

天冬酰胺内肽酶敲除协同阿可拉定有效抑制乳腺癌骨转移

包佳煜 陈峻崧 郭方

摘要 目的 研究天冬酰胺内肽酶敲除和阿可拉定对乳腺癌骨转移的影响。方法 分别用野生型、天冬酰胺内肽酶敲除型的小鼠进行心脏注射造模,用阿可拉定进行治疗, Micro-CT 分析检测,观察乳腺癌骨转移造成的骨腐蚀情况;蛋白免疫印迹实验检测相关指标变化。结果 单纯敲除天冬酰胺内肽酶的小鼠可以轻微缓解乳腺癌的骨转移,联合阿可拉定用药以后可以有效缓解乳腺癌骨转移,两者共同影响信号传导及转录激活蛋白-3、糖原合成酶激酶-3 β 、 β -连环蛋白信号通路。结论 天冬酰胺内肽酶敲除协同阿可拉定用药可有效缓解乳腺癌骨转移。

关键词 天冬酰胺内肽酶;阿可拉定;骨转移;乳腺癌

中图分类号 Q 956

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)11-1671-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.11.005

在中国,癌症的发生发展率正在不断增加,每年被诊断出超过 1 600 万人,并且有 1 200 万人死于该疾病。与其他大多数国家一样,乳腺癌现在是我国女性中最常见的癌症。我国占全球所有新诊断乳腺癌的 12.2%, 占所有乳腺癌死亡人数的 9.6%^[1]。晚期乳腺癌易发生肋骨、胸骨、胸椎及腰椎等部位骨转移,其发生率为 65%~75%^[2]。

天冬酰胺内肽酶(legumain, LGMN)是一种酸性半胱氨酸内肽酶,具有良好的保守性,在植物、无脊椎动物寄生虫以及哺乳动物中均存在。它在肿瘤微环境中过表达,同时通过促进细胞迁徙和组织入侵等方式,促进癌细胞的转移^[3]。

阿可拉定是异戊二烯类黄酮衍生物,具有化学稳定性、易于获得等特点。此外,阿可拉定在不同的癌细胞中表现出抗癌活性,包括肝癌^[4]、乳腺癌^[5]、结肠癌^[6]等。近几年,研究表明阿可拉定不仅具有抗癌活性,还可以抑制破骨细胞的体外活性,通过抑制骨吸收来发挥骨保护功能^[7]。该研究旨在从动

物水平探究 LGMN 的敲除和联合用药阿可拉定对乳腺癌骨转移的疗效,为未来肿瘤转移等研究和治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物与细胞株 SPF 级 Balb/C 雌鼠,6 周龄,由上海交通大学动物房饲养,其中 Balb/C 背景的 LGMN 敲除鼠是由日本 Masahide Asano 课题组的 C57 背景敲除鼠与 Balb/C 小鼠回交约 10 代得到。细胞株:4T1.2 细胞株为可定向骨转移细胞株。

1.1.2 主要的仪器与试剂 二氧化碳细胞培养箱、-80℃超低温冰箱(美国 Thermo 公司);高速超低温离心机(德国 Beckman 公司);DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);GAPDH、 β -actin(美国 Proteintech 公司);p-STAT3、STAT3(武汉博士德公司);legumain(美国 Abcam 公司);p-GSK3 α / β 、GSK3 β 、 β -catenin(美国 CST 公司);Sodium Pyruvate、MEM NEAA(美国 Sigma 公司);阿可拉定(上海融禾医药科技发展有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 乳腺癌细胞株 4T1.2 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基(加入 1% 的 Sodium Pyruvate 和 1% 的 MEM NEAA),置 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养,取对数生长期细胞用于后续实验。

1.2.2 模型制备 应用左心室注射 4T1.2 细胞法进行造模(活细胞悬液浓度为 10⁶ 个/ml,每只注射 0.1 ml),具体操作为将小鼠四肢用胶带固定在加热垫,小鼠身体完全伸展开,保持在实验过程中小鼠体温相对恒定,用 1 ml 的胰岛素注射器吸取细胞悬液,注射进小鼠的左心室,其位置是:距离中轴约 3 mm,第二类间隙,进针角度与腹正中中线夹角约为 45°,进针长度约为 7 mm,扎针成功的标志是鲜红色的血液不断往外蹦,保持扎针角度和位置不变,缓慢将细胞悬液缓慢推进左心室,当注射器拔出后,用棉球按压左心室片刻,以防细胞漏于胸腔,造模约 3 周时间取材检测,实验分为空白对照组、模型组、用药组,其中用 0.5% 羧甲基纤维素钠作为空白对照组

2020-09-01 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81672310)

作者单位:上海交通大学系统生物医学教育部重点实验室系统生物医学研究院,上海 200240

作者简介:包佳煜,女,硕士研究生;

郭方,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: fguo@sytu.edu.cn

的灌胃剂,实验组阿可拉定的浓度是 5 mmol/L,每组 15 只。根据小鼠体质量灌胃(0.01 ml/g),相关实验均在 SPF 级动物房完成,并且符合动物伦理。

1.2.3 模型检测 Micro-CT 是专用于小动物的计算机断层成像系统,反映骨标本的三维数据,其中图像和数据的处理软件包括 CTAn、CTvol 等。将固定好的骨标本进行检测,在分析之前使用 DataView-er 将分析区域骨骼的长轴作调整,使其与冠状位及矢状位的轴线保持平行。用 CTAn 软件对骨的微观结构进行相应参数分析,具体包括骨体积分数(percent bone volume, BV/TV)、骨小梁数量(trabecular number, Tb. N)、骨表面密度(bone surface density, BS/TV)、骨小梁分离度(trabecular separation, TB. sp)等。用 CTvol 进行 CT 扫描图像三维演示。

1.2.4 蛋白免疫印迹实验 液氮研磨法将新鲜骨组织碾碎,将研磨好的组织用蛋白裂解液裂解(含 PMSF 1 mmol/L 和磷酸酶抑制剂),13 200 r/min 离心 5 min,取上清液,测定蛋白浓度,加入蛋白 loading,100 °C、煮 10 min,使蛋白变性。Bio-Rad 湿法电泳,10% 聚丙烯酰胺凝胶进行分离蛋白,再 100 V 转膜 2 h。5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h;分别加入对应的一抗,其中 β-actin 稀释比为 1 : 10 000;其余抗体均为 1 : 1 000 4 °C 孵育过夜。次日用 TBST 缓冲液漂洗 3 次,每次 5 min;加入对应二抗 1 : 5 000,1 h,室温 TBST 缓冲液漂洗 3 次,每次 5 min;加入曝光液显影,拍摄成像。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件处理数据,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 的形式描述,通过单因素方差分析(One-way ANOVA)完成组间比较。检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠鉴定与生存分析 根据正常野生型小鼠和 LGMN 敲除型小鼠骨髓中蛋白表达条带显示,在野生型中存在蛋白表达,在敲除型小鼠中没有蛋白表达,见图 1A。每组 15 只小鼠进行动物实验,20 d 为时间节点统一处理实验小鼠,根据生存周期,绘制

生存曲线。野生型的小鼠中位生存期低于 LGMN 敲除型的小鼠,同时敲除型联合用药组的小鼠生存周期长于单独 LGMN 敲除型的小鼠,采用 Log-rank (Mantel-Cox) 方法分析得出差异有统计学意义 $P < 0.05$ 。见图 1B。

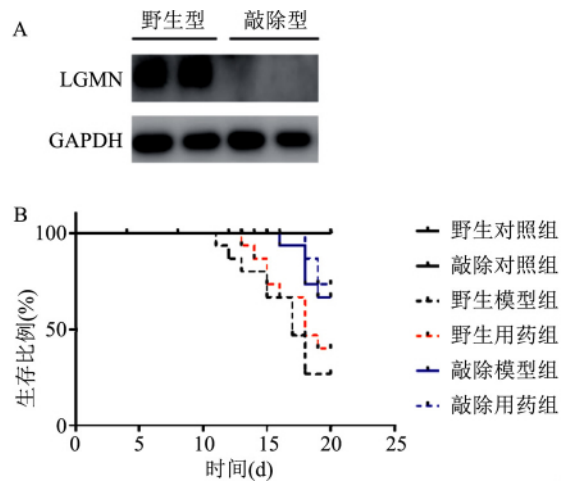


图 1 小鼠 LGMN 表达与生存曲线图

2.2 骨腐蚀情况检测 经 Micro-CT 的检测结果显示 LGMN 缺失的小鼠在造模后腐蚀情况较野生型的差异体现在松质骨, BV/TV 数值上升 ($F = 7.90$, $P < 0.05$)、TB. sp 下降 ($F = 9.59$, $P < 0.05$);而在 LGMN 敲除的小鼠同时用阿可拉定进行治疗,骨腐蚀的情况得到改善, Tb. N 为 ($F = 117.16$, $P < 0.001$)、BV/TV 为 ($F = 326.96$, $P < 0.001$)、TB. sp 为 ($F = 37.84$, $P < 0.01$)、BS/TV 为 ($F = 115.90$, $P < 0.001$)。见表 1、图 2。

2.3 骨组织相关蛋白检测 蛋白免疫印迹实验表明在造模组, β-catenin ($F = 15.79$, $P < 0.05$)、p-STAT3 ($F = 16.72$, $P < 0.05$)、p-GSK3β ($F = 9.68$, $P < 0.05$) 的表达量上升而在 LGMN 敲除的小鼠中对应蛋白的表达量下降,具有显著性差异;在 LGMN 敲除和联合用药的情况下,蛋白的表达量进一步降低, β-catenin ($F = 28.10$, $P < 0.01$)、p-STAT3 ($F = 107.56$, $P < 0.001$)、p-GSK3β ($F = 26.77$, $P < 0.01$)。见图 3。

表 1 骨小梁结构参数($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

骨小梁结构参数	野生模型组	野生用药组	敲除模型组	敲除用药组
Tb. N (1/mm)	0.79 ± 0.35	2.52 ± 0.60	1.70 ± 0.43	3.93 ± 0.22***
BV/TV (%)	4.96 ± 1.71	17.98 ± 2.06	10.44 ± 2.17*	31.23 ± 1.14***
TB. sp (mm)	0.44 ± 0.07	0.18 ± 0.08	0.26 ± 0.04*	0.14 ± 0.01**
BS/TV (1/mm)	3.48 ± 1.36	10.97 ± 2.18	7.00 ± 1.35	15.65 ± 0.84***

与野生模型组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

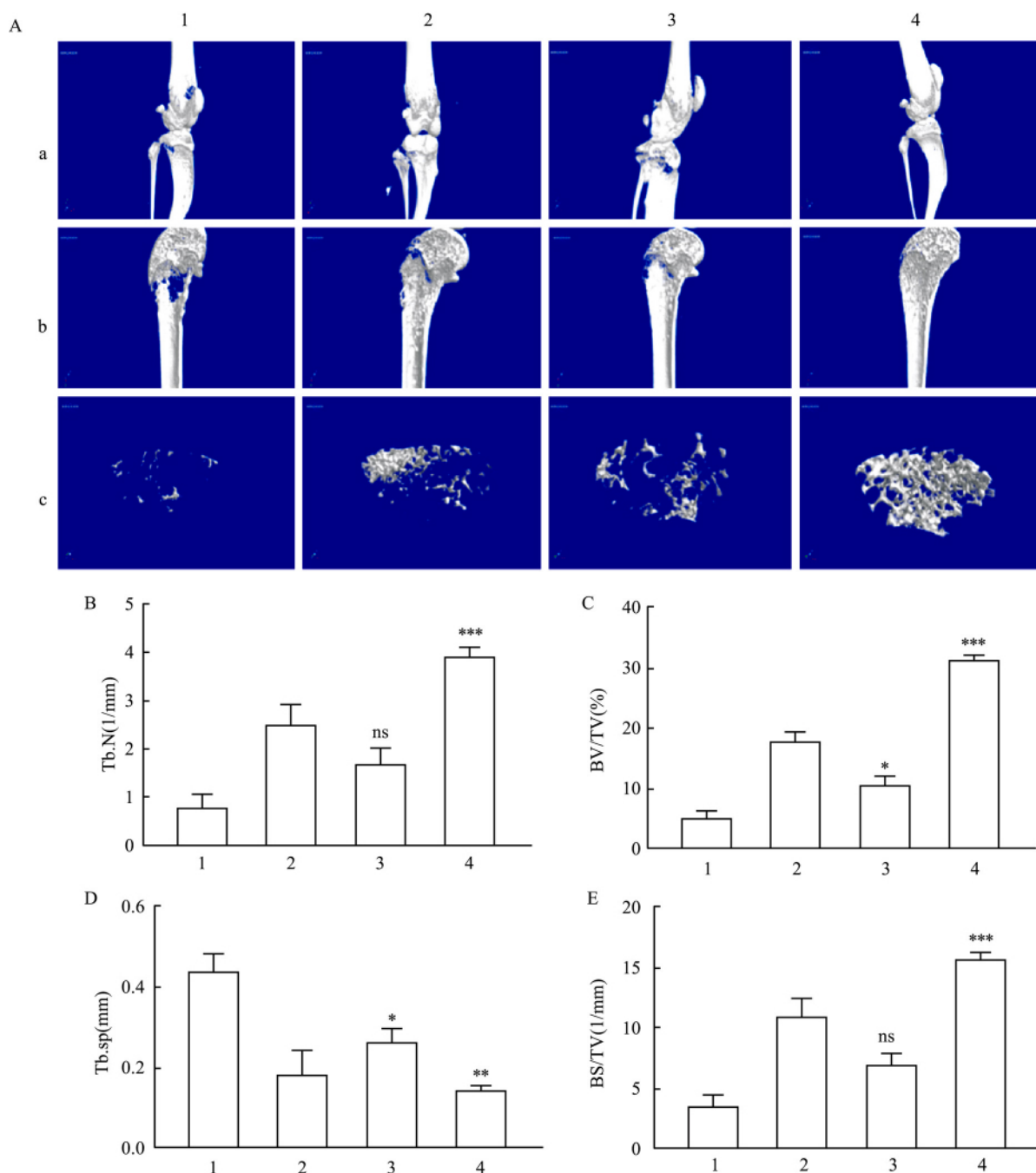


图2 骨组织三维重构与分析图

A: 骨组织三维重构; a: 骨的三维重构图; b: 骨截面; c: 松质骨; B: 骨小梁数量; C: 骨体积分数; D: 骨小梁分离度; E: 骨表面密度; 1: 野生模型组; 2: 野生用药组; 3: 敲除模型组; 4: 敲除用药组; 与野生模型组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.4 模型组和用药组的脏器观察 通过对小鼠的脾脏观察 模型组野生型和 LGMN 敲除型小鼠的脾脏不存在显著性差异,但在 LGMN 敲除联合用药的情况下脾脏减小,差异有统计意义 ($F = 73.50$, $P < 0.01$)。见图4。

3 讨论

众所周知 转移包括多重步骤 具体为肿瘤细胞

首先从原发肿瘤部位脱落并迁移,侵入邻近组织并穿透基底膜,进入血液或淋巴管,从而经过循环系统传播至远处的器官,形成微转移性结节,然后在周围的基质定植并且重塑,并形成转移^[8]。骨骼是实体瘤转移的第3部位,在晚期乳腺癌中,骨转移的发生率高,同时首发症状为骨转移者占27%~50%^[2]。其中转移通常存在于富含红骨髓和骨小梁的骨骼中,例如椎骨、肋骨、骨盆和长骨的末端,在手或脚的

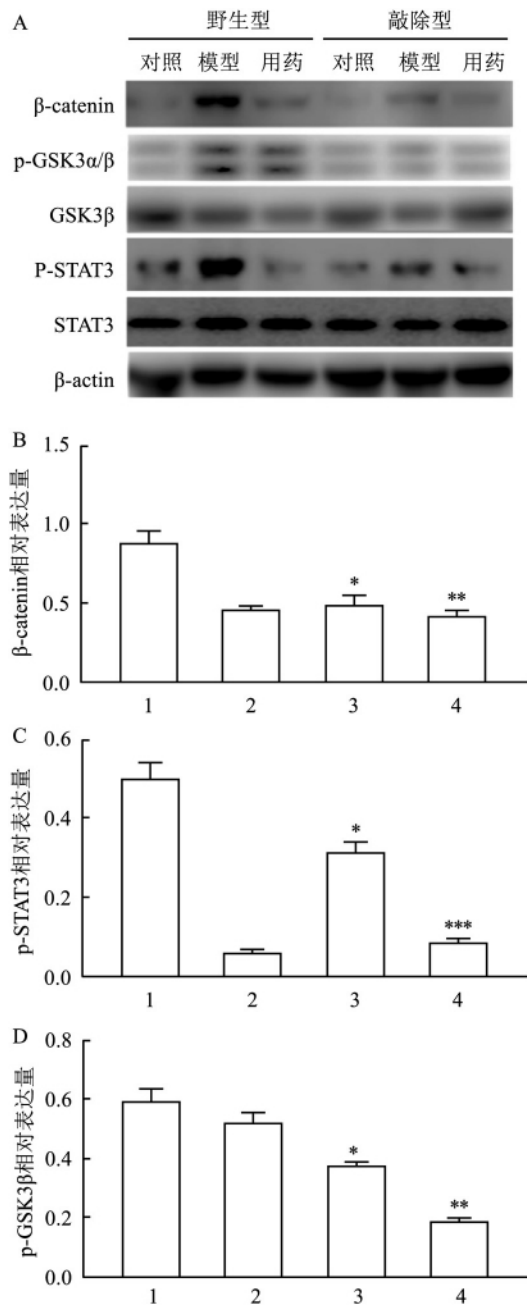


图3 小鼠骨组织的蛋白检测与丰度统计

A: 不同处理的蛋白丰度,其中免疫印迹为平行胶; B: β-catenin/β-actin 的相对蛋白表达量; C: p-STAT3/STAT3 的相对蛋白表达量; D: p-GSK3β/GSK3β 的相对蛋白表达量; 1: 野生模型组; 2: 野生用药组; 3: 敲除模型组; 4: 敲除用药组; 与野生模型组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001

骨骼中很少。同时,骨痛、骨损伤、骨痛加剧等是乳腺癌骨转移常见的并发症,同时一旦发生骨转移,预后相对较差。目前临床上乳腺癌的治疗方法,有通过 FDA 批准的单克隆抗体药物地诺单抗、阿法替尼等^[9]。但是疗效仍然不尽人意,更有效的靶点和治疗仍需要被探究。

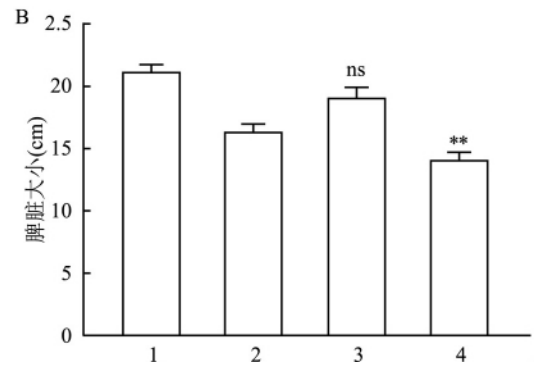
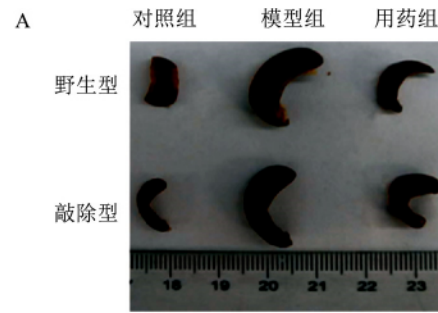


图4 小鼠脾脏大小统计

A: 模型组和用药组的脾脏图; B: 脾脏大小的统计; 1: 野生模型组; 2: 野生用药组; 3: 敲除模型组; 4: 敲除用药组; 与野生模型组比较: ** P < 0.01

研究^[10-11]表明 STAT3 激活发生于 40% 以上的乳腺癌中,STAT3 的抑制可以改善乳腺癌的进程,并且减少转移,最终提高患者的整体生存率。在肿瘤炎症微环境中,GSK3β 磷酸化可影响 WNT 信号通路的下游因子是 β-catenin^[12]。相关研究^[13]发现,与不发生骨转移的 TM40D 乳腺癌细胞比较,高骨转移的 TM40D-MB 乳腺癌细胞表现出更高的 β-catenin 的信号活性。

本研究表明,在 LGMN 敲除的小鼠中,骨腐蚀程度明显减小;联合用药后显示乳腺癌骨转移的情况得到进一步改善。根据蛋白免疫印迹图,联合用药后,改变了 STAT3、GSK3β、β-catenin 相关信号通路,治疗组 p-GSK3β 和 β-catenin 均发生了下调,说明敲除 LGMN 联合用药降低了机体的促炎反应,从而缓解了乳腺癌的骨转移。同时由于阿可拉定的骨保护作用,其遏制破骨细胞的形成,这可能也将对已经发生骨转移的小鼠,在转移灶处起一定的保护作用,进一步的减少骨的破坏^[13]。

LGMN 在肿瘤微环境中高度表达,具有作为生物标记物和治疗靶标的潜力。研究^[3]表明使用基于 LGMN 的 DNA 疫苗可以特异性靶向肿瘤微环境中的肿瘤相关巨噬细胞,该疫苗通过控制 LGMN 阳性的肿瘤相关巨噬细胞,参与调控 CD8⁺ 的 T 细胞应答,有

效地保护宿主免受肿瘤细胞的攻击。本研究选择用 LGMN 野生型和敲除型的小鼠进行实验,观察 LGMN 敲除的情况下可缓解小鼠乳腺癌骨转移。

阿可拉定在药理学中的研究表明,它具有广泛的治疗能力,存在巨大的医用价值,它有效靶向癌症干细胞和耐药性癌细胞,以抗增殖、抗血管生成等方式参与调节^[14]。阿可拉定在相关的研究中被发现可以有效抑制三阴性乳腺癌,同时通过影响相关信号通路诱导细胞凋亡,同时减少乳腺癌细胞中干样细胞比例^[5]。本研究表明使用药物后可以略微缓解乳腺癌骨转移。

参考文献

- [1] Fan L, Strasser-Weippl K, Li J J, et al. Breast cancer in China [J]. *Lancet Oncology*, 2014, 15(7): e279-89.
- [2] 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会. 中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2019年版) [J]. *中国癌症杂志*, 2019, 29(8): 609-80.
- [3] Mai C W, Chung F F, Leong C O. Targeting legumain as a novel therapeutic strategy in cancers [J]. *Curr Drug Targets*, 2017, 18(11): 1259-68.
- [4] Wang Z M, Song N, Ren Y L. Anti-proliferative and cytoskeleton-disruptive effects of icariin on HepG2 cells [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(5): 6815-20.
- [5] Wang X, Zheng N, Dong J, et al. Estrogen receptor- α 36 is involved in icaritin induced growth inhibition of triple-negative breast cancer cells [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2017, 171: 318-27.
- [6] Li C, Peng W, Song X, et al. Anticancer effect of icaritin inhibits cell growth of colon cancer through reactive oxygen species, Bcl-2 and cyclin D1/E signaling [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(5): 3537-42.
- [7] Liu Y Q, Yang Q X, Cheng M C, et al. Synergistic inhibitory effect of Icariside II with Icaritin from *Herba Epimedii* on pre-osteoclastic RAW264.7 cell growth [J]. *Phytotherapy*, 2014, 21(12): 1633-7.
- [8] Fornetti J, Welm A L, Stewart S A. Understanding the bone in cancer metastasis [J]. *J Bone Miner Res*, 2018, 33(12): 2099-113.
- [9] Gnant M, Pfeiler G, Dubsy P C, et al. Adjuvant denosumab in breast cancer (ABCSG-48): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Lancet*, 2015, 386(9992): 433-43.
- [10] Kuo W Y, Hwu L, Wu C Y, et al. STAT3/NF- κ B-regulated lentiviral TK/GCV suicide gene therapy for cisplatin-resistant triple-negative breast cancer [J]. *Theranostics*, 2017, 7(3): 647-63.
- [11] Banerjee K, Resat H. Constitutive activation of STAT3 in breast cancer cells: a review [J]. *Int J Cancer*, 2016, 138(11): 2570-8.
- [12] Jain S, Ghanghas P, Rana C, et al. Role of GSK-3 β in regulation of canonical Wnt/ β -catenin signaling and PI3-K/Akt oncogenic pathway in colon cancer [J]. *Cancer Invest*, 2017, 35(7): 473-83.
- [13] Chen Y, Shi H Y, Stock S R, et al. Regulation of breast cancer-induced bone lesions by β -catenin protein signaling [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(49): 42575-84.
- [14] Fan Y, Li S, Ding X, et al. First-in-class immune-modulating small molecule Icaritin in advanced hepatocellular carcinoma: preliminary results of safety, durable survival and immune biomarkers [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 279.

Legumain knockout and icaritin effectively inhibit breast cancer bone metastasis

Bao Jiayu, Chen Junsong, Guo Fang

[Key Laboratory of Systems Biomedicine (Ministry of Education), Shanghai Center for Systems Biomedicine, Shanghai JiaoTong University, Shanghai 200240]

Abstract Objective To investigate the effect of legumain knockout and icaritin on bone metastasis in breast cancer. **Methods** Wild-type and legumain knock-out mice were operated for heart injection, and the therapy group was treated with icaritin. Micro-CT was used to detect bone erosion caused by bone metastasis in breast cancer. Western blot experiments were used to detect relevant indicators. **Results** Mice with legumain knock out alone could slightly alleviate bone metastasis in breast cancer. Combined with icaritin, they could effectively alleviate bone metastasis in breast cancer via affecting signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3), glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β), β -catenin pathways. **Conclusion** Legumain knockout cooperated with icaritin can effectively relieve breast cancer bone metastasis.

Key words legumain; icaritin; bone metastasis; breast cancer