

本文引用: 周锦宏, 吴小兰, 张嘉恒, 李玥衡, 杜玉, 刘奇英, 刘慧萍. 理冲汤对卵巢癌荷瘤小鼠的免疫调节及抗肿瘤作用[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(5): 754-763.

## 理冲汤对卵巢癌荷瘤小鼠的免疫调节及抗肿瘤作用

周锦宏<sup>1</sup>, 吴小兰<sup>1</sup>, 张嘉恒<sup>1</sup>, 李玥衡<sup>2</sup>, 杜玉<sup>2</sup>, 刘奇英<sup>3\*</sup>, 刘慧萍<sup>1,4\*</sup>

1. 湖南中医药大学中西医结合学院, 湖南长沙 410208; 2. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南长沙 410005;  
3. 长沙市妇幼保健院, 湖南长沙 410007; 4. 湖南中医药大学医学院, 湖南长沙 410208

**[摘要]** **目的** 探讨理冲汤对卵巢癌荷瘤小鼠的免疫调节及抗肿瘤作用。**方法** 按随机数字表法将 48 只 C57BL/6 雌性小鼠随机分为空白组 8 只和造模组 40 只。采用腋下注射 ID8 细胞方法制备卵巢癌荷瘤小鼠模型。造模成功的 40 只小鼠随机分为模型组、紫杉醇组[10 mg/(kg·3 d)], 理冲汤低剂量组[17.89 g/(kg·d)], 理冲汤中剂量组[35.78 g/(kg·d)]和理冲汤高剂量组[71.56 g/(kg·d)], 每组 8 只。空白组及模型组灌胃蒸馏水[10 mL/(kg·d)]。每组干预 21 d。计算抑瘤率及脏器指数, HE 染色观察肿瘤组织病理形态变化; 流式细胞术检测脾脏中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)细胞亚群比例; 流式微球阵列技术检测血清中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)水平; 免疫组织化学法检测肿瘤组织中 Wnt 家族成员-1(Wnt family member-1, Wnt-1)、 $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)、糖原合成酶激酶-3 $\beta$ (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ )、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、白细胞分化抗原 4(cluster of differentiation 4, CD4)、白细胞分化抗原 8(cluster of differentiation 8, CD8)蛋白表达水平; RT-PCR 法检测肿瘤组织 Wnt-1、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 、叉头蛋白 P3(forkheadbox protein 3, Foxp3)mRNA 表达水平。**结果** 与空白组比较, 模型组脾脏指数及血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-2 水平显著降低( $P < 0.01$ ), 血清中 IL-6、IL-10 水平及脾脏中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞亚群比例显著升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 理冲汤各剂量组脾脏指数升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 各治疗组肿瘤指数显著降低( $P < 0.01$ )。模型组小鼠肿瘤组织病理形态学病变显著, 各治疗组干预后均有一定程度改善。与模型组比较, 各治疗组脾脏中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞亚群比例及血清 IL-10 水平显著降低( $P < 0.01$ ); 紫杉醇组和理冲汤中剂量组 TNF- $\alpha$  水平升高( $P < 0.05$ ); 理冲汤高剂量组 TNF- $\alpha$ 、IL-2 水平升高( $P < 0.01$ ), IL-6 水平降低( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 理冲汤各剂量组肿瘤组织中 GSK-3 $\beta$ 、CD4 蛋白的表达升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), Wnt-1、MMP-9 蛋白表达降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 理冲汤中、高剂量组 CD8 蛋白表达显著升高( $P < 0.01$ ),  $\beta$ -catenin 蛋白表达降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与模型组比较, 各治疗组 GSK-3 $\beta$  mRNA 表达水平升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), Wnt-1、 $\beta$ -catenin、Foxp3 mRNA 表达水平显著降低( $P < 0.01$ )。**结论** 理冲汤具有抑制卵巢癌荷瘤小鼠肿瘤生长的作用, 该作用可能与降低 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞亚群比例, 提高机体免疫, 调节 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路有关。

**[关键词]** 理冲汤; 卵巢癌; Wnt/ $\beta$ -catenin 通路; 肿瘤微环境; 免疫逃逸; 调节性 T 细胞

**[中图分类号]** R271

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.05.006

## Immunomodulatory and anti-tumor effects of Lichong Decoction on ovarian cancer-bearing mice

ZHOU Jinhong<sup>1</sup>, WU Xiaolan<sup>1</sup>, ZHANG Jiaheng<sup>1</sup>, LI Yueheng<sup>2</sup>, DU Yu<sup>2</sup>, LIU Qiyang<sup>3\*</sup>, LIU Huiping<sup>1,4\*</sup>

**[收稿日期]** 2024-02-08

**[基金项目]** 湖南省自然科学基金项目(2022JJ30035); 湖南省中医药科研计划项目(D2022039); 湖南省卫生健康委员会科研项目重点指导项目(202305017379); 长沙市自然科学基金项目(kq2202038); 湖南省高校中医肿瘤重点实验室; 湖南省研究生创新基金项目(CX20220784); 湖南中医药大学研究生创新项目(2023CX28, 2023CX107); 国家级大学生创新创业计划训练项目(S202310541063); 湖南省大学生创新创业计划训练项目(S202310541063)。

**[通信作者]** \* 刘慧萍, 女, 博士, 教授, 博士研究生导师, E-mail: 1074983953@qq.com; 刘奇英, 女, 硕士, 副主任医师, E-mail: 2843403653@qq.com。

1. School of Integrated Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The Second Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China; 3. Changsha Hospital for Maternal & Child Health Care, Changsha, Hunan 410007, China; 4. School of Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

**[Abstract] Objective** To explore the immunomodulatory and anti-tumor effects of Lichong Decoction (LCD) on ovarian cancer-bearing mice. **Methods** Forty-eight C57BL/6 female mice were randomized into blank group ( $n=8$ ) and modeling group ( $n=40$ ) by random number table method, and the ovarian cancer-bearing mouse model was prepared by subaxillary injection of ID8 cells. Forty mice with successful modeling were randomly subdivided into model group, paclitaxel group [10 mg/(kg·3d)], low-, medium-, and high-dose [17.89 g/(kg·d), 35.78 g/(kg·d), 71.56 g/(kg·d)] LCD groups, with eight mice in each group. The blank group and model group were given distilled water [10 mL/(kg·d)], and each group was intervened for 21 d. The tumor inhibition rate and organ indexes were calculated; HE staining was used to observe histopathological and morphological changes in tumor tissue; the proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>regulatory T cell (Treg) subpopulations in spleen was checked by flow cytometry, Cytometric Bead Array (CBA) was used to determine the serum levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-2 (IL-2), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-10 (IL-10); immunohistochemistry was performed to examine the protein expression levels of Wnt family member 1 (Wnt1),  $\beta$ -catenin, glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), cluster of differentiation 4 (CD4), and cluster of differentiation 8 (CD8); the mRNA expression levels of Wnt-1,  $\beta$ -catenin, GSK-3 $\beta$ , and forkheadbox protein 3 (Foxp3) were determined by RT-PCR. **Results** Compared with the blank group, both the spleen index and the serum levels of TNF- $\alpha$  and IL-2 in the model group were significantly lower ( $P<0.01$ ), while the proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg cell subpopulations in the spleen and the serum levels of IL-6 and IL-10 were significantly higher ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the spleen index in each dose of LCD group increased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), the tumor index in each treatment group significantly reduced ( $P<0.01$ ), and the histopathological and morphological lesions in tumor tissue of the model group were significant, and there were variable degrees of improvement in all treatment groups after intervention. Compared with the model group, the proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg subpopulations in the spleen and the serum level of IL-10 were significantly reduced in each treatment group ( $P<0.01$ ), the TNF- $\alpha$  level in the paclitaxel and medium-dose LCD groups increased ( $P<0.05$ ), and the serum levels of TNF- $\alpha$  and IL-2 in high-dose LCD group increased ( $P<0.01$ ), while the IL-6 level decreased ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, the protein expressions of GSK-3 $\beta$  and CD4 in tumor tissue of mice in each dose of LCD group increased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), the protein expressions of Wnt-1 and MMP-9 decreased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), and the CD8 protein expression in the medium- and high-dose LCD groups significantly increased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), while  $\beta$ -catenin protein expression reduced ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Compared with the model group, the GSK-3 $\beta$  mRNA expression level in each treatment group increased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), while the mRNA expression levels of Wnt-1,  $\beta$ -catenin, and Foxp3 decreased ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Lichong Decoction can inhibit tumor growth in ovarian cancer-bearing mice, which may be related to reducing the proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg cell subpopulations, improving immunity, and regulating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway.

**[Keywords]** Lichong Decoction; ovarian cancer; Wnt/ $\beta$ -catenin pathway; tumor microenvironment; immune escape; regulatory T cell

卵巢癌(ovarian cancer, OC)是全球女性的第三大威胁性恶性肿瘤,可发生于任何年龄,早期病变隐匿,患者常缺乏特异性的症状,晚期常缺乏有效的治

疗手段,严重危害妇女健康<sup>[1]</sup>。据2023年美国癌症统计数据,OC是继子宫体癌之后发病率排名第2位的生殖系统肿瘤,也是排名第2位的女性致死性肿

瘤,死亡率仅次于乳腺癌<sup>[2]</sup>。我国 OC 总体发病率与死亡率呈上升趋势<sup>[3]</sup>,晚期 OC 患者平均 5 年生存率低于 30%<sup>[4]</sup>。目前,临床上以根治性手术为主,同时采用化学治疗、放射治疗 OC,然而这些治疗手段可能会降低患者的免疫功能,所以寻找安全有效的肿瘤治疗药物已成为 OC 研究中的热点和难点。

理冲汤出自清代著名医家张锡纯的《医学衷中参西录·治女科方》,由黄芪、党参、三棱、莪术等 9 味中药组成,具有健脾补气、化痰消癥的功效。理冲汤在临床上常用于治疗子宫肌瘤、宫颈癌、OC 等多种疾病,且临床疗效显著<sup>[5-7]</sup>。实验研究表明,理冲汤对癌细胞的增殖有明显的抑制作用,并且可以促进其凋亡<sup>[8-10]</sup>。因此,本实验建立 OC 荷瘤小鼠模型,并用理冲汤进行干预,通过动物实验研究,观察理冲汤对 OC 荷瘤小鼠的免疫调节作用,并探讨其可能的通路,为中医药治疗 OC 提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

48 只健康 C57BL/6 雌性小鼠,SPF 级,6~8 周龄,体质量(18±2) g。所有小鼠均委托湖南中医药大学实验动物中心购买,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[许可证号:SCXK(湘)2019-0004],饲养于湖南中医药大学实验动物中心[许可证号:SYXK(湘)2019-0009]。饲养环境恒温恒湿,室温 18~22 ℃,湿度 40%~60%,光照 12 h,予标准动物饲料喂养,自由饮水。本实验所有操作均经湖南中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理审批号:LL2022061204)。

### 1.2 实验细胞

鼠源 OC 的细胞株 ID8 (浙江美森细胞科技有限公司,批号:CTCC-003-0111)。

### 1.3 药物

理冲汤(黄芪 9 g、党参 6 g、白术 6 g、山药 15 g、天花粉 12 g、知母 12 g、三棱 9 g、莪术 9 g、鸡内金 9 g)药材购自湖南中医药大学第一附属医院中药房。将上述饮片,加入 10 倍量的蒸馏水浸泡 30 min,煮沸后再煎煮 30 min,过滤取出药液。然后将残渣加蒸馏水 1.5 L,再煎 20 min 之后过滤取出药液,将两次所得药液混匀合并,在 70 ℃水浴锅上蒸发浓缩。紫杉醇(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:

P106869,规格 250 mg)。

### 1.4 主要试剂及仪器

FITC 标记抗小鼠白细胞分化抗原(cluster of differentiation,CD)3 抗体、藻红蛋白(phycoerythrin, PE)/Cyanine7 标记抗小鼠 CD4 抗体、别藻青蛋白(allophycocyanin, APC)标记抗小鼠 CD25 抗体、多甲藻黄素-叶绿素-蛋白质复合物(peridinin-chlorophyll-protein complex, PerCP)/Cyanine5.5 标记抗小鼠 CD45 抗体、PE 标记抗小鼠叉头蛋白 P3(forkheadbox protein 3, Foxp3)抗体、LEGENDPlex™ 多因子流式检测试剂盒(美国 BioLegend 公司,批号分别为 100203、103131、102011、100527、126403、741050);Wnt 家族成员-1(Wnt family member-1, Wnt-1)抗体、 $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -Catenin)抗体、糖原合成酶激酶-3 $\beta$ (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ )抗体、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)抗体(武汉三鹰生物技术公司,批号分别为 27935-1-AP、51067-2-AP、21112-1-AP、10375-2-AP);CD4 抗体、CD8 抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为 bs-0647R、bs-0648R);HRP 标记山羊抗兔 IgG 抗体(北京兰杰柯科技有限公司,批号:BL003A)。

Spark 型多功能酶标仪(奥地利 TECAN 公司);SW-CJ-2F 型超净工作台(苏州安泰公司);FA2004N 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司);HERA-cell 150i 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo 公司);5810R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);RM2235 型切片机、HI1210 型摊片机、DMLB2 型双目显微镜(德国 Leica 公司);Motic BA410 型生物显微镜(德国麦克奥迪实业集团公司);cyto FLEX 型流式细胞仪(美国 Beckman 公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养及动物造模

ID8 细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养基常规培养于 37 ℃、含 5% CO<sub>2</sub> 的孵育箱中。将 ID8 细胞培养至对数生长期,并用 PBS 将密度调整为 5×10<sup>7</sup> 个/mL。小鼠右侧腋下常规消毒后,接种单细胞悬液 0.1 mL/只,若 1 周左右瘤体体积达到 30 mm<sup>3</sup>,提示造模成功<sup>[11]</sup>;空白组小鼠于右侧腋下注射 0.1 mL 生理盐水。

## 2.2 动物分组及给药

采用随机数字表法将 48 只 C57BL/6 雌性小鼠随机分 8 只作为空白组[10 mL/(kg·d),蒸馏水,灌胃],其余 40 只为造模组。将造模成功的小鼠随机分为模型组[10 mL/(kg·d),蒸馏水,灌胃]、紫杉醇组[10 mg/(kg·3 d),腹腔注射]<sup>[12]</sup>、理冲汤低剂量组[17.89 g/(kg·d),灌胃]、理冲汤中剂量组[35.78 g/(kg·d),灌胃]、理冲汤高剂量组[71.56 g/(kg·d),灌胃],其中低剂量是小鼠与 60 kg 成人临床用量等效剂量,中剂量和高剂量分别为等效剂量的 2 倍与 4 倍<sup>[13]</sup>。每组干预 21 d。

## 2.3 抑瘤率及脏器指数计算

处死小鼠后摘除肿瘤及脾脏组织,称重记录。抑瘤率=(模型组瘤重-给药组瘤重)/模型组瘤重×100%。脏器指数(mg/g)=脏器质量(mg)/小鼠体质量(g)。

## 2.4 流式微球阵列技术检测小鼠血清中细胞因子含量

末次给药 12 h 后,小鼠眼球取血,分离血清,冻存储备用。严格按照 LEGENDplex™ 多因子流式检测试剂盒说明书检测小鼠血清中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)含量。

## 2.5 HE 染色观察肿瘤组织病理变化

将各组小鼠 1/2 的瘤体组织固定于 4%多聚甲醛中 12~24 h,石蜡包埋,切成 3~4  $\mu$ m 的切片。常规脱水后,进行 HE 染色,中性树胶封片后于光学显微镜下观察。

## 2.6 流式细胞术检测小鼠脾脏淋巴细胞亚群 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞亚群比例

取出小鼠脾脏置于 1×PBS 中,研磨脾脏,使细胞散于 PBS 中。用 300 目滤网过滤,以 1 500 r/min 离心 5 min(离心半径 20 cm),弃上清液。每份组织用 500  $\mu$ L 红细胞裂解液,吹打涡旋后静置 10 min。裂解反应结束后,以 3 000 r/min 离心 5 min(离心半径 20 cm),弃上清液。PBS 洗涤,细胞计数,调整浓度为 1×10<sup>7</sup> 个/mL。取 100  $\mu$ L 细胞液,将样本移至 V 底板中进行染色,加入 FITC 标记抗小鼠 CD3、PE/Cyanine7 标记抗小鼠 CD4、APC 标记抗小鼠 CD25、Per-

CP/Cyanine5.5 标记抗小鼠 CD45 抗体,混匀后,室温孵育 15~20 min。每孔加入 200  $\mu$ L Foxp3 固定/破膜工作液,室温孵育 30~60 min,以 800 r/min 离心 5 min(离心半径 20 cm),弃上清液。用 1×破膜液将体积调节至约 100  $\mu$ L,不洗涤,加入 PE 标记抗小鼠 Foxp3 抗体,室温避光孵育 30 min 以上。加入 200  $\mu$ L 1×破膜液,在室温下以 800 r/min 离心 5 min(离心半径 20 cm),弃上清液。用至少 0.5 mL 细胞染色缓冲液重悬染色后的细胞,上机检测分析。

## 2.7 免疫组织化学法检测瘤组织中 Wnt-1、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 、MMP-9、CD4、CD8 蛋白表达水平

4%多聚甲醛固定瘤组织,常规石蜡包埋、切片,二甲苯透明,梯度乙醇脱水,柠檬酸抗原修复液修复抗原,PBS 洗涤 5 min×3 次,切片放入 3%过氧化氢溶液中室温避光孵育 25 min,BSA 室温封闭 30 min,分别滴加一抗 Wnt-1(1:200)、 $\beta$ -catenin(1:1 000)、GSK-3 $\beta$ (1:200)、MMP-9(1:200)、CD4(1:200)、CD8(1:200),4  $^{\circ}$ C 湿盒内孵育过夜。第 2 天 PBS 洗涤 5 min×3 次,加相应二抗 HRP 标记山羊抗兔 IgG 抗体,室温孵育 50 min,DAB 显色后苏木素复染,脱水、封片,显微镜观察,Image J 软件进行图像分析。

## 2.8 RT-PCR 法检测小鼠肿瘤组织 Wnt-1、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 、Foxp3 mRNA 表达水平

采用总 RNA 提取试剂盒提取肿瘤组织 RNA,测定纯度和浓度后逆转录合成 cDNA,并进行 RT-PCR 检测,反应条件为 95  $^{\circ}$ C 反应 1 min,95  $^{\circ}$ C 变性 20 s,58  $^{\circ}$ C 退火 20 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 20 s,循环 45 次。以 GAPDH 为内参,运用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法计算 Wnt-1、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 、Foxp3 mRNA 相对表达水平。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成,引物序列见表 1。

## 2.9 统计学分析

采用 SPSS 26.0 统计软件进行分析。所有实验数据均采用“ $\bar{x}\pm s$ ”形式表示。多组计量资料先进行方差齐性分析,若符合方差齐性,则各组间数据采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法;若不符合方差齐性,则采用非参数秩和检验。 $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

表1 引物序列

引物名称	序列(5'-3')	引物长度/bp
Wnt-1	正向:CGAGACTGCAAATGGCAATTCCG	23
	反向:GATGAACGCTGTTTCTCGGCAG	
β-catenin	正向:GTTTCGCCTTCATTATGGACTGCC	23
	反向:ATAGCACCCCTGTTCCCGCAAAG	
GSK-3β	正向:GAGCCACTGATTACACGTCCAG	23
	反向:CCAAGTATCCACACCACTGTC	
Foxp3	正向:CCTGGTTGTGAGAAGGTCTTCG	22
	反向:TGCTCCAGAGACTGCACCACTT	
GAPDH	正向:CATCACTGCCACCCAGAAGACTG	22
	反向:ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG	

### 3 结果

#### 3.1 理冲汤对荷瘤小鼠的抑瘤作用

与模型组比较,各治疗组瘤体质量显著减轻( $P<0.01$ )。与紫杉醇组比较,理冲汤低、中剂量组瘤体质量升高( $P<0.05, P<0.01$ ),抑瘤率降低( $P<0.05, P<0.01$ );理冲汤高剂量组瘤体质量显著降低( $P<0.01$ ),抑瘤率显著升高( $P<0.01$ )。与理冲汤低、中剂量组比较,理冲汤高剂量组瘤体质量显著降低( $P<0.01$ ),抑瘤率显著升高( $P<0.01$ )。详见图1、表2。

表2 各组小鼠瘤体质量、抑瘤率比较( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	瘤体质量/mg	抑瘤率/%
模型组	85.42±6.27	—
紫杉醇组	43.72±6.23 <sup>#</sup>	48.6±7.3
理冲汤低剂量组	57.56±7.92 <sup>#△△</sup>	32.4±9.2 <sup>△△</sup>
理冲汤中剂量组	53.08±6.03 <sup>#△</sup>	38.0±7.1 <sup>△</sup>
理冲汤高剂量组	25.98±4.92 <sup>#△△□□■</sup>	69.6±5.7 <sup>△△□□■</sup>

注:与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.01$ ;与紫杉醇组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ,<sup>△△</sup> $P<0.01$ ;与理冲汤低剂量组比较,<sup>□</sup> $P<0.01$ ;与理冲汤中剂量组比较,<sup>■</sup> $P<0.01$ 。

#### 3.2 理冲汤对荷瘤小鼠脏器指数的影响

与空白组比较,模型组的脾脏指数明显降低( $P<0.01$ );与模型组比较,理冲汤各剂量组脾脏指数升高( $P<0.05, P<0.01$ ),各治疗组肿瘤指数显著降低( $P<0.01$ );与紫杉醇组比较,理冲汤中、高剂量组脾脏指数升高( $P<0.05, P<0.01$ ),理冲汤低、中剂量组肿瘤指数显著升高( $P<0.01$ ),理冲汤高剂量组肿瘤指数显著降低( $P<0.01$ );与理冲汤低、中剂量组比较,理冲汤高剂量组肿瘤指数显著降低( $P<0.01$ )。详见表3。

表3 各组小鼠脾脏指数、肿瘤指数比较( $\bar{x}\pm s, n=5, \text{mg/g}$ )

组别	脾脏指数	肿瘤指数
空白组	5.07±0.48	—
模型组	3.88±0.42 <sup>**</sup>	4.80±0.29
紫杉醇组	4.21±0.18	2.36±0.23 <sup>#</sup>
理冲汤低剂量组	4.53±0.21 <sup>#</sup>	3.08±0.34 <sup>#△△</sup>
理冲汤中剂量组	4.78±0.54 <sup>#△</sup>	2.94±0.20 <sup>#△△</sup>
理冲汤高剂量组	4.93±0.39 <sup>#△△</sup>	1.41±0.26 <sup>#△△□□■</sup>

注:与空白组比较,<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>#</sup> $P<0.01$ ;与紫杉醇组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ,<sup>△△</sup> $P<0.01$ ;与理冲汤低剂量组比较,<sup>□</sup> $P<0.01$ ;与理冲汤中剂量组比较,<sup>■</sup> $P<0.01$ 。

#### 3.3 理冲汤对荷瘤小鼠血清中细胞因子含量的影响

与空白组比较,模型组的血清TNF-α、IL-2水平显著降低( $P<0.01$ ),IL-6、IL-10水平显著升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,各治疗组的血清IL-10水平显著降低( $P<0.01$ );紫杉醇组和理冲汤中剂量组TNF-α水平升高( $P<0.05$ );理冲汤高剂量组TNF-α、IL-2水平显著升高( $P<0.01$ ),IL-6水平降低( $P<0.05$ )。与紫杉醇组,理冲汤低、中剂量组比较;理冲汤高剂量组TNF-α、IL-2水平升高( $P<0.05, P<0.01$ )。详见表4。

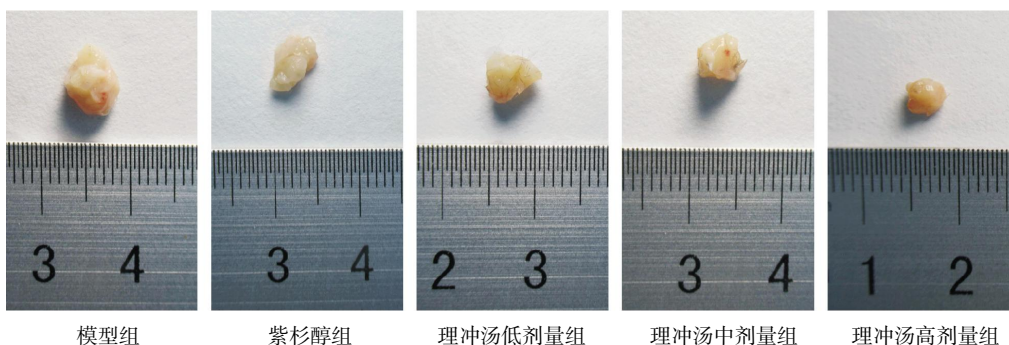


图1 各组小鼠瘤体大小比较

表 4 各组小鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-6、IL-10 含量比较( $\bar{x}\pm s, n=5, \text{pg/mL}$ )

组别	TNF- $\alpha$	IL-2	IL-6	IL-10
空白组	3.99 $\pm$ 0.15	3.94 $\pm$ 0.32	5.24 $\pm$ 0.78	2.15 $\pm$ 0.18
模型组	3.29 $\pm$ 0.12**	1.78 $\pm$ 0.24**	50.55 $\pm$ 6.12**	4.42 $\pm$ 0.58**
紫杉醇组	3.45 $\pm$ 0.07 <sup>#</sup>	1.90 $\pm$ 0.36	20.89 $\pm$ 0.28	2.83 $\pm$ 0.50 <sup>##</sup>
理冲汤低剂量组	3.42 $\pm$ 0.06	1.87 $\pm$ 0.20	18.74 $\pm$ 2.22	2.78 $\pm$ 0.59 <sup>##</sup>
理冲汤中剂量组	3.46 $\pm$ 0.05 <sup>#</sup>	2.10 $\pm$ 0.25	17.13 $\pm$ 1.78	2.60 $\pm$ 0.50 <sup>##</sup>
理冲汤高剂量组	3.78 $\pm$ 0.11 <sup>##<math>\Delta</math><math>\square</math><math>\blacksquare</math></sup>	2.46 $\pm$ 0.21 <sup>##<math>\Delta</math><math>\square</math><math>\blacksquare</math></sup>	12.87 $\pm$ 0.74 <sup>#</sup>	2.31 $\pm$ 0.55 <sup>##</sup>

注:与空白组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$ ;与紫杉醇组比较, $\Delta$  $P<0.01$ ;与理冲汤低剂量组比较, $\square$  $P<0.01$ ;与理冲汤中剂量组比较, $\blacksquare$  $P<0.01$ , $\blacksquare$  $P<0.01$ 。

### 3.4 理冲汤对荷瘤小鼠脾脏中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞亚群的影响

与空白组比较,其余各组 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞亚群比例均显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,各治疗组 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞亚群比例均显著降低( $P<0.01$ );与紫杉醇组、理冲汤低剂量组比较,理冲汤中、高剂量组 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞亚群比例显著降低( $P<0.01$ );与理冲汤中剂量组比较,理冲汤高剂量组 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞亚群比例显著降低( $P<0.01$ )。详见表 5、图 2。

### 3.5 理冲汤对荷瘤小鼠肿瘤组织病理变化的影响

模型组肿瘤组织细胞增殖旺盛,排列紧密,大小不一,未见明显肿瘤坏死灶。各治疗组均可观察到肿瘤细胞的减少,细胞核出现变形和破碎,甚至部分细胞核发生裂解,呈现不同程度的肿瘤坏死灶。详见图 3。

表 5 各组小鼠脾脏中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞亚群比例比较( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> Treg
空白组	2.68 $\pm$ 0.49
模型组	8.55 $\pm$ 0.56**
紫杉醇组	7.35 $\pm$ 0.18** <sup>##</sup>
理冲汤低剂量组	7.20 $\pm$ 0.43** <sup>##</sup>
理冲汤中剂量组	5.95 $\pm$ 0.41** <sup>##<math>\Delta</math><math>\square</math></sup>
理冲汤高剂量组	4.70 $\pm$ 0.49** <sup>##<math>\Delta</math><math>\square</math><math>\blacksquare</math></sup>

注:与空白组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>##</sup> $P<0.01$ ;与紫杉醇组比较, $\Delta$  $P<0.01$ ;与理冲汤低剂量组比较, $\square$  $P<0.01$ ;与理冲汤中剂量组比较, $\blacksquare$  $P<0.01$ 。

### 3.6 理冲汤对荷瘤小鼠肿瘤组织中的 Wnt-1、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 、MMP-9、CD4 和 CD8 蛋白表达的影响

与模型组比较,理冲汤各剂量组 GSK-3 $\beta$ 、CD4 蛋白表达升高( $P<0.05, P<0.01$ ), Wnt-1、MMP-9 蛋

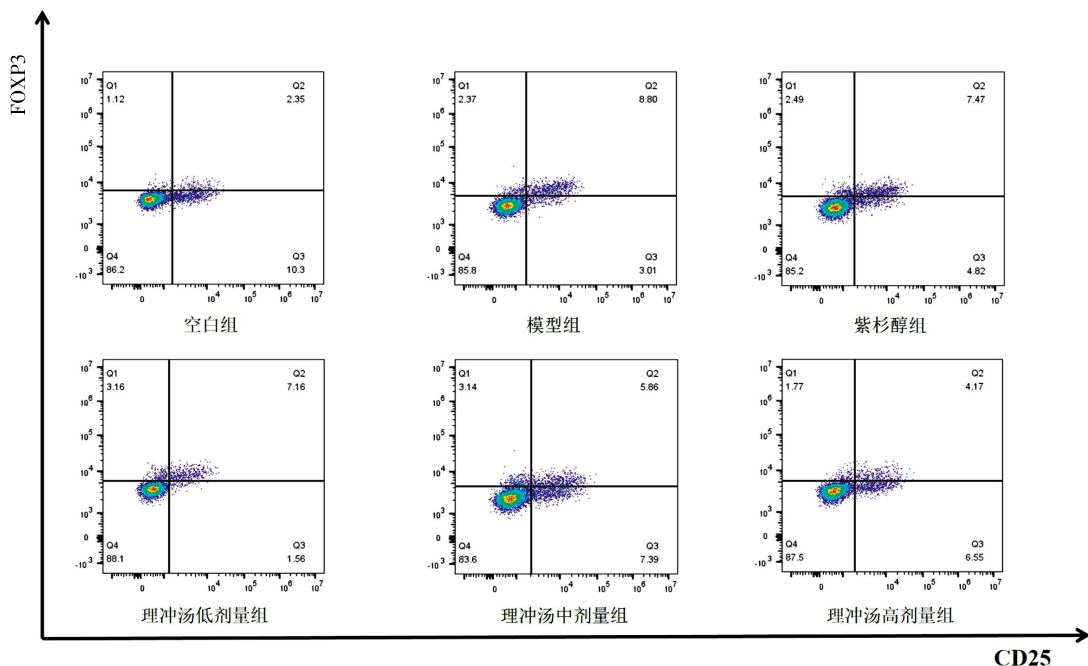


图 2 各组小鼠脾脏中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞亚群比例

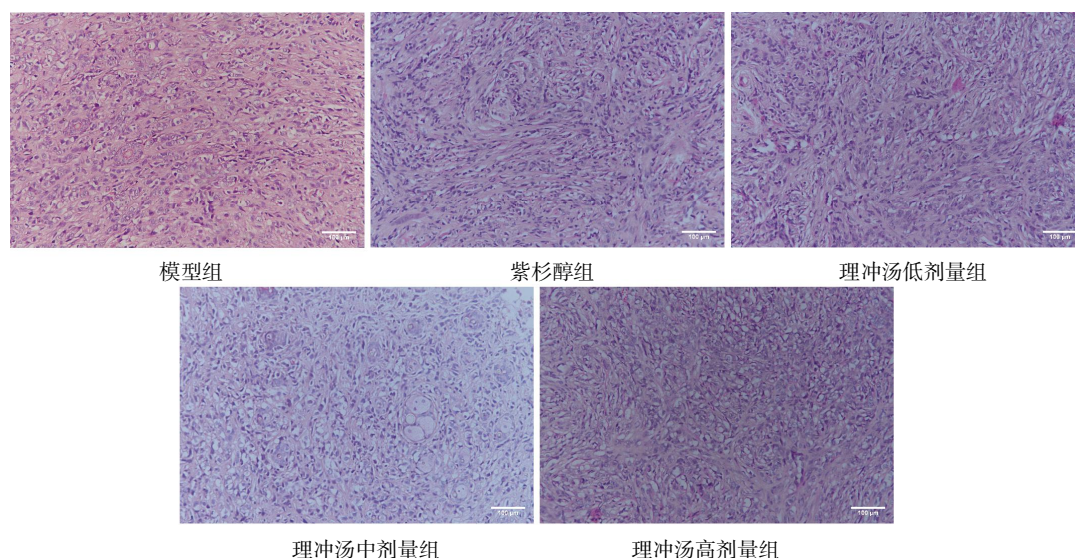


图3 各组小鼠肿瘤组织形态学变化(HE, ×200, 标尺: 100 μm)

白表达降低( $P<0.05, P<0.01$ ), 理冲汤中、高剂量组 CD8 蛋白表达升高( $P<0.01$ ),  $\beta$ -catenin 蛋白表达降低( $P<0.05, P<0.01$ )。与紫杉醇组比较, 理冲汤各剂量组 MMP-9 蛋白表达降低( $P<0.05, P<0.01$ ); 理冲汤中、高剂量组 Wnt-1、 $\beta$ -catenin 蛋白表达降低( $P<0.05, P<0.01$ ); 理冲汤高剂量组 GSK-3 $\beta$ 、CD4、CD8 蛋白表达升高( $P<0.05, P<0.01$ )。与理冲汤低剂量组比较, 理冲汤中剂量组  $\beta$ -catenin 蛋白表达显著降低( $P<0.01$ ), CD4 蛋白表达显著升高( $P<0.01$ ); 理冲汤高剂量组  $\beta$ -catenin、MMP-9 蛋白表达显著降低( $P<0.01$ ), CD4、CD8 蛋白表达显著升高( $P<0.01$ )。详见表 6、图 4。

### 3.7 理冲汤对小鼠肿瘤组织 Wnt-1、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 、Foxp3 mRNA 表达的影响

与模型组比较, 各治疗组 Wnt-1、 $\beta$ -catenin、Foxp3 mRNA 表达显著降低( $P<0.01$ ), GSK-3 $\beta$  表达升高( $P<0.05, P<0.01$ )。与紫杉醇组比较, 理冲汤中、高剂量组 GSK-3 $\beta$  mRNA 表达显著升高( $P<0.01$ ),  $\beta$ -catenin、Foxp3 mRNA 表达显著降低( $P<0.01$ ); 理

冲汤低剂量组 GSK-3 $\beta$  mRNA 表达降低( $P<0.05$ ),  $\beta$ -catenin、Wnt-1 mRNA 表达升高( $P<0.05, P<0.01$ ); 理冲汤高剂量组 Wnt-1 mRNA 表达显著降低( $P<0.01$ )。与理冲汤低剂量组比较, 理冲汤中、高剂量组 Wnt-1、 $\beta$ -catenin、Foxp3 mRNA 表达显著降低( $P<0.01$ ), GSK-3 $\beta$  mRNA 表达显著升高( $P<0.01$ )。与理冲汤中剂量组比较, 理冲汤高剂量组 Wnt-1 mRNA 表达显著降低( $P<0.01$ )。详见表 7。

## 4 讨论

OC 属于中医学“癥瘕”“肠覃”“积聚”等范畴。OC 为本虚标实证, 脏腑气血虚弱为本, 瘀血、湿毒、痰饮、湿浊为标, 日久气滞血结或痰湿凝聚, 或湿(热)毒壅滞, 与血相搏, 而致“癌浊”<sup>[14]</sup>。目前, 中医药在治疗 OC 中得到了广泛应用, 且有数据表明中医药辅助治疗 OC 有明显积极治疗作用, 如降低 OC 患者术后化学治疗的不良反应, 缓解化学治疗后的不适症状, 提高患者机体的免疫力, 延长生存时间等<sup>[15]</sup>。

理冲汤由黄芪、党参、白术、山药、天花粉、知母、

表6 各组小鼠肿瘤组织 Wnt-1、 $\beta$ -catenin、GSK-3 $\beta$ 、MMP-9、CD4、CD8 蛋白表达比较( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	Wnt-1	$\beta$ -catenin	GSK-3 $\beta$	MMP-9	CD4	CD8
模型组	0.243±0.022	0.159±0.066	0.122±0.055	0.163±0.008	0.171±0.003	0.115±0.005
紫杉醇组	0.207±0.008	0.138±0.001	0.139±0.009	0.149±0.004	0.206±0.012	0.139±0.008
理冲汤低剂量组	0.118±0.008 <sup>#</sup>	0.126±0.039	0.178±0.011 <sup>#</sup>	0.126±0.007 <sup>##△</sup>	0.214±0.003 <sup>###</sup>	0.156±0.009
理冲汤中剂量组	0.104±0.006 <sup>##△△</sup>	0.115±0.006 <sup>#△□□</sup>	0.186±0.003 <sup>###</sup>	0.112±0.004 <sup>##△△</sup>	0.242±0.004 <sup>###□□</sup>	0.193±0.001 <sup>###</sup>
理冲汤高剂量组	0.108±0.003 <sup>###△</sup>	0.106±0.004 <sup>##△△□□</sup>	0.201±0.013 <sup>###△</sup>	0.099±0.007 <sup>##△△□□</sup>	0.284±0.017 <sup>###△□□</sup>	0.224±0.006 <sup>##△△□□</sup>

注: 与模型组比较, <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$ ; 与紫杉醇组比较, <sup>△</sup> $P<0.05$ , <sup>△△</sup> $P<0.01$ ; 与理冲汤低剂量组比较, <sup>□□</sup> $P<0.01$ 。

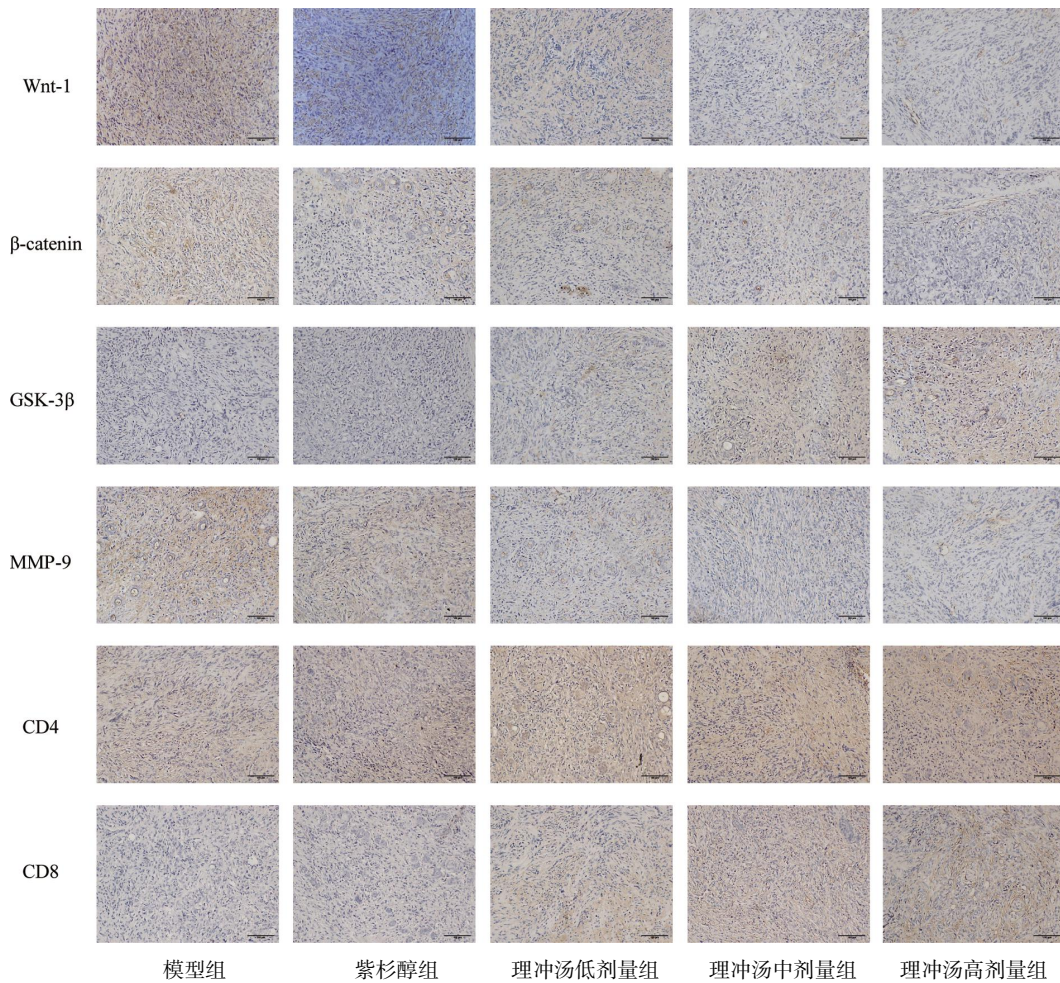


图 4 各组小鼠肿瘤组织 Wnt-1、β-catenin、GSK-3β、MMP-9、CD4、CD8 蛋白表达 (免疫组织化学, ×200, 标尺: 100 μm)

表 7 各组小鼠肿瘤组织 Wnt-1、β-catenin、GSK-3β、Foxp3 mRNA 表达比较 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	Wnt-1	β-catenin	GSK-3β	Foxp3
模型组	1.00±0.05	1.00±0.09	1.00±0.09	1.01±0.09
紫杉醇组	0.58±0.04 <sup>##</sup>	0.53±0.04 <sup>##</sup>	1.45±0.14 <sup>##</sup>	0.78±0.08 <sup>##</sup>
理冲汤低剂量组	0.76±0.04 <sup>##△△</sup>	0.65±0.02 <sup>##△</sup>	1.23±0.09 <sup>#△</sup>	0.88±0.04 <sup>##</sup>
理冲汤中剂量组	0.50±0.06 <sup>##□□</sup>	0.40±0.02 <sup>##△△□□</sup>	2.29±0.08 <sup>##△△□□</sup>	0.30±0.04 <sup>##△△□□</sup>
理冲汤高剂量组	0.32±0.04 <sup>##△△□□■</sup>	0.32±0.04 <sup>##△△□□</sup>	2.39±0.02 <sup>##△△□□</sup>	0.22±0.02 <sup>##△△□□</sup>

注:与模型组比较, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与紫杉醇组比较, <sup>△</sup> $P < 0.05$ , <sup>△△</sup> $P < 0.01$ ;与理冲汤低剂量组比较, <sup>□</sup> $P < 0.01$ ;与理冲汤中剂量组比较, <sup>■</sup> $P < 0.01$ 。

三棱、莪术和鸡内金组成,方中三棱、莪术为君药,活血化瘀、破气消积;黄芪、党参、白术为臣,护脾胃之元气,君臣为伍,则补而不滞、祛瘀而不伤正;以山药、知母、天花粉、鸡内金为佐使药,健脾消积、益气行血。全方配伍“补而不滞,攻而不峻,寓攻于补”,共奏健脾补气、化瘀消癥之功,为治疗妇人癥瘕的临床常用方。本研究建立 ID8 OC 荷瘤小鼠模型,经理冲汤干预后,各剂量组小鼠瘤体质量及肿瘤指数降低、抑瘤率升高,其中理冲汤高剂量组对小鼠

肿瘤生长的抑制作用最为显著,提示理冲汤具有抑制 OC 荷瘤小鼠肿瘤生长的作用。

免疫逃逸是指肿瘤细胞采取各种手段逃避免疫系统的识别和攻击,从而在体内得以生存和增殖的现象<sup>[16]</sup>。Treg 属于具有调节免疫功能的 CD4<sup>+</sup> T 细胞亚群,其经典表型为 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>,在肿瘤微环境中,Treg 可被传统 T 细胞诱导分化,具有较强的免疫抑制功能,以促进肿瘤的发生发展,是介导免疫逃逸的关键 T 细胞亚群之一<sup>[17]</sup>。Treg 通过释放抑制



性细胞因子,如 IL-10、转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ),或通过细胞与细胞之间的直接接触,从而抑制其他免疫细胞的活性,保持免疫耐受<sup>[18]</sup>;或通过靶向 IL-2 和 CD25 消耗 Treg,发挥抗肿瘤作用<sup>[19]</sup>。田璐等<sup>[20]</sup>研究显示,扶正抗癌汤可以提高 OC 荷瘤大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-2 水平及 CD4<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>T、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T 细胞比例,改善机体免疫功能,进而抑制肿瘤生长,发挥抗肿瘤作用。本研究中,理冲汤高剂量组可降低小鼠血清 IL-6、IL-10 水平,降低脾脏中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞亚群比例及肿瘤组织中 MMP-9 蛋白及 Foxp3 mRNA 水平,提高小鼠脾脏指数,血清 TNF- $\alpha$ 、IL-2 水平及肿瘤组织 CD4、CD8 蛋白的表达。提示理冲汤可能通过调节免疫细胞比例降低免疫抑制因子分泌水平,增强机体抗肿瘤免疫应答反应,从而减少肿瘤细胞免疫逃逸,抑制 OC 荷瘤小鼠肿瘤生长。

Wnt/ $\beta$ -catenin 连环蛋白通路,又称 Wnt 经典信号通路,已被确定为与免疫逃逸相关的最重要的致癌信号通路之一<sup>[21-23]</sup>。Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在非激活状态下,细胞内的  $\beta$ -catenin 主要位于细胞膜附近;在激活状态下,Wnt 蛋白通过结合细胞表面的受体卷曲蛋白和核心受体脂蛋白受体相关蛋白 5/6 来启动信号传导,抑制 GSK-3 $\beta$  酶活性,阻止  $\beta$ -catenin 的降解。未降解的  $\beta$ -catenin 在细胞内逐渐积累并进入细胞核,与 T 细胞因子/淋巴增强因子结合,调节多个基因的转录,进而通过影响细胞的增殖、分化、炎症免疫等促进肿瘤的发生和发展<sup>[24-25]</sup>。研究表明,癌细胞释放的 Wnt 配体可以诱导树突状细胞的经典 Wnt 信号通路,导致 IL-10 分泌增加,白细胞介素-12 产生受限,吡啶胺 2,3-双加氧酶上调,有助于 Treg 的产生和随后细胞毒性淋巴细胞活性的抑制<sup>[26]</sup>。抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路可增强 OC 的抗肿瘤免疫力<sup>[27]</sup>。朱文雄等<sup>[28]</sup>研究显示,益肾通瘀颗粒可下调人前列腺癌 PC3 细胞荷瘤裸鼠 Wnt-1、 $\beta$ -catenin 蛋白及 mRNA 的表达,上调 GSK-3 $\beta$  蛋白及 mRNA 的表达,抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路,发挥抗肿瘤作用。本研究中,理冲汤各剂量组肿瘤组织 GSK-3 $\beta$  蛋白及 mRNA 表达升高,Wnt-1、 $\beta$ -catenin 蛋白及 mRNA 表达降低,提示理冲汤可能通过下调 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的表达抑制肿瘤生长及肿

瘤细胞的免疫逃逸。

综上所述,理冲汤具有抑制 OC 荷瘤小鼠肿瘤生长的作用,该作用可能与降低 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞亚群比例,提高机体免疫,调节 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路有关。

## 参考文献

- [1] KONSTANTINOPOULOS P A, MATULONIS U A. Clinical and translational advances in ovarian cancer therapy[J]. *Nature Cancer*, 2023, 4: 1239-1257.
- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, WAGLE N S, et al. Cancer statistics, 2023[J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73(1): 17-48.
- [3] 徐杰茹, 陈磊, 张敏, 等. 1990—2019 年中国卵巢癌发病与死亡趋势及其年龄-时期-队列模型分析[J]. *中国肿瘤*, 2022, 31(4): 276-283.
- [4] MENON U, GENTRY-MAHARAJ A, BURNELL M, et al. Ovarian cancer population screening and mortality after long-term follow-up in the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): A randomised controlled trial[J]. *Lancet*, 2021, 397(10290): 2182-2193.
- [5] 陈秋叶, 卢雯平. 紫蛇理冲汤合外洗方治疗宫颈癌伴人乳头瘤病毒感染随机对照研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2023, 43(8): 916-921.
- [6] 赵书阁, 张霄峰. 张霄峰主任医师理冲汤治疗大肠癌经验总结[J]. *光明中医*, 2022, 37(15): 2718-2721.
- [7] 祁君, 冯硕, 宋锐, 等. 理冲汤加减联合针刺治疗盆腔炎性疾病后遗症慢性盆腔痛的临床观察[J]. *中国临床医生杂志*, 2022, 50(8): 998-1001.
- [8] 陈莹莹, 刘超萍, 陈杨. 理冲汤对性激素诱导的子宫肌瘤大鼠 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的调节作用研究[J]. *西部中医药*, 2023, 36(10): 40-44.
- [9] 王冬梅, 庞瑞. 理冲汤干预卵巢癌肿瘤微环境的机制研究[J]. *新疆医科大学学报*, 2022, 45(1): 104-110.
- [10] 李冬华, 刘宇, 王文娜. 基于免疫相关细胞因子研究理冲汤对子宫肌瘤细胞凋亡和增殖的影响[J]. *世界中医药*, 2022, 17(12): 1692-1696.
- [11] ZHENG J, SUN Y X, LONG T F, et al. Sonosensitizer nanoplat-form-mediated sonodynamic therapy induced immunogenic cell death and tumor immune microenvironment variation[J]. *Drug Delivery*, 2022, 29(1): 1164-1175.
- [12] 杨姣, 陈君君, 张湘奇, 等. 消癌平注射液联合紫杉醇对人卵巢癌 SK-OV-3 细胞增殖及裸鼠异位移植瘤生长的作用[J]. *药理学实践杂志*, 2017, 35(6): 516-519, 529.
- [13] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人

- 体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [14] 徐倩, 王超然, 孙彬栩, 等. 全国名中医贾英杰“黜浊培本”论治卵巢癌的经验撷英[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(1): 60-64.
- [15] 杨爽, 沈影, 韩凤娟. 中医药对卵巢癌的治疗作用及研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2021, 48(10): 202-207.
- [16] ZHAO H, MING T Q, TANG S, et al. Wnt signaling in colorectal cancer: Pathogenic role and therapeutic target[J]. *Molecular Cancer*, 2022, 21(1): 144.
- [17] TAY C, TANAKA A, SAKAGUCHI S. Tumor-infiltrating regulatory T cells as targets of cancer immunotherapy[J]. *Cancer Cell*, 2023, 41(3): 450-465.
- [18] NISHIKAWA H, KOYAMA S. Mechanisms of regulatory T cell infiltration in tumors: Implications for innovative immune precision therapies[J]. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2021, 9(7): e002591.
- [19] YAN Y H, HUANG L, LIU Y M, et al. Metabolic profiles of regulatory T cells and their adaptations to the tumor microenvironment: Implications for antitumor immunity[J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2022, 15(1): 104.
- [20] 田璐, 张新, 张阳. 扶正抗癌汤免疫调节及抑制大鼠卵巢癌移植瘤生长的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(10): 38-43.
- [21] ZHOU Z J, LI X, YANG G, et al. Targeting  $\beta$ -catenin and PD-L1 simultaneously by a racemic supramolecular peptide for the potent immunotherapy of hepatocellular carcinoma[J]. *Theranostics*, 2023, 13(10): 3371-3386.
- [22] LI N, WEI L W, LIU X Y, et al. A frizzled-like cysteine-rich domain in glypican-3 mediates Wnt binding and regulates hepatocellular carcinoma tumor growth in mice[J]. *Hepatology*, 2019, 70(4): 1231-1245.
- [23] ZHOU Y, XU J, LUO H C, et al. Wnt signaling pathway in cancer immunotherapy[J]. *Cancer Letters*, 2022, 525: 84-96.
- [24] TSUTSUMI N, HWANG S, WAGHRAY D, et al. Structure of the Wnt-Frizzled-LRP6 initiation complex reveals the basis for coreceptor discrimination[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120(11): e2218238120.
- [25] ZHANG Y, WANG X. Targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in cancer[J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2020, 13(1): 165.
- [26] OSMAN A, YAN B Y, LI Y, et al. TCF-1 controls Treg cell functions that regulate inflammation, CD8+T cell cytotoxicity and severity of colon cancer[J]. *Nature Immunology*, 2021, 22(9): 1152-1162.
- [27] DOO D W, MEZA-PEREZ S, LONDOÑO A I, et al. Inhibition of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway enhances antitumor immunity in ovarian cancer[J]. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 2020, 12: 1758835920913798.
- [28] 朱文雄, 袁轶峰, 彭涛, 等. 益肾通癥颗粒调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路对人前列腺癌 PC3 细胞荷瘤裸鼠的干预作用[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(12): 2177-2184.

(本文编辑 田梦妍)