

四君子汤调节NKG2A表达影响NK细胞抗结肠癌作用

陈良燕, 朱月伊, 王鑫鑫, 石晓兰*
(上海中医药大学附属普陀医院, 上海 200062)

[摘要] **目的:**探讨中药复方四君子汤通过调节NKG2A的表达影响自然杀伤(NK)细胞抗结肠癌的作用。**方法:**分离、纯化来自健康人外周血NK细胞进行培养,分别构建人NK细胞单培、HCT116细胞单培和NK细胞与HCT116细胞共培模型,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测NK细胞中自然杀伤细胞2族成员A(NKG2A)、白细胞介素(IL)-15及结肠癌细胞中组织相容性白细胞抗原E(HLA-E) mRNA的表达,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测NK细胞中IL-15分泌;噻唑蓝(MTT)比色法筛选IL-15的浓度,检测四君子汤和IL-15对NK细胞活性和共培模型中HCT116细胞活性的影响,Real-time PCR检测四君子汤和IL-15对NK细胞中NKG2A和HCT116中HLA-E mRNA表达的影响;使用Anti-NKG2A抗体(M)阻断NKG2A/HLA-E通路,MTT比色法检测共培模型中HCT116细胞增殖情况。**结果:**与单培组比较,NK细胞和HCT116细胞相互作用引起NK细胞的NKG2A和HCT116中的HLA-E mRNA表达均上调($P<0.05$);IL-15 mRNA表达和分泌也增加($P<0.05$);IL-15可增强NK细胞活性和抗结肠癌作用($P<0.01$),也可上调NKG2A表达($P<0.05$);与空白组比较,四君子汤组、四君子汤+IL-15组的NK细胞活性和抗结肠癌作用进一步增加($P<0.01$),Real-time PCR结果显示,与空白组比较,四君子汤组和四君子汤+IL-15组中NK细胞NKG2A表达下调($P<0.05$),共培模型中四君子汤组HCT116中HLA-E表达下调($P<0.01$);与相应未加M组比较,M组与IL-15+M组HCT116细胞增殖被抑制($P<0.01$)。**结论:**NK细胞与结肠癌细胞相互作用可引起NKG2A-HLA-E通路活化导致NK功能受损,四君子汤可抑制该信号激活从而恢复NK细胞抗结肠癌作用。

[关键词] NK细胞;自然杀伤细胞2族成员A(NKG2A);组织相容性白细胞抗原E(HLA-E);白细胞介素(IL)-15;结肠癌;四君子汤

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)15-0028-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220926

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220311.1115.006.html>

[网络出版日期] 2022-03-13 14:46

Si Junzitang Regulates NKG2A Expression to Improve Anti-colon Cancer Function of NK Cells

CHEN Liangyan, ZHU Yueyi, WANG Xinxin, SHI Xiaolan*

(Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of Si Junzitang in regulating the expression of NKG2A to affect the anti-colon cancer function of natural killer (NK) cells. **Method:** NK cells isolated from healthy donors were cultured and used to construct the three incubation models of NK cells, human colon cancer HCT116 cells, and NK cells + HCT116 cells (co-incubation). real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was conducted to determine the mRNA levels of natural killer group 2 member A (NKG2A) and interleukin (IL)-15 in NK cells, as well as the mRNA level of histocompatibility leucocyte antigen E (HLA-E) in HCT116 cells. The secretion of IL-15 was detected by enzyme-linked immunosorbent

[收稿日期] 2021-12-14

[基金项目] 上海市普陀区卫生系统自主创新科研资助项目(重点项目)(ptkwws201804);全国(上海市)名中医普陀传承工作室建设项目(ptzygzs2101)

[第一作者] 陈良燕, 硕士, 从事中医药肿瘤免疫研究, E-mail: 2458035943@qq.com

[通信作者] * 石晓兰, 硕士, 主任医师, 从事中医药肿瘤免疫研究, E-mail: lan701206@163.com

assay (ELISA). Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was employed to determine the applicable concentration of IL-15 and test the effects of Si Junzhitang and IL-15 on the activities of NK cells and the HCT116 cells in the co-incubation model. The effects of Si Junzhitang and IL-15 on the mRNA levels of NKG2A in NK cells and HLA-E in HCT116 cells were detected by Real-time PCR. Monalizumab (M, anti-NKG2A mab) was used to block the NKG2A-HLA-E pathway in co-incubation model, and then the proliferation of HCT116 cells was detected by MTT assay. **Result:** The interaction of NK cells and HCT116 cells up-regulated the mRNA levels of NKG2A in NK cells and HLA-E in HCT116 cells ($P<0.05$), as well as the expression level and secretion of IL-15 ($P<0.05$). Compared with the blank group, Si Junzhitang and Si Junzhitang + IL-15 promoted the proliferation and improved the anti-colon cancer function of NK cells ($P<0.01$). Furthermore, they down-regulated the mRNA levels of NKG2A in NK cells and HLA-E in the HCT116 cells co-incubated with NK cells ($P<0.01$). M and IL-15 + M inhibited the proliferation of HCT116 cells compared with the groups without M ($P<0.01$). **Conclusion:** The interaction of NK cells and HCT116 cells can induce activation of NKG2A-HLA-E pathway to impair NK cell function. Si Junzhitang can inhibit the activation of NKG2A-HLA-E pathway to restore the anti-colon cancer function of NK cells.

[Keywords] natural killer (NK) cells; natural killer group 2 member A (NKG2A); histocompatibility leucocyte antigen E (HLA-E); interleukin (IL)-15; colon cancer; Si Junzhitang

自然杀伤(NK)细胞属于固有免疫系统中大颗粒淋巴细胞,无需预先刺激、能够快速有效地识别“感染”细胞和癌变细胞^[1],通过直接细胞毒作用、穿孔素-颗粒酶、死亡受体表达及分泌效应细胞因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、 γ -干扰素(IFN- γ)等方式杀伤溶解靶细胞,还能产生记忆效应,具有适应性免疫细胞的功能,同时能够激活适应性免疫系统产生免疫应答^[2-3],因此,NK细胞成为肿瘤免疫疗法中备受青睐的效应细胞。NK细胞的激活由活化受体和抑制性受体与相对应的配体结合产生的信号平衡来调节的,其中自然杀伤细胞2族成员A(NKG2A)是NK细胞表达的主要抑制性受体之一,与其配体组织相容性白细胞抗原E(HLA-E)结合产生的抑制信号可阻断活化信号传递,从而抑制NK细胞活化^[4]。在实体瘤如肝癌中,肝癌组织内高表达NKG2A的NK细胞功能受损,与肝癌的不良预后相关^[5],有研究表明结肠癌患者体内NK细胞的NKG2A表达上调^[6],结肠癌细胞也能高表达HLA-E^[7-8],因此可以认为NKG2A/HLA-E信号通路可能是结肠癌细胞抑制NK细胞活性的机制之一。

基于现代基础研究对中医药的分析发现中药中的补益药及其成分偏于调节免疫相关和肿瘤相关通路^[9],如人参及其成分能够调节机体免疫细胞,包括NK细胞,增强其活性和杀伤作用^[10];黄芪的有效成分黄芪甲苷Ⅲ能够增加NK细胞活化受体NKG2D表达、促进NK细胞抗结肠癌作用^[11]。经补益药物配伍组成的中药复方对免疫系统具有更强

的调节作用,如由人参、白术、茯苓、甘草4味补益药配伍而成的四君子汤,现代药理学研究表明四君子汤能够改善T细胞、巨噬细胞、NK细胞抗肿瘤作用^[12-13],经过分析发现四君子汤成分主要包含黄酮苷、萜类、皂苷类化合物等^[14],这些成分对免疫系统具有强调节作用。本课题组长期进行四君子汤调节NK细胞抗结肠癌的基础实验研究,前期研究已经证明了四君子汤有利于增加结肠癌荷瘤小鼠体内NK细胞的比例,抑制结肠癌复发和转移^[15],体外实验证明四君子汤可促进NK细胞增殖和抗结肠癌作用^[16]。本研究分析结肠癌微环境下NK细胞功能变化及四君子汤对NK细胞抗结肠癌作用的影响。

1 材料

1.1 细胞株 HCT116人结肠癌细胞株,购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库,编号TCHu 99,自复苏后传至7~15代用于实验。

1.2 药物与试剂 人白细胞介素(IL)-15蛋白(北京百普赛斯生物科技有限公司,批号S7-83VF1-8AQ),anti-NKG2A抗体(M,武汉科斯坦生物科技有限公司,批号CSD00396),人参、白术、白茯苓、蜜炙甘草(上海雷允上药业有限公司,批号分别为29539、41784、29519、41723),由上海中医药大学中药学院崔波老师鉴定均为正品,胎牛血清(Gemini公司,批号A24G00J),青-链霉素(Boster公司,批号PYG0016),PRMI 1640培养基、0.25%胰蛋白酶溶液(Gibco公司,批号分别为8120222、1930154),人外周血淋巴细胞分离液(TBD,天津灏洋华科生物

科技有限公司,批号 20210808-3466),噻唑蓝(MTT)(中国 Solarbio 公司,批号 424B0516),人白细胞介素(IL)-15 酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号 228CP4LX1T),TRIzol 试剂(Tiagen 公司,批号 DP405),三氯甲烷、异丙醇、无水乙醇(上海凌峰化学试剂有限公司,批号分别为 20190408、20200326、20201222),primerscriptRT master mix、TB Green® premix ex Taq™ II(日本 Takara 公司,批号分别为 AL13661A、AJ10746),奥沙利铂(OXA,山东罗欣药业集团股份有限公司,批号 372320053,国药准字 H20123347)。

1.3 仪器 SVE-4A1 型生物安全柜(美国 Esco 公司),170-200PLUS 型 CO₂ 恒温培养箱(英国 RS Biotech 公司),VIA 7 Dx 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 Life Technologies 公司),Varioskan Lux 型多功能全自动酶标仪(美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 四君子汤提取物制备^[16] 人参、白术、茯苓、甘草共 540 g,以 2:3:3:1 混合剪碎,加入 6 倍体积的水浸泡,回流提取,90 °C 加热回流 3 次,第 1 次提取 2 h,第 2 次和第 3 次,每次回流提取 1 h。合并 3 次提取液,过滤,减压,蒸发至浸膏,减压干燥成干粉,每 1 g 生药获得干粉 0.32 g。实验前定量称取,无菌蒸馏水溶解,0.22 μm 过滤,-20 °C 冰箱保存备用。

2.2 细胞培养 人结肠癌细胞株 HCT116 细胞使用含有 15% FBS、1% P/S 的 RPMI 1640 培养基培养在 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养基中。

2.3 原代 NK 细胞提取、分离与培养^[16] 健康人外周血购自上海长海医院献血站,共 60 mL,以 1:1 的比例使用 PBS 进行稀释后,与 TBD 以 2:1 的比例分层,以 1 500 r·min⁻¹ 离心 20 min(离心半径 15 cm,下同),离心后分为 4 层,从上至下依次为血清层、淋巴细胞层、分离层、红细胞层,收集淋巴细胞层的细胞,悬浮于 PBS 中,再次以 1 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃上清,收集沉淀悬浮于含 20%FBS 的完全培养基中,使用 MACS NK 细胞分离试剂盒磁珠阳性分选分离 NK 细胞,收集 CD3-CD56⁺ NK 细胞,流式细胞仪上检测纯度约 ≥90%,可用于后续实验。

2.4 构建细胞培养模型 将人 NK 细胞调整密度为 3×10⁶ 个/mL,分别接种于 96 孔细胞培养板或 12 孔细胞培养板构建 NK 细胞单培模型;将 HCT116 细胞调整密度为 10×10⁴ 个/mL,分别接种于 96 孔细胞培

养板或 12 孔细胞培养板构建 HCT116 细胞单培模型;将人 NK 细胞调整密度为 5×10⁶ 个/mL,与 HCT116 细胞以 50:1 的比例共同接种于 96 孔细胞培养板或 12 孔细胞培养板,构建 NK 细胞与 HCT116 的共培模型,用于后续实验。

2.5 MTT 比色法检测 IL-15 对 NK 细胞活性 NK 细胞单培模型分别设置空白组、IL-15 组(10、20、50、100、200 μg·L⁻¹),按分组顺序分别加入 96 孔板,处理 24、48 h,加入 MTT 试剂(浓度、体积),10 μL/孔,3.5 h 后加入 SDS 试剂,100 μL/孔,24 h 后于酶标仪上 570 nm 处检测吸光度 *A*,代表 NK 细胞活性。

2.6 MTT 比色法检测四君子汤对 NK 细胞活性和杀伤作用 向 NK 细胞单培模型和 NK 细胞与 HCT116 细胞共培模型中加入含不同药物的培养基,分别设置为空白组,IL-15 组(50 μg·L⁻¹),OXA 组(10 mmol·L⁻¹),四君子汤组(5 g·L⁻¹),四君子汤+IL-15 组(5 g·L⁻¹+50 μg·L⁻¹),按分组顺序分别加入 96 孔板,分别培养 24、48 h,单培模型直接加入 MTT,10 μL/孔,3.5 h 后加入 SDS 试剂,100 μL/孔,24 h 后于酶标仪上 570 nm 处检测 *A*,代表 NK 细胞活性;共培模型中使用移液器轻轻吸弃上清中 NK 细胞,加入培养液 100 μL,加入 MTT 试剂,10 μL/孔,3.5 h 后加入 SDS 试剂,100 μL/孔,24 h 后于酶标仪上 570 nm 检测 *A*。

2.7 MTT 比色法检测四君子汤和 monalizumab 对 NK 细胞杀伤作用 向 NK 细胞和 HCT116 细胞共培模型中加入含不同药物的培养基,分为设置为空白组, M 组(1 mg·L⁻¹),IL-15 组(50 μg·L⁻¹),IL-15+M 组(50 μg·L⁻¹+1 mg·L⁻¹),OXA 组(10 mmol·L⁻¹),OXA+M 组(10 mmol·L⁻¹+1 mg·L⁻¹),四君子汤组(5g·L⁻¹),四君子汤+M 组(5 g·L⁻¹+1 mg·L⁻¹),四君子汤+IL-15 组(5 g·L⁻¹+50 μg·L⁻¹),四君子汤+IL-15+M 组(5 g·L⁻¹+50 μg·L⁻¹+1 mg·L⁻¹),按分组顺序分别加入 96 孔板,分别培养 24、48 h,轻轻吸弃上清及 NK 细胞,加入 100 μL 培养液后,加入 MTT,10 μL/孔,3.5 h 后加入 SDS 试剂,100 μL/孔,24 h 后于酶标仪上 570 nm 处检测 *A*。

2.8 ELISA 检测 IL-15 的分泌 NK 细胞单培模型和共培养模型分别处理 24、48 h,轻轻吸取上清,室温 200 r·min⁻¹ 离心 10 min,收集上清,冷冻于-80 °C 冰箱。根据人 IL-15 ELISA 试剂盒说明书,建立标准曲线方程,计算 IL-15 含量。

2.9 Real-time PCR 检测 IL-15、NKG2A、HLA-E mRNA 表达 分别收集培养模型中 NK 细胞和

HCT116细胞, TRIzol试剂对细胞进行裂解5 min, 以500:150加入三氯甲烷, 剧烈震荡以充分融合后, 在4 °C, 12 000 r·min⁻¹离心15 min, 收集水相层液体转移至相对应的离心管内, 以1:1加入异丙醇, 吹匀, 室温静置30 min, 4 °C, 12 000 r·min⁻¹离心10 min, 弃上清, 加入75%无水乙醇后吹匀, 4 °C, 5 000 r·min⁻¹离心3 min, 弃尽上清, 加入无酶超纯水20 μL, 55 °C水浴10 min。20 μL反应体系在37 °C、15 min, 85 °C、5 s, 4 °C逆转录为cDNA, 进行PCR反应, 反应条件: 95 °C预变性30 s, 95 °C变性5 s, 60 °C退火34 s, 40个循环, 以β-actin作为内参, 使用2^{-ΔΔCt}法进行计算。引物序列由上海捷瑞生物工程有限公司合成, 见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primers sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
β-actin	上游 CTACCTCATGAAGATCCTCACCGA	84
	下游 TTCTCCTTAATGTACACGACGATT	
NKG2A	上游 AGCTCCATTTTAGCAACTGAACA	190
	下游 CAACTATCGTTACCACAGAGGC	
IL-15	上游 TTTTCAGTGCAGGGCTTCCTAA	129
	下游 GGGTGAACATCACTTCCGTAT	
HLA-E	上游 TTCCGAGTGAATCTGCGGAC	138
	下游 GTCGTAGGCGAACTGTTTCATAC	

2.10 统计学处理 使用 Graph Prism 8.0.1 软件对数据进行统计学分析, 计量数据符合正态分布的使用 $\bar{x} \pm s$ 表达, 两组间比较采用 *t* 检验, 3组及以上的组间比较采用 One-way ANOVA 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 NK细胞和结肠癌细胞相互作用对NKG2A和HLA-E表达的影响 NK细胞与HCT116细胞共培养模拟结肠癌免疫微环境, 与NK细胞单培模型比较, 共培模型NKG2A mRNA表达上调($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与HCT116细胞单培比较, 共培养模型中HCT116细胞HLA-E表达上调($P < 0.01$)。见表2。

3.2 NK细胞和结肠癌细胞相互作用对IL-15分泌和mRNA表达的影响 与NK细胞单培比较, 共培模型中IL-15 mRNA表达升高($P < 0.05$), IL-15的分泌也显示增加($P < 0.01$)。见表3。

3.3 IL-15对NK细胞活性和NKG2A表达的影响 与空白组比较, 10、20、50 μg·L⁻¹ IL-15组NK细胞活性均显著增加($P < 0.01$), 100、200 μg·L⁻¹ IL-15组

表2 单培和共培对NK细胞的NKG2A与HCT116细胞的HLA-E mRNA表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of incubation and co-incubation models on expression of NKG2A mRNA in NK cell and HLA-E in HCT116 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	NKG2A		HLA-E	
	24 h	48 h	24 h	48 h
单培组	1.000±0.000	0.858±0.110	1.000±0.000	1.859±0.134
共培组	1.201±0.082 ¹⁾	1.157±0.068 ²⁾	5.661±0.778 ²⁾	5.193±0.332 ²⁾

注: 与相同时间单培比较 ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表3同)

表3 单培和共培对NK细胞中IL-15的mRNA表达和分泌的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of incubation and Co-incubation models on expression and secretion of IL-15 of NK cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	IL-15 mRNA		IL-15/ng·L ⁻¹	
	24 h	48 h	24 h	48 h
单培组	1.00±0.000	1.27±0.20	41.72±0.05	45.33±0.36
共培组	1.69±0.09 ³⁾	1.71±0.14 ¹⁾	105.26±0.73 ²⁾	240.61±0.78 ²⁾

NK细胞活性降低, 当IL-15为50 μg·L⁻¹时, NK细胞活性最高, 后续实验选择50 μg·L⁻¹继续实验。与空白组比较, IL-15组中48 h时NK细胞的NKG2A mRNA表达显著上调($P < 0.01$)。见表4、表5。

表4 IL-15对NK细胞的活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of IL-15 on activities of NK cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/μg·L ⁻¹	24 h	48 h
空白组		0.280±0.005	0.302±0.008
IL-15组	10	0.294±0.006 ¹⁾	0.332±0.007 ¹⁾
	20	0.297±0.005 ¹⁾	0.336±0.012 ¹⁾
	50	0.299±0.004 ¹⁾	0.336±0.006 ¹⁾
	100	0.273±0.004 ¹⁾	0.296±0.008
	200	0.271±0.006 ¹⁾	0.295±0.006

注: 与相同时间空白组比较 ¹⁾ $P < 0.01$ (表5同)

表5 IL-15对NK细胞中NKG2A mRNA表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of IL-15 on expression of NKG2A mRNA of NK cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/μg·L ⁻¹	24 h	48 h
空白组		1.000	0.826±0.213
IL-15组	50	0.957±0.004	1.490±0.068 ¹⁾

3.4 四君子汤对NK细胞活性和抗结肠癌作用的影响 与空白组比较, IL-15组、四君子汤组及四君子汤+IL-15组中NK细胞活性和杀伤作用显著增强, 差异有统计学意义($P < 0.01$), OXA组中NK细胞活性显著下调($P < 0.01$), 与IL-15组和四君子汤组

比较,四君子汤+IL-15组进一步促进NK细胞对结肠癌细胞的杀伤作用($P<0.05$)。见表6。

表6 四君子汤和IL-15对单培模型中NK细胞和共培模型中HCT116细胞活性的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Si Junzitang and IL-15 on activities of NK cells in incubation and HCT116 in co-incubation models ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度	NK		HCT116	
		24 h	48 h	24 h	48 h
空白组		0.193±0.004	0.214±0.007	0.748±0.045	0.732±0.042
IL-15组	50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.195±0.005	0.225±0.006 ¹⁾	0.631±0.041 ¹⁾	0.405±0.048 ¹⁾
OXA组	10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.172±0.003 ¹⁾	0.168±0.006 ¹⁾	0.586±0.041 ¹⁾	0.282±0.051 ¹⁾
四君子汤组	5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.475±0.011 ¹⁾	0.415±0.013 ¹⁾	0.603±0.034 ¹⁾	0.381±0.035 ¹⁾
四君子汤+IL-15组	5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.457±0.020 ¹⁾	0.408±0.011 ¹⁾	0.564±0.040 ^{1,2,3)}	0.369±0.033 ¹⁾

注:与同时空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与IL-15组比较²⁾ $P<0.01$;与四君子汤组比较³⁾ $P<0.05$

3.5 四君子汤对NK细胞中NKG2A mRNA表达的影响 与同时空白组比较,四君子汤组处理48 h的NK细胞中NKG2A mRNA表达降低,差异有统计学意义($P<0.05$),四君子汤+IL-15组的NK细胞NKG2A mRNA表达显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$),见表7。

表7 四君子汤和IL-15对单培和共培模型中NK细胞中NKG2A mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of Si junzidang and IL-15 on expression of NKG2A mRNA of NK cell in incubation and co-incubation models ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度	单培		共培	
		24 h	48 h	24 h	48 h
空白组		1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
OXA组	10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	1.835±0.199 ²⁾	0.821±0.018	1.146±0.003	0.791±0.030 ¹⁾
四君子汤组	5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.804±0.078	0.702±0.017 ¹⁾	0.438±0.066 ²⁾	0.470±0.003 ²⁾
四君子汤+IL-15组	5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.599±0.061 ²⁾	0.440±0.087 ²⁾	0.781±0.091 ¹⁾	0.578±0.165 ²⁾

注:与同时空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ (表8同)

3.6 四君子汤对结肠癌细胞中HLA-E的mRNA表达的影响 与同时空白组比较,单培四君子汤组的HCT116细胞HLA-E mRNA表达显著上调($P<0.01$),共培模型中四君子汤组HCT116细胞HLA-E mRNA表达显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表8。

表8 四君子汤对单培和共培模型中HCT116细胞HLA-E mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 8 Effect of Si junzidang on expression of HLA-E mRNA of HCT116 in incubation and co-incubation models ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度	单培		共培	
		24 h	48 h	24 h	48 h
空白组		1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
OXA组	10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.859±0.036 ²⁾	0.878±0.034 ¹⁾	0.603±0.008 ²⁾	1.396±0.034 ²⁾
四君子汤组	5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	1.947±0.066 ²⁾	1.852±0.039 ²⁾	0.416±0.007 ²⁾	0.430±0.045 ²⁾

3.7 NKG2A-HLA-E通路对NK细胞抗结肠癌的功能的影响 与同时空白组比较,M组HCT116细胞活性降低($P<0.01$),与IL-15组比较,IL-15+M组中HCT116细胞活性降低($P<0.01$)。见表9。

4 讨论

肿瘤组织中NK细胞浸润度的升高与肿瘤的良好预后相关,然而在复杂的肿瘤微环境的作用下,肿瘤细胞通过多种抑制NK细胞功能活性,导致抗癌免疫应答反应低下,在多种实体瘤肿瘤微环境

中,补体C3a分泌增加,与NK细胞表达的C3aR作用抑制NK细胞在实体瘤中的迁移和浸润度^[17],肿瘤低氧微环境也可以促进SHP-1磷酸化抑制信号转导与转录激活因子3(STAT3)和细胞外信号调节激酶(ERK)信号通路阻断NK细胞活化,从而抑制NK细胞抗癌效果^[18]。在结肠癌中,结肠癌来源的外泌体可引起NK细胞功能失调,降低NK细胞的活性和穿孔素、颗粒酶B的释放^[19];结肠癌细胞表面表达增殖细胞核抗原(PCNA)也会改变IFN- γ 的分泌,

表9 四君子汤和 monalizumab 对共培养模型中 HCT116 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 9 Effect of Si Junzitang and monalizumab on activities of HCT116 in co-incubation models ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度	24 h	48 h
空白组		0.663±0.023	0.788±0.032
M组	1 mg·L ⁻¹	0.606±0.033 ¹⁾	0.652±0.028 ¹⁾
IL-15组	50 μg·L ⁻¹	0.576±0.038	0.419±0.037
IL-15+M组	50 μg·L ⁻¹ +1 mg·L ⁻¹	0.531±0.022 ¹⁾	0.355±0.053 ¹⁾
OXA组	10 mmol·L ⁻¹	0.564±0.067	0.409±0.022
OXA+M组	10 mmol·L ⁻¹ +1 mg·L ⁻¹	0.538±0.027	0.285±0.027 ¹⁾
四君子汤组	5 g·L ⁻¹	0.495±0.036	0.341±0.043
四君子汤+M组	5 g·L ⁻¹ +1 mg·L ⁻¹	0.477±0.040	0.335±0.025
四君子汤+IL-15组	5 g·L ⁻¹ +50 μg·L ⁻¹	0.455±0.034	0.339±0.021
四君子汤+IL-15+M组	5 g·L ⁻¹ +50 μg·L ⁻¹ +1 mg·L ⁻¹	0.450±0.019	0.316±0.015

注:与同时间相应未加M组比较¹⁾P<0.01

抑制NK细胞的活性^[20]。本研究通过构建NK细胞与结肠癌细胞共培养模型模拟结肠癌免疫微环境时发现NK细胞的抑制性受体NKG2A表达上调,结肠癌细胞表面的HLA-E表达也上调。在NK细胞中,NKG2A和CD94形成二聚体后与HLA-E结合磷酸化位于尾端的酪氨酸免疫受体的抑制序列(ITIMs),下调多种去磷酸化产生的活化信号从而影响NK细胞的功能效果^[21]。

IL-15能够强有力的刺激NK细胞和CD8⁺T细胞活化发挥抗肿瘤作用^[22],但是IL-15作为细胞因子免疫疗法并未使更多的患者受益,在肿瘤微环境中,IL-15甚至可能有利于肿瘤进展和免疫逃逸^[23],目前发现IL-15能够影响NK细胞的免疫检查位点表达,如IL-15联合糖皮质激素等导致NK细胞的程序性死亡受体-1(PD-1)表达上调^[24],且IL-15在肿瘤微环境的作用下也能引起程序性死亡配体1(PD-L1)高表达,从而抑制NK细胞活性和抗肿瘤作用^[25]。在本研究发现,当NK细胞与结肠癌细胞相互作用时促进了IL-15的分泌和表达,使用外源性IL-15作用于NK细胞时发现能够促进NK细胞增殖,但同时也能够上调NK细胞中NKG2A的表达,联合anti-NKG2A mAb时进一步增加NK细胞杀伤结肠癌作用,这表明在肿瘤免疫微环境中,由IL-15上调NKG2A引起的抑制性信号可能是NK细胞抗肿瘤作用不足的原因之一。

结肠癌在中医学中归属于“肠结”“癥瘕”等范

畴,机体正气虚弱、脾肾亏虚为其发病的内在因素^[26],治疗上当注重补助正气,调理脾胃;四君子汤是临床上常用的补益剂之一,常联合手术、放化疗应用于结肠癌的临床治疗,能够有效改善患者免疫功能,提高患者生存质量^[27-28]。四君子汤中人参大补元气,健脾养胃,白术健脾燥湿以助运化,茯苓渗湿健脾,炙甘草补气和缓,调和诸药,四药配伍,共奏益气健脾之功^[29],现代研究发现四君子汤可改善免疫功能、增强免疫细胞的抗肿瘤效应^[30];本研究结果表明四君子汤可增加NK细胞活性和抗肿瘤作用,并下调了NKG2A表达,在与IL-15联合时,也能降低NKG2A表达,同时四君子汤还可以降低微环境下结肠癌细胞中HLA-E的表达,使用anti-NKG2A单抗阻断NKG2A-HLA-E通路后,IL-15刺激的NK细胞抗肿瘤作用进一步增强。

综上所述,结肠癌微环境下NK细胞发挥抗肿瘤作用的同时,也会增强NKG2A-HLA-E的活化而损害NK细胞抗肿瘤作用,而四君子汤可促进NK细胞抗肿瘤作用,增强NK细胞的杀伤作用,这些可能与四君子汤抑制结肠癌微环境中NKG2A-HLA-E通路信号有关,改变了由于NK细胞过度活化导致的功能低下引起的结肠癌细胞免疫逃逸的状态。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] ALFARRA H, WEIR J, GRIEVE S, et al. Targeting NK cell inhibitory receptors for precision multiple myeloma immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2020, doi:10.3389/fimmu.2020.575609.
- [2] PESCE S, TRABANELLI S, DI VITO C, et al. Cancer immunotherapy by blocking immune checkpoints on innate lymphocytes [J]. *Cancers*, 2020,12(12):3504.
- [3] ZHANG C, LIU Y. Targeting NK cell checkpoint receptors or molecules for cancer immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2020, doi:10.3389/fimmu.2020.01295.
- [4] BORST L, VAN DER BURG S H, VAN HALL T. The NKG2A-HLA-E axis as a novel checkpoint in the tumor microenvironment [J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(21):5549-5556.
- [5] SUN C, XU J, HUANG Q, et al. High NKG2A expression contributes to NK cell exhaustion and predicts a poor prognosis of patients with liver cancer [J]. *Oncoimmunology*, 2017,6(1):e1264562.
- [6] MECKAWY G R, MOHAMED A M, ZAKI W K, et al. Natural killer NKG2A and NKG2D in patients with

- colorectal cancer[J]. *J Gastrointest Oncol*, 2019, 10(2):218-225.
- [7] HUANG R, ZHANG D, LI F, et al. Loss of Fas expression and high expression of HLA-E promoting the immune escape of early colorectal cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(5):3379-3386.
- [8] LEVY E M, BIANCHINI M, VON EUW E M, et al. Human leukocyte antigen-E protein is overexpressed in primary human colorectal cancer [J]. *Int J Oncol*, 2008, 32(3):633.
- [9] ZHENG J, WU M, WANG H, et al. Network pharmacology to unveil the biological basis of health-strengthening herbal medicine in cancer treatment[J]. *Cancers*, 2018, 10(11):461.
- [10] RATAN Z A, YOUN S H, KWAK Y, et al. Adaptogenic effects of *Panax ginseng* on modulation of immune functions[J]. *J Ginseng Res*, 2021, 45(1):32-40.
- [11] CHEN X, CHEN X, GAO J, et al. Astragaloside III enhances anti-tumor response of NK cells by elevating NKG2D and IFN- γ [J]. *Front Pharmacol*, 2019, doi: 10.3389/fphar.2019.00898.
- [12] GAO B, PENG Y, PENG C, et al. A comparison of characterization and its actions on immunocompetent cells of polysaccharides from Sijunzi decoction [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, doi: 10.1155/2019/9860381.
- [13] 欧阳庆武, 费雁, 魏运姣, 等. 四君子汤对结肠癌小鼠肠道菌群及免疫功能的调节作用[J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(21):4819-4823.
- [14] DONG B, PENG C, MA P, et al. An integrated strategy of MS-network-based offline 2DLC-QTOF-MS/MS coupled with UHPLC-QTRAP((R))-MS/MS for the characterization and quantification of the non-polysaccharides in Sijunzi decoction[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2021, 413(13):3511-3527.
- [15] 杜锦芳, 禹雯琦, 周诣, 等. 十全大补汤对结肠癌原发瘤切除后转移瘤生长及NK细胞的影响[J]. *上海中医药杂志*, 2017, 51(12):79-83.
- [16] 朱月伊, 宋运来, 石晓兰. 基于PD-1/PD-L1表达影响探讨四君子汤对NK细胞及结肠癌作用的研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(3):295-300.
- [17] NANDAGOPAL S, LI C G, XU Y, et al. C3aR signaling inhibits NK-cell infiltration into the tumor microenvironment in mouse models [J]. *Cancer Immunol Res*, 2021, doi:10.1158/2326-6066.
- [18] TENG R, WANG Y, LV N, et al. Hypoxia impairs NK cell cytotoxicity through SHP-1-mediated attenuation of STAT3 and ERK signaling pathways [J]. *J Immunol Res*, 2020, doi: 10.1155/2020/4598476.
- [19] HUANG Y, LUO Y, OU W, et al. Exosomal lncRNA SNHG10 derived from colorectal cancer cells suppresses natural killer cell cytotoxicity by upregulating INHBC[J]. *Cancer Cell Int*, 2021, doi: 10.1186/s12935-021-02221-2.
- [20] MALAER J D, MATHEW P A. Role of LLT1 and PCNA as natural killer cell immune evasion strategies of HCT 116 cells[J]. *Anticancer Res*, 2020, 40(12):6613-6621.
- [21] CHEN Y, LU D, CHUROV A, et al. Research progress on NK cell receptors and their signaling pathways [J]. *Mediators Inflamm*, 2020, doi: 10.1155/2020/6437057.
- [22] GUO J, LIANG Y, XUE D, et al. Tumor-conditional IL-15 pro-cytokine reactivates anti-tumor immunity with limited toxicity [J]. *Cell Res*, 2021, 31(11):1190-1198.
- [23] FIORE P F, DI MATTEO S, TUMINO N, et al. Interleukin-15 and cancer: Some solved and many unsolved questions[J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(2):e1428.
- [24] QUATRINI L, VACCA P, TUMINO N, et al. Glucocorticoids and the cytokines IL-12, IL-15, and IL-18 present in the tumor microenvironment induce PD-1 expression on human natural killer cells[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2021, 147(1):349-360.
- [25] KNUDSON K M, HICKS K C, OZAWA Y, et al. Functional and mechanistic advantage of the use of a bifunctional anti-PD-L1/IL-15 superagonist [J]. *J Immunother Cancer*, 2020, doi: 10.1136/jitc-2019-000493.
- [26] 孟宪萌, 许斌, 陈维. 基于中医数据挖掘探讨桃红四物汤治疗结肠癌机制的网络药理学研究[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2021, doi:21.1543.R.20210916.1153.022.
- [27] 李进安, 王永多, 王奎, 等. 四君子汤对结肠癌术后患者胃肠恢复及免疫功能作用研究[J]. *实用癌症杂志*, 2016, 31(6):1034-1036.
- [28] 崔钰珠, 邢晓静, 于慧会, 等. 四君子汤加减方联合化疗改善大肠癌患者生存质量的Meta分析[J]. *中国当代医药*, 2017, 24(22):7-10.
- [29] 梁华, 张君成, 李奇玮, 等. 四君子汤及其加味方防治肿瘤的机制研究进展[J]. *中医药学报*, 2022, 50(1):86-90.
- [30] 陈莉媚, 金彤, 宁春桃, 等. 加味四君子汤对H22肝癌小鼠的抑瘤作用和免疫功能的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2019, 39(2):241-248.

[责任编辑 张丰丰]