

基于转录组学探讨西达本胺联合复方苦参注射液对 乳腺癌细胞的作用机制

毕艳兴¹, 李育宁¹, 李戈¹, 崔文平¹, 杨孝来^{2*}

(1. 甘肃中医药大学药学院, 兰州 730000; 2. 甘肃省人民医院, 兰州 730000)

[摘要] 目的:探讨西达本胺(CHI)与复方苦参注射液(CKI)联合对乳腺癌MCF-7细胞的协同抑制作用,并基于转录组学阐明其潜在分子机制。方法:采用噻唑蓝(MTT)法检测细胞增殖,应用“一带一线法”筛选给药的最佳协同质量浓度;根据合用指数(CI)将细胞分为空白组、CHI组($1.6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、CKI组($0.4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)和CHI+CKI组($1.6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+0.4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$);采用Transwell实验检测细胞迁移能力;采用流式细胞术检测细胞周期分布与细胞凋亡率。基于转录组测序(RNA-seq)与加权基因共表达网络分析(WGCNA)筛选与细胞抑制率高度相关的关键模块,将模块基因与差异表达基因(DEGs)取交集获得候选基因,进行功能富集分析;采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组细胞中组蛋白去乙酰化酶1(HDAC1)、蛋白激酶A(PKA)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白1(p21)、cAMP反应元件结合蛋白(CREB)及其磷酸化(p)-CREB、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)及Bcl-2相关X蛋白(Bax)的蛋白表达。结果:与空白组比较,CHI与CKI单药呈质量浓度依赖性抑制MCF-7细胞增殖;与空白组及CHI组、CKI组比较,CHI+CKI组可显著抑制细胞迁移,使 G_0/G_1 期阻滞比例增加,凋亡率显著上升($P<0.01$)。WGCNA筛选出与抑制率强相关的MEred模块($r=0.90, P<0.01$),与DEGs交集获得97个候选基因。京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析显示,cAMP信号通路显著富集。Western blot结果显示,与空白组比较,各给药组均显著下调HDAC1,上调PKA、p21表达及p-CREB/CREB、Bax/Bcl-2值($P<0.01$);与CHI组、CKI组比较,CHI+CKI组进一步显著上调PKA、p21表达,提高p-CREB/CREB及Bax/Bcl-2值($P<0.01$)。结论:CHI与CKI联合可发挥协同抗肿瘤作用,其机制可能涉及CHI通过抑制HDAC1发挥表观遗传调控作用,联合CKI可能进一步参与激活cAMP/PKA/CREB信号通路,上调p21表达及Bax/Bcl-2值,阻滞细胞周期并诱导凋亡。

[关键词] 西达本胺; 复方苦参注射液; 乳腺癌; 协同作用; 转录组学; 环磷酸腺苷(cAMP)信号通路

[中图分类号] R242;R273;R711 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)17-0134-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20260665

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20260603.1236.003>

[网络出版日期] 2026-06-03 13:40:26 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>



Mechanism of Chidamide Combined with Compound Kushen Injection on Breast Cancer Cells Based on Transcriptomics

BI Yanxing¹, LI Yuning¹, LI Ge¹, CUI Wenping¹, YANG Xiaolai^{2*}

(1. College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;
2. Gansu Provincial People's Hospital, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the synergistic inhibitory effect of chidamide (CHI) combined with compound Kushen injection (CKI) on breast cancer MCF-7 cells and to elucidate the potential molecular mechanisms based on transcriptomics analysis. **Methods:** Cell proliferation was detected by the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay, and the "one belt and one line" method was adopted to screen the optimal mass concentration for synergistic effect. According to the combination index (CI) values, cells were allocated into the blank, CHI ($1.6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), CKI ($0.4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), and CHI+CKI ($1.6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+0.4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) groups. Transwell assay was employed to examine cell migration, and flow cytometry to measure cell cycle distribution and apoptosis rate.

[收稿日期] 2026-01-24

[基金项目] 甘肃省自然科学基金项目(1208RJZA120)

[第一作者] 毕艳兴,在读硕士,从事肿瘤药理学研究,E-mail:biyanxing1121@163.com

[通信作者] * 杨孝来,硕士生导师,主任药师,从事肿瘤药理学研究,E-mail:yxl1668@vip.163.com

Transcriptome sequencing (RNA-seq) and weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) were performed to screen the key modules highly correlated with the cell inhibition rate. Candidate genes were identified by intersecting module genes with differentially expressed genes (DEGs), followed by functional enrichment analysis. Western blot was employed to quantify the protein levels of histone deacetylase 1 (HDAC1), protein kinase A (PKA), cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (p21), cAMP response element-binding protein (CREB) and its phosphorylated form (p-CREB), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), and Bcl-2-associated X protein (Bax) in cells of each group. **Results:** Compared with the blank group, both CHI and CKI monotherapies inhibited the proliferation of MCF-7 cells in a mass concentration-dependent manner. Compared with the blank and monotherapy groups, CHI+CKI inhibited cell migration, increased the proportion of cells arrested in the G₀/G₁ phase, and elevated the apoptosis rate ($P<0.01$). WGCNA identified the MEred module strongly correlated with the inhibition rate ($r=0.90$, $P<0.01$), yielding 97 candidate genes upon intersection with DEGs. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analysis indicated significant enrichment of the cAMP signaling pathway. Western blot results showed that compared with the blank group, all treatment groups down-regulated the expression of HDAC1, up-regulated the expression of PKA and p21, and increased the p-CREB/CREB and Bax/Bcl-2 ratios ($P<0.01$). Compared with the monotherapy groups, CHI+CKI further up-regulated the PKA and p21 expression and increased the p-CREB/CREB and Bax/Bcl-2 ratios ($P<0.01$). **Conclusion:** The combination of CHI and CKI exerts a significant synergistic anti-tumor effect. CHI exerts epigenetic regulation by inhibiting HDAC1, which, in combination with CKI, may further contribute to the activation of the cAMP/PKA/CREB signaling pathway, leading to up-regulation of p21 expression and the Bax/Bcl-2 ratio, thereby promoting cell cycle arrest and apoptosis.

[Keywords] chidamide; compound Kushen injection; breast cancer; synergism; transcriptomics; cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling pathway

乳腺癌是全球女性最常见的恶性肿瘤之一,其发病率约占女性恶性肿瘤的32%,死亡率约15%,严重威胁女性健康^[1]。近年来,激素受体阳性(HR⁺)乳腺癌的比例不断上升,约占全部乳腺癌的2/3^[2]。临床上单一治疗手段往往存在疗效有限、耐药、复发及转移等问题,因此联合治疗逐渐成为提高疗效的重要策略^[3-4]。

西达本胺(CHI)是一种新型口服选择性I型及IIb型组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂,通过表观遗传调控作用影响肿瘤细胞增殖、凋亡及免疫微环境^[5]。目前已被批准用于治疗复发或难治性外周T细胞淋巴瘤^[6],并联合芳香化酶抑制剂用于HR⁺/人表皮生长因子受体2阴性(HER2⁻)晚期乳腺癌的二线治疗^[7]。然而,CHI在临床应用中仍存在部分患者应答率低、长期使用易产生耐药性等局限^[8-10],需寻找新的联合方案。

复方苦参注射液(CKI),又名“岩舒注射液”,由苦参和白土苓组成,具有清热凉血、消肿散结、解毒祛瘀等功效,在癌症辅助治疗中应用广泛^[11-13]。CKI中的苦参碱、氧化苦参碱等主要活性生物碱成分能够通过调控多条关键通路发挥协同抗乳腺癌作用。例如,CKI联合化疗可显著增强抗肿瘤疗效并减轻不良反应^[14];其可通过调节转移抑制蛋白1/肌动蛋白相关蛋白2/3复合物亚基3/丝状肌动蛋白(MTSS1/ARPC3/F-actin)信号通路有效抑制乳腺癌的侵袭与转移^[15],并通过调控相磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)等信号通路阻断肿瘤细胞周期并促进凋亡^[16]。临床研究亦提示,CKI与多种抗

肿瘤药物联用可产生协同作用,提高治疗效果^[17-19]。

既往研究表明,CHI通过调控表观遗传与其他药物联用发挥逆转耐药或增敏作用,其联合依西美坦逆转乳腺癌内分泌耐药^[8],或联合吉非替尼增强对非小细胞肺癌的杀伤作用^[20],此外,HE等^[21]研究发现苦参碱可显著增强CHI在T细胞淋巴瘤中的抗肿瘤疗效,促进细胞凋亡。LIU等^[22]基于网络Meta分析证实,包含CKI在内的中药注射液可显著增强卡培他滨和奥沙利铂等化疗药物对结直肠癌的抗肿瘤活性,展现出良好的疗效和安全性。基于此,将具有表观遗传增敏作用的CHI与具有多靶点的CKI联合,有望产生“增效减毒”的协同效应,具有潜在的临床转化潜力。

尽管CHI和CKI在乳腺癌治疗中的单药作用已有相关报道,但二者联合用药是否存在协同效应及其潜在分子机制尚未阐明。转录组测序技术能够系统解析药物干预后基因表达谱的整体变化,揭示关键信号通路及潜在作用靶点。因此,本研究基于转录组学,深入探讨CHI联合CKI治疗乳腺癌的协同作用及其关键信号通路,旨在为该联合方案的临床应用提供确切的实验依据。

1 材料

1.1 细胞株 人乳腺癌细胞系MCF-7(货号AC1466)购自北京赛文创新生物科技有限公司。该细胞株已通过短串联重复序列(STR)图谱分析进行身份鉴定,基因分型结果与ExPASy数据库中MCF-7细胞的标准数据匹配,支原体检测呈阴性。所有实验均使用处于对数生长期、第5~20代内的

细胞。

1.2 药物与试剂 CHI(深圳微芯生物科技有限公司,批号20221031),CKI(山西振东制药股份有限公司,国药准字Z14021231,规格5 mL/支,批号20230515),噻唑蓝(MTT,美国Sigma公司,货号M2128),十二烷基硫酸钠(SDS)、结晶紫染色液(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为S8010、G1063),Transwell小室(美国Corning公司,货号353097),膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啉(AnnexinV-FITC/PI)凋亡检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司,货号KGA107),细胞周期检测试剂盒(杭州联科生物技术股份有限公司,货号CCS012),TRIzol试剂(美国Invitrogen公司,货号15596-018),放射免疫沉淀分析法(RIPA)细胞裂解液、特超敏增强化学发光(ECL)试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号分别为P10013B、P10018AFT),HDAC1、蛋白激酶A(PKA)、cAMP反应元件结合蛋白(CREB)、磷酸化(p)-CREB、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白1(p21)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)相关X蛋白(Bax)一抗(武汉三鹰生物技术有限公司,货号分别为10197-1-AP、67491-1-Ig、67927-1-Ig、81871-1-RR、82669-2-RR、60267-1-Ig),Bcl-2一抗(武汉博士德生物工程有限公司,货号BA0412), β -肌动蛋白(β -actin)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记兔抗山羊免疫球蛋白(Ig)G、HRP标记山羊抗小鼠IgG(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号分别为GB15003、GB23204、GB23301)。

1.3 仪器 ME204E型万分之一分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),FlexStation3型多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司),KA-1000型台式离心机(上海仪天科学仪器有限公司),TGL-16G-A型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂),NovoCyte Quanteon型流式细胞仪(美国Agilent公司),Mini-PROTEAN Tetra型电泳仪(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

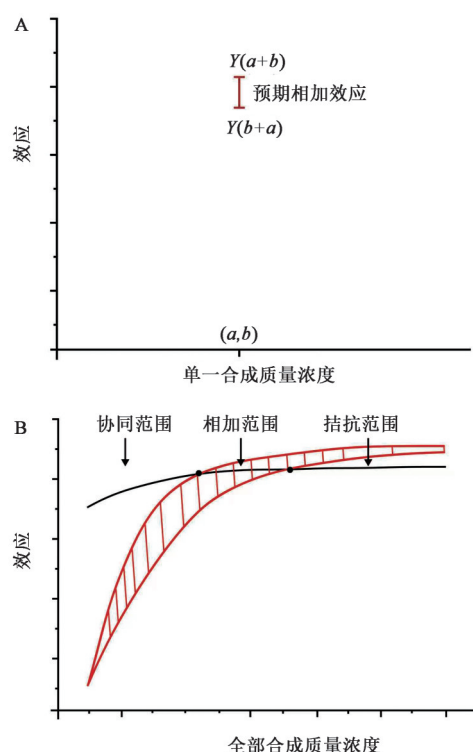
2.1 药物配制 配制CHI溶液时,先称取CHI 5 mg,加入二甲基亚砜(DMSO)640 μ L溶解,制成质量浓度为7.8 g $\cdot$ L⁻¹的母液,经0.22 μ m微孔滤膜过滤后,于-20 $^{\circ}$ C保存,使用前用完全培养基将其稀释至所需实验质量浓度,保证DMSO终体积分数<0.5%;配制CKI溶液时,先依据文献得到CKI按所含生物碱质量浓度计算,原液质量浓度为25 g $\cdot$ L⁻¹^[23],将原液经0.22 μ m微孔滤膜过滤后,4 $^{\circ}$ C

避光保存,使用前用完全培养基直接稀释至所需质量浓度。

2.2 MTT实验检测细胞活力 取对数生长期的MCF-7细胞以 5×10^4 个/mL的密度接种于96孔板中,每孔加入细胞悬液100 μ L。待24 h细胞贴壁后,实验组分别加入不同质量浓度的CHI(2、4、8、16、32 mg $\cdot$ L⁻¹)和CKI(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 g $\cdot$ L⁻¹),空白组加入含有等体积溶媒的完全培养基进行处理,每孔设3个复孔。培养72 h,弃培养基,每孔加入终质量浓度为5 g $\cdot$ L⁻¹的MTT溶液100 μ L,孵育4 h后加入10% SDS 100 μ L,避光过夜。于570 nm处测定吸光度值A,计算细胞增殖抑制率。

2.3 合用指数(CI)的计算 依据MTT结果,为保留联合用药后更大效应的上升空间,将细胞用固定CKI质量浓度(0.4 g $\cdot$ L⁻¹)和不同质量浓度CHI(0.34、0.4、1、1.6、2.2、2.8、3.4、4、4.6 mg $\cdot$ L⁻¹)进行单药及联合给药处理72 h后,计算细胞增殖抑制率。应用Excel 2016软件和Origin 2024软件中的Logistic程序拟合单药和联合用药生长曲线,联合效应应用“一带一线法”的CI来评价。当两药联用时,预期的相加效应是在一个药物效应水平基础上,另一个药物遵循自己的量效曲线前行达到自身质量浓度达到的效应值,药物组合质量浓度的预期相加效应值是一个闭区间的效应值域 $[Y(a+b), Y(b+a)]$,药物预期相加效应的量效关系显示为一条曲带,实际药效的量效关系为一条曲线,构成线带图,该方法称为“一带一线法”模型,见图1。将药物联用的实际效应值与预期相加效应值进行比较,判断药物合用时药效的协同、相加和拮抗。某一确定的组合质量浓度下,实际药效值(Y_{obs})分别与相加效应值范围的两个边界值($Y_{exp-min}$ 和 $Y_{exp-max}$,即预期相加效应范围内的最小值和最大值)进行比较,分别得到 CI_{d1} 和 CI_{d2} ,($CI_{d1}=Y_{obs}/Y_{exp-max}$, $CI_{d2}=Y_{obs}/Y_{exp-min}$),其中,如果 $CI_{d1}>1$ 且 $CI_{d2}>1$,药物表现为协同效应;如果 $CI_{d1}\leq 1$ 且 $CI_{d2}\geq 1$,药物表现为相加效应;如果 $CI_{d1}<1$ 且 $CI_{d2}<1$,药物表现为拮抗效应^[24-25]。依据CI值筛选出两药联用的最佳质量浓度组合,实验分为空白组、CHI组、CKI组及CHI+CKI组进行后续实验。

2.4 Transwell实验检测细胞迁移能力 取对数生长期的MCF-7细胞消化,于25 $^{\circ}$ C、1 000 r $\cdot$ min⁻¹离心5 min后,弃上清,用无血清培养基调整细胞密度为 1×10^6 个/mL,每孔加入细胞悬液200 μ L于Transwell上室,下室加入含10%血清的完全培养基600 μ L。按分组分别加入相应的CHI、CKI及CHI+



注:A.药物效应相加的数学规律;B.协同/相加/拮抗质量浓度范围示意

图1 量效曲带构成示意

Fig. 1 Schematic of dose-effect band construction

CKI药液于上室细胞中进行处理。培养24 h后,取出小室,擦除未发生迁移的细胞,4%多聚甲醛固定15 min,结晶紫染色10 min,拍照并使用Image J 1.54 g软件计数各组迁移细胞数。

2.5 细胞凋亡实验检测细胞凋亡 取对数生长期的MCF-7细胞以 5×10^4 个/mL的密度接种于6孔板中,待24 h细胞贴壁后,按分组分别加入相应的CHI、CKI及CHI+CKI药液进行处理。持续培养72 h后,收集细胞,加入Binding Buffer 300 μ L重悬后,再加入Annexin V-FITC 3 μ L与PI染液3 μ L,避光孵育15 min。使用流式细胞仪检测并用NovoExpress 2.2.0软件分析早晚期凋亡比例。

2.6 细胞周期实验检测细胞周期 取对数生长期的MCF-7细胞以 5×10^4 个/mL的密度接种于6孔板中,待24 h细胞贴壁后,按分组分别加入相应的CHI、CKI及CHI+CKI药液进行处理。持续培养72 h后,收集细胞,加入DNA染色液(DNA Staining Solution)重悬细胞500 μ L,再加入透膜液(Permeabilization Solution)5 μ L,避光孵育30 min。用流式细胞仪检测并用NovoExpress 2.2.0软件分析细胞周期分布。

2.7 转录组测序分析和差异表达分析 取对数生

长期的MCF-7细胞以 5×10^4 个/mL的密度接种于100 mm培养皿中,待24 h细胞贴壁后,按分组分别加入相应的CHI、CKI及CHI+CKI药液进行处理。置于细胞培养箱继续培养72 h后,每皿加入TRIzol试剂1 mL对细胞进行裂解,收集裂解液并混匀,立即置于 -80°C 保存。样本由杭州广科安德生物科技有限公司进行RNA提取及文库构建,采用Illumina平台进行转录组测序(RNA-seq)。采用DESeq2软件包对不同处理组进行差异表达分析。为筛选具有显著生物学意义且变化幅度较大的差异基因,设定筛选阈值为 $|\log_2$ 差异倍数(FC)| >0.585 且 $P<0.05$,获得各组间的差异表达基因(DEGs)。

2.8 加权基因共表达网络分析(WGCNA) 利用R语言(v 4.5.1)中的WGCNA软件包(v 1.73)对转录组表达矩阵进行WGCNA分析。为确保WGCNA分析的稳定性和数据质量,筛选出在至少20%样本中表达量超过阈值(FPKM >1)且变异系数(CV)位于前50%的基因,剔除离群样本和低表达基因。使用WGCNA中的pickSoftThreshold函数进行软阈值筛选。依据无尺度拓扑拟合指数(R^2) >0.85 且平均连接度保持适中水平的原则,确定最佳软阈值(β),构建加权邻接矩阵并计算拓扑重叠矩阵(TOM),以评估基因间的共表达相似性。通过层次聚类识别基因模块,并计算模块特征值(ME)。分析各模块特征值与性状变量——细胞抑制率(由MTT实验计算得出)之间的皮尔逊相关性,构建模块与性状相关性矩阵。筛选与细胞抑制率显著相关的模块,并基于模块归属度(MM >0.4)及基因显著性(GS >0.15)筛选与该模块和性状高度相关的基因。采用jvenn (<https://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html>)在线工具对空白组/CHI组、空白组/CKI组、空白组/CHI+CKI组间DEGs与最相关模块基因进行交集用于进一步分析,并绘制韦恩图与基因表达量热图。

2.9 功能富集分析 将上述交集基因利用微生信在线平台(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)中R包clusterProfiler(version 3.14.3)进行基因本体(GO)与京都基因与基因组百科全书(KEGG)功能富集分析。GO富集包括生物学过程(BP)、细胞组分(CC)和分子功能(MF)3个层面。 $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2.10 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达 取对数生长期的MCF-7细胞以 5×10^4 个/mL的密度接种于60 mm培养皿中,待24 h细胞贴壁后,

按分组分别加入相应的CHI、CKI及CHI+CKI药液进行处理,待培养72 h后,用RIPA裂解缓冲液裂解细胞,于4℃、12 000 r·min⁻¹离心15 min,取上清液作为细胞总蛋白,聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)法检测蛋白含量,向蛋白中加入上样缓冲液混合煮沸变性。电泳,湿转法转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜后,用含5%脱脂奶粉的1×TBST封闭2 h,用封闭液稀释的一抗HDAC1(1:5 000)、PKA(1:5 000)、CREB(1:30 000)、p-CREB(1:30 000)、p21(1:2 000)、Bax(1:2 000)、Bcl-2(1:1 000)、β-actin(1:4 000)在4℃孵育过夜后,次日加入二抗(1:10 000)室温孵育2 h,ECL显影液显影。以β-actin为内参,通过Gel-Pro analyzer(version 4.0)软件计算目的蛋白相对表达量。

2.11 统计学分析 采用GraphPad Prism 9.5软件进行数据统计分析与作图。计量资料经正态性检验符合正态分布后,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析结合Tukey事后多重比较法;若数据不符合正态分布,则采用非参数检验Kruskal-Wallis H检验,并结合Dunn's检验进行事后多重比较。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 CHI和CKI单用对乳腺癌细胞MCF-7活力的影响 与空白组比较,CHI和CKI均可显著抑制MCF-7细胞的增殖($P < 0.01$),且抑制作用呈明显质量浓度依赖性,见表1。

表1 CHI和CKI对MCF-7细胞增殖抑制的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 1 Effects of CHI and CKI on proliferation inhibition of MCF-7 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	细胞抑制率/%	组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	细胞抑制率/%
空白组	0	0.00±0.00	空白组	0	0.00±0.00
CHI组	2	37.70±0.77 ¹⁾	CKI组	0.5	21.66±2.35 ¹⁾
	4	58.70±0.15 ¹⁾		1	41.94±2.79 ¹⁾
	8	61.23±1.27 ¹⁾		1.5	52.37±3.38 ¹⁾
	16	72.32±0.06 ¹⁾		2	55.36±2.93 ¹⁾
	32	82.20±0.03 ¹⁾		2.5	61.69±2.59 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$

3.2 CHI与CKI联合用药效应评价 为评估两药联合效应,依据联合用药评价原则需选择低效应质量浓度。表1中CKI 0.5 g·L⁻¹的抑制率为21.66%,为保留更大的效应上升空间,选择0.4 g·L⁻¹作为CKI固定质量浓度和不同质量浓度CHI(0.34、0.4、1、1.6、2.2、2.8、3.4、4、4.6 mg·L⁻¹)进行单药及联合给药处理72 h。采用“一带一线法”进行分析:①利用

表1数据,使用Origin 2024软件中非线性拟合的Logistic程序进行数据处理,拟合得出CHI单药和CKI单药对MCF-7细胞的量效曲线及相关参数,CHI的量效曲线为 $Y = (-0.123\ 39 - 92.696\ 7) / [1 + (X / 2.767\ 07)^{0.778\ 89}] + 92.696\ 7$,CKI的量效曲线为 $Y = (-0.039\ 68 - 68.652\ 05) / [1 + (X / 0.778\ 25)^{0.288\ 93}] + 68.652\ 05$;②采用质量浓度序贯兑换的方法,通过CKI的量效曲线方程算出CKI 0.4 g·L⁻¹的理论抑制率,将其代入CHI量效曲线换算为等效CHI质量浓度,与实际CHI联用质量浓度相加后由CHI量效曲线计算得出以CHI为目标药物的预期相加效应值 $f(\text{CHI} + \text{CHI}_{\text{CKI}})$,以及通过CHI的量效曲线方程算出各质量浓度CHI的理论抑制率,将其代入CKI量效曲线换算为等效CKI质量浓度,与实际CKI联用质量浓度相加后由CKI量效曲线计算得出以CKI为目标药物的预期相加效应值 $g(\text{CKI} + \text{CKI}_{\text{CHI}})$;③以合用组CHI各质量浓度水平为横坐标,以各预期相加效应值 $f(\text{CHI} + \text{CHI}_{\text{CKI}})$ 和 $g(\text{CKI} + \text{CKI}_{\text{CHI}})$ 为纵坐标作图,构成预期等效相加效应的量效曲带。同时,在该图上作出两药联合的实际效应曲线的量效曲线;④比较合用组预期相加曲带和实际效应曲线的位置关系及基于质量浓度的合用指数(CI_d)来评价CHI与CKI联合用药效应。

在合用质量浓度点为(0.34+400)、(0.4+400)、(1+400)、(1.6+400)、(2.2+400)、(2.8+400) mg·L⁻¹时,曲线高于曲带, $CI_{d1} > 1$ 且 $CI_{d2} > 1$,表现为协同效应;在合用质量浓度点为(3.4+400) mg·L⁻¹时,曲线在曲带内, $CI_{d1} \geq 1$ 且 $CI_{d2} \leq 1$,表现为相加作用;在合用质量浓度点为(4+400)、(4.6+400) mg·L⁻¹时,曲线低于曲带, $CI_{d1} < 1$ 且 $CI_{d2} < 1$,表现为拮抗效应。依据曲带与曲线的位置及 CI_d 值,本研究利用“一带一线法”模型筛选出具有最佳增殖抑制潜力的质量浓度组合。其中,CHI 1.6 mg·L⁻¹与CKI 0.4 g·L⁻¹组合表现出较强的协同趋势($CI_{d1} = 1.264\ 5$, $CI_{d2} = 1.079\ 3$),故选择该质量浓度组合进行后续的细胞表型及分子机制验证。见表2及增强出版附加材料。

3.3 CHI和CKI对乳腺癌细胞MCF-7迁移的影响

与空白组比较,CHI组、CKI组、CHI+CKI组MCF-7细胞通过小室穿过的细胞数均显著减少($P < 0.01$);与CHI组、CKI组比较,CHI+CKI组通过小室穿过的细胞数也显著减少($P < 0.01$),提示CHI与CKI联合能更有效地抑制MCF-7细胞迁移,见图2、表3。

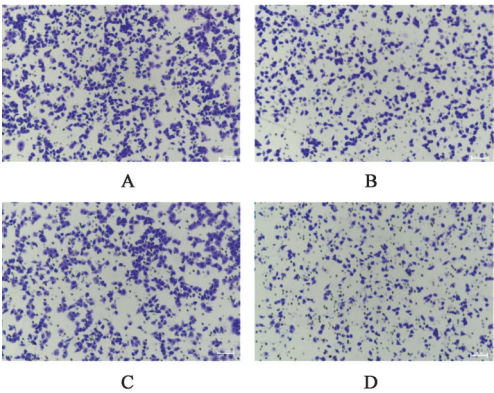
3.4 CHI和CKI对乳腺癌细胞MCF-7凋亡和周期的影响

与空白组比较,CHI组、CKI组、CHI+CKI

表 2 CHI 和 CKI 分别作为目标药序贯等效剂量兑换后预期相加效应值和 CI_d 值
Table 2 Expected additive effect values and CI_d values following sequential equivalent dose conversion with CHI and CKI as respective target drugs

CHI/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	CHI 单药抑制率/%	CKI/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	CKI 单药抑制率/%	$f(\text{CHI}+\text{CHI}_{\text{CKI}})/\%$	$g(\text{CKI}+\text{CKI}_{\text{CHI}})/\%$	实际效应/%	CI_{d1}	CI_{d2}	判定
0.34	20.81	0.4	19.76	24.25	34.06	35.68	1.471 6	1.047 6	协同
0.4	24.72	0.4	19.76	25.36	35.21	37.51	1.479 2	1.065 3	协同
1.0	38.01	0.4	19.76	34.19	42.80	45.29	1.324 7	1.058 3	协同
1.6	44.58	0.4	19.76	40.40	47.33	51.09	1.264 5	1.079 3	协同
2.2	46.29	0.4	19.76	45.12	50.61	53.62	1.188 2	1.059 3	协同
2.8	48.19	0.4	19.76	48.88	53.19	53.67	1.097 9	1.009 0	协同
3.4	49.30	0.4	19.76	51.97	55.31	54.01	1.039 4	0.976 6	相加
4.0	50.05	0.4	19.76	54.56	57.11	53.67	0.983 7	0.939 6	拮抗
4.6	54.64	0.4	19.76	56.78	58.68	52.53	0.925 2	0.895 1	拮抗

注： CI_{d1} 实际效应/ $f(\text{CHI}+\text{CHI}_{\text{CKI}})$ ； CI_{d2} 实际效应/ $g(\text{CKI}+\text{CKI}_{\text{CHI}})$



注：A.空白组；B.CHI组；C.CKI组；D.CHI+CKI组(图3同)

图 2 CHI 和 CKI 对乳腺癌 MCF-7 细胞迁移的影响 (结晶紫, $\times 100$)
Fig. 2 Effect of CHI and CKI on migration of MCF-7 breast cancer cells (crystal violet, $\times 100$)

表 3 CHI 和 CKI 对乳腺癌 MCF-7 细胞迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 3 Effect of CHI and CKI on migration of MCF-7 breast cancer cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞迁移率/%
空白组		100.00 $\pm$ 1.85
CHI 组	1.6	63.66 $\pm$ 0.73 ¹⁾
CKI 组	400	82.41 $\pm$ 2.32 ¹⁾
CHI+CKI 组	1.6+400	41.38 $\pm$ 0.50 ^{1,2,3)}

注：与空白组比较¹⁾ $P<0.01$ ；与 CHI 比较²⁾ $P<0.01$ ；与 CKI 比较³⁾ $P<0.01$ (表 4 和表 5 同)

组细胞凋亡率显著升高($P<0.01$)；与 CHI 组、CKI 组比较，CHI+CKI 组的细胞凋亡率也显著升高($P<0.01$)，提示 CHI 与 CKI 联合能更有效地促进 MCF-7 细胞凋亡。与空白组比较，CHI 组及 CHI+CKI 组 G_0/G_1 的细胞占比显著升高($P<0.01$)；与 CHI 组、CKI 组比较，CHI+CKI 组 G_0/G_1 的细胞占比显著升高($P<0.01$)，提示 CHI 与 CKI 联合能够诱导更多

的 MCF-7 细胞停滞在 G_0/G_1 期。见表 4 及增强出版附加材料。

表 4 CHI 和 CKI 对乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡和细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of CHI and CKI on apoptosis and cell cycle in MCF-7 breast cancer cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞凋亡率/%	G_0/G_1
空白组		4.62 $\pm$ 0.16	56.35 $\pm$ 0.24
CHI 组	1.6	11.50 $\pm$ 0.94 ¹⁾	63.46 $\pm$ 1.31 ¹⁾
CKI 组	400	6.84 $\pm$ 0.50 ¹⁾	57.39 $\pm$ 0.57
CHI+CKI 组	1.6+400	17.60 $\pm$ 0.57 ^{1,2,3)}	78.36 $\pm$ 0.34 ^{1,2,3)}

3.5 转录组测序质量评估 对空白、CHI、CKI 及 CHI+CKI 组进行转录组测序。经质控与比对后，所有样本的有效测序碱基量(clean bases)均在 6.56 G 以上，鸟嘌呤-胞嘧啶碱基(GC)含量在 48.65%~51.45%，碱基错误率 $\leq 1\%$ 的高质量碱基比例(Q20)和碱基错误率 $\leq 0.1\%$ 的超高质量碱基比例(Q30)碱基比例分别在 99%、97% 以上，表明测序质量可靠，可以用于后续分析。

3.6 WGCNA 构建与关键模块识别 对转录组数据构建 WGCNA。软阈值筛选结果显示，当设定软阈值 $\beta=21$ 时，网络的无尺度拓扑拟合指数 $R^2>0.85$ ，且平均连接度趋于稳定，表明构建的共表达网络符合无尺度分布特性，因此选择 $\beta=21$ 进行后续模块识别。在该阈值下共识别 9 个共表达模块，灰色模块中的未分类基因被排除。对各模块与性状数据进行相关性分析，结果表明，MEdarkorange、MEgreenyellow、MEdarkgreen 和 MERed 模块与细胞抑制率均呈明显相关($P<0.05$)。其中 MERed 模块的相关性最强($r=0.90, P<0.01$)，且呈显著正相关。

因此,将MEred模块确定为关键模块,共包含1 508个基因,该模块基因可能在CHI与CKI联合作用的抗肿瘤机制中发挥重要调控作用。见增强出版附加材料。

3.7 DEGs分析与候选基因筛选 使用DESeq2软件对各组间进行差异表达分析。与空白组比较,CHI组共有4 907个DEGs(上调3 053个、下调1 854个);CKI组共有2 520个DEGs(上调1 102个、下调1 418个);CHI+CKI组共有4 268个DEGs(上调3 232个、下调1 036个)。通过韦恩图对MEred模块与各组间DEGs取交集,筛选出97个候选基因。基因表达量热图表明,这些候选基因在不同组间表现出显著的表达差异,与CHI组和CKI组比较,CHI+CKI组中部分基因的表达变化幅度更为显著,提示这些基因可能参与CHI与CKI联合抗肿瘤作用过程。见增强出版附加材料。

3.8 GO与KEGG功能富集分析 对97个候选基因进行GO与KEGG富集分析($P<0.05$):GO富集结果显示候选基因主要富集于脂肪酸氧化、脂质代谢重塑、细胞外基质组织、线粒体功能及细胞连接相关的BP。MF层面富集于生长因子活性、受体配体活性、整合素结合及多种酶活性调控。这些结果表明候选基因在能量代谢、细胞结构维持及信号转导过程中具有重要作用。KEGG富集结果显示多条通

路显著富集包括雌激素信号通路、胆碱能突触、松弛素信号通路、色氨酸代谢、cAMP信号通路等。值得注意的是,cAMP信号通路在KEGG富集结果中显著富集。在该通路中,本研究筛选出4个关键的DEGs,cAMP反应元件结合蛋白3样3(CREB3L3)、脑源性神经营养因子(BDNF)、SRY盒转录因子9(SOX9)和谷氨酸离子型受体NMDA型亚基3B(GRIN3B)。其中,CREB3L3作为CREB家族成员,其表达变化直接反映了cAMP信号通路的转录活性;而BDNF是CREB通路的经典下游靶基因,其上调进一步证实了核内转录程序的激活。这些下游靶基因的转录改变提示上游核心信号通路可能被激活,因此后续实验进一步对cAMP/PKA/CREB核心通路相关蛋白的表达进行了验证。见增强出版附加材料。

3.9 Western blot检测HDAC1、cAMP信号通路及细胞周期与凋亡相关的表达 与空白组比较,CHI组、CKI组及CHI+CKI组均显著下调HDAC1($P<0.01$);各给药组均显著上调PKA、p21的表达及p-CREB/CREB、Bax/Bcl-2值($P<0.01$);与CHI组、CKI组比较,CHI+CKI组PKA、p-CREB/CREB值、p21及Bax/Bcl-2值均显著升高($P<0.01$);CHI+CKI组HDAC1表达水平显著低于CKI组($P<0.01$),与CHI组比较差异无统计学意义。见表5、图3。

表5 CHI、CKI及其联合处理对MCF-7细胞中HDAC1、细胞周期、凋亡及cAMP信号通路相关蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 5 Effect of CHI, CKI, and their combined treatment on expression of HDAC1, cell cycle, apoptosis, and cAMP signaling pathway related proteins in MCF-7 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	HDAC1 β -actin	Bax/Bcl-2	p21 β -actin	PKA β -actin	p-CREB/CREB
空白组		1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01
CHI组	1.6	0.27 $\pm$ 0.02 ¹⁾	2.87 $\pm$ 0.05 ¹⁾	8.99 $\pm$ 0.11 ¹⁾	1.98 $\pm$ 0.05 ¹⁾	1.78 $\pm$ 0.05 ¹⁾
CKI组	400	0.59 $\pm$ 0.01 ¹⁾	1.89 $\pm$ 0.04 ¹⁾	5.69 $\pm$ 0.2 ¹⁾	2.70 $\pm$ 0.08 ¹⁾	1.26 $\pm$ 0.01 ¹⁾
CHI+CKI组	1.6+400	0.29 $\pm$ 0.02 ^{1,3)}	5.12 $\pm$ 0.17 ^{1,2,3)}	16.26 $\pm$ 0.93 ^{1,2,3)}	3.61 $\pm$ 0.31 ^{1,2,3)}	2.56 $\pm$ 0.08 ^{1,2,3)}

4 讨论

本研究明确了CHI与中药复方CKI联合应用对HR⁺乳腺癌MCF-7细胞具有显著的协同抗肿瘤活性。该联合方案能有效抑制细胞迁移,诱导显著的G₀/G₁期阻滞并促进细胞凋亡。为进一步探讨联合治疗的分子机制,本研究通过RNA-seq联合WGCNA分析筛选出与细胞抑制率高度相关的关键模块(MEred模块),并通过空白组与CHI组、空白组与CKI组、空白组与CHI+CKI组的组间DEGs取交集,最终获得97个候选基因。对这些候选基因进行GO和KEGG富集分析发现,这些基因主要涉及代

谢调控、细胞结构重塑及信号转导过程。值得注意的是,cAMP信号通路在KEGG富集结果中显著富集,且包含CREB3L3、BDNF等多个关键下游基因的表达改变,提示其上游的PKA/CREB核心信号通路可能已被激活。为证实这一推测,本研究进一步在蛋白水平检测该通路关键分子的表达与磷酸化状态。cAMP信号通路在癌症发生发展中具有重要且复杂的调控作用。cAMP作为经典的第二信使,主要通过激活PKA,进而磷酸化并调控转录因子CREB的活性,从而影响细胞周期、凋亡、增殖等相关基因的表达^[26]。KOK等^[27]在雌激素受体(ER)阳

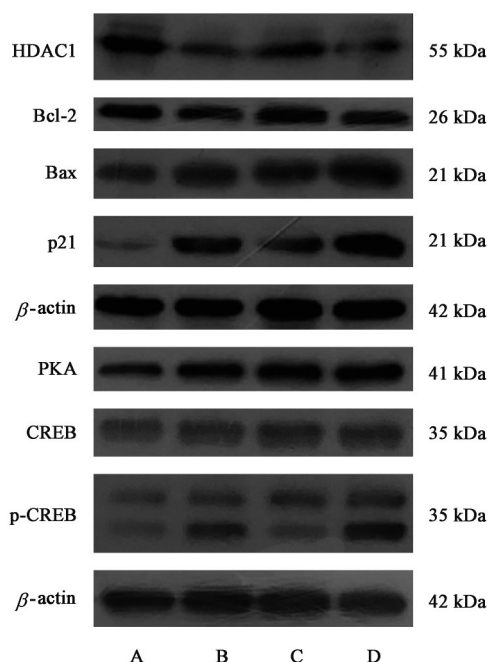


图3 各组MCF-7细胞中HDAC1、细胞周期、凋亡及cAMP信号通路相关蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of HDAC1, cell cycle, apoptosis, and cAMP signaling pathway related proteins in MCF-7 cells of each group

性乳腺癌中发现PKA诱导的ERα S305磷酸化与PAK1水平升高,与三苯氧胺耐药相关。此外,研究表明血清素通过cAMP/PKA信号通路增加线粒体生物合成^[28];胞质G蛋白偶联ER通过cAMP/PKA/CREB信号通路增加有氧糖酵解^[29]。相反,PERSAUD等^[30]研究报道白细胞介素-24(IL-24)能够通过激活PKA,促进肿瘤蛋白p53(TP53)依赖的凋亡和内质网应激,从而抑制乳腺癌细胞生长。这些证据表明,cAMP/PKA/CREB信号通路在HR⁺乳腺癌中是一个复杂且关键的双重调控枢纽。在本研究中,转录组分析提示cAMP信号通路中下游效应基因CREB3L3和BDNF的mRNA水平显著升高。由于这些基因的转录主要受上游PKA-CREB级联反应调控,为研究这一转录改变的上游驱动机制,本研究进一步通过Western blot检测了核心信号蛋白,结果证实了上游PKA表达上调及CREB的磷酸化激活。这种蛋白水平的信号活化直接驱动了下游靶基因的转录响应,构建了从“上游磷酸化激活”到“下游基因表达”的证据链,有力支持了cAMP/PKA/CREB信号通路可能在联合用药协同抗肿瘤效应中的关键调控作用。

CHI作为HDAC抑制剂,已有研究表明其可通过抑制HDAC1活性、提高组蛋白乙酰化水平来恢复抑癌基因表达^[5]。本研究的Western blot结果显

示,CHI组与CHI+CKI组的HDAC1表达水平差异无统计学意义,且均低于CKI组和空白组。这提示CHI主导HDAC1的抑制作用,HDAC1的抑制可能通过影响组蛋白乙酰化状态改变染色质可及性,从而调控下游基因的转录。

已有研究证实HDAC抑制与cAMP/PKA/CREB信号通路之间存在密切的功能联系。ZHANG等^[31]研究揭示,HDAC1通过去乙酰化PKA催化亚基抑制其活性,进而阻断CREB磷酸化;而HDAC1被抑制后,PKA乙酰化激活,进而促进CREB磷酸化和色氨酸羟化酶1(Tph1)转录。VECSEY等^[32]研究证实,HDAC抑制剂可通过增强组蛋白乙酰化水平,提高CREB靶基因启动子区域的染色质可及性,从而增强cAMP/CREB依赖的基因转录。MICHAEL等^[33]研究表明,HDAC抑制剂通过维持染色质乙酰化状态松动核小体结构,增强PKA对CREB的可及性,从而延长CREB Ser133位点的磷酸化持续时间,并持续招募共激活因子CREB结合蛋白/E1A结合蛋白p300(CBP/p300)维持转录激活状态。结合既往研究,HDAC1抑制可能通过影响染色质乙酰化状态或PKA/CREB信号相关调控过程,从而为cAMP/CREB依赖性转录提供有利条件。本研究结果在蛋白表达层面支持这一可能性,但具体分子机制仍有待进一步验证。

在此基础上,联合用药可显著放大信号转导强度。Western blot结果显示,尽管CHI+CKI组HDAC1的表达水平与CHI组相近,但未呈现进一步下调,而cAMP通路下游信号分子PKA表达、p-CREB/CREB值及p21表达和Bax/Bcl-2值均显著高于CHI与CKI单用组。p21作为周期蛋白依赖性激酶抑制剂,其高表达可直接阻滞细胞周期进程;而Bax/Bcl-2值升高则反映线粒体通路凋亡倾向增强。值得注意的是,CHI+CKI组HDAC1水平并未较CHI组进一步降低,这一结果提示,联合治疗增强的抗肿瘤效应可能并不完全依赖于对HDAC1的深度抑制,而可能更多地与PKA/CREB信号通路的激活程度较高有关。值得注意的是,吕路等研究发现CKI的主要活性成分苦参碱可显著增强组织中p-PKA和p-CREB的表达水平,通过活化PKA/CREB信号通路发挥生物学效应^[34]。结合本研究结果,推测CKI可能通过对PKA/CREB信号通路的激活作用,与CHI的表观遗传调控形成机制互补发挥协同抗肿瘤效应,但该通路在协同作用中的确切地位仍需后续功能性实验进一步确证。

尽管本研究揭示了CHI与CKI的协同抗肿瘤作用,但仍存在一定的局限性。本研究仅在MCF-7这一HR⁺乳腺癌细胞系中进行验证,虽然该模型与CHI临床获批的HR⁺适应证相符,但单一细胞系尚无法全面反映三阴性或HER2阳性乳腺癌等其他分子分型对该联合疗法的反应差异;本研究现阶段主要通过体外实验确证协同效应并利用转录组学探索其分子机制,旨在为后续体内实验的给药方案设计 & 关键检测指标的选择奠定基础,尚未开展针对正常细胞的毒性测试及体内动物模型的安全性评估。虽然CHI与CKI均为已获批上市的临床常用药物,且既往多项Meta分析与基础研究表明CKI在联合抗肿瘤药物时具有显著的“增效减毒”作用^[12,14,35-36],但鉴于中药注射剂成分的复杂性,两药联用是否会产生非预期的药物相互作用或加重主要脏器毒性仍属未知。因此,单纯的体外实验尚不足以全面评估该联合方案的临床安全性,在未来的研究中,将构建MCF-7裸鼠移植瘤模型,模拟临床给药途径,检测联合用药对小鼠体重、肝肾功能及重要脏器的影响,利用液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)技术检测血药浓度及组织分布,并结合动物肿瘤组织验证关键分子标志物的变化;收集接受该联合方案治疗的乳腺癌患者的临床样本,检测关键分子标志物的变化,并结合临床疗效评价,从而为该联合方案的体内有效性及临床转化提供更坚实的证据。此外,本研究虽然观察到联合用药后PKA/CREB信号通路相关蛋白表达显著改变,但未采用PKA特异性抑制剂或基因沉默技术(siRNA)阻断该通路以确证其因果关系,仍需功能性实验加以确证。

综上所述,本研究证实CHI与CKI在体外对HR⁺乳腺癌MCF-7细胞具有显著的协同抗肿瘤作用。其机制可能涉及CHI通过抑制HDAC1发挥表观遗传调控作用,联合用药可能进一步通过调控PKA/CREB信号通路增强CREB的磷酸化,进而上调p21与Bax/Bcl-2值,导致细胞周期阻滞与凋亡(机制图见增强出版附加材料)。本研究为这2种药物的临床联合应用提供初步的实验依据与理论支持,并为开发基于表观遗传药物与中药复方联用的乳腺癌治疗新策略提供新的研究思路。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] SUN K, ZHANG B, LEI S, et al. Incidence, mortality, and disability-adjusted life years of female breast cancer in China, 2022[J]. Chin Med J(Engl), 2024, 137(20):2429-2436.
- [2] ZATTARIN E, LEPORATI R, LIGORIO F, et al. Hormone

receptor loss in breast cancer: Molecular mechanisms, clinical settings, and therapeutic implications[J]. Cells, 2020, 9(12): 2644.

- [3] JIN H, WANG L, BERNARDS R. Rational combinations of targeted cancer therapies: Background, advances and challenges[J]. Nat Rev Drug Discov, 2023, 22(3):213-234.
- [4] JAAKS P, COKER E A, VIS D J, et al. Effective drug combinations in breast, colon and pancreatic cancer cells[J]. Nature, 2022, 603(7899):166-173.
- [5] CAO H Y, LI L, XUE S L, et al. Chidamide: Targeting epigenetic regulation in the treatment of hematological malignancy[J]. Hematol Oncol, 2023, 41(3):301-309.
- [6] HE B, WANG Q, LIU X, et al. A novel HDAC inhibitor chidamide combined with imatinib synergistically targets tyrosine kinase inhibitor resistant chronic myeloid leukemia cells[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 129:110390.
- [7] 张会强, 李健斌, 李曼, 等. 《CSCO乳腺癌诊疗指南2025》更新要点解读[J]. 中国肿瘤外科杂志, 2025, 17(3):209-215.
- ZHANG H Q, LI J B, LI M, et al. Interpretation of key updates in the 2025 Chinese Society of Clinical Oncology(CSCO) breast cancer diagnosis and treatment guidelines[J]. Chin J Surg Oncol, 2025, 17(3):209-215.
- [8] JIANG Z, LI W, HU X, et al. Tucidinostat plus exemestane for postmenopausal patients with advanced, hormone receptor-positive breast cancer (ACE): A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial[J]. Lancet Oncol, 2019, 20(6): 806-815.
- [9] 周游, 王雅楠, 张堃, 等. ER阳性乳腺癌中西达本胺逆转内分泌耐药[J]. 深圳大学学报:理工版, 2018, 35(4):339-344.
- ZHOU Y, WANG Y N, ZHANG K, et al. Reverse effect of chidamide on endocrine resistance in estrogen receptor-positive breast cancer[J]. J Shenzhen Univ: Sci Eng, 2018, 35(4), 339-344.
- [10] TONOUZUKA Y, TANAKA H, NOMURA K, et al. The combination of brentuximab vedotin and chidamide synergistically suppresses the proliferation of T-cell lymphoma cells through the enhancement of apoptosis[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2024, 93(2):137-149.
- [11] YE Y, ZHANG B, LIANG Q, et al. Exploring the pharmacological mechanism of compound kushen injection in the treatment of breast cancer using in vitro experiments: Coupling network pharmacology with GEO database[J]. Front Oncol, 2022, 12:946758.
- [12] LI C, NIU D, ZHU R, et al. Adjunctive effect of compound Kushen injection for cancer: An overview of systematic reviews[J]. J Ethnopharmacol, 2023, 317:116778.
- [13] CHEN Y, MA M, XU F. The safety and efficacy of Compound Kushen Injection with chemoradiotherapy for the outcomes of lung and gastrointestinal cancers: A PRISMA-compliant meta-analysis[J]. Medicine(Baltimore), 2024, 103(14):e36758.
- [14] AO M, XIAO X, LI Q. Efficacy and safety of compound Kushen injection combined with chemotherapy on postoperative patients

- with breast cancer: A Meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Medicine*(Baltimore), 2019, 98(3): e14024.
- [15] WANG Y T, LIAO Q Y, DONG Y Z, et al. Compound kushen injection inhibits breast cancer lung metastasis through regulating MTSS1/ARPC3/F-actin [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 350: 120054.
- [16] LI Y, WANG K, CHEN Y, et al. A system pharmacology model for decoding the synergistic mechanisms of compound Kushen injection in treating breast cancer[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 723147.
- [17] LIU S, WANG H, WANG M, et al. Comparative efficacy and safety of Chinese herbal injections combined with cyclophosphamide and 5-fluorouracil chemotherapies in treatment of breast cancer: A Bayesian network meta-analysis[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 572396.
- [18] TIAN F, WEI Y, WANG T, et al. Letter to the Editor Re: Treatment progress of compound Kushen injection and gemcitabine in postoperative patients with bladder cancer and selection of drug delivery mode[J]. *Arch Esp Urol*, 2024, 77(4): 453-454.
- [19] ZHAO X, MENG T, WANG K, et al. Comprehensive evaluation of compound Kushen injection combined with zoledronic acid in treating bone metastasis cancer pain based on Meta-analysis and decision tree model[J]. *Front Pain Res (Lausanne)*, 2024, 5: 1512925.
- [20] SHAO J, YE Z, SHEN Z, et al. Chidamide improves gefitinib treatment outcomes in NSCLC by attenuating recruitment and immunosuppressive function of myeloid-derived suppressor cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 173: 116306.
- [21] HE X, WANG G, WANG Y, et al. Matrine enhances the antitumor efficacy of chidamide in CTCL by promoting apoptosis[J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2025, 20(2): 223-231.
- [22] LIU S, ZHANG K, HU X. Comparative efficacy and safety of Chinese medicine injections combined with capecitabine and oxaliplatin chemotherapies in treatment of colorectal cancer: A Bayesian network meta-analysis[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1004259.
- [23] LIU X, WU Y, ZHANG Y, et al. High throughput transcriptome data analysis and computational verification reveal immunotherapy biomarkers of compound Kushen injection for treating triple-negative breast cancer[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 747300.
- [24] 袁守军. 多药合用药效学协同、相加和拮抗定量计算新方法的建立[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2016, 30(12): 1316-1332. YUAN S J. Establishment of new method for quantitatively calculating synergistic, additive and antagonistic effect in multipledrug combination[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2016, 30(12): 1316-1332.
- [25] 袁守军. 几种常用药物联用计算方法的数学瑕疵和一带一线模型法的解决方案[J]. *中国药物警戒*, 2021, 18(1): 11-17, 29. YUAN S J. Mathematical flaws of commonly used calculating methods of multi-drug combination and solution based on one belt and one line model method[J]. *Chin J Pharmacovigilance*, 2021, 18(1): 11-17, 29.
- [26] AHMED M B, ALGHAMDI A A A, ISLAM S U, et al. cAMP signaling in cancer: A PKA-CREB and EPAC-centric approach [J]. *Cells*, 2022, 11(13): 2020.
- [27] KOK M, ZWART W, HOLM C, et al. PKA-induced phosphorylation of ER α at serine 305 and high PAK1 levels is associated with sensitivity to tamoxifen in ER-positive breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 125(1): 1-12.
- [28] SOLA-PENNA M, PAIXÃO L P, BRANCO J R, et al. Serotonin activates glycolysis and mitochondria biogenesis in human breast cancer cells through activation of the Jak1/STAT3/ERK1/2 and adenylate cyclase/PKA, respectively[J]. *Br J Cancer*, 2020, 122(2): 194-208.
- [29] YU T, YANG G, HOU Y, et al. Cytoplasmic GPER translocation in cancer-associated fibroblasts mediates cAMP/PKA/CREB/ glycolytic axis to confer tumor cells with multidrug resistance[J]. *Oncogene*, 2017, 36(15): 2131-2145.
- [30] PERSAUD L, MIGHTY J, ZHONG X, et al. IL-24 promotes apoptosis through cAMP-dependent PKA pathways in human breast cancer cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(11): 3561.
- [31] ZHANG Y, WANG S, ZHANG L, et al. Protein acetylation derepresses serotonin synthesis to potentiate pancreatic beta-cell function through HDAC1-PKA-Tph1 signaling[J]. *Theranostics*, 2020, 10(16): 7351-7368.
- [32] VECSEY C G, HAWK J D, LATTAL K M, et al. Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB: CBP-dependent transcriptional activation [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(23): 6128-6140.
- [33] MICHAEL L F, ASAHARA H, SHULMAN A I, et al. The phosphorylation status of a cyclic AMP-responsive activator is modulated via a chromatin-dependent mechanism[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(5): 1596-1603.
- [34] 吕路, 梅蕊, 王昉, 等. 苦参碱通过 PKA/CREB 信号通路对阿尔茨海默病大鼠认知障碍及神经炎症的调节作用[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(16): 3931-3934. LYU L, MEI R, WANG F, et al. Regulatory effect of matrine on cognitive impairment and neuroinflammation in rats with Alzheimer's disease via PKA/CREB signaling pathway[J]. *Chin J Gerontol*, 2017, 37(16): 3931-3934.
- [35] LAI B Y, CHU A J, YU B W, et al. Clinical effectiveness and safety of Chinese herbal medicine compound Kushen injection as an add-on treatment for breast cancer: A systematic review and Meta-analysis[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 8118408.
- [36] LIU X, BAI M, LI H, et al. Single-cell RNA-sequencing uncovers compound kushen injection synergistically improves the efficacy of chemotherapy by modulating the tumor environment of breast cancer[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 965342.

[责任编辑 王鑫]