

消癥颗粒通过抑制肿瘤 TAMs/CXCL1 通路抑制乳腺癌干细胞

王胜奇^{1, 2, 3}, 刘晓雁¹, 黄仁伦^{1, 2}, 郑轶枫^{1, 2, 3}, 王能^{1, 4}, 杨博文^{1, 2}, 司徒红林¹, 林毅¹, 王志宇^{1, 2, 3, 4}

DOI <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01371>

Frontiers in Pharmacology (IF 5.810)

摘要

在包括乳腺癌在内的多种恶性肿瘤中,巨噬细胞是与宿主免疫系统相关最密切的基质细胞。2018 年,消癥颗粒(XPS)经国家食品药品监督管理局(SFDA)批准用于治疗乳腺增生症,临床疗效确切,无明显不良反应。现有关于 XPS 抗乳腺癌活性及其作用机制的研究非常有限。

本研究旨在探讨 XPS 能否通过调节肿瘤相关巨噬细胞在肿瘤微环境中发挥抗乳腺癌作用。

在此,我们利用 transwell 共培养系统将乳腺癌细胞与 TAMs 共同培养,模拟它们共存的情况。在共培养体系中,XPS 能显著抑制人和小鼠乳腺癌细胞的增殖、集落形成、乳腺癌干细胞亚群、乳腺微球形成能力以及干细胞相关基因的表达。此外,XPS 还能抑制 M2 表型极化,抑制 CXCL1 的表达和分泌。

值得注意的是,进一步的机制研究证实,TAMs/CXCL1 是 XPS 在共培养体系中抑制乳腺 CSCs 自我更新的关键靶点,因为外源性 CXCL1 可以抵消 XPS 对乳腺 CSCs 自我更新的抑制作用。

更重要的是,XPS 在小鼠 4T1-Luc 异种移植体内能显著抑制乳腺肿瘤生长、乳腺 CSCs 亚群和 TAMs/CXCL1 的活性,而且没有任何可检测到的副作用。

综上所述,本研究不仅揭示了 XPS 在乳腺癌治疗中的免疫调节机制,而且为 TAMs/CXCL1 作为消除乳腺 CSCs 的潜在分子靶点提供了新的见解。

引言

乳腺癌是最常见的恶性肿瘤，也是女性癌症相关死亡的第二大原因(Allemani 等人, 2015;Bray 等人, 2018)^{【1-2】}。乳腺癌本身约占全球新诊断癌症病例的 24.2%，占全球女性癌症相关死亡病例的 15.0%(Bray 等人, 2018 年)^{【2】}。乳腺癌的发病率仍在上升(Allemani 等人, 2015)^{【1】}，全球乳腺癌发病年龄趋于年轻化(Ali 等人, 2011)^{【3】}。

虽然在过去几十年中，由于早期发现和包括常规手术、放射治疗、化疗、内分泌治疗和分子靶向治疗在内的多学科进展，乳腺癌患者的总体存活率有了显著提高，但仍有相当比例的患者会复发，甚至死于乳腺癌(Chia 等人, 2008 年)^{【4】}。因此，人们正在作出广泛的努力，以确定新的治疗目标或开发新的药物治疗这种可怕的疾病。

中医药在延长癌症患者的生存时间、减轻副作用和提高生活质量方面取得了令人鼓舞的效果，几千年来，中医药一直被广泛应用于癌症的预防和治疗，主要在中国及其周边地区(Nie 等人, 2016;Liao 等人, 2017)^{【5-6】}。值得注意的是，中医药在乳腺癌治疗中具有独特的优势，可以提高乳房切除术后短期治疗效果，延长 5 年生存期，并减少乳腺癌患者乳腺切除术后的不良反应发生率(Tian 等, 2015;Wang 等, 2015)^{【7-8】}。中医药已广泛应用于乳腺癌的临床治疗。据估计，在台湾，超过 35.6%的乳腺癌患者曾接受过中医治疗(Lin and Chiu, 2011)^{【9】}。

消癖颗粒是 2018 年 12 月 28 日国家食品药品监督管理局批准的新型抗乳腺增生药物。它已经在临床上用于治疗乳腺增生病几十年了，其疗效已被广泛的临床实践所证实。乳腺癌通常起源于不受控制的乳腺上皮细胞增生和乳腺导管增生，而非典型增生则是乳腺的癌前病变(Santisteban 等., 2010)^{【10】}。此外，网络药理学分析表明，消癖颗粒中的 10 种中药可能含有 105 种活性化合物，并进一步调控 806 个潜在靶点，其中 81 种与乳腺癌的发展密切相关(Wang 等, 2017)^{【11】}。基于上述证据，我们推测消癖颗粒在抑制乳腺癌方面也可能是有效的。然而，现有关于消癖颗粒抗乳腺癌活性及其作用机制的研究非常有限。

在中医哲学中，乳腺癌被认为是一种系统性疾病，是细胞微环境失调的结果。因此，中医专注于内在免疫的整体增强和重塑肿瘤免疫微环境以治疗乳腺癌，而不是直接杀死癌细胞(Cohen 等人, 2002;Xie 等人, 2018)^{【12-13】}。乳腺 CSCs 是肿

瘤细胞的一个亚组，它们具有启动肿瘤的能力，自我更新的能力，多能性和高致瘤性(Vahidian 等人, 2019)^{【14】}。越来越多的证据表明，乳腺 CSCs 对乳腺癌的发生、进展、复发和治疗耐药性至关重要(Shima 等人, 2017)^{【15】}。因此，迫切需要采取更有针对性的策略来针对乳腺癌干细胞，以改善乳腺癌患者的预后。越来越多的证据表明，CSCs 可以通过募集各种免疫细胞并与之相互作用来逃避免疫破坏，促进免疫抑制性肿瘤微环境的建立(Vahidian 等人, 2019)^{【14】}。因此，进一步阐明乳腺 CSCs 与免疫细胞的相互作用和潜在的信号机制将为改善乳腺癌免疫治疗提供新的机会(Vahidian 等人, 2019)^{【14】}。

肿瘤免疫微环境由多种免疫细胞组成，包括巨噬细胞、自然杀伤细胞、骨髓源性抑制细胞(MDSC)、调节性 T 细胞(Tregs)、细胞毒性 T 淋巴细胞(CTLs)和辅助性 T 细胞(Th)(Binnewies 等人, 2018 年)^{【16】}。巨噬细胞是包括乳腺癌在内的多种恶性肿瘤中最丰富的免疫细胞(Lao 等人, 2017;DelaFuenteLopez 等人, 2018)^{【17-18】}。巨噬细胞一般分为两个广泛但不同的亚类，即经典激活(M1)，或者是交替激活(M2 或肿瘤相关的巨噬细胞(TAMs))(Parisi 等人, 2018)^{【19】}。M2 型巨噬细胞在人类肿瘤中占主导地位，并产生促生长趋化因子，促进肿瘤生长。

TAMs 的浸润创造了一种支持癌症发生和分泌多种细胞因子，促进癌症血管生成和侵袭，并抑制抗肿瘤免疫的炎症状态(Mills 等人, 2016)^{【20】}。TAMs 也与促进乳腺癌的生长和转移有关(Hollmen 等人, 2016)^{【21】}。临床证据有力地证明了乳腺癌患者高 TAMs 浸润与预后不良之间的关系(Tang 等人, 2013;Hollmen 等人, 2016)^{【21-22】}。

中医药因其在肿瘤治疗中的重要作用而倍受关注。多项研究表明，抑制 TAMs 向 M2 型极化或重编程 TAMs 向 M1 型转变可以抑制肿瘤生长(Parisi 等人, 2018)^{【19】}。然而，XPS 能否抑制肿瘤免疫微环境中巨噬细胞 M2 极化或其细胞因子的分泌，目前尚不清楚。

本研究通过体外构建 TAMs 与乳腺癌细胞共培养体系和体内构建乳腺癌细胞异种移植瘤，系统地证明 XPS 能够抑制 M2 表型极化以及 CXCL1 的表达和分泌，最终导致消癥颗粒对乳腺癌细胞自我更新的抑制作用。总的来说，我们的研究揭示了消癥颗粒在乳腺癌治疗中的免疫调节机制，并强调 TAMs/CXCL1 是一个潜在的分子靶点，可用于消除乳腺 CSCs。

物料及方法

细胞培养和诱导

来自于美国菌种保藏中心的非恶性人乳腺上皮细胞系 MCF-10A、人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231、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。所有这些细胞系的身份已经通过短串联重复序列分析验证。

MCF-10A 细胞在 DMEM/F12 培养基中培养，补充加入 5% 马血清、1% 青霉素和链霉素 (Gibco, Grand Island, NY, USA)、20 ng/ml 重组人表皮生长因子 (EGF)、0.5 μ g/ml 氢化可的松、100 ng/ml 霍乱毒素和 10 μ g/ml 胰岛素 (Aldrich Sigma, 中国上海)。

MDA-MB-231 和 4T1 细胞在添加 10% 胎牛血清和 1% 青霉素和链霉素 (Gibco) 的 DMEM 培养基中培养。

Thp1 和 Raw264.7 细胞在添加 10% 胎牛血清和 1% 青霉素和链霉素 (Gibco) 的 RPMI-1640 培养基中培养。

所有细胞在含有 5% CO₂ 的湿化培养箱中保持在 37°C。

100 ng/ml phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA, Sigma-Aldrich) 诱导 Thp1 单核细胞附着和分化为巨噬细胞。

以乳腺癌细胞系 MDA-M-231 和 4T1 的细胞培养上清液作为条件培养基 (CM)，诱导 Thp1 巨噬细胞和 RAW264.7 巨噬细胞向 M2 表型转化。

对于乳腺癌细胞与 TAMs 的共培养，采用 6 孔或 24 孔跨孔共培养系统。

简而言之，transwell 插入物被放置在含有乳腺癌细胞的 6 孔或 24 孔培养板中。TAMs 置于上交换腔内。

Transwell 插入物由一个 0.4 μ m 的可渗透膜隔开，允许介质和可溶性分子的自由交换。

消癥颗粒的制备及质量控制

从淫羊藿、肉苁蓉、益母草、丹参、郁金、莪术、女贞子、制何首乌、牡蛎、鳖甲 10 种中药的混合物中提取了消癥颗粒。采用回流萃取法分别提取，采用高

效液相色谱指纹图谱法对其进行质量控制。详细的制备和质量控制信息以前已经报道过(Liu, 2010;Wang and Huang, 2010;Wang 等人, 2017)^{【23-24, 11】}。

流式细胞仪分析

流式细胞仪分析巨噬细胞表面标志物, 鉴定巨噬细胞的表型。在浓度为 5×10^6 细胞/ml 浓度下, 用 100 μ l PBS 溶液, 对巨噬细胞进行简单的收集、洗涤和悬浮。

以 Thp1 巨噬细胞为实验对象, 在 37°C 条件下分别用 FITC 结合的 F4/80 抗体(SC-71085, Santa Cruz Biotechnology, 美国加利福尼亚州圣克鲁斯)和 PE 结合的 CD163 抗体(12-1639-42, eBioscience San Diego, 美国加利福尼亚州)孵育 30 分钟。

对 Raw264.7 巨噬细胞, 在 37°C 下用 FITC 结合的 F4/80 抗体(SC-71085, Santa Cruz)和 PE 结合的 CD206 抗体(141705, Biolegend, San Diego, CA)孵育 30 分钟。

用 CD45-PE-Cy7(25-0451-82, eBioscience)、FITC-F4/80 抗体(SC-71085, Santa Cruz)和 PE-CD206 抗体(141705, Biolegend)在 37°C 培育 30 分钟, 用于对小鼠 4T1-Luc 异种移植物中原代巨噬细胞进行表型分析。

培养后, 用 PBS 洗涤细胞一次, 然后用 FC500 流式细胞仪(富勒顿 Beckman Coulter)或 FACS Aria III 流式细胞仪(BD Biosciences, San Diego, CA)进行分析。

将 F4/80⁺/CD163⁺亚群、F4/80⁺/CD206⁺亚群或 CD45⁺/F4/80⁺/CD206⁺亚群定量为 M2 型巨噬细胞。

MTT 分析

MTT 法检测消癥颗粒对乳腺上皮细胞、乳腺癌细胞和巨噬细胞的细胞毒性。总之, 将细胞种植到密度为 5×10^3 /孔的 96 孔板中。细胞粘附后, 分别用 XPS 浓度梯度法处理细胞 24h 和 48h, 以探讨 XPS 在 TAMs 存在下是否仍对乳腺癌细胞增殖有抑制作用, 并与乳腺癌细胞和 TAMs 在 24 孔共培养体系中共培养。TAMs 以每孔 3×10^4 细胞的密度接种在上部 transwell 小室中, 乳腺癌细胞以每孔 5×10^3 细胞的密度接种在下部小室中, 细胞粘附后用 XPS 进行连续浓度梯度处理 48h, 按照制造商的说明书, 用 MTT 法检测细胞活力。MTT 测定以独立的三次重复进行。

集落形成试验

为了研究 XPS 对乳腺癌细胞集落形成的影响, 将 MDA-MB-231 和 4T1 细胞分别接种于密度为每孔 2,000 个细胞的 6 孔板中。

为了探讨在 TAMs 存在下 XPS 是否仍具有抑制乳腺癌细胞集落形成的作用, 将乳腺癌细胞与 TAMs 在 24 孔 transwell 共培养体系中共同培养。TAMs 以 3×10^4 个细胞/孔的密度接种在上部 transwell 小室中, 而乳腺癌细胞以 200 个细胞/孔的密度接种在下部小室中。

细胞贴壁后, 用连续浓度梯度的 XPS 处理细胞 48h, 然后用新鲜培养基代替。

然后, 细胞培养 2 周, 所得菌落用 4% 的多聚甲醛固定, 再用考马斯蓝染色。

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 (01700, STEMCELL Technologies, 加拿大温哥华), 用流式细胞仪分析乳腺癌干细胞的数量。

简单地说, 将乳腺癌细胞种植在密度为 4×10^5 个细胞/孔的 6 孔板中。

为了进行乳腺癌细胞与 TAMs 的共培养, 将 4×10^5 TAMs 种植在上部的 transwell 室中, 并将其插入到接种有 4×10^5 个乳腺癌细胞/孔的 6 孔培养板中。

用指定浓度的 XPS、CXCL1 (人 CXCL1, C597, Novoprotein, 小鼠 CXCL1, 250-11-20, Peprotech, Rocky Hill, NJ, 美国) 或 XPS 和 CXCL1 联合处理 48h。

处理后收集乳腺癌细胞, 再悬浮在 500 μ l ALDEFLUOR™ 测定缓冲液中, 然后, 将细胞与 ALDEFLUOR™ 缓冲液在 37°C 下孵育 30min 以标记 ALDH⁺ 细胞。

培养后, 用 PBS 洗涤细胞一次, 用 FC500 流式细胞仪 (Beckman) 进行分析。定义 ALDH⁺ 亚群为乳腺 CSCs。用特异性抑制 ALDH 活性的抑制剂二乙氨基苯甲醛 (DEAB) 控制 ALDH 染色中的背景荧光。

为了分析小鼠 4T1-Luc 异种移植物中乳腺 CSCs 的种群, 首先采用机械法从小鼠乳腺肿瘤中分离原发性乳腺癌细胞, 然后如上所示进行乳腺 CSCs 种群分析。

乳腺微球形成分析

将乳腺癌细胞以 1×10^5 细胞/孔的超低密度接种在 6 孔超低附着板上。

为了进行乳腺癌细胞与 TAMs 的共培养, 将 4×10^5 个 TAMs 种植在上层的 transwell 腔中, 并将 transwell 插入接种有 1×10^5 个乳腺癌细胞/孔的 6 孔培养板中。

然后按提示, 用 XPS、CXCL1 或 XPS 和 CXCL1 联合处理上述细胞 48h。

用于乳腺微球形成测定的完整培养基为 DMEM/F12 培养基, 添加有 1% 青霉素-链霉素(Gibco)、2% B27 补充剂(Gibco)、20ng/ml EGF、 $5 \mu\text{g/ml}$ 胰岛素和 0.4% 牛血清白蛋白(BSA、Sigma-Aldrich)。在显微镜下对乳腺微球的数量进行定量。

实时荧光定量核酸扩增检测系统

用 Trizol 提取总 RNA, 并用 primeScript[™]RT 试剂盒按照制造商的说明逆转录成互补 cDNA。

用 SYBR premix Ex TaqKit 试剂盒(Takara)和 Quant Studio6 和 7Flex Real-Time PCR 系统(应用生物系统, 福斯特市, 加州, 美国)进行 RT-PCR。

人 β -肌动蛋白(β -actin)的引物序列分别为 5' -CCAACCGCGAGAAGATGA-3' (正向)和 5' -CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3' (反向)。

人 β -连环蛋白(β -catenin)的引物序列为 5' -GCTTTCAGTTGAGCTGACCA-3' (正向)和 5' -CAAGTCCAAGATCAGCAGTCTC-3' (反向)。

人 OCT4 基因的引物序列分别为 5' -CAATTTGCCAAGCTCCTGA-3' (正向)和 5' -AGATGGTCGTTTGGCTGAAT-3' (反向)。

人 Nanog 基因的引物序列分别为 5' -ATGCCTCACACGGAGACTGT-3' (正向)和 5' -CAGGGCTGTCCTGAATAAGC-3' (反向)。

人 CXCL1 基因的引物序列分别为 5' -AGGGAATTCACCCCAAGAAC-3' (正向)和 5' -ACTATGGGGGATGCAGGATT-3' (反向)。

小鼠 β -肌动蛋白的引物序列分别为 5' -GGAGGGGGTTGAGGTGTT-3' (正向)和 5' -GTGTGCACTTTTATTGGTCTCAA-3' (反向)。

小鼠 β -连环蛋白的引物序列分别为 5' -ACAGCACCTTCAGCACTCT-3' (正向)和 5' -AAGTTCTTGGCTATTACGACA-3' (反向)。

小鼠 OCT4 基因的引物序列为 5' -CTGTAGGGAGGGCTTCGGGCACTT-3' (正向)和 5' -CTGAGGGCCAGGCAGGAGCACGAG-3' (反向)。

小鼠 Nanog 基因的引物序列分别为 5' -AGGGTCTGCTACTGAGATGCTCTG-3' (正

向)和 5' -CAACCACTGGTTTTCTGCCACCG-3' (反向)。

小鼠 CXCL1 基因的引物序列分别为 5' -GACTCCAGCCACACTCCAAC-3' (正向)和 5' -TGACAGCGCAGCTCATTG-3' (反向)。

蛋白质印迹法

细胞按指示处理后,用 RIPA (Beyotime Biotechnology, 中国上海)进行裂解。

根据制造商的说明书,用 Bicinchoninic Acid 试剂盒(Sigma-Aldrich)对蛋白质浓度进行定量。

将等量的蛋白质(30 μ g)在 SDS-PAGE 凝胶上溶解,转移到聚偏二氟乙烯微孔膜(Millipore Billerica, MA, USA)上,并用 β -actin(4970S, Cell signal Technology, CST, Boston, MA, USA), CXCL1(AF5403, Affinity Biosciences, OH, USA)和 β -catenin(51067-2-AP, 美国芝加哥 Proteintech)的初级抗体进行检测。

应用 Gel-Pro 4.0 分析软件(Media Cybernetics, Maryland, USA)比较条带的光密度,计算蛋白质在各组间蛋白质的相对表达水平。

酶联免疫吸附试验(Elisa Assay)

采用酶联免疫吸附试验(Elisa)检测 XPS 对 TAMs 分泌 CXCL1 的影响。

简单地说,采用 6 孔平板培养 TAMs,并用连续浓度梯度 XPS 处理 48h。

经 XPS 处理后,将 TAMs 取出,再次以 5×10^5 个细胞/孔的密度接种到 6 孔平板中,培养 24h,收集各孔的细胞培养上清液,按照生产说明书使用人 CXCL1 酶联免疫吸附试剂盒(中国武汉 USCN 商业公司 SEA041Hu)或小鼠 CXCL1 试剂盒(SEA041Mu, USCN Business)检测细胞培养上清液中 CXCL1 的浓度。

双荧光素酶报告基因检测

采用双荧光素酶报告基因法研究 XPS 对 CXCL1 启动子活性的影响。

根据生产说明书,利用 Vigenefection (FH880806, Vigene Biosciences, 济南)将 CXCL1 启动子质粒(Genecopeia, 广州)转染到 Raw264.7 衍生的 TAMs。然后将转染细胞种植在密度为 2×10^4 个细胞/孔的 96 孔板中,并用连续浓度梯

度 XPS 处理 48h。

经 XPS 处理后, 收集各孔的细胞培养上清液。根据生产厂家的说明, 采用 Secrete-Pair™ Dual Luminescence Assay 试剂盒 (LF031, Genecopeia), 通过分析细胞培养上清液中 Gaussia 荧光素酶活性和分泌性碱性磷酸酶活性来检测 CXCL1 启动子活性。

组织免疫荧光

对于免疫荧光分析, 乳腺肿瘤冰冻切片用 4%多聚甲醛固定 20 分钟, 用 PBS 洗涤 3 次, 0.25% Triton X-100 透化 20 分钟, 然后室温下用 5% BSA 封闭 1h, 对于 F4/80 和 CXCL1 检测, 将组织切片用 F4/80 抗体 (17-4801-80, eBioscience) 和 CXCL1 抗体 (AF5403, Affinity) 在 4°C 通宵孵育, 然后与 Alexa Fluor 555 结合的抗大鼠 IgG (4417S, CST) 和 Alexa Fluor 488 结合的抗兔 IgG (4412S, CST) 孵育 2 小时。对于 ALDH1A1 检测, 组织切片与 ALDH1A1 抗体 (BF0220, Affinity) 在 4°C 孵育过夜, 然后与 Alexa Fluor 555 结合抗鼠 IgG (A21422, Thermo Fisher) 二级抗体孵育 2h。

4', 6-二氨基-2-苯基吲哚 (DAPI, Sigma) 用于显示细胞核。采用 LSM710 共聚焦显微镜 (蔡司, 耶拿, 德国) 获得荧光图像。

动物实验

所有的活体实验都是根据我们机构的实验动物使用指南进行的, 并且得到了广东省中医院动物护理和使用委员会 (编号 2018044) 的批准。

在广东省中医院实验动物中心, 在室温 20–25°C、相对湿度 45%–50% 的无菌条件下饲养 6 周龄雌性 Balb/c 小鼠, 并给予无菌食物和饮水。饲养设施维持在 12 小时的光照–黑暗周期。

将 2×10^6 个 4T1-Luc 细胞悬浮于 200 μ l PBS 中, 接种于小鼠乳腺脂肪垫皮下, 建立 4T1-Luc 异种移植模型。

当肿瘤直径达到平均 0.5cm 时, 将小鼠随机分为两组 (每组 6 只), 分别灌注生理盐水和 XPS (1g/kg/d)。

在整个治疗过程中, 小鼠被称重, 每 3 天用卡尺测量它们的肿瘤。

计算肿瘤体积 (v) 的公式为: $v = (\text{长度}) \times (\text{宽度})^2 / 2$ 。

腹腔注射 d-荧光素 (150mg/kg weight, 122799, PerkinElmer, Boston, USA), 每周使用 IVIS Lumina XR 体内成像系统 (Perkin Elmer) 对小鼠进行成像, 以监测肿瘤生长和转移。

当肿瘤长到合适的大小时, 对小鼠实施安乐死, 并切除肿瘤。

用机械方法从新鲜乳腺肿瘤中分离出原代细胞, 并进行巨噬细胞表型分析或乳腺 CSCs 亚群分析。

其余的肿瘤组织储存在零下 80°C, 如上所示用于组织免疫荧光分析。

统计分析

数据采用平均值 ± 标准差 (SD) 表示。所有统计分析均使用 SPSS19.0 软件 (Abbott Laboratories 美国芝加哥) 进行。采用 t 检验和单因素方差分析进行组间比较。P<0.05 具有统计学意义。

结果

共培养体系中 XPS 显著抑制乳腺癌细胞增殖和集落形成能力

首先, 采用 MTT 法研究了 XPS 对乳腺上皮细胞和乳腺癌细胞的细胞毒性。

如图 1A 所示, XPS 处理 24h 或 48h 只能适度抑制人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和小鼠乳腺癌细胞 4T1 的增殖, 而对 MCF-10A 细胞没有明显的细胞毒性。三种细胞的 XPS 的 IC₅₀ 值均在 500 μg/ml 以上。

然而在 2 周培养期间 XPS 可显著抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 4T1 的集落形成能力 (图 1B), 表明 XPS 对乳腺癌细胞增殖有长期抑制作用。

在肿瘤微环境中, 癌细胞与多种细胞共存, 其中以 TAMs 占最大比例。TAMs 通常表现出免疫抑制 M2 样表型, 促进肿瘤生长并增强对治疗的抵抗力。

MDA-MB-231 细胞条件培养基 (CM) 显著增加 Thp1 巨噬细胞的 F4/80⁺/CD163⁺ 亚群, 而 4T1-CM 显著增加小鼠 Raw264.7 巨噬细胞的 F4/80⁺/CD206⁺ 亚群。这些结果表明, 人 Thp1 巨噬细胞和小鼠 Raw264.7 巨噬细胞均被成功地刺激为 M2 型巨噬细胞 (图 1C)。

乳腺癌细胞与这些 M2 样表型的 TAMs 共同培养, 利用 transwell 共培养系统研究 TAMs 存在时 XPS 能否抑制乳腺癌细胞的生长。如图 1D 所示, 在共培养体系

中, XPS 处理 48h 可显著抑制乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 和 4T1 的增殖。与 TAMs 共培养时, XPS 对 MDA-MB-231 细胞和 4T1 细胞的 IC₅₀ 值分别为 402.05 μ g/ml 和 92.64 μ g/ml。同时, XPS 还能强烈抑制共培养体系中乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 4T1 的集落形成能力(图 1E)。

总之, XPS 能显著抑制乳腺癌细胞的增殖和集落形成能力, 特别是与 TAMs 共培养时。

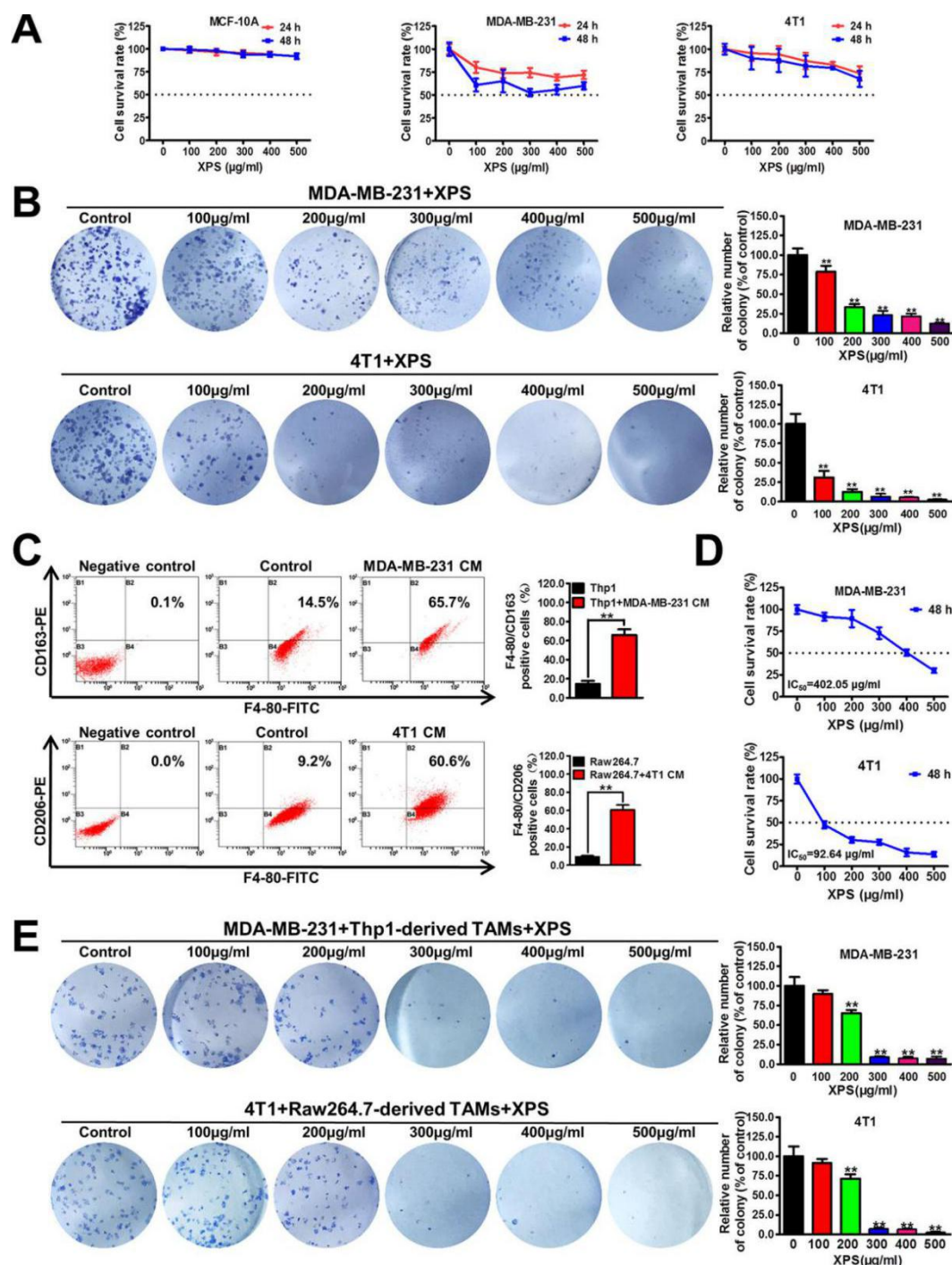


图 1|消癥颗粒 (XPS) 显著抑制共培养系统中乳腺癌细胞的增殖和集落形成能力。

(A) 通过 MTT 方法研究 XPS 在非恶性乳腺上皮细胞系 MCF-10A 和乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 和 4T1 中的细胞毒性。

(B) XPS(100~500 μ g/ml)可显著抑制乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 和 4T1 的集落形成能力。

(C) 人和小鼠巨噬细胞用乳腺癌细胞条件培养基(CM)处理 48 小时后, 均成功诱导为 M2 表型 TAM。

(D) XPS 处理 48 小时可显著抑制共培养系统中乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 和 4T1 的增殖。IC50 值通过 Bliss 方法计算。

(E) XPS 可以显著抑制共培养系统中乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 和 4T1 的集落形成能力。

所有值均表示为平均值 \pm SD, $n=3$, $**P<0.05$ 。

XPS 抑制乳腺癌细胞和 TAMs 共培养系统中乳腺 CSCs 的自我更新活性

乳腺 CSCs 被认为是乳腺癌细胞增殖和生长的启动细胞。因此, 我们进一步研究了 XPS 对乳腺 CSCs 的影响。

过度活跃的 aldehyde dehydrogenase (ALDH) 活性与 CSCs 的生理特性密切相关(Wang and Lei, 2017)^{【25】}, 与 ALDH 亚群相比, ALDH⁺亚群显示出更强的活性(Shao 等., 2016)^{【26】}。

如图 2A 所示, XPS 能显著降低 MDA-MB-231 细胞和 4T1 细胞中 ALDH⁺亚群的比例。乳腺 CSCs 在非粘连的球形细胞集群中富集, 被称为乳腺微球(Wang 等人, 2014)^{【27】}。因此, 我们进一步研究 XPS 能否抑制乳腺 CSCs 在乳腺癌细胞和 TAMs 共培养体系中的乳腺微球形成效率。

如图 2B 所示, XPS 治疗显著降低乳腺癌细胞和 TAMs 共同培养系统中乳腺微球数量。已有研究表明, 多种干细胞转录因子在 CSCs 中过度表达, 如八聚体结合转录因子 4(OCT4)、Nanog 和 β -catenin, 它们维持多能性(Hattermann 等人, 2016)^{【28】}。为进一步验证 XPS 对乳腺癌细胞共培养体系中干细胞表达的抑制作用, 采用 QPCR 方法研究 XPS 对乳腺癌细胞共培养体系中干细胞相关基因表达水平的影响。

如图 2C 所示, 在共培养乳腺癌细胞中 XPS 显著减弱干细胞相关基因的表达水平, 包括 β -catenin、OCT4 和 Nanog。

众所周知, β -连环蛋白信号通路与乳腺 CSCs 的干细胞活性增强和耐药性增强有关。此外, 已经广泛报道 β -连环蛋白可以直接上调 OCT4(Kelly 等, 2011;

Lee 等, 2014; Qi 等, 2016; Yong 等, 2016)【²⁹⁻³²】和 Nanog (Takao. 等, 2007; Li. 等, 2013; Yong. 等, 2016; Yu. 等, 2017)【^{33-35, 32}】在多种癌细胞和 CSCs 中的转录基因和蛋白表达。因此, 我们只能进一步研究 XPS 是否能降低 β -连环蛋白的表达水平。

如图 2D 所示, 蛋白质印迹法分析进一步证实, XPS 也能显著降低共培养乳腺癌细胞中 β -连环蛋白的表达水平。

结果表明, XPS 可抑制乳腺癌细胞和 TAMs 共培养系统中乳腺 CSCs 的自我更新活性。

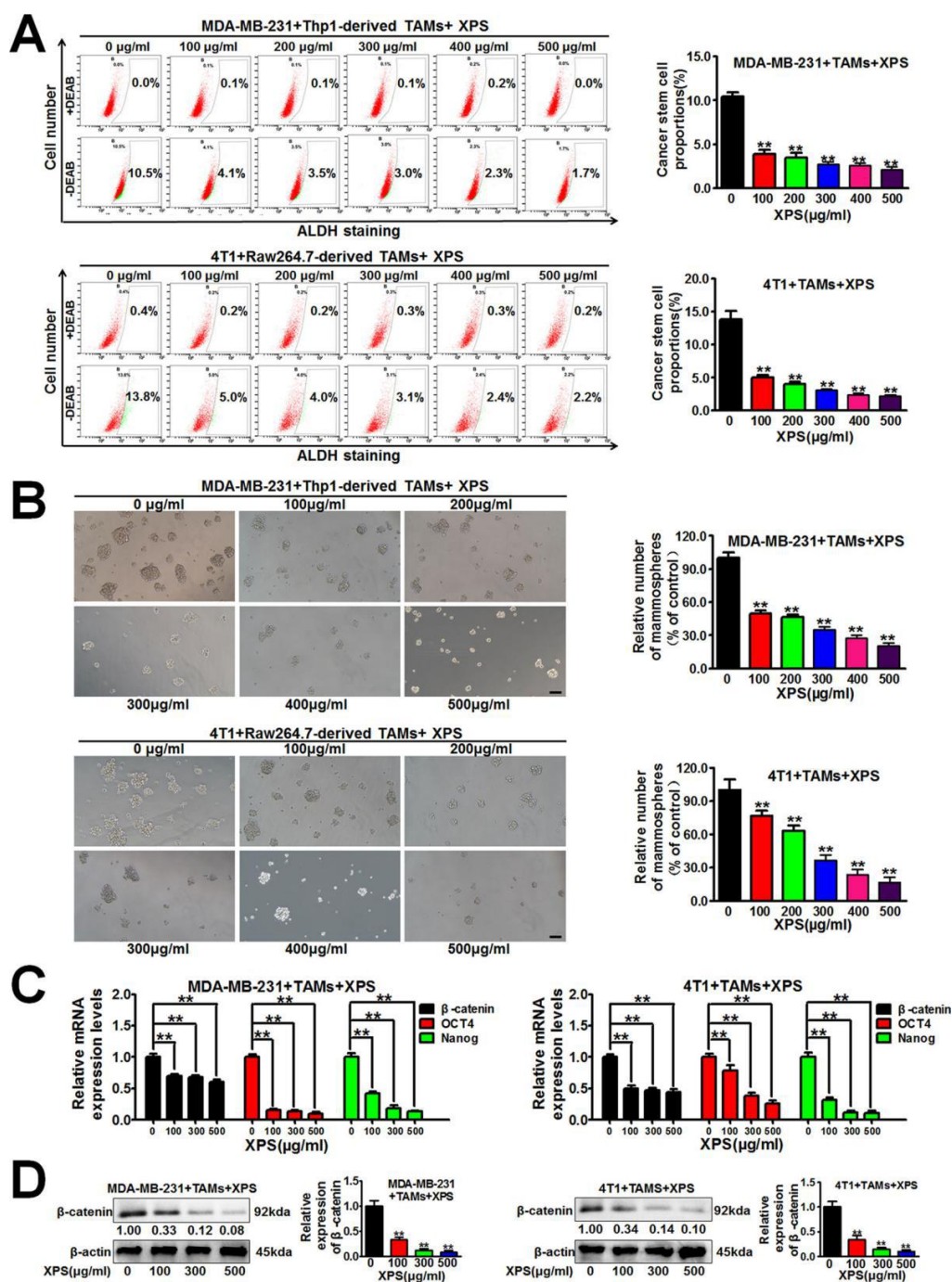


图 2 | 消癥颗粒 (XPS) 抑制乳腺癌细胞和肿瘤相关巨噬细胞 (TAMs) 共培养系统中乳腺癌干细胞 (CSCs) 的自我更新活性。

(A) XPS 处理 48 小时可显著降低 MDA-MB-231 细胞和 4T1 细胞与 TAM 共培养时 ALDH⁺亚群的比例。

(B) XPS 处理 48 小时显著降低了共培养乳腺癌细胞的乳腺微球数量。比例尺 = 100µm。

(C) XPS 处理 48 小时强烈减弱了共培养的乳腺癌细胞中β-连环蛋白、OCT4 和 Nanog 的 mRNA 表达水平。

(D) XPS 处理 48 小时可显著减弱共培养的乳腺癌细胞中β-连环蛋白的蛋白表达水平。所有值均表示为平均值±SD, n=3, **P < 0.05。

XPS 抑制 M2 表型极化、CXCL1 表达和 TAMs 的分泌

大量研究表明,肿瘤微环境中的 TAMs 可以促进肿瘤的生长。因此,我们推测 XPS 可以通过调节 TAMs 来抑制乳腺癌的生长。

如图 3A 所示,XPS 能显著抑制 raw264.7 衍生的 TAMs 的增殖,而对 Thp1 衍生的 TAMs 没有明显的细胞毒性。

这些结果表明,XPS 可能通过其他机制而不是通过直接的细胞毒作用来调节 TAMs。TAMs 通常表现出促肿瘤生长的 M2 表型,促进肿瘤生长并增强对治疗的抵抗力。然而,巨噬细胞具有高度的可塑性,并能转化为抗肿瘤 M1 表型(Parisi 等人,2018)^{【19】}。

如图 3B 所示,XPS 能显著抑制乳腺癌细胞 CM 诱导 TAMs 的 M2 表型极化。

接下来,重要的是研究 XPS 诱导的 TAMs 极化变化如何在共培养系统中引起乳腺 CSCs 种群的强烈变化。由于乳腺癌细胞和 TAMs 在 transwell 共培养体系中被 0.4 μm 的可渗透膜分离,只允许介质和可溶性分子的自由交换,而不允许细胞间的直接相互作用,因此我们推测 TAMs 分泌的一些促肿瘤分子可能被 XPS 抑制,从而削弱 TAMs 对乳腺 CSCs 自我更新的促进作用。CXCL1 是 TAMs 分泌的最丰富的趋化因子(Palomino 和 Marti 等,2015; Wang 等,2018)^{【36-37】}。

酶联免疫吸附试验表明,XPS 能显著抑制 TAMs 分泌 CXCL1,呈剂量依赖性(图 3C)。

蛋白质印迹法和 QPCR 结果进一步证实,消癥颗粒能显著抑制人和小鼠 TAMs 中 CXCL1 蛋白表达水平(图 3D, E)和 mRNA 转录(图 3F),且呈剂量依赖性。

双荧光素酶报告基因实验表明,XPS 能抑制肿瘤细胞 CXCL1 基因的启动子活性。

结果表明,XPS 可抑制 TAMs 的 M2 表型极化和 CXCL1 的表达及分泌。

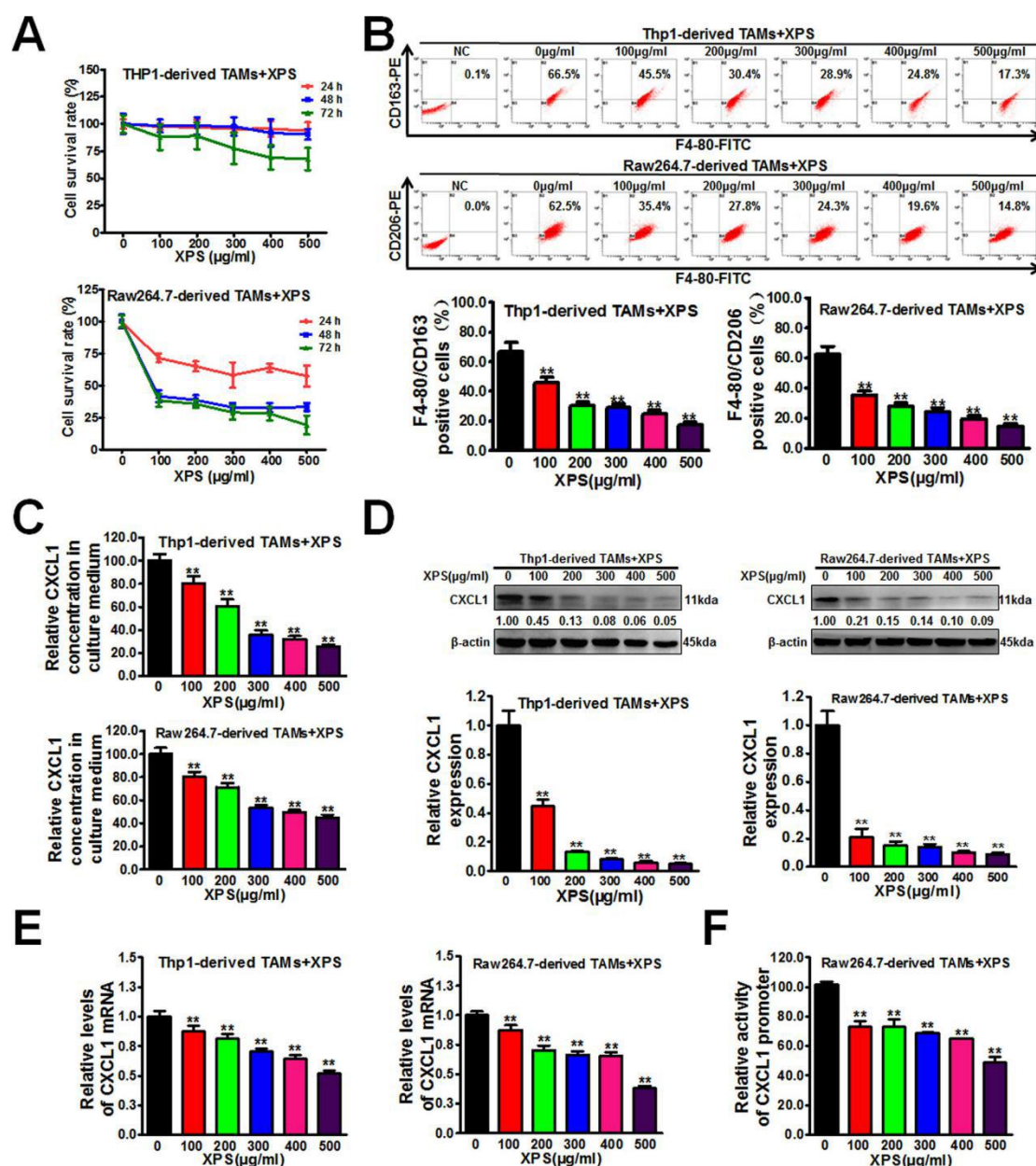


图 3 | 消癥颗粒(XPS)抑制 M2 表型极化、C-X-C 基序趋化因子配体 1(CXCL1)的表达和肿瘤相关巨噬细胞(TAM)的分泌。

(A) MTT 实验表明 XPS(100~500 μg/ml)可以强烈抑制 Raw264.7 来源的 TAMs 的增殖而对 Thp1 来源的 TAMs 没有表现出明显的细胞毒性。

(B) XPS 处理 48 小时可以显著抑制由乳腺癌细胞的 CM 诱导的 TAM 的 M2 表型极化。

(C) Elisa 测定表明 XPS 处理 48 小时可以以剂量依赖性方式显著抑制 TAM 分泌 CXCL1。

(D-E) 蛋白质印迹和 QPCR 结果进一步证实，消癥颗粒处理 48 小时可以显著抑制人和小鼠 TAM 中的 CXCL1 蛋白表达水平 (D) 和 CXCL1 mRNA 转录水平 (E)。

(F) 双荧光素酶报告基因检测表明 XPS 处理 48 小时可以抑制 Raw264.7 衍生的 TAM 中 CXCL1 基因的启动子活性。所有值均表示为平均值 ± SD, n = 3, **P < 0.05。

XPS 通过调控 TAMs/CXCL1 通路抑制乳腺 CSCs

由于 XPS 能显著抑制乳腺癌细胞系 CXCL1 的表达和分泌, 因此进一步研究 CXCL1 是否是 XPS 抑制乳腺癌细胞系 CXCL1 的关键分子具有重要意义。如图 4A、B 所示, CXCL1 能显著增加乳腺癌细胞中的 ALDH⁺ 亚群和乳腺微球数量。同时, CXCL1 能够抑制 XPS 对乳腺 CSCs 和乳腺微球形成能力的影响(图 2A, B 和图 4A, B)。QPCR 检测进一步表明 CXCL1 可提高乳腺癌细胞干细胞相关基因 β -catenin、OCT4 和 Nanog 的 mRNA 表达水平, 同时消除 XPS 对上述基因 mRNA 表达水平的抑制作用(图 4C)。蛋白质印迹法分析进一步证实 CXCL1 能提高乳腺癌细胞中 β -catenin 蛋白的表达水平, 同时逆转 XPS 对共培养乳腺癌细胞中 β -catenin 蛋白表达的抑制作用(图 4D)。结果表明, XPS 可通过抑制 TAMs/CXCL1 通路, 抑制乳腺癌细胞和 TAMs 共培养系统中 CSCs 的自我更新活性。

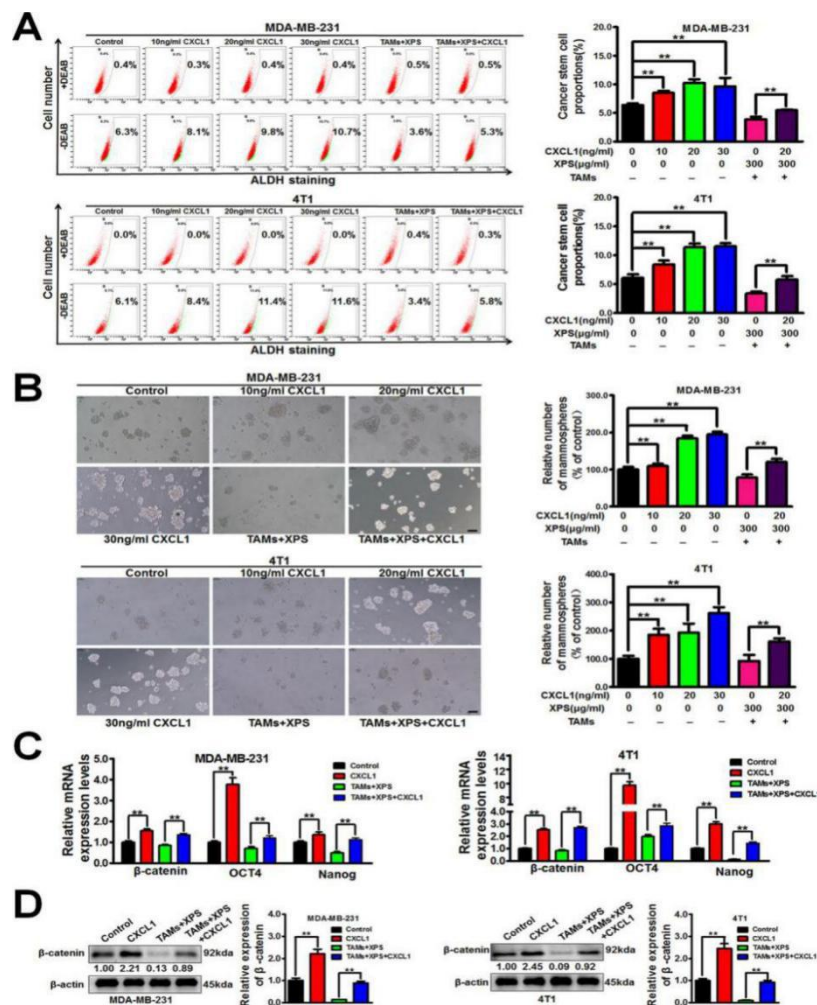


图 4 | 消癥颗粒(XPS)通过调节肿瘤相关巨噬细胞(TAM)/C-X-C 基序趋化因子配体 1 (CXCL1)通路抑制乳腺癌干细胞(CSC)。

(A-B) CXCL1 刺激 48 小时可以抵消消癥颗粒对共培养乳腺癌细胞中乳腺 CSCs 亚群和乳腺球形形成能力的抑制作用。比例尺=100 μ m。

(C) QPCR 检测表明 CXCL1 刺激 48 小时可以抵消消癥颗粒对共培养乳腺癌细胞中干细胞相关基因（包括 β -catenin、OCT4 和 Nanog）的 mRNA 表达水平的抑制作用。

(D) 蛋白质印迹分析进一步证实 CXCL1 处理 48 小时可以抵消消癥颗粒对共培养的乳腺癌细胞中 β -连环蛋白表达的抑制作用。所有值均表示为平均值 \pm SD, $n = 3$, $**P < 0.05$ 。

XPS 在体内抑制乳腺肿瘤生长及乳腺 CSCs 活性

基于我们的体外研究结果,在体内验证 XPS 的抗乳腺癌活性和机制是非常重要的。将荧光素酶标记的 4T1-Luc 细胞植入 Balb/c 小鼠乳腺,建立乳腺癌异种移植瘤模型。

在小鼠 4T1-Luc 异种移植模型中,XPS 能有效地抑制乳腺肿瘤的生长(图 5A, B)。

此外,与生理盐水组相比,没有观察到治疗相关的死亡率或体重明显下降(图 5C),这意味着 XPS 给药没有引起额外的毒性和副作用。

值得注意的是,体内成像实验也表明 XPS 能抑制乳腺癌细胞系 4T1-Luc 的转移效应(图 5A),提示 XPS 也可能具有体内抗转移活性。

此外,XPS 能显著降低 4T1-Luc 异种移植物体内巨噬细胞的浸润程度和 M2 表型极化。与此同时,与我们的体外研究结果一致,XPS 在体内强烈减弱了乳腺肿瘤组织中 CXCL1 的表达(图 5D, E)。

这些结果表明,XPS 在体内也可能抑制 TAMs 的 M2 表型转化和 CXCL1 分泌。此外,XPS 能显著降低 4T1-Luc 异种移植物中 ALDH⁺亚群的比例,抑制 ALDH1A1 的表达,提示 XPS 也能抑制体内乳腺 CSCs 的活性(图 5F, G)。

如补充图 1 和补充材料与方法所示,与生理盐水组相比,TAMs 联合注射能显著增加乳腺肿瘤的生长和乳腺 CSCs 的数量。此外,XPS 治疗和 CXCL1 基因敲除可部分消除 TAMs 对乳腺肿瘤生长和乳腺 CSCs 群的促进作用。

更重要的是,CXCL1 在乳腺癌细胞系中的过表达部分逆转了 XPS 对乳腺肿瘤生长和乳腺 CSCs 群体的抑制作用。结果表明,XPS 可通过调节 TAMs/CXCL1 通路抑制乳腺肿瘤的生长和乳腺 CSCs 的活性。

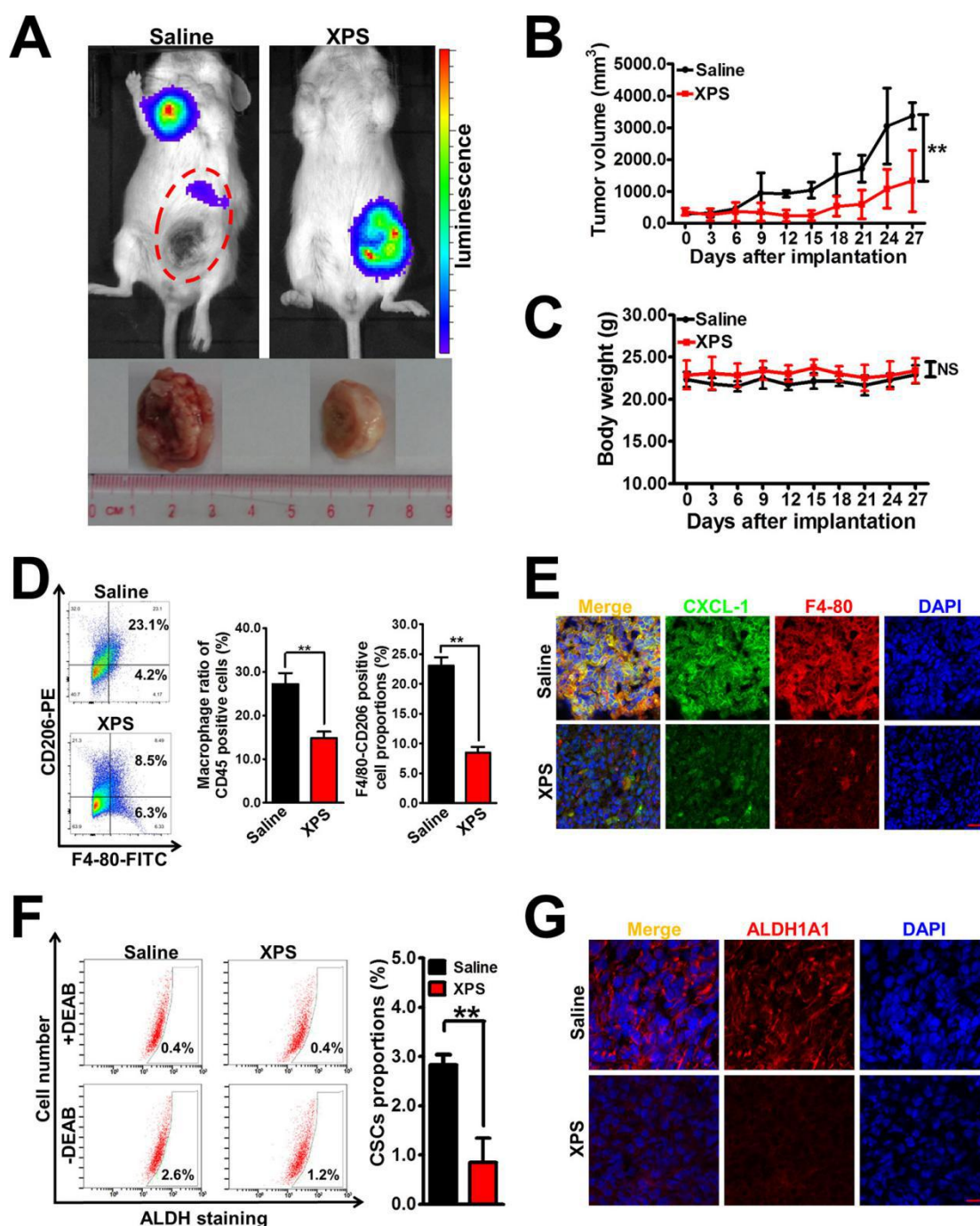


图 5 | 消癥颗粒(XPS)在体内抑制乳腺肿瘤生长和乳腺癌干细胞(CSC)活性。

(A) 小鼠 4T1-Luc 异种移植模型体内成像实验的代表性图片。通过将荧光素酶标记的 4T1-Luc 细胞植入 Balb/c 小鼠的乳腺, 建立了乳腺癌异种移植模型。携带 4T1-Luc 异种移植物的 小鼠通过胃内灌注接受盐水或 XPS (1 g/kg/天)。

(B) XPS 给药可有效抑制体内小鼠 4T1-Luc 异种移植模型中的乳腺肿瘤生长。n = 6。

(C) 生理盐水组和消癥颗粒组之间的小鼠体重没有显著差异, 这意味着 XPS 没有额外的毒副作用。n = 6。

(D-E) XPS 给药显著降低了巨噬细胞的浸润程度以及它们的 M2 表型极化和 C-X-C 基序趋化因子配体 1 (CXCL1) 在体内 4T1-Luc 异种移植模型中的表达。n = 3。

(F-G) XPS 给药显著降低了 ALDH⁺亚群(F)的比例并抑制了体内 4T1-Luc 异种移植模型中 ALDH1A1 (G) 的表达水平。n = 3。比例尺 = 20 μm。所有值均表示为平均值 ± SD, ** P < 0.05。

讨论

乳腺癌的高发病率和死亡率严重威胁妇女健康 (Bray 等人, 2018 年)^{【2】}。几十年来, 人们一直在努力寻找和开发新的乳腺癌靶点或治疗策略。虽然许多细胞毒性药物或细胞抑制药物已经被开发用于治疗乳腺癌, 如蒽醌类、烷化剂、生物碱和抗代谢物, 但由于肿瘤内部和肿瘤间的异质性, 它们的治疗效果令人失望 (Jin and Ye 等, 2013; Yuan. 等, 2016)^{【38-39】}。

最近, 传统的策略已经偏向于对肿瘤微环境的理解, 从而使肿瘤细胞与其宿主之间的免疫动力学改变成为可能 (Kjeldsen 等, 2018)^{【40】}。一个旨在破解宿主免疫系统的新型药物时代正在稳步来临。新出现的免疫治疗策略, 包括免疫检查点抑制剂、治疗性疫苗和过继性细胞治疗, 在“难以治疗”的癌症类型和以前难治的病例中带来了难以置信的临床疗效和延长生存期。

在本研究中, 我们证明了现有的抗乳腺增生药物 XPS 通过调节 M2 表型极化及其 CXCL1 分泌, 在体外显著抑制乳腺 CSCs。更重要的是, XPS 能抑制小鼠 4T1-Luc 异种移植物的体内生长。提示 XPS 可能通过免疫调节作用抑制乳腺癌的发生。这一发现为 XPS 在乳腺癌治疗中的应用提供了科学依据。此外, 本研究还强调了肿瘤免疫微环境是中药抗肿瘤药理活性的关键机制。

CSCs 被认为是癌症发生和发展的起源和驱动力 (Nilendu. 等, 2017)^{【41】}。CSCs 的微环境由免疫细胞等多种成分组成。免疫细胞与 CSCs 之间复杂的相互作用正受到越来越多的关注。例如, 据报道, 与非 CSCs 相比, CSCs 表现出较低的免疫原性, 它们可能抑制多种肿瘤相关抗原, 从而限制了适应性免疫系统识别它们的效力, 并导致癌症复发或转移 (Di Tomaso. 等, 2010; Chikamatsu. 等, 2011; Volonte. 等, 2014)^{【42-44】}。CSCs 可以分泌多种分子, 如 TGF- β , 可以促进 Treg 向 iTreg 分化, 从而降低其抗肿瘤免疫力 (Dunn 等人, 2004; Bruttel 和 Wischhusen 等, 2014; Maccalli 等人, 2014)^{【45-47】}。此外, CSCs 可以将免疫抑制的免疫细胞募集到肿瘤的微环境中, 因此有利于它们自己的生存 (Vahidian 等人, 2019)^{【14】}。关于 TAMs, 据报道, 包括 CSF-1 和 CCL2 在内的多种因子在 CSCs 微环境中富集, 并能募集极化为免疫抑制 M2 表型的巨噬细胞。(Wu 等人, 2010; Zhou 等人, 2015)^{【48-49】}。此外, TAMs 还可以通过多种方式介导 CSCs 的功能 (Jinushi., 2012; Yang., 2013)^{【50-51】}。例如, 据报道, TAMs 是防止肿瘤微环境

中的 CSCs 持续免疫监测所必需的 (Wynn 等人, 2013; Noy 和 Pollard, 2014; Sarkar 等人, 2014) ^{【52-54】}。此外, TAMs 通过释放 TGF- β 和有利于干细胞的细胞因子 IL-8 和 CXCL12 (Plaks 等) ^{【55】}, 激活 CSCs 的 Hedgehog 信号通路, 促进 CSCs 的增殖和侵袭。本研究表明, 抑制乳腺癌细胞分泌 CXCL1 是一种抑制乳腺癌细胞自我更新活性的新工具。这些结果表明, 利用免疫调节方法靶向 CSCs 可能是消除这些肿瘤起始细胞的有效途径。

肿瘤微环境中的免疫细胞, 包括 TAMs, 可以释放趋化因子作为炎症介质, 通过激活更多的免疫抑制细胞到肿瘤基质中, 最终促进肿瘤的发生和转移, 从而影响癌症的发展 (De la Fuente Lopez 等) ^{【56】}。趋化因子是细胞因子的一个大家族, 一般分子量在 7-15kda 之间, 具有多效性功能 (细胞趋化、细胞因子分泌、细胞增殖和存活)。有两个主要的趋化因子亚家族基于半胱氨酸残基的位置: CXC 和 CC。目前, 大约有 50 种内源性趋化因子配体被描述, 而 CXCL1 是由 TAMs 分泌的最丰富的趋化因子 (Palomino 和 Marti 等, 2015; Wang 等人, 2018) ^{【57, 37】}。越来越多的研究表明 CXCL1 在多种肿瘤的检测和预后预测中是一个很有前景的指标。例如, 与临近的非癌组织相比, CXCL1 在胃癌组织中的表达上调。CXCL1 上调是影响胃癌患者生存的独立预后因素之一, 与胃癌患者的肿瘤进展显著相关 (Cheng 等, 2011) ^{【58】}。在膀胱癌中, 浸润性膀胱癌患者尿液中 CXCL1 水平显著高于非浸润性膀胱癌患者和正常对照组, 这表明 CXCL1 是预测膀胱癌浸润的独立因素 (Kawanishi 等, 2008) ^{【59】}。更重要的是, 膀胱癌组织中高浓度的 CXCL1 水平与膀胱癌中增加的 TAMs 浸润和病理分期呈正相关 (Kawanishi 等人, 2008; Miyake 等人, 2016) ^{【59-60】}。关于乳腺癌, Zou 等人报告说, 乳腺癌间质中 CXCL1 表达增加与患者预后不良有关 (Zou 等人, 2014) ^{【61】}。我们以前也报道过来自 TAMs 的 CXCL1 在体外可以促进乳腺癌细胞的上皮间质转化、迁移和侵袭。此外, CXCL1 基因沉默可抑制 TAMs 诱导的乳腺癌异种移植物的生长和肺转移。 (Wang. 等, 2018) ^{【37】}。机制研究进一步证实 NF- κ B/SOX4 信号通路是 TAMs/CXCL1 促进乳腺癌转移的主要作用靶点。这与现有的报道一致, 即 CXCL1 介导的 TAMs 和癌细胞之间的相互作用可以促进人类膀胱癌的肿瘤进展 (Miyake 等, 2016) ^{【60】}。此外, TAMs 分泌的 CXCL1 可以募集 MDSCs 进入肿瘤微环境, 其分泌的趋化因子包括 S100A8/9, 增强癌细胞存活、化疗耐药性、转移和转移微环境形成 (Acharyya 等人, 2012; Miyake

等人, 2016)【^{62, 60}】。在本研究中, 我们发现 TAMs 分泌的 CXCL1 可以促进乳腺癌细胞的自我更新活性。这与现有的报道一致, 即炎症趋化因子 CXCL1 可以通过增强 CD133 的表达和 aldehyde 活性来增强结肠 CSC 的特性 (Hsu 等 2018)【⁶³】。考虑到乳腺 CSCs 是乳腺癌发生的起源细胞, 也是乳腺癌发展的驱动力, 肿瘤微环境中的 TAMs/CXCL1 通路可能在调节乳腺癌发展和预后方面发挥重要作用, 有望成为未来乳腺癌诊断和预后的生物标志物。

总结

结论: XPS 可能通过阻断 CXCL1 介导的 TAMs 与 CSCs 之间的相互作用而抑制乳腺癌的生长。本研究不仅揭示了 XPS 在乳腺癌治疗中的免疫调节机制, 而且为 TAMs/CXCL1 作为乳腺 CSCs 消除的潜在分子靶点提供了新的见解。

数据可用性声明

本项研究生成的所有数据集都包含在文章/补充材料中。

参考文献

- 【1】Allemani, C., Weir, H. K., Carreira, H., Harewood, R., Spika, D., and Wang, X. S. (2015). Global surveillance of cancer survival 1995–2009: analysis of individual data for 25,676,887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *Lancet* 385 (9972), 977–1010. doi: 10.1016/S0140-6736(14)62038-9
- 【2】Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., and 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 (6), 394–424. doi: 10.3322/caac.21492
- 【3】Ali, I., Wani, W. A., and Saleem, K. J. C. T. (2011). Cancer scenario in India with future perspectives. *Cancer Ther.* 8 (8), 56–70.
- 【4】Chia, S., Swain, S. M., Byrd, D. R., and Mankoff, D. A. (2008). Locally advanced and inflammatory breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 26 (5), 786–790. doi: 10.1200/JCO.2008.15.0243
- 【5】Nie, J., Zhao, C., Deng, L. I., Chen, J., Yu, B., and Wu, X. (2016). Efficacy of traditional Chinese medicine in treating cancer. *Biomed. Rep.* 4 (1), 3–14. doi: 10.3892/br.2015.537
- 【6】Liao, Y. H., Li, C. I., Lin, C. C., Lin, J. G., Chiang, J. H., and Li, T. C. (2017). Traditional Chinese medicine as adjunctive therapy improves the long-term survival of lung cancer patients. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 143 (12), 2425–2435. doi: 10.1007/s00432-017-2491-6

- 【7】 Tian, H., Qin, W., Wu, W., Guo, P., Lu, Y., and Liu, P. (2015). Effects of traditional chinese medicine on chemotherapy-induced myelosuppression and febrile neutropenia in breast cancer patients. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 2015, 736197. doi: 10.1155/2015/736197
- 【8】 Wang, W., Xu, L., and Shen, C. (2015). Effects of traditional chinese medicine in treatment of breast cancer patients after mastectomy: a meta-analysis. *Cell Biochem. Biophys.* 71 (3), 1299–1306. doi: 10.1007/s12013-014-0348-z
- 【9】 Lin, Y. H., and Chiu, J. H. (2011). Use of Chinese medicine by women with breast cancer: a nationwide cross-sectional study in Taiwan. *Complement Ther. Med.* 19 (3), 137–143. doi: 10.1016/j.ctim.2011.04.001
- 【10】 Santisteban, M., Reynolds, C., Barr Fritcher, E. G., Frost, M. H., Vierkant, R. A., and Anderson, S. S. (2010). Ki67: a time-varying biomarker of risk of breast cancer in atypical hyperplasia. *Breast Cancer Res. Treat.* 121 (2), 431–437. doi: 10.1007/s10549-009-0534-7
- 【 11 】 Wang, N., Zheng, Y., Gu, J., Cai, Y., Wang, S., and Zhang, F. (2017). Network-pharmacology-based validation of TAMS/CXCL-1 as key mediator of XIAOPI formula preventing breast cancer development and metastasis. *Sci. Rep.* 7 (1), 14513. doi: 10.1038/s41598-017-15030-3
- 【 12 】 Cohen, I., Tagliaferri, M., and Tripathy, D. (2002). Traditional Chinese medicine in the treatment of breast cancer. *Semin. Oncol.* 29 (6), 563–574. doi: 10.1053/sonc.2002.50005
- 【 13 】 Xie, W. J., Lin, Y., Liang, Q. R., Zhong, S. W., Situ, H. L., and Chen, Y. (2018). [Analysis of professor Lin Yi' s experience for metastasis breast cancer by data mining]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 43 (15), 3198–3204. doi: 10.19540/j.cnki.cjcmm.2018.0095
- 【14】 Vahidian, F., Duijf, P. H. G., Safarzadeh, E., Derakhshani, A., Baghbanzadeh, A., and Baradaran, B. (2019). Interactions between cancer stem cells, immune system and some environmental components: Friends or foes?. *Immunol. Lett.* 208, 19–29. doi: 10.1016/j.imlet.2019.03.004
- 【15】 Shima, H., Yamada, A., Ishikawa, T., and Endo, I. (2017). Are breast cancer stem cells the key to resolving clinical issues in breast cancer therapy?. *Gland. Surg.* 6 (1), 82–88. doi: 10.21037/gs.2016.08.03
- 【 16 】 Binnewies, M., Roberts, E. W., Kersten, K., Chan, V., Fearon, D. F., and Merad, M. (2018). Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat. Med.* 24 (5), 541–550. doi: 10.1038/s41591-018-0014-x
- 【17】 Lao, L., Fan, S., and Song, E. (2017). Tumor associated macrophages as therapeutic targets for breast cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1026, 331–370. doi: 10.1007/978-981-10-6020-5_16
- 【 18 】 De la Fuente Lopez, M., Landskron, G., Parada, D., Dubois-Camacho, K., Simian, D., and Martinez, M. (2018). The relationship between chemokines CCL2, CCL3, and CCL4 with the tumor microenvironment and tumorassociated macrophage markers in colorectal cancer. *Tumour Biol.* 40 (11), 1010428318810059. doi: 10.1177/1010428318810059
- 【 19 】 Parisi, L., Gini, E., Baci, D., Tremolati, M., Fanuli, M., and Bassani, B. (2018). Macrophage polarization in chronic inflammatory diseases: killers or builders?. *J. Immunol. Res.* 2018, 8917804. doi: 10.1155/2018/8917804

- 【20】 Mills, C. D., Lenz, L. L., and Harris, R. A. (2016). A breakthrough: macrophage-directed cancer immunotherapy. *Cancer Res.* 76 (3), 513–516. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1737
- 【21】 Hollmen, M., Karaman, S., Schwager, S., Lisibach, A., Christiansen, A. J., and Maksimow, M. (2016). G-CSF regulates macrophage phenotype and associates with poor overall survival in human triple-negative breast cancer. *Oncoimmunol.* 5 (3), e1115177. doi: 10.1080/2162402X.2015.1115177
- 【22】 Tang, X. (2013). Tumor-associated macrophages as potential diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer. *Cancer Lett.* 332 (1), 3–10. doi: 10.1016/j.canlet.2013.01.024
- 【23】 Liu, H. (2010). Study on determination of Xiaopi Granules by HPLC. *China Medical Herald* 7 (27), 47–48. doi: 10.3969/j.issn.1673-7210.2010.27.024
- 【24】 Wang, D., and Huang, N. (2010). Determination of tanshinone in Xiaopi Granules by TLC. *Guangzhou Medical J.* 41 (05), 59–60. doi: 10.3969/j.issn.1000-8535.2010.05.029
- 【25】 Wang, Y. P., and Lei, Q. Y. (2017). Perspectives of reprogramming breast cancer metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1026, 217–232. doi: 10.1007/978-981-10-6020-5_10
- 【26】 Shao, J., Fan, W., Ma, B., and Wu, Y. (2016). Breast cancer stem cells expressing different stem cell markers exhibit distinct biological characteristics. *Mol. Med. Rep.* 14 (6), 4991–4998. doi: 10.3892/mmr.2016.5899
- 【27】 Wang, Z., Wang, N., Li, W., Liu, P., Chen, Q., and Situ, H. (2014). Caveolin-1 mediates chemoresistance in breast cancer stem cells via beta-catenin/ABCG2 signaling pathway. *Carcinogenesis* 35 (10), 2346–2356. doi: 10.1093/carcin/bgu155
- 【28】 Hattermann, K., Fluh, C., Engel, D., Mehdorn, H. M., Synowitz, M., and Mentlein, R. (2016). Stem cell markers in glioma progression and recurrence. *Int. J. Oncol.* 49 (5), 1899–1910. doi: 10.3892/ijco.2016.3682
- 【29】 Kelly, K. F., Ng, D. Y., Jayakumaran, G., Wood, G. A., Koide, H., and Doble, B. W. (2011). beta-catenin enhances Oct-4 activity and reinforces pluripotency through a TCF-independent mechanism. *Cell Stem. Cell* 8 (2), 214–227. doi: 10.1016/j.stem.2010.12.010
- 【30】 Lee, S. H., Koo, B. S., Kim, J. M., Huang, S., Rho, Y. S., and Bae, W. J. (2014). Wnt/beta-catenin signalling maintains self-renewal and tumourigenicity of head and neck squamous cell carcinoma stem-like cells by activating Oct4. *J. Pathol.* 234 (1), 99–107. doi: 10.1002/path.4383
- 【31】 Qi, Y. F., Wu, L., Li, Z. Q., Wu, M. L., Wang, H. F., and Chan, K. Y. (2016). Nodal signaling modulates the expression of Oct-4 via nuclear translocation of betacatenin in lung and prostate cancer cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 608, 34–41. doi: 10.1016/j.abb.2016.07.003
- 【32】 Yong, X., Tang, B., Xiao, Y. F., Xie, R., Qin, Y., and Luo, G. (2016). *Helicobacter pylori* upregulates Nanog and Oct4 via Wnt/beta-catenin signaling pathway to promote cancer stem cell-like properties in human gastric cancer. *Cancer Lett.* 374 (2), 292–303. doi: 10.1016/j.canlet.2016.02.032
- 【33】 Takao, Y., Yokota, T., and Koide, H. (2007). Beta-catenin up-regulates Nanog expression through interaction with Oct-3/4 in embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353 (3), 699–705. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.12.072

- 【34】 Li, X. Q., Yang, X. L., Zhang, G., Wu, S. P., Deng, X. B., and Xiao, S. J. (2013). Nuclear beta-catenin accumulation is associated with increased expression of Nanog protein and predicts poor prognosis of non-small cell lung cancer. *J. Transl. Med.* 11, 114. doi: 10.1186/1479-5876-11-114
- 【35】 Yu, S. J., Kim, H. J., Lee, E. S., Park, C. G., Cho, S. J., and Jeon, S. H. (2017). betaCatenin accumulation is associated with increased expression of nanog protein and predicts maintenance of MSC self-renewal. *Cell Transplant* 26 (2), 365–377. doi: 10.3727/096368916X693040
- 【36】 Palomino, D. C., and Marti, L. C. (2015). Chemokines and immunity. *Einstein (Sao Paulo)* 13 (3), 469–473. doi: 10.1590/S1679-45082015RB3438
- 【37】 Wang, N., Liu, W., Zheng, Y., Wang, S., Yang, B., and Li, M. (2018). CXCL1 derived from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via activating NF-kappaB/SOX4 signaling. *Cell Death Dis.* 9 (9), 880. doi: 10.1038/s41419-018-0876-3
- 【38】 Jin, S., and Ye, K. J. (2013). Targeted drug delivery for breast cancer treatment. *Recent Patents Anti-Cancer Drug Discovery* 8 (2), 143–153. doi: 10.2174/1574892811308020003
- 【39】 Yuan, T., Yue, W., Kiani, M. F., and Wang, B.J.C.B.C. (2016). Classification, treatment strategy, and associated drug resistance in breast cancer. *Clin. Breast Cancer* 16 (5), 335–343. doi: 10.1016/j.clbc.2016.05.012
- 【40】 Kjeldsen, J. W., Donia, M., and Svane, I. M. (2018). Cancer immunotherapy. *Ugeskr. Laeger.* 180 (21).
- 【41】 Nilendu, P., Kumar, A., Kumar, A., Pal, J. K., and Sharma, N. K. (2017). Breast cancer stem cells as last soldiers eluding therapeutic burn: a hard nut to crack. *Int. J. Cancer.* 142 (1), 7–17. doi: 10.1002/ijc.30898
- 【42】 Di Tomaso, T., Mazzoleni, S., Wang, E., Sovenia, G., Clavenna, D., and Franzin, A. (2010). Immunobiological characterization of cancer stem cells isolated from glioblastoma patients. *Clin. Cancer Res.* 16 (3), 800–813. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2730
- 【43】 Chikamatsu, K., Takahashi, G., Sakakura, K., Ferrone, S., and Masuyama, K. (2011). Immunoregulatory properties of CD44+ cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 33 (2), 208–215. doi: 10.1002/hed.21420
- 【44】 Volonte, A., Di Tomaso, T., Spinelli, M., Todaro, M., Sanvito, F., and Albarello, L. (2014). Cancer-initiating cells from colorectal cancer patients escape from T cell-mediated immunosurveillance in vitro through membrane-bound IL-4. *J. Immunol.* 192 (1), 523–532. doi: 10.4049/jimmunol.1301342
- 【45】 Dunn, G. P., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2004). The three Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 329–360. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803
- 【46】 Bruttel, V. S., and Wischhusen, J. (2014). Cancer stem cell immunology: key to understanding tumorigenesis and tumor immune escape?. *Front. Immunol.* 5, 360. doi: 10.3389/fimmu.2014.00360
- 【47】 Maccalli, C., Volonte, A., Cimminiello, C., and Parmiani, G. (2014). Immunology of cancer stem cells in solid tumours. *A. Rev. Eur. J. Cancer* 50 (3), 649–655. doi: 10.1016/j.ejca.2013.11.014

- 【48】Wu, A., Wei, J., Kong, L. Y., Wang, Y., Priebe, W., and Qiao, W. (2010). Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia. *Neuro. Oncol.* 12 (11), 1113–1125. doi: 10.1093/neuonc/noq082
- 【49】Zhou, W., Ke, S. Q., Huang, Z., Flavahan, W., Fang, X., and Paul, J. (2015). Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth. *Nat. Cell Biol.* 17 (2), 170–182. doi: 10.1038/ncb3090
- 【50】Jinushi, M., Baghdadi, M., Chiba, S., and Yoshiyama, H. (2012). Regulation of cancer stem cell activities by tumor-associated macrophages. *Am. J. Cancer Res.* 2 (5), 529–539.
- 【51】Yang, J., Liao, D., Chen, C., Liu, Y., Chuang, T. H., and Xiang, R. (2013). Tumor-associated macrophages regulate murine breast cancer stem cells through a novel paracrine EGFR/Stat3/Sox-2 signaling pathway. *Stem. Cells* 31 (2), 248–258. doi: 10.1002/stem.1281
- 【52】Wynn, T. A., Chawla, A., and Pollard, J. W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nat.* 496 (7446), 445–455. doi: 10.1038/nature12034
- 【53】Noy, R., and Pollard, J. W. (2014). Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immun.* 41 (1), 49–61. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.010
- 【54】Sarkar, S., Doring, A., Zemp, F. J., Silva, C., Lun, X., and Wang, X. (2014). Therapeutic activation of macrophages and microglia to suppress brain tumor-initiating cells. *Nat. Neurosci.* 17 (1), 46–55. doi: 10.1038/nn.3597
- 【55】Plaks, V., Kong, N., and Werb, Z. (2015). The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells?. *Cell Stem. Cell* 16 (3), 225–238. doi: 10.1016/j.stem.2015.02.015
- 【56】De la Fuente Lopez, M., Landskron, G., Parada, D., Dubois-Camacho, K., Simian, D., and Martinez, 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 (11), 1010428318810059. doi: 10.1177/1010428318810059
- 【57】Palomino, D. C., and Marti, L. C. (2015). Chemokines and immunity. *Einstein (Sao Paulo)* 13 (3), 469–473. doi: 10.1590/S1679-45082015RB3438
- 【58】Cheng, W. L., Wang, C. S., Huang, Y. H., Tsai, M. M., Liang, Y., and Lin, K. H. (2011). Overexpression of CXCL1 and its receptor CXCR2 promote tumor invasion in gastric cancer. *Ann. Oncol.* 22 (10), 2267–2276. doi: 10.1093/annonc/mdq739
- 【59】Kawanishi, H., Matsui, Y., Ito, M., Watanabe, J., Takahashi, T., and Nishizawa, K. (2008). Secreted CXCL1 is a potential mediator and marker of the tumor invasion of bladder cancer.
- 【60】Miyake, M., Hori, S., Morizawa, Y., Tatsumi, Y., Nakai, Y., and Anai, S. (2016). CXCL1-mediated interaction of cancer cells with tumor-associated macrophages and cancer-associated fibroblasts promotes tumor progression in human bladder cancer. *Neoplasia* 18 (10), 636–646. doi: 10.1016/j.neo.2016.08.002
- 【61】Zou, A., Lambert, D., Yeh, H., Yasukawa, K., Behbod, F., and Fan, F. (2014). Elevated CXCL1 expression in breast cancer stroma predicts poor prognosis and is inversely associated with expression of TGF-beta signaling proteins. *BMC Cancer* 14, 781. doi: 10.1186/1471-2407-14-781

【62】 Acharyya, S., Oskarsson, T., Vanharanta, S., Malladi, S., Kim, J., and Morris, P. G. (2012). A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis. *Cell* 150 (1), 165–178. doi: 10.1016/j.cell.2012.04.042

【63】 Hsu, Y. L., Chen, Y. J., Chang, W. A., Jian, S. F., Fan, H. L., and Wang, J. Y. (2018). Interaction between tumor-associated dendritic cells and colon cancer cells contributes to tumor progression via CXCL1. *Int. J. Mol. Sci.* 19 (8), 1–17. doi: 10.3390/ijms19082427