



南京中医药大学学报

Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine

ISSN 1672-0482, CN 32-1247/R

《南京中医药大学学报》网络首发论文

题目： 益气养阴解毒方对 Lewis 肺癌小鼠的免疫调节及抗肿瘤作用
作者： 刘莲芳, 卢子涵, 胡霞, 周勤峰, 秦垠, 梅宇波
收稿日期： 2023-10-28
网络首发日期： 2024-03-07
引用格式： 刘莲芳, 卢子涵, 胡霞, 周勤峰, 秦垠, 梅宇波. 益气养阴解毒方对 Lewis 肺癌小鼠的免疫调节及抗肿瘤作用[J/OL]. 南京中医药大学学报.
<https://link.cnki.net/urlid/32.1247.R.20240306.1731.004>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

益气养阴解毒方对 Lewis 肺癌小鼠的免疫调节及抗肿瘤作用

刘莲芳¹, 卢子涵², 胡霞¹, 周勤峰¹, 秦垠¹, 梅宇波¹

(1.南京中医药大学附属张家港医院,江苏 张家港 215600;2.南京中医药大学中西医结合学院,江苏 南京 210023)

摘要:目的 探索益气养阴解毒方对 Lewis 肺癌小鼠的抗肿瘤作用及其对免疫调节的影响。方法 腋下皮下注射 Lewis 肺癌细胞构建 Lewis 肺癌小鼠模型,分为模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组,并计算肿瘤体积、抑瘤率和生存率。分别使用 HE 染色, TUNEL 试验和彗星实验检测肿瘤细胞凋亡和 DNA 损伤。ELISA 法检测 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 的表达水平。免疫荧光、流式细胞术检测 CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺、PD-1⁺、IFN- γ ⁺、CD28⁺ 细胞占比。Western Blot 法检测 PD-1、CD69、CD28 的蛋白水平。结果 益气养阴解毒方具有抗肿瘤,延长生存期的作用,还可促进肿瘤细胞凋亡并加剧肿瘤细胞 DNA 损伤。药物处理促进了 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 的表达,提高了 CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺、IFN- γ ⁺、CD28⁺ 细胞占比,并抑制了 PD-1⁺ 细胞占比和蛋白表达,CD69、CD28 的蛋白水平显著上升。结论 益气养阴解毒方可以抑制肿瘤发展,其对免疫功能的调节是其抗肿瘤作用的潜在作用机制。

关键词: 益气养阴解毒方;非小细胞肺癌;免疫调节

Immunoregulation and Antitumor Effect of Yiqiyangyin Detoxification Recipe on Lewis Lung Cancer Mice

LIU Lianfang¹, LU Zihan², HU Xia¹, ZHOU Qinfeng¹, QIN Yin¹, MEI Yubo¹

(1. Zhangjiagang TCM Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Zhangjiagang 215600, China; 2. College of Integrative Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the anti-tumor effect of yiqiyangyin detoxification recipe on Lewis lung cancer mice and its influence on immunomodulation. **METHODS** Lewis lung cancer mouse model was constructed by subcutaneous injection of Lewis lung cancer cells under the armpit and divided into model group, low dose group, medium dose group and high dose group. The tumor volume, tumor inhibition rate and survival rate were calculated. The apoptosis and DNA damage of tumor cells were detected by HE staining, TUNEL assay and comet assay. The expression levels of IFN- γ , IL-2 and TNF- α were detected by ELISA. CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺, PD1⁺, IFN- γ ⁺, CD28⁺ cells were detected by immunofluorescence and flow cytometry. The protein levels of PD1, CD69 and CD28 were detected by Western blot. **RESULTS** Yiqiyangyin detoxification recipe has the effect of anti-tumor, prolonging survival, promoting apoptosis of tumor cells and aggravating DNA damage of tumor cells. Drug treatment promoted the expression of IFN- γ , IL-2 and TNF- α , increased the proportion of CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺, IFN- γ ⁺ and CD28⁺ cells, and inhibited the proportion of PD1⁺ cells and protein expression, and the protein levels of CD69 and CD28 were significantly increased. **CONCLUSION** Yiqiyangyin detoxification recipe can inhibit the development of tumor, and its regulation of immune function is the potential mechanism of its anti-tumor effect.

KEYWORDS: Yiqiyangyin detoxification recipe; Non-small cell lung cancer; Immune regulation

肺癌作为常见的癌症类型,在我国的发病率和致死率高居首位^[1],其中非小细胞肺癌约占肺癌总数的 85%^[2],常用的肿瘤治疗方法,如手术,化放疗等,常带给患者巨大的痛苦,并伴随多种副作用^[3],因此,越来越多的学者聚焦于非小细胞肺癌新型药物的研究。

机体的免疫与肺癌的发生发展密切相关^[4],抑制 PD-1 这一免疫检查点已被证明具有延长生存周期的作用^[5]。此外,阻断 PD-1 还可增加肿瘤组织

中 CD8⁺ 和 CD4⁺T 细胞,抑制肿瘤增殖^[6]。PD-1 与 PD-L1 结合会抑制 T 细胞增殖^[7],挽救 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 的表达^[8],是免疫逃逸的关键机制之一。临床研究表明,益气养阴解毒方对非小细胞癌具有良好疗效,还可延缓耐药,延长患者生存期^[9],但益气养阴解毒方治疗肺癌的具体作用机制还需进一步研究。本研究中,我们构建 Lewis 肺癌小鼠模型,观察益气养阴解毒方的抗肿瘤作用机制,并观察其在荷瘤小鼠体内调节免疫反应的作用,为益气养阴解毒

收稿日期: 2023-10-28

基金项目: 江苏省卫生健康委医学科研立项项目(Z2023037);南京中医药大学自然科学基金项目(XZR2021055);国家自然科学基金青年科学基金项目(82205211);苏州市临床试验机构能力提升项目(SLT2022008)

第一作者: 刘莲芳,女,副主任中医师,E-mail:llf8911@126.com

通信作者: 梅宇波,男,主任医师,主要从事恶性肿瘤的综合治疗研究,E-mail:jackmei2024@126.com

方的临床应用提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物与瘤株

C57BL/6J 雄性小鼠,7 周龄,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2016-0011。Lewis 肺癌肿瘤株购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 益气养阴解毒方的准备

益气养阴解毒方由党参、茯苓、北沙参、麦冬、怀山药、黄精、薏苡仁、白花蛇舌草、仙鹤草、番荔枝、白术、黄芪、甘草组成。取 1 kg 益气养阴解毒方,加入八倍量的水煎煮,过滤后的药渣加入 6 倍量的水再次煎煮,过滤后,合并 2 次滤液并浓缩成流浸膏,分装后 4 ℃ 保存。

1.3 试剂与抗体

IFN- γ 、IL-2、TNF- α ELISA 试剂盒(上海茁彩生物科技有限公司,货号:ZC-37905、ZC-37976、ZC-39024);TUNEL 原位细胞凋亡检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司,货号:C1088);CD28、CD69、PD1 抗体(英国 Abcam 公司,货号:ab243228、ab202909、ab214421);CD8、GAPDH 抗体(美国 Cell signaling Technology 公司,货号:98941S、5174);FITC 标记的抗 CD8 α 抗体(英国 Abcam 公司,货号:ab237367);PE 标记的抗 CD4 抗体、抗 CD28 抗体、抗 PD1 抗体(英国 Abcam 公司,货号:ab252151、ab275154、ab210291);PE 标记的抗小鼠 IFN- γ 抗体(美国 Bio-Legend 公司,货号:505808)。

1.4 细胞培养

Lewis 肺癌细胞(LLC)在完全 DMEM 高糖培养基(含 10%胎牛血清和 0.5%的青霉素、链霉素)中,37 ℃、5%CO₂ 培养箱中培养。当细胞生长融合至 80%以上,按 1:3 的比例传代细胞。

1.5 Lewis 肺癌模型小鼠的制备及分组给药

取对数生长期细胞,经 0.25%胰酶消化,消化后装入 15 mL 的离心管中 1 000 r·min⁻¹,5 min 离心,加入生理盐水制成细胞悬液。活细胞数大于 95%,调整细胞浓度至 1×10⁷ mL⁻¹,用 1 mL 注射器将肿瘤细胞接种于 C57BL/6J 小鼠右前肢右腋下皮下,每只注射 0.1 mL 细胞悬液(即 1×10⁶ 个/只),全程严格无菌操作,建立皮下移植瘤模型。造模成功后随即将小鼠分为模型组,低剂量组,中剂量组和高剂量组,每组 10 只。按《中药药理研究方法学》附表“人和动物间接体表面积折算表”计算出小鼠用量:低

剂量组 8.7 g·kg⁻¹,中剂量组 17.4 g·kg⁻¹,高剂量组 34.8 g·kg⁻¹。灌胃给药,每日 1 次,持续 14 d,模型组使用生理盐水灌胃给药。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 肿瘤体积及抑制率 接种 Lewis 肺癌细胞后 0、3、6、9、12、15、18、21 d 后测量肿瘤最大长径(a)和最小短径(b),按照如下公式进行肿瘤体积计算: $V=ab^2/2$;小鼠死亡后,精密称取肿瘤质量,并计算抑瘤率:抑瘤率=[(对照组平均瘤质量-用药组平均瘤质量)/对照组平均瘤质量]×100%。

1.6.2 生存期 记录小鼠造模后 60 d 内生存时间情况,根据不同处理条件下的生存期绘制生存曲线。

1.6.3 瘤体组织病理观察 新鲜瘤体组织放入 4%多聚甲醛中固定,脱水、透明后进行石蜡包埋,石蜡切片进行 HE 染色,脱水封片后使用光学显微镜进行瘤体图像采集与分析。

1.6.4 TUNEL 法检测肿瘤细胞凋亡 根据 TUNEL 试剂盒说明书进行 TUNEL 分析,即切片在 37 ℃ 恒温箱中与 TUNEL 反应混合物中避光孵育 1 h,随后加入 DAPI 孵育 10 min。在荧光显微镜下观察,并使用 Image J 软件进行分析。

1.6.5 彗星实验检测 DNA 损伤 分离肿瘤组织,收集细胞悬液,调整细胞密度为 10⁶ mL⁻¹。凝胶制片方法参考之前的研究^[10],随后 4 ℃ 裂解细胞 1.5 h。清洗完成后,放入电泳缓冲液中室温解旋 30 min。水平电泳仪中倒入 4 ℃ 预冷的电泳液,将载玻片轻柔浸没其中,按照 1 V·cm⁻¹ 设定电压,在电流 300 mA 条件下电泳 30 min。随后进行中和与染色,载玻片使用荧光显微镜观察,并使用 CASP(Comet Assay Software Project)软件分析。

1.6.6 ELISA 检测肿瘤组织中 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 含量 按照制造商提供的说明使用酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(上海茁彩生物科技有限公司)检测小鼠血清中的抗肿瘤免疫相关因子的水平,包括 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 。

1.6.7 免疫荧光观察肿瘤组织中 CD8⁺T 细胞浸润

上述肿瘤石蜡切片使用 PBS 清洗后,在含有 3% BSA 中孵育 1 h。随后切片与 CD8 抗体(1:80)过夜孵育,PBS 清洗 3 次后,加入荧光二抗室温避光孵育 1 h,使用 DAPI 溶液进行核染。封片后在 Olympus TH4-200 microscope 下,分析免疫荧光图像。

1.6.8 流式细胞术检测细胞免疫指标 给药结束后,收集小鼠外周血,加入上述 FITC 标记的抗

CD8 α 抗体(1:200);PE 标记的抗 CD4 抗体、抗 CD28 抗体、抗 PD1 抗体(1:200);PE 标记的抗小鼠 IFN- γ 抗体(1:200),避光孵育 30 min。随后加入红细胞裂解液室温避光反应 10 min,弃上清,PBS 清洗后,使用流式细胞仪检测,并用 FlowJo 软件分析。

1.6.9 Western blot 检测肿瘤组织中 PD1、CD69、CD28 的表达 将肿瘤组织切碎,匀浆离心后取清液,使用 BCA 蛋白测定试剂盒定量蛋白质浓度。等量蛋白质样品在 8%~12% 的 SDS-PAGE 凝胶上进行电泳,随后电转移到 PVDF 膜上。封闭结束后,将膜与 PD1(1:1 000)、CD69(1:1 000)、CD28(1:1 000)和 GAPDH 抗体(1:1 000)在 4 $^{\circ}$ C 下过夜孵育。然后室温与第二抗体共同孵育 1 h,使用 ImageJ 软件分析蛋白质表达水平,并标准化为 GAPDH。

1.7 统计学分析

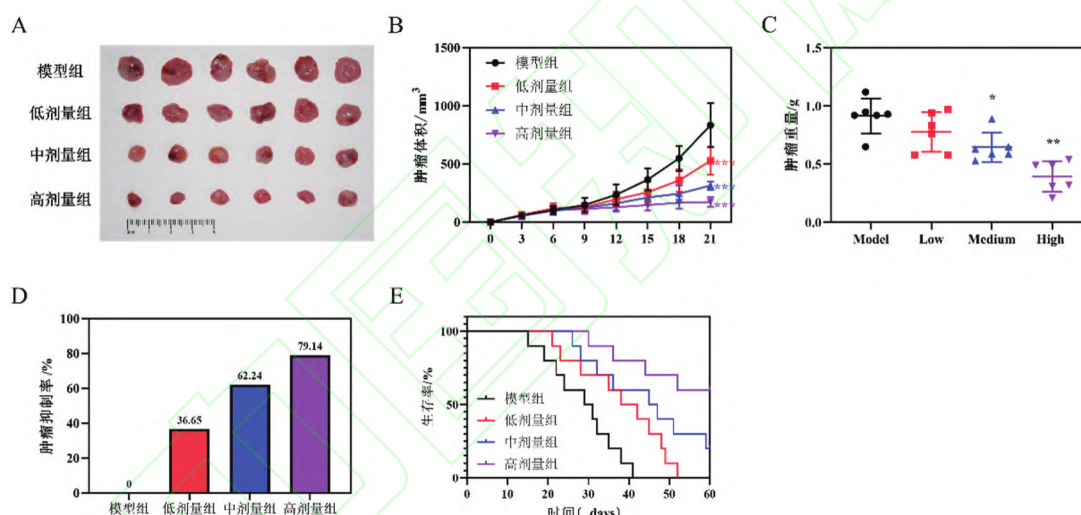
所有数据使用 GraphPad Prism 8.0 进行统计分

析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 的方式显示,使用 One-way ANOVA 进行多重比较, $P < 0.05$ 被认为具有显著差异。

2 结果

2.1 益气养阴解毒方抑制 Lewis 肺癌小鼠肿瘤进展

Lewis 肺癌小鼠实体瘤以及肿瘤体积生长曲线如图 1A、B 所示,21 d 时,与模型组相比,低、中、高剂量益气养阴解毒方处理后,小鼠的肿瘤体积显著下降($P < 0.01$)。此外,与模型组相比,中、高剂量组小鼠的实体瘤重量显著下降,而模型组与低剂量组之间未见显著统计学差异(图 1C)。各组小鼠肿瘤抑制率和生存曲线如图 1D、E 所示,与模型组相比,低、中、高剂量组的抑瘤率分别为 36.65%、62.24%、79.14%,而益气养阴解毒方处理可以延长 Lewis 肺癌小鼠的生存期。



注:A.各组 Lewis 肺癌小鼠实体瘤照片;B.各组 Lewis 肺癌小鼠不同时间段肿瘤体积变化;C.各组 Lewis 肺癌小鼠肿瘤质量;D.不同给药浓度下的肿瘤抑制率;E.各组 Lewis 肺癌小鼠生存曲线图。与模型组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。 $\bar{x} \pm s$, $n = 6$ 。

图 1 益气养阴解毒方对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤进展的影响

Fig. 1 Effect of yiqiyangyin detoxification recipe on tumor progression in Lewis lung cancer mice

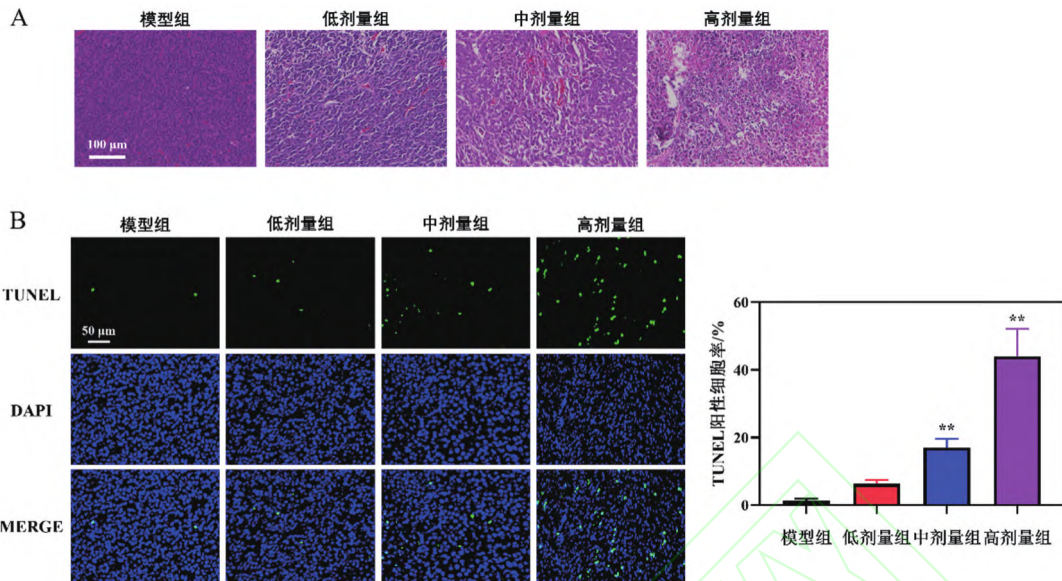
2.2 益气养阴解毒方促进肿瘤细胞凋亡

HE 染色显示,与对照组相比,低、中、高剂量益气养阴解毒方给药组瘤体细胞的增殖被明显抑制,细胞排列不整齐,边界不清晰(图 2A)。经 TUNEL 检测,中、高剂量组 TUNEL 阳性细胞率更高($P < 0.01$),模型组与低剂量组的差异性低于中、高两组,且差异未

见显著性(图 2B, $P < 0.01$)。

2.3 益气养阴解毒方加剧肿瘤细胞 DNA 损伤

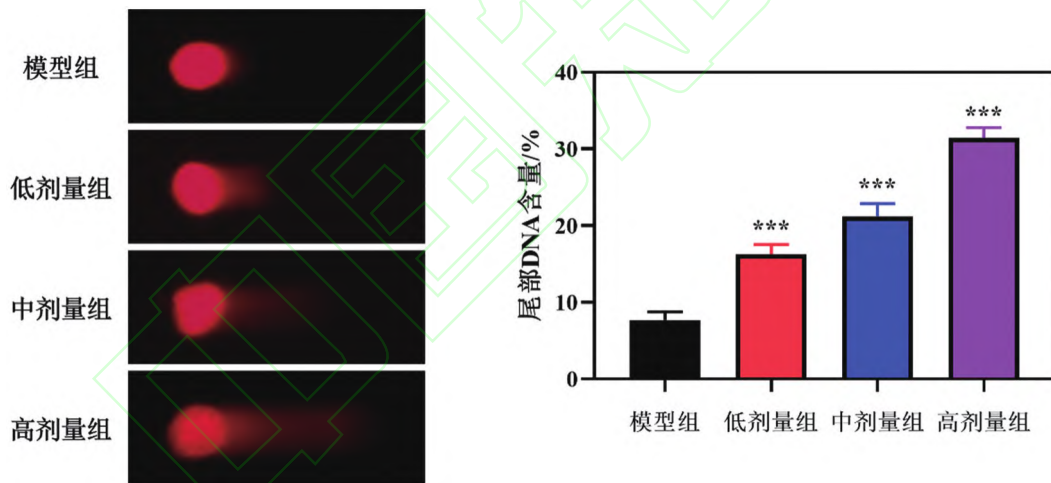
彗星实验结果显示,与模型组相比,低、中、高剂量益气养阴解毒方均可显著加剧肿瘤细胞 DNA 损伤,使彗星尾部 DNA 含量百分比上升,并且表现出剂量依赖性($P < 0.001$)。



注: A. 各组 Lewis 肺癌小鼠肿瘤组织病理学形态 (HE, $\times 100$); B. 各组 Lewis 肺癌小鼠肿瘤组织 TUNEL 检测结果 ($\times 50$)。与模型组相比, $** P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 3$ 。

图 2 益气养阴解毒方对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤组织病理形态及细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effect of yiqiyangyin detoxification recipe on pathological morphology and cell apoptosis of Lewis lung cancer mice



注: 与模型组相比, $*** P < 0.001$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 6$ 。

图 3 益气养阴解毒方加剧肿瘤细胞 DNA 损伤

Fig. 3 The DNA damage of tumor cells was aggravated by yiqiyangyin detoxification recipe

2.4 益气养阴解毒方促进抗肿瘤免疫相关因子的表达

采用 ELISA 检测各组小鼠血清中 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 的水平,结果显示,与模型组相比,低、中、高剂量组 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 的水平呈显著上升趋势。

2.5 益气养阴解毒方可促进 CD8⁺T 细胞浸润及 CD4⁺/CD8⁺T 细胞比率

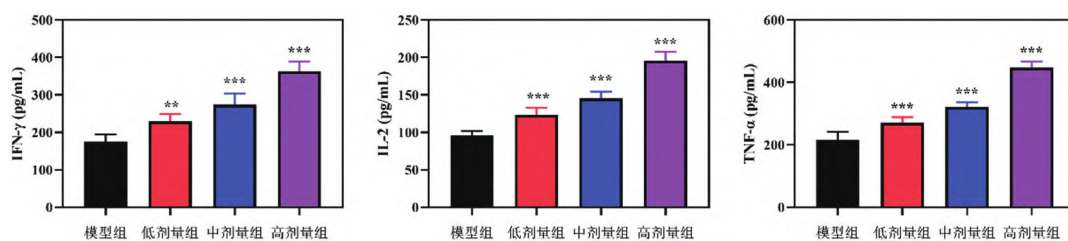
免疫荧光结果如图 5A 所示,益气养阴解毒方可显著促进肿瘤组织中 CD8⁺T 细胞的表达 ($P < 0.$

01)。流式结果证实了,与模型组相比,血清中 CD4⁺/CD8⁺T 细胞比率显著上升(图 5B, $P < 0.01$)。

2.6 益气养阴解毒方调节免疫信号

PD-1 介导免疫抑制信号,CD69 和 CD28 分别是 T 细胞活化和耗竭的标志物。WB 结果显示,益气养阴解毒方显著抑制了 PD-1 的表达,并促进了 CD69 和 CD28 的表达(图 6A)。流式结果表明,与模型组相比,益气养阴解毒方降低了 PD-1⁺细胞占比,低、中、高剂量组的 IFN- γ ⁺、CD28⁺占比均高于模

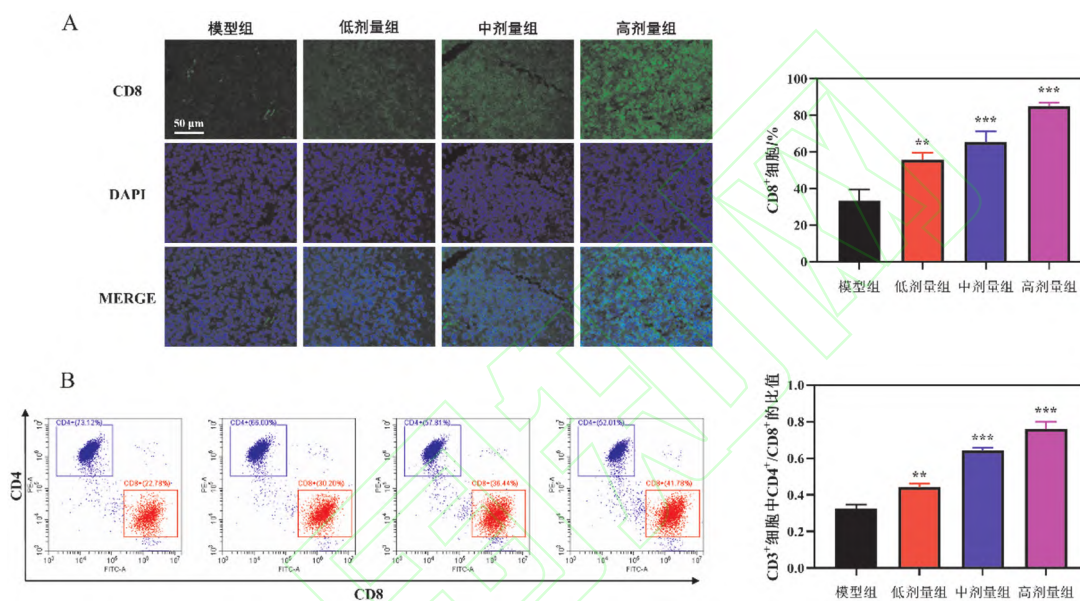
型组(图 6B)。



注:与模型组相比,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 6$ 。

图 4 各种血清中 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 水平

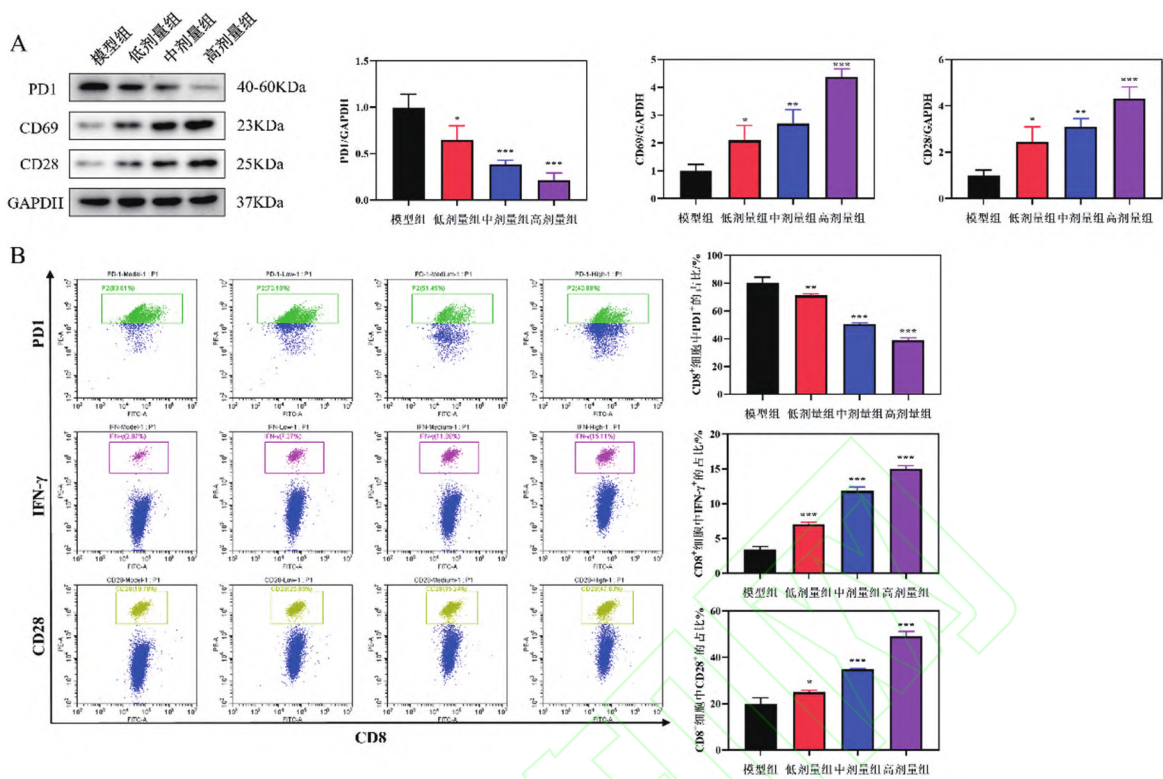
Fig. 4 Serum levels of IFN- γ , IL-2 and TNF- α



注:A.各组 Lewis 肺癌小鼠肿瘤组织中 CD8⁺T 细胞的表达(免疫荧光,×50);B.益气养阴解毒方对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤微环境中 CD4⁺/CD8⁺T 细胞比率的影响。与模型组相比,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 3$ 。

图 5 益气养阴解毒方对 CD8⁺T 细胞及 CD4⁺/CD8⁺T 细胞比率的影响

Fig. 5 Effects of yiqiyangyin detoxification recipe on CD8⁺T cells and CD4⁺/CD8⁺T cell ratio



注:A.各组 Lewis 肺癌小鼠 PD1、CD69、CD28 的免疫印迹;B.各组 Lewis 肺癌小鼠 PD1、IFN-γ、CD28 的阳性细胞占比。
与模型组相比,* P<0.05,** P<0.01,*** P<0.001。 $\bar{x} \pm s, n=3$ 。

图 6 益气养阴解毒方对 Lewis 肺癌小鼠免疫信号的影响

Fig. 6 Effect of yiqiyangyin detoxification recipe on immune signal of Lewis lung cancer mice

3 讨论

气阴两虚是肺癌的主要证型,益气养阴解毒方临床上常用于治疗肺癌^[11],通过益气扶正达到“养正积自消”的目的,其抗癌机制与免疫功能的调节密切相关^[12]。本研究构建了 Lewis 肺癌模型,实验分为模型组,低、中、高剂量组,结果显示益气养阴解毒方的抗癌作用与剂量正相关,其抗肿瘤作用体现在促进肿瘤细胞凋亡,加剧肿瘤细胞 DNA 损伤等方面,这些现象在黄芪多糖的抗肿瘤作用机制研究中同样被证实^[13]。

在癌症免疫周期中,IFN-γ, TNF-α 和 IL-2, CD28 分别是癌症抗原呈递和效应 T 细胞启动和激活的正向调节剂^[14]。考虑到益气养阴解毒方的免疫调节功能,我们使用 ELISA 检测了 Lewis 肺癌模型小鼠血清中 IFN-γ, TNF-α 和 IL-2 的表达,与预期结果一致,益气养阴解毒方显著增加了 IFN-γ, TNF-α 和 IL-2 等抗肿瘤免疫相关因子的表达。CD4⁺, CD8⁺T 细胞作为 T 淋巴细胞的主要亚群,其比值直接反映了机体的免疫状态^[15],流式结果显示 CD4⁺/CD8⁺T 细胞比率上升提示机体免疫功能上升。这些

结果再次验证了益气养阴解毒方的抗肿瘤作用与免疫调节功能有关。

PD-1 及其配体 PD-L1 是目前研究最广的一对免疫检查点,二者结合后负向调控 IL-2 的生成和炎症因子的产生,抑制 T 细胞的增殖与活化,引起 T 细胞耗竭,从而导致肿瘤免疫逃逸^[16-17]。目前,抗 PD-1 或抗 PD-L1 免疫疗法作为非小细胞肺癌的新型疗法^[18],已经彻底改变了非小细胞肺癌患者的治疗格局,带来了长期的生存获益^[19-20]。临床研究表明,抗 PD-1/PD-L1 免疫治疗的关键特征是肿瘤和免疫细胞表达 PD-L1 以及免疫细胞浸润^[21],抗 PD-1/PD-L1 免疫疗法主要通过阻断抑制性淋巴细胞受体 PD-1 发挥作用^[22]。我们的研究证实,益气养阴解毒方抑制了肿瘤和免疫细胞中 PD-1 的表达,并促进了肿瘤组织中 CD8⁺T 细胞的浸润。之前的研究表明,PD-1 阻断后挽救 CD8⁺T 细胞的耗竭需要 CD28 的存在^[23],肿瘤组织中观察到的 CD69 和 CD28 表达水平的上升,表明益气养阴解毒方促进了 T 细胞的活化并挽救了 T 细胞耗竭。

综上所述,益气养阴解毒方通过增强 Lewis 肺

癌小鼠的免疫功能发挥抗肿瘤作用,其作用机制可能与 PD-1 信号抑制有关。

参考文献:

- [1] CAO W, CHEN H D, YU Y W, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: A secondary analysis of the global cancer statistics 2020[J]. Chin Med J, 2021, 134(7): 783-791.
- [2] CHAE Y K, PAN A L, DAVIS A A, et al. Recent advances and future strategies for immune-checkpoint inhibition in small-cell lung cancer[J]. Clin Lung Cancer, 2017, 18(2): 132-140.
- [3] WANG X, MA K W, CHI L M, et al. Combining telomerase reverse transcriptase genetic variant rs2736100 with epidemiologic factors in the prediction of lung cancer susceptibility[J]. J Cancer, 2016, 7(7): 846-853.
- [4] PENG J Z, YU Z G, XUE L, et al. The effect of foxp3-overexpressing Treg cells on non-small cell lung cancer cells [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(4): 5860-5868.
- [5] PAZ-ARES L, LUFT A, VICENTE D, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer [J]. N Engl J Med, 2018, 379(21): 2040-2051.
- [6] SUZUKI M, MATSUDA T, NAKAJIMA K, et al. PD1 blockade alters cell-cycle distribution and affects 3'-deoxy-3'-[¹⁸F]fluorothymidine uptake in a mouse CT26 tumor model[J]. Ann Nucl Med, 2022, 36(11): 931-940.
- [7] SHARPE A H, WHERRY E J, AHMED R, et al. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection[J]. Nat Immunol, 2007, 8(3): 239-245.
- [8] WANG W S, LAU R, YU D H, et al. PD1 blockade reverses the suppression of melanoma antigen-specific CTL by CD4⁺CD25^(Hi) regulatory T cells[J]. Int Immunol, 2009, 21(9): 1065-1077.
- [9] 陆雁, 王芹, 苏羚子, 等. 中医益气养阴解毒方案联合安罗替尼治疗晚期非小细胞肺癌的疗效与安全性分析[J]. 上海中医药杂志, 2022, 56(8): 54-58.
LU Y, WANG Q, SU L Z, et al. Efficacy and safety of Yiqi Yangyin Jiedu regimen plus anlotinib in the treatment of advanced non-small cell lung cancer[J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2022, 56(8): 54-58.
- [10] 武彦彤, 刘习平, 范玉洁, 等. 维生素 E 对藜芦生物碱引起的小鼠脑神经 DNA 损伤的干预作用[J]. 河南大学学报(医学版), 2018, 37(1): 14-17.
WU Y T, LIU X P, FAN Y J, et al. The intervention effect of vitamin E on DNA damage of brain nerve induced by *Veratrum* alkaloid in mice[J]. J Henan Univ Med Sci, 2018, 37(1): 14-17.
- [11] 蒙家泉, 焦丽静, 姚嘉麟, 等. 益气养阴解毒方联合埃克替尼治疗老年晚期 EGFR 突变肺腺癌的临床研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2022, 31(7): 877-881, 1004.
MENG J Q, JIAO L J, YAO J L, et al. Clinical study on Yiqi Yangyin Jiedu Decoction combined with icotinib in the treatment of elderly patients with advanced EGFR-mutant lung adenocarcinoma [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2022, 31(7): 877-881, 1004.
- [12] 刘嘉湘, 施志明, 李和根, 等. 益肺抗癌饮治疗 271 例非小细胞肺癌临床观察 [C]//中医药优秀论文选(下), 2009: 498-501.
LIU J X, SHI Z M, LI H G, et al. Clinical observation of Yifei Kangyuyin treating 271 cases of non-small cell lung cancer [C]// Selected Chinese Medicine Outstanding Papers (Part 2), 2009: 498-501.
- [13] 李津津, 杨金颖, 孙芳芳, 等. 黄芪多糖对 Lewis 荷瘤小鼠 PD-1/PD-L1 表达的影响[J]. 天津药学, 2022, 34(5): 9-13, 37.
LI J J, YANG J Y, SUN F F, et al. Regulatory effects of astragalus polysaccharides on PD-1/PD-L1 expression in Lewis tumor-bearing mouse model[J]. Tianjin Pharm, 2022, 34(5): 9-13, 37.
- [14] CHEN D S, MELLMAN I. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle[J]. Immunity, 2013, 39(1): 1-10.
- [15] DEGHANI M, SHARIFPOUR S, AMIRGHOFRAN Z, et al. Prognostic significance of T cell subsets in peripheral blood of B cell non-Hodgkin's lymphoma patients[J]. Med Oncol, 2012, 29(4): 2364-2371.
- [16] HU J X, HE H, YANG Z G, et al. Programmed death ligand-1 on microglia regulates Th1 differentiation via nitric oxide in experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. Neurosci Bull, 2016, 32(1): 70-82.
- [17] TOPALIAN S L, DRAKE C G, PARDOLL D M. Targeting the PD-1/B7-H1 (PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity [J]. Curr Opin Immunol, 2012, 24(2): 207-212.
- [18] DANTOING E, PITON N, SALAÜN M, et al. Anti-PD1/PD-L1 immunotherapy for non-small cell lung cancer with actionable oncogenic driver mutations[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(12): 6288.
- [19] KANG J, ZHANG C, ZHONG W Z. Neoadjuvant immunotherapy for non-small cell lung cancer: State of the art[J]. Cancer Commun, 2021, 41(4): 287-302.
- [20] YIN L M, XUE J X, LI R, et al. Effect of low-dose radiation therapy on abscopal responses to hypofractionated radiation therapy and anti-PD1 in mice and patients with non-small cell lung cancer [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2020, 108(1): 212-224.
- [21] BYLICKI O, PALEIRON N, MARGERY J, et al. Targeting the PD-1/PD-L1 immune checkpoint in EGFR-mutated or ALK-translocated non-small-cell lung cancer [J]. Target Oncol, 2017, 12(5): 563-569.
- [22] RIBAS A. Tumor immunotherapy directed at PD-1 [J]. N Engl J Med, 2012, 366(26): 2517-2519.
- [23] KAMPHORST A O, WIELAND A, NASTI T, et al. Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent [J]. Science, 2017, 355(6332): 1423-1427.

(编辑:董宇)