

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.15.016

益肾活血止痛方对骨转移癌大鼠胫骨组织 OPG、RANKL、RANK 表达的影响

宋程¹, 潘博², 杨晓³, 田韵⁴, 唐蔚^{*}

(1. 湖南省肿瘤医院/中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院, 湖南省长沙市岳麓区桐梓坡路 283 号, 410006; 2. 湖南省中医药研究院附属医院; 3. 湖南中医药大学; 4. 中南大学湘雅三医院)

摘要 目的 探讨益肾活血止痛方治疗骨转移癌的可能作用机制。方法 40 只 SD 大鼠随机分为中药组、唑来膦酸组、模型组、假手术组, 每组 10 只。除假手术组外其余各组采用大鼠乳腺癌 Walker 256 细胞悬液 3 μ l 缓慢注射于大鼠胫骨骨髓腔内建立骨转移癌模型。于造模后第 5 天开始给药, 唑来膦酸组给予唑来膦酸溶液于第 5、7、9、12、14、16、19 天腹腔注射, 每次 30 μ g/kg; 中药组给予益肾活血止痛方 0.5 ml (浓度 1.92 g/ml) 灌胃, 假手术组及模型组给予等量生理盐水 0.5 ml 灌胃, 每日 1 次, 连续 3 周。观察各组大鼠肿瘤体积, X 线摄片对骨质破坏程度进行评分, HE 染色观察胫骨组织病理形态; 检测胫骨组织中骨保护素 (OPG)、核因子 κ B 受体活化因子 (RANK)、核因子 κ B 受体活化因子配体 (RANKL) 蛋白及 mRNA 表达。结果 与模型组比较, 中药组和唑来膦酸组大鼠胫骨肿瘤体积及骨质破坏减少, 胫骨组织 OPG 蛋白及 mRNA 表达升高, RANKL、RANK 蛋白及 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$)。中药组和唑来膦酸组各指标组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 益肾活血止痛方可抑制大鼠骨转移癌的生长, 其机制可能与其激活胫骨组织 OPG 表达, 抑制 RANKL 和 RANK 的活化有关。

关键词 骨转移癌; 益肾活血止痛方; 胫骨组织; 骨保护素; 核因子 κ B 受体活化因子

骨转移是恶性肿瘤临床常见的并发症, 许多常见的恶性肿瘤都有向各种骨发生转移的强烈倾向, 如乳腺癌、前列腺癌、肺癌等^[1-2]。目前西医治疗骨转移癌主要以镇痛药物、放疗、化疗、双膦酸盐、手术等为主, 临床中有的患者出现成瘾性等不良反应^[3]。中医药治疗骨转移癌副作用小, 疗效确切, 既能止痛, 又有抑瘤抗癌的功效, 可起到标本同治的作用, 具有较好的临床应用优势^[4]。有研究发现, 骨保护素/核因子 κ B 受体活化因子配体/核因子 κ B 受体活化因子 (OPG/RANKL/RANK) 通路在骨转移癌中起关键作用, 该通路持续激活产生的肿瘤骨质破坏程度与骨癌痛的持续进展呈正相关^[5-6]。益肾活血止痛方由身痛逐瘀汤加减化裁而来, 在前期临床应用中取得了较好临床疗效^[7]。本研究选取与骨转移癌相关的 OPG/RANKL/RANK 通路为切入点, 探讨益肾活血止痛

方抗肿瘤的可能作用机制, 为临床治疗骨转移癌提供理论依据。

1 材料及方法

1.1 动物及细胞

SPF 级雌性 SD 大鼠 40 只, 体重 110 ~ 130 g, 6 ~ 8 周龄, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 实验动物合格证号: SCXK (湘) 2011-0003。大鼠乳腺癌 Walker256 细胞购自上海生物医学工程研究所。

1.2 药物

益肾活血止痛方: 淫羊藿 15 g, 补骨脂 15 g, 骨碎补 10 g, 桃仁 10 g, 红花 10 g, 当归 10 g, 香附 6 g, 川芎 6 g, 牛膝 10 g, 半枝莲 15 g, 白花蛇舌草 15 g, 甘草 6 g。以上药物加入 10 倍量水浸泡 1 h, 加入药罐中煎制 1 h, 滤过, 将滤液储存, 再加入 8 倍量水, 煎煮 1 h, 滤过, 将两次滤液合并, 浓缩至 1.92 g/ml 生药浓度的药液, 于 4℃ 冰箱保存备用。唑来膦酸注射液 (江苏正大天晴药业股份有限公司, 批号: H20041346)。

基金项目: 湖南省中医药科研计划项目 (201750); 湖南省中医药研究院院级项目 (201402)

* 通讯作者: 173521216@qq.com

1.3 主要试剂及仪器

RPMI 1640 细胞培养基 (批号: 31800)、胰酶溶液 (批号: 00742), 均购自 Hyclone 公司; 胎牛血清 FBS (批号: 201508)、青霉素/链霉素溶液 (批号: 15140), 均购自 Gibco 公司; OPG 抗体 (批号: 20624R)、RANK 抗体 (批号: 2695R)、RANKL 抗体 (批号: 20646R)、GAPDH 抗体 (批号: 10900R) 均为 Cell Signaling Technology 公司产品; 山羊抗小鼠二抗 (美国 Proteintech, 批号: SA00001-1); RT-PCR 试剂盒 (Takara 公司, 批号: RR047); 戊巴比妥钠 (Sigma 公司, 批号: P3761); 苏木素-伊红染色液 (HE 染色, Solarbio 公司, 批号: G1120)。

CB160 型 CO₂ 培养箱 (德国 Binder 公司), Z32HK 型冷冻高速离心机 (德国 Hermle 公司), ME5 型微量电子天平 (Sartorius 公司), IX37 型倒置显微镜 (Olympus 公司), PLX8200 医用 X 光机 (南京普爱医疗器械公司), EG1150H 包埋机、RM2235 切片机、HI1210 摊片机均为 Leica 公司产品, JY2002 电子天平 (上海精密科学仪器有限公司), 0~150 mm 型游标卡尺 (上海精密科学仪器有限公司), ND-2000 型分光光度计 (美国 Nano-Drop 科技有限公司)。

1.4 骨转移癌大鼠模型建立

大鼠乳腺癌 Walker 256 细胞, 采用 RPMI 1640 细胞培养基, 在 37℃、5% CO₂ 的环境下进行培养, 细胞贴壁并长满后进行传代, 配制成浓度 1×10^6 个/ml 的细胞悬液备用。根据 Medhurst 等^[8]方法造模: 将大鼠腹部向上置于鼠板上, 将左后肢皮毛用生理盐水湿润后剪毛, 75% 医用酒精消毒; 用手术刀片切开胫骨上部的皮肤和肌肉, 切口长度约 1 cm, 暴露出左侧胫骨内侧; 在膝关节以下约 5 mm 处的胫骨内侧面, 先用 21G 针头穿刺打孔, 针头穿透骨皮质进入骨髓腔后, 使用微量注射器吸取配制好的大鼠乳腺癌 Walker 256 细胞悬液 3 μ l (假手术组予以生理盐水 3 μ l), 缓慢注射于大鼠胫骨骨髓腔内; 撤出微量注射器后迅速用骨蜡密封针孔, 以防癌细胞悬液从骨髓腔溢出; 缝合肌肉和皮肤。

1.5 分组和给药

将 40 只大鼠按照随机数字表法分为中药组、唑来膦酸组、假手术组、模型组, 每组 10 只。除假手术组外其余各组建立大鼠骨转移癌模型, 于造模后第 5 天开始给药。中药组给予益肾活血止痛方

0.5 ml 灌胃, 每日 1 次; 唑来膦酸组给予唑来膦酸溶液 (浓度为 3 μ g/ml, 每 24 h 更换新配制的溶液) 于造模后第 5、7、9、12、14、16、19 天腹腔注射, 每次 30 μ g/kg; 假手术组及模型组给予生理盐水 0.5 ml 灌胃, 每日 1 次, 连续 3 周。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 肿瘤体积 造模第 22 天进行取材, 取材前禁食 10 h。腹主动脉取血, 剪下左后肢。将大鼠的左后肢直接置于 4% 多聚甲醛中进行固定, 待 X 线检查后再剥离皮肤和肌肉, 用游标卡尺测定肿瘤长径和短径。按下列公式计算肿瘤体积: 肿瘤体积 = 肿瘤长径 $\times$ (肿瘤短径)² / 2。

1.6.2 骨质破坏程度 将 4% 多聚甲醛固定的大鼠左侧胫骨排列在医用 X 光诊断系统的拍摄台上进行 X 线摄片, 电压 50 kV, 曝光时间 2 ms。根据所拍摄影像对骨质破坏程度并进行评分, 标准如下^[9]: 0 分: 正常的骨结构, 无任何骨质破坏的征象; 1 分: 在胫骨注射部位附近见小的骨质缺损病灶 (数量少于 3 个); 2 分: 髓质骨缺损, 病灶增多 (大于 3 个); 3 分: 髓质骨缺失, 同时皮质骨受侵; 4 分: 单面的骨皮质完全缺损; 5 分: 双面的骨皮质缺失, 移位性骨折。

1.6.3 骨组织切片制备及 HE 染色 大鼠胫骨取材后在 4% 多聚甲醛固定 24 h 后, 0.1 mol/L PBS 充分漂洗, 后用 10% EDTA/0.1 mol/L PBS 4℃ 脱钙, 隔天换液 1 次, 4 周后脱钙结束。取大鼠左侧胫骨上段 1/3 (病灶组织), 依次用梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 浸蜡, 石蜡包埋。进行 HE 染色, 观察胫骨病理组织形态学变化。

1.6.4 荧光定量 PCR 法检测胫骨组织 OPG、RANKL、RANK mRNA 表达 检测步骤: 1) 提取胫骨组织总 RNA; 2) 分光光度法检测 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 吸光度, 计算提取标本总 RNA 的浓度和纯度; 3) 反转录试剂盒逆转录合成 cDNA; 4) RT-PCR 试剂盒进行 PCR 反应; 5) 引物设计采用 Primer 5.0 软件, 引物设计和合成由上海吉凯基因科技有限公司完成。引物序列如下: GAPDH: 上游 5'-GGCAAGTTCAACGGCAGAG-3'; 下游 3'-CGC-CAGTAGACTCCACGACAT-5'。OPG: 上游 5'-GCATACCACTTTCCCAAAACC-3'; 下游 3'-AGC-CCAGTGACCATTCTTAAC-5'。RANKL: 上游 5'-TATGATGGAAGGTTCTGCTGGCT-3'; 下游 3'-AA-GAGGACAGACTGACTTTATGGG-5'。RANK: 上游 5'-AGCTCTTCCCTGACACTCATAA-3'; 下游 3'-TTTC-CCTCCCTTCCTGTAGTA-5'。结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

1.6.5 Western blot 法检测胫骨组织 OPG、RANKL、RANK 蛋白表达 分别称取各组胫骨组织 0.1 g, 用 PBS 洗涤 1 次后加入 200 μ l RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, 经过电泳及转膜后加入 100 ml/L 5% 脱脂奶粉, 封闭 60 min, 分别加入 OPG、RANKL、RANK、GAPDH 一抗 (稀释比例 1 : 200), 4 $^{\circ}$ C 过夜, TBS-T 洗涤 3 次后将稀释后的二抗 (用封闭液稀释 HRP 标记的二抗, 稀释比例 1 : 3000) 与膜共同孵育 60 min。TBS-T 洗涤 3 次后, 采用化学发光试剂曝光显影, 扫描底片, 分析条带灰度值。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。计量数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较用方差分析, 计数资料采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠胫骨肿瘤体积比较

表 1 示, 假手术组无肿瘤生长; 与模型组比较, 中药组和唑来膦酸组肿瘤体积均减少 ($P < 0.05$), 中药组和唑来膦酸组组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠胫骨肿瘤体积比较 (mm^3 , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	肿瘤体积
假手术组	10	—
模型组	10	64.18 $\pm$ 2.32
中药组	10	37.04 $\pm$ 1.97*
唑来膦酸组	10	36.01 $\pm$ 1.95*

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$

2.2 各组大鼠胫骨影像学评分分布情况比较

表 2 示, 假手术组均为正常的骨结构, 无明显骨质破坏。模型组骨质破坏严重, 与模型组比较, 中药组和唑来膦酸组大鼠胫骨影像学评分分布差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 中药组和唑来膦酸组组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠胫骨影像学评分分布情况比较 (只)

组别	鼠数	0 分	1 分	2 分	3 分	4 分	5 分
假手术组	10	10	0	0	0	0	0
模型组	10	0	0	0	0	3	7
中药组	10	1	5	3	1	0	0
唑来膦酸组	10	4	5	1	0	0	0

2.3 各组大鼠胫骨 HE 染色结果

HE 染色结果示, 假手术组骨皮质结构完整清

晰; 模型组可见大量肿瘤细胞浸润, 排列紊乱, 大小不一, 形态不规则, 细胞分化差, 细胞核与细胞质比例失常, 血管和神经结构消失, 肿瘤组织充填骨髓腔并向骨皮质浸润。中药组与唑来膦酸组可见到骨基质与染色较浅的骨样组织和编织骨相移行, 新生骨内有大量排列密集的软骨骨陷窝, 内壁模糊不清, 陷窝内可见肥大的软骨骨细胞。

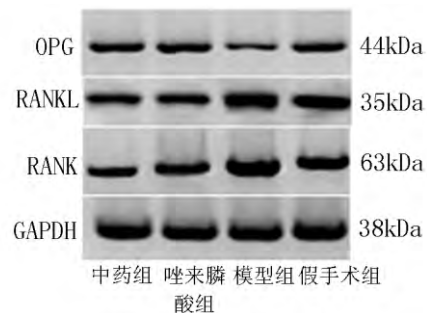
2.4 各组大鼠胫骨组织 OPG、RANKL、RANK 蛋白表达比较

表 3 示, 与假手术组比较, 模型组大鼠胫骨组织 OPG 蛋白表达降低, RANKL 和 RANK 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 中药组、唑来膦酸组 OPG 蛋白表达升高, RANKL 和 RANK 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。中药组和唑来膦酸组胫骨组织 OPG、RANKL、RANK 蛋白表达组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组大鼠胫骨组织 OPG、RANKL、RANK 蛋白电泳图见图 1。

表 3 各组大鼠胫骨组织 OPG、RANKL、RANK 蛋白表达比较 ($/\text{GAPDH}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	OPG	RANKL	RANK
假手术组	10	0.92 $\pm$ 0.02*	1.10 $\pm$ 0.03*	1.11 $\pm$ 0.02*
模型组	10	0.64 $\pm$ 0.02	1.24 $\pm$ 0.02	1.62 $\pm$ 0.01
中药组	10	1.21 $\pm$ 0.01*	0.84 $\pm$ 0.01*	0.73 $\pm$ 0.01*
唑来膦酸组	10	1.22 $\pm$ 0.02*	0.86 $\pm$ 0.02*	0.74 $\pm$ 0.02*

注: OPG, 骨保护素; RANK, 核因子 κ B 受体活化因子; RANKL, 核因子 κ B 受体活化因子配体; 与模型组比较, * $P < 0.05$



注: OPG, 骨保护素; RANK, 核因子 κ B 受体活化因子; RANKL, 核因子 κ B 受体活化因子配体

图 1 各组大鼠胫骨组织 OPG、RANKL、RANK 蛋白电泳图

2.5 各组大鼠胫骨组织 OPG、RANKL、RANK mRNA 表达比较

表 4 示, 与假手术组比较, 模型组大鼠胫骨组织 OPG mRNA 表达降低, RANKL 和 RANK mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 中药组、

唑来膦酸组 OPG mRNA 表达升高, RANKL 和 RANK mRNA 表达降低 ($P < 0.05$)。中药组和唑来膦酸组胫骨组织 OPG、RANKL、RANK mRNA 表达组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 4 各组大鼠胫骨组织 OPG、RANKL、RANK mRNA 表达比较 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	OPG	RANKL	RANK
假手术组	10	1.17 ± 0.04*	0.84 ± 0.00*	0.74 ± 0.02*
模型组	10	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
中药组	10	1.78 ± 0.05*	0.67 ± 0.00*	0.66 ± 0.01*
唑来膦酸组	10	1.76 ± 0.03*	0.78 ± 0.00*	0.63 ± 0.02*

注: OPG, 骨保护素; RANK, 核因子 κB 受体活化因子; RANKL, 核因子 κB 受体活化因子配体; 与模型组比较, * $P < 0.05$

3 讨论

中医学将骨转移瘤归属于“骨蚀”“骨疽”“骨瘤”“骨痹”“石瘤”等范畴。历代医家认为骨瘤与肝、肾二脏密切相关, 肾虚不能生髓壮骨, 则“不荣”; 肝郁气结致血瘀阻滞经络, 则“不通”。《外科正宗·癰疽论》曰“肾主骨, 恣欲伤肾, 肾火郁遏, 骨无荣养而为肿, 曰骨瘤”, 指出肾虚是骨癌发生的发病基础。肾主骨, 精化髓, 骨髓强壮依赖于肾精充足。晚期恶性肿瘤骨转移者多为肾精亏损, 精不化髓, 骨不强壮, 易为癌毒所袭, 所以容易发生骨转移, 且骨质破坏明显, 疼痛剧烈, 治疗当以扶正祛邪为原则。益肾活血止痛方由清代医家王清任《医林改错》身痛逐瘀汤加减化裁而来, 方中以淫羊藿为主, 补肾强骨, 益精填髓为君药; 桃仁、红花活血化瘀止痛, 为臣药; 补骨脂、骨碎补温肾助阳, 当归滋阴补肝、养血调经, 半枝莲、白花蛇舌草解毒祛瘀、抗癌, 牛膝、香附、川芎活血行气止痛、以助活血之功, 为佐药; 甘草调和诸药, 为使药。此方既着重补肾气、温肾阳, 又兼顾活血祛瘀解毒, 以求攻补兼施, 祛邪而不伤正。

OPG/RANKL/RANK 通路是近几年发现的肿瘤坏死因子超家族成员, OPG 也称破骨细胞生成抑制因子, 是肿瘤坏死因子受体超家族成员之一, 属分泌型糖蛋白, 无跨膜部分及直接的信号性能, 主要表达于骨组织中^[8]。RANKL 也称为肿瘤坏死因子超家族成员¹¹, 是肿瘤坏死因子超家族成员之一, 是一种 II 型跨膜蛋白, RANKL mRNA 在骨和骨髓及淋巴组织中的表达最高^[9]。RANK 也称破骨细胞分化激活受体, 是一种 I 型跨膜蛋白, 主要

在单核和巨噬细胞系表达, 负责信号 RANKL 生物学行为的受体活化因子, 是 RANKL 调节破骨细胞发育过程中不可缺少的信号受体^[10]。当肿瘤细胞释放多种因子, 破坏了 OPG 和 RANKL 的平衡, 抑制成骨细胞 OPG 的表达, 同时增加 RANKL 和 RANK 的表达, 从而激活破骨细胞促进了骨吸收作用, 造成溶骨性病理改变, 通过支配骨的感觉神经细胞去极化而将疼痛信号传递至脊髓, 引起骨转移癌^[11]。

本研究发现, 益肾活血止痛方可以显著缩小大鼠胫骨肿瘤, 减轻骨质破坏, 其机制可能是上调胫骨组织 OPG 的表达, 下调 RANKL 和 RANK 的表达, 促进成骨细胞分泌 OPG, 使之与 RANK 的结合增多, 进而使破骨细胞活性降低, 减少 RANKL 合成, 从而抑制骨转移的发生和发展。

参考文献

- [1] REINSTEIN ZZ, PAMARTHY S, SAGAR V, et al. Overcoming immunosuppression in bone metastases [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2017, 117: 114-127. doi: 10.1016/j.crit-rev-onc.2017.05.004.
- [2] 杨勇, 姜玉秋, 王永高, 等. 乳腺癌骨转移的研究进展 [J]. 中国普外基础与临床杂志, 2016, 23(2): 253-257.
- [3] 姜文娟, 程继荣, 邵国安. 恶性肿瘤骨转移治疗的进展 [J]. 肿瘤基础与临床, 2013, 26(2): 174-177.
- [4] 姚喧, 贾立群. 恶性肿瘤骨转移的中医临床研究进展 [J]. 北京中医药, 2012, 31(1): 67-69.
- [5] HSU H, LACEY DL, DUNSTAN CR, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(7): 3540-3545.
- [6] TAKAYANAGI H, OGASAWARA K, HIDA S, et al. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signaling cross-talk between RANKL and IFN- γ [J]. Nature, 2000, 408(6812): 600-605.
- [7] 宋程. 补肾活血方治疗骨转移癌痛临床疗效及镇痛机制研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2016.
- [8] MEDHURST SJ, WALKER K, BOWES M, et al. A rat model of bone cancer pain [J]. Pain, 2002, 96(1-2): 129-140.
- [9] DOUGALL WC, CHAISSON M. The RANK/RANKL/OPG triad in cancer-induced bone diseases [J]. Cancer Metastasis Rev, 2006, 25(4): 541-549.
- [10] MULCAHY LE, TAYLOR D, LEE TC, et al. RANKL and OPG activity is regulated by injury size in networks of osteocyte-like cells [J]. Bone, 2010, 48(2): 182-188.
- [11] DESCHNER J, WYPASEK E, FERRETTI M, et al.

Regulation of RANKL by biomechanical loading in fibro-chondrocytes of meniscus [J]. J Biomech, 2006, 39 (10): 1796-1803.

[2] TAKAYAMA K, INOUE T, NARITA S, et al. Inhibition of the RANK/RANKL signaling with osteoprotegerin pre-

vents castration-induced acceleration of bone metastasis in castration-insensitive prostate cancer [J]. Cancer Lett, 2017, 379: 103-110. doi: 10.1016/j.canlet.2017.03.034.

Effects of *Yishen Huoxue Zhitong Decoction* (益肾活血止痛方) on Expression of OPG, RANKL and RANK in Tibial Tissue of Bone Metastatic Cancer Model Rats

SONG Cheng¹, PAN Bo², YANG Xiao³, TIAN Yun⁴, TANG Wei²

(1. Hunan Provincial Cancer Hospital, Affiliated Tumor Hospital of Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410006; 2. Affiliated Hospital of Hunan Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine; 3. Hunan University of Chinese Medicine; 4. Xiangya Third Hospital, Central South University)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Yishen Huoxue Zhitong Decoction* (益肾活血止痛方) in the treatment of bone metastases. **Methods** A total of 40 SD rats were randomly divided into Chinese medicine group, zoledronic acid group, model group and sham operation group, with 10 rats in each group. Except the sham operation group, 3 μ l of rat breast cancer Walker 256 cell suspension was slowly injected into the bone marrow cavity of rat tibia to establish a bone metastasis model in other groups. The drug was administered on the 5th day after modeling, and the zoledronic acid group was given zoledronic acid solution intraperitoneally on the 5th, 7th, 9th, 12th, 14th, 16th, and 19th day, with 30 μ g/kg each time; *Yishen Huoxue Zhitong Decoction* 0.5 ml (concentration 1.92 g/ml) was intragastrically administered. The sham operation group and the model group were given normal saline 0.5 ml once a day for 3 weeks. The tumor volume of each group was observed. The degree of bone destruction was scored by X-ray film. The pathological morphology of the tibia was observed by HE staining. The osteoprotegerin (OPG) and nuclear factor κ B receptor activating factor (RANK), nuclear factor kappa B receptor activating factor ligand (RANKL) protein and mRNA expression were detected in the tibia. **Results** Compared with the model group, the sacral tumor volume and bone destruction were decreased in the Chinese medicine group and the zoledronic acid group, and the expression of OPG protein and mRNA in the tibia was increased, The expression of RANKL, RANK protein and mRNA were decreased ($P < 0.05$). There was no significant difference between the Chinese medicine group and the zoledronic acid group in all indicators ($P > 0.05$). **Conclusion** *Yishen Huoxue Zhitong Decoction* can inhibit the growth of rat bone metastases, and its mechanism may be related to the activation of OPG expression in tibia and the inhibition of RANKL and RANK activation.

Keywords bone metastases; *Yishen Huoxue Zhitong Decoction*; tibial tissue; osteoprotegerin; nuclear factor kappa B receptor activating factor

(收稿日期: 2018-01-15; 修回日期: 2018-04-08)

编辑: 邓 媛

欢迎邮购 《中医杂志》 过刊

1985、1987、1988、1989、1990、1992、1993、1994、1995、1996、1998、1999、2000、2001 年合订本, 每本 100 元, 2002 年合订本 105 元, 2003 年合订本 105 元, 2004 年合订本 115 元, 2005 年合订本 125 元, 2007—2010 年合订本每年 140 元。2011(缺 5、6 期)—2013 年每册 9.80 元, 2014(缺 21 期)—2017 年(缺 3、5、15、18 期) 每册 15 元。2011—2013 年合订本(每年 4 本), 每年 280 元, 2014、2015、2016、2017 年合订本(每年 4 本), 每年 400 元。《中医杂志》2006—2008 年增刊每册 40 元。以上免费邮寄, 如需挂号每件另加 3 元。

欲购者请汇款至北京市东直门内南小街 16 号, 收款人: 中医杂志社, 或关注《中医杂志》官方微信(yzzgzh) 购买。邮编: 100700, 电话: (010) 64089195。