

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

刘琦¹, 程旭锋^{2*}, 张新峰³, 赵慧朵², 王伟²

(1. 河南中医学院科研处, 郑州 450008; 2. 河南中医学院第一附属医院乳腺外科, 郑州 450000;
3. 河南省肿瘤医院中西医结合科, 郑州 450008)

[摘要] **目的:**从调节护骨素(OPG)/细胞核因子 κ B受体活化因子配体(RANKL)系统探讨附子白术汤抑制乳腺癌骨转移骨损伤的机制。**方法:**采用左心室注射人乳腺癌骨转移细胞株(MDA-MB-231BO)细胞法建立乳腺癌骨转移裸鼠模型;随机分为模型组、唑来膦酸组、附子白术汤组、附子-白术药对组,另备正常裸鼠正常组($n=6$)。造模后第4天开始药物干预:唑来膦酸组sc唑来膦酸 $0.2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$;模型组、附子白术汤组、附子-白术药对组、正常组,分别ig给予生理盐水 $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、附子白术汤 $5.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、附子-白术药对煎液 $2.4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、生理盐水 $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$;每周3次,持续6周。观察各组裸鼠体重、骨转移灶病理和OPG,RANKLmRNA表达变化。**结果:**①与模型组比较,附子-白术药对组与附子白术汤组骨转移个数、骨转移率及体重下降率均明显下降($P<0.05$),骨转移灶中TRAP⁽⁺⁾细胞数量均减少($P<0.01$),OPG mRNA表达含量上调($P<0.01$),RANKL mRNA表达含量及二者比值降低($P<0.01$);②与附子白术汤组比较,附子-白术药对组骨转移个数、骨转移率、体重下降率、骨转移灶中TRAP细胞数量,OPG mRNA,RANKL mRNA表达含量及其比值均无统计学差异。**结论:**附子白术汤和附子-白术药对均可通过调节OPG/RANKL系统,减少破骨细胞的数量并抑制其活性,从而减轻乳腺癌骨转移裸鼠溶骨性损伤;附子-白术药对与附子白术汤功效相近,可能是附子白术汤的核心药物。

[关键词] 乳腺癌;骨转移;护骨素细胞核因子 κ B受体活化因子配体系统;附子白术汤

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0206-05

[doi] 10.11653/syfy2013150206

Protection Action of Fuzi Baizhu Decoction on the Bone Damage in Nude Mice with Bone Metastases of Breast Cancer by Regulating OPG/RANKL

LIU Qi¹, CHENG Xu-feng^{2*}, ZHANG Xin-feng³, ZHAO Hui-duo², WANG Wei²

(1. Department of Scientific Research, Henan University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Zhengzhou 450008, China; 2. Department of Breast Surgery, First Affiliated Hospital of Henan University of TCM, Zhengzhou 450000, China; 3. Department of Combining Traditional Chinese and Western Medicine of Henan Province Tumor Hospital, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of inhibiting the bone injury by Fuzi Baizhu decoction in bone metastases of breast cancer by regulating osteoprotegerin (OPG) /receptor activator of nuclear- κ B ligand (RANKL). **Method:** The model of breast cancer bone metastases was established by injecting the MDA-MB-231BO cells into left ventricle. 24 nude mice in model group were divided into model group, zoledronic acid group, Fuzi Baizhu decoction group and rhizoma atractylodis macrocephalae-radix aconiti carmichaeli group randomly, and another 6 normal unde mice were as normal group ($n=6$). Four days after the modeling, the drug intervention

[收稿日期] 20121230(001)

[基金项目] 河南省科技厅2011年科技攻关项目(112102310108);河南省科技厅2010年基础与前沿项目(102300410040);河南省教育厅科技攻关计划(2010B360005);郑州市金水区科技攻关项目(20093542)

[第一作者] 刘琦,硕士,讲师,从事中医药的分子生物学研究,E-mail:liuqi117@126.com

[通讯作者] *程旭锋,博士,副主任医师,副教授,从事中西医结合防治乳腺病的临床与基础研究,Tel:0371-66247453,E-mail:cx9939@163.com

was carried out respectively: zoledronic acid group was treated with, zoledronic acid, $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; model group, rhizoma atractylodis macrocephalae radix aconiti carmichaeli decoction group, rhizoma atractylodis macrocephalae-radix aconiti carmichaeli group and normal group; normal sodium (NS) $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, Fuzi Baizhu decoction $5.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, rhizoma atractylodis macrocephalae-radix aconiti carmichaeli $2.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ and NS $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ merely, po; 3 times every week, lasting 6 weeks. The weight, pathology of bone metastases focus were observed and OPG mRNA and RANKLmRNA expression was detected. **Result:** ① In the model group, the number and rate of bone metastases and weight loss of the pair of rhizoma atractylodis macrocephalae and radix aconiti carmichaeli group and Fuzi Baizhu decoction group declined obviously ($P < 0.05$), the number of TRAP⁽⁺⁾ reduced in the bone metastases ($P < 0.01$), the OPGmRNA relative expression content increased ($P < 0.01$), the RANKLmRNA relative expression content and ratio declined obviously ($P < 0.01$); ② In the group of the Fuzi Baizhu decoction, the number and the rate of bone metastases, the rate of weight loss, the number of TRAP⁽⁺⁾, the OPGmRNA and the RANKL mRNA relative expression content and ratio had no statistically significant differences between rhizoma atractylodis macrocephalae and radix aconiti carmichaeli group. **Conclusion:** Both decoction of rhizoma atractylodis macrocephalae and radix aconiti carmichaeli and the pair of Rhizoma Atractylodis Macrocephalae and radix aconiti carmichaeli could regulate OPG/RANKL, decrease osteoclast and restrain activity of them, reduce osteolytic damage accordingly.

[Key words] breast cancer; bone metastases; OPG/RANKL/RANK system; Fuzi Baizhu decoction

乳腺癌是全球女性最常见的恶性肿瘤,约 70% 的乳腺癌患者在自然病程中发生骨转移^[1]。超过 75% 的乳腺癌骨转移患者发生溶骨性损伤,导致骨质疏松、高血钙症、脊髓压迫和病理性骨折等骨不良事件^[2],严重降低患者生存质量;目前临床使用二膦酸盐虽可减少骨不良事件的发生,但并不能修复已受损的骨组织。传统中医在防治乳腺癌及骨转移、提高患者生活质量等方面经验丰富^[3];现代研究证实,一些中医方剂在防治乳腺癌骨转移方面疗效确切^[4-7]。我们在前期临床研究发现《金匱要略》白术附子汤可用于乳腺癌骨转移的防治^[8],而其作用机理尚不清楚。本研究采用动物实验观察附子白术汤对乳腺癌骨转移裸鼠模型的保护作用,并从 OPG/RANKL 信号途径探讨附子白术汤抑制乳腺癌骨转移骨损伤的机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级裸鼠 BALC/nu-nu 80 只,雌性,6~8 周龄,体重 18~22 g,由河南省实验动物中心提供,许可证号 SCXK(豫)2010-0011。裸鼠适应新环境 1 周后开始实验。

1.2 细胞株的培养 人乳腺癌骨转移细胞株(MDA-MB-231BO)由美国德克萨斯州立大学医学系内分泌所 Toshiyuki Yoneda 博士惠赠。培养基为高糖型 DMEM(葡萄糖 $4.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 10% 胎牛血清, $3.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$, 1% L-谷氨酰胺以及 $1 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素-链霉素双抗液),培养条件为 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5%

CO_2 ,湿度为 95%。

1.3 药物 附子白术汤煎液由炮附子 15 g,白术 9 g,炙甘草 5 g,生姜 7 g,大枣 9 枚(18 g)组成;附子-白术药对为炮附子 15 g,白术 9 g。以上中药煎液均由河南中医学院第一附属医院制剂室制备:① 分别将附子白术汤和附子-白术药对的药物加水 1 000 mL,浸泡 30 min,武火煎煮至药液沸腾(15 min),文火煎煮 60 min,滤出药液;② 分别向附子白术汤和附子-白术药对药渣中加水 1 000 mL,武火煎煮至药液沸腾(15 min),文火煎煮 30 min,滤出药液;③ 将 2 次滤出的药液混合,文火煎煮、浓缩,得到水煎液 200 mL,放置冷却至室温,移入加盖的试剂瓶,放入 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存;附子白术汤煎液相当于含 $280 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (1 mL 附子白术汤煎液相当于含炮附子 75 mg,白术 45 mg,炙甘草 25 mg,生姜 35 mg,大枣 90 mg);附子-白术药对煎液相当于含 $120 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (1 mL 附子-白术药对煎液相当于含炮附子 75 mg,白术 45 mg)。唑来膦酸注射液(江苏正大天晴药业股份有限公司,批号 0809122)。

1.4 仪器与试剂 Forma Series 11CO₂ 培养箱(美国, Thermo 公司),组织包埋机、组织切片机、冰冻恒温切片机(德国 Leica),MIQAS 医学图像定量分析系统(上海达为生物科技有限公司),BH2 生物显微镜(日本, Olympus 公司),SBE6003 电泳仪(上海申能博彩生物有限公司),FR-980 生物电泳图像分析系统(上海复日科技有限公司),Millipore 纯水系统

(美国, Millipore 公司), FTC-2000 型荧光定量基因扩增仪(上海枫岭生物技术有限公司)。TRIZOL 试剂(Invitrogen 公司); RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司), Taq 酶(华美生物工程公司), NBIP/CBP(Promega 公司), SYBR Green Supermix(Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 模型制备 采用左心室注射 MDA-MB-231BO 细胞法^[9]建立乳腺癌骨转移裸鼠模型(活细胞悬液密度为 0.8×10^7 个/mL)。

2.2 动物分组及给药 随机选取造模成功后的裸鼠 24 只, 采用 Excell“随机数发生器”^[10] 将其随机分为模型组、唑来膦酸组、附子白术汤组、附子-白术药对组, 每组 6 只; 另备正常裸鼠 6 只作为正常组。各组裸鼠于造模成功后第 4 天开始给予中药煎液灌胃干预。模型组、附子白术汤组、附子-白术药对组、正常组分别给予生理盐水 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、附子白术汤 $5.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、附子-白术药对煎液 $2.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ ig}$; 灌胃量为 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$; 每周 3 次, 持续 6 周。来膦酸组在造模后第 4 天开始皮下注射唑来膦酸, $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每周 3 次, 持续 6 周^[11]; 正常组 ig 给予生理盐水, $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每周 3 次, 持续 6 周。

2.3 放射性核素骨显像 肿瘤细胞种植 3 周后做放射性核素骨显像。每只小鼠尾静脉注射骨显像剂 Tc-99m MDP 111-148 MBq, 约 $0.1 \sim 0.15 \text{ mL}$, 显像剂注射 5 ~ 6 h 后, 分别在 SINMENS MULTI-SPECT 行平面显像和在 GZ-B 大视野伽马相机行改良型针孔(Micropinhole SPECT)显像。矩阵 256×256 , Zoom 为 2.67。采集计数为 300 ~ 500 K/帧; 显像裸鼠的采集体位可选择前后位、后前位、左侧位和右侧位, 发现放射性核素异常浓聚或缺损的骨组织后做好记录。

结果判断: 由 3 位或 3 位以上核医学科医生读片, 以骨骼出现多发、非对称的局部放射性浓聚和/或缺损为异常; 对有多发、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, 判断骨转移灶的部位和数量; 对虽有异常放射浓聚或增高病灶但数目较少者, 需经病理活检证实。

2.4 体重变化状况 造模 1 周后每天称重 1 次, 计算造模后第 28 天的裸鼠体重下降率。计算公式:

$$\text{体重下降率} = (\text{术前体重} - \text{术后第 28 天体重}) / \text{术前体重} \times 100\%$$

2.5 病理观察 取 4 组骨组织转移灶进行病理切片, HE 染色观察骨转移程度, TRACP 染色观察破骨细胞的形态和数量。TRAP 是破骨细胞的特征性

酶, 是破骨细胞活性的良好标志物, TRAP 染色下破骨细胞呈棕黄色, 即 TRAP⁺ 细胞^[12]; 每组切片在 20 倍镜下随机选取 8 个视野, 用 MIQAS 医学图像定量分析系统采集图像, 对视野中的 TRAP⁽⁺⁾ 细胞计数。

2.6 骨转移组织 OPG mRNA, RANKL mRNA 的相对含量及其比值检测 以 TRIZOL 法提取总 RNA, 按试剂盒说明进行 cDNA 合成和 PCR 扩增, 采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行检测; 根据不同引物的不同退火温度进行 PCR 反应, 引物合成由上海博彩公司设计, 引物设计及退火温度见表 1。条件如下: $95 \text{ }^\circ\text{C} \text{ 5 s}$, $60 \text{ }^\circ\text{C} \text{ 35 s}$, 扩增 40 个循环, 每组重复检测 8 次。Prism5.0 软件设计引物序列由上海博彩公司合成。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对正常组骨组织和各组乳腺癌骨转移裸鼠模型骨转移灶中的 OPG mRNA 和 RANKL mRNA 进行相对定量^[13]。

表 1 引物设计及退火温度

引物	引物序列	退火温度 / $^\circ\text{C}$
GAPDH	Sense: 5'-GGTCCGAGTCAACGGATTG-3'	58.4
	Anti-sense: 5'-ACATGACTTCCAAGCTGGCCGT-3'	
OPG	Sense: 5'-TTCTACTGCATGGA-3'	52.1
	Anti-sense: 5'-TTGGGAAAGTGGGATGT-3'	
RANKL	Sense: 5'-TCCCTCCTTTCATCAGGTTAT-3'	52.1
	Anti-sense: 5'-TCCCTCCTTTCATCAGGTTAT-3'	

2.7 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本的 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 各组裸鼠骨转移程度比较 模型组裸鼠骨转移灶个数为 12 个, 其他各组转移灶个数均有不同程度的减少, 其中附子-白术药对组与附子白术汤组转移灶个数均为 6 个; 模型组裸鼠骨转移率为 100%, 其他各组骨转移率有不同程度的减小, 其中附子-白术药对组与附子白术汤组转移率均为 50%。见表 2。

3.2 各组裸鼠体重下降率比较 与模型组比较, 附子-白术药对组、附子白术汤组裸鼠体重下降率均显著减小, 具有统计学意义 ($P < 0.05$); 唑来膦酸组、附子-白术药对组、附子白术汤组 3 组之间比较, 裸鼠体重下降率均无统计学意义。见表 2。

表 2 附子白术汤及附子-白术药对对裸鼠骨转移程度、体重变化的影响 (n = 6)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	转移灶数 /个	转移率 /%	体重下降率 /%
模型	-	12	100.0	16.60 ± 1.84
唑来膦酸	0.2	4	33.3	13.88 ± 1.48
附子-白术药对	2 400	6	50.0	11.85 ± 3.93 ¹⁾
附子白术汤	5 600	6	50.0	12.55 ± 2.81 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ P < 0.05。

3.3 各组骨转移灶 TRAP 染色病理检测 每组切片在 200 倍镜下随机选取 8 个视野,用 MIQAS 医学图像定量分析系统采集图像,并对视野中的 TRAP⁽⁺⁾ 细胞计数。TRAP⁽⁺⁾ 的破骨细胞计数;与正常组比较,模型组、唑来膦酸组、附子-白术药对组、附子白术汤组 TRAP⁽⁺⁾ 细胞数量均明显增多 (P < 0.05, P < 0.01);与模型组比较,唑来膦酸组、附子-白术药对组、附子白术汤组 TRAP⁽⁺⁾ 细胞数量均明显减少 (P < 0.01)。见表 3。

3.4 各组裸鼠 OPG mRNA, RANKL mRNA 相对表达含量及其比值 与正常组比较,模型组 OPG mRNA 相对表达量显著减少 (P < 0.01),模型组 RANKL mRNA 的相对表达量显著增加 (P < 0.01),模型组 OPG mRNA/RANKL mRNA 值显著降低 (P < 0.01)。见表 4。

与模型组比较,唑来膦酸组、附子-白术药对组、

表 5 附子白术汤及附子-白术药对对裸鼠 OPG mRNA, RANKL mRNA 相对表达含量及其比值的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	OPG mRNA	RANKL mRNA	OPG mRNA/RANKL mRNA
模型	-	100 ± 0	100 ± 0	1 ± 0
唑来膦酸	0.2	264.63 ± 26.24 ¹⁾	41.46 ± 3.91 ¹⁾	6.43 ± 0.87 ¹⁾
附子-白术药对	2 400	197.04 ± 25.19 ^{1,2)}	52.49 ± 2.93 ^{1,2)}	4.12 ± 0.59 ^{1,2)}
附子白术汤	5 600	206.65 ± 23.9 ^{1,2)}	49.19 ± 4.75 ^{1,2)}	4.38 ± 0.68 ^{1,2)}

注:与模型组比较¹⁾ P < 0.01;与唑来膦酸组比较²⁾ P < 0.01。

4 讨论

乳腺癌骨转移属中医“骨瘤”、“骨蚀”、“骨痹”等范畴。在中医骨伤学理论中,“肾主骨”的论述居于核心地位^[14],《医经精义》“肾藏精,精生髓,髓生骨,故骨者肾之所合也。”故乳腺癌骨转移的发生与中医的“肾”关系密切;肾虚久不复,火不生土,脾肾为互济之脏,必伤脾阳,故脾肾阳虚也是乳腺癌骨转移的重要病机。《素问·五脏生成篇》曰“肾之合骨也,其荣在发,其主脾也”,说明脾肾对骨的充养具有重要作用;《景岳全书》谓“脾肾不足及虚弱失调之人,多有积聚之病”。故脾肾阳虚当是骨转移癌发生的重要病机。前期研究发现《金匱要略》白术附子汤加味治疗乳腺癌骨转移具有可靠的疗效^[8],而

表 3 附子白术汤及附子-白术药对对裸鼠骨转移灶 TRAP⁽⁺⁾ 细胞数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TRAP ⁽⁺⁾ 细胞数/个/HP
正常	-	4.0 ± 3.2 ²⁾
模型	-	61.2 ± 16.6
唑来膦酸	0.2	13.7 ± 4.9 ^{1,3)}
附子-白术药对	2 400	18.9 ± 4.3 ^{2,3)}
附子白术汤	5 600	18.2 ± 4.0 ^{2,3)}

注:与模型组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01;与唑来膦酸组比较³⁾ P < 0.01(表 5 同)。

表 4 附子白术汤及附子-白术药对对裸鼠 OPG mRNA, RANKL mRNA 相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	OPG mRNA	RANKL mRNA	OPG mRNA/RANKL mRNA
正常	100	100	1
模型	27.85 ± 3.52 ¹⁾	395.88 ± 15.66 ¹⁾	0.07 ± 0.02 ¹⁾

注:与正常组比较¹⁾ P < 0.01。

附子白术汤组 OPG mRNA 相对表达含量显著上调 (P < 0.01),RANKL mRNA 相对表达含量及二者比值显著降低 (P < 0.01);与唑来膦酸组比较,附子-白术药对组、附子白术汤组 OPG mRNA 相对表达含量显著下调,RANKL mRNA 相对表达含量 (P < 0.01), OPG mRNA/RANKL mRNA 显著降低 (P < 0.01);附子-白术药对组与附子白术汤组比较,两组 OPG mRNA, RANKL mRNA 相对表达含量及其比值均无统计学差异。见表 5。

附子白术汤是否通过影响 OPG/RANKL 系统而干预乳腺癌骨转移尚未见报道。

正常的骨代谢依靠破骨细胞介导的骨吸收和成骨细胞介导的骨形成之间的动态平衡来维持。乳腺癌转移至骨组织,可激活破骨细胞的活性,可导致骨代谢失衡,骨组织被分解,导致骨质吸收;OPG 和 RANKL 是调节破骨细胞和骨吸收的重要因子^[15];RANKL 能直接启动破骨细胞前体细胞或破骨细胞内信号传导过程,导致破骨细胞分化,激活并维持破骨细胞活性^[16],而破骨细胞表面的 RANK 是 RANKL 刺激破骨细胞分化、成熟的唯一靶受体;研究显示,RANKL/RANK 途径是乳腺癌骨转移骨质吸收过程中发挥重要作用是这个过程中最终的共同

通^[17-18]。OPG 又称护骨素,是 RANKL 假受体,可与 RANKL 竞争性结合,阻断 RANKL/RANK 间的相互作用,使 RANKL 失去功能,从而抑制体内及体外破骨细胞的分化,抑制成熟破骨细胞的活性,并诱导成熟破骨细胞的凋亡^[19];所以骨代谢主要由 OPG/RANKL 来调节,OPG/RANKL 系统在乳腺癌骨转移骨吸收和重建中起关键作用^[20-21]。乳腺癌细胞可通过干预 OPG/RANKL/RANK 系统而导致骨转移灶骨质破坏^[22]。

本研究通过干预乳腺癌骨转移裸鼠模型,探讨附子白术汤及附子白术药对防治乳腺癌骨转移的作用机制。本研究发现,乳腺癌骨转移裸鼠模型建立后,裸鼠骨转移灶 OPG mRNA 减少,而 RANKL mRNA 升高,说明造模后肿瘤细胞可在一定程度上下调 OPG 基因的表达,上调 RANKL 基因的表达,OPG/RANKL 值较正常组显著降低,打破 OPG 和 RANKL 的相对平衡,造成骨组织出现溶骨性损伤,该结果与文献报道相符^[20]。附子白术汤及附子白术药对均可不同程度地上调 OPG mRNA 表达,下调 RANKL mRNA 表达,从基因方面调节 OPG/RANKL;这些结果提示,附子白术汤及附子白术药对可能是通过恢复 OPG 与 RANKL 的相对平衡,而抑制破骨细胞的活性,减轻溶骨性损伤;而在上述方面,附子白术汤与附子白术药对间无显著差异,提示附子白术药对可能是附子白术汤防治乳腺癌骨转移的核心药物。然而本实验结果仅提示附子白术汤可用于抑制乳腺癌骨转移骨质损伤的进一步发展,其是否具有修复已受损骨组织的作用,尚有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Akhtari M, Mensuri J, Newman K A, et al. Biology of breast cancer Bone metastasis [J]. *Cancer Biol Ther*, 2008,7(1):3.

[2] Coleman R E, Lipton A, Roodman G D, et al. Metastasis and bone loss: advancing treatment and prevention [J]. *Cancer Treat Rev*, 2010,36(11):615.

[3] 卢雯平,姜翠红. 古方治疗乳腺癌的用药规律 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010,16(3):133.

[4] 邓博,贾立群,高福云. 化痰止痛方对骨转移癌骨质破坏影响的研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010,16(11):43.

[5] 李琼,刘胜,杨顺芳. 补骨脂与蛇床子抑制乳腺癌骨转移的体内实验 [J]. *上海中医药大学学报*, 2010,24(1):53.

[6] 刘胜,吴宇春,程旭峰,等. 从 OPG/RANKL/RANK 系统阐述补骨脂-蛇床子抑制乳腺癌骨转移的机制 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2011,31(5):684.

[7] 程旭峰,刘胜,金惠,等. 蛇床子-补骨脂在乳腺癌骨转

移裸鼠模型中吸收入血特征的研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012,18(6):175.

[8] 程旭峰,张新峰,刘琦,等.《金匱》白术附子汤加味治疗乳腺癌骨转移例临床观察 [J]. *中医学报*, 2012,27(3):266.

[9] 程旭峰,刘胜,杨顺芳,等. 放射性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.

[10] 顾晓明,陆群,沈伟. 运用“Excel 随机发生器”进行随机化分组 [J]. *中国医院统计*, 2007,14(3):287.

[11] Matsumoto S, Kimura S, Segawa H, et al. Efficacy of the third generation bisphosphonate, zoledronic acid alone and combined with anti-cancer agents against small cell lung cancer cell lines [J]. *Lung Cancer*, 2005,47(1):31.

[12] Hiraga T, Myoui A, Choi M E, et al. Stimulation of cyclooxygenase-2 expression by bone-derived transforming growth factor enhances bone metastases in breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2006,66(4):2067.

[13] 刘正霞,徐阳,徐进梅,等. 不同引物及数据分析方法对定量 PCR 结果的影响 [J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2009,29(8):1112.

[14] 张登本. “肾主骨”理论的发生及其意义 [J]. *河南中医学院学报*, 2007,22(3):5.

[15] Brendan F Boyce, Lianping Xing. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2008,473(2):139.

[16] Boyce B F, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin [J]. *Arthritis Res Ther*, 2007,9(Suppl1):S1.

[17] Beleut M, Rajaram R D, Caikovski M, et al. Two distinct mechanisms underlie progesterone-induced proliferation in the mammary gland [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010,107(8):2989.

[18] Schramek D, Leibbrandt A, Sigl V, et al. Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progestin-driven mammary cancer [J]. *Nature*, 2010,468(12):98.

[19] Clark J, Vagenas P, Panesar M, et al. What does tumor necrosis factor excess do to the immune system long term [J]. *Ann Rheum Dis*, 2005,64(Suppl4):70.

[20] Yu-Chi Chen, Donna M Sosnoski, Andrea M Mastro. Breast cancer metastasis to the bone: mechanisms of bone loss [J]. *Breast Cancer Res*, 2010,12(1):215.

[21] Bhatia P, Sanders M M, Hansen M F. Expression of receptor activator of nuclear factor-kappa B is inversely correlated with metastatic phenotype in breast carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2005,11(6):162.

[22] Owen S, Ye L, Sanders A J, et al. Expression profile of receptor activator of nuclear- κ B (RANK), RANK ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) in breast cancer [J]. *Anticancer Res*, 2013,33(1):199.

[责任编辑 聂淑琴]