

引用: 轩艳红, 张洪亮, 王月, 张立平. 益气养血方通过激活CD4⁺T细胞抑制食管癌增殖的机制研究[J]. 中医导报, 2025, 31(5): 33-37.

益气养血方通过激活CD4⁺T细胞抑制食管癌增殖的机制研究*

轩艳红, 张洪亮, 王月, 张立平

(新疆医科大学第四附属医院/新疆医科大学第四临床医学院, 新疆 乌鲁木齐 830000)

[摘要] 目的: 探讨益气养血方通过激活CD4⁺T淋巴细胞杀伤作用抑制食管癌细胞增殖的机制。方法: 采用ECA109人食管癌细胞和CD4⁺T淋巴细胞共培养模型, 加入0.5 μg/mL益气养血方进行干预, 通过细胞计数(CCK-8)实验、流式细胞术、酶联免疫吸附试验(ELISA)和免疫印迹(Western blotting)等方法, 观察益气养血方对食管癌细胞增殖、凋亡及磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路的影响。结果: CCK-8和流式细胞术表明益气养血方能进一步增强CD4⁺T细胞的杀伤作用, 显著降低食管癌细胞的存活率($P<0.05$)。ELISA结果显示, 在共培养体系中益气养血方能够显著上调γ干扰素(IFN-γ)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和乳酸脱氢酶(LDH)的表达水平($P<0.05$)。Western blotting结果显示, 在共培养体系中益气养血方能够显著下调食管癌细胞中p-PI3K和p-Akt1的表达水平, 抑制PI3K/Akt信号通路的激活($P<0.05$)。结论: 益气养血方能通过激活CD4⁺T淋巴细胞的杀伤作用, 抑制食管癌细胞增殖, 其机制可能与抑制PI3K/Akt信号通路的激活有关。

[关键词] 食管癌; 益气养血方; CD4⁺T细胞; 细胞增殖; PI3K/Akt信号通路

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2025)05-0033-05

DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2025.05.006

The Mechanism of Yiqi Yangxue Decoction (益气养血方) Inhibiting the Proliferation of Esophageal Cancer by Activating CD4⁺T Cells

XUAN Yanhong, ZHANG Hongliang, WANG Yue, ZHANG Liping

(The Fourth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University/The Fourth Clinical Medical College of Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang 830000, China)

[Abstract] Objective: To explore the mechanism of Yiqi Yangxue decoction inhibiting the proliferation of esophageal cancer cells by activating the killing effect of CD4⁺T lymphocytes. Methods: The co-culture model of ECA109 human esophageal cancer cells and CD4⁺T lymphocytes was used, and Yiqi Yangxue decoction (0.5 μg/mL) was added for intervention. Through cell counting kit-8 (CCK-8) experiments, flow cytometry, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and Western blotting, the effects of Yiqi Yangxue decoction on esophageal cancer cell proliferation, apoptosis, and the phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway were observed. Results: CCK-8 and flow cytometry showed that Yiqi Yangxue decoction could further enhance the killing effect of CD4⁺T cells and significantly reduce the survival rate of esophageal cancer cells ($P<0.05$). ELISA results showed that Yiqi Yangxue decoction could significantly up-regulate the expression levels of IFN-γ, TNF-α, and LDH in the co-culture system ($P<0.05$). Western blotting results showed that Yiqi Yangxue decoction could significantly down-regulate the expression levels of p-PI3K and p-Akt1 in esophageal cancer cells in the co-culture system, and inhibit the activation of the PI3K/Akt signaling pathway ($P<0.05$). Conclusion: Yiqi Yangxue decoction can inhibit the proliferation of esophageal cancer cells by activating the killing effect of CD4⁺T lymphocytes, and its mechanism may be related to the inhibition of the

*基金项目: 省部共建中亚高发病成因与防治国家重点实验室开放课题项目(SKL-HIDCA-2019)

通信作者: 张立平, 女, 主任医师, 研究方向为中西医结合肿瘤康复与治疗

activation of the PI3K/Akt signaling pathway.

[Keywords] esophageal cancer; Yiqi Yangxue decoction; CD4⁺T cells; cell proliferation; PI3K/Akt signaling pathway

食管癌作为一种常见的消化道恶性肿瘤,尽管目前针对食管癌的治疗手段有所进步,包括手术、放疗、化疗等,但患者的5年生存率仍然较低,且治疗过程中的副作用和生活质量的下降也是亟待解决的问题^[1-2]。因此,寻找新的、有效的治疗方法成为当前食管癌研究的重要方向。近年来中医药以其独特的整体观念和辨证论治体系而逐渐受到重视,在改善肿瘤患者症状、提高生活质量、减轻放化疗副作用等方面显示出一定的优势^[3]。益气养血方作为中医药方剂的一种,在扶正固本、益气养血方面的功效已被广泛认可,然而,益气养血方在抗食管癌方面的具体作用机制尚不完全明确^[4-5]。CD4⁺T淋巴细胞作为免疫系统中的重要组成部分,不仅参与细胞免疫应答,还能通过分泌细胞因子等调节免疫反应;已有研究表明激活的CD4⁺T淋巴细胞能够直接杀伤肿瘤细胞或通过激活其他免疫细胞间接发挥抗肿瘤作用^[6]。本研究旨在深入探讨益气养血方对食管癌细胞增殖的抑制作用,并阐明其作用机制是否与激活CD4⁺T淋巴细胞的杀伤作用有关。

1 材料与方法

1.1 实验细胞 ECA109人食管癌细胞购自上海雅吉生物科技有限公司,细胞培养条件为RPMI 1640培养基+10%胎牛血清(FBS)+1%青霉素-链霉素双抗(P/S),37℃,5% CO₂,饱和湿度。CD4⁺T细胞分离自患者血液,该研究收集了两名患者的CD4⁺T细胞,所有患者均签署了知情同意书。

1.2 实验动物 20只SPF级雄性SD大鼠用于制备含药血清,体质量为(180±20)g,购自新疆医科大学实验动物中心,动物生产许可证号:SCXK(新)2023-0003,实验动物质量合格证号:2307292023000023。饲养大鼠的环境温度控制在(22±2)℃,湿度则维持在(52±5)%的范围内,可以自由的获取食物和水。本研究经新疆医科大学实验动物福利伦理审查委员会审核批准后开展(动物伦理号:XJYKDX-201907-03)。

1.3 主要实验试剂 CCK-8细胞增殖/毒性检测试剂盒(批号:FC101-03)购自全式金生物科技有限公司。乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(批号:E-BC-K046-M)和FITC-Anti-CD4流式抗体(批号:E-AB-F1109C)购自伊莱瑞特公司。人源性γ干扰素(IFN-γ)ELISA试剂盒(批号:EK180-48)和人源性肿瘤坏死因子-α(TNF-α)ELISA试剂盒(批号:EK182-48)购自联科生物技术有限公司。Annexin V凋亡流式检测盒(批号:559763)购自美国BD公司。Mouse-Anti-β Actin内参抗体(批号:100166-MM10)购自义翘神州生物技术有限公司。Rabbit-Anti-PI3K抗体(批号:AF6241)、Rabbit-Anti-Phospho-PI3K(Tyr607)抗体(批号:AF3241)、Rabbit-Anti-Akt1抗体(批号:AF0836)和Rabbit-Anti-Phospho-Akt1(Thr308)抗体(批号:AF0832)购自美国Affinity公司。

1.4 主要实验仪器 酶标仪(型号:xMarkTM)购自美国Bio-Rad公司;流式细胞仪(型号:FACS Aria II)购自美国BD公司。

CO₂细胞培养箱(型号:Smart Cell HF-90)购自上海力康仪器有限公司;生物安全柜(型号:HF1200LC)购自上海力康仪器有限公司;手动单道移液器(型号:Research plus)购自德国Eppendorf公司;台式低速离心机(型号:DK-80)购自上海飞鸽仪器有限公司。

1.5 CD4⁺T细胞分离和细胞共培养 取患者新鲜抗凝全血3 mL,使用等体积RPMI 1640培养基稀释全血;在15 mL离心管中加入3 mL分离液;将稀释后的血液平铺在分离液液面上方;室温下2 000 r/min(离心半径为10 cm)离心20 min;离心后收集血浆与分离液间的白膜层,小心吸取白膜层细胞到15 mL离心管中,PBS洗涤后备用。收集得到的PBMC细胞,使用PBS制备成1×10⁷/mL细胞悬液,取1 mL细胞悬液至流式管中,加入5 μL FITC anti-human CD4,4℃避光孵育30 min,PBS洗涤一遍1 500 r/min(离心半径为10 cm),离心5 min,加入1 mL PBS重悬细胞上流式细胞仪进行CD4⁺细胞分选。将分离得到的CD4⁺T细胞与ECA109细胞(细胞数量比为1:1,CD4⁺T细胞在上室,ECA109细胞在下室)共培养24 h,收集ECA109细胞进行下游实验。

1.6 含药血清制备 益气养血方(主要组成:黄芪30 g,党参15 g,陈皮10 g,升麻10 g,柴胡10 g,当归20 g,桂枝15 g,白芍15 g,白术15 g,防风15 g,川芎15 g,骨碎补15 g,淫羊藿15 g,甘草5 g)由新疆医科大学第四临床医学院中药制剂室制备。首先将饮片加入2 L纯净水中,浸泡1 h。随后进行煎煮,约1 h后倒出滤液,此过程重复一次,但第二次煎煮时间缩短为30 min,并再次倒出滤液。将两次所得的滤液合并,并转移至500 mL的圆底烧瓶中,此时药液体积约为烧瓶容积的1/2。将烧瓶装入旋转蒸发器中进行蒸发,直至药液浓缩至约30 mL。随后,将浓缩液倒入无菌烧杯内,即制得益气养血方流质浸膏。对浸膏进行质量称量后,使用锡箔纸进行封顶,并保存于4℃的冰箱中。经过计算,每1 g浸膏含有2.7 g生药。本研究采用18.4 g生药/kg的水溶液进行灌胃给药,根据Meerh-Rubner转换法,此给药量与人类临床等效剂量相等,连续灌胃3 d,2次/d,两次相隔12 h^[7]。共灌胃7次,末次给药后2 h采血(灌药前禁食不禁水12 h)。用10%水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,腹主动脉取血,室温下静置4 h,3 000 r/min(离心半径为10 cm)离心15 min,无菌分离血清,同组血清相混。置于56℃水浴中灭活30 min,再用0.22 μm滤器过滤除菌,分装保存,-80℃保存备用。

1.7 实验分组和药物干预 (1)CD4⁺T细胞组:CD4⁺T细胞单独培养;(2)CD4⁺T细胞+益气养血方组:CD4⁺T细胞中加入益气养血方含药血清,干预24 h;(3)ECA109细胞组:ECA109细胞单独培养;(4)ECA109细胞+CD4⁺T细胞组:两种细胞共培养;(5)ECA109细胞+益气养血方组:ECA109细胞中加入益气养血方含药血清,干预24 h;(6)ECA109细胞+CD4⁺T细胞+益

气养血方组:在共培养体系中,加入益气养血方含药血清,干预24 h。

1.8 观察指标

1.8.1 CCK-8实验检测细胞活力 各组细胞用完全培养基制备成 5×10^4 mL单细胞悬液,接种至96孔板中(100 μ L/孔),37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养24 h贴壁后,弃去培养基。干预24 h后弃去培养基,每孔加入100 μ L配置好的10% CCK-8溶液,继续在培养箱中孵育1 h后用酶标仪测定450 nm处的OD值。

1.8.2 流式细胞术检测细胞凋亡 将各组细胞瓶内的培养液吸出至离心管内,PBS洗涤贴壁细胞两次,将PBS一并收集至离心管内,胰酶消化细胞,将细胞转移到离心管内,1 000 r/min(离心半径为10 cm)离心5 min,弃上清。用预冷的PBS洗涤2遍,弃干净上清。加入500 μ L 1 \times Binding Buffer重悬细胞,过200目筛网,制成单细胞悬液。每管加入5 μ L膜联蛋白V-PE偶联物(Annexin V-PE)和10 μ L 7-氨基放线菌素D(7-AAD),轻轻混匀,4 $^{\circ}$ C避光孵育10 min,在30 min内进行流式细胞仪检测。

1.8.3 ELISA检测炎症因子 收集各组细胞培养皿中的上清液,根据ELISA试剂盒提供的说明书,检测上清液中IFN- γ 、TNF- α 的表达水平。

1.8.4 LDH释放率 收集各组细胞培养皿中的上清液,根据LDH试剂盒提供的说明书,检测上清液中LDH的表达水平。

1.8.5 Western blotting检测p-PI3K/PI3K、p-Akt1/Akt1表达水平 收集各组细胞,离心弃上清,用RIPA裂解提取总蛋白,按照SDS-PAGE电泳、PVDF膜转膜,脱脂奶粉去除非特异结合的蛋白,然后在PI3K、p-PI3K、Akt1、p-Akt1和 β -actin抗体中孵育过夜,使用Bio-rad系统显影,使用ImageJ计算灰度值,定量评估蛋白的表达情况。

1.9 统计学方法 计量资料采用“均数 \pm 标准差”($\bar{x} \pm s$)表示,运用SPSS 20.0软件对各组数据进行统计学分析,组间采用单因素方差分析和LSD法进行统计分析,当 $P < 0.05$ 时,表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组食管癌细胞增殖活性 CCK-8实验结果表明,与ECA109细胞组比较,ECA109细胞+CD4 $^{+}$ T细胞组的存活率显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。在加入益气养血方后,ECA109细胞的存活率高于ECA109细胞+CD4 $^{+}$ T细胞组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。当同时将CD4 $^{+}$ T细胞和益气养血方与ECA109细胞共培养时,ECA109细胞+CD4 $^{+}$ T细胞+益气养血方组的存活率显著低于其他所有实验组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。(见表1)

表1 细胞增殖活性统计分析结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	存活率/%
ECA109细胞组	3	100.000 \pm 5.934
ECA109细胞+CD4 $^{+}$ T细胞组	3	89.266 \pm 7.469 ^a
ECA109细胞+益气养血方组	3	94.567 \pm 5.267 ^b
ECA109细胞+CD4 $^{+}$ T细胞+益气养血方组	3	80.836 \pm 5.217 ^{a,b,c}

注:与ECA109细胞组比较,^a $P < 0.05$;与ECA109细胞+CD4 $^{+}$ T细胞组比较,^b $P < 0.05$;与ECA109细胞+益气养血方组比较,^c $P < 0.05$ 。

2.2 各组食管癌细胞凋亡情况 流式细胞术结果显示,与ECA109细胞组比较,ECA109细胞+CD4 $^{+}$ T细胞组的细胞凋亡率明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。在ECA109细胞中加入益气养血方后,与ECA109细胞+CD4 $^{+}$ T细胞组比较,凋亡率显著下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。当益气养血方与CD4 $^{+}$ T细胞共同作用于ECA109细胞时,凋亡率显著高于其他所有实验组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。(见表2)

表2 细胞凋亡率统计分析表 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	凋亡率/%
ECA109细胞组	3	2.510 \pm 0.730
ECA109细胞+CD4 $^{+}$ T细胞组	3	6.333 \pm 1.034 ^a
ECA109细胞+益气养血方组	3	3.607 \pm 0.578 ^b
ECA109细胞+CD4 $^{+}$ T细胞+益气养血方组	3	10.203 \pm 0.605 ^{a,b,c}

注:与ECA109细胞组比较,^a $P < 0.05$;与ECA109细胞+CD4 $^{+}$ T细胞组比较,^b $P < 0.05$;与ECA109细胞+益气养血方组比较,^c $P < 0.05$ 。

2.3 各组细胞上清液中IFN- γ 、TNF- α 含量 ELISA实验结果表明,在CD4 $^{+}$ T细胞中加入益气养血方,可以显著增加上清液中IFN- γ 和TNF- α 的含量,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与ECA109细胞组比较,加入CD4 $^{+}$ T细胞后,IFN- γ 和TNF- α 的分泌量均显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。加入益气养血方后,IFN- γ 水平显著高于ECA109细胞组,显著低于ECA109细胞+CD4 $^{+}$ T细胞组;TNF- α 的表达水平显著低于ECA109细胞+CD4 $^{+}$ T细胞组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。当益气养血方与CD4 $^{+}$ T细胞共同作用于ECA109细胞时,IFN- γ 和TNF- α 的含量显著高于其他所有实验组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。CD4 $^{+}$ T细胞+益气养血方组与ECA109细胞+益气养血方组比较,IFN- γ 和TNF- α 含量显著上升,差异有统计学意义($P < 0.05$)。(见表3)

表3 各组细胞上清液中IFN- γ 、TNF- α 含量分析 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IFN- γ /(pg/mL)	TNF- α /(pg/mL)
CD4 $^{+}$ T细胞组	3	2.951 \pm 0.548	13.146 \pm 1.132
CD4 $^{+}$ T细胞+益气养血方组	3	4.782 \pm 0.607 ^a	15.378 \pm 1.275 ^a
ECA109细胞组	3	0.700 \pm 0.264	9.289 \pm 0.600
ECA109细胞+CD4 $^{+}$ T细胞组	3	3.064 \pm 0.565 ^{b,c}	13.516 \pm 0.693 ^{b,c}
ECA109细胞+益气养血方组	3	2.266 \pm 0.165 ^d	10.357 \pm 1.051 ^d
ECA109细胞+CD4 $^{+}$ T细胞+益气养血方组	3	4.818 \pm 0.274 ^{a,d,e}	15.438 \pm 1.396 ^{a,d,e}

注:与CD4 $^{+}$ T细胞组比较,^a $P < 0.05$;与CD4 $^{+}$ T细胞+益气养血方组比较,^b $P < 0.05$;与ECA109细胞组比较,^c $P < 0.05$;与ECA109细胞+CD4 $^{+}$ T细胞组比较,^d $P < 0.05$;与ECA109细胞+益气养血方组比较,^e $P < 0.05$ 。

2.4 各组食管癌细胞上清液LDH水平 LDH检测结果表明,在CD4 $^{+}$ T细胞中加入益气养血方,可以显著增加上清液中LDH的含量,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与ECA109细胞组比较,单独加入CD4 $^{+}$ T细胞后,LDH的释放量显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。单独加入益气养血方后,LDH的释放相较于ECA109细胞+CD4 $^{+}$ T细胞组显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。当益气养血方与CD4 $^{+}$ T细胞共同作用于ECA109细胞时,LDH的释放量显著高于其他所有实验组,差异均有统计学意义

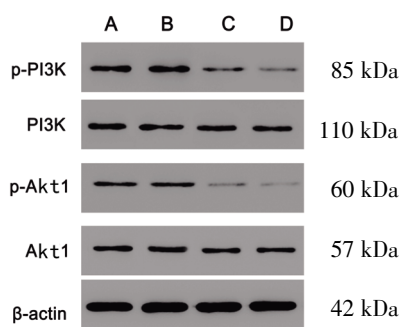
义($P<0.05$)。CD4⁺T细胞+益气养血方组与ECA109细胞+益气养血方组比较,LDH含量显著上升,差异有统计学意义($P<0.05$)。(见表4)

表4 各组细胞上清液 LDH 含量分析 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	LDH/(U/L)
CD4 ⁺ T细胞组	3	271.63 ± 29.753
CD4 ⁺ T细胞+益气养血方组	3	385.50 ± 36.009 ^a
ECA109细胞组	3	161.393 ± 31.355
ECA109细胞+CD4 ⁺ T细胞组	3	274.389 ± 39.061 ^c
ECA109细胞+益气养血方组	3	200.027 ± 23.679 ^{b,d}
ECA109细胞+CD4 ⁺ T细胞+益气养血方组	3	353.735 ± 35.608 ^{c,d,e}

注:与CD4⁺T细胞组比较,^a $P<0.05$;与CD4⁺T细胞+益气养血方组比较,^b $P<0.05$;与ECA109细胞组比较,^c $P<0.05$;与ECA109细胞+CD4⁺T细胞组比较,^d $P<0.05$;与ECA109细胞+益气养血方组比较,^e $P<0.05$ 。

2.5 各组食管癌细胞中p-PI3K/PI3K,p-Akt1/Akt1表达水平与ECA109细胞组比较,ECA109细胞+CD4⁺T细胞组的p-PI3K和p-Akt1的表达未发生明显变化,差异无统计学意义($P>0.05$)。在益气养血方单独或联合CD4⁺T细胞处理的组中,相较于ECA109细胞组和ECA109细胞+CD4⁺T细胞组,p-PI3K和p-Akt1的表达水平均显著下调,差异均有统计学意义($P<0.05$)。(见图1、表5)



注:A.ECA109细胞组;B.ECA109细胞+CD4⁺T细胞组;C.ECA109细胞+益气养血方组;D.ECA109细胞+CD4⁺T细胞+益气养血方组。

图1 ECA109细胞在不同分组各蛋白表达 Western blotting 图

表5 ECA109细胞在不同分组各蛋白的表达水平分析 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	PI3K	p-PI3K	Akt1	p-Akt1
ECA109细胞组	3	0.712 ± 0.069	0.805 ± 0.043	0.803 ± 0.029	0.800 ± 0.062
ECA109细胞+CD4 ⁺ T细胞组	3	0.737 ± 0.070	0.728 ± 0.091	0.831 ± 0.068	0.659 ± 0.050 ^a
ECA109细胞+益气养血方组	3	0.770 ± 0.063	0.463 ± 0.028 ^b	0.863 ± 0.059	0.504 ± 0.086 ^b
ECA109细胞+CD4 ⁺ T细胞+益气养血方组	3	0.767 ± 0.040	0.405 ± 0.017 ^b	0.888 ± 0.031	0.430 ± 0.067 ^b

注:与ECA109细胞组比较,^a $P<0.05$;与ECA109细胞+CD4⁺T细胞组比较,^b $P<0.05$;与ECA109细胞+益气养血方组比较,^c $P<0.05$ 。

3 讨论

食管癌是一种严重威胁人类健康的恶性肿瘤。ECA109细胞株是1973年建系的人食管中段鳞癌细胞,在研究食管癌的发病机制和生物学特性中发挥重要作用。CD4⁺T淋巴细胞是免疫系统中的关键效应细胞,是近年来的肿瘤研究热点^[8-9]。

本研究观察到在CD4⁺T细胞与ECA109细胞共培养后食管癌细胞的存活率显著降低,表明CD4⁺T细胞对食管癌细胞具有直接的杀伤作用。这些发现与之前的报道相一致,即CD4⁺T细胞在抗肿瘤免疫中发挥着重要作用^[10]。当益气养血方加入到这一体系中时食管癌细胞增殖的抑制作用进一步增强,特别是在与CD4⁺T细胞共同作用时效果更为显著。这表明益气养血方可能通过某种机制增强了CD4⁺T细胞的杀伤活性。既往的研究也证明,激活CD4⁺T淋巴细胞可以有效抑制肿瘤细胞的增殖和转移^[11]。细胞凋亡分析结果显示,益气养血方与CD4⁺T细胞共同作用时食管癌细胞的凋亡率显著增加。这进一步证实了益气养血方对食管癌细胞的增殖抑制作用,提示这种抑制作用可能部分是通过诱导细胞凋亡来实现的。既往一项关于软骨细胞的研究也证明益气养血方与细胞凋亡有关^[12]。

在进一步探究其作用机制时,本研究检测了细胞上清液中的IFN- γ 和TNF- α 含量。IFN- γ 是一种具有抗病毒、抗肿瘤及免疫调节功能的细胞因子,主要由活化的T细胞和NK细胞分泌,能有效增强巨噬细胞和淋巴细胞的活性,促进抗肿瘤免疫反应^[13]。TNF- α 是一种多功能细胞因子,由活化的巨噬细胞、NK细胞和T细胞等分泌,具有广泛的生物学效应,包括促进细胞增殖、引发炎症反应和诱导肿瘤细胞凋亡等,在抗肿瘤过程中发挥着重要作用^[14]。结果显示益气养血方能够显著增加IFN- γ 和TNF- α 的分泌,特别是在与CD4⁺T细胞共同作用时,这表明益气养血方可能通过刺激免疫细胞释放这些细胞因子来发挥其抗肿瘤作用。

LDH是一种在细胞质中普遍存在的氧化还原酶,其释放量的变化可以反映食管癌细胞在药物作用下的代谢状态和细胞损伤程度;当食管癌细胞受到损伤或死亡时,细胞膜的完整性被破坏,LDH会释放到细胞外^[15]。结果显示,益气养血方与CD4⁺T细胞共同作用时LDH的释放量显著增加,这表明细胞毒性作用增强,进一步支持了益气养血方对食管癌细胞的杀伤作用。

PI3K和Akt1是细胞信号传导通路中的关键分子,在食管癌细胞增殖和存活机制中扮演重要角色。p-PI3K是PI3K的活化形式,可通过催化磷脂酰肌醇的磷酸化生成磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸,从而激活下游信号分子;p-Akt1是Akt1的活化形式,作为PI3K信号通路下游的关键效应分子,在细胞生长、增殖、存活和代谢等多个方面发挥调控作用^[16-17]。本研究的Western blotting结果显示,益气养血方能够显著下调p-PI3K和p-Akt1的表达水平,这表明益气养血方可能通过抑制PI3K/Akt信号通路来发挥其抗肿瘤作用,这与既往的研究结果类似。张倩等^[18]的结果表明丹参酮同样是通过PI3K/Akt通路来抑制食管癌细胞的生长。

尽管取得了上述结果,但是本研究仍存在不足之处,首先本研究是体外实验,由于体内环境更为复杂,未来需要进一步的研究来验证益气养血方在体内的抗肿瘤效果;此外,还需要深入研究益气养血方的具体作用机制和可能的副作用,以便为其临床应用提供更全面的支持。

综上所述,益气养血方能够通过激活CD4⁺T淋巴细胞的杀

伤作用来显著抑制食管癌细胞的增殖,这种抑制作用可能部分是通过诱导细胞凋亡、刺激免疫细胞释放IFN- γ 和TNF- α ,以及抑制PI3K/Akt信号通路来实现的。这些发现为益气养血方在食管癌治疗中的潜在应用提供了有力的实验依据,并为进一步的临床研究奠定了基础。

参考文献

- [1] WATERS J K, REZNIK S I. Update on management of squamous cell esophageal cancer [J]. *Curr Oncol Rep*, 2022, 24(3): 375-385.
- [2] ZHU H C, MA X, YE T, et al. Esophageal cancer in China: Practice and research in the new era[J]. *Int J Cancer*, 2023, 152(9): 1741-1751.
- [3] 刘馨怡,邓天好,刘珍,等.中医药治疗食管癌的临床及实验研究进展[J].*湖南中医杂志*, 2023, 39(8): 201-206.
- [4] 李玉凤,林伟玲,董小齐.益气养血方联合皮内针对三阴性乳腺癌术后患者疲乏症状及免疫功能的影响[J].*中医研究*, 2022, 35(6): 46-50.
- [5] 李德秀.益气养血方联合化疗对晚期气血两虚型结直肠癌疗效及安全性的队列研究[D].乌鲁木齐:新疆医科大学, 2023.
- [6] XU S W, ZHU Q W, WU L X, et al. Association of the CD4⁺/CD8⁺ ratio with response to PD-1 inhibitor-based combination therapy and dermatological toxicities in patients with advanced gastric and esophageal cancer[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 123(26): 110642.
- [7] 赵婷.基于LncRNA-UFC1/miR-34a/MMP-13轴探讨益气养血方干预骨关节炎软骨退变的机制[D].昆明:云南中医药大学, 2024.
- [8] WANG F Y, LUO M, QU H L, et al. BAP1 promotes viability and migration of ECA109 cells through KLF5/CyclinD1/FGF-BP1[J]. *FEBS Open Bio*, 2021, 11(5): 1497-1503.
- [9] CHEN X, ZHANG W C, QIAN D, et al. Chemoradiotherapy-induced CD4⁺ and CD8⁺ T-cell alterations to predict patient outcomes in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Front Oncol*, 2019, 9(13): 73-79.
- [10] 吴丽娟,徐燕,郭明飞,等.食管癌术后肺部感染患者外周血NK细胞活性、CD4⁺T细胞亚群计数及循环肿瘤细胞水平变化分析[J/OL].*中国免疫学杂志*, 1-13[2024-04-05]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/22.1126.R.20230731.1908.004.html>.
- [11] 樊慧,陈林林,郭军辉,等.食管癌来源外泌体通过E2F4对CD4⁺T细胞向Th17细胞分化的影响[J].*中国免疫学杂志*, 2023, 39(1): 86-93.
- [12] 吴晶金,陈永健,刘维超,等.益气养血方调控Bcl-2/Bax平衡干预ATDC5软骨细胞凋亡的机制研究[J].*中华中医药杂志*, 2016, 31(12): 5202-5205.
- [13] JORGOVANOVIC D, SONG M J, WANG L P, et al. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: A review[J]. *Biomark Res*, 2020, 8(2): 49-65.
- [14] ZHANG H, LUO Y B, WU W T, et al. The molecular feature of macrophages in tumor immune microenvironment of glioma patients[J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2021, 19: 4603-4618.
- [15] HU T, ZHOU C, JIANG J J, et al. Effects of long-term exposure to sevoflurane on the proliferation, migration, invasion, and cisplatin sensitivity of esophageal cancer[J]. *Transl Cancer Res*, 2022, 11(5): 1045-1052.
- [16] XU J C, CHEN T Y, LIAO L T, et al. NETO2 promotes esophageal cancer progression by inducing proliferation and metastasis via PI3K/AKT and ERK pathway[J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(1): 259-270.
- [17] LIU B L, ZHANG B F, QI J L, et al. Targeting MFGE8 secreted by cancer-associated fibroblasts blocks angiogenesis and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, 120(42): e2307914120.
- [18] 张倩,刘艳娇,贾晓龙,等.丹参酮II_A通过调控PI3K/Akt/mTOR信号通路对食管癌细胞放疗敏感性的影响[J].*现代药物与临床*, 2023, 38(11): 2645-2654.

(收稿日期:2024-05-07 编辑:李海洋)