

doi:10.3969/j.issn.1674-4616.2024.05.006

· 实验研究 ·

# 四君子汤调节铁死亡增强小鼠三阴性乳腺癌免疫治疗效果实验研究

丁晓明<sup>1</sup> 张 曲<sup>2</sup> 罗 波<sup>2△</sup><sup>1</sup>武汉市第三医院中医科,武汉 430060<sup>2</sup>湖北省肿瘤医院放疗中心,武汉 430000

**摘要** **目的** 探讨四君子汤对抗 PD-1 免疫治疗小鼠三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)的疗效及作用机制。**方法** 建立 TNBC 移植瘤小鼠模型,将小鼠随机分为 4T1 组(模型组)、四君子汤组、抗 PD-1 治疗组、四君子汤联合抗 PD-1 治疗组,每组 6 只。四君子汤组小鼠按实验动物与人体表面积比换算给予 4.85 g/(kg·d)四君子汤灌胃(每周 5 次),抗 PD-1 治疗组给予 80 μg/只抗 PD-1 抗体腹腔注射(每周 2 次),四君子汤联合抗 PD-1 治疗组则分别给予上述治疗,4T1 组则灌胃等体积的 0.9%氯化钠溶液(每周 5 次);连续干预 3 周。比较各组肿瘤体积大小,通过生存分析比较各组小鼠生存时间。采用 C11-BODIPY 染色法进行脂质过氧化评估各组小鼠肿瘤细胞脂质过氧化水平,并通过测量丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量确认;采用 7-氨基放线菌素 D(7-aminoactinomycin D, 7-AAD)染色法检测细胞死亡比例;采用实时定量 PCR 检测铁死亡相关基因表达。并进一步通过体外实验分析四君子汤有效成分(人参皂苷 Rb1)对 4T1 癌细胞脂质过氧化和铁死亡的影响。**结果** 与抗 PD-1 治疗组相比,四君子汤联合抗 PD-1 治疗组小鼠肿瘤体积明显缩小( $P < 0.01$ ),四君子汤联合抗 PD-1 治疗组中位生存期明显延长(34 d vs. 25 d,  $P < 0.05$ )。与抗 PD-1 治疗组相比,四君子汤联合抗 PD-1 治疗组脂质过氧化平均荧光强度明显升高( $P < 0.05$ ),肿瘤细胞中的 MDA 含量、癌细胞死亡率均明显升高( $P$  均  $< 0.01$ )。四君子汤组(与 4T1 组相比)和四君子汤联合抗 PD-1 治疗组(与抗 PD-1 治疗组相比)铁死亡抑制基因 *NRF2*、*GPX4*、*SLC7A11* 表达水平显著降低( $P$  均  $< 0.05$ ),但铁死亡促进基因 *TFRC* 组间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。细胞实验结果显示:与 4T1 细胞空白对照组相比,人参皂苷 Rb1 单体对乳腺癌细胞脂质过氧化平均荧光强度的作用差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。人参皂苷 Rb1 单体联合 IFN- $\gamma$  对乳腺癌细胞脂质过氧化平均荧光强度的作用明显高于单用 IFN- $\gamma$  ( $P < 0.05$ )。人参皂苷 Rb1 干预下 4T1 癌细胞铁死亡抑制基因 *NRF2*、*GPX4*、*SLC7A11* 表达水平显著降低( $P$  均  $< 0.05$ )。**结论** 四君子汤单独应用未见对小鼠 TNBC 有明显治疗效果,但可增强抗 PD-1 抗体免疫治疗小鼠 TNBC 的效果,其机制可能与四君子汤降低癌细胞铁死亡抑制基因表达有关。

**关键词** 四君子汤;三阴性乳腺癌;免疫治疗;程序性死亡受体 1;铁死亡

**中图分类号** R285.5;R273 **文献标志码** A

## Experimental Study on Sijunzi Decoction Regulating Ferroptosis and Enhancing the Immunotherapeutic Effects of Triple Negative Breast Cancer in Mice

DING Xiaoming<sup>1</sup>, ZHANG Qu<sup>2</sup>, LUO Bo<sup>2</sup><sup>1</sup>Department of Traditional Chinese Medicine, Wuhan Third Hospital, Wuhan 430060, China<sup>2</sup>Radiotherapy Center, Hubei Cancer Hospital, Wuhan 430000, China

**Abstract Objective** To explore the therapeutic effect and mechanism of Sijunzi decoction on anti-PD-1 im-

munotherapy in mice with triple negative breast cancer(TNBC). **Methods** A TNBC transplantation tumor mouse model was established. Mice were randomly divided into 4T1 group, Sijunzi decoction treatment group, anti-PD-1 treatment group and Sijunzi decoction combined with anti-PD-1 treatment group, with 6 mice in each group. Mice in the Sijunzi decoction treatment group were given Sijunzi decoction by gavage at a dose of 4.85 g/(kg·d) according to the experimental animal to human surface area ratio(five times a week). The anti-PD-1 treatment group was injected intraperitoneally with 80  $\mu$ g/mouse anti-PD-1 antibody(twice a week). The combination of Sijunzi decoction and anti-PD-1 treatment group was given the above treatments respectively. The 4T1 group was given an equal volume of 0.9% sodium chloride solution by gavage(five times a week). The interventions were continuous for 3 weeks. The volume size of tumors were compared. Survival analysis was used to compare the survival time of mice in each group. Further assessment of lipid peroxidation in tumor cells of mice in each group was performed by C11-BODIPY staining, and confirmed by measuring malondialdehyde(MDA) content. The proportion of cell death was detected by 7-aminoactinomycin D(7-AAD)staining. Real-time quantitative PCR was used to detect the expression of ferroptosis-related genes. Furthermore, an in vitro experiment was conducted to analyze the effects of the active ingredient of Sijunzi decoction(ginsenoside Rb1) on lipid peroxidation and ferroptosis in 4T1 cancer cells. **Results** Compared with the anti-PD-1 treatment group, the tumor volume size of mice in the Sijunzi decoction combined with anti-PD-1 treatment group were significantly reduced( $P<0.01$ ), and the median survival time of the Sijunzi decoction combined with anti-PD-1 treatment group was significantly prolonged (34 days vs. 25 days,  $P<0.05$ ). Compared with the anti-PD-1 treatment group, the average fluorescence intensity of lipid peroxidation in the Sijunzi decoction combined with anti-PD-1 treatment group was significantly increased( $P<0.05$ ), and the MDA content and cancer cell death rate were significantly increased(all  $P<0.01$ ). The expression levels of *NRF2*, *GPX4*, and *SLC7A11*, which are ferroptosis inhibitory genes, were significantly lower in the Sijunzi decoction group(compared to the 4T1 group) and the Sijunzi decoction combined with anti-PD-1 treatment group(compared to the anti-PD-1 treatment group)(all  $P<0.05$ ). However, there was no significant difference in the expression of the ferroptosis promoting gene *TFRC*( $P>0.05$ ). The results of cells experiment showed that there was no significant difference in the effect of ginsenoside Rb1 monomer on the average fluorescence intensity of lipid peroxidation in breast cancer cells compared with the blank control group of 4T1 cells( $P>0.05$ ). However, when ginsenoside Rb1 was used in the combination with IFN- $\gamma$ , the fluorescence intensity of lipid peroxidation in breast cancer cells were significantly higher than that of IFN- $\gamma$  alone( $P<0.05$ ). Under the intervention of ginsenoside Rb1, the expression levels of *NRF2*, *GPX4*, and *SLC7A11*, which are ferroptosis inhibitory genes, in 4T1 cancer cells were significantly reduced(all  $P<0.05$ ). **Conclusion** Sijunzi decoction did not show significant therapeutic effects on TNBC in mice when used alone, but it may enhance the immunotherapy effect of anti-PD-1 antibody on TNBC in mice. The mechanism may be related to the fact that Sijunzi decoction reduces the expression of ferroptosis inhibiting genes in cancer cells, thereby promoting cancer cell ferroptosis.

**Key words** Sijunzi decoction; triple negative breast cancer; immunotherapy; programmed death receptor 1; ferroptosis

三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)是缺乏雌激素受体、孕激素受体和人表皮生长因子受体 2 表达的乳腺癌亚型, 占新诊断乳腺癌的 24%。该类患者肿瘤转移发生率高, 现有治疗方式效果较差<sup>[1]</sup>。患者一旦发生转移, 中位生存期为 11~14 个月<sup>[2]</sup>。免疫检查点抑制剂是免疫治疗的一种, 近些年在实体瘤的治疗中取得了较大进展, 并在 TNBC 方面开展了一系列临床研究, 显现出一定疗效, 并被批准应用于临床, 但其仍存在治疗后肿瘤缓解时间短、

生存期延长有限、部分患者疗效不佳等问题。因此, 如何进一步提高 TNBC 临床疗效是亟需解决的问题。四君子汤由人参、白术、茯苓、甘草组成, 具有扶正益气、健脾固本的功效, 目前被广泛用于恶性肿瘤的临床治疗。有研究表明, 四君子汤可直接抑制部分肿瘤细胞生长, 并可调节机体免疫系统间接抑制肿瘤进展<sup>[3-4]</sup>。笔者在临床实践中发现, 四君子汤能够增强免疫治疗对于 TNBC 的疗效, 但其机制尚未明确。铁死亡是一种由铁依赖性脂质过氧化引起的调节性细

胞死亡,被认为与 T 细胞介导的抗肿瘤免疫有关,在免疫治疗中具有重要作用并影响肿瘤免疫治疗的效果<sup>[5]</sup>。因此,本研究探讨四君子汤对免疫检查点抑制剂(抗 PD-1 抗体)治疗 TNBC 小鼠荷瘤模型的疗效和对乳腺癌细胞铁死亡的影响,揭示四君子汤增强免疫治疗效果的作用机制,现报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物/细胞

SPF 级 Balb/c 雌性小鼠 18 只,6 周龄,体质量(20±2)g,饲养于湖北省肿瘤医院实验动物中心,温度(22±2)℃,相对湿度(55±10)%,12 h 光照-12 h 黑暗交替的昼夜周期环境。给予普通饲料,自由进食、饮水。动物实验严格按照《动物伦理学使用指南》进行,并经湖北省肿瘤医院动物伦理学委员会批准(批件号:LLH-BCH2020LW-022)。4T1 细胞株由中国科学院细胞中心提供,细胞培养:将 4T1 细胞用含有 10% 标准胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基培养,放置在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养,2~3 d 传代 1 次。

### 1.2 主要干预药物

四君子汤由人参(产地:吉林,批号:2211291)、白术(产地:浙江,批号:20220119)、茯苓(产地:湖北,批号:202211005)、甘草(产地:内蒙,批号:202210017)按 3:3:3:2 制成,均购自武汉市第三医院。所有中药用 10 倍体积双蒸水浸泡 2 h,武火煎至沸腾,文火煎煮 1.5 h,过滤,收集滤液,重复煎煮 1 次,合并 2 次滤液。滤液蒸发浓缩后,于烘干箱干燥,碾碎后,得四君子汤干粉,于-20℃保存。

### 1.3 主要试剂及仪器

小鼠抗 PD-1 抗体(Bio X Cell 公司,批号:BE0146);4% 多聚甲醛(上海诺宁公司,批号:NBS0135);MDA 测定试剂盒(Abcam 公司,批号:ab118970);荧光定量 PCR 试剂盒(ThermoFisher 公司,批号:4385618);C11-BODIPY 脂质过氧化荧光探针(ThermoFisher 公司,批号:D3861);7-氨基放线菌素 D(7-aminoactinomycin, 7-AAD)染色液(Elab-science 公司,批号:E-CK-A162);RPMI 1640 培养基(武汉普诺赛,批号:PM150110);胎牛血清(ThermoFisher 公司,批号:26010066);胰蛋白酶消化液(上海爱必信,批号:abs47048223);CCK-8 试剂盒(Elab-science,批号:E-CK-A362);人参皂苷 Rb1(默克公司,批号:41753-43-9);Trizol 试剂(Invitrogen,批号:15596026CN);QuantiTect 逆转录试剂盒(Qiagen,批号:205311);Fast SYBR® Green Master Mix 试剂盒

(ThermoFisher 公司,批号:4385610)。

AL104 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司);水平摇床(北京沃德生物);高速低温组织研磨仪(武汉塞维尔);Odyssey CLX 型红外荧光扫描成像系统(美国 LI-COR 公司);FACS Canto II 型流式细胞仪(美国 BD 公司);RT6100 酶标仪(美国 Rayto 公司);PRIMO VERT 型倒置荧光显微镜(德国 ZEISS 公司)。

### 1.4 造模及干预方法

取对数生长期 4T1 细胞,细胞密度调整至 5×10<sup>5</sup> 个/mL,取 200 μL 注射于小鼠右侧腋部皮下,若 1 周后肿瘤直径达 5 mm,即认为 TNBC 移植瘤小鼠模型建立成功。将小鼠随机分为 4T1 组(模型组)、四君子汤组、抗 PD-1 治疗组和四君子汤联合抗 PD-1 治疗组,每组 6 只。四君子汤治疗组小鼠按实验动物与人体表面积比换算给予 4.85 g/(kg·d)四君子汤灌胃,4T1 组小鼠灌胃等体积的 0.9% 氯化钠溶液,每周 5 次;抗 PD-1 治疗组每周 2 次腹腔注射 80 μg/只小鼠抗 PD-1 抗体,共 5 次注射;四君子汤联合抗 PD-1 治疗组则分别给予相应前述药物干预;以上干预均连续 3 周。实时称重、测量小鼠皮下肿瘤的长度和宽度。肿瘤体积=长度(mm)×宽度(mm)<sup>2</sup>/2,其中长度为肿瘤的最长直径,宽度为肿瘤的最短直径。生存分析以肿瘤体积达到 1200 mm<sup>3</sup> 为终点。

### 1.5 检测指标及方法

#### 1.5.1 细胞增殖实验

采用 CCK-8 法检测细胞增殖,将处于对数生长期的 4T1 细胞接种于 96 孔板,调整细胞密度为 1×10<sup>4</sup> 个/孔,每孔体积 100 μL,置于培养箱(37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>)培养;待细胞完全贴壁后,分别更换含有人参皂苷 Rb1(50 μM)以及不含药物的培养液 100 μL;分别在孵育 24 h、48 h、72 h 后,加入 10 μL CCK-8 溶液。另设调零孔,每组 5 个复孔,将培养板在培养箱中孵育 2 h 后,用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 OD 值,计算出各组细胞抑制率。抑制率=[(对照组 OD 值-本底 OD 值)-(给药组 OD 值-本底 OD 值)]/(对照组 OD 值-本底 OD 值)×100%。

#### 1.5.2 脂质过氧化评估和细胞死亡的检测

将 4T1 细胞重悬于含有 5 μM C11-BODIPY 荧光探针的 Hanks 平衡盐溶液 1 mL 中,并在组织培养箱中于 37℃ 培养 15 min。将细胞洗涤并重悬于 200 μL HBSS 缓冲液中,然后立即通过流式细胞仪分析样品,并监测来自未氧化的 C11[藻红蛋白(PE)通道]和氧化的 C11(FITC 通道)的荧光强度。将所有数据标准化为对照样品,并显示为相对脂质活性氧(reactive

oxygen species, ROS)。为了进行细胞死亡分析,对细胞进行处理、收集,然后在含有 1 μg/mL 7-AAD 的 PBS 中重悬 5 min,并直接在流式细胞仪上运行检测。

### 1.5.3 丙二醛(malondialdehyde,MDA)含量测定

使用 MDA 测定试剂盒测量肿瘤细胞中的 MDA 含量,在该测定中,细胞中的 MDA 与硫代巴比妥酸(TBA)反应,产生 MDA-TBA 加合物,该加合物可以通过荧光定量法进行定量。收集各组肿瘤组织,并在 MDA 裂解缓冲液中匀浆,对细胞裂解物进行超声处理和离心以去除不溶性物质。将总计 200 μL 的上清液与 600 μL TBA 溶液混合,并在 95°C 下孵育 1 h。在具有 Ex/Em=532/553 nm 或 OD=532 nm 的相对

荧光单位的微孔板读取器上测量 MDA-TBA 复合物浓度,并将其标准化为蛋白质浓度即为 MDA 含量。

### 1.5.4 实时定量 PCR 检测铁死亡相关基因表达

使用 Trizol 试剂分离 RNA。用苯酚-氯仿提取 RNA,用乙醇沉淀,并重悬于焦碳酸二乙酯处理的水(不含 RNase 水)中。用 QuantiTect 逆转录试剂盒制备 cDNA,并进行实时定量 PCR,根据制造商的方案,使用 Fast SYBR® Green Master Mix 试剂盒进行。RT-qPCR 反应条件如下:95°C 持续 10 min,40 次,95°C 循环 15 s,0°C 持续 30 s。通过  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算 mRNA 的相对表达量,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	序列	长度/bp
NRF2	正向 5'-CAGCATAGAGCAGGACATGGAG-3'	107
	反向 3'-GAACAGCGGTAGTATCAGCCAG-5'	
SLC7A11	正向 5'-CTTTGTTGCCCTCTCCTGCTTC-3'	136
	反向 3'-CAGAGGAGTGTGCTTGTGGACA-5'	
GPX4	正向 5'-CCTCTGCTGCAAGAGCCTCCC-3'	144
	反向 3'-CTTATCCAGGCAGACCATGTGC-5'	
TFRC	正向 5'-GAAGTCCAGTGTGGGAACAGGT-3'	151
	反向 3'-CAACCACTCAGTGGCACCAACA-5'	
GAPDH	正向 5'-CATCACTGCCACCCAGAAGACTG-3'	153
	反向 3'-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG-5'	

## 1.6 统计学方法

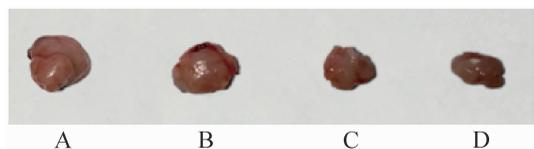
实验数据用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用 Graph-Pad Prism 软件进行统计分析,多组之间比较采用单因素方差分析;使用 Kplan-Meier 法进行生存分析,生存时间以中位生存期表示,用对数秩检验(log rank test)比较各组生存曲线;以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小鼠肿瘤大小和生存分析

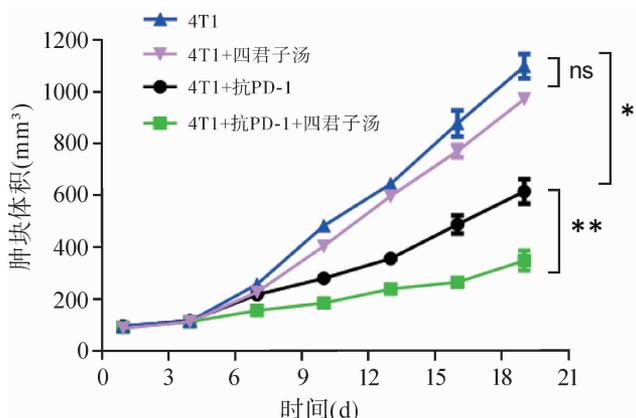
与 4T1 组相比,抗 PD-1 治疗组小鼠肿瘤体积显著缩小( $P < 0.05$ ),四君子汤组小鼠肿瘤体积未见明显缩小( $P > 0.05$ )。四君子汤联合抗 PD-1 治疗组小鼠肿瘤体积较抗 PD-1 单药治疗组明显缩小( $P < 0.01$ )。见图 1、图 2。

在随后进行的生存分析中,与 4T1 组相比,抗 PD-1 治疗组小鼠中位生存期明显延长(20 d vs. 25 d,  $P < 0.05$ )。四君子汤组小鼠中位生存期与 4T1 组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。四君子汤联合抗 PD-1 治疗组中位生存期较抗 PD-1 单药治疗组明显延长(34 d vs. 25 d,  $P < 0.05$ )。见图 3。



A: 4T1 组; B: 4T1+四君子汤; C: 4T1+抗 PD-1; D: 4T1+抗 PD-1+四君子汤。

图 1 4T1 细胞移植瘤小鼠肿块大小



\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , ns 无显著性差异。

图 2 4T1 细胞移植瘤小鼠肿块体积增长比较

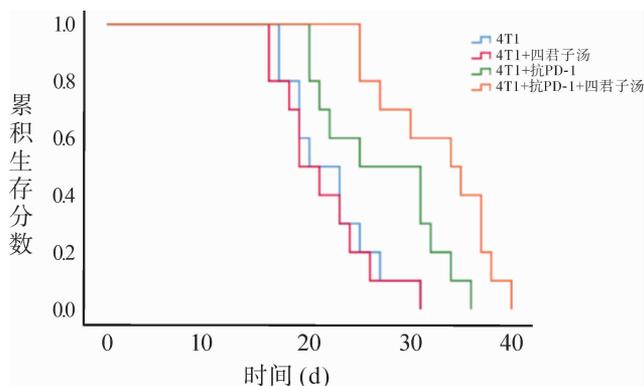


图 3 各组 4T1 细胞移植瘤小鼠生存时间

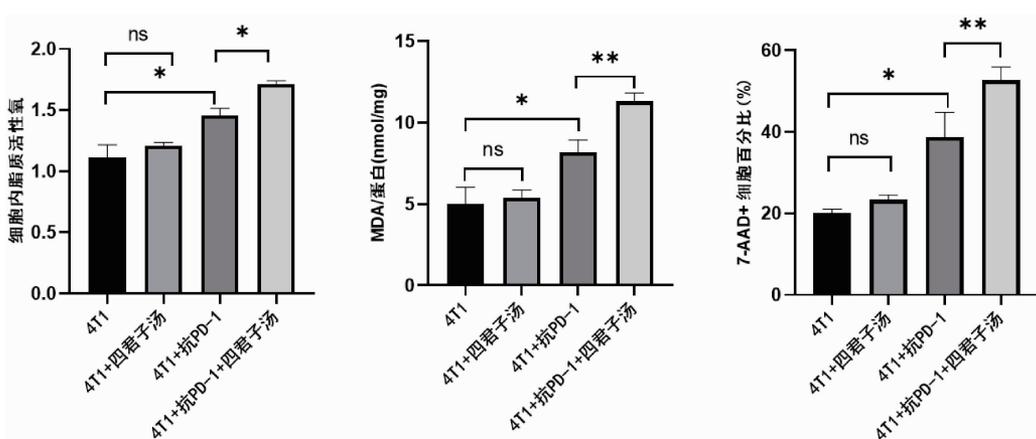
## 2.2 各组肿瘤组织中癌细胞的铁死亡水平

与 4T1 组相比,四君子汤组肿瘤细胞脂质过氧化及细胞死亡率未见明显升高( $P>0.05$ )。抗 PD-1 治疗组脂质过氧化和细胞死亡率明显高于 4T1 组( $P<0.05$ ),四君子汤联合抗 PD-1 治疗组脂质过氧化明显

高于抗 PD-1 单药治疗组( $P<0.05$ );且四君子汤联合抗 PD-1 治疗组肿瘤细胞中的 MDA 含量明显高于抗 PD-1 单药治疗组( $P<0.01$ ),7-AAD 染色阳性细胞百分比明显高于抗 PD-1 单药治疗组( $P<0.01$ )。见图 4。

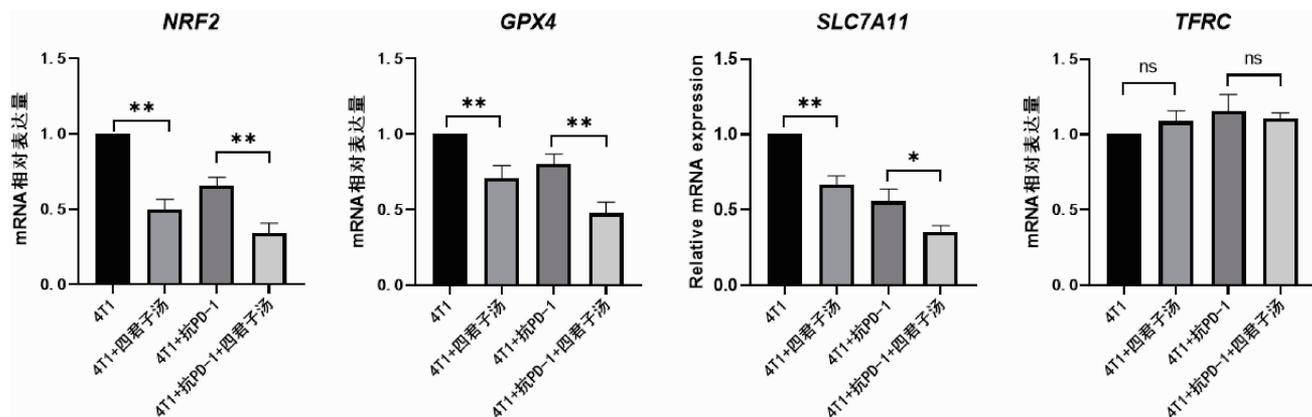
## 2.3 各组肿瘤组织中铁死亡相关基因表达水平比较

与 4T1 组相比,抗 PD-1 治疗组铁死亡抑制基因 *NRF2*、*GPX4*、*SLC7A11* 差异无统计学意义( $P>0.05$ ),而四君子汤组铁死亡抑制基因 *NRF2*、*GPX4*、*SLC7A11* 表达水平显著降低( $P$  均  $<0.01$ ),四君子汤联合抗 PD-1 治疗组上述铁死亡抑制基因也低于抗 PD-1 单药治疗组( $P$  均  $<0.05$ );但铁死亡促进基因 *TFRC* 各组间比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见图 5。



\*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ , ns 无显著性差异。

图 4 各组小鼠肿瘤组织中癌细胞铁死亡水平比较



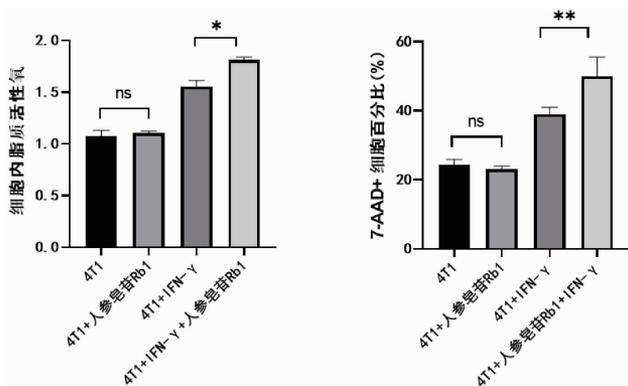
\*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ , ns 无显著性差异。

图 5 各组小鼠肿瘤组织中铁死亡相关基因的表达比较

## 2.4 人参皂苷 Rb1 对乳腺癌细胞铁死亡的影响

与 4T1 组相比,人参皂苷 Rb1 单体对乳腺癌细胞脂质过氧化水平未见明显影响( $P>0.05$ )。人参皂苷 Rb1 单体联合  $\gamma$  干扰素(interferon  $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )诱导乳

腺癌细胞脂质过氧化水平明显高于单用 IFN- $\gamma$ ( $P<0.05$ )。通过测量 7-AAD+ 细胞比率进一步确证,人参皂苷 Rb1 单体联合 IFN- $\gamma$  促进癌细胞死亡率明显高于单用 IFN- $\gamma$ ( $P<0.01$ )。见图 6。

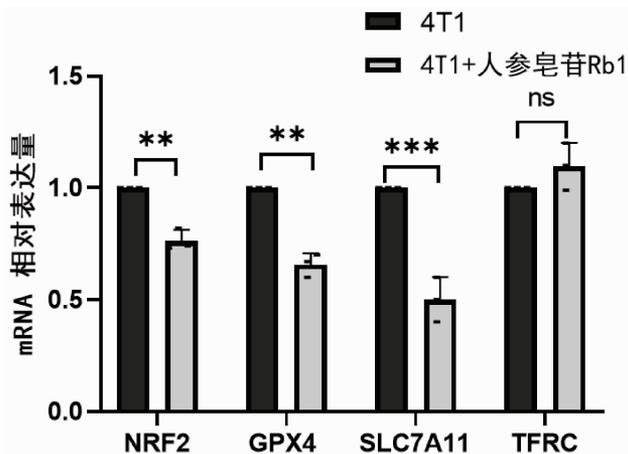


\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , ns 无显著性差异。

图 6 人参皂苷 Rb1 促进 IFN- $\gamma$  诱导乳腺癌细胞铁死亡

### 2.5 人参皂苷 Rb1 对乳腺癌细胞铁死亡相关基因表达的影响

与 4T1 组相比,人参皂苷 Rb1 干预组癌细胞铁死亡抑制基因 *NRF2*、*GPX4*、*SLC7A11* 表达水平明显降低( $P$  均  $< 0.05$ ),铁死亡促进基因 *TFRC* 组间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图 7。



\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , ns 无显著性差异。

图 7 人参皂苷 Rb1 对铁死亡相关基因表达的影响

### 3 讨论

随着手术、化疗、放疗、内分泌治疗、靶向治疗等多学科综合诊疗模式的快速发展,乳腺癌的病死率已逐年下降,但数据显示 2020 年全球仍约有 69 万例乳腺癌患者死亡,对患者健康造成较大威胁<sup>[6]</sup>。TNBC 具有独特的生物学特性和临床特征,与其他亚型的乳腺癌相比,其侵袭性强,恶性程度高。因此,寻找 TNBC 新的且有效的治疗手段和策略,显得尤为重要<sup>[7]</sup>。

近年来,TNBC 的免疫治疗取得了一定进展,一些新的免疫治疗药物被应用于临床。抗 PD-1 抗体是免疫检查点抑制剂,也是免疫治疗的主要药物之一。PD-1 是 T 细胞膜表面的一种免疫调节受体,当 PD-L1 和 PD-L2 等

配体与它相结合时,会抑制 T 细胞免疫应答。TNBC 等癌细胞可利用这种机制来逃避免疫监视,从而逃避人体免疫细胞攻击。抗 PD-1 抗体能够阻断 PD-1 与其配体 PD-L1 的结合,使人体的 T 细胞能够重新被激活<sup>[8]</sup>。目前临床上 PD-1 抑制剂已经被用于恶性淋巴瘤、肺癌、胃癌、肠癌、肝癌等的治疗<sup>[9]</sup>。抗 PD-1 抗体在 TNBC 中也显现出一定的疗效,其能减少早期 TNBC 患者的复发和转移,并能延长转移性 TNBC 患者的生存期,但对总体生存率的提高作用仍然非常有限。因此,进一步研究提高免疫治疗效果的手段和方法显得非常必要<sup>[10]</sup>。

中医认为 TNBC 的病机多为本虚标实,因虚致实,虚实相兼,虚者以肝、脾、肾不足多见,扶正是其治疗的重要原则<sup>[11]</sup>。健脾益气方——四君子汤中人参为君,甘温益气、健脾养胃;臣以苦温之白术,健脾燥湿,加强益气助运之力;佐以甘淡茯苓,健脾渗湿;使以炙甘草,益气和中,调和诸药;四药配伍,共奏益气健脾之效。目前已有基础研究显示,四君子汤中君药人参能够抑制乳腺癌荷瘤小鼠肿瘤的生长<sup>[3,12]</sup>,能促进乳腺癌细胞凋亡,并且对免疫器官、免疫细胞及免疫因子均有调控作用<sup>[4]</sup>。铁死亡是区别于细胞凋亡、细胞坏死、细胞自噬的铁依赖性、新型的细胞程序性死亡方式。铁死亡的主要机制是在二价铁或酯氧合酶的作用下,发生脂质过氧化,从而诱导细胞死亡<sup>[13]</sup>。研究显示,免疫细胞会诱导肿瘤细胞发生铁死亡,进而提高免疫细胞抗肿瘤效果<sup>[5]</sup>。基于此,笔者探讨四君子汤是否通过调节癌细胞铁死亡促进抗 PD-1 抗体治疗 TNBC 的疗效。

本研究中,我们通过小鼠动物模型发现四君子汤能够增强免疫治疗疗效,但是单用四君子汤未见明显的抗肿瘤效果,与肖冉等<sup>[3]</sup>的结果有矛盾之处,但也有研究显示,四君子汤有效单体未有直接的肿瘤抑制作用<sup>[14]</sup>;因此,四君子汤的直接抗肿瘤效应还需进一步验证。抗 PD-1 治疗组肿瘤大小较对照组明显缩小,且联合治疗组的肿瘤体积进一步缩小;说明在本研究中四君子汤本身并不能直接缩小肿瘤,但是在与抗 PD-1 抗体联合作用的情况下,可以增强抗 PD-1 抗体免疫治疗效果。这间接地支持我们在临床中观察到四君子汤提高 TNBC 患者免疫治疗效果的结论。临床研究也显示抗 PD-1 抗体能够延长转移性 TNBC 患者的生存期<sup>[10]</sup>。生存分析结果进一步显示,四君子汤联合抗 PD-1 抗体能够延长模型小鼠的生存时间。

进一步的实验发现,在乳腺癌小鼠模型中,抗 PD-1 抗体能够诱导癌细胞铁死亡,而四君子汤能增强抗 PD-1 抗体诱导癌细胞铁死亡的能力,与 Wang 等<sup>[5]</sup>的研究结果类似。因此,四君子汤增强抗 PD-1 抗体抑制肿瘤生长的

能力可能与其促进铁死亡的作用有关,但是单独应用四君子汤未能增加癌细胞的铁死亡,这提示四君子汤的干预不是癌细胞铁死亡的直接原因。为进一步探讨其机制,我们检测了四君子汤对小鼠肿瘤细胞铁死亡抑制基因<sup>[15]</sup>*NRF2*、*GPX4*、*SLC7A11* 表达的影响。结果显示,四君子汤明显降低小鼠肿瘤细胞铁死亡相关抑制基因的表达,且联合治疗组铁死亡相关抑制基因的表达进一步降低,但是四君子汤未能增加铁死亡促进基因的表达;这提示四君子汤促进铁死亡的作用机制可能是降低了铁死亡抑制基因的表达,但是未能增加铁死亡促进基因的表达。

研究显示,四君子汤有多种有效成分,其中包括人参皂苷 Rb1。我们进一步研究了人参皂苷 Rb1 对铁死亡抑制基因表达水平的影响,发现人参皂苷 Rb1 能够显著降低铁死亡抑制基因 *NRF2*、*GPX4*、*SLC7A11* 的表达水平。这有可能是四君子汤的作用机制之一。此外,体外实验进一步探讨了人参皂苷 Rb1 对 T 细胞的主要效应分子 IFN- $\gamma$  抑制癌细胞作用的影响,发现人参皂苷 Rb1 能够增强 IFN- $\gamma$  诱导癌细胞铁死亡的作用。这可能是四君子汤促进癌细胞死亡的机制之一。

综上,本研究显示,四君子汤可以促进抗 PD-1 抗体免疫治疗诱导癌细胞铁死亡而增强小鼠 TNBC 免疫治疗效果,其机制可能与四君子汤降低铁死亡抑制基因的表达有关。本研究结果为应用四君子汤组方增强抗 PD-1 免疫治疗 TNBC 提供实验依据。

参 考 文 献

[1] Yin L, Duan JJ, Bian XW, et al. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress[J]. *Breast Cancer Res*, 2020, 22(1):61.

[2] Li X, Yang J, Peng L, et al. Triple-negative breast cancer has worse overall survival and cause-specific survival than non-triple-negative breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2017, 161(2):279-287.

[3] 肖冉, 杨盟, 丁茹梦, 等. 四君子汤对三阴性乳腺癌细胞及小鼠模型增殖、转移的抑制作用[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(6):3569-3573.

[4] 赵慧朵. 四君子汤对乳腺癌术后患者细胞免疫功能的影响

[J]. *辽宁中医杂志*, 2010, 37(3):475-476.

[5] Wang W, Green M, Choi JE, et al. CD8<sup>+</sup> T cells regulate tumour ferroptosis during cancer immunotherapy[J]. *Nature*, 2019, 569(7755):270-274.

[6] 曹毛毛, 陈万青. GLOBOCAN 2020 全球癌症统计数据解读[J]. *中国医学前沿杂志(电子版)*, 2021, 13(3):63-69.

[7] Sachdev JC, Sandoval AC, Jahanzeb M. Update on precision medicine in breast cancer[J]. *Cancer Treat Res*, 2019, 178:45-80.

[8] Heeke AL, Tan AR. Checkpoint inhibitor therapy for metastatic triple-negative breast cancer[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2021, 40(2):537-547.

[9] Bagchi S, Yuan R, Engleman EG. Immune checkpoint inhibitors for the treatment of cancer: clinical impact and mechanisms of response and resistance [J]. *Annu Rev Pathol*, 2021, 16:223-249.

[10] Cortes J, Cescon DW, Rugo HS, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial[J]. *Lancet*, 2020, 396(10265):1817-1828.

[11] 卢雯平, 徐兵河, 姜翠红, 等. 中药对中晚期三阴乳腺癌的生存影响及中医治疗策略探讨[J]. *世界中医药*, 2013, 8(1):53-55.

[12] 李朵璐, 张待娣, 杨盟, 等. 四君子汤提取物对人乳腺癌 MDA-MB-468 细胞生长的抑制作用[J]. *中草药*, 2020, 51(4):1037-1043.

[13] Lei G, Zhuang L, Gan B. Targeting ferroptosis as a vulnerability in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22(7):381-396.

[14] Wan Y, Liu D, Xia J, et al. Ginsenoside CK, rather than Rb1, possesses potential chemopreventive activities in human gastric cancer via regulating PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B signal pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13:977539.

[15] Zhang C, Liu X, Jin S, et al. Ferroptosis in cancer therapy: a novel approach to reversing drug resistance[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1):47.

(收稿日期:2024-01-25)