

芪玉三龙汤通过 PTEN 通路诱导 M2/M1 巨噬细胞极化改善小鼠非小细胞肺癌肿瘤免疫微环境的机制研究

徐维升¹, 焦安男², 顾经华³, 王 萌⁴, 李 平¹, 李泽庚⁵, 童佳兵⁵, 陈 杨^{1*}

1. 安徽医科大学第一附属医院 中西医结合肿瘤科, 安徽 合肥 230022

2. 青岛市中医医院, 山东 青岛 266033

3. 安徽医科大学, 安徽 合肥 230032

4. 安徽中医药大学 科研技术中心, 安徽 合肥 230038

5. 安徽中医药大学第一附属医院, 安徽 合肥 230031

摘 要: 目的 探讨芪玉三龙汤(QYSLD)通过 PTEN 通路诱导 M2/M1 巨噬细胞极化的机制。方法 Lewis 肺癌细胞株(LLC)皮下接种于 C57BL/6 小鼠右前肢腋下构建非小细胞肺癌(NSCLC)动物模型, 将模型成功小鼠随机分成模型组和 QYSLD (80.48 g·kg⁻¹) 组, 肿瘤体积约 150 mm³ 开始 ig 给药, 每天给药 1 次, 连续给药 15 d, 模型组 ig 0.9% 氯化钠溶液。转录组学分析小鼠的移植瘤样本, 进行转录组测序及生物信息学分析; 流式细胞术检测肿瘤组织 M1 和 M2 型巨噬细胞、CD8⁺ T、CD4⁺ T 细胞的百分比。体外培养小鼠腹腔原代巨噬细胞, 40 ng·mL⁻¹ 的 IL-4 刺激构建 M2 型模型, 分为模型组、20% 空白血清组、20% QYSLD 含药血清(以 13.96 g·kg⁻¹ 的 QYSLD 每隔 12 h ig 给予大鼠 1 次, 持续 3 d, 制备含药血清)组、脂多糖(LPS, 阳性药, 20 ng·mL⁻¹) 组, 流式细胞仪检测细胞 CD206、活性氧(ROS) 水平, 实时荧光定量 PCR 法检测精氨酸酶-1(*Arg-1*)、CC 趋化因子配体 24 (*CCL24*)、趋化因子配体 17 (*CXCL17*)、白细胞介素(*IL*)-10、肿瘤坏死因子(*TNF*)- α 、*PTEN* 的 mRNA 相对表达水平; ELISA 法检测上清液中诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、IL-10、IL-12 和环氧合酶-2(COX-2) 水平; M2 型小鼠腹腔原代巨噬细胞设置为模型组、20% 空白血清组、20% QYSLD 含药血清组, PTEN 抑制剂组、QYSLD 含药血清+PTEN 抑制剂组, 与 CD4⁺ T、CD8⁺ T 细胞共培养, ELISA 法检测各组细胞上清中干扰素- γ (IFN- γ)、IL-2 的分泌水平; 流式细胞术检测 CD279、CD69、CD366 的表达情况。**结果** 体内实验中, 转录组测序结果表明, M1/M2 型肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)和 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞与 QYSLD 对 NSCLC 的治疗相关; QYSLD 降低了肿瘤组织的葡萄糖细胞内稳态($P<0.05$), CD4⁺ T 细胞、单核细胞、NK 细胞对碳水化合物分解代谢的依赖性较高。相对于模型组, QYSLD 组 NSCLC 组织内 M1/M2 相对增加(0.24 $\rightarrow$ 0.37), CD4⁺/CD8⁺ T 细胞的比值相对减少(0.39 $\rightarrow$ 0.20)。体外实验中, 相对于空白血清, 含有 QYSLD 的血清可以有效减少巨噬细胞表面 CD206 以及 M2 型巨噬细胞相关 *Arg-1*、*CCL24*、*CXCL17*、*IL-10* mRNA 的表达($P<0.05$ 、0.01、0.001), 并增加 M1 型巨噬细胞相关 *TNF- α* mRNA 及 *PTEN* mRNA 的表达($P<0.01$ 、0.001); 含药血清显著降低 IL-10 蛋白分泌($P<0.01$), 显著增加 M1 型巨噬细胞相关蛋白 IL-12、iNOS、COX-2 的分泌($P<0.01$)。与空白血清组比较, 在加入 QYSLD 后 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞均增加 IFN- γ 、IL-2 ($P<0.01$) 和 CD69 的表达, 二者被活化。与 20% 含药血清组相比, 加了 PTEN 抑制剂后, IL-2、IFN- γ ($P<0.01$)、CD69、CD279 表达下调。**结论** QYSLD 通过激活 PTEN 通路促进 TAMs 向 M1 型极化以及 T 细胞活化, 改善肿瘤免疫微环境。

关键词: 芪玉三龙汤; 非小细胞肺癌; 巨噬细胞极化; T 细胞; PTEN; 肿瘤免疫微环境

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)04-0820-13

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.04.004

Mechanism of Qiyu Sanlong Decoction inducing M2/M1 macrophage polarization improve immune microenvironment of non-small cell lung cancer in mice through PTEN pathway

XU Weisheng¹, JIAO Annan², GU Jinghua³, WANG Meng⁴, LI Ping¹, LI Zegeng⁵, TONG Jiabing⁵, CHEN Yang¹

收稿日期: 2024-12-04

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(82004314); 安徽省中医药传承创新科研项目(2024ZYYXH160); 安徽医科大学校科研基金立项资助项目(2023xkj128)

作者简介: 徐维升(1999—), 硕士研究生, 主要从事中西医结合防治恶性肿瘤研究。E-mail: 18214781731@163.com

*通信作者: 陈 杨, 博士, 副教授, 主要从事中西医结合防治恶性肿瘤研究。E-mail: ayyfycy@163.com

1. Oncology Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China
2. Qingdao Hospital of Chinese Medicine, Qingdao 266033, China
3. Anhui Medical University, Hefei 230022, China
4. Scientific Research & Experiment Center, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China
5. The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China

Abstract: Objective The purpose of this study was to explore the mechanism of Qiyu Sanlong Decoction (QYSLD) inducing M2 / M1 macrophage polarization through PTEN pathway. **Methods** Lewis lung cancer cell line (LLC) was subcutaneously inoculated into the right lower limb of C57BL/6 mice to establish a lung cancer animal model. The successfully modeled mice were randomly divided into the model group and the QYSLD (80.48 g·kg⁻¹) group. Intragastric administration was started when the tumor volume was approximately 150 mm³, once a day for 15 consecutive days. The model group was ig administered 0.9% sodium chloride solution. The tumor samples of the mice were subjected to transcriptome analysis, including transcriptome sequencing and bioinformatics analysis. The percentages of M1 and M2 type macrophages, CD8⁺ T cells, and CD4⁺ T cells in the tumor tissues were detected by flow cytometry. Mouse peritoneal primary macrophages were cultured *in vitro*, and the M2 type model was constructed by stimulating with 40 ng·mL⁻¹ IL-4. The groups included the model group, 20% blank serum group, 20% QYSLD-containing serum group (prepared by ig administering 13.96 g·kg⁻¹ QYSLD to rats once every 12 hours for 3 d), and the lipopolysaccharide (LPS, positive drug, 20 ng·mL⁻¹) group. The levels of CD206 and reactive oxygen species (ROS) in the cells were detected by flow cytometry. The relative mRNA expression levels of arginase-1 (*Arg-1*), CC chemokine ligand 24 (*CCL24*), chemokine ligand 17 (*CXCL17*), interleukin (*IL*)-10, tumor necrosis factor (*TNF*)- α , and *PTEN* were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS), IL-10, IL-12, and cyclooxygenase-2 (COX-2) in the supernatant were detected by ELISA. For the M2 type mouse peritoneal primary macrophages, the groups included the model group, 20% blank serum group, 20% QYSLD-containing serum group, PTEN inhibitor group, and QYSLD-containing serum + PTEN inhibitor group. They were co-cultured with CD4⁺ T and CD8⁺ T cells, and the secretion levels of interferon- γ (IFN- γ) and IL-2 in the supernatant of each group were detected by ELISA. The expression of CD279, CD69, and CD366 was detected by flow cytometry. **Results** In the *in vivo* experiments, the transcriptome sequencing results indicated that M1/M2 type tumor-associated macrophages (TAMs) and CD4⁺/CD8⁺ T cells were related to the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) by QYSLD. QYSLD decreased the intracellular glucose homeostasis of tumor tissues ($P < 0.05$), and CD4⁺ T cells, monocytes, and NK cells had a higher dependence on carbohydrate catabolism. Compared with the model group, the ratio of M1/M2 in the NSCLC tissues of the QYSLD group increased (0.24 $\rightarrow$ 0.37), and the ratio of CD4⁺/CD8⁺ T cells decreased (0.39 $\rightarrow$ 0.20). In the *in vitro* experiments, compared with the blank serum, the serum containing QYSLD could effectively reduce the expression of CD206 on the surface of macrophages and the mRNA expression of *Arg-1*, *CCL24*, *CXCL17*, and *IL-10* related to M2 type macrophages ($P < 0.05$, 0.01, 0.001), and increase the mRNA expression of *TNF*- α and *PTEN* related to M1 type macrophages ($P < 0.01$, 0.001). The drug-containing serum significantly reduced the secretion of IL-10 protein ($P < 0.01$) and significantly increased the secretion of M1 type macrophage-related proteins IL-12, iNOS, and COX-2 ($P < 0.01$). Compared with the blank serum group, after adding QYSLD, both CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells increased the expression of IFN- γ , IL-2 ($P < 0.01$), and CD69, indicating that they were activated. Compared with the 20% drug-containing serum group, after adding the PTEN inhibitor, the expressions of IL-2, IFN- γ ($P < 0.01$), CD69 and CD279 were down-regulated. **Conclusion** QYSLD promotes the polarization of tumor-associated macrophages to M1 type and the activation of T cells by activating the PTEN pathway, improves the tumor immune microenvironment.

Key words: Qiyu Sanlong Decoction; NSCLC; macrophage polarization; T cell; PTEN; tumor immune microenvironment

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一, 2022 年全球癌症最新统计, 其发病率和死亡率分别为 12.4%、18.7%, 均位居前列, 严重危害人类健康^[1], 其中非小细胞肺癌 (NSCLC) 最普遍^[2-3]。NSCLC 在治疗方面, 尽管有许多国际公认的治疗方案, 但其治疗效果仍然不足。传统的放疗和化疗对肿瘤细胞的杀伤不具有特异性, 还会影响正常细胞, 损害免疫系

统, 大大降低患者的生活质量^[4]。NSCLC 患者的前景有所改善, 部分归功于对肿瘤免疫微环境的深入研究, 其中靶向肿瘤微环境中的免疫炎症细胞已成为肿瘤治疗的一个重要研究领域。

巨噬细胞和 T 淋巴细胞作为肿瘤免疫微环境的主要免疫炎症细胞已成为肿瘤治疗的重要研究领域。肿瘤相关巨噬细胞 (TAMs) 具有较强的重塑

性,不同条件下能向不同类型进行转化。活化的巨噬细胞分为发挥抗肿瘤免疫作用的 M1 型和重塑肿瘤间质、促进肿瘤发展的 M2 型^[5]。T 淋巴细胞是抗肿瘤免疫的主要执行者,可通过识别和杀死肿瘤细胞来达到抗癌作用^[6]。

中医药通过改善肿瘤免疫微环境的病理特性从而起到对肿瘤细胞的“拨乱反正”,芪玉三龙汤(QYSLD)作为治疗肺癌的传统中药复方,具有“扶正解毒通络”的功效,前期研究已经证实了其成分的药理学特性,如对免疫系统的调节作用、抗炎和抗肿瘤效应等^[7-11]。团队前期发现 QYSLD 可能通过促进 TAMs 向 M1 型极化发挥抗 NSCLC 的作用,因此,本研究拟从肿瘤免疫微环境的角度,探究 QYSLD 对 NSCLC 中 TAMs 极化和 T 淋巴细胞活化的影响及其潜在的作用机制,为中医“扶正抗癌”理论及 QYSLD 的临床推广提供参考。

1 材料

1.1 细胞

Lewis 肺癌细胞株(LLC),来源于中国科学院细胞库。

1.2 动物

雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠,鼠龄为 6~8 周,80 只,体质量为(20±2)g;雄性 SD 大鼠,鼠龄 6~8 周,20 只,体质量为(200±10)g,均购自常州卡文斯实验动物有限公司,实验动物生产许可证号 SCXK(苏)2011-0003。饲养在 SPF 条件下,饲养温度为(24±2)℃,相对湿度 70%,并提供充足的灭菌饲料和饮用水。依照《实验动物管理条例》进行动物实验操作,所有动物研究经安徽中医药大学动物伦理委员会授权(批准号 AHUCM-mouse-2019013),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 药物与主要试剂

QYSLD 由黄芪(30 g)、玉竹(10 g)、天龙(6 g)、地龙(6 g)、龙葵(20 g)、白花蛇舌草(20 g)、薏苡仁(20 g)、泽漆(6 g)、莪术(10 g)及川贝母(6 g)组成,中药饮片来源于安徽中医药大学第一附属医院,并经中药房鉴定并出具合格报告,符合《中国药典》规定。

RPMI 1640 培养基(批号 SH30027.01)、胎牛血清(批号 SH30070.03)购自美国 Hyclone 公司;胰蛋白酶(批号 A003702-0001)、cDNA 引物购自上海生工生物工程股份有限公司;二甲基亚砷

(DMSO,批号 ST2336)、蛋白酶磷酸酶(PTEN)抑制剂 VO-Ohpic trihydrate 混合物(批号 P1056)、RIPA 裂解液(批号 P0013E-1)、苯甲基磺酰氟(PMSF,批号 ST505)购自上海碧云天生物技术有限公司;磷酸盐缓冲液(PBS)粉末(批号 P1010-2L)、青霉素/链霉素溶液(批号 15140-122)、戊巴比妥钠(批号 BC1040)、红细胞裂解液(批号 GL0192)、ELISA 检测试剂盒(批号 BSEM-016-96T、BSEM-013-96T、YC-30337、ZK-5146)、总 RNA 提取试剂盒(批号 BL1179A)、逆转录试剂盒(批号 K1622)、荧光定量 PCR 试剂盒(批号 C6028)、DEPC 水(批号 PM11649)购自北京兰杰柯科技有限公司;Trizol(批号 15596-018)购自美国 Invitrogen 公司;0.4%台盼蓝染色液(批号 PB180423)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;anti-mouse-FITC-F4/80(批号 70AM048005)、anti-mouse-PE-CD11b(批号 B2018137)、anti-mouse-APC-CD16/32(批号 70AM01601100)、anti-mouse-APC-CD206(批号 SZB13607)、anti-mouse-PE-PD-L1(批号 SZB18013)、anti-mouse-PE-Cy7-Galectin-9(批号 BS2417)、anti-mouse-FITC-CD4(批号 100405)、anti-mouse-FITC-CD8(批号 100701)抗体购自美国 Biolegend 公司;anti-mouse-APC-CD155(批号 B335690)、anti-mouse-APC-TIGIT(批号 B217242)抗体购自美国 eBioscience 公司;白细胞介素(IL)-4(批号 E-21403)购自美国 Peprotech 公司。

1.4 实验仪器

W200IR 型 CO₂ 细胞培养箱(美国 SIM 公司);-80℃超低温冰箱(美国 Thermo 公司);恒温水浴锅(德国 LAUDR 公司);TS-1000 型水平摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);Leica DMI1 型倒置生物显微镜(南京江南永新光学有限公司);实时荧光定量 PCR(qRT-PCR, Applied Biosystems™ QuantStudio);Allegra 64R 型低温高速离心机、流式细胞仪(美国 BACKMAN COULTER 公司);OptiClean 1300 型洁净工作台(上海利康精密科技有限公司)。

2 方法

2.1 QYSLD 的制备

取黄芪(30 g)、玉竹(10 g)、天龙(6 g)、地龙(6 g)、龙葵(20 g)、白花蛇舌草(20 g)、薏苡仁(20 g)、泽漆(6 g)、莪术(10 g)及川贝母(6 g),在药材中加入 1.34 L 蒸馏水浸泡 1 h,

武火煮沸后文火慢煎 90 min。将提取液通过 4 层纱布滤过，残渣再加入 1.07 L 蒸馏水，武火煮沸后文火慢煎 40 min，然后通过 4 层纱布再次滤过。将 2 次煎液在 50 °C 真空中混合浓缩至 2 g·mL⁻¹，制得 QYSLD。参考课题组前期研究利用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱 (UPLC-QTOF-MS) 的数据非依赖性采集 (DIA) 技术，结合靶向采集方法分析 QYSLD，共识别出 166 种化学成分，其中皂苷类 22 种、生物碱类 13 种、黄酮类 27 种、萜类 32 种、氨基酸类 20 种、苯丙素类 16 种、有机酸类 9 种、甾醇类 6 种、葱醌类 6 种、其他类 15 种^[5]。QYSLD 中黄芪补肺益气，龙葵解毒抗癌，共为君药，其主要化学成分为皂苷类黄芪甲苷和生物碱类澳洲茄碱，经高效液相色谱高分辨质谱 (HPLC-HRMS) 测定，2.142 mg·mL⁻¹ QYSLD 药液中黄芪甲苷质量分数为 2.666 5%、澳洲茄碱质量分数为 0.002 4%。

2.2 QYSLD 含药血清的制备

中药成分复杂，代谢较慢，大鼠血清可保留更多活性成分；且需大量血清，大鼠更经济；基于“3R 原则”，选择大鼠制备血清^[12-13]。6~8 周龄的健康 SD 大鼠 20 只，体质量 (200±10) g，随机分为对照组和 QYSLD 组，每组 10 只，实验前大鼠禁食 8 h。对照组 ig 0.1 mL·kg⁻¹ 的 0.9% 氯化钠溶液，QYSLD 组以 13.96 g·kg⁻¹ (临床等效剂量)^[14-15] 的 QYSLD 每隔 12 h ig 1 次，持续 3 d。末次给药 1 h 后，大鼠由 2.5% 戊巴比妥钠 (5 mL·kg⁻¹) 麻醉，无菌条件下腹主动脉取血，3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min 分离血清，56 °C 水浴中灭活 30 min，经 0.22 μm 过滤器除菌，分装保存于 -80 °C 冰箱备用，分别得到空白血清及含药血清。

2.3 小鼠肺癌模型的建立和体内实验

将 1×10⁶ 个 Lewis 肺癌细胞株注射到小鼠右前肢腋下间隙建立移植瘤模型，建模后 5 d 观察小鼠皮下，若出现米粒大小肿物，将每组中随机 1 只小鼠的移植瘤取出进行病理检测，观察是否均为癌细胞，以此来判断建模是否成功^[16-17]。依据课题组前期研究结果^[18]，将模型成功小鼠随机分成模型组和 QYSLD (80.48 g·kg⁻¹) 组，肿瘤体积约 150 mm³ 开始 ig 给药，每天给药 1 次，连续给药 15 d，模型组 ig 0.9% 氯化钠溶液。

2.4 转录组测序技术 (RNA-seq)

将模型组和 QYSLD 组的小鼠肿瘤组织各取 3

只，使用 Trizol 试剂提取部分肿瘤组织 RNA，进行 RNA-seq，使用 QuantSeq 3' mRNA-Seq 文库制备试剂盒从分离的总 RNA 中制备文库。使用高输出 V2.5 试剂盒在 Illumina HiSeq 上对条形码文库进行配对末端测序。对测序的 reads 进行适配器序列裁剪，对低复杂度或低质量序列进行屏蔽，reads 使用默认参数的 STAR 与 mm10 参考基因组进行对齐。

2.5 生物信息学分析

利用 DESeq2 R 包分析移植瘤小鼠模型肺肿瘤 RNA-seq 数据得出差异表达基因^[19]。从 TCGA 数据库 (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) 中获取非小细胞肺鳞癌和非小细胞肺腺癌患者的 RNA-seq 数据，用 Metaseape 进行差异表达基因的富集分析^[20]。用于人或鼠免疫浸润分析的参考数据分别是从小鼠免疫细胞的测序数据获取，用 Cibersortx 进行免疫浸润分析^[23]，用多因素 Cox 回归寻找影响 NSCLC 患者预后的免疫细胞。相关性分析揭示免疫细胞之间的关系。

2.6 流式细胞仪检测表面抗原表达

收集小鼠的部分肿瘤组织制成单个细胞悬液，细胞样本经 PBS 清洗处理，离心沉淀细胞，加入 100 μL 含流式抗体的染色缓冲液，根据不同组合加入荧光抗体染色细胞，4 °C 避光孵育 30 min，1 200 r·min⁻¹ 离心 5 min，弃上清，染色缓冲液洗涤 2 遍，200 μL 染色缓冲液重悬后上流式细胞仪检测，同时做单阳管及阴性管用于补偿调节，检测 M1 和 M2 型巨噬细胞、CD8⁺ T、CD4⁺ T 细胞的百分比。

2.7 小鼠腹腔原代巨噬细胞的获取

将小鼠麻醉后脱颈处死，灭菌消毒处理后，移入超净台，仰卧固定小鼠。小鼠腹部剪开小口，将 10 mL RPMI 1640 缓缓注入腹腔，轻柔腹部 1 min，抽出培养基，1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min，弃上清，重悬细胞，台盼蓝染色法计数，将细胞调整成浓度 2×10⁶ 个·mL⁻¹ 加到 6 孔平底培养板中，每孔 3 mL。置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养 2 h 后换液，培养基洗 2 次，弃去未黏附孔板壁的细胞，贴壁细胞即为单层的小鼠腹腔巨噬细胞。

2.8 构建 M2 型 TAMs 模型

按照“2.7”项方法获得的巨噬细胞，在培养 8~12 h 后的体系中，加入 40 ng·mL⁻¹ 的 IL-4 刺激原代巨噬细胞 48 h，对照组不加药。流式细胞仪检测 CD206 表达。

2.9 细胞加药实验

按照“2.7”项方法获得的巨噬细胞，分为模型组、20%空白血清组、20%QYSLD 含药血清组（前期研究有效剂量^[14, 24]）、脂多糖（LPS，阳性药，20 ng·mL⁻¹）组，各组在按照“2.8”项方法造模的同时，给予药物干预 24 h。

2.10 流式细胞仪检测 CD206、活性氧（ROS）

0.25%胰酶消化、离心、洗涤收集各组细胞，加入 5 mL 红细胞裂解液吹打混匀，静置 5 min，1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min，弃上清；加入 5 mL PBS 混匀，70 目筛网滤过，1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min；加入抗体 CD206，4 ℃ 避光孵育 30 min，用流式细胞

仪检测 CD206 的含量。以荧光素 DCFH-DA 为探针，检测培养后各组细胞上清 ROS 的含量。

2.11 qRT-PCR 分析

使用 Trizol 试剂提取各组细胞 RNA，按逆转录试剂盒逆转录成 cDNA。以 cDNA 为扩增模板进行 qRT-PCR 扩增，反应总体积为 10 μL，反应条件为：95 ℃ 1 min；95 ℃ 20 s，60 ℃ 1 min，40 个循环。以 β-actin 为内参，2^{-ΔΔCt} 方法分析精氨酸酶-1 (*Arg-1*)、CC 趋化因子配体 24 (*CCL24*)、趋化因子配体 17 (*CXCL17*)、*IL-10*、肿瘤坏死因子 (*TNF*) -α、*PTEN* 的相对表达水平。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	引物序列(5'→3')	
<i>TNF-α</i>	F: CTAGTGGTGCCAGCCGATGGGTT	R: CAAATCGGCTGACGGTGTGGGTG
<i>PTEN</i>	F: TGATGAAGCTCGTCAGGCAGAAG	R: GCAGGTCATTTAACCAAGTGGTGC
<i>IL-10</i>	F: CTTACTGACTGGCATGAGGATCA	R: GCAGCTCTAGGAGCATGTGG
<i>Arg-1</i>	F: TTGGCTTGAGAGACGTGGAC	R: GTGCCAGTAGCTGGTGTGAA
<i>CXCL17</i>	F: CGAGAGTGCTGCCTGGATTACT	R: GGTCTGCACAGATGAGCTTGCC
<i>CCL24</i>	F: ACATCATCCCTACGGGCTCT	R: TGTACCTCTGGACAGCCACA
<i>β-actin</i>	F: AACAGTCCGCCTAGAAGCAC	R: CGTTGACATCCGAtAAAGACC

2.12 ELISA 法检测诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、IL-10、IL-12 和环氧合酶-2 (COX-2)

0.25%胰酶消化、离心、洗涤收集各组作用的细胞上清，ELISA 试剂盒检测 iNOS、IL-10、IL-12 和 COX-2 的水平。

2.13 流式细胞仪分选 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞

颈椎脱臼法处死小鼠，浸泡于 75%的乙醇中消毒 5 min 后，再将其转移至超净工作台的无菌培养皿中，无菌取出脾脏放入事先准备好的培养皿中，利用无菌的磨砂载玻片轻柔研磨脾脏直至细胞均已研出，200 目的尼龙网滤过所得细胞悬液，4 ℃、1 200 r·min⁻¹ 离心 5 min，弃上清，加入 5 mL 1×红细胞裂解液，混匀，室温放置 5 min，加入 5 mL RPMI 1640 培养液洗涤 1 遍，4 ℃ 1 200 r·min⁻¹ 离心 5 min，弃上清，用 20 mL 的 PBS 培养基重悬细胞，将其分成 2 份，每份 10 mL，分别加入 anti-mouse CD4、anti-mouse CD8 抗体，4 ℃ 避光孵育 30 min，加入 PBS 洗涤，4 ℃、1 200 r·min⁻¹ 离心 5 min，弃上清，再重复 PBS 洗涤 1 次，最后重悬于流式管中通过流式分选仪进行 CD4⁺ T、CD8⁺ T 细胞的分选。

2.14 M2 型 TAMs 与 CD4⁺ T、CD8⁺ T 细胞共培养

按照“2.8”项方法获得的巨噬细胞以 2×10⁶ 个·mL⁻¹ 浓度接种于 6 孔板中，每孔 1 mL，分组设置为模型组、空白血清组（20%空白血清）、QYSLD 含药血清组（20% QYSLD 含药血清），PTEN 抑制剂组（VO-Ohpic trihydrate，40 μL）、QYSLD 含药血清+PTEN 抑制剂组（20% QYSLD 含药血清+VO-Ohpic trihydrate 40 μL）。在按照“2.8”项方法造模的同时，给予血清和抑制剂处理 4 h 后，将流式细胞仪分选的 CD4⁺ T、CD8⁺ T 细胞以 2×10⁶ 个·mL⁻¹ 分别加入 1 mL 至上述 M2 型 TAMs 培养体系中，在 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。ELISA 法检测各组细胞上清中 IFN-γ、IL-2 的分泌水平；流式细胞术检测 CD279、CD69、CD366 的表达情况。

2.15 糖代谢途径分析

鉴于肿瘤组织高糖代谢的特点，QYSLD 诱导的碳水化合物分解代谢过程的改变值得重视。在小鼠肿瘤组织的 RNA-seq 结果中发现糖酵解相关基因 Gapdh 在加药组中表达下调 (log₂FC=-3.8, P=0.000 4)，说明 QYSLD 可以抑制肿瘤的糖代谢。使

用 GSVA 算法对本研究中 RNA-seq 结果进行葡萄糖相关途径打分。从 GEO 数据库中筛选出 NSCLC 患者外周血 csRNA-seq 数据集 GSM3635372, 并对其进行分析。

2.16 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行统计分析, 结果使用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多样本间比较使用单因素方差分析, 两样本间比较使用 SNK- q 检验。

3 结果

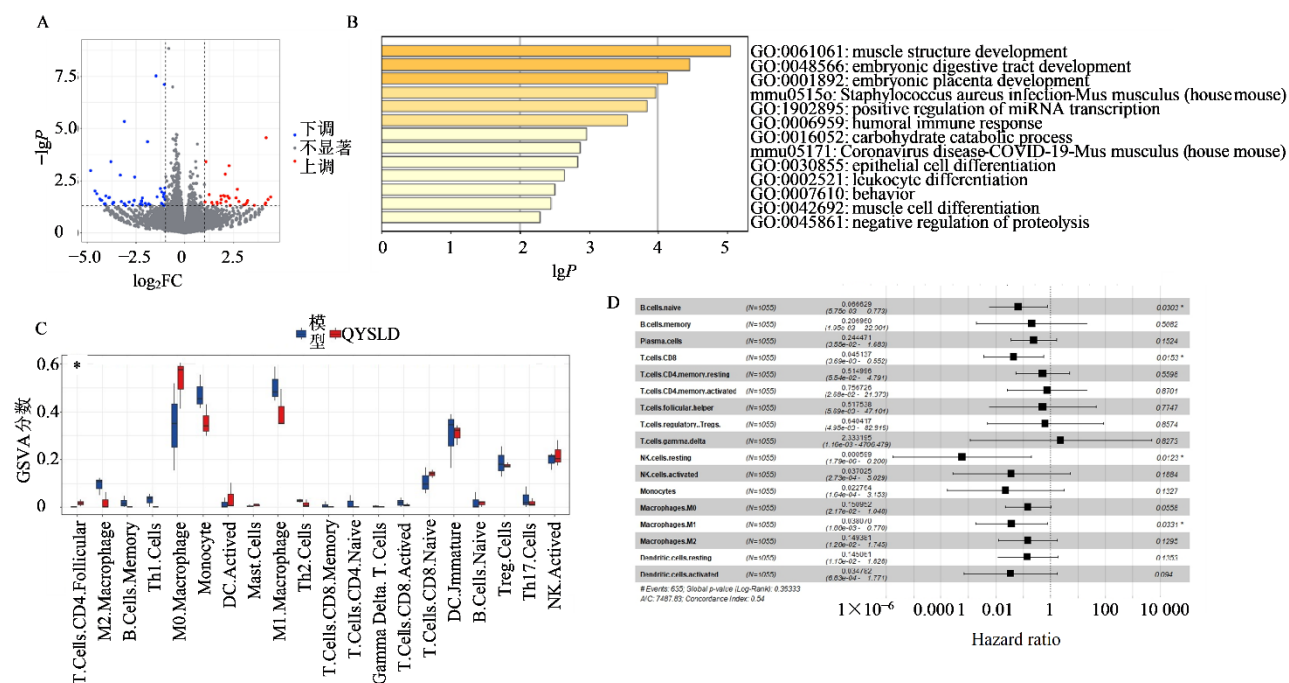
3.1 QYSLD 重塑 NSCLC 免疫微环境

将模型组和 QYSLD 组的小鼠肿瘤组织各取 3 组进行 RNA-seq, 并用 DESeq2 包进行差异表达分析 (图 1-A)。通过对 87 个差异表达基因进行 Metascape 富集分析, 结果显示 miRNA 阳性转录、体液免疫反应、碳水化合物分解代谢过程、上皮细胞分化、白细胞分化、阴性蛋白溶解等生物途径被显著富集 ($P < 0.01$, 图 1-B)。免疫反应一直是肿瘤治疗过程中被关注的重点, Ciphersortx 算法被用来对小鼠肿瘤进行免疫浸润分析, 结果表明在进行 QYSLD 治疗后 $CD4^+$ 滤泡 T 细胞的浸润水平增加 (图 1-C)。滤泡 T 细胞数量增加对于一般癌症 (Tfh

细胞来源或 B 细胞相关恶性肿瘤除外) 来说是良好预后的表现, 该细胞与 $CD8^+$ T 细胞之间的串扰可以增强抗肿瘤免疫^[25]。结果表明, QYSLD 可以在免疫层面上抑制 NSCLC 的进展。

为了进一步确定 NSCLC 组织中的免疫互作关系, TCGA 数据库中非小细胞肺鳞癌与非小细胞肺腺癌患者的 RNA-seq 数据以及临床数据被用来进行免疫浸润分析和多因素 Cox 回归分析, 结果表明幼稚 B 细胞、 $CD8^+$ T 细胞、静息自然杀伤 (NK) 细胞和 M1 型巨噬细胞占比是 NSCLC 患者良好预后的重要因素 (图 1-D)。由于样本量较小, 在小鼠的肿瘤内仅显示 $CD4^+$ 滤泡 T 细胞占比与单核细胞占比呈负相关 ($r = -0.83$, $P < 0.05$) (图 2-A)。在 TCGA 数据库中 $CD8^+$ T 细胞占比和 M1 细胞占比呈正相关 ($r = 0.31$, $P < 0.001$) (图 2-B)。因此, M1/M2 型 TAMs 和 $CD4^+$ / $CD8^+$ T 细胞与 QYSLD 对 NSCLC 的治疗相关。

为了探究 QYSLD 如何改变 NSCLC 肿瘤免疫微环境, 流式细胞术被用来测算不同类别 TAMs 和 T 细胞的占比。结果表明 (图 3、表 2), 与模型组比较, QYSLD 可以诱导 M1、M2 型 TAMs 占比显



A-差异表达基因; B-Metascape 富集分析; C-小鼠肿瘤组织免疫浸润分析, 与对照组比较: $*P < 0.05$; D-TCGA 数据库中 Cox 回归分析筛选免疫细胞。

A-Differentially expressed genes; B-Metascape enrichment analysis; C-Immuneinfiltration analysis of mouse tumor tissues, $*P < 0.05$ vs control group;

D-Screening of immune cells by Cox regression analysis in TCGA database.

图 1 生物信息学分析

Fig. 1 Bioinformatics analysis

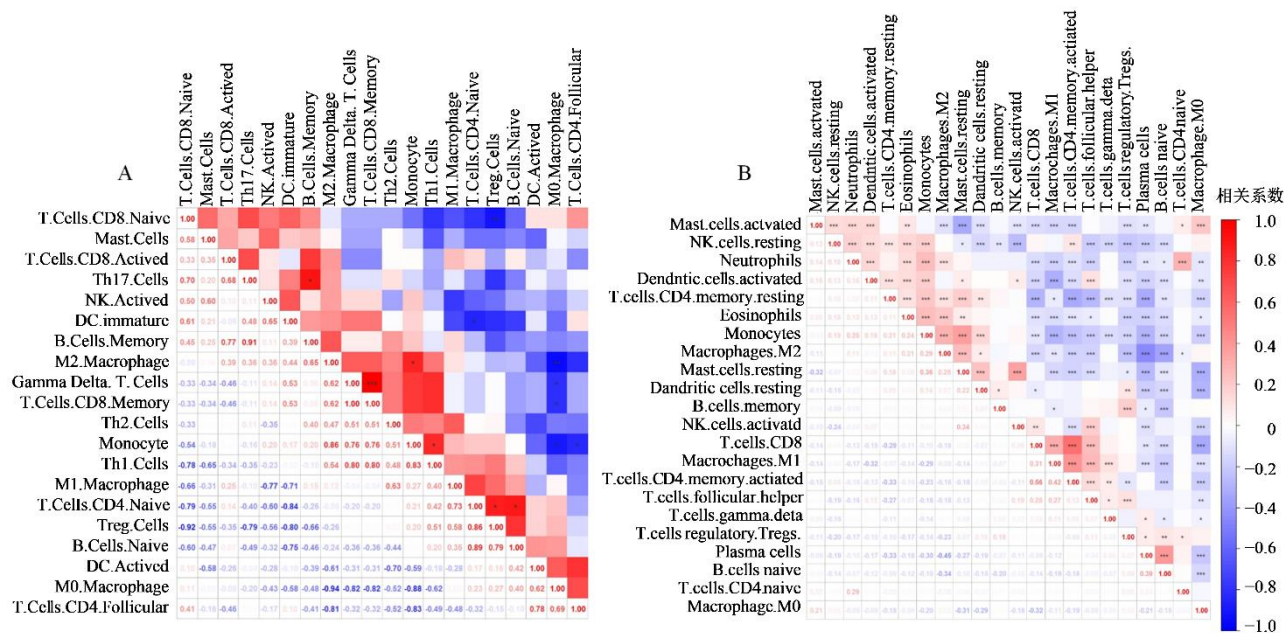


图 2 小鼠肿瘤组织免疫细胞(A)、人 NSCLC 浸润免疫细胞(B)相关性分析

Fig. 2 Correlation analysis of mouse tumor tissue immune cell (A) and human NSCLC infiltration immune cell (B)

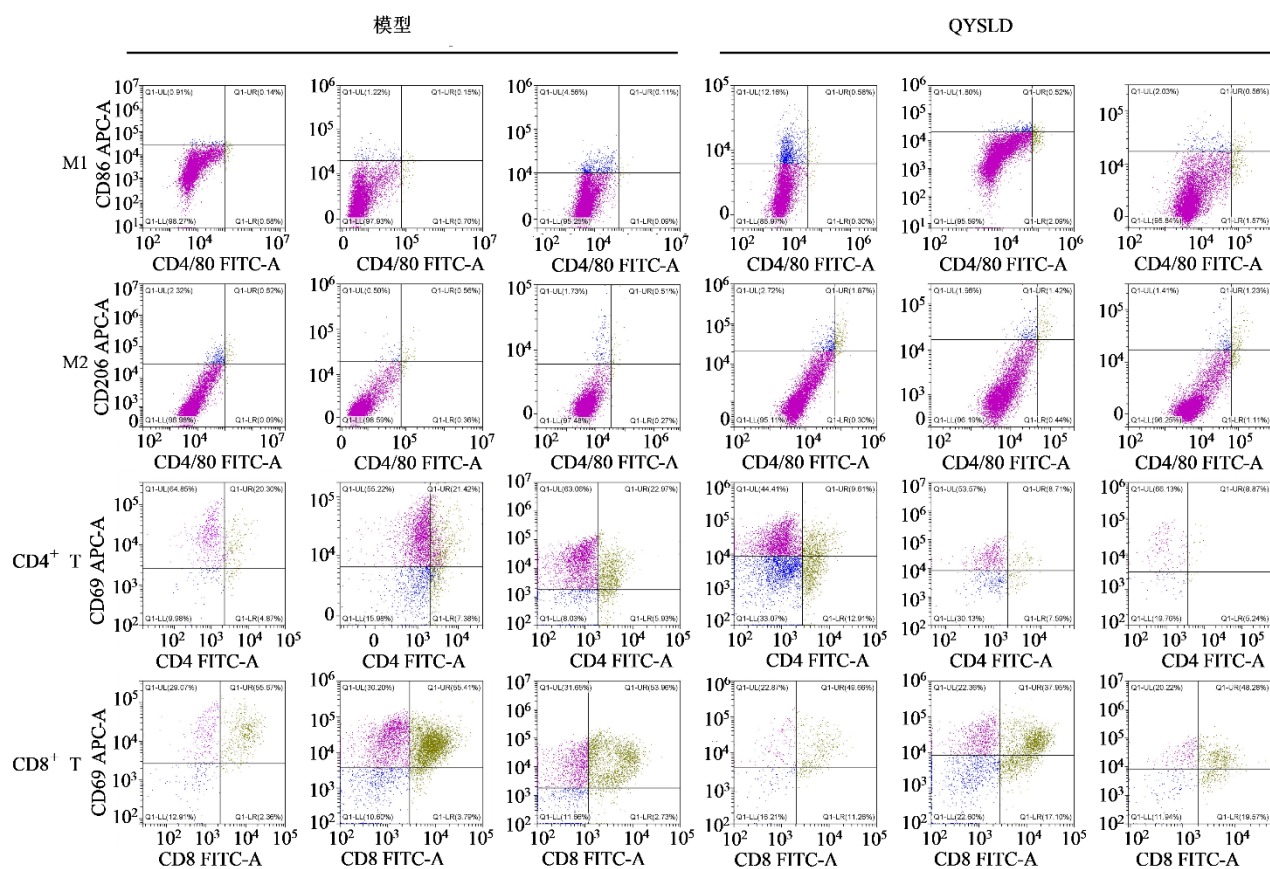


图 3 流式细胞术检测小鼠肿瘤组织活化的 M1 型、M2 型巨噬细胞和 CD4⁺ T、CD8⁺ T 细胞百分比

Fig. 3 Percentage of activated M1-type macrophages, and M2-type macrophages and CD8⁺ T, CD4⁺ T cells of mouse tumor tissues detected by flow cytometry

表 2 小鼠肿瘤组织活化的 CD8⁺ T 细胞、CD4⁺ T 细胞、M1 型巨噬细胞、M2 型巨噬细胞百分比($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table 2 percentage of activated CD8⁺ T cell, CD4⁺ T cell, M1 macrophages and M2 macrophages in tumor tissue of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	M1 型巨噬细胞/% (F4/80 ⁺ /CD86 ⁺)	M2 型巨噬细胞/% (F4/80 ⁺ /CD206 ⁺)	CD4 ⁺ T 细胞/% (CD4 ⁺ /CD69 ⁺)	CD8 ⁺ T 细胞/% (CD8 ⁺ /CD69 ⁺)
模型	0.13±0.02	0.56±0.06	21.56±1.34	55.01±0.92
QYSLD	0.55±0.03***	1.51±0.33**	9.06±0.48***	45.30±6.40

与模型组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ 。
** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs model group.

著增加 ($P<0.01$ 、 0.001), 活化 CD4⁺ T 细胞占比显著减少 ($P<0.001$), 活化 CD8⁺ T 细胞占比呈减少趋势。由于在肺癌早期, 巨噬细胞 M1 样和 M2 样基因特征的表达并不相互排斥^[26], 所以能够观察到 2 种极化类型的 TAMs 都表现为占比增加。然而, 相对于模型组, QYSLD 组 NSCLC 组织内 M1/M2 相对增加 ($0.24 \rightarrow 0.37$), CD4⁺/CD8⁺ T 细胞的比值相对减少 ($0.39 \rightarrow 0.20$)。这表明 QYSLD 可以诱导 NSCLC 组织内 TAMs 向 M1 型极化, T 细胞向 CD8⁺ T 细胞方向分化。综合来看, 影响 TAMs 极化和 T 细胞分化是 QYSLD 治疗 NSCLC 的重要方式。

3.2 QYSLD 诱导 M2 型巨噬细胞向 M1 型极化

由于在肿瘤微环境中, 诱导巨噬细胞极化的因素很多^[27]。为了确定 QYSLD 能否独立诱导巨噬细胞向 M1 方向极化, 将小鼠腹腔内的巨噬细胞提取出来并利用 IL-4 诱导其向 M2 极化 (图 4-A)。相对于空白血清, 含有 QYSLD 的血清可以有效减少巨噬细胞表面 CD206 以及 M2 型巨噬细胞相关 *Arg-1*、*CCL24*、*CXCL17*、*IL-10* mRNA 的表达 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 即减少了 M2 型巨噬细胞的数量 (图 4-B、D), 并增加 M1 型巨噬细胞相关 *TNF- α* mRNA 及 *PTEN* mRNA 的表达 ($P<0.01$ 、 0.001)。与空白血清组比较, 含药血清显著降低 IL-10 蛋白分泌 ($P<0.01$), 显著增加 M1 型巨噬细胞相关蛋白 IL-12、iNOS、COX-2 的分泌 ($P<0.01$)^[28] (图 4-C)。结果表明 QYSLD 具有单独诱导巨噬细胞向 M1 方向极化的能力。

3.3 QYSLD 通过 PTEN 通路诱导巨噬细胞极化介导 T 细胞活化

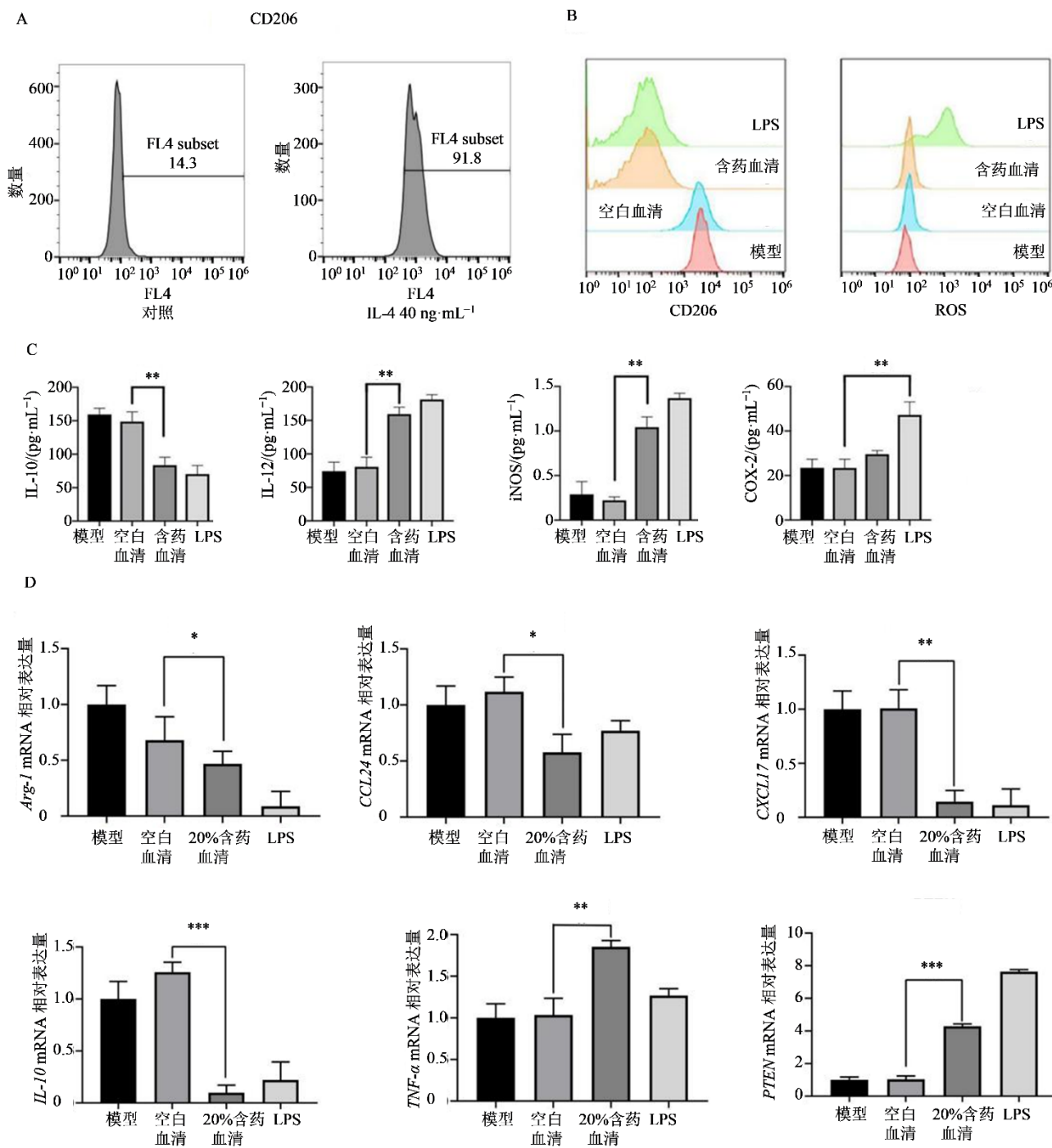
信号转导及转录激活 3 (STAT3) 因子是 STAT 家族成员, 在 TAMs 极化为 M2 型的过程中起着重要作用。据文献报道^[29], 在 NSCLC 中, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 可以磷酸化 STAT3, 使

其达到最大转录活化状态, 促进 STAT3 对靶基因的转录。PTEN 作为一种抑癌基因, 其与 mTOR 表达呈负相关^[30]。

为进一步验证 QYSLD 通过激活 PTEN 通路发挥抗肿瘤作用, 并且由于 CD8⁺ T 细胞是 NSCLC 预后的独立影响因素 (图 1-D), 巨噬细胞的抗原提呈功能可以看作 T 细胞的上游^[31], 将 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞分别与巨噬细胞共培养, 观察加药前后的改变。结果表明 (图 5), 与空白血清组比较, 在加入 QYSLD 后 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞均增加 IFN- γ 、IL-2 ($P<0.01$) 和 CD69 的表达, 二者被活化。与 20% 含药血清组相比, 加了 PTEN 抑制剂后, IL-2、IFN- γ ($P<0.01$)、CD69、CD279 表达下调。结果表明, QYSLD 可能通过 PTEN 通路诱导巨噬细胞极化进而介导 T 细胞活化。除此之外, 加药后 T 淋巴细胞免疫球蛋白黏蛋白 3 (TIM-3) (CD366) 在 T 细胞表面的表达减少, 表明肿瘤微环境中失调的 T 细胞可以得到控制, 改善 NSCLC 患者的预后^[32]。然而, T 细胞的程序性死亡受体 1 (PD-1) (CD279) 在 QYSLD 加入后却表达增加, 这解释了在用药后 T 细胞占比减少的结果 (图 3)。

3.4 QYSLD 抑制细胞糖代谢

使用 GSVA 算法对样本进行葡萄糖相关途径打分, 结果发现 QYSLD 降低了肿瘤组织的葡萄糖细胞内稳态 ($P<0.05$) (图 6-A)。结果提示患者服用 QYSLD 后, 其葡萄糖耐受能力将会被抑制, 长期服用的患者的血糖可能会发生一定水平的增加。由于口服 QYSLD 会增加血清中的药物水平, 所以血清内免疫细胞代谢的研究是有必要的。从 GEO 数据库中筛选出了 NSCLC 患者外周血 csRNA-seq 数据集 GSM3635372, 并对其进行分析, 结果显示 CD4⁺ T 细胞、单核细胞、NK 细胞对碳水化合物分解代谢的依赖性较高 (图 6-B、C), 受 QYSLD 的影响较大。



A-流式细胞术检测 IL-4 刺激的小鼠腹腔巨噬细胞表面特异性 CD206 表达水平; B-流式细胞术检测各组小鼠腹腔巨噬细胞表面特异性 CD206 和胞质 ROS 表达水平; C-小鼠腹腔巨噬细胞上清中 IL-10、IL-12、iNOS、COX-2 分泌水平; D-*Arg-1*、*CCL24*、*CXCL17*、*IL-10*、*TNF- α* 、*PTEN* 基因的 mRNA 表达水平; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

A-Flow cytometry detection of surface-specific CD206 expression levels in mouse peritoneal macrophages stimulated with IL-4; B-Flow cytometry detection of surface-specific CD206 and cytoplasmic ROS expression levels in mouse peritoneal macrophages; C- IL-10, IL-12, iNOS, and COX-2 secretion levels in supernatants of mouse peritoneal macrophages; D-mRNA expression levels of *Arg-1*, *CCL24*, *CXCL17*, *IL-10*, *TNF- α* , and *PTEN* genes; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

图 4 QYSLD 诱导 M2 型巨噬细胞向 M1 型极化 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 4 QYSLD induces polarization of M2 macrophages towards M1 macrophages ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

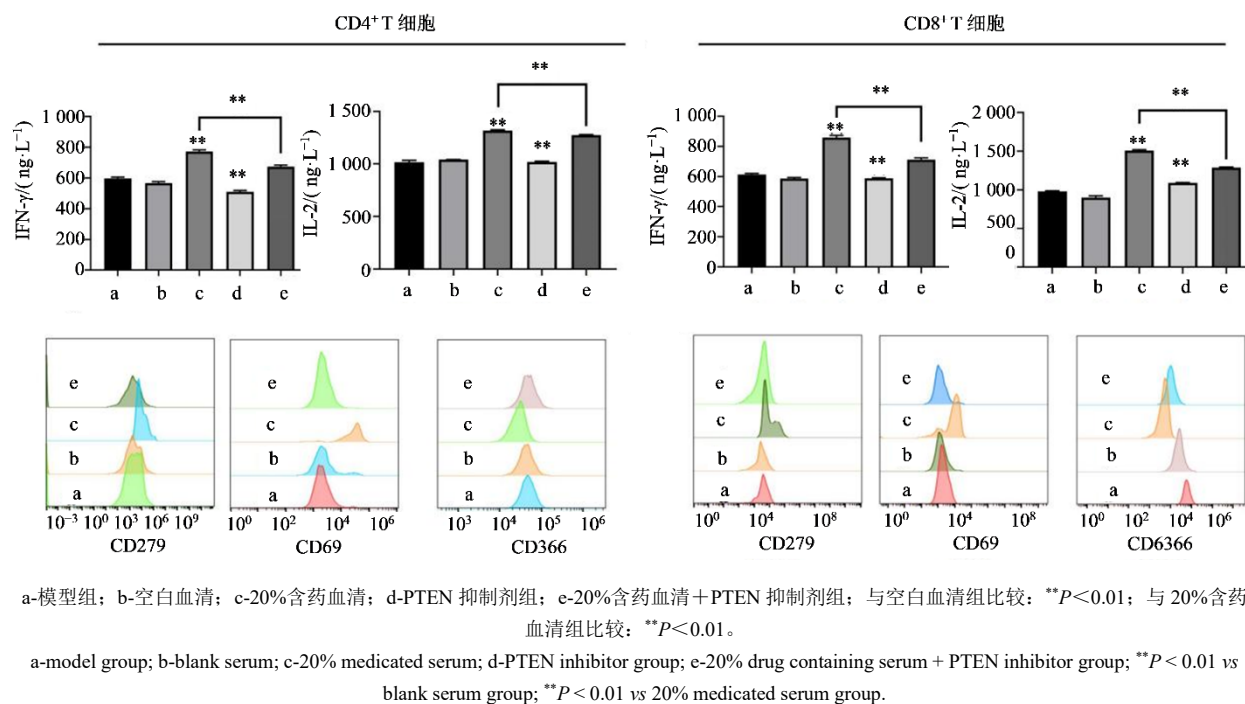


图 5 QYSLD 通过 PTEN 通路诱导巨噬细胞极化介导 T 细胞活化 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 5 QYSLD induces macrophage polarization and mediates T cell activation through PTEN pathway ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

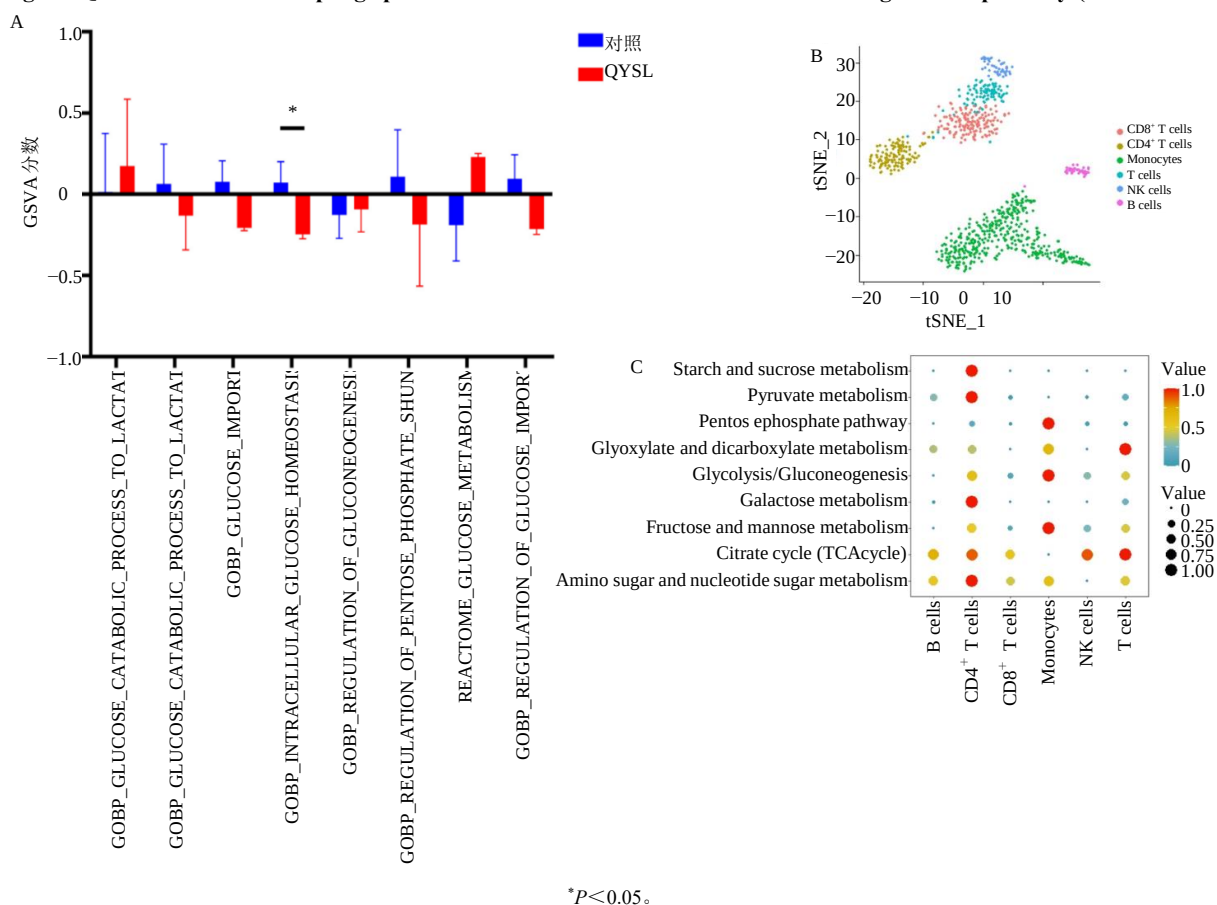


图 6 小鼠肿瘤组织葡萄糖代谢相关通路 GSEA 评分 (A) 和 NSCLC 患者外周血单细胞代谢分析 (B、C)

Fig. 6 GSEA score of glucose metabolism-related pathways in mouse tumor tissues (A) and metabolic analysis of peripheral blood single cells in patients with NSCLC (B, C)

4 讨论

与化学药不同的是,中药往往因其复杂的组成成分而增加了研究难度。QYSLD 作为一种治疗 NSCLC 的中药处方,应用于临床已 20 余年。本研究从肿瘤免疫微环境入手,对 QYSLD 的抗肿瘤机制进行研究,表明 QYSLD 可以通过 PTEN 信号通路诱导巨噬细胞向 M1 型极化以及促进 T 细胞活化,来发挥其抗肿瘤功能。

PTEN 作为关键的肿瘤抑制因子,其表达上调可通过拮抗 mTOR 通路抑制 STAT3 的磷酸化。本实验中,QYSLD 显著下调 Arg-1 和 IL-10 的表达,同时上调 PTEN 及 M1 相关因子(如 TNF- α 、iNOS)表达,提示 PTEN 的激活可能通过抑制 mTOR/STAT3 信号轴重塑巨噬细胞表型。

除巨噬细胞极化外,PTEN 通路对 T 细胞功能的调控亦值得关注。本研究显示,QYSLD 处理后 CD8⁺ T 细胞分泌的 IFN- γ 和 IL-2 显著增加。此外,PTEN 抑制剂的应用显著逆转了含药血清对 T 细胞活化的促进作用,进一步验证了 PTEN 通路的核心地位。

肿瘤免疫微环境中,巨噬细胞与 T 细胞的串扰是抗肿瘤免疫的关键。本研究发现,QYSLD 处理后 M1/M2 升高,且 M1 型巨噬细胞与 CD8⁺ T 细胞浸润呈正相关。M1 型巨噬细胞可通过分泌 IL-12 和 CXCL10 促进 CD8⁺ T 细胞的募集与活化,而活化的 T 细胞又可分泌 IFN- γ 进一步诱导巨噬细胞向 M1 型极化,形成正向反馈环路。

在利用多因素 Cox 回归寻找影响 NSCLC 预后的免疫因素时,除了巨噬细胞和 T 细胞外,B 细胞的浸润水平也与 NSCLC 患者预后相关(图 1-D)。近年来,大量证据表明肿瘤浸润 B 淋巴细胞是抗肿瘤反应中强大的、多方面的参与者。并且 B 细胞、T 细胞和巨噬细胞的共同浸润往往表明肿瘤预后良好^[33]。在对模型小鼠用药后,富集分析结果表明体液免疫途径发生了改变,这说明除了 T 细胞和巨噬细胞外,B 细胞的浸润水平也受到了 QYSLD 的影响。B 细胞和 B 细胞相关途径目前被认为具有控制肿瘤的临床意义^[34]。由于 B 细胞从幼稚发育为成熟形态需要代谢和能量的大幅度波动,所以 QYSLD 对 B 细胞碳水化合物代谢的影响需要被考虑(图 6-C)。

本研究结果表明,QYSLD 可以通过 PTEN 信号通路诱导巨噬细胞向 M1 型极化以及促进 T 细胞

活化,来发挥其 NSCLC 功能。然而,通过对研究结果的深入分析发现 QYSLD 对 B 细胞的影响需要进一步研究以完善该药在免疫途径的作用机制,并且在药物使用情况下对抗肿瘤免疫细胞的保护也需要完善。

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] Chen P X, Liu Y H, Wen Y K, et al. Non-small cell lung cancer in China [J]. Cancer Commun (Lond), 2022, 42(10): 937-970.
- [3] Wu H, Chen Y, Li Q L, et al. Intervention effect of Qi-Yu-San-Long Decoction on Lewis lung carcinoma in C57BL/6 mice: Insights from UPLC-QTOF/MS-based metabolic profiling [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2018, 1102/1103: 23-33.
- [4] Zhao Y, Chen Y, Li R J, et al. An ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry method based on a four-step analysis strategy to investigate metabolites of Qi-Yu-San-Long decoction in rat plasma [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2023, 37(1): e9419.
- [5] 黄梦文, 吴欢, 于伟, 等. 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法快速识别芪玉三龙汤化学成分 [J]. 色谱, 2021, 39(7): 730-743.
Huang M W, Wu H, Yu W, et al. Rapid identification of chemical components in Qi-Yu-San-Long decoction by ultra high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2021, 39(7): 730-743.
- [6] Huang M W, Li R J, Yang M, et al. Discovering the potential active ingredients of Qi-Yu-San-Long decoction for anti-oxidation, inhibition of non-small cell lung cancer based on the spectrum-effect relationship combined with chemometric methods [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 989139.
- [7] Zheng T, Zhao Y, Li R J, et al. The dynamic metabolic profile of Qi-Yu-San-Long decoction in rat urine using UPLC-QTOF-MSE coupled with a post-targeted screening

- strategy [J]. *J Pharm Anal*, 2022, 12(5): 755-765.
- [8] Locati M, Curtale G, Mantovani A. Diversity, mechanisms, and significance of macrophage plasticity [J]. *Annu Rev Pathol*, 2020, 15: 123-147.
- [9] Thommen D S, Schumacher T N. T cell dysfunction in cancer [J]. *Cancer Cell*, 2018, 33(4): 547-562.
- [10] Anderson N R, Minutolo N G, Gill S, et al. Macrophage-based approaches for cancer immunotherapy [J]. *Cancer Res*, 2021, 81(5): 1201-1208.
- [11] O'Donnell J S, Teng M W L, Smyth M J. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019, 16(3): 151-167.
- [12] Diehl K H, Hull R, Morton D, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes[J]. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 2001, 21(1): 15-23.
- [13] Festing M F W, Altman D G. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals[J]. *ILAR J*, 2002, 43(4): 244-258.
- [14] 高雅婷, 王心恒, 王小乐, 等. 芪玉三龙汤调节 mTOR/Beclin1/LC3 信号轴相关分子的表达诱导肺癌 A549 细胞自噬 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(1): 98-104.
- Gao Y T, Wang X H, Wang X L, et al. Qiyu Sanlong Decoction regulates the expression of mTOR/Beclin1/LC3 signaling axis-related molecules to induce autophagy in lung cancer A549 cells [J]. *Chin J Exp Prescrip*, 2021, 27(1): 98-104.
- [15] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004(9): 1069-1072.
- Huang J H, Huang X H, Chen Z Y, et al. Equivalent dose conversion between animals and between animals and humans in pharmacological experiments [J]. *Chin Clin Pharm Therap*, 2004(9): 1069-1072.
- [16] Park B Y, Min B S, Ahn K S, et al. Daphnane diterpene esters isolated from flower buds of *Daphne genkwa* induce apoptosis in human myelocytic HL-60 cells and suppress tumor growth in Lewis lung carcinoma (LLC)-inoculated mouse model [J]. *J Ethnopharmacol*, 2007, 111(3): 496-503.
- [17] 明海霞, 陈彦文, 胡永浩, 等. 黄芪多糖对 Lewis 肺癌小鼠细胞因子及顺铂所致免疫功能低下的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(5): 44-48.
- Ming H X, Chen Y W, Hu Y H, et al. Effects of Astragalus polysaccharide(APS) on cytokine and immune function impairment induced by cisplatin in mice bearing Lewis lung cancer [J]. *Acta Lab Animalis Sci Sin*, 2014, 22(5): 44-48.
- [18] 童佳兵, 张星星, 韩明向, 等. 芪玉三龙方调节 Wnt/ β -catenin 通路下游靶基因表达抑制荷瘤小鼠肺癌生长 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(5): 2014-2017.
- Tong J B, Zhang X X, Han M X, et al. Research on Qiyu Sanlong Formula inhibiting growth of tumor-bearing mice of lung cancer by regulating downstream target genes expression levels of Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2018, 33(5): 2014-2017.
- [19] Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data [J]. *Genome Biol*, 2010, 11(10): R106.
- [20] Zhou Y Y, Zhou B, Pache L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1523.
- [21] Newman A M, Liu C L, Green M R, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles [J]. *Nat Meth*, 2015, 12(5): 453-457.
- [22] Chen Z Y, Huang A F, Sun J Y, et al. Inference of immune cell composition on the expression profiles of mouse tissue [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 40508.
- [23] Newman A M, Steen C B, Liu C L, et al. Determining cell type abundance and expression from bulk tissues with digital cytometry [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(7): 773-782.
- [24] 刘桐, 王小乐, 高雅婷, 等. 芪玉三龙汤药物血清对肺癌 A549 细胞增殖及凋亡的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2022, 29(1): 85-89.
- Liu T, Wang X L, Gao Y T, et al. Effect of Qiyu Sanlong Decoction drug serum on proliferation and apoptosis of lung cancer A549 cells [J]. *Chin J Tradit Chin Med Inform*, 2022, 29(1): 85-89.
- [25] Gutiérrez-Melo N, Baumjohann D. T follicular helper cells in cancer [J]. *Trends Cancer*, 2023, 9(4): 309-325.
- [26] Garrido-Martin E M, Mellows T W P, Clarke J, et al. M1 hot tumor-associated macrophages boost tissue-resident memory T cells infiltration and survival in

- human lung cancer [J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(2): e000778.
- [27] Boutilier A J, Elsawa S F. Macrophage polarization states in the tumor microenvironment [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13): 6995.
- [28] Kashfi K, Kannikal J, Nath N. Macrophage reprogramming and cancer therapeutics: Role of iNOS-derived NO [J]. *Cells*, 2021, 10(11): 3194.
- [29] Jin H, Jiang A Y, Wang H, et al. Dihydroartemisinin and gefitinib synergistically inhibit NSCLC cell growth and promote apoptosis via the Akt/mTOR/STAT3 pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(3): 3475-3481.
- [30] Li B, Zhang J K, Su Y, et al. Overexpression of PTEN may increase the effect of pemetrexed on A549 cells via inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway and carbohydrate metabolism [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(4): 3793-3801.
- [31] Jakubzick C V, Randolph G J, Henson P M. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions [J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(6): 349-362.
- [32] Datar I, Sanmamed M F, Wang J, et al. Expression analysis and significance of PD-1, LAG-3, and TIM-3 in human non-small cell lung cancer using spatially resolved and multiparametric single-cell analysis [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(15): 4663-4673.
- [33] Laumont C M, Banville A C, Gilardi M, et al. Tumour-infiltrating B cells: Immunological mechanisms, clinical impact and therapeutic opportunities [J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22(7): 414-430.
- [34] Tokunaga R, Naseem M, Lo J H, et al. B cell and B cell-related pathways for novel cancer treatments [J]. *Cancer Treat Rev*, 2019, 73: 10-19.

[责任编辑 兰新新]