

淫羊藿醇提物调节 M2 样巨噬细胞极化减少乳腺癌细胞迁移和集落形成的研究

侯曼婷^{1,2,3}, 杨慧捷^{2,3}, 李 强^{2,3}, 湛小燕^{2,3}, 柏兆方^{2,3}, 肖小河^{1,2,3*}

1. 南方医科大学中医药学院, 广东 广州 510515

2. 中国人民解放军总医院 第五医学中心 肝病医学部, 北京 100039

3. 中国人民解放军总医院 第五医学中心 全军中医药研究所, 北京 100039

摘要:目的 探讨淫羊藿 *Epimedium brevicornu* 醇提物对体外巨噬细胞极化调控机制及对 M2 样巨噬细胞促进 4T1 细胞迁移和集落形成的影响。方法 采用 CCK-8 法检测不同浓度淫羊藿醇提物对骨髓来源巨噬细胞 (bone marrow derived macrophages, BMDM) 活力的影响, 确定淫羊藿醇提物的安全作用浓度; 采用 Western blotting 和 qRT-PCR 检测淫羊藿醇提物对 M2 样巨噬细胞标志物精氨酸酶-1 (arginase-1, Arg-1) 和 CD163 表达的影响; 采用 qRT-PCR 检测淫羊藿醇提物对 M2-肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophages, TAMs) 相关基因炎症区域 1 (found in inflammatory zone 1, *Fizz1*)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , *PPAR* γ)、几丁质酶 3 样分子 3 (chitinase 3-like 3, *Ym1*)、趋化因子 24 (C-C motif chemokine ligand 24, *CCL24*)、巨噬细胞半乳糖型 C 型凝集素 2 (macrophage galactose-type C-type lectin 2, *MGL2*) 和干扰素调节因子 4 (interferon regulatory factor 4, *IRF4*) mRNA 表达的影响; 划痕实验检测淫羊藿醇提物对 M2-TAMs 促 4T1 细胞迁移的影响; 集落实验检测淫羊藿醇提物对 M2-TAMs 促 4T1 细胞生长的影响。结果 淫羊藿醇提物在 0.015 625~2.000 000 mg/mL 对 BMDM 细胞无毒副作用; 淫羊藿醇提物显著抑制 M2-TAMs 相关基因 *Arg-1*、*CD163*、*Fizz1*、*PPAR* γ 、*CCL24*、*Ym1*、*MGL2* 和 *IRF4* 表达 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 抑制 M2-TAMs 促 4T1 细胞的迁移和集落形成能力 ($P<0.05$ 、 0.001)。结论 淫羊藿醇提物减弱 M2 样巨噬细胞对 4T1 细胞迁移和集落形成的促进作用, 其作用机制可能与抑制巨噬细胞 M2 型极化有关。

关键词: 淫羊藿; 巨噬细胞; M2 型极化; 乳腺癌; 迁移; 集落形成; 安息香酸; 松柏醛; 大黄素; 香草酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)06-1842-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.06.016

Alcohol extract of *Epimedium brevicornu* reduces migration and colony formation of breast cancer cells by regulating polarization of M2 macrophages

HOU Man-ting^{1,2,3}, YANG Hui-jie^{2,3}, LI Qiang^{2,3}, ZHAN Xiao-yan^{2,3}, BAI Zhao-fang^{2,3}, XIAO Xiao-he^{1,2,3}

1. School of Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

2. Department of Hepatology, the Fifth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100039, China

3. China Military Institute of Chinese Materia, the Fifth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100039, China

Abstract: Objective To investigate the effect and regulatory mechanism of alcohol extract of *Epimedium brevicornu* on macrophage polarization and M2 macrophages in promoting the migration and colony formation of 4T1 cells. **Methods** CCK-8 assay was used to detect the effect of different concentrations of alcohol extract of *E. brevicornu* on activity of bone marrow derived macrophages (BMDM), and determine the safe concentration of alcohol extract of *E. brevicornu*. Western blotting and qRT-PCR were used to detect the expressions of arginase-1 (*Arg-1*) and *CD163*. qRT-PCR was used to detect the effect of alcohol extract of *E. brevicornu* on mRNA expressions of M2-tumor-associated macrophages (TAMs) related genes such as found in inflammatory zone 1 (*Fizz1*), peroxisome proliferator-activated receptor γ (*PPAR* γ), chitinase 3-like 3 (*Ym1*), C-C motif chemokine ligand 24 (*CCL24*), macrophage galactose-type C-type lectin 2 (*MGL2*) and interferon regulatory factor 4 (*IRF4*). The effect of alcohol extract of *E. brevicornu* on M2-TAMs

收稿日期: 2022-11-17

基金项目: 国家中医药管理局中医药创新团队及人才支持计划项目 (ZYXCXTD-C-202005); 国家自然科学基金创新群体项目 (81721002)

作者简介: 侯曼婷, 硕士研究生, 主要从事中药药理研究。E-mail: hmtby98@163.com

*通信作者: 肖小河, 研究员, 博士生导师, 主要从事临床中药学研究。E-mail: pharmacy_302@126.com

promoting the migration of 4T1 cells was detected by wound healing assay. Colony formation experiment was conducted to detect the effect of alcohol extract of *E. brevicornu* on the growth of 4T1 cells promoted by M2-TAMs. **Results** Alcohol extract of *E. brevicornu* had no adverse effects on BMDM cells at 0.015 625—2.000 000 mg/mL. Alcohol extract of *E. brevicornu* significantly inhibited the expression of M2-TAMS related genes *Arg-1*, *CD163*, *Fizz1*, *PPAR γ* , *CCL24*, *Ym1*, *MGL2* and *IRF4* ($P < 0.05$, 0.01, 0.001), and reduced the ability of M2-TAMS promoting the migration and colony formation of 4T1 cells ($P < 0.05$, 0.001). **Conclusion** Alcohol extract of *E. brevicornu* attenuates the promoting effects of M2 macrophages on migration and colony formation of 4T1 cells, and the mechanism may be related to the inhibition of M2 polarization of macrophages.

Key words: *Epimedium brevicornu* Maxim.; macrophages; M2 polarization; breast cancer; migration; colony formation; benzoic acid; coniferyl aldehyde; emodin; 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid

乳腺癌是危害妇女健康主要的恶性肿瘤，也是世界上癌症的第 2 大死亡原因^[1-2]。乳腺癌后期多有肺和肝的转移，当发生器官转移时，患者生存率和生活质量将大大降低^[3]。乳腺癌的一线治疗主要依赖于蒽环类、紫杉醇等细胞毒性药物的化疗，但在治疗过程中经常发生耐药性。因此，探索乳腺癌的病理机制和寻找有效的治疗方法至关重要。巨噬细胞对各种肿瘤的发生和发展至关重要^[4-5]，巨噬细胞的标志物可作为预后指标。巨噬细胞浸润率高与乳腺癌预后不良有关，肿瘤相关巨噬细胞（tumor-associated macrophages, TAMs）是肿瘤浸润免疫细胞中最典型的类型，从乳腺癌早期癌变到进展，尤其是转移，它们都发挥着重要作用^[6]。TAMs 参与乳腺癌的转移、血管生成、基质重塑、侵袭和免疫抑制。

中药在乳腺癌的整个治疗疗程中起着重要作用。中药具有多组分、多途径、多靶点的特点，能够降低肿瘤患者的复发率和转移率，改善生活质量，延长肿瘤患者的生存时间。淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim. 为毛茛目小檗科植物，味辛甘，性温，走肝肾二经，具有坚筋骨、补肾阳等功效，还具有保护心血管^[7]、促进骨质形成^[8]、调节机体免疫能力^[9]、抑制癌症^[10]等作用。研究表明，淫羊藿醇提取物有抑制乳腺癌细胞增殖的作用^[11]，但关于淫羊藿醇提取物如何影响乳腺癌肿瘤免疫微环境的研究尚未报道。故本研究拟探讨淫羊藿醇提取物对 M2 样巨噬细胞的影响及其调控 M2 样巨噬细胞对 4T1 乳腺癌细胞迁移和集落形成的影响，以期为后续淫羊藿的临床应用提供实验依据和理论指导。

1 材料

1.1 动物和细胞

SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠，8 周龄，购自斯贝福（北京）生物技术有限公司，动物合格证号 110324210105240115。小鼠饲养于解放军总医院第五医学中心动物实验中心，在整个实验期间，小鼠

自由进食饮水，并给予 12 h 光照/12 h 黑暗的周期。动物实验按照实验动物护理和使用指南进行，并经解放军总医院第五医学中心批准，动物实验伦理批准号 IACUC-2021-0007。

4T1 细胞购自上海富衡生物科技有限公司。

1.2 药物

淫羊藿经肖小河研究员鉴定为小檗科植物淫羊藿 *E. brevicornu* Maxim. 的干燥叶。取淫羊藿叶片，粉碎过 4 号筛，精密称定，加入稀乙醇，超声处理（功率 400 W、频率 50 kHz）1 h，放冷，再称定质量，用稀乙醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，冷冻干燥即得淫羊藿提取物。

1.3 药品与试剂

精氨酸酶-1（arginase-1，Arg-1）抗体（批号 93668）购自美国 CST 公司； β -actin 抗体（批号 20536-1-AP）购自 Proteintech 公司；HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗（批号 J111-035-003）购自 Jackson Immuno Research 公司；Trizol 试剂（批号 BSC51M1）购自 Bioflux 公司；CCK-8 试剂（批号 KTA1020-1000T）购自 Abbkine 公司；白细胞介素-4（interleukin-4，IL-4）因子（批号 96-214-14-20）购自 Peprotech 公司。

1.4 仪器

QB-9002 型震板仪（海门其林贝尔公司）；Epoch 酶标仪、P100+型核酸浓度测定仪（美国 Bio-Tek 公司）；Quantstudio 6 Flex 荧光定量 PCR 仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；MINI6K 型手掌离心机（杭州奥盛公司）；Vortex-Genie 2 型震荡器（美国 Scientific Industries 公司）。

2 方法

2.1 淫羊藿醇提取物成分分析

2.1.1 样品制备 取淫羊藿醇提取物加入甲醇，制备成 5 mg/mL 混悬液，超声提取 40 min，取 1 mL 于 12 000 r/min 离心 10 min，离心后取上清液，过 0.22 μ m 滤膜，取样品进 UPLC-MS/MS。通过中药

系统药理学数据库与分析平台 (traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP) 收集淫羊藿成分, MS 结果采用 Progenesis QI 数据平台分析 (基于 NPATLAS 和 GNPS 数据库), 将所得结果与淫羊藿成分检索比对, 进行非靶向成分分析。

2.1.2 色谱条件 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为双蒸水 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~3 min, 5% B; 3~35 min, 5%~95% B; 35~42 min, 95%~5% B。体积流量为 0.3 mL/min; 进样体积为 5 μL; 柱温箱温度为 40 °C。

2.1.3 质谱条件 采用电喷雾离子源 (ESI), 在正离子模式下进行检测, 毛细管温度 275 °C; 鞘气体积流量 20 Arb; 辅助气体体积流量 5 Arb; 离子源电压 5 kV。

2.2 细胞培养

从 8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠的股骨骨髓中分离骨髓来源巨噬细胞 (bone marrow derived macrophages, BMDM), 用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基和小鼠巨噬细胞集落刺激因子 M-CSF (50 ng/mL) 进行培养, 置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养 6 d。用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA (2:1) 消化细胞, 以 1.2×10⁶/mL 密度接种于孔板中过夜。第 2 天, 加入淫羊藿醇提取物 1 h 后, 用 IL-4 (20 ng/mL) 刺激细胞 24 h。

2.3 CCK-8 法检测淫羊藿醇提取物对 BMDM 的细胞毒性

将 BMDM 细胞以 1.2×10⁶/mL 密度接种于 96 孔板中, 置于培养箱中过夜, 用不同质量浓度 (0、0.015 625、0.031 25、0.062 5、0.125、0.25、0.5、1、2、4 mg/mL) 淫羊藿醇提取物处理细胞 24 h。弃去培养基, 加入 CCK-8-培养基 (1:10) 溶液, 置于培养箱中孵育 1 h, 用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度 (*A*), 检测淫羊藿醇提取物对细胞的毒性。

2.4 Western blotting 检测 BMDM 细胞 Arg-1 蛋白表达

设置对照组、模型组和不同质量浓度 (0.062 5、0.125、0.25 mg/mL) 淫羊藿醇提取物组, 按“2.2”项下方法给药, 收集细胞, 加入 RIPA 裂解液提取蛋白。蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 于含 5% 脱脂牛奶的 TBST 中封闭 1 h, 加入一抗, 4 °C 孵育过夜; TBST 洗涤后, 加

入二抗孵育, 使用增强的化学发光检测试剂显影。

2.5 qRT-PCR 法检测 BMDM 细胞趋化因子 24 (C-C motif chemokine ligand 24, *CCL24*)、炎症区域 1 (found in inflammatory zone 1, *Fizz1*)、几丁质酶 3 样分子 3 (chitinase 3-like 3, *Ym1*)、巨噬细胞半乳糖型 C 型凝集素 2 (macrophage galactose-type C-type lectin 2, *MGL2*)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ, *PPARγ*)、干扰素调节因子 4 (interferon regulatory factor 4, *IRF4*)、*Arg-1* 和 *CD163* mRNA 表达

设置对照组、模型组和不同质量浓度 (0.062 5、0.125、0.25 mg/mL) 淫羊藿醇提取物组, 按“2.2”项下方法给药, 收集细胞, 按照试剂盒说明书提取细胞总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列 (5'-3')
<i>CCL24</i>	F: ATTCTGTGACCATCCCCCTCAT R: TGTATGTGCCTCTGAACCCAC
<i>Fizz1</i>	F: ACCTTTCCTGAGATTCTGCCCC R: CAGTGGTCCAGTCAACGAGTAAGC
<i>Ym1</i>	F: GGCTACACTGGAGAAAAAT AGTCCCC R: CCAACCCACTCATTACCCTGATAG
<i>MGL2</i>	F: GATAACTGGCATGGACATATG R: TTTCTAATCACCATAACACATTC
<i>PPARγ</i>	F: GGAAGACCACTCGCATTCCTT R: GTAATCAGCAACCATTTGGGTCA
<i>IRF4</i>	F: CTTTGAGGAATTGGTCGAGAGG R: GAGAGCCATAAGGTGCTGTCA
<i>Arg-1</i>	F: GTGAAGAACCACCGGTCTGT R: CTGGTTGTGAGGGGAGTGTT
<i>CD163</i>	F: GGTGGACACAGAATGGTTCTTC R: CCAGGAGCGTTAGTGACAGC
<i>GAPDH</i>	F: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG R: GGGGTCGTTGATGGCAACA

2.6 条件培养基的制备

参考文献方法^[12], 按“2.2”项下方法培养 BMDM, 细胞种板贴壁后加入含淫羊藿醇提取物 (0.25 mg/mL) 的无血清培养基, 1 h 后加入 IL-4 (20 ng/mL)。24 h 后, 收集上清液作为条件培养基。条件培养基 2000 r/min 离心以沉淀碎片, 吸上清并在 -80 °C 下保存, 用于细胞迁移实验。

按“2.2”项下方法培养 BMDM, 细胞种板贴壁后加入含淫羊藿醇提取物 (0.25 mg/mL) 的 DMEM 培养基, 1 h 后加入 IL-4 (20 ng/mL)。24 h 后, 收集上清液作为条件培养基。条件培养基 2000 r/min

离心以沉淀碎片，吸上清并在-80 ℃下保存，用于细胞集落实验。

2.7 细胞迁移实验

将伤口愈合的 4 孔插件放置于 12 孔板中，4T1 细胞以 $3.6 \times 10^5/\text{mL}$ 接种。细胞过夜贴壁后，取出插件，用 PBS 洗去飘浮死细胞。加入含 50% 条件培养基的无血清培养基。置于培养箱中培养 24 h。0、24 h 时，用倒置显微镜拍照，使用 Image J 分析图片，计算细胞迁移率。

细胞迁移率 = (0 h 创面面积 - 24 h 创面面积) / 0 h 创面面积

2.8 细胞集落实验

6 孔板中每孔接种 1000 个 4T1 细胞，并用含 50% 条件培养基的培养基孵育 8 d。用 2% 多聚甲醛固定，用 1% 结晶紫染色，拍照，使用 Image J 分析图片。

2.9 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8 软件进行分析，计量资

料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。

3 结果

3.1 淫羊藿醇提取物的成分分析

如图 1 和表 2 所示，淫羊藿醇提取物中含安息香酸、松柏醛、大黄素、香草酸、hyaladione、epirodin A。

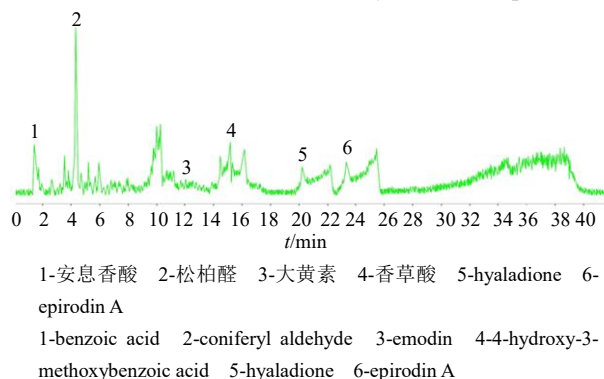


图 1 淫羊藿醇提取物成分分析

Fig. 1 Composition analysis of alcohol extract of *E. brevicornu*

表 2 淫羊藿醇提取物成分分析

Table 2 Composition analysis of alcohol extract of *E. brevicornu*

编号	加合离子	化学式	误差 ($\times 10^{-6}$)	m/z	t_R/min	相对丰度	成分
1	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$	5.677 357 29	123.044 7	1.593 8	1 589.567 777	安息香酸
2	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$	-2.342 852 04	179.069 9	4.295 1	3 586.541 796	松柏醛
3	$[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^+$	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	-4.539 241 05	315.022 8	12.105 9	304.253 911	大黄素
4	$[2\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$	8.701 646 00	359.076 7	14.511 1	1 451.912 390	香草酸
5	$[\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^+$	$\text{C}_7\text{H}_6\text{ClNO}_2\text{S}$	3.556 038 24	167.967 6	20.097 9	412.098 799	hyaladione
6	$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}$	7.987 707 44	228.176 4	23.835 0	400.752 688	epirodin A

3.2 淫羊藿醇提取物对 BMDM 的细胞毒性

不同质量浓度的淫羊藿醇提取物处理 BMDMs 细胞 24 h，结果显示 0.015 625~2 mg/mL 淫羊藿醇提取物对 BMDMs 细胞无毒性作用 (图 2)。

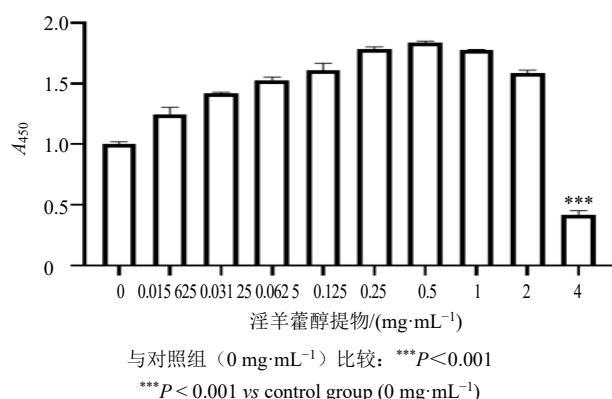
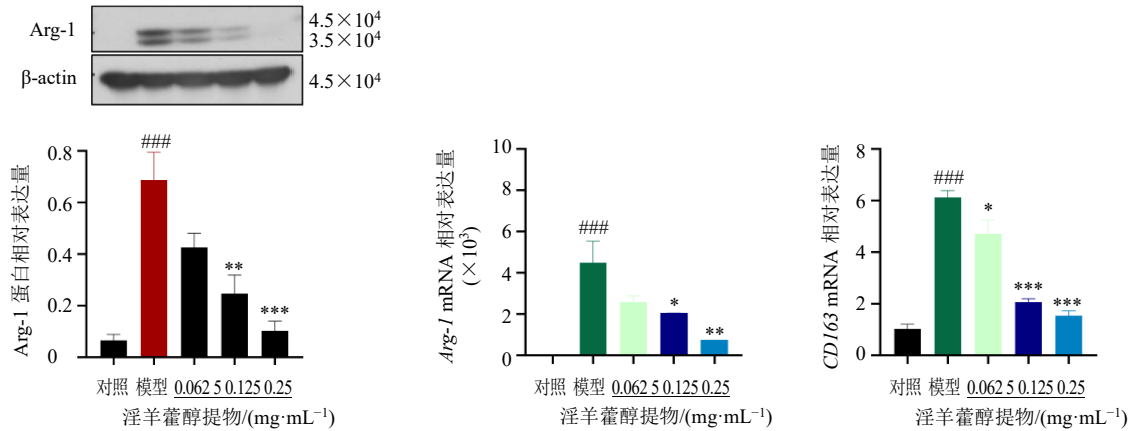


图 2 淫羊藿醇提取物对 BMDM 的细胞毒性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 2 Cytotoxicity of alcohol extract of *E. brevicornu* to BMDM ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.3 淫羊藿醇提取物在体外抑制巨噬细胞 M2 极化

在 BMDM M0 型巨噬细胞中，M2 样巨噬细胞的标志物 Arg-1 和 CD163 低表达，经 IL-4 诱导后表达显著上升，表明 BMDM 成功极化成 M2 样巨噬细胞。利用 Western blotting 和 qRT-PCR 技术验证淫羊藿醇提取物呈剂量相关性地下调 IL-4 诱导的 Arg-1 和 CD163 表达 (图 3)，表明淫羊藿醇提取物可以直接抑制巨噬细胞的 M2 样极化。

为了进一步探讨淫羊藿醇提取物对巨噬细胞 M2 极化的影响，采用 qRT-PCR 技术研究 M2 样巨噬细胞相关基因 *Fizz1*、*PPAR γ* 、*Ym1*、*CCL24*、*MGL2* 和 *IRF4* 的转录水平，如图 4 所示，与模型组比较，淫羊藿醇提取物 (0.062 5、0.125、0.25 mg/mL) 组 *Fizz1*、*Ym1*、*CCL24* 和 *IRF4* 的 mRNA 表达水平均显著下降 ($P<0.05$ 、0.01、0.001)，淫羊藿醇提取物 (0.125、0.25 mg/mL) 组 *PPAR γ* mRNA 表达水平显著下降 ($P<0.01$ 、0.001)，淫羊藿醇提取物 (0.25



与对照组比较: $^{\#}P < 0.05$ $^{\#\#}P < 0.01$ $^{\#\#\#}P < 0.001$; 与模型组比较: $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$, 下图同
 $^{\#}P < 0.05$ $^{\#\#}P < 0.01$ $^{\#\#\#}P < 0.001$ vs control group; $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$ vs model group same as below figures

图 3 淫羊藿醇提取物对 Arg-1 蛋白及 mRNA、CD163 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of alcohol extract of *E. brevicornu* on Arg-1 protein and mRNA expressions and CD163 mRNA expression ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

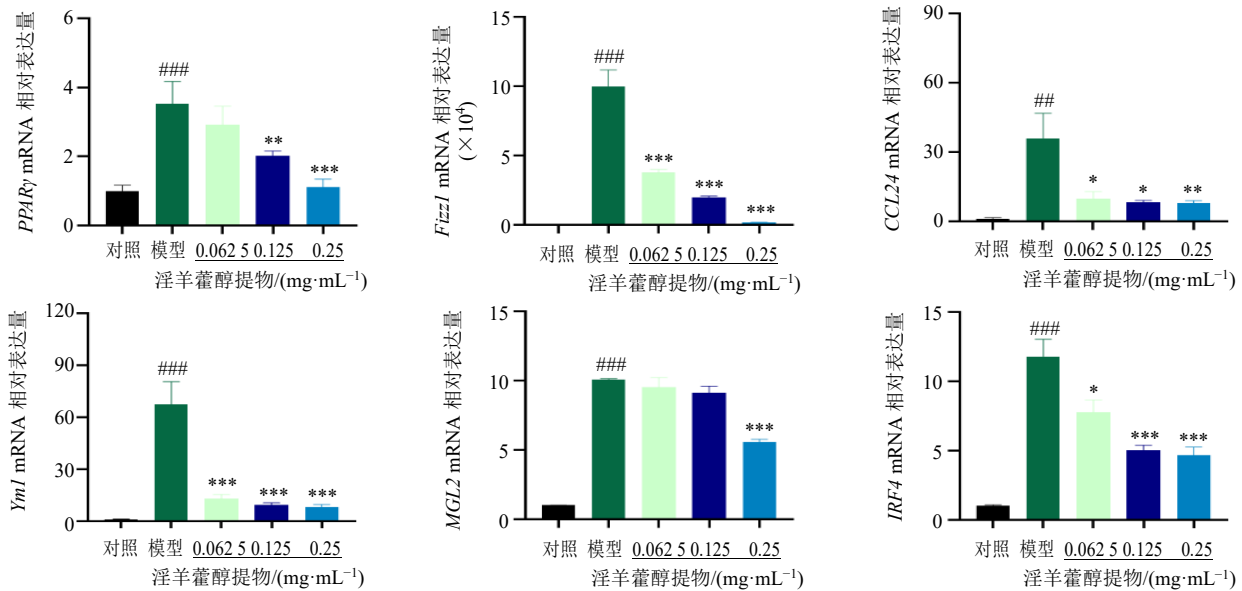


图 4 淫羊藿醇提取物对 PPAR γ 、Fizz1、CCL24、Ym1、MGL2 和 IRF4 mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of alcohol extract of *E. brevicornu* on PPAR γ , Fizz1, CCL24, Ym1, MGL2 and IRF4 mRNA expressions ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

mg/mL) 组 MGL2 mRNA 表达水平显著下降 ($P < 0.001$)。

3.4 淫羊藿醇提取物减弱 M2 样巨噬细胞对 4T1 细胞迁移的促进作用

采用划痕实验观察淫羊藿醇提取物作用巨噬细胞后上清对乳腺癌细胞的迁移能力的影响。BMDM 在含 IL-4 和淫羊藿醇提取物的无血清培养基中孵育 24 h, 收集上清液作为条件培养基。用含 50% 条件培养基的无血清培养基培养 4T1, 如图 5 所示, IL-4 单独处理的 BMDM 收集的条件培养基显著促

进 4T1 细胞的迁移 ($P < 0.05$), 而淫羊藿醇提取物处理后的 BMDM 的条件培养基显著抑制 4T1 细胞迁移 ($P < 0.05$)。

3.5 淫羊藿醇提取物减弱 M2 样巨噬细胞对 4T1 细胞集落形成的促进作用

使用集落形成实验来评估淫羊藿醇提取物对 M2 样巨噬细胞促进 4T1 细胞集落形成的影响。如图 6 所示, IL-4 处理的条件培养基显著促进 4T1 细胞的集落形成 ($P < 0.05$), 而淫羊藿醇提取物处理后的条件培养基显著抑制细胞的集落形成 ($P < 0.001$)。

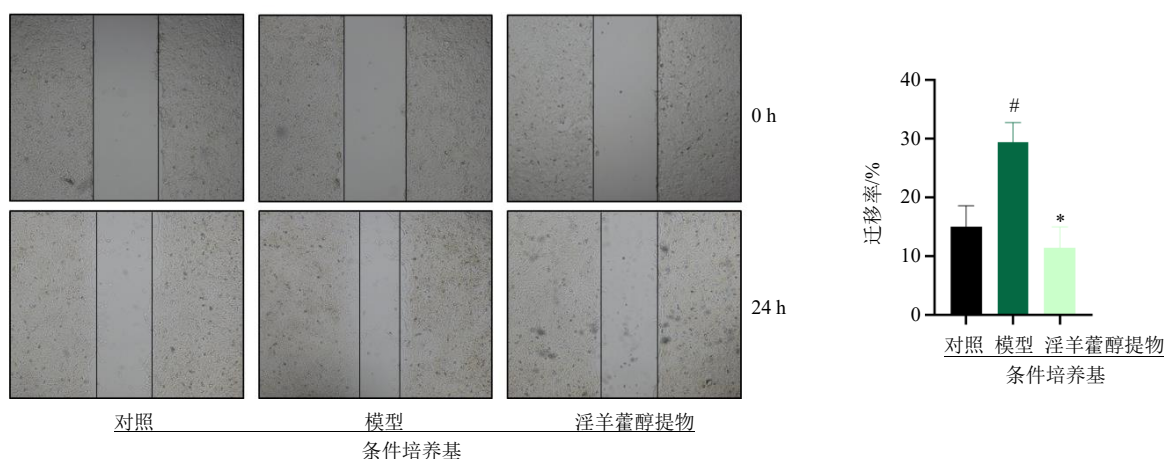


图 5 淫羊藿醇提取物对 M2-TAMs 促 4T1 细胞迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of alcohol extract of *E. brevicornu* on M2-TAMs promoting 4T1 cell migration ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

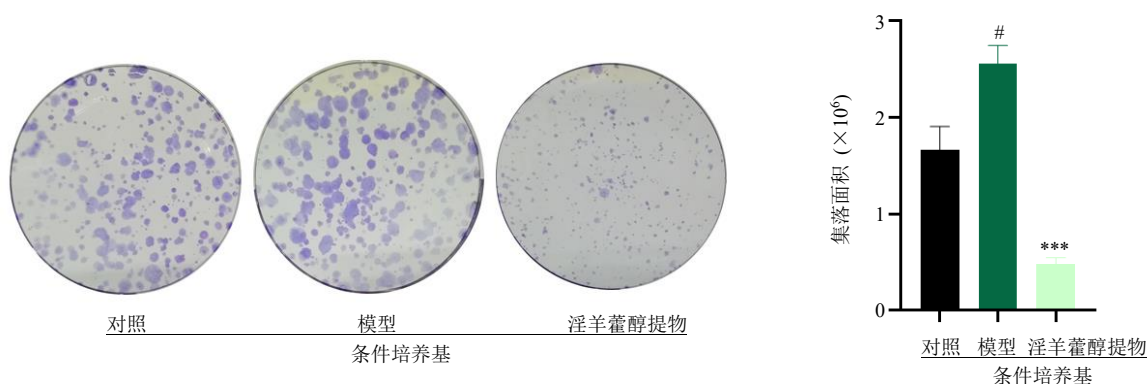


图 6 淫羊藿醇提取物对 M2-TAMs 促 4T1 细胞集落形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of alcohol extract of *E. brevicornu* on on M2-TAMs promoting 4T1 cell colony formation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

目前, 乳腺癌仍然是全球性的公共卫生问题。乳腺癌发病率呈现逐年增长和年轻化趋势, 严重威胁女性健康^[13]。中医认为肿瘤初期因机体阳虚不能气化, 阴气随之不足, 不能正常聚精成形, 而异常聚积为痰浊、瘀血等病理产物, 致使化毒成瘤^[14]。淫羊藿作为补阳之要药, 具有益精气、补肾阳之功效, 能够调节免疫, 是临床上常用的补肾中药, 现常用于治疗乳腺癌, 常以复方形式高频率入药。

癌症的一个特征是免疫功能障碍, 本应对抗肿瘤的免疫细胞受到肿瘤周围组织、肿瘤微环境的特异性抑制, 从而导致肿瘤不受控制地生长和扩散^[15]。越来越多的证据表明, 当存在于肿瘤微环境中时, 先天免疫细胞 (巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突状细胞、先天淋巴样细胞、骨髓源性抑制细胞和 NK 细胞) 以及适应性免疫细胞 (T 细胞和 B 细胞) 有助于肿瘤进展^[16]。巨噬细胞是组织内稳态不可或缺

的介质, 其向替代激活型巨噬细胞 (M2 型) 极化能促进癌细胞增殖、血管生成和转移。因此, 调节 TAMs 并维持其稳态已成为肿瘤治疗的重点^[17]。TAMs 参与乳腺癌的转移、血管生成、基质重塑、侵袭、免疫抑制。TAMs 主要分为 2 种不同的表型, 它们是经典激活的 M1 样巨噬细胞和替代激活的 M2 样巨噬细胞^[18]。在良性或非功能性肿瘤中, 大多数 TAM 是经典激活的 M1 样巨噬细胞, 被 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 或脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 激活, 从而促进 TAMs 产生促炎因子和吞噬肿瘤细胞的吞噬作用。而 M2 样巨噬细胞可被 Th2 细胞因子如 IL-4 激活, 产生大量抗炎因子, 这些因子直接促进乳腺癌的发展^[19]。因此, 逆转或抑制 M2 样巨噬细胞的极化是乳腺癌免疫治疗的策略。Arg-1 是 M2 样巨噬细胞的标志物, Arg-1 的过表达与癌症患者预后不良有关^[20]。CD163 是 M2 样巨噬细胞的特异性标志物^[21], CD163 与肿瘤转移相关, CD163+

TAM 诱导上皮介质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT), 促进癌细胞的迁移^[22]。本研究结果表明, 淫羊藿提取物在一定程度上发挥调节免疫的作用, 抑制 M2 样巨噬细胞的表面标志物 Arg-1 和 CD163 表达, 抑制巨噬细胞 M2 型极化。PPAR γ 是代谢传感器, 通过多种脂肪酸和脂肪酸衍生物 (如棕榈酸) 激活来调节脂质稳态^[23]。PPAR γ 与巨噬细胞 M2 极化有关, PPAR γ 已成为巨噬细胞 M2 极化的主要调节剂^[24], PPAR γ 配体已被证明对体内肿瘤生长具有强大的抑制作用^[25]。Fizz1、Ym1 均为 M2 样巨噬细胞标记基因, Fizz1 和 Ym1 参与组织修复过程中的纤维化^[26]。M2 样巨噬细胞在体外产生大量的 CCL24^[27], CCL24 表达增加能够促进肿瘤增殖、迁移和侵袭^[28]。IRF4 是 IRF 家族的一员, 它参与巨噬细胞 M2 极化过程, 并通过与 MyD88 衔接分子结合作为 Toll 样受体信号的负调节因子^[29]。MGL2 是巨噬细胞半乳糖型 C 型凝集素家族的成员, 也在替代激活条件下刺激的巨噬细胞中表达^[30]。本研究结果表明, 淫羊藿提取物通过抑制 M2 样巨噬细胞相关基因 PPAR γ 、Fizz1、Ym1、CCL24、IRF4、MGL2 的表达, 抑制巨噬细胞 M2 型极化, 表明淫羊藿可作为 M2 样巨噬细胞的有效抑制剂。

越来越多的证据表明, M2 样巨噬细胞具有促进癌症转移和生长的能力^[31]。来自 M2 样巨噬细胞的条件培养基可以模拟肿瘤微环境并诱导肿瘤迁移和生长, 其特征类似于从恶性肿瘤中分离的巨噬细胞^[12]。IL-4 能促进巨噬细胞向 M2 型极化, 可促进肿瘤增殖和血管生成^[18]。本研究证明了巨噬细胞极化和淫羊藿抗肿瘤作用的相关性。来自 IL-4 活化巨噬细胞的条件培养基促进了 4T1 细胞的迁移和生长, 而与淫羊藿共同干预后, 逆转了这种 M2 激活的肿瘤促进作用, 表明 IL-4 激活的 M2 极化被淫羊藿消除。

本研究发现淫羊藿提取物通过体外调节巨噬细胞极化来抑制乳腺癌细胞迁移和集落形成, 表明淫羊藿治疗乳腺癌可能与调节肿瘤微环境有关, 淫羊藿可能通过影响巨噬细胞来充当转移部位肿瘤微环境的调节剂, 这为淫羊藿的抗肿瘤功能提供新的机制见解, 揭示了淫羊藿癌症治疗作用的新潜在机制, 可能有助于降低癌症发病率和癌症相关死亡率。今后, 本课题组将进一步在体内探讨淫羊藿抑制巨噬细胞 M2 型极化后对乳腺癌生长及转移的影响, 以期更深层地说明淫羊藿抗肿瘤机制, 为淫羊藿临

床应用于治疗肿瘤疾病提供依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] GBD 2019 Cancer Risk Factors Collaborators. The global burden of cancer attributable to risk factors, 2010-19: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. *Lancet*, 2022, 400(10352): 563-591.
- [2] Yin L, Duan J J, Bian X W, et al. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress [J]. *Breast Cancer Res*, 2020, 22(1): 61.
- [3] Medeiros B, Allan A L. Molecular mechanisms of breast cancer metastasis to the lung: Clinical and experimental perspectives [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(9): 2272.
- [4] Pathria P, Louis T L, Varner J A. Targeting tumor-associated macrophages in cancer [J]. *Trends Immunol*, 2019, 40(4): 310-327.
- [5] Shen M J, Chen Y B, Xu L J, et al. Increased infiltration of macrophages to radioresistant lung cancer cells contributes to the development of the additional resistance of tumor cells to the cytotoxic effects of NK cells [J]. *Int J Oncol*, 2018, 53(1): 317-328.
- [6] Tariq M, Zhang J Q, Liang G K, et al. Macrophage polarization: Anti-cancer strategies to target tumor-associated macrophage in breast cancer [J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(9): 2484-2501.
- [7] 马立. 淫羊藿苷对急性大脑中动脉梗死大鼠基质细胞衍生因子-1 (SDF-1) 及其受体 CXCR-4 的影响 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2014.
- [8] 郝福良. 淫羊藿苷促进兔颅骨缺损修复愈合的影响和机制的探讨 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2013.
- [9] He J, Zang S L, Liu N, et al. *Epimedium* polysaccharides attenuates hematotoxicity by reducing oxidative stress and enhancing immune function in mice model of benzene-induced bone marrow failure [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 125: 109908.
- [10] 华辞怡, 史有阳, 谢颖, 等. 淫羊藿有效成分治疗乳腺癌作用机制的研究进展 [J]. *中草药*, 2022, 53(20): 6593-6600.
- [11] 陈晓蕾, 汤立建, 李庆林. 淫羊藿、秦皮醇提取物体外抗乳腺癌细胞增殖的研究 [J]. *中国药房*, 2007, 18(15): 1124-1127.
- [12] Xu F, Cui W Q, Wei Y, et al. Astragaloside IV inhibits lung cancer progression and metastasis by modulating macrophage polarization through AMPK signaling [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 207.
- [13] Britt K L, Cuzick J, Phillips K A. Key steps for effective breast cancer prevention [J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20(8):

- 417-436.
- [14] 郝菲菲, 田思胜. 基于气化理论的恶性肿瘤转移之“阳主阴从”探讨 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(1): 164-166.
- [15] Denk D, Petrocelli V, Conche C, *et al.* Expansion of T memory stem cells with superior anti-tumor immunity by urolithin A-induced mitophagy [J]. *Immunity*, 2022, 55(11): 2059-2073.
- [16] Hinshaw D C, Shevde L A. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(18): 4557-4566.
- [17] DeNardo D G, Ruffell B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy [J]. *Nat Rev Immunol*, 2019, 19(6): 369-382.
- [18] Dong R, Gong Y L, Meng W, *et al.* The involvement of M2 macrophage polarization inhibition in fenretinide-mediated chemopreventive effects on colon cancer [J]. *Cancer Lett*, 2017, 388: 43-53.
- [19] Jiménez-García L, Herránz S, Luque A, *et al.* Critical role of p38 MAPK in IL-4-induced alternative activation of peritoneal macrophages [J]. *Eur J Immunol*, 2015, 45(1): 273-286.
- [20] Ma Z G, Lian J, Yang M, *et al.* Overexpression of Arginase-1 is an indicator of poor prognosis in patients with colorectal cancer [J]. *Pathol Res Pract*, 2019, 215(6): 152383.
- [21] Tao S F, Chen Q, Lin C, *et al.* Linc00514 promotes breast cancer metastasis and M2 polarization of tumor-associated macrophages via Jagged1-mediated Notch signaling pathway [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 191.
- [22] Wei C, Yang C G, Wang S Y, *et al.* Crosstalk between cancer cells and tumor associated macrophages is required for mesenchymal circulating tumor cell-mediated colorectal cancer metastasis [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 64.
- [23] Francque S, Szabo G, Abdelmalek M F, *et al.* Nonalcoholic steatohepatitis: The role of peroxisome proliferator-activated receptors [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(1): 24-39.
- [24] Tian Y, Yang C M, Yao Q Y, *et al.* Procyanidin B2 activates PPAR γ to induce M2 polarization in mouse macrophages [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1895.
- [25] Takada I, Makishima M. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists and antagonists: A patent review (2014-present) [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2020, 30(1): 1-13.
- [26] Okuzumi S, Miyata J, Kabata H, *et al.* TLR7 agonist suppresses group 2 innate lymphoid cell-mediated inflammation via IL-27-producing interstitial macrophages [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2021, 65(3): 309-318.
- [27] Makita N, Hizukuri Y, Yamashiro K, *et al.* IL-10 enhances the phenotype of M2 macrophages induced by IL-4 and confers the ability to increase eosinophil migration [J]. *Int Immunol*, 2015, 27(3): 131-141.
- [28] Jin L, Liu W R, Tian M X, *et al.* CCL24 contributes to HCC malignancy via RhoB-VEGFA-VEGFR2 angiogenesis pathway and indicates poor prognosis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(3): 5135-5148.
- [29] Satoh T, Takeuchi O, Vandenbon A, *et al.* The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(10): 936-944.
- [30] Raes G, Brys L, Dahal B K, *et al.* Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation [J]. *J Leukoc Biol*, 2005, 77(3): 321-327.
- [31] Mantovani A, Allavena P, Sica A, *et al.* Cancer-related inflammation [J]. *Nature*, 2008, 454(7203): 436-444.

[责任编辑 李亚楠]