

参芪扶正注射液通过肿瘤相关巨噬细胞提高人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞对顺铂的敏感性

周钱梅, 苏式兵*

(上海中医药大学, 上海 201203)

[摘要] **目的:** 观察参芪扶正注射液通过免疫调节提高顺铂化疗的敏感性, 并探讨其作用机制。**方法:** 采用噻唑蓝 (MTT) 比色法测定参芪扶正注射液 1, 10, 100 mL·L⁻¹ 对细胞的敏感性, 流式细胞法检测细胞凋亡率, 酶联免疫印迹法 (Western blot) 检测凋亡相关蛋白的表达, 酶联免疫吸附实验 (ELISA) 检测细胞因子表达水平。**结果:** 参芪扶正注射液能显著抑制人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 与 THP-1 共培养细胞生长, 参芪扶正注射液 10, 100 mL·L⁻¹ 时, 其细胞存活率分别为 71.8%, 59.9%; 参芪扶正注射液 10 mL·L⁻¹ 与顺铂联合运用, 提高了共培养细胞对顺铂的敏感性, 顺铂的半数抑制浓度 (IC₅₀) 由 30 μmol·L⁻¹ 降低至 15 μmol·L⁻¹; 联合运用参芪扶正注射液 10 mL·L⁻¹ 和顺铂, 比 15 μmol·L⁻¹ 顺铂诱导的细胞凋亡率增加了 15.5% ($P < 0.05$); 联合用药均能明显抑制 B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2), B 细胞淋巴瘤-w (Bcl-w) 和细胞外淋巴瘤 (Bcl-x1) 的表达, 增加 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 和人 BH3 结构域凋亡诱导蛋白 (Bid) 的表达 ($P < 0.05$); 参芪扶正注射液降低顺铂诱导的白细胞介素-10 (IL-10) 和前列腺素 E₂ (PGE₂) 的释放 ($P < 0.05$)。**结论:** 参芪扶正注射液通过调节免疫细胞改善了乳腺癌细胞 MDA-MB-231 对顺铂的敏感性, 起到协同抑制肿瘤细胞增殖的作用。该研究为益气扶正防治肿瘤提供实验依据, 为中医药缓解肿瘤耐药研究提供实验参考。

[关键词] 参芪扶正注射液; 肿瘤相关巨噬细胞; 乳腺癌; 顺铂

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)04-0076-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200421

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191104.1202.004.html>

[网络出版时间] 2019-11-04 13:48

Effect of Shenqi Fuzheng Injection in Improving Sensitivity of Human Breast Cancer MDA-MB-231 Cells to Cisplatin Through Tumor Associated Macrophages

ZHOU Qian-mei, SU Shi-bing*

(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Shenqi Fuzheng injection on the sensitivity of cisplatin through immunomodulation, in order to explore its mechanisms. **Method:** The cell survival was measured by thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT), the rate of apoptosis was detected by flow cytometry, the expressions of apoptosis-related proteins were detected by Western blot, and the expression level of cytokines was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** Shenqi Fuzheng injection 1, 10, 100 mL·L⁻¹ significantly inhibited the growth of co-cultured cells, and the cell survival rate was 71.8% and 59.9% at the concentration of 10, 100 mL·L⁻¹ respectively. Shenqi Fuzheng injection 10 mL·L⁻¹ combined with cisplatin significantly increased the sensitivity of co-cultured cells to cisplatin. The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of cisplatin was reduced from 30 to 15 μmol·L⁻¹. The rate of apoptosis induced by the combined treatment

[收稿日期] 20190510(013)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81803934)

[第一作者] 周钱梅, 博士, 副研究员, 从事中医药抗肿瘤药理研究, E-mail: tazhou@163.com

[通信作者] * 苏式兵, 博士, 研究员, 从事中医复杂系统研究, E-mail: shibingsu07@163.com

increased by 15.5% compared with that of cisplatin $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.05$). The expressions of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), B-cell lymphoma-w (Bcl-w) and B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xl) were inhibited, and the expressions of Bcl-2-associated X protein (Bax) and protein induced by BH3 domain (Bid) apoptosis were increased ($P < 0.05$). Shenqi Fuzheng injection reduced the release of interleukin-10 (IL-10) and prostaglandin E_2 (PGE_2) induced by cisplatin ($P < 0.05$). **Conclusion:** Shenqi Fuzheng injection improves the sensitivity of MDA-MB-231 to cisplatin by regulating immune cells, and plays a synergistic role in inhibiting the proliferation of breast cancer cells. This study provides experimental basis for the prevention and treatment of tumors with Yiqi Fuzheng method, and experimental reference for the study of traditional Chinese medicine in alleviating drug resistance of tumors.

[**Key words**] Shenqi Fuzheng injection; tumor associated macrophages; breast cancer; cisplatin

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,其死亡率占女性癌症的 15%,居女性各类恶性肿瘤死亡率之首。自 20 世纪 90 年代以来,乳腺癌发病率呈现快速上升趋势^[1]。在中国年龄低于 35 岁的三阴性乳腺癌 (TNBC) 患者占较高比例,欧洲和中国女性的 TNBC 平均发病年龄较非 TNBC 提早约 10 年^[2]。因其靶受体的丧失, TNBC 患者不能受益于基于激素或基于曲妥珠单抗的靶向治疗^[3]。由于缺乏靶向治疗, TNBC 已成为临床治疗与研究的难点。乳腺癌在历代中医文献中一般被称为“乳岩”。《医学汇编·乳岩附论》指出:“正气虚则为岩”。研究表明,参芪扶正注射液联合顺铂能提高 TNBC 患者的疗效,延长患者的中位生存期,有效改善其生活质量^[4-5];其辅助治疗还具有增强免疫作用,能明显提高 TNBC 患者的机体免疫力,降低化疗毒副作用^[6-7]。同时,参芪扶正注射液能通过促进细胞凋亡和下调 B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2) 表达逆转多药耐药^[8]。但参芪扶正注射液在减轻 TNBC 耐药现象的机制有待进一步明确。肿瘤相关巨噬细胞 (TAMs) 在乳腺癌基质中大量存在并分泌细胞因子,发挥促瘤作用的 M2 型 TAMs 的表达与 TNBC 的化疗耐药具有明显的相关性^[9]。本课题组前期研究显示,参芪扶正注射液能显著降低诱导 TAMs 极化的炎症因子的释放;下调顺铂耐药乳腺癌细胞中 P-糖蛋白 (P-gp) 的表达,从而提高化疗药物敏感性。因此,本课题组提出“参芪扶正注射液能通过减少 TAMs 细胞因子分泌,防止向 M2 型极化,降低 TNBC 耐药”。拟从细胞凋亡和减少细胞因子释放,探讨参芪扶正注射液缓解顺铂耐药的效应及其作用机制。本研究在理论上,提出益气扶正治疗法对改善化疗耐药有积极意义;思路上,将前期研究结果与国内外研究进展相结合,运用乳腺癌细胞与 TAMs 共培养,探讨参芪扶正注射液从调节免疫、多个靶点地改善

耐药的分子机制,为中医药改善耐药研究提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞 人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 (SCSP-5043),传至第 5 代。人单核细胞 THP-1 购自中国科学院细胞库 (TCHu 57),传至第 5 代。

1.2 药物和试剂 参芪扶正注射液 (丽珠集团利民制药厂,批号 180820);参芪扶正注射液是以黄芪、党参为主要原料,经提取、分离有效成分而配制成的中药静脉制剂,含生药为 $160 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。噻唑蓝 (MTT) 细胞增殖试剂盒 (碧云天生物技术公司,批号 C0009); Annexin V-FITC/碘化丙啶 (PI) 试剂盒 (Biovision 公司,批号 K101-100); BCA 蛋白定量试剂盒,一氧化氮 (NO) 试剂盒 (南京建成生物生物工程研究所,批号分别为 A045-3, K12707E); 白细胞介素-10 (IL-10), 前列腺素 E_2 (PGE_2) 试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为 EK0416, EK7124); Bcl-2, B 细胞淋巴瘤-w (Bcl-w), 细胞外大淋巴瘤 (Bcl-xl), Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax), 人 BH3 结构域凋亡诱导蛋白 (Bid), 内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 一抗 (美国 CST 公司,批号分别为 3498, 2724, 2764, 2772, 8762, 5174)。

1.3 仪器 BB15 型 CO_2 培养箱 (德国 Heraeus 公司), CKX41 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司), LB940 型多功能酶标仪 (德国 Berthold 公司), FACS Calibar 型流式细胞仪 (美国 BD 公司), PAC200 型电泳仪及转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司), ImageQuant LAS 4000 mini 型成像系统 (美国 GE 公司)。

2 方法

2.1 参芪扶正注射液配制 参芪扶正注射液加入 RPMI 1640 培养液,将注射液原液分别配成 1, 10, 100 $\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 细胞培养 采用开放式单层贴壁法培养人乳

腺癌 MDA-MB-231 细胞,培养液为 RPMI 1640(加入 100 mg·L⁻¹链霉素,100 U·mL⁻¹青霉素和 10% 胎牛血清),培养条件为 37 ℃ 5% CO₂,相对饱和湿度。隔日更换培养液,细胞呈贴壁生长,待细胞覆盖率达 80% ~ 90% 时传代。人单核细胞 THP-1 培养于 RPMI 1640 中,以佛波酯(PMA, 10 μg·L⁻¹)刺激 THP-1 细胞 3 d,诱导细胞贴壁分化成巨噬细胞(定义为 M0 型),再加入 20 μg·L⁻¹ IL-4 0.7 mL,培养 72 h 即可获得 TAM。以 MDA-MB-231-THP-1 1:5 进行直接接触共培养。

2.3 细胞存活率检测 采用 MTT 比色法检测人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 与 THP-1 共培养,检测细胞的存活率。加入顺铂 3.75, 7.5, 15, 30, 60 μmol·L⁻¹,参芪扶正注射液 + 顺铂 + M2(M2 由 IL-4 诱导 THP-1 形成)组加入参芪扶正注射液 10 mL·L⁻¹,培养 48 h,避光环境下每孔加入 5 g·L⁻¹ MTT 溶液 20 μL,37 ℃ 5% CO₂ 培养箱内继续培养 4 h,吸弃上清液,每孔加入 DMSO 150 μL,微量振荡 10 min。观察各孔在 490 nm 波长处的吸光度 A。细胞存活率 = A_{药物组} / A_{空白组} × 100%。

2.4 Annexin V-FITC/PI 双染检测细胞凋亡率 选取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞 1 × 10⁶ 个/mL 接种于 25 cm² 培养瓶中,37 ℃ 5% CO₂ 相对饱和湿度中 RPMI 1640 孵育 24 h,更换培养液,加入参芪扶正注射液(1,10,100 mL·L⁻¹)。培养 48 h 后消化收集细胞,离心,先后加入 PI 10 μL,Annexin V-FITC 10 μL 混匀,避光孵育 30 min,采用流式细胞仪检测,按 Q2 象限细胞(晚期凋亡)和 Q4 象限细胞(早期凋亡)所占百分比之和计算凋亡率。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达 细胞裂解,4 ℃,13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清,测定蛋白浓度,进行 SDS-PAGE 电泳。电泳后转膜,15 V 稳压转移 30 min。5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,弃去封闭液,一抗(1:1 000)室温孵育 1 h,4 ℃ 孵育过夜;二抗室温孵育 1 h。Odyssey 红外荧光扫描成像系统进行成像。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料采用单因素方差分析比较,计数资料采用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 参芪扶正注射液对细胞存活率的影响 将乳腺癌细胞 MDA-MB-231 与 TAMs 共培养,与单独参芪扶正注射液干预 MDA-MB-231 细胞组 10,

100 mL·L⁻¹ 组比较,参芪扶正注射液 + M2 组细胞存活率均明显降低($P < 0.05$),参芪扶正注射液能显著抑制共培养细胞生长。见表 1。

表 1 参芪扶正注射液对 MDA-MB-231 细胞和共培养细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of Shenqi Fuzheng injection on cell survival in MDA-MB-231 cells and co-cultured cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 / mL·L ⁻¹	细胞存活率/%
空白	-	100.00 ± 5.29
参芪扶正注射液	1	100.47 ± 6.34
	10	94.46 ± 11.37
	100	91.91 ± 8.32
参芪扶正注射液 + M2	1	82.23 ± 9.99
	10	71.83 ± 8.01 ¹⁾
	100	59.95 ± 9.32 ²⁾

注:与参芪扶正注射液 10 mL·L⁻¹ 组比较¹⁾ $P < 0.05$;与参芪扶正注射液 100 mL·L⁻¹ 组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 参芪扶正注射液对细胞药物敏感性的影响 与顺铂 + M2 组比较,参芪扶正注射液 10 mL·L⁻¹ + 顺铂 7.5,15,30,60 μmol·L⁻¹ + M2 组细胞存活率均明显降低($P < 0.05$)。联用后顺铂组 IC₅₀ 由 30 μmol·L⁻¹ 降低至 15 μmol·L⁻¹,参芪扶正注射液提高了顺铂的药物敏感性。见表 2。

3.3 参芪扶正注射液对细胞凋亡的影响 单独运用参芪扶正注射液 1,10,100 mL·L⁻¹ 分别干预共培养细胞,细胞凋亡率分别为 7.9%,17.8%,22.4%。与 15 μmol·L⁻¹ 顺铂组比较,参芪扶正注射液 + 顺铂组细胞凋亡率明显增加($P < 0.05$),参芪扶正注射液能增加顺铂诱导 MDA-MB-231 与 TAMs 共培养细胞发生凋亡。见表 3。

3.4 参芪扶正注射液对细胞凋亡相关蛋白表达的影响 与空白组比较,参芪扶正注射液 + 顺铂组能明显抑制 Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xl 蛋白表达,增加 Bax, Bid 蛋白表达($P < 0.05$),参芪扶正注射液联合顺铂能抑制 MDA-MB-231 与 TAMs 共培养细胞中凋亡相关蛋白的表达。见图 1,表 4。

3.5 参芪扶正注射液对细胞中顺铂诱导的细胞因子释放的影响 与空白组比较,顺铂组 TAMs 中释放 IL-10, PGE₂ 和 NO 水平明显增加($P < 0.05$)。与顺铂组比较,顺铂 + 参芪扶正注射液组 IL-10 和 PGE₂ 水平明显降低($P < 0.05$),参芪扶正注射液能降低共培养细胞中顺铂诱导的细胞因子释放。见表 5。

表 2 参芪扶正注射液联合顺铂对共培养细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 2 Effect of Shenqi Fuzheng injection combined with cisplatin on cell survival in MDA-MB-231 cells and co-cultured cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞存活率/%
空白	-	100.00 \pm 5.62
顺铂	3.75	87.04 \pm 1.2
	7.5	70.89 \pm 5.51
	15	54.95 \pm 4.71
	30	31.43 \pm 8.89
	60	13.39 \pm 4.86
空白	-	116.81 \pm 2.81
顺铂 + M2	3.75	107.55 \pm 3.38
	7.5	96.25 \pm 4.43
	15	74.74 \pm 5.26
	30	63.77 \pm 4.48
	60	33.57 \pm 4.72
空白	-	112.07 \pm 3.07
参芪扶正注射液 + 顺铂 + M2	3.75	88.75 \pm 9.45
	7.5	74.79 \pm 9.51 ¹⁾
	15	48.77 \pm 3.52 ²⁾
	30	39.61 \pm 5.53 ³⁾
	60	24.74 \pm 9.25 ⁴⁾

注:参芪扶正注射液 10 mL·L⁻¹;与顺铂 7.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + M2 组比较¹⁾ $P < 0.05$;与顺铂 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + M2 组比较²⁾ $P < 0.05$;与顺铂 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + M2 组比较³⁾ $P < 0.05$;与顺铂 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + M2 组比较⁴⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

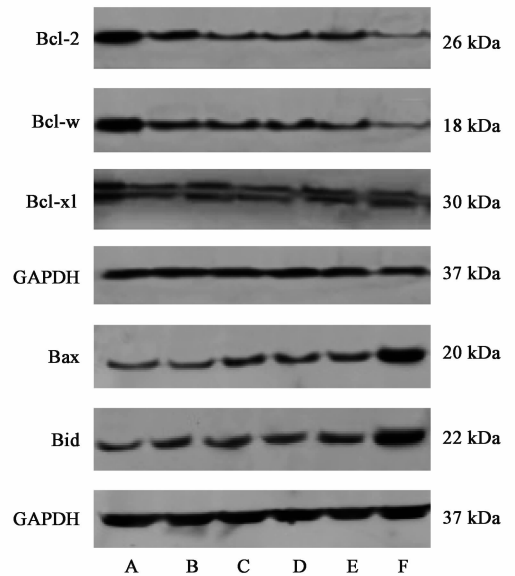
三阴性乳腺癌不能从针对乳腺癌的内分泌治疗及抗 Her-2 的靶向治疗中获益^[10]。因此积极寻找 TNBC 的治疗靶点是当前国内外乳腺癌研究领域的

表 3 参芪扶正注射液联合顺铂对共培养细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 3 Effect of Shenqi Fuzheng injection combined with cisplatin on apoptosis in co-cultured cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	浓度	细胞凋亡率/%
空白	-	1.91 \pm 1.33
参芪扶正注射液	1 mL·L ⁻¹	7.92 \pm 1.87
	10 mL·L ⁻¹	17.86 \pm 2.47
	100 mL·L ⁻¹	22.44 \pm 2.37
顺铂	15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	25.39 \pm 0.99
参芪扶正注射液 + 顺铂	10 mL·L ⁻¹ + 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	40.89 \pm 5.99 ¹⁾

注:与顺铂 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。



A. 空白组; B ~ D. 参芪扶正注射液 (1, 10, 100 mL·L⁻¹) 组; E. 顺铂 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; F. 参芪扶正注射液 10 mL·L⁻¹ + 顺铂 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组
图 1 参芪扶正注射液联合顺铂对共培养细胞中凋亡相关蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of Shenqi Fuzheng injection combined with cisplatin on expressions of apoptosis associated proteins in co-cultured cells

表 4 参芪扶正注射液联合顺铂对共培养细胞凋亡相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 4 Electrophoresis of Shenqi Fuzheng injection combined with cisplatin on expressions of apoptosis associated proteins in co-cultured cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	浓度	Bcl-2 /GAPDH	Bcl-w /GAPDH	Bcl-xl /GAPDH	Bax /GAPDH	Bid /GAPDH
空白	-	1.03 \pm 0.12	0.99 \pm 0.13	0.98 \pm 0.16	0.48 \pm 0.11	0.46 \pm 0.04
参芪扶正注射液	1 mL·L ⁻¹	0.95 \pm 0.14	0.92 \pm 0.18	0.69 \pm 0.09	0.49 \pm 0.09	0.52 \pm 0.07
	10 mL·L ⁻¹	0.62 \pm 0.09	0.71 \pm 0.20	0.75 \pm 0.13	0.63 \pm 0.12	0.55 \pm 0.03
	100 mL·L ⁻¹	0.59 \pm 0.04	0.65 \pm 0.11	0.72 \pm 0.11	0.68 \pm 0.08	0.64 \pm 0.10
顺铂	15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.63 \pm 0.05	0.52 \pm 0.09	0.68 \pm 0.08	0.78 \pm 0.14	0.81 \pm 0.16
参芪扶正注射液 + 顺铂	10 mL·L ⁻¹ + 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.28 \pm 0.02 ¹⁾	0.21 \pm 0.05 ¹⁾	0.56 \pm 0.06 ¹⁾	0.92 \pm 0.16 ¹⁾	0.91 \pm 0.21 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

表 5 参芪扶正注射液联合顺铂对共培养细胞中 IL-10, PGE₂ 和 NO 释放的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of Shenqi Fuzheng injection combined with cisplatin on IL-10, PGE₂ and NO in co-cultured cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度	IL-10/ng·L ⁻¹	PGE ₂ /ng·L ⁻¹	NO/ μ mol·L ⁻¹
空白	-	62.63 ± 7.43	50.09 ± 8.51	42.52 ± 6.64
参芪扶正注射液	1 mL·L ⁻¹	61.57 ± 8.74	49.12 ± 5.46	45.95 ± 6.33
	10 mL·L ⁻¹	60.43 ± 11.59	43.11 ± 6.71	44.53 ± 7.69
	100 mL·L ⁻¹	55.95 ± 7.72	35.45 ± 9.48	42.21 ± 7.59
顺铂	15 μ mol·L ⁻¹	73.28 ± 9.73 ¹⁾	58.85 ± 8.12 ¹⁾	49.98 ± 7.96 ¹⁾
顺铂 + 参芪扶正注射液	15 μ mol·L ⁻¹ + 1 mL·L ⁻¹	70.05 ± 9.28	56.72 ± 9.32	48.24 ± 7.60
	15 μ mol·L ⁻¹ + 10 mL·L ⁻¹	59.48 ± 9.47 ²⁾	48.85 ± 9.92 ²⁾	45.06 ± 6.78
	15 μ mol·L ⁻¹ + 100 mL·L ⁻¹	41.47 ± 14.17 ³⁾	41.17 ± 6.59 ³⁾	43.29 ± 10.94

注:与空白组比较¹⁾ P < 0.05;与顺铂组比较²⁾ P < 0.05, ³⁾ P < 0.01。

难点和热点。临床对 TNBC 的治疗仍以蒽环类和紫杉烷类为标准的新辅助和辅助化疗方案^[11]。然而, TNBC 的早期复发率仍然很高,所以针对性的靶向治疗或多靶点的联合治疗或许为三阴性乳腺癌患者带来新的希望。

乳腺癌发病的主要原因是正气不足,邪气入侵是重要外因,肝郁脾虚、冲任失调影响其病程发生发展的重要因素。其病机是“本虚标实,虚实夹杂”。因手术损伤机体元气,放化疗耗气伤津,属热毒,长期放化疗生痰致瘀,导致肿瘤复发或转移,因此提倡使用“益气扶正”之法来治疗该疾病。方中黄芪健脾益气,既能使脾气健运,痰浊得消,又能补气而活血,使气行则血行,瘀血自消。气能生血,气又为血之帅,能助其行血,气血充足,则能有力抵挡外邪,促邪外出,抑制乳腺癌转移,减少复发概率。党参性平味甘微酸,具有补中健脾益气的功效。《本草从新》记载党参:“补中益气、和脾胃、除烦渴。中气微弱,用以调补,甚为平妥”。党参与黄芪合用,能加强黄芪益气健脾,化痰散浊的作用。

近年,有关参芪扶正注射液改善化疗耐药进行了大量研究。结果显示,参芪扶正注射液能通过调节 MDRL, Bcl-2 和 Bax mRNA 的转录及蛋白表达逆转多药耐药^[12];能调节细胞凋亡,逆转 A549/DDP 细胞对顺铂的耐药性^[13]。但参芪扶正注射液通过调控免疫机制抑制 TNBC 的作用机制有待进一步明确。

细胞凋亡又称细胞程序性死亡,细胞凋亡机制异常可以导致包括癌症在内的多种疾病的发生。乳腺癌治疗面临最大的问题之一就是癌细胞对各种放化疗诱导的细胞生长抑制和细胞凋亡不敏感或产生抗性。Bcl-2 家族蛋白调控细胞凋亡在乳腺癌治疗

中发挥关键调控作用。Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w 等属于 Bcl-2 家族抗凋亡蛋白,临床发现约 75% 的乳腺癌组织高表达 Bcl-2^[14]。Bcl-2 表达高低可以作为乳腺癌化疗敏感性的判断指标。中药及其成分在诱导肿瘤细胞凋亡中起着重要作用。温阳散结中药能够有效抑制细胞增殖及诱导凋亡^[15];毛钩藤碱可诱导 MDA-MB-231 细胞发生凋亡^[16];本课题组前期研究显示,姜黄素能通过诱导乳腺癌细胞凋亡提高丝裂霉素 C 的化疗敏感性^[17],改善其耐药^[18]。本研究显示,参芪扶正注射液能通过诱导细胞凋亡,提高顺铂的药物敏感性,并且其作用机制与其抑制抗凋亡蛋白和增加促凋亡蛋白表达有关。

TAMs 来源于血液循环中的单核细胞,在肿瘤微环境中分化成为 M2 表型的巨噬细胞,是乳腺癌基质中主要的炎症细胞^[19]。研究显示, TAMs 与肿瘤免疫逃逸有关^[20]。参芪扶正注射液通过提高荷瘤小鼠的细胞免疫功能,改善荷瘤小鼠的抗肿瘤免疫状态,协同对肿瘤细胞的直接杀伤作用,在荷瘤小鼠体内发挥其抑瘤抗瘤作用^[21]。参芪扶正注射液联合化疗有助于清除和杀伤癌细胞,增强机体免疫力,可以作为胃癌化疗的辅助用药^[22]。本研究结果显示,参芪扶正注射液能通过调节 M2 型 TAMs 提高顺铂药物敏感性,能降低顺铂诱导的 IL-10 和 PGE₂ 释放,进一步揭示参芪扶正注射液通过改善免疫发挥其协同抗肿瘤效应。

综上所述,参芪扶正注射液能显著抑制人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 与 THP-1 共培养细胞生长,其与顺铂联合运用,提高了共培养细胞对顺铂的敏感性,促进了细胞凋亡。参芪扶正注射液降低了顺铂诱导的 IL-10 和 PGE₂ 释放。正气虚弱是乳腺癌发病的根本病机,晚期乳腺癌患者经过长期化疗后,

其免疫功能低下明显。机体免疫功能与乳腺癌的发病及预后密切相关。因此,改善机体免疫状态,通过提高免疫功能来防治肿瘤已成为不可忽视的重要环节。本研究中,参芪扶正注射液通过调节免疫细胞改善了乳腺癌细胞 MDA-MB-231 对顺铂的敏感性,起到协同抑制肿瘤细胞增殖的作用。由于益气扶正中药具有疗效显著、毒副作用小且不易产生耐药的特点,具有广阔的应用前景,因而揭示其作用机制也显得尤为必要。

[参考文献]

[1] 许家瑞,胡剑,刘冬冬,等.长链非编码 RNA 在乳腺癌中的研究进展[J].分子诊断与治疗杂志,2018,10(1):61-66.

[2] 蒋伯刚,陈林,张汉超.三阴性乳腺癌的研究进展[J].中国妇幼保健,2012,27(30):4819-4821.

[3] YAO H, HE G, YAN S, et al. Triple-negative breast cancer: is there a treatment on the horizon [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (1):1913-1924.

[4] 洪锐东.参芪扶正注射液联合化疗治疗晚期三阴性乳腺癌的效果[J].北方药学,2015,12(6):25-26.

[5] 张强,蔡军波,陈鑫,等.参芪扶正注射液联合化疗治疗晚期三阴性乳腺癌 32 例[J].中国药师,2013,16(12):1866-1867.

[6] 刘小英,宋小玲.参芪扶正注射液辅助治疗乳腺癌对患者免疫功能及生活质量的影响[J].上海医药,2017,38(19):29-31,37.

[7] 余青,张锦,李有怀,等.参芪扶正注射液用于乳腺癌根治术后辅助化疗的临床效果观察[J].广西医科大学学报,2017,34(12):1734-1737.

[8] 钟陆行,熊建萍,张锡泉.参芪扶正注射液对 K562/ADM 多药耐药的影响[J].江西医学院学报,2006,46(4):41-44.

[9] 朱玉芬,李崖青,付丽.肿瘤相关巨噬细胞与乳腺癌关系的研究进展[J].天津医科大学学报,2014,20(6):499-501,505.

[10] 杜江洋,徐元,王楠,等.白花蛇舌草-半枝莲药对组分诱导三阴性乳腺癌细胞凋亡的机制[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(17):99-107.

[11] 李云祥,梁引库,高飞雄,等.中药治疗乳腺癌疾病研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(3):

211-219.

[12] 文柳静,王晨,任丽.参芪扶正注射液对胰腺癌多药耐药逆转作用研究[J].中国药学杂志,2017,52(13):1147-1151.

[13] 熊英,刘春英,王淳.参芪扶正注射液对人肺腺癌耐药细胞株 A549/DDP 的增敏作用[J].上海中医药大学学报,2016,30(4):52-56.

[14] Merino D, Lok S W, Visvader J E, et al. Targeting BCL-2 to enhance vulnerability to therapy in estrogen receptor-positive breast cancer[J]. *Oncogene*, 2016, 35 (15):1877-1887.

[15] 刘晓菲,李静蔚,时光喜,等.温阳散结中药干预乳腺癌细胞 SK-BR-3 的生长抑制及诱导凋亡研究[J].中国医药导报,2018,15(2):13-18.

[16] 黄器伟,翟娜娜,黄涛,等.毛钩藤碱通过线粒体途径诱导乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡[J].生理学报,2018,70(1):40-46.

[17] ZHOU Q M, WANG X F, LIU X J, et al. Curcumin improves MMC-based chemotherapy by simultaneously sensitising cancer cells to MMC and reducing MMC-associated side-effects [J]. *Eur J Cancer*, 2011, 47 (14):2240-2247.

[18] ZHOU Q M, SUN Y, LU Y Y, et al. Curcumin reduces mitomycin C resistance in breast cancer stem cells by regulating Bcl-2 family-mediated apoptosis [J]. *Cancer Cell Int*, 2017, 17(1):84.

[19] Allavena P, Sica A, Garlanda C, et al. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance[J]. *Immunol Rev*, 2008, 222 (1):155-161.

[20] Hagemann T, Lawrence T, McNeish I, et al. "Reeducating" tumor-associated macrophages by targeting NF-kappa B[J]. *J Exp Med*, 2008, 205(6):1261-1268.

[21] 梅龙,董晓慧,段刚,等.参芪注射液对 H22 荷瘤小鼠抑瘤作用的细胞免疫机制[J].西安交通大学学报:医学版,2007,28(3):279-282.

[22] 廖修用,刘忠和,余灏东,等.参芪扶正注射液联合化疗对胃癌患者外周血细胞水平、肿瘤标志物及免疫功能的影响[J].海南医学院学报,2018,24(2):181-184.

[责任编辑 张丰丰]