

消癌解毒方含药血清增强NK细胞杀伤结肠癌的作用及机制

沈政洁^{1,2}, 黎思苑¹, 徐丽贤¹, 潘攀¹, 陈亚楠¹, 孙东东^{2,3}, 左云^{1*}

(1. 苏州大学附属张家港医院, 江苏 张家港 215600;

2. 江苏省中医药防治肿瘤协同创新中心, 南京 210023;

3. 南京中医药大学 中医学院·中西医结合学院, 南京 210023)

[摘要] 目的:探讨消癌解毒方含药血清对自然杀伤(NK)细胞杀伤结肠癌细胞的增强作用及分子机制。方法:消癌解毒方含药血清(0.1%、0.5%、1%、5%、10%)处理HCT-116细胞、NK-92MI细胞24 h, 噻唑蓝(MTT)比色法检测其对细胞增殖的影响。选取低体积分数(0.1%、0.5%、1%)含药血清处理共培养的HCT-116细胞、NK-92MI细胞24 h, 钙黄绿素-乙酰甲酯/碘化丙啶(Calcein-AM/PI)双染检测NK细胞对结肠癌细胞杀伤作用;流式细胞仪检测结肠癌细胞凋亡;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测凋亡、信号传导及转录激活蛋白4(STAT4)通路相关蛋白表达;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测干扰素(IFN)- γ 分泌。结果:MTT比色法显示,与空白组比较,消癌解毒方含药血清(5%、10%)能有效抑制HCT-116、NK-92MI细胞增殖($P < 0.01$),但消癌解毒方含药血清(0.1%、0.5%、1%)对细胞增殖无明显影响。与空白组比较,消癌解毒方含药血清(0.1%、0.5%、1%)呈浓度依赖性的增强NK细胞对结肠癌细胞的杀伤活性,并诱导结肠癌细胞凋亡($P < 0.01$)。Western blot显示,与空白组比较,消癌解毒方含药血清能下调B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关xl蛋白(Bcl-xl)表达,上调Bcl-2相关X蛋白(Bax)表达($P < 0.05$, $P < 0.01$);与共培养组比较,消癌解毒方含药血清(0.1%、0.5%、1%)能激活p-STAT4磷酸化,促进IFN- γ 表达($P < 0.05$)。ELISA显示,与空白组比较,消癌解毒方含药血清(0.1%、0.5%、1%)能提高IFN- γ 分泌量($P < 0.01$)。结论:消癌解毒方含药血清增强NK细胞杀伤结肠癌细胞活性的机制可能与激活STAT4通路,增加NK细胞IFN- γ 分泌量,下调Bcl-xl、Bcl-2表达,上调Bax表达,进而促进结肠癌细胞凋亡相关。

[关键词] 消癌解毒方; 结肠癌; NK细胞; 凋亡

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)13-0085-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220822

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220208.1351.003.html>

[网络出版日期] 2022-02-08 14:31

Xiaoai Jiedu Prescription-containing Serum Enhances Lethal Effect of NK Cells on Colon Cancer Cells

SHEN Zhengjie^{1,2}, LI Siyuan¹, XU Lixian¹, PAN Pan¹, CHEN Yanan¹, SUN Dongdong^{2,3}, ZUO Yun^{1*}

(1. Zhangjiagang Hospital Affiliated to Soochow University, Zhangjiagang 215600, China;

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

3. School of Chinese Medicine, School of Integrated Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the influence of Xiaoai Jiedu prescription (XJP)-containing serum on natural killer (NK) cells' lethal effect on colon cancer cells and the molecular mechanism. **Method:** XJP-

[收稿日期] 2021-12-19

[基金项目] 江苏省自然科学基金项目(BK 20190236);张家港市卫健委青年科技项目(ZJGQNKJ 201902);苏州市“科教兴卫”青年科技项目(KJXW 2021061)

[第一作者] 沈政洁, 博士, 主治医师, 从事中医抗肿瘤的临床及机制研究, E-mail: szjtcn@126.com

[通信作者] *左云, 博士, 主任医师, 从事肿瘤防治的临床及机制研究, E-mail: zuoyun1@163.com

containing serum (0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10%) was used to treat HCT-116 cells and NK-92MI cells respectively for 24 h, and methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was employed to detect cell proliferation. Then, low-concentration (0.1%, 0.5%, 1%) XJP-containing serum was selected to treat co-cultured HCT-116 cells and NK-92MI cells for 24 h and calcein acetoxymethyl ester/propidium iodide (Calcein-AM/PI) was applied to detect the killing effect of NK cells on colon cancer cells. Flow cytometry was used to detect apoptosis of colon cancer cells, Western blot the expression of apoptosis-related proteins and signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4) pathway-related proteins, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) the secretion of interferon (IFN)- γ . **Result:** High-concentration (5%, 10%) XJP-containing serum inhibited the proliferation of HCT-116 and NK-92MI cells ($P<0.01$), while low-concentration (0.1%, 0.5%, 1%) XJP-containing serum had no obvious influence on cell proliferation compared with the blank group. As compared with the blank group, low-concentration XJP-containing serum enhanced the killing activity of NK cells against colon cancer cells in a concentration-dependent manner ($P<0.01$), and induced apoptosis of colon cancer cells ($P<0.01$). Moreover, XJP-containing serum (0.1%, 0.5%, 1%) down-regulated the expression of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) and B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xl), and up-regulated the expression of Bcl-2-associated X (Bax) compared with the blank group ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the co-culture group, XJP-containing serum (0.1%, 0.5%, 1%) increased the expression of p-STAT4 and IFN- γ ($P<0.05$). ELISA result showed that XJP-containing serum (0.1%, 0.5%, 1%) raised IFN- γ secretion ($P<0.01$). **Conclusion:** XJP-containing serum can enhance the activity of NK cells to kill colon cancer cells. The mechanism is the likelihood that it activates STAT4 pathway, increases IFN- γ secretion by NK cells, down-regulates the expression of Bcl-xl and Bcl-2, and up-regulates the expression of Bax, thereby promoting the apoptosis of colon cancer cells.

[Keywords] Xiaoi Jiedu prescription; colon cancer; NK cells; apoptosis

结肠癌在我国的发病率、死亡率近年来迅速上升^[1-2],目前结肠癌的治疗多综合运用手术、化疗和靶向治疗。随着治疗技术的发展,免疫治疗的兴起为肿瘤治疗提供了新策略,众多临床研究^[3-5]也证实免疫治疗在肠癌中具有良好应用前景。自然杀伤(NK)细胞是免疫系统的重要组成,其无需致敏即可杀伤肿瘤,在肿瘤免疫监视中发挥重要作用。且NK细胞在杀灭肿瘤的同时,还能增强其他免疫细胞的抗癌活性。当下,NK细胞肿瘤免疫治疗主要聚焦于两大热点:①优化治疗性NK细胞的来源进行过继转移;②增强NK细胞的细胞毒性和在体持久性^[6]。众多基于NK细胞因子、参与分子和免疫检查点抑制剂的临床研究已陆续开展^[7]。国医大师周仲瑛教授依据60余载临床经验提出了癌毒病机学说,认为癌毒属毒邪之一,是导致肿瘤发生、发展的特异性致病因子。癌毒与痰、瘀搏结形成肿块,在至虚之处留着滋生,形成肿瘤。痰瘀郁毒是肿瘤的核心病机。抗癌解毒、扶正祛邪是肿瘤的基本治则^[8-9]。并据此创立了抗癌临床验方——消癌解毒方^[10]。课题组针对消癌解毒方的临床疗效和作用机制开展了大量研究。临床研究证实消癌解毒方

能有效改善肠癌患者术后生活质量、减轻化疗不良反应^[11],并能提高T细胞、NK细胞活性^[12]。基础研究发现消癌解毒方能解除结肠癌移植瘤小鼠的免疫抑制,其机制与减少调节性T(Treg)细胞分布,促进叉头转录因子蛋白3(Foxp3)表达,提高白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、转化生长因子(TGF)- β_1 分泌相关^[13-14]。但未对消癌解毒方调控NK细胞杀伤活性做深入研究。本研究拟将消癌解毒方作为干预手段,以NK细胞杀伤肿瘤为切入点,观察消癌解毒方对NK细胞杀伤结肠癌活性的调控,并探讨其作用机制。

1 材料

1.1 动物 雄性清洁级新西兰兔,体质量2.0~2.2 kg,购自南京市青龙山动物繁殖场,合格证号SCXK(苏)2012-0008,动物实验方案经南京中医药大学动物实验中心伦理委员会批准,批号20201124。

1.2 细胞 人结肠癌HCT-116细胞购自上海生命科学研究院细胞库,目录号TCHu 99。NK细胞购自上海中乔新舟生物科技有限公司,货号ZQ0434。均由江苏省中医药防治肿瘤协同创新中心实验室

保存,本研究采用传代10代以内细胞用于实验。

1.3 药物 消癌解毒方由白花蛇舌草(批号190913)、太子参(批号190522)、山慈菇(批号190725)等组成,所含饮片均购自亳州国苑中药材饮片有限公司,经南京中医药大学潘林梅教授鉴定均为正品。称取药材后,加10倍药量水,煎煮2次,收集合并2次滤液,减压浓缩,制成含生药 $2\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 滤液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4 试剂 McCoy's 5A改良培养基、青霉素-链霉素(美国Gibco公司,批号分别为16600082、15070063),胎牛血清(FBS,乌拉圭ABW公司,批号AB-FBS-1050S),MEM α 完全培养基(上海中乔新舟生物科技有限公司,批号ZQ-801),0.25%胰酶、噻唑蓝(MTT)、钙黄绿素-乙酰甲酯/碘化丙啶(Calcein-AM/PI)活细胞/死细胞双染试剂盒、膜联蛋白-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin-FITC/PI)细胞凋亡检测试剂盒(上海翊圣生物科技股份有限公司,批号分别为40126ES60、40201ES72、40747ES80、40302ES60),干扰素- γ (IFN- γ)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号为ml077386),B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关x1蛋白(Bcl-x1)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、磷酸化-信号传导及转录激活蛋白4(p-STAT4)、STAT4、IFN- γ 、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国Abcam公司,批号分别为ab32124、ab32370、ab32503、ab28815、ab280213、ab9657、ab8245)。

1.5 仪器 SL16型离心机(美国Thermo Fisher公司),FACSCantoTM型流式细胞仪(美国BD公司),1658001型ProwerPacTM Basic凝胶电泳仪、1645050型转膜仪(美国Bio-Rad公司),Tanon-5500型化学发光凝胶成像系统(上海天能科技有限公司),Spark 10M型多功能酶标仪(瑞士Tecan公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 结肠癌HCT-116细胞培养于10% FBS,1%青-链霉素的McCoy's 5A改良培养基;NK-92MI细胞培养于MEM α 完全培养基;均于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。

2.2 含药血清制备 清洁级雄性新西兰兔,随机分为空白组和消癌解毒方组,每组2只。消癌解毒方组以临床治疗量为灌胃剂量浓度 $3.78\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,每日分2次灌胃。空白组给予等体积生理盐水灌胃。连续给药4 d,末次给药前12 h禁食,末次给药2 h后异氟烷麻醉,颈总动脉取血。血液静置30 min, $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ (离心半径10 cm)离心5 min分离血

清,合并同组血清。 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴灭活30 min, $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜除菌, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.3 MTT比色法检测细胞增殖 将对数生长期HCT-116细胞、NK-92MI细胞密度调整为 1×10^5 个/mL,分别接种于96孔板,次日弃去培养基。设空白组,予含正常兔血清的培养基 $100\text{ }\mu\text{L}$,另设0.1%、0.5%、1%、5%、10%消癌解毒方组,每孔加相应体积分数含药血清完全培养基 $100\text{ }\mu\text{L}$,每组设6个复孔。给药24 h,每孔加入 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ MTT $10\text{ }\mu\text{L}$ 继续培养4 h,吸去上清,每孔加DMSO $200\text{ }\mu\text{L}$,振荡10 min,酶标仪570 nm波长检测吸光度 A 。计算含药血清对HCT-116细胞、NK细胞增殖的抑制作用。抑制率= $(1-A_{\text{药物组}}/A_{\text{空白组}})\times 100\%$ 。

2.4 Calcein-AM/PI双染检测NK细胞杀伤作用 设空白组:HCT116细胞单独培养;共培养组:NK-92MI与HCT116共培养,效靶比5:1;消癌解毒方组:在共培养组基础上予0.1%、0.5%、1%消癌解毒方含药血清干预。给药24 h,收集细胞,去上清,清洗2~3次,染色液 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育15 min,荧光显微镜下观察拍照。

2.5 流式细胞仪检测结肠癌细胞凋亡率 将细胞接种于6孔板,分为空白组、共培养组、消癌解毒方组。干预24 h,弃去悬浮细胞,收集贴壁HCT-116细胞,Annexin-FITC和PI染色,上机检测。Flowjo软件分析结果。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测凋亡相关蛋白、STAT4通路蛋白表达 凋亡相关蛋白检测分为空白组、共培养组、消癌解毒方组;STAT4通路蛋白表达检测分为共培养组、消癌解毒方组。给药24 h,收集细胞,提取蛋白质。定量变性,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),湿转法转膜,5%脱脂牛奶封闭, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 一抗(1:1 000)孵育过夜,洗膜后室温孵育二抗(1:5 000)1 h。化学发光(ECL)试剂盒显色,Gel Analysis软件分析条带。

2.7 ELISA检测IFN- γ 的表达 NK-92MI细胞接种于96孔板,分为空白组、共培养组、消癌解毒方组。空白组及共培养组予含正常兔血清的培养基 $100\text{ }\mu\text{L}$,消癌解毒方组予0.1%、0.5%、1%消癌解毒方含药血清培养基 $100\text{ }\mu\text{L}$,每组设6个复孔。干预24 h,收集上清,参照ELISA试剂盒操作进行检测,计算IFN- γ 浓度。

2.8 统计学分析 所有统计学分析均使用SPSS 16.0软件处理。结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 t 检验或方差分析进行统计分析。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对结肠癌HCT-116细胞、NK-92MI细胞增殖的影响 消癌解毒方含药血清干预24 h,与空白组比较,5%、10%消癌解毒方含药血清对HCT-116细胞的增殖具有抑制作用($P<0.01$);5%、10%消癌解毒方含药血清对NK-92MI细胞的增殖同样具有抑制作用($P<0.01$)。与空白组比较,0.1%、0.5%、1%消癌解毒方含药血清对HCT-116细胞的增殖无明显影响。上述3个低体积分数的消癌解毒方含药血清对NK-92MI细胞的增殖也无明显抑制作用。为排除消癌解毒方含药血清自身对肿瘤细胞的杀伤作用,本研究选择低体积分数0.1%、0.5%、1%消癌解毒方含药血清用于后续实验。见表1。

3.2 对NK-92MI细胞杀伤结肠癌HCT-116细胞作用的影响 Calcein-AM穿透细胞膜后,被细胞内酯酶剪切成Calcein,滞留在活细胞内发出强绿色荧光,用于标记活细胞。PI不能穿过活细胞的细胞膜,只能与死细胞DNA双螺旋结合产生红色荧光,用于标记死细胞 Calcein-AM/PI染料用于活细胞和死细胞的双重染色标记,结肠癌HCT-116细胞与NK-92MI细胞共培养后,出现零星红色荧光,提示共培养条件下,少量结肠癌细胞被NK细胞杀伤。0.1%、0.5%、1%消癌解毒方含药血清给药干预后,与共培养组比较,消癌解毒方组红色荧光明显

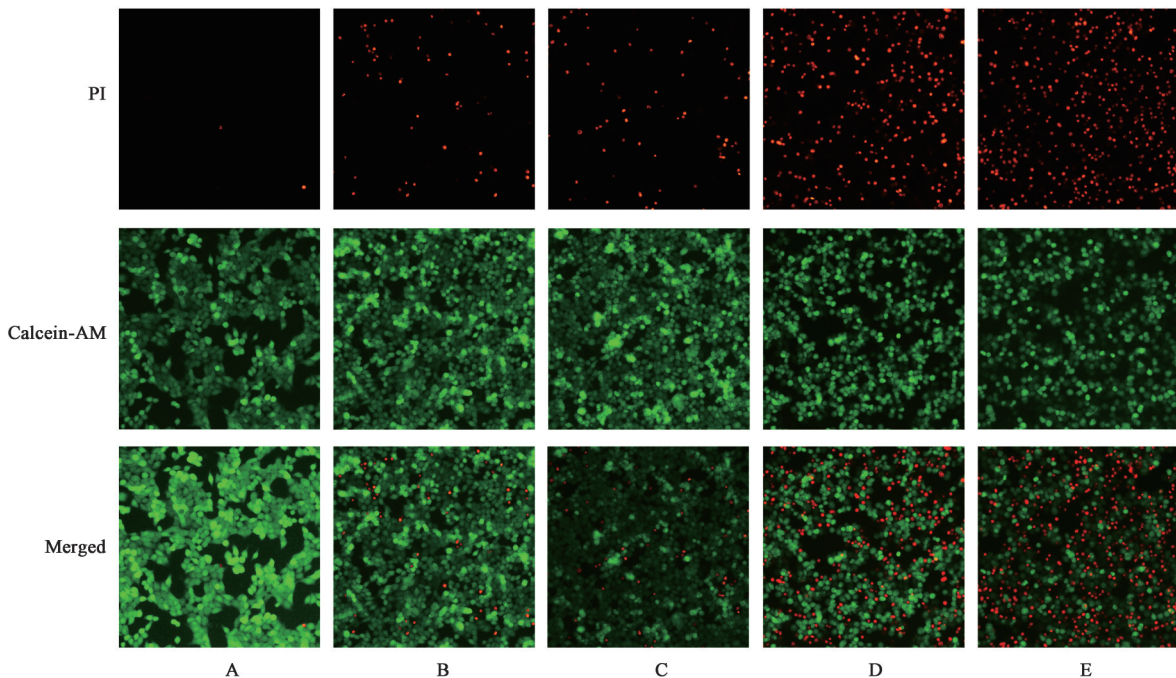
表1 消癌解毒方含药血清对细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Effect of Xiaoi Jiedu prescription containing serum on proliferation of colon cancer cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

细胞	组别	体积分数/%	A_{570nm}	抑制率/%
HCT-116	空白组		1.701±0.058	-
	消癌解毒方组	0.10	1.668±0.080	1.95±0.47
		0.50	1.643±0.069	3.42±0.35
		1.00	1.635±0.054	3.90±0.24
		5.00	1.488±0.109	12.53±0.71 ²⁾
10.00	1.385±0.071	18.62±0.43 ²⁾		
NK-92	空白组		1.315±0.079	-
	消癌解毒方组	0.10	1.305±0.043	0.78±0.22
		0.50	1.268±0.042	3.57±0.19
		1.00	1.242±0.075	5.56±0.52
		5.00	1.185±0.087	9.86±0.75 ²⁾
10.00	1.129±0.073	14.12±0.69 ²⁾		

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ (表2、表3同)

增多,说明消癌解毒方能增强NK细胞对结肠癌细胞的杀伤作用;且随着消癌解毒方含药血清浓度的升高,红色荧光比例逐渐增多,说明消癌解毒方对NK细胞杀伤作用的增强呈浓度依赖性。见图1。



注:A.空白组;B.共培养组;C~E.0.1%、0.5%、1%消癌解毒方含药血清组(图2同)

图1 消癌解毒方含药血清对NK-92MI细胞杀伤结肠癌HCT-116细胞作用的影响(Calcein-AM/PI,×40)

Fig. 1 Effect of Xiaoi Jiedu prescription containing serum on killing colon cancer HCT-116 cells by NK-92MI cells (Calcein-AM/PI,×40)

3.3 对结肠癌 HCT-116 细胞凋亡的影响 与空白组比较,共培养条件下NK细胞能诱导少量结肠癌细胞凋亡,凋亡率为(18.00±0.60)%,差异具有统计学意义($P<0.05$);在共培养基础上,0.1%、0.5%、1%消癌解毒方含药血清给药处理24 h,凋亡的结肠癌细胞比例明显增多($P<0.05$),见表2。说明NK细胞杀伤结肠癌细胞的效应可能与诱导凋亡相关,且消癌解毒方能浓度依赖性的促进NK细胞诱导结肠癌细胞凋亡。

3.4 对结肠癌 HCT-116 细胞凋亡相关蛋白的影响 与空白组比较,共培养及0.1%、0.5%、1%消癌解毒方含药血清处理后,HCT-116细胞中的Bcl-x1、Bcl-2蛋白表达降低,Bax蛋白表达上调($P<0.05$),见图2、表3。说明在NK细胞与结肠癌细胞共培养

表2 消癌解毒方含药血清对NK-92MI细胞诱导结肠癌HCT-116细胞凋亡率的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of Xiaocai Jiedu Prescription containing serum on apoptosis rate of colon cancer HCT-116 cells induced by NK-92MI cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	凋亡率/%
空白组		2.58±0.05
共培养组		18.00±0.60 ²⁾
消癌解毒方组	0.10	30.70±0.40 ²⁾
	0.50	36.50±0.80 ²⁾
	1.00	53.50±0.10 ²⁾

的条件下,消癌解毒方能抑制结肠癌抗凋亡蛋白Bcl-x1、Bcl-2表达,增加促凋亡Bax蛋白表达,诱导结肠癌细胞凋亡。

表3 消癌解毒方含药血清对结肠癌HCT-116细胞凋亡相关蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Xiaocai Jiedu prescription containing serum on expression of colon cancer HCT-116 cells apoptosis-related proteins ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	Bcl-x1/GAPDH	Bcl-2/GAPDH	Bax/GAPDH
空白组		1.22±0.05	0.97±0.05	0.31±0.01
共培养组		1.01±0.03 ¹⁾	0.75±0.03 ¹⁾	0.52±0.02 ¹⁾
消癌解毒方组	0.10	0.82±0.03 ¹⁾	0.68±0.03 ¹⁾	0.70±0.01 ¹⁾
	0.50	0.63±0.02 ¹⁾	0.44±0.05 ²⁾	0.91±0.03 ²⁾
	1.00	0.45±0.04 ²⁾	0.35±0.03 ²⁾	1.20±0.01 ²⁾

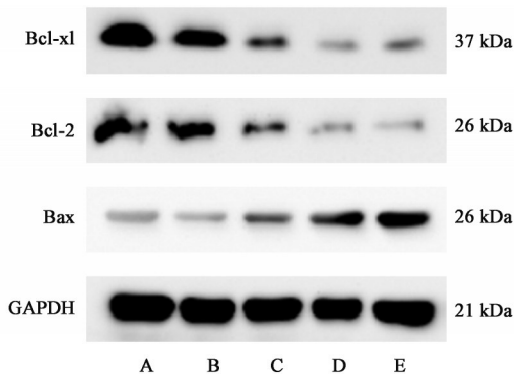
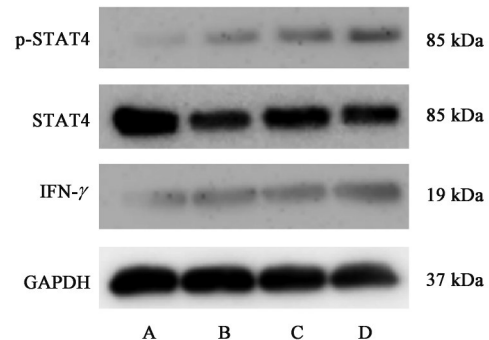


图2 结肠癌HCT-116细胞凋亡蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of expression of colon cancer HCT-116 cells apoptotic proteins

3.5 对STAT4通路的影响 在共培养条件下,0.1%、0.5%、1%消癌解毒方含药血清处理后,与共培养组比较,p-STAT4、IFN- γ 表达随着消癌解毒方含药血清浓度的升高而上调($P<0.05$),见图3、表4。说明消癌解毒方能激活STAT4通路,提高IFN- γ 表达。

3.6 对NK-92MI细胞分泌IFN- γ 的影响 与空白组比较,共培养后、消癌解毒方含药血清干预24 h



注:A. 共培养组;B~D. 0.1%、0.5%、1%消癌解毒方含药血清组

图3 STAT4通路相关蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of protein expression of STAT4 pathway

均提高了上清中NK-92MI细胞分泌的IFN- γ 浓度,且该效应随着含药血清浓度的增加而增强($P<0.05$),见表5。并发现0.5%、1%含药血清干预后与单纯共培养比较,NK-92MI分泌的IFN- γ 浓度明显升高($P<0.05$)。说明消癌解毒方能促进共培养条件下NK-92MI细胞分泌IFN- γ 。

4 讨论

结肠癌属中医“肠覃”“积聚”“脏毒”等范畴,癌

表4 消癌解毒方含药血清对STAT4通路相关蛋白相对表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Xiaoi Jiedu prescription containing serum on related proteins of STAT4 pathway ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	体积分 数/%	p-STAT4 /GAPDH	STAT4 /GAPDH	IFN- γ /GAPDH
共培养组		0.42 \pm 0.02	0.94 \pm 0.04	0.37 \pm 0.03
消癌解毒方组	0.10	0.53 \pm 0.02 ¹⁾	0.86 \pm 0.03	0.48 \pm 0.03 ¹⁾
	0.50	0.81 \pm 0.06 ¹⁾	0.91 \pm 0.05	0.63 \pm 0.02 ¹⁾
	1.00	1.02 \pm 0.02 ²⁾	0.88 \pm 0.03	0.81 \pm 0.05 ²⁾

注:与共培养组比较¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01

表5 消癌解毒方含药血清对NK-92MI细胞分泌IFN- γ 的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of Xiaoi Jiedu prescription containing serum on IFN- γ secretion of NK-92MI cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	体积分 数/%	IFN- γ /ng·L ⁻¹
空白组		118.90 \pm 13.05
共培养组		131.86 \pm 15.86
消癌解毒方组	0.10	149.78 \pm 15.42 ²⁾
	0.50	174.96 \pm 18.83 ^{2,4)}
	1.00	234.81 \pm 14.65 ^{2,4)}

注:与空白组比较¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01;与共培养组比较³⁾P<0.05, ⁴⁾P<0.01

毒病机理论认为正气亏虚、湿邪侵犯、情志失调、饮食不节是肠癌发病的主要病因,“湿热瘀毒,脾气亏虚”是肠癌的基本病机。而癌毒、正虚贯穿肠癌病程的始终,故治疗上强调扶正抗癌解毒,认为扶正祛邪为肠癌中医治疗根本^[15-16]。肿瘤免疫治疗指通过靶向机体免疫系统,增强机体对肿瘤的自然免疫防御、重塑免疫微环境等方式杀伤肿瘤的新型疗法^[17]。其与扶正祛邪的中医抗癌治法具有相似的理论基础,都强调通过提高自身正气或自身免疫功能杀伤肿瘤,目前有多种中药提取物^[18-20]及中药复方^[21-23]被证实可通过调节免疫功能抑制肿瘤。受肿瘤细胞主要组织相容性复合物提呈抗原能力的限制,目前主流的T细胞肿瘤免疫治疗存在很大局限性。而NK细胞作为机体免疫系统的第一道防线,在肿瘤先天免疫和获得性免疫中具有重要作用,且NK细胞可通过非抗原特异性方式杀伤肿瘤细胞,拥有细胞脱粒、激活凋亡途径和介导抗体依赖性的细胞毒作用等众多杀伤肿瘤途径,能弥补T细胞在免疫治疗中的不足。现已有众多研究^[24-26]发现NK细胞可诱导胃癌、肝癌、食管癌等凋亡抑制肿瘤。

消癌解毒方由白花蛇舌草、麦冬、太子参等组

成;方中白花蛇舌草清热解毒抗癌为君;八月札、蜈蚣与僵蚕化痰祛瘀,解郁消癌为臣;佐以太子参、麦冬扶正消癌、益气养阴。全方共奏扶正抗癌解毒之功。对消癌解毒方扶正抗癌机制的探讨有望揭示其生物学基础。

前期研究发现消癌解毒方能提高肠癌患者NK细胞活性^[12],但未对机制进一步研究。本研究通过Calcein-AM/PI双染免疫荧光实验发现,在共培养条件下,消癌解毒方能激活NK细胞杀伤结肠癌细胞的活性。流式细胞实验发现在共培养条件下,NK细胞能诱导结肠癌细胞凋亡,且消癌解毒方呈浓度依赖性的增强NK细胞诱导凋亡的效应。据此推测诱导凋亡是消癌解毒方激活NK细胞杀伤结肠癌的作用机制之一。后续通过Western blot发现,消癌解毒方干预后凋亡相关的抗凋亡蛋白Bcl-x1、Bcl-2表达被抑制,促凋亡蛋白Bax表达被上调。初步证实消癌解毒方激活NK细胞杀伤结肠癌的效应与诱导凋亡相关。有文献报道NK细胞诱导肿瘤凋亡与激活STAT4通路,上调IFN- γ 相关^[27]。IFN- γ 是T细胞、NK细胞等产生的一种细胞因子,在肿瘤免疫中发挥重要作用,具有加强抗原传递和吞噬,抑制肿瘤增殖,促进肿瘤凋亡,增强肿瘤免疫原性等功能。进一步研究发现,消癌解毒方能上调p-STAT4、IFN- γ 蛋白表达,促进NK细胞IFN- γ 分泌。证实消癌解毒方激活NK细胞杀伤结肠癌的效应与激活STAT4通路,促进IFN- γ 分泌,诱导凋亡相关。

综上所述,在NK细胞与肿瘤细胞共培养的条件下,消癌解毒方能增强NK细胞杀伤肿瘤活性、诱导肿瘤凋亡,该机制可能与消癌解毒方激活STAT4通路,增加NK细胞IFN- γ 分泌量,下调Bcl-x1、Bcl-2表达,上调Bax表达相关。本研究为探讨消癌解毒方调控NK细胞主导的肿瘤免疫治疗奠定了基础,但消癌解毒方激活NK细胞的确切机制仍未明确,将进一步开展后续研究深入探索。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] 田传鑫, 赵磊. 结直肠癌及结直肠癌肝转移流行病学特点[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2021, 28(13): 1033-1038.
- [3] LE D, DURHAM J N, SMITH K N, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to

- PD-1 blockade [J]. *Science*, 2017, 357 (6349) : 409-413.
- [4] ANDRE T, SHIU K K, KIM T W, et al. Pembrolizumab in microsatellite-instability-high advanced colorectal cancer[J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(23): 2207-2218.
- [5] LE D, KIM T W, VAN CUTSEM E, et al. Phase II open-label study of pembrolizumab in treatment-refractory, microsatellite instability-high/mismatch repair-deficient metastatic colorectal cancer: KEYNOTE-164 [J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38 (1) : 11-19.
- [6] MYERS J A, MILLER J S. Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021,18(2): 85-100.
- [7] HUNTINGTON N D, CURSONS J, RAUTELA J. The cancer-natural killer cell immunity cycle[J]. *Nat Rev Cancer*, 2020,20(8): 437-454.
- [8] 程海波, 沈卫星, 姚志华, 等. 基于癌毒病机理论的消癌解毒方抗肿瘤研究进展[J]. *南京中医药大学学报*, 2014,30(6): 593-595.
- [9] 沈政洁, 程海波, 沈卫星, 等. 肿瘤炎症微环境与“癌毒”病机相关性探讨[J]. *北京中医药大学学报*, 2015,38(1): 14-17.
- [10] 吴勉华. 吴勉华效方治验——消癌解毒方[J]. *江苏中医药*, 2021,53(9): 1-2.
- [11] 周肸, 张丹, 钱海华, 等. 消癌解毒方治疗肠癌术后临床研究[J]. *南京中医药大学学报*, 2020,36(6): 826-830.
- [12] 陈海彬, 周红光, 程海波, 等. 消癌解毒方对中晚期恶性肿瘤患者免疫功能的影响[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2009,29(9): 1257-1259.
- [13] 周芷若, 俞晓忆, 贾志荣, 等. 消癌解毒方对CT26荷瘤小鼠抗结肠癌药效及机制研究[J]. *中华中医药学刊*, 2018,36(7): 1625-1629.
- [14] 谭佳妮, 石文静, 沈卫星, 等. 消癌解毒方对结肠癌的抑制作用及对Treg细胞的影响[J]. *南京中医药大学学报*, 2017,33(5): 515-518.
- [15] 程海波, 李柳, 吴勉华, 等. 癌毒病机理论辨治肠癌探讨[J]. *时珍国医国药*, 2017,28(10): 2487-2488.
- [16] 魏小曼, 程海波. 基于癌毒病机理论的大肠癌治则治法[J]. *中华中医药杂志*, 2020,35(12): 6182-6184.
- [17] YANG Y. Cancer immunotherapy: Harnessing the immune system to battle cancer [J]. *J Clin Invest*, 2015,125(9): 3335-3337.
- [18] 王梦晨, 张雪涟, 陈向东, 等. 灵芝三萜与灵芝多糖抗肿瘤作用及其机制研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, doi: 10. 13422/j. cnki. syfjx. 20220431.
- [19] 周钱梅, 苏式兵. 参芪扶正注射液通过肿瘤相关巨噬细胞提高人乳腺癌MDA-MB-231细胞对顺铂的敏感性[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26 (4) : 76-81.
- [20] 许晓燕, 罗霞, 宋怡, 等. 灵芝多糖通过调节内皮细胞ICAM-1表达促进T淋巴细胞肿瘤浸润的研究[J]. *中国中药杂志*, 2021,46(19): 5072-5079.
- [21] 白璐, 苏锐, 权兴苗, 等. 八珍汤加减对胃癌新辅助化疗患者营养状况和免疫功能的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021,27(11): 117-122.
- [22] 罗文, 王涛, 熊国江, 等. 补中益气汤加减对非小细胞肺癌术后化疗患者VEGF, IGF-1, TGF- β_1 , 免疫功能的影响及安全性分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021,27(16): 90-95.
- [23] 卢泰成, 李杰, 朱广辉, 等. 基于免疫重塑探讨活血药、益气活血药对肿瘤转移影响差异[J]. *中国中药杂志*, 2021,46(11): 2766-2772.
- [24] 吴海斯. NK细胞抗肿瘤应答的调控机制研究[D]. 深圳:中国科学院大学(中国科学院深圳先进技术研究院), 2020.
- [25] 彭六生. NK细胞在胃癌中的应答调控及作用研究[D]. 重庆:第三军医大学, 2014.
- [26] 连晶瑶, 李红, 黄岚, 等. 体外扩增人脐带血来源的NK细胞对食管癌细胞的促凋亡作用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017,24(2): 117-121.
- [27] GOTTHARDT D, SEXL V. STATs in NK-cells: The Good, the Bad, and the Ugly [J]. *Front Immunol*, 2017, doi: 10. 3389/fimmu. 2016. 00694.

[责任编辑 张丰丰]