

阳和汤加减对乳腺癌骨转移大鼠骨破坏的影响及机制研究^Δ

卢 舜^{1*}, 蔡 昂¹, 樊婷婷², 何威华^{1#} (1. 武汉市中医医院肿瘤科, 武汉 430050; 2. 武汉市中医医院骨伤科, 武汉 430050)

中图分类号 R737.9; R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)04-0431-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.04.04



摘要 **目的** 基于受体相互作用蛋白激酶1(RIPK1)/RIPK3通路探讨阳和汤加减对乳腺癌骨转移大鼠骨破坏的改善作用及潜在机制。**方法** 以骨髓腔注射乳腺癌细胞悬液的方式构建乳腺癌骨转移大鼠模型,将造模成功的雌性大鼠随机分为模型组(灌胃等体积生理盐水),阳和汤加减低、中、高剂量组(分别灌胃相应药液1.30、2.60、5.20 g/kg,按生药量计),阳和汤加减高剂量+si-RIPK1组(灌胃相应药液5.20 g/kg,按生药量计;同时尾静脉注射RIPK1小干扰RNA),阳和汤加减高剂量+si-NC组(灌胃相应药液5.20 g/kg,按生药量计;同时尾静脉注射阴性对照小干扰RNA),每组12只;另取12只健康大鼠作为对照组(灌胃等体积生理盐水);每天给药1次,持续14 d。称定各组大鼠给药前及末次给药后的体重;检测其机械性痛阈值、热痛阈值,观察其胫骨骨破坏情况、病理变化情况、破骨细胞形成情况;检测其胫骨组织中核因子 κ B受体活化因子(RANK)及其配体(RANKL)蛋白的阳性表达情况以及RIPK1、RIPK3、混合谱系激酶结构域样蛋白(MLKL)的磷酸化水平。**结果** 与对照组比较,模型组大鼠胫骨组织中肿瘤细胞明显增生并弥散浸润骨髓腔,并可见大片细胞肿瘤性坏死、骨破坏严重、骨皮质变薄、骨小梁受损;其体重(给药前及末次给药后)、机械性痛阈值、热痛阈值和RIPK1、RIPK3、MLKL的磷酸化水平均显著降低,肿瘤体积、胫骨骨破坏面积占比、破骨细胞数量和RANK、RANKL蛋白阳性表达均显著升高/增多/上调($P<0.05$);与模型组比较,阳和汤加减低、中、高剂量组大鼠胫骨组织上述病理改变均有所缓解,各定量指标均呈剂量依赖性改善($P<0.05$)。沉默RIPK1后,高剂量阳和汤加减的上述改善作用被显著减弱($P<0.05$)。**结论** 阳和汤加减可减轻乳腺癌骨转移大鼠的骨破坏,上述作用可能与激活RIPK1/RIPK3通路有关。

关键词 阳和汤加减;乳腺癌;骨转移;骨破坏;RIPK1/RIPK3通路

Study on the effect and mechanism of modified Yanghe decoction on bone destruction in rats with breast cancer bone metastasis

LU Shun¹, CAI Ang¹, FAN Tingting², HE Weihua¹ (1. Dept. of Oncology, Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430050, China; 2. Dept. of Orthopedics and Traumatology, Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430050, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the improvement effect and potential mechanism of modified Yanghe decoction on bone destruction in rats with breast cancer bone metastasis based on the receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (RIPK1)/RIPK3 pathway. **METHODS** The rat model of breast cancer bone metastasis was established by injecting a suspension of breast cancer cells into the bone marrow cavity. The rats with successful modeling were randomly divided into a model group (intragastric administration of equal volume of normal saline), modified Yanghe decoction low-, medium-, and high-dose groups (intragastric administration of corresponding decoction at 1.30, 2.60 and 5.20 g/kg, calculated by the dosage of crude drug), high-dose modified Yanghe decoction+si-RIPK1 group (intragastric administration of corresponding decoction at 5.20 g/kg, calculated by the dosage of crude drug; simultaneous injection of small interfering RNA for RIPK1 via the tail vein), and high-dose modified Yanghe decoction+si-NC group (intragastric administration of corresponding decoction at 5.20 g/kg, calculated by the dosage of crude drug; simultaneous injection of small interfering RNA for negative control via the tail vein), with 12 rats in each group. Another 12 healthy rats were selected as the control group and were given the same volume of normal saline intragastrically, once a day, for 14 consecutive days. Body weight was measured before administration and at the end of the last administration. The mechanical pain threshold and thermal pain threshold were measured, and the bone destruction, pathological changes and osteoclast formation of the tibia were observed. The positive expression of receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) in the tibial tissue, as well as the phosphorylation levels of RIPK1, RIPK3 and mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL) were detected. **RESULTS** Compared with the control group, the tumor cells of tibia tissues in rats of the model group showed significant proliferation and diffuse infiltration into the bone

^Δ 基金项目 湖北省中医药管理局中医药科研项目 (No. ZY2023F054)

* 第一作者 主治医师, 硕士。研究方向: 恶性肿瘤的中西医结合治疗。E-mail: guzemi@163.com

通信作者 副主任医师, 博士。研究方向: 肿瘤疾病的中医药治疗。E-mail: thxxnp@163.com

marrow cavity. Extensive areas of tumor necrosis of cells, severe bone destruction, thinning of the bone cortex, and damage to the bone trabeculae were observed. The body weight (before administration and at the end of the last administration), mechanical pain threshold, thermal pain threshold, and the phosphorylation levels of RIPK1, RIPK3 and MLKL were decreased significantly; the tumor volume, the proportion of bone destruction area, the number of osteoclasts, and the positive expressions of RANK and RANKL were increased/up-regulated significantly ($P<0.05$). Compared with the model group, the above pathological changes in the tibial tissues of rats in modified Yanghe decoction low-, medium- and high-dose groups were all alleviated, and all quantitative indicators showed dose-dependent improvement ($P<0.05$). After silencing RIPK1, the aforementioned beneficial effects of high-dose modified Yanghe decoction were significantly weakened ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Modified Yanghe decoction can alleviate bone destruction in rats with breast cancer bone metastasis. The above effect is related to the activation of the RIPK1/RIPK3 pathway.

KEYWORDS modified Yanghe decoction; breast cancer; bone metastasis; bone destruction; RIPK1/RIPK3 pathway

乳腺癌是全球女性常见的恶性肿瘤之一,因极易发生转移而导致治疗难度较大。骨骼是除肺和肝之外,乳腺癌较易发生转移的部位,故乳腺癌也是骨转移发生率较高的恶性肿瘤之一。乳腺癌骨转移患者往往会表现出间歇性疼痛,这种疼痛会随病情逐步演变为持续性钝痛或刀割样痛,并在运动时加剧,甚至可能导致病理性骨折、残疾等骨相关疾病的发生,严重影响患者的正常生活及生命健康^[1-2]。目前,临床主要通过抗肿瘤全身治疗及骨靶向剂来减缓骨吸收,降低骨相关疾病的发生风险。随着医疗技术的快速发展,乳腺癌骨转移的治疗效果得以大幅度提升,但距理想治疗效果尚有一定差距,且存在胃肠道不适、肝肾损伤等副作用,故深入了解乳腺癌骨转移的发病机制、寻求新的治疗药物及策略仍是当前研究的热点和难点^[3]。

近年来,中医药因其安全、低毒等特性备受学者关注。中医理论认为,乳腺癌骨转移属“骨瘤”“坏死”等范畴,与肾阴、气血不足等密切相关。阳和汤加减是由清代名医王洪绪的“阳和汤”演化而来,由灵芝、骨碎补等11味中药煎制而成,具有补脾益气、活血化瘀、散寒化痰等功效,其与化学止痛药联合使用,可有效缓解乳腺癌骨转移患者的疼痛,提高患者的生活质量^[4],但具体作用机制尚不明确。受体相互作用蛋白激酶1(receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1, RIPK1)/RIPK3通路是参与细胞程序性坏死的重要通路之一,激活该通路可促进三阴性乳腺癌异种移植瘤小鼠的肿瘤细胞坏死,进而抑制肿瘤生长^[5]。然而,该通路在乳腺癌骨转移进程中的作用机制尚不清楚,且其与阳和汤加减之间的靶向调控关系亦有待进一步探讨。基于此,本研究拟探究阳和汤加减对乳腺癌骨转移大鼠骨破坏的影响,并通过RIPK1/RIPK3通路初步阐释其作用机制,以期为该方治疗乳腺癌骨转移提供理论依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括RZ型小动物Micro CT仪(上海然哲仪器设备有限公司)、BX51型显微镜(日本

Olympus公司)、GenoSens 2000型凝胶成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司)、D165H型细胞培养箱(深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司)、38450型动物电子机械刺痛仪和35150型冷热板测痛仪(上海玉研科学仪器有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

阳和汤加减组方药材饮片灵芝、骨碎补、生晒参、白术、鹿角胶(烊化)、茯苓、桂枝、白芥子、甘草、麻黄、全蝎(均产自湖北省黄冈市英山县,批号均为B251102002)均购自湖北辰美中药有限公司,经武汉市中医医院药学部副主任药师魏从师鉴定均为真品。

DMEM培养基(批号iCell-0003)购自镜像绮点(上海)细胞技术有限公司;RIPK1小干扰RNA(si-RIPK1)及其阴性对照(si-NC)均由上海中乔新舟生物科技有限公司合成;抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)染液(批号R27216)购自上海源叶生物科技有限公司;兔抗核因子 κ B受体活化因子(receptor activator of nuclear factor- κ B, RANK)、核因子 κ B受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)、磷酸化RIPK1(phosphorylated RIPK1, p-RIPK1)多克隆抗体(批号分别为C06836H、C00425H、12953)均购自南京赛戈巍生物科技有限公司;兔抗RIPK1多克隆抗体(批号AF7896)购自上海碧云天生物科技股份有限公司;兔抗RIPK3、混合谱系激酶结构域样蛋白(mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL)多克隆抗体(批号分别为TA380940、TA332779)均购自无锡傲锐东源生物科技有限公司;兔抗磷酸化RIPK3(phosphorylated RIPK3, p-RIPK3)多克隆抗体(批号ab240383)购自英国Abcam公司;兔抗磷酸化MLKL(phosphorylated MLKL, p-MLKL)多克隆抗体(批号K200099M)购自北京索莱宝科技有限公司;兔抗 β -肌动蛋白(β -actin)多克隆抗体(批号4967)购自美国CST公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(H+L)二抗(批号DKY0991A)购自西宝生物科技(上海)股份有限公司。

1.3 实验细胞与动物

人乳腺癌细胞MCF-7(批号HT-X1646)购自深圳市豪地华拓生物科技有限公司。

7~8周龄雌性SPF级SD大鼠97只[生产许可证号:SCXK(鄂)2022-0029]购自武汉贝赛模式生物科技有限公司。动物饲养于温度 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度50%~55%、每12 h光照/黑暗交替的干燥清洁级动物房内,自由摄食、饮水。本研究方案已通过武汉贝赛模式生物科技有限公司动物伦理委员会审批[编号:BSMS动(福)第2024-12-1237A号]。

2 方法

2.1 药液制备

根据阳和汤加减的组成,按相关文献^[9]方法制备药液:取灵芝、骨碎补、生晒参、白术、鹿角胶(烊化)、茯苓、桂枝、白芥子、甘草、麻黄、全蝎饮片(质量比10:10:9:9:9:9:6:6:6:3:3),混合,加7~8倍量水,浸泡、煎煮各30 min,过滤;药渣再加4~5倍量水,煎煮30 min,过滤;合并2次滤液,浓缩成每1 mL含生药0.013、0.026、0.052 g的药液,备用。

2.2 细胞培养

将MCF-7细胞置于DMEM培养基(含10%胎牛血清、1%青-链霉素双抗)中,于 37°C 、5% CO_2 条件下培养,每2 d更换培养基1次,待细胞融合度达90%左右进行消化传代,取对数期细胞进行后续研究。

2.3 造模、分组与给药

参考相关文献^[7]方法构建乳腺癌骨转移大鼠模型:取大鼠85只,以戊巴比妥钠麻醉,再将其膝关节屈曲 90° 后固定于操作台上,以确定胫骨平台位置;消毒其右后肢皮肤,用26 G显微注射器吸取 1×10^7 个/mL的MCF-7乳腺癌细胞悬液(以磷酸盐缓冲液为溶剂)10 μL ,从胫骨近端斜下向胫骨远端缓慢旋转刺入骨髓腔(至针尖有落空感),缓慢注入细胞悬液并停留1 min后,退针并局部压迫;将大鼠置于 37°C 恒温板上,待苏醒后再放回笼中(任选3只进行检测,若其出现体重下降、精神萎靡、毛色暗淡、伴患肢运动障碍等症状,机械性痛阈值及热痛阈值较正常大鼠显著下降,CT扫描可见胫骨骨破坏,则提示造模成功^[7])。另取健康大鼠12只,仅向其骨髓腔内注射磷酸盐缓冲液10 μL ,作为对照组。

造模成功的大鼠共75只。除用于模型验证的3只外,将余下的72只随机分为模型组,阳和汤加减低、中、高剂量组,阳和汤加减高剂量+si-NC组,阳和汤加减高剂量+si-RIPK1组,每组12只。阳和汤加减低、中、高剂量大鼠分别灌胃相应药液1.30、2.60、5.20 g/kg(体积为20 mL,按生药量计,根据前期预实验结果设置);阳和汤加减高剂量+si-NC组、阳和汤加减高剂量+si-RIPK1组大鼠在灌胃相应药液5.20 g/kg(体积为20 mL,按生药量计)的同时,分别尾静脉注射si-NC、si-RIPK1溶液25 nmol/kg(体积为100 μL ,以配套缓冲液为溶剂);对照组

和模型组大鼠分别灌胃等体积生理盐水。每天给药1次,连续14 d。

2.4 体重及肿瘤体积检测

分别于给药前及末次给药后称定各组大鼠的体重;于末次给药后第2天,将各组大鼠麻醉、处死并暴露带有转移肿瘤的胫骨,以游标卡尺测量其瘤组织长短径,计算肿瘤体积(体积=长径 $\times$ 短径 $\times$ 短径/2)。

2.5 机械性痛阈值和热痛阈值检测

末次给药并称定体重后,将各组大鼠置于金属网上,罩上有机玻璃限制其活动,待大鼠安静后,以探针刺刺激其右侧足底中心,共10次(5次/min,每次间隔10 s),分析每次测量峰值,取平均值,即为大鼠机械性痛阈值。随后,将各组大鼠置于 55°C 恒温板上,记录从放入到舔右后肢的时间,共3次(每次间隔10 min,热刺激不超过30 s),取平均值,即为大鼠热痛阈值。

2.6 胫骨骨破坏面积占比分析

检测机械性痛阈值及热痛阈值后,将各组大鼠麻醉并将其右后肢固定在CT仪载物台上,以10 μm 分辨率进行 360° 扫描,并进行三维重建,观察、分析大鼠胫骨骨破坏面积占比(胫骨骨破坏面积占比=胫骨骨破坏面积/胫骨总面积 $\times 100\%$)。

2.7 胫骨组织病理观察

检测肿瘤体积后,每组任选6只大鼠的右后肢胫骨组织,以4%甲醛溶液固定,经脱钙脱水、浸蜡包埋后制作石蜡切片;取切片,经脱蜡至水、二甲苯透明、脱水后,进行HE染色;清洗后,经干燥、透明后密封,使用显微镜观察大鼠胫骨组织的病理学变化。

2.8 胫骨组织破骨细胞观察

取“2.7”项下各组大鼠胫骨组织石蜡切片,经脱蜡至水后,加入TRAP染色液适量,于 37°C 下避光孵育70 min;以流水冲洗后,加入苏木精染色;经脱水、透明后密封,使用显微镜观察并记录破骨细胞(呈酒红色)数量。

2.9 胫骨组织中RANK、RANKL蛋白阳性表达检测

采用免疫组化法检测。取“2.7”项下各组大鼠胫骨组织石蜡切片,经脱蜡至水后,进行抗原修复及灭活处理,再以脱脂奶粉密封;加入RANK、RANKL一抗(稀释比例均为1:100),于 4°C 下孵育;次日,加入相应二抗(稀释比例为1:500),于 37°C 下孵育1 h;经DAB显影、苏木精复染后漂洗,使用显微镜观察并分析上述蛋白阳性表达区域(呈棕黄色或褐色)的平均光密度,以反映对应蛋白的阳性表达水平。

2.10 胫骨组织中RIPK1/RIPK3通路相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取每组剩余6只大鼠的胫骨组织,进行蛋白裂解以提取总蛋白;定量后,于沸水浴中加热变性。取变性蛋白适量,经凝胶电泳分离后转移至聚偏二氟乙烯膜上,以脱脂奶粉封闭;洗膜后,加入p-RIPK1、RIPK1、p-RIPK3、RIPK3、p-MLKL、MLKL、

β -actin 一抗(稀释比例分别为 1:500、1:500、1:500、1:500、1:500、1:500、1:1 000),于 4℃下孵育;次日洗膜后,加入相应二抗(稀释比例为 1:10 000),于 37℃下孵育 1 h;洗膜后,加入 ECL 试剂显色、成像。使用 Image J 软件进行灰度值分析,以目的蛋白与内参蛋白(β -actin)的条带灰度值比值表示各目的蛋白的相对表达量,再以 p-RIPK1 与 RIPK1、p-RIPK3 与 RIPK3、p-MLKL 与 MLKL 的相对表达量比值表示 RIPK1、RIPK3、MLKL 的磷酸化水平。

2.11 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件对数据进行统计分析。计量资料符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 阳和汤加减对模型大鼠体重及肿瘤生长的影响

给药前,与对照组比较,模型组大鼠的体重显著减轻($P<0.05$)。末次给药后,与对照组比较,模型组大鼠的体重显著减轻,肿瘤体积显著增大($P<0.05$);与模型组比较,阳和汤加减低、中、高剂量组大鼠的体重均显著增加,肿瘤体积均显著减小,且呈剂量依赖性($P<0.05$);与阳和汤加减高剂量组、阳和汤加减高剂量+si-NC 组比较,阳和汤加减高剂量+si-RIPK1 组大鼠的体重均显著减轻,肿瘤体积显著增大($P<0.05$)。结果见表 1。

表 1 各组大鼠体重、肿瘤体积比较($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	给药前体重/g	末次给药后体重/g	肿瘤体积/mm ³
对照组	225.63±23.04	326.74±33.19	0
模型组	160.54±17.38 ^a	207.51±21.53 ^a	1 287.35±131.26 ^a
阳和汤加减低剂量组	161.17±17.42	239.42±24.08 ^b	1 044.61±109.54 ^b
阳和汤加减中剂量组	161.42±17.69	276.26±28.55 ^{bc}	802.69±82.73 ^{bc}
阳和汤加减高剂量组	163.05±17.92	319.55±32.83 ^{bcd}	685.47±71.29 ^{bcd}
阳和汤加减高剂量+si-NC 组	162.87±17.73	312.64±32.25	697.22±72.93
阳和汤加减高剂量+si-RIPK1 组	162.11±17.51	260.15±27.34 ^{ef}	976.34±104.38 ^{ef}

a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$;c:与阳和汤加减低剂量组比较, $P<0.05$;d:与阳和汤加减中剂量组比较, $P<0.05$;e:与阳和汤加减高剂量组比较, $P<0.05$;f:与阳和汤加减高剂量+si-NC 组比较, $P<0.05$ 。

3.2 阳和汤加减对模型大鼠痛阈值的影响

与对照组比较,模型组大鼠的机械性痛阈值、热痛阈值均显著降低($P<0.05$);与模型组比较,阳和汤加减低、中、高剂量组大鼠的机械性痛阈值、热痛阈值均显著升高,且呈剂量依赖性($P<0.05$);与阳和汤加减高剂量组、阳和汤加减高剂量+si-NC 组比较,阳和汤加减高剂量+si-RIPK1 组大鼠的机械性痛阈值、热痛阈值均显著降低($P<0.05$)。结果见表 2。

3.3 阳和汤加减对模型大鼠胫骨骨破坏面积占比的影响

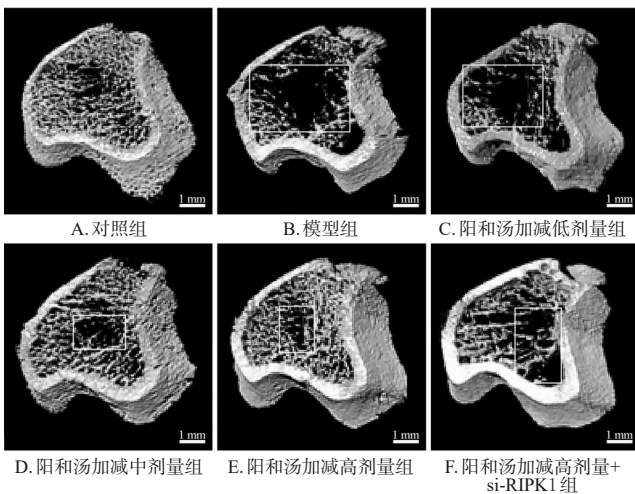
与对照组比较,模型组大鼠的胫骨骨破坏面积占比

表 2 各组大鼠机械性痛阈值、热痛阈值比较($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	机械性痛阈值/g	热痛阈值/s
对照组	24.71±2.64	7.65±0.82
模型组	9.52±0.98 ^a	3.87±0.44 ^a
阳和汤加减低剂量组	14.28±1.51 ^b	5.03±0.52 ^b
阳和汤加减中剂量组	19.36±2.16 ^{bc}	6.29±0.67 ^{bc}
阳和汤加减高剂量组	23.96±2.53 ^{bcd}	7.50±0.79 ^{bcd}
阳和汤加减高剂量+si-NC 组	23.57±2.42	7.47±0.78
阳和汤加减高剂量+si-RIPK1 组	17.84±1.85 ^{ef}	5.71±0.63 ^{ef}

a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$;c:与阳和汤加减低剂量组比较, $P<0.05$;d:与阳和汤加减中剂量组比较, $P<0.05$;e:与阳和汤加减高剂量组比较, $P<0.05$;f:与阳和汤加减高剂量+si-NC 组比较, $P<0.05$ 。

显著增大($P<0.05$);与模型组比较,阳和汤加减低、中、高剂量组大鼠的胫骨骨破坏面积占比均显著减小,且呈剂量依赖性($P<0.05$);与阳和汤加减高剂量组、阳和汤加减高剂量+si-NC 组比较,阳和汤加减高剂量+si-RIPK1 组大鼠的胫骨骨破坏面积占比均显著增大($P<0.05$)。结果见图 1(鉴于阳和汤加减高剂量+si-NC 组与阳和汤加减高剂量组结果相似,故本图只展示后者,后图 2~图 4 同)、表 3。



注:方框标记的为骨破坏区域。

图 1 各组大鼠胫骨骨破坏情况的 CT 图

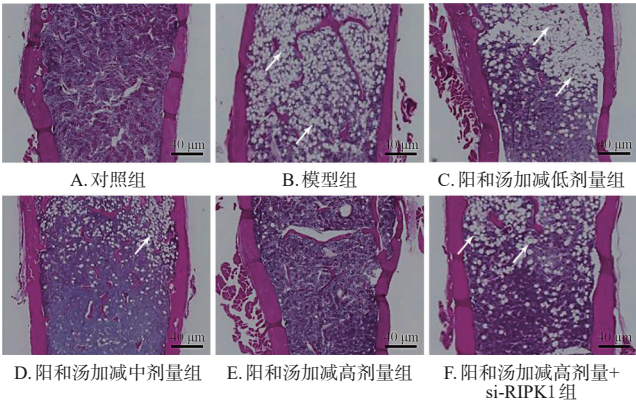
表 3 各组大鼠的胫骨骨破坏面积占比、破骨细胞数量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	胫骨骨破坏面积占比/(n=12)	破骨细胞/个(n=6)
对照组	0	3.17±0.37
模型组	43.19±4.76 ^a	16.83±1.74 ^a
阳和汤加减低剂量组	34.05±3.71 ^b	13.17±1.42 ^b
阳和汤加减中剂量组	26.71±3.05 ^{bc}	9.83±1.06 ^{bc}
阳和汤加减高剂量组	17.62±1.92 ^{bcd}	5.17±0.55 ^{bcd}
阳和汤加减高剂量+si-NC 组	18.14±2.07	5.50±0.58
阳和汤加减高剂量+si-RIPK1 组	30.56±3.14 ^{ef}	11.67±1.29 ^{ef}

a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$;c:与阳和汤加减低剂量组比较, $P<0.05$;d:与阳和汤加减中剂量组比较, $P<0.05$;e:与阳和汤加减高剂量组比较, $P<0.05$;f:与阳和汤加减高剂量+si-NC 组比较, $P<0.05$ 。

3.4 阳和汤加减对模型大鼠胫骨组织病理变化的影响

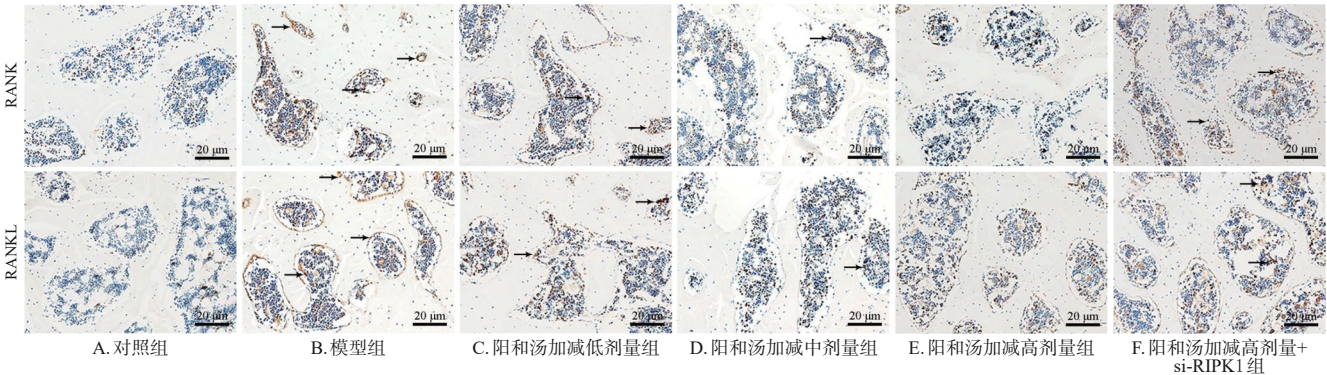
对照组大鼠胫骨组织形态结构正常,骨小梁排列有序,骨皮质发育良好,骨髓腔细胞分散分布,无明显病理损伤。与对照组比较,模型组大鼠胫骨组织中肿瘤细胞明显增生,并弥散浸润骨髓腔;骨髓腔细胞呈簇状或片状聚集分布,并可见大片肿瘤性坏死;同时存在骨质被破坏、骨皮质变薄、骨小梁受损等情况。与模型组比较,阳和汤加减低、中、高剂量组大鼠胫骨组织肿瘤细胞浸润、骨皮质损伤、骨小梁受损等病理改变均有不同程度改善,其中阳和汤加减高剂量组的改善最明显。阳和汤加减高剂量+si-NC组与阳和汤加减高剂量组大鼠胫骨组织的病理表现基本一致,而阳和汤加减高剂量+si-RIPK1组大鼠胫骨组织的病理损伤较上述两组严重。结果见图2。



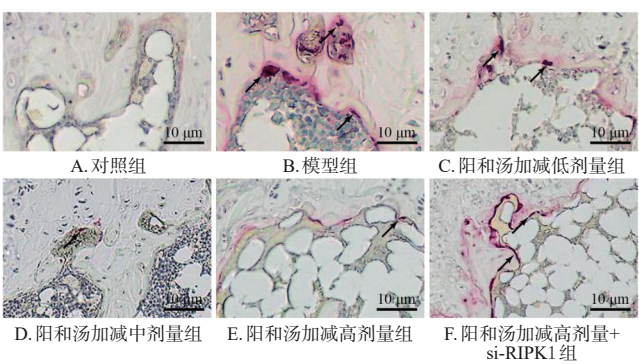
箭头:肿瘤细胞。
图2 各组大鼠胫骨组织病理变化的显微图(HE染色)

3.5 阳和汤加减对模型大鼠胫骨组织中破骨细胞数量的影响

与对照组比较,模型组大鼠胫骨组织中破骨细胞数量显著增多($P<0.05$);与模型组比较,阳和汤加减低、中、高剂量组大鼠胫骨组织中破骨细胞数量均显著减少,且呈剂量依赖性($P<0.05$);与阳和汤加减高剂量组、阳和汤加减高剂量+si-NC组比较,阳和汤加减高剂量+si-RIPK1组大鼠胫骨组织中破骨细胞数量均显著增多($P<0.05$)。结果见表3、图3。



箭头:RANK或RANKL蛋白阳性表达区域。
图3 各组大鼠胫骨组织破骨细胞数量观察的显微图(TRAP染色)



箭头:破骨细胞。
图4 各组大鼠胫骨组织中RANK、RANKL蛋白表达的显微图(免疫组化法)

3.6 阳和汤加减对模型大鼠胫骨组织中RANK、RANKL蛋白阳性表达的影响

与对照组比较,模型组大鼠胫骨组织中RANK、RANKL蛋白的阳性表达均显著上调($P<0.05$);与模型组比较,阳和汤加减低、中、高剂量组大鼠胫骨组织中RANK、RANKL蛋白的阳性表达均显著下调,且呈剂量依赖性($P<0.05$);与阳和汤加减高剂量组、阳和汤加减高剂量+si-NC组比较,阳和汤加减高剂量+si-RIPK1组大鼠胫骨组织中RANK、RANKL蛋白的阳性表达均显著上调($P<0.05$)。结果见图4、表4。

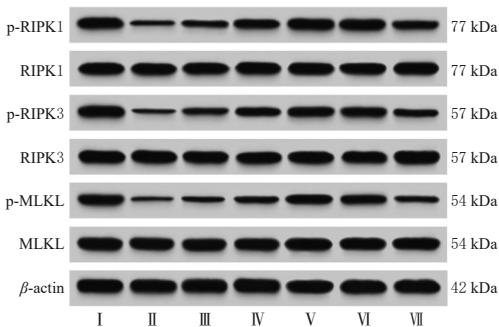
3.7 阳和汤加减对模型大鼠胫骨组织中RIPK1/RIPK3通路相关蛋白磷酸化水平的影响

与对照组比较,模型组大鼠胫骨组织中RIPK1、RIPK3、MLKL的磷酸化水平均显著降低($P<0.05$);与模型组比较,阳和汤加减低、中、高剂量组大鼠胫骨组织中RIPK1、RIPK3、MLKL的磷酸化水平均显著升高,且呈剂量依赖性($P<0.05$);与阳和汤加减高剂量组、阳和汤加减高剂量+si-NC组比较,阳和汤加减高剂量+si-RIPK1组大鼠胫骨组织中RIPK1、RIPK3、MLKL的磷酸化水平均显著降低($P<0.05$)。结果见图5、表5。

表4 各组大鼠胫骨组织中RANK、RANKL蛋白阳性表达区域平均光密度比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	RANK	RANKL
对照组	0.19±0.03	0.14±0.02
模型组	0.72±0.08 ^a	0.65±0.07 ^a
阳和汤加减低剂量组	0.56±0.07 ^b	0.45±0.06 ^b
阳和汤加减中剂量组	0.38±0.05 ^{bc}	0.30±0.04 ^{bc}
阳和汤加减高剂量组	0.24±0.03 ^{bcd}	0.18±0.03 ^{bcd}
阳和汤加减高剂量+si-NC组	0.26±0.04	0.19±0.03
阳和汤加减高剂量+si-RIPK1组	0.48±0.06 ^d	0.40±0.05 ^d

a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与模型组比较, $P<0.05$; c: 与阳和汤加减低剂量组比较, $P<0.05$; d: 与阳和汤加减中剂量组比较, $P<0.05$; e: 与阳和汤加减高剂量组比较, $P<0.05$; f: 与阳和汤加减高剂量+si-NC组比较, $P<0.05$ 。



I: 对照组; II: 模型组; III: 阳和汤加减低剂量组; IV: 阳和汤加减中剂量组; V: 阳和汤加减高剂量组; VI: 阳和汤加减高剂量+si-NC组; VII: 阳和汤加减高剂量+si-RIPK1组。

图5 各组大鼠胫骨组织中RIPK1/RIPK3通路相关蛋白表达的电泳图

表5 各组大鼠胫骨组织中RIPK1/RIPK3通路相关蛋白的磷酸化水平比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	p-RIPK1/RIPK1	p-RIPK3/RIPK3	p-MLKL/MLKL
对照组	0.94±0.10	0.82±0.09	0.70±0.08
模型组	0.33±0.04 ^a	0.27±0.04 ^a	0.22±0.03 ^a
阳和汤加减低剂量组	0.48±0.06 ^b	0.42±0.05 ^b	0.35±0.05 ^b
阳和汤加减中剂量组	0.69±0.08 ^{bc}	0.58±0.07 ^{bc}	0.50±0.06 ^{bc}
阳和汤加减高剂量组	0.90±0.10 ^{bcd}	0.77±0.09 ^{bcd}	0.68±0.08 ^{bcd}
阳和汤加减高剂量+si-NC组	0.87±0.10	0.75±0.08	0.66±0.08
阳和汤加减高剂量+si-RIPK1组	0.55±0.07 ^d	0.49±0.06 ^d	0.43±0.05 ^d

a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与模型组比较, $P<0.05$; c: 与阳和汤加减低剂量组比较, $P<0.05$; d: 与阳和汤加减中剂量组比较, $P<0.05$; e: 与阳和汤加减高剂量组比较, $P<0.05$; f: 与阳和汤加减高剂量+si-NC组比较, $P<0.05$ 。

4 讨论

本研究通过骨髓腔注射乳腺癌细胞悬液构建乳腺癌骨转移大鼠模型,结果显示,模型组大鼠的机械性痛阈值、热痛阈值均显著降低,体内肿瘤体积显著增大,破骨细胞生成显著增多,胫骨骨破坏面积占比显著增大,胫骨组织病理损伤严重,提示乳腺癌骨转移模型构建成功。研究指出,骨吸收是导致乳腺癌骨转移部位发生骨破坏的关键因素^[8]。RANK、RANKL均是参与骨吸收的关键蛋白,其中RANK作为肿瘤坏死因子受体家族成员之一,是促进破骨细胞增殖、分化、成熟的必需因子——

RANKL的特异性受体,两者结合可共同调控骨吸收,介导乳腺癌骨转移部位发生溶骨性破坏,进而导致肿瘤性骨破坏^[9-10]。研究证实,RANK、RANKL蛋白高表达,可促进骨吸收、肿瘤细胞归巢,加剧骨痛,增加骨折风险;而抑制RANK、RANKL蛋白的表达则可抑制破骨细胞活性,改善骨吸收,阻止肿瘤骨转移^[8]。此外,RANKL还可诱导破骨细胞生成,加剧乳腺癌诱导的骨破坏,增加乳腺癌骨转移的风险;且抑制RANKL蛋白表达后,三阴性乳腺癌肿瘤细胞的生长将明显受阻^[11-12]。本研究结果显示,模型组大鼠胫骨组织中破骨细胞数量及RANK、RANKL蛋白阳性表达均显著升高或上调,故推测抑制RANK、RANKL蛋白的表达可能是抑制破骨细胞生成,进而抑制乳腺癌骨转移所致骨破坏的潜在途径之一。

阳和汤作为常见的治疗恶性肿瘤的中药方剂,可通过改善肿瘤免疫微环境,抑制肺癌荷瘤小鼠肿瘤的生长^[13];此外,该方还可通过抑制肿瘤细胞的增殖、转移,从而提升乳腺癌骨转移患者的治疗效果^[14]。阳和汤加减是在“阳和汤”基础上演化而来。方中,鹿角胶(烊化)温补肾阳、益精养血,桂枝温通血脉、散寒止痛,麻黄升发阳气、开腠理以散寒结,白芥子去皮膜、善化痰湿、通络散结,生甘草调和诸药以解毒。上述诸药的功效与属阴寒证的乳腺癌骨转移“阴盛则寒、寒主收引、主凝滞、主痛”对症,故推测阳和汤加减对乳腺癌骨转移具有治疗作用。本研究结果显示,低、中、高剂量的阳和汤加减可剂量依赖性地升高乳腺癌骨转移大鼠的机械性痛阈值、热痛阈值,抑制其体内肿瘤生长,减少破骨细胞生成,减小胫骨骨破坏面积占比,改善胫骨组织肿瘤细胞浸润、骨皮质损伤、骨小梁受损等病理损伤,提示阳和汤加减对乳腺癌骨转移引发的骨破坏具有潜在的改善作用。

RIPK1/RIPK3通路是参与细胞程序性坏死的关键通路:RIPK1与RIPK3相互作用,可结合形成死亡小体,激活MLKL并使p-MLKL从细胞质转移至细胞膜,造成细胞内钙、钠离子流紊乱,促使细胞膜肿胀破裂、丧失完整性,以及细胞质渗漏和线粒体功能障碍,最终导致细胞坏死^[15-16]。另有研究显示,激活RIPK1/RIPK3通路可促使非小细胞肺癌细胞停滞于G₂/M期,诱导该细胞发生程序性坏死,从而抑制裸鼠移植瘤的生长^[17-18];同时,RIPK1和RIPK3是宫颈癌患者的阳性预后因子,上调RIPK1和RIPK3蛋白的表达可促进宫颈癌细胞的凋亡和坏死,进而抑制其生长、增殖^[19-20]。本研究结果显示,模型组大鼠胫骨组织中RIPK1、RIPK3、MLKL的磷酸化水平均较对照组显著降低;而低、中、高剂量的阳和汤加

减可剂量依赖性地升高RIPK1、RIPK3、MLKL蛋白的磷酸化水平,提示阳和汤加减对乳腺癌骨转移大鼠骨破坏的改善作用可能与激活RIPK1/RIPK3通路有关。随后,本研究通过沉默RIPK1蛋白表达对上述假设进行验证,结果显示,转染si-RIPK1以沉默RIPK1后,高剂量阳和汤加减的改善作用均被减弱,提示该方可能通过激活RIPK1/RIPK3通路来改善乳腺癌骨转移引发的骨破坏。

综上,阳和汤加减可减轻乳腺癌骨转移大鼠的骨破坏,上述作用可能与激活RIPK1/RIPK3通路有关。然而,乳腺癌骨转移的发生机制较为复杂,且阳和汤加减药理作用丰富,其可能通过多条途径影响乳腺癌骨转移的发生,故尚需后续研究进一步深入探索阳和汤加减对乳腺癌骨转移的干预机制。

参考文献

- [1] IBRAGIMOVA M K, TSYGANOV M M, KRAVTSOVA E A, et al. Organ-specificity of breast cancer metastasis[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(21):15625.
- [2] VENETIS K, PICIOTTI R, SAJJADI E, et al. Breast cancer with bone metastasis: molecular insights and clinical management[J]. *Cells*, 2021, 10(6):1377.
- [3] SHAO H M, VARAMINI P. Breast cancer bone metastasis: a narrative review of emerging targeted drug delivery systems[J]. *Cells*, 2022, 11(3):388.
- [4] 王志伟. 阳和汤加减联合西药止痛药治疗骨转移癌疼痛的临床观察[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2020, 20(54):29-30.
- [5] NEWELL M, GORUK S, SCHUELER J, et al. Docosa-hexaenoic acid enrichment of tumor phospholipid membranes increases tumor necroptosis in mice bearing triple negative breast cancer patient-derived xenografts[J]. *J Nutr Biochem*, 2022, 107:109018.
- [6] 徐波, 徐蕾. 阳和汤加减对强直性脊柱炎小鼠RANKL系统表达的影响[J]. *中医药临床杂志*, 2018, 30(10):1844-1846.
- [7] 胡玉蝶, 王晓丽, 焦方敏, 等. 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.
- [8] ZHANG Y, LIANG J Q, LIU P L, et al. The RANK/RANKL/OPG system and tumor bone metastasis: potential mechanisms and therapeutic strategies[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13:1063815.
- [9] DE LEON-OLIVA D, BARRENA-BLÁZQUEZ S, JIMÉNEZ-ÁLVAREZ L, et al. The RANK-RANKL-OPG system: a multifaceted regulator of homeostasis, immunity, and cancer[J]. *Medicina*, 2023, 59(10):1752.
- [10] TUFAIL M, WU C X. RANK pathway in cancer: underlying resistance and therapeutic approaches[J]. *J Chemother*, 2023, 35(5):369-382.
- [11] ZHENG J H, HE W L, CHEN Y, et al. Erianin serves as an NFATc1 inhibitor to prevent breast cancer-induced osteoclastogenesis and bone destruction[J]. *J Adv Res*, 2025, 69:399-411.
- [12] PILARD C, RONCARATI P, ANCIÓN M, et al. RANKL blockade inhibits cancer growth through reversing the tolerogenic profile of tumor-infiltrating (plasmacytoid) dendritic cells[J]. *J Immunother Cancer*, 2025, 13(3):e010753.
- [13] 吴琳, 张渭波, 行艳丽, 等. 阳和汤对Lewis肺癌荷瘤小鼠的抑瘤效应及肿瘤免疫微环境影响的实验研究[J]. *中国医药导报*, 2021, 18(25):26-30, 封4.
- [14] 李阳, 黄立中. 阳和汤对肾阳虚乳腺癌骨转移患者CXCL12/CXCR4及其下游血管内皮生长因子的影响[J]. *肿瘤药学*, 2020, 10(1):73-76.
- [15] SPEIR M, NOWELL C J, CHEN A A, et al. Ptpn6 inhibits caspase-8- and RIPK3/MLKL-dependent inflammation[J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(1):54-64.
- [16] JACOBSEN A V, PIEROTTI C L, LOWES K N, et al. The Lck inhibitor, AMG-47a, blocks necroptosis and implicates RIPK1 in signalling downstream of MLKL[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(4):291.
- [17] 王乙波, 焦斌, 王小强, 等. 苍术素通过激活RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路诱导非小细胞肺癌A549细胞程序性坏死并抑制裸鼠移植瘤生长[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2024, 31(2):146-153.
- [18] LIN S S, CHANG T M, WEI A I, et al. Acetylshikonin induces necroptosis via the RIPK1/RIPK3-dependent pathway in lung cancer[J]. *Aging*, 2023, 15(24):14900-14914.
- [19] VOGELSANG T L R, KAST V, BAGNJUK K, et al. RIPK1 and RIPK3 are positive prognosticators for cervical cancer patients and C2 ceramide can inhibit tumor cell proliferation *in vitro*[J]. *Front Oncol*, 2023, 13:1110939.
- [20] MOHANTY S, YADAV P, LAKSHMINARAYANAN H, et al. RETRA induces necroptosis in cervical cancer cells through RIPK1, RIPK3, MLKL and increased ROS production[J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 920:174840.

(收稿日期:2025-10-23 修回日期:2026-02-03)

(编辑:张元媛)