

本文引用: 陈雪珍, 朱 蓉, 杨满英, 谢 婷, 杨 争, 袁 博, 胡金辉. 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.

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

陈雪珍¹, 朱 蓉², 杨满英², 谢 婷², 杨 争³, 袁 博³, 胡金辉^{3*}

1. 张家界市中医医院, 湖南 张家界 427000; 2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208;

3. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

【摘要】目的 通过体内实验观察补肾活血汤对乳腺癌骨转移裸鼠组织破骨细胞活性及肿瘤侵袭性的影响, 探究补肾活血汤治疗乳腺癌骨转移的作用机制。**方法** 按照完全随机法选取 6 只裸鼠作为空白组(蒸馏水灌胃 20 mL·kg⁻¹, 每天 1 次); 取对数生长期 4T1 乳腺癌细胞接种于其余 BALB/c 裸鼠右侧胫骨, 接种后标记, 成模后进行完全随机分组并干预: 模型组(蒸馏水灌胃 20 mL·kg⁻¹, 每天 1 次)、补肾活血汤组(中药液灌胃 36.67 g·kg⁻¹, 每天 1 次)、LY294002 组(LY294002 腹腔注射, 50 mg·kg⁻¹, 每周 2 次)、补肾活血汤联合 LY294002 组(中药液灌胃, 36.67 g·kg⁻¹, 每天 1 次; LY294002 腹腔注射, 50 mg·kg⁻¹, 每周 2 次); 每组 6 只; 记录生长状况及右下肢直径。给药结束后脱颈处死, 剖取瘤组织, 称重, X 线检测骨质破坏情况, 采用 HE 染色法观察瘤组织病理情况, 抗酒石酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)染色评估破骨细胞活性, 采用 Western blot 检测瘤组织中磷酸化磷酸肌醇 3-激酶(phosphorylated phosphatidylinositol-3-kinase, p-PI3K)、磷酸化蛋白质激酶 B(phosphorylated protein kinase B, p-Akt)、基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase 2, MMP-2)、活化 T 细胞胞质核因子 1(nuclear factor of activated T cells c1, NFATc1)蛋白的表达水平。**结果** 与空白组相比, 模型组、补肾活血汤组、LY294002 组及补肾活血汤联合 LY294002 组裸鼠右下肢可见局部肿胀, 瘤体增长, 以模型组增长速度最为迅速($P<0.01$)。除空白组外, 余各组 HE 染色可见肿瘤细胞浸润, 核大深染, 明确发生骨转移; X 线检测可见裸鼠右侧胫骨均呈现溶骨性改变, 严重者骨干消失; TRAP 染色可见骨转移发生后, 组织破骨细胞数量增多, 补肾活血汤组、LY294002 组、补肾活血汤联合 LY294002 组破骨细胞数量均较模型组有不同程度减少。与空白组比较, 模型组补肾活血汤组裸鼠瘤组织中 p-PI3K、p-Akt、MMP-2 和 NFATc1 蛋白的表达均升高($P<0.01$ 或 $P<0.05$); 与模型组比较, 补肾活血汤组、LY294002 组及补肾活血汤联合 LY294002 组肿瘤增长受到抑制, 其中以补肾活血汤联合 LY294002 组抑制肿瘤生长作用最为明显($P<0.05$), 瘤组织中 p-PI3K、p-Akt、MMP-2 和 NFATc1 的表达均降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$); 与补肾活血汤组比较, LY294002 组 MMP-2 表达水平下降, 补肾活血汤联合 LY294002 组裸鼠瘤组织中 p-PI3K、p-Akt、MMP-2 的表达均降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。**结论** 补肾活血汤可通过抑制 PI3K/Akt 信号通路下调 MMP-2 及 NFATc1 的表达, 削弱破骨细胞的活性和肿瘤细胞发生转移的能力来治疗乳腺癌骨转移。

【关键词】 乳腺癌; 骨转移; 补肾活血汤; 磷酸化肌醇 3-激酶; 磷酸化蛋白质激酶 B; 基质金属蛋白酶 2; 活化 T 细胞胞质核因子 1

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.02.009

The mechanism of Bushen Huoxue Decoction for treating breast cancer bone metastasis based on PI3K/Akt signaling axis

CHEN Xuezheng¹, ZHU Rong², YANG Manying², XIE Ting², YANG Zheng³, YUAN Bo³, HU Jinhui^{3*}

1. Zhangjiajie Hospital of Chinese Medicine, Zhangjiajie, Hunan 427000, China; 2. Hunan University of Chinese Medicine,

[收稿日期] 2022-08-20

[基金项目] 湖南省教育厅基金项目(20A373); 湖南省中医药管理局重点基金项目(C2022020); 湖南省卫生健康委员会科研计划项目一般指导课题(D202304139639); 湖南中医药大学校级基金项目(2019XJJJ039)。

[第一作者] 陈雪珍, 女, 硕士, 初级医师, 研究方向: 乳腺疾病的中西医结合研究。

[通信作者]* 胡金辉, 女, 博士, 教授, E-mail: hujinhui173@163.com。

Changsha, Hunan 410208, China; 3. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

[Abstract] Objective To observe the effects of Bushen Huoxue Decoction on osteoclast activity and tumor invasiveness in nude mice with breast cancer bone metastasis in vivo experiments and explore the mechanism of Bushen Huoxue Decoction for treating breast cancer bone metastasis. **Methods** Six nude mice were randomly selected as blank group (distilled water 20 mL/kg by gavage, once a day). The 4T1 breast cancer cells at logarithmic growth stage were inoculated into the right tibia of other BALB/c nude mice, marked and then grouped by complete randomized design and intervened after modeling. They were divided in to model group (distilled water 20 mL/kg by gavage, once a day), Bushen Huoxue Decoction group (Chinese medicine liquid 36.67 g/kg by gavage, once a day), LY294002 group (LY294002 50 mg/kg by intraperitoneal injection, twice a week), Bushen Huoxue Decoction combined with LY294002 group (Chinese medicine liquid 36.67 g/kg by gavage, once a day LY294002 50 mg/kg by intraperitoneal injection, twice a week), with 6 in each group. Growth status and diameters of right lower limb were recorded. The mice were sacrificed by cervical dislocation, the tumor tissues were dissected, weighed, and the bone destruction was detected by X-ray afterwards. The histopathologic condition of the tumor was observed by HE staining, and the activity of osteoclasts was evaluated by tartrate-resistant acid phosphatase staining (TRAP). The proteins expression levels of phosphorylated phosphoinositol-3-kinases (p-PI3K), phosphorylated protein kinase B (p-Akt), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), and nuclear factor of activated T cells c1 (NFATc1) were detected by Western blot. **Results** Compared with blank group, the model group, Bushen Huoxuetang group, LY294002 group and Bushen Huoxuetang combined with LY294002 group showed local swelling and tumor growth in the right lower limb of nude mice, with the fastest growth rate in the model group ($P<0.01$). Except the blank group, HE staining showed tumor cell infiltration, large and deep staining of nuclei, and bone metastasis. X-ray examination showed that the right tibia of nude mice showed osteolytic changes, and the diaphysis disappeared in severe cases. TRAP staining showed that the number of tissue osteoclasts increased after the occurrence of bone metastasis, and the number of osteoclasts in the Bushen Huoxuetang group, LY294002 group, Bushen Huoxuetang combined with LY294002 group were reduced to varying degrees compared with the model group. Compared with the blank group, the expressions of p-PI3K, p-Akt, MMP-2 and NFATc1 protein in the model group increased ($P<0.01$ or $P<0.05$). Compared with the model group, the tumor growth of Bushen Huoxuetang group, LY294002 group and Bushen Huoxuetang combined LY294002 group was inhibited, among which Bushen Huoxuetang combined LY294002 group had the most obvious inhibitory effect on tumor growth ($P<0.05$), and the expressions of p-PI3K, p-Akt, MMP-2 and NFATc1 in tumor tissues were all decreased ($P<0.01$ or $P<0.05$). Compared with Bushen Huoxuetang group, the expression level of MMP-2 in LY294002 group decreased, and the expressions of p-PI3K, p-Akt and MMP-2 in nude mice tumor tissues of Bushen Huoxuetang combined with LY294002 group decreased ($P<0.01$ or $P<0.05$). **Conclusion** Bushen Huoxue Decoction can inhibit the PI3K/Akt pathway to downregulate the expression of MMP-2 and NFATc1, and weaken the activity of osteoclasts and the ability of tumor cells to metastasize, so as to treat breast cancer bone metastasis.

[Keywords] breast cancer; bone metastasis; Bushen Huoxue Decoction; phosphatidylinositol-3-kinases; protein kinase B; matrix metalloproteinase 2; nuclear factor of activated T cells c1

国际癌症研究署(International Agency for Research on Cancer, IARC)发布的2020年全球癌症数据显示,乳腺癌新发病高达226万例,被称为全球女性第一大癌^[1-3]。虽然乳腺癌^[4-7]的治疗不断更新和完善,但仍有部分患者会出现骨转移、脑转移、肺转移、肌肉转移、锁骨上淋巴结转移、肝转移等远处转移;由于癌症复发、转移的出现,使乳腺癌患者的临床结局仍不满意,特别是三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)。TNBC具有高侵袭性、高转移率、治疗手段有限等复杂问题,严重威胁患者生命健康和^[4-7]生活质量。其中,骨转移常导致病理性

骨折、骨痛、高钙血症,甚至累及脊髓等,严重影响患者及家属生活质量。由于乳腺癌骨转移机制尚未明确^[8],临床上治疗方案较单一,效果欠佳且时间持久。因此,寻找能防治乳腺癌发生骨转移的辅助治疗方案具有深远意义。

补肾活血汤是一种中药复方制剂,具有补肾填精、活血化瘀的功效,临床研究证实其在治疗乳腺癌及乳腺癌骨转移患者中有明确疗效^[9-11]。实验研究证实,其对于抗血管生成、抑制肿瘤细胞迁移侵袭、促进骨质修复等方面均有一定疗效^[12-13],但复方成分复杂,作用机制尚未明确。磷酸肌醇3-激酶(phos-

phatidylinositol-3-kinases, PI3K)/蛋白质激酶 B (protein kinase B, Akt)信号通路在肿瘤的发生发展中发挥着极其重要的作用,该通路中的突变在癌症中经常被发现,在乳腺癌中尤为常见,特别是与 TNBC 密切相关^[14-17]。目前研究结果显示,PI3K/Akt 通路涉及乳腺癌与乳腺癌骨转移的多个过程,包括增殖、迁移、侵袭、上皮间质转化、免疫逃逸、诱导破骨细胞形成等。研究表明,补肾中药淫羊藿可通过 PI3K/Akt 促进成骨分化治疗骨质疏松^[18];没药的成分之一槲皮素^[19]能通过调节 PI3K/Akt 信号通路来减少细胞增殖、诱导细胞凋亡等发挥抗癌作用。骨微环境中成骨与破骨原是动态平衡的状态,一旦打破则可能出现骨质增生、骨质破坏等情况。因此,本研究拟通过构建乳腺癌骨转移模型,探究补肾活血汤是否通过调控 PI3K/Akt 信号轴抑制肿瘤细胞转移能力和破骨细胞活性改善骨转移,对其治疗乳腺癌骨转移机制进行研究,为补肾活血汤临床治疗乳腺癌骨转移提供新的视角。

1 材料

1.1 实验动物及细胞

雌性,SPF 级,体质量 15~20 g,5~6 周龄的 BALB/c 裸鼠 30 只,动物由湖南中医药大学统一购买(来源于湖南斯莱克景达有限公司),许可证号:SCXK(湘)2019-0009,符合湖南中医药大学动物伦理委员会要求(LLBH-202141404)。鼠源性 TNBC 细胞系 4T1 (武汉普诺赛生命科技有限公司,批号:CL-0007,传代至约 18 代),用含 10%胎牛血清和 1%双抗(青霉素-链霉素)的 1640 培养,于 37 °C、5% CO₂ 孵育。细胞密度达 80% 传代。

1.2 试剂与药品

p-PI3K 兔单克隆抗体(批号:PA5-38905),购自美国 thermofisher 公司;磷酸化蛋白质激酶 B(phosphorylated protein kinase B, p-Akt)兔单克隆抗体(批号:9271S),购自美国 Thermofisher 公司;活化 T 细胞胞质核因子 1(nuclear factor of activated T cells c1, NFATc1)小鼠单克隆抗体(批号:66963-1-Ig)、 β -肌动蛋白(β -actin)小鼠单克隆抗体(批号:66009-1-Ig)、一抗、二抗稀释液(批号:SA00001-1、SA00001-2)

均购自美国 Proteintech 公司;基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP-2)兔单克隆抗体(批号:Ab92536)购自英国 Abcam 公司;苏木精核染液(批号:20210809)、伊红染色液(批号:20210809)、TRAP 染色试剂盒(批号:20210918)均购自中国 Abiowell 公司。补肾活血汤全部中药均由湖南中医药大学第一附属医院药剂科统一采购,具体成分如下:杜仲 15 g(批号:2112192),独活 15 g(批号:NG22032103),没药 6 g(批号:2021120201),红花 6 g(批号: SX22032203),当归尾 12 g(批号:TH22042504),熟地黄 12 g(批号:21120141B),山茱萸 15 g(批号: SX22032207),补骨脂 15 g(批号:HY22051001),枸杞子 15 g(批号:CK22053105),菟丝子 15 g(批号: SX22041301),肉苁蓉 15 g(批号:21121841A)。PI3K 抑制剂 LY294002(批号:154447-36-6-50 mg),购自中国 MCE 公司。

1.3 仪器

YT-CJ-2NB 型超净工作台(北京亚泰隆公司); DH-1601 型恒温培养箱(上海三藤仪器公司); YD-315 型病理切片仪(浙江金华益迪试验器材); DYY-6C 型电泳仪、DYCZ-40D 型转膜仪(中国北京六一公司); BX43 型光学显微镜(日本 Olympus 公司); E7242X 型医用诊断 X 射线管组件(中国深圳威图公司)。

2 方法

2.1 动物造模^[20]、分组

30 只 BALB/c 裸鼠,随机选取 6 只裸鼠作为空白组(蒸馏水灌胃 20 mL·kg⁻¹,每天 1 次;取对数生长期 4T1 乳腺癌细胞接种于其余 BALB/c 裸鼠右侧胫骨,接种后标记并进行完全随机分组:模型组(蒸馏水灌胃 20 mL·kg⁻¹,每天 1 次)、补肾活血汤组(中药液灌胃 36.67 g·kg⁻¹,每天 1 次)、LY294002 组(LY294002 腹腔注射,50 mg·kg⁻¹,每周 2 次)、补肾活血汤联合 LY294002 组(中药液灌胃,36.67 g·kg⁻¹,每天 1 次+LY294002 腹腔注射,50 mg·kg⁻¹,每周 2 次);每组 6 只。具体造模操作为:制备细胞悬液密度约 1×10⁶ 细胞,接种体积 20 μ L,准备 27 G 胰岛素注射器,吸入人乳腺癌 4T1 细胞悬液备用。4%水合氯醛注射液(0.15 mL/10 g)腹腔注射麻醉。麻醉成功后用左手固定后肢,屈膝呈 90°暴露膝盖和胫骨

之间的白色髌韧带。用75%乙醇将裸鼠的右后肢进行消毒,右手握住针平行于胫骨,并将针通过髌韧带中心扎入胫骨近端骨髓腔内,缓慢注入大约20 μL 的细胞悬液,拔出针头后用棉花按压针口。约3 d胫骨区可见瘤体,经X线检测发生溶骨性改变,本研究以胫骨区可见瘤体为模型成功评价标准。

2.2 药物制备与给药剂量

将中药材倒入电陶瓷煎药壶中,一煎加水1000 mL浸泡30 min,武火(500 W)煮沸,转文火(200 W)煎60 min,过滤药渣;二煎加水800 mL煎煮45 min,过滤合并2次煎液,混匀。将煎液倒入圆底烧瓶中,置于旋转蒸发仪上减压浓缩(70 $^{\circ}\text{C}$, -0.1 MPa),至约1 g/mL时停止。将浓缩后的煎液倒入蒸发皿中,恒温水浴锅蒸干,转移至真空减压干燥箱,干燥后得补肾活血汤浸膏。收集浸膏,用铝箔袋封装,保存于干燥器中。根据70 kg人与20 g小鼠等效剂量比例1:9.1折算并取2倍浓缩剂量得到裸鼠给药剂量:补肾活血汤36.67 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,灌胃前蒸馏水溶解浸膏成生药浓度为1.8 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;PI3K抑制剂(LY294002)^[21],按说明书进行配制,给药剂量为50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

2.3 各组裸鼠生长情况及瘤体变化情况

从造模后第4天开始干预,连续干预14 d,同时观察裸鼠的生存状态,实验开始后每2天测量一次裸鼠右下肢直径(mm)。所有裸鼠在实验期间用同一电子秤、游标卡尺统一测量体质量及右下肢直径。第15天脱颈处死后取材,对各组瘤体进行常规石蜡切片,采用HE、TRAP染色进行观察。分多聚甲醛固定及-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。

2.4 X线评估骨转移破坏情况

X线扫描多聚甲醛固定标本,评估骨溶解情况。设置参数为:40 kV、32 mA、6 mAs。

2.5 HE及TRAP染色

处死后对裸鼠右下肢骨组织制备石蜡切片,进

行病理学HE染色检测,确认为乳腺癌骨转移。TRAP染色评估破骨细胞数量。

2.6 Western blot检测骨组织相关蛋白表达

转移瘤标本在冷RIPA缓冲液中溶解,并在12000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心10 min,离心半径7 cm。将裂解物从10% SDS-PAGE凝胶上电泳转移到NC膜上。将膜在含有5%脱脂奶的Tris缓冲盐(PBST)缓冲液中于室温下封闭1.5 h后,膜与抗 β -actin、抗p-PI3K、p-Akt、MMP-2、NFATc1的抗(分别为1:5000、1:1000、1:1000、1:1000、1:2000)室温孵育过夜,洗膜后与二抗(鼠源1:6000,兔源1:5000)室温下孵育1.5 h。加入ECL显影液,放于化学凝胶成像系统显影,采用全自动化学发光图像分析系统对蛋白条带进行分析,以目标条带的灰度值与内参 β -actin灰度值的比值表示蛋白的相对表达水平。

2.7 统计学分析

运用SPSS 19.0及Graphpad Prism 5.0软件进行统计分析,每组至少重复3次,所有计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,检验各组数据的正态性检验和方差齐性,组间比较采用单因素方差分析,重复测量资料进行球形分布检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组裸鼠生长曲线及瘤体变化情况

造模成功率100%。由于移植瘤表现为局部膝关节肿胀,与普通皮下移植瘤不同,故测量下肢肿胀部分最大直径进行对比。结果显示:与A组相比,B组、C组、D组及E组裸鼠右下肢直径增长明显,其中B组增长速度最为迅速($P<0.01$);与B组相比,C组、D组及E组增长较缓,且各组增长程度呈递减趋势,以E组最为明显($P<0.01$)。详见表1、图1。

表1 补肾活血汤对乳腺癌骨转移裸鼠右下肢直径的影响(mm, $\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	干预时间						
	0 d	2 d	4 d	6 d	8 d	10 d	12 d
A	6.89 \pm 0.32	7.11 \pm 0.26	7.32 \pm 0.33	7.51 \pm 0.37	7.74 \pm 0.30	7.89 \pm 0.30	7.99 \pm 0.30
B	7.18 \pm 1.16	7.23 \pm 1.15	8.46 \pm 1.83	9.05 \pm 1.42	11.49 \pm 3.25	11.92 \pm 2.49	14.15 \pm 3.21**
C	6.50 \pm 0.35	6.56 \pm 0.35	7.36 \pm 0.88	8.04 \pm 1.47	9.27 \pm 1.45	10.75 \pm 1.04	11.76 \pm 1.05
D	7.14 \pm 0.59	7.23 \pm 0.61	7.28 \pm 0.72	7.83 \pm 0.89	8.90 \pm 1.42	9.71 \pm 1.87	10.71 \pm 1.26
E	6.75 \pm 0.76	6.83 \pm 0.77	6.78 \pm 1.00	7.34 \pm 1.00	8.35 \pm 0.92	9.16 \pm 1.25	9.73 \pm 0.93 [#]

注:A.空白组;B.模型组;C.补肾活血汤组;D.LY294002组;E.补肾活血汤联合LY294002组。整体组别比较, $P=0.034<0.05$;与A组相比,** $P<0.01$;与B组相比,[#] $P<0.01$ 。

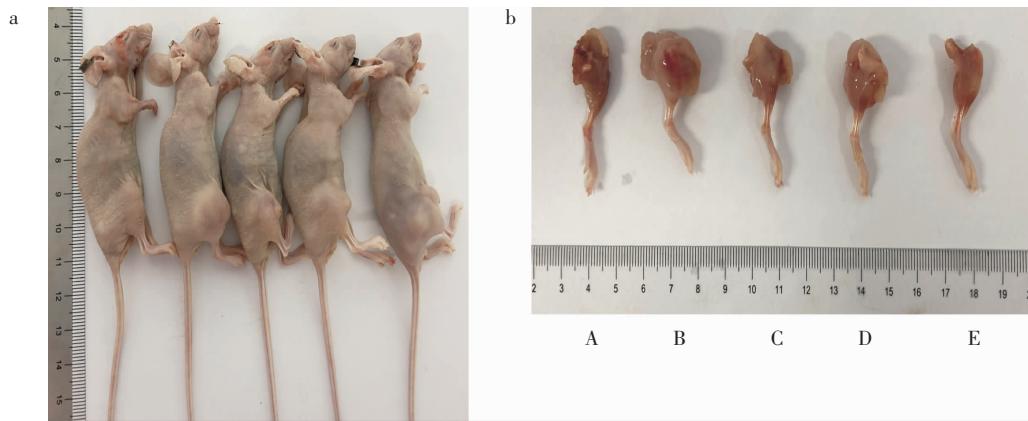


图 1 乳腺癌骨转移裸鼠、瘤体图

注:a.裸鼠图;b.瘤体图。A.空白组;B.模型组;C.补肾活血汤组;D.LY294002组;E.补肾活血汤联合LY294002组。

3.2 补肾活血汤对乳腺癌骨转移灶的影响

与 A 组比较,B 组、C 组、D 组和 E 组 HE 染色可见肿瘤细胞浸润,核大深染,部分可见与正常组织分界,明确发生骨转移,证实造模成功(如图 2)。对下肢组织进行 X 线检测,与 A 组比较,B 组、C 组、D

组及 E 组裸鼠右侧胫骨呈现溶骨性改变,严重者骨干消失,C 组、D 组及 E 组骨溶解情况均较 B 组稍轻(如图 3);TRAP 染色提示,与 A 组比较,B、C、D、E 组破骨细胞数量增多,且 C 组、D 组、E 组破骨细胞数量均较 B 组有不同程度减少(如图 4)。

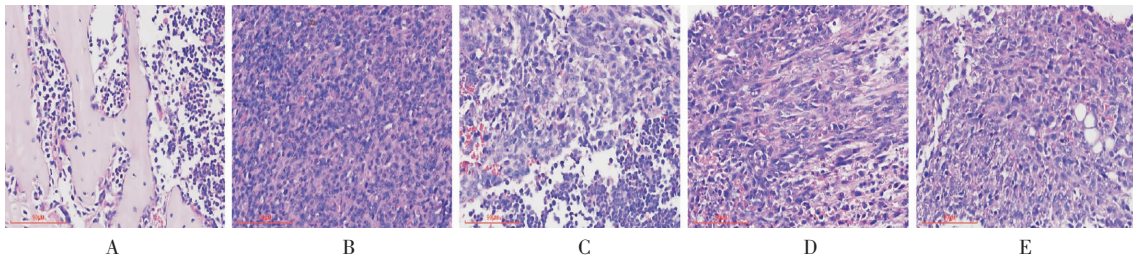


图 2 补肾活血汤对裸鼠乳腺癌骨转移灶病理组织学(HE,×200)

注:A.空白组;B.模型组;C.补肾活血汤组;D.LY294002组;E.补肾活血汤联合LY294002组。

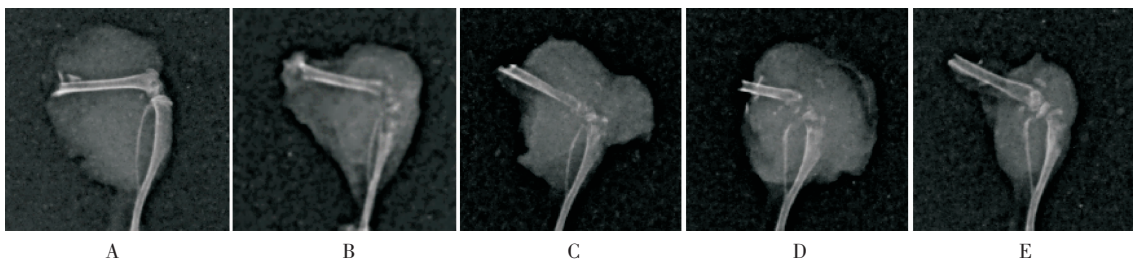


图 3 补肾活血汤对裸鼠乳腺癌骨转移灶影像学影响

注:A.空白组;B.模型组;C.补肾活血汤组;D.LY294002组;E.补肾活血汤联合LY294002组。

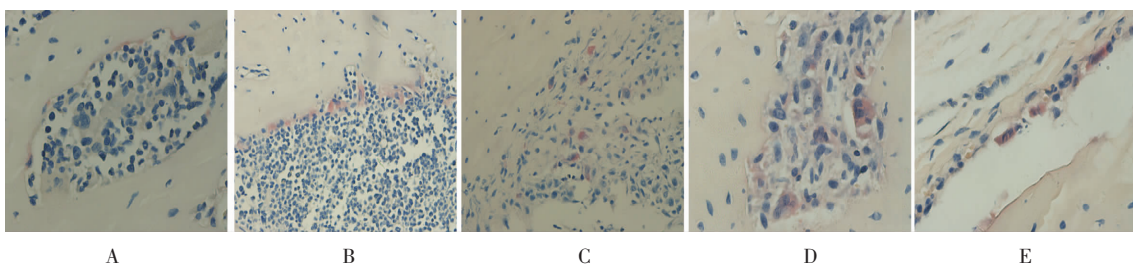


图 4 补肾活血汤对裸鼠乳腺癌骨转移灶 TRAP 染色的影响(TRAP,×400)

注:A.空白组;B.模型组;C.补肾活血汤组;D.LY294002组;E.补肾活血汤联合LY294002组。

3.3 补肾活血汤对乳腺癌骨转移转移瘤组织中通路蛋白表达情况的影响

与A组比较,B组、C组、D组裸鼠瘤组织中 p-PI3K、p-Akt、MMP-2 和 NFATc1 蛋白的表达均升高 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$),E 组裸鼠瘤组织中 p-PI3K、p-Akt 和 MMP-2 蛋白的表达均升高 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$); 与 B 组比较,C 组、D 组及 E 组裸鼠瘤组织中 p-PI3K、p-Akt、MMP-2 和 NFATc1 的表达均降低 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$); 与 C 组比较,E 组裸鼠瘤组织中 p-PI3K、p-Akt、MMP-2 的表达均降低 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$), D 组及 E 组裸鼠瘤组织中 NFATc1 的表达呈现递减趋势 ($P>0.05$)。详见表 2、图 5。

表 2 补肾活血汤对乳腺癌骨转移瘤组织中 p-PI3K、p-Akt、MMP-2 和 NFATc1 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	p-PI3K/ β -actin	p-Akt/ β -actin	MMP-2/ β -actin	NFATc1/ β -actin
A	0.083±0.015	0.100±0.046	0.097±0.015	0.100±0.026
B	0.573±0.011**	0.550±0.090**	0.460±0.036**	0.660±0.165**
C	0.430±0.010***	0.362±0.008***	0.345±0.035***	0.355±0.055*#
D	0.300±0.040***	0.275±0.057*#	0.240±0.010*** Δ	0.260±0.070#
E	0.210±0.060*** $\Delta\Delta$	0.177±0.031*** $\Delta\Delta$	0.187±0.035*** $\Delta\Delta$	0.197±0.060#
F 值	95.81	31.70	72.88	17.43
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 A 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 B 组比较,# $P<0.05$,# $P<0.01$;与 C 组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。A.空白组;B.模型组;C.补肾活血汤组;D.LY294002 组;E.补肾活血汤联合 LY294002 组。

4 讨论

现代医学治疗乳腺癌有手术、放化疗、靶向治疗、内分泌治疗、中医药等多种综合治疗手段,药物选择丰富多样^[4]。但是对于晚期乳腺癌,特别是转移

率高达 65%~75%的骨转移^[22],治疗手段及疗效仍有待进一步开发研究。PI3K/Akt 通路是细胞内的信号传导通路,其突变在 TNBC 中经常被发现,高达 70%^[23-24]。PI3K/Akt 通路可促使 M2 巨噬细胞发生极化并释放特异性降解细胞外基质的 MMP-2^[25-30];MMP-2 作为乳腺癌侵袭性的标志物,能促进肿瘤细胞和肿瘤基质细胞的迁移,导致肿瘤细胞更难以被免疫细胞识别、追踪与杀伤^[31-32];另外,PI3K/Akt 信号通路可以通过调控破骨细胞特异性蛋白质 NFATc1 的表达来影响破骨细胞形成和分化。因此,PI3K/Akt 信号通路可能通过调控 MMP-2、NFATc1 达到改善乳腺癌溶骨性骨转移的作用^[33-35]。

中医学认为,乳腺癌病机为正虚邪恋,正气亏虚,邪毒凝结,病位在乳,归经属于肝、胃、肾。邪毒以痰、瘀、毒为主^[7,36-37]。加上手术、放化疗等伴随的毒副作用,导致气血精的进一步虚损,脏腑功能随之减退,全身呈现免疫低下、代谢减退及紊乱等状态。乳腺癌骨转移以肾虚为本,血瘀为标,瘀血邪毒趁虚而入流于至虚病所,深入经筋骨骱之中,胶着不去,使经脉凝滞不通,发为病灶,出现骨痛等现象。补肾活血汤出自《伤科大成·跌打引经用药法》,方中杜仲、熟地黄、补骨脂、独活共为君药,具有补肾壮阳、益精生髓、强筋壮骨之效;没药、当归尾、红花共为臣药,助君药以补肾填精、祛瘀通络、活血止痛;肉苁蓉、菟丝子、山茱萸、枸杞子均为佐药,性甘温平,善于补肾益精助阳。全方以补为主,标本同治,有补肾填精、活血化瘀之效。研究证实,补肾活血汤有改善局部血液循环、提高成骨细胞活性、促进骨髓间充质干细胞增殖和成骨分化、抑制破骨形成等作用^[38-40]。

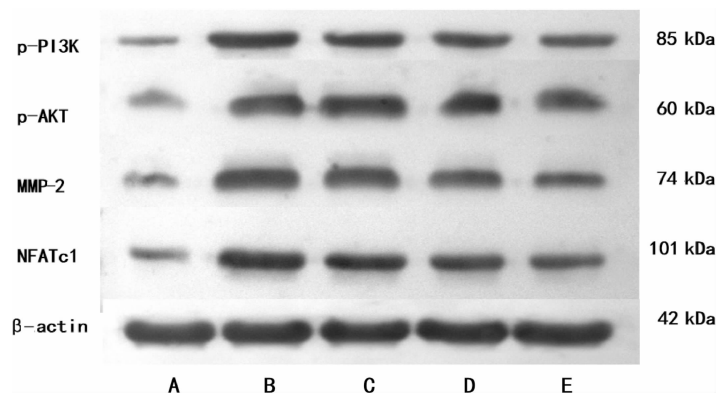


图 5 各组裸鼠骨转移瘤组织 p-PI3K、p-Akt、MMP-2、NFATc1 蛋白表达图

注:A.空白组;B.模型组;C.补肾活血汤组;D.LY294002 组;E.补肾活血汤联合 LY294002 组。

本研究结果显示,造模后,组织中 p-PI3K、p-Akt、NFATc1 及 MMP-2 蛋白的表达增高,药物干预后,C 组、D 组及 E 组的转移瘤组织中 p-PI3K、p-Akt、NFATc1 及 MMP-2 蛋白的表达均较 B 组下降;组间比较发现,E 组表达最低,呈现协同作用。由此可见,乳腺癌骨转移发生时,机体内 PI3K/Akt 通路被激活,破骨细胞活性增加,肿瘤侵袭性增强;补肾活血汤能抑制 PI3K/Akt 信号通路的活化,PI3K/Akt 通路的抑制下调了 NFATc1 及 MMP-2 蛋白的表达,减弱了破骨细胞的活性及肿瘤细胞侵袭性。因此,补肾活血汤可能通过抑制 PI3K/Akt 通路下调 MMP-2 及 NFATc1 的表达发挥治疗乳腺癌骨转移的作用。本课题组选用人源性 TNBC 细胞株 MDA-MB-231 细胞裸鼠胫骨注射造模,在预实验进行动物造模时出现造模周期长,成模率低的困境,故后期调整为鼠源性 TNBC 细胞株 4T1 细胞。由于实验设备等原因,对于 X 线结果无法进行量化分析,评估存在一定局限性,无法获得统计学的验证,后续研究可结合小动物 CT 进行检测,进一步评估骨小梁、骨密度等指标。

综上所述,补肾活血汤可抑制 PI3K/Akt 通路以下调 MMP-2 及 NFATc1 的表达,削弱破骨细胞的活性和肿瘤侵袭性来治疗乳腺癌骨转移。本研究为补肾活血汤的进一步深入研究提供了方向,为补肾活血汤的临床运用提供了数据支持。

参考文献

- [1] LANG G T, JIANG Y Z, SHI J X, et al. Characterization of the genomic landscape and actionable mutations in Chinese breast cancers by clinical sequencing[J]. *Nature Communication*, 2020, 11(1): 5679-5679.
- [2] 郑荣寿,孙可欣,张思维,等.2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. *中华肿瘤杂志*,2019,41(1):19-28.
- [3] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *A Cancer Journal for Clinicians*, 2021, 71(3): 209-249.
- [4] 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会.中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2021 年版)[J].*中国癌症杂志*,2021,31(10):954-1040.
- [5] TAHARA R K, BREWER T M, THERIAULT R L, et al. Bone metastasis of breast cancer[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2019, 1152: 105-129.
- [6] 郭 启,张 超,马育林.乳腺癌骨转移靶向治疗:机制与转化并行[J].*天津医科大学学报*,2019,25(4):418-421.
- [7] 田惠中,王云启.乳腺癌骨转移的中医治疗研究进展[J].*中医药导报*,2016,22(14):41-44.
- [8] NAOMI B, EMILY B, ARUN D, et al. Breast cancer bone metastases: pathogenesis and therapeutic targets[J]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2018, 96: 63-78.
- [9] 王贤彬,胡金辉,袁 博,等.补肾活血汤联合化疗对三阴性乳腺癌骨转移患者免疫功能及生活质量的影响[J].*中医药导报*,2018,24(9):55-57.
- [10] 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.
- [11] 袁 博,胡金辉,杨 争,等.补肾活血汤对内分泌治疗乳腺癌术后患者生活质量的影响[J].*湖南中医杂志*,2017,33(6):16-18.
- [12] 杨 争,胡金辉,王 希,等.补肾活血汤对 SDF-1 α 诱导的人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖及迁移的影响[J].*时珍国医国药*, 2016,27(8):1868-1870.
- [13] 刘德果.补肾活血汤对裸鼠乳腺癌骨转移瘤及 VEGF、bFGF、MVD 影响的研究[D].长沙:湖南中医药大学,2017.
- [14] 吴子鑫,吴申伟.PI3K/AKT/mTOR 信号通路及其与乳腺癌关系的研究进展[J].*山东医药*,2020,60(16):107-110.
- [15] 黄佳欢,陈俊青,杨紫烟,等.PI3K/AKT/mTOR 信号通路在三阴性乳腺癌中的作用及靶向治疗研究进展[J].*肿瘤学杂志*,2020,26(9):784-790.
- [16] GUERRERO-ZOTANO A, MAYER I A, ARTEAGA C L. Pi3k/akt/mtor: Role in breast cancer progression, drug resistance, and treatment [J]. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2016, 35(4): 515-524.
- [17] LIU R, CHEN Y, LIU G, et al. PI3K/AKT pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers[J]. *Cell death & disease*, 2020, 11: 797.
- [18] 肖亚平,曾 杰,焦琳娜,等.补肾中药对骨质疏松症的治疗及其信号通路调节作用的研究进展[J].*中国中药杂志*,2018,43(1):21-30.
- [19] MARJORIE R-F, CATALINA C-P. The anti-cancer effect of quercetin: Molecular implications in cancer metabolism[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20 (13): 3177-3177.
- [20] TULOTTA C, GROENEWOUD A, SNAAR-JAGALSKA B E, et al. Animal models of breast cancer bone metastasis[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2019, 1914: 309-330.
- [21] JIANG H, FAN D, ZHOU G, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor (ly294002) induces apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cells[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2019, 120(12): 2015-2022.

- ryngeal carcinoma in vitro and in vivo[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2010, 29(1): 34.
- [22] BLANK A T, LERMAN D M, PATEL N M, et al. Is prophylactic intervention more cost-effective than the treatment of pathologic fractures in metastatic bone disease?[J]. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2016, 474(7): 1563-1570.
- [23] LÓPEZ-KNOWLES E, O'TOOLE S A, MCNEIL C M, et al. Pi3k pathway activation in breast cancer is associated with the basal-like phenotype and cancer-specific mortality[J]. *International Journal of Cancer*, 2010, 126(5): 1121-1131.
- [24] DAVID A F, HONYIN C, BENJAMIN D H, et al. The pi3k pathway in human disease[J]. *Cell*, 2017, 170(4): 605-635.
- [25] 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.
- [26] 毛响,薛鹏,李林澍,等.早期骨转移分子机制的研究进展[J].*肿瘤防治研究*,2019,46(9):856-860.
- [27] NUNNERY S E, MAYER I A. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in hormone-positive breast cancer.[J]. *Drugs*, 2020, 80 (prepublish): 1-13.
- [28] CHEN D, QIU Y B, GAO Z Q, et al. Sodium propionate attenuates lipopolysaccharide-induced epithelial-mesenchymal transition via pi3k/akt/mTOR signaling pathway[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(24): 6554-6563.
- [29] YANG Q, JI G X, LI J Y. Steap2 is down-regulated in breast cancer tissue and suppresses pi3k/akt signaling and breast cancer cell invasion in vitro and in vivo[J]. *Cancer Biology & Therapy*, 2020, 21(3): 278-291.
- [30] AZZURRA I, MARIA M S, TERESA S, et al. mTOR links tumor immunity and bone metabolism: What are the clinical implications?[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(23) : 5841-5856.
- [31] RHEE I. Diverse macrophages polarization in tumor microenvironment[J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2016, 39 (11): 1588-1596.
- [32] WANG W, LIU Y, GUO J, et al. miR-100 maintains phenotype of tumor-associated macrophages by targeting mTOR to promote tumor metastasis via Stat5a/IL-1ra pathway in mouse breast cancer[J]. *Oncogenesis*, 2018, 7(12) : 97-103.
- [33] WENLI J, YOULUTUZIAYI R, HAO H, et al. Asperolide A prevents bone metastatic breast cancer via the PI3K/AKT/mTOR/c-Fos/NFATc1 signaling pathway[J]. *Cancer Medicine*, 2020, 9 (21): 8173-8185.
- [34] OSAMA H, KERSTIN T, MONZUR M, et al. Rapamycin inhibits osteolysis and improves survival in a model of experimental bone metastases[J]. *Cancer Letters*, 2011, 314(2): 176-184.
- [35] GUIXIN Y, ZHEN L, QIAN L, et al. Phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K)-mTOR inhibitor PKI-402 inhibits breast cancer induced osteolysis[J]. *Cancer Letters*, 2018, 443: 135-144.
- [36] 于洁,王祥麒,王俊涛,等.王祥麒教授基于“肾主骨”理论妙治乳腺癌骨转移[J].*中医临床研究*,2018,10(26):106-107,110.
- [37] 杨鹭,张程程,王中奇.肿瘤骨转移中医病因病机研究进展[J].*中医文献杂志*,2019,37(3):58-60.
- [38] 施乐,张超,季文辉,等.补肾活血汤通过抑制 Wnt β -catenin 信号通路对激素性股骨头坏死大鼠疗效及血管形态、VEGF 的影响[J].*四川中医*,2020,38(2):59-62.
- [39] 刘义辉,陈冬梅,王立忠,等.补肾活血汤对骨质疏松性胸腰椎压缩骨折患者术后血清 OPG、RANKL 水平的影响[J].*国际检验医学杂志*,2018,39(24):3036-3038.
- [40] 王贤彬.补肾活血汤对裸鼠乳腺癌骨转移模型和 Jagged1/Notch 及 TGF- β 通路蛋白的干预研究[D].长沙:湖南中医药大学,2018.

(本文编辑 苏维)