【基础研究】

甘草干姜汤对小鼠乳腺癌细胞侵袭、迁移及异常转化的影响

薛 军[1]，单世胜[2*]
（1.陕西省三原县医院普外二科，陕西三原 713800；2.咸阳市中心医院甲乳外科，陕西咸阳 712000）

摘要：目的 探讨甘草干姜汤对小鼠乳腺癌 4T1 细胞上皮 - 间质转化及侵袭的影响。**方法** 将 4T1 细胞接种至小鼠腋下造模，造模成功后分为对照组（不干预）和中药组（0.9 g/kg 甘草干姜汤，连续 20 d），每组 20 只。采用酶联免疫吸附法检测光密度，计算腹腔巨噬细胞增殖抑制率；通过 Transwell 检测并比较两组细胞侵袭和迁移力；创伤愈合试验检测细胞的愈合率；上皮 - 间质转化相关蛋白表达试验检测细胞的异常转化情况。**结果** 与同组 6 h 时，两组其他时间点细胞增殖抑制率、侵袭力、迁移力及愈合率均增高（$P < 0.05$）；在 6、12、18 及 24 h 时，中药组细胞增殖抑制率、侵袭力、迁移力及愈合率均明显高于对照组（$P < 0.05$）；中药组上皮间质未转化发生率明显低于对照组，上皮标记物缺失异常转化发生率高于对照组，差异均有统计学意义（$P < 0.05$）。**结论** 甘草干姜汤可抑制小鼠乳腺癌 4T1 细胞侵袭、迁移、细胞愈合及上皮 - 间质转化。

关键词：甘草干姜汤；乳腺癌；肿瘤相关巨噬细胞；乳腺癌 4T1 细胞；侵袭能力
中图分类号：R-33 **文献标志码：**A **文章编号：**1672-9188(2025)07-0646-005
引用：薛军, 单世胜. 甘草干姜汤对小鼠乳腺癌细胞侵袭、迁移及异常转化的影响[J]. 世界临床药物, 2025, 46(7): 646-650.
DOI：10.13683/j.wph.2025.07.003

Effect of licorice and dried ginger decoction on invasion, migration and abnormal transformation of mouse breast cancer cells

XUE Jun[1], SHAN Shisheng[2*]
(*1. Department of General Surgery Ⅱ, Sanyuan County Hospital, Sanyuan 713800, Shaanxi Province, China;*
2. Department of Thyroid and Breast Surgery, Xianyang Central Hospital, Xianyang 712000, Shaanxi Province, China)

Abstract: ***Objective*** To explore the effect of licorice and dried ginger decoction on epithelial-mesenchymal transition and invasion of breast cancer 4T1 cells in mice. ***Methods*** 4T1 cells were inoculated into the armpits of mice for modeling. After successful modeling, the mice were divided into the control group (without intervention) and the traditional Chinese medicine (TCM) group (0.9 g/kg licorice and dried ginger decoction for 20 consecutive days), with 20 mice in each group. The optical density was detected by enzyme-linked immunosorbent assay, and the proliferation inhibition rate of peritoneal macrophages was calculated. The invasion and migration abilities of cells were compared by Transwell assay. The wound healing test was used to detect the cell healing ability, and the epithelial-mesenchymal transition-related protein expression test was used to detect the abnormal transformation of cells. ***Results*** Compared with the same group at 6 hours, the cell proliferation inhibition rate, invasiveness, migration ability and healing rate at other time points in both groups were all increased ($P<0.05$). At 6, 12, 18 and 24 hours, the cell proliferation inhibition rate, invasiveness, migration ability and healing rate of the TCM group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). The incidence of

收稿日期：2024-09-29
作者简介：薛军，主治医师，研究方向：中药抗肿瘤转移的机制研究。
通信作者：单世胜，副主任医师，研究方向：中西医结合防治乳腺恶性肿瘤的基础与临床研究。
基金项目：陕西省教育厅2021年度青年创新团队建设科研计划项目(21JP012)

epithelial-mesenchymal non-transformation in the TCM group was significantly lower than that in the control group, and the incidence of abnormal transformation with epithelial marker deletion was higher than that in the control group, and the difference were statistically significant（$P<0.05$）. ***Conclusion*** Licorice and dried ginger decoction can inhibit the invasion, migration, cell healing and epithelial-mesenchymal transition of breast cancer 4T1 cells in mice.

Key words: licorice and dried ginger decoction; breast cancer; tumor-associated macrophage; breast cancer 4T1 cell; invasion ability

乳腺癌是女性群体目前发病率较高的恶性肿瘤疾病之一[1]，其在恶性肿瘤的发病率约占 25%[2]，死亡率占 15%[3]。放化疗作为乳腺癌常规治疗手段之一，尽管疗效明确，但其伴随的不良反应较大、患者耐受性较差。基于此，研究者正积极探索如免疫疗法、中医治疗等的新型治疗策略，以期提高疗效，减轻不良反应。在传统中医学中，乳腺癌被称为“乳岩”，其主要由气滞、血瘀、痰凝以及毒邪积聚等形成。脾主运化，脾虚则生痰，痰瘀互结是肿瘤的重要病机[4]。4T1 细胞系乳腺癌细胞是中活性与功能均较显著的细胞[5]。研究[6]表明，甘草干姜汤对乳腺癌小鼠的肿瘤进展有明显抑制作用。故本研究拟探讨甘草干姜汤对乳腺癌 4T1 细胞上皮-间质转化及侵袭的影响，分析甘草干姜汤在乳腺癌治疗中潜在作用机制，旨在为临床提供理论依据，报告如下：

1 材料与方法

1.1 材料

四周龄白变种 SPF 级小鼠共 40 只，体质量（18.12±0.28）g，小鼠使用许可证 SYXK（苏）2023-0001，生产许可证：SCXK（京）2019-0004。4T1 小鼠乳腺癌细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库（YS-X0565）。小鼠雌雄分笼饲养，室温（22±2）℃，湿度 45% ～ 55%，自然昼夜节律照明，自由摄取水食。

胎牛血清购自上海圣达生物科技有限公司（SH30070），无血清细胞冻存培养基 -164 购自美国 Gibco（MFCD00217820）。甘草（1801001）、干姜（1806001）饮片购自安国市昌达中药材饮片有限公司。

1.2 造模分组与方法

将 4T1 细胞在 10% 胎牛血清培养皿中进行培养，置于 37 ℃，5% 二氧化碳及饱和湿度（44 g/m^3）的培养箱中常规培养，用 0.25% 胰酶消化传代，细胞处于对数生长期。通过皮下接种方式，接种至小鼠右侧腋下。在接种后的 2 周内观察到肿瘤的形成。通过手动触诊和使用超声波确认肿瘤的存在，即造模成功。

将小鼠分为对照组、中药组，每组 20 只。从接瘤后次日起，中药组参考辛雨濛等[6]研究中的小鼠给药剂量。称取甘草饮片 30 g，干姜饮片 15 g，加入 450 mL 水，将中药药材投入圆底烧瓶，使用加热回流的方式进行提取，从微沸时开始计时，2 h 后转移药液，再加入 360 mL 水进行提取，从再次微沸时开始计时，1.5 h 后与之前药液合并，离心除渣后利用旋转蒸发仪浓缩，将浓缩后的药液置于 −80 ℃预冻，过夜后使用冻干机，冻干 48 h，得到中药冻干粉。溶于水后，密封于 4 ℃冰箱保存。中药组予 0.9 g/kg 甘草干姜汤灌胃，一日 1 次，连续 20 d。对照组不给药干预。

1.3 Transwell 检测侵袭、迁移

提取两组小鼠腹腔巨噬细胞（peritoneal macrophage，PM），使用无菌生理盐水灌洗小鼠腹腔，收集灌洗液并离心 5 min，得到细胞沉淀。使用细胞计数板对细胞进行计数，并调节细胞浓度至 1×10^6 细胞 /mL 浓度。将 5×10^5/ 孔 PM 接种于 6 孔培养板底部，将 5×10^5/ 孔 4T1 细胞接种在与 6 孔培养板匹配的 Transwell 悬挂小室，二者分开培养至细胞贴壁后，将贴有 4T1 细胞的小室移至 PM

的 6 孔板中，建立上下双层细胞共培养体系，两组放入仅有培养基无PM细胞的Transwell悬挂小室中，继续培养 24 h。随时观察细胞形态进行细胞密度观察，测定 6、12、18 以及 24 h 后的穿膜细胞数，侵袭力检测使用 Transwell 小室法，结晶紫染色后用酶标仪测定吸光度；迁移力检测采用划痕实验法，通过图像分析软件测量划痕区域宽度变化率。宽度变化率＝（初始时间划痕宽度－ t 时划痕宽度）/ 初始划痕宽度 ×100%。

1.4 细胞增殖抑制率及愈合率

采用酶标仪 492 nm 处检测光密度（optical density，OD）值，计算 6、12、18 以及 24 h 后的细胞增殖抑制率。增殖抑制率＝（$OD_{空白孔}$－$OD_{样品孔}$）/ $OD_{空白孔}$ ×100%。

取样拍照进行计数统计以测定细胞愈合率。异常转化：细胞培养过程中上皮间质未转化、上皮标记物缺失及间质标记物缺失的发生情况。

1.5 统计学分析

采用 SPSS19.0 统计软件，符合正态分布的计量资料以（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较采用 t 检验，比较同一组在不同时间点或不同条件下的平均值采用 F 检验；非正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示，组间比较采用非参数检验。计数资料以 n(%) 表示，组间比较采用 Fisher 确切概率法进行组间差异检验，设定检验水准 $\alpha = 0.05$。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组小鼠细胞增殖抑制率比较

与同组 6 h 比较，两组 12、18 以及 24 h 细胞增殖抑制率均增高（$P < 0.05$）；于 6、12、18 以及 24 h，中药组细胞增殖抑制率均高于对照组，差异有统计学意义（$P < 0.05$），见表 1。

2.2 两组小鼠细胞侵袭力比较

与同组 6 h 比较，两组 12、18 以及 24 h 细胞侵袭力均增高（$P < 0.05$）；于 6、12、18 以及 24 h，中药组细胞侵袭力均高于对照组，差异具有统计学意义（$P < 0.05$），见表 2。

表 1 两组小鼠细胞增殖抑制率比较（$\bar{x}\pm s$，单位：%）

Table 1 Comparison of cell proliferation inhibition rate between the two groups ($\bar{x}\pm s$, unit: %)

组别	6 h	12 h	18 h	24 h
中药组（n=20）	0.54±0.15	0.59±0.04[a]	0.69±0.02[ab]	0.78±0.02[abc]
对照组（n=20）	0.32±0.14	0.33±0.15[a]	0.34±0.16[ab]	0.41±0.03[abc]
t值	4.795	5.914	6.853	7.952
P值	＜0.001	＜0.001	＜0.001	＜0.001

注：与同组 6 h 比较，[a]$P < 0.01$；与同组 12 h 比较，[b]$P < 0.01$；与同组 18 h 比较，[c]$P < 0.01$。

Note: vs. the same group at 6 h, [a]$P < 0.01$; vs. the same group at 12 h, [b]$P < 0.01$; vs. the same group at 18 h, [c]$P < 0.01$.

表 2 两组细胞侵袭力比较（$\bar{x}\pm s$）

Table 2 Comparison of cell invasiveness between the two groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	6 h	12 h	18 h	24 h
中药组（n=20）	0.40±0.06	0.50±0.07[a]	0.68±0.07[ab]	0.78±0.09[abc]
对照组（n=20）	0.28±0.03	0.29±0.06[a]	0.34±0.09[ab]	0.39±0.10[abc]
χ^2值	14.142	14.132	13.125	12.141
P值	＜0.001	＜0.001	＜0.001	＜0.001

注：与同组 6 h 比较，[a]$P < 0.01$；与同组 12 h 比较，[b]$P < 0.01$；与同组 18 h 比较，[c]$P < 0.01$。

Note: vs. the same group at 6 h, [a]$P < 0.01$; vs. the same group at 12 h, [b]$P < 0.01$; vs. the same group at 18 h, [c]$P < 0.01$.

2.3 两组小鼠细胞迁移力比较

同组间比较，两组 12、18 以及 24 h 细胞迁移力均较 6 h 升高（$P < 0.05$）。于 6、12、18 以及 24 h，中药组细胞宽度变化率均高于对照组，差异具有统计学意义（$P < 0.05$），见表 3。

2.4 不同时间两组小鼠细胞的愈合率比较

与同组 6 h 比较，两组 12、18 以及 24 h 细胞愈合率均较 6 h 升高（$P < 0.05$）。于 6、12、18 以及 24 h，中药组细胞愈合率均明显高于对照组，差异具有统计学意义（$P < 0.05$），见表 4。

表 3 两组细胞迁移力比较（$\bar{x}\pm s$，单位：%）

Table 3 Comparison of cell migration between the two groups ($\bar{x}\pm s$, unit: %)

组别	6 h	12 h	18 h	24 h
中药组（n=20）	53.65±8.03	76.35±6.28[a]	78.64±7.64[ab]	94.26±8.94[abc]
对照组（n=20）	19.59±4.01	24.16±4.49[a]	33.15±5.25[ab]	49.29±6.06[abc]
χ^2值	3.521	3.152	5.122	7.212
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：与同组 6 h 比较，[a]$P<0.01$；与同组 12 h 比较，[b]$P<0.01$；与同组 18 h 比较，[c]$P<0.01$。

Note: vs. the same group at 6 h, [a]$P<0.01$; vs. the same group at 12 h, [b]$P<0.01$; vs. the same group at 18 h, [c]$P<0.01$.

表 4 两组小鼠细胞愈合率比较（$\bar{x}\pm s$，单位：%）

Table 4 Comparison of cell healing rate between the two groups ($\bar{x}\pm s$, unit: %)

组别	6 h	12 h	18 h	24 h
中药组（n=20）	89.49±10.65	98.17±11.29[a]	102.39±12.37[ab]	119.27±11.37[abc]
对照组（n=20）	51.04±12.37	60.25±12.13[a]	65.29±13.35[ab]	69.09±12.43[abc]
t值	10.534	12.397	13.567	14.543
P值	0.000	0.000	0.000	0.000

注：与同组 6 h 比较，[a]$P<0.01$；与同组 12 h 比较，[b]$P<0.01$；与同组 18 h 比较，[c]$P<0.01$。

Note: vs. the same group at 6 h, [a]$P<0.01$; vs. the same group at 12 h, [b]$P<0.01$; vs. the same group at 18 h, [c]$P<0.01$.

2.5 两组小鼠细胞异常转化率

相比对照组，中药组上皮间质未转化发生率更低，上皮标记物缺失的异常转化发生率更高，差异均具有统计学意义（$P<0.05$），间质标记物缺失转化发生率比较无统计学意义（$P>0.05$），见表 5。

表 5 两组细胞异常转化率比较［n(%)］

Table 5 Comparison of abnormal conversion rates of cells between the two groups［n(%)］

组别	上皮间质未转化	上皮标记物缺失	间质标记物缺失
中药组(n=20)	2(10.00)	10(50.00%)	10(50.00%)
对照组(n=20)	17(85.00)	2(10.00%)	7(35.00%)
P值	<0.001	0.005	0.342

3 讨论

乳腺癌细胞存在较高的侵袭性，肿瘤细胞向其他组织扩散、转移而造成不同程度的损伤，最终导致患者死亡。乳腺癌相关 PM 在肿瘤发病过程中随内、外环境产生不同反应，参与肿瘤细胞的侵袭、迁移等过程，是患者预后转归的重要细胞，乳腺癌相关 PM 中有过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子（peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator，PGC）-1α，PGC-1α 能明显降低肿瘤细胞中蛋白质的表达水平[15]。高水平的 PGC-1α 会使机体线粒体功能亢进，导致其氧化应激反应不断增强，同时产生更多物质与能量诱导肿瘤细胞进一步侵袭、扩散与迁移。肿瘤细胞可能利用氧化应激来激活信号传导途径，促进细胞增殖和生存。肿瘤细胞能通过调节氧化还原平衡来抵抗氧化应激的损伤，从而获得生存优势。甘草补中益气，干姜温阳脾肺，全方躁烈性不强，药性平和，具有补中复阳之功。现代中医治疗乳腺癌多为补虚益肾，疏肝健脾行气养血。

本研究结果显示，不同时间点中药组细胞增殖抑制率均高于对照组，表明甘草干姜汤对细胞生长有抑制作用，与临床研究[6]结果一致。有研究[16]证实，甘草组方对肿瘤细胞 SGC-7901 具有抑制增殖能力，提示甘草组方可阻断肿瘤细胞增殖。

本研究结果显示，不同时间点两组细胞的侵袭力、迁移力、细胞愈合率均明显高于对照组，表明甘草和干姜中的活性成分可通过影响细胞外基质的组成或结构，使细胞更易穿透基质。此外，可通过刺激细胞增殖或改善细胞存活率来增强细胞的迁移和侵袭能力。

相比对照组，中药组上皮间质未转化发生率更低，上皮标记物缺失的异常转化发生率更高，说明甘草干姜汤可抑制乳腺癌 4T1 细胞侵袭、迁移、细胞愈合及上皮 - 间质转化能力，进一步缓解肿瘤细胞的进展，与研究[17]结果基本一致。上皮 - 间质转化是肿瘤细胞侵袭和转移的重要机制，细胞通过失去上皮特性而获得间质特性，从而增强迁移和侵袭力。在一些情况下，抑制上皮 - 间质转化可以遏

制肿瘤的进展。有研究[18]表明，甘草干姜汤能提高肺癌小鼠肺组织超氧化物歧化酶和谷胱甘肽的水平，降低脂质过氧化物水平，清除体内过多的自由基，增强抗氧化防御系统，同时调控转化生长因子β和沉默信息调节因子2相关酶1的表达，抑制肺纤维化。本次研究结果提示，甘草干姜汤同样具有一定抗乳腺癌作用，可能因甘草中的甘草酸和干姜中的姜辣素等成分具有抗炎作用。慢性炎症与肿瘤的发展密切相关，因此抗炎作用可能有助于减少肿瘤的形成和发展。另研究[19]表明，甘草干姜汤可能通过诱导肿瘤细胞凋亡来抑制肿瘤生长。

4 结论

综上所述，PGC-1α与乳腺癌4T1细胞侵袭、迁移、细胞愈合及上皮-间质转化均相互联系，增强上皮间质转化进一步促进乳腺癌细胞的进展，可能成为其临床治疗的新靶点。

参考文献：

[1] 陈为军, 王晓丹, 都婧, 等. 白细胞介素-6/信号转导和转录激活因子-3信号通路关键分子与乳腺癌易感性关系[J]. 中华内分泌外科杂志, 2024, 18(3): 409-413.

[2] 袁洋, 江泽飞. 乳腺癌临床研究年度进展2023[J]. 中华医学杂志, 2024, 104(22): 2087-2091.

[3] 国家肿瘤质控中心乳腺癌专家委员会, 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会, 中国抗癌协会肿瘤药物临床研究专业委员会. 中国晚期乳腺癌规范诊疗指南(2024版)[J]. 中华肿瘤杂志, 2024, 46(12): 1079-1106.

[4] 李俊峰, 杨小蒨, 窦建卫. 从《医宗金鉴》乳腺癌方药论乳腺癌病因病机及治法[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(3): 1783-1785.

[5] DANG X, DU G, WEI H, *et al*. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1α/HSF1 axis effectively alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via suppressing oxidative stress and inflammatory response[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(1): 544-551.

[6] 辛雨濛, 梁桓熙, 孙震晓. 甘草干姜汤抗小鼠乳腺癌实验研究[J]. 癌变·畸变·突变, 2022, 34(2): 88-92.

[7] CHEN X, JIA G, LIU G, *et al*. Effects of apple polyphenols on myofiber-type transformation in longissimus dorsi muscle of finishing pigs[J]. Animal Biotechnol, 2020, 32(2): 246-253.

[8] LAGORY EL, WU C, TANIGUCHI CM, *et al*. Suppression of PGC-1α is critical for reprogramming oxidative metabolism in renal cell carcinoma[J]. Cell Rep, 2015, 12(1): 116-127.

[9] 代朦, 靳鑫, 雷优扬, 等. 过表达miR-382的肿瘤相关巨噬细胞对三阴性乳腺癌生物学特性的影响[J]. 第三军医大学学报, 2018, 40(15): 1375-1382.

[10] LEBLEU VS, OCONNELL JT, GONZALEZ HERRERA KN, *et al*. PGC-1α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis[J]. Nat Cell Biol, 2014, 16(10): 992-1003.

[11] WERNER L, DREYER JH, HARTMANN D, *et al*. Tumor-associated macrophages in classical Hodgkin lymphoma: hormetic relationship to outcome[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 9410.

[12] DATTACHOUDHURY S, SHARMA R, KUMAR A, *et al*. Sorafenib inhibits proliferation, migration and invasion of breast cancer cells[J]. Oncology, 2020, 98(7): 478-486.

[13] XU X, ZHU Z, XU Y, *et al*. Effects of zinc finger protein 403 on the proliferation, migration and invasion abilities of prostate cancer cells[J]. Oncol Rep, 2020, 44(6): 2455-2464.

[14] ZENG Q, JIN F, QIAN H, *et al*. The miR-345-3p/PPP2CA signaling axis promotes proliferation and invasion of breast cancer cells[J]. Carcinogenesis, 2021, 43(2): 150-159.

[15] 李占勇, 刘志杰, 李蕾, 等. δ-catenin通过PI3K/AKT信号通路促进乳腺癌细胞上皮间质转化的机制研究[J]. 北京医学, 2022, 44(11): 975-978.

[16] 金文伟, 李湧健, 江国荣, 等. 四逆汤不同配比甘草组方对胃癌细胞SGC-7901体外抑制作用的实验研究[J]. 内蒙古中医药, 2014, 33(35): 109-110..

[17] 辛雨濛, 梁桓熙, 余悦华, 等. 基于网络药理学和分子对接法预测甘草干姜汤抗乳腺癌的主要活性成分及作用机制[J]. 癌变·畸变·突变, 2022, 34(1): 7-13.

[18] 刘秋月. 基于数据挖掘探讨荣震教授运用中药联合EGFR-TKIs治疗NSCLC的用药规律和临证经验[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2022.

[19] 余悦华, 梁桓熙, 辛雨濛, 等. 甘草干姜汤的抗胃癌作用及其机制研究[J]. 癌变·畸变·突变, 2022, 34(3): 219-226.

（编辑：沈佳婕）