二至丸乙醇提取物抑制乳腺癌骨转移及保护骨微环境的作用及机制

李雅婧[1]，陈子超[1]，庄　静[2, 3]，牛明月[1]，丁佳欣[1]，张誉宝[2]，张　振[1*]，孙长岗[2, 3*]

1. 山东中医药大学中医药创新研究院，山东 济南　250355
2. 山东第二医科大学中医学院，山东 潍坊　261000
3. 潍坊市中医院 肿瘤科，山东 潍坊　261000

摘　要：目的　探讨二至丸乙醇提取物对乳腺癌骨转移的预防作用及其对骨微环境的影响。**方法**　采用不同体积分数乙醇溶液回流提取二至丸，通过 MTT 实验比较 50%、60%、70%、80%、90%乙醇提取物对 4T1 乳腺癌细胞活力的影响，采用划痕愈合实验和结晶紫染色评价二至丸乙醇提取物对 4T1 细胞迁移和增殖能力的影响；运用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用（ultra-performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap high-resolution mass spectrometry，UPLC-Q-Exactive-MS/MS）分析二至丸乙醇提取物化学成分。经左心室注射萤火虫荧光素酶标记的 4T1 乳腺癌细胞（4T1-Luc）建立乳腺癌骨转移小鼠模型，设置对照组、模型组、顺铂（5 mg/kg）组和二至丸乙醇提取物高、低剂量（10、5 g/kg）组；利用小动物活体成像监测小鼠全身生物发光信号及体内肿瘤负荷变化，并记录小鼠生存状态、体质量变化及脏器指数；通过显微计算机断层扫描（micro-computed tomography，Micro-CT）评价骨微结构变化；ELISA 检测血清中白细胞介素-6（interleukin-6，IL-6）、肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、γ 干扰素（interferon-γ，IFN-γ）、骨保护素（osteoprotegerin，OPG）和核因子-κB 受体活化因子配体（receptor activator of nuclear factor-κB ligand，RANKL）水平；苏木素-伊红（hematoxylin-eosin，HE）染色观察主要脏器和骨组织病理变化；抗酒石酸酸性磷酸酶（tartrate-resistant acid phosphatase，TRAP）染色观察破骨细胞相关表型变化。**结果**　不同体积分数乙醇提取物均可不同程度降低 4T1 细胞活力，其中 70%乙醇提取物抑制作用最强，半数抑制浓度（half-maximal inhibitory concentration，IC_{50}）为 548.8 μg/mL，将其命名为 E-EZP 并用于后续研究。体外实验显示，E-EZP 可降低 4T1 细胞划痕愈合率，减少结晶紫染色面积，抑制 4T1 细胞迁移和增殖（$P<0.01$、0.001）。UPLC-Q-Exactive-MS/MS 共鉴定出 E-EZP 中 27 个化学成分，包括木犀草素、槲皮素、蜈蚣菊内酯、芹菜素-7-葡萄糖苷、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 等。体内实验显示，与模型组比较，E-EZP 组小鼠第 21 天双侧后肢骨 ROI 总光子通量降低（$P<0.05$、0.01），生存时间延长，体质量维持相对稳定，肝脏指数和脾脏指数降低（$P<0.05$、0.01、0.001）；Micro-CT 结果显示，E-EZP 可改善模型小鼠骨微结构破坏和骨量丢失（$P<0.05$、0.01、0.001）；ELISA 结果显示，E-EZP 可降低血清 IL-6、TNF-α 和 RANKL 水平（$P<0.05$、0.001），提高 IFN-γ 和 OPG 水平（$P<0.001$）；组织病理学结果显示，E-EZP 在实验剂量下未引起心、肝、肺、肾明显组织损伤，并可改善骨小梁结构，减少骨组织 TRAP 阳性细胞数量。**结论**　E-EZP 可抑制 4T1 乳腺癌细胞增殖和迁移，降低乳腺癌骨转移模型小鼠骨骼区域肿瘤相关负荷，改善骨微结构及破骨细胞相关表型，其作用伴随血清炎症因子和 RANKL/OPG 水平变化，提示 E-EZP 具有抗肿瘤和保护骨微环境的双重作用。

关键词：二至丸；乳腺癌；骨转移；骨微环境；木犀草素；槲皮素；蜈蚣菊内酯；芹菜素-7-葡萄糖苷；异绿原酸 A；异绿原酸 C；核因子-κB 受体活化因子配体

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2026)22 - 8954 - 12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.22.012

Effect and mechanism of ethanol extract of Erzhi Pill on inhibiting breast cancer bone metastasis and protecting bone microenvironment

LI Yajing[1], CHEN Zichao[1], ZHUANG Jing[2, 3], NIU Mingyue[1], DING Jiaxin[1], ZHANG Yubao[2], ZHANG Zhen[1], SUN Changgang[2, 3]

收稿日期：2026-06-09

基金项目：国家自然科学基金重点项目（82430123）；山东省自然科学基金项目（ZR2025MS1285）；慢性非传染性疾病国家科技重大专项（SQ2024AAA030186）；国家自然科学基金区域创新发展联合基金重点支持项目（U25A20169）；山东省中医药科技项目（M20251705）；国家级领军人才项目（TP-001-2025）；国家自然科学基金面上项目（82676023）

作者简介：李雅婧，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: lyjjj595@163.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

孙长岗，教授，研究方向为中草药及天然药物抗肿瘤机制。E-mail: scgdoctor@126.com

1. Innovative Institute of Chinese Medicine and Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China
2. College of Traditional Chinese Medicine, Shandong Second Medical University, Weifang 261000, China
3. Department of Oncology, Weifang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Weifang 261000, China

Abstract: Objective To investigate the preventive effect of ethanol extract of Erzhi Pill (二至丸) on breast cancer bone metastasis and to explore its effect on the bone microenvironment. **Methods** Erzhi Pill was extracted by reflux extraction with ethanol solutions of different volume fractions. The effects of 50%, 60%, 70%, 80% and 90% ethanol extracts on the viability of 4T1 breast cancer cells were compared by MTT assay. The effects of ethanol extract of Erzhi Pill on 4T1 cell migration and proliferation were evaluated by wound healing assay and crystal violet staining. The chemical components of ethanol extract of Erzhi Pill were analyzed by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap high-resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Exactive-MS/MS). A mouse model of breast cancer bone metastasis was established by left ventricular injection of firefly luciferase-labeled 4T1 breast cancer cells (4T1-Luc). The mice were divided into control group, model group, cisplatin (5 mg/kg) group, ethanol extract of Erzhi Pill high-and low-dose (10, 5 g/kg) groups. *In vivo* imaging system was used to monitor bioluminescent signals and changes in tumor burden in mice. Survival status, body weight and organ indexes were recorded. Micro-computed tomography (Micro-CT) was used to evaluate bone microstructure. ELISA was used to detect the levels of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor-α (TNF-α), interferon-γ (IFN-γ), osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL) in serum. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe pathological changes in major organs and bone tissues. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining was used to observe the phenotypic changes related to osteoclasts. **Results** The ethanol extracts at different concentrations reduced the viability of 4T1 cells to varying degrees. The 70% ethanol extract showed the strongest inhibitory effect, with a half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 548.8 μg/mL. Therefore, this extract was named E-EZP and used in the following experiments. *In vitro* results showed that E-EZP reduced the wound healing rate and the crystal violet staining area of 4T1 cells, indicating that it inhibited cell migration and proliferation ($P < 0.01$, 0.001). UPLC-Q-Exactive-MS/MS analysis identified 27 chemical components in E-EZP, including luteolin, quercetin, wedelolactone, apigenin-7-glucoside, isochlorogenic acid A, and isochlorogenic acid C. *In vivo* results showed that, compared with model group, E-EZP decreased the total photon flux in the bilateral hindlimb bone ROIs on day 21 ($P < 0.05$, 0.01), prolonged survival time, maintained relatively stable body weight, and decreased the liver and spleen indexes ($P < 0.05$, 0.01, 0.001). Micro-CT results showed that E-EZP improved bone microstructural damage and bone loss in model mice ($P < 0.05$, 0.01, 0.001). ELISA results showed that E-EZP decreased the levels of IL-6, TNF-α and RANKL in serum ($P < 0.05$, 0.001), while increasing the levels of IFN-γ and OPG ($P < 0.001$). Histopathological results showed that E-EZP did not cause obvious damage to the heart, liver, lung or kidney at the tested doses. It also improved trabecular bone structure and reduced the number of TRAP-positive cells in bone tissue. **Conclusion** E-EZP inhibits the proliferation and migration of 4T1 breast cancer cells, reduces tumor-related burden in bone regions of mice with breast cancer bone metastasis models, and improves bone microstructure and osteoclast-related phenotypes. These effects are accompanied by changes in serum inflammatory factors and RANKL/OPG levels, indicating that E-EZP exerts dual roles in anti-tumor activity and protection of the bone microenvironment.

Key words: Erzhi Pill; breast cancer; bone metastasis; bone microenvironment; luteolin; quercetin; wedelolactone; apigenin-7-glucoside; isochlorogenic acid A; isochlorogenic acid C; receptor activator of nuclear factor-κB ligand

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一，远处转移是导致乳腺癌患者死亡和预后不良的重要原因。骨是乳腺癌最常见的远处转移部位之一，乳腺癌细胞一旦在骨组织内定植并形成转移灶，可进一步引起持续性骨痛、病理性骨折、高钙血症及脊髓压迫等骨相关事件，严重降低患者生活质量并增加治疗负担[1-2]。目前，临床针对乳腺癌骨转移的治疗多集中于转移灶形成后的骨破坏控制和症状缓解，如抗骨吸收治疗、放疗、化疗及靶向治疗等[3]。然而，骨转移的发生并非在临床可见骨损伤时才开始，其早期已涉及肿瘤细胞血行播散、骨组织黏附、骨内定植及骨微环境预重塑等连续过程。因此，在骨转移“未发”或早期定植阶段进行预防性干预，阻断肿瘤细胞在骨组织中的生存扩增及其诱导的骨微环境失衡，对于延缓乳腺癌骨转移进展具有重要意义。

乳腺癌骨转移的形成依赖于肿瘤细胞与骨微环境之间的相互作用。肿瘤细胞进入骨组织后，可通过分泌炎症因子、改变局部免疫状态以及调节核

因子-κB 受体活化因子配体（receptor activator of nuclear factor-κB ligand，RANKL）/骨保护素（osteoprotegerin，OPG）系统，促进破骨细胞分化和活化[4-5]。破骨细胞介导的骨吸收增强又可释放骨基质中储存的多种生长因子，进一步促进肿瘤细胞增殖和扩增，最终形成“肿瘤生长-骨破坏-肿瘤再生长”的恶性循环[6]。因此，乳腺癌骨转移的早期防控不应仅局限于抑制肿瘤细胞本身，还应同时关注骨微环境稳态的维持。降低肿瘤细胞迁移和定植能力、减轻炎症反应、调节 RANKL/OPG 失衡并抑制破骨细胞异常活化，是预防乳腺癌骨转移发生和发展的重要策略。

中医药在“未病先防”“既病防变”方面具有整体调节和多靶点干预优势。中医理论认为“肾主骨”“肝肾同源”，骨质失养、骨络失固与肝肾亏虚、精血不足密切相关；而乳腺癌转移进展又常与正虚毒瘀、瘀毒内蕴及痰瘀互结等病机有关[7-8]。乳腺癌骨转移“未发”阶段虽尚未形成明显骨破坏，但肿瘤细胞播散、炎症微环境异常及骨代谢失衡已可启动骨转移前微环境重塑。基于“补益肝肾、强筋健骨、扶正祛邪”的干预思路，选择兼具抗肿瘤与骨保护潜力的中药复方进行早期预防研究，具有较强的理论依据和应用价值[9-10]。二至丸出自《医方集解》，由女贞子和墨旱莲组成，具有补益肝肾、滋阴填精之功[11]。现代研究表明，二至丸及其组成药物含有木犀草素、槲皮素、蜕皖菊内酯、异绿原酸类等多种活性成分，具有抗炎、抗氧化、调节免疫、抑制肿瘤细胞增殖和迁移以及改善骨代谢等药理作用[12-14]。考虑到传统煎煮提取效率有限，且可能造成部分抗肿瘤活性成分损失[15]，本研究采用不同体积分数乙醇对二至丸进行回流提取，并通过体外细胞实验筛选具有较强抗乳腺癌活性的提取部位。在此基础上，进一步结合液质联用技术分析其化学成分，并通过乳腺癌骨转移小鼠模型评价其对肿瘤负荷、骨微结构、炎症因子及骨代谢指标的影响，以期为评价二至丸乙醇提取物干预乳腺癌骨转移及保护骨微环境的作用提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞与动物

小鼠乳腺癌细胞 4T1 和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。4T1 和 4T1-Luc 细胞均采用 Dulbecco 改良 Eagle 培养基培养，培养基中加入 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素，置于 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中培养。

6 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠，体质量 16～18 g，购自济南鹏悦实验动物繁育有限公司，实验动物生产许可证号 SCXK（鲁）2022-0006，动物质量合格证号 No.370726251101347656。动物实验均遵循山东中医药大学实验动物护理和使用指南，动物伦理批准号为 SDUTCM20250829001。

1.2 药材

女贞子和墨旱莲（批号均为 241101）购自济南建联中药店，经山东中医药大学药学院刘谦教授分别鉴定为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait.的干燥成熟果实、菊科植物鳢肠 *Eclipta prostrata* L.的干燥地上部分。

1.3 药品与试剂

小鼠 OPG ELISA 试剂盒（批号 ml002117）、小鼠 RANKL ELISA 试剂盒（批号 ml037743）购自上海酶联生物科技有限公司；小鼠肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）ELISA 试剂盒（批号 EK282/4）、小鼠 γ 干扰素（interferon-γ，IFN-γ）ELISA 试剂盒（批号 EK280/3）、小鼠白细胞介素-6（interleukin-6，IL-6）ELISA 试剂盒（批号 GER0001）、抗酒石酸酸性磷酸酶（tartrate-resistant acid phosphatase，TRAP）染色试剂盒（批号 G1050-50T）、DMEM 高糖培养基（批号 G4511）、PBS（批号 G4202）购自武汉赛维尔生物科技有限公司。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（批号 C0222）、胰酶细胞消化液（批号 C0203）、MTT（批号 ST316）、二甲基亚砜（批号 ST038）、*D*-荧光素钾盐（批号 ST196）购自上海碧云天生物技术有限公司。

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）；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 二至丸提取物的制备及成分分析

2.1.1 二至丸提取物的制备 分别配制体积分数为 50%、60%、70%、80%、90%的乙醇水溶液。称取女贞子和墨旱莲各 6 g，按照料液比 1∶10 分别

加入 120 mL 相应体积分数的乙醇水溶液，回流提取 3 h，经 8 层纱布滤过，滤液减压浓缩至膏状，随后置于−80 ℃预冻过夜，经冷冻干燥得到相应的二至丸乙醇提取物冻干粉。上述 5 种乙醇提取物均由独立药材样品分别制备，不进行连续提取或混合处理，分别用于后续体外活性筛选。根据筛选结果，将活性较强的 70%乙醇提取物命名为 E-EZP，并用于后续实验。

2.1.2 E-EZP 的成分分析 准确称取 E-EZP 冻干粉末 20 mg，加入超纯水溶解，配制成质量浓度为 2 mg/mL 的供试品溶液，超声处理使其充分溶解，12 000 r/min 离心 10 min，取上清液，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后转入进样瓶，供 UPLC-Q-Exactive-MS/MS 分析。

（1）色谱条件：采用 Ultimate 3000-Q Exactive 高分辨率液质联用分析系统，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：0～2 min，5% A；2～42 min，5%～95% A；42～47 min，95% A；47～47.1 min，95%～5% A；47.1～50 min，5% A。体积流量 0.2 mL/min；柱温 25 ℃；进样量 5 μL。

（2）质谱条件：采用电喷雾离子源（electrospray ionization，ESI），在正、负离子模式下采集数据。一级质谱扫描范围为 *m*/*z* 100～1 500，二级质谱扫描范围为 *m*/*z* 80～1 200；喷雾电压 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 ℃；采集模式为 Full MS/dd-MS^2，二级碰撞能量设置为 20、40、60 eV。采用 Thermo Xcalibur 软件 Qual Browser 模块进行数据采集和定性分析。通过与 TCMSP、PubChem 数据库及相关文献比对，结合保留时间、精确质荷比、碎片离子信息，对 E-EZP 中化学成分进行初步鉴定[16]。

2.2 细胞活力、迁移和增殖实验

2.2.1 MTT 法检测细胞活力 将对数生长期的 4T1 细胞以 6×10^3 个/孔接种于 96 孔板中，每孔 100 μL。细胞贴壁后给予 19.53～5 000.00 μg/mL 不同体积分数的二至丸提取物处理 24 h。加入 MTT 溶液孵育 4 h，弃去上清，加入二甲基亚砜溶解甲瓒结晶，采用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度（*A*）值，计算细胞存活率。

$$细胞存活率=(A_{给药}-A_{空白})/(A_{对照}-A_{空白})$$

2.2.2 划痕实验检测细胞迁移能力 将对数生长期的 4T1 细胞以 6×10^5 个/孔接种于 6 孔板中，待细胞生长至约 90%融合形成单层细胞时，使用无菌 200 μL 枪头垂直划痕。PBS 轻洗去除脱落细胞后，加入含不同质量浓度（250、500、750、1 000 μg/mL）E-EZP 的无血清培养基培养。分别于 0、24 h 拍照记录，并计算划痕愈合率。

划痕愈合率＝(0 h 划痕面积−24 h 划痕面积)/0 h 划痕面积

2.2.3 结晶紫实验检测细胞增殖 将对数生长期的 4T1 细胞以 6×10^5 个/孔接种于 6 孔板中，待细胞贴壁并形成约 90%融合单层后，按“2.2.2”项下方法处理，固定细胞并进行结晶紫染色，拍照观察细胞增殖情况。

2.3 动物造模与给药

造模前，小鼠连续 7 d ig E-EZP，建立造模前给药的早期干预方案。第 7 天，通过左心室注射 4T1-Luc 细胞悬液（6×10^3 个细胞，80 μL）建立实验性乳腺癌骨转移模型。造模后第 3 天开始药物干预。小鼠随机分为对照组、模型组、顺铂（5 mg/kg）组和 E-EZP 高、低剂量（10、5 g/kg，分别相当于临床等效剂量的 2、1 倍）组，每组 5 只。E-EZP 每天给药 1 次，CDDP 每 3 天给药 1 次，实验周期为 28 d。每 7 天进行 1 次 IVIS 活体成像，监测体内肿瘤负荷变化；在解剖后进行 Micro-CT 扫描，评价骨结构。

2.4 活体成像及生存观察

小鼠 ip *D*-荧光素钾盐（150 mg/kg，以 DPBS 溶解），10～20 min 后通过小动物麻醉系统用 3%异氟烷麻醉。随后使用成像系统进行生物发光检测。系统自动调整曝光时间并选择成像区域，于第 21 天在各组小鼠双侧后肢骨的相同解剖区域设置大小和形状一致的固定感兴趣区域（region of interest，ROI），在统一分析参数下计算双侧骨 ROI 总光子通量之和，用于定量评价骨骼区域肿瘤相关生物发光负荷，并根据信号强度评价肿瘤生长和骨定植进程[17]。

2.5 Micro-CT 骨重建分析

末次给药结束后，脱颈处死小鼠，取小鼠股骨、胫骨和腓骨，用 4%多聚甲醛固定后进行 Micro-CT X 射线扫描（Bruker Micro-CT）。使用 NRecon 软件重建图像，Data Viewer 软件进行空间定位，CTvox 软件进行三维可视化。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）。

2.6　ELISA 检测血清炎症因子和骨代谢指标

采集小鼠眼眶后血液样本，室温静置 4 h 后，4 ℃、2 000×*g* 离心 20 min，收集上清，按照 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-6、TNF-α、IFN-γ、OPG 及 RANKL 水平。

2.7　苏木素-伊红（hematoxylin-eosin，HE）和 TRAP 染色

处死小鼠后取心、肝、肺、肾及骨组织，用 4% 多聚甲醛固定。骨组织经 EDTA 脱钙后进行石蜡包埋和切片。主要脏器和骨组织切片经脱蜡、水化后进行 HE 染色，观察组织结构和病理改变。骨组织另行进行 TRAP 染色，观察 TRAP 阳性细胞数量及分布情况。

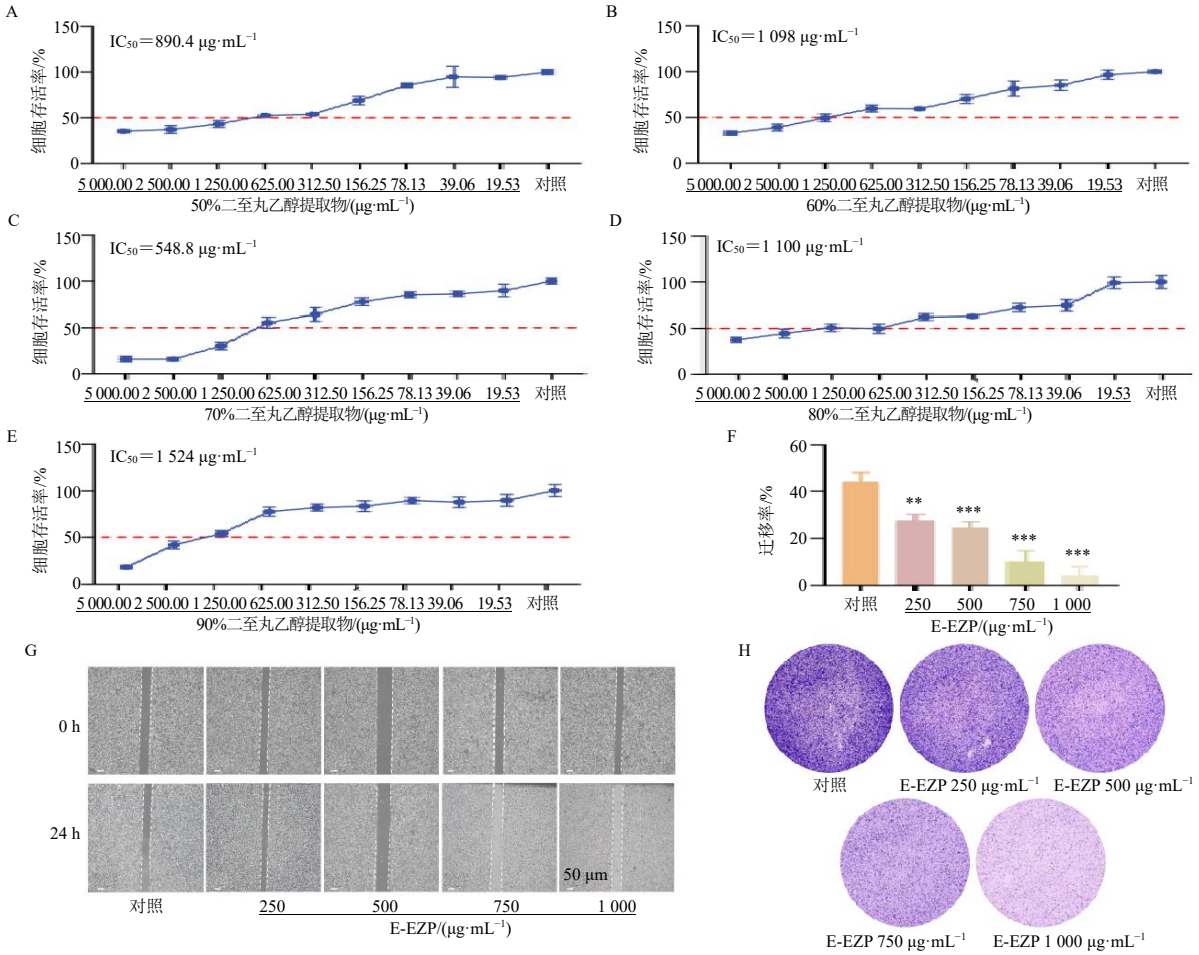
2.8　统计学分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，使用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析，2 组间比较采用 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用 Dunnett-*t* 检验。

3　结果

3.1　不同体积分数二至丸乙醇提取物的活性筛选及 E-EZP 对 4T1 细胞迁移和增殖的影响

为筛选二至丸抑制乳腺癌细胞的有效提取体积分数，采用 MTT 法比较 50%、60%、70%、80%、90% 乙醇提取物对 4T1 细胞活力的影响。如图 1-A～E 所示，不同体积分数乙醇提取物均可不同程度降低 4T1 细胞活力，并呈一定剂量相关性，其中 70%乙醇提取物的半数抑制浓度（half-maximal inhibitory concentration，IC_{50}）最低，为 548.8 μg/mL，提示其对



与对照组比较：$^{**}P<0.01$　$^{***}P<0.001$。

$^{**}P<0.01$　$^{***}P<0.001$ *vs* control group.

图 1　不同体积分数二至丸乙醇提取物对 4T1 细胞活力（A～E）、迁移（F、G，×40）及增殖（H）的影响（$\bar{x} \pm s$，$n=3$）

Fig. 1　Effects of different volume fractions of Erzhi Pill ethanol extracts on viability (A—E), migration (F, G, × 40) and proliferation (H) of 4T1 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

4T1 细胞的抑制作用最强。因此，后续实验选取二至丸 70%乙醇提取物（E-EZP）作为主要研究对象。进一步采用划痕愈合实验评价 E-EZP 对 4T1 细胞迁移能力的影响，如图 1-F、G 所示，与对照组比较，E-EZP 处理后 4T1 细胞划痕闭合速度明显减慢，划痕愈合率显著降低（$P<0.01$、0.001），且呈剂量相关性，提示 E-EZP 可抑制 4T1 细胞迁移。结晶紫染色结果（图 1-H）显示，E-EZP 处理后 4T1 细胞染色面积明显减少，细胞增殖能力受到抑制。以上结果表明，E-EZP 可显著抑制 4T1 乳腺癌细胞活力、迁移及增殖。

3.2 E-EZP 主要化学成分的 LC-MS 分析

为明确 E-EZP 的化学成分，采用 LC-MS 对其进行分析，正、负离子模式下 E-EZP 的总离子流图见图 2。结合保留时间、精确质荷比、碎片离子信息及数据库比对，初步推测鉴定出 27 种化合物（表 1），包括木犀草素、槲皮素、蟛蜞菊内酯、芹菜素-7-葡萄糖苷、异绿原酸 A、异绿原酸 C、木犀草素相关黄酮苷类及酚酸类成分等。

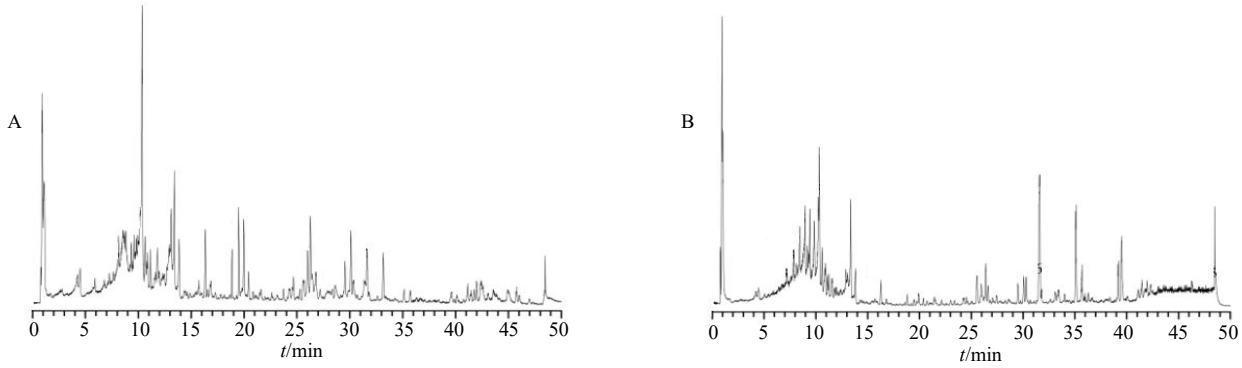


图 2 负 (A)、正 (B) 离子模式下 E-EZP 的 LC-MS 总离子流图

Fig. 2 LC-MS total ion chromatograms of E-EZP in negative (A) and positive (B) ion modes

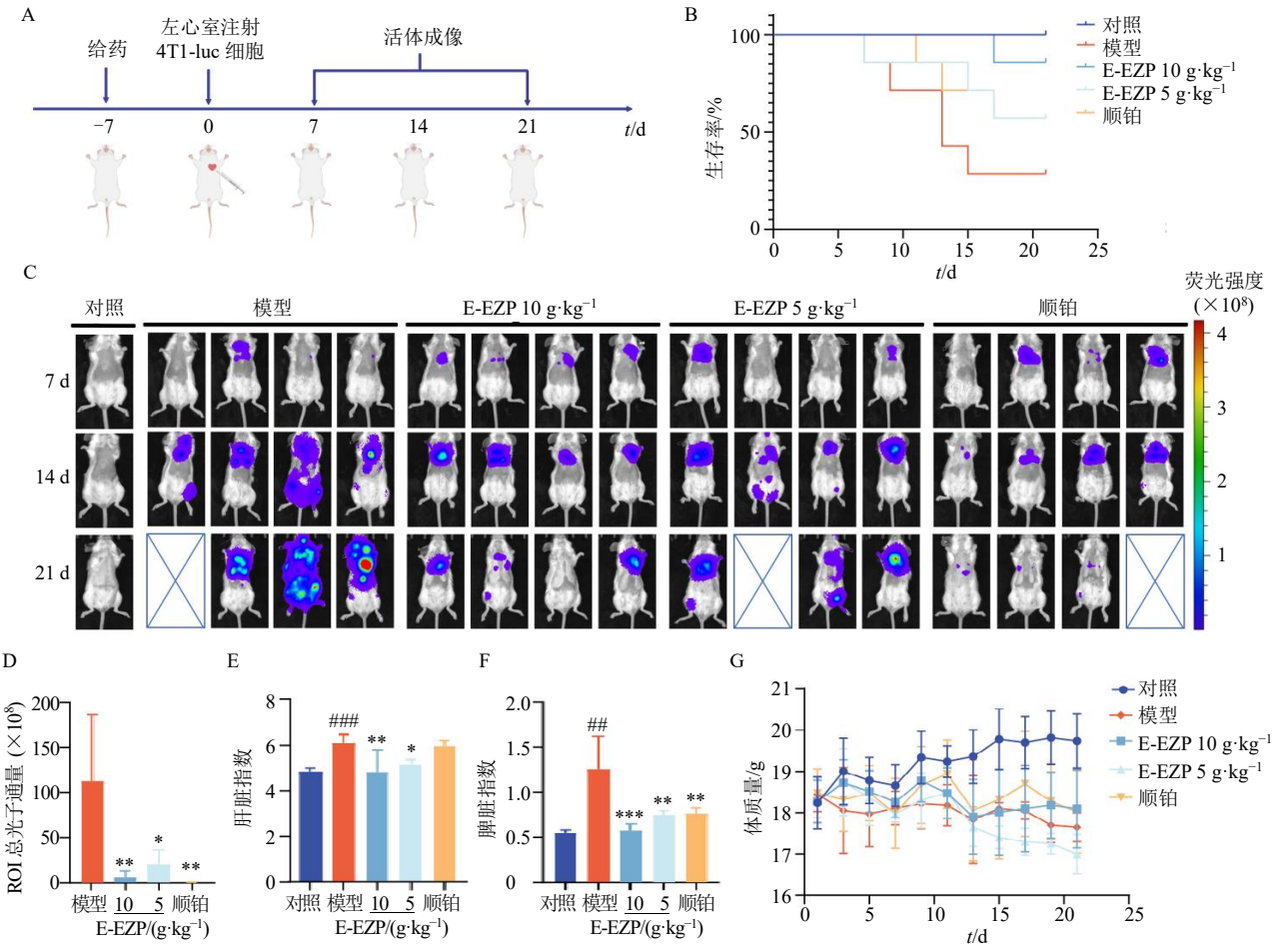
表 1 E-EZP 中化学成分的结构鉴定

Table 1 Identification of chemical components in E-EZP

序号	化合物	t_R/min	分子式	*m*/*z* 实测值	*m*/*z* 理论值	误差 ($\times10^{-6}$)	碎片离子 (*m*/*z*)	离子模式	PubChem CID
1	异绿原酸 A	9.99	$C_{25}H_{24}O_{12}$	517.134 05	517.133 85	0.387	163.038 91, 319.081 09	$[M+H]^+$	6474310
2	5-羟甲基糠醛	1.61	$C_6H_6O_3$	127.038 97	127.039 10	−1.023	81.034 16, 109.028 79	$[M+H]^+$	237332
3	苯乙酮	10.45	C_8H_8O	121.064 79	121.064 93	−1.156	93.070 47	$[M+H]^+$	7410
4	芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷	10.46	$C_{21}H_{20}O_{10}$	433.112 92	433.112 73	0.439	153.018 14, 271.060 03	$[M+H]^+$	5280704
5	间苯二甲酰肼	5.21	$C_8H_{10}N_4O_2$	195.087 65	195.087 62	0.154	110.071 67, 138.066 25	$[M+H]^+$	72700
6	隐绿原酸	5.31	$C_{16}H_{18}O_9$	355.102 36	355.102 02	0.957	163.039 05, 135.044 24	$[M+H]^+$	9798666
7	3′,5-二羟基-7-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖氧基-4′-甲氧基黄酮	11.04	$C_{22}H_{22}O_{11}$	463.123 49	463.123 23	0.561	301.070 65	$[M+H]^+$	11016019
8	吉马酮	25.03	$C_{15}H_{22}O$	219.174 34	219.174 30	0.183	159.117 16, 95.086 09	$[M+H]^+$	6436348
9	高车前苷	10.83	$C_{22}H_{22}O_{11}$	463.123 49	463.122 92	1.231	301.070 53	$[M+H]^+$	5318083
10	羟基芫花素	16.90	$C_{16}H_{12}O_6$	301.070 66	301.070 16	1.661	167.033 83, 258.051 45	$[M+H]^+$	5318214
11	异绿原酸 C	10.80	$C_{25}H_{24}O_{12}$	517.134 05	517.133 61	0.851	163.038 86, 135.044 05	$[M+H]^+$	6474309
12	蒙花苷	12.97	$C_{28}H_{32}O_{14}$	593.186 48	593.185 61	1.467	285.075 71, 242.056 69	$[M+H]^+$	5317025
13	*L*-苯丙氨酸	1.46	$C_9H_{11}NO_2$	166.086 26	166.086 24	0.120	120.081 04	$[M+H]^+$	6140
14	木犀草素	12.84	$C_{15}H_{10}O_6$	287.055 01	287.054 50	1.777	153.018 16, 135.044 14	$[M+H]^+$	5280445
15	槲皮素	12.61	$C_{15}H_{10}O_7$	303.049 93	303.049 53	1.320	229.049 67, 137.023 48	$[M+H]^+$	5280343
16	杨梅苷	8.98	$C_{21}H_{20}O_{12}$	465.102 75	465.102 54	0.452	153.018 11	$[M+H]^+$	5281673
17	对香豆酸	6.99	$C_9H_8O_3$	165.054 62	165.054 52	0.606	91.054 76, 119.048 83	$[M+H]^+$	637542
18	滨蒿内酯	10.34	$C_{11}H_{10}O_4$	207.065 19	207.064 87	1.545	151.075 35, 179.070 16	$[M+H]^+$	8417
19	芥子酸	8.39	$C_{11}H_{12}O_5$	225.075 75	225.075 23	2.310	119.049 41	$[M+H]^+$	5281116
20	鸢尾苷	9.95	$C_{22}H_{22}O_{11}$	463.123 49	463.123 20	0.626	301.070 50	$[M+H]^+$	5281810
21	鸢尾黄素	14.43	$C_{16}H_{12}O_6$	301.070 66	301.070 25	1.362	286.046 97	$[M+H]^+$	5281811
22	蟛蜞菊内酯	13.24	$C_{16}H_{10}O_7$	315.049 93	315.049 41	1.651	231.065 14, 287.054 87	$[M+H]^+$	5281813
23	维采宁/维采宁-2	7.05	$C_{27}H_{30}O_{15}$	595.165 75	595.164 92	1.395	379.080 54, 457.112 88	$[M+H]^+$	3084407
24	高车前素	14.97	$C_{16}H_{12}O_6$	301.070 66	301.070 19	1.561	286.046 97	$[M+H]^+$	5281628
25	大黄素	21.68	$C_{15}H_{10}O_5$	269.045 68	269.045 55	0.512	225.055 28, 241.050 98	$[M-H]^-$	3220
26	熊果酸	31.62	$C_{30}H_{48}O_3$	457.367 10	457.367 62	−1.150	411.362 12, 203.179 49	$[M+H]^+$	64945
27	亚油酸甲酯	37.65	$C_{19}H_{34}O_2$	295.262 79	295.263 16	−1.264	174.213 00	$[M+H]^+$	5284421

3.3　E-EZP 抑制乳腺癌骨转移模型小鼠体内肿瘤负荷并改善生存状态

为评价 E-EZP 对乳腺癌骨转移的体内干预作用，通过左心室注射 4T1-Luc 细胞建立乳腺癌骨转移小鼠模型（图 3-A），并利用活体成像动态监测小鼠全身生物发光信号变化，结果如图 3-C、D 所示，模型组小鼠造模后出现明显生物发光信号，且随时间延长信号逐渐增强，提示 4T1-Luc 细胞在体内持续生长和定植；与模型组比较，E-EZP 高、低剂量组小鼠生物发光信号明显减弱，第 21 天双侧后肢骨 ROI 总光子通量降低（P＜0.05、0.01），表明 E-EZP 可减少乳腺癌细胞体内负荷。生存曲线结果（图 3-B）显示，模型组小鼠生存率下降较快，E-EZP 组小鼠生存时间较模型组延长。实验期间，各组小鼠体质量未见明显进行性下降，E-EZP 组小鼠体质量总体保持稳定（图 3-G）。脏器指数结果（图 3-E、F）显示，模型组小鼠肝脏指数和脾脏指数显著升高（P＜0.01、0.001）；与模型组比较，E-EZP 干预后肝脏指数和脾脏指数显著下降（P＜0.05、0.01、0.001），提示 E-EZP 可能减轻肿瘤负荷引起的全身应激反应。



A-左心室注射 4T1-Luc 细胞建立乳腺癌骨转移模型及 E-EZP 给药方案示意图；B-各组小鼠生存曲线（n=5）；C-活体成像显示各组小鼠体内生物发光信号变化（n=4）；D-第 21 天各组小鼠双侧后肢骨 ROI 总光子通量之和（n=4）；E-各组小鼠肝脏指数（n=4）；F-各组小鼠脾脏指数（n=4）；G-实验期间各组小鼠体质量变化曲线（n=5）；与对照组比较：$^{\#\#}P$＜0.01　$^{\#\#\#}P$＜0.001；与模型组比较：$^{*}P$＜0.05　$^{**}P$＜0.01　$^{***}P$＜0.001，图 4、5 同。

A-schematic diagram of breast cancer bone metastasis model established by left ventricular injection of 4T1-Luc cells and E-EZP administration; B-survival curves of mice in each group (n = 5); C-changes in bioluminescence signals in mice detected by *in vivo* imaging system (n = 4); D-total photon flux in fixed regions of interest of bilateral hindlimb bones on day 21 (n = 4); E-liver index of mice in each group (n = 4); F-spleen index of mice in each group (n = 4); G-changes in body weight of mice during experiment (n = 5); $^{\#\#}P$ < 0.01　$^{\#\#\#}P$ < 0.001 *vs* control group; $^{*}P$ < 0.05　$^{**}P$ < 0.01　$^{***}P$ < 0.001 *vs* model group, same as figs. 4, 5.

图 3　E-EZP 抑制乳腺癌骨转移模型小鼠体内肿瘤负荷并改善生存状态（$\bar{x} \pm s$）

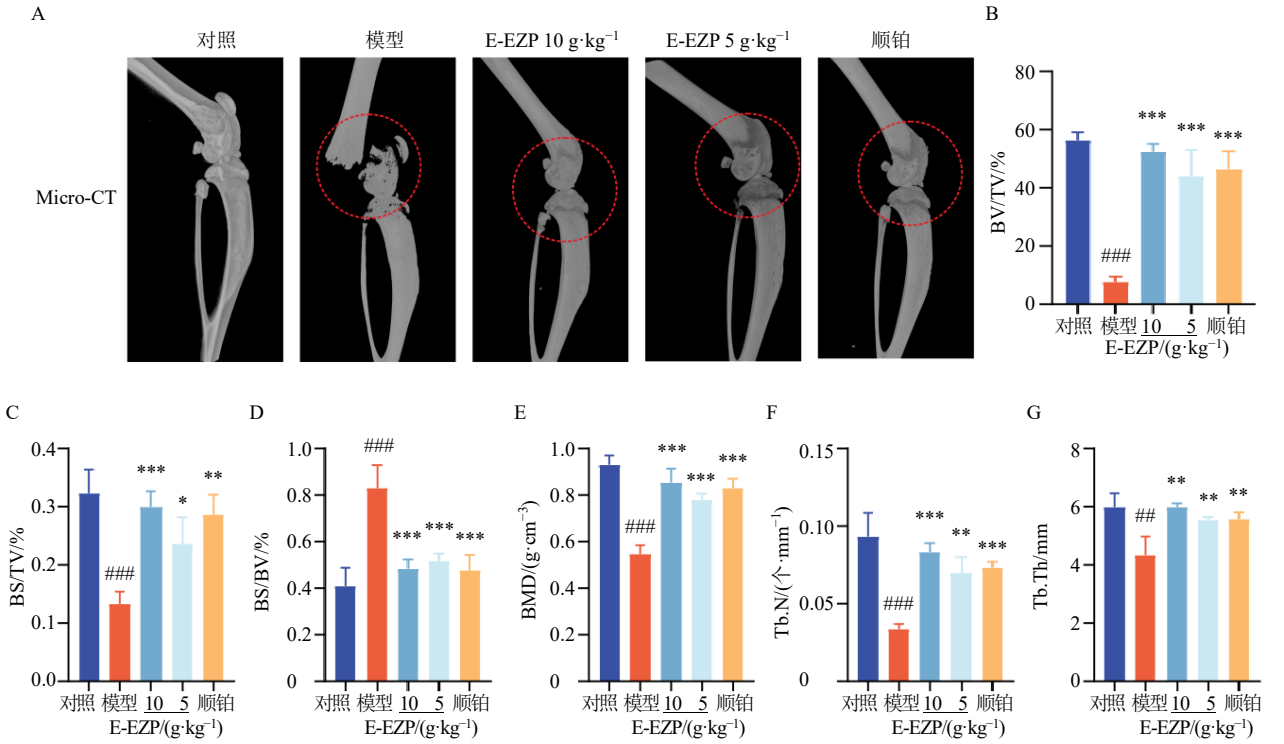
Fig. 3　E-EZP inhibits tumor burden and improves survival status in breast cancer bone metastasis model mice ($\bar{x} \pm s$)

3.4 E-EZP 对乳腺癌骨转移模型小鼠骨微结构的影响

为评价 E-EZP 对乳腺癌骨转移模型小鼠骨微结构的影响，采用 Micro-CT 对小鼠下肢骨进行三维重建和骨形态学分析。如图 4-A 所示，模型组小鼠骨结构破坏明显，表现为骨小梁稀疏、连续性下降及局部骨缺损；与模型组比较，E-EZP 处理后骨结构完整性改善，骨小梁排列较为致密，提示其可减轻骨转移相关骨破坏。骨形态学参数分析（图 4-B～G）显示，与模型组比较，E-EZP 可显著改善 BV/TV、BS/TV、BS/BV、BMD、Tb.N 及 Tb.Th（$P<0.05$、0.01、0.001），提示其能够缓解骨量丢失和骨微结构损伤。以上结果显示，E-EZP 干预后模型小鼠骨量和骨小梁相关指标得到改善，提示其可减轻乳腺癌骨转移模型中的骨微结构损伤。

3.5 E-EZP 对乳腺癌骨转移模型小鼠血清炎症因子及 RANKL/OPG 水平的影响

为评价 E-EZP 对乳腺癌骨转移模型小鼠血清炎症因子及骨代谢相关指标的影响，检测各组小鼠血清炎症因子及骨代谢相关指标。如图 5-A 所示，



A-各组小鼠下肢骨 Micro-CT 三维重建代表性图像；B～G-骨形态学参数定量分析。

A-representative Micro-CT three-dimensional reconstruction images of lower limb bones in each group; B—G-quantitative analysis of bone morphological parameters.

图 4 E-EZP 对乳腺癌骨转移模型小鼠骨微结构的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 4 Effect of E-EZP on bone microstructure in mice with breast cancer bone metastasis ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

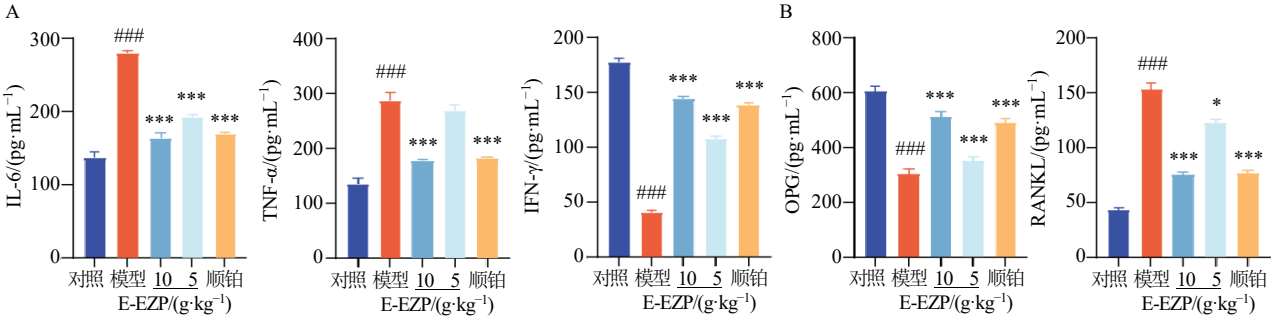


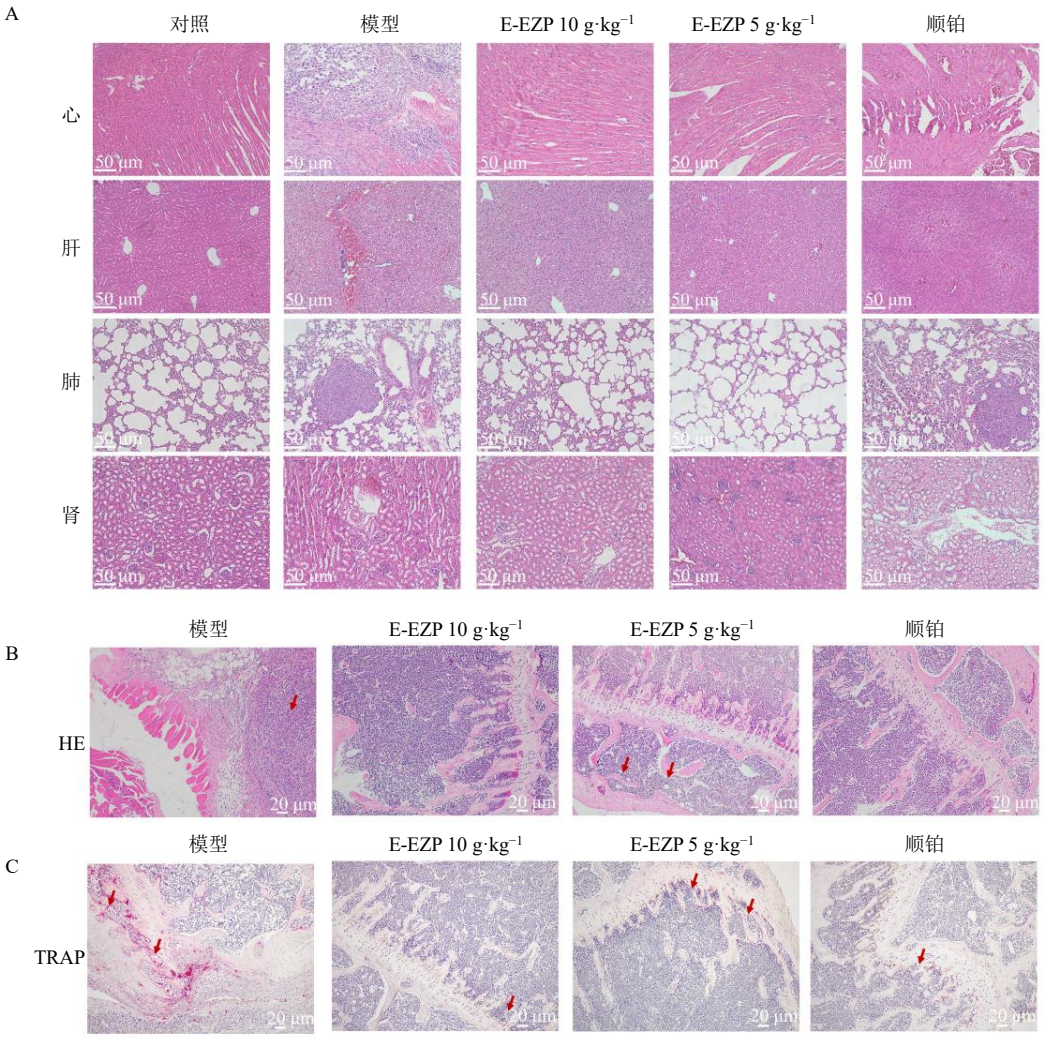
图 5 E-EZP 对乳腺癌骨转移模型小鼠血清炎症因子（A）及 RANKL/OPG（B）水平的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 5 Effect of E-EZP on levels of inflammatory cytokines (A) and RANKL/OPG (B) in serum of mice with breast cancer bone metastasis ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

与对照组比较，模型组小鼠血清中 IL-6 和 TNF-α 水平显著升高（$P<0.001$），IFN-γ 水平显著降低（$P<0.001$），提示乳腺癌骨转移模型小鼠存在炎症反应增强及免疫相关微环境异常。与模型组比较，除 E-EZP 低剂量组 TNF-α 水平外，E-EZP 干预后 IL-6 和 TNF-α 水平显著降低（$P<0.001$），IFN-γ 水平显著升高（$P<0.001$），提示 E-EZP 干预与模型小鼠炎症相关指标改善相伴。骨代谢相关指标结果（图 5-B）显示，与对照组比较，模型组小鼠血清中 RANKL 水平显著升高（$P<0.001$），OPG 水平显著降低（$P<0.001$），即该模型伴随 RANKL/OPG 平衡失调，可能形成有利于破骨细胞形成的环境。与模型组比较，E-EZP 干预后 RANKL 水平显著降低（$P<0.05$、0.001），OPG 水平显著升高（$P<0.001$），表明 E-EZP 干预与 RANKL 降低及 OPG 升高相关，可能影响骨重塑相关环境。以上结果显示，E-EZP 干预后炎症因子及 RANKL/OPG 相关指标发生变化。

3.6　E-EZP 对乳腺癌骨转移模型小鼠主要脏器、骨组织病理形态及骨组织 TRAP 阳性细胞的影响

为评价 E-EZP 的体内安全性及其对骨组织病理改变的影响，采用 HE 染色观察各组小鼠主要脏器和骨组织形态变化，结果（图 6-A）显示，E-EZP 组小鼠心、肝、肺、肾组织结构较完整，未见明显炎性细胞浸润、坏死或组织结构破坏，提示实验剂



B 图中箭头表示骨组织内的肿瘤细胞浸润区域（骨转移瘤灶）；C 图中箭头表示骨小梁表面 TRAP 阳性破骨细胞。

Arrow in figure B indicates tumor cell infiltration area (bone metastatic lesion) within bone tissue; Arrow in figure C points to TRAP-positive osteoclasts on surface of trabeculae.

图 6　E-EZP 对小鼠主要脏器（A）、骨组织（B）病理及骨组织 TRAP 阳性细胞（C）的影响（×100）

Fig. 6　Effect of E-EZP on pathology of major organs (A), bone tissue (B) and TRAP-positive cells in bone tissue (C) in mice (× 100)

量下 E-EZP 未引起明显主要脏器病理损伤。骨组织 HE 染色结果（图 6-B）显示，模型组小鼠骨小梁变薄、排列紊乱，骨组织结构破坏明显；与模型组比较，E-EZP 处理后骨小梁结构较完整，排列更为致密，骨破坏程度减轻。TRAP 染色结果（图 6-C）显示，模型组骨组织中 TRAP 阳性细胞数量增加，提示破骨细胞相关表型增强；E-EZP 处理后 TRAP 阳性细胞数量减少，提示破骨细胞相关表型减弱。以上结果进一步说明，E-EZP 在实验剂量下具有较好的安全性，并可改善骨组织结构。

4 讨论

乳腺癌骨转移的发生发展与肿瘤细胞恶性生物学行为和骨微环境失衡密切相关。乳腺癌细胞进入骨组织后，可通过分泌炎症因子、调节免疫微环境及激活破骨细胞等方式破坏正常骨重塑平衡[18-19]。破骨细胞活化后引起骨吸收增强，骨基质破坏又可释放多种促肿瘤生长因子，进一步促进肿瘤细胞在骨组织内生长和扩增，最终形成“肿瘤生长-骨破坏-肿瘤再生长”的恶性循环[20]。因此，乳腺癌骨转移的早期干预不仅应关注肿瘤细胞增殖、迁移和定植能力，还应重视骨微环境稳态的维持，包括抑制炎症反应、调节异常骨代谢和减少破骨细胞活化。

本研究首先考察不同体积分数二至丸乙醇提取物对 4T1 乳腺癌细胞活力的影响，结果显示，50%、60%、70%、80%、90%乙醇提取物均可不同程度抑制 4T1 细胞活力，其中 70%乙醇提取物的 IC_{50} 最低，提示其对 4T1 乳腺癌细胞的抑制作用最强，因此将其作为后续研究对象并命名为 E-EZP。进一步的划痕愈合实验和结晶紫染色结果显示，E-EZP 能够抑制 4T1 细胞迁移和增殖。

LC-MS 分析从 E-EZP 中初步推测鉴定出木犀草素、槲皮素和蒙蛸菊内酯等成分。既往研究报道，上述成分具有抗炎、抗氧化、抑制肿瘤细胞增殖[21]及调节骨代谢[22-23]等作用。同时，二至丸在非肿瘤性骨质疏松模型中可改善骨量和骨微结构，其乙醇提取物可促进原代成骨细胞增殖及分化[24-26]。上述文献证据与本研究的成分鉴定及药效结果具有一定一致性，提示这些成分可能共同参与 E-EZP 的整体抗肿瘤和骨保护作用，并为其影响骨重塑相关过程提供一定的物质与药理学依据。

体内实验进一步观察了 E-EZP 对小鼠肿瘤负荷及骨损伤相关表型的影响。本研究通过左心室注射 4T1-Luc 细胞建立乳腺癌骨转移模型，该模型能够模拟乳腺癌细胞经血流播散并在骨组织内定植的过程。IVIS 活体成像结果显示，模型组小鼠随时间延长出现逐渐增强的生物发光信号，提示肿瘤细胞在体内持续生长和定植；E-EZP 干预后第 21 天双侧后肢骨 ROI 总光子通量降低，提示其体内肿瘤负荷下降。生存曲线结果显示，E-EZP 可延长模型小鼠生存时间，提示其抗骨转移作用具有一定整体获益。

乳腺癌骨转移常伴随明显的骨质破坏和骨微结构损伤。Micro-CT 结果显示，模型组小鼠骨小梁稀疏、连续性下降及骨量丢失明显；E-EZP 处理后骨微结构及骨量相关参数得到改善。骨组织 HE 染色结果与 Micro-CT 结果一致，E-EZP 处理后骨小梁排列更为致密，结构完整性提高；TRAP 染色进一步显示骨组织 TRAP 阳性细胞数量减少。上述结果表明，E-EZP 在降低骨骼区域肿瘤相关负荷的同时，可改善骨结构及破骨细胞相关表型，提示其兼具抗肿瘤和骨微环境调节作用。

炎症反应和 RANKL/OPG 平衡失调与乳腺癌骨转移相关骨破坏密切相关[27]。IL-6 和 TNF-α 等炎症因子可影响骨重塑相关环境[28]，RANKL/OPG 平衡变化则是影响破骨细胞形成的重要因素[27]。本研究显示，E-EZP 干预后 IL-6、TNF-α 和 RANKL 水平降低，IFN-γ 和 OPG 水平升高，与骨组织 TRAP 阳性细胞数量减少在生物学方向上具有一致性，提示 RANKL/OPG 平衡变化可能与破骨细胞相关表型减弱有关，即 E-EZP 可在降低肿瘤负荷的同时改善骨重塑相关环境。

安全性方面，E-EZP 处理期间小鼠体质量保持相对稳定，主要脏器 HE 染色未见明显组织损伤，提示在本实验剂量和观察周期内未见明显体质量下降及主要脏器组织病理损伤。模型组肝脾指数升高可能与肿瘤负荷、炎症反应及免疫应激有关，E-EZP 可降低肝脾指数，提示其可能减轻肿瘤相关全身反应。

综上，E-EZP 可抑制 4T1 乳腺癌细胞增殖和迁移，降低乳腺癌骨转移模型小鼠骨骼区域肿瘤相关负荷，并改善骨微结构及破骨细胞相关表型，其作用伴随血清炎症因子和 RANKL/OPG 水平变化。结合本文结果及既往二至丸的骨保护研究，提示 E-EZP 兼具抗肿瘤和骨微环境调节作用。

本研究仍存在局限性，现有结果主要支持破骨

细胞相关表型减弱，其分化、骨吸收功能及相关分子环节尚需验证，同时 LC-MS 鉴定成分与 E-EZP 整体药效的直接联系仍不明确。后续将结合不同分子亚型的乳腺癌细胞与相应动物实验、主要成分定量与入血分析、分子生物学检测及功能验证，进一步明确 E-EZP 的药效物质基础及其干预乳腺癌骨转移、保护骨微环境的关键作用环节。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Liang Y R, Zhang H W, Song X J, *et al*. Metastatic heterogeneity of breast cancer: Molecular mechanism and potential therapeutic targets [J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 60: 14-27.

[2] Tulotta C, Ottewell P. The role of IL-1B in breast cancer bone metastasis [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2018, 25(7): R421-R434.

[3] 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.

[4] 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.

[5] El-Masri B M, Andreasen C M, Laursen K S, *et al*. Mapping RANKL-and OPG-expressing cells in bone tissue: The bone surface cells as activators of osteoclastogenesis and promoters of the denosumab rebound effect [J]. *Bone Res*, 2024, 12(1): 62.

[6] Infante M, Fabi A, Cognetti F, *et al*. RANKL/RANK/OPG system beyond bone remodeling: Involvement in breast cancer and clinical perspectives [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 12.

[7] 王亮, 卫宜锐, 黄博臻, 等. 中医药治疗乳腺癌骨转移研究进展 [J]. 光明中医, 2025, 40(4): 786-790.

[8] 刘辉, 陈子超, 李肖, 等. 雷公藤抑制三阴性乳腺癌增殖及其骨转移的作用 [J]. 中草药, 2025, 56(12): 4279-4288.

[9] 王依雯, 高晴琪, 周康钰, 等. 中药调控 OPG/RANK/RANKL 信号通路干预乳腺癌骨转移的机制研究进展 [J]. 中草药, 2026, 57(4): 1492-1505.

[10] Qi Y, Li P, Li B Q, *et al*. Integrating of serum pharmacochemistry, metabolomics, and experimental validation to explore the mechanism of Erzhi Pill against triple-negative breast cancer [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 353(Pt A): 120287.

[11] 董梦雪, 李涛, 赵泽宇, 等. 基于网络药理学和分子对接分析二至丸治疗代谢相关脂肪性肝病的作用机制及实验验证 [J]. 现代药物与临床, 2023, 38(1): 37-47.

[12] Li H, Hou M, Zhang P, *et al*. Wedelolactone suppresses breast cancer growth and metastasis via regulating TGF-β1/Smad signaling pathway [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2024, 76(8): 1038-1050.

[13] Wu H T, Lin J, Liu Y E, *et al*. Luteolin suppresses androgen receptor-positive triple-negative breast cancer cell proliferation and metastasis by epigenetic regulation of MMP9 expression via the Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2021, 81: 153437.

[14] Wu Z Y, Qiu K Y, Gai Y J, *et al*. Quercetin: A natural ally in combating breast cancer [J]. *Int J Nanomed*, 2025, 20: 9155-9177.

[15] 杨霞, 韦建齐. 墨旱莲中总黄酮成分提取工艺优化 [J]. 广州化工, 2025, 53(11): 72-74.

[16] 刘悦, 丁晓彦, 王娜, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive Plus-Orbitrap MS 的丹参提取物成分表征及其抗血栓作用谱效相关药效物质基础解析 [J]. 中草药, 2024, 55(5): 1609-1619.

[17] 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.

[18] Wang Y O, Hu Y, Wang M Z, *et al*. The role of breast cancer cells in bone metastasis: Suitable seeds for nourishing soil [J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2024, 22(1): 28-43.

[19] Nolan E, Kang Y B, Malanchi I. Mechanisms of organ-specific metastasis of breast cancer [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2023, 13(11): a041326.

[20] Clézardin P, Coleman R, Puppo M, *et al*. Bone metastasis: Mechanisms, therapies, and biomarkers [J]. *Physiol Rev*, 2021, 101(3): 797-855.

[21] Imran M, Rauf A, Abu-Izneid T, *et al*. Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108612.

[22] Chai S, Yang Y B, Wei L W, *et al*. Luteolin rescues postmenopausal osteoporosis elicited by OVX through alleviating osteoblast pyroptosis via activating PI3K-AKT signaling [J]. *Phytomedicine*, 2024, 128: 155516.

[23] Inchingolo A D, Inchingolo A M, Malcangi G, *et al*. Effects

of resveratrol, curcumin and quercetin supplementation on bone metabolism: A systematic review [J]. *Nutrients*, 2022, 14(17): 3519.

[24] Cheng M, Wang Q W, Fan Y K, *et al*. A traditional Chinese herbal preparation, Er-Zhi-Wan, prevent ovariectomy-induced osteoporosis in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 138(2): 279-285.

[25] Qin X Y, Niu Z C, Han X L, *et al*. Anti-perimenopausal osteoporosis effects of Erzhi formula via regulation of bone resorption through osteoclast differentiation: A network pharmacology-integrated experimental study [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 270: 113815.

[26] Wu Y B, Wu J G, Yi J, *et al*. Osteoblastic activity of ethanolic extract and volatile compounds from Er-Zhi-Wan, a famous traditional Chinese herbal formula [J]. *Afr J Pharm Pharmacol*, 2012, 6(24): 1733-1740.

[27] 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*, 2022, 13: 1063815.

[28] Xu J, Yu L X, Liu F, *et al*. The effect of cytokines on osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling in osteoporosis: A review [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1222129.

[责任编辑 李亚楠]