

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.11.003

· 基础研究 ·

Klotho 蛋白通过 TGF- β 1/Foxp3/ROR γ t 通路抑制 Treg 和 Th7 细胞介导的宫颈癌细胞的免疫逃逸

李美, 张红艳, 邵海鸥 (河北省沧州中西医结合医院 妇科, 河北 沧州 061000)

[摘要] **目的:** 研究抗衰老蛋白 Klotho 对荷宫颈癌小鼠体内调节性 T 细胞 (Treg 细胞) 和辅助性 T 细胞 17 (Th7) 细胞介导宫颈癌细胞免疫逃逸的影响及其作用机制。 **方法:** 建立宫颈癌 U14 细胞移植瘤小鼠模型, 并设 Control 组 (正常小鼠组)、Model 组 (荷宫颈癌小鼠模型组)、Klotho 处理组 (荷宫颈癌小鼠经 Klotho 蛋白处理组, 200 ng/d)。分别在处理 7、14 d 时称取各组小鼠体内宫颈癌移植瘤质量, 以流式细胞术检测各组小鼠脾淋巴细胞功能、Treg 和 Th7 细胞比例变化, qPCR 检测各组小鼠 Treg 和 Th7 细胞关键转录因子 Foxp3、ROR γ t 的表达情况, ELISA 方法检测各组小鼠脾淋巴细胞培养液中 IL-17、IL-6、IL-10、TGF- β 、IL-23 等因子的含量变化, WB 检测各组小鼠脾淋巴细胞中 Klotho、TGF- β 1、Foxp3、ROR γ t 蛋白表达的变化。 **结果:** 14 d 时, Klotho 组宫颈癌荷瘤小鼠肿瘤抑瘤率显著高于 Model 组 [(52.16 \pm 8.25)% vs (23.33 \pm 6.29)%, $P < 0.05$]。 Model 组与 Control 组相比, 荷瘤小鼠脾淋巴细胞中 Treg、Th7 细胞比例均显著升高 (均 $P < 0.05$), 总 T 淋巴细胞 (CD3 $^{+}$)、辅助/诱导 T 淋巴细胞 (CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$) 比例及免疫指数 (CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ /CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$) 显著下降 (均 $P < 0.05$), Foxp3、ROR γ t 基因 mRNA 表达显著增加 (均 $P < 0.05$), IL-17、IL-6、IL-10、TGF- β 、IL-23 等因子分泌显著增加 (均 $P < 0.05$), Klotho 蛋白水平明显下降 ($P < 0.05$), TGF- β 1、Foxp3、ROR γ t 蛋白表达均明显升高 (均 $P < 0.05$); 而 Klotho 处理组与 Model 组相比, 上述指标均出现了相反的变化 (均 $P < 0.05$), 但与 Control 组无显著差异 (均 $P > 0.05$)。 **结论:** Klotho 蛋白可能通过调控 TGF- β 1/Foxp3/ROR γ t 信号通路抑制宫颈癌荷瘤小鼠体内 Treg 和 Th7 细胞介导的免疫逃逸, 从而发挥抗肿瘤作用。

[关键词] Klotho 蛋白; 宫颈癌; 调节性 T 细胞; Th7 细胞; 免疫逃逸

[中图分类号] R737.33; R730.2 [文献标识码] A [文章编号] 1007-385X(2019)11-1196-07

Klotho protein inhibits Treg/TH17 cell-mediated immune escape of cervical cancer cells by regulating TGF- β 1/Foxp3/ROR γ t signaling pathway

LI Mei, ZHANG Hongyan, SHAO Haiou (Department of Gynecology, Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital of Cangzhou City, Cangzhou 061000, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of anti-aging Klotho protein on immune escape mediated by regulatory T cells (Treg)/helper T cells 17 (TH17) in mice bearing cervical cancer and its mechanism. **Methods:** The model of cervical cancer-bearing mice were established, and the control group (normal mice), model group (cervical cancer-bearing mice model), and Klotho treatment group (cervical cancer-bearing mice treated with Klotho protein, 200 ng/d) were set up. The weight of cervical cancer tumors in mice of each group was weighed at 7 and 14 days after treatment respectively, PBMCs were separated at the same time. Flow cytometry was used to detect the changes of T lymphocyte function and the proportion of Treg and TH17 cells in mice. qPCR was used to detect the expressions of Foxp3 and ROR γ t, the key transcription factors of Treg/TH17 cells, in PBMCs of mice in each group. The changes of IL-17, IL-6, IL-10, TGF- β and IL-23 in PBMCs were detected by ELISA. The protein expressions of Klotho, TGF- β , Foxp3 and ROR γ t in PBMCs of mice were detected by WB assay. **Results:** On the 14th day, the tumor inhibition rate of the cervical cancer-bearing mice in the Klotho group was significantly higher than that in the Model group [(52.16 \pm 8.25)% vs (23.33 \pm 6.29)% the model group to be supplemented, $P < 0.05$]. Compared with the Control group, the ratios of Treg and TH17 cells in the lymphocytes of the tumor-bearing mice significantly increased (all $P < 0.05$), the ratios of total T lymphocytes (CD3 $^{+}$), auxiliary/induced T lymphocytes (CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$) and immune index (CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ /CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$ cells) decreased significantly (all $P < 0.05$); in addition, the mRNA expressions of Foxp3 and ROR γ t genes, cytokines of IL-17, IL-6, IL-10, TGF- β and IL-23, as well as protein expressions of TGF- β 1, Foxp3 and ROR γ t increased significantly (all $P < 0.05$), while the level of Klotho protein significantly decreased in Model group ($P < 0.05$). Compared with the Model group, the above

[基金项目] 河北省医学科学重点课题计划资助项目 (No.20171182)。Project supported by the Key Project of Medical Science Research of Hebei Province (No.20171182)

[作者简介] 李美 (1980-), 女, 硕士, 医师, 主要从事妇科肿瘤及内分泌免疫学研究, E-mail: 673089162@qq.com

[通信作者] 张红艳 (ZHANG Hongyan, corresponding author), 主任医师, 硕士生导师, 主要从事妇科肿瘤学研究, E-mail: 1037639754@qq.com

indicators showed opposite changes in Klotho group ($P < 0.05$), but there was no significant difference with the Control group (all $P > 0.05$). **Conclusion:** Klotho protein may inhibit Treg/TH17 cell-mediated immune evasion in cervical cancer-bearing mice by inhibiting TGF- β 1/Foxp3/ROR γ t signaling pathway and exert anti-tumor effect.

[Key words] Klotho protein; cervical cancer; regulatory T (Treg) cell; Th7 cell; immune evasion

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(11): 1196-11202. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.11.003]

肿瘤细胞免疫逃逸是肿瘤发生发展的重要机制之一,也是当前肿瘤免疫学研究的热点。CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺表型的调节性T细胞(regulatory T cell, Treg细胞)和CD4⁺IL-17⁺表型的辅助性T细胞17(helper T cell 17, Th7细胞)被认为在各种肿瘤的免疫逃逸中扮演重要角色^[1]。宫颈癌是最常见的女性恶性肿瘤之一,其在导致女性死亡的肿瘤中占第二位。宫颈癌患者在接受治疗中常会发生复发和远处转移,主要原因可能是肿瘤细胞发生免疫逃逸^[2]。同时有调查研究^[3]表明,年龄也是宫颈癌的发病原因之一,即衰老也可导致宫颈癌的发生。统计^[4]发现,宫颈癌的发病年龄主要集中在40~60岁,随着年龄的增加,免疫力逐渐下降,宫颈癌等恶性肿瘤的发病率也会增加。新近发现的抗衰老蛋白Klotho广泛参与体内生理活动,在老化、癌症、免疫调节等各方面均发挥重要调节作用,它可能是联系老龄因素和肿瘤免疫调节的一条重要纽带^[5]。贺启华等^[6]最新研究发现,Klotho蛋白在宫颈癌细胞系中低表达,而Klotho能够显著抑制人宫颈癌细胞株增殖、迁移,并且其可以成为诊断和靶向治疗宫颈癌的潜在作用位点。因此,本研究建立宫颈癌荷瘤小鼠模型,以探索抗衰老蛋白Klotho对荷宫颈癌小鼠淋巴细胞中Treg和Th7细胞的影响,并揭示其是否通过调节Treg和Th7细胞介导宫颈癌的免疫逃逸。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

雌性昆明小鼠(KM)80只,4~5周龄,SPF级,购自北京大学实验动物中心,在本实验中心SPF室内饲养。鼠源宫颈癌细胞株U14购自中国科学院上海生科院细胞资源中心。

分泌型Klotho蛋白购自美国Sigma公司,流式细胞术检测T淋巴细胞功能标记抗体(FITC标记的CD3、PE标记的CD4、APC标记的CD8)、Treg标记抗体(PE-RCP标记的CD4、FITC标记的CD25、PE标记的叉状螺旋转录因子3(foxhead/winged helix transcription factor, FOXP3)、Th7细胞标记抗体(FITC标记的CD4、PE标记的IL-17)及所有单克隆鼠抗购自美国BD公司,RPMI 1640细胞培养基、胎牛血清、淋巴细胞分离液均购自美国Gibco公司,TRIzol总RNA提取试剂、逆转录试剂盒、qPCR试剂盒均购自大连TaKaRa公司,鼠源细胞因子IL-17、IL-6、IL-10、TGF- β 、IL-23酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒购自武汉博士德公司,多克隆兔抗小鼠Klotho、

TGF- β 1、Foxp3、维甲酸相关核受体(orphan nuclearreceptor, ROR γ t)一抗均购自美国Abcam公司,单克隆山羊抗兔IgG二抗、化学发光试剂ECL购自北京中杉金桥公司,Calibur流式细胞仪购自BD公司。

1.2 宫颈癌荷瘤小鼠模型的构建及分组处理

宫颈癌U14细胞用RPMI 1640细胞培养基稀释成每200 μ l含 1×10^7 个细胞的悬液,注射至3只小鼠的腹腔,继续饲养1周后,可见小鼠的腹部明显隆起,说明含有宫颈癌肿瘤细胞的腹水生成。将小鼠脱脊处死后,用医用酒精消毒灭菌后超净工作台中剪开小鼠腹部,用无菌注射器吸取腹水,800 \times g离心5 min,去上清后用无菌PBS溶液洗涤细胞2次。后加入适量细胞培养基调整密度为 1×10^8 个/ml。60只KM小鼠随机分成3组:空白组(Control组),不做任何处理;宫颈癌荷瘤模型组(Model组),将200 μ l的上述腹水宫颈癌细胞悬液接种到小鼠右侧腋下于腋中线上约2 cm处皮下,并观察小鼠成瘤情况,当皮下宫颈瘤块直径为5 mm时即为宫颈癌荷瘤模型成功;Klotho蛋白处理组(Klotho组),即宫颈癌荷瘤小鼠造模成功后,每只每天腹腔注射200 μ l的Klotho蛋白溶液(1 ng/ μ l)。

1.3 脾脏组织单个核细胞的分离

各组小鼠在处理7 d和14 d时,随机挑取10只,分离并提取脾脏中淋巴细胞。在超净工作台中麻醉处死各组小鼠,取出移植瘤组织,称质量。抑瘤率=(对照组瘤质量-处理组瘤质量)/对照组瘤质量 \times 100%。分离小鼠的脾脏制成细胞悬液,经200目细胞筛过滤后转移至新的离心管,800 \times g离心5 min,去上清。用PBS溶液洗涤细胞2次后离心去上清。加入适量细胞培养基,调整细胞密度为 1×10^7 个/ml。用淋巴细胞分离液处理使细胞分层,淋巴细胞层为分层液和上清液之间的云雾层,用注射针吸取到新的离心管中。同样用无菌PBS溶液洗涤2次后,离心去上清,即得到脾脏组织单个核细胞。

1.4 流式细胞术检测Klotho蛋白处理对荷瘤小鼠脾淋巴细胞功能的影响

取各组小鼠分离的脾脏组织单个核细胞,调整至 1×10^6 个/ml。分别取100 μ l的细胞悬液于两个流式细胞管中,第1管为阴性对照,第2管中加入FITC标记的CD3抗体、PE标记的CD4抗体、APC标记的CD8抗体各5 μ l,在室温下避光孵育20 min。两组各加入1 ml的PBS溶液洗涤1次,1 500 \times g离心5 min,再加入100 μ l

PBS重悬细胞,经流式细胞仪检测各组小鼠淋巴细胞中CD3⁺(T淋巴细胞)、CD3⁺CD4⁺(辅助/诱导T淋巴细胞)、CD3⁺CD8⁺(抑制/毒性T淋巴细胞)比例,并计算CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺比值以反映小鼠机体免疫力。

1.5 流式细胞术检测Klotho蛋白处理对荷瘤小鼠脾淋巴细胞中Treg和Th7的影响

按照上述同样方法各取100 μl的脾脏组织单个核细胞悬液于两个流式管中,第1管中加入PERCP标记的CD4抗体,第2管中加入PERCP标记的CD4、FITC标记的CD25,室温下避光孵育20 min后,分别加入500 μl的胞内破膜剂作用10 min,离心去上清;再加入PE标记的Foxp3抗体,避光孵育20 min,PBS洗涤1次并重悬细胞;上流式细胞仪检测各组小鼠淋巴细胞中CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺(Treg)细胞比例。

取500 μl的脾淋巴细胞悬液加入1 ml的RPMI 1640细胞培养液于细胞培养板中,加入佛波醇乙酯20 μl,培养3 h后800×g离心5 min收集细胞,加入500 μl的PBS重悬后分成对照管和测试管。先分别

加入FITC标记的CD4室温下避光孵育20 min,PBS洗涤1次后,分别加入200 μl的细胞破膜剂A孵育15 min后,再加入200 μl的细胞破膜剂B和PE标记的IL-17抗体避光孵育30min,后PBS洗涤1次再重悬细胞,上流式细胞仪检测各组小鼠淋巴细胞中CD4⁺IL-17⁺/CD4⁺(Th7)细胞的比例。

1.6 qPCR检测Klotho蛋白处理对荷瘤小鼠脾淋巴细胞中Foxp3、RORγt表达的影响

利用TRIzol法提取各组小鼠脾淋巴细胞的总RNA,分光光度法测定总RNA浓度,用逆转录试剂盒反转录各组提取小鼠淋巴细胞的总RNA 500 ng得到cDNA模板。Foxp3、RORγt基因的qPCR引物由上海生工公司设计和合成(表1)。按照SYBR Premix Ex Taq™ II中说明方法进行的操作,由美国Bio-Rad IQ5 qPCR系统进行检测。GAPDH作为内参基因,进行3次重复实验,以2^{-ΔΔct}法计算各组小鼠淋巴细胞中Foxp3、RORγt mRNA的相对表达情况。

表1 qPCR引物序列

Tab.1 Real-time PCR primer sequence

Primer name	Sequence
Foxp3 Sense:	5'-CACCTATGCCACCCTTATCCG-3'
Foxp3 Anti-sense:	5'-CATGCGAGTAAACCAATGGTAGA-3'
RORγt Sense:	5'-CCGCTGAGAGGGCTTCA-3'
RORγt Anti-Sence:	5'-TGCAGGAGTAGGCCACATTACA-3'
GAPDH Sense:	5'-AGGTCGGTGAACGGATTTG-3'
GAPDH Anti-Sence:	5'-GGGGTCGTTGATGGCAACA-3'

1.7 ELISA检测Klotho蛋白处理对脾淋巴细胞IL-17、IL-6、IL-10、TGF-β、IL-23分泌的影响

取分离的各组小鼠脾淋巴细胞细胞悬液500 μl,无菌PBS洗涤1次,用RPMI 1640调整细胞密度为1×10⁶个/ml。各组取1 ml的细胞液接种到6孔细胞培养板中,置于细胞培养箱中继续培养24 h。收集各组培养上清液,ELISA方法检测其中IL-17、IL-6、IL-10、TGF-β、IL-23的含量。

1.8 WB检测Klotho蛋白处理对脾淋巴细胞中TGF-β1/Foxp3/RORγt信号通路相关蛋白表达的影响

Klotho蛋白处理14 d后,取各组小鼠脾淋巴细胞,PBS洗涤,每组细胞中加入200 μl的RAPI强细胞裂解液,冰上裂解细胞并提取小鼠淋巴细胞中总蛋白。BCA方法测定各组细胞中总蛋白浓度,每组上样30 ng总蛋白进行SDS-PAGE,后将蛋白电转移至PVDF膜上,封闭后分别孵育多克隆兔抗Klotho、TGF-β1、Foxp3、RORγt、GAPDH一抗(1:1 000),4℃下孵育过夜,后TBST洗涤3次,每次5 min;再孵育HRP标记的山羊抗兔IgG二抗(1:5 000),室

温下孵育2 h,TBST洗涤3次,加入1 ml的ECL化学发光试剂对目的蛋白条带进行曝光显影,并利用Qunativity One软件分析各目的蛋白的相对表达量。

1.9 统计学处理

应用SPSS13.0统计软件进行相关数据分析,所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间的比较采用t检验,多组间的比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。以P<0.05或P<0.01表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Klotho处理可抑制小鼠宫颈癌移植瘤的生长

Klotho蛋白处理宫颈癌荷瘤小鼠7、14 d后,摘取移植瘤称质量,分析结果显示,14 d时Model组瘤质量显著高于7 d时[(0.73±0.16) vs (0.31±0.09) g, P<0.05],而Klotho组小鼠瘤质量增加不显著[(0.32±0.11) vs (0.23±0.06) g, P>0.05]。7 d时Klotho组宫颈癌荷瘤小鼠肿瘤抑瘤率与Model组无显著差异(P>0.05);14 d时,Klotho组宫颈癌荷瘤小鼠肿瘤抑瘤率显著高于Model组[(52.16±8.25)% vs (23.33±6.29)%, P<0.05]。

2.2 Klotho 蛋白对宫颈癌荷瘤小鼠脾淋巴细胞水平的影响

流式术检测结果表 2 显示, 与 Control 组相比, Model 组宫颈癌荷瘤小鼠脾淋巴细胞中总 T 淋巴细胞(CD3⁺)、辅助/诱导 T 淋巴细胞(CD3⁺CD4⁺)比例及免疫指数(CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺)显著下降, (均 $P < 0.05$)。而与 Model 组比较, Klotho 蛋白处理组 CD3⁺、

CD3⁺CD4⁺细胞比例及 CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺指数显著升高(均 $P < 0.05$); 同时随着处理时间从 7 d 到 14 d, Model 组宫颈癌荷瘤小鼠脾淋巴细胞中 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺细胞比例及 CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺指数均显著下降(均 $P < 0.05$), 但 Klotho 蛋白处理组中 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺细胞比例及 CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺指数则均显著上升(均 $P < 0.05$)。

表 2 Klotho 蛋白对宫颈癌荷瘤小鼠 T 淋巴细胞水平的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab.2 Effect of Klotho protein on the level of T lymphocyte in mice bearing cervical cancer ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Group	CD3 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺
Control	35.11±6.41	24.42±4.16	9.72±3.47	2.21±0.55
Model (d 7)	18.39±4.51*	8.57±2.56*	7.89±2.33	0.96±0.34*
Model (d 14)	12.03±5.27* [△]	4.67±2.35* [△]	6.59±2.71	0.52±0.33* [△]
Klotho (d 7)	24.58±6.33 [△]	15.29±2.11 [△]	8.47±2.63	1.89±0.22 [△]
Klotho (d 14)	28.77±4.13 ^{△△}	20.55±3.48 ^{△△}	9.33±2.17	3.14±0.47 ^{△△}

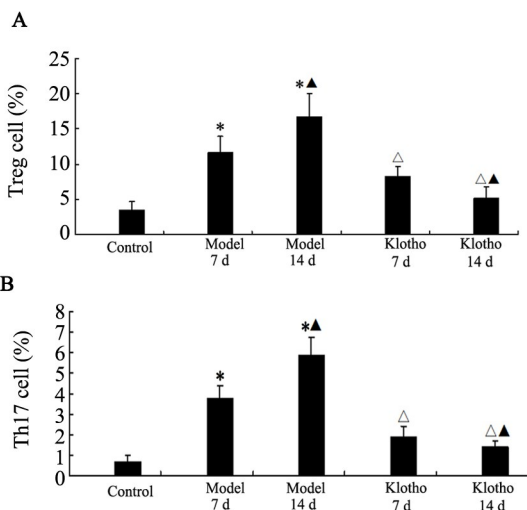
* $P < 0.05$ vs Control group; [△] $P < 0.05$ vs Model group (at the same time); ^{△△} $P < 0.05$ vs Model group (d 7) (in the same group)

2.3 Klotho 蛋白对宫颈癌荷瘤小鼠脾淋巴细胞中 Treg、Th7 细胞含量的影响

流式术检测结果(图 1)显示, 相同时间点时, Model 组宫颈癌荷瘤小鼠淋巴细胞中 Treg、Th7 细胞与 Control 组相比均显著升高(均 $P < 0.05$), 而 Klotho 组淋巴细胞中 Treg、Th7 细胞含量较 Model 组显著降低(均 $P < 0.05$)、与 Control 组无显著差异(均 $P > 0.05$); 在同一组内, 与处理 7 d 时相比, 处理 14 d 时 Model 组宫颈癌荷瘤小鼠淋巴细胞中 Treg、Th7 细胞比例显著上升(均 $P < 0.05$), 而 Klotho 组小鼠淋巴细胞中 Treg、Th7 细胞比例显著减少(均 $P < 0.05$)。

2.4 Klotho 蛋白对宫颈癌荷瘤小鼠脾淋巴细胞中 Foxp3、RORγt mRNA 表达的影响

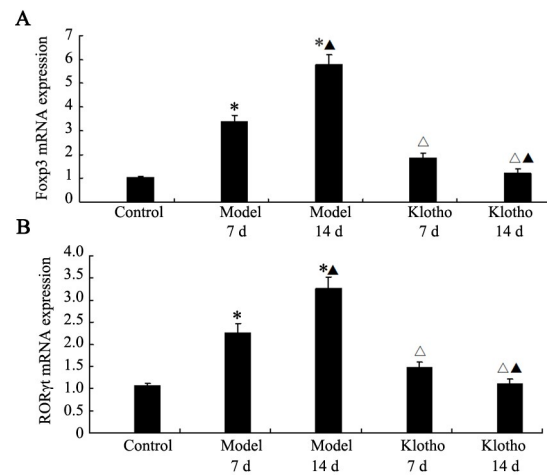
qPCR 检测结果(图 2)显示, Model 组宫颈癌荷瘤小鼠淋巴细胞中 Foxp3、RORγt mRNA 表达与 Control 组相比显著增加($P < 0.05$), 而 Klotho 蛋白处理组小鼠淋巴细胞中 Foxp3、RORγt mRNA 表达较 Model 组相比则显著下降($P < 0.05$)、与 Control 组无显著差异; 在同一组内, 与处理 7 d 时相比, 处理 14 d 时, Model 组宫颈癌荷瘤小鼠淋巴细胞中 Foxp3、RORγt mRNA 表达显著上升($P < 0.05$), 而 Klotho 组小鼠淋巴细胞中 Foxp3、RORγt mRNA 表达显著降低($P < 0.05$)。



* $P < 0.05$ vs Control group; [△] $P < 0.05$ vs Model group (at the same time); ^{△△} $P < 0.05$ vs d 7 group (in the same group)

图 1 流式细胞术检测 Klotho 蛋白处理后宫颈癌移植瘤小鼠 Treg (A) 和 Th17 (B) 细胞的变化

Fig.1 Changes of Treg (A) and Th17 (B) in cervical cancer model mice treated by Klotho protein detected by flow cytometry



* $P < 0.05$ vs Control group; [△] $P < 0.05$ vs Model group (at the same time); ^{△△} $P < 0.05$ vs d 7 group (in the same group)

图 2 Klotho 处理对宫颈癌荷瘤小鼠淋巴细胞中 Foxp3 (A)、RORγt (B) mRNA 表达的影响

Fig.2 Effects of Klotho on the expression of Foxp3 (A) and RORγt (B) mRNA in lymphocytes of cervical cancer-bearing mice

2.5 Klotho 处理对宫颈癌荷瘤小鼠脾淋巴细胞中免疫相关细胞因子的影响

ELISA 方法检测结果(表3)显示, Model 组宫颈癌荷瘤小鼠淋巴细胞中 IL-17、IL-6、IL-10、TGF-β、IL-23 细胞因子含量较 Control 组均显著增加 ($P < 0.05$); 而 Klotho 蛋白处理组小鼠淋巴细胞中 IL-17、IL-6、IL-10、TGF-β、IL-23 细胞因子含量较 Model 组均明显下降 ($P < 0.05$)、且与 Control 组无显著差异; 在同一组内, 与处理 7 d 时相比, 处理 14 d 时 Model 组宫颈癌荷瘤小鼠淋巴细胞中 IL-17、IL-6、IL-10、TGF-β、IL-23 细胞因子含量显著升高 ($P < 0.05$), 而 Klotho 组小鼠淋巴细胞中 IL-17、IL-6、IL-10、TGF-β、IL-23 细胞因子

含量显著下降 ($P < 0.05$)。

2.6 Klotho 处理对荷瘤小鼠脾淋巴细胞中 TGF-β1/Foxp3/RORγt 信号通路相关蛋白的影响

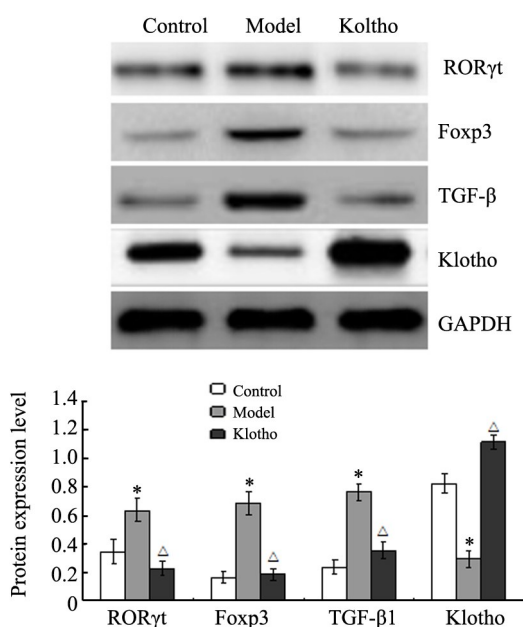
WB 检测结果(图3)显示, Klotho 蛋白处理 14 d 后, Model 组宫颈癌荷瘤小鼠脾淋巴细胞中 Klotho 蛋白水平较 Control 组明显下降 ($P < 0.05$), TGF-β1、Foxp3、RORγt 蛋白表达均明显升高 ($P < 0.05$); 与 Model 组相比, Klotho 组小鼠脾淋巴细胞中 Klotho 蛋白含量显著升高 ($P < 0.05$)、TGF-β1、Foxp3、RORγt 蛋白显著降低 ($P < 0.05$), 与 Control 组比较则均无显著差异。

表3 Klotho 处理对宫颈癌荷瘤小鼠淋巴细胞中免疫相关细胞因子水平的影响 [ρ_B /(pg·ml⁻¹)]

Tab.3 Effect of klotho treatment on levels of immune-related cytokines in lymphocytes of cervical carcinoma-bearing mice [ρ_B /(pg·ml⁻¹)]

Group	IL-17	IL-6	IL-10	TGF-β	IL-23
Control	74.58±19.45	53.57±17.43	33.14±9.38	35.69±7.88	29.96±8.89
Model(d 7)	156.42±22.35*	93.79±18.82*	68.26±11.50*	89.34±19.24*	94.43±18.44*
Model(d 14)	288.39±26.67* [△]	111.50±18.93* [△]	94.84±15.57* [△]	193.57±21.39* [△]	175.35±20.25* [△]
Klotho(d 7)	90.46±18.33 [△]	65.38±14.33 [△]	44.57±9.04 [△]	51.02±11.25 [△]	45.59±9.46 [△]
Klotho(d 14)	43.27±15.59 ^{△△}	35.68±11.36 ^{△△}	31.24±8.41 ^{△△}	20.25±6.67 ^{△△}	18.15±6.38 ^{△△}

* $P < 0.05$ vs Control group; [△] $P < 0.05$ vs Model group (at the same time); ^{△△} $P < 0.05$ vs d 7 group (in the same group)



* $P < 0.05$ vs Control group; [△] $P < 0.05$ vs Model group;

图3 Klotho 处理对宫颈癌荷瘤小鼠脾淋巴细胞中 TGF-β1/Foxp3/RORγt 通路相关蛋白表达的影响

Fig.3 Effects of Klotho on TGF-β1/Foxp3/RORγt signaling pathway related proteins in lymphocytes of mice bearing cervical cancer

3 讨论

目前中国每年新发的宫颈癌病例就有 10 万例, 占全球病例的 1/5; 每年有约 3 万妇女死于宫颈癌^[7]。宫颈癌是一个病因明确的恶性肿瘤, 除了人类乳头状瘤病毒 HPV 感染外, 年龄因素和机体免疫力下降都是其重要致病原因^[8]。另外宫颈癌细胞容易发生免疫逃逸, 从而导致肿瘤侵袭性转移, 其是患者病死率高的主要原因之一^[9]。Klotho 作为新发现的具有抗衰老功能的新型蛋白, 近来发现其在胃癌、肺癌、乳腺癌、宫颈癌中均表达下调, 而提高这些癌细胞中 Klotho 蛋白表达水平后能够显著抑制肿瘤的扩散转移能力, 并促使肿瘤细胞趋于凋亡, 因此推测 Klotho 蛋白作为抗衰老因子也可发挥重要的抗癌作用^[10]。DAI 等^[11]研究发现, Klotho 能够通过调节 stanniocalcin-1 的表达抑制人卵泡甲状腺癌细胞的恶性行为。而新近研究^[12]也发现, Klotho 蛋白能够抑制人宫颈癌细胞增殖、迁移并能够促进细胞凋亡, 提示 Klotho 能够作为诊断和靶向治疗宫颈癌的作用位点。本研究成功建立宫颈癌荷瘤小鼠模型, 发现 Klotho 处理宫颈癌荷瘤小鼠 14 d 能够显著抑制体内宫颈癌生长, 并随着时间的延长, 其抑瘤率随之上升, 同样验证了 Klotho 蛋白对宫颈癌具有抑制作用。

宫颈癌在发生发展及侵袭转移过程中会通过多种途径使机体免疫功能下降,而同时肿瘤细胞所处的免疫微环境会发生变化,致使发生免疫逃逸^[13]。一般认为 CD4⁺T 淋巴细胞能够辅助免疫杀伤细胞杀伤肿瘤,而缺乏 CD4⁺T 淋巴细胞及 CD4⁺/CD8⁺ 细胞比例降低是导致抗肿瘤免疫效应降低的主要原因之一^[14]。也有研究^[15]发现, Klotho 蛋白与机体 CD4⁺ 淋巴细胞具有表达相关性,它影响机体感染和肿瘤的免疫调节能力,并推测其可能可作为衰老因素和肿瘤免疫抑制的枢纽,但 Klotho 具体能否发挥免疫调节作用及其如何影响宫颈癌肿瘤细胞的免疫逃逸尚未见研究。本研究发现,当 Klotho 蛋白连续作用于宫颈癌荷瘤小鼠后,其总 T 淋巴细胞(CD3⁺)、辅助/诱导 T 淋巴细胞(CD3⁺CD4⁺) 比例及免疫指数(CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺) 均显著上升,说明 Klotho 蛋白能够提升宫颈癌荷瘤小鼠的淋巴细胞免疫能力。

肿瘤细胞发生免疫逃逸是肿瘤发生发展的重要机制之一,也是当前肿瘤免疫学研究的热点^[16]。研究^[17]发现, Treg、Th7 细胞在抑制 T 淋巴细胞功能的同时,会降低机体对肿瘤细胞的免疫监视,间接促进肿瘤的生长进展,因此 Treg、Th7 细胞在肿瘤细胞的免疫逃逸中扮演重要角色。鉴于 Treg、Th7 细胞在肿瘤免疫逃逸中发挥的重要作用,减少或抑制 Treg、Th7 细胞时将有助于机体抗肿瘤免疫功能的恢复^[18]。本研究发现,宫颈癌荷瘤小鼠脾淋巴细胞中的 Treg、Th7 细胞水平显著高于普通小鼠,并且随着时间增长和荷瘤生长,其 Treg、Th7 细胞水平随之显著上升,也说明 Treg 和 Th7 细胞介导了宫颈癌荷瘤细胞发生免疫逃逸而促进肿瘤生长。而当 Klotho 蛋白作用于宫颈癌荷瘤小鼠后,其体内淋巴细胞中 Treg、Th7 细胞水平均显著下降,说明 Klotho 蛋白能够抑制 Treg 和 Th7 细胞介导的宫颈癌荷瘤细胞免疫逃逸。

Foxp3 是 Treg 细胞最具特异性的标志物,对 Treg 细胞的分化和功能调节发挥关键作用^[19]。ROR γ t 是 Th7 细胞的关键性转录因子,它控制着 Th7 细胞的增生和分化^[20-21]。本研究利用 qPCR 检测了宫颈癌荷瘤小鼠脾淋巴细胞中 Treg 和 Th7 细胞的关键转录因子基因表达变化,发现荷瘤模型组小鼠体内淋巴细胞中 Foxp3 和 ROR γ t mRNA 表达水平显著上升,而 Klotho 蛋白处理组中 Foxp3 和 ROR γ t mRNA 表达水平均下降明显,并具有时间效应,说明 Klotho 蛋白可能通过抑制 Treg 和 Th7 细胞中关键转录因子 Foxp3 和 ROR γ t mRNA 表达而发挥免疫调节作用。同时本研究也发现,宫颈癌荷瘤模型组小鼠体内 Treg 和 Th17 细胞相关免疫细胞因子(IL-17、IL-6、IL-10、TGF- β 、IL-23) 的含量均显著上升,而 Klotho 蛋白处

理后 Treg 和 Th17 细胞相关免疫细胞因子含量均显著下降,说明 Klotho 蛋白能够通过抑制 Treg 和 Th17 细胞相关免疫细胞因子水平,进而降低宫颈癌荷瘤小鼠脾淋巴细胞中 Treg 和 Th7 细胞含量。研究^[22-23]发现,多数肿瘤不能依靠自身免疫系统清除肿瘤细胞,与 Klotho 表达下调不无关系。为了进一步揭示 Klotho 蛋白如何调控宫颈癌荷瘤小鼠体内的 Treg 和 Th7 细胞介导的免疫逃逸,本研究检测了各组宫颈癌荷瘤小鼠淋巴细胞中 TGF- β 1/Foxp3/ROR γ t 信号通路相关蛋白表达情况,发现宫颈癌荷瘤模型组小鼠脾淋巴细胞中 Klotho 蛋白水平显著下降,同时 TGF- β 1/Foxp3/ROR γ t 蛋白水平也显著上升;而 Klotho 蛋白处理组小鼠体内 Klotho 水平随之上升,而 TGF- β 1/Foxp3/ROR γ t 蛋白水平明显下降。

综上,本研究认为 Klotho 蛋白能够通过抑制宫颈癌荷瘤小鼠淋巴细胞中 TGF- β 1/Foxp3/ROR γ t 信号通路来调节 Treg 和 Th17 细胞介导的癌细胞免疫逃逸,具有成为宫颈癌免疫治疗靶点的潜力。

[参考文献]

- [1] JÓZWICKI W, BROŻYNA A A, SIEKIERA J, et al. Frequency of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells in peripheral blood in relation to urinary bladder cancer malignancy indicators before and after surgical removal[J/OL]. *Oncotarget*, 2016, 7(10): 11450-11462[2019-06-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4905485/>. DOI: 10.18632/oncotarget.7199.
- [2] BAYU H, BERHE Y, MULAT A, et al. Cervical cancer screening service uptake and associated factors among age eligible women in mekelle zone, northern Ethiopia, 2015: A community based study using health belief model[J/OL]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0149908 [2019-06-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4786115/>. DOI:10.1371/journal.pone.0149908.
- [3] MOORE K N, JAVA J J, SLAUGHTER K N, et al. Is age a prognostic biomarker for survival among women with locally advanced cervical cancer treated with chemoradiation? An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group ancillary data analysis[J]. *Gynecol Oncol*, 2016, 143(2): 294-301. DOI:10.1016/j.ygyno.2016.08.317.
- [4] LIU Y J, ZHANG Q, HU S Y, et al. Effect of vaccination age on cost-effectiveness of human papillomavirus vaccination against cervical cancer in China[J/OL]. *BMC Cancer*, 2016, 16: 164[2019-06-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4768405/>. DOI:10.1186/s12885-016-2207-3.
- [5] HOU P F, ZHU L J, CHEN X Y, et al. Age-related changes in CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells and their relationship with lung cancer[J/OL]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0173048[2019-06-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5333862/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0173048.
- [6] 贺启华. Klotho 对人宫颈癌细胞生物学行为的影响及其相关机制[J]. *中国妇幼保健*, 2017, 32(14): 3331-3335.
- [7] ZHANG H J, ZHANG S L. The expression of Foxp3 and TLR4 in cervical cancer: association with immune escape and clinical pathol-

- ogy[J]. Arch Gynecol Obstet, 2017, 295(3): 705-712. DOI:10.1007/s00404-016-4277-5.
- [8] CHEN Z F, PANG N N, DU R, et al. Elevated expression of programmed death-1 and programmed death ligand-1 negatively regulates immune response against cervical cancer cells[J/OL]. Mediators Inflamm, 2016, 2016: 6891482[2019-06-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5046046/>. DOI: 10.1155/2016/6891482.
- [9] 成慧, 宋明芮, 张晓云, 等. 宫颈鳞状细胞癌中 Klotho 和 c-myc 的表达及相关性研究[J]. 中国伤残医学, 2014, 22(9): 132-134. DOI: 10.13214/j.cnki.cjotadm.2014.09.102.
- [10] 张艳芳, 李醒亚. Klotho 基因对子宫颈鳞癌细胞恶性生物学行为的影响及相关机制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(5): 521-526. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2017.05.011.
- [11] DAI D, WANG Q, LI X F, et al. Klotho inhibits human follicular thyroid cancer cell growth and promotes apoptosis through regulation of the expression of stanniocalcin-1[J]. Oncol Rep, 2016, 35(1): 552-558. DOI:10.3892/or.2015.4358.
- [12] MENCKE R, OLAUSON H, HILLEBRANDS J L. Effects of Klotho on fibrosis and cancer: A renal focus on mechanisms and therapeutic strategies[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2017, 121: 85-100. DOI:10.1016/j.addr.2017.07.009.
- [13] SONG H, PARK H, PARK G, et al. Corticotropin-releasing factor induces immune escape of cervical cancer cells by downregulation of NKG2D[J]. Oncol Rep, 2014, 32(1): 425-430. DOI: 10.3892/or.2014.3191.
- [14] SASAGAWA T, TAKAGI H, MAKINODA S. Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer[J]. J Infect Chemother, 2012, 18(6): 807-815. DOI:10.1007/s10156-012-0485-5.
- [15] WITKOWSKI J M, SOROCZYŃSKA-CYBULA M, BRYL E, et al. Klotho—a common link in physiological and rheumatoid arthritis-related aging of human CD4⁺ lymphocytes[J]. J Immunol, 2007, 178(2): 771-777. DOI:10.4049/jimmunol.178.2.771.
- [16] LIM S O, LI C W, XIA W Y, et al. EGFR signaling enhances aerobic glycolysis in triple-negative breast cancer cells to promote tumor growth and immune escape[J/OL]. Cancer Res, 2016, 76(5): 1284-1296[2019-06-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4775355/>. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-15-2478.
- [17] ZHU Q Y, WU X L, WANG X P. Differential distribution of tumor-associated macrophages and Treg/Th17 cells in the progression of malignant and benign epithelial ovarian tumors[J]. Oncol Lett, 2017, 13(1): 159-166. DOI:10.3892/ol.2016.5428.
- [18] WANG X F, WANG L, MO Q J, et al. Changes of Th17/Treg cell and related cytokines in pancreatic cancer patients[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(5): 5702-5708.
- [19] LI Q X, LI Q J, CHEN J X, et al. Prevalence of Th17 and Treg cells in gastric cancer patients and its correlation with clinical parameters[J]. Oncol Rep, 2013, 30(3): 1215-1222. DOI:10.3892/or.2013.2570.
- [20] WANG M, CHEN B, SUN X X, et al. Gastric cancer tissue-derived mesenchymal stem cells impact peripheral blood mononuclear cells via disruption of Treg/Th17 balance to promote gastric cancer progression[J]. Exp Cell Res, 2017, 361(1): 19-29. DOI:10.1016/j.yexcr.2017.09.036.
- [21] YOUNG M R, LEVINGSTON C A, JOHNSON S D. Treatment to sustain a Th17-type phenotype to prevent skewing toward Treg and to limit premalignant lesion progression to cancer[J]. Int J Cancer, 2016, 138(10): 2487-2498. DOI:10.1002/ijc.29989.
- [22] XUAN N T, HAIN V. Changes in expression of Klotho affect physiological processes, diseases, and cancer [J]. Iran J Basic Med Sci, 2018, 21(1):3-8.
- [23] GAO M, LIU L X, WU F L, et al. The changes of Th17/treg and related cytokines: IL-17, IL-23, IL-10, and TGF- β in respiratory syncytial virus bronchiolitis rat model[J]. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2017, 16(5): 386-395.

[收稿日期] 2019-06-30

[修回日期] 2019-09-09

[本文编辑] 黄静怡