDF 膜上, 室温封闭 2 h 后加抗 CXCR4 抗体一抗(1:1 000) 4 ℃ 过夜, 次日加辣根过氧化物酶交联二抗(1:5 000), 室温孵育 2 h, 使用超敏电化学发光 ECL 法显影。

1.9 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 14.0 软件, 采用 *t* 检验分析。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AMD3100 抑制 MDA-MB-231SA-rfp 细胞增殖

CCK8 增殖实验结果显示, PBS 组(无 SDF-1)、单纯 AMD3100 组(仅添加 AMD3100 无 SDF-1)、SDF-1 组、1 000 和 2 000 ng/ml AMD3100 组(SDF-1 存在条件下)细胞增殖率分别为(4.72 ± 0.29)%、(4.42 ± 0.15)%、(7.70 ± 0.66)%、(5.35 ± 0.28)%、(3.35 ± 0.21)%。结果显示, SDF-1 和 CXCR4 结合对细胞增殖的刺激作用受到 AMD3100 的明显抑制($P < 0.05$), 且 2 000 ng/ml 的 AMD3100 对细胞增殖的抑制作用

更明显($P < 0.01$)。单纯 AMD3100 组(仅添加 AMD3100 无 SDF-1)和 PBS 组(无 SDF-1)细胞增殖比较存在差异, 但无统计学意义($P > 0.05$)。以上结果说明, AMD3100 抑制 MDA-MB-231SA-rfp 细胞在 SDF-1 刺激下的细胞增殖($P < 0.05$), 并且较高质量浓度的 AMD3100(2 000 ng/ml)抑制细胞增殖作用更为显著($P < 0.01$)。

2.2 AMD3100 抑制 MDA-MB-231SA-rfp 细胞的体外迁移能力

Transwell 迁移实验结果显示, SDF-1 组迁移细胞 *D* 值为 0.22 ± 0.04 , 1000 ng/ml 及 2 000 ng/ml AMD3100 组迁移细胞 *D* 值分别为 0.14 ± 0.03 、 0.08 ± 0.01 。比较结果发现, AMD3100 对 CXCR4 活性的抑制能够明显降低 MDA-MB-231SA-rfp 细胞的体外迁移能力($P < 0.05$), 较高质量浓度的 AMD3100(2 000 ng/ml)对 MDA-MB-231SA-rfp 细胞体外迁移能力的抑制作用更明显($P < 0.01$)。由此可见, AMD3100 能抑制 MDA-MB-231SA-rfp 细胞的体外迁移能力

2.3 裸鼠乳腺癌模型的骨转移灶形成情况

虽然研究^[9]发现 X 线摄片检测肿瘤骨转移模型的效率较低, 对早期骨转移灶显示欠佳, 但 X 线摄片仍然是检测肿瘤骨转移灶形成的常用手段。本实验中, 早期 X 线观察发现心内注射第 4 周对照组裸鼠下肢出现疑似轻微的下肢骨皮质破坏情况, 但未发现高、低剂量 AMD3100 组裸鼠出现明显骨转移灶生成及骨的变化; 直至模型建立的第 6 周, X 线摄片发现在各组裸鼠均能够观察到较为明显的骨侵蚀的现象, 提示骨转移的形成(图 1)。结果显示, 在裸鼠骨转移灶建立中, 对照组裸鼠下肢骨破坏状况与其余两组相比更为严重, 并且较早出现了骨皮质的破坏, 提示 AMD3100 对 MDA-MB-231SA-rfp 细胞对裸鼠体内骨转移灶的发生起到抑制和延缓作用, 高剂量 AMD3100 对延缓骨转移的形成似乎更为有效。

2.4 AMD3100 抑制 MDA-MB-231SA-rfp 细胞在裸鼠体内的骨转移

取前述骨转移模型建立 6 周的裸鼠行 MicroPET 成像观察及半定量分析。图 2 显示分别来自 3 组裸鼠的 MicroPET 图像, 左侧色标颜色变化从上至下依次代表由高到低的葡萄糖(放射性示踪剂¹⁸F-FDG)代谢的颜色, 区域颜色亮度与该处肿瘤摄取¹⁸F-FDG 量成正比。直接观察图像发现, 对照组裸鼠在下肢、肋骨、脊柱处的颜色高亮区域明显高于其余两个 AMD3100 治疗组, 表明 MDA-MB-231SA-rfp 细胞在对照组裸鼠骨转移形成中的表现较其余两组更

为突出,提示 AMD3100 对于 MDA-MB-231SA-rfp 细胞在裸鼠体内骨转移的形成存在抑制作用,高剂量的 AMD3100 更能抑制骨转移的形成(图 2)。

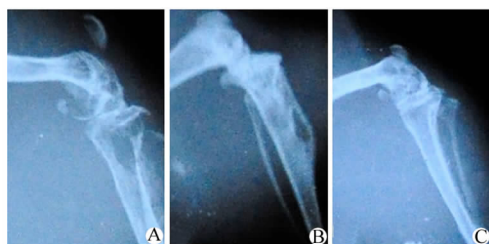


图 1 MDA-MB-231SA-rfp 细胞裸鼠移植瘤第 6 周骨缺损 X 线图像

Fig. 1 X-ray images of bone defect on the sixth week after MDA-MB-231SA-rfp cell xenograft establishment

A: Control group; B: Low dose of AMD3100 group; C: High dose of AMD3100 group

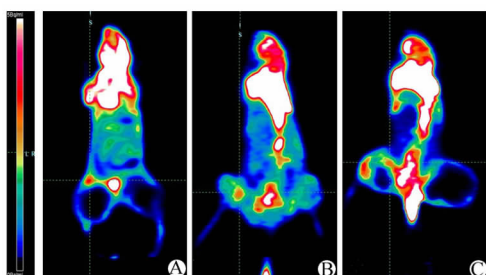


图 2 裸鼠全身骨转移灶 MicroPET 成像
Fig. 2 MicroPET images of bone metastasis of total body in xenograft nude mice

A: Low dose of AMD3100 group; B: High dose of AMD3100 group; C: Control group

为了进一步证实上述结果,勾取各组骨转移图像 ROI,以 SUV_{max} 作为半定量指标,半定量分析各组骨转移灶的差异。结果显示,对照组、低剂量组(AMD3100 4 mg/kg)和高剂量组(AMD3100 6 mg/kg)的 SUV_{max} 值分别为 9.44 ± 0.53、5.70 ± 0.25、2.18 ± 0.47。结果说明 AMD3100 能够明显抑制裸鼠体内种植的 MDA-MB-231SA-rfp 细胞骨转移的形成(P < 0.05),较高剂量 AMD3100 的抑制转移效果更明显(P < 0.01)。

2.5 MDA-MB-231SA-rfp 细胞移植瘤小鼠骨转移灶组织的病理变化

根据 X 线及 MicroPET 影像结果,切取与图像相对应的移植瘤裸鼠下肢、脊柱、肋骨部位骨转移灶进行 H-E 染色,镜下可见大量癌细胞聚集,排列紊乱,形态不规则,细胞核大且深染,异型性明显,骨结构

破坏,某些部位被癌组织取代,骨皮质连续性中断明显(图 3)。以上结果进一步证实了前述 MicroPET 图像显示与半定量分析的结果。

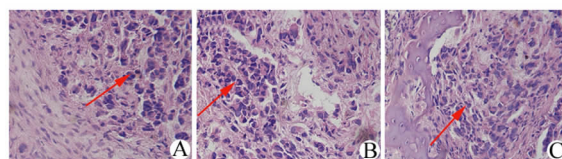


图 3 MDA-MB-231SA-rfp 细胞移植瘤裸鼠骨转移灶标本 H-E 染色结果(×200)

Fig. 3 H-E staining of bone metastasis in MDA-MB-231SA-rfp cells xenograft nude mice(×200)

A: Metastasis in the rib; B: Metastasis in the spine; C: Metastasis in the lower limb

2.6 AMD3100 对 MDA-MB-231SA-rfp 细胞和移植瘤骨转移组织中 CXCR4 蛋白表达的影响

Western blotting 检测显示,经添加 AMD3100 培养的 MDA-MB-231SA-rfp 细胞中 CXCR4 蛋白表达未见明显差异(图 4A);移植瘤模型中,对照组裸鼠与高剂量 AMD3100(6 mg/kg)组裸鼠骨转移标本中 CXCR4 蛋白表达相比无明显差异(图 4B)。以上说明,AMD3100 对 MDA-MB-231SA-rfp 细胞和移植瘤骨转移组织中 CXCR4 蛋白表达没有影响。

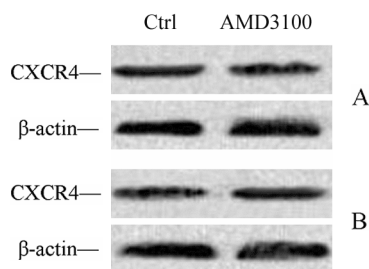


图 4 AMD3100 作用前后 MDA-MB-231SA-rfp 细胞(A)和裸鼠移植瘤转移灶组织(B)中 CXCR4 的表达
Fig. 4 CXCR4 expression in MDA-MB-231SA-rfp cells(A) and nude mice xenograft tissues(B) before and after AMD3100 administration

3 讨论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,欧洲每年约有 35 万女性死于乳腺癌^[10],其死亡的主要原因是肿瘤在体内的转移播散^[11-12]。乳腺癌骨转移的发生是一个非常复杂的过程,涉及多种因素,其中细胞因子的异常分泌在转移中发挥非常重要的作用。

CXCR4 属于趋化因子受体家族,是一类介导趋化因子行使功能的高度保守的 G 蛋白偶联受体,其 α 螺旋穿膜 7 次,编码 352 个氨基酸,是人体内 CX-CL12 的特异性受体。早期关于 CXCR4 的研究多集中在 HIV 感染方面,后期研究发现,CXCR4 在多种不同类型肿瘤中表达,是肿瘤细胞表达最为普遍的趋化因子受体^[13-14]。在各种恶性肿瘤的浸润和转移中,CXCR4 同样起到重要的作用。自 Muller 等^[15]发现,利用多种手段阻断 CXCR4 表达能够明显抑制乳腺癌向淋巴结和肺的转移,之后更多的研究^[16-17]表明,CXCR4 与多种恶性肿瘤的转移密切相关。Smith 等^[15]实验证实,小鼠尾静脉注射 CXCR4 拮抗剂能延缓乳腺癌细胞肺转移的发生。AMD3100 是趋化因子受体 CXCR4 的特效阻断剂^[18],它主要通过 CXCR4 的第二胞外环状区结合,特异性阻断 CXCR4 与其配体的结合,抑制其功能发挥^[19],从而实现了对肿瘤细胞转移的抑制作用。

本研究通过体内、体外实验探讨 CXCR4 与乳腺癌骨转移的关系。在体外实验中,为了研究 CXCR4 表达对乳腺癌细胞生物学特性的影响,选择 CXCR4 特异性拮抗剂 AMD3100,并同时利用细胞增殖实验、Transwell 实验检测 CXCR4 被抑制前后乳腺癌细胞肿瘤学特征的变化。CCK8 法检测体外乳腺癌 MDA-MB-231SA-rfp 细胞增殖能力,结果显示,SDF-1 刺激作用下的细胞增殖效应在抑制 CXCR4 活性后明显降低,说明 CXCR4 在乳腺癌细胞的生长和增殖过程中发挥重要作用,抑制 CXCR4 活性能显著降低乳腺癌细胞体外增殖能力。

近年来的研究^[20]显示,CXCR4 与其配体的结合参与调节细胞的运动和迁移。本实验利用 Transwell 迁移实验检测 AMD3100 抑制 CXCR4 活性对乳腺癌细胞迁移能力的影响。结果表明,抑制 CXCR4 活性能显著降低乳腺癌细胞的迁移能力($P < 0.05$),揭示了 CXCR4 能促进乳腺癌细胞的远处转移这一机制。

为了验证 CXCR4 对乳腺癌细胞体外生物学特性的作用,以体内实验进一步观察抑制 CXCR4 对乳腺癌骨转移能力的影响,本实验利用骨高转移性的乳腺癌 MDA-MB-231SA-rfp 细胞建立裸鼠乳腺癌骨转移模型,以不同质量浓度的 AMD3100 抑制 CXCR4 活性,并通过 X 线摄片、MicroPET 图像及 H-E 染色多种手段对实验结果进行定性定量分析。早期(第 4 周)X 线摄片发现对照组裸鼠下肢出现疑似轻度骨缺损时,低剂量和高剂量 AMD3100 组裸鼠 X 线影像仍表现正常,但随着时间推移最终出现骨转

移灶。MicroPET 影像与半定量分析结果与 X 线摄片得出的结论是相一致的,AMD3100 组与对照组相比,能明显抑制乳腺癌细胞的骨转移,且治疗效果呈浓度依赖趋势,但不能完全阻断骨转移,随时间延长,骨转移仍无法避免。

经裸鼠左心室注射肿瘤细胞与人类乳腺癌细胞骨转移过程吻合,是构建乳腺癌骨转移动物模型最常用的方法^[29]。为了排除非骨组织转移对骨转移模型建立的影响,经过筛选得到的骨高转移性乳腺癌细胞得到了广泛的认可,例如早先经过筛选的 MDA-MB-231BO 乳腺癌细胞显示骨转移率达 100%,并且不存在非骨组织转移^[30]。本实验选用的 MDA-MB-231SA-rfp 细胞同样也具有上述特点,不存在非骨组织转移现象,并且实验过程中未发现其余组织器官的转移。但也有国内报道^[31]发现,骨高转移性的乳腺癌细胞株建立的乳腺癌骨转移模型仍然存在其他组织的转移,对此现象可能的解释是裸鼠个体的差异以及实验时间较短导致骨外转移灶未能充分形成。此外,MicroPET 虽在肋骨与脊柱部位也发现了转移灶,但相较于下肢强烈的转移灶信号仍较为微弱,这种现象可能与下肢干骺端附近血供较为丰富,癌细胞易于生长有关。

最近研究^[21-22]发现,SDF-1 可能尚存在 CXCR7 这一新受体,SDF-1/CXCR7 轴同样在肿瘤的生长、发展、转移过程中起重要作用^[23-27]。研究^[28]证实,CXCR4 的选择性小分子抑制剂虽然也能够结合 CXCR7,但却是 CXCR7 的变构抑制剂。因此,虽然 CXCR4 小分子抑制剂能够明显抑制裸鼠乳腺癌细胞骨转移的发生,但只能延缓或降低转移的发生。

综上所述,本实验不仅从体外水平初步证明了抑制 CXCR4 活性能够显著降低乳腺癌细胞的增殖、迁移能力,更进一步在体内揭示了 CXCR4 对乳腺癌生长和转移的影响,为深入研究乳腺癌骨转移机制提供了新的思路。

[参考文献]

- [1] Liekens S, Schols, Hatse S. CXCL12-CXCR4 axis in angiogenesis, metastasis and stem cell mobilization [J]. *Curr Pharm Des*, 2012, 16(35): 3903-3920.
- [2] Furusato B, Mohamed A, Uhlén M, et al. CXCR4 and cancer [J]. *Pathol Int*, 2010, 60(7): 497-505.
- [3] Hinton CV, Avraham S, Avraham Hk. Role of the CXCR4/CXCL12 signaling axis in breast cancer metastasis to the brain [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2010, 27(2): 97-105.
- [4] Dubrovskaya A, Elliott J, Salamone RJ, et al. CXCR4 expression in prostate cancer progenitor cells [J]. *PloS One*, 2012, 7(2): e31226.

- [5] Sun YX, Fang M, Wang J, et al. Expression and activation of alpha v beta 3 integrins by SDF-1/CXCL12 increases the aggressiveness of prostate cancer cells [J]. *Prostate*, 2007, 67(1): 61-73.
- [6] Sutton A, Friand V, Brule-Donneger S, et al. Stromal cell-derived factor-1/chemokine(C-X-C motif) ligand 12 stimulates human hepatoma cell growth, migration, and invasion [J]. *Mol Cancer Res*, 2007, 5(1): 21-33.
- [7] Raman D, Baugher PJ, Thu YM, et al. Role of chemokines in tumor growth [J]. *Cancer Lett*, 2007, 256(2): 137-165.
- [8] Yang SF, Dong QG, Yao M, et al. Establishment of an experimental human lung adenocarcinoma cell line SPC-A-1BM with highly bone metastases potency by 99mTc-MDP bone scintigraphy [J]. *Nucl Med Biol*, 2009, 36(3): 313-321.
- [9] Iguchi H, Tanaka S, Ozawa Y, et al. An experimental model of bone metastasis by human lung cancer cells: The role of parathyroid hormone-related protein in bone metastasis [J]. *Cancer Res*, 1996, 56(17): 4040-4043.
- [10] Clézardin P. Therapeutic targets for bone metastases in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res*, 2011, 13(2): 207.
- [11] Dowsland MH, Harvey JR, Lennard TW, et al. Chemokines and breast cancer: A gateway to revolutionary targeted cancer treatments? [J]. *Curr Med Chem*, 2003, 10(7): 579-592.
- [12] Mundy GR. Metastasis to bone: Causes, consequences and therapeutic opportunities [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(8): 584-593.
- [13] Wilen CB, Tilton JC, Doms RW. Molecular mechanisms of HIV entry [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 726: 223-242.
- [14] Balkwill F. Cancer and the chemokine network [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(7): 540-550.
- [15] Muller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis [J]. *Nature*, 2001, 410(6824): 50-56.
- [16] Kim J, Mori T, Chen SI, et al. Chemokine receptor CXCR4 expression in patients with melanoma and colorectal cancer liver metastases and the association with disease outcome [J]. *Ann Surg*, 2006, 244(1): 113-120.
- [17] Sun YX, Schneider A, Jung Y, et al. Skeletal localization and neutralization of the SDF-1(CXCL12)/CXCR4 axis blocks prostate cancer metastasis and growth in osseous sites *in vivo* [J]. *J Bone Miner Res*, 2005, 20(2): 318-329.
- [18] Alkhatib G, Combadiere C, Broder C, et al. CC CKR5: RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1 [J]. *Science*, 1996, 272(5270): 1955-1958.
- [19] Li JK, Yu L, Shen Y. Inhibition of CXCR4 activity with AMD3100 decreases invasion of human colorectal cancer cells *in vitro* [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(15): 2308-2313.
- [20] Park B, Sung B, Yadav VR, et al. Acetyl-11-keto- β boswellic acid suppresses invasion of pancreatic cancer cells through the downregulation of CXCR4 chemokine receptor expression [J]. *Int Cancer*, 2011, 129(1): 23-33.
- [21] Balabanian K, Lagane B, Infantino S, et al. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(42): 35760-35766.
- [22] Burns JM, Summers BC, Wang Y, et al. A novel chemokine receptor for SDF-1 and 1-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development [J]. *J Exp Med*, 2006, 203(9): 2201-2213.
- [23] Miao Z, Luker KE, Summers BC, et al. CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth *in vivo* and is expressed on tumor-associated vasculature [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(40): 15735-15740.
- [24] Wang J, Shiozawa Y, Wang Y, et al. The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(7): 4283-4294.
- [25] Iwakiri S, Mino N, Takahashi T, et al. Higher expression of chemokine receptor CXCR7 is linked to early and metastatic recurrence in pathological stage I non-small cell lung cancer [J]. *Cancer*, 2009, 115(11): 2580-2593.
- [26] Raggio C, Ruhl R, McAllister S, et al. Novel cellular genes essential for transformation of endothelial cells by Kaposi's sarcoma-associated herpes virus [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(12): 5084-5095.
- [27] Meijer J, Ogink J, Roos E. Effect of the chemokine receptor CXCR7 on proliferation of carcinoma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Br J Cancer*, 2008, 99(9): 1493-1501.
- [28] Kalatskays I, Berchiche YA, Gravel S, et al. AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties [J]. *Mol Pharmacol*, 2009, 75(5): 1240-1247.
- [29] Chrapusta SJ, Giermek J, Pienkowski T, et al. Long-term survival in primary breast cancer: Correlation with estrogen and progesterone receptor assay results and adjuvant tamoxifen therapy [J]. *Med Sci Monit*, 2004, 10(10): 577-586.
- [30] Yoneda T, Williams PJ, Hiraga T, et al. A bone-seeking clone exhibits different biological properties from the MDA-MB-231 parental human breast cancer cells and a brain-seeking clone *in vivo* and *in vitro* [J]. *J Bone Miner Res*, 2001, 16(8): 1486-1496.
- [31] 李琼, 刘胜, 杨顺芳. 骨高转移人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231BM 及其动物模型的建立 [J]. *Tumor Vol*, 2009, 29(11): 1031-1035.

[收稿日期] 2012 - 07 - 10 [修回日期] 2012 - 10 - 25

[本文编辑] 王莹



欢迎登陆本刊网站 www.biother.org