

## · 基础研究 ·

RANKL 诱导内皮间质化促进乳腺癌骨转移<sup>△</sup>李勇爱<sup>a</sup>, 孟通<sup>a</sup>, 宋滇文<sup>a</sup>, 杨正峰<sup>b</sup>, 岳智颖<sup>b</sup>, 尹华斌<sup>a\*</sup>

(上海交通大学医学院附属第一人民医院 a: 脊柱外科; b: 临床转化研究院, 上海 201620)

**摘要:** [目的] 探讨核因子 κB 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor-κB ligand, RANKL) 在乳腺癌骨转移中的作用及其机制。[方法] MDA-MB-231, BT549 和 MCF-7 乳腺癌细胞体外培养, 加入终浓度为 200 ng/ml RANKL (RANKL 组), 或同体积双蒸水 (Ctrl 组), 行 transwell、单细胞钙成像、PCR 和 western blot 检测。分离小鼠骨髓细胞 (bone marrow stromal cells, BMSCs), 在培养其中加入乳腺癌细胞上清, 行 TRAP、ALP 和 von Kossa 染色。[结果] RANKL 在 MDA-MB-231 细胞 [(1.7±0.1) 个 vs (1.0±0.1) 个,  $P=0.002$ ]、BT549 细胞 [(1.6±0.1) 个 vs (1.0±0.1) 个,  $P=0.027$ ] 的相对迁移数显著高于 Ctrl 组。RANKL-200 组 MCF-7 [阳性数/总数 (%), 58/127 (45.7) vs 3/118 (2.5),  $P<0.001$ ] 和 BT549 细胞 [阳性数/总数 (%), 51/224 (22.8) vs 31/228 (13.6),  $P=0.011$ ] 显著高于 Ctrl 组。PCR 检测, RANKL-200 组中 MDA-MB-231 细胞中的 E-cadherin 显著低于 Ctrl 组, N-cadherin、vimentin 表达量显著高于 Ctrl 组。Western blot 显示, N-cadherin 相对表达水平依次为 RANKL-500 组>RANKL-200 组>Ctrl 组 ( $P<0.05$ ); 而 E-cadherin 蛋白表达水平依次为 RANKL-500 组<RANKL-200 组<Ctrl 组 ( $P<0.05$ )。在小鼠骨髓细胞体外试验中, 加入含 RANKL 上清组的 TRAP 染色阳性细胞数 [(451.3±15.0) 个 vs (174.3±9.2) 个,  $P<0.001$ ] 显著高于 Ctrl 组, 而 ALP 染色和 Von Kossa 染色差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。[结论] RANKL 诱导的钙信号经 NF-κB 通路增强乳腺癌细胞 EMT 过程进而促进乳腺癌的骨转移。

**关键词:** RANKL, 乳腺癌骨转移, 钙振荡, EMT, NF-κB 信号通路**中图分类号:** R318 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-8478 (2024) 13-1215-07

**RANKL induces endothelial mesenchymation to promote bone metastasis of breast cancer** // LI Yong-ai<sup>a</sup>, MENG Tong<sup>a</sup>, SONG Dian-wen<sup>a</sup>, YANG Zheng-feng<sup>b</sup>, YUE Zhi-ying<sup>b</sup>, YIN Hua-bin<sup>a</sup>. a. Department of Spinal Surgery, b. Clinical Transformation Research Institute, First People's Hospital, School of Medicine, Shanghai JiaoTong University, Shanghai 201620, China

**Abstract: [Objective]** To explore the role and mechanism of receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL) in bone metastasis of breast cancer. **[Methods]** The MDA-MB-231, BT549 and MCF-7 breast cancer cells were cultured in vitro, with the final concentration of 200ng/ml RANKL (RANKL group), or the same volume of double distilled water (control, Ctrl group). Transwell, single-cell calcium imaging (SCCI), PCR, and western blot assays were performed. The bone marrow stem cells (BMSCs) of mice were isolated, and cultured with the supernatant of breast cancer cells, which contained RANKL. TRAP, ALP and von Kossa staining were performed. **[Results]** The relative migration cell numbers of RANKL added MDA-MB-231 cells [(1.7±0.1) vs (1.0±0.1),  $P=0.002$ ] and BT549 cells [(1.6±0.1) vs (1.0±0.1),  $P=0.027$ ] were significantly higher than those in the Ctrl group. The RANKL-200 group showed significantly higher levels of MCF-7 [positive/total (%), 58/127 (45.7) vs 3/118 (2.5),  $P<0.001$ ] and BT549 cells [positive/total (%), 51/224 (22.8) vs 31/228 (13.6),  $P=0.011$ ] compared to the Ctrl group. PCR detection showed that E-cadherin in MDA-MB-231 cells of the RANKL-200 group was significantly lower than that in the Ctrl group, while the expression levels of N-cadherin and vimentin in the former were significantly higher than those in the latter. Western blot showed that the relative expression levels of N-cadherin were in the following order: RANKL-500 group>RANKL-200 group>Ctrl group ( $P<0.05$ ), whereas the expression levels of E-cadherin protein were in the order of RANKL-500 group<RANKL-200 group<Ctrl group. In the in vitro experiment of mouse bone marrow cells, the number of TRAP stained positive cells in the group containing RANKL supernatant was significantly higher than that in the Ctrl group [(451.3±15.0) vs (174.3±9.2),  $P<0.001$ ], while there was no statistically significant difference between ALP staining and Von Kossa staining ( $P>0.05$ ). **[Conclusion]** RANKL induced calcium signaling is mediated by NF-κB pathway, enhances the EMT process of breast cancer cells and promotes bone metastasis of breast cancer.

**Key words:** RANKL, bone metastasis of breast cancer, calcium oscillation, EMT, NF-κB signaling pathway

DOI:10.20184/j.cnki.Issn1005-8478.100726

**△基金项目:**上海市自然科学基金项目(编号:22ZR1450500);上海市卫生健康委员会科研项目(编号:20234Z0020)**作者简介:**李勇爱, 硕士生, 研究方向:骨肿瘤, (电子信箱)liyongai@sjtu.edu.cn**\* 通信作者:**尹华斌, (电话)021-37798569, (电子信箱)yinhuabin0525@163.com

在过去两年中,世界范围新增乳腺癌大约 226 万病例,造成近 68.5 万人死亡<sup>[1]</sup>。乳腺癌是一个由肿瘤微环境和恶性细胞共同组成的复杂新生组织,其中 RANKL 在乳腺癌的侵袭和进展中发挥了重要作用<sup>[1-3]</sup>。乳腺癌是发生骨转移最常见的肿瘤之一,严重影响患者的生活质量并造成患者的死亡<sup>[4]</sup>。核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear Factor- $\kappa$ B ligand, RANKL) 是肿瘤坏死因子家族的一员,是骨保护素的配体, RANKL 通过其受体 RANK 结合,通过 NF- $\kappa$ B 经典信号通路或 MAPK 信号通路诱导破骨前体细胞向破骨细胞分化<sup>[5]</sup>。除作为破骨细胞分化的关键因子外, RANKL 在乳腺癌骨转移患者中的表达水平和频率较原位乳腺癌更高, RANKL 的表达水平与乳腺癌骨转移风险呈正相关<sup>[6-8]</sup>。RANKL 信号通路参与了乳腺癌发生发展的所有阶段,从增强上皮细胞的增殖,到通过升高肿瘤细胞对抗肿瘤药物对其 DNA 破坏的抵抗力,并促进乳腺癌的转移<sup>[3, 9]</sup>。这提示 RANKL 不仅是乳腺癌骨转移后造成溶骨性骨破坏的原因,也可能是促进乳腺癌骨转移的重要因素。为进一步探究 RANKL 在乳腺癌骨转移中的作用,需改变 RANKL 表达水平通过体内外实验观察乳腺癌细胞的表型特征及其对成骨、破骨细胞的影响,但目前相关的研究未见报道。基于此,本研究旨在探究 RANKL 在乳腺癌骨转移中的作用,阐明其具体的分子机制,这可能为今后预防乳腺癌骨转移提供相关的作用靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞与主要试剂

人正常乳腺上皮细胞 MCF 10A、人乳腺癌细胞 MCF-7、BT549 和 MDA-MB-231 均由中国科学院细胞库提供; 4 种细胞培养体系均为基础培养基+10% 胎牛血清+1% 双抗。于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养,细胞汇合度达 90% 时 0.25% 胰酶消化,并以 1:2~1:4 的传代比例和 2~3 次/周的换液频率培养细胞。1640 培养基、 $\alpha$ -MEM 培养基、改良  $\alpha$ -MEM 培养基、MEM 培养基、DMEM/F12 培养基购自 basal-media 公司, Leibovitz's L-15 培养基、0.25% 胰蛋白酶、双抗 (青霉素+链霉素)、胎牛血清购自 Gibco 公司; DMSO、地塞米松、 $\beta$  甘油磷酸、维生素 C、TRAP 染色试剂盒购自 Sigma 公司; rhRANKL、rmMCSF 和 rmRANKL 购自 R&D 公司; transwell 小室购自 FALCON 公司; Cacl<sub>2</sub>、多聚甲醛购自上海生

工公司; Triton X-100 购自 Sangon 公司; Fura-2 AM 购自碧云天公司; western blot 相关试剂购自碧云天公司。C57BL/6 小鼠购自上海吉辉实验动物饲养有限公司。

### 1.2 乳腺癌细胞分组与体外处理

乳腺癌细胞分为对照 (control, Ctrl) 组和 RANKL 组, RANKL 组中加入用双蒸水溶解的 rhRANKL, 使培养体系中 RANKL 的终浓度为 200 ng/ml; Ctrl 组中加入相同体积的双蒸水。在验证 rhRANKL 的浓度梯度作用时, 乳腺癌细胞被分为 Ctrl 组、RANKL-200 组 (200 ng/ml) 和 RANKL-500 组 (500 ng/ml)。每组均做 3 个重复的副孔。

### 1.3 检测方法与指标

#### 1.3.1 Transwell 试验

将 150  $\mu$ l, 共 5 万乳腺癌细胞 (MDA-MB-231 和 BT549) 或者 12 万骨髓来源的巨噬细胞 (bone marrow-derived macrophages, BMMs) 接种于 8  $\mu$ m 孔径的 transwell 上室中, 下室加入 600  $\mu$ l 完全培养基, RANKL 组下室中加入 1.2  $\mu$ l 100  $\mu$ g/ml rhRANKL, 使 600  $\mu$ l 培养基中含有终浓度为 200 ng/ml rhRANKL。Ctrl 组下室加入 1.2  $\mu$ l 双蒸水。每组 3 个副孔。迁移后多聚甲醛固定 10 min、结晶紫染色 5 min, 擦去未迁移细胞后镜下计数、统计。

#### 1.3.2 单细胞钙成像

将乳腺癌细胞 (MCF-7 和 BT549) 饥饿处理 12 h, 或将 2 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 加到完全培养基中刺激 12 h, 之后 2  $\mu$ mol/L Fura-2 AM 处理 30 min, 将细胞分为分为 Ctrl 组和 RANKL 组, RANKL 组在使用 340 nm 和 380 nm 两个荧光值检测细胞内钙离子浓度 30 s 后, 缓慢地以枪头贴着液面的方式加入 200 ng/ml rhRANKL, Ctrl 组加入相同体积的双蒸水, 用 Photometrics Iris9 仪器检测钙流并进行成像。

#### 1.3.3 PCR 检测

将 MDA-MB-231 乳腺癌细胞分为 Ctrl 组和 RANKL 组, RANKL 组中加入终浓度为 200 ng/ml RANKL 共培养, Ctrl 组加入相同体积的双蒸水。通过 PCR 以  $\beta$ -ACTIN 作为内参检测 E-cadherin、N-cadherin 等上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 标志物在 mRNA 水平的表达量。PCR 引物序列见表 1。

#### 1.3.4 western blot 检测

首先将 MCF 10A 乳腺癌细胞分为 3 组, Ctrl 组、200 ng/ml rhRANKL 组 (RANKL-200 组) 以及 500 ng/ml rhRANKL 组 (RANKL-500 组)。通过 west-

ern blot 以 GAPDH 作为内参检测 N-cadherin 在蛋白水平的表达量。然后将 MCF 10A 细胞分为 4 组, 分别为 Ctrl 组、200 ng/ml rhRANKL+4 mmol/L Cacl2 组、200 ng/ml rhRANKL+8 mmol/L Cacl2 组和 200 ng/ml rhRANKL+12 mmol/L Cacl2 组。通过 western blot 以 GAPDH 作为内参检测 E-cadherin 和 N-cadherin 两个 EMT 标志物在蛋白水平的表达量。将 MDA-MB-231 乳腺癌细胞分为对照和 RANKL 组, RANKL 组中加入 200 ng/ml rhRANKL 共培养, Ctrl 组加入相同体积的双蒸水。

### 1.3.5 荧光素酶基因检测

利用 293T 细胞进行病毒包装, 并构建 NF- $\kappa$ B luciferase MDA-MB-231 瞬转株。将 MDA-MB-231-Luc 细胞分为 Ctrl 和 RANKL 组, RANKL 组加入 200 ng/ml rhRANKL 共培养, Ctrl 组加入相同体积的双蒸水, 加入荧光素后检测荧光素酶活性。

### 1.4 小鼠骨髓细胞分离与体外处理

BMMs 取自 6~8 周龄的 C57BL/6 野生型小鼠。具体地, 在 CO<sub>2</sub> 窒息处死小鼠后取其双后肢, 在超净工作台中剔除软组织并从干骺端剪断长骨, 离心后获得骨髓原代细胞。用完全培养基 ( $\alpha$ -MEM+10% FBS+1% 双抗) 重悬并离心, 计数并接板, 12 000 细胞/每孔。骨髓间充质干细胞 (bone marrow stem cells, BM-SCs) 取自 6~8 周龄的 C57BL/6 野生型小鼠。在离心后获得骨髓原代细胞后接板, 用改良 aMEM 培养基培养 24 h 后去除上清。消化并接种于 24 孔板, 每孔 500  $\mu$ l, 10~12 万细胞/孔。

### 1.5 检测方法与指标

#### 1.5.1 破骨分化 TRAP 染色

BMM 细胞接板后, RANKL 组 100  $\mu$ l 完全培养基中加入乳腺癌细胞的培养基上清, Ctrl 组中加入相同体积的新鲜培养基。此外, 加入终浓度为 20 ng/ml 的 rmM-CSF 和 50 ng/ml 的 rmRANKL 刺激分化。每日换液, 5~7 d 后行 TRAP 染色。具体地, 多聚甲醛固定 10 min, triton X-100 通透 6 min, 后加入 TRAP 染液染色 1 h。

#### 1.5.2 成骨分化 ALP 和 von Kossa 染色

BMSCs 接板后, 加入地塞米松 (1 mmol/L, 1000X)、 $\beta$  甘油磷酸 (1 mol/L, 1000X) 以及维生素 C (50 mg/ml, 100X) 刺激分化。1 周后行 ALP 染色, 2 周后行 Von Kossa 染色。具体地, 多聚甲醛固定 10 min, triton X-100 通透 6 min, 后加入 ALP 染液染色 1 h。Von Kossa 染色在加入染液后紫外线照射过夜。

### 1.6 统计学方法

利用 GraphPad Prism 8 软件对数据进行统计分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 资料呈正态分布时, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验; 资料呈非正态分布时, 采用秩和检验。计数资料采用卡方检验或 Fisher 确切概率法。P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 乳腺癌细胞体外试验

#### 2.1.1 Transwell 试验

Transwell 试验结果见图 1 和表 1。与 Ctrl 组相比, RANKL-200 组 MDA-MB-231 和 BT549 两种乳腺癌细胞穿过 transwell 小室孔洞的数量显著增多 (P<0.05)。与 Ctrl 组相比, 加入 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的培养基上清的上清组中迁移穿过 transwell 小室孔洞的 BMMs 数量显著增多 (P<0.05)。

#### 2.1.2 单细胞钙成像

单细胞钙成像试验结果见表 1。MCF-7 和 BT549 乳腺癌细胞被饥饿处理后, 与 Ctrl 组相比, RANKL-200 组中两种乳腺癌细胞的钙应答率显著升高 (P<0.05)。

#### 2.1.3 PCR 检测

PCR 检测结果见表 1。以  $\beta$ -ACTIN 作为内参检测 E-cadherin、N-cadherin 和 vimentin 在 mRNA 水平的表达量。与 Ctrl 组相比, RANKL-200 组中 MDA-MB-231 细胞中的 N-cadherin 和 vimentin 表达量显著升高 (P<0.05), 而 E-cadherin 的表达水平显著降低 (P<0.05)。

#### 2.1.4 western blot 检测

western blot 检测结果见表 1。以 GAPDH 作为内参检测 N-cadherin 在不同 RANKL 浓度下的蛋白表达量, 以及检测 N-cadherin 在不同 Ca<sup>2+</sup> 浓度下的蛋白表达水平。RANKL 能呈剂量依赖性地升高 MCF 10A 细胞中 N-cadherin 的蛋白表达水平。N-cadherin 蛋白表达水平: RANKL-500 组 > RANKL-200 组 > Ctrl 组, 差异具有统计学意义 (P<0.05); E-cadherin 蛋白表达水平: RANKL-500 组 < RANKL-200 组 < Ctrl 组, 差异具有统计学意义 (P<0.05)。在相同浓度的 rhRANKL 的情况下, Ca<sup>2+</sup> 能呈剂量依赖性地升高 MCF 10A 细胞中 N-cadherin 的蛋白表达水平并降低 E-cadherin 的蛋白表达水平, 具体地, N-cadherin 蛋白表达水平为 12 mmol/L (1.9 $\pm$ 0.3) Ca<sup>2+</sup> 组 > 8 mmol/L (1.7 $\pm$ 0.2) Ca<sup>2+</sup> 组 > 4 mmol/L (1.5 $\pm$ 0.1) Ca<sup>2+</sup> 组 > 0 mmol/L



( $1.0 \pm 0.0$ )  $\text{Ca}^{2+}$ 组; E-cadherin 的蛋白表达水平为  $0 \text{ mmol/L}$  ( $8.5 \pm 0.6$ )  $\text{Ca}^{2+}$ 组 >  $4 \text{ mmol/L}$  ( $6.3 \pm 0.1$ )  $\text{Ca}^{2+}$ 组 >  $8 \text{ mmol/L}$  ( $2.1 \pm 0.2$ )  $\text{Ca}^{2+}$ 组 >  $12 \text{ mmol/L}$  ( $1.0 \pm 0.0$ )  $\text{Ca}^{2+}$ 组, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

### 2.1.5 荧光酶报告基因检测

荧光素酶报告基因检测试验结果见表 1。与 Ctrl 组相比, RANKL-200 组 MDA-MB-231-Luc 细胞的荧光素强度显著增强 ( $P < 0.05$ )。

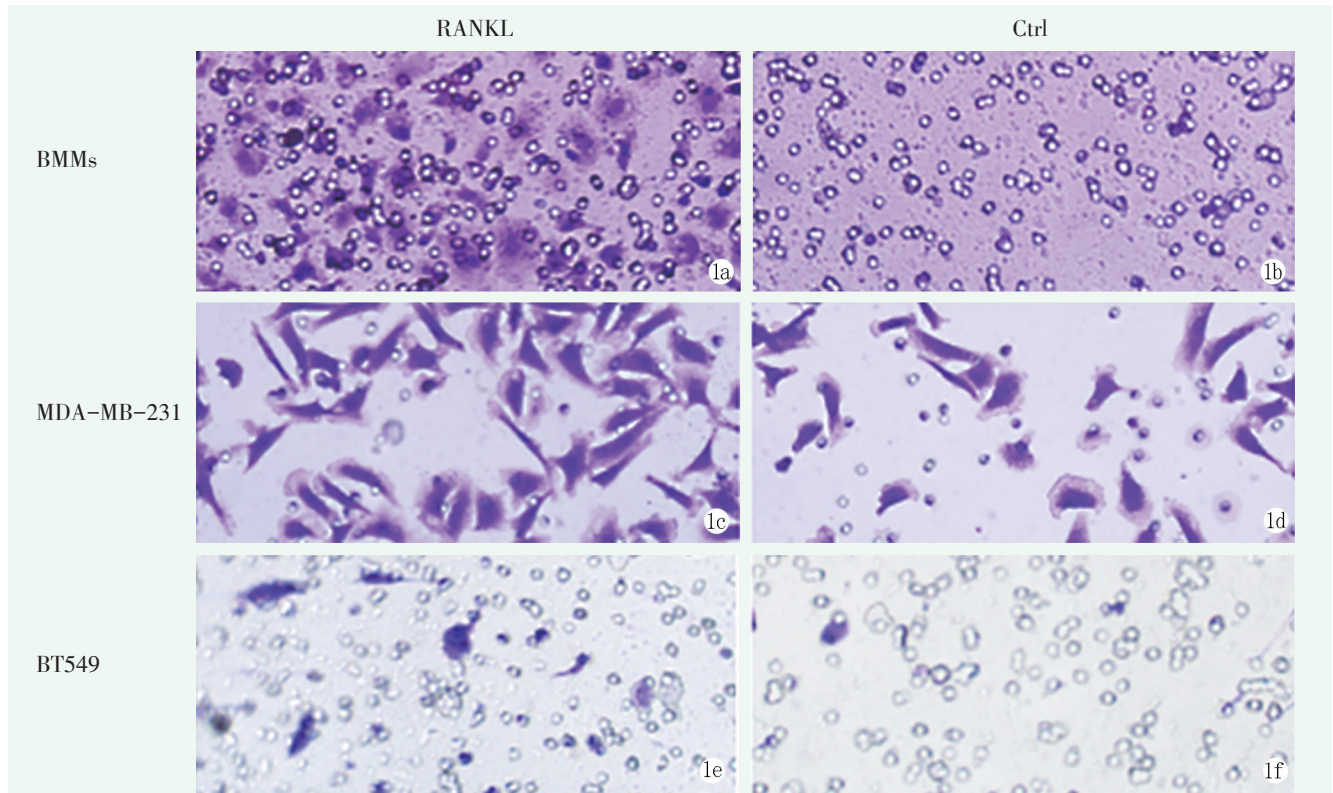


图 1. Transwell 试验。1a, 1b: MDA-MB-231 乳腺癌细胞的培养基上清能促进 BMMs 的迁移能力; 1c, 1d: RANKL 能显著促进 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的迁移能力; 1e, 1f: RANKL 能显著促进 BT549 乳腺癌细胞的迁移能力。

Figure 1. Transwell test. 1a, 1b: The medium supernatant of MDA-MB-231 breast cancer cells promoted the migration ability of BMMs; 1c, 1d: RANKL significantly promoted the migration capacity of MDA-MB-231 breast cancer cells; 1e, 1f: RANKL significantly promoted the migration ability of BT549 breast cancer cells.

表 1. 乳腺癌细胞体外试验检测结果比较

Table 1. Comparison of detection results of breast cancer cells in vitro test

指标	RANKL-200 组 (n=3)	RANKL-500 组 (n=3)	Ctrl 组 (n=3)	P 值
Transwell 试验迁移细胞数 ( $\bar{x} \pm s$ )				
MDA-MB-231 细胞	$1.7 \pm 0.1$	/	$1.0 \pm 0.1$	<b>0.002</b>
BT549 细胞	$1.6 \pm 0.2$	/	$1.0 \pm 0.1$	<b>0.027</b>
单细胞钙成像应答 [阳性数/总数 (%)]				
BT549 细胞	51/224 (22.8)	/	31/228 (13.6)	<b>0.011</b>
MCF-7 细胞	58/127 (45.7)	/	3/118 (2.5)	<b>&lt;0.001</b>
PCR 检测 MDA-MB-231 [RQ, (LEB, UEB)]				
E-cadherin	0.1 (0.01, 0.01)	/	1 (0.03, 0.02)	<b>&lt;0.001</b>
N-cadherin	77.5 (15.83, 15.25)	/	1 (0.29, 0.40)	<b>&lt;0.001</b>
Vimentin	2.12 (0.39, 0.44)	/	1 (0.19, 0.23)	<b>0.007</b>
Western blot 检测 MCF 10A (RQ, $\bar{x} \pm s$ )				
E-cadherin	$1.3 \pm 0.1$	$1.0 \pm 0.0$	$1.8 \pm 0.0$	<b>0.019</b>
N-cadherin	$3.4 \pm 0.7$	$6.0 \pm 1.2$	$1.0 \pm 0.0$	<b>0.007</b>
荧光酶检测 293T 细胞 (RQ, $\bar{x} \pm s$ )	$2.2 \pm 0.3$	/	$1.0 \pm 0.1$	<b>&lt;0.001</b>

注: RQ, relative quantity, 相对表达量; LEB, lower error bars, 下误差; UEB, upper error bars, 上误差。

2.2 小鼠骨髓细胞体外试验

2.2.1 破骨分化、TRAP 染色

C57BL/6 小鼠 BMMs 破骨分化及 TRAP 染色试验结果见表 2。与 Ctrl 组相比，加入 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的培养基上清中的 TRAP+破骨细胞数量显著增多 ( $P<0.05$ )。

2.2.2 成骨分化、ALP 和 Von Kossa 染色

C57BL/6 小鼠 BMSCs 成骨分化及 ALP 和 Von Kossa 染色试验结果见图 2 和表 2。与 Ctrl 组相比，加入 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的培养基上清的 ALP 染色和 Von Kossa 染色差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

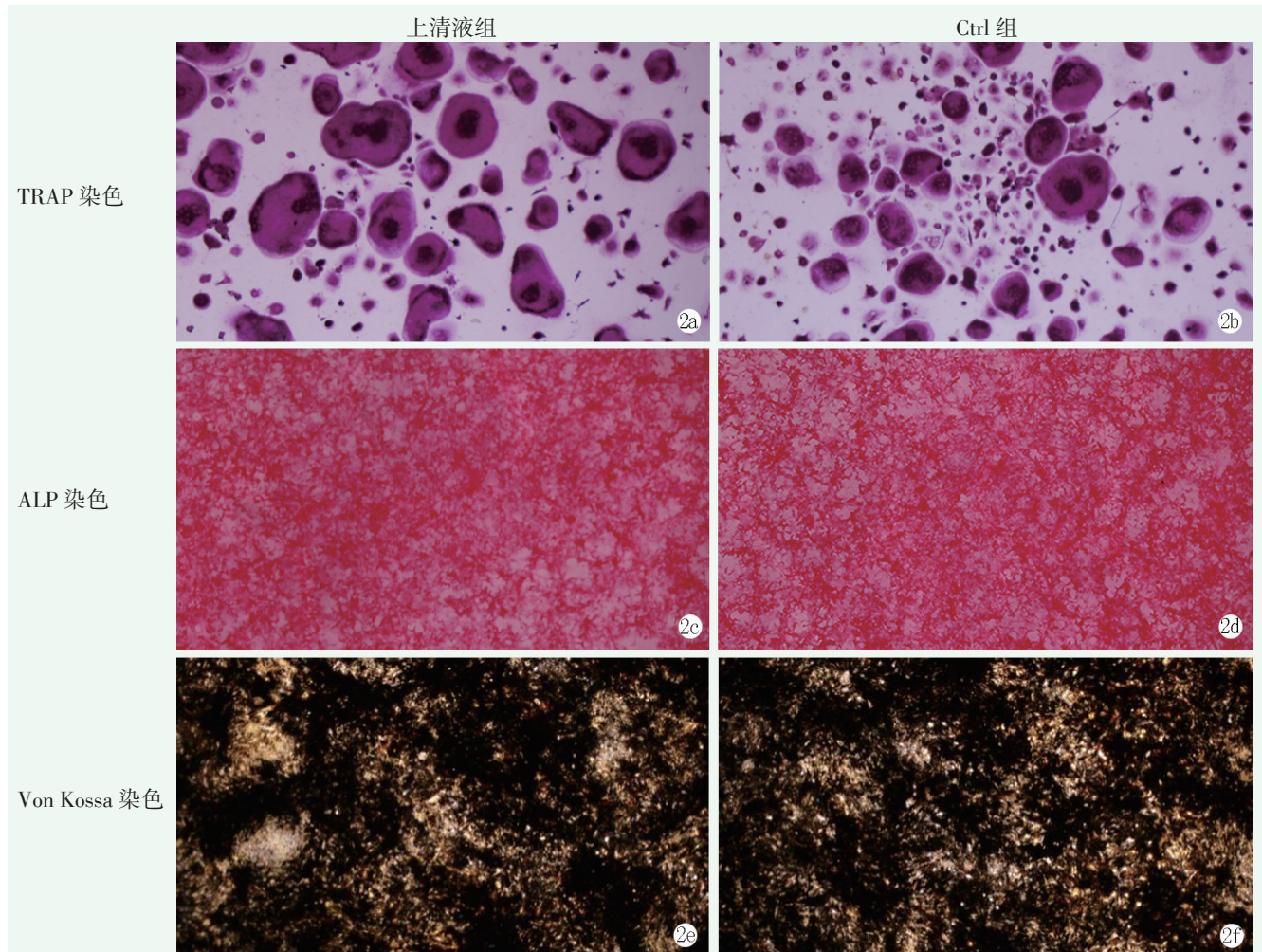


图 2. 小鼠骨髓细胞体外试验染色观察。2a, 2b: 加入 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的培养基上清与相同体积培养基后 BMMs 向破骨细胞分化的情况；2c, 2d: 加入 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的培养基上清与加入相同体积培养基后 BMSCs 向成骨细胞分化的 ALP 染色情况；2e, 2f: 加入 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的培养基上清与相同体积培养基后 BMSCs 向成骨细胞分化的 Von Kossa 染色情况。

Figure 2. Staining of mouse bone marrow cells in vitro. 2a, 2b: BMMs differentiation into osteoclasts after adding MDA-MB-231 breast cancer cell supernatant and the same medium volume; 2c, 2d: ALP staining of BMSCs differentiation into osteoblasts after addition of MDA-MB-231 breast cancer cell supernatant and the same volume medium; 2e, 2f: Von Kossa staining of osteoblast differentiation of BMSCs after addition of MDA-MB-231 breast cancer cell supernatant and the same volume medium.

表 2. 小鼠骨髓细胞体外试验 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2. Results of mouse bone marrow cells in vitro test ( $\bar{x} \pm s$ )

指标	上清液组 (n=3)	Ctrl 组 (n=3)	P 值
TRAP 染色 (阳性细胞数)	451.3±15.0	174.3±9.2	<0.001
ALP 染色 (相对阳性面积)	0.6±0.1	0.7±0.1	0.593
Von Kossa 染色 (相对阳性面积)	0.6±0.1	0.6±0.0	0.482



### 3 讨论

乳腺癌的发病率在 2020 年取代肺癌成为全球第一大癌症，是导致女性死亡的最常见的恶性肿瘤<sup>[9, 10]</sup>。乳腺癌可转移至各个器官，其中骨转移最为常见，占比高达 60%~80%，其次为肺（57%~77%）、肝（5%~12%）和脑（10%~30%）。并且 25%~40% 的转移性乳腺癌患者中骨是第一转移部位<sup>[10-12]</sup>。乳腺癌的远处转移是乳腺癌细胞从侵袭、血液/淋巴转移到远处定植的复杂过程，与包括遗传、乳腺癌分型等多种因素相关<sup>[11, 13]</sup>。骨量调节依赖于骨形成和骨吸收之间的动态平衡，骨形成和骨吸收分别由成骨细胞激活和破骨细胞激活驱动<sup>[12, 14]</sup>。RANKL 是破骨细胞分化的调控因子，RANKL 通过与 TNFRSF11A 结合，通过 TNF 受体相关因子和 NF-κB 诱导信号传导，最终导致 NFATC1 (nuclear factor of activated T cells cytoplasmic 1) 的激活<sup>[13-16]</sup>。目前的研究表明，除了作为破骨细胞分化的关键因子外，RANKL 在乳腺癌骨转移患者中的表达水平和频率较原位乳腺癌更高，RANKL 的表达水平和多态性与乳腺癌骨转移风险密切相关，目前临床上 denosumab 已应用于乳腺癌骨转移患者的治疗方案中，但实验表明，RANKL 不仅参与乳腺癌的远期骨转移过程，在乳腺癌的早期侵袭和进展中也发挥重要作用<sup>[15, 17]</sup>。抑制 RANK/RANKL 信号传导已被证明可作为乳腺癌的治疗靶点之一，还可消耗肿瘤干细胞群，减少乳腺癌的复发和转移<sup>[16, 18]</sup>。

本研究首先利用 transwell 实验明确了 RANKL 能够促进乳腺癌细胞的侵袭、迁移能力。介于 RANK/RANKL 信号通路主要是通过 Ca<sup>2+</sup>-NFATC1 信号轴实现的，其中钙离子的持续震荡是维持该信号轴的关键，本研究利用单细胞钙成像技术发现，RANKL 显著升高乳腺癌细胞内的钙信号。钙信号是正常上皮细胞向转移性癌细胞相关的 EMT 表型转化所必需，在乳腺癌中，钙和 EMT 标记物存在相关性<sup>[17, 19]</sup>。EMT 是肿瘤细胞中一种常见的表型转化，可导致肿瘤细胞间的黏附下降并增加细胞的活动性，因此被认为是肿瘤转移的关键因素<sup>[18, 20]</sup>。本研究利用 PCR、western blot 发现 RANKL 能够通过上调 N-cadherin 并下调 E-cadherin 来诱导乳腺癌细胞的 EMT 过程，这与多项研究的结果相一致<sup>[19-23]</sup>。进一步的荧光素酶报告基因实验发现，加入外源的重组 RANKL 蛋白能够使乳腺癌细胞中的 NF-κB 信号通路活化，具体表现

为 pp65 表达量的升高以及 p65 和 IκBα 的下调。有趣的是，NF-κB 信号通路的活化既能升高胞内的钙信号，也能够促进肿瘤细胞的 EMT 过程<sup>[22-25]</sup>。本研究用 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的培养基上清与 BMMs 和 BMSCs 细胞进行共培养，发现乳腺癌细胞能够促进 BMM 向破骨的分化，但对成骨分化没有影响。综上，利用 Transwell、单细胞钙成像技术检测钙应答、荧光素酶报告基因实验以及破骨分化、成骨分化等实验明确了 RANKL 能够促进乳腺癌骨转移，其可能的机制为 RANKL 诱导的钙信号经 NF-κB 通路增强乳腺癌细胞 EMT 过程。

综上，本研究发现 RANKL 不仅作为破骨分化的关键调控因子参与乳腺癌骨转移的骨破坏，还通过增强乳腺癌细胞的 EMT 过程促进其骨转移。目前临床上 denosumab 在乳腺癌骨转移的应用主要针对于乳腺癌骨转移后产生的骨破坏作用，可能提示在乳腺癌未转移前可能也需要抗 RANKL 治疗。本研究并未采用小鼠构建模型以进行体内验证。为进一步验证该结论，需在利用免疫缺陷小鼠通过左心室注射乳腺癌细胞的方法构建乳腺癌骨转移模型的基础上，通过注射 Denosumab 来观察肿瘤的转移和生长情况。

### 参考文献

- [1] Orsini A, Diquigiovanni C, Bonora E. Omics technologies improving breast cancer research and diagnostics [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (16): 12690. DOI: 10.3390/ijms241612690.
- [2] Gomes I, Gallego-Paez LM, Jiménez M, et al. Co-targeting RANK pathway treats and prevents acquired resistance to CDK4/6 inhibitors in luminal breast cancer [J]. *Cell Rep Med*, 2023, 4 (8): 101120. DOI: 10.1016/j.xcrm.2023.101120.
- [3] Simatou A, Sarantis P, Koustas E, et al. The role of the RANKL/RANK axis in the prevention and treatment of breast cancer with immune checkpoint inhibitors and Anti-RANKL [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (20): 7570. DOI: 10.3390/ijms21207570.
- [4] 吴瑞丽, 杜巧红, 李洁心, 等. 脊柱肿瘤减压固定术后生存与生存质量相关因素 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2022, 30 (8): 678-682. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2022.08.02. Wu RL, Du QH, Li JX, et al. Factors related to survival and quality of life secondary to decompression and internal fixation for spinal tumors [J]. *Orthopedic Journal of China*, 2022, 30 (8): 678-682. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2022.08.02.
- [5] Gai D, Chen JR, Stewart JP, et al. CST6 suppresses osteolytic bone disease in multiple myeloma by blocking osteoclast differentiation [J]. *J Clin Invest*, 2022, 132 (18): e159527. DOI: 10.1172/JCI159527.
- [6] 袁毅, 傅裕, 许东, 等. 柚皮苷联合脉冲电磁场对大鼠股骨骨折愈合的影响 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2018, 26 (6): 543-547.

- DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2018.06.14.
- Yuan Y, Fu Y, Xu D, et al. Effect of naringin combined with pulsed electromagnetic field on healing of femoral fracture in rats [J]. Orthopedic Journal of China, 2018, 26 (6) : 543-547. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2018.06.14.
- [7] Hayat F, Khan NU, Khan AU, et al. Risk association of RANKL and OPG gene polymorphism with breast cancer to bone metastasis in Pashtun population of Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan [J]. PLoS One, 2022, 17 (11) : e276813. DOI: 10.1371/journal.pone.0276813.
- [8] Mao Y, Xie X, Jiang T, et al. XI019, a novel JAK inhibitor, suppressed osteoclasts differentiation induced by RANKL through MAPK signaling pathway [J]. Biochem Pharmacol, 2023, 215: 115704. DOI: 10.1016/j.bcp.2023.115704.
- [9] Wu X, Li F, Dang L, et al. RANKL/RANK System-based mechanism for breast cancer bone metastasis and related therapeutic strategies [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 76. DOI: 10.3389/fcell.2020.00076.
- [10] Müller V, Bartsch R, Lin NU, et al. Epidemiology, clinical outcomes, and unmet needs of patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer and brain metastases: a systematic literature review [J]. Cancer Treat Rev, 2023, 115: 102527. DOI: 10.1016/j.ctrv.2023.102527.
- [11] Parkes A, Clifton K, Al-Awadhi A, et al. Characterization of bone only metastasis patients with respect to tumor subtypes [J]. NPJ Breast Cancer, 2018, 4: 2. DOI: 10.1038/s41523-018-0054-x.
- [12] 栾兆生, 周雯, 李艳玲, 等. 骨转移瘤的核素<sup>89</sup>Sr 治疗 [J]. 中国矫形外科杂志, 2013, 21 (21) : 2142-2145. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2013.21.05.
- Luan ZS, Zhou W, Li YL, et al. Efficacy of radionuclide <sup>89</sup>Sr in treating malignant bone metastasis [J]. Orthopedic Journal of China, 2013, 21 (21) : 2142-2145. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2013.21.05.
- [13] Soni A, Ren Z, Hameed O, et al. Breast cancer subtypes predispose the site of distant metastases [J]. Am J Clin Pathol, 2015, 143 (4) : 471-478. DOI: 10.1309/AJCPYO5FSV3UPEXS.
- [14] Rashed F, Kamijyo S, Shimizu Y, et al. The effects of receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand-binding peptides on bone resorption and bone formation [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 648084. DOI: 10.3389/fcell.2021.648084.
- [15] Craven M, Vajravelu ME, Shekdar KV, et al. Early identification of a 12-bp tandem duplication in TNFRSF11A encoding receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (RANK) : Clinical characterization and response to bisphosphonate therapy [J]. Bone, 2023, 170: 116698. DOI: 10.1016/j.bone.2023.116698.
- [16] 李风波, 孙晓雷, 马剑雄, 等. 柚皮苷对破骨细胞凋亡的影响 [J]. 中国矫形外科杂志, 2021, 29 (5) : 450-454. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2021.05.15.
- Li FB, Sun XL, Ma JX, et al. Effect of naringin on apoptosis of osteoclasts in vitro [J]. Orthopedic Journal of China, 2021, 29 (5) : 450-454. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2021.05.15.
- [17] Kolokotroni A, Gkikopoulou E, Rinotas V, et al. A humanized RANKL transgenic mouse model of progesterin-induced mammary carcinogenesis for evaluation of novel therapeutics [J]. Cancers (Basel), 2023, 15 (15) : 4006. DOI: 10.3390/cancers15154006.
- [18] Yoldi G, Pellegrini P, Trinidad EM, et al. RANK signaling blockade reduces breast cancer recurrence by inducing tumor cell differentiation [J]. Cancer Res, 2016, 76 (19) : 5857-5869. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2745.
- [19] Jones CA, Hazlehurst LA. Role of calcium homeostasis in modulating EMT in cancer [J]. Biomedicines, 2021, 9 (9) : 1200. DOI: 10.3390/biomedicines9091200.
- [20] Ramundo V, Zanirato G, Palazzo ML, et al. APE-1/Ref-1 inhibition blocks malignant pleural mesothelioma cell proliferation and migration: crosstalk between oxidative stress and epithelial mesenchymal transition (EMT) in driving carcinogenesis and metastasis [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24 (16) : 12570. DOI: 10.3390/ijms241612570.
- [21] Shao M, Jiang C, Yu C, et al. Capecitabine inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and proliferation of colorectal cancer cells by mediating the RANK/RANKL pathway [J]. Oncol Lett, 2022, 23 (3) : 96. DOI: 10.3892/ol.2022.13216.
- [22] Cuyàs E, Corominas-Faja B, Martín MM, et al. BRCA1 haploinsufficiency cell-autonomously activates RANKL expression and generates denosumab-responsive breast cancer-initiating cells [J]. Oncotarget, 2017, 8 (21) : 35019-35032. DOI: 10.18632/oncotarget.16558.
- [23] Hoshi H, Kubota S, Takigawa M, et al. Dual roles of cellular communication network factor 6 (CCN6) in the invasion and metastasis of oral cancer cells to bone via binding to BMP2 and RANKL [J]. Carcinogenesis, 2023, 44 (8-9) : 695-707. DOI: 10.1093/carcin/bgad057.
- [24] Karmokar PF, Moniri NH. Free-fatty acid receptor-1 (FFA1/GPR40) promotes papillary RCC proliferation and tumor growth via Src/PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B but suppresses migration by inhibition of EGFR, ERK1/2, STAT3 and EMT [J]. Cancer Cell Int, 2023, 23 (1) : 126. DOI: 10.1186/s12935-023-02967-x.
- [25] Wang M, Wu Y, Li X, et al. IGJ suppresses breast cancer growth and metastasis by inhibiting EMT via the NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. Int J Oncol, 2023, 63 (3) : 105. DOI: 10.3892/ijo.2023.5553.

(收稿:2023-10-17 修回:2024-02-18)  
(同行评议专家: 黄金承, 张开亮)  
(本文编辑: 宁桦)