

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2023.11.004

· 基础研究 ·

基于“正虚伏毒”理论探讨金复康有效组分调控NK细胞功能抑制Lewis肺癌细胞的转移

于盼^a, 田建辉^{ab}, 陆鑫熠^a, 罗斌^a, 阙祖俊^b (上海市中医医院暨上海中医药大学附属中医医院 a. 肿瘤临床医学中心; b. 肿瘤研究所, 上海 200071)

[摘要] **目的:** 基于“正虚伏毒”理论, 探讨金复康中有效的“扶正”和“解毒”组分黄芪甲苷IV联合重楼皂苷VII抑制Lewis肺癌细胞转移的免疫学机制。**方法:** C57BL/6J小鼠尾静脉注射Lewis细胞建立肺癌转移动物模型, 将小鼠按随机表法随机分为治疗组和对照组(每组8只), 治疗组采用金复康有效组分黄芪甲苷IV(25 mg/kg)联合重楼皂苷VII(2.5 mg/kg)进行干预, 4周后观察小鼠肺和肝转移情况, H-E染色观察肺和肝转移灶病理组织变化, 流式细胞术检测外周血和脾组织中NK细胞的比例, ELISA法检测血清中TNF- α 、IFN- γ 水平, 免疫组化法检测转移灶组织中Ki-67蛋白的表达水平, 免疫荧光法检测转移灶组织中NK细胞的浸润和IFN- γ 分泌水平。免疫磁珠法分选健康小鼠脾内的NK细胞, 然后与黄芪甲苷IV(5 μ mol/L)、重楼皂苷VII(0.5 μ mol/L)及两药联合干预后的Lewis细胞共培养, 流式细胞术检测共培养后NK细胞的脱颗粒水平, LDH法检测NK细胞对Lewis细胞的杀伤活性。**结果:** 与对照组相比, 经黄芪甲苷IV联合重楼皂苷VII干预后的小鼠肺转移和肝转移灶的数目明显减少(均 $P<0.05$), 且转移负荷也显著降低(均 $P<0.05$); 转移灶中Ki-67蛋白的表达水平显著降低($P<0.05$), 转移灶组织中NK细胞的浸润水平显著增加, 且IFN- γ 从NK细胞的胞内释放至胞外。此外, 模型小鼠脾组织中的NK细胞比例显著降低($P<0.05$)而外周血中的NK细胞水平却显著升高($P<0.05$), 小鼠血清中IFN- γ 的水平显著减少而TNF- α 的水平却显著升高(均 $P<0.05$)。体外研究发现, 黄芪甲苷IV和重楼皂苷VII单药或联合干预后, NK细胞的脱颗粒水平显著增加($P<0.05$), 但并未提高NK细胞对Lewis细胞的杀伤活性($P>0.05$)。**结论:** 金复康中的有效组分黄芪甲苷IV联合重楼皂苷VII可通过促进NK细胞浸润到肿瘤组织内和增强IFN- γ 分泌以抑制Lewis肺癌细胞的肺转移和肝转移, 研究结果为“正虚伏毒”理论提供了科学依据。

[关键词] 肺癌; Lewis细胞; 金复康; 正虚伏毒; 转移; NK细胞; 重楼皂苷VII; 黄芪甲苷IV

[中图分类号] R734.2; R228; R730.52 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)11-0957-08

Study on the effective components of Jinfukang in regulating the function of NK cells and inhibiting the metastasis of lung cancer Lewis cells based on "Deficiency of Vital Qi and Hidden Toxin" theory

YU Pan^a, TIAN Jianhui^{a,b}, LU Xinyi^a, LUO Bin^a, QUE Zujun^b (a. Cancer Clinical Medical Center; b. Institute of Oncology, Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200071, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the immunological mechanism of the effective components in Jinfukang, astragaloside IV and paris saponins VII, in inhibiting lung cancer Lewis cells metastasis based on the theory of "Deficiency of Vital Qi and Hidden Toxin". **Methods:** The animal model of lung cancer metastasis was established by injecting Lewis cells into the tail vein of C57BL/6J mice. The model mice were randomly divided into a treatment group and a control group according to the random table method, 8 mice per group. The treatment group was intervened with Jinfukang effective components, astragaloside IV (25 mg/kg) and with paris saponins VII (2.5 mg/kg). Four weeks later, the lung and liver metastases were observed. The histopathological changes of lung and liver metastatic foci were observed by H-E staining. The proportions of NK cells in peripheral blood and spleen tissues were detected by flow cytometry. The levels of TNF- α and IFN- γ in serum were detected by ELISA. The protein expression of Ki-67 in the metastatic foci was detected by immunohistochemical method, and the infiltration of NK cells and the secretion of IFN- γ in the metastatic foci were detected by immunofluorescence. The NK cells in the spleen of healthy mice were separated by immunomagnetic beads and co-cultured with astragaloside IV (5 μ mol/L), paris saponins VII (0.5 μ mol/L), and Lewis cells that intervened by both drugs. The

[基金项目] 国家自然科学基金项目(No. 81973517, No. 82174245, No. 8214943, No. 82174017); 上海市卫生健康委领军人才基金(No. 2022LJ014); 上海市中医医院未来计划科技发展基金项目(No. WL-HBRC-2021001K); 上海市进一步加快中医传承创新发展三年行动计划[No. ZY(2021-2023)-0211]

[作者简介] 于盼(1996—), 女, 博士生, 主要从事中医药防治肺癌的基础与临床研究。E-mail: tcm_yp@163.com

[通信作者] 田建辉, E-mail: tjhhawk@shutcm.edu.cn

degranulation level of NK cells was detected by flow cytometry, and the killing activity of NK cells against Lewis cells was detected by LDH method. **Results:** Compared with the control group, the number and load of lung and liver metastases were significantly decreased (both $P<0.05$). The transfer load is also significantly reduced (both $P<0.05$), and the expression of Ki-67 protein in the metastatic foci was significantly reduced ($P<0.05$) in the mice treated with astragaloside IV and paris saponins VII; the infiltration level of NK cells in metastatic tumor tissue was significantly increased, and IFN- γ was released from intracellular to extracellular of NK cells. In addition, the proportion of NK cells in spleen decreased significantly ($P<0.05$), while the level of NK cells in peripheral blood increased significantly ($P<0.05$). The level of IFN- γ in serum of mice decreased significantly ($P<0.05$), while the level of TNF- α increased significantly (all $P<0.05$). *In vitro* study found that the degranulation level of NK cells increased significantly ($P<0.05$) after single or combined intervention of astragaloside IV and paris saponins VII, which, however, had no significant effect on the killing activity of NK cells against Lewis cells ($P>0.05$). **Conclusion:** The combined use of astragaloside IV and paris saponins VII, the effective components of Jinfukang, can promote the infiltration of NK cells into tumor tissues and increase the secretion of IFN- γ to inhibit the lung and liver metastasis of Lewis cells, provides a convincing experimental case for the "Deficiency of Vital Qi and Hidden Toxin" theory.

[Key words] lung cancer; Lewis cell; Jinfukang; Deficiency of Vital Qi and Hidden Toxin; metastasis; NK cell; paris saponins VII; astragaloside IV

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(11): 957-964. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.11.004]

最新流行病学数据显示,由肺癌导致的新发死亡病例数在恶性肿瘤中居于首位^[1],而转移是导致肺癌患者死亡的关键临床环节^[2]。肺癌早期术后患者由于影像学无法检出肿瘤病灶,临床评估为已治愈,然而在其外周血中依然存在术前从原发灶脱落的循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)^[3],这些 CTC 到达转移靶器官后即成为播散肿瘤细胞(disseminated tumor cell, DTC)^[4]。DTC 在靶器官免疫微环境的抑制作用下处于休眠状态,当免疫平衡被打破时, DTC 将迅速增殖形成转移灶^[5]。针对肺癌转移的亚临床阶段,田建辉教授^[6-7]提出“正虚伏毒”核心病机理论,其中“正虚”主要指免疫衰老、免疫逃逸等机体免疫功能紊乱,“伏毒”则包括 CTC、DTC、肿瘤干细胞、休眠肿瘤细胞等,该学说认为转移是“正虚”与“伏毒”动态博弈的过程,正盛则伏而不作,正虚则出而为病。金复康口服液具有益气养阴、清热解毒的功效,可有效改善肺癌患者的免疫功能,提高生存质量,延长晚期肺癌患者生存期,以及预防复发和转移^[8]。黄芪甲苷 IV 是该方中扶正代表药黄芪的有效活性成分,重楼皂苷 VII 是解毒代表药重楼的有效活性成分。NK 细胞作为固有免疫中的主要效应细胞,具有直接杀伤肿瘤或诱导肿瘤细胞休眠的作用^[9]。本研究基于“正虚伏毒”理论,探讨扶正治癌中药金复康中的有效组分(扶正代表药黄芪甲苷 IV 和解毒代表药重楼皂苷 VII),通过调控 NK 细胞抑制 Lewis 肺癌细胞转移的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养、实验动物及主要试剂

细胞及其培养:小鼠 Lewis 肺癌细胞购自中国科

学院细胞库,在含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素溶液的 DMEM 培养基中,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。

实验动物:C57BL/6J 小鼠,雄性,5 周龄,购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司[实验动物使用许可证号:SCXK(苏)2018-0008],饲养于上海市中医医院动物实验中心[实验单位使用许可证号:SYXK(沪)2020-0014]。本研究设计方案经上海市中医医院动物实验伦理及福利委员会批准(伦理号 2021038)。

药物与主要试剂:黄芪甲苷 IV(货号 PS1279,粉末,纯度 98.0%)采用 DMSO 溶解成 500 mg/mL 的母液,重楼皂苷 VII(货号 PU0811,粉末,纯度 98.5%)采用 DMSO 溶解成 50 mg/mL 的母液,均购自成都普思生物科技股份有限公司。Bouin's 固定液(货号 HT101128)购自美国 SIGMA 公司,PE/Cyanine7 抗小鼠 CD3 抗体(货号 100220)、APC 抗小鼠 NK1.1 抗体(货号 108710)、PE 抗小鼠 CD107a 抗体(货号 121611)购自美国 Biolegend 公司,红细胞裂解液(货号 6208846)购自美国 BD 公司,小鼠 TNF- α ELISA 试剂盒、小鼠 IFN- γ ELISA 试剂盒购自上海源桔生物科技有限公司。小鼠脾组织淋巴细胞分离液(货号 LTS1092PK)购自天津灏洋生物公司,NK 细胞阴性分选磁珠(货号 130-115-818)购自德国 Miltenyi 公司,重组鼠 IL-2(货号 212-12)购自美国 PeproTech 公司,乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性检测试剂盒(货号 C0017)购自上海碧云天公司,Ki-67 抗体(货号 AF0198)、羊抗兔 IgG HRP(货号 S0001)购自美国 Affinity 公司,NK1.1 抗体(PK136)(货号 14-5941-82)购自美国 Invitrogen 公司,小鼠 IFN- γ 抗体(货号 AF-585-NA)购自美国 R&D 公司。

1.2 小鼠肺癌转移模型的建立和给药剂量

将对数生长期的Lewis肺癌细胞消化离心后,用生理盐水重悬,并将细胞密度调整为 5×10^6 个/mL,小鼠适应性饲养1周后经尾静脉注射0.1 mL细胞悬液,建立小鼠肺癌转移模型。共注射16只小鼠,按随时数字表法将小鼠分为对照组和治疗组,每组各8只。1 d后对两组小鼠注射药物干预,治疗组每周腹腔注射给药3次,每次0.2 mL,共给药4周。给药方案为重楼皂苷VII(2.5 mg/kg)+黄芪甲苷IV(25 mg/kg),对照组腹腔注射等量生理盐水。注射Lewis细胞4周后取材,可见肺表面存在转移结节,采用H-E法鉴定转移成瘤的病理学特征,确定成瘤。鉴定结果显示对照组6只小鼠成瘤,治疗组2只小鼠成瘤。

1.3 模型小鼠脾指数计算及肺、肝表面转移灶的检测

将模型小鼠置于二氧化碳麻醉箱中处死。称量小鼠体质量,取出小鼠脾器官并称质量,脾指数=脾质量(mg)/小鼠体质量(g)。取出小鼠双肺及肝,经生理盐水漂洗后置于Bouin's固定液中浸泡4 h,然后置于4%多聚甲醛中固定24 h,采用相机拍摄肺和肝图像,器官表面圆形或类圆形凸起样结节为转移灶。小鼠肺和肝经4%多聚甲醛固定,进行常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片,H-E染色后脱水封片,显微镜下观察并采集图像,将细胞核大深染、相互重叠、排列密集紊乱、呈弥漫性生长的确定为转移灶。转移负荷=转移灶面积/器官总面积 $\times 100\%$ 。

1.4 流式细胞术检测模型小鼠外周血和脾组织中NK细胞比例

每只模型小鼠摘眼球取100 μ L抗凝血,脾组织研磨后经70 μ m孔径的细胞滤网过滤,离心、弃上清液,用2 mL PBS洗涤2遍。在抗凝血和脾组织细胞悬液中分别加入10 μ L含10% BSA的PBS封闭10 min,加入CD3和NK1.1抗体,室温避光反应15 min,加入1 mL红细胞裂解液室温下裂解8 min,350 $\times$ g离心4 min,弃上清液,用2 mL PBS洗涤2遍,加入300 μ L含1% BSA的PBS重悬,采用流式细胞仪检测NK细胞比例。

1.5 ELISA法检测模型小鼠血清中TNF- α 、IFN- γ

取模型小鼠全血,经4 $^{\circ}$ C、800 $\times$ g离心10 min后收集血清,采用小鼠TNF- α 和IFN- γ 检测试剂盒分析血清中的TNF- α 和IFN- γ 水平。

1.6 流式细胞术检测药物干预对正常小鼠脾组织中NK细胞脱颗粒水平的影响

分离健康小鼠脾组织中淋巴细胞,用免疫磁珠分选NK细胞。采用重楼皂苷VII(0.5 μ mol/L)和黄芪甲苷IV单药(5 μ mol/L)及两药联合分别干预小

鼠Lewis细胞,然后与NK细胞共培养,同时加入CD107a抗体共培养4 h。收集细胞,分别加入CD3、NK1.1抗体,室温避光反应15 min,PBS洗涤2遍,采用流式细胞仪检测各组共培养体系中NK细胞的脱颗粒水平。

1.7 LDH法检测药物干预对正常小鼠NK细胞Lewis肺癌细胞的杀伤活性的影响

分别用不同剂量重楼皂苷VII(0、50、100、200、400 nmol/L)干预小鼠Lewis细胞,然后与正常小鼠NK细胞共培养24 h。采用LDH试剂盒检测共培养上清中LDH的水平,以评估NK细胞对Lewis肺癌细胞的杀伤活性。

1.8 免疫组织化学法检测转移灶组织中Ki-67蛋白的表达水平

经石蜡包埋的转移组织标本进行切片、抗原修复,BSA阻滞后用Ki-67抗体4 $^{\circ}$ C下处理过夜,加二抗处理后经DAB显色,苏木精复染,中性树胶封片,显微镜下观察并采集图像。采用Image J软件分别对图片中所有细胞和Ki-67阳性细胞计数,Ki-67阳性细胞比例=Ki-67阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.9 免疫荧光染色法检测转移灶中NK细胞的浸润和IFN- γ 释放的水平

经石蜡包埋的组织标本进行切片、抗原修复,BSA阻滞后用NK1.1和IFN- γ 抗体4 $^{\circ}$ C下处理过夜,加荧光二抗处理后加入DAPI避光处理,脱色洗涤后用抗荧光淬灭封片剂封片,荧光显微镜下观察并采集图像。

1.10 统计学处理

上述实验均独立重复3次。本研究中流式细胞术数据应用Flowjo V10软件分析,H-E染色、免疫组化染色图像应用K-Viewer软件分析,其余数据应用GraphPad Prism8软件统计分析。呈正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用独立样本 t 检验;多组比较采用单因素方差分析,多组中两两间比较采用LSD- t 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芪甲苷IV联合重楼皂苷VII可有效抑制Lewis肺癌细胞在模型小鼠中的肝和肺转移

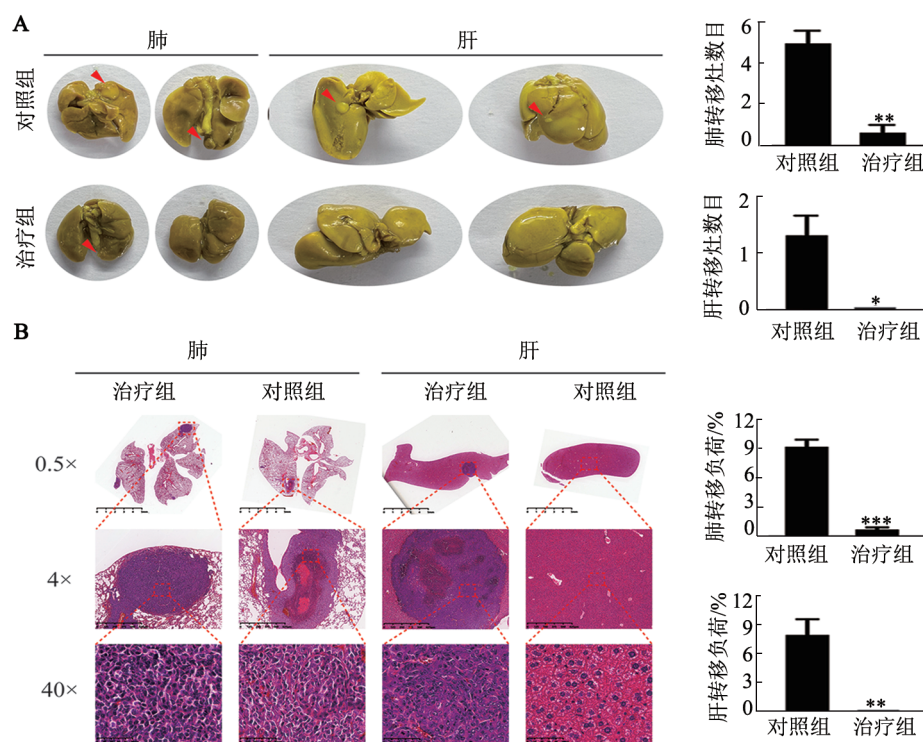
结果显示(图1A),对照组小鼠肺和肝表面存在明显的转移灶,治疗组少数肺表面存在转移灶,肝表面未见转移灶。H-E染色结果(图1B)显示,与对照组相比,治疗组肺转移灶数目显著减少($P < 0.001$),两器官的肿瘤转移负荷显著降低($P < 0.01$)。对照组肝中存在转移灶,而治疗组中未观察到肝转移灶。上

述实验结果表明,黄芪甲苷IV联合重楼皂苷VII可有效抑制Lewis细胞的肺转移和肝转移。

2.2 黄芪甲苷IV联合重楼皂苷VII可将模型小鼠脾组织中的NK细胞动员至外周血

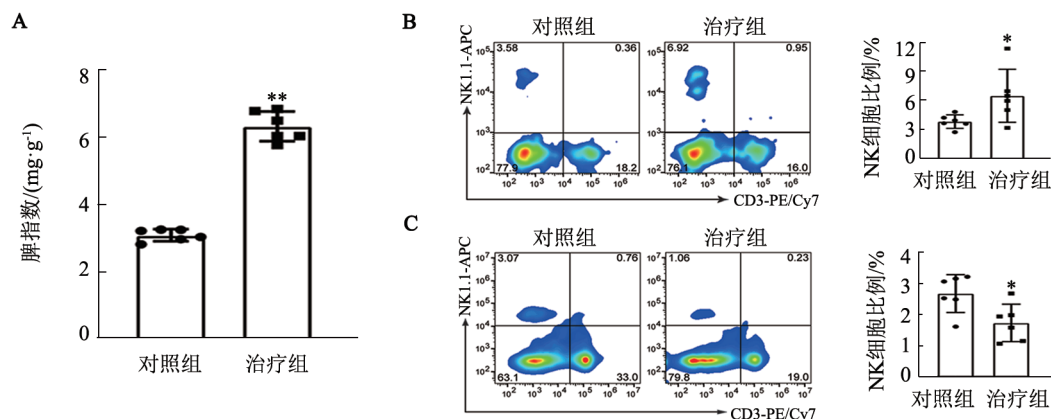
与对照组相比,治疗组脾指数显著升高($P<0.01$,图2A)。流式细胞术检测结果显示,与对照组相比,

治疗组外周血中NK细胞的比例显著升高($P<0.05$,图2B),而脾中NK细胞的比例显著降低($P<0.05$,图2C)。实验结果表明,黄芪甲苷IV联合重楼皂苷VII可调控肺癌转移模型小鼠的免疫功能,将其脾组织中的NK细胞动员至外周血。



与治疗组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图1 模型小鼠肺、肝转移灶(A)和及其组织的H-E染色(B)分析



与治疗组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图2 模型小鼠脾指数(A)和外周血(B)及脾组织(C)中NK细胞比例变化

2.3 黄芪甲苷IV联合重楼皂苷VII调控模型小鼠外周血中TNF- α 与IFN- γ 水平

ELISA结果显示,与对照组相比,治疗组小鼠血清中的TNF- α 水平显著升高($P<0.05$,图3A),而IFN- γ 的水平显著降低($P<0.05$,图3B)。实验结果提

示,黄芪甲苷IV联合重楼皂苷VII可能对模型小鼠外周血中TNF- α 与IFN- γ 水平具有调控作用。

2.4 黄芪甲苷IV联合重楼皂苷VII对NK细胞的体外杀伤活性无影响

为了进一步研究黄芪甲苷IV联合重楼皂苷VII对

NK细胞功能的调控作用,采用流式细胞术和LDH检测试剂盒,评估NK细胞对肿瘤细胞的杀伤作用。研究发现与对照组相比,重楼皂苷VII组(0.5 $\mu\text{mol/L}$)和黄芪甲苷IV组(5 $\mu\text{mol/L}$)及两药联合组的NK细胞脱颗粒水平明显增加(图4A),然而与重楼皂苷VII单药组相比,两药联合组的NK细胞脱颗粒水平显著下降($P<0.05$,图4B)。因此,选用不同药物浓度的重楼皂苷VII干预Lewis细胞后,再与小鼠脾NK细胞进行共培养,效靶比分别为1:1和2:1。LDH检测结果(图4C)显示,与效靶比1:1组相比,效靶比2:1组的NK细胞杀伤能力显著增强($P<0.01$),提示小鼠脾脏来源的NK细胞杀伤活性正常;而与对照组相比,不同药物浓度的重楼皂苷VII组的NK细胞杀伤活性无显著差异($P>0.05$)。实验结果表明,重楼皂苷VII和黄芪甲苷IV在体外可促进NK细胞的脱颗粒,然而对其自身杀伤活性无显著调控作用。

2.5 黄芪甲苷IV联合重楼皂苷VII通过促进NK细胞释放IFN- γ 以诱导DTC休眠进而抑制肺癌转移

模型小鼠转移灶组织免疫组化结果显示,与对照组相比,治疗组肺转移灶中Ki-67蛋白的表达水平

显著降低(图5A)。对照组肝转移灶中Ki-67蛋白高表达,而治疗组无明显的肝转移灶,肝组织中未见Ki-67的表达(图5A)。模型小鼠转移灶组织免疫荧光染色结果(图5B)显示,与对照组相比,治疗组肺转移灶中NK细胞的浸润水平显著增加,IFN- γ 的表达水平也增加,且IFN- γ 从NK细胞的胞内释放至胞外。上述实验结果表明,黄芪甲苷IV联合重楼皂苷VII可通过促进NK细胞释放IFN- γ 诱导播散肿瘤细胞休眠从而抑制肺癌的转移。

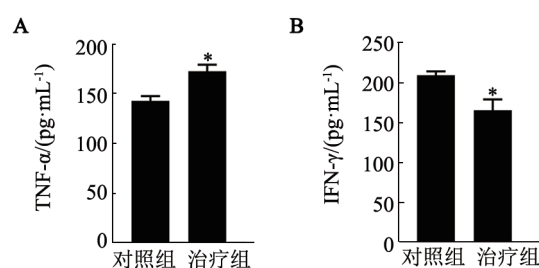
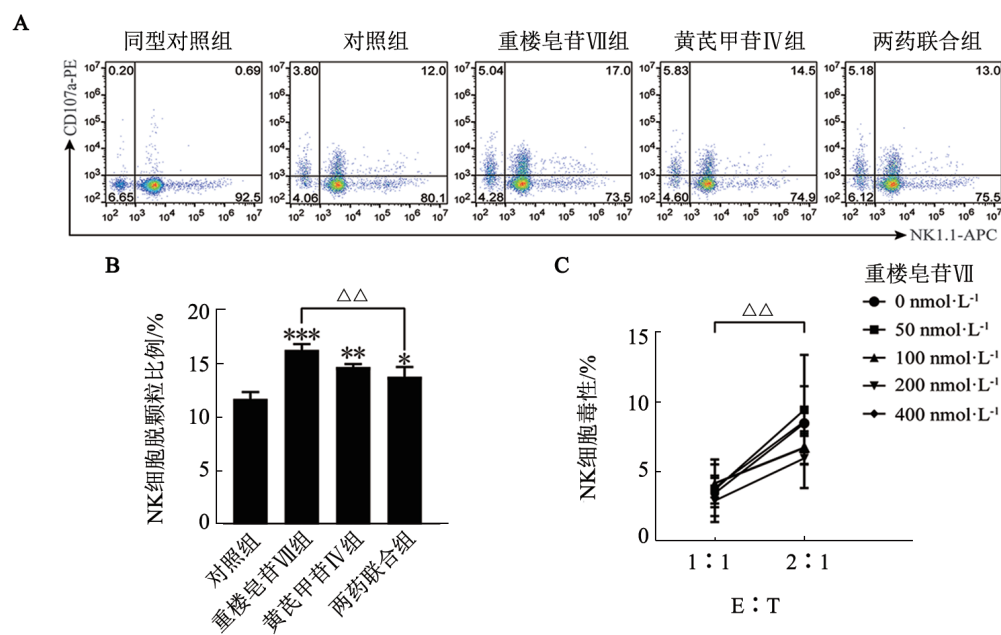


图3 黄芪甲苷IV联合重楼皂苷VII对模型小鼠血清中TNF- α (A)和IFN- γ (B)水平的影响



A、B: NK细胞脱颗粒水平; C: NK细胞杀伤活性。与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; $\Delta\Delta P<0.01$ 。

图4 黄芪甲苷IV联合重楼皂苷VII对正常小鼠脾组织中NK细胞有显著脱颗粒作用而对NK细胞的杀伤能力无调控作用

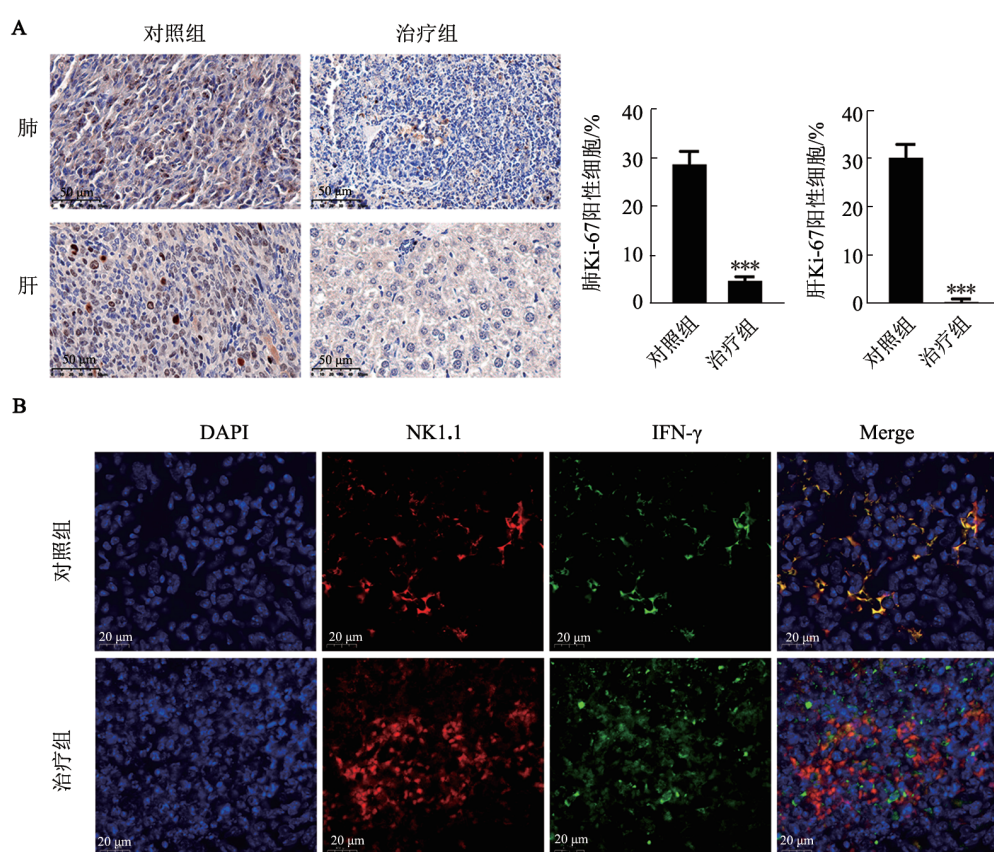
3 讨论

远处转移是制约肺癌疗效提高的关键临床事件,传统的化疗疗效已达到瓶颈。自2015年以来,免疫检查点抑制剂陆续获批肺癌适应证,免疫治疗的出现改变了肺癌的临床治疗格局^[10]。免疫治疗单药如纳武利尤单抗(nivolumab)、帕博利珠单抗

(pembrolizumab)、阿替利珠单抗(atenzolizumab)、度伐利尤单抗(durvalumab)的临床试验均取得了显著的临床疗效^[11]。然而以免疫检查点为靶点的免疫治疗仍然存在过敏反应、发热、感染、免疫相关性肺炎等不良反应^[12]。这些不良反应与现阶段免疫治疗主要针对适应性免疫有关,因此,固有免疫逐渐成为免疫研究新热点。

NK细胞是一种淋巴细胞来源的细胞毒性固有免疫细胞,具有杀伤肿瘤细胞的能力,作为固有免疫中唯一的效应细胞,在肿瘤转移全程中均发挥重要作用。肺癌原发灶中浸润的NK细胞将通过ADCC、FASL/TRAIL等途径介导肿瘤细胞凋亡,还可招募并调控T细胞、B细胞、DC等免疫细胞的功能发挥协同抗肿瘤作用^[13]。在肺癌组织中,低水平的NK细胞浸润、NK抑制性受体的过表达和原发灶体积较大与患者预后不良有关^[14]。因此靶向NK细胞的实体瘤治疗策略以招募NK细胞、增加其浸润水平为主^[15]。当肿瘤细胞从原发灶脱落进入外周血后,NK细胞的免

疫监视作用是抑制转移形成的实质性因素,然而CTC可通过下调MHC I类分子和NK细胞激活配体的表达水平,以及多个CTC聚集成簇等方式导致免疫逃逸^[16-17]。CTC逃避免疫监视到达靶器官定植即成为DTC,此时靶器官的免疫平衡尚未被打破,NK细胞可选择性地清除早期定植的DTC^[18]。在乳腺癌肝转移小鼠模型中,NK细胞可通过分泌IFN- γ 介导肝DTC维持休眠状态^[19]。在肺癌转移休眠微环境中,NK细胞依赖的STING通路激活可抑制肿瘤细胞的增殖,从而维持DTC休眠^[20]。



A: 模型小鼠肺、肝转移灶组织Ki-67表达(棕褐色为Ki-67阳性肿瘤细胞),标尺=50 μ m; B: 模型小鼠肺转移灶中NK细胞浸润及IFN- γ 释放情况(蓝色:DAPI染色示细胞核,红色:NK1.1;绿色:IFN- γ),标尺=20 μ m。与对照组相比,*** P <0.001。

图5 黄芪甲苷IV联合重楼皂苷VII促进模型小鼠转移灶组织中NK细胞释放IFN- γ 诱导DTC休眠

《素问·宝命全形论》曰:“人以天地之气生,四时之法成”,中医学强调天人相应、以人为本,重视阴平阳秘、形与神俱。《素问·汤液醪醴论》载:“病为本,工为标”和“治病必求于本”。随着对肿瘤发生发展机制的揭示,研究人员普遍认为免疫治疗的靶点并不局限于肿瘤细胞,免疫细胞治疗、细胞因子治疗等均可以调控免疫细胞数量和功能的方式发挥抗肿瘤作用^[21],这与中医学“以人为本”的治疗理念逐渐趋同。“正气不足,而后邪气踞之”。国医大师刘嘉湘教授“扶正治癌”思想认为机体正气盛衰是肺癌发生发展

和预后的关键,提倡以人为本、人瘤并重,调控免疫、精准治癌^[22]。在“扶正治癌”思想指导下,田建辉教授融合《道德经》“有生于无”思想和《黄帝内经》重视“正气”思想及现代肿瘤免疫理论,创新性提出“正虚伏毒”是肺癌转移亚临床阶段的核心病机理论^[6],并构建肺癌转移特异性研究平台^[23],聚焦肿瘤转移这一临床“卡脖子”难题展开系列研究。前期研究发现,金复康口服液可通过增加衰老小鼠的外周血NK细胞比例以抑制肺癌转移^[24],并通过促进人肺腺癌CTC-TJH-01细胞分泌CX3CL1,增强对NK细胞的招

募,同时上调FasL表达增强NK细胞对CTC的清除作用,进而抑制肺癌转移^[25]。

中医药具有直接抗肿瘤和调控免疫的双重作用,诸如诱导肿瘤细胞周期阻滞、细胞凋亡、调节代谢等直接抗肿瘤机制逐渐明确^[26],中医药调控免疫的研究成为新的研究热点。研究发现,玉屏风散可增强NK细胞介导的杀伤活性从而抑制肺癌进展^[27],丹参酮II A上调ULBP1和DR5增强肺癌细胞对NK细胞的免疫原性^[28],参麦注射液通过促进NK细胞释放颗粒酶A增强PD-1抑制剂的抗肿瘤作用^[29]。然而,相关研究均针对肿瘤原发病灶,缺乏对转移靶器官的转移预防和保护。本研究选用金复康有效组分中扶正代表药黄芪甲苷IV和蠲毒代表药重楼皂苷VII联合干预肺癌转移模型小鼠,发现黄芪甲苷IV联合重楼皂苷VII通过促进NK细胞向靶器官肿瘤细胞募集,然后诱导IFN- γ 从NK细胞的胞内释放至胞外,从而抑制转移靶器官中肿瘤细胞的增殖,维持DTC休眠,进而发挥抗肺癌转移的作用。黄芪甲苷IV和重楼皂苷VII联合应用,一守一攻,精准靶向转移核心病机“正虚伏毒”理论:一方面直接抑制肿瘤细胞增殖,即“清透伏毒”,此为攻;另一方面招募NK细胞,通过调控免疫预防肺癌转移,即“扶助正气”,此为守。黄芪甲苷IV联合重楼皂苷VII,扶正蠲毒、攻守相宜,为应用“正虚伏毒”理论防治肺癌转移的物质载体。

综上所述,本研究基于“正虚伏毒”理论,揭示了扶正治癌中药金复康中的有效组分黄芪甲苷IV联合重楼皂苷VII可通过促进靶器官NK细胞释放IFN- γ ,诱导播散肿瘤细胞休眠,从而抑制肺癌转移的机制。研究结果丰富了“扶正治癌”学术思想,并为中医药调控NK细胞功能抑制肿瘤转移提供了新的研究思路。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, WAGLE N S, *et al.* Cancer statistics, 2023[J]. *CA A Cancer J Clinicians*, 2023, 73(1): 17-48. DOI: 10.3322/caac.21763.
- [2] FENG R M, SU Q L, HUANG X Y, *et al.* Cancer situation in China: what does the China cancer map indicate from the first national death survey to the latest cancer registration?[J]. *Cancer Commun*, 2023, 43(1): 75-86. DOI: 10.1002/cac2.12393.
- [3] LI Z, XU K, TARTARONE A, *et al.* Circulating tumor cells can predict the prognosis of patients with non-small cell lung cancer after resection: a retrospective study[J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2021, 10(2): 995-1006. DOI: 10.21037/tlcr-21-149.
- [4] SCHALLER J, AGUDO J. Metastatic colonization: escaping immune surveillance[J/OL]. *Cancers*, 2020, 12(11): 3385[2023-07-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33207601/>. DOI: 10.3390/cancers12113385.
- [5] SUMMERS M A, MCDONALD M M, CROUCHER P I. Cancer cell dormancy in metastasis[J/OL]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2020, 10(4): a037556[2023-07-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31548220/>. DOI: 10.1101/cshperspect.a037556.
- [6] 田建辉, 罗斌, 阙祖俊, 等. 癌症转移亚临床阶段核心病机“正虚伏毒”学说[J]. *上海中医药杂志*, 2021, 55(10): 1-3, 13. DOI: 10.16305/j.1007-1334.2021.2105080.
- [7] 田建辉. “正虚伏毒”为肺癌发病的核心病机[J]. *上海中医药杂志*, 2016, 50(12): 10-14. DOI: 10.16305/j.1007-1334.2016.12.003.
- [8] 刘嘉湘, 潘敏求, 黎月恒, 等. 金复康口服液治疗原发性非小细胞肺癌临床研究[J]. *肿瘤*, 2001, 21(6): 463-465. DOI: 10.3781/j.issn.1000-7431.2001.06.022.
- [9] HESS J B, SUTHERLAND K D, BEST S A. Exploring natural killer cell immunology as a therapeutic strategy in lung cancer[J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2021, 10(6): 2788-2805. DOI: 10.21037/tlcr-20-765.
- [10] ZHOU F, QIAO M, ZHOU C C. The cutting-edge progress of immune-checkpoint blockade in lung cancer[J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(2): 279-293. DOI: 10.1038/s41423-020-00577-5.
- [11] TANG S J, QIN C, HU H Y, *et al.* Immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer: progress, challenges, and prospects[J/OL]. *Cells*, 2022, 11(3): 320[2023-07-06]. <https://doi.org/10.3390/cells11030320>. DOI: 10.3390/cells11030320.
- [12] TAN S Z, LI D P, ZHU X. Cancer immunotherapy: pros, cons and beyond[J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 124: 109821 [2023-07-06]. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109821>. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.109821.
- [13] RAN G H, LIN Y Q, TIAN L, *et al.* Natural killer cell homing and trafficking in tissues and tumors: from biology to application[J/OL]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 205 [2023-07-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35768424/>. DOI: 10.1038/s41392-022-01058-z.
- [14] JIN S, DENG Y, HAO J W, *et al.* NK cell phenotypic modulation in lung cancer environment[J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e109976 [2023-07-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4192363/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0109976.
- [15] TONG L, JIMÉNEZ-CORTEGANA C, TAY A H M, *et al.* NK cells and solid tumors: therapeutic potential and persisting obstacles[J/OL]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 206 [2023-07-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36319998/>. DOI: 10.1186/s12943-022-01672-z.
- [16] PEREIRA-VEIGA T, SCHNEEGANS S, PANTEL K, *et al.* Circulating tumor cell-blood cell crosstalk: biology and clinical relevance[J/OL]. *Cell Rep*, 2022, 40(9): 111298 [2023-07-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36044866/>. DOI: 10.1016/j.celrep.2022.111298.
- [17] DIANAT-MOGHADAM H, MAHARI A, HEIDARIFARD M, *et al.* NK cells-directed therapies target circulating tumor cells and metastasis[J]. *Cancer Lett*, 2021, 497: 41-53. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.09.021.
- [18] LAUGHNEY A M, HU J, CAMPBELL N R, *et al.* Regenerative lineages and immune-mediated pruning in lung cancer metastasis[J]. *Nat Med*, 2020, 26(2): 259-269. DOI: 10.1038/s41591-019-0750-6.
- [19] CORREIA A L, GUIMARAES J C, DER MAUR P A, *et al.* Hepatic stellate cells suppress NK cell-sustained breast cancer dormancy[J]. *Nature*, 2021, 594(7864): 566-571. DOI: 10.1038/s41586-021-03614-z.

- [20] HU J, SÁNCHEZ-RIVERA F J, WANG Z H, *et al.* STING inhibits the reactivation of dormant metastasis in lung adenocarcinoma [J/OL]. *Nature*, 2023, 616(7958): 806-813[2023-07-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10569211/>. DOI: 10.1038/s41586-023-05880-5.
- [21] LAHIRI A, MAJI A, POTDAR P D, *et al.* Lung cancer immunotherapy: progress, pitfalls, and promises[J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 1-37. DOI: 10.1186/s12943-023-01740-y.
- [22] 刘嘉湘. 扶正治癌融汇中西继承创新[J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 39(1): 10-12. DOI: 10.7661/j.cjim.20181121.370.
- [23] 阙祖俊, 罗斌, 董昌盛, 等. “正虚伏毒”肺癌研究平台的构建[J]. *上海中医药杂志*, 2019, 53(4): 11-16. DOI: 10.16305/j.1007-1334.2019.04.003.
- [24] 姚望, 阙祖俊, 姚嘉良, 等. 金复康调控免疫衰老抑制肺癌转移[J]. *肿瘤防治研究*, 2022, 49(11): 1134-1138. DOI: 10.3971/j.issn.1000-8578.2022.21.1474.
- [25] QUE Z J, YAO J L, ZHOU Z Y, *et al.* Jinfukang inhibits lung cancer metastasis by upregulating CX3CL1 to recruit NK cells to kill CTCs [J/OL]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 275: 114175[2023-07-06]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2021.114175>. DOI: 10.1016/j.jep.2021.114175.
- [26] ZHANG L, ZHANG F Y, LI G F. Traditional Chinese medicine and lung cancer--from theory to practice[J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 137: 111381[2023-07-06]. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111381>. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111381.
- [27] LUO Y B, WU J C, ZHU X W, *et al.* NK cell-dependent growth inhibition of lewis lung cancer by Yu-Ping-Feng, an ancient Chinese herbal formula[J/OL]. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016: 3541283 [2023-07-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4789500/>. DOI: 10.1155/2016/3541283.
- [28] SUN Y F, GONG C Y, NI Z Y, *et al.* Tanshinone II A enhances susceptibility of non-small cell lung cancer cells to NK cell-mediated lysis by up-regulating ULBP1 and DR5[J]. *J Leukoc Biol*, 2021, 110(2): 315-325. DOI: 10.1002/jlb.5ma1120-776rr.
- [29] YU D Y, YANG P H, LU X Y, *et al.* Single-cell RNA sequencing reveals enhanced antitumor immunity after combined application of PD-1 inhibitor and Shenmai injection in non-small cell lung cancer [J/OL]. *Cell Commun Signal*, 2023, 21(1): 169[2023-07-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10332015/>. DOI: 10.1186/s12964-023-01184-3.

[收稿日期] 2023-07-10

[修回日期] 2023-10-09

[本文编辑] 黄静怡, 沈志超