

## 益气解毒颗粒协同顺铂对鼻咽癌移植瘤干预及调节 Foxp3/ROR- $\gamma$ T 平衡的作用

胡梅<sup>1,2</sup>, 周芳亮<sup>1,2</sup>, 宋岚<sup>1,3</sup>, 李玲<sup>1</sup>, 何迎春<sup>1,3\*</sup>

1. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410028

2. 湖南中医药大学 中医药防治眼耳鼻喉疾病湖南省重点实验室, 湖南长沙 410028

3. 湖南中医药大学 湖南省中医药防治眼耳鼻喉疾病与视功能保护工程技术研究中心, 湖南长沙 410028

**摘要:** **目的** 探讨益气解毒颗粒对鼻咽癌移植瘤微环境中调节性 T 细胞 (Treg) 主导的免疫耐受的影响, 及其与顺铂联合应用的体内抗肿瘤效应。 **方法** 采用肿瘤细胞 CNE<sub>2</sub> 制备鼻咽癌移植瘤裸鼠模型, 观察益气解毒颗粒单用或与顺铂联合使用在体内的抑瘤效应, 检测转录因子叉头翼状螺旋转录因子 (Foxp3) 和维甲酸依赖性核受体  $\gamma$  (ROR- $\gamma$ T) 蛋白表达水平和荷瘤裸鼠血清中 IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ 、IL-17 等的水平。 **结果** 益气解毒颗粒组和联合治疗组的荷瘤裸鼠血清中 TGF- $\beta$  和 IL-17 水平明显低于模型组, IFN- $\gamma$  水平明显高于模型组和顺铂组, 凋亡率明显高于模型组, Foxp3 蛋白表达明显升高, ROR- $\gamma$ T 蛋白表达明显下降, 其中联合治疗组明显优于各药单用组 ( $P < 0.01$ )。 **结论** 益气解毒颗粒能有效调节小鼠 Treg/Th17 的平衡, 恢复 Treg 的功能, 增强小鼠化疗期间 T 细胞的免疫功能, 产生抑瘤效应, 联合顺铂可减轻化疗毒性。

**关键词:** 益气解毒颗粒; 鼻咽癌; 凋亡; 叉头翼状螺旋转录因子; 维甲酸依赖性核受体  $\gamma$ ; Treg/Th17

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)09-2121-06

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.09.016

## Effect of Qi-Boosting Toxin-Resolving Granules and cisplatin on transplanted tumor of nasopharyngeal carcinoma and balance of Foxp3/ROR- $\gamma$ T

HU Mei<sup>1,2</sup>, ZHOU Fang-liang<sup>1,2</sup>, SONG Lan<sup>1,3</sup>, LI Ling<sup>1</sup>, HE Ying-chun<sup>1,3</sup>

1. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410028, China

2. Hunan Provincial Key Laboratory for Prevention and Treatment of Ophthalmology and Otolaryngology Diseases with Chinese Medicine, Changsha 410028, China

3. Hunan Provincial Engineering and Technological Research Center for Prevention and Treatment of Ophthalmology and Otolaryngology Diseases with Chinese Medicine and Protecting Visual Function, Changsha 410028, China

**Abstract: Objective** To investigate the immune tolerance of Qi-Boosting Toxin-Resolving Granules (QBTRF) to Treg in the micro-environment of nasopharyngeal carcinoma (NPC) transplanted tumor, and reveal the possible anti-tumor mechanism of traditional Chinese medicine. **Methods** Using tumor cells CNE<sub>2</sub> to build grafted tumor models, the anti-tumor effect of the QBTRF and cisplatin was observed, and the protein expression levels of Foxp3, ROR- $\gamma$ T and the content of IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  and IL-17 in serum were detected. **Results** It was found that the content of TGF- $\beta$  and IL-17 in serum of the tumor granule group and the combination therapy group were significantly lower than the model group, the IFN- $\gamma$  content was obviously higher than that of the model group and cisplatin group, the apoptotic rate was significantly higher than that of the model group, the protein expression of Foxp3 was significantly increased, and the expression of ROR- $\gamma$ T was obviously decreased, in which the combination group was obviously better than that of single-use groups ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** QBTRF can effectively regulate the balance of Treg/Th17 in mice, restore the function of Treg, enhance the immune function of T cells during chemotherapy in mice, and exert anticancer effect. Combined with cisplatin, it can reduce the toxicity of chemotherapy.

**Key words:** Qi-Boosting Toxin-Resolving Granules; nasopharyngeal carcinoma; apoptosis; Foxp3; ROR- $\gamma$ T; Treg/Th17

收稿日期: 2018-11-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573721); 国家自然科学基金资助项目 (81874408); 湖南省自然科学基金资助项目 (2016JJ61117); 湖南省自然科学基金资助项目 (2017JJ3246)

作者简介: 胡梅 (1976—), 副教授, 主要从事鼻咽癌中医药防治研究。Tel: 15802548753 E-mail: 674026652@qq.com

\*通信作者 何迎春 (1972—), 教授, 博士生导师, 主要从事鼻咽癌中医药防治研究。Tel: 13973139164 E-mail: 1305851329@qq.com

据国际癌症中心数据统计,鼻咽癌是我国南方发病率最高的头颈恶性肿瘤,其病例数约占世界鼻咽癌病例总数的80%以上<sup>[1]</sup>。该病恶性程度高,大部分患者在确诊时已扩散到淋巴结甚至发生远处转移。由于鼻咽位置特殊,手术治疗非常困难,现主要采用放射治疗,但治疗后容易复发和远处转移<sup>[2-3]</sup>。治疗后复发及远处转移仍然是鼻咽癌治疗中有待解决的瓶颈问题,究其原因,除患者处于正气耗竭状态,还涉及肿瘤微环境中T调节细胞(Tregs)主导的免疫耐受现象<sup>[4-5]</sup>。中药复方益气解毒颗粒已作为湖南中医药大学第一附属医院医院制剂应用于临床多年,在鼻咽癌癌前病变治疗、放化疗增效减毒中都显示了良好疗效。前期研究证实其可以提高树突状细胞(DCs)抗原摄取能力,促进幼稚CD4<sup>+</sup>T向Th1漂移,表现出有效的抗肿瘤免疫反应<sup>[6-7]</sup>。为进一步明确Tregs在主导肿瘤免疫监视网络中免疫耐受机制,拟采用肿瘤细胞CNE<sub>2</sub>制备鼻咽癌移植瘤模型,观察益气解毒颗粒或其与化疗药物顺铂联合使用体内的抑瘤效应,测定转录因子叉头翼状螺旋转录因子(Foxp3)、维甲酸依赖性核受体 $\gamma$ (ROR- $\gamma$ t)mRNA表达水平和相关因子 $\gamma$ 干扰素(IFN- $\gamma$ )、转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )、白细胞介素-17(IL-17)等的水平,以期探讨其对鼻咽癌肿瘤微环境中Treg主导的免疫耐受的调节作用,为鼻咽癌中医药免疫疗法提供实验依据及参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

台式高速冷冻离心机(美国Thermo公司);实时定量PCR仪(美国Bio-RadFX Connect公司);微量移液器(德国Eppendorf公司);石蜡切片机(美国A0820公司);电泳仪、垂直电泳槽、电转槽(美国Bio-Rad公司);WD-9405B水平摇床(北京六一仪器厂);Synergy2多功能酶标仪(美国Bio-Tek公司);ChemiDoc XRS+化学发光成像分析系统(美国Bio-Rad公司)。

### 1.2 药品与试剂

益气解毒颗粒购自湖南中医药大学第一附属医院药房(为院内制剂,湘药制字Z20070962,批号20160828);注射用顺铂购于山东齐鲁制药有限公司(批号H20023460);小鼠IFN- $\gamma$  ELISA试剂盒(bsk00005)、TGF- $\beta$  ELISA试剂盒(bsk0429)、IL-17 ELISA试剂盒(bsk00054),均购于BIOSS公司;BCA试剂盒(P0012),碧云天生物技术公司;

Foxp3抗体(22228-1-AP)、ROR- $\gamma$ t抗体(10616-1-AP)、IL-17抗体(13082-1-AP)、 $\beta$ -actin抗体(14395-1-AP)、HRP标记的羊抗鼠二抗(SA00001-1)、HRP标记的羊抗兔二抗(SA00001-2),均购于Proteintech公司。

### 1.3 实验动物

健康BALB/c裸鼠40只,体质量18~22g,雌雄各半,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,动物质量合格证号SYXK(湘)2013-0005;由湖南中医药大学实验动物中心提供SPF级饲养条件,动物使用许可证号SCXK(湘)2013-0004,期间自由进食进水,保持环境安静。

### 1.4 细胞株

人鼻咽癌CNE<sub>2</sub>细胞由中南大学湘雅医学院中心实验室提供,于湖南中医药大学分子生物学实验室培养传代保存。

## 2 方法

### 2.1 移植瘤模型制备与分组干预

取CNE<sub>2</sub>细胞株,接种于大号培养瓶,10%胎牛血清培养基培养传代,取对数分裂期细胞备用。裸鼠分别于前肢腋下sc接种CNE<sub>2</sub>细胞,制备鼻咽癌裸鼠移植瘤模型<sup>[8]</sup>。待造模裸鼠瘤体长至直径约1cm时按随机数字表法随机分为4组,每组8只,即模型组、益气解毒颗粒组、顺铂组及联合治疗组(益气解毒颗粒+顺铂),模型组裸鼠ig及ip生理盐水;益气解毒颗粒组裸鼠每天ig益气解毒颗粒1.22g/kg(2倍临床等效剂量),共给药16d;顺铂组裸鼠每天ip顺铂注射液2mg/kg,共给药16d;联合治疗组裸鼠ig给予益气解毒颗粒1.22g/kg,并ip给予顺铂注射液2mg/kg,2种药物交替给药(隔日1次),每种药物给药8d,共给药16d。另外8只裸鼠不接种瘤细胞,仅正常饲养,作为对照组。

### 2.2 指标检测

**2.2.1 各组荷瘤裸鼠的一般情况** 自第1天开始每4天用游标卡尺测量每个肿瘤的长度和宽度,计算瘤体体积及肿瘤抑制率<sup>[9]</sup>。在实验第21天(造模第5天给药,给药16d后,禁食8h,次日处理裸鼠),常规记录荷瘤裸鼠一般情况和体质量,分离荷瘤裸鼠外周血清,剥离瘤体并称质量,收集各实验荷瘤裸鼠瘤体组织,每份组织分别置于液氮冻存及4%多聚甲醛中固定。

$$\text{瘤体体积} = \text{长度} \times \text{宽度}^2 / 2$$

$$\text{肿瘤抑制率} = (\text{模型组肿瘤体积} - \text{给药组肿瘤体积}) / \text{模型组肿瘤体积}$$

**2.2.2 ELISA 法检测荷瘤裸鼠血清中 IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$  和 IL-17 水平** 实验结束时处死动物，快速从眼球收集血液，2 500 r/min 离心 10 min，分离上层血清。根据 ELISA 试剂盒说明书进行操作，检测血清中 IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$  和 IL-17 水平。

**2.2.3 TUNEL 法检测瘤体组织细胞凋亡情况** 处理 4%多聚甲醛中固定的瘤体组织，制作组织蜡块，常规切片、脱蜡，使用 TUNEL 试剂盒，按操作说明书进行瘤体组织细胞凋亡情况检测，染色后 Motic B5 显微摄像系统进行摄像。细胞核棕黄色颗粒者为阳性凋亡细胞，随机统计各组 5~7 个高倍视野 ( $\times 400$  倍) 中的凋亡细胞总数，计算每高倍视野下的平均凋亡细胞数。用图像分析软件 IPP6.0 (Image Pro Plus 6.0) 计算累积吸光度值<sup>[10]</sup>。

**2.2.4 Western blotting 法检测各组裸鼠瘤体组织中 Foxp3 和 ROR- $\gamma$ t 的蛋白表达** 提取各组裸鼠瘤体组织的总蛋白质，应用 BCA 法测定蛋白含量，取 50  $\mu$ g 总蛋白上样。进行 SDS-PAGE 电泳，转膜后，封闭处理 1 h，加入一抗孵育过夜，二抗室温孵育 1 h，DAB 显色，扫描仪扫描膜，用图像分析软件 IPP6.0 对目的条带进行累积吸光度值分析，计算目的蛋白与内参  $\beta$ -actin 的相对比值。

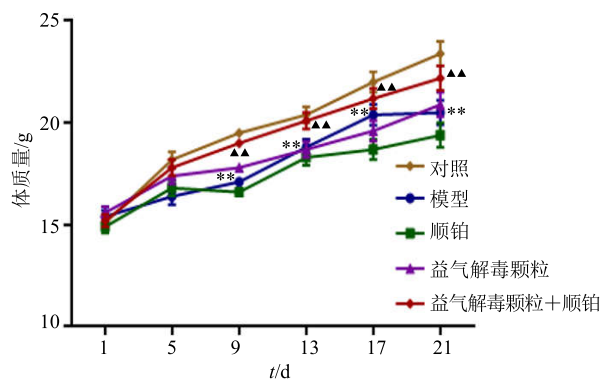
**2.3 统计分析**

采用 SPSS 22.0 统计软件处理，计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示，数据符合正态分布，两组比较采用 *t* 检验，多组比较采用单因素方差分析，并进行组间的多重比较 (方差齐时采用 LSD 法，方差不齐时采用 Tamhane's T2)。计数资料采用  $\chi^2$  检验，等级资料采用秩和检验。

**3 结果**

**3.1 各组荷瘤裸鼠一般情况**

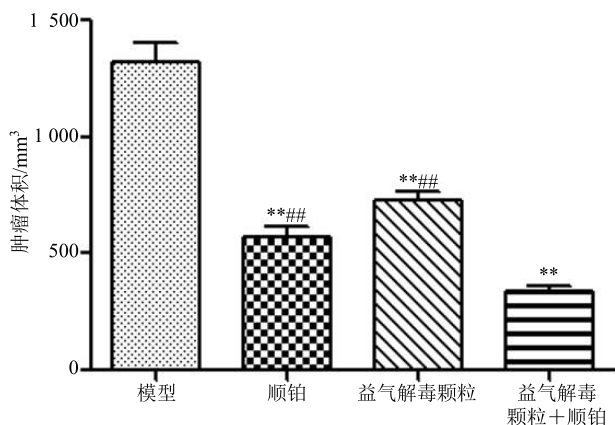
模型组荷瘤裸鼠蜷缩，怕冷，呼吸加快、短促，食差，消瘦，体质量明显下降，瘤体明显增大，各药物干预组均能不同程度改善裸鼠的一般情况，比较各组荷瘤裸鼠体质量变化、肿瘤体积和肿瘤抑制率，结果见图 1 和 2。在体质量增长方面，模型荷瘤裸鼠增长幅度明显低于正常裸鼠，差异显著 ( $P < 0.01$ )，联合治疗组裸鼠体质量增加幅度较模型组增长幅度大，差异显著 ( $P < 0.01$ )，同时也优于顺铂组 ( $P < 0.05$ )；各药物干预组均抑制荷瘤裸鼠瘤体增大，与模型组比较，差异显著 ( $P < 0.01$ )，其中联合治疗组明显优于单用药物组，差异显著 ( $P < 0.01$ )。提示益气解毒颗粒对裸鼠损害小，有助于协同顺铂注射液用药后改善裸鼠自然生长情况。



与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较:  $\blacktriangle P < 0.01$   
 \*\* $P < 0.01$  vs control group;  $\blacktriangle P < 0.01$  vs model group

图 1 各组荷瘤裸鼠体质量变化比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

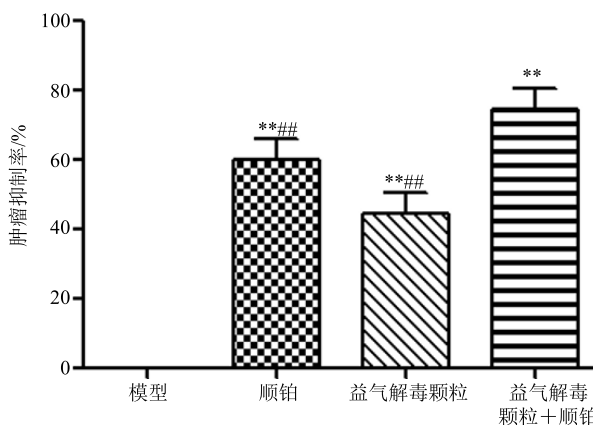
Fig. 1 Comparison on body weight in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )



与模型组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与联合用药组比较:  $\#\# P < 0.01$   
 \*\* $P < 0.01$  vs model group;  $\#\# P < 0.01$  vs DPP+YQJD group

图 2 各组荷瘤裸鼠肿瘤体积和肿瘤抑制率比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 2 Comparison on tumor volume and tumor inhibition rate in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )



### 3.2 各组荷瘤裸鼠血清中 IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ 和 IL-17 水平比较

模型荷瘤裸鼠血清中 IFN- $\gamma$  显著减少, TGF- $\beta$  和 IL-17 显著增加, 与对照组裸鼠比较, 差异显著 ( $P < 0.01$ ); 药物干预组的荷瘤裸鼠血清中 TGF- $\beta$  和 IL-17 水平明显低于模型组 ( $P < 0.01$ ), 其中联合治疗组明显优于各药单用组 ( $P < 0.05$ ); 益气解毒颗粒组和联合治疗组荷瘤裸鼠血清中 IFN- $\gamma$  水平明显高于模型组和顺铂组 ( $P < 0.01$ ), 尤其顺铂组 IFN- $\gamma$  水平显著低于其他 3 组 ( $P < 0.01$ ), 提示益气解毒颗粒能有效增强小鼠化疗期间 T 细胞的免疫功能, 降低化疗毒性。结果见图 3。

### 3.3 各组裸鼠瘤体组织中细胞凋亡情况

药物干预组的荷瘤裸鼠瘤体组织 TUNEL 染色

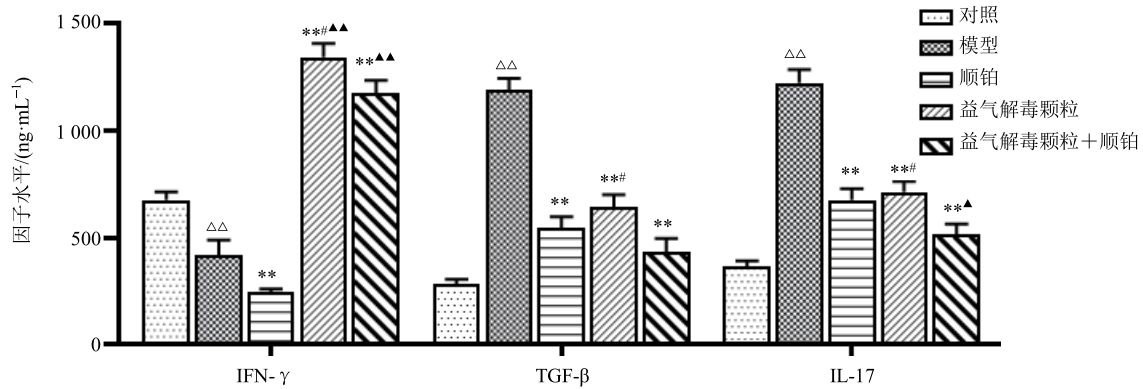
显示, 凋亡细胞数量较模型组增多, 凋亡率明显高于模型组 ( $P < 0.01$ ), 联合治疗组优于各药单用组, 但组间差异不显著。结果见图 4。

### 3.4 各组裸鼠瘤体组织中 Foxp3 和 ROR- $\gamma$ t 的蛋白表达情况

药物干预组的荷瘤裸鼠瘤体组织中 Foxp3 蛋白表达水平明显升高, ROR- $\gamma$ t 蛋白表达水平明显下降, 与模型组比较, 差异显著 ( $P < 0.01$ ); 其中联合治疗组明显优于各药单用组 ( $P < 0.01$ )。提示益气解毒颗粒能有效调节小鼠 Treg/Th17 的平衡。结果见图 5。

## 4 讨论

Treg 是一群具有免疫调节功能的细胞, 具有明显的免疫抑制性, 该细胞在维持机体免疫、预防免疫性疾病之中起到重要作用。Foxp3 分子是赋予 Treg



与对照组比较:  $\Delta\Delta P < 0.01$ ; 与模型组比较:  $**P < 0.01$ ; 与联合治疗组比较:  $^{\#}P < 0.05$   $^{\#\#}P < 0.01$ ; 与顺铂组比较:  $^{\wedge}P < 0.05$   $^{\wedge\wedge}P < 0.01$ , 下同  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs control group;  $**P < 0.01$  vs model group;  $^{\#}P < 0.05$   $^{\#\#}P < 0.01$  vs DPP+YQJD group;  $^{\wedge}P < 0.05$   $^{\wedge\wedge}P < 0.01$  vs DPP group, same as below

图 3 各组荷瘤裸鼠血清中 IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$  和 IL-17 水平的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )  
Fig. 3 Comparison on levels of IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , and IL-17 in serum ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

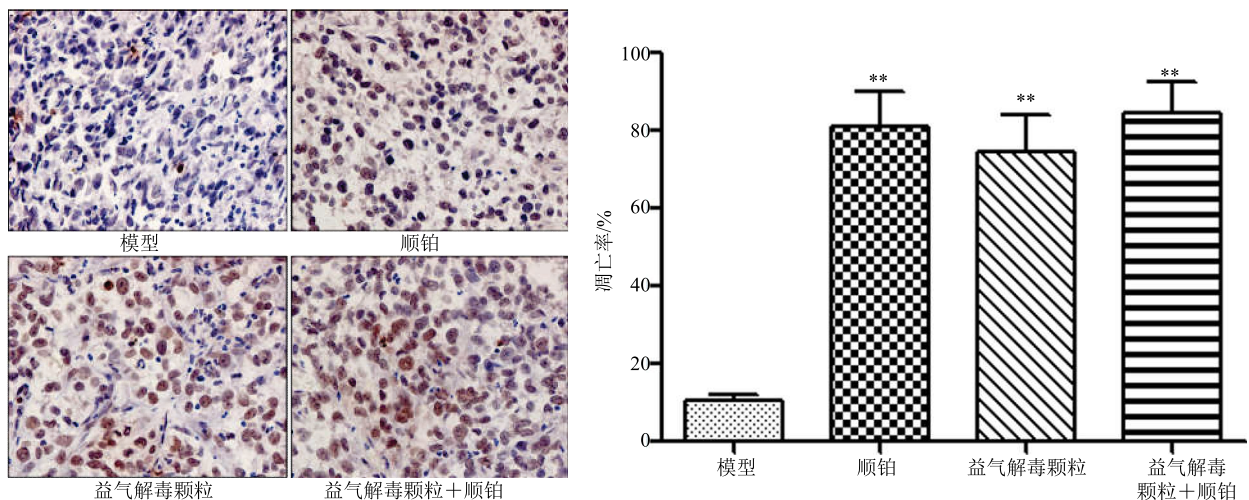


图 4 各组荷瘤裸鼠 TUNEL 染色结果和凋亡率的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 8, \times 400$ )

Fig. 4 TUNEL staining results and apoptotic rate of nude mice bearing tumors in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 8, \times 400$ )

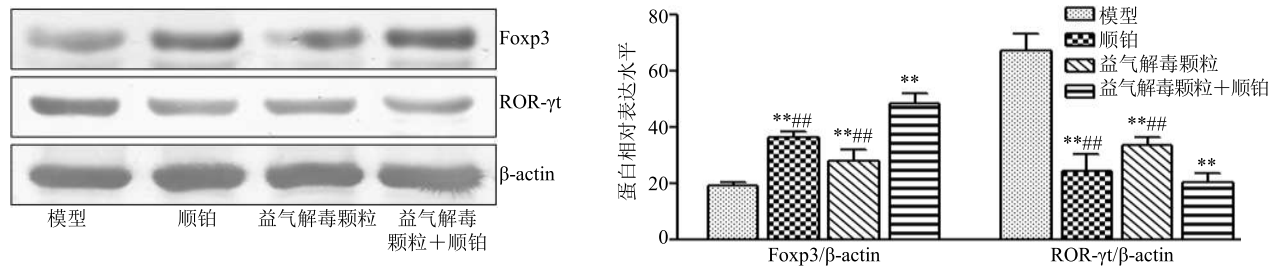


图 5 各组荷瘤裸鼠瘤体组织中 Foxp3 和 ROR-γt 蛋白表达水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 5 Protein expression of Foxp3 and ROR-γt of nude mice bearing tumors in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

细胞免疫抑制功能的主要分子，也是其最具有特异性的可靠的标志分子。近年来，关于 Treg 肿瘤免疫以及肿瘤免疫治疗逐渐成为研究热点。Th17 细胞是新近发现的一类 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群，其主要效应分子 IL-17，具有强烈的促炎症作用，在多种自身免疫性疾病中发挥着重要作用。Treg/Th17 平衡在免疫细胞启动对肿瘤细胞的杀伤作用中有着重要的意义，当 Treg/Th17 平衡向 Th17 细胞漂移时，IL-17 分泌增多，从而促进肿瘤逃避免疫系统监视和肿瘤转移的发生。IL-17 的水平增高也可间接促进细胞分泌 TGF-β、IL-6、细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 等多种分子，最终促进肿瘤细胞增殖和克隆集落形成。RORγt 作为 Th17 细胞的特异转录因子，不仅在促进 Th17 细胞分化方面起关键作用，而且可以特异地调节 Th17 细胞的功能<sup>[11-14]</sup>。由此可见，Foxp3 和 RORγt 分别作为 Treg 和 Th17 细胞的特异性转录因子，两者在组织内含量的高低可以说明 Th17 和 Treg 细胞在组织内数量的多少。而表达的失衡也是反映 Treg/Th17 失衡的一个重要评价指标。

鼻咽癌是指发生于鼻咽腔顶部和侧壁的恶性肿瘤，其发病率为耳鼻咽喉恶性肿瘤之首。其中医理论归结鼻咽癌的病理机制为正虚邪实，因先天禀赋不足，后天环境因素容易沾染邪毒而导致鼻咽癌发生，治疗当以扶正祛邪为主。益气解毒颗粒以生黄芪益气解毒，黄连、白花蛇舌草清热解毒为君，补泄并用、气阴双补、扶正祛邪，在前期研究中，该方治疗鼻咽癌得到了较好的临床效果，同时在实验研究上也有着较好的药理优势<sup>[7]</sup>。本研究为进一步明确 Treg 在主导肿瘤免疫监视网络中免疫耐受机制，并结合益气解毒颗粒抑制鼻咽癌的研究基础，对益气解毒颗粒或与化疗药物顺铂联合使用干预 CNE<sub>2</sub> 鼻咽癌移植瘤模型，结果发现益气解毒颗粒及其联合顺铂使用能抑制 CNE<sub>2</sub> 鼻咽癌移植瘤的体内

生长，上调 Foxp3 mRNA 和蛋白表达水平、下调 ROR-γt mRNA 和蛋白表达水平，逆转 Treg/Th17 失衡。减少 TGF-β 和 IL-17 的分泌，增加 IFN-γ 的分泌，最终调节鼻咽癌肿瘤微环境中 Treg 主导的免疫耐受现象。本研究为益气解毒颗粒在鼻咽癌防治方面提供进一步的理论基础，也为鼻咽癌中医药免疫疗法提供实验依据。

#### 参考文献

- [1] 骆敏, 张玉梅, 李永强. 鼻咽原发性腺癌的研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2017, 25(21): 3534-3537.
- [2] 潘琦津, 龚建忠, 韦燕. 转移性鼻咽癌维持治疗研究现状及进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(21): 3505-3508.
- [3] 李永红, 刘文明. 同步推量调强放疗治疗鼻咽癌的近期疗效、毒副作用和中期预后分析 [J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27(27): 3047-3050.
- [4] 周亚娟. 程序性死亡配体-1 在鼻咽癌中表达的临床意义及调控机制 [D]. 武汉: 武汉大学, 2017.
- [5] 江志超, 唐发清, 田道法, 等. 中晚期鼻咽癌患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 调节细胞和 Th17 细胞的免疫病理意义 [J]. 肿瘤基础与临床, 2014, 27(2): 105-108.
- [6] 江志超, 田道法, 严文辉, 等. 益气解毒方对中晚期鼻咽癌患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞的作用研究 [J]. 湖南中医杂志, 2013, 29(5): 9-11.
- [7] 刘湘, 范婧莹, 何迎春, 等. 益气解毒方干预鼻咽癌细胞裸鼠移植瘤微环境细胞免疫耐受现象的初步研究 [J]. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志, 2013, 21(1): 10-15.
- [8] 冯少博, 吴爱国, 王梦川, 等. Beclin 1 基因过表达对人乳腺癌细胞 BT-549 裸鼠皮下成瘤生长影响研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2017, 24(21): 1495-1500.
- [9] Naito S, von Eschenbach A C, Giavazzi R, et al. Growth and metastasis of tumor cells isolated from a human renal cell carcinoma implanted into different organs of mice [J]. *Nude Cancer Res*, 1986, 46(8): 4109-4115.

- [10] Zhu Y H, Fang J, Wang H D, *et al.* Baicalin suppresses proliferation, migration, and invasion in human glioblastoma cells via Ca<sup>2+</sup>-dependent pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 3247-3261.
- [11] Najafi M, Farhood B, Mortezaee K. Contribution of regulatory T cells to cancer: A review [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6): 7983-7993.
- [12] Ren J, Li B. The functional stability of FOXP3 and ROR $\gamma$ t in Treg and Th17 and their therapeutic applications [J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2017, 107: 155-189.
- [13] Magnuson A M, Kiner E, Ergun A, *et al.* Identification and validation of a tumor-infiltrating Treg transcriptional signature conserved across species and tumor types [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(45): E10672-E10681.
- [14] Ahmad S F, Ansari M A, Ahmed N, *et al.* S3I-201, a selective Stat3 inhibitor, restores neuroimmune function through upregulation of Treg signaling in autistic BTBR T + Itpr3<sup>tf</sup>/J mice [J]. *Cellul Signal*, 2018, 52: 127-136.