

消癥颗粒通过抑制 TAMs/CXCL1 信号通路抑制乳腺癌转移前微环境的形成

郑轶枫^{1, 2}, 王能^{1, 3}, 王胜奇^{1, 2}, 杨博文^{1, 2}, 司徒红林^{1, 2}, 钟丽丹⁴, 林毅^{1, 2}, 王志宇^{1, 2, 3, 4}。

DOI <https://doi.org/10.1186/s12964-020-0520-6>

Cell Communication and Signaling (IF 5.712)

摘要

背景

近年来的研究表明, 肿瘤转移前微环境(PMN)是介导肿瘤转移的先决条件。此前我们证实, 消癥颗粒可通过抑制肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)分泌 CXCL1 来抑制乳腺癌肺转移。本文旨在探讨消癥颗粒预防乳腺癌 PMN 形成的作用及其分子机制。

方法

用 qPCR 和蛋白质印迹法检测肿瘤相关抗原 CXCL1 的表达。采用 CCK8 和 EdU 染色法检测消癥颗粒对共培养体系中 TAMs 和 4T1 增殖的影响。采用 transwell 实验研究了消癥颗粒对 HSPCs 和 4T1 侵袭能力的影响。将 4T1 细胞接种于 Balb/c 小鼠乳腺脂肪垫皮下, 构建乳腺癌异种移植瘤, 用荧光素酶显像监测肺转移。免疫荧光法检测肺组织上皮细胞间充质细胞转化过程和 PMN 的形成。采用流式细胞仪检测消癥颗粒对造血干/祖细胞(HSPCs)、骨髓抑制细胞(MDSCs)的影响。

结果

结果发现消癥颗粒能抑制 M2 表型巨噬细胞的增殖和极化, 并呈剂量依赖性地降低 CXCL1 的表达。消癥颗粒对 M1 表型的影响不明显。TAMs/CXCL1 信号通路可以刺激 c-Kit⁺/Sca-1⁺HSPCs 的补充和分化为 CD11b⁺/Gr-1⁺MDSCs, 这是促进 PMN 形成的象征性事件。此外, 消癥颗粒能有效抑制 HSPCs 的激活, 抑制 HSPCs 与 TAMs 共培养系统诱导的乳腺癌细胞 4T1 的增殖和转移, 提示消癥颗粒在体外对

PMN的形成有明显的抑制作用。乳腺癌异种移植实验进一步证实, 消癍颗粒能抑制乳腺癌 PMN 的形成和随后的肺转移。消癍颗粒治疗组骨髓内和肺组织内的 HSPCs 数量均明显下降。而 CXCL1 的过表达可以减轻消癍颗粒的抑制作用。

结论

综上所述, 我们的研究为消癍颗粒在预防乳腺癌 PMN 形成中的应用提供了临床前证据, 并强调 TAMs/CXCL1 作为 PMN 靶向治疗的潜在治疗策略。

关键词: 消癍颗粒, 转移前微环境, 肿瘤相关巨噬细胞, CXCL1, 乳腺癌

背景

乳腺癌是全世界妇女中最常见的恶性肿瘤, 平均发病率为 21.6/10000^[1]。虽然乳腺癌的诊断和治疗已经取得了很大进展, 但远处转移一直是影响临床预后的生命威胁事件。据报道, 6%的患者首次诊断为转移性乳腺癌, 20-50%的原发性乳腺癌患者在 3-10 年后出现远处转移^[2]。因此, 阐明乳腺癌转移的分子机制和制定靶向治疗策略已成为全球肿瘤学家迫切需要解决的问题。

自 1889 年 Paget 等人首次提出“种子和土壤”理论以来, 越来越多的研究表明, 原发肿瘤与转移前部位的微环境密切相关。2005 年, Kaplan 等人进行了一项开创性的研究, 通过招募骨髓来源的 VEGFR1⁺祖细胞, 证明了原发肿瘤细胞分泌的因子形成了肿瘤转移前微环境 (PMN)^[3]。从那时起, 非恶性细胞的关键作用和促进 PMN 形成的因素受到了广泛的关注。例如, 发现缺氧条件促进了骨髓源性细胞 (BMDCs) 在肺组织中的补充, 最终降低了 PMN 的 NK 细胞毒性^[4]。此外, Jagged2 在缺氧条件下在骨髓中不受控制, 随后通过激活 Notch 信号增强了癌症干细胞的自我更新能力^[5]。此外, 非编码 RNA 作为肿瘤来源的分子成分, 诱导 PMN 的形成。据报道, 乳腺癌分泌的 miR-122 抑制微环境细胞对葡萄糖的摄取, 最终支持 PMN 的建立^[6]。最近的研究结果还表明, 微泡和从癌细胞释放的外泌体有利于在各种恶性肿瘤中形成 PMN^[7]。研究发现黑色素瘤分泌的外泌体通过间充质上皮细胞转化使骨髓祖细胞转变为前转移型细胞^[8]。更重要的是, 基质细胞高度牵连 PMN 的形成^[9]。据报道中性粒细胞促进卵巢癌大网膜中 PMN 的形成^[10]。肿瘤相关的巨噬细胞 (TAMs) 分泌的 CXCL1 可以招募 CXCR2⁺骨髓抑制细胞 (MDSCs) 促进肝脏 PMN 的形成^[11]。综上所述, PMN 理论将我们的注意力从肿瘤细胞的杀伤策

略转移到肿瘤转移预防的生态微环境成份调控上。

值得注意的是, PMN 过程可分为 3 个阶段: (1) 肿瘤分泌的可溶性细胞因子或组分进入循环; (2) 免疫抑制细胞在骨髓中的激活和定向招募; (3) PMN 的细胞和基质重塑^[12]。因此, PMN 的形成是一个涉及多个器官、多种细胞和多个靶点的整体过程。同时, 中医也以其整体的观点来看待疾病的治疗和预防。近年来, 大量研究表明, 中药不仅可以通过杀死癌细胞来抑制肿瘤的生长和转移, 而且可以改善肿瘤或远端器官的免疫抑制微环境。一些研究表明, 中医方剂能够通过增强 T 细胞的免疫功能, 激活单核巨噬细胞和 NK 细胞, 提高树突状细胞的抗原呈现能力和抑制肿瘤免疫逃逸等方式来预防转移^[13-15]。我们以前的研究发现消癥颗粒能抑制乳腺癌的肺转移。网络药理学分析结合实验验证发现消癥颗粒主要通过抑制 TAMs/CXCL1 通路发挥抗癌作用^[16]。但是, 消癥颗粒对抑制 PMN 形成的作用及其机制尚不清楚。

本研究发现消癥颗粒能抑制 TAMs/CXCL1 信号转导, 降低 HSPCs 的活化和分化为 MDSCs, 最终抑制乳腺癌细胞的增殖和转移。体内研究也表明消癥颗粒能抑制乳腺癌的生长和转移。更重要的是, 消癥颗粒通过抑制 HSPCs 在肺组织中的招募和 MDSCs 的蓄积而抑制 PMN 的形成。本研究不仅为消癥颗粒在预防乳腺癌 PMN 形成中的应用提供了依据, 而且强调了 TAMs/CXCL1 作为预防乳腺癌转移潜在治疗靶点的重要作用。

方法

细胞培养和诱导

小鼠乳腺癌细胞系 4T1 和小鼠巨噬细胞系 Raw264.7 来源于美国菌种保藏中心。4T1 细胞和 Raw264.7 细胞分别在 DMEM 和 RPMI1640 培养基中培养, 并添加 10% 胎牛血清。所有细胞在含有 5% CO₂ 的湿化培养箱中保持在 37℃。用 100 ng/ml 脂多糖和 100 ng/ml IFN- γ 诱导 RAW264.7 进入 M1 表型。应用 IL-4 和 IL-13 分别诱导巨噬细胞 RAW264.7 向 M2 表型转化。

消癥颗粒的制备及质量控制

采用回流提取法, 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 味中药的混合物中提取消癥颗粒。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方法以前已经报道过^[16]。

小鼠骨髓制备造血干/祖细胞(HSPCs)

在无菌条件下,用注射器清除股骨和胫骨中的小鼠骨髓细胞。随后,根据谱系细胞耗竭试剂盒(130-090-858, Miltenyi Biotec China, Guangzhou, China)和 CD117 微珠(130-091-224, Miltenyi Biotec China, Guangzhou, China)的生产方案,用 MACS 分离器分离 Lineage⁻细胞和 c-Kit⁺细胞。采用免疫组织化学方法(MACS)分离细胞,用 c-Kit(12-1171-81, Thermo Fisher Scientific, 上海)和 Sca-1(11-5981-81, Thermo Fisher Scientific, 上海)抗体进行孵育,流式细胞仪分离。HSPC 细胞被鉴定为 c-Kit⁺ 和 Sca-1⁺细胞群。

蛋白质印迹法

细胞按照指示处理,然后用 RIPA(中国上海碧昂斯生物技术)进行裂解。根据制造商的说明书,使用 Bicinchoninic Acid Kit 试剂盒(中国上海 Sigma-Aldrich)对蛋白质浓度进行定量。等量的蛋白质(50 微克)载入 SDS-PAGE 电泳,转移到聚偏二氟乙烯微孔膜(Millipore Billerica, MA)。用初级抗体探测信号,用二级抗体扩增。主要抗体包括 ARG1(DF6657, Affinity Biosciences, 俄亥俄州辛辛那提)、iNOS(18985-1-AP, proteintech, 罗斯蒙特, IL, USA)、CXCL1(AF5403, Affinity Biosciences, 俄亥俄州辛辛那提)、CXCR2(20634-1-AP, proteintech, 罗斯蒙特, IL, USA)、 β -肌动蛋白抗体细胞信号技术,丹弗斯, MMP2(A6247, 美国波士顿剑桥非克隆技术学院),MMP9(10375-2-AP, 美国罗斯蒙特蛋白质技术学院)。最后,通过 ECL 先进试剂(上海塔农科技有限公司)对这些条带进行了成像。

流式细胞仪分析

在 1×10^6 细胞密度的 100 μ l PBS 溶液中分离、洗涤和悬浮细胞。检测 M2 极化、FITC 结合的 F4/80 抗体(SC-71085, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)、PE 结合的 CD206 抗体(141,705, Biolegend, San Diego, CA, USA)、PE-结合的 CD206 抗体(17-4801-80, Thermo Fisher Scientific, Hudson, USA)、APC 结合的 CD86

抗体(558, 703, BD Biosciences, San Jose, CA, USA)。ARG1 抗体(DF6657, Affinity Biosciences, Cincinnati, OH, USA)。Alexa Fluor488 探针与 Arg1 抗体结合。用 Alexa Fluor488Gr-1 抗体(108, 419, Biolegend, 加利福尼亚州圣地亚哥)和 PE 抗鼠/人 CD11b 抗体(101, 207, Biolegend, 加利福尼亚州圣地亚哥)进行 MDSCs 分析。用 CD45-PE-Cy7(25-0451-82, Thermo Fisher Scientific, Hudson, USA)、FITC 结合 F4/80 抗体(SC-71085, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)和 PE-CD206 抗体(141, 705, Biolegend, 加利福尼亚州圣地亚哥)培养小鼠乳腺肿瘤和肺损伤的 TAMs。利用流式细胞仪分析 FITC 共轭 Sca-1(11-5981-81, Thermo Fisher Scientific, Hudson, USA)和 PE-共轭 c-Kit(12-1171-81, Thermo Fisher Scientific, Hudson, USA)的表面标记物鉴定 HSPCs。培养后, 用 PBS 清洗细胞, 然后放入 FACS Aria III 流式细胞仪(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)。

细胞活力

采用 CCK-8 法检测细胞活性。诱导 M1 和 M2 表型巨噬细胞以 3×10^3 细胞密度接种于 96 孔板中。细胞贴壁后分别用消癍颗粒浓度梯度处理 24、48 和 72h。根据生产厂家的说明书, 采用 8 号 CCK-8 试剂(中国上海碧昂斯生物技术有限公司)测定细胞活力。进行了三个独立的重复实验。

实时-定量 PCR 分析

用 RNAiso Plus 试剂(日本 Takara BIO)提取总 RNA, 并按照制造商的说明, 使用 primeScript[®] RT 试剂盒和 gDNA 擦除器(日本 Takara BIO)逆转录成互补 cDNA。根据生产商的说明, 使用 SYBR Premix Ex Taq[™] II 试剂盒(日本 Takara BIO), 在应用生物系统 ViiA7 实时 PCR 系统(Thermo Fisher Scientific, Hudson, USA)上进行 RT-PCR。小鼠 β -肌动蛋白的引物序列分别为 5' -GGAGGGGTTGAGGTGTT-3' (正向)和 5' -GTGTGCACTTTTATTGGTCTCAA-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)。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法比较各组大鼠的相对 mRNA 水平。

Transwell 侵袭试验

为了探讨 HSPCs 在不同干预条件下的流动趋势,进行了 Transwell 侵袭试验。简单地说,造血干/祖细胞(HSPCs)以 2×10^5 细胞的密度在上面的 transwell 室中播种。然后分别用 500 μ g/ml 消癍颗粒、TAMs 条件培养基(CM)和 20ng/ml CXCL1 处理 HSPCs。培养 24h 后,用 4%多聚甲醛固定渗透过滤器的细胞,然后用 0.1%考马斯蓝染色。同时对进入下室的造血干/祖细胞进行计数。对于 4T1 和 HSPCs 的共培养,采用 24 孔 transwell 共培养体系。简而言之,将密度为 5×10^4 的 4T1 细胞,放置在上方的 transwell 室中。将 2×10^5 细胞密度的 HSPC 接种于下腔室。。Transwell 插入物由可渗透膜隔开,允许介质和可溶性分子的自由交换。然后,按预先排列的方法,在 4T1 细胞中分别加入 TAMs 的 CM、500 μ g/ml 消癍颗粒、20ng/ml CXCL1 或 50ng/ml CXCL1 中和抗体。同样,培养 24 小时后,渗透滤网的 4T1 细胞,用 0.1%考马斯蓝染色。

EdU 检测

生长期的 4T1 细胞接种于 35mm 激光共聚焦培养皿中,培养密度为 5×10^4 。然后,对照培养基、500 μ g/ml 消癍颗粒、TAMs 的 CM、20ng/ml CXCL1 或按预先排列的 50ng/ml CXCL1 中和抗体处理细胞。处理 24h 后,用含 50 μ M EdU 试剂的培养基置换每个孔,培养 2h。然后用 PBS 洗涤 3 次,室温下用 4%甲醛固定 30min。然后用 0.5% Triton X-100 进行渗透。最后,在室温条件下,用 Apollo 染色 30 分钟,用 PBS 冲洗,激光扫描共聚焦显微镜观察。

免疫荧光分析

对于细胞免疫荧光,细胞被接种在 35mm 的激光共聚焦培养皿上。处理后,用 4%多聚甲醛固定 20min,用 PBS 洗涤 3 次,用 0.25% Triton X-100 渗透 20min,室温下用 5%BSA 封闭 30min。用 E-cadherin 抗体(20874-1-AP, proteintech, 罗斯蒙特, IL, USA)和 vimentin 抗体(10366-1-AP, proteintech, 罗斯蒙特, IL, USA)在 4°C 通宵孵育,然后用 Alexa Fluor 488-anti-rabbit IgG(4412, Cell Signaling Technology, 丹弗斯, MA, USA)和 Alexa Fluor 555-conjugated-anti-rat IgG 孵育(4417, Cell Signaling Technology, 丹弗斯, MA, USA)2h。对于组织免

疫荧光, 冷冻组织切片与上述处理相同, 并在 4℃ 条件下通宵培养 Alexa Fluor 488Gr-1 抗体(108, 419, Biolegend, 加利福尼亚州圣地亚哥)和 Alexa Fluor 594 CD11b 抗体(101, 207, Biolegend, 加利福尼亚州圣地亚哥)。另外, CK-19 抗体(10712-1-AP, Proteintech, 罗斯蒙特, IL, USA)也同时孵育, 然后与 Alexa Fluor 647 conjugated-anti-rabbit IgG(4414, Cell Signaling Technology, 丹弗斯, MA)的荧光抗体结合。用 DAPI(Sigma-Aldrich, 上海)在室温下染色 20 分钟。最后用德国耶拿蔡司公司 LMS710 共聚焦显微镜观察荧光。

动物实验

选用北京维特里弗实验动物技术有限公司生产的 5 周龄雌性 Balb/c 小鼠。所有体内实验均经广东省中医院动物护理和使用机构委员会审核通过。小鼠在广东省中医院实验动物中心无菌条件下饲养, 环境温度为 20-25℃, 相对湿度为 45-50%, 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。为建立小鼠乳腺癌肺转移模型, 将荧光素酶基因标记的 4T1(4T1-Luc)接种于小鼠乳腺脂肪垫皮下, 密度为 2×10^6 。小鼠随机分为 6 组(n=12), 分别为生理盐水(灌胃)、消癥颗粒(灌胃 1g/kg/d)、TAMs(联合注射 4T1-Luc 细胞和 M2 表型 RAW264.7 的比例为 1:3)、TAMs+消癥颗粒(4T1-Luc 和 M2 表型 RAW264.7 的联合注射)、shCXCL1/TAMs(4T1-Luc 和 M2 表型 RAW264.7 共注射 CXCL1 基因敲除))、rCXCL1/TAMs+消癥颗粒(4T1-Luc 与 M2 表型 RAW264.7 联合注射+CXCL1 过表达, 然后进行消癥颗粒治疗)。在整个治疗过程中, 每 3 天给小鼠称重, 并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-luciferin(美国波士顿 PerkinElmer)150mg/kg 进行发光显像。每周用 IVISpectrum 系统(PerkinElmer, Boston, USA)对小鼠进行肺转移监测。6 周后, 对小鼠实施安乐死, 切除肿瘤和肺。原代细胞分离自新鲜肿瘤和肺部, 并通过如上文所示流式细胞仪进行 TAMs 分析。另外, 从接种第二周开始, 每周用流式细胞仪检测小鼠骨髓中 HSPC 的募集情况。苏木精-伊红染色检测肺组织微转移。流式细胞仪检测肿瘤和肺中 MDSCs 的数量。

苏木精-伊红染色

肿瘤标本在 4%的多聚甲醛中固定 24 小时, 然后按照我们先前描述的方案

进行处理。苏木精-伊红染色是根据制造商的说明使用 Hematoxylin-伊红染色试剂盒(中国上海碧昂斯生物技术公司)进行的^[17]。

统计分析

数据采用平均标准差(SD)。所有的统计分析都是使用 SPSS20.0 软件(美国雅培, 美国芝加哥)进行的。采用单因素方差分析和 T 检验进行多组比较。对重复测量数据进行方差分析。P<0.05 为统计学意义。

结果

消癥颗粒抑制 M2 巨噬细胞极化及 CXCL1 表达

巨噬细胞可被 IL-4、TGF- β 等细胞因子诱导分化为 M2 表型(通常称为肿瘤相关性巨噬细胞, TAMs)。因此, 我们首次应用 IL-4 和 IL-13 在体外刺激 RAW264.7 进入 M2 表型。结果表明, M1 标记物 iNOS 水平下降, 而 M2 标记物 ARG1 水平上升。同时, 流式细胞仪分析显示 M2 抗原 CD206 比例升高(图 1A)。

我们之前的研究表明消癥颗粒可能通过阻断 TAMs/CXCL1 信号转导途径抑制乳腺癌的生长和肺转移^[16]。因此, 我们需要证实消癥颗粒对 TAMs 的活力、极化和 CXCL1 表达的影响。结果发现, 消癥颗粒对巨噬细胞 M2 表型 RAW264.7 的增殖具有时间和剂量依赖性的抑制作用。但与 M2 巨噬细胞不同, 消癥颗粒对 M1 巨噬细胞的增殖无明显抑制作用, 提示消癥颗粒可能对 M2 巨噬细胞有选择性, 而不是一般性免疫毒性(图 1B)。

另一方面, 随着消癥颗粒剂量的增加, M2 巨噬细胞 CD163、CD206 和 Arg1 的表达逐渐下调, 提示消癥颗粒阻断了 M2 巨噬细胞的极化(图 1C)。此外, 消癥颗粒还能增加巨噬细胞 CD86 的表达, 提示消癥颗粒也可能促进 M2 巨噬细胞的复极化。

由于 CXCL1 被证明是 TAMs 分泌水平最高的趋化因子, 我们还发现消癥颗粒剂量依赖性地抑制 M2 表型巨噬细胞 CXCL1 的转录和表达(图 1D&E)。

以上结果表明, 消癥颗粒在体外能有效抑制 TAMs/CXCL1 信号转导。

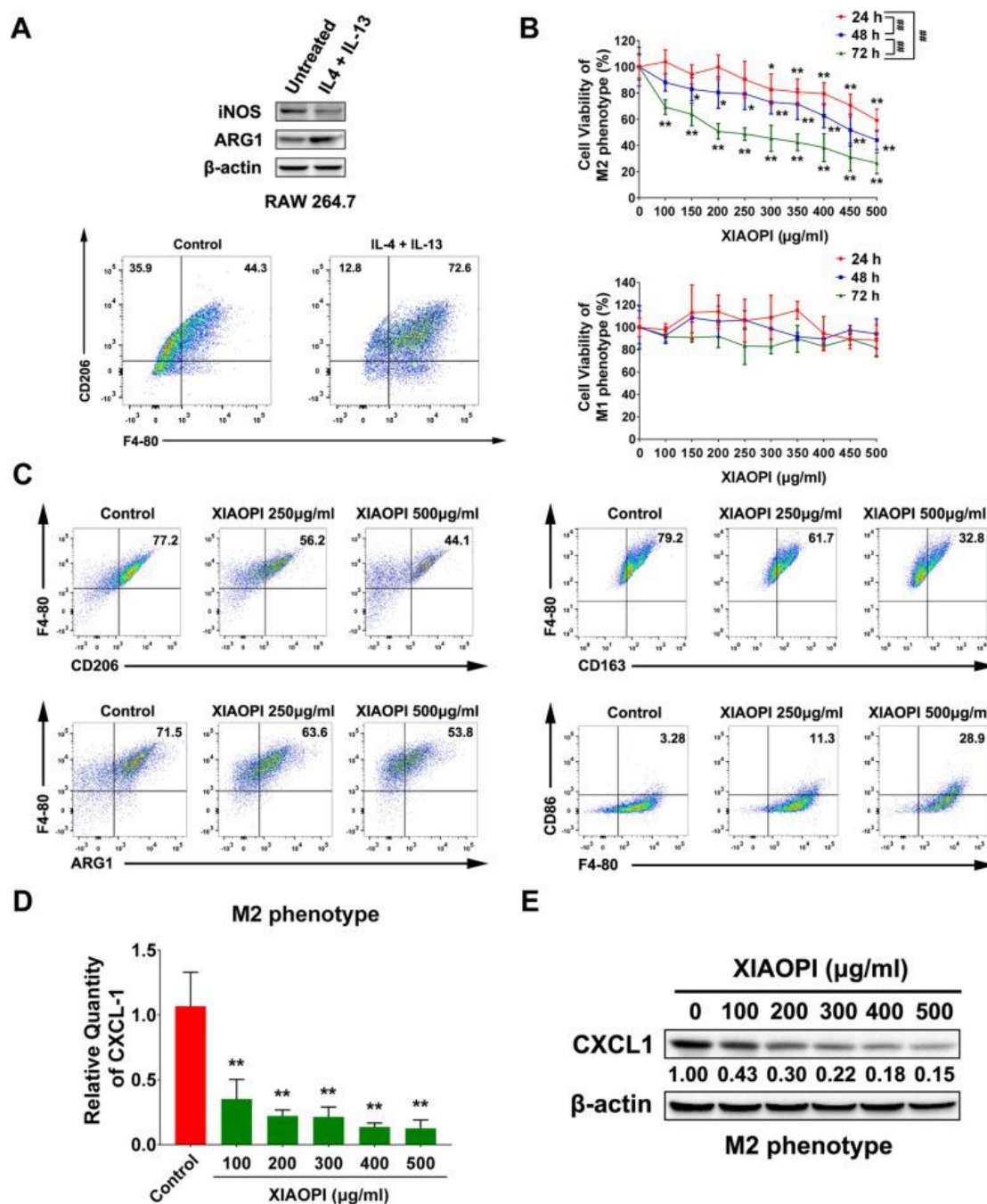


图 1 消癥颗粒抑制 M2 巨噬细胞的极化和 CXCL1 的表达。

- A. 40ng/ml IL-4 和 40ng/ml IL-13 诱导 RAW264.7 表型改变。
- B. 消癥颗粒对 M1 和 M2 表型 RAW264.7 增殖的影响。
- C. 消癥颗粒对 M2 表型的表面标志物 CD206、CD163 和 Arg1 均呈剂量依赖性下调，而 M1 标志物 CD86 则呈剂量依赖性上调。
- D. 消癥颗粒剂量依赖性抑制 M2 表型 RAW264.7 细胞 CXCL1 转录水平。
- E. 消癥颗粒剂量依赖性抑制 M2 表型 RAW264.7 细胞 CXCL1 的表达。(一式三份的实验结果分别为:平均值 \pm SD, * p <0.05, ** p <0.01 与对照相比, # p <0.01,对比 24h, 48h, 72h 三个时间点的比较。)

消癥颗粒通过抑制 TAMs/CXCL1 抑制 HSPCs 募集和 MDSCs 分化

造血干/祖细胞 (HSPCs) 在微环境形成中起着重要的调节作用。在此, 我们使用 MACS 结合 FACS 策略从小鼠骨髓中分离出带有 Lineage⁻/c-Kit⁺/Sca-1⁺ 标记的 HSPCs (图 2A)。

因为 HSPCs 的募集和动员依赖于肿瘤或抑制性免疫细胞分泌的趋化因子, 并且 CXCL1 被证实能促进远处转移^[11, 18], 因此, 我们检测 CXCL1 对 HSPCs 分化的影响。流式细胞仪检测结果表明, CXCL1 能逐渐增加 HSPCs 中 CD11b⁺/Gr-1⁺ MDSCs 的数量 (图 2B)。

另外, 条件培养基 (CM) 能够提高 HSPCs 的侵袭能力, 表明 TAM 能够激活 HSPCs 的定向募集。与此相反, 消癥颗粒显著阻断了 TAMs 诱导的 HSPCs 侵袭增强, 而 CXCL1 进一步缓解了这种抑制, 提示 CXCL1 是 TAMs 分泌的一种关键的趋化因子, 参与了 HSPCs 的招募 (图 2C&D)。

此外, 还发现 TAMs-CM 能促进 HSPCs 向 MDSCs 的分化, 并被消癥颗粒阻断。同样, CXCL1 处理降低了消癥颗粒对 MDSCs 分化的抑制作用 (图 2E)。

由于 MDSCs 被认为是促进 PMN 形成的必要因素, 这些研究结果表明, 消癥颗粒可能通过抑制 HSPCs 的招募和肾上腺皮质干细胞的分化而有效抑制 PMN 的形成。

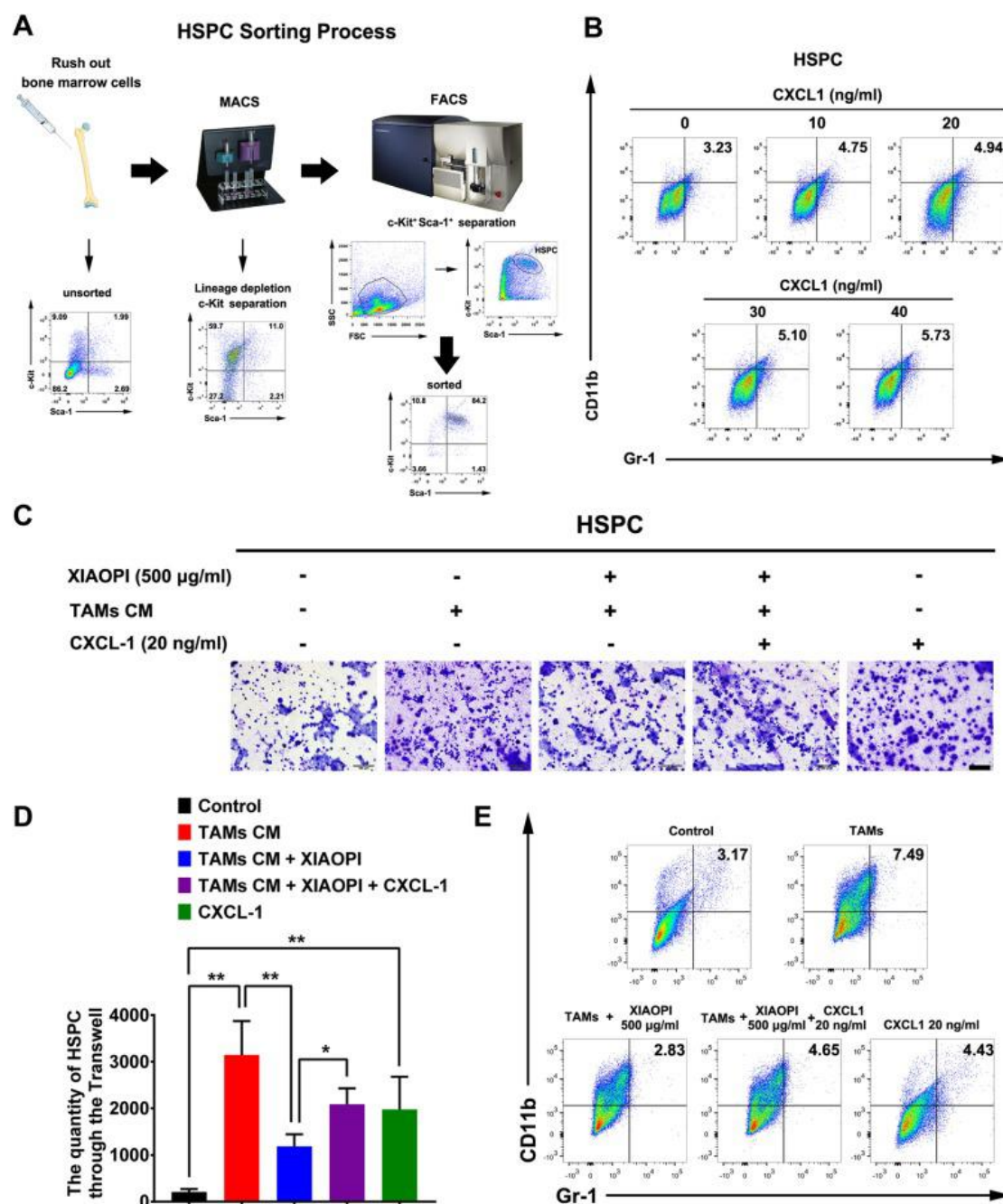


图 2 消癥颗粒通过抑制 TAMs/CXCL1 抑制 HSPCs 的招募和 MDSCs 的分化。

A.造血干/祖细胞制备过程流程图。简单地，在无菌条件下用注射器冲洗小鼠骨髓细胞。随后进行谱系⁻/c-Kit⁺雌性细胞分选。最后，采用流式细胞仪(FACS)分别收集Sca-1⁺/c-Kit⁺ HSPCs。

B.CXCL1 剂量依赖性地增加 CD11b⁺/Gr-1⁺细胞的比例，促进 HSPCs 向 MDSCs 的分化。

C-D.消癥颗粒能明显减轻 TAMs-CM 诱导的 HSPCs 的运动，CXCL1 能明显减轻消癥颗粒对 TAMs-CM 诱导的 HSPCs 运动的抑制。

E.消癥颗粒抑制 TAMs-CM 诱导的 HSPCs 向 CD11b⁺/Gr-1⁺MDSCs 的分化，并可通过 CXCL1 处理降低 HSPCs 向 CD11b⁺/Gr-1⁺MDSCs 的分化。(实验结果为平均值 \pm SD, *p<0.05, **p<0.01)。

消癥颗粒抑制 TAMs 和 HSPCs 共培养的 4T1 细胞增殖和侵袭

以上结果表明,消癥颗粒可能通过抑制 MDSCs 而阻断肿瘤免疫抑制微环境的形成。

在模拟肿瘤微环境(TME)的条件下,探讨该方对肿瘤细胞增殖和转移的影响是有意义的。

将 HSPCs 和 TAMs-CM 单独或联合添加到小鼠肿瘤细胞系 4T1 的上清液中。EdU 细胞增殖实验表明, HSPCs 单独作用对 4T1 细胞增殖的影响不大,但 TAMs-CM 处理的 HSPCs 能显著增强这种影响。当 CXCL1 中和抗体加入共培养体系后,其促增殖作用被抑制,表明 CXCL1 是 TAMs-CM 激活 HSPCs 介导的癌细胞增殖的关键趋化因子。值得注意的是,经 TAMs-CM 处理的 HSPCs 对肿瘤细胞的增殖促进作用在消癥颗粒注射后被明显抑制,并随后被 CXCL1 过表达所逆转(图 3A)。

这些发现进一步证实了 TAMs/CXCL1 信号通路是调节 HSPCs 功能的关键趋化因子,并证实了消癥颗粒的抗肿瘤作用。

Transwell 实验还发现, TAMs-CM 处理的 HSPCs 能够增强 4T1 细胞的侵袭能力,并且能够被消癥颗粒或 CXCL1 中和抗体抑制。同样, CXCL1 过表达可以缓解消癥颗粒的抑制作用(图 3B)。

此外,消癥颗粒还能抑制 TAMs-CM 处理的 HSPCs 诱导的 MMP2 和 MMP9 表达上调,从而减弱转移前微环境形成过程中的细胞外间质重构。同样,外源性 CXCL1 可以部分恢复消癥颗粒抑制的 MMP2 和 MMP9 水平,提示消癥颗粒可能以 CXCL1 依赖的方式抑制乳腺癌细胞的侵袭(图 3C)。

免疫荧光实验进一步表明,经 TAMs-CM 处理的 HSPCs 促进了间充质标记波形蛋白的表达,并下调了上皮标记 E-cadherin 的水平。相反,消癥颗粒通过抑制 CXCL1 抑制 EMT 过程(图 3D)。

这些结果提示消癥颗粒能抑制 TME 中癌细胞的增殖和转移能力,从而抑制 PMN 的形成。

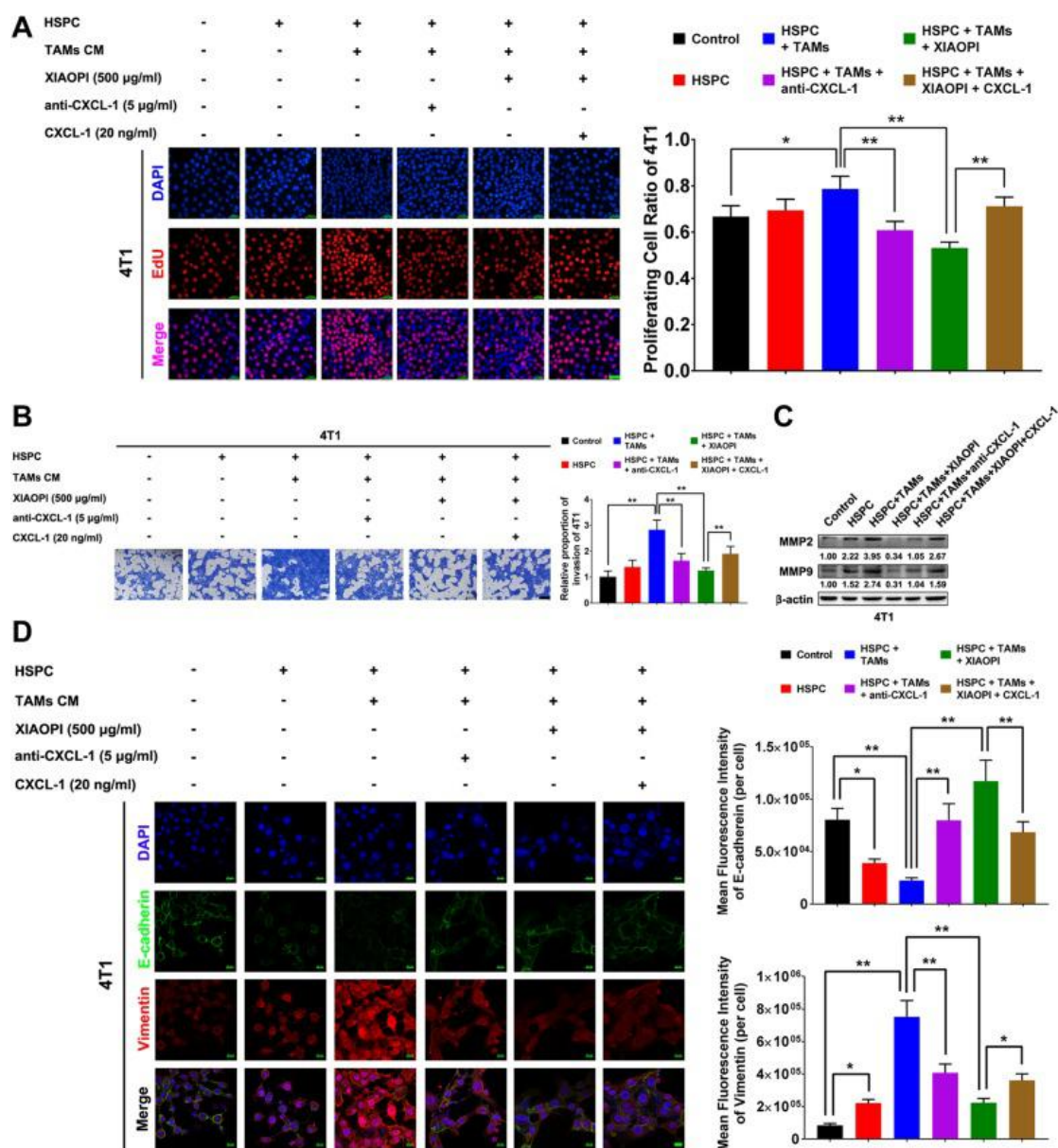


图 3 消癥颗粒抑制 TAMs 和 HSPCs 共培养的 4T1 细胞增殖和侵袭。

A. EdU 细胞增殖实验表明 HSPCs 与 TAMs-CM 共培养可促进 4T1 细胞的增殖，而消癥颗粒或 CXCL1 中和抗体(比例尺表示 50µm)则可抑制 4T1 细胞的增殖。

B. HSPCs 与 TAMs-CM 联合培养可明显促进 4T1 细胞的侵袭，而消癥颗粒和 CXCL1 中和抗体对 4T1 细胞的侵袭有抑制作用。同时，外源 CXCL1 处理可逆转消癥颗粒的抑制作用(比例尺表示 200µm)。

C. HSPCs 和 TAMs-CM 共培养能显著促进 MMP2 和 MMP9 的表达，而消癥颗粒和 CXCL1 中和抗体能显著降低 MMP2 和 MMP9 的表达。外源性 CXCL1 可部分恢复消癥颗粒所抑制的 MMP2 和 MMP9 水平。

D. 4T1 细胞(每个细胞)荧光强度的定量分析表明，消癥颗粒和 CXCL1 中和抗体对间充质标记波形蛋白有抑制作用，并与 HSPCs 和 TAMs-CM 共培养上调。相比之下，上皮标志物 E-cadherin 的表达增强(比例尺表示 20µm)。(实验结果为平均值±SD，*p<0.05，**p<0.01)。

消癥颗粒抑制乳腺癌肺转移

为了验证体外实验结果，我们将荧光素酶标记的 4T1 细胞注射到 BALB/c 小鼠乳腺脂肪垫中，进一步评价消癥颗粒的体内抗转移作用。从实验第一周开始至实验结束，采用口服给药法，每日 1g/kg 给药。每周监测乳腺癌肺转移，苏木精-伊红染色观察肺微转移形成情况。此外，还检测了小鼠骨髓和肺组织中的造血干/祖细胞的比例(图 4A)。

每 3 天测量一次肿瘤体积。结果表明，消癥颗粒对肿瘤的生长有明显的抑制作用，对 TAMs 诱导的促癌作用有抑制作用。更重要的是，CXCL1 过表达显著降低了消癥颗粒的抑制作用(图 4B-D)。

荧光素酶显像实验进一步表明，消癥颗粒或 CXCL1 基因敲除能显著抑制 TAMs 诱导的癌细胞转移，并且消癥颗粒的抗转移作用被 CXCL1 基因在 TAMs 中的过表达所消除(图 4E)。

这些结果进一步表明，TAMs/CXCL1 是消癥颗粒抑制乳腺癌转移的关键靶点。因此，我们通过流式细胞仪检测消癥颗粒对肿瘤细胞比例的影响。结果表明，消癥颗粒和 CXCL1 基因敲除能显著抑制肿瘤组织中的 F4-80⁺CD206⁺细胞，即使与 4T1 细胞共同注射也能显著抑制 F4-80⁺CD206⁺细胞的增殖。同样，过表达 CXCL1 的 TAMs 联合注射缓解了消癥颗粒对 TAMs 群体的抑制作用(图 4F)。

另一方面，消癥颗粒也能抑制肿瘤组织中的 MDSCs 数量，抑制肿瘤组织中的 CXCL1 基因表达。重要的是，消癥颗粒可以抑制 TAMs 诱导的 MDSCs 数量增加，这一点随后被 CXCL1 过表达所逆转(图 4G)。

结果提示 TAMs/CXCL1 在介导消癥颗粒的抗癌和抑制转移作用中起关键作用，这与肿瘤组织中 TAMs 和 MDSCs 的下调密切相关。

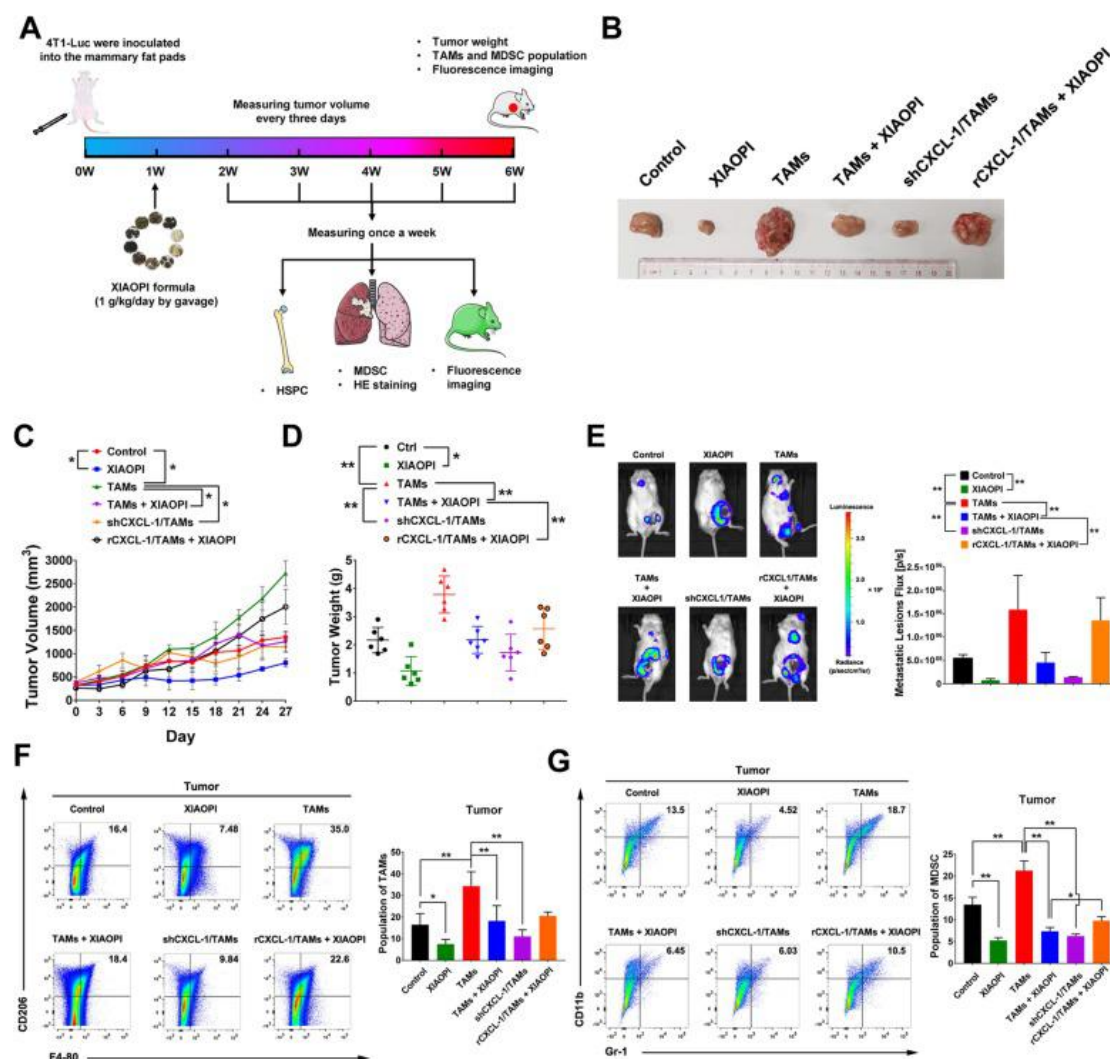


图 4 消癥颗粒抑制乳腺癌肺转移，降低肿瘤内 MDSCs 和 TAMs 的比例。

A.动物模型建立、药物使用和参数测试示意图。

B.不同治疗方法下乳腺肿瘤的代表性影像。

C-D.消癥颗粒对乳腺癌细胞生长有抑制作用，并能抑制 TAMs 联合注射诱导的促生长作用。同时发现 TAMs 中 CXCL1 基因敲除可抑制 TAMs 对乳腺癌的生长刺激作用，而 CXCL1 基因过表达能够减轻消癥颗粒的抑制作用。

E.消癥颗粒对乳腺癌肺转移具有抑制作用，并能抑制 TAMs 联合注射诱导的促转移作用。同时发现 TAMs 中 CXCL1 基因的敲除可抑制 TAMs 对乳腺癌转移的刺激作用，而 CXCL1 基因在 TAMs 中的过表达则可抑制消癥颗粒的抑制转移作用。

F.消癥颗粒对原发性乳腺肿瘤或 TAMs 刺激的乳腺肿瘤中的 M2 型巨噬细胞有抑制作用，而在 TAMs 中的 CXCL1 基因表达下调可以降低 M2 表型群体的数量，而在 TAMs 中的 CXCL1 过表达则可以缓解消癥颗粒的抑制作用。

G.消癥颗粒能抑制 4T1 细胞或 TAMs 刺激诱导的 MDSCs 的数量，CXCL1 在 TAMs 中的表达下调，而 CXCL1 在 TAMs 中的过表达可缓解消癥颗粒的抑制作用。(结果表示为平均值 \pm SD, * p <0.05, ** p <0.01)。

消癍颗粒通过抑制 CXCL1 介导的 MDSCs 激活抑制 TAMs 诱导的小鼠肿瘤微环境形成

PMN 被认为是促进转移性病灶形成的必要条件。

为了研究消癍颗粒对肿瘤转移前微环境形成的影响，用 Gr-1 和 CD11b 标记 MDSCs，CK19 标记肿瘤细胞。

免疫荧光结果发现，TAMs 联合注射早在第 2 周开始诱导 CD11b⁺Gr1⁺ MDSCs 蓄积，并伴有 CK19⁺癌细胞浸润肺 PMN。但是，消癍颗粒或 CXCL1 基因敲除可明显阻断 TAMs 诱导的 MDSCs 积累和肿瘤细胞浸润。相反，CXCL1 在 TAMs 中的过度表达逆转了消癍颗粒对 PMN 的抑制作用(图 5A)。

在肿瘤进展的第 2-4 周，CD11b⁺Gr1⁺MDSCs 在肺组织中积累越多，CK19⁺乳腺癌细胞浸润越多，提示 PMN 的形成为肿瘤细胞种植提供了一个良好的条件。两组之间的统计学差异在第 2-4 周保持一致(图 5B)。

此外，我们注意到在第 2-4 周各组均未见明显的肺转移病灶，如图 5C 所示，但 HE 染色显示，消癍颗粒能抑制 TAMs 诱导的肺微转移灶的形成，进一步证实消癍颗粒能通过抑制 PMN 的形成而阻止肺转移(图 5D)。

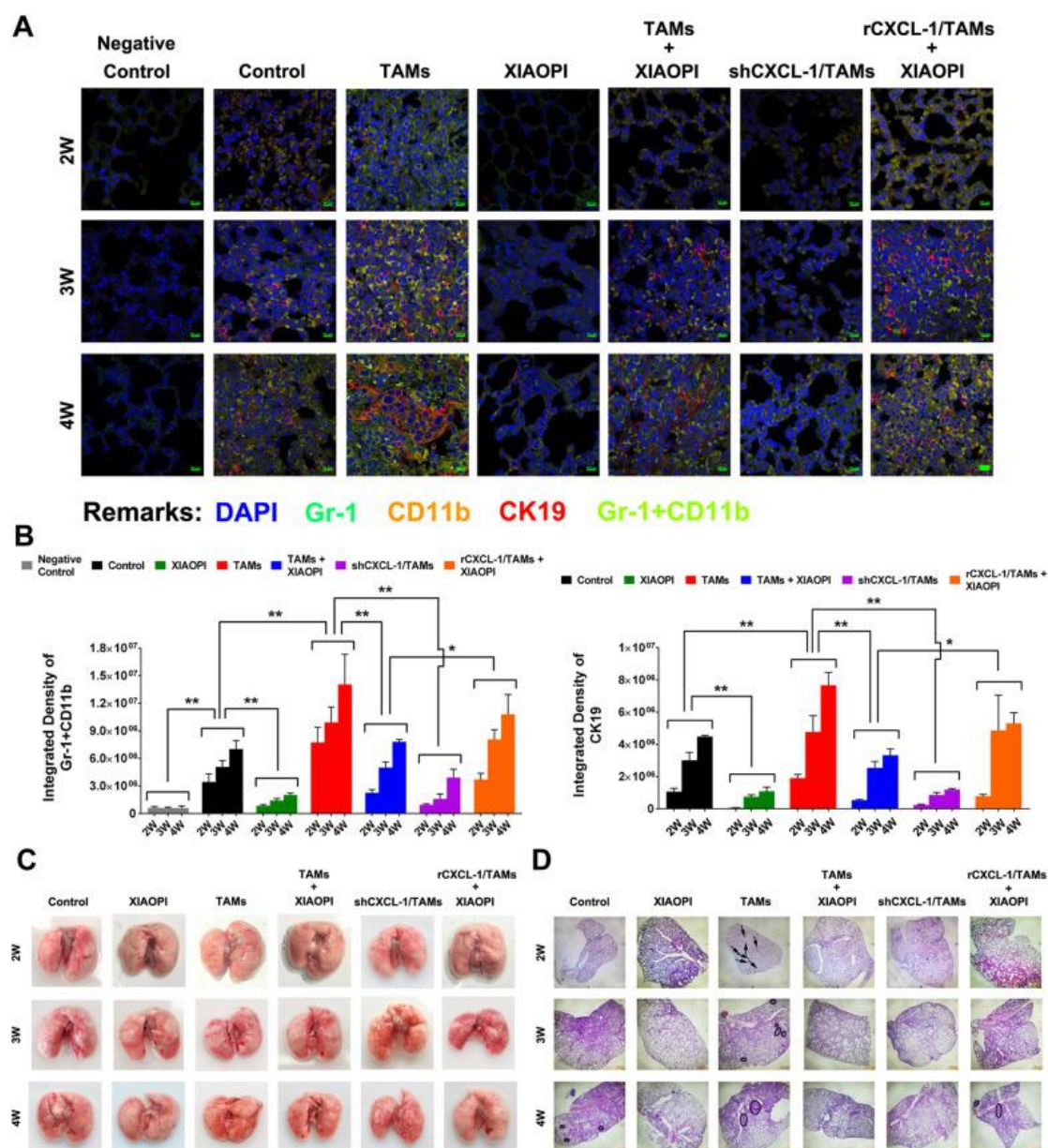


图 5 消癥颗粒通过抑制 CXCL1 介导的 MDSCs 活化抑制 TAMs 诱导的小鼠 PMN 形成。

A. 接种后第 2 至 4 星期的小鼠肺组织免疫荧光。Gr-1⁺CD11b⁺ 标记 MDSCs 和 CK19⁺ 标记肿瘤细胞。消癥颗粒能明显抑制肺组织 CD11b⁺/Gr1⁺MDSCs 的积累，而 CXCL1 在肺组织中的过度表达则能明显减轻消癥颗粒的抑制作用。

B. 小鼠 2-4 周肺组织 Gr-1、CD11b 和 CK19 荧光强度的统计学分析。

C. 第 2-4 周小鼠肺组织大体观察。未发现明显的肺转移性病灶。

D. 苏木精-伊红染色法检测 2-4 周小鼠肺组织。消癥颗粒对 TAMs 诱导的肺微转移有抑制作用。(结果表示为平均值±SD, *p<0.05, **p<0.01)。

消癥颗粒抑制 HSPCs 招募和向 MDSCs 分化

以上结果表明，消癥颗粒能抑制 MDSCs 在靶器官的活化和积累，因为据报道 MDSCs 与 HSPCs 有区别，探讨 TAMs 接种或消癥颗粒处理后 HSPCs 的变化是有意

义的。

如图 6A 和 B 所示, 与阴性对照组相比, 接种肿瘤细胞后第 2-4 周 HSPCs 数量明显增加。更重要的是, TAMs 共注射进一步激活了 HSPCs, 而 CXCL1 的敲除可以抑制这一过程。有趣的是, 消癍颗粒对肿瘤细胞诱导或 TAMs 诱导的 HSPCs 富集均有明显的抑制作用, 而 CXCL1 过表达降低了消癍颗粒对 HSPC 活化的抑制作用, 进一步说明 TAMs/CXCL1 是消癍颗粒抗 PMN 作用的重要信号传导途径。

流式细胞仪分析显示, 肺组织中的 MDSCs 数量在第 2-4 周与 HSPCs 数量变化趋势基本一致, 与骨髓中 HSPCs 数量变化趋势一致。接种 TAMs 可以诱导 MDSCs 群体, CXCL1 基因敲除可以下调 MDSCs 群体。同时, 消癍颗粒能抑制 TAMs 诱导的 MDSCs 增高, CXCL1 过表达阻断消癍颗粒的治疗作用(图 6C 和 D)。

结论:消癍颗粒能抑制 HSPCs 的增殖和分化, 从而抑制 PMN 的形成, 防止乳腺癌的转移。

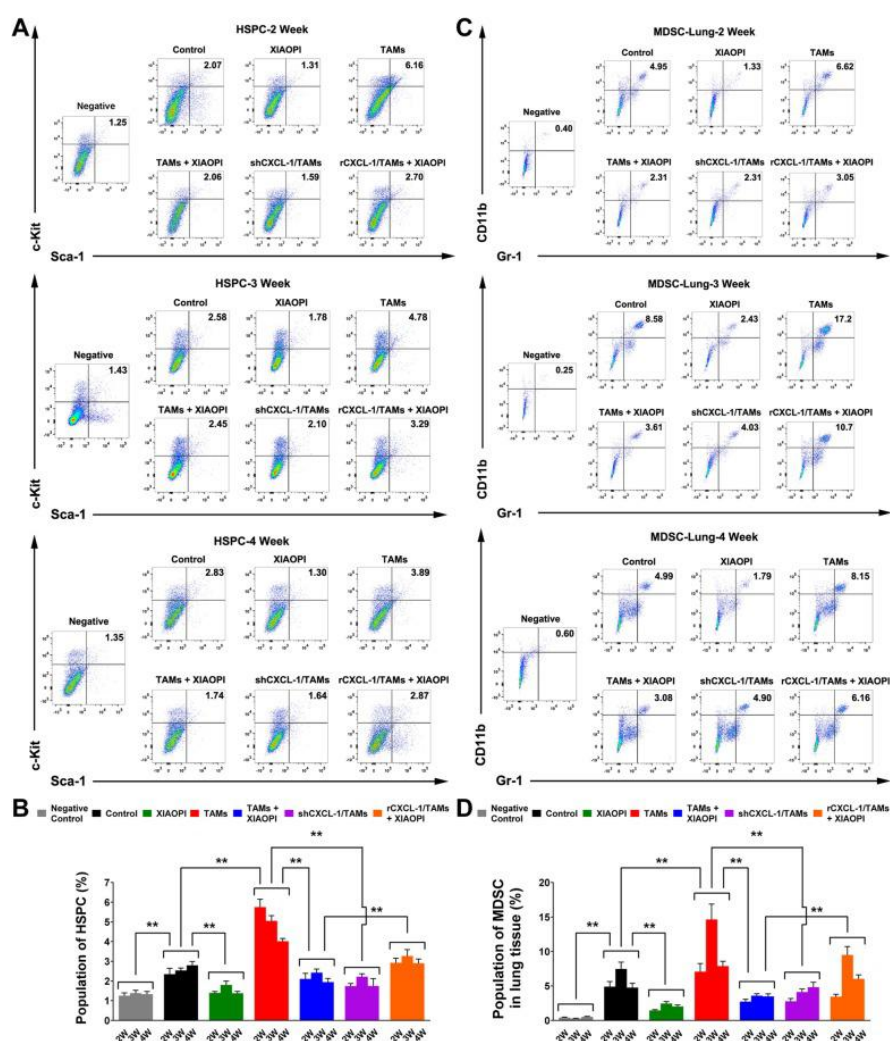


图 6 消癍颗粒抑制 HSPCs 的募集和向 MDSCs 的分化。

A-B.流式细胞仪检测骨髓中 HSPCs 的数量。消癥颗粒可阻断 TAMs 诱导的 HSPCs 升高,但可通过 CXCL1 过表达缓解。

C-D 流式细胞仪检测肺组织中 MDSCs 的数量。从第 2 周到第 4 周消癥颗粒对肺组织 CD11b+/Gr1+MDSCs 的积累有明显的抑制作用,而通过 TAMs 中 CXCL1 的过度表达能够缓解。(结果表示为平均值 \pm SD, * $p<0.05$, ** $p<0.01$)

讨论

最近的研究表明 PMN 的形成是决定癌转移部位和时间的关键因素^[19,20]。针对 PMN 的药物可能是改善癌症患者临床疗效的一种新的治疗策略。然而,PMN 的形成是一个复杂的过程,涉及多种细胞因子、骨髓细胞和转移前器官的组织重塑^[21]。传统的细胞杀伤策略或靶向治疗可能不足以阻断神经网络反应。

中药含有多种成分,可同时作用于多个靶点,由于其对免疫功能的系统调节,长期以来一直被用于癌症辅助预防和治疗的试验^[22-26]。多项研究表明,常规方剂可通过调节 T 细胞表型、巨噬细胞极化、趋化因子表达和免疫检查点抑制肿瘤耐药或转移^[27,28]。临床试验的 meta 分析也表明,传统的医疗实践可以提高癌症患者的生存期和生活质量,伴随着肿瘤免疫微环境的正常化^[14,29-32]。与此同时,槐耳颗粒、PHY906、华蟾素等对于肿瘤患者具有积极临床疗效的多种中药配方已商品化,对肿瘤微环境调节作用显著,包括巨噬细胞抑制、T 细胞分化和细胞因子分泌^[30,33,34]。我们的研究表明消癥颗粒可以通过抑制 TAMs/CXCL1 信号转导从而抑制乳腺癌 PMN 的形成。

TAMs 的特征通常是典型的 M1 型巨噬细胞和 M2 型巨噬细胞^[35]。一般认为,M1 具有促进 Th1 反应、杀微生物和杀肿瘤的作用,因此被认为是“抑制”型,而 M2 具有激活 Th2 反应、促进组织修复和重塑、免疫抑制以及肿瘤进展的作用,因此被认为是“治愈”型^[36]。因此,抑制 M2 表型极化被认为是肿瘤治疗的重要策略。在本研究中,我们发现 TAMs 在体内外均能促进乳腺癌的生长和转移。TAMs 的 CM 可以诱导 HSPCs 招募和分化为 MDSCs,进一步支持 PMN 的形成。

2015 年,Kaplan 等人追踪了 HSPCs 在荷瘤小鼠体内的发展历程。研究发现,远端的原发性肿瘤促使骨髓中造血干/祖细胞的扩张,并将其转移到血液中。进一步的体内示踪表明,在荷瘤小鼠早期转移部位,这些造血干/祖细胞已分化为 MDSCs^[12]。此外,Kaplan 等人的另一项研究表明,VEGFR1 阳性造血祖细胞在调节肿瘤转移中是必要的^[3]。CXCL1 也已被证明通过中性粒细胞释放 MMP9 间接地动

造血干/祖细胞进入骨髓的外周血液^[37, 38]。我们的研究表明 CXCL1 能促进 HSPCs 的募集及其向 MDSCs 的分化。然而, 还需要进一步研究 CXCL1 动员和扩展造血干/祖细胞的确切机制。

当然, CXCL1 并不是唯一诱导 HSPCs 分化为 MDSCs 的细胞因子。以往的研究结果表明, TAMs 分泌的多种因子, 如 TGF- β 、SDF-1 和 VEGF, 可促进远处器官中性粒细胞的形成^[39]。特别是 GM-CSF 和 IL-6 不仅能促进髓系偏向性分化, 而且能诱导骨髓前体细胞向功能性 MDSCs 的分化^[40]。然而, 我们以前的研究表明 CXCL1 是从乳腺癌分离的 TAMs 分泌的最高的趋化因子^[16, 41]。此外, 在小鼠和人类模型中发现 CXCL1 基因沉默是通过抑制 NF- κ B/SOX4 信号通路从而抑制乳腺癌的生长和肺转移^[42]。在其他恶性肿瘤中也观察到类似的结果。来自 TAMs 和癌相关成纤维细胞的 CXCL1 可促进膀胱癌细胞的侵袭和定植^[43]。另外, 结肠癌细胞分泌的 VEGF-A 可以刺激 TAMs 产生 CXCL1, 随后将 MDSCs 募集到转移前的部位建立 PMN, 进而促进肝转移^[11]。也有报道表明 CXCL1 可以吸引 CD11b⁺Gr1⁺髓系细胞进入肿瘤, 从而产生能促进肿瘤生长和转移的趋化因子包括 S100A8/9^[21]。临床上, 276 例结肠癌患者的组织分析表明 CXCL1 在结肠癌的进展和转移中发挥了重要作用^[44]。CXCL1 的表达水平是结肠癌患者 OS 和 DFS 的独立预后因素^[45]。因此, 干扰 TAMs/CXCL1 信号转导以阻断 PMN 的形成是治疗肿瘤转移的一个有前途的方法。尽管如此, 针对多种细胞因子的鸡尾酒疗法仍然值得进一步研究。

骨髓源性细胞的激活被认为是建立 PMN 的核心步骤。以往的研究表明, HSPCs 的募集和 MDSCs 的分化是介导 PMN 形成的重要前提^[12]。在我们的研究中, 我们还观察到在小鼠接种 4T1 细胞 2 周后, 骨髓中的 HSPCs 明显增加, 同时肺中的 MDSCs 也增加, 表明 PMN 是在乳腺癌早期形成。有趣的是, 人们注意到 HSPCs 的数量并不总是增加。接种 4T1 细胞 6 周后, HSPCs 明显减少。这与 Liu 等人的研究结果一致, 即在转移的靶器官中形成肿瘤集落后 HSPCs 的数量逐渐减少^[19]。此外, 还发现 TAMs 联合接种可促进 HSPCs 的增殖和 MDSCs 的分化, 而消癍颗粒和 CXCL1 基因敲除可阻断这种增殖和分化。这些发现表明, TAMs/CXCL1 信号通路是触发骨髓源性细胞的关键信使。有趣的是, 消癍颗粒治疗组的 HSPCs 总数在整个实验过程中保持稳定。结果提示消癍颗粒不仅能抑制早期乳腺癌 HSPCs 的升高, 而且在治疗过程中造血毒性作用不明显。

在东亚, 中医尤其受到癌症辅助化疗的重视。不同于传统的化疗药物和靶向抑制剂, 中医药是具有整体调节和神经网络干预的属性^[22, 23]。大量研究表明, 中药配方不仅能协同增强细胞毒药物的治疗效果, 而且能减少其副作用^[24-26]。此外, 多项临床研究证实, 中医药使用者的生存期比非使用者大大延长, 这与免疫功能的改善密切相关。

例如, 一种新的中药配方 KSG-002 被报道通过下调来自 TAMs 的 NF- κ B 依赖性 TNF- α 分泌来抑制乳腺癌的生长和转移^[46]。还发现槐耳提取物抑制 M2 巨噬细胞浸润和血管生成^[47]。这些结果提示 TME (肿瘤微环境) 是中医药的核心调控对象。然而, 关于中药抑制 PMN 作用的研究很少见报道。值得注意的是, 一项研究探讨了健脾补肾方对胃癌中 PMN 生物标志物表达变化的调节作用。结果表明, 健脾补肾^[48]均能抑制 PMN 信号, 包括 Rac1、Cdc42、SDF-1 和 FN, 但该研究过于描述性, 未检测到 HSPCs 和 MDSCs 的总体变化。

本研究发现消癥颗粒能剂量依赖性地抑制 M2 极化和 CXCL1 表达。此外, 消癥颗粒还能抑制 TAMs/CXCL1 诱导的 HSPCs 的募集和 MDSCs 的分化, 最终抑制 PMN 的形成和肺转移。本研究进一步为中医药防治乳腺癌转移提供了科学依据。此外, 目前还没有特异性的 CXCL1 抑制剂, 目前的靶向策略是通过作用于其受体 CXCR2 来设计的, 这表明 CXCL1 的抑制作用不是特异性的。但是, 我们的研究表明, 消癥颗粒可以抑制 CXCL1 的 mRNA 和蛋白质表达。更重要的是, 我们以前的研究表明, 消癥颗粒抑制了 TAMs 中 CXCL1 基因的启动子活性^[41]。同时, 消癥颗粒含有数千种植物化学成分和分子靶点, 与 CXCL1 单靶点策略相比, 具有天然的优势。另外, 在我们的研究中, 消癥颗粒几乎没有发生不良反应, 并且已经得到国家食品药品监督管理局的批准, 但是消癥颗粒中哪种化合物能够解释 CXCL1 的抑制作用还不清楚。因此, 从消癥颗粒或天然化学库中发现和鉴定 CXCL1 抑制剂仍是值得研究的课题。

总结

综上所述, 我们的研究表明消癥颗粒通过抑制 TAMs/CXCL1 信号转导, 可以阻止乳腺癌 PMN 的形成和肺转移。我们的研究结果不仅提供了临床前证据支持消癥颗粒应用于预防 PMN 形成, 而且突出了 TAMs/CXCL1 在介导 PMN 建立中的新作用。

参考文献:

- 【1】DeSantis CE, Ma J, Sauer AG, Newman LA, Jemal A. Breast cancer statistics, 2017, racial disparity in mortality by state. *CA-Cancer J Clin*. 2017;67(6):439–48.
- 【2】Harbeck N, Gnant M. Breast cancer. *Lancet*. 2017;389(10074):1134–50.
- 【3】Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the premetastatic niche. *Nature*. 2005;438(7069):820–7.
- 【4】Wong CCL, Zhang HF, Gilkes DM, Chen J, Wei H, Chaturvedi P, et al. Inhibitors of hypoxia-inducible factor 1 block breast cancer metastatic niche formation and lung metastasis. *J Mol Med*. 2012;90(7):803–15.
- 【5】Xing F, Okuda H, Watabe M, Kobayashi A, Pai SK, Liu W, et al. Hypoxia-induced Jagged2 promotes breast cancer metastasis and self-renewal of cancer stem-like cells. *Oncogene*. 2011;30(39):4075–86.
- 【6】Fong MY, Zhou W, Liu L, Alontaga AY, Chandra M, Ashby J, et al. Breast cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis. *Nat Cell Biol*. 2015;17(2):183–94.
- 【7】Hoffman RM. Stromal-cell and cancer-cell exosomes leading the metastatic exodus for the promised niche. *Breast Cancer Res*. 2013;15(3):310.
- 【8】Gener Lahav T, Adler O, Zait Y, Shani O, Amer M, Doron H, et al. Melanoma-derived extracellular vesicles instigate proinflammatory signaling in the metastatic microenvironment. *Int J Cancer*. 2019;145(9):2521–34.
- 【9】Doglioni G, Parik S, Fendt SM. Interactions in the (pre) metastatic niche support metastasis formation. *Front Oncol*. 2019;9:219.
- 【10】Lee W, Ko SY, Mohamed MS, Kenny HA, Lengyel E, Naora H. Neutrophils facilitate ovarian cancer premetastatic niche formation in the omentum. *J Exp Med*. 2019;216(1):176–94.
- 【11】Wang D, Sun H, Wei J, Cen B, DuBois RN. CXCL1 is critical for premetastatic niche formation and metastasis in colorectal cancer. *Cancer Res*. 2017;77(13):3655–65.
- 【12】Giles AJ, Reid CM, Evans JD, Murgai M, Vicioso Y, Highfill SL, et al. Activation of hematopoietic stem/progenitor cells promotes immunosuppression within the pre-metastatic niche. *Cancer Res*. 2016;76(6):1335–47.
- 【13】Yan Z, Lai Z, Lin J. Anticancer properties of traditional Chinese medicine. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2017;20(5):423–9.
- 【14】Dang Z, Liu X, Wang X, Li M, Jiang Y, Wang X, et al. Comparative effectiveness and safety of traditional Chinese medicine supporting Qi and enriching blood for cancer-related anemia in patients not receiving chemoradiotherapy: a meta-analysis and systematic review. *Drug Des Dev Ther*. 2019;13:221–30.
- 【15】Xu J, Song Z, Guo Q, Li J. Synergistic effect and molecular mechanisms of traditional Chinese medicine on regulating tumor microenvironment and cancer cells. *Biomed Res Int*.

2016;2016:1490738..

【16】 Wang N, Zheng Y, Gu J, Cai Y, Wang S, Zhang F, et al. Network pharmacology-based validation of TAMS/CXCL-1 as key mediator of XIAOPI formula preventing breast cancer development and metastasis. *Sci Rep.* 2017;7(1):14513.

【17】 Cai YL, Zheng YF, Gu JY, Wang SQ, Wang N, Yang BW, et al. Betulinic acid chemosensitizes breast cancer by triggering ER stress-mediated apoptosis by directly targeting GRP78. *Cell Death Dis.* 2018;9:16.

【18】 Yu PF, Huang Y, Han YY, Lin LY, Sun WH, Rabson AB, et al. TNF α -activated mesenchymal stromal cells promote breast cancer metastasis by recruiting CXCR2(+) neutrophils. *Oncogene.* 2017;36(4):482–90.

【19】 Meng D, Meng M, Luo A, Jing X, Wang G, Huang S, et al. Effects of VEGFR1(+) hematopoietic progenitor cells on pre-metastatic niche formation and in vivo metastasis of breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2019;145(2):411–27.

【20】 Zingg D, Debbache J, Pena-Hernandez R, Antunes AT, Schaefer SM, Cheng PF, et al. EZH2-Mediated Primary Cilium Deconstruction Drives Metastatic Melanoma Formation. *Cancer Cell.* 2018;34(1):69–84 e14.

【21】 Acharyya S, Oskarsson T, Vanharanta S, Malladi S, Kim J, Morris PG, et al. A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis. *Cell.* 2012;150(1):165–78.

【22】 Wang CY, Bai XY, Wang CH. Traditional Chinese medicine: a treasured natural resource of anticancer drug research and development. *Am J Chinese Med.* 2014;42(3):543–59.

【23】 Wang S, Long S, Wu W. Application of traditional Chinese medicines as personalized therapy in human cancers. *Am J Chinese Med.* 2018;46(5):953–70.

【24】 Hsiao WLW, Liu L. The role of traditional Chinese herbal medicines in Cancer therapy - from TCM theory to mechanistic insights. *Planta Med.* 2010;76(11):1118–31.

【25】 Kong D-X, Li X-J, Tang G-Y, Zhang H-Y. How many traditional Chinese medicine components have been recognized by modern Western medicine? A chemoinformatic analysis and implications for finding multicomponent drugs. *Chemmedchem.* 2008;3(2):233–6.

【26】 Zhao L, Zhao AG, Zhao G, Xu Y, Zhu XH, Cao ND, et al. Survival benefit of traditional Chinese herbal medicine (a herbal formula for invigorating spleen) in gastric cancer patients with peritoneal metastasis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014;2014:1–6.

【27】 Li P, Liu Q. Analysis of Astragalus Membranaceus in promoting anti-tumor immune function and international spread of TCM. *Boletin De Malariologia Y Salud Ambiental.* 2019;59(2):21–8.

【28】 Ma H-D, Deng Y-R, Tian Z, Lian Z-X. Traditional Chinese medicine and immune regulation. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2013;44(3):229–41.

【29】 Liao YH, Li CI, Lin CC, Lin JG, Chiang JH, Li TC. Traditional Chinese medicine as adjunctive therapy improves the long-term survival of lung cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2017;143(12):2425–35.

【30】 Zhang Y, Wang X, Chen T. Efficacy of Huaier granule in patients with breast cancer. *Clin Transl Oncol.* 2019;21(5):588–95.

- 【31】 Tao W, Luo X, Cui B, Liang D, Wang C, Duan Y, et al. Practice of traditional Chinese medicine for psycho-behavioral intervention improves quality of life in cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*.2015;6(37):39725–39.
- 【32】 Xu Y, Mao JJ, Sun L, Yang L, Li J, Hao Y, et al. Association Between Use of Traditional Chinese Medicine Herbal Therapy and Survival Outcomes in Patients With Stage II and III Colorectal Cancer: A Multicenter Prospective Cohort Study. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2017;2017(52):19–25.
- 【33】 Lam W, Jiang Z, Guan F, Huang X, Hu R, Wang J, et al. PHY906(KD018), an adjuvant based on a 1800-year-old Chinese medicine, enhanced the antitumor activity of Sorafenib by changing the tumor microenvironment. *Sci Rep*. 2015;5:9384.
- 【34】 Cheng CS, Wang J, Chen J, Kuo KT, Tang J, Gao H, et al. New therapeutic aspects of steroidal cardiac glycosides: the anticancer properties of Huachansu and its main active constituent Bufalin. *Cancer Cell Int*. 2019;19:92.
- 【35】 Salmaninejad A, Valilou SF, Soltani A, Ahmadi S, Abarghan YJ, Rosengren RJ, et al. Tumor-associated macrophages: role in cancer development and therapeutic implications. *Cell Oncol (Dordr)*. 2019;42(5):591–608.
- 【36】 Almatroodi SA, McDonald CF, Darby IA, Pouniotis DS. Characterization of M1/M2 tumour-associated macrophages (TAMs) and Th1/Th2 cytokine profiles in patients with NSCLC. *Cancer Microenviron*. 2016;9(1):1–11.
- 【37】 Hoggatt J, Pelus LM. Hematopoietic stem cell mobilization with agents other than G-CSF. *Methods Mol Biol*. 2012;904:49–67.
- 【38】 Pelus LM, Fukuda S. Peripheral blood stem cell mobilization: the CXCR2 ligand GROβ rapidly mobilizes hematopoietic stem cells with enhanced engraftment properties. *Exp Hematol*. 2006;34(8):1010–20.
- 【39】 Chen XW, Yu TJ, Zhang J, Li Y, Chen HL, Yang GF, et al. CYP4A in tumorassociated macrophages promotes pre-metastatic niche formation and metastasis. *Oncogene*. 2017;36(35):5045–57.
- 【40】 Lin Y, Yang X, Liu W, Li B, Yin W, Shi Y, et al. Chemerin has a protective role in hepatocellular carcinoma by inhibiting the expression of IL-6 and GM-CSF and MDSC accumulation. *Oncogene*. 2017;36(25):3599–608.
- 【41】 Wang S, Liu X, Huang R, Zheng Y, Wang N, Yang B, et al. XIAOPI formula inhibits breast Cancer stem cells via suppressing tumor-associated macrophages/C-X-C motif chemokine ligand 1 pathway. *Front Pharmacol*.2019;10:1371.
- 【42】 Wang N, Liu W, Zheng Y, Wang S, Yang B, Li M, et al. CXCL1 derived from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via activating NF-κB/SOX4 signaling. *Cell Death Dis*. 2018;9(9):880.
- 【43】 Miyake M, Hori S, Morizawa Y, Tatsumi Y, Nakai Y, Anai S, et al. CXCL1-Mediated Interaction of Cancer Cells with Tumor-Associated Macrophages and Cancer-Associated Fibroblasts Promotes Tumor Progression in Human Bladder Cancer. *Neoplasia (New York, NY)*. 2016;18(10):636–46.

【44】 Sipos F, Germann TM, Wichmann B, Galamb O, Spisak S, Krenacs T, et al. MMP3 and CXCL1 are potent stromal protein markers of dysplasia-carcinoma transition in sporadic colorectal cancer. *Eur J Cancer Prev.* 2014;23(5):336–43.

【45】 Zhuo C, Wu X, Li J, Hu D, Jian J, Chen C, et al. Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 is associated with tumor progression and poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Biosci Rep.* 2018;38(4):1–8.

【46】 Woo SM, Choi YK, Cho SG, Park S, Ko SG. A new herbal formula, KSG-002, suppresses breast cancer growth and metastasis by targeting NF- κ B-dependent TNF α production in macrophages. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:728258.

【47】 Li Y, Qi W, Song X, Lv S, Zhang H, Yang Q. Huaier extract suppresses breast cancer via regulating tumor-associated macrophages. *Sci Rep.* 2016;6:20049.

【48】 Zhu X, Zhou Y, Xu Q, Wu J. Traditional Chinese medicine Jianpi Bushen therapy suppresses the onset of pre-metastatic niche in a murine model of spontaneous lung metastasis. *Biomed Pharmacother.* 2017;86:434–40.