

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2026.12.011

实验研究

化痰散结方对三阴性乳腺癌模型小鼠肿瘤组织刚度及 integrin β 1/FAK/YAP 力学信号通路的影响

赵祥羽¹, 刘竞阳², 张民仆², 王雪¹, 孙长岗^{1,3}✉

1. 山东第二医科大学中医学院, 山东省潍坊市胜利东街4948号, 261053; 2. 澳门科技大学中医药学院; 3. 潍坊市中医院肿瘤诊疗中心

[摘要] 目的 基于整合素 β 1/局部黏着斑激酶/yes相关蛋白(integrin β 1/FAK/YAP)力学信号通路探讨化痰散结方治疗三阴性乳腺癌(TNBC)的潜在作用机制。方法 50只BALB/c小鼠随机分为模型组、阿霉素组及化痰散结方低、中、高剂量组,每组10只。各组小鼠采用4T1细胞同种原位移植法构建TNBC原位移植瘤模型。造模成功后模型组小鼠每日给予0.2 ml生理盐水灌胃,化痰散结方低、中、高剂量组分别给予化痰散结方溶液5.99、11.97、23.94 g/(kg·d)灌胃,阿霉素组每隔两天给予阿霉素溶液1.5 mg/kg腹腔注射,各组均给药30天。最后一次给药后处死小鼠,检测各组小鼠肿瘤重量和体积;采用HE染色、Masson染色、天狼猩红染色观察肿瘤组织病理形态及胶原纤维沉积程度;TUNEL染色检测肿瘤组织细胞凋亡情况;原子力显微镜测定肿瘤组织杨氏模量;免疫荧光法检测YAP核质定位;Western Blot法检测integrin β 1、FAK、YAP、磷酸化局部黏着斑激酶(p-FAK)蛋白水平;qRT-PCR法检测integrin β 1、FAK、YAP mRNA表达水平;采用Pearson相关性分析探究肿瘤组织杨氏模量、细胞凋亡率与integrin β 1/FAK/YAP通路相关蛋白水平的相关性。结果 与模型组比较,阿霉素组和化痰散结方中、高剂量组小鼠肿瘤重量显著降低,阿霉素组和化痰散结方高剂量组小鼠肿瘤体积显著缩小($P<0.01$)。化痰散结方高剂量组肿瘤重量低于化痰散结方低剂量组,肿瘤体积小于化痰散结方低、中剂量组($P<0.05$)。化痰散结方中、高剂量组和阿霉素组肿瘤组织病理改善显著,胶原纤维沉积占比、YAP核质比均显著降低($P<0.01$)。化痰散结方各剂量组及阿霉素组细胞凋亡率均显著升高,杨氏模量显著降低,integrin β 1、YAP mRNA表达水平均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。化痰散结方高剂量组integrin β 1、p-FAK、YAP蛋白水平低于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。Pearson相关性分析结果显示,肿瘤组织杨氏模量与细胞凋亡率呈显著负相关($r=-0.93$, $P<0.01$);integrin β 1、p-FAK、YAP蛋白水平与杨氏模量呈显著正相关($r=0.88$ 、 0.97 、 0.98 , $P<0.05$),与细胞凋亡率呈显著负相关($r=-0.93$ 、 -0.97 、 -0.93 , $P<0.05$)。结论 化痰散结方可显著抑制TNBC模型小鼠肿瘤生长,其作用机制可能与通过抑制肿瘤组织integrin β 1/FAK/YAP力学信号通路从而降低肿瘤组织刚度有关。

[关键词] 三阴性乳腺癌;肿瘤组织刚度;整合素 β 1;局部黏着斑激酶;yes相关蛋白;化痰散结方

三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)是乳腺癌中侵袭性最强、预后最差的亚型之一,其典型病理特征为肿瘤组织硬度显著升高并伴有纤维结缔组织增生,形成独特的力学微环境^[1]。

研究^[2]表明,基质刚度升高可通过调控细胞力学感知,促进TNBC的侵袭与转移,且瘤体硬度与患者远处转移风险呈正相关、与总生存期呈负相关,是驱动其恶性进展的关键因素。目前TNBC因缺乏有效治疗靶点,常规化疗与靶向治疗效果有限,因而针对肿瘤组织硬度这一物理特性的有效干预有望成为治疗TNBC的新突破口^[3]。乳腺癌依据其临床症状可归属于中医学“乳岩”范畴,化痰散结方以

基金项目:国家自然科学基金(82430123, U25A20169);国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目(ZYYZDXK-2023125);创新药物研发国家科技重大专项(2025ZD1800600);山东省泰山学者特聘专家人才项目(tstp20221166)

✉ 通讯作者:scgdoctor@126.com

《疡医大全》消乳岩丸为基础化裁而来,具有理气化痰、软坚散结功效。前期临床观察^[4]显示,其在改善晚期乳腺癌患者症状、减轻化疗耐药及毒副反应方面具有一定作用。然而,该方是否通过调节肿瘤刚度及相关力学信号通路抑制 TNBC 进展,需进一步研究。基于此,本研究拟建立 TNBC 原位移植瘤小鼠模型,运用生物力学药理学研究方法,探讨化痰散结方对肿瘤组织刚度及其胞外力学信号传导的经典核心通路整合素 $\beta 1$ /局部黏着斑激酶/yes 相关蛋白(integrin $\beta 1$ /FAK/YAP)关键分子的影响,旨在从改善肿瘤力学微环境的角度揭示该方潜在的作用机制,为其临床应用提供实验依据。本实验通过山东第二医科大学实验动物伦理委员会审批(编号:2024SDL274)。

1 材料

1.1 动物和细胞系

SPF 级 BALB/c 小鼠 50 只,6~8 周龄,体质量(20 $\pm$ 2) g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物许可证号:SCXK(京)2021-0006。小鼠饲养于山东第二医科大学屏障动物房,温度 22~26℃,湿度 45%~60%,12 h 光照与黑暗交替,适应性喂养 1 周。小鼠乳腺癌细胞 4T1 系购自亿泽丰生物科技(上海)有限公司(批号:YCL-0010),并在含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 RPMI-1640 培养基中培养,培养条件为 37℃、5% CO₂。当细胞达到 80% 汇合时进行传代,传至第 5 代后,取汇合率为 80% 的对数生长期细胞进行实验。

1.2 药物

化痰散结方组成:土贝母 18 g,茯苓 15 g,天花粉 15 g,夏枯草 15 g,莪术 9 g,牡蛎 12 g(先煎),漏芦 9 g。药材购自安徽精诚本草中药饮片有限公司。将草药以 10 倍体积纯水浸 1 h,然后将药材武火煮沸后文火煎 30 min,过滤得到水提物。随后加入 6 倍体积的纯水再煎 30 min 并再次过滤得到水提物,将这两次过滤后的溶液混合,进行抽滤,随后通过旋转蒸发仪浓缩成膏状,-80℃过夜后上冷冻干燥机处理,最终得到化痰散结方冻干粉。

1.3 主要试剂及仪器

BCA 蛋白浓度测定试剂盒、免疫荧光染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:P00125, P0179);苏木素-伊红(HE)高清恒染试剂盒、Masson 染液套装、改良天狼猩红染色试剂盒、iF488-Tyramide(武汉赛维尔生物科技有限公司,

批号:G1076、G1006、G1078、G1231);RIPA 裂解液、ECL 超灵敏化学发光检测试剂盒(上海雅酶生物医药科技有限公司,批号:PC101、SQ201);PVDF 转移膜(Merck Millipore 公司,批号:ISEQ00010);阿霉素(Medchemexpress 公司,批号:HY-15142A);integrin $\beta 1$ 抗体、磷酸化局部黏着斑激酶(p-FAK)抗体、FAK 抗体、YAP 抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、 β -肌动蛋白(β -actin)、山羊抗鼠抗体、山羊抗兔抗体(Proteintech Group 公司,批号:12594-1-AP、83933-1-RR、66258-1-Ig、13584-1-AP、60004-1-Ig、66009-1-Ig、SA00001-1、SA00001-2);qPCR 试剂盒(Biosharp 公司,批号:BL697A);一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(TMR 红色荧光)、DAPI 染色试剂(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号:G1502、G1012)。

电泳仪(美国 Biorad 公司,型号:1645050);iBright™ CL750 成像系统(美国 Thermo Fisher 公司,型号:A44116);超高速离心机(美国 Beckman coulter 公司,型号:Optima XE-100);光学显微镜(型号:ECLIPSETs2-FL)、正置荧光显微镜(型号:Nikon Eclipse C1),Nikon 公司;原子力显微镜(苏州飞时曼精密仪器有限公司,型号:FM-Nanoview OP-AFM);酶标仪[中国美谷分子仪器(上海)有限公司,型号:SpectraMax i3x];病理切片机(上海徕卡仪器有限公司,型号:RM2016);扫描仪(匈牙利 3DHISTECH 公司,型号:Pannoramic MIDI)。

1.4 模型制备

构建肿瘤 TNBC 原位移植瘤小鼠模型,将培养于 RPMI-1640 培养基中的 4T1 细胞以胰蛋白酶消化、计数,生理盐水制备为 5 $\times$ 10⁶ 个/ml 的细胞悬液。将上述悬液接种于 BALB/c 小鼠右侧第四乳腺脂肪垫皮下,接种量为每只 50 μ l^[5],接种后将小鼠放回饲养笼继续饲养。肿瘤细胞接种后第 7 天,小鼠出现肉眼可见的实体瘤,则证明造模成功。

1.5 分组与处理

按随机数字表法将 50 只造模成功小鼠分为模型组,化痰散结方低、中、高剂量组,阿霉素组,每组 10 只。根据人体与动物体表面积等效剂量系数折算法^[6]计算,化痰散结方低、中、高剂量组小鼠分别给予化痰散结方溶液 5.99、11.97、23.94 g/(kg·d)灌胃,每日灌胃 1 次,其中中剂量为临床等效剂量;阿霉素组每隔 2 天腹腔注射阿霉素 1.5 mg/kg,给药剂量为 100 μ l/只;模型组小

鼠给予0.2 ml/d生理盐水灌胃。各组均干预30天。

1.6 观察指标与方法

1.6.1 测定肿瘤生长情况 末次给药次日，脱颈处死所有小鼠并收集肿瘤组织。每组小鼠采用随机数字表法选取6个肿瘤组织，用电子秤称重并使用游标卡尺测量肿瘤长径、短径，计算肿瘤体积，瘤体积=长径×短径²/2^[7]。测定完成后每组从中选取3个肿瘤组织分别进行HE染色、Masson染色、天狼猩红染色、TUNEL染色、YAP核质定位、原子力显微镜检测肿瘤组织杨氏模量。

1.6.2 HE染色观察肿瘤组织病理形态 肿瘤组织经4%多聚甲醛固定，常规石蜡包埋，并制备4 μm厚的切片进行HE染色，显微镜下观察小鼠肿瘤组织病理改变情况。

1.6.3 Masson染色和天狼猩红染色观察肿瘤组织纤维化程度 肿瘤组织常规石蜡切片进行Masson染色和天狼猩红染色，显微镜下观察小鼠肿瘤组织纤维化程度和胶原沉积情况并拍照，使用Image J 1.54软件分析胶原纤维面积，胶原纤维面积占比=胶原纤维面积/组织总面积×100%。

1.6.4 TUNEL染色检测肿瘤组织细胞凋亡情况 取肿瘤组织常规制备石蜡切片，脱蜡、水合、滴加蛋白酶K工作液37℃孵育，PBS（pH=7.4）洗涤。破膜，滴加破膜工作液常温孵育20 min后洗涤。采用TUNEL细胞凋亡检测试剂盒检测，步骤按说明书进行，于正置荧光显微镜下观察并采集图像（DAPI蓝色荧光，TUNEL阳性凋亡细胞红色荧光），计算细胞凋亡指数。凋亡指数=凋亡细胞数/总细胞数×100%。

1.6.5 原子力显微镜检测肿瘤组织杨氏模量 取各组小鼠新鲜肿瘤组织200 mg，OCT包埋制备6 μm冰冻切片，置于35 mm培养皿中，采用原子力显微镜力映射模式，在光学显微镜辅助定位下选取肿瘤

实质区（避开坏死区及大血管）。每组取3个生物学重复样本，每样本取3个独立视野。用赫兹接触模型拟合计算杨氏模量，结果以千帕（kPa）表示。

1.6.6 免疫荧光法检测YAP核质定位 取肿瘤组织石蜡切片，经环保型脱蜡液、梯度无水乙醇依次处理后脱蜡至水，EDTA（pH=9.0）修复液进行抗原修复，PBS洗涤。切片经3%双氧水室温避光封闭内源性过氧化物酶，PBS洗涤后滴加BSA完成封闭。滴加YAP一抗（1：1000），4℃孵育过夜；PBS洗涤后加HRP标记山羊抗兔IgG（1：500）孵育，再滴加iF488-Tyramide（1：500）避光孵育，TBST洗涤。DAPI染液避光孵育复染细胞核，PBS洗涤后以抗荧光淬灭封片剂封片，最后用扫描仪于DAPI通道（激发波长330~380 nm、发射波长420 nm）采集荧光图像，并计算YAP核质比。

1.6.7 qRT-PCR法检测肿瘤组织中integrinβ1、FAK、YAP mRNA的表达水平 各组剩余小鼠肿瘤组织采用随机数字表法选取3个肿瘤组织进行qRT-PCR及Western Blot检测。取肿瘤组织50 mg，提取组织中总RNA，检测RNA浓度，反转录为cDNA，按照qPCR试剂盒说明书进行实时荧光定量PCR反应。反应结束后，以GAPDH基因为内参，采用2^{-ΔΔCt}法计算肿瘤组织中integrinβ1、FAK、YAP、GAPDH mRNA表达水平。引物由山东思科捷生物技术有限公司合成设计，引物序列见表1。

1.6.8 Western Blot法检测integrinβ1、FAK、p-FAK、YAP、β-actin蛋白水平 取肿瘤组织50 mg，提取组织总蛋白并检测浓度，取20 μg蛋白进行SDS-PAGE凝胶电泳，后经转膜、封闭，integrinβ1、FAK、p-FAK、YAP、β-actin一抗（稀释比例分别为1：10 000、1：10 000、1：800、1：10 000、1：10 000）孵育，HRP标记的二抗（稀释比例1：5000）孵育、ECL发光液显色，扫描后分析电泳

表1 三阴性乳腺癌小鼠肿瘤组织中integrinβ1、FAK、YAP、GAPDH的qRT-PCR引物序列
Table 1 qRT-PCR primer sequences for integrinβ1, FAK, YAP and GAPDH in tumor tissues

引物	序列	长度/bp
integrinβ1	上游: GCATCCCAGCCAGTCCCAAGGCAGTAAGCGTCCATGTCTTCAC	140
	下游: GCATCCCAGCCAGTCCCAAGGCAGTAAGCGTCCATGTCTTCAC	
FAK	上游: CCAAATTGTCCTCCACCCCTCTAC	149
	下游: TCCATCCTCATCCGTTCTTCTTGC	
YAP	上游: CTGGTGCTGACAGTGTCTCTCGCTGGACACAACAAGAAAGACTACG	125
	下游: CTGGTGCTGACAGTGTCTCTCGCTGGACACAACAAGAAAGACTACG	
GAPDH	上游: CCTTCCTGTTCTACCCCGCCCAAGATGCCCTTCAGT	131
	下游: CCTTCCTGTTCTACCCCGCCCAAGATGCCCTTCAGT	

注: integrinβ1, 整合素β1; FAK, 局部黏着斑激酶; YAP, yes相关蛋白; GAPDH, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

图，以目的蛋白灰度与内参 β -actin 灰度的比值代表蛋白的相对表达量。

1.7 统计学方法

采用 GraphPad Prism 10.1.2 软件进行数据分析。计量资料均符合正态分布，以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示，方差齐者多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用最小显著性差异法 (LSD) 检验；方差不齐者多组间比较选择 Welch 检验，组间两两比较选择 Kruskal-Wallis 检验。相关性分析采用 Pearson 相关分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肿瘤生长情况比较

表 2 示，与模型组比较，阿霉素组和化痰散结方中、高剂量组小鼠肿瘤重量降低，阿霉素组和化痰散结方高剂量组小鼠肿瘤体积缩小 ($P<0.01$)。与阿霉素组比较，化痰散结方低、中剂量组小鼠肿

表 2 各组小鼠肿瘤组织肿瘤重量和体积比较

Table 2 Comparison of tumor weight and volume in mice of each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	肿瘤重量/g	肿瘤体积/mm ³
模型组	6	1.15 $\pm$ 0.08	627.70 $\pm$ 37.10
阿霉素组	6	0.46 $\pm$ 0.10 ^{a)}	250.47 $\pm$ 59.34 ^{a)}
化痰散结方低剂量组	6	1.04 $\pm$ 0.15 ^{b)}	599.75 $\pm$ 50.44 ^{b)}
化痰散结方中剂量组	6	0.81 $\pm$ 0.04 ^{a) b)}	550.26 $\pm$ 80.76 ^{b)}
化痰散结方高剂量组	6	0.66 $\pm$ 0.03 ^{a) c)}	386.71 $\pm$ 99.04 ^{a) c) d)}

注：a) 与模型组比较， $P<0.05$ ；b) 与阿霉素组比较， $P<0.05$ ；c) 与化痰散结方低剂量组比较， $P<0.05$ ；d) 与化痰散结方中剂量组比较， $P<0.05$ 。

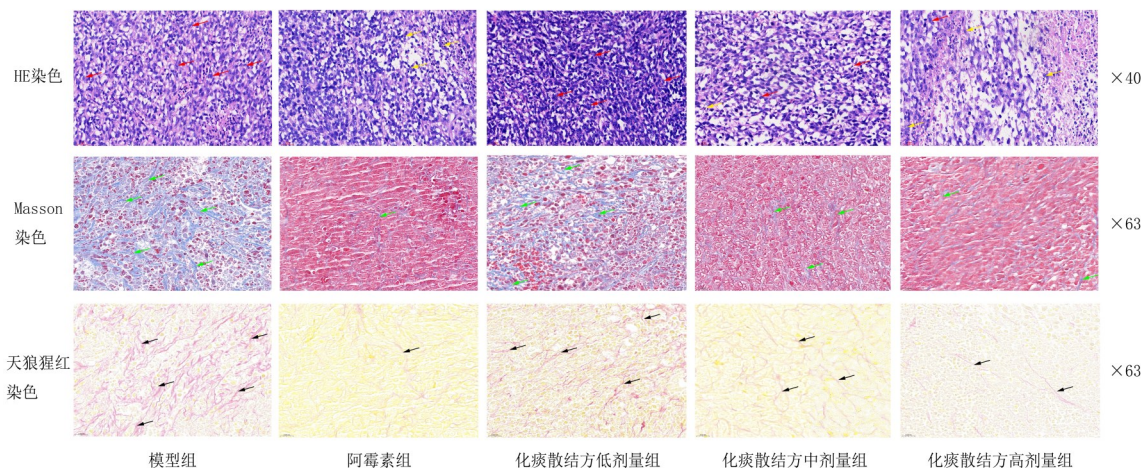
瘤重量及体积均增加 ($P<0.05$)。化痰散结方高剂量组肿瘤重量低于化痰散结方低剂量组，肿瘤体积小于化痰散结方低、中剂量组 ($P<0.05$)。

2.2 各组小鼠肿瘤组织病理形态学及胶原纤维沉积程度比较

图 1 示，经 HE 染色后，模型组小鼠肿瘤组织细胞密集且排列紊乱，形态异常；化痰散结方低、中剂量组肿瘤细胞排列相对稀疏，伴空泡状散在及部分区域排列紊乱，坏死区增多；化痰散结方高剂量组和阿霉素组可见大片弥漫的坏死灶，周边肿瘤细胞核着色较浅，细胞稀疏。Masson 染色显示，模型组可见胶原纤维分布广泛；随着化痰散结方剂量的增加，纤维化区域逐步缩小。天狼星红染色显示，模型组胶原纤维沉积水平较高；随着化痰散结方剂量的增加，胶原纤维面积呈递减趋势。表 3 示，Masson 染色下与模型组比较，阿霉素组和化痰散结方各剂量组胶原沉积占比减少，且化痰散结方各剂量组随着剂量增加胶原沉积占比降低，呈剂量依赖性 ($P<0.05$)。天狼星红染色下与模型组比较，阿霉素组和化痰散结方中、高剂量组胶原沉积占比降低 ($P<0.05$)；化痰散结方各剂量组随剂量增加胶原沉积占比降低，呈剂量依赖性 ($P<0.05$)。

2.3 各组小鼠肿瘤组织细胞凋亡率及杨氏模量比较

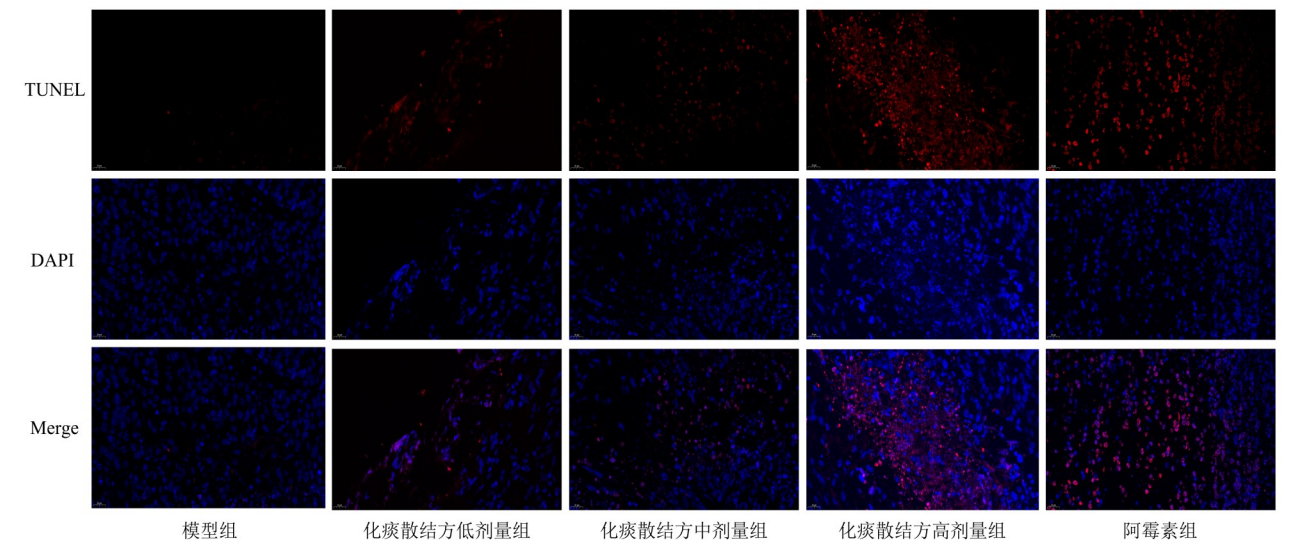
表 4 示，与模型组比较，化痰散结方各剂量组及阿霉素组细胞凋亡率均显著升高，杨氏模量显著降低 ($P<0.01$)。与阿霉素组比较，化痰散结方中、高剂量组细胞凋亡率降低，杨氏模量升高 ($P<0.05$)。化痰散结方高剂量组细胞凋亡率高于化痰



注：图中红色箭头示核分裂象；黄色箭头示坏死；绿色箭头示纤维沉积；黑色箭头示 I 型胶原。

图 1 各组小鼠肿瘤组织 HE 染色、Masson 染色、天狼猩红染色图

Figure 1 Images of HE staining, Masson staining, and Sirius Red staining of tumor tissues in each group of mice



注：红色荧光为 TUNEL 检测的凋亡细胞，蓝色荧光为 DAPI 染料显示细胞核，Merge 为上面两个图的合并图。

图 2 各组小鼠肿瘤组织 TUNEL 荧光染色图 (×50)

Figure 2 Fluorescence staining images of TUNEL in tumor tissues of each group of mice (×50)

表 3 各组小鼠肿瘤组织胶原纤维沉积比较

Table 3 Comparison of collagen fiber deposition in tumor tissues of mice in each group (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	胶原纤维沉积占比	
		Masson 染色	天狼猩红染色
模型组	3	1.00±0.04	1.00±0.15
阿霉素组	3	0.25±0.01 ^{a)}	0.32±0.01 ^{a)}
化痰散结方低剂量组	3	0.78±0.06 ^{a) b)}	0.83±0.07 ^{b)}
化痰散结方中剂量组	3	0.46±0.06 ^{a) b) c)}	0.52±0.02 ^{a) c)}
化痰散结方高剂量组	3	0.22±0.01 ^{a) c) d)}	0.31±0.03 ^{a) c) d)}

注：a) 与模型组比较， $P<0.05$ ；b) 与阿霉素组比较， $P<0.05$ ；c) 与化痰散结方低剂量组比较， $P<0.05$ ；d) 与化痰散结方中剂量组比较， $P<0.05$ 。

表 4 各组小鼠肿瘤组织细胞凋亡率及杨氏模量比较

Table 4 Comparison of cell apoptosis rate in tumor tissues of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	细胞凋亡率/%	杨氏模量/KPa
模型组	3	0.10±0.17	22.98±4.95
阿霉素组	3	19.86±2.86 ^{a)}	4.10±0.99 ^{a)}
化痰散结方低剂量组	3	5.16±1.16 ^{b)}	20.29±1.52 ^{b)}
化痰散结方中剂量组	3	10.15±2.28 ^{a) b)}	11.81±1.47 ^{a) b) c)}
化痰散结方高剂量组	3	19.36±3.04 ^{a) c) d)}	10.65±0.22 ^{a) c)}

注：a) 与模型组比较， $P<0.01$ ；b) 与阿霉素组比较， $P<0.05$ ；c) 与化痰散结方低剂量组比较， $P<0.05$ ；d) 与化痰散结方中剂量组比较， $P<0.05$ 。

散结方低、中剂量组，化痰散结方中、高剂量组杨氏模量低于化痰散结方低剂量组 ($P<0.05$)。图 2 示，模型组红色荧光标记的凋亡细胞极少，各药物干预组红色荧光信号随化痰散结方剂量增加逐渐增

强，化痰散结方高剂量组与阿霉素组可见大量散在分布的凋亡细胞。

2.4 各组小鼠肿瘤组织中 YAP 核质定位情况比较

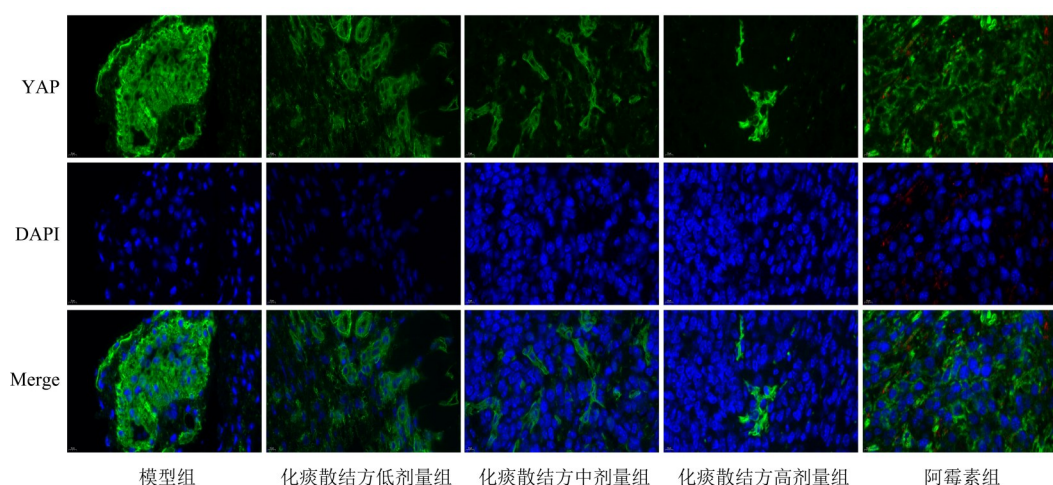
表 5 示，与模型组比较，阿霉素组和化痰散结方中、高剂量组 YAP 核质比均显著降低 ($P<0.01$)；与阿霉素组比较，化痰散结方低、中剂量组的 YAP 核质比升高 ($P<0.05$)；化痰散结方各剂量组随剂量增加 YAP 核质比降低，具有剂量依赖性 ($P<0.05$)。图 3 示，模型组 YAP 蛋白主要聚集于细胞核内，与 DAPI 标记的细胞核高度重叠，呈现明显的核内定位；各药物干预组 YAP 核内荧光信号随化痰散结方剂量增加逐渐减弱，胞质内信号相应增强，化痰散结方高剂量组与阿霉素组 YAP 蛋白主要分布于细胞质中，与 YAP 核质比定量结果一致。

表 5 各组小鼠肿瘤组织细胞 YAP 核质比比较

Table 5 Comparison of the nuclear-to-cytoplasmic ratio of YAP in tumor tissue cells of each group of mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	YAP 核质比
模型组	3	1.00±0.07
阿霉素组	3	0.31±0.03 ^{a)}
化痰散结方低剂量组	3	0.95±0.07 ^{b)}
化痰散结方中剂量组	3	0.79±0.06 ^{a) b) c)}
化痰散结方高剂量组	3	0.40±0.04 ^{a) c) d)}

注：YAP，yes 相关蛋白。
a) 与模型组比较， $P<0.01$ ；b) 与阿霉素组比较， $P<0.05$ ；c) 与化痰散结方低剂量组比较， $P<0.05$ ；d) 与化痰散结方中剂量组比较， $P<0.05$ 。



注：YAP，yes 相关蛋白；DAPI，4',6-二脒基-2-苯基吡啶。绿色为 YAP 核质定位；蓝色为 DAPI 染色显示细胞核；Merge 为上面两个图的合并图。

图 3 各组小鼠肿瘤组织中 YAP 核质定位情况

Figure 3 Comparison of YAP nuclear and cytoplasmic localization in tumor tissues of each group of mice

表 6 各组小鼠肿瘤组织 *integrinβ1*、FAK、YAP mRNA 表达比较

Table 6 Comparison of *integrinβ1*, FAK, and YAP mRNA expression in tumor tissues of each group of mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	<i>integrinβ1</i> mRNA	FAK mRNA	YAP mRNA
模型组	3	1.00±0.15	1.00±0.11	1.00±0.09
阿霉素组	3	0.32±0.10 ^{a)}	1.10±0.07 ^{a)}	0.38±0.05 ^{a)}
化痰散结方低剂量组	3	0.63±0.08 ^{a) b)}	1.23±0.14 ^{a) b)}	0.83±0.05 ^{a) b)}
化痰散结方中剂量组	3	0.61±0.07 ^{a) b)}	1.04±0.08 ^{a) b) c)}	0.65±0.05 ^{a) b) c)}
化痰散结方高剂量组	3	0.38±0.07 ^{a)}	1.07±0.10 ^{a) c) d)}	0.59±0.03 ^{a) b) c)}

注：*integrinβ1*，整合素β1；FAK，局部黏着斑激酶；YAP，yes 相关蛋白。

a) 与模型组比较， $P < 0.01$ ；b) 与阿霉素组比较， $P < 0.05$ ；c) 与化痰散结方低剂量组比较， $P < 0.05$ 。

2.5 各组小鼠肿瘤组织中 *integrinβ1*、FAK、YAP mRNA 表达比较

表 6 示，与模型组比较，各药物干预组小鼠肿瘤组织中 *integrinβ1*、YAP mRNA 表达水平均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与阿霉素组比较，化痰散结方低、中剂量组 *integrinβ1*、YAP mRNA 水平升高，化痰散结方高剂量组 YAP mRNA 表达水平升高 ($P < 0.05$)。与化痰散结方低剂量组比较，化痰散

结方中、高剂量组 YAP mRNA 表达水平降低 ($P < 0.05$)。各组 FAK mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.6 各组小鼠肿瘤组织 *integrinβ1*、FAK、p-FAK、YAP 蛋白水平比较

表 7 示，与模型组比较，阿霉素组及化痰散结方高剂量组 *integrinβ1*、p-FAK、YAP 蛋白水平均降低，化痰散结方中剂量组 *integrinβ1*、YAP 蛋白水

表 7 各组小鼠肿瘤组织 *integrinβ1*、FAK、p-FAK、YAP 蛋白水平比较

Table 7 Comparison of *integrinβ1*, FAK, p-FAK, and YAP protein expressions in tumor tissues of mice in each group

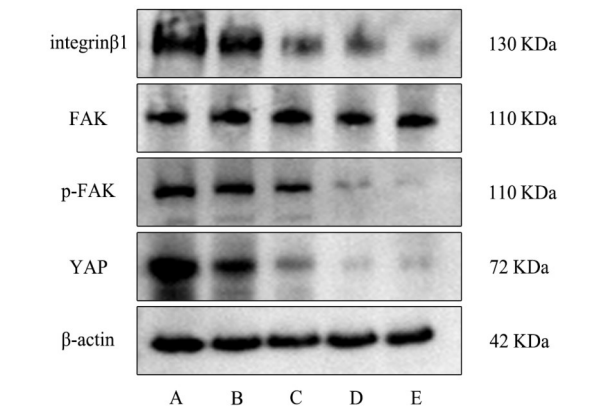
(/ β -actin, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	<i>integrinβ1</i>	FAK	p-FAK	YAP
模型组	3	1.00±0.21	1.00±0.28	1.00±0.35	1.00±0.15
阿霉素组	3	0.31±0.09 ^{a)}	1.19±0.26	0.20±0.08 ^{a)}	0.32±0.05 ^{a)}
化痰散结方低剂量组	3	0.61±0.15	0.99±0.19	0.75±0.21 ^{b)}	0.80±0.09 ^{b)}
化痰散结方中剂量组	3	0.44±0.15 ^{a)}	1.08±0.04	0.61±0.17	0.63±0.25 ^{a)}
化痰散结方高剂量组	3	0.29±0.10 ^{a)}	1.05±0.30	0.41±0.06 ^{a)}	0.49±0.15 ^{a) c)}

注：*integrinβ1*，整合素β1；FAK，局部黏着斑激酶；p-FAK，磷酸化局部黏着斑激酶；YAP，yes 相关蛋白。

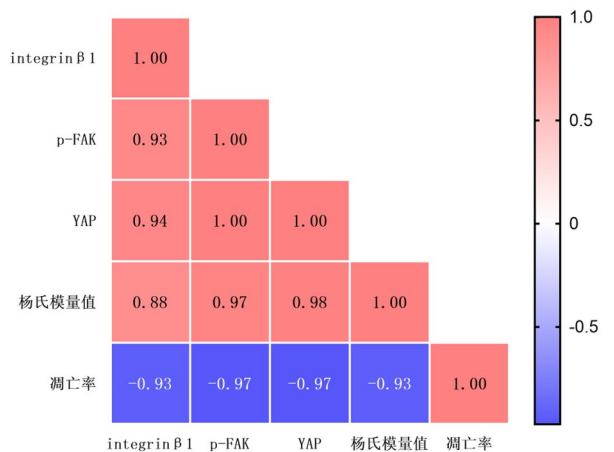
a) 与模型组比较， $P < 0.05$ ；b) 与阿霉素组比较， $P < 0.05$ ；c) 与化痰散结方低剂量组比较， $P < 0.05$ 。

平降低 ($P<0.05$)。与阿霉素组比较,与化痰散结方低剂量组 YAP 蛋白水平升高 ($P<0.05$)。与化痰散结方低剂量组比较,化痰散结方高剂量组 YAP 蛋白水平降低 ($P<0.05$)。各组 FAK 蛋白水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。各组小鼠肿瘤组织 integrin β 1、FAK、p-FAK、YAP 蛋白电泳图见图 4。



注: A, 模型组; B, 化痰散结方低剂量组; C, 化痰散结方中剂量组; D, 化痰散结方高级剂量组; E, 阿霉素组。integrin β 1, 整合素 β 1; FAK, 局部黏着斑激酶; p-FAK, 磷酸化局部黏着斑激酶; YAP, yes 相关蛋白。

图 4 各组小鼠肿瘤组织 integrin β 1、FAK、p-FAK、YAP、 β -actin 蛋白电泳图
Figure 4 Protein band diagrams of integrin β 1, FAK, p-FAK, YAP, and β -actin in tumor tissues of each group of mice



注: 红色为正相关, 蓝色为负相关, 图例数字代表相关系数。integrin β 1, 整合素 β 1; FAK, 局部黏着斑激酶; p-FAK, 磷酸化局部黏着斑激酶; YAP, yes 相关蛋白。

图 5 各组小鼠肿瘤组织细胞凋亡率、杨氏模量及 integrin β 1、p-FAK、YAP 蛋白表达的相关性热图
Figure 5 Heatmap of the correlation between apoptosis rate, Young's modulus and the expression of integrin β 1, p-FAK, and YAP proteins

2.7 各组小鼠肿瘤组织细胞凋亡率、杨氏模量及 integrin β 1、p-FAK、YAP 蛋白水平的相关性分析

Pearson 相关性分析结果 (图 5) 显示, 肿瘤组织杨氏模量与细胞凋亡率间呈显著负相关 ($r=-0.93$, $P<0.01$), 提示瘤体硬度越高, 细胞凋亡水平越低; 同时 integrin β 1、p-FAK、YAP 蛋白表达水平与杨氏模量呈显著正相关 ($r=0.88$ 、 0.97 、 0.98 , 均 $P<0.05$), 与细胞凋亡率呈显著负相关 ($r=-0.93$ 、 -0.97 、 -0.93 , 均 $P<0.05$)。

3 讨论

TNBC 作为乳腺癌中恶性程度极高的特殊亚型, 因缺乏雌激素受体、孕激素受体及人表皮生长因子受体 2 表达, 临床无针对性内分泌及靶向治疗方案, 且存在复发转移率高、预后差、化疗不良反应等问题, 是当前乳腺癌临床治疗的重点与难点^[7], 亟需探寻安全有效的干预新策略。中医学认为, 痰瘀互结是乳腺癌发生发展的核心病机, 而 TNBC 侵袭性强、肿块质硬、病情进展迅速的临床特征, 与中医学痰瘀胶结、乳络壅滞、坚结不散的病机高度契合, 且痰瘀互结的病机特征较其他亚型更为显著^[8]。化痰散结方中土贝母清热解毒、散结消肿痛, 为君药; 茯苓健脾利湿且化痰散结, 牡蛎味咸善软坚, 为臣药; 夏枯草、漏芦、天花粉清热消痈、化痰散结, 为佐药; 莪术破血逐瘀、荡壅开滞, 为使药。全方共奏理气化痰、软坚散结之效。阿霉素作为 TNBC 一线化疗药物, 通过抑制 DNA 复制、诱导肿瘤细胞凋亡以抑制肿瘤细胞增殖, 疗效确切^[9], 故在本研究中作为阳性对照药。

本研究结果表明, 与模型组比较, 化痰散结方各剂量组及阿霉素组均可有效抑制 TNBC 小鼠的肿瘤重量与体积增长, 改善肿瘤组织病理形态 (如减少肿瘤细胞密度、增加坏死区), 同时显著提高肿瘤细胞凋亡率, 提示化痰散结方对于 TNBC 有确切的治疗潜力。进一步组间分析可见, 化痰散结方低、中、高剂量组疗效存在明显剂量依赖性, 其中低剂量可轻度抑制瘤体生长, 提升细胞凋亡率, 对瘤体硬度及间质纤维化无明显改善作用; 中剂量化痰散结方抑瘤、促凋亡效果显著优于低剂量, 肿瘤病理形态改善更为明显, 同时可轻度降低肿瘤组织刚度、减少胶原沉积。而高剂量化痰散结方各项指标改善最优, 不仅抑瘤与促凋亡效应达到峰值, 还可显著降低瘤体硬度、缓解间质纤维化, 为化痰散

结方最佳干预剂量。与阿霉素组比较,化痰散结方高剂量组抑瘤、促凋亡及病理改善、调控肿瘤力学微环境的效果相近,组间差异无统计学意义;化痰散结方低、中剂量组疗效则弱于阿霉素组。以上结果提示随剂量递增,化痰散结方药效逐步增强,可有效消解癌毒癥结、疏通局部经络壅滞。

瘤体硬度是区分良性肿瘤与恶性肿瘤的重要临床标志性特征^[10],其力学特征改变已成为调控肿瘤恶性进展的核心环节。与良性肿瘤相比,恶性肿瘤的瘤体硬度显著升高,如乳腺癌组织硬度可达 1.54~15.9 kPa,而正常组织为 0.4~2.5 kPa^[11],其中 TNBC 瘤体硬度的物理特征相较于其他乳腺癌亚群更为突出^[12]。既往临床研究证实,瘤体硬度与 TNBC 患者预后呈显著负相关,硬度升高可作为独立不良预后因素,且与肿瘤远处转移、免疫逃逸及治疗耐药相关,而肿瘤基质纤维化、胶原过度沉积是介导瘤体硬度异常升高的核心病理基础^[13]。本研究通过检测肿瘤组织纤维化程度、胶原沉积量及杨氏模量指标,多维度评估瘤体刚度变化。结果显示,与模型组比较,化痰散结方低剂量组肿瘤组织刚度、纤维化程度及胶原沉积量无明显改善,化痰散结方中剂量组上述指标均有所缓解,化痰散结方高剂量组肿瘤组织刚度显著降低,间质纤维化及胶原沉积情况得到明显改善,组间差异具有统计学意义。与阿霉素组比较,化痰散结方高剂量组调控瘤体硬度、改善基质纤维化的效果与之相当,化痰散结方低、中剂量组作用效果则弱于阿霉素组。上述结果表明,化痰散结方可通过调控肿瘤微环境力学特征,逆转异常硬化的肿瘤基质,进而抑制 TNBC 恶性进展及相关生物学行为。

Integrin β 1 是细胞表面关键的力学调节因子,通过特异性结合细胞外基质 (ECM) 中的胶原、纤连蛋白等成分,搭建起 ECM 与细胞骨架间的力学信号传递桥梁,是细胞感知并响应外界力学微环境变化的核心媒介,其介导的 integrin β 1/FAK/YAP 通路是胞外力学信号传导的经典核心通路^[14]。当乳腺癌微环境中 ECM 因胶原沉积变硬时,整合素 β 亚基识别细胞外基质硬度变化,如乳腺癌微环境中 ECM 因胶原沉积变硬时, integrin β 1 激活并启动黏着斑复合体组装,促使 FAK 自磷酸化激活^[15];激活的 FAK 通过调节细胞骨架张力,解除 YAP 的细胞质滞留限制,推动 YAP 入核,进而调控肿瘤增殖、侵袭、远处转移等恶性表型相关基因的表达^[16]。已有研究^[17-18]证实,硬基质可通过激活 integrin β 1

转导 FAK/YAP 信号级联反应,增强乳腺癌细胞的侵袭转移能力,同时诱发治疗耐药,加剧肿瘤恶性进展。因此,靶向调控该通路有望成为干预肿瘤基质刚度相关恶性表型、改善抗肿瘤治疗效果的潜在策略。本研究结果显示,与模型组比较,化痰散结方低剂量组对 integrin β 1、p-FAK、YAP 蛋白及其 mRNA 表达无明显抑制作用,化痰散结方中剂量组可小幅下调上述指标表达,化痰散结方高剂量组可显著抑制通路关键分子蛋白及其 mRNA 转录水平。与阿霉素组比较,化痰散结方高剂量组对该通路的抑制效果相近,化痰散结方低、中剂量组抑制作用则弱于阿霉素组。因此,化痰散结方可能通过阻断 integrin β 1/FAK/YAP 通路激活,下调通路关键分子表达,逆转肿瘤基质异常硬化,阻断胞外力学信号向胞内传导,进而发挥抗 TNBC 作用,并以高剂量效果更好。

综上所述,化痰散结方可显著抑制 TNBC 小鼠原位移植瘤生长,其作用机制可能与靶向抑制 integrin β 1/FAK/YAP 通路,降低肿瘤基质纤维化与胶原沉积、调控瘤体刚度密切相关。本研究尚存在一定局限,肿瘤力学微环境的调控是一个多通路、多分子交叉协同的复杂网络过程,对瘤体硬度相关的其他关键通路未纳入研究,难以全面阐释其调控肿瘤力学微环境的完整机制,需在后续研究中进一步探索。

参考文献

- [1] NIA H T, MUNN L L, JAIN R K. Physical traits of cancer [J]. Science, 2020, 370(6516): eaaz0868.
- [2] CHEUNG K J, GABRIELSON E, WERB Z, et al. Collective invasion in breast cancer requires a conserved basal epithelial program [J]. Cell, 2013, 155(7): 1639-1651.
- [3] REUTEN R, ZENDEHROUD S, NICOLAU M, et al. Basement membrane stiffness determines metastases formation [J]. Nat Mater, 2021, 20(6): 892-903.
- [4] 张婷婷. 化痰散结方联合 XT 化疗方案治疗晚期乳腺癌的临床研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2019.
- [5] 高紫闻. 聚赖氨酸溶瘤肽诱导免疫原性死亡用于三阴性乳腺癌免疫治疗的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2025.
- [6] 魏伟, 吴希美, 李元健. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 1698.
- [7] LIEDTKE C, MAZOUNI C, HESS K R, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer [J]. J Clin Oncol, 2008, 26(8): 1275-1281.
- [8] 王桂彬, 谭世珩, 宋雪, 等. 中医临床“六辨”思维视域下乳腺癌全周期管理与辨治 [J]. 北京中医药大学学报,

- 2025, 48(12):1629–1635.
- [9]刘存. 漏芦散干预三阴性乳腺癌的作用机制研究及整合药理学模型探索[D]. 济南:山东中医药大学, 2022.
- [10]吕海通, 廖宁. HGF 在浸润性乳腺癌中的表达及其对化疗敏感性和预后的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2016, 25(5):747–751.
- [11]PIERSMA B, HAYWARD M K, WEAVER V M. Fibrosis and cancer: a strained relationship [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2020, 1873(2):188356.
- [12]MASSEY A, STEWART J, SMITH C, et al. Mechanical properties of human tumour tissues and their implications for cancer development[J]. Nat Rev Phys, 2024, 6(4): 269–282.
- [13]QUINTELA-FANDINO M, BERMEJO B, ZAMORA E, et al. High mechanical conditioning by tumor extracellular matrix stiffness is a predictive biomarker for antifibrotic therapy in HER2-negative breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2024, 30(22):5094–5104.
- [14]王美婧. PIEZO1 介导微环境刚度影响骨肉瘤成骨成脂分化的机制研究[D]. 长春:吉林大学, 2022.
- [15]YANG J, MA Y, ZHANG R, et al. Fibrotic extracellular matrix microenvironment induces alveolar type III epithelial cell senescence via integrin- β 1/FAK/YAP signaling pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2025, 162: 115169. doi: 10.1016/j.intimp. 2025. 115169.
- [16]王心荷. 魔芋多糖-纤维蛋白复合凝胶特性研究及其在细胞支架中的应用[D]. 无锡:江南大学, 2023.
- [17]邵伟华, 李晋, 龚伟韬, 等. Hippo-TAZ/YAP 信号通路在头颈部鳞状细胞癌中的研究进展[J]. 口腔医学, 2020, 40(1):71–77.
- [18]HAN B, GUAN X, MA M, et al. Stiffened tumor microenvironment enhances perineural invasion in breast cancer via integrin signaling[J]. Cell Oncol (Dordr), 2024, 47(3):867–882.

Effects of *Huatan Sanjie Formula* (化痰散结方) on Tumor Tissue Stiffness and the Integrin β 1/FAK/YAP Mechanotransduction Signaling Pathway in Triple Negative Breast Cancer Model Mice

ZHAO Xiangyu¹, LIU Jingyang², ZHANG Minpu², WANG Xue¹, SUN Changgang^{1,3}

1. School of Traditional Chinese Medicine, Shandong Second Medical University, Weifang, 261053; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Macau University of Science and Technology; 3. Cancer Diagnosis and Treatment Center, Weifang Hospital of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To investigate the potential mechanism of *Huatan Sanjie Formula* (化痰散结方, HSF) in the treatment of triple negative breast cancer (TNBC) based on the integrin β 1/focal adhesion kinase/yes-associated protein (integrin β 1/FAK/YAP) mechanotransduction signaling pathway. **Methods** Fifty BALB/c mice were randomly assigned to a model group, doxorubicin group, low-, medium-, and high-dose HSF groups, with 10 mice per group. An orthotopic TNBC transplantation model was established in all mice using syngeneic implantation of 4T1 cells. After successful modeling, mice in the model group received intragastric administration of normal saline 0.2 ml each day. Mice in the low-, medium-, and high-dose HSF groups received HSF by gavage at doses of 5.99, 11.97, and 23.94 g/(kg·d), respectively. The doxorubicin group received intraperitoneal injections of doxorubicin (1.5 mg/kg) once every two days. All treatments lasted for 30 days. After the final administration, mice were sacrificed, and tumor weight and volume were measured. Hematoxylin-eosin (HE), Masson's trichrome, and Sirius Red staining were performed to evaluate histopathological changes and collagen fiber deposition in tumor tissues. TUNEL staining was used to assess apoptosis. The Young's modulus of tumor tissues was measured using atomic force microscopy (AFM). The nuclear-cytoplasmic localization of YAP was determined by immunofluorescence staining. Protein expression levels of integrin β 1, focal adhesion kinase (FAK), YAP, and phosphorylated focal adhesion kinase (p-FAK) were detected by Western Blotting. The mRNA expression levels of *integrin β 1*, *FAK*, and *YAP* were assessed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Pearson correlation analysis was performed to evaluate the relationships among tumor tissue Young's modulus, apoptosis rate, and the expression levels of proteins related to the integrin β 1/FAK/YAP signaling pathway. **Results** Compared to the model group, tumor weight was significantly reduced in the doxorubicin group and the medium- and high-dose HSF groups, while tumor volume significantly decreased in the doxorubicin group and the high-dose HSF group ($P < 0.01$). Tumor weight in the high-dose HSF group was significantly lower than that in the low-dose group, and tumor volume was significantly smaller than that in both the low- and

medium-dose groups ($P < 0.05$). Marked improvements in histopathological morphology were observed in the medium- and high-dose HSF groups and the doxorubicin group, while the proportion of collagen fiber deposition and the nuclear-to-cytoplasmic ratio of YAP were significantly reduced ($P < 0.01$). Compared to the model group, all three HSF groups and the doxorubicin group exhibited significantly increased apoptosis rates, decreased Young's modulus, and reduced mRNA expression levels of *integrinβ1*, and YAP ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Furthermore, protein expression levels of *integrinβ1*, p-FAK, and YAP in the high-dose HSF group were significantly lower than those in the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Pearson correlation analysis demonstrated a significant negative correlation between tumor tissue Young's modulus and apoptosis rate ($r = -0.93$, $P < 0.01$). In contrast, the protein expression levels of *integrinβ1*, p-FAK, and YAP were positively correlated with Young's modulus ($r = 0.88$, 0.97 , and 0.98 , respectively; $P < 0.05$) and negatively correlated with apoptosis rate ($r = -0.93$, -0.97 , and -0.93 , respectively; $P < 0.05$). **Conclusion** HSF can significantly inhibit tumor growth in TNBC model mice. Its antitumor effect may be associated with reducing tumor tissue stiffness through suppression of the *integrinβ1*/FAK/YAP mechanotransduction signaling pathway.

Keywords triple negative breast cancer; tumor tissue stiffness; *integrinβ1*; focal adhesion kinase; yes-associated protein; *Huatan Sanjie Formula* (化痰散结方)

(收稿日期: 2025-12-01; 录用日期: 2026-01-14; 修回日期: 2026-03-08)

[编辑: 邓 媛]

珍贵文献 临床科研必备《中医杂志》光盘合订本

广告

《中医杂志》光盘检索系统收录了 1951—2013 年出版发行的《中医杂志》所有期刊(繁体字已转为简体字)。您可借助计算机阅读收录的任意一篇文章,而且可对光盘进行任意词或多组合条件检索,检索结果可以打印或下载保存。您可以在几秒钟内就能检索到某种疾病、某种疗法或某种药的相关文章,本光盘可按自然年、期排序,方便阅读与保存。1951—1986 年光盘还收录了扫描的原文版面图像。

邮购地址:北京东直门内南小街 16 号中医杂志社,邮政编码:100700

电话:(010) 64035632 联系人:杨秋雷(请在汇款单附言栏写明购买者的电话)

1951—1986 年光盘合订本每套(4 张光盘)480 元

1987—1994 年光盘合订本每套(1 张光盘)260 元

1995—2004 年光盘合订本每套(1 张光盘)280 元

2005—2013 年光盘合订本每套(1 张光盘)300 元



欢迎关注《中医杂志》公众号

科技精品光盘全文检索管理系统 3.5—《中医杂志》(1987—1994)

工系统工具 E检索结果 S检索设置 D桌面设置 H帮助

