

# 人参多糖-壳寡糖纳米粒联合放疗通过 IFN-I 介导的 JAK3/STAT5 通路促进 NK 细胞分化增强抗肿瘤效应

王浩捷, 胡哲铭, 于兴泰, 陈祉君, 吴焱昕, 樊家怡, 王文艺, 张丽群, 刘笑洋, 陆 洋\*

北京中医药大学中药学院, 北京 102488

**摘要:**目的 构建人参多糖-壳寡糖纳米粒 (*Ginseng polysaccharide-chitosan oligosaccharide nanoparticles*, GP-NPs), 并探究其联合放疗能否通过激活 I 型干扰素 (interferon-I, IFN-I) 介导的 Janus 激酶 3 (Janus kinase 3, JAK3)/信号转导和转录激活蛋白 5 (signal transducer and activator of transcription 5, STAT5) 信号通路, 促进自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞向高细胞毒性亚群分化, 从而增强对非小细胞肺癌的抗肿瘤免疫应答。**方法** 通过离子交联法制备 GP-NPs, 并对其粒径、分散性及稳定性进行表征。建立 A549 肺癌细胞皮下荷瘤裸鼠模型, 将小鼠分为 PBS 组、单纯放疗组和 GP-NPs 联合放疗组。通过测量肿瘤体积、ELISA 检测血清细胞因子水平、流式细胞术分析 NK 细胞亚群、Western blotting 检测 JAK3/STAT5 通路蛋白表达, 以及组织病理学分析, 综合评价 GP-NPs 联合放疗的抗肿瘤效果与机制。**结果** GP-NPs 联合放疗显著抑制肿瘤生长, 且效果显著优于单纯放疗组 ( $P<0.01$ )。联合治疗组血清中  $\gamma$  干扰素 (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、白细胞介素-15 (interleukin-15, IL-15)、颗粒酶和穿孔素水平显著升高 ( $P<0.01$ )。流式细胞术显示肿瘤内 NK 细胞浸润比例增加 ( $P<0.01$ ), 且成熟细胞毒亚群 (CD27<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) 比例显著上升 ( $P<0.01$ )。Western blotting 结果表明联合治疗显著激活 JAK3/STAT5 信号通路 ( $P<0.01$ )。组织学分析显示联合治疗组肿瘤细胞凋亡增加、DNA 损伤加重、NK 细胞浸润增强, 且主要脏器未见明显毒性。**结论** GP-NPs 联合放疗通过激活 IFN-I 介导的 JAK3/STAT5 信号通路, 促进 NK 细胞向高细胞毒性亚群分化, 增强其抗肿瘤功能。该联合策略不仅显著提升放疗的疗效, 还具有良好的生物安全性, 为非小细胞肺癌的免疫联合治疗提供了新的实验依据和策略方向。

**关键词:** 人参多糖; 壳寡糖; 纳米粒; 免疫调节; NK 细胞; 放射治疗; JAK3/STAT5 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)02-0541-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.02.014

## *Ginseng polysaccharide-chitosan oligosaccharide nanoparticles combined with radiotherapy promote NK cells differentiation and enhance antitumor efficacy via IFN-I-mediated JAK3/STAT5 pathway*

WANG Haojie, HU Zheming, YU Xingtai, CHEN Zhijun, WU Tianxin, FAN Jiayi, WANG Wenyi, ZHANG Liqun, LIU Xiaoyang, LU Yang

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

**Abstract: Objective** To construct *Ginseng polysaccharide-chitosan oligosaccharide nanoparticles* (GP-NPs) and investigate whether their combination with radiotherapy could promote the differentiation of natural killer (NK) cells into highly cytotoxic subsets by activating interferon-I (IFN-I)-mediated Janus kinase 3 (JAK3)/signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) signaling pathway, thereby enhancing the antitumor immune response against non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** GP-NPs were prepared via the ionic cross-linking method, and their particle size, dispersibility and stability were characterized. A subcutaneous xenograft model of A549 lung cancer cells in nude mice was established, and the mice were divided into PBS group, radiotherapy alone group and GP-NPs combined with radiotherapy group. The antitumor efficacy and mechanism of GP-NPs combined with radiotherapy were comprehensively evaluated by measuring tumor volume, detecting levels of cytokines in serum via ELISA, analyzing

收稿日期: 2025-09-17

基金项目: 北京市科技新星计划 (20240484544); 中国原子能科学研究院稳定性支持经费科研项目 (CNNCWZ-2023002)

作者简介: 王浩捷, 男, 硕士研究生, 研究方向为中药新剂型与新技术。E-mail: hjwang47@163.com

\*通信作者: 陆 洋, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事中药新剂型与新技术研究。E-mail: luyang@bucm.edu.cn

NK cells subsets by flow cytometry, detecting the protein expressions of JAK3/STAT5 pathway through Western blotting and performing histopathological analysis. **Results** GP-NPs combined with radiotherapy significantly inhibited tumor growth, and the effect was significantly better than that of the simple radiotherapy group ( $P < 0.01$ ). The levels of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleukin-15 (IL-15), granzyme and perforin in serum of combined treatment group were significantly increased ( $P < 0.01$ ). Flow cytometry showed an increase in the proportion of NK cells infiltration within the tumor ( $P < 0.01$ ), and a significant increase in the proportion of mature cytotoxic subgroups (CD27<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) ( $P < 0.01$ ). Western blotting results showed that the combination therapy significantly activated the JAK3/STAT5 signaling pathway ( $P < 0.01$ ). Organizational analysis showed that the combination therapy group had increased tumor cell apoptosis, aggravated DNA damage and enhanced NK cell infiltration, with no significant toxicity observed in major organs. **Conclusion** GP-NPs combined with radiotherapy promote the differentiation of NK cells into highly cytotoxic subsets and enhance their antitumor function by activating IFN-I-mediated JAK3/STAT5 signaling pathway. This combination strategy not only significantly improves the efficacy of radiotherapy but also has good biosafety, providing new experimental evidence and strategic directions for the immunocombination therapy of NSCLC.

**Key words:** *Ginseng* polysaccharide; chitosan oligosaccharide; nanoparticles; immunomodulation; NK cells; radiotherapy; JAK3/STAT5 signaling pathway

非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 作为肺癌最主要的病理学亚型, 约占所有肺癌病例的 85%。根据最新全球癌症统计数据, 2023 年全球新发肺癌病例超过 220 万, 死亡病例约 180 万, 其中 NSCLC 占据绝大多数。中国作为肺癌高发国家, 年新发病例数约占全球的 40%, 形势尤为严峻<sup>[1]</sup>。其巨大的危害性不仅体现在高发病率与高死亡率所导致的沉重疾病负担上, 更源于其复杂的异质性、隐匿的临床进程、高昂的治疗成本以及对患者生活质量的多维破坏。放射治疗作为肺癌治疗的传统手段之一, 在临床中具有核心地位。据统计, 超过半数的肿瘤患者将放疗作为首选治疗方式。对于早期、局限性肿瘤放疗可以达到与手术相似的根治效果, 有较好的治疗效果<sup>[2]</sup>。然而放疗主要针对照射野内的肿瘤细胞, 对于远处已存在的微小转移灶效果有限或无效, 通常需要联合化疗或免疫治疗来应对全身性问题<sup>[3]</sup>。此外, 某些肿瘤类型或个别肿瘤细胞对辐射不敏感 (抵抗), 可能导致治疗后原位复发, 缺氧的肿瘤细胞通常对辐射更具抵抗力<sup>[4]</sup>。本研究中的肿瘤模型为 A549 肺癌细胞皮下荷瘤模型, 该细胞属于 NSCLC 中的肺腺癌细胞亚型, 具有高度的临床相关性和代表性。而 A549 细胞存在一定放疗抵抗性, 其原因可能是 A549 细胞通过高效激活非同源末端连接通路来快速修复放疗引起的 DNA 双链断裂<sup>[5]</sup>。

人参多糖 (*Ginseng* polysaccharide, GP) 具有调节免疫、抗氧化衰老、抗肿瘤功能, 可调节多种免疫细胞活性<sup>[6]</sup>, 在机体的固有免疫和获得性免疫中发挥重要作用, 其抗肿瘤作用并非通过直接杀伤

细胞, 而是主要通过多途径、多靶点调节机体免疫系统和调控肿瘤微环境来实现的<sup>[7]</sup>, 其作用机制非常复杂且具有独特优势。在激活适应性免疫途径方面, GP 可以促进 T 淋巴细胞的增殖和分化, 特别是增强细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 的杀伤活性和辅助性 T 细胞 (T helper cell, Th) 的功能<sup>[8]</sup>。此外, GP 可以激活固有免疫细胞, 能极大地促进巨噬细胞的活化和增殖, 诱导其从促肿瘤的 M2 型向抗肿瘤的 M1 型极化<sup>[9]</sup>。活化的 M1 型巨噬细胞吞噬能力增强, 并能分泌多种细胞因子如肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 来直接或间接杀伤肿瘤细胞<sup>[10]</sup>。树突状细胞 (dendritic cells, DCs) 是功能最强大的抗原呈递细胞。GP 还可以促进 DCs 的成熟<sup>[11]</sup>, 表现为主要组织相容性复合体-II (major histocompatibility complex-II, MHC-II) 等共刺激分子表达上调, 增强其捕获、处理和呈递肿瘤抗原能力, 从而有效启动后续 T 细胞免疫应答<sup>[12]</sup>。此外, GP 能显著增强自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞的细胞毒性活性<sup>[13]</sup>, 促进其分泌穿孔素、颗粒酶等效应分子, 从而更有效地识别并溶解肿瘤细胞<sup>[14]</sup>。

基于上述研究背景, 本研究展开 GP 对 NK 细胞抗肿瘤作用的机制研究。为了提高 GP 的生物利用度, 采用自组装纳米技术将 GP 纳米化, 成功构建了 GP-壳寡糖纳米粒 (GP-chitosan oligosaccharide nanoparticles, GP-NPs); 通过构建裸鼠的非小细胞 A549 人肺癌模型, 对 GP-NPs 进行人源化肿瘤的药效学研究, 采用流式细胞术、免疫荧光法及 Western

blotting 分析 GP-NPs 联合放疗对 NK 细胞的免疫调节抗肿瘤作用的机制。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级雌性 Balb/c Nude 裸鼠 24 只, 6~8 周龄, 体质量 ( $18 \pm 2$ ) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 生产许可证编号 SYXK(京)2023-0011, 质量合格证号 No.110011251101069965。动物饲养于标准实验室, 饲养温度 20~26 °C, 相对湿度 40%~70%, 全新风换气 >15 次/h, 光照明暗交替 (12 h/12 h)。相关研究按照动物实验原则进行, 动物护理按照中国科学技术部 (2006) 的指导方针和北京中医药大学的相关伦理规范进行。本研究方案已获得北京中医药大学实验动物伦理委员会 (27-5-2018) 批准 (批准号 BUCM-20250814-003)。

### 1.2 细胞株

A549 细胞购自中国医学科学院协和细胞库。

### 1.3 药品与试剂

GP (质量分数为 98%, 批号 MF1585) 购自陕西沐凡生物科技有限公司; 壳寡糖 (批号 S31060-100 g) 购自上海源叶生物科技有限公司; 三聚磷酸钠 (sodium tripolyphosphate, TPP, 批号 S817361-100 g) 购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 冰醋酸 (批号 S20231101) 购自北京迈瑞达科技有限公司; 无水乙醇 (批号 10009218)、二甲苯 (批号 10023418)、盐酸 (批号 10011018)、氨水 (批号 10002108) 中性树脂 (批号 10004160) 均购自国药集团化学试剂有限公司; Zombie NIR™ Fixable Viability Kit (批号 423106)、PE/Cyanine7 anti-mouse CD49b (批号 103517)、Brilliant Violet 421™ anti-mouse/human CD11b (批号 101251)、PE anti-mouse/rat/human CD27 (批号 124209)、TruStain FcX™ (anti-mouse CD16/32, 批号 101320) 均购自美国 BioLegend 公司; 细胞分离液 (密度 1.130) Percoll (批号 BN31708)、胶原酶 IV (批号 BN31712)、透明质酸酶 (批号 BN33506) 均购自北京拜尔迪生物医药技术有限公司; 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染液 (批号 B1002)、EDTA (PH9.0) 抗原修复液 (批号 B2002)、DAPI 染色试剂 (批号 G1012)、抗荧光淬灭封片剂 (批号 K0007)、酪胺-CY3 (批号 K0002) 均购自武汉百忞度生物科技有限公司; 小鼠 IL-15 ELISA 试剂盒 (批号 MM-0172M1)、小鼠  $\gamma$  干扰素 (interferon- $\gamma$ ,

IFN- $\gamma$ ) ELISA 试剂盒 (批号 MM-0182M1)、小鼠穿孔素 ELISA 试剂盒 (批号 MM-45049M1)、小鼠颗粒酶 ELISA 试剂盒 (批号 MM-46882M1) 均购自北京众欣思诚科技发展有限公司; 磷酸化蛋白酶抑制剂 (批号 G2007)、预染蛋白 Marker (相对分子质量  $1 \times 10^4 \sim 1.8 \times 10^5$ , 批号 G2091)、预染蛋白 Marker (相对分子质量  $5.5 \times 10^4 \sim 3.2 \times 10^5$ , 批号 G2085) 均购自武汉赛维尔生物科技有限公司; DAB 显色试剂盒 (批号 2005289) 购自江苏世泰实验器材有限公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 60004-1-Ig)、信号转导和转录激活蛋白 5 (signal transducer and activator of transcription 5, STAT5) 抗体 (批号 13179-1-AP) 均购自美国 Proteintech 生物技术公司; p-STAT5 抗体 (批号 AP0887) 购自爱博泰克生物科技有限公司; Janus 激酶 3 (Janus kinase 3, JAK3) 抗体 (批号 bs-2808R)、p-JAK3 抗体 (批号 bs-20168R) 均购自北京博奥森生物技术有限公司。

### 1.4 仪器

MA205 型分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); KQ5200DA 型数控超声清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); ZNCL-S-10D 型多点磁力搅拌器 (巩义市予华仪器有限公司); Nano-ZS90 型激光粒度分析仪 (英国马尔文仪器有限公司); 标准型 PB-10 型 pH 计 (德国赛多利斯公司);  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  射线辐照装置 (中国原子能科学研究院); JJ-12J 型脱水机、JB-L5 型冻台 (武汉俊杰电子有限公司); JB-P5 型包埋机 (武汉俊杰电子有限公司); RM2016 型病理切片机 (上海徕卡仪器有限公司); KD-P 型组织摊片机 (浙江省金华市科迪仪器设备有限公司); DHG-9140A 型烤箱 (上海慧泰仪器制造有限公司); Nikon Eclipse CI 型正置光学显微镜、Nikon DS-U3 型成像系统 (日本尼康公司); 10212432C 型载玻片及盖玻片 (江苏世泰实验器材有限公司); FACSCanto II 型流式细胞仪 (美国 BD 公司); SIM-F140AY65-PC 型制冰机 (日本 SANYO 公司); SCG-W3000plus 型化学发光成像仪 (武汉赛维尔生物科技有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 GP-NPs 的制备

预先制备 2 mL 质量浓度为 1 mg/mL 的壳寡糖溶液 (提前用冰醋酸调节 pH 至 4.8), 在持续搅拌下将其匀速滴入预先溶解好的 1 mL 质量浓度为 8

mg/mL GP 溶液中,在搅拌状态下向 GP-壳寡糖溶液中逐滴滴加 1 mL 质量浓度为 1 mg/mL TPP 溶液,滴加结束后将所得混合液使用细胞破碎仪超声处理 10 min (功率为 200 W,工作 3 s 停 1 s),即得 GP-NPs。

## 2.2 单因素实验考察 GP-NPs 处方工艺

固定 GP 终质量浓度为 2 mg/mL 不变,分别考察交联剂壳寡糖质量浓度 (0.25、0.50、1.00、2.00 mg/mL)、TPP 质量浓度 (0.125、0.250、0.500、1.000 mg/mL) 与反应体系 pH (4.0、4.5、5.0、5.5) 对纳米粒形成的影响。评价指标包括粒径分布、多分散指数 (polydispersity index, PDI) 以及溶液外观状态 (是否透明、均一、有无沉淀或聚集)。基于以上指标数据,筛选制备 GP-NPs 的最优处方组合。

## 2.3 GP-NPs 形貌表征

取最优处方制备的 GP-NPs 溶液,用去离子水稀释 10 倍。取 10  $\mu$ L 稀释液滴加至覆有碳支持膜的铜网上,室温静置 5 min。用滤纸边缘小心吸去多余液体。滴加 10  $\mu$ L 0.5% 磷钨酸溶液进行负染色,静置 5 min 后吸干。室温干燥后,于电子显微镜下观察纳米粒形貌并拍照记录。

## 2.4 制剂稳定性考察

**2.4.1 血清稳定性考察** 取 3 份 GP-NPs,与含 20% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 PBS 混合,于 37  $^{\circ}$ C 孵育 24 h。分别于孵育 0、1、2、4、6、8、12、24 h 取样,与此同时平行制备 3 份 GP-NPs,与 PBS 混合,于 37  $^{\circ}$ C 孵育 24 h,测定粒径与 PDI,同时肉眼观察是否出现聚集或沉淀,评价生理环境中的稳定性。

**2.4.2 4  $^{\circ}$ C 储存稳定性考察** 取 3 份 GP-NPs 置于 4  $^{\circ}$ C 冰箱中储存,连续取样 48 h,测定其粒径与 PDI,考察其短期储存稳定性。

## 2.5 联合放疗体内药效学研究

**2.5.1 4T1 乳腺癌荷瘤小鼠模型的构建** A549 细胞用含 10% FBS、1% 双抗的 DMEM 完全培养基培养至对数生长期,胰酶消化后,用预冷的 PBS 洗涤 3 次,用基础培养基将其稀释至  $5 \times 10^7$  个/mL,于小鼠右侧肩胛骨 sc 0.1 mL 细胞悬液,观察小鼠接种后状态,并正常提供饲料及饮用水。

**2.5.2 分组与给药** 待小鼠的肿瘤体积长至 50~80 mm<sup>3</sup> 时,将小鼠随机分为 PBS 组、单纯放疗组 (RT) 和放疗协同 GP-NPs 组 (GP-NPs+RT),每组 8 只。此时记为第 0 天并开始实验,从第 1 天开始进行 <sup>60</sup>Co- $\gamma$  射线单次放疗治疗,剂量率为 1.2

Gy/min,剂量为 6 Gy。并于第 2、5、8、11 天进行干预,PBS 组和 RT 组尾 iv PBS; GP-NPs+RT 组尾 iv GP-NPs,注射体积为 200  $\mu$ L,给药剂量以 GP 计为 20 mg/kg,共给药 4 次。每隔 2 d 使用游标卡尺测量小鼠肿瘤体积,于第 14 天实验结束时,每组随机选取 5 只小鼠的肿瘤组织用于肿瘤质量、体积测量及免疫组化、免疫荧光分析,其余 3 只小鼠的肿瘤组织用于流式细胞术分析和 Western blotting 分析。

肿瘤体积=(长径 $\times$ 短径<sup>2</sup>)/2

肿瘤抑制率=1-实验组平均肿瘤质量/对照组平均肿瘤质量

## 2.6 血清中细胞因子水平的检测

眼眶取血后,3 000 r/min 离心 (离心半径 8.3 cm) 10 min,吸取上层血清,采用 ELISA 法检测血清中 IFN- $\gamma$ 、IL-15、颗粒酶、穿孔素的水平。

## 2.7 流式细胞术检测免疫细胞表型

每组随机选取 3 只小鼠的肿瘤组织进行肿瘤内 NK 细胞浸润 (CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>) 及浸润的 NK 细胞亚群 (CD11b/CD27) 分析。将肿瘤组织剪成约 3 mm<sup>3</sup> 的小块,加入组织消化酶 (含胶原酶 IV 和透明质酸酶) 15 mL,37  $^{\circ}$ C 恒温摇床上振荡消化 30~45 min;用 70  $\mu$ m 的尼龙过滤器对消化后的组织滤过,用 PBS 缓冲液反复冲洗滤过,收集肿瘤单细胞,用 20% Percoll 重悬细胞,静置 10 min 去除死细胞,通过细胞计数仪计数后调整浓度为  $1 \times 10^7$  个/mL,用 5% 牛血清白蛋白溶液封闭 15 min 后,加入 1  $\mu$ g CD3、CD49b、CD27、CD11b、Zombie NIR 抗体,4  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,孵育结束后,用 FACS 缓冲液洗涤,最后用 400  $\mu$ L PBS 重悬细胞,上机检测。

## 2.8 组织病理学分析

实验结束后,每组随机取 1 只小鼠,采集心、肝、脾、肺、肾和肿瘤组织,于 4% 多聚甲醛中固定 24 h,脱水后用二甲苯透明,随后石蜡包埋和切片,进行 HE 染色评估主要脏器的病理学改变。

## 2.9 免疫组化检测肿瘤组织 Ki67 表达

取肿瘤组织切片,石蜡切片脱蜡至水,切片置于盛满 EDTA 抗原修复缓冲液 (pH 9.0) 的修复盒中,于微波炉内进行抗原修复,随后切片放入 3% 过氧化氢溶液进行阻断,画圈后用 3% 牛血清白蛋白封闭,孵育一抗和二抗,DAB 显色及复染细胞核,随后脱水封片,于显微镜下观察并拍照。

## 2.10 TUNEL 染色检测肿瘤组织细胞凋亡

取肿瘤组织切片,石蜡切片脱蜡至水,随后用

蛋白酶 K 修复, 室温平衡后, 加入按 1 : 5 : 50 比例混合的反应液 TDT 酶、dUTP、Buffer, 覆盖组织, 滴加 DAPI 复染细胞核后封片, 于显微镜下观察并拍照。

### 2.11 免疫荧光检测肿瘤组织 $\gamma$ -H2AX 表达

取肿瘤组织切片, 石蜡切片脱蜡至水, 切片置于盛满 EDTA 抗原修复缓冲液 (pH 9.0) 的修复盒中, 于微波炉内进行抗原修复, 3%过氧化氢溶液阻断, 画圈后加入 3%牛血清白蛋白封闭, 孵育一抗和二抗, DAPI 复染细胞核, 封片, 于显微镜下观察并拍照。参数设置: FITC 激发波长 465~495 nm, 发射波长 515~555 nm, 发绿光; DAPI 紫外激发波长 330~380 nm, 发射波长 420 nm, 发蓝光。

### 2.12 免疫荧光检测肿瘤组织 NK 细胞浸润情况

取肿瘤组织切片, 石蜡切片脱蜡至水, 切片置于盛满 EDTA 抗原修复缓冲液 (pH 9.0) 的修复盒中, 于微波炉内进行抗原修复, 3%过氧化氢溶液阻断, 画圈后加入 3%牛血清白蛋白封闭, 孵育一抗和二抗, 在组织上滴加酪胺盐-CY3 (现配现用, 用含 0.003%过氧化氢溶液的 PBST 配制), 微波修复, 再次画圈封闭, 孵育一抗, DAPI 复染细胞核, 于显微镜下观察并拍照。参数设置: FITC 激发波长 465~495 nm, 发射波长 515~555 nm, 发绿光; DAPI 紫外激发波长 330~380 nm, 发射波长 420 nm, 发蓝光; CY3 激发波长 510~560 nm, 发射波长 590 nm, 发红光。

### 2.13 Western blotting 检测肿瘤组织 JAK3/STAT5 通路相关蛋白表达

取肿瘤组织, 加入 RIPA 裂解液裂解细胞 30 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 与 Loading buffer 按比例混匀, 100 °C加热 10 min 使蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 于 5%脱脂牛奶中封闭 1 h, 加入一抗 (1 : 1 000), TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min; 加入二抗, 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min; 对 PVDF 膜进行化学发光检测, 将图片从仪器中导出整理, Image J 软件分析目的条带的灰度值。

### 2.14 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 软件对实验数据进行统计分析, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。两组间差异分析采用 *t* 检验, 多组间差异分析采用单因素方差分析 (ANOVA)。

## 3 结果

### 3.1 GP-NPs 的制备

如图 1 所示, 采用离子交联法制备的 GP-NPs 呈黄色澄清溶液, 测得粒径为 (250.0 ± 9.8) nm, PDI 为 0.276 ± 0.025,  $\zeta$  电位为 (4.02 ± 0.14) mV。游离 GP 粒径约 1 000 nm 经过自组装后形成 250 nm 左右的纳米粒, 证明 GP 已被成功吸附在载体表面, 初步证明经过静电吸附, 即可自组装形成纳米粒, 可以进行后续的单因素优化制备工艺实验。

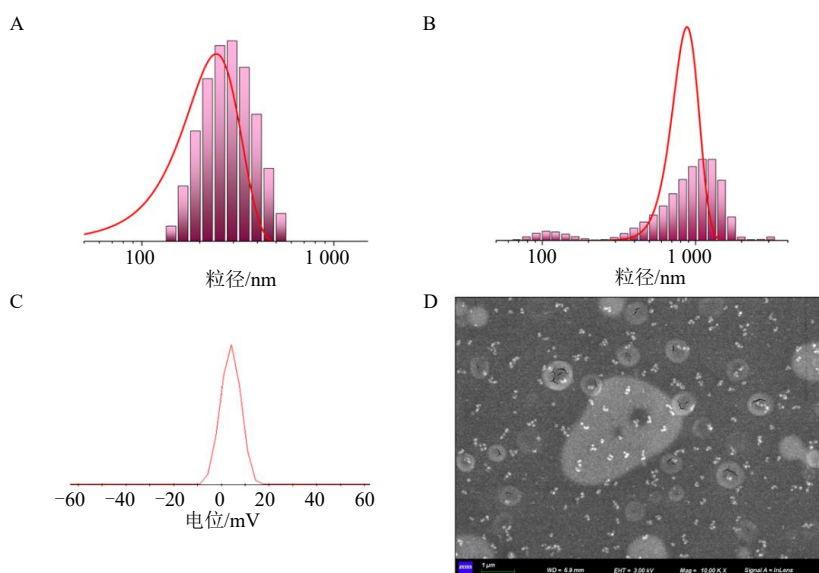


图 1 GP-NPs 粒径图 (A)、游离 GP 粒径图 (B)、GP-NPs 的  $\zeta$  电位图 (C) 和 GP-NPs 扫描电镜图 (D,  $\times 10\ 000$ )

Fig. 1 Particle size diagram of GP-NPs (A), particle size diagram of free GP (B),  $\zeta$  potential of GP-NPs (C), scanning electron microscope diagram of GP-NPs (D,  $\times 10\ 000$ )

### 3.2 单因素考察结果

**3.2.1 壳寡糖质量浓度考察** 固定 GP 质量浓度不变, 考察不同质量浓度的壳寡糖对 GP-NPs 特性的影响, 结果见表 1, 随着壳寡糖质量浓度的增加, 粒径与 PDI 变化呈钟形<sup>[15]</sup>, 在壳寡糖质量浓度为 0.50 mg/mL 时达到最小值, 使用该质量浓度进行反应 pH 考察。

**3.2.2 TPP 质量浓度考察** 固定 GP 质量浓度与壳寡糖最佳质量浓度不变, 考察不同质量浓度的 TPP 对 GP-NPs 特性的影响, 结果见表 2, 随着 TPP 质量浓度的增加, 粒径与 PDI 变化呈钟形, 在 TPP 质

量浓度为 0.250 mg/mL 时达到最小值, 使用该质量浓度进行反应 pH 考察。

**3.2.3 反应 pH 的考察** 固定 GP 质量浓度、壳寡糖最佳质量浓度、TPP 最佳质量浓度不变, 考察不同 pH 对 GP-NPs 特性的影响, 结果见表 3, 随着 pH 的增加, 粒径与 PDI 变化呈钟形, 在 pH 为 4.5 时达到最小值, 此时, 最佳处方中各组分比例为 GP: 壳寡糖: TPP=8:2:1, 溶液 pH 为 4.5, 此时的粒径为  $(210.6 \pm 23.3)$  nm, PDI 为  $0.202 \pm 0.035$ , GP-NPs 呈规则球形, 边缘清晰且粒径分布均匀, 大小均一 (图 1-D)。

表 1 不同质量浓度的壳寡糖对纳米体系粒径及 PDI 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 1 Effect of different concentrations of chitosan oligosaccharide on particle size and PDI of nano-systems ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

壳寡糖/(mg·mL <sup>-1</sup> )	粒径/nm	PDI	溶液形态
0.25	322.4±44.7	0.356±0.021	黄色透明、均一、无沉淀
0.50	242.4±44.7	0.313±0.013	黄色透明、均一、无沉淀
1.00	657.7±45.7	0.411±0.047	黄色不均一、少量沉淀
2.00	791.8±85.0	0.456±0.052	黄色不均一、少量沉淀

表 2 不同质量浓度的 TPP 对纳米体系粒径及 PDI 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of different concentrations of TPP on particle size and PDI of nano-systems ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

TPP/(mg·mL <sup>-1</sup> )	粒径/nm	PDI	溶液形态
0.125	324.0±56.6	0.352±0.054	黄色透明、均一、无沉淀
0.250	227.8±11.1	0.241±0.064	黄色透明、均一、无沉淀
0.500	316.0±30.9	0.451±0.110	黄色不均一、少量沉淀
1.000	415.1±67.9	0.544±0.116	黄色不均一、较多沉淀

表 3 不同的 pH 对纳米体系粒径及 PDI 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of different pH on particle size and PDI of nano-systems ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

pH	粒径/nm	PDI	溶液形态
4.0	317.5±59.4	0.318±0.103	黄色透明、均一、无沉淀
4.5	210.6±23.3	0.202±0.035	黄色透明、均一、无沉淀
5.0	377.9±24.9	0.289±0.121	黄色不均一、少量沉淀
5.5	438.9±56.4	0.603±0.184	黄色不均一、较多沉淀

### 3.3 制剂稳定性考察

GP-NPs 在含有 20% FBS 的介质中表现出良好的短期稳定性, 能够在 24 h 内维持均匀分散状态, 未发生可见聚集。动态光散射分析表明, 纳米粒子的流体力学粒径及 PDI 在整个观测期间均未出现显著变化 (图 2), 提示其具有有效的抗蛋白吸附及抗聚集能力。经 48 h 稳定性测试, GP-NPs 在 4 °C 冷藏条件下仍保持粒径与 PDI 的较小波动 (图 3), 体系透明均一, 表明其在冷藏条件下及生理环境中均具备良好的稳定性, 符合纳米药物载体在生物介质中的稳定性要求。

### 3.4 联合放疗体内药效学研究结果

如图 4 所示, 在本研究的 A549 肺癌细胞皮下

荷瘤模型中放疗效果较差, 与 PBS 组相比, RT 组对肿瘤生长未表现出显著抑制作用, 抑瘤率为 12%; GP-NPs+RT 组显示出较强的肿瘤抑制效果 ( $P<0.01$ ), 抑瘤率为 64.8%。

### 3.5 各组小鼠血清中细胞因子的水平

本研究测定了 4 类血清中的信号分子, 分别为 IFN- $\gamma$ 、IL-15、颗粒酶和穿孔素。这些分子是细胞毒性免疫反应 (如由 CTL 和 NK 细胞介导的反应, 裸鼠中为后者) 的核心<sup>[16]</sup>。如图 5 所示, 经过放射治疗, 除 IL-15 外, RT 组小鼠血清中的免疫效应分子较 PBS 组会略有上升, 而 IL-15 会显著降低 ( $P<0.05$ ); 与 PBS 组和 RT 组相比, GP-NPs+RT 组小鼠血清中 IFN- $\gamma$ 、IL-15、颗粒酶和穿孔素均显著升

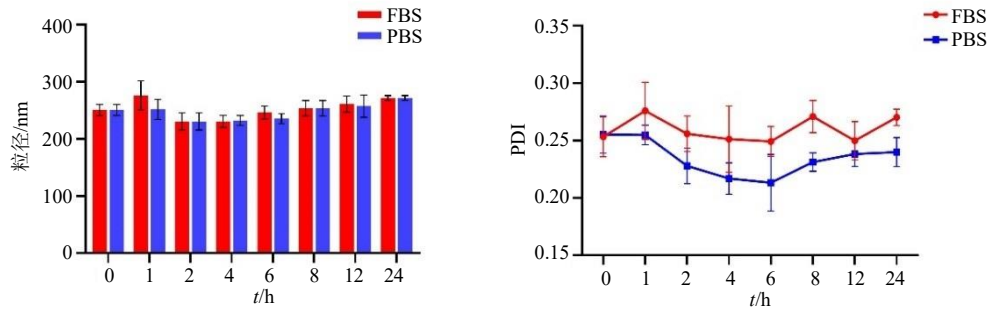


图 2 GP-NPs 在含 20% FBS 的 PBS 中的粒径与 PDI 变化 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 2 Changes in particle size and PDI of GP-NPs in PBS containing 20% FBS ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

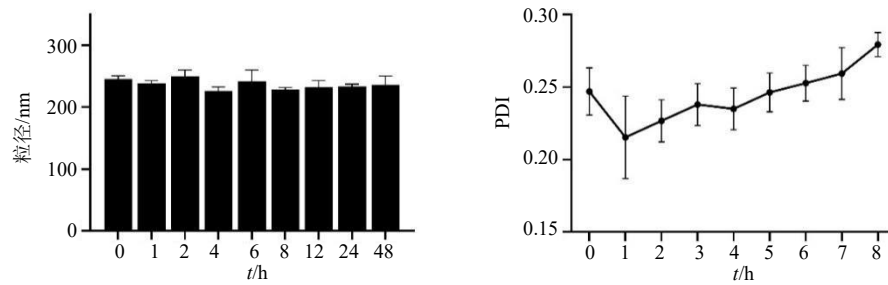
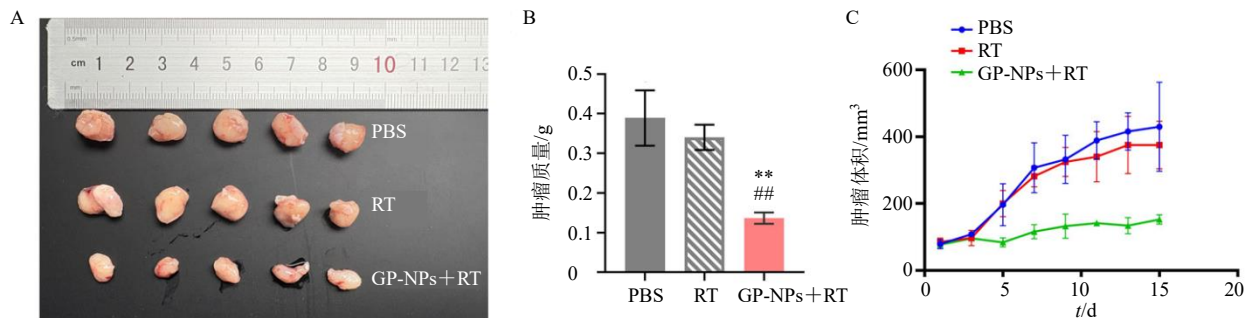


图 3 GP-NPs 在 4 °C 环境下粒径与 PDI 变化 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 3 Changes in particle size and PDI of GP-NPs at 4 °C ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )



与 PBS 组比较: \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$ ; 与 RT 组比较: ## $P<0.01$ , 下同。

\* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  vs PBS group; ## $P<0.01$  vs RT group, same as below figures.

图 4 荷瘤小鼠离体肿瘤图 (A)、肿瘤质量 (B) 和肿瘤生长曲线 (C) ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Fig. 4 Tumor image of tumor bearing mice *in vitro* (A), tumor weight (B) and tumor growth curve (C) ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

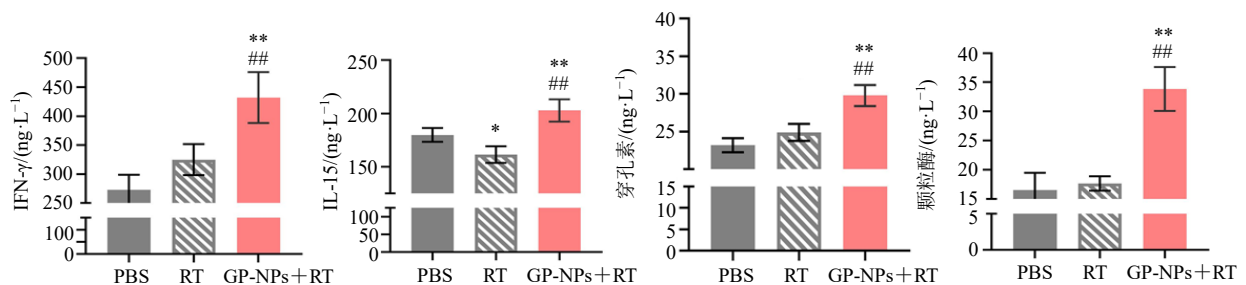


图 5 各组小鼠血清中 IFN-γ、IL-15、穿孔素和颗粒酶水平 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Fig. 5 Levels of IFN-γ, IL-15, perforin and granzyme in serum of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

高 ( $P < 0.01$ ), 表明 GP-NPs 与放疗联合产生了协同增强效应, 而非简单叠加, 能更有效地激活抗肿瘤免疫应答。

### 3.6 免疫细胞亚群分析结果

CD49b<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> 是鉴定 NK 细胞的经典表面标志物组合。CD49b (又称 DX5) 是 NK 细胞的标志, CD3<sup>-</sup> 用于排除 T 细胞<sup>[17]</sup>。如图 6-A、C 所示, 单纯放疗可以引起 NK 细胞比例显著升高 ( $P < 0.05$ ), 这可能是机体对损伤 (放疗) 的应激免疫反应。GP-NPs+RT 组 NK 细胞比例进一步升高 ( $P < 0.01$ ), 表明 GP-NPs 能极大地协同和增强放疗招募或激活 NK 细胞的能力。

根据 CD27 和 CD11b 的表达<sup>[18]</sup>, NK 细胞可分为 4 个功能亚群, 成熟度和功能侧重点不同, CD27<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> 为早期 NK 细胞, 细胞因子分泌功能

弱, 杀伤力弱<sup>[19]</sup>; CD27<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> 为 NK 细胞的中间成熟阶段<sup>[20]</sup>, 兼具细胞因子分泌和杀伤功能; CD27<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> 为 NK 细胞的成熟阶段, 核心细胞毒亚群, 抗肿瘤细胞因子 (如 IFN- $\gamma$ 、穿孔素和颗粒酶) 分泌能力强, 杀伤能力最强<sup>[21]</sup>。如图 6-B、D 所示, 在未经治疗的状态下, 体内的 NK 细胞大多处于未激活的“预备”状态; 而放疗能激活 NK 细胞, 促使它们成熟, 但大部分细胞停滞在了中间阶段, 未能充分分化成最具杀伤力的终末亚群; GP-NPs+RT 组出现了根本性的转变, 中间亚群的比例从 RT 组的 62% 回落至 30%, 而最具杀伤力的成熟细胞毒亚群 (CD27<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>) 的比例从 16.9% 大幅跃升至 44.2%, 成为主导亚群。表明 GP-NPs 起到了“推动”的作用, 它帮助被放疗激活的 NK 细胞克服了分化障碍, 完成了从“中间态”到“终极杀伤态”的转变。

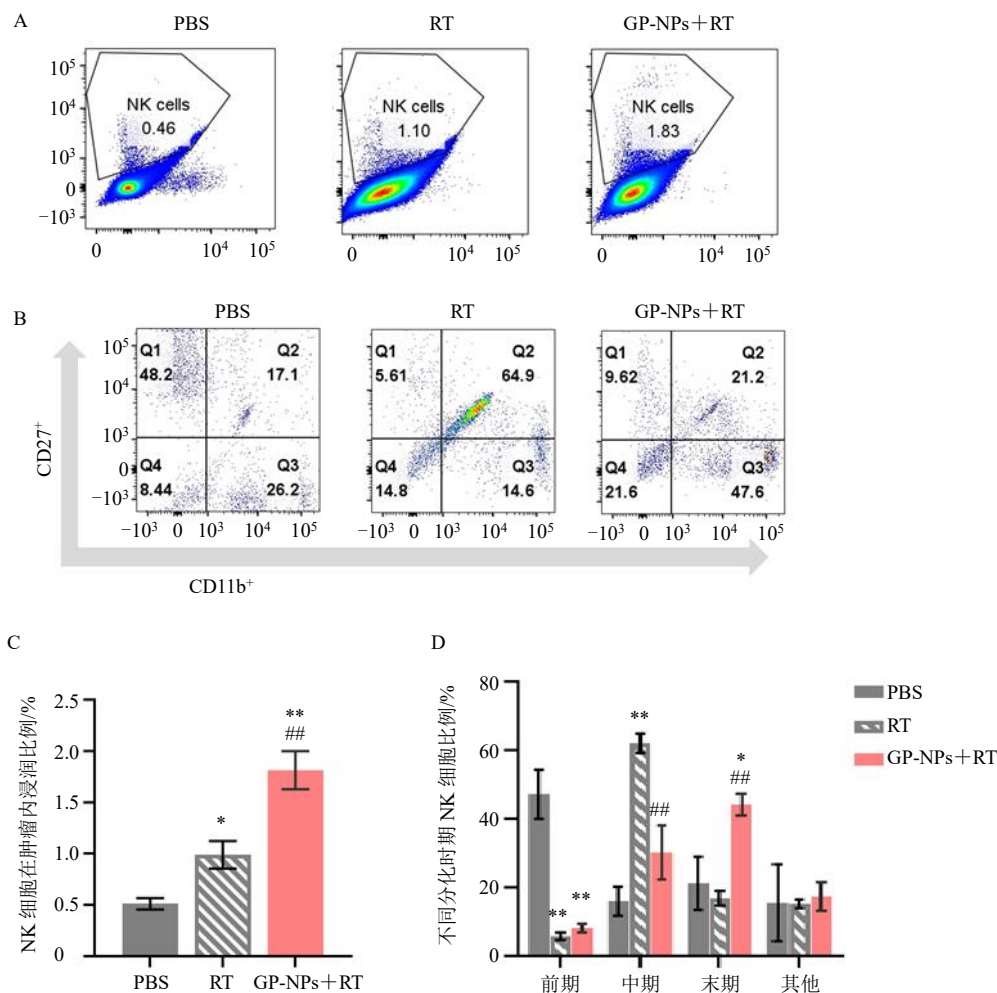


图 6 NK 细胞在肿瘤内的浸润比例 (A、C) 及不同分化时期 NK 细胞比例 (B、D) ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

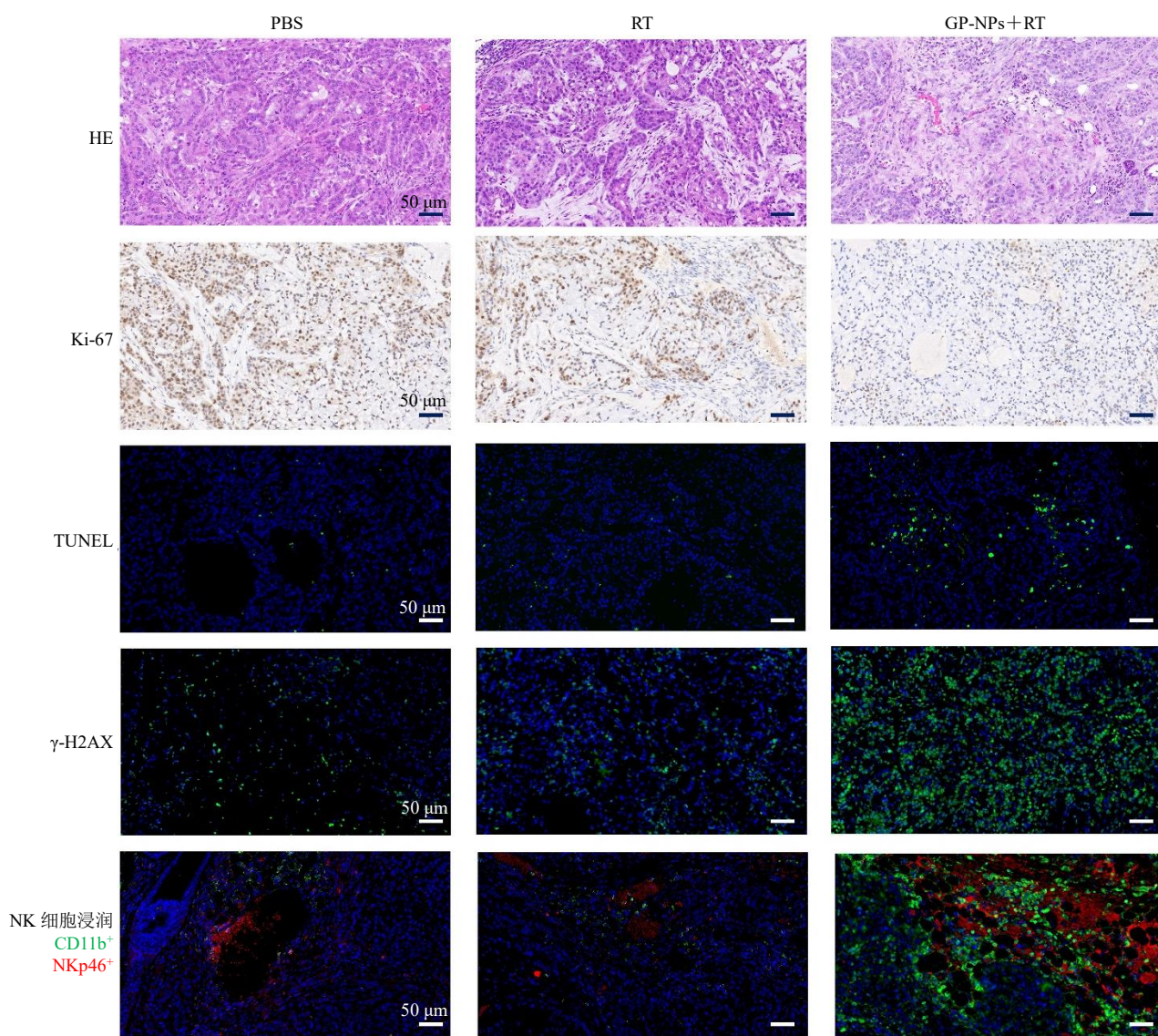
Fig. 6 Infiltration ratio of NK cells in tumors (A, C) and proportion of NK cells at different differentiation stages (B, D) ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.7 组织病理学分析结果

**3.7.1 HE 染色结果** 如图 7 所示, PBS 组肿瘤细胞排列紧密, 呈现出典型的肿瘤组织结构特征, 细胞形态较为杂乱, 说明 PBS 组的肿瘤细胞保持旺盛的增殖能力, 生长未被抑制; RT 组肿瘤组织形态有所改变, 但仍有较多肿瘤细胞, 放疗对肿瘤细胞有一定的杀伤作用, 但效果有限; GP-NPs+RT 组肿瘤细胞的密度相对较低, 组织结构松散, 表明联合放疗能更有效地破坏肿瘤组织的结构, 抑制肿瘤细胞的生长。

**3.7.2 免疫组化检测 Ki-67 表达** 如图 7 所示, PBS 组阳性染色区域较多, 说明肿瘤细胞增殖活跃; RT 组阳性染色区域减少, 表明放疗对肿瘤细胞的增殖有抑制作用; GP-NPs+RT 组阳性染色区域进一步减少, 说明联合治疗对肿瘤细胞增殖的抑制效果优于单纯放疗。

**3.7.3 TUNEL 染色检测细胞凋亡** 如图 7 所示, PBS 组荧光染色较弱, 细胞凋亡数量较少; RT 组可见一定数量的凋亡细胞, 放疗诱导了部分肿瘤细胞凋亡; GP-NPs+RT 组绿色荧光强度明显增强, 调



Ki-67 免疫组化中棕色为 Ki-67 阳性表达; TUNEL、 $\gamma$ -H2AX 染色中绿色为 DNA 受损的细胞染色阳性表达; NK 细胞浸润中 CD11b<sup>+</sup> 为绿色荧光表达, NKp46<sup>+</sup> 为红色荧光表达。

Brown color in Ki-67 immunohistochemistry indicates positive expression of Ki-67; Green color in TUNEL and  $\gamma$ -H2AX staining indicates positive expression of DNA damaged cells; CD11b<sup>+</sup> is expressed with green fluorescence and NKp46<sup>+</sup> is expressed with red fluorescence in NK cell infiltration.

图 7 肿瘤组织的 HE、免疫组化及免疫荧光染色结果 ( $\times 100$ )

Fig. 7 HE, immunohistochemical and immunofluorescence staining results of tumor tissues ( $\times 100$ )

亡细胞数量显著增加,表明联合治疗能够更有效地诱导肿瘤细胞凋亡。

**3.7.4 免疫荧光检测  $\gamma$ -H2AX 表达**  $\gamma$ -H2AX 是 DNA 双链断裂的标志物。如图 7 所示, PBS 组荧光信号较弱,说明 DNA 损伤程度较低; RT 组荧光信号有所增强,放疗导致了一定程度的 DNA 损伤; GP-NPs+RT 组荧光信号显著增强,表明联合治疗对肿瘤细胞 DNA 的损伤作用更强。

**3.7.5 免疫荧光检测 NK 细胞浸润** 如图 7 所示, PBS 组红色荧光标记的 NK 细胞数量较少,说明肿瘤组织中 NK 细胞浸润水平低; RT 组 NK 细胞浸润数量有一定增加; GP-NPs+RT 组 NK 细胞浸润数量明显增多,说明 GP-NPs 联合放疗能促进 NK 细胞向肿瘤组织浸润,这可能与联合治疗通过 I 型干扰素 (interferon-I, IFN-I) 介导的 JAK3/STAT5 通路促进 NK 细胞分化有关<sup>[22]</sup>。

**3.7.6 五脏 HE 染色的生物安全性分析** 各组小鼠心、

肝、脾、肾、肺的 HE 染色结果见图 8, GP-NPs+RT 组心肌细胞排列有序,细胞形态正常,未出现细胞肿胀、坏死或炎症细胞浸润等异常情况;肝细胞排列规整,肝小叶结构完整,未观察到显著的肝脏毒性表现;脾脏的白髓和红髓结构保持完整,淋巴细胞数量和分布正常,未出现明显的病理变化;肾脏的肾小球和肾小管结构清晰,未见明显的病理改变;肺泡结构清晰,肺组织未出现明显的水肿、出血或炎性细胞聚集等情况<sup>[23]</sup>,表明 GP-NPs 联合放疗对肺脏的生物安全性较高,不会引发严重的肺部病变。以上结果表明 GP-NPs 生物安全性较高。

### 3.8 各组小鼠肿瘤组织 JAK3/STAT5 通路相关蛋白表达

如图 9 所示,各组总 JAK3 和总 STAT5 蛋白的表达量相对稳定,无显著性差异。磷酸化是信号通路激活的直接标志,GP-NPs 与放疗具有显著的协同增效作用。与 PBS 组和 RT 组比较,GP-NPs+RT

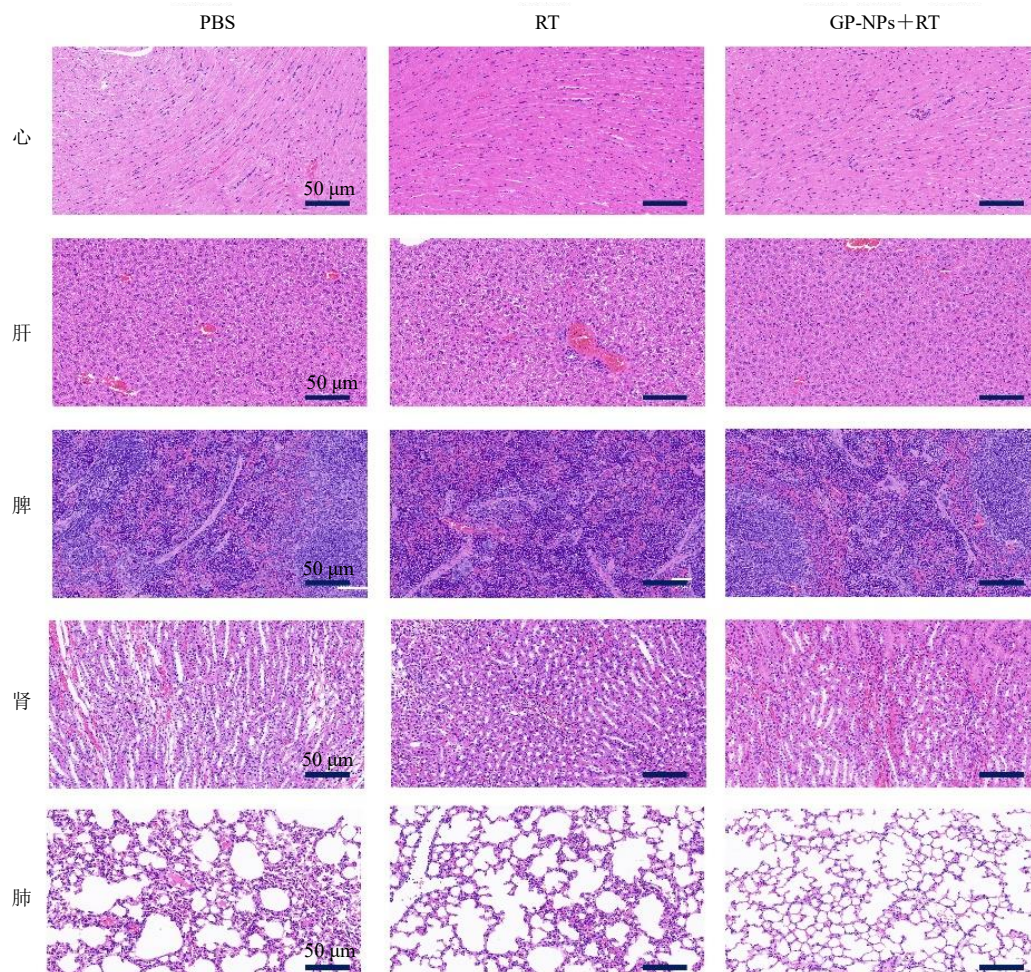


图 8 各组小鼠心、肝、脾、肾、肺的 HE 染色结果 (×100)

Fig. 8 HE staining results of heart, liver, spleen, kidney and lung tissues of mice in each group (× 100)

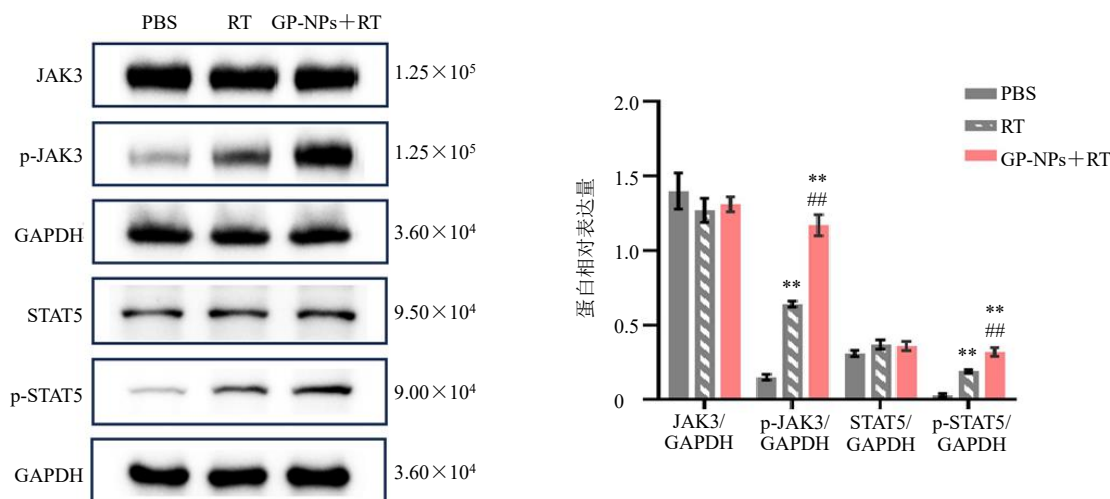


图 9 各组小鼠肿瘤组织 JAK3/STAT5 通路相关蛋白表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 9 Expressions of JAK3/STAT5 pathway related proteins in tumor tissues of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组 JAK3 和 STAT5 的磷酸化水平显著上调 ( $P < 0.05$ ), 表明 GP-NPs 能够增强放疗对 JAK3/STAT5 通路的激活能力 ( $P < 0.01$ )。

#### 4 讨论

放疗虽为肿瘤常规治疗手段, 但其在如 NSCLC 等免疫抑制型微环境中常表现为“孤军深入”, 疗效有限。本研究中 GP-NPs 并非放疗的简单“辅助”, 而是关键的“协同激活剂”。二者联合不仅显著提升了抑瘤率, 更重要的是, 将放疗导致的局部损伤信号, 通过 GP-NPs 的免疫调节作用, 放大为一场系统性的抗肿瘤免疫应答, 实现了从“局部杀伤”到“全身免疫动员”的升级。本研究机制探索的深度体现在精准定位了 IFN-I-JAK3/STAT5 这一关键信号轴, 最终导向 NK 细胞的功能性与抗肿瘤效应端极化, 使最具杀伤力的终末亚群成为主导。这与仅能轻度激活 NK 细胞的单纯放疗或单纯多糖给药研究相比, 体现了联合策略在驱动免疫细胞“终末分化”上的独特优势。

本研究成功制备 GP-NPs, 在此基础上进行药效初步评价并探讨了 GP-NPs 联合放疗在调控抗肿瘤免疫应答中的作用及其分子机制。发现 GP-NPs+RT 组能显著促进细胞毒性细胞因子 (IFN- $\gamma$ 、穿孔素、颗粒酶) 的分泌, 高效扩增肿瘤微环境中 NK 细胞的比例, 并驱动其向终末成熟的高杀伤力亚群 (CD27<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) 分化。进一步的机制研究表明, 这些效应很可能是通过激活 IFN-I 介导的 JAK3/STAT5 信号通路来实现的。

从分子机制层面来看, Western blotting 结果显

示, GP-NPs+RT 组 JAK3 及 STAT5 的磷酸化水平显著高于单一放疗组, 表明联合治疗可激活该信号通路。且在总蛋白层面, 总 JAK3 和 STAT5 蛋白表达量在各组间无显著差异, 说明该调控发生于蛋白质翻译后修饰层面, 而非转录或翻译水平。这一发现与 IFN-I 信号通路的经典激活模式相符: IFN-I 与受体 IFNAR 结合后, 通过 JAK 家族激酶引发 STAT 蛋白的二聚化及核转位, 进而启动特定基因的转录程序<sup>[24]</sup>。本研究结果证实了 GP-NPs 可显著增强放疗诱导的该通路活化; 在细胞表型层面, 上述分子事件的激活引发了显著的免疫效应。流式细胞术结果表明, 联合治疗不仅显著提高了 NK 细胞 (CD49b<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>) 的浸润比例, 更关键的是驱动其向终末分化的细胞毒性亚群 (CD27<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) 极化。这一表型变化与 STAT5 信号的特异性激活高度一致, 已有研究明确表明 STAT5 是调控 NK 细胞增殖、成熟及功能分化的关键转录因子; 在功能层面, NK 细胞的活化与分化直接体现为细胞毒性效应的增强。GP-NPs+RT 组颗粒酶和穿孔素的分泌水平显著上调, 从分子水平证实了细胞毒颗粒介导的杀伤机制被极大强化。同时, IFN- $\gamma$  和 IL-15 等关键细胞因子水平的升高, 证实了该纳米粒在促进 NK 细胞成熟方面有较强的效力<sup>[25]</sup>。综上, 本研究揭示了 GP-NPs 作为一种有效的放射增敏剂和免疫佐剂, 其作用机制是通过增强 IFN-I-JAK3/STAT5 信号轴的通路活化, 协同放疗促进 NK 细胞的毒性分化及功能发挥, 最终强化抗肿瘤免疫应答。本研究为解决放疗免疫抑制问题、开发更有效的肿瘤联合治疗

方案提供了实验依据。

此外,本研究制备的 GP-NPs 目前为液态制剂,存在长期储存稳定性方面的挑战。基于此,在后续研究中,将重点优化其冻干工艺,通过筛选合适的冻干保护剂(如甘露醇、海藻糖等),系统考察冻干前后纳米粒的粒径、分散性、形貌及生物活性的变化,并对其进行冻融循环稳定性考察,以期获得稳定性更佳、便于储存和运输的固体纳米制剂,为其未来的开发应用奠定基础。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 李思苒, 刘荣衡, 张炳松. 1992—2021 年中国育龄期人群肺癌发病和死亡趋势及年龄-时期-队列分析 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2025, 32(17): 1033-1040.
- [2] 李洁莹. PD-1 单抗为基础的联合策略在晚期头颈鳞癌治疗中的临床评价 [D]. 青岛: 青岛大学, 2023.
- [3] 金少华, 张晓青, 马纯正, 等. 铁死亡及其在胶质母细胞瘤放疗化疗中的作用机制及研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2024, 32(17): 3335-3341.
- [4] 单莉平, 刘倩, 宋琼, 等. 放射治疗与肿瘤疫苗联合在肿瘤治疗中的应用研究进展 [J]. 陕西医学杂志, 2025, 54(8): 1141-1144.
- [5] 王晓芳. 黄芪建中汤含药血清联合顺铂对人肺腺癌 A549 细胞 E-cadherin、Snail1 表达的影响 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2020.
- [6] 任晨晨, 姚立志, 苏肖肖, 等. 人参的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 广东化工, 2025, 52(16): 62-64.
- [7] 梁贝贝, 李彬, 李佳, 等. 人参总皂苷通过改善线粒体能量代谢抑制血管紧张素 II 诱导的原代心肌细胞肥大 [J/OL]. 安徽中医药大学学报, (2025-08-11) [2025-09-03]. <https://link.cnki.net/urlid/34.1324.R.20250811.1253.004>.
- [8] 黄鸿才, 余华. 植物源性外泌体样纳米囊泡在癌症治疗中的潜力研究进展 [J]. 中国临床新医学, 2025, 18(8): 937-942.
- [9] 刘泳君, 张国华, 林瑞芳, 等. 基于“虚气留滞”理论探讨线粒体动力学介导巨噬细胞焦亡与极化在慢性心力衰竭中的作用及中药防治 [J/OL]. 中国免疫学杂志, (2025-09-03) [2025-12-03]. <https://link.cnki.net/urlid/22.1126.R.20250912.1546.002>.
- [10] 李艺, 张艳, 牟琪瑞. 基于正邪理论探讨巨噬细胞极化在冠脉微循环障碍中的作用及中药干预 [J/OL]. 中华中医药学刊, (2025-09-03) [2025-12-03]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1546.R.20250912.1346.038>.
- [11] 马文妍, 辛杰, 苗宇航, 等. 植物细胞外囊泡在肿瘤疾病中的研究进展 [J]. 中国细胞生物学学报, 2025, 47(8): 2084-2094.
- [12] Jan P, Nikola M, Liliana T, *et al.* Microbiota modulate immune cell populations and drive dynamic structural changes in gut-associated lymphoid tissue [J]. *Gut Microbes*, 2025, 17(1): 2543908.
- [13] Jang J, He Z L, Huang L, *et al.* Upregulation of NK cell activity, cytokine expression, and NF- $\kappa$ B pathway by ginsenoside concentrates from *Panax ginseng* Berries in healthy mice and macrophage cell lines [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 335: 118681.
- [14] Jeevan-Raj B, Gehrig J, Charmoy M, *et al.* The transcription factor Tcf1 contributes to normal NK cell development and function by limiting the expression of granzymes [J]. *Cell Rep*, 2017, 20(3): 613-626.
- [15] 史同瑞, 崔宇超, 王丽坤, 等. 壳聚糖-海藻酸钠载药微球制备工艺研究 [J]. 中国兽药杂志, 2019, 53(8): 56-65.
- [16] 杨继辰, 邱玲, 林建国. 监测免疫治疗反应的颗粒酶 B 靶向分子影像探针研究进展 [J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2025, 45(9): 1267-1275.
- [17] 李亚丹. CCL17/CCL22-CCR4 趋化因子轴对淋巴瘤肿瘤微环境的作用研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2023.
- [18] 陈子嫣, 郭紫婵, 陈丽华. 结肠癌皮下荷瘤小鼠体内 NK 细胞表型检测和分析 [J]. 空军军医大学学报, 2025, 16(7): 923-930.
- [19] Yang F, Li A Q, Zhu Y Y, *et al.* GATA1-mediated Notch signaling augment antitumor immunity of CD11b<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> natural killer cells maturation via BCL9/ $\beta$ -catenin signal [J]. *Cell Rep*, 2025, 44(5): 115708.
- [20] Zhang Y Z, Guo H. Su1997: Cd11b<sup>-</sup>cd27<sup>-</sup> NK subsets account for NK-cell dysfunction in patients with inflammatory bowel disease [J]. *Gastroenterology*, 2025, 169(1): S-924.
- [21] Ni M, Zhao P, Kang Q, *et al.* CD56briCD27<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>-NK cells mediated remission of agvhd via immunoregulation [J]. *Blood*, 2020, 136: 28.
- [22] 汪熙, 张一飞, 滕业方, 等. 受体偏向性白细胞介素-2 类似药在肿瘤免疫治疗中的研究进展 [J]. 中国新药与临床杂志, 2024, 43(10): 743-750.
- [23] 刘陶霞. 疏水无机纳米晶的环糊精功能化用于肿瘤的诊疗研究 [D]. 北京: 北京化工大学, 2025.
- [24] 郑颖城. 原型泡沫病毒 Gag 蛋白与 Alix 相互作用引发粒噬的机制与功能研究 [D]. 武汉: 武汉大学, 2020.
- [25] 焦雨竹, 李慧杰, 杨青. 乌帕替尼皮肤科超说明书应用进展 [J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2025, 41(9): 692-696.

[责任编辑 李亚楠]