

四君子汤含药血清联合PD-1抗体调节肺癌肿瘤浸润CD4⁺T淋巴细胞免疫功能和作用机制

毛启远¹, 王学谦¹, 林 飞¹, 蒋伶俐¹, 张楚楚², 谭 滢¹, 蔡瑞娟¹, 李道睿^{1*}, 林洪生¹

1. 中国中医科学院广安门医院 肿瘤科, 北京 100053

2. 中国中医科学院中医药信息研究所, 北京 100700

摘要: 目的 通过体外实验探究四君子汤含药血清(SJZDCS)联合PD-1抗体对肺癌肿瘤浸润CD4⁺T淋巴细胞免疫功能的影响和机制。方法 取雄性SD大鼠, 连续ig四君子汤6 d, 麻醉取血, 制备含药血清。取雄性C57BL/6J小鼠, 建立Lewis肺癌荷瘤小鼠模型, 饲养第18天后处死小鼠, 提取肿瘤并分离肿瘤浸润淋巴细胞, 磁珠分选肿瘤浸润CD4⁺T淋巴细胞。建立Lewis细胞与肿瘤浸润CD4⁺T淋巴细胞共培养体系, CCK-8法检测Lewis细胞的增殖, 筛选SJZDCS的最佳作用浓度和时间。建立Lewis细胞与肿瘤浸润CD4⁺T淋巴细胞间接共培养体系, 分为对照组、PD-1抗体(20 μg·mL⁻¹)组、SJZDCS(20%)组、SJZDCS(20%)+PD-1抗体(20 μg·mL⁻¹)组, 干预72 h;酶联免疫吸附实验(ELISA)检测共培养细胞上清中免疫功能相关细胞因子乳酸脱氢酶(LDH)、转化生长因子-β1(TGF-β1)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、干扰素-γ(IFN-γ)、白细胞介素(IL)-2、IL-4、IL-6和IL-10表达水平, Western blotting检测肿瘤浸润CD4⁺T淋巴细胞中PD-1和Ras-MEK-ERK通路蛋白表达水平。结果 20% SJZDCS干预肿瘤浸润CD4⁺T淋巴细胞72 h对抑制共培养Lewis细胞的增殖效果最佳。与对照组相比, PD-1抗体组TNF-α、IFN-γ、IL-2和TGF-β1水平显著升高($P<0.01$), IL-4、IL-6、IL-10和LDH水平显著降低($P<0.05$); SJZDCS组IL-2水平显著升高($P<0.01$), IL-4、IL-6、LDH和TGF-β1水平显著降低($P<0.05, 0.01$); SJZDCS+PD-1抗体组TNF-α、IFN-γ和IL-2水平显著升高($P<0.01$), IL-4、IL-6、LDH和TGF-β1水平降低($P<0.01$)。与PD-1抗体组相比, SJZDCS+PD-1抗体组TNF-α、IFN-γ、IL-2升高水平和IL-4、IL-6和TGF-β1的降低水平更显著($P<0.01$)。与SJZDCS组相比, SJZDCS+PD-1抗体组TNF-α、IFN-γ、IL-2和IL-6的水平更高($P<0.01$)。与对照组相比, PD-1抗体组、SJZDCS组、SJZDCS+PD-1抗体组CD4⁺T淋巴细胞中PD-1蛋白表达显著降低($P<0.01$), p-MEK1/2和MRK1/2蛋白表达显著升高($P<0.05, 0.01$); PD-1抗体组、SJZDCS+PD-1抗体组Ras和P-ERK1/2蛋白表达显著升高($P<0.01$)。与PD-1抗体组相比, SJZDCS+PD-1抗体组ERK1/2、p-MEK1/2和p-ERK1/2蛋白表达显著升高($P<0.01$), Ras蛋白表达显著降低($P<0.01$)。与SJZDCS组相比, SJZDCS+PD-1抗体组Ras、p-MEK1/2、MEK1/2和p-ERK1/2蛋白表达显著升高($P<0.05$)。结论 SJZDCS单用或与PD-1抗体联用, 可在体外调节肺癌肿瘤浸润CD4⁺T淋巴细胞免疫功能, 其机制与调控PD-1及下游Ras-MEK-ERK通路表达有关。

关键词: 四君子汤; 含药血清; 抗PD-1免疫治疗; 肿瘤浸润CD4⁺T淋巴细胞; 免疫细胞因子; Ras-MEK-ERK信号通路
中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)11-2508-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.11.006

Effect and mechanism of Sijunzi Decoction containing serum combined with PD-1 antibody regulating immune function of tumor-infiltrating CD4⁺T lymphocytes in lung cancer

MAO Qiyuan¹, WANG Xueqian¹, LIN Fei¹, JIANG Lingli¹, ZHANG Chuchu², TAN Ying¹, CAI Ruijuan¹, LI Daorui¹, LIN Hongsheng¹

1. Department of Oncology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China

2. Institute of Information on Traditional Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: Objective The objective of this study was to investigate the impact and underlying mechanisms of Sijunzi Decoction containing serum (SJZDCS) in combination with a PD-1 antibody on the immune function of CD4⁺T lymphocytes infiltrating lung

收稿日期: 2024-05-28

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82074405)

第一作者: 毛启远, 博士研究生, 主要从事中西医结合肿瘤临床与基础研究。E-mail: qiyuanamao@163.com

*通信作者: 李道睿, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事中西医结合肿瘤临床与基础研究。E-mail: lidaorui@sina.com

cancer tumors through *in vitro* experiments. **Methods** Male SD rats were administered Sijunzi Decoction via continuous gavage for 6 d, after which blood was collected under anesthesia to prepare serum containing the medication. Lewis lung cancer tumor-bearing mouse model was established using male C57BL/6J mice. After 18 d, the mice were sacrificed, tumors were excised, and tumor-infiltrating lymphocytes were isolated. CD4⁺ T lymphocytes were sorted using magnetic beads, and a co-culture system with Lewis cells was established, and divided into control group, PD-1 antibody (20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) group, SJZDCS (20%) group, SJZDCS (20%)+PD-1 antibody (20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) group, intervention for 72 h. The proliferation of Lewis cells was assessed using the CCK-8 assay to determine the optimal concentration and exposure time of the medicated serum. Immune function-related cytokines, including lactate dehydrogenase (LDH), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), interleukin-2 (IL-2), IL-4, IL-6, and IL-10, were measured in the supernatant of the co-cultured cells using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression levels of PD-1 and proteins involved in the Ras-MEK-ERK pathway in CD4⁺ T lymphocytes were evaluated using Western blotting. **Results** The intervention of 20% SJZDCS on tumor infiltrating CD4⁺ T lymphocytes for 72 h showed the best inhibitory effect on the proliferation of co cultured Lewis cells. Compared with the control group, the levels of TNF- α , IFN- γ , IL-2 and TGF- β 1 were significantly increased ($P < 0.01$) and the levels of IL-4, IL-6, IL-10 and LDH were significantly decreased ($P < 0.05$) in the PD-1 antibody group. The level of IL-2 was significantly increased ($P < 0.01$) and the levels of IL-4, IL-6, LDH and TGF- β 1 were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$) in the SJZDCS group. The levels of TNF- α , IFN- γ and IL-2 were significantly increased ($P < 0.01$) and the levels of IL-4, IL-6, LDH and TGF- β 1 were decreased ($P < 0.01$) in the SJZDCS+PD-1 antibody group. Compared with the PD-1 antibody group, the increase in the levels of TNF- α , IFN- γ , IL-2 and the decrease in the levels of IL-4, IL-6 and TGF- β 1 were more significant ($P < 0.01$). Compared with the SJZDCS group, the levels of TNF- α , IFN- γ , IL-2 and IL-6 were higher ($P < 0.01$) in the SJZDCS+PD-1 antibody group. Compared with the control group, the expression of PD-1 protein in CD4⁺ T lymphocytes was significantly decreased ($P < 0.01$) in the PD-1 antibody group, SJZDCS group and SJZDCS+PD-1 antibody group, and the expression of p-MEK1/2 and MRK1/2 proteins was significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). The expression of ERK1/2, p-MEK1/2 and p-ERK1/2 proteins was significantly increased ($P < 0.01$) in the PD-1 antibody group and SJZDCS+PD-1 antibody group, and the expression of Ras protein was significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with the PD-1 antibody group, the expression of ERK1/2, p-MEK1/2, and p-ERK1/2 proteins was significantly increased ($P < 0.01$) in the SJZDCS+PD-1 antibody group, while the expression of Ras protein was significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with the SJZDCS group, the expression of Ras, p-MEK1/2, MEK1/2, and p-ERK1/2 proteins was significantly increased ($P < 0.05$) in the SJZDCS+PD-1 antibody group. **Conclusions** Sijunzi Decoction medicated serum, whether used alone or in combination with PD-1 antibodies, can modulate the immune function of CD4⁺ T lymphocytes infiltrating lung cancer tumors *in vitro*. This effect is associated with the regulation of PD-1 expression and the Ras-MEK-ERK signaling pathway.

Key words: Sijunzi Decoction; containing serum; anti-PD-1 immunotherapy; tumor-infiltrating CD4⁺ T lymphocytes; immune cytokines; Ras-MEK-ERK signaling pathway

肺癌是最常见的恶性肿瘤,2022年全球肺癌的发病人数和死亡人数分别为248.03万和181.72万,均居所有恶性肿瘤的首位^[1]。非小细胞肺癌(NSCLC)约占全部肺癌的80%~85%,超过半数的肺癌患者发现时已为晚期,而远处转移后的5年生存率仅为5%左右^[2],疾病负担极为严重。近年来,以程序性细胞死亡蛋白1/程序性细胞死亡配体1(PD-1/PD-L1)的单克隆抗体为代表的免疫治疗发展迅速,为晚期NSCLC带来了明显的生存获益^[3]。然而免疫治疗存在应答率低、易出现耐药性及免疫相关不良反应等局限性。因此,如何提高免疫治疗的疗效是目前肿瘤相关研究的重点问题。

研究表明,肺癌免疫治疗的疗效与肿瘤浸润淋巴细胞(TILs)的功能关系密切^[4]。TILs是肿瘤微环境(TME)中的免疫细胞,是机体免疫应答后产生能

够浸润癌组织的一类高度异质性淋巴细胞亚群,通过对肿瘤细胞的识别、杀伤和清除,实现免疫应答,且较少产生细胞因子风暴^[5]。TILs抗肿瘤作用的提高主要归功于CD8⁺ T淋巴细胞的再激活,CD8⁺ T淋巴细胞主要与表达组织相容性复合体-1(MHC-I⁺)的肿瘤细胞相互作用,易受到MHC缺陷肿瘤细胞和免疫抑制TME的限制。有新的研究证据表明^[6],极少数CD4⁺效应T细胞(约占TILs的1%),即位于肿瘤浸润边缘的CD4⁺ T淋巴细胞,也可以独立促进抗肿瘤免疫而杀伤肿瘤细胞,主要表现为CD4⁺ T淋巴细胞可优先聚集在肿瘤浸润边缘激活,与CD11c⁺ MHC-II⁺抗原呈递免疫细胞相互作用,以抗原依赖的方式分泌 γ 干扰素(IFN- γ),间接消除肿瘤^[7]。另有研究表明^[8],CD4⁺ T淋巴细胞可单独通过G₁/S细胞周期阻滞在体外抑制肿瘤细胞增殖,同

时其分泌的细胞因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)也在介导抗肿瘤活性中发挥作用,导致体内肿瘤的有效消退。而PD-1/PD-L1信号通路在CD4⁺T淋巴细胞的激活、增殖及凋亡等多个过程中扮演了重要角色,其激活能够抑制由CD4⁺T淋巴细胞介导的细胞免疫反应^[9]。PD-1通过调控Ras-MEK-ERK信号通路,抑制蛋白激酶途径的激活,并降低下游信号分子的传递,进而抑制T淋巴细胞的激活和增殖。这一过程导致CD4⁺T淋巴细胞的细胞因子和抗凋亡蛋白的分泌减少,从而促进CD4⁺T淋巴细胞的功能失调或凋亡^[10],降低免疫治疗疗效。

四君子汤出自宋代《太平惠民和剂局方》,是以中医扶正培本思想治疗肿瘤的重要方剂,研究表明其可调节恶性肿瘤患者免疫功能,与现代医学治疗手段联合可增效减毒,并改善耐药等^[11-12]。然而针对四君子汤与肺癌免疫治疗方法联用的疗效尚不清楚。因此,本研究旨在通过体外实验,探究四君子汤含药血清(Sijunzi Decoction containing serum, SJZDCS)单用或联合抗PD-1免疫治疗对肺癌肿瘤浸润CD4⁺T淋巴细胞免疫功能的调节作用,并探究内在机制,以期为进一步开展肺癌的中医药联合免疫治疗相关研究提供参考。

1 材料

1.1 细胞

鼠源Lewis肺癌细胞购自国家生物医学实验细胞资源库。

1.2 动物

雄性SD大鼠20只,体质量180~220 g;雄性C57BL/6J小鼠10只,体质量18~20 g,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(京)2021-0006,饲养于北京迈德康纳生物技术有限公司屏障环境动物实验室,实验动物使用许可证号SYXK(京)2020-0050。本研究获得中国中医科学院广安门医院实验动物伦理委员会批准(批号IACUC-GAMH-2024-016),所有实验研究均符合中国伦理委员会有关动物研究指导原则。

1.3 药物与试剂

人参、茯苓、白术、炙甘草饮片均购自中国中医科学院广安门医院,经药剂科鉴定为正品,符合《中国药典》规定。

小鼠PD-1抗体购自美国MedChemExpress公司;DMEM高糖培养基、RPMI 1640培养基购自北京索莱宝科技有限公司;胎牛血清、0.25%胰蛋白酶购自美国Gibco公司;Cell Counting Kit-8(CCK-8)

试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;I型胶原酶购自德国Sigma公司;DNase I DNA酶购自美国Millipore公司;Hank's平衡盐溶液(HBSS)和小鼠淋巴细胞分离液试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;小鼠CD4⁺T细胞分离试剂盒购自德国Miltenyi Biotec公司;ELISA小鼠乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒购自南京建成生物工程研究所;ELISA小鼠转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、TNF- α 、IFN- γ 、白细胞介素(IL)-2、IL-4、IL-6、IL-10试剂盒购自深圳欣博盛生物科技有限公司;一抗Ras、p-丝裂原活化蛋白激酶1/2(MEK1/2)、MEK1/2、p-细胞外调节蛋白激酶1/2(ERK1/2)、ERK1/2购自美国Cell Signaling Technology公司;一抗PD-1购自美国Abcam公司;一抗 β -actin购自北京中杉金桥生物技术有限公司;二抗山羊抗兔IgG/辣根酶标记购自美国Jackson公司;Western blotting相关试剂均购自北京普利莱基因技术有限公司;ECL发光液购自美国Millipore公司。

1.4 实验仪器

超净工作台(苏州净化设备有限公司);5%CO₂、37℃恒温细胞培养箱、Thermo Q-Exactive HFX质谱仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);TE2000-U倒置显微镜(日本Nikon公司);Synergy HT多功能酶标仪(美国Biotek公司);FACS Calibur流式细胞仪(美国BD公司);高速冷冻离心机(美国Sigma公司);台式低速离心机(德国Eppendorf公司);MACS分离器、LS柱等购自德国MiltenyiBiotecGmbH公司;垂直电泳槽、电转移槽、电泳仪、Bio-Rad Chemi DoCXRS凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 SJZDCS的制备

取人参9 g、白术9 g、茯苓9 g、炙甘草6 g,加10倍量水浸泡1 h后文火煎煮2 h,滤出上清后再加8倍量水文火煎煮1 h,合并2次上清液,静置滤过并除掉中药渣滓。参考相关研究报道^[13-14]将上清在水浴中浓缩为2 g·mL⁻¹的贮存液,置4℃保存备用。经超高效液相色谱高分辨率质谱(UPLC-HRMS)分析,贮存液中苯及其取代衍生物质量分数为12.76%、羧酸及其衍生物质量分数为26.20%、脂肪酰基质量分数为13.72%、黄酮类化合物质量分数为10.56%、有机氧化合物质量分数为15.07%、异戊二烯脂质量分数为21.69%。

将20只雄性SD大鼠适应性喂养2 d后,随机分

为2组,含药血清组10只、对照组10只。含药血清组给予四君子汤贮存液,给药剂量参照“人和动物按体表面积折算的等效剂量比率表”计算^[15],大鼠给药剂量约为 $4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,对照组给予等体积0.9%氯化钠溶液,连续ig给药6 d^[16]。用戊巴比妥钠($40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)ip麻醉大鼠^[17],麻醉约5 min后,剪开腹腔,腹主动脉取血,立即注入干燥红色采血管内,垂直静置2 h后, $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min,取血清,放入1.5 mL EP管^[18]。56℃水浴30 min灭活,0.22 μm 微孔滤膜滤过,用冻存管分装,得到含药血清和空白血清,-80℃冰箱保存备用。

2.2 肺癌荷瘤小鼠模型的构建

将Lewis细胞用含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基培养。细胞置于37℃、5% CO₂细胞培养箱中培养,每2~3天更换培养液,待细胞增殖至85%左右时,用0.25%胰蛋白酶消化传代,传代3~4次后,选择至对数生长期且生长状态良好的细胞,消化并制备成单细胞悬液,进行后续细胞实验。重新悬浮并调整细胞密度至 1×10^7 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 。在无菌操作下,将每只C57BL/6小鼠分别接种0.1 mL细胞悬液至右侧腋下皮下,建立荷瘤模型,5~7 d后可触及腋下结节时,证明造模成功。接种后继续饲养,待肿瘤体积长至约400 mm³时,处死小鼠,提取肿瘤。

2.3 TILs的分离

在无菌条件下将切除新鲜瘤体组织去除坏死部分与结缔组织,用RPMI 1640培养液冲洗干净,移至无菌平皿内用手术剪将肿瘤组织剪碎至1~2 mm³小块。用200目孔径的不锈钢滤网将悬液滤过, $1\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min收集单个细胞,用RPMI 1640培养液洗细胞2次。使用含0.1% I型胶原酶和0.05% DNA酶的HBSS消化上述细胞,37℃消化1 h,用RPMI 1640培养液洗涤2次。梯度离心分离TILs:于无菌离心管内分层放入100%及75%的淋巴细胞分离液,其上再沿管壁轻轻加入细胞悬液,经 $2\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心20 min,收集100%分离液界面上的细胞为富含TILs的细胞悬液(75%的界面上是肿瘤细胞),再用RPMI 1640将TILs洗2次,此时TILs即可应用于流式分选。

2.4 肿瘤浸润CD4⁺ T淋巴细胞的磁珠分选

将分离的TILs充分滤过,计数。每 1×10^7 个细胞用40 μL 含5% BSA的预冷缓冲液重悬,加入10 μL Biotin-Antibody Cocktail,4℃孵育5 min。加入30 μL 缓冲液,加20 μL Anti-Biotin MicroBeads,

4℃孵育10 min。将LS柱置于MACS分离器的磁场中。用3 mL缓冲液冲洗准备柱,将细胞悬液缓慢滴加至柱上,收集含有未标记细胞的流式细胞,代表富集的CD4⁺ T淋巴细胞,重复收集数遍,将流出细胞液混合,进行流式鉴定。

2.5 细胞增殖实验

取对数生长期Lewis细胞,胰酶消化,终止后离心收集,细胞计数调整细胞悬液浓度,以每孔 1×10^3 个接种于96孔板。将获得的肿瘤浸润CD4⁺ T淋巴细胞与Lewis细胞按100:1比例共培养,即96孔板中每孔加入 1×10^5 个CD4⁺ T淋巴细胞。置于37℃、5% CO₂细胞培养箱培养24 h,使Lewis细胞贴壁。设置对照组、SJZDCS组,SJZDCS组以20%、5%、1%的SJZDCS进行处理,对照组不加含药血清,每个浓度设置3复孔。在药物分别处理24、48、72 h后,移除CD4⁺ T淋巴细胞,进行CCK-8检测。向每孔加入10 μL CCK-8溶液,将培养板在培养箱内孵育1~2 h,用酶标仪测定在450 nm处的吸光度(A)值。

2.6 细胞间接共培养

将Lewis细胞以每孔 2×10^5 个铺于6孔板中,用含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基培养;上方覆盖Transwell小室,将肿瘤浸润CD4⁺ T淋巴细胞用相同培养基重悬计数后以每孔 2×10^7 个铺于Transwell小室上室,建立共培养体系。分为对照组、PD-1抗体($20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[19-20])组、SJZDCS(20%)组、SJZDCS(20%)+PD-1抗体($20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组,干预72 h。

2.7 ELISA实验

取“2.6”项各组干预后的共培养细胞上清液检测LDH、TGF- β 1、TNF- α 、IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10含量,具体操作参照试剂盒说明书进行。

2.8 Western blotting实验

分别取“2.6”项各组干预后的Transwell小室上室中的CD4⁺ T淋巴细胞,提取总蛋白,BCA法测定蛋白含量。随后进行Western blotting检测,根据目的蛋白的相对分子质量,配制10%分离胶、5%浓缩胶,SDS-PAGE电泳,采用0.45 μm 孔径PVDF膜,转膜时间120 min。转膜完成后,丽春红染色试剂对膜进行染色,观察转膜效果。将膜完全浸没于5% BSA-TBST中,水平摇床孵育1 h封闭。5% BSA-TBST稀释一抗,4℃水平摇床一抗孵育过夜。TBST洗膜3次,每次10 min。5% BSA-TBST稀释二抗,山羊抗兔IgG(H+L)HRP、山羊抗鼠IgG(H+

L)和兔抗山羊IgG(H+L) HRP 1:10 000,室温二抗孵育40 min,洗膜3次。将ECL滴加到膜的蛋白面,反应3 min;胶片曝光10 s~5 min(曝光时间随不同光强度而调整);显影2 min,定影。图像分析仪计算PD-1/ β -actin、Ras/ β -actin、MEK1/2/ β -actin、p-MEK1/2/ β -actin、ERK1/2/ β -actin、p-ERK1/2/ β -actin的灰度值比值。

2.9 统计学分析

采用GraphPad Prism 10进行数据分析和图表制作,实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行正态性(Shapiro-Wilk)检验和方差齐性(Levene检验)分析,组间统计学差异采用 t 检验,多组间统计学差异采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。

3 结果

3.1 肿瘤浸润CD4⁺T淋巴细胞的富集纯化结果

Lewis肺癌荷瘤小鼠在肿瘤接种后第18天左右,肿瘤体积约达400 mm³。取肿瘤组织进行TILs分离,如图1所示,在磁珠分选前流式鉴定显示CD4⁺T淋巴细胞约16.8%;在进行磁珠分选后,CD4⁺T淋巴细胞比例达98.9%,可进行后续细胞实验。

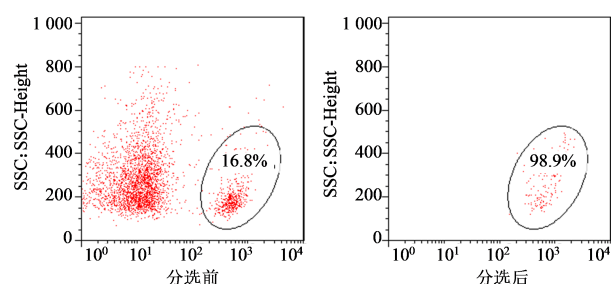


图1 分选前、后肿瘤浸润CD4⁺T淋巴细胞的比例

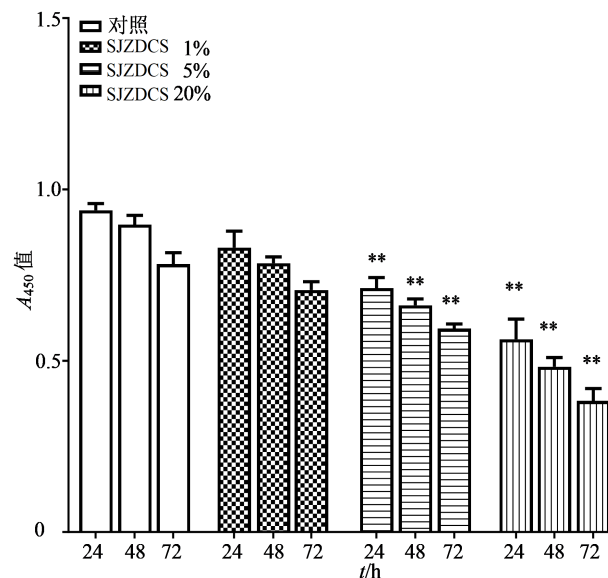
Fig. 1 Proportion of CD4⁺T lymphocytes in TILs before and after sorting

3.2 SJZDCS增强肿瘤浸润CD4⁺T淋巴细胞对Lewis细胞增殖的抑制作用

如图2所示,与对照组比较,5%、20%的SJZDCS作用24、48、72 h后Lewis细胞的活力明显下降($P < 0.01$),且20%作用效果好于5%,组内比较72 h Lewis细胞活力最低($P < 0.01$)。选择20%的SJZDCS干预72 h进行后续实验。

3.3 SJZDCS和PD-1抗体对肿瘤浸润CD4⁺T淋巴细胞-Lewis细胞共培养体系免疫功能相关细胞因子水平的影响

如图3所示,与对照组相比,PD-1抗体组TNF- α 、IFN- γ 、IL-2、TGF- β 1水平显著升高($P < 0.01$),IL-4、IL-6、IL-10、LDH水平显著降低($P < 0.05$);SJZDCS



与同时时间点对照组比较: ** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group at same time point.

图2 不同作用浓度及时间的SJZDCS促进肿瘤浸润CD4⁺T淋巴细胞对Lewis细胞的抑制作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 SJZDCS with different concentrations and durations of action promotes the inhibitory effect of tumor infiltrating CD4⁺T lymphocytes on Lewis cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

组IL-2水平显著升高($P < 0.01$),IL-4、IL-6、LDH、TGF- β 1水平显著降低($P < 0.05, 0.01$);SJZDCS+PD-1抗体组TNF- α 、IFN- γ 和IL-2水平显著升高($P < 0.01$),IL-4、IL-6、LDH和TGF- β 1水平降低($P < 0.01$)。

与PD-1抗体组相比,SJZDCS+PD-1抗体组TNF- α 、IFN- γ 、IL-2水平升高和IL-4、IL-6和TGF- β 1的水平降低更显著($P < 0.01$)。

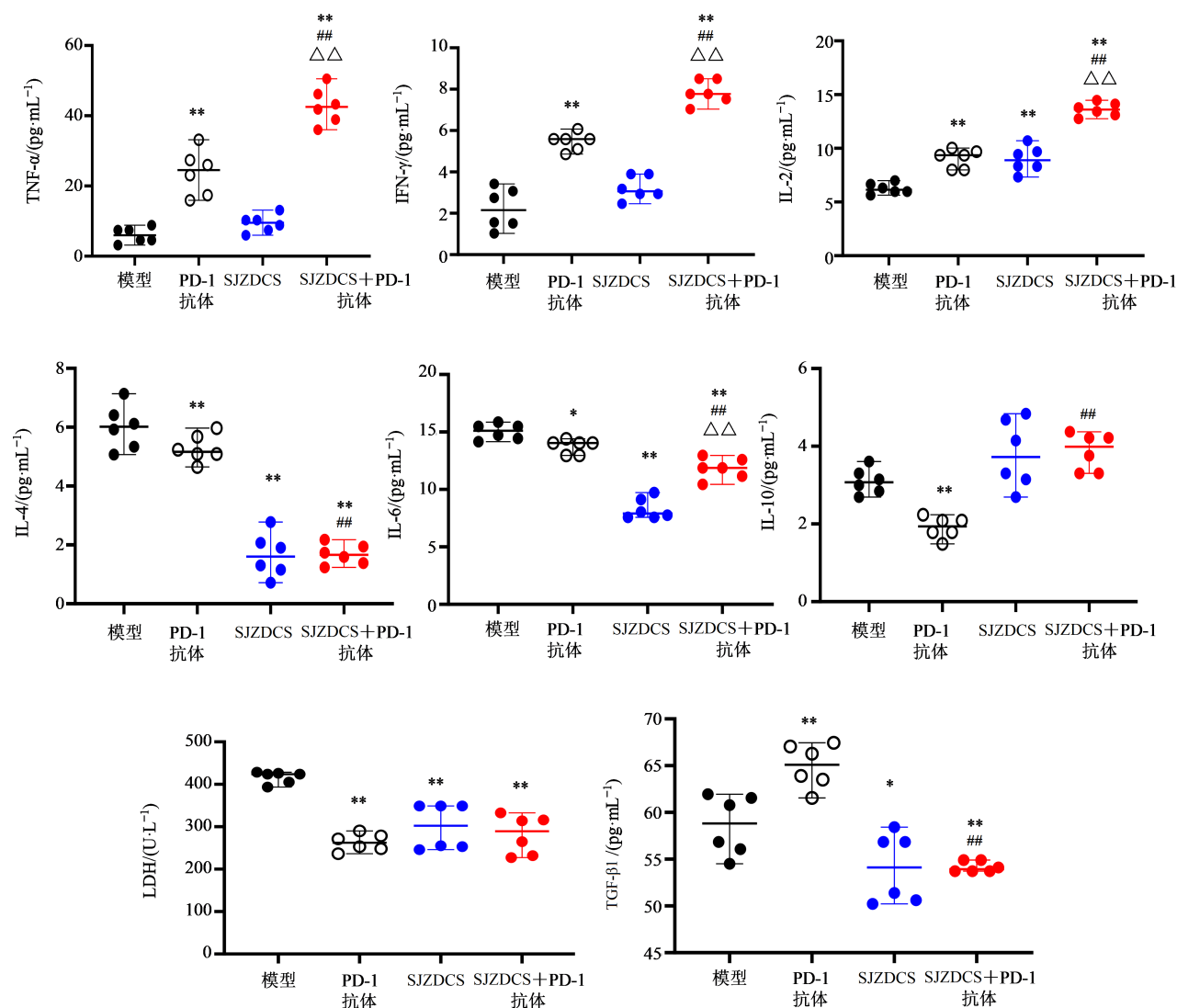
与SJZDCS组相比,SJZDCS+PD-1抗体组TNF- α 、IFN- γ 、IL-2和IL-6的水平更高($P < 0.01$)。

3.4 SJZDCS和PD-1抗体对共培养体系肿瘤浸润CD4⁺T淋巴细胞中PD-1、Ras-MEK-ERK信号通路相关蛋白表达的影响

如图4、5所示,与对照组相比,PD-1抗体组、SJZDCS组、SJZDCS+PD-1抗体组CD4⁺T淋巴细胞中PD-1蛋白表达显著降低($P < 0.01$),p-MEK1/2和MEK1/2蛋白表达显著升高($P < 0.05, 0.01$);PD-1抗体组、SJZDCS+PD-1抗体组Ras和p-ERK1/2蛋白表达显著升高($P < 0.01$)。

与PD-1抗体组相比,SJZDCS+PD-1抗体组ERK1/2、p-MEK1/2和p-ERK1/2蛋白表达显著升高($P < 0.01$),Ras蛋白表达显著降低($P < 0.01$)。

与SJZDCS组相比,SJZDCS+PD-1抗体组



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 PD-1 抗体组比较: ### $P < 0.01$; 与 SJZDCS 组比较: △△ $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; ### $P < 0.01$ vs PD-1 antibody group; △△ $P < 0.01$ vs SJZDCS group.

图3 SJZDCS和PD-1抗体对肿瘤浸润CD4⁺T淋巴细胞-Lewis细胞共培养上清中TNF-α、IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、LDH和TGF-β1水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Effects of SJZDCS and PD-1 antibody on levels of TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, LDH, and TGF-β1 in supernatant of co-cultured CD4⁺ T lymphocyte Lewis cells with tumor infiltration ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Ras、p-MEK1/2、MEK1/2和p-ERK1/2蛋白表达显著升高($P < 0.05$)。

4 讨论

肺癌免疫治疗的疗效与TILs的功能密切相关,而TILs在肿瘤微环境中发挥着不同的作用。CD4⁺T淋巴细胞作为TILs的重要组成部分,其中包含具有正向调节免疫应答的细胞,如CD4⁺Th1等,除传递肿瘤抗原信号外可产生TNF-α、IFN-γ、IL-2等细胞因子,杀伤并清除肿瘤细胞,实现肿瘤免疫应答。同时CD4⁺T淋巴细胞中还有负向调节免疫应答的细胞,如CD4⁺Th2和调节性T细胞等,可分泌免疫

抑制细胞因子和生长因子,如IL-4、IL-6、IL-10、TGF-β等,抑制免疫激活,从而使肿瘤细胞逃脱免疫监视,最终导致肿瘤形成、侵袭与转移^[21]。因此调节TILs的功能,尤其是肿瘤浸润CD4⁺T淋巴细胞的功能,是提高肺癌免疫治疗疗效的重要因素^[22]。

四君子汤是中医健脾补气的经典名方,临床研究表明四君子汤运用培土生金原理即补脾益肺法可显著改善肺癌恶病质等诸多症状^[23-24],还可调节机体免疫功能,改善炎症反应^[25]。因此本研究选择其作为代表进行体外实验,探究其对肿瘤浸润CD4⁺T淋巴细胞免疫功能的影响和机制。

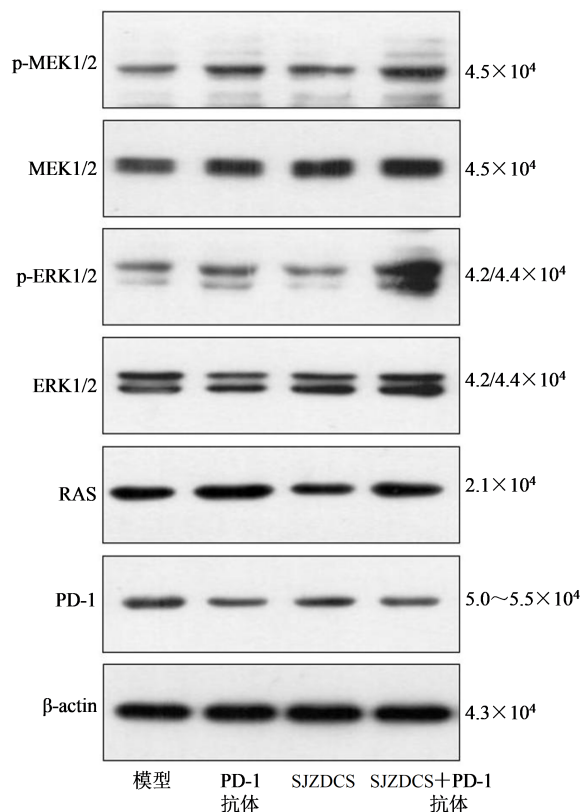
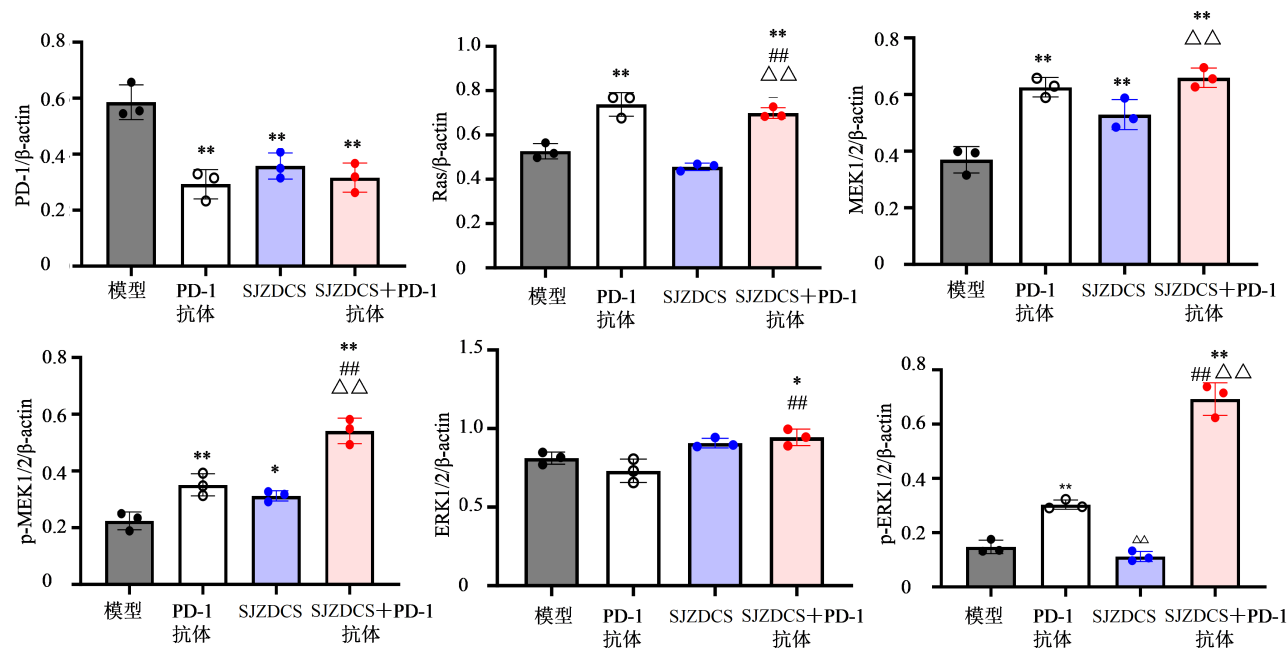


图 4 共培养体系肿瘤浸润 CD4⁺ T 淋巴细胞中 PD-1、Ras-MEK-ERK 信号通路相关蛋白表达

Fig. 4 Expression of PD-1 and Ras-MEK-ERK signaling pathway related proteins in tumor infiltrating CD4⁺ T lymphocytes in co-culture system

本研究结果显示, 20% 浓度的 SJZDCS 干预 72 h 能使共培养体系中肿瘤浸润 CD4⁺ T 淋巴细胞达到最理想的抑制 Lewis 细胞增殖的效果。PD-1 抗体作为常用的免疫检查点抑制剂, 可提高免疫促进相关细胞因子 TNF- α 、IFN- γ 和 IL-2 的水平, 同时降低免疫抑制和炎症相关细胞因子 IL-4、IL-6、IL-10 和 LDH 的水平, 起到良好的杀伤肿瘤作用, 但其对 TGF- β 1 存在促进作用, 这与 TGF- β 1 信号作为免疫检查点阻断疗法原发性耐药的因素相关^[26]。肿瘤浸润 CD4⁺ T 淋巴细胞-Lewis 细胞共培养上清细胞因子检测结果提示, SJZDCS 单用可升高 IL-2 水平, 在联合 PD-1 抗体后可显著提高 TNF- α 、IFN- γ 和 IL-2, 促进抗肿瘤免疫, 同时降低 IL-4、IL-6、LDH 和 TGF- β 1, 抑制炎症反应和肿瘤增殖, 但其对 IL-10 水平可能存在与 PD-1 抗体相反的促进作用。

Ras-MEK-ERK 是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)级联的信号通路, 通过关键蛋白 MEK 和 ERK 的磷酸化, 可调节细胞多种生理过程如增殖、分化、凋亡和应激反应等。作为肿瘤微环境中 PD-1/PD-L1 重要的下游信号通路, Ras-MEK-ERK 的下调可抑制 CD4⁺ T 淋巴细胞活化增殖, 使得 CD4⁺ Th1 细胞因子及抗凋亡蛋白的分泌减少^[27]。本研究提示, SJZDCS 无论单用还是联合 PD-1 抗体, 都可抑制肿瘤浸润 CD4⁺ T 淋巴细胞 PD-1 蛋白



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 PD-1 抗体组比较: # $P < 0.01$; 与 SJZDCS 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.01$ vs PD-1 antibody group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs SJZDCS group.

图 5 蛋白定量结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Protein quantification results ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表达。SJZDCS联合PD-1抗体还促进肿瘤浸润CD4⁺T淋巴细胞关键的磷酸化蛋白p-MEK和p-ERK的表达,比单用PD-1抗体效果更强。此外,SJZDCS联合PD-1抗体可促进肿瘤浸润CD4⁺T淋巴细胞Ras蛋白的表达。但与PD-1抗体组相比,SJZDCS和联合组Ras蛋白表达水平更低,提示可能与Ras蛋白的消耗或其他的下游通路激活有关。

本结果表明四君子汤可抑制CD4⁺T淋巴细胞PD-1的表达并激活Ras-MEK-ERK通路,提高CD4⁺T淋巴细胞增殖和分化能力,进而增强其抗肿瘤免疫功能,且在联合PD-1抗体后调控能力更强。

综上所述,本研究从体外实验角度初步证实了SJZDCS单用与联合PD-1抗体,可调节肿瘤浸润CD4⁺T淋巴细胞免疫相关细胞因子的表达,从而抑制Lewis细胞的增殖,其作用机制与调控肿瘤浸润CD4⁺T淋巴细胞PD-1及Ras-MEK-ERK信号通路有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-263.
- [2] Wang M N, Herbst R S, Boshoff C. Toward personalized treatment approaches for non-small-cell lung cancer [J]. *Nat Med*, 2021, 27(8): 1345-1356.
- [3] Vokes E E, Ready N, Felip E, et al. Nivolumab versus docetaxel in previously treated advanced non-small-cell lung cancer (CheckMate 017 and CheckMate 057): 3-year update and outcomes in patients with liver metastases [J]. *Ann Oncol*, 2018, 29(4): 959-965.
- [4] Sas Z, Cendrowicz E, Weinhäuser I, et al. Tumor microenvironment of hepatocellular carcinoma: Challenges and opportunities for new treatment options [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(7): 3778.
- [5] Paijens S T, Vledder A, de Bruyn M, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes in the immunotherapy era [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(4): 842-859.
- [6] Kruse B, Buzzai A C, Shridhar N, et al. CD4⁺T cell-induced inflammatory cell death controls immune-evasive tumours [J]. *Nature*, 2023, 618(7967): 1033-1040.
- [7] Oh D Y, Fong L. Cytotoxic CD4⁺T cells in cancer: Expanding the immune effector toolbox [J]. *Immunity*, 2021, 54(12): 2701-2711.
- [8] Seung E, Xing Z, Wu L, et al. A trispecific antibody targeting HER2 and T cells inhibits breast cancer growth via CD4 cells [J]. *Nature*, 2022, 603(7900): 328-334.
- [9] Rota G, Niogret C, Dang A T, et al. Shp-2 is dispensable for establishing T cell exhaustion and for PD-1 signaling *in vivo* [J]. *Cell Rep*, 2018, 23(1): 39-49.
- [10] Qiu X Y, Hu D X, Chen W Q, et al. PD-L1 confers glioblastoma multiforme malignancy via Ras binding and Ras/Erk/EMT activation [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(5 Pt A): 1754-1769.
- [11] 肖萌, 赵景涛, 王军徽, 等. 四君子汤治疗肝癌的临床研究进展 [J]. *现代中药研究与实践*, 2023, 37(6): 94-98.
Xiao M, Zhao J T, Wang J H, et al. Clinical application research progress of Sijunzi Decoction in the treatment of liver cancer [J]. *Res Pract Chin Med*, 2023, 37(6): 94-98.
- [12] 沈怡, 马萍, 董邦健, 等. 四君子汤非多糖功效组分的体外人源肠、肝微粒体代谢研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(15): 4905-4919.
Shen Y, Ma P, Dong B j, et al. *In vitro* metabolism of non-polysaccharide components in Sijunzi Decoction by human intestinal and liver microsomes [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(15): 4905-4919.
- [13] 李凡, 张学林, 冯静茹, 等. 四君子汤含药血清通过抑制RhoA/Rac1/Cdc42通路影响卵巢癌细胞的上皮间质转化 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(8): 29-37.
Li F, Zhang X L, Feng J R, et al. Sijunzi Decoction containing serum affects the epithelial mesenchymal transition of ovarian cancer cells by inhibiting the Rho A/Rac1/Cdc42 pathway [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(8): 29-37.
- [14] 周昕欣, 杨关林. MiR-7介导加味四君子汤含药血清抑制B16恶性黑色素瘤细胞侵袭和相关蛋白MMP2和MMP9表达的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2015, 31(6): 114-117.
Zhou X X, Yang G L. Study of miR-7 mediated Plus Sijunzi Decoction containing serum inhibiting B16 malignant melanoma cell invasion and related protein MMP2 and MMP9 expression [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2015, 31(6): 114-117.
- [15] 黄晓燕, 马媛萍, 李桂贤, 等. 四君子汤含药血清调控hTERT, TRF1, Tankyrase表达及对UCAC的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(8): 128-133.
Huang X Y, Ma Y P, Li G X, et al. Effect of serum of Sijunzitang in regulating hTERT, TRF1 and tankyrase expressions and UCAC [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2018, 24(8): 128-133.
- [16] 李乡南, 杨宇峰, 郭胜男, 等. 四君子汤含药血清抑制胃癌细胞干样特性的作用及机制 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2022, 28(7): 1120-1125.
Li X N, Yang Y F, Guo S N, et al. Effects of serum

- containing Sijunzi Decoction on stemness properties of gastric cancer cells and its mechanism [J]. J Basic Chin Med, 2022, 28(7): 1120-1125.
- [17] Shao N, Xiao Y, Zhang J X, et al. Modified Sijunzi Decoction inhibits Epithelial-Mesenchymal transition of non-small cell lung cancer by attenuating AKT/GSK3 β pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. Front Pharmacol, 2022, 12: 821567.
- [18] 宋厚盼, 李如意, 魏艳霞, 等. 四君子汤含药血清上调 c-Myc 表达促进小肠上皮细胞迁移和增殖 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(22): 154-159.
- Song H P, Li R Y, Wei Y X, et al. Effect of sijunzi Tang in promoting migration and proliferation of small intestinal epithelial cells by up-regulating c-Myc expression [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2016, 22 (22): 154-159.
- [19] Geng Y C, Su S F, Cao L, et al. Effect of PD-1 inhibitor combined with X-ray irradiation on the inflammatory microenvironment and lung tissue injury in mice [J]. J Inflamm Res, 2022, 15: 545-556.
- [20] Xu W H, Cui J J, Wu L Q, et al. The role of PD-1/PD-L1 checkpoint in arsenic lung tumorigenesis [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2021, 426: 115633.
- [21] 白素杭, 杨晓悦, 张楠, 等. 肿瘤浸润淋巴细胞在实体肿瘤中作用的研究进展 [J]. 生物工程学报, 2019, 35(12): 2308-2325.
- Bai S H, Yang X Y, Zhang N, et al. Function of tumor infiltrating lymphocytes in solid tumors-a review [J]. Chin J Biotechnol, 2019, 35(12): 2308-2325.
- [22] 赵善东, 郑梦, 王燕, 等. 肿瘤浸润淋巴细胞(TILs)免疫疗法在实体瘤治疗中的研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2023, 31(21): 4055-4061.
- Zhao S D, Zheng M, Wang Y, et al. Research progress in tumor-infiltrating lymphocytes immunotherapy in solid tumors [J]. J Mod Oncol, 2023, 31(21): 4055-4061.
- [23] 吕苑. 四君子汤的药理研究和临床应用 [J]. 中医研究, 2012, 25(1): 76-78.
- Lü Y. Pharmacological study and clinical application of Sijunzi Decoction [J]. Tradit Chin Med Res, 2012, 25(1): 76-78.
- [24] 陈玉茹, 陈豪, 龚普阳, 等. 四君子汤防治结直肠癌的药理作用机制研究进展 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(12): 2671-2676.
- Chen Y R, Chen H, Gong P Y, et al. Research progress of pharmacological action and mechanism of Sijunzi Decoction in prevention and treatment of colorectal cancer [J]. Drug Eval Res, 2023, 46(12): 2671-2676.
- [24] 黄环环, 胡志祥, 吴兆中. 小陷胸合四君子汤加减辅助治疗对晚期肺癌化疗患者免疫功能和不良影响的影响 [J]. 四川中医, 2024, 42(3): 116-119.
- Huang H H, Hu Z X, Wu Z Z. Effect of xiaoxixiong and Sijunzi Decoction on immune function and adverse reactions in patients with advanced lung cancer undergoing chemotherapy [J]. J Sichuan Tradit Chin Med, 2024, 42(3): 116-119.
- [25] Martin C J, Datta A, Littlefield C, et al. Selective inhibition of TGF β 1 activation overcomes primary resistance to checkpoint blockade therapy by altering tumor immune landscape [J]. Sci Transl Med, 2020, 12 (536): eaay8456.
- [26] Itamura H, Shindo T, Yoshioka S, et al. Phosphorylated ERK1/2 in CD4 T cells is associated with acute GVHD in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. Blood Adv, 2020, 4(4): 667-671.

【责任编辑 兰新新】