

三叶青醇提取物对 4T1 乳腺癌的体内外抑制作用及其对 TNF- α /Akt/STAT3 信号轴的调控机制

邵杨洁¹, 凌立君², 于瑞莲^{1*}, 刘学湘¹, 崔爱平¹, 陈家龙¹, 宋 栋¹, 朱宇航¹

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 南京医科大学第一附属医院, 江苏省人民医院, 江苏 南京 210029

摘要: 目的 鉴定三叶青醇提取物 (ethanol extract of *Tetrastigma hemsleyanum*, SYQ) 入血成分并探讨其抗 4T1 乳腺癌的作用机制。方法 采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱 (ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry, UHPLC-Q-TOF-MS/MS) 分析 SYQ 的入血成分; 通过 MTT 法、克隆形成与划痕实验检测 SYQ 含药血清对 4T1 乳腺癌细胞增殖和迁移的影响。构建 4T1 荷瘤小鼠模型, 设置对照组、模型组、环磷酰胺 (20 mg/kg) 组和 SYQ 低、中、高剂量 (5、10、20 g/kg) 组, 给药干预后, ELISA 检测血清中白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 水平; 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察肿瘤组织病理变化; 免疫组化检测肿瘤组织 CD68 和 Ki67 表达; Western blotting 法检测肿瘤组织中 TNF- α /蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) /信号传导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 信号轴及凋亡相关蛋白表达。结果 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 鉴定出 19 种入血成分, 主要包括黄酮类 (芦丁、橘皮素、水仙苷) 以及苯丙素类和其他苷类化合物 (连翘苷 E、达伦苷 B)。体外实验结果显示, SYQ 含药血清显著抑制 4T1 细胞增殖、迁移及克隆形成 ($P < 0.01$ 、 0.001)。体内实验结果显示, SYQ 显著抑制荷瘤小鼠肿瘤体积增长 ($P < 0.001$), 高剂量组抑瘤率达 25.95%; 降低血清中 IL-6 和 TNF- α 水平 ($P < 0.05$ 、 0.001), 诱导肿瘤组织坏死并显著降低 CD68 和 Ki67 表达 ($P < 0.001$), 同时下调肿瘤组织中 TNF- α 、p-Akt/Akt、p-STAT3/STAT3 及 B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结论 SYQ 可通过降低炎症因子水平、抑制肿瘤细胞增殖及诱导肿瘤组织坏死, 从而发挥抗乳腺癌作用, 其机制可能与抑制 TNF- α /Akt/STAT3 信号轴有关。

关键词: 三叶青; 血清药物化学; 乳腺癌; 炎症; Akt/STAT3 信号通路; 芦丁; 橘皮素; 水仙苷; 连翘苷 E; 达伦苷 B

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)10-3861-17

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.10.016

Inhibitory effects of ethanol extract of *Tetrastigma hemsleyanum* on 4T1 breast cancer *in vivo* and *in vitro* and its regulatory mechanism on TNF- α /Akt/STAT3 signaling axis

SHAO Yangjie¹, LING Lijun², YU Ruilian¹, LIU Xuexiang¹, CUI Aiping¹, CHEN Jialong¹, SONG Dong¹, ZHU Yuhang¹

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Jiangsu Province Hospital, Nanjing 210029, China

Abstract: Objective To identify the blood-absorbed constituents of ethanol extract of *Tetrastigma hemsleyanum* (SYQ) and investigate its anti-breast cancer activity and underlying mechanisms. **Methods** Blood-absorbed components of SYQ were identified using ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. The effects of SYQ drug containing serum on proliferation and migration of 4T1 cells were evaluated by MTT, colony formation and wound-healing assays. A 4T1 tumor-bearing mouse model was established, control group, model group, cyclophosphamide (20 mg/kg) group, SYQ low-,

收稿日期: 2026-02-08

基金项目: 江苏省人民医院专项发展基金 (ZXFZ2026017); 南京中医药大学中药学一级重点学科开放项目 (ZYXPY2024-008)

作者简介: 邵杨洁 (2001—), 女, 硕士, 研究方向为中药效应与安全性评价。E-mail: 754156285@qq.com

*通信作者: 于瑞莲 (1970—), 女, 副教授, 硕士生导师, 主要研究方向为中药新药开发。E-mail: yu3ruilian@126.com

medium-, and high-dose (5, 10, 20 g/kg) groups were set up. After drug intervention, ELISA was used to detect the levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe pathological changes in tumor tissue. Immunohistochemistry was used to detect CD68 and Ki67 expressions in tumor tissue. Western blotting was used to detect the expressions of TNF- α /protein kinase B (Akt)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling axis and apoptosis related proteins in tumor tissues. **Results** A total of 19 blood components were identified by UHPLC-Q-TOF-MS/MS, mainly including flavonoids (rutin, tangeretin, narcissoside), phenylpropanoids, and other glycoside compounds (forsythoside E, darendoside B). The *in vitro* experimental results showed that SYQ drug containing serum significantly inhibited the proliferation, migration and colony formation of 4T1 cells ($P < 0.01, 0.001$). The *in vivo* experimental results showed that SYQ significantly inhibited tumor volume growth in tumor bearing mice ($P < 0.001$), with a tumor inhibition rate of 25.95% in high-dose group. SYQ reduced the levels of IL-6 and TNF- α in serum ($P < 0.05, 0.001$), induced tumor tissue necrosis and significantly reduced the expressions of CD68 and Ki67 ($P < 0.001$), while downregulated the expression levels of TNF- α , p-Akt/Akt, p-STAT3/STAT3 and B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) in tumor tissue ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** SYQ could exerts anti-breast cancer effects by reducing the levels of inflammatory factors, inhibiting tumor cell proliferation and inducing tumor tissue necrosis. The mechanism may be related to the inhibition of TNF- α /Akt/STAT3 signaling axis.

Key words: *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg; serum pharmacochemistry; breast cancer; inflammation; Akt/STAT3 signaling pathway; rutin; tangeretin; narcissoside; forsythoside E; darendoside B

乳腺癌是一种源自乳腺上皮细胞的恶性肿瘤，是女性中发病率最高的恶性肿瘤之一，同时也是全球癌症致死的主要原因之一^[1]。根据2020年世界卫生组织国际癌症研究机构发布的癌症数据分析，全球每年新增女性乳腺癌病例约为230万例，死亡病例约为69万例，严重威胁女性的生命健康^[2]。其预防和治疗依然存在很大困难，尽管临床上采用了化疗、内分泌治疗、靶向治疗和免疫治疗等多种方法，但其疗效常受到肿瘤异质性、药物耐药性以及肿瘤微环境（tumor microenvironment, TME）复杂调控的影响^[3]。近年来，中药凭借其独特优势在抗乳腺癌领域崭露头角，能够显著抑制肿瘤生长，防止肿瘤复发与转移，逆转耐药性，并调节机体免疫功能。此外，中药还具有防治抗肿瘤药物所致心脏毒性的作用，其多途径、多靶点的特性更有助于实现全身性的治疗效果^[4-5]。

三叶青为葡萄科植物三叶崖爬藤 *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg 干燥块根的药用部位，亦称金线吊葫芦、蛇附子、石老鼠及三叶对等，主要分布于中国浙江、广西、江西、福建、云南等省区^[6]，常生长于山谷阴湿环境或林下岩石缝隙中。三叶青素有“药王”及“植物抗生素”之美誉，其化学成分丰富，主要包括黄酮类、三萜类、多酚类及甾体等，这些有效成分使其具备抗肿瘤、抗病毒、抗炎、解热镇痛、免疫调节及保肝护肝等多重药理活性^[7]。本研究基于肿瘤相关炎症在乳腺癌恶性进展中的重要推动作用，结合三叶青“清热解毒”的显著抗炎和免疫调节特性，采用体内外联合实验方法，系

统评估三叶青醇提物（ethanol extract of *T. hemsleyanum*, SYQ）对乳腺癌的抑制作用。重点探讨其通过抑制细胞增殖与迁移、降低炎症因子表达等机制，阐明其抗肿瘤效果，为三叶青在乳腺癌临床治疗中的应用提供理论依据。

1 材料

1.1 动物与细胞株

SPF级雌性BALB/c小鼠60只，体质量（18±2）g；SPF级雄性SD大鼠12只，体质量（200±20）g，均购自南京青龙山动物繁殖场，合格证号SCXK（苏）2024-0001。动物于SPF级环境中饲养，室温（22±2）℃，相对湿度（55±5）%，12h/12h明暗循环，自由摄食饮水。动物实验操作遵守《实验动物管理条例》相关规定，并经南京中医药大学实验动物伦理委员会批准（批准号202512A105）。

小鼠4T1乳腺癌细胞由南京中医药大学药理实验室惠赠。

1.2 药材

三叶青块根购自广西玉林市中药材专业市场，由南京中医药大学中药鉴定学教研室刘圣金教授鉴定为葡萄科崖爬藤属植物三叶崖爬藤 *T. hemsleyanum* Diels et Gilg 的干燥块根。

1.3 药品与试剂

RPMI 1640培养基（批号BC20250711）、含乙二胺四乙酸的胰蛋白酶细胞消化液（trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid, Trypsin-EDTA, 0.25%，批号BC20250912）、磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline, PBS,批号BC20250808）、

青霉素-链霉素溶液(批号 BC20250826)购自南京森贝伽生物科技有限公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 批号 7E701H3)购自诺维赞生物科技有限公司;MTT 试剂(批号 EZ3413A112)、戊巴比妥钠(批号 F20021216)、多聚甲醛(批号 GP250230725587)购自广州赛国生物科技有限公司;二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 20241213)购自南京建成生物科技有限公司;注射用环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX, 批号 F13IS206786)购自上海源叶生物科技有限公司;小鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 检测试剂盒(批号 201-202511)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6) ELISA 检测试剂盒(批号 202-202511)购自南京拉普达生物科技有限公司;二甲苯(批号 251223433G)、无水乙醇(批号 260205364D)购自南京化学试剂股份有限公司;苏木素染色液(批号 C240809)、伊红染色液(批号 C250103)、苏木素(批号 C250102)购自珠海贝索生物技术有限公司;柠檬酸钠抗原修复液(批号 20250705)、乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)抗原修复液(批号 20260102)购自飞净生物科技有限公司;即用型正常山羊血清(批号 20L05A09)、DAB 显色试剂盒(批号 20K05A27)购自博士德生物工程有限公司;免疫组化检测试剂盒(批号 NJXL251215)购自艾方生物科技有限公司;Ki67 多克隆抗体(批号 00153100)、CD68 重组单克隆抗体(批号 23007895)、蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)抗体(批号 10026612)、p-Akt(Ser473)抗体(批号 10028150)、信号传导及转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)抗体(批号 00143630)、p-STAT3(Ser727)抗体(批号 00170631)、TNF- α 抗体(批号 00179471)、 β -actin 抗体(批号 10038080)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(批号 20001367)、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 二抗(批号 20001336)购自美国 Proteintech 公司;B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)抗体(批号 L1724)购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司;PageRuler™ 预染蛋白相对分子质量 Marker(批号 3364840)、苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF, 批号 3233087)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 Z928241227)、

RIPA 裂解液(弱,批号 A353250722)、四甲基乙二胺(N,N,N',N' -tetramethylethylenediamine, TEMED)替代物(批号 A349250509)、30%丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺(acrylamide-bisacrylamide, Acr-Bis, 29:1, 批号 A523251224)、1.5 mol/L 三羟甲基氨基甲烷(Tris)-HCl(pH 8.8, 批号 A469251217)、1 mol/L Tris-HCl(pH 6.8, 批号 A567251221)、过硫酸铵(ammonium persulfate, APS)替代物(批号 A364250606)、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液(5 \times , 批号 A039240905)、磷酸酶抑制剂混合物(50 \times , 批号 091823240331)、Western 一抗稀释液(批号 Z997240920)购自上海碧云天生物技术有限公司;增强型化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)液(批号 180-5001)购自上海天能科技有限公司;甲醇(批号 32058)购自亚盛化工有限公司;十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS, 批号 L40913A0003)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;甘氨酸(批号 EZ678F9D1E)、Tris(批号 EZ660D62DD2)购自德国 BioFroxx 公司;聚山梨酯 20(批号 A354250716)购自 Diamond 公司;1 \times Tris 缓冲盐溶液(Tris-buffered saline, TBS, 批号 240005002)购自北京索莱宝科技有限公司;脱脂奶粉(批号 LEE0023)购自富士胶片和光贸易有限公司;聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜(批号 0000390118)、色谱级乙腈(批号 JA112130)购自德国 Merck 公司;0.1%结晶紫溶液(批号 0225A25)购自北京雷根生物技术有限公司;色谱级甲酸(批号 73C1804DP)购自安耐吉化学。

1.4 仪器

Multiskan FC 型酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);EPS-600 型电泳仪、4600SF 型化学发光成像系统(上海天能科技有限公司);XW-80A 型微型涡旋混合仪(上海泸西分析仪器厂);HWS-24 型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司);FA1104N 型分析天平(上海平轩科学仪器有限公司);RE100-Pro 型旋转蒸发器(大龙兴创实验仪器股份公司);SW-CJ-2G 型超净工作台(苏州净化实验设备有限公司);CO₂ 培养箱(长沙华曦电子科技有限公司);XD-202 型倒置显微镜(江南永新光学有限公司);ELx50 型微孔板全自动洗板机(美国 BIOTEK 公司);WZ80-2 型微孔板恒温振荡

器(杭州佑宁仪器有限公司); RM2125 RTS 型石蜡切片机、HistoCore 型包埋机(德国 Leica 公司); LTF-K 脱水机、DP45 型烘片机、DK45 型摊片机、RS36 型全自动染色机(派斯杰科技有限公司); 3D HISTECH-150 型扫片机(匈牙利 3D HISTECH 公司); DHG-9071A 型电热恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司); Triple TOF™ 5600+型超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱(ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry, UHPLC-Q-TOF-MS/MS) 仪(美国 AB SCIEX 公司)。

2 方法

2.1 SYQ 的制备

将干燥的野生三叶青块根粉碎后过 80 目筛, 按照 1:10 的料液比加入 60%乙醇, 在 85 °C 恒温水浴条件下提取 3 次, 每次 1.5 h。将所得滤液合并, 浓缩并冷冻干燥获得 SYQ。

2.2 SYQ 含药血清的制备

SD 大鼠适应性饲养 7 d 后, 随机分为对照组和 SYQ 组, 每组 6 只。给药剂量依据本课题组前期急性毒性实验结果, SYQ 在 ICR 小鼠中的单次最大给药剂量为 180 g/kg (以生药量计), 连续观察 14 d 未见明显毒性反应及脏器病理学改变。结合临床等效剂量倍数原则及人体与大鼠体表面积换算关系, 本研究将大鼠给药剂量设定为 20 g/kg。预实验结果表明, 该剂量连续给药未引起显著的不良反应, 且所得含药血清在体外对乳腺癌细胞表现出较强的抑制作用。因此, SYQ 组以 20 g/kg 剂量 ig 给药, 对照组 ig 等体积的纯水, 1 次/d, 连续给药 7 d。末次给药 1 h 后, 大鼠 ip 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 麻醉并自腹主动脉采集血液。采集的血液在室温下静置 2 h, 随后分离血清, 在 56 °C 水浴中灭活 30 min, 经 0.22 μm 滤膜滤过除菌, 分装后置于 -20 °C 冰箱保存备用。

2.3 SYQ 及含药血清的 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 分析

2.3.1 色谱条件 Agilent Zorbax Extend C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 流动相为 0.1%甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~0.01 min, 5% B; 0.01~25 min, 5%~95% B; 25~27 min, 95% B; 27~29 min, 95%~5% B; 29~31.01 min, 5% B。柱温 25 °C; 体积流量 0.3 mL/min; 进样量 2 μL。

2.3.2 质谱条件 采用电喷雾电离 (electrospray

ionization, ESI) 源, 分别在正、负离子模式下进行扫描, 启用动态背景扣除 (dynamic background subtraction, DBS) 功能。单次扫描周期为 840 ms, 包含 1 次 200 ms 的 TOF MS 扫描和 8 次 80 ms 的 TOF MS/MS 扫描; 配备自动校正系统 (calibrant delivery system, CDS), 设置每 6 针自动校正 1 次。主要质谱参数设置如下: TOF MS 扫描范围 m/z 100~1 500; 离子喷雾电压 (ion spray voltage floating, ISVF) 为 5 500 V、-4 500 V; 去簇电压 (declustering potential, DP) 为 ±60 V; 碰撞能量 (collision energy, CE) 为 ±10 V; 雾化气 (Gas 1) 压力为 55 psi (1 psi=6.895 kPa); 辅助加热气 (Gas 2) 压力为 55 psi; 气帘气 (curtain gas, CUR) 压力为 35 psi; 离子源温度 (temperature, TEM) 为 550 °C。TOF MS/MS 扫描采用高灵敏度模式, 扫描范围 m/z 50~1 000; DP 为 ±60 V; CE 为 ±40 V; 碰撞能量扩散 (collision energy spread, CES) 为 10 V。

2.4 成分集的建立与数据处理

通过 TCMSP、PubChem、Chemical Book 以及 PubMed 等数据库和相关文献, 系统收集三叶青的化学成分信息, 整理化合物名称、分子式、精确相对分子质量及结构式 (mol 格式) 等数据, 建立三叶青化学成分自建数据库。将 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 采集的原始数据导入分析软件, 依次进行基线校正、峰提取、峰对齐及去卷积等处理。以自建数据库为基础进行化学成分匹配鉴定, 设定一级质谱质量误差 $\leq 1.5 \times 10^{-5}$, 并结合二级质谱碎片特征及文献报道进行人工核对与确认, 获得三叶青的化学成分组成。进一步对比含药血清与空白血清, 遵循“化合物在醇提物及含药血清中均可检出, 且在空白血清中未检出”的判定原则, 综合保留时间、准分子离子峰及碎片信息, 确定三叶青入血的原型成分。

2.5 细胞培养

4T1 细胞用含 10% FBS 及 1% 青霉素-链霉素的 RPMI 1640 完全培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。当细胞融合度达到 80%~90% 时, 弃去培养基, 加入胰酶消化 3 min, 轻柔吹打以促使细胞完全脱落, 将细胞悬液以 1 000 r/min 离心 4 min, 弃去上清液, 加入完全培养基重悬细胞, 并根据后续实验需求接种于培养板中备用。

2.6 MTT 法测定细胞活力

将处于对数生长期的 4T1 细胞以 8×10^3 个/孔接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后弃去原培养液。对

对照组加入 200 μL 含 20%空白血清的完全培养基；给药组则分别加入 200 μL 含有 5%、10%、15%、20% SYQ 含药血清的完全培养基，另设置不接种细胞不给药的空白组。培养 24 h 后，在避光条件下每孔加入 20 μL MTT 溶液 (5 mg/mL)，置于培养箱中孵育 4 h。孵育结束后弃去上清液，每孔加入 150 μL DMSO，采用酶标仪在 490 nm 波长处测定各孔的吸光度 (A) 值，计算细胞存活率。

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

2.7 集落形成实验检测细胞克隆能力

将处于对数生长期的 4T1 细胞以 2×10^3 个/孔接种于 6 孔板中，待细胞贴壁后弃去原培养基。对照组加入 2 mL 含 20%空白血清的培养基，给药组分别加入 2 mL 含 5%、10%、20% SYQ 含药血清的培养基。培养过程中每隔 3 d 更换 1 次相应培养基，连续培养 12 d。培养结束后弃去培养基，用 PBS 轻柔洗涤细胞，加入 4%多聚甲醛固定 15 min 后，采用 0.1%结晶紫溶液染色 30 min，自然晾干，在显微镜下观察、拍摄并统计细胞克隆集落数。

2.8 划痕实验检测细胞迁移能力

将处于对数生长期的 4T1 细胞接种于 6 孔板中培养，当细胞融合度达到 90%以上时，用 200 μL 无菌吸头在每孔中央垂直划取一道均匀划痕。用 PBS 冲洗细胞 3 次后，对照组加入 2 mL 含 20%空白血清的培养基，给药组分别加入 2 mL 含 2.5%、5%、10%、15% SYQ 含药血清的培养基。分别在划痕 0 h 及培养 24 h 后，采用倒置显微镜在固定视野下拍摄划痕区域图像，利用 Image J 软件计算细胞迁移率。

$$\text{细胞迁移率} = (0\text{h 划痕宽度} - 24\text{h 划痕宽度}) / 0\text{h 划痕宽度}$$

2.9 4T1 荷瘤小鼠模型的建立、分组与给药

取处于对数生长期的 4T1 细胞，经胰酶消化及离心处理用 PBS 重悬，调整细胞密度至 1×10^7 个/mL。取 0.1 mL 细胞悬液注射于 BALB/c 小鼠第 4 对乳腺脂肪垫以建立乳腺癌模型。成瘤后的小鼠随机分为模型组、CTX (20 mg/kg) 组及 SYQ 低、中、高剂量 (按生药量分别为 5、10、20 g/kg) 组，每组 10 只，同时另取 10 只健康 BALB/c 小鼠作为对照组。SYQ 组连续 ig 给药 21 d，CTX 组隔日 ip 给药 1 次 (给药方案参考相关文献方法^[8])，对照组和模型组 ig 等体积纯水。

2.10 荷瘤小鼠一般状态与肿瘤生长监测

给药期间每日对小鼠的一般状况进行观察，包括精神状态、饮食情况、被毛状况及活动表现，并

记录死亡情况。每隔 2 d 测量小鼠体质量，同时使用游标卡尺测量肿瘤的长径与短径，并称定离体肿瘤质量，计算肿瘤体积与抑瘤率。

$$\text{肿瘤体积} = (\text{长径} \times \text{短径}^2) / 2$$

$$\text{抑瘤率} = (\text{模型组平均肿瘤质量} - \text{给药组平均肿瘤质量}) / \text{模型组平均肿瘤质量}$$

2.11 脾脏和胸腺指数测定

给药 21 d 后，禁食不禁水，采用颈椎脱臼法处死小鼠，迅速摘取脾脏和胸腺，称定质量并计算脏器指数。

$$\text{脏器指数} = \text{脏器质量} / \text{体质量}$$

2.12 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察肿瘤组织病理变化

取小鼠的肿瘤组织，用 4%多聚甲醛固定 24~48 h，经过常规脱水、透明和石蜡包埋，切成 4 μm 的连续切片，进行 HE 染色并封片，在光学显微镜下观察肿瘤组织的形态及病理变化。

2.13 ELISA 检测血清中炎症因子水平

实验结束后处死小鼠，采集眼眶静脉血，分离集血清并分装，于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。按照 ELISA 试剂盒说明书测定血清中 TNF- α 和 IL-6 水平。

2.14 免疫组化法检测肿瘤组织中 Ki67、CD68 的表达

将固定后的肿瘤组织常规进行石蜡包埋，切制厚度为 4 μm 的连续切片。切片经二甲苯脱蜡及梯度乙醇复水处理后，置于柠檬酸钠抗原修复液中进行抗原修复。随后加入过氧化物酶封闭液，于室温下孵育 10 min 以阻断内源性过氧化物酶活性，并用即用型正常山羊血清封闭 30 min。分别加入 Ki67 多克隆抗体和 CD68 重组单克隆抗体，在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 湿盒中孵育过夜。切片用 PBS 洗涤后，滴加 Polymer-HRP 羊抗鼠/兔二抗，于室温孵育 1 h；采用 DAB 显色试剂盒进行显色，并用苏木素复染细胞核。切片经梯度乙醇脱水、二甲苯透明处理后，使用中性和树胶封片。显微镜下观察阳性表达呈棕黄色颗粒，用 Image J 软件对阳性面积进行定量分析。

2.15 Western blotting 检测肿瘤组织 TNF- α /Akt/STAT3 信号轴及凋亡相关蛋白表达

肿瘤组织剪碎后加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液，在冰浴条件下匀浆裂解，随后以 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min，取上清液。采用 BCA 法测定蛋白浓度，按等量蛋白原则取样，加入样品缓冲液后，于 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 煮沸 5 min 使蛋白变性。

蛋白样品经 10%~12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,置于含 5%脱脂奶粉的 TBST 溶液中,室温封闭 1 h;分别加入 TNF- α 、Akt、p-Akt、STAT3、p-STAT3、Bcl-2 及 β -actin 一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗膜后加入 HRP 标记的二抗,室温孵育 1 h,采用 ECL 化学发光法显色并成像。利用 Image J 软件分析条带灰度值,以 β -actin 作为内参,计算目的蛋白的相对表达量。

2.16 统计学分析

所有数据均通过 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。

3 结果

3.1 SYQ 入血原型成分的分析与鉴定

通过 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 在正、负离子模式下分析 SYQ、空白血清和含药血清的成分,其总离子流图如图 1 所示。

3.1.1 SYQ 化学成分解析 通过与自建数据库对比并结合文献鉴定出 107 种化合物,并对其结构类型进行分析。根据化学结构特征,这些成分主要包

括黄酮类(如芦丁、橘皮素、山柰酚及其糖苷、槲皮素糖苷等),苯丙素及酚酸类(如阿魏酸、肉桂酸、香豆酸),核苷类(如鸟苷、鸟嘌呤),氨基酸类(如苯丙氨酸、亮氨酸、缬氨酸),有机酸类(如柠檬酸、苹果酸、琥珀酸),环烯醚萜类(如栀子苷),糖类及其他小分子衍生物。各类成分的鉴定结果见表 1。

3.1.2 入血原型成分筛选与鉴定 为进一步明确 SYQ 在体内发挥作用的直接活性成分,对含药血清进行成分筛选分析。筛选标准为化合物需同时存在于醇提物与含药血清中,且在空白血清中未检出。基于一级精确相对分子质量、二级质谱碎片特征,并结合提取物成分库(表 1)进行比对,在含药血清中共鉴定出 19 种入血原型成分(表 2)。结构类型分析显示,入血成分主要包括黄酮类(芦丁、橘皮素、水仙苷)以及苯丙素类和其他苷类化合物(连翘苷 E、达伦苷 B)。上述成分在含药血清中的保留时间与提取物高度一致,并具有相应的准分子离子峰及特征碎片信息,表明 SYQ 中部分黄酮及苯丙素类成分可经胃肠道吸收并以原型形式进入体循环,可能构成其发挥药效的重要物质基础。

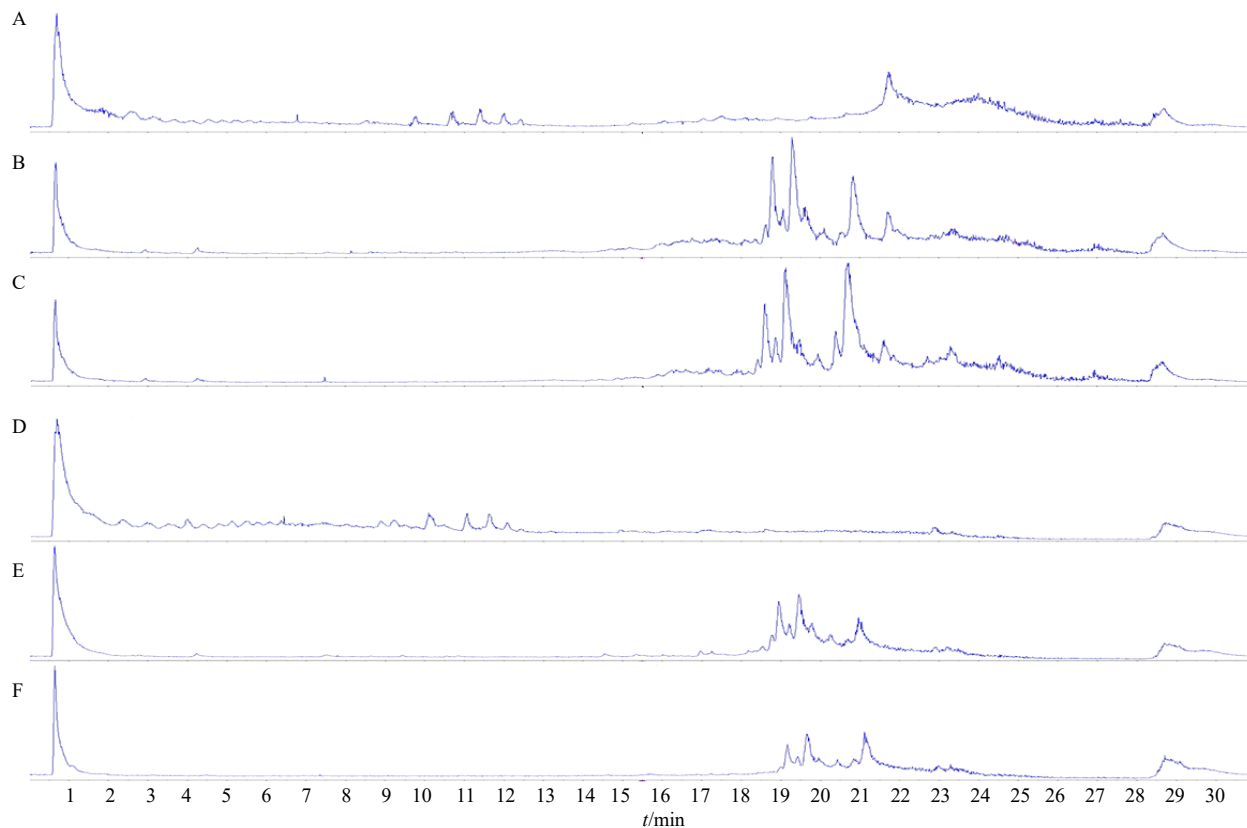


图 1 正 (A~C)、负 (D~F) 离子模式下 SYQ、含药血清、空白血清样品的 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 总离子流图
Fig. 1 Total ion chromatograms of SYQ, medicated serum and blank serum samples in positive (A—C) and negative (D—F) ion modes by UHPLC-Q-TOF-MS/MS

表 1 SYQ 化学成分鉴定
Table 1 Identification of chemical constituents in SYQ

序号	化合物	化学式	加合离子	t_R/min	误差 ($\times 10^{-6}$)	离子碎片 (m/z)
1	鸟苷	$C_{10}H_{13}N_5O_5$	$[M+H]^+$	1.92	0.9	152.056 4
2	苯丙氨酸	$C_9H_{11}NO_2$	$[M+H]^+$	2.54	1.7	103.054 2, 120.080 7
3	圣草酚-7-O-葡萄糖苷	$C_{21}H_{22}O_{11}$	$[M+H]^+$	4.59	0.2	135.041 3, 139.035 7, 111.042 2, 123.043 9
4	山柰酚-3-芸香糖苷-4'-葡萄糖苷	$C_{33}H_{40}O_{20}$	$[M+H]^+$	8.80	0.9	287.055 7
5	槲皮素-3-O-葡萄糖苷-7-O-鼠李糖苷	$C_{27}H_{30}O_{16}$	$[M+H]^+$	8.72	0.2	303.049 9
6	东方蓼黄素	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$[M+H]^+$	9.67	-0.5	287.054 9
7	异东方蓼黄素	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$[M+H]^+$	9.67	-0.5	287.054 9
8	刺槐素	$C_{33}H_{40}O_{19}$	$[M+H]^+$	8.44	-0.6	287.054 2
9	芦丁	$C_{27}H_{30}O_{16}$	$[M+H]^+$	8.72	0.2	303.049 9
10	异槲皮苷	$C_{21}H_{20}O_{12}$	$[M+H]^+$	9.03	-0.1	303.050 9
11	异鼠李素-3-芸香糖苷	$C_{28}H_{32}O_{16}$	$[M+H]^+$	9.91	-0.4	317.065 3
12	木犀草素-7-O-葡萄糖苷	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$[M+H]^+$	9.67	-0.5	287.054 9
13	槲皮素-3-O-葡萄糖苷	$C_{21}H_{20}O_{12}$	$[M+H]^+$	9.03	-0.1	303.050 9
14	根皮苷	$C_{21}H_{24}O_{10}$	$[M+H]^+$	5.58	-0.9	139.037 6
15	紫云英苷	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$[M+H]^+$	9.67	-0.5	287.054 9
16	槲皮苷	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$[M+H]^+$	9.67	-0.5	287.054 9
17	木犀草素	$C_{15}H_{10}O_6$	$[M+H]^+$	9.67	0.8	287.053 8
18	山柰酚	$C_{15}H_{10}O_6$	$[M+H]^+$	9.67	0.8	287.053 8
19	槲皮素-3-鼠李糖苷-7-葡萄糖苷	$C_{27}H_{30}O_{16}$	$[M+H]^+$	8.72	0.2	303.049 9
20	胡芦巴碱	$C_7H_7NO_2$	$[M+H]^+$	0.74	0.5	92.049 4, 138.055 1, 94.064 9
21	洋蓟素	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$[M+H]^+$	9.67	-0.5	287.054 9
22	山柰酚-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$[M+H]^+$	9.67	-0.5	287.054 9
23	亮氨酸苷	$C_{26}H_{28}O_{15}$	$[M+H]^+$	9.27	0.9	287.055 0
24	烟酸	$C_6H_5NO_2$	$[M+H]^+$	1.06	-0.7	80.050 0, 78.034 4, 124.039 4
25	槲皮素-7-鼠李糖苷	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$[M+H]^+$	9.67	-0.5	287.054 9
26	4'-O-葡萄糖基牡荆素	$C_{27}H_{30}O_{15}$	$[M+H]^+$	9.66	0.7	287.055 3
27	苯乙酮	C_8H_8O	$[M+H]^+$	1.30	0.1	77.038 8
28	小檗碱	$C_{20}H_{18}NO_4$	$[M+H]^+$	0.80	-0.5	58.064 6
29	山茶苷 B	$C_{32}H_{38}O_{19}$	$[M+H]^+$	8.80	0.9	317.065 3
30	非瑟酮	$C_{15}H_{10}O_6$	$[M+H]^+$	9.67	0.8	287.053 8
31	L-亮氨酸	$C_6H_{13}NO_2$	$[M+H]^+$	1.44	1.0	86.095 6, 69.069 1
32	忍冬苷	$C_{27}H_{30}O_{15}$	$[M+H]^+$	9.66	0.7	287.055 3, 449.108 6
33	L-苯丙氨酸	$C_9H_{11}NO_2$	$[M+H]^+$	2.54	0.7	103.054 2, 120.080 7
34	L-酪氨酸	$C_9H_{11}NO_3$	$[M+H]^+$	1.29	0.2	91.054 3
35	L-缬氨酸	$C_5H_{11}NO_2$	$[M+H]^+$	0.80	-0.5	58.064 6, 55.053 7, 72.080 0
36	水仙苷	$C_{28}H_{32}O_{16}$	$[M+H]^+$	9.91	-0.4	317.065 3
37	烟酰胺	$C_6H_6N_2O$	$[M+H]^+$	1.08	-0.7	80.050 4, 78.033 4, 123.056 4
38	紫花前胡苷	$C_{20}H_{24}O_9$	$[M+H]^+$	5.75	0.9	213.074 4, 151.036 0, 151.043 5, 177.053 3
39	黄芩素	$C_{15}H_{10}O_6$	$[M+H]^+$	9.67	0.8	287.053 8
40	补骨脂素	$C_{20}H_{20}O_4$	$[M+H]^+$	6.82	-10.0	191.082 4, 147.088 1
41	4-甲氧基肉桂酸乙酯	$C_{12}H_{14}O_3$	$[M+H]^+$	8.37	0.1	161.096 5, 77.038 1, 79.052 2
42	罗汉果苷	$C_{33}H_{40}O_{19}$	$[M+H]^+$	8.44	-0.6	287.054 2, 433.110 6
43	鸟嘌呤	$C_5H_5N_5O$	$[M+H]^+$	1.92	-0.3	135.0278, 110.0332, 152.063 4
44	高藜芦酸	$C_{10}H_{12}O_4$	$[M+H]^+$	5.67	3.8	114.939 0, 151.032 0, 151.047 6, 169.134 0
45	金丝桃苷	$C_{21}H_{20}O_{12}$	$[M+H]^+$	9.03	-0.1	303.050 9
46	异补骨脂素	$C_{20}H_{20}O_4$	$[M+H]^+$	6.83	-10.0	191.082 4, 147.088 1
47	异鸟苷	$C_{10}H_{13}N_5O_5$	$[M+H]^+$	1.92	0.9	152.056 4, 135.029 8, 34.451 0
48	杨梅苷	$C_{21}H_{20}O_{12}$	$[M+H]^+$	9.03	-0.1	303.050 9
49	苔色酸乙酯	$C_{10}H_{12}O_4$	$[M+H]^+$	5.67	3.8	114.939 0
50	三叶苷	$C_{21}H_{24}O_{10}$	$[M+H]^+$	5.58	-0.9	139.037 6, 275.089 8
51	芹菜素	$C_{15}H_{10}O_5$	$[M+H]^+$	6.74	0.5	137.056 4
52	高良姜素	$C_{15}H_{10}O_5$	$[M+H]^+$	6.74	0.5	137.056 4, 137.063 6

表 1 (续)

序号	化合物	化学式	加合离子	t_R/min	误差 ($\times 10^{-6}$)	离子碎片 (m/z)
53	染料木素	$C_{15}H_{10}O_5$	$[M+H]^+$	6.74	0.5	137.056 4, 137.063 6
54	橘皮素	$C_{20}H_{20}O_7$	$[M+H]^+$	6.74	0.1	239.073 9
55	阿魏酸	$C_{10}H_{10}O_4$	$[M-H]^-$	2.08	-0.1	95.070 6, 125.070 8, 134.891 2
56	梔子苷	$C_{17}H_{24}O_{11}$	$[M-H]^-$	4.34	-5.0	169.050 3, 243.085 7
57	乙酰香兰素	$C_{10}H_{10}O_4$	$[M-H]^-$	2.08	2.1	195.070 6, 125.070 8, 134.891 2
58	肉桂酸	$C_9H_8O_2$	$[M-H]^-$	2.54	1.7	103.054 2, 120.080 7
59	獐牙菜苷	$C_{16}H_{22}O_9$	$[M-H]^-$	3.75	0.7	147.041 9
60	断氧化马钱子苷	$C_{17}H_{24}O_{11}$	$[M-H]^-$	4.34	-5.0	169.050 3, 243.085 7
61	甘露糖	$C_6H_{12}O_6$	$[M-H]^-$	0.72	0.8	59.014 9
62	葡萄糖酸	$C_6H_{12}O_7$	$[M-H]^-$	0.73	0.5	75.009 5
63	粘酸	$C_6H_{10}O_8$	$[M-H]^-$	0.73	0	71.012 8
64	奎宁酸	$C_7H_{12}O_6$	$[M-H]^-$	0.76	-0.2	191.055 9
65	苹果酸	$C_4H_6O_5$	$[M-H]^-$	0.84	-0.5	71.013 5
66	乌头酸	$C_6H_6O_6$	$[M-H]^-$	1.27	-0.9	96.961 5
67	柠檬酸	$C_6H_8O_7$	$[M-H]^-$	1.26	0.7	87.009 0
68	琥珀酸	$C_4H_6O_4$	$[M-H]^-$	1.60	-0.3	73.027 8
69	原儿茶醛	$C_7H_6O_3$	$[M-H]^-$	4.79	0.4	93.035 2
70	原花青素 B ₁	$C_{30}H_{26}O_{12}$	$[M-H]^-$	5.11	2.6	289.069 9, 407.074 6
71	4-羟基苯甲酸	$C_7H_6O_3$	$[M-H]^-$	4.79	0.4	93.035 2
72	原花青素 B ₂	$C_{30}H_{26}O_{12}$	$[M-H]^-$	5.11	2.6	289.069 9, 407.074 6
73	3-O-阿魏酰奎宁酸	$C_{17}H_{20}O_9$	$[M-H]^-$	0.70	4.4	367.104 4
74	4-羟基苯甲醛	$C_7H_6O_2$	$[M-H]^-$	6.27	0	121.030 2
75	桑皮苷 A	$C_{26}H_{32}O_{14}$	$[M-H]^-$	6.92	0.8	243.064 8, 567.173 7
76	山梔苷甲酯	$C_{17}H_{26}O_{11}$	$[M-H]^-$	4.91	1.7	79.071 1
77	香豆酸	$C_9H_8O_3$	$[M-H]^-$	7.89	-0.2	119.046 6
78	杨梅素-3-O-芸香糖苷	$C_{27}H_{30}O_{17}$	$[M-H]^-$	9.20	1.4	625.147 9
79	N-乙酰苯丙氨酸	$C_{11}H_{13}NO_3$	$[M-H]^-$	8.35	0.9	85.931 1, 91.053 9
80	杨梅素-3-O-半乳糖苷	$C_{21}H_{20}O_{13}$	$[M-H]^-$	9.53	3.9	299.016 9, 479.099 7
81	达伦苷 B	$C_{21}H_{32}O_{12}$	$[M-H]^-$	8.87	2.1	163.061 0
82	水杨酸	$C_7H_6O_3$	$[M-H]^-$	4.79	0.4	93.035 2
83	富马酸	$C_4H_4O_4$	$[M-H]^-$	0.84	0.1	71.013 4
84	马来酸	$C_4H_4O_4$	$[M-H]^-$	0.84	0.1	71.013 4
85	对羟基苯甲醛	$C_7H_6O_2$	$[M-H]^-$	6.27	0	121.030 2
86	对羟基肉桂酸	$C_9H_8O_3$	$[M-H]^-$	7.89	-0.2	119.046 6
87	8-O-乙酰山梔苷甲酯	$C_{19}H_{28}O_{12}$	$[M-H]^-$	6.90	0.2	401.149 3
88	连翘苷 E	$C_{20}H_{30}O_{12}$	$[M-H]^-$	7.52	1.8	415.163 1
89	银杏内酯 J	$C_{20}H_{24}O_{10}$	$[M-H]^-$	2.33	0.7	422.972 6
90	王不留行黄酮苷	$C_{32}H_{38}O_{19}$	$[M-H]^-$	9.27	2.5	725.192 5
91	芍药苷	$C_{20}H_{28}O_{12}$	$[M-H]^-$	6.09	0.6	459.155 9
92	白芍苷	$C_{23}H_{28}O_{11}$	$[M-H]^-$	2.73	6.9	479.154 5
93	莪术醇	$C_{15}H_{22}O_2$	$[M-H]^-$	19.53	1.7	233.154 1
94	D(-)-水杨苷	$C_{13}H_{18}O_7$	$[M-H]^-$	5.23	0.1	59.013 6
95	苔黑酚龙胆二糖苷	$C_{19}H_{28}O_{12}$	$[M-H]^-$	6.90	0.2	401.149 3
96	桑皮酮	$C_{25}H_{26}O_6$	$[M-H]^-$	7.38	-2.1	255.091 4
97	花旗松素-7-鼠李糖苷	$C_{21}H_{22}O_{11}$	$[M-H]^-$	8.70	1.0	269.044 9
98	8-O-乙酰哈帕苷	$C_{17}H_{26}O_{11}$	$[M-H]^-$	4.91	1.7	179.071 1
99	大豆苷	$C_{21}H_{20}O_9$	$[M-H]^-$	5.39	11.0	209.065 2
100	L-色氨酸	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	$[M-H]^-$	4.08	1.3	116.049 0
101	芹糖葡萄糖基-4-羟基苯甲酸酯	$C_{18}H_{24}O_{12}$	$[M+HCOO]^-$	3.70	3.1	137.025 0
102	甘蔗苷 C	$C_{19}H_{26}O_{13}$	$[M+HCOO]^-$	3.99	2.2	167.035 6
103	儿茶素	$C_{15}H_{14}O_6$	$[M+HCOO]^-$	5.56	4.0	289.069 1
104	表儿茶素	$C_{15}H_{14}O_6$	$[M+HCOO]^-$	5.56	4.0	289.069 1
105	虎杖苷	$C_{20}H_{22}O_8$	$[M+HCOO]^-$	9.00	2.4	227.072 6
106	算盘子苷 D	$C_{19}H_{30}O_8$	$[M+HCOO]^-$	7.39	2.4	179.056 3
107	矢车菊素醇	$C_{15}H_{14}O_6$	$[M+HCOO]^-$	5.56	4.0	289.069 1

表 2 SYQ 入血成分鉴定结果

Table 2 Identification of serum absorbed components of SYQ

序号	化合物	化学式	加合离子	tr/min	误差 ($\times 10^{-6}$)	离子碎片(m/z)
1	鸟苷	C ₅ H ₄ N ₄ O ₂	[M+H] ⁺	1.92	-0.1	136.013 4, 136.036 0
2	苯丙氨酸	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M+H] ⁺	2.54	0.6	95.048 0, 77.037 9, 91.053 0
3	圣草酚-7-O-葡萄糖苷	C ₂₀ H ₂₄ O ₆	[M+H] ⁺	4.59	8.0	122.973 2, 211.027 1
4	山柰酚-3-芸香糖苷-4'-葡萄糖苷	C ₁₈ H ₂₈ O ₄	[M+H] ⁺	8.80	-4.1	135.000 0, 309.197 2
5	槲皮素-3-O-葡萄糖苷-7-O-鼠李糖苷	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	[M+H] ⁺	8.72	1.2	133.062 2, 149.021 5
6	东方蓼黄素	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	[M+H] ⁺	9.67	0.3	80.048 7, 53.037 5, 78.031 6
7	异东方蓼黄素	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	[M+H] ⁺	9.67	6.6	359.153 0, 197.008 1, 204.979 0, 341.178 6
8	刺槐素	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	[M+H] ⁺	8.44	12.8	281.049 6, 207.030 7
9	芦丁	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	[M+H] ⁺	8.72	-1.7	121.065 6, 149.054 6, 165.049 0, 259.093 8, 259.112 0
10	异槲皮苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	[M+H] ⁺	9.03	12.8	281.049 6, 207.030 7
11	异鼠李素-3-芸香糖苷	C ₃₂ H ₅₀ O ₅	[M+H] ⁺	9.91	3.8	403.203 4
12	木犀草素-7-O-葡萄糖苷	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₀	[M+H] ⁺	9.67	-13.1	453.165 6
13	槲皮素-3-O-葡萄糖苷	C ₃₂ H ₅₀ O ₅	[M+H] ⁺	9.03	3.8	403.203 4
14	根皮苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	[M+H] ⁺	5.58	11.1	355.067 2
15	紫云英苷	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	[M+H] ⁺	9.67	-12.2	781.482 7, 781.449 8
16	槲皮苷	C ₂₁ H ₃₂ O ₁₂	[M+H] ⁺	9.67	-2.7	385.180 2, 341.197 3, 475.183 7
17	木犀草素	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₂	[M+H] ⁺	9.67	5.5	153.000 0, 281.263 4, 461.171 5
18	山柰酚	C ₂₄ H ₂₈ O ₇	[M+H] ⁺	9.67	0.5	369.170 0, 287.152 1, 337.188 6
19	槲皮素-3-鼠李糖苷-7-葡萄糖苷	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	[M+H] ⁺	8.72	6.7	291.106 9

3.2 SYQ 含药血清对 4T1 细胞增殖的影响

如图 2-A 所示, 与对照组比较, SYQ 含药血清对 4T1 细胞的增殖有抑制作用, 呈剂量相关性, 其中 15%、20%含药血清的抑制效果尤为显著 ($P < 0.01$), 表明 SYQ 能够抑制乳腺癌细胞的生长。

3.3 SYQ 含药血清对 4T1 细胞克隆形成的影响

如图 2-B 所示, 与对照组比较, 5%、10%、15% SYQ 含药血清组的细胞克隆数量明显减少 ($P < 0.01$ 、 0.001), 呈剂量相关性, 表明 SYQ 能够有效抑制肿瘤细胞的克隆形成能力。

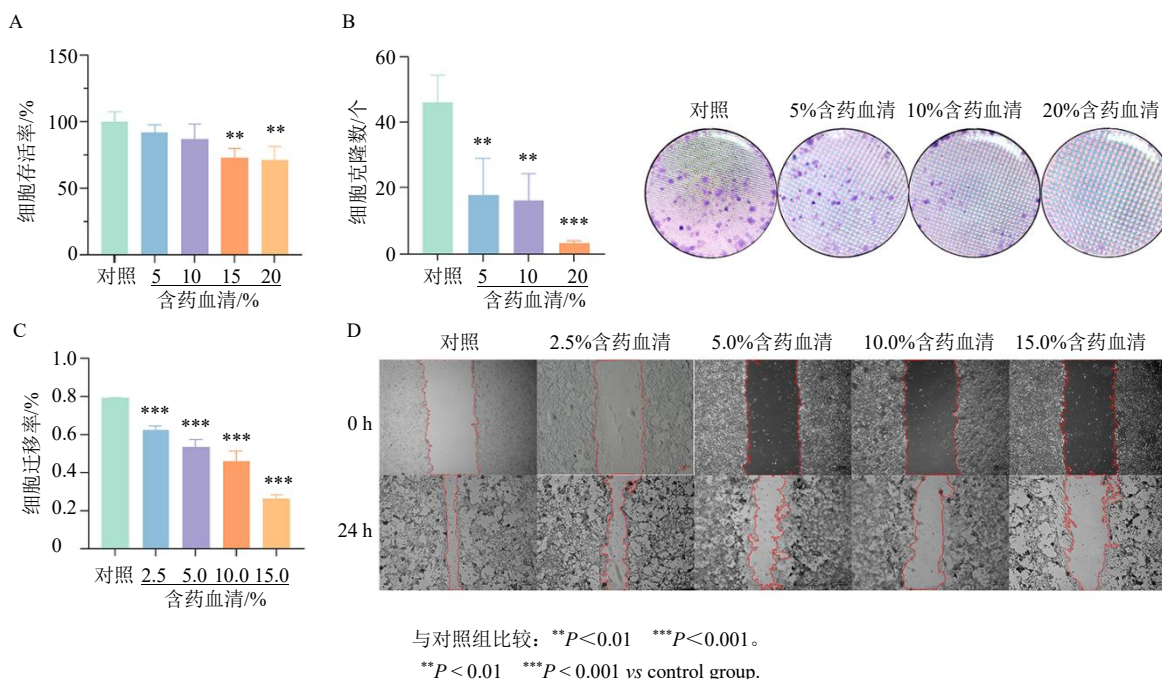


图 2 SYQ 含药血清对 4T1 细胞增殖 (A)、克隆形成 (B) 及迁移能力 (C、D, $\times 100$) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
 Fig. 2 Effect of SYQ drug-containing serum on proliferation (A), colony formation (B) and migration ability (C, D, $\times 100$) of 4T1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 SYQ 含药血清对 4T1 细胞迁移能力的影响

如图 2-C、D 所示，对照组细胞在 24 h 内迁移愈合明显，经过 2.5%、5%、10%、15% SYQ 含药血清处理后，细胞迁移能力明显受到抑制 ($P < 0.001$)，划痕闭合速度显著减慢，表明 SYQ 能够有效抑制乳腺癌细胞的迁移能力。

以上结果表明，SYQ 含药血清在 5%~20% 体积分数范围内均表现出显著的体外抗肿瘤活性。上述体外实验表型为后续利用体内动物模型深入探讨 SYQ 对肿瘤生长抑制的作用机制奠定了坚实的实验基础。

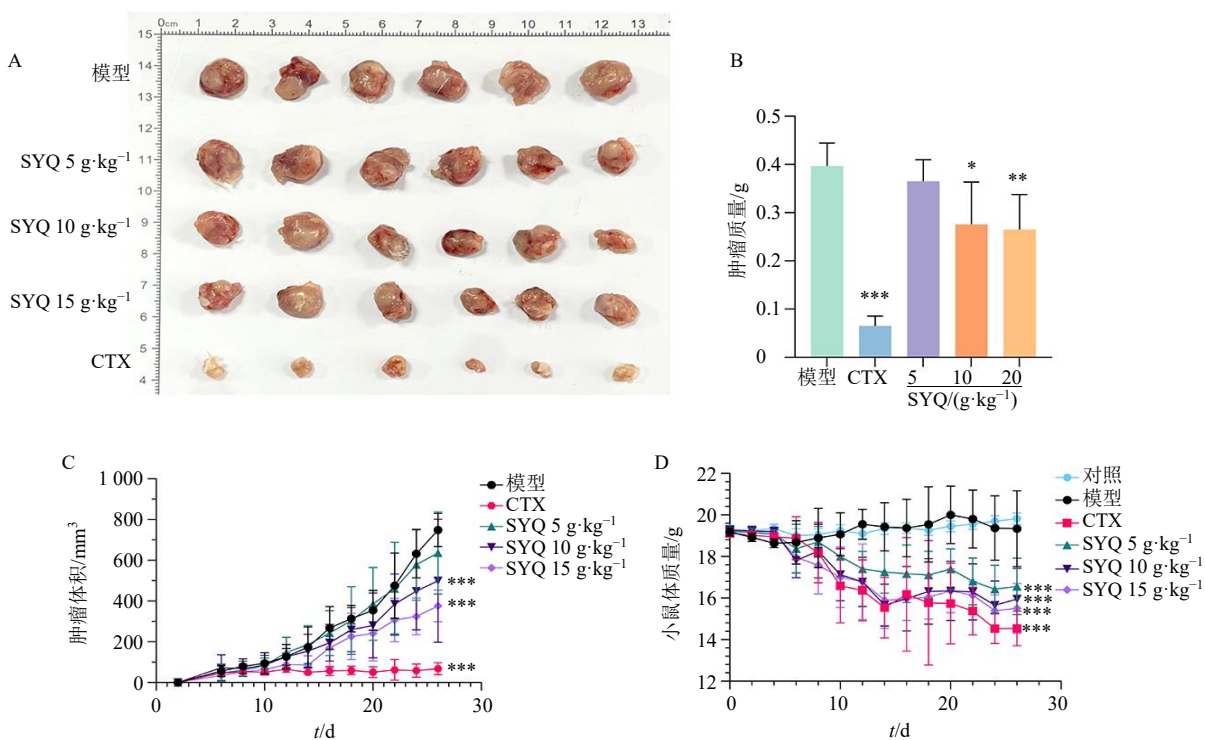
3.5 SYQ 对荷瘤小鼠肿瘤生长的抑制作用

如图 3-A~C 所示，模型组小鼠肿瘤体积随时间显著增大，实验终点时平均肿瘤质量最大。CTX 组表现出显著的抗肿瘤作用，肿瘤体积增长基本停滞 ($P < 0.001$)，最终肿瘤质量显著低于模型组 ($P < 0.001$)，抑瘤率达 81.45%。SYQ 各剂量组在连续给药 12 d 后逐渐显示出抑制肿瘤生长的趋势。与模型

组相比，SYQ 中、高剂量组终末肿瘤体积显著减小 ($P < 0.001$)，肿瘤质量明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。SYQ 低、中、高剂量组的抑瘤率分别为 6.02%、20.37% 和 25.95%。结果提示，SYQ 对 4T1 乳腺癌在体内的生长具有一定抑制作用，并呈剂量相关性。

3.6 SYQ 对荷瘤小鼠一般状态及体质量的影响

在一般状态观察期间，对照组小鼠状态良好，饮食和活动正常。随着肿瘤负荷增加，模型组小鼠逐渐出现精神萎靡等表现。CTX 组表现出明显的毒性反应，表现为食欲下降导致的消瘦。相比之下，SYQ 各剂量组整体状态明显优于模型组与 CTX 组，未见严重衰竭。如图 3-D 所示，对照组体质量稳步增加；模型组体质量波动较小，推测是由于肿瘤组织增大掩盖了恶病质引起的机体消耗。CTX 组在给药早期即出现体质量持续大幅下降 ($P < 0.001$)。SYQ 各剂量组体质量也显著低于模型组 ($P < 0.001$)，可能是由于高浓度药物对胃肠道的潜在刺激，但整体安全性优于 CTX。



A-各组小鼠离体肿瘤代表性图片；B-各组小鼠肿瘤质量；C-各组小鼠肿瘤体积生长曲线；D-各组小鼠体质量变化；与对照组比较：#### $P < 0.001$ ；与模型组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ ，下同。

A- Representative images of isolated tumors from mice in each group; B- Tumor weight of mice in each group; C- Tumor volume growth curves of mice in each group; D: Body weight changes of mice in each group; #### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图 3 SYQ 对荷瘤小鼠肿瘤生长及体质量变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effect of SYQ on tumor growth and body weight changes in tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.7 SYQ对荷瘤小鼠免疫器官指数的影响

如图4所示,与模型组比较,CTX组小鼠的胸腺指数和脾脏指数均显著降低($P < 0.001$),表明化疗药物可引起免疫器官明显萎缩。SYQ各剂量组小鼠的脾脏指数与模型组相比无显著差异,表明SYQ对脾脏无明显毒性作用。在胸腺指数方面,SYQ低剂量组与模型组差异不显著;但随着剂量的增加,中、高剂量组的胸腺指数出现不同程度的下降($P < 0.05$ 、 0.01)。总体来看,SYQ各剂量组小鼠的免疫器官指数均显著高于CTX组,提示其对免疫器官的损伤较轻,具有较好的安全性。

3.8 SYQ对荷瘤小鼠肿瘤组织病理变化的影响

如图5所示,模型组小鼠的肿瘤组织结构紊乱,肿瘤细胞大量增生,排列极为无序,肿瘤细胞增殖活跃,同时可见其向周围脂肪组织浸润生长。与模

型组相比,各给药组肿瘤组织均出现不同程度的损伤。SYQ低剂量组可见局灶性坏死及核固缩;SYQ中剂量组出现大面积凝固性坏死,高倍镜下可见细胞核溶解或消失;SYQ高剂量组肿瘤组织结构明显松散,巢状结构被破坏,肿瘤细胞数量显著减少;CTX组肿瘤细胞增殖明显受到抑制,核分裂象减少,异型性降低,细胞排列较为疏松。

3.9 SYQ对荷瘤小鼠血清中炎症因子水平的影响

如图6所示,与对照组比较,模型组小鼠血清中TNF- α 和IL-6水平显著升高($P < 0.001$);与模型组比较,各给药组小鼠血清中TNF- α 和IL-6水平显著降低($P < 0.05$ 、 0.001),且呈剂量相关性。

3.10 SYQ对荷瘤小鼠肿瘤组织中关键病理标志物表达的影响

如图7所示,模型组肿瘤组织中Ki67阳性表

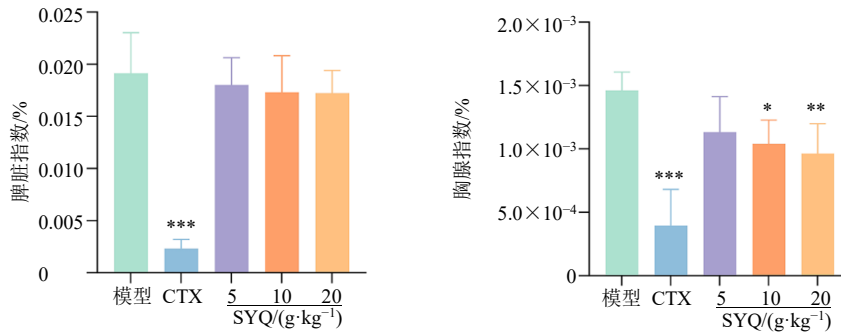


图4 SYQ对荷瘤小鼠免疫器官指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Effect of SYQ on immune organ indices in tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

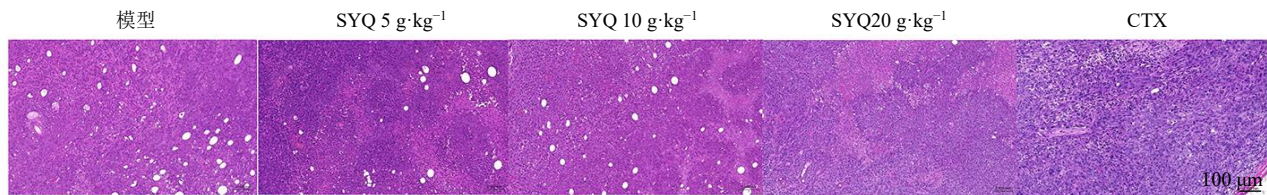


图5 SYQ对荷瘤小鼠肿瘤组织病理变化的影响 (HE, ×200)

Fig. 5 Effect of SYQ on histopathological changes of tumor tissues in tumor-bearing mice (HE, × 200)

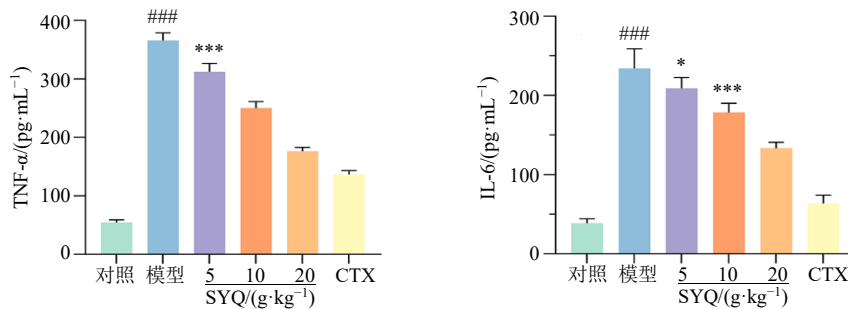


图6 SYQ对荷瘤小鼠血清中TNF- α 和IL-6水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 6 Effect of SYQ on levels of TNF- α and IL-6 in serum of tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

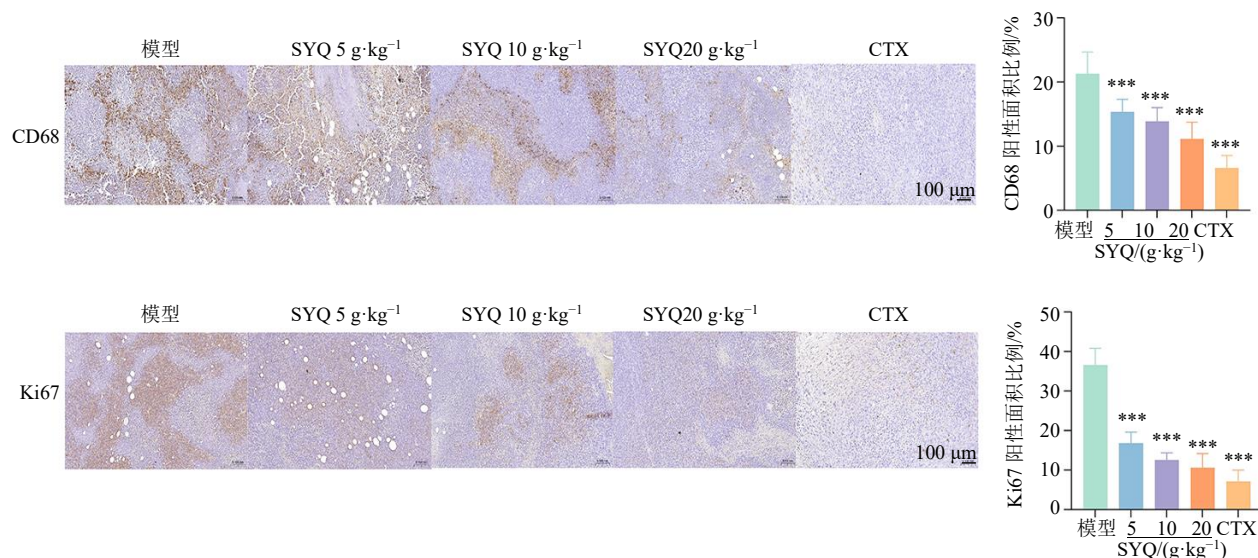


图7 SYQ对荷瘤小鼠肿瘤组织CD68和Ki67表达的影响 (×200; $\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of SYQ on expressions of CD68 and Ki67 in tumor tissues of tumor-bearing mice (× 200; $\bar{x} \pm s, n = 3$)

达较高,且阳性信号呈密集分布,表明肿瘤细胞处于高度活跃的增殖状态;肿瘤间质中大量CD68阳性巨噬细胞浸润,提示肿瘤存在严重的炎症症状。与模型组比较,各给药组Ki67和CD68的阳性表达均显著减少 ($P < 0.001$),且呈剂量相关性。

3.11 SYQ对荷瘤小鼠肿瘤组织TNF-α/Akt/STAT3信号轴及凋亡相关蛋白表达的影响

如图8所示,与对照组比较,模型组小鼠肿瘤组织中TNF-α蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$),表明肿瘤局部存在严重炎症反应;此外,Akt和

STAT3的磷酸化水平显著增加 ($P < 0.001$),抗凋亡蛋白Bcl-2的表达也维持在较高水平 ($P < 0.001$),提示肿瘤细胞具有较强的抗凋亡能力。与模型组比较,SYQ各剂量组TNF-α蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01, 0.001$),p-STAT3/STAT3值显著降低 ($P < 0.05, 0.001$);SYQ中、高剂量组p-Akt/Akt值及Bcl-2蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$),且呈剂量相关性。表明SYQ显著抑制肿瘤组织中TNF-α的表达,且有效抑制Akt/STAT3信号通路的激活,同时减少抗凋亡蛋白Bcl-2的表达。

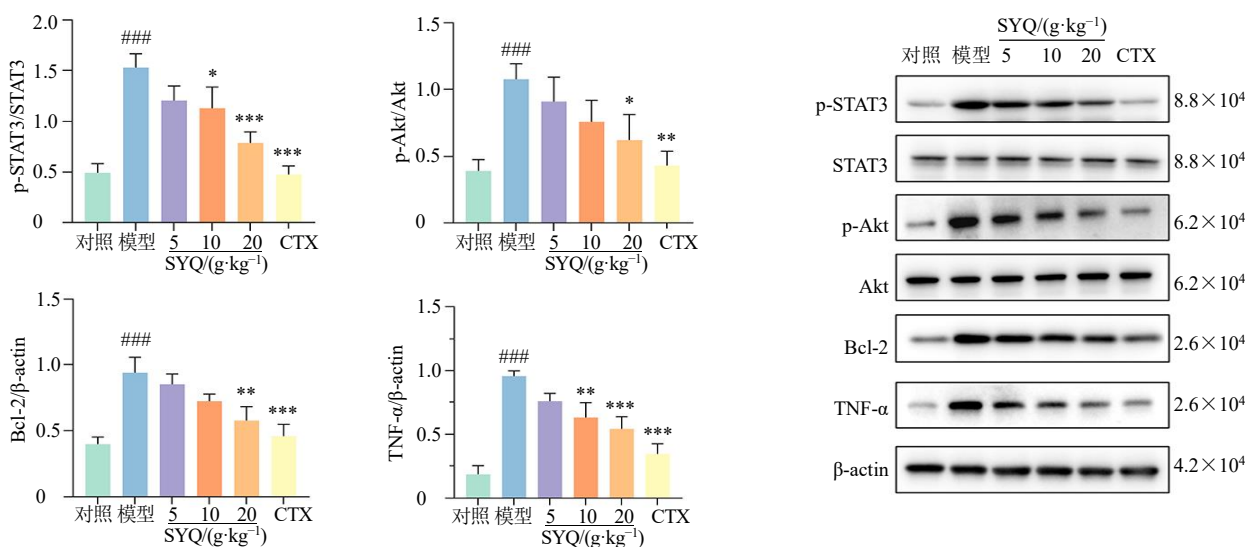


图8 SYQ对荷瘤小鼠肿瘤组织TNF-α/Akt/STAT3信号轴及凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

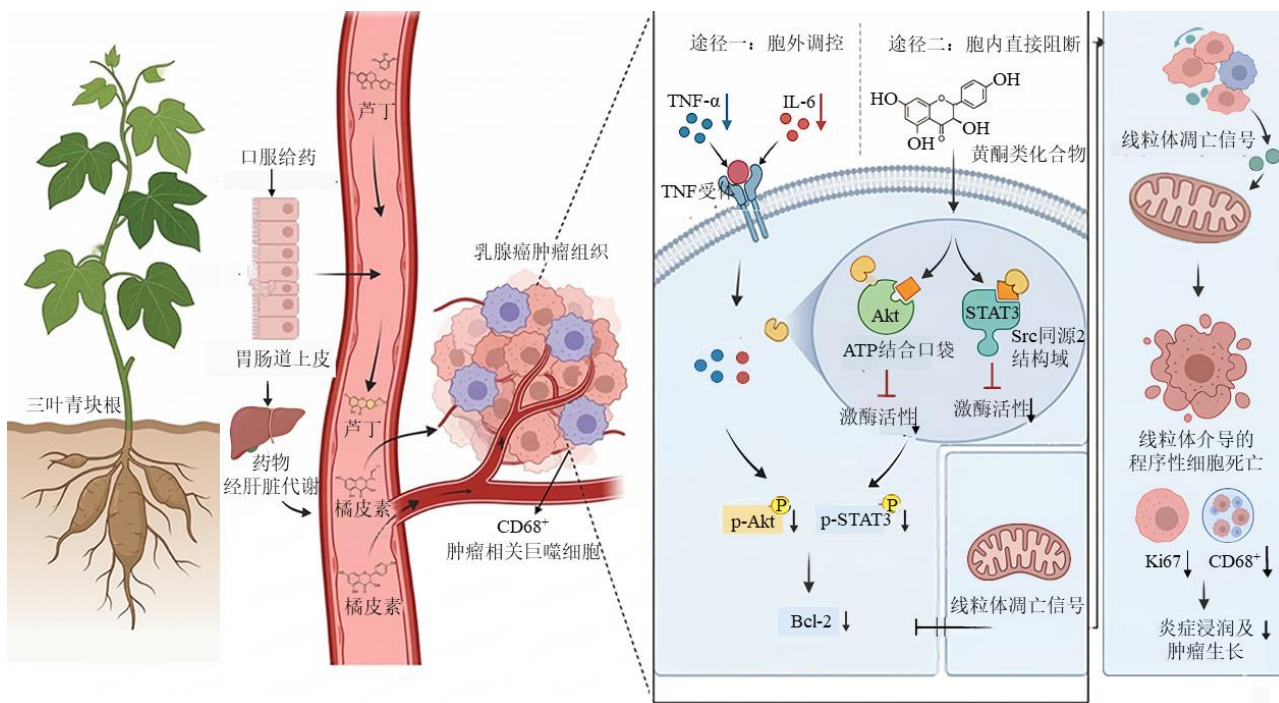
Fig. 8 Effect of SYQ on TNF-α/Akt/STAT3 signaling axis and apoptosis-related protein expressions in tumor tissues of tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

乳腺癌作为全球女性发病率首位的恶性肿瘤，其高复发率和转移性一直是临床治疗的难点^[7]。中医认为，乳腺癌多与“热毒内蕴”和“正气不足”密切相关。“热毒”不仅表现为局部红肿、发热和疼痛等临床症状，在微观层面也可对应 TME 中炎症介质异常积累及免疫监视功能受损^[9-10]。三叶青作

为清热解毒的中药，临床上也常用于肿瘤的辅助治疗，但其抗肿瘤的活性成分及分子调控机制尚未被系统阐明。本研究利用中药血清药物化学和系统生物学的方法，从“活性成分入血-肿瘤微环境调控-关键信号通路干预”的整体角度，系统探讨了 SYQ 治疗 4T1 乳腺癌的作用机制（图 9）。

中药发挥药效的前提是其活性成分能够穿过



图中“↓”及“⊥”标记的关键抗肿瘤表型数据及蛋白表达趋势来源于本研究体内外实验，其余信号级联及入血黄酮成分作用靶点参考既往文献绘制。Key anti-tumor phenotype data and protein expression trends marked with “↓” and “⊥” in figure are derived from *in vitro* and *in vivo* experiments in this study. The other signal cascades and targets of flavonoids entering the bloodstream were plotted based on previous literature.

图 9 SYQ 通过阻断 TNF-α/Akt/STAT3 信号轴抑制乳腺癌进展

Fig. 9 SYQ inhibits breast cancer progression by blocking TNF-α/Akt/STAT3 signaling axis

机体的生物屏障进入血液循环，并达到有效的作用浓度。传统的体外实验通常直接将中药粗提物作用于细胞体系，忽略了药物在胃肠道吸收及肝脏“首过效应”等体内生物转化过程，因此所得结果难以真实反映其体内的药效^[11]。将 SYQ 与含药血清的化学成分谱进行比较，发现两者在成分组成上存在显著差异。UHPLC-Q-TOF-MS/MS 分析结果显示，醇提取物中共鉴定出 107 种化合物，主要包括黄酮类、酚酸类、氨基酸及有机酸等；而含药血清中检测到 19 种入血原型成分，主要包括黄酮类、苯丙素及苷类成分等。该结果表明口服给药后，胃肠道吸收屏障及肝脏首过代谢对中药成分具有显著的筛选和转化作用。部分极性较大、生物利用度较低的成分未能以原型形式进入血液循环。相比之下，芦丁、

橘皮素、连翘苷 E 等成分能够以原型形式进入血液，可能构成三叶青在体内发挥抗肿瘤作用的物质基础。基于此，本研究采用中药血清药物化学方法模拟 SYQ 在体内的实际代谢与转化过程。鉴定出的入血成分在理化性质上表现出一定的互补性，其中相对脂溶性的黄酮类成分有利于跨膜分布，而极性较大的苷类和酚酸类成分则可能更适合参与体循环相关的免疫与炎症调控过程^[12]。这些入血物质与三叶青传统“清热解毒”功效之间存在较为明确的物质基础联系。现代药理学研究表明，中药“清热解毒”作用的微观物质基础主要与富含多羟基结构的黄酮类及酚酸类化合物密切相关，这类成分不仅具备显著的自由基清除能力，还能抑制肿瘤微环境中炎症因子（如 TNF-α、IL-6）的释放^[13]。研究显

示, 芦丁通过调控活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平及脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) /Akt 信号通路, 抑制乳腺癌细胞的增殖并诱导其凋亡^[14]; 橘皮素作为多甲氧基黄酮的代表, 因其较强的亲脂性, 易于穿透细胞膜, 进而抑制 STAT3 等关键促癌信号通路的异常激活, 从而发挥抗肿瘤侵袭的作用^[15]。此外, 苯丙素苷类的代表成分连翘苷 E 表现出显著的抗炎及调节巨噬细胞极化的活性, 能够通过调控炎症级联反应实现免疫调节功能^[16]。综上, 三叶青入血原型成分在结构类型上的多样性及其已报道的抗炎、抗肿瘤活性, 为其“清热解毒”功效提供了坚实的现代药理学支持。通过对这些物质基础的系统分析, 本研究认为三叶青的“凉性”药性主要来源于其丰富的黄酮类和生物碱类成分, 且相关成分已被证实具有显著的抗炎和抗氧化活性, 从现代生物学角度为三叶青“清热凉血”以及抗肿瘤的功​​效提供了合理的科学依据^[17]。大量研究表明, 肿瘤微环境中长期存在的慢性炎症状态是促进乳腺癌发生、发展及转移的重要因素之一, 这一病理特征与中医学“热毒内蕴”致病理论高度契合^[18]。在 TME 中, 炎症反应不仅为肿瘤细胞的存活和增殖提供有利条件, 还能诱导上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT), 从而增强肿瘤细胞的侵袭和转移能力^[19]。本研究发现, 三叶青含药血清能够显著抑制 4T1 细胞的迁移能力, 提示其可能在肿瘤转移级联反应的早期阶段发挥干预作用。体内实验结果也表明, SYQ 能显著发挥“清热”作用, 给药组荷瘤小鼠血清中促炎因子水平明显降低。从组织病理学角度分析, CD68 是肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophages, TAMs) 的特异性标志物, 其在肿瘤间质中的高表达通常意味着严重的炎症浸润和不良预后。结果显示, 模型组肿瘤组织中 CD68 表现为大量棕黄色颗粒沉积, 反映出 TAMs 大量聚集; SYQ 干预能够抑制巨噬细胞的募集及局部炎症反应。TAMs 是 TME 中数量最多的免疫细胞类型之一, 常在肿瘤信号的诱导下向促肿瘤表型转化, 持续分泌炎症因子和生长因子, 从而形成有利于肿瘤生存和发展的炎性微环境^[20-21]。SYQ 通过降低全身炎症水平并抑制局部巨噬细胞的募集, 有效干扰了炎症反应与肿瘤进展之间的相互促进机制, 这一作用也与炎症-癌症共生理理论的经典观点相符^[22-23]。这种对 TME 的调节为后续关键信号通路的抑制奠定了基础。

中药抗肿瘤作用具有多成分、多靶点、多通路协同调控的特点。进一步的分子机制研究表明, SYQ 的抗肿瘤效果与其对 TNF- α /Akt/STAT3 信号轴的调节密切相关。TNF- α 作为炎症级联反应及炎性微环境中的关键启动因子, 其持续高表达通过与受体结合异常激活 PI3K/Akt 和酪氨酸激酶 (Janus kinase, JAK) /STAT3 等促癌信号通路^[24-25]。Akt 和 STAT3 分别作为调控细胞存活、增殖及凋亡的重要分子节点, 在多种肿瘤类型中表现出持续活化状态。研究表明, Akt 与 STAT3 及炎症因子之间存在复杂的正向调控网络: 一方面, Akt 的激活可通过哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 通路或直接磷酸化 STAT3 的 Ser727 位点, 增强其转录活性^[26-27]; 另一方面, STAT3 作为转录因子, 不仅能够上调 microRNA-21 以抑制张力蛋白同源物 (phosphatase and tensin homolog, PTEN) 表达, 从而维持 Akt 的持续激活^[28-29], 还可反向诱导 TNF- α 、IL-6 等炎症因子的分泌, 在肿瘤微环境中形成“炎症-生存”恶性正反馈循环^[30-31]。这种相互促进的信号网络被认为是乳腺癌细胞逃避凋亡、维持恶性表型的重要分子基础^[32]。已有研究表明, 三叶青的活性成分能够通过调控 PI3K/Akt 信号通路发挥抗肿瘤作用。何佳奇等^[33]发现, 三叶青总黄酮能够通过上调 PTEN 表达、下调 p-PI3K 和 p-Akt 水平, 增强吉非替尼诱导的细胞凋亡并逆转肺腺癌的耐药性, 表明三叶青可能通过调控 PI3K/Akt/PTEN 信号通路发挥抗肿瘤作用。p-Akt 作为 Akt 的活化形式, 被认为是不良预后的指标之一, 在某些乳腺癌亚型中具有重要的临床意义^[34]。Western blotting 结果显示, SYQ 显著降低了肿瘤组织中 TNF- α 蛋白的表达, 同时抑制了 Akt 和 STAT3 的异常磷酸化水平, 并下调了下游抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达。免疫组化结果进一步显示, SYQ 组增殖标志物 Ki67 阳性表达显著降低, 与 Western blotting 结果相互印证, 证实 SYQ 通过阻断 Akt/STAT3 通路, 最终有效抑制了肿瘤细胞的恶性增殖。同时, 下游抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达也明显减少。上述发现与 Chen 等^[35]的研究结果一致, 其研究表明三叶青醋酸乙酯提取物可在肝癌细胞 HepG2 和 SMMC-7721 中通过调控半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cystein-aspartate protease-3, Caspase-3) 的表达, 显著抑制细胞增殖并诱导细胞凋亡, 进一步提示 SYQ 可能通过“下调 Bcl-2、激活 Caspase-

3”的双向调控机制启动线粒体介导的凋亡程序。通过深入探讨其调控机制,发现SYQ的作用并非单一靶点效应,而是可能同时具备“上游环境间接抑制”与“下游激酶直接阻断”的协同调控模式^[36]。具体而言,一方面SYQ显著降低全身及肿瘤局部的TNF- α 和IL-6水平,减弱胞外炎症因子对膜受体的持续激活,导致Akt和STAT3的磷酸化信号因上游刺激减弱而逐步衰减^[37];另一方面,三叶青中入血的黄酮类及苷类成分(如芦丁、橘皮素)具备良好的跨膜能力,能够进入细胞内并与Akt的三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)结合口袋或STAT3的SH2结构域结合,从而直接抑制其异常激活^[38]。此种既降低炎症微环境刺激又直接干预细胞内激酶活性的双重调控机制,有助于破坏肿瘤依赖的“炎症-生存”正反馈回路。该信号通路受抑制后,肿瘤细胞内抗凋亡信号显著下调,最终诱导线粒体途径介导的程序性细胞死亡^[39-41]。

综上,本研究表明SYQ能够通过其多种活性成分的协同作用发挥抗乳腺癌效果。在TME层面,通过降低全身及局部的炎症反应,改善肿瘤的“炎性土壤”,体现了“清热”的作用。在细胞分子层面,其展现出对TNF- α /Akt/STAT3信号轴的多节点协同阻断优势:一方面通过下调微环境中TNF- α 的释放,减弱促生存信号的传导;另一方面同步抑制靶细胞内Akt和STAT3的异常激活,破坏其正反馈调控回路,从而有效削弱肿瘤细胞的抗凋亡能力。本研究从现代生物学视角为中医药“扶正祛邪”理论提供了实验依据。尽管本研究取得了一定的进展,但仍存在若干局限性。鉴于体外实验对含药血清的需求量较大且受动物伦理规范的限制,本研究采用采血量较多的SD大鼠制备含药血清并将其应用于小鼠来源的4T1细胞系。此种跨物种实验设计在一定程度上可能引入异源蛋白等潜在混杂因素,同时种属差异亦可能影响药物代谢产物的谱系及靶点识别的特异性。因此,本研究中体外实验结果主要作为药效物质基础及作用机制探索的初步依据。未来研究拟采用同源小鼠制备含药血清,或设置交叉对照实验(例如小鼠含药血清与大鼠含药血清的平行干预),以进一步提升机制推断的生物学合理性。同时,可引入经典抗肿瘤药物作为阳性对照,以增强实验结果的可比性与可靠性。另外,由于目前对入血成分药效贡献的分析主要基于成分检测结果进行推测,未来将开展代表性单体及其组合的体内

外功能验证实验,以进一步完善“成分-效应”关联的证据链。在分子机制研究方面,可结合CRISPR/Cas9基因编辑技术对关键靶基因(如Akt、STAT3)进行功能验证,并联合单细胞测序技术,从特定细胞亚群(如巨噬细胞)层面系统解析三叶青的调控机制,为其在乳腺癌精准治疗及新药研发中的应用提供更加坚实的实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Nolan E, Lindeman G J, Visvader J E. Deciphering breast cancer: From biology to the clinic [J]. *Cell*, 2023, 186(8): 1708-1728.
- [2] 李萍萍. 中医药治疗乳腺癌述评 [J]. 北京中医药大学学报, 2023, 46(11): 1616-1622.
- [3] Loibl S, André F, Bachelot T, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up [J]. *Ann Oncol*, 2024, 35(2): 159-182.
- [4] 鲍敏, 陈群, 赵森. 中药治疗乳腺癌的药理作用机制和临床应用研究进展 [J]. 中草药, 2025, 56(21): 7983-7994.
- [5] Wu Q Y, Xu X G, Liu H, et al. Efficacy and safety of Huachansu Capsule as adjuvant therapy for breast cancer: A systematic review and Meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 353(Pt B): 120464.
- [6] Zhao M J, Jin C, Xu J W, et al. Polysaccharide from *Tetragymna hemsleyana* Diels et Gilg attenuates Poly(I:C)-induced acute lung injury by preserving epithelial barrier integrity and modulating STING/TBK1-NF- κ B and IRF1-STAT1 signaling [J]. *J Ethnopharmacol*, 2026, 360: 121192.
- [7] 张云飞, 叶春林, 陈信佳. 三叶青黄酮调控 AMPK/mTOR 信号通路介导的线粒体自噬抑制肝癌细胞增殖与侵袭的分子机制研究 [J]. 药物评价研究, 2025, 48(8): 2135-2144.
- [8] Fang Y K, Ning A H, Li S, et al. Polysaccharides extracted from rhizoma pleionis have antitumor properties *in vitro* and in an H22 mouse hepatoma ascites model *in vivo* [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(5): 1386.
- [9] Hanahan D. Hallmarks of cancer: New dimensions [J]. *Cancer Discov*, 2022, 12(1): 31-46.
- [10] Liu J, Wang S, Zhang Y, et al. Traditional Chinese medicine and cancer: History, present situation, and development [J]. *Thorac Cancer*, 2015, 6(5): 561-569.

- [11] Zhang L, Li Z Y, Skrzypczynska K M, *et al.* Single-cell analyses inform mechanisms of myeloid-targeted therapies in colon cancer [J]. *Cell*, 2020, 181(2): 442-459.
- [12] Zhou F M, Lu Y, Sun T, *et al.* Antitumor effects of polysaccharides from *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg via regulation of intestinal flora and enhancing immunomodulatory effects *in vivo* [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1009530.
- [13] Luo W, Huang R F, Tao Y. Bridging traditional knowledge and modern science: A systematic review of *Ampelopsis japonica* with emphasis on novel anti-cancer compounds, polypharmacology and clinical translation potential [J]. *J Ethnopharmacol*, 2026, 356: 120835.
- [14] Nouri Z, Fakhri S, Nouri K, *et al.* Targeting multiple signaling pathways in cancer: The rutin therapeutic approach [J]. *Cancers*, 2020, 12(8): 2276.
- [15] Raza W, Luqman S, Meena A. Prospects of tangeretin as a modulator of cancer targets/pathways [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 161: 105202.
- [16] Wu B X, Yu X C, Li Y L, *et al.* Forsythoside E alleviates liver injury by targeting PKM2 tetramerization to promote macrophage M2 polarization [J]. *Adv Sci*, 2026, 13(6): e14514.
- [17] Zheng W L, Wang H N, Wang X, *et al.* Kaempferol 3-O-rutinoside, a flavone derived from *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg, reduces body temperature through accelerating the elimination of IL-6 and TNF- α in a mouse fever model [J]. *Molecules*, 2024, 29(7): 1641.
- [18] Fernandes Q, Inchakalody V P, Bedhiafi T, *et al.* Chronic inflammation and cancer; the two sides of a coin [J]. *Life Sci*, 2024, 338: 122390.
- [19] Yeung K T, Yang J. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis [J]. *Mol Oncol*, 2017, 11(1): 28-39.
- [20] Jin H, Meng X Y, Feng J W. Mechanisms of tumor-associated macrophages in breast cancer and treatment strategy [J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1560393.
- [21] Lin Y X, Xu J X, Lan H Y. Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: Biological roles and clinical therapeutic applications [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 76.
- [22] Coussens L M, Werb Z. Inflammation and cancer [J]. *Nature*, 2002, 420(6917): 860-867.
- [23] Di Meglio A, Havas J, Pagliuca M, *et al.* A bio-behavioral model of systemic inflammation at breast cancer diagnosis and fatigue of clinical importance 2 years later [J]. *Ann Oncol*, 2024, 35(11): 1048-1060.
- [24] Aggarwal B B, Gupta S C, Kim J H. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey [J]. *Blood*, 2012, 119(3): 651-665.
- [25] Cruceriu D, Baldasici O, Balacescu O, *et al.* The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in breast cancer: Molecular insights and therapeutic approaches [J]. *Cell Oncol*, 2020, 43(1): 1-18.
- [26] Mardiana L, Milanda T, Hadisaputri Y E, *et al.* Anticancer mechanisms of *Poikilospermum suaveolens* root fraction: Ethnopharmacological relevance, signaling pathways, and *in vitro/in silico* studies on MCF-7 cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2026, 361: 121177.
- [27] Yu H, Lee H, Herrmann A, *et al.* Revisiting STAT3 signalling in cancer: New and unexpected biological functions [J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(11): 736-746.
- [28] Samad M A, Ahmad I, Hasan A, *et al.* STAT3 signaling pathway in health and disease [J]. *MedComm*, 2025, 6(4): e70152.
- [29] Ihara S, Kida H, Arase H, *et al.* Inhibitory roles of signal transducer and activator of transcription 3 in antitumor immunity during carcinogen-induced lung tumorigenesis [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(12): 2990-2999.
- [30] Zughairi T A, Suhail M, Tarique M, *et al.* Targeting PI3K/Akt/mTOR pathway by different flavonoids: A cancer chemopreventive approach [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(22): 12455.
- [31] Qin J J, Yan L, Zhang J, *et al.* STAT3 as a potential therapeutic target in triple negative breast cancer: A systematic review [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 195.
- [32] Johnson D E, O'Keefe R A, Grandis J R. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(4): 234-248.
- [33] 何佳奇, 李娟娟, 吕晓皑, 等. 三叶青总黄酮逆转吉非替尼耐药肺腺癌细胞的耐药性 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2021, 26(4): 368-375.
- [34] Kim J Y, Park C S, Jang S K, *et al.* The significance of p-AKT1 as a prognostic marker and therapeutic target in patients with hormone receptor-positive and human epidermal growth factor receptor-2-positive early breast cancer [J]. *J Breast Cancer*, 2022, 25(5): 387.
- [35] Chen S P, Luo M X, Ma L, *et al.* Ethylacetate extract from *Tetrastigma hemsleyanum* inhibits proliferation and

- induces apoptosis in HepG2 and SMMC-7721 cells [J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 10: 3793-3799.
- [36] Xiang Y N, Guo Z M, Zhu P F, *et al.* Traditional Chinese medicine as a cancer treatment: Modern perspectives of ancient but advanced science [J]. *Cancer Med*, 2019, 8(5): 1958-1975.
- [37] Dostert C, Grusdat M, Letellier E, *et al.* The TNF family of ligands and receptors: Communication modules in the immune system and beyond [J]. *Physiol Rev*, 2019, 99(1): 115-160.
- [38] da Silva M F, Lins A A, Gomes M C, *et al.* Anticancer drug discovery from natural compounds targeting PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Curr Med Chem*, 2025, 32(24): 4859-4887.
- [39] Manning B D, Toker A. AKT/PKB signaling: Navigating the network [J]. *Cell*, 2017, 169(3): 381-405.
- [40] Kaneko T, Zhang Z C, Mantellini M G, *et al.* Bcl-2 orchestrates a cross-talk between endothelial and tumor cells that promotes tumor growth [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(20): 9685-9693.
- [41] Czabotar P E, Lessene G, Strasser A, *et al.* Control of apoptosis by the Bcl-2 protein family: Implications for physiology and therapy [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(1): 49-63.

[责任编辑 李亚楠]