

左归丸抗乳腺癌破骨性骨转移机制探讨

付剑江¹, 刘婷¹, 墨啸箏², 柯小琴¹, 朱小翠¹, 张舟妙¹, 吕红³

(1. 江西中医药大学药学院, 南昌 330004; 2. 江西中医药大学中医理论分化发展研究中心, 南昌 330004; 3. 江西中医药大学网络与教育技术中心, 南昌 330004)

[摘要] **目的:**研究左归丸的抗乳腺癌破骨性骨转移作用,并探讨其机制。**方法:**采用左心室注射人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞法建立裸鼠乳腺癌实验性骨转移模型,实验分为空白组、左归丸(21,42 g·kg⁻¹)组,采用巢式 PCR 特异性扩增裸鼠骨髓中人细胞角蛋白(CK19),确定肿瘤细胞在骨髓组织中的转移情况。体外分离小鼠破骨细胞前体细胞小鼠骨髓巨噬细胞(BMMs),外源性加入核转录因子- κ B(NF- κ B)受体活化因子配体(sRANKL),模拟肿瘤条件下破骨细胞活化,观察左归丸对破骨细胞活化、组织蛋白酶 K(Cathepsin K)分泌以及骨片吸收的影响。采用免疫印迹法(Western blot)检测破骨细胞前体细胞 NF- κ B 受体活化因子(RANK)表达的影响。**结果:**与空白组比较,左归丸(21,42 g·kg⁻¹)组均可显著抑制乳腺癌骨转移动物骨髓组织中人 CK19 表达的影响($P < 0.01$)。体外血清药理学研究表明,左归丸含药血清可显著抑制 BMMs 分化为具有多细胞核的破骨细胞($P < 0.05$),同时可明显抑制破骨细胞分泌 Cathepsin K($P < 0.05$)。10% 左归丸含药血清组的骨片吸收窝的数量和面积明显低于正常大鼠血清组($P < 0.05$)。Western blot 实验结果表明,左归丸含药血清可明显抑制 RANK 蛋白表达($P < 0.05$)。**结论:**左归丸具有明显的抗乳腺癌破骨性骨转移作用,RANKL/RANK 系统活性可能是其作用机制之一。

[关键词] 左归丸; 破骨性骨转移; 乳腺癌; 巢式 PCR; 人源细胞角蛋白; 核转录因子- κ B 受体活化因子配体; 组织蛋白酶 k

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)12-0123-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016120123

Effects of Zuogui Wan on Osteolytic Metastasis Induced by Breast Cancer Cells

FU Jian-jiang¹, LIU Ting¹, MO Xiao-zheng², KE Xiao-qin¹, ZHU Xiao-cui¹, ZHANG Zhou-miao¹, LYU Hong³

(1. School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanchang 330004, China; 2. Research Center for Differentiation and Development of TCM Basic Theory, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China; 3. Network and Education Technology Center, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-osteolytic metastasis effects of Zuogui Wan for breast cancer. **Method:** Balb/C Nu mice were used to establish *in vivo* experimental bone metastasis models by left ventricle injection of human breast cancer MDA-MB-231 cells. The mice in the experiment was divided into three groups: blank group, Zuogui Wan groups (21, 42 g·kg⁻¹). The cytokeratin 19 (CK19) in bone marrow were detected by nest PCR assay. The bone marrow-derived macrophages (BMMs) were *in vitro* isolated as osteoclast precursors, and soluble receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (sRANKL) was exogenously added to simulate the activation of osteoclasts under tumor conditions, and then the effects of Zuogui Wan on activation of osteoclasts, Cathepsin K secretion levels and bone slices absorption were observed. Western blot assay was used to detect its effect on RANK expression levels in BMMs. **Result:** As compared with the blank group, Zuogui Wan

[收稿日期] 20151031(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81160530,81260656,81560639);江西省自然科学基金项目(2010GQY0147);教育部重点科技项目(211091)

[第一作者] 付剑江,博士,副教授,从事中药抗肿瘤药理研究,Tel:0791-87118919,E-mail:jianjiang_fu@yeah.net

[通讯作者] *吕红,讲师,从事中药抗肿瘤药理研究,Tel:0791-87118901,E-mail:jianghong_6666@126.com

(21, 42 g · kg⁻¹) exhibited significant inhibition on human CK19 expression levels in bone marrow tissues of animals with breast cancer bone metastasis ($P < 0.01$). *In vitro* serum pharmacological studies showed that Zuogui Wan significantly inhibited RANKL-induced osteoclastogenesis in murine BMMs ($P < 0.05$) and significantly inhibited the secretion of Cathepsin K in RANKL-induced osteoclasts ($P < 0.05$). Bone slices experiment indicated that, the number and area of bone slices resorption pits in 10% Zuogui Wan group were significantly lower than those in normal group ($P < 0.05$). Western blot assay indicated that medicated serum of Zuogui Wan could significantly inhibit the expression of RANK in RANKL-induced osteoclasts. **Conclusion:** Zuogui Wan have significant anti-osteolytic metastasis effects for breast cancer cells, and the mechanism may be associated with inhibiting RANKL/RANK activation.

[Key words] Zuogui Wan; osteolytic metastasis; breast cancer; nest PCR; cytokeratin 19; soluble receptor activator of nuclear factor- κ B ligand; Cathepsin k

恶性肿瘤骨转移按病变特征可分为以下 3 种类型:破骨性、成骨性和混合性^[1]。成骨性骨转移常见于前列腺癌、膀胱癌,约占骨转移的 10%。破骨性骨转移占 70%,常见于乳腺癌和肺癌^[2]。在乳腺癌患者中,约有 65% ~ 70% 的患者出现破骨性骨转移,其主要特征是破骨细胞导致的骨吸收异常,大多表现为破骨性病损,属骨吸收类疾病范畴^[1]。依据“肾主骨”理论,传统中医认为乳腺癌破骨性骨转移的病位在肾,肾虚是其重要病因,治法则以补肾为主。左归丸是滋阴补肾法的代表方剂,出自明代温补名家张景岳的《景岳全书·新方八阵》,是张景岳据其真阴学说、参以个人用药体悟、由六味地黄丸化裁而来。研究表明,左归丸可通过调节核转录因子- κ B 受体活化因子/核转录因子- κ B 受体活化因子配体/骨保护素 (RANK/RANKL/OPG) 信号通路的活性,治疗骨质疏松等骨吸收类疾病^[3]。然而,对于同样属于骨吸收性疾病的破骨性骨转移,左归丸的作用却未见相关研究报道。因此,本文对左归丸治疗乳腺癌破骨性骨转移机制进行探讨。

1 材料

1.1 药物 左归丸方药组成和用量参照《景岳全书》中的药味组成及用量折算^[4-5]:熟地黄 24 g,山药 12 g,枸杞子 12 g,山萸肉 12 g,牛膝 9 g,菟丝子 12 g,龟甲胶 12 g,鹿角胶 12 g^[6-7]。上述药材均购自北京同仁堂(亳州)饮片有限公司。除龟甲胶和鹿角胶外,上述药材加 10 倍量水回流提取 2 次,每次 1 h,过滤后合并 2 次滤液,并将龟甲胶和鹿角胶烱化后加入水提液中。随后将上述水提液浓缩成生药含量为 2.1 g · mL⁻¹ 的浓缩液。此药物浓度按照人日用临床剂量(每日 1 剂,生药含量为 105 g/剂),经人/小鼠体表面积折算为裸鼠用量。

1.2 主要试剂 QIAshredder, RNeasy Protect Mini

试剂盒, OneStep RT-PCR 试剂盒, Multiplex PCR 试剂盒 (Qiagen 公司, 批号分别为 79656, 74124, 210210, 206143), 小鼠重组核转录因子- κ B 受体活化因子配体 (sRANKL) 试剂盒 (Rockland 公司, 批号 010-001-C22), 小鼠巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF) 试剂盒 (R&D 公司, 批号 416-ML), SensiZyme 组织蛋白酶 K (Cathepsin K) 酶联免疫 (ELISA) 试剂盒 (Sigma-Aldrich 公司, 批号 CS1150), 小鼠 RANK 多克隆抗体 (Santa Cruz 公司, 批号 sc-374360)。

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。细胞于 DMEM 培养基中培养, 置于 37 °C 5% CO₂ 的培养箱内, 3 ~ 4 d 传代 1 次。小鼠骨髓巨噬细胞 (BMMs) 采用 Histopaque 密度梯度离心法 (400 g, 30 min) 从 4 周龄的 ICR 小鼠胫骨骨髓内提取。分离得到的 BMMs 培养于 α -MEM 培养基中。

1.4 动物 18 ~ 22 g 雌性 BALB/c Nu 裸鼠, 4 周龄雌性 ICR 小鼠, 180 ~ 220 g SD 大鼠均购自于北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号 SCXK (京)2012-0001。

1.5 主要仪器 Mastercycler gradient 型 PCR 仪 (德国 Eppendorf 公司), EC3 型凝胶成像系统 (美国 UVP 公司), ELx800 型酶标仪 (美国 Bio Tek 公司), BX63 型正置显微镜 (日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 乳腺癌骨转移动物模型 取 BALB/c Nu 裸鼠 30 只, 左心室注射含有 2 × 10⁶ 个/mL MDA-MB-231 细胞的生理盐水 200 μ L。24 h 后随机分为空白组、左归丸 (21, 42 g · kg⁻¹) 组。左归丸 *ig* 给予左归丸 21 g · kg⁻¹ (相当于人用剂量) 和 42 g · kg⁻¹ (相当于人用剂量 2 倍), 给药体积 0.02 mL · g⁻¹, 空白组则给予同体积生理盐水, 每天 1 次, 连续给药 8 周。给

药结束后,处死裸鼠,无菌剥离双侧股骨,取骨髓。采用 QIAshredder 和 RNeasy Protect Mini Kit 提取总 RNA,通过巢式 PCR 检测裸鼠骨髓组织中人源细胞角蛋白 19(CK19)含量,确定骨转移程度。

2.2 RNA 提取及巢式 PCR 检测相关基因 骨髓组织中总 RNA 采用 QIAshredder 和 RNeasy Protect Mini 试剂盒提取。CK19 基因巢式 PCR 采用 Qiagen OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) 和 Qiagen Multiplex PCR Kit (Qiagen) 试剂盒进行扩增,同时以 β -actin 基因作为内参基因,详细扩增条件以及引物见参考文献[8]。巢式 PCR 产物进行电泳分离,凝胶成像系统拍照。

2.3 左归丸含药血清的制备^[9] 取雌性 SD 大鼠 20 只,随机分为正常组和左归丸组,每组 10 只。左归丸组大鼠 ig 左归丸($84 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每天 2 次,相当于人用量 5.7 倍),正常组 ig 等容积的蒸馏水。连续 5 d,于末次给药后 1 h,乙醚麻醉,经腹主动脉采血,冷置 1 h, $2\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 25 min,分离血清, $56 \text{ }^\circ\text{C}$ 灭活 30 min, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用。

2.4 薄骨片的制作 取新鲜牛股骨的皮质骨,锯成 $10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$ 的骨片,磨成 $100 \sim 200 \text{ }\mu\text{m}$ 薄片。经超声波洗涤,75%乙醇浸泡,无菌蒸馏水洗涤 10 min,3 次,浸泡于 10 倍抗生素的 DMEM 培养液中, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

2.5 破骨细胞致骨陷窝数目及面积的检测 取出薄骨片,75%乙醇浸泡,无菌条件下晾干,铺于 24 孔板中。收集对数生长期的 BMMs 细胞,调整细胞密度为 2×10^6 个/mL。接种在铺有骨片的 24 孔板中,加入 sRANKL(终质量浓度 $100 \text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),M-CSF(终质量浓度 $30 \text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)。左归丸处理组加入含有 10% 左归丸含药血清,另设 10% 胎牛血清 + DMSO 组,10% 正常大鼠血清 + sRANKL 组。各组置 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 培养箱内连续培养 7 d。培养结束后在对整张骨片进行陷窝计数,用 LAS 图像分析仪系统计算骨吸收陷窝的面积。

2.6 破骨细胞活化的检测 收集对数生长期细胞,调整细胞密度为 5×10^5 个/mL。接种于 96 孔板,加入 sRANKL(终质量浓度 $100 \text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),M-CSF(终质量浓度 $30 \text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)。左归丸处理组加入含有 10% 左归丸含药血清的培养基 $150 \text{ }\mu\text{L}$ 。另设 10% 胎牛血清 + DMSO 组,10% 正常大鼠血清 + sRANKL 组。各组细胞置 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 的培养箱内连续培养 5 d。培养结束后,用 3.7% 的甲醛溶液固定,蒸馏水

洗涤后用酸性磷酸酶白细胞试剂盒(Sigma-Aldrich)进行抗酒石酸盐酸性磷酸酶(TRAP)染色。于倒置显微镜下计数 TRAP 阳性的多核细胞(细胞核 ≥ 3)的细胞数目。

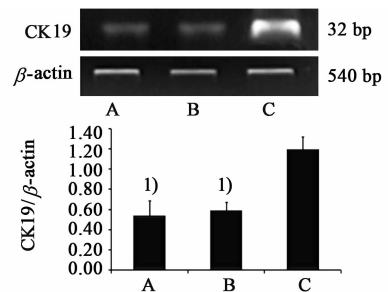
2.7 Cathepsin K 含量检测 细胞加药及培养同 2.6,结束 5 d 后收集上清液,采用 SensiZyme Cathepsin K ELISA 试剂盒检测上清液中 Cathepsin K 含量。

2.8 Western blot 检测蛋白表达 各组破骨细胞裂解,提取蛋白,测定蛋白含量,取等量蛋白凝胶电泳,转膜,封闭,加入 RANK 一抗($1:1\,000$) $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜,洗膜后加入二抗孵育 1 h,洗膜,显色剂显色,在凝胶成像系统中拍照,分析。

2.9 统计学分析 应用 SPSS 13.0 统计软件包进行分析,计量结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析,方差齐性采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 左归丸的体内抗骨转移作用 与空白组比较,左归丸可显著降低动物骨髓组织中 CK19 表达量 ($P < 0.01$),其中左归丸($21,42 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组 CK19 的相对表达量分别为 53.84%,58.93%。见图 1。



A ~ B. 左归丸 ($21,42 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组; C. 空白组; 与空白组比较 ¹⁾ $P < 0.01$

图 1 左归丸对裸鼠骨髓组织中人 CK19 mRNA 表达的影响

Fig.1 Effects of Zuogui Wan on human CK19 mRNA expression levels in bone marrow tissues

3.2 左归丸含药血清对破骨细胞形成的影响 经过 5 d 的培养,10% 正常大鼠血清组 BMMs 在 sRANKL 的诱导下形成的破骨细胞数明显高于 10% 左归丸含药血清组 ($P < 0.05$)。见表 1。

3.3 左归丸含药血清对 Cathepsin K 分泌的影响 与 10% 胎牛血清 + DMSO 组,10% 正常大鼠血清 + sRANKL 组比较,左归丸含药血清可明显抑制 BMMs 分泌 Cathepsin K ($P < 0.05$)。见表 2。

3.4 左归丸含药血清对体外骨片吸收作用的影响 各组细胞培养第 7 天,骨片上出现的骨吸收陷窝数、陷窝面积出现较大差异,其中 10% 正常大鼠血

表 1 左归丸对破骨细胞活化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 1 Effects of Zuogui Wan on activation of osteoclasts ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	多核细胞数目
A	0
B	343.3 ± 107.6 ¹⁾
C	257.6 ± 118.4
D	136.4 ± 45.7 ²⁾

注: A. 10% 胎牛血清 + DMSO 组, B. 10% 正常大鼠血清 + sRANKL 组, C. 5% 左归丸含药大鼠血清 + 5% 正常大鼠血清 + sRANKL, D. 10% 左归丸含药大鼠血清 + sRANKL 组。与 10% 胎牛血清 + DMSO 组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与 10% 正常大鼠血清 + sRANKL 组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2, 3 同, 图 2 同)。

表 2 左归丸对破骨细胞分泌 Cathepsin K 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 2 Effects of Zuogui Wan on secretion of Cathepsin K in osteoclasts ($\bar{x} \pm s, n = 4$) $\times 10^{-9}$

组别	Cathepsin K 蛋白/总蛋白
A	0
B	362.1 ± 117.4 ¹⁾
C	199.1 ± 86.8 ²⁾
D	88.5 ± 28.5 ²⁾

清 + sRANKL 组的陷窝个数和陷窝面积明显高于 10% 胎牛血清组 ($P < 0.05$)。10% 左归丸含药大鼠血清 + sRANKL 组可明显抑制骨片上的陷窝数以及陷窝面积 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 左归丸对破骨细胞骨吸收所致陷窝数目与面积变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 3 Effects of Zuogui Wan on number and area of bone slice resorption pits ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	数目/个	面积/ $\times 10^2 \cdot \mu\text{m}^2$
A	137.72 ± 21.26	693.10 ± 118.27
B	300.74 ± 33.28 ¹⁾	1 023.40 ± 98.11 ¹⁾
C	229.10 ± 39.40	971.60 ± 108.10
D	197.19 ± 44.02 ²⁾	742.90 ± 195.91 ²⁾

3.5 左归丸含药血清对破骨细胞 RANK 蛋白表达水平的影响 与 10% 胎牛血清 + DMSO 组, 10% 正常大鼠血清 + sRANKL 组比较, 左归丸含药血清可显著抑制 RANK 的表达 ($P < 0.01$), 且具有剂量依赖性。见图 2。

4 讨论

左归丸是滋阴补肾法的代表方剂, 被广泛用于各种证见真阴不足、精髓亏乏者。左归丸对以“肾精不足不能濡养于骨”为根本致病原因的骨质疏松症具有一定的治疗作用。左归丸对与骨质疏松同属

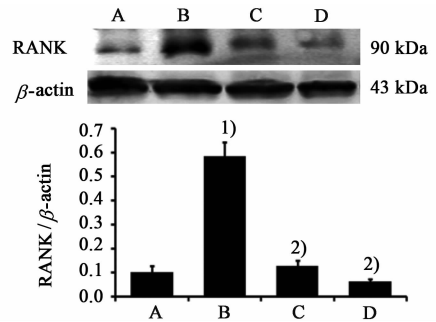


图 2 左归丸含药血清对破骨细胞 RANKL 蛋白表达水平的影响

Fig. 2 Effects of Zuogui Wan on RANK protein expression in osteoclasts

骨吸收性疾病的恶性肿瘤所导致的破骨性骨转移的治疗未见相关报道。鉴于此, 本文以左归丸为研究对象, 利用体内、外向结合的方法, 观察了左归丸的抗乳腺癌骨转移作用, 并对其可能的作用机制做了初步探索。本研究结果显示, 左归丸在体内可显著抑制骨转移灶的形成; 在体外, 左归丸含药血清可显著抑制破骨细胞前体细胞 BMMs 的分化、活化。此外, 左归丸还可显著抑制破骨细胞的溶骨作用以及蛋白酶 Cathepsin K 的分泌。上述结果提示, 左归丸对于乳腺癌所诱导的破骨性骨转移具有一定的抑制作用, 其作用可能与破骨细胞的活化抑制有关。

大量研究表明, 作为破骨细胞分化、成熟过程中最重要的分子, OPG/RANKL/RANK 系统在肿瘤骨转移过程中具有重要作用^[10-11]。Mancino 等^[12]将乳腺癌细胞与小鼠骨髓基质细胞共培养, 发现乳腺癌细胞表达大量 M-CSF, 且能促进骨髓基质细胞增加 RANKL 的表达量, 而这两种细胞因子都是破骨细胞形成时起关键作用的因子。Park 等^[13]研究发现, 乳腺癌细胞不仅可促进成骨细胞表达 RANKL, 还能减少成骨细胞 OPG 的表达, 以致 OPG 浓度太低而不能代偿 RANKL 的高表达, 导致 RANKL/OPG 上升, 刺激破骨细胞前体细胞的分化和成熟。Grimaud 等^[14]分析了肿瘤组织与非肿瘤组织、健康组织中的 RANKL/OPG, 结果表明有严重破骨性破坏的患者 RANKL/OPG 较健康组明显升高, 提示 OPG 表达减少或 RANKL 表达增加可引起 OPG 相对不足, 破骨细胞生成增加。由此可见, 在恶性肿瘤骨转移的过程中, 骨组织破坏的主要机制是肿瘤细胞刺激破骨细胞促进骨吸收, 导致骨组织发生溶骨性破坏, 并从骨基质中释放出多种细胞因子, 这些细胞因子又促进肿瘤细胞在骨组织中增殖, 进而促进肿瘤细胞在骨组织中侵袭性生长, 释放出更多细胞因子。此过程中破骨细胞的激活是关键步骤, OPG/

RANKL/RANK 系统是其中的关键分子^[15]。本研究结果显示,阐明左归丸的抗乳腺癌骨转移作用与 OPG/RANKL/RANK 有关,左归丸可显著抑制破骨细胞表达 RANK 蛋白。

综上所述,左归丸对于乳腺癌诱导的破骨性骨转移具有一定的治疗作用。抑制破骨细胞 RANK 表达,从而抑制其分化、活化可能是左归丸抗破骨性骨转移的作用机制之一。

[参考文献]

[1] Shiozawa Y, Eber M R, Berry J E, et al. Bone marrow as a metastatic niche for disseminated tumor cells from solid tumors [J]. *Bonekey Rep*, 2015 (4): 689. doi: 10.1038/bonekey.2015.57. eCollection 2015.

[2] 孙燕,管忠震,廖美琳,等.肺癌骨转移诊疗专家共识(2014版)[J].中国肺癌杂志,2014,17(2):57-72.

[3] 鞠大宏,张春英,王安民,等.左归丸对去卵巢所致大鼠骨质疏松症的治疗作用[J].中国中医基础医学杂志,2001,7(3):17-19.

[4] 张介宾.景岳全书[M].海南:海南国际新闻出版中心,1995:89.

[5] 周敏,方晓阳.左归丸及右归丸创方思想的历史考察[J].中医杂志,2015,56(11):901-905.

[6] 鞠大宏,刘洁梅,赵宏艳,等.左归丸含药血清对成骨细胞 OPG、RANKL mRNA 表达的影响[J].北京中医药大学学报,2008,31(5):312-315.

[7] 孙月娇,宋囡,何文智,等.左、右归丸对大鼠骨髓间充质干细胞成骨诱导中转化生长因子- β_1 及 Smad2/3 的影响[J].中国组织工程研究,2014,18(10):1496-1501.

[8] Ma J, Lu H, Wang S, et al. The anthraquinone derivative Emodin inhibits angiogenesis and metastasis through downregulating Runx2 activity in breast cancer [J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(4):1619-1628.

[9] 赵宏艳,鞠大宏,刘洁梅,等.左归丸含药血清对破骨细胞骨吸收功能的影响以及成骨细胞对其的介导作用[J].中国中医基础医学杂志,2006,12(9):662-664.

[10] Walsh M C, Choi Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG system in immunity, bone, and beyond [J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 511. doi: 10.3389/fimmu.2014.00511. eCollection 2014.

[11] Xing L, Xiu Y, Boyce B F. Osteoclast fusion and regulation by RANKL-dependent and independent factors [J]. *World J Orthop*, 2012, 3(12):212-222.

[12] Mancino A T, Klimberg V S, Yamamoto M, et al. Breast cancer increases osteoclastogenesis by secreting M-CSF and upregulating RANKL in stromal cells [J]. *J Surg Res*, 2001, 100(1):18-24.

[13] Park H R, Min S K, Cho H D, et al. Expression of osteoprotegerin and RANK ligand in breast cancer bone metastasis [J]. *J Korean Med Sci*, 2003, 18(4):541-546.

[14] Grimaud E, Soubigou L, Couillaud S, et al. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis [J]. *Am J Pathol*, 2003, 163(5):2021-2031.

[15] Sigl V, Penninger J M. RANKL/RANK-from bone physiology to breast cancer [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2014, 25(2):205-214.

[责任编辑 张丰丰]