复方守宫散联合唑来膦酸通过 B 淋巴细胞诱导成熟蛋白 -1/B 细胞淋巴瘤因子 6 通路对肺癌骨转移的研究

张良军[1]，蔡　琪[2]，张思龙[3]，黄　璟[1]，田敬海[4]，夏黎明[5]
（1. 武汉市东西湖区人民医院肿瘤科，湖北武汉 430040；2. 安徽医科大学第一临床学院，安徽合肥 230032；3. 武汉科技大学化工学院，湖北武汉 430081；4. 武汉市东西湖区人民医院骨外科，湖北武汉 430040；5. 安徽中医药大学第一附属医院肿瘤科，安徽合肥 230031）

摘要：目的 探讨复方守宫散联合唑来膦酸对肺癌骨转移的治疗作用，及对 B 淋巴细胞诱导成熟蛋白（B lymphocyte induced maturation protein，Blimp）1/B 细胞淋巴瘤因子（B-cell lymphoma factor，Bcl）-6 通路的影响。**方法** 建立肺癌骨转移小鼠模型，分为骨转移组、中药低剂量（40 mg/kg 复方守宫散）组、中药高剂量（120 mg/kg 复方守宫散）组、西药（50 μg/kg 唑来膦酸）组以及联合用药（120 mg/kg 复方守宫散＋ 50 μg/kg 唑来膦酸）组，另设假手术组，每组 10 只。21 d 后，观察胫骨损伤、病理形态、统计破骨细胞数目、骨转移细胞活体成像系统荧光信号以及胫骨组织中 Blimp1、Bcl-6 表达水平。**结果** 与假手术组相比，骨转移组破骨细胞数目、肿瘤细胞荧光信号以及 Blimp1 表达增加，Bcl-6 表达降低（$P < 0.01$）；与骨转移组相比，中药低、高剂量组以及西药组的破骨细胞数目、肿瘤细胞荧光信号以及 Blimp1 表达降低，Bcl-6 表达增加（$P < 0.01$）；联合用药增强肺癌骨转移的治疗作用（$P < 0.01$）。**结论** 复方守宫散联合唑来膦酸治疗肺癌骨转移具有协同作用，其机制可能与抑制 Blimp1/Bcl-6 通路有关。

关键词：复方守宫散；唑来膦酸；肺癌骨转移；B 淋巴细胞诱导成熟蛋白 1/B 细胞淋巴瘤因子 -6
中图分类号：R734.2；R273　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1672-9188（2023）11-1152-07
DOI：10.13683/j.wph.2023.11.004

Study of compound Shougong powder combined with zoledronic acid on bone metastasis of lung cancer through B lymphocyte induced maturation protein-1/B cell lymphoma factor 6 pathway

ZHANG Liangjun[1], CAI Qi[2], ZHANG Silong[3], HUANG Jing[1], TIAN Jinghai[4], XIA Liming[5]
(*1. Department of Oncology, People's Hospital of Dongxihu District , Wuhan 430040, Hubei Province, China; 2. The First Clinical College, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China; 3. School of Chemical Engineering, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430081, Hubei Province, China; 4. Department of Orthopedics, People's Hospital of Dongxihu District, Wuhan 430040, Hubei Province, China; 5. Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, Anhui Province, China*)

Abstract: ***Objective*** To investigate the therapeutic effect of compound Shougong power combined with zoledronic acid on bone metastasis of lung cancer, and the effect on B lymphocyte induced maturation protein (Blimp) 1/B cell lymphoma factor (Bcl)-6 pathway. ***Methods*** The mouse model of lung cancer bone metastasis was established and divided into bone metastasis group, low dose of traditional Chinese medicine (40 mg/kg compound Shougong powder) group, high dose of traditional Chinese medicine (120 mg/kg compound Shougong powder) group, western medicine (50 μg/kg zoledronic acid) group and combined treatment (120 mg/kg compound Shougong powder＋50 μg/kg zoledronic acid) group, and set up sham operation group, with 10 mice in each group. After 21 days, tibial injury, pathological morphology, number of osteoclasts, *in vivo* imaging system fluorescence signal of bone metastasis and expression levels of Blimp1 and Bcl6 in tibial

收稿日期：2022-08-22；**修回日期：**2023-09-19
作者简介：张良军，主治医师，研究方向：中西医结合防治恶性肿瘤。
基金项目：武汉市医学科研项目（WZ20A02）

tissue were observed. ***Results*** Compared with the sham operation group, the number of osteoclasts, tumor cell fluorescence signals and Blimp1 expression in bone metastasis group were increased, while the Bcl-6 expression decreased（$P<0.01$）. Compared with the bone metastasis group, the number of osteoclasts, tumor cell fluorescence signal and Blinp1 expression in the low and high dose traditional Chinese medicine groups and the western medicine group decreased, while Bcl-6 expression increased（$P<0.01$）. Combination therapy enhanced the therapeutic effect of bone metastasis in lung cancer（$P<0.01$）. ***Conclusion*** The combination of compound Shougong powder and zoledronic acid has a synergistic effect in the treatment of lung cancer bone metastasis, which may be related to the inhibition of the Blinmp1/Bcl-6 pathway.

Key words: compound Shougong powder; zoledronic acid; bone metastasis of lung cancer; B-lymphocyte-induced maturation protein-1/B-cell lymphoma factor 6 pathway

肺癌是常见恶性肿瘤之一，发病率较高[1]。骨转移是肺癌常见转移部位[2]，其导致患者疼痛、脊髓受压以及病理性骨折等，损害骨骼结构完整性，同时降低患者生活质量[3]。因此有必要研究肺癌骨转移的机制以寻求最佳药物治疗。B 淋巴细胞诱导成熟蛋白 1（B lymphocyte induced maturation protein 1，Blimp-1）是浆细胞终末分化的关键调节因子，对 B 细胞系定型和早期 B 细胞发育至关重要，且其与下游因子 B 细胞淋巴瘤因子（B-cell lymphoma，Bcl）-6 参与破骨细胞的调控[4—5]。中医认为痰瘀阻络、肾精亏虚是肿瘤骨转移的根本原因[6]，复方守宫散具有消肿止痛、扶正祛邪及补虚解毒等功效，可抗肿瘤、提高免疫力[7]。唑来膦酸作为双膦酸盐类药物在肺癌骨转移治疗中可抑制骨质破坏及破坏骨细胞活性，对骨骼起保护作用，但该药物亦会引发严重不良反应[8]。本研究探讨唑来膦酸联合复方守宫散治疗肺癌骨转移及相关作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及细胞

上海医药工程研究院动物中心提供 LL/2-Luc-M38 肺癌细胞株。将细胞培养在含有 10% 胎牛血清、1% 青霉素 / 链霉素的改良 Eagle 培养基（Dulbecco's modified Eagle's medium，DMEM）中，并置于 5% 二氧化碳、37 ℃的培养箱中继续传代培养。

华阜康生物科技股份有限公司提供 62 只 7 周龄 C57BL/6 雄性小鼠，体质量 20 ～ 23 g，实验动物使用许可证：SYXK（鄂）2019-0325；实验动物生产许可证：SYXK（京）2019-0008。所有小鼠均饲养在温度 22 ℃、湿度 55%、12 h 光 / 暗循环的 SPF 饲养笼中，每笼饲养 4 ～ 5 只小鼠。所有小鼠可自由获取食物和水。该研究已获得动物伦理和使用委员会的批准（2110256205）。

1.2 试剂与仪器

安徽省中医药大学提供自制剂复方守宫散，组方包括人参、守宫、梅花、制何首乌、没药以及三七等；瑞士诺华制药有限公司提供唑来膦酸（5 ml，20210824）；默克公司提供青霉素（500 g，69-57-8）、链霉素（5 g，11860-038）、DMEM 培养基（D5546）；Gibco 提供 10% 胎牛血清（10099-141）；碧云天公司提供放射免疫沉淀法（adioimmunoprecipitation assay，RIPA）缓冲液（100 ml，P0013B）；赛默飞世尔科技公司提供蛋白质提取试剂（15 ml，78833）；Takara 公司提供 TRIzol 试剂（200 ml，9109）、反转录试剂盒（10 μl，RR037A）、聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）引物序列（R0001A）；Invitrogen 公司提供抗酒石酸酸性磷酸酶（tartrate-resistant acid phosphatase，TRAP）试剂盒（48T/96T）；上海起发实验试剂公司提供 D-luciferin potassium 工作液（100 mg，1-360221-200）；上海康拓化工有限公司提供苏木精 - 伊红（hematoxylin-eosin，HE）染色液（517-28-2）；武汉益普生物科技有限公司提供磷酸盐缓冲液（phosphate buffered solution，PBS）溶液（500 ml，PB18052）；武汉天植生物技术有限公司提供巴比妥钠（5 mg，CFN00448）；Abcam 公司

提供 Blimp-1（ab198287）、Bcl-6（ab33901）一抗。

日本奥林帕斯提供 CX41 显微镜；柯达公司提供 DR7100 X 线摄影机；美国 Xenogen 公司提供小动物活体成像系统（*in vivo* imaging system，IVIS）；ABI 公司提供 ABI-7300 Real-time 检测仪；日本三洋公司提供 MCO-18AIC 培养箱。

1.3 动物造模及分组

参照文献[9]将传代培养的 LL/2-Luc-M38 细胞收集于 EP 管中，调整细胞浓度 1×10^7 个 /ml，无菌条件下，取 0.2 ml 细胞悬液，皮下接种至随机选取的 2 只小鼠前右腋部位，继续饲养 14 d 后，采用脱颈椎处死小鼠，酒精消毒，无菌操作取出肿瘤组织，制备成瘤细胞悬液，PBS 调整细胞浓度 2×10^8 个 /ml，储存于冰盒中用于制备肺癌骨转移小鼠模型。

将剩余 60 只小鼠随机数字法分为假手术组 10 只、造模组 50 只。所有小鼠腹腔注射戊巴比妥钠麻醉所有小鼠，1 ml 注射器针头在小鼠右腿膝关节处的胫骨处穿刺，进针深度为 3.5 mm，采用 25 μl 微量注射器向造模组小鼠胫骨骨髓腔内注入 10 μl 肿瘤细胞悬液，2 μl 明胶海绵水溶液以及 1 μl 空气，假手术组仅注入 PBS 溶液。造模组小鼠出现明显缩足反应时，表明骨转移模型造模成功。将造模组小鼠随机分为骨转移组、中药低、高剂量组、西药组及联合用药组，每组 10 只。其中中药低、高剂量组小鼠分别以 40 及 120 mg/kg 复方守宫散灌胃干预[10]；西药组以腹腔注射 50 μg/kg 唑来膦酸干预[11]；联合用药组采用 120 mg/kg 复方守宫散灌胃，同时以腹腔注射 50 μg/kg 唑来膦酸干预，骨转移组及假手术组均以生理盐水干预，每组 3 d 干预 1 次，连续干预 21 d。

1.4 研究方法

1.4.1 X 射线观察胫骨部位骨损伤程度

D21 干预结束后，采取仰卧位固定各组小鼠，随后行双侧后肢 X 线摄片检查，观察骨损伤程度。

1.4.2 肿瘤细胞 IVIS 荧光信号表达

X 射线完成后，麻醉小鼠，运用动物活体荧光 IVIS 成像系统检测 IVIS 荧光信号表达，取 15 mg/ml *D*- 荧光素钾工作液，以 10 μl/g 腹腔注射至各组小鼠，以腹面向上的方式将小鼠放到暗箱里进行荧光成像拍片。

1.4.3 HE 检测小鼠胫骨组织病理学变化

D22 处死各组小鼠，分离部分胫骨组织并固定在 10% 中性福尔马林溶液中，制备石蜡切片，经固定、脱水、清除、浸润、包埋和切片步骤后，将组织切片经 HE 染色，中性树脂封片后，在显微镜下随机选取 5 个视野，以 200 倍数观察小鼠胫骨组织病理学特征。

1.4.4 TRAP 检测胫骨组织中破骨细胞数目及形态

取各组小鼠胫骨组织，制备组织切片，按照 TRAP 染色试剂盒说明进行配液、染色、漂洗等操作步骤，封片，于光镜下随机选取 5 个视野，以 200 放大倍数观察破骨细胞形态和数量。

1.4.5 实时定量聚合酶链式反应（quantitative real-time polymerase chain reaction，qRT-PCR）检测胫骨组织中 Blimp1、Bcl-6 信使（messenger，m）RNA 表达水平

取部分胫骨组织，用 TRizol 试剂从组织中提取总 RNA，利用 2000 分光光度计检测 RNA 溶液的纯度和浓度，使用逆转录酶进行 RNA 的逆转录，使用 SYBR Green mix 在 StepOne Plus 实时 PCR 系统上进行实时定量 PCR，Blimp1 上游引物序列：5'-CCGGCACCTTCAGACTCTGA-3'，下游引物序列：5'-GCGCAAATGAAGTCGCAGTT-3'，Bcl-6 上游引物序列：5'-TTTGGAGGATCTGACCCGAA-3'，下游引物序列：5'-CCATGGAGGTCACATCGACA-3'，β- 肌动蛋白（actin）上游引物序列：5'-AGGGAGAACCGTGAGAAG-3'，下游引物序列：5'-CTGGTCCGACAGGTAGAA-3'。以 β-actin 为内源参照物，按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式分析 Blimp1、Bcl-6 mRNA 表达水平。

1.4.6 免疫印迹法（western blot，WB）检测胫骨组织中 Blimp1、Bcl-6 蛋白表达

取部分胫骨组织，使用 RIPA 缓冲液提取总蛋白，在 10% 十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝

胶 电 泳（sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）上分离，然后转移到硝酸纤维素膜上。将膜在 5% 脱脂牛奶中封闭 1 h，并在 4 ℃下与 Blimp1、Bcl-6、β-actin 一抗孵育过夜，洗膜后，与适当的辣根过氧化物酶偶联二抗孵育。最后用化学发光试剂盒显色、定影后进行观察、拍照并分析蛋白表达。

1.5 统计学方法

以 SPSS27.0 软件进行分析，计量资料 Blimp1、Bcl-6 mRNA 及蛋白表达以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示，破骨细胞数目、IVIS 荧光信号及 Blimp1、Bcl-6 mRNA 及蛋白表达均符合正态分布，各组比较以单因素方差分析，进一步采用 SNK-q 进行两两比较，以 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨损伤程度

假手术组小鼠无明显损伤；骨转移组可见明显溶骨性骨破损，骨皮质模糊不清；中药低、高剂量组及西药组，溶骨性骨破损得到改善，其中中药高剂量组、西药组胫骨上端表现出穿凿状小斑点骨质破坏，但联合用药组仅表现出轻度骨皮质损坏，见图 1。

2.2 复方守宫散对小鼠肿瘤细胞 IVIS 荧光信号表达的影响

与假手术组相比，骨转移组荧光信号表达量显著上升（$P < 0.01$）；与骨转移组相比，中药低剂量组荧光信号表达量显著下降（$P < 0.01$）；与中药低剂量组，西药组、中药高剂量组荧光信号表达量显著下降（$P < 0.01$），但两组间荧光信号表达量无显著差异（$P > 0.01$）；与西药组、中药高剂量组相比，联合用药组荧光信号表达量显著下降（$P < 0.01$），见表 1。

2.3 复方守宫散对小鼠胫骨组织病理学的影响

假手术组未见明显肿瘤细胞形成；骨转移组胫骨组织中肿瘤细胞成团，骨肿瘤灶显著；中药低、高剂量组、西药组以及联合用药组肿瘤细胞密集程度显著降低，其中以联合用药组表现最为显著，仅存在少量散在肿瘤细胞，见图 2。

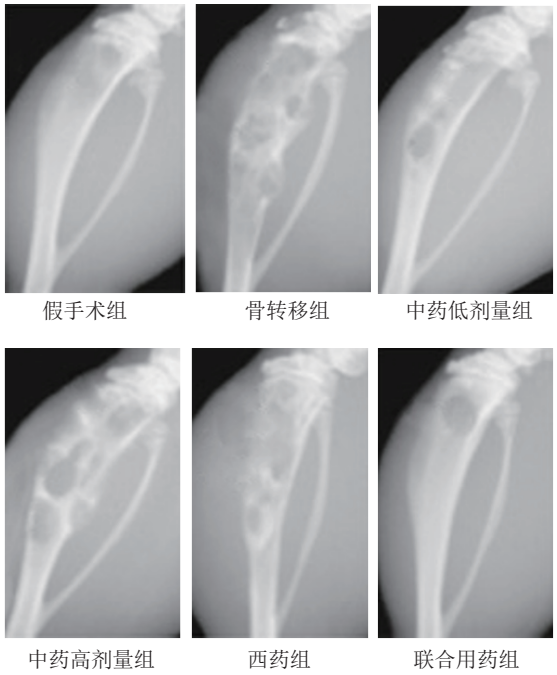


图 1 各组小鼠 X 线胫骨部位
Figure 1 X - ray tibia of mice in each group

表 1 比较各组小鼠 IVIS 荧光信号表达 $(\bar{x}\pm s)$
Table 1 Comparison of IVIS fluorescence signal expression in mice of each group $(\bar{x}\pm s)$

组别	IVIS荧光信号表达量/$\times 10^5$ p·s^{-1}
假手术组（n=10）	1.77±0.18
骨转移组（n=10）	5.88±0.59*
中药低剂量组（n=10）	4.56±0.46$^{\#}$
中药高剂量组（n=10）	3.07±0.31$^{\#\blacktriangle}$
西药组（n=10）	3.11±0.32$^{\#\blacktriangle}$
联合用药组（n=10）	2.16±0.22$^{\blacktriangledown\&}$
F值	169.912
P值	＜0.001

注：与假手术组比较，*$P < 0.01$；与骨转移组比较，$^{\#}P < 0.01$；与中药低剂量组比较，$^{\blacktriangle}P < 0.01$；与中药高剂量组比较，$^{\blacktriangledown}P < 0.01$；与西药组比较，$^{\&}P < 0.01$。

Note: *vs* the sham operation group, *$P < 0.01$; *vs* the bone metastasis group, $^{\#}P < 0.01$; *vs* the Chinese medicine low dose group, $^{\blacktriangle}P < 0.01$; *vs* the Chinese medicine high dose group, $^{\blacktriangledown}P < 0.01$; *vs* the western medicine group, $^{\&}P < 0.01$.

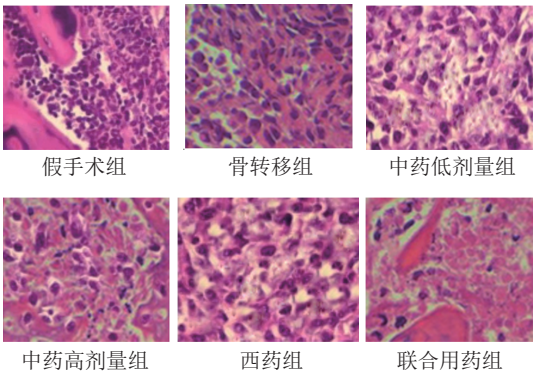


图 2 各组小鼠胫骨部位病理切片（HE，×200）

Figure 2 The pathological sections of tibia of mice in each group（HE，×200）

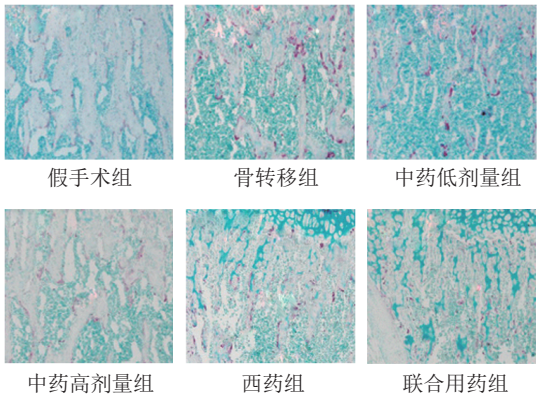


图 3 各组小鼠胫骨组织破骨细胞数目及形态（TRAP，×200）

Figure 3 The number and morphology of osteoclasts in the tibia tissue of mice in each group（TRAP，×200）

表 2 比较各组小鼠胫骨组织阳性表达数（$\bar{x}\pm s$）

Table 2 Comparison of the number of positive expressions in tibia tissues of mice in each group（$\bar{x}\pm s$）

组别	阳性表达数/个
假手术组（n=10）	5.01±0.51
骨转移组（n=10）	16.89±1.69*
中药低剂量组（n=10）	13.49±1.35$^{\#}$
中药高剂量组（n=10）	8.51±0.86$^{\#\blacktriangle}$
西药组（n=10）	8.55±0.86$^{\#\blacktriangle}$
联合用药组（n=10）	5.76±0.58$^{\blacktriangledown}$&
F值	188.890
P值	＜0.001

注：与假手术组比较，*P＜0.01；与骨转移组比较，$^{\#}P$＜0.01；与中药低剂量组比较，$^{\blacktriangle}P$＜0.01；与中药高剂量组比较，$^{\blacktriangledown}P$＜0.01；与西药组比较，$^{\&}P$＜0.01。

Note: *vs* the sham operation group, *P ＜ 0.01; *vs* the bone metastasis group, $^{\#}P$ ＜ 0.01; *vs* the Chinese medicine low dose group, $^{\blacktriangle}P$ ＜ 0.01; *vs* the Chinese medicine high dose group, $^{\blacktriangledown}P$＜0.01; *vs* the western medicine group, $^{\&}P$＜0.01.

2.4 复方守宫散对小鼠胫骨组织破骨细胞数目及形态的影响

阳性的破骨细胞胞浆呈酒红色。假手术组仅存在少量破骨细胞，体积较小；与假手术组相比，骨转移组骨内膜中破骨细胞数目较多，体积较大，阳性细胞数显著增加（P＜0.01）；与骨转移组相比，中药低、高剂量组及西药组破骨细胞数目虽减少但依然体积较大、清晰可见，且阳性细胞数显著减少（P＜0.01），但中药高剂量与西药组阳性细胞数无显著差异（P＞0.01）；与中药高剂量组、西药组相比，联合用药组阳性细胞数显著下降（P＜0.01），见图 3，表 2。

2.5 复方守宫散对小鼠胫骨组织中 Blimp1、Bcl-6 mRNA 表达水平的影响

骨转移组 Blimp1 mRNA 表达较假手术组显著升高，Bcl-6 mRNA 表达显著降低（P＜0.01）；中药低剂量组 Blimp1 mRNA 表达较骨转移组显著下降，Bcl-6 mRNA 表达显著增加（P＜0.01）；西药组、中药高剂量组 Blimp1 mRNA 表达较中药低剂量组显著下降，Bcl-6 mRNA 表达显著增加（P＜0.01），但两组间 Blimp1、Bcl-6 mRNA 表达无显著差异（P＞0.01）；联合用药组 Blimp1 mRNA 表达较西药组、中药高剂量组显著下降，Bcl-6 mRNA 表达显著增加（P＜0.01），见表 3。

2.6 复方守宫散对小鼠胫骨组织中 Blimp1、Bcl-6 蛋白表达的影响

骨转移组 Blimp1 蛋白表达较假手术组显著升高，Bcl-6 表达显著降低（P＜0.01）；中药低剂量组 Blimp1 蛋白表达较骨转移组显著下降，Bcl-6 表达显著增加（P＜0.01）；西药组、中药高剂量组 Blimp1 蛋白表达较中药低剂量组显著下降，Bcl-6 表达显著

表 3 比较各组小鼠胫骨组织中 Blimp1、Bcl-6 mRNA 表达水平（$\bar{x}\pm s$）

Table 3 Comparison of mRNA expression levels of Blimp1 and Bcl-6 in tibia tissues of mice in each group（$\bar{x}\pm s$）

组别	Blimp1 mRNA	Bcl-6 mRNA
假手术组（n=10）	0.21±0.03	0.93±0.10
骨转移组（n=10）	0.88±0.09*	0.13±0.02*
中药低剂量组（n=10）	0.67±0.07$^{\#}$	0.33±0.04$^{\#}$
中药高剂量组（n=10）	0.46±0.05$^{\#\blacktriangle}$	0.58±0.06$^{\#\blacktriangle}$
西药组（n=10）	0.48±0.05$^{\#\blacktriangle}$	0.55±0.06$^{\#\blacktriangle}$
联合用药组（n=10）	0.29±0.03$^{\blacktriangledown\&}$	0.83±0.09$^{\blacktriangledown\&}$
F值	183.929	196.959
P值	＜0.001	＜0.001

注：与假手术组比较，*P＜0.01；与骨转移组比较，$^{\#}P$＜0.01；与中药低剂量组比较，$^{\blacktriangle}P$＜0.01；与中药高剂量组比较，$^{\blacktriangledown}P$＜0.01；与西药组比较，$^{\&}P$＜0.01。

Note: *vs* the sham operation group, *P ＜ 0.01; *vs* the bone metastasis group, $^{\#}P$ ＜ 0.01; *vs* the Chinese medicine low dose group, $^{\blacktriangle}P$ ＜ 0.01; *vs* the Chinese medicine high dose group, $^{\blacktriangledown}P$＜0.01; *vs* the western medicine group, $^{\&}P$＜0.01.

表 4 各组小鼠胫骨组织中 Blimp1、Bcl-6 蛋白表达的比较（$\bar{x}\pm s$）

Table 4 Comparison of Blimp1 and Bcl-6 protein expression in tibia tissue of mice in each group（$\bar{x}\pm s$）

组别	Blimp1/β-actin	Bcl-6/β-actin
假手术组（n=10）	0.23±0.03	0.98±0.10
骨转移组（n=10）	0.89±0.09*	0.16±0.02*
中药低剂量组（n=10）	0.62±0.07$^{\#}$	0.31±0.04$^{\#}$
中药高剂量组（n=10）	0.41±0.05$^{\#\blacktriangle}$	0.53±0.06$^{\#\blacktriangle}$
西药组（n=10）	0.43±0.05$^{\#\blacktriangle}$	0.57±0.06$^{\#\blacktriangle}$
联合用药组（n=10）	0.28±0.03$^{\blacktriangledown\&}$	0.87±0.09$^{\blacktriangledown\&}$
F值	180.323	217.758
P值	＜0.001	＜0.001

注：与假手术组比较，*P＜0.01；与骨转移组比较，$^{\#}P$＜0.01；与中药低剂量组比较，$^{\blacktriangle}P$＜0.01；与中药高剂量组比较，$^{\blacktriangledown}P$＜0.01；与西药组比较，$^{\&}P$＜0.01。

Note: *vs* the sham operation group, *P ＜ 0.01; *vs* the bone metastasis group, $^{\#}P$ ＜ 0.01; *vs* the Chinese medicine low dose group, $^{\blacktriangle}P$ ＜ 0.01; *vs* the Chinese medicine high dose group, $^{\blacktriangledown}P$＜0.01; *vs* the western medicine group, $^{\&}P$＜0.01.

增加（P＜0.01），但两组间无显著差异（P＞0.01）；联合用药组 Blimp1 蛋白表达较西药组、中药高剂量组显著下降，Bcl-6 表达显著增加（P＜0.01），见图 4、表 4。

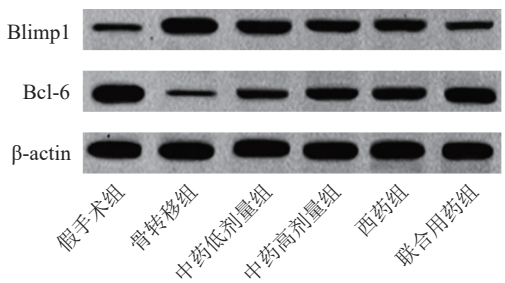


图 4 WB 法检测各组小鼠胫骨组织中 Blimp1、Bcl-6 蛋白表达

Figure 4 The expression of Blimp1 and Bcl-6 protein in tibia tissue of mice in each group was detected by WB

3 讨论

肺癌转移的好发部位有骨骼，超过 1/3 的晚期肺癌患者可检测到骨转移[12]。骨转移患者会出现较多并发症，降低患者生活质量，而临床上主要用双膦酸盐药物预防和治疗骨转移，但该类药物会导致血小板减少、贫血等不良反应，在一定程度上限制了药物的应用[13]，故需找寻临床上可推广的新药物治疗骨转移。本研究通过 C57BL/6 小鼠骨髓腔接种肺癌细胞株建立骨转移模型，用于新药及作用机制的探索。

复方守宫散是由多种组分制备的复方药，其抗肿瘤机制已在研究中得到证明。如杨飞等[14]研究证明，复方守宫散对消化道肿瘤、晚期肺癌均具有抑制作用，且不良反应较小，可改善患者生活质量。在晚期非小细胞肺癌化疗患者中，复方守宫散可通过降低血液毒性，进而提高免疫功能及生存质量[15]，但复方守宫散对于肺癌骨转移治疗鲜有报道。本研究显示，肺癌骨转移小鼠经 X 射线检测到产生明显的溶骨性骨破损，肿瘤细胞密集，荧光信号表达量、破骨细胞数较高，表明肿瘤细胞呈持续增长，但经复方守宫散干预后，肿瘤细胞减少，溶骨性骨破损得到改善，荧光信号表达量、破骨细胞数显著降低，提示复方守宫散能抑制肿瘤细胞生长及破骨细胞活性，改善骨转移。同时研究以西药唑来膦酸为对照，

结果显示，高剂量复方守宫散治疗肺癌骨转移的检测指标与唑来膦酸差异不显著，但两者联合对抑制肿瘤细胞生长、破骨细胞的活化具有协同作用，治疗效果显著高于单一治疗。

肺癌骨转移的主要病理表现是破骨细胞过度活化进而引起骨质溶解受损，表明破骨细胞与肺癌骨转移的发生密切相关[4]。Blimp1作为一种转录因子，可诱导B细胞分化为浆细胞，广泛存在于淋巴结、骨髓、脾等器官。研究表明Blimp1是破骨细胞生成所必需的[16]。Bcl-6是Blimp1下游因子，可通过降低Bcl-6表达参与破骨细胞生成，维持骨组织的动态平衡[17—18]。如Bcl-6通过在体外减弱破骨细胞基因的转录抑制破骨细胞分化调节骨稳态[19]。罗琴琴等[20]研究发现，骨痛灵方联合唑来膦酸可以缓解肺癌骨转移疼痛，其机制可能与下调Blimp1表达、上调Bcl-6表达有关。本研究显示，肺癌骨转移组Blimp1 mRNA及蛋白表达显著上调，而Bcl-6 mRNA及蛋白表达显著下调，表明肺癌骨转移的发生可能与Blimp1/Bcl-6激活有关，经复方守宫散、唑来膦酸及两者联合用药后，Blimp1下调表达、Bcl-6上调表达，且破骨细胞的活化及肿瘤细胞增殖均得到抑制，缓解肺癌骨转移的发展，联合用药效果较单一用药显著。

4 结论

综上所述，复方守宫散及唑来膦酸可减少肺癌骨转移中骨质损坏，抑制破骨细胞的活化，可能与抑制Blimp1/Bcl-6通路有关，且研究表明两者联合治疗效果更好，为治疗肺癌骨转移提供新方案，但由于复方药成分及作用机制复杂，可从Blimp1/Bcl-6表达水平与骨破坏程度的相关性等方面进一步验证。

参考文献：

[1] Pozza DH, de Mello RBA. Treatment sequencing strategies in lung cancer[J]. 中国肺癌杂志, 2022, 25(5): 323-336.

[2] Wu S, Pan Y, Mao Y, *et al*. Current progress and mechanisms of bone metastasis in lung cancer: a narrative review[J]. Transl Lung Cancer Res, 2021, 10(1): 439-451.

[3] Zhang L, Gong Z. Clinical characteristics and prognostic factors in bone metastases from lung cancer[J]. Med Sci Monit, 2017, 23: 4087-4094.

[4] Yu J, Kim S, Lee N, *et al*. Pax5 negatively regulates osteoclastogenesis through downregulation of Blimp1[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(4): 2097.

[5] Zhao B, Ivashkiv LB. Negative regulation of osteoclastogenesis and bone resorption by cytokines and transcriptional repressors[J]. Arthritis Res Ther, 2011, 13(4): 234.

[6] 王泽坤, 臧云彩, 王俊涛, 等. 郑玉玲运用补肾护骨方治疗恶性肿瘤骨转移经验[J]. 中医杂志, 2022, 63(14): 1323-1326.

[7] 孙彤, 王曙光, 吴飞雪, 等. 复方守宫散治疗肿瘤恶病质的临床研究[J]. 安徽中医学院学报, 2003, 22(6): 19-20.

[8] 王永新. 唑来膦酸治疗骨转移癌痛的临床效果[J]. 中国处方药, 2015, 13(1): 58.

[9] 罗勇, 张林琳, 宁亮, 等. 前列腺癌细胞株Du145裸鼠胫骨部骨肿瘤转移模型的建立[J]. 中华男科学杂志, 2006, 12(2): 133-136.

[10] 沈迪, 李崇慧, 周晋华, 等. 复方守宫散对Lewis肺癌小鼠JAK2-STAT3信号通路的影响[J]. 中国医药科学, 2014, 4(9): 17-21.

[11] 李芸, 章智慧, 吴婷婷, 等. 益肾固骨方基于Wnt5a/β-catenin信号通路调控炎性因子治疗肺腺癌骨转移实验研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2020, 27(24): 1957-1966.

[12] Chai X, Yinwang E, Wang Z, *et al*. Predictive and prognostic biomarkers for lung cancer bone metastasis and their therapeutic value[J]. Front Oncol, 2021, 11: 692788.

[13] Ruilian Z, Ying G, Hongmei S, *et al*. Exploration of the effect of icariin on nude mice with lung cancer bone metastasis via the OPG/RANKL/RANK system[J]. Comput Math Methods Med, 2022, 2022: 2011625.

[14] 杨飞. 复方守宫散的研究现状[J]. 中国科技纵横, 2019(6): 196-198.

[15] 徐国品, 夏黎明. 复方守宫散对TP方案治疗的晚期非小细胞肺癌患者血液学毒性及免疫功能的影响[J]. 安徽中医药大学学报, 2018, 37(6): 14-17.

[16] Hou H, Peng Q, Wang S, *et al*. Anemonin attenuates RANKL-induced osteoclastogenesis and ameliorates LPS-induced inflammatory bone loss in mice via modulation of NFATc1[J]. Front Pharmacol, 2020, 10: 1696.

（下转第 1178 页）

[7] Choe JY, Kim SK. Association between hematological indicesand disease activity in patients with rheumatoid arthritis treated with janus kinase inhibitors for 24 weeks[J]. Medicina (Kaunas), 2022, 58 (3): 426.
[8] Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, *et al*. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative[J]. Arthritis Rheum, 2010, 62 (9): 2569-2581.
[9] Fransen J, van Riel PL. The disease activity score and the EULAR response criteria[J]. Rheum Dis Clin North Am, 2009, 35 (4): 745-757.
[10] 中华医学会风湿病学分会. 2018中国类风湿关节炎诊疗指南[J]. 临床医学研究与实践, 2018, 3 (12): 201.
[11] Angelini J, Talotta R, Roncato R, *et al*. JAK-inhibitors for the treatment of rheumatoid arthritis: a focus on the present and an outlook on the future[J]. Biomolecules, 2020, 10 (7): 1002.
[12] Fragoulis GE, McInnes IB, Siebert S. JAK-inhibitors. New players in the field of immune-mediated diseases, beyond rheumatoid arthritis[J]. Rheumatology (Oxford), 2019, 58 (Suppl 1): i43-i54.
[13] Harrington R, Al Nokhatha SA, Conway R. JAK inhibitors in rheumatoid arthritis: an evidence-based review on the emerging clinical data[J]. J Inflamm Res, 2020, 13: 519-531.
[14] Pereira ICP, Sousa NCF, Pereira DMS, *et al*. Treatment with either leflunomide or adalimumab reduces anaemia in patients with rheumatoid arthritis[J]. An Acad Bras Cienc, 2018, 90 (Suppl 1): 2161-2166.
[15] Sakthiswary R, Syahrul Sazliyana S, Mohd Shahrir MS, *et al*. Beyond the joints in rheumatoid arthritis: effects of adalimumab on hematologic and lipid indices[J]. EXCLI J, 2012, 11: 142-149.
[16] Madu A, Ughasoro M. Anemia of chronic disease: an in-depth review[J]. Med Princ Pract, 2017, 26 (1): 1-9.
[17] Weiss G, Ganz T, Goodnough LT. Anemia of inflammation[J]. Blood, 2019, 133 (1): 40-50.
[18] Masson C. Rheumatoid anemia[J]. Joint Bone Spine, 2011, 78 (2): 131-137.
[19] Kay J, Harigai M, Rancourt J, *et al*. Changes in selected haematological parameters associated with JAK1/JAK2 inhibition observed in patients with rheumatoid arthritis treated with baricitinib[J]. RMD Open, 2020, 6 (3): e001370.

（编辑：虞　瑛）

（上接第1158页）

[17] Miyauchi Y, Miyamoto H, Yoshida S, *et al*. Conditional inactivation of Blimp1 in adult mice promotes increased bone mass[J]. J Biol Chem, 2012, 287 (34): 28508-28517.
[18] Ono T, Nakashima T. Recent advances in osteoclast biology[J]. Histochem Cell Biol, 2018, 149 (4): 325-341.
[19] Miyauchi Y, Ninomiya K, Miyamoto H, *et al*. The Blimp1-Bcl-6 axis is critical to regulate osteoclast differentiation and bone homeostasis[J]. J Exp Med, 2010, 207 (4): 751-762.
[20] 罗琴琴, 徐振晔, 薛莎. 基于Blimp1/Bcl-6通路探讨骨痛灵联合唑来膦酸治疗肺癌骨转移的实验研究[J]. 上海中医药杂志, 2018, 52 (12): 84-88.

（编辑：沈佳婕）