

淫羊藿素调控巨噬细胞极化治疗肝内胆管癌的药效作用及机制初探

王婧雯^{1,2}, 李 珍², 黄秀勤², 徐子婧², 耿嘉豪², 许燕瑜², 梁天祎², 湛小燕³,
康利平⁴, 王伽伯^{1,2,4*}, 宋鑫华^{2*}

(1. 南方医科大学中医药学院, 广东 广州 510000; 2. 首都医科大学中医药学院, 北京 100071; 3. 解放军总医院第五医学中心, 北京 100071; 4. 道地药材品质保障与资源持续利用全国重点实验室, 北京 100070)

摘要: 肝内胆管癌 (intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC) 发病率持续攀升, 目前尚无有效治疗药物。免疫微环境在 ICC 发展中扮演重要角色, 是当前研究热点。淫羊藿素 (icaritin, ICA) 是治疗晚期肝细胞癌的创新中药, 被认为有潜在的免疫调控抗肿瘤作用, 与中医“扶正”治疗肿瘤的认识潜在相合。然而, ICA 是否可用于 ICC 治疗尚未见研究报道。为此, 本研究选取免疫系统完整的原位 ICC 小鼠模型 sgp19/kRas, 首次在体内评估了 ICA 治疗 ICC 的药效, 并通过流式细胞术分析 ICA 对 ICC 小鼠肿瘤免疫微环境的影响 [本实验所有动物实验均获得首都医科大学动物伦理委员会 (中国北京) 批准, 批准号: AEEI-2023-138]。本研究应用 100 mg·kg⁻¹ ICA 灌胃治疗 sgp19/kRas ICC 原位小鼠模型, 结果显示, ICA 治疗 3 周后能够显著抑制 sgp19/kRas ICC 小鼠模型的肿瘤生长及肿瘤细胞增殖。通过流式细胞术分析 ICA 对 ICC 小鼠肿瘤免疫微环境的影响, 结果表明, ICA 治疗后能够显著降低 M2 型巨噬细胞占比, 并且显著增加 CD3⁺CD4⁺ T 细胞的数量。体外实验阐明 ICA 能促进巨噬细胞向 M1 型巨噬细胞极化, 抑制其向 M2 型巨噬细胞极化。此外, 转录组学分析结果提示, ICA 能够增强 Toll 样受体 9 (TLR9) 的表达, 影响巨噬细胞一氧化氮代谢合成途径及膜受体相关活性, 发挥其巨噬细胞极化调节功能。综上, 本研究发现 ICA 治疗能显著延缓 sgp19/kRas ICC 小鼠肿瘤进展。机制上, ICA 可能通过上调 TLR9 受体表达水平, 促进巨噬细胞向 M1 细胞的极化, 改变肿瘤免疫微环境, 进而达到抗 ICC 的作用。

关键词: 肝内胆管癌; 淫羊藿素; 免疫微环境; 巨噬细胞极化; Toll 样受体 9

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)08-2227-10

Preliminary exploration of the pharmacological effects and mechanisms of icaritin in regulating macrophage polarization for the treatment of intrahepatic cholangiocarcinoma

WANG Jing-wen^{1,2}, LI Zhen², HUANG Xiu-qin², XU Zi-jing², GENG Jia-hao², XU Yan-yu²,
LIANG Tian-yi², ZHAN Xiao-yan³, KANG Li-ping⁴, WANG Jia-bo^{1,2,4*}, SONG Xin-hua^{2*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510000, China; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100071, China; 3. Fifth Medical Center, PLA General Hospital, Beijing 100071, China; 4. State Key Laboratory for Quality Ensurance and Sustainable Use of Dao-Di Herbs, Beijing 100070, China)

Abstract: The incidence of intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) continues to rise, and there are no effective drugs to treat it. The immune microenvironment plays an important role in the development of ICC and is currently

收稿日期: 2024-03-25; 修回日期: 2024-05-15.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82204680); 中央本级重大增减支项目“名贵中药资源可持续利用能力建设项目” (2060302-2303-19); 国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目 (ZYYZDXK-2023004); 国家中医药管理局中医药创新团队及人才支持计划项目 (ZYYCXTD-C-202005).

*通讯作者 E-mail: jjabo_wang@ccmu.edu.cn; songxinhua0726@yeah.net

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0265

a research hotspot. Icaritin (ICA) is an innovative traditional Chinese medicine for the treatment of advanced hepatocellular carcinoma. It is considered to have potential immunoregulatory and anti-tumor effects, which is potentially consistent with the understanding of "Fuzheng" in the treatment of tumor in traditional Chinese medicine. However, whether ICA can be used to treat ICC has not been reported. Therefore, in this study, sgp19/kRas, an *in situ* ICC mouse model with intact immune system, was selected to evaluate the efficacy of ICA in the treatment of ICC *in vivo* for the first time, and the effects of ICA on the tumor immune microenvironment of ICC mice were analyzed by flow cytometry. This experiment was approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Capital Medical University (approval number: AEEI-2023-138). In this study, sgp19/kRas ICC mouse model was treated with oral gavage of 100 mg·kg⁻¹ ICA. We found that ICA significantly inhibited tumor growth and tumor cell proliferation in the sgp19/kRas ICC mouse model after 3 weeks of treatment. Flow cytometry analysis indicated that ICA treatment markedly reduced the proportion of M2 macrophages and increased the number of CD3⁺CD4⁺ T cells. *In vitro* experiments demonstrated that ICA promoted macrophage polarization towards the M1 phenotype while inhibiting polarization towards the M2 phenotype. Furthermore, transcriptomic analysis suggested that ICA enhanced Toll-like receptor 9 (TLR9) expression, influencing macrophage nitric oxide metabolism synthesis pathways and receptor-related activities, thereby regulating macrophage polarization. In summary, this study demonstrates that ICA treatment significantly delays tumor progression in sgp19/kRas ICC mouse models. Mechanistically, ICA may achieve its anti-ICC effects by upregulating TLR9 receptor expression levels, promoting macrophage polarization towards the M1 phenotype, and altering the tumor immune microenvironment.

Key words: intrahepatic cholangiocarcinoma; icaritin; immune microenvironment; macrophage polarization; Toll-like receptor 9

肝内胆管癌 (intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC) 是仅次于肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 的第二大原发性肝癌, 近年来在我国发病率持续攀升, 目前尚无有效治疗药物^[1,2]。ICC 是一种恶性程度极高的肝脏原发肿瘤, 与 HCC 相比, ICC 具有更高的转移率、更高的侵袭性、高化疗耐药性、发病隐匿和早期转移等特性, 因此多数患者确诊时常伴有局部侵袭或远处转移而失去手术根治机会, 5 年生存率仅为 15%~40%^[3-5]。

淫羊藿 (epimedium) 又名仙灵脾, 《神农本草经》列为中品, 具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的功效。淫羊藿素 (icaritin, ICA) 是从中药淫羊藿中提取、分离得到的淫羊藿苷水解产物, 其常用商品名为阿可拉定。多项药理研究表明, ICA 不仅具备促骨骼修复和消炎作用等广泛的治疗能力, 还可影响多种免疫细胞的活性, 临床上可作为一种新的免疫调节剂以治疗肝癌^[6]。而关于 ICA 治疗肝癌的作用机制研究, 大多集中在 HCC 上, 对于 ICC 的报道少之又少。仅有的报道也只限于 ICA 对于 ICC 细胞的直接杀伤, 且缺乏体内机制研究^[7]。

肿瘤免疫微环境 (tumor microenvironment, TME) 是指肿瘤的发生、生长及转移与肿瘤细胞所处的内外环境有着密切关系。在 TME 中, 多种免疫细胞被招募且浸润的免疫细胞成分复杂多变, 并对肿瘤细胞的生长产生一定的影响。肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-asso-

ciated macrophages, TAMs) 是肝癌微环境中数量最多的免疫细胞, 具有高度可塑性与异质性, 是造成肝癌抑制性免疫微环境的重要亚群之一。肿瘤微环境中的 TAMs 能够被不同的细胞因子招募和激活, 分化成与特定病理状况相关的特定极化形式: M1 型巨噬细胞和 M2 型巨噬细胞。M1 型巨噬细胞加速适应性免疫反应的激活, 同时分泌细胞因子, 促进炎症反应; 而 M2 型巨噬细胞分泌抑制性细胞因子, 同时促进免疫逃逸、血管生成和组织重塑, 以实现肿瘤生长和转移^[8]。基于中医药“扶正”调节免疫治疗肿瘤的认识, 中药对 TME 的影响已成为近年来的研究热点。

因此, 靶向 ICC 体内的肿瘤微环境可能作为治疗癌症的潜在靶标。本研究将重点对 ICA 是否通过作用于肿瘤免疫微环境而起到抗 ICC 的作用进行研究。

材料与方法

实验动物 从斯贝福生物技术有限公司购买 6~8 周龄、体重 18~20 g 的雌性 C57BL/6J 小鼠。在实验期间, 动物被饲养在没有病原体的环境中, 同时可以不受限制地获得食物和水。本研究中的所有动物程序均按照实验动物的护理和使用指南进行, 并经首都医科大学动物伦理委员会批准。在实验时, 尽最大努力将痛苦和使用的动物数量降至最低。实验动物伦理编号为 AEEI-2023-138。

药物与试剂 淫羊藿素(货号: 118525-40-9)购自成都普菲德生物技术有限公司; 聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl pyrrolidone, PVP, 货号: 81420-100G)、胶原酶(货号: C5138)购自美国Sigma-Aldrich公司; LB肉汤(货号: 02-136)购自北京奥博星生物技术有限责任公司; ACK裂解液(货号: 2451173)、EDTA ($0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (货号: R1021)、ACK裂解缓冲液(货号: A1049201)购自美国Thermo Fisher Scientific公司; 牛血清白蛋白V(货号: A21749-5G)、脱氧核糖核酸酶I(货号: EZ1178)、Hyaluronidase(货号: EZ1176)、两性霉素B(货号: AT0453)购自北京中海威基因科技有限公司; Percoll细胞分离液(货号: 17-0891-01)购自美国GE公司; Cyto-Last Buffer(货号: 422501)购自美国Biolegend公司; Foxp3/转录因子染色缓冲液套件(货号: 00-5523-00)购自美国eBioscience公司; FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2(货号: RC112-01)、增强型ECL化学发光检测试剂盒(货号: E411-04/05)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; Western blot一抗稀释液(货号: P0023A-500 mL)、Western blot二抗稀释液(货号: P0023D-500 mL)购自上海碧云天生物技术有限公司; 无蛋白快速封闭液(货号: PS108P)、Western blot抗体快速剥离缓冲液(温和通用型)(货号: PS107)、一步法PAGE凝胶快速制备试剂盒(货号: PG213)购自上海雅酶生物医药科技公司; RIPA裂解液(货号: BN25012)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(货号: BN27109)购自北京百瑞极生物科技有限公司; 2 mL冻存管(货号: 430659-1)、50 mL离心管(货号: 430829)购自美国Corning公司; Trizol(货号: 111003)、涂布棒(货号: HK9945-100)购自北京军科弘创生物技术有限公司; 无内毒素质粒小提中量试剂盒(货号: DP118-02)、无内毒素质粒大提试剂盒(增强型)(DP120)购自北京天根生化科技有限公司。

主要仪器 FACSymphonyTM流式细胞仪(美国BD Biosciences公司); 离心机(美国Sigma公司); 恒温孵箱(美国Thermo Fisher公司); 多功能酶标仪(美国伯腾仪器有限公司); 摇床(北京兰杰柯科技有限公司); $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱(海尔公司)。

细胞用ICA配制 使用细胞培养级DMSO溶解至 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 后超声, 现用现配。

动物用ICA配制 用15% PVP溶解, 后超声, 过 $0.22 \mu\text{m}$ 滤网。配制成 $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 浓度, 现用现配。每只鼠灌胃给予 0.2 mL , 即给药质量浓度为 $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 淫羊藿素溶液。

质粒配制 质粒溶液用量为10%体重(以小鼠体重 20 g 为例, 质粒溶解在 2 mL 生理盐水中)质粒用量

如下: sgp19 ($10 \mu\text{g}$), kRas ($25 \mu\text{g}$), SB ($5 \mu\text{g}$)。选用6~8周龄雄性FVB/N小鼠。将质粒sgp19、kRas、SB质粒混合, 混合后的质粒溶液经过 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 在5~10 s内快速注入小鼠尾静脉。

分组与给药 对于模型组和治疗组, 将以上模型随机分为每组8只, 间隔处死小鼠, 确定小鼠肿瘤形成及进展时间, 肿瘤重量为 $2\sim 3 \text{ g}$ 时处死小鼠作为用药前组, 收集肝脏组织。此后开始给药, ICA用量为 $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 每天给药1次, 每周灌胃6天间歇1天, 连续给药3周。

流式细胞术实验分组为同周龄的正常小鼠组、模型对照组和ICA治疗组。

小鼠骨髓来源巨噬细胞 (bone marrow-derived macrophages, BMDM) 的提取 取雌性C57小鼠, 脱颈处死后浸泡在75%乙醇中, 浸泡 $2\sim 3 \text{ min}$ 。在超净工作台中, 用消毒的剪刀剪开小鼠大腿处的皮毛, 沿着大腿剪至髌关节, 直至取出完整大腿, 放置在干净的纱布上, 隔着纱布剥离上面的组织。取配制好的DMEM培养基和5 mL注射器, 将吸取了培养基的注射器针头插入大腿和小腿末端缺口, 在50 mL离心管中冲洗 $3\sim 4$ 次, 看到大腿骨头泛白即冲洗干净。骨髓来源的巨噬细胞已在离心管中, 慢慢吹匀。加入 $25 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 小鼠集落刺激因子 (macrophage colony stimulating factor, M-CSF), 可以催化细胞生长, 后放置在孵箱中培养。在第3天时, 6孔板每个孔补加 1 mL 配制好的含M-CSF的DMEM培养基继续培养。细胞培养至第5天时, 可以在显微镜下观察细胞状态, 为长梭形、密度合适时即可进行后续实验。

细胞培养 M4-2a、SK肝内胆管癌细胞、RAW264.7、小鼠BMDM在DMEM培养基中培养, 细胞培养箱的条件设置为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温, CO_2 浓度为5%。

细胞给药 细胞贴壁完全后, 先弃去上清, 巨噬细胞给予相应的刺激后 24 h 再加入相应浓度的淫羊藿素。

荧光实时定量聚合酶链式反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, real-time PCR) 检测巨噬细胞极化相关因子水平 将细胞用试剂盒提取总RNA, 并测定总RNA浓度。取 $1 \mu\text{g}$ 总RNA, 反转录成cDNA, 按照反转录试剂盒说明书步骤操作。采用SYBR Green染料法进行RT-qPCR, 总反应体积为 $20 \mu\text{L}$ 。反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s , $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s , $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s , 共进行40次循环。设置3个复孔, 实验重复3次。以GAPDH为内参照, 引物序列见表1。

巨噬细胞预处理培养基的收取 RAW264.7细胞接种于6孔板里, 接种密度为每毫升 1×10^6 个, 贴壁后

Table 1 Primer sequences used in this study

Gene	Primer sequence
<i>TNF-α</i>	Forward 5'-CTCTTCTGTCTACTGAACCTTCGG-3' Reverse 5'-AAGATGATCTGAGTGTGAGGGT-3'
<i>VEGFα</i>	Forward 5'-GACCTCTCACCGAAAGACC-3' Reverse 5'-TCCTCTTCCTCATGTCAGGC-3'
<i>ARG1</i>	Forward 5'-CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG-3' Reverse 5'-AGGAGCTGTCATTAGGGACATC-3'
<i>Ccl22</i>	Forward 5'-CCCTATGGTGCCAATGTGA-3' Reverse 5'-GCAAGGCTCTTGCTGGAATG-3'
<i>CD206</i>	Forward 5'-TTTGGAGGCTGATTACGAGCA-3' Reverse 5'-TGGTTCACCGTAAGCCCAAT-3'
<i>IL-13</i>	Forward 5'-ATGAGTCTGCAGTATCCCG-3' Reverse 5'-CCGTGGCAGACAGGAGTGTT-3'
<i>TGFβ1</i>	Forward 5'-GTCCAACTAAGGCTCGCCA-3' Reverse 5'-ATAGATGGCGTTGTTGCGGT-3'
<i>Fizz1</i>	Forward 5'-GAGACCATAGAGATTATCGTGGA-3' Reverse 5'-CACACCCAGTAGCAGTCATC-3'
<i>TLR9</i>	Forward 5'-ATGTTCTCCGTCGAAGGACT-3' Reverse 5'-GAGGCTTCAGCTCACAGGG-3'
<i>GAPDH</i>	Forward 5'-GGCATTGCTCTCAATGACAA-3' Reverse 5'-ATGTAGCCATGAGGTCCAC-3'

分别给予 LPS (200 ng·mL⁻¹)、IL-4 (20 ng·mL⁻¹) 刺激, 24 h 后给予对应浓度的 ICA, 并按照 0、6、24、48、72 h 收集细胞上清, 2 000 r·min⁻¹, 4 °C 离心 10 min 后, 吸取上清, 过滤后, 冻存于 -80 °C, 作为预处理培养基。

细胞活力检测 使用结晶紫染色检测 ICA 刺激 RAW264.7 细胞后产生的预处理培养基对 M4-2a、SK 细胞活力的影响。将 ICC 细胞接种在 24 孔板中, 待细胞贴壁完全后, 弃去上层培养基, 将预处理培养基和细胞完全培养基 1:1 混合制备成条件培养基 (conditioned medium, CM), 加入 24 孔板内。在孵箱中处理 24 h 后, 吸干各孔中的培养基, 加入配制好的结晶紫染料, 静置 2~5 min 后, 用流水缓慢洗去多余染料。倒扣 24 孔培养皿, 待其完全风干后, 每孔加入 300 μ L 33% 乙酸溶解, 再点 96 孔板酶标仪在 570 nm 波长处检测吸光值。

蛋白质印记法检测蛋白表达 设置对照组及时间梯度 ICA 刺激组, 每组设置 3 个复孔, 巨噬细胞在 LPS/IL-4 刺激后, 给予不同浓度的 ICA, 用 BCA 试剂盒对蛋白浓度进行定量, 每孔上样量 25 μ g, 分离后的样本转移至 PVDF 膜中, 转膜结束后加入 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入 GAPDH (1:2 000)、iNOS (1:1 000)、ARG1 (1:1 000)、TLR9 (1:1 000)。4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤一抗 3 次, 每次 10 min, 室温下在膜中加入兔抗 (1:1 000) 孵育 1 h, 用 TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 化学发光法显色后拍照。

转录组学样本准备 RAW264.7 细胞用 1 000 μ L 移液枪吹打, 将细胞收集至 15 mL 离心管内, 800 r·min⁻¹

离心 3 min, 去除上清, 加入培养基重悬细胞。计数, 接种至 6 孔板中, 种板密度为每毫升 1×10^6 个。贴壁后给予相应刺激, 然后使用对应浓度的淫羊藿素处理, 在不同时间点收集细胞沉淀。用 1 mL Trizol 重悬至 2 mL 冻存管 (RNA/DNA-free), 放入液氮内速冻 30 s~1 min 后转入 -80 °C。然后进行转录组学测序分析。

统计学处理 使用 GraphPad Prism 9.0 和 OFFICE EXCEL 软件进行数据分析, 数据均以平均值 \pm 标准差表示。差异采用非配对学生 *t* 检验 (两组间比较) 进行统计学评估。 *P* < 0.05 时, 认为差异具有统计学意义。

结果

1 ICA 治疗延缓了 sgp19/kRas 诱导的 ICC 小鼠肿瘤发展

建立 sgp19/kRas ICC 小鼠原位肿瘤模型, 评估 ICA 对 ICC 的体内治疗作用, 利用高压水动力尾静脉将质粒混合物注射进入小鼠体内, 间隔处死小鼠, 确定小鼠肿瘤形成及进展时间, 肿瘤重量为 2~3 g 时处死小鼠作为用药前组, 收集肝脏组织。此后开始给药, 给药剂量为 100 mg·kg⁻¹, 每天给药 1 次, 灌胃 6 天间歇 1 天, 连续给药 3 周, 以肝重及免疫组化染色为评价指标。实验结果显示, ICA 治疗后, 可以显著抑制该模型小鼠的肿瘤负荷, 具体表现为肝重显著下降。同时利用 H&E 染色以及肝内胆管癌指标 CK19 肿瘤阳性着染区域作为肿瘤多少的表征, 染色结果图显示, ICA 治疗后可以显著降低肝脏中肿瘤所占面积, 提示肿瘤生长被 ICA 显著抑制。同时, 细胞增殖指标 Ki-67 免疫组化染色结果显示, ICA 处理后, 能显著降低肿瘤细胞细胞核的 Ki-67 阳性着染, 抑制肿瘤细胞增殖生长 (图 1)。

2 ICA 治疗影响 sgp19/kRas ICC 小鼠体内 TAM 水平

扶正祛邪是中医治疗疾病的基本法则, 其中扶正治法强调通过增强正气的方法, 提高机体免疫力, 从而祛邪外出, 恢复健康, 即所谓“正盛邪自祛”, 这也体现出中药调节和治疗疾病的一种重要而普遍的作用机制: 间接调控作用^[9]。为了进一步研究淫羊藿素对于肿瘤的抑制作用是否对肿瘤免疫微环境产生影响, 本实验运用流式细胞术分析了淫羊藿素治疗后 sgp19/kRas 小鼠体内免疫细胞的浸润情况。实验结果显示, ICA 治疗后, 能够显著降低 M2 型巨噬细胞 (CD86⁺CD206⁺M2) 的占比, 同时 CD3⁺CD4⁺T 的数量显著增加 (图 2)。此外, 使用 DAPI 标记细胞核, F4/80 和 CD80 共定位 M1 型巨噬细胞, F4/80 和 CD206 共定位 M2 型巨噬细胞, 动物组织免疫荧光共定位染色结果显示, ICA 治疗后小鼠组织 M1 型巨噬细胞 (F4/80⁺CD80⁺) 数量显著增多, M2 型巨噬细胞 (F4/80⁺CD206⁺) 数量减少 (图 3),

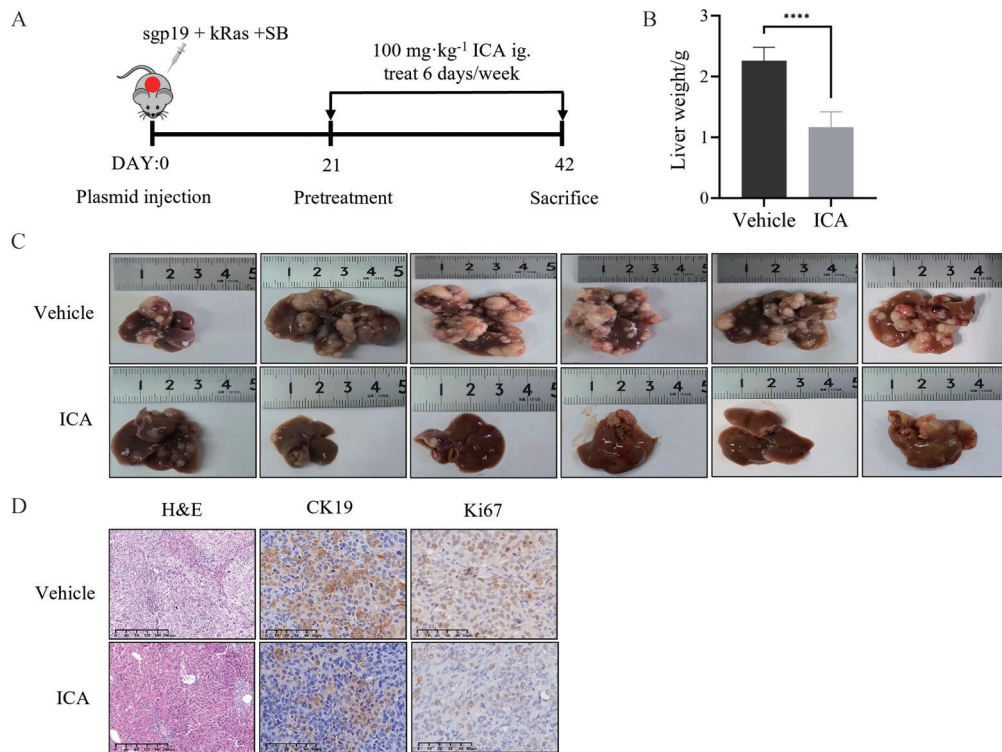


Figure 1 Icaritin (ICA) significantly inhibits tumor growth in sgp19/kRas mice. A: Study design; B: Liver weight of vehicle and ICA-treated sgp19/kRas mice; C: Representative images of tumor morphology in vehicle and ICA-treated sgp19/kRas mice; D: Gross images and H&E, CK19 (magnification $\times 400$; scale bar = 50 μm), Ki67 (magnification $\times 400$; scale bar = 50 μm) staining of livers from vehicle and ICA-treated sgp19/kRas mice. Ig: Intragastric. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. **** $P < 0.0001$

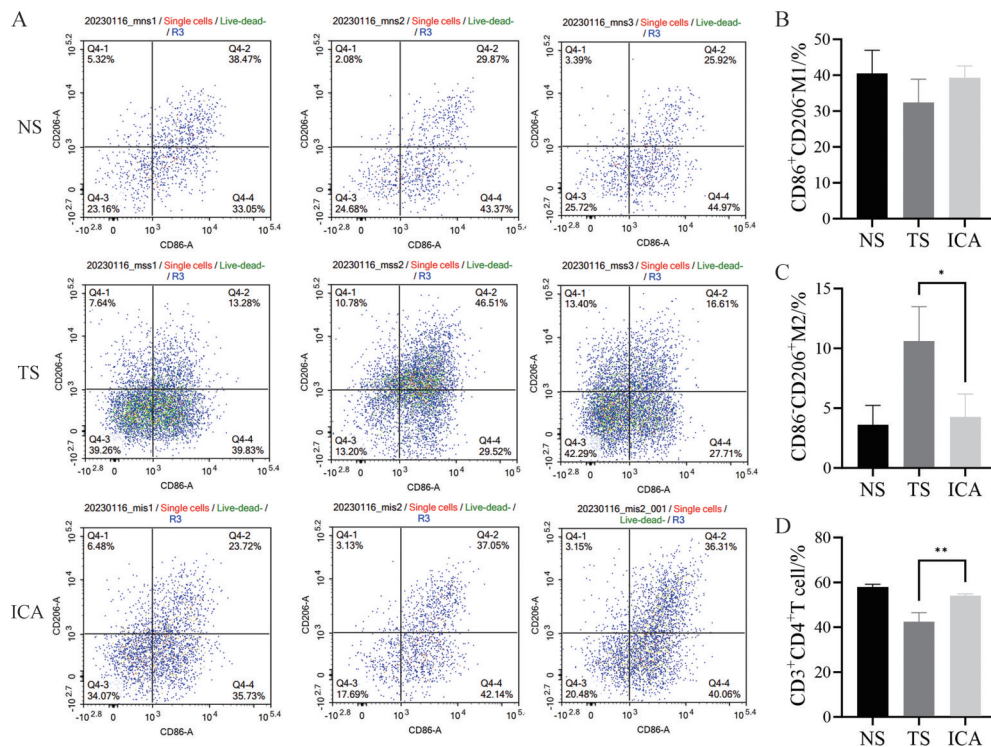


Figure 2 Effect of ICA on macrophage polarization in the sgp19/kRas model. A: Cell suspensions from spleen of tumor free mice, sgp19/kRas tumor-bearing mice treated by ICA or vehicle were stained for CD86 and CD206 and analyzed by flow cytometry; B: Quantification of the M1 macrophage populations; C: Quantification of the M2 macrophage populations; D: Quantification of CD3⁺CD4⁺ T cells. NS: Normal spleen; TS: Tumor spleen; ICA: ICA treated spleen. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

该结果与小鼠流式结果一致。

3 ICA 体外诱导 M1 型巨噬细胞极化

为了进一步验证 ICA 对巨噬细胞极化的影响, 在体外分别使用 LPS 或 IL-4 预刺激后, 再用 ICA 处理不同的巨噬细胞系, 以 iNOS 表征 M1 型巨噬细胞极化水平, ARG1 表征 M2 型巨噬细胞极化水平。结果显示, 在处理 6 h, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ICA 促进 BMDM 巨噬细胞向 M1 型极化, 并抑制 M2 型巨噬细胞极化。对于

RAW264.7 细胞, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ICA 在 72 h 促进其向 M1 巨噬细胞极化, 而在 6 h 抑制 M2 型巨噬细胞极化水平显著 (图 4)。此外, 本研究利用 RT-qPCR 测定了在 ICA 刺激 BMDM 细胞后 6 h, 巨噬细胞极化相关细胞因子变化, 结果显示 M1 型巨噬细胞极化的相关细胞因子 *TNF α* 和 *VEGF α* 表达上升, 与此同时, 表征 M2 型巨噬细胞极化的 *ARG1*、*Ccl22*、*CD206*、*IL-13*、*TGF β 1*、*Fizz1* 表达显著降低 (图 5)。证实了 ICA 确实有促进 M1 型

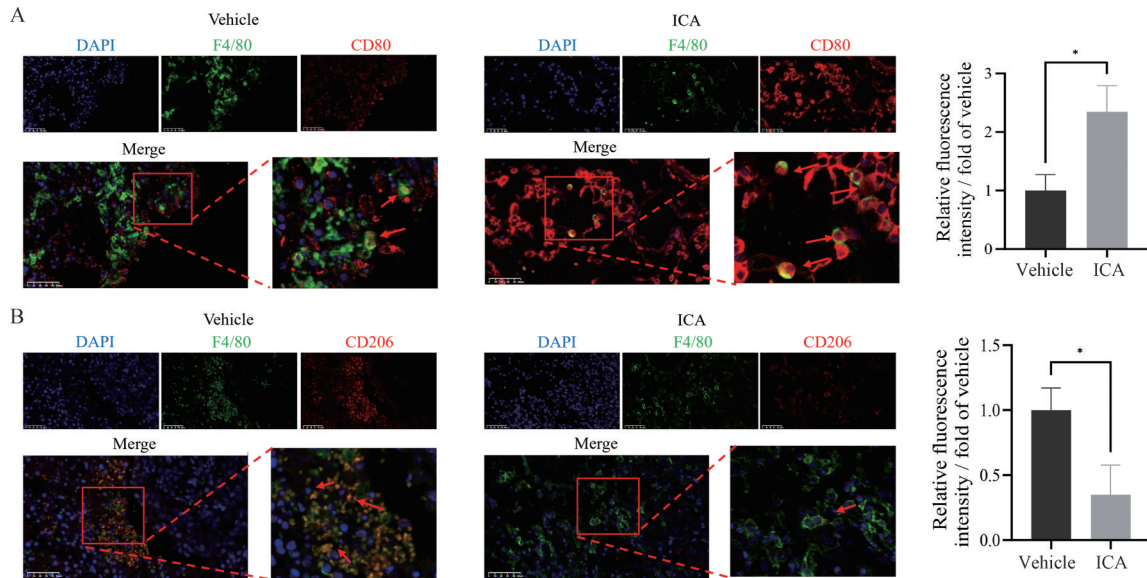


Figure 3 Immunofluorescence staining of M1-like and M2-like macrophages in the liver/tumor tissues of sgp19/kRas mice treated with vehicle or ICA. F4/80⁺CD80⁺ M1-like macrophages (A) and F4/80⁺CD206⁺ M2-like macrophages (B) were stained and quantified by Image J. Magnification $\times 400$; scale bar=50 μm . $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$

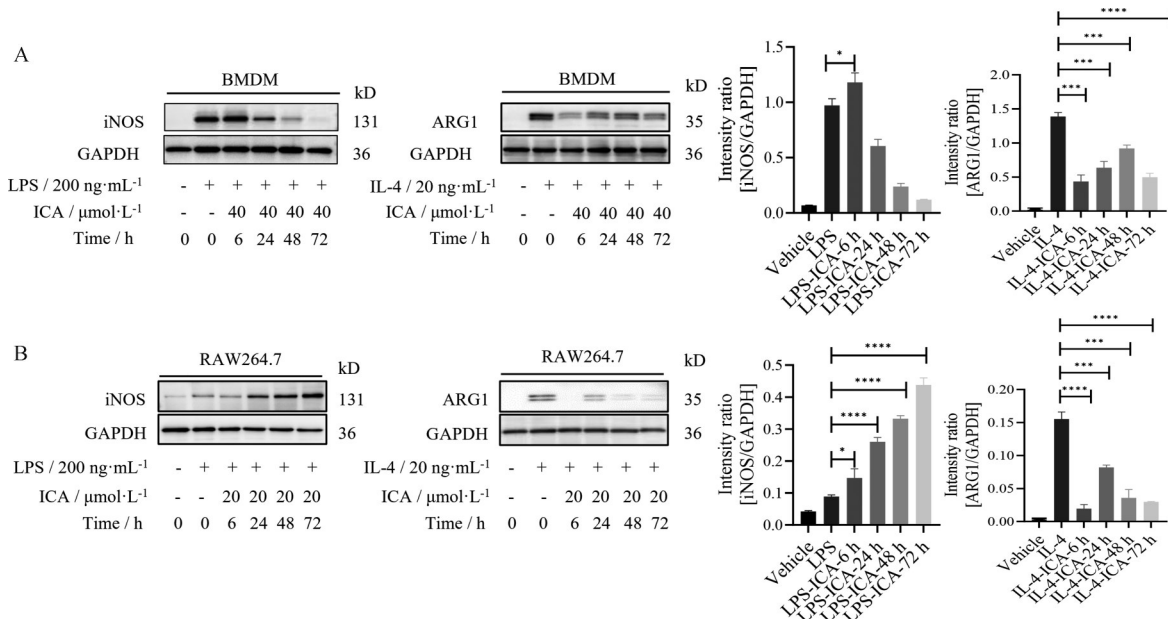


Figure 4 Effects of ICA on macrophage polarization *in vitro*. Western blot of polarization level in BMDM cells (A) and RAW264.7 cells (B). iNOS: Inducible nitric oxide synthase, as a marker of M1-like macrophage polarization. ARG1: Arginase-1, as a marker of M2-like macrophage polarization. Macrophages were stimulated with 200 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS or 20 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ IL-4, and then treated with ICA to evaluate the regulation of ICA on macrophage polarization. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

极化,抑制M2型极化的作用,与体内结果一致。

4 ICA驱动的M1巨噬细胞极化间接抑制ICC细胞增殖

以上结果表明,ICA在不同时间点能够促进巨噬细胞向M1型极化。据相关文献^[10]报道,M1型巨噬细胞具有免疫激活、促进癌细胞凋亡以及增强抗原呈递的作用,对于肿瘤免疫微环境具有重要的影响。接下来,本实验对ICA所促进的巨噬细胞M1型极化,是否能够在体外抑制ICC细胞系的增殖进行进一步探究。首先,条件培养基制备:ICA处理RAW264.7巨噬细胞72 h,收集此时的培养基上清作为ICA预处理培养基,随后,将ICA预处理培养基与细胞完全培养基1:1混合,制成条件培养基,将上述条件培养基用于两种ICC细胞系,M4-2a (AKT/YAP ICC小鼠原代细胞),以及SK (sgp19/kRas ICC小鼠原代细胞)的后续培养(图6),48 h后,进行结晶紫染色和吸光度的测定。结果显示,刺激后的LPSICA-CM,在体外更有效地抑制了ICC细胞增殖(图7)。

5 基于转录组学探索ICA调控巨噬细胞极化的作用机制

为了进一步探究ICA调控巨噬细胞极化的具体机

制,基于前文ICA处理巨噬细胞不同时间点iNOS表达水平,本实验选择ICA显著促进M1型巨噬细胞极化的时间点,收集ICA刺激RAW264.7细胞72 h的细胞沉淀,进行转录组学测序分析。PCA结果显示,4组之间均存在明显分离(图8A),提示淫羊藿素确实对巨噬细胞产生一定的调控作用。GO富集分析结果显示(图8B),膜受体通路活性显著上调,并综合FPKM值和文献调研分析发现,ICA刺激后,巨噬细胞膜表面Toll样受体9 (TLR9)基因上调(图8C、D)。同时,对TLR9受体活性进行了蛋白印迹检测和RT-qPCR分析,结果表明ICA作用RAW264.7细胞后的24~72 h以及ICA作用BMDM细胞后6 h,TLR9受体基因及蛋白表达水平均显著上调(图9)。

讨论

ICC发病隐匿,极易侵犯肝脏周围器官、组织和神经,发生淋巴结和肝外远处转移。早期诊断难,恶性程度高,并对放疗极不敏感,预后极差,患者术后5年总体生存率为7%~20%^[11,12],目前市面上的靶向药物

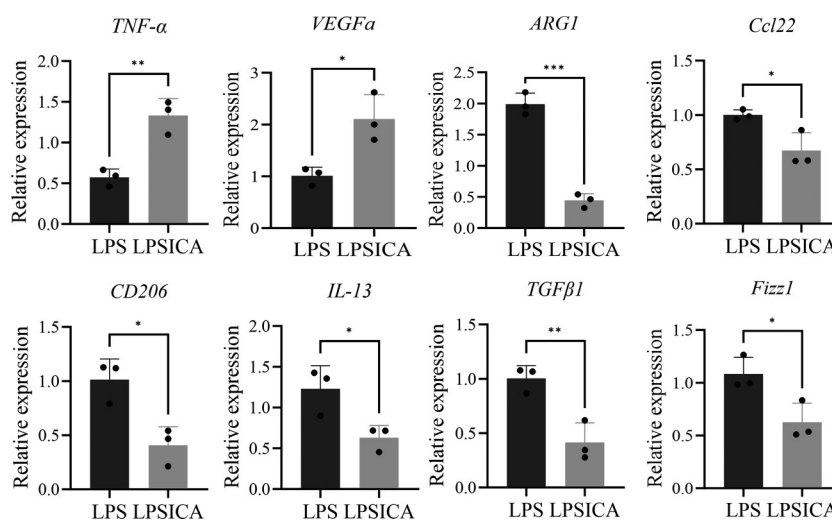


Figure 5 RT-qPCR of M1 marker expression (*TNF-α*, *VEGFa*) and M2 marker expression (*ARG1*, *Ccl22*, *CD206*, *IL-13*, *TGFβ1*, *Fizz1*) in BMDM cells. *TNF-α*: Tumor necrosis factor- α ; *VEGFa*: Vascular endothelial growth factor A; *Ccl22*: C-C motif chemokine ligand 22; *CD206*: Macrophage mannose receptor 1; *IL-13*: Interleukin-13; *TGFβ1*: Transforming growth factor, beta 1; *Fizz1*: Found in inflammatory zone 1. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

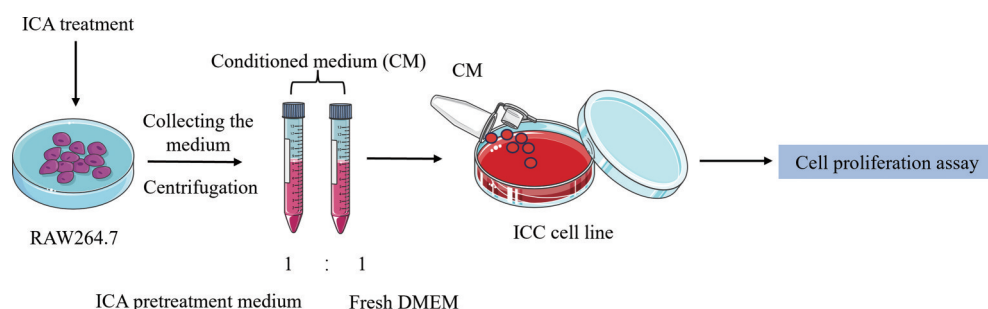


Figure 6 Conditioned medium (CM) preparation from ICA-treated macrophages

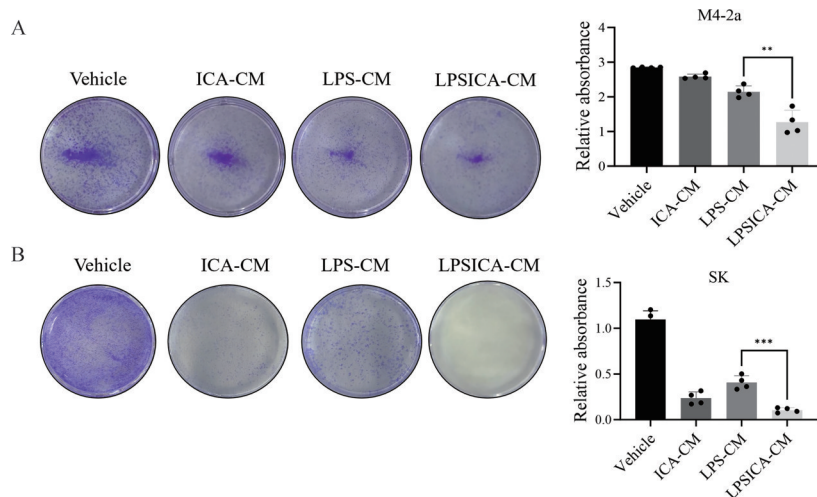


Figure 7 ICA-driven M1 macrophage polarization inhibits ICC cell proliferation. Crystal violet staining and quantification of M4-2a (A) and SK (B) cells after CM treatment of ICA-treated macrophages. ICA-CM: Conditioned medium from 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ICA stimulation in RAW264.7 cells; LPS-CM: Conditioned medium from 200 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS stimulation in RAW264.7 cells; LPSICA-CM: Conditioned medium from 200 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS and 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ICA stimulation in RAW264.7 cells. Typical imagery was extracted in terms of three individual assays. Bottom relative absorbance quantitative analysis. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

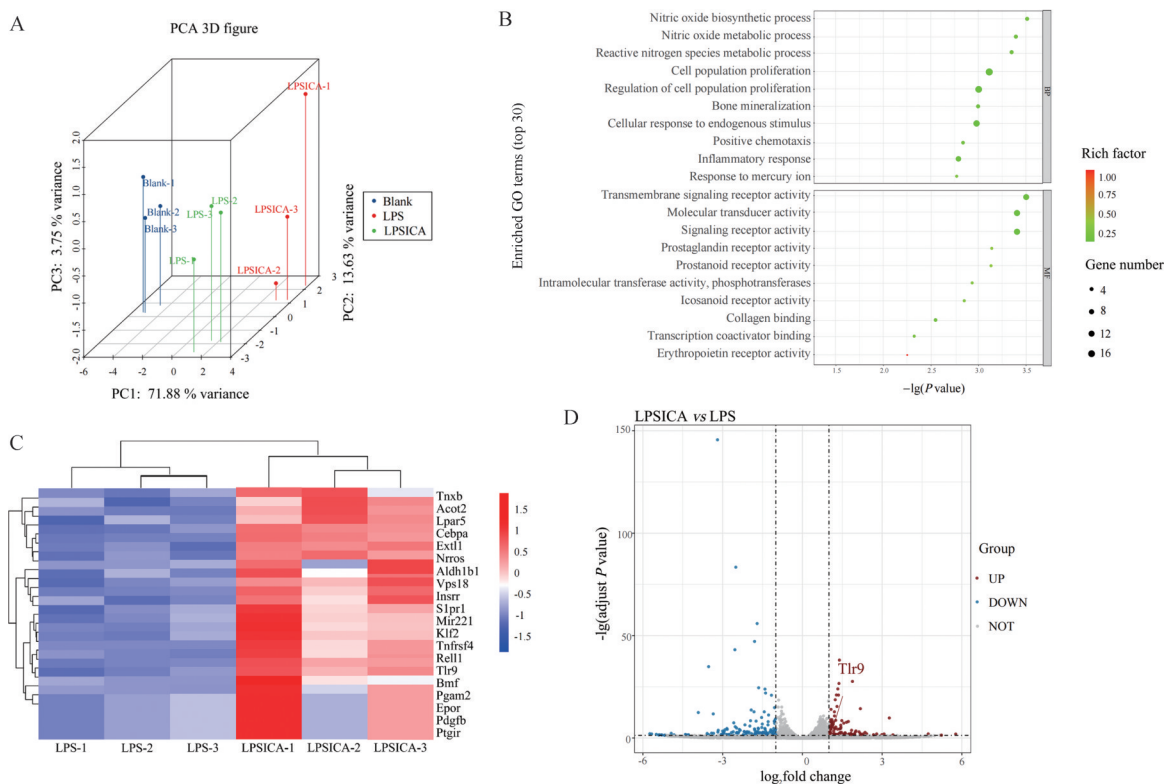


Figure 8 Transcriptome sequencing analysis in RAW264.7 cells after ICA treatment. A: Transcriptome-based three-dimensional principal component (PCA) diagram; B: Gene ontology (GO) enrichment analysis of predicted target genes of ICA regulating macrophage polarization in LPSICA vs LPS; C: Clustering of LPS and LPSICA differential genes; D: Volcano plot of differential genes in LPSICA vs LPS. LPSICA: RAW264.7 cells stimulated by 200 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS and 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ICA. LPS: RAW264.7 cells stimulated by 200 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS

作用有限, 且存在耐药问题。因此, 寻找治疗 ICC 患者新药及其分子机制的研究迫在眉睫。

ICA 作为一种肝癌创新中药获批上市, 被认为是继“青蒿素”之后中药现代化的又一重大突破。通过对

目前 ICA 在免疫调节方面的研究进行全面的文献调研发现, 现有的研究主要关注在 ICA 通过调控免疫抑制因素发挥抗肿瘤作用, 如通过抑制免疫检查点 PD-L1 表达和髓源抑制性细胞 (myeloid-derived suppressor

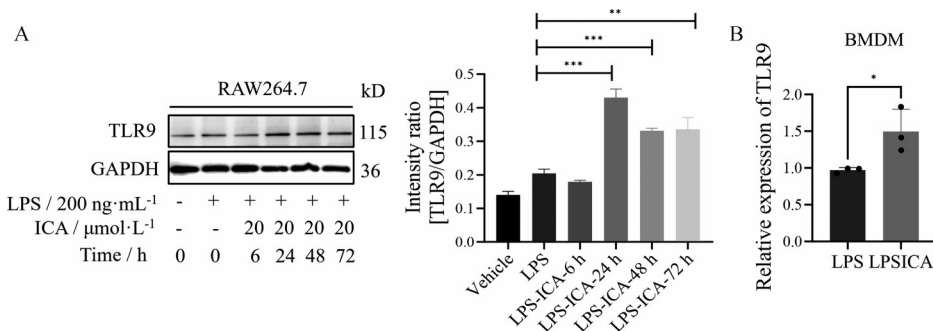


Figure 9 TLR9 expression was upregulated after ICA stimulation *in vitro*. A: Western blot analysis of TLR9 in RAW264.7 cells following stimulation with 200 ng·mL⁻¹ LPS, and then treated with 20 μmol·L⁻¹ ICA. GAPDH was used as a loading control; B: RT-qPCR quantification of TLR9 mRNA levels in BMDM cells pre-stimulated with 200 ng·mL⁻¹ LPS, and then treated with 40 μmol·L⁻¹ ICA. $n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

cells, MDSCs) 的作用, 以及活化干扰素- γ (interferon- γ) 阳性 CD8⁺ T 细胞等作用^[6,13-15]。然而, 目前对 ICA 抗肝内胆管癌的具体调控机制和靶标仍然缺乏系统清晰的认识。

基于中医药“扶正祛邪”的治则, 中药对肿瘤免疫微环境的影响已成为近年来的研究热点。不少中药表现出良好的抑制免疫检查点 PD-L1 的表达^[16], 增加 TME 中的 T 细胞浸润, 增强细胞毒性 T 细胞 (cytotoxic T cells, CTL) 的活性, 以及促进 TAM 由 M2 型向 M1 型转化^[17] 的治疗潜力。当前肿瘤治疗药物的开发方向越发关注机体本身的免疫能力, 除了强调实现直接杀伤肿瘤细胞还着重于驱动机体自身免疫, 这与中医“扶正祛邪”治癌症的诊疗观点辩证统一。而 ICA 作为一种小分子免疫调节剂, 其对于 ICC 的治疗作用及其肿瘤免疫微环境的调控作用未有相关报道。基于 ICA 对 sgp19/kRas 模型小鼠的抑癌表型, 本实验通过流式细胞术分析发现, ICA 处理后, 能够显著促进体内体外模型中巨噬细胞的 M1 极化反应, 而 M1 型巨噬细胞被认为能够促进肿瘤免疫激活, 起到抑制肿瘤生长的作用。

TLR9 已被报道可以引起先天性和适应性免疫反应的级联效应, 还具有招募树突状细胞 (dendritic cells, DCs)、促进抗原提呈细胞 (antigen-presenting cells, APCs) 活化、调节肿瘤免疫微环境的作用^[18-20]。TLR9 与 CpG 配体结合后还可以通过 TLR9/MyD88/NF- κ B 信号通路, 促进 M2 型巨噬细胞向 M1 型巨噬细胞转化^[21]。此外, ICA 与 CpG 联合治疗可增加 DCs 和 TAM 的募集、细胞毒性 CD8⁺ T 细胞的浸润和抗 PD-1/CTLA-4 免疫检查点阻断治疗的抗肿瘤免疫应答^[22]。目前已有多种 Toll 样受体家族的激动剂上市, 如 TLR3 激动剂可以用于实体瘤、黑色素瘤、胃癌、结直肠癌等的治疗^[23,24]。TLR7 受体激动剂可以用作实体瘤、HER2 阳性的实体瘤的治疗, 同时有文献报道 TLR7 可

以驱动 TAMs 向 M1 型巨噬细胞极化^[25]。TLR9 激动剂也可用作黑色素瘤的治疗^[26]。本实验进一步的转录组学分析结果提示, ICA 刺激后, 可以激活巨噬细胞上 TLR9 受体的表达。因此, 推测 ICA 可能通过激活 TLR9 受体, 与肿瘤细胞表面或者内部的 CpG 序列结合, 调动先天免疫, 启动 M2 型巨噬细胞重编程, 使“冷肿瘤”向“热肿瘤”方向转化, 进而产生杀伤肿瘤的作用 (图 10)。后续将通过敲除 TLR9 基因, 在体内体外进行更为深入的研究。

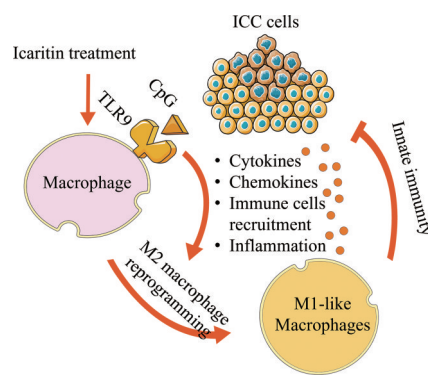


Figure 10 Icaritin inhibits intrahepatic cholangiocarcinoma development by TLR9-mediated macrophages M1 polarization

综上, 本研究首次揭示, ICA 改变了 ICC 小鼠体内的肿瘤免疫微环境, 通过调控巨噬细胞极化水平, 进而调动先天免疫, 延缓该模型小鼠的肿瘤进展。本研究为 ICA 的免疫调节作用提供了科学依据, 以为深入认识中医干预肝内胆管癌的生物机制提供新依据和新视角, 在此基础上对 ICA 通过免疫调节治疗多种肿瘤疾病的研究起到启示和示范作用, 为 ICA 联合免疫治疗的创新疗法选择提供理论依据, 丰富中医药“扶正”辨治癌症的科学内涵。

作者贡献: 王婧雯负责实验方案设计与实施、数据处理、

文章撰写;李珍、黄秀勤、徐子婧、耿嘉豪、许燕瑜、梁天祜负责对本研究实验方案提出建议;湛小燕、康利平、王伽伯、宋鑫华提供基金支持与论文修改。

利益冲突: 所有作者均声明无利益冲突。

References

- [1] Florio AA, Ferlay J, Znaor A, et al. Global trends in intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma incidence from 1993 to 2012 [J]. *Cancer*, 2020, 126: 2666-2678.
- [2] Bertuccio P, Malvezzi M, Carioli G, et al. Global trends in mortality from intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *J Hepatol*, 2019, 71: 104-114.
- [3] Banales JM, Marin JGG, Lamarca A, et al. Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17: 557-588.
- [4] Valle JW, Furuse J, Jitlal M, et al. Cisplatin and gemcitabine for advanced biliary tract cancer: a meta-analysis of two randomised trials [J]. *Ann Oncol*, 2014, 25: 391-398.
- [5] Lo EC, N Rucker A, Federle MP. Hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma: imaging for diagnosis, tumor response to treatment and liver response to radiation [J]. *Semin Radiat Oncol*, 2018, 28: 267-276.
- [6] Tao HM, Liu MY, Wang Y, et al. Icaritin induces anti-tumor immune responses in hepatocellular carcinoma by inhibiting splenic myeloid-derived suppressor cell generation [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 609295.
- [7] Deng DJ, Li L, Tan XY, et al. Effect of icariin on the proliferation of intrahepatic bile duct cancer cells by regulating glycolysis *via* Akt/mTOR [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2002, 53: 3061-3069.
- [8] Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233: 6425-6440.
- [9] Wang JB, Xiao XH. The indirect regulatory role of traditional Chinese medicine and the innovative development of indirect acting traditional Chinese medicine [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2021, 46: 5443-5449.
- [10] Pan Y, Yu Y, Wang X, et al. Tumor-associated macrophages in tumor immunity [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 583084.
- [11] Moris D, Palta M, Kim C, et al. Advances in the treatment of intrahepatic cholangiocarcinoma: an overview of the current and future therapeutic landscape for clinicians [J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73: 198-222.
- [12] Sirica AE, Gores GJ, Groopman JD, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: continuing challenges and translational advances [J]. *Hepatology*, 2019, 69: 1803-1815.
- [13] Qin SK, Li Q, Xu JM, et al. Icaritin-induced immunomodulatory efficacy in advanced hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: immunodynamic biomarkers and overall survival [J]. *Cancer Sci*, 2020, 111: 4218-4231.
- [14] Yu Z, Guo J, Hu M, et al. Icaritin exacerbates mitophagy and synergizes with doxorubicin to induce immunogenic cell death in hepatocellular carcinoma [J]. *ACS Nano*, 2020, 14: 4816-4828.
- [15] Mo D, Zhu H, Wang J, et al. Icaritin inhibits PD-L1 expression by targeting protein I κ B kinase α [J]. *Eur J Immunol*, 2021, 51: 978-988.
- [16] Shi K, Huang YY, Hou J, et al. Research progress on mechanism of Fuzheng and detoxification prescriptions regulating microenvironment of liver cancer [J]. *Beijing J Tradit Chin Med (北京中医药)*, 2020, 39: 1321-1323.
- [17] Ye LH, Cheng HB, Zhang YH, et al. Discussion on the etiology of TCM diseases of primary liver cancer [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药)*, 2010, 21: 2627-2628.
- [18] Su C, Kent CL, Pierpoint M, et al. Enhancing radiotherapy response *via* intratumoral injection of the TLR9 agonist CpG to stimulate CD8 T cells in an autochthonous mouse model of sarcoma [J]. *bioRxiv*, 2024. DOI: 10.1101/2024.01.03.573968.
- [19] Bao D, Zhao J, Zhou X, et al. Mitochondrial fission-induced mtDNA stress promotes tumor-associated macrophage infiltration and HCC progression [J]. *Oncogene*, 2019, 38: 5007-5020.
- [20] Chen P, Wang D, Wang Y, et al. Maximizing TLR9 activation in cancer immunotherapy with dual-adjuvanted spherical nucleic acids [J]. *Nano Lett*, 2022, 22: 4058-4066.
- [21] Huang H, Sun Z, Xu J, et al. Yang-Xin-Shu-Mai granule alleviates atherosclerosis by regulating macrophage polarization *via* the TLR9/MyD88/NF- κ B signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 318: 116868.
- [22] Häcker H, Vabulas RM, Takeuchi O, et al. Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6 [J]. *J Exp Med*, 2000, 192: 595-600.
- [23] Liu Y, Gu Y, Han Y, et al. Tumor exosomal RNAs promote lung pre-metastatic niche formation by activating alveolar epithelial TLR3 to recruit neutrophils [J]. *Cancer Cell*, 2016, 30: 243-256.
- [24] Tavora B, Mederer T, Wessel KJ, et al. Tumoural activation of TLR3-SLIT2 axis in endothelium drives metastasis [J]. *Nature*, 2020, 586: 299-304.
- [25] Rodell CB, Arlauckas SP, Cuccarese MF, et al. TLR7/8-agonist-loaded nanoparticles promote the polarization of tumour-associated macrophages to enhance cancer immunotherapy [J]. *Nat Biomed Eng*, 2018, 2: 578-588.
- [26] Ribas A, Medina T, Kirkwood JM, et al. Overcoming PD-1 blockade resistance with CpG-A Toll-like receptor 9 agonist vidutolimod in patients with metastatic melanoma [J]. *Cancer Discov*, 2021, 11: 2998-3007.