

[药 理]

白花蛇舌草-半枝莲药对乙酸乙酯组分对破骨细胞分化的抑制作用

徐元¹, 陈龙², 章丹丹^{1*}

(1. 上海中医药大学交叉科学研究院, 上海 201203; 2. 上海中医药大学科技实验中心分析测试室, 上海 201203)

摘要: 目的 研究白花蛇舌草-半枝莲药对乙酸乙酯组分(YDW11)对破骨细胞分化的抑制作用。方法 UPLC-MS法鉴定YDW11中化学成分后, MTT法分析其对RAW264.7细胞活力的影响。100 ng/mL核因子- κ B受体活化因子配体(RANKL)诱导RAW264.7细胞7 d以建立破骨细胞模型后, 抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色考察TRAP阳性多核细胞数, 相应试剂盒测定TRAP酶活性。QRT-PCR检测TRAP、树突状细胞-特异性跨膜蛋白(DC-STAMP)、活化T细胞核因子c1(NFATc1)基因表达, Western blotting检测核因子 κ B受体活化因子(RANK)、肿瘤坏死因子受体相关因子6(TRAF6)、NFATc1、组织蛋白酶K蛋白表达, Taqman MicroRNA RT-PCR检测miR-155表达。结果 YDW11中有16种成分, 鉴定出对羟基苯乙酮、野黄芩苷、木犀草素、芹菜素。与模型组比较, YDW11组(25、50 μ g/mL)阳性多核细胞数显著减少($P < 0.01$), 并对细胞活力无明显影响($P > 0.05$); 呈剂量依赖性地显著抑制酶活性, TRAP、DC-STAMP、NFATc1基因表达, RANK、TRAF6、NFATc1、组织蛋白酶K蛋白表达($P < 0.05$), 并显著提高miR-155表达($P < 0.05$)。结论 YDW11可通过上调miR-155表达、下调相关基因和蛋白表达抑制RANKL诱导的破骨细胞分化。

关键词: 白花蛇舌草; 半枝莲; 药对; 乙酸乙酯组分; 破骨细胞; 分化

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)01-0044-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.01.010

Inhibitory effects of ethyl acetate component of *Hedyotis diffusa*-*Scutellaria barbata* drug pair on osteoclast differentiation

XU Yuan¹, CHEN Long², ZHANG Dan-dan^{1*}

(1. Institute of Interdisciplinary Integrative Medicine Research, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Analysis and Test Laboratory, Experiment Center for Science and Technology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: AIM To study the inhibitory effects of ethyl acetate component of *Hedyotis diffusa* Willd. -*Scutellaria barbata* D. Don drug pair (YDW11) on osteoclast differentiation. **METHODS** After the identification of chemical constituents in YDW11 by UPLC-MS, their effect on RAW264.7 cell viability was analyzed by MTT. Osteoclast models were induced via RAW264.7 cells by 7 d exposure to 100 ng/mL receptor activator for nuclear factor- κ B ligand (RANKL). And TRAP positive polykaryocyte count was investigated by tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining, and the TRAP enzyme activity was determined by corresponding kit. Subsequently, the detection of TRAP gene expression, dendritic cells-specific transmembrane protein (DC-STAMP) and nuclear factor of activated T cells c1 (NFATc1) by QRT-PCR, the protein expression detection of receptor activator for nuclear factor- κ B (RANK), tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6), NFATc1 and cathepsin K by Western blotting, and the expression detection of miR-155 by Taqman MicroRNA RT-PCR were conducted. **RESULTS** Among the sixteen constituents in YDW11, *p*-hydroxyacetophenone, scutellarein, luteolin and

收稿日期: 2018-01-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(81001666, 81573673, 81773946); 上海教委创新项目(13YZ048); 上海卫计委青年项目(20144Y0143); 上海教委优秀项目(SZY07029)

作者简介: 徐元(1992—), 女, 硕士生, 从事抗肿瘤药物筛选及机制研究。Tel: (021) 51322534, E-mail: 2313390806@qq.com

* 通信作者: 章丹丹(1980—), 女, 博士, 副研究员, 从事中药干预肿瘤微环境机制研究。Tel: (021) 51322534, E-mail: izhangdd@126.com

apigenin were identified. Compared with the model group, YDW11 groups (25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), leaving no obvious effect on cell viability ($P>0.05$), significantly reduced positive polykaryocyte count ($P<0.01$), enzyme activity, TRAP, DC-STAMP, NFATc1 gene expressions, RANK, TRAF6, NFATc1, cathepsin K protein expressions ($P<0.05$), and increased dose-dependently miR-155 expression ($P<0.05$). **CONCLUSION** YDW11 can inhibit RANKL-induced osteoclast differentiation by up-regulating miR-155 expression and down-regulating related gene and protein expressions.

KEY WORDS: *Hedyotis diffusa* Willd.; *Scutellaria barbata* D. Don; drug pair; ethyl acetate component; osteoclasts; differentiation

风湿性关节炎、慢性病毒感染、肿瘤等疾病的发展过程中都伴有骨密度减少、破骨细胞异常活化^[1-3],同时乳腺癌、肺癌、前列腺癌晚期常见骨转移,其一旦发生将伴发病理性骨折、脊髓压迫、疼痛等,降低患者生活质量,甚至危及生命^[4]。破骨细胞的分化依赖成骨细胞产生的核因子- κB 受体活化因子配体(RANKL)与破骨细胞前体细胞膜上的核因子 κB 受体活化因子(RANK)相互作用活化,两者结合后促进骨吸收,并抑制破骨细胞凋亡^[5]。

中医药在干预乳腺癌等肿瘤中,不仅可抑制肿瘤生长,在转移环节还具有延缓骨转移发生及减少溶骨性损伤的作用。中医认为,肿瘤属于“岩证”“恶核”“石痕”“石疽”等范畴,清热解毒、活血化痰、扶正祛邪、软坚散结、化痰祛湿等是中医治疗肿瘤的常用方法^[6]。白花蛇舌草味甘、淡,性凉,具有清热解毒、利尿消肿、活血止痛之功效^[7];半枝莲味辛、苦,性寒,具有清热解毒、散瘀活血之功效^[8],两者均为清热解毒药,临床上常相须为用以治疗各种炎症、肿瘤等。现代药理研究表明,两者提取物或所含成分对结直肠癌、肝癌、膀胱癌等均具有抑制作用^[9-11],也是乳腺癌治疗的核心药对^[12],但尚未开展其对破骨细胞分化及肿瘤骨转移的研究。前期预实验对白花蛇舌草-半枝莲药对不同配比提取物及其不同极性组分进行活性导向的追踪分离,发现等比提取的乙酸乙酯组分抑制体外破骨细胞分化活性最强,故本实验基于RANKL诱导RAW264.7细胞分化作为破骨细胞模型,探讨该组分抑制破骨细胞分化的机制,为其临床治疗肿瘤骨转移或其他骨性疾病提供参考。

1 材料

1.1 试药 白花蛇舌草(批号050815)、半枝莲(批号050621)饮片购自上海养和堂药业连锁经营有限公司,经上海市食品药品监督管理局专家鉴定为正品(报告书编号20080338、20080337)。对羟基苯

乙酮、野黄芩苷、木犀草素、芹菜素由上海中医药大学中药学院中药化学课题组提供,含有量均>98%。小鼠巨噬细胞株RAW264.7购自美国ATCC公司;RPMI-1640培养基干粉购自美国Gibco公司;胎牛血清购自美国HyClone公司;噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、Trizol RNA提取试剂、HighCapacity cDNA Reverse Transcription Kits、miR-155引物套装及TaqMan Small RNA Assays购自美国Life Technologies公司;RealMaster-Mix SYBR Green试剂盒购自美国罗氏公司;RANKL购自美国Peprotech公司;PVDF膜购自美国Millipore公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒、抗酒石酸酸性磷酸酶检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色试剂盒购自美国Sigma公司;RANK、肿瘤坏死因子受体相关因子6(TRAF6)、活化T细胞核因子 cl (NFATc1)、组织蛋白酶K抗体购自美国Santa Cruz公司;引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。其他溶剂均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器 Delta Series生物安全柜(美国Labconco公司); CO_2 培养箱、高分辨质谱仪(美国Thermo公司);倒置显微镜(日本Olympus公司);Centrifuge 5810R低温高速离心机(德国Eppendorf公司);Cellometer Auto T4全自动细胞计数仪(美国Nexcelom公司);Spectra MAX190酶标仪(美国MD公司);QB-9006恒温微孔板快速振荡器(海门市其林贝尔仪器有限公司);7500Fast System荧光定量PCR仪(美国Applied Biosystems公司);PowerPacTMHC电泳仪(美国Bio-Rad公司);Tanon NIM2045凝胶成像系统(上海天能科技有限公司);UPLC(美国Waters公司)。

2 方法

2.1 白花蛇舌草-半枝莲药对乙酸乙酯组分(YDW11)制备及成分鉴定 白花蛇舌草、半枝莲

以1:1比例加水提取,取适量浸膏溶于蒸馏水中,乙酸乙酯萃取,即得相应组分。

取适量YDW11溶于DMSO溶液中,离子源喷雾电压正、负离子模式下分别为3.5、3.2 kV;毛细管温度350℃;鞘气、辅助气体积流量35、15 arb (1 arb = 0.3 L/min);反吹气体积流量1 arb;离子源雾化温度300℃。S-Lens级别60;离子检测方式全扫描(Full Scan),分辨率60 000。二级采用10个峰的DDA检测模式(数据依赖分析模式);分辨率15 000;碰撞能35 eV;动态排除时间10 s。

YDW11以5 mg/mL质量浓度溶于甲醇中进行UPLC分析,条件为Waters Acquity UPLC HSS T3色谱柱;流动相乙腈-0.1%甲酸;柱温40℃。

2.2 YDW11对细胞活力的影响 RAW264.7细胞以 $1 \times 10^4/100 \mu\text{L}$ 密度接种于96孔板中,培养过夜,设置对照组、模型组、YDW11组(25、50 $\mu\text{g/mL}$),刺激处理24 h后弃去上清,每孔加入RPMI 1640 100 μL 、MTT (PBS溶解为5 g/L) 10 μL ,继续培养4 h后弃去上清,加入100 μL DMSO,置于摇床上至结晶完全溶解,酶标仪读取490 nm下吸光度,以对照组为100%,计算YDW11对细胞活力的影响。每组设3个复孔,实验重复3次。

2.3 YDW11对阳性多核细胞数的影响 RAW264.7细胞在10%FBS1640条件下以10 000/孔培养于24孔板中,分组同“2.2”项,贴壁生长过夜,第2天在相同条件下加药物预处理24 h,第3天在相同条件下加入诱导剂RANKL(终质量浓度100 ng/mL),再加入药物进行处理,隔天换液并加入上述诱导剂和药物,RANKL诱导处理7 d后根据TRAP染色试剂盒说明书进行染色,200倍镜下随机选取5个视野观察细胞分化情况,具有3个及3个以上细胞核的多核细胞认定为破骨样细胞,对其进行计数,并进行典型破骨样细胞图像采集。实验重复3次。

2.4 TRAP活性检测 RAW264.7细胞在10%FBS1640条件下以10 000/孔培养于24孔板中,分组同“2.2”项,贴壁生长过夜,第2天在相同条件下加药物预处理24 h,第3天在相同条件加入诱导剂RANKL(终质量浓度100 ng/mL),再加入药物进行处理,隔天换液并加入上述诱导剂和药物,诱导处理7 d后弃去上清,PBS洗涤1次后每孔加入100 μL PBS,刮取细胞并收集细胞悬液,150 W

下超声3次,每3 s间歇2 s,超声后4℃、12 000 r/min下离心15 min,取上清,根据TRAP试剂盒说明书检测TRAP活性,同时采用BCA蛋白测定试剂盒测定样品蛋白浓度。实验重复3次。

2.5 YDW11对TRAP、树突状细胞-特异性跨膜蛋白(DC-STAMP)、NFATc1基因表达的影响 RAW264.7细胞在10%FBS1640条件下以10 000/孔培养于24孔板中,分组同“2.2”项,贴壁生长过夜,第2天在洗脱条件下加药物预处理24 h,第3天在相同条件下加入诱导剂RANKL(终质量浓度100 ng/mL),再加入药物进行处理,隔天换液并加入上述诱导剂和药物,诱导处理7 d后收集RNA样品,Trizol法提取RNA,根据样品吸光度计算RNA浓度,将其调整至500 ng/ μL ,按RT试剂盒说明书逆转成cDNA样品后,根据PCR试剂盒说明书进行聚合酶链式反应。实验重复3次,引物序列见表1。

表1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

基因	引物序列(5'-3')
TRAP	正向 TGACAAGAGGTTCCAGGA
	反向 AGCCAGGACAGCTGAGTG
DC-STAMP	正向 CTGTGTTACTGAGGGCTCTTTG
	反向 CAGAGAAGTCTTCCAGGATCTC
NFATc1	正向 GTCTCTTCCCGACATCAT
	反向 TCTCCAAGTAACCGTGTAGC
GAPDH	正向 AACGGATTTGCTGATTGGG
	反向 CAGGGGTGCTAAGCACTGG

2.6 YDW11对RANK、TRAF6、NFATc1、组织蛋白酶K蛋白表达的影响 RAW264.7细胞在10%FBS1640条件下以10 000/孔培养于24孔板中,分组同“2.2”项,贴壁生长过夜,第2天在相同条件下加入药物预处理24 h,第3天在相同条件下加入诱导剂RANKL(终质量浓度100 ng/mL),再加入药物进行处理,隔天换液并加入上述诱导剂和药物,诱导处理7 d后收集蛋白,100 W下超声3次,每3 s间歇2 s,超声后4℃、12 000 r/min下离心15 min,取上清,BCA蛋白测定试剂盒测定样品蛋白浓度,每孔上样30 μg 蛋白,在SDS-PAGE凝胶中电泳,转膜后5%牛奶封闭,检测RANK、TRAF6、NFATc1、cathepsin K蛋白表达。实验重复3次。

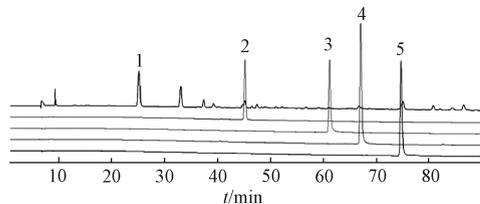
2.7 YDW11对miR-155表达的影响 RAW264.7细胞在10%FBS1640条件下以10 000/孔培养于24孔板中,分组同“2.2”项,贴壁生长过夜,第2

天在相同条件下加入药物预处理24 h,第3天在相同条件下加入诱导剂RANKL(终质量浓度100 ng/mL),再加入药物进行处理,隔天换液并加入上述诱导剂和药物,诱导处理7 d后收集RNA样品,采用Trizol法提取总RNA,根据Taqman Small RNA试剂盒说明书,各样品取10 ng总RNA,逆转成cDNA后进行PCR反应,检测miR-155表达。实验重复3次。

2.8 统计学分析 通过SPSS21.0软件进行处理,组间资料比较采用单因素方差分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

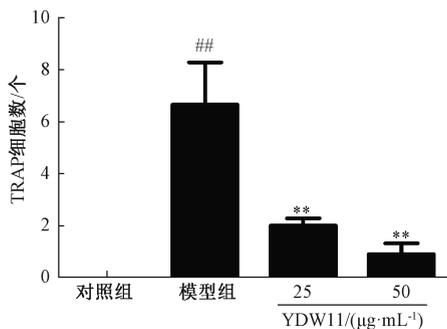
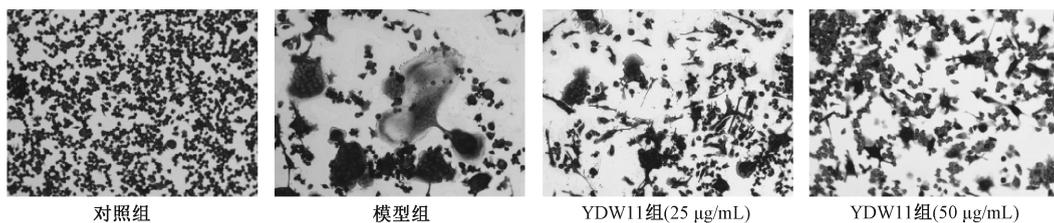
3.1 成分鉴定 YDW11中可能含有16种成分。通过比较YDW11和各成分UPLC色谱图(图1),鉴定出对羟基苯乙酮、野黄芩苷、木犀草素、芹菜素。



1. YDW11 2. 对羟基苯乙酮 3. 野黄芩苷 4. 木犀草素 5. 芹菜素
1. YDW11 2. *p*-hydroxyacetophenone 3. scutellarein 4. luteolin
5. apigenin

图1 各成分UPLC色谱图

Fig. 1 UPLC chromatogram of various constituents



注:与对照组比较,## $P < 0.01$;与模型组比较,** $P < 0.01$

图3 YDW11对阳性多核细胞数的影响($\times 200$)

Fig. 3 Effect of YDW11 on positive polykaryocyte count ($\times 200$)

3.2 YDW11对细胞活力的影响 图2显示,与对照组比较,YDW11组对细胞活力无明显影响($P > 0.05$)。

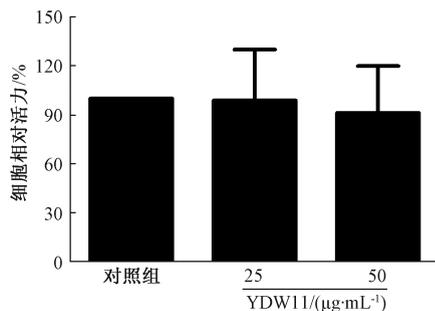
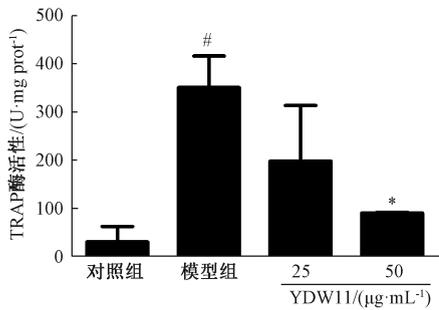


图2 YDW11对细胞活力的影响

Fig. 2 Effect of YDW11 on cell viability

3.3 YDW11对阳性多核细胞数的影响 RAW264.7细胞体积较小,镜下观察呈圆形、多角形等,一般只含有1个细胞核,极少数有2个核,TRAP染色阴性;与单核巨噬细胞比较,破骨细胞体积明显增大,部分细胞质可见空泡状,细胞核数 ≥ 3 ,TRAP染色阳性。图3显示,对照组无明显TRAP染色阳性多核细胞(细胞核 ≥ 3),模型组显著增加($P < 0.01$),YDW11组显著减少($P < 0.01$)。

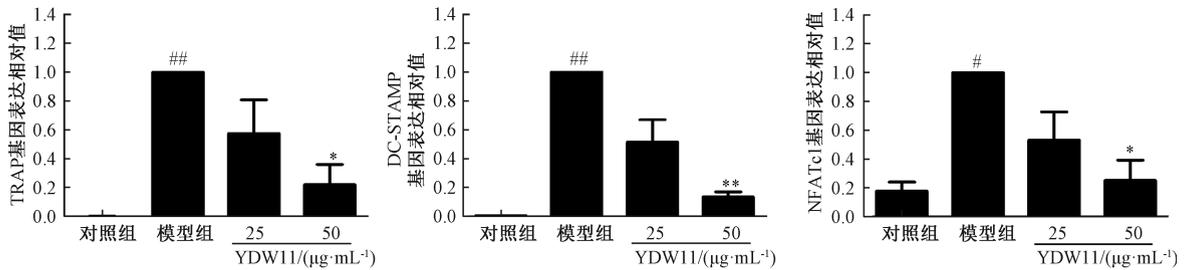
3.4 YDW11对TRAP酶活性的影响 图4显示,与对照组比较,模型组酶活性显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,YDW11组酶活性有所降低,以50 μg/mL组更显著($P < 0.05$)。



注：与对照组比较，[#] $P < 0.05$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$

图4 YDW11对TRAP酶活性的影响

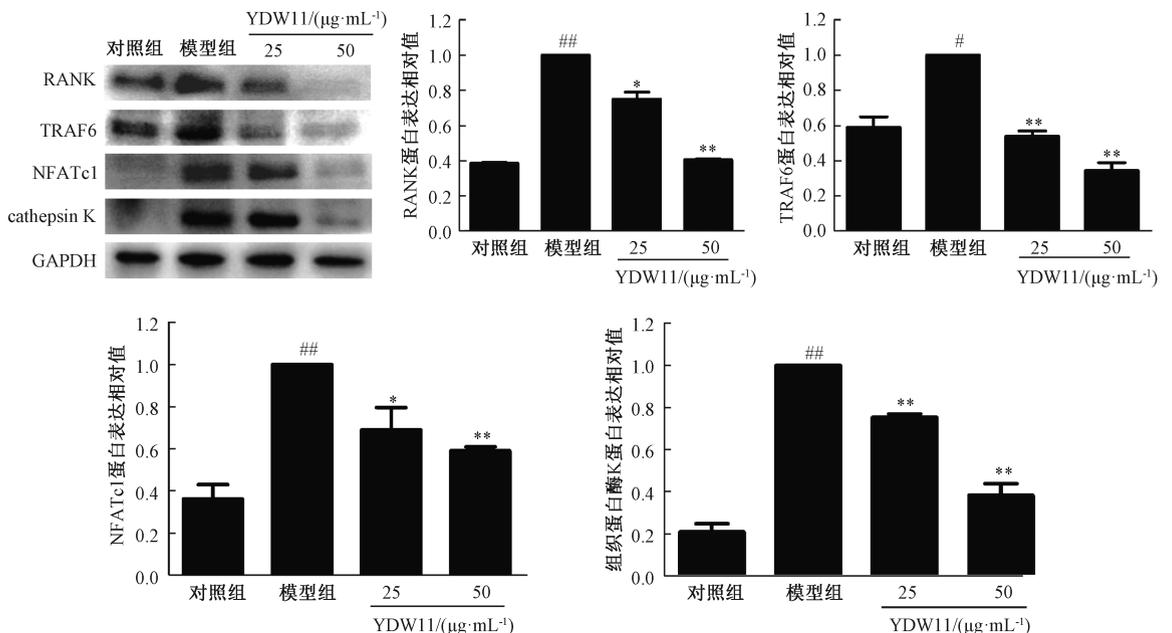
Fig. 4 Effect of YDW11 on TRAP enzyme activity



注：与对照组比较，[#] $P < 0.05$ ，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$

图5 YDW11对TRAP、DC-STAMP、NFATc1基因表达的影响

Fig. 5 Effects of YDW11 on TRAP, DC-STAMP, NFATc1 gene expressions



注：与对照组比较，[#] $P < 0.05$ ，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$

图6 YDW11对RANK、TRAF6、NFATc1、组织蛋白酶K蛋白表达的影响

Fig. 6 Effects of YDW11 on RANK, TRAF6, NFATc1, cathepsin K protein expressions

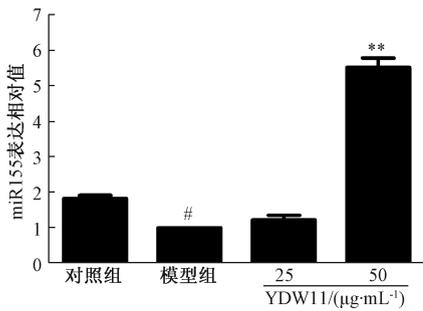
0.05, $P < 0.01$), 并呈剂量依赖性。

3.7 YDW11对miR-155表达的影响 图7显示, 与对照组比较, 模型组 miR-155 表达显著下降

3.5 YDW11对TRAP、DC-STAMP、NFATc1基因表达的影响 图5显示, 与对照组比较, 模型组 TRAP、DC-STAMP、NFATc1 基因表达显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, YDW11组三者基因表达有所降低, 以 50 μg/mL 组更显著 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3.6 YDW11对RANK、TRAF6、NFATc1、组织蛋白酶K蛋白表达的影响 图6显示, 与对照组比较, 模型组 RANK、TRAF6、NFATc1、组织蛋白酶K蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型组比较, YDW11组三者蛋白表达显著降低 ($P <$

($P < 0.05$); 与模型组比较, YDW11组其表达有所升高, 以 50 μg/mL 组更显著 ($P < 0.01$)。



注：与对照组比较，# $P < 0.05$ ；与模型组比较，** $P < 0.01$

图7 YDW11对miR-155表达的影响

Fig. 7 Effect of YDW11 on miR-155 expression

4 讨论

骨是一个代谢活跃的器官，在整个生命周期中都在进行不断的更新和改进。正常情况下，成骨细胞介导的骨基质合成、破骨细胞介导的骨吸收维持着骨完整性的平衡，数量与活性正常的两者对正常的骨转换至关重要，若功能失调将导致骨骼形态结构异常，如骨质疏松时骨量减少，而骨硬化症时骨量增多，当骨形成动态平衡被打破，破骨细胞介导的骨吸收大于成骨细胞介导的骨形成时，就会导致骨质疏松^[13]。由在肿瘤发生骨转移时，常伴有骨密度减少及破骨细胞异常活化，故防治骨质疏松最重要的方式之一就是抑制破骨细胞活性、减少骨吸收。

酸性磷酸酶也称为酸性磷酸酯酶，在酸性条件下可催化磷酸酯键水解，其主要分为两类，一类是抗酒石酸酸性磷酸酶（TRAP），一类是抗氟离子酸性磷酸酶^[14]，其中前者是一种糖基化的含金属蛋白酶，主要存在于巨噬细胞、破骨细胞、Gaucher细胞、红细胞、血小板、脾脏毛状细胞、单核吞噬细胞中，但在肺泡巨噬细胞和破骨细胞中含有量最丰富，而单核细胞的前体则不含该酶^[15]，它在细胞信号转导、细胞增殖、分化等方面起到重要作用^[16]。本实验发现，经核因子- κ B受体活化因子配体（RANKL）处理7 d后，模型组中存在大量破骨细胞（细胞质呈空泡状、细胞核数目 ≥ 3 、体积明显增大、TRAP染色阳性），但在白花蛇舌草-半枝莲药对乙酸乙酯组分（YDW11）干预下破骨细胞明显减少，同时TRAP表达及酶活性也被显著抑制。

核因子- κ B受体活化因子（RANK）是由其配体RANKL（TRANCE/OPGL/ODF）激活的在树突状细胞上鉴定的TNFR家族成员，可促进树突状细胞存活和破骨细胞分化^[13]。RANKL促进破骨细胞前

体分化的过程中，能诱导活化T细胞核因子c1（NFATc1）、树突状细胞-特异性跨膜蛋白（DC-STAMP）表达，而且前者可通过后者上调破骨细胞前体细胞间的融合，从而促进破骨细胞分化^[17]。肿瘤坏死因子受体相关因子6（TRAF6）是NF- κ B受体活化因子（RANK）的重要衔接分子，它与RANK的耦联对破骨细胞骨吸收功能的维持至关重要^[18]；组织蛋白酶K是一种溶酶体半胱氨酸蛋白酶，被认为在骨再吸收过程中由破骨细胞特异性表达^[19]。本实验证实，YDW11可显著抑制破骨细胞分化重要蛋白和基因的表达，抑制破骨细胞分化。

miRNA是一种在细胞分化、组织发育阶段特异性表达，主要参与基因转录后调节的内源性非编码单链小分子RNA，可通过与mRNA配对调节转录后基因表达使得翻译抑制或mRNA降解，在许多生理或病理过程中发挥关键作用，包括细胞分化、免疫发展、癌症转化等^[20-21]。研究表明，多种miRNA在破骨细胞分化的过程中发挥了重要作用，如miR-223、miR-21、miR-503、miR-155等^[2]，其中miR-155作为miRNAs家族一员，是一种炎症相关的多功能microRNA，与免疫功能和细胞凋亡有关，活化T细胞、B细胞、巨噬细胞可诱导其表达^[20]。研究表明，在RAW264.7向破骨细胞分化时，miR-155表达显著下降，而提升其表达可使破骨细胞分化受到抑制^[22]。本实验发现，经RANKL处理7 d后，模型组中miR-155表达显著降低，而YDW11在50 μ g/mL剂量下可大大提升其表达。

中药复方配伍灵活多变，可依据症状种类及轻重辨证论治，随证加减，药对是中药诸多配伍形式中的一种，为其最小单位^[23]。课题组前期对白花蛇舌草-半枝莲药对不同部位组分进行提取分离，寻找活性部位或成分，并对其中的化学成分进行初步分析和质量控制，有助于该药对药用价值的进一步开发。

综上所述，YDW11可通过上调miR-155表达、下调相关基因和蛋白表达抑制RANKL诱导的破骨细胞分化，提示其具有抑制肿瘤骨转移的潜能，可为临床相关治疗提供一定参考。

参考文献：

- [1] Oshita K, Yamaoka K, Tanaka Y. Regulation of osteoclastogenesis by human mesenchymal stem cells leading to application of a novel treatment for rheumatoid arthritis[J]. *J UOEH*, 2013, 35(1): 33-37.
- [2] Kagiya T. MicroRNAs and osteolytic bone metastasis: The roles

- of microRNAs in tumor-induced osteoclast differentiation [J]. *J Clin Med*, 2015, 4(9): 1741-1752.
- [3] Baum R, Gravallesse E M. Impact of inflammation on the osteoblast in rheumatic diseases[J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2014, 12(1): 9-16.
- [4] 芦殿荣, 芦殿香, 冯 利. 中药治疗恶性肿瘤骨转移疼痛临床应用概述[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(2): 251-253.
- [5] Ikeda K, Takeshita S. The role of osteoclast differentiation and function in skeletal homeostasis [J]. *J Biochem*, 2016, 159(1): 1-8.
- [6] 李 艳. 扶正祛邪化毒法在肿瘤治疗中的应用[J]. *中医药临床杂志*, 2009, 21(6): 487-489.
- [7] 程琪庆, 程春松, 刘智祖, 等. 白花蛇舌草和水线草的鉴别与药用进展比较 [J]. *中草药*, 2017, 48(20): 4328-4338.
- [8] 陈香爱, 袁志芳, 刘伟娜, 等. 不同产地半枝莲药材及其混淆品 HPLC 指纹图谱研究[J]. *中成药*, 2007, 29(10): 1412-1415.
- [9] Sun G D, Wei L H, Feng J Y, et al. Inhibitory effects of *Hedyotis diffusa* Willd. on colorectal cancer stem cells [J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(6): 3875-3881.
- [10] Li Y L, Zhang J, Min D, et al. Anticancer effects of 1, 3-dihydroxy-2-methylanthraquinone and the ethyl acetate fraction of *Hedyotis diffusa* Willd against HepG2 carcinoma cells mediated via apoptosis[J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0151502.
- [11] Pan L T, Sheung Y, Guo W P, et al. *Hedyotis diffusa* plus *Scutellaria barbata* induce bladder cancer cell apoptosis by inhibiting Akt signaling pathway through downregulating miR-155 expression [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 2016: 9174903.
- [12] Yeh Y C, Chen H Y, Yang S H, et al. *Hedyotis diffusa* combined with *Scutellaria barbata* are the core treatment of Chinese herbal medicine used for breast cancer patients: A population-based study[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014: 202378.
- [13] Park J H, Lee N K, Lee S Y. Current understanding of RANK signaling in osteoclast differentiation and maturation [J]. *Mol Cells*, 2017, 40(10): 706-713.
- [14] Bull H, Murray P G, Thomas D, et al. Acid phosphatases [J]. *Mol Pathol*, 2002, 55(2): 65-72.
- [15] Janckila A J, Nakasato Y R, Neustadt D H, et al. Disease-specific expression of tartrate-resistant acid phosphatase isoforms [J]. *J Bone Miner Res*, 2003, 18(10): 1916-1919.
- [16] Silvestris F, Ciavarella S, De Matteo M, et al. Bone-resorbing cells in multiple myeloma: osteoclasts, myeloma cell polykaryons, or both? [J]. *Oncologist*, 2009, 14(3): 264-275.
- [17] 许 娟. 高糖对 RANKL 诱导的破骨细胞分化及 ATP6vO₂、DC-STAMP 表达水平的影响[D]. 济南: 山东大学, 2014.
- [18] 曾祥周. 青蒿琥酯对破骨细胞的作用和分子机制研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2015.
- [19] 何伟涛, 刘 康, 孙金谔, 等. 组织蛋白酶 k 与骨质疏松症治疗的研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2008, 14(9): 670-673.
- [20] Liu Q, Yang J. Expression and significance of miR155 and vascular endothelial growth factor in placenta of rats with pre-eclampsia[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(9): 15731-15737.
- [21] Du F, Yu F, Wang Y, et al. MicroRNA-155 deficiency results in decreased macrophage inflammation and attenuated atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(4): 759-767.
- [22] Zhang J, Zhao H Y, Chen J P, et al. Interferon- β -induced miR-155 inhibits osteoclast differentiation by targeting SOCS1 and MITF[J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(19): 3255-3262.
- [23] 杨鸿珠, 龚雨萍. 中药药对的研究进展与思考[J]. *中国中西医结合杂志*, 2010, 30(2): 218-220.