

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.01.006

· 基础研究 ·

红景天苷通过TLR4调控DC提高T细胞对肺癌3LL细胞的杀伤力

张雪伟¹, 张燕丽¹, 文泽馨², 李鹏飞¹, 崔琳¹, 张敏¹(1. 西藏民族大学医学部 自治区生命科学基础实验室, 陕西咸阳 712082; 2. 福建医科大学医学院 临床医学院, 福建 福州 350004)

[摘要] **目的:** 探讨红景天苷(salidroside, SAL)对树突状细胞(dendritic cell, DC)表型及细胞毒性T细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)抗肿瘤能力的影响。**方法:** 选用Lewis肺癌细胞株3LL、野生型C57BL/6和TLR4^{-/-}C57BL/6小鼠, 获取小鼠骨髓来源的DC前体细胞, 经过培养分化成未成熟DC, 收获第6天的DC, 经磁珠分选后获得纯度较高的CD11c⁺DC。将细胞分成PBS组、SAL组和脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)组, 培养48 h后用流式细胞术检测SAL体外对DC表面分子、吞噬功能、TLR4通路和对T细胞杀伤能力的影响。**结果:** 与PBS组比较, SAL组DC的表面分子CD80、CD86、MHC II表达水平显著升高(均 $P<0.05$)、吞噬功能显著下降($P<0.05$)、TLR4表达水平显著升高($P<0.01$); 与野生型组比较, TLR4^{-/-}组DC经SAL或LPS处理后, 其表面分子CD80、CD86、MHC II的表达水平显著降低(均 $P<0.05$); 与PBS组比较, SAL组刺激活化的CTL对肺癌3LL细胞的杀伤效应显著升高($P<0.05$)。**结论:** SAL可以通过调控TLR4诱导DC成熟, 从而提高T细胞的杀伤能力。

[关键词] 红景天苷; 树突状细胞; Toll-样受体4; 细胞毒性T淋巴细胞

[中图分类号] R734.2; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)01-0037-05

Salidroside regulates DC through TLR4 to increase the lethality of T cells to lung cancer 3LL cells

ZHANG Xuewei¹, ZHANG Yanli¹, WEN Zexin², LI Pengfei¹, CUI Lin¹, ZHANG Min¹(1. Basic Laboratory of the Life Sciences of the Tibet Autonomous, Department of Medicine of Xizang Minzu University, Xianyang 712082, Shaanxi, China; 2. Clinical School of Medicine, Medical School of Fujian Medical University, Fuzhou 350004, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of salidroside (SAL) on the phenotype of dendritic cells (DCs) and the antitumor ability of cytotoxic T lymphocytes (CTL). **Methods:** Lewis lung cancer cell line 3LL, wild type (WT) C57BL/6 mice and TLR4^{-/-} C57BL/6 mice were chosen for this study. Mice bone marrow derived DC precursor cells were obtained to differentiate into immature DCs, which were harvested on the sixth day of culture. CD11c⁺ DCs were obtained by magnetic beads screening, and further divided into PBS group, SAL group and lipopolysaccharide (LPS) group. After being cultured for 48 h, the effects of SAL on surface molecules and phagocytosis of DCs as well as the effect of TLR4 pathway on the killing effect of T cells were detected by Flow cytometry. **Results:** Compared with PBS group, expressions of DC surface molecules CD80, CD86 and MHC II significantly increased (all $P<0.05$), phagocytosis significantly decreased ($P<0.05$), and TLR4 expression level significantly increased ($P<0.01$) in SAL group; Compared with WT group, after being treated with SAL or LPS, the expressions of DC surface molecules CD80, CD86 and MHC II decreased significantly in TLR4^{-/-} group (all $P<0.05$); Compared with PBS group, the activated CTL in SAL group exhibited a significantly elevated killing effect against lung cancer 3LL cells ($P<0.05$). **Conclusion:** SAL can induce DC maturation by regulating TLR4, thus improving the killing ability of T cells.

[Key words] salidroside (SAL); dendritic cells (DCs); Toll-like receptor 4 (TLR4); cytotoxic T lymphocyte (CTL)

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(1): 37-41. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.01.006]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.81560668, No.81860719); 西藏自治区自然科学基金资助项目(No.XZ2017ZRG-59, No.XZ2018ZRG-72); 西藏学校青年教师创新支持项目(No.QCZ2016-36)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81560668, No.81860719), the Natural Science Foundation of Tibet Autonomous Region (No.XZ2017ZRG-59, No.XZ2018ZRG-72), and the Tibetan School Youth Teacher Innovation Support Project(No.QCZ2016-36)

[作者简介] 张雪伟(1990-), 女, 硕士, 主要从事抗肿瘤免疫的研究, E-mail: 957739672@qq.com

[通信作者] 张敏(ZHANG Min, correspondence author), 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事抗肿瘤免疫的研究, E-mail: zhangmin-wen@163.com

树突状细胞(dendritic cells, DC)是目前已知功能最强的抗原提呈细胞,因此决定了其在肿瘤治疗中的独特地位^[1]。未成熟DC通常表达低水平的MHC II类分子和共刺激分子,导致T细胞无反应性会促进肿瘤的发展^[2]。诱导DC适当活化和调控适应性免疫反应可以清除有害的病原体或肿瘤细胞。红景天苷(salidroside, SAL)是传统藏药红景天的主要有效成分之一,近年来已证明SAL通过多种途径影响肿瘤细胞的增殖、凋亡,并对宫颈癌、肺癌等多种肿瘤有治疗作用^[3-5],如SAL可通过提高特异性细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)和非特异性杀伤NK细胞免疫活性而发挥抗肿瘤作用,甚至可以通过提高小鼠体液免疫功能达到抑制人胃腺癌的生长^[6-7]。各种证据表明,SAL可以通过调控免疫力达到抗肿瘤效应,但其作用机制尚不明确。本研究拟采用SAL处理的DC,探讨SAL对DC功能及介导T细胞抗肿瘤免疫效应的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及细胞株

6~8周龄、20~25 g的雄性SPF级野生型(wild-type, WT)C57BL/6小鼠购于西安交通大学医学部[实验动物合格证号:SYXK(陕)2018-001],6~8周龄、20~25 g的雌性SPF级TLR4^{-/-}小鼠C57BL/6购于上海斯莱克实验动物有限公司[实验动物合格证号:SCXK(沪)2017-0005],均饲养于西藏民族大学实验动物科学部。

Lewis肺癌细胞株3LL由上海复旦大学赠予。

1.2 药物与主要试剂

SAL购于成都彼斯特生物科技有限公司。rmGM-CSF、rmIL-4、LPS、FITC-dextran购于美国SIGMA-ALORICH公司,正常山羊血清、RPMI 1640培养基、青链霉素混合液购于美国HyClone公司,FBS购于四季青公司,RBC Lysis Buffer、APC anti-mouse CD11c、FITC anti-mouse CD11c、PE anti-mouse CD80、FITC anti-mouse CD86、PerCP/Cy5.5 anti-mouse I-A/I-E、PE anti-mouse CD282 (TLR2)、PE anti-mouse CD284 (TLR4)、FITC Annexin V/PI凋亡检测试剂盒等购于Biolegend公司。

1.3 小鼠骨髓来源体外诱导的DC培养

参照文献^[8-9]的方法,取6~8周龄雄性小鼠的股骨和胫骨,用PBS将骨髓腔内的细胞冲洗出并用细胞筛过滤,取适量红细胞裂解液裂解后,调整细胞密度为 2×10^6 个/ml,铺于12孔平底细胞培养板中。DC完全培养基为含有rmGM-CSF(10 ng/ml)、rmIL-4(10 ng/ml)、10%FBS、1%青链霉素混合液的RPMI 1640。每2 d换液一次,在第6天收获半悬浮DC,经磁珠分选后获得纯

度较高的CD11c⁺DC,用于后续实验。

1.4 MTT法检测SAL对DC增殖率的影响

经磁珠分选出CD11c⁺DC,用含10%FBS的RPMI 1640完全培养基重悬细胞,使细胞终密度为 1×10^6 /ml。以 2×10^5 /孔铺于96孔板,分别加入PBS和不同浓度(0.025、0.05、0.1 mg/ml)SAL,每组设3个复孔(200 μ l/孔)。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养48 h后,加入20 μ l MTT液(5 mg/ml),再孵育4 h,去上清,加入150 μ l二甲苯亚砷,酶标仪上在波长570 nm处检测各孔的光密度(D)值。实验重复3次。

1.5 流式细胞术检测DC表面分子

将分选过的DC调整细胞密度为 1×10^6 个/ml铺于96孔平底板,分组为PBS组、SAL组(0.05 mg/ml)、LPS组(200 ng/ml),培养48 h后收集细胞,用PBS洗2次,加入10%山羊血清4 $^{\circ}$ C避光孵育25 min,进行非特异性封闭,然后PBS清洗2次,按照1:100分别加入APC anti-mouse CD11、PE anti-mouse CD80、FITC anti-mouse CD86、PerCP/Cy5.5 anti-mouse I-A/I-E抗体,4 $^{\circ}$ C避光孵育15 min后,加入1 ml流式缓冲液,充分洗涤细胞2次。用500 μ l流式缓冲液重悬后,上流式细胞仪检测各组细胞表面分子的表达。实验重复3次。

1.6 体外淋巴细胞特异性杀伤实验

参考文献^[10]的方法,按1.3的方法培养DC,在培养第3天加入SAL,在第6天DC中加入100 μ l 3LL细胞冻融抗原培养48 h。取6~8周龄雄性小鼠脾脏,体外分离淋巴细胞。按比例肿瘤致敏的DC:淋巴细胞=5:1铺板共培养5 d后,收集活化的T淋巴细胞(效应细胞)与加入的3LL细胞(靶细胞)按照5:1的比例混合后共培养4 h。取出培养板,每孔加入20 μ l(5 mg/ml)MTT,放入培养箱继续培养,4 h后离心,快速去除上清,每孔加入150 μ l DMSO,震荡混匀,用酶标仪检测波长570 nm处的D值,按照下述公式计算效应细胞的杀伤率:杀伤率=[1-(实验组D值-效应细胞对照组D值)/靶细胞对照组D值]×100%。实验重复3次。

1.7 统计学处理

采用Graphpad Prism软件处理数据,正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用t检验,多组间比较采用单因素ANOVA分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

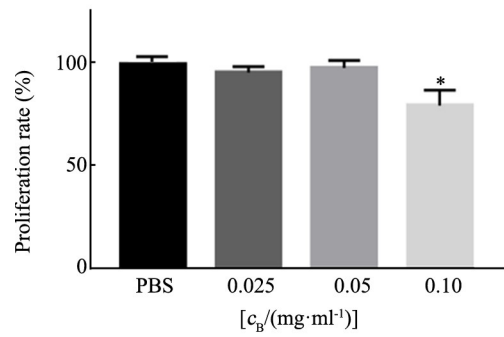
2.1 0.05 mg/ml以下的SAL在体外对DC增殖活性无影响

MTT法检测结果(图1)显示,0.025、0.05 mg/ml

的SAL组DC的相对增殖率与PBS组比较差异无统计学意义($t=2.321, 0.8249$, 均 $P>0.05$), 而0.1 mg/ml组DC的相对增殖率显著下降($t=4.677, P<0.05$)。结果表明, 0.05 mg/ml以下质量浓度的SAL对DC毒性较小, 所以后续实验选用0.05 mg/ml的SAL处理DC。

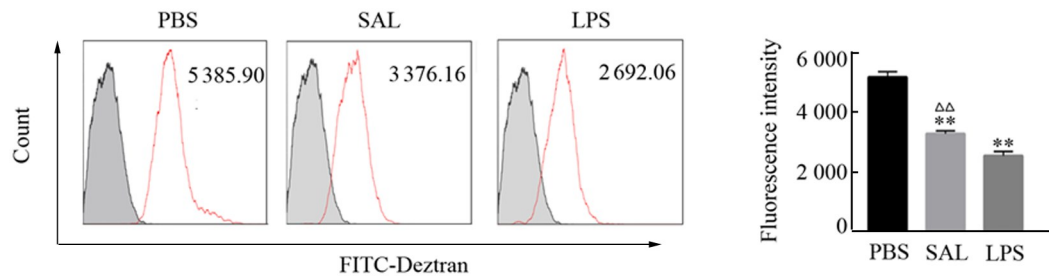
2.2 SAL下调DC的吞噬能力

流式细胞术检测结果(图2)显示, 在37 °C下, 经SAL(0.05 mg/ml)刺激DC吞噬物的平均荧光强度显著高于PBS组($t=26.82, P<0.01$), SAL刺激的DC摄取FITC-右旋糖酐的能力显著高于LPS刺激的DC($t=19.12, P<0.01$)。



* $P<0.05$ vs PBS or 0.025 or 0.05 group

图1 不同质量浓度SAL对体外培养DC增殖活性的影响
Fig.1 Effects of SAL at different mass concentrations on DC proliferation activity *in vitro*



** $P<0.01$ vs PBS group; $\Delta\Delta P<0.01$ vs LPS group

图2 SAL(0.05 mg/ml)对DC吞噬能力的影响
Fig.2 Effects of SAL (0.05 mg/ml) on DC phagocytosis

2.3 SAL体外诱导DC的表面分子表达升高

流式细胞术检测结果(图3)表明, 经SAL(0.05 mg/ml)刺激48 h后DC表面的CD80、CD86、MHCII(I-A/I-E)平均荧光强度相较于PBS组明显升高($t=6.875, 11.14, 7.2$, 均 $P<0.05$), 且与LPS阳性对照组比较, 差异均无统计学意义($t=0.031, 0.217, 0.011$, 均 $P>0.05$)。结果表明, SAL体外可诱导DC成熟。

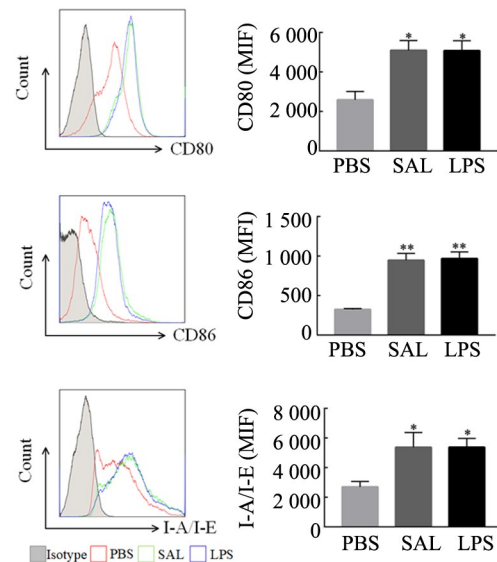
2.4 TLR4是SAL作用于DC的靶点

荧光强度检测结果(图4)显示, 经SAL(0.05 mg/ml)处理的DC表达的TLR4与PBS组比较, 差异有统计学意义($t=12.2, P<0.01$); 而表达的TLR2与PBS组比较, 差异无统计学意义($t=0.572, P>0.05$)。结果表明, TLR4可能是SAL调控DC的靶点。

2.5 SAL刺激后TLR4^{-/-}小鼠来源DC表面分子的表达未增加

流式细胞术检测结果显示, 在SAL刺激下, TLR4^{-/-}小鼠来源的DC表面分子CD80、CD86、MHC II的表达, 与PBS组比较差异无统计学意义($t=1.065, 0.433, 2.662$, 均 $P>0.05$; 图5); 与WT来源的DC经SAL或LPS刺激后相比, CD80、CD86、MHC II表达均有显著的统计学

意义($t=6.994, 9.267, 5.182$, 均 $P<0.05$; 图6)。因此, 推测TLR4是SAL作用于DC的靶点。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs PBS group

图3 SAL(0.05 mg/ml)对DC表面分子表达的影响
Fig.3 Effects of 0.05 mg/ml SAL on the expression of DC surface molecules

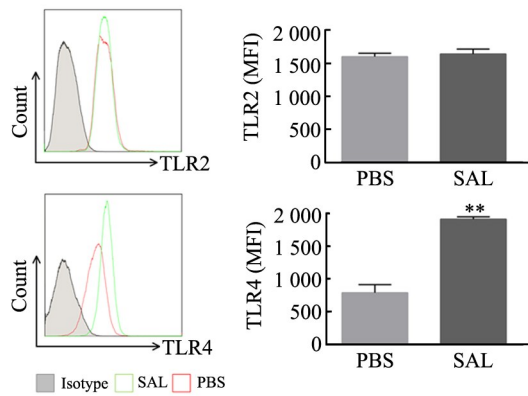


图4 SAL(0.05 mg/ml)对DC表达TLR2和TLR4的影响
Fig.4 Effects of 0.05 mg/ml SAL on the expressions of TLR2 and TLR4 in DC

2.6 DC诱导的CTL可提高对肺癌3LL细胞的杀伤效应

体外杀伤实验结果(图7)显示,经0.05 mg/ml的SAL处理后,用肿瘤抗原致敏的DC诱导CTL对肺癌3LL细胞的杀伤率显著高于PBS组[(79.97±5.88)%

vs (49.84±5.23)%, $t=5.36, P<0.05$]。结果表明,SAL可以显著增强CTL细胞的杀伤功能。

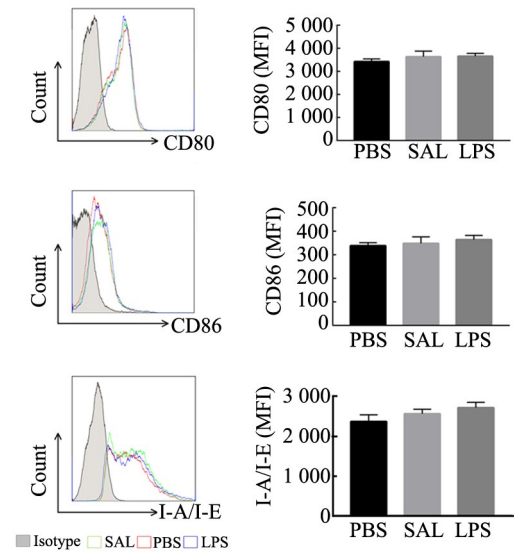


图5 TLR4^{-/-}小鼠的DC经SAL刺激表面分子表达
Fig.5 Expressions of surface molecules on DC of TLR4^{-/-} mice stimulated by SAL

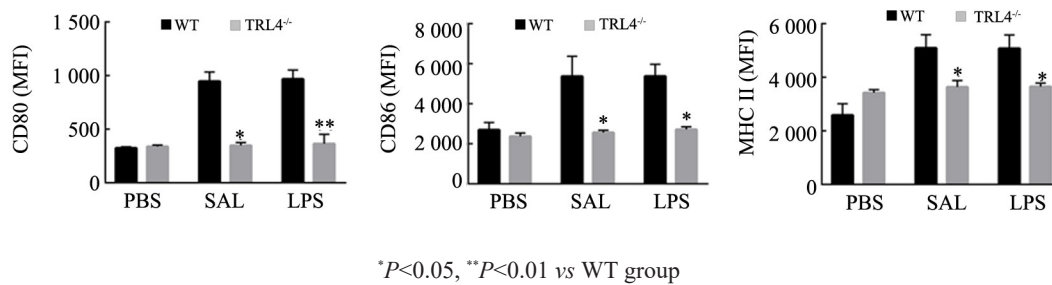


图6 SAL或LPS对TLR4^{-/-}组与WT组DC表面分子表达的影响
Fig.6 Effects of SAL or LPS on expressions of DC surface molecules in TLR4^{-/-} and WT groups

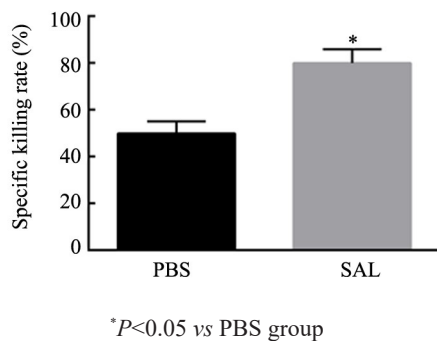


图7 SAL刺激DC诱导CTL对肺癌3LL细胞的杀伤作用
Fig.7 Killing effect of CTL induced by SAL-stimulated DC against lung cancer 3LL cells

3 讨论

DC在免疫系统中起着至关重要的作用并以不成熟的状态存在于外周组织中,以DC为基础的肿瘤

免疫治疗旨在激活免疫系统,特别是可以清除肿瘤的CTL^[11]。传统药物对于肿瘤的治疗有一定的局限性,并且不良反应大,基于DC的肿瘤免疫疗法是目前研究热点,但如何选取DC疫苗佐剂是治疗中的重点。

本实验选用小鼠原代骨髓细胞,以经典培养方法培养刺激祖细胞向未成熟DC分化,进行SAL的体外实验。在筛选SAL浓度时,发现0.05 mg/ml以下的SAL处理对DC的增殖无明显的毒性作用,从而确定后续实验中选用该浓度。在肿瘤微环境中,由于受肿瘤免疫抑制影响,DC无法通过表达抗原肽复合物和共刺激分子,向CTL提供抗原活化信号,甚至进一步促进Treg的增殖,抑制T细胞杀伤效应^[12]。CD80、CD86、MHC II等,是DC成熟的关键标志。在本研究中,经0.05 mg/ml的SAL处理后,DC共刺激分子的表达水平亦显著增高,说明SAL可以促进DC

成熟,说明SAL在治疗肿瘤中的积极作用。另外,在SAL对肺癌体内作用的研究中,证明了SAL可以通过促进CD80、MHC II表达升高,具有促进DC成熟的作用。

本实验证明了SAL可以促进DC成熟,但SAL调控DC的靶点尚不明确。TLR对DC的成熟和激活初始T细胞对炎症的反应非常重要,经实验证明SAL可以通过正向调控TLR4的表达从而促进DC的成熟,SAL通过TLR4作为调控DC的靶点可以有效提高机体的免疫力。同时取自小鼠脾的T淋巴细胞与SAL处理的DC共培养时,显著提高了T细胞的杀伤能力,提示SAL通过激活DC表面分子,提高其抗原提呈能力,提高T细胞特异性杀伤肿瘤细胞的功能,从而在一定程度上提高了治疗肿瘤的效果。

本研究证明了SAL抗肿瘤的作用,而SAL作用DC的细胞信号通路尚未完全明了,但它对DC的积极作用在本实验中得到证实,为以后SAL的临床应用提供了参考依据。

[参考文献]

- [1] PUHR S, LEE J, ZVEZDOVA E, et al. Dendritic cell development-History, advances, and open questions[J/OL]. *Semin Immunol*, 2015, 27(6): 388-396[2019-08-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5032838/>. DOI:10.1016/j.smim.2016.03.012.
- [2] ZONG J B, KESKINOV A A, SHURIN G V, et al. Tumor-derived factors modulating dendritic cell function[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2016, 65(7): 821-833. DOI:10.1007/s00262-016-1820-y.
- [3] 王志强,刘娅丽,马丽娟,等. 红景天苷对人舌鳞状细胞癌CAL-27细胞增殖、凋亡、周期及迁移的影响[J]. *国际口腔医学杂志*, 2018, 45(6): 678-685. DOI:10.7518/gjkq.2018.06.010.
- [4] 章丽霞,王涛,牛彩琴. 红景天苷对小鼠宫颈癌移植瘤中Eag1表达的影响和意义[J]. *重庆医学*, 2017, 46(25): 3470-3472, 3476. DOI:CNKI:SUN:CQYX.0.2017-25-005.
- [5] 明拂晓,靳彩玲,赵树鹏,等. 红景天苷通过下调ERK1/2信号通路抑制肺癌A549细胞的增殖作用[J]. *中药新药与临床药理*, 2016, 27(2): 225-230.
- [6] HUANG Q, HU X L. Effects of salidroside on the secretion of inflammatory mediators induced by lipopolysaccharide in murine macrophage cell line J774.1[J]. *Acta Physiol Sin*, 2017, 69(1): 41-46.
- [7] 张敏,赵亚玲,孙芳云. 红景天提取物对Lewis肺癌小鼠移植瘤中CD4⁺CD25⁺Treg的抑制作用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2013, 20(4): 444-448. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2013.04.011.
- [8] 刘振明,胡何节,方征东,等. 小鼠骨髓源性树突状细胞体外诱导培养体系的构建[J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(8): 1177-1180. DOI:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2015.08.033.
- [9] 谢楠,张理超,付必莽,等. GM-CSF浓度梯度对树突状细胞体外诱导培养的影响[J]. *世界华人消化杂志*, 2016, 24(13): 2038-2044.
- [10] 冯婷,赵明耀,孙丽莎,等. 牛膝多糖对小鼠骨髓来源树突状细胞抗肿瘤能力的影响[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2010, 45(3): 359-362. DOI:10.13705/j.issn.1671-6825.2010.03.013.
- [11] HUBER A, DAMMEIJER F, AERTS J G J V, et al. Current state of dendritic cell-based immunotherapy: opportunities for in vitro antigen loading of different DC subsets?[J/OL]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2804[2019-08-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6287551/>. DOI:10.3389/fimmu.2018.02804.
- [12] LIU J, CAO X T. Regulatory dendritic cells in autoimmunity: A comprehensive review[J]. *J Autoimmun*, 2015, 63: 1-12. DOI:10.1016/j.jaut.2015.07.011.
- [13] 贺拥军,岳秋娟,张敏. 藏药红景天苷诱导DC成熟并增强T细胞抑制肺癌的实验研究[J/OL]. *现代免疫学*, 2015, 35(3): 226-229[2019-08-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5527264/>.

[收稿日期] 2019-08-03

[修回日期] 2019-11-11

[本文编辑] 党瑞山