

大黄廑虫丸抑制趋化因子配体 17 表达对 CT26 小鼠结肠癌的影响

阮志燕, 任宏, 徐哲, 赖满香, 苏新国(广东食品药品职业学院药学院, 广东 广州 510520)

摘要: **目的** 观察大黄廑虫丸对趋化因子配体 17(CCL17)在 CT26 结肠癌小鼠模型中表达的影响, 研究其可能的抗肿瘤作用机制。**方法** 复制 CT26 结肠癌小鼠模型, 将模型小鼠随机分为模型组, 大黄廑虫丸高、中、低剂量组(48、24、12 g·kg⁻¹·d⁻¹), 另设正常组。计算各组小鼠结肠癌的抑瘤率; 用流式细胞术和免疫荧光法分别检测外周血、肿瘤归巢淋巴结和肿瘤组织细胞中调节性 T 细胞(Tregs)百分比, 肿瘤组织中 CCL17 的表达, 趋化因子受体 4(CCR4)在外周血和肿瘤组织细胞表面的表达百分比和肿瘤组织细胞核转录因子 κ B(NF- κ B)p65 的表达。**结果** 大黄廑虫丸能明显抑制小鼠结肠癌的生长, 且呈剂量依赖性; 大黄廑虫丸各剂量组肿瘤组织中 Tregs 明显减少($P < 0.05$), 肿瘤组织中 CCL17 的荧光强度明显下降($P < 0.05$); 模型组的 CCR4⁺ Tregs 百分比和 CCL17 荧光强度最高, 大黄廑虫丸各剂量组随着用药浓度增加, CCR4⁺ Tregs 百分比和 CCL17 荧光强度均表现为依次降低($P < 0.05$); 大黄廑虫丸能显著抑制结肠癌细胞 NF- κ B 的活化($P < 0.05$), NF- κ B p65 的荧光比例显著降低。**结论** 大黄廑虫丸可通过减少肿瘤组织中 Tregs 的聚集, 降低肿瘤组织中 CCL17 的表达, 下调 CCR4 在 Treg 细胞表面的表达比率, 降低结肠癌细胞 NF- κ B p65 在细胞内的表达, 从而抑制 CT26 小鼠结肠癌细胞的生长。

关键词: 大黄廑虫丸; 趋化因子配体 17; CT26 小鼠模型; 结肠癌

中图分类号: R285.5; R967 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)01-0044-06

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.01.006

Effect of *Dahuang Zhechong* Pill on Development of Colon Cancer in CT26 Mice by Inhibiting the Expression of CCL17

RUAN Zhiyan, REN Hong, XU Zhe, LAI Manxiang, SU Xinguo(College of Pharmacy, Guangdong Food & Drug Vocational College, Guangzhou 510520 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** The effect of *Dahuang Zhechong* pill(DZP) on CCL17 in CT26 colon cancer mice model was investigated, and the possible anti-tumor mechanism and clinical application strategy were explored. **Methods** CT26 colon cancer mice were divided into three groups randomly: model group, DZP(high, medium and low dose) sub-groups and normal group. Flow cytometry and immunofluorescence were used to detect the following indicators respectively: tumor inhibition rate, the percentage of Tregs in peripheral blood, tumor homing lymph nodes and tumor tissues, the expression of chemokine CCL17 in tumor tissues, the expression ratio of chemokine receptor CCR4 on the surface of peripheral blood and tumor tissues, and the activation of nuclear transcription factor κ B(NF- κ B)p65 in tumor tissues. **Results** DZP can inhibit tumor growth of colon cancer in mice in a dose-dependent manner. Compared with the tumor bearing group, the local Tregs in tumor tissues of each dose group of DZP were significantly reduced($P < 0.05$). Compared with the tumor bearing group, the mean fluorescence intensities of CCL17 in tumor tissue in each dose group of DZP were significantly decreased($P < 0.05$); the changes of CCR4 expression percentage on Tregs surface in each experimental group were consistent with these of CCL17. The percentage of CCR4⁺ Tregs in the tumor bearing group was the highest, and the percentages of CCR4⁺ Tregs in each dose group decreased in turn with the increase of drug concentration($P < 0.05$); the activation of NF- κ B in colon cancer cells was significantly inhibited by DZP($P < 0.05$), and the fluorescence percentage of p65 was significantly reduced.

收稿日期: 2020-06-15

作者简介: 阮志燕, 女, 副教授, 博士, 研究方向: 中药质量控制与活性评价研究。Email: 19867188@qq.com。通信作者: 苏新国, 男, 教授, 研究方向: 中药免疫与药学评价研究。Email: 31999678@qq.com。

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金(A2020412); 广东省普通高校创新团队项目(2018GKCXTD005); 广东省普通高校特色创新类项目(2019GKTSCX046); 广东食品药品职业学院自然科学研究项目(2019ZR06)。

Conclusion DZP can inhibit the aggregation of Tregs, reduce the expression of CCL17 and the expression ratio of CCR4 on the surface of Treg cells, and reduce the expression of NF- κ B p65 in colon cancer cells to inhibit the development of colon cancer in CT26 mice.

Keywords: Dahuang Zhezhong pill; CCL17; CT26 mice; colon cancer

大黄廑虫丸出自张仲景《金匱要略》，由熟大黄、土鳖虫、水蛭、虻虫、蛭蟥、干漆、桃仁、炒苦杏仁、黄芩、地黄、白芍、甘草共 12 味中药组成，是去瘀生新、缓中补虚的经典方，临床上已用于多种肿瘤疾病的辅助治疗，可抑制肿瘤的增长，改善患者的生存质量^[1]。结直肠癌(Colorectal Cancer, CRC)是临床最常见的胃肠道恶性肿瘤，全球死亡率居所有恶性肿瘤的第 3 位，总发病率约占 5%，5 年生存率约 40%~60%^[2]。肿瘤细胞免疫逃逸是抗肿瘤机制研究的热点，调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)的免疫抑制功能在肿瘤细胞的免疫逃逸中发挥重要作用^[3-4]。本课题组前期研究^[5]发现小鼠结肠癌局部存在 Tregs 聚集，而大黄素有减少肿瘤局部 Tregs 的作用。趋化因子是调节白细胞在免疫反应和炎症反应中迁移的细胞因子家族，在肿瘤的发生发展过程中发挥重要作用。趋化因子和趋化因子受体在肿瘤中的异常表达可调节白细胞向肿瘤微环境迁移^[6]。趋化因子配体 17(CC chemokine ligand 17, CCL17)和其同源 CC 趋化因子受体 4(CC chemokine receptor 4, CCR4)有控制白细胞迁移和 Tregs 扩增的作用。研究^[7]显示，小鼠因 CCL17 缺陷，迁移进入中枢神经系统的 CD4⁺T 细胞减少，而外周 Treg 细胞增多，可改善实验性自身免疫性脑脊髓炎。在非小细胞肺癌患者中发现高表达 CCL17 有利于 Treg 细胞募集到肿瘤局部，而肿瘤浸润性 Treg 细胞 CCR4 的表达高于相邻位置^[8]。大黄素单体可以抑制小鼠结肠癌的生长，显著降低 Tregs 在肿瘤局部的比率，从实验结果推测大黄素可能通过抑制 CCL17 及其受体 CCR4 的相互作用，降低了调节性 T 细胞向肿瘤组织的趋化^[5]。本研究观察大黄廑虫丸对结肠癌小鼠模型中肿瘤局部 Tregs 比例的影响及 CCL17 及其受体 CCR4 的相互作用，探讨大黄廑虫丸抑制结肠癌肿瘤生长的可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物 BALB/c 小鼠 50 只，SPF 级，雌雄各半，7~8 周龄，体质量(20±2) g，广东省医学实验动物中心，动物使用许可证号：SYXK(粵)2012-0125。

1.2 细胞和药物 结肠癌细胞株 CT26，中国科学院

典型培养物保藏委员会细胞库；大黄廑虫丸，北京同仁堂(国药准字 Z11021241)，用前研磨成粉，用生理盐水配置成悬浊液，现配现用。

1.3 试剂和仪器 单克隆抗体 anti-mouse CD4 FITC，美国 eBioscience 公司，批号：E00087-1630；anti-mouse CD25 APC，美国 MACS 公司，批号：5120306286；anti-mouse CD3 PE-CY7 和 anti-mouse CCR4 PE，美国 BioLegend 公司，批号：B140783、B141432；goat anti-mouse CCL17 和 PE donkey anti-goat IgG，美国 Santa Cruz 公司，批号：C2308、K2217；核转录因子 κ B(NF- κ B)激活-核转运检测试剂盒，碧云天生物技术研究，批号：SN368；FACSCanto II 流式细胞仪，美国 BD 公司；LSM710 激光共聚焦荧光显微镜，德国蔡司公司；CM1950 冷冻切片机，德国莱卡公司。

1.4 结肠癌小鼠模型的建立和大黄廑虫丸的抑瘤作用 CT26 细胞添加 RPMI 1640 完全培养液，置于 37 ℃，5% CO₂ 孵育，体外培养至对数生长期，收集细胞，使用无菌生理盐水调节细胞浓度为 $1 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$ ，将细胞接种于小鼠右前肢腋窝皮下，每只接种结肠癌细胞 2×10^6 个，建立结肠癌小鼠模型。接种第 4 天后，将结肠癌模型小鼠随机分 4 组：大黄廑虫丸高剂量组、中剂量组、低剂量组和模型组。另取 10 只小鼠作正常组，给药剂量见表 1，连续灌胃给药 21 d；模型组和正常组灌胃等体积生理盐水。末次给药后第 2 天颈椎脱臼处死小鼠，分别取外周血、接种侧腋下淋巴结和肿瘤组织。测定大黄廑虫丸各剂量组抑瘤率。抑瘤率(%)=(1-给药组平均瘤质量/模型组平均瘤质量)×100%。

1.5 CD4⁺CD25⁺Tregs 在外周血、肿瘤归巢淋巴结和肿瘤细胞中的表达 摘除小鼠眼球取外周血，常规处理获得单细胞悬液。取肿瘤归巢淋巴结和适量肿瘤组织剪碎碾压，200 目筛网过滤获取单个组织细胞。取 10^6 个细胞进行免疫染色。按抗体试剂说明书加入单克隆抗体，室温避光孵育 15 min，PBS 洗 1 次，离心($300 \times g$ ，4 ℃，5 min)，弃上清液；100 μL PBS 重悬细胞。使用单克隆抗体 CD3、CD4 和 CD25 标记 Tregs，用流式细胞仪检测。Tregs 百分比=(CD3⁺CD4⁺CD25⁺细胞数/CD3⁺CD4⁺细胞数)×100%。

1.6 CCL17 在小鼠肿瘤组织中的表达 取 0.5 cm×0.5 cm×0.3 cm 大小的肿瘤标本,液氮速冻后置于-70℃冰箱保存备用。取出低温保存的肿瘤标本冰冻切片制成 10 μm 厚的切片,于-20℃以丙酮固定 10 min,室温风干。按说明书依次加入一抗 CCL17、藻胆色素蛋白(Phycoerythrin, PE)标记的二抗 IgG、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)处理标本,激光共聚焦显微镜检测,以图像处理软件 ImageJ 分析图片的平均荧光强度。

1.7 CCR4 在 Tregs 表面的表达 取外周血、肿瘤归巢或相同位置的淋巴结和肿瘤组织的单细胞悬液,加入单克隆抗体 CD3、CD4、CD25 和 CCR4 进行免疫染色后上机检测。CCR4⁺Tregs 百分比=(CD3⁺CD4⁺CD25⁺CCR4⁺细胞数/CD3⁺CD4⁺CD25⁺细胞数)×100%。

1.8 CT26 细胞 NF-κB p65 的表达 应用 NF-κB 活化试剂盒检测,通过免疫染色检测细胞核内 NF-κB p65 判断 NF-κB 的活化。取新鲜的肿瘤组织轻柔研磨,200 目筛网过滤获取单个肿瘤组织细胞,取 10⁶ 个细胞进行免疫染色。按照试剂盒说明书进行操作,NF-κB p65 抗体使用 Cy3 染色(红色荧光),细胞核使用 DAPI 染色(蓝色荧光)。最后一遍洗涤完时吸尽洗涤液,滴加抗荧光淬灭封片液,尽快检测。以图像处理软件 ImageJ 分析细胞核内 p65 的相对荧光强度。

1.9 统计学处理方法 计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。使用 SPSS 19.0 for Windows 软件对实验数据进行统计学分析。多组间比较使用单因素方差分析,两组间比较使用 LSD 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大黄廑虫丸对小鼠结肠癌的抑制作用 见表 1。大黄廑虫丸(DZP)高、中、低剂量组的抑瘤率依次为 48%、35%和 18%,具有一定的量效关系。与模型组比较,DZP 高、中剂量组肿瘤质量差异有统计学意义($P < 0.05$)。提示 DZP 对小鼠结肠癌有明显的抑制作用。

2.2 CD4⁺CD25⁺Tregs 在外周血、淋巴结和肿瘤组织中的表达 见表 2。与正常组比较,模型组外周血 CD4⁺CD25⁺Tregs 百分比明显下降($P < 0.05$),而淋巴结中 CD4⁺CD25⁺Tregs 百分比明显上升($P < 0.05$)。与模型组比较,DZP 各剂量组外周血、淋巴结和肿瘤组织中的 CD4⁺CD25⁺Tregs 的百分比均明显下降($P <$

表 1 大黄廑虫丸(DZP)对小鼠结肠癌生长的抑制作用($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Effect of DZP on tumor inhibition rate of mice($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	肿瘤质量/g	抑瘤率/%
DZP 高剂量组	48	0.55 ± 0.23 [*]	48
DZP 中剂量组	24	0.69 ± 0.30 [*]	35
DZP 低剂量组	12	0.87 ± 0.37	18
模型组	-	1.06 ± 0.31	-
正常组	-	0	-

注:与模型组比较,^{*} $P < 0.05$

表 2 各组在不同组织中的 CD4⁺CD25⁺Tregs 百分比($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 Distribution of CD4⁺CD25⁺Tregs in different tissues of mice($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs 百分比/%		
	外周血	淋巴结	肿瘤
DZP 高剂量组	1.08 ± 0.138 [*]	3.13 ± 0.097 [*]	2.53 ± 0.126 [*]
DZP 中剂量组	1.31 ± 0.099 [*]	3.34 ± 0.086 [*]	2.95 ± 0.099 [*]
DZP 低剂量组	1.63 ± 0.118 [*]	3.79 ± 0.103 [*]	3.25 ± 0.173 [*]
模型组	1.71 ± 0.111 [*]	4.46 ± 0.165 [*]	4.01 ± 0.154
正常组	2.48 ± 0.109	4.15 ± 0.181	-

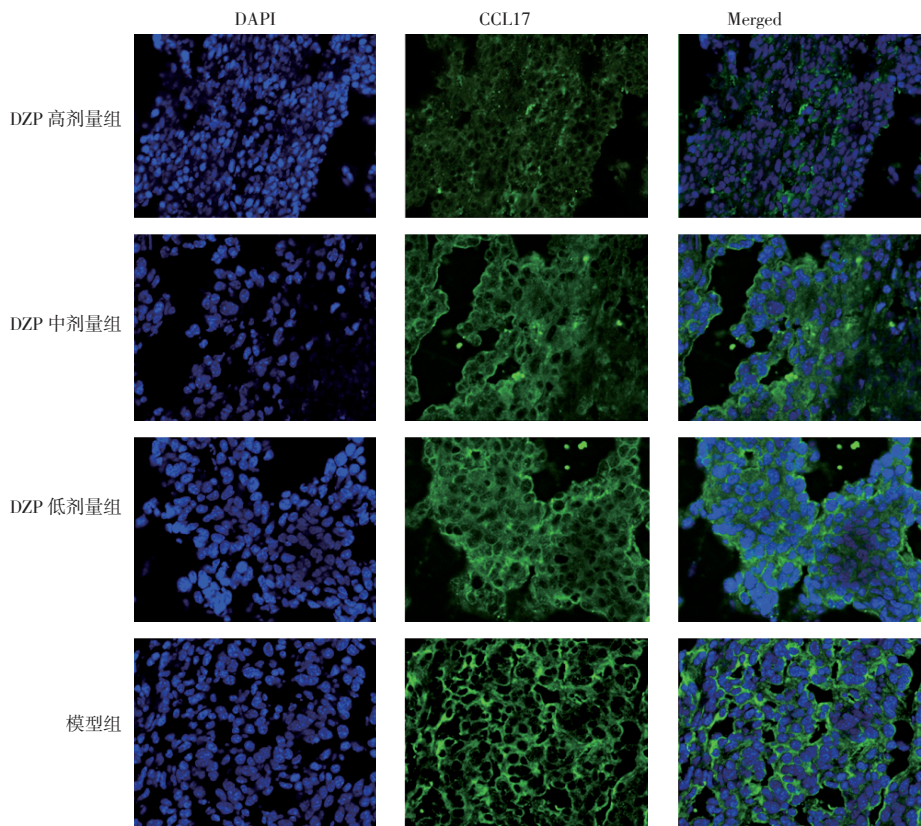
注:DZP:大黄廑虫丸。与正常组相比,^{*} $P < 0.05$;与模型组相比,^{*} $P < 0.05$

0.05),各剂量组 CD4⁺CD25⁺Tregs 的百分比下降幅度与剂量呈相关性。

2.3 CCL17 在小鼠肿瘤组织中的表达 见图 1 和图 2。模型组肿瘤组织可见绿色荧光,分布清晰;DZP 各剂量组肿瘤组织均可见绿色荧光分布,与模型组比较,DZP 各剂量组肿瘤组织局部 CCL17 荧光强度有所下降,其中高、中剂量组差异有统计学意义($P < 0.05$),且随剂量增加下降趋势更为明显。结果提示 DZP 可以降低 CCL17 在模型小鼠肿瘤局部组织的表达。

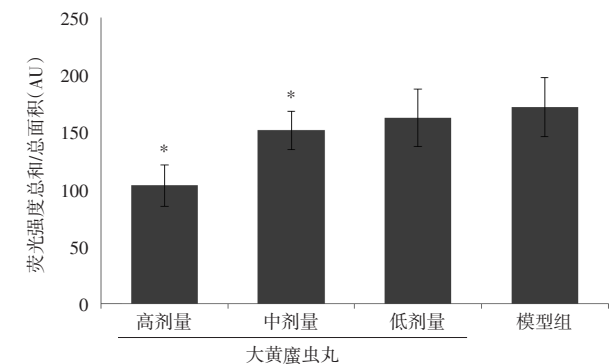
2.4 CCR4 在外周血、淋巴结、肿瘤组织中 Tregs 的表达 见表 3。模型组小鼠外周血和淋巴结中 CCR4⁺Tregs 的百分比低于正常组($P < 0.05$);与模型组比较,DZP 各剂量组外周血中 CCR4⁺Tregs 比值差异无统计学意义($P > 0.05$);在淋巴结中的比值有所升高,其中中剂量组差异有统计学意义($P < 0.05$);DZP 各剂量组肿瘤局部 CCR4⁺Tregs 比值均显著低于模型组($P < 0.05$),提示大黄廑虫丸能降低肿瘤局部 CCR4⁺Tregs 的比值。

2.5 肿瘤细胞 NF-κB p65 在细胞内的表达 见图 3 和图 4。NF-κB p65 使用 Cy3 染色显示为红色荧光,细胞核使用 DAPI 染色显示为蓝色荧光,两荧光通道



注：DZP：大黄廑虫丸。蓝色荧光为 DAPI 标记细胞核的荧光；绿色荧光为 CCL17 抗体标记的荧光。Merged 为蓝色荧光和绿色荧光双通道合并图
图 1 CCL17 在小鼠肿瘤组织中的表达(×400)

Figure 1 The fluorescence of CCL17 in tumor tissues of mice(×400)



注：与模型组相比，**P* < 0.05
图 2 CCL17 在各组肿瘤组织中的荧光表达强度($\bar{x} \pm s$, %; *n* = 10)

Figure 2 The mean fluorescence intensity of CCL17 in tumor tissues of mice($\bar{x} \pm s$, %; *n* = 10)

合并显示粉紫色荧光为 p65 在细胞核内表达。与模型组比较，DZP 各剂量组肿瘤细胞核内 p65 的荧光染色阳性率明显下降，粉紫色荧光面积占全部荧光细胞面积的比例显著减少(*P* < 0.05)，随着用药剂量的增加，粉紫色荧光面积占全部荧光细胞面积的比例越少。提示 DZP 下调了 p65 在细胞核内的表达，抑制了 NF-κB 的活化信号途径。

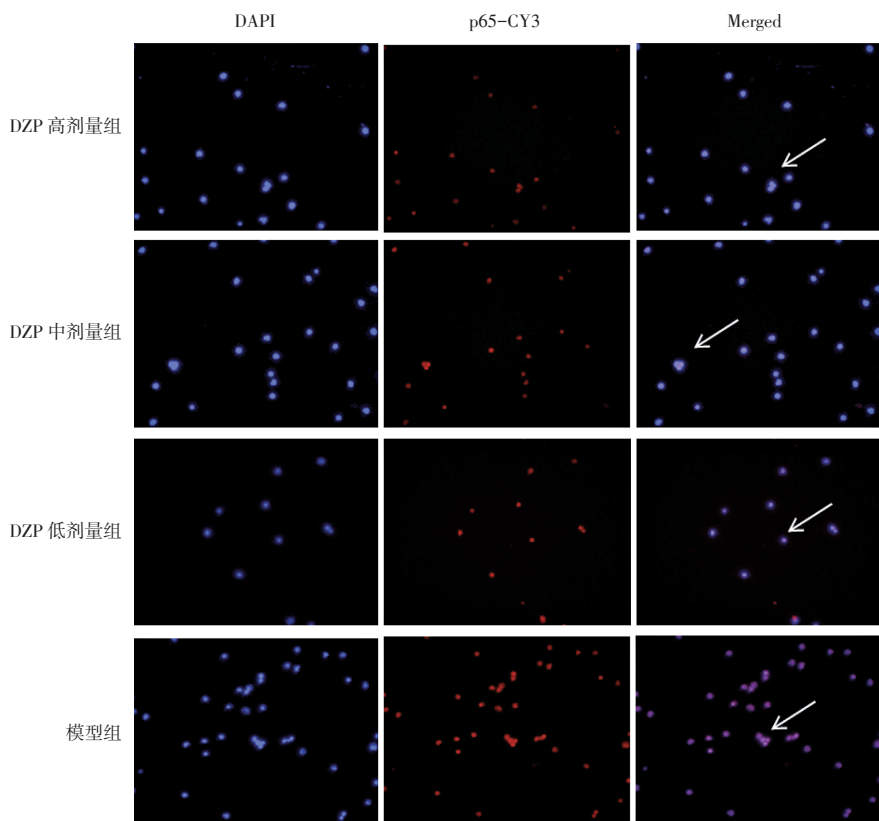
表 3 各组在不同组织中 CCR4⁺ Tregs 百分比($\bar{x} \pm s$, %; *n* = 10)
Table 3 Distribution of CCR4⁺ Tregs in different tissues of mice ($\bar{x} \pm s$, %; *n* = 10)

组别	CCR4 ⁺ Tregs 百分比/%		
	外周血	淋巴结	肿瘤
DZP 高剂量组	41.46 ± 3.523	45.77 ± 3.203	14.27 ± 3.921*
DZP 中剂量组	39.32 ± 1.045	44.14 ± 2.275*	15.36 ± 3.005*
DZP 低剂量组	40.59 ± 2.674	43.34 ± 3.573	17.67 ± 2.861*
模型组	38.87 ± 2.635 [#]	41.54 ± 2.157 [#]	22.31 ± 4.617
正常组	50.71 ± 3.623	52.96 ± 3.091	—

注：DZP：大黄廑虫丸。与正常组相比，[#]*P* < 0.05；与模型组相比，**P* < 0.05

3 讨论

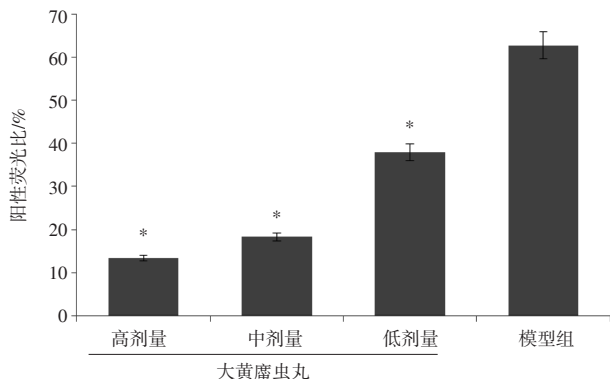
肿瘤组织中的调节性 T 细胞(Tregs)是肿瘤免疫抑制的关键介质，与癌症患者的病程进展和预后不良相关。动物研究^[9]表明，降低肿瘤组织中的 Tregs 可逆转机体抑制性免疫。本研究显示，结肠癌小鼠模型肿瘤中存在 Tregs 积聚，使用大黄廑虫丸(DZP)处理后，显著减少了 Tregs 在肿瘤中的积聚，其中 DZP 高剂量组作用最为显著，提示 DZP 有抑制肿瘤



注：DZP：大黄廑虫丸。DAPI 蓝色荧光染细胞核，CY3 红色荧光染 p65，应用软件合并后呈粉紫色荧光(箭头所示)

图 3 NF-κB p65 在各组肿瘤细胞核内的荧光表达

Figure 3 The fluorescence of p65 in tumor cells



注：与模型组比较，* $P < 0.05$ 。

图 4 各组 NF-κB p65 在肿瘤细胞核内的阳性荧光占比($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Figure 4 The positive fluorescence proportion of p65 in tumor cells($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组织 Tregs 积聚的作用。

Tregs 在肿瘤局部富集是趋化的结果。有研究^[10-11]报道胰腺癌细胞可以分泌高水平的趋化因子，通过与 Tregs 表面受体的相互作用诱导 Tregs 向肿瘤局部迁徙；趋化因子水平越高，肿瘤内 Tregs 浸润越明显，预后越差。在多种肿瘤动物模型中，肿瘤浸润

Tregs 和 CCR4⁺细胞增多，与健康组织相比，癌组织 CCL17 的表达增加了 10~25 倍，说明 CCL17 与其特异性受体 CCR4 参与肿瘤诱导的 Tregs 向肿瘤局部迁徙^[12]。本研究显示，除正常组外，各组小鼠肿瘤组织中均检测到不同水平的 CCL17，其中模型组 CCL17 的表达最高，浸润的 CCR4⁺ Tregs 的比例也最高；与正常组相比，模型组外周血和肿瘤归巢淋巴结中的 CCR4⁺ Tregs 的比例明显减少，这可能是肿瘤内 CCL17 诱导 CCR4⁺ Tregs 向肿瘤局部迁移的结果。

多个研究^[13-15]表明抑制 Tregs 向肿瘤局部迁移、减少 Tregs 在肿瘤局部聚集，有助于改善肿瘤微环境的免疫抑制状态，增强机体抗肿瘤效应。本研究显示，DZP 对小鼠实体肿瘤的生长有抑制作用，且与剂量呈正相关。Leena 等^[16]观察来自健康志愿者和患有黑素瘤或结直肠癌患者的外周组织 Tregs 和 Teff (effector T cells, 效应性 T 细胞) CCR4 的表达及分布，发现所有组织中的 CCR4⁺ Tregs 百分比高于 CCR4⁺ Teffs，肿瘤组织尤其显著；在 CCL17 分泌增加的肿瘤组织中，CCR4⁺ Tregs 显示出高趋化性，被募集到癌组织局部。通过下调或基因沉默 CCL17 在肿瘤相关细胞的表达可抑制癌细胞的迁移和侵

袭^[17-18]。Maeda 等^[19]发现在肿瘤小鼠模型中阻滞 CCR4, 减少 Tregs 向肿瘤局部聚集, 可显著抑制肿瘤生长; 给予自发性膀胱癌的狗抗 CCR4 治疗可以明显提高患狗的生存率。DZP 各剂量组肿瘤组织 CCL17 的荧光表达强度显著低于模型组, 其中 DZP 高剂量组 CCL17 的平均荧光强度约为模型组的 50%; 与 CCL17 的表达相对应的是, 肿瘤局部 CCR4⁺ Tregs 百分比同样随用药剂量增加而减少。提示 DZP 通过降低肿瘤组织 CCL17 的表达, 可抑制 CCR4⁺ Tregs 向肿瘤组织积聚。

NF- κ B 是一种常见的转录因子, 有激活 T 细胞亚群的功能, 正常 Tregs 的分化与 NF- κ B 的激活密切相关^[20], Tregs 在肿瘤微环境中免疫抑制作用可能是通过减少 NF- κ B p65 活化来实现的^[21]。本研究显示, 肿瘤细胞中有明显的 NF- κ B 活化的标志, 使用大黄廑虫丸处理后, NF- κ B p65 活化的肿瘤细胞比例减少, 提示该药抑制了肿瘤细胞 NF- κ B 活化。

结果表明, 大黄廑虫丸对结肠癌生长具有抑制作用; 影响趋化因子 CCL17 及其受体 CCR4 的趋化作用, 减少了 CCR4⁺ Tregs 向肿瘤局部迁移, 改善了肿瘤免疫抑制微环境。同时大黄廑虫丸能抑制 NF- κ B 的活化, 提示 NF- κ B 参与了大黄廑虫丸的抗肿瘤效应。但是, 无论是肿瘤内 Tregs 的来源和迁移, 还是 CCL17 的分泌都是复杂信号通路调节的结果; NF- κ B 可由多种信号通路触发影响肿瘤机体内的 Tregs, 所以 NF- κ B 在结肠癌发展中的具体作用环节有待于进一步系统研究。

参考文献:

- [1] 倪子惠, 曹可馨, 刘晓, 等. 大黄廑虫丸抗癌作用的基础理论及临床治疗研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2019, 25(5): 710-714.
- [2] SIEGEL P L, KIMBERLY D, MILLER K D, AHMEDIN J, et al. Colorectal cancer statistics, 2020[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 71(3): 145-164.
- [3] TANAKA A, SAKAGUCHI S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy[J]. Cell Research, 2017, 27: 109-118.
- [4] TAKEUCHI Y, NISHIKAWA H. Roles of regulatory T cells in cancer immunity[J]. International Immunology, 2016, 28(8): 401-409.
- [5] 阮志燕, 邓向亮, 周联, 等. 大黄素抑制核转录因子- κ B 在结肠癌细胞活化的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(14): 155-159.
- [6] GRIVENNIKOV S I, GRETEN F R, KARIN M. Immunity, inflammation, and cancer[J]. Cell, 2010, 140: 883-899.
- [7] RULAND C, RENKEN H, KUZMANOV I, et al. Chemokine CCL17 is expressed by dendritic cells in the CNS during experimental autoimmune encephalomyelitis and promotes pathogenesis of disease[J]. Brain Behavior Immunity, 2017, 66: 382-393.
- [8] LIU W, WEI X, LI L, et al. CCR4 mediated chemotaxis of regulatory T cells suppress the activation of T cells and NK cells via TGF- β pathway in human non-small cell lung cancer[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 488(1): 196-203.
- [9] SU S C, LIAO J Y, LIU J, et al. Blocking the recruitment of naive CD4⁺ T cells reverses immunosuppression in breast cancer[J]. Cell Research, 2017, 27(4): 461-482.
- [10] LANDSKRON G, DE LA FUENTE M, THUWAJIT P, et al. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment [J]. Journal of Immunological Research, 2014, 2014: 149-185.
- [11] JANG J E, HAJDU C, LIOT C, et al. Crosstalk between regulatory T cells and tumor-associated dendritic cells negates anti-tumor immunity in pancreatic cancer[J]. Cell Reports, 2017, 20: 558-571.
- [12] MAWDA S, NAKAZAWA M, UCHIDA M. Foxp3+ regulatory T cells associated with CCL17/CCR4 expression in carcinomas of dogs[J/OL]. Veterinary Pathology, 2020, 57: 19[2020-06-10]. <https://www.researchgate.net/publication/341027935>. DOI: 10.1177/0300985820-921535.
- [13] MARABELLE A, KOHRT H, SAGIV-BARFI I, et al. Depleting tumor-specific Tregs at a single site eradicates disseminated tumors [J]. Journal of Clinical Investigation, 2013, 123: 2447-2463.
- [14] KOCHIN V, NISHIKAWA H. Meddling with meddlers: curbing regulatory T cells and augmenting antitumor immunity[J]. Nagoya Journal of Medical Science, 2019, 81(1): 1-18.
- [15] PASTILLE E, BARDINI K, FLEISSNER D, et al. Transient ablation of regulatory T cells improves antitumor immunity in colitis-associated colon cancer[J]. Cancer Research, 2014, 74(16): 4258-4269.
- [16] LEENA H, MARCO R, REUBEN M, et al. An atlas of human regulatory T helper-like cells reveals features of Th2-like Tregs that support a tumorigenic environment[J]. Cell Reports, 2017, 20(3): 757-770.
- [17] LI J, YANG C, YANG J, ZOU L. Down-regulation of CCL17 in cancer-associated fibroblasts inhibits cell migration and invasion of breast cancer through ERK1/2 pathway[J]. Cancer Management and Research, 2019, 7(11): 7439-7453.
- [18] BIRAGYN A, BODOGAI M, PUREVDORJ B. Inhibition of lung metastasis by chemokine CCL17-mediated in vivo silencing of genes in CCR4⁺ Tregs [J]. Journal of Immunotherapy, 2013, 36(4): 258-267.
- [19] MAEDA S, MURAKAMI K, INOUE A. CCR4 Blockade Depletes Regulatory T cells and prolongs survival in a canine model of bladder cancer[J]. Cancer Immunology Research, 2019, 7(7): 1175-1187.
- [20] SIEGMUND K, THUILLIE N, WACHOWICZ K, et al. Protein kinase C theta is dispensable for suppression mediated by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells[J]. PLoS ONE, 2017, 12(5): e0175463.
- [21] TORREY H, BUTTERWORTH J, MERA T, et al. Targeting TNFR2 with antagonistic antibodies inhibits proliferation of ovarian cancer cells and tumor-associated Tregs[J]. Sci Signal, 2017, 10: 1-12.

(编辑: 梁进权)