

附子-白术药对对乳腺癌骨转移裸鼠生存时间及血清中 TGF-β1、PTHRP 的影响

程旭峰¹, 张新峰², 刘琦³, 乔翠霞⁴, 赵慧朵¹, 王蓓蓓³

(1. 河南中医药大学第一附属医院, 河南 郑州 450003; 2. 郑州大学附属肿瘤医院, 河南 郑州 450008;

3. 河南中医药大学, 河南 郑州 450046; 4. 河南省中医药研究院, 河南 郑州 450004)

摘要: 目的 观察附子-白术药对对乳腺癌骨转移裸鼠的保护作用, 并探讨其抑制骨转移的作用机制。方法 采用左心室注射乳腺癌细胞 MDA-MB-231BO 法建立骨转移模型; 裸鼠随机分为 A 大组和 B 大组; A 大组分为模型组、唑来膦酸组、附子-白术药对组; B 大组分为: 假手术组、模型组、唑来膦酸组、附子-白术药对组; 并进行相应干预。观察 A 大组裸鼠生存时间及体质量变化情况; 观察 B 组裸鼠骨转移程度, 抗酒石酸性磷酸酶染色法 (tartrate resistant acid phosphatase, TRAP) 观察骨转移灶中破骨细胞数量, ELISA 法检测血清中转化生长因子 (TGF-β1)、甲状旁腺激素相关蛋白 (PTHRP) 的含有量。结果 与模型组比较, 药对组生存时间明显延长 ($P < 0.05$), 造模后 6 周时体质量下降率减小 ($P < 0.05$), 骨转移程度明显降低 ($P < 0.01$)、TRAP (+) 细胞数量均明显减少 ($P < 0.05$), 血清中 TGF-β1 和 PTHrP 的表达均显著降低 ($P < 0.05$)。结论 附子-白术药对可改善乳腺癌骨转移裸鼠体质量下降, 延长生存时间, 减轻骨转移溶骨性损伤, 其机理可能与其调控 TGFβ 信号通路, 减少 PTHrP 的表达相关。

关键词: 附子-白术药对; 乳腺癌骨转移; 生存时间; TGF-β; PTHrP

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)03-0544-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2018.03.007

The influence of the drug pair of Baizhu-Fuzi on the survival time of nude mice which have bone metastasis of breast cancer and the TGF-β1 and PTHrP in their serum

CHENG Xu-feng¹, ZHANG Xin-feng², LIU Qi³, QIAO Cui-xia⁴, ZHAO Hui-duo¹, WANG Bei-bei³

(1. The Frist Hospital Affiliated to Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China; 2. The Tumor Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450008, China; 3. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 4. Henan Academy of Chinese Medicine, Zhengzhou 450004, China)

ABSTRACT: AIM To observe the drug pair Baizhu-Fuzi's protection on the breast cancer nude mice with bony metastasis and to explore the mechanism of bone metastasis. **METHODS** Nude mouse models of breast cancer with bone metastasis were developed through injection of breast cancer cell MDA-MB-231BO into the left ventricle. Nude mice were randomly divided into group A and group B. Group A were subdivided into model group, zoledronic acid group and the drug pair of Baizhu-Fuzi group; and Group B were subdivided into sham-operation group, model group, zoledronic acid group and Baizhu-Fuzi group were subsequently administered with the intervention accordingly. The nude mice in group A had their surviving time and the weight changes observed; and those in group B had the degree of bone metastasis examined. Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) method for quantitative determination of osteoclast in bone metastasis, and ELISA method were employed to check the

收稿日期: 2017-08-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (U1304822, 81603469); 河南省科技攻关项目 (162102310185); 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)

作者简介: 程旭峰 (1976—), 男, 博士, 从事中西医结合防乳腺疾病的临床与基础研究。E-mail: cxf9939@163.com

*通信作者: 张新峰 (1982—), 男, 博士, 从事中西医结合防治恶性肿瘤的临床与基础研究。E-mail: 15890114393@163.com

content of TGF- β 1 and PTHrP in serum. **RESULTS** Compared to the model group, Baizhu-Fuzi group displayed distinctly longer survival time ($P < 0.05$), reduced rate of weight loss 6 weeks after modeling ($P < 0.05$), significantly declined degree of bone metastasis ($P < 0.01$), and significantly decreased quantity of TRAP (+) cell ($P < 0.05$) and serum TGF- β 1 and PTHrP ($P < 0.05$). **CONCLUSION** The drug pair, Baizhu-Fuzi's influence in TGF β signal path control and PTHrP expression reduction may contribute to the weight loss management, prolonged survival time, osteolytic bone defect rectification in mouse models of breast cancer with bone metastasis.

KEY WORDS: the drug pair of Baizhu-Fuzi; bone metastasis of breast cancer; survival time; TGF- β ; PTHrP

随着乳腺癌诊疗技术的提高，患者生存时间不断延长，但发生骨转移风险也不断增加，乳腺癌晚期发生骨转移的机率达65%~75%^[1-2]。乳腺癌骨转移可导致骨痛、病理性骨折等骨相关事件的发生，严重影响患者生活质量；临幊上放疗、化疗、内分泌治疗及抗骨质吸收药物等^[2]治疗方法，虽在一定程度上可延缓肿瘤进展，但又带来了相应的不良反应，增加患者痛苦；中医药凭借其疗效可靠及不良反应少等优势，已成为恶性肿瘤重要的辅助治疗方法^[3-6]。前期研究^[3-5]发现《金匱要略》白术附子汤及其核心药物附子-白术药对对乳腺癌骨转移具有一定的抑制作用。本研究旨在观察附子-白术药对对乳腺癌骨转移裸鼠的保护作用，并探讨其可能的作用机制。

1 实验材料与方法

1.1 实验动物及细胞株 6周龄 SPF 级雌性 BALB/c 裸鼠，45只，体质量20~22 g，购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司，生产许可证号：SCXK（沪）2013-0016。人乳腺癌骨高转移细胞 MDA-MB-231BO，美国德克萨斯州立大学医学系 Toshiyuki Yoneda 博士惠赠。

1.2 主要药品、试剂与仪器 附片配方颗粒（每袋0.5 g，相当于制附子3 g，批号140321）购自江阴天江药业有限公司；白术配方颗粒（每袋1 g，相当于白术6 g，批号1309002）购自华润三九医药股份有限公司；唑来膦酸（批号1309125）购自江苏正大天晴药业股份有限公司；DMEM培养基、胎牛血清购自美国Invitrogen公司；抗酒石酸酸性磷酸酶（TRAP）染色试剂盒购自美国Sigma公司；小鼠的转化生长因子 β 1（TGF- β 1）酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司；人甲状旁腺激素相关蛋白（PTHrP）ELISA试剂盒购于美国Phoenix Pharmaceuticals公司。生物安全柜及CO₂培养箱（美国Thermo公司）；倒置显微镜（日本NIKON公司）；MIQAS医学图像定量分析系统（上海达为科生物科技有限公司）；十万分之一电子天平（瑞士Mettler Toledo公司）；台式离心机（美国Thermo公司）；Multiskan MK3酶标仪（美国Thermo公司）。

2 实验方法

2.1 药物配制 采用附片配方颗粒0.5 g、白术配方颗粒0.33 g，加入生理盐水，配制成相当于33 mL（相当于每毫升含附子-白术药对生药150 mg），放入冰箱保存（参考《金匱要略》白术附子汤每付含白术6 g、炮附子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，本实验所需药量如上述）；药液均为灌胃当天配制。

2.2 乳腺癌骨转移裸鼠模型制备 按照前期文献方法^[7-8]进行裸鼠左心室注射MDA-MB-231BO细胞（细胞悬液密度 1.0×10^7 /L，0.1 mL）法制备乳腺癌骨转移裸鼠模型；另取6只正常组裸鼠行左心室注射生理盐水0.1 mL。

2.3 分组、给药与取材 将36只乳腺癌骨转移裸鼠，采用Excell“随机数发生器”法随机分为A大组和B大组。A大组：模型组、唑来膦酸组、附子-白术药对组，每组6只。B大组：模型组、唑来膦酸组、附子-白术药对组，每组6只；另将左心室注射生理盐水的6只裸鼠为假手术组。

药对组于造模后第4天开始灌胃给以附子-白术药对药液0.4 mL（60 mg/只），灌胃后立即皮下注射生理盐水0.2 mL；模型组、唑来膦酸组及假手术组均于相同时间点灌胃给予生理盐水0.4 mL/只，唑来膦酸组于灌胃后立即皮下注射唑来膦酸0.2 mg/kg（0.2 mL），模型组及假手术组均皮下注射0.2 mL生理盐水，以上给药均每周3次。A大组裸鼠一直给药至所有动物死亡，B大组持续给药6周^[4-5]。

B大组裸鼠末次给药后禁食4 h，行放射性核素骨显像（emission computed tomography，ECT）检测（具体方法见参考文献[8]）确定可疑骨转移灶部位；末次给药后禁食12 h，眼眶取血，分离血清，置-20℃冰箱冷冻保存。取血完毕后颈椎

脱臼法处死裸鼠，进行大体解剖，根据ECT结果，取出所有可疑骨转移灶，液氮保存，经病理证实为骨转移灶后，记录每只裸鼠骨转移灶数量及大小。

2.4 指标观察

2.4.1 生存状况及生存时间 每天观察A大组各组裸鼠生长情况直至其全部自然死亡，记录生存时间。

2.4.2 体质量变化状况 A大组各组裸鼠于造模后每周称重1次，记录体质量变化情况，并计算造模后第6周的裸鼠体质量下降率。计算公式：体质量下降率 = (术前体质量 - 术后第6周体质量) / 术前体质量 × 100%。

2.4.3 骨转移程度判断 裸鼠骨转移程度从以下3方面进行综合判断：①骨转移灶数量及转移率(病理证实)；②骨转移灶病理片上肿瘤细胞数/细胞总数(%)。

肿瘤细胞数/细胞总数(%) 的计算方法^[8]：在400倍显微镜下，每张切片随机选取3个视野，计算每一视野中的肿瘤细胞数及同一视野中的细胞总数(除红细胞)，计算肿瘤细胞数/细胞总数(%)，取3个视野求其均值。

2.4.4 TRAP染色观察 按照前期文献报道方法^[4-5,8]进行：取B大组裸鼠最大的骨转移灶组织，甲醛固定，石蜡包埋，进行病理切片，以TRAP染色法观察破骨细胞形态并记录TRAP阳性细胞数量^[9]。

2.4.5 血清中TGF-β1和PHTRP的测定 血清中TGF-β1和PHTRP的含有量用ELISA试剂盒测定，具体步骤按试剂盒说明书进行操作。

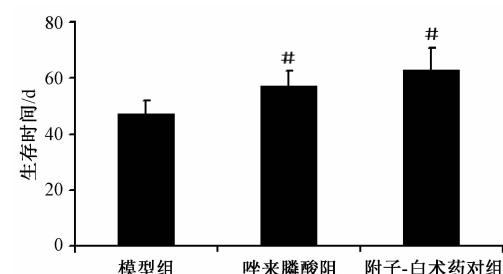
2.5 统计学方法 采用SPSS 17.0统计软件，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析， $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 裸鼠生存状况及生存时间 A大组裸鼠存活时间均超过6周。药物干预后，药对组和唑来膦酸组存活时间均超过模型组：与模型组比较，唑来膦酸组和药对组生存时间均显著延长，具有统计学意义($P < 0.05$)。结果见图1。

3.2 裸鼠造模后6周内体质量变化 A大组造模前各组裸鼠体质量无显著性差异($P > 0.05$)；造模成功后6w内，各组裸鼠体质量呈下降趋势。结果见图2。

3.3 裸鼠造模后6周体质量下降率 A大组裸鼠，假手术组体质量呈上升趋势，模型组、唑来膦酸组



注：与模型组比较，# $P < 0.05$

图1 各组裸鼠模型生存时间(n=6)

Fig. 1 Survival time of nude mouse models in each group (n=6)

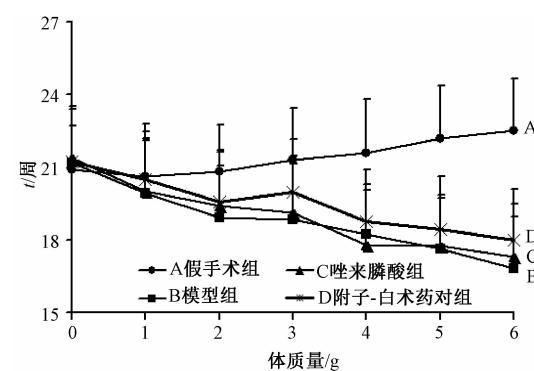


图2 各组裸鼠模型6周内体质量变化(n=6)

Fig. 2 Body weight changes of nude mouse models in each group within six weeks (n=6)

及药对组体质量均呈下降趋势。与模型组及唑来膦酸组比较，药对组体质量下降率均显著减小，具有统计学意义($P < 0.05$)。结果见表1。

表1 各组裸鼠模型6周后体质量下降率($\bar{x} \pm s$, n=6)

Tab. 1 Body weight loss rates of nude mouse models in each group after six weeks ($\bar{x} \pm s$, n=6)

组别	体质量下降率/%
假手术组	-7.66 ± 2.51
模型组	20.75 ± 4.27
唑来膦酸组	19.16 ± 4.61
附子-白术药对组	15.17 ± 4.85 ^{#▲}

注：与模型组比较，# $P < 0.05$ ；与唑来膦酸组比较，[▲] $P < 0.05$

3.4 小鼠骨转移程度结果 B大组中假手术组未发生骨转移，其余3组裸鼠骨转移率均为100%；与模型组比较，唑来膦酸组、药对组裸鼠骨转移灶个数及转移灶中肿瘤细胞数/细胞总数值均较显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果见表2。

3.5 TRAP(+)的破骨细胞计数 B大组中假手术组在骨基质边缘可见到少量单个的TRAP(+)细胞；模型组、唑来膦酸组、药对组骨基质边缘和

表2 各组裸鼠骨转移程度 ($\bar{x} \pm s$, n=6)Tab. 2 Bone metastasis extent of nude mice in each group
($\bar{x} \pm s$, n=6)

组别	转移灶数/个	(肿瘤细胞数/细胞总数) /%
假手术组	0	0
模型组	4.33 ± 1.86	42.25 ± 6.32
唑来膦酸组	2.00 ± 1.27 [#]	24.57 ± 4.71 ^{##}
附子-白术药对组	2.50 ± 1.05 [#]	22.83 ± 4.06 ^{##}

注:与模型组比较,[#]P<0.05,^{##}P<0.01

瘤体中均可见数量不等的TRAP(+)细胞;结果见图2。与正常组相比,模型组、唑来膦酸组、药对组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、药对组TRAP(+)细胞数量均明显减少(P<0.05)。结果见图3、4。

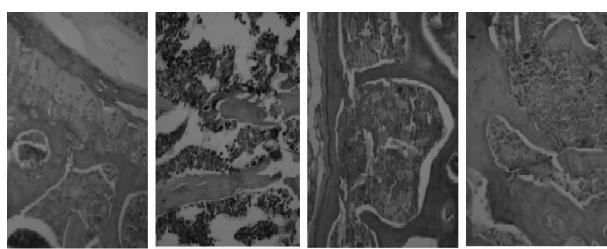
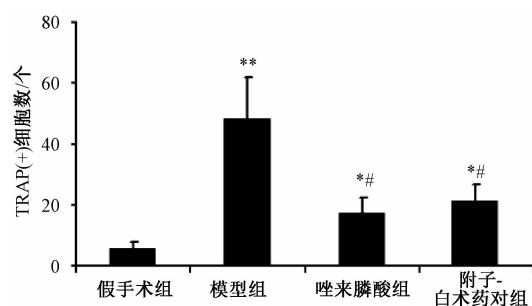


图3 各组裸鼠骨组织中TRAP染色结果 (×100)

Fig. 3 TRAP staining results in the bone tissue of nude mice in each group (×100)



注:与假手术组比较,*P<0.05,**P<0.01;与模型组比较,[#]P<0.05

图4 各组裸鼠骨组织中TRAP(+)细胞数 (n=6)

Fig. 4 Number of TRAP(+) cells in the bone tissue of nude mice in each group (n=6)

3.6 各组裸鼠血清中TGF-β1和PTHrP结果 正常组裸鼠血清中含少量的TGF-β1和PTHrP;模型组、唑来膦酸组、药对组血清中TGF-β1和PTHrP含有量均明显增多(P<0.05,P<0.01);与模型组比较,唑来膦酸组、药对组血清中TGF-β1和PTHrP含有量均明显减少(P<0.05)。结果见表3。

表3 各组裸鼠血清中TGF-β1和PTHrP ($\bar{x} \pm s$, n=6)Tab. 3 TGF-β1 and PTHrP in the serum of nude mice in each group ($\bar{x} \pm s$, n=6)

组别	TGF-β1($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	PTHrP($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
正常组	9.75 ± 2.77	3.95 ± 1.66
模型组	33.58 ± 9.93 ^{**}	11.81 ± 4.55 ^{**}
唑来膦酸组	15.23 ± 4.31 ^{*#}	6.59 ± 2.41 ^{*#}
药对组	17.67 ± 5.83 ^{*#}	7.15 ± 2.77 ^{*#}

注:与正常组比较,*P<0.05,**P<0.01;与模型组比较,[#]P<0.05,^{##}P<0.01

4 讨论

乳腺癌骨转移属中医“骨蚀”、“骨痹”等范畴,属中医“阴证”、“寒证”,病位在骨,其发生、发展与脾肾关系密切。《素问·五脏生成篇》曰“肾之合骨也,其荣在发,其主脾也”,《景岳全书》指出“脾肾不足及虚弱失调之人,多有积聚之病”。脾与肾相互影响,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,最终导致脾肾阳虚,单独温肾或健脾均不能取得良好的临床疗效,“温肾健脾”应为其主要治法,非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,左心室注射乳腺癌细胞后,所有裸鼠体质量均呈下降趋势,但附子-白术药对可降低裸鼠造模后6周时的体质量下降率,减轻乳腺癌骨转移程度,并延长裸鼠的生存时间。乳腺癌骨转移发生后,破骨细胞数量及活性增强,从而导致溶骨性损伤。TRAP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;本实验发现,模型组骨转移灶中TRAP(+)细胞明显增多(与文献报道一致^[4]),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-白术药对可抑制破骨细胞的增殖。

乳腺癌骨转移骨质损伤以溶骨性损伤为主,生长转化因子β(TGF-β)/Smads信号通路是调控乳腺癌骨转移发生、发展的重要途径^[10-11]。TGF-β是骨代谢中关键的信号因子,在肿瘤转移过程中能帮助瘤细胞逃避免疫监控^[10],有利于乳腺癌骨转移的发生,并可促进破骨细胞的增殖和分化^[11];骨是TGF-β的主要存储场所,骨转移溶骨破坏可释放大量TGF-β,且乳腺癌细胞直接分泌TGF-β,TGF-β通过调控TGF-β/Smads信号通路,调控破骨细胞活性的主要介导因子PTHrP等的表达,加速骨质流失^[10-13];抑制TGF-β及PTHrP的表达,可截断骨损伤恶性循环,修复骨损伤^[14]。本研究

发现,附子-白术药对可降低乳腺癌骨转移裸鼠血清中TGF- β 1、PTHRP的含有量。

综上所述,附子-白术药对可改善乳腺癌骨转移裸鼠体质量下降,延长生存时间,减轻骨转移溶骨性损伤,其机理可能与其调控TGF- β 信号通路,减少PTHRP的表达相关。

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] 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研究[J].中医学报,2012,27(3):270-272.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 卢海松,王祥麒,姬卫国,等.中医综合疗法治疗晚期乳腺癌骨转移临床研究[J].中医药临床杂志,2016,28(4):531-534.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 刘水涛,雷鸣,安佰京,等.人破骨细胞的体外培养及鉴定[J].武警医学,2011,22(5):381-384.
- [10] Javelaud D, Alexaki V I, Dennler S, et al. TGF- β /SMAD/GLI2 signaling axis in Cancer progression and metastasis[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(17): 5606-5610.
- [11] Swati B, Jeffry S N, JoAnn A, et al. Anti-transforming growth factor β antibody treatment rescues bone loss and prevents breast cancer metastasis to bone [J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27090.
- [12] 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: 440-446.
- [13] Cannonier S A, Gonzales C B, Ely K, et al. Hedgehog and TGF β signaling converge on Gli2 to control bony invasion and bone destruction in oral squamous cell carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(46): 76062-76075.
- [14] Johnson R W, Nguyen M P, Pada lecki S S, et al. TGF- β promotion of Gli2 induced PTHRP expression is independent of canonical Hedgehog signaling[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(3): 822-831.