

# 疏肝益肾方对乳腺癌肺转移微环境基因表达谱及免疫相关基因表达的影响

李心怡, 崔闯, 陈皖晴, 朱为康

(上海中医药大学附属市中医医院, 上海 200071)

**摘要:** **目的** 通过研究疏肝益肾方对乳腺癌小鼠肺部微环境基因表达的影响, 探讨疏肝益肾方抑制乳腺癌肺转移的作用机制。 **方法** 构建乳腺癌原位移植瘤高转移模型, 随机分为生理盐水组, 疏肝益肾低、中、高(0.5、1、2 g·kg<sup>-1</sup>) 剂量以及多西他赛组(5 mg·kg<sup>-1</sup>), 干预 28 d。HE 染色观察肺组织结构情况; 对转移灶进行转录组分析, 通过生物信息学分析基因表达谱的 GO 和 KEGG 通路特点, 筛选关键差异基因表达情况, 采用 qPCR 和 Western blot 分析关键免疫基因的表达。流式细胞术检测髓源抑制细胞(Myeloid suppressor cells, MDSCs) 表达情况; ELISA 法检测细胞因子和趋化因子 Cxcl2、GM-CSF 的表达。 **结果** 与生理盐水组相比, 疏肝益肾方中、高剂量组与多西他赛组肺组织转移结节数量均有相应减少; HE 染色提示肺部病理程度有所改善。疏肝益肾方高剂量组与生理盐水组的肺组织微环境有 814 个差异表达基因, 其中 713 个基因下调, 101 个基因上调; 筛选疏肝益肾组中关键炎症介质基因 Nfkbiz、Tnfaip3、Maff、Hspa1a、Hspb1、Cxcl2, 与生理盐水组相比, 疏肝益肾方组炎症基因显著下调( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 最终其结果与转录组结果趋势相符。采用 Western blot 在蛋白质层面进行验证, 发现与生理盐水组相比, 疏肝益肾方组 Nfkbiz、Tnfaip3、Maff、Hspa1a 和 Cxcl2 蛋白表达水平下降( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 但 Hspb1 蛋白表达上调( $P<0.01$ )。疏肝益肾方组和多西他赛组能够抑制 MDSCs 表达( $P<0.001$ ), 一定程度降低 Cxcl2、GM-CSF 的表达( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。 **结论** 疏肝益肾方能抑制乳腺癌肺转移, 并且调控肺部免疫微环境基因, 其调控范围较广。

**关键词:** 乳腺癌; 肺部微环境; 基因表达谱; 炎症介质; 疏肝益肾方

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-0482(2025)03-0352-11

**DOI:** 10.14148/j.issn.1672-0482.2025.0352

**引文格式:** 李心怡, 崔闯, 陈皖晴, 等. 疏肝益肾方对乳腺癌肺转移微环境基因表达谱及免疫相关基因表达的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2025, 41(3): 352-362.

## Effect of Shugan Yishen Recipe on Microenvironment Gene Expression Profile and Immune-Related Gene Expression in Lung Metastasis of Breast Cancer

LI Xinyi, CUI Chuang, CHEN Wanqing, ZHU Weikang

(Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese medicine, Shanghai 200071, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the mechanism of inhibition of breast cancer lung metastasis by Shugan Yishen Recipe by studying the effects of Shugan Yishen Recipe (SGYSR) on gene expression in the lung microenvironment of mice with breast cancer. **METHODS** A high metastasis model of breast cancer was constructed, and the mice were randomly divided into saline group, low, medium, high(0.5, 1, 2 g·kg<sup>-1</sup>) Shugan Yishen Recipe groups, and docetaxel group (5 mg·kg<sup>-1</sup>), and intervened for 28 days. HE staining was used to observe the lung tissue structure; transcriptome analysis was performed on the metastatic foci, and the key differential gene expression was screened by bioinformatics analysis of the GO and KEGG pathway characteristics of the gene expression profiles, and the expression of key immune genes was analyzed by qPCR and Western blot. The expression of MDSCs was detected by flow cytometry; the expression of cytokines and chemokines including Cxcl2, and GM-CSF was detected by ELISA. **RESULTS** Compared with the saline group, the number of metastatic nodules in lung tissues of the middle and high dose groups of Shugan Yishen Recipe and docetaxel group were correspondingly lower; HE staining suggested that the degree of lung pathology was improved. There were 814 differentially expressed genes in the lung microenvironment of the high-dose group of Shugan Yishen Recipe and the saline group, of which 713 genes were down-regulated and 101 genes were up-regulated; screening for key inflammatory mediator genes in the Shugan Yishen Recipe group, Nfkbiz, Tnfaip3, Maff, Hspa1a, Hspb1 and Cxcl2, the inflammatory genes in the Shugan Yishen Recipe, as compared with that of the saline group, were significantly down-regulated ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), and ultimately its results were consistent with the trend of the transcriptome results. Western blot was used to verify the results at the protein level,

收稿日期: 2024-12-20

基金项目: 上海市“科技创新行动计划”医学创新研究专项项目(20Y21902600); 上海医学创新发展基金会“未来计划”项目(WL-LXBB-2021002K, WL-HBMS-2022008K, WL-QNRC-2022001K); 免疫与炎症全国重点实验室开放课题项目(2024Q0010)

第一作者: 李心怡, 女, 硕士研究生, E-mail: lxyzry77@163.com

通信作者: 朱为康, 男, 主任医师, 主要从事中医药防治恶性肿瘤的临床及基础研究, E-mail: zwkz5k1016@163.com;

陈皖晴, 女, 主治医师, 主要从事中医药防治恶性肿瘤的临床及基础研究, E-mail: chenwq1101@163.com

and it was found that compared with the saline group, the protein expression levels of Nfkbiz, Tnfaip3, Maff, Hspa1a and Cxcl2 in the Shugan Yishen Recipe group were decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), while the protein expression of Hspb1 was up-regulated ( $P < 0.01$ ). Both the Shugan Yishen Recipe group and the docetaxel group could inhibit the expression of MDSCs ( $P < 0.001$ ), and the expression of Cxcl2, and GM-CSF decreased to a certain extent ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **CONCLUSION** Shugan Yishen Recipe can inhibit breast cancer lung metastasis and regulate the lung immune microenvironment genes in a wide range.

**KEYWORDS:** breast cancer; lung microenvironment; gene expression profiling; inflammatory mediator; Shugan Yishen Recipe

乳腺癌(Breast cancer, BRC)在女性的发病率居全球第一,死亡率位居第二<sup>[1]</sup>。目前,以手术为主的综合治疗是BRC的主要治疗方式,但仍有19%以上患者出现术后3年复发转移,转移性BRC的5年生存率仅14%<sup>[2]</sup>。因此,高转移率是乳腺癌患者死亡的主要原因,也是亟待解决的医学难题。

《景岳全书·积聚》将肿瘤发生发展的病机总结为“凡脾肾不足及虚弱失调之人,多有积聚之病”<sup>[3]</sup>,另《内经知要》云:“郁者,痞塞不通。”<sup>[4]</sup>课题组前期流行病学研究发现,乳腺癌患者肝郁证型比例显著高于其他证型,并且肝郁证型与乳腺癌预后不良有显著相关性<sup>[5]</sup>。因此,本课题组认为脾肾亏虚,正气不行,气郁余毒伏居,癌毒传舍,最终导致肿瘤转移,病位在乳,脾肾亏虚为本,肝郁为标,为本虚标实之证。并基于《素问·六元正纪大论》中“衰其大半而止”的原则,总结出以疏肝益肾填精治法的临床验方-疏肝益肾方,前期研究证实,疏肝益肾方能够改善乳腺癌术后患者骨质疏松、生活质量,调节免疫状态的作用<sup>[6-7]</sup>,但其具体机制尚不清楚。本研究旨从疏肝益肾方对乳腺癌小鼠肺部微环境中的基因表达变化进行分析,为中医药靶向转移前微环境的治疗提供依据。

## 1 材料

### 1.1 动物与细胞株

SPF级Balb/c雌性小鼠,6周龄,购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司,动物生产许可证号:SCXK(苏)2023-0009。小鼠饲养于上海市中医医院动物房,适应性饲养1周后予以原位接种乳腺癌细胞。小鼠乳腺癌细胞4T1购自中科院上海生命科学研究院细胞库。本实验经上海市中医医院动物伦理委员会批准,伦理号:2023029。

### 1.2 实验药物

疏肝益肾方(柴胡18g,党参18g,半夏18g,黄芩9g,大枣9g,干姜3g,菟丝子27g,甘草6g,煅牡蛎30g,紫草15g)。上述中药饮片均购自上海市中医医院。将上述药材按剂量称取,煎煮后浓缩至含生药量 $8\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,冷却后置于4℃冰箱内保存备用。用时稀释成相应浓度用于体内实验。多西他

赛(Docetaxel, DTX),规格:50mg,购自美国MCE公司。

### 1.3 试剂与抗体

苏木素伊红(HE)染液(货号:C0105S,碧云天);FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2试剂盒(货号:RC112-01,诺唯赞);PrimeScript™ FAST RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒(货号:RR092A, Takara);TB Green® Premix Ex Taq™ II FAST qPCR试剂盒(货号:CN830A, Takara);BCA蛋白定量试剂盒(货号:KGPBCA,凯基生物);Cxcl2、GM-CSF ELISA试剂盒(货号:EM30143M、EM30224M,上海威奥生物科技有限公司);Nfkbiz抗体(货号:14014-1-AP, Proteintech);Tnfaip3抗体(货号:DF6850, Affinity Biosciences);Maff抗体(货号:12771-1-AP, Proteintech);Hspa1a抗体(货号:10995-1-AP, Proteintech);Hspb1抗体(货号:18284-1-AP, Proteintech);CXCL2抗体(货号:ab317569, abcam);Anti-Mouse APC-Cy7 CD45抗体(货号:557659, BD Pharmingen);Anti-Mouse FITC CD11b抗体(货号:557396, BD Pharmingen);Anti-Mouse PE Ly-6G and Ly-6C抗体(货号:553128, BD Pharmingen)。

### 1.4 仪器

371型CO<sub>2</sub>细胞培养箱(Thermo Fisher Scientific);Veriti Dx96核酸扩增仪(ABI公司);CFX96荧光定量PCR[伯乐生命医学产品(上海)有限公司];DYY-6C型蛋白垂直电泳仪(北京市六一仪器厂);ChemiDoc XRS+化学发光成像系统[伯乐生命医学产品(上海)有限公司];CytoFLEX流式细胞仪(贝克曼库尔特有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

4T1细胞培养在含10%胎牛血清的1640培养基中,置于37℃,5%CO<sub>2</sub>的细胞孵箱中培养。次日更换培养液,待细胞生长融合至70%~80%,用含EDTA的胰酶消化并进行传代。

### 2.2 动物分组及造模

选取Balb/c雌性小鼠40只随机分为生理盐水

组,疏肝益肾方低、中、高剂量组,多西他赛组,每组 8 只。适应性喂养 1 周后构建原位移植瘤转移模型。取对数生长期的乳腺癌 4T1 细胞,PBS 稀释成  $2.5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  单细胞悬液。按照每只 200  $\mu\text{L}$  ( $5 \times 10^5$  个)接种于小鼠第 4 对乳腺脂肪垫,后继续饲养 28 d。

### 2.3 给药

根据成人和小鼠等效剂量换算<sup>[8]</sup>,中药干预低、中、高剂量组小鼠灌胃给予 0.5、1、2  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  疏肝益肾方,多西他赛组给予 5  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  药物,生理盐水组小鼠灌胃给予生理盐水,给药体积均为 0.2 mL,连续给药 28 d。

### 2.4 评估小鼠肺转移情况

实验终点处死小鼠,解剖收获小鼠肺脏,并以 Bouin's 液固定 24 h 后,观察小鼠肺组织表面有无肉眼可见转移灶,不计大小。统计每组小鼠发生肺转移数。

### 2.5 HE 染色观察肺组织病理学变化

将肺组织于福尔马林中固定,脱蜡后切片。于二甲苯和梯度酒精中脱蜡水化,苏木素、伊红染色后水洗,经脱水透明、封片后,采集样本图片。

### 2.6 转录组测序

利用 Illumina 高通量测序对乳腺癌小鼠转移肺组织进行转录组测序,分析转移灶相关基因的变化情况。

### 2.7 肺部免疫微环境差异表达基因功能分析

对生理盐水组和疏肝益肾方组间的差异基因进行 GO、KEGG 富集分析,分析差异基因主要影响的功能,以便进行后续研究。

### 2.8 qPCR 检测免疫相关基因 mRNA 的表达

使用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA 并检测其浓度;qPCR 试剂盒将待测 RNA 逆转录成 cDNA,反转录体系如下:5 $\times$ PrimeScript RT Master Mix 4  $\mu\text{L}$ ;8 $\times$

gDNA Eraser Premix 2  $\mu\text{L}$ ;总 RNA 1  $\mu\text{g}$ ;RNase Free H<sub>2</sub>O 加至 20  $\mu\text{L}$ 。反应程序如下:37  $^{\circ}\text{C}$  10 min;85  $^{\circ}\text{C}$  5 s。最后使用荧光定量试剂盒在 PCR 仪上进行检测,体系如下:2 $\times$  PerfectStart Green qPCR SuperMix, 5  $\mu\text{L}$ ; 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Universal primer, 0.8  $\mu\text{L}$ ;cDNA 2  $\mu\text{L}$ ;Nuclease-free H<sub>2</sub>O 6.4  $\mu\text{L}$ ;程序为:95  $^{\circ}\text{C}$  30 s;94  $^{\circ}\text{C}$  5 s,60  $^{\circ}\text{C}$  10 s,40 个循环。检测荧光信号,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行计算并统计表达量。引物信息见表 1。

### 2.9 Western blot 检测

将适量肺组织裂解后,12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,4  $^{\circ}\text{C}$ ,离心 15 min,取上清,并用 BCA 测定蛋白质含量。制备下层胶,待下层胶凝固后加入上层胶并插入梳子。倒入适量电泳缓冲液后开始上样,每孔 20  $\mu\text{g}$  蛋白。浓缩胶 80 V,30 min,分离胶 120 V,60 min,进行电泳。转膜条件为 300 mA,60 min。5%脱脂奶粉封闭后一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。二抗室温孵育 1 h,均匀蘸取已配置好的 ECL 发光液后,于成像系统中进行扫描并采集图像。

### 2.10 流式细胞术检测

制备肺组织单细胞混悬液,加入相应流式抗体进行染色:APC-Cy7-CD45、FITC-CD11b、PE-Gr-1,室温避光孵育 15 min 后加入 PBS 洗涤,待上机检测。

### 2.11 ELISA 检测

依据 ELISA 试剂盒说明书检测小鼠肺组织中相关免疫因子 Cxcl2、GM-CSF 的水平。

### 2.12 统计学方法

所有统计分析均使用 SPASS。收集的各组数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间的比较采用 ANOVA 方差分析。两组间的比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

表 1 各基因引物信息

Table1 Primer information for each gene

Primer	Forward(5' → 3')	Reverse(3' → 5')
$\beta$ -actin	TATGCTCTCCCTCACGCCATCC	GTCACGCACGATTTCCCTCTCAG
Nfkbiz	CGCTCAACCTGGCTTACTTCTACG	AAGTGGAGGAGAAATCGGAGGAGTC
Tnfaip3	CTGTACCAACGCTCCAAGTCTG	TGCTTGTCCCTGCTCTGTCTCC
Maff	AGCAAAGCCCTGAAGGTCAAGC	GTCACCTCTCCGCCGACAG
Hspa1a	GGTGCTGACGAAGATGAAGGAGATC	CTGCCCGCTGAGAGTCGTTGAAG
Hspb1	GCTCACAGTGAAGACCAAGGAAGG	GCACCGAGAGATGTAGCCATGTTC
Cxcl2	CACTGGTCTGCTGCTGCTG	GCGTCACTCAAGCTCTGGATG

### 3 结果

#### 3.1 疏肝益肾方抑制 4T1 乳腺癌小鼠肺转移率

本研究通过构建乳腺癌肺转移模型,观察各组小鼠肺转移情况。结果显示(见图 1,表 2),与生理盐水组相比,疏肝益肾方低剂量组无明显抑制肺转

移的作用( $P>0.05$ ),中、高剂量以及多西他赛组均能降低乳腺癌小鼠肺组织转移结节数量( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ),其中疏肝益肾方高剂量组和多西他赛组抑制肺转移作用相当。



注: NS. 生理盐水组; SGYS. 疏肝益肾方组; DTX. 多西他赛组

图 1 各组小鼠肺转移情况

Fig. 1 Lung metastases in various groups of mice

表 2 各组小鼠肺转移病灶结节数

Table 2 The number of nodules in lung metastatic lesions in mice of each group

组别	剂量/(g · kg <sup>-1</sup> )	肿瘤结节数
生理盐水组	—	6.20±1.79
疏肝益肾方低剂量组	0.5	6.00±1.58
疏肝益肾方中剂量组	1.0	3.80±0.84*
疏肝益肾方高剂量组	2.0	3.00±0.71**
多西他赛组	0.005	2.20±0.84***

注:与生理盐水组比较, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ 。

#### 3.2 疏肝益肾方抑制乳腺癌小鼠肺组织病理改变

采用 HE 染色明确各组小鼠肺组织病理结构情况。结果如图 2 显示,与生理盐水组相比,疏肝益肾方组和多西他赛组小鼠肺组织中的肺泡结构紊乱程度、炎症细胞浸润程度均有不同程度的改善,表明疏肝益肾方可以减轻乳腺癌肺转移小鼠肺组织的炎症及转移灶情况。



注: NS. 生理盐水组; SGYS. 疏肝益肾方组; DTX. 多西他赛组

图 2 各组乳腺癌小鼠肺组织病理变化(HE, ×400)

Fig. 2 Histopathological changes in the lungs of mice with breast cancer in each group (HE staining, ×400)

#### 3.3 不同治疗组肺转移灶差异基因表达谱比较

将各组表达基因与生理盐水组相比,以  $P<0.01$  和  $|\log_2 FC|>2$  为筛选条件,结果显示:多西他赛组共有 446 个差异基因,其中包括 77 个上调基因和 369 个下调基因;疏肝益肾方组差异基因数远高于多西他赛组,共有 814 个差异基因,其中包括 101 个上调基因和 713 个下调基因(见图 3~4)。与生理盐水组相比,多西他赛组上调基因前 5 位基因是: Muc2、Lrrc75b、Zfp971、Med18、Zfp442, 基因表达下调的前 5 位基因是: Il6、Egr1、Has1、C2、Phlda3; SGYS 组上调基因前 5 位基因是: Med18、Prnd、Gpnm-b、Nusap1、Mis18bp1, 基因表达下调的前 5 位基因

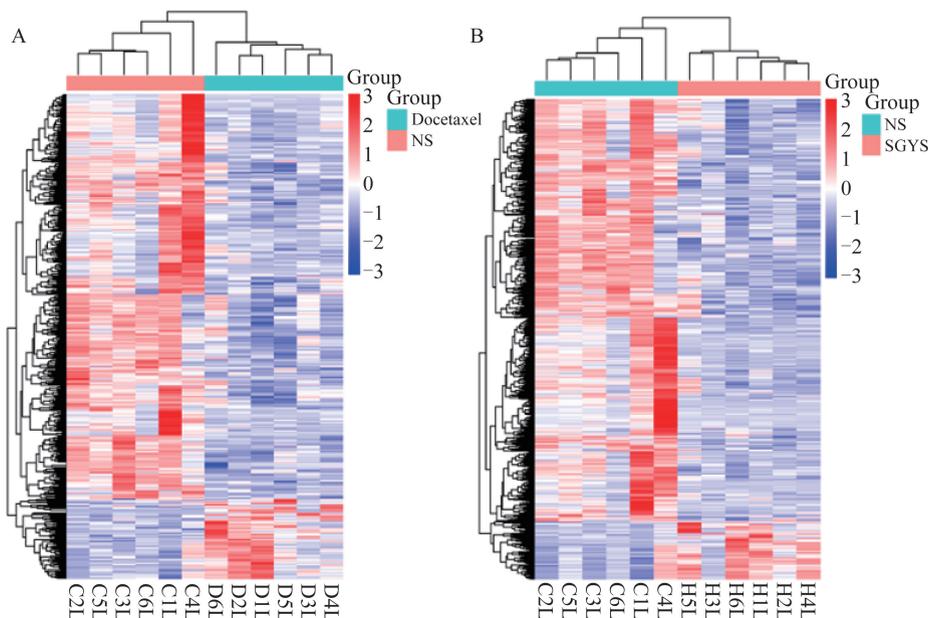
为: Cxcl2、Fosb、Hspb1、Maff、Hrc。另外, Hspa1a、Tnfaip3 和 Nfkbiz 差异基因分别排在下调差异基因的第 6 位、第 11 位和第 14 位。在差异基因中,疏肝益肾方组与多西他赛组共有 264 个相同差异基因,其中有 20 个基因共同上调,244 个基因共同下调(见图 5)。

#### 3.4 不同治疗组肺转移灶差异表达基因 GO 富集分析比较

分别对多西他赛组、疏肝益肾方组差异表达上调和下调基因进行 GO 富集分析,结果显示:多西他赛组下调差异基因与生物过程(Biological process, BP)相关的 GO 条目有 21 条,主要集中在发育过程

和应激反应上;细胞组分( Cell components, CC)有 14 条,主要富集在细胞结构域和细胞连接功能上;分子功能( Molecular function, MF)有 12 条,主要分布在信号受体激活和连接功能上;多西他赛组表达上调的差异基因 GO 聚类主要富集在转录因子激活、DNA 连接及 RNA 代谢调节过程等功能(图 6)。疏肝益肾方组上调差异基因 GO 富集分析,得到生物过程条目 17 条,主要集中在解剖结构发育及对刺

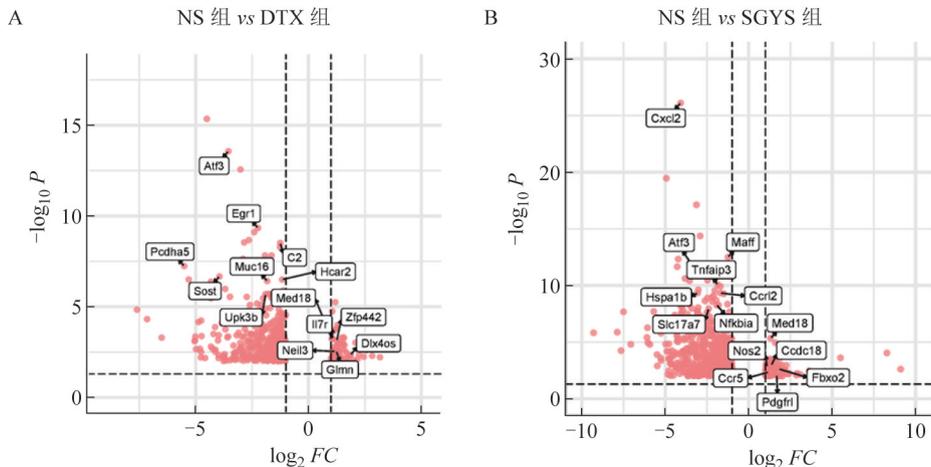
激响应功能上,细胞组成条目 12 条,多与受体活性及蛋白质结合相关,分子功能条目 7 条,主要富集在细胞-细胞连接区及细胞外分泌功能上;而疏肝益肾方下调差异基因 GO 聚类与多西他赛组下调基因在发育过程、生物系统进程调控功能类似,并富集在免疫系统过程和代谢过程上。以上结果提示疏肝益肾方对乳腺癌肺组织微环境的生物学过程的调控可能与多西他赛相似(见图 7)。



注:A.生理盐水处理组与多西他赛组间差异表达基因热图;B.生理盐水处理组与疏肝益肾方组差异表达基因热图;红色为基因表达上调,蓝色为基因表达下调。

图 3 组间差异基因聚类分析

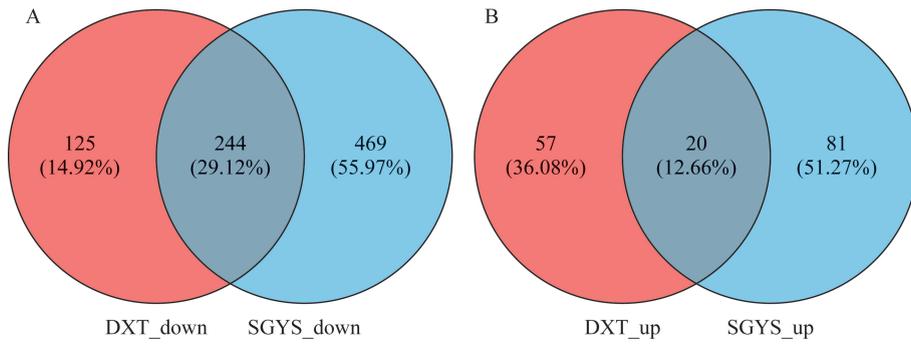
Fig. 3 Cluster analysis of differential genes between groups



注:A.生理盐水处理组与多西他赛组间基因表达量差异火山图及显著差异基因筛选;B.生理盐水处理组与疏肝益肾方组基因表达量差异火山图及显著差异基因筛选

图 4 组间基因表达量差异统计

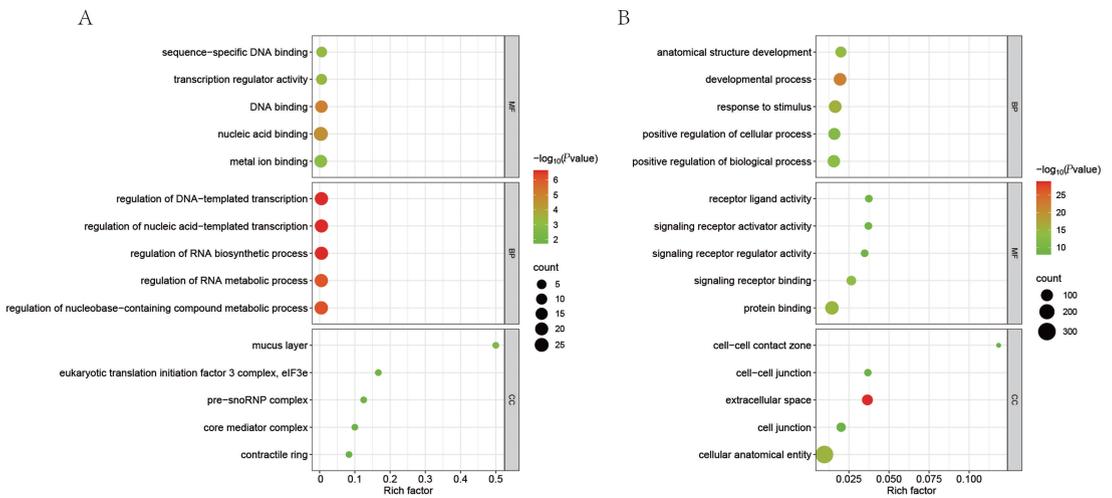
Fig. 4 Differential gene expression statistics between groups



注: A. 2组用药组之间下调差异基因 Venn 图; B. 2组用药组之间上调差异基因 Venn 图

图 5 组间差异基因 Venn 分析

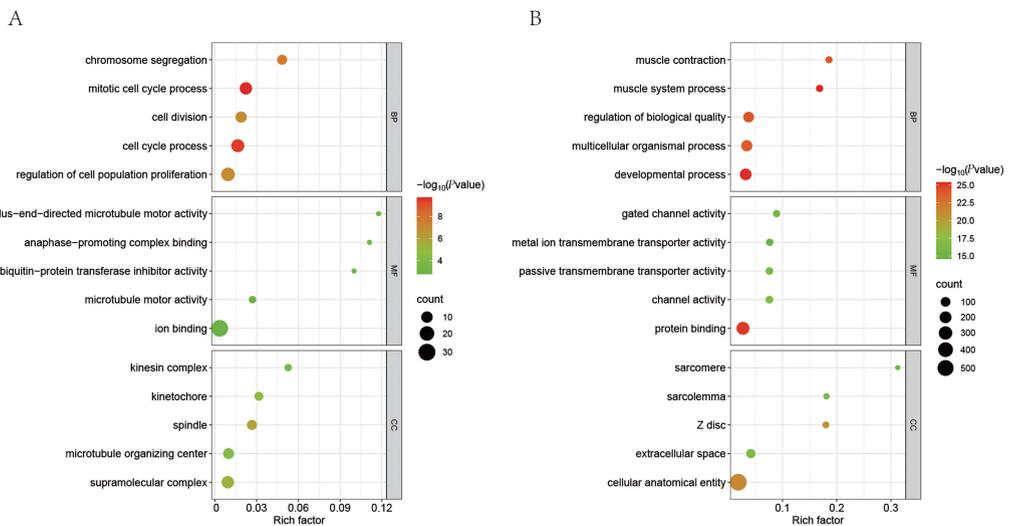
Fig. 5 Differential gene Venn analysis between groups



注: A. 上调基因 BP、MF、CC 富集分析 Top5; B. 下调基因 BP、MF、CC 富集分析 Top5

图 6 生理盐水组与多西他赛组组间差异表达基因 GO 富集分析

Fig. 6 GO enrichment analysis of differentially expressed genes between saline and docetaxel groups



注: A. 上调基因 BP、MF、CC 富集分析 Top5; B. 下调基因 BP、MF、CC 富集分析 Top5

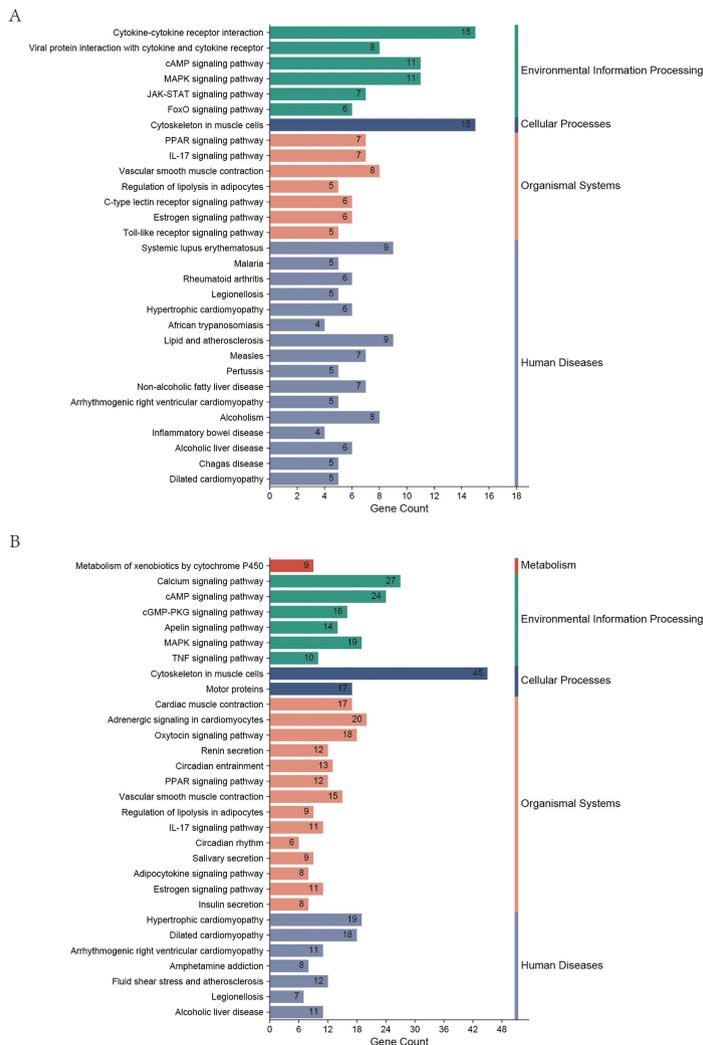
图 7 生理盐水组与疏肝益肾方组组间差异表达基因 GO 富集分析

Fig. 7 GO enrichment analysis of differentially expressed genes between the saline group and the SGYSR group

### 3.5 不同治疗组肺转移灶差异表达基因 KEGG 信号通路富集比较

在明确疏肝益肾方和多西他赛调控小鼠肺组织微环境的 GO 富集聚类情况后,我们进一步分析差异基因 KEGG 通路富集情况。多西他赛组 77 个上调差异基因注释到的 KEGG 通路共 2 条,其中满足  $FDR < 0.05$  的通路 1 条: Ribosome biogenesis in eukaryotes (path: mmu03008)。369 个下调差异基因注释到 KEGG 通路共计 32 条,其中  $P < 0.05$  且  $FDR < 0.05$  的通路共 1 条: Cytoskeleton in muscle cells (path: mmu04820)。疏肝益肾方组 101 个上调差异基因注释到 KEGG 通路共 2 条,其中满足  $FDR < 0.05$  的通路 0 条。下调基因注释到 KEGG 通路共

计 56 条,其中  $P < 0.05$  且  $FDR < 0.05$  的通路共 18 条,包括 Calcium signaling pathway (path: mmu04020), cAMP signaling pathway (path: mmu04024), IL-17 signaling pathway (path: mmu04657) 等。随后,我们以  $P < 0.05$  为筛选条件分别对 KEGG 途径 (Top30) 进行分类,结果显示 (见图 8),多西他赛组富集的 KEGG 途径分为 4 类: 环境信息处理,细胞途径过程,生物系统和人类疾病;疏肝益肾方组注释的 KEGG 途径聚类在代谢、环境信息处理,细胞途径过程,生物系统和人类疾病。以上提示疏肝益肾方对乳腺癌小鼠肺组织微环境的调控机制与多西他赛有共性,但疏肝益肾方涉及的通路范围更为广泛。



注: A. 生理盐水组与多西他赛组间差异基因 KEGG 通路富集分析及分类;  
B. 生理盐水组与疏肝益肾方组间差异基因 KEGG 通路富集分析及分类

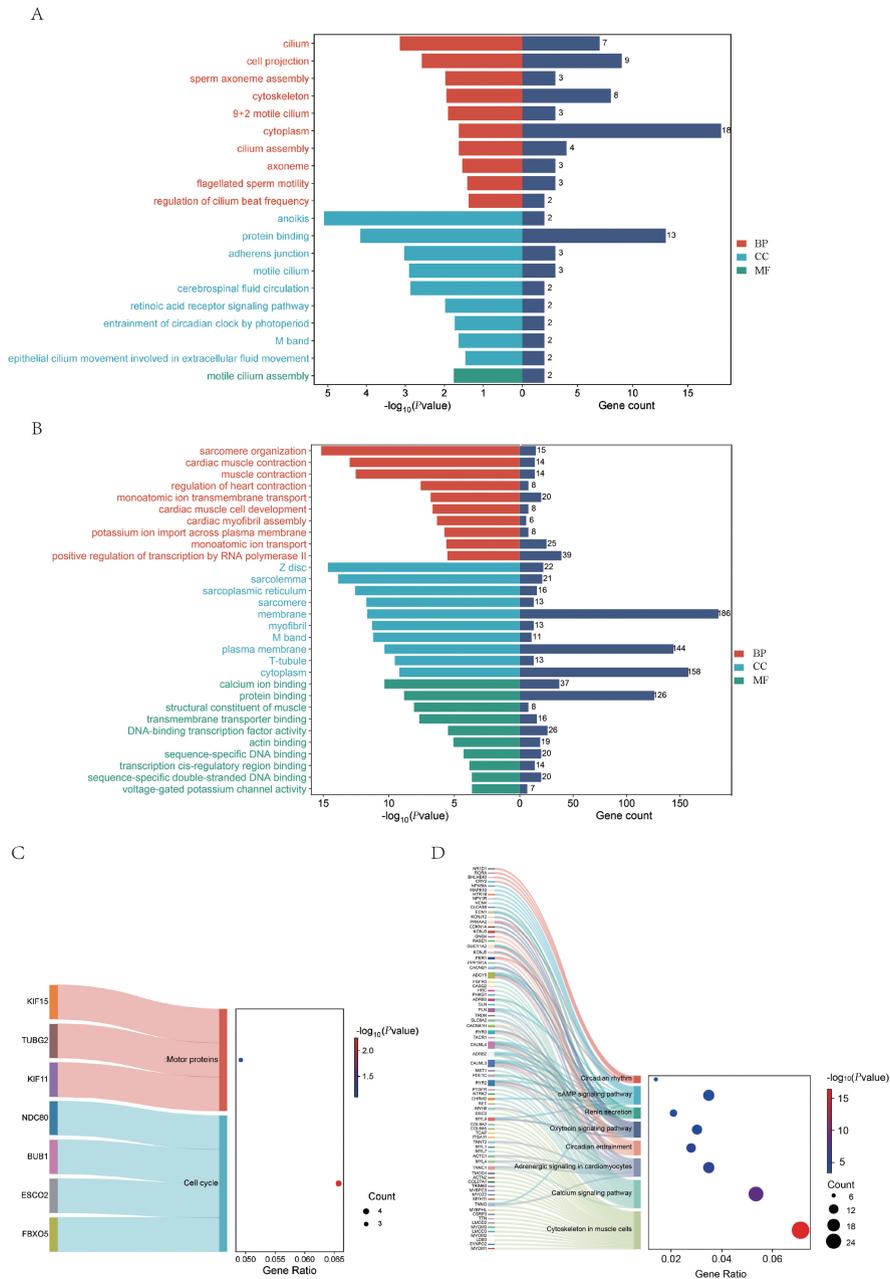
图 8 组间差异基因 KEGG 通路富集分析 (前 30)

Fig. 8 Differential gene KEGG pathway enrichment analysis between groups (Top 30)

### 3.6 疏肝益肾方对肺转移灶特异表达基因的生物信息学分析

本研究进一步对疏肝益肾方组中 81 个特异性表达上调基因和 469 个特异性表达下调的基因进行 GO 和 KEGG pathway 富集分析(见图 9)。特异性上调基因 GO 功能主要包括:细胞骨架、视黄酸受体信号通路和光周期对生物钟的影响等。特异性下调基因 GO 功能主要包括:心肌细胞发育、RNA 聚合酶转

录的正向调控及钙离子结合蛋白等。特异性上调基因注释的 KEGG pathway 主要包括: cell cycle (pathway: mmu04110), 参与调控细胞周期,其中通路相关基因有 Fbxo5、Esco2、Bub1、Ndc80。特异性下调基因富集的 KEGG pathway 主要包括钙信号通路、肾素分泌及昼夜节律信号通路等,主要相关基因包括 Per1、Rora、Ret、Edn1 等。



注: A. 特异性上调基因 BP、CC、MF 富集分析双侧条形图; B. 特异性下调基因 BP、CC、MF 富集分析双侧条形图; C. 特异性上调基因 KEGG 通路桑基气泡图; D. 特异性下调基因 KEGG 通路桑基气泡图

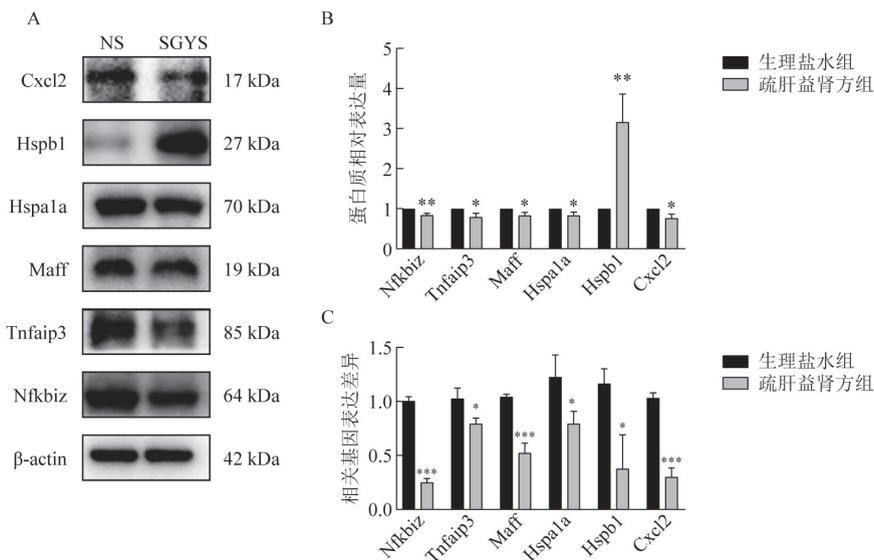
图 9 疏肝益肾方组特异性表达基因 GO 和 KEGG 通路富集分析

Fig. 9 Enrichment analysis of GO and KEGG pathways of genes specifically expressed in the SGYSR group

### 3.7 疏肝益肾方对肺转移微环境中炎性介质表达的影响

根据课题组前期研究发现,疏肝益肾方防治乳腺癌转移的作用与炎性微环境密切相关。根据 GO、KEGG 的富集结果对差异基因进行分析,筛选出 Nfkbiz、Tnfaip3、Maff、Hspa1a、Hspb1、Cxcl2 基因。随后,我们采用 qPCR 验证肺组织中炎性介质的表达变化,结果发现与生理盐水组相比,疏肝益肾方组中 Nfkbiz、Tnfaip3、Maff、Hspa1a、Hspb1 和 Cxcl2 表达下降( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),与基因表达谱芯片结果

一致,其中 Nfkbiz 和 Cxcl2 下降最为显著( $P<0.001$ )。同时,我们采用 Western blot 在蛋白质层面进行验证,结果显示(图 10),与生理盐水组相比,疏肝益肾方组 Nfkbiz、Tnfaip3、Maff、Hspa1a 和 Cxcl2 蛋白表达水平下降( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),与 mRNA 一致,但 Hspb1 蛋白表达上调( $P<0.01$ )。由此可见,疏肝益肾方可以下调 Nfkbiz、Tnfaip3、Maff、Hspa1a 和 Cxcl2 基因和蛋白的表达,对 Hspb1 表达的影响还需进一步分析。



注:A~B. Western blot 验证肺组织中相关蛋白的表达;C. qPCR 验证肺组织中相关基因的表达。

与生理盐水组比较, \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ 。

图 10 2 组转移肺组织蛋白表达和基因表达差异

Fig. 10 Differences in protein expression and gene expression in metastatic lung tissue between the two groups

### 3.8 疏肝益肾方调控肺转移组织中 MDSCs 及其相关炎性因子浸润

课题组前期研究已证实炎性介质促进免疫抑制微环境形成,并且 MDSCs 是介导免疫抑制信号的关键环节。本研究采用流式细胞术检测小鼠肺组织中 MDSCs 比例,结果见图 11,与生理盐水组相比,疏肝益肾方组和多西他赛组均能降低 CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>细胞比例( $P<0.001$ );通过 ELISA 法检测相关炎性因子和趋化因子表达,与生理盐水组相比,疏肝益肾方组和多西他赛组 GM-CSF、Cxcl-2 表达降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),2 组间相比无显著性差异,提示炎性介导的免疫微环境重塑可能是疏肝益肾方发挥抗乳腺癌转移的机制之一。

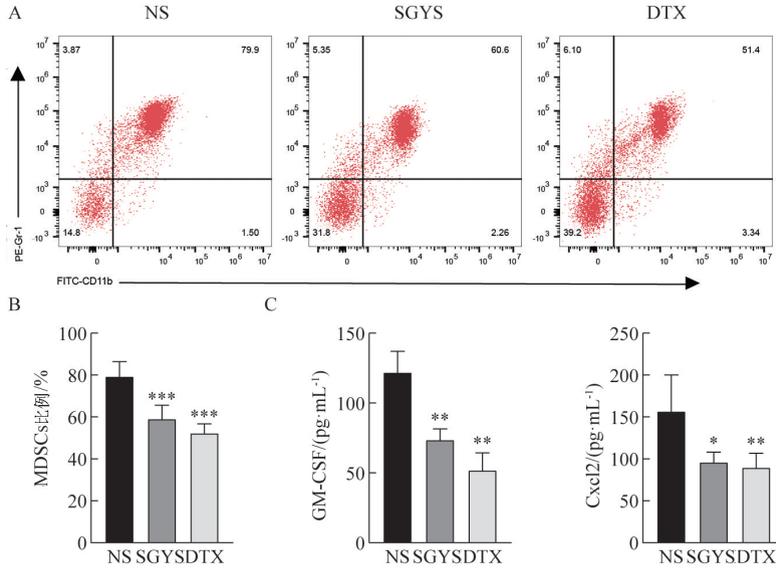
## 4 讨论

乳腺癌在祖国医学中归属于“乳岩”“乳石痈”等范畴,肝失疏泄,气机不畅是乳腺癌发病的关键病

机。研究显示,情志抑郁程度与癌症患者炎症反应之间存在显著正相关性<sup>[9]</sup>。乳腺癌转移涉及多种机制<sup>[10]</sup>,包括免疫逃逸、上皮间质转化、血管新生和细胞外基质降解等。其中,一种由肿瘤中的致癌突变决定的持续性炎症状态,是促进癌症进展到转移微环境形成阶段的标志<sup>[11]</sup>。持续性的炎症一方面直接通过细胞因子信号传导,另一方面通过氮物质和活性氧间接诱导表观遗传修饰,从而导致肿瘤转移<sup>[12]</sup>。此外,这种“低级别”炎症导致的癌细胞增殖和存活,促进血管生成,破坏适应性免疫反应,导致免疫细胞转化为免疫抑制表型<sup>[13]</sup>。研究显示,促炎因子 IL-23 和 IL-12 之间的平衡稳态,以及 MDSCs 和效应淋巴细胞之间的比例,与肿瘤免疫逃逸显著相关<sup>[14]</sup>。另有研究显示,T 细胞中 NF- $\kappa$ B 激活刺激效应 T 细胞活化,并促进表现为免疫抑制活性的 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞的数量<sup>[15]</sup>。课题组前期研究也

证实,早期肺癌术后患者外周血中 IL-1 $\beta$  水平增高,并通过 NF- $\kappa$ B 通路促进 MDSCs 免疫抑制活性,影响患者无进展生存期<sup>[16]</sup>。针对炎性转移前微环

境的治疗,对从“治未病”角度防治乳腺癌这一临床问题的解决具有实际意义。



注:A~B. 疏肝益肾方对肺组织中 MDSCs 表达的影响;C. ELISA 对肺组织中 GM-CSF、Cxcl-2 表达的影响。NS. 生理盐水组; SGYS. 疏肝益肾方组;DTX. 多西他赛组。与生理盐水组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ 。

图 11 疏肝益肾方对乳腺癌肺转移小鼠肺组织中免疫细胞及炎症因子的影响

Fig. 11 Effects of Shugan Yishen Recipe on immune cells and inflammatory factors in lung tissues of mice with lung metastases from breast cancer

中医药治疗已经在乳腺癌综合治疗中显露出独特优势。课题组在小柴胡汤基础上,加减化裁总结出疏肝健脾、益肾填精的疏肝益肾方。已有研究显示,小柴胡汤能够通过 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 通路降低脓毒血症小鼠血清中 NO 及 TNF- $\alpha$  水平<sup>[17]</sup>。此外,柴胡皂苷 D,作为柴胡的主要小分子化合物,已被证实能够通过抑制  $\beta$ -catenin 及下游靶基因诱导三阴性乳腺癌细胞凋亡,发挥抗肿瘤作用<sup>[18]</sup>。菟丝子和牡蛎为调和肾阴、肾阳常用药对,具有补肾壮阳、补益肝肾、固精缩尿的功效。现代研究显示菟丝子能减少 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的氧化损伤,并通过激活 PI3K/AKT 通路发挥抗炎作用<sup>[19]</sup>。牡蛎能够通过有氧糖酵解重编程调控肿瘤微环境<sup>[20]</sup>。

本研究通过建立乳腺癌高转移模型,明确了疏肝益肾方能够抑制乳腺癌肺转移率,并改善肺组织的病理状态。通过对肺组织基因谱分析发现,疏肝益肾方对乳腺癌小鼠肺组织微环境涉及的 BP、CC、MF 更为广泛,并且筛选出 Hspb1、Hspa1a、Maff、Tnfaip3、Cxcl2 等基因下调。热休克蛋白  $\beta$ -1 (Hspb1) 和诱导型 70 kDa 热休克蛋白 (Hspa1a) 是人类小热休克蛋白 (HSPBs) 的成员,与乳腺癌的预后不良相

关<sup>[21]</sup>。其中 Hspb1 与 I $\kappa$ B- $\alpha$  结合并促进其泛素化介导的降解,导致核转位增加和 NF- $\kappa$ B 信号的激活,是其促进乳腺癌进展的机制之一<sup>[22]</sup>。Hspa1a 在乳腺癌患者的血清水平大大升高<sup>[23]</sup>,与本研究结果一致,但具体机制尚不清楚。Maff 是与炎症相关的转录因子,在体内和体外均能够作为缺氧基因增强肿瘤细胞的侵袭促进疾病的发展<sup>[24]</sup>;此外,Maff 被发现可以作为促炎因子刺激 LPS<sup>[25]</sup>。Tnfaip3 被证实可在 FGFR 1 的调节下能够促进乳腺癌小鼠的肿瘤生长以及肺转移,Tnfaip3 的敲低可抑制乳腺癌细胞中 VEGFA 的表达<sup>[26]</sup>。Cxcl2 是 CXC 家族的一员,作为原癌基因编码的蛋白,可促进血管形成<sup>[27]</sup>,另有研究显示,Cxcl2 激活乳腺癌细胞中 NOTCH1/HEY1 通路可能是维持乳腺癌干性的机制之一<sup>[28]</sup>。肺组织基因表达谱聚焦于乳腺癌小鼠肺转移微环境,炎性介质是免疫抑制微环境形成的基础,免疫抑制细胞是促进肿瘤免疫逃逸的关节环节<sup>[29]</sup>。其中,MDSCs 是抑制微环境形成的主要角色,MDSCs 耗竭能够抑制乳腺癌细胞的迁移与侵袭<sup>[30]</sup>。此外,免疫微环境中存在细胞因子和趋化因子与免疫细胞间相互作用能够影响肿瘤发生发展。研究显示,肿瘤细胞分泌的 GM-CSF 能诱导 MDSCs 扩增<sup>[31]</sup>;趋化因

子 Cxcl2 对 MDSCs 募集有特异性功能<sup>[32]</sup>, 靶向抑制 Cxcl2 及其受体能够抑制肿瘤中的血管生成和转移。

综上所述, 本研究采用乳腺癌转移模型, 利用基因芯片技术重点探究疏肝益肾方对乳腺癌肺转移微环境基因组表达的影响, 结果显示疏肝益肾方可以干预多种炎症介质基因的表达, 并且相关显著差异基因涉及免疫调节、心肌细胞发育等生物功能, 以及参与更为广泛的通路调控, 如钙信号通路、肾素分泌及昼夜节律信号通路及 IL-17 信号通路等。此外, Hspb1、Hspa1a、Maff、Tnfaip3、Cxcl2 等炎症介质基因表达下调, 并且参与调控 MDSCs 介导的免疫微环境重塑, 这可能是疏肝益肾方发挥抗乳腺癌转移的关键靶标。该研究具有重要探索意义, 为后续进一步实验明晰了新的方向。

#### 参考文献:

[1] SIEGEL R L, GIAQUINTO A N, JEMAL A. Cancer statistics, 2024[J]. *Cancer J Clin*, 2024, 74(1): 12-49.

[2] GIAQUINTO A N, SUNG H, NEWMAN L A, et al. Breast cancer statistics 2024[J]. *Cancer J Clin*, 2024, 74(6): 477-495.

[3] 张介宾. 景岳全书[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007.

[4] 李中粹. 内经知要[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2011.

[5] 金岚, 屠思远, 褚美玲, 等. 从气质特征角度看乳腺癌的肝郁属性[J]. *新中医*, 2024, 56(7): 195-200.

[6] 郑诗芸, 崔国, 陈皖晴, 等. 疏肝益肾方治疗肝郁脾虚型绝经后雌激素受体阳性乳腺癌术后患者的临床疗效[J]. *医学研究杂志*, 2024, 53(9): 117-121.

[7] 朱为康, 陈旻, 李雁, 等. 补肾疏肝联合芳香化酶抑制剂治疗绝经后激素受体阳性乳腺癌[J]. *世界中医药*, 2020, 15(20): 3113-3116, 3120.

[8] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9): 1069-1072.

[9] ANDERSEN B L, MYERS J, BLEVINS T, et al. Depression in association with neutrophil-to-lymphocyte, platelet-to-lymphocyte, and advanced lung cancer inflammation index biomarkers predicting lung cancer survival[J]. *PLoS ONE*, 2023, 18(2): e0282206.

[10] ALTEA-MANZANO P, DOGLIONI G, LIU Y W, et al. A palmitate-rich metastatic niche enables metastasis growth via p65 acetylation resulting in pro-metastatic NF- $\kappa$ B signaling[J]. *Nat Cancer*, 2023, 4(3): 344-364.

[11] HANAHAHAN D. Hallmarks of cancer: New dimensions[J]. *Cancer Discov*, 2022, 12(1): 31-46.

[12] MANTOVANI A, ALLAVENA P, SICA A, et al. Cancer-related

inflammation[J]. *Nature*, 2008, 454(7203): 436-444.

[13] DIAKOS C I, CHARLES K A, MCMILLAN D C, et al. Cancer-related inflammation and treatment effectiveness[J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(11): e493-503.

[14] CHRISTOFIDES A, STRAUSS L, YEO A, et al. The complex role of tumor-infiltrating macrophages[J]. *Nat Immunol*, 2022, 23(8): 1148-1156.

[15] UHL L F K, CAI H, ORAM S L, et al. Interferon- $\gamma$  couples CD8<sup>+</sup> T cell avidity and differentiation during infection[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 6727.

[16] ZHANG S F, CHEN W Q, WANG Y L, et al. Chinese herbal prescription fu-Zheng-qu-Xie prevents recurrence and metastasis of postoperative early-stage lung adenocarcinoma: A prospective cohort study followed with potential mechanism exploration[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6673828.

[17] YANG Q X, WANG Y L, CAO G F, et al. Anti-sepsis effect of Xiaochaihu decoction based on the TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *Heliyon*, 2024, 10(5): e26712.

[18] WANG J X, QI H, ZHANG X L, et al. Saikosaponin D from *Radix Bupleuri* suppresses triple-negative breast cancer cell growth by targeting  $\beta$ -catenin signaling[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 108: 724-733.

[19] LIANG Y S, SHI Y, GUO R, et al. Wine- and stir-frying processing of *Cuscutae Semen* enhance its ability to alleviate oxidative stress and apoptosis via the Keap1-Nrf2/HO-1 and PI3K/AKT pathways in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-challenged KGN human granulosa cell line[J]. *BMC Complement Med Ther*, 2024, 24(1): 189.

[20] CORPOREAU C, HUVET A, PICHEREAU V, et al. The oyster *Crassostrea gigas*, a new model against cancer[J]. *Med Sci*, 2019, 35(5): 463-466.

[21] HUO Q, WANG J, XIE N. High HSPB1 expression predicts poor clinical outcomes and correlates with breast cancer metastasis[J]. *BMC Cancer*, 2023, 23(1): 501.

[22] LIANG Y R, WANG Y J, ZHANG Y, et al. HSPB1 facilitates chemoresistance through inhibiting ferroptotic cancer cell death and regulating NF- $\kappa$ B signaling pathway in breast cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(7): 434.

[23] DE FREITAS G B, PENTEADO L, MIRANDA M M, et al. The circulating 70 kDa heat shock protein (HSPA1A) level is a potential biomarker for breast carcinoma and its progression[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 13012.

[24] MOON E J, MELLO S S, LI C G, et al. The HIF target MAFF promotes tumor invasion and metastasis through IL11 and STAT3 signaling[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 4308.

[25] WANG W, LIU Y, XIONG L L, et al. Synthesis of lathyrrol PRO-TACs and evaluation of their anti-inflammatory activities[J]. *J Nat Prod*, 2023, 86(4): 767-781.

[26] GAO M D, LI X, YANG M, et al. TNFAIP3 mediates FGFR1 activation-induced breast cancer angiogenesis by promoting VEGFA expression and secretion[J]. *Clin Transl Oncol*, 2022, 24(12): 2453-2465.

[27] ZHANG R, DONG M X, TU J, et al. PMN-MDSCs modulated by CXCL20 from cancer cells promoted breast cancer cell stemness through CXCL2-CXCR2 pathway[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 97.

[28] LIN X Y, ZHAO Z F, CAI Y Q, et al. MyD88 deficiency in mammary epithelial cells attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced mastitis in mice[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2024, 739: 150569.

[29] VEGLIA F, SANSEVERO E, GABRILOVICH D I. Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21(8): 485-498.

[30] EUM D Y, JEONG M, PARK S Y, et al. AM-18002, a derivative of natural amminodenol A, enhances radiosensitivity in mouse breast cancer cells[J]. *PLoS ONE*, 2024, 19(4): e0296989.

[31] WELTE T, KIM I S, TIAN L, et al. Oncogenic mTOR signalling recruits myeloid-derived suppressor cells to promote tumour initiation[J]. *Nat Cell Biol*, 2016, 18(6): 632-644.

[32] KUMAR S, WILKES D W, SAMUEL N, et al.  $\Delta$ Np63-driven recruitment of myeloid-derived suppressor cells promotes metastasis in triple-negative breast cancer[J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(11): 5095-5109.

(编辑:董宇)