

白术内酯 II 逆转 M2 型巨噬细胞极化调控 PDL1 表达抑制 A549 细胞迁移

蒋宗莹, 赵云辉, 张云亭, 郑一, 王建光, 刘羽茜, 王艳杰*

辽宁中医药大学中西医结合学院, 沈阳 110847

摘要: 探究白术内酯 II (atractylenolide II, AT-II) 对 M2 型巨噬细胞极化与 A549 细胞迁移能力的影响, 并分析其潜在机制。利用 PMA 将 THP-1 细胞诱导成 M0 巨噬细胞, 然后加入 IL-4 和 IL-13 继续诱导为 M2 型巨噬细胞。利用 Transwell 小室将 M2 型巨噬细胞与 A549 细胞共培养, 分别给予 0、2.5、5 $\mu\text{mol/L}$ 的 AT-II 进行作用。采用 MTT 实验测定共培养条件下 AT-II 对 A549 细胞活力的影响; 采用 Real-time PCR 检测 M2 型巨噬细胞 Arg-1 的 mRNA 表达水平; 采用 ELISA 检测共培养体系中 TNF- α 、IL-1 β 的含量; 采用 WB 检测 A549 细胞 TLR4、p-p65、NF- κ B (p65)、PDL1 的蛋白表达水平; 采用划痕实验检测 A549 细胞的迁移能力。结果显示, 共培养条件下, 与对照组相比, 实验组 (2.5、5 $\mu\text{mol/L}$) A549 细胞活力降低 (2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组 $P > 0.05$, 5 $\mu\text{mol/L}$ 组 $P < 0.01$); M2 型巨噬细胞特异性基因 Arg-1 的 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$); M1 型巨噬细胞相关炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 含量增多但无显著差异 ($P > 0.05$); A549 细胞 TLR4/NF- κ B 信号通路相关蛋白 TLR4、p-p65、NF- κ B (p65) 蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$); A549 细胞 PDL1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), A549 细胞迁移能力下降。以上结果表明, AT-II 可以逆转 M2 型巨噬细胞极化, 抑制 A549 细胞 TLR4/NF- κ B 信号通路降低 PDL1 的表达水平, 从而抑制肺癌细胞的迁移。

关键词: 白术内酯 II; A549 细胞; M2 型巨噬细胞; PDL1 蛋白

中图分类号: R34

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)11-1857-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.11.003

Atractylenolide II inhibits A549 cell migration by reversing M2 type macrophage polarization and regulating PDL1 expression

JIANG Zong-ying, ZHAO Yun-hui, ZHANG Yun-ting,
ZHENG Yi, WANG Jian-guang, LIU Yu-xi, WANG Yan-jie*

College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Liaoning
University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China

Abstract: To explore the effect of atractylenolide II (AT-II) on the polarization of M2 macrophages and the migration of A549 cells, and to analyze its potential mechanism. THP-1 cells were induced into M0 macrophages using PMA, and then IL-4 and IL-13 were added to continue inducing M0 macrophages into M2 macrophages. M2 macrophages were co-cultured with A549 cells in Transwell chambers and treated with 0, 2.5, 5 $\mu\text{mol/L}$ AT-II. MTT assay was used to determine the effect of AT-II on the viability of A549 cells under co-culture condition; Real-time PCR was used to detect the mRNA expression level of Arg-1; ELISA was used to detect TNF- α , IL-1 β content in co-culture system; WB was used to detect the protein expression levels of TLR4, p-p65, NF- κ B (p65), PDL1; Scratch experiment was used to detect the migration ability of A549 cells. The results showed that under co-culture condition, compared with the control group, the activity of A549 cells in the experimental group decreased, 2.5 $\mu\text{mol/L}$ group ($P > 0.05$), 5 $\mu\text{mol/L}$ group ($P < 0.01$); The mRNA expression level of M2 macrophage specific gene Arg-1 was significantly reduced ($P < 0.01$); The content of M1 macrophage associated inflammatory factor TNF- α , IL-1 β increased, but did not constitute a significant difference ($P > 0.05$); The expression levels of TLR4, p-p65

收稿日期: 2023-04-12 接受日期: 2023-06-25

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (81202789); 辽宁省自然科学基金指导计划 (2019-ZD-0950); 辽宁省教育厅一般项目 (LJKM20221311)

* 通信作者 Tel: 86-015940157054; E-mail: 15940157054@163.com

and NF- κ B (p65) proteins related to the TLR4/NF- κ B signaling pathway decreased in A549 cells ($P < 0.01$); The expression of PDL1 protein in A549 cells significantly decreased ($P < 0.01$), and the ability of A549 cells migration decreased. These results indicate that AT-II can reverse the polarization of M2 macrophages, inhibit NF- κ B signaling pathway in A549 cells and reduce the expression level of PDL1, thus inhibiting the migration of lung cancer cells.

Key words: atractylenolide II; A549 cells; M2 macrophages; PDL1 protein

肺癌是常见的恶性肿瘤,威胁着人类的健康,是公共卫生面临的一项重大难题。据 GLOBOCAN 2020 年数据和世界卫生组织《世界人口前景》分析,2022 年肺癌仍是我国发生率和死亡率最高的肿瘤^[1]。在肿瘤微环境中,发挥免疫效用的巨噬细胞多表达为 M2 型,多项实验结果显示 M2 型巨噬细胞促进肿瘤细胞增殖与迁移,并与肿瘤耐药呈正相关性^[2,3]。肺癌早期 M1 型巨噬细胞高表达,而中晚期巨噬细胞更倾向于表达 M2 型^[4]。巨噬细胞具有较强的可塑性,并且 M1 型巨噬细胞比率与生存率增加呈正相关,这让阻断 M2 型极化或促进 M2 型复极为 M1 型策略具有吸引力,为肿瘤免疫治疗提供了重要研究方向^[5]。“培土生金法”在治疗肺癌中取得良好成效,本课题组前期发现四君子汤、参苓白术散等培土生金中药复方可以有效抑制肺癌增殖^[6,7]。白术内酯 II (atractylenolide II, AT-II) 是培土生金中药复方中白术里提取的倍半萜单体,在多种肿瘤中具有抗肿瘤活性^[8-10]。AT-II 可以通过诱导凋亡来阻碍肿瘤进展,但其是否可以通过调控免疫,对肿瘤细胞与巨噬细胞间的相互作用产生影响尚不明确,故本文针对 AT-II 对共培养体系下肺癌细胞的免疫调控进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株

THP-1 细胞、A549 细胞,购自武汉普诺赛生命科技有限公司 (CL-0233, CL-0016)。

1.1.2 试剂

胎牛血清 (四季青,批号 19110502); RPMI-1640 培养基 (普诺赛,货号 PM150110B); MTT 试剂 (碧云天,货号 C0009); PMA (Solarbio,货号 P6741); RNase inhibitor (BioTeke,货号 RP5602); RIPA 裂解液 (Solarbio,货号 R0010)。

1.2 方法

1.2.1 M2 型巨噬细胞诱导

参照课题组前期的实验方法^[11],用 PMA、IL-4 与 IL-13 将 THP-1 细胞诱导分化为 M2 巨噬细胞。

待其密度达到 90% 按 1:2 进行传代。

1.2.2 共培养模型建立

利用 Transwell 小室,模拟体内肿瘤微环境^[12],将种有 M2 型巨噬细胞的小室嵌入含 A549 细胞的 96 孔板中共同培养。

1.2.3 MTT 实验测定 A549 细胞活力

根据课题组前期实验摸索发现 2.5、5 $\mu\text{mol/L}$ AT-II 单独作用巨噬细胞与 A549 细胞 48 h 对其细胞活力无影响。构建共培养体系,检测 2.5、5 $\mu\text{mol/L}$ AT-II 对共培养条件下肺癌细胞活力的影响。A549 细胞消化离心后,重悬计数,按 4×10^3 个/孔接种于 96 孔板,设置五个复孔,待其贴壁。将接种不同浓度 AT-II 孵育的 M2 型巨噬细胞的小室嵌入 96 孔板中,共培养 48 h。然后更换为含 MTT 的培养基,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 4 h。去上清,加入 DM-SO,放入酶标仪,读取 570 nm 处 OD 值,根据实验组与对照组 (control, Con) 的 OD 比值计算细胞存活率:细胞存活率 = $[(OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白组}}) / (OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。

1.2.4 Real-time PCR 实验检测 Arg-1 的 mRNA 表达水平

每组设置三个复孔,0、2.5、5 $\mu\text{mol/L}$ AT-II 作用后提取 M2 型巨噬细胞,与裂解液混匀静置后,加入氯仿,震荡 15 s 后放置于室温下 3 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 10 000 g 离心 10 min,将得到的透明水相与无水乙醇按 2:1 混匀,转入吸附柱离心后,弃废液。加入去蛋白液离心 30 s 后,用漂洗液清洗。最后向装有吸附柱的离心管中加入不含 RNA 酶 ddH₂O,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心得到总 RNA。对所得样本进行浓度测定后进行反转录,即将含有模板 RNA、引物、Reaction Buffer、RNase Inhibitor、dNTP Mix、M-MLV 反转录酶的反应体系放入 PCR 仪中。将得到的 cDNA 模板、上下游引物 (Arg-1 上游: CATAGGGATTATTGGAGC, Arg-1 下游: TCATTAGGGATGTCAGCA; GAPDH 上游: GACCTGACCTGCCGTCTAG, GAPDH 下游: AGGAGTGGGTGTCGCTGT)、SYBR GREEN 与 MasterMix 放入荧光定量仪进行扩增处理。最后进行数据分析,根据溶

解曲线判定扩增数据是否可用,若可用则根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值来判断表达量。

1.2.5 ELISA 实验检测 TNF- α 和 IL-1 β 含量

取共培养体系中的上清,离心去除沉淀物。按照试剂盒说明书稀释标准品与抗体。在加样前,用洗液洗板以使包被抗体保持最佳活性,按照每孔 100 μ L 进行加样,加入抗体后封膜。室温振荡孵育 1.5 h 后,弃液,漂洗。再向孔中加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素,封膜孵育 30 min 后再洗涤 6 次。最后再加入 TMB 避光静置 20 min 后终止反应,放入酶标仪进行检测。将校准的 OD 值(450 nm 的测定值减去 570 nm 的测定值)带入绘制的标准曲线计算出各组上清中 TNF- α 、IL-1 β 炎性因子含量。

1.2.6 Western blot 实验检测 TLR4、p-p65、NF- κ B (p65)、PDL1 的蛋白表达水平

提取 A549 细胞,按照试剂盒指示提取总蛋白,采用 BCA 法进行蛋白质定量。将稀释的样品进行煮沸变性,制成上样液。将上样液按每孔 20 μ L 注入胶槽中,进行电泳。电泳结束后按照“三明治”法转膜封闭。完成后再将 PVDF 膜用一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育。清洗 4 次后再将其放入二抗中孵育 1 h,清洗后转入暗盒,洒匀发光液进行曝光。记录条带的光密度值,计算目的蛋白与内参的比值,用于后续分析。

1.2.7 划痕实验检测 A549 细胞迁移能力

铺板前在六孔板底背面画三条平行线,将对数生长的 A549 细胞接种于 6 孔板,置于培养箱内培养。待细胞贴壁且融合度达到 80% 时,用 200 μ L 枪头划出与标记线垂直的细胞划痕,清洗细胞碎片,倒置显微镜下观察记录 0 h 状态。随后将成功种有 M2 型巨噬细胞的小室转入 6 孔板中与 A549 细胞共培养 48 h,48 h 后拍照记录。

2 结果

2.1 AT-II 对 A549 细胞活力的影响

共培养条件下,与 Con 组(1.000 ± 0.089)相比,2.5 μ mol/L 组(0.944 ± 0.094) A549 细胞活力未见显著变化($P > 0.05$),5 μ mol/L 组(0.744 ± 0.111)细胞活力明显下降,具有统计学差异($P < 0.01$)(见图 1)。该项实验数据表明 5 μ mol/L AT-II 对巨噬细胞共培养条件下的肺癌细胞活力具有抑制作用。

2.2 AT-II 对 M2 型巨噬细胞 Arg-1 的 mRNA 表达水平的影响

通过溶解曲线判定扩增基因为单一目的基因 Arg-1,具有特异性,数据具有可信性(见图 2)。与

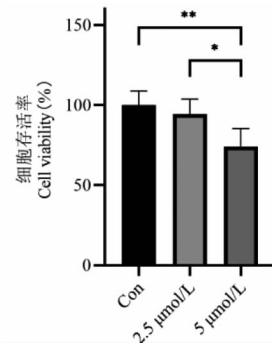


图 1 AT-II 对共培养条件下 A549 细胞活力的影响

Fig. 1 Effect of AT-II on cell viability of A549 in co-culture

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,下同。Note: * $P < 0.05$,

** $P < 0.01$, the same below.

Con 组相比,2.5,5 μ mol/L 组 Arg-1 表达明显降低,具有统计学差异($P < 0.01$)(见图 3)。Arg-1 为 M2 型巨噬细胞相关的特异性分子,其含量降低说明 AT-II 可以逆转巨噬细胞 M2 型极化。

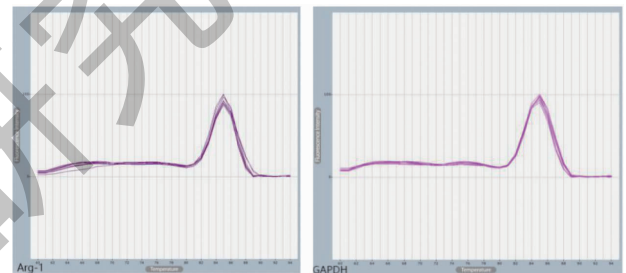


图 2 Arg-1、GAPDH 溶解曲线

Fig. 2 Arg-1 and GAPDH melting curve

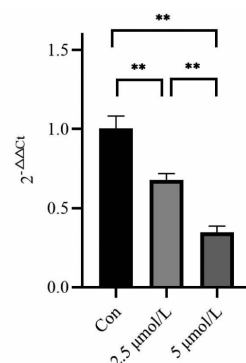


图 3 AT-II 对 M2 型巨噬细胞 Arg-1 的 mRNA 表达水平的影响

Fig. 3 Effect of AT-II on mRNA expression of Arg-1 in M2 macrophages

2.3 AT-II 对上清中 TNF- α 、IL-1 β 含量的影响

2.5 μ mol/L 组与 Con 组相比,上清中 TNF- α 与 IL-1 β 含量无明显差异($P > 0.05$)。5 μ mol/L 组与

Con 组相比有增多趋势但未构成显著差异 ($P > 0.05$) (见图 4)。

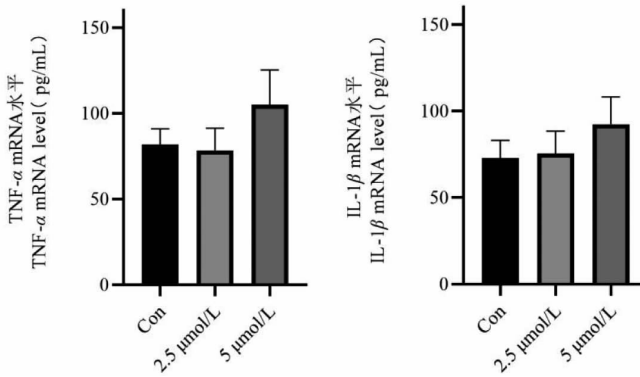


图 4 AT-II 对上清中 TNF- α 、IL-1 β 含量的影响

Fig. 4 Effect of AT-II on TNF- α , IL-1 β content in supernatant

2.4 AT-II 对 A549 细胞 TLR4、p-p65、NF- κ B (p65)、PDL1 的蛋白表达水平的影响

通过条带宽度及目的蛋白与内参的灰度比值可以看出 AT-II 明显抑制 A549 细胞表面 TLR4 蛋白的表达, 显著降低 p-p65、NF- κ B 与 PDL1 蛋白的表达 ($P < 0.01$) (见图 5 与表 1)。

2.5 AT-II 对 A549 细胞迁移能力的影响

划痕 0 h Con、2.5、5 μ mol/L 三组原始边缘距离无差异 ($P > 0.05$), 48 h 后与 Con 组相比, 2.5 μ mol/L 与 5 μ mol/L 组细胞的边缘距离明显增大 ($P < 0.01$) (见图 6)。

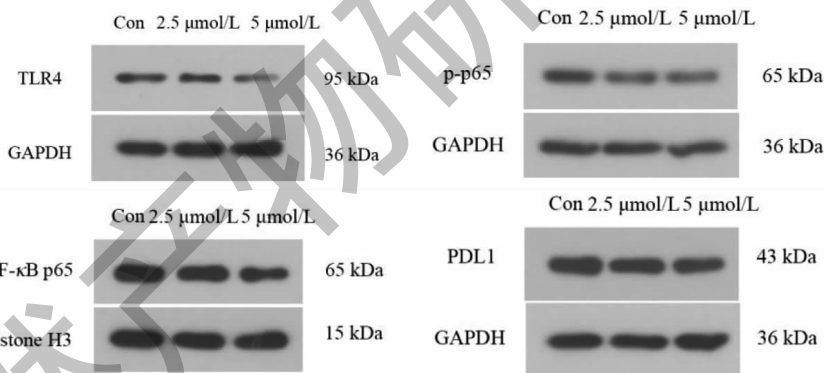


图 5 AT-II 对 A549 细胞 TLR4、p-p65、NF- κ B p65、PDL1 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of AT-II on the expression of TLR4, p-p65, NF- κ B p65 and PDL1 in A549 cells

表 1 AT-II 对 A549 细胞 TLR4、p-p65、NF- κ B (p65)、PDL1 蛋白灰度比值的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of AT-II on the gray ratio of TLR4, p-p65, NF- κ B (p65), PDL1 proteins in A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 Group | TLR4 | p-p65 | NF- κ B p65 | PDL1 |
|-----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Con | 1.072 \pm 0.003 | 0.885 \pm 0.004 | 0.949 \pm 0.001 | 1.035 \pm 0.002 |
| 2.5 μ mol/L | 0.789 \pm 0.002 ** | 0.756 \pm 0.005 ** | 0.967 \pm 0.001 ** | 0.927 \pm 0.004 ** |
| 5 μ mol/L | 0.505 \pm 0.001 ** | 0.729 \pm 0.001 ** | 0.738 \pm 0.001 ** | 0.754 \pm 0.003 ** |

注: 与 Con 组比较, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with Con, ** $P < 0.01$.

3 讨论与结论

肺癌是癌症致死的头号原因, 发病初期病情隐

匿, 容易错过最佳治疗时机^[13]。邪之所凑其气必虚, 中医认为癌瘤为标, 正虚为本, 正虚乃成岩。

“培土生金法”是五行相生理理论的实践化,是“虚则补其母”的具体化。肺癌虽病位在肺,但课题组前期证明“培土生金法”可以通过调理脾脏达到抑制肺癌进展的效果。同时大量实验结果也表明参苓白术散^[14,15]、四君子汤^[16,17]、健脾益肺方^[18]均可以调补脾胃,从而抑制肺癌生长。白术是上述复方中的共有药物,是补脾益气药的代表,其主要药效成分为白术内酯、苍术酮。苍术酮在加热、炮制后含量会明显下降,因此白术内酯成为白术中药煎剂的主要作

用成分。以往药理研究发现白术具有抗肿瘤作用,并且无明显机体毒性。AT- II 是白术中提取的一种倍半萜单体,已证实对多种肿瘤起到抑制作用。

中华中医药学会指出中医药学与免疫学相结合有益于阐明中医药调节机体免疫的机理,为中医药临床有效性提供依据。2018 年诺贝尔获得者詹姆斯·艾利森与庶佑提出通过调动自身免疫能力来攻击癌症的全新观念,印证了“扶正治癌”理论。在肿瘤微环境中,巨噬细胞被招募至微环境中活化成肿瘤

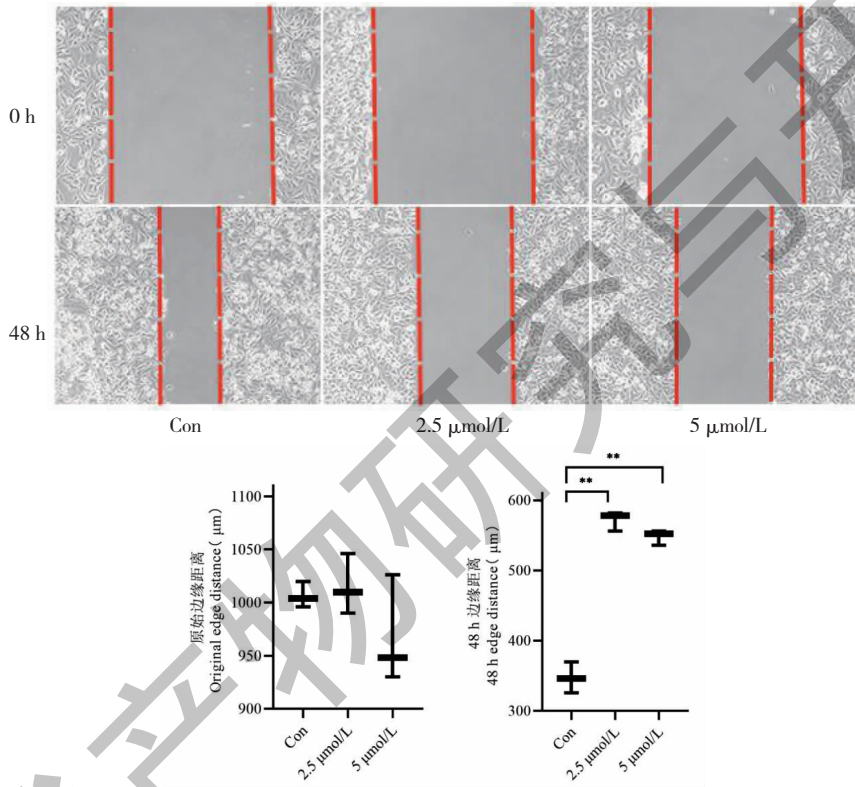


图 6 AT- II 对 A549 细胞迁移能力的影响

Fig. 6 Effect of AT- II on migration ability of A549 cells

相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophages, TAMs),多表达为促瘤 M2 型^[19],高表达 Arg-1,产生 CCL17、CCL18、CCL22 等抗炎因子。本研究通过模拟肿瘤微环境的共培养实验发现 AT- II 降低了巨噬细胞 Arg-1 的表达与肺癌细胞活力,说明 AT- II 可通过减少 M2 型极化抑制肺癌细胞的增殖能力。M2 型巨噬细胞促进肿瘤进展,而 M1 型巨噬细胞高浸润被证实可以抑制肿瘤转移,与生存率增加呈正相关^[20,21]。巨噬细胞较强的可塑性使重编程或再极化成为调节巨噬细胞功能的有效途径。巨噬细胞极化与临床上多种疾病的发生发展相关,尤其是恶性

肿瘤。研究表明 TAMs 根据局部环境呈现一种或几种表型的暂时性表达^[22]。本研究通过 ELISA 测定上清液中 M1 型巨噬细胞相关因子 TNF-α、IL-1β 的含量来推断 AT- II 是否将 M2 型巨噬细胞转换为 M1 型巨噬细胞来达到抑制肿瘤细胞增殖的效果。结果显示 M1 型相关因子 TNF-α、IL-1β 含量有增多趋势但未构成显著性差异,可能与仍处于 M2 型向 M1 型转换过渡期,尚未完全逆转为 M1 型巨噬细胞有关;巨噬细胞极化不受其所在部位本身影响,而是受到其所在特定微环境的信号作用影响。影响极化的因素包括肿瘤细胞来源的因子、肿瘤微环境、巨噬细胞

自分泌因子及稳态失衡因素。临床研究表明炎症是癌症的独立危险因素, SII、NLR、PLR 等炎性标志物可用于评估癌症患者预后^[23]。炎症是肿瘤进展的驱动因素, NF- κ B 信号通路是目前最被认可的炎症通路, 参与肿瘤进展^[24]。同时研究表明激活的 NF- κ B 通路促进 M1 型巨噬细胞炎症介质的合成释放^[25], 本研究 WB 结果显示 AT- II 抑制 A549 细胞 TLR4/NF- κ B 通路, 故可能导致 TNF- α 、IL-1 β 含量无显著增加。同时 TLR4/NF- κ B 通路被证实与免疫抑制分子 PDL1 也有着密切联系, Larsen 课题组的富集结果显示 PD-L1 通过 NF- κ B 富集到其他标志基因集^[26]。IL-1 α 与 IFN- γ 联合时具有协同作用, Chen 等^[27]运用 siRNA 敲低 p65, 发现细胞因子联合驱动的 PD-L1 水平降低。实验表明, 在肿瘤微环境中 PDL1 高表达与肿瘤细胞的迁移能力呈正相关^[28], 与本研究 PDL1 蛋白水平表达降低与划痕实验愈合速率变慢的结果相吻合, 即 AT- II 通过抑制 TLR4/NF- κ B 通路减少 PDL1 表达从而降低了 A549 细胞的迁移能力。

在肿瘤微环境中, TAMs 被驯服, 多表达为促肿瘤型。靶向 TAMs 治疗已成为肿瘤治疗的新兴途径。本文通过实验证明 AT- II 可以逆转巨噬细胞促肿瘤型转换, 减少 PDL1 的表达来抑制肺癌细胞迁移, 为临床治疗肺癌提供了新思路。

参考文献

- Xia CF, Dong XS, Li H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants [J]. Chin Med J (中华医学杂志: 英文版), 2022, 135:584-590.
- Zhang YS, Wang YN, Gao F. Research progress of M1/M2 macrophages in the regulation of colorectal cancer tumor microenvironment [J]. J Mod Med Health (现代医药卫生), 2022, 38:3322-3325.
- Shi F, Chen XQ, Xu ZG, et al. Research progress on the role of tumor-associated macrophages in gastric cancer [J]. Chin J Surg Integr Tradit West Med (中国中西医结合外科杂志), 2022, 28:726-729.
- Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis [J]. Cell, 2010, 141:39-51.
- Qiao YY, Fu EQ. Advances in the study of tumor-associated macrophages in lung cancer [J]. Chin J Lung Cancer (中国肺癌杂志), 2022, 25:34-39.
- Zhang YT, Liu YX, Jiang ZY, et al. Study of I κ B α /NF- κ B pathway about regulation of autophagy in Lewis lung cancer mice through reinforcing shenlingbaizhu powder [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol (世界科学技术-中医药现代化), 2022, 24:1487-1494.
- Guo JF, Wang YJ, Miao LY, et al. Effects of sijunzi decoction containing serum on apoptosis and caspase-3/8/9 mRNA expression of human lung adenocarcinoma SPCA1 cells [C]//China Association of Chinese Medicine. Proceedings of the Fourth Forum on Scientific and Technological Achievements of Chinese Medicine, 2014:42-44.
- Yuan MY, Zhang XX, Xie XD, et al. Observation on effect of atractyloidesin II on gastric cancer cells based on macrophage polarization [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2020, 26:100-108.
- Zhang CX. Atractylenolide II promotes the apoptosis of Lovo cells and its effect on the expression of PARP1 and caspase-3 [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine (南京中医药大学), 2017.
- Dou S, Yang C, Zou D. Atractylenolide II induces cell cycle arrest and apoptosis in breast cancer cells through ER pathway [J]. Pak J Pharm Sci, 2021, 34:1449-1458.
- Zhang YT, Liu YX, Wang JG, et al. Atractylenolide II inhibits tumor-associated macrophages (TAMs)-induced lung cancer cell metastasis [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2022, 44:227-237.
- Wei C. Interaction between tumor-associated macrophages and lymphoma cells and the mechanism of lenalidomide [D]. Beijing: Peking Union Medical College (北京协和医学院), 2013.
- You Q. Study on thoracoscopic radical resection of lung cancer was performed under non-endotracheal intubation and spontaneous respiration [D]. Anhui: Wannan Medical College (皖南医学院), 2020.
- Jiang HY, Xia TT, Wang Y. *In vitro* study on the intervention of the method of reinforcing earth to generate metal on the metastasis of non-small cell lung cancer by regulating TNKS2/APC protein [J]. J Zhejiang Chin Med Univ (浙江中医药大学学报), 2021, 45:214-221.
- Song J, Wang YJ, Guo FJ, et al. The expression of TLR4 on LPS-induced SPCA1 by the serum containing the method of shenling baizhu powder [J]. Inner Mongolia J Tradit Chin Med (内蒙古中医药), 2017, 36:119-121.
- Wu TS, Wang YJ, Guo JF, et al. Effects of inhibition and apoptosis of four noble drugs on Lewis lung cancer in mouse [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2015, 26:2070-2072.

- 17 Guo JF, Wang YJ, Miao LY, et al. Effects of Sijunzi decoction containing serum on apoptosis and Caspase-3/8/9 mRNA expression of human lung adenocarcinoma SPCA1 cells [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2015, 26: 1293-1295.
- 18 Zhang ZH, Yin YS, Liu YF, et al. To investigate the effect of Jianpi-Yifei decoction on the improvement of acute symptoms in patients with advanced non-small cell lung cancer [J]. *J Emerg Tradit Chin Med*(中国中医急症), 2016, 25: 1207-1209.
- 19 Dong JX, Liu XG, Li CX, et al. Effect of jujube leaves alcohol extract on M1 and M2 polarization of mouse macrophages [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2020, 32: 961-967.
- 20 Ahirwar DK, Charan M, Mishra S, et al. Slit2 inhibits breast cancer metastasis by activating M1-Like phagocytic and anti-fibrotic macrophages [J]. *Cancer Res*, 2021, 81: 5255-526.
- 21 Garrido-Martin EM, Mellows TWP, Clarke J, et al. M1^{hot} tumor-associated macrophages boost tissue-resident memory T cells infiltration and survival in human lung cancer [J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8: e000778.
- 22 Dallavalasa S, Beeraka NM, Basavaraju CG, et al. The role of tumor associated macrophages (TAMs) in cancer progression, chemoresistance, angiogenesis and metastasis-current status [J]. *Curr Med Chem*, 2021, 28: 8203-8236.
- 23 Ye DY, Yang S, Zhao LL, et al. Research progress in effects of inflammatory markers on occurrence, development and prognosis of malignant tumors and their mechanisms [J]. *J Jilin Univ: Med*(吉林大学学报:医学版), 2022, 48: 1079-1087.
- 24 Cai H, Yan L, Liu N, et al. IFI16 promotes cervical cancer progression by upregulating PD-L1 in immunomicroenvironment through STING-TBK1-NF- κ B pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 123: 109790.
- 25 Yang F, Tong JH, Li H, et al. BTK inhibitor GDC-0853 inhibits M1 macrophages polarization and alleviates UUO kidney injury via TLR4/NF- κ B pathway [J]. *Immunol J*(免疫学杂志), 2021, 37: 107-114.
- 26 Larsen TV, Hussmann D, Nielsen AL. PD-L1 and PD-L2 expression correlated genes in non-small-cell lung cancer [J]. *Cancer Commun*, 2019, 39: 30.
- 27 Chen S, Crabill GA, Pritchard TS, et al. Mechanisms regulating PD-L1 expression on tumor and immune cells [J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7: 305.
- 28 Kang Y, Ge CL. Effect of miR-200a-3p on PDL1 expression, proliferation and migration of pancreatic cancer cells [J]. *J Mod Oncol*(现代肿瘤医学), 2022, 30: 1937-1940.