

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.12.013

基于单细胞转录组测序探讨仙连解毒方对结直肠癌湿热瘀毒证模型小鼠肠道免疫细胞的影响

张钦畅, 程海波[✉], 沈卫星, 徐长亮, 谭佳妮, 赖岳阳, 范旻旻, 李柳

南京中医药大学第一临床医学院, 南京市栖霞区仙林大道 138 号, 210023

[摘要] **目的** 探讨仙连解毒方治疗结直肠癌湿热瘀毒证的可能作用机制。**方法** 30 只 C57BL/6N 小鼠随机分为正常组、模型组、仙连解毒方组, 每组 10 只。模型组和仙连解毒方组小鼠采用高温高湿环境、高脂饮食与氧化偶氮甲烷/葡聚糖硫酸钠联合诱导建立结直肠癌湿热瘀毒证小鼠模型。造模成功后, 仙连解毒方组给予仙连解毒方 12.9 g/(kg·d) 灌胃, 正常组、模型组给予 0.2 ml 生理盐水灌胃, 均每周 6 次, 连续 16 周。给药期间每周统计疾病活动指数 (DAI) 评分, 末次给药后处死小鼠, 检测小鼠血清二胺氧化酶 (DAO)、结直肠组织髓过氧化物酶 (MPO) 含量, 取结肠组织进行单细胞转录组测序 (scRNA-seq), 采用 SingleR-v1.4.1, 根据细胞表面标记基因, 对肿瘤微环境 (TME) 中的免疫细胞进行细胞亚型鉴定, 分析各组小鼠免疫细胞表达的差异基因的生物学术功能和信号通路。**结果** 仙连解毒方组给药第 7 周至第 16 周, DAI 评分较模型组显著降低 ($P<0.01$)。与正常组比较, 模型组小鼠生存率显著降低, 血清 DAO、结直肠组织 MPO 水平显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与模型组比较, 仙连解毒方组小鼠生存率升高, 血清 DAO、结直肠组织 MPO 水平显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。scRNA-seq 分析结果显示, 小鼠肠道 T 细胞可分为 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、自然杀伤 (NK) T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞 4 种亚型。与模型组比较, 仙连解毒方组小鼠肠道组织中肠上皮细胞、成纤维细胞、红系细胞数量和占比升高, B 细胞、T 细胞、髓系细胞数量和占比降低; T 细胞中激活 CD4⁺T 细胞, 效应 CD4⁺T 细胞、记忆 CD8⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、NK T 细胞数量和占比降低, 细胞毒性 CD8⁺T 细胞、耗竭 CD8⁺T 细胞数量和占比升高, CD8⁺T 细胞、初始 CD4⁺T 细胞、记忆 CD4⁺T 细胞、调节性 T 细胞 (Treg)、初始 CD8⁺T 细胞数量降低, 占比升高; 髓系细胞中各类细胞数量皆下降, 其中巨噬细胞与中性粒细胞占比降低, 肥大细胞、树突状细胞占比升高。差异基因富集分析显示, 仙连解毒方对 CD8⁺T 细胞的调控功能主要富集在 RNA 聚合酶 II 对转录的正向调控、转录因子激活蛋白-1 (AP-1) 复合物等, 信号通路主要富集在破骨细胞分化、白细胞介素 (IL-17) 信号通路、核因子 κ B (NF- κ B) 信号通路、肿瘤坏死因子 (TNF) 信号通路等方面; 对 CD4⁺T 细胞的调控功能主要富集在伴侣辅因子依赖性蛋白质重折叠、p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38MAPK) 级联负调控等, 信号通路主要富集在炎症性肠病、破骨细胞分化、细胞凋亡、TNF 信号通路等方面; 对髓系细胞的调控功能主要富集在炎症反应、中性粒细胞趋化性、免疫反应等, 信号通路主要富集在 IL-17 信号通路、TNF 信号通路、NF- κ B 信号通路、抗原提呈加工等方面。**结论** 仙连解毒方可能通过调控 TME 中的 CD8⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、巨噬细胞、中性粒细胞等多种免疫细胞数量和比例, 干预 Th1/Th2 细胞分化、Th17 细胞分化、IL-17、TNF、NF- κ B 等信号通路, 改善结直肠癌免疫、炎性微环境, 从而治疗结直肠癌湿热瘀毒证。

[关键词] 结直肠癌; 湿热瘀毒证; 仙连解毒方; 单细胞转录组测序; 免疫细胞

基金项目: 国家自然科学基金 (81930117); 国家中医药管理局中医药创新团队及人才支持计划项目 (ZYXCXTD-C-202208)

[✉] 通讯作者: hbcheng@njucm.edu.cn, (025)85811001

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是我国高发的恶性肿瘤, 2020 年在我国癌症发病率中排名第二, 癌症死亡率中排名第五^[1]。除了遗传因素与生活习惯外, 肿瘤与肿瘤微环境 (TME) 的异质性可能是导致 CRC 发病的主要因素, 这可能与肿瘤中不同的细胞亚群、基因状态和表型有关^[2]。免疫细胞是 TME 的重要组成部分, 主要包括髓系细胞 (巨噬细胞、中性粒细胞、肥大细胞、树突状细胞等) 和淋巴细胞 (T 细胞和 B 细胞), 其可通过调控肿瘤炎症反应和免疫监视, 影响肿瘤的增殖、侵袭和转移^[3]。仙连解毒方是本团队在癌毒病机理论指导下研制的, 可显著改善 CRC 湿热瘀毒证患者中医证候^[4]; 通过抑制血管新生, 维持内皮细胞稳态, 抑制糖酵解, 影响缺氧微环境下 CRC 细胞增殖, 调控细胞色素 P450 酶对外源性药物的代谢作用等方式干预 CRC^[5-8]; 并可显著改变 TME 中肠上皮细胞、T 细胞、B 细胞、成纤维细胞等的细胞数目与比例^[9-10]。本研究在前期研究基础上, 采用单细胞转录组测序 (scRNA-seq) 技术结合生物信息学方法进一步研究仙连解毒方对 CRC 湿热瘀毒证模型小鼠肠道免疫细胞的影响, 探讨其调控 TME 的可能作用机制。本研究通过南京中医药大学实验动物中心伦理审查 (批准号: 201911A027)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6N 小鼠 30 只, 体质量 18~22 g, 6~8 周龄, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物使用许可证号为 SCXK (京) 2016-0006, 饲养室温 22~26 °C, 相对湿度 40%~60%, 明暗各 12 h。

1.2 药物

仙连解毒方组成: 仙鹤草 12 g, 黄连 5 g, 苦参 9 g, 薏苡仁 15 g, 醋三棱 9 g, 醋莪术 9 g, 炙黄芪 15 g, 麸炒白术 12 g。药材均购自江苏省中医院, 经南京中医药大学中药资源与鉴定中心估为正品, 交由南京中医药大学药理教研室煎制: 称取各药材, 首先按 1 g 中药加 10 ml 水的比例加水煎煮 2 h, 随后按 1 g 中药加 8 ml 水的比例加水煎煮 1.5 h, 过滤两次煎煮后的药液, 合并, 减压浓缩至生药量为 1.2 g/ml, 配入 95% 乙醇使浓缩药液的含醇量达 70%, 静置 1 天, 过滤, 滤液减压浓缩, 复方水提浓缩为 1 g/ml 后, 60% 乙醇 4 °C 醇沉 24 h, 抽滤后旋蒸浓缩至 3 g/ml, 4 °C 保存。

1.3 主要试剂及仪器

45% 脂肪热能的啮齿动物饲料 (配方号 D12451), 江苏省协同医药生物工程有限责任公司; 氧化偶氮甲烷 (AOM, 货号 A2107153), 美国 Sigma 公司; 葡聚糖硫酸钠 (DSS, 货号 SR01606), 美国 MPBIO 公司; 髓过氧化物酶 (MPO) 试剂盒 (货号 20210123), 南京建成生物工程研究所; 二胺氧化酶 (DAO) 试剂盒 (货号 200107KE7), 江苏晶美生物科技有限公司; 肿瘤组织解离试剂盒 (货号 130-097-410), 德国美天旎生物技术有限公司。

Spark 型多功能酶标仪, 瑞士 TECAN 公司; QN2881 型细胞过滤器, 北京百奥莱博科技有限公司; Qubit 3.0 型定量仪、AMQAF 1000 型细胞计数仪, 美国赛默飞世尔科技公司; 10×Magnetic H 型磁力架, Chromium 公司; 2100 型生物分析仪器, 安捷伦科技有限公司; gentleMACS™ Octo Dissociator with Heaters 型活细胞组织均质机, 德国美天旎生物技术有限公司; FYL-YS-430L 型灭活恒温小鼠培养箱, 北京福意电器有限公司。

1.4 动物模型的建立

30 只小鼠采用随机数字表法分为正常组、模型组和仙连解毒方组, 每组 10 只。模型组和仙连解毒方组小鼠腹腔注射 AOM 10 mg/kg 1 次。AOM 给药 1 周后, 给予 2% DSS 溶液持续饮用 1 周, 每天 5 ml, DSS 饮水期间将小鼠置于灭活恒温小鼠培养箱 [温度 (33±2) °C, 相对湿度 93%±2%] 中, 每天持续 8 h, 随后正常饮水 2 周, 正常环境饲养。DSS 溶液饮用与正常饮水交替, 共进行 3 个循环, 同时每天给予 45% 脂肪热能的啮齿动物饲料喂养。以结直肠中下段及肛门处黏膜充血水肿、出现多个隆起赘生物为结直肠癌造模成功标准^[11-12]。以造模后小鼠出现腹泻、黏液样便、血便、食欲不振、精神萎靡、嗜卧懒动、毛发晦暗无泽等症状和体征为湿热瘀毒证型造模成功标准^[13]。

3 个循环的 DSS 饮水结束后, 模型组和仙连解毒方组各 10 只小鼠造模成功, 仙连解毒方组小鼠给予仙连解毒方 12.9 g/(kg·d) 灌胃, 正常组与模型组给予 0.2 ml 的生理盐水灌胃, 均每周一至周六每日 1 次, 周日停 1 次, 连续 16 周。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 疾病活动指数评分及生存率 给药期间每日称量各组小鼠的体质量, 观察粪便质地及便血情况, 对小鼠进行疾病活动指数 (DAI) 评分^[14], 根据每日检测结果取每周平均值。DAI 评分= (体质

量下降率评分+大便性状评分+便血情况评分)/3。体质量下降率评分包括5级(0分:下降率<1%;1分:1%≤下降率≤5%;2分:5%<下降率≤10%;3分:10%<下降率≤15%;4分:下降率>15%),体质量下降率=(原体质量-下降后的体质量)/原体质量×100%;大便性状评分包括5级(0分:量少、硬、干、不黏;1分:量少、硬、湿、黏;2分:量多、软、很黏;3分:量多、软、散;4分:稀便);便血情况评分包括5级(0分:无颜色;1分:颜色反应为点状;2分:持续蓝色;3分:深色粪便+潜血蓝色;4分:便血+深蓝反应)。

造模给药期间,记录各组小鼠生存情况,绘制Kaplan-Meier生存曲线,生存率 $S(t_i)$ 等于上一个时间点 $i-1$ 的生存率乘以1与 d_i/n_i 差值的乘积, n_i 是 t_i 点前存活总鼠数, d_i 是事件在 t_i 发生数目, t_i 表示第 i 个时间点。 $S(t_{i-1})$ 表示在上一个时间点 $i-1$ 的生存率,即 $S(t_i)=S(t_{i-1})(1-d_i/n_i)^{[15]}$ 。

1.5.2 结直肠组织MPO与血清DAO含量检测 末次给药2 h后,脱颈椎处死小鼠,分离各组小鼠的结直肠,摘眼球取血。每组采用随机数字表法选取3只小鼠,采用ELISA法检测各组小鼠血清DAO水平,酶标仪测定结直肠组织MPO含量。

1.5.3 scRNA-seq测序与免疫细胞类型鉴定 每组采用随机数字表法选取1只小鼠,取小鼠结直肠段,用肿瘤组织解离试剂盒酶解,建库与测序部分由晶能生物技术(上海)有限公司完成。采用微滴式文库构建工作站官方软件Cell Ranger v5.0.0对原始数据进行数据质量统计,使用Seurat v3.1.1软件包过滤剔除双细胞、多细胞或死细胞等低质量细胞。

通过 t 分布随机邻居嵌入(t -SNE)对所有细胞进行非线性降维并将其投射至二维空间,细胞根据共同特征聚集成细胞群。检索各类免疫细胞的典型标记基因,通过FeaturePlot函数对检索到的标记基因进行可视化,采用使用SingleR v1.4.1软件包对每类免疫细胞相关细胞群进行细胞亚型注释,将样本中每一个细胞的表达谱与参考数据集中注释的每个细胞表达谱计算Spearman相关性,选择数据集中与样本细胞表达相关性最大的细胞作为最终待鉴定的细胞类型。

1.5.4 差异基因生物信息学分析 使用Seurat包中的FindMarkers函数进行各类免疫细胞的差异基因筛选($P<0.05$, $\log_2FC>1.5$)^[16],并通过超几何分布检验进行差异显著基因的GO分析和KEGG富集分析。

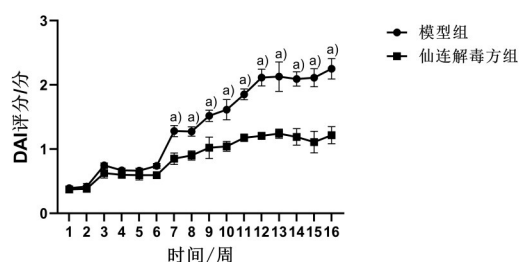
1.6 统计学方法

采用SPSS 26.0软件进行统计分析。计量资料均符合正态分布,以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,方差齐者多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用LSD检验;方差不齐者多组间比较使用Kruskal-Wallis H 检验,两组间比较使用Mann-Whitney U 检验。采用Kaplan-Meier方法分析仙连解毒方与结直肠癌生存预后的关系,组间比较采用log-rank检验。采用Pearson相关分析检验不同基因表达谱之间的相关性。采用卡方检验分析细胞亚群比例。 $P<0.05$ 认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠DAI评分和生存率比较

图1示,模型组小鼠DAI评分随造模时间推移不断升高,与模型组比较,仙连解毒方组小鼠给药第7周至第16周DAI评分显著降低($P<0.01$)。图2示,与正常组比较,模型组小鼠生存率显著降低($P<0.05$),仙连解毒方组小鼠生存率较模型组升高($P<0.05$)。



注:DAI,疾病活动指数。

a)与模型组比较, $P<0.01$ 。

图1 结直肠癌湿热瘀毒证模型组与仙连解毒方组小鼠DAI评分比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Figure 1 Comparison of DAI scores between model group and XJF group

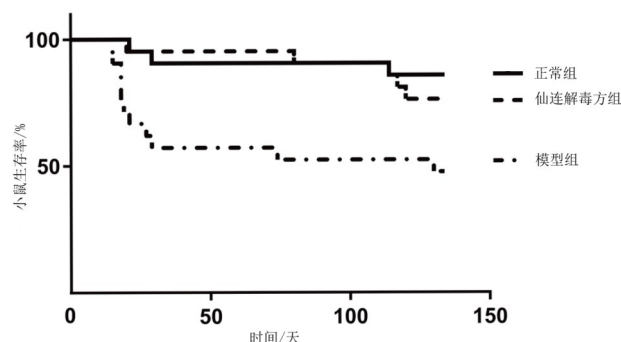


图2 各组小鼠生存率比较

Figure 2 Comparison of survival rate in each group

2.2 各组小鼠血清DAO、结肠组织MPO水平比较

表1示,与正常组比较,模型组小鼠血清DAO、结肠组织MPO水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,仙连解毒方组小鼠血清DAO、结肠组织MPO水平显著降低($P<0.01$)。

表1 各组小鼠血清DAO、结肠组织MPO水平比较

Table 1 Comparison of serum DAO and colorectal tissue MPO contents in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	DAO/U·ml ⁻¹	MPO/U·L ⁻¹
正常组	3	10.15±1.148	69.40±6.146
模型组	3	32.68±3.097 ^{a)}	143.00±12.49 ^{a)}
仙连解毒方组	3	22.16±2.208 ^{b)}	90.90±2.211 ^{b)}

注: DAO, 二胺氧化酶; MPO, 髓过氧化物酶。

a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较 $P<0.01$ 。

2.3 各组小鼠肠道免疫细胞比较

前期研究结果^[9]表明, scRNA-seq共捕获细胞45 480个, t -SNE降维聚类后共归类为20个细胞群, 采用参考数据集法对细胞类型进行鉴定, 可分为9种细胞类型。本研究根据细胞Marker标记基因对细胞类型进行人工鉴定, 剔除低质量细胞后, 发现小鼠肠道组织主要包括肠上皮细胞、B细胞、T细胞、红系细胞、髓系细胞、成纤维细胞6种细胞类型。表2示, 与正常组比较, 模型组小鼠肠上皮细胞、成纤维细胞的数量和占比降低, B细胞、T细胞、红系细胞、髓系细胞数量和占比升高; 与模型组比较, 仙连解毒方组肠上皮细胞、成纤维细胞、红系细胞数量和占比升高, B细胞、T细胞、髓系细胞数量和占比降低。

表2 各组小鼠肠道细胞类型人工鉴定结果

Table 2 Manual identification results of intestinal cell types in each group

细胞类型	正常组 (n=1)		模型组 (n=1)		仙连解毒方组 (n=1)	
	细胞数	占比/%	细胞数	占比/%	细胞数	占比/%
肠上皮细胞	7862	84.46	1490	15.86	6511	60.38
B细胞	508	5.46	3152	33.56	995	9.23
T细胞	735	7.90	2855	30.39	1658	15.38
红系细胞	83	0.89	627	6.68	1044	9.68
髓系细胞	81	0.87	1135	12.08	445	4.13
成纤维细胞	28	0.30	4	0.04	107	0.99
低质量细胞	11	0.12	130	1.38	23	0.21
合计	9308	100	9393	100	10 783	100

根据上述细胞分类, 本研究共捕获T细胞5248个, t -SNE降维聚类为13个细胞群, 主要包括4类细胞亚型: CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、

自然杀伤(NK) T细胞。表3示, 与正常组比较, 模型组CD4⁺T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、NK T细胞数量和占比升高, CD8⁺T细胞数量增加而占比降低; 与模型组比较, 仙连解毒方组CD4⁺T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、NK T细胞数量和占比降低, CD8⁺T细胞数量减少而占比升高。

表3 各组小鼠肠道CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞数量和占比结果

Table 3 Number and proportion of intestinal CD4⁺T cells and CD8⁺T cells in each group

细胞类型	正常组 (n=1)		模型组 (n=1)		仙连解毒方组 (n=1)	
	细胞数	占比/%	细胞数	占比/%	细胞数	占比/%
CD4 ⁺ T细胞	253	34.42	1441	50.47	633	38.18
CD8 ⁺ T细胞	445	60.54	997	34.92	881	53.14
NK T细胞	29	3.95	165	5.78	65	3.92
$\gamma\delta$ T细胞	4	0.54	196	6.87	46	2.77
未知细胞	4	0.54	56	1.96	33	1.99
合计	735	100	2855	100	1658	100

将捕获的2327个CD4⁺T细胞与2323个CD8⁺T细胞进行 t -SNE降维聚类分析。CD4⁺T细胞主要分为初始CD4⁺T细胞、效应CD4⁺T细胞、记忆CD4⁺T细胞、激活CD4⁺T细胞、调节性T细胞(Treg)5个亚群; CD8⁺T细胞主要分为初始CD8⁺T细胞、记忆CD8⁺T细胞、细胞毒性CD8⁺T细胞、耗竭CD8⁺T细胞4个亚群。表4示, 与正常组比较, 模型组中效应CD4⁺T细胞、记忆CD4⁺T细胞、Treg、记忆CD8⁺T细胞数量和占比升高; 细胞毒性CD8⁺T细胞数量和占比降低; 激活CD4⁺T细胞、耗竭CD8⁺T细胞、初始CD4⁺T细胞、初始CD8⁺T细胞数量升高, 占比降低。与模型组比较, 仙连解毒方组中激活CD4⁺T细胞、效应CD4⁺T细胞、记忆CD8⁺T细胞数量和占比降低; 细胞毒性CD8⁺T细胞、耗竭CD8⁺T细胞数量和占比升高; 初始CD4⁺T细胞、记忆CD4⁺T细胞、Treg、初始CD8⁺T细胞数量降低, 占比升高。

本研究共捕获髓系细胞1661个, t -SNE降维聚类为5个细胞群, 主要包括4类细胞亚型: 巨噬细胞、中性粒细胞、肥大细胞、树突状细胞。表5示, 与正常组比较, 模型组各类髓系细胞数量均升高, 其中巨噬细胞、中性粒细胞、肥大细胞占比升高, 树突状细胞占比降低; 与模型组比较, 仙连解毒方组各类髓系细胞数量均降低, 其中巨噬细胞与中性粒细胞占比降低, 肥大细胞、树突状细胞占比升高。

表 4 各组小鼠肠道 CD4⁺T 细胞与 CD8⁺T 细胞亚型数量和占比统计结果

Table 4 The number and proportion of intestinal CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells subtypes in each group

细胞类型	正常组 (n=1)		模型组 (n=1)		仙连解毒方 组 (n=1)	
	细胞数	占比/%	细胞数	占比/%	细胞数	占比/%
激活 CD4 ⁺ T 细胞	52	20.55	256	17.77	84	13.27
效应 CD4 ⁺ T 细胞	26	10.28	465	32.27	33	5.21
记忆 CD4 ⁺ T 细胞	25	9.88	269	18.67	195	30.81
初始 CD4 ⁺ T 细胞	136	53.75	248	17.21	209	33.02
调节性 T 细胞	14	5.53	203	14.09	112	17.69
细胞毒性 CD8 ⁺ T 细胞	44	9.89	19	1.91	177	20.09
耗竭 CD8 ⁺ T 细胞	34	7.64	64	6.42	90	10.22
记忆 CD8 ⁺ T 细胞	45	10.11	328	32.90	44	4.99
初始 CD8 ⁺ T 细胞	322	72.36	586	58.78	570	64.70

表 5 各组小鼠肠道髓系细胞亚群数量和占比统计结果

Table 5 The number and proportion of intestinal myeloid cell subsets in each group

细胞类型	正常组 (n=1)		模型组 (n=1)		仙连解毒方组 (n=1)	
	细胞数	占比/%	细胞数	占比/%	细胞数	占比/%
巨噬细胞	23	28.40	497	43.78	182	40.90
中性粒细胞	15	18.52	369	32.51	79	17.75
肥大细胞	9	11.11	140	12.33	129	28.99
树突状细胞	34	41.98	129	11.37	55	12.36
合计	81	100	1135	100	445	100

2.4 仙连解毒方组与模型组 CD8⁺T 细胞差异基因的功能与通路比较

与正常组比较，模型组小鼠 CD8⁺T 细胞 34 个基因表达升高，131 个基因表达降低 ($P<0.05$)；与模型组比较，仙连解毒方组 85 个基因表达升高，34 个基因表达降低 ($P<0.05$)。分别比较模型组与正常组，在差异有统计学意义 ($P<0.05$) 的基

因中，以 log₂FoldChange 绝对值由高至低筛选仙连解毒方组与模型组中上、下调最显著的 50 个基因，发现在模型组中高表达，同时在仙连解毒方组中低表达的基因共 18 个：Igkc、Iglc1、Igha、S100a4、Lgals1、Gm26917、Ifi2712a、Jchain、Actb、Hist1hle、Uba52、AW112010、CD52、Clec2d、Mbnl1、Tmsb10、Klrd1、Hist1h1d；在模型组中低表达，同时在仙连解毒方组中高表达的基因共 10 个：Vps37b、Junb、Nfkb1a、Neur13、IFrd1、Dusp1、Ier5l、Pnrc1、Dusp5、Btg2。

GO 分析结果显示，仙连解毒方干预 CRC 湿热瘀毒证模型 CD8⁺T 细胞的基因生物学功能主要富集在 RNA 聚合酶 II 对转录的正向调控、环磷酸腺苷 (cAMP) 反应、转录因子激活蛋白 1 (AP-1) 复合物、RNA 聚合酶 II 近端启动子序列特异性 DNA 结合，详见表 6。KEGG 富集分析结果显示，主要信号通路富集在破骨细胞分化、白细胞介素 17 (IL-17)、核因子 κB (NF-κB)、肿瘤坏死因子 (TNF)、Th1/Th2 细胞分化、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、辅助性 T 细胞 17 (Th17) 细胞分化，详见表 7。

2.5 仙连解毒方组与模型组 CD4⁺T 细胞差异基因的功能与通路的比较

与正常组比较，模型组小鼠 CD4⁺T 细胞升高 58 个基因表达、降低 104 个基因表达 ($P<0.05$)；与模型组比较，仙连解毒方组升高 86 个基因表达、降低 59 个基因表达 ($P<0.05$)。在差异有统计学意义的基因中，分别以 log₂FoldChange 绝对值由高至低筛选仙连解毒方组与模型组中上、下调最显著的 50 个基因，发现在模型组中高表达、同时在仙连解毒方组中低表达的基因共 16 个：Iglc1、Igha、Hspa1b、Hspa1a、Igkc、Jchain、AW112010、Hist1hle、Cd74、Clec2d、S100a4、Ly6a、Actb、Hist1h1c、Lgals1、Ifi2712a；在模型组中低表达、同时在仙连解毒方组中高表达的基因共 8 个：Vps37b、Dusp10、

表 6 仙连解毒方组与模型组小鼠 CD8⁺T 细胞差异基因功能 GO 分析结果

Table 6 GO analysis results of differential gene functions of CD8⁺ T cells in XJF group and model group

功能名称	功能分类	P 值	关键基因
RNA 聚合酶 II 对转录的 正向调控	生物学过程	4.06×10 ⁻¹¹	Stat4; Atf3; Nr4a2; Cebpb; Nr4a3; Klf4; Jun; Fosl2; Fosb; Sertad1; Jund; Klf2; Ier2; Junb; Csrmp1; Cited2; Per1; Kdm6b; Ifrd1; Nfkb1a; Fos; Klf6; Rgcc; Nr4a1; Litaf
cAMP 反应	生物学功能	2.33×10 ⁻¹⁰	Jun; Fosb; Jund; Junb; Per1; Fos; Dusp1
转录因子 AP-1 复合物	细胞成分	2.67×10 ⁻¹²	Jun; Jund; Junb; Fos
RNA 聚合酶 II 近端启动 子序列特异性 DNA 结合	分子功能	1.21×10 ⁻¹¹	Atf3; Nr4a2; Cebpb; Nr4a3; Klf4; Jun; Fosl2; Bhlhe40; Fosb; Jund; Junb; Per1; Kdm6b; Fos; Klf6; Nr4a1; Litaf; Tgif1

注：cAMP，环磷酸腺苷；AP-1，激活蛋白 1。

表7 仙连解毒方组与模型组小鼠CD8⁺T细胞差异基因通路KEGG富集结果Table 7 KEGG enrichment results of differential gene pathways of CD8⁺ T cells in XJF group and model group

通路名称	P 值	关键基因
破骨细胞分化	4.04×10 ⁻⁸	Fos; Fosb; Fosl2; Ifngr1; Jun; Junb; Jund; Nfkb; Socs1
IL-17	5.49×10 ⁻⁷	Cebpb; Fos; Fosb; Jun; Jund; Nfkb; Tnfaip3
NF-κB	1.20×10 ⁻⁵	Bcl2a1b; Ccl4; Gadd45b; Ltb; Nfkb; Tnfaip3
TNF	2.42×10 ⁻⁵	Cebpb; Fos; Jun; Junb; Nfkb; Tnfaip3
Th1/Th2 细胞分化	6.36×10 ⁻⁵	Fos; Ifngr1; Jun; Nfkb; Stat4
MAPK	1.13×10 ⁻⁴	Dusp1; Dusp10; Dusp5; Fos; Gadd45b; Hspa1b; Jun; Jund; Nr4a1
Th17 细胞分化	1.30×10 ⁻³	Fos; Ifngr1; Jun; Nfkb

注: IL-17, 白细胞介素 17; NF-κB, 核因子 κB; TNF, 肿瘤坏死因子; MAPK, 丝裂原活化蛋白激酶; Th17, 辅助性 T 细胞 17。

Junb、Rgcc、Ccr7、Klf2、Nfkb、Irf1。

GO 富集分析结果显示, 仙连解毒方干预 CRC 湿热瘀毒证模型 CD4⁺T 细胞的基因生物学功能主要富集在伴侣辅因子依赖性蛋白质重折叠、p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38MAPK) 级联负调控、C-C 趋化因子结合、趋化因子受体活性, 详见表 8。KEGG 富集分析结果显示, 主要信号通路富集在炎症性肠病、破骨细胞分化、细胞凋亡、TNF、MAPK、Th1/Th2 细胞分化、Th17 细胞分化, 详见表 9。

2.6 仙连解毒方组与模型组髓系细胞差异基因的功能与通路的比较

与正常组比较, 模型组模型小鼠髓系细胞升高 141 个基因表达、降低 229 个基因表达 ($P<0.05$); 与模型组比较, 仙连解毒方组升高 95 个基因表达、降低 130 个基因表达 ($P<0.05$)。在差异有统计学

意义的基因中, 分别以 log₂FoldChange 绝对值由高至低筛选仙连解毒方组与模型组中上、下调最显著的 50 个基因, 发现在模型组中高表达、同时在仙连解毒方组中低表达的基因共 6 个: Ig1c1、Pim1、Grina、Osm、Ccl6、G0s2; 在模型组中低表达、同时在仙连解毒方组中高表达的基因 1 个: Lmna。

GO 富集分析结果显示, 仙连解毒方干预 CRC 湿热瘀毒证模型髓系细胞的基因生物学功能主要富集在炎症反应、中性粒细胞趋化、免疫反应、对脂多糖的反应, 详见表 10。KEGG 富集分析结果显示, 主要信号通路富集在 IL-17、TNF、破骨细胞分化、抗原提呈加工、NF-κB、炎症性肠病, 详见表 11。

3 讨论

癌毒病机理论认为, CRC 是在肠腑功能失常、

表8 仙连解毒方组与模型组小鼠CD4⁺T细胞差异基因功能GO分析结果Table 8 GO analysis results of differential gene functions of CD4⁺ T cells in XJF group and model group

功能名称	功能分类	P 值	关键基因
伴侣辅因子依赖性蛋白质重折叠	生物学过程	1.99×10 ⁻⁸	Hspe1; Hsph1; Hspa1b; Hspa1a; Cd74
p38MAPK 级联负调控	生物学功能	2.00×10 ⁻⁸	Dusp10; Ezr; Dusp1
C-C 趋化因子结合	分子功能	7.58×10 ⁻⁹	Cxcr4; Zfp36; Cxcr6; Ccr2; Ccr7
趋化因子受体活性	分子功能	1.50×10 ⁻⁷	Cxcr4; Cxcr6; Ccr2; Ccr7

注: p38MAPK, p38 丝裂原活化蛋白激酶。

表9 仙连解毒方组与模型组小鼠CD4⁺T细胞差异基因通路KEGG富集结果Table 9 KEGG enrichment results of differential gene pathways of CD4⁺ T cells in XJF group and model group

通路名称	P 值	关键基因
炎症性肠病	1.82×10 ⁻⁶	Ifngr1; Ifngr2; Il18r1; Maf; Stat1; Tnf
破骨细胞分化	3.85×10 ⁻⁶	Ifngr1; Ifngr2; Junb; Jund; Nfkb; Sqstm1; Stat1; Tnf
细胞凋亡	9.40×10 ⁻⁶	Actb; Atf4; Ctsw; Gadd45b; Lmna; Nfkb; Tnf; Tubal1
TNF	1.33×10 ⁻⁵	Atf4; Cebpb; Il18r1; Junb; Nfkb; Tnf; Tnfaip3
MAPK	4.04×10 ⁻⁵	Areg; Atf4; Dusp1; Dusp10; Dusp5; Gadd45b; Hspa1a; Hspa1b; Jund; Nr4a1; Tnf
Th1/Th2 细胞分化	2.37×10 ⁻⁴	Ifngr1; Ifngr2; Maf; Nfkb; Stat1
Th17 细胞分化	3.04×10 ⁻⁴	Cebpb; Jund; Nfkb; Tnf; Tnfaip3

注: TNF, 肿瘤坏死因子; MAPK, 丝裂原活化蛋白激酶; Th17, 辅助性 T 细胞 17。

表 10 仙连解毒方组与模型组小鼠髓系细胞差异基因功能富集结果

Table 10 Functional enrichment results of differential genes in myeloid cells in XJF group and model group			
功能名称	功能分类	P 值	关键基因
炎症反应	生物学过程	2.14×10 ⁻¹⁶	Aif1; Cxcl2; Il1rn; Il1b; Il1a; Ptgs2; Lilrb4a; Serpinb1a; Ptafr; Adam8; Themis2; Pf4; Cxcl3; Il1f9; Ecm1; Ccl6; Ccl4; Tnf; Ccl2; Tnfaip3; Ccr1; Ccl5; Thbs1; Kit; Anxa1
中性粒细胞趋化	生物学功能	6.35×10 ⁻¹⁶	Pde4b; Cxcl2; Il1rn; Il1b; Il1a; Cxcr2; Pf4; Cxcl3; Syk; Ccl6; Ccl4; Ccl2; Ccl5; Csf3r
免疫反应	生物学功能	6.46×10 ⁻¹⁶	Osm; H2-Q10; H2-Eb1; Cxcl2; Il1rn; Il1b; Il1a; Cxcr2; Slpi; H2-D1; Lst1; H2-Ab1; Pf4; Cxcl3; Il1f9; Nfil3; H2-Aa; Ccl6; Ccl4; Tnf; Ccl2; Ccr1; Ccl5; Thbs1; Cd74; H2-K1; Clec4e
对脂多糖的反应	生物学功能	3.25×10 ⁻¹⁴	Nfkbia; Il1b; Ptgs2; Jun; Lilrb4a; Gch1; Cebpb; Ptafr; Fos; Slpi; Junb; Ass1; Cxcl3; Jund; Tnf; Ccl2; Trib1; Vcam1

表 11 仙连解毒方组与模型组小鼠髓系细胞差异基因通路富集结果

Table 11 Enrichment results of differential gene pathways in myeloid cells in XJF group and model group			
通路名称	P 值	关键基因	
IL-17	3.68×10 ⁻¹³	Ccl2; Cebpb; Cxcl2; Cxcl3; Fos; Fosl; Hsp90aa1; Il1b; Jun; Jund; Lcn2; Nfkbia; Ptgs2; Tnf; Tnfaip3	
TNF	6.92×10 ⁻¹²	Ccl2; Ccl5; Cebpb; Cxcl2; Cxcl3; Fos; Il1b; Jun; Junb; Nfkbia; Ptgs2; Socs3; Tnf; Tnfaip3; Vcam1	
破骨细胞分化	4.99×10 ⁻¹⁰	Fos; Fosl; Fosl2; Il1a; Il1b; Jun; Junb; Jund; Lilrb4a; Nfkbia; Socs3; Sqstm1; Syk; Tnf	
抗原提呈加工	2.54×10 ⁻⁹	Cd74; Ctst; H2-Aa; H2-Ab1; H2-D1; H2-Eb1; H2-K1; H2-Q10; Hsp90aa1; Hspa1a; Tnf	
NF-κB	2.70×10 ⁻⁷	Ccl4; Cxcl2; Gadd45b; Il1b; Nfkbia; Ptgs2; Syk; Tnf; Tnfaip3; Vcam1	
炎症性肠病	2.77×10 ⁻⁶	H2-Aa; H2-Ab1; H2-Eb1; Il1a; Il1b; Jun; Tnf	

注：IL-17，白细胞介素 17；TNF，肿瘤坏死因子；NF-κB，核因子 κB。

气血郁滞的基础上，癌毒内生，阻滞肠道经络血脉，使津聚成湿，血结为瘀，久蕴化热，致肠腑通降失司，湿热瘀毒胶结，形成有利于肿块生长的内环境^[17]。仙连解毒方是在癌毒病机理论指导下研制的治疗 CRC 湿热瘀毒证的临床验方，方中仙鹤草、黄连抗癌解毒为君；苦参、薏苡仁清热化湿，三棱、莪术破血消癥，四者共为臣药；黄芪、白术补气健脾，为佐药。全方合用，共奏抗癌解毒、清热化湿、祛瘀消癥、健脾益气之功。癌毒病机理论认为，恶性肿瘤中癌毒、热邪、正虚、湿浊、血瘀等病机证素与 TME 中炎性、免疫、酸性、缺氧的致病特征密切相关^[18]。因此，我们认为仙连解毒方在直接干预肿瘤细胞的同时，还可通过调节 TME 发挥抗肿瘤功效。DAO 是肠黏膜上皮细胞中具有高度活性的酶，可反映肠道完整性与受损程度^[19]。MPO 是中性粒细胞溶酶体中的一种氧化酶，可反映结直肠组织中性粒细胞的浸润程度，通过产生次氯酸、活性氧等物质，诱发 DNA 损伤和基因突变，促进 CRC 的发生、发展，在致癌基因的激活过程中发挥重要作用^[20]。本研究发现，CRC 湿热瘀毒证模型组小鼠出现了 DAI 评分的持续升高、生存率的降低，小鼠血清 DAO、结直肠组织 MPO 水平升高。与模型组比较，仙连解毒方组小鼠 DAI 评分降低、生存率显著升高，小鼠 DAO 和 MPO 的水平较模型组降低，提示仙连解毒方可改善 CRC

湿热瘀毒证小鼠疾病症状，提高生存率，减轻结直肠黏膜损伤，降低中性粒细胞浸润，抑制肠道炎症反应。

T 细胞亚群在 CRC 免疫微环境中发挥重要作用。研究表明，细胞毒性 CD8⁺T 细胞通过检测肿瘤表面抗原对肿瘤细胞进行杀伤，增强自身免疫系统对肿瘤细胞的清除，其在 CRC 中的高度浸润提示预后良好^[21]；Th2、Th17、Th22 等效应 CD4⁺T 细胞在 CRC 中浸润与预后不良相关，Th2 细胞可分泌白细胞介素 4（IL-4）、白细胞介素 6（IL-6）等免疫抑制因子，降低机体免疫功能，Th17 细胞分泌的白细胞介素 17A（IL-17A）等炎性因子可促进肿瘤生长和进展，诱导血管生成^[22-23]；结直肠癌中的 γδ T 细胞可分泌白细胞介素 8（IL-8）、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）等募集髓源性抑制细胞，介导免疫抑制和炎症反应，促进 CRC 进展^[24]。本研究采用 scRNA-seq 分析仙连解毒方对结直肠癌湿热瘀毒证模型小鼠 TME 中免疫细胞的影响。结果表明，模型组和仙连解毒方组小鼠肠道中 T 细胞、髓系细胞、B 细胞等多种免疫细胞亚型的数量和比例皆发生变化。与正常组比较，模型组小鼠肠道中 γδ T 细胞、效应 CD4⁺T 细胞数量和比例升高，细胞毒性 CD8⁺T 细胞数量和比例下降；仙连解毒方可降低模型小鼠肠道 γδ T 细胞、效应 CD4⁺T 细胞的数量和比例，升高细胞毒性 CD8⁺T 细胞的数量

和比例,其调控 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞亚型的基因主要富集在 Th1/Th2 细胞分化、Th17 细胞分化、TNF、MAPK 等信号通路。上述结果表明,仙连解毒方可通过调控 TME 中多种 T 细胞亚型,恢复机体免疫功能,促进抗肿瘤免疫反应,干预免疫抑制状态,改善肿瘤免疫微环境。

巨噬细胞和中性粒细胞在 CRC 早期阶段可释放高水平的活性氧,损伤肠上皮细胞 DNA 诱发癌变,肿瘤形成后髓系细胞可进一步分泌肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 等炎性因子,激活 NF- κ B、信号转导和转录激活因子 3 (STAT3) 信号通路,促进肿瘤进展^[3,25]。肿瘤相关巨噬细胞是 TME 中最常见的免疫细胞之一,其高度浸润与 CRC 不良预后相关,可通过分泌趋化因子配体 5 (CCL5)、血管内皮生长因子 (VEGF)、白细胞介素 10 (IL-10) 等细胞因子促进肿瘤侵袭,诱导血管生成、免疫抑制^[26];肿瘤相关中性粒细胞可通过分泌转化生长因子 β (TGF- β) 介导免疫抑制,同时还可调节炎症反应,促进肿瘤进展^[27]。本研究中髓系细胞亚型分析显示,模型组小鼠巨噬细胞和中性粒细胞的数量和比例较正常组小鼠升高,仙连解毒方组小鼠巨噬细胞和中性粒细胞的数量和比例较模型组小鼠降低,仙连解毒方调控髓系细胞的基因功能主要富集在炎症反应、中性粒细胞趋化、免疫反应等,通路主要富集在 IL-17、TNF、NF- κ B、抗原提呈加工等信号通路。以上结果表明,仙连解毒方可能通过调控 TME 中巨噬细胞和中性粒细胞的募集、极化,干预炎症反应和免疫抑制,抑制 CRC 炎性微环境,给药后结直肠组织中性粒细胞介导的炎性反应指标 MPO 的下调也验证了这一结论。

综上所述,本研究通过运用单细胞转录组测序的研究方法,联合生物信息学分析发现仙连解毒方可调控 CRC 湿热瘀毒证小鼠 TME 中 CD8⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、巨噬细胞、中性粒细胞等多种免疫细胞数量和比例,作用机制与 Th1/Th2 细胞分化、Th17 细胞分化、IL-17、TNF、NF- κ B、MAPK 等信号通路相关,其可能通过干预免疫抑制和炎症反应,改善免疫、炎症微环境发挥治疗 CRC 湿热瘀毒证的功效。此外,B 细胞、NK T 细胞等免疫细胞已在前期研究^[9-10]中报道,在此不做讨论。本研究仍存在一定的局限性:因 scRNA-seq 实验费用较高、风险较大,故本研究每组仅选取一个样本,且仙连解毒方调控上述免疫细胞类型的具体作用机制尚不明确,未来可扩大样本量进行测序分

析,根据测序结果设计实验,验证仙连解毒方干预结直肠癌湿热瘀毒证的作用机制。

参考文献

- [1] CAO W, CHEN HD, YU YW, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. Chin Med J (Engl), 2021, 134(7): 783-791.
- [2] NAVIN N, KENDALL J, TROGE J, et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing [J]. Nature, 2011, 472(7341): 90-94.
- [3] GRIVENNIKOV SI, GRETEN FR, KARIN M. Immunity, inflammation, and cancer [J]. Cell, 2010, 140(6): 883-899.
- [4] 王俊壹, 李柳, 程海波. 仙连解毒方联合 XELOX 方案治疗 IV 期结直肠癌的临床研究 [J]. 中医药学报, 2022, 50(2): 77-81.
- [5] 王启娟, 沈卫星, 姜瑞阳, 等. 仙连解毒方维持肿瘤相关血管内皮细胞稳态抑制肿瘤血管新生的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(8): 86-92.
- [6] 陶李蕙蕙, 赖岳阳, 程海波, 等. 仙连解毒方对人结直肠癌细胞增殖及糖酵解的调控作用及机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(8): 72-78.
- [7] 姜瑞阳, 徐长亮, 程海波, 等. 缺氧微环境下仙连解毒方抑制结直肠癌细胞增殖的作用及机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(8): 79-85.
- [8] 陈桐庆, 余成涛, 许惠琴, 等. 仙连解毒方干预“湿热瘀毒证”小鼠结直肠肿瘤的转录组学分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(8): 63-71.
- [9] 张钦畅, 程海波, 余成涛, 等. 仙连解毒方对结直肠癌湿热瘀毒证模型小鼠肠道细胞类型的影响 [J]. 中医杂志, 2022, 63(5): 461-467.
- [10] YU CT, CHEN T, LU S, et al. Identification of significant modules and targets of Xian-Lian-Jie-Du decoction based on the analysis of transcriptomics, proteomics and single-cell transcriptomics in colorectal tumor [J]. J Inflamm Res, 2022, 15: 1483-1499. doi: 10.2147/JIR.S344861.
- [11] DAS S, RACHAGANI S, SHEININ Y, et al. Mice deficient in Muc4 are resistant to experimental colitis and colitis-associated colorectal cancer [J]. Oncogene, 2016, 35(20): 2645-2654.
- [12] PARANG B, BARRETT CW, WILLIAMS CS. AOM/DSS model of colitis-associated cancer [J]. Methods Mol Biol, 2016, 1422: 297-307. doi: 10.1007/978-1-4939-3603-8_26.
- [13] 吕冠华, 劳绍贤. 脾胃湿热证动物模型的建立与评价 [J]. 广州中医药大学学报, 2005, 22(3): 231-235.

- [14] COOPER HS, MURTHY SN, SHAH RS, et al. Clinico-pathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis[J]. Lab Invest, 1993, 69(2): 238–249.
- [15] RICH JT, NEELY JG, PANIELLO RC, et al. A practical guide to understanding Kaplan-Meier curves [J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2010, 143(3): 331–336.
- [16] BUTLER A, HOFFMAN P, SMIBERT P, et al. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species [J]. Nat Biotechnol, 2018, 36(5): 411–420.
- [17] 程海波, 李柳, 吴勉华, 等. 癌毒病机理论辨治肠癌探讨[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(10): 2487–2488.
- [18] 程海波, 沈卫星, 吴勉华, 等. 基于肿瘤微环境的癌毒病机理论研究[J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30(2): 105–107.
- [19] ZHANG J, CHEN Z, LU Y, et al. A Functional food inhibits azoxymethane/dextran sulfate sodium-induced inflammatory colorectal cancer in mice[J]. Onco Targets Ther, 2021, 14: 1465–1477. doi: 10.2147/OTT.S283465.
- [20] GALDIERO MR, BIANCHI P, GRIZZI F, et al. Occurrence and significance of tumor-associated neutrophils in patients with colorectal cancer [J]. Int J Cancer, 2016, 139(2): 446–456.
- [21] ZOU Q, HU B, YU HC, et al. Characteristics of CD8⁺ T cell infiltration in colorectal cancer and their correlation with prognosis [J]. Chin J Gastrointest Surg, 2021, 24(12): 1086–1092.
- [22] DITORO D, BASU R. Emerging complexity in CD4⁺T lineage programming and its implications in colorectal cancer [J]. Front Immunol, 2021, 12: 694833. doi: 10.3389/fimmu.2021.694833.
- [23] 许迪, 米曰堂. 结直肠癌与 T 细胞亚群的关系[J]. 中国现代普通外科进展, 2022, 25(3): 250–252.
- [24] WU P, WU D, NI C, et al. $\gamma\delta$ T17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer[J]. Immunity, 2014, 40(5): 785–800.
- [25] SCHMITT M, GRETEN FR. The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer [J]. Nat Rev Immunol, 2021, 21(10): 653–667.
- [26] CHEN Y, SONG Y, DU W, et al. Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression [J]. J Biomed Sci, 2019, 26(1): 78.
- [27] HEDRICK CC, MALANCHI I. Neutrophils in cancer: heterogeneous and multifaceted [J]. Nat Rev Immunol, 2022, 22(3): 173–187.

Effect of *Xianlian Jiedu Formula* (仙连解毒方) on Intestinal Immune Cells in Colorectal Cancer Mice with Dampness-heat Stasis Toxin Syndrome based on Single-cell Transcriptome Sequencing

ZHANG Qinchang, CHENG Haibo, SHEN Weixing, XU Changliang, TAN Jiani, LAI Yueyang, FAN Minmin, LI Liu

The First Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Xianlian Jiedu Formula* (仙连解毒方, XJF) in treating dampness-heat stasis toxin syndrome of colorectal cancer. **Methods** Thirty C57BL/6N mice were randomly divided into normal group, model group and XJF group with 10 rats in each group. The mice in model group and XJF group were induced by high temperature and high humidity environment, high fat diet and azoxymethane/ dextran sodium sulfate to establish the model of dampness-heat stasis toxin syndrome of colorectal cancer. After successful modeling, XJF group was given 12.9 g/(kg·d) of XJF by gavage, while the normal group and the model group were given 0.2 ml of normal saline by gavage, both for 6 times per week, 16 weeks. Disease activity index (DAI) score was calculated weekly during administration, and serum diamine oxidase (DAO) and colorectal tissue myeloperoxidase (MPO) contents were detected after last administration. The colonic tissue was taken for single-cell transcriptome sequencing (scRNA-seq). According to the cell surface marker gene, SingleR-v1.4.1 was used to identify cell subtypes of the immune cells in the tumor microenvironment (TME). The biological function and signaling pathway of the differentially expressed genes by immune cells in each group were analyzed. **Results** Compared to that in the model group, DAI score in XJF group was significantly lower from week 7 to week 16 during administration ($P < 0.01$). Compared to those in the normal group, the survival rate of mice in the model group significantly decreased, while the serum DAO and colorectal tissue MPO contents increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); compared to the model group, the XJF group had higher survival rate and lower serum DAO and colorectal tissue MPO contents ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The scRNA-seq analysis showed that mouse intestinal T cells could be divided into four subtypes, including

CD4⁺T cells, CD8⁺T cells, natural killer (NK) T cells and $\gamma\delta$ T cells. Compared to those in the model group, the number and proportion of intestinal epithelial cells, fibroblasts and erythroid cells in the intestinal tissues in XJF group increased, while the number and proportion of B cells, T cells and myeloid cells decreased; among T cells, the number and proportion of active CD4⁺T cells, effector CD4⁺T cells, memory CD8⁺T cells, CD4⁺T cells, $\gamma\delta$ T cells and NK T cells decreased, while those of CD8⁺ T cells, cytotoxic CD8⁺T cells and depletion CD8⁺T cells increased; the number of initial CD4⁺T cells, memory CD4⁺T cells, regulatory T cells (Tregs) and initial CD8⁺T cells decreased, while the proportion increased; the number of all kinds of myeloid cells decreased, while the proportion of macrophages and neutrophils decreased, and that of mast cells and dendritic cells increased. Differential gene enrichment analysis showed that the regulation function of XJF on CD8⁺T cells was mainly concentrated in the positive regulation of RNA polymerase II on transcription and transcription factor activator protein-1 (AP-1) complex, and the signaling pathway was mainly concentrated in osteoclast differentiation, interleukin-17 (IL-17) signaling pathway, nuclear factor κ B (NF- κ B) signaling pathway, tumor necrosis factor (TNF) signaling pathway. The regulatory functions of CD4⁺T cells was mainly concentrated in chaperone cofactory-dependent protein refolding, p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) cascade negative regulation, and the signaling pathways were mainly concentrated in inflammatory bowel disease (IBD), osteoclast differentiation, cell apoptosis, and TNF signaling pathway. The regulatory functions of myeloid cells were mainly concentrated in inflammatory response, neutrophil chemotaxis, and immune response, and the signaling pathways were mainly concentrated in IL-17 signaling pathway, TNF signaling pathway, NF-kappa B signaling pathway, and antigen presentation and processing. **Conclusion** XJF can be used to treat colorectal cancer with dampness-heat stasis toxin syndrome, and its mechanism may be related to regulating the number and proportion of CD8⁺ T cells, CD4⁺ T cells, $\gamma\delta$ T cells, macrophages, neutrophils and other immune cells in TME, and interfering with Th1/Th2 cell differentiation, Th17 cell differentiation, IL-17, TNF, NF- κ B and other signaling pathways, so as to improve the immune and inflammatory microenvironment of colorectal cancer.

Keywords colorectal cancer; dampness-heat stasis toxin syndrome; *Xianlian Jiedu Formula* (仙连解毒方); single-cell transcriptome sequencing; immune cells

(收稿日期: 2022-07-05; 修回日期: 2023-04-04)

[编辑: 王利芬]

广告

欢迎邮购《中医杂志》过刊

2000、2001 年合订本每本 100 元, 2002、2003 年合订本每本 105 元, 2004 年合订本 115 元, 2005 年合订本 125 元, 2007—2010 年合订本, 每本 140 元。2011(缺 5、6 期)—2013 年每册 9.80 元, 2014(缺 21 期)—2017 年(缺 3、5、15、18 期)每册 15 元, 2018 年(缺 5、7、9 期)每册 20 元, 2020 年(缺 7、8、9 期)每册 20 元, 2021 年每册 20 元。2011—2013 年合订本, 每年 4 本, 全年 280 元, 2014—2017 年合订本, 每年 4 本(缺 2017 年上半年合订本), 全年 400 元, 2018—2021 年合订本, 每年 4 本, 全年 600 元。2022 年合订本, 共 4 本, 全年 800 元。《中医杂志》2006—2008 年增刊每册 40 元。

以上免费邮寄, 如需挂号每件另加 3 元。

欲购者请汇款至北京市东直门内南小街 16 号, 收款人: 中医杂志社

或关注《中医杂志》官方微信(zyzgzzh)购买。邮编: 100700, 电话: (010)64089195。