

T Cell Exhaustion Could Be Regulating by Yangyin Fuzheng Decoction in Lewis Lung Cancer in a Tumor Burdened Mice

Mei Jiang*, Hong Chen, Xiyuan Sun, Dongmei Wei, Chunlei Pan, Molan Chen, Lingling Liu, Jie Zhang

The Qiqihar Affiliated Hospital of Southern Medical University, the First Hospital of Qiqihar, Qiqihar Heilongjiang
Email: jm605503@163.com, sunxiyuan2004@126.com

Received: Mar. 4th, 2020; accepted: Mar. 20th, 2020; published: Mar. 27th, 2020

Abstract

Objective: To explore the mechanism of Yangyin Fuzheng Decoction in regulating T cell exhaustion of mice with Lewis lung cancer cell. **Methods:** The cell lines of PD-L1+Lewis lung cancer were screened by immunomagnetic bead method, and the C57BL/6 mice models of PD-L1+Lewis and Lewis lung cancer cell were constructed respectively. After successful modeling, C57BL/6 mice with PD-L1+Lewis and Lewis lung cancer cell were divided into model group, PD-L1 inhibitor group (Atezolizumab), Yangyin Fuzheng Decoction group, and combined group (Yangyin Fuzheng Decoction + Atezolizumab) according to the random number table method. After 10 days of drug intervention, ELISA was used to detect the levels of IL-2, I IFN- γ , IL-10 and TGF- β secreted by spleen lymphocytes in each group. **Results:** The levels of IL-2 and IFN- γ secreted by spleen lymphocytes increased and IL-10 and TGF- β secreted decreased in the treatment group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Yangyin Fuzheng Decoction can reverse the exhaustion of T cells, and is expected to be an effective Chinese medicine prescription to reverse the exhaustion of T cells.

Keywords

T Cell Exhaustion, Yangyin Fuzheng Decoction, Cytokines, Lung Cancer

养阴扶正汤调节Lewis肺癌荷瘤鼠T细胞耗竭的实验研究

姜梅*, 陈宏, 孙玺媛, 魏冬梅, 潘春蕾, 陈沫岚, 刘玲玲, 张杰

齐齐哈尔市第一医院暨南方医科大学附属齐齐哈尔医院, 黑龙江 齐齐哈尔
Email: jm605503@163.com, sunxiyuan2004@126.com

收稿日期: 2020年3月4日; 录用日期: 2020年3月20日; 发布日期: 2020年3月27日

*第一作者。

文章引用: 姜梅, 陈宏, 孙玺媛, 魏冬梅, 潘春蕾, 陈沫岚, 刘玲玲, 张杰. 养阴扶正汤调节 Lewis 肺癌荷瘤鼠 T 细胞耗竭的实验研究[J]. 世界肿瘤研究, 2020, 10(2): 31-40. DOI: 10.12677/wjcr.2020.102005

摘要

目的：探讨养阴扶正汤调控Lewis肺癌荷瘤鼠T细胞耗竭的机制。方法：应用免疫磁珠法筛选出PD-L1+Lewis肺癌细胞系，分别构建PD-L1+Lewis及Lewis肺癌荷瘤鼠模型。造模成功后，将PD-L1+Lewis及Lewis肺癌荷瘤鼠按随机数字表法分组，分为模型组、PD-L1抑制剂组(阿特殊单抗)、养阴扶正汤组、联合组(养阴扶正汤 + 阿特殊单抗)。药物干预10天后，利用ELISA检测各组脾脏淋巴细胞分泌IL-2、IFN- γ 、IL-10、TGF- β 的水平。结果：PD-L1+Lewis及Lewis肺癌荷瘤鼠养阴扶正汤治疗组脾淋巴细胞分泌IL-2、IFN- γ 水平均增高($P < 0.05$)，分泌IL-10、TGF- β 水平均降低($P < 0.05$)。结论：养阴扶正汤能逆转T细胞耗竭状态，有望成为有效逆转PD-1+T细胞耗竭的中药方剂。

关键词

T细胞耗竭，养阴扶正汤，细胞因子，肺癌

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

在肿瘤发生发展过程中，由于肿瘤抗原长期持续的刺激，T细胞表现出功能缺陷的状态[1]，包括细胞表面抑制性受体的增加，细胞因子分泌能力的降低，细胞毒作用丧失等[2]，即为T细胞耗竭状态。相关研究证实，在卵巢癌、黑色素瘤、肝癌、前列腺癌、乳腺癌等肿瘤中均存在PD1⁺的肿瘤浸润T细胞(tumor infiltrating lymphocytes, TILs)，其产生细胞因子的能力及细胞毒活性均下降[3]，且其他转移病灶中的T细胞也可出现功能缺失，不能有效分泌细胞因子，同时PD-1、CTLA-4和TIM-3等抑制性受体明显上调[4]。临床治疗上，可通过单克隆抗体封闭PD-1、TIM-3的方式恢复T细胞功能，从而达到逆转T细胞耗竭的[5]。但抗PD-1和TIM-3抗体价格昂贵，且在不同的研究中其作用也存在较大差异。

中医治疗肿瘤的历史悠久，中草药可能是逆转T细胞耗竭的途径。《黄帝内经》云：“正气存内，邪不可干，邪之所凑，其气必虚”，认为肿瘤的发生与正气不足有关。而“正气”相当于机体的免疫功能，T细胞在其中发挥着不可缺少的作用。T细胞耗竭，其介导的免疫应答减弱，肿瘤细胞发生免疫逃逸，形成实体瘤。与祖国医学的“积之成也，正气之虚也，正气虚而后积成”不谋而和。因此“扶正抗癌”贯穿于肿瘤的治疗始终，即所谓的“养正积自消”。“扶正”能调动机体的免疫功能，从而对体液、细胞免疫及细胞因子活性起到增强作用。

本研究通过构建Lewis肺癌荷瘤鼠模型，拟采用具有养阴扶正作用的养阴扶正汤来逆转肺癌荷瘤鼠的T细胞耗竭，探索中医临床治疗肿瘤T细胞耗竭的思路。

2. 材料与方法

2.1. 动物及试剂

Lewis肺癌细胞株购自武汉博士德生物工程有限公司。C57BL/6小鼠(6~8周龄，雄性，SPF级，20±2g/只)购于黑龙江中医药大学实验动物中心[证书编号：SYXK(黑)2016004]。本实验通过《齐齐哈尔市第

一医院试验动物管理办法(试行)》伦理审核(NO. 2018-01)。小鼠 IL-2、IFN- γ 、IL-10、TGF- β ELISA 检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。养阴扶正汤购自齐齐哈尔市第一医院。PD-L1 抑制剂(阿特殊单抗, Atezolizumab)购自罗氏基因泰克公司。

2.2. 方法

2.2.1. 养阴扶正汤的制备方法

黄芪 30 g、党参 20 g、沙参 30 g、天冬 12 g、麦冬 15 g、生白术 15 g、山药 30 g、白花蛇舌草 30 g、拳参 30 g、绞股蓝 15 g、茯苓 20 g、莪术 15 g。添加 10 倍量水, 浸泡 30 min 后, 于中药煎药壶中煎煮 60 min, 用纱布过滤。残余药渣中再添加 10 倍量水, 再煎煮 60 min 后纱布过滤。合并滤液并旋转蒸发浓缩至含生药浓度 5.25 g/ml, 4℃ 存放, 备用。以上药材由齐齐哈尔市第一医院制剂室提供, 并经过该院药剂科鉴定。

2.2.2. PD-L1⁺Lewis 肺癌荷瘤鼠模型的建立

体外培养 Lewis 肺癌细胞系, 待细胞至增殖期, 应用免疫磁珠筛选出 PD-L1⁺Lewis 肺癌细胞系。将 PD-L1⁺Lewis 肺癌细胞系及 Lewis 肺癌细胞系分别传代培养, 将密度为 2×10^{10} 个/L 的 PD-L1⁺Lewis 肺癌细胞悬液及 Lewis 肺癌细胞悬液分别接种于小鼠右侧腋窝皮下(0.2 ml/只), 分别构建 PD-L1⁺Lewis 肺癌荷瘤鼠模型及 Lewis 肺癌荷瘤鼠模型。接种 10 d 后, 待皮下移植瘤长至 1 cm³ 左右, 剥取 1 只皮下移植瘤行病理检测均为癌细胞, 说明造模成功。

2.2.3. 实验分组

将造模成功的荷瘤鼠按随机数字表法分为以下 8 组, 每组 6 只: A) PD-L1⁺Lewis 肺癌荷瘤鼠分组: 模型组、PD-L1 抑制剂组(阿特殊单抗)、养阴扶正汤组、联合组(养阴扶正汤 + 阿特殊单抗); B) Lewis 肺癌荷瘤鼠分组: 模型组、PD-L1 抑制剂组(阿特殊单抗)、养阴扶正汤组、联合组(养阴扶正汤 + 阿特殊单抗)。

2.2.4. 给药方式

- 1) 模型组: 0.2 mL 生理盐水、灌胃、共 10 d, 第 1 d、3 d、5 d 生理盐水 0.4 mL、腹腔注射。
- 2) PD-L1 抑制剂组: 0.2 mL 生理盐水、灌胃、共 10 d, 第 1 d、3 d、5 d 阿特殊单抗 0.4 ml (60 mg/kg)、腹腔注射。
- 3) 养阴扶正汤组: 0.2 ml 养阴扶正汤(52 g/kg/d)、灌胃、共 10 d, 第 1 d、3 d、5 d 生理盐水 0.4 mL、腹腔注射。
- 4) 联合组: 0.2 ml 养阴扶正汤(52 g/kg/d)、灌胃、共 10 d, 第 1 d、3 d、5 d 阿特殊单抗 0.4 ml (60 mg/kg)、腹腔注射。

2.2.5. 荷瘤小鼠脾脏单个淋巴细胞的分离

停药第 2 日颈椎脱臼处死各组荷瘤小鼠, 取出脾脏。无菌分离荷瘤小鼠脾脏单个淋巴细胞, 加入 1 ml 含有双抗和胎牛血清的完全 RPMI1640 培养液。用牛鲍氏计数板进行细胞计数, 调整所需的细胞浓度为 1×10^7 cells/ml。

2.2.6. 荷瘤小鼠脾脏单个淋巴细胞分泌 IL-2、IFN- γ 、IL-10、TGF- β 的水平检测

取已调整好细胞计数的脾脏单个淋巴细胞悬液 1 ml 铺入 24 孔板, 按照试剂盒的说明书进行操作, 酶标仪 450 nm 处读取 OD 值, 检测细胞因子 IL-2、IFN- γ 、IL-10、TGF- β 的水平。

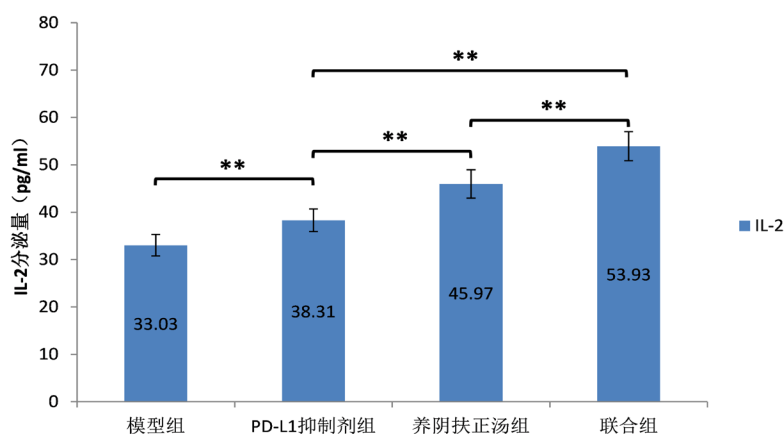
2.3. 数据分析

应用 Excel2007 进行数据处理, *t* 检验比较两组之间的差异。以 $P < 0.05$ 定义为差异有统计学意义。

3. 结果

1) 养阴扶正汤治疗组 PD-L1⁺Lewis 肺癌荷瘤鼠及 Lewis 肺癌荷瘤鼠脾淋巴细胞分泌 IL-2、IFN- γ 水平均增高。

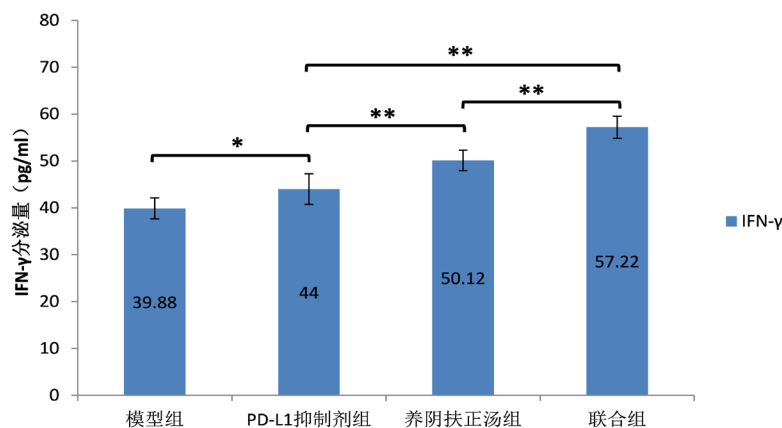
将 PD-L1⁺Lewis 肺癌各组荷瘤小鼠脾淋巴细胞悬液均匀铺于 24 孔板中, ELISA 检测上清中 IL-2、IFN- γ 的含量, 结果如图 1、图 2 所示。比较 PD-L1⁺Lewis 肺癌荷瘤鼠模型组、PD-L1 抑制剂组、养阴扶正汤组及联合组中 IL-2、IFN- γ 的含量显示, 养阴扶正汤组及联合组 IL-2、IFN- γ 分泌量较模型组、PD-L1 抑制剂组明显上升, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。将 Lewis 肺癌各组荷瘤小鼠脾淋巴细胞悬液均匀铺于 24 孔板中, ELISA 检测上清中 IL-2、IFN- γ 的含量, 结果如图 3、图 4 所示。比较 PD-L1⁺Lewis 肺癌荷瘤鼠模型组、PD-L1 抑制剂组、养阴扶正汤组及联合组中 IL-2、IFN- γ 的含量显示, 养阴扶正汤组及联合组 IL-2、IFN- γ 分泌量较模型组、PD-L1 抑制剂组明显上升, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。比较 PD-L1⁺Lewis 肺癌及 Lewis 肺癌各组荷瘤小鼠脾淋巴细胞悬液 IL-2、IFN- γ 的含量, 结果如图 5、图 6 所示, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注: ** $P < 0.01$ 。

Figure 1. The levels of IL-2 secreted by spleen lymphocytes of mice with tumor transplanted by PD-L1⁺Lewis lung cancer cell lines ($n = 6$)

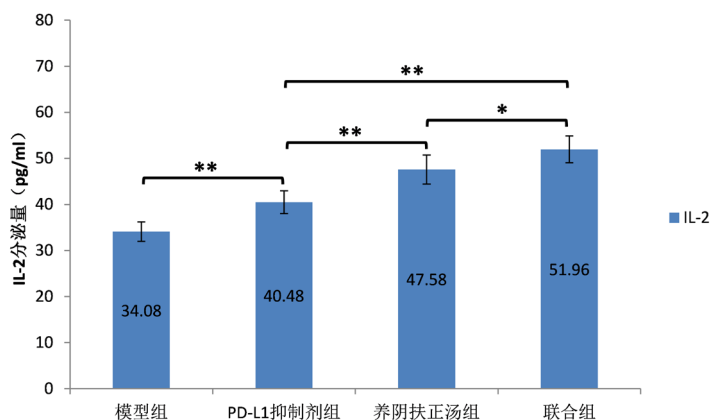
图 1. PD-L1⁺Lewis 肺癌细胞株各组荷瘤鼠脾淋巴细胞分泌 IL-2 的水平($n = 6$)



注: ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

Figure 2. The levels of IFN- γ secreted by spleen lymphocytes of mice with tumor transplanted by PD-L1⁺Lewis lung cancer cell lines ($n = 6$)

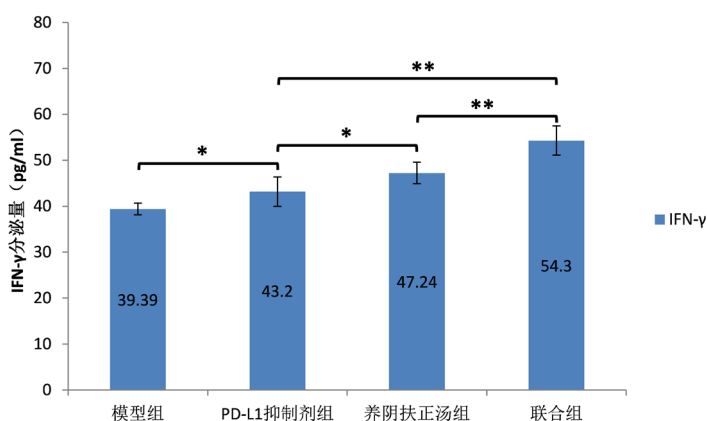
图 2. PD-L1⁺Lewis 肺癌细胞株各组荷瘤鼠脾淋巴细胞分泌 IFN- γ 的水平($n = 6$)



注: ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

Figure 3. The levels of IL-2 secreted by spleen lymphocytes of mice with tumor transplanted by Lewis lung cancer cell lines ($n = 6$)

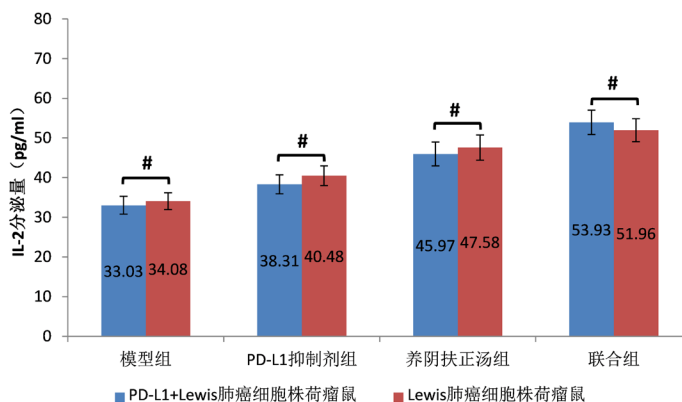
图 3. Lewis 肺癌细胞株各组荷瘤鼠脾淋巴细胞分泌 IL-2 的水平($n = 6$)



注: ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

Figure 4. The levels of IFN- γ secreted by spleen lymphocytes of mice with tumor transplanted by Lewis lung cancer cell lines ($n = 6$)

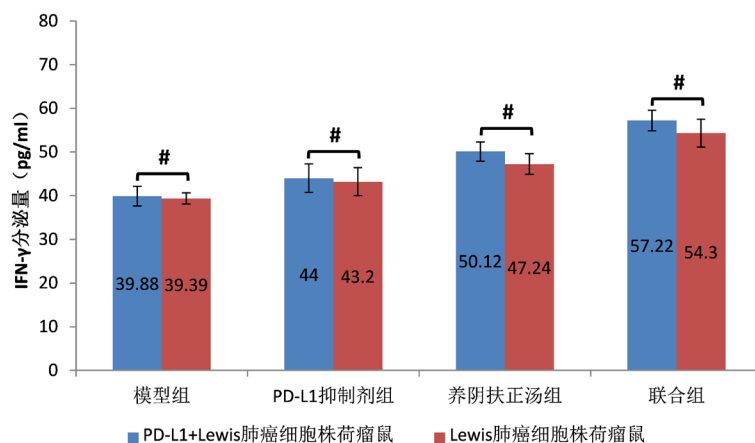
图 4. Lewis 肺癌细胞株各组荷瘤鼠脾淋巴细胞分泌 IFN- γ 的水平($n = 6$)



注: # $P > 0.05$ 。

Figure 5. The levels of IL-2 secreted by spleen lymphocytes of mice with tumor transplanted by PD-L1⁺Lewis lung cancer cell lines and transplanted by Lewis lung cancer cell lines ($n = 6$)

图 5. PD-L1⁺Lewis 肺癌细胞株及 Lewis 肺癌细胞株各组荷瘤鼠脾淋巴细胞分泌 IL-2 的水平($n = 6$)



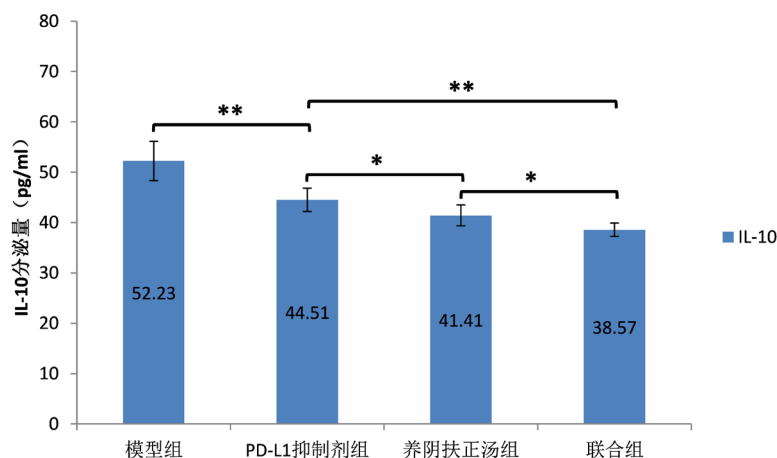
注: # $P > 0.05$ 。

Figure 6. The levels of IFN- γ secreted by spleen lymphocytes of mice with tumor transplanted by PD-L1⁺Lewis lung cancer cell lines and transplanted by Lewis lung cancer cell lines ($n = 6$)

图 6. PD-L1⁺Lewis 肺癌细胞株及 Lewis 肺癌细胞株各组荷瘤鼠脾淋巴细胞分泌 IFN- γ 的水平($n = 6$)

2) 养阴扶正汤治疗组 PD-L1⁺Lewis 肺癌荷瘤鼠及 Lewis 肺癌荷瘤鼠脾淋巴细胞分泌 IL-10、TGF- β 水平均降低

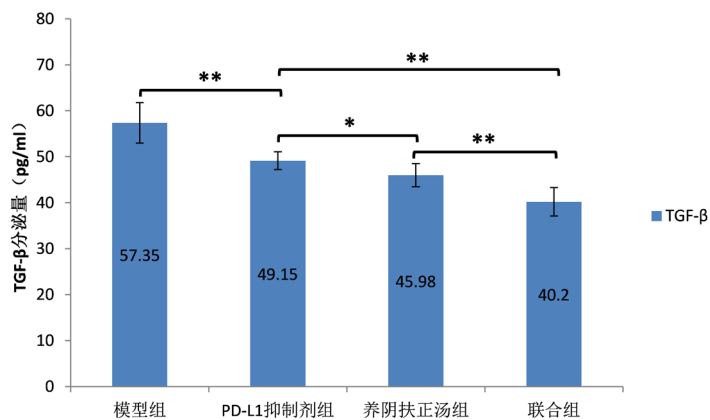
将 PD-L1⁺Lewis 肺癌各组荷瘤小鼠脾淋巴细胞悬液均匀铺于 24 孔板中, ELISA 检测上清中 IL-10、TGF- β 的含量, 结果如图 7、图 8 所示。比较 PD-L1⁺Lewis 肺癌荷瘤鼠模型组、PD-L1 抑制剂组、养阴扶正汤组及联合组中 IL-10、TGF- β 的含量显示, 养阴扶正汤组及联合组 IL-10、TGF- β 分泌量较模型组、PD-L1 抑制剂组明显降低, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。将 Lewis 肺癌各组荷瘤小鼠脾淋巴细胞悬液均匀铺于 24 孔板中, ELISA 检测上清中 IL-10、TGF- β 的含量, 结果如图 9、图 10 所示。比较 PD-L1⁺Lewis 肺癌荷瘤鼠模型组、PD-L1 抑制剂组、养阴扶正汤组及联合组中 IL-10、TGF- β 的含量显示, 养阴扶正汤组及联合组 IL-10、TGF- β 分泌量较模型组、PD-L1 抑制剂组明显降低, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。比较 PD-L1⁺Lewis 肺癌及 Lewis 肺癌各组荷瘤小鼠脾淋巴细胞悬液 IL-10、TGF- β 的含量, 结果如图 11、图 12 所示, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注: ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

Figure 7. The levels of IL-10 secreted by spleen lymphocytes of mice with tumor transplanted by PD-L1⁺Lewis lung cancer cell lines ($n = 6$)

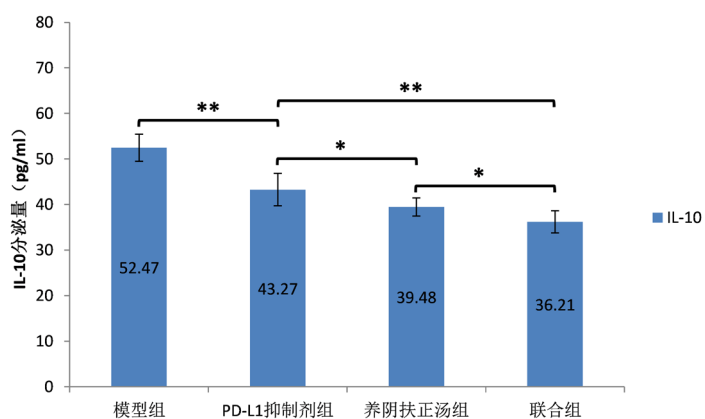
图 7. PD-L1⁺Lewis 肺癌细胞株各组荷瘤鼠脾淋巴细胞分泌 IL-10 的水平($n = 6$)



注: ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

Figure 8. The levels of TGF- β secreted by spleen lymphocytes of mice with tumor transplanted by PD-L1⁺Lewis lung cancer cell lines ($n = 6$)

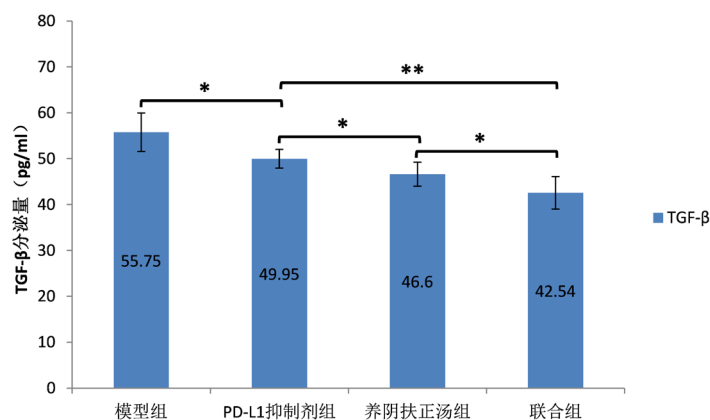
图 8. PD-L1⁺Lewis 肺癌细胞株各组荷瘤鼠脾淋巴细胞分泌 TGF- β 的水平($n = 6$)



注: ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

Figure 9. The levels of IL-10 secreted by spleen lymphocytes of mice with tumor transplanted by Lewis lung cancer cell lines ($n = 6$)

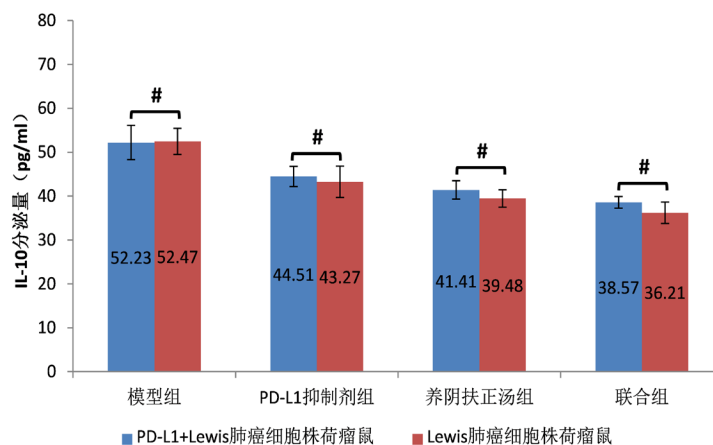
图 9. Lewis 肺癌细胞株各组荷瘤鼠脾淋巴细胞分泌 IL-10 的水平($n = 6$)



注: ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

Figure 10. The levels of TGF- β secreted by spleen lymphocytes of mice with tumor transplanted by Lewis lung cancer cell lines ($n = 6$)

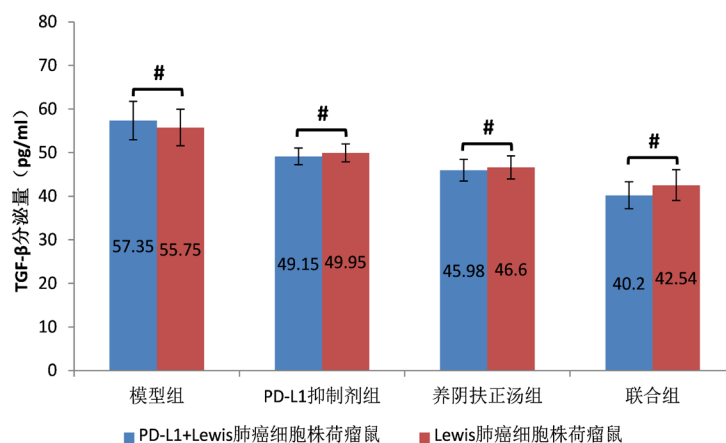
图 10. Lewis 肺癌细胞株各组荷瘤鼠脾淋巴细胞分泌 TGF- β 的水平($n = 6$)



注: # $P > 0.05$ 。

Figure 11. The levels of IL-10 secreted by spleen lymphocytes of mice with tumor transplanted by PD-L1⁺Lewis lung cancer cell lines and transplanted by Lewis lung cancer cell lines ($n = 6$)

图 11. PD-L1⁺Lewis 肺癌细胞株及 Lewis 肺癌细胞株各组荷瘤鼠脾淋巴细胞分泌 IL-10 的水平($n = 6$)



注: # $P > 0.05$ 。

Figure 12. The levels of TGF- β secreted by spleen lymphocytes of mice with tumor transplanted by PD-L1⁺Lewis lung cancer cell lines and transplanted by Lewis lung cancer cell lines ($n = 6$)

图 12. PD-L1⁺Lewis 肺癌细胞株及 Lewis 肺癌细胞株各组荷瘤鼠脾淋巴细胞分泌 TGF- β 的水平($n = 6$)

4. 讨论

T 细胞的耗竭是一个动态发展的过程,随着耗竭严重程度的增加,T 细胞表面抑制性受体表达的数量和种类也逐渐增多[6][7]。PD1 通路中的 PD1 及其配体 PD-L1 是 T 细胞耗竭过程中主要的抑制性受体,在 T 细胞耗竭过程中起到极其重要的作用。PD-L 广泛表达在肺癌、乳腺癌、肝癌、卵巢癌等癌组织上,而肿瘤邻近的正常组织中仅呈现低水平表达,故提示其可能参与肿瘤发生发展[8]。当 T 细胞表面的 PD-1 与肿瘤细胞表面的配体 PD-L 耦联后,导致下游信号受到抑制,进而减弱对免疫细胞的活化作用[9],最终抑制 T 淋巴细胞增殖和相关细胞因子的分泌。T 细胞耗竭早期,表现为分泌 IL-2 的能力下降及 T 细胞的增殖、体外杀伤能力的下降。进展至耗竭晚期,IFN- γ 产生能力显著受损[10],直至最终 T 细胞死亡。

同时,T 细胞耗竭过程中,IL-10、TGF- β 等细胞因子的分泌能力增加。IL-10 和 T 细胞功能缺失有关,阻断 IL-10 可以促进 T 细胞反应,增强其功能[11]。TGF- β 也可促进 T 细胞耗竭发生,阻断 T 细胞接收 TGF- β 信号的能力可以提高 CD8⁺T 细胞功能,阻止 T 细胞耗竭发生[11]。

T 细胞耗竭导致机体的细胞免疫功能障碍, 进而导致免疫功能低下。临床上, 养阴扶正方常用于调节肿瘤晚期患者的免疫功能。本研究中的方剂成分由沙参、天冬、麦冬、黄芪、党参、生白术、茯苓、山药、拳参、白花蛇舌草、绞股蓝、莪术构成, 具有滋阴、免疫调节的功效。方剂中沙参、天冬、麦冬为滋阴扶正常用中药。药理试验证明, 沙参粗多糖可增强阴虚小鼠脾脏 NK 细胞杀伤率和 T 淋巴结细胞转化功能, 增加血清 IgG 和 IgM 含量, 进而增强特异性免疫及非特异性免疫功能[12]。麦冬多糖能通过调节 IL-2、TNF- α 、IFN- γ 及 IL-10 的表达增强免疫功能。临床研究证实, “脾虚”时消化功能紊乱, 机体免疫功能下降。方剂中的黄芪、党参、生白术、茯苓、山药亦均具有补脾益气、增强机体免疫功能的作用。药理实验证明, 黄芪多糖可通过激活 TLR4 介导的 MyD88 依赖性信号传导途径来调节宿主生物的免疫功能[13]。党参多糖可通过增加小鼠巨噬细胞系细胞中 TNF- α 和 IL-6 分泌参与机体的免疫调节[14]。白术多糖[15]能有效的促进小鼠脾脏淋巴细胞增殖, 且对细胞因子 IL-2、IL-10、TGF- β 1 的分泌具有明显的促进作用。茯苓多糖能增强细胞免疫和体液免疫[16]。山药多糖可促进淋巴细胞转化, 有增强免疫的作用[17]。另外, 方剂中的白花蛇舌草、绞股蓝、莪术的现代药理学研究均显示有抗肿瘤作用。养阴扶正汤中的各味汤药合用, 既可调节免疫功能, 亦可抗肿瘤。其调节免疫功能的作用, 均与免疫增强有关, 该方剂对 T 细胞耗竭具有一定的调节作用。

本研究 PD-L1⁺Lewis 肺癌荷瘤鼠模型经养阴扶正汤治疗后, T 细胞分泌 IL-2 和 IFN- γ 的能力显著增强, 而分泌 IL-10、TGF- β 的能力显著减弱。其作用机制可能是通过下调 T 细胞耗竭信号上游分子 PD-1 的表达, 阻止耗竭 T 细胞免疫抑制信号的传递, 进而逆转 T 细胞耗竭状态, 恢复 T 细胞功能。因此, 养阴扶正汤有望成为有效逆转 PD-1⁺T 细胞耗竭的中药方剂。

参考文献

- [1] Kim, P.S. and Ahmed, R. (2010) Features of Responding t Cells in Cancer and Chronic Infection. *Current Opinion in Immunology*, **22**, 223-230. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.02.005>
- [2] Wherry, E.J. (2011) T Cell Exhaustion. *Nature Immunology*, **131**, 492-499. <https://doi.org/10.1038/ni.2035>
- [3] Ahmadzadeh, M., Johnson, L.A., Heemskerk, B., et al. (2009) Tumor Antigen-Specific cd8 t Cells Infiltrating the Tumor Express High Levels of pd-1 and Are Functionally Impaired. *Blood*, **114**, 1537-1544. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-195792>
- [4] Sakuishi, K., Apetoh, L., Sullivan, J.M., et al. (2010) Targeting Tim-3 and pd-1 Pathways to Reverse t Cell Exhaustion and Restore Anti-Tumor Immunity. *The Journal of Experimental Medicine*, **207**, 2187-2194. <https://doi.org/10.1084/jem.20100643>
- [5] Dietze, K.K., Zelinsky, G., Liu, J., et al. (2013) Combining Regulatory T Cell Depletion and Inhibitory Receptor Blockade Improves Reactivation of Exhausted Virus-Specific CD8+ T Cells and Efficiently Reduces Chronic Retroviral Loads. *PLoS Pathogens*, **9**, e1003798. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003798>
- [6] Virgin, H.W., Wherry, E.J. and Ahmed, R. (2009) Redefining Chronic Viral Infection. *Cell*, **138**, 30-50. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.036>
- [7] Wherry, E.J., Blattman, J.N., Murali-Krishna, K., et al. (2003) Viral Persistence Alters cd8 t-Cell Immunodominance and Tissue Distribution and Results in Distinct Stages of Functional Impairment. *Journal of Virology*, **77**, 4911-4927. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.8.4911-4927.2003>
- [8] Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., et al. (2008) Pd-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annual Review of Immunology*, **26**, 677-704. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331>
- [9] Ohaegbulam, K.C., Assal, A., Lazar-Molnar, E., et al. (2015) Human Cancer Immunotherapy with Antibodies to the pd-1 and pd-11 Pathway. *Trends in Molecular Medicine*, **21**, 24-33. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.10.009>
- [10] Brooks, D.G., Trifilo, M.J., Edelmann, K.H., et al. (2006) Interleukin-10 Determines Viral Clearance or Persistence in Vivo. *Nature Medicine*, **12**, 1301-1309. <https://doi.org/10.1038/nm1492>
- [11] Tinoco, R., Alcalde, V., Yang, Y., et al. (2009) Cell-Intrinsic Transforming Growth Factor-Beta Signaling Mediates Virus-Specific cd8+ t Cell Deletion and Viral Persistence in Vivo. *Immunity*, **31**, 145-157. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.06.015>

- [12] 宋立新, 鲁爽, 刘咏梅. 北沙参多糖对甲亢型阴虚小鼠的免疫调节作用[J]. 中国中医基础医学杂志, 2013, 19(6): 640-641.
- [13] Zhou, L., Liu, Z., Wang, Z., *et al.* (2017) Astragalus Polysaccharides Exerts Immunomodulatory Effects via TLR4-Mediated MyD88-Dependent Signaling Pathway *in Vitro* and *in Vivo*. *Scientific Reports*, **7**, 44822. <https://doi.org/10.1038/srep44822>
- [14] 石轶男, 孙娜, 孙耀贵, 等. 党参多糖对巨噬细胞的诱导活化作用[J]. 畜牧兽医学报, 2017, 48(4): 777-784.
- [15] 丁采苒. 白术及其提取物免疫调节功能和机制研究[D]: [硕士学位论文]. 郑州: 河南大学, 2016: 1-10.
- [16] 张敏, 高晓红, 孙晓萌, 等. 茯苓的药理作用及研究进展[J]. 北华大学学报: 自然科学版, 2008, 9(1): 63-68.
- [17] 苗明三. 怀山药多糖对小鼠免疫功能的增强作用[J]. 中药药理与临床, 1997, 13(3): 26-27.