

宝藿苕 i 通过下调肿瘤相关巨噬细胞 /C-X-C 基序趋化因子配体 1 通路抑制乳腺癌转移

王胜奇^{a,b}，王能^{a,b,c}，黄晓伟^{a,b,c}，杨博文^{a,b}，郑轶枫^{a,b}，张菊萍^{a,b}，王璇^{a,b}，林毅^{a,b}，王志宇^{a,b,c,*}

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153331>

Phytpmedicine (IF 5.340)

关键词: 宝藿苕 i；消癥颗粒；乳腺癌转移；肿瘤相关巨噬细胞；CXCL1；ALDH，醛脱氢酶；BHS，宝藿苕 i；CM，条件介质；CSCs，癌症干细胞；CXCL1，C-X-C 基序趋化因子配体 1；Di1，1，1'-二十八烷基-3，3，3'，3'-四甲基吡啶卡蓝氨酸高氯酸盐；ESI-MS，电喷雾电离质谱；MDSCs，髓源性抑制细胞；NMR，核磁共振；SFDA，国家食品药品监督管理局；TAMs，肿瘤相关巨噬细胞；TCM，中医。

删除[冬瓜]: CSCs

删除[冬瓜]: ；

删除[冬瓜]: TAMs

摘要

背景

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤，转移是乳腺癌相关死亡的主要原因。我们之前的研究表明，中国国家食品药品监督管理局（SFDA）新批准的药物消癥配方可以通过调节肿瘤相关巨噬细胞/ C-X-C 基序趋化因子配体 1（TAMs / CXCL1）途径来显著抑制乳腺癌转移。然而，消癥颗粒抗转移作用的生物活性化合物尚不清楚。

删除[ly]: XIAOPI

删除[冬瓜]: TAM

目的

本研究旨在从消癥颗粒中分离出抗转移作用的生物活性化合物，并阐明其作用机制。

删除[冬瓜]: 康

研究设计/方法

采用 TAMs/CXCL1 启动子活性引导分离和多种化学结构鉴定方法，筛选消癥颗粒中的生物活性化合物。乳腺癌细胞和 TAMs 在体外共培养或在体内共注射以

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: 离

删除[冬瓜]: TAM

模拟它们的共存。应用多种分子生物学实验、斑马鱼乳腺癌异种移植模型和小鼠乳腺癌异种移植物来验证所筛选化合物的抗转移活性。

结果

生物活性引导分子鉴定宝藿苣苣 i (BHS) 是消癥颗粒抑制 TAMs/CXCL1 启动子活性的关键生物活性化合物。功能研究表明, BHS 可以显著抑制人类和小鼠乳腺癌细胞的迁移和侵袭以及转移相关蛋白的表达, 同时降低乳腺癌干细胞 (CSCs) 的比例。此外, BHS 可以抑制 TAMs 的 M2 表型极化, 从而减弱其 CXCL1 的表达和分泌。值得注意的是, 机理研究证实, TAMs/CXCL1 是 BHS 抑制乳腺癌转移的关键靶标, 因为外源添加 CXCL1 显著消除了 BHS 对乳腺癌细胞的抗转移作用。此外, BHS 在体内高度安全, 因为它对斑马鱼胚胎没有表现出可观察到的胚胎毒性或致畸作用。更重要的是, BHS 显著抑制了斑马鱼乳腺癌异种移植模型和小鼠乳腺癌异种移植物中的乳腺癌转移和 TAMs/CXCL1 活性。

删除[冬瓜]: 离
删除[冬瓜]: TAMs
删除[冬瓜]: CSCs
删除[冬瓜]: TAM
删除[冬瓜]: TAM

删除[冬瓜]: TAMs

结论

这项研究不仅为 TAMs/CXCL1 作为抗转移药物发现的可靠筛选靶点提供了新的见解, 而且还表明了 BHS 是转移性乳腺癌治疗的有前景的候选药物。

删除[冬瓜]: TAMs

介绍

乳腺癌仍然是最常见的癌症类型, 也是全球女性癌症相关死亡的主要原因。仅乳腺癌就占全球女性癌症发病率的 24.2% 和癌症死亡率的 15% (Bray 等人, 2018 年)^[1]。据估计, 2018 年全球约有 210 万例新发乳腺癌病例, 转移性疾病占相关死亡人数的大部分 (Bray 等, 2018)^[1]。转移性乳腺癌目前在很大程度上无法治愈, 中位 5 年生存率为 26% (DeSantis 等人, 2017 年)^[2]。因此, 迫切需要进一步阐明转移机制并鉴定新型抗转移药物以改善乳腺癌患者的临床结局。

几千年来, 中医药 (TCM) 在中国的癌症治疗中一直备受推崇 (Nie 等人, 2016)^[3]。值得注意的是, 越来越多的证据清楚地表明, 中医可以延长乳腺癌患者的生存期并降低其死亡风险 (Tian 等人, 2015; Wang 等人, 2015)^[4-5]。多项研究表明, 重塑肿瘤免疫抑制微环境是中医药治疗抑制肿瘤发生和进展的核心机制之一

删除[ly]: .

(Ye 等人, 2015)^{【6】}。中医药治疗可通过调节免疫抑制细胞增强抗肿瘤免疫反应, 如逆转 [TAMs](#) 和 T 淋巴细胞的免疫表型, 促进树突状细胞成熟, 抑制髓源性抑制细胞 (MDSCs) 功能和调节 Th1/Th2 因子 (guo 等人, 2015)^{【7】}。[TAMs](#) 通常占总肿瘤基质细胞的 30%至 50%, 并且仍然是包括乳腺癌在内的多种恶性肿瘤中最丰富的免疫细胞群 (De la Fuente Lopez 等人, 2018; Lao 等人, 2017 年)^{【8-9】}。[TAMs](#) 可以分泌趋化因子作为炎症介质, 将更多的免疫抑制细胞募集到肿瘤微环境中, 最终加速癌症转移 (De la Fuente Lopez 等, 2018)^{【8】}。据报道, CXCL1 是 [TAMs](#) 释放的最丰富的趋化因子 (Palomino 和 Marti, 2015; Wang 等, 2018)^{【10-11】}。越来越多的证据还表明, 乳腺基质中升高的 CXCL1 表达通常预示着乳腺癌患者的不良预后 (Zou 等, 2014)^{【12】}。就机制而言, [TAMs](#) 分泌的 CXCL1 可以通过招募 MDSC 形成免疫抑制和促转移微环境, 从而促进癌细胞存活、化学抗性和转移 (Acharyya et al, 2012; Miyake et al, 2016)^{【13-14】}。我们之前还证明, [TAMs](#) 分泌的 CXCL1 可以通过上调 β -连环蛋白途径促进乳腺 [CSCs](#) 的自我更新, 从而促进乳腺癌转移 (Wang 等人, 2019b)^{【15】}。

所有这些发现表明, 靶向 [TAMs](#)/CXCL1 通路可能是一种有前途的乳腺癌抗转移策略。考虑到基于靶点的筛选策略正在成为设计新药或从自然资源中寻找生物活性先导化合物的重要工具, 我们推测, [TAMs](#)/CXCL1 活性引导的中药配方或中药中生物活性化合物的分离可能是乳腺癌抗转移药物开发中一种前途可靠的筛选技术。

自 1980 年代以来, 消癥颗粒已被经验性地广泛用作中医治疗乳腺增生和预防乳腺癌的辅助疗法。消癥颗粒最近通过临床试验的安全性和有效性测试, 获得了国家食品药品监督管理局 (SFDA) 的批准。

最近, 我们系统地证明了消癥颗粒在抑制乳腺癌耐药和转移方面也很有效。例如, 消癥颗粒已被证明可通过减弱 CXCL1 介导的自噬来促进紫杉醇在乳腺癌中的化学敏感性 (Wang et al, 2019a)^{【16】}。此外, 消癥颗粒可通过下调 MMTV-PyVT^{+/-} 自发性乳腺癌小鼠的 [TAMs](#)/CXCL1 通路来抑制乳腺癌的发生和转移 (Wang et al, 2017)^{【17】}。消癥颗粒还可以通过调节 [TAMs](#)/CXCL1/[CSCs](#) 活性显著延缓小鼠乳腺癌异种移植物的生长和肺转移 (Wang et al, 2019b)^{【15】}。这些结果清楚地揭示了消癥颗粒抑制乳腺癌转移的生物学活性和分子机制。然而, 消癥颗粒对乳腺癌

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: 。

删除[冬瓜]: TAM

删除[冬瓜]: TAM

删除[冬瓜]: TAM

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: ；

删除[冬瓜]: TAM

删除[冬瓜]: CSC

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAM

删除[冬瓜]: 离

删除[冬瓜]: 有

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: CSCs

的抗转移作用的物质基础却鲜为人知。从消癥颗粒中筛选生物活性化合物具有重要的临床意义，可进一步促进消癥颗粒的开发和临床应用，以及发现新型抗转移候选药物。

材料和方法

消癥颗粒中生物活性成分的生物活性引导分离鉴定。

消癥颗粒是从 10 种中草药的混合物中通过回流萃取法提取的，包括淫羊藿、肉苁蓉、益母草、丹参、莪术、益母草、女贞子、制何首乌、鳖甲、牡蛎。关于其制备和质量控制方法的详细描述之前已经报道过（Wang et al., 2017）^[17]。在本研究中，首先将 2.5kg 消癥颗粒和 10 升水混合。然后采用回流提取法和冷冻干燥工艺制得消癥颗粒的水提取物（F0）。消癥颗粒的水提取物进一步采用溶剂萃取法用不同极性溶剂萃取，得到石油醚相提取物（F1）、乙酸乙酯相提取物（F2）、正丁醇相提取物（F3）和剩余的水相提取物（F4）。将每个组份真空干燥，溶解在完整的培养基中，并通过 CXCL1 启动子报告基因测定进行第一轮筛选。随后将正丁醇相提取物（F3）进行凝胶过滤柱色谱法和硅胶柱色谱法分离其生物活性化合物。通过核磁共振（NMR）和电喷雾电离质谱（ESI-MS）方法对这些分离的化合物进行化学鉴定。

细胞培养和诱导

非恶性人乳腺上皮细胞系 MCF-10A 和 HBL100、人乳腺癌细胞系 BT549、小鼠乳腺癌细胞系 4T1、人急性单核细胞白血病细胞系 THP1 和小鼠巨噬细胞系 Raw264.7 取自美国菌种保藏中心。上述细胞株的传代数均小于 20。在 D-荧光素底物存在下发出荧光的 4T1-Luc 细胞，是用慢病毒荧光素酶报告质粒转染 4T1 细胞获得的。所有这些细胞系的身份都通过短串联重复分析进行了验证。先前已经报道了细胞培养、[TAMs](#) 诱导以及乳腺癌细胞和 [TAMs](#) 共培养的详细描述（Wang 等人，2019b）^[15]，并且也在补充材料中提供。

删除[冬瓜]: TAM

删除[冬瓜]: TAM

细胞毒性测定

根据制造商的说明，使用 CCK8 试剂盒（C0038，Beyotime Biotechnology，中国上海）研究 BHS（纯度 98%，MB6526，美伦生物，中国大连）在不同类型细胞中的细胞毒性。

菌落形成试验

为了研究 BHS 对乳腺癌细胞生长的长期影响，如先前报道的那样进行了集落形成测定（Wang 等人，2019b）^[15]。

巨噬细胞极化分析

如前所述，通过使用流式细胞术分析巨噬细胞的表面标志物来研究巨噬细胞的表型变化（Wang 等人，2019b）^[15]。

伤口愈合测定和转孔测定

如前所述，为了研究外源性干预后乳腺癌细胞的迁移和侵袭能力变化，分别进行了伤口愈合试验和转孔测定（Yang 等人，2019a）^[18]。

蛋白质印迹

如前所述（Jiao 等人，2018）^[19]应用蛋白质印迹分析。本研究中使用的一抗如下：波形蛋白（10,366-1-AP）(Proteintech, 芝加哥, 美国), MMP2 (A6247, ABclonal, 波士顿, 美国), CXCL1 (AF5403, Affinity, 辛辛那提, 俄亥俄州, 美国), GAPDH (5174S) 和 β 肌动蛋白（ β -actin）(4970S, Cell Signaling Technology, CST, 波士顿, 马萨诸塞州, 美国)。

乳腺肿瘤干细胞群体分析

根据制造商的说明，使用 ALDEFLUOR 干细胞鉴定试剂盒（01,700, STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada）通过流式细胞术分析乳腺 **CSCs** 群。ALDH⁺ 亚群被量化并定义为乳腺 **CSCs**。二乙氨基苯甲醛 (DEAB) 是一种 ALDH 活性的特异性抑制剂，用于控制背景荧光。

删除[冬瓜]: CSC

删除[冬瓜]: CSC

酶联免疫吸附试验（ELisa）

进行 Elisa 测定以研究 BHS 对 **TAMs** 分泌 CXCL1 的影响。简而言之，**TAMs** 用不同浓度的 BHS 处理 48 小时。随后，收获 **TAMs** 并再次以 5×10^5 个细胞/孔的密度接种到 6 孔板中并培养 24 小时。然后，根据制造商的说明，使用人 CXCL1 ELISA 试剂盒（SEA041Hu）或小鼠 CXCL1 ELISA 试剂盒（SEA041Mu, USCN Business）通过酶联免疫吸附试验测量 **TAMs** 的细胞培养上清液中的 CXCL1 浓度。

删除[冬瓜]: TAM

删除[冬瓜]: TAM

删除[冬瓜]: TAM

删除[冬瓜]: TAM

实时荧光定量 PCR

使用 RNAiso Plus (9109, TaKaRa, Tokyo, Japan) 提取总 RNA 并使用 PrimeScriptTMRT 试剂盒 (RR047A, TaKaRa) 逆转录成互补 cDNA。使用 SYBR[®] Premix

Ex Taq™ II KIT (RR820A, TaKaRa) 和 ABI Quant Studio 7 Flex 实时 PCR 系统 (Applied Biosystems, 福斯特城, 美国) 进行 cDNA 扩增。引物序列如下: 人类 GAPDH 基因的 5' -GACTAACCTGCGCTCCTG-3' (正向) 和 5' -GCCCAATACGACCAAATCAG-3' (反向); 人类 CXCL1 基因的 5' -AGGGAATTCACCCAAGAAC-3' (正向) 和 5' -ACTATGGGGATGCAGGATT-3' (反向)。小鼠基因 CXCL1 基因的 5' -GACTCCAGCCACACTCCAAC-3' (正向) 和 5' -TGACACCGCAGCTCATTG-3' (反向)。小鼠 β - 肌动蛋白的 5' -GGAGGGGGTTGAGGTGTT-3' (正向) 和 5' -GTGTGCACTTTTATTGGTCTCAA-3' (反向)。每个试剂盒的分析程序均按照制造商的说明进行。2^{-ΔΔCt} 法用于计算各组间基因的相对表达水平。

CXCL1 启动子报告基因分析

如前所述, 通过双荧光素酶报告基因测定法检测消癍颗粒提取物或 BHS 对 TAMs 的 CXCL1 启动子活性的影响 (Wang 等人, 2019b)^[15]。

删除[冬瓜]: TAM

质粒和细胞转染

shCXCL1 质粒购自 Vigene Biosciences (中国济南), 并根据制造商的说明通过 LipoFiter™ 试剂 (Hanbio Biotechnology Co., LTD. 上海, 中国) 转染到 TAMs 中。

删除[冬瓜]: TAM

斑马鱼胚胎毒性试验

进行斑马鱼胚胎毒性试验以研究 BHS 的体内毒性。AB 株斑马鱼获自中国斑马鱼资源中心 (中国武汉)。斑马鱼的维护和产卵是按照我们之前描述的 (Jiao et al., 2018)^[19] 进行的。补充材料中提供了斑马鱼胚胎毒性试验的详细描述。

斑马鱼乳腺癌异种移植模型

建立斑马鱼乳腺癌异种移植模型以研究 BHS 对乳腺癌的体内抗转移作用。简而言之, BT549 细胞被 5 细胞膜红色荧光探针 1,1' -Diocadecyl-3,3,3',3' -tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI, Sigma-Aldrich) 标记为红色荧光。在受精后 48 小时, 将 200 个 DiI 染色的 BT549 细胞或 200 个 DiI 染色的 BT549 细胞和 600 个 THP1 衍生的 TAMs 的混合物悬浮在 50n1 培养基中, 并通过显微注射器注射到每个胚胎的肠下血管中以建立斑马鱼乳腺癌异种移植模型。将携带乳腺癌细胞的幼年斑马鱼 (48 小时龄) 在 96 孔板 (每孔一条鱼) 中进一步培养, 并如图所示将 10 μ m BHS 添加到水产养殖水中。处理 48 h 后, 在荧

删除[冬瓜]: TAM

光显微镜下观察斑马鱼中 Dil 染色的 BT549 细胞(Nikon Eclipse C1, 东京, 日本)。

组织免疫荧光

如先前报道的那样进行免疫荧光 (Jiao 等人, 2018; Wang 等人, 2019b)^[19]^[15]。对于波形蛋白检测, 将组织切片与波形蛋白抗体 (10, 366-1-AP, Proteintech) 在 4° C 下孵育过夜, 然后与 Alexa Fluor® 555 偶联抗兔 IgG (4413S, CST) 的二抗孵育 2 小时。对于 ALDH1A1 检测, 将组织切片与 ALDH1A1 抗体 (BF0220, Affinity)在 4° C 下孵育过夜, 然后与 Alexa Fluor®488 偶联抗小鼠 IgG(A10680, Thermo Fisher, Waltham, MA, 美国) 2 小时。对于 β -连环蛋白检测, 将组织切片与连环蛋白抗体 (51, 067-2-AP, Proteintech) 在 4° C 下孵育过夜, 然后与 Alexa Fluor® 488 偶联抗兔 IgG(4412S,CST)的二抗孵育. 对于 F4/80 和 CXCL1 检测, 斑马鱼切片与 F4/80-FITC 抗体 (sc71, 085, Santa Cruz) 和 CXCL1 抗体 (AF5403, Affinity) 在 4° C 下孵育过夜, 然后与 Alexa Fluor® 555 结合抗兔 IgG (4413S, CST) 孵育 2 小时。使用倒置荧光显微镜 (Ts2R-FL, 尼康, 东京, 日本) 获得荧光图像。

动物实验

动物实验经广东省中医院动物护理和使用机构委员会 (编号 2, 018, 044) 批准, 并根据我们机构的实验动物使用指南进行。6 周龄雌性 Balb/c 小鼠购自广东省医学实验动物中心, 在广东省中医院实验动物中心无特定病原菌条件下饲养, 给予无菌食物和水。对于 4T1-Luc 异种移植物的建立, 2×10⁶ 个 4T1-Luc 细胞悬浮于 200 μ l PBS 中并皮下接种到小鼠的乳腺脂肪垫中。将小鼠随机分为 6 组 (每组 n=9), 包括盐水组 (0.5%羧甲基纤维素钠溶液, 腹膜内 [i. p.]); 10 mg/kg/d BHS 组 (i. p.); 20 mg/kg/d BHS 组 (i. p.); TAMs 组 (4T1-Luc 细胞与 Raw264. 7 衍生的 TAMs 以 1:3 的比例共同注射, 然后给予生理盐水, i. p.); TAMs+20 mg/kg/d BHS 组 (4T1-Luc 细胞与 Raw264. 7 衍生的 TAMs 以 1:3 的比例共同注射, 随后 20 mg/kg/d BHS 给药, i. p), 和 TAMs/rCXCL1 +20 mg/kg/d BHS 组 (4T1-Luc 细胞与 Raw264. 7/rCXCL1 衍生的 TAMs 以 1:3 的比例共同注射, 然后给予 20 mg/kg/d BHS)。在整个治疗过程中, 每 3 天对小鼠称重, 并用游标卡尺测量它们的肿瘤。使用以下公式计算肿瘤体积 (V): $V = (长 \times 宽^2) / 2$ 。

删除[冬瓜]: TAMs
删除[冬瓜]: TAMs
删除[冬瓜]: TAMs
删除[冬瓜]: TAMs
删除[冬瓜]: TAMs
删除[冬瓜]: TAMs

腹膜内注射 D-荧光素（150mg/kg 体重，122,799，PerkinElmer，Boston，USA），小鼠每周使用 IVIS Lumina XR 体内成像系统（PerkinElmer）进行成像，以监测 4T1-Luc 异种植物的生长和肺转移。当肿瘤长到合适的大小或小鼠存活到指定的天数时，用异氟醚对小鼠实施安乐死。然后，切除肿瘤和肺并拍照。通过机械方法从新鲜肿瘤中分离原代细胞，并进行如上所述的 CSCs 亚群分析或巨噬细胞表型分析。剩余的肿瘤组织储存在-80° C 并用于组织免疫荧光，如上所示。

为了研究 BHS 对小鼠肝肾功能的毒性，在实验结束时分别采集生理盐水组和 BHS 处理组小鼠的血液。通过离心获得血清并使用自动生化分析仪（Roche Group，Basel，Switzerland）分析肝功能参数（丙氨酸转氨酶和天冬氨酸氨基转移酶）和肾功能参数（尿素、尿酸和肌酐）。

统计分析

使用 SPSS 22.0 软件（Abbott Laboratories，Chicago，USA）进行统计分析。数据以平均值±标准差表示，并使用单因素方差分析（ANOVA）和 t 检验进行两两统计显著性分析。在 p<0.05 时差异被认为是显著的。

结果

消癍颗粒的生物活性引导分离

删除[冬瓜]: 馏

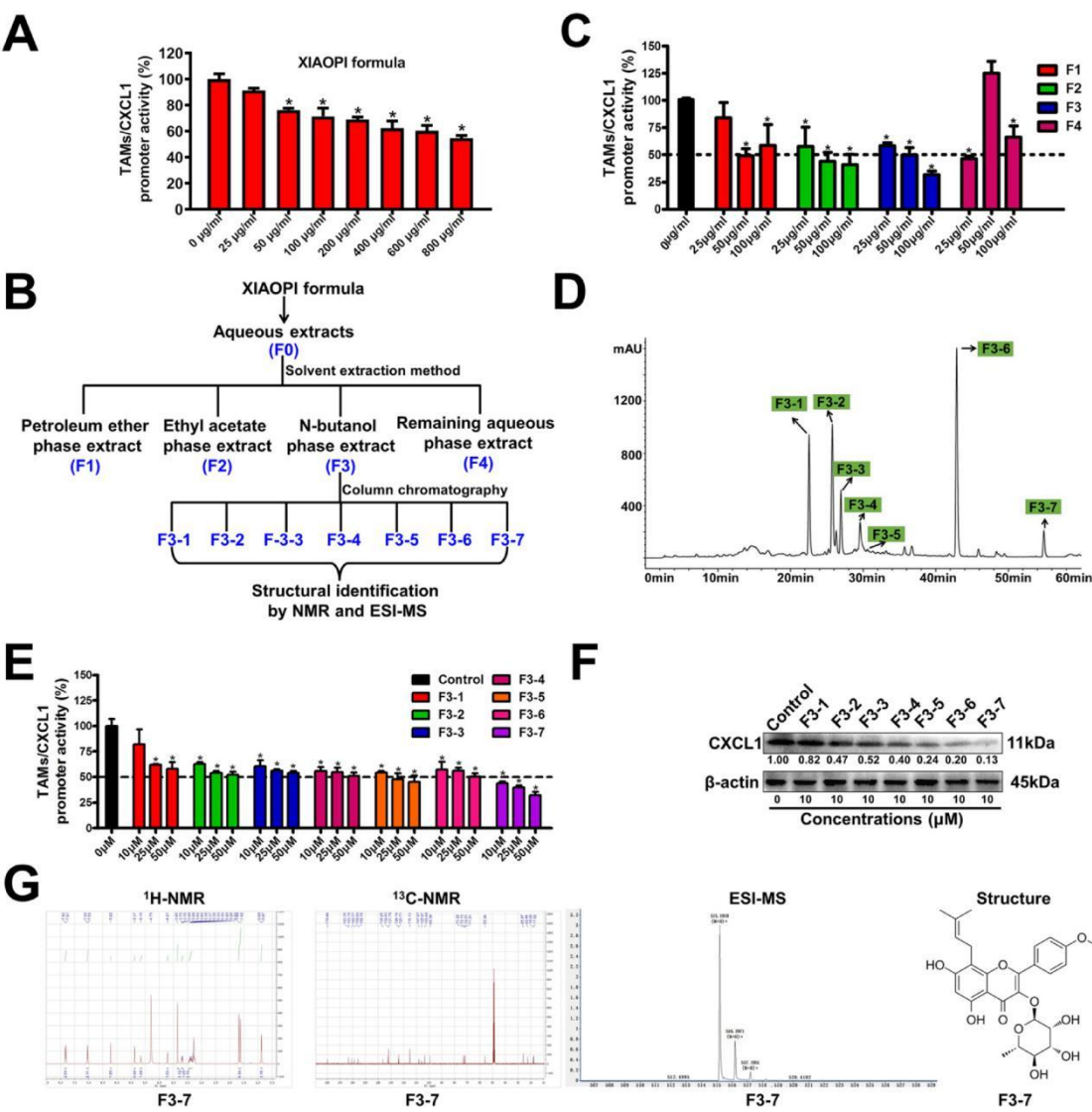


图 1 消癍颗粒中生物活性引导的分离。

删除[冬瓜]: 馏

(A) 消癍颗粒可呈剂量依赖性抑制 Raw264.7 衍生的 TAMs 的 CXCL1 启动子活性。N=6。

删除[冬瓜]: TAM

(B) 消癍颗粒的分馏提取方案。

(C) 第一轮筛选确定消癍颗粒(F3)的正丁醇相提取物为对 TAMs/CXCL1 启动子活性具有

删除[冬瓜]: TAMs

最强抑制作用的子集。N=6。

(D) 消癍颗粒正丁醇相提取物的 HPLC 指纹图谱。共获得并鉴定了 7 个单峰。(E F) 第二

轮筛选表明, F37 在七类化合物中对 TAMs/CXCL1 启动子活性(N=6)和 TAMs/CXCL1 表达(N=3)

删除[冬瓜]: TAMs

的抑制作用最强。(G) 分离的 F3-7 化合物经 NMR 和 ESI-MS 方法将鉴定为 BHS。所有值均表

删除[冬瓜]: TAMs

示为平均值±标准差 SD。*p<0.05。

我们之前的研究表明，消癍颗粒可以通过抑制 [TAMs](#)/CXCL1 的转录活性来抑制乳腺癌的转移。为筛选消癍颗粒生物活性化合物，基于对 [TAMs](#)/CXCL1 活性的抑制作用，进行生物活性引导分级筛选消癍颗粒生物活性化合物。生物活性引导的分离试验是在中药研究中分离单一草药或配方中的生物活性化合物的常规实验。该系统通常基于通过石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和剩余的水提取物连续分馏后的物质极性（Jo et al., 2020; [Wozniak et al., 2010](#)）^{【20-21】}。由于配方中可能存在数千种植物化学物质，通常选择抑制效果最强的成分作为靶向提取物并进行下一轮分馏，因为在有限的资源下无法分析每个馏分（Han et al., 2018; [Ilhan et al., 2020](#); [Jo et 等人, 2020](#); [李等人, 2013](#)）^{【22-24】}。为了实现这一点，我们首先在巨噬细胞中建立了 CXCL1 荧光素酶报告系统，以识别消癍颗粒中靶向 CXCL1 的潜在生物活性化合物。消癍颗粒可以以剂量依赖性方式抑制 Raw264.7 衍生的 [TAMs](#) 的 CXCL1 启动子活性（图 1A），这表明 CXCL1 荧光素酶报告系统的可靠性。

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: ;

删除[冬瓜]: ;

删除[冬瓜]: ;

删除[冬瓜]: TAM

然后，通过回流提取法和冷冻干燥工艺获得消癍颗粒的水提取物（F0）。随后，将消癍颗粒的水提液进一步用不同极性溶剂萃取，得到石油醚相提取液（F1）、乙酸乙酯相提取液（F2）、正丁醇相提取液（F3）和剩余的水相提取液（F4）（图 1B）。第一轮筛选将 F3 部分确定为对 CXCL1 转录具有最强抑制功效的子集（图 1C）。因此，我们通过大孔吸附树脂和硅胶技术进一步分离 F3。如图 1D 所示，我们通过 NMR 和 ESI-MS 方法共鉴定出 7 种纯化化合物，包括松果菊苷（F3-1）、二苯乙烯苷（F3-2）、毛蕊花苷（F3-3）、益母草碱（F3-4）、丹酚酸 B（F3-5）、淫羊藿苷 C（F3-6）（数据未显示）和 BHS（F3-7）。在这 7 种化合物中，BHS 显示出对 [TAMs](#)/CXCL1 活性的抑制作用最高，这通过蛋白质印迹分析得到了进一步证实（图 1E-G）。虽然这些结果表明 BHS 是潜在的 CXCL1 抑制剂，但不能排除其它化合物具有抑制 CXCL1 能力的可能性。总之，根据我们目前在本研究中的知识，BHS 被确定为消癍颗粒中抑制 CXCL1 转录的最佳化合物。

删除[冬瓜]: TAMs

BHS 显著抑制共培养系统中乳腺癌细胞的生长

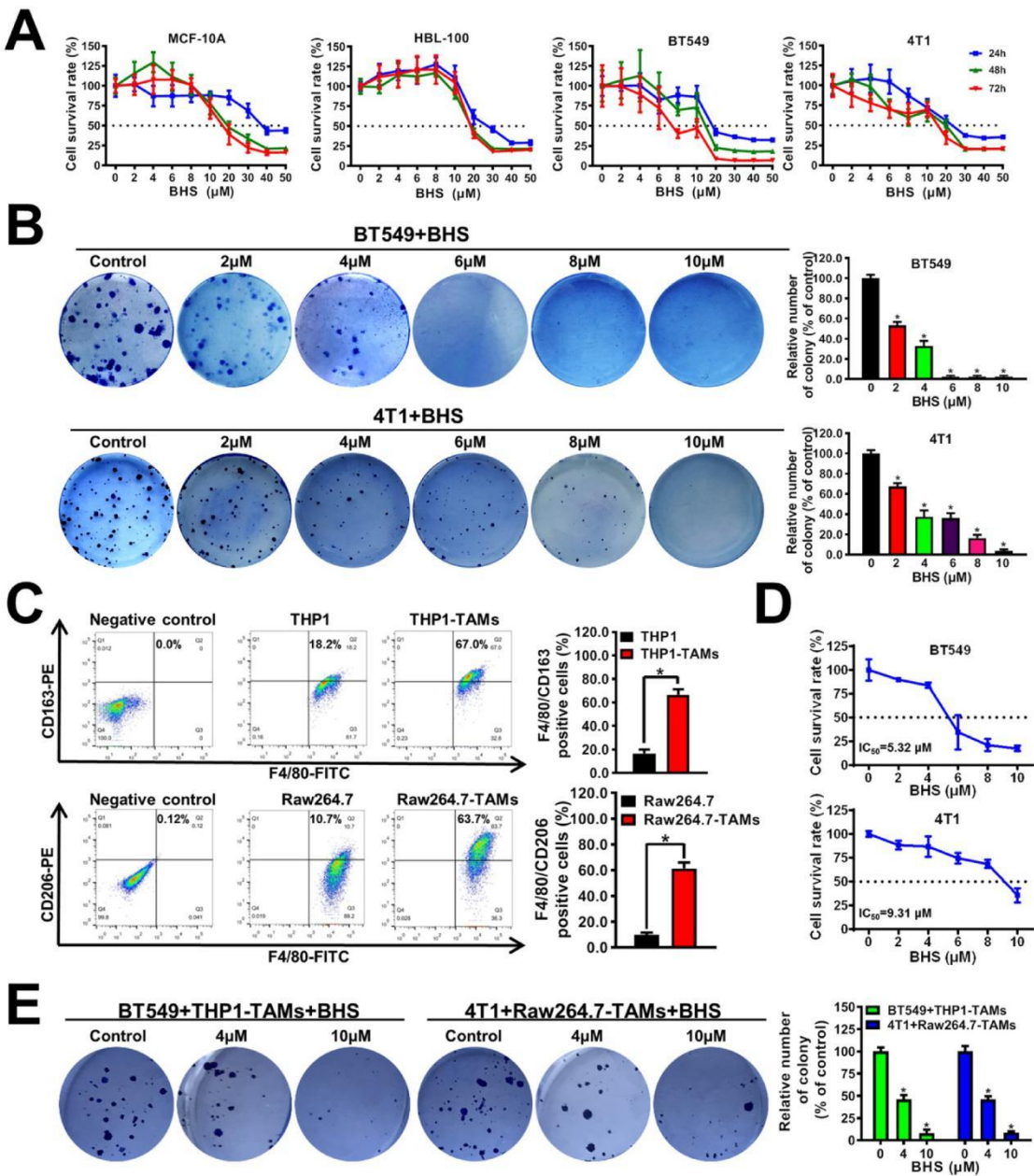


图 2. BHS 显著抑制共培养系统中乳腺癌细胞的生长。

(A) BHS 在非恶性乳腺上皮细胞和高转移性乳腺癌细胞中的细胞毒性。

(B) 低浓度 (2×10^{-6} μm) 的 BHS 显著抑制乳腺癌细胞系 BT549 和 4T1 的集落形成能力。

(C) 通过流式细胞仪分析巨噬细胞表面标志物来确定 TAMs 的成功诱导。BT549 细胞的条件培养基 (CM) 显著提高了人 THP1 巨噬细胞中的 F4/80+/CD163+ 亚群，而 4T1-CM 显著提高了小鼠 Raw264.7 巨噬细胞中的 F4/80+/CD206+ 亚群数量。

(D-E) 在 TAMs 共培养的情况下，低浓度的 BHS 还可以显著抑制 BT549 和 4T1 细胞的增殖和集落形成能力。所有值均表示为平均值 ± 标准差 SD。N=3。*p<0.05。

删除[冬瓜]: TAM

删除[冬瓜]: TAM

为了确认 BHS 是否为消癥颗粒的生物活性化合物，研究了 BHS 对非恶性乳腺上皮细胞和高转移性乳腺癌细胞的生长抑制作用。高于 $10\text{ }\mu\text{m}$ 的高浓度 BHS 对乳腺上皮细胞和乳腺癌细胞均表现出显著的细胞毒性。相比之下，低浓度($2\times 10\text{ }\mu\text{m}$)的 BHS 在 24-72h 治疗期间只能轻微或中度抑制乳腺癌细胞系 BT549 和 4T1 的增殖，而对非恶性 MCF-10A 和 HBL100 没有明显的细胞毒性抑制（图 2A）。这四种细胞在用 BHS 处理 48 小时后，BHS 的所有 IC50 值均高于 $10\text{ }\mu\text{m}$ 。然而，低浓度（ $2\times 10\text{ }\mu\text{m}$ ）的 BHS 在两周培养期内显著抑制乳腺癌细胞系 BT549 和 4T1 的集落形成能力。这种差异表明，BHS 可以在长期给药后抑制乳腺癌细胞的增殖(图 2B)。

乳腺癌细胞与肿瘤微环境中的多种基质细胞共存，而 TAMs 是最丰富的群体。TAMs 通常偏向于 M2 样表型分化，从而促进肿瘤生长和转移。BT549 细胞的条件培养基 (CM) 显著提高了人 THP1 巨噬细胞中的 $\text{F4/80}^+/\text{CD163}^+$ 亚群，而 4T1-CM 显著提高了小鼠 Raw264.7 巨噬细胞中的 $\text{F4/80}^+/\text{CD206}^+$ 亚群（图 2C），表明成功诱导 M2 表型巨噬细胞 (TAMs)。然后，将乳腺癌细胞和 TAMs 在 transwell 共培养系统中共培养，以模拟它们的共存。有趣的是，低浓度 ($2\times 10\text{ }\mu\text{m}$) BHS 可显著抑制共培养系统中 BT549 和 4T1 细胞的增殖。当 BHS 与 TAMs 共培养时，BT549 细胞和 4T1 细胞的 IC50（半抑制浓度）值分别为 $5.32\text{ }\mu\text{m}$ 和 $9.31\text{ }\mu\text{m}$ （图 2D）。同时，低浓度的 BHS 还可以显著抑制 BT549 和 4T1 细胞在 TAMs 存在下的集落形成能力（图 2E）。总之，即使在 TAMs 共培养的情况下，BHS 也可以显著抑制乳腺癌细胞的增殖和集落形成能力。

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAM

删除[冬瓜]: TAM

删除[冬瓜]: TAM

删除[冬瓜]: TAM

删除[冬瓜]: TAM

BHS 显著抑制 TAMs 诱导的乳腺癌细胞转移

删除[冬瓜]: TAMs

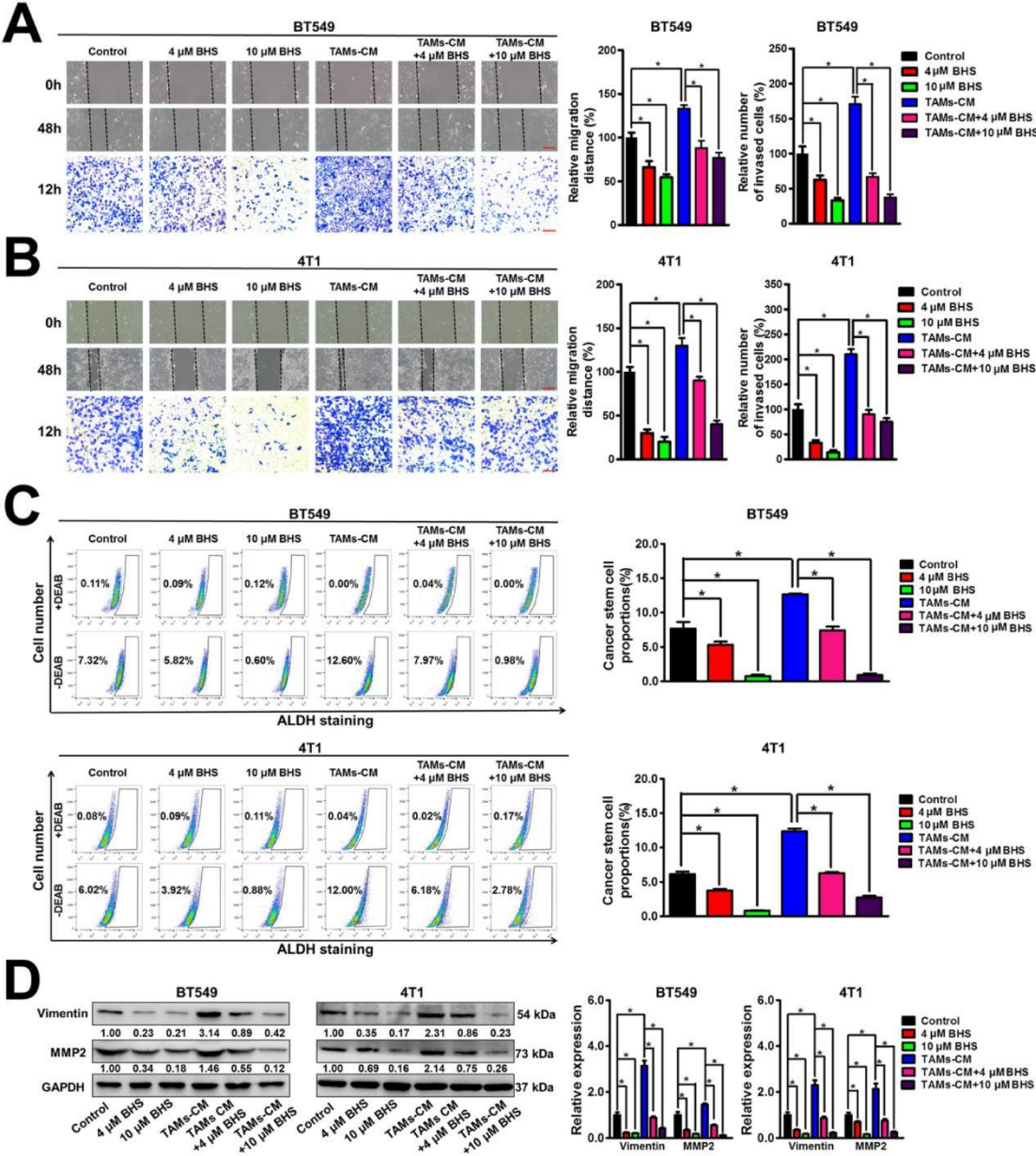


图 3. BHS 显著抑制 TAMs 诱导的乳腺癌细胞转移。

删除[冬瓜]: TAMs

(A-B) 伤口愈合试验和 transwell 试验结果表明，单独 BHS 治疗可以显著抑制乳腺癌细胞的迁移和侵袭能力，同时消除 TAMs-CM 对其的促进作用。比例尺代表 400 μ m 的伤口愈合测定图像和 100 μ m 的 transwell 测定图像。

删除[冬瓜]: TAMs

(C) 通过 ALDH⁺ 染色和流式细胞术测定 BHS、TAMs-CM 或其组合处理后乳腺癌细胞中乳腺癌 CSCs 的比例。二乙氨基苯甲醛 (DEAB) 是一种 ALDH 活性的特异性抑制剂，用于控制背景荧光。

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: CSCs

(D) BHS、TAMs-CM 或它们的组合处理后乳腺癌细胞中转移相关蛋白的表达水平。所有值均表示为平均值 \pm 标准差 SD。N=3。*p<0.05。

删除[冬瓜]: TAMs

接下来，我们研究了 BHS 对乳腺癌转移的影响。单独的 BHS 治疗可以显著抑制 BT549 和 4T1 细胞的迁移和侵袭能力。同时，BHS 还显著消除了 TAMs-CM 对乳腺癌细胞迁移和侵袭的促进作用（图 3A-B）。乳腺癌干细胞（CSCs）是乳腺癌复发和转移的根本原因，而过度活跃的乙醛脱氢酶（ALDH）活性与干细胞（CSCs）的生理特性密切相关（Wang 和 Lei，2017）^[25]。BHS 治疗显著降低了 BT549 细胞和 4T1 细胞中的 ALDH⁺亚群的数量，而 TAMs-CM 显著增加了这些群体的数量，表明 BHS 可以抑制乳腺 CSCs 的自我更新，而 TAMs-CM（培养基）可以促进乳腺 CSCs 的自我更新。同时，BHS 还显著消除了 TAMs-CM 对乳腺 CSCs 自我更新的促进作用（图 3C）。此外，BHS 显著减弱了 BT549 和 4T1 细胞中包括波形蛋白（Vimentin）和 MMP2 在内的转移相关蛋白的表达水平，而 TAMs-CM 达到了相反的效果，表明 BHS 可以抑制乳腺癌转移，而 TAMs-CM 可以促进乳腺癌转移。此外，BHS 显著逆转了 TAMs-CM 对乳腺癌细胞中转移相关蛋白的上调作用（图 3D）。总之，即使在 TAMs 存在的条件下，BHS 也可以在体外抑制乳腺癌转移。

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: CSCs

删除[冬瓜]: CSCs

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: CSCs

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: CSCs

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: CSC

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAM

BHS 抑制 M2 表型极化、CXCL1 表达和 TAMs 的分泌

删除[冬瓜]: TAM

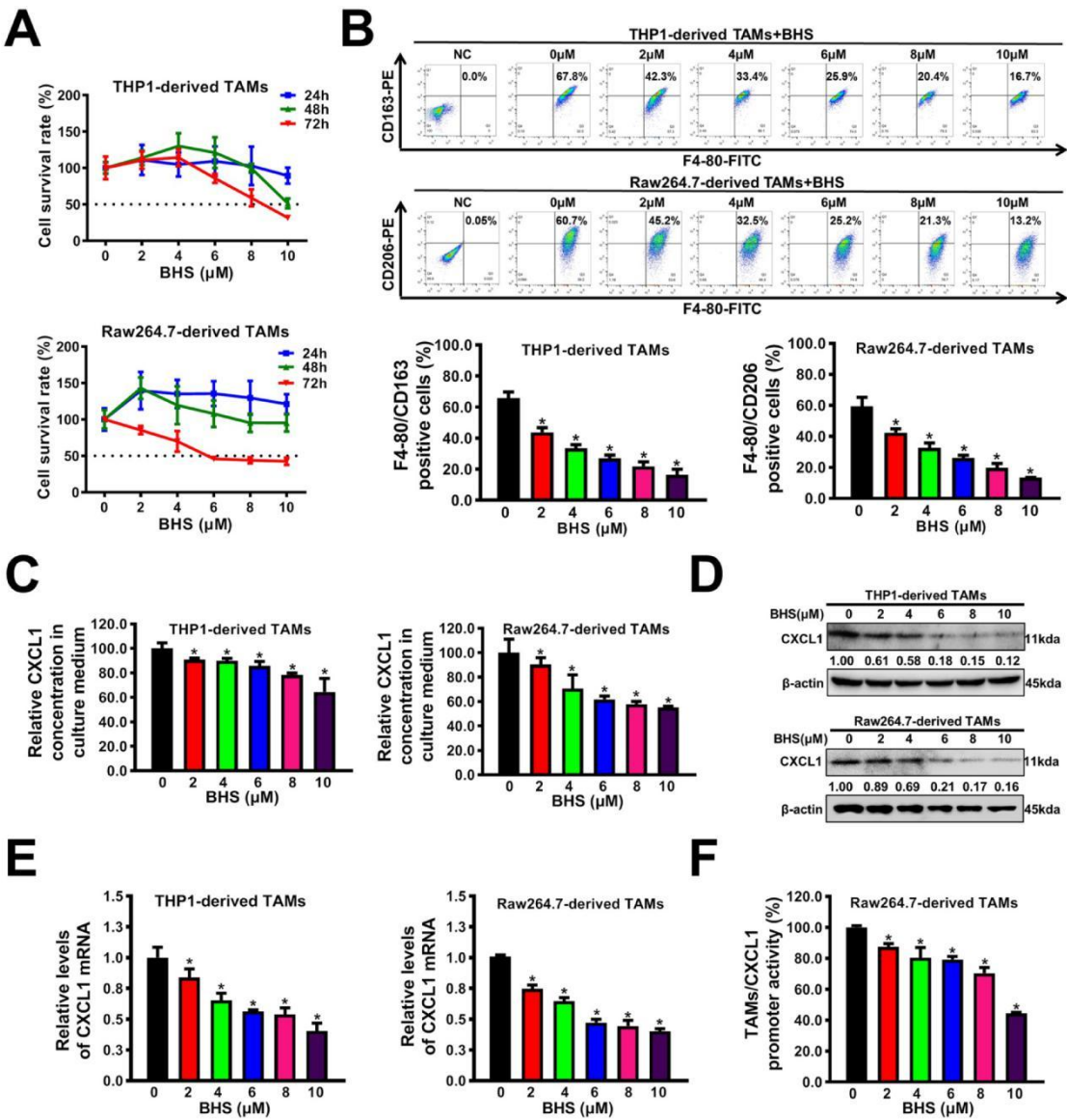


图 4. BHS 抑制 M2 表型极化、CXCL1 表达和 TAMs 的分泌。

删除[冬瓜]: TAMs

(A) BHS 在 THP1 衍生的 TAMs 和 Raw264.7 衍生的 TAMs 中的细胞毒性。N=3。

删除[冬瓜]: TAMs

(B) BHS 可以以剂量依赖性方式显著逆转 TAMs 的 M2 表型极化。N=3。

删除[冬瓜]: TAM

(C) 酶联免疫吸附试验表明，BHS 还以剂量依赖性方式显著抑制 TAMs 的 CXCL1 分泌。N=3。

删除[冬瓜]: TAM

(D-E) 蛋白质印迹 (N=3) 和 QPCR 测定 (N=6) 进一步证实了 BHS 对 TAMs 中 CXCL1 蛋白表达水平和 mRNA 转录水平的抑制作用。

删除[冬瓜]: TAMs

(F) 双荧光素酶报告基因检测表明 BHS 显著抑制 TAMs 中 CXCL1 基因的启动子活性。N=6。所

删除[冬瓜]: TAMs

所有值均表示为平均值 ± 标准差 SD。*p<0.05。

删除[冬瓜]: TAMs

如上所述，低浓度的 BHS 可以显著消除 TAMs-CM 对乳腺癌细胞增殖和转移的促进作用。因此，我们推测 BHS 可以通过调节 TAMs 来抑制乳腺癌的增殖和转移。因此，我们进一步研究了 BHS 对 TAMs 的影响。如图 4A 所示，浓度为 2 μm 至 10 μm 的 BHS 在 THP1 衍生的 TAMs 和 Raw264.7 衍生的 TAMs 中均没有明显的细胞毒性。这些结果表明，BHS 可能通过其他机制来调节 TAMs 的促肿瘤作用，而不是通过对 TAMs 的直接细胞毒性作用。TAMs 具有高度可塑性，可在刺激后转化为抗肿瘤发生的 M1 表型巨噬细胞（Parisi 等人，2018 年）^{【26】}。如图 4B 所示，BHS 可以以剂量依赖性方式显著逆转 TAMs 的 M2 表型极化。

酶联免疫吸附试验分析表明，BHS 还以剂量依赖性方式显著抑制 TAMs 分泌 CXCL1（图 4C）。蛋白质印迹法和 QPCR 测定进一步证实了 BHS 对 TAMs 中 CXCL1 蛋白表达水平和 mRNA 转录水平的抑制作用（图 4D-E）。双荧光素酶报告基因测定表明，BHS 显著抑制了 TAMs 中 CXCL1 基因的启动子活性（图 4F）。总之，BHS 可以逆转 TAMs 中的 M2 表型极化以及 CXCL1 的表达和分泌。

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAM

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAM

删除[冬瓜]: TAM

删除[冬瓜]: TAM

删除[冬瓜]: TAM

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAM

BHS 通过调节 **TAMs**/CXCL1 通路抑制乳腺癌转移

删除[冬瓜]: TAMs

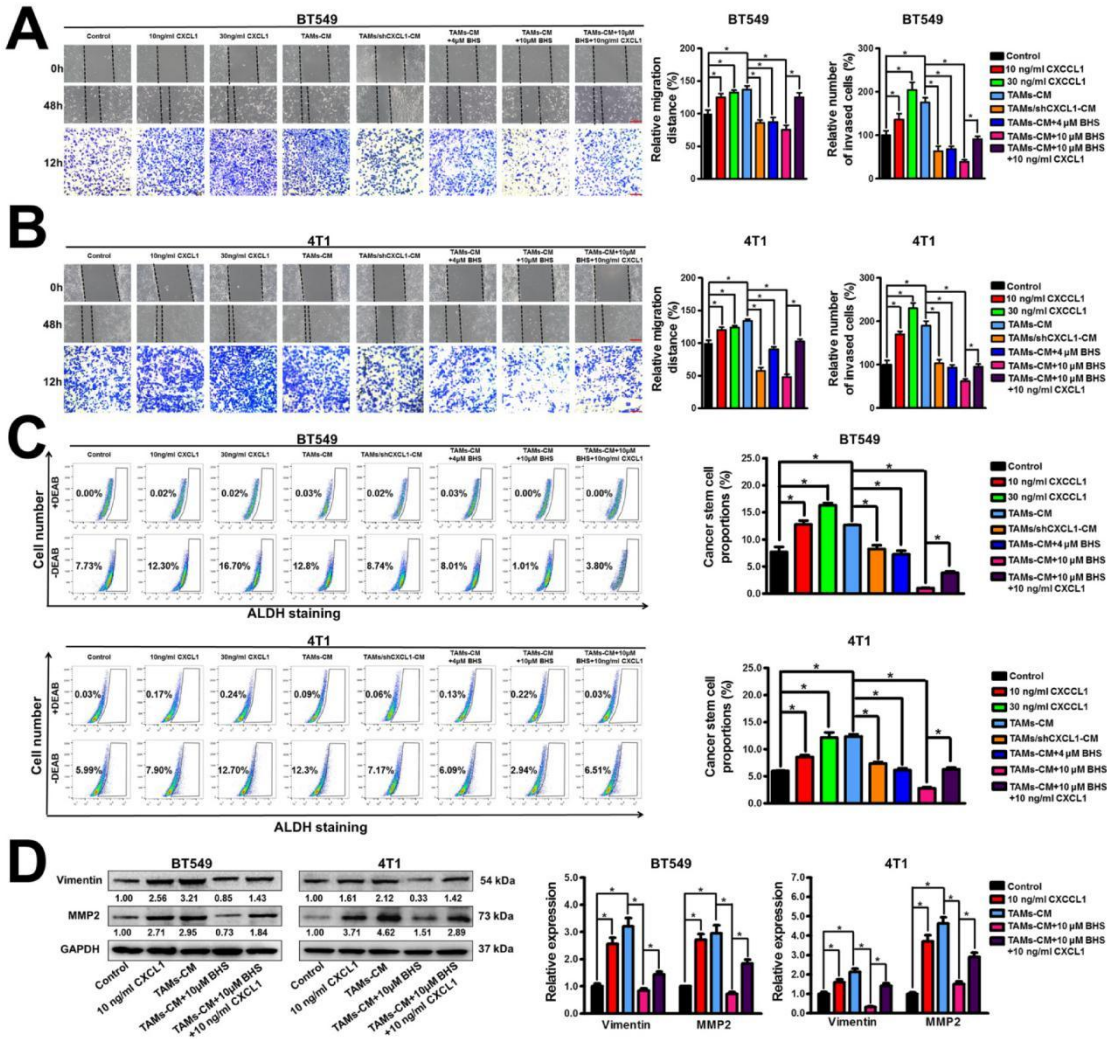


图 5. BHS 通过调节 **TAMs**/CXCL1 通路抑制乳腺癌转移。

删除[冬瓜]: TAMs

(A-B) 伤口愈合试验和 transwell 试验结果表明，外源添加 CXCL1 可以显著促进人和小鼠乳腺癌细胞的迁移和侵袭能力。同时，外源性加入 CXCL1 可以消除 BHS 对共培养乳腺癌细胞迁移和侵袭的抑制作用。比例尺代表 400 μ m 的伤口愈合测定图像和 100 μ m 的 transwell 测定图像。

(C) 外源性添加重组 CXCL1 蛋白可以增加乳腺癌细胞中的 ALDH⁺ 亚群数量，同时逆转 BHS 对共培养的乳腺癌细胞亚群的下调作用。

(D) 外源性添加 CXCL1 可以上调乳腺癌细胞中转移相关蛋白的表达水平，同时逆转 BHS 对共培养乳腺癌细胞的抑制作用。所有值均表示为平均值 \pm 标准差 SD。N=3。*p<0.05。

接下来,我们进一步研究了 CXCL1 是不是 BHS 对乳腺癌转移抑制作用的关键靶点。如图 5A-C 所示,外源性添加 CXCL1 和 TAMs-CM 都可以显著促进乳腺癌细胞的迁移和侵袭能力,以及 ALDH⁺乳腺癌干细胞亚群的自我更新。同时, TAMs 和 BHS 治疗中的 CXCL1 干扰部分,抵消了 TAMs-CM 对乳腺癌迁移和侵袭以及乳房自我更新的促进作用。

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAMs

另外,外源性添加 CXCL1 可以部分消除 BHS 对共同培养的乳腺癌细胞的迁移、侵袭和 CSCs 亚群的抑制作用。此外,外源性添加 CXCL1 和 TAMs-CM 均能上调乳腺癌细胞中转移相关蛋白的表达水平,而且外源性添加 CXCL1 可逆转 BHS 对共培养的乳腺癌细胞的抑制作用 (图 5D)。总之, BHS 可以通过抑制 TAMs/CXCL1 通路来抑制 TAMs 和乳腺癌细胞共培养系统中乳腺癌细胞的转移。

删除[冬瓜]: CSCs

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAMs

BHS 在斑马鱼乳腺癌异种移植模型中抑制乳腺癌转移和 TAMs/CXCL1 活性

删除[冬瓜]: TAM

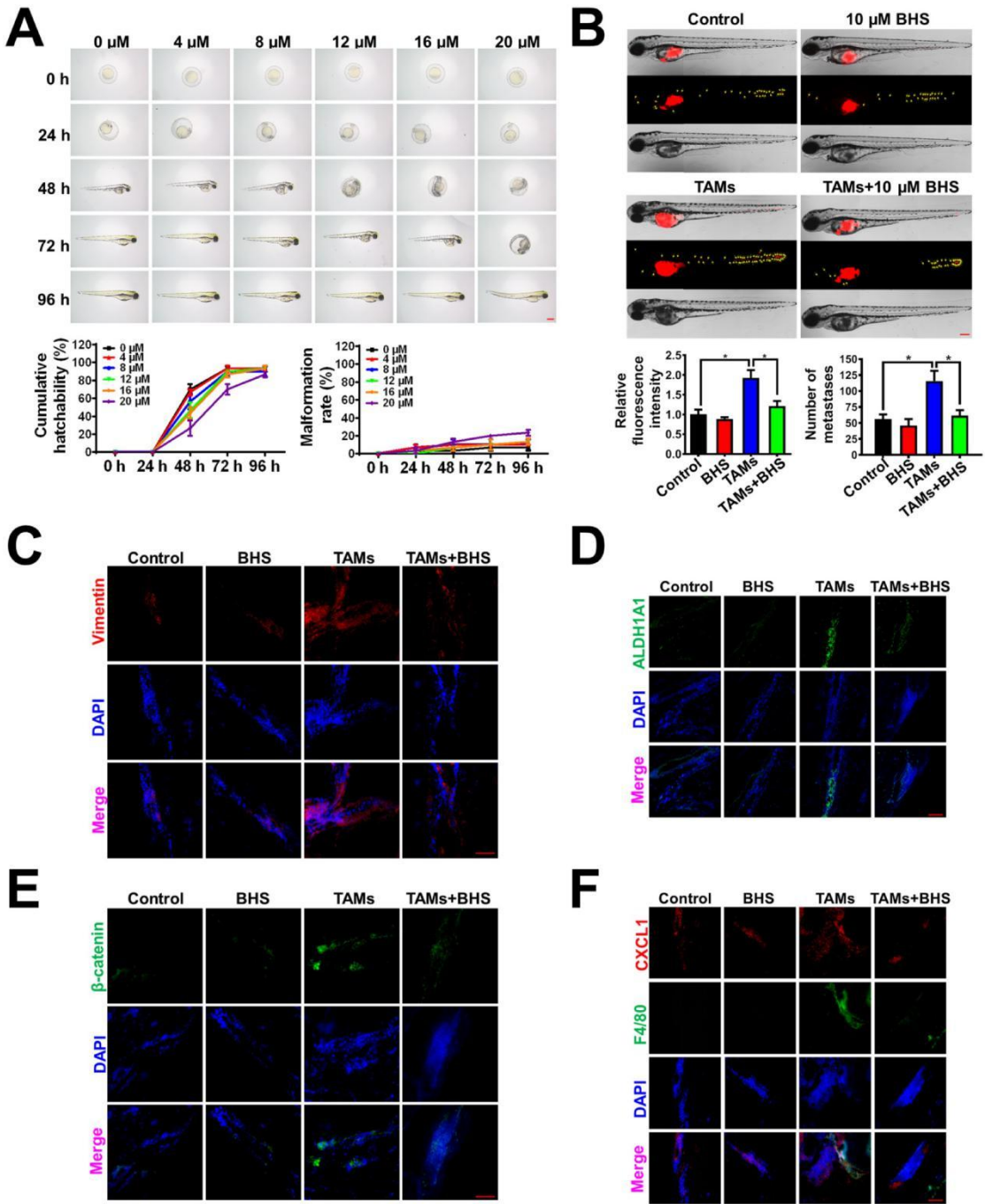


图 6. BHS 在斑马鱼乳腺癌异种移植模型体内抑制乳腺癌转移和 TAMs/CXCL1 活性。

删除[冬瓜]: TAMs

(A) 斑马鱼胚胎毒性试验表明，BHS (0-20 μ m) 在斑马鱼胚胎的孵化和发育过程中都没有表现出明显的胚胎毒性或致畸作用。比例尺=400 μ m。N=10。

(B) BHS 显著逆转了联合注射 TAMs 对斑马鱼移植 BT549 细胞转移的促进作用。黄色箭头表示转移性 BT549 细胞。比例尺=200 μ m。N=10。

删除[冬瓜]: TAMs

(C-E) BHS 显著逆转了联合注射 TAMs 对斑马鱼移植 BT549 细胞中转移相关蛋白（波形蛋白）和干细胞相关蛋白(ALDH1A1 和 β -连环蛋白)表达水平的上调作用。比例尺= 40 μ m。

删除[冬瓜]: TAM

(F) BHS 显著减弱了斑马鱼中 F4-80 和 CXCL1 的表达水平，表明 BHS 在体内也抑制了 TAMs/CXCL1 活性。比例尺=40 μ m。所有值均表示为平均值±标准差 SD，*p<0.05。

删除[冬瓜]: TAMs

接下来，使用斑马鱼模型研究了 BHS 的体内毒性和抗转移活性。首先，应用斑马鱼胚胎发育毒性试验研究 BHS 的体内毒性。如图 6A 所示，即使在 20 μ m 的高浓度下，BHS 在斑马鱼胚胎的孵化和发育过程中也没有表现出明显的胚胎毒性或致畸作用。BHS 处理之后，斑马鱼胚胎的累积孵化率或畸形率没有显著变化(p > 0.05)。同时，BHS 处理后斑马鱼心包水肿、卵黄囊水肿和脊髓弯曲未见明显的形态学变化。这些结果突出显示 BHS 在体内的低毒性。

斑马鱼异种移植模型是通过将 Dil 染色的 BT549 细胞注射到斑马鱼体内来实时监测乳腺癌的生长和转移及其对 BHS 处理后的反应。如图 6B 所示，BHS 显著逆转了联合注射 TAMs 对斑马鱼移植 BT549 细胞转移的促进作用。

删除[冬瓜]: TAMs

此外，BHS 显著逆转了联合注射的 TAMs 对斑马鱼移植 BT549 细胞中转移相关蛋白（波形蛋白）和干细胞相关蛋白（ALDH1A1 和 β -连环蛋白）表达水平的上调作用（图 6C-E）。这些结果清楚地表明，在与 TAMs 联合注射的情况下，BHS 可以显著抑制乳腺癌转移。更重要的是，BHS 显著减弱了斑马鱼体内 F4/80 和 CXCL1 的表达水平，表明 BHS 在体内也抑制了 TAMs/CXCL1 活性（图 6F）。总之，BHS 可以通过调节 TAMs/CXCL1 途径，抑制斑马鱼乳腺癌异种移植模型体内的乳腺癌转移。

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAMs

BHS 通过调节 TAMs/CXCL1 通路抑制小鼠乳腺癌异种移植模型体内乳腺肿瘤生长和肺转移

删除[冬瓜]: TAMs

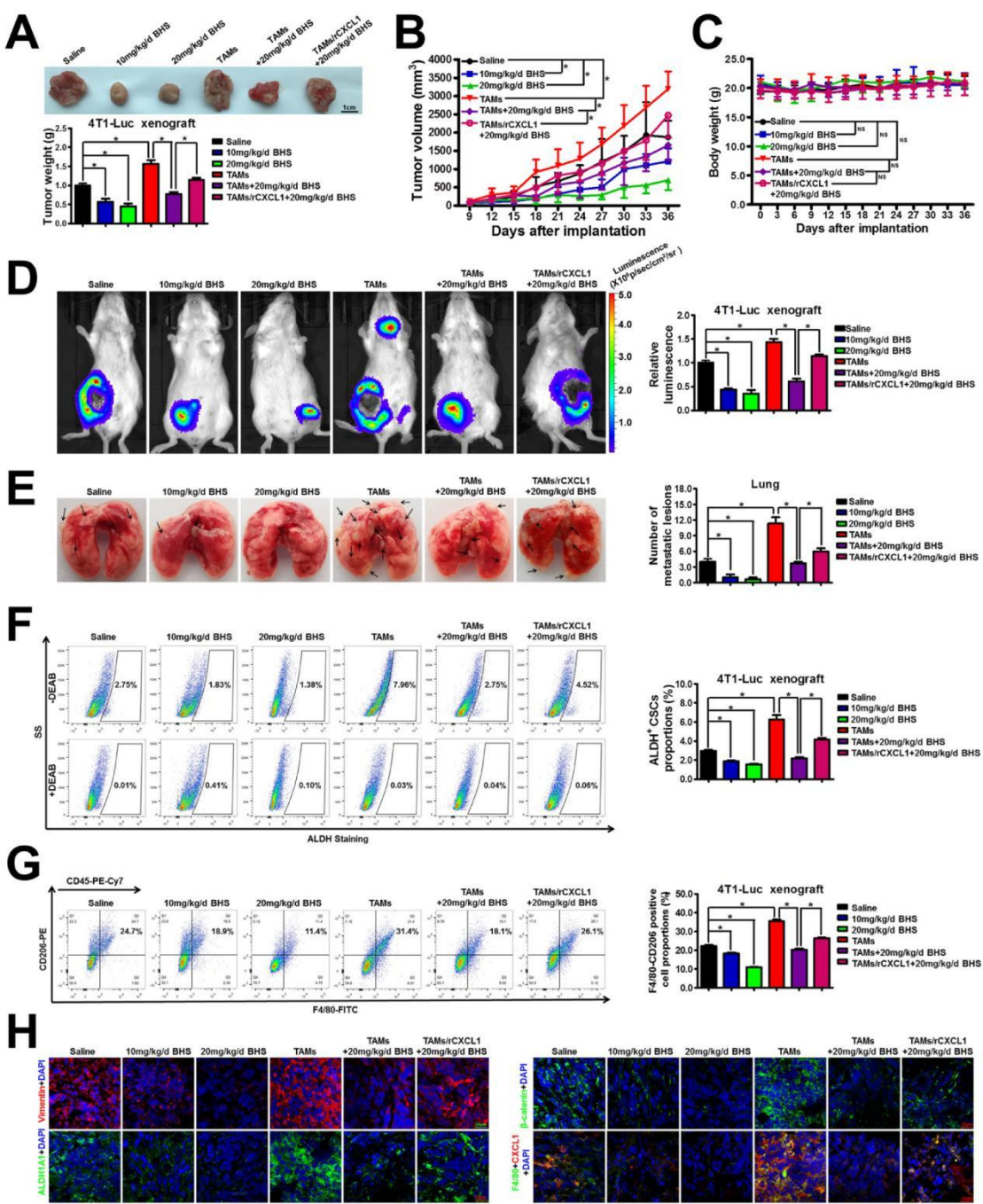


图 7. BHS 通过调节 TAMs/CXCL1 通路在体内抑制小鼠乳腺癌异种移植模型中的乳腺肿瘤生长和肺转移。

删除[冬瓜]: TAMs

(A-B) BHS 通过调节 TAMs/CXCL1 活性显著抑制小鼠 4T1-Luc 异种移植模型中的乳腺肿瘤生长。在存在或不存在 TAMs 或 TAMs/rCXCL1 共同注射的情况下，小鼠成功植入 4T1-Luc 异种移植

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAM

移植物的重量差异 (A) 以及肿瘤生长曲线 (B)。N=9，比例尺=1 厘米。

(C) 比较不同组小鼠的体重变化。N=9。

(D-E) 体内成像实验表明，BHS 通过调节 [TAMs](#)/CXCL1 活性显著抑制小鼠 4T1-Luc 异种移植植物中乳腺肿瘤的生长和肺转移。黑色箭头表示肺部乳腺癌的转移性病变。N=9。

(F-G) 流式细胞术测定证实 BHS 可以显著降低 ALDH⁺[CSCs](#) 亚群 (F) 的比例以及 M2 表型 [TAMs](#) (G) 在 4T1-Luc 异种移植植物中的浸润。N=9。

(H) 采用组织免疫荧光法检测不同组小鼠 4T1-Luc 异种移植植物中转移相关蛋白 (波形蛋白)、干细胞相关蛋白 (ALDH1A1 和 β -catenin) 和巨噬细胞标志物 (F4/80) 以及 CXCL1 的表达水平。比例尺=20 μ m。所有值均表示为平均值 \pm 标准差 SD。*p<0.05。

为了进一步验证 BHS 在体内对乳腺癌转移和 [TAMs](#)/CXCL1 活性的抑制作用，通过将荧光素酶标记的 4T1-Luc 细胞植入 Balb/c 小鼠的乳腺中，建立了小鼠乳腺癌异种移植模型。研究发现 BHS 的治疗显著延迟了 4T1-Luc 异种移植植物的生长，而 [TAMs](#) 联合注射却显著促进了这一点。更重要的是，BHS 治疗可以消除 [TAMs](#) 联合注射对 4T1-Luc 异种移植植物生长的促进作用，但这可以通过联合注射 [TAMs](#) 中的 CXCL1 过表达进一步逆转（图 7A-B）。这些结果表明，BHS 可以通过减弱 [TAMs](#)/CXCL1 活性来抑制体内乳腺异种移植植物的生长。

此外，没有观察到与 BHS 治疗相关的死亡或体重明显下降的现象（图 7C）。如补充表 1 所示，在实验结束时，收集盐水组和 BHS 处理组小鼠的血液并进行毒性测定。BHS 并未导致肝功能参数（丙氨酸转氨酶和天冬氨酸转氨酶）和小鼠肾功能参数（尿素、尿酸和肌酐），表明 BHS 对小鼠的肝肾功能没有明显影响。

值得注意的是，BHS 治疗还显著抑制了 4T1-Luc 异种移植植物的肺转移，而 [TAMs](#) 联合注射显著促进了肺转移。同时，BHS 可以消除 [TAMs](#) 联合注射对 4T1-Luc 异种移植植物肺转移的促进作用，这可以通过联合注射 [TAMs](#) 中的 CXCL1 过表达进一步逆转（图 7D-E）。

这些结果表明，BHS 可以通过减弱 [TAMs](#)/CXCL1 活性来抑制体内异种乳腺移植植物的肺转移。上述结果与我们之前的研究结果一致 (Wang et al., 2019b; Zheng et al., 2020)^{[15][27]}，即通过 CXCL1 干扰抑制 [TAMs](#)/CXCL1 活性可以显著抑制小鼠 4T1-Luc 异种移植模型中的乳腺肿瘤生长和肺转移。

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: CSC

删除[冬瓜]: TAM

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAM

删除[冬瓜]: TAM

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAM

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: .

在机理探索方面，流式细胞术进一步验证了 BHS 可以显著降低 ALDH⁺CSCs 亚群的比例以及 M2 表型 TAMs 在 4T1-Luc 异种移植物中的浸润，而 TAMs 联合注射显著提高了它们。

更重要的是，BHS 治疗显著消除了联合注射 TAMs 对 CSCs 自我更新和 M2 表型 TAMs 在 4T1-Luc 异种移植物中浸润的促进作用，但这可以通过联合注射 TAMs 中的 CXCL1 过表达进一步逆转（图 7F-G）。

此外，组织免疫荧光测定表明，BHS 的治疗，即使在存在 TAMs 联合注射的情况下，也能显著抑制了 4T1-Luc 异种移植物中转移相关蛋白(波形蛋白)和干细胞相关蛋白(ALDH1A1 和 β -catenin)的表达水平以及 TAMs/CXCL1 活性，但这可以通过联合注射的 TAMs 中的 CXCL1 过表达来逆转（图 7H）。总之，BHS 可以通过调节 TAMs/CXCL1 通路在体内抑制小鼠乳腺癌异种移植模型中的乳腺肿瘤生长和肺转移。

讨论

转移仍然是临床成功治疗乳腺癌的主要障碍。超过 90%的乳腺癌相关死亡可归因于转移性疾病。因此，人们正在努力寻找转移性乳腺癌的新治疗靶点和药物。我们之前的数据表明，新获批治疗乳腺增生的药物消癍颗粒通过抑制 TAMs/CXCL1 通路在小鼠自发性乳腺癌模型（Wang et al., 2017）^{【17】}和小鼠乳腺癌异种移植模型中均能显著抑制乳腺癌的发生和肺转移。（Wang et al., 2019b）^{【15】}。

BHS，又名淫羊藿苷 II，是淫羊藿中的一种生物活性黄酮成分，（消癍颗粒中的一种中药）。在此，由 TAMs/CXCL1 启动子活性引导的分级分离和生物学验证方法进一步确定了 BHS 是解释消癍颗粒对 TAMs 的抗 CXCL1 作用的生物活性化合物。BHS 可通过抑制 TAMs/CXCL1 活性在体外和体内均可抑制乳腺癌转移。

值得注意的是，即使在 20 μ m 的高浓度下，BHS 在体内也没有表现出可观察到的胚胎毒性或致畸作用。理想的抗转移药物应该是无毒的，在较低剂量下有效，经济且易于获得。BHS 很容易从各种植物物种中获得，例如淫羊藿，可以很容易的提取（Khan 等人，2015 年）^{【28】}。因此，这些结果有力地表明，BHS 具有多种优势和良好的前景，可作为一种有前途的抗转移候选药物进行开发。然而，未来肯

删除[冬瓜]: CSCs

删除[冬瓜]: TAM

删除[冬瓜]: TAM

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: CSCs

删除[冬瓜]: TAM

删除[冬瓜]: TAM

删除[冬瓜]: .

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAMs

定需要更多的临床前研究和临床试验来验证 BHS 的抗转移应用。

BHS 具有多种生物学和药理特性，包括抗骨质疏松、抗炎、抗氧化和神经保护作用（Chen 等，2016）^{【29】}。值得注意的是，在过去的十年中，越来越多的证据表明，BHS 可以通过多种信号通路包括 JAK2-STAT3、MAPK、PI3k-Akt-mTOR 和 miRNAs（Chen 等，2016）^{【29】}，调节细胞周期、细胞凋亡、血管生成和转移，从而对各种恶性肿瘤表现出抗肿瘤特性。例如，BHS 可以通过激活 p38 通路诱导细胞周期停滞和急性髓性白血病细胞分化（Yang 等人，2019b）^{【30】}。此外，BHS 可以通过上调黑色素瘤中的 miR-144 来抑制细胞增殖和迁移（Peng 和 Zhang，2018）^{【31】}。此外，BHS 还可以提高紫杉醇对人黑色素瘤细胞的化学治疗的敏感作用（Chen 等，2016）^{【29】}。

现有关于 BHS 抗肿瘤作用的研究大多集中在 BHS 对癌细胞的直接作用上。BHS 是否可以通过调节免疫细胞的抗肿瘤免疫功能来抑制癌症的生长和转移尚不清楚。宋等人曾报道，用于报告非细胞毒性浓度的 BHS 可以抑制 LPS 刺激的巨噬细胞 CM 诱导的肺癌 A549 和 H1299 细胞的侵袭和 EMT（Song 等，2017）^{【32】}，表明 BHS 和巨噬细胞之间存在潜在的相关性。然而，潜在的机制仍不清楚。在此，我们首次发现 BHS 还可以抑制 M2 表型极化、CXCL1 表达和 TAMs 分泌，从而抑制 TAMs/CXCL1 介导的乳腺癌细胞转移和乳腺癌干细胞 CSCs 的自我更新。因此，我们的发现有力地表明了 BHS 作为乳腺癌治疗的抗转移候选药物的优势，不仅通过直接杀死癌细胞发挥作用，而且通过 TAMs/CXCL1 通路重塑肿瘤免疫微环境。

删除[冬瓜]: TAMs
删除[冬瓜]: TAMs
删除[冬瓜]: CSCs
删除[冬瓜]: TAMs

同样，Kim 等人报道，BHS 可以通过下调另一种趋化因子 CXCL12 及其结合受体 CXCR4（CXC 趋化因子受体 4）来抑制乳腺癌细胞的侵袭（Kim 和 Park，2014 年）^{【33】}。此外，据报道，BHS 在体外也表现出对 T 细胞和 B 细胞活化的选择性免疫抑制作用（Ma et al., 2004）^{【34】}，表明 BHS 可能通过调节淋巴细胞来重塑肿瘤免疫微环境。考虑到肿瘤免疫微环境的复杂性，BHS 对其他类型趋化因子和免疫细胞的调节作用仍需进一步研究。

在过去的几十年里，中医药被广泛认为是药物发现和开发的丰富资源。例如，2015 年诺贝尔生理学或医学奖授予了药理学家屠呦呦，因为他们发现青蒿素是一种关键的抗疟药物，来自中药黄花蒿。草药提取物长期以来一直用于癌症治疗，据报道有 3000 多种草药用于临床治疗癌症（Amin 等，2009）^{【35】}。过去几十年

的广泛研究已经确定了许多被广泛用作一线抗癌药物的草药化合物，如紫杉醇、喜树碱、长春新碱和鬼臼毒素酊。尽管有一些新的药物发现方法，例如组合化学和基于计算机的分子建模设计，它们都不能取代中药化合物在抗癌药物发现和开发中的重要性。事实上，中药化合物将继续在未来高效抗癌药物的发现中发挥主导作用（Millimouno 等，2014）^{【36】}。

然而，由于一种中药中可能含有数百种植物化学物质，因此确定中药配方或草药中的实际生物活性化合物仍然是一个障碍。因此，设计一种可靠的策略来专门筛选药材中的活性化合物至关重要。近年来，越来越多的研究强调了肿瘤微环境成分对乳腺癌细胞，尤其是乳腺癌干细胞 [CSCs](#) 的重要调控作用。所以，基于肿瘤微环境调控筛选药用植物中的活性化合物可能是比传统的以细胞毒性为导向的分离策略更具体、更经济的策略。在本研究中，采用 [TAMs](#)/CXCL1 启动子活性引导的 [分离](#)方法分离消癍颗粒中的生物活性化合物。通过在体外和体内验证 BHS 的抗转移作用，该策略被证明是一种有前途且可靠的筛选技术。同时，这种以生物活性为指导的分级分离方法也表明 BHS 作为消癍颗粒质量控制的关键参考化合物之一。

删除[冬瓜]: CSCs

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: 馏

结论

综上所述，生物活性指导的分级分离和生物验证方法确定了 BHS 是消癍颗粒的生物活性化合物，通过调节 [TAMs](#)/CXCL1 通路抑制乳腺癌转移。该研究不仅为 [TAMs](#)/CXCL1 作为抗转移药物发现的可靠筛选靶点提供了新的见解，而且还表明 BHS 作为转移性乳腺癌治疗的有希望的候选药物。

删除[冬瓜]: TAMs

删除[冬瓜]: TAMs

作者贡献

王志宇参与了数据的设计、分析、解读和文章的撰写。王胜奇进行了实验，分析了数据，并起草了手稿。黄晓伟进行了实验并分析了数据。王能、杨博文、郑佚枫、张菊萍、王璇、林毅参与了资料的解读、文稿的讨论和校对。所有作者都知道并同意论文的内容以及他们被列为论文的作者。All data were generated in-house, and no paper mill was used。所有作者同意对确保完整性和准确性的工作的所有方面负责。

竞争利益声明

作者宣称没有利益冲突。

致谢

这项工作得到了国家自然科学基金的支持[81873306, 81573651, 81973526, 81703749, 81703764]；广东省科技厅[2016A030306025]；广东省特殊支持计划高层次人才 [A1.3002.16.111.003] ； 广 东 省 教 育 厅 [2018KZDXM022, A1-2606-19-111-009]；广东省中医药局项目[20181132、20182044、20201132] ； 广 东 省 自 然 科 学 基 金 博 士 研 究 基 金 [2017A030310213, 2018A030310506]；广东省科技规划项目[2017B030314166]；广州市科技计划[201904010407]；广东省中医院中医药科技专项研究基金 [YN2018MJ07, YN2018QJ08]和广州中医药大学青年学者基金会[QNYC20190101]。

补充材料

可以在 doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153331 的在线版本中找到与本文相关的补充材料。

参考文献

- 【1】Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A., 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68, 394–424.
- 【2】DeSantis, C.E., Ma, J., Goding Sauer, A., Newman, L.A., Jemal, A., 2017. Breast cancer statistics, 2017, racial disparity in mortality by state. *CA Cancer J Clin* 67, 439–448.
- 【3】Nie, J., Zhao, C., Deng, L.I., Chen, J., Yu, B., Wu, X., Pang, P., Chen, X., 2016. Efficacy of traditional Chinese medicine in treating cancer. *Biomed Rep* 4, 3–14.
- 【4】Tian, H., Qin, W., Wu, W., Guo, P., Lu, Y., Liu, P., Liu, Q., Su, F., 2015. Effects of Traditional Chinese Medicine on Chemotherapy-Induced Myelosuppression and Febrile Neutropenia in Breast Cancer Patients. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015, 736197.

【5】Wang, W., Xu, L., Shen, C., 2015. Effects of Traditional Chinese Medicine in Treatment of Breast Cancer Patients After Mastectomy: a Meta-Analysis. *Cell Biochem. Biophys.* 71, 1299–1306.

【6】Ye, L., Jia, Y., Ji, K.E., Sanders, A.J., Xue, K., Ji, J., Mason, M.D., Jiang, W.G., 2015. Traditional Chinese medicine in the prevention and treatment of cancer and cancer metastasis. *Oncol Lett* 10, 1240–1250.

【7】Guo, Q., Li, J., Lin, H., 2015. Effect and Molecular Mechanisms of Traditional Chinese Medicine on Regulating Tumor Immunosuppressive Microenvironment. *Biomed Res Int* 2015, 261620.

【8】De la Fuente Lopez, M., Landskron, G., Parada, D., Dubois-Camacho, K., Simian, D., Martinez, M., Romero, D., Roa, J.C., Chahuan, I., Gutierrez, R., Lopez, K.F., Alvarez, K., Kronberg, U., Lopez, S., Sanguinetti, A., Moreno, N., Abedrabo, M., Gonzalez, M.J., Quera, R., Hermoso, R.M., 2018. The relationship between chemokines CCL2, CCL3, and CCL4 with the tumor microenvironment and tumor-associated macrophage markers in colorectal cancer. *Tumour Biol.* 40, 1010428318810059.

【9】Lao, L., Fan, S., Song, E., 2017. Tumor Associated Macrophages as Therapeutic Targets for Breast Cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1026, 331–370.

【10】Palomino, D.C., Marti, L.C., 2015. Chemokines and immunity. *Einstein (Sao Paulo)* 13, 469–473.

【11】Wang, N., Liu, W., Zheng, Y., Wang, S., Yang, B., Li, M., Song, J., Zhang, F., Zhang, X., Wang, Q., Wang, Z., 2018. CXCL1 derived from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via activating NF- κ B/SOX4 signaling. *Cell Death Dis* 9, 880.

【12】Zou, A., Lambert, D., Yeh, H., Yasukawa, K., Behbod, F., Fan, F., Cheng, N., 2014. Elevated CXCL1 expression in breast cancer stroma predicts poor prognosis and is inversely associated with expression of TGF- β signaling proteins. *BMC Cancer* 14, 781.

【13】Acharyya, S., Oskarsson, T., Vanharanta, S., Malladi, S., Kim, J., Morris, P.G., Manova-Todorova, K., Leversha, M., Hogg, N., Seshan, V.E., Norton, L., Brogi, E., Massague, J., 2012. A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis. *Cell* 150, 165–178.

【14】Miyake, M., Hori, S., Morizawa, Y., Tatsumi, Y., Nakai, Y., Anai, S., Torimoto, K., Aoki, K., Tanaka, N., Shimada, K., Konishi, N., Toritsuka, M., Kishimoto, T., Rosser, C.J., Fujimoto, K., 2016. CXCL1-Mediated Interaction of Cancer Cells with Tumor-Associated Macrophages and Cancer-Associated Fibroblasts Promotes Tumor Progression in Human Bladder Cancer. *Neoplasia*

18, 636–646.

【15】 Wang, S., Liu, X., Huang, R., Zheng, Y., Wang, N., Yang, B., Situ, H., Lin, Y., Wang, Z., 2019b. XIAOPI Formula Inhibits Breast Cancer Stem Cells via Suppressing TumorAssociated Macrophages/C-X-C Motif Chemokine Ligand 1 Pathway. *Front Pharmacol* 10, 1371.

【16】 Wang, N., Yang, B., Muhetaer, G., Wang, S., Zheng, Y., Lu, J., Li, M., Zhang, F., Situ, H., Lin, Y., Wang, Z., 2019a. XIAOPI formula promotes breast cancer chemosensitivity via inhibiting CXCL1/HMGB1-mediated autophagy. *Biomed. Pharmacother* 120, 109519.

【17】 Wang, N., Zheng, Y., Gu, J., Cai, Y., Wang, S., Zhang, F., Chen, J., Situ, H., Lin, Y., Wang, Z., 2017. Network-pharmacology-based validation of TAMS/CXCL-1 as key mediator of XIAOPI formula preventing breast cancer development and metastasis. *Sci Rep* 7, 14513.

删除[冬瓜]: TAMS

【18】 Yang, B.W., Wang, N., Wang, S.Q., Li, X., Zheng, Y.F., Li, M., Song, J.X., Zhang, F.X., Mei, W.J., Lin, Y., Wang, Z.Y., 2019a. Network-pharmacology-based identification of caveolin-1 as a key target of *Oldenlandia diffusa* to suppress breast cancer metastasis. *Biomed. Pharmacother.* 112, 108607.

【19】 Jiao, L., Wang, S.Q., Wang, N., Zheng, Y.F., Yang, B.W., Wang, D.M., Wang, Z.Y., 2018. Betulinic acid suppresses breast tumorigenesis by inducing metabolism reprogramming via caveolin-1 pathway. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 123, 33–34.

【20】 Jo, A., Eon Kim, C., Lee, M., 2020. Serratane triterpenoids isolated from *Lycopodium clavatum* by bioactivity-guided fractionation attenuate the production of inflammatory mediators. *Bioorg. Chem.* 96, 103632.

【21】 Wozniak, D., Janda, B., Kapusta, I., Oleszek, W., Matkowski, A., 2010. Antimutagenic and anti-oxidant activities of isoflavonoids from *Belamcanda chinensis* (L.) DC. *Mutat. Res.* 696, 148–153.

【22】 Han, C., Wang, S., Li, Z., Chen, C., Hou, J., Xu, D., Wang, R., Lin, Y., Luo, J., Kong, L., 2018. Bioactivity-guided cut countercurrent chromatography for isolation of lysine-specific demethylase 1 inhibitors from *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Anal. Chim. Acta* 1016, 59–68.

【23】 İlhan, M., Ali, Z., Khan, I.A., Tastan, H., Kupeli Akkol, E., 2020. Isolation and identification of triterpenes from *Anthemis austriaca* Jacq. through bioactivity-guided fractionation on polycystic ovary syndrome rat model. *Arch. Gynecol. Obstet* 301, 1103–1111.

【24】 Li, L.F., Chan, B.C., Yue, G.G., Lau, C.B., Han, Q.B., Leung, P.C., Liu, J.K., Fung, K.P., 2013. Two

immunosuppressive compounds from the mushroom *Rubinoletus ballouii* using human peripheral blood mononuclear cells by bioactivity-guided fractionation. *Phytomedicine* 20, 1196–1202.

【25】 Wang, Y.P., Lei, Q.Y., 2017. Perspectives of Reprogramming Breast Cancer Metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1026, 217–232.

【26】 Parisi, L., Gini, E., Baci, D., Tremolati, M., Fanuli, M., Bassani, B., Farronato, G., Bruno, A., Mortara, L., 2018. Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: killers or Builders? *J Immunol Res* 2018, 8917804.

【27】 Zheng, Y., Wang, N., Wang, S., Yang, B., Situ, H., Zhong, L., Lin, Y., Wang, Z., 2020. XIAOPI formula inhibits the pre-metastatic niche formation in breast cancer via suppressing TAMs/CXCL1 signaling. *Cell Commun Signal* 18, 48.

删除[冬瓜]: TAMs

【28】 Khan, M., Maryam, A., Qazi, J.I., Ma, T., 2015. Targeting Apoptosis and Multiple Signaling Pathways with Icariside II in Cancer Cells. *Int. J. Biol. Sci.* 11, 1100–1112.

【29】 Chen, M., Wu, J., Luo, Q., Mo, S., Lyu, Y., Wei, Y., Dong, J., 2016. The Anticancer Properties of *Herba Epimedii* and Its Main Bioactive Components icariin and Icariside II. *Nutrients* 8, 563.

【30】 Yang, J., Lan, J., Du, H., Zhang, X., Li, A., Zhang, X., Liu, Y., Zhang, J., Zhang, C., Ding, Y., Zhang, T., 2019b. Icariside II induces cell cycle arrest and differentiation via TLR8/MyD88/p38 pathway in acute myeloid leukemia cells. *Eur. J. Pharmacol.* 846, 12–22.

【31】 Peng, Y.G., Zhang, L., 2018. Baohuoside-I suppresses cell proliferation and migration by up-regulating miR-144 in melanoma. *Pharm Biol* 56, 43–50.

【32】 Song, J., Feng, L., Zhong, R., Xia, Z., Zhang, L., Cui, L., Yan, H., Jia, X., Zhang, Z., 2017. Icariside II inhibits the EMT of NSCLC cells in inflammatory microenvironment via down-regulation of Akt/NF- κ B signaling pathway. *Mol. Carcinog.* 56, 36–48.

【33】 Kim, B., Park, B., 2014. Baohuoside I suppresses invasion of cervical and breast cancer cells through the downregulation of CXCR4 chemokine receptor expression. *Biochemistry* 53, 7562–7569.

【34】 Ma, A., Qi, S., Xu, D., Zhang, X., Daloze, P., Chen, H., 2004. Baohuoside-1, a novel immunosuppressive molecule, inhibits lymphocyte activation in vitro and in vivo. *Transplantation* 78, 831–838.

【35】 Amin, A.R., Kucuk, O., Khuri, F.R., Shin, D.M., 2009. Perspectives for cancer prevention with natural compounds. *J. Clin. Oncol.* 27, 2712–2725.

【36】 Millimouno, F.M., Dong, J., Yang, L., Li, J., Li, X., 2014. Targeting apoptosis pathways in cancer and perspectives with natural compounds from mother nature. *Cancer Prev Res (Phila)* 7, 1081–1107.