

引用:李良,吴华锋,何碧钻,庞良承,覃久芸,童建军,蒋伟哲,付书婕.鸡参芪抗癌颗粒水提物的体内外抗乳腺癌作用[J].中医导报,2025,31(10):8-15.

鸡参芪抗癌颗粒水提物的体内外 抗乳腺癌作用*

李 良^{1,2}, 吴华锋², 何碧钻², 庞良承², 覃久芸², 童建军², 蒋伟哲², 付书婕²

(1.玉林市第一人民医院, 广西 玉林 537000;

2.广西医科大学, 广西 南宁 530021)

[摘要] 目的:探究鸡参芪抗癌颗粒水提物(JSQ)的抗乳腺癌作用及其机制。方法:制备不同浓度的JSQ含药培养基和条件培养基,测定药物作用24、48 h后不同给药浓度对乳腺癌细胞增殖的抑制作用,并计算IC₅₀;检测JSQ对乳腺癌细胞凋亡的影响;通过建立乳腺癌荷瘤小鼠模型,经JSQ治疗后,检测脏器指数、抑瘤率、血清炎症因子和免疫因子以及T细胞亚群占比,观察肿瘤组织病理变化。结果:JSQ在体外实验表现出对乳腺癌细胞的显著抑制活性,且成剂量和时间依赖性,24、48 h的IC₅₀分别为2.976、1.864 mg/mL;经JSQ诱导刺激后的Raw264.7细胞培养上清产生了对乳腺癌细胞活性更强的抑制作用,提示JSQ可能通过作用于巨噬细胞产生的某些物质增强了对肿瘤的杀伤作用;乳腺癌细胞凋亡试验结果表明,JSQ可促进乳腺癌细胞凋亡坏死。体内试验中JSQ能显著抑制乳腺癌小鼠肿瘤的生长,恢复乳腺癌小鼠的体质量,降低肿瘤生长引起的白细胞和淋巴细胞增加,减少炎症反应,提高CD8⁺T细胞比例,恢复小鼠的胸腺指数,减轻肿瘤生长引起的脾脏和肝脏肿大症状,恢复其正常肝功能,同时可增加小鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β)、IL-2、IL-6、 γ 干扰素(INF- γ)的表达,促进肿瘤细胞的凋亡从而抑制肿瘤的生长。结论:JSQ具有一定的抗乳腺癌作用和增强免疫的作用,无明显毒副作用,对免疫系统及肝功能具有一定的保护作用,其抗肿瘤活性可能是通过免疫调节实现的。

[关键词] 鸡参芪抗癌颗粒;乳腺癌;小鼠;乳腺癌细胞;抗肿瘤

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2025)10-0008-08

DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2025.10.002

Study on the Ex Vivo and In Vivo Anti-Breast Cancer Effects of Compound Extracts of Ji Shenqi Anti-Cancer Granules (鸡参芪抗癌颗粒)

LI Liang^{1,2}, WU Huafeng², HE Bizuan², PANG Liangcheng², QIN Jiujuan²,

TONG Jianjun², JIANG Weizhe², FU Shujie²

(1.The First People's Hospital of Yulin, Yulin Guangxi 537000, China;

2.Guangxi Medical University, Nanning Guangxi 530021, China)

[Abstract] Objective: To investigate the anti-tumour activity of Ji Shenqi composite extract (JSQ) on breast cancer and its mechanism of action. Methods: Different concentrations of JSQ-containing medium and conditioned medium were prepared to determine the inhibitory effects of different administered concentrations on the proliferation of breast cancer cells after 24 h and 48h of drug action, and the IC₅₀ was calculated. The effect of JSQ on apoptosis of breast cancer cells was detected. A hormonal mouse model of breast cancer was established, and the breast cancer mice were intervened by JSQ. The organ index, tumour suppression rate, serum inflammatory and immune factors, and percentage of T-cell subpopulations were determined. The histopathological changes of the tumour were observed after treatment with JSQ. Results: JSQ showed significant inhibitory activity against breast cancer cells in vitro, and the effect was dose-dependent and time-dependent. The IC₅₀ of 24 h and 48 h

*基金项目:国家自然科学基金地区基金项目(82460806)

通信作者:蒋伟哲,男,教授,研究方向为中药研究与开发

was 2.976 mg/mL and 1.864 mg/mL respectively. Raw264.7 cell culture supernatants, induced by JSQ, produced a stronger inhibitory effect on the activity of breast cancer cells, suggesting that JSQ may enhance the tumour killing effect by acting on certain substances produced by macrophages. The results of apoptosis assay showed that JSQ promoted apoptotic necrosis of breast cancer cells. JSQ significantly inhibited the growth of tumours in mice with breast cancer in vivo, restored the body weight of mice with breast cancer, reduced the increase of leukocytes and lymphocytes induced by the growth of tumours, decreased inflammatory reactions, increased the proportion of CD8⁺ T cells, restored the thymic index of mice, reduced the symptoms of enlargement of the spleen and the liver induced by the growth of tumours, restored the normal liver function, increased the expression of TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6 and INF- γ , and promoted apoptosis of tumour cells, thus inhibiting the growth of tumours. Conclusion: JSQ has certain anti-breast cancer effects and immune-enhancing effects without obvious toxic side effects, and JSQ has certain protective effects on the immune system as well as on the liver function. Its anti-tumour activity may be achieved through immune modulation.

[Keywords] Ji Shenqi anti-cancer granules; breast cancer; mice; breast cancer cells; anti-tumour effect

国家癌症中心发布的2022年中国恶性肿瘤疾病报告负担情况显示,我国乳腺癌发病人数35.72万,人数排在恶性肿瘤中的第六名。乳腺癌也是全世界妇女癌症死亡的主要原因之一^[1],约20%的乳腺癌患者被诊断为三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)。由于TNBC具有特殊的生物学行为和临床病理特征,转移风险高。尽管在临床实践中辅助化疗药物在患者中取得了一定的疗效,但TNBC的预后仍然很差,死亡风险仍然很高。化疗药物存在免疫抑制、多重有机毒性和多重耐药等诸多缺陷,限制了传统抗肿瘤药的抗肿瘤活性。扶正抗癌中药制剂因其振奋元气和抗癌作用而被广泛用于治疗癌症^[2]。增强先天免疫是最有效的抗肿瘤方法之一,机体免疫能破坏和清除抗原性异物,而且提高免疫力对维持机体健康、抵御疾病、改善癌症患者生活质量以及延长晚期患者寿命具有重要作用^[3-5]。中草药通过抑制肿瘤进展和改善机体的免疫系统来治疗癌症,对免疫调节有良好的作用,能够改善肿瘤微环境。

三阴性乳腺癌是目前乳腺癌治疗中最棘手的一种,死亡率最高、且最容易复发,主要患病人群为绝经前女性。4T1乳腺癌细胞和MDA-MB-231细胞系均属于三阴性乳腺癌细胞。在本研究中,侵袭TNBC MDA-MB-231细胞系已知对多种抗癌药物具有耐药性,因此被选为研究对象^[6],另外联合化疗提供了一种规避化疗药物剂量依赖性不良事件的潜在手段^[7]。传统化疗策略的不良反应推动了天然化合物作为新型治疗药物的开发,并促使人们迫切探索其他抗癌策略^[8]。天然来源的化疗药物显示出潜在的抗癌特性,特别是与乳腺癌的治疗有关^[9]。鸡参芪抗癌扶正方是南宁壮要方中医医院治疗乳腺癌的经验方,该方主要由鸡血藤、黄芪、人参等药材经加減化裁后组成,经临床实践证实本方具有提高免疫力、抗癌扶正作用。课题组前期工作中已经建立了鸡参芪抗癌颗粒的质量标准^[9],拟将其研发成新药。中医学将肿瘤的病因病机归结为邪毒稽留、湿热蕴结、气滞血瘀、正气虚衰。“虚”“毒”“瘀”是该病的3个主要病机环节^[10]。鉴于鸡参芪抗癌颗粒在临床上治疗乳腺癌的显著疗效,本研究选择4T1乳腺癌小鼠模型来评价鸡

参芪抗癌颗粒水提物(JSQ)的体内抗肿瘤活性。人参皂苷是抑制细胞肿瘤转移的主要成分,人参多糖刺激非特异性免疫细胞并激活自然杀伤细胞和巨噬细胞,以保护宿主免受外来抗原和肿瘤生长的侵害,亦可激活巨噬细胞并抑制肿瘤血管生成和转移^[11]。黄芪多糖通过激活巨噬细胞和免疫细胞的免疫调节作用发挥体内和体外的抗肿瘤作用^[12]。黄芪甲苷能够提高CD45磷酸酶的活性并具有抑制促炎细胞因子等免疫调节作用和抗炎活性^[13]。鸡血藤是补血常用药,越来越多临床证据表明鸡血藤及其复方制剂对乳腺癌的治疗具有显著疗效。复方中药制剂具有多靶点多成分作用的特点,可以通过加强细胞免疫和提高机体清除异物能力等途径达到杀伤多种肿瘤细胞的作用^[13]。本研究从JSQ对乳腺癌小鼠体内外的抗肿瘤活性来评估JSQ的抗肿瘤作用,并探讨其机制。

1 材料与仪器

1.1 药物及试剂 鸡血藤饮片(批号:20220701)、人参饮片(批号:20220603)、黄芪饮片(批号:20220610)均购自广西玉林利波中药材购销部,经广西中医药大学谢阳姣研究员鉴定其分别为豆科植物密花豆的干燥藤茎、豆科植物蒙古黄芪的干燥根、五加科植物人参的干燥根和根茎,均为正品。白细胞介素-2(IL-2)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(批号:202401)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELISA试剂盒(批号:202401)、IL-6 ELISA试剂盒(批号:202401)、IL-1 β ELISA试剂盒(批号:202401)、 γ 干扰素(INF- γ)ELISA试剂盒(批号:202401)均购自凡科维;天冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒(批号:20240329)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)试剂盒(批号:20240327)和碱性磷酸酶(ALP)试剂盒(批号:20240325)均购自南京建成生物工程研究所;Gibco RPMI-1640培养基(批号:8823013)、Gibco DMEM培养基(批号:8123342)均购自美国Thermo公司;0.25%胰蛋白酶消化液(批号:20220815)、青-链霉素混合液(批号:20220705)、红细胞裂解液(批号:20220628)均购自北京索莱宝科技有限公司;Gemini胎牛血清(美国Gembio公司,批号:A02-1008);盐酸多柔比星(瀚晖制药有限公司,AMD,批号:21014711);Annexin V-APC/7-

ADD apoptosis kit凋亡试剂盒(联科生物科技有限公司,批号:A310211);流式抗体Anti-Mo FITC-CD3e(批号:2452781)、Anti-Mo APC-CD4(批号:2514153)、Anti-Mo PE-CD8a(批号:2555841)均购自美国赛默飞公司;CCK-8(百赛生物科技有限公司,批号:211104Z01-10)。

1.2 主要仪器 OptiMair超净工作台(ESCO公司);CO₂培养箱(美国Thermo公司);DMi8倒置显微镜(德国Leica公司);DZTW型调温电热套(北京市永光明医疗仪器有限公司);Synergy H1酶标仪(美国Biotek公司)。

1.3 动物和细胞 SPF级BALB/c小鼠,60只,体质量(20±2)g,雌性,5周龄,购自斯贝斯(北京)生物技术有限公司。实验动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0010,实验动物质量合格证号:110324231107296221,实验动物使用许可证号:SCXK桂2020-0004。4T1细胞和MDA-MB-231细胞由广西医科大学科技楼靶向中心实验室赠。

1.4 JSQ的制备 处方量药材共提取3次,第一次加9倍量水浸泡80 min,其余两次均加8倍量水,每次煎煮1 h,过滤合并滤液,减压浓缩至相对密度在1.10~1.20范围,保存于冰箱冷藏,备用。

2 方 法

2.1 CCK-8法评价JSQ、条件培养基对4T1细胞及MDA-MB-231细胞生长的影响 (1)条件培养基(CM)的收集。将鸡参芪干膏粉溶解于不同质量浓度(分别为0.4、0.8、1.0、1.6和3.2 mg/mL)的DMEM中,用0.22 μm微孔滤膜过滤灭菌。将RAW264.7细胞(1×10^5 cell/mL)接种于24孔板,用不同质量浓度的JSQ孵育溶液放置24 h。收集各组上清液,在3 000 r/min下离心10 min(离心半径8.6 cm)。收集不同质量浓度JSQ的巨噬细胞上清液,称为条件培养基,-20℃保存备用。

(2)将对数生长期的4T1细胞(2×10^4 cells/mL)接种在96孔板上(约每孔5 000个细胞)。过夜后,去除原始培养基,加入不同质量浓度的JSQ溶液(0、0.4、0.8、1.0、1.6和3.2 mg/mL)和CM溶液。以RPMI-1640完全培养液作为阴性对照。加药孵育24 h/48 h后,吸弃旧培养基,加入10%的CCK-8,置于培养箱中孵育2 h,酶标仪450 nm测定OD值。

(3)将对数生长期的MDA-MB-231细胞(2×10^4 cells/mL)接种在96孔板上(约每孔5 000个细胞)。过夜后,去除原始培养基,加入不同质量浓度的JSQ溶液(0、0.4、0.8、1.6、3.2和4.0 mg/mL)。以RPMI-1640完全培养液作为阴性对照。加药孵育24 h/48 h后,吸弃旧培养基,加入10%的CCK-8,置于培养箱中孵育2 h,酶标仪450 nm测定OD值。

2.2 细胞凋亡检测 使用Annexin V-APC/7-ADD凋亡试剂盒测定细胞凋亡的程度。将4T1细胞或MDA-MB-231细胞(1×10^6 cell/mL)接种于6孔板中并用JSQ处理48 h。用不含EDTA的胰蛋白酶消化后收集细胞,用PBS洗涤并以1 000 r/min离心5 min(离心半径8.6 cm)。随后,将细胞加入10 μL的Annexin V-APC中,并加入5 μL的7-ADD,并在室温下避光孵育5 min,通过200目不锈钢筛过滤细胞,并通过流式细胞术进行上机测试。

2.3 荷瘤小鼠模型的建立及给药方案 60只小鼠随机分为空白组10只、模型组50只。对模型组小鼠右侧倒数第二对乳腺脂肪垫皮肤部位脱毛,在小鼠脱毛部位皮下注射0.1 mL 4T1乳腺癌细胞(2×10^6 个/mL),48 h后观察接种部位,若有2 mm×2 mm粉红色小突起,即表明4T1乳腺癌荷瘤小鼠造模成功。每隔3 d测量模型小鼠体质量及肿瘤长径和宽径,并计算肿瘤体积。空白组10只正常小鼠在相应部位皮下注射0.1 mL PBS溶液。4T1乳腺癌荷瘤小鼠模型构建成功后,根据小鼠体质量和结节大小,随机分为模型组、预防组、中剂量组、高剂量组和联合用药组,每组10只。中剂量组和高剂量组分别予5.96、11.92 g/kg JSQ灌胃,空白组和模型组予等体积生理盐水灌胃,1次/d;预防组于皮下种瘤当天开始灌胃5.96 g/kg JSQ,1次/d。给药14 d取血后处死小鼠检测相关指标;联合用药组腹腔注射药物ADM(5 mg/kg),1次/周,同时每天灌胃5.96 g/kg JSQ,肿瘤的第34天取血后处死,检测相关指标。给药期间,观察小鼠体质量、精神状态、毛发、行动等一般指征情况,测量肿瘤体积。

2.4 抑瘤率及脏器指数计算 检测肿瘤生长体积和抑瘤率。从给药第1天起,每隔3 d用游标卡尺测量1次荷瘤小鼠的肿瘤长径(a)和短径(b),计算肿瘤体积并绘制肿瘤生长曲线。末次给药24 h后,颈椎脱臼处死小鼠,剥离肿瘤称定质量,计算各给药组抑瘤率。肿瘤体积= $(a \times b^2)/2$ 。抑瘤率= $[1 - (\text{实验组肿瘤平均质量}/\text{模型组肿瘤平均质量})] \times 100\%$ 。其中实验组为经药物干预的组别。末次给药24 h后,颈椎脱臼处死小鼠,摘取小鼠脾脏、胸腺和肝脏,称定质量,计算脏器系数。脏器系数=脏器质量(mg)/体质量(g)。

2.5 血液分析仪检测外周血中白细胞数目及淋巴细胞占比 肿瘤的第34天后,小鼠眼眶取血,置于EDTA抗凝管中,使用全自动血液分析仪测定小鼠外周血中白细胞数目及淋巴细胞占比。

2.6 ELISA法检测血清中细胞因子水平和肝功能指标水平 末次给药24 h后,小鼠摘眼球取血,3 000 r/min离心20 min(离心半径8.6 cm),分离血清,按照ELISA试剂盒说明书检测血清中IL-2、IL-1β、IL-6、TNF-α和IFN-γ表达水平,以及血清AST、ALT和ALP的活力。

2.7 流式细胞术检测外周血中T淋巴细胞的比例 最后1次给药24 h后,小鼠眼眶取血,取50 μL置于流式管中,设置空白管、单染管、样本管。全血中加入红细胞裂解液裂解后,空白管不加抗体、单染管加入相对应的抗体,样本管加入抗体FITC-CD3、APC-CD4、PE-CD8混匀,4℃避光孵育15 min,加入1×Lysing Buffer,4℃避光孵育20 min,1 500 r/min离心5 min(离心半径8.6 cm),弃上清,加入350 μL PBS重悬后,上机检测CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T细胞,并计算CD4⁺/CD8⁺比值。

2.8 组织病理变化 取各组小鼠肿瘤组织放入4%多聚甲醛溶液固定48 h后,脱水、包埋、切片、HE染色、封片,最后于显微镜下观察形态学变化。

2.9 统计学方法 采用SPSS 23.0软件进行统计分析,计量资料用“均数±标准差”($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。使用Graphpad Prism 5.0作图。

3 结果

3.1 JSQ和CM对乳腺癌细胞增殖的影响 与0 mg/mL JSQ比较,随着JSQ质量浓度的递增,对4T1细胞和MDA-MB-231细胞的抑制作用越来越强,具有浓度依赖性,差异有统计学意义($P<0.05$);4T1细胞经药物干预后,给药48 h的抑制率显著大于给药24 h的抑制率,表明对4T1细胞的抑制作用具有时间依赖性。然而在0.4 mg/mL质量浓度时细胞增殖抑制率为负数,但差异无统计学意义($P>0.05$)。对MDA-MB-231细胞来说当质量浓度达到3.2 mg/mL时细胞毒性才呈现出时间依赖性。(见表1~2)

与0 mg/mL JSQ比较,JSQ条件培养基各质量浓度对4T1细胞的抑制作用具有时间依赖性和剂量依赖性,差异有统计学意义($P<0.01$)。条件培养基对4T1细胞的抑制作用均强于JSQ各质量浓度的抑制作用,提示JSQ可能通过刺激巨噬细胞产生某些细胞因子,从而增强对4T1乳腺癌细胞的抑制作用。(见表3)

表1 JSQ 对 4T1 细胞增殖活力的影响 ($n=6$)

质量浓度 /(mg/mL)	24 h		48 h	
	OD值($\bar{x}\pm s$)	抑制率/%	OD值($\bar{x}\pm s$)	抑制率/%
0.0	1.17 \pm 0.246		1.01 \pm 0.067	
0.4	1.12 \pm 0.084	5.07	1.07 \pm 0.049	-6.88
0.8	1.07 \pm 0.175	10.21	0.89 \pm 0.057 ^b	13.64
1.0	1.01 \pm 0.061	15.84	0.84 \pm 0.067 ^b	19.99
1.6	0.98 \pm 0.111 ^a	18.36	0.65 \pm 0.079 ^b	41.75
3.2	0.62 \pm 0.066 ^b	53.89	0.24 \pm 0.018 ^b	90.69

注:与模型组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

表2 JSQ 对 MDA-MB-231 细胞增殖活力的影响 ($n=6$)

质量浓度 /(mg/mL)	24 h		48 h	
	OD值($\bar{x}\pm s$)	抑制率/%	OD值($\bar{x}\pm s$)	抑制率/%
0.0	0.98 \pm 0.044		1.39 \pm 0.180	
0.4	0.98 \pm 0.046	0.16	1.29 \pm 0.315	4.48
0.8	0.96 \pm 0.059	3.00	1.32 \pm 0.069	6.62
1.6	0.74 \pm 0.025 ^b	31.36	1.13 \pm 0.132	22.20
3.2	0.73 \pm 0.025 ^b	32.62	0.97 \pm 0.124 ^a	36.29
4.0	0.63 \pm 0.032 ^b	44.99	0.80 \pm 0.021 ^b	50.41

注:与模型组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

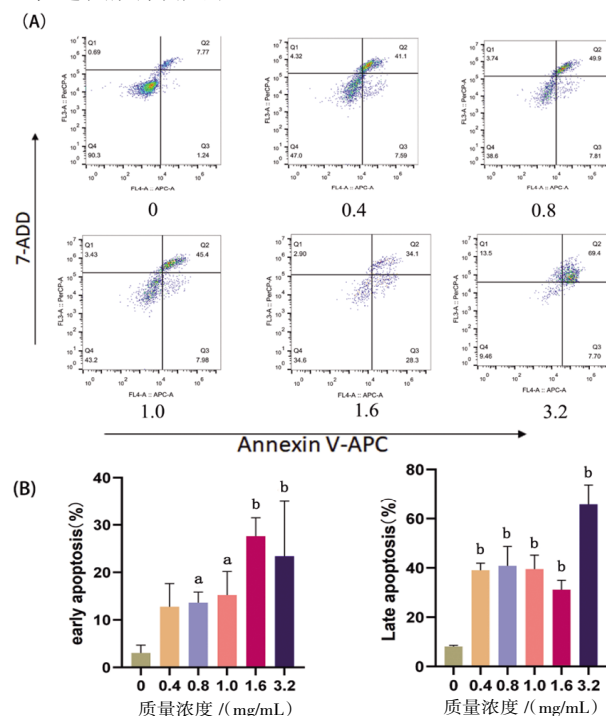
表3 条件培养基(CM)对 4T1 细胞增殖活力的影响 ($n=6$)

质量浓度 /(mg/mL)	24 h		48 h	
	OD值($\bar{x}\pm s$)	抑制率/%	OD值($\bar{x}\pm s$)	抑制率/%
0.0	1.71 \pm 0.617		1.62 \pm 0.836	
0.4	0.93 \pm 0.015 ^b	51.83	0.68 \pm 0.046 ^b	66.68
0.8	0.95 \pm 0.066 ^b	50.98	0.72 \pm 0.057 ^b	63.60
1.0	0.91 \pm 0.102 ^b	53.29	0.75 \pm 0.075 ^b	61.75
1.6	0.81 \pm 0.040 ^b	60.00	0.66 \pm 0.062 ^b	67.91
3.2	0.58 \pm 0.023 ^b	75.41	0.69 \pm 0.199 ^b	65.83

注:与模型组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

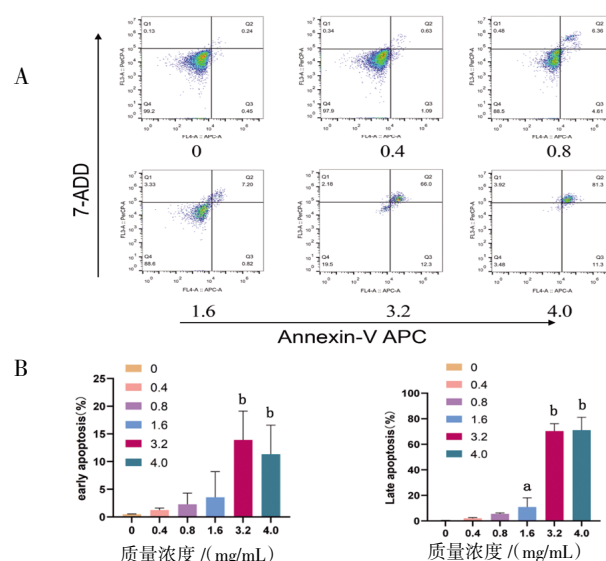
3.2 JSQ对乳腺癌细胞凋亡的影响 JSQ显著促进4T1细胞凋亡,差异有统计学意义($P<0.05$);当剂量为0.8 mg/mL和3.2 mg/mL时,凋亡细胞大部分为晚调;当剂量为1.6 mg/mL时,

凋亡细胞大部分为早调;对照组中的早调和晚调细胞可能是细胞处理过程中对细胞造成了损伤(见图1)。JSQ显著促进MDA-MB-231细胞凋亡,差异有统计学意义($P<0.05$);当剂量为1.6 mg/mL时,凋亡细胞大部分为早调;当剂量为3.2 mg/mL和4.0 mg/mL时,凋亡细胞大部分为晚调(见图2)。结果表明,JSQ可促进乳腺癌细胞凋亡。



注:A.细胞凋亡图;B.JSQ各质量浓度组Q2(晚调)、Q3(早调)象限凋亡细胞比例,数值为3次重复试验的结果;象限图细胞分布分析:Q1象限为损伤细胞;Q2象限为坏死细胞和晚调细胞;Q3象限为早调细胞;Q4象限为正常细胞。与0 mg/mL JSQ比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

图1 4T1 细胞凋亡结果图 ($\bar{x}\pm s, n=3$)



注:A.细胞凋亡图;B.JSQ各质量浓度组Q2(晚调)、Q3(早调)象限凋亡细胞比例,数值为3次重复试验的结果;与0 mg/mL JSQ比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

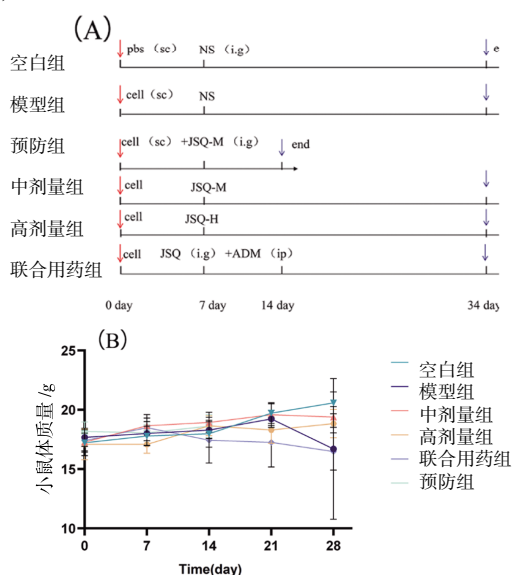
图2 MDA-MB-231 细胞凋亡结果图 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

3.3 JSQ对乳腺癌小鼠的形态及体质量的影响 在治疗组给药后的第7天,与空白组比较,各药物组小鼠的自由活动减少,而与模型组比较,各药物组小鼠的体质量均有不同程度的增加,差异有统计学意义($P<0.05$)(见表4),然而联合用药组小鼠的平均体质量不断降低,差异有统计学意义($P<0.01$),小鼠活动减少,毛色黯淡无光。实验过程中模型组死亡小鼠经解剖后发现皮下肿瘤已经转移至腹腔内的肠道等部位,推测其可能原因是肿瘤迁移扩散至腹腔内导致小鼠死亡。与模型组比较,中剂量组和高剂量组小鼠的活动正常,小鼠体质量增长与空白组比较略有放缓。这表明,小鼠的乳腺癌对体质量有影响,其中不同浓度的JSQ对小鼠的体质量恢复有帮助。(见表4、图3)

表4 JSQ对乳腺癌小鼠体质量的影响 ($\bar{x}\pm s, g$)

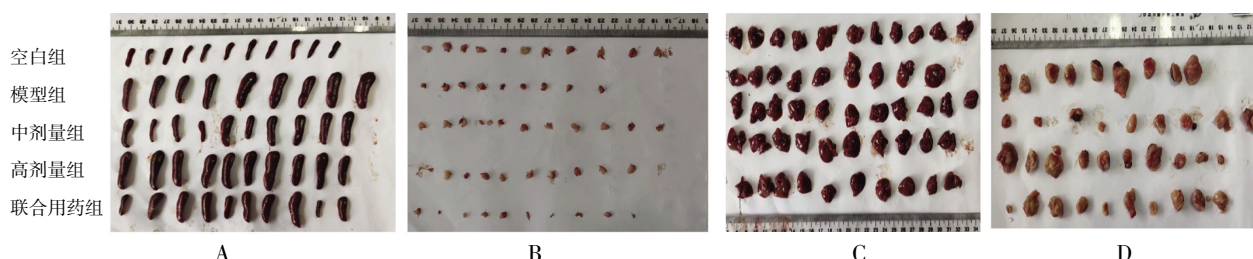
组别	n	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
空白组	10	17.22 \pm 1.09	17.79 \pm 0.83	17.98 \pm 1.14	19.72 \pm 0.88	20.59 \pm 0.93
模型组	10	17.68 \pm 0.76	18.01 \pm 1.01	18.29 \pm 0.71	19.23 \pm 0.73	16.70 \pm 5.93 ^b
中剂量组	10	17.28 \pm 0.75	18.65 \pm 0.65 ^a	18.94 \pm 0.86 ^a	19.59 \pm 0.93	19.39 \pm 0.88 ^a
高剂量组	10	17.09 \pm 1.30	18.65 \pm 0.76	18.30 \pm 0.84	18.84 \pm 1.13	18.61 \pm 1.20
联合用药组	10	17.40 \pm 0.99	18.49 \pm 1.11	17.44 \pm 1.93	17.25 \pm 2.08 ^b	16.48 \pm 1.57 ^{b,d}
预防组	10	18.18 \pm 0.80 ^a	18.06 \pm 0.68	18.62 \pm 0.97	-	-

注:与空白组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与模型组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ 。



注:与模型组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;A.小鼠分组图;B.小鼠体质量随时间增长变化曲线。

图3 JSQ对乳腺癌小鼠体质量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)



注:A.各组小鼠脾脏;B.各组小鼠胸腺;C.各组小鼠肝脏;D.乳腺癌小鼠肿瘤组织。

图4 各组小鼠脏器和肿瘤组织形态 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

3.4 JSQ对乳腺癌小鼠脏器指数的影响 与空白组比较,模型组的胸腺指数降低,但差异无统计学意义($P>0.05$);联合用药组的胸腺指数显著降低,而模型组脾脏指数和肝脏指数显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$),表明荷瘤小鼠的脾脏和肝脏明显肿大(见图4)。与模型组比较,各给药组的脾脏指数和肝脏指数显著降低,高剂量组和预防组的胸腺指数显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$),表明JSQ对乳腺癌小鼠有恢复免疫功能的作用。(见表5)

表5 JSQ对乳腺癌小鼠脏器指数的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	胸腺指数	脾脏指数	肝脏指数
空白组	10	2.10 \pm 0.49	4.99 \pm 0.62 ^d	39.05 \pm 1.85 ^d
模型组	10	1.71 \pm 0.61	38.28 \pm 9.00	60.52 \pm 8.00
中剂量组	10	1.92 \pm 0.49	16.59 \pm 8.06 ^{b,d}	44.58 \pm 4.98 ^{a,d}
高剂量组	10	1.97 \pm 0.32	32.91 \pm 7.54 ^b	54.18 \pm 3.23 ^{b,c}
联合用药组	10	0.85 \pm 0.56 ^{b,d}	20.67 \pm 10.93 ^{b,d}	53.57 \pm 7.53 ^{b,d}
预防组	10	3.06 \pm 0.56 ^{b,d}	6.87 \pm 1.49 ^d	-

注:与空白组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与模型组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ 。

3.5 JSQ对乳腺癌小鼠肿瘤生长变化的影响 第19天时,乳腺癌小鼠瘤体生长迅速,然而不同剂量JSQ组小鼠瘤体明显受到抑制(见图5),差异有统计学意义($P<0.05$),但不具有浓度依赖性。其中以5.96 g/kg浓度组的抑制效果最明显,中剂量组的抑瘤率达到66.20%,与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.01$),JSQ显著抑制瘤体生长($P<0.05$)。(见表6)

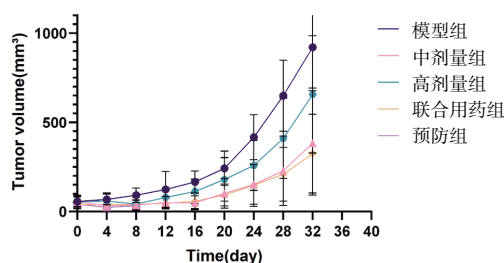


图5 各组乳腺癌小鼠肿瘤体积变化

表6 JSQ对乳腺癌小鼠肿瘤变化影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量/(g/kg)	体积/mm ³	肿瘤质量/g	抑瘤率/%
模型组	10	-	921.1 \pm 228.2	0.938 \pm 0.332	-
中剂量组	10	5.96	384.8 \pm 293.1 ^b	0.317 \pm 0.069 ^b	66.20
高剂量组	10	11.92	656.4 \pm 328.8 ^a	0.643 \pm 0.333 ^a	31.45
联合用药组	10	(5.96 g/kg JSQ+5 mg/kg AMD)	325.0 \pm 220.7 ^b	0.377 \pm 0.278 ^b	59.81
预防组	10	5.96	32.4 \pm 17.1 ^b	0.026 \pm 0.016 ^b	-

注:与模型组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

3.6 JSQ对小鼠外周血中白细胞数目及淋巴细胞数的影响 与空白组比较,模型组白细胞数和淋巴细胞数显著增加,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,各给药组白细胞数和淋巴细胞数显著减少,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),但不具有剂量依赖性,JSQ能改善乳腺癌小鼠血液中的白细胞数和淋巴细胞数的水平,减少炎症反应。(见表7)

表7 小鼠外周血检测结果 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	白细胞数 $\times 10^9/L$	淋巴细胞数 $\times 10^9/L$
空白组	6	7.4 \pm 1.39	5.7 \pm 0.71
模型组	6	320.2 \pm 78.10 ^a	116.2 \pm 78.99 ^a
中剂量组	6	113.2 \pm 71.01 ^{ab}	18.6 \pm 38.61 ^c
高剂量组	6	202.8 \pm 79.38 ^{ab}	19.8 \pm 2.47 ^c
联合用药组	6	69.7 \pm 59.27 ^c	12.2 \pm 10.55 ^c
预防组	6	10.1 \pm 3.16 ^c	5.9 \pm 1.48 ^c

注:与空白组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$ 。

3.7 JSQ对乳腺癌小鼠的血清细胞因子的表达以及肝功能的影响 与空白组比较,乳腺癌小鼠的血清IL-2、IL-6、INF- γ 、IL-1 β 水平均显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$),模型组TNF- α 的水平降低,差异无统计学意义($P>0.05$),然而联合用药组小鼠的IL-6表达水平显著降低;与模型组比较,JSQ各给药组的IL-2水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$),具有剂量依赖性;与模型组比较,JSQ高剂量组IL-6的表达水平显著升高,JSQ高剂量组和预防组的INF- γ 水平显著升高,除JSQ中剂量组外,各给药组TNF- α 表达水平均显著升高,但中剂量组的TNF- α 表达水平却显著降低,联合用药组的IL-1 β 的表达水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。这些表明,JSQ能促进乳腺癌小鼠IL-2、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 以及INF- γ 的表达,从而抑制乳腺癌细胞的生长。(见表8)

表8 小鼠乳腺癌细胞血清细胞因子表达比较 ($\bar{x}\pm s$,ng/mL)

组别	n	IL-2	IL-6	INF- γ	TNF- α	IL-1 β
空白组	10	0.311 \pm 0.037	0.122 \pm 0.018 ^a	0.575 \pm 0.050 ^a	0.402 \pm 0.055	0.254 \pm 0.089
模型组	10	0.265 \pm 0.032 ^a	0.102 \pm 0.006	0.497 \pm 0.037	0.373 \pm 0.063	0.081 \pm 0.015 ^b
中剂量组	10	0.323 \pm 0.050 ^d	0.111 \pm 0.008	0.620 \pm 0.068	0.220 \pm 0.013 ^{b,d}	0.109 \pm 0.048 ^b
高剂量组	10	0.340 \pm 0.034 ^d	0.116 \pm 0.010 ^c	0.542 \pm 0.050 ^d	0.443 \pm 0.034 ^c	0.116 \pm 0.041 ^a
联合用药组	10	0.360 \pm 0.033 ^d	0.102 \pm 0.010 ^b	0.586 \pm 0.081 ^d	0.547 \pm 0.041 ^{b,d}	0.206 \pm 0.165 ^c
预防组	10	0.340 \pm 0.055 ^{a,d}	0.112 \pm 0.013	0.622 \pm 0.069 ^d	0.416 \pm 0.044	0.086 \pm 0.064 ^d

注:与空白组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与模型组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ 。

与空白组比较,模型组AST、ALT水平显著升高,ALP水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。给药各剂量组AST、ALT较模型组明显降低,预防组和中剂量组ALP较BC组明显升高,但联合用药组ALP异常减低,差异均有统计学意义($P<0.05$),表明AMD可能存在肝功能毒性。(见表9)

表9 小鼠血清生化分析 ($\bar{x}\pm s$,U/L)

组别	n	AST	ALT	ALP
空白组	10	15.25 \pm 5.77 ^b	5.02 \pm 4.85 ^b	11.31 \pm 3.84 ^b
模型组	10	43.06 \pm 21.70	15.54 \pm 6.16	4.24 \pm 1.49
中剂量组	10	20.27 \pm 15.45 ^b	6.79 \pm 5.93 ^b	12.96 \pm 2.53 ^b
高剂量组	10	15.79 \pm 7.40 ^b	4.90 \pm 4.21 ^b	7.25 \pm 2.11 ^b
联合用药组	10	20.04 \pm 8.18 ^b	9.61 \pm 6.29 ^a	6.10 \pm 1.51
预防组	10	22.98 \pm 15.03 ^b	7.47 \pm 7.67 ^b	3.66 \pm 0.87

注:与模型组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

3.8 JSQ对乳腺癌小鼠外周血中T淋巴细胞比例的影响 与空白组比较,模型组小鼠CD3⁺T细胞比例和CD4⁺/CD8⁺值显著降低,CD8⁺T细胞比例显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,中剂量组和高剂量组小鼠的CD8⁺T细胞比例显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$);然而各给药剂量组对CD3⁺T细胞比例和CD4⁺/CD8⁺值均无影响,差异无统计学意义($P>0.05$),JSQ对免疫细胞的调节作用还有待进一步实验确定。(见图6、表10)

表10 JSQ对乳腺癌小鼠T淋巴细胞的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	CD3 ⁺ %	CD4 ⁺ %	CD8 ⁺ %	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
空白组	5	35.07 \pm 12.05 ^b	41.80 \pm 17.47	13.98 \pm 4.73 ^a	3.18 \pm 0.42 ^a
模型组	5	2.10 \pm 0.86	37.19 \pm 17.32	22.00 \pm 2.62	1.36 \pm 0.67
中剂量组	5	7.96 \pm 10.54	53.34 \pm 7.92	11.94 \pm 5.78 ^a	2.47 \pm 0.15
高剂量组	5	2.15 \pm 1.10	56.93 \pm 9.81	13.69 \pm 9.51 ^a	2.68 \pm 1.45
联合用药组	5	1.35 \pm 0.48	47.38 \pm 25.47	14.40 \pm 2.03	1.74 \pm 1.51

注:与模型组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

3.9 JSQ对乳腺癌小鼠肿瘤组织形态结构的影响 组织染色结果表明,模型组肿瘤细胞可见少量血管(黄色箭头),组织中可见较多肿瘤细胞水样变性(红色箭头),细胞肿胀,胞质疏松淡染,核固缩深染、碎裂或溶解;预防组肿瘤细胞未见明显的血管结构;组织中可见大量的肿瘤细胞水样变性(红色箭头),细胞肿胀,胞质疏松淡染,核固缩深染、碎裂或溶解;中剂量组可见少量血管(黄色箭头);组织中可见少量肿瘤细胞水样变性(红色箭头),细胞肿胀,胞质疏松淡染,核固缩深染、碎裂或溶解。高剂量组肿瘤细胞可见少量血管(黄色

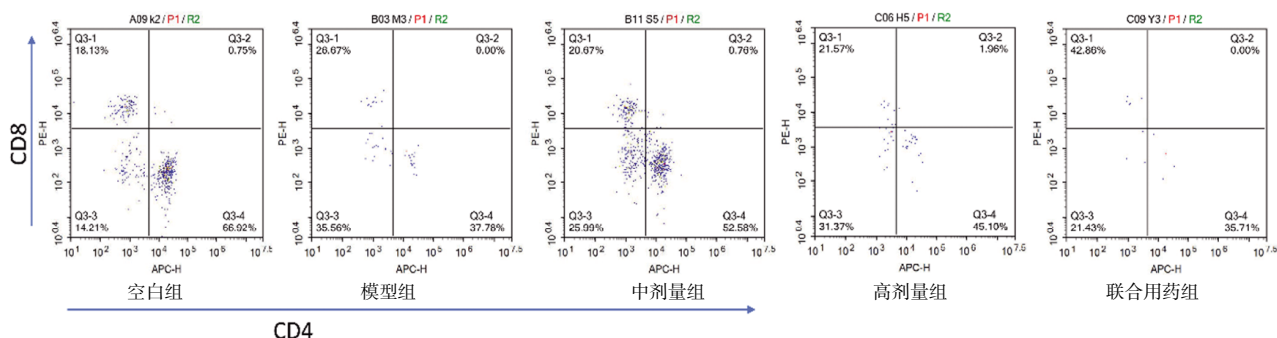


图6 JSQ对乳腺癌小鼠外周血中T淋巴细胞亚群的影响

箭头);核固缩深染、碎裂或溶解,少见出血(棕色箭头);联合用药组肿瘤细胞可见少量血管(黄色箭头);组织中可见少量肿瘤细胞水样变性(红色箭头),细胞肿胀,胞质疏松淡染,核固缩深染、碎裂或溶解;除预防组发现局部可见少量炎性细胞浸润(绿色箭头)外,其余乳腺癌小鼠肿瘤组织均未见明显的炎性细胞浸润,与模型组肿瘤组织比较,各给药组均出现较大面积的肿瘤细胞坏死(蓝色箭头),其中以高剂量组和联合用药组坏死面积更多;各组乳腺癌小鼠血管丰富度未见明显差异,各个组别小鼠肿瘤细胞核质比高,胞核形状大小不一,未见或少见核分裂象(黑色箭头)。(见图7)

4 讨 论

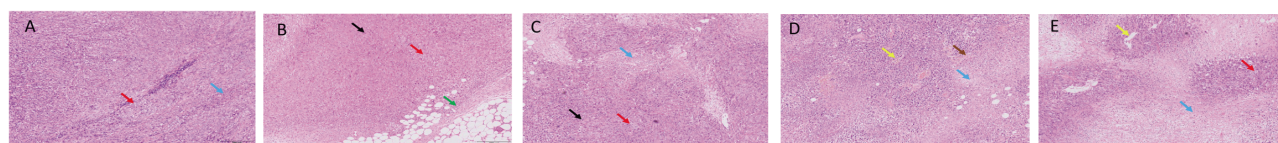
在过去的几十年里,乳腺癌的患病率一直在上升。尽管在早期乳腺癌的治疗方面取得了进展,但许多女性经历了复发和转移。近年来,替代治疗方式,如天然产物和中药民族药抗癌药物,在乳腺癌治疗中越来越重要。本研究的主要目的是通过体内外实验研究JSQ对4T1和MDA-MB-231乳腺癌细胞系的细胞毒作用和体内抗肿瘤活性。

粗提成分给药、中药多糖给药、中药单体给药、含药血清给药等是目前中药实验的主要给药方式。含药血清主要用于体外实验,“血清药理”是很多年以来的研究热点。中药复方含药血清被广泛应用于中药药理研究中,有证据表明复方动物实验结果与复方含药血清的体外实验结果一致,认可度也较高;某些学者认为细胞生长显著受到培养环境中中药成分带来的pH等物化因素的影响,并不适宜细胞的生长,口服之后吸收分布代谢造成有效成分变化药效也就随之变化,如果中药直接用于细胞体外实验,不具备充足的说服力证明体内也具备同样的药效。笔者也探索过复方含药血清体外抑癌活性,较难得到一致的稳定结果,甚至有些浓度促进乳腺癌细胞的增殖,其他复方含药血清项目研究者也遇到同样的问题(难以得到重复稳定的结果),可能是由于大鼠代谢药物过后的血液中不仅会含有中药的成分,而且会掺杂其他代谢产物或因子(如激素、受体等),也就可以理解不含药物的空白血清也会产生阳性结果的原因,实际上粗提物和单体是中药药理研究中常用的制剂方式^[12]。传统汤剂不适宜直接用作细胞实验,某些有效成分在高温下不稳定,而冻干粉能够较完整保留有效成分。

小鼠成瘤之后肿瘤快速生长引起小鼠免疫脏器器官出现异常,预实验发现荷瘤小鼠脾脏肿大,但胸腺异常不明显,故考虑通过检测免疫指标和免疫细胞,探究对乳腺癌小鼠的免疫调节作用。结果证实AMD联合JSQ给药比仅给药JSQ的抑瘤效果更好,与模型组比较具有恢复乳腺癌小鼠部分免疫功能和减轻化疗药副作用的作用;从中剂量组和高剂量组结果看在该浓度梯度下JSQ对小鼠肿瘤生长并没表现出剂量

依赖性,因此5.96 g/kg剂量更适合给药。CD4⁺T细胞的减少可导致细胞因子分泌减少及B淋巴细胞活化率下降,使细胞免疫与体液免疫均受抑制^[13]。CD8⁺T细胞可通过分泌抑制因子抑制细胞毒性T淋巴细胞和B淋巴细胞,起到负调节作用^[12]。大量研究发现免疫缺陷及恶性肿瘤患者CD4⁺T细胞比例下降,CD8⁺T细胞比例升高,CD4⁺/CD8⁺比值降低^[14]。结果表明,JSQ能够降低CD8⁺T细胞比例至接近正常水平,提示其可恢复乳腺癌小鼠正常免疫水平,然而对CD3⁺T细胞比例以及CD4⁺/CD8⁺比值无显著性影响,提示JSQ免疫调节作用有限。

TNF- α 是一种具有多种生物学活性的细胞因子,其过量表达与肿瘤发生发展密切相关,高表达可以抗炎和抑制肿瘤生长,低表达则促进免疫细胞的分化,增强机体免疫力。IL-2、IL-6及INF- γ 作为抗肿瘤直接作用效应分子,也与乳腺癌发生、发展密切相关;IL-2和INF- γ 是促进细胞免疫和防止癌症进展以及各种细胞内传染病的两种重要细胞因子。IL-1 β 与肿瘤导致的炎症密切相关,其升高说明体内存在炎症。与模型组比较,JSQ对给药组小鼠的肿瘤生长均具有显著抑制作用,均显著促进乳腺癌小鼠IL-2、IL-6、INF- γ 以及TNF- α 的表达,表明这些细胞因子水平的提高可能促进了肿瘤细胞的凋亡,但中剂量组平均肿瘤生长速度和最终瘤体积比高剂量组小;然而,中剂量组小鼠的TNF- α 水平低于模型组,同时观察到中剂量组淋巴细胞和白细胞数均少于高剂量组及脾脏的肿大症状最轻,胸腺指数与正常小鼠无明显差异,故推测JSQ对免疫器官的作用可能是通过减轻病变,降低TNF- α 的水平,抑制脾脏及胸腺中的细胞凋亡而产生^[15]。与对照组比较,模型组小鼠肝脏指数显著升高,即肝脏质量明显增大,而与模型组比各给药组肝脏指数显著减低,提示JSQ可能对乳腺癌小鼠的肝功能有恢复作用。进一步检测血清AST、ALP和ALT发现,JSQ可以恢复血清AST、ALP和ALT的正常水平。一般来说,肿瘤小鼠的肝功能异常时通常伴随着ALT、AST、ALP等指标异常升高。据报道,患有骨或肝转移的乳腺癌患者的ALP升高^[16]。本实验中模型组小鼠ALT、AST水平均显著升高,与文献[6,17]的实验结果趋势基本一致,与本实验不同的是乳腺癌细胞大量侵袭转移至其他内脏器官。BAHAMIN N等^[18]认为乳腺癌小鼠的血清ALT和AST活性升高可能是由于肿瘤诱导的肝损伤以及随后这些酶渗漏到循环中所致。令人意外的是,实验中模型组ALP值却显著降低了,可以看到预防组在给药14 d时ALP水平是略高于正常组的,说明随着肿瘤的进展血液中的ALP被逐渐耗竭了,然而治疗组给药治疗后恰好能够延缓这一进程。ALP是一种癌症诊断中重要的生物标志物酶。ALP表达水平异常可在乳腺癌、前列腺癌、肾肿瘤和骨肉瘤等多种疾病中发现,因此ALP被认为是一种有价值的肿瘤标志物^[19],它也是富含ALP的细胞的通用生物标志物,并应用于区分癌细胞与



注:A.模型组;B.预防组;C.中剂量组;D.高剂量组。比例尺=200 μ m。

图7 乳腺癌小鼠肿瘤组织 HE 染色病理图片 ($\times 100$)

正常细胞。GAO Z W等^[10]设计了近红外探针(QcyP)用于成像和评估不同细胞系和荷瘤小鼠模型中的内源性ALP变化;同时有研究表明细胞活性氧能够下调癌细胞ALP水平,JSQ是否对小鼠体内活性氧响应水平有影响,有待进一步研究。结果表明,JSQ可以恢复AST、ALP和ALT的正常水平,对肝脏具有保护作用。

细胞凋亡(程序性细胞死亡)是细胞在适当刺激下自我毁灭的过程。通常,细胞是通过细胞分裂和细胞凋亡之间的平衡来维持和调节的。细胞凋亡和细胞周期阻滞是预防和抑制乳腺癌的关键方面之一。细胞凋亡是细胞死亡的途径之一;然而,癌细胞的存活是通过诱导细胞凋亡抵抗机制来促进的^[10]。病理组织染色结果也证实了JSQ可减缓肿瘤生长,可以观察到给药组乳腺瘤组织有较大面积肿瘤细胞坏死,表明JSQ能够促使肿瘤细胞凋亡坏死。通过CCK-8法检测细胞增殖活性试验发现,JSQ能够明显抑制4T1乳腺癌细胞的增殖,成剂量和时间依赖性。复方中药制剂具有多靶点多成分作用,作用机制复杂,越来越多研究表明中药不仅具有直接杀伤肿瘤细胞的细胞毒性作用,还可以通过免疫系统产生靶向毒性杀伤肿瘤细胞^[20],如中药有效成分刺激巨噬细胞产生抗癌活性成分,以及加强机体的T、B细胞的免疫力,提高机体清除异物能力等从而杀伤肿瘤细胞。

总之,药效学实验证明,JSQ具有良好的抗肿瘤作用,对乳腺癌小鼠无明显毒副作用,对免疫脏器以及肝脏具有保护作用。JSQ条件培养基细胞毒性的增强也侧面反映其可能通过刺激巨噬细胞分泌杀伤物质,增强免疫系统来杀伤肿瘤细胞。AMD和JSQ联用不仅抗肿瘤效果较好,而且可以减轻化疗药乳腺癌小鼠的免疫抑制作用,基于此JSQ也适合作为免疫佐剂使用。虽然我们已初步探明JSQ对TNBC的抗乳腺癌作用和作用机制,但作用机理阐述不完善,仍须进一步研究。

参考文献

- [1] LU Q, LAI Y, ZHANG H, et al. Hesperetin inhibits TGF- β 1-induced migration and invasion of triple negative breast cancer MDA-MB-231 cells via suppressing Fyn/paxillin/RhoA pathway[J]. *Integr Cancer Ther*, 2022, 21: 15347354221086900.
- [2] 姜广亮.从中医免疫理论论自身免疫病的治疗[J].*中国民族民间医药*, 2011, 20(6):42, 44.
- [3] 王冬梅,林森森,郑司浩,等.UPLC-Q-TOF-MS分析鸡血藤乙酸乙酯提取物中抑制表皮生长因子受体活性成分[J].*北京中医药大学学报*, 2014, 37(1):58-62.
- [4] 徐麟,颜冬梅,聂鹤云,等.基于2020年版中国药典毒性药材标准现状对中药毒性分级标准的思考与探讨[J].*中药材*, 2021, 44(5):1041-1045.
- [5] 范宏宇.吴煜教授治疗肿瘤经验[J].*中医研究*, 2021, 34(1):65-68.
- [6] LI W F, HU X Y, WANG S P, et al. Characterization and anti-tumor bioactivity of Astragalus polysaccharides by immunomodulation[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 145: 985-997.
- [7] PAHOREA K, KHAN S, KARIM N. Illicium verum anticancer activity against MDA-MB-231 cell line[J]. *Pak J Med Sci*, 2024, 40(1Part-I):110-114.
- [8] 李雪,时圣明,赵余庆.人参及其皂苷和人参方剂防治病毒性疾病的研究进展[J].*中草药*, 2020, 51(9):2379-2389.
- [9] 李良,吴华锋,何碧钻,等.鸡参芪抗癌颗粒的制备工艺和质量标准研究[J].*广西医科大学学报*, 2025, 42(1):138-147.
- [10] ZHOU H L, YAN Y X, ZHANG X B, et al. Ginseng polysaccharide inhibits MDA-MB-231 cell proliferation by activating the inflammatory response[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(6):229.
- [11] QI Y, GAO F, HOU L F, et al. Anti-inflammatory and immunostimulatory activities of astragalosides[J]. *Am J Chin Med*, 2017, 45(6):1157-1167.
- [12] 杨永.参仙龙甲方对SDF-1/CXCR4生物轴介导的4T1乳腺癌生长转移的干预作用研究[D].北京:北京中医药大学, 2018.
- [13] 汪舒云,吴霖光,陈彬,等.扶正类中药调节肿瘤免疫抑制微环境的研究现状[J].*世界科学技术-中医药现代化*, 2022, 24(10):3862-3868.
- [14] YANG C, CHENG H, LUO G, et al. The metastasis status and tumor burden-associated CA125 level combined with the CD4/CD8 ratio predicts the prognosis of patients with advanced pancreatic cancer: A new scoring system[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2017, 43(11):2112-2118.
- [15] 周悦芳,范培红.中药免疫调节作用研究进展[J].*时珍国医国药*, 2017, 28(1):204-207.
- [16] ALIPANAH H, BIGDELIM R, ESMAEILIM A. Inhibitory effect of Viola odorata extract on tumor growth and metastasis in 4T1 breast cancer model[J]. *Iran J Pharm Res*, 2018, 17(1):276-291.
- [17] CHANGIZI Z, MOSLEHI A, ROHANIA H, et al. Chlorogenic acid induces 4T1 breast cancer tumor's apoptosis via p53, Bax, Bcl-2, and caspase-3 signaling pathways in BALB/c mice[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2021, 35(2):e22642.
- [18] BAHAMIN N, RAFIEIAN-KOPAEI M, AHMADIAN S, et al. Combined treatment with Alhagi maurorum and docetaxel inhibits breast cancer progression via targeting HIF-1 α /VEGF mediated tumor angiogenesis in vivo[J]. *Heliyon*, 2023, 9(5):e16292.
- [19] GAO Z W, SUN J Y, GAO M, et al. A unique off-on near-infrared cyanine-based probe for imaging of endogenous alkaline phosphatase activity in cells and in vivo[J]. *Sens Actuat B Chem*, 2018, 265:565-574.
- [20] 张楠,曹晓东,刘颖,等.阿霉素抗4T1乳腺癌荷瘤小鼠的免疫调控机制[J].*生物工程学报*, 2021, 37(7):2522-2533.

(收稿日期:2025-01-11 编辑:罗英姣)