

---分类号_____ 密 级 _____

UDC 注 1 _____

上海中醫藥大學

硕 士 学 位 论 文

论 文 题 目 基于 PD-1/PD-L1 表达影响探讨四君子汤对结肠
癌作用的研究

作 者 姓 名 朱月伊 学 号 22018331

指导教师姓名 石晓兰

专 业 名 称 中医内科学

论文答辩日期 2021 年 5 月 24 日

学位授予单位 上海中医药大学

2021 年 5 月 24 日

上海中医药大学

硕士学位论文

论文题目 基于 PD-1/PD-L1 表达影响探讨四君子汤对结肠癌作用的研究

作者姓名 朱月伊 类别 统招生 (学术学位)

指导教师姓名 石晓兰

专业名称

及授予学位类型 中医内科学

论文答辩日期 2021 年 5 月 24 日

学位授予单位 上海中医药大学

2021 年 5 月 24 日

学位论文答辩委员会成员名单

姓名	职称	工作单位	备注
范忠泽	教授	上海中医药大学附属普陀医院	主任
李和根	教授	上海中医药大学附属龙华医院	委员
刘建文	教授	华东理工大学	委员

*备注栏内请注明答辩委员会主任或委员

目 录

第一部分 四君子汤对 NK 细胞活性及 IFN- γ 分泌的影响	1
1.实验材料.....	1
1.1 人血液标本.....	1
1.2 中药制备.....	1
1.3 主要试剂.....	2
1.4 主要仪器设备.....	2
1.5 主要试剂制备.....	3
2.实验方法.....	4
2.1 人NK 细胞相关方法.....	4
2.2 细胞毒性实验.....	6
2.3 酶联标免疫吸附测定实验.....	7
2.4 荧光定量 PCR 实验.....	8
2.5 统计学处理.....	11
3.实验结果.....	11
3.1 IFN- γ 对人 NK 细胞活性的影响.....	11
3.2 四君子汤对人 NK 细胞分泌 IFN- γ 的影响.....	12
3.3 四君子汤对人 NK 细胞 mRNA 的影响.....	13
4.分析与讨论.....	15
第二部分 四君子汤对 NK 细胞杀伤 HCT116 结肠癌细胞的影响 ...	17
1.实验材料.....	17
1.1 细胞株.....	17
1.2 主要试剂药品.....	17
1.3 主要仪器设备.....	17
1.4 主要试剂的制备.....	17
2.实验方法.....	18
2.1 HCT116 人结肠癌细胞相关方法.....	18
2.2 人NK 细胞相关方法.....	19
2.3 人NK 细胞与 HCT116 结肠癌细胞共培养模型.....	19
2.4 细胞毒性实验.....	20
2.5 酶联标免疫吸附测定实验.....	21
2.6 荧光定量 PCR 实验.....	22
2.7 统计学处理.....	25
3.实验结果.....	25
3.1 四君子汤对共培养模型的影响.....	25

3.2 四君子汤对共培养模型中人 NK 细胞分泌 IFN- γ 的影响	26
3.3 四君子汤对单一 HCT116 的 mRNA 的影响	28
3.4 四君子汤对共培养模型中 mRNA 的影响	29
4.分析与讨论	31
第三部分 四君子汤对结肠癌荷瘤小鼠的影响	33
1.实验材料	33
1.1 主要试剂	33
1.2 主要仪器设备	33
2.实验方法	34
2.1 小鼠 CT-26 结肠癌肿瘤细胞的相关方法	34
2.2 结肠癌荷瘤小鼠皮下瘤模型建立	34
2.3 活体成像技术	34
2.4 荧光定量技术	35
2.5 酶联免疫吸附测定实验	35
2.6 蛋白质免疫印迹技术	35
2.7 免疫组化实验技术	38
2.8 统计学处理及分析	38
3 实验结果	38
3.1 四君子汤对小鼠皮下瘤生长的影响	38
3.2 四君子汤对结肠癌荷瘤小鼠血清中细胞因子表达的影响	40
3.3 四君子汤对结肠癌荷瘤小鼠皮下瘤 PD-L1m RNA 表达的影响	41
3.4 四君子汤对结肠癌荷瘤小鼠皮下瘤蛋白表达的影响	42
3.5 四君子汤对结肠癌荷瘤小鼠皮下瘤抗体表达的影响	43
4、讨论与分析	44
结论	46
参考文献	47
附录	53
PD-1/PD-L1 抗肿瘤免疫治疗研究进展	53
参考文献	58
基于 PD-1/PD-L1 表达影响探讨四君子汤对 NK 细胞及结肠癌作用的研究	63
参考文献	73

英文缩略词

PD-1	Programmed Cell Death Protein 1	程序性死亡受体 1
PD-L1	Programmed Cell Death 1 Ligand 1	程序性死亡配体 1
NK	Natural-killer Cells	自然杀伤细胞
IFN- γ	Interferon γ	γ 干扰素
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	酶联免疫吸附测定实验
STAT3	Signal transducer and activator of transcription3	信号转导与转录激活因子
RNA	Ribonucleic Acid	核糖核酸
mRNA	Messenger RNA	信使核糖核酸
DNA	Deoxyribonucleic Acid	脱氧核糖核酸
cDNA	Complementary DNA	互补脱氧核糖核酸
JAK	Janus Kinase	酪氨酸激酶
IL-2	Interleukin-2	白介素-2
TNF- α	Tumor Necrosis Factor	肿瘤坏死因子
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	十二烷基硫酸钠
SJZ	Sijunzi Decoction	四君子汤
MTT	Methyl Thiazolyl Tetrazolium	噻唑蓝
CD274	Another name of PD-L1	PD-L1 别称

CD279	Anther name of PD-1	PD-1 别称
OXA	Oxaliplatin	奥沙利铂
PBS	Phosphate Buffer Saline	磷酸盐缓冲液
FBS	Foetal Bovine Serum	胎牛血清
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell	外周血单个核细胞
OD	Optocal Density	吸光度（光密度）
R	Napabucasin	STAT3 抑制剂
DEPC	Diethy pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
DdH ₂ O	Distillation-Distillation H ₂ O	二次蒸馏水
NKG2D	Natural Killer Group 2, Member D	活化性受体凝集素样同 型二聚体
AKT1	Protein Kinase B Alpha	蛋白激酶 B

中文摘要

基于 PD-1/PD-L1 表达影响探讨四君子汤对结肠癌作用的研究

目的:

本论文通过建立 NK 细胞与 HCT116 结肠癌细胞共培养模型、结肠癌荷瘤小鼠模型,观察四君子汤对 PD-1/PD-L1 表达及 NK 细胞功能活性的影响,欲验证四君子汤是否可以通过降低 PD-1/PD-L1 的表达来提高 NK 细胞功能活性,增强抗肿瘤能力,探讨四君子汤通过抑制 PD-1/PD-L1 表达提高 NK 细胞功能活性的机制,为四君子汤在临床治疗肿瘤提供一定的实验依据。

方法:

1. 利用细胞毒性实验检测 IFN- γ 对 NK 细胞活性的影响,酶联免疫吸附测定实验检测 NK 细胞中 IFN- γ 的分泌,荧光定量 PCR 实验检测 NK 细胞中 IFN- γ 、PD-1、STAT3 的 mRNA 表达,以观察四君子汤对 NK 细胞上 PD-1 的作用并探讨四君子汤影响 PD-1 表达的机制;
2. 建立 NK 细胞与 HCT116 结肠癌细胞共培养模型,利用细胞毒性实验检测 HCT116 结肠癌肿瘤细胞的存活率,酶联免疫吸附测定实验检测共培养模型中 IFN- γ 的分泌,荧光定量 PCR 实验检测共培养模型中 NK 细胞的 IFN- γ 、PD-1、STAT3 的 mRNA 表达,以及共培养模型中 HCT116 细胞的 STAT3 和 PD-L1 的 mRNA 表达,观察四君子汤对 NK 细胞杀伤 HCT116 细胞作用以及 PD-1/PD-L1 表达的影响,以探讨四君子汤是否可以通过影响 PD-1/PD-L1 表达提高 NK 细胞对 HCT116 的杀伤作用。
3. 建立结肠癌荷瘤小鼠给药模型,利用活体成像技术检测各组间小鼠皮下瘤的荧光强度观察皮下瘤生长情况,酶联免疫吸附测定实验检测小鼠血液中 IFN- γ 的分泌情况,荧光定量 PCR 实验检测小鼠皮下瘤中 PD-L1 和 STAT3 的 mRNA 表达,蛋白质免疫印迹技术实验和免疫组化实验检测小鼠皮下瘤 PD-L1 蛋白及抗体的表达,以探讨四君子汤对结肠癌荷瘤小鼠肿瘤生长及相关免疫通路蛋白的影响。

结果:

1. 通过细胞实验显示,与空白对照组 (Ctrl) 相比,一定浓度下的 IFN- γ 对人 NK 细胞生长有明显的抑制作用 ($P < 0.05$); 24h 和 48h 的 5mg/ml 四君子汤均可以降低 IFN- γ 分泌 ($P < 0.05$); 四君子汤可以使 NK 细胞中的 IFN- γ mRNA ($P < 0.01$)、PD-1 mRNA、STAT3 mRNA ($P < 0.05$) 表达均降低; 四君子汤在加入 STAT3 抑制剂后可以更加显著降低 NK 细胞 IFN- γ 的分泌 ($P < 0.01$), 并且依然可以显著降低人 NK 细胞中 PD-1 mRNA, STAT3 mRNA, IFN- γ mRNA 表

达 ($P<0.01$)。

2. 与空白对照组 (Ctrl) 相比较, 四君子汤可以增强共培养模型中 NK 细胞对 HCT116 细胞杀伤作用 ($P<0.05$); 在 24h 和 48h 时, 5mg/ml 四君子汤可以降低共培养模型中人 NK 细胞 IFN- γ 的分泌 ($P<0.05$); 在 24h 下, 四君子汤还可以降低单一 HCT116 细胞中 PD-L1 和 STAT3 的 mRNA 的表达 ($P<0.01$); 并在联合 STAT3 抑制剂后, 使 HCT116 细胞中 PD-L1 mRNA, STAT3 mRNA 表达更明显降低 ($P<0.01$); 四君子汤也可以降低共培养模型中 NK 细胞 IFN- γ ($P<0.05$)、PD-1 ($P<0.05$)、STAT3 ($P<0.01$) 的 mRNA 的表达, 同时, 可以降低共培养模型中 HCT116 细胞 PD-L1 ($P<0.05$)、STAT3 ($P<0.05$) 的 mRNA 的表达, 在加入 STAT3 抑制剂后, 共培养模型中 IFN- γ 分泌降低更为明显 ($P<0.05$), 并且在共培养 NK 细胞与 HCT116 细胞 mRNA 上的降低也较为显著。
3. 通过动物实验显示, 与生理盐水组对比, 四君子汤组皮下瘤生长速度为生理盐水组的 62%, 即四君子汤对肿瘤生长具有抑制的作用 ($P<0.05$); 并且, 四君子汤组小鼠肿瘤的荧光强度低于生理盐水组和空白组 ($P<0.05$); 四君子汤组小鼠血清中 IFN- γ 分泌量降低 ($P<0.05$); 四君子汤组小鼠皮下瘤中 PD-L1 mRNA 表达降低 ($P<0.01$)。

结论:

1. IFN- γ 一定浓度下可以抑制 NK 细胞生长, 四君子汤可以降低 NK 细胞中 IFN- γ 的分泌。
2. 四君子汤可以影响 NK 细胞功能活性, 其作用可能与 STAT3 抑制剂相近, 通过调控 STAT3 信号干预 IFN- γ 的分泌, 降低 PD-1/PD-L1 的表达从而改善 NK 细胞功能活性抑制 HCT116 结肠癌细胞的生长。

关键词:

NK 细胞; PD-1/PD-L1; 四君子汤; 结肠癌; STAT3; IFN- γ

Abstract

Study on the Effect of Sijunzi Decoction on Colon Cancer based on the Expression of PD-1 / PD-L1

Objective:

To observe the effect of Sijunzi Decoction on the expression of PD-1 / PD-L1 and the activity of NK cells by establishing the co culture model of NK cells and HCT116 colon cancer cells and the model of colon cancer bearing mice, and to verify whether Sijunzi Decoction can improve the activity of NK cells and enhance the anti-tumor ability by reducing the expression of PD-1 / PD-L1, and to explore whether Sijunzi Decoction can improve the activity of NK cells by inhibiting the expression of PD-1 / PD-L1 The mechanism of cell activity provides a certain experimental basis for Sijunzi Decoction in the clinical treatment of cancer.

Method:

1. Cytotoxicity test was used to detect the effect of IFN - γ on NK cell activity, enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the secretion of IFN - γ in NK cells, and fluorescent quantitative PCR was used to detect the mRNA expression of IFN - γ , PD-1 and STAT3 in NK cells;
2. The survival rate of HCT116 colon cancer cells was detected by cytotoxicity assay. The secretion of IFN - γ was detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The mRNA expression of IFN - γ , PD-1 and STAT3 in NK cells and HCT116 cells were detected by fluorescence quantitative PCR Objective to investigate whether Sijunzi Decoction can improve the killing effect of NK cells on HCT116 cells by affecting the expression of PD-1 / PD-L1.
3. In vivo imaging technique was used to detect the fluorescence intensity of subcutaneous tumor to observe the growth of subcutaneous tumor. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the secretion of IFN - γ in the blood of mice. Fluorescent quantitative PCR was used to detect the mRNA expression of PD-L1 and STAT3 in subcutaneous tumor. Western blot and immunohistochemistry were used to detect the expression of PD-L1 and STAT3 in subcutaneous tumor To investigate the effect of Sijunzi Decoction on tumor growth and related immune pathway proteins in colon cancer bearing mice.

Result:

1. Compared with the blank control group (CTRL), IFN - γ at a certain concentration significantly inhibited the growth of human NK cells ($P < 0.05$); Sijunzi Decoction at the concentration of 5mg / ml for 24h and 48h could reduce the secretion of IFN - γ ($P < 0.05$); Sijunzi decoction could increase the expression of IFN - γ mRNA ($P < 0.01$) and PD-1 in NK cells Sijunzi Decoction in combination with STAT3 inhibitor can more significantly reduce the secretion of IFN - γ in NK cells, with statistical significance ($P < 0.01$), and still can significantly reduce the expression of PD-1 mRNA, STAT3 mRNA, IFN - γ mRNA in human NK cells, with statistical significance ($P < 0.01$).
2. Compared with the blank control group (CTRL), Sijunzi Decoction could enhance the killing effect of NK cells on HCT116 cells in the co culture model ($P < 0.05$); at 24h and 48h, 5mg / ml Sijunzi Decoction could reduce the secretion of IFN - γ of human NK cells in the co culture model ($P < 0.05$); at 24h, Sijunzi Decoction could also reduce the mRNA of PD-L1 and STAT3 in single HCT116 cells After combined with STAT3 inhibitor, the expression of PD-L1 mRNA in HCT116 cells decreased significantly ($P < 0.01$), STAT3 Sijunzi Decoction could also reduce the mRNA expression of IFN - γ ($P < 0.05$), PD-1 ($P < 0.05$) and STAT3 ($P < 0.01$) of NK cells in co culture model, and could also reduce the mRNA expression of PD-L1 ($P < 0.05$) and STAT3 ($P < 0.05$) of HCT116 cells in co culture model In the model, the secretion of IFN - γ decreased more significantly ($P < 0.05$), and the mRNA of co cultured NK cells and HCT116 cells also decreased significantly.
3. Compared with the normal saline group, the growth rate of subcutaneous tumor in Sijunzi Decoction group was 62 %The results showed that Sijunzi Decoction could inhibit the growth of tumor with statistical significance ($P < 0.05$); the fluorescence intensity of tumor in Sijunzi Decoction group was lower than that in normal saline group and blank group ($P < 0.05$); the secretion of IFN - γ in serum of Sijunzi Decoction group was decreased with statistical significance ($P < 0.05$); the expression of PD-L1 mRNA in subcutaneous tumor of Sijunzi Decoction group was decreased ($P < 0.05$) 01), there was statistical significance.

Conclusion:

1. IFN- γ Sijunzi Decoction can inhibit the growth of NK cells, and reduce the IFN in NK cells- γ The secretion of blood.

2. Sijunzi Decoction can affect the function and activity of NK cells, and its effect may be similar to that of STAT3 inhibitor. Sijunzi Decoction can intervene IFN by regulating STAT3 signal- γ It can improve the function and activity of NK cells and inhibit the growth of HCT116 colon cancer cells by reducing the expression of PD-1 / PD-L1.

Key words:

NK cell; PD-1/PD-L1; Sijunzi Decoction; Colon cancer; STAT3; IFN- γ

引言

结肠癌是最常见的恶性肿瘤之一，世界卫生组织国际癌症中心 2021 年 1 月公布的最新癌症统计数据表明：结肠癌在全球新发癌症发病率和死亡率中分别排名第三和第二^[1]；我国结直肠癌的发病率和死亡率均保持上升趋势，2018 年中国癌症统计报告显示：我国结直肠癌发病率和死亡率在全部恶性肿瘤中分别位居第三及第五位，新发病例 37.6 万，死亡病例 19.1 万。其中，城市高于农村，且结肠癌发病率上升显著，多数病人在确诊时已属中晚期^[2]。自 2020 年统计的最新数据表明，癌症已经成为中国居民死亡的首要原因^[3]。由此可见，结肠癌对人类的生命存在巨大威胁。

手术和化疗是结肠癌治疗的主要手段，但是，由于手术无法检测和清除残存的微转移病灶，因此无法达到彻底根治结肠癌的目的，甚至是为癌症的复发提供可能^[1]；越来越多的证据表明，化疗的非特异性会损害人体正常细胞以及改变肿瘤微环境，从而影响肿瘤的发生发展^[4,5]，并且，化疗带来的一些副作用会加速病情的恶化^[6]，促进肿瘤的复发及转移^[7,8]。因此寻找副作用小且有效的治疗方法诊疗结肠癌成为必然。

结肠癌属中医“肠风下血”、“肠积”、“脏毒”等范畴，中医古籍中有许多关于结肠癌的论述。《圣济总录》云：“脾胃虚弱，饮食累伤，积久不去，结在肠内，与正气交争……积块有形。”；《周慎斋遗书》中有云：“肠风泄泻，血出于脾，浓朴丸。心火乘脾，血出于心”；《医宗金鉴》中则写道：“发于外者，由醇酒厚味，勤劳辛苦，蕴注于肛门，两旁肿突……发于内者，兼阴虚湿热，下注肛门，内结壅肿，刺痛如锥”；还有《景岳全书》指出：“若饥饱无伦，饮食迭进，以致阳明胃气一有所逆，则阴寒之气得以乘之，而脾不及化，故余滞未消，乃并肠外汁沫搏聚不散，渐成积矣。”由此不难看出：古代医家认为结肠癌的病因可分为脾胃虚弱、气机不调、邪气内侵、湿热内结、热毒内蕴以及痰湿阻滞，其中脾胃虚弱为主要病因，因此，中医治疗以益气健脾最为主要：健脾气以强运化，脾气强健则生化之源充足，水谷精微得以化为正气，正气得养积得消，正如金源四大家之一的张元素所说“养正积自消”。

四君子汤是治疗恶性肿瘤的临床常用方^[9,10]，也是临床上治疗脾胃疾病、增强免疫力的经典方剂^[11]。最早出自于《太平惠民和剂局方》，方中包含人参、白术、茯苓、炙甘草四味中药，主要功效为补脾益气。近几年在关于四君子汤扶正抗癌的研究中发现四君子汤对结肠癌^[12]、肺癌^[13]、肝癌^[14]和胃癌^[15]等的转移和复发都具有良好的预防作用，对延长患者生存期和改善生活质量方面有较好作用。

近几年免疫疗法在恶性肿瘤的治疗中取得了许多成果和突破，越来越多的人开始选择免疫疗法。而免疫疗法也从最初以关注 T 细胞为主转变为关注更多的免

疫细胞，NK 细胞便是新兴的免疫疗法关注点之一^[16]。众所周知，与抑制 PD-1 和 PD-L1 相关的免疫疗法在许多实体瘤治疗中成效显著，随着研究的深入，许多研究者发现 PD-1/PD-L1 的抑制会使 NK 细胞活性大大增强^[17]。最近有证据表明 PD-1 可以在 NK 细胞中表达^[18,19]，同时有文献指出，在消化系统的恶性肿瘤中 PD-1 对 NK 细胞抗肿瘤活性的影响尤为突出^[18]，尽管如此，PD-1 影响 NK 细胞活性的详细机制并不十分清楚，因此，研究 NK 细胞与 PD-1、PD-L1 的关系变得尤为重要。

NK 细胞是最重要的免疫细胞之一，其细胞毒性在抗病毒和抗肿瘤免疫过程中发挥重要的作用^[20,21]，研究发现 PD-1 在卵巢癌^[19]、多发性骨髓瘤^[22]等癌症患者血液的 NK 细胞中表达增强；在食道癌和肝癌诊疗方面，NK 细胞上 PD-1 表达的增强预示预后较差^[23]；在一项针对消化道癌患者外周血 NK 细胞的研究中发现：消化道癌患者外周血 NK 细胞 PD-1 表达水平明显高于健康人，随着 PD-1 表达水平的升高，NK 细胞出现更多的凋亡^[23]；目前 NK 细胞已在胃肠道恶性肿瘤及肺腺癌的检测中，作为预测无进展期的独立因素^[19]。

JAK/STAT 信号通路与很多癌症的发生发展密切相关，有关于 JAK/STAT 信号通路的研究发现 JAK/STAT 信号通路可以介导和激活许多与 NK 细胞相关的细胞因子^[20,24]，最近有研究指出，STAT3 是 NK 细胞毒性的负调节剂^[25]，许多癌症的发生发展都与 STAT3 信号的过度激活密切相关^[26]，而免疫逃逸则可能是 STAT3 驱动 PD-1 表达上调所造成的结果^[27]，有研究者推测使用 STAT3 抑制剂治疗可能会使 NK 细胞的细胞毒性增强^[20]；同时，有研究发现 JAK2/STAT3 下游能够调节 NK 细胞中 IFN- γ 的分泌^[28]。

综上所述，基于本课题组前期的研究成果显示：四君子汤可以在降低小鼠结肠癌原发瘤切除术后转移瘤生长速率，同时使瘤体内 NK 细胞总数及活化比例增加，四君子汤还可以增加外周血及脾脏中 NK 细胞的活化比例，以及增加外周血中 IL-2、TNF- α 的分泌。欲通过本论文进一步观察四君子汤对 NK 细胞的影响，探讨四君子汤能否通过影响 NK 细胞中 PD-1/PD-L1 表达来达到治疗结肠癌的目的。

第一部分 四君子汤对 NK 细胞活性及 IFN- γ 分泌的影响

根据美国 2021 年初公布的癌症新发病率统计数据显示：结直肠癌在男性和女性中的发病概率均为 8%，但男性死亡率略高于女性，分别为 9%和 8%^[29]。在我国最新癌症发病统计中发现结肠癌发病率为 12.2%^[3]。

目前，手术和化疗由于各自的局限性导致并不能十分有效的达到根治肿瘤和提高患者生活质量的目的，更无法预防复发及转移。

四君子汤是临床用以辅助治疗癌症的常用方剂^[10,11]，对许多癌症的复发及转移具有良好的预防作用^[12~15]。NK 细胞作为最重要的免疫细胞之一，能够在肿瘤发生的早期识别并在对其产生细胞毒性，同时，NK 细胞还会调节其他免疫细胞产生适应性免疫以增强机体的抗肿瘤能力。随着肿瘤的发展，NK 细胞的功能和活化程度会受到严重抑制^[30]，由于 NK 细胞发挥抗肿瘤作用的关键在于 NK 细胞活性，所以关于提高 NK 细胞相关疗法疗效研究的关键点之一就是提高 NK 细胞的活性。

本课题组前期研究成果发现：四君子汤可能以上调 NK 细胞中 CD335、NKG2D 两种活化受体表达的方式达到抑制结肠癌原发瘤切除术后转移瘤生长的目的^[31]。为了明确四君子汤是否可以通过影响 IFN- γ 的分泌改善 NK 细胞活性，我们从人外周血淋巴细胞中提取 NK 细胞，探讨四君子汤对 NK 细胞活性及 IFN- γ 分泌的影响。

1. 实验材料

1.1 人血液标本

于上海市长海医院血站购置全部指标均在正常范围内的健康人血。

1.2 中药制备

四君子汤所需中药材为红参、白术、茯苓、炙甘草于上海市雷允上药业有限公司购置，共计 5 付，即红参 30g，白术 45g，茯苓 45g，炙甘草 30g，并经由上海中医药大学中药学院制备。将药物与水体积按 1:6 浸泡 12h，进行 90℃加热 3 次回流提取后，再采用过滤、蒸发等方式制成干粉剂，所提取的药物中有效成分比例为 32%。用实验室电子天平定量称取后，使用灭菌超纯水充分溶解，过滤后，进行灭菌，于超净台内进行分装，拧紧瓶盖，使用封口膜密封后标记好试剂名称、浓度、实验者、日期，少量于 4℃冷藏保存，以便实验使用；其余于-20℃冷冻以长期保存。

1.3 主要试剂

试剂名称	生产公司	批号
RPMI-Medium 培养基	美国 HyClone	AE29163437
FETAL BOVINE SERUM	美国 GEMINI	A24G00J
Penicillin-Streptomycin	中国 BOSTER 公司	PYG0016
磷酸盐缓冲液 (10X)	中国 Sangon 公司	F715FA0002
噻唑蓝 MTT	中国 Solarbio 公司	424B0510
十二烷基硫酸钠 SDS	中国 Solarbio 公司	521S031
人外周血淋巴分离液	中国灏洋科技有限公司	LTS1077
Anti-human CD274	eBioscience 公司	12-5983-71
Anti-human CD279	eBioscience 公司	12-9969-42
TRNzol Reagent	TIANGEN 公司	DP405
TB Green TM Premix EX Taq TM II(TliRNaseH Plus)	TAKARA 公司	Scipu002333
Prime Script TM RT Master Mix(Perfect Real Time)	TAKARA 公司	RR036Q
Human IFN-gama ELISA Kit	MultiSciences 公司	70-EK180-48
Rat IL-2	PEPROTECH 公司	96-400-02-5
IFN-gama	PEPROTECH 公司	AF-300-02
Napabucasin STAT3 抑制剂	美国 MCE 公司	83280-65-3
奥沙利铂	Target molecule Corp 公司	61825-94-3
人 NK 细胞分选试剂盒	加拿大 Stemcell Technologies 公司	15025

1.4 主要仪器设备

主要仪器设备	生产公司	型号
净化工作台	美国 ESCO 公司	SVE-6A1
生物安全柜	美国 ESCO 公司	SVE-4A1
微量小型移液器	美国 Thermo 公司	4640040

精密电子天平	北京 Sartorius 公司	QUINITIX313-1CN
恒温磁力搅拌器	美国 Thermo 公司	94-2
水源纯化系统	美国 MILLIPORE 公司	Milli-Q Direct8
全自动细胞计数仪	美国 Life 公司	Countess II FL
导置相差显微镜	德国 Leica 公司	DMI3000B
常温离心机	德国 Eppendorf 公司	5702
低温离心机	德国 Eppendorf 公司	5810R
高速低温离心机	德国 Eppendorf 公司	5804R
高速冷冻离心机	美国 Thermo 公司	Micro CL21R
CO ₂ 培养箱	英国 RS Biotech 公司	170-200PLUS
恒温电热水浴锅	上海精宏实验设备有限公司	DK-S22
医用冷藏柜	青岛 Haier 有限公司	HYC-608
实时梯度 PCR 仪	美国 Thermo 公司	Veriti DX
实时荧光定量 PCR 仪	美国 Life technologies 公司	VILA 7 DX
超低温保存箱	青岛 Haier 公司	DW-86L388A
超低温冰箱	美国 Thermo 公司	902
多功能全自动酶标仪	美国 Thermo 公司	VARIOSKAN LUX
流式自动细胞仪	美国优宁维公司	FACS Calibur

1.5 主要试剂制备

1.5.1 灭菌超纯水

接取全自动纯化系统处理后的超纯水 500ml 于玻璃灭菌瓶中，进行高温灭菌，120°C，20min；待冷却至室温，标记名称、实验者、日期，使用封口膜密封后，放入 4°C 冰箱冷藏保存。

1.5.2 胎牛血清 (FBS)

将全新未拆封的胎牛血清于室温或 4°C 环境下进行解冻后，待解冻完全，上下颠倒摇匀，在净化工作台中进行过滤，过滤器规格为 0.22μm，使用 50ml 离心管进行分装，40ml/管，标记试剂名称、实验者、日期，使用封口膜密封后，少部分于 4°C 冷藏保存，其余放入 -20°C 冷冻进行长期保存。

1.5.3 青霉素-链霉素溶液 (Penicillin-Streptomycin)

将全新未拆封的青霉素-链霉素溶液于室温或 4°C 冷藏完全解冻后, 在净化工作台使用 15ml 离心管进行分装, 即 10ml/支, 标记试剂名称、实验者、日期后, 少量于 4°C 冷藏保存用于实验, 其余于 -20°C 冷冻长期保存。

1.5.4 磷酸盐缓冲液 (1X)

在净化工作台, 将全新 PBS (10X) 进行分装, 50ml/支后, 取 1 支分装好的 PBS (10X) 加入 1000ml 烧杯中, 再加入灭菌超纯水至 500ml, 使用恒温磁力搅拌器对密封好的烧杯进行搅拌, 设置为中速搅拌 30min。将完成搅拌的 PBS

(1X) 从烧杯中转移至 500ml 玻璃灭菌瓶中, 进行高温灭菌, 120°C, 20min。待冷却至室温, 标记试剂名称、实验者、日期, 用封口膜密封, 于 4°C 冷藏保存。

1.5.5 含 3% 双抗的磷酸盐缓冲液 (1X)

在净化工作台, 取 1 支 50ml 离心管, 加入 1.2ml 双抗后, 加入 PBS(1X) 至 40ml, 上下颠倒混匀, 用封口膜密封, 并标记试剂名称、实验者、日期, 于 4°C 冷藏保存。

1.5.6 人 NK 细胞培养液 [20%FBS, 1%双抗]

在净化工作台, 取 1 支 50ml 离心管加入 9ml FBS, 0.45ml 双抗后, 加入 RPMI-Medium 培养基至 45ml, 上下颠倒混匀, 标记试剂名称、实验者、日期, 试验后, 剩余部分, 于 50ml 离心管中, 使用封口膜密封, 于 4°C 冷藏保存。

1.5.7 十二烷基硫酸钠溶液 (SDS 10%)

使用精密电子天平称取 10g SDS 粉末加入 200ml 玻璃灭菌瓶中, 在生物安全柜内, 向 SDS 粉末中加入 100ml 灭菌水后, 加入 100 μ l 10mM/ml 的浓盐酸, 盖上瓶盖, 静置 24h, 封口膜封口后, 标记试剂名称、实验者、日期, 于室温保存。

1.5.8 噻唑蓝溶液 (MTT)

使用 15ml 离心管收集由精密电子天平所称取的 MTT 粉末 50mg, 在生物安全柜内向 MTT 粉末中加入 10ml PBS (1X), 混匀后, 室温静置 5min, 盖紧瓶盖, 置于超声波共振仪中, 启动仪器, 超声震荡 15min, 于 4°C 条件下静置 24h 后, 于净化工作台使用 EP 管进行分装, 标记试剂名称、实验者、日期, 于 -20°C 冷冻保存。

2. 实验方法

2.1 人 NK 细胞相关方法

2.1.1 人外周血淋巴细胞的分离

1) 首先使用灭菌超纯水配制 80ml 含 3% 双抗的 PBS (1X) 溶液, 40ml/支,

共 2 支，即 1.2ml 双抗+4mlPBS(10X)+34.8ml 灭菌超纯水；

2) 取 1 支 50ml 离心管，将其中一支 40ml 含 3%双抗的 PBS (1X) 平分，即 20ml/支，加入等体积 (20ml) 人外周血，使用 3ml 吸管吹匀，制成血液稀释液；

3) 取 10 支 15ml 离心管，加入人外周血淋巴细胞分离液，4ml/支；

4) 缓慢贴壁向装有 4ml 人外周血淋巴分离液的离心管中加入吹匀的血液稀释液，使其浮于人外周血淋巴分离液上，不得打破液面平衡，此处比例为 2:1，即加入 8ml 血液稀释液；

5) 10 支离心管在常温离心机内呈中心对称配平后，进行离心，设置为 400XG，20min，室温；

6) 离心后，液面总共分为 4 层，由下至上依次为红细胞层 (呈暗红色) — 分离液层 (呈透明色) — 淋巴细胞层 (呈灰白色) — 血清及组织液层 (呈半透明淡黄色)；

7) 吸取淋巴细胞层液体，按 1:1 比例加入 2 支装有 20ml 含 3%双抗的 PBS (1X) 中，混匀，制成淋巴细胞稀释液；

8) 将淋巴细胞稀释液进行离心，设置为 200XG，10min，室温；

9) 配制含 20%胎牛血清+1%双抗的 NK 细胞培养液 60ml，即 12ml 胎牛血清+0.6ml 双抗+47.4mlRPMI Medium 培养基，上下颠倒混匀，备用；

10) 离心后的 2 支离心管弃上清，并向沉淀中各加 5ml NK 细胞培养液，吹匀；

11) 将 2 支吹匀后的细胞悬液混合为 1 支并稀释至 20ml，再次吹匀；

12) 将吹匀后的细胞悬液取少量滴入电子细胞计数板 A 孔；再次吹匀，取少量滴入 B 孔；

13) 使用电子细胞计数器、选取常规视野，对 A、B 两孔分别进行计数，每侧重复 3 次，取平均值 (浓度在 1×10^7 个/ml 上下浮动)；

14) 根据人外周血淋巴细胞最适生长浓度为 300×10^4 个/ml，进行人外周血淋巴细胞悬液的配制；将 20ml 人外周血淋巴细胞悬液吹匀后，平分至两支离心管中，各加入 20ml NK 细胞培养液，吹匀；

15) 将人外周血淋巴细胞悬液吹匀，缓慢转移至 10cm 细胞培养皿中，10ml/皿，共 6 个，标记细胞浓度、名称、实验者、日期后，培养于 37°C，5%CO₂ 的细胞培养箱。

2.1.2 人外周血淋巴细胞的提取

1) 从培养箱取出培养 12h 后的人外周血淋巴细胞，使用移液器吸取培养皿中细胞上清液，并平分于 2 支 50ml 离心管中，约 30ml/支；

- 2) 两支 50ml 离心管在常温离心机中呈中心对称配平进行离心, 设置为 200XG, 10min;
- 3) 配制 45ml 人外周血细胞培养液, 含 20%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素溶液, 即 9ml 胎牛血清+0.45ml 青霉素-链霉素溶液+35.5mlRPMI Medium 培养基, 混匀;
- 4) 向离心完成并弃上清的人外周血淋巴细胞沉淀中, 各加入 5ml 人外周血淋巴细胞培养液吹匀后, 合二为一, 进行第二次吹匀;
- 5) 使用电子细胞计数器进行计数, 同 2.1.1 步骤 12、13;
- 6) 根据外周血淋巴细胞最适细胞密度 300×10^4 个/ml, 将细胞悬液稀释吹匀备用。

2.1.3 人 NK 细胞的纯化

- 1) 使用人 NK 细胞富集试剂盒对人外周血淋巴细胞悬液进行磁珠分选, 分离非目的细胞;
- 2) 通过流式细胞检测技术, 检测 CD56⁺评估 NK 细胞纯度, 达到实验所需 (纯度 > 90%)。
- 3) 根据 NK 细胞最适生长密度为 30×10^4 个/ml, 配制 NK 细胞悬液, 并分装于 T25 透气盖细胞培养瓶, 5ml/瓶, 标记细胞浓度、名称、实验者、日期后, 培养条件为 37°C, 5%CO₂。

2.2 细胞毒性实验

2.2.1 IFN- γ 对人 NK 细胞

- 1) NK 细胞的分离、提取与提纯见 2.1.1, 2.1.2, 2.1.3;
- 2) 取出一块 96 孔平底细胞培养板, 标记好分组及给药区域;
- 3) 将 NK 细胞以 30×10^4 个/ml 的浓度进行造模, 100 μ l/孔, 共计 60 个孔, 最外侧一圈孔中加入 PBS (1X), 200 μ l/孔;
- 4) 按照划分区域分别进行 IFN- γ 给药 (200ng/ml), IL-2 (阳性对照组) 给药 (200ng/ml)、PBS (1X), IFN- γ 和 IL-2 每类浓度药物连续加 1 列 6 个竖孔, PBS (1X) 连续加 1 列 6 个竖孔, 共计 18 个孔, 其余作为空白对照组;
- 5) 药物 24h 后, 加入 MTT 溶液, 10 μ l/孔;
- 6) 3.5h 后, 加入 10%SDS 溶液, 100 μ l/孔;
- 7) 24h 后, 使用酶标仪测 OD 值, 选择波长在 570nm 处。
- 8) 48h 组操作同步骤 1~7。

2.3 酶联标免疫吸附测定实验

2.3.1 四君子汤对人 NK 细胞

1) 取两块 12 孔平底细胞培养板, 进行组别划分, 并标记细胞名称、浓度、实验者、日期;

2) 将人 NK 细胞以 50×10^4 个/ml 浓度差进行铺板, 500 μ l/孔, 共计 12 孔;

3) 按照划分区域, 进行四君子汤 (5mg/ml), 奥沙利铂 (100 μ M, 参照组) 给药, 每组 3 个孔;

组别	孔数
空白对照组[24h,48h]	3
四君子汤 (5mg/ml) [24h,48h]	3
奥沙利铂 (100 μ M) [24h,48h]	3

4) 加药完毕后, 放入 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 培养箱, 24h 后, 收集上清至对应编号的 15ml 离心管中;

5) 将 9 支 15ml 离心管呈中心对称放入常温离心机中进行离心, 设置为 1000r, 10min;

6) 使用 9 支对应编号的 1.5ml 灭菌 EP 管收集离心后的上清液, 于-80 $^{\circ}$ C冰箱中保存。

7) 48h 操作同步骤 1~6;

8) 根据说明书绘制标准曲线;

9) 根据标准曲线建立标准方程;

10) 用试剂盒中的板架固定所需数量的板条, 标注好计划顺序及组别;

11) 使用量程为 200 μ l 排枪向各个板条的 8 个孔加入洗涤液 (1X) 进行洗涤, 400 μ l/孔, 静置 30s, 甩出液体, 拍干;

12) 重复步骤 10 一次;

13) 样本液于室温解冻完全后, 向板条中按照计划顺序及组别依次加入 50 μ l 样本液、50 μ l 缓冲液 (1X) 及 50 μ l 稀释抗体 (1X), 注意三者加入顺序不得调换;

14) 使用封口膜密封板条后, 用锡纸完全覆盖并放入遮光盒中, 室温条件下, 摇床 150 次/min, 2H;

15) 将板条中液体甩出, 并在滤纸上拍干后, 重复步骤 10 六次;

16) 使用排枪向板条中加入 HRP (1X), 100 μ l/孔, 使用封口膜密封、锡纸遮光并放入遮光盒后, 室温条件下, 摇床 150 次/min, 45min;

17) 重复步骤 10 一次后, 重复步骤 12 六次;

18) 于暗室加入 TMB, 100 μ l/孔, 并在室温条件下, 摇床 150 次/min, 15-

20min (视显色情况而定), 显色后, 使用终止液进行终止, 100 μ l/孔;

19) 使用自动多功能酶标仪, 在波长为 450nm、570nm、630nm 处分别进行 OD 值检测;

20) 将数值 Δ (450-630) 带入标准方程并乘以 2, 即可得到 IFN- γ 的表达量。

2.3.2 加入 STAT3 抑制剂对人 NK 细胞

1) 同 2.3.1 步骤 1、2;

2) 按照划分区域, 进行四君子汤 (5mg/ml), 奥沙利铂 (100 μ M, 参照组) 给药, 每组 3 个孔;

组别	孔数
空白对照组[24h,48h]	3
STAT3 抑制剂 (2 μ M) [24h,48h]	3
四君子汤 (5mg/ml) +STAT3 抑制剂 (2 μ M) [24h,48h]	3
奥沙利铂 (100 μ M) +STAT3 抑制剂 (2 μ M) [24h,48h]	3

3) 同 2.3.1 步骤 4;

4) 将 12 支 15ml 离心管呈中心对称放入常温离心机中进行离心, 设置为 1000r, 10min;

5) 使用 12 支对应编号的 1.5ml 灭菌 EP 管对离心后的上清液进行收集, 于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

6) 48h 操作同步骤 1~5;

7) 同 2.3.1 步骤 8~19。

2.4 荧光定量 PCR 实验

2.4.1 四君子汤对人 NK 细胞

1) 取一块六孔平底细胞培养板并进行组别划分, 分别为 24hCtrl (1), Ctrl (2), OXA (100 μ M, 参照组), 四君子汤 (5mg/ml);

2) 将人 NK 细胞以 50*10⁴ 个/ml 浓度, 在六孔板中进行造模, 1ml/孔, 共 6 个孔;

3) 按照组别进行加药;

4) 24h 后统一收集上清液至各自对应编号的 15ml 离心管中, 并使用 PBS (1X) 冲洗板底, 1ml/孔, 加入各自对应组别编号的离心管中;

5) 在常温离心机中呈中心对称摆放后, 进行离心, 1000r, 10min;

6) 离心后, 弃上清, 获得 NK 细胞沉淀。

2.4.1.1 人 NK 细胞总 RNA 提取

1) 向 2.4.1 中获得的 NK 细胞沉淀中, 分别加入 TRNzol, 1ml/支, 使用移液器吹匀后, 室温静置 5min;

2) 取 6 支灭菌后的 EP 管并做好标号, 1-4, 分别对应 Ctrl (1), Ctrl (2), OXA (100 μ M), 四君子汤 (5mg/ml);

3) 待离心管中液体油样变至水样后, 转移液体至对应编号的 EP 管中, 在室温条件下, 继续裂解 5min;

4) 向 EP 管中按照 TRNzol:氯仿=500:150 的比例加入氯仿, 即 300 μ l/支, 盖紧 EP 管上盖, 剧烈震荡 15s, 使充分接触后, 室温静置 15s;

5) 在高速低温离心机中呈中心对称配平后, 进行离心, 12000r, 15min, 4 $^{\circ}$ C;

6) 再次进行步骤 2;

7) 使用对应编号的 EP 管收集离心后 EP 管中最上层淡黄色半透明液体, 约 450 μ l;

8) 按照 1: 1 比例向 4 支 EP 管中各加入异丙醇, 即 450 μ l/支, 使用移液器吹匀后, 室温静置 30min;

9) 在高速低温离心机中呈中心对称配平后, 进行离心, 12000r, 10min, 4 $^{\circ}$ C;

10) 离心后, 4 支 EP 管弃上清后, 加入由 DEPC 水配置的 75%乙醇, 500 μ l/支;

11) 向 4 支离心后弃上清的 EP 管中各加入 500 μ l 步骤 10 中配好的乙醇溶液;

12) 在高速低温离心机中呈中心对称配平后, 进行离心, 8000r, 3min, 4 $^{\circ}$ C;

13) 离心后, 弃上清, 吸出残余的液体, 注意观察沉淀位置, 移液器不要触碰或吸走沉淀;

14) 向各管加入 20 μ l DEPC 水, 并使用移液器充分吹打, 使 RNA 沉淀溶解;

15) 水浴锅进行 55 $^{\circ}$ C 预热后, 将 EP 管盖紧盖子, 使用浮板使 EP 管漂浮于水面上进行水浴加热, 时长为 10min;

16) 将完成加热的 EP 管放入冰盒中, 使用核酸定量仪测量其浓度, 最适浓度值为 600-1000ng/ μ l, A260/A280 在 1.8-2.0;

17) 测量结束后, 将提取的 RNA 放入 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱保存。

2.4.1.2 人 NK 细胞 RNA 逆转录

1) 取 4 支 0.2ml PCR 薄壁管, 标号 1-4, 对应组别依次为 24hCtrl (1), Ctrl (2), OXA (100 μ M), 四君子汤 (5mg/ml);

2) 根据每 20 μ l 反应体系使用 RNA 最大量为 1000ng 为标准, 建立 20 μ l 反应体系:

组成	体积(μ l)
5X PrimeScript Master Mix	4
RNA	1000ngRNA
DDH ₂ O	补充至 20 μ l
Total	20

3) 使用梯度 PCR 仪进行逆转录, 反应条件设置如下:

温度 ($^{\circ}$ C)	时间
37	15min
85	5sec
4	5min

4) 将逆转录结束后的 cDNA 于 -20 $^{\circ}$ C 冷冻保存。

2.4.1.3 荧光定量 PCR 实验

1) 确立反应体系为 20 μ l, 所需试剂组成剂体积如下:

组成	体积(μ l)
SYBR Premix EX Taq(2X)	10
ROX Reference(50X)	0.4
引物	0.8
cDNA	2
DDH ₂ O	6.8
Total	20

2) 反应条件如下:

阶段	温度 ($^{\circ}$ C)	时间 (sec)
stage1/Reps1	95	30
Reps2/Reps40	95	5
Reps2/Reps40	60	34

3) 运用 $\Delta\Delta$ ct 法进行数值统计: 荧光定量 PCR 结果得到目的基因与 GAPDH 基因的 ct 值, 二者相减得到 Δ ct, 再将实验组 Δ ct 与空白组 Δ ct 相减得到 $\Delta\Delta$ ct, 用 $2^{-\Delta\Delta$ ct 表示目的基因的 mRNA 的表达量。

2.4.2 加入 STAT3 抑制剂 (R) 对人 NK 细胞

1) 取一块六孔平底细胞培养板并进行组别划分, 分别为 24hCtrl, Ctrl+R, OXA (100 μ M) +R, 四君子汤 (5mg/ml) +R;

2) 后续步骤同 2.4.1 步骤 2~6。

2.4.2.1 人 NK 细胞总 RNA 提取

1) 向 2.4.2 中获得的 NK 细胞沉淀中, 分别加入 TRNzol, 1ml/支, 使用移液器吹匀后, 室温静置 5min;

2) 取 4 支灭菌后的 EP 管并做好标号, 1-4, 分别对应 24h 或 48h Ctrl, Ctrl+R, OXA (100 μ M) +R, 四君子汤 (5mg/ml) +R;

3) 后续步骤同 2.4.1.1 步骤 3~17。

2.4.2.2 人 NK 细胞 RNA 逆转录

1) 取 4 支 0.2ml PCR 薄壁管, 标号 1-4, 对应组别依次为 24h Ctrl, Ctrl+R, OXA (100 μ M) +R, 四君子汤 (5mg/ml) +R;

2) 后续步骤同 2.4.1.2 步骤 2~4。

2.4.2.3 荧光定量 PCR 实验

步骤同 2.4.1.3

2.5 统计学处理

采用 SPSS26.0 统计软件进行数据记载, 并进行统计分析, 计量资料均采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 如果数据满足正态性分布和方差齐性时, 实验两组使用 t 检验, 在多组内运用单因素方差分析, 如果不符合正态性分布和方差齐性时, 使用秩和检验, 当 $P<0.05$ 时, 有统计学意义。

3. 实验结果

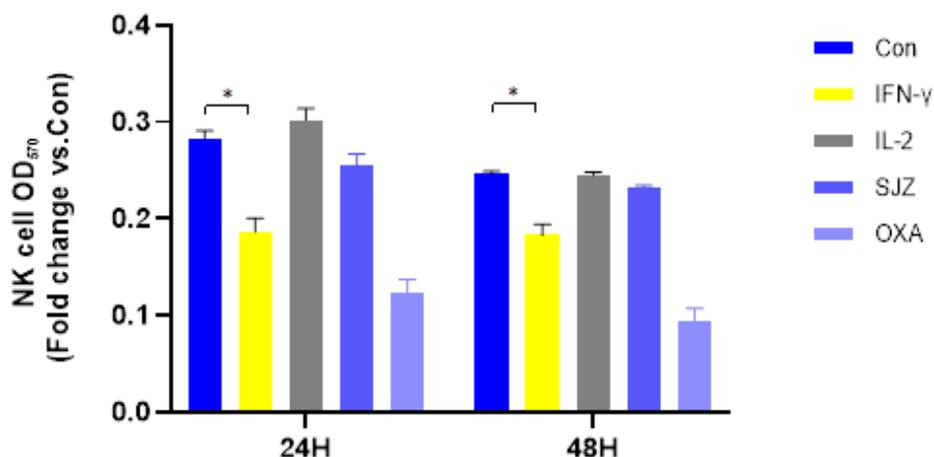
3.1 IFN- γ 对人 NK 细胞活性的影响

提纯人外周血淋巴细胞的 NK 细胞后, 与 IFN- γ 、IL-2 (阳性对照组)、四君子汤和 OXA (参照组) 分别共培养 24h、48h 后, 利用细胞毒性实验检测 NK 细胞活性。结果显示: 与空白对照组 (Ctrl) 及阳性对照组 (IL-2) 相比, 200ng/ml 的 IFN- γ 对人 NK 细胞生长存在明显抑制作用, 有统计学意义 ($P<0.05$); 与参照组 (OXA) 相比, 四君子汤能够改善 NK 细胞活性, 有统计学意义 ($P<0.05$), 如表 1-1, 图 1-1。

表 1-1 IFN- γ 对人 NK 细胞活性的影响 (24h,48h) ($\bar{X}\pm S$)

Groups	NK cell OD ₅₇₀	
	24H	48H
Con	0.283±0.008	0.246±0.003
IFN- γ	0.186±0.014*	0.183±0.011*
IL-2	0.302±0.012	0.245±0.003
SJZ	0.255±0.012	0.232±0.002
OXA	0.124±0.013*	0.093±0.014**

注:IFN- γ (200ng/ml), IL-2 (200ng.ml), SJZ (5mg/ml), OXA(100 μ M), 与 Con 组相比, * P <0.05;
** P <0.01.(n=3)



注: IFN- γ (200ng/ml), IL-2 (200ng.ml), SJZ (5mg/ml), OXA(100 μ M), 与 Con 组相比,
* P <0.05.(n=3)

图 1-1 IFN- γ 对人 NK 细胞活性的影响 (24h, 48h)

3.2 四君子汤对人 NK 细胞分泌 IFN- γ 的影响

根据上述细胞毒性实验结果提示, IFN- γ 浓度对 NK 细胞活性存在关联, 接下来, 采用酶联免疫吸附测定实验检测四君子汤对人 NK 细胞分泌 IFN- γ 的影响。实验结果发现, 24h 和 48h 的 5mg/ml 四君子汤均可以降低 IFN- γ 分泌, 有统计学意义 (P <0.05)。如表 1-2, 图 1-2; 为进一步验证假设是否成立, 我们加入 STAT3 抑制剂检测对人 NK 细胞分泌 IFN- γ 的影响。结果与上述结果一致, 且抑制效果更明显, 有统计学意义 (P <0.01)。表 1-3, 图 1-2。

表 1-2 四君子汤对人 NK 细胞分泌 IFN- γ 的影响 (24h, 48h) ($\bar{X}\pm S$)

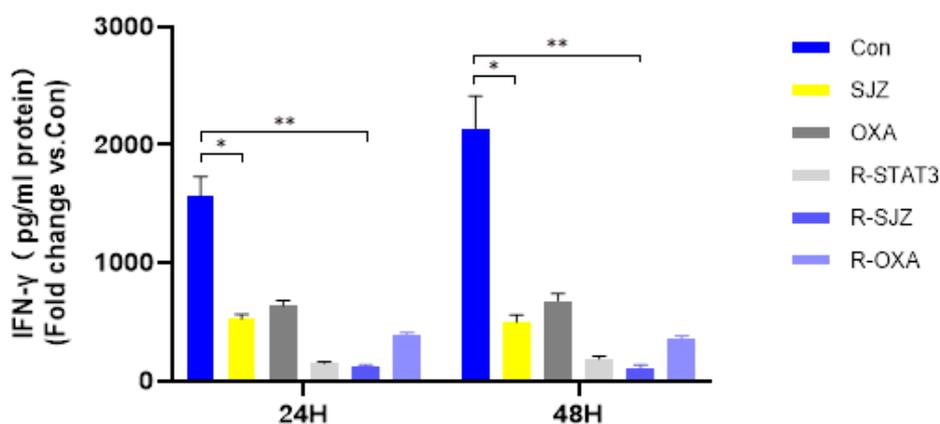
Groups	NK cell IFN- γ	
	24H	48H
Con	1569.10 \pm 162.40	2139.11 \pm 274.60
SJZ	526.90 \pm 36.17*	498.32 \pm 59.97*
OXA	638.81 \pm 42.37	679.50 \pm 58.19

注: SJZ (5mg/ml), OXA(100 μ M), 与 Con 组相比, * P <0.05; ** P <0.01.(n=3)

表 1-3 加入 STAT3 抑制剂对 NK 分泌 IFN- γ 的影响(24h,48h) ($\bar{X}\pm S$)

Groups	NK cell IFN- γ	
	24H	48H
Con	1569.10 \pm 162.40	2139.11 \pm 274.60
R-STAT3	151.52 \pm 8.86*	189.30 \pm 20.57*
R-SJZ	126.10 \pm 8.36**	112.12 \pm 21.58**
R-OXA	380.81 \pm 28.21	356.71 \pm 27.79

注: SJZ (5mg/ml), OXA(100 μ M), STAT3 (2 μ M), 与 Con 组相比, * P <0.05; ** P <0.01.(n=3)



注: SJZ (5mg/ml), OXA(100 μ M), STAT3 (2 μ M), 与 Con 组相比, * P <0.05; ** P <0.01.(n=3)

图 1-2 四君子汤对人 NK 细胞分泌 IFN- γ 的影响

3.3 四君子汤对人 NK 细胞 mRNA 的影响

提纯人外周血淋巴细胞的 NK 细胞后, 用固定浓度的四君子汤、奥沙利铂 (OXA) 分别共培养 24h, 并通过荧光定量 PCR 技术检测对 NK mRNA 的影响。结果显示: 与空白对照组相比, 四君子汤组 IFN- γ mRNA (P <0.01)、PD-1

mRNA、STAT3 mRNA ($P<0.05$) 表达均降低, 有统计学意义; 如表 1-4, 图 1-3; 根据加入 STAT3 抑制剂的 ELISA 实验结果提示, 进一步检测加入 STAT3 抑制剂对人 NK 细胞 mRNA 的表达情况的影响。结果显示: 加入 STAT3 抑制剂后的人 NK 细胞中 PD-1 mRNA、STAT3 mRNA、IFN- γ mRNA 表达较 3.3 结果出现更显著的降低, 有统计学意义 ($P<0.01$)。表 1-5 和图 1-3。

表 1-4 四君子汤对人 NK 细胞 mRNA 的影响($\bar{X}\pm S$)

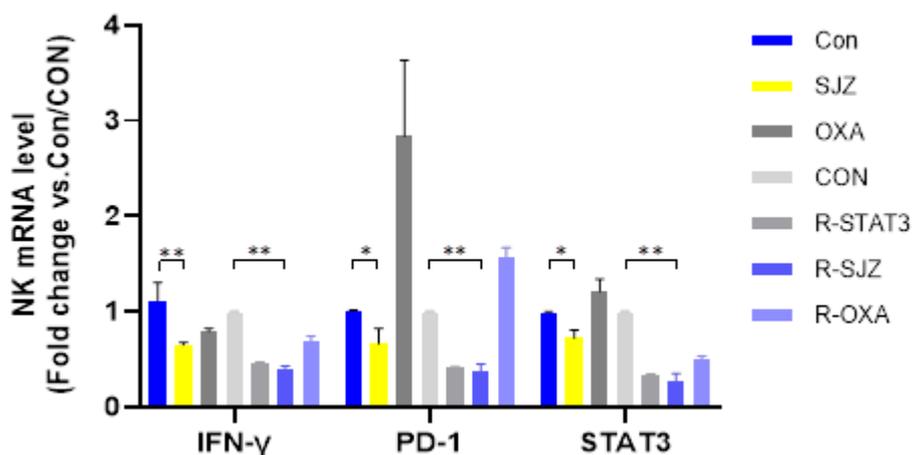
Groups	NK mRNA		
	IFN- γ	PD-1	STAT-3
Con	1.11 \pm 0.19	1.00 \pm 0.01	0.99 \pm 0.01
SJZ	0.65 \pm 0.02**	0.66 \pm 0.16*	0.72 \pm 0.09*
OXA	0.79 \pm 0.03	2.84 \pm 0.79	1.21 \pm 0.13

注: SJZ (5mg/ml), OXA(100 μ M), 与 Con 组相比, * $P<0.05$; ** $P<0.01$.(n=3)

表 1-5 加入 STAT3 抑制剂对人 NK 细胞 mRNA 的影响($\bar{X}\pm S$)

Groups	NK mRNA		
	IFN- γ	PD-1	STAT-3
	24H		
Con	0.99 \pm 0.01	0.99 \pm 0.01	0.99 \pm 0.01
R-STAT3	0.45 \pm 0.02	0.41 \pm 0.01	0.32 \pm 0.02
R-SJZ	0.39 \pm 0.04**	0.37 \pm 0.08**	0.26 \pm 0.09**
R-OXA	0.69 \pm 0.05	1.57 \pm 0.10	0.49 \pm 0.04

注: SJZ (5mg/ml), OXA(100 μ M), STAT3 (2 μ M), 与 Con 组相比, * $P<0.05$; ** $P<0.01$.(n=3)



注: SJZ (5mg/ml), OXA(100 μ M), STAT3 (2 μ M), 与 Con/CON 组相比, * P <0.05;
** P <0.01.(n=3)

图 1-3 四君子汤对人 NK 细胞 mRNA 的影响

4. 分析与讨论

结肠癌归属为中医“肠风下血”、“肠积”、“癥瘕”、“肠癖”等范畴。最早在战国时期,《黄帝内经》中对结肠癌便有肠覃、癥瘕、肥气等病名的记载,也有肠瘤等直接以“瘤”为病名的记载;到唐代,孙思邈首次对“瘤”进行分类,并曰:“凡肉瘤……,慎之,慎之”。

历代医家对于结肠癌其相关病因病机的论述十分丰富。张元素在《活法机要》中云:“脾胃怯弱,气血两衰穉……皆能成积”;《圣济总录》中有言:“论曰脾象土,位处中焦,主腐化水谷,通行营卫,脾气和,则可以埤诸脏,灌四旁,若虚则生寒,令人心腹胀满……补养之法,不可缓也”;《医门补要》曰:“脾主消化,居人身中,属土色黄,蒸腐水谷,分别清浊而行升降,以生气血而助精神,一失常度,即易生病,身面虚浮而色淡黄,如目珠不黄,并非黄疸病,乃脾虚,补土为治。”国医大师刘嘉湘指出正虚和脏腑功能失调会减弱机体的抗癌能力,最终导致癌症发生。种种论述皆可看出历代医家对肿瘤病因的定义皆为“壮盛人无积,虚人有之”;因此,结肠癌的病因病机主要为脾胃气虚。

古代文献关于肿瘤的治疗始终以“养正则积自除”为主旨:《证治汇补》云:“若去积及半,即宜纯与甘温调养,使脾土健运,则破残余积,不攻自走,所谓养正积自除之谓也。”;《济阴纲目》曰:“论治积须养正气,使荣卫充实。”;现代中医治疗肿瘤同样以扶正为主,其中尤以健脾为要。

四君子汤是健脾益气的常见方剂^[32~34],现代也常用于肿瘤术后以及康复期的治疗,用以恢复机体免疫功能^[35~37]。临床发现,术后应用四君子汤可以改善术后

体虚和预防肿瘤的复发及转移，研究指出，中医扶正抗癌的机制很可能就是通过提高机体免疫细胞活性得以实现^[38]。同时有药理学研究表明，人参中皂素、黄酮类等多种物质可以通过调节多种细胞因子（如 $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{IFN-}\gamma$ 、 Th17 等）的分泌来提高人体自身的免疫力，从而产生很好的抗炎、抗菌及抗肿瘤的作用^[39]；白术所含有的白术多糖等成分能够有效调节肠道免疫系统并抑制肿瘤生长^[40]；在近期国外一项关于茯苓及其提取物的研究中发现茯苓提取可以显著刺激 NK 细胞激活、以及降低 IL-4 和 IL-5 的分泌，提高人体的免疫力^[41]；甘草中的甘草酸和甘油成分具有调节免疫系统的作用，同时甘草中的黄酮类化合物成分具有广泛的抗癌作用^[42]。由此可以看出四君子汤无论是其提取物还是单味药均具有调节免疫系统功能和抗癌的作用。

NK 细胞是人体内三大主要淋巴细胞之一，占健康成年人体内淋巴细胞总数的 5%~15%，成熟的 NK 细胞在受到刺激后，会迅速产生大量的 $\text{IFN-}\gamma$ 以调节其自身的细胞毒性^[43]，有研究发现，NK 细胞中 $\text{IFN-}\gamma$ 分泌增多与 NK 细胞毒性降低存在关联^[44]。 $\text{IFN-}\gamma$ 是一种可以由多种细胞分泌产生的细胞因子，在机体防御病毒感染及肿瘤发生发展和免疫治疗中均具有一定效用^[45]， $\text{IFN-}\gamma$ 主要通过 JAK/STAT 信号通路产生作用^[46]，在过往的研究中发现 STAT3 的激活会促进肿瘤的发展^[47]，而在最近的研究中，有人指出 STAT3 是 NK 细胞毒性的负调节剂^[25]，使用 STAT3 抑制剂可能使 NK 细胞毒性增强^[20]。

本实验通过体外分离人外周血 NK 细胞，使用不同种浓度的 $\text{IFN-}\gamma$ 进行给药培养 24h 和 48h 后发现， $\text{IFN-}\gamma$ 浓度在 200ng/ml 时，对人外周血 NK 细胞的生长具有明显的抑制作用，得出结论： $\text{IFN-}\gamma$ 在一定浓度下可以抑制 NK 细胞的生长；将体外分离的人 NK 细胞与四君子汤在 5mg/ml 浓度下培养 24h 和 48h 后分别进行细胞毒性实验、ELISA 实验、qRT-PCR 实验发现，四君子汤可以使 NK 细胞中 $\text{IFN-}\gamma$ 分泌及 $\text{IFN-}\gamma$ 、PD-1、STAT3 mRNA 表达降低，因此，四君子汤对 NK 细胞的活性有一定的增强作用。为进一步验证假设，加入一定浓度的 STAT3 抑制剂进行培养后，发现 NK 细胞中 $\text{IFN-}\gamma$ 的分泌及 PD-1、STAT3、 $\text{IFN-}\gamma$ mRNA 表达均出现了更明显降低，从而得出结论：四君子汤可能会通过抑制 STAT3 的生成，降低 NK 细胞中 $\text{IFN-}\gamma$ 的分泌以及 PD-1 的表达，达到调控 NK 细胞的目的。

第二部分 四君子汤对 NK 细胞杀伤 HCT116 结肠癌细胞的影响

近几年, NK 细胞在肿瘤的治疗中取得重大进展^[48], 基于 NK 细胞的免疫疗法为旨在单独用药或联合用药治疗肿瘤领域开拓了新的方向^[49]。但是, 由于 NK 细胞只占人体内淋巴细胞的很少一部分 (5%~15%), 并且 NK 细胞只有在活化后才能够产生杀伤肿瘤的作用, 因此使用 NK 细胞进行抗肿瘤治疗仍具有一定的局限性^[48]。为了研究四君子汤能否影响 NK 细胞对 HCT116 细胞的杀伤作用, 我们建立了 NK 细胞与 HCT116 结肠癌细胞的共培养模型, 采用体外实验的方式进行实验, 并根据实验数据对 NK 细胞杀伤 HCT116 的结果进行探讨。

1. 实验材料

1.1 细胞株

于中国科学院上海生命科学研究院细胞库购置的人结肠癌 HCT116 肿瘤细胞株。

1.2 主要试剂药品

试剂名称	生产公司	批号
0.25% Trypsin-EDTA(1X)	美国 Gibco 公司	1930154
细胞冻存液	博奥龙	KX0310041-100

1.3 主要仪器设备

同第一部分 1.4

1.4 主要试剂的制备

1.4.1 胰酶 (0.25% Trypsin-EDTA(1X))

于-20℃冰箱取出一瓶胰酶于 4℃冷藏或常温融化, 在净化工作台中, 取出 12 支无菌 50ml 离心管, 打开胰酶瓶盖, 进行分装, 45ml/支, 分装完成后, 拧紧离心管盖子, 标记试剂名称、实验者、日期, 封口膜密封, 少量 4℃冰箱保存以便实验使用, 其余胰酶置于-20℃冷冻以长期保存。

1.4.2 HCT116 细胞培养液 [15%FBS, 1%双抗]

在净化工作台中, 取 1 支 50ml 离心管加入 7.5mlFBS, 0.5ml 双抗后, 加

RPMI-Medium 培养基至 50ml 后，上下颠倒混匀，标记试剂名称、实验者、日期。

2. 实验方法

2.1 HCT116 人结肠癌细胞相关方法

2.1.1 HCT116 的复苏

- 1) 于-80℃冰箱取出 1 支 HCT116 冻存细胞，并在室温条件下静置 1-2min;
- 2) 将冻存的 HCT116 细胞于 37℃水浴锅中融化至完全呈液态;
- 3) 使用常温离心机离心，设置为：1000r，5min;
- 4) 于净化工作台中，向离心后弃上清的 HCT116 细胞沉淀中加入 0.5ml HCT116 培养液，使用移液器将沉淀吹至完全消失后，移至加有 4.5ml HCT116 细胞培养液的 T25 透气细胞培养瓶中，使用 3ml 巴氏吸管轻吹 3~5 下，拧紧细胞培养瓶盖，标记细胞名称、实验者、实验日期后，放入 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱。

2.1.2 HCT116 的传代

- 1) 将细胞传代相关器材放入净化工作台;
- 2) 进行 30min 紫外线照射灭菌;
- 3) 打开净化工作台通风后，HCT116 细胞放入净化工作台;
- 3) 75%酒精消毒双手后，倒出 HCT116 细胞培养瓶中废液，并使用移液器吸净残液;
- 4) 加入 0.5ml 胰酶，盖紧瓶盖并轻轻摇晃，放入 37℃，5%CO₂ 细胞培养箱 1~2min，助细胞脱落;
- 5) 观察培养箱取出的细胞培养瓶中细胞脱落的程度，达 85%~90%即可进行终止脱落;
- 6) 加入 2.5ml HCT116 细胞培养液，并使用 3ml 巴氏吸管轻吹 10~15 下;
- 7) 将吹匀的细胞悬液分入 4 个新的 5ml 透气细胞培养瓶，0.5ml/瓶，与原瓶共计 5 瓶，并将各瓶细胞悬液中加入 HCT116 细胞培养液至 5ml;
- 8) 使用 3ml 巴氏吸管吹匀后，拧紧瓶盖，标记细胞、实验者、日期后，放入 37℃，5%CO₂ 培养箱中，以备实验使用。

2.1.3 细胞冻存

- 1) 细胞处理方法见 2.1.2 细胞传代 1~6;
- 2) 将 2.5ml 细胞悬液移至 15ml 离心管中;
- 3) 使用常温离心机离心，设置为：1000r，5min;
- 4) 向弃上清的细胞沉淀中加入 0.5ml 细胞冻存液，轻轻吹匀，制成细胞悬

液；

- 5) 细胞冻存管收集细胞悬液，封口膜密封，标记细胞、日期；
- 6) 放入-80℃冰箱冻存。

2.1.5 细胞计数

- 1) 细胞处理方法见 2.1.2 细胞传代步骤 1~6；
- 2) 将 2.5ml 细胞悬液移至装有 2.5ml HCT116 细胞培养液的 15ml 离心管中，并使用 3ml 巴氏吸管吹匀；
- 3) 吸取 10 μ l 细胞悬液于显微镜下使用细胞计数板计数，显微镜下 4 个象限中细胞均呈散在分布；
- 4) 分别对 4 个象限进行计数后，取平均值，乘以 10^4 ，即为细胞密度（通常密度为 50×10^4 个/ml 左右）。

2.1.6 单一 HCT116 模型构建（6 孔板）

- 1) 在净化工作台中，打开一块 6 孔板，将 HCT116 细胞以 1×10^4 个/ml 密度加入铺有 NK 细胞的 12 孔板中，1ml/孔，共计 6 孔；
- 2) 盖好板盖并在板盖上标记共培养细胞浓度及用途、实验者、实验日期，放入 37℃，5%CO₂ 培养箱中培养。

2.2 人 NK 细胞相关方法

同第一部分实验内容 2.1 人 NK 细胞相关方法。

2.3 人 NK 细胞与 HCT116 结肠癌细胞共培养模型

2.3.1 细胞共培养模型（96 孔板）

- 1) 在净化工作台中，打开一块 96 孔板，将 NK 细胞以 30×10^4 个/ml 密度加入除最外圈以外的所有孔中进行铺板，100 μ l/孔，共计 60 孔；
- 2) 将 HCT116 细胞以 10×10^5 个/ml 密度加入已铺入一定浓度 NK 细胞的 60 个孔中，10 μ l/孔；
- 3) 向外周一圈空孔中加入 PBS（1X），200 μ l/孔，共计 36 孔，以防培养液蒸发，影响共培养细胞状态；
- 4) 盖好板盖，轻轻摇晃，使 NK 细胞与 HCT116 细胞充分接触，并在板盖上标记共培养细胞浓度及用途、实验者、实验日期，放入 37℃，5%CO₂ 培养箱中培养。

2.3.2 细胞共培养模型（12 孔板）

- 1) 在净化工作台中，打开一块 24 孔板，将 NK 细胞以 50×10^4 个/ml 的密度进行铺板，0.5ml/孔，共计 12 孔；

2) 将 HCT116 细胞以 10×10^5 个/ml 密度加入铺有 NK 细胞的 12 孔板中, 50 μ l/孔, 共计 12 孔;

3) 盖好板盖, 轻轻摇晃, 使 NK 细胞与 HCT116 细胞充分接触, 并在板盖上标记共培养细胞浓度及用途、实验者、实验日期, 放入 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 培养箱中培养。

2.3.3 细胞共培养模型 (6 孔板)

1) 在净化工作台中, 打开一块 6 孔板, 将 NK 细胞以 50×10^4 个/ml 的密度进行铺板, 1ml/孔, 共计 6 孔;

2) 将 HCT116 细胞以 10×10^5 个/ml 密度加入铺有 NK 细胞的 6 孔板中, 100 μ l/孔, 共计 6 孔;

3) 盖好板盖, 轻轻摇晃, 使 NK 细胞与 HCT116 细胞充分接触, 并在板盖上标记共培养细胞浓度及用途、实验者、实验日期, 放入 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 培养箱中培养。

2.4 细胞毒性实验

2.4.1 IFN- γ 对细胞共培养模型

1) 细胞共培养模型构建详见 2.3.1;

2) 按照划分区域分别进行 IFN- γ 给药 (200ng/ml), IL-2 (阳性对照组) 给药 (200ng/ml)、PBS (1X), IFN- γ 和 IL-2 每类浓度药物连续加 1 列 6 个竖孔, PBS (1X) 连续加 1 列 6 个竖孔, 共计个孔 18 个孔, 其余孔作为空白对照组;

3) 药物 24h 后, 加入 MTT 溶液, 10 μ l/孔;

4) 3.5h 后, 加入 10%SDS 溶液, 100 μ l/孔;

5) 24h 后, 使用酶标仪测定 OD 值, 选择波长在 570nm 处。

6) 48h 操作同步骤 1~5。

2.4.2 四君子汤对细胞共培养模型

1) 细胞共培养模型构建详见 2.3.1

2) 按照划分区域分别进行四君子汤给药 (5mg/ml), 奥沙利铂 (参照组) 给药 (100 μ M)、PBS (1X), 四君子汤和奥沙利铂每类药物连续加 1 列 6 个竖孔, PBS (1X) 连续加 1 列 6 个竖孔, 共计 18 孔, 其余孔为空白对照组;

3) 24h 后加入 MTT 溶液, 10 μ l/孔;

4) 3.5h 后, 加入 10%SDS 溶液, 100 μ l/孔;

5) 24h 后, 使用酶标仪测定 OD 值, 选择波长在 570nm 处;

6) 48h 操作同步骤 1~5。

2.5 酶联免疫吸附测定实验

2.5.1 四君子汤对细胞共培养模型

1) 细胞共培养模型构建详见 2.3.2

2) 按照划分区域, 进行四君子汤 (5mg/ml), 奥沙利铂 (100 μ M, 参照组) 给药, 每组 3 个孔;

组别	孔数
空白对照组[24h/48h]	3
四君子汤 (5mg/ml) [24h/48h]	3
奥沙利铂 (100 μ M) [24h/48h]	3

3) 加药完毕后, 放入 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 培养箱, 24h 后, 收集上清至对应编号的 15ml 离心管中;

4) 将 9 支 15ml 离心管呈中心对称放入常温离心机中进行离心, 设置为 1000r, 10min;

5) 用 9 支对应编号的 1.5ml 灭菌 EP 管收集离心后的上清液, 于-80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

6) 48h 操作同步骤 1~6。

7) 根据说明书绘制标准曲线;

8) 根据标准曲线建立标准方程;

9) 使用试剂盒中的板架固定所需数量的板条, 标注好计划顺序及组别;

10) 使用量程为 200 μ l 排枪向各个板条的 8 个孔加入洗涤液 (1X) 进行洗涤, 400 μ l/孔, 静置 30s, 甩出液体, 拍干;

11) 重复步骤 9 一次;

12) 样本液于室温解冻完全后, 向板条中按照计划顺序及组别依次加入 50 μ l 样本液、50 μ l 缓冲液 (1X) 及 50 μ l 稀释抗体 (1X), 注意三者加入顺序不得调换;

13) 使用封口膜密封板条后, 用锡纸完全覆盖并放入遮光盒中, 室温条件下, 摇床 150 次/min, 2h;

14) 将板条中液体甩出, 并在滤纸上拍干后, 重复步骤 10 六次;

15) 使用排枪向板条中加入 HRP (1X), 100 μ l/孔, 使用封口膜密封、锡纸遮光并放入遮光盒后, 室温条件下, 摇床 150 次/min, 45min;

16) 重复步骤 10 一次后, 重复步骤 12 六次;

17) 于暗室加入 TMB, 100 μ l/孔, 并在室温条件下, 摇床 150 次/min, 15-20min (视显色情况而定), 显色后, 使用 100 μ l/孔的终止液进行终止;

18) 使用自动多功能酶标仪, 在波长为 450nm、570nm、630nm 处分别进行

OD 值检测:

19) 将数值 Δ (450-630) 带入标准方程并乘以 2, 即可得到 IFN- γ 的表达量。

2.5.2 加入 STAT3 抑制剂对细胞共培养模型

1) 细胞共培养模型构建详见 2.3.2

2) 按照划分区域, 进行四君子汤 (5mg/ml), 奥沙利铂 (100 μ M, 参照组) 给药, 每组 3 个孔;

组别	孔数
空白对照组[24h/48h]	3
STAT3 抑制剂 (2 μ M) [24h/48h]	3
四君子汤 (5mg/ml) +STAT3 抑制剂 (2 μ M) [24h/48h]	3
奥沙利铂 (100 μ M) +STAT3 抑制剂 (2 μ M) [24h/48h]	3

3) 后续操作同 2.5.1 步骤 3~18。

2.6 荧光定量 PCR 实验

2.6.1 四君子汤对单一 HCT116

1) HCT116 模型构建详见 2.1.6;

2) 进行组别划分并进行给药, 分别为 Ctrl (1), Ctrl (2), OXA (100 μ M), 四君子汤 (5mg/ml), 此处 OXA 为参照组;

2.6.1.1 单一 HCT116 模型 RNA 的提取

1) 将单一 HCT116 模型给药 24h 后使用移液器统一吸出上清液并丢弃后, 向六孔板中加入 TRNzol, 1ml/孔, 盖上班盖后轻轻震荡, 静置 5min;

2) 取 4 支灭菌后的 EP 管并做好标号, 1~6, 分别对应 24h 116 Ctrl (1), 116 Ctrl (2), 116 OXA (100 μ M), 116 四君子汤 (5mg/ml);

3) 待离心管中液体油样变至水样后, 转移液体至对应编号的 EP 管中, 在室温条件下, 继续裂解 5min;

4) 向 EP 管中按照 TRNzol:氯仿=500:150 的比例加入氯仿, 即 300 μ l/支, 盖紧 EP 管上盖, 剧烈震荡 15s, 使充分接触后, 室温静置 15s;

5) 在高速低温离心机中呈中心对称配平后, 进行离心, 12000r, 15min, 4 $^{\circ}$ C;

6) 再次进行步骤 2;

7) 使用对应编号的 EP 管收集离心后最上层淡黄色半透明液体, 约 450 μ l;

8) 按照 1: 1 比例向各 4 支 EP 管中加入异丙醇, 即 450 μ l/支, 使用移液器

吹匀后，室温静置 30min；

9) 在高速低温离心机中呈中心对称配平后，进行离心，12000r，10min，4°C；

10) 离心后，4 支 EP 管弃上清后，加入由 DEPC 水配置的 75%乙醇，500 μ l/支；

11) 离心后，向 4 支弃上清的 EP 管中个加入 500 μ l 步骤 10 中配置好的乙醇溶液；

12) 离心后，弃上清，吸出残余液体，注意观察沉淀位置，移液器不要触碰到沉淀；

13) 取一张干净的白色滤纸，平放于桌面，将 6 支 EP 管开盖并且倒扣于滤纸上，2-3min；

14) 向各管加入 20 μ l DEPC 水，并使用移液器充分吹打，使 RNA 沉淀溶解；

15) 水浴锅进行 55°C 预热后，使用浮板将 EP 管盖紧盖子，进行水浴加热 10min；

16) 将 EP 管放入冰盒中，使用核酸定量仪测量其浓度，最适浓度值为 600-1000ng/ μ l，A260/A280 在 1.8-2.0 之间为宜；

17) 测量结束后，放入-80°C 冰箱保存。

2. 6. 1. 2 单一 HCT116 给药模型总 RNA 逆转录

1) 取 4 支 0.2ml PCR 薄壁管，标号 1-6，对应组别依次为 116 Ctrl (1)，116 Ctrl (2)，116 OXA (100 μ M)，116 四君子汤 (5mg/ml)；

2) 操作同第一部分 2.4.1.2 步骤 2~4。

2. 6. 1. 3 荧光定量 PCR 实验

操作同第一部分 2.4.1.3。

2. 6. 2 四君子汤对细胞共培养模型

1) 细胞共培养模型构建详见 2.3.3；

2) 进行组别划分并进行给药，分别为 24hCtrl (1)，Ctrl (2)，OXA (100 μ M)，四君子汤 (5mg/ml)，此处 OXA 为阳性对照组；

3) 24h 后统一收集上清液并离心，设置为：1000r，5min，室温；

4) 离心后，弃上清，获得共培养模型中 NK 细胞沉淀。

5) 六孔板中贴壁细胞即为共培养模型中 HCT116 细胞。

2. 6. 2. 1 共培养模型中人 NK 细胞总 RNA 的提取

1) 向 2.6.2 中获得的 NK 细胞沉淀中，分别加如 TRNzol，1ml/支，使用移液器吹匀后，室温静置 5min；

2) 取 4 支灭菌后的 EP 管并做好标号, 1-6, 分别对应共 NK Ctrl (1), 共 NK Ctrl (2), 共 NK OXA (100 μ M), 共 NK 四君子汤 (5mg/ml);

3) 操作同 2.6.1.1 步骤 3~17。

2.6.2.2 共培养模型中 HCT116 细胞总 RNA 的提取

1) 向 2.6.2 中长有贴壁 HCT116 细胞的六孔板中加入 TRNzol, 1ml/孔, 使用移液器吹匀后, 室温静置 5min;

2) 取 4 支灭菌后的 EP 管并做好标号, 1-6, 分别对应共 116 Ctrl (1), 共 116 Ctrl (2), 共 116 OXA (100 μ M), 共 116 四君子汤 (5mg/ml);

3) 操作同 2.6.1.1 步骤 3~17。

2.6.2.3 共培养模型下人 NK 细胞总 RNA 逆转录

1) 取 4 支 0.2mlPCR 薄壁管, 标号 1-6, 对应组别依次为共 NK Ctrl (1), 共 NK Ctrl (2), 共 NK OXA (100 μ M), 共 NK 四君子汤 (5mg/ml);

2) 操作同第一部分 2.4.1.2 步骤 2~4。

2.6.2.4 共培养模型下 HCT116 细胞总 RNA 逆转录

1) 取 4 支 0.2mlPCR 薄壁管, 标号 1-4, 对应组别依次为共 116 Ctrl (1), 共 116 Ctrl (2), 共 116 OXA (100 μ M), 共 116 四君子汤 (5mg/ml);

2) 操作同第一部分 2.4.1.2 步骤 2~4。

2.6.2.5 荧光定量 PCR 实验

操作同第一部分 2.4.1.3。

2.6.3 加入 STAT3 抑制剂 (R) 对单一 HCT116

1) 细胞模型构建详见 2.1.6;

2) 进行组别划分并进行给药, 分别为 R-Ctrl (1), R-Ctrl (2), R-OXA (100 μ M), R-四君子汤 (5mg/ml), 此处 OXA 为参照组;

3) 操作同 2.6.2 步骤 3~5。

2.6.3.1 单一 HCT116 模型总 RNA 的提取

1) 将单一 HCT116 模型给药 24h 后使用移液器统一吸出上清液并丢弃后, 向六孔板中加入 TRNzol, 1ml/孔, 盖上板盖后轻轻震荡, 静置 5min;

2) 取 4 支灭菌后的 EP 管并做好标号, 1-4, 分别对应 24h R-Ctrl (1), R-Ctrl (2), R-OXA (100 μ M), R-四君子汤 (5mg/ml)

3) 同 2.6.1.1 步骤 3~17。

2.6.3.2 单一 HCT116 总 RNA 逆转录

操作同 2.6.1.2。

2.6.3.3 荧光定量 PCR 实验

操作同第一部分 2.4.1.3。

2.6.4 加入 STAT3 抑制剂 (R) 对共培养模型

- 1) 细胞共培养模型构建详见 2.3.3;
- 2) 进行组别划分并进行给药, 分别为 R-Ctrl (1), R-Ctrl (2), R-OXA (100 μ M), R-SJZ (5mg/ml), 此处 OXA 为参照组;
- 3) 24h 后使用各自对应编号的 15ml 离心管统一收集上清液并离心, 设置为: 1000r, 5min, 室温;
- 4) 离心后, 弃上清, 获得共培养模型中 NK 细胞沉淀。
- 5) 六孔板中贴壁细胞即为共培养模型中 HCT116 细胞。

2.6.4.1 共培养模型下人 NK 细胞、HCT116 结肠癌细胞 RNA 提取

操作同 2.6.2.1~2.6.2.2。

2.6.4.2 共培养模型下人 NK 细胞、HCT116 结肠癌细胞 RNA 逆转录

操作同 2.6.2.3~2.6.2.4。

2.6.4.3 荧光定量 PCR 实验

操作同第一部分 2.4.1.3。

2.7 统计学处理

同第一部分 2.5。

3. 实验结果

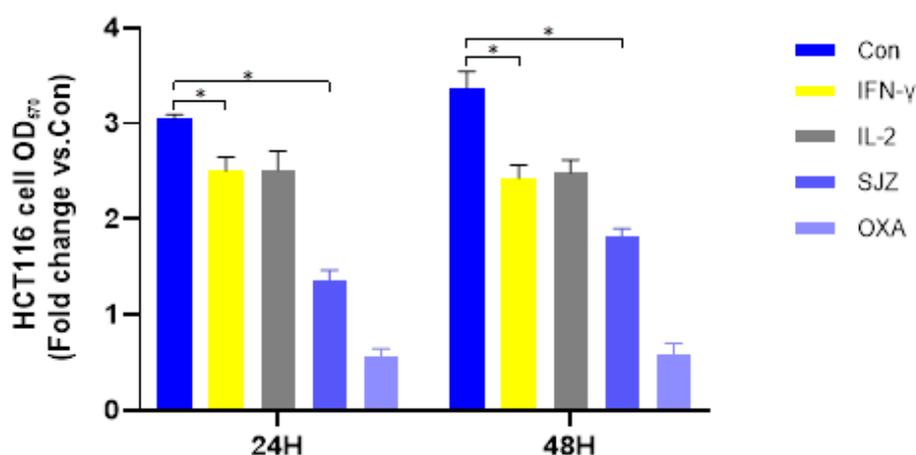
3.1 四君子汤对共培养模型的影响

通过建立单一人 NK 细胞模型 (96 孔板) 及建立人 NK 细胞与 HCT116 细胞共培养模型 (96 孔板) 后, 与 5mg/ml 四君子汤、100 μ M 奥沙利铂共培养 24h、48h 后, 利用细胞毒性实验检测 NK 细胞活性。结果显示: 与空白对照组 (Ctrl) 及各组相比较, 四君子汤在共培养模型中, NK 细胞对 HCT116 细胞杀伤作用增强 ($P<0.01$), 如表 2-1。

表 2-1 四君子汤对共培养模型中 HCT116 的影响($\bar{X}\pm S$)

Groups	Culture model HCT116 cell OD ₅₇₀	
	24H	48H
Con	3.049±0.044	3.367±0.179
IFN- γ	2.505±0.141*	2.429±0.134*
IL-2	2.515±0.195	2.485±0.132
SJZ	1.356±0.109*	1.819±0.079*
OXA	0.552±0.089*	0.574±0.126*

注: IFN- γ (200ng/ml), IL-2 (200ng/ml), SJZ (5mg/ml), OXA(100 μ M), 与 Con 组相比, * P <0.05.(n=3)



注: IFN- γ (200ng/ml), IL-2 (200ng/ml), SJZ (5mg/ml), OXA(100 μ M), 与 Con 组相比, * P <0.05.(n=3)

图 2-1 四君子汤对共培养模型中 HCT116 的影响

3.2 四君子汤对共培养模型中人 NK 细胞分泌 IFN- γ 的影响

通过建立人 NK 细胞与 HCT116 细胞共培养模型 (12 孔板) 后, 与 5mg/ml 四君子汤、100 μ M 奥沙利铂共培养 24h、48h 后, 利用 ELISA 实验检测共培养模型中 IFN- γ 的分泌。结果显示: 24h 时, 四君子汤降低共培养模型中人 NK 细胞 IFN- γ 分泌的作用较明显, 有统计学意义 (P <0.01); 欲进一步验证假设, 我们选择加入 STAT3 抑制剂后培养 24h 和 48h, 再次利用 ELISA 进行检测, 结果显示: 加入 STAT3 抑制剂后, 共培养模型中 IFN- γ 分泌降低较上述结果更为明显 (P <0.05), 如表 2-2、2-3, 图 2-1。

表 2-2 四君子汤对共培养模型中 IFN- γ 的分泌的影响 (24h, 48h) ($\bar{X}\pm S$)

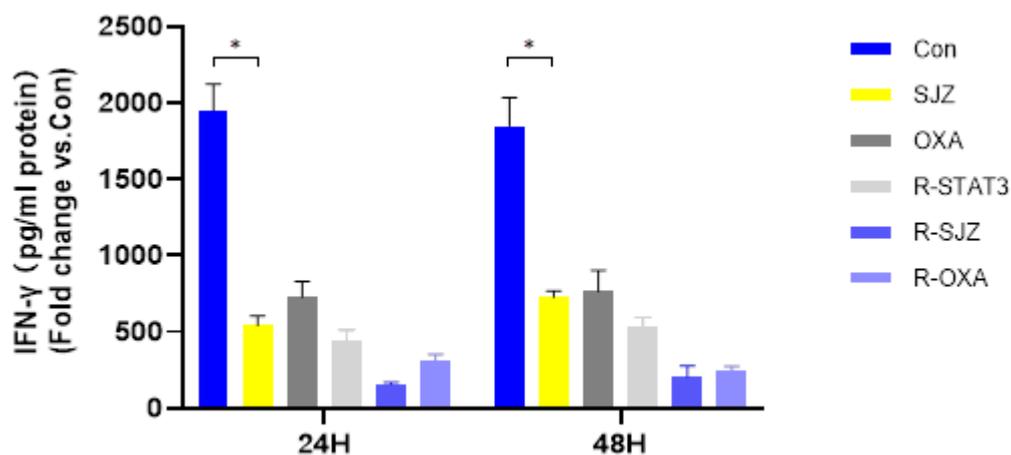
Groups	Culture model IFN- γ	
	24H	48H
Con	1948.01 \pm 175.80	1848.09 \pm 186.80
SJZ	543.10 \pm 59.86*	728.50 \pm 38.41*
OXA	727.80 \pm 102.31	766.10 \pm 136.90

注: SJZ (5mg/ml), OXA(100 μ M), 与 Con 组相比, * P <0.05.(n=3)

表 2-3 加入 STAT3 抑制剂对共培养模型中人 NK 细胞 IFN- γ 分泌的影响($\bar{X}\pm S$)

Groups	Culture model IFN- γ	
	24H	48H
Con	1948.01 \pm 175.80	1848.09 \pm 186.80
R-STAT3	446.91 \pm 65.79*	539.11 \pm 54.51*
R-SJZ	158.20 \pm 12.44*	205.8 \pm 69.44**
R-OXA	316.03 \pm 38.01	249.21 \pm 25.19

注: SJZ (5mg/ml), OXA(100 μ M), STAT3 (2 μ M), 与 R-STAT3 组相比, * P <0.05; ** P <0.01.(n=3)



注: SJZ (5mg/ml), OXA(100 μ M), STAT3 (2 μ M), 与 Con 组相比, * P <0.05.(n=3)

图 2-1 四君子汤对共培养模型中 IFN- γ 的分泌的影响

3.3 四君子汤对单一 HCT116 的 mRNA 的影响

通过建立单一 HCT116 人结肠癌细胞模型（6 孔板）与 5mg/ml 四君子汤、100 μ M 奥沙利铂培养 24h 后，利用荧光定量 PCR 实验对 HCT116 中 PD-L1 和 STAT3 的 mRNA 进行检测，结果显示：24h 下与空白对照组（Ctrl）相比较，四君子汤降低了单一 HCT116 细胞中 PD-L1 和 STAT3 的 mRNA 的表达，有统计学意义（ $P < 0.01$ ）；进一步加入 STAT3 抑制剂培养 24h 后，再次利用荧光定量 PCR 技术检测对 NK mRNA 的影响，结果显示：加入抑制剂后的 HCT116 细胞中 PD-L1 mRNA，STAT3 mRNA 表达较上述结果出现更显著的降低，有统计学意义（ $P < 0.01$ ）。表 2-4、2-5 和图 2-2。

表 2-4 四君子汤对单独 HCT116 的 mRNA 的影响($\bar{X} \pm S$)

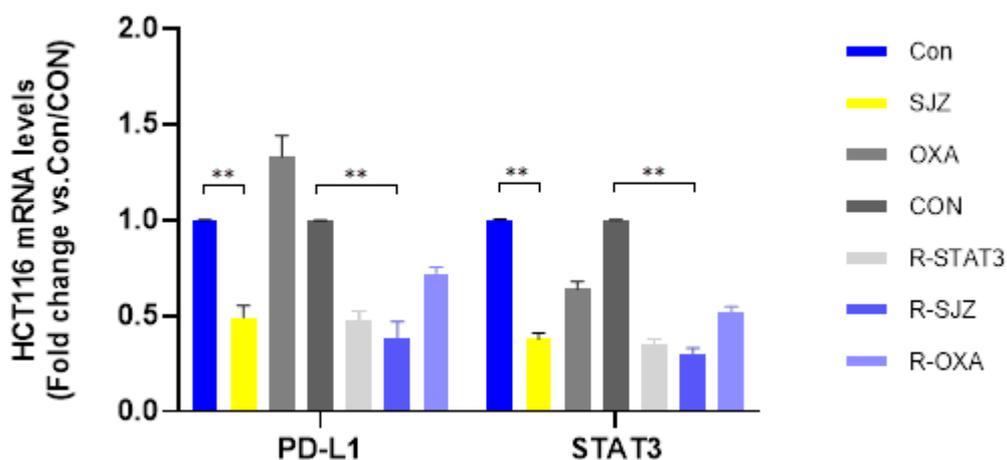
Groups	HCT116 mRNA	
	PD-L1	STAT3
Con	0.99 \pm 0.01	0.99 \pm 0.02
SJZ	0.49 \pm 0.06**	0.38 \pm 0.03**
OXA	1.33 \pm 0.11	0.64 \pm 0.04

注: SJZ (5mg/ml), OXA(100 μ M), 与 Con 组相比, ** $P < 0.01$.(n=3)

2-5 加入 STAT3 抑制剂对单独 HCT116 的 mRNA 影响($\bar{X} \pm S$)

Groups	HCT116 mRNA	
	PD-L1	STAT3
Con	0.99 \pm 0.01	1.00 \pm 0.03
R-STAT3	0.47 \pm 0.05	0.35 \pm 0.03
R-SJZ	0.38 \pm 0.08**	0.30 \pm 0.03**
R-OXA	0.72 \pm 0.03	0.51 \pm 0.04

注: SJZ (5mg/ml), OXA(100 μ M), STAT3 (2 μ M), 与 Con 组相比, ** $P < 0.01$.(n=3)



注: SJZ (5mg/ml), OXA(100 μ M), STAT3 (2 μ M), 与 Con/CON 组相比, ** $P < 0.01$. (n=3)

图 2-2 加入 STAT3 抑制剂对单独 HCT116 的 mRNA 影响

3.4 四君子汤对共培养模型中 mRNA 的影响

通过建立人 NK 细胞与 HCT116 细胞共培养模型 (6 孔板) 后, 与不同浓度四君子汤、奥沙利铂(OXA)共培养 24h 后, 利用 qRT-PCR 实验检测共培养模型中 mRNA 的分泌。结果显示: 四君子汤可以降低共培养模型中 NK 细胞 IFN- γ ($P < 0.05$)、PD-1 ($P < 0.05$)、STAT3 ($P < 0.01$) 的 mRNA 的表达, 同时, 可以降低 HCT116 细胞 PD-L1 ($P < 0.05$)、STAT3 ($P < 0.05$) 的 mRNA 的表达; 根据上述结果提示, 我们再次建立人 NK 细胞与 HCT116 结肠癌细胞共培养模型 (6 孔板) 并使用不同浓度四君子汤、奥沙利铂联合给药后, 共培养 24h, 使用 qRT-PCR 技术进行检测共培养模型中 mRNA 的表达, 我们发现四君子汤加入抑制剂可以更明显的降低共培养模型中 NK 细胞 IFN- γ ($P < 0.05$)、PD-1 ($P < 0.05$)、STAT3 ($P < 0.05$) 的 mRNA 的表达, 同时, 也可以更明显降低 HCT116 细胞 PD-L1 ($P < 0.01$)、STAT3 ($P < 0.01$) 的 mRNA 的表达, 如表 2-6、2-7、2-8、2-9 和图 2-3、2-4。

表 2-6 四君子汤对共培养模型中 NK 细胞 mRNA 的影响($\bar{X} \pm S$)

Groups	NK cell mRNA		
	IFN- γ	PD-1	STAT-3
Con	0.99 \pm 0.01	0.98 \pm 0.01	0.99 \pm 0.01
SJZ	0.72 \pm 0.09*	0.73 \pm 0.04*	0.81 \pm 0.02**
OXA	1.21 \pm 0.07	2.59 \pm 0.17	2.53 \pm 0.27

注: SJZ (5mg/ml), OXA(100 μ M), 与 Con 组相比, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. (n=3)

表 2-7 四君子汤对共培养模型中 HCT116 细胞 mRNA 的影响($\bar{X}\pm S$)

Groups	HCT116 cell mRNA	
	PD-L1	STAT-3
Con	0.99±0.01	0.98±0.01
SJZ	0.63±0.02**	0.74±0.04*
OXA	0.73±0.04	0.94±0.01

注: SJZ (5mg/ml), OXA(100 μ M), 与 Con 组相比, * P <0.05; ** P <0.01.(n=3)

表 2-8 加入 STAT3 抑制剂对共培养模型中 NK 细胞的 mRNA 的影响 (24H) ($\bar{X}\pm S$)

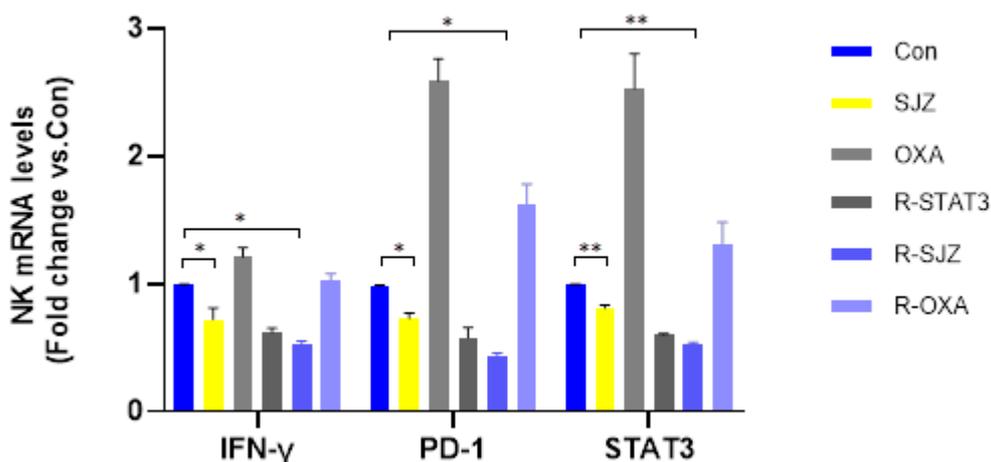
Groups	NK cell mRNA		
	IFN- γ	PD-1	STAT-3
Con	0.99±0.01	0.98±0.01	0.99±0.01
R-STAT3	0.62±0.03*	0.58±0.08*	0.60±0.01*
R-SJZ	0.53±0.02*	0.43±0.03*	0.52±0.02**
R-OXA	1.02±0.06	1.62±0.16	1.31±0.17

注: SJZ (5mg/ml), OXA(100 μ M), STAT3 (2 μ M), 与 R-STAT3 组相比, * P <0.05; ** P <0.01.(n=3)

表 2-9 加入 STAT3 抑制剂对共培养模型中 HCT116 细胞的 mRNA 的影响($\bar{X}\pm S$)

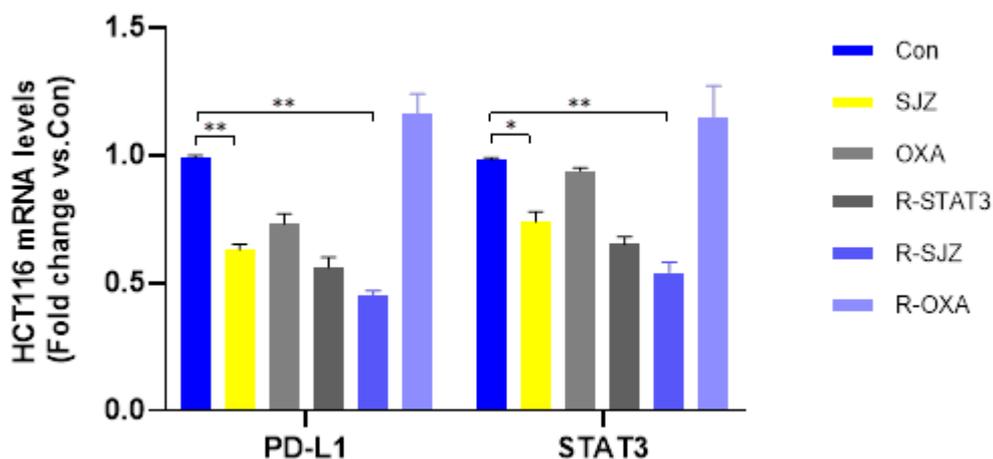
Groups	HCT116 cell mRNA	
	PD-L1	STAT-3
Con	0.99±0.01	0.98±0.01
R-STAT3	0.56±0.04*	0.65±0.03*
R-SJZ	0.45±0.02**	0.54±0.04**
R-OXA	1.16±0.08	1.15±0.12

注: SJZ (5mg/ml), OXA(100 μ M), STAT3 (2 μ M), 与 R-STAT3 组相比, * P <0.05; ** P <0.01.(n=3)



注: SJZ (5mg/ml), OXA(100μM), STAT3 (2μM), 与 Con 组相比, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.(n=3)

图 2-3 四君子汤对共培养模型中 NK 细胞 mRNA 的影响



注: SJZ (5mg/ml), OXA(100μM), STAT3 (2μM), 与 Con 组相比, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.(n=3)

图 2-4 四君子汤对共培养模型中 HCT116 细胞 mRNA 的影响

4. 分析与讨论

中医认为肿瘤多由正虚邪聚所致, 治疗也多以扶正为主的同时辅以祛邪。由于结肠癌的主要病因病机为脾胃虚弱, 因此治疗结肠癌时常选用补益脾胃的方法, 目前四君子汤作为补益脾胃的经典方剂在临床肿瘤治疗组常常被应用。

近些年研究证实许多肿瘤的发生和发展过程都伴随着免疫抑制的发生, 并且免疫抑制通常以 NK 细胞的抑制为主^[50], 当肿瘤细胞上表达出的配体与 NK 细胞上免疫检查点发生结合时, 免疫检查点发生异常表达导致 NK 细胞功能出现异常^[50, 51], 这其中就包括了 PD-1 与 PD-L1 的结合: 许多肿瘤会过度表达 PD-L1, 并与

PD-1 结合导致免疫逃逸和促进肿瘤发展^[52]。

免疫逃逸的发生离不开肿瘤固有通路的信号传导^[53]，研究发现 STAT3 的过度激活存在于大多数癌症中，并且会对 T 细胞、NK 细胞、DC 等免疫细胞的功能进行负调节，使这些免疫细胞的抗肿瘤功能减弱^[54]。STAT3 可以通过生长因子或致癌蛋白调控^[55]，有研究指出，STAT3 可以通过调节 PD-1/PD-L1 的表达来诱导免疫抑制的发生^[56]，同时另一项研究指出，IFN- γ 可以诱导 STAT3 活化和 PD-1 表达增加^[57]。目前有免疫检查点抑制剂与 STAT3 抑制剂联合应用在临床治疗中取得了很好的效果^[58]。

四君子汤作为补脾益气的经典方剂可以辅助杀伤肿瘤细胞^[59]，增强机体的免疫力^[11]。同时，最近发现四君子汤中的多糖成分对巨噬细胞、淋巴细胞等产生不同的免疫调控^[60]。

本实验通过体外分离人外周血 NK 细胞，建立人 NK 细胞与 HCT116 人结肠癌细胞共培养模型并进行 5mg/ml 四君子汤给药培养 24h 和 48h 后，分别进行细胞毒性实验、ELISA 实验和 qRT-PCR 实验检测相关指标，发现共培养模型中 IFN- γ 分泌、PD-1、PD-L1、IFN- γ 及 STAT3mRNA 表达均降低，认为四君子汤在一定浓度下可以增强人 NK 细胞对 HCT116 结肠癌细胞的杀伤作用，并影响 PD-1、PD-L1 的表达；随后，加入一定浓度的 STAT3 抑制剂进行类比实验，发现四君子汤可以进一步增强人 NK 细胞对 HCT116 结肠癌细胞的杀伤作用，与此同时，IFN- γ 的分泌量、PD-1、PD-L1 和 STAT3 的 mRNA 的表达量均更明显降低，因此我们推测可能存在相关免疫通路机制的影响。

第三部分 四君子汤对结肠癌荷瘤小鼠的影响

既往研究加味四君子汤能增强荷瘤小鼠的非特异性免疫，产生良好的体内抑瘤活性^[13, 14]，并且提高癌症小鼠的存活率和降低转移的发生率^[13]。

本课题组前期研究发现：四君子汤可以通过 NKG2D 受体活化 NK 细胞，降低结肠癌原发瘤手术切除后转移几率；奥沙利铂化疗后，可以降低 AKT1 蛋白的表达，抑制结肠癌肿瘤的生长。因此，为进一步验证体外实验的结果，我们选择建立结肠癌荷瘤小鼠模型，通过活体成像、ELISA、qRT-PCR、WB、免疫组化等实验方法观察小鼠皮下瘤生长情况、血清中 IFN- γ 分泌以及皮下瘤中蛋白及相关 mRNA 的表达情况，探讨四君子汤对结肠癌荷瘤小鼠肿瘤及 NK 细胞的影响。

1. 实验材料

1.1 主要试剂

试剂名称	生产公司	批号
TRNzol-A+ Reagent	中国 TIANGEN 公司	R6620
TB Green TM Premix Ex Taq TM (Tli RNaseH Plus)	日本 TaKaRa 公司	AJ10746A
PrimeScript TM RT Master Mix (Perfect Real Time)	日本 TaKaRa 公司	AIG1952A
RIPA 裂解液	上海威奥生物科技有限公司	WB0101
SDS-PAGE 凝胶试剂盒	上海威奥生物科技有限公司	WB0130
ECL 超敏发光试剂盒	上海威奥生物科技有限公司	WB0164
内源性过氧化物酶阻断剂	上海威奥生物科技有限公司	WH1028
即用型 SABC-POD 试剂盒	中国 BOSTER 公司	SA1020

1.2 主要仪器设备

仪器名称	生产公司	型号
自动超微量分光光度计	德国伯赫公司	Colibri
恒温水浴锅	上海精宏设备公司	DK-S22
小型垂直电泳槽	美国 Bio-Rad 公司	165-8001
Trans-Blot 转印槽	美国 Bio-Rad 公司	170-3930
组织匀浆器	北京鼎昊源	TL-2010S
小型梯度 PCR 仪	美国 Thermo 公司	Veriti DX
实时荧光定量 PCR 仪	美国 Life Technologies	VIIA 7 DX

全自动离心机	德国 Eppendorf 公司	5702
荧光病理显微镜	日本奥林巴斯公司	BX43
脱色摇床	江苏海门其林贝尔公司	TS-1
干燥箱	上海一恒仪器有限公司	BPG-9040A
脱水机	美国 Thermo 公司	Thermo Excelsior
包埋机	美国 Thermo 公司	Thermo Histo Star
切片机	德国 Leica 公司	R2245

2. 实验方法

2.1 小鼠 CT-26 结肠癌肿瘤细胞的相关方法

参考第二部分 2.1。

2.2 结肠癌荷瘤小鼠皮下瘤模型建立

1) 使用 0.9%浓度的生理盐水将 CT26 小鼠结肠癌细胞制成浓度为 5×10^6 个/ml 的细胞悬液, 使用电子细胞计数器检测细胞悬液中 CT26 细胞的成活率, 选取体重在 20g 左右的 6 周龄雄性 Balb/c 小鼠, 按照 0.2ml/20g 的比例进行接种, 接种位置为右侧腋下, 接种完成 48h 后, 开始监测小鼠皮下瘤生长情况, 当体积达 100mm^3 左右时, 进行随机分组后, 对各组小鼠采取对应的给药方式进行处理。

2) 小鼠分为 4 组, 12 只/组, 给药周期 14 天, 如表 3-1:

3-1 各组小鼠处置一览表

组别	处理	给药方式
空白对照	无	无
生理盐水	生理盐水	灌胃 0.2ml/1 次/2 天
四君子汤	四君子汤	灌胃 0.2ml/1 次/2 天
奥沙利铂	奥沙利铂	注射 0.1ml/1 次/2 天

3) 其他处置: 皮下瘤体积每两天测量一次, 并按照公式 $(a \times b \times b)/2$ 进行计算, a 为皮下瘤最大径, b 为皮下瘤最小径; 同时, 每两天进行一次体重测量。

4) 活体成像结束后, 进行摘取眼球取血, 血液分别收集至 EP 管中, 离心机离心后, 保存血清与-80°C冰箱。将取血后小鼠脱颈处死, 取出肺、肝、脾及皮下瘤于动物组织冻存管中保存, 做好标记, 于-80°C冷冻保存。

2.3 活体成像技术

1) 上机前准备: 按照药物与体重 $50\mu\text{l}/20\text{g}$ 的比例给小鼠进行戊巴比妥钠注射麻醉, 待麻醉后, 按照药物与体重 $200\mu\text{l}/20\text{g}$ 进行荧光素钾盐注射;

2) 固定曝光时长, 上机, 进行成像并拍照。

2.4 荧光定量技术

1) 将各组小鼠摘取的皮下瘤切取相同体积并剪碎, 放入对应编号的 5ml EP 管中, 加入 TRNzol, 1ml/支, 并放入磁珠后, 使用动物 RNA 提取仪进行 RNA 提取, 设置为 60HZ, 1min, 重复 2 次;

2) 后续操作同第一部分实验内容 2.4。

2.5 酶联免疫吸附测定实验

1) 依照 IFN- γ 说明书制作标准曲线方程, 如图 3-1:

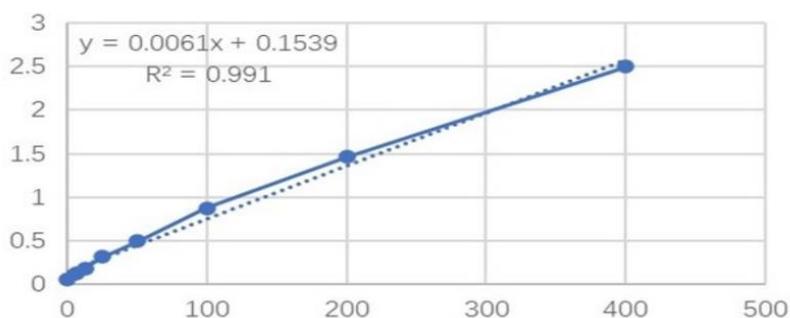


图 3-1 IFN- γ 标准曲线

2) 后续操作同第一部分实验内容 2.3

2.6 蛋白质免疫印迹技术

2.6.1 组织蛋白制备方法

1) 将从各组小鼠摘取的皮下瘤切取相同体积并剪碎, 加入含有酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 与皮下瘤组织比例为 5 μ l:1mg;

2) 使用组织匀浆机进行研磨, 至组织完全溶解于裂解液中即可;

3) 对皮下瘤组织与 RIPA 裂解液的混合液进行离心, 设置为: 12000r, 5min, 4 $^{\circ}$ C;

4) 离心后, 收集上清至对应编号的 EP 管中。

2.6.2 蛋白浓度测定方法

1) 取一块 96 孔板, 在最左侧从上至下进行标号 1-8, 并第一列按照序号从上至下加入对应体积的蛋白标准品: 0 μ l, 1 μ l, 2 μ l, 3 μ l, 4 μ l, 6 μ l, 8 μ l, 10 μ l, 12 μ l;

2) 使用 PBS (1X) 将 96 板各孔液体补足至 20 μ l;

3) 96 孔板第二列加入待测浓度的蛋白 2 μ l, 再各加入 18 μ l PBS(1X)使各孔补足至 20 μ l;

- 4) 再向第一列、第二列孔中加入 BCA 混合液 (A:B=50:1), 200 μ l/孔;
- 5) 置于 37 $^{\circ}$ C, 0.05%CO₂ 培养箱中充分反应 35min 后, 取出;
- 6) 使用酶标仪测定 OD 值, 选择波长在 570nm 处;
- 7) 获取标准曲线方程, 并用以计算待测定蛋白的浓度。

2.6.3 配胶

1) 10%分离胶的配制

10%分离胶成分表

组成	体积
蒸馏水	4.7ml
30% Acr/bis	2.5ml
1M tris PH8.8	2.6ml
10% SDS	0.1ml
10% 过硫酸铵	0.1ml
TEMED	0.004ml
Total	10ml

按成分表加入对应体积的各试剂后进行灌胶, 距离板底 2cm 处, 加入蒸馏水以隔绝空气等待凝固。

2) 5%浓缩胶的配制

5%浓缩胶成分表

组成	体积
蒸馏水	4.7ml
30% Acr/bis	2.5ml
1M tris PH8.8	2.6ml
10% SDS	0.1ml
10% 过硫酸铵	0.1ml
TEMED	0.004ml
Total	10ml

凝固后, 用滤纸吸净蒸馏水, 吹匀的 5%浓缩胶加入玻璃板中并加满后, 垂直方向插入梳子待浓缩胶凝固。

2.6.4 电泳

1) 对上样蛋白样品预处理并进行蛋白定量后, 参考对应体积加入 5X 上样缓冲液后, 置于 95 $^{\circ}$ C 金属浴中加热 8min, 结束加热后, 置于冰上骤冷降温, 并在降温后进行离心, 设置为 3000r, 1min, 4 $^{\circ}$ C;

2) 将处理好的玻璃板安装在电泳架上, 加入电泳液, 加满后垂直方向取出

之前垂直插入的梳子，加入样品蛋白及 Maker；

3) 槽盖盖紧并接通电源开始电泳，电泳总共分为两个阶段：

第一阶段：恒压电压 70V，30min，当指示剂标准线（蓝线）到达分离胶时，即第一阶段结束，转为第二阶段；

第二阶段：恒压电压为 90V，1-2h，具体时间长度视指示剂标准线（蓝线）而定。

2.6.5 转膜

1) 电泳结束前 20min 行 PVDF 膜预处理，使用塑料镊夹将 PVDF 膜放入甲醇中浸泡 20s 后，使用 DDH₂O 进行两次漂洗，转膜缓冲液浸泡 10min；

2) 将电泳结束后的玻璃胶轻轻缓慢取出，将浓缩胶裁掉，根据上样蛋白的体积来确定胶的体积后，使用转膜缓冲液将胶浸泡 20min；

3) 按照转膜“三明治”法进行如下操作：负极（黑色面）-海绵-胶-PVDF 膜-滤纸-海绵-正极（红色面），此步骤应在转膜缓冲液中进行操作并且要避免气泡产生；

4) 将转移槽装好，加入转膜缓冲液，插好对应颜色的正负极后，将整体放入冰水中，开启电源，200mA，30-60min，此处转膜时间应根据蛋白大小来确定。

2.6.6 封闭

1) 取出结束转膜后的 PVDF 膜并在室温条件下使用 5%BSA 密封 2h；

2) 密封结束后，进行三次洗膜，洗膜要求为：在摇床上开启低速后用 TBST 进行清洗，每次摇晃 5min，重复三次。

2.6.7 孵育抗体

1) 封闭完成后，加入稀释好的一抗并于 4℃环境下过夜，一抗稀释程度可根据具体情况进行调整；

2) 回收一抗，进行三次洗膜，洗膜要求为：在摇床上开启低速后用 TBST 进行清洗，每次摇晃 5min，重复三次；

3) 洗膜完成后，加入二抗，并孵育 2h，室温即可；

4) 二抗孵育结束后，再次进行三次洗膜，洗膜要求为：在摇床上开启低速后用 TBST 进行清洗，每次摇晃 10min，重复三次。

2.6.8 显影

1) 使用滤纸吸净残留的 TBST；

2) 将膜放在干净的保鲜膜上；

3) 将 1:1 混匀的发光化学试剂 A、B 混合液在避光条件下逐滴滴在膜上；

4) 将滴好发光试剂的膜放入显影仪中进行一次自动曝光后，手动调节曝光

时间并拍照记录影像；

2.6.9 数据处理

用 Image J 软件测定灰度值，使用 SPSS26.0 统计学软件处理数据，并用 $\bar{X} \pm S$ 表示数据。

2.7 免疫组化实验技术

2.7.1 脱蜡及水化

- 1) 将石蜡切片，使用二甲苯和无水乙醇常规脱蜡至水；
- 2) 使用蒸馏水浸泡后，再冲洗 10min。

2.7.2 灭活

- 1) 在室温条件下，消除内源性过氧化物酶活性，方法：用 3% H_2O_2 浸泡 10min；
- 2) 浸泡完成后，使用 PBS (1X) 进行冲洗，5min/次，共 2 次。

2.7.3 闭及抗体的敷育

- 1) 加入 5%BSA 封闭液，室温封闭 30min 后，缓慢适量滴入一抗，4°C 环境下过夜；
- 2) 过夜后，使用 PBS (1X) 进行冲洗，15min/次，共计 4 次；
- 3) 用滤纸将残留液体吸净，缓慢滴加适量的二抗后，37°C，静置 30min；
- 4) 取出的组织切片进行步骤 2 一次。

2.7.4 显色及封片

- 1) 按照试剂盒要求配制染色液，进行显色 5-10min (视显色情况而定) 后，流水冲洗；
- 2) 使用无水乙醇进行脱水处理并封片。

2.7.5 数据处理及分析

用 Image-Pro Plus 6.0 软件测定灰度值，SPSS26.0 处理数据，并用 $\bar{X} \pm S$ 表示数据。

2.8 统计学处理及分析

详见第一部分 2.5 全部内容。

3 实验结果

3.1 四君子汤对小鼠皮下瘤生长的影响

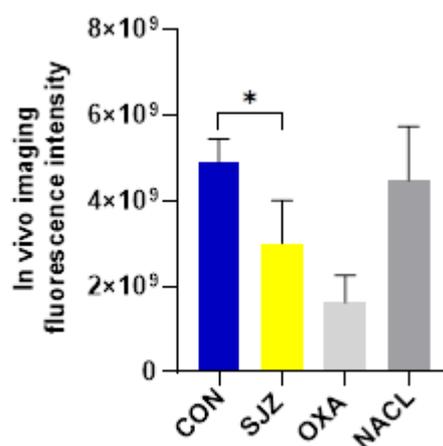
Balb/c 小鼠皮下瘤体积达 $100m^3$ 后，开始进行四君子汤灌胃给药，并每隔两天称重 1 次及皮下瘤大小测量 1 次，持续 2 周后，采用活体成像法进行检测并观

察各组间小鼠皮下瘤生长情况（体积）以及荧光强度，并进行组间的对比，结果显示：与生理盐水组对比，四君子汤组皮下瘤生长速度为生理盐水组的 76%，即四君子汤对肿瘤生长具有抑制的作用，存在统计学意义（ $P < 0.05$ ），如表 3-2；同时，四君子汤组小鼠肿瘤的荧光强度低于生理盐水组和空白组（ $P < 0.05$ ），如图 3-2，3-3：

表 3-2 结肠癌荷瘤小鼠皮下瘤荧光强度($\bar{X} \pm S$)

Groups	Fluorescence intensity [p/s/cm ² /sr]10 ⁹
CON	4.89±0.54
SJZ	3.01±1.00*
OXA	1.63±0.62
NACL	4.48±1.26

注：SJZ (5mg/ml)，OXA(25ng/20g)，NACL (生理盐水)，与 CON 组相比，* $P < 0.05$ 。(n=6)



注：SJZ (5mg/ml)，OXA(25ng/20g)，NACL (生理盐水)，与 CON 组相比，* $P < 0.05$ 。(n=6)

图 3-2 结肠癌荷瘤小鼠皮下瘤荧光强度[p/s/cm²/sr]10⁹

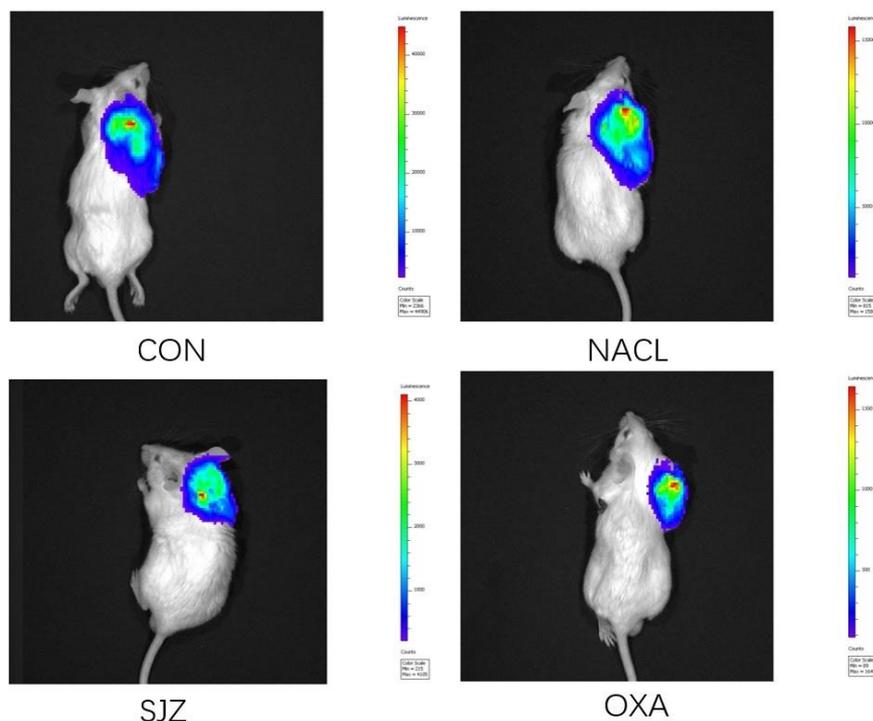


图 3-3 结肠癌荷瘤小鼠皮下瘤活体成像(n=6)

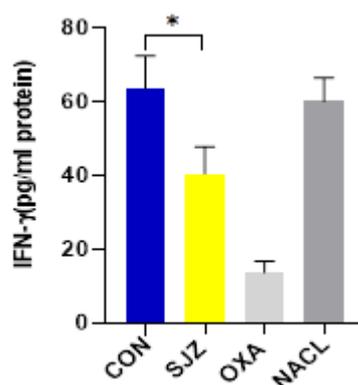
3.2 四君子汤对结肠癌荷瘤小鼠血清中细胞因子表达的影响

小鼠进行持续两周给药并完成活体成像检测后，对各组小鼠摘取眼球取血，离心后收集上清，采用酶联免疫吸附测定实验检测小鼠血清中 IFN- γ 的分泌，结果显示：与空白对照组和阴性对照组（NAEL）相比，四君子汤组小鼠血清中 IFN- γ 分泌降低，有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。如表 3-3，图 3-4：

表 3-3 四君子汤对结肠癌荷瘤小鼠血清中 IFN- γ 表达的影响($\bar{X} \pm S$)

Groups	IFN- γ (pg/ml)
CON	63.49 \pm 8.91
SJZ	40.50 \pm 7.32*
OXA	13.69 \pm 2.98
NAEL	60.12 \pm 6.31

注：SJZ (5mg/ml)，OXA(25ng/20g)，NAEL (生理盐水)，与 CON 组相比，* $P < 0.05$ 。(n=6)



注: SJZ (5mg/ml), OXA(25ng/20g), NACL (生理盐水), 与 CON 组相比, * $P < 0.05$. (n=6)

图 3-4 四君子汤对结肠癌荷瘤小鼠血清中 IFN- γ 表达的影响

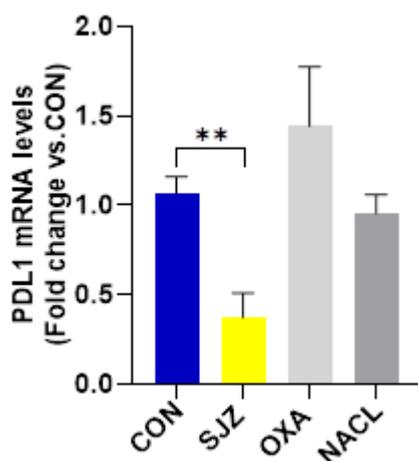
3.3 四君子汤对结肠癌荷瘤小鼠皮下瘤 PD-L1mRNA 表达的影响

小鼠进行持续两周给药并完成活体成像检测, 对各组小鼠完成摘取眼球取血后, 进行处死, 摘取皮下瘤, 采用荧光定量 PCR 实验检测其 mRNA 表达, 结果显示: 与空白对照组、阳性对照组 (OXA) 和阴性对照组 (NACL) 相比, 四君子汤组小鼠皮下瘤中 PD-L1mRNA 表达均明显降低 ($P < 0.01$), 存在统计学意义。如表 3-4, 图 3-5:

表 3-4 四君子汤对结肠癌荷瘤小鼠皮下瘤 PD-L1mRNA 表达的影响($\bar{X} \pm S$)

Groups	PD-L1 mRNA
CON	1.07 \pm 0.09
SJZ	0.37 \pm 0.14**
OXA	1.44 \pm 0.33
NACL	0.95 \pm 0.10

注: SJZ (5mg/ml), OXA(25ng/20g), NACL (生理盐水), 与 CON 组相比, ** $P < 0.01$. (n=6)



注: SJZ (5mg/ml), OXA(25ng/20g), NACL (生理盐水), 与 CON 组相比, $**P<0.01$. (n=6)

图 3-5 四君子汤对结肠癌荷瘤小鼠皮下瘤 PD-L1mRNA 表达的影响

3.4 四君子汤对结肠癌荷瘤小鼠皮下瘤蛋白表达的影响

小鼠进行持续两周给药并完成活体成像检测, 对各组小鼠完成摘取眼球取血后, 进行处死, 摘取各组小鼠的皮下瘤, 采用蛋白免疫印迹技术对各组小鼠摘取的皮下瘤蛋白表达情况进行测定, 结果示: 与生理盐水组相比, 四君子汤组小鼠皮下瘤 PD-L1 蛋白表达降低 ($P<0.05$), 存在统计学意义。如表 3-5, 图 3-6, 图 3-7, 图 3-8:

表 3-5 四君子汤对结肠癌荷瘤小鼠皮下瘤蛋白表达的影响($\bar{X}\pm S$)

Groups	PD-L1 expression
CON	0.72±0.03
SJZ	0.58±0.05*
OXA	1.24±0.15
NACL	0.78±0.03

注: SJZ (5mg/ml), OXA(25ng/20g), NACL (生理盐水), 与 CON 组相比, $*P<0.05$. (n=6)

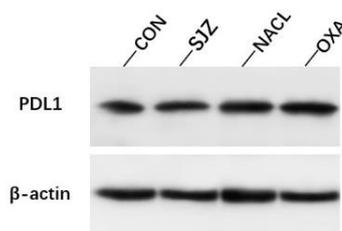
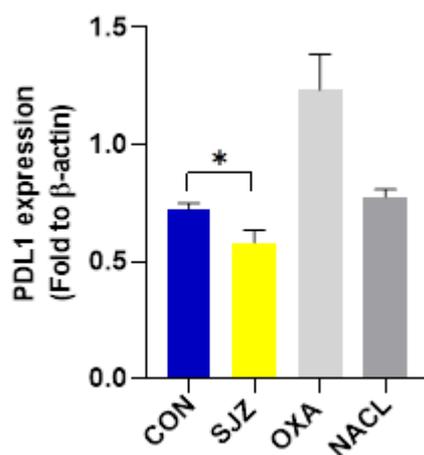


图 3-6 四君子汤对结肠癌荷瘤小鼠皮下瘤 PD-L1 蛋白表达影响



注：SJZ (5mg/ml)，OXA(25ng/20g)，NACL (生理盐水)，与 CON 组相比，* $P < 0.05$ 。(n=6)

图 3-7 四君子汤对结肠癌荷瘤小鼠皮下瘤 PD-L1 蛋白表达的影响

3.5 四君子汤对结肠癌荷瘤小鼠皮下瘤抗体表达的影响

小鼠进行持续两周给药并完成活体成像检测，对各组小鼠完成摘取眼球取血后，进行处死，摘取各组小鼠的皮下瘤，采用免疫组化技术对各组小鼠摘取的皮下瘤抗体表达情况进行测定，结果显示：与生理盐水组相比，四君子汤组小鼠皮下瘤 PD-L1 抗体表达降低 ($P < 0.05$)，存在统计学意义。如表 3-6，图 3-8，图 3-9：

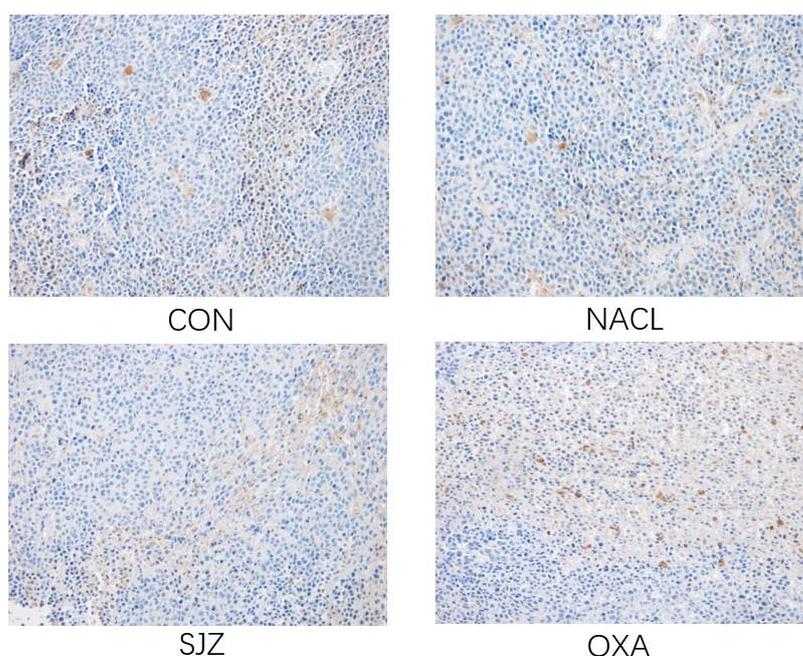
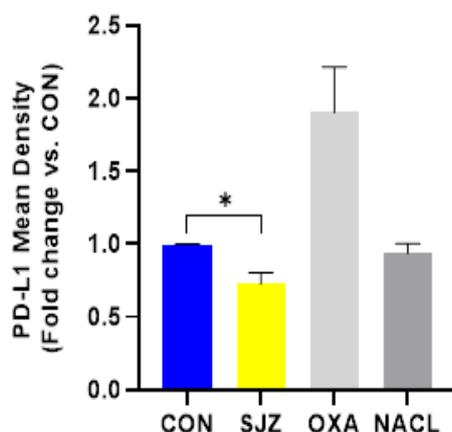


图 3-8 四君子汤对结肠癌荷瘤小鼠皮下瘤 PD-L1 抗体表达的影响 (x200)

表 3-6 四君子汤对结肠癌荷瘤小鼠皮下瘤 PD-L1 抗体表达的影响($\bar{X}\pm S$)

Groups	PD-L1 Mean Density/CON
CON	0.99±0.01
SJZ	0.73±0.08*
OXA	1.90±0.31
NACL	0.94±0.07

注: SJZ (5mg/ml), OXA(25ng/20g), NACL (生理盐水), 与 CON 组相比, * $P<0.05$. (n=6)



注: SJZ (5mg/ml), OXA(25ng/20g), NACL (生理盐水), 与 CON 组相比, * $P<0.05$. (n=6)

图 3-9 四君子汤对结肠癌荷瘤小鼠皮下瘤 PD-L1 蛋白表达的影响

4、讨论与分析

手术和化疗是结肠癌治疗的常用手段,必要时会辅以免疫疗法。但是,由于结肠癌位置的特殊性、手术和化疗的局限性以及免疫治疗费用过于昂贵无法广泛应用于临床等原因导致结肠癌预后并不理想。许多临床研究指出,中医药治疗可有效延长患者生存期、提高生活质量,但其内在机制尚不明确。

《医学集成》中有言“脾胃为后天化源,喜燥恶湿,虚冷则寒从中生,邪气壅滞胸膈,中气不运,百病丛生,宜节饮食,忌生冷。凡治病勿伤胃气,久病宜保脾土,以土能生万物,他脏皆取资焉。”而在中医学中,结肠癌的主要病机为脾胃虚弱,因此补益脾胃是中医治疗结肠癌的最常用方法。现代研究指出,四君子汤能使荷瘤小鼠的恶病质症状明显减轻^[61];结肠癌患者术后进行四君子汤联合肠内营养治疗可以改善免疫力,促进患者恢复^[62];同时,四君子汤可以通过很好的调节肠道菌群平衡、消除肠道内潜在的细菌来恢复胃肠功能,提高机体的免疫力^[63]。

研究表明 STAT3 对肿瘤干细胞有重要作用，它可以调节原癌、抑癌基因及肿瘤微环境^[64]，并且 STAT 所有亚型的激活都与癌症相关^[65]，STATs 由 JAKs 在细胞质中激活^[66]，有大量研究证据表明，在实体瘤中 JAK/STAT 信号通路的激活与肿瘤生长、免疫逃逸、癌症复发及实体肿瘤耐药相关^[65]。PD-1 和 PD-L1 的过度表达与 STAT3 的磷酸化显著相关，且目前已证实 STAT3 可以增强肿瘤微环境中 IFN- γ 的分泌^[67]。

我们通过第一部分研究发现四君子汤会通过抑制 STAT3 的生成，降低 NK 细胞中 IFN- γ 的分泌以及 PD-1 的表达，达到调控 NK 细胞的目的，并通过与 STAT3 抑制剂的比较实验验证了这一实验结果。经由第二部分研究发现四君子汤可以增强 NK 细胞对 HCT116 结肠癌细胞的杀伤并降低 PD-1 及 PD-L1 的表达，在与 STAT3 抑制剂的比较实验中，我们发现 NK 细胞对 HCT116 的杀伤作用会进一步增强，表达会进一步降低。通过前两个部分的研究，我们提出推测：四君子汤可能通过 STAT3 影响 NK 细胞及 HCT116 中 PD-1 及 PD-L1 的表达，使 NK 细胞对 HCT116 的杀伤作用得以增强。为进一步探索四君子汤治疗结肠癌的可能机制，我们通过建立结肠癌荷瘤小鼠模型，给予四君子汤药物治疗。小鼠活体成像显示四君子汤组小鼠皮下瘤荧光强度明显低于对照组及生理盐水组；qRT-PCR 检测发现四君子汤给药治疗后，小鼠皮下瘤中 PD-L1 mRNA 表达降低；WB 和免疫组化均显示皮下瘤中 PD-L1 蛋白表达减少，说明四君子汤可以影响结肠癌荷瘤小鼠 PD-L1 表达并抑制其皮下瘤的生长；ELISA 检测结肠癌荷瘤小鼠外周血血清中 IFN- γ 分泌发现，与对照组相比，四君子汤组 IFN- γ 分泌减少。由此推测四君子汤可能通过减少 IFN- γ 分泌影响 PD-L1 表达，抑制结肠癌肿瘤的生长，这与我们细胞实验的结果相近。因此，我们得出结论：四君子汤影响 NK 细胞活性的作用可能与 STAT3 抑制剂相近，通过调控 STAT3 信号干预 IFN- γ 的分泌，降低 PD-1/PD-L1 的表达从而改善 NK 细胞活性以及抑制结肠癌细胞的生长。

结论

本论文通过建立 NK 细胞与 HCT116 结肠癌共培养模型、结肠癌荷瘤小鼠模型，采用细胞毒性实验、酶联免疫吸附测定实验、荧光定量 PCR 实验、蛋白质免疫印迹技术、免疫组化及活体成像技术等方法观察四君子汤对人外周血 NK 细胞活性的影响和四君子汤对结肠癌荷瘤小鼠模型中肿瘤及 NK 细胞的影响，从而得出以下结论：

1. IFN- γ 一定浓度下可以抑制 NK 细胞生长，四君子汤可以降低 NK 细胞中 IFN- γ 的分泌。
2. 四君子汤可以影响 NK 细胞功能活性，其作用可能与 STAT3 抑制剂相近，通过调控 STAT3 信号干预 IFN- γ 的分泌，降低 PD-1/PD-L1 的表达从而改善 NK 细胞功能活性抑制 HCT116 结肠癌细胞的生长。

参考文献

- [1] Wang H, Wang L, Xie Z, et al. Nitric Oxide (NO) and NO Synthases (NOS)-Based Targeted Therapy for Colon Cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(7):1881.
- [2] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政医管局, 中华医学会肿瘤学术分会. 中国结直肠癌诊疗规范(2020版)[J]. *中国实用外科杂志*, 2020, 6(40):601-625.
- [3] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020:GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 2:doi:10.3322/caac.21660.
- [4] 吴瑞影, 许建华. 化疗后肿瘤微环境的变化与肿瘤转移的研究进展[J]. *中国肿瘤临床*, 2017, (20):49-54.
- [5] Karagiannis G S, Condeelis J S, Oktay M H. Chemotherapy-induced metastasis: mechanisms and translational opportunities[J]. *Clinical & Experimental Metastasis*, 2018, (4):269-284.
- [6] 刘艳杰. 吉西他滨联合奥沙利铂治疗晚期胰腺癌的疗效研究[J]. *现代医药卫生*, 2020, 36(06):889-891.
- [7] Mastrangelo M. Cisplatin-based therapy and CINV:Optimal antiemetics during germ cell testicular cancer treatment[J]. *Clin J Oncol Nurs*, 2018, 22(2):31-36.
- [8] Michalska M, Schultze S, Kuckuck I, et al. Impact of methadone on cisplatin treatment of bladder cancer cells[J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(3):1369-1375.
- [9] 禹雯琦, 等. 四君子汤及加味方治疗恶性肿瘤及基础研究[J]. *上海中医药大学学报*, 2017, 31(9):95-100.
- [10] Jin H, Cai C, Li B, et al. Modified Si-Jun-Zi-Tang Attenuates Airway Inflammation in a Murine Model of Chronic Asthma by Inhibiting Teff Cells via the mTORC1 Pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10:161.
- [11] Ziblat A, Nuñez SY, Raffo Iraolagoitia XL, et al. Interleukin (IL)-23 Stimulates IFN- γ Secretion by CD56^{bright} Natural Killer Cells and Enhances IL-18-Driven Dendritic Cells Activation[J]. *Front Immunol*, 2018, 8:1959.
- [12] Zhou X, Li Y, Zhang M, et al. Spectrum-Effect Relationship between UPLC Fingerprints and Antitumor Cancer Effect of Si Jun Zi Tang[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019:1-9.

- [13] Zhou JY, Chen M, Wu CE, et al. The modified Si-Jun-Zi Decoction attenuates colon cancer liver metastasis by increasing macrophage cells[J], *BMC Complement Altern Med*, 2019, 19(1):86.
- [14] 陈莉媚, 金彤, 宁春桃, 等. 加味四君子汤对 H22 肝癌小鼠的抑瘤作用和免疫功能的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2019, 39(02):241-248.
- [15] Li C, Niu M, Wang R, et al. The modulatory properties of Si Jun Zi Tang enhancing anticancer of gefitinib by an integrating approach[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 111:1132-1140.
- [16] Chakrabarti S, Peterson CY, Sriram D, et al. Early stage colon cancer: Current treatment standards, evolving paradigms, and future directions[J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2020, 12(8):808-832.
- [17] Khan M, Arooj S, Wang H. NK Cell-Based Immune Checkpoint Inhibition [J]. *Front Immunol*, 2020, 11:167.
- [18] Hsu J, Hodgins JJ, Marathe M, et al. Contribution of NK cells to immunotherapy mediated by PD-1/PD-L1 blockade[J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(10):4654-4668.
- [19] Liu Y, Cheng Y, Xu Y, et al. Increased expression of programmed cell death protein 1 on NK cells inhibits NK-cell-mediated anti-tumor function and indicates poor prognosis in digestive cancers[J]. *Oncogene*, 2017, 36(44):6143-6153.
- [20] Mariotti FR, Petrini S, Ingegnere T, et al. PD-1 in human NK cells: evidence of cytoplasmic mRNA and protein expression[J]. *Oncoimmunology*, 2018, 8(3):1-10.
- [21] Gotthardt D, Trifinopoulos J, Sexl V, et al. JAK/STAT Cytokine Signaling at the Crossroad of NK Cell Development and Maturation[J]. *Front Immunol*, 2019, 10:2590.
- [22] Wu Y, Tian Z, Wei H. Developmental and Functional Control of Natural Killer Cells by Cytokines[J]. *Front Immunol*, 2017, 8:930.
- [23] Giuliani M, Janji B, Berchem G. Activation of NK cells and disruption of PD-L1/PD-1 axis: two different ways for lenalidomide to block myeloma progression[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(14):24031-24044.
- [24] Gras Navarro A, Björklund AT, Chekenya M. Therapeutic potential and challenges of natural killer cells in treatment of solid tumors[J]. *Front Immunol*, 2015, 6:202.

- [25] Scarno G, Pietropaolo G, Di Censo C, et al. Transcriptional, Epigenetic and Pharmacological Control of JAK/STAT Pathway in NK Cells[J]. *Front Immunol*, 2019, 10:2456.
- [26] Domagala J, Lachota M, Klopotoska M, et al. The Tumor Microenvironment-A Metabolic Obstacle to NK Cells' Activity[J]. *Cancers (Basel)*,2020, 12(12):3542.
- [27] Qureshy Z, Johnson DE, Grandis JR. Targeting the JAK/STAT pathway in solid tumors[J]. *J Cancer Metastasis Treat*, 2020, 6:27.
- [28] De Mel S, Hue SS, Jeyasekharan AD, et al. Molecular pathogenic pathways in extranodal NK/T cell lymphoma[J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1):33.
- [29] L.Siegel, R, D.Miller, et al. *Cancer Statistics,2021*[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 3:doi:10.3322/caac.21654
- [30] Zhang C, Liu Y. Targeting NK Cell Checkpoint Receptors or Molecules for Cancer Immunotherapy[J]. *Front Immunol*, 2020, 11:1295.
- [31] 杜锦芳, 禹雯琦, 石晓兰, 等. 十全大补汤对结肠癌原发瘤切除后转移瘤生长及NK细胞的影响[J]. *上海中医药杂志*, 2017, 51(12):79-83.
- [32] 张莉丹, 刘培, 王伊楠, 等. 基于网络药理学的四君子汤治疗胃炎的作用机制研究[J]. *Drug Evaluation Research*, 2020, 43(4).
- [33] 宋媛媛. 半夏泻心汤联合四君子汤治疗化疗消化道反应的临床观察[J]. *陕西中医*, 2016, 37(5):578-579.
- [34] 李进安, 王永多, 王奎, 等. 四君子汤对结肠癌术后患者胃肠恢复及免疫功能作用研究[J]. *实用癌症杂志*, 2016, 31(6):1034-1036.
- [35] 俞志高. 四君子汤对结肠癌患者术后营养状态及胃肠功能恢复的影响[J]. *哈尔滨医药*, 2019, 39(04):383-384.
- [36] 莫淑婵, 田甜, 吴钟彪. 加味四君子汤辨证治疗结肠癌术后化疗的不良反应效果观察[J]. *辽宁中医杂志*, 2018, 45(03):571-574. .
- [37] 徐鹏, 孙芳, 李群. 肠内营养联合四君子汤应用于结肠癌患者术后治疗的效果观察[J]. *中国处方药*, 2018, 16(03):65-66.
- [38] 林晓洁, 关若丹, 司徒红林, 等. 中医扶正法预防恶性肿瘤转移的免疫治疗机制[J]. *中医临床研究*, 2015, (24):22-24
- [39] Ratan ZA, Youn SH, Kwak YS, et al. Adaptogenic effects of Panax ginseng on modulation of immune functions[J]. *J Ginseng Res*, 2021, 45(1):32-40.
- [40] Zhang WJ, Zhao ZY, Chang LK, et al. *Atractylodis Rhizoma: A review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology, toxicology and quality control*

- [J]. *Ethnopharmacol*, 2021, 266:113415.
- [41] Chao CL, Huang HW, Su MH, et al. The Lanostane Triterpenoids in *Poria cocos* Play Beneficial Roles in Immunoregulatory Activity[J]. *Life (Basel)*, 2021, 11(2):111.
- [42] Murray MT. *Glycyrrhiza glabra* (Licorice)[J]. *Textbook of Natural Medicine*, 2020, 641-647.
- [43] Freud AG, Mundy-Bosse BL, Yu J, et al. The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity[J]. *Immunity*, 2017, 47(5):820-833.
- [44] Mukherjee N, Ji N, Hurez V, et al. Intratumoral CD56^{bright} natural killer cells are associated with improved survival in bladder cancer[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(92):36492-36502.
- [45] Zhao YC, Tang D, Yang S, et al. Novel Variants of ELP2 and PIAS1 in the Interferon Gamma Signaling Pathway Are Associated with Non-Small Cell Lung Cancer Survival[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2020, 29(8):1679-1688.
- [46] Tau G, Rothman P. Biologic functions of the IFN-gamma receptors[J]. *Allergy*, 1999, 54:1233-1251.
- [47] Wang Y, Shen Y, Wang S, et al. The role of STAT3 in leading the crosstalk between human cancers and the immune system[J]. *Cancer Lett*, 2018, 415:117-128.
- [48] Fernández A, Navarro-Zapata A, Escudero A, et al. Optimizing the Procedure to Manufacture Clinical-Grade NK Cells for Adoptive Immunotherapy[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(3):577.
- [49] Ljunggren HG. Paths taken towards NK cell-mediated immunotherapy of human cancer-a personal reflection[J]. *Scand J Immunol*, 2021, 93(1):e12993.
- [50] Sordo-Bahamonde C, Vitale M, Lorenzo-Herrero S, et al. Mechanisms of Resistance to NK Cell Immunotherapy[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(4):893.
- [51] Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade[J]. *Science*, 2018, 359(6382):1350-1355.
- [52] Hudson K, Cross N, Jordan-Mahy N, et al. The Extrinsic and Intrinsic Roles of PD-L1 and Its Receptor PD-1: Implications for Immunotherapy Treatment[J]. *Front Immunol*, 2020, 11(21):568931.
- [53] Markowitz G J, Gao D, Port J L, et al. The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis[J]. *Nature reviews Cancer*, 2019, 19(1):9-

31.

- [54] Johnson DE, O'Keefe RA, Grandis JR. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(4):234-248.
- [55] Pham TH, Park HM, Kim J, et al. STAT3 and p53: Dual Target for Cancer Therapy[J]. *Biomedicines*, 2020, 8(12):637.
- [56] Chen W, Dai X, Chen Y, et al. Significance of STAT3 in Immune Infiltration and Drug Response in Cancer[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(6):834.
- [57] Yoyen-Ermis D, Tunali G, Tavukcuoglu E, et al. Myeloid maturation potentiates STAT3-mediated atypical IFN- γ signaling and upregulation of PD-1 ligands in AML and MDS[J]. *Sci Re*, 2019, 9(1):11697.
- [58] D'Angelo S P, Shoushtari A N, Keohan M L, et al. Combined KIT and CTLA-4 Blockade in Patients with Refractory GIST and Other Advanced Sarcomas: A Phase Ib Study of Dasatinib plus Ipilimumab[J]. *Clinical Cancer Research*, 2017, 23:2972 - 2980.
- [59] Qian J, Li J, Jia J, et al. Different concentrations of sijunzi decoction inhibit proliferation and induce apoptosis of human gastric cancer sgc-7901 side population [J]. *African Journal of Traditional Complementary & Alternative Medicines*, 2016, 13(4):145-156.
- [60] Beibei, Gao, Ying, et al. A Comparison of Characterization and Its Actions on Immunocompetent Cells of Polysaccharides from Sijun zi Decoction[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 11:doi:10.1155/2019/9860381.
- [61] 李斌, 万丽丽, 李颜等. 四君子汤对结肠癌荷瘤小鼠癌性恶病质的影响[J]. *中医杂志*, 2014, 55(18):1584-1587.
- [62] 王鄂明, 符克燕, 齐若谷. 四君子汤联合肠内营养对结肠癌手术免疫功能及血清 IL-2、IL-6 水平的影响[J]. *实用中医内科杂志*, 2021, 35(1):66-69.
- [63] 崔钰珠, 于慧会, 崔巧妍, 等. 四君子汤加减改善大肠癌患者生存质量研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2017, 19(2):74-76.
- [64] Galoczova M, Coates P, Vojtesek B. STAT3, stem cells, cancer stem cells and p63[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2018, 23:12.
- [65] Qureshy Z, Johnson DE, Grandis JR. Targeting the JAK/STAT pathway in solid tumors[J]. *J Cancer Metastasis Treat*, 2020, 6:27.
- [66] Tolomeo M, Cascio A. The Multifaced Role of STAT3 in Cancer and Its Implication for Anticancer Therapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2):603.
- [67] Bu LL, Yu GT, Wu L, et al. STAT3 Induces Immunosuppression by Upregulating

PD-1/PD-L1 in HNSCC[J]. J Dent Res, 2017, 96(9) : 1027-1034.

附录

PD-1/PD-L1 抗肿瘤免疫治疗研究进展

[摘要] 免疫检查点是恶性肿瘤发生免疫逃逸的主要原因，针对免疫检查点的抑制疗法是目前最重要的免疫疗法之一，以 PD-1/PD-L1 为免疫检查点的免疫治疗是近几年研究的热点，PD-1/PD-L1 免疫疗法对许多类型的癌症产生良好疗效的同时，也获得了许多研究上的突破，本文就 PD-1/PD-L1 研究进展进行综述。

[关键词] PD-1; PD-L1; 恶性肿瘤; 免疫;

PD-1/PD-L1 anti-tumor immunotherapy research progress

[Abstract] Immune checkpoints are the main cause of immune escape in malignant tumors. Suppressive therapy against immune checkpoints is one of the most important immunotherapy at present. Immunotherapy with PD-1/PD-L1 as immune checkpoints has been studied in recent years. While PD-1/PD-L1 immunotherapy has a good effect on many types of cancer, it has also obtained many research breakthroughs. This article reviews the progress of PD-1/PD-L1 anti-tumor immunity.

[Key words] PD-1; PD-L1; cancer; immunity;

1. 概述

恶性肿瘤目前仍是世界死亡率最高的疾病，这与其病情发展迅速、预后不佳密切相关，目前许多癌症在发现及确诊时已属中晚期或晚期^[1]。尽管在健康状态下，免疫系统具有识别、监视和杀伤恶性肿瘤细胞的能力，但是在癌症状态下，免疫系统在杀伤和抑制肿瘤细胞的同时，会有一些免疫原性差的变体进行循环性免疫选择，从而促进免疫逃逸的发生和癌症的发展^[2]。

程序性死亡受体-1(PD-1)是一种关键的免疫检查点，主要在活化的 T 细胞表面表达^[3]，其配体称为程序性死亡配体-1 或-2 (PD-L1 和 PD-L2)^[4,5]。当 PD-1 与恶性肿瘤表面过表达的 PD-L1 发生结合 (PD-1/PD-L1 信号通路激活) 时，会使 T 细胞结构发生改变，失去抗肿瘤免疫功能，从而无法发挥抗肿瘤的免疫作用^[3,6]。使用 PD-1 或 PD-L1 抑制剂可阻断 PD-1/PD-L1 信号通路恢复 T 细胞免疫活性，促进机体抗肿瘤能力^[3]，因此，抗 PD-1/PD-L1 疗法拥有广泛的关注度。

2. PD-1 与相关免疫细胞

2.1 NK

随着抗 PD-1 治疗在恢复 T 细胞抗肿瘤能力方面取得的研究突破，越来越多的人开始探索 PD-1 与 NK 细胞之间的关系，且有许多研究者推测：抑制 PD-1 表达能够提高 NK 细胞活性及抗肿瘤作用^[7]。有研究人员在小鼠肿瘤的 NK 细胞中发现 PD-1 的表达，并通过抑制 PD-1 表达激活了 NK 细胞的抗肿瘤免疫反应，与此同时

此人指出：PD-1 在高度活化的 NK 细胞表面具有更丰富的表达能力，并产生抑制 NK 细胞的依赖性免疫监视，促进肿瘤细胞逃逸 NK 细胞的免疫反应^[7]。在一项关于肺癌的研究中发现：PD-1⁺NK 细胞较 PD-1⁻NK 细胞的抗肿瘤能力弱，且分泌细胞因子的数量较 PD-1⁻NK 少^[8]；另一项研究指出：在健康人体的外周血检测中发现，PD-1⁺NK 细胞亚群占 NK 细胞数量的 25%，PD-1 由 CD56⁻NK 细胞表面表达，并且其表达局限于完全成熟的 NK 细胞（NKG2A⁻KIR⁺CD57⁺）表型^[9]。此外，仍有大量实验数据表明：PD-1 可以在 NK 细胞表面表达，并抑制 NK 细胞活性^[7-10]，阻断 PD-1 表达可恢复 NK 细胞抗肿瘤活性^[7-9]。

2.2 巨噬细胞

巨噬细胞是免疫系统中重要的免疫细胞之一，其吞噬能力在机体抗肿瘤的过程中起到至关重要的作用。近几年，巨噬细胞与 PD-1 表达之间的关系正在被广泛研究和挖掘。2017 年，一项关于原发人类结肠癌的癌症小鼠模型中发现，肿瘤相关巨噬细胞（TAM）中 PD-1 的表达与患病时间及病情的加重呈正相关，与其针对肿瘤细胞的吞噬能力呈负相关；阻断 PD-1 的表达，会增强巨噬细胞吞噬功能，减缓肿瘤生长速度，进而延长癌症小鼠模型的存活时间^[11]。这项研究表明 PD-1 的表达对巨噬细胞的抗肿瘤免疫活性起抑制作用。

常见的巨噬细胞分为 M1 和 M2 两个表型，其中 M1 为“经典巨噬细胞”，具有抗肿瘤作用；而 M2 则被称为“变异型巨噬细胞”，具有免疫抑制且促进肿瘤发展的作用^[12]。2018 年一项关于骨肉瘤（OS）肺转移的研究中发现：抗 PD-1 治疗可以同时增加 M1 表型巨噬细胞和减少 M2 表型巨噬细胞，且 M2 型巨噬细胞会出现向活化的 M1 型巨噬细胞转化的现象，与此同时，OS 细胞会出现大量死亡，该研究者在进一步的实验中发现巨噬细胞是抗 PD-1 治疗的关键介质^[13]。这些发现意味着抗 PD-1 治疗可以通过改变巨噬细胞分型而发挥直接治疗肿瘤的作用。2020 年一项关于胃癌相关巨噬细胞的研究结果中指出：PD-1⁺巨噬细胞大多数呈 M2 表型，PD-1⁺巨噬细胞的含量与胃癌患者的预后程度呈负相关^[14]。这项研究同样证明了 PD-1 对巨噬细胞的抑制作用。同年，在一项关于胰腺癌的研究中发现：M2 型巨噬细胞可以诱导单核细胞上的 PD-L1 表达，使该表达与 CD8⁺T 细胞表面的 PD-1 结合从而诱导免疫疲劳^[15]。

以上数据均证明：PD-1 的表达会对 M1 型巨噬细胞的抗肿瘤活性产生抑制作用，抗 PD-1 治疗可改变巨噬细胞的活性，且 M2 型巨噬细胞会影响 T 细胞的免疫活性。因此，巨噬细胞很可能是继 T 细胞之后，又一具有极大潜力的抗 PD-1 治疗的关键介质。

2.3 T 细胞

PD-1 最早是在活化的 T 细胞表面被发现，T 细胞上 PD-1 的表达仅表明 T 细

胞接收到免疫抑制信号^[16]，目前 PD-1 靶向药在实体瘤的治疗中的应用已得到广泛认可，并且 PD-1 靶向药正作为治疗血液系统恶性肿瘤的新选择^[17]。但是，仍有很大的局限性，很多癌症对抗 PD-1 疗法并不敏感^[18]。

在一项关于晚期上皮性卵巢癌（EOC）的研究中发现，PD-1 在 EOC 患者腹水和肿瘤中的 T 细胞上明显表达，而 T 细胞效应因子明显减少，当使用 PD-1 抑制剂时，T 细胞效应因子分泌增多，在接下来进行的一系列相关检测实验指标均得到类似结果，同时，使用蛋白构建体代替蛋白支架能够得到更好的效果，该实验者指出：PD-1 靶向治疗具有一定的局限性，蛋白构建体可以设计多种特异性蛋白，两种方式联合治疗带来的疗效具有很大的探索前景^[19]。

有报道指出：针对 MC-38 荷瘤小鼠进行抗 PD-1 治疗时，线粒体激活，从而实现抗 PD-1 疗法的疗效；据此有学者推测对抗 PD-1 疗法无效的肿瘤也许是源于相关线粒体无法激活，并对此进行实验研究发现：在对抗 PD-1 疗法存在疗效的小鼠模型中检测发现 CD8⁺T 细胞活性明显增强并与其线粒体激活状态相似；而在具有全身免疫抑制特性的肿瘤（SIP）的小鼠中发现，PD-1 的表达可直接下调线粒体功能并抑制 T 细胞增殖，加入线粒体活性激动剂会部分改善抗 PD-1 疗法无效的现象，该研究对抗 PD-1 疗法无效的群体提供了潜在的解决方案^[20]。

以上研究为我们提供了针对单一 PD-1 靶向治疗无效的群体，采取相关联合疗法或许会得到十分惊喜的疗效。

2.4 B 细胞

B 细胞表位肽疫苗（B-Vaxx）疗法是相对落后但具有巨大研究价值的领域。在一篇关于 B 细胞表位肽疫苗疗法的综述性文章中明确指出：该疗法已对过度表达 HER-2 的癌症，尤其是乳腺癌、结直肠癌和胃癌产生一定疗效，但并不尽如人意。目前使用单一 PD-1 免疫疗法的耐药问题尚未解决，开发联合疗法使更多的患者受益是至关重要的。在最新的假说中提到：PD-1 疫苗（PD1-Vaxx）联合 B-Vaxx 组合 HER-2 具有协同作用，在相关的小鼠模型中的确检测到与假说复合的结果，显著降低了肿瘤的生长速度^[21]。关于 PD-1 疫苗开发相关研究的初步结果已于 2019 年 AACR 会议上公布，其相关临床试验计划已于 2020 年美国癌症研究协会年会上得以介绍，介绍中指出：PD1-Vaxx 的临床 I 期实验将以非小细胞肺癌（NSCLC）为研究主体，并确定单一疗法和联合疗法中不同的使用剂量以及关注患者的耐受性、疗效等。如果 PD1-Vaxx 联合 B-Vaxx 治疗能够取得成功并应用于肿瘤治疗中，将会为广大患者带来巨大福音。

此外，在一篇关于 NSCLC 的研究文献中明确指出 PD-1 在 B 细胞表面表达能够限制 B 细胞的免疫应答功能^[22]。2018 年一项关于黑色素瘤患者抗 CTLA4 和抗 PD1 联合治疗（CCB）的检测中发现：治疗第一个周期后，循环 B 细胞减少，同

时黑色素瘤患者所特有的 B 细胞亚群 CD21^{lo} B 细胞增加, 在相关的 CD21^{lo} B 细胞的 RNA 测定中可检测出 B 细胞活化, 患者无进展生存期得到延长^[23]。

3. PD-1/PD-L1 与相关恶性肿瘤信号通路

3.1 PI3K/AKT (磷酸肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B)

PI3K/AKT 信号通路功能的异常与癌症发生发展以及耐药密切相关, 在最近的研究报道中, PI3K/AKT 抑制剂的使用已成为癌症靶向治疗的选择之一^[24]。近几年, 关于 PD-1/PD-L1 与 PI3K/AKT 的文献并不多, 且 NSCLC 相关的研究占大多数。在 2019 年一项关于 NSCLC 的研究中发现, 表皮生长因子酪氨酸激酶 (EGFR) 作为 NSCLC 最重要的驱动因子之一, 其突变大多发生于 PD-L1 低表达的患者中^[25]。但是, 在 2017 年至今关于 NSCLC 的多项研究中均指出 EGFR 抑制剂对 PD-L1 高表达或低表达的患者均能够产生良好疗效^[26,27]。早在 2015 年便有专家指出: EGFR 可通过激活 PI3K/AKT 通路上调 PD-L1 表达, 使用特异性 PI3K/AKT 信号通路阻断剂, 能够观察到 PD-L1 表达的明显下降^[28]。但是, 该结论至今仍存在很大争议, 预明确 NSCLC 中 EGFR 与 PD-L1 之间关系及相关机制仍需进一步研究。

2016 年有研究者在黑色素瘤小鼠模型中肿瘤细胞中磷酸酶和张力蛋白同源物 (PTEN) 的缺失会导致抑制性细胞因子分泌增多, 影响 T 细胞的免疫功能, 适当应用 PI3K/AKT 抑制剂会与抗 PD-1 治疗产生协同作用^[29]。

3.2 MAPK

丝裂原激活的蛋白激酶 (MAPK) 信号通路是靶向治疗黑色素瘤转移的最重要通路^[30]。目前, MAPK 信号通路的致癌作用及其对癌症治疗的不良影响已得到充分证实。实验证明阻断 MEK1/2 是抑制 MAPK 信号通路表达的关键, 当 MAPK 被阻断时, PD-L1 相关 mRNA 及蛋白质的表达会被阻止^[31], 从而达到免疫治疗的效果。2015 年美国癌症协会在 CT-26 小鼠模型试验中发现, MEK 抑制剂与免疫检查点抑制剂联合应用具有相互促进的协同作用, 并投入临床试验^[32], 目前, 该联合治疗方案仍处于临床评估中。2018 年, 有研究人员发现 MAPK 信号通路可以促进 PD-L1 的表达^[33], 应用 MAPK 阻断剂可增强抗 PD-1/PD-L1 疗效^[34], 目前抗 PD-1/PD-L1 联合 MEK 阻断剂正在广泛研究中, 2019 年最新研究成果展示抗 PD-1 治疗联合 MEK 抑制剂间断或持续给药均对晚期黑色素瘤产生良好疗效^[35]。

3.3 JAK/STAT

Janus 激酶 (JAK) /信号转导子和转录激活子 (STAT) 信号通路诱导基因表达发生变化的重要信号通路, JAK/STAT 的异常激活会促进肿瘤发生^[36]。在免疫机制中, JAKs 突变会间接导致 T 细胞对 IFN- γ 失去敏感性并使 PD-L1 表达显著升高^[37], 且 PD-L1 表达水平的上调可由 STAT3 与 PD-L1 启动子结合来调控^[38], 目前 STAT3 与癌细胞存活, 免疫抑制和持续炎症之间的关系已得到广泛认知^[39],

JAK/STAT 信号通路通过影响 IFN- γ 进而调控 PD-L1 表达已在胃癌^[40]、胰腺癌^[41]、中得到认证, 其他癌症中的作用, 仍处于探索状态。在 2020 年一项关于肺腺癌的研究中发现 IFN- γ 增强了 JAK1、JAK2、STAT1 的磷酸化, 且 PD-L1 表达明显增多^[42]。在近期一项关于大肠癌的临床研究中发现: PD-L1 的表达与 JAK2、STAT1 表达呈正相关, 采用 IFN- γ 治疗后, JAK2 和 STAT1 表达比率上升, 并指出 JAK2/STAT1 可能是 IFN- γ 诱导 PD-L1 表达的相关通路^[43]。在 2017 年一项关于胰腺癌的研究中发现, 在胰腺原位癌小鼠模型中使用 JAK/STAT 抑制剂(Ruxolitinib) 可检测到 STAT1 和 STAT3 活化、IFN- γ 的分泌均受到抑制, 进而 PD-L1 表达降低, T 细胞免疫活性提高, 抗 PD-1 疗效提高^[44]; 在近期一项关于胶质母细胞瘤小鼠模型的实验中发现: 使用 STAT3 抑制剂 (ACT001) 会抑制 PD-L1 表达并改善胶质瘤荷瘤小鼠的抗肿瘤能力^[45]。

3.4 Wnt

Wnt 主要分为 β -连环蛋白依赖性 (Wnt/ β -catenin) 和非依赖性两类^[46], 其中, Wnt/ β -catenin 异常激活与卵巢癌^[47, 48]、肝癌^[49]、肺癌^[50]等多种癌症发生发展密切相关。许多研究已证实, Wnt 信号通路的失调可促使人类恶性肿瘤的进展和对常规治疗耐药性^[51, 52]。在 2019 年发表的一项关于肝癌的研究中指出: PD-L1 表达由 Wnt 靶基因 MYC 控制, 当 Wnt/ β -catenin 发生突变时会引起 MYC 的异常表达, PD-L1 的表达也会随之增高; 同时, 他们在肝癌小鼠模型中发现 β -catenin 的激活会使小鼠对抗 PD-1 等免疫疗法产生抗药性^[49]。在最近关于卵巢癌的研究中, 在已知 Wnt 激活影响机体抗肿瘤能力和产生免疫疗法抗药性的基础上, 实验者使用 Wnt 抑制剂后, 发现 CD8⁺T 细胞上 PD-1、CTLA-4 表达比率降低, CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞效应子活性增强^[48]。基于 Wnt 与 PD-L1 表达之间的相互作用以及实验中使用 Wnt 抑制剂可以促进免疫细胞活性和降低 PD-L1 表达的数据, 我们推断可以以此达到治疗癌症的目的^[53]。

4、结语与展望

在过去的十几年中, PD-1/PD-L1 免疫疗法展现出惊人的成果。通过对免疫检查点 PD-1/PD-L1 进行检测、预估癌症预后和相应抗体进行靶向治疗, 使得我们对于肿瘤的治疗迈入了一个新的阶段。在近几年的研究和临床应用中, 我们已经不仅仅局限于单一抗 PD-1/PD-L1 药物的使用, 而是通过联合用药来获得更好的疗效。尽管 PD-L1/PD-L1 抑制剂在越来越多的癌症治疗中获得良好疗效, 但依然存在很大的局限性, PD-1/PD-L1 免疫疗法仍然是一个具有很大探索空间的领域。如何更加成熟地使这项技术进入平稳阶段且使更多的患者能够从中受益是我们接下来所要研究的主要方向。

【参考文献】

- [1] Saab S, Zalzale H, Rahal Z, et al. Insights Into Lung Cancer Immune-Based Biology, Prevention, and Treatment [J]. *Front Immunol.* 2020;11:159.
- [2] Law AMK, Valdes-Mora F, Gallego-Ortega D. Myeloid-Derived Suppressor Cells as a Therapeutic Target for Cancer [J]. *Cells.* 2020;9(3):561.
- [3] Sambhi M, Bagheri L, Szewczuk MR. Current Challenges in Cancer Immunotherapy: Multimodal Approaches to Improve Efficacy and Patient Response Rates [J]. *J Oncol.* 2019;2019:4508794.
- [4] Wang M, Wang J, Wang R, et al. Identification of a monoclonal antibody that targets PD-1 in a manner requiring PD-1 Asn58 glycosylation [J]. *Commun Biol.* 2019;2:392.
- [5] Chen D, Tan S, Zhang H, et al. The FG Loop of PD-1 Serves as a "Hotspot" for Therapeutic Monoclonal Antibodies in Tumor Immune Checkpoint Therapy [J]. *iScience,* 2019,14:113-124.
- [6] Ikegawa S, Meguri Y, Kondo T, et al. PTCy ameliorates GVHD by restoring regulatory and effector T-cell homeostasis in recipients with PD-1 blockade [J]. *Blood Adv.* 2019;3(23):4081-4094.
- [7] Hsu J, Hodgins JJ, Marathe M, et al. Contribution of NK cells to immunotherapy mediated by PD-1/PD-L1 blockade [J]. *J Clin Invest.* 2018;128(10):4654-4668.
- [8] Niu C, Li M, Zhu S, et al. PD-1-positive Natural Killer Cells have a weaker antitumor function than that of PD-1-negative Natural Killer Cells in Lung Cancer [J]. *Int J Med Sci.* 2020;17(13):1964-1973.
- [9] Pesce S, Greppi M, Tabellini G, et al. Identification of a subset of human natural killer cells expressing high levels of programmed death 1: A phenotypic and functional characterization [J]. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139(1):335-346.
- [10] Giuliani M, Poggi A. Checkpoint Inhibitors and Engineered Cells: New Weapons for Natural Killer Cell Arsenal Against Hematological Malignancies [J]. *Cells.* 2020;9(7):1578.
- [11] Gordon SR, Maute RL, Dulken BW, et al. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity [J]. *Nature.* 2017;545(7655):495-499.
- [12] Fang P, Li X, Dai J, et al. Immune cell subset differentiation and tissue inflammation [J]. *J Hematol Oncol.* 2018;11(1):97.
- [13] Dhupkar P, Gordon N, Stewart J, et al. Anti-PD-1 therapy redirects macrophages from an M2 to an M1 phenotype inducing regression of OS lung metastases [J]. *Cancer*

Med. 2018;7(6):2654-2664.

[14] Kono Y, Saito H, Miyauchi W, et al. Increased PD-1-positive macrophages in the tissue of gastric cancer are closely associated with poor prognosis in gastric cancer patients [J] . *BMC Cancer.* 2020;20(1):175.

[15] Saka D, Gökalp M, Piyade B, et.al. Mechanisms of T-Cell Exhaustion in Pancreatic Cancer [J] . *Cancers.* 2020; 12(8):2274.

[16] Chu C, Yao K, Lu J, et al. Immunophenotypes Based on the Tumor Immune Microenvironment Allow for Unsupervised Penile Cancer Patient Stratification [J] . *Cancers (Basel).* 2020;12(7):1796.

[17] Saulite I, Ignatova D, Chang YT, et al. Blockade of programmed cell death protein 1 (PD-1) in Sézary syndrome reduces Th2 phenotype of non-tumoral T lymphocytes but may enhance tumor proliferation [J] . *Oncoimmunology.*2020;9(1):1738797. DOI:10.1080/2162402X.2020.1738797

[18] Kumar A, Chamoto K, Chowdhury PS, Honjo T. Tumors attenuating the mitochondrial activity in T cells escape from PD-1 blockade therapy [J] . *Elife.* 2020;9:e52330.

[19] Foord E, Klynning C, Schoutrop E, et al. Profound Functional Suppression of Tumor-Infiltrating T-Cells in Ovarian Cancer Patients Can Be Reversed Using PD-1-Blocking Antibodies or DARPin® Proteins [J] . *J Immunol Res.* 2020;2020:7375947.

[20] Kumar A, Chamoto K, Chowdhury PS, Honjo T. Tumors attenuating the mitochondrial activity in T cells escape from PD-1 blockade therapy [J] . *Elife.* 2020;9:e52330.

[21] Kaumaya PT. B-cell epitope peptide cancer vaccines: a new paradigm for combination immunotherapies with novel checkpoint peptide vaccine [J] . *Future Oncol.* 2020;16(23):1767-1791.

[22] Patel AJ, Richter A, Drayson MT, Middleton GW. The role of B lymphocytes in the immuno-biology of non-small-cell lung cancer [J] . *Cancer Immunol Immunother.* 2020;69(3):325-342.

[23] Das R, Bar N, Ferreira M, et al. Early B cell changes predict autoimmunity following combination immune checkpoint blockade [J] . *J Clin Invest.* 2018;128(2):715-720.

[24] Jiang N, Dai Q, Su X, Fu J, Feng X, Peng J. Role of PI3K/AKT pathway in cancer: the framework of malignant behavior [J] . *Mol Biol Rep.* 2020;47(6):4587-4629.

[25] Jie, Chen, Da,et.al. Advances of the Correlation between Driver Gene Status and Immunotherapy in Non-small Cell Lung Cancer [J] . *Chinese Journal of Lung Cancer,*

2019.

[26] Hellmann MD, Rizvi NA, Goldman JW, et al. Nivolumab plus ipilimumab as first-line treatment for advanced non-small-cell lung cancer (CheckMate 012): results of an open-label, phase 1, multicohort study [J] . *Lancet Oncol.* 2017;18(1):31-41.

[27] Garassino MC, Cho BC, Kim JH, et al. Durvalumab as third-line or later treatment for advanced non-small-cell lung cancer (ATLANTIC): an open-label, single-arm, phase 2 study [J] . *Lancet Oncol.* 2018;19(4):521-536.

[28] Ota K, Azuma K, Kawahara A, et al. Induction of PD-L1 Expression by the EML4-ALK Oncoprotein and Downstream Signaling Pathways in Non-Small Cell Lung Cancer [J] . *Clin Cancer Res.* 2015;21(17):4014-4021.

[29] Peng W, Chen JQ, Liu C, et al. Loss of PTEN Promotes Resistance to T Cell-Mediated Immunotherapy [J] . *Cancer Discov.* 2016;6(2):202-216.

[30] Li J, Van Valkenburgh J, Hong X, et al. Small molecules as theranostic agents in cancer immunology [J]. *Theranotics* 2019;9(25):7849-7871.

[31] Stutvoet TS, Kol A, de Vries EG, et al. MAPK pathway activity plays a key role in PD-L1 expression of lung adenocarcinoma cells [J] . *J Pathol*, 2019,249:52-64.

[32] Liu L, Mayes PA, Eastman S, et al. The BRAF and MEK Inhibitors Dabrafenib and Trametinib: Effects on Immune Function and in Combination with Immunomodulatory Antibodies Targeting PD-1, PD-L1, and CTLA-4 [J] . *Clin Cancer Res.* 2015;21(7):1639-1651.

[33] Zong W, Ju S, Jing R, Cui M. Long non-coding RNA-mediated regulation of signaling pathways in gastric cancer [J] . *Clin Chem Lab Med.* 2018;56(11):1828-1837.

[34] Qingyang Lei, Dan Wang, Kai Sun, et al. Resistance Mechanisms of Anti-PD-1/PD-L1 Therapy in Solid Tumors [J] . *Front Cell Dev Biol*, 2020;8:672,

[35] Wang M, Liu Y, Cheng Y, Wei Y, Wei X. Immune checkpoint blockade and its combination therapy with small-molecule inhibitors for cancer treatment [J] . *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2019;1871(2):199-224.

[36] Bose S, Banerjee S, Mondal A, et al. Targeting the JAK/STAT Signaling Pathway Using Phytochemicals for Cancer Prevention and Therapy [J] . *Cells.* 2020;9(6):1451.

[37] Xiao Q, Nobre A, Piñeiro P, et al. Genetic and Epigenetic Biomarkers of Immune Checkpoint Blockade Response [J] . *J Clin Med.* 2020;9(1):286.

[38] Ju X, Zhang H, Zhou Z, Wang Q. Regulation of PD-L1 expression in cancer and clinical implications in immunotherapy [J] . *Am J Cancer Res.* 2020;10(1):1-11.

[39] Owen KL, Brockwell NK, Parker BS. JAK-STAT Signaling: A Double-Edged Sword

- of Immune Regulation and Cancer Progression [J] . *Cancers (Basel)*. 2019;11(12):2002.
- [40] Mimura K, Teh JL, Okayama H, et al. PD-L1 expression is mainly regulated by interferon gamma associated with JAK-STAT pathway in gastric cancer [J] . *Cancer Sci*. 2018;109(1):43-53.
- [41] Imai D, Yoshizumi T, Okano S, et al. IFN- γ Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and the Expression of PD-L1 in Pancreatic Cancer [J] . *J Surg Res*. 2019;240:115-123
- [42] Sunhei Teranishi,Nobuaki Kobayashi,Seigo Katakura,et,al.Class A CpG oligodeoxynucleotide inhibits IFN- γ -induced signaling and apoptosis in lung cancer [J] , *Thorac Cancer*. 2020,11(4): 983–992.
- [43] Zhao T, Li Y, Zhang J, Zhang B. PD-L1 expression increased by IFN- γ via JAK2-STAT1 signaling and predicts a poor survival in colorectal cancer [J] . *Oncol Lett*. 2020;20(2):1127-1134.
- [44] Lu C, Talukder A, Savage NM, Singh N, Liu K. JAK-STAT-mediated chronic inflammation impairs cytotoxic T lymphocyte activation to decrease anti-PD-1 immunotherapy efficacy in pancreatic cancer [J] . *Oncoimmunology*. 2017;6(3):e1291106.
- [45] Tong L, Li J, Li Q, et al. ACT001 reduces the expression of PD-L1 by inhibiting the phosphorylation of STAT3 in glioblastoma [J] . *Theranostics*. 2020;10(13):5943-5956.
- [46] Gajos-Michniewicz A, Czyz M. WNT Signaling in Melanoma [J] . *Int J Mol Sci*. 2020;21(14):4852.
- [47] Nguyen VHL, Hough R, Bernaudo S, Peng C. Wnt/ β -catenin signalling in ovarian cancer: Insights into its hyperactivation and function in tumorigenesis [J] . *J Ovarian Res*. 2019;12(1):122.
- [48] Doo DW, Meza-Perez S, Londoño AI, et al. Inhibition of the Wnt/ β -catenin pathway enhances antitumor immunity in ovarian cancer [J] . *Ther Adv Med Oncol*. 2020;12:1758835920913798.
- [49] Ruiz de Galarreta M, Bresnahan E, Molina-Sánchez P, et al. β -Catenin Activation Promotes Immune Escape and Resistance to Anti-PD-1 Therapy in Hepatocellular Carcinoma [J] . *Cancer Discov*. 2019;9(8):1124-1141.
- [50] Shan Lin,Yu Zhen,Yinghui Guan,et al.Roles of Wnt/ β -Catenin Singaling Pathway Regulatory Long Non-Coding RNAs in the Pathogenesis of Non-Small Cell Lung Cancer [J] ,*Cancer Manag*, 2020; 12: 4181–4191.
- [51] Hua F, Shang S, Yang YW, et al. TRIB3 interacts With β -catenin and TCF4 to increase stem cell features of colorectal cancer stem cells and tumorigenesis

- [J] . *Gastroenterology*, 2019,156(3):708–721.
- [52] Galluzzi L, Spranger S, Fuchs E, López-Soto A. WNT Signaling in Cancer Immunosurveillance [J] . *Trends Cell Biol.* 2019;29(1):44-65.
- [53] Patel S, Alam A, Pant R, Chattopadhyay S. Wnt Signaling and Its Significance Within the Tumor Microenvironment: Novel Therapeutic Insights [J] . *Front Immunol.* 2019;10:2872.

基于 PD-1/PD-L1 表达影响探讨四君子汤对 NK 细胞及结肠癌作用的研究

朱月伊 宋运来 石晓兰 (上海中医药大学附属普陀医院 200062)

中国图书分类号: [R735.3] 文献标识码: A 文章编号: 1000-484X(2021)03-0295-07

[摘要]目的: 通过四君子汤探讨 PD-1/PD-L1 的表达对 NK 细胞活性、结肠癌细胞 HCT116 增殖等影响及作用机制。**方法:** 1) 通过人外周血淋巴分离液分离出 NK 细胞, 构建 NK 细胞:HCT116 细胞=5:1 的共培养模型, 将 200ng/ml IFN- γ 处理的 NK 细胞为 IFN- γ 组, 200ng/ml 的 IL-2 处理的 NK 细胞设为 IL-2 组 (阳性对照组), 5mg/ml 的四君子汤处理的 NK 细胞设为 SJZ 组, 100 μ M 奥沙利铂处理的 NK 细胞设为 OXA 组 (阳性对照组), 正常处理的 NK 细胞设为 Con 组, 分别单独培养 NK 细胞, 与 HCT116 细胞共培养 24h 及 48h, MTT 法检测 NK 细胞及 HCT116 细胞的增殖情况; 加入 STAT3 信号抑制剂后, 即 R-STAT3 组、R-SJZ 组、R-OXA 组。ELISA 检测 NK 细胞及共培养模型中 IFN- γ 的分泌情况; qRT-PCR 检测共培养模型中 NK 细胞 mRNA IFN- γ 、STAT3、PD-1 的表达以及 HCT116 细胞 STAT3、PD-L1 mRNA 的表达; 2) 建立小鼠结肠癌皮下瘤模型, 将小鼠随机分为 4 组, 空白组 (CON)、生理盐水组 (NACL)、四君子汤组 (SJZ)、奥沙利铂组 (OXA), 分别给药 2 周后, 利用活体成像技术检测小鼠皮下瘤的荧光强度; ELISA 检测小鼠血液中 IFN- γ 的分泌量; qRT-PCR、蛋白质印迹实 Western blot 与免疫组化实验分别检测小鼠皮下瘤中 PD-L1 mRNA、蛋白及抗体的表达情况。**结果:** 1) IFN- γ 在一定浓度下可以抑制 NK 细胞的生长 ($P < 0.01$), 四君子汤对共培养模型中 HCT116 具有显著的抑制作用 ($P < 0.01$); 四君子汤单独使用或者与 STAT3 抑制剂联合使用可有效降低 IFN- γ 的分泌 ($P < 0.01$); 四君子汤单独使用或与 STAT3 抑制剂联合使用可降低共培养模型 NK 细胞中 IFN- γ 、PD-1、STAT3 及 HCT116 细胞中 PD-L1、STAT3 mRNA 的表达; 2) 在小鼠动物实验中, 四君子汤组的肿瘤荧光强度要弱于生理盐水组和空白组 ($P < 0.05$); 皮下瘤中 PD-L1 蛋白及抗体低表达 ($P < 0.05$), PD-L1 的 mRNA 表达与细胞实验结果一致 ($P < 0.01$), 且小鼠血液中的 IFN- γ 在四君子汤组分泌量最低 ($P < 0.05$)。**结论:** 四君子汤可以影响 NK 细胞活性及结肠癌增殖, 其功能与 STAT3 抑制剂相近, 可

基金项目: 上海市普陀区卫生系统自主创新科研资助项目 (ptkwws201804)

作者简介: 朱月伊 (1994-2), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中医药防治肿瘤的临床和基础研究, 邮箱:

通讯作者及指导老师: 石晓兰, 女, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 中医药防治肿瘤的临床和基础研究, 邮箱:

能通过调控 STAT3 信号干预 IFN- γ 分泌,降低 PD-1/PD-L1 表达从而改善 NK 细胞及抑制结肠癌细胞生长。

[关键词] NK 细胞; PD-1/PD-L1; 四君子汤; 结肠癌; STAT3; IFN- γ

Effect of Sijunzi Decoction on NK cells and colon cancer based on expression of PD-1 / PD-L1

Zhu Yueyi, Song Yunlai, Shi Xiaolan (Putuo hospital, Shanghai University of traditional Chinese medicine, 200062)

[Abstract] Objective: To explore the effect and mechanism of PD-1 / PD-L1 expression on NK cell activity and proliferation of colon cancer cell HCT116 by Sijunzi Decoction. **Methods:** 1) NK cells were isolated from human peripheral blood lymphocytes and co cultured with HCT116 cells (5:1). The NK cells treated with 200 ng / ml IFN - γ were treated with IFN - γ , 200 ng / ml IL-2 (positive control group), 5 mg / ml Sijunzi Decoction (SJZ group), 100 μ m oxaliplatin treated oxa group (positive control group) NK cells were separately cultured in con group and co cultured with HCT116 cells for 24h and 48h. The proliferation of NK cells and HCT116 cells was detected by MTT assay. After adding STAT3 signal inhibitor, namely r-stat3 group, r-sjz group and r-oxa group, the secretion of IFN - γ in NK cells and co culture model was detected by ELISA, and the expression of IFN - γ in NK cells and co culture model was detected by enzyme-linked immunosorbent assay The mRNA expressions of IFN - γ , STAT3 and PD-1 in NK cells and the mRNA expressions of STAT3 and PD-L1 in HCT116 cells were detected by RT-PCR. 2) The mice were randomly divided into four groups: blank group (CON), saline group (NaCl), Sijunzi Decoction group (SJZ) and oxaliplatin group (oxa), Two weeks later, the fluorescence intensity of subcutaneous tumor was detected by in vivo imaging technology; IFN - γ secretion in blood was detected by ELISA; the expression of PD-L1 mRNA, protein and antibody in subcutaneous tumor was detected by fluorescence quantitative PCR, Western blot and immunohistochemistry. **Results:** IFN - γ could inhibit the growth of NK cells ($P < 0.01$), Sijunzi decoction had significant inhibitory effect on HCT116 in co culture model ($P < 0.01$); Sijunzi Decoction alone or combined with STAT3 inhibitor could effectively reduce the secretion of IFN - γ ($P < 0.01$); Sijunzi decoction alone or combined with STAT3 inhibitor could effectively reduce the secretion of IFN - γ ($P < 0.01$) The expression of IFN - γ , PD-1, STAT3 in NK cells and HCT116 cells in co culture model were decreased The expression of PD-L1 and STAT3; in mouse animal experiment, we also found similar results, Sijunzi Decoction group tumor fluorescence

intensity is weaker than normal saline group and blank group ($P < 0.05$); the expression of PD-L1 protein and antibody in subcutaneous tumor is low ($P < 0.05$), PDL1 mRNA is consistent with cell experiment result ($P < 0.01$), and IFN - γ in blood of mice is secreted in Sijunzi Decoction group The lowest ($P < 0.05$). **Conclusion:** Sijunzi Decoction can affect the activity of NK cells and the proliferation of colon cancer, and its function is similar to that of STAT3 inhibitor. It may regulate the secretion of IFN - γ and reduce the expression of PD-1 / PD-L1, so as to improve NK cells and inhibit the growth of colon cancer cells.

[Key words] NK cell ;PD-1 / PD-L1;Sijunzi Decoction;colon cancer ;STAT3;IFN - γ

结肠癌是世界常见的恶性肿瘤之一，2018 年就已经有接近 180 万的新患病例^[1]。最近还有研究表明，结肠癌的患病概率与吸烟相关^[2]。尽管近年的存活率逐渐上升，但其难发现、易复发的特性使患者的治疗前景不容乐观^[3]。

结肠癌由于发现不够及时，其治疗往往需要通过手术和放化疗联合使用，确诊后，大部分患者会选择手术治疗，手术治疗成为了结肠癌治疗的主要手段^[4]，然而，手术等疗法存在复发及转移的可能，导致结肠癌的治疗更加棘手。

近年来，免疫疗法发展迅速，NK 细胞得到了前所未有的重视。其不通过繁琐的信号通路调控就可以直接快速地清除感染或被肿瘤侵占的细胞。而 NK 细胞自身拥有的多个膜表达活化受体及不同表型子集，也是发挥它强大免疫反应的关键^[5,6]。正因为这种特殊性，一旦 NK 细胞表面受体被信号介导抑制，就会失去对病毒防御和对肿瘤监视的能力^[7]。程序性死亡受体 1 (PD-1) 是一种免疫学检查位点，常见于 T 淋巴细胞，该位点可与其对应的配体结合，激活相关信号通路，抑制 T 淋巴细胞的免疫反应，从而发生免疫逃逸。但与 T 淋巴细胞相关的 NK 细胞在 PD-1 方向还在探索中。大量研究数据显示，NK 细胞对 PD-1/PD-L1 通路产生影响^[8]。NK 细胞表面存在 PD-1，PD-1 受体不仅抑制 T 细胞，还抑制 NK 细胞，且肿瘤活性的提升与 PD-1 表达上调密切相关，尤其在结肠癌、多发性骨髓瘤、卵巢癌中^[9-11]。因此，抑制 PD-1 表达可能为 NK 细胞加强免疫反应提供帮助。STAT3 是一种由 770 个氨基酸组成的蛋白质，其通过 STAT 结构区域与特定的磷酸酪氨酸序列结合在信号传导中起关键作用^[12]。而作为转录因子，STAT3 可直接结合启动子增加 PD-1、PD-L1 表达，也可以通过多种信号通路间接诱导这些因子的免疫检查点分子的表达^[13-17]。尽管 IFN- γ 在临床多用于治疗恶性肿瘤，但最新研究显示其还可能促进肿瘤发展，并借由 JAK/STAT3 通路产生影响^[18]。

四君子汤出自《太平惠民和剂局方》，是中医补益正气的经典代表方，由人参、白术、茯苓、炙甘草四药相伍而成，方中人参大补元气为君药，白术燥湿补气为臣，

茯苓渗湿泄热为佐药，甘草和中益土为使药，四药相合共行补脾益气之功效，临床上常用于治疗慢性胃炎、消化性溃疡、结肠癌等脾胃气虚病症。

1 材料与方法

1.1 材料

人结肠癌细胞株 HCT116 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库；RPMI-Medium 培养基购自美国 HyClone 公司；胰酶与血清购自美国 Gibco 公司，MTT、SDS 购自中国 Sangon 公司；人外周血淋巴分离液 TBD 购自中国灏洋生物公司；人 NK 细胞富集试剂盒购自加拿大 Stemcell Technology 公司；RNA 试剂盒及逆转录试剂盒购自日本 TaKaRa 公司；IFN- γ ELISA 试剂盒购自中国 LIANKE 公司；PCR 引物购自苏州泓迅生物科技股份有限公司；Napabucasin STAT3 抑制剂来自美国 MCE 公司；血液标本购置自上海市长海医院血站，标本来自健康人，所有的指标都在范围内；四君子汤中药制备于上海中医药大学中药学院，药材购自上海市雷允上药业有限公司。常用离心机购自德国 Eppendorf 公司；梯度离心机、超低温冰箱及酶标仪等购自美国 Thermo 公司；实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Life technologies 公司；显微镜购自德国 Leica 公司；小型垂直电泳槽以及小型 Trans-Blot 转印槽购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 NK 细胞的分离

将得到的标本以 1: 1 比例稀释于含有 3% 的双抗的 PBS (1X) 溶液，待充分稀释后，与人外周血淋巴分离液以 2: 1 的比例置于 15ml 小离心管，共 12ml，先放入 4ml 分离液后缓慢加入 8ml 稀释标本，配平至离心机，25 $^{\circ}$ C、400XG、20min 离心。离心后分为 4 层，用吸管缓慢少量多次吸取第 2 层液面（即淋巴细胞层），尽量吸尽，并再次加入含 3% 双抗的 PBS (1X) 溶液，25 $^{\circ}$ C、200XG 下离心 10min，弃上清，加入含 20% 血清、1% 双抗的 1640 培养液，电子计数至 3×10^6 个/ml，并将其以 10ml/皿均匀铺开，24h 后吸取上清液重复上述第二步离心，所得沉淀即为低浓度 NK 细胞。利用 NK 细胞富集试剂盒进行磁珠分选，排除非目的细胞，最后流式细胞术检测 CD56 $^{+}$ 以评估 NK 细胞纯度，纯度 > 90% 即为实验所需。

1.2.2 细胞的处理与分组

单一 NK 细胞铺板每孔 3×10^6 个/ml。在共培养模型中，NK 细胞与 HCT116 比例为 5: 1 铺板，并尽量保持孔内体积较小，HCT116 细胞以 1×10^4 个/10 μ l 加至 5×10^4 个/100 μ l 的 NK 细胞中。设 200ng/ml IFN- γ 处理的 NK 细胞为 IFN- γ 组，200ng/ml 的 IL-2 处理的 NK 细胞为 IL-2 组（阳性对照组），5mg/ml 的四君子汤处理的 NK 细胞为 SJZ 组，100 μ M 奥沙利铂处理的 NK 细胞为 OXA 组（阳性对照组），正常处理的 NK 细胞为 Con 组，分别单独培养 NK 细胞，与 HCT116 细胞共

培养 24h 及 48h。同时以相同方式再加入 STAT3 信号抑制剂后, 即 R-STAT3 组、R-SJZ 组、R-OXA 组, 进行共培养 24h 及 48h 后进行后续实验。

1.2.3 建立小鼠结肠癌皮下瘤模型

用生理盐水将 CT-26 细胞调整为 5×10^6 个/ml, 以 0.2ml/只皮下注射至小鼠右侧腋下, 接种 2d 后检查小鼠皮下瘤生长情况, 待瘤体达到 100mm^3 后, 通过完全随机法将小鼠分为 4 组, 每组 6 只, 分别为空白组 (CON)、生理盐水组 (NACL)、四君子汤组 (SJZ) 和奥沙利铂组 (OXA), 空白组不作任何处理, NACL 组、SJZ 组以 0.2ml/只灌胃给药, 奥沙利铂组每隔 1d 进行 1 次腹腔注射给药, 0.1ml/(20g·只), 并持续 2 周。

1.2.4 MTT 法检测细胞毒性

细胞处理到 24h 及 48h 后, 单一 NK 细胞每孔加入 $10\mu\text{l}$ 5mg/ml 的 MTT, 3.5h 后, 每孔加入 $100\mu\text{l}$ 10%SDS 溶液, 24h 后, 上样酶标仪检测, 在波长 570nm 处 OD 值并进行统计计算。共培养模型中的 HCT116 细胞需要先用移液器轻吹, 少量多次缓慢吸取上清液, 加入新的 20%血清、1%双抗的培养液 $100\mu\text{l}$ 后, 再进行上述常规的加入 MTT 操作。

1.2.5 qRT-PCR 检验 mRNA 表达

细胞共培养 24h 及 48h 后, 轻吹各孔得到上清液, 由于 HCT116 肿瘤细胞与 NK 细胞体积密度不同, 以差速离心法得到 NK 细胞沉淀。以相同方法得到肿瘤细胞沉淀, 加入适量 TRNzol 溶液溶解, 通过异丙醇, 氯仿, 无水乙醇获得 RNA, 并逆转录成 cDNA, qRT-PCR 反应条件为: 95°C , 30sec, 95°C , 5sec, 60°C , 34sec, 40 个循环, 最后得到数值后利用 $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ 法进行数值统计。小鼠皮下瘤的 RNA 提取需要先将肿块剪碎后放入磁珠, 再加入适量 TRNzol 溶液并放到动物 RNA 提取仪器中 60HZ、1min、2 次震荡, 再进行后续操作。

1.2.6 ELISA 检测 IFN- γ 水平

细胞共培养 24h 及 48h 后, 获得各组上清液, 根据 IFN- γ 试剂盒说明书建立标准曲线方程, 最后得到的 OD 值代入方程中进行换算得到 IFN- γ 分泌量。小鼠眼球血液的上清液需以 3000r/min, 4°C 离心 5min。

1.2.7 活体成像技术

小鼠给药 2 周后, 以每只小鼠 $200\mu\text{l}/20\text{g}$ 、15mg/ml 的荧光素钾盐进行腹腔注射, 根据体重利用戊巴比妥钠麻醉 [$50\mu\text{l}/(20\text{g}\cdot\text{只})$], 待小鼠失去行动能力后, 置于活体成像仪进行检测。

1.2.8 Western blot 检测蛋白表达

摘取小鼠皮下瘤后, 各组剪取相同统计大小的的肿块进行 RIPA 裂解, 并放入组织匀浆器中充分研磨, 以 4°C , 12000r, 离心 5min, 得到上清液。根据蛋白浓度

试剂盒取得标准方程，按照步骤操作后在酶标仪波长 570nm 处取得 OD 值，换算得到蛋白浓度。根据 PD-L1 蛋白大小进行配胶，10%的分离胶，5%的浓缩胶，蛋白在定量后根据体积加入 5X 上样缓冲液，95°C 金属浴 10min，随后以 4°C，3000r 离心 1min。上样完毕后，用恒压电 70V，30min，根据标准线指示，转为恒压电 90V，视情况而定等待 1-2h，随后转膜并封闭，洗膜后加入 PD-L1 的稀释一抗并 4°C 过夜。回收一抗洗膜 3 次后，加入二抗，室温孵育 2h，再次洗膜 3 次，最后加化学发光试剂显影，得到数据后通过 Image J 软件换算出灰度数值并进行统计分析。

1.2.9 免疫组化实验

将取得的皮下瘤进行石蜡切片，用二甲苯与无水乙醇常规脱蜡，灭活后进行封闭并加入抗体孵育，二抗孵育完成后用 PBS(1X)冲洗 4 次，根据显色试剂盒说明，加入显色试剂，最后用无水乙醇冲洗并封片在显微镜下观察。利用软件 Image-Pro Plus 6.0 进行灰度值测定，并进行统计分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS26.0 软件进行数据统计，计量资料均通过 \pm 标准差 \pm S 表示，符合正态性分布与方差齐性时，两组之间采用 t 检验，多组之间用单因素方差分析，不满足时，采用秩和检验，当 $P < 0.05$ 时表示有统计学意义。

2 结果

2.1 IFN- γ 可抑制 NK 细胞生长

IFN- γ 在 200ng/ml 浓度下，可以抑制 NK 细胞的生长 ($P < 0.05$)，四君子汤在 NK 细胞存在的情况下，可以增强对 HCT116 细胞的杀伤作用 ($P < 0.01$)，奥沙利铂在抑制 NK 细胞生长的同时，也抑制了 HCT116 细胞的增殖 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 四君子汤可降低 NK 细胞分泌 IFN- γ 的水平

四君子汤可降低单一 NK 细胞 IFN- γ 的分泌 ($P < 0.05$)，并在与 STAT3 抑制剂联合使用后抑制作用更加明显 ($P < 0.05$)。在共培养模型中，四君子汤联合 STAT3 抑制剂依旧可以降低 IFN- γ 的分泌 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 四君子汤可降低 NK 细胞 mRNA 表达

四君子汤可降低共培养模型中 NK 细胞 IFN- γ ($P < 0.05$)、PD-1 ($P < 0.05$)、STAT3 ($P < 0.01$) mRNA 的表达，并在与 STAT3 抑制剂联合后，更为显著降低 IFN- γ ($P < 0.05$)、PD-1 ($P < 0.05$)、STAT3 24h ($P < 0.05$)。相同的是，四君子汤与 STAT3 抑制剂联合也可降低共培养模型中 HCT116 细胞 PD-L1、STAT3 mRNA 的表达 ($P < 0.05$)。见表 3，表 4。

表 1 IFN- γ 和四君子汤对 NK 细胞活性及共培养模型中 HCT116 的增殖影响
 Tab.1 Effects of IFN - γ and Sijunzi Decoction on NK cell activity and proliferation of HCT116 in co culture model

Groups	NK cell OD ₅₇₀		Culture model HCT116 cell OD ₅₇₀	
	24H	48H	24H	48H
Con	0.283±0.008	0.246±0.003	3.049±0.044	3.367±0.179
IFN- γ	0.186±0.014 ¹⁾	0.183±0.011 ¹⁾	2.505±0.141 ¹⁾	2.429±0.134 ²⁾
IL-2	0.302±0.012	0.245±0.003	2.515±0.195	2.485±0.132
SJZ	0.255±0.012 ²⁾	0.232±0.002 ²⁾	1.356±0.109 ²⁾	1.819±0.079 ²⁾
OXA	0.124±0.013 ¹⁾	0.093±0.014 ²⁾	0.552±0.089 ²⁾	0.574±0.126 ²⁾
F	112.2	173.1	194.1	178.8
P	0.000	0.000	0.000	0.000

NOTE:Compared with Con groups,1)P < 0.05,2)P < 0.01.IFN- γ and IL-2 were 200ng/ml,SJZ were 5mg/ml,OXA were 100 μ M

表 2 四君子汤和 STAT3 抑制剂对 NK 细胞及共培养模型中 IFN- γ 分泌的影响
 Tab.2 Effects of Sijunzi Decoction and STAT3 inhibitor on IFN - γ secretion in NK cells and co culture model

Groups	NK cell IFN- γ		Culture model IFN- γ	
	24H	48H	24H	48H
Con	1569.10±162.40	2139.11±274.60	1948.01±175.80	1848.09±186.80
SJZ	526.90±36.17 ¹⁾	498.32±59.97 ¹⁾	543.10±59.86 ²⁾	728.50±38.41 ¹⁾
OXA	638.81±42.37	679.50±58.19	727.80±102.31	766.10±136.90
R-STAT3	151.52±8.86 ¹⁾	189.30±20.57 ¹⁾	446.91±65.79 ²⁾	539.11±54.51 ¹⁾
R-SJZ	126.10±8.36 ⁴⁾	112.12±21.58 ⁴⁾	158.20±12.44 ³⁾	205.8±69.44 ⁴⁾
R-OXA	380.81±28.21	356.71±27.79	316.03±38.01	249.21±25.19
F	167.3	121.1	147.7	101.6
P	0.000	0.000	0.000	0.000

NOTE:Compared with Con groups,1) P < 0.05,2)P < 0.01;compared with ConR-STAT3 groups,3)P < 0.05,4)P < 0.01.IFN- γ and IL-2 were 200ng/ml,SJZ were 5mg/ml,OXA were 100 μ M.

表 3 四君子汤和 STAT3 抑制剂对共培养模型中 NK 细胞 mRNA 的影响
Tab.3 Effects of Sijunzi Decoction and STAT3 inhibitor on NK cell mRNA in co culture model

Groups	NK cell mRNA					
	IFN- γ		PD-1		STAT-3	
	24H	48H	24H	48H	24H	48H
Con	0.99 \pm 0.01	0.99 \pm 0.01	0.98 \pm 0.01	0.98 \pm 0.01	0.99 \pm 0.01	0.98 \pm 0.01
SJZ	0.72 \pm 0.09 ¹⁾	0.77 \pm 0.05 ¹⁾	0.73 \pm 0.04 ¹⁾	0.69 \pm 0.07 ¹⁾	0.81 \pm 0.02 ²⁾	0.83 \pm 0.02 ²⁾
OXA	1.21 \pm 0.07	1.45 \pm 0.20	2.59 \pm 0.17	2.19 \pm 0.15	2.53 \pm 0.27	2.62 \pm 0.23
R-STAT3	0.62 \pm 0.03 ²⁾	0.64 \pm 0.04 ²⁾	0.58 \pm 0.08 ¹⁾	0.61 \pm 0.04 ²⁾	0.60 \pm 0.01 ²⁾	0.63 \pm 0.04 ²⁾
R-SJZ	0.53 \pm 0.02 ³⁾	0.53 \pm 0.02	0.43 \pm 0.03	0.36 \pm 0.05 ⁴⁾	0.52 \pm 0.02 ³⁾	0.53 \pm 0.02 ³⁾
R-OXA	1.02 \pm 0.06	1.08 \pm 0.20	1.62 \pm 0.16	1.55 \pm 0.09	1.31 \pm 0.17	1.38 \pm 0.16
F	74.02	24.44	197.6	220.5	97.2	133.1
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

NOTE:Compared with Con groups,1) P < 0.05,2)P < 0.01;compared with ConR-STAT3 groups,3)P < 0.05,4)P < 0.01.IFN- γ and IL-2 were 200ng/ml,SJZ were 5mg/ml,OXA were 100 μ M.

表 4 四君子汤和 STAT3 抑制剂对共培养模型中 HCT116 细胞 mRNA 的影响
Tab.4 Effects of Sijunzi Decoction and STAT3 inhibitor on mRNA expression of HCT116 cells in co culture model

Groups	HCT116 cell mRNA			
	PD-L1		STAT-3	
	24h	48h	24h	48h
Con	0.99 \pm 0.01	0.99 \pm 0.01	0.98 \pm 0.01	0.99 \pm 0.01
SJZ	0.63 \pm 0.02 ²⁾	0.66 \pm 0.06 ¹⁾	0.74 \pm 0.04 ¹⁾	0.78 \pm 0.03 ¹⁾
OXA	0.73 \pm 0.04	0.77 \pm 0.09	0.94 \pm 0.01	1.03 \pm 0.13
R-STAT3	0.56 \pm 0.04 ²⁾	0.62 \pm 0.02 ²⁾	0.65 \pm 0.03 ²⁾	0.67 \pm 0.02 ²⁾
R-SJZ	0.45 \pm 0.02 ³⁾	0.47 \pm 0.06	0.54 \pm 0.04 ³⁾	0.57 \pm 0.03 ³⁾
R-OXA	1.16 \pm 0.08	1.25 \pm 0.07	1.15 \pm 0.12	1.26 \pm 0.10
F	116.7	69.14	49.30	38.82
P	0.000	0.000	0.000	0.000

NOTE:Compared with Con groups,1) P < 0.05,2)P < 0.01;compared with ConR-STAT3 groups,3)P < 0.05,4)P < 0.01.IFN- γ and IL-2 were 200ng/ml,SJZ were 5mg/ml,OXA were 100 μ M.

2.4 四君子汤可抑制小鼠结肠癌皮下瘤生长, 并降低 PD-L1 蛋白及抗体表达

四君子汤可降低 PD-L1 的蛋白及抗体表达 (P<0.05, 图 1, 2, 3); 还可抑制小鼠结肠癌皮下瘤的生长, 其荧光强度低于 NACL 组和空白组 (P<0.05, 图 4, 5)

2.5 四君子汤可降低小鼠结肠癌皮下瘤 PD-L1 mRNA 表达和血液中 IFN- γ 分泌

四君子汤可降低小鼠结肠癌皮下瘤的 PD-L1mRNA 表达 ($P < 0.01$), 并可降低其血液中 IFN- γ 分泌 ($P < 0.05$)。见图 6., 7。

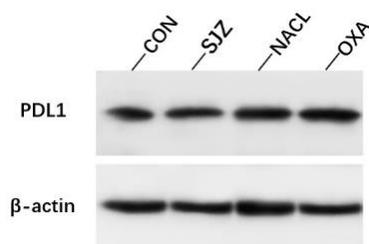


图 1 蛋白显影图

Fig.1 Protein development

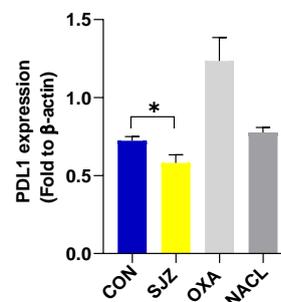


图 2 PD-L1 蛋白表达

Fig.2 Expression of PD-L1 protein

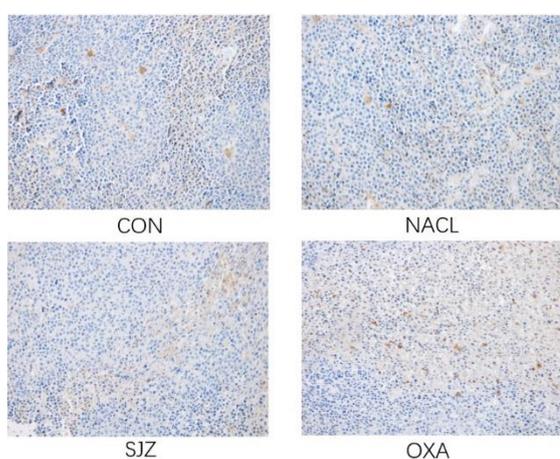


图 3 免疫组化 PDL1 表达图(200X)

Fig.3 Immunohistochemical expression of PD-L1(200X)

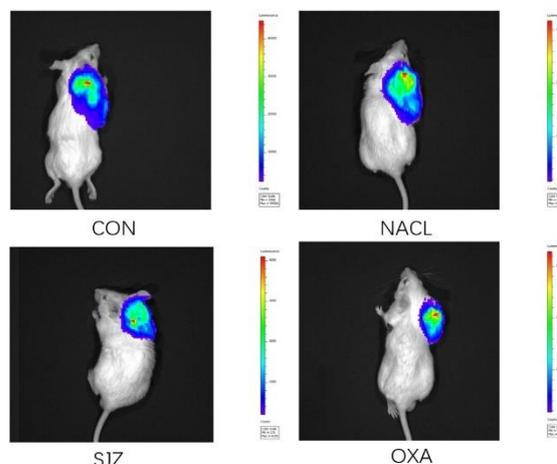


图 4 小鼠两周荧光成像图

Fig.4 Two week fluorescence imaging of mice

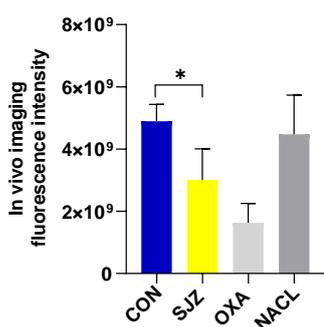


图 5 小鼠荧光强度

Fig.5 Fluorescence intensity of mice

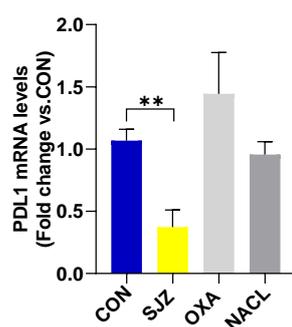


图 6 PD-L1 mRNA 表达

Fig.6 PD-L1 mRNA expression

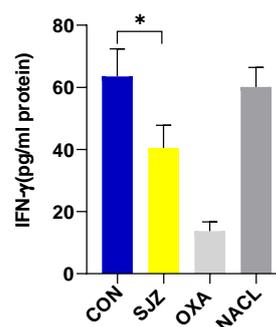


图 7 小鼠血液 IFN-γ 水平

Fig.7 Serum IFN - γ levels in mice

3 讨论

NK 细胞在对肿瘤的杀伤中起关键作用，当 NK 细胞表面的 PD-1 与肿瘤的免疫检查位点 PD-L1 发生结合时，NK 细胞表达的活化受体将无法激活，细胞活化、分裂、细胞毒性等能力减弱，导致肿瘤免疫逃脱，使免疫反应无法进行。因此，降低 PD-1 或者 PD-L1 的表达，抑制两者结合及信号通路形成，可有效避免 NK 细胞衰弱，达到增强免疫反应的目的^[10-19]。

既往研究发现，STAT3 的异常激活可以通过传播肿瘤细胞与肿瘤微环境之间串扰导致肿瘤免疫反应的抑制，在自身激活活化的同时，会促进其他免疫抑制因子表达^[20]。最近也有发现 CD4⁺T 细胞 PD-1 的表达可以上调 STAT3 mRNA 的增加^[21]，免疫检查位点抑制剂和 STAT3 抑制剂联合使用在临床上也达到了很好的预期效果^[22]。同时，也有研究发现，STAT3 在肿瘤浸润免疫细胞中过度活化，会影响先天免疫和适应性免疫应答，从而引起免疫抑制。例如在先天的免疫细胞中存在大量的 STAT3，可能会引发以降低 IFN-γ 为代表的炎性介质的一系列反应，从而减缓了炎症信息的传递，导致免疫抑制，在适应性免疫中，STAT3 活性的持续升高会导致 T 淋巴细胞活性降低，导致抗肿瘤作用降低^[23-25]。四君子汤作为中药的经典方可以杀伤肿瘤细胞^[26]，最近发现其中蕴含的多糖可以对淋巴细胞、脾细胞以及巨噬细胞发挥不同的免疫作用^[27]，而加味四君子汤具有很好的抗肿瘤活性，还可以改善荷瘤小鼠的肝肾功能，其作用可能归功于 IL-2, TNF-α 等^[28]。最近有研究表明，LY294002 PI3K/AKT 信号通路抑制剂，可以抑制 IFN-γ 分泌和经过番茄素处理的肺癌细胞 PD-L1 的水平^[29]。

综上所述，四君子汤可影响 NK 细胞活性及结肠癌增殖，其功能与 STAT3 抑制剂相近，可能通过调控 STAT3 信号干预 IFN-γ 分泌，降低 PD-1/PD-L1 的表达从而改善 NK 细胞活性及抑制结肠癌细胞的生长，可为结肠癌临床治疗及实验研究提供依据。

参考文献:

- [1] Siegel R L , Miller K D , Jemal A . Cancer statistics, 2020 [J] .CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2020, 70(1).
- [2] Jo A, Oh H. Incidence of Colon Cancer Related to Cigarette Smoking and Alcohol Consumption in Adults with Metabolic Syndrome: Prospective Cohort Study [J] .J Korean Acad Nurs, 2019, 49(6):713-723.
- [3] White A , Joseph D , Rim S H , et al. Colon cancer survival in the United States by race and stage (2001-2009): Findings from the CONCORD-2 study [J] .Cancer, 2017, 12. 5014-5036.
- [4] Brouwer NPM, Bos ACRK, Lemmens VEPP, et al. An overview of 25 years of incidence, treatment and outcome of colorectal cancer patients [J] .Int J Cancer, 2018, 143(11):2758–2766.
- [5] Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. [J] .Trends Immunol, 2001, (22):633–640.
- [6] Michel T, Poli A, Cuapio A, et al. Human CD56bright NK Cells: An update[J] .J Immunol, 2016, 196:2923–31.
- [7] Sivori S, Vacca P, Del Zotto G, et al. Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications [J] .Cellular & molecular immunology, 2019.
- [8] Hsu J, Hodgins JJ, Marathe M, et al. Contribution of NK cells to immunotherapy mediated by PD-1/PD-L1 blockade [J] .J Clin Investig, 2018, 128:4654–4668.
- [9] Pesce S, Greppi M, Tabellini G, et al. Identification of a subset of human natural killer cells expressing high levels of programmed death 1: A phenotypic and functional characterization [J] .Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2017, 139(1):335-346.
- [10] Benson DM, Jr, Bakan CE, Mishra A, et al. The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody[J] .Blood, 2010, 116:2286–2294.
- [11] Concha-Benavente F, Kansy B, Moskovitz J, et al. PD-L1 mediates dysfunction in activated PD-1+ NK cells in head and neck cancer patients [J] .Cancer Immunol Res, 2018, 6:1548–1560.
- [12] Sgrignani J, Garofalo M, Matkovic M, et al. Structural Biology of STAT3 and Its Implications for Anticancer Therapies Development[J]. Int J Mol Sci, 2018;19.
- [13] Atsaves V, Tsesmetzis N, Chioureas D, et al. PD-L1 is commonly expressed and transcriptionally regulated by STAT3 and MYC in ALK-negative anaplastic large-cell lymphoma[J] .Leukemia, 2017, 31:1633–1637.

- [14] Song TL, Nairismagi ML, Laurensia Y, et al. Oncogenic activation of the STAT3 pathway drives PD-L1 expression in natural killer/T-cell lymphoma[J]. *Blood*, 2018, 132:1146–1158.
- [15] Garcia-Diaz A, Shin DS, Moreno BH, et al. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression[J]. *Cell Rep*, 2017, 19:1189–1201.
- [16] Yoyen-Ermis D, Tunali G, Tavukcuoglu E, et al. Myeloid maturation potentiates STAT3-mediated atypical IFN- γ signaling and upregulation of PD-1 ligands in AML and MDS [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):11697.
- [17] Zou S, Tong Q, Liu B, et al. Targeting STAT3 in Cancer Immunotherapy [J]. *Mol Cancer*, 2020, 24(19):145.
- [18] Zhang X, Zeng Y, Qu Q, et al. PD-L1 induced by IFN- γ from tumor-associated macrophages via the JAK/STAT3 and PI3K/AKT signaling pathways promoted progression of lung cancer [J]. *Int J Clin Oncol*, 2017, 22(6):1026-1033.
- [19] Giuliani M, Janji B, Berchem G. Activation of NK cells and disruption of PD-L1/PD-1 axis: two different ways for lenalidomide to block myeloma progression [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(14).
- [20] Wang T, Niu G, Kortylewski M, et al. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells[J]. *Nat Med*, 2004, 10:48–54.
- [21] Celada LJ, Kropski JA, Herazo-Maya JD, et al. PD-1 up-regulation on CD4(+) T cells promotes pulmonary fibrosis through STAT3-mediated IL-17A and TGF- β 1 production [J]. *Sci Transl Med*, 2018;10.
- [22] D'Angelo SP, Shoushtari AN, Keohan ML, et al. Combined KIT and CTLA-4 Blockade in Patients with Refractory GIST and Other Advanced Sarcomas: A Phase Ib Study of Dasatinib plus Ipilimumab [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23:2972–2980.
- [23] Cédric Rébé, Ghiringhelli F. STAT3, a Master Regulator of Anti-Tumor Immune Response [J]. *Cancers*, 2019, 11(9):1280.
- [24] Huynh J, Chand A, Gough D, et al. Therapeutically exploiting STAT3 activity in cancer - using tissue repair as a road map [J]. *Nat Rev Cancer*, 2019, 19:82–96.
- [25] Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7:41–51.
- [26] Qian J, Li J, Jia J, et al. Different concentrations of Sijunzi Decoction inhibit the proliferation and induce apoptosis of gastric cancer SGC-7901 [J]. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2016, 13(4):145-156.
- [27] Gao B, Peng Y, Peng C, et al. A Comparison of Characterization and Its Actions on

Immunocompetent Cells of Polysaccharides from Sijunzi Decoction [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, (12):1-12.

[28]Chen L, Jin T, Ning C, et al. Anti-tumor and immune-modulating effect of Jiawei Sijunzi decoction in mice bearing hepatoma H22 tumor [J]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2019, 39(2):241-248.

[29]Jiang X, Wu H, Zhao W, et al. Lycopene improves the efficiency of anti-PD-1 therapy via activating IFN signaling of lung cancer cells [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19:68.