

蚊母草提取物通过抑制 Runx2 活性抗乳腺癌破骨性骨转移作用

刘盛玲¹, 吕红¹, 田会茹¹, 姜思琴¹, 袁萍¹, 傅蔚然², 高书亮^{1*}, 付剑江^{1*}
(1. 江西中医药大学, 南昌 330004; 2. 首都医科大学基础医学院, 北京 100069)

[摘要] 目的:研究蚊母草提取物(EVP)的抗乳腺癌破骨性骨转移作用。方法:采用左心室注射肿瘤细胞法建立裸鼠骨转移模型,通过巢式聚合酶链式反应(PCR)检测裸鼠骨髓组织中人细胞角蛋白-19(Ck-19)基因表达量确定肿瘤细胞的骨转移程度及 EVP 的抑制作用;采用多核细胞计数法及组织蛋白酶 K(Cathepsin K)分泌量检测法,确定小鼠破骨细胞前体骨髓巨噬细胞(BMMs)的活性,并观察 EVP(40、80、160 g·L⁻¹)的抑制作用;采用蛋白免疫印迹法(Western blot)观察 EVP 对 BMMs 细胞内核转录因子- κ B 受体活化因子(RANK)、Runt 相关转录因子 2(Runx2)、磷酸化 Runx2(p-Runx2)及其下游蛋白基质金属蛋白酶-9(MMP-9)表达的影响;采用明胶酶谱法检测 EVP 对基质金属蛋白酶(MMPs)水解明胶活性的影响。结果:与空白组比较,裸鼠给予 EVP 5.5、11、22 g·kg⁻¹,其骨髓组织中 Ck-19 水平明显降低($P<0.05$),提示 EVP 具有抗骨转移作用;体外实验显示,与空白组比较,可溶性核转录因子- κ B 受体活化因子配基(sRANKL)可诱导 BMMs 分化为多核细胞($P<0.05$),EVP(40、80、160 g·L⁻¹)可显著抑制上述 sRANKL 诱导的多核细胞形成($P<0.01$)。与空白组比较,sRANKL 可显著增加 BMMs 的 Cathepsin K 分泌($P<0.01$);与 sRANKL 组比较,EVP 组 Cathepsin K 分泌量明显下调($P<0.05$)。Western blot 显示,与空白组比较,sRANKL 可显著增加 BMMs 细胞 RANK 表达($P<0.01$);与 sRANKL 组比较,EVP 组(40、160 g·L⁻¹)BMMs 细胞表达 RANK 蛋白明显降低($P<0.05$)。与空白组比较,sRANKL 可明显增加 BMMs 细胞 p-Runx2 和 MMP-9 表达($P<0.05$);与 sRANKL 组比较,EVP 组(40、160 g·L⁻¹)BMMs 细胞表达的 p-Runx2 和 MMP-9 蛋白明显降低($P<0.05$)。明胶酶谱显示,与空白组比较,sRANKL 可明显增加 pro-MMP-9、pro-MMP-2 及 64 kDa MMP-2 水平($P<0.05$);与 sRANKL 组比较,EVP 组 pro-MMP-9、64 kDa MMP-2 水平明显降低($P<0.05$),且 160 g·L⁻¹ EVP 处理可明显降低 pro-MMP-2 水平($P<0.05$)。结论:蚊母草提取物可抑制肿瘤细胞诱导的破骨性骨转移,抑制骨形成相关转录因子 Runx2 活化,进而干扰 RANK/RANKL 信号转导从而抑制破骨细胞活化可能是其作用机制之一。

[关键词] 蚊母草; 破骨性骨转移; 乳腺癌; Runt 相关转录因子 2(Runx2); 核转录因子- κ B 受体活化因子

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)07-0081-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220624

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220113.1701.007.html>

[网络出版日期] 2022-01-14 12:49

Effect of Extracts from *Veronica peregrina* on Breast Cancer Cell-induced Osteoclastic Bone Metastasis via Inhibiting Runx2 Activation

LIU Sheng-ling¹, LYU Hong¹, TIAN Hui-ru¹, JIANG Si-qin¹, YUAN Ping¹, FU Wei-ran²,
GAO Shu-liang^{1*}, FU Jian-jiang^{1*}

(1. Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate inhibitory effect of extracts from *Veronica peregrina* (EVP) on the

[收稿日期] 2021-11-08

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81960736,81873043)

[第一作者] 刘盛玲,在读硕士,从事中药抗肿瘤药理工作,E-mail:980728984@qq.com

[通信作者] *高书亮,硕士,副教授,从事中西医结合基础研究工作,E-mail:906954195@qq.com;

*付剑江,博士,教授,从事中药抗肿瘤药理工作,E-mail:jianjiang_fu@yeah.net

osteoclastic bone metastasis induced by breast cancer cells. **Method:** Bone metastasis model was established by injection of MDA-MB-231 cells, a human breast cancer cell line, into the left ventricle of BALB/c nude mice. The expression of human cytokeratin-19 (Ck-19) gene in mouse bone marrow was determined by nested polymerase chain reaction (PCR) to assess the bone metastasis of MDA-MB-231 cells. To assess the effects of EVP on the activation of bone marrow macrophages (BMMs), we counted the multinuclear cells and measured the secretion of Cathepsin K. Western blot was adopted to assess the effects of EVP on receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK), Runt-related transcription factor 2 (Runx2), phosphorylated Runx2 (p-Runx2), and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in BMMs. Gelatin zymography was employed to determine the activities of matrix metalloproteinases (MMPs). **Result:** Compared with that in the blank group, Ck-19 expression was down-regulated in EVP groups ($P<0.05$). The multinucleated cells increased when the BMMs were induced by soluble receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (sRANKL), which was inhibited by EVP ($P<0.05$). The level of cathepsin K in the supernatant of sRANKL group increased compared with that of the blank group, while EVP groups had lower cathepsin K levels than sRANKL group ($P<0.05$). Compared with the blank group, the sRANKL group showed up-regulated RANK expression, Runx2 phosphorylation, and MMP-9 expression ($P<0.05$), while the expression levels of RANK, p-Runx2, and MMP-9 were down-regulated when the cells were incubated with EVP ($P<0.05$). Furthermore, exposure of BMMs to sRANKL resulted in an increase in gelatin hydrolyzation compared with the blank group ($P<0.01$), which, however, was reversed in EVP groups ($P<0.05$). **Conclusion:** EVP significantly inhibits bone marrow metastasis of MDA-MB-231 cells, which may be associated with the suppression of osteoclast activation by inhibiting Runx2 phosphorylation.

[Keywords] *Veronica peregrina*; osteoclastic bone metastasis; breast cancer; Runt-related transcription factor 2 (Runx2); receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK)

骨组织由于其血供丰富及特殊生长微环境,成为人体内仅次于肺和肝的第三大易发生肿瘤转移的组织,乳腺癌和前列腺癌是发生骨转移的主要肿瘤病种,二者的骨转移发病率为65%~75%^[1]。近年来,随着乳腺癌、前列腺癌等易侵犯骨组织的恶性肿瘤临床发生率的迅速升高,导致患者数量大幅增加;同时由于肿瘤诊疗手段和技术的不断进步,患者的生存时间明显延长,使得很大一部分患者在生存获益的同时,出现骨转移的风险也大大增加,这样导致恶性肿瘤骨转移患者的数量大幅攀升^[2]。一旦被诊断为骨转移,患者的死亡率将大大增加,同时也预示患者生活质量的显著下降^[3]。

蚊母草也称为接骨仙桃草、八卦仙桃、蟠桃草、夺命丹、活血丹、活血接骨丹、接骨草等,具有活血,止血,清肺热,和肝胃的功效,用于治跌打损伤、咳嗽痰中带血、咽喉肿痛、肝胃气痛、疝痛、痛经等病症。以往的研究表明,蚊母草的主要化学成分包括原儿茶酸、木犀草素、甘露醇和香草酸等^[4-5]。现代药理研究也表明,蚊母草可以促进骨折的愈合及对骨缺损具有显著的治疗作用^[6]。提示,蚊母草可能对骨生成有一定促进作用,本文拟从乳腺癌细胞系MDA-MB-231细胞诱导的破骨性骨转移入手,观察蚊母草

对骨质破坏的保护作用,并探讨其作用机制。

1 材料

1.1 药物 蚊母草采自江西省九江市,经江西省药品检验检测研究院中药室许妍主任药师鉴定为玄参科婆婆纳属植物蚊母草 *Veronica peregrina* 的干燥地上部分。蚊母草提取物(EVP)的提取方法为带虫瘿的蚊母草全草20 kg粉碎成粗粉,用95%乙醇回流提取3次,合并醇提液,减压浓缩得浸膏,蒸馏水混悬后,依次用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯和含水正丁醇萃取,其中乙酸乙酯部位84 g,总黄酮鉴别反应呈阳性,用作本研究作为研究对象。体内实验以0.5%羧甲基纤维素钠水溶液作为溶剂;体外实验以二甲基亚砜(DMSO)作为溶剂,DMSO的终体积分数不超过0.05%。

1.2 动物 BALB/c Nude裸鼠,雌性,体质量18~22 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号SCKK(京)2012-0023。ICR小鼠,购自于北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号SCKK(京)-2012-0001。所有动物实验操作均严格按照江西中医药大学实验动物伦理委员会所批准的实验方案开展,批准编号JZ-2019-0086。

1.3 细胞株及细胞培养 人乳腺癌细胞株MDA-

MB-231细胞,购自中国医学科学院基础医学研究所细胞库,由江西中医药大学药理学科组传代、保管。MDA-MB-231细胞培养于含10%胎牛血清、青霉素和链霉素的DMEM培养基中培养,置于37℃,5%CO₂的培养箱内,3~4 d传代1次,其中30代以内的细胞用于实验。小鼠骨髓巨噬细胞(BMMs)采用Histopaque密度梯度离心法自ICR小鼠胫骨骨髓提取,详细方法参见文献[7]。

1.4 试剂 RNeasy mini试剂盒、OneStep Ahead聚合酶链式反应(PCR)试剂盒(Qiagen公司,批号分别为74116、220211),可溶性核转录因子- κ B受体活化因子配基(sRANKL)多肽、Runx2单克隆抗体、核转录因子- κ B受体活化因子(RANK)抗体、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)抗体、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(Abcam公司,批号分别为92943、10606、10683、03126、09705),酸性磷酸酶白细胞(TRAP)、明胶酶谱试剂盒(Cosmo公司,批号分别为P1011、0322-05),小鼠组织蛋白酶K(Cathepsin K)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(Abbexa公司,批号5791-32),phospho-Runx2(Ser340)多克隆抗体(Invitrogen公司,批号119513),兔抗免疫球蛋白(Ig)G、辣根过氧化物酶(HRP)-linked Antibody(Cell Signaling Technology,批号均为0753)。

1.5 仪器 EC3型凝胶成像系统(美国UVP公司),ELx800型酶标仪(美国BioTek公司),Mastercycler gradient PCR型扩增仪(德国Eppendorf公司),PowerPac™型通用电泳仪、Trans-blot型转膜仪(美国Bio-Rad公司),DMI3000B型荧光倒置显微镜(德国Leica公司),BX-63型荧光正置显微镜(日本Olympus公司)。

2 方法

2.1 乳腺癌骨转移动物模型 依据参考文献[8-9]的方法,采用左心室注射法建立乳腺癌骨转移模型,取对数生长期的MDA-MB-231细胞,制备细胞悬液,密度为 4×10^6 个/mL。雌性BALB/c Nude裸鼠,在10%水合氯醛麻醉下($0.1 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$)行左心室注射,每只小鼠注射100 μL 。24 h后随机分为4组,EVP组和空白组。EVP组分别口服给予EVP。以参考文献[10-11]中人用量为参考,结合预实验,确定EVP各给药组剂量为生药 $5.5、11、22 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,给药体积为 $0.02 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 。空白组给予同体积溶剂。每天给药1次,连续给药10周。给药结束后,处死动物,无菌剥离双侧股骨,用无RNA酶、无菌生理盐水冲出骨髓,并用RNeasy mini试剂盒提取总RNA,用

OneStep Ahead PCR试剂盒、采用巢式PCR扩增人源细胞角蛋白19(Ck-19)mRNA,检测裸鼠骨髓组织中人源Ck-19含量,以确定乳腺癌细胞MDA-MB-231的骨转移情况。巢式PCR的方法、步骤及扩增条件参考文献[12]。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳分离后,在EC3凝胶成像系统拍照,采用ImagePro Plus 5.0软件分析条带。

2.2 BMMs活化实验 收集对数生长期的BMMs细胞,经胰酶消化后制备单细胞悬液,细胞密度为 6×10^5 个/mL。取细胞悬液100 μL 接种于96孔板。24 h后,上述细胞分为空白组、sRANKL组、sRANKL+EVP组,其中sRANKL组加入终质量浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的sRANKL;sRANKL+EVP组则在加入同浓度的sRANKL后,分别加入相当于终质量浓度为 $40、80、160 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的EVP;空白组则加入等体积DMSO。各组细胞置于37℃,5%CO₂的培养箱中继续培养96 h。待培养结束后,各组细胞均以体积浓度为2.5%的戊二醛固定30 min,经洗涤后加入TRAP试剂盒进行TRAP染色,显微镜下计数TRAP阳性的多核细胞数(细胞核 ≥ 3)。

2.3 BMMs分泌Cathepsin K的含量检测 收集对数生长期的BMMs细胞,经胰酶消化后制备细胞密度为 6×10^5 个/mL的单细胞悬液,接种于96孔板中,每孔100 μL 。细胞分组与给药方法同2.2项。各组细胞置于37℃,5%CO₂的培养箱中继续培养96 h,收集上清液,采用Cathepsin K ELISA试剂盒检测各组细胞上清液中的Cathepsin K含量。

2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测蛋白表达 BMMs细胞培养及分组给药方法同2.2项。各组细胞处理结束后,收集细胞,经洗涤、裂解后,采用考马斯亮蓝法测定总蛋白质含量。取等量蛋白在10%的SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳。转膜、封闭、加入一抗(1:1 000)4℃孵育过夜,经TTBS洗膜后,加入二抗(1:1 000),室温孵育2 h。洗膜,DAB显色剂显色,在EC3凝胶成像系统中拍照,采用ImagePro Plus 5软件分析条带,以目的条带与内参条带的比值表示蛋白的相对表达量。

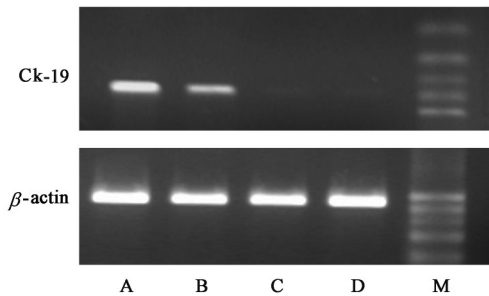
2.5 明胶酶谱实验 采用明胶酶谱实验检测MMPs活性。BMMs细胞培养及分组给药方法同2.2项。各组细胞处理结束后,收集细胞,经洗涤、裂解后,采用考马斯亮蓝法测定总蛋白质含量。按照明胶酶谱试剂盒操作方法检测MMPs活性,取等量蛋白在含有 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 明胶的7.5%SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳。电泳结束后,将凝胶置于溶液I中室温

下孵育30 min,随后将凝胶置于溶液Ⅱ中并在37℃孵育16 h。孵育结束后,凝胶经染色、洗脱后,在EC3凝胶成像系统中拍照,采用Image Pro Plus 5.0软件分析条带。

2.6 统计学分析 应用SPSS 13.0统计软件包进行分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析,方差齐性采用最小显著性差异法(LSD)检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 体内抗骨转移作用 前期实验中采用骨组织病理切片的方法未能观测到乳腺癌细胞在骨髓组织中形成的微小转移。因此,在本研究中改用巢式PCR特异性扩增裸鼠骨髓组织中的人源Ck-19基因的方法检测乳腺癌细胞在骨髓组织中形成的微小转移灶。与空白组比较,荷瘤裸鼠在给予EVP 5.5、11、22 g·kg⁻¹,其骨髓组织中的人Ck-19表达明显降低($P < 0.05$),但对肿瘤的生长未表现出明显的抑制作用,提示EVP具有抗骨转移作用提示蚊母草提取物可显著抑制肿瘤细胞在骨髓组织中形成转移灶的能力。结果见图1和表1。



注:A. 空白组;B-D. EVP组(5.5、11、22 g·kg⁻¹);M. DNA分子量标记

图1 EVP对裸鼠乳腺癌骨转移的影响

Fig. 1 Effect of EVP on human Ck-19 mRNA expression levels in bone marrow tissue of nude mice

表1 EVP对裸鼠乳腺癌骨转移的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Effect of EVP on human Ck-19 mRNA expression levels in bone marrow tissue of nude mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Ck-19
空白组		0.657 5±0.033 5
EVP组	5.5	0.572 3±0.045 5 ¹⁾
	11	0.215 5±0.044 8 ²⁾
	22	0.175 6±0.003 5 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$

3.2 对破骨细胞形成的影响 与空白组比较,sRANKL可显著诱导BMMs分化为多核细胞

($P < 0.01$);与sRANKL组比较,EVP(40、80、160 g·L⁻¹)+sRANKL可明显抑制sRANKL诱导的多核细胞形成($P < 0.05$)。见表2。

表2 EVP对破骨细胞活化的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 2 Effect of EVP on activation of osteoclasts ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	多核细胞数目/个
空白组		0
sRANKL组		358.6±93.1 ¹⁾
EVP+sRANKL组	40	255.2±73.7 ²⁾
	80	156.7±26.4 ²⁾
	160	101.3±10.5 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与sRANKL组比较²⁾ $P < 0.05$ (表3-表6同)

3.3 对破骨细胞Cathepsin K分泌的影响 与空白组比较,sRANKL可显著增加BMMs的Cathepsin K分泌量($P < 0.01$);与sRANKL组比较,EVP(40、80、160 g·L⁻¹)+sRANKL可明显下调Cathepsin K分泌量($P < 0.05$)。见表3。

表3 蚊母草提取物对破骨细胞分泌Cathepsin K的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

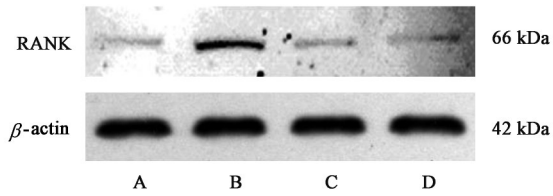
Table 3 Effect of EVP on secretion of Cathepsin K in osteoclast ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	Cathepsin K/ng·g ⁻¹
空白组		0
sRANKL组		433.3±73.6 ¹⁾
EVP+sRANKL组	40	204.8±85.9 ²⁾
	80	138.4±25.5 ²⁾
	160	113.1±27.7 ²⁾

3.4 对破骨细胞RANK表达的影响 与空白组比较,sRANKL可显著增加BMMs细胞RANK蛋白表达($P < 0.01$);与sRANKL组比较,EVP(40、160 g·L⁻¹)+sRANKL中BMMs细胞RANK蛋白表达明显降低($P < 0.05$),提示RANK参与了蚊母草对破骨细胞活化的抑制作用。见图2和表4。

3.5 对破骨细胞Runx2及下游蛋白表达的影响

与空白组比较,sRANKL可显著增加BMMs细胞p-Runx2和MMP-9蛋白表达($P < 0.01$)。与sRANKL组比较,EVP(160 g·L⁻¹)+sRANKL中BMMs细胞p-Runx2和MMP-9蛋白表达明显降低($P < 0.05$)。提示蚊母草可抑制BMMs细胞中Runx2的活化。见图3和表5。



注: A. 空白组; B. sRANKL组; C、D. EVP+sRANKL组(EVP 40、160 g·L⁻¹)(图3、图4同)

图2 EVP对sRANKL诱导的BMMs细胞RANK蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of EVP on RANK expression in sRANKL induced BMMs

表4 EVP对sRANKL诱导的BMMs细胞RANK表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of EVP on RANK expression in sRANKL induced BMMs ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	RANK/ β -actin
空白组		0.063±0.008
sRANKL组		0.485±0.056 ¹⁾
EVP+sRANKL组	40	0.060±0.009 ²⁾
	160	0.076±0.003 ²⁾

3.6 对破骨细胞MMPs活性的影响 与空白组比较, sRANKL处理可显著增强MMPs水解明胶的能力($P<0.01$)。与sRANKL组比较, 经EVP处理BMMs细胞分泌MMPs明显减少, 其水解明胶的能力明显降低($P<0.05$)。见图4和表6。

4 讨论

恶性肿瘤的骨转移按其病变特征可分为3种类型: 成骨性、破骨性和混合性, 其中成骨性骨转移约占骨转移的10%, 常见于前列腺癌、膀胱癌; 而破骨性骨转移占70%, 常见于乳腺癌和肺癌^[13-14]。破骨

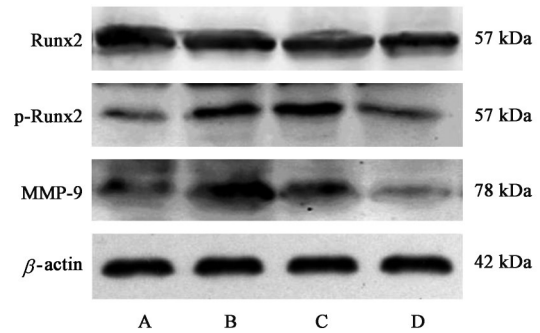


图3 EVP对sRANKL诱导的BMMs细胞Runx2蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of EVP on Runx2 activities in sRANKL induced BMMs

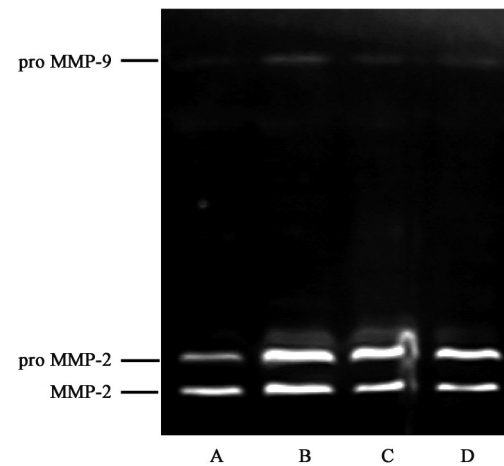


图4 BMMs细胞相关MMPs mRNA电泳
Fig. 4 Electrophoresis of MMPs mRNA in BMMs cell

性骨转移的主要特征是破骨细胞异常活化导致的骨吸收异常, 表现为破骨性病变, 属骨吸收异常类疾病^[14-15]。破骨性骨转移的主要病理机制是由于肿瘤细胞通过直接和间接的方式激活破骨细胞, 从而

表5 EVP对sRANKL诱导的BMMs细胞Runx2活性的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of EVP on Runx2 activities in sRANKL induced BMMs ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	Runx2/ β -actin	p-Runx2/ β -actin	MMP-9/ β -actin
空白组		0.453±0.063	0.064±0.008	0.131±0.017
sRANKL组		0.359±0.042	0.262±0.031 ¹⁾	0.601±0.070 ¹⁾
EVP+sRANKL组	40	0.391±0.075	0.344±0.052	0.221±0.034 ²⁾
	160	0.395±0.079	0.115±0.004 ²⁾	0.139±0.016 ²⁾

表6 EVP对BMMs细胞MMPs活性的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of EVP on MMP activities detected by gelatin zymography assay ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	pro MMP-9	pro MMP-2	64 kDa MMP-2
空白组		11 118.3±1 001.6	37 985.0±710.1	51 405.7±4 509.3
sRANKL组		14 970.0±1 167.6 ¹⁾	93 178.0±1 1970.2 ¹⁾	71 729.7±1 537.1 ¹⁾
EVP+sRANKL组	40	5 601.6±461.7 ²⁾	71 264.0±1 0572.4	44 225.7±2 522.6 ²⁾
	160	6 873.3±458.3 ²⁾	69 495.3±3 268.6 ²⁾	47 532.7±5 510.8 ²⁾

介导肿瘤性骨破坏。近年来,肿瘤细胞、成骨细胞和破骨细胞之间相互作用的“恶性循环”学说越来越被人们所接受。

蚊母草性温、味苦、无毒,具有活血、止血、清肺热、和肝胃的功效,用于治跌打损伤、咳嗽痰中带血、咽喉肿痛、肝胃气痛、疝痛、痛经等。在江西民间,蚊母草用于伤科,特别是骨折患者,疗效非常明显,深受广大草药医的青睐,素有民间中医“不宣之密”的称号。另外,许多用于骨伤科的成药中也含有蚊母草。例如用于骨折、脱臼、新旧伤痛的跳骨片的主要成分中含有黄芪、骨碎补(炒)、血竭及蚊母草等,可以消肿定痛、活血舒筋,并可促进骨痂生长。现代药理研究也表明,蚊母草可以促进骨折的愈合及对骨缺损具有显著的治疗作用。相关研究将蚊母草联合体外冲击波疗法用于家兔桡骨骨不连模型的治疗^[6]。结果发现,蚊母草可显著提高体外冲击波疗法的疗效,与体外冲击波单独治疗组比较,蚊母草联合治疗组的骨痂增多、骨痂密度升高,骨折愈合情况明显优于单独治疗组。方芳等^[16]的研究发现蚊母草可显著促进桡骨骨折家兔的愈合,进一步证实了上述结果。

上述研究表明,蚊母草具有促进骨形成、抑制骨破坏的作用。然而,对于恶性肿瘤所致破骨性骨转移的治疗,同样需要促进骨形成、抑制骨破坏,蚊母草对此是否具有同样的效果,目前尚不清楚。鉴于此,本文围绕破乳腺癌诱导的骨细胞活化,对蚊母草的抗破骨性骨转移的作用及其机制做了初步研究。结果发现,在左心室注射法裸鼠骨转移模型中,蚊母草提取物可显著抑制肿瘤细胞在骨髓组织中分布,表现出明显抗骨转移作用。体外实验也表明,蚊母草提取物可抑制sRANKL诱导的破骨细胞活化并可抑制破骨细胞分泌蛋白裂解酶 Cathepsin K,提示蚊母草对乳腺癌诱导的破骨性骨转移具有抑制作用。进一步机制研究发现,蚊母草可抑制sRANKL诱导破骨细胞骨表达RANK,同时也可抑制骨相关核转录因子Runx2活化并下调其靶基因MMP-9的表达。

Runx2又称核心结合因子 $\alpha 1$ (CBFA1),是一种属于Runt结构域基因家族的转录因子。最初,Runx2被发现在骨骼发育和骨形成中起了至关重要的作用,是骨发育中的一个关键性转录因子,它通过活化p21、Rank1、MMP-2、MMP-9、骨唾液蛋白(Bsp)和骨桥蛋白(Opn)等基因的表达,促进骨骼发育^[17]。近年来大量研究证据表明,Runx2基因还可

异位表达与乳腺细胞和乳腺癌细胞,参与乳腺的发育和乳腺肿瘤的发生、发展过程。在肿瘤细胞的浸润、转移等过程中,特别是在肿瘤细胞的骨组织克隆生长过程中起了关键性的调控作用^[18-19]。研究表明,在破骨细胞的活化过程中,Runx2转录因子可以通过活化Smad5相关的信号转导通路,促进肿瘤细胞释放RANKL,导致破骨细胞异常活化。研究发现,Smad5可以明显促进Runx2磷酸化及其核内定位,同时RANKL的表达量也显著增加^[20]。因此,在肿瘤细胞诱导的破骨细胞活化中,Runx2起着关键性的枢纽作用,进而促进破骨细胞活化。近年来,也有研究表明,Runx2在骨发育和骨转移中的作用不仅体现在促进成骨细胞活化和肿瘤细胞侵袭,在破骨细胞的活化中,同样扮演非常重要的角色。有研究发现,Runx2可通过干扰相关信号转导,从而启动破骨细胞分化,促进F-actin环的形成和骨吸收^[21]。结合本文发现的蚊母草提取物可显著抑制RANKL诱导的破骨细胞分化,并抑制骨吸收,同时可下调Runx2活性的结果,推测蚊母草抗骨转移作用机制可能是通过抑制Runx2磷酸化,抑制RANK表达,从而抑制破骨细胞活化,抑制骨转移灶的形成。

综上,蚊母草提取物具有显著的抗破骨性骨转移作用,抑制破骨细胞骨形成相关转录因子Runx2活化,进而干扰RANKL-RANK信号转导,从而抑制破骨细胞活化可能是其作用机制之一。鉴于Runx2在乳腺癌细胞迁移、侵袭及在成骨细胞活化中的作用,因此后续对蚊母草抗破骨性骨转移作用机制的研究可从对成骨细胞-破骨细胞活化的影响和对肿瘤细胞的转移特性的影响两方面入手。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] RIQUWLME M A, CARDENAS E R, JIANG J X. Osteocytes and bone metastasis [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020, doi: 10.3389/fendo.2020.567844.
- [2] TAHARA R K, BREWER T M, THERIAULT R L, et al. Bone metastasis of breast cancer [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, doi: 10.1007/978-3-030-20301-6_7.
- [3] COLEMAN R E, CROUCHER P I, PADHANI A R, et al. Bone metastases [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2020, 6(1):83.
- [4] 赵子星,李宏宇,席立成,等. 体外冲击波疗法联合仙桃草口服用于兔桡骨骨不连临床效果观察[J]. *山东*

- 医药, 2016, 56(36):31-33.
- [5] 金继曙, 于在东, 种明才. 仙桃草化学成分的分
离[J]. 中草药, 1982, 13(4):10-12.
- [6] 都述虎, 金继曙. 仙桃草主要化学成分体外促凝
血作用[J]. 中草药, 1996, 27(7):416-417.
- [7] 付剑江, 刘婷, 墨啸笋, 等. 左归丸抗乳腺癌破骨
骨转移机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22
(12):123-127.
- [8] SIMMONS J K, DIRKSEN W P, HILDRETH B E,
et al. Canine prostate cancer cell line (Probasco)
produces osteoblastic metastases *in vivo*[J]. Prostate,
2014, 74(13):1251-1265.
- [9] ELSHAFAE S M, DIRKSEN W P,
ALASONYALILAR-DEMIRER A, et al. Canine
prostatic cancer cell line (LuMa) with osteoblastic
bone metastasis[J]. Prostate, 2020, 80(9):698-714.
- [10] 杨启权. 仙桃草散治外伤[J]. 四川中医, 1985, 4(7):
42-42.
- [11] 孙静如. 仙桃草的临床应用[J]. 江西医药, 1965
(10):1050-1051.
- [12] WANG W, CHEN B, ZOU R, et al. Codonolactone,
a sesquiterpene lactone isolated from *Chloranthus
henryi* Hemsl, inhibits breast cancer cell invasion,
migration and metastasis by downregulating the
transcriptional activity of Runx2 [J]. Int J Oncol,
2014, 45(5):1891-1900.
- [13] LOFTUS L S, EDWARDS-BENNETT S, SOKOL G
H. Systemic therapy for bone metastases [J]. Cancer
Control, 2012, 19(2):145-153.
- [14] REN G, ESPOSITO M, KANG Y. Bone metastasis
and the metastatic niche[J]. J Mol Med (Berl), 2015,
93(11):1203-1212.
- [15] DAVID ROODMAN G, SILBERMANN R.
Mechanisms of osteolytic and osteoblastic skeletal
lesions [J]. Bonekey Rep, 2015, doi: 10.1038/
bonekey. 2015. 122.
- [16] 方芳, 王平珍, 邱芸. 仙桃草促进骨折愈合机制探讨
[J]. 中国民族民间医药, 2014, 23(21):15.
- [17] KOMORI T. Runx2, an inducer of osteoblast and
chondrocyte differentiation [J]. Histochem Cell Biol,
2018, 149(4):313-323.
- [18] FERRARI N, MCDONALD L, MORRIS J S, et al.
RUNX2 in mammary gland development and breast
cancer[J]. J Cell Physiol, 2013, 228(6):1137-1142.
- [19] WEIGELT B, PETERSE J L, VAN'T VEER L J.
Breast cancer metastasis: Markers and models [J].
Nat Rev Cancer, 2005, 5(8):591-602.
- [20] GUPTA A, CAO W, CHELLAIAH M A. Integrin
alpha3beta3 and CD44 pathways in metastatic prostate
cancer cells support osteoclastogenesis via a Runx2/
Smad 5/receptor activator of NF-kappaB ligand
signaling axis [J]. Mol Cancer, 2012, doi: 10.1186/
1476-4598-11-66.
- [21] XIN Y, LIU Y, LIU D, et al. New function of runx2
in regulating osteoclast differentiation via the Akt/
NFATc1/CTSK axis [J]. Calcif Tissue Int, 2020, 106
(5):553-566.

[责任编辑 张丰丰]