

DOI:10.16305/j.1007-1334.2025.z20240903003

基于 MAPK 信号通路探讨肺岩宁颗粒逆转 T 细胞衰老抗非小细胞肺癌的作用机制

吴新鸿¹, 王立芳¹, 王中奇¹, 王文婕¹, 邓海滨¹, 徐振晔²

1. 上海中医药大学附属龙华医院肿瘤二科(上海 200032); 2. 上海中医药大学附属龙华医院全国名老中医专家工作室(上海 200032)

【摘要】 目的 探究肺岩宁颗粒抗非小细胞肺癌(NSCLC)的作用,及其对肺肿瘤组织中T细胞的比例、T细胞衰老相关细胞因子的作用及机制。**方法** SPF级C57BL/6J小鼠24只,尾静脉注射Lewis肺癌细胞LLC-luc构建小鼠肺肿瘤模型,随机分为模型对照组(Model组)、肺岩宁组(FYN组)和阳性对照组(SB225002组),每组8只;另取8只设无瘤对照组(Control组)。实验开始第1天起,Control组和Model组小鼠给予等体积0.9%氯化钠溶液灌胃,FYN组给予肺岩宁颗粒溶液4.8 g/(kg·d)灌胃,SB225002组给予CXC趋化因子受体2(CXCR2)抑制剂SB225002 5 mg/(kg·d)腹腔注射,连续干预20 d。观察小鼠一般情况,记录体质量及肺组织质量,苏木精-伊红(HE)染色法观察肺组织形态,流式细胞术检测肺肿瘤组织CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞和T细胞比例,免疫组织化学法检测肺肿瘤组织精氨酸酶-1(Arg-1)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)和肿瘤蛋白p53(p53)蛋白表达,实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(RT-qPCR)法检测肺肿瘤组织白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和转化生长因子- β (TGF- β) mRNA表达,Western blot法检测肺肿瘤组织Arg-1、ICAM-1蛋白表达,以及丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路蛋白[细胞外信号调节激酶(ERK1/2)、磷酸化细胞外信号调节激酶(p-ERK1/2)、p38 MAPK和磷酸化p38 MAPK(p-p38 MAPK)]的表达。**结果** 与Control组比较,Model组、FYN组和SB225002组平均体质量在15 d后增长减缓,其中Model组出现明显差异($P<0.05$, $P<0.01$),FYN组和SB225002组差异无统计学意义($P>0.05$);与Model组相比,FYN组和SB225002组体质量增幅较大,但差异无统计学意义($P>0.05$)。与Model组相比,FYN组和SB225002组肺组织炎症浸润减少,肺泡淤血减少,肺泡形态较为正常,肺组织平均质量降低($P<0.01$, $P<0.001$);FYN组和SB225002组肺肿瘤组织中T细胞和CD8⁺T细胞比例升高($P<0.05$);FYN组和SB225002组肺肿瘤组织中IL-6、TNF- α 、TGF- β mRNA及Arg-1、p53、p-ERK1/2和p-p38 MAPK蛋白表达水平降低($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$),ICAM-1表达水平升高($P<0.05$, $P<0.001$)。**结论** 肺岩宁颗粒能够抑制小鼠NSCLC进展,增加肺部肿瘤组织T细胞的浸润与活化,降低T细胞衰老相关细胞因子和蛋白的表达,其机制可能与其参与调节MAPK信号通路而逆转T细胞衰老有关。

【关键词】 非小细胞肺癌;肺岩宁颗粒;肿瘤微环境;T淋巴细胞;作用机制;中药研究

Exploration of anti-non-small cell lung cancer mechanism of Feiyaning Granules by reversing T cell senescence based on MAPK signaling pathway

WU Xinhong¹, WANG Lifang¹, WANG Zhongqi¹, WANG Wenjie¹, DENG Haibin¹, XU Zhenye²

1. Oncology Department II, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China; 2. National Famous Traditional Chinese Medicine Expert Studio, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

[基金项目] 国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目(zyyzdxk-2023063);国家中医药管理局全国名老中医药专家传承工作室建设项目(徐振晔全国名老中医药专家传承工作室)(2022);上海市中医肿瘤临床医学研究中心项目(21MC1930500);上海市浦东新区中医药传承创新发展示范试点项目建设“高水平研究型中医医院建设”项目(YC-2023-0901)

[作者简介] 吴新鸿,女,硕士,住院医师,主要从事中医及中西医结合治疗恶性肿瘤的临床及实验研究工作

[通信作者] 邓海滨,主任医师,硕士研究生导师;E-mail: 13661578200@163.com。徐振晔,教授,博士研究生导师;

E-mail: xuzhenye1947@126.com

Abstract: Objective To explore the effect of Feiyaning Granules on non-small cell lung cancer (NSCLC), and its effect and mechanism on the proportion of T cells as well as T cell aging-related cytokines and proteins in lung tumor tissue. **Methods** Twenty-four SPF C57BL/6J mice were injected with Lewis lung cancer cells LLC-luc through the tail vein to establish a mouse lung tumor model. They were randomly divided into model control group (Model group), Feiyaning group (FYN group) and positive control group

(SB225002 group), with 8 mice in each group. A tumor-free control group (Control group) was also set up with 8 mice. From the first day of the experiment, mice in the Control group and the Model group were given an equal volume of sodium chloride solution (9 g/L) by gavage, the FYN group was given Feiyaning Granules solution 4.8 g/(kg·d) by gavage, and the SB225002 group was given a CXC chemokine receptor 2 (CXCR2) inhibitor SB225002 5 mg/(kg·d) by intraperitoneal injection. The intervention was continued for 20 d. The general conditions of the mice were observed, and the body mass and lung tissue mass were recorded. The morphology of lung tissue was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The ratios of CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells and T cells in lung tumor tissues were detected by flow cytometry. The protein expressions of arginase-1 (Arg-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and tumor protein p53 (p53) in lung tumor tissues were detected by immunohistochemistry. The mRNA expressions of interleukin-6 (*IL-6*), tumor necrosis factor- α (*TNF- α*) and transforming growth factor- β (*TGF- β*) in lung tumor tissues were detected by real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR). The protein expressions of Arg-1 and ICAM-1 in lung tumor tissues, as well as the expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway proteins [extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2), phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (p-ERK1/2), p38 MAPK and phosphorylated p38 MAPK (p-p38 MAPK)] were detected by Western blot. **Results** Compared with the Control group, the average body mass of the Model group, FYN group and SB225002 group slowed down after 15 d, among which the Model group showed significant difference ($P<0.05$, $P<0.01$), while there was no significant difference between the FYN group and the SB225002 group ($P>0.05$). Compared with the Model group, the FYN group and the SB225002 group showed a greater increase in body mass, but the difference was not statistically significant ($P>0.05$). Compared with the Model group, the inflammatory infiltration of lung tissues in the FYN and SB225002 groups was reduced, alveolar congestion was reduced, alveolar morphology was relatively normal, and the average mass of lung tissues was reduced ($P<0.01$, $P<0.001$); the proportions of T cells and CD8⁺ T cells in lung tumor tissues of the FYN and SB225002 groups were increased ($P<0.05$); the expression levels of *IL-6*, *TNF- α* and *TGF- β* mRNA, as well as Arg-1, p53, p-ERK1/2 and p-p38 MAPK proteins in lung tumor tissues of the FYN and SB225002 groups were decreased ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$), and the expression level of ICAM-1 was increased ($P<0.05$, $P<0.001$). **Conclusions** Feiyaning Granules can inhibit the progression of NSCLC in mice, increase the infiltration and activation of T cells in lung tumor tissues, and reduce the expressions of T cell aging-related cytokines and proteins. Its mechanism may be related to the participation in regulating the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway to reverse T cell aging.

Keywords: non-small cell lung cancer; Feiyaning Granules; tumor microenvironment; T lymphocytes; mechanism of action; traditional Chinese herbal medicine research

肺癌是全球常见的恶性肿瘤之一,其发病率在男性和女性群体中均位于前列^[1]。在所有肺癌病例中,非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)占 85% 以上^[2]。尽管近年来在治疗策略上取得了很多突破,但 NSCLC 患者的存活率仍然不尽如人意,5 年存活率仅为 17%^[3]。研究^[4]表明,肿瘤存在由脱氧核糖核酸(DNA)损伤引起的遗传改变,例如由于暴露于紫外线、烟草烟雾或 DNA 修复缺陷等引起的遗传改变。这些改变将癌细胞与正常细胞区分开来,从而可能诱导癌症患者体内肿瘤反应性 T 细胞反应^[5]。虽然肿瘤浸润淋巴细胞,特别是 CD8⁺ T 细胞的存在是肿瘤预后良好的标志^[6],但肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)中存在的广泛免疫抑制机制限制了 T 细胞的效应器功能^[7]。

免疫系统在抗肿瘤反应中发挥着重要的免疫监视作用,与肿瘤的发生和进展密切相关。免疫系统衰老,也称为免疫衰老,是一个随着年龄增长而发生的自然过程,能够导致免疫功能下降,从而影响免疫功能网络的各个方面,增加癌症发病风险。研究^[8]发现, TME 也会加速免疫系统的衰老。例如, T 细胞是获得性免疫的主要效应物,其结构在衰老过程中逐渐累积缺陷并受到严重影响^[9],从而增加免疫系统损伤、疾病易感性和老年人恶性肿瘤的发生风险^[10]。

中医学认为,癌症作为全身性疾病,反映了人体处

于阴阳失衡的一种状态。《黄帝内经》云“邪之所凑,其气必虚”,肺癌的关键病机为精气不足、脾肾两亏、痰毒瘀结^[11]。TME 中免疫效应细胞的免疫衰老现象,是由于人体“精气亏虚”导致的免疫逃逸,进一步造成肿瘤进展与转移,即“邪气所趋”^[12]。

肺岩宁颗粒是上海市名中医徐振晔教授基于“精气理论”结合多年临床经验研制的治疗肺癌的经验方^[13],以益气养精、解毒散结为治疗原则。临床研究^[13-15]表明,肺岩宁颗粒能够抑制患者肿瘤进展以及预防肿瘤复发转移,显著延长患者生存期和生存质量,改善放射治疗和化学疗法后的副作用。然而,肺岩宁颗粒调控机体免疫抗肿瘤的机制尚未完全阐明。本研究将基于中医学治疗肿瘤“益气养精、解毒散结”的原则,通过构建小鼠肺肿瘤模型,分析肺肿瘤组织 TME 中 T 细胞的功能,观察肺岩宁颗粒对 TME 中 T 细胞的影响,探索肺岩宁颗粒抗 NSCLC 的机制,以期丰富中医学“扶正法”的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与动物 荧光素酶标记的小鼠 Lewis 肺癌细胞(LLC-luc),购自上海富衡公司(货号:FH1113)。

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,32 只,6~8 周龄,体质量

为(20±2)g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。动物生产许可证号:SCXK(沪)2017-0005。动物使用许可证号:SYXK(沪)2014-008。动物饲养于上海中医药大学实验动物中心,饲养室保持良好通风,饲养温度为(25±2)℃,湿度为(50±10)%,12 h循环光照,正常饲养1周以适应环境,第2周开始进行实验。动物实验方案经上海中医药大学实验动物伦理委员会审批,符合实验动物福利与伦理相关规范(伦理审批号:PZSHUTCM210913010)。

1.1.2 药物与试剂 肺岩宁颗粒(上海中医药大学附属龙华医院院内制剂)由黄芪 30 g、石见穿 30 g、黄精 30 g、淫羊藿 15 g、灵芝 15 g、山茱萸 15 g、重楼 9 g、山慈菇 9 g、白术 9 g、蜂房 9 g、干蟾皮 6 g 组成,均购自上海中医药大学附属龙华医院,并进行了质量控制。肺岩宁颗粒制备由上海万仕诚药业有限公司完成(批号:202102020107),其中石见穿按照《上海市中药饮片炮制规范 2018 年版》^[16]进行质量控制,其余中药材按照《中华人民共和国药典(2020 年版):四部》^[17]进行质量控制。制备方法:所有药材加 10 倍量的水浸泡,煎煮 1 h 后过滤;喷雾干燥后,以体积分数为 80 % 的乙醇为润湿剂,过 20 目筛制粒,60 ℃干燥。每包 15 g 颗粒含 94.5 g 生药。肺岩宁颗粒成分鉴定采用薄层色谱法,成分含量鉴定采用高效液相色谱法,颗粒制成后进行检查,产品符合《中华人民共和国药典(2020 年版):三部》^[18]颗粒标准要求。

CXC 趋化因子受体 2(CXCR2)抑制剂 SB225002(批号:HY-16711),美国 Med Chem Express 公司;RNA 提取试剂盒(批号:9767),日本 Takara 公司;CD45 抗体、CD3 抗体、CD4 抗体、CD8 抗体、Ly6G 抗体(批号分别为 563891、563565、563151、750024、740664),美国 BD Pharmingen 公司;细胞间黏附分子-1(ICAM-1)抗体、精氨酸酶-1(Arg-1)抗体(批号分别为 ab222736、ab203490),英国 Abcam 公司;磷酸化丝裂原活化蛋白激酶 p38(p-p38 MAPK)抗体、磷酸化细胞外信号调节激酶(p-ERK1/2)抗体、β-肌动蛋白(β-actin)抗体、肿瘤蛋白 p53(p53)抗体(批号分别为 4511T、4370T、8457S、2527T),美国 Cell Signaling Technology 公司;二辛可酸(BCA)蛋白定量试剂盒(批号:ZJ101),上海雅酶生物医药科技有限公司。

1.1.3 主要仪器 流式细胞仪(型号:CytoFLEX LX),美国 Beckman Coulter 公司;荧光倒置显微镜(型号:DMI3000B),德国 Leica 公司;实时荧光定量 PCR 仪(型号:Quanti-Studio 5),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;组织研磨仪(型号:ST-M50),北京旭鑫盛科仪器设备有限公司;多功能酶标仪(型号:Synergy HTX),美国 BioTek 公司。

1.2 细胞培养 LLC-luc 细胞用含体积分数为 10% 的

胎牛血清、1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基培养,置于 37 ℃,体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱中,隔天更换 1 次培养液,待培养皿密度达到 80%~90% 时进行传代,取对数生长期细胞用于动物造模。

1.3 分组、造模与干预 24 只小鼠随机分为模型对照组(Model 组)、肺岩宁组(FYN 组)和靶向 CXCR2 抑制剂阳性对照组(SB225002 组),每组 8 只。参照文献^[19],每只小鼠尾静脉注射 4×10⁵ 个 LLC-luc 细胞构建小鼠肺肿瘤模型。另取 8 只小鼠,设为无瘤对照组(Control 组)。

各组小鼠自造模第 2 天开始给予相应干预,剂量依据前期研究^[20]中的剂量设置。FYN 组每只小鼠灌胃给予肺岩宁颗粒溶液 4.8 g/(kg·d),给药体积为 0.4 mL/d,连续干预 20 d;SB225002 组每只小鼠腹腔注射 CXCR2 抑制剂(SB225002)5 mg/(kg·d),给药体积为 0.2 mL/d,连续干预 20 d。Control 组和 Model 组灌胃给予 0.4 mL/d 0.9% 氯化钠溶液,连续干预 20 d。每 3 天记录体重 1 次。造模第 21 天,小鼠经戊巴比妥麻醉后取血,并处死。取出肺组织,拍照,计算肺结节数量,按照后续实验分装于磷酸盐缓冲液(PBS)、10% 甲醛溶液、-80 ℃ 冰箱备用。

1.4 检测指标与方法

1.4.1 流式细胞术检测 T 细胞亚群比例 使用胶原酶 IV 及脱氧核糖核酸酶 I(DNase I)配制成消化液消化肺组织,制备单细胞悬液,用红细胞裂解液裂解红细胞后用 PBS 重悬计数,每个样本取 10⁶ 个细胞,依次用死活细胞鉴定染料(FVS)标记死活细胞、Fc 受体(FcR)阻断剂阻断,加入 CD45、CD3、CD4 和 CD8 表面抗体,在冰上避光孵育染色 30 min,用预冷的染色缓冲液(Stain Buffer)洗涤 1 次,再次离心并弃去 Stain Buffer。每管 300 μL Stain Buffer 重悬,使用微球染色调节补偿,在 Cytotflex LX 流式细胞仪上进行数据采集,并通过 FlowJo V10 软件进行分析。

1.4.2 苏木精-伊红染色(HE)法染色观察肺组织形态 在 10% 甲醛溶液中浸泡固定肺部组织 24 h 后,经脱水、常规石蜡包埋,切片。然后依次干燥、脱蜡、水化、染色、脱水、二甲苯充分浸泡。用中性树胶封片,光学显微镜下随机拍摄 3 个视野。

1.4.3 免疫组织化学法检测相关蛋白表达 组织切片常规脱蜡和水化后进行热抗原修复,封闭,分别加稀释好的一抗(Arg-1, 1:2 000;ICAM-1, 1:1 000;p53, 1:200),4 ℃孵育过夜,次日复温后 PBS 洗涤干净,分别加稀释好的二抗,37 ℃孵育 30 min, PBS 洗涤。加适量 3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐(DAB)孵育 5 min, PBS 终止反应,苏木精复染 30 s, PBS 冲洗后,依次用不同浓度梯度的乙醇脱水,无菌滤纸吸净表面残存液体,二甲苯透明,用中性树胶封片,光学显微镜下观察组织形态

并拍照。于镜下无特异性着色的不同区域,随机拍摄 3 个视野,采用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件计算平均光密度值(AOD,阳性面积),阳性面积(%)=累积光密度(OD)值/有效目标分布区域的面积(Area)。

1.4.4 Western blot 法检测相关蛋白表达 从-80℃冰箱中取出各组样本,用组织匀浆机打碎离心,加入放射免疫沉淀测定(RIPA)裂解液冰上裂解 20 min 后,离心收集上清提取蛋白,提取蛋白后取一部分用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白含量,计算每个样本 10 μg 蛋白上样量,其余加入十二烷基硫酸钠(SDS)上样缓冲液煮沸,室温冷却后依次上样、电泳、转膜,使用脱脂牛奶配制的封闭液室温封闭 1 h。加入适宜浓度一抗(Arg-1, 1:1 000; ICAM-1, 1:1 000; ERK1/2, 1:1 000; p-ERK1/2, 1:1 000; p38 MAPK, 1:1 000; p-p38 MAPK, 1:1 000; β-actin, 1:1 000),于 4℃封闭过夜。次日用含吐温 20 的 Tris 缓冲盐溶液(TBST)清洗聚偏二氟乙烯(PVDF)膜 3 次,加入二抗(1:10 000),室温孵育 1 h 后,加入 ECL 显色液曝光显影,用 Tanon 化学发光图像分析系统拍摄图片。

1.4.5 实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(RT-qPCR)法检测相关细胞因子 mRNA 表达 采用 RNA 提取试剂盒提取各组样本的总 RNA,并进行 PCR 扩增,引物序列见表 1。反应条件:50℃预变性 2 min;95℃变性 10 min,60℃退火 30 s,90℃延伸 15 s,共 40 个循环。各组均设 3 个复孔。以 β-actin 基因为内参,采用 2^{-ΔΔCt}法表示各目的基因的相对表达量。

表 1 引物序列

基因	序列	引物长度/bp
TGF-β	上游:5'-TGGAGCAACATGTGGAAGTC-3'	20
	下游:5'-GTCAGCAGCCGGTTACCA-3'	18
IL-6	上游:5'-TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC-3'	23
	下游:5'-TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC-3'	21
TNF-α	上游:5'-CCCTCAGCTCAGATCATCTTCT-3'	23
	下游:5'-GCTACGACGTGGGCTACAG-3'	19
β-actin	上游:5'-CCACCATGTACCCAGGCATT-3'	20
	下游:5'-AGGGTGTAACACGCAGCTCA-3'	20

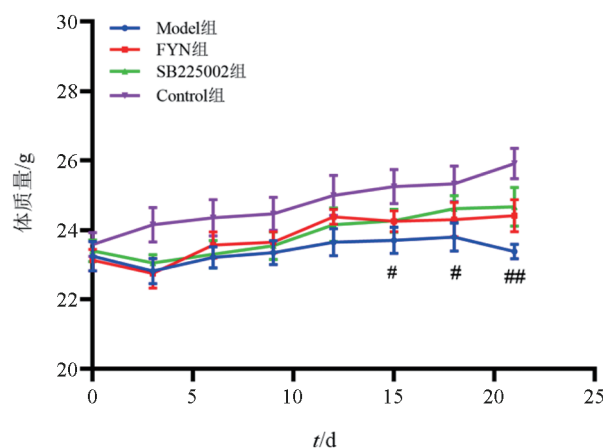
注:TGF-β为转化生长因子-β基因,IL-6为白细胞介素-6基因,TNF-α为肿瘤坏死因子-α基因,β-actin为β-肌动蛋白基因。

1.5 统计学方法 采用 SPSS26.0、GraphPad Prism 9.0 软件进行数据分析和作图,两组间比较采用非配对独立样本 *t* 检验,多组比较采用单因素方差分析等统计方法进行实验数据处理。计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对小鼠体质量及一般情况的影响 饲养前 2 周各

组小鼠精神状态良好,行动灵活,毛发光泽,进食饮水正常,体质量稳定增长。2 周后 Model 组、FYN 组和 SB225002 组部分小鼠先后出现精神萎靡不振、行动缓慢、被毛凌乱无光泽、进食减少、消瘦等现象;与 Model 组相比,FYN 组和 SB225002 组小鼠精神状态较好,行动较为灵便,饮水进食增加。饲养期间各组小鼠体质量变化如图 1 所示,与 Control 组相比,Model 组、FYN 组和 SB225002 组平均体质量在 15 d 增长减缓,其中 Model 组出现明显差异(*P*<0.05,*P*<0.01),而 FYN 组和 SB225002 组差异无统计学意义(*P*>0.05);与 Model 组相比,FYN 组和 SB225002 组体质量增幅较大,但差异无统计学意义(*P*>0.05)。



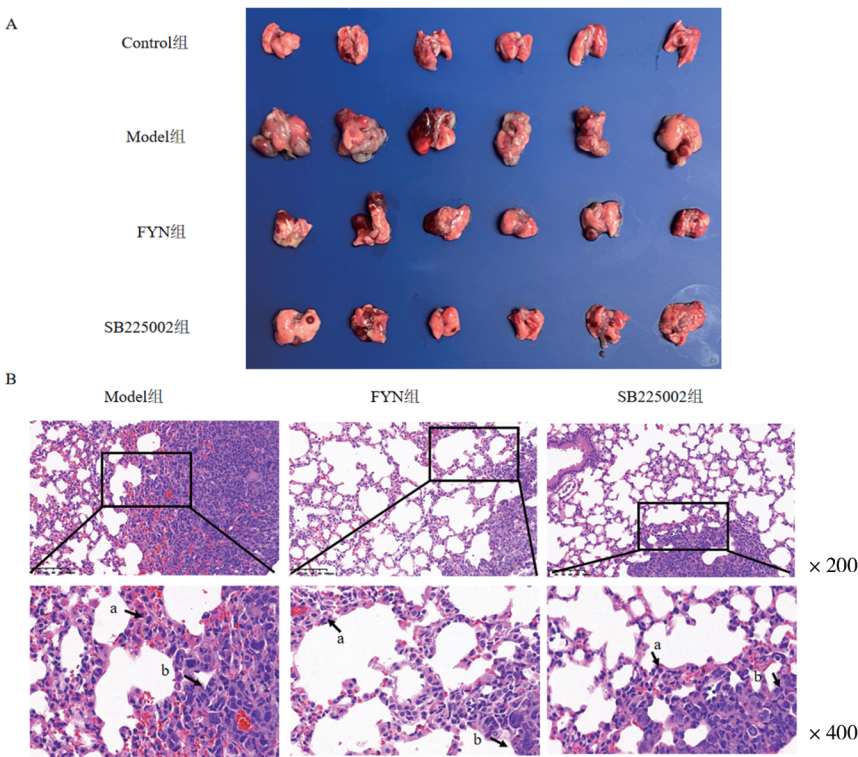
注:与 Control 组比较,#*P*<0.05,##*P*<0.01;*n*=6, $\bar{x} \pm s$ 。

图 1 各组小鼠的体质量变化曲线

2.2 对小鼠肺部肿瘤进展的影响 Model 组、FYN 组和 SB225002 组肺组织形态均出现改变,表面有若干肉眼可见的不规则赘生物生成,或大或小,有些肺组织表面可见暗红色淤血沉着;与 Model 组相比,FYN 组和 SB225002 组表面赘生物体积减小,数量减少,淤血沉着面积减少,见图 2A。

镜下观察各组小鼠肺组织 HE 染色病理切片,Model 组小鼠肺组织肺泡及间质明显有淤血,大部分肺泡细胞萎缩、排列紊乱,炎症细胞浸润,癌细胞代替正常细胞,失去正常结构;与 Model 组相比,FYN 组与 SB225002 组肺组织炎症浸润减少,肺泡淤血减少,肺泡形态较为正常,肺组织平均质量明显降低(*P*<0.01,*P*<0.001),见图 2B、表 2。

2.3 对小鼠肺肿瘤组织中 T 细胞群及 T 细胞亚群比例的影响 流式细胞术结果显示,与 Model 组相比,FYN 组与 SB225002 组小鼠肺肿瘤组织免疫细胞群中 T 细胞群以及 T 细胞亚群中 CD8⁺ T 细胞的比例均上调,差异有统计学意义(*P*<0.05),虽然 FYN 组与 SB225002 组 T 细胞亚群中 CD4⁺ T 细胞的比例均上调,但差异无统计



注:A为各组小鼠肺组织,B为苏木精-伊红染色(HE)法检测各组小鼠肺组织形态,a为炎症区(炎症细胞严重水肿,肺泡极度萎缩),b为癌细胞区(细胞核大、深染、核质比失衡的细胞)。

图2 小鼠肺部组织形态

表2 各组小鼠肺组织质量($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	肺组织平均质量/g
Model组	0.44 ± 0.20
FYN组	$0.25 \pm 0.06^{**}$
SB225002组	$0.25 \pm 0.08^{**}$
Control组	$0.19 \pm 0.01^{***}$

注:与Model组比较,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

学意义($P>0.05$),见图3。结果表明,肺岩宁颗粒能够增加肺肿瘤组织T细胞浸润以及上调活化T细胞的比例。

2.4 对小鼠肺肿瘤组织中 *IL-6*、*TNF- α* 和 *TGF- β* mRNA 表达的影响 RT-qPCR 结果显示,与Model组相比,FYN组与SB225002组小鼠肺肿瘤组织中 *IL-6*、*TNF- α* 和 *TGF- β* mRNA 表达水平均下调,差异均有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$),见表3。结果表明,肺岩宁颗粒能够下调肺肿瘤组织中衰老T细胞分泌相关细胞因子 *IL-6*、*TNF- α* 和 *TGF- β* mRNA 的表达。

2.5 对小鼠肺肿瘤组织中 Arg-1、ICAM-1 和 p53 蛋白表达的影响 免疫组织化学结果显示,与Model组相比,FYN组与SB225002组小鼠肺肿瘤组织中 Arg-1 和 p53 蛋白表达下调,ICAM-1 蛋白表达上调,差异均有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$),见图4A、表4。

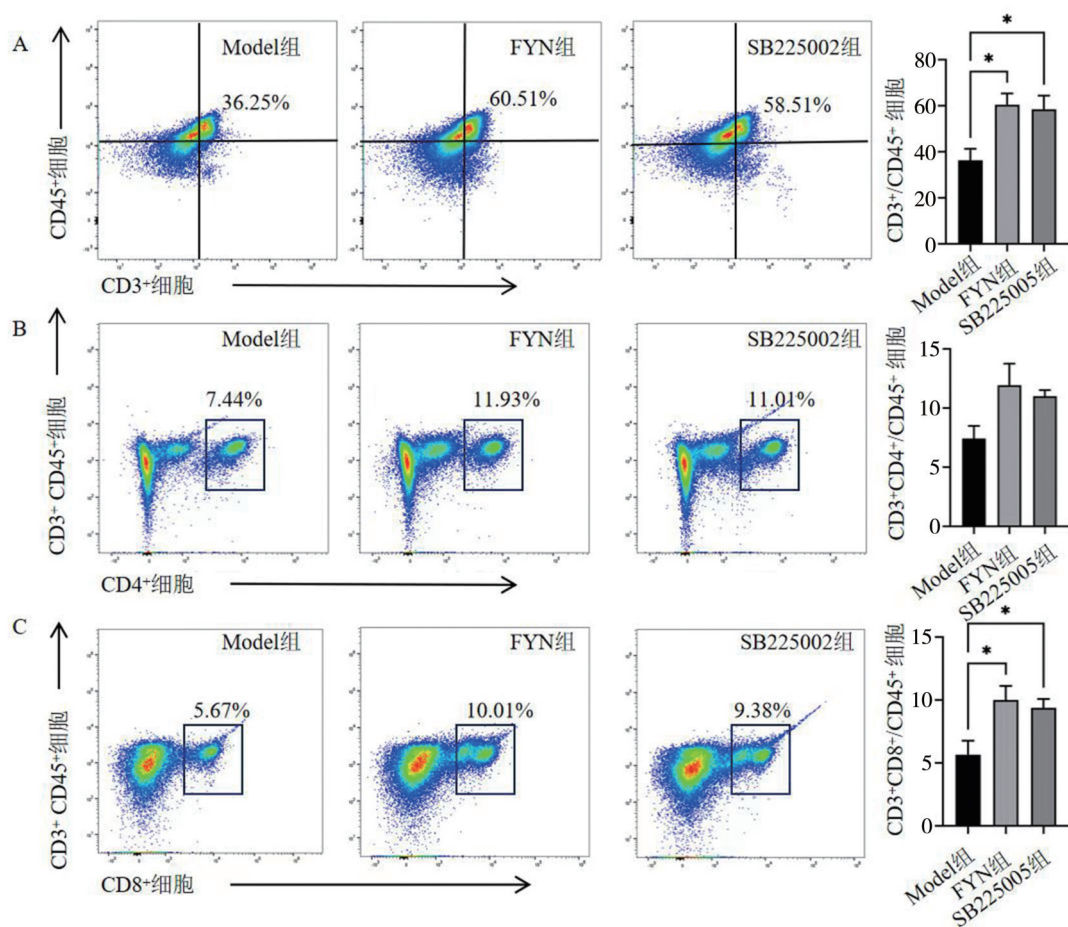
Western blot 结果显示,与Model组相比,FYN组与

SB225002组小鼠肺肿瘤组织中 Arg-1 蛋白表达下调,ICAM-1 蛋白表达上调,差异均有统计学意义($P<0.05$, $P<0.001$),见图4B。

2.6 对小鼠肺肿瘤组织中 MAPK 通路蛋白表达的影响 与Model组相比,FYN组与SB225002组中 MAPK 通路相关蛋白 p-p38 MAPK 与 p-ERK1/2 的表达水平均显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$, $P<0.001$)。各组 ERK1/2 与 p38 MAPK 蛋白表达水平差异无统计学意义($P>0.05$),见图5。结果表明,肺岩宁颗粒能够抑制小鼠肺肿瘤组织中 MAPK 通路 ERK1/2 与 p38 MAPK 蛋白磷酸化。

3 讨论

TME 是肿瘤的重要组成部分,由白细胞、成纤维细胞、内皮细胞等多种正常细胞和细胞因子、趋化因子等非细胞成分组成。许多基因、蛋白和细胞对肿瘤的影响具有双重效应,在肿瘤的发展过程中起着关键作用^[21]。中医学理论认为,恶性肿瘤是一种“本虚标实、因虚致实”的疾病,肿瘤的发病是机体正与邪相互斗争、阴与阳相互消长的一个长时间的过程^[22]。调节阴阳平衡,是中医临床治疗癌症患者的重要手段之一。国医大师刘嘉湘教授指出,癌症治疗不能单纯着眼于抑制和消灭肿瘤,更重要的应是调整已经失衡的阴阳和因治疗带来的新的不平衡^[23]。多项研究^[24-26]表明,中



注:A为各组T细胞在免疫细胞群中的占比;B为各组辅助性T细胞(CD4⁺T细胞)在T细胞群中的占比;C为各组细胞毒性T细胞(CD8⁺T细胞)在T细胞群中的占比。表面标记CD45⁺的细胞群为免疫细胞群,表面标记CD45⁺CD3⁺的细胞群为T细胞群,表面标记CD45⁺CD3⁺CD8⁺的细胞群为CD8⁺T细胞群,表面标记CD45⁺CD3⁺CD4⁺的细胞群为CD4⁺T细胞群。与Model组比较,**P*<0.05;*n*=4, $\bar{x}\pm s$ 。

图3 各组小鼠肺肿瘤组织中T细胞、CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞比例的比较

表3 各组小鼠肺肿瘤组织中IL-6、TNF-α和TGF-β mRNA表达的比较(*n*=3, $\bar{x}\pm s$)

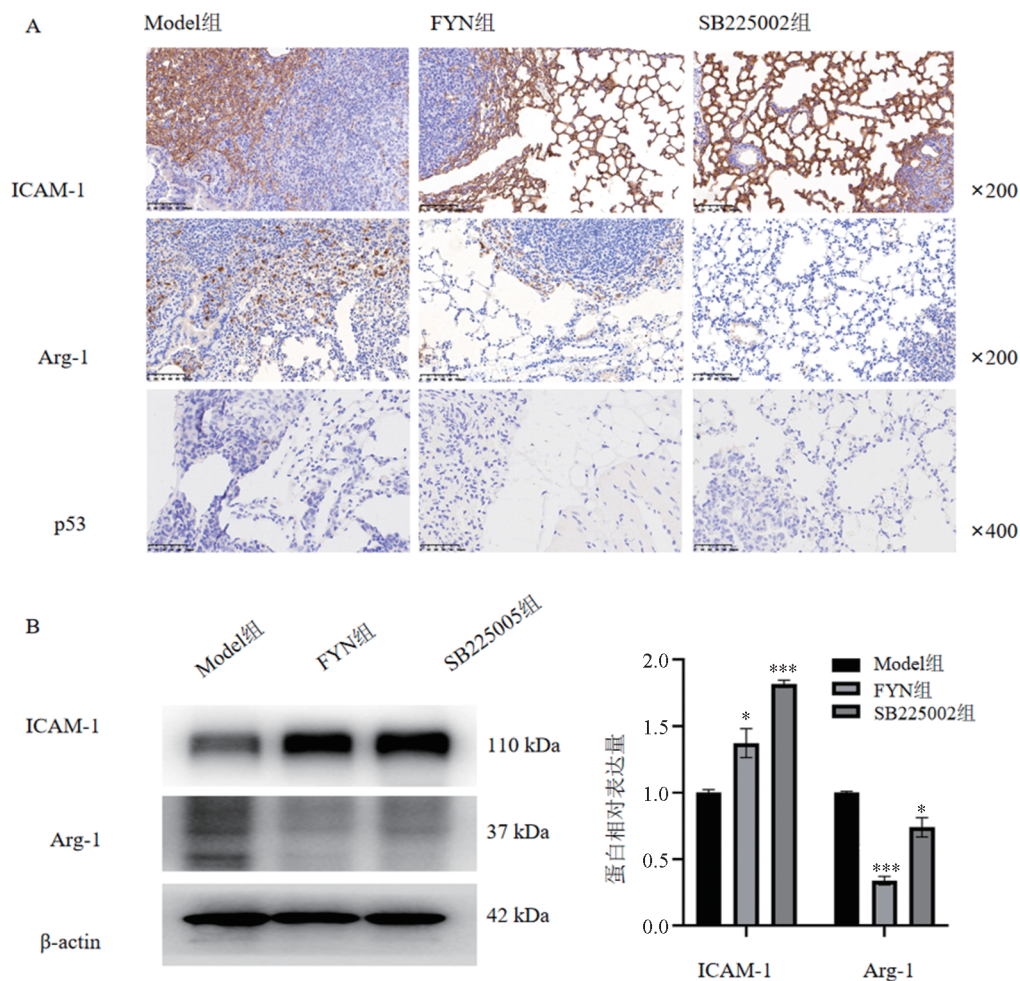
组别	IL-6	TNF-α	TGF-β
Model组	1.01±0.15	1.01±0.18	1.02±0.22
FYN组	0.04±0.01***	0.51±0.03**	0.61±0.06*
SB225002组	0.03±0.01***	0.58±0.05**	0.57±0.18*

注:IL-6为白细胞介素-6基因,TNF-α为肿瘤坏死因子-α基因,TGF-β为转化生长因子-β基因。与Model组比较,**P*<0.05,***P*<0.01,****P*<0.001。

药能够直接或间接调节TME中的基因、蛋白与细胞的阴阳失衡,促进机体的抗癌能力,解除机体的免疫抑制状态。肺岩宁颗粒作为多年临床经验方,临床研究证明^[14]其能够抗肺癌进展以及预防肺癌术后的复发和转移。课题组前期在肺岩宁颗粒干预NSCLC细胞A549、H1975和95D后,运用了转录组测序(RNA-seq)和转座酶可接近染色质测序(ATAC-seq)和染色质可及性分析技术进行分析,结果表明,经肺岩宁颗粒干预后,差异基因在p53通路以及MAPK通路调控的基因集中富集^[27]。这两条通路都与细胞周期及衰老有着密不可分

的关系。

免疫衰老的主要表现之一是T细胞衰老。多项研究^[28]在肺癌、结直肠癌、肝细胞癌和乳腺癌等癌症患者体内发现了衰老T细胞。肿瘤细胞可将正常T细胞转化为衰老T细胞^[29]。衰老T细胞的特质是端粒缩短和细胞周期停滞,归因于过度增殖活动导致的端粒过度侵蚀,或者因线粒体功能障碍导致活性氧物质产生增加而造成的DNA损伤^[30]。T细胞衰老后获得独特的衰老相关分泌表型(SASP),产生大量的促炎性细胞因子(如IL-6和TNF-α),以及免疫抑制细胞因子TGF-β,且能够抑制其他免疫细胞,包括正常T细胞和树突状细胞(DC),导致癌症中的免疫抑制加剧^[10,31],促进肿瘤进展^[32-33]。MAPK通路在T细胞衰老的调控网络中起着核心作用。肿瘤细胞诱导的葡萄糖缺乏激活T细胞中的MAPK信号通路,诱导效应T细胞的细胞周期停滞和细胞衰老,并导致T细胞中的线粒体功能障碍^[32]。细胞周期控制蛋白p53位于MAPK通路下游,通常会抑制细胞周期进程,并已被证明会在衰老细胞中积累,因此被作为T细胞衰老的主要标志物之一^[34]。根据目前的



注:Arg-1为精氨酸酶-1,ICAM-1为细胞间黏附分子-1,p53为肿瘤蛋白p53。A为免疫组织化学法实验图($\times 400$);B为Western blot法实验和统计图;与Model组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;n=3, $\bar{x}\pm s$ 。

图4 各组小鼠肺肿瘤组织中Arg-1、ICAM-1和p53蛋白表达的比较

表4 各组小鼠肺肿瘤组织中Arg-1、ICAM-1和p53蛋白表达水平(免疫组织化学法)(n=3, $\bar{x}\pm s$)

组别	ICAM-1	Arg-1	p53
Model组	5.66 $\pm$ 0.90	2.58 $\pm$ 0.61	0.17 $\pm$ 0.00
FYN组	15.73 $\pm$ 3.13**	0.61 $\pm$ 0.51*	0.15 $\pm$ 0.01**
SB225002组	20.20 $\pm$ 0.41***	0.88 $\pm$ 0.96*	0.13 $\pm$ 0.00***

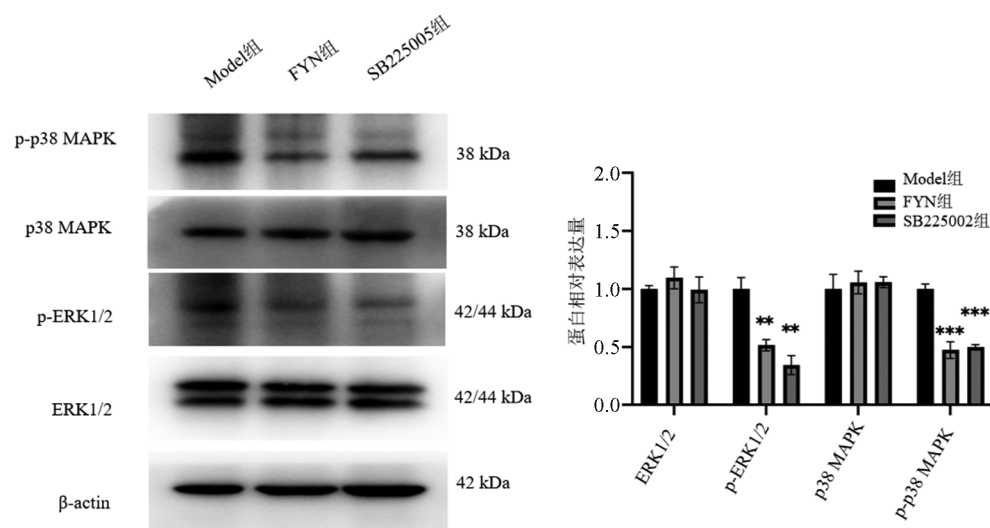
注:Arg-1为精氨酸酶-1,ICAM-1为细胞间黏附分子-1,p53为肿瘤蛋白p53。与Model组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

研究,T细胞衰老受MAPK信号通路的调控是可逆过程,可以通过调控该信号通路来增强T细胞的抗肿瘤免疫力^[10]。

临床前实验研究^[35]表明,针对p38 MAPK、ERK1/2、c-Jun氨基末端激酶(JNK)和信号传导及转录激活蛋白(STAT)信号通路的抑制剂可延缓T细胞衰老,哺乳动物雷帕霉素复合物1(mTORC1)抑制剂二甲双胍和p38 MAPK抑制剂BIRB 796可增加线粒体的生物合成和活力,通过调节代谢来逆转T细胞衰老。T细胞衰老和肿瘤的关系密不可分,目前中医药防治肿瘤的相关

研究较少。本研究探讨了肺岩宁颗粒对C57BL/6J小鼠体内T细胞衰老的影响及其可能机制。与既往研究主要关注肺岩宁颗粒对调节性T细胞(Treg)的调节作用不同^[36-37],本研究侧重于肺岩宁颗粒对T细胞免疫效应的调控。由于本研究旨在验证肺岩宁颗粒对肺肿瘤组织中T细胞效应的干预作用,因此采用了具有类似作用的CXCR2抑制剂SB225002作为阳性对照。在肺腺癌中,CXCR2是一个预后不良的标志物,其表达与肿瘤进展、转移有关^[38]。靶向抑制CXCR2能够增强T细胞的浸润,改善T细胞的免疫抑制状态,同时抑制肿瘤细胞的浸润,抗肺癌进展与转移^[39-40]。我们通过构建小鼠肺肿瘤模型,观察肺岩宁颗粒干预后对小鼠肺部肿瘤的大小、形态和肺组织质量的影响,验证了肺岩宁颗粒能够抑制C57BL/6J小鼠肺部肿瘤进展,这与此前肺岩宁颗粒抗肿瘤药效研究结果一致^[20]。

由于肺岩宁颗粒对T细胞功能的调节作用机制尚未完全阐明,为了研究其对T细胞效应的调控作用,我们分析了各组小鼠肺肿瘤组织中T细胞亚群的比例以



注:p38 MAPK为丝裂原活化蛋白激酶p38,p-p38 MAPK为磷酸化丝裂原活化蛋白激酶p38,ERK1/2为细胞外信号调节激酶,p-ERK1/2为磷酸化细胞外信号调节激酶。与Model组比较,** $P<0.01$,*** $P<0.001$; $n=3$, $\bar{x}\pm s$ 。

图5 各组小鼠肺肿瘤组织中 MAPK 通路蛋白表达的比较(Western blot 法)

及T细胞免疫效应相关蛋白的表达,结果表明肺岩宁颗粒干预后能够明显增加肺部肿瘤组织的T细胞浸润以及上调T细胞的活化比例,同时上调ICAM-1蛋白的表达,下调Arg-1蛋白的表达。Arg-1是一种催化精氨酸转化为鸟氨酸的酶,Arg-1在TME中发挥促肿瘤发生和抑制T细胞的作用^[41]。ICAM-1又名CD54,主要功能是介导细胞间的黏附反应。其参与免疫细胞相互作用,如T细胞活化、抗原呈递和免疫突触的形成等^[42]。前期肺岩宁颗粒干预NSCLC细胞测序的结果显示,肺岩宁颗粒具有调节p53通路和MAPK通路的潜力^[27]。通过查阅文献并结合现有研究基础,我们推测肺岩宁颗粒可能通过干预T细胞衰老来调节肺肿瘤组织中T细胞的活化,因此我们检测了肺肿瘤组织中衰老T细胞分泌相关细胞因子IL-6、TNF- α 和TGF- β 的基因表达,以及衰老标志物p53蛋白的表达。结果表明,肺岩宁颗粒下调了小鼠肺肿瘤组织中IL-6、TNF- α 和TGF- β 基因的表达,且下调了T细胞衰老相关蛋白p53蛋白的表达,说明肺岩宁颗粒能够通过抗T细胞衰老的方式提高T细胞的免疫效应。为了深入探究肺岩宁颗粒调节T细胞衰老的机制,我们对各组小鼠肺肿瘤组织中的MAPK通路相关蛋白进行了检测、分析,结果显示FYN组MAPK通路蛋白p-p38 MAPK与p-ERK1/2表达水平降低,这表明肺岩宁颗粒可能通过调节MAPK通路蛋白的表达来逆转T细胞的衰老。但该通路的上下游机制较为复杂,后期需要进一步验证肺岩宁颗粒对该通路中上下游蛋白表达的影响。与此同时,此次研究仅采用了C57BL/6J小鼠作为研究载体,研究样本以及物种具有一定的局限性,后期需要进一步扩大样本量,同时从细胞层面进一步分析肺岩宁颗粒对T细胞

衰老的调控作用。

综上,本研究证实了肺岩宁颗粒对TME存在一定的调控作用,能够上调TME的T细胞浸润,下调T细胞衰老相关基因与蛋白的表达,增强T细胞的活化,其机制可能与下调MAPK通路相关蛋白的表达从而逆转T细胞的衰老状态有关。本研究进一步揭示了肺岩宁颗粒调控免疫微环境抗肺癌的生物学基础,为肺岩宁颗粒基于“精气理论”治疗肺癌提供了理论和实验依据,丰富了“扶正法”治疗癌症的理论基础。

参考文献:

- [1] CAO M, LI H, SUN D, et al. Cancer burden of major cancers in China: A need for sustainable actions[J]. Cancer Commun (Lond), 2020, 40(5): 205-210.
- [2] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 68(6): 394-424.
- [3] MILLER K D, NOGUEIRA L, MARIOTTO A, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(5): 363-385.
- [4] LI Y, AITIAN L, QING Y, et al. Tumor-intrinsic signaling pathways: key roles in the regulation of the immunosuppressive tumor microenvironment[J]. J Hematol Oncol, 2019, 12(1): 125.
- [5] JOHN C C, SEBASTIAN K, JAN D, et al. Exploiting the mutanome for tumor vaccination[J]. Cancer Res, 2012, 72(5): 1081-1091.
- [6] WOLF H F, FRANCK P, CATHERINE S, et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome[J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(4): 298-306.
- [7] THOMMEN D S, SCHUMACHER T N. T cell dysfunction in cancer[J]. Cancer Cell, 2018, 33(4): 547-562.
- [8] MITCHELL F, T W A. How the ageing microenvironment influences tumour progression[J]. Nat Rev Cancer, 2020, 20(2): 89-106.

- [9] JANKO N. Aging of the T cell compartment in mice and humans: from no naive expectations to foggy memories [J]. *J Immunol*, 2014, 193(6): 2622-2629.
- [10] JING Y, LIAN Y, YUE W, et al. Immunosenescence: a key player in cancer development [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 151.
- [11] 许海柱, 邓海滨, 陈佩晶, 等. 徐振晔从脾肾论治肺癌经验 [J]. *上海中医药杂志*, 2024, 58(6): 53-56, 81.
- [12] 孙睿博, 韩钦芮, 徐萌, 等. 肿瘤转移前微环境的正虚痰瘀病机探讨 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(6): 3529-3532.
- [13] 刘畅, 赵晓珍, 王中奇, 等. 肺岩宁方联合抗瘤增效方对中老年肺癌患者化疗后癌因性疲乏、免疫功能及肿瘤标志物影响的临床研究 [J]. *上海中医药杂志*, 2019, 53(6): 49-53.
- [14] 王中奇, 徐振晔, 邓海滨, 等. 中医药结合化疗防治非小细胞肺癌术后复发转移的临床研究 [J]. *上海中医药杂志*, 2011, 45(5): 36-39.
- [15] 赵晓珍, 徐振晔, 吴中华. 肺岩宁方对 EMT 间质细胞标志因子 Vimentin, Fibronectin 和 N-cadherin 表达的影响 [J]. *上海中医药大学学报*, 2008, 22(6): 47-49.
- [16] 上海市药品监督管理局. 上海市中药饮片炮制规范 2018 年版 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2018: 330.
- [17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (2020 年版): 四部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 64-69.
- [18] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (2020 年版): 三部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 94.
- [19] 张琦君, 殷书敏, 车勇, 等. 肺岩宁方对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤浸润性髓样细胞的调控作用研究 [J]. *中医医学报*, 2021, 49(12): 34-40.
- [20] 司海龙, 王立芳, 徐振晔, 等. 肺岩宁颗粒对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤相关巨噬细胞及肿瘤转移的影响 [J]. *上海中医药大学学报*, 2016, 30(3): 47-52.
- [21] SEBASTIEN J, ANDREA P, DILETTA M, et al. Neutrophil diversity and plasticity in tumour progression and therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20(9): 485-503.
- [22] 井艳华, 贾彦焘. 论带瘤生存与中医阴阳平衡的关系 [J]. *广州中医药大学学报*, 2019, 36(10): 1655-1658.
- [23] 刘嘉湘. 中医扶正法治疗支气管肺癌的体会 [J]. *新医学杂志*, 1977, 26(10): 17-19.
- [24] LI J, CAI H, SUN H, et al. Extracts of *Cordyceps sinensis* inhibit breast cancer growth through promoting M1 macrophage polarization via NF- κ B pathway activation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 260: 112969.
- [25] XU F, CUI W Q, WEI Y, et al. Astragaloside IV inhibits lung cancer progression and metastasis by modulating macrophage polarization through AMPK signaling [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 207.
- [26] KIMURA Y, SUMIYOSHI M. Resveratrol prevents tumor growth and metastasis by inhibiting lymphangiogenesis and M2 macrophage activation and differentiation in tumor-associated macrophages [J]. *Nutr Cancer*, 2016, 68(4): 667-678.
- [27] WANG C Y, PENG X, LI Y L, et al. Integrative RNA-Seq and ATAC-Seq analysis reveals the migration-associated genes involved in antitumor effects of herbal medicine Feiyanning on lung cancer cells [J]. *Front Genet*, 2021, 12: 799099.
- [28] TU W, RAO S. Mechanisms underlying T cell immunosenescence: aging and cytomegalovirus infection [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 2111.
- [29] MONTES C. Tumor-induced senescent T cells with suppressor function: a potential form of tumor immune evasion [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(3): 870-879.
- [30] CRESPO J, SUN H, WELLING T, et al. T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment [J]. *Curr Opin Immunol*, 2013, 25: 214-221.
- [31] ZHAO Y, SHAO Q, PENG G. Exhaustion and senescence: two crucial dysfunctional states of T cells in the tumor microenvironment [J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(1): 27-35.
- [32] LIU X, MO W, YE J, et al. Regulatory T cells trigger effector T cell DNA damage and senescence caused by metabolic competition [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 249.
- [33] YE J, MA C L, EDDY C, et al. Tumor-derived gammadelta regulatory T cells suppress innate and adaptive immunity through the induction of immunosenescence [J]. *J Immunol*, 2013, 190(5): 2403-2414.
- [34] BEAUSÉJOUR C, KRTOLICA A, GALIMI F, et al. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways [J]. *Embo J*, 2003, 22(16): 4212-4222.
- [35] HUANG M, WANG Y, FANG L, et al. T cell senescence: a new perspective on immunotherapy in lung cancer [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1338680.
- [36] 郭净, 王菊勇, 郑展, 等. 肺岩宁方对肺癌小鼠 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞比例及 Foxp3 表达的影响 [J]. *中西医结合学报*, 2012, 10(5): 584-590.
- [37] 张铭, 徐振晔, 姜唯洁. 肺岩宁方对晚期非小细胞肺癌患者血清调节性 T 细胞 CD4⁺CD25⁺的影响 [J]. *辽宁中医杂志*, 2006, 33(8): 916-917.
- [38] SAINTIGNY P, MASSARELLI E, LIN S, et al. CXCR2 expression in tumor cells is a poor prognostic factor and promotes invasion and metastasis in lung adenocarcinoma [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(2): 571-582.
- [39] SHARMA B, NAWANDAR D M, NANNURU K C, et al. Targeting CXCR2 enhances chemotherapeutic response, inhibits mammary tumor growth, angiogenesis, and lung metastasis [J]. *Mol Cancer Ther*, 2013, 12(5): 799-808.
- [40] CHENG Y, MO F, LI Q, et al. Targeting CXCR2 inhibits the progression of lung cancer and promotes therapeutic effect of cisplatin [J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 62.
- [41] GLÖCKNER J H, MARTINENAIT E, LISLE L T, et al. Arginase-1 specific CD8⁺ T cells react toward malignant and regulatory myeloid cells [J]. *Oncoimmunology*, 2024, 13(1): 2318053-2318053.
- [42] OLIVEIRA G, WU C J. Dynamics and specificities of T cells in cancer immunotherapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2023, 23(5): 295-316.

编辑: 杨轶舜

收稿日期: 2024-09-03