

人参皂苷 Rg₃ 调节免疫检查点 PD-L1 抑制肺癌 Lewis 细胞增殖的作用及机制研究

王蔚^{1,2}, 王旭^{1,2}, 余苏云^{1,2}, 黄帅^{1,2}, 丁语石^{1,2}, 陈文星^{1,2}, 王爱云^{1,2}, 陆茵^{1,2*}

1. 南京中医药大学药学院 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 江苏 南京 210023

2. 南京中医药大学江苏省中医药防治肿瘤协同创新中心, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 研究人参皂苷 Rg₃ 对小鼠非小细胞肺癌 Lewis 细胞 (LLC) 中免疫检查点程序性死亡分子 1 配体 (PD-L1) 的调节作用及其作用机制。方法 通过 MTT 法及细胞长时程动态监测法观察人参皂苷 Rg₃ 对 LLC 增殖的影响; 20 ng/mL γ 干扰素 (IFN- γ) 处理 LLC 制备 PD-L1 高表达体外模型, 采用人参皂苷 Rg₃ 进行干预, 流式细胞术及免疫荧光检测人参皂苷 Rg₃ 对 PD-L1 表达的影响; 采用 Western blotting 法验证人参皂苷 Rg₃ 对 PI3K/蛋白激酶 B (Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 通路相关蛋白表达的影响。结果 人参皂苷 Rg₃ 16、32、64、128 $\mu\text{mol/L}$ 能够显著抑制 LLC 增殖 ($P < 0.01$) 及减少 IFN- γ 诱导的 PD-L1 表达 ($P < 0.05$); 人参皂苷 Rg₃ 32、64 $\mu\text{mol/L}$ 能够降低 PI3K、mTOR 蛋白的表达水平 ($P < 0.01$); 人参皂苷 Rg₃ 16、32、64 $\mu\text{mol/L}$ 能够抑制 Akt 蛋白的磷酸化 ($P < 0.05$)。结论 人参皂苷 Rg₃ 能够显著抑制 LLC 中 PD-L1 表达, 通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路, 阻断 PD-L1 介导的肿瘤细胞免疫逃逸, 增强 T 细胞的免疫应答作用, 抑制 LLC 生长。

关键词: 非小细胞肺癌; 人参皂苷 Rg₃; 程序性死亡分子 1 配体; PI3K/Akt/mTOR 通路; 细胞增殖

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)01-0166-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.01.025

Effect and mechanism of ginsenoside Rg₃ on inhibition of LLC proliferation in non-small cell lung cancer cells by immune checkpoint PD-L1

WANG Wei^{1,2}, WANG Xu^{1,2}, YU Su-yun^{1,2}, HUANG Shuai^{1,2}, DING Yu-shi^{1,2}, CHEN Wen-xing^{1,2},
WANG Ai-yun^{1,2}, LU Yin^{1,2}

1. Jiangsu Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica, School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Traditional Chinese Medicine Prevention and Treatment of Tumor, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To investigate the effect of ginsenoside Rg₃ on immune checkpoint PD-L1 in Lewis cells (LLC) and to explore the related mechanism. **Methods** The effects of ginsenoside Rg₃ on the proliferation of LLC were observed by MTT assay and cell long-term dynamic monitoring. LLC cells treated with 20 ng/mL IFN- γ were used to construct experimental model with high expression of PD-L1 *in vitro*. The effect of ginsenoside Rg₃ on expression of PD-L1 was detected by flow cytometry and immunofluorescence. The effect of ginsenoside Rg₃ on the protein expression of PI3K/Akt/mTOR pathway was verified by Western blotting. **Results** Ginsenoside Rg₃ at 16, 32, 64, and 128 $\mu\text{mol/L}$ significantly inhibited the proliferation of LLC ($P < 0.01$) and reduced the expression of PD-L1 induced by IFN- γ ($P < 0.05$). Ginsenoside Rg₃ at 32 and 64 $\mu\text{mol/L}$ significantly decreased the protein expression of PI3K and mTOR ($P < 0.01$), and ginsenoside Rg₃ at 16, 32, and 64 $\mu\text{mol/L}$ significantly inhibited the phosphorylation of Akt proteins ($P < 0.05$). **Conclusion** Ginsenoside Rg₃ significantly inhibited the expression of PD-L1 in LLC cells by inhibiting PI3K/Akt/mTOR pathway. Ginsenoside Rg₃ blocked the tumor cells escaping immune response by PD-L1 over-expression, enhanced the immune response of T cells, and inhibited the growth of non-small cell lung cancer cells.

收稿日期: 2018-07-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81403260); 国家自然科学基金资助项目 (81673725); 国家自然科学基金资助项目 (81573859); 国家自然科学基金资助项目 (81673648); 国家自然科学基金资助项目 (81703765); 江苏省研究生创新基金项目 (KYCX18_1584); 江苏省研究生创新基金项目 (KYCX18_1616); 江苏省研究生创新基金项目 (KYCX17_1315); 江苏省自然科学基金项目 (BK20151567); 江苏高校品牌专业建设工程资助项目 (TAPP-PPZY2015A070); 江苏高校中药学优势学科建设工程资助项目 (PAPD) [苏政办发 (2014) 37 号文]; 江苏省中药领军人才项目 (SLJ0229)

作者简介: 王蔚 (1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药及复方抗肿瘤。Tel: 18652677506 E-mail: m18652677506@163.com

***通信作者** 陆茵 (1963—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药及复方抗肿瘤。Tel: (025)85811239 E-mail: luyingreen@126.com

Key words: non-small cell lung cancer; ginsenoside Rg₃; PD-L1; PI3K/Akt/mTOR signal pathway; cell proliferation

非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 是致死率极高的一类恶性肿瘤, 居我国恶性肿瘤发病率及致死率之首^[1]。近年来, 肿瘤免疫治疗成为研究的热点, 同时给 NSCLC 药物研究带来新希望。机体免疫系统通过免疫监视清除肿瘤细胞, 然而当程序性死亡分子 1 配体 (PD-L1) 高表达后, 导致机体免疫功能被抑制, 肿瘤细胞逃避机体免疫监视和 T 细胞的杀伤作用^[2]。研究表明, 在 NSCLC 实体瘤中常见 PD-L1 过度表达^[3]。因此, 寻找抑制 PD-L1 的药物将成为治疗 NSCLC 的新方向。

人参皂苷 Rg₃ 是多种人参皂苷成分中免疫调节作用最显著的小分子物质, 研究表明人参皂苷 Rg₃ 可通过多种途径增强机体对肿瘤细胞的免疫能力^[4]。然而人参皂苷 Rg₃ 与免疫检查点之间的关联研究较少。人参皂苷调节免疫发挥抗肿瘤的作用是否与调控 PD-L1 表达有关尚不明确。本研究对人参皂苷 Rg₃ 影响 PD-L1 表达的作用进行研究, 并初步探索其作用机制, 为抑制 PD-L1 的中药新药开发提供参考。

1 材料

1.1 细胞

小鼠非小细胞肺癌 Lewis 细胞 (LLC) 源于 ATCC 细胞库。

1.2 药品与试剂

人参皂苷 Rg₃ (成都曼思特生物科技有限公司, 质量分数 98.44%, 批号 MUST-16030711); DMEM 基础培养基、胎牛血清 (Gibco 公司); RIPA 裂解液+PMSF (北京鼎国昌盛生物技术有限公司); 磷酸酶抑制剂 (江苏凯基生物技术有限公司); ECL 化学发光试剂盒 (Millipore 公司); MTT (Promega 公司); γ 干扰素 (IFN- γ , Peprotec 公司); IFN- γ 稀释液 (杭州联科生物技术有限公司); 流式细胞术 PD-L1 抗体 (eBioscience 公司); 免疫荧光 PD-L1 抗体、GAPDH 抗体 (Proteintech 公司); 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 抗体 (Abclonal 公司); 蛋白激酶 B (Akt)、p-Akt、PI3 抗体 (CST 公司); 山羊抗小鼠 IgG H&L (Abcam 公司); 二抗 (Bioword 公司); DAPI 染色液 (Beyotime 公司)。

1.3 仪器

CO₂ 细胞培养箱, Thermo 公司; 酶标仪, 美国 BioTek 公司; Flow Cytometer C6 流式细胞计数仪, BD 公司; 荧光倒置显微镜, Zeiss 公司; 凝胶成像

系统, 美国 Bio-Rad 公司。

2 方法

2.1 MTT 法检测人参皂苷 Rg₃ 对 LLC 增殖的影响

DMEM 完全培养基 (DMEM 基础培养基+10% 胎牛血清+青霉素+链霉素) 培养 LLC, PBS 清洗 2 遍, 胰酶消化, 离心后计数, 调整细胞数为 8×10^3 个/mL, 接种于 96 孔细胞培养板, 每孔加入 200 μ L 细胞悬液, 培养 12~24 h 细胞待贴壁并显示形态。实验分为对照组及人参皂苷 Rg₃ 1、2、4、8、16、32、64、128 μ mol/L 组。每组设置 6 个平行孔。5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 的饱和湿度培养箱孵育 24、48 h 后, 弃去上清, 各孔加入 100 μ L 基础培养基 DMEM 和 MTT 10 μ L, 孵育 4 h, 移除上清, 各孔加入 DMSO 100 μ L 溶解, 震荡 5 min 混匀后, 在 490 nm 处读取其吸光度 (A) 值。

2.2 长时程细胞动态监测人参皂苷 Rg₃ 对 LLC 增殖的影响

DMEM 完全培养基培养 LLC, PBS 清洗 2 遍, 胰酶消化, 离心后计数, 调整细胞数为 8×10^3 个/mL, 接种于 96 孔细胞培养板, 每孔加入 200 μ L 细胞悬液, 培养 12~24 h 待细胞贴壁并显示形态。实验分组同“2.1”项。给药后置于 CO₂ 细胞培养箱中, 培养 24、48 h, 每小时拍照记录进行细胞长时程动态监测。

2.3 流式细胞术筛选 IFN- γ 诱导 PD-L1 表达的有效浓度

取对数生长期的 LLC, PBS 清洗 2 遍, 胰酶消化, 离心后计数, 调整细胞数为 1×10^5 个/mL, 接种于 6 孔板上, 每孔加入 2 mL 细胞悬液。提前用稀释液配制不同质量浓度的 IFN- γ 。细胞分为 IgG 阴性对照组及 IFN- γ 10、20、30 ng/mL 组, 每组设置 3 个平行对照孔。各组分别加入对应药物继续培养 24 h, PBS 清洗 2 遍, 不含 EDTA 的胰酶轻轻吹打消化, 1 000 r/min、5 min 离心后计数, 调整细胞数为 5×10^6 个/mL。除阴性对照组外各组每 200 μ L 体系加入 1 μ L PD-L1 抗体, 阴性对照组每 200 μ L 体系加入 1 μ L 山羊抗小鼠 IgG。常温孵育 15 min 后 500 \times g 离心 5 min, 弃上清加入 100 μ L PBS 重悬, 采用 Flow Cytometer C6 检测 PD-L1 表达。

2.4 流式细胞术检测人参皂苷 Rg₃ 对 LLC PD-L1 表达的影响

取对数生长期的 LLC, PBS 清洗 2 遍, 胰酶消

化,离心后计数,调整细胞数为 1×10^5 个/mL,接种于 6 孔板,每孔加入 2 mL 细胞悬液。实验分为对照组、模型组及人参皂苷 Rg₃ 16、32、64、128 $\mu\text{mol/L}$ 组,每组设 3 个平行孔。除对照组外每孔分别加入 20 ng/mL 的 IFN- γ 诱导 PD-L1 表达,培养 24 h 后,各给药组分别给予不同浓度的人参皂苷 Rg₃,对照组及模型组加入 DMSO。继续培养 24 h,检测各组 PD-L1 表达,方法同“2.3”项。

2.5 免疫荧光法检测人参皂苷 Rg₃ 对 LLC PD-L1 表达的影响

取对数生长期的 LLC, PBS 清洗 2 遍,胰酶消化,调整细胞数为 1×10^5 个/mL,接种于 6 孔板(内含细胞爬片),每孔加入 2 mL 细胞悬液。实验分组及处理同“2.4”项。继续培养 24 h 后, PBS 洗涤,多聚甲醛固定 10 min, 0.1% Triton X-100 透化 10 min, 1% BSA 室温封闭 30 min, 一抗 PD-L1 (1:10) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,山羊抗小鼠 IgG(1:1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, Hoechst33342 孵育 5 min, 封片,荧光倒置显微镜下观察,放大 400 倍拍摄。

2.6 Western blotting 法检测 PI3K/Akt/mTOR 通路相关蛋白表达

取对数生长期的 LLC,接种于 6 孔板。实验分为对照组、人参皂苷 Rg₃ 16、32、64 $\mu\text{mol/L}$ 组。培养 24 h 后,对照组给予 DMSO,各给药组给予不同浓度人参皂苷 Rg₃。继续培养 24 h, PBS 清洗 2 遍,加入细胞裂解液(RIPA 裂解液-蛋白酶抑制剂-磷酸酶抑制剂 100:1:1)冰上裂解细胞,离心取上清,加入 $5 \times$ loading buffer (1:4), 100 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min, 样品保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。蛋白样品上样量 25 μg ,电泳条件 40 A, 100 min, 转膜条件 100 V, 90 min。加入一抗(mTOR、Akt、p-Akt、PI3K) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,二

抗室温孵育 2 h, TBST 洗涤后 ECL 发光液显影。使用 Gelpro 凝胶分析软件进行蛋白条带灰度分析。

2.7 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件对实验数据进行统计学处理分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间采用单因素方差分析比较,样本均数间比较采用 LSD-*t* 检验。

3 结果

3.1 人参皂苷 Rg₃ 对 LLC 增殖的影响

不同浓度的人参皂苷 Rg₃ 作用于 LLC 24、48 h 后, MTT 结果显示(图 1),人参皂苷 Rg₃ 在浓度为 16、32、64、128 $\mu\text{mol/L}$ 时能够显著抑制 LLC 增殖,其他浓度下人参皂苷 Rg₃ 未明显抑制 LLC 增殖。24、48 h 长时程细胞动态监测显示(图 2),人参皂苷 Rg₃ 呈浓度依赖性地抑制 LLC 增殖。由此可见,人参皂苷 Rg₃ 能够显著抑制 LLC 增殖,其抑制作用呈现出时间和浓度依赖性。

3.2 IFN- γ 诱导 PD-L1 表达的浓度筛选

IFN- γ 是协调肿瘤免疫应答的中枢细胞因子之一。肿瘤浸润淋巴细胞产生 IFN- γ , 进一步启动细胞周期停滞并诱导相邻肿瘤细胞的细胞凋亡^[5]。然而,研究表明 IFN- γ 通过调控细胞周期素依赖蛋白激酶 5 (CDK5) 上调 PD-L1 表达,促进肿瘤细胞免疫逃逸^[6]。本实验分别采用 10、20、30 ng/mL 的 IFN- γ 诱导 PD-L1 表达,结果(图 3)显示 IFN- γ 质量浓度高于 20 ng/mL 时显著增加 LLC 中 PD-L1 的表达 ($P < 0.001$)。因此,在后续实验中选用 20 ng/mL IFN- γ 构建 PD-L1 高表达的 LLC 体外实验模型。

3.3 人参皂苷 Rg₃ 对 LLC PD-L1 表达的影响

IFN- γ 诱导 PD-L1 表达后,分别以人参皂苷 Rg₃ 16、32、64、128 $\mu\text{mol/L}$ 干预 LLC。免疫荧光结果显示(图 4),与对照组比较,模型组 PD-L1 高表达

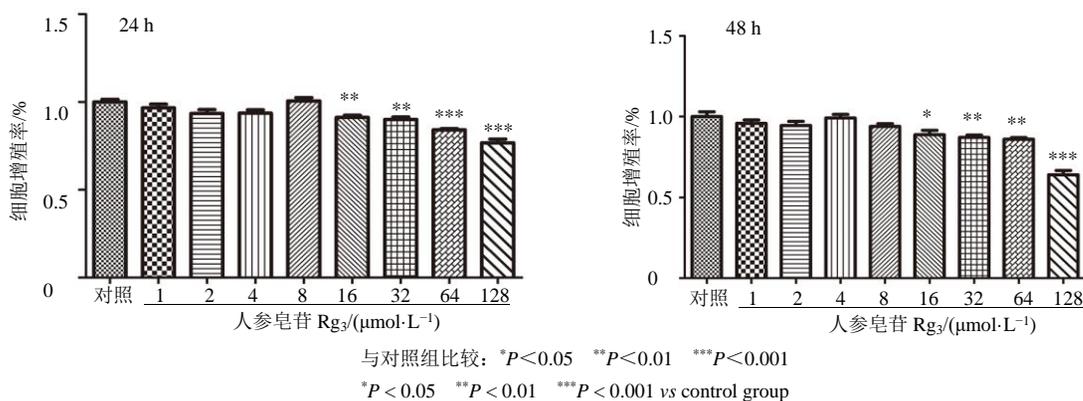


图 1 人参皂苷 Rg₃ 对 LLC 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Inhibitory effects of ginsenoside Rg₃ on proliferation of LLC ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

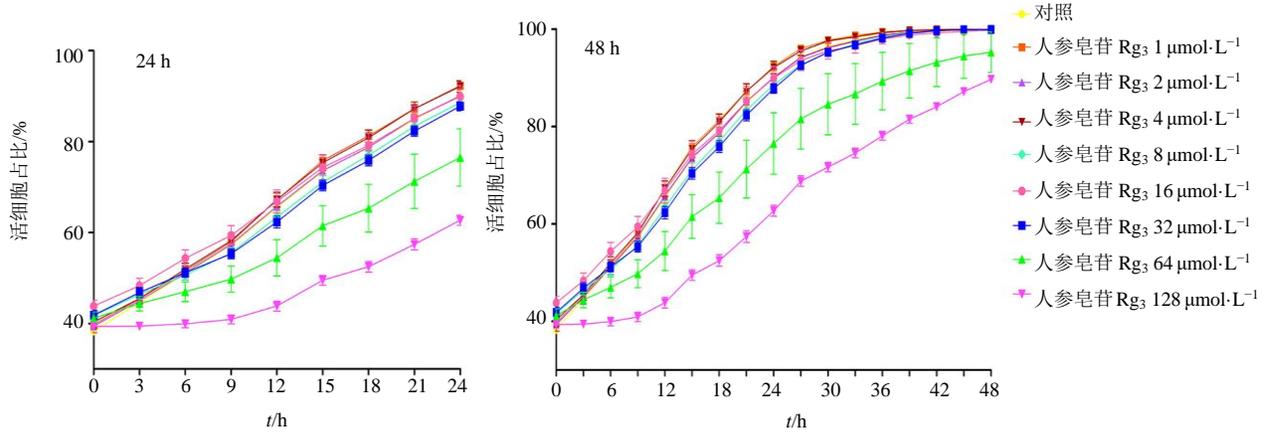
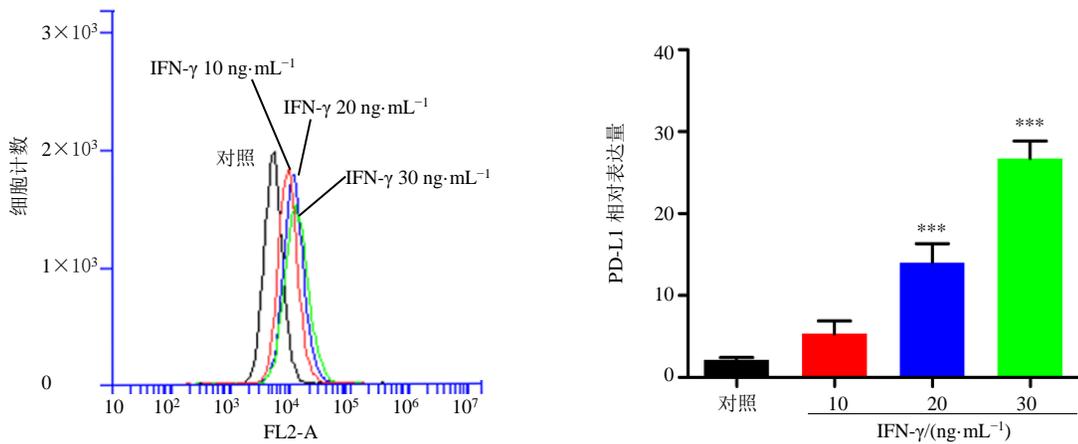


图 2 长时程细胞动态监测人参皂苷 Rg₃ 对 LLC 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

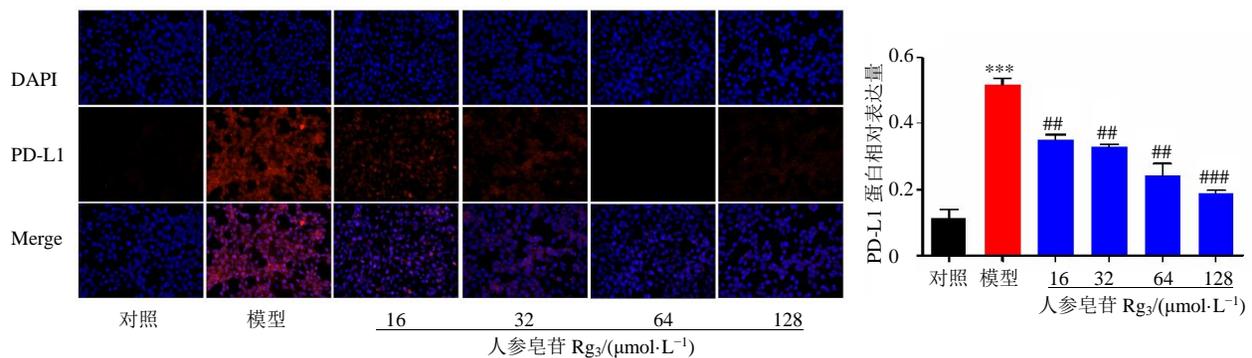
Fig. 2 Inhibitory effects of ginsenoside Rg₃ on proliferation of LLC by cell long-term dynamic monitoring ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



与对照组比较: *** $P < 0.001$
*** $P < 0.001$ vs control group

图 3 IFN- γ 诱导 LLC 细胞 PD-L1 表达的浓度筛选 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Concentration screening of PD-L1 expression in LLC cells induced by IFN- γ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$
*** $P < 0.001$ vs control group; ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group

图 4 人参皂苷 Rg₃ 对 LLC 细胞表面 PD-L1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$, 免疫荧光)

Fig. 4 Effects of ginsenoside Rg₃ on PD-L1 expression of LLC cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$, immunofluorescence)

于 LLC 细胞膜表面 (红色), 人参皂苷 Rg₃ 干预后, PD-L1 表达显著降低 ($P < 0.01, 0.001$)。流式细胞

计数结果显示 (图 5), 与对照组比较, 模型组细胞 PD-L1 表达显著增加 ($P < 0.001$)。与模型组比较,

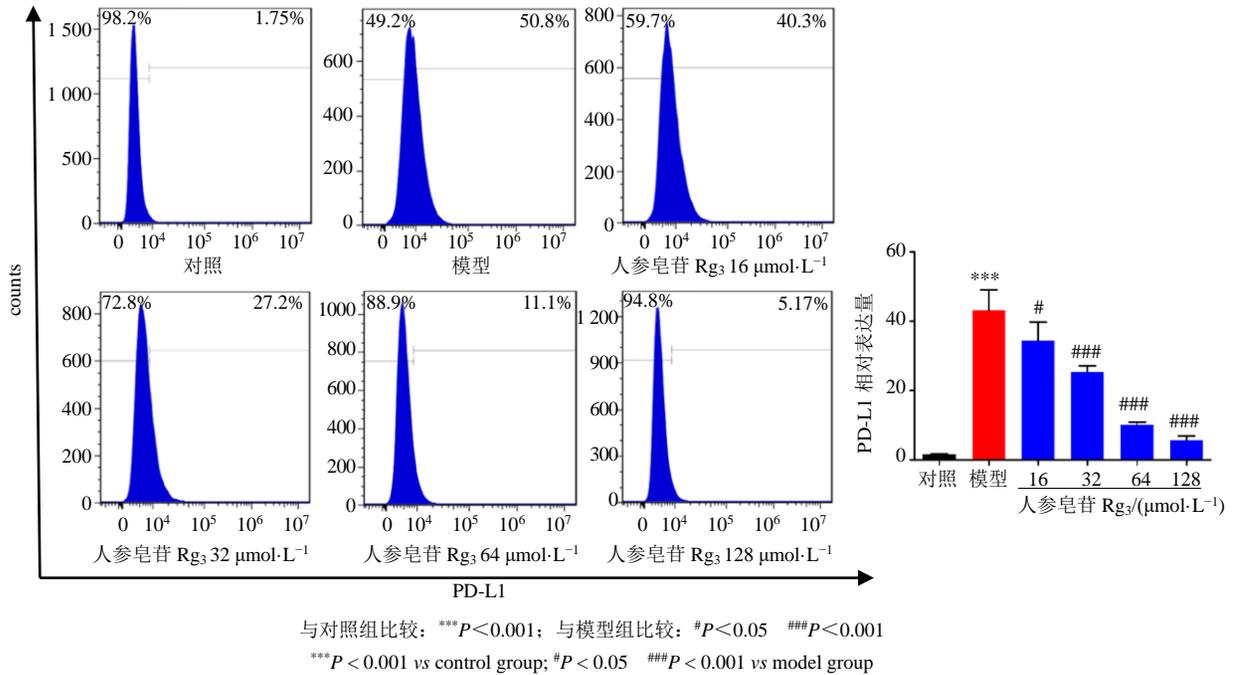


图 5 人参皂苷 Rg₃ 对 LLC 细胞表面 PD-L1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$, 流式细胞术)

Fig. 5 Effects of ginsenoside Rg₃ on PD-L1 expression of LLC cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$, flow cytometry)

人参皂苷 Rg₃ 呈浓度依赖性地降低 PD-L1 的表达 ($P < 0.05, 0.001$)。

3.4 人参皂苷 Rg₃ 对 PI3K/Akt/mTOR 通路相关蛋白表达的影响

进一步研究人参皂苷 Rg₃ 的作用机制, 由于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路与 PD-L1 表达存在关联。因此检测肿瘤细胞中 PI3K、mTOR、Akt、p-Akt 的表达情况。Western blotting 结果表明 (图 6), 人参皂苷 Rg₃ 16 μmol/L 组细胞 p-Akt 表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 人参皂苷 Rg₃ 32 μmol/L 组细胞 mTOR、PI3K、p-Akt 表达显著降低 ($P < 0.05, 0.01$); 人

参皂苷 Rg₃ 64 μmol/L 组细胞 mTOR、PI3K、p-Akt 表达显著降低 ($P < 0.01, 0.001$); 各浓度下人参皂苷 Rg₃ 均不显著影响细胞 Akt 表达。人参皂苷 Rg₃ 可能通过下调 PI3K、mTOR 表达, 抑制 Akt 活化, 从而阻断 PI3K/Akt/mTOR 信号通路, 进一步降低 LLC 表面 PD-L1 表达, 阻断肿瘤细胞逃避免疫应答。

4 讨论

在传统中医学中, 人参具有大补元气、复脉固脱、补脾益肺等功效^[7]。人参中有效活性成分人参皂苷在调节免疫方面的作用尤为显著。现代药理学研究发现, 人参皂苷通过以下方式影响机体免疫系

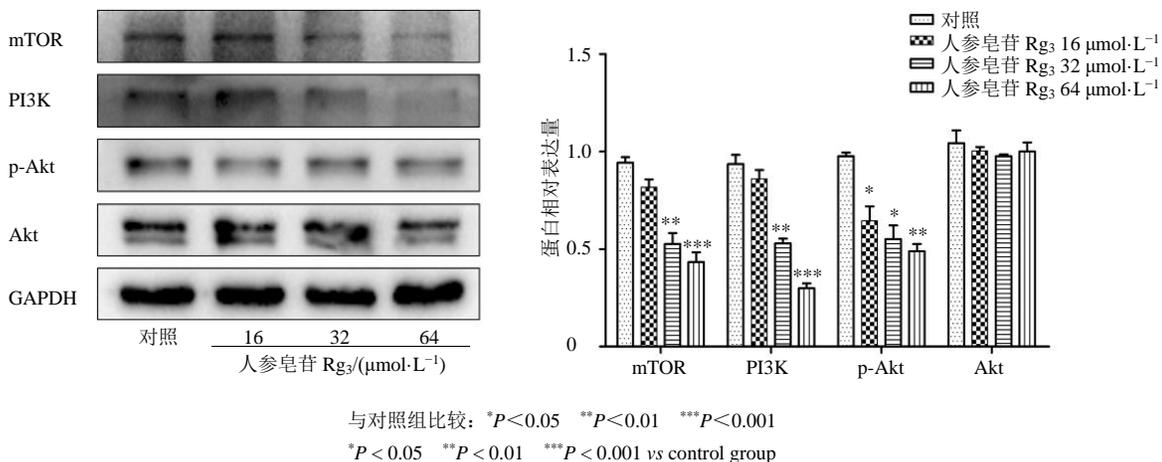


图 6 人参皂苷 Rg₃ 对 LLC 细胞 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effects of ginsenoside Rg₃ on protein expression of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

统：通过保护固有免疫器官胸腺、脾脏、淋巴结等发挥抗病毒作用；增强树突状细胞、吞噬细胞、NK 细胞等固有免疫细胞的免疫应答，杀伤病毒感染细胞及肿瘤细胞；调节细胞因子、补体等免疫分子产生免疫调节效应^[8-10]。人参中含有近 50 种人参皂苷成分，其中多种成分均具有显著的抑制肿瘤细胞增殖、转移的作用。人参皂苷 Rg₃ 为四环三萜类原人参二醇型皂苷，存在 2 种构型，分别为 20 (S)-型和 20 (R)-型，其中 20 (S)-型 Rg₃ 具有显著抗肿瘤效应，是众多 R 型人参皂苷中调节免疫和抗肿瘤作用最显著的有效成分^[11]。

PD-L1 表达于多种肿瘤细胞表面，其与 T 细胞上的 PD-1 相结合后，导致 T 细胞失活，无法杀伤肿瘤细胞，最终诱导免疫逃逸。NSCLC 是最具攻击性和破坏性的恶性肿瘤之一。在 NSCLC 实体瘤中常见 PD-L1 过度表达，虽然 PD-L1 作为肺癌的生物标志物还存在争议，但是肿瘤细胞发生免疫逃逸的微环境中 PD-L1 的高表达值得关注^[12-13]。免疫应答微环境涉及多种信号调节，包括信号传导及转录激活因子 STAT3、Akt/mTOR 或编码 RAF 家族丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 BRAF 的突变^[14-15]。PD-L1 的调节是复杂的，取决于潜在的转录和信号转导网络状态以及蛋白翻译水平。PI3K/Akt/mTOR 信号通路是多种细胞过程中的重要调节因子，在 70% 的 NSCLC 病例中发生 Akt/mTOR 过度活化^[16]。因此，PI3K/Akt/mTOR 通路能够抑制 PD-L1 表达，阻断肿瘤细胞免疫逃逸。

目前，人参皂苷 Rg₃ 对 PD-L1 的作用研究较少。本研究通过 MTT 法及长时程动态监测验证人参皂苷 Rg₃ 可显著抑制 LLC 增殖。流式细胞术及免疫荧光结果显示人参皂苷 Rg₃ 调控 IFN- γ 诱导的 PD-L1 高表达。并且免疫印迹结果表明该作用通过 PI3K/Akt/mTOR 通路介导，从而增强 T 细胞的肿瘤细胞杀伤作用，抑制 LLC 增殖。本研究从免疫检查点 PD-L1 角度揭示了人参皂苷 Rg₃ 调节免疫、抗肿瘤的作用，为相关新药的研究提供了依据。

然而，本研究仅涉及体外实验部分。后续实验将对照人参皂苷 Rg₃ 对免疫正常小鼠以及免疫缺陷裸鼠的 LLC 移植瘤模型的影响进行体内验证，以及对人参皂苷增强 T 细胞活力的具体机制进行深入研究，以阐明人参皂苷 Rg₃ 通过调节免疫检查点 PD-L1 抑制 NSCLC 发生发展的机制。

参考文献

- [1] Reck M, Heigener D F, Mok T, *et al.* Management of non-small-cell lung cancer: Recent developments [J]. *Lancet*, 2013, 382(9893): 709-719.
- [2] Hughes P E, Caenepeel S, Wu L C. Targeted therapy and checkpoint immunotherapy combinations for the treatment of cancer [J]. *Trend Immunol*, 2016, 37(7): 462-476.
- [3] Smit E F, Mm V D H. PD-L1 in non-small-cell lung cancer: The third target for immunotherapy [J]. *Lancet*, 2016, 387(10030): 1795-1796.
- [4] 罗林明, 石雅宁, 姜懿纳, 等. 人参抗肿瘤作用的有效成分及其机制研究进展 [J]. *中草药*, 2017, 48(3): 582-596.
- [5] Zamarron B F, Chen W J. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression [J]. *Inter J Biol Sci*, 2011, 7(5): 651-658.
- [6] Dorand R D, Nthale J, Myers J T, *et al.* Cdk5 disruption attenuates tumor PD-L1 expression and promotes antitumor immunity [J]. *Science*, 2016, 353(6297): 399-403.
- [7] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [8] Zhang B, Zhou W J, Gu C J, *et al.* The ginsenoside PPD exerts anti-endometriosis effects by suppressing estrogen receptor-mediated inhibition of endometrial stromal cell autophagy and NK cell cytotoxicity [J]. *Cell Death Dis*, 2018, doi: 10.1038/s41419-018-0581-2.
- [9] Choi Y J, Kang L J, Lee S G. Stimulation of DDX3 expression by ginsenoside Rg₃ through the Akt/p53 pathway activates the innate immune response via TBK1/IKK ϵ /IRF3 signalling [J]. *Curr Med Chem*, 2014, 21(8): 1050-1060.
- [10] Yang X, Zou J, Cai H, *et al.* Ginsenoside Rg₃ inhibits colorectal tumor growth via down-regulation of C/EBP β /NF- κ B signaling [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, doi: 10.1016/j.biopha.2017.11.092.
- [11] Wong A S, Che C M, Leung K W. Recent advances in ginseng as cancer therapeutics: A functional and mechanistic overview [J]. *Nat Prod Rep*, 2015, 32(2): 256-272.
- [12] Hiley C T, Le Q J, Santis G, *et al.* Challenges in molecular testing in non-small-cell lung cancer patients with advanced disease [J]. *Lancet*, 2016, 388(10048): 1002-1011.
- [13] Chen F, Zhang Y, Parra E, *et al.* Multiplatform-based molecular subtypes of non-small cell lung cancer [J]. *Oncogene*, 2016, 36(10): 1384-1393.
- [14] Chan B A, Hughes B G. Targeted therapy for non-small cell lung cancer: Current standards and the promise of the future [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2015, 4(1): 36-54.
- [15] Obenauf A C, Zou Y, Ji A L, *et al.* Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression [J]. *Nature*, 2015, 520(7547): 368-372.
- [16] Chan B A, Hughes B G. Targeted therapy for non-small cell lung cancer: Current standards and the promise of the future [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2015, 4(1): 36-54.