

来源于 HHV8 MIP N 端多肽抗乳腺癌作用的实验研究

李成华¹, 丁勇兴¹, 杨清玲², 陈昌杰², 李馨³

[摘要] 目的: 探讨来源于 HHV8 MIP N 端多肽(NT21MP)治疗小鼠乳腺癌的疗效。方法: 采用乳腺癌细胞株 4T-1 构建乳腺癌小鼠模型; 实验分为 NT21MP 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组, NT21MP 与 Herceptin 联合用药组 (NT21MP 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ + Herceptin 36.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、阳性对照组 (Herceptin 36.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 及生理盐水对照组; 观察各组小鼠肿瘤体积大小, 并计算抑瘤率; 检测肺转移结节。结果: 与生理盐水组荷瘤小鼠比较, NT21MP 呈剂量依赖性地抑制肿瘤的生长, 以联合用药组为明显 ($P < 0.01$)。NT21MP 不同浓度、联合用药及阳性对照组的抑瘤率分别为 10.0%、41.6%、81.0%、58.2% 及 39.2%; 对照组小鼠肺内均见转移性 Lewis 肺癌瘤灶, 肺脏表面可见多个肿瘤转移结节; NT21MP 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组小鼠肺内均见转移性 Lewis 肺癌瘤灶, 肺脏表面可见到散在的肿瘤转移结节; NT21MP 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组和 Herceptin 组中, 各有 5/6 动物肺内见转移性 Lewis 肺癌瘤灶, 肺表面可见小的单个肿瘤转移结节; NT21MP 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组和联合用药组各有 2/6 和 3/6 动物肺内见转移性 Lewis 肺癌瘤灶, 肺表面未见明显的转移结节。结论: NT21MP 可抑制乳腺癌的生长和转移, 联合应用基因靶向药物 Herceptin, 可提高对乳腺癌靶向治疗的效果。

[关键词] 乳腺肿瘤, 实验性; 人疱疹病毒; NT21MP; 肺转移; 小鼠, 近交系 BALB/c

[中国图书资料分类法分类号] R 737.9

[文献标识码] A

Role of NT21MP from HHV8 MIP N-terminal peptide in resisting breast cancer

LI Cheng-hua¹, DING Yong-xing¹, YANG Qing-ling², CHEN Chang-jie², LI Xin³

(1. Department of Oncology, Bengbu Third People's Hospital, Bengbu Anhui 233000;

2. Clinical Testing and Diagnose Experimental Center, Bangbu Medical College, Bengbu Anhui 233030;

3. Department of Biotechnology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan Hubei 430074, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the function of NT21MP from human herpesvirus-8 (HHV8) monocyte inflammatory protein (MIP) N-terminal peptide in resisting breast cancer. **Methods:** Breast carcinoma model mice were established by 4T-1 breast cancer cell strains. The models were divided into NT21MP group (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$), combination therapy group (NT21MP 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ + Herceptin 36.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$), positive control group (Herceptin 36.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and sodium chloride group. The size of the tumor on the tumor-bearing mice was observed, the tumor inhibitory rate was calculated and the metastasis lung node was detected. **Results:** Compared with the tumor-bearing mice in sodium chloride group, NT21MP inhibited the growth of tumor in a dose-dependent manner, which was the most evident in the combination group ($P < 0.01$). The tumor inhibitory rates in the NT21MP groups with different concentrations, the combination group and the positive control group were 10.0%, 41.6%, 81.0%, 58.2% and 39.2% respectively. Metastasis Lewis lung cancers were observed in both of the control groups, and several metastasis nodes of white tumor were observed on the surface of the mice's lung; and the situation was the same with NT21MP 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ group. In NT21MP 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ group and Herceptin group, metastasis Lewis lung cancers were noted in the lungs of five sixths of the mice, and small and single metastasis node was found on the surface of the lung. In the NT21MP 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ group and the combination therapy group, metastasis Lewis lung cancers were noted in two sixths and three sixths of the mice, respectively, and no obvious metastasis nodes were found on the surface of the mice's lung. **Conclusions:** NT21MP may inhibit the growth and metastasis of breast cancer. Combination therapy of NT21MP and the targeted drug Herceptin can improve the clinical efficacy.

[Key words] breast neoplasms, experimental; herpesvirus hominis; NT21MP; pulmonary metastasis; mice, inbred BALB/c

乳腺癌的转移是乳腺癌患者高病死率的主要原因。目前还没有发现能控制乳腺癌发展、转移的特

效药物。趋化因子及其受体的相互作用在病原体的清除、炎症反应、肿瘤形成及其转移等方面都起着重要作用。以趋化因子及其受体分子为药物靶点, 通过激活或拮抗趋化因子受体的信号转导来调控趋化因子系统的功能, 可用于治疗相关疾病, 如获得性免疫缺陷综合征感染、恶性肿瘤转移和动脉粥样硬化等^[1]。病毒巨噬细胞炎性蛋白 (virus macrophage inflammatory protein-II, vMIP-II) 是由人疱疹病毒 8 K4 基因编码的一种病毒趋化因子, 与人的单核细

[收稿日期] 2008-08-29

[基金项目] 安徽省临床医学应用技术研究计划项目 (06B105); 安徽省自然科学基金资助项目 (070413119); 安徽省蚌埠市科技计划项目 (蚌科 200617 号)

[作者单位] 1. 安徽省蚌埠市第三人民医院 肿瘤外科, 233000; 2. 蚌埠医学院 临床检验诊断实验中心, 安徽 蚌埠 233030; 3. 华中科技大学 生物技术系, 湖北 武汉 430074

[作者简介] 李成华 (1960 -), 男, 主任医师。

胞炎性蛋白 (monocyte inflammatory protein, MIP) 同源性高达 41%, 是人趋化因子的类似物。通过对 vMIP-II 序列以及分子结构的分析, 寻找趋化因子与受体结合相关的高度保守区, 合成来源于 vMIP-II、具有特异结合 CXCR4 受体的活性多肽, 对治疗与 CXCR4 受体相关的疾病如恶性肿瘤等具有良好的作用, 在制药工业具有很好的前景。因此, 本研究通过人工合成能与 CXCR4 结合的 CXCR4 抑制性多肽 (NT21MP), 并研究其抗乳腺癌的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 实验用 6~8 周龄 BALB/c 雌性健康小鼠 40 只, 体重 15~20 g, 购自上海斯莱克实验动物责任有限公司 (SPF 级), 合格证号为 SCXK (沪) 2007-000 号。小鼠乳腺癌细胞株 4T-1 购自复旦大学。NT21MP 由上海吉尔生化有限公司合成。Herceptin 购自上海罗氏公司。

1.2 方法

1.2.1 构建乳腺癌小鼠模型 胰酶消化乳腺癌细胞株 4T-1, 调整为 1×10^7 /ml, 沿小鼠右侧第 2 乳垫下注射 0.1 ml。

1.2.2 动物分组及其用药 实验分 6 组: 生理盐水对照组, NT21MP 5 μ g/kg、50 μ g/kg、500 μ g/kg 组, Herceptin 36.04 μ g/kg 组, Herceptin 36.04 μ g/kg + NT21MP 50 μ g/kg 组, 肿瘤 24 h 后, 小鼠尾静脉注射药物, 每天 1 次, 每 5 天停药 2 天, 连续给药 4 周。实验以乳腺癌临床化疗药物 Herceptin 为阳性对照, 以生理盐水为阴性对照。

1.2.3 瘤重的测定及抑瘤率 用药 4 周后第 2 天处死小鼠, 从胸部皮下完整剥取肿瘤组织, 除纤维包膜, 在电子天平上称取瘤重 (T), 按公式计算肿瘤生长抑制率。抑瘤率 (%) = [(对照组瘤重 - 实验组瘤重) / 对照组瘤重] \times 100%。

1.2.4 肺结节计数 分离小鼠肺脏, 将肺脏置于 Bouin 液 (饱和苦味酸 75 ml + 4% 多聚甲醛 25 ml + 冰醋酸 5 ml) 中固定 24~48 h, 取出肉眼观察, 肺组织呈黄色, 肿瘤转移灶呈白色。

1.2.5 HE 染色观察乳腺组织和肺转移情况 所有石蜡包埋标本, 4 μ m 连续切片后均常规脱水后苏木素染色 5 min, 1% 盐酸酒精分化数秒, 温水蓝化 1 min, 伊红复染 2 min, 脱水、透明、封片。

1.3 统计学方法 采用方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 瘤重的测定与抑瘤率 与生理盐水处理的荷瘤小鼠比较, NT21MP 呈剂量依赖性地抑制肿瘤的

生长, 联合用药组较单独用药组作用明显 ($P < 0.01$) (见表 1)。荷乳腺癌小鼠转移组肿瘤大小见图 1A。

表 1 各组药物作用后的瘤重和抑瘤率 (%) 比较 ($n_i = 6; \bar{x} \pm s$)

分组	瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
生理盐水对照组	2.79 \pm 0.109	-
NT21MP 500 μ g/kg	0.52 \pm 0.071	81.0**
NT21MP 50 μ g/kg	1.63 \pm 0.073	41.6**
NT21MP 5 μ g/kg	2.51 \pm 0.086	10.0**
Herceptin 36.04 μ g/kg + NT21MP 50 μ g/kg	1.17 \pm 0.045	58.2***
Herceptin 36.04 μ g/kg	1.70 \pm 0.137	39.2**
<i>F</i>	502.45	
<i>P</i>	<0.01	
<i>MS</i> _{组内}	0.008	

q 检验: 与 Herceptin 36.04 μ g/kg 组比较 ## $P < 0.01$; 与生理盐水对照组比较 * * $P < 0.01$

2.2 肺转移结节 荷乳腺癌小鼠 NT21MP 5 μ g/kg 组小鼠肺表面可见到多个散在的, 且体积较大的白色肿瘤转移结节; NT21MP 50 μ g/kg 组和 Herceptin 组小鼠肺表面可见散在的、小的单个肿瘤转移结节; 而 NT21MP 50 μ g/kg 组和联合用药组小鼠肺表面肉眼没有看到明显的转移结节形成 (见图 1B)。

2.3 HE 染色观察不同组小鼠肺转移情况 荷瘤小鼠肺组织 HE 染色光镜下可见各组的小鼠肺内形成不同程度的肿瘤转移病灶。生理盐水组的 6 只小鼠肺内均见转移性 Lewis 肺癌瘤灶, 瘤灶范围广, 数量多, 有围绕血管生长现象, 偶见血管内瘤栓, 小鼠肺表面可见多个散在的, 体积较大的白色肿瘤转移结节; NT21MP 5 μ g/kg 组的 6 只小鼠肺内均见转移性 Lewis 肺癌瘤灶, 数量较多, 2/6 见围绕血管生长现象, 小鼠肺表面可见到散在的白色肿瘤转移结节; NT21MP 50 μ g/kg 组和 Herceptin 组, 各有 5/6 动物肺内见转移性 Lewis 肺癌瘤灶, 瘤灶范围有大有小, 未见围绕血管生长现象, 小鼠肺表面可见散在的、小的单个肿瘤转移结节; NT21MP 500 μ g/kg 组和联合用药组分别有 2/6 和 3/6 动物肺内见转移性 Lewis 肺癌瘤灶, 但范围小, 数量少, 未见围绕血管生长现象和瘤栓。其余小鼠肺内未见明显的转移灶形成, 肺表面肉眼没有看到明显的转移结节形成 (见图 2)。

3 讨论

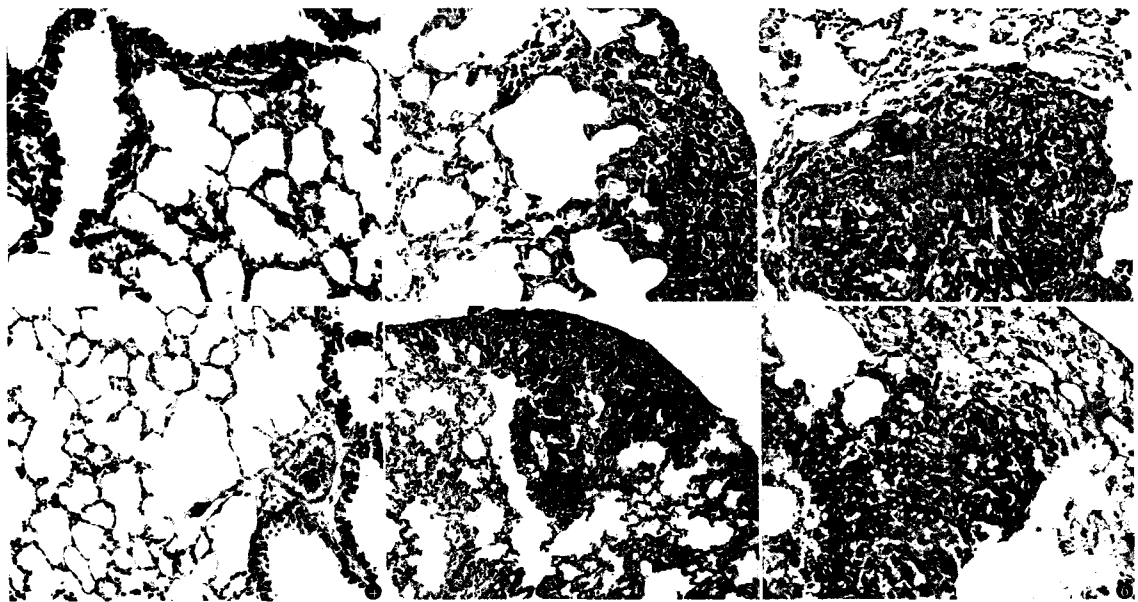
SDF-1 基质细胞来源因子, 属于趋化因子, 通过与靶细胞膜上趋化因子受体 CXCR4 结合, 触发细胞内 G 蛋白的级联活化信号。趋化因子 SDF-1 及其



1,2,3 分别为 NT21MP 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组; 4: Herceptin 36.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ +NT21MP 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 5: Herceptin 36.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$

A: 肿瘤大小; B: 转移肺结节

图1 荷乳腺癌小鼠转移组肿瘤大小和肺转移结节



1,2,3 分别为 NT21MP 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组; 4: NT21MP 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ +Herceptin 36.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 5: Herceptin 36.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 6: 生理盐水对照组

图2 荷乳腺癌小鼠肺转移(HE染色 $\times 200$)

受体 CXCR4 相互作用构成的 SDF-1/CXCR4 生物学轴在多种肿瘤的生长、播散和器官特异性转移中的作用越来越受到人们的关注。恶性乳腺癌细胞表达趋化因子受体 CXCR4, 乳腺癌特异性转移器官(如肺、肝、骨等)分泌大量 SDF-1 α ^[2,3], SDF-1 α /CXCR4 相互作用导致乳腺癌细胞迁移至这些靶器官, 增殖和诱导血管形成, 形成癌症转移灶^[4]。

CXCR4/CXCL12 信号轴在其他类型的肿瘤中的作用也得到证实, 如 CXCR4/CXCL12 信号轴可能在非小细胞肺癌胸膜播散过程中起到了一定的作用^[5]。Yasumoto 等^[6]通过检测临床样本, 发现来自胃癌扩散病人的恶性腹水中, 含高浓度的 SDF-1, 肿瘤细胞表达 CXCR4。证实胃癌中 CXCR4 表达阳性与腹膜癌扩散有高度的相关性。食管癌中, 用

CXCR4 的配基 SDF-1 处理, 提高了表达 CXCR4 肿瘤细胞株的活力和侵袭力^[2,7], Helbig 证明 NF- κ B 可通过诱导 CXCR4 的表达而刺激乳腺癌细胞的迁移和转移^[8]。并且 CXCR4 的过表达还与乳腺癌患者的不良预后成正相关^[9]。这些研究均表明癌细胞表面趋化因子受体 CXCR4 与配体 SDF-1 的结合是乳腺癌转移的分子生物学基础, 因此可作为抗肿瘤极好的靶点。阻断 CXCR4/SDF-1 的相互作用可作为设计治疗转移性癌症患者新型治疗工具的途径。

HER-2 又名 c-erbB-2 癌基因, 目前已公认其表达程度与乳腺癌的发生、发展关系密切, 约在 20% ~ 30% 的乳腺癌中可以检测到该基因的扩增和过表达^[10], 且与肿瘤恶性程度增高、转移能力增强、化疗抵抗及预后密切相关^[11]。目前, 针对人体表皮

生长因子受体 HER2 的药物 Herceptin 作为基因靶向治疗乳腺癌的代表性药物是近几年才进入临床的,特异性作用于酪氨酸激酶受体。Herceptin 不仅价格昂贵而且对低表达 HER-2 受体的乳腺癌患者治疗不敏感^[12]。Li 等^[13]发现 HER2 和 CXCR4 受体在乳腺癌的病程和转移中呈正相关。HER2 通过刺激 CXCR4 的翻译和减少 CXCR4 的降解而提高 CXCR4 的表达,即 HER2 对乳腺癌的转移作用中 CXCR4 是必需的^[14]。

本研究为了从体内观察 NT21MP 对乳腺癌的抑制作用,建立乳腺癌小鼠动物模型,结果发现,相对于生理盐水对照组,NT21MP 可剂量依赖性地抑制肿瘤的生长和肺转移结节的形成。NT21MP 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组的抑瘤率分别是 81.0%、41.6% 和 10.0% NT21MP 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组小鼠肺表面可以见到多个散在的,体积较大的白色肿瘤转移结节;NT21MP 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组可见散在的、小的单个肿瘤转移结节;而 NT21MP 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组肺表面肉眼没有看到明显的转移结节形成。NT21MP 与 Herceptin 联合用药后提高了 Herceptin 的药物敏感性。Herceptin 36.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ + NT21MP 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组、Herceptin 36.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的抑瘤率分别为 58.2% 和 39.2% ($P < 0.05$)。Herceptin 单独组可见散在的、小的单个肿瘤转移结节,而联合用药组小鼠肺表面肉眼没有看到明显的转移结节形成。肺组织 HE 染色光镜下可见各组的小鼠肺内形成不同程度的肿瘤转移病灶。生理盐水组的 6 只小鼠肺内均见转移性 Lewis 肺癌瘤灶,瘤灶范围广,数量多;NT21MP 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组的 6 只小鼠肺内均见转移性 Lewis 肺癌瘤灶,数量较多;NT21MP 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组和 Herceptin 组,各自 5/6 动物肺内见转移性 Lewis 肺癌瘤灶,瘤灶范围有大有小;NT21MP 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组和联合用药组分别有 2/6 和 3/6 动物肺内见转移性 Lewis 肺癌瘤灶,但范围小,数量少。证实 NT21MP 可通过封闭趋化因子受体的作用,抑制乳腺癌的生长和转移,联合应用基因靶向药物 Herceptin,可提高乳腺癌靶向治疗的效果。

[参 考 文 献]

[1] Harvey JR, Mellor P, Eldaly H, *et al.* Inhibition of CXCR4-

- mediated breast cancer metastasis: a potential role for heparinoids? [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(5): 1562 - 1570.
- [2] Ishikawa T, Nakashiro K, Hara S, *et al.* CXCR4 expression is associated with lymph-node metastasis of oral squamous cell carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2006, 28(1): 61 - 66.
- [3] Müller A, Homey MB, Soto H, *et al.* Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis [J]. *Nature*, 2001, 410(6824): 50 - 56.
- [4] Taichman RS, Cooper C, Keller ET, *et al.* Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(6): 1832 - 1837.
- [5] Oonakahara K, Matsuyama W, Higashimoto I, *et al.* Stromal-derived factor-1 α /CXCL12/CXCR4 axis is involved in the dissemination of NSCLC cells into pleural space [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, 30(5): 671 - 677.
- [6] Yasumoto K, Koizumi K, Kawashima A, *et al.* Role of the CXCL12/CXCR4 axis in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(4): 2181 - 2187.
- [7] Kaifi JT, Yekebas EF, Schurr P, *et al.* Tumor-cell homing to lymph nodes and bone marrow and CXCR4 expression in esophageal cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2005, 97(24): 1840 - 1847.
- [8] Helbig G, Christopherson KW 2nd, Bhat-Nakshatri P, *et al.* NF- κ B promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4 [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(24): 21631 - 21638.
- [9] Byrnes HK, MacDonald M. Overexpression of chemokine receptor CXCR4 in cancer specimens following neoadjuvant chemotherapy predicts outcome in patients with locally advanced breast cancer (LABC) [J]. *ASCO Meeting Abstracts*, 2007, 25: 10578 - 10584.
- [10] Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene [J]. *Science*, 1987, 235(4785): 177 - 182.
- [11] Tapia C, Savic S, Wagner U, *et al.* HER2 gene status in primary breast cancers and matched distant metastases [J]. *Breast Cancer Res*, 2007, 9(3): R31.
- [12] 罗荣城, 李爱民, 张军一, 等. Herceptin 治疗 HER-2 过度表达的转移性乳腺癌 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2004, 26(1): 52 - 54.
- [13] Li YM, Pan Y, Wei Y, *et al.* Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis [J]. *Cancer Cell*, 2004, 6(5): 459 - 469.
- [14] 杨清玲, 丁勇兴, 李成华. CXCR4 表达上调与 HER2 介导乳腺癌转移的相关性研究 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2008, 20(4): 303 - 307.