

补肾解毒方调控髓源抑制细胞功能抑制大肠癌肺转移的影响

陈皖晴^{1,2}, 栾玉玲³, 石诺林², 朱惠蓉², 朱为康^{1*}

(1. 上海中医药大学附属市中医医院, 上海 200071; 2. 上海中医药大学, 上海 201203; 3. 上海中医药大学附属普陀医院, 上海 200062)

摘要: 目的 探讨补肾解毒方调控髓源抑制细胞(MDSCs)功能对大肠癌转移的影响。方法 体内实验, 构建小鼠大肠癌皮下转移模型, 随机分为对照组和补肾解毒方低、高剂量组(11.6、23.2 g/kg), 给药干预5周后, 检测大肠癌肺转移率、肺质量及生存期; 免疫组化法检测肺组织缺氧、凋亡相关蛋白表达; 流式细胞术检测 Mo-MDSCs、PMN-MDSCs、巨噬细胞和树突状细胞比例; RT-qPCR 法检测 Mo-MDSCs 和巨噬细胞功能基因 *Arg-1*、*IRF8*、*iNOS*、*CD163*、*CD206* mRNA 表达。体外实验, MACS 磁珠分选出肺组织 Mo-MDSCs, 采用补肾解毒方(0、30、90 μg/mL)处理72 h, 流式细胞术检测 CD11b⁺Arg-1⁺、F4/80⁺CD163⁺、F4/80⁺CSF1R⁺细胞群比例。结果 体内实验结果显示, 与对照组比较, 补肾解毒方高剂量组肿瘤肺转移率降低, 肺质量减轻($P<0.01$), 小鼠生存期延长($P<0.01$), 肺组织 Ki67、CA9 蛋白表达降低($P<0.05$, $P<0.01$), caspase-3 蛋白表达升高($P<0.01$), 肺组织 Mo-MDSCs 浸润减少($P<0.05$, $P<0.01$), M1 型巨噬细胞比例升高($P<0.01$), M2 型巨噬细胞比例降低($P<0.05$), CD11b⁺Ly6C⁺Arg-1⁺单核型 MDSCs 在肺组织中的浸润减少, 且多定位于肺转移灶外周; Mo-MDSCs 免疫抑制相关基因 *Arg-1* mRNA 表达降低($P<0.01$), 分化基因 *iNOS*、*IRF8* mRNA 表达升高($P<0.01$)。体外实验结果显示, 与对照组比较, 补肾解毒方干预后可降低 Mo-MDSCs 中 *Arg-1*、*CSF1R* 表达($P<0.01$), 促进 F4/80⁺CD163⁺表达($P<0.01$)。结论 补肾解毒方可通过促进 Mo-MDSCs 向成熟的单核细胞分化重塑大肠癌肺转移微环境。

关键词: 补肾解毒方; 大肠癌转移; 髓源抑制细胞; 转移微环境

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)09-3104-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.09.043

大肠癌(colorectal cancer, CRC)是造成全球癌症相关死亡的第三大癌症, 高转移率是大肠癌死亡的主要原因^[1]。肺是结直肠癌第二常见转移部位, 约11.3%的患者出现肺转移, 且伴有肺门及纵膈淋巴结转移患者的5年生存率仅为6.2%^[2]。

《景岳全书·积聚》将肿瘤发生发展的病机总结为“凡脾肾不足及虚弱失调之人, 多有积聚之病”。课题组前期流行病学调查发现, 肾虚证型大肠癌患者转移率及外周血中髓源抑制细胞(myeloid derived suppressor cell, MDSCs)水平显著高于其他证型, 并且MDSCs与大肠癌临床分期、预后之间有显著相关性^[3]。因此, 课题组认为肾虚骨髓化生失常, 正气不行, 湿热余毒伏居, 脉络空虚, 癌毒传舍, 最终导致肿瘤转移, 病位在肠, 病本在肾, 为本虚标实之证。课题组基于《素问·六元正纪大论》中“衰其大半而止”的原则, 总结出以补肾填精治法的临床验方——补肾解毒方, 并在前期研究证实补肾解毒方联合辅助化疗能够

显著抑制Ⅲ期大肠癌患者复发及转移, 抑制机体MDSCs水平, 提高机体免疫^[4], 但其具体机制尚不清楚。本研究旨在探讨补肾解毒方是否通过抑制MDSCs功能发挥抗大肠癌转移, 以期为中医药靶向MDSCs的治疗提供新的治疗策略。

1 材料

1.1 动物 健康雄性C57BL/6小鼠60只, SPF级, 6周龄, 体质量17~22 g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[实验动物生产许可证号SCXK(沪)2022-0004], 按照SPF动物饲养管理要求饲养于上海中医药大学动物实验中心[实验动物使用许可证号SYXK(沪)2020-0009], 动物实验经上海中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理号PZSHUTCM210423008)。

1.2 细胞 MC-38小鼠结肠癌细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库。

1.3 药物 补肾解毒方由熟地黄15 g、肉苁蓉9 g、女贞

收稿日期: 2023-12-15

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(82030118); 国家自然科学基金青年科学基金(82205223); 上海市科委“科技创新行动计划”扬帆计划项目(21YF1444500)

作者简介: 陈皖晴(1991—), 女, 博士, 从事中医药调控肿瘤免疫微环境的机制研究。Tel: 17317301310, E-mail: chenwq1101@163.com

*通信作者: 朱为康(1977—), 男, 硕士, 主任医师, 从事中医药防治恶性肿瘤的临床及机制研究。Tel: 13818186762, E-mail: zwkz15k1016@163.com

子9 g、山慈菇12 g、人参片5 g、八月札6 g、甘草9 g组成,饮片购自上海中医药大学附属市中医医院。称取上述药材,传统煎煮法煎煮后,浓缩至生药量8 g/mL,冷却后于4℃保存备用。

1.4 试剂 DMEM高糖培养基、胎牛血清(美国HyClone公司,批号11965084、10100147);异氟烷(北京科月华诚科技有限公司,批号W100);4%多聚甲醛固定液、苏木素-伊红染液、柠檬酸钠缓冲液、山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G标记二抗(上海碧云天生物技术股份有限公司,批号P0099、C0109、005000、A-11034);Ki67一抗、CA9一抗、caspase-3一抗[艾博抗(上海)贸易有限公司,批号ab16667、ab243660、9662];Anti-mouse BUV395 CD45、Anti-mouse/human BUV661 CD11b、Anti-mouse BV605 Gr-1、Anti-mouse APC Ly6G、Anti-mouse APC F4/80、Anti-mouse PE-Cy7 Arg-1、Anti-mouse Per-cp5.5 CSF1R(美国BD公司,货号564279、612977、563299、551460、565635、NBP1-32731PECY7、135525);Anti-mouse FITC CD163、Anti-mouse APC CD206、Anti-mouse FITC Ly6C(美国BioLegend公司,货号15-0862-82、141708、128041)。

1.5 仪器 HLE30086V-80℃超低温冰箱、Thermo 75009022低温离心机(美国Thermo公司);CytoFLEX S流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司);SX-BHC生物洁净安全柜(苏州净化设备有限公司);DSX1000激光扫描共聚焦显微镜(德国Leica公司);Precipoint M8数字扫描显微成像系统(德国Precipoint公司);Gentle MACS 25 C Tubes、Gentle MACS组织处理器(德国Miltenyi Biotec公司);JXFSTPRP-192低温快速研磨仪(上海净信实业发展有限公司)。

2 方法

2.1 分组及造模 将60只小鼠分为对照组和补肾解毒方低、高剂量组,每组20只,其中10只用于生存期观察。小鼠适应性饲养1周后造模,取对数期生长MC-38结肠癌细胞,PBS调整细胞密度为 2×10^7 /mL,接种于小鼠右侧肩胛部皮下,待肿瘤生长至长径1.5 cm左右,于无菌麻醉状态下剥除瘤体,缝合皮肤,继续常规饲养小鼠5周,建立转移皮下移植瘤高转移模型。

2.2 给药 根据成人和小鼠等效剂量换算^[5],补肾解毒方低、高剂量组小鼠灌胃给予11.6、23.2 g/kg补肾解毒方(分别为临床剂量的1、2倍),对照组小鼠灌胃给予生理盐水,给药体积均为0.2 mL,瘤体剥除后第1天开始给药,连续给药5周。饲养期间小鼠自由饮食、饮水,末次给药后12 h,安乐死小鼠,获取小鼠肺脏。

2.3 转移率及生存期评估

2.3.1 观察肺转移率及肺质量 解剖获取小鼠肺脏,称量湿重,并以Bouiss液固定24 h后,观察肺转移情况。

2.3.2 生存期观察 从建立转移瘤模型分组开始,观察不同干预条件下小鼠的生存时间,绘制生存曲线。

2.4 免疫组化法检测肺组织CA9、Ki67、caspase-3蛋白表

达 各组小鼠肺组织用4%多聚甲醛固定液于4℃固定24 h后,梯度脱水,浸蜡,包埋,石蜡切片后进行脱蜡处理,组织切片于煮沸的柠檬酸钠缓冲液中进行抗原修复,用含3% BSA的PBS封闭切片1 h,分别滴加CA9、Ki67、caspase-3一抗4℃孵育过夜,PBS洗涤后将100 μL二抗滴加于载玻片上,室温避光孵育1 h,DAB显色剂孵育,终止显色后滴加苏木素染色液复染,封片后于显微镜下观察。

2.5 免疫荧光染色观察肺组织CD11b、Ly6C、Arg-1表达及定位 将石蜡切片置于抗原修复液中,高温修复7 min,冷却至室温后滴加适量过氧化氢,并于室温静置20 min,TBST洗涤3次,封闭液室温封闭30 min,分别用CD11b、Ly6C、Arg-1一抗4℃孵育过夜,洗涤后用辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育1 h,TBST洗涤3次,DAPI染核,滴加抗荧光淬灭剂封片,于激光共聚焦显微镜下观察分子表达和定位。

2.6 流式细胞术检测肺组织MDSCs及巨噬细胞亚群 使用Miltenyi小鼠肺脏解离试剂盒制备肺组织单细胞悬液,1 000 r/min离心5 min,PBS重悬后置于EP管(每管100 μL),设置对照管、单标管和实验管,分别加入抗CD11b、抗Gr-1、抗Ly6C、抗F4/80、抗CD163、抗CD206荧光抗体,4℃孵育30 min,PBS离心洗涤2次,弃上清,PBS重悬细胞,上机检测并分析数据。

2.7 磁珠分选Mo-MDSCs及体外干预 将新鲜的1 mm³预转移肺组织小块用胶原酶37℃孵育后,制备单细胞悬液。根据Miltenyi Biotec MDSCs磁珠分选试剂盒说明书,用FcR封闭剂(1×10^8 /50 μL)处理10 min,加入生物素偶联的细胞受体Gr-1或Ly-6C单克隆抗体,4℃孵育30 min,在磁场环境中使细胞通过MACS柱,阳性选择出Mo-MDSCs亚群的纯度和活力大于90%的细胞。采用不同质量浓度补肾解毒方(0、30、90 μg/mL)处理Mo-MDSCs 72 h,流式细胞术检测Arg-1、F4/80、CD163及CSF1R表达。

2.8 RT-qPCR法检测肺组织Arg-1、iNOS、IRF8、CD163、CD206 mRNA表达 按试剂盒说明书提取肺组织总RNA,使用逆转录试剂盒逆转录成cDNA,以GAPDH为内参进行荧光定量PCR检测,扩增反应条件为94℃ 10 min,94℃ 15 s,60℃ 30 s,40个循环。以2^{-ΔΔCT}法进行基因相对表达量分析,每组3个复孔。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成,引物序列见表1。

2.9 统计学分析 通过SPSS 25.0软件进行处理,数据以($\bar{x} \pm s$)表示,两独立样本均数比较采用独立样本t检验,多样本均数比较采用单因素方差分析,均数间两两比较采用SNK-q检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 补肾解毒方对大肠癌肺转移小鼠肺转移率及生存期的影响 大肠癌皮下高转移模型结果显示,与对照组比较,补肾解毒方各剂量组大肠癌肺转移率均降低,见图1A。与对照组比较,补肾解毒方高剂量组肺质量降低($P < 0.01$),见图1B,提示补肾解毒方高剂量组能抑制大肠癌肺转移。

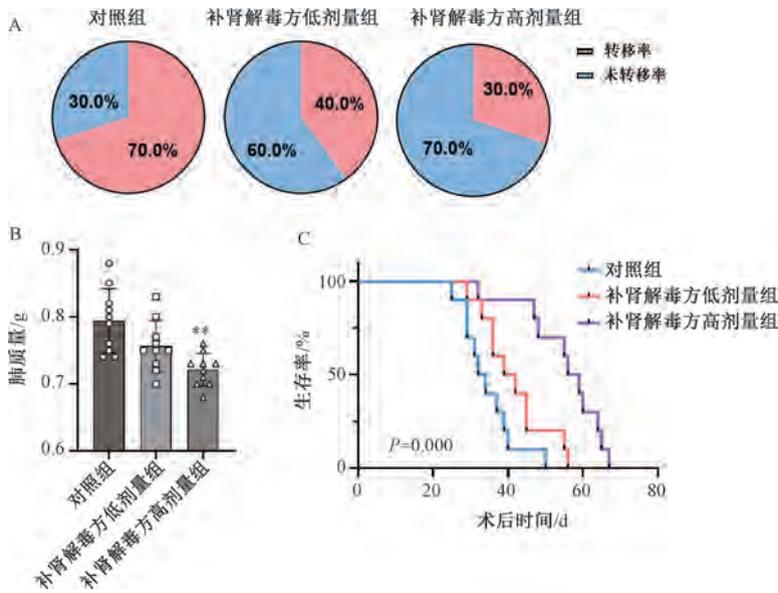
表 1 引物序列

基因	序列(5'→3')
iNOS	正向 ATGAGGCTGCTCATCCCTTCCTTGA
	反向 CTTTTCTCATCTCGTTCTGCCACCT
IRF8	正向 CCTGGTGAACACTACGACTGCT
	反向 GCCTGGGATGGCATCAGTT
GAPDH	正向 AGGTCGGTGTGAACGGATTG
	反向 TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
Arg-1	正向 CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG
	反向 AGGAGCTGTCATTAGGGACATC
CD206	正向 CTCTGTTACGCTATTGGACGC
	反向 CGGAATTTCTGGGATTCAGCTTC
CD163	正向 ATGGGTGGACACAGAATGGTT
	反向 CAGGAGCGTTAGTGACAGCAG

对照组及补肾解毒方各剂量组中位生存期分别为 33、40.5、57.5 d, Log-rank 检验和 Gehan-Breslow-Wilcoxon 检验显示远期及近期效应均有差异 ($P < 0.01$), 见图 1C。以上结果表明, 补肾解毒方可延长小鼠生存期, 且安全性较高。

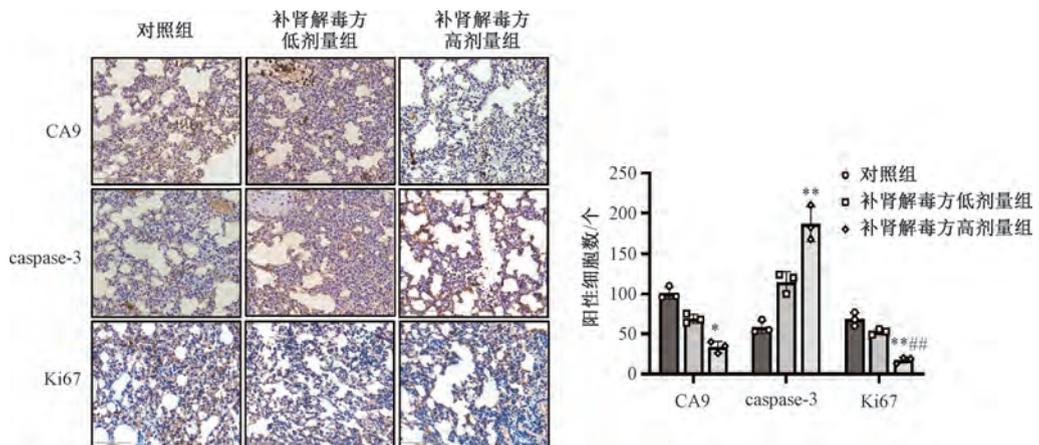
3.2 补肾解毒方对大肠癌肺转移小鼠肺组织凋亡、缺氧的影响 由图 2 可知, 与对照组比较, 补肾解毒方高剂量组小鼠肺组织 Ki67、CA9 表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), caspase-3 蛋白表达升高 ($P < 0.01$)。以上结果表明, 补肾解毒方可促进大肠癌肺转移组织中凋亡蛋白表达, 并抑制缺氧蛋白表达。

3.3 补肾解毒方对大肠癌肺转移小鼠肺组织 MDSCs、巨噬细胞分群及树突状细胞的影响 由图 3A~3B 可知, 与对照



注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 1 补肾解毒方对小鼠大肠癌肺转移率及生存期的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)



注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 补肾解毒方组间比较, ### $P < 0.01$ 。

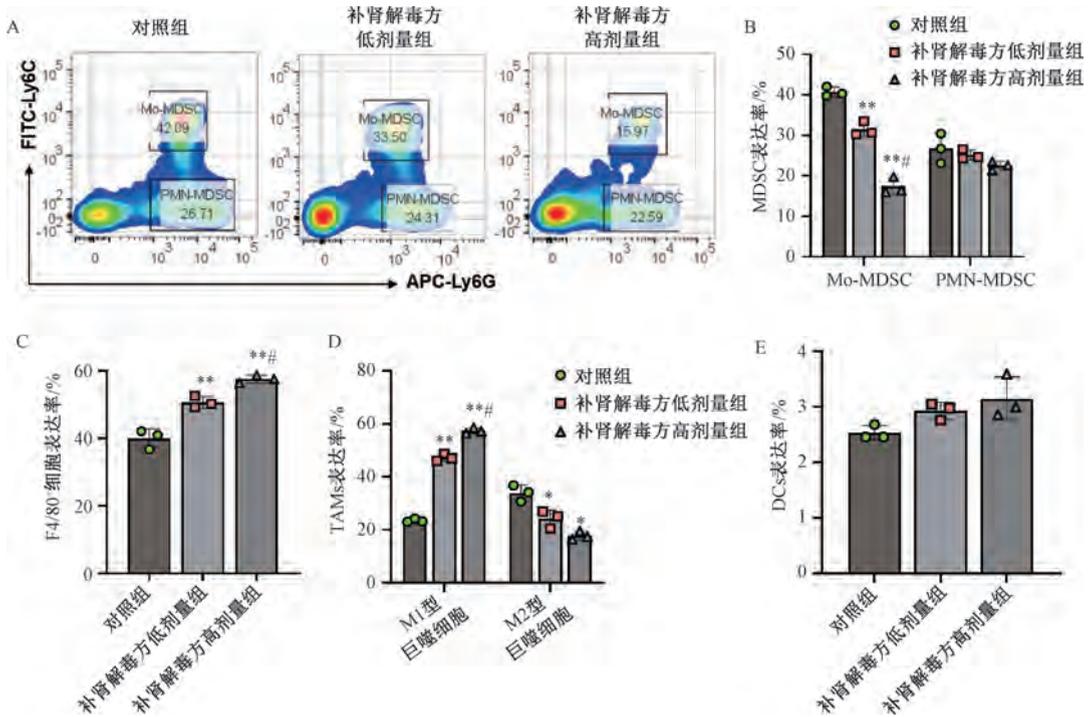
图 2 补肾解毒方对大肠癌肺转移小鼠肺组织 Ki67、CA9、caspase-3 蛋白表达的影响 ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组比较, 补肾解毒方各剂量组小鼠肺组织中 Mo-MDSCs 浸润均降低 ($P < 0.01$), 且高剂量组降低更显著 ($P < 0.05$),

但对 PMN-MDSCs 比例无显著调控作用 ($P > 0.05$)。由图 3C~3E 可知, 与对照组比较, 补肾解毒方组肺组织中 F4/

80⁺及M1型巨噬细胞比例均升高 ($P < 0.01$), M2型巨噬细胞比例降低 ($P < 0.05$), 对CD11b⁺CD11c⁺ DC细胞无显著调控作用 ($P > 0.05$)。以上结果表明, 补肾解毒方可能通

过抑制肺内免疫抑制性微环境的形成, 抑制大肠癌肺转移的发生。



注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与补肾解毒方低剂量组比较, # $P < 0.05$ 。

图3 补肾解毒方对大肠癌肺转移小鼠肺组织MDSCs、巨噬细胞分群及树突状细胞的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

3.4 补肾解毒方对大肠癌肺转移小鼠肺组织Mo-MDSCs表达及定位影响 由图4可知, 补肾解毒方能抑制CD11b⁺

Ly6C⁺Arg-1⁺单核型MDSCs在小鼠肺组织的浸润, 并且多在肺转移灶的外周聚集。

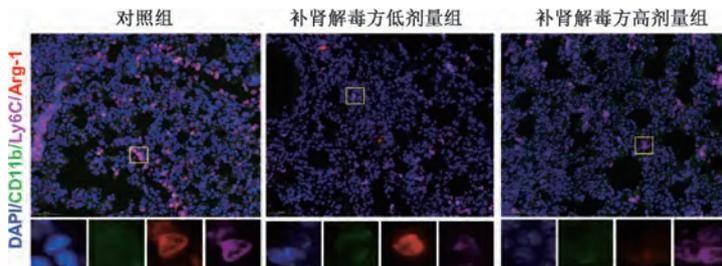


图4 各组小鼠肺组织中CD11b⁺Ly6C⁺Arg-1⁺MDSCs定位及表达(免疫荧光, $\times 400$)

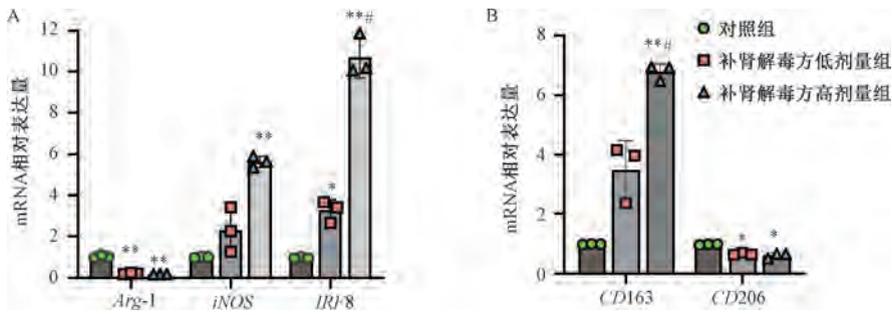
3.5 补肾解毒方对大肠癌肺转移小鼠肺组织中Mo-MDSCs、巨噬细胞关键基因表达的影响 由图5A可知, 与对照组比较, 补肾解毒方高剂量组Mo-MDSCs免疫抑制基因Arg-1 mRNA表达降低 ($P < 0.01$), 分化基因iNOS、IRF8 mRNA表达升高 ($P < 0.01$), 补肾解毒方低剂量组Arg-1 mRNA表达降低 ($P < 0.01$), IRF8 mRNA表达升高 ($P < 0.05$)。由图5B可知, 与对照组比较, 补肾解毒方高剂量组促炎性巨噬细胞表型CD163 mRNA表达升高 ($P < 0.01$), 抗炎巨噬细胞表型CD206 mRNA表达降低 ($P < 0.05$), 补肾解毒方低剂量组CD206 mRNA表达降低 ($P < 0.05$)。以上结果表明, 补肾解毒方可调控Mo-MDSCs和巨噬细胞表型, 重塑大肠癌肺转移微环境。

3.6 补肾解毒方促进Mo-MDSCs向成熟单核细胞分化的体

外验证 由图6A~6B可知, 与对照组比较, 补肾解毒方组均能降低Mo-MDSCs免疫抑制分子Arg-1表达 ($P < 0.01$)。由图6C~6E可知, 补肾解毒方组F4/80⁺CD163⁺表型均升高 ($P < 0.01$), 免疫抑制分子CSF1R表达降低 ($P < 0.01$)。以上结果表明, 补肾解毒方在体外可能调控Mo-MDSCs向M1巨噬细胞分化, 从而抑制Mo-MDSCs免疫抑制活性。

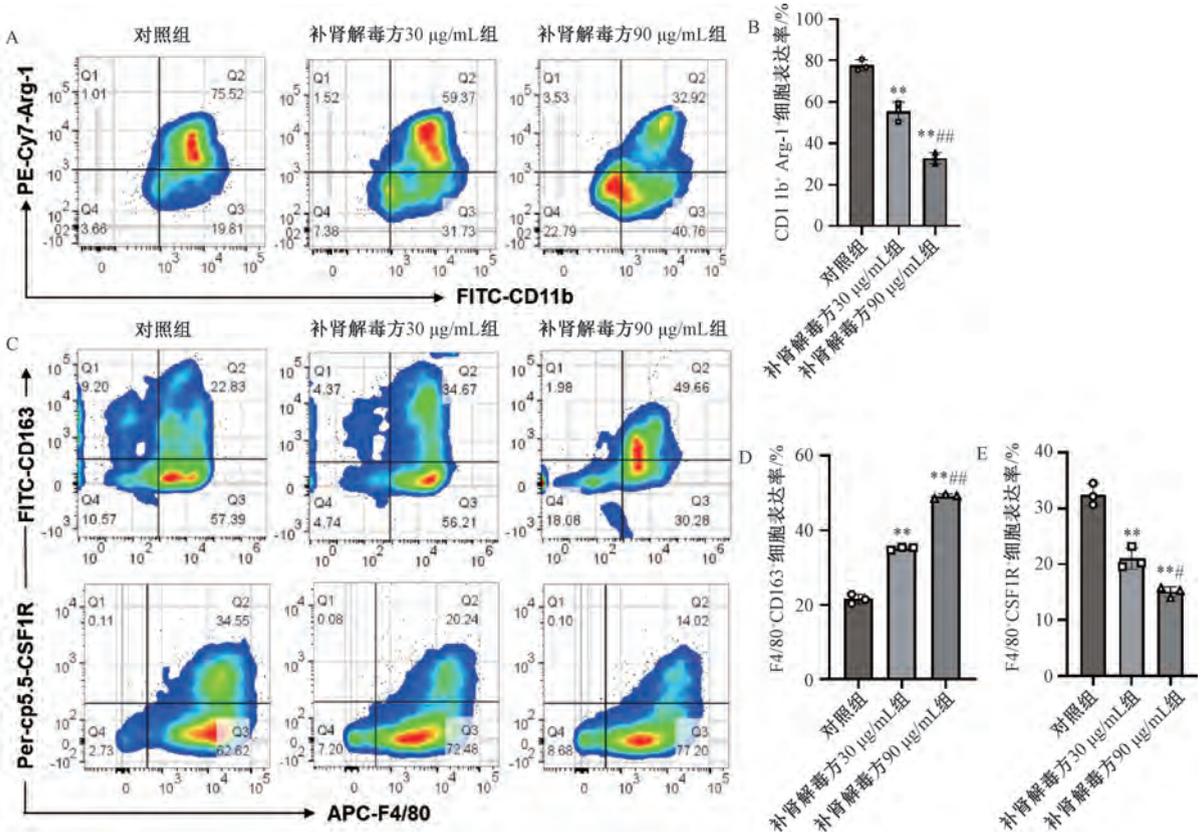
4 讨论

大肠癌转移涉及多种机制, 包括免疫逃逸、上皮间质转化、血管新生和细胞外基质降解等, 而转移前微环境(pre-metastatic niches, PMNs)的形成是肿瘤发生免疫逃逸的关键^[6], 肿瘤细胞在转移之前会在靶器官形成转移前微环境, 从而有利于播散肿瘤细胞的定植、增殖^[7-8]。有研究显示, 大量抑制性免疫细胞浸润是构筑转移前微环境的关键



注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与补肾解毒方低剂量组比较，# $P < 0.05$ 。

图5 补肾解毒方对大肠癌肺转移小鼠肺组织 *Arg-1*、*iNOS*、*IRF8*、*CD163*、*CD206* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



注：与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与补肾解毒方 30 $\mu\text{g/mL}$ 组比较，# $P < 0.05$ ，### $P < 0.01$ 。

图6 补肾解毒方促进 Mo-MDSCs 向成熟的单核细胞分化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

键^[9]。其中 MDSCs 是骨髓调节性细胞的一个特殊亚群，通过多种机制抑制 T 细胞的抗肿瘤活性^[10-11]。MDSCs 能够先于肿瘤细胞到达转移靶器官，介导炎症、免疫抑制及血管高渗等转移标志性特征的形成，进而构筑转移前微环境^[12]。其中，单核型髓源抑制细胞 (Mo-MDSCs) 与单核细胞相似，被 CCL2、CCL5 募集至靶器官，发挥主要免疫抑制活性，具有高可塑性和分化潜力^[13]。针对免疫微环境中 MDSCs 的治疗，有望成为防治大肠癌转移的新策略。

中医药已经在大肠癌综合治疗中显露出独特优势。课题组在济川煎基础上，加减化裁出补肾填精、解毒散结的补肾解毒方。方中熟地黄滋补肾阴，填精益髓，为补肾阴之要药，现代药理学研究表明其能调节大鼠外周血中 CD4⁺、CD8⁺ 细胞调节免疫功能^[14]，与肉苁蓉、女贞子共

用，以发挥缓补肝肾、补肾填精之功；人参片温补元气、补脾益肺，研究显示人参皂苷能显著减低结肠癌荷瘤小鼠脾脏中 MDSCs 浸润，提高人参抗肿瘤能力^[15]。山慈菇、八月札解毒散结，共奏散毒攻瘤之功，两者为临床消肿散结抗肿瘤常用中药。课题组前期临床研究结果显示，补肾解毒方能够抑制大肠癌术后辅助化疗患者血清 MMP9、VEGF 表达^[16]，降低转移风险，并抑制机体 MDSCs 水平，减轻晚期结肠癌患者癌因性疲乏程度^[17]。

本研究建立大肠癌高转移小鼠模型，明确补肾解毒方可降低大肠癌肺转移率，抑制肿瘤侵袭转移相关指标 Ki67、CA9 表达，并促进凋亡蛋白 caspase-3 表达。有研究显示，在一定条件下，Mo-MDSCs 可以向具有抑制 T 细胞效应的 MHC II⁺M1 型巨噬细胞分化^[18]。本研究发现，Mo-MDSCs

与大肠癌肺转移微环境构建密切相关，这与临床研究中发现肠癌患者外周血及肿瘤组织中 MDSCs 数量多于正常人的结果一致^[19]。通过免疫荧光定位实验发现，补肾解毒方干预后 Ly6C⁺ Arg-1⁺ 的单核细胞表达降低，这类细胞多聚集在转移灶外周。IRF8 能调控骨髓细胞向单核-巨噬细胞分化，是一个诱导并维持髓系细胞终末成熟分化状态的重要分子^[20-21]。本研究发现，补肾解毒方可抑制 Mo-MDSCs 免疫抑制活性，并促进分化因子 IRF8 表达，同时促进炎性巨噬细胞标志分子 CD163 表达升高，提示补肾解毒方抑制 Mo-MDSCs 免疫抑制活性可能与其分化有关。巨噬细胞依靠集落刺激因子-1 (colony stimulating factor-1, CSF-1) 进行分化和存活。有研究显示，抑制 CSF-1R 能抑制巨噬细胞向 M2 型极化^[22]，CD163 是炎性巨噬细胞的主要标志物，CD163 高表达巨噬细胞能促进 T 细胞的免疫活性^[23]。本研究发现，补肾解毒方能降低其免疫抑制活性，并证实其促进 Mo-MDSCs 向抗肿瘤原性的 F4/80⁺ CD163⁺ 细胞群分化，并降低 CSF1R 表达，说明补肾解毒方在体外调控 Mo-MDSCs 向 M1 巨噬细胞分化，从而抑制 Mo-MDSCs 免疫抑制活性。

综上所述，本研究通过建立大肠癌肺转移小鼠模型发现补肾解毒方能特异性调控髓系细胞成熟，使 Mo-MDSCs 偏向肺转移微环境中促炎性巨噬细胞群分化，发挥抗大肠癌转移，从而为中医药靶向 MDSCs 的治疗提供新策略。

利益冲突：本文不存在任何利益冲突。

参考文献：

[1] Siegel R L, Miller K D, Wagle N S, et al. Cancer statistics, 2023[J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73(1): 17-48.

[2] Huang Y W, Zhao M G, Yin J C, et al. Pulmonary metastasis in newly diagnosed colon-rectal cancer: a population-based nomogram study [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2019, 34(5): 867-878.

[3] De Cicco P, Ercolano G, Ianaro A. The new era of cancer immunotherapy: Targeting myeloid-derived suppressor cells to overcome immune evasion [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1680.

[4] Jia R, Liu N N, Cai G X, et al. Effect of PRM1201 combined with adjuvant chemotherapy on preventing recurrence and metastasis of stage III colon cancer: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 618793.

[5] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9): 1069-1072.

[6] Klein C. Cancer progression and the invisible phase of metastatic colonization[J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20(11): 681-694.

[7] Peinado H, Zhang H, Matei I, et al. Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases[J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(5): 302-317.

[8] Puccini A, Lenz H. Colorectal cancer in 2017: Practice-

changing updates in the adjuvant and metastatic setting[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(2): 77-78.

[9] Tang M S, Wang H M, Cao Y T, et al. Nomogram for predicting occurrence and prognosis of liver metastasis in colorectal cancer: a population-based study [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2021, 36(2): 271-282.

[10] Yang T Y, Li J W, Li R M, et al. Correlation between MDSC and immune tolerance in transplantation: Cytokines, pathways and cell-cell interaction [J]. *Curr Gene Ther*, 2019, 19(2): 81-92.

[11] Grover A, Sanseviero E, Timosenko E, et al. Myeloid-derived suppressor cells: A propitious road to clinic [J]. *Cancer Discov*, 2021, 11(11): 2693-2706.

[12] Sieminska I, Baran J. Myeloid-derived suppressor cells in colorectal cancer [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1526.

[13] Tesi R J. MDSC; the most important cell you have never heard of [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2019, 40(1): 4-7.

[14] 刘阳阳, 张学兰, 孔庆悦, 等. 生地黄与熟地黄补血与免疫调节作用研究 [J]. *中药材*, 2022, 45(8): 1853-1856.

[15] Wei H M, Guo C X, Zhu R L, et al. Shuangshen granules attenuate lung metastasis by modulating bone marrow differentiation through mTOR signalling inhibition [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 281: 113305.

[16] 贾茹, 刘宁宁, 季青, 等. 补肾解毒散结方对大肠癌术后肿瘤转移及血管新生与金属蛋白酶表达的影响 [J]. *上海中医药大学学报*, 2019, 33(1): 15-19.

[17] 刘宁宁, 杨越, 贾茹, 等. 补肾解毒方联合姑息化疗对晚期结直肠癌患者癌因性疲乏的影响 [J]. *上海中医药杂志*, 2021, 55(7): 59-63.

[18] Movahedi K, Laoui D, Gysemans C, et al. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C (high) monocytes [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(14): 5728-5739.

[19] Grothey A, Sobrero A, Shields A, et al. Duration of adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer [J]. *N Engl J Med*, 2018, 379(4): 396-397.

[20] Muhitch J, Hoffend N, Azabdaftari G, et al. Tumor-associated macrophage expression of interferon regulatory factor-8 (IRF8) is a predictor of progression and patient survival in renal cell carcinoma [J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(1): 155.

[21] Nixon B G, Kuo F S, Ji L L, et al. Tumor-associated macrophages expressing the transcription factor IRF8 promote T cell exhaustion in cancer [J]. *Immunity*, 2022, 55(11): 2044-2058.

[22] Pyonteck S M, Akkari L, Schuhmacher A J, et al. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression [J]. *Nat Med*, 2013, 19(10): 1264-1272.

[23] Van Elsas M J, Labrie C, Etzerodt A, et al. Invasive margin tissue-resident macrophages of high CD163 expression impede responses to T cell-based immunotherapy [J]. *J Immunother Cancer*, 2023, 11(3): e006433.