

桂枝茯苓丸调复 MDSCs 重塑免疫微环境阻延结肠炎 相关结肠癌的干预机制

郝彦伟¹, 李春润¹, 瞿正午¹, 唐俊梅¹, 郭静¹, 张怡^{1*}, 由凤鸣^{1,2*}

(1. 成都中医药大学附属医院, 成都 610075; 2. 成都中医药大学肿瘤研究所, 成都 610058)

[摘要] 目的: 基于髓源性抑制细胞(MDSCs)相关免疫抑制微环境, 探讨桂枝茯苓丸干预结肠炎相关结肠癌(CAC)小鼠的疗效及相关作用。方法: 选用60只雄性C57BL/6小鼠, 随机分为空白组, 模型组, 阿司匹林组(0.04 g·kg⁻¹), 桂枝茯苓丸低、中、高剂量组(4.87、9.75、19.50 g·kg⁻¹), 每组10只。采用氧化偶氮甲烷(AOM)/葡聚糖硫酸钠(DSS)复合诱导制备CAC小鼠模型, 第5周开始进行药物干预, 连续灌胃治疗9周。观察并记录小鼠进食、体质量、粪便性状及便血等情况, 根据评分标准计算疾病活动指数评分(DAI)值。苏木素-伊红(HE)染色观察小鼠结肠组织病理学改变, 免疫组织化学测定结肠组织细胞核增殖抗原67(Ki67)表达, 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测小鼠血清白细胞介素-6(IL-6)、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量; 流式细胞术检测小鼠脾脏MDSCs、CD4⁺T、CD8⁺T细胞比例水平, 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测MDSCs功能相关效应分子精氨酸酶1(Arg1)和诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)mRNA表达。之后建立“MDSCs细胞+CD8⁺T细胞”体外共培养模型, 并予桂枝茯苓丸含药血清干预。流式细胞术检测不同桂枝茯苓丸含药血清浓度对MDSCs细胞活性氧(ROS)、iNOS水平及CD8⁺T细胞增殖的影响; ELISA检测细胞上清颗粒酶B(GZMB)、干扰素- γ (IFN- γ)水平。结果: 与空白组比较, 模型组小鼠体质量显著下降($P<0.01$), DAI评分显著升高($P<0.01$), 结肠长度显著缩短($P<0.01$), 肿瘤数目和Ki67表达显著升高($P<0.01$), 血清IL-6、IL-1 β 、TNF- α 含量显著升高($P<0.01$); 小鼠脾脏MDSCs细胞显著升高($P<0.01$), CD4⁺T、CD8⁺T细胞水平显著降低($P<0.01$), 且MDSCs功能相关效应分子Arg1、iNOS mRNA表达显著上调($P<0.01$)。与模型组比较, 桂枝茯苓丸中剂量组小鼠体质量有所增加, DAI评分明显降低($P<0.05$, $P<0.01$), 桂枝茯苓丸中、高剂量组小鼠结肠缩短明显改善, 肿瘤数目显著减少, 肿瘤增殖标志物Ki67表达明显减少($P<0.05$, $P<0.01$), 血清IL-6、IL-1 β 、TNF- α 含量明显降低($P<0.05$, $P<0.01$); 此外桂枝茯苓丸给药显著减少了小鼠脾脏MDSCs细胞浸润, CD4⁺T、CD8⁺T细胞水平均明显增加($P<0.05$, $P<0.01$), 且Arg1和iNOS mRNA表达明显下降($P<0.05$, $P<0.01$)。细胞体外共培养显示, 桂枝茯苓丸含药血清给药显著降低了MDSCs细胞中ROS、iNOS活性水平, 并促进CD8⁺T细胞增殖和GZMB、IFN- γ 的分泌($P<0.05$, $P<0.01$)。结论: 桂枝茯苓丸能够降低促炎因子分泌, 抑制CAC小鼠结肠肿瘤增殖, 其潜在机制可能与其减少MDSCs浸润, 增强效应T细胞尤其是CD8⁺T细胞应答, 改善肿瘤免疫抑制微环境有关。

[关键词] 结肠炎相关结肠癌; 桂枝茯苓丸; 髓源性抑制细胞; 肿瘤免疫微环境; T淋巴细胞

[中图分类号] R256; R259; R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)14-0185-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20260527

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20260130.1712.003>

[网络出版日期] 2026-02-02 09:18:59



Intervention Mechanism of Guizhi Fulingwan in Delaying Colitis-associated Colon Cancer via Modulating and Restoring MDSCs and Reshaping Immune Microenvironment

HAO Yanwei¹, LI Chunrun¹, QU Zhengwu¹, TANG Junmei¹, GUO Jing¹, ZHANG Yi^{1*}, YOU Fengming^{1,2*}

(1. Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China;

2. Institute of Oncology, Chengdu University of TCM, Chengdu 610058, China)

[收稿日期] 2025-10-04

[基金项目] 中国博士后科学基金面上项目(2025MD784212); 四川省科技厅自然科学基金青年项目(2026NSFSC1853); 四川省中医药管理局项目(25MSZX121); 成都市卫生健康委员会联合创新专项(WXLH202403086)

[第一作者] 郝彦伟, 博士后, 从事中医药防治结肠炎癌转化的临床与基础研究, E-mail: haoyw116@163.com

[通信作者] * 由凤鸣, 教授, 博士生导师, 从事中医药防治肿瘤病证的临床与基础研究, E-mail: youfengming@cdutcm.edu.cn;

* 张怡, 教授, 硕士生导师, 从事中医药防治脾胃病的临床与基础研究, E-mail: zhangyi2288@163.com

[Abstract] **Objective:** This paper aims to investigate the efficacy and related actions of Guizhi Fulingwan in intervening in the mice with colitis-associated colon cancer (CAC) based on the immunosuppressive microenvironment associated with myeloid-derived suppressor cells (MDSCs). **Methods:** Sixty male C57BL/6 mice were randomly assigned to a blank group, a model group, an aspirin group ($0.04 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and low-, medium-, and high-dose Guizhi Fulingwan groups (4.87 , 9.75 , and $19.50 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), with ten mice per group. The CAC mouse model was established via combined induction of azoxymethane (AOM)/dextran sulphate sodium (DSS). Drug intervention commenced in week five, with continuous intragastric administration for nine weeks. The food intake, body weight, fecal characteristics, and haematochezia were observed and recorded, and disease activity index (DAI) scores were calculated according to scoring criteria. Hematoxylin and eosin (HE) staining was used to observe the histopathological changes in the colon tissues of the mice. Immunohistochemistry was used to determine proliferating cell nuclear antigen-67 (Ki67) expression in the colon tissues, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the contents of interleukin-6 (IL-6), IL-1 β , and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the serum of the mice. Flow cytometry was employed to determine the proportion levels of MDSCs, CD4⁺T cells, and CD8⁺T cells in the spleen tissues of the mice. The mRNA expressions of MDSC-associated effector molecules, including arginase 1 (Arg1) and inducible nitric oxide synthase (iNOS), were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). After that, an *in vitro* co-culture model of MDSCs and CD8⁺T cells was established, and drug-containing serum of Guizhi Fulingwan was used for intervention. The Flow cytometry was employed to assess the effects of drug-containing serum of Guizhi Fulingwan with different concentrations on the levels of reactive oxygen species (ROS) and iNOS in MDSCs and the proliferation of CD8⁺T cells. The levels of granzyme B (GZMB) and interferon- γ (IFN- γ) in cell supernatant were detected by ELISA. **Results:** Compared with those in the control group, the mice in the model group exhibited significantly reduced body weight, elevated DAI scores, shortened colon length ($P < 0.01$), increased number of tumors and Ki67 expression ($P < 0.01$), and significantly elevated contents of IL-6, IL-1 β , and TNF- α in the serum ($P < 0.01$). Significant increases in the number of MDSCs were observed in mouse spleens, alongside marked reductions in the levels of CD4⁺T and CD8⁺T cells ($P < 0.01$). Furthermore, the mRNA expressions of MDSC function-associated effector molecules Arg1 and iNOS were significantly upregulated ($P < 0.01$). Compared with those in the model group, the mice in the middle-dose Guizhi Fulingwan group exhibited increased body weight and significantly decreased DAI scores ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The mice in the middle- and high-dose Guizhi Fulingwan groups exhibited significantly improved colon shortening, significantly decreased number of tumors and Ki67 expression ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and significantly decreased contents of IL-6, IL-1 β , and TNF- α in the serum ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Furthermore, administration of Guizhi Fulingwan markedly reduced MDSC infiltration in the spleen of the mice, with different degrees of increase in the levels of both CD4⁺T and CD8⁺T cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$), alongside significant decreases in the mRNA expressions of Arg1 and iNOS ($P < 0.05$, $P < 0.01$). *In vitro* cell co-culture shows that administration of drug-containing serum of Guizhi Fulingwan significantly decreases the activity levels of ROS and iNOS in MDSCs and promotes the proliferation of CD8⁺T cells and the secretion of GZMB and IFN- γ ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Guizhi Fulingwan can reduce pro-inflammatory cytokine secretion and inhibit tumor proliferation in the colon tissues of CAC mice. Its potential mechanism may involve reducing MDSC infiltration, enhancing effector T cells, particularly CD8⁺T cell response, and improving the tumor immunosuppressive microenvironment.

[Keywords] colitis-associated colon cancer; Guizhi Fulingwan; myeloid-derived suppressor cell; tumor immune microenvironment; T lymphocyte

根据世界卫生组织(WHO)发布的最新全球癌症统计数据,结直肠癌是全球第三大常见恶性肿瘤,同时也是导致癌症相关死亡的第二大原因。2022年,全球预计新增结直肠癌病例超过190万,死亡病例约90.4万,分别占全部癌症发病和死亡总数的约10%,其高发病率与死亡率对全球公共卫生构成重大威胁^[1]。近年来,随着居民饮食结构和生活方式的显著变化,我国结肠癌的发病率持续上升,目前已跃居所有癌症类型的第二位^[2]。肠道慢性炎症是结肠癌发生的重要危险因素,结肠炎相关结肠癌(CAC)的发生遵循“炎症-异型增生-癌变”的演进模式,随着病程延长,其癌变风险不断增高^[3]。当前,以免疫检查点抑制剂为代表的肿瘤免疫治疗已在多种肿瘤中广泛应用,成为包括结肠癌在内的多

种肿瘤的一线治疗方案,显示出良好的临床获益^[4]。然而,部分患者对肿瘤免疫治疗无反应,且相当一部分初始有效的患者最终因出现获得性耐药而导致疾病进展^[5]。造成这一现象的关键在于高度免疫抑制性肿瘤微环境的形成^[6]。因此,深入探索驱动免疫抑制性肿瘤微环境形成的内在机制,并发展有效调控该微环境的干预策略,具有重要的临床意义。

结肠炎相关肿瘤免疫微环境是一个复杂且高度异质的系统,主要由大量浸润的髓系细胞和淋巴细胞构成。这些细胞通过分泌多种细胞因子、生长因子和蛋白酶,持续重塑肿瘤微环境,从而推动慢性炎症向CAC恶性进展^[7]。在肠道局部微环境中,巨噬细胞和树突状细胞能够感知入侵的微生物信

号,进而调控促炎淋巴细胞分化;而活化的淋巴细胞又进一步介导更多髓系细胞向肠道组织局部募集。这些髓系细胞在驱动慢性炎症向CAC转化过程中发挥着关键作用^[8]。在众多髓系细胞中,髓源性抑制细胞(MDSCs)作为肿瘤微环境中的重要组成部分,表现出强烈的免疫抑制活性和促肿瘤增殖功能。近年来越来越多的研究证据表明,MDSCs在炎症依赖性的CAC进展过程中扮演了关键性角色,并且是导致结肠癌免疫治疗应答不佳的重要因素^[9]。因此,针对MDSCs的干预策略,包括抑制MDSCs细胞浸润及削弱其免疫抑制功能已成为当前抗肿瘤免疫最具潜力的方向之一。

桂枝茯苓丸出自《金匮要略》,原为主治妇人瘀阻胞宫所设,取其活血化瘀、缓消癥块之效,现代被广泛用于治疗卵巢癌、肝癌、多发性骨髓瘤等恶性肿瘤^[10-12]。前期研究发现,桂枝茯苓丸加味显著减少了氧化偶氮甲烷(AOM)/葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的小鼠结肠腺瘤数量,并通过调控磷酸酯酶与张力蛋白同源物(PTEN)/磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路介导的线粒体凋亡抑制细胞过度增殖^[13]。本研究通过观察桂枝茯苓丸对CAC小鼠炎症因子、MDSCs相关免疫细胞及MDSCs功能相关效应分子的影响,旨在揭示桂枝茯苓丸对AOM/DSS诱导的CAC小鼠肿瘤免疫微环境的干预作用,特别是桂枝茯苓丸对免疫微环境中MDSCs细胞介导的免疫抑制的影响。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性C57BL/6小鼠60只,8周龄,体重20~22 g,由成都达硕生物科技有限公司提供,动物许可证号SYXK(川)2025-0030。动物饲养于成都中医药大学临床医学院实验动物房。小鼠饲养条件:室内温度(23±2)℃,湿度(50±10)%,明暗循环12 h。

1.2 伦理 相关实验经成都中医药大学动物伦理委员会批准(批准号为2025133)。

1.3 药物 桂枝茯苓丸按照《金匮要略》原书记载的药物比例配伍:桂枝15 g(批号241101)、茯苓15 g(批号240809)、赤芍15 g(批号240806)、桃仁15 g(批号240607)、牡丹皮15 g(批号240905)。上述中药饮片均购自四川省中药饮片有限责任公司,并经成都中医药大学中医药创新研究院付兴副教授完成药物鉴定。将上述药物分别以8倍、6倍体积水煎煮2次并通过后续浓缩处理,制成1 g·mL⁻¹的浓液。于4℃冰箱保存备用。

1.4 试剂 AOM(美国Sigma Aldrich公司,货号A5486);DSS(美国MP Biomedicals公司,货号9011-18-1);阿司匹林肠溶片(德国拜耳医药保健有限公司,国药准字J20171021,规格100 mg/片);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号G1120);细胞核增殖抗原67(Ki67)抗体(中国Affinity公司,货号AF0198);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔、一氧化氮(NO)荧光探针、活性氧(ROS)检测试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司,货号分别为A0352、S0019、S0033);小鼠白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和IL-1 β 酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒、小鼠PerCP/Cyanine 5.5 CD45 抗体、FITC CD11b 抗体、PE (Ly-6G/Ly-6C)Gr-1 抗体、FITC CD4 抗体、PE CD8a 抗体(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,货号分别为E-EL-M0044、M3063、M0037、E-AB-F1136J、F1081C、F1120D、F1097C、F1104D);小鼠MDSC分离试剂盒(加拿大STEMCELL公司,货号18970);FastPure组织/细胞总RNA提取试剂盒、HiScript[®] III 反转录试剂盒、SYBR Green qPCR(南京诺唯赞医疗科技有限公司,货号分别为RC101-01、R333-01、Q711-02);重组小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、IL-6、IL-2(苏州近岸蛋白质科技股份有限公司,货号分别为CK02、CG39、CK24);小鼠CD8⁺T细胞分选试剂盒、小鼠CD3/CD28 T细胞激活磁珠(苏州海狸生物医学工程有限公司,货号分别为70902、70912);5(6)-羧基二乙酸荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)荧光染料(美国MCE公司,货号HY-D0938);颗粒酶B(GZMB)、干扰素- γ (IFN- γ) ELISA试剂盒(杭州联科生物,货号分别为EK2173、EK280)。

1.5 仪器 RM2016型病理切片机(德国Leica公司);JT-12S型自动组织脱水机(武汉俊杰公司);Pannoramic midi型多功能病理切片扫描仪(匈牙利3DHISTECN公司);MK3型多功能酶标仪(美国Thermo Fisher公司);CytoFLEX型流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司);BSCI300IIA2型生物安全柜(苏州苏净安泰公司);Mastercycler ep型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(德国Eppendorf公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药 将小鼠适应性喂养1周,随机分为空白组,模型组,阿司匹林组,桂枝茯苓丸低、中、高剂量组,每组各10只。除空白组外,

采用AOM/DSS复合诱导制备CAC模型^[14]。具体造模方法如下:小鼠先通过一次性腹腔注射 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的AOM工作液,正常自由饮水、进食。1周后,用2% DSS溶液代替饮用水供小鼠连续自由饮用7 d,随后继续恢复正常饮水14 d。上述7 d+14 d为1个DSS循环周期,共进行3个DSS循环周期。在第2个DSS循环即第5周开始进行药物干预,给药剂量按人与小鼠体表面积比值折算等效剂量^[15],以桂枝茯苓丸中剂量组为临床等效剂量,桂枝茯苓丸低、中、高剂量组分别予 4.87 、 9.75 、 $19.50\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 药液灌胃,阿司匹林组将阿司匹林肠溶片研碎成粉末,溶解在0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)中制成混悬液予 $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃,空白组和模型组每日接受等体积的0.5% CMC-Na灌胃。灌胃容积均为 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,每日1次,连续9周。造模结束后,通过结肠肉眼观察及组织病理学检测,判断CAC模型是否构建成功。

2.2 小鼠一般情况及疾病活动指数评分(DAI)评分 实验期间,观察并记录各组小鼠每日一般状况、进食、粪便性状、便血及死亡情况。每周定期给小鼠称体质量,并采用随机盲法计算DAI值^[16]:体质量未下降,下降1%~5%、5%~10%、10%~15%和>15%分别记0~4分;粪便性状正常记0分,粪便松散记2分,稀便记4分;粪便隐血阴性记0分,隐血阳性记2分,肉眼血便记4分。实验结束后,禁食12 h,按 $3.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 予20%乌拉坦溶液腹腔注射麻醉,采集小鼠眼眶血离心收集血清,记录各组结肠组织长度和肿瘤数,取脾脏、结肠进行后续检测。考虑到实验过程中部分小鼠死亡、实验动物人道主义终点等因素,后续研究每组仅取6只进行分析。

2.3 HE染色观察结肠组织病理 将小鼠结肠组织固定在4%多聚甲醛固定液,行常规脱水、透明、浸蜡及石蜡包埋后切片,切片厚度约 $5\text{ }\mu\text{m}$ 。将切片脱蜡后依次浸入不同梯度乙醇脱水,流水冲洗后进行苏木素和伊红染色,风干后进行中性树胶封片。将玻片置于多功能病理切片扫描仪完成全景扫描,CaseViewer 2.4.0软件观察各组小鼠结肠组织病理改变并拍照。

2.4 免疫组织化学(IHC)法测定结肠Ki67表达 将石蜡包埋切片依次放入二甲苯和梯度乙醇中进行脱蜡脱水处理。柠檬酸钠溶液高温修复,3% H_2O_2 孵育,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤。10%山羊血清 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育2 h,滴加Ki67(1:150稀释)一抗 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜,辣根酶标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G室

温孵育1 h,二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染,乙醇和二甲苯脱水透明,中性树胶封片。将玻片全景扫描后,CaseViewer 2.4.0软件观察各组小鼠结肠Ki67表达并拍照,随机选取5个不重复视野,使用ImagePro Plus 6.0软件统计阳性染色区域的平均积分光密度值(IOD/面积),取均值进行结果比较。

2.5 ELISA检测血清IL-6、TNF- α 和IL-1 β 含量 采集的血液常温放置2 h, $3\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min,取上清,ELISA测定小鼠血清中IL-6、TNF- α 和IL-1 β 含量,按照试剂盒说明书提供的步骤进行操作,最后将孔板置于MK3型多功能酶标仪,测定波长为450 nm处各孔吸光度A。

2.6 流式细胞术检测脾脏MDSCs、CD4 $^+$ T、CD8 $^+$ T细胞比例水平 取新鲜脾脏组织轻轻研磨,使用 $70\text{ }\mu\text{m}$ 细胞过滤器过滤,制备单细胞悬液。用PerCP/Cyanine偶联的CD45抗体标记免疫细胞,再用FITC偶联的CD11b抗体和PE偶联Gr-1抗体孵育细胞悬液检测小鼠脾脏总MDSCs。用FITC偶联的CD4抗体和PE偶联的CD8抗体染色检测小鼠脾脏T淋巴细胞。使用CytoFLEX流式细胞仪进行上机检测,并用CytExpert 2.6.0软件进行分析。

2.7 Real-time PCR检测MDSCs功能相关效应分子mRNA表达 使用EasySep[™]小鼠MDSCs分离试剂盒对制备好的单细胞悬液进行分选,收集脾脏MDSCs,置于无RNA酶的离心管,采用诺唯赞Total RNA Isolation Kit,严格按照说明书提取MDSCs的RNA。提取的总RNA进一步逆转录合成cDNA。最后将配好的反应液加至PCR 8联管完成PCR扩增。PCR反应扩增程序设置为 $95\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性30 s, $95\text{ }^\circ\text{C}$ 变性10 s, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸30 s,共40个循环。根据所得的C_t值,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{C}_t}$ 值法计算目的基因相对表达量。相关引物序列由北京擎科生物设计合成,见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primers sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
Arg1	上游CTCCAAGCCAAGTCCTTAGAG	185
	下游AGGAGCTGTCATTAGGGACATC	
iNOS	上游GAGACAGGGAAGTCTGAAGCAC	127
	下游CCAGCAGTAGTTGCTCCTCTTC	
GAPDH	上游GAAGGTCGGTGTGAACGGAT	257
	下游CCCATTGATGTTAGCGGGAT	

注:Arg1.精氨酸酶1;iNOS.诱导型一氧化氮合酶;GAPDH.甘油醛-3-磷酸脱氢酶

2.8 MDSCs与CD8⁺T细胞共培养模型建立和干预 通过无菌操作获取C57BL/6小鼠的胫骨和股骨,冲洗收集骨髓细胞,红细胞裂解液裂解20 min。将细胞接种于10 cm培养皿,为诱导骨髓MDSCs分化,加入40 μg·L⁻¹的GM-CSF和IL-6,4 d后收集细胞,添加荧光标记的抗小鼠CD11b和Gr-1抗体,流式细胞术检测CD11b⁺/Gr-1⁺细胞比例,鉴定诱导效果。同时从C57BL/6小鼠脾脏分选CD8⁺T细胞,将分选后的CD8⁺T细胞用小鼠CD3/CD28T细胞激活磁珠刺激48 h,之后向培养基内加入30 U·mL⁻¹重组IL-2。共培养当日,收集CD8⁺T细胞并用CFSE荧光染料标记,与MDSCs细胞按1:1比例共培养。实验设置空白组(正常大鼠血清)和不同质量分数桂枝茯苓丸含药血清组(2.5%、7.5%),干预时间24 h。

2.9 流式细胞术检测MDSCs细胞ROS和iNOS活性水平 收集各孔MDSCs细胞,通过2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)探针检测ROS活性水平,NO探针DAF-FM DA检测iNOS酶活水平。将重悬的细胞加入配制好的探针工作液,在37℃细胞培养箱中避光孵育20 min。孵育结束后用PBS洗涤细胞,进行上机检测。

2.10 CFSE检测CD8⁺T细胞增殖情况 CD3/CD28抗体刺激CD8⁺T细胞增殖,IL-2促进CD8⁺T细胞扩增。使用细胞增殖荧光探针CFSE标记孵育

CD8⁺T细胞,并将MDSCs细胞与CD8⁺T细胞共培养,72 h后通过流式细胞仪检测CFSE荧光强度并统计CD8⁺T细胞增殖水平。

2.11 ELISA检测共培养细胞上清中GZMB、IFN-γ水平 收集共培养细胞上清液,ELISA测定共培养细胞上清液中GZMB、IFN-γ含量,按照试剂盒说明书提供的步骤进行操作,最后将孔板置于MK3型多功能酶标仪,测定波长为450 nm处各孔吸光度A。

2.12 统计学分析 采用SPSS 23.0软件进行统计学分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),首先对数据进行方差齐性检验,方差齐时采用ANOVA分析并进一步使用Tukey检验进行组间两两分析,若方差不齐,采用非参数Kruskal-Wallis检验进行分析。两组比较采用独立样本t检验。以P<0.05表示组间差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 桂枝茯苓丸对AOM/DSS诱导的CAC小鼠体质量的影响 与空白组比较,模型组小鼠的体质量在第4、6、8、10、12周时显著下降(P<0.01)。与模型组比较,自第8周起,桂枝茯苓丸中剂量组的体质量明显增加(P<0.05),而桂枝茯苓丸低、高剂量组和阿司匹林组的小鼠体质量虽有增加,但差异无统计学意义。见表2。

表2 桂枝茯苓丸对CAC小鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Guizhi Fulingwan on body weight of CAC mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	4周	6周	8周	10周	12周
空白组		24.10±0.67	25.68±0.73	26.72±0.84	27.77±0.48	28.98±0.79
模型组		20.91±1.10 ¹⁾	19.74±0.61 ¹⁾	20.77±0.31 ¹⁾	20.60±0.35 ¹⁾	22.13±0.48 ¹⁾
阿司匹林组	0.04	21.03±0.66	20.59±1.10	21.80±0.58	21.20±1.48	23.13±0.75
桂枝茯苓丸低剂量组	4.87	21.27±1.40	20.12±1.31	21.14±0.73	21.06±1.17	22.60±0.82
桂枝茯苓丸中剂量组	9.75	21.57±1.15	20.85±1.04	22.10±0.83 ²⁾	22.15±0.69 ²⁾	23.46±0.77 ²⁾
桂枝茯苓丸高剂量组	19.50	21.93±0.85	20.68±1.73	21.76±0.57	21.95±1.52	23.17±0.49

注:与空白组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.05,³⁾P<0.01(表3-表8同)

3.2 桂枝茯苓丸对AOM/DSS诱导的CAC小鼠DAI评分的影响 与空白组比较,模型组小鼠DAI评分在第4、6、8、10、12周时显著升高(P<0.01);与模型组比较,桂枝茯苓丸中剂量组的DAI评分在第6、10、12周明显降低(P<0.05, P<0.01),阿司匹林组和桂枝茯苓丸高剂量组的DAI评分在第6周时明显降低(P<0.05, P<0.01)。见表3。

3.3 桂枝茯苓丸对AOM/DSS诱导的CAC小鼠结肠长度和肿瘤数目的影响 与空白组比较,模型组

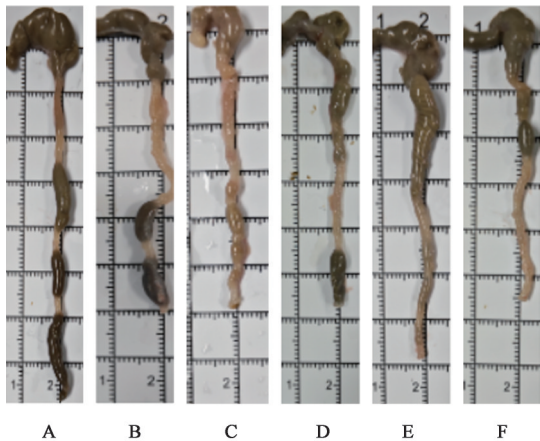
小鼠的结肠长度显著缩短(P<0.01),且结肠部位出现数个肉眼可见的腺瘤(P<0.01)。与模型组比较,桂枝茯苓丸各剂量组和阿司匹林组小鼠的结肠组织明显缩短,差异有统计学意义(P<0.05, P<0.01),且桂枝茯苓丸中、高剂量组和阿司匹林组的肠道肿瘤数目明显减少,差异有统计学意义(P<0.05)。见图1、表4。

3.4 桂枝茯苓丸对AOM/DSS诱导的CAC小鼠结肠病理损伤的影响 空白组小鼠结肠黏膜结构和

表3 桂枝茯苓丸对CAC小鼠DAI评分的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Guizhi Fulingwan on DAI score of CAC mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	4周	6周	8周	10周	12周
空白组		0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组		1.84±0.18 ¹⁾	3.00±0.21 ¹⁾	2.84±0.18 ¹⁾	2.72±0.13 ¹⁾	2.22±0.35 ¹⁾
阿司匹林组	0.04	2.11±0.45	2.45±0.35 ³⁾	2.50±0.41	2.34±0.37	1.78±0.17
桂枝茯苓丸低剂量组	4.87	1.83±0.18	2.78±0.17	2.61±0.49	2.44±0.35	2.06±0.33
桂枝茯苓丸中剂量组	9.75	1.83±0.18	2.34±0.37 ³⁾	2.61±0.33	2.22±0.35 ²⁾	1.66±0.37 ²⁾
桂枝茯苓丸高剂量组	19.50	2.06±0.49	2.56±0.27 ²⁾	2.72±0.39	2.39±0.44	1.95±0.39



注:A.空白组;B.模型组;C.阿司匹林组;D.桂枝茯苓丸低剂量组;E.桂枝茯苓丸中剂量组;F.桂枝茯苓丸高剂量组(图2-图3同)

图1 桂枝茯苓丸对CAC小鼠结肠长度的影响

Fig. 1 Effect of Guizhi Fulingwan on colon length of CAC mice

绒毛完整,腺体有序,隐窝正常,无黏膜糜烂和损伤,无中性粒细胞浸润。模型组小鼠结肠结构严重

表4 桂枝茯苓丸对CAC小鼠结肠长度、肿瘤数目的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Guizhi Fulingwan on colon length and tumors number of CAC mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	结肠长度/cm	肿瘤数目/个
空白组		8.10±0.59	0.00±0.00
模型组		5.99±0.34 ¹⁾	5.67±0.82 ¹⁾
阿司匹林组	0.04	6.65±0.56 ²⁾	3.83±1.17 ²⁾
桂枝茯苓丸低剂量组	4.87	6.59±0.43 ²⁾	4.50±1.05
桂枝茯苓丸中剂量组	9.75	7.06±0.26 ³⁾	3.67±1.03 ²⁾
桂枝茯苓丸高剂量组	19.50	6.72±0.45 ³⁾	3.67±1.21 ²⁾

受损,黏膜绒毛和隐窝消失,腺体萎缩,黏膜层变厚,大量中性粒细胞浸润并可见形态各异的肿瘤细胞增生。与模型组比较,阿司匹林组及桂枝茯苓丸中、高剂量组小鼠结肠黏膜损伤减轻,炎症浸润减少,腺体结构及排列均较模型组改善,可见少量异型增生。表明桂枝茯苓丸可以显著改善AOM/DSS诱导的肠道损伤,阻延CAC进展。见图2。

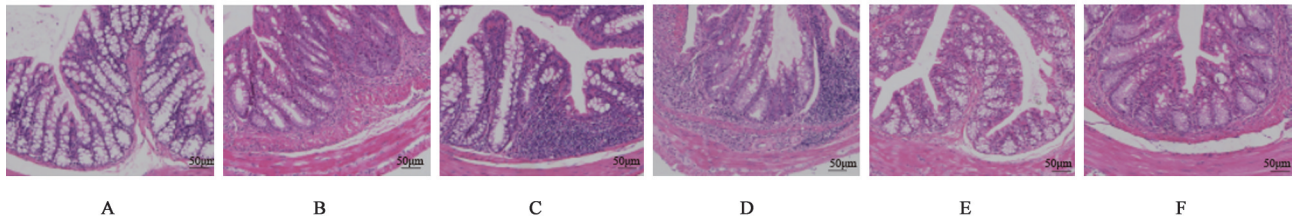


图2 桂枝茯苓丸对CAC小鼠结肠病理损伤的影响(HE,×400)

Fig. 2 Effect of Guizhi Fulingwan on pathological injury of colon in CAC mice (HE,×400)

3.5 桂枝茯苓丸对AOM/DSS诱导的CAC小鼠结肠Ki67表达的影响 空白组小鼠结肠组织仅见少量Ki67阳性表达,与空白组比较,模型组小鼠结肠组织Ki67表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,阿司匹林组及桂枝茯苓丸中、高剂量组小鼠结肠组织Ki67表达明显减少($P<0.05, P<0.01$)。表明桂枝茯苓丸可以有效抑制结肠肿瘤细胞增殖,对防治CAC具有良好效果。见图3、表5。

3.6 桂枝茯苓丸可显著降低CAC小鼠血清IL-6、TNF- α 和IL-1 β 水平 与空白组比较,模型组血清促炎

因子IL-6、TNF- α 和IL-1 β 的水平显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,阿司匹林及桂枝茯苓丸各剂量组IL-6和TNF- α 水平明显降低($P<0.05, P<0.01$),阿司匹林及桂枝茯苓丸中、高剂量组血清IL-1 β 水平明显降低($P<0.05, P<0.01$)。表明桂枝茯苓丸给药可以显著降低CAC小鼠炎症因子水平,缓解肠道炎症。见表6。

3.7 桂枝茯苓丸对小鼠脾脏MDSCs、CD4⁺T和CD8⁺T细胞水平的影响 与空白组比较,模型组小鼠脾脏MDSCs细胞占比显著升高($P<0.01$),CD4⁺T和CD8⁺T细胞占比显著降低($P<0.01$);与模型组

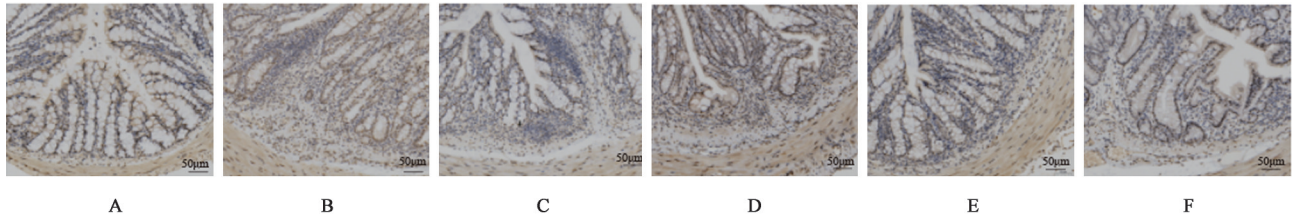


图3 桂枝茯苓丸对CAC小鼠结肠Ki67表达的影响(IHC,×400)

Fig. 3 Effect of Guizhi Fulingwan on expression of Ki67 in colon of CAC mice (IHC,×400)

表5 桂枝茯苓丸对CAC小鼠结肠Ki67表达的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 5 Effect of Guizhi Fulingwan on expression of Ki67 in colon of CAC mice ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Ki67阳性表达
空白组		17.52±1.24
模型组		32.26±2.55 ¹⁾
阿司匹林组	0.04	26.21±1.87 ³⁾
桂枝茯苓丸低剂量组	4.87	29.75±2.38
桂枝茯苓丸中剂量组	9.75	26.36±0.96 ³⁾
桂枝茯苓丸高剂量组	19.50	27.42±1.64 ²⁾

比较,桂枝茯苓丸中、高剂量组小鼠脾脏中MDSCs细胞占比显著降低($P<0.01$),CD4⁺T和CD8⁺T细胞占比明显升高($P<0.05, P<0.01$)。表明桂枝茯苓丸给药减少了CAC小鼠脾脏中MDSCs免疫浸润,改善了肿瘤免疫微环境。见表7。

3.8 桂枝茯苓丸对MDSCs相关效应分子Arg1、iNOS表达的影响 与空白组比较,模型组小鼠脾脏MDSCs功能相关效应分子Arg1、iNOS mRNA表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,桂枝茯苓丸中、高剂量组小鼠脾脏MDSCs功能相关效应分子Arg1、iNOS mRNA表达明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见表8。

3.9 桂枝茯苓丸含药血清对MDSCs细胞ROS、iNOS活性水平的影响 与空白组比较,2.5%和7.5%桂枝茯苓丸含药血清组共培养细胞模型中MDSCs细胞ROS和iNOS活性水平明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见表9。

表6 桂枝茯苓丸对CAC小鼠血清炎症因子的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 6 Effect of Guizhi Fulingwan on serum inflammatory factors in CAC mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-6	TNF- α	IL-1 β
空白组		28.21±2.15	176.75±10.45	42.17±2.33
模型组		57.63±2.85 ¹⁾	425.16±16.32 ¹⁾	64.28±3.55 ¹⁾
阿司匹林组	0.04	49.31±2.64 ³⁾	355.13±9.87 ³⁾	54.65±3.34 ²⁾
桂枝茯苓丸低剂量组	4.87	51.73±1.98 ²⁾	385.62±14.08 ²⁾	60.74±3.72
桂枝茯苓丸中剂量组	9.75	48.36±2.01 ³⁾	354.57±13.02 ³⁾	51.33±4.16 ³⁾
桂枝茯苓丸高剂量组	19.50	50.61±2.87 ³⁾	363.15±15.29 ³⁾	53.39±3.52 ³⁾

3.10 桂枝茯苓丸含药血清对CD8⁺T细胞增殖及GZMB、IFN- γ 水平的影响 与空白组比较,2.5%和7.5%桂枝茯苓丸含药血清组共培养细胞模型中CD8⁺T细胞增殖明显升高($P<0.05, P<0.01$);与空白组比较,7.5%桂枝茯苓丸含药血清组细胞上清中GZMB水平明显升高($P<0.05$),2.5%和7.5%桂枝茯苓丸含药血清组细胞上清中IFN- γ 水平明显升高($P<0.05, P<0.01$)。见表10。

4 讨论

结直肠癌可塑造抑制性肿瘤免疫微环境,促进肿瘤进展并导致对免疫检查点抑制剂治疗的耐药。在炎症驱动肿瘤发生与发展的过程中,一方面,IL-4、IL-10、转化生长因子- β (TGF- β)等免疫抑制性细胞因子募集MDSCs、肿瘤相关巨噬细胞等免疫抑制细胞浸润至肿瘤区域;另一方面,肿瘤微环境中低氧、酸性及营养匮乏等特征导致肿瘤细胞与免疫细胞之间发生代谢争夺,最终削弱抗肿瘤免疫应答能力^[17]。在中医理论中,结直肠癌属于“肠覃”“癥瘕”等范畴,病位在大肠。大肠主津,其传导功能依赖气津调和,而气津正常运行有赖营卫二气的协同作用^[18-19]。营气行于脉中,负责濡养肠腑、化生精微;卫气行于脉外,主司卫护肠黏膜、抵御外邪、调节黏膜局部免疫应答,与现代免疫学中黏膜屏障防御及局部免疫调节功能高度契合^[20]。《卫生宝鉴·肠覃论治并方》指出:“卫气不荣,有所系止而结瘕在内贴着,其延久不已,是名肠覃也。”指出卫气亏耗、循行失常可致大肠津液输布障碍,进而与痰浊、瘀

表7 桂枝茯苓丸对CAC小鼠脾脏MDSCs、CD4⁺T和CD8⁺T细胞比例的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of Guizhi Fulingwan on ratio of spleen MDSCs, CD4⁺T and CD8⁺T cells in CAC mice ($\bar{x}\pm s, n=3$) %

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MDSCs	CD4 ⁺ T	CD8 ⁺ T
空白组		1.14±0.12	11.93±1.31	7.88±0.34
模型组		2.77±0.30 ¹⁾	7.77±0.45 ¹⁾	5.24±0.16 ¹⁾
桂枝茯苓丸中剂量组	9.75	1.50±0.19 ³⁾	10.30±0.43 ²⁾	7.50±0.41 ³⁾
桂枝茯苓丸高剂量组	19.50	1.68±0.26 ³⁾	10.27±0.97 ²⁾	8.04±0.56 ³⁾

表8 桂枝茯苓丸对CAC小鼠Arg1、iNOS mRNA表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 8 Effect of Guizhi Fulingwan on Arg1 and iNOS mRNA expression in CAC mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Arg1	iNOS
空白组		1.07±0.07	1.06±0.14
模型组		2.36±0.22 ¹⁾	2.15±0.19 ¹⁾
桂枝茯苓丸中剂量组	9.75	1.70±0.24 ³⁾	1.69±0.25 ²⁾
桂枝茯苓丸高剂量组	19.50	1.68±0.22 ³⁾	1.72±0.24 ²⁾

表9 桂枝茯苓丸含药血清对MDSCs细胞ROS、iNOS活性水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 9 Effect of Guizhi Fulingwan containing serum on activity levels of ROS and iNOS in MDSCs cells ($\bar{x}\pm s, n=3$) %

组别	体积分数/%	ROS阳性率	iNOS阳性率
空白组		80.10±5.81	73.55±3.37
桂枝茯苓丸含药血清组	2.5	63.07±3.12 ¹⁾	64.27±4.39 ¹⁾
	7.5	54.78±5.39 ²⁾	50.80±1.41 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01(表10同)

表10 桂枝茯苓丸含药血清对CD8⁺T细胞增殖及GZMB、IFN- γ 水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 10 Effect of Guizhi Fulingwan containing serum on proliferation of CD8⁺T cells and levels of GZMB and IFN- γ ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	体积分 数/%	CFSE增殖 率/%	GZMB / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	IFN- γ / $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$
空白组		33.55±1.63	0.38±0.02	169.07±4.24
桂枝茯苓丸含药血清组	2.5	40.62±2.75 ¹⁾	0.41±0.02	178.33±3.75 ¹⁾
	7.5	43.91±2.34 ²⁾	0.52±0.05 ¹⁾	203.72±5.36 ²⁾

血、糟粕互结,附着肠壁,渐成“肠覃”之痼疾。桂枝茯苓丸作为活血消癥的经典方剂,其组方暗含卫调和之意。方中桂枝与芍药为调和营卫的核心药对,《本经疏证》谓:“芍药、桂枝一破阴,一通阳……此实和营布阳之功”;桃仁、丹皮主入营分,功擅活血祛瘀、散结消癥;“血不利则为水”,茯苓性平味甘

淡,利水行痰,通补兼长,《本草正》言其“能利窍去湿”“厚肠藏,治痰之本,助药之降”,使湿无所聚,痰无由生,以助桃仁、牡丹皮消癥之功。以上诸药合用,共奏调营复卫、活血消癥之效。现代研究表明,桂枝茯苓丸在调节免疫反应及抗肿瘤方面具有广泛潜力,但其参与CAC免疫微环境重塑的相关作用机制仍不清楚。本研究表明,桂枝茯苓丸治疗后小鼠体质量明显增加,DAI评分降低,小鼠结肠肿瘤数目减少。与模型组比较,桂枝茯苓丸给药显著下调了细胞增殖标志物Ki67表达并降低促炎因子IL-6、TNF- α 和IL-1 β 水平,提示桂枝茯苓丸可改善CAC小鼠体内炎症状态,阻延炎症诱导的结肠肿瘤进展。

越来越多的证据表明,MDSCs是免疫抑制性肿瘤微环境的核心组成部分,其持续募集通过诱导肿瘤免疫抑制,阻碍CD8⁺T细胞应答,成为诱导结肠癌进展的重要驱动因素^[21]。MDSCs由一群表型异常、具有免疫抑制功能的未成熟髓系来源细胞组成,根据表型与功能特征分为多形核MDSCs(PMN-MDSCs)和单核MDSCs(M-MDSCs)两大主要亚群,其中PMN-MDSCs占比超70%,为最丰富亚群^[22]。MDSCs在结肠炎症和CAC的发展中至关重要^[23-24]。在大多数癌症中,MDSCs可能要到肿瘤晚期才会大量积累。然而以CAC为代表的部分癌症,MDSCs可以在肠道肿瘤和慢性炎症环境中大量浸润,对抑制免疫功能具有重要作用^[25]。已有证据表明,结肠癌患者肿瘤部位及外周血中MDSCs的累积量与肿瘤分期呈显著正相关^[26]。MDSCs的核心特征是抑制效应T细胞的增殖与活性,其免疫抑制效应可由多种分子介导,包括分泌Arg1消耗精氨酸等必需代谢产物,以及产生iNOS和ROS^[27-28]。MDSCs通过抑制T细胞的增殖与功能促进肿瘤免疫逃逸,还会削弱免疫治疗的效果,是诱导免疫抑制性TME形成的关键细胞群。实验结果显示,与空白组比较,模型组小鼠脾脏MDSCs比例显著升高,且MDSCs功能相关效应分子Arg1和iNOS mRNA表达显著升高,桂枝茯苓丸给药显著减少了CAC小鼠脾脏MDSCs的积累,并降低了MDSCs功能相关效应分子Arg1和iNOS mRNA表达,此外使用桂枝茯苓丸含药血清处理显著降低了MDSCs细胞中ROS和iNOS活性水平,表明桂枝茯苓丸通过减少MDSCs浸润及其免疫抑制功能改善了CAC肿瘤免疫微环境。

T淋巴细胞作为肿瘤微环境中MDSCs的核心作用靶标,其功能亚群CD4⁺T细胞与CD8⁺T细胞

是介导抗肿瘤免疫应答的关键效应细胞,对于促进机体抗肿瘤免疫反应至关重要^[29-30]。其中CD8⁺T细胞具有特异性识别肿瘤细胞并直接介导肿瘤杀伤的核心功能。其杀伤机制主要通过以下途径实现:一方面,CD8⁺T细胞可显著增强促凋亡因子穿孔素与GZMB的分泌,协助GZMB进入靶细胞,启动靶细胞凋亡程序;另一方面,CD8⁺T细胞还可通过分泌IL-2、IFN- γ 、TNF等关键细胞因子,进一步放大其杀伤活性并诱导肿瘤细胞凋亡^[31-32]。CD8⁺T细胞耗竭会导致肿瘤快速生长,相反,增加肿瘤免疫微环境中的CD8⁺T细胞浸润可以增强机体抗肿瘤免疫活性^[33]。本实验研究表明,与空白组比较,CAC小鼠脾脏中CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的数量显著降低,桂枝茯苓丸给药促进了脾脏中效应T细胞尤其是CD8⁺T细胞的产生,抑制结肠肿瘤的生长。同时细胞体外共培养结果显示,桂枝茯苓丸含药血清处理显著促进了共培养细胞模型中CD8⁺T细胞增殖,增加CD8⁺T细胞中GZMB、IFN- γ 水平,这些结果表明,桂枝茯苓丸可能通过调节MDSCs增加效应CD8⁺T细胞应答,阻延CAC进展。

综上所述,桂枝茯苓丸能够降低促炎因子分泌,抑制CAC小鼠肿瘤增殖,其潜在机制可能与其减少MDSCs浸润,改善肿瘤免疫抑制微环境,增强效应T细胞尤其是CD8⁺T细胞应答有关。这一发现为进一步探索桂枝茯苓丸干预CAC提供了实验依据。然而本研究只是检测了桂枝茯苓丸对CAC小鼠MDSCs细胞、CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞等免疫细胞水平及MDSCs相关效应分子的影响,基于肿瘤与代谢和免疫之间的密切联系,下一步还需就MDSCs介导的免疫微环境与CAC代谢之间的关系作进一步的研究揭示,为桂枝茯苓丸干预CAC提供更为完善的理论依据和实验证据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-263.

[2] 张金珠, 杨明, 王锡山. 中国、美国及世界结直肠癌流行病学与疾病负担的对比和思考[J]. *中华结直肠疾病电子杂志*, 2024, 13(2): 89-93.

ZHANG J Z, YANG M, WANG X S. Epidemiology and disease burden of colorectal cancer in China, the United States, and worldwide: A comparative analysis and reflection [J]. *Chin J Colorec Dis: Electronic Edition*, 2024, 13(2):

89-93.

[3] SHAH S C, ITZKOWITZ S H. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: Mechanisms and management [J]. *Gastroenterology*, 2022, 162(3): 715-730.

[4] ALIAZIS K, CHRISTOFIDES A, SHAH R, et al. The tumor microenvironment's role in the response to immune checkpoint blockade [J]. *Nat Cancer*, 2025, 6(6): 924-937.

[5] ZHAO W, JIN L, CHEN P, et al. Colorectal cancer immunotherapy: Recent progress and future directions [J]. *Cancer Lett*, 2022, 545: 215816.

[6] LI W, ZHAO D, CHEN M, et al. Emerging advances in CAR-T therapy for solid tumors: Latest clinical trial updates from 2025 ASCO annual meeting [J]. *J Hematol Oncol*. 2025, 18(1): 104.

[7] SCHMITT M, GRETEN F R. The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer [J]. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21(10): 653-667.

[8] ZHANG J, LIAN J, LI N, et al. Multifaceted role of myeloid-derived suppressor cells in colorectal cancer [J]. *Int Immunopharmacol*, 2025, 163: 115274.

[9] GUO L X, YI J, ZHANG A, et al. Zhenqi Fuzheng granule targets the SCFAs-GPR109A axis to enhance PD-1 antibody efficacy via immunometabolic remodeling in colorectal cancer [J]. *Phytomedicine*, 2025, 148: 157312.

[10] 关木馨, 冯佳兴, 朱梦一, 等. 桂枝茯苓丸治疗卵巢癌临床研究的前沿进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(12): 296-303.

GUAN M X, FENG J X, ZHU M Y, et al. Clinical research on Guizhi Fulingwan in treatment of ovarian cancer: A review [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2025, 31(12): 296-303.

[11] 李兴强, 晁旭, 田甜, 等. 基于p53/SLC7A11/GPX4信号通路研究桂枝茯苓丸抑制肝癌肿瘤组织血管生成及诱导铁死亡的分子机制 [J]. *药学报*, 2025, 60(6): 1755-1766.

LI X Q, CHAO X, TIAN T, et al. Exploring the mechanism of action of Guizhi Fulingwan on angiogenesis and ferroptosis for the treatment of hepatocellular carcinoma based on p53/SLC7A11/GPX4 signaling pathway [J]. *Acta Pharm Sin*, 2025, 60(6): 1755-1766.

[12] YU M, ZHANG J, FU J, et al. Guizhi Fuling decoction protects against bone destruction via suppressing exosomal ERK1 in multiple myeloma [J]. *Phytomedicine*, 2025, 140: 156627.

[13] 贾苏杰, 刘龙辉, 张艺凡, 等. 加味桂枝茯苓丸通过PTEN/PI3K/Akt通路调控线粒体凋亡途径预防小鼠结肠腺瘤的作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(19): 10-20.

JIA S J, LIU L H, ZHANG Y F, et al. Mechanism of modified Guizhi Fulingwan in regulating mitochondrial apoptosis pathway through PTEN/PI3K/Akt pathway to prevent colorectal adenoma in mice [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2024, 30(19): 10-20.

[14] LU Z H, DING Y, WANG Y J, et al. Early administration of Wumei Wan inhibit myeloid-derived suppressor cells via

- PI3K/Akt pathway and amino acids metabolism to prevent colitis-associated colorectal cancer [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 333:118260.
- [15] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 71.
- WEI W, WU X M, LI Y J. Methodology of Pharmacological Experiment[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2010: 71.
- [16] TIAN G, DONG F, FU A, et al. Preventive effect of oleanolic acid on ulcerative colitis caused by dextran sulfate sodium via a PPAR γ -involved mechanism in mice [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2025, 19:11641-11657.
- [17] KENNEL K B, GRETEN F R. The immune microenvironment of colorectal cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2025, 25(12):945-964.
- [18] 潘磊, 由凤鸣, 祝捷, 等. 营卫不和与肿瘤的发生发展[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(1):47-49.
- PAN L, YOU F M, ZHU J, et al. Discussion on 'disharmony between Ying and Wei' and tumorigenesis with tumor progression [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2019, 34(1):47-49.
- [19] 李奕, 姜晓晨, 刘福栋, 等. 基于《黄帝内经》“营卫倾移”理论初步构建恶性肿瘤辨治体系[J]. *中医杂志*, 2024, 65(23):2408-2412.
- LI Y, JIANG X C, LIU F D, et al. Construction of differentiation and treatment system of malignant tumor under the theory of "Ying-Wei disorder" in the inner canon of yellow emperor [J]. *J Tradit Chin Med*, 2024, 65(23):2408-2412.
- [20] 陈抒鹏, 章美玲, 罗钧允, 等. 基于营卫学说探讨免疫代谢的交互作用及肿瘤细胞的免疫逃逸[J]. *时珍国医国药*, 2025, 36(7):1316-1320.
- CHEN S P, ZHANG M L, LUO J Y, et al. Exploring the interaction of immune metabolism and immune escape of tumor cells based on the theory of Yingwei [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2025, 36(7):1316-1320.
- [21] HE J, CHAI X, ZHANG Q, et al. The lactate receptor HCAR1 drives the recruitment of immunosuppressive PMN-MDSCs in colorectal cancer [J]. *Nat Immunol*, 2025, 26(3):391-403.
- [22] VEGLIA F, SANSEVIERO E, GABRILOVICH D I. Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21(8):485-498.
- [23] 陈佳, 夏琪, 何钰洁, 等. 靶向 MDSCs 免疫治疗结肠炎相关性癌症的研究现状 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2024, 40(2):294-298.
- CHEN J, XIA Q, HE Y J, et al. Research status of targeting MDSCs for immunotherapy of colitis-associated cancer [J]. *Chin J Clin Pharm*, 2024, 40(2):294-298.
- [24] ZHAO F, GONG W, SONG J, et al. The paradoxical role of MDSCs in inflammatory bowel diseases: From bench to bedside [J]. *Front Immunol*. 2022, 13:1021634.
- [25] LI K, SHI H, ZHANG B, et al. Myeloid-derived suppressor cells as immunosuppressive regulators and therapeutic targets in cancer [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1):362.
- [26] WANG K, WANG Y, YIN K. Role played by MDSC in colitis-associated colorectal cancer and potential therapeutic strategies [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2024, 150(5):243.
- [27] HU T, ZHAI J, YANG Z, et al. Myeloid-derived suppressor cells in cancer: Mechanistic insights and targeted therapeutic innovations [J]. *MedComm (2020)*, 2025, 6(6):e70231.
- [28] KE Z, WANG C, WU T, et al. PAR2 deficiency enhances myeloid cell-mediated immunosuppression and promotes colitis-associated tumorigenesis [J]. *Cancer Lett*, 2020, 469:437-446.
- [29] GOLDMANN O, NWOFOR O V, CHEN Q, et al. Mechanisms underlying immunosuppression by regulatory cells [J]. *Front Immunol*, 2024, 15:1328193.
- [30] LIU H, YANG W, JIANG J. Targeting tumor metabolism to augment CD8 T cell anti-tumor immunity [J]. *J Pharm Anal*, 2025, 15(5):101150.
- [31] CHEN B, ZHU L, LIN X, et al. SLC4A10 impedes atherosclerosis by diminishing IFN- γ /GZMB levels of CD8 T cells via the MAPK pathway [J]. *Front Immunol*, 2025, 16:1568999.
- [32] PATTU V, KRAUSE E, CHANG H F, et al. IFN γ expression correlates with enhanced cytotoxicity in CD8⁺ T cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(14):7024.
- [33] 杨懿, 胡艳娥, 蒋义芳, 等. 痛泻要方调节 T 淋巴细胞亚群改善慢性应激下大肠癌免疫微环境的机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(12):46-54.
- YANG Y, HU Y E, JIANG Y F, et al. Tongxie Yaofang regulates T lymphocyte subsets to improve immune microenvironment of colorectal cancer under chronic stress [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2023, 29(12):46-54.

[责任编辑 张丰丰]