

复方阿胶浆改善肿瘤免疫微环境增强 PD-1 抑制剂抗小鼠肺癌作用

侯玉菲^{1,2,3}, 袁芳⁴, 王淑美^{1,2,3}, 李雄⁵, 马建春⁵, 谢媛媛^{1,2,3*}

1. 广东药科大学 中药学院, 广东 广州 510006

2. 广东省中药质量工程技术研究中心, 广东 广州 510006

3. 国家中医药管理局中药数字化质量评价技术重点实验室, 广东 广州 510006

4. 广东药科大学 药学院, 广东 广州 510006

5. 广东省常用民族药质量标准评价与标准提升研究重点实验室, 广东 广州 510006

摘要: **目的** 探讨复方阿胶浆 (FFEJ) 改善肺癌肿瘤免疫微环境 (TIME) 增强程序性死亡蛋白-1 (PD-1) 抑制剂抗小鼠肺癌的作用。 **方法** 42 只 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组, 模型组, PD-1 抗体 (每只 200 μg) 组, FFEJ 低、高剂量 (10、20 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组, PD-1 抗体+FFEJ 低、高剂量 (10、20 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组, 每组各 6 只。收集处于对数生长期的 Lewis 细胞, 调节至 5×10^6 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$, 除对照组外, 其余组小鼠右腋 sc 100 μL 细胞悬液构建荷瘤小鼠模型。ig 给药, 体积为 20 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, 造模第 1 天开始, 每天 1 次, 持续 23 d; 对照组和模型组每天 ig 等体积纯水。PD-1 抗体组 ip 抗 PD-1 单抗, 共 5 次, 每 3 天 1 次 (第 9、12、15、18、21 天)。记录小鼠肿瘤体积变化情况; 称量小鼠肿瘤质量; 苏木精-伊红 (HE) 染色观察肿瘤组织病理情况; 免疫组织化学检测肿瘤组织中增殖细胞相关抗原 (Ki67) 表达; 血常规检测小鼠外周血淋巴细胞 (Lym)、粒细胞 (Neu) 含量及粒细胞/淋巴细胞比值 (NLR); 免疫荧光检测肿瘤组织中 CD8^+ T 细胞和 γ 干扰素 ($\text{IFN-}\gamma$) 表达情况。 **结果** 与模型组比较, 单药组和联合给药组小鼠肿瘤体积均显著下降 ($P<0.001$); FFEJ、PD-1 抗体单药组和联合给药高剂量组肿瘤质量均有下降趋势 ($P>0.05$), 联合给药低剂量组平均肿瘤质量显著下降 ($P<0.05$); HE 染色显示, FFEJ 或 PD-1 抗体单用对肿瘤细胞的抑制作用不明显, 与 PD-1 抗体联用时肿瘤组织可见大面积坏死区域, 显著抑制肿瘤细胞生长, 坏死率显著增加 ($P<0.01$ 、 0.001); FFEJ 和 PD-1 抗体单药组 Ki67 表达均有下降趋势 ($P>0.05$), 联合给药组 Ki67 表达显著下降 ($P<0.05$); FFEJ 高剂量组和联合给药组 Neu、NLR 数量显著降低 ($P<0.05$ 、 0.001), Lym 数量显著升高 ($P<0.001$); FFEJ 单药组 CD8^+ T、 $\text{IFN-}\gamma$ 荧光强度并无明显变化, PD-1 抗体组 $\text{IFN-}\gamma$ 荧光强度有升高趋势 ($P>0.05$), 联合给药低剂量组 CD8^+ T 荧光强度有升高趋势 ($P>0.05$), $\text{IFN-}\gamma$ 荧光强度显著升高 ($P<0.05$), 联合给药高剂量组 CD8^+ T、 $\text{IFN-}\gamma$ 荧光强度显著升高 ($P<0.01$)。 **结论** FFEJ 可有效改善肺癌 TIME, 减轻炎症反应, 激活机体对肿瘤的免疫应答, 增强 PD-1 抑制剂抗小鼠肺癌的作用。

关键词: 复方阿胶浆; 肺癌; 肿瘤免疫微环境; 程序性死亡蛋白-1; 联合用药

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)11-3097-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.11.005

Efficacy of Fufang Ejiao Jiang in improving immune microenvironment and enhancing anti-lung cancer activity of PD-1 inhibitors in mice

HOU Yufei^{1,2,3}, YUAN Fang⁴, WANG Shumei^{1,2,3}, LI Xiong⁵, MA Jianchun⁵, XIE Yuanyuan^{1,2,3}

1. School of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. Guangdong Provincial Traditional Chinese Medicine Quality Engineering and Technology Research Center, Guangzhou 510006, China

3. Key Laboratory of Digital Quality Evaluation Technology of Traditional Chinese Medicine, National Administration of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

4. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

5. Guangdong Provincial Key Laboratory of Evaluation and Standard Improvement of Quality Standards for Traditional Ethnic Medicine, Guangzhou 510006, China

收稿时间: 2025-07-11

基金项目: 广东省药品监督管理局科技创新项目 (2023ZDZ03)

作者简介: 侯玉菲, 硕士研究生, 从事中药质量控制研究。E-mail: 1529581028@qq.com

*通信作者: 谢媛媛, 教授, 博士生导师, 从事中药功效物质基础研究。E-mail: yuanyuan8078@163.com

Abstract: Objective To explore the effect of Fufang Ejiao Jiang (FFEJ) in improving the tumor immune microenvironment (TIME) of lung cancer and enhancing the anti-lung cancer effect of programmed death protein-1 (PD-1) inhibitors in mice. **Methods** Forty-two C57BL/6J mice were randomly divided into control group, model group, PD-1 antibody (200 μg per mouse) group, low and high-dose FFEJ (10 and 20 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) groups, and PD-1 antibody + low and high-dose FFEJ (10 and 20 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) groups, with 6 mice in each group. Lewis cells in the logarithmic growth phase were collected and adjusted to 5×10^6 cells $\cdot\text{mL}^{-1}$. Except for the control group, the remaining groups were subcutaneously injected with 100 μL of cell suspension in the right axilla to establish tumor-bearing mouse models. The mice were administered ig with a volume of 20 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, starting from the first day of modeling, once a day for 23 days; The control group and the model group were given the same volume of pure water ig every day. The PD-1 antibody group was ip injected with anti-PD-1 monoclonal antibody for a total of 5 times, once every 3 d (on the 9th, 12th, 15th, 18th, and 21st d). The changes in tumor volume of the mice were recorded; The tumor mass in mice was weighed; the pathological conditions of the tumor tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining; The expression of proliferation cell-associated antigen (Ki67) in the tumor tissue was detected by immunohistochemistry; The peripheral blood lymphocytes (Lym), granulocytes (Neu) content and granulocyte/lymphocyte ratio (NLR) of the mice were detected by blood routine; the expression of CD8^+ T cells and interferon γ (IFN- γ) in the tumor tissue was detected by immunofluorescence. **Results** Compared with the model group, the tumor volume of the single drug group and the combination drug group decreased significantly ($P < 0.001$); The tumor mass of the FFEJ, PD-1 antibody single drug group and the high-dose combination drug group showed a decreasing trend ($P > 0.05$), and the average tumor mass of the low-dose combination drug group decreased significantly ($P < 0.05$); HE staining showed that the inhibitory effect of FFEJ or PD-1 antibody alone on tumor cells was not obvious, but when combined with PD-1 antibody, large areas of necrotic regions were observed in the tumor tissue, significantly inhibiting the growth of tumor cells, and the necrosis rate increased significantly ($P < 0.01, 0.001$); The expression of Ki67 in the FFEJ and PD-1 antibody single drug groups showed a decreasing trend ($P > 0.05$), and the expression of Ki67 in the combination drug group decreased significantly ($P < 0.05$); the number of Neu and NLR in the high-dose FFEJ group and the combination drug group decreased significantly ($P < 0.05, 0.001$), and the number of Lym increased significantly ($P < 0.001$); The fluorescence intensity of CD8^+ T and IFN- γ in the FFEJ single drug group did not change significantly, the fluorescence intensity of IFN- γ in the PD-1 antibody group showed an increasing trend ($P > 0.05$), the fluorescence intensity of CD8^+ T in the low-dose combination drug group showed an increasing trend ($P > 0.05$), and the fluorescence intensity of IFN- γ increased significantly ($P < 0.05$), and the fluorescence intensity of CD8^+ T and IFN- γ in the high-dose combination drug group increased significantly ($P < 0.01$). **Conclusion** FFEJ can effectively improve TIME of lung cancer, reduce inflammatory responses, activate the immune response of the body to tumors, and enhance the anti-lung cancer effect of PD-1 inhibitors in mice.

Key words: Fufang Ejiao Jiang; lung cancer; tumor immune microenvironment; programmed death protein-1; combination medication

据 2022 年全球癌症统计报道,肺癌是构成全球肿瘤相关死亡的首要诱因,以 18.0% 的死亡率稳居癌症相关死亡首位。其中非小细胞肺癌(NSCLC)在临床上占新确诊肺癌患者的 80%~85%,多数患者在就诊时已处于中晚期,5 年生存率低^[1]。目前,NSCLC 的主要治疗方法包括手术治疗、放疗和化疗、靶向分子结构的药物治疗和免疫治疗。临床研究数据显示,基于程序性死亡蛋白-1(PD-1)/程序性死亡配体-1(PD-L1)信号轴阻断的免疫检查点抑制剂(ICIs)在 NSCLC 肺癌晚期患者的治疗中疗效显著,使患者获得更大的生存获益,已成为肺癌一线或二线治疗用药^[2-4]。但 ICIs 在临床应用中的反应率有限,其中肿瘤免疫微环境(TIME)的激活成为重要因素^[5-7]。TIME 主要包括肿瘤细胞、肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)、肿瘤浸润性淋巴细胞(TILs)、髓源性抑制细胞(MDSCs)、树突状细胞(DCs)等,

在肿瘤发生、发展以及转移中起到关键作用。TIME 主要包括 3 个方面的功能:炎症、代谢异常和免疫抑制^[8]。肿瘤生长初期,炎症反应发展成慢性炎症,炎症细胞释放细胞因子和炎症介质白细胞介素(IL)- 1β 、IL-23、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、基质金属蛋白酶(MMP)等,触发相关通路激活刺激血管生成,诱导肿瘤的发展和转移;肿瘤发生发展过程中,肿瘤细胞与其他细胞发生营养竞争导致代谢异常,这些代谢途径中的有害代谢产物如乳酸、活性氧和犬尿氨酸促进 TIME 形成免疫抑制环境,包括免疫抑制细胞募集和 T 细胞功能抑制,导致肿瘤发生免疫逃逸,促进肿瘤的进展。因此 TIME 调控对于肺癌的免疫治疗具有重要意义。

研究发现,中药可通过调控宿主 TIME 中免疫系统间接发挥抗肿瘤作用,同时联合 ICIs 具有增效减毒的效果^[9-13]。复方阿胶浆(FFEJ)是一种补益

剂,以阿胶为君,滋阴补血;臣以人参、党参大补元气;佐以熟地黄,填精益髓;使以山楂,行气消导,具有气血双补的功效。该方中红参、熟地黄等均与免疫细胞的激活密切相关^[14-15]。现代药理学研究表明,FFEJ 可以诱导肿瘤细胞凋亡和调控细胞周期发挥抗肿瘤作用,同时辅助化疗药物提高机体免疫^[16-17]。在临床上常与化疗药物联合广泛用于恶性肿瘤的治疗和预防,可以改善化疗患者骨髓抑制、升高白细胞数量和缓解癌因性疲乏,提高患者的免疫力,改善患者的生活质量^[18-20]。也有研究发现,FFEJ 可以抑制 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤的生长^[21],但其是否可以靶向 TIME 增敏 ICIs 抑制肿瘤免疫的研究目前尚无报道。

本研究通过 sc Lewis 肺癌细胞构建荷瘤小鼠模型,采用流式细胞术、免疫组化和免疫荧光等方法探究 FFEJ 联合 PD-1 抑制剂对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠 TIME 的影响,以期为后续探讨 FFEJ 改善 TIME 的功效物质基础及作用机制奠定基础。

1 材料

1.1 主要仪器

UPLC-Q-Exactive-Orbitrap MS (美国 ThermoFisher Scientific 公司),配有戴安 U3000 变色龙工作站 6.8、Xcalibur 4.0 和 Compound Discoverer 3.1 数据处理软件;BMBFree-17 台式高速冷冻离心机(广州博美科学仪器有限公司);KQ-300DE 型台式数控超声波清洗机(昆山舒美超声仪器有限公司);101-0AS 电热鼓风干燥箱(上海市尚光仪器厂);荧光显微镜(日本奥林巴斯公司)。

1.2 药物与主要试剂

FFEJ(货号 2310031,东阿阿胶药业股份有限公司,规格每支 20 mL);鼠源性抗 PD-1 单抗(货号 RMP1-14, Bioxcel 公司);增殖细胞相关抗原(Ki67)一抗(CAT SAF008)、兔抗鼠 CD8 单克隆抗体(CAT 98941s)、兔抗鼠 γ 干扰素(IFN- γ)单克隆抗体(CAT AF301097)均购自艾方生物科技有限公司。

1.3 实验动物和细胞

C57BL/6J 小鼠,SPF 级,雌性,体质量(18±2)g,实验动物生产许可证号 SCXK(粤)2022-0002,购自广东省医学实验动物中心。动物饲养于广东药科大学动物实验中心,饲养环境:温度 22~24℃;相对湿度(55±5)%,光照 12h 和黑暗 12h,自由进食和饮水。本研究方案经广东药科大学动物伦理

委员会批准,并且遵循实验动物保护法以及动物实验准则(实验动物伦理号 GDPULACSPF2022143)。

Lewis 肺癌细胞(CAT iCell-m027)购自于赛百慷生物科技股份有限公司。

2 方法

2.1 造模、分组和给药

6 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠适应性饲养 7 d,随机分为对照组,模型组,PD-1 抗体(每只 200 μ g)组,FFEJ 低、高剂量(10、20 mL·kg⁻¹)组,PD-1 抗体+FFEJ 低、高剂量(10、20 mL·kg⁻¹)组,每组各 6 只。收集处于对数生长期的 Lewis 细胞,将细胞浓度调节至 5×10⁶ 个·mL⁻¹,除对照组外,其余组小鼠右腋 sc 100 μ L 细胞悬液构建荷瘤小鼠模型,接种后 3~5 d 可在小鼠成瘤部位触及大小 50~100 mm³ 的结节,即为造模成功。FFEJ 临床常规用量为 60 mL·d⁻¹,剂量按照相关参考文献报道^[22-23]设置,FFEJ 用纯水稀释至不同浓度,ig 给药,体积为 20 mL·kg⁻¹,造模第 1 天开始,每天 1 次,持续 23 d;对照组和模型组每天 ig 等体积纯水。PD-1 抗体组 ip 抗 PD-1 单抗,共 5 次,每 3 天 1 次(第 9、12、15、18、21 天)。连续治疗 23 d 后,第 24 天异氟烷麻醉,眼眶采血后颈椎脱臼处死小鼠,摘取小鼠肿瘤组织,进行拍照和称质量。

2.2 肿瘤组织病理形态观察

取各组小鼠肿瘤组织,4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,4 μ m 切片,脱蜡复水,采用试剂盒进行苏木素-伊红染色,梯度脱水后中性树胶封固,于光学显微镜下进行形态学观察并采集数字图像保存。随机选取 4 个高倍视野进行图像采集,用 Image J 软件进行图像定量分析。

2.3 免疫组织化学检测肿瘤组织中 Ki67 表达

取各组小鼠肿瘤组织包埋切片,0.01 mol·L⁻¹柠檬酸缓冲液抗原修复,3%牛血清白蛋白(BSA)室温封闭 30 min。滴加适量稀释后的一抗放入湿盒内 4℃孵育过夜。磷酸盐缓冲液(PBS)清洗后,滴加二抗,37℃孵育 60 min, PBS 清洗, DAB 显色,苏木素复染,封片,于光学显微镜下进行形态学观察并采集数字图像保存。随机选取 4 个高倍视野进行图像采集,用 Image J 软件进行图像定量分析。

2.4 血常规检测

小鼠眼眶取血,置于 EDTAK2 抗凝管中,使用全自动血液分析仪测定小鼠外周血中淋巴细胞

(Lym)、中性粒细胞 (Neu) 含量。

2.5 免疫荧光检测肿瘤组织中 CD8⁺ T 细胞和 IFN- γ 水平

取各组小鼠肿瘤组织包埋切片, 0.01 mol·L⁻¹ 柠檬酸缓冲液抗原修复, 3% BSA 室温封闭 30 min。滴加适量稀释后的一抗放入湿盒内 4 °C 孵育过夜。TBST 清洗后, 滴加二抗, 37 °C 孵育 60 min, PBST 清洗, DAPI 复染, 封片, 于荧光显微镜/共聚焦/多通道荧光扫描仪/多光谱成像系统下观察并采集图像。随机选取 4 个高倍视野进行图像采集, 用 Image J 软件进行图像定量分析。

2.6 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析, 满足正态分布的两组间数据比较用 *t* 检验, 满足正态分布的多组间数据比较用单因素方差分析。

3 结果

3.1 小鼠肿瘤生长变化

为了研究 FFEJ 是否可以增强 PD-1 抗体的抗肿瘤作用, 首先评估了其对 Lewis 荷瘤小鼠肿瘤生长情况的影响。各组小鼠肿瘤生长变化如图 1 所示, 第 24 天实验结束时, 与模型组比较, 单药组和联合给药组小鼠肿瘤体积均显著下降 ($P < 0.001$)。与模型组比较, FFEJ、PD-1 抗体单药组和联合给药高剂量组肿瘤质量均有下降趋势 ($P > 0.05$), 联合给药低剂量组平均肿瘤质量显著下降 ($P < 0.05$)。与 PD-1 抗体组比较, 联合给药组肿瘤体积和肿瘤质量均有下降趋势, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。表明 FFEJ 与 PD-1 抗体联用时可增强其抑制肿瘤生长的作用。

3.2 小鼠肿瘤组织病理形态变化

如图 2 所示, 模型组荷瘤小鼠肿瘤组织细胞形

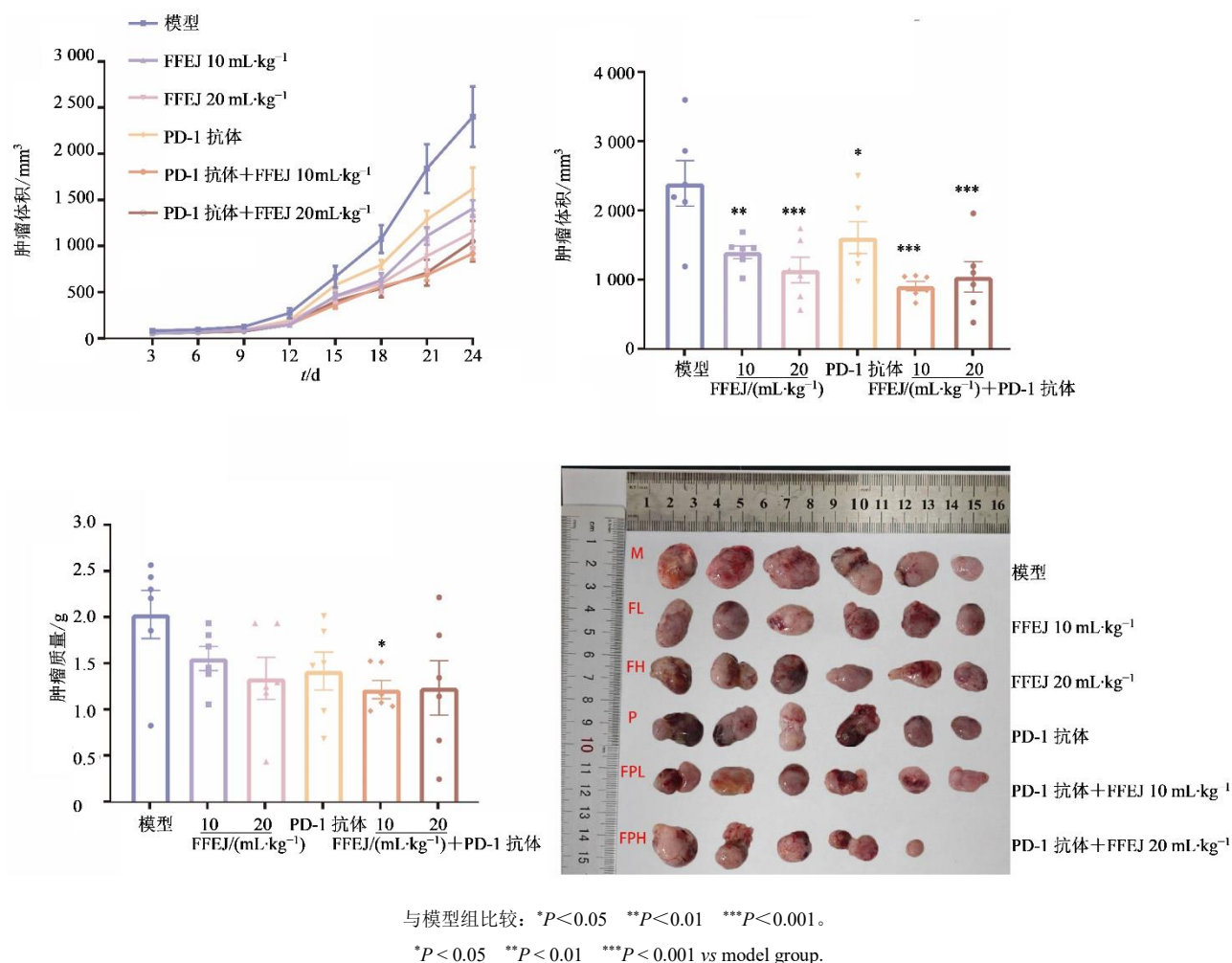


图 1 FFEJ 对荷瘤小鼠肿瘤生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 1 Effect of FFEJ on tumor growth in tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

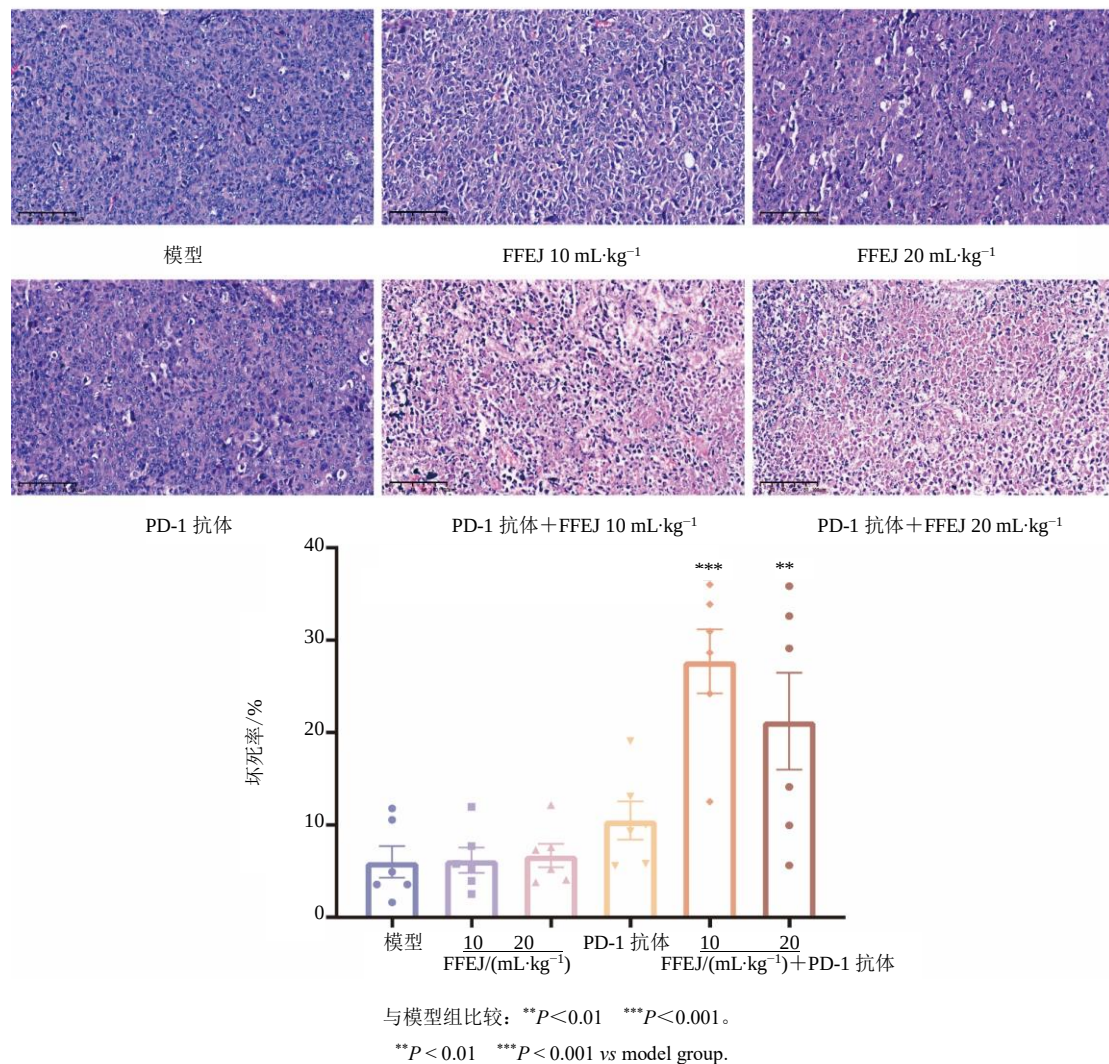


图 2 FFEJ 对荷瘤小鼠肿瘤组织病理变化的影响 ($\times 20$, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 2 Effect of FFEJ on tumor pathological changes in tumor-bearing mice ($\times 20$, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

态大小不一、轮廓清晰、分布密集、核大深染、呈片状或巢状分布,可见大量瘤巨细胞和病理性核分裂象;FFEJ 和 PD-1 抗体单药组荷瘤小鼠肿瘤组织少部分细胞形态略有变化、分布较为稀疏、部分细胞核染色较浅,可见少量部分瘤巨细胞和病理性核分裂象;联合给药组荷瘤小鼠肿瘤组织大部分细胞形态轮廓不清,呈现核固缩、核碎裂和核溶解现象,可见极少量病理性核分裂象,且间质基质崩解,呈现斑片状坏死。表明 FFEJ 或 PD-1 抗体单用对肿瘤细胞的抑制作用不明显,与 PD-1 抗体联用时肿瘤组织可见大面积坏死区域,显著抑制肿瘤细胞生长,坏死率较模型组显著增加 ($P < 0.01$ 、 0.001)。

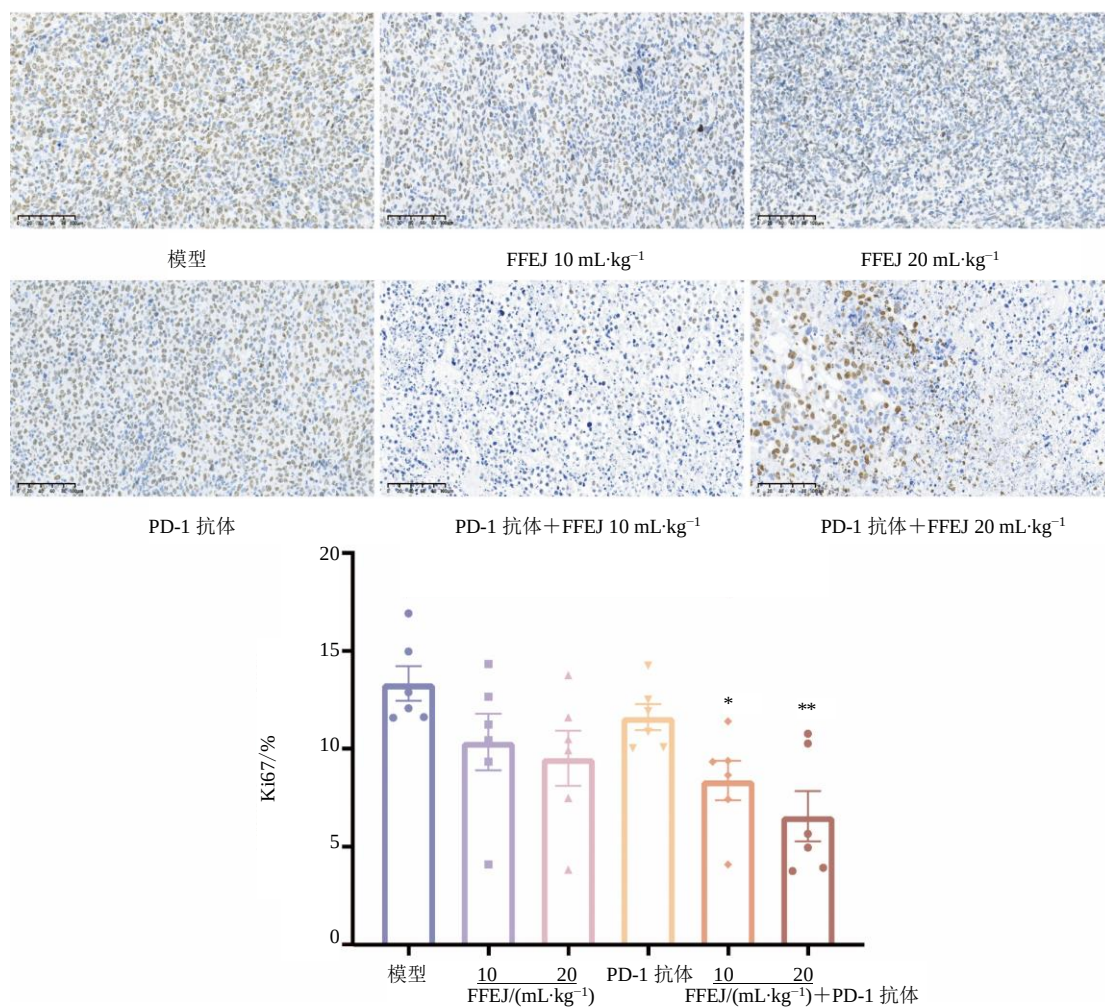
3.3 小鼠肿瘤组织增殖标志物 Ki67 表达变化

Ki67 的水平代表细胞增殖的活跃程度。为了进

一步评价 FFEJ 增强 PD-1 抗体抗肿瘤作用,评估了 Lewis 荷瘤小鼠肿瘤组织中增殖相关蛋白 Ki67 表达。如图 3 所示,与模型组比较,FFEJ 和 PD-1 抗体单药组 Ki67 表达均有下降趋势 ($P > 0.05$),联合给药组 Ki67 表达显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.01)。提示 FFEJ 或 PD-1 单用可以轻微抑制荷瘤小鼠肿瘤细胞的增殖,与 PD-1 抗体联用时可显著抑制肿瘤细胞的增殖。

3.4 小鼠血常规指标

临床上,肿瘤患者往往外周血白细胞中的 Neu 升高, Lym 比率减少,粒细胞/淋巴细胞比值 (NLR) 增高,反映机体处于炎症和免疫失衡状态^[24],是肿瘤免疫治疗预后的重要指标^[25]。如图 4 所示,与对照组比较,模型组外周血中 Neu 数量、NLR 显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.001), Lym 数量有降低趋势 ($P >$

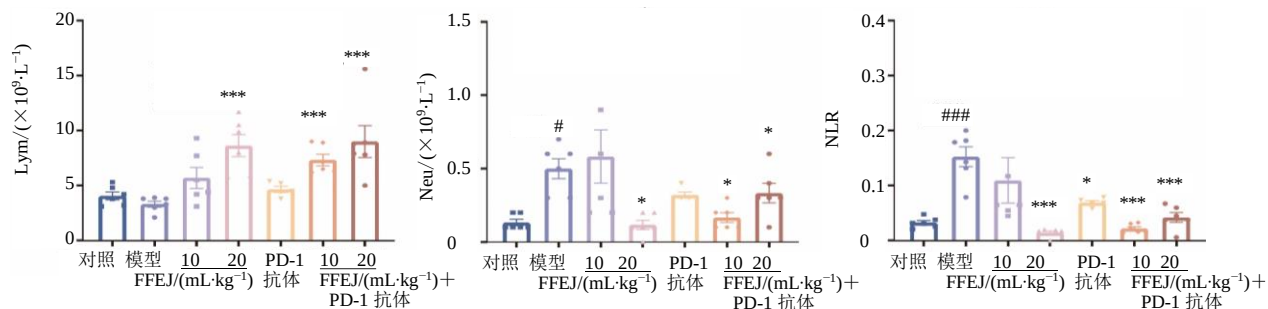


与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group.

图 3 FFEJ 对荷瘤小鼠肿瘤组织 Ki67 的影响 ($\times 20$, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 3 Effect of FFEJ on Ki67 in tumor tissues of tumor-bearing mice ($\times 20$, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)



与对照组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ 。

$P < 0.05$ ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图 4 FFEJ 对荷瘤小鼠外周血中 Lym、Neu 数量和 NLR 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 4 Effect of FFEJ on number of Lym and Neu cells and NLR of whole blood in tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

0.05); 与模型组比较, FFEJ 高剂量组和联合给药组 Neu、NLR 数量显著降低 ($P < 0.05$ 、0.001), Lym 数量显著升高 ($P < 0.001$)。表明 FFEJ 单用或与 PD-1

抗体联用可以明显改善荷瘤小鼠的炎症状态, 提高机体免疫力, 提示 FFEJ 增强 PD-1 抗肿瘤作用可能与炎症和免疫反应有关。

3.5 肿瘤组织 CD8⁺ T 和 IFN- γ 变化

临床前模型中有明确的证据表明, TIME 的变化与抗 PD-1 的治疗反应密切相关。CD8⁺ T 作为杀伤肿瘤的重要亚群, 其浸润高可以增强免疫治疗的抗肿瘤效果。IFN- γ 作为 TIME 中的“全局调控因子”, 可以募集和活化 CD8⁺ T 细胞, 活化的 CD8⁺ T 细胞继续产生 IFN- γ , 从而抑制肿瘤细胞免疫逃避增效肿瘤免疫治疗。与模型组比较, FFEJ 单药组 CD8⁺ T、IFN- γ 荧光强度并无明显变化, PD-1 抗

体组 IFN- γ 荧光强度有升高趋势 ($P>0.05$), 但并无统计学意义, 联合给药低剂量组 CD8⁺ T 荧光强度有升高趋势 ($P>0.05$), IFN- γ 荧光强度显著升高 ($P<0.05$), 联合给药高剂量组 CD8⁺ T、IFN- γ 荧光强度显著升高 ($P<0.01$), 见图 5。表明 FFEJ 或 PD-1 抗体单用对 Lewis 肿瘤组织 CD8⁺ T 细胞比例和 IFN- γ 水平并无明显影响, 但与 PD-1 抗体联用可显著提高 CD8⁺ T 比例和 IFN- γ 水平, 增强 PD-1 阻断对 Lewis 荷瘤小鼠的抗肿瘤效果。

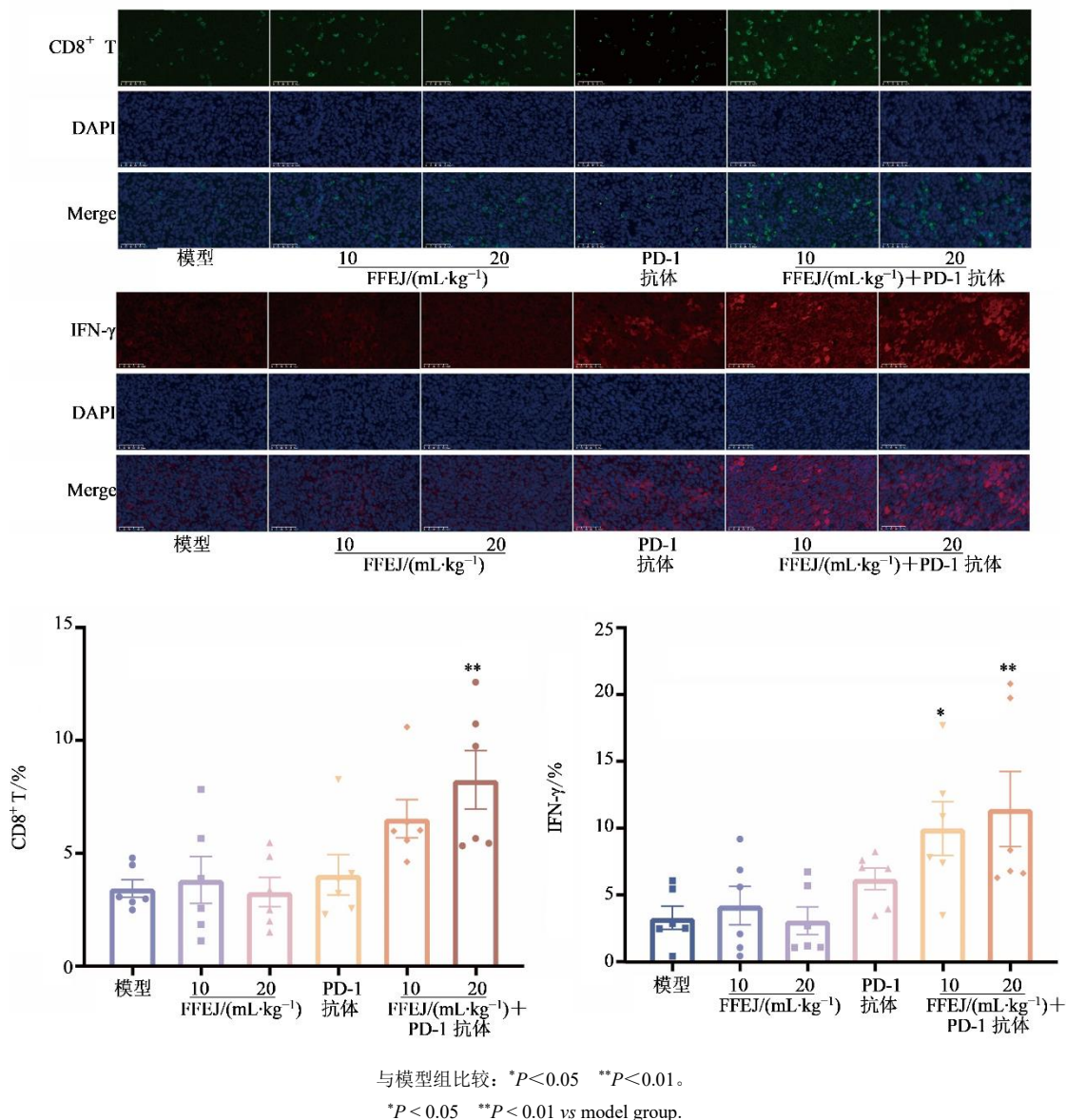


图 5 FFEJ 对荷瘤小鼠肿瘤组织 CD8⁺ T 和 IFN- γ 的影响 ($\times 40$, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 5 Effect of FFEJ on CD8⁺ T and IFN- γ in tumor tissues of tumor-bearing mice ($\times 40$, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

4 讨论

宿主系统免疫稳态与 TIME 的动态互动, 成为影响免疫治疗效果的关键性因素。在肿瘤的发生发

展过程中, Neu 作为血液中的主要吞噬细胞被异常激活而升高, 释放一系列炎症因子, 从而促进肿瘤微环境转变为慢性炎症微环境。Lym 主要包括 T 细

胞、B 细胞和自然杀伤 (NK) 细胞, 对机体免疫应答起重要作用, 肿瘤炎症微环境中 Neu 抑制 Lym 的活性, 导致 T 细胞和 B 细胞水平降低, 从而降低机体免疫。因此 Neu、Lym 和 NLR 被作为炎症指标在评估肿瘤进展和预后中发挥了重要作用^[26-28]。TIME 中存在大量的免疫抑制细胞如髓源性抑制细胞 (MDSCs) 等, 其一方面分泌 IL-6、TNF- α 、血管内皮生长因子 (VEGF) 和 MMP 等炎症因子诱发肿瘤新血管生成^[29], 另一方面通过释放免疫抑制因子如 IL-10 和转化生长因子- β (TGF- β) 干扰 CD8⁺ T 细胞活化, 分泌 IFN- γ 、TNF- α 等细胞因子, 介导肿瘤免疫逃逸, 促进肿瘤进展^[30]。研究表明, 在宿主的抗肿瘤免疫过程中, CD8⁺ T 作为杀伤肿瘤的重要亚群, 其浸润高可以增强免疫治疗的抗肿瘤效果。IFN- γ 作为 TIME 中的“全局调控因子”, 可以募集和活化 CD8⁺ T 细胞, 活化的 CD8⁺ T 细胞继续产生 IFN- γ , 增强适应性免疫, 从而抑制肿瘤细胞免疫逃避增效肿瘤免疫治疗^[31-32]。

为评价 FFEJ 改善 TIME 的药效, 本研究采用 sc Lewis 肺癌细胞构建荷瘤小鼠模型, 表明 FFEJ 单一治疗可以轻微抑制荷瘤小鼠肿瘤的生长, 明显改善荷瘤小鼠机体炎症和免疫失衡状态。FFEJ 和 PD-1 抗体联合治疗可明显改善荷瘤小鼠的炎症和免疫失衡状态, 提高肿瘤组织中 CD8⁺ T 的浸润, 促进 IFN- γ 分泌, 改善 TIME。然而由于肿瘤体积存在个体异质性、样本量偏少等原因, 导致联合治疗与 PD-1 单药相比无统计学差异。FFEJ 通过增强单核巨噬细胞的吞噬功能促进肿瘤抗原特异性 T 细胞的启动^[33-34], 而 PD-1 抗体则通过阻断抑制 PD-1/PD-L1 信号通路解除 T 细胞的抑制状态^[35], 基于两者在机制上的潜在互补与协同作用, 该联合策略在理论上具有克服单药治疗局限性、提升疗效的潜力。未来研究将通过扩大样本量、深入探索免疫微环境变化来进一步验证其协同增效效果。本研究中, 低、高剂量的 FFEJ 与 PD-1 抗体联用时, 不同炎症及免疫指标呈现的量效关系并不一致, 反映了 FFEJ 作用机制的复杂性。FFEJ 具有多成分、多靶点的药理特性, 其不同成分在体内可能通过不同分子途径调节 TIME。通路的激活或抑制存在阈值效应, 低剂量 FFEJ 可能更倾向于改善炎症反应发挥协同增效作用, 而高剂量 FFEJ 的药效成分可能达到其有效浓度阈值, 更显著作用于 T 细胞, 促进免疫细胞浸润, 与 PD-1 抗体形成高效协同作用, 这为后续深

入探讨其具体作用机制提供了方向。

PD-1/PD-L1 信号通路是肿瘤免疫过程中的关键调节机制, 研究表明 PD-L1 在肿瘤细胞或肿瘤微环境中的非转化细胞上过表达, 主要由丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、核因子 κ B (NF- κ B) 和磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 等信号通路的激活和信号转导与转录激活因子 3 (STAT3) 诱导, 从而抑制免疫细胞活化并降低细胞因子的产生, 促进免疫细胞凋亡和肿瘤细胞免疫逃逸^[36-37]。T 细胞受体和 Toll 样受体作为上游靶点, 激活 PI3K/Akt 信号通路, 促进效应 T 细胞免疫应答^[38]。Th17、Th1 和 Th2 细胞作为 CD4⁺ 辅助性 T 淋巴细胞的亚群, 可以分泌细胞因子 IL 或 TNF, 在肿瘤免疫反应中起着关键作用。研究发现, IL-17、TNF- α 等炎症因子可通过产生炎症环境激活 NF- κ B、PI3K/Akt、MAPK、STAT3 等信号通路, 刺激 MMP2、MMP9 等表达, 增加免疫抑制细胞的数量导致肿瘤免疫逃逸, 促进肿瘤生长^[39-40]。人参皂苷类、环烯醚萜苷类、苯乙醇苷类、有机酸类、党参炔苷是 FFEJ 的主要小分子化合物结构类型。目前中药主要通过抗原呈递、T 细胞活化、T 细胞浸润和肿瘤细胞杀伤 4 个癌症免疫周期 (CIC) 调控肿瘤免疫^[41]。人参皂苷类化合物改善 TIME 的机制主要为抑制 NF- κ B 信号转导或下调表皮生长因子 (EGFR) 降低 PD-L1 的表达^[42-43], 降低糖皮质激素受体促进抗原提呈细胞 (DCs) 和 T 细胞激活^[44], 促进免疫效应因子 IL-2、IL-12P40 等分泌^[45], 激活 MAPK/ERK 通路活化 CD8⁺ T 细胞释放细胞因子 IL-2、IFN- γ 增加抗肿瘤作用^[46]。环烯醚萜类化合物改善 TIME 的机制通过诱导肿瘤细胞周期停滞或调控 PI3K/Akt 信号通路促进肿瘤细胞凋亡^[47], 阻断 MAPK/ERK 信号通路降低细胞外基质 (ECM) 的蛋白水解活性和 MMPs 的表达^[48], 从而杀死肿瘤细胞, 抑制肿瘤生长。苯乙醇苷类化合物可通过 MAPK 信号通路诱导肿瘤细胞凋亡, 激活 M1 细胞释放细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 来改善 TIME^[49-50]。党参炔苷通过下调 TIM3 表达, 抑制肿瘤细胞的增殖和免疫逃逸来改善 TIME^[51]。有机酸类可以通过促进 T 细胞浸润、诱导肿瘤细胞凋亡来改善 TIME^[52]。故 FFEJ 有可能通过 PI3K/Akt、MAPK 等信号通路, 调控细胞因子水平和 CD8⁺ T 浸润等改善 TIME, 增强 PD-1 抗体抗肿瘤效果 (图 6)。

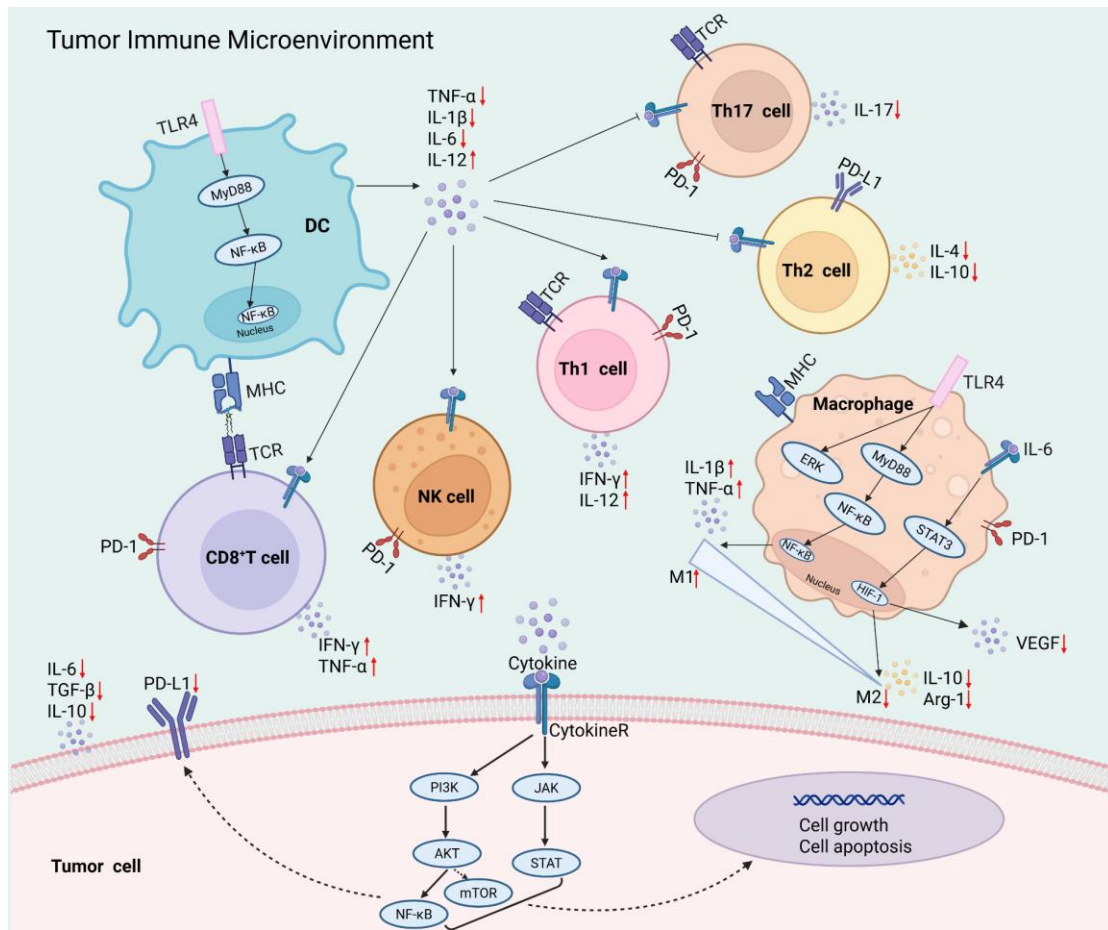


图 6 FFEJ 改善 TIME 潜在作用机制

Fig. 6 Potential mechanisms of FFEJ in TIME amelioration

本研究通过 Lewis 肺癌荷瘤小鼠模型证实了 FFEJ 联合 PD-1 抑制剂可以明显改善 TIME, 增强抗肿瘤免疫反应, FFEJ 中不同种类化学成分可能通过不同的分子途径发挥整合调节的作用, 为 FFEJ 辅助肿瘤免疫检查点抑制剂促进肿瘤免疫的临床应用提供基础研究数据, 也为揭示 FFEJ 调控肿瘤微环境的分子机制研究奠定了基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Chen P, Liu Y, Wen Y, et al. Non-small cell lung cancer in China [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2022, 42(10): 937-970.
- [2] Okita R, Maeda A, Shimizu K, et al. PD-L1 overexpression is partially regulated by EGFR/HER2 signaling and associated with poor prognosis in patients with non-small-cell lung cancer [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2017, 66(7): 865-876.
- [3] Wang L, Ma Q, Yao R, et al. Current status and development of anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy for lung cancer [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 79: 106088.
- [4] Wang C, Li M, Wei R, et al. Adoptive transfer of TILs plus anti-PD1 therapy: An alternative combination therapy for treating metastatic osteosarcoma [J]. *J Bone Oncol*, 2020, 25: 100332.
- [5] Matson V, Fessler J, Bao R, et al. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients [J]. *Science*, 2018, 359(6371): 104-108.
- [6] Gopalakrishnan V, Spencer C N, Nezi L, et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients [J]. *Science*, 2018, 359(6371): 97-103.
- [7] Sivan A, Corrales L, Hubert N, et al. *Commensal Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy [J]. *Science*, 2015, 350(6264): 1084-1089.
- [8] 韩懿存, 季青. 聚焦肿瘤微环境重塑: 中药及其有效成分干预肿瘤复发转移的优势与思考 [J]. *上海中医*

- 药杂志, 2023, 57(04): 1-7.
- Han Y C, Ji Q. Focus on tumor microenvironment remodeling: advantages and considerations of traditional Chinese herbal medicines and their effective components in intervening tumor recurrence and metastasis [J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2023, 57(4): 1-7.
- [9] Wang Y, Huang M, Sun R, et al. Extraction, characterization of a *Ginseng* fruits polysaccharide and its immune modulating activities in rats with Lewis lung carcinoma [J]. Carbohydr Polym, 2015, 127: 215-221.
- [10] Bamodu O A, Kuo K T, Wang C H, et al. *Astragalus* polysaccharides (PG2) enhances the M1 polarization of macrophages, functional maturation of dendritic cells, and T Cell-mediated anticancer immune responses in patients with lung cancer [J]. Nutrients, 2019, 11(10): 2264.
- [11] 梁宗英, 侯继申, 孙光蕊, 等. 板蓝根多糖促进 NKG2D 配体表达增强 NK 细胞对食管癌细胞的杀伤作用及机制研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(8): 965-970.
- Liang Z Y, Hou J S, Sun G R, et al. *Radix isatidis* polysaccharide enhances killing effect of NK cells on esophageal cancer cells by promoting expression of NKG2D ligand and its mechanism [J]. Chin J Immunol, 2020, 36(8): 965-970.
- [12] Tu J, He Y, Zhang H, et al. Anti-tumor effect of *Crocus sativus* petals polysaccharides by reconstructing tumor microenvironment [J]. Int J Biol Macromol, 2023, 248: 125878.
- [13] 谭倩影, 谢贵萍, 李响, 等. 黄芪四君子汤调节 T 细胞 PD1 泛素化水平重塑肿瘤免疫微环境抑制胃癌增殖的研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2023, 39(7): 629-636.
- Tan Q Y, Xie G P, Li X, et al. Huangqi Sijunzi Decoction restrained gastric cancer proliferation via regulating the level of PD1 Ubiquitination on T Cells and remodeling the tumor immune microenvironment [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2023, 39(7): 629-636.
- [14] 汤淼淼, 赵姝婷, 李冉琪, 等. 红参的炮制方法、化学成分及药理研究进展 [J/OL]. 特产研究. [2025-04-30]. <https://doi.org/10.16720/j.cnki.tcyj.2024.037>.
- Tang M M, Zhao S T, Li R Q, et al. Research progress on processing methods, chemical composition and pharmacology of Red Ginseng [J/OL]. Special Wild Econ Anim Plant Res [2025-04-30]. <https://doi.org/10.16720/j.cnki.tcyj.2024.037>.
- [15] 董发亮, 李翠娟, 史永超, 等. 熟地黄的药理作用研究进展 [J]. 环球中医药, 2025, 18(5): 1065-1070.
- Dong F L, Li Q J, Shi Y C, et al. Research progress on pharmacological effects of *Rehmanniae Radix Praeparata* [J]. Global Trad Chin Med, 2025, 18(5): 1065-1070.
- [16] 刘培民, 秦玉峰, 蔡宝昌. 复方阿胶浆对 S180 肉瘤抑瘤增效延长生存期实验 [J]. 中成药, 2006, 28(9): 1366-1367.
- Liu P M, Qin Y F, Cai B C. The experiment on the anti-tumor effect, enhancement of efficacy and prolongation of survival period of Compound Ejiao Oral Liquid on S180 Sarcoma [J]. Chin Trad Patent Med, 2006, 28(9): 1366-1367.
- [17] 刘培民, 郭建平, 李龙华. 复方阿胶浆含药血清对胃癌 SGC7901 细胞 Bcl-2 基因表达作用实验 [J]. 辽宁中医杂志, 2008, 35(02): 185-186.
- Liu P M, Guo J P, Li L H. Experiment on the effect of Compound Ejiao Decoction medicated serum on the expression of Bcl-2 gene in gastric cancer SGC7901 cells [J]. Liaoning J Trad Chin Med, 2008, 35(02): 185-186.
- [18] 李潇, 陈信义, 侯丽, 等. 复方阿胶浆治疗癌性贫血的临床研究 [J]. 北京中医药大学学报(中医临床版), 2013, 20(6): 27-30.
- Li X, Chen X Y, Hou L, et al. Curative effect of Fufang Ejiao Jiang on cancer related anemia [J]. Modern Chin Clin Med, 2013, 20(6): 27-30.
- [19] 谭秦湘, 龙德, 周明强. 复方阿胶浆在肿瘤患者化疗中的应用 [J]. 现代中西医结合杂志, 2009, 18(36): 4502-4503.
- Tan Q X, Long D, Zhou M Q. The application of Fufang Ejiao Jiang in the chemotherapy of cancer patients [J]. Modern J Integr Trad Chin Western Med, 2009, 18(36): 4502-4503.
- [20] 宋腾, 梁绍平, 王华庆, 等. 复方阿胶浆改善化疗后骨髓抑制的临床疗效观察 [J]. 天津医科大学学报, 2016, 22(1): 24-27.
- Song T, Liang S P, Wang H Q, et al. Clinical effect on compound Ejiao Jiang treating chemotherapy-induced myelosuppression [J]. J Tianjin Med Univ, 2016, 22(1): 24-27.
- [21] 孙叙敏, 陈信义. 复方阿胶浆对移植性 lewis 肺癌组织凋亡蛋白 Bcl-2/Bax 表达的影响 [J]. 中国医学创新, 2011, 8(7): 20-22.
- Sun X M, Chen X Y. The effect of Compound Ejiao Oral Liquid on the expression of apoptosis proteins Bcl-2 and Bax in transplanted Lewis lung cancer tissues [J]. Med Innov China, 2011, 8(7): 20-22.
- [22] 孙叙敏, 陈信义. 复方阿胶浆对小鼠 lewis 肺癌 CyclinD1、CD44 表达的影响 [J]. 世界中医药, 2013, 8(3): 318-321.
- Sun X M, Chen X Y. Influence of Compound E-Jiao Slurry (CEJS) on the expression of CyclinD1, CD44 of Lewis

- lung carcinoma tissues in mice [J]. *World Chin Med*, 2013, 8(3): 318-321.
- [23] Zhang Y, Ye T, Hong Z, et al. Pharmacological and transcriptome profiling analyses of Fufang Ejiao Jiang during chemotherapy-induced myelosuppression in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 238: 111869.
- [24] Duan J, Pan L, Yang M. Preoperative elevated neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) and derived NLR are associated with poor prognosis in patients with breast cancer: A meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(49): e13340.
- [25] Grivannikov S I, Greten F R, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer [J]. *Cell*, 2010, 140(6): 883-899.
- [26] Liu J, Li S, Zhang S, et al. Systemic immune-inflammation index, neutrophil-to-lymphocyte ratio, platelet-to-lymphocyte ratio can predict clinical outcomes in patients with metastatic non-small-cell lung cancer treated with nivolumab [J]. *J Clin Lab Anal*, 2019, 33(8): e22964.
- [27] Kumarasamy C, Sabarimurugan S, Madurantakam R M, et al. Prognostic significance of blood inflammatory biomarkers NLR, PLR, and LMR in cancer-A protocol for systematic review and meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(24): e14834.
- [28] Kiri T, Yamamoto M, Nagano T, et al. The time-series behavior of neutrophil-to-lymphocyte ratio is useful as a predictive marker in non-small cell lung cancer [J]. *PLoS One*, 2018, 13(2): e0193018.
- [29] Joshi S, Sharabi A. Targeting myeloid-derived suppressor cells to enhance natural killer cell-based immunotherapy [J]. *Pharmacol Ther*, 2022, 235: 108-114.
- [30] Wu Y, Yi M, Niu M, et al. Myeloid-derived suppressor cells: an emerging target for anticancer immunotherapy [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 184.
- [31] Marchesi J R, Dutilh B E, Hall N, et al. Towards the human colorectal cancer microbiome [J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e20447.
- [32] Wang T, Cai G, Qiu Y, et al. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers [J]. *ISME J*, 2012, 6(2): 320-329.
- [33] 栗敏, 马洪宇, 沈继朵, 等. 复方阿胶浆对 H22 肝癌荷瘤小鼠 5-FU 化疗的增效减毒作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(20): 216-219.
- Li M, Ma H Y, Shen J D, et al. Effects of Fufang Ejiao Jiang enhances efficacy and reduces toxicity of 5-FU in hepatoma H22-bearing mice [J]. *Chin J Exper Tradit Med Form*, 2012, 18(20): 216-219.
- [34] Li M, Ma H Y, Shen J D, et al. Effects of Fufang Ejiao Jiang enhances efficacy and reduces toxicity of 5-FU in hepatoma H22-bearing mice [J]. *Chin J Exper Tradit Med Form*, 2012, 18(20): 216-219.
- [35] Wang Q, Xie B, Liu S, et al. What happens to the immune microenvironment after PD-1 inhibitor therapy? [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 773168.
- [36] Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: Current researches in cancer [J]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10(3): 727-742.
- [37] Pardoll D M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(4): 252-264.
- [38] Okkenhaug K. Signaling by the phosphoinositide 3-kinase family in immune cells [J]. *Annu Rev Immunol*, 2013, 31: 675-704.
- [39] Kuen D S, Kim B S, Chung Y. IL-17-producing cells in tumor immunity: Friends or foes ? [J]. *Immune Netw*, 2020, 20(1): e6.
- [40] Yang Y, Islam M S, Hu Y, et al. TNFR2: Role in cancer immunology and immunotherapy [J]. *Immunotargets Ther*, 2021, 10: 103-122.
- [41] Wen R, Huang X, Long J, et al. Advances in traditional Chinese herbal medicine and their pharmacodynamic mechanisms in cancer immunoregulation: a narrative review [J]. *Transl Cancer Res*, 2024, 13(2): 1166-1187.
- [42] Hu M, Yang J, Qu L, et al. Ginsenoside Rk1 induces apoptosis and downregulates the expression of PD-L1 by targeting the NF- κ B pathway in lung adenocarcinoma [J]. *Food Funct*, 2020, 11(1): 456-471.
- [43] Wang W, Kong M, Shen F, et al. Ginsenoside Rg3 targets glycosylation of PD-L1 to enhance anti-tumor immunity in non-small cell lung cancer [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1434078.
- [44] Wang X H, Fu Y L, Xu Y N, et al. Ginsenoside Rh1 regulates the immune microenvironment of hepatocellular carcinoma via the glucocorticoid receptor [J]. *J Integr Med*, 2024, 22(6): 709-718.
- [45] 武文华. 人参皂苷 Rg₁ 在裸鼠抗肿瘤治疗中免疫调节作用的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2017.
- Wu W H. Immunomodulatory effects of ginsenoside Rg₁ in nude mice with antitumor therapy [D]. Changchun: Jilin University, 2017.
- [46] Huang M Y, Chen Y C, Lyu W Y, et al. Ginsenoside Rh2 augmented anti-PD-L1 immunotherapy by reinvigorating CD8(+) T cells via increasing intratumoral CXCL10 [J]. *Pharmacol Res*, 2023, 198: 106988.
- [47] Jin D, Cao M, Mu X, et al. Catalpol inhibited the proliferation of T24 human bladder cancer cells by inducing apoptosis through the blockade of Akt-mediated

- anti-apoptotic signaling [J]. Cell Biochem Biophys, 2015, 71(3): 1349-56.
- [48] Kim C W, Choi K C. Potential roles of iridoid glycosides and their underlying mechanisms against diverse cancer growth and metastasis: do they have an inhibitory effect on cancer progression? [J]. Nutrients, 2021, 13(9): 2974.
- [49] 骆紫燕, 卿德刚, 孙宇, 等. 管花肉苁蓉苯乙醇苷的巨噬细胞激活作用及其与当归、黄芪在调节免疫方面的协同作用 [J]. 食品工业科技, 2020, 41(21): 311-316.
- Luo Z Y, Qing D G, Sun Y, et al. Activation of macrophage of phenylethanol glycosides extracted from *Cistanche tubulosa* and its synergistic effect with *Angelica sinensis* and *Astragalus propinquus* in regulating immunity [J]. Sci Tech Food Industry, 2020, 41(21): 311-316.
- [50] Yuan P, Fu C, Yang Y, et al. *Cistanche tubulosa* phenylethanoid glycosides induce apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by mitochondria-dependent and MAPK pathways and enhance antitumor effect through combination with Cisplatin [J]. Integr Cancer Ther, 2021, 20: 15347354211013085.
- [51] 张丹, 王翠霞, 汤云. 党参炔苷调节 TIM3/Gal9 信号通路对子宫内膜癌细胞增殖、凋亡和免疫逃逸的影响 [J]. 标记免疫分析与临床, 2024, 31(3): 512-518, 544.
- Zhang D, Wang C X, Tang Y. Impacts of Lobetyolin on the proliferation, apoptosis, and immune escape of endometrial cancer cells by regulating TIM3/Gal9 signaling pathway [J]. Labeled Immunoassays Clin Med, 2024, 31(3): 512-518.
- [52] Zeng A Q, Liang X, Zhu S M, et al. Chlorogenic acid induces apoptosis, inhibits metastasis and improves antitumor immunity in breast cancer via the NF- κ B signaling pathway [J]. Oncol Rep, 2021, 45(2): 717-727.

[责任编辑 兰新新]