

·数字中医药·

本文引用:胡玉蝶,王晓丽,焦方敏,杨争,袁博,胡金辉.基于Src/VEGF轴探究补肾活血汤治疗乳腺癌骨转移的作用机制[J].湖南中医药大学学报,2023,43(1):59-68.

## 基于 Src/VEGF 轴探究补肾活血汤治疗 乳腺癌骨转移的作用机制

胡玉蝶<sup>1</sup>,王晓丽<sup>1</sup>,焦方敏<sup>1</sup>,杨争<sup>2</sup>,袁博<sup>2</sup>,胡金辉<sup>2\*</sup>

1.湖南中医药大学,湖南长沙410208;2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙410007

**〔摘要〕**目的 探讨 Src/VEGF 信号通路对补肾活血汤治疗乳腺癌骨转移的影响及作用机制。方法 通过 TC MSP、GeneCards 数据库,挖掘出补肾活血汤治疗乳腺癌骨转移的潜在靶点,并将靶点进行拓扑分析和 GO、KEGG 富集分析,对拓扑分析排第一的关键核心靶点进行实验验证。15 只裸鼠随机分为对照组、模型组、补肾活血汤组,5 只/组,模型组、补肾活血汤组通过胫骨注射人乳腺癌 4T1-luc 细胞构建裸鼠乳腺癌骨转移模型,补肾活血汤组按照 36.67 g/(kg·d)予以补肾活血汤灌胃,对照组、模型组按照 0.01 mL/(g·d)予以生理盐水灌胃,连续给药 14 d。监测并记录裸鼠体重变化;HE 染色法检测裸鼠骨组织病理学变化;X 线、微 CT 检测裸鼠胫骨情况;胫骨组织 Trap 染色观察破骨细胞;Western blot 检测裸鼠胫骨组织细胞原癌基因(Src)、血管内皮生长因子抗体(vascular endothelial growth factor, VEGF)、金属基质蛋白 1(matrix metalloproteinase 1, MMP1)蛋白表达水平;免疫组化法检测裸鼠胫骨组织 SRC、VEGF、MMP1、活化 T 细胞核因子抗体(nuclear factor of activated T-Cells 1, NFATc1)基因表达水平。结果 补肾活血汤治疗乳腺癌骨转移潜在靶点共 949 个,其中核心靶点 15 个,关键核心靶点为 Src;KEGG 富集分析显示,补肾活血汤可能调控 197 个信号通路;GO 富集分析得到生物过程(biological process, BP)605 个条目、细胞组成(cellular component, CC)52 个条目、分子功能(molecular function, MF)117 个条目。与对照组相比,模型组裸鼠体重明显减轻( $P<0.01$ ),HE 染色可见大量肿瘤细胞和炎性细胞浸润,X 线、微 CT 下观测胫骨骨破坏面积百分比显著增加( $P<0.01$ ),Trap 染色可见成熟破骨细胞数量明显增加( $P<0.01$ ),胫骨组织 Src、VEGF、MMP1、NFATc1 表达水平显著升高( $P<0.01$ );与模型组相比,补肾活血汤组裸鼠体重明显增加( $P<0.01$ ),肿瘤细胞和炎性细胞浸润情况好转,X 线、微 CT 下观测胫骨骨破坏面积百分比显著降低( $P<0.05$ ),成熟破骨细胞数量明显减少( $P<0.05$ ),胫骨组织 SRC、VEGF、MMP1、NFATc1 表达水平显著降低( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。结论 补肾活血汤治疗乳腺癌骨转移是多成分、多靶点、多通路共同作用的结果,其可能通过下调 Src/VEGF 轴及其下游 MMP1、NFATc1 基因的表达,抑制破骨细胞活化、改善骨破坏,发挥治疗乳腺癌骨转移的作用。

**〔关键词〕** 乳腺癌;骨转移;骨破坏;补肾活血汤;Src/VEGF 轴;实验验证;作用机制

**〔中图分类号〕** R285.5

**〔文献标志码〕** A

**〔文章编号〕** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.01.010

### Bushen Huoxue Decoction's mechanisms of action in treating bone metastasis of breast cancer based on Src/VEGF axis

HU Yudie<sup>1</sup>, WANG Xiaoli<sup>1</sup>, JIAO Fangmin<sup>1</sup>, YANG Zheng<sup>2</sup>, YUAN Bo<sup>2</sup>, HU Jinhui<sup>2\*</sup>

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

**〔Abstract〕 Objective** To explore the mechanisms of Bushen Huoxue Decoction in treating bone metastasis of breast cancer

**〔收稿日期〕** 2022-05-21

**〔基金项目〕** 湖南省教育厅重点项目(20A373);湖南省科技厅科普专项(2021ZK4108);湖南省中医药管理局重点项目(C2022020);长沙市科技局一般项目(kq2202461);校级研究生创新课题(2021CX68);校级课题重点课题(2019XJJ039)。

**〔第一作者〕** 胡玉蝶,女,硕士研究生,研究方向:中医外科乳腺疾病综合诊疗。

**〔通信作者〕\*** 胡金辉,女,主任医师,教授,硕士研究生导师,E-mail:hujinhui173@163.com。

based on Src/VEGF signaling pathway. **Methods** Potential targets for treating bone metastasis of breast cancer by Bushen Huoxue Decoction were identified from TCMSP database and GeneCards database. Topological analysis and GO and KEGG enrichment analysis were performed on the targets, and the hub core targets that were ranked the first were further verified in topological analysis. Then 15 nude mice were randomly divided into control group, model group and Bushen Huoxue Decoction group, with 5 mice per group. The model group and Bushen Huoxue Decoction group were injected human breast cancer 4T1-LUC cells into the tibia to construct the nude mouse breast cancer bone metastasis model, and bushen Huoxue Decoction group was given Bushen Huoxue Decoction by 36.67 g/ (kg·d). Control group and model group were given intragastric normal saline according to 0.1 mL/(g·d) for 14 consecutive days, and the changes of body weight were monitored and recorded. The histopathological changes of bone in nude mice was measured by HE staining. The tibial bone of nude mice was detected by X-ray and mic-CT. The number and size of osteoclasts were observed by Trap staining. The expression levels of Src, vascular endothelial growth factor (VEGF) and matrix metalloproteinase 1 (MMP1) in tibial cells of nude mice were measured by Western blot. The expression levels of Src, VEGF, MMP1 and nuclear factor of activated T-cells 1 (NFATc1) in tibial tissues of nude mice were detected by immunohistochemical method. **Results** A total of 949 potential targets of Bushen Huoxue Decoction in treating bone metastasis of breast cancer were identified, among which 15 were core targets and Src was the hub target. KEGG enrichment analysis showed that Bushen Huoxue Decoction may regulate 197 signaling pathways. GO enrichment analysis revealed 605 items of biological process (BP), 52 items of cellular component (CC), and 117 items of molecular function (MF). Compared with control group, the model group showed significant lower body weight ( $P<0.01$ ). Moreover, for model group, HE staining showed a large number of tumor cells and inflammatory cells; X-ray and microCT revealed the significant higher percentage of tibial bone damage area ( $P<0.01$ ); Trap staining showed the significantly larger number of mature osteoclasts ( $P<0.01$ ) and higher expression levels of Src, VEGF, MMP1 and NFATc1 in tibia tissues ( $P<0.01$ ). Compared with model group, Bushen Huoxue Decoction group had the significantly higher body weight of nude mice ( $P<0.01$ ) and the infiltration of tumor cells and inflammatory cells was improved. X-ray and microCT observation showed the lower percentage of damaged area of tibia bone ( $P<0.05$ ), less number of mature osteoclasts ( $P<0.05$ ) and decreased expression levels of Src, VEGF, MMP1 and NFATc1 in tibia tissue ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ) for Bushen Huoxue Decoction group in comparison to model group. **Conclusion** Bushen Huoxue Decoction treats the bone metastasis of breast cancer by the interaction of multiple components, multiple targets and multiple pathways. It may inhibit osteoclast activation, improve bone destruction by down-regulating Src/VEGF axis and the expression of downstream MMP1 and NFATc1 genes, thus taking effects on bone metastasis of breast cancer.

[**Keywords**] breast cancer; bone metastases; bone destruction; Bushen Huoxue Decoction; Src/VEGF axis; experimental verification; mechanisms of action

乳腺癌是我国女性发病率最高的恶性肿瘤疾病<sup>[1-2]</sup>,其主要死亡原因是远处转移的发生,骨骼是该病最常见的转移部位,发生率高达 70%~85%<sup>[3-4]</sup>,临床症状多为局部或全身疼痛、病理性骨折、高钙血症等,严重影响患者生活质量<sup>[5]</sup>。目前,西医主要治疗方法有骨改良药物的应用、抗肿瘤治疗、手术治疗、镇痛治疗等,但毒副作用较多且疗效有限<sup>[6]</sup>。近年来,中医药基于辨证论治、因人制宜的特点,在防治乳腺癌骨转移中取得良好疗效,临床上越来越多的患者选择中西医结合疗法防治乳腺癌骨转移<sup>[7]</sup>。补肾活血汤出自《伤科大成》,乃治疗乳腺癌骨转移临床常用方<sup>[8-9]</sup>,本研究利用网络药理学预测补肾活血汤治疗乳腺癌骨转移的作用靶点,并行实验验证,旨在揭示补肾活血汤治疗乳腺癌骨转移的内在分子机制,为其临床进一步应用提供科学依据。

## 1 材料

### 1.1 动物与细胞

15 只健康 BALB/c 6~8 周龄雌性裸鼠,饲养于湖南中医药大学动物中心实验室,饲养温度 24~26 ℃,湿度为 50%~70%,许可证号:SYCK(湘)2020-0038。乳腺癌 4T1-luc 细胞株(批号:CL-0007)购自普诺赛公司,本实验已通过湖南中医药大学实验动物伦理委员会,批准编号:LL2021041404。

### 1.2 主要药品与试剂

Src 抗体(批号:ab109381)、MMP1 抗体(批号:ab52631)均购自英国 Abcam 公司;VEGF 抗体(批号:13687-1-AP)、内参  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)(批号:66009-1-Ig)、NFATc1 抗体(批号:66963-1-Ig)、HRP goat anti-rabbit IgG(批号:SA00001-2)、

HRP goat anti-mouse IgG(批号:SA00001-1)均购自美国 proteintech 公司。

补肾活血汤药物组成:熟地黄 12 g(批号:2106031)、杜仲 15 g(批号:21050406)、枸杞子 15 g(批号:HH21050701)、补骨脂 15 g(批号:HY21051901)、菟丝子 15 g(批号:CK21042906)、当归尾 12 g(批号:TH2105702)、没药 6 g(批号:21051901)、山茱萸 15 g(批号: SX21052806)、红花 6 g(批号: SX21051301)、独活 15 g(批号:TH21052606)、肉苁蓉 15 g(批号:2105245),均购自湖南中医药大学第一附属医院,张裕民主任药师鉴定为正品,药品质量均符合《中华人民共和国药典》(2020年版)规定<sup>[38]</sup>。

### 1.3 主要仪器

煎药壶(一壶百饮有限公司,型号:FST-10A);旋转蒸发仪(中天仪器科技有限公司,型号:RE-2000A);摇床(其林贝尔公司,型号:TS-1);化学发光成像系统(勤翔公司,型号:ChemiScope6100);小动物标本 Micro-CT 成像系统(美国 GE 公司,型号:Super Nova CT);医用诊断 X 射线仪器(威图科技有限公司,型号:E7242X)。

## 2 方法

### 2.1 网络药理学

2.1.1 补肾活血汤中药成分收集及作用靶点预测 运用中药系统药理学数据库与分析平台数据库(<http://tcmispw.com/tcmisp.php>),检索补肾活血汤 11 味中药成分信息,以口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 、药物类药性(DL) $\geq 0.18$  为滤过条件,筛选活性成分;利用 PubChem 数据库(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取各活性成分的 SDF 结构式或 SMILES 码并导入 Swiss Target Prediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)收集补肾活血汤的潜在作用靶点。

2.1.2 乳腺癌骨转移疾病靶点筛选 在 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)中以“Bone metastasis of breast cancer”为检索词检索,获得乳腺癌骨转移疾病治疗靶点。

2.1.3 补肾活血汤治疗乳腺癌骨转移潜在靶点筛选及 PPI 网络构建 将乳腺癌骨转移疾病靶点与补肾活血汤潜在作用靶点导入韦恩软件工作平台(<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>),获取补肾活血汤活性成分治疗乳腺癌骨转移的潜在作用靶点,并绘制韦恩图。

将补肾活血汤治疗乳腺癌骨转移潜在作用靶点导入 STRING(<https://string-db.org/>)数据库,限定物种

为 Homo sapiens;Required score 为 0.900;FDR Sstringency 为 high,获得 PPI 相关信息。利用 Cytoscape 3.9.0 软件对 PPI 网络可视化,并对其行 Degree、Betweenness、Closeness 算法拓扑分析,获取补肾活血汤治疗乳腺癌骨转移核心靶点。

2.1.4 GO、KEGG 富集分析 运用 WebGestalt(<http://www.webgestalt.org/>)数据库,ORA 算法,导入拓扑分析靶点,GO、KEGG 富集分析,获取 BP、CC、MF 及 KEGG 富集分析数据,权重分析后绘制火山图。

### 2.2 体内实验验证

2.2.1 补肾活血汤中药制备 补肾活血汤单付剂量 141 g,取 3 付,根据《医疗机构中药煎药室管理规范[2009]》煎煮。第一次加 8 倍量水(3384 mL)浸泡 30 min,煎煮 30 min,趁热过滤;余药渣再加 6 倍量水煎煮 30 min,过滤,合并 2 次水煎液,旋转蒸发仪(70 °C,-0.1 MPa)浓缩至约 116 mL,分装,备用。

2.2.2 细胞培养 乳腺癌 4T1-luc 细胞复苏后用含有 10%胎牛血清、1%青-链霉素溶液的 DMEM 培养,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中,每天换液。造模时取对数生长期细胞,用 PBS 配制成浓度为  $5 \times 10^6$  个/ $\mu$ L 细胞悬液,保存至冰上备用,全程无菌操作。

2.2.3 动物分组 健康 Balb/c 6~8 周龄裸鼠共 15 只,每笼 5 只。适应性喂养 3 d,确认无烈性传染病且已适应新环境后根据体质量将其标号,采用随机数字表法将裸鼠分为 3 组,分别为对照组、模型组、补肾活血汤组,每组 5 只。

2.2.4 选用胫骨骨髓腔内注射乳腺癌细胞建立乳腺癌骨转移模型 裸鼠造模前用 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(0.4 mL/20 g)。麻醉完毕后固定于操作台,75%酒精消毒左侧后肢皮肤,屈曲膝关节呈 90°,确定胫骨平台位置。模型组、补肾活血汤组裸鼠均用 26G 显微注射器针头从胫骨近端向胫骨远端斜下缓慢旋转刺入骨髓腔,针尖有落空感并部位固定,用显微注射器吸取 10  $\mu$ L 4T1-luc 细胞悬液,缓慢注入骨髓腔,注射完毕后针头在胫骨内停留 1 min,随后退针局部压迫,对照组裸鼠用上述方法向骨髓腔内注射 10  $\mu$ L PBS。最后将裸鼠均放置于 37 °C 恒温板上,苏醒后放回笼中饲养。

2.2.5 给药方法 造模 5 d 后,补肾活血汤组裸鼠每天补肾活血汤中药液灌胃 1 次(0.01 mL/g)(给药剂量为 36.67 g/(kg·d));对照组、模型组以生理盐水灌胃(0.01 mL/g)。连续给药 14 d。

2.2.6 检测指标与方法 (1)裸鼠体质量监测:造模第 1 天、干预第 4、7、11、14 天各称量体质量 1 次。

(2) 肿瘤组织 HE 染色形态学观察:4%甲醛溶液固定胫骨组织 144 h,脱钙,脱水后石蜡包埋,切片,60 °C 烤片 12 h,脱蜡至水,将切片置二甲苯中 20 min,重复 3 次,乙醇梯度脱水,苏木素染色,蒸馏水冲洗,PBS 返蓝,伊红染复染,蒸馏水冲洗,梯度酒精脱水,取出后置于二甲苯 10 min,2 次,封片,显微镜下观察。

(3) 裸鼠胫骨微 CT 检测:将裸鼠左后肢固定在微 CT 载物台上,设定 360°扫描角度、10 μm 分辨率,获取连续的平面 CT 图像并进行三维重建,分析胫骨骨破坏面积百分比(胫骨骨破坏面积百分比=胫骨骨破坏面积:胫骨总面积)。

(4) 裸鼠胫骨 X 线检测:药物干预结束后将裸鼠眼眶取血处死,分离患侧后肢置于 X 线成像系统中拍照观察。

(5) 胫骨组织 TRAP 染色:4%甲醛溶液固定胫骨组织,脱钙,脱水,石蜡包埋,切片,60 °C 烤片 1~2 h,再将切片置于二甲苯中,梯度酒精脱水。TRAP 孵育液 37 °C 避光浸染 70 min、流水冲洗,苏木素复染,蒸馏水冲洗,PBS 返蓝,梯度酒精脱水。取出后置于二甲苯中,封片、镜下观察,阳性细胞为酒红色。

(6) Western blot 检测:取新鲜胫骨组织 0.025 g,加 250 μL RIPA 裂解液并反复研磨组织,冰上裂解,4 °C 离心,检测上清蛋白浓度。电泳,转膜,封闭,依次一抗(Src 抗体,1:10 000 稀释、VEGF 抗体,1:500 稀释;MMP1 抗体,1:1000 稀释;β-actin 单克隆抗体,1:5000 稀释)、二抗(HRP goat anti-mouse IgG,1:5000 稀释;HRP goat anti-rabbit IgG,1:6000 稀释)与膜一起各孵育 90 min。使用 ECL 化学发光液显色曝光。Image Lab Software 软件测定光密度,以目标蛋白与 β-actin 条带比值表示相对表达量。

(7) 免疫组化检测:甲醛溶液固定胫骨组织,脱

钙,石蜡包埋,切片,脱蜡至水,热修复抗原,室温加 1% 高碘酸,PBS 冲洗后滴加一抗(Src、VEGF、MMP1、NFATc1 均 1:100 稀释) 4 °C 过夜,PBS 冲洗,滴加二抗(抗兔-IgG 抗体-HRP 多聚体)37 °C 孵育 30 min,DAB 显色,苏木素复染,PBS 返蓝,酒精脱水。置于二甲苯后封片、镜下观察。阳性染色为棕黄色或褐色,Image J 软件分析图像平均光密度(Average IOD)。

2.2.7 统计学方法 采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,计量资料满足正态分布,则用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,方差齐性时用单因素方差分析,组间比较采用 LSD 法;不满足方差齐性时采用多个独立样本比较的秩和检验;不满足正态分布时,采用 Kruskal-Wallis 秩和检验。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 网络药理学分析结果

##### 3.1.1 补肾活血汤有效成分及作用靶点筛选结果

运用 TCMSP 数据库收集活性成分,其中熟地黄 2 个、杜仲 28 个、枸杞子 45 个、补骨脂 42 个、菟丝子 11 个、当归尾 2 个、没药 45 个、山茱萸 20 个、红花 25 个、独活 9 个、肉苁蓉 6 个。通过 PubChem 数据库获取上述成分 SDF 结构式或 SMILES 码,导入 SwissTargetPrediction 数据库预测补肾活血汤潜在作用靶点,去除重复值且保留唯一值,共得 1443 个补肾活血汤药物潜在靶点。

3.1.2 乳腺癌骨转移疾病靶点筛选结果 运用 GeneCards 数据库,获得乳腺癌骨转移疾病靶点共 6973 个。

3.1.3 药物与疾病共同靶点筛选结果及 PPI 网络构建 将乳腺癌骨转移疾病靶点 6973 个与补肾活血汤潜在靶点 1443 个取交集,并绘制韦恩图(图 1 A),得

表 1 前 10 位 Degree、Closeness、Betweenness 算法拓扑分析结果

Degree		Closeness		Betweenness	
靶点	分数	靶点	分数	靶点	分数
SRC	111.000	SRC	396.583	TP53	60 729.368
TP53	104.000	TP53	387.700	SRC	45 609.532
MAPK1	97.000	MAPK3	383.150	AKT1	43 554.577
MAPK3	95.000	AKT1	382.567	HSP90AA1	37 630.909
HRAS	90.000	MAPK1	382.133	CTNNB1	34 944.287
PIK3R1	88.000	HSP90AA1	379.367	ESR1	31 909.334
AKT1	87.000	STAT3	372.550	RXRA	28 884.825
HSP90AA1	86.000	EP300	369.817	EP300	23 905.049
PIK3CA	83.000	PIK3CA	369.350	CYP1A1	23 339.526
CTNNB1	80.000	CTNNB1	369.000	STAT3	22 034.132



药物与疾病的共同靶点 949 个(如 MMP7、EP300 等)。运用 Cytoscape 软件对 PPI 相关信息网络可视化(图 2);同时对 PPI 网络进行 Degree、Closeness、Betweenness 算法拓扑分析,并行可视化(图 1B 和图 1D)。PPI 网络中,有 933 个节点(16 个无交集靶点不纳入统计),

4525 条边,富集  $P$  值 $<1.0e-16$ 。运用 Degree、Closeness、Betweenness 算法拓扑分析得出 PPI 网络中排名前十的核心靶点(见表 1),整合后收集到核心靶点共 15 个(如 SRC、TP53 等)。

### 3.1.4 拓扑分析靶点 GO 与 KEGG 富集分析 BP

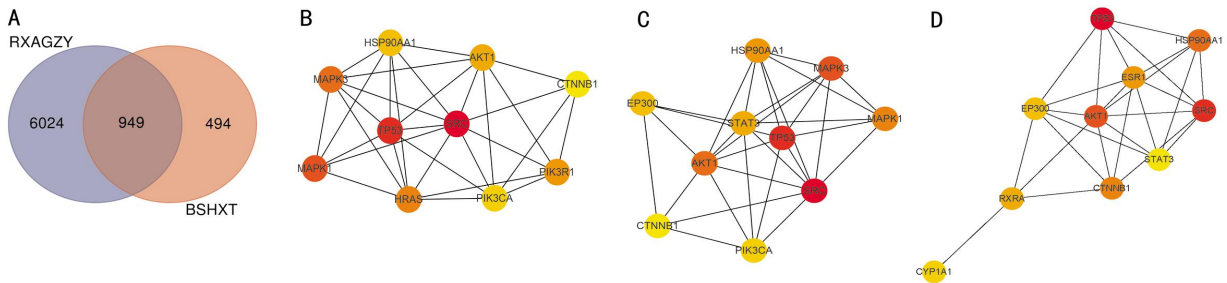


图 1 共同靶点韦恩图、拓扑分析网络图

注:A 疾病与药物共同靶点韦恩图;B-D 分别为 Degree、Closeness、Betweenness 算法拓扑分析前 10 位靶点网络图,节点颜色越深代表度值越大。

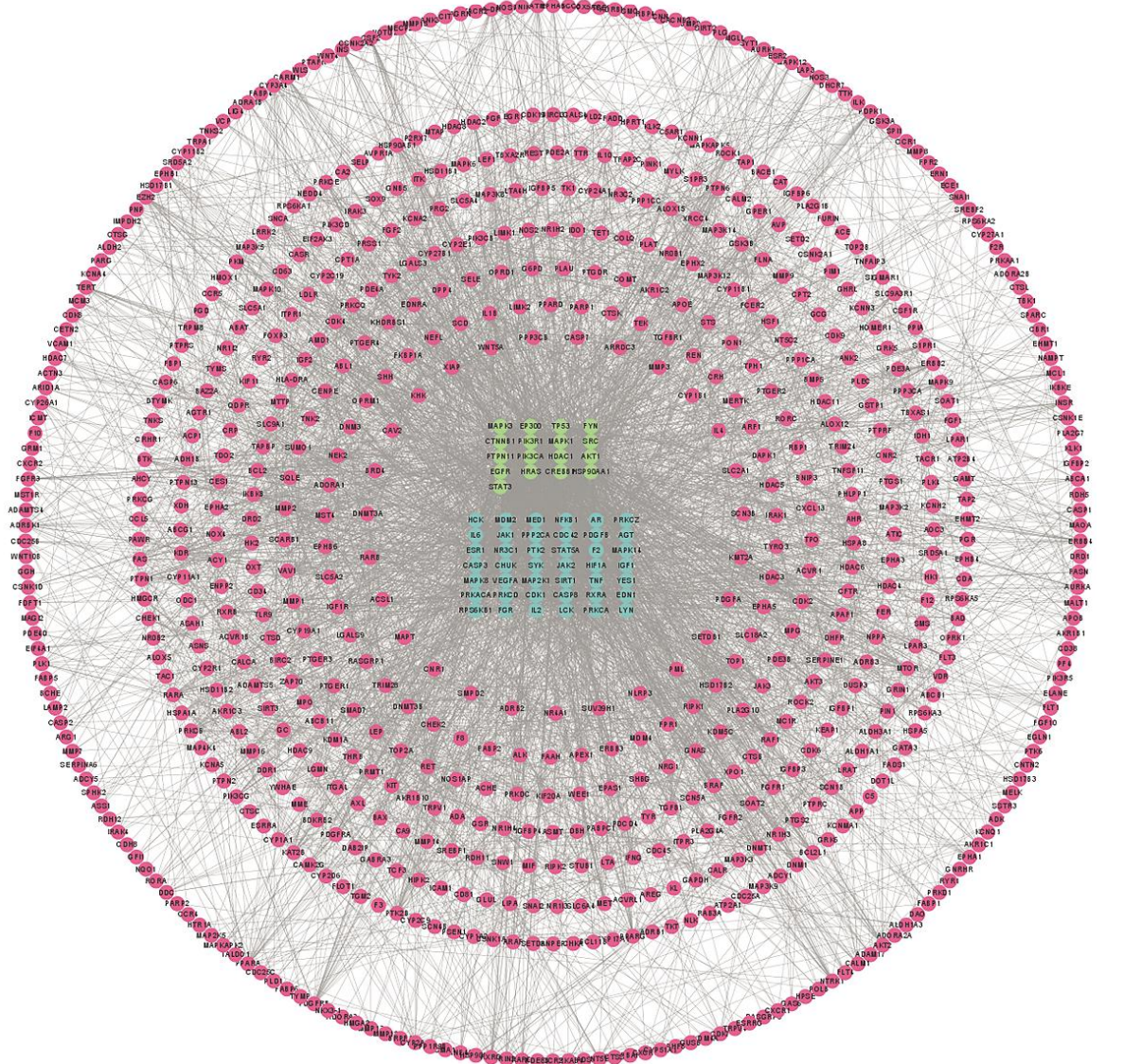


图 2 PPI 网络图

注:其中圆形节点代表靶点,连线代表着靶点与靶点之间的联系,节点颜色由 Degree 值大小决定,绿色为  $64 \leq \text{Degree 值} \leq 111$ ;蓝色为  $30 < \text{Degree 值} < 64$ ;粉色为  $1 \leq \text{Degree 值} \leq 30$ ,基因靶点的 Degree 值越大代表该靶点与其他靶点之间关联性越强。

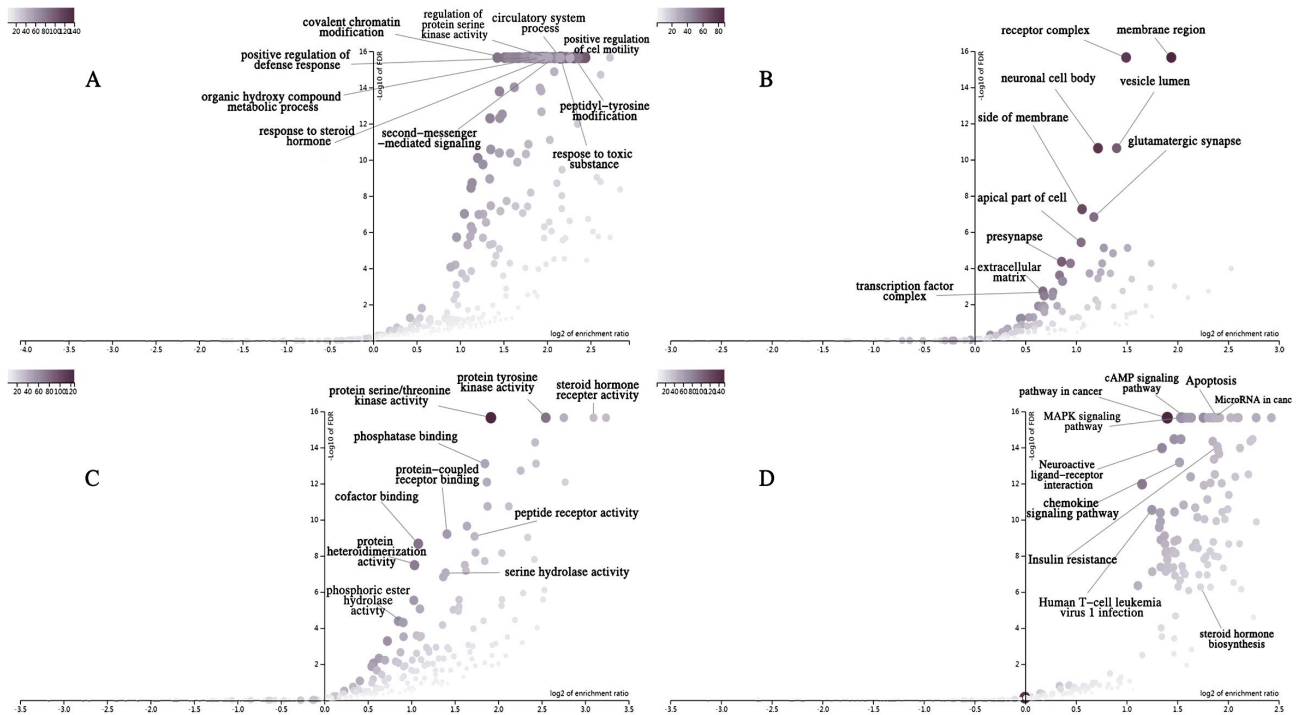


图 3 GO、KEGG 富集分析火山图

注:A. BP 富集分析;B. CC 富集分析;C. MF 富集分析;D. KEGG 富集分析;仅显示排名前 10 的富集结果。

共富集 605 个生物进程,整合 FDR、ratio 与  $P$  值结果并进行权重分析,绘制火山图(图 3A),主要富集于正向调节防御反应、类固醇激素的反应、共价染色质修饰等生物进程。CC 共富集 52 个细胞组分,整合 FDR、ratio 与  $P$  值结果并进行权重分析,绘制火山图(图 3B),主要富集于受体复合物、膜区、细胞外基质等细胞组分。MF 共富集 117 个细胞功能,整合 FDR、ratio 与  $P$  值结果并进行权重分析,绘制火山图(图 3C),主要富集于蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、类固醇激素受体活性、蛋白异源二聚体活性等细胞功能。KEGG 共富集 179 个信号通路,整合 FDR、ratio 与  $P$  值结果并进行权重分析,绘制火山图(图 3D),主要富集于 MAPK 信号通路、cAMP 信号通路、细胞凋亡等相关通路。

### 3.2 体内实验验证结果

3.2.1 体质量监测结果 造模第 1 天,各组裸鼠体质量差异无统计学意义( $P>0.05$ );干预第 14 天,模型组体质量较对照组明显下降( $P<0.01$ ),与模型组比较,补肾活血汤组体质量明显增加( $P<0.01$ )。详见表 2。

3.2.2 胫骨组织 HE 染色结果 对照组骨组织完整,骨小梁排列规整,骨皮质未见明显缺失,骨髓腔内细胞散在分布无聚集,无明显炎性浸润。与对照

表 2 各组裸鼠体质量比较( $\bar{x}\pm s, g$ )

组别	$n$	造模第 1 天	干预第 14 天
对照组	5	18.53±0.31	20.79±0.69 <sup>#</sup>
模型组	5	18.55±0.46	16.98±0.24 <sup>△△</sup>
补肾活血汤组	5	18.32±0.56	19.15±0.42 <sup>△△*#</sup>

注:与对照组比较,△△ $P<0.01$ ;与模型组比较,\*\* $P<0.01$ ;与造模第一天比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ 。

组相比,模型组、补肾活血汤组细胞增生显著,有明显骨转移征象,均可见不同程度骨质破坏、肿瘤细胞浸润、骨髓腔细胞呈簇状或片状聚集分布、核大深染、炎性浸润、细胞形态欠规则。与模型组相比,补肾活血汤组肿瘤细胞浸润、骨皮质毛燥等情况明显好转。详见图 4。

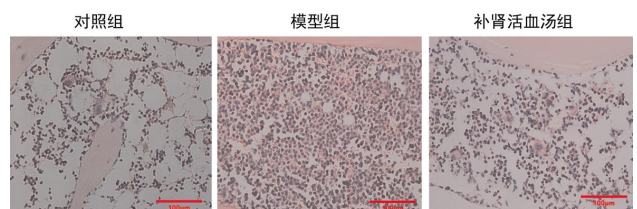


图 4 胫骨组织 HE 染色(×200)

3.2.3 裸鼠胫骨微 CT 检查结果 由微 CT 摄图(图 5A)及胫骨骨破坏面积百分比分析(图 5B)可见,对照组骨密度正常,未见明显骨缺损;与对照组比较,模型组骨破坏面积比显著增加( $P<0.01$ )、骨密度下



降,有明显“蚀骨”征,尤以造模时注射 4T1-luc 细胞处为甚;与模型组相比,补肾活血汤组骨破坏面积比明显降低( $P<0.05$ )。

**3.2.4 裸鼠胫骨 X 线检查结果** 由各组裸鼠 X 线检测照片可见(图 5C),对照组裸鼠胫骨骨质连接完整,未见骨缺损;与对照组相比,模型组、补肾活血汤组可见不同程度骨皮质毛糙欠规则欠连续、密度降低、关节变形,其中模型组骨破坏程度最明显;与模型组相比,补肾活血汤组乳腺癌骨转移骨缺损程度明显好转。

**3.2.5 胫骨组织切片 Trap 染色结果** 各组切片可见数量不等的红染 Trap(+)细胞(图 6)。与对照组相比,模型组骨基质边缘 Trap(+)细胞数量显著增加( $P<0.01$ ),多个细胞核聚集明显;与模型组相比,补肾活血汤组 Trap(+)细胞数量减少( $P<0.05$ )且形态

变小,无明显核聚集,红染变淡。

**3.2.6 胫骨组织中 SRC、VEGF、MMP1、NFATc1 表达结果** 免疫组化法(图 7、表 3)与 Western blot 法(图 8)两种检测方法显示,模型组 SRC、VEGF、MMP1、NFATc1 基因表达水平显著高于对照组( $P<0.05$ );与模型组相比较,补肾活血汤组 SRC、VEGF、MMP1、NFATc1 基因表达水平明显降低( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。

## 4 讨论

乳腺癌骨转移是由肿瘤细胞突破原发灶基膜,侵犯周围基质与脉管系统,到达转移组织或靶器官,并从循环系统中逃逸出来定植于此,形成转移灶<sup>[10]</sup>。乳腺癌骨转移多为溶骨性病变,主要是肿瘤细胞与骨细胞之间相互串扰产生的结果<sup>[11]</sup>。正常情况下骨形成与骨吸收处于平衡状态<sup>[12]</sup>,骨转移发生时,肿瘤细

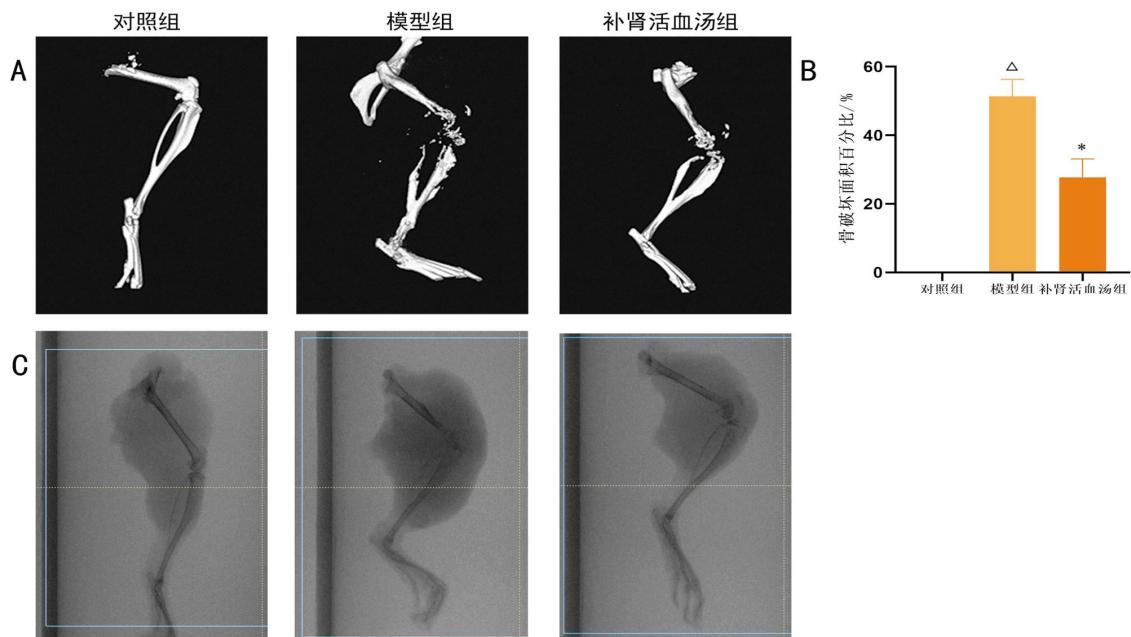


图 5 胫骨微 CT、X 线检测及骨破坏面积百分比

注:A.裸鼠胫骨微-CT 成像;B.胫骨骨破坏面积百分比柱状图;C.裸鼠胫骨 X 线成像。与对照组相比, $\Delta P<0.01$ ;与模型组相比, $*P<0.05$ 。

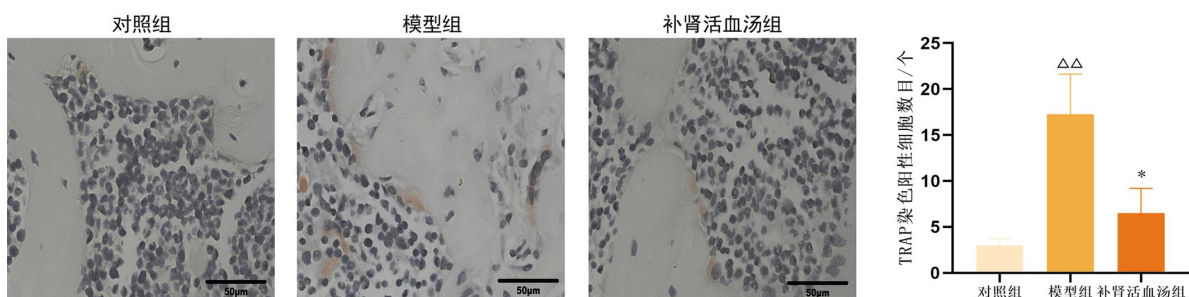


图 6 胫骨组织 Trap 染色(400 $\times$ )及 Trap 染色阳性细胞数目柱状图

注:与对照组相比, $\Delta\Delta P<0.01$ ,与模型组相比, $*P<0.05$ 。

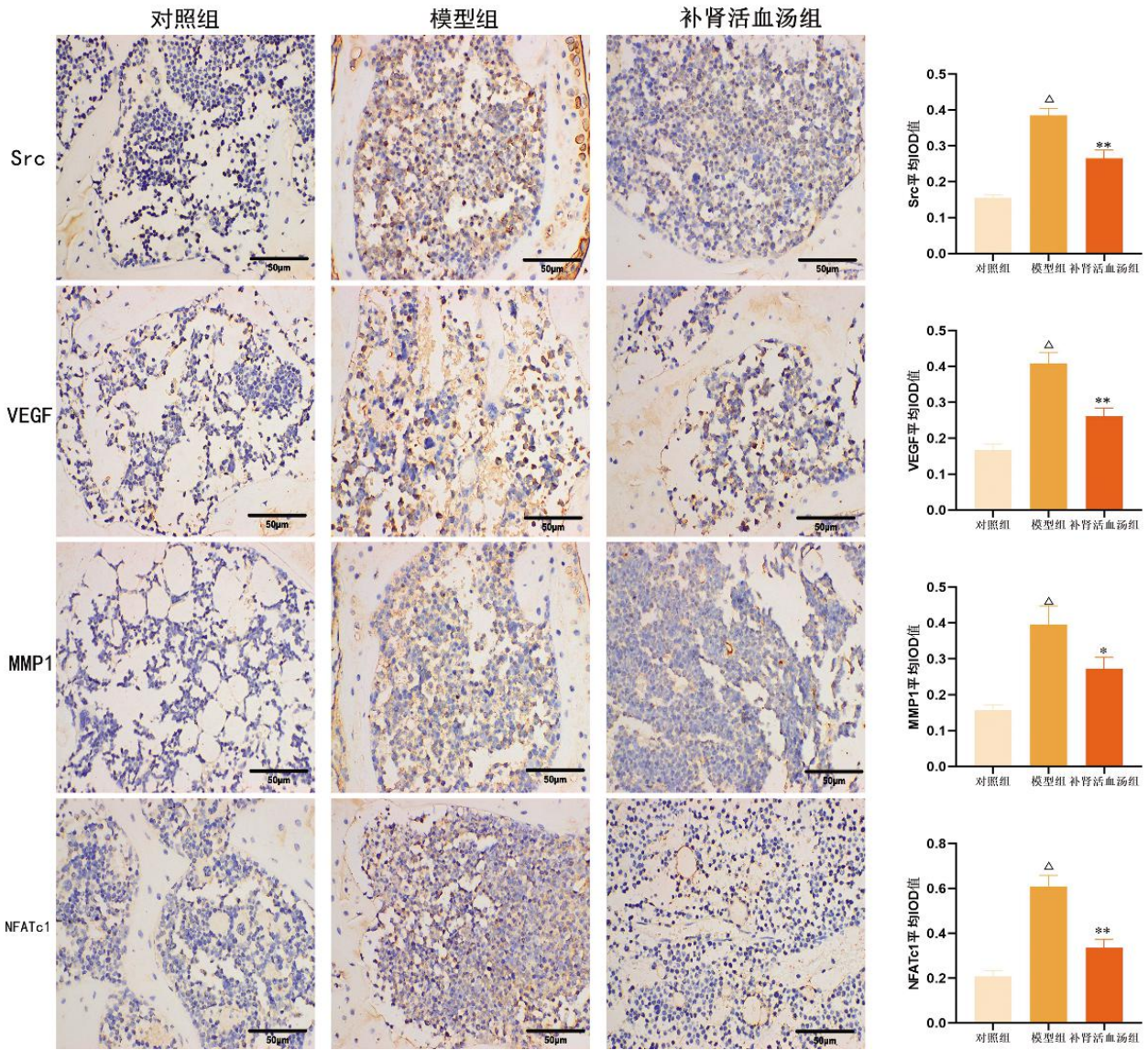


图 7 免疫组化法检测各组 SRC、VEGF、MMP1、NFATc1 表达水平(×400)

注:与对照组相比, <sup>Δ</sup> $P < 0.01$ ;与模型组相比, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

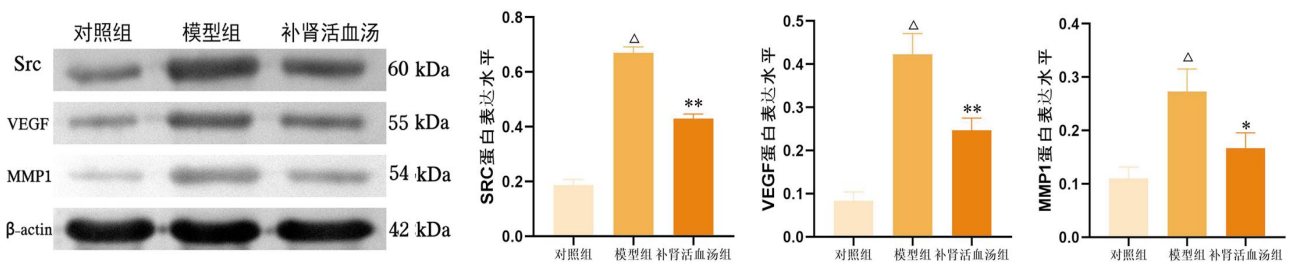


图 8 Western blot 法检测各组 SRC、VEGF、MMP1 蛋白表达水平

注:与对照组相比, <sup>Δ</sup> $P < 0.01$ ;与模型组相比, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

胞产生的细胞因子和生长因子如甲状旁腺激素相关蛋白(parathyroid hormone-related peptide, PTHrP)、IL-6 等刺激成骨细胞产生核因子 κB 配体受体激活因子(receptor or activator of NF-κB ligand, RANKL), RANKL 促进破骨细胞形成进而产生溶骨效应<sup>[13]</sup>;反过来,骨吸收过程中释放的生长因子又促进肿瘤细

胞生长,如血小板衍生生长因子、胰岛素样生长因子等,形成了一个“恶性循环”<sup>[14]</sup>,可见,破骨细胞的骨吸收作用是乳腺癌骨转移中的一个重要环节。

中医学认为,乳腺癌骨转移病属于“骨瘤”“骨蚀”“胫阴疽”等范畴<sup>[15]</sup>,肾主骨生髓,肾虚精亏,骨髓不充则利于癌邪侵犯骨骼。《灵枢·本藏》中记载:“血和



则经脉流行,营复阴阳,筋骨劲强,关节清利矣。”血液往来流利是骨骼强健的保证。补肾活血汤<sup>[16]</sup>由熟地黄、杜仲、枸杞子、补骨脂、菟丝子、当归尾、没药、山茱萸、红花、独活、肉苁蓉组成,全方共奏补肾活血、通络止痛的功效。现代研究表明,补肾活血汤能改善骨质丢失、骨折,抑制破骨细胞活化<sup>[17-19]</sup>,方中红花、补骨脂、枸杞子、没药等多种中药均具有抗肿瘤活性<sup>[20-24]</sup>,该方在治疗乳腺癌骨转移中颇有疗效<sup>[8-9]</sup>。

本研究通过网络药理学,挖掘补肾活血汤治疗乳腺癌骨转移的作用机制,并对所得结果进行实验验证。共获得补肾活血汤治疗乳腺癌骨转移的活性成分 235 个、潜在靶点 949 个、相关通路 179 个。拓扑算法分析筛选 15 个核心靶点(Src、TP53 等)。其中 Degree、Closeness 度值排名第一的核心靶点均为 Src,说明其可能是补肾活血汤治疗乳腺癌骨转移的关键靶点,选其为验证对象。Src 是 Src 家族激酶中的核心家族成员<sup>[25]</sup>,参与细胞增殖、分化、迁移等过程<sup>[26]</sup>,亦对破骨细胞的调控至关重要,抑制 Src 活性会抑制破骨细胞形成,阻止破骨细胞前体从成骨细胞层迁移到骨表面,阻止再吸收坑的形成<sup>[27]</sup>。VEGF 是 Src 重要的下游靶点<sup>[28-29]</sup>,VEGF 诱导可以提高裸鼠骨髓破骨细胞前体的存活率、分化能力和骨吸收活性<sup>[30]</sup>,因此,Src/VEGF 信号通路在骨转移疾病中发挥重要作用。MMP1 与 NFATc1 是该通路下游靶基因<sup>[31-32]</sup>,MMP1 与原发性上皮-间充质转换密切相关<sup>[33]</sup>;且沉默 MMP1 显著减少骨转移灶中破骨细胞数量<sup>[34-35]</sup>。NFATc1 是调控破骨细胞的终末开关,抑制 RANKL、异位表达 NFATc1 的破骨细胞前体仍可分化为破骨细胞;破坏小鼠造血细胞中 NFATc1 表达将诱导小鼠骨量增加和破骨细胞减少<sup>[36-37]</sup>。

实验表明,与对照组相比,模型组裸鼠体质量减轻( $P<0.01$ );胫骨组织切片可见大量肿瘤细胞和炎性细胞浸润;胫骨骨破坏面积百分比显著增加( $P<0.01$ );破骨细胞数量明显增加( $P<0.01$ );胫骨组织 SRC、VEGF、MMP1、NFATc1 表达水平显著升高( $P<0.01$ )。与模型组相比,补肾活血汤组裸鼠体质量显著增加( $P<0.01$ );肿瘤细胞和炎性细胞浸润情况好转;胫骨骨破坏面积百分比降低( $P<0.05$ );破骨细胞数量减少( $P<0.05$ );SRC、VEGF、MMP1、NFATc1 表达水平显著降低( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。因此,补肾活血汤

可能通过抑制 Src/VEGF 轴及下游 MMP1、NFATc1 表达进而发挥治疗乳腺癌骨转移的作用。

综上所述,本研究通过对网络药理学预测结果进行验证,明确了补肾活血汤可能通过下调 Src/VEGF 轴及其下游 MMP1、NFATc1 基因的表达发挥抑制乳腺癌骨转移疾病进展的作用。

## 参考文献

- [1] LAMB R, BONUCCELLI G, OZSVÁRI B, et al. Mitochondrial mass, a new metabolic biomarker for stem-like cancer cells: Understanding WNT/FGF-driven anabolic signaling[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(31): 30453-30471.
- [2] FENG R M, ZONG Y N, CAO S M, et al. Current cancer situation in China: Good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics?[J]. *Cancer Communications*, 2019, 39(1): 22.
- [3] LI B, WANG P, JIAO J, et al. Roles of the RANKL-RANK axis in immunity-implications for pathogenesis and treatment of bone metastasis[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 824117.
- [4] WANG R, ZHU Y Y, LIU X X, et al. The clinicopathological features and survival outcomes of patients with different metastatic sites in stage IV breast cancer[J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 1-12.
- [5] SONG X, WEI C, LI X. The signaling pathways associated with breast cancer bone metastasis[J]. *Frontiers in Oncology*, 2022, 12: 855609.
- [6] 王家辉,蒋林兰,沈 赞.乳腺癌骨转移研究的新进展及展望:从机制到临床[J].*中国癌症杂志*,2022,32(2):172-176.
- [7] 刘 军,梁 惠.填精益髓止痛方联合中药热奄包治疗乳腺癌骨转移疼痛的临床观察[J].*中医药导报*,2020,26(16):115-118.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 林明曦,张 剑.乳腺癌骨转移分子机制的研究进展[J].*肿瘤*, 2019,39(9):767-774.
- [11] LIANG Y R. Metastatic heterogeneity of breast cancer: Molecular mechanism and potential therapeutic targets[J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2020, 60: 14-27.
- [12] FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZ-GIL I, ALOBERA-GRACIA M A, del-CANTO-PINGARRÓN M, et al. Physiological bases of bone regeneration II: The remodeling process[J]. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, 2006, 11(2): E151-E157.
- [13] BROOK N. Breast cancer bone metastases: Pathogenesis and therapeutic targets[J]. *The International Journal of Biochemistry &*

- Cell Biology, 2018, 96: 63–78.
- [14] SAAD F, et al. SRC kinase inhibition: Targeting bone metastases and tumor growth in prostate and breast cancer[J]. *Cancer Treatment Reviews*, 2010, 36(2): 177–184.
- [15] 毛 昫,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.
- [16] 鄂 远,王雨辰.基于 SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 通路探讨补肾活血汤对骨质疏松大鼠骨折愈合的促进作用[J].*中医药导报*,2021,27(12): 10–14.
- [17] 韩 杰,任国武,莫 坚,等.补肾活血类中药复方干预激素性股骨头缺血性坏死的相关信号通路及作用靶点[J].*中国组织工程研究*,2022,26(11):1758–1764.
- [18] 侯 伟,杜 斌.中医药治疗骨质疏松症的研究进展[J].*世界中西医结合杂志*,2021,16(10):1956–1960.
- [19] 黄季红,朱 波,李学家,等.补肾活血汤对激素性股骨头坏死模型大鼠神经肽 Y 系统的影响[J].*中医杂志*,2021,62(14):1247–1252.
- [20] 王佐梅,肖洪彬,李雪莹,等.中药红花的药理作用及临床应用研究进展[J].*中华中医药杂志*,2021,36(11):6608–6611.
- [21] 张 莹,吕惠子.补骨脂的化学成分和药理作用研究进展[J].*临床医药文献电子杂志*,2020,7(30):195–196.
- [22] 宋艳梅,张启立,崔治家,等.枸杞子化学成分和药理作用的研究进展及质量标志物的预测分析[J].*华西药学杂志*,2022,37(2): 206–213.
- [23] 郭倩倩,柳敏娜,刘天龙.没药甾酮药理作用研究进展[J].*中医学报*,2022,50(4):115–119.
- [24] 高宏伟,李玉萍,李守超.杜仲的化学成分及药理作用研究进展[J].*中医药信息*,2021,38(6):73–81.
- [25] WANG J, ZHUANG S G. Src family kinases in chronic kidney disease[J]. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 2017, 313(3): F721–F728.
- [26] 曾 琴,聂敏海.Src 激酶在肿瘤侵袭和转移中的作用研究进展[J].*新乡医学院学报*,2021,38(3):293–295,300.
- [27] MIYAZAKI T, SANJAY A, NEFF L, et al. Src kinase activity is essential for osteoclast function[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(17): 17660–17666.
- [28] CLAESSEON-WELSH L, WELSH M. VEGFA and tumour angiogenesis[J]. *Journal of Internal Medicine*, 2013, 273(2): 114–127.
- [29] LIU X, GUO X, LI H, et al. Src/STAT3 signaling pathways are involved in KAI1-induced down regulation of VEGF-C expression in pancreatic cancer[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2016, 13(6): 4774–4778.
- [30] YANG Q L, MCHUGH K P, PATNTIRAPONG S, et al. VEGF enhancement of osteoclast survival and bone resorption involves VEGF receptor-2 signaling and beta3-integrin[J]. *Matrix Biology*, 2008, 27(7): 589–599.
- [31] JANG G H, et al. Differential functions of genes regulated by VEGF-NFATc1 signaling pathway in the migration of pulmonary valve endothelial cells[J]. *FEBS Letters*, 2010, 584(1): 141–146.
- [32] WANG S, UMRATH F, CEN W, et al. Angiogenic potential of VEGF mimetic peptides for the biofunctionalization of collagen/hydroxyapatite composites[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(10): 1538–1541.
- [33] CANER A, ASIK E, OZPOLAT B. SRC signaling in cancer and tumor microenvironment[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2021, 1270: 57–71.
- [34] LU X, WANG Q, HU G, et al. ADAMTS1 and MMP1 proteolytically engage EGF-like ligands in an osteolytic signaling cascade for bone metastasis[J]. *Genes & Development*, 2009, 23(16): 1882–1894.
- [35] OHSHIBA T, MIYAURA C, INADA M, et al. Role of RANKL-induced osteoclast formation and MMP-dependent matrix degradation in bone destruction by breast cancer metastasis[J]. *British Journal of Cancer*, 2003, 88(8): 1318–1326.
- [36] TAKAYANAGI H, KIM S, KOGA T, et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts[J]. *Developmental Cell*, 2002, 3(6): 889–901.
- [37] ALIPRANTIS A O, UEKI Y, SULYANTO R, et al. NFATc1 in mice represses osteoprotegerin during osteoclastogenesis and dissociates systemic osteopenia from inflammation in cherubism[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2008, 118(11): 3775–3789.
- [38] 张晓萍,白 莉,李彩霞,等.2020年版《中华人民共和国药典》外用方制剂作用特点分析[J].*中国实验方剂学杂志*,2022,28(7): 207–217.

(本文编辑 苏 维)