

## 雷公藤抑制三阴性乳腺癌增殖及其骨转移的作用

刘辉<sup>1</sup>, 陈子超<sup>1</sup>, 李肖<sup>1</sup>, 王晓婷<sup>1</sup>, 郑昊<sup>2\*</sup>, 张振<sup>1\*</sup>

1. 山东中医药大学 中医药创新研究院, 山东 济南 250355

2. 临沂市人民医院, 山东 临沂 276000

**摘要:** 目的 探讨雷公藤 *Tripterygium wilfordii* 抑制三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 增殖及骨转移的作用及机制。方法 通过 MTT、细胞划痕、结晶紫染色及克隆形成实验, 评估雷公藤对 4T1 细胞增殖、迁移及克隆形成的抑制作用; 采用 Western blotting 分析雷公藤对 4T1 细胞铁死亡相关蛋白表达的影响。体内构建小鼠乳腺癌骨转移模型, 利用活体成像、CT 扫描及 TRAP 染色观察雷公藤对骨转移的干预作用。结果 雷公藤显著抑制 4T1 细胞的增殖、迁移和克隆形成 ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ), 同时诱导铁死亡并降低核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)、溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 蛋白的表达 ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ )。体内实验结果显示, 雷公藤可抑制乳腺癌骨转移模型小鼠肿瘤的进展, 降低继发性肺转移的发生; 通过离体骨组织 3D 重建发现, 雷公藤显著缓解了肿瘤诱导的骨质流失; TRAP 染色证实雷公藤通过抑制破骨细胞过度分化和募集, 阻断了肿瘤-破骨细胞的恶性循环, 有效维持了胫骨和股骨的骨微结构完整性。结论 雷公藤体外可抑制 TNBC 细胞增殖, 体内可有效干预 TNBC 骨转移, 显示出其潜在的治疗价值。

**关键词:** 三阴性乳腺癌; 骨转移; 雷公藤; 铁死亡; 破骨细胞; 雷公藤甲素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)12-4279-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.12.012

## Effect of *Tripterygium wilfordii* on proliferation and bone metastasis of triple negative breast cancer

LIU Hui<sup>1</sup>, CHEN Zichao<sup>1</sup>, LI Xiao<sup>1</sup>, WANG Xiaoting<sup>1</sup>, ZHENG Hao<sup>2</sup>, ZHANG Zhen<sup>1</sup>

1. Innovation Institute of Chinese Medicine and Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. Linyi People's Hospital, Linyi 276000, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect and mechanism of *Tripterygium wilfordii* in inhibiting the proliferation and bone metastasis of triple-negative breast cancer (TNBC). **Methods** MTT assay, wound healing assay, crystal violet staining and colony formation assay were used to evaluate the inhibitory effect of *T. wilfordii* on proliferation, migration and colony formation of 4T1 cells; Western blotting was performed to examine the effect of *T. wilfordii* on expressions of ferroptosis-related proteins in 4T1 cells. An *in vivo* mouse model of breast cancer bone metastasis was constructed, and the effect of *T. wilfordii* on bone metastasis was observed using *in vivo* imaging, CT scans and TRAP staining. **Results** *T. wilfordii* significantly inhibited the proliferation, migration and colony formation of 4T1 cells ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ), induced ferroptosis and down-regulated the expressions of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2), solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11) and glutathione peroxidase 4 (GPX4) proteins ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ). *In vivo* experiment results showed that *T. wilfordii* could inhibit the progression of tumor in bone metastasis model mice of breast cancer and reduce the occurrence of secondary lung metastasis; *T. wilfordii* significantly alleviated tumor-induced bone loss through 3D reconstruction of *ex vivo* bone tissue; TRAP staining confirmed that *T. wilfordii* inhibited excessive osteoclast differentiation and

收稿日期: 2025-01-23

基金项目: 泰山学者青年专家计划项目 (tsqn202211136); 山东省中医药科技项目 (M-2023182); 国家自然科学基金资助项目 (21775061); 济南市“新高校 20 条”资助项目 (202228085); 山东中医药大学青年创新团队支持计划项目 (22202401)

作者简介: 刘辉, 硕士研究生, 研究方向为中药药效物质基础与药物创新。E-mail: LH19863826935@126.com

\*通信作者: 张振, 教授, 研究方向为中药药效物质基础与药物创新。E-mail: zhangzhen19801981@126.com

郑昊, 副主任医师, 研究方向为中药药效物质基础及作用机制。E-mail: zpm\_030@126.com

recruitment, blocking the malignant cycle between tumors and osteoclasts, and effectively maintained the structural integrity of the tibial and femoral bone microstructures. **Conclusion** *In vitro*, *T. wilfordii* inhibits the proliferation of TNBC cells and promotes osteoblastic mineralization. *In vivo*, it effectively interferes with TNBC bone metastasis, demonstrating its potential therapeutic value. **Key words:** triple-negative breast cancer; bone metastasis; *Tripterygium wilfordii* Hook. f.; ferroptosis; osteoclasts; triptolide

乳腺癌是全球女性健康的主要威胁之一。根据统计, 2022 年全球新增癌症病例约 1 996 万例, 其中乳腺癌的新增病例为 230 万例, 死亡人数为 66 万例<sup>[1]</sup>。三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 是指雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 和人表皮生长因子受体-2 (human epidermal growth factor receptor-2, HER-2) 均为阴性表达的类型<sup>[2]</sup>。TNBC 占乳腺癌的 15%~20%, 其特点是高度低分化、容易发生耐药性和转移<sup>[3]</sup>。乳腺癌最常见的远端转移部位是骨骼, 60%~75% 的转移性乳腺癌患者会出现骨转移。骨转移不仅可能导致病理性骨折、剧烈骨痛、高钙血症等严重并发症, 还会显著降低患者的生存质量和寿命<sup>[4-5]</sup>。尽管近些年在骨转移的治疗方面已有一定进展, 如双膦酸盐和核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, RANKL) 抑制剂 (地诺单抗) 等药物可以减缓骨吸收并降低骨相关事件的发生率<sup>[6]</sup>, 但它们主要起辅助治疗作用, 并且存在不良反应, 无法从根本上改善患者预后<sup>[7]</sup>。鉴于以上困难和挑战, 迫切需要研发有效的治疗药物。

近年来, 中药因其多靶点、多成分等特点逐渐受到关注。在抗肿瘤及其转移治疗中, 中药被证明能够通过调控肿瘤微环境、抑制肿瘤增殖与转移、促进骨修复等多种机制发挥作用。雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 是一种传统中药, 以其显著的抗炎、免疫调节及抗肿瘤作用而得到广泛研究<sup>[8]</sup>, 其主要活性成分包括雷公藤红素、雷公藤甲素、雷公藤内酯酮等。先前研究表明雷公藤及其活性成分能够抑制乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭<sup>[9]</sup>, 诱导乳腺癌细胞凋亡与自噬<sup>[10]</sup>, 抑制乳腺癌组织血管生成<sup>[11]</sup>, 调控雌激素水平<sup>[12]</sup>等, 从而发挥抗乳腺癌的作用。雷公藤除了具有显著的抗肿瘤作用外, 还常用于治疗骨关节炎、骨质疏松、骨折以及类风湿关节炎。研究报道, 雷公藤红素能够调控 Toll 样受体 2 (Toll-like receptor 2, TLR2)/核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 信号通路治疗骨关节炎<sup>[13]</sup>; 雷公藤甲素可以通过抑制破骨细胞的生成从而预防骨

丢失<sup>[14-15]</sup>; 通过网络药理学探讨了雷公藤多成分、多靶点、整体调节的作用特点, 预测了雷公藤可能通过抗炎、免疫调节等治疗类风湿关节炎<sup>[16]</sup>。

乳腺癌骨转移与骨微环境之间关系错综复杂。鉴于雷公藤在调控骨微环境及预防骨关节病变中的作用, 其通过调节骨微环境干预乳腺癌骨转移的作用机制具有重要研究意义。因此, 本研究基于 TNBC 骨转移中肿瘤-骨恶性循环的核心病理特征, 系统探讨雷公藤抗肿瘤与骨保护的双重效应。

## 1 材料

### 1.1 细胞与动物

鼠源乳腺癌细胞 (4T1)、萤火虫荧光素酶标记的小鼠乳腺癌细胞 (4T1-luc) 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

SPF 级雌性 BALB/c 小鼠, 6 周龄, 体质量 16~18 g, 购自山东朋悦实验动物科技有限公司, 动物合格证号 SCXK (鲁) 2022-0006。动物于山东中医药大学实验动物研究中心, 适应性饲养 1 周后开始实验。动物实验经山东中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批准号 SDUTCM20230905203)。

### 1.2 药材

雷公藤 (批号 231101) 购自济南建联中药店, 经山东中医药大学药学院刘谦教授鉴定为卫矛科植物雷公藤 *T. wilfordii* Hook. f. 的干燥根。

### 1.3 药品与试剂

胎牛血清 (批号 SA301.02.V) 购自北京澳美细胞技术有限公司; 青霉素-链霉素溶液、胰酶细胞消化液、MTT、二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、D-荧光素钾盐 (批号分别为 C0222、C0203、ST316、ST038、ST196) 购自上海碧云天生物技术有限公司; DMEM 高糖培养基 (批号 G4511)、PBS (批号 G4202)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 多克隆抗体 (批号 GB11002)、抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP) 染色试剂盒 (批号 G1050-50T) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 无血清细胞冻存液 (批号 BL203B) 购自兰杰柯科技有限公司; 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶蛋白上样缓冲液

(批号 SW116-02) 购自北京赛文创新生物科技有限公司; 核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2) 抗体 (批号 AF0639)、溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11) 抗体 (批号 DF12509) 购自澳大利亚 Affinity Biosciences 公司; 谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 抗体 (批号 ab125066) 购自英国 Abcam 公司; HRP 标记的山羊抗兔单克隆抗体 (批号 AS014) 购自武汉爱博泰克生物公司; 唑来膦酸 (批号 Z129382) 购自阿拉丁公司。

## 1.4 仪器

U3000-Q Exactive Focus 型高分辨率液质联用分析仪、Multiskan SkyHigh 型酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); ChemiDocXRS 型化学发光成像仪 (美国 Bio-Rad 公司); IVIS Lumina XRMS Series III 型小动物活体成像系统 (美国 PerkinElmer 公司); SkyScan 1276 型小动物 Micro CT 成像系统 (美国 Bruker 公司)。

## 2 方法

### 2.1 雷公藤提取物的制备及成分分析

**2.1.1 雷公藤提取物的制备** 取 100 g 雷公藤细粉, 加入 10 倍量的 95% 乙醇, 浸泡过夜。超声处理 45 min, 冷却至室温, 补足质量后, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 旋转蒸发器减压回收乙醇至无醇味, 并置于真空干燥箱中干燥, 得雷公藤提取物粉末<sup>[17]</sup>。经 HPLC 检测本研究制备的提取物中雷公藤甲素质量分数为 0.002 3%。

#### 2.1.2 雷公藤提取物的成分分析

精确称量 20 mg 雷公藤提取物粉末, 用 95% 乙醇溶解至 2 mg/mL, 通过 0.22 μm 滤膜滤过, 转入进样小瓶中备用, LC-MS 进样检测。

(1) 色谱条件: 采用 Ultimate 3000-Q-Exac 分析仪对雷公藤提取物中的成分进行分析, 使用 Acquity UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)。流动相为甲醇 (A)-0.05% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0~8 min, 5%~50% A; 8~15 min, 50%~98% A; 15~15.1 min, 98%~5% A; 15.1~18 min, 5% A。体积流量 0.2 mL/min; 柱温 25 °C; 进样量 5 μL。

(2) 质谱条件: ESI 离子源, 正、负离子模式检测; 第 1 阶段质量扫描范围  $m/z$  150~2 000, 第 2 阶段质量扫描范围  $m/z$  80~1 200; 电压为 4 000 V; 鞘气体积流量 45 mL/min, 辅助气体积流量 10

mL/min, 毛细管温度 300 °C。采用具有 “Qual Browser” 模块的 Thermo Xcalibur 软件对数据进行定性分析。参考 TCMSP (<https://old.tcmssp-e.com/tcmssp.php>) 和 PubMed (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库, 设置误差  $<1 \times 10^{-5}$  以识别预测的化学成分。

## 2.2 药物配制

**2.2.1 体内实验给药溶液的配制** 称取雷公藤提取物粉末适量, 用蒸馏水溶解, 分别配制成质量浓度为 8、4 mg/mL 的溶液<sup>[18]</sup>, 分别用于雷公藤高、低剂量组给药。

**2.2.2 体外实验给药溶液的配制** 称取雷公藤提取物粉末 10 mg, 以少量 DMSO 助溶后, 用完全培养基定容至 5 mL, 配制成终质量浓度为 2 mg/mL 的母液, 0.22 μm 微孔滤器滤过除菌, 分装, -20 °C 保存备用, DMSO 终体积分数小于 0.1%<sup>[17]</sup>。

## 2.3 细胞培养

4T1 细胞用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的高糖 DMEM 培养基, 4T1-luc 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 每隔 1 d 传代 1 次。

## 2.4 MTT 法检测细胞存活率

取对数生长期的 4T1 细胞, 胰酶消化后, 制备细胞悬液, 以  $5 \times 10^3$  个/孔接种至 96 孔板中, 培养 24 h。实验组加入不同质量浓度 (0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/mL) 的雷公藤提取物, 对照组加入不含药物的培养基, 继续培养 24 h。另设置不接种细胞不含药物的调零孔。加入 10 μL MTT 溶液 (5 mg/mL), 避光孵育 4 h, 弃去上清液后加入 DMSO 溶解。使用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度 ( $A$ ) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{调零}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{调零}})$$

## 2.5 划痕实验检测细胞迁移能力

取对数生长期的 4T1 细胞接种于 6 孔板中, 细胞密度达到 80%~90% 时, 用 200 μL 枪头划痕, PBS 清洗后, 加入不同质量浓度 (0.2、0.4、0.6 mg/mL) 的雷公藤提取物, 对照组加入不含药物的培养基, 继续培养。于 0、24、48 h 观察并拍照, 用 Image J 软件测量划痕面积, 计算迁移率。

$$\text{迁移率} = (0 \text{ h 划痕面积} - 24 \text{ h 或 } 48 \text{ h 划痕面积}) / 0 \text{ h 划痕面积}$$

## 2.6 结晶紫实验检测细胞活力

取对数生长期的 4T1 细胞接种于 6 孔板中, 细胞密度达到约 80% 时, 加入不同质量浓度 (0.4、0.8、

1.2 mg/mL) 的雷公藤提取物, 对照组加入不含药物的培养基, 继续培养 24 h。PBS 清洗后, 加入 4% 多聚甲醛固定 30 min; PBS 清洗, 加入结晶紫溶液孵育 15 min, PBS 清洗 3 次并干燥, 拍照记录。

### 2.7 平板克隆实验检测细胞克隆增殖能力

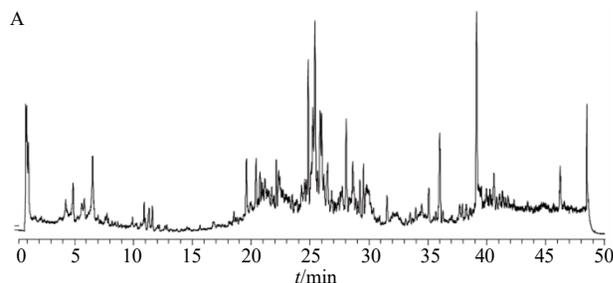
取对数生长期的 4T1 细胞, 以 500 个/孔接种于 6 孔板中, 贴壁后加入不同质量浓度 (0.4、0.8、1.2 mg/mL) 的雷公藤提取物, 对照组加入不含药物的培养基, 继续培养 14 d, 每 3 天更换 1 次培养基。用 4% 多聚甲醛固定细胞后进行结晶紫染色<sup>[19]</sup>, 拍摄染色结果, 并利用 Image J 软件计算克隆形成数。

### 2.8 Western blotting 检测 Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白表达

取对数生长期的 4T1 细胞接种于 6 孔板中, 加入不同质量浓度 (0.4、0.8、1.2 mg/mL) 的雷公藤提取物, 对照组加入不含药物的培养基, 培养 24 h 后提取总蛋白。使用 NanoDrop 分光光度计测定蛋白浓度, 加入上样缓冲液并在 100 °C 加热 5 min 使蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 封闭 2 h 后加入一抗, 4 °C 孵育过夜; 加入 HRP 标记的二抗, 于室温孵育 2 h, 加入 ECL 化学发光试剂显影, 利用 Image J 软件分析条带灰度值。

### 2.9 动物分组、造模与给药

雌性 BALB/c 小鼠在异氟烷麻醉下, 用胰岛素注射器将 10  $\mu$ L 含  $2 \times 10^5$  个 4T1-luc 细胞的细胞悬液注入胫骨骨髓腔, 构建骨转移模型<sup>[20-21]</sup>; 对照组 ( $n=5$ ) 注射生理盐水。7 d 后, 将小鼠随机分为模型组及雷公藤高、低剂量 (80、40 mg/kg)<sup>[22]</sup> 组和唑来膦酸 (30  $\mu$ g/kg) 组, 每组 5 只。雷公藤高、低剂量组每天 ig 雷公藤提取物, 唑来膦酸组每 2 天 ip 唑来膦酸<sup>[23]</sup>。给药治疗 21 d, 每 7 天进行 1 次肿瘤荧光成像; 实验结束前 1 d, 使用 Micro CT 对小鼠进行检查。



### 2.10 胫骨和股骨组织 TRAP 染色

末次给药结束后, 脱颈椎处死小鼠, 取股骨及胫骨, 于多聚甲醛中固定, 加入 14% 乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 进行脱钙, 在 4 °C 下搅拌。脱钙后的骨组织嵌入石蜡, 切片后进行 TRAP 染色, 于显微镜下观察并拍照<sup>[24]</sup>。

### 2.11 小鼠肿瘤荧光成像

小鼠 ip *D*-荧光素钾盐 (150 mg/kg), 注射 5~10 min 后进行异氟烷麻醉, 利用小动物活体成像系统进行实时荧光拍摄<sup>[25]</sup>。

### 2.12 Micro CT 离体成像

使用 Micro-CT 分析系统对小鼠骨组织进行三维重建, 在预定义的感兴趣区域内自动计算骨体积分数 (bone volume/tissue volume, BV/TV)、骨面积分数 (bone surface/bone volume, BS/BV)、骨表面积密度 (bone surface/tissue volume, BS/TV)、骨小梁数量 (trabecular number, Tb.N)、骨小梁厚度 (trabecular thickness, Tb.Th) 和骨矿物质密度 (bone mineral density, BMD)<sup>[25]</sup>。

### 2.13 Micro CT 活体成像

使用 Micro-CT 分析系统对小鼠进行活体成像, 活体需异氟烷麻醉, 小鼠嘴部对准小黑管, 用胶带固定好, 按照机器使用说明书进行拍摄扫描。

### 2.14 统计学分析

使用 GraphPad Prism 9.5 软件对数据进行作图与处理, 结果用  $\bar{x} \pm s$  表示。采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行组间差异的比较。

## 3 结果

### 3.1 雷公藤提取物的 UPLC-Q-Exactive-MS/MS 鉴定

正、负离子模式下雷公藤提取物的总离子流图如图 1 所示。通过参考相关文献、对比保留时间、精确质谱信息等, 对雷公藤提取物的化学成分进行鉴定, 鉴定出雷公藤甲素、雷公藤内酯酮、雷公藤内酯甲等 15 个化学成分 (表 1)。

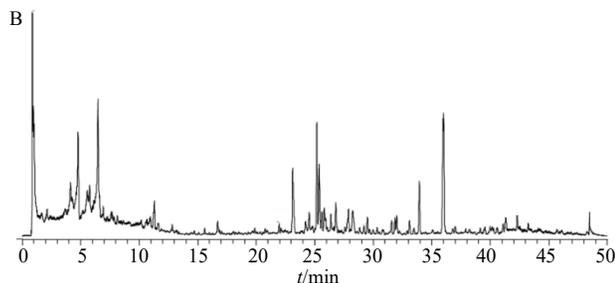


图 1 正 (A)、负 (B) 离子模式下雷公藤提取物的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of *T. wilfordii* extract in positive (A) and negative (B) ion modes

表 1 雷公藤提取物中的成分鉴定

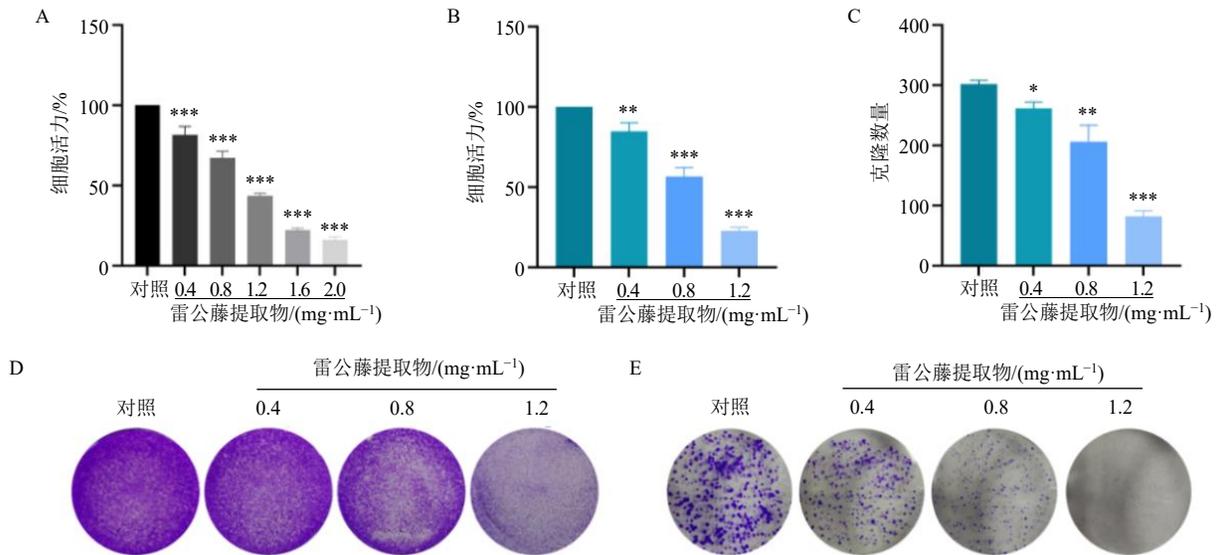
Table 1 Identification of components in *T. wilfordii* extract

序号	化合物	<i>t<sub>R</sub></i> /min	分子式	<i>m/z</i>		误差 ( $\times 10^{-6}$ )	碎片离子 ( <i>m/z</i> )	离子模式	PubChem CID
				实测值	理论值				
1	熊果酸	31.35	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	457.367 4	457.367 6	-0.437	203.179 5, 439.357 1	正离子	64945
2	3,4-二羟基苯甲醛	2.97	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	139.039 1	139.039 0	0.719	121.028 4, 111.044 1	正离子	8768
3	没食子儿茶素	1.71	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	307.081 1	307.081 2	-0.326	289.070 8, 165.054 6	正离子	65084
4	雷公藤内酯甲	16.83	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>	455.353 0	455.351 9	2.146	315.159 3, 409.210 3	正离子	158477
5	雷公藤内酯酮	16.65	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	359.148 6	359.148 9	-0.835	343.154 2, 191.070 3	正离子	65411
6	咖啡因	5.03	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	195.087 8	195.087 6	1.025	178.061 1, 138.054 6	正离子	2519
7	雷公藤甲素	3.21	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub>	361.164 3	361.164 4	-0.277	343.148 9, 297.133 2	正离子	107985
8	大豆黄素	11.91	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	255.065 3	255.065 1	0.784	135.008 8, 199.312 1	正离子	5281708
9	表儿茶素	6.52	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	291.086 2	291.086 3	-0.344	139.720 7, 123.409 8	正离子	72276
10	表没食子儿茶素	4.24	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	307.081 3	307.081 2	0.326	139.403 2, 287.605 6	正离子	72277
11	原花青素 B <sub>1</sub>	4.34	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	579.149 9	579.149 7	0.345	291.086 3, 409.092 4	正离子	11250133
12	原花青素 B <sub>2</sub>	5.94	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	579.149 6	579.149 7	-0.173	425.700 5, 287.109 7	正离子	122738
13	葛根素	6.64	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	417.117 8	417.118 0	-0.479	255.406 7, 137.203 4	正离子	5281807
14	葛根素	6.63	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	415.103 1	415.103 4	-0.723	297.106 5, 162.704 6	负离子	5281807
15	蟾蜍菊内酯	13.06	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	313.035 4	313.035 3	0.319	295.424 5, 211.500 4	负离子	5281813

3.2 雷公藤提取物抑制 4T1 细胞增殖及克隆形成

如图 2-A 所示, 与对照组比较, 雷公藤提取物作用 24 h 后, 4T1 细胞存活率显著下降 ( $P < 0.001$ ), 且呈剂量相关性, 其半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>) 值为 1.081 mg/mL。为了更加直观地观察雷公藤提取物对 4T1 细胞的抑制作用, 对细胞进行结晶紫染色, 结果见图 2-B、D, 与对照组比较, 各剂量的雷公藤提取物均显著抑制 4T1 细

胞生长 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), 且呈剂量相关性, 与 MTT 实验结果一致。克隆形成实验结果 (图 2-C、E) 显示, 雷公藤提取物作用 14 d 后, 对照组形成的细胞群落数量较多且结构紧密, 雷公藤提取物组细胞群落数量明显减少 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ), 形态不规则且尺寸较小。以上结果表明, 雷公藤提取物能够显著抑制 4T1 细胞的增殖及克隆形成, 且具有剂量相关性。



A-MTT 检测雷公藤提取物对 4T1 细胞活力的影响; B、D-结晶紫染色检测雷公藤提取物对 4T1 细胞活力的影响; C、E-雷公藤提取物对 4T1 细胞克隆形成的影响; 与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ , 下同。

A-effect of *T. wilfordii* extract on viability of 4T1 cells detected by MTT; B, D-effect of *T. wilfordii* extract on viability of 4T1 cells detected by crystal violet staining; C, E-effect of *T. wilfordii* extract on colony formation of 4T1 cells; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group, same as below figures.

图 2 雷公藤提取物抑制 4T1 细胞增殖及克隆形成 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 2 *T. wilfordii* extract inhibits proliferation and colony formation of 4T1 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.3 雷公藤提取物抑制 4T1 细胞迁移

为避免细胞毒性的直接杀伤作用对实验结果造成干扰,选取低质量浓度(0.2、0.4、0.6 mg/mL)的雷公藤提取物分别作用 24、48 h 进行划痕实验。

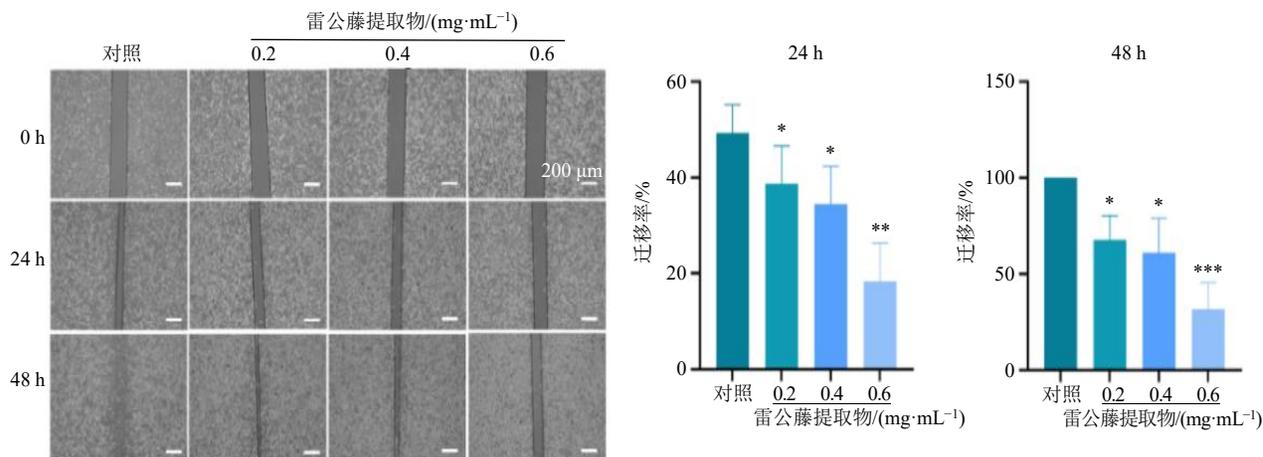


图 3 雷公藤提取物抑制 4T1 细胞迁移 ( $\times 10$ ;  $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 *T. wilfordii* extract inhibits migration of 4T1 cells ( $\times 10$ ;  $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.4 雷公藤提取物通过下调 Nrf2/SLC7A11/GPX4 通路诱导 4T1 细胞铁死亡

乳腺癌的发生发展及耐药性与铁死亡密切相关,调控铁死亡通路已成为新型抗肿瘤药物研发的重要方向。研究表明,激活铁死亡可通过多途径抑制乳腺癌进展<sup>[26]</sup>。七叶内酯通过 p53/SLC7A11/GPX4 信号轴诱导 4T1 细胞铁死亡<sup>[27]</sup>; 槐耳多糖通过 p53/SLC7A11/GPX4 信号轴促进三阴乳腺癌 MDA-MB-231 细胞铁死亡<sup>[28]</sup>; 而 miR-221-3p 过表达则通过 Nrf2/GPX4 轴抑制铁死亡促进转移<sup>[29]</sup>,提示铁死亡调控网络的多靶点特性。雷公藤及其成分抑制乳腺癌的作用机制主要有抑制增殖、迁移和侵袭<sup>[9]</sup>、诱导凋亡自噬<sup>[10]</sup>、抗血管生成<sup>[11]</sup>及调控雌激

素<sup>[12]</sup>等多重途径。近年来的研究揭示雷公藤活性成分在肝病<sup>[30]</sup>、胰腺癌<sup>[31]</sup>和结肠癌<sup>[32]</sup>中通过谷胱甘肽 (glutathione, GSH) /GPX4、泛素化 GPX4 降解及 p53/SLC7A11 等通路诱导铁死亡。然而,目前尚无雷公藤调控乳腺癌铁死亡通路的直接证据。本研究通过检测 Nrf2、SLC7A11、GPX4 关键蛋白表达,旨在揭示雷公藤抗乳腺癌的机制,为天然药物诱导铁死亡的研究提供理论依据。如图 4 所示,与对照组比较,0.4、0.8、1.2 mg/mL 的雷公藤提取物均可以显著下调 4T1 细胞 Nrf2、SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达 ( $P < 0.05、0.01、0.001$ ),表明雷公藤提取物可通过抑制 Nrf2/SLC7A11/GPX4 通路诱导 4T1 细胞铁死亡。

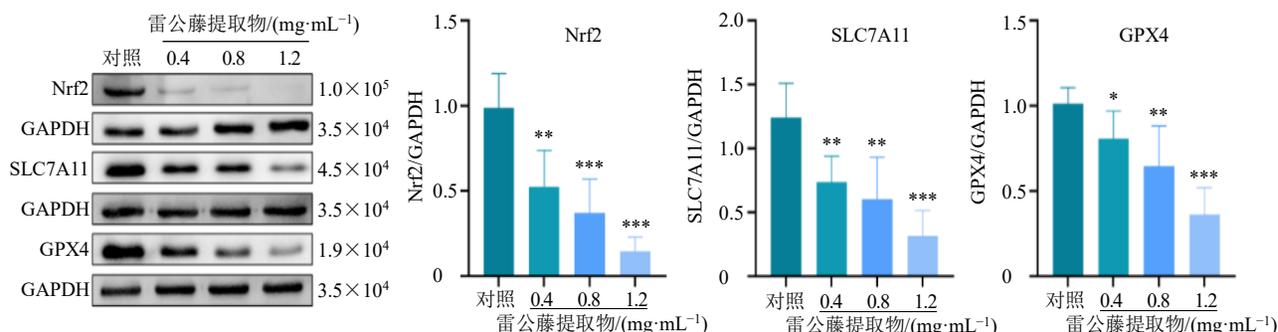


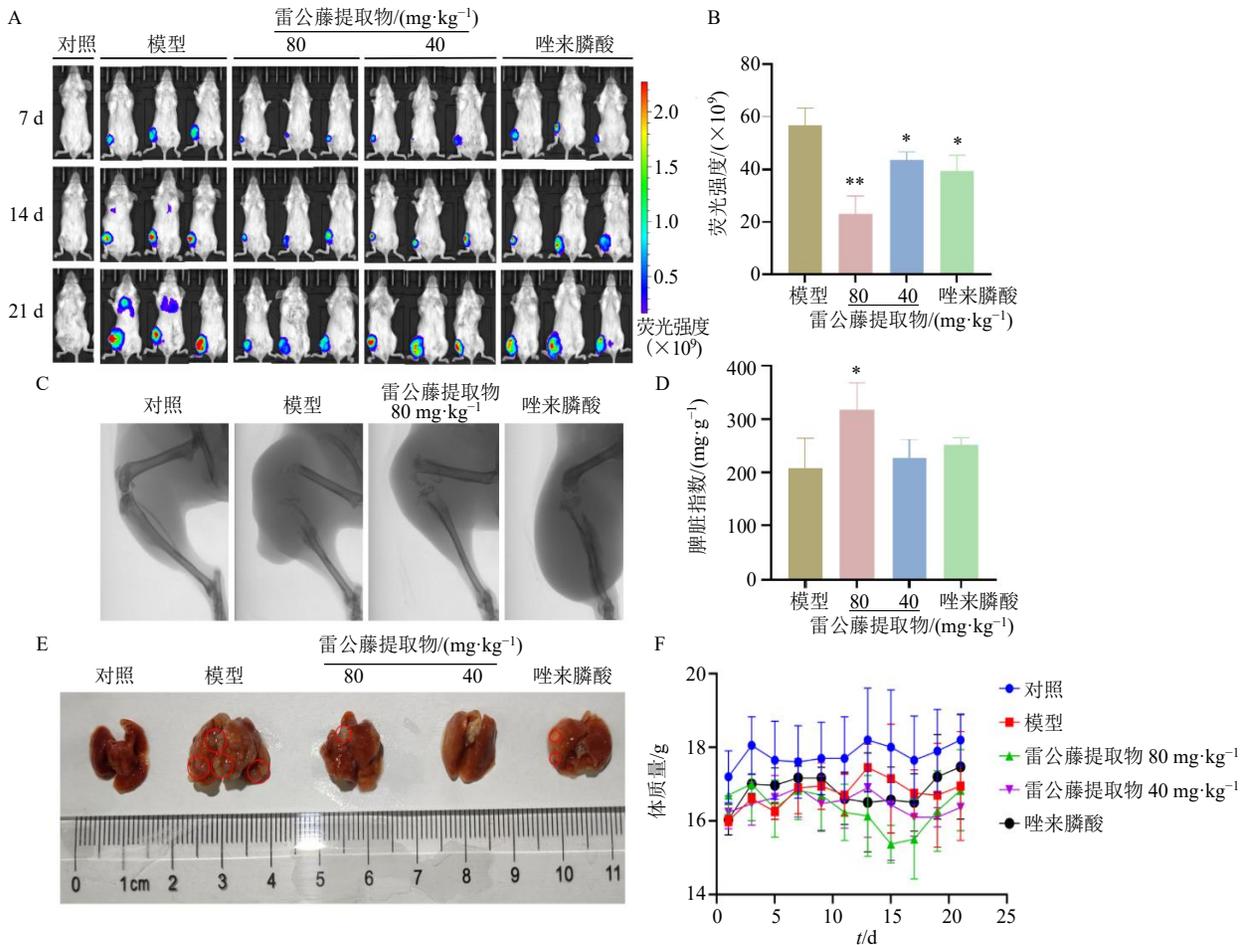
图 4 雷公藤提取物对 4T1 细胞 Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Effect of *T. wilfordii* extract on expressions of Nrf2, SLC7A11 and GPX4 proteins in 4T1 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.5 雷公藤提取物抑制骨转移肿瘤的进展和继发性肺转移

为了评估雷公藤提取物抑制乳腺癌骨转移的药效作用,小鼠胫骨中注射 4T1-luc 细胞构建骨转移模型,给予药物进行干预。如图 5-A、B 所示,与模型组比较,雷公藤提取物和唑来膦酸明显减缓肿瘤的生长 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。X 射线(图 5-C)结果显示,肿瘤导致明显的骨质丢失及胫骨骨折,而

雷公藤提取物表现出一定的骨保护作用。如图 5-D 所示,雷公藤提取物高剂量组小鼠脾脏指数显著高于模型组 ( $P < 0.05$ )。如图 5-E 所示,模型组小鼠出现远端肺转移,而雷公藤提取物组显著抑制了骨转移灶引发的继发性肺转移。实验过程中,各组小鼠体质量无明显变化(图 5-F)。以上结果表明,雷公藤提取物能够干预乳腺癌骨转移的进展,并且对乳腺癌继发性肺转移具有一定的抑制作用。



A-小鼠肿瘤生长的实时荧光成像; B-实验第 21 天小鼠肿瘤的荧光分析; C-小鼠的体内 CT 代表性图像; D-各组小鼠脾脏指数; E-实验第 21 天肺组织的代表性图像; F-各组小鼠体质量变化; 与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ 。

A-real time fluorescence imaging of tumor growth in mice; B-fluorescence analysis of tumor in mice on the 21st day of experiment; C-representative CT images of mice *in vivo*; D-spleen index of mice in each group; E-representative images of lung tissue on the 21st day of experiment; F-changes in body mass of mice in each group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs model group.

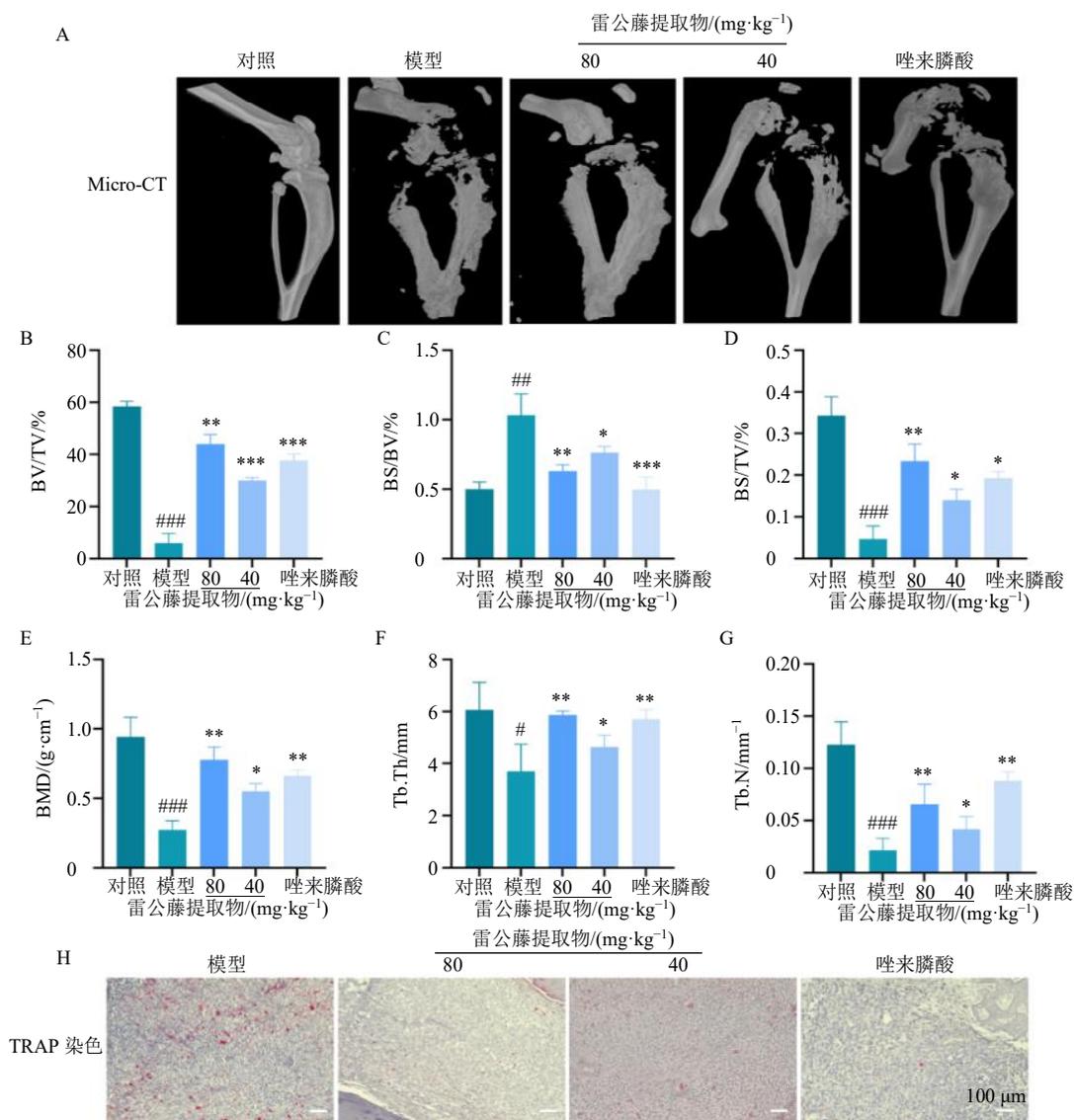
图 5 雷公藤提取物抑制骨转移肿瘤的进展和继发性肺转移 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 5 *T. wilfordii* extract inhibits progression of bone metastases and secondary lung metastasis ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

### 3.6 雷公藤提取物抑制破骨细胞募集和骨质流失

对小鼠离体骨组织的 3D 重建,如图 6-A 所示,模型组小鼠出现严重的骨质丢失、骨折,甚至骨小梁完全消失,这是由于肿瘤细胞诱导破骨细胞过度分化和募集,造成恶性循环所致;与模型组比较,雷公藤提取物治疗明显改善了骨质丢失的情况,这

种改善表现在各种骨参数上,包括 BV/TV 增加、BS/BV 降低、BS/TV 增加、BMD 增强、Tb.Th 增厚、Tb.N 增加(图 6-B~G)。此外,胫骨和股骨组织的 TRAP 染色显示,雷公藤提取物治疗减少了破骨细胞的分化和募集,最大限度地减少了骨质流失(图 6-H)。



A-骨组织的代表性 Micro-CT 重建分析; B~G-骨相关指标分析; H-胫骨和股骨组织的 TRAP 染色 (×20); 与对照组比较: \* $P < 0.05$  ### $P < 0.001$  与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ 。

A-representative Micro-CT reconstruction analysis of bone tissue; B~G-analysis of bone-related parameters; H-TRAP staining of tibial and femoral tissue (× 20); \* $P < 0.05$  ### $P < 0.001$  vs control group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs model group.

图 6 雷公藤提取物抑制破骨细胞募集和骨质流失 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 6 *T. wilfordii* extract inhibits osteoclast recruitment and bone loss ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

#### 4 讨论

近年来雷公藤的抗肿瘤活性逐渐受到关注。研究表明其主要活性成分如雷公藤红素可通过下调细胞周期蛋白、上调细胞周期蛋白依赖性激酶 (cyclin-dependent kinase, CDK) 表达诱导细胞周期阻滞, 将人乳腺癌 MCF-7 细胞周期阻滞在 G<sub>2</sub>/M 期<sup>[33-34]</sup>; 雷公藤内酯醇通过调控 miR-142-3p/热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70) 通路抑制 MCF-7 细胞增殖、侵袭和迁移<sup>[9]</sup>; 雷公藤活性成分主要通过线粒体和内质网途径诱导乳腺癌细胞凋

亡, 阻止乳腺癌转移<sup>[35]</sup>; 雷公藤甲素可以上调 MCF-7 细胞中自噬相关蛋白表达, 下调细胞自噬受体蛋白表达, 促进细胞自噬<sup>[36]</sup>; 雷公藤甲素通过抑制 Twist 相关蛋白 1 (Twist related protein 1, Twist1) 下调人乳腺癌 BT-549、MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞中跨膜受体蛋白-1 (neurogenic locus notch homolog protein-1, Notch-1) 的表达和 NF-κB 的磷酸化, 从而降低神经钙黏蛋白 (neural-cadherin, N-cadherin)、血管内皮钙黏蛋白 (vascular endothelial-cadherin, VE-cadherin) 和血管内皮细胞生长因子受

体2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2) 的表达, 抑制血管生成<sup>[1]</sup>; 雷公藤甲素可以通过下调雌激素受体相关的 ER $\alpha$ 、ER $\beta$  和丝裂原活化蛋白激酶 1/2 (mitogen-activated protein kinases 1/2, MEK 1/2) 蛋白表达及磷酸化水平, 抑制 MEK/ER 信号通路, 从而发挥对 4T1 细胞的抑制作用<sup>[37]</sup>。既往研究多聚焦于凋亡与自噬机制, 而本研究揭示了雷公藤通过下调 Nrf2/SLC7A11/GPX4 通路诱导 4T1 细胞铁死亡的作用。这一发现与在卵巢癌<sup>[38]</sup>、胰腺癌<sup>[30]</sup>、结肠癌<sup>[31]</sup>的铁死亡研究形成互补, 提示铁死亡可能成为雷公藤抗多种癌症作用的关键机制。

雷公藤在应用中不仅表现出良好的抗肿瘤效果, 还被广泛用于多种骨骼系统疾病的治疗, 包括骨关节炎、骨质疏松及骨折修复等疾病。研究表明, 雷公藤甲素通过靶向抑制磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)/核因子活化 T 细胞 1 (nuclear factor-activated T cell 1, NFATc1) 信号通路显著抑制破骨细胞生成, 进而发挥抗骨质流失作用<sup>[39]</sup>。雷公藤甲素抗老年性骨质疏松机制主要源于其对破骨细胞数量及骨吸收功能的双重抑制<sup>[15]</sup>。雷公藤另一重要活性成分雷公藤红素通过阻断 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 信号通路抑制破骨细胞成熟分化<sup>[40]</sup>。本研究通过体内实验证实, 雷公藤治疗对肿瘤相关骨破坏具有显著改善作用, 具体表现为 BV/TV、BMD 及 Tb.Th 显著增加, 同时 BS/BV 降低。此外, TRAP 染色进一步证实雷公藤可有效抑制破骨细胞的分化与募集, 从组织学层面揭示了其对骨保护的直接作用。这些发现提示雷公藤可能通过调控破骨细胞的过度活化, 打破肿瘤-破骨细胞恶性循环, 从而缓解病理性骨破坏。

尽管本研究取得重要发现, 但是仍需正视以下局限: 虽然 4T1 细胞系是研究 TNBC 骨转移的经典模型, 但其人鼠种属差异可能影响机制外推, 未来需在 MDA-MB-231 等人源细胞系中验证; 由于雷公藤成分复杂多样, 发挥关键作用的具体成分不明确, 后续可通过 HPLC 指纹图谱结合活性追踪确定关键组分。综上, 本研究表明雷公藤通过抑制 TNBC 细胞的增殖和迁移、诱导铁死亡及改善骨微环境, 能够有效干预乳腺癌骨转移的进程。本研究从“抑瘤-护骨”双重角度拓展了雷公藤的药用价值, 为乳腺癌骨转移的综合治疗策略开发提供了新思路。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Bray F, Laversanne M, Sung H, *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-263.
- [2] Leon-Ferre R A, Goetz M P. Advances in systemic therapies for triple negative breast cancer [J]. *BMJ*, 2023, 381: e071674.
- [3] Liu B, Yang Q, Cheng Y, *et al.* Calcium phosphate hybrid micelles inhibit orthotopic bone metastasis from triple negative breast cancer by simultaneously killing cancer cells and reprogramming the microenvironment of bone resorption and immunosuppression [J]. *Acta Biomater*, 2023, 166: 640-654.
- [4] Tahara R K, Brewer T M, Theriault R L, *et al.* Bone metastasis of breast cancer [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1152: 105-129.
- [5] Pan Y X, Lin Y F, Mi C. Clinicopathological characteristics and prognostic risk factors of breast cancer patients with bone metastasis [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(16): 1340.
- [6] Satcher R L, Zhang X H. Evolving cancer-niche interactions and therapeutic targets during bone metastasis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22(2): 85-101.
- [7] Coleman R E. Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(20 Pt 2): 6243s-6249s.
- [8] 江婷婷, 赵文文, 武香香, 等. 基于网络药理学和实验验证探讨雷公藤治疗黑色素瘤的作用机制 [J]. *现代药物与临床*, 2024, 39(1): 34-40.
- [9] 王进军, 崔鹏来, 程欣, 等. 雷公藤内酯醇通过调控 miR-142-3p/HSP70 通路抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、侵袭和迁移 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2024, 31(3): 240-246.
- [10] 吕仙梅, 郭秋生. 雷公藤内酯醇通过调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路诱导三阴性乳腺癌细胞凋亡与自噬 [J]. *浙江中西医结合杂志*, 2024, 34(12): 1106-1111.
- [11] Zhang M L, Meng M, Liu Y X, *et al.* Triptonide effectively inhibits triple-negative breast cancer metastasis through concurrent degradation of Twist1 and Notch1 oncoproteins [J]. *Breast Cancer Res*, 2021, 23(1): 116.
- [12] 王进军, 文斌, 金阳, 等. 雷公藤内酯醇对三阴性乳腺癌细胞的作用及机制 [J]. *华中科技大学学报: 医学版*, 2022, 51(2): 187-191.
- [13] 杨光夏. 雷公藤红素调控 TLR2/NF- $\kappa$ B 信号通路治疗骨关节炎的机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学,

- 2022.
- [14] 胡昊, 余田甜, 丰瑞兵, 等. 雷公藤甲素对去势小鼠骨质疏松模型破骨细胞分化的影响 [J]. 生物骨科材料与临床研究, 2023, 20(1): 13-18.
- [15] 陈俊泽, 俞辉, 肖进. 雷公藤甲素通过抑制破骨细胞生成预防骨丢失的研究 [J]. 中国临床解剖学杂志, 2023, 41(1): 77-80.
- [16] 孙健淇, 孙瑶, 张颖利, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨雷公藤片治疗类风湿关节炎的作用机制 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2025, 25(1): 19-24.
- [17] 高丽, 聂中标, 柴智, 等. 雷公藤醇提物对骨髓细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 146-149.
- [18] 白赞, 高丽, 王永辉, 等. 雷公藤醇提物小鼠急性毒性实验 [J]. 世界中西医结合杂志, 2014, 9(2): 138-140.
- [19] 张振勇, 李肖, 李保宏, 等. 芒柄花素诱导肺癌细胞焦亡并抑制 PD-L1 介导的免疫逃逸 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(5): 971-981.
- [20] 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.e20.
- [21] Luo Z Y, Lu Y C, Shi Y Y, *et al.* Neutrophil hitchhiking for drug delivery to the bone marrow [J]. *Nat Nanotechnol*, 2023, 18(6): 647-656.
- [22] 焦利萍. 雷公藤提取物对正常小鼠免疫功能的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(9): 2054-2056.
- [23] 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 fishing [J]. *Phytomedicine*, 2024, 123: 155257.
- [24] Niu Y M, Yang H B, Yu Z Y, *et al.* Intervention with the bone-associated tumor vicious cycle through dual-protein therapeutics for treatment of skeletal-related events and bone metastases [J]. *ACS Nano*, 2022, 16(2): 2209-2223.
- [25] Huang Y J, Guan Z L, Dai X L, *et al.* Engineered macrophages as near-infrared light activated drug vectors for chemo-photodynamic therapy of primary and bone metastatic breast cancer [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 4310.
- [26] Zhang Y Y, Su F Z, Zhu E L, *et al.* A systematical review on traditional Chinese medicine treating chronic diseases via regulating ferroptosis from the perspective of experimental evidence and clinical application [J]. *Chin Herb Med*, 2025, 17(2): 246-260.
- [27] 何丹, 李琳霏, 谭小宁, 等. 基于 p53/SLC7A11/GPX4 信号轴探讨七叶内酯诱导小鼠乳腺癌 4T1 细胞铁死亡的作用机制 [J]. 中国病理生理杂志, 2024, 40(2): 282-290.
- [28] 王玲, 史晓光, 高爽, 等. 槐耳多糖通过 p53/sLC7A11/GPX4 信号轴促进三阴乳腺癌细胞铁死亡的机制研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2025, 34(8): 1023-1028.
- [29] 张倩, 马楠, 李琦, 等. miR-221-3p 通过 NRF2/GPX4 轴调节铁死亡促进乳腺癌细胞转移的分子机制研究 [J]. 河北医学, 2025, 31(1): 22-28.
- [30] 王伟艳, 刘珊, 李会芳, 等. 基于谷胱甘肽/谷胱甘肽过氧化物酶 4 轴探讨雷公藤甲素引起肝细胞铁死亡的作用机制 [J]. 中草药, 2024, 55(9): 2967-2975.
- [31] 李泽彦, 李国东, 孙硕, 等. 雷公藤红素诱导人胰腺癌 PANC-1 细胞铁死亡的机制研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2024, 40(6): 1062-1069.
- [32] 徐嘉韩, 陆新刚. 雷公藤甲素调控 p53/SLC7A11 轴诱导结肠癌细胞铁死亡 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2023, 33(6): 502-505.
- [33] Ou G X, Jiang X Y, Gao A, *et al.* Celastrol inhibits canine mammary tumor cells by inducing apoptosis via the caspase pathway [J]. *Front Vet Sci*, 2022, 8: 801407.
- [34] Feng Y, Zhang B, Lv J L, *et al.* Scaffold hopping of celastrol provides derivatives containing pepper ring, pyrazine and oxazole substructures as potent autophagy inducers against breast cancer cell line MCF-7 [J]. *Eur J Med Chem*, 2022, 234: 114254.
- [35] 张静, 李静蔚, 陈子超, 等. 雷公藤治疗乳腺癌及其骨转移的药理研究进展 [J]. 中药新药与临床药理, 2024, 35(8): 1272-1280.
- [36] 高欢, 曲晓宇, 张月明, 等. Erk 信号传导通路在雷公藤甲素诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞自噬与凋亡中的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(9): 930-933.
- [37] 潘国风, 张奇, 高建莉, 等. 基于雌激素受体信号通路雷公藤甲素抗乳腺癌作用及机制研究 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(12): 3739-3742.
- [38] 马勃. 小剂量雷公藤多苷靶向 NRF2/GPX4 信号途径诱导细胞铁死亡逆转卵巢癌耐药的作用及机制研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2023.
- [39] Cui J, Li X Q, Wang S C, *et al.* Triptolide prevents bone loss via suppressing osteoclastogenesis through inhibiting PI3K-AKT-NFATc1 pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(11): 6149-6161.
- [40] 李帆. 雷公藤红素经 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 信号通路抑制破骨细胞形成及防治磨损颗粒诱导骨溶解的实验研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2018.

[责任编辑 李亚楠]