

本文引用: 毛 昫, 丁致薰, 付 玲, 胡贝尔, 朱世杰, 曹 文. 不同补肾类中药方含药血清抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 间质-上皮转化的机制研究比较[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(8): 1434-1442.

## 不同补肾类中药方含药血清抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 间质-上皮转化的机制研究比较

毛 昫<sup>1</sup>, 丁致薰<sup>1</sup>, 付 玲<sup>1</sup>, 胡贝尔<sup>1</sup>, 朱世杰<sup>2\*</sup>, 曹 文<sup>1\*</sup>

1. 湖南中医药大学第二附属医院肿瘤血液科, 湖南 长沙 410005; 2. 中国中医科学院望京医院肿瘤科, 北京 100102

**[摘要]** **目的** 探讨补肾阳方、补肾阴方、阴阳双补方含药血清干预乳腺癌细胞间质-上皮转化的疗效差异与分子机制。**方法** 建立乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和成骨前体细胞 MC3T3-E1 共培养模型, 分组为对照组、模型组、补肾阳方组、补肾阴方组、阴阳双补方组, 其中对照组为乳腺癌细胞单培养, 其他组为乳腺癌细胞与成骨前体细胞共培养模型。对照组和模型组培养液中加入 10% 普通血清, 补肾阳方组、补肾阴方组、阴阳双补方组培养液中加入 10% 相应含药血清。给药干预 24、48、72 h 后, 采用 CCK-8 法检测乳腺癌细胞活力; 结晶紫染色观察细胞形态。共培养 48 h 后, 细胞划痕实验检测乳腺癌细胞迁移能力, 流式细胞术检测乳腺癌细胞周期和凋亡; 培养 48 h 后 qRT-PCR 和 Western blot 检测 E-钙黏蛋白(E-cad)、N-钙黏蛋白(N-cad)、缝隙连接蛋白 43(Cx43)和 dickkopf 相关蛋白 1(Dkk-1) mRNA 相对表达水平和蛋白表达量。**结果** 与对照组比较, 模型组乳腺癌细胞活力增加( $P<0.05$ )、细胞总凋亡率下降( $P<0.05$ ), 细胞周期检测示 G<sub>2</sub>/M 期细胞增多( $P<0.05$ ), G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期、S 期细胞减少( $P<0.05$ ); E-cad、N-cad、Cx43 和 Dkk-1 mRNA 相对表达水平和蛋白表达量均上升( $P<0.05$ )。与模型组比较, 补肾阳方组、补肾阴方组、阴阳双补方组细胞活力、迁移愈合率降低( $P<0.05$ ), 细胞总凋亡率增加( $P<0.05$ ), 细胞周期检测示 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞增多( $P<0.05$ ), G<sub>2</sub>/M 期细胞减少( $P<0.05$ ); E-cad、N-cad、Cx43 和 Dkk-1 mRNA 相对表达水平和蛋白表达量下降( $P<0.05$ )。**结论** 成骨前体细胞 MC3T3-E1 通过间质-上皮转化促进乳腺癌细胞 MDA-MB-231 存活; 采用补肾类中药干预共培养模型后, 可抑制乳腺癌细胞活力、促进凋亡, 机制与抑制间质-上皮转化进程, 下调关键蛋白 mRNA(E-cad、N-cad、Cx43 和 Dkk-1) 的表达相关。

**[关键词]** 乳腺癌; 骨转移; MDA-MB-231 细胞; MC3T3-E1 细胞; 间质-上皮转化; 补肾类中药

**[中图分类号]** R285.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.08.006

## Comparative study on the mechanisms of inhibiting mesenchymal-epithelial transition in breast cancer MDA-MB-231 cells by drug-containing sera from different kidney-tonifying Chinese medicine formulas

MAO Yun<sup>1</sup>, DING Zhixun<sup>1</sup>, FU Ling<sup>1</sup>, HU Bei'er<sup>1</sup>, ZHU Shijie<sup>2\*</sup>, CAO Wen<sup>1\*</sup>

1. Department of Oncology and Hematology, The Second Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China; 2. Oncology Department, Wang Jing Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100029, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the efficacy differences and molecular mechanisms of drug-containing sera from Bushenyang Formula (BSYAF), Bushenyin Formula (BSYIF), and Yin-yang Shuangbu Formula (YYSBF) in intervening mesenchymal-epithelial transition (MET) in breast cancer cells. **Methods** A co-culture model of breast cancer cells MDA-MB-231 and osteoblast precursor cells MC3T3-E1 was established. Groups included the control group, model group, BSYAF group, BSYIF group, and

**[收稿日期]** 2025-06-03

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81973640); 国家自然科学基金青年项目(82405165); 湖南省自然科学基金青年项目(2023JJ40497); 湖南省教育厅优秀青年项目(22B0356); 长沙市自然科学基金项目(kq2403109); 湖南中医药大学校级重点课题(2022XYLH020)。

**[通信作者]** \* 曹 文, 女, 博士, 主任医师, E-mail: cwfly2008@163.com; 朱世杰, 男, 博士, 主任医师, E-mail: 13381058340@163.com。

YYSBF group. In the control group, breast cancer cells were cultured alone, while the other groups adopted the co-culture model. The culture medium of the control group and the model group was supplemented with 10% normal serum, while that of the BSYAF, BSYIF, and YYSBF groups was supplemented with 10% corresponding drug-containing sera. After 24, 48, and 72 hours of drug intervention, the viability of breast cancer cells was determined using the CCK-8 assay, and cell morphology was observed through crystal violet staining. After 48 hours of co-culture, the migration ability of breast cancer cells was assessed using a wound healing assay, and the cell cycle and apoptosis of breast cancer cells were tested by flow cytometry. After 48 hours of culture, the relative mRNA expression levels and protein expression amounts of E-cadherin (E-cad), N-cadherin (N-cad), connexin 43 (Cx43), and dickkopf-related protein 1 (Dkk-1) were measured by qRT-PCR and Western blot respectively. **Results** Compared with the control group, the breast cancer cell viability in the model group increased ( $P<0.05$ ), the total cell apoptosis rate decreased ( $P<0.05$ ). Cell cycle analysis showed an increase in the number of cells in the G<sub>2</sub>/M phase ( $P<0.05$ ) and a decrease in the number of cells in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> and S phases ( $P<0.05$ ). The relative mRNA expression levels and protein expression amounts of E-cad, N-cad, Cx43, and Dkk-1 all increased ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, the cell viability and migration healing rate in the BSYAF, BSYIF, and YYSBF groups decreased ( $P<0.05$ ), while the total cell apoptosis rate increased ( $P<0.05$ ). Cell cycle analysis revealed an increase in the number of cells in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase ( $P<0.05$ ) and a decrease in the G<sub>2</sub>/M phase ( $P<0.05$ ). The relative mRNA expression levels and protein expression amounts of E-cad, N-cad, Cx43, and Dkk-1 decreased ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Osteoblast precursor cells MC3T3-E1 promote the survival of breast cancer cells MDA-MB-231 through mesenchymal-epithelial transition. After intervention with kidney-tonifying Chinese medicines in the co-culture model, the viability of breast cancer cells can be effectively inhibited and apoptosis can be promoted. The mechanism is related to the downregulation of the expression of key proteins and mRNAs (E-cad, Cx43, and Dkk-1) involved in mesenchymal-epithelial transition.

[**Keywords**] breast cancer; bone metastasis; MDA-MB-231 cells; MC3T3-E1 cells; mesenchymal-epithelial transition; kidney-tonifying Chinese medicines

骨转移是恶性肿瘤的常见并发症,65%~75%晚期乳腺癌和前列腺癌患者均会发生骨转移<sup>[1]</sup>。骨转移常常伴有疼痛、高钙血症、病理性骨折、脊髓压迫等骨相关事件,严重影响患者生活质量<sup>[2-3]</sup>。目前的治疗仅能延缓骨转移进展,尚缺乏根治性措施,研究骨微环境的变化及分子机制倍受重视。骨转移早期阶段,骨微环境和乳腺癌细胞的相互作用是发生骨转移的重要原因,其中癌细胞和成骨细胞之间相互调控促进肿瘤细胞的定植、存活和增殖,可加速骨转移进程<sup>[4-6]</sup>。

成骨细胞通过介导间质-上皮转化(mesenchymal epithelial transition, MET)促进乳腺癌细胞异位存活<sup>[7]</sup>。骨微环境中乳腺癌细胞优先向成骨细胞周边迁移,并最终通过异型黏附和缝隙连接进行定植<sup>[8]</sup>。研究表明,肿瘤转移过程中存在 MET 现象,过表达 E-钙黏着蛋白(E-cadherin, E-cad)的肿瘤细胞增殖能力更强,迁移性较低,易于形成转移灶<sup>[9]</sup>。成骨细胞通过分泌胶原蛋白激活自然杀伤细胞上的白细胞关联免疫球蛋白样受体 1,抑制自然杀伤细胞的活性,从而保护肿瘤细胞免受免疫杀伤促进骨转移<sup>[10]</sup>。

肾主骨、生髓,肾中精气的盛衰直接影响骨细胞的功能及状况。肾气不足易造成癌毒侵袭,形成骨转移瘤,故临床常采用补肾填精、补肾壮骨、补肾健脾等法防治骨转移<sup>[3,11]</sup>。如左归丸能打破肿瘤-成骨细胞-破骨细胞的恶性循环抑制乳腺癌骨转移<sup>[12]</sup>。吴春宇等<sup>[13]</sup>研究结果显示,温肾壮骨方能抑制乳腺癌骨转移溶骨性恶性循环,降低骨质破坏进程。本研究团队总结全国名老中医李佩文教授临床用药经验时发现补肾阳方、补肾阴方、阴阳双补方对骨转移的疗效具有差异性,其中阴阳双补方的临床疗效更佳,能有效降低骨转移患者血清碱性磷酸酶水平,缓解疼痛,改善生活质量<sup>[14]</sup>。本研究旨在从成骨细胞调控乳腺癌细胞的角度探索骨转移微环境的变化,以及明确补肾阳方、补肾阴方、阴阳双补方的疗效。

## 1 材料

### 1.1 细胞及动物

于北京维通利华动物技术有限公司购入 SPF 级健康的 SD 大鼠 40 只,体质量 180~200 g,自由摄取水和食物,饲养于中国中医科学院医学实验中心动物房,温度(25±3)℃,相对湿度 55%±10%,12 h 光暗交替,自由摄食饮水,每周更换 2 次垫料,实验操作

经中国中医科学院医学实验中心动物伦理委员会审批(伦理批号:LLBH-202311040003)。人源性乳腺癌细胞 MDA-MB-231、成骨前体细胞 MC3T3-E1(批号:1101HUM-PUMC000014、4201MOU-CCTCC00188)购自国家生物医学实验细胞资源库。

## 1.2 主要实验试剂

CCK-8 试剂盒(日本同仁化学研究所,批号:7635); Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司,批号:KGA2431); Transwell 小室(美国 Merck millipore 公司,批号:3422); 结晶紫(上海碧云天生物技术有限公司,批号:093116170538); 胎牛血清(美国 Hyclone 公司,批号:SH31441); Trizol 试剂盒、RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 转膜液(上海碧云天生物技术有限公司,批号:P0012、P2234、08645、6587H), E-cad(批号:0874-1-AP)、N-钙黏着蛋白(N-cadherin, N-cad)(批号:30803-1-AP)、缝隙连接蛋白 43(Connexin43, Cx43)(批号:15386-1-AP)、Dickkopf 相关蛋白 1(Dickkopf-related protein 1, Dkk-1)(批号:21112-1-AP)抗体均购自美国 Proteintech 公司;青霉素/链霉素溶液(双抗)(美国 Hyclone 公司,批号:15142243)。

## 1.3 主要仪器

流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司,型号:Canto II); 荧光定量 PCR 仪、电泳仪(美国 BIO-RAD 公司,型号:CFX384、Mini-Protean); 显微镜照相系统(日本 Olympus 公司,型号:CKX53); 低速离心机(美国 Thermo 公司,型号:TD5A); 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司,型号:SpectraMax)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

将 MDA-MB-231 细胞和 MC3T3-E1 细胞复苏,分别加入含 10%胎牛血清的 DMEM、 $\alpha$ -MEM 培养液置于 37 °C、含 5%CO<sub>2</sub> 孵箱中培养,48~72 h 换液一次,待细胞汇合约 90%时,用 0.25%胰蛋白酶消化、传代。待细胞生长稳定、呈对数期生长时进行实验。

### 2.2 含药血清制备

从中国中医科学院望京医院购入补肾阳方(淫羊藿、补骨脂、肉苁蓉各 30 g)、补肾阴方(熟地黄、山茱萸、山药各 30 g)、阴阳双补方(熟地黄、山茱

萸、山药、淫羊藿、补骨脂、肉苁蓉各 15 g)。取 SPF 级健康的雄性 SD 大鼠 40 只,随机分成对照组、补肾阳方组、补肾阴方组、阴阳双补方组 4 个组。根据人与大鼠体表面积折算方法<sup>[15]</sup>计算后,实验组按生药量 9.26 g/(kg·d)给予大鼠灌胃,对照组给予同体积生理盐水灌胃,每天 1 次,连续灌胃 5 d,第 6 天继续灌胃 1 次,灌胃后 1 h 采用 3%戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉取血,取血前禁食 16 h,不禁水。所取全血于室温下静置 3 h,于 4 °C 下 3 000 r/min 离心 15 min(离心半径 8 cm),分离血清,将组内血清混合,56 °C 水浴箱中灭活 30 min,细胞室内 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤分装,-80 °C 冰箱保存备用,根据前期筛选,10%的含药血清为最佳浓度剂量<sup>[16]</sup>。

### 2.3 建立细胞模型及分组

取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞和 MC3T3-E1 细胞进行计数,将细胞悬浮液稀释至  $5 \times 10^4$  个/mL。建立共培养模型:MDA-MB-231 细胞 1 mL 并注入 24 孔板中,采用 transwell 小室(孔径 0.4  $\mu$ m)盖于 24 孔板上面,小室中接种相同密度及体积 MC3T3-E1 细胞,使得小室上、下两面的细胞不直接接触但允许分泌的蛋白及因子可自由通过小室;对照组中 transwell 小室上、下两层均接种  $5 \times 10^4$  个/mL 的 MDA-MB-231 细胞 1 mL,置于恒温培养箱中培养,显微镜下观察各组小室上、下层细胞生长情况,定时更换培养基。分为对照组、模型组、补肾阳方组、补肾阴方组、阴阳双补方组,每组设 3 个复孔。模型构建 24 h 后,补肾阳方组、补肾阴方组、阴阳双补方组分别在 transwell 小室下层加入补肾阳方、补肾阴方、阴阳双补方 10%的含药血清 1 mL;对照组和模型组在 transwell 小室下层分别加入 10% DMEM 培养液 1 mL。

### 2.4 结晶紫染色观察细胞形态

分组参照“2.3”,给药干预 48 h 后,行结晶紫染色。弃去培养液,并用 PBS 溶液清洗 3 遍。在各组中加入 1 mL 4%多聚甲醛,固定 8~10 min。多聚甲醛固定后弃去废液,PBS 清洗 3 min,重复 3 次,加入 0.1%结晶紫溶液,在室温下静置 8 min,用超纯水反复清洗多余的结晶紫染料,室温下晾干,并放置在倒置显微镜下观测并随机挑选 5 个视野进行观测。

### 2.5 CCK-8 法测定细胞活力

分组参照“2.3”,给药干预 24、48、72 h 后,弃去

培养基,加入 CCK-8 工作液,37 °C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱避光孵育 2 h,酶标仪检测 450 nm 波长处各孔 OD 值。按照以下公式:细胞增殖率=(实验组 OD 值-对照组 OD 值)/对照组 OD 值×100%。

## 2.6 细胞划痕实验检测细胞迁移能力

分组参照“2.3”,MDA-MB-231 细胞接种 24 孔板中,建立共培养模型后待贴壁生长整个底部时,使用 200 μL 枪头垂直于板面在 24 孔板中划出直径约 1 mm 的直线,PBS 清洗 24 孔板以洗去游离细胞,分组加入含药血清进行培养,在划痕后的 0、24、48 h 分别在显微镜下拍照记录每孔划痕直径。

## 2.7 流式细胞仪检测细胞凋亡和周期

分组参照“2.3”,给药干预 48 h 后,检测 MDA-MB-231 细胞凋亡和周期。细胞凋亡:采用不含 EDTA 胰酶消化并搜集细胞,PBS 洗涤 2 次,500 μL 的 Binding Buffer 悬浮细胞,5 μL Annexin V-FITC 混匀后,再加入 5 μL Propidium Iodide 混匀,室温避光反应 10 min,上机检测。细胞周期:采用不含 EDTA 胰酶消化并搜集细胞,PBS 洗涤细胞 2 次,调整细胞浓度为 1×10<sup>6</sup> mL,70%冷乙醇 500 μL 固定 2 h,4 °C 保存,100 μL RNase A 37 °C 水浴 30 min,400 μL PI 染色混匀,4 °C 避光 30 min,上机检测。

## 2.8 Western blot 检测间质-上皮转化相关蛋白表达水平

分组参照“2.3”,给药干预 48 h 后,弃掉培养液,PBS 漂洗 2 次,加入 300 μL 细胞裂解液 RIPA,反复冻融裂解 3 次,按照 BCA-200 蛋白定量试剂盒说明书进行蛋白定量,蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离后,转移至 PVDF 膜上用封闭液封闭后,分别加入 1:1 000 的各抗体,加入 1:10 000 HRP 标记的羊抗兔和羊抗鼠二抗,TBST 漂洗后 ECL 显色,结果用图像分析软件 Scion Image beta 4.0 分析灰度值。

## 2.9 qRT-PCR 检测间质-上皮转化相关基因表达水平

分组参照“2.3”,给药干预 48 h 后进行 qRT-PCR 检测。提取细胞总 RNA:待分组给药干预 48 h 后,弃掉培养液,采用 RNAiso Plus 提取 MC3T3-E1 总 RNA。RNA 浓度及纯度检测:用 RNase-free 水调零后,将样品取 1 μL 稀释 50 倍在微量核酸仪器上进行测量,记录 A260/A280、260/230 值及浓度。选取

A260/A280 值 1.8~2.1、260/230 值大于 2.0 的样品。逆转录反应制备 cDNA:按照 TaKaRa PrimeScript™ Reagent Kit 说明书合成 cDNA -20 °C 保存备用。PCR 扩增 cDNA:按照 SYBR Premix Ex Taq™ II 说明书添加 PCR 反应体系,反应条件为 95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 31 s,进行 40 个循环扩增目的基因,检测相关基因相对表达水平,合成的引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 的引物序列

Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

名称	引物序列	长度/bp
E-cad	正向:TCCTCTATFCTCATGCCGTGT	125
	反向:GTAAACTCTGGCCTGTTGTCA	
N-cad	正向:CCATCATCGCTATCCTTCTGT	130
	反向:CTCTTACATCATCTTCTGGGTCA	
Cx 43	正向:ACTGAGCCCATCAAAGACTT	43
	反向:CCAGTGACCAGCTTGTACCCA	
Dkk1	正向:TTGACAACTACCAGCCCTACCCTT	35
	反向:GTGCCTCATGCAGCGCTTCC	
β-actin	正向:CTCCTGAGCGCAAGTACTCT	43
	反向:TACTCCTGCTTGCTGATCCAC	

## 2.10 统计学分析

运用 SPSS 27.0 软件进行统计分析,计量结果以“ $\bar{x} \pm s$ ”形式显示。若计量资料服从正态分布且方差齐,多组间比较行单因素方差分析,两两比较行独立样本 *t* 检验;方差不齐时两两比较行 *Dunnnett's T3* 检验,不服从正态分布时采用非参数秩和检验,以 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 各组细胞形态学观察

对照组 MDA-MB-231 细胞呈贴壁生长状态,细胞呈梭形、胞体圆润透亮,分布均匀;模型组中 MDA-MB-231 细胞生长速度加快,细胞密度增加。补肾阳方组、补肾阴方组较模型组 MDA-MB-231 细胞数目减少,细胞间连接减少;阴阳双补方组 MDA-MB-231 细胞数目明显减少更为明显,细胞间连接减少,胞体皱缩、空隙增加,培养液中可见少量絮状漂浮的细胞碎片。详见图 1。

### 3.2 各组细胞活力比较

与对照组比较,24、48、72 h 时模型组 MDA-

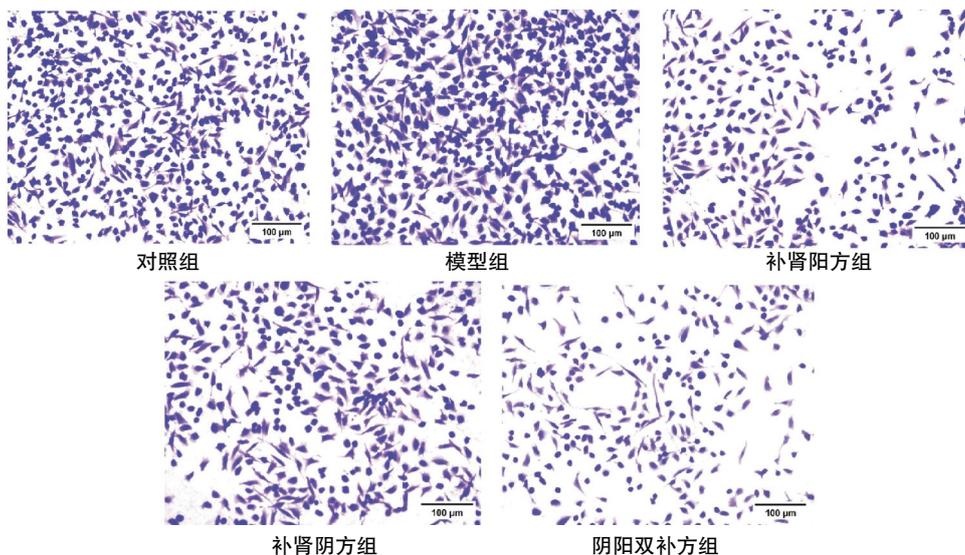


图 1 补肾类中药方影响乳腺癌细胞形态(结晶紫染色,×200)

Fig.1 Effects of the kidney-tonifying CM formulas on the morphology of breast cancer cells (crystal violet staining, × 200)

MB-231 细胞活力均明显升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,24、48、72 h 时补肾阳方组、补肾阴方组、阴阳双补方组均不同程度抑制乳腺癌细胞活力( $P<0.05$ )。详见表 2。

### 3.3 各组细胞迁移能力比较

与对照组比较,模型组 48 h 细胞迁移愈合率增强( $P<0.05$ )。与模型组比较,补肾阳方组、补肾阴方组、阴阳双补方组 24、48 h 细胞迁移愈合率降低( $P<0.05$ )。详见图 2。

表 2 各组 MDA-MB-231 细胞增殖率情况

Table 2 The proliferation rates of MDA-MB-231 cells in each group

分组	干预 24 h/%	干预 48 h/%	干预 72 h/%
对照组	99.91±0.27	110.59±1.84	112.07±1.84
模型组	114.28±2.75*	130.55±1.66*	133.28±1.70*
补肾阳方组	107.70±1.30*#	101.54±0.88*#	68.80±1.25*#
补肾阴方组	109.80±1.65*#	102.12±1.84*#	72.94±0.55*#
阴阳双补方组	103.26±2.19#	99.79±1.54*#	64.20±1.25*#

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

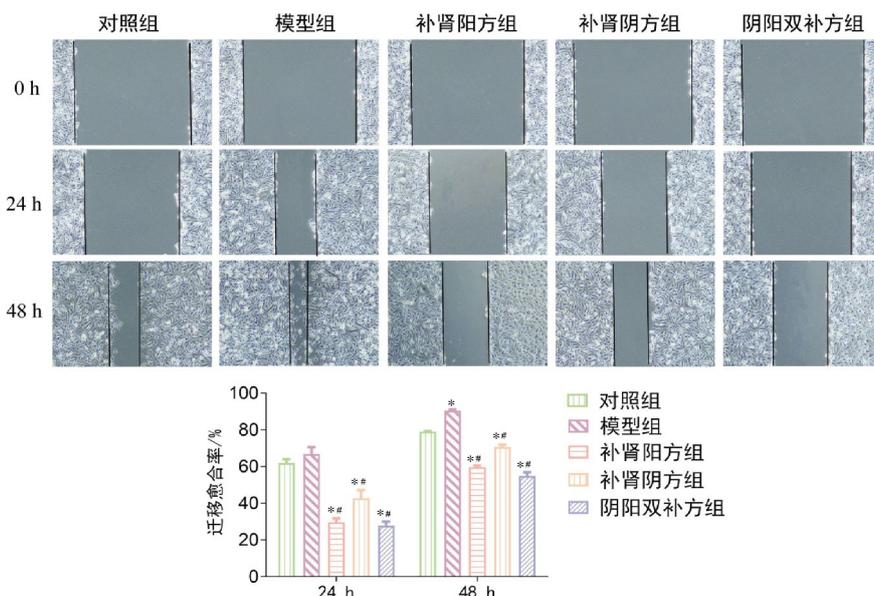


图 2 补肾类中药方抑制乳腺癌细胞的迁移情况

Fig.2 Inhibitory effects of kidney-tonifying CM formulas on the migration of breast cancer cells

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

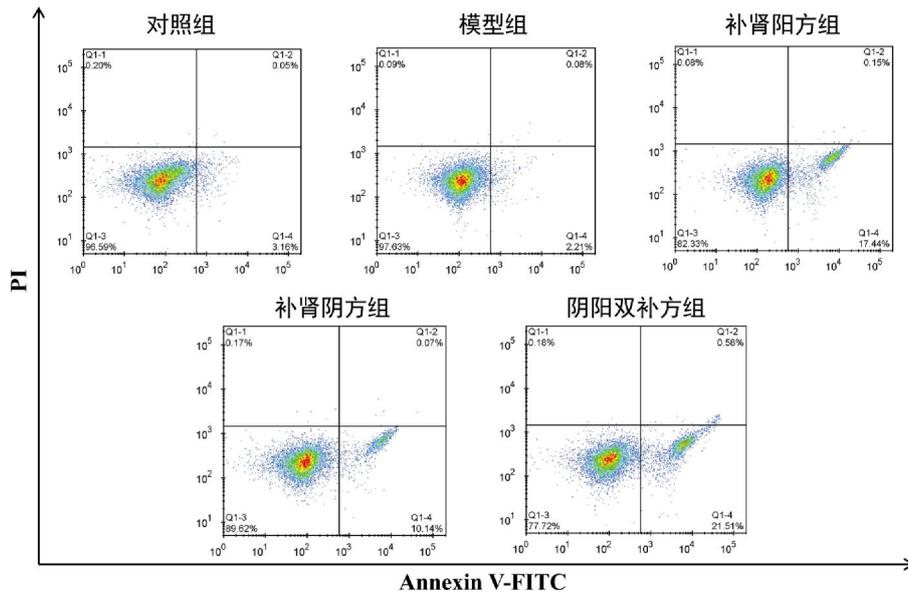


图 3 补肾类中药方促进乳腺癌细胞凋亡

Fig.3 Promoting effects of kidney-tonifying CM formulas on the apoptosis of breast cancer cells

3.4 各组细胞凋亡率比较

与对照组比较,模型组细胞晚期凋亡率和总凋亡率下降( $P<0.05$ );与模型组比较,干预 48 h 后补肾阳方组、补肾阴方组、阴阳双补方组晚期凋亡率和总凋亡率均升高( $P<0.05$ ),阴阳双补方组早期凋亡率升高( $P<0.05$ )。详见图 3、表 3。

3.5 各组细胞周期比较

与对照组比较,MDA-MB-231 细胞模型组  $G_2/M$  期增加( $P<0.05$ ), $G_0/G_1$  期、S 期减少( $P<0.05$ )。与

表 3 各组乳腺癌细胞凋亡率比较

Table 3 Comparison of apoptosis rates in each group of breast cancer cells

分组	早期凋亡率/%	晚期凋亡率/%	总凋亡率/%
对照组	0.19±0.06	3.05±0.12	3.24±0.07
模型组	0.17±0.08	2.18±0.18*	2.35±0.20*
补肾阳方组	0.22±0.10	17.56±0.16*#	17.77±0.07*#
补肾阴方组	0.12±0.04	10.28±0.17*#	10.39±0.20*#
阴阳双补方组	0.57±0.32*#	21.58±0.84*#	22.15±0.56*#

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

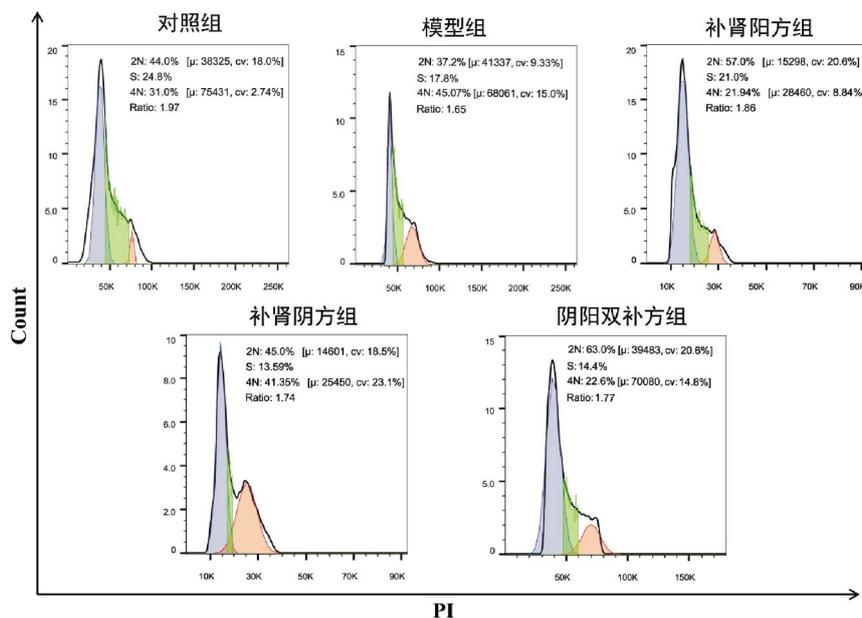


图 4 补肾类中药方阻滞乳腺癌细胞周期

Fig.4 Blocking effects of kidney-tonifying CM formulas on the cell cycle of breast cancer cells

模型组比较,补肾阳方组、阴阳双补方组 MDA-MB-231 细胞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期均增加( $P<0.05$ ),G<sub>2</sub>/M 期细胞均降低( $P<0.05$ );补肾阳方组 MDA-MB-231 细胞 S 期升高( $P<0.05$ ),阴阳双补方组 MDA-MB-231 细胞 S 期降低( $P<0.05$ )。详见图 4、表 4。

表 4 各组乳腺癌细胞周期情况比较

Table 4 Comparison of cell cycle status of breast cancer cells among different groups

分组	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 期/%	S 期/%	G <sub>2</sub> /M 期/%
对照组	44.53±0.89	22.83±2.07	32.32±1.00
模型组	37.33±0.61*	16.43±1.26*	46.27±1.40*
补肾阳方组	54.50±2.45**	20.93±2.00#	25.23±5.15**
补肾阴方组	47.17±1.85#	15.00±1.51*	37.83±3.07**
阴阳双补方组	62.77±0.21**	12.77±1.61**	24.50±1.82**

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

### 3.6 各组细胞间质-上皮转化关键蛋白表达水平比较

与对照组比较,模型组 MDA-MB-231 细胞的 E-cad、Cx43、Dkk-1 蛋白及 MC3T3-E1 细胞的 N-cad 蛋白表达均升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,补肾阳方组、补肾阴方组、阴阳双补方组干预 48 h 后,MDA-MB-231 细胞的 E-cad、Cx43、Dkk-1 蛋白及 MC3T3-E1 细胞表达的 N-cad 蛋白表达均降低( $P<0.05$ )。详见图 5。

### 3.7 各组细胞间质-上皮转化关键基因相对表达水平比较

与对照组比较,模型组 MDA-MB-231 细胞的 E-cad、Cx43、Dkk-1 蛋白,MC3T3-E1 细胞的 N-cad 蛋白表达升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,补肾阳方组、补肾阴方组、阴阳双补方组干预 48 h 后 MDA-MB-231 细胞 E-cad、Cx43、Dkk-1 mRNA 表达降低( $P<0.05$ ),MC3T3-E1 细胞 N-cad mRNA 表达降低( $P<0.05$ )。详见表 5。

表 5 各组间质-上皮转化关键基因 mRNA 相对表达水平的影响

Table 5 Effects on relative mRNA expression levels of key genes in mesenchymal-epithelial transition among different groups

分组	E-cad	N-cad	Cx43	Dkk-1
对照组	1.04±0.06	1.04±0.04	1.14±0.13	1.07±0.07
模型组	2.21±0.05*	2.08±0.16*	2.42±0.21*	2.76±0.06*
补肾阳方组	0.45±0.02**	0.35±0.01**	0.47±0.01**	0.56±0.02**
补肾阴方组	0.65±0.01**	0.68±0.01**	0.73±0.05**	0.76±0.01**
阴阳双补方组	0.21±0.01**	0.46±0.01**	0.24±0.02**	0.27±0.02**

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

## 4 讨论

中医药防治乳腺癌骨转移确有疗效,能够早期预防骨转移的发生,延缓骨转移进展,改善患者生活质量<sup>[17]</sup>。中医药对骨转移的调节作用呈多靶点、多途

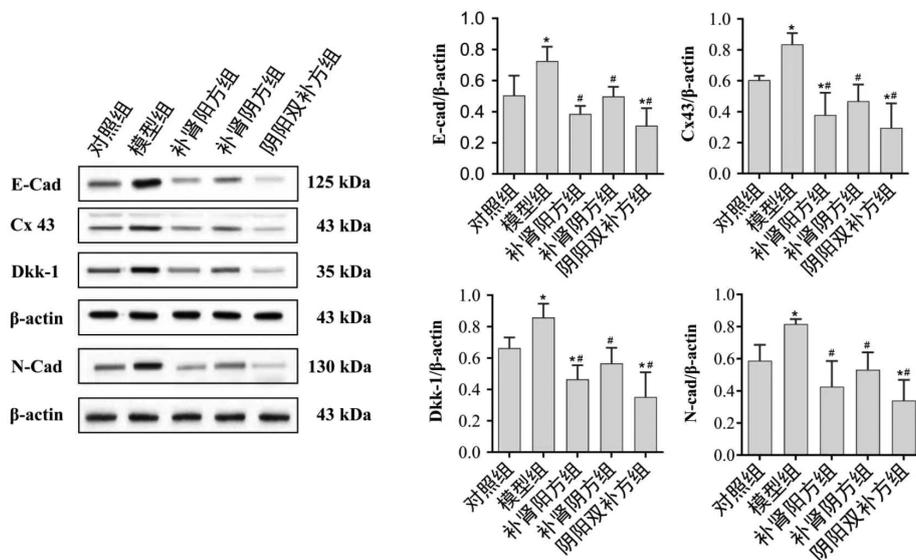


图 5 补肾类中药方对间质-上皮转化关键蛋白的影响

Fig.5 Effects of kidney-tonifying CM formulas on key proteins in mesenchymal-epithelial transition

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

径的特点,前期研究发现淫羊藿-肉苁蓉可以通过干预间隙连接、黏附连结等方式影响乳腺癌细胞、成骨细胞的存活、分化和成熟等,并对 E-cad、N-cad、Dkk-1 等基因及其表达的蛋白具有调节作用<sup>[18]</sup>。

骨微环境中成骨细胞诱导乳腺癌细胞 MET 转化,促进癌细胞的定植和存活<sup>[19]</sup>。在骨转移早期阶段,原发灶癌细胞由上皮表型转化为间充质表型赋予肿瘤转移和侵袭能力<sup>[20]</sup>。癌细胞定植于骨微环境后,成骨细胞诱导癌细胞 MET 转化以促进异位存活,表现在 E-cad、Cx43、N-cad 等蛋白的表达变化<sup>[21-22]</sup>。乳腺癌微转移灶优先分布于成骨细胞周围,而成骨细胞的数量随着肿瘤负荷的增加而减少<sup>[23]</sup>;成骨细胞促进乳腺癌细胞在小鼠骨生态位中定植,成骨细胞表达 N-cad 和癌细胞表达 E-cad 通过异型连接的方式促进癌细胞在局部的黏附、存活<sup>[8]</sup>。研究表明,E-cad 缺失减弱远处器官转移灶向外生长的能力,乳腺癌微转移数量减少 15 倍<sup>[9]</sup>。近年研究表明,成骨细胞下调雌激素受体水平加速癌细胞定植于骨,诱导癌细胞高表达 E-cad 形成 MET 转化,并赋予骨转移中癌细胞再次转移至其他脏器的能力<sup>[24-25]</sup>。Cx43 在 MET 过程中具有重要作用,KAZAN 等<sup>[26]</sup>发现过表达 Cx43 能上调 E-cad 的表达,癌细胞和成骨细胞接触区域有较强的 Cx43 表达,成骨细胞通过 Cx43 使  $Ca^{2+}$ 定向流入细胞内促进癌细胞定植。此外,研究发现具有溶骨性骨转移特征的乳腺癌细胞和肺癌细胞均高表达 Dkk-1,当敲除 Dkk-1 后能够加速成骨细胞的成熟<sup>[27]</sup>。本研究建立 MDA-MB-231 细胞和 MC3T3-E1 细胞共培养模型,结果显示成骨细胞促进乳腺癌细胞存活、减少细胞凋亡,MDA-MB-231 细胞  $G_2/M$  期细胞增多, $G_0/G_1$  期、S 期细胞减少,促进 E-cad、N-cad、Cx43 和 Dkk-1 蛋白和 mRNA 相对表达水平。

本研究中阴阳双补方由淫羊藿、补骨脂、肉苁蓉、熟地黄、山茱萸、山药等六味药组成,而补肾阳方包含淫羊藿、补骨脂和肉苁蓉,补肾阴方包含熟地黄、山茱萸和山药。补肾类中药能抑制乳腺癌细胞活性、促进凋亡,如阴阳双补方抑制癌细胞活力,阻滞癌细胞在  $G_0/G_1$  期,而 S 期、 $G_2/M$  期细胞比例降低,能够降低 E-cad、N-cad、Dkk-1 和 Cx43 蛋白和 mRNA

表达,表明补肾类中药对乳腺癌细胞的 MET 转化具有抑制作用,而不同补肾类方防治骨转移疗效具有一定的差异性。WU 等<sup>[28]</sup>采用温肾壮骨方含药血清干预成骨细胞和破骨细胞后,能阻止 Jagged 1 蛋白/Notch 通路之间的信号串扰,延缓乳腺癌骨转移进展。陈雪珍等<sup>[29]</sup>探讨补肾活血方干预骨转移病灶,结果表明补肾活血方通过抑制磷酸肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路削弱破骨细胞的活性和癌细胞发生转移的能力来治疗乳腺癌骨转移。

综上,本研究探讨成骨细胞促进乳腺癌细胞存活的机制及补肾类中药的干预作用,结果表明乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和成骨前体细胞 MC3T3-E1 共培养通过 MET 转化促进肿瘤细胞存活;补肾类中药抑制乳腺癌细胞活力、促进凋亡,机制可能与降低 E-cad、N-cad、Dkk-1、Cx43 蛋白和 mRNA 表达相关。

## 参考文献

- [1] XU D C, TANG M X. Advances in the study of biomarkers related to bone metastasis in breast cancer[J]. *British Journal of Radiology*, 2023, 96(1150): 20230117.
- [2] 赖桂花, 曹建雄, 周 君, 等. 基于“肾主骨”观察壮骨镇痛胶囊联合奥施康定治疗肾虚痰瘀证骨转移癌瘤的临床疗效及对骨代谢的影响[J/OL]. *中药药理与临床*, 2025: 1-20. (2025-04-11). <https://link.cnki.net/doi/10.13412/j.cnki.zyyl.20250411.004>.
- [3] 李子琳, 王淑玲, 刘俊保. 基于肾主骨探讨补肾法在恶性骨肿瘤治疗中的应用[J]. *中医学报*, 2024, 39(11): 2306-2310.
- [4] 张文博, 杨 勇. 乳腺癌骨转移研究进展[J]. *药学进展*, 2024, 48(8): 625-632.
- [5] XIN Z F, QIN L Y, TANG Y, et al. Immune mediated support of metastasis: Implication for bone invasion[J]. *Cancer Communications*, 2024, 44(9): 967-991.
- [6] 袁春露, 陈 龙, 廖雅芳, 等. 乳腺癌骨转移的蛋白质组学特性及代谢途径活化研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2024, 51(13): 695-702.
- [7] DAI R C, LIU M F, XIANG X C, et al. Osteoblasts and osteoclasts: A n important switch of tumour cell dormancy during bone metastasis[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2022, 41(1): 316.
- [8] ZHANG W J, XU Z, HAO X X, et al. Bone metastasis initiation is coupled with bone remodeling through osteogenic differentiation of  $NG2^+$  cells[J]. *Cancer Discovery*, 2023, 13(2): 474-495.

- [9] PADMANABAN V, KROL I, SUHAIL Y, et al. E-cadherin is required for metastasis in multiple models of breast cancer[J]. *Nature*, 2019, 573(7774): 439–444.
- [10] WU Q Y, TIAN P, HE D S, et al. SCUBE2 mediates bone metastasis of luminal breast cancer by modulating immune-suppressive osteoblastic niches[J]. *Cell Research*, 2023, 33(6): 464–478.
- [11] 任娟霞, 郑广达, 尚 璐, 等. 花宝金治疗前列腺癌骨转移经验探析[J]. *辽宁中医杂志*, 2025, 52(4): 21–24.
- [12] LI B H, CHEN Z C, ZHANG Z Y, et al. Zuogui pill disrupt the malignant cycle in breast cancer bone metastasis through the Piezo1–Notch–1–GPX4 pathway and active molecules fish-ing[J]. *Phytomedicine*, 2024, 123: 155257.
- [13] 吴春宇, 孙霏平, 刘 胜. 温肾壮骨方对来曲唑诱发骨损伤大鼠的骨保护作用[J]. *中华中医药杂志*, 2024, 39(11): 5844–5848.
- [14] 杨梦霞. 阴阳双补方治疗阳虚型骨转移癌痛的机制探讨及临床疗效研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2023.
- [15] 陈 奇. 中药药理研究方法学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1261.
- [16] HUANG Q L, NING H J, WANG J, et al. Wenshen Zhuanggu formula inhibits tumor-exosomes induced bone pre-metastasis niche formation in primary breast cancer mice[J]. *Chinese Medicine*, 2025, 20(1): 88.
- [17] 毛 昫. 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 H, YU C J, GAO X, et al. The osteogenic niche promotes early-stage bone colonization of disseminated breast cancer cells[J]. *Cancer Cell*, 2015, 27(2): 193–210.
- [19] 毛 昫, 褚雪镭, 薛 鹏, 等. “淫羊藿–肉苁蓉”治疗乳腺癌骨转移的作用机制探讨[J]. *海南医学院学报*, 2020, 26(4): 262–269.
- [20] 李俊晓, 毛永鑫, 徐 淦, 等. 骨转移癌免疫微环境研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*, 2025, 47(5): 1158–1168.
- [21] STANGER B Z, WAHL G M. Cancer as a disease of development gone awry[J]. *Annual Review of Pathology*, 2024, 19: 397–421.
- [22] ZHANG X H, MA H J, GAO Y, et al. The tumor microenvironment: Signal transduction[J]. *Biomolecules*, 2024, 14(4): 438.
- [23] WANG X X, ZHANG T J, ZHENG B X, et al. Lymphotoxin- $\beta$  promotes breast cancer bone metastasis colonization and osteolytic outgrowth[J]. *Nature Cell Biology*, 2024, 26(9): 1597–1612.
- [24] BADO I L, ZHANG W J, HU J Y, et al. The bone microenvironment increases phenotypic plasticity of ER+ breast cancer cells[J]. *Developmental Cell*, 2021, 56(8): 1100–1117.
- [25] ZHANG W J, BADO I L, HU J Y, et al. The bone microenvironment invigorates metastatic seeds for further dissemination[J]. *Cell*, 2021, 184(9): 2471–2486.
- [26] KAZAN J M, EL-SAGHIR J, SALIBA J, et al. Cx43 expression correlates with breast cancer metastasis in MDA-MB-231 cells in vitro, in a mouse xenograft model and in human breast cancer tissues[J]. *Cancers*, 2019, 11(4): 460.
- [27] CHU T Q, TENG J J, JIANG L Y, et al. Lung cancer-derived Dickkopf1 is associated with bone metastasis and the mechanism involves the inhibition of osteoblast differentiation[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, 443(3): 962–968.
- [28] WU C Y, CHEN M C, SUN Z P, et al. Wenshen Zhuanggu formula mitigates breast cancer bone metastasis through the signaling crosstalk among the Jagged1/Notch, TGF- $\beta$  and IL-6 signaling pathways[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2019, 232: 145–154.
- [29] 陈雪珍, 朱 蓉, 杨满英, 等. 基于 PI3K/Akt 信号轴探究补肾活血汤治疗乳腺癌骨转移的机制研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2023, 43(2): 232–239.

(本文编辑 田梦妍)