

补肾活血汤对乳腺癌骨转移模型裸鼠 Bax/Bcl-2 及 cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响

朱蓉¹, 郭雪斌¹, 杨满英², 陈雪珍², 胡玉蝶², 杨争³, 袁博³, 胡金辉^{3*}

(1. 益阳市第一中医医院, 湖南 益阳 413000;

2. 湖南中医药大学, 长沙 410208; 3. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410021)

[摘要] 目的:观察补肾活血汤对乳腺癌骨转移模型裸鼠细胞凋亡及B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)相关X蛋白(Bax)/Bcl-2及切割型胱天蛋白酶-3(cleaved Caspase-3)蛋白表达的影响,探讨其抑制骨质破坏的作用机制。方法:将30只BALB/c雌性裸鼠随机分成空白组6只、造模组24只。将乳腺癌细胞株4T1经裸鼠右下肢胫骨注射构建乳腺癌骨转移模型,将成膜裸鼠随机分为模型组、补肾活血汤组、唑来膦酸组、联合用药组,每组6只。补肾活血汤组予以补肾活血汤中药灌胃 $36.67\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,每日1次,唑来膦酸组予以皮下注射 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,每周2次,联合用药组给予相同剂量补肾活血汤组灌胃联合唑来膦酸皮下注射,正常组和模型组予以等体积蒸馏水灌胃,连续14 d,次日脊柱脱臼法处死,观察裸鼠一般情况及体质量变化,截取每组裸鼠右下肢,称重,X射线扫描及苏木素-伊红(HE)染色观察裸鼠骨组织形态学变化、原位末端标记法(TUNEL)检测裸鼠骨组织凋亡情况,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测裸鼠骨组织中Bax/Bcl-2及cleaved Caspase-3蛋白表达情况。结果:与空白组比较,模型组第5~15天裸鼠体质量显著减轻($P<0.01$),右下肢组织质量显著增加($P<0.01$),与模型组比较,补肾活血汤组、唑来膦酸组、联合用药组第10~15天裸鼠体质量显著增加($P<0.01$),右下肢组织质量显著降低($P<0.01$)。HE染色显示与空白组比较,模型组、补肾活血汤组、唑来膦酸组、联合用药组裸鼠肿瘤细胞异型性明显,核染色深,骨转移明确。X射线扫描显示与空白组比较,模型组裸鼠右下肢出现明显溶骨性破坏,胫骨近段、膝关节完整结构基本丧失,与模型组比较,补肾活血汤组、唑来膦酸组、联合用药组右下肢溶骨性病变更明显减少,部分结构完整,对骨质破坏具有抑制作用。TUNEL染色显示与空白组比较,模型组骨转移瘤细胞凋亡率降低,与模型组比较,补肾活血汤组、唑来膦酸组、联合用药组裸鼠骨转移瘤中细胞凋亡率显著升高($P<0.01$)。Western blot显示,与空白组比较,模型组骨转移瘤中Bax、cleaved Caspase-3蛋白表达显著降低($P<0.01$),Bcl-2蛋白表达显著升高($P<0.01$),与模型组比较,补肾活血汤组、唑来膦酸组、联合用药组骨转移瘤Bax蛋白含量明显升高($P<0.01$),cleaved Caspase-3蛋白表达明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),Bcl-2蛋白表达明显下调($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:补肾活血汤对乳腺癌骨转移模型裸鼠具有抑制骨质破坏作用,其机制可能和上调Bax,下调Bcl-2,激活cleaved Caspase-3诱导细胞凋亡相关。

[关键词] 补肾活血汤; 乳腺癌骨转移; 凋亡; B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2); Bcl-2相关X蛋白(Bax); 切割型胱天蛋白酶-3(cleaved Caspase-3)

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2023)08-0133-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20222426

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20221024.1415.001.html>

[网络出版日期] 2022-10-25 10:04:32

Effect of Bushen Huoxuetang on Expression of Bax/Bcl-2 and Cleaved Caspase-3 in Nude Mice with Bone Metastasis of Breast Cancer

ZHU Rong¹, GUO Xuebin¹, YANG Manying², CHEN Xuezheng², HU Yudie², YANG Zheng³,
YUAN Bo³, HU Jinhui^{3*}

(1. Yiyang First Hospital of Tradition Chinese Medicine, Yiyang 413000, China;

[收稿日期] 2022-05-04

[基金项目] 湖南省教育厅基金项目(20A373);湖南中医药大学校级基金项目(2019XJJJ039);湖南省科技厅科普专项(2021ZK4108);湖南省中医药管理局重点基金项目(C2022020)

[第一作者] 朱蓉, 硕士, 医师, 从事乳腺疾病的中西医研究, E-mail: 767188324@qq.com

[通信作者] * 胡金辉, 硕士, 主任医师, 从事乳腺疾病的中西医研究, E-mail: hujinhui173@163.com

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

3. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410021, China)

[Abstract] Objective: To study the effect of Bushen Huoxuetang on the apoptosis and the expression of B-cell lymphoma (Bcl-2)-associated X protein (Bax)/ Bcl-2 and cleaved cysteine-containing aspartate proteolytic enzyme-3 (cleaved Caspase-3) in the nude mouse model of bone metastasis of breast cancer, and explore the mechanism of Bushen Huoxuetang in inhibiting bone destruction. **Method:** Thirty BALB/c female nude mice were randomly assigned into blank group ($n=6$) and model group ($n=24$). The suspension of 4T1 breast cancer cells was injected into the tibia of mouse right lower limb to establish model of bone metastasis of breast cancer. The successfully modeled nude mice were randomly assigned into model group, Bushen Huoxuetang group, zoledronic acid group, and combined drug group, with 6 mice in each group. Bushen Huoxuetang was administrated at a dose of $36.67 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, once a day, and zoledronic acid was administrated by subcutaneous injection at a dose of $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, twice a week. The combined drug group was administrated with the same doses of Bushen Huoxuetang group by gavage and zoledronic acid by subcutaneous injection. The mice in the blank group and the model group were administrated with the same volume of distilled water by gavage for 14 days. On the next day at the end of drug administration, the mice were sacrificed by cervical dislocation. The general situation and weight changes of the mice were examined. The right lower limb was collected, and X-ray scanning and hematoxylin-eosin (HE) staining methods were used for observation of pathological changes in the bone. The terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) was employed to detect the apoptosis of bone tissue in nude mice, and Western blot to determine the expression of Bax/Bcl-2 and cleaved Caspase-3 in the bone tissue. **Result:** Compared with the blank group, the modeling reduced the body weight ($P<0.01$) and increased the right lower limb weight of the nude mice ($P<0.01$). Compared with the model group, Bushen Huoxuetang, zoledronic acid, and their combination increased the body weight ($P<0.01$) and decreased the right lower limb weight ($P<0.01$). Compared with the blank group, the other groups showed obvious tumor cell atypia, deep nuclear staining, and clear bone metastasis, and the model group showed obvious osteolytic damage in right lower limb and loss of proximal tibia and knee joint. Compared with the model group, Bushen Huoxuetang, zoledronic acid, and their combination reduced the osteolytic lesions in the right lower limb and recovered part of the bone structure, demonstrating an inhibitory effect on bone destruction. The TUNEL assay showed that the model group had lower apoptosis rate of bone metastatic tumor cells than the blank group, Bushen Huoxuetang group, zoledronic acid group, and combined drug group ($P<0.01$). Compared with the blank group, the modeling down-regulated the expression of Bax and cleaved Caspase-3 ($P<0.01$) and up-regulated the expression of Bcl-2 ($P<0.01$). Compared with the model group, Bushen Huoxuetang, zoledronic acid, and their combination up-regulated the expression of Bax ($P<0.01$) and cleaved Caspase-3 ($P<0.05$, $P<0.01$) and down-regulated the expression of Bcl-2 ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** Bushen Huoxuetang may inhibit bone destruction in the nude mouse model of bone metastasis of breast cancer by up-regulating the expression of Bax, down-regulating the expression of Bcl-2, activating cleaved Caspase-3, and further inducing apoptosis.

[Keywords] Bushen Huoxuetang; bone metastasis of breast cancer; apoptosis; B-cell lymphoma (Bcl-2); Bcl-2-associated X protein (Bax); cleaved cysteine-containing aspartate proteolytic enzyme-3 (cleaved Caspase-3)

世界卫生组织(WHO)国际癌症研究机构(IARC)发布最新数据,乳腺癌成为全世界癌症发病率第1位癌症^[1],并预测未来50年全球癌症负担,其

中乳腺癌增幅最大,预计2070年乳腺癌发病率为2020年一倍^[2]。进展期乳腺癌约70%会发生骨转移,乳腺癌骨转移的综合治疗使生存率得到提升,

预后得到改善,乳腺癌辅助治疗过程中引起卵巢功能衰竭、雌激素水平降低,从而引起骨质流失^[3]。国医大师朱良春^[4]据多年临床经验认为肿瘤从原发灶流窜至骨,主要为肾虚为本,痰瘀为标;谭新华教授认为乳腺癌经综合治疗后,阳气虚损,致肾虚不能生髓养骨^[5]。晚期肿瘤患者出现进行性消瘦、疼痛、腰膝酸软、久病咳喘等临床表现,故在治疗恶性肿瘤等慢性久病中善用补肾类中药补肾养髓,有利于预防转移的发生。

补肾活血汤出自《伤科大成》,具有补肾壮骨、活血止痛之功效。当前主要用于骨质疏松、膝关节病等骨科疾病范畴,研究发现补肾活血汤具有增加骨量、提高骨密度、调节骨代谢标志物水平、增强免疫功能等多种生物学特性^[6]。基于肾虚血瘀理论,本课题组将补肾活血汤临床运用乳腺癌骨转移疗效显著^[7-9],在临床实验基础上,基础实验进一步验证补肾活血汤能够抑制肿瘤细胞增殖迁移、下调血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维生长因子(bFGF)蛋白表达、降低微血管密度(MVD)、抑制新生血管生成、阻断Notch信号配体1(Jagged1)/Notch信号受体(Notch)及转化生长因子- β (TGF- β)通路、促进成骨活动、增强骨保护素(OPG)/核转录因子(NF)- κ B受体激活因子(RANK)比例、抑制破骨细胞分化、促进骨质修复、抑制磷脂酸肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白质激酶B(Akt)信号通路活化,下调活化T细胞胞质核因子1(NFATc1)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、逆转上皮间质转化等多种分子机制^[10-13]。基于前期研究基础,细胞凋亡作为多种信号通路的下游调控因子,但有关补肾活血汤对乳腺癌骨转移与细胞凋亡之间分子机制尚未阐明。细胞凋亡过程具有肿瘤抑制作用,逃避凋亡可能是肿瘤发生和治疗抵抗的重要途径。其中B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)家族蛋白中促凋亡和抗凋亡之间的动态平衡是确定细胞是否发生凋亡的关键。本研究旨在探讨补肾活血汤对治疗乳腺癌骨转移是否调控Bcl-2相关X蛋白(Bax)/Bcl-2及切割型胱天蛋白酶-3(cleaved Caspase-3)蛋白表达,从而诱导细胞凋亡实现的,为补肾活血汤的临床应用提供证据,进一步提供合理科学依据,为乳腺癌骨转移的防治提供新方法,对继承和发展中医药具有深远意义。

1 材料

1.1 动物与细胞株 30只SPF级BALB/c雌性裸鼠(5~6周龄,15~20g),购于湖南斯莱克景达有限公司,动物合格证号SCXK(湘)2019-0004。饲养与湖

南中医药大学实验动物中心,饲养条件为恒温(25 \pm 2) $^{\circ}$ C,相对湿度50%。本实验经湖南中医药大学动物伦理委员会批准,实验动物伦理批号LL202141404。4T1乳腺癌细胞购于普诺赛公司,批号CL-10007,细胞传代约18代。

1.2 试剂 Bax、Bcl-2一抗(美国Abcam公司,批号分别为ab32503、ab196495);cleaved Caspase-3抗体、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体、二抗(美国Proteintech公司,批号分别为9664T、66009-1-Ig、SA00001-1);原位末端标记染色(TUNEL)试剂盒(上海翊圣生物公司,批号T9101190);苏木素-伊红(HE)染液(中国Abiowell公司,批号20210809);特级胎牛血清、0.25%胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液(PBS)(普诺塞公司,批号分别为164210-50、PB180226、PB180327);RPMI 1640培养基(美国Gibco公司,批号C11875500BT)。

1.3 仪器 YT-CJ-2NB型超净工作台(北京亚泰隆公司);DYY-6C型电泳仪、DYCZ-40D型转膜仪(北京六一公司);BA410T型荧光显微镜(美国Motic公司);DH-1601型恒温箱(上海三藤仪器公司);YD-315型切片机(浙江金华益迪试验器材);E7242X小型动物X光机(深圳威图数码科技有限公司)。

1.4 药物及制备方法 根据《医疗机构中药煎药室管理规范[2009]》、《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》相关规定,补肾活血汤由杜仲15g、独活15g、没药6g、红花6g、当归尾12g、熟地黄12g、山茱萸15g、补骨脂15g、枸杞子15g、菟丝子15g、肉苁蓉15g组成,生药量共141g,由湖南中医药大学第一附属医院药剂科定点采购,所用中药经该院刘绍贵主任药师鉴定。补肾活血汤浸膏的制备方法:将上述药材放入煎药壶中,加水浸泡30min,武火煮沸后转文火煎煮60min,药物过筛盛出,再次加入水重复上述操作(无须浸泡),2次药液混匀,将所得的中药液置于圆底烧瓶中,旋转蒸发仪浓缩至1g \cdot mL⁻¹停止,将浓缩药液倒入蒸发皿中,恒温水浴锅水浴蒸干,真空减压干燥箱中干燥,获得补肾活血汤生药质量浓度为1g \cdot mL⁻¹浸膏,铝箔袋封装后放入干燥剂保存。根据实验动物用药剂量换算,裸鼠每日给药剂量36.67g \cdot kg⁻¹,方便计算配置成含生药为1.8g \cdot mL⁻¹(蒸馏水溶解)药液,灌胃前加热。

唑来膦酸(择泰,瑞士诺华制药有限公司,批号H20150049,药品规格4mg,5mL);购于湖南中医药大学第一附属医院药剂科。裸鼠每日给药剂量

100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[14],制备方法具体:将唑来膦酸溶于0.9% NaCl溶液中,配置质量浓度为0.02 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,4 °C冰箱内保存备用。

2 方法

2.1 细胞培养 乳腺癌4T1细胞采用完全培养基(10% FBS+90% 1640培养基+青/链霉素 100 μL 配置),放置CO₂培养箱(37 °C、5% CO₂饱和湿度)。

2.2 分组及建模方法 将实验裸鼠适应性饲养3 d后,将30只裸鼠随机分为空白组、模型组、补肾活血汤组、唑来膦酸组、联合用药组,每组6只。

参照文献[15-16]方法,除空白组外,将4T1乳腺癌细胞经右下肢胫骨注射构建乳腺癌骨转移模型,麻醉,腹部朝上,消毒,借助27 G针头吸取4T1细胞混悬液(细胞密度为 1×10^6 个/mL),针头从裸鼠右下肢胫骨平台钻入胫骨髓腔,沿着胫骨方向,注射乳腺癌4T1单细胞混悬液(20 μL /只),缓慢注射、拔针,用无菌棉球稍压针孔,接种完成,放回饲养笼中,密切观察裸鼠生命体征。基于前期实验及参考文献[17-18]证明3 d可见右下肢胫骨区瘤体,X射线可见溶骨性破坏,以造模后胫骨区可见瘤体作为成模标准。

2.3 给药方法 造模后第4 d进行给药干预,补肾活血汤组给予灌胃20 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$;唑来膦酸组给予皮下注射5 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,2次/周;联合用药组给予相同剂量补肾活血汤组灌胃联合唑来膦酸皮下注射;对照组和模型组给予等剂量蒸馏水灌胃,连续给药14 d,末次给药后,全部裸鼠禁食不禁水过夜,次日(即治疗第15天)脱颈处死,无菌剥离肿瘤组织,称取组织质量、迅速包埋、冻存。

2.4 每组裸鼠体质量及右下肢质量测定 每日记录每组裸鼠体质量,并选取造模第1天、治疗第5、10、15天共4个时间点进行统计;处死后解剖裸鼠右下肢,拍照称重。比较每组裸鼠的体质量变化及右下肢质量情况。

2.5 X射线扫描及HE染色观察裸鼠骨组织结构形态变化 所有固定样本用X射线扫描(设定电压40 kV、电流32 mA、曝光6 mAs),分析每组裸鼠骨组织骨质破坏程度。

将右下肢进行4%多聚甲醛固定3 d。进行脱钙、乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片及烤片;将骨组织切片进行HE染色、封胶、显微镜观察组织形态结构变化。

2.6 TUNEL法检测裸鼠骨组织细胞凋亡情况 将石蜡切片浸入二甲苯脱蜡,依次梯度无水乙醇浸泡

水化,蒸馏水浸洗,每个样本滴加蛋白K工作液100 μL (37 °C,20 min)通透,PBS浸洗。根据TUNEL试剂盒操作步骤,每个样本滴加TUNEL检测液50 μL (37 °C恒温箱孵育,60 min,避光),PBS浸洗,DAPI核染(37 °C,10 min,避光),PBS浸洗,缓冲甘油封片,荧光显微镜下观察。凋亡细胞阳性为绿色,在 $\times 400$ 高倍镜下观察,每个样本随机计数3个不重叠视野,ImageJ进行细胞计数并进行公式计算,凋亡指数=凋亡细胞(阳性)/正常细胞数。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3凋亡蛋白表达水平 剪取冻存的各组裸鼠骨组织30 mg,加入RIPA裂解液混匀研磨,4 °C,12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min(离心半径6 cm)提取总蛋白。BCA法测定蛋白浓度,电泳、转膜至NC膜。含PBST稀释5%脱脂牛奶的封闭,分别加入Bax、cleaved Caspase-3(1:1 000),Bcl-2(1:500), β -actin(1:5 000),放入摇床,4 °C过夜。滴加二抗(1:5 000、1:6 000),孵育90 min。ECL显影。将各条带用quantity one专业灰度分析软件进行分析并 β -actin为内参校正。

2.8 统计学方法 用Microsoft Excel 2021软件建立数据库,GraphPad Prism6.0软件进行统计学分析并绘制统计图,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多样本比较,满足正态性和方差齐性,运用单因素分析最小显著性差异法(LSD),方差不齐,采用秩和检验方法, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 补肾活血汤对乳腺癌骨转移裸鼠一般情况及体质量的影响 与空白组比较,模型组、补肾活血汤组、唑来膦酸组、联合用药组裸鼠于造模第3天可见右下肢胫骨区瘤体。与空白组比较,模型组裸鼠造模后期,逐渐消瘦,右下肢肿瘤负荷明显,肿瘤生长速度快,反应能力减弱,皮温低,甚者个别裸鼠右下肢出现脱疽。与模型组比较,补肾活血汤组、唑来膦酸组、联合用药组裸鼠精神状态良好,肿瘤负荷较轻,肿瘤生长速度较模型组慢,反应相对活跃。

与空白组比较,在治疗第5、10、15天,模型组、补肾活血汤组、唑来膦酸组裸鼠体质量显著减轻($P<0.01$),联合用药组裸鼠体质量稍减轻,差异无统计学意义。与模型组比较,在治疗第10、15天,补肾活血汤组、唑来膦酸组裸鼠体质量显著增加($P<0.01$),在治疗第5、10、15天,联合用药组裸鼠体质量显著增加($P<0.01$)。见表1。

表1 补肾活血汤对乳腺癌骨转移裸鼠体质量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Effect of Bushen Huoxuetang on body weight of nude mice with bone metastasis of breast cancer ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	造模第1天	治疗第5天	治疗第10天	治疗第15天
空白组		18.64±0.31	19.36±0.52	20.01±0.50	20.84±0.47
模型组		18.60±0.29	17.79±0.41 ¹⁾	17.38±0.65 ¹⁾	16.90±0.81 ¹⁾
补肾活血汤组	36.67	18.70±0.55	18.26±0.66 ¹⁾	18.49±0.80 ^{1,2)}	19.48±1.24 ^{1,2)}
唑来膦酸组	0.000 1	18.46±0.58	18.20±0.36 ¹⁾	18.78±0.29 ^{1,2)}	19.19±0.28 ^{1,2)}
联合用药组	36.67+0.000 1	18.57±0.37	18.89±0.28 ²⁾	19.33±0.93 ²⁾	19.92±0.93 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.01(表2同)

3.2 补肾活血汤对乳腺癌骨转移裸鼠右下肢质量的影响 截取每组裸鼠右下肢,与空白组比较,模型组右下肢质量显著增加(P<0.01),补肾活血汤组、唑来膦酸组、联合用药组右下肢质量有不同程度增加,差异均无统计学意义,与模型组比较,补肾活血汤、唑来膦酸组、联合用药组裸鼠右下肢质量显著降低(P<0.01)。见表2和图1。

表2 补肾活血汤对乳腺癌骨转移裸鼠右下肢组织的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Bushen Huoxuetang on tissue weight of right lower limb in nude mice with bone metastasis of breast cancer ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	质量/g
空白组		1.07±0.13
模型组		4.18±0.15 ¹⁾
补肾活血汤组	36.67	2.98±0.12 ²⁾
唑来膦酸组	0.000 1	2.60±0.25 ²⁾
联合用药组	36.67+0.000 1	2.04±0.16 ²⁾

3.3 补肾活血汤对乳腺癌骨转移裸鼠骨组织形态学的影响 HE染色结果示,与空白组比较,模型组、补肾活血汤、唑来膦酸组、联合用药组裸鼠肿瘤细胞异型性明显,增生活跃,呈弥漫生长,成团聚

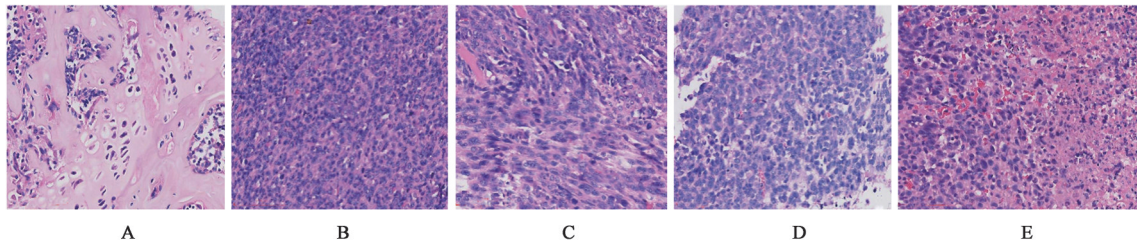
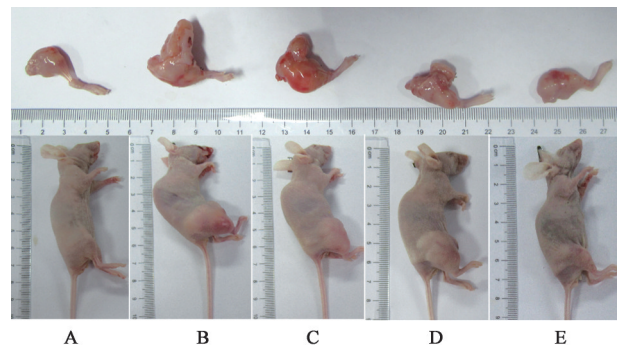


图2 补肾活血汤对乳腺癌骨转移裸鼠骨组织病理学变化的影响 (HE, ×200)

Fig. 2 Effect of Bushen Huoxuetang on bone histopathology of nude mice with bone metastasis from breast cancer (HE, ×200)

3.4 补肾活血汤对乳腺癌骨转移裸鼠细胞凋亡的影响 与空白组比较,模型组骨转移瘤中细胞凋亡率减少,差异无统计学意义,与模型组比较,补肾活



注:A.空白组;B.模型组;C.补肾活血汤组;D.唑来膦酸组;E.联合用药组(图2-图5同)

图1 补肾活血汤对乳腺癌骨转移裸鼠局部及整体的影响

Fig. 1 Effect of Bushen Huoxuetang on local and whole of bone metastasis of breast cancer in nude mice

集,排列紊乱,核染色深,具有骨转移征象。见图2。

X射线扫描,正常组裸鼠右下肢胫骨连续,未见肿瘤侵蚀的缺损性病变,边缘清晰,结构完整,与空白组比较,模型组裸鼠胫骨近端、膝关节附近出现了广泛、明显的溶骨性缺损,完整结构基本丧失,肿瘤组织已经突破骨膜侵犯骨外组织,与模型组比较,补肾活血汤组、唑来膦酸组、联合用药组裸鼠的溶骨性病变更明显减少,部分结构完整,边缘尚清晰,可见膝关节基本形态。见图3。

血汤、唑来膦酸组、联合用药组能够显著增加骨转移瘤细胞凋亡率,差异有统计学意义(P<0.01)。见表3和图4。

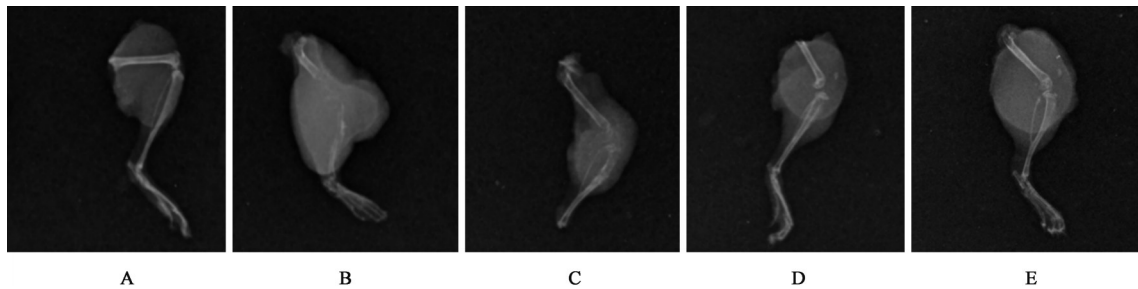


图3 补肾活血汤对乳腺癌骨转移裸鼠骨组织影像学变化的影响(X射线)

Fig. 3 Effect of Bushen Huoxuetang on imaging changes of bone tissue in nude mice with bone metastasis from breast cancer(X-ray)

表3 补肾活血汤对乳腺癌骨转移裸鼠细胞凋亡的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 3 Effect of Bushen Huoxuetang on apoptosis in nude mice with bone metastasis of breast cancer ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	凋亡率/%
空白组		12.36±2.17
模型组		6.30±0.15
补肾活血汤组	36.67	27.67±6.58 ¹⁾
唑来膦酸组	0.000 1	32.84±4.99 ¹⁾
联合用药组	36.67+0.000 1	45.60±1.15 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾P<0.01

3.5 补肾活血汤对乳腺癌骨转移裸鼠骨转移瘤中Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组裸鼠骨转移瘤中相关Bax、cleaved Caspase-3蛋白表达显著降低($P<0.01$), Bcl-2蛋白表达显著升高($P<0.01$),差异有统计学意义;与模型组比较,补肾活血汤组、唑来膦酸组、联合用药组裸鼠骨转移瘤中Bax蛋白表达显著升高($P<0.01$), cleaved Caspase-3蛋白表达明显升高($P<0.05, P<0.01$), Bcl-2蛋白表达明显降低($P<0.05, P<0.01$),差异有统计学意义。见表4和图5。

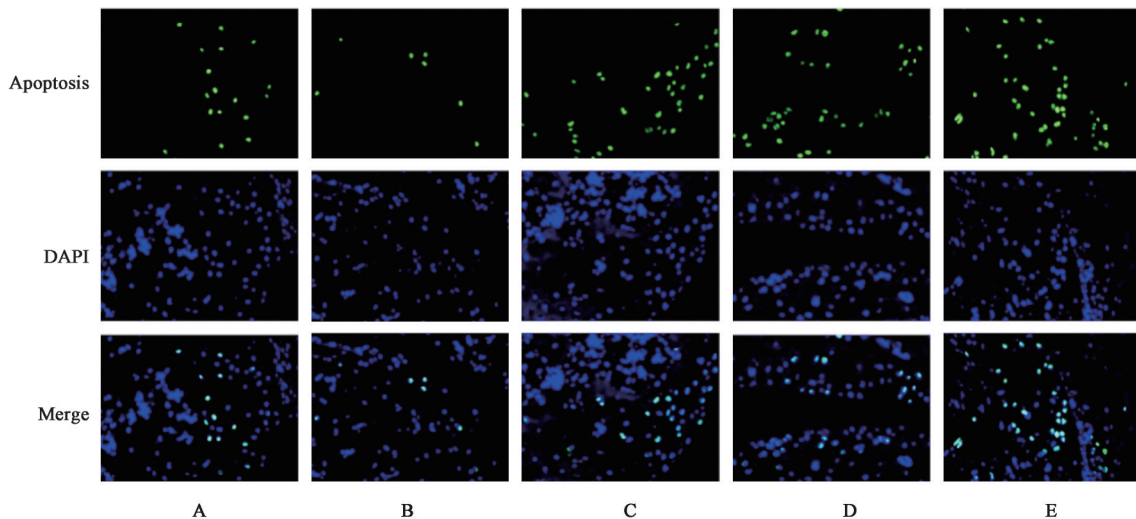


图4 补肾活血汤对乳腺癌骨转移裸鼠细胞凋亡的影响(TUNEL, ×400)

Fig. 4 Effect of Bushen Huoxuetang on apoptosis in nude mice with bone metastasis of breast cancer (TUNEL, ×400)

表4 补肾活血汤对乳腺癌骨转移裸鼠骨组织中Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Bushen Huoxuetang on Bax, Bcl-2 and cleaved Caspase-3 protein expression in bone tissue of nude mice with bone metastasis of breast cancer ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Bax/ β -actin	Bcl-2/ β -actin	cleaved Caspase-3/ β -actin
空白组		0.39±0.06	0.15±0.07	0.55±0.07
模型组		0.15±0.03 ¹⁾	0.45±0.03 ¹⁾	0.09±0.02 ¹⁾
补肾活血汤组	36.67	0.32±0.06 ³⁾	0.33±0.07 ²⁾	0.24±0.05 ²⁾
唑来膦酸组	0.000 1	0.30±0.05 ³⁾	0.25±0.06 ³⁾	0.47±0.09 ³⁾
联合用药组	36.67+0.000 1	0.46±0.03 ³⁾	0.14±0.03 ³⁾	0.75±0.04 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.05, ³⁾P<0.01

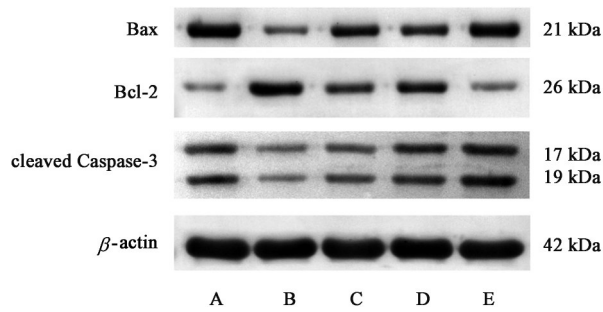


图5 乳腺癌骨转移裸鼠骨组织中Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of Bax, Bcl-2 and cleaved Caspase-3 protein expression in bone tissue of nude mice with bone metastasis of breast cancer

4 讨论

近年来有研究表明,我国乳腺癌发病率较1990年增长3倍,死亡率增长近1倍,其中25~29岁女性发病率增长幅度最高^[19],说明我国乳腺癌发病呈年轻化趋势,然而青年女性被诊断患有乳腺癌,具有复发转移风险高、进展快、侵袭强、恶性程度高、预后差等特点^[20]。尽管乳腺癌的综合治疗中生存率得到提升,预后改善,但转移的发生发展仍然是一种无法控制的状况,进展期乳腺癌约70%会发生骨转移,骨骼是乳腺癌侵袭最常见部位之一。乳腺癌骨转移的临床治疗包括抗肿瘤的 systemic 治疗^[21]和骨靶向药物^[22],主要是减缓骨吸收,降低骨相关事件的风险^[23],对晚期乳腺癌患者的生存影响仍然存在争议。中医药可通过单体、复方、提取物等多种方式参与治疗恶性肿瘤始终^[24],具有增效减毒,并固本培元以鼓邪外出,中医药以其多靶点、多机制的作用特点及辨证论治的个性化诊疗,对提升患者生存质量、改善预后具有重要意义。

乳腺癌骨转移属“骨瘤”“骨痹”范畴,癌毒日久,脏腑失调,伏留于内,久及伤肾,肾主骨养髓^[25],肾精亏虚,骨髓失养,此时正气乃虚,中医认为若人体精神内守,真气从之,病安从来,认为肿瘤发生转移可称为“传舍”,根据“传舍”理论即认为正气已虚,癌毒循经而入,致使痰瘀毒聚集于骨。国医大师朱良春^[4]多年临床经验认为肿瘤从原发灶流窜至骨,主要为肾虚为本,痰瘀为标。补肾活血汤源于《伤科大成》,由杜仲、熟地黄、补骨脂、独活四药为君,具有补肾强骨;没药、当归尾、红花为臣,助君以填补精血,活血祛瘀;肉苁蓉、菟丝子、山茱萸、枸杞子为佐药,以补肾益精,诸药联用,发挥补肾强筋,活血祛瘀之效。前期课题组研究发现补肾活血汤对乳腺癌骨转移疗效显著,并通过基础实验发现补

肾活血汤具有抑制癌细胞侵袭、增殖作用,抑制破骨细胞活化,抑制新生血管生成等方面具有一定优势,但补肾活血汤作为中药复方,成分复杂,其作用机制仍需进一步探究。

细胞异常增殖及凋亡被抑制是肿瘤特性之一。限制细胞数量扩张是细胞凋亡的关键生理机制,不仅可以维持组织间的动态平衡,也可以清除潜在的有害细胞,当接受抗凋亡保护允许突变细胞存活、癌前或恶性群体的生长,随后抵抗任何凋亡途径,进而发生浸润、转移、获得性耐药。逃避凋亡可能是肿瘤发生和治疗抵抗的重要途径。有研究发现乳腺癌骨转移是由癌细胞异常增殖及异常凋亡所引起的^[26],本次实验从细胞凋亡角度出发,探讨乳腺癌骨转移的机制及补肾活血汤干预研究。杜仲^[27]可抑制肿瘤细胞的生长,促进抑癌基因的表达,使细胞周期被阻断于G₂/M期,提高肿瘤细胞的放射敏感性。熟地黄^[28]药理作用主要集中在免疫调节、抗肿瘤、调钙途径等方面。红花^[29]作为活血汤代表药,抗肿瘤作用具有明显优势,其红花黄色素作为发挥药理作用的主要物质基础,其药理机制包括抑制肿瘤细胞增殖、诱导凋亡等多方面。有研究证实唑来膦酸可通过抑制破骨细胞活性,诱导破骨细胞凋亡,还可通过与骨结合来抑制破骨细胞对骨吸收作用^[30]。KAYA等^[31]证实卡培他滨联合通过诱导细胞凋亡来抑制4T1乳腺癌细胞侵袭。HOU等^[32]通过调控Bcl-2/Bax蛋白和激活Caspase-3信号通路诱导乳腺癌细胞凋亡。王坤等^[33]通过放疗剂量可以降低Bcl-2水平,提高Bax水平,从而抑制乳腺癌细胞增殖。刘斌^[34]临床研究中发现在乳腺癌有无骨转移中Caspase-3具有表达差异性,由此认为Caspase-3高表达可能是发生骨转移的风险因素。调控细胞凋亡已成为抗肿瘤药物研究热点。

通过本次实验结果得出,与空白组比较,模型组裸鼠体质量及一般情况整体呈下降趋势,局部肿瘤生长较快,右下肢出现明显的溶骨性破坏,关节基本形态丧失。经药物干预,补肾活血汤、唑来膦酸、联合用药组裸鼠一般情况相对稳定,裸鼠体质量整体呈缓慢上升趋势,局部肿瘤负荷减轻,可见基本关节形态,具有明显抑制骨质破坏作用。为进一步探究补肾活血汤是否通过调控Bax/Bcl-2和cleaved Caspase-3蛋白表达诱导细胞凋亡,从而抑制乳腺癌骨转移。

与空白组比较,模型组裸鼠骨转移瘤细胞凋亡率降低,差异无统计学意义,查阅相关性文献^[35-36],

考虑为正常状态下细胞增殖与凋亡之间的动态平衡关系及肿瘤生长表现为细胞异常增殖及凋亡被抑制^[26];与模型组比较,补肾活血汤、唑来膦酸、联合用药组细胞凋亡率明显增加,说明补肾活血汤可明显诱导骨转移瘤发生细胞凋亡作用。与空白组比较,模型组 Bax、cleaved Caspase-3 蛋白明显降低, Bcl-2 蛋白表达升高,这符合乳腺癌抑制细胞凋亡特性之一,这可能是乳腺癌骨转移模型裸鼠骨质破坏严重的重要原因之一。经药物治疗后,与模型组比较,补肾活血汤、唑来膦酸、联合用药组能够显著增加 Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达、抑制 Bcl-2 蛋白表达,提示补肾活血汤可能是通过 Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3 蛋白表达诱导细胞凋亡,从而抑制乳腺癌骨转移的发生。

综上,补肾活血汤抑制乳腺癌骨转移模型裸鼠具有抑制骨质破坏作用,其机制可能和上调 Bax、下调 Bcl-2、激活 cleaved Caspase-3 诱导细胞凋亡相关。本结果为课题组进一步探讨补肾活血汤治疗乳腺癌骨转移的机制提供了科学理论依据,也为中医药干预乳腺癌骨转移提供新方法、新思路。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

[2] SOERJOMATARAM I, BRAY F. Planning for tomorrow: Global cancer incidence and the role of prevention 2020-2070 [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2021, 18(10):663-672.

[3] 张宇,解新鹏,李峰,等. 唑来膦酸对乳腺癌治疗相关骨流失保护作用的研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(12):1853-1858.

[4] 毛昀,陈峥,褚雪镭,等. 国医大师朱良春治疗骨转移临证经验 [J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(9): 1101-1105.

[5] 范洪桥,周亮,刘丽芳,等. 谭新华治疗乳腺癌骨转移经验撷菁 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2020, 26(8): 1175-1176, 1182.

[6] 王磊,沙湖,王翠平,等. 补肾活血汤治疗膝骨关节炎合并骨质疏松症疗效及对骨代谢标志物水平的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(6):225-228.

[7] 方颖,胡金辉,杨争,等. 补肾活血汤联合唑来膦酸治疗乳腺癌骨转移的临床研究 [J]. 湖南中医药大学学

报, 2015, 35(9):55-57.

[8] 袁博,胡金辉,周亮,等. 补肾活血汤对乳腺癌患者芳香化酶抑制剂治疗后骨量减少的影响 [J]. 中医药导报, 2016, 22(21):42-44.

[9] 王贤彬,胡金辉,袁博,等. 补肾活血汤联合化疗对三阴性乳腺癌骨转移患者免疫功能及生活质量的影响 [J]. 中医药导报, 2018, 24(9):55-57.

[10] 王贤彬. 补肾活血汤对裸鼠乳腺癌骨转移模型和 Jagged_1/Notch 及 TGF- β 通路蛋白的干预研究 [D]. 长沙:湖南中医药大学, 2018.

[11] 刘德果. 补肾活血汤对裸鼠乳腺癌骨转移瘤及 VEGF、bFGF、MVD 影响的研究 [D]. 长沙:湖南中医药大学, 2017.

[12] 杨争,胡金辉,王希,等. 补肾活血汤对 SDF-1 α 诱导的人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖及迁移的影响 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(8):1868-1870.

[13] 孟树. 补肾活血汤对裸鼠乳腺癌骨转移模型及 OPG/RANK/RANKL 系统影响的研究 [D]. 长沙:湖南中医药大学, 2019.

[14] SHOJI R, TSUCHIE H, NAGASAWA H, et al. Development of new mouse breast cancer model of local bone metastasis and verification using bisphosphonates [J]. In Vivo, 2022, 36(2):667-671.

[15] RUCCI N, MILLIMAGGI D, MARI M, et al. Receptor activator of NF-kappaB ligand enhances breast cancer-induced osteolytic lesions through upregulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer/CD147 [J]. Cancer Res, 2010, 70(15):6150-6160.

[16] 乔涵. 白花丹素和唑来膦酸联合使用抑制乳腺癌骨转移的诊疗体系研究 [D]. 上海:上海交通大学, 2018.

[17] 毛昀. 补肾类中药调节乳腺癌骨转移生态位的作用机制研究 [D]. 北京:北京中医药大学, 2021.

[18] WANG W, GORDON J L, PHILBRICK K A, et al. Low calcium diet increases 4T1 mammary tumor carcinoma cell burden and bone pathology in mice [J]. PLoS One, 2017, 12(7):e0180886.

[19] 闵淑慧,胡依,郭芮绮,等. 1990—2019年中国女性乳腺癌疾病负担及变化趋势分析 [J]. 现代预防医学, 2021, 48(16):2941-2945, 2956.

[20] PALUCH-SHIMON S, PAGANI O, PARTRIDGE A H, et al. ESO-ESMO 3rd international consensus guidelines for breast cancer in young women (BCY3) [J]. Breast, 2017, 35:203-217.

[21] WESTPHAL T, GAMPENRIEDER S P, RINNERHALER G, et al. Cure in metastatic breast cancer [J]. Memo, 2018, 11(3):172-179.

[22] 郑亚男,李梅,赵基源. 乳腺癌骨转移分子机制及靶

- 向药物的研究进展[J]. 基础医学与临床, 2021, 41(3):433-437.
- [23] HIRANO F, OKUMA K F, ZENKE Y, et al. Disturbance of osteonal bone remodeling and high tensile stresses on the lateral cortex in atypical femoral fracture after long-term treatment with Risedronate and Alfacalcidol for osteoporosis[J]. Bone Rep, 2021, 14: 101091.
- [24] 裴晓华, 彭艳梅. 中医药治疗恶性肿瘤70年[J]. 中国肿瘤外科杂志, 2019, 11(5):305-308.
- [25] 毛昀, 李林澍, 褚雪镭, 等. 论乳腺癌骨转移中医病机治法[J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(10): 44-47.
- [26] MA Y V, LAM C, DALMIA S, et al. Mechanical regulation of breast cancer migration and apoptosis via direct and indirect osteocyte signaling [J]. J Cell Biochem, 2018, 119(7):5665-5675.
- [27] 刘铭, 王俊, 李丽, 等. 杜仲绿原酸通过PI3K/Akt/Nrf-2通路增强视网膜母细胞瘤细胞系HXO-Rb44放射敏感性[J]. 中国临床解剖学杂志, 2019, 37(6): 644-649, 655.
- [28] 严斐霞, 谢永艳, 陈畅, 等. 熟地黄炮制过程中的化学成分变化和药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(10):2493-2495.
- [29] 郑焯韵, 周凤华. 红花黄色素抗肿瘤机制新进展[J]. 中药药理与临床, 2022, doi: 10.13412/j.cnki.zyyl.20220608.001.
- [30] GOLDVASER H, AMIR E. Role of Bisphosphonates in breast cancer therapy[J]. Curr Treat Options Oncol, 2019, 20(4):26.
- [31] KAYA ÇAKIR H, EROGLU O. *In vitro* anti-proliferative effect of capecitabine(Xeloda) combined with mocetinostat (MGCD0103) in 4T1 breast cancer cell line by immunoblotting[J]. Iran J Basic Med Sci, 2021, 24(11):1515-1522.
- [32] HOU Q, LIN X, LU X, et al. Discovery of novel steroidal-chalcone hybrids with potent and selective activity against triple-negative breast cancer [J]. Bioorg Med Chem, 2020, 28(23):115763.
- [33] 王坤, 钱金权, 年建泽, 等. 放疗加量对T4期乳腺癌改良根治术后患者血清Ki-67、Bax及Bcl-2水平的影响[J]. 医学综述, 2021, 27(11):2279-2283, 2288.
- [34] 刘斌. Bcl-2、Caspase-3在乳腺癌骨转移患者组织中的表达及相关性研究初探[D]. 南充:川北医学院, 2017.
- [35] 肖龙, 朱杰, 朱丽科, 等. 基于STAT3通路探讨补肾活血方抑制骨细胞凋亡[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(1):204-208, 后插32-32后插36.
- [36] 刘永明, 张圆, 衣鑫, 等. 高负荷运动抑制鼠软骨细胞自噬并促进其凋亡[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2021, 37(5):427-434.

[责任编辑 张丰丰]