

肺岩宁方调控 TGF- β 介导的骨转移相关 PTHrP/RANKL 信号通路抗肺癌侵袭转移

张程程¹, 季青², 杨越², 吴新楠², 钦敬茹¹, 谢瑜¹, 李琦², 王中奇^{1*}

(1. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032; 2. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200021)

[摘要] 目的:探讨肺岩宁方通过调控转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)介导的骨转移相关甲状旁腺激素相关蛋白(parathyroid hormone-related protein, PTHrP)/NF- κ B受体活化因子配体(receptor or activator of NF- κ B ligand, RANKL)信号通路抗肺癌细胞侵袭转移的作用机制。方法:体外培养 A549 肺癌细胞,用不同浓度肺岩宁方进行处理,未加肺岩宁方为空白组。分别采用 cell counting kit-8 (CCK-8)检测肺岩宁方对 A549 细胞增殖抑制作用,计算半数浓度抑制率(IC₅₀);采用转移小室(transwell)侵袭实验、划痕实验检测肺岩宁方对 A549 细胞体外侵袭及迁移的抑制作用;以及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 TGF- β , PTHrP, RANKL 蛋白表达。结果:肺岩宁方作用于 A549 肺癌细胞 48 h 后,与空白组相比,肺岩宁方(12.5, 25, 50 mg·L⁻¹)组穿膜细胞明显减少($P < 0.05$, $P < 0.01$);肺岩宁方(12.5, 25, 50 mg·L⁻¹)组的划痕距离较空白组明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);且肺岩宁方(25, 50 mg·L⁻¹)组作用于 A549 细胞后, TGF- β 蛋白表达明显下调($P < 0.05$),其对应下游靶基因 PTHrP 及 RANKL 蛋白也发生明显表达下调($P < 0.05$)。结论:肺岩宁方可抑制 A549 肺癌细胞的侵袭迁移能力,直接下调 TGF- β 基因及其下游靶基因 PTHrP, RANKL 蛋白表达,且具有浓度相关性。本研究证实了肺岩宁方通过调控 TGF- β 介导的骨转移相关 PTHrP/RANKL 信号通路,以达到抗肺癌侵袭转移的作用机制,这为肺癌临床靶向治疗提供了一定的实验依据,也显示了肺岩宁方作为抗肺癌侵袭转移药物广泛的应用前景。

[关键词] 肺岩宁方; 转化生长因子- β ; 甲状旁腺激素相关蛋白; 肺癌; 侵袭转移

[中图分类号] R22; R24; R273; R274; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)03-0132-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018030132

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20171103.1302.002.html>

[网络出版时间] 2017-11-3 13:02

Effect of Feiyaning Formula on Invasion and Metastasis of Lung Cancer *via* Inhibiting TGF- β Mediated Bone Metastasis Related PTHrP/RANKL Signaling Pathway

ZHANG Cheng-cheng¹, JI Qing², YANG Yue², WU Xin-nan²,

QIN Jing-ru¹, XIE Yu¹, LI Qi², WANG Zhong-qi^{1*}

(1. Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shanghai 200032, China;

2. Shuguang Hospital, Shanghai University of TCM, Shanghai 200021, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect mechanism of Feiyaning formula on invasion and metastasis of lung cancer cells *via* inhibiting transforming growth factor- β (TGF- β) mediated bone metastasis related parathyroid hormone-related protein (PTHrP) /receptor or activator of NF- κ B ligand (RANKL) signaling pathway. **Method:** A549 cells were cultured *in vitro* and treated with Feiyaning formula with various concentrations, with no Feiyaning formula as blank group. The anti-proliferation effects and the 50% inhibitory

[收稿日期] 20170609(009)

[基金项目] 上海市科委项目(16ZR1437700)

[第一作者] 张程程,在读硕士,住院医师,从事中医药防治肺癌骨转移的相关研究, Tel:18117022797, E-mail:18117022797@163.com

[通信作者] *王中奇,博士,主任医师,硕士生导师,从事肺癌的诊断与中医疗法的临床与实验研究, Tel:18917763093, E-mail:aledx@sina.com

concentration (IC_{50}) of Feiyanning formula was measured by cell counting kit-8 (CCK-8) method. The inhibiting effect against invasion and migration ability of A549 cells was detected by transwell assay and scratch test. Western blot was used to detect the protein expression of TGF- β , parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and receptor or activator of NF- κ B ligand (RANKL). **Result:** After Feiyanning formula effected on A549 lung cancer cells for 48 h, as compared with blank control group, the transmembrane cells in the low, medium and high dose Feiyanning formula (12.5, 25, 50 $mg \cdot L^{-1}$) groups were obviously reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the scratch distance in Feiyanning formula groups was also significantly shortened ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Furthermore, medium and high dose Feiyanning formula group significantly down-regulated the expression of TGF- β ($P < 0.05$) and its corresponding downstream target genes of PTHrP and RANKL ($P < 0.05$). **Conclusion:** Feiyanning formula can directly down-regulate the protein expression of TGF- β and its downstream target genes PTHrP and RANKL, and inhibit the invasion and migration ability of A549 lung cancer cells in a concentration-dependent manner. This study confirmed the mechanism of Feiyanning formula on inhibiting the invasion and migration of lung cancer by regulating TGF- β mediated bone metastasis related PTHrP/RANKL signaling pathway, providing a certain experimental basis for the clinical target therapy of lung cancer, suggesting that Feiyanning formula could be a potential candidate in the treatment of lung cancer cell bone metastasis.

[**Key words**] Feiyanning formula; transforming growth factor- β (TGF- β); parathyroid hormone-related protein (PTHrP); lung cancer; bone metastasis

肺癌是目前世界上发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一,占整个癌症死亡总数的 30%^[1],且发病率呈逐年上升趋势^[2]。骨转移是肺癌常见的转移部位之一,约 30%~40% 的进展期肺癌出现骨转移^[3],是目前临床治疗的难点之一。因此,防治肺癌转移越来越受到国内外研究的重视。研究表明,肺癌骨转移以溶骨性骨转移为主,溶骨性骨吸收过程中,骨基质释放大转化生长因子- β (TGF- β)^[4]。Lorch 等^[5]发现,TGF- β 信号传导途径一旦被阻滞,骨转移相关甲状旁腺激素相关蛋白(PTHrP)的产生将受到抑制,并降低 NF- κ B 受体活化因子配体(RANKL)的表达。因此本课题组推断,PTHrP/RANKL 途径是肺癌侵袭转移过程中介导溶骨性骨转移的重要环节,TGF- β 是这一过程的重要调节因素。

肺岩宁方已获得国家专利,专利号 201010022885.7,以补肾抗癌为原则,强调祛邪扶正和恢复阴阳平衡。前期研究显示该方药可抑制肿瘤侵袭和转移,提高患者的生存质量、延长生存期,具有抗肺癌侵袭转移的作用^[6-7]。基础研究证实肺岩宁方药可抑制肿瘤微环境血管新生、调节免疫,抑制肺肿瘤生长和转移^[8-10]。因此,进一步阐明其作用机制,有助于提高肺癌治疗疗效,也有助于发挥中医药在防治肺癌骨转移中的优势。本研究重点在探讨肺岩宁方如何通过调控 TGF- β 介导的骨转移相关 PTHrP/RANKL 信号通路,以达到抗肺癌侵袭转

移的作用机制,为肺癌临床靶向治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 药物 肺岩宁方组成为黄芪 30 g,白术 9 g,女贞子 15 g,七叶一枝花 15 g,蜂房 9 g,蟾酥 9 g,黄精 30 g,山茱萸 15 g,淫羊藿 30 g,灵芝 30 g,中药饮片购自于上海医药大学附属龙华医院中药房,由该院副主任药师奚燕鉴定为正品。醇提物由上海现代药物制剂工程研究中心提取,将复方加入 10 倍量的 90% 乙醇回流提取 1.5 h,以沸腾后开始计时,重复 2 次,过滤合并,旋转浓缩,真空干燥称重,醇得率为 19.8%。并将溶液用 0.22 μm 的滤器过滤,配制成质量浓度 10 $g \cdot L^{-1}$ 的肺岩宁方醇提物原液,实验前稀释成所需质量浓度。

1.2 细胞株 人非小细胞肺癌 A549 细胞株购自于中国科学院上海细胞生物研究所细胞库。细胞株用含 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养基,在 37 $^{\circ}C$ 5% CO_2 的环境下常规培养,取对数生长期的细胞进行细胞实验。

1.3 试剂 胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号 10099-141);胰酶(美国 Sigma 公司,批号 T4799);RPMI 1640 培养基(美国 Hyclone 公司,批号 10094961);TGF- β , RANKL 单克隆抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 Ab66043, Ab45039);PTHrP 单克隆抗体(美国 Thermo 公司,批号 PA5-40799);羊抗兔 HRP 标记二抗,羊抗鼠 HRP 标记二抗, β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国 Cell Signaling

Technology 公司,批号分别为 7074p2, 7076p2, 3700s); cell counting kit-8 (CCK-8) 试剂盒(日本同仁化学研究所,批号 KQ749); transwell 小室(美国 Corning 公司,批号 3422)。

1.4 仪器 150i 型 CO₂ 培养箱, MEGAFUGE 1.0R 型台式低速离心机(美国 Thermo 公司); DW-40L626 型低温冰箱, DW-86L626 型超低温冰箱(中国海尔集团公司); HFsafe-1200 型生物安全柜(新加坡 ESCO 公司); CP225D 型高精密度电子天秤(德国 Sartorius Stedim Biotech 公司); DMI3000B 型荧光倒置显微镜(德国 Leica 公司); VE-180 型 Western 湿转仪(上海天能科技有限公司); CYT3MF 型酶标仪, TC-20 型自动细胞计数仪, Mini-protein Tetra Cell 型垂直电泳槽, Gel Doc XR+ 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 CCK-8 法检测细胞增殖 取对数生长期的 A549 细胞按 1×10^4 个/孔接种于 96 孔细胞培养板中,待细胞贴壁后,空白组加入 RPMI 1640 培养液 100 μ L,其余加入肺岩宁方醇提物,使其终质量浓度分别为 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,每个质量浓度设 3 个复孔。培养 48 h 后更换含 10% CCK-8 的培养基,培养箱内继续培养 1.5 h 后,酶标仪 450 nm 波长下测定各孔吸光度 A ,计算各质量浓度肺岩宁方对 A549 细胞的抑制率,抑制率 = $(1 - A_{\text{药物组}} / A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

2.2 transwell 检测细胞侵袭 A549 细胞分空白组, 12.5, 25, 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 肺岩宁方组,空白组加入 RPMI 1640 培养液 100 μ L,其余加入肺岩宁方醇提物,作用于 A549 细胞 48 h,制备成 4.0×10^5 个/mL 细胞悬液,按 100 μ L/室加入 transwell 细胞培养小室的上室(含基质胶),同时,将含 15% 血清的 RPMI 1640 培养液 600 μ L,加入 transwell 细胞培养小室的下室,37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 培养箱培养。24 h 后将 transwell 细胞培养小室取出,滤膜用 4% 多聚甲醛固定 15 min,结晶紫染色,于 200 倍光学显微镜下计数迁移细胞数。

2.3 划痕实验检测细胞迁移 用 marker 笔在 6 孔板背后,用直尺比着,均匀的划横线,在 6 孔中加入每孔约 2×10^5 个细胞,待细胞长满后,用枪头比着直尺,尽量垂直于背后的横线划痕,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞 3 次,去除划下的细胞,加入无血清培养基,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 培养箱培养,按 0, 48 h 取样,拍照,并计算迁移距离。

2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测蛋白表达

细胞分组及培养同 2.2 项,取作用 48 h 的 A549 细胞,PBS 清洗 3 次,加入细胞裂解液,于冰浴中裂解蛋白,4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清,分装备用。BCA 法测定其浓度确定上样量。制胶,上样进行 SDS-PAGE 蛋白电泳,然后转膜至 PVDF 膜上,10% BSA 室温封闭 2 h,加入一抗(1:1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,加相应二抗(1:2 000)室温作用 2 h,显影曝光,扫描观察统计,条带灰度值采用 quantity one 图像分析软件分析,以目的蛋白灰度值与 β -actin 灰度值比值来表示目的蛋白相对表达量。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用完全随机设计的单因素方差分析,组间两两比较用 LSD 进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 肺岩宁方对 A549 细胞增殖的影响 与空白组比较,肺岩宁方醇提物(3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 分别作用肺癌 A549 细胞 48 h 后,呈现明显的增殖抑制作用($P < 0.05$),并且呈浓度依赖性,见图 1。肺岩宁方醇提物对 A549 细胞作用 48 h 的半数抑制浓度(IC₅₀)为 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,以此为依据,在后续的实验分别选择 50, 25, 12.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 肺岩宁方进行研究。

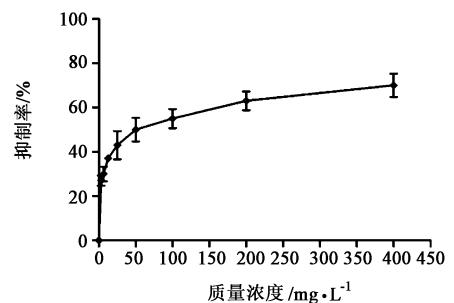


图 1 肺岩宁方对 A549 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.1 Effect of Feiyaning formula on proliferation of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.2 肺岩宁方对 A549 侵袭能力的影响 与空白组比较, A549 细胞经肺岩宁方(12.5, 25, 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 干预 48 h 后,穿膜细胞明显减少($P < 0.05$, $P < 0.01$)。其中,与肺岩宁方 12.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组相比,肺岩宁方 25, 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组抑制 A549 细胞侵袭的能力显著增高($P < 0.01$)。见图 2。

3.3 肺岩宁方对 A549 迁移能力的影响 与空白组比较, A549 细胞经肺岩宁方(12.5, 25, 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 干预 48 h 后,划痕距离改变明显降低($P <$

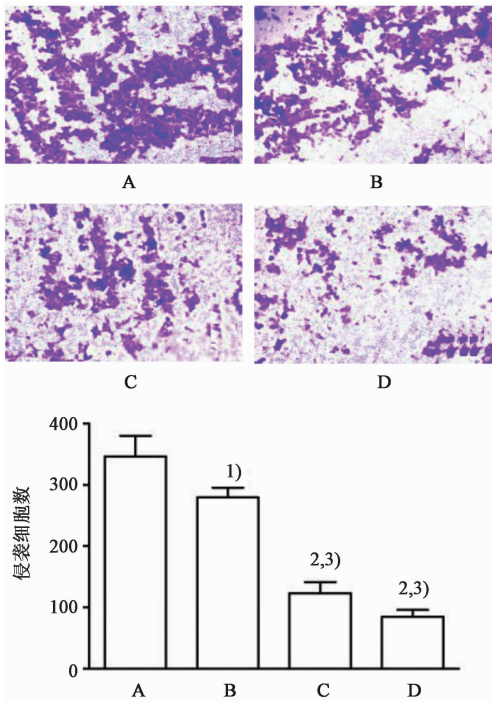


图 2 肺岩宁方对 A549 侵袭能力的影响(结晶紫染色, $\times 200$)
Fig. 2 Effect of Feiyanning formula on invasion of A549 cells (crystal violet stained, $\times 200$)

A. 空白组; B~D. 肺岩宁方(12.5, 25, 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)组(图 3, 4 同); 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与肺岩宁方 12.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较³⁾ $P < 0.01$

0.05, $P < 0.01$), 说明肺岩宁方抑制了 A549 细胞迁移。其中, 与肺岩宁方 12.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比, 肺岩宁方 25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组划痕距离显著增加($P < 0.01$)。见图 3, 表 1。

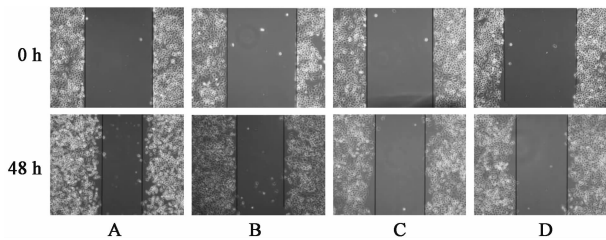


图 3 肺岩宁方对 A549 划痕距离的影响(倒置显微镜, $\times 200$)
Fig. 3 Effect of Feiyanning formula on scratching distance of A549 cells (inverted microscope, $\times 200$)

3.4 肺岩宁方对 TGF- β 及其下游靶基因 PTHrP, RANKL 蛋白的影响 与空白组相比, 肺岩宁方(25, 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 组作用于 A549 细胞后, TGF- β 蛋白表达明显下调($P < 0.05$), 其对应的下游靶基因 PTHrP 及 RANKL 蛋白也发生明显的表达下调($P < 0.05$), 肺岩宁方(12.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 组对 A549 细胞的 TGF- β 及 PTHrP, RANKL 蛋白表达无明显下调作用。见图

表 1 肺岩宁方对 A549 划痕距离的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of Feiyanning formula on scratching distance of A549 cells($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	划痕距离/cm	
		0 h	48 h
空白	-	7.03 \pm 0.95	4.30 \pm 0.59
肺岩宁方	12.5	7.12 \pm 0.20	4.84 \pm 0.50 ¹⁾
	25	7.21 \pm 0.18	6.13 \pm 0.42 ^{2,3)}
	50	7.08 \pm 0.64	6.26 \pm 0.23 ²⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与肺岩宁方 12.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

4, 表 2。提示肺岩宁方(25, 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 能够抑制 TGF- β 及其下游靶基因 PTHrP, RANKL 蛋白的表达。

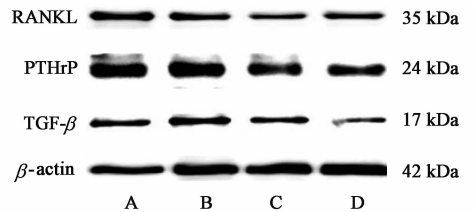


图 4 A549 细胞 TGF- β 及其下游靶基因 PTHrP, RANKL 蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of protein expression of TGF- β and its downstream target genes PTHrP and RANKL A549 cells

表 2 肺岩宁方对 A549 细胞 TGF- β 及 PTHrP, RANKL 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effect of Feiyanning formula on TGF- β and PTHrP, RANKL protein expression of A549 cells($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	质量浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	TGF- β / β -actin	PTHrP / β -actin	RANKL / β -actin
空白	-	0.73 \pm 0.31	1.93 \pm 0.53	0.84 \pm 0.27
肺岩宁方	12.5	0.78 \pm 0.32	1.86 \pm 0.29	0.71 \pm 0.35
	25	0.52 \pm 0.24 ¹⁾	1.22 \pm 0.19 ¹⁾	0.43 \pm 0.21 ¹⁾
	50	0.35 \pm 0.11 ¹⁾	1.05 \pm 0.14 ¹⁾	0.48 \pm 0.16 ¹⁾

4 讨论

肺癌是目前最常见的恶性肿瘤, 骨转移是晚期肺癌常发生的事件之一, 肺癌一旦发生骨转移, 常导致诸如疼痛、高钙血症、病理性骨折、脊柱压迫等严重后果, 严重影响患者的生存质量^[11]。在肺癌骨转移过程中, 一方面 RANKL 过多可促进破骨细胞成熟, 增加骨质破坏, 而 PTHrP 通过与特异性受体结合, 促进 RANKL 的表达^[12], Muguruma 等^[13] 研究发现 PTHrP 阳性表达率越高, 肺癌发生骨转移就越容易; 另一方面骨基质释放大量 TGF- β , 刺激 PTHrP

的产生,促使大量破骨细胞成熟,形成恶性循环^[14]。因此,PTHrP/RANKL 信号通路是由 TGF- β 介导的肺癌骨转移相关信号通路,进一步探讨 PTHrP/RANKL 信号通路有助于为研制抗肺癌骨转移新药提供新的理论基础。

肺癌骨转移在中医典籍中归入“骨疽”、“骨痈”、“骨蚀”等范畴,中医药在治疗肿瘤骨转移方面有一定的作用。中医学认为肺癌骨转移的基本原因在于肾精亏虚、阴阳失衡,常发生于中老年人;且癌毒一经产生,久治不愈,癌毒弥漫,最终导致骨转移,因此治疗应补肾养精,解毒通络散结^[15]。肺岩宁方由强调祛邪扶正和恢复阴阳平衡。肺岩宁方由黄芪、女贞子、白术、七叶一枝花、蜂房、山茱萸、蟾酥、黄精、淫羊藿等药物组成,在临床治疗中取得了良好效果^[16]。实验研究也提示补肾抗癌法对 TGF- β , PTHrP 蛋白表达具有一定抑制作用^[17]。

本实验发现,肺岩宁方作用 A549 肺癌细胞 48 h 后,和空白组相比,抑制率增高,同时具有浓度依赖性;transwell 及划痕实验也发现,肺岩宁方对 A549 细胞有一定的抑制侵袭迁移作用。Ehata 等^[18]研究证实 TGF- β 既促进癌细胞增生,又导致癌细胞 PTHrP 表达量增加,而 TGF- β 抑制剂可以抑制 PTHrP 释放,减少骨转移概率。本研究也发现,肺岩宁方(25, 50 mg · L⁻¹)通过作用于 TGF- β , 抑制 PTHrP 蛋白的表达,并影响其下游基因 RANKL,能够抑制 A549 细胞的增殖和侵袭转移性能,且具有浓度相关性。

综上所述,肺岩宁方可能通过抑制 TGF- β 介导的骨转移相关 PTHrP/RANKL 信号通路,从而抑制肺癌侵袭转移的发生发展。

[参考文献]

[1] Dela Cruz C S, Tanoue L T, Matthay R A. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention [J]. Clin Chest Med, 2011, 32(4): 605-644.

[2] CHEN W Q, ZHENG R S, ZENG H M, et al. Annual report on status of cancer in China, 2011 [J]. Chin J Cancer Res, 2015, 27(1): 2-12.

[3] McErlean A, Ginsberg M S. Epidemiology of lung cancer [J]. Semin Roentgenol, 2011, 46(3): 173-177.

[4] Chiechi A, Waning D L, Staybrook K R, et al. Role of TGF- β in breast cancer bone metastases [J]. Adv Biosci Biotechnol, 2013, 4(10c): 15-30.

[5] Lorch G, Gilmore J L, Koltz P F, et al. Inhibition of epidermal growth factor receptor signalling reduces hypercalcaemia induced by human lung squamous-cell

carcinoma in athymic mice [J]. Br J Cancer, 2007, 97(2): 183-193.

[6] XU Z Y, JIN C J, ZHOU C C, et al. Treatment of advanced non-small-cell lung cancer with Chinese herbal medicine by stages combined with chemotherapy [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2011, 137(7): 1117-1222.

[7] 王中奇, 邓海滨, 张铭, 等. 中医药分阶段结合化疗治疗晚期肺腺癌临床研究 [J]. 上海中医药杂志, 2010, 44(3): 7-11.

[8] 王中奇, 徐振晔, 邓海滨, 等. 中医药分阶段结合化疗防治非小细胞肺癌术后复发转移的临床研究 [J]. 上海中医药杂志, 2011, 45(5): 36-39.

[9] 王中奇, 邓海滨, 吴继, 等. 肺岩宁方组对小鼠肿瘤血管生成与 MMP-2、MMP-9 关系研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(9): 1229-1233.

[10] 王中奇, 邓海滨, 张丽曼, 等. 肺岩宁方及其拆方对 Lewis 小鼠肿瘤肺转移与 VEGF/KDR 表达关系的研究 [J]. 上海中医药大学学报, 2011, 25(2): 61-65.

[11] Coleman R E. Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity [J]. Clinical Cancer Res, 2006, 12(20): 6243-6249.

[12] Miki T, Yano S, Hanibuchi M, et al. Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) is responsible for production of bone metastasis, but not visceral metastasis, by human small cell lung cancer SBC-5 cells in natural killer cell-depleted SCID mice [J]. Int J Cancer, 2004, 108(4): 511-515.

[13] Muguruma H, Yano S, Kakiuchi S, et al. Reveromycin A inhibits osteolytic bone metastasis of small-cell lung cancer cells, SBC-5, through an antiosteoclastic activity [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(24): 8822-8828.

[14] Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression [J]. Nat Med, 2011, 17(10): 1231-1234.

[15] 王中奇, 徐振晔. 肺癌从肾论治 [J]. 四川中医, 2011, 29(6): 28-30.

[16] 徐振晔, 金长娟, 沈德义, 等. 中医药分阶段结合化疗治疗晚期非小细胞肺癌的临床研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(10): 874-878.

[17] 张炜, 赵凌艳, 徐祖红, 等. 补肾散结方联合唑来膦酸治疗肺癌骨转移的临床疗效 [J]. 世界中西医结合杂志, 2015, 10(6): 791-794.

[18] Ehata S, Hanyu A, Fujime M, et al. Ki26894, a novel transforming growth factor- β type I receptor kinase inhibitor, inhibits *in vitro* invasion and *in vivo* bone metastasis of a human breast cancer cell line [J]. Cancer Sci, 2007, 98(1): 127-133.

[责任编辑 张丰丰]