DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.04.029

汉黄芩素通过调控巨噬细胞极化抑制心肌梗死后乳腺癌肺转移的作用研究

许振坤[1],杨文杰[2],李宏宇[1],李梦瑶[2],任秀云[2],曹贤海[1],刘昕月[1],陈璐[1],王虹[2]
(1.天津中医药大学测试中心,天津 301617;2.天津中医药大学医学技术学院,天津 301617)

摘要:目的 探讨汉黄芩素对心肌梗死(Myocardial infarction,MI)后乳腺癌肺转移的药理作用及其机制,为乳腺癌肺转移的治疗提供潜在药物以及实验基础。方法 实验通过6~7周雌性BALB/c小鼠构建心肌梗死乳腺癌小鼠模型,检测汉黄芩素对心肌梗死后乳腺癌肺转移的影响及对小鼠肿瘤中巨噬细胞的影响。体外诱导THP-1、RAW264.7及骨髓来源巨噬细胞(Bone marrow-derived macrophages,BMDM)细胞构建巨噬细胞极化模型,检测汉黄芩素对巨噬细胞极化的影响及调控极化关键蛋白的变化。结果 与模型组小鼠相比,汉黄芩素组小鼠肺部肿瘤转移灶数显著减少,乳腺肿瘤重量显著降低,心功能和心脏炎症明显改善,肿瘤中M2型巨噬细胞表达显著降低。体外实验显示,汉黄芩素显著抑制巨噬细胞M2极化,显著降低信号转导和转录激活剂6(Signal transducer and activator of transcription 6,STAT6)磷酸化;显著阻抑MDA-MB 231细胞迁移。结论 汉黄芩素可以遏制心肌梗死后乳腺腺癌肺转移,其作用机制可能是通过抑制STAT6磷酸化进而影响肿瘤中巨噬细胞M2极化实现的。

关键词:汉黄芩素;心肌梗死;乳腺癌;巨噬细胞极化
中图分类号:R285.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2026)04-0136-10

Effect of Wogonin in Suppressing Lung Metastasis of Breast Cancer After Myocardial Infarction by Regulating Macrophage Polarization

XU Zhenkun[1],YANG Wenjie[2],LI Hongyu[1],LI Mengyao[2],REN Xiuyun[2],CAO Xianhai[1],LIU Xinyue[1],CHEN Lu[1],WANG Hong[2]
(1. Testing Center,Tianjin University of Traditional Chinese Medicine,Tianjin 301617,China;
2. School of Medical Technology,Tianjin University of Traditional Chinese Medicine,Tianjin 301617,China)

Abstract:*Objective* This study explored the pharmacological effect and mechanism of wogonin on lung metastasis of breast cancer after myocardial infarction,and provided potential drugs and experimental basis for the treatment of lung metastasis of breast cancer. *Methods* In the experiment,the mouse model of myocardial infarction and breast cancer was established by 6-7 weeks old female balb/c mice,and the effect of wogonin on lung metastasis of breast cancer after myocardial infarction and macrophages in mouse tumors was detected. THP-1,RAW264.7 and bone marrow-derived macrophages(BMDM) cells were induced in vitro to construct macrophage polarization model,and the effect of wogonin on macrophage polarization and the changes of key proteins regulating polarization were detected. *Results* The results showed that compared with those of the model group,the number of lung tumor metastasis,the weight of breast tumor,cardiac function and cardiac inflammation were significantly reduced,and the expression of M2 macrophages in tumor was significantly reduced in the wogonin group. In vitro experiments showed that wogonin significantly inhibited the M2 polarization of macrophages,reduced the phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 6(STAT6) and inhibited the migration of MDA-MB 231 cells. *Conclusions* The above results indicate that wogonin can inhibit the lung metastasis of breast adenocarcinoma after myocardial infarction,and its mechanism may be realized by inhibiting the phosphorylation of STAT6 and then affecting the M2 polarization of macrophages in the tumor.

Keywords:wogonin;myocardial infarction;breast cancer;macrophage polarization

基金项目:国家自然科学基金项目(82274135,82174205);天津市科技计划项目(23ZYJDSS00020)

作者简介:许振坤(1998-),男,山东泰安人,硕士在读,研究方向:中药药理。
通讯作者:陈璐(1989-),女,江西吉安人,副研究员,硕士研究生导师,博士,研究方向:中药药理。E-mail:chenlutjutcm@tjutcm.edu.cn。
王虹(1974-),女,山东烟台人,教授,博士研究生导师,博士,研究方向:中药药理。E-mail:wanghongsys@tjutcm.edu.cn。

乳腺癌是女性最常见的癌症,超过90%乳腺癌患者死亡与乳腺癌转移相关,其中乳腺癌肺转移为最常见的转移情况[1-2]。心肌梗死(Myocardial infarction,MI)会促进癌症的发生及转移,临床数据统计发现心肌梗死患者患癌概率为健康人群的3.29倍[3-5],实验结果显示心肌梗死后,心脏小细胞外囊泡会促进癌细胞的增殖以及转移[6]。乳腺癌与心肌梗死也存在相关性,临床数据研究及Meta数据分析发现,乳腺癌患者心肌梗死死亡率上升1.98倍[7-9],实验研究结果显示心肌梗死后会加速乳腺癌的生长以及乳腺癌小鼠死亡[10]。

乳腺癌在肿瘤微环境中存在着大量的炎症细胞的浸润,其中以肿瘤相关巨噬细胞(Tumour-associated macrophages,TAMs)最为丰富。TAMs具有高度的可塑性在不同环境因素下,它们主要分化为2个亚型:促炎表型(M1型)和抗炎表型(M2型)[11-12]。其中M2极化的巨噬细胞可以通过调节血管生成因子和细胞外基质调节因子等细胞因子促进肿瘤进展和肿瘤相关血管生成[13-14]。

汉黄芩素为黄芩中的重要有效成分,研究表明汉黄芩素不仅具有心血管保护作用,该化合物还具有显著的抗癌效果。最近研究发现汉黄芩素可以抑制三阴性乳腺癌中的血管生成、诱导皮肤癌细胞的凋亡,抑制肺癌细胞和结肠癌等癌细胞黏附和迁移能力,同时汉黄芩素还可以通过改善肿瘤免疫微环境、调节免疫系统来发挥治疗癌症的作用[15-17]。因此本研究以汉黄芩素为研究对象,探究汉黄芩素是否能通过抑制巨噬细胞M2极化从而减少MI介导的乳腺癌肺转移。

1 材料

1.1 *动物* 健康BALB/c小鼠,雌性,24只,6~7周龄;健康C57BL/6,雄鼠,6只,8~12周龄购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,动物许可证号SCXK(京)2019-0010,在天津中医药大学实验动物中心饲养,室温20~25 ℃。实验动物所有操作均严格按照天津中医药大学动物伦理委员会标准执行(动物伦理号:TCM-LAEC2018028)。

1.2 *细胞* 小鼠RAW264.7巨噬细胞株购自北京协和细胞库,THP-1人类白血病单核细胞系购自北纳生物细胞库,4T1、MDA-MB-231购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.3 *药品与试剂* 汉黄芩素标准品(HPLC≥98%)(武汉德斯特公司,货号DC0037-1000),DMSO、三溴乙醇和叔戊醇(德国Sigma-Aldrich公司,货号分别为D2650、T48402-100G和152463-250ML);Stat-6 antibody和p-Stat-6 antibody(美国Cell Signaling Technology公司,货号3230和66245);CD68 antibody(英国Abcam公司,货号ab955);MTS(美国promega公司,货号G5421);重组小鼠IL-4、重组小鼠IL-13、重组小鼠M-CSF(美国Peprotech公司,货号214-14、210-13、315-02);PMA(美国MedChemExpress公司,货号16561-29-8);HE染色液(上海碧云天生物技术有限公司,货号C0105);BSA粉末(德国biofrox公司,货号4240GR100);柠檬酸纳抗原修复液(北京索莱宝生物科技有限公司,货号C1032);0.5%羧甲基纤维素钠(瑞典MCE公司,货号9004-32-4);TGF-β1(中国Novoprotein公司,货号CA59)。

1.4 *仪器* CO_2恒温培养箱(美国Thermo公司,型号HeraceII VIOS 160I);多功能酶标仪(美国Molecula Device公司,型号Flex Station 3);生物安全柜(力康生物医疗科技控股有限公司,型号NU-430-60E);低温高速离心机(德国Eppendorf公司);倒置显微镜(日本尼康公司,型号TS2);实时定量PCR仪Q6(美国Applied Biosystems公司);小动物呼吸机(上海Harvard Inspira,型号Harvard USA ventilators687);体视显微镜、高分辨率超声仪(加拿大Visual Sonics公司,型号分别为LEICA S8APO、Vevo 3100 TM);小动物MI手术器械包(中国瑞沃德公司);双极电凝笔(美国bovie公司);IncuCyte Zoom(美国ESSEN公司,型号4473)。

2 方法

2.1 *小鼠乳腺癌模型的制备* 选取6~7周龄雌性BALB/c小鼠,取4T1细胞(1×10^7个/mL),100 μL/只无菌条件下接种于右侧倒数第二对乳腺脂肪垫下,建立小鼠乳腺癌原位接种瘤模型[18],每日观察肿瘤生长情况。

2.2 *小鼠心肌梗死模型的制备* 建立乳腺癌原位接种瘤模型成功的小鼠,于接种乳腺癌模型3 d后进行心脏功能学检测,纳入实验小鼠的标准为:射血分数(Left ventricular ejection fractions,LVEF)≥50%,左室短轴缩短分数(Left ventricular fractional shortening,LVFS)≥30%。按照如下过程建立小鼠左前降支永久性结扎模型[19]:随机编号(称量体质量),麻醉(腹腔注射Avertin,0.33 mL/20 g),气管插管,分离胸大肌和胸小肌,连接小动物呼吸机(参数为weight 0.05 kg,潮气量为0.15 ccH_2O,呼吸频率为145次/min,呼吸比为1∶1),暴露心脏,结扎心尖[通过8/0单丝尼龙缝合线将左心耳到心尖的1/3~1/2处(冠状动脉左前降支2 mm)]穿线并永久性结扎,结扎后可见结扎点以下明显的苍白缺血区),缝合胸部肌层,最后拔管前将胸腔抽为负压。对照组仅开胸后用8/0单丝尼龙缝合线在左心耳到心尖的1/3~1/2处穿过不结扎,其他操作如上。术后将小鼠随机分为3组,即假手术组、模型组(0.5% CMC-Na,灌胃)、汉黄芩素[50 mg/(kg·d),灌胃]组,每组8只。术后1 h给药,术后药物治疗组给药1次/d,连续给药14 d,对照组、模型组给予等体积0.5% CMC-Na。

2.3 *心脏功能学检测* 使用Vevo 3100TM多普勒超声仪进行心脏功能学检测,超声前通过腹腔注射Avertin(0.11 mL/20 g)对小鼠进行麻醉。麻醉后小鼠仰卧位固定于感应板上,四肢均涂抹适量导电液,小鼠胸部覆盖适量耦合剂。通过Vevo 3100TM多普勒超声仪在M mode超声心动图模式中采集二尖瓣前后叶水平的左心室收缩和舒张期运动曲线,取3个心动周期求平均值,分别测量LVFS、LVEF、左心室舒张末期容积(Left ventricular end-diastolic volume,LVEDV)和左心室收缩末期容积(Left ventricular end-systolic volume,LVESV)。

2.4 *免疫组化染色* 随机选取每组3只鼠心脏进行固定,固定完成后依次进行石蜡包埋、切片、脱蜡、抗原修复、BSA封闭45 min、滴加一抗(CD206,1∶200稀释)孵育过夜,次日洗涤后滴加二抗(1∶100稀释)孵育1 h,PBS洗涤3次后DAB显色,苏木素复染3 min,脱水封片后拍照。

2.5 *细胞培养* RAW264.7细胞株培养基为90% DEME+10% FBS(热灭活血清)+1% PS(双抗),培养条件为37 ℃,95%湿度,5% CO_2;换液传代,取对数生长的细胞用于实验。THP-1细胞株培养基为90% 1640+10% FBS(热灭活血

清)+1% PS(双抗),其余培养条件与RAW264.7一致。骨髓来源单核巨噬细胞(BMDM)从8~12周龄的C57BL/6小鼠骨髓中获得,经过过滤、红细胞裂解、离心等步骤后,培养于1640完全培养基(与THP-1细胞株培养基一致),1640完全培养基中重组小鼠M-CSF浓度为20 ng/mL,次日进行半量换液后,每隔1 d进行完全换液,1周后即可在体外诱导分化为BMDM。MDA-MB-231乳腺癌细胞以含5% FBS的1640完全培养基常规培养。

2.6 M2型巨噬细胞 THP-1细胞经佛波酯(Phorbol 12-myristate 13-acetate,PMA)刺激24 h后给予白细胞介素-4(Interleukin-4,IL-4)/白细胞介素-13(Interleukin-13,IL-13)(10 ng/mL IL-4+10 ng/mL IL-13)诱导24 h后成为M2型巨噬细胞,M2型巨噬细胞培养于含10% FBS(HI)的DMEM完全培养基进行常规培养。RAW264.7巨噬细胞给予IL-4/IL-13(10 ng/mL IL-4+10 ng/mL IL-13)诱导24 h后成为M2型巨噬细胞,M2型巨噬细胞培养于含10% FBS(HI)的DMEM完全培养基进行常规培养。BMDM经过巨噬细胞集落刺激因子(Macrophage colony-stimulating factor,M-CSF)诱导7 d成为骨髓来源单核巨噬细胞,通过IL-4/IL-13(10 ng/mL IL-4+10 ng/mL IL-13)诱导骨髓来源单核巨噬细胞向M2型巨噬细胞极化,细胞培养于1640完全培养基。

2.7 MTS细胞活力 根据2.6将THP-1细胞诱导为M2型巨噬细胞,MDA-MB-231乳腺癌细胞以含10% FBS(HI)的DMEM完全培养基常规培养,分别取对数期细胞以5×10^3个/孔接种于96孔板中。实验中汉黄芩素浓度设立0、10、20、40、80、160 μmol/L 6个浓度梯度,每组6个副孔,进行细胞毒性检测。给药24 h后,避光加入20 μL/孔MTS溶液,置于孵箱中继续培养1 h后小心取出96孔板,放入多功能酶标仪中选择490 nm测量各孔的吸光值,记录数据。细胞存活率(%)=$(A_{实验孔}-A_{空白孔})/(A_{对照孔}-A_{空白孔})\times100\%$。

2.8 RT-qPCR 将2.2项所取的心脏及肿瘤样本随机选择3个放入离心管中,于冰上充分剪碎,每管1 mL PBS清洗1遍,4 ℃,2000 r/min,离心5 min;去除上清,每管加入1 mL Trizol UP,通过组织研磨器裂解组织至透明黏稠液体。根据试剂盒说明书进行RNA提取,检测RNA浓度,反转录cDNA,Qrt-PCR进行扩增。引物序列见表1。M2型巨噬细胞中RNA提取步骤细胞接种于为6孔板,每孔加入1 mL Trizol UP,冰上刮去收集细胞于1.5 mL离心管中,随后步骤如动物组织处理。

2.9 Western-blotting检测巨噬细胞M2极化关键蛋白STAT6磷酸化表达 RAW264.7巨噬细胞以1×10^6个/孔接种于6孔板中。细胞分为对照组、M2巨噬细胞模型组、汉黄芩素组(10、20、40 μmo/L),每组3个复孔,以未分化的M0型巨噬细胞为对照。细胞培养24 h后,置换成含有药物及诱导因子的完全培养液中。再次培养24 h后收集细胞,冻存于-80 ℃冰箱。后续依次进行蛋白提取、BCA蛋白定量法、蛋白浓度均一化,与上样缓冲液(5×)混匀,金属浴99 ℃,10 min使蛋白充分变性后,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,PVDF膜封闭,加入一抗,4 ℃孵育过夜,洗涤,加入二抗,室温孵育1~2 h,洗涤,显色,用Image J对条带进行灰度值计算。原代骨髓来源巨噬细胞以2×10^6个/孔接种于六孔板中。经M-CSF诱导7 d后将培养液置换为含有药物及诱导因子的完全培养液,分组同上。于24 h后收集细胞,-80 ℃冰箱中保存。其余步骤如RAW264.7巨噬细胞所示。

表1 引物序列

引物名称	引物序列
GAPDH	F 5'-CAACGGGAAACCCATCACCA-3'
	R 5'-ACGCCAGTAGACTCCACGACAT-3'
iNOS	F 5'-GTGTTCCACCAGGAGATGTTG-3'
	R 5'-CTCCTGCCCACTGAGTTCGTC-3'
IL-6	F 5'-TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC-3'
	R 5'-TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC-3'
IL-1β	F 5'-TCGCAGCAGCACATCAACAAGAG-3'
	R 5'-AGGTCCACGGGAAAGACACAGG-3'
MR	F 5'-CAAGGAAGGTTGGCATTTGT-3'
	R 5'-CCTTTCAGTCCTTTGCAAGC-3'
TGF-β	F 5'-CGCAACAACGCCATCTATGA-3'
	R 5'-ACCAAGGTAACGCCAGGAAT-3'
Arg-1	F 5'-AGCACTGAGGAAAGCTGGTC-3'
	R 5'-TACGTCTCGCAAGCCAATGT-3'
TNF-α	F 5'-CAGAAAGCATGATCCGCGAC-3'
	R 5'-GGTCTGGGCCATAGAACTGA-3'
IL-10	F 5'-CTGCTATGTTGCCTGCTCTTACTG-3'
	R 5'-GGGTCTGGCTGACTGGGAAG-3'
IGF-1	F 5'-TTATTTCAACAAGCCCACAGG-3'
	R 5'-CTTAGATCACAGCTCCGGA-3'

2.10 细胞划痕实验 THP-1单核细胞以1×10^6个接种于6孔板中,培养过夜。根据2.6及2.9进行分组及诱导M2巨噬细胞,收取细胞上清液,按照分组进行保存。MDA-MB-231细胞以5×10^4个/孔接种于96孔板中,每组3个副孔,培养24 h。细胞分为对照组、汉黄芩素组(包含3组浓度10、20、40 μmol/L)、汉黄芩素处理过的M2型巨噬细胞上清液组(汉黄芩素3组浓度处理,分别为10、20、40 μmol/L)以及M2型巨噬细胞上清液组。24 h后,对MDA-MB-231细胞进行细胞划痕实验,PBS去除掉落细胞,并按照分组进行给药,放入IncuCyte中,继续培养24 h。在此过程中使用倒置显微镜进行拍照。记录0、12、24 h时细胞前沿位置。测量0 h(细胞开始迁移前)与24 h划痕间隙宽度,通过二者宽度计算迁移率,计算公式为24 h迁移率=$(W_{0\,h}-W_{24\,h})/W_{0\,h}\times100\%$;W指划痕间隙宽度。

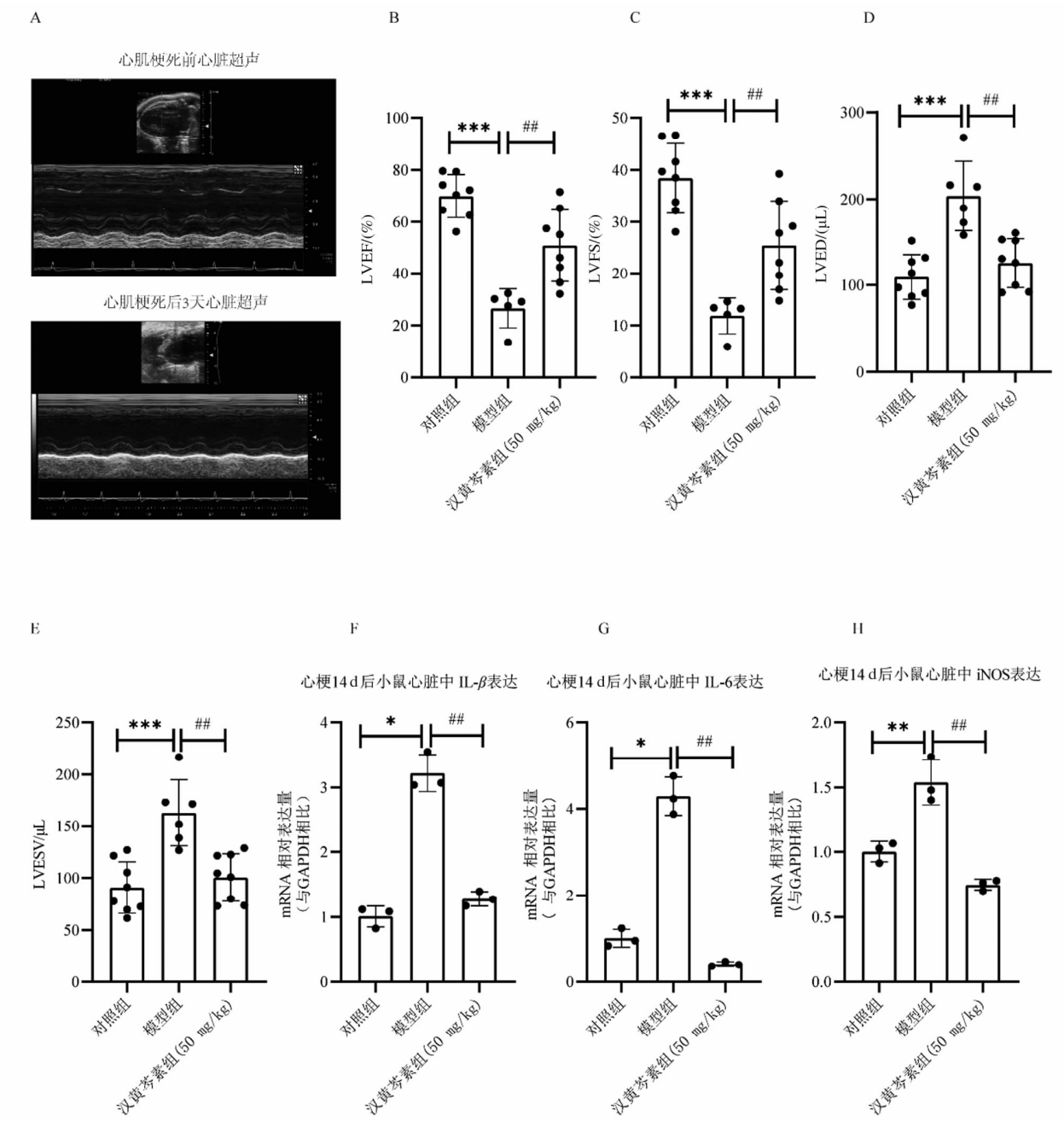
2.11 统计学方法 用SPSS 16.0软件进行统计分析。实验数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析,两两比较用配对样本t检验,$P<0.05$为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 汉黄芩素显著遏制心肌梗死后乳腺癌肺转移且显著降低乳腺癌肿瘤质量 建立乳腺癌原位接种瘤模型后结扎冠状动脉左前降支建立心肌缺血模型,连续给药14 d。14 d内小鼠体质量无显著变化。14 d后,取材称量小鼠肺部及肿瘤质量,结果显示小鼠肺部质量无显著改变;相比于对照组,模型组小鼠肿瘤质量显著增加($P<0.05$),汉黄芩素组和模型组相比,肿瘤组织质量显著下降($P<0.05$)。小鼠肺组织进行固定,显微镜下观察小鼠肺组织上的乳腺癌的肺转移情况。结果显示相比于对照组,模型组心肌梗死后肺部肿瘤转移灶数显著增加

($P<0.01$)；汉黄芩素组相比于模型组肺部肿瘤转移灶数显著下降($P<0.05$)。以上结果表明，汉黄芩素的干预能够有效抑制乳腺癌肺转移，并显著减轻乳腺癌肿瘤的重量，展示出对乳腺癌治疗的潜在价值，实验结果见插页XXⅢ图1。

3.2 汉黄芩素显著抑制心肌梗死后心功能的恶化，有效下调心脏炎症的表达水平 为了研究汉黄芩素对MI术后乳腺癌小鼠的心功能的影响，本实验在术前1天及术后3、7 d对各组小鼠进行超声心动检测，记录LVEDV、LVESV、LVEF、LVFS，比较各组小鼠心脏功能变化。结果显示，模型组术后LVEDV、LVESV显著升高，LVEF、LVFS显著降低($P<0.001$)，表明心肌梗死小鼠模型建立成功，小鼠左心室的收缩舒张功能变差，心室腔有明显扩张，汉黄芩素组给药7 d后，LVEDV、LVESD显著降低，LVEF、LVFS显著增加($P<0.01$)。同时本研究检测了心肌梗死14 d后，心脏中iNOS、IL-1β及IL-6炎症指标，结果显示心肌梗死后小鼠心脏中炎症的表达显著增加($P<0.05$，$P<0.01$)，汉黄芩素可以显著抑制心脏中炎症的表达($P<0.01$)。以上结果提示，汉黄芩素能够显著抑制心肌梗死后心功能的恶化，并且有效下调心脏炎症反应的表达水平，表明汉黄芩素对心肌梗死后的心脏功能有明显的保护作用，实验结果见图2。



注：A. 小鼠心脏超声图；B～E. 小鼠心功能指标；F～H. 小鼠心脏中炎症指标结果；*与对照组比较，$P<0.05$，**与对照组比较，$P<0.01$，***与对照组比较，$P<0.001$；##与模型组比较，$P<0.01$。

图2 汉黄芩素对心肌梗死后小鼠心功能、心脏炎症的表达水平的影响($\bar{x}\pm s$)

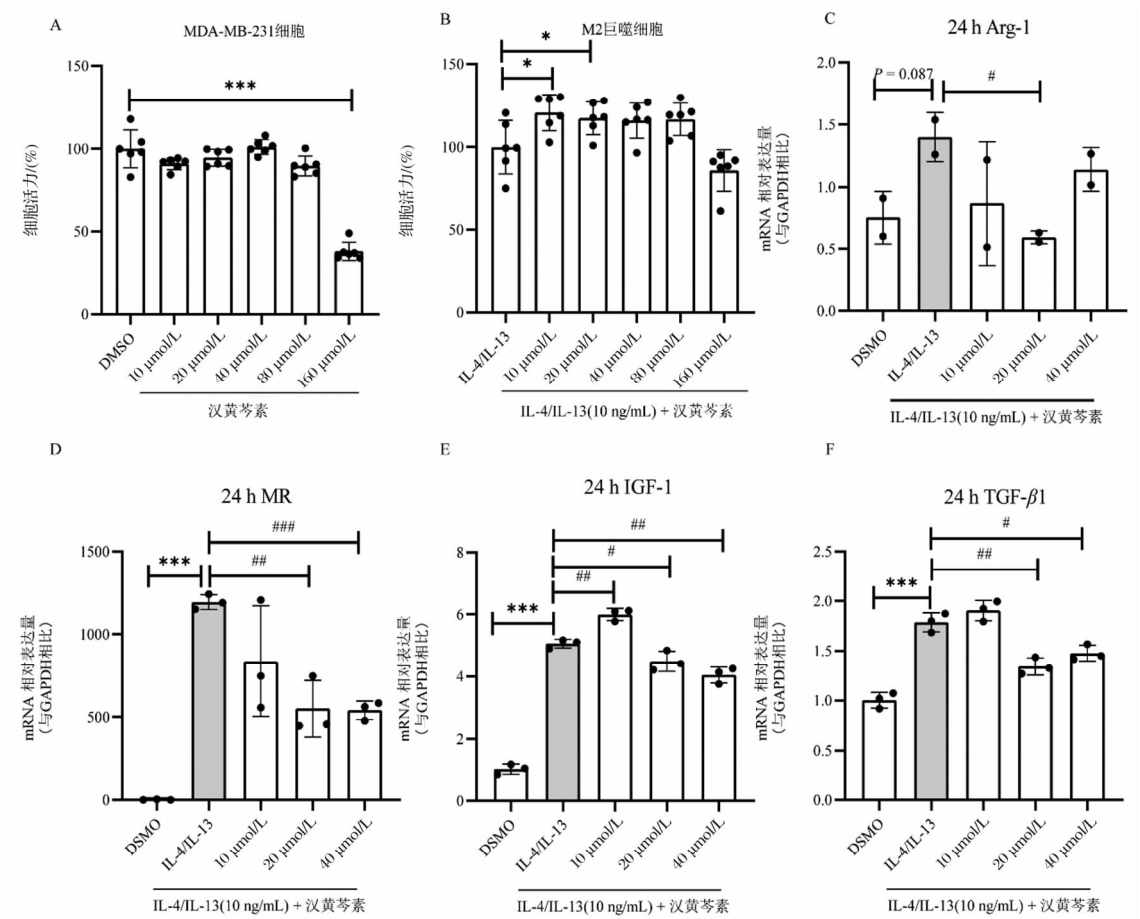
3.3 汉黄芩素限制心肌梗死后乳腺癌小鼠肿瘤组织中M2型巨噬细胞数量 为了探究汉黄芩素对心肌梗死后的乳腺癌小鼠肿瘤组织中M2型巨噬细胞的影响，通过免疫组化法检测了心肌梗死后的乳腺癌小鼠肿瘤组织中M2型巨噬细胞的数量。结果显示，与对照组相比，心肌梗死组的乳腺癌小鼠肿瘤组织中M2型巨噬细胞数量显著增加（$P<0.001$）；和心肌梗死组相比，汉黄芩素组肿瘤组织中M2型巨噬细胞数量显著减少（$P<0.01$）。结果提示，汉黄芩素可以抑制M2型巨噬细胞在MI后的乳腺癌小鼠肿瘤组织中的数量。

同时本研究对心肌梗死后的乳腺癌小鼠肿瘤组织中M2型巨噬细胞标志基因进行了检测，结果显示，和对照组相比，模型组的乳腺癌小鼠肿瘤组织中M2型巨噬细胞标志型基因和功能型基因表达显著增加（$P<0.05$，$P<0.01$，$P<0.001$）；与模型组相比，汉黄芩素组肿瘤组织中M2型巨噬细胞标志型基因和功能型基因表达显著降低（$P<0.05$，$P<0.001$）。以上结果提示汉黄芩素能够限制心肌梗死后乳腺癌小鼠肿瘤组织中M2型巨噬细胞数量。实验结果见插页XXⅦ图3。

3.4 汉黄芩素能够显著抑制巨噬细胞向M2极化 通过MTS的方法检测汉黄芩素在0、10、20、40、80、160 μmol/L对THP-1诱导后的M2型巨噬细胞活力以及MDA-MB-231乳腺癌细胞活力的影响。结果显示，汉黄芩素在160 μmol/L时对MDA-MB-231乳腺癌细胞存在显著的细胞毒性（$P<0.001$），为了避免汉黄芩素的细胞毒性对实验结果带来影响，选择汉黄芩素的给药浓度为10、20、40 μmol/L。

通过IL-4/IL-13（10 ng/mL）诱导RAW264.7巨噬细胞为M2型极化巨噬细胞，利用RT-PCR检测汉黄芩素对M2型巨噬细胞极化的影响。结果显示，IL-4/IL-13能够显著促进RAW264.7巨噬细胞中M2标志型基因Arg-1、MR及功能型基因IGF-1、TGF-β1的表达（$P<0.001$）；汉黄芩素能够显著降低M2标志型基因Arg-1、MR及功能型基因IGF-1、TGF-β1的表达（$P<0.05$，$P<0.01$，$P<0.001$）。以上结果表明，汉黄芩素能够显著抑制巨噬细胞向M2极化。实验结果见图4。

3.5 汉黄芩素以及汉黄芩素处理过的巨噬细胞上清溶液能够显著的限制乳腺癌细胞的迁移 为了探究汉黄芩素对乳腺癌细胞迁移作用的影响，本研究利用IncuCyte Zoom观察不同条件下处理的乳腺癌细胞的迁移能力。结果显示，20、40 μmol/L浓度的汉黄芩素能够显著抑制乳腺癌细胞MDA-MB-231的迁移（$P<0.001$）；根据2.10实验步骤收集巨噬细胞上清液（Macrophage conditioned medium，MCM），结果显示MCM能够显著促进乳腺癌细胞MDA-MB-231的迁移（$P<0.05$），当



注：A. MDA-MB-231细胞活力结果；B. M2型巨噬细胞活力结果；C～F. RAW264.7细胞M2极化标志基因的表达；*与对照组比较，$P<0.05$；***与对照组比较，$P<0.001$；#与模型组比较，$P<0.05$；##与模型组比较，$P<0.01$；###与模型组比较，$P<0.001$。

图4 汉黄芩素对巨噬细胞向M2极化的影响

使用汉黄芩素预处理巨噬细胞的上清液后,相比于模型组乳腺癌细胞 MDA - MB - 231 的迁移得到显著抑制($P < 0.001$)。插页XXV图 5D 对比了汉黄芩素单独给药与给予预处理巨噬细胞上清液后对乳腺癌细胞迁移的抑制作用,结果显示汉黄芩素预处理巨噬细胞后,相比于直接给予汉黄芩素,乳腺癌细胞 MDA - MB - 231 的迁移得到更为显著的抑制($P < 0.05$,$P < 0.000\ 1$),提示汉黄芩素可能通过影响巨噬细胞进而限制乳腺癌细胞迁移。给予 5 ng/mL TGF - β1 后模型组乳腺癌细胞 MDA - MB - 231 迁移能力显著增强($P < 0.05$),汉黄芩素干预后相比于模型组实验组乳腺癌细胞 MDA - MB - 231 的迁移得到显著抑制($P < 0.001$)。结果提示汉黄芩素以及汉黄芩素处理过的巨噬细胞上清溶液能够显著地限制乳腺癌细胞的迁移,且巨噬细胞对汉黄芩素抑制乳腺癌细胞转移的药效具有显著增强作用,实验结果见插页XXV图 5。

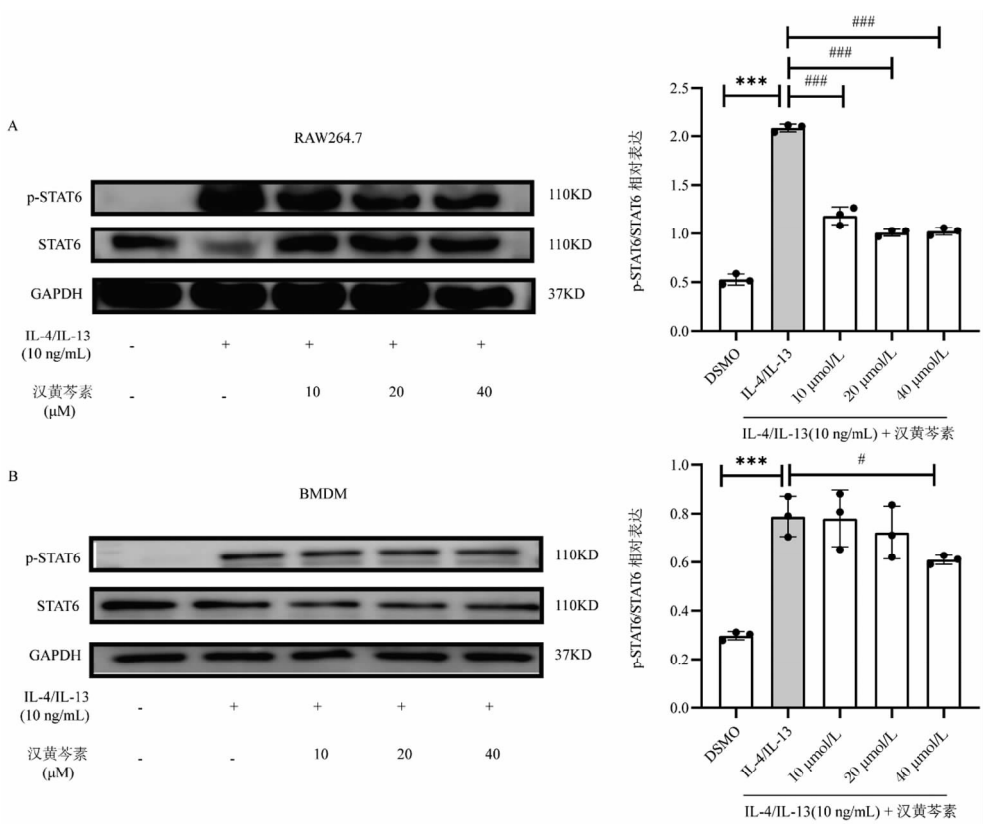
3.6 汉黄芩素通过调控 STAT6 蛋白磷酸化抑制巨噬细胞向 M2 型极化 为了探究汉黄芩素抑制 RAW264.7 巨噬细胞及 BMDM 巨噬细胞向 M2 型巨噬细胞极化的机制,本研究通过 Western - blotting 实验检测了汉黄芩素对巨噬细胞极化的关键蛋白 STAT6 的影响,结果显示,汉黄芩素能够显著抑制 STAT6 蛋白的磷酸化($P < 0.05$,$P < 0.001$)。以上结果提示汉黄芩素可能通过抑制 STAT6 蛋白磷酸化进而抑制巨噬细胞向 M2 型极化。实验结果见图 6。

4 讨论

最近的研究表明,心血管疾病与癌症可能存在关联。例如,心力衰竭患者患癌的风险增加,而心肌梗死可能加速乳腺癌的生长和肺部转移[10,20]。乳腺癌导致死亡的原因基本与肿瘤转移相关[1],临床及基础研究发现肿瘤中的巨噬细胞会促进肿瘤生长以及转移[21]。这些发现突显了心血管健康与癌症之间的复杂关系,需要进一步的研究和关注。

汉黄芩素作为中药黄芩的活性成分,已被广泛应用于保护心血管和治疗癌症[22]。研究显示,汉黄芩素不仅具有抗癌和抗炎效果,还能抑制 M2 型巨噬细胞标志物如 Arg - 1、MR 和 TGF - β1 的表达。本实验探索了汉黄芩素是否能够抑制心肌梗死后促进的乳腺癌肺转移及其机制。体内实验结果显示,汉黄芩素显著降低了心肌梗死增强的乳腺癌小鼠肺转移,并减少了肿瘤组织中 M2 型巨噬细胞的 CD206 表达及相关基因 Arg - 1 和 IGF - 1 的表达。心脏超声结果以及心脏炎症水平的检测结果显示,汉黄芩素对左心室的收缩与舒张能力有所改善,并且汉黄芩素降低了心脏炎症水平。结果展示出汉黄芩素具有抑制心肌梗死后乳腺癌肺转移的作用,且汉黄芩素可能通过影响乳腺癌肿瘤中的巨噬细胞向 M2 型极化发挥该作用,此外汉黄芩素遏制了心肌梗死后的心功能的恶化,展示出对心脏具有一定的保护作用。

为了进一步研究 M2 型巨噬细胞在心肌梗死后乳腺癌肺转移中的作用,本研究进行了体外研究。通过体外培养 THP - 1 细胞,并将其诱导为 M2 型巨噬细胞,收集其上清溶液,与 MDA - MB - 231 乳腺癌细胞进行了共培养。通过细胞划痕实验展示出 M2 型巨噬细胞上清溶液能够显著促进 MDA - MB -



注:A. RAW264.7 细胞中 p - STAT6/STAT6 蛋白表达;B. BMDM 细胞中 p - STAT6/STAT6 蛋白表达;* * * 与对照组比较,$P < 0.001$;# 与模型组比较,$P < 0.05$;### 与模型组比较,$P < 0.001$。

图 6 汉黄芩素对通过控制 STAT6 蛋白磷酸化抑制巨噬细胞向 M2 型极化的影响($\bar{x} \pm s$)

231乳腺癌细胞的迁移。通过RT－qPCR检测了汉黄芩素对巨噬细胞向M2型极化的影响，结果显示汉黄芩素能够显著抑制巨噬细胞M2型标志基因（如Arg－1、MR）和功能型基因（如IGF－1、TGF－β1）的表达。STAT6蛋白的磷酸化为调控巨噬细胞向M2型极化的关键[23－24]，Western blot实验检测了汉黄芩素对STAT6磷酸化的影响，结果显示汉黄芩素显著抑制STAT6蛋白磷酸化，该结果表明汉黄芩素能够抑制巨噬细胞向M2型极化。此外细胞划痕实验也展示出，汉黄芩素与M2型巨噬细胞共孵育后的细胞上清液能够显著抑制MDA－MB－231乳腺癌细胞迁移，此外汉黄芩素单独给予MDA－MB－231乳腺癌细胞也能够显著抑制癌细胞的迁移，并且汉黄芩素与M2型巨噬细胞共孵育后的细胞上清液对MDA－MB－231乳腺癌细胞迁移作用的抑制作用比单独给予汉黄芩素更加显著。以上结果显示，M2型巨噬细胞能够促进MDA－MB－231乳腺癌细胞迁移；汉黄芩素能够通过抑制巨噬细胞内STAT6蛋白磷酸化进而抑制巨噬细胞向M2型极化；汉黄芩素能够通过干预M2型巨噬细胞显著抑制MDA－MB－231乳腺癌细胞迁移，并且汉黄芩素也能显著抑制MDA－MB－231乳腺癌细胞迁移。

综上所述，心肌梗死会促进乳腺癌肺转移的发生，汉黄芩素可以抑制心肌梗死后乳腺癌肺转移的发生，发挥该作用的机制至少有一部分与汉黄芩素通过抑制巨噬细胞STAT6磷酸化抑制巨噬细胞M2极化进而抑制乳腺癌转移有关。更加具体的作用机制仍需要进一步的探索。

参考文献

[1] MEDEIROS B, ALLAN A L. Molecular mechanisms of breast cancer metastasis to the lung: clinical and experimental perspectives[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(9): 2272.

[2] 姚一菲，孙可欣，郑荣寿.《2022全球癌症统计报告》解读：中国与全球对比[J]. 中国普外基础与临床杂志，2024，31(7)：769－780.

[3] KWOK C S, WONG C W, KONTOPANTELIS E, et al. Percutaneous coronary intervention in patients with cancer and readmissions within 90 days for acute myocardial infarction and bleeding in the USA[J]. Eur Heart J, 2021, 42(10): 1019－1034.

[4] KARLSTAEDT A, MOSLEHI J, DE BOER R A. Cardio－onco－metabolism: metabolic remodelling in cardiovascular disease and cancer[J]. Nat Rev Cardiol, 2022, 19(6): 414－425.

[5] ZHANG S S, LIU L, SHI S S, et al. Bidirectional association between cardiovascular disease and lung cancer in a prospective cohort study[J]. J Thorac Oncol, 2024, 19(1): 80－93.

[6] CALLER T, ROTEM I, SHAIHOV－TEPER O, et al. Small extracellular vesicles from infarcted and failing heart accelerate tumor growth[J]. Circulation, 2024, 149(22): 1729－1748.

[7] GALIMZHANOV A, ISTANBULY S, TUN H N, et al. Cardiovascular outcomes in breast cancer survivors: a systematic review and meta－analysis[J]. Eur J Prev Cardiol, 2023, 30(18): 2018－2031.

[8] GREENLEE H, IRIBARREN C, RANA J S, et al. Risk of cardiovascular disease in women with and without breast cancer: the pathways heart study[J]. J Clin Oncol, 2022, 40(15): 1647－1658.

[9] DHIR A A, SAWANT S P. Cardiac morbidity & mortality in patients with breast cancer: a review[J]. Indian J Med Res, 2021, 154(2): 199－209.

[10] KOELWYN G J, NEWMAN A A C, AFONSO M S, et al. Myocardial infarction accelerates breast cancer *via* innate immune reprogramming[J]. Nat Med, 2020, 26(9): 1452－1458.

[11] GU Y Q, ZHENG Q, FAN G F, et al. Advances in anti－cancer activities of flavonoids in *Scutellariae radix*: perspectives on mechanism[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(19): 11042.

[12] KIM Y, NURAKHAYEV S, NURKESH A, et al. Macrophage polarization in cardiac tissue repair following myocardial infarction[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(5): 2715.

[13] MANTOVANI A, ALLAVENA P, MARCHESI F, et al. Macrophages as tools and targets in cancer therapy[J]. Nat Rev Drug Discov, 2022, 21(11): 799－820.

[14] BOUTILIER A J, ELSAWA S F. Macrophage polarization states in the tumor microenvironment[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(13): 6995.

[15] 霍雨佳，阳远舟，邹成丽，等. 汉黄芩素调节Hippo/YAP信号通路对慢性心力衰竭大鼠心肌纤维化的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志，2024，22(15)：2740－2745.

[16] EGHBALIFERIZ S, TALEGHANI A, TAYARANI－NAJARAN Z. *Scutellaria*: debates on the anticancer property[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 105: 1299－1310.

[17] CAI C P, WU Q H, HONG H H, et al. In silico identification of natural products from Traditional Chinese Medicine for cancer immunotherapy[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 3332.

[18] YANG Y N, CHENG S Y, LIANG G K, et al. Celastrol inhibits cancer metastasis by suppressing M2－like polarization of macrophages[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 503(2): 414－419.

[19] 余烊，杨帆，蒋磊，等. 显微操作条件下小鼠急性心肌梗死模型的建立与评估[J]. 岭南心血管病杂志，2019，25(3)：346－351.

[20] HASIN T, GERBER Y, WESTON S A, et al. Heart failure after myocardial infarction is associated with increased risk of cancer[J]. J Am Coll Cardiol, 2016, 68(3): 265－271.

[21] QIAN B Z, POLLARD J W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis[J]. Cell, 2010, 141(1): 39－51.

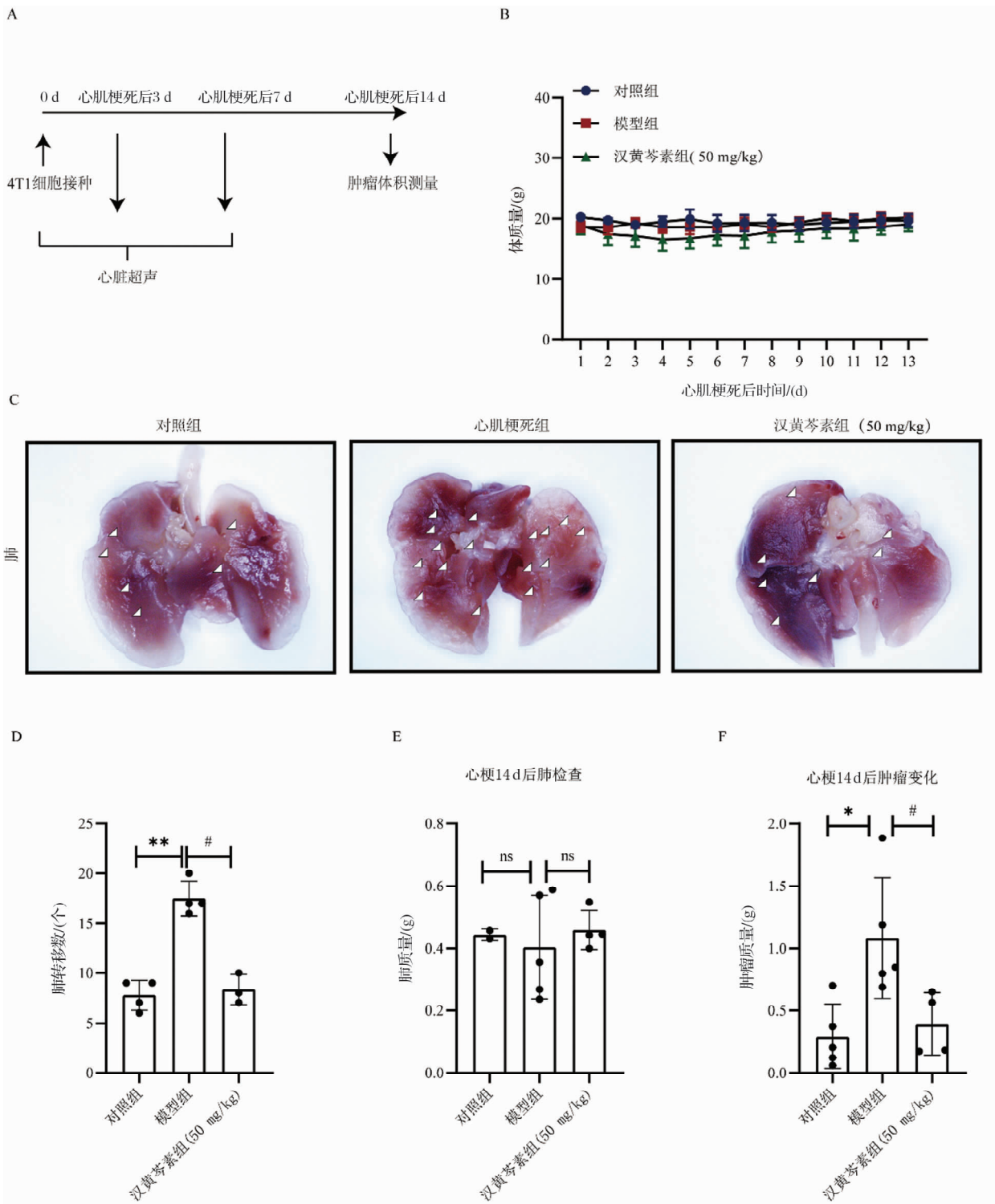
[22] HUANG Y J, FANG J S, LU W Q, et al. A systems pharmacology approach uncovers wogonoside as an angiogenesis inhibitor of triple－negative breast cancer by targeting hedgehog signaling[J]. Cell Chem Biol, 2019, 26(8): 1143－1158.

[23] VAŠÍČEK O, FEDR R, SKOROPLYAS S, et al. Natural pseurotins and analogs thereof inhibit activation of B－cells and differentiation into the plasma cells[J]. Phytomedicine, 2020, 69: 153194.

[24] AN J Y, PANG H G, HUANG T Q, et al. AG490 ameliorates early brain injury *via* inhibition of JAK2/STAT3－mediated regulation of HMGB1 in subarachnoid hemorrhage[J]. Exp Ther Med, 2018, 15(2): 1330－1338.

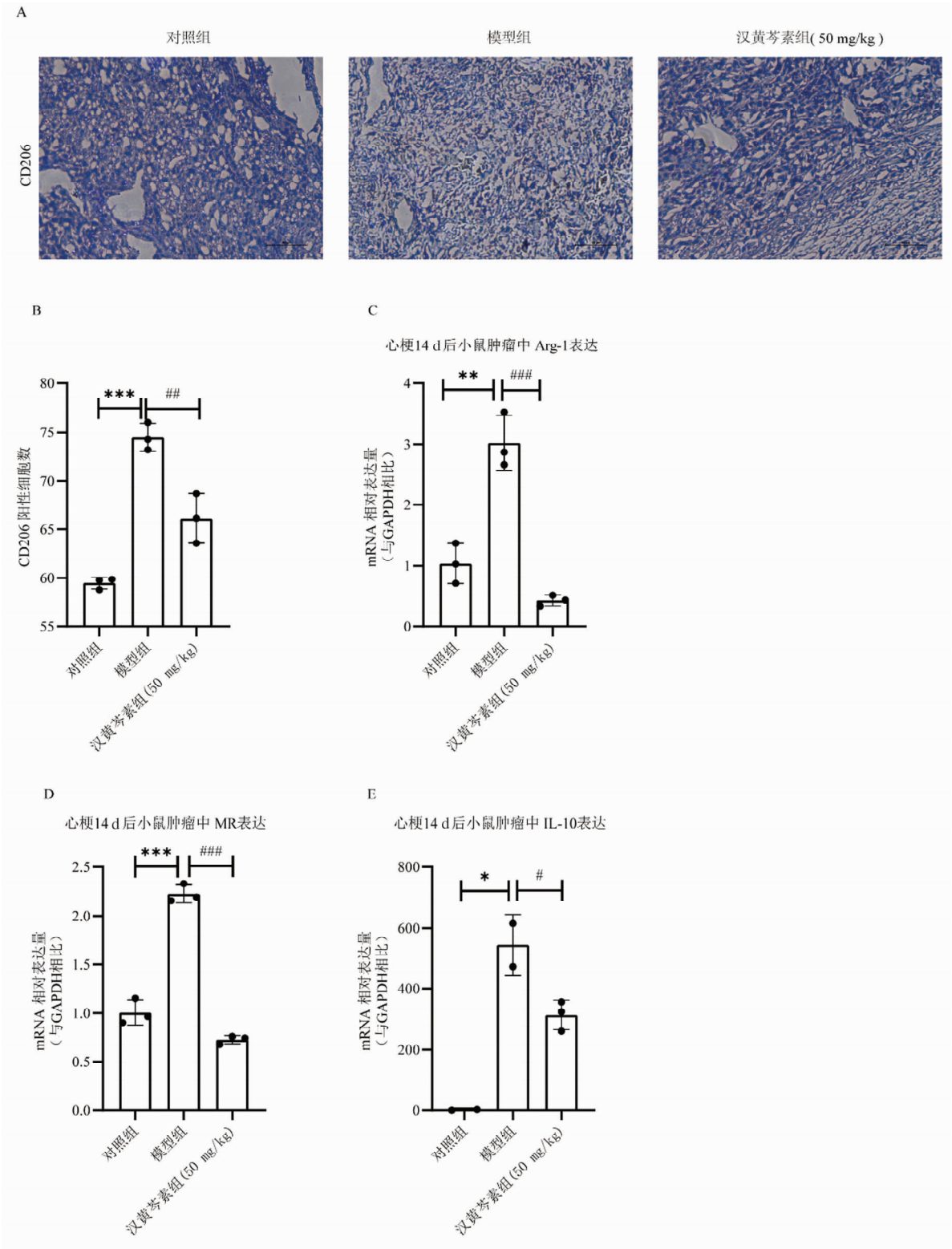
汉黄芩素通过调控巨噬细胞极化抑制心肌梗死后乳腺癌肺转移的作用研究

(正文见 136 – 142 页)



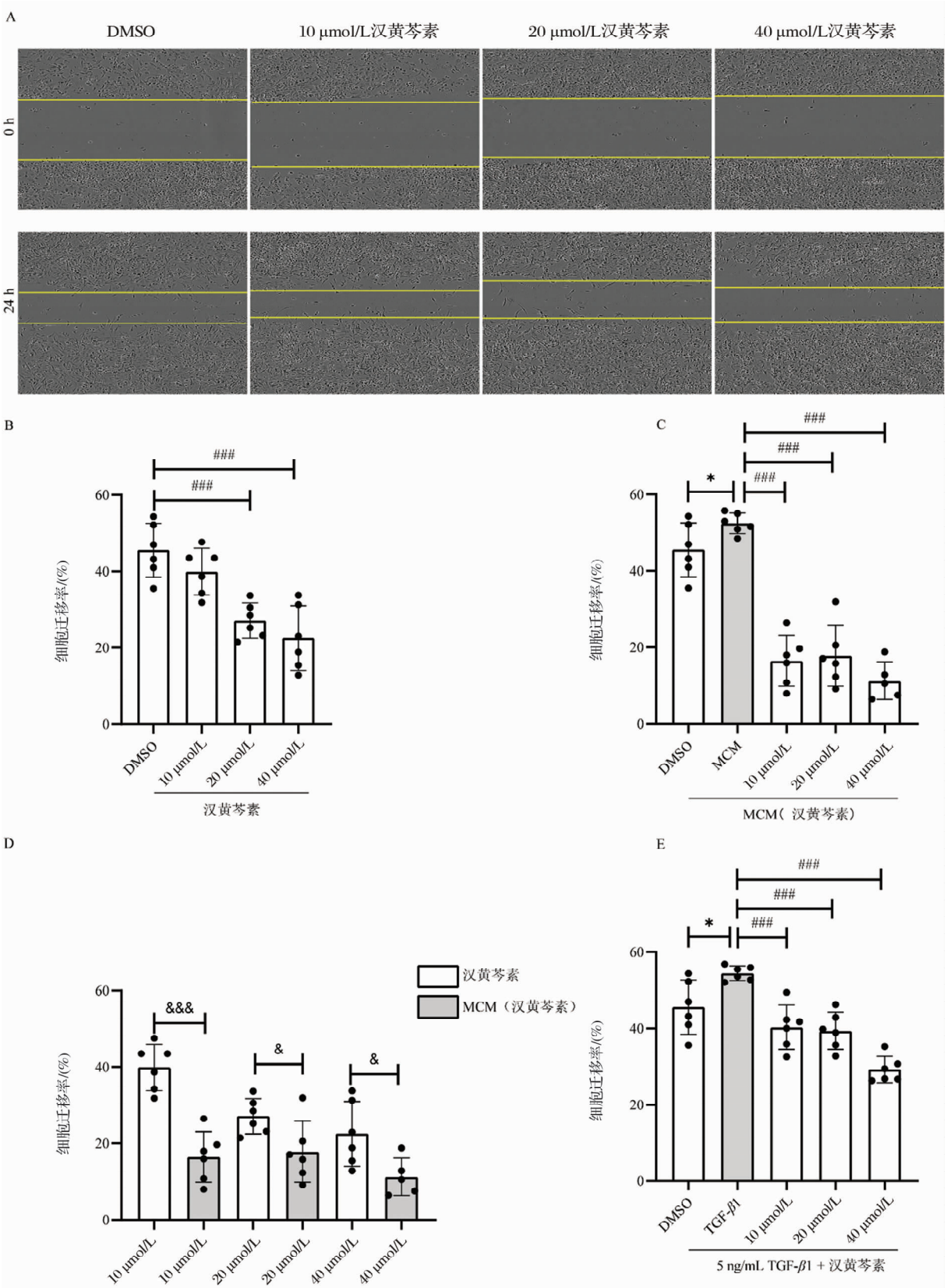
注:A. 实验流程;B. 小鼠体质量变化;C. 小鼠肺部肿瘤转移图;D. 小鼠肺部肿瘤转移量化图;E. 小鼠肺部质量;F. 小鼠乳腺癌肿瘤质量;＊与对照组比较,$P<0.05$;＊＊与对照组比较,$P<0.01$;#与模型组比较,$P<0.05$。

图 1 汉黄芩素对心肌梗死后小鼠乳腺癌肺转移和降低乳腺癌肿瘤质量的影响($\bar{x}\pm s$)



注：A. 肿瘤组织免疫组化；B. 免疫组化量化结果；D ~ E. 小鼠肿瘤中 M2 型巨噬细胞标志基因表达结果；＊与对照组比较，$P < 0.05$；＊＊与对照组比较，$P < 0.01$；＊＊＊与对照组比较，$P < 0.001$；#与模型组比较，$P < 0.05$；##与模型组比较，$P < 0.01$；###与模型组比较，$P < 0.001$。

图 3 汉黄芩素对心肌梗死后乳腺癌小鼠肿瘤组织中 M2 型巨噬细胞数量的影响（$\bar{x} \pm s$）



注：A. MDA－MB－231 细胞迁移图；B～E. MDA－MB－231 细胞迁移量化图；* 与对照组比较，$P<0.05$；### 与模型组比较，$P<0.001$；& 汉黄芩素组与汉黄芩素预处理细胞上清液组比较，$P<0.05$；&&& 汉黄芩素组与汉黄芩素预处理细胞上清液组比较，$P<0.0001$。

图 5 汉黄芩素以及汉黄芩素处理过的巨噬细胞上清溶液对乳腺癌细胞迁移的影响（$\bar{x}\pm s$）