

## 附子-白术药对对乳腺癌骨转移裸鼠 TGF- $\beta$ /Smads/ Gli2/PTHrP 信号通路的影响

程旭锋<sup>1</sup>, 张新峰<sup>2\*</sup>, 刘琦<sup>3</sup>, 乔翠霞<sup>4</sup>, 赵慧朵<sup>1</sup>

(1. 河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450008; 2. 郑州大学附属肿瘤医院, 郑州 450008;  
3. 河南中医药大学, 郑州 450008; 4. 河南省中医药研究院, 郑州 450008)

**[摘要]** 目的:研究附子-白术药对对乳腺癌骨转移裸鼠的保护作用及其作用机制。方法:裸鼠随机分为正常组、模型组、唑来膦酸组、附子-白术药对组,采用左心室注射乳腺癌细胞 MDA-MB-231BO 法建立骨转移模型,并进行相应干预。观察裸鼠骨转移程度,微计算机断层扫描(Micro-CT)检测裸鼠胫骨矿物质密度(BMD),骨体积(BV),选取感兴趣区域(ROI)体积(TV),计算骨体积分数 BV/TV,抗酒石酸酸性磷酸酶染色法(TRAP)观察骨转移灶中破骨细胞表达,蛋白免疫印迹法(Western blot)法检测转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ ), Smad3, Smad4, 胶质瘤相关癌基因同源蛋白 2(Gli2)和甲状旁腺激素相关蛋白(PTHrP)的表达。结果:与模型组比较,附子-白术药对组骨转移程度显著降低( $P < 0.01$ ),裸鼠胫骨 BMD, BV/TV 显著升高( $P < 0.01$ ), TRAP(+)细胞数量显著减少( $P < 0.01$ ),骨转移灶中 TGF- $\beta_1$ , Smad3, Gli2 和 PTHrP 表达均显著降低( $P < 0.01$ ), Smad4 表达均明显升高( $P < 0.05$ )。结论:附子-白术药对可减轻乳腺癌骨转移裸鼠溶骨性损伤,其机制可能与其上调 Smad4 蛋白表达,下调 TGF- $\beta_1$ , Smad3, Gli2 和 PTHrP 蛋白表达,调控 TGF- $\beta_1$ /Smads/Gli2/PTHrP 信号通路有关。

**[关键词]** 乳腺癌骨转移; 附子-白术药对; 转化生长因子- $\beta$ /Smads/胶质瘤相关癌基因同源蛋白 2/甲状旁腺激素相关蛋白(TGF- $\beta$ /Smads/Gli2/PTHrP)信号通路; 温肾健脾

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)24-0128-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017240128

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170912.1425.046.html>

**[网络出版时间]** 2017-09-12 14:25

### Effect of Aconiti Lateralis Radix Praeparata-Atractylodis Macrocephalae Rhizoma on TGF- $\beta_1$ /Smads/Gli2/PTHrP Signaling Pathway in Nude Mice with Bone Metastasis of Breast Cancer

CHENG Xu-feng<sup>1</sup>, ZHANG Xin-feng<sup>2\*</sup>, LIU Qi<sup>3</sup>, QIAO Cui-xia<sup>4</sup>, ZHAO Hui-duo<sup>1</sup>

(1. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China; 2. Cancer Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450008, China; 3. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China; 4. Henan Province Chinese Medicine Research Institute, Zhengzhou 450008, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the therapeutic efficacy of Aconiti Lateralis Radix Praeparata-Atractylodis Macrocephalae Rhizoma on nude mice with bone metastasis of breast cancer and its mechanism. **Method:** Nude mice were randomly divided into normal group, model group, zoledronate group and Aconiti Lateralis Radix Praeparata-Atractylodis Macrocephalae Rhizoma group. Except for normal group, MDA-MB-231BO cells were injected into the left ventricle to create the model of bone metastasis of breast cancer. Aconiti Lateralis Radix Praeparata-Atractylodis Macrocephalae Rhizoma group nude mice were orally administered with Aconiti

**[收稿日期]** 20170609(011)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(U1304822,81603469);河南省科技攻关计划项目(162102310185,162102310331);河南省教育厅科学技术研究重点项目(2011A360004)

**[第一作者]** 程旭锋,博士,副主任医师,从事中西医结合防治乳腺疾病研究,Tel:13937189939,E-mail:cx9939@163.com

**[通讯作者]** \*张新峰,博士,主治医师,从事中西医结合防治恶性肿瘤研究,Tel:0371-65587091,E-mail:zhangxinfeng125@126.com

Lateralis Radix Praeparata-Atractylodis Macrocephalae Rhizoma. Normal group, model group and zoledronate group nude mice were orally administered with physiological saline, and zoledronate was injected into the abdominal cavity in zoledronate group. The degree of bone metastases was evaluated. Bone mineral density (BMD), bone volume (BV), range of interests (ROI) and total volume (TV) were evaluated by micro-CT. Osteoclasts in bone metastasis were evaluated by tartrate resistant acid phosphatase dye (TRAP). Transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ), drosophila mothers against decapentaplegic protein 3 (Smad3), Smad4, Glioma-associated oncogene homologue 2 (Gli2) and Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in bone metastasis tissues were evaluated by Western blot. **Result:** The degree of bone metastases, BMD and BV/TV in Aconiti Lateralis Radix Praeparata-Atractylodis Macrocephalae Rhizoma group were higher than those of model group ( $P < 0.01$ ). The number of TRAP (+) cells in Aconiti Lateralis Radix Praeparata-Atractylodis Macrocephalae Rhizoma group was lower than that of model group ( $P < 0.01$ ). The expression of TGF- $\beta_1$ , Smad3, Gli2 and PTHrP protein expressions of bone metastases tissues in Aconiti Lateralis Radix Praeparata-Atractylodis Macrocephalae Rhizoma group were lower than those of model group ( $P < 0.01$ ), and the expression of Smad4 in Aconiti Lateralis Radix Praeparata-Atractylodis Macrocephalae Rhizoma group was higher than that of model group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Aconiti Lateralis Radix Praeparata-Atractylodis Macrocephalae Rhizoma has a therapeutic effect on soluble osseous injury in nude mice with bone metastasis of breast cancer, and the mechanisms of action may be that Aconiti Lateralis Radix Praeparata-Atractylodis Macrocephalae Rhizoma could up-regulate Smad4, down-regulate TGF- $\beta_1$ , Smad3, Gli2 and PTHrP, and regulate TGF- $\beta_1$ /Smads/Gli2/PTHrP signaling pathway.

[ **Key words** ] bone metastasis of breast cancer; Aconiti Lateralis Radix Praeparata-Atractylodis Macrocephalae Rhizoma; TGF- $\beta_1$ /Smads/Gli2/PTHrP signaling pathway; warming kidney and strengthening spleen

乳腺癌是我国女性发病率最高的恶性肿瘤,骨是乳腺癌最常见的转移部位,晚期乳腺癌患者骨转移的发生率达 65% ~ 75%<sup>[1-2]</sup>。乳腺癌骨转移以溶骨性损伤为主,可引起骨痛、高钙血症、病理性骨折等一系列骨相关事件,使患者承担较高的医疗费用,且严重影响患者的自主活动能力和生活质量,甚至导致患者死亡<sup>[2]</sup>。临床上乳腺癌骨转移多采用放疗、化疗、内分泌治疗、靶向治疗、手术治疗及骨调节药物治疗(如双膦酸盐和地诺单抗)等<sup>[2-3]</sup>,这些方法在阻止进一步骨损伤上具有一定疗效,但是并不能修复已经存在的骨质损伤,且又带来了相应的不良反应,临床上依然缺乏安全、有效的乳腺癌骨转移防治方案<sup>[3-4]</sup>;因此,寻找高效低毒的防治乳腺癌骨转移的治疗方法,对于改善患者生存质量和延长生命具有现实意义。

近年来中医药防治乳腺癌骨转移的研究取得了一定的进展,在减轻患者骨痛、提高生存质量、延长生存时间方面具有一定优势<sup>[5-7]</sup>。本课题组临床研究发现,脾肾阳虚为乳腺癌骨转移的重要病机,具有温肾健脾功效的白术附子汤(《金匮要略》)治疗乳腺癌骨转移疗效可靠<sup>[6]</sup>,基础实验也证实,白术附子汤及其核心药物附子-白术药对对乳腺癌骨转移裸鼠骨损伤具有一定的保护作用<sup>[8-9]</sup>。转化生长因

子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )是调节人体骨代谢结构重建的系列过程中关键的信号因子,可通过调控 TGF- $\beta_1$ /Smads/胶质瘤相关癌基因同源蛋白 2/甲状旁腺激素相关蛋白(TGF- $\beta_1$ /Smads/Gli2/PTHrP)T 信号通路,影响乳腺癌骨转移的发生与发展<sup>[10-11]</sup>;本文旨在从调控 TGF- $\beta_1$ /Smads/Gli2/PTHrP 信号通路方面探讨附子-白术药对保护乳腺癌骨损伤机制。

## 1 材料

**1.1 实验动物及细胞株** 32 只雌性 SPF 级 BALB/c-nude 裸鼠,合格证号 SCXK(沪)2013-0016,6 ~ 7 周龄,体重 20 ~ 22 g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,饲养于 SPF 级动物实验室;经过郑州大学生命科学伦理审查委员会审查通过,编号 1403067。乳腺癌骨高转移细胞 MDA-MB-231BO 由美国德克萨斯州立大学医学系 Toshiyuki Yoneda 博士惠赠。

**1.2 药品与试剂** 附子配方颗粒、白术配方颗粒(江阴天江药业有限公司,批号分别为 140321, 140615),唑来膦酸(江苏正大天晴药业股份有限公司,批号 1309125);PTHrP 抗体(美国 Epitomic 公司,批号 T2287),TGF- $\beta_1$  抗体,Smad3 抗体,Smad4 抗体和 Gli2 抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 Ab64715, Ab28379, Ab33875, Ab26056); $\beta$ -肌动蛋白

( $\beta$ -actin, 英国 Abcam 公司, 批号 Ab54724); DMEM 培养基, 胎牛血清(美国 Invitrogn 公司, 批号分别为 13985-092, 1414426); RIPA 裂解液(北京索莱宝科技有限公司, 批号 20131209); 抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 染色试剂盒(美国 Sigma 公司, 批号 SLBP6455V)。

**1.3 仪器** Thermo Forma 3111 型生物安全柜及 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo 公司), TS100 型倒置显微镜(日本 Nikon 公司), FR-988 型医学图像分析系统(上海复日科技有限公司); Explore Locus SP 型小动物标本 micro-CT 及 Microview 分析系统(美国 GE 公司); POWER PAC1000 型电泳仪, Gel Doc XR + 型凝胶成像系统, Trans blot Turbo 170-4150 全能型蛋白转膜仪(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 药物配制** 附子-白术药对采用附子配方颗粒(每包 0.5 g, 相当于制附子 3 g), 白术配方颗粒(每包 3 g, 相当于白术 10 g), 按照生药量 3:2, 加入生理盐水, 配制药液生药含量 15 g/(100 mL), 放入 4 °C 保存(参考《金匱要略》白术附子汤每付含白术 6 g, 制附子 9 g; 小鼠每次灌胃 0.4 mL, 根据小鼠与人体间的等效剂量换算法计算); 灌胃当天配制。

**2.2 乳腺癌骨转移裸鼠模型制备** 按照前期实验裸鼠左心室注射 MDA-MB-231BO 细胞法(细胞悬液密度为  $1.0 \times 10^7$  个/mL, 注射 0.1 mL) 制备乳腺癌骨转移裸鼠模型; 所有动物均于肿瘤细胞接种 14 d 后做放射性核素骨显像, 以判定模型是否成功; 模型建立成功标准, 由 3 位或 3 位以上核医学科医生读片, 以骨骼出现多发、散在、无规则分布的放射性浓聚或增高病灶者, 确定为乳腺癌转移灶<sup>[12]</sup>。

**2.3 分组与给药** 采用 Excell 随机数发生器随机选取 24 只造模成功裸鼠, 分为模型组、唑来膦酸组、药对组, 每组 8 只; 另取 8 只裸鼠为正常组。药对组于造模后第 14 天开始灌胃 (*ig*) 给以附子-白术药对药液  $3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , *ig* 后皮下注射生理盐水 0.2 mL; 模型组、唑来膦酸组及正常组均于相同时间点 *ig* 给予生理盐水 0.4 mL/只, 模型组 *ig* 后皮下注射生理盐水 0.2 mL, 唑来膦酸组于 *ig* 后立即皮下注射唑来膦酸  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ; 以上给药均每周 3 次, 持续 6 周<sup>[2-3]</sup>。

**2.4 骨转移程度判断** 骨转移程度从 3 方面进行综合判断, 经病理证实的裸鼠骨转移率; 经病理证实的裸鼠的转移部位数量; 骨转移灶病理片上肿瘤细胞数/细胞总数。具体方法按照前期文献报道的方

法进行<sup>[8-9, 12-13]</sup>。

**2.5 Micro-CT 检测** 各组小鼠经戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后, 取出每只小鼠左胫骨, 固定在 Micro-CT 载物台上对胫骨近端进行扫描。以 360° 扫描角度, 10  $\mu\text{m}$  的扫描分辨率沿小鼠胫骨长轴方向扫描胫骨近端, 获取连续的平面 CT 图像。扫描完成后在主机上选出生长板下 1 mm 和胫骨近端 1.5 mm 的区域为 ROI, 进行骨小梁三维图像重建, 利用机载软件分析, 主要检测参数, BMD, BV, 选取 ROI 体积 TV, 计算相对骨体积或骨体积分数 BV/TV。

**2.6 TRAP 染色观察** 按照前期实验方法<sup>[8-9, 12]</sup> 进行。

**2.7 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测骨转移组织中 TGF- $\beta_1$ , Smad3, Smad4, Gli2, PTHrP 的表达** 截取小鼠骨组织转移灶, 加入组织裂解液, 匀浆, 蛋白定量; 取蛋白样品 (50  $\mu\text{g}$ /孔), 凝胶电泳, 转膜, 5% 脱脂奶粉封闭, 加入 TGF- $\beta_1$ , Smad3, Smad4, Gli2, PTHrP 一抗 (1:250),  $\beta$ -actin (1:300), 4 °C 静置 12 h; 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 3 次, 加入二抗, 25 °C 孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次; ECL 显色, X 射线胶片曝光。采用 Bio-Rad 公司 Quantity One 系统检测各条带灰度值。蛋白相对表达量以相应蛋白灰度值/ $\beta$ -actin 灰度值表示。

**2.8 统计学方法** 采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 药对对各组小鼠骨转移程度的影响** 3 组裸鼠骨转移率均为 100%; 模型组每只裸鼠均发现了骨转移灶, 可评价的骨转移灶总数为 35 个, 唑来膦酸组和药对组裸鼠骨转移灶个数分别为 16, 20 个。与模型组比较, 唑来膦酸组、药对组裸鼠肿瘤细胞数/细胞总数均降低 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 附子-白术药对对裸鼠骨转移程度的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

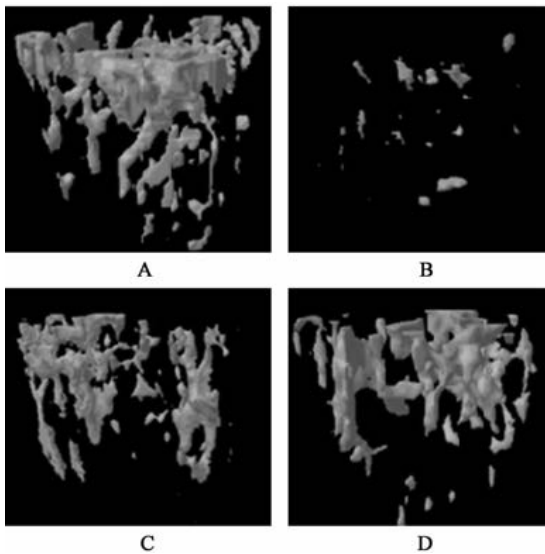
Table 1 Effect of Aconiti Lateralis Radix Praeparata-Atractylodis Macrocephalae Rhizoma on bone metastasis degree ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量	转移灶数/个	肿瘤细胞数-细胞总数/%
模型	-	35	45.61 $\pm$ 6.83
唑来膦酸	0.2 mg·kg <sup>-1</sup>	16	26.19 $\pm$ 4.67 <sup>1)</sup>
药对	3 g·kg <sup>-1</sup>	20	21.63 $\pm$ 4.21 <sup>1)</sup>

注: 与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.2 药对对各组小鼠左胫骨转移灶骨质破坏的影响** Micro-CT 扫描发现, 正常组小鼠骨质正常, 无骨质破坏的征象; 其余各组裸鼠均存在不同程度的骨溶解, 导致 BV/TV 偏低, BMD 下降; 与正常组比较,

模型组小鼠骨质破坏严重, BMD, BV/TV 显著下降 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 唑来膦酸组和药对组裸鼠骨质破坏有所减轻, BMD, BV/TV 显著升高 ( $P < 0.01$ )。见图 1, 表 2。



A. 正常组; B. 模型组; C. 唑来膦酸组; D. 药对组 (图 2 同)

图 1 各组裸鼠左胫骨转移灶三维 Micro-CT 扫描

Fig. 1 Three-dimensional Micro-CT scanning of left tibial metastasis in nude mice with bone metastasis of breast cancer

表 2 附子-白术药对对各组裸鼠 BMD, BV-TV 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 2 Effect of Aconiti Lateralis Radix Praeparata-Atractylodis Macrocephalae Rhizoma on BMD and BV/TV in nude mice bone metastasis ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量	BMD/mg·cm <sup>-3</sup>	BV-TV/%
正常	-	269.72 ± 15.75	13.88 ± 1.33
模型	-	54.34 ± 7.30 <sup>1)</sup>	2.01 ± 1.45 <sup>1)</sup>
唑来膦酸	0.2 mg·kg <sup>-1</sup>	192.66 ± 26.24 <sup>2)</sup>	8.78 ± 2.94 <sup>2)</sup>
药对	3 g·kg <sup>-1</sup>	157.50 ± 14.75 <sup>2)</sup>	9.96 ± 3.11 <sup>2)</sup>

注: 与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (表 3 同)。

### 3.3 药对对各组骨转移灶中 TRAP(+) 细胞的影响

表 4 附子-白术药对对各组裸鼠 TGF-β<sub>1</sub>, Smad3, Smad4, Gli2 和 PHTrP 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 4 Effect of Aconiti Lateralis Radix Praeparata-Atractylodis Macrocephalae Rhizoma on TGF-β<sub>1</sub>, Smad3, Smad4, Gli2 and PHTrP in nude mice with bone metastasis of breast cancer ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量	TGF-β <sub>1</sub> /β-actin	Smad3/β-actin	Smad4/β-actin	Gli2/β-actin	PHTrP/β-actin
正常	-	0.29 ± 0.08	0.27 ± 0.03	0.58 ± 0.06	0.08 ± 0.05	0.12 ± 0.05
模型	-	0.86 ± 0.23 <sup>1)</sup>	0.93 ± 0.14 <sup>1)</sup>	0.16 ± 0.04 <sup>1)</sup>	0.62 ± 0.09 <sup>1)</sup>	0.73 ± 0.10 <sup>1)</sup>
唑来膦酸	0.2 mg·kg <sup>-1</sup>	0.56 ± 0.15 <sup>2)</sup>	0.46 ± 0.09 <sup>3)</sup>	0.37 ± 0.07 <sup>3)</sup>	0.19 ± 0.05 <sup>3)</sup>	0.35 ± 0.06 <sup>3)</sup>
药对	3 g·kg <sup>-1</sup>	0.38 ± 0.10 <sup>3)</sup>	0.37 ± 0.08 <sup>3)</sup>	0.27 ± 0.06 <sup>2)</sup>	0.22 ± 0.07 <sup>3)</sup>	0.37 ± 0.07 <sup>3)</sup>

注: 与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.01$ 。

## 4 讨论

乳腺癌骨转移属中医“骨蚀”、“骨痹”等范畴, 历代中医典籍认为骨转移癌的发生与脾肾关系密切。《素问·五脏生成篇》曰:“肾之合骨也, 其荣在发, 其主脾也”, 从生理方面说明脾肾对骨的充养

具有重要作用;《景岳全书》进一步指出“脾肾不足及虚弱失调之人, 多有积聚之病”。脾与肾相互资助, 相互影响, 互为因果, 肾阳不足, 不能温煦脾阳, 致脾阳不振; 脾阳虚弱, 可损及肾阳, 引起肾阳亦虚, 二者最终均可导致脾肾阳虚, 即脾与肾在病理上

表 3 附子-白术药对对各组小鼠骨转移灶中 TRAP(+) 细胞数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 3 Effect of Aconiti Lateralis Radix Praeparata-Atractylodis Macrocephalae Rhizoma on number of TRAP(+) cells in nude mice bone metastasis ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量	TRAP(+) 细胞数/个
正常	-	4.87 ± 2.48
模型	-	46.19 ± 10.73 <sup>1)</sup>
唑来膦酸	0.2 mg·kg <sup>-1</sup>	10.58 ± 3.61 <sup>2)</sup>
药对	3 g·kg <sup>-1</sup>	12.06 ± 3.09 <sup>2)</sup>

### 3.4 药对对各组裸鼠骨转移灶中 TGF-β<sub>1</sub>, Smad3, Smad4, Gli2 和 PHTrP 蛋白表达的影响

与正常组比较, 模型组 TGF-β<sub>1</sub>, Smad3, Gli2 和 PHTrP 的表达均增加, Smad4 表达降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 唑来膦酸组和药对组 TGF-β<sub>1</sub>, Smad3, Gli2 和 PHTrP 的表达均降低, Smad4 表达均升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见图 2, 表 4。

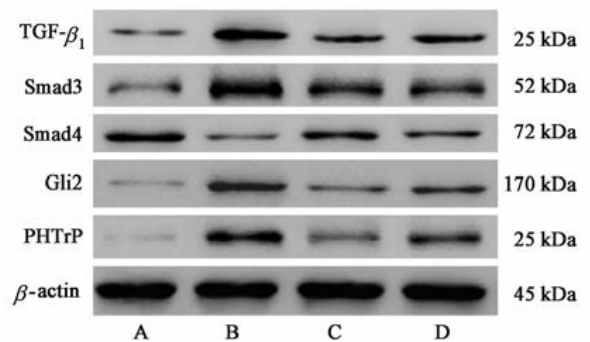


图 2 各组裸鼠 TGF-β<sub>1</sub>, Smad3, Smad4, Gli2 和 PHTrP 蛋白电泳

Fig. 2 Electrophoresis patterns of TGF-β<sub>1</sub>, SMAD3, SMAD4, Gli2 and PHTrP in nude mice with bone metastasis of breast cancer

具有重要作用;《景岳全书》进一步指出“脾肾不足及虚弱失调之人, 多有积聚之病”。脾与肾相互资助, 相互影响, 互为因果, 肾阳不足, 不能温煦脾阳, 致脾阳不振; 脾阳虚弱, 可损及肾阳, 引起肾阳亦虚, 二者最终均可导致脾肾阳虚, 即脾与肾在病理上

存在恶性循环关系,单独温肾或健脾均不能取得良好的临床疗效。因此,本课题组在前期研究基础上,提出“脾肾阳虚”是乳腺癌骨转移的主要病机,“温肾健脾”是其主要治法。乳腺癌骨转移属中医“阴证”、“寒证”,病位在骨,非用大辛大热的附子不足以取效;白术为“脾脏补气第一要药”,可助附子温肾暖脾、散寒除湿止痛。

本实验发现,附子-白术药对可减轻乳腺癌骨转移程度;micro-CT 扫描提示,小鼠骨转移发生后,发生不同程度的骨质流失,导致 BV/TV 偏低, BMD 下降,与文献报道一致<sup>[5]</sup>,附子-白术药对可使小鼠骨转移组织 BV/TV 及 BMD 升高,提示其对乳腺癌骨转移骨质流失具有一定的抑制作用。骨骼代谢依赖于由破骨细胞介导骨吸收和成骨细胞介导骨形成的动态平衡,破骨细胞活性的增加可使骨吸收增强,从而导致骨质流失。TRAP5b 是破骨细胞的特征性酶,可反映破骨细胞活性和骨吸收的状态;本实验中模型组骨转移灶中 TRAP(+) 细胞明显增多,提示骨转移发生后破骨细胞过度激活,与前期文献报道一致<sup>[8-9]</sup>,附子-白术药对组 TRAP(+) 细胞数量较模型组均明显减少,提示附子-白术药对对破骨细胞的激活具有一定的抑制作用。

TGF- $\beta_1$  能帮助癌细胞逃避宿主免疫系统的监控,易化侵袭和转移过程<sup>[14]</sup>,有利于乳腺癌转移进展到骨,可促进破骨细胞的分化同时抑制成骨细胞的增殖<sup>[15]</sup>。Smad 家族是 TGF- $\beta$  受体激酶的底物,其中 Smad3 为 R-Smad,是 TGF- $\beta$  受体激酶 1 的直接底物;Smad4 属 Co-Smad,能与活化的 R-Smad 形成异聚体,在信号转导中起瓶颈作用。TGF- $\beta_1$  与受体形成复合物并激活 Smad3,Smad3 再与 Smad4 结合,通过识别不同的 Smad 结合蛋白并形成复合体,从而调控 GLI2 的特异性表达,而 Gli2 可调控破骨细胞活性的主要介导因子 PTHrP 等的表达,进而引起溶骨性损伤<sup>[10-11]</sup>;骨转移溶骨性破坏时释放的大量 TGF- $\beta_1$  及乳腺癌细胞直接分泌的 TGF- $\beta_1$ ,又可通过调控 TGF- $\beta_1$ /Smad/GLI2/PTHrP 信号通路途径加重骨组织的破坏,从而导致乳腺癌骨转移恶性循环现象的发生<sup>[15]</sup>。抑制 TGF- $\beta_1$ /Smad/GLI2/PTHrP 信号转导,下调 PTHrP 等溶骨因子的表达,可截断骨损伤恶性循环,修复骨损伤<sup>[10-11]</sup>。本研究发现,附子-白术药对可上调 Smad4 蛋白表达,下调 TGF- $\beta_1$ , Smad3, Gli2 和 PTHrP 蛋白表达,从而调控 TGF- $\beta_1$ /Smad/GLI2/PTHrP 信号通路。

综上所述,上调 Smad4 蛋白表达,下调 TGF- $\beta_1$ ,

Smad3, Gli2 和 PTHrP 蛋白表达,调控 TGF- $\beta_1$ /Smad/GLI2/PTHrP 信号通路,从而减轻溶骨性损伤,可能是附子-白术药对防治乳腺癌骨转移的作用机制之一。

#### [参考文献]

- [1] 陈万青,郑荣寿,张思维,等. 2013 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤,2017,26(1):1-7.
- [2] 江泽飞,陈佳艺,牛晓辉,等. 乳腺癌骨转移及骨相关性疾病临床诊疗专家共识(2014 版)[J]. 中华医学杂志,2015,95(4):241-247.
- [3] 王如良,江泽飞. 乳腺癌骨转移治疗的若干热点问题思考和讨论:乳腺癌骨转移和骨相关性疾病临床诊疗专家共识(2014 版)解读[J]. 肿瘤研究与临床,2015,10(27):707-710.
- [4] Sterling J A, Edwards J R, Martin T J, et al. Advances in the biology of bone metastasis: how the skeleton affects tumor behavior[J]. Bone,2011,48(1):80-87.
- [5] 冯宇,杨青青,王海明,等. 补肾壮骨法治疗乳腺癌骨转移的临床研究[J]. 中华中医药学刊,2012,30(6):1412-1414.
- [6] 程旭峰,张新峰,刘琦,等. 白术附子汤加味治疗乳腺癌骨转移临床[J]. 中医学报,2012,27(3):266-269.
- [7] 李奥博,万冬桂. 乳腺癌骨转移的中医治疗现状与展望[J]. 中日友好医院学报,2016,30(5):312-314.
- [8] 刘琦,程旭峰,张新峰,等. 附子白术汤通过调节 OPG/RANKL 保护乳腺癌骨转移裸鼠骨损伤的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(15):206-210.
- [9] 刘琦,程旭峰,张新峰,等. 白术附子汤对乳腺癌骨转移裸鼠生存时间及骨转移灶中破骨细胞的影响[J]. 中药新药与临床药理,2013,24(5):441-445.
- [10] Cannonier S A, Gonzales C B, Ely K, et al. Hedgehog and TGF- $\beta$  signaling converge on Gli2 to control bony invasion and bone destruction in oral squamous cell carcinoma[J]. Oncotarget,2016,7(46):76062-76075.
- [11] Page J M, Merkel A R, Ruppender N S, et al. Altering adsorbed proteins or cellular gene expression in bone-metastatic cancer cells affects PTHrP and Gli2 without altering cell growth [J]. Data Brief, 2015, 4(7):440-446.
- [12] 程旭峰,刘胜,杨顺芳,等. 放射性核素骨显像支持下建立乳腺癌骨转移裸鼠模型[J]. 中华实验外科杂志,2011,28(9):1588-1590.
- [13] 程旭峰,张新峰,刘琦,等. 蛇床子-补骨脂配伍引经药对乳腺癌骨转移裸鼠 CXCL12-CXCR4 轴的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(16):91-96.
- [14] Javelaud D, Alexaki V I, Dennler S, et al. TGF $\beta$ /Smad/GLI2 signaling axis in cancer progression and metastasis [J]. Cancer Res,2011,71(17):5607-5610.
- [15] Biswas S, Jeffrey S N, Alvarez J, et al. Anti-transforming growth factor  $\beta$  antibody treatment rescues bone loss and prevents breast cancer metastasis to bone [J]. PLoS One,2011,6(11):e27090.

[责任编辑 张丰丰]