

◇基础医学研究◇

TLR7 激动剂 Gardiquimod 上调 BxPC-3 细胞中 IL-15 mRNA 表达

王 芳 金 锐 李 磊 程丰伟 罗 欣 张胜权

摘要 目的 研究 TLR7 在胰腺癌 BxPC-3 细胞中表达,并探讨 TLR7 激动剂激活 TLR7 后细胞因子白介素 15(IL-15)的表达。方法 通过 Western blot 和 Real-time PCR 分析 TLR7 在细胞内的表达水平;BxPC-3 细胞经过不同时间点 Gardiquimod(3 $\mu\text{g/ml}$) 的处理后,Real-time PCR 分析 TLR7 激活后 IL-15 mRNA 水平表达变化;Western blot 分析 Gardiquimod 刺激细胞后,磷脂酰肌醇-3-激酶-蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶(PI3K-AKT)信号通路的变化。结果 Western blot 和 Real-time PCR 结果显示:与外周血单核细胞(PBMC)相比,TLR7 在 BxPC-3 中弱表达;Real-time PCR 分析显示:Gardiquimod 处理细胞后能刺激细胞中 IL-15 的表达;TLR7 激动剂能够激活 PI3K-AKT 信号通路。结论 Gardiquimod 激活 TLR7 后能够上调 IL-15 的表达,并且其激活与 PI3K-AKT 信号途径相关。

关键词 TLR7; Gardiquimod; IL-15; PI3K-AKT; BxPC-3

中图分类号 R 34

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)01-0001-04

Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)是一类识别病原相关分子模式(pathogen associated molecular pattern, PAMP)的模式识别受体(pattern-recognition receptor, PRR)^[1]。TLRs 广泛分布于体内不同免疫细胞表面,如 TLR1 能在单核细胞、T、B 淋巴细胞和 NK 细胞等多种细胞中表达,TLR3 只能够特异性表达于树突状细胞^[2]。TLRs 的生物学功能主要包括激活固有免疫和参与适应性免疫的应答的启动^[3]。同样,TLR7 在肿瘤的免疫治疗中也发挥着十分重要的作用^[4]。而磷脂酰肌醇-3-激酶-蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶(phosphatidylinositol-3-kinase-protein serine threonine kinase, PI3K-AKT)信号通路与 TLRs 受体也有密切联系,作为联系细胞外信号分子与细胞内的细胞因子之间的桥梁,在肿瘤细胞的生长、分化、凋亡等方面起着重要的调节作用^[5]。Ha et al^[6]研

究显示,TLR2 配体可通过 PI3K-AKT 信号通路保护心脏进而缓解动脉缺血/再灌注损伤。同时,PI3K-AKT 在细胞功能调节如防御和免疫方面也发挥重要作用^[7]。白介素-15(interleukin-15, IL-15)是一种细胞因子,源于 T 细胞,能够在体内 T、B 淋巴细胞、单核巨噬细胞等多种细胞中表达,其生物学功能广泛,能诱导 T 细胞增殖、NK 细胞分化等^[8]。Shenoy et al^[9] 研究显示 IL-15 能够通过 PI3K-AKT 和 JAK-STAT 等信号通路诱导和抑制凋亡,从而对 T 细胞进行调节。在众多肿瘤中,胰腺癌是一种高度恶性的肿瘤,与其高侵袭性、转移性、耐药性有关^[10]。因此,腺癌的治疗目前仍然是医学界的难题。该研究旨在对 TLR7 与胰腺癌的关系以及 TLR7 配体 Gardiquimod 激活 TLR7 后对信号通路 PI3K-AKT 和下游细胞因子 IL-15 表达进行探讨。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂 胰腺癌 BxPC-3 细胞株购自中国科学院上海细胞库, Gardiquimod 购自美国 Invitrogen 公司, RPMI-1640 培养基和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS) 购自美国 Gibco 公司, TLR7、 β -actin 和 PI3K-AKT 抗体购自美国 Cell signaling 公司, 逆转录试剂和实时荧光定量 PCR (Real-time PCR, RT-PCR) 试剂均购自日本 TaKaRa 公司, 引物由上海生工生物工程公司合成。

1.2 引物 登陆 NCBI 网站检索人 GAPDH、IL-15 基因序列, Primer Premier 5.0 软件设计引物, 见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

引物	序列
GAPDH	F: 5'-AGATCATCAGCAATGCCTCCTG-3' R: 5'-ATGGCATGGACTGTGGTCATG-3'
IL-15-V ₁₃	F: 5'-CAGCCCATACAAGATCGTATTG-3' R: 5'-GCCACGGTAAATCCTTAAGTATTGAA-3'
IL-15-V ₂	F: 5'-CATGGTATTGGGAACCATAGATTG-3' R: 5'-CATTCACCCAGTTGGCTTCTG-3'

1.3 细胞培养 从液氮复苏胰腺癌 BxPC-3 细胞株, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养于含 10% FBS 的 1640 培养液。细胞长到 70%~80% 时, 以 $4 \times 10^4/\text{ml}$ 的密

2014-09-24 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81271748)

作者单位: 安徽医科大学生物化学与分子生物学教研室, 合肥 230032

作者简介: 王 芳, 女, 硕士研究生;

张胜权, 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: sqz36@yahoo.com

度接种于 24 孔细胞培养板。实验前 1 d 换无血清培养液,用 Gardiquimod (3 $\mu\text{g/ml}$) 在不同时间点 (0.2、0.5、1.0、3.0、6.0、12.0、24.0 h) 刺激 BxPC-3 细胞作为实验组,以不做任何处理的细胞作空白对照组;并另设外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 对照,不做任何处理的细胞作阳性对照组。

1.4 RT-PCR 检测 IL-15 mRNA 的表达水平 用 TRIzol 提取 BxPC-3 细胞中总 RNA,以逆转录试剂盒合成方法合成 cDNA。以 cDNA 为模板,加入特异性引物(表 1) 配成 RT-PCR 体系。具体如下: $2 \times \text{SYBR Premix Ex Taq II}$ 10 μl 、ROX DYE II 0.4 μl 、上下游引物各 0.4 μl 、cDNA 2 μl 、ddH₂O 6.8 μl , 总体积 20 μl 。总体系在 AB 7500 荧光定量分析仪上按程序运行,以 GAPDH 为内参。最后用相对定量分析法分析 BxPC-3 组与 PBMC 组。

1.5 Western blot 分析 TLR7 的表达及其激活的信号通路 经过不同时间点 Gardiquimod 刺激后,用细胞裂解液裂解细胞提取 24 孔板中的总蛋白。配制 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶,将蛋白与 $5 \times \text{loading buffer}$ 混合后上样,浓缩胶中恒压 60 V,分离胶加至 120 V,待电泳完成,将蛋白转至 PVDF 膜上(恒流 150 mA 3 h)。用 5% 脱脂牛奶将膜封闭 2 h 后用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,一抗以工作浓度 1:500,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(TLR7 为兔抗 1:10 000; β -actin 为鼠抗 1:12 000; p-AKT 为兔抗 1:14 000)。孵育 2 h,用 ECL 发光剂压胶片发光、显影。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间计量资料采用成组设计的方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。

2 结果

2.1 TLR7 在 BxPC-3 细胞中表达 从 BxPC-3 及 PBMC 中提取 mRNA 和总蛋白,以 PBMC 作阳性对照组。Western blot 和 RT-PCR 结果显示:与阳性对照组相比,实验组细胞中 TLR-7 表达,但较弱($F = 2.015$)。见图 1。

2.2 Gardiquimod 刺激 BxPC-3 细胞能够上调 IL-15 的表达 IL-15 表达具有波动性,IL-15- V_{13} 的表达呈现升高趋势,在 12.0 h 时达峰值,约是空白对照组的 4 倍,之后下降;IL-15- V_2 也有上升趋势,在 3.0 h 出现峰值,约是空白对照组的 2.3 倍。($F_{\text{IL-15-}V_{13}} = 1.836$; $F_{\text{IL-15-}V_2} = 4.580$)。见图 2。

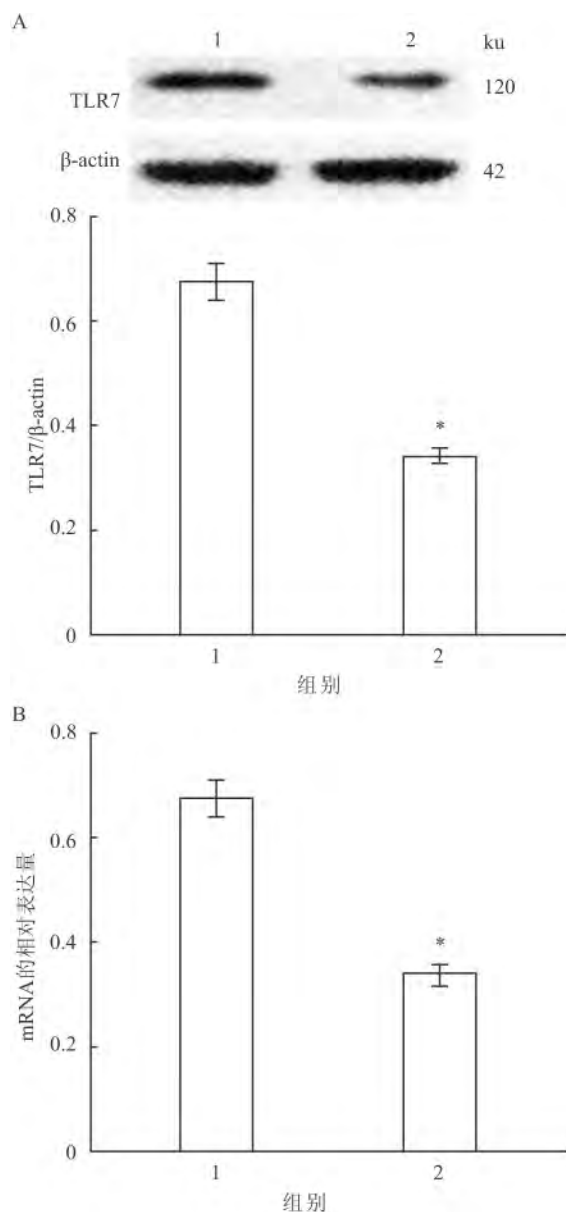


图1 Western blot 分析 TLR7 蛋白在 PBMC 以及 BxPC-3 细胞中的表达

A: Western blot 分析结果; B: RT-PCR 分析结果; 1: 阳性对照组; 2: 实验组; 与阳性对照组比较: * $P < 0.05$

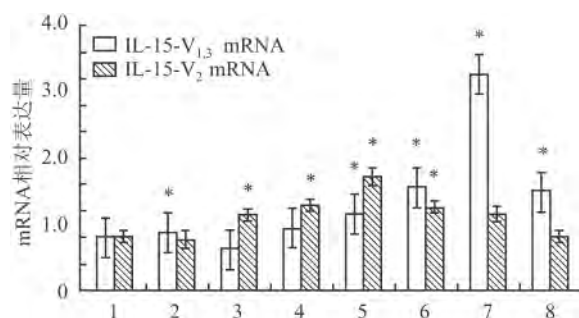


图2 Gardiquimod (3 $\mu\text{g/ml}$) 对 BxPC-3 细胞中 IL-15- V_{13} 、IL-15- V_2 mRNA 相对表达量的影响

1: 空白对照组; 2: 0.2 h; 3: 0.5 h; 4: 1.0 h; 5: 3.0 h; 6: 6.0 h; 7: 12.0 h; 8: 24.0 h; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$

2.3 Gardiquimod 激活 BxPC-3 细胞中 PI3K-AKT 信号通路 与空白对照组相比,加 Gardiquimod 刺激的细胞中 p-AKT 在 0~3.0 h 表达升高,并在 3.0 h 达到峰值,以后略微下降,呈明显的剂量依赖性($F=388.745$)。见图 3。

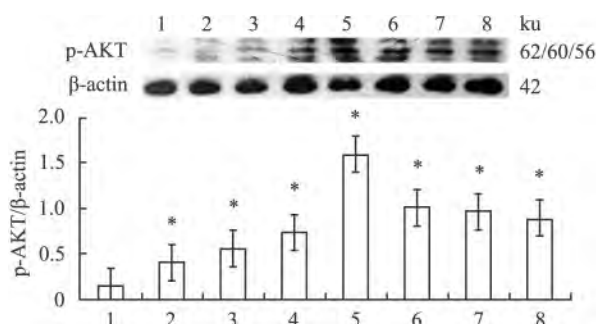


图3 Western blot 分析 p-AKT 信号蛋白的表达

1: 空白对照组; 2: 0.2 h; 3: 0.5 h; 4: 1.0 h; 5: 3.0 h; 6: 6.0 h; 7: 12.0 h; 8: 24.0 h; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

Gardiquimod 是一种咪唑喹啉类小分子化合物,是咪唑莫特的衍生物,作为 TLR7 的配体,能够激活细胞内区 Toll/IL-1 受体同源区 (TIR),通过下游髓样分化因子 88 (MyD88) 信号通路,激活信号蛋白核转录因子 κB (NF- κB)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 和 PI3K 等,从而诱导细胞因子 IL-6、IL-15 等因子,干扰素 IFN- γ 合成,从而调节免疫反应^[11]。

实验表明,TLR7 能够在胰腺癌细胞中表达,尽管很弱。进一步的研究^[12]显示 TLR7 的激活诱导下游细胞因子 IL-15 表达升高。IL-15 组织分布极为广泛,在骨骼肌和胎盘中 IL-15 mRNA 水平很高,也表达于淋巴细胞、单核细胞、NK 细胞等表面^[13]。IL-15 与 IL-2 氨基酸序列不同,但空间结构相似,因此具有相似的生物学作用。主要有促进 T 细胞增殖,促进 NK 细胞毒性活性产生 CK,诱导 B 细胞增殖产生抗体,激活单核/巨噬细胞等等。故 IL-15 是参与体内免疫应答的重要细胞因子^[9]。本实验中,TLR7 激活后能够上调 IL-15 的表达,进一步诱导体内免疫系统,对胰腺癌的发展起到一定的抑制作用。

程丰伟等^[14]研究显示,PI3K-AKT 信号通路为细胞内信号传导途径,与肿瘤细胞的增殖与存活、侵袭与转移等行为密切相关。PI3K 的异常与类脂磷酸酶 (PTEN) 的负调节失活有关,AKT 异常会导致下游血管内皮生长因子 (VEGF) 的高表达,而 VEGF 是血管生长、肿瘤增殖、迁移的关键。本研究

结果显示,PI3K-AKT 信号通路被激活并在 3.0 h 出现了升高的峰值之后略微下降,说明 TLR7 的激活对胰腺癌的增殖、迁移等具有一定的抑制作用。

参考文献

- [1] Mai C W, Kang Y B, Pichika M R. Should a Toll-like receptor 4 (TLR-4) agonist or antagonist be designed to treat cancer? TLR-4: its expression and effects in the ten most common cancers [J]. *Onco Targets Ther*, 2013, 6: 1573-87.
- [2] Holldack J. Toll-like receptors as therapeutic targets for cancer [J]. *Drug Discov Today*, 2014, 19(4): 379-82.
- [3] Basith S, Manavalan B, Yoo T H, et al. Roles of Toll-like receptors in cancer: a double-edged sword for defense and offense [J]. *Arch Pharm Res*, 2012, 35(8): 1297-316.
- [4] Fehres C M, Bruijns S C, van Beelen A J, et al. Topical rather than intradermal application of the TLR7 ligand imiquimod leads to human dermal dendritic cell maturation and CD8 + T-cell cross-priming [J]. *Eur J Immunol*, 2014, 44(8): 2415-24.
- [5] Ma F, Zhang J, Zhang J, et al. The TLR7 agonists imiquimod and gardiquimod improve DC-based immunotherapy for melanoma in mice [J]. *Cell Mol Immunol*, 2010, 7(5): 381-8.
- [6] Ha T, Hu Y, Liu L, et al. TLR2 ligands induce cardioprotection against ischaemia/reperfusion injury through a PI3K/Akt-dependent mechanism [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 87(4): 694-703.
- [7] Ojaniemi M, Glumoff V, Harju K, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in Toll-like receptor 4-mediated cytokine expression in mouse macrophages [J]. *Eur J Immunol*, 2003, 33(3): 597-605.
- [8] Lai Y G, Hou M S, Lo A, et al. IL-15 modulates the balance between Bcl-2 and Bim via a Jak3/1-PI3K-Akt-ERK pathway to promote CD8 $\alpha\alpha$ + intestinal intraepithelial lymphocyte survival [J]. *Eur J Immunol*, 2013, 43(9): 2305-16.
- [9] Shenoy A R, Kirschnek S, Häcker G, et al. IL-15 regulates Bcl-2 family members Bim and Mcl-1 through JAK/STAT and PI3K/AKT pathways in T cells [J]. *Eur J Immunol*, 2014, 44(8): 2500-7.
- [10] Kim E J, Simeone D M. Advances in pancreatic cancer [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2011, 27(5): 460-6.
- [11] Buitendijk M, Eszterhas S K, Howell A L. Gardiquimod: a Toll-like receptor-7 agonist that inhibits HIV type 1 infection of human macrophages and activated T cells [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2013, 29(6): 907-18.
- [12] Li L, Cheng F W, Wang F, et al. The activation of TLR7 regulates the expression of VEGF, TIMP1, MMP2, IL-6, IL-15 in HeLa cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 389(1-2): 43-9.
- [13] Marra P, Mathew S, Grigoriadis A, et al. IL15RA drives antagonistic mechanisms of cancer development and immune control in lymphocyte-enriched triple-negative breast cancers [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(17): 4908-21.
- [14] 程丰伟,李磊,王芳,等. Gardiquimod 对 HepG2 细胞中 VEGF 和 TIMP1 表达的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(5): 561-4.

鞘碱性蛋白活化的 SD 大鼠 T 细胞培养与鉴定

赵 皓^{1,2}, 余 晓², 张敬星³, 陈月娟³, 吕合作^{2,3}, 王保龙¹

摘要 目的 培养针对髓鞘碱性蛋白(MBP)特异的SD大鼠T淋巴细胞,对其表型和细胞因子分泌特征进行鉴定。方法 将MBP免疫SD大鼠,收集回流淋巴结,制备成单细胞悬液,在RMPI 1640培养液中用MBP反复刺激获得MBP特异性T细胞(MBP-T)。然后用³H-胸腺嘧啶核苷(³H-TdR)掺入法测定其对MBP刺激的反应性,用流式细胞术鉴定其表型和细胞因子的产生。结果 当MBP抗原存在的情况下,MBP-T的³H-TdR掺入量明显增加。流式细胞术检测表明MBP-T主要为CD3⁺CD4⁺的T淋巴细胞(98%),并可以产生干扰素 γ (IFN- γ)和白细胞介素10(IL-10)等细胞因子。结论 MBP免疫SD大鼠的回流淋巴结细胞,经过体外扩增可以获得MBP特异性的T细胞,其表型主要为CD3⁺CD4⁺,并可以产生Th1和Tr1型细胞因子。

关键词 髓鞘碱性蛋白;淋巴细胞;免疫;流式细胞术
中图分类号 R 392.12

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)01-0004-05

2014-09-23 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81071268,81271363)

作者单位:¹安徽医科大学附属医院检验科,合肥 230001

²蚌埠医学院第一附属医院中心实验室,蚌埠 233004

³组织移植安徽省重点实验室,蚌埠 233030

作者简介:赵 皓,男,主管检验师,硕士研究生;

王保龙,男,教授,主任检验师,博士生导师,责任作者,

E-mail: wbl196555@163.com

传统观点认为中枢神经系统(central nervous system, CNS)是一个免疫豁免区, CNS抗原如髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)与免疫系统在解剖学上处于隔离状态,被称为隐蔽抗原^[1-2]。因而,长期以来一直认为CNS损伤后的自身免疫反应会加重继发性损害,不利于神经保护和神经再生^[3-4]。然而,以色列Schwartz et al^[5]研究小组却提出CNS“保护性自身免疫”学说。该学说认为CNS损伤后的自身免疫反应除具有加重继发性损伤的负面作用外,也具有神经保护和促进神经再生的积极作用,只是在自然状态下,这种作用过于微弱,被其负面作用压制而难以表现。采用一些免疫干预的手段,如用体外扩增的MBP特异性T细胞(myelin basic protein specific T cells, MBP-T)进行过继免疫则可以激发这种神经保护作用^[6]。因此,该研究拟采用MBP免疫SD大鼠,获取回流淋巴结,再通过反复刺激的方法体外扩增MBP特异的T细胞,然后采用流式细胞术检测其表型和细胞因子分泌特征。

1 材料与方法

1.1 实验动物 5只健康成年清洁级SD大鼠, 220~250 g,由蚌埠医学院实验动物中心提供。动物实

The agonist of TLR7 Gardiquimod up-regulates the expression of interleukin-15 in BxPC-3 cells

Wang Fang, Jin Rui, Li Lei, et al

(Dept of Biochemistry and Molecular Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the expression of Toll-like receptor 7 (TLR7) in pancreatic cancer BxPC-3 cells, and to explore the effect of TLR7 activation on the expression of interleukin-15 (IL-15). **Methods** BxPC-3 cells were used to analyze the expression of TLR7 by Western blot and Real-time PCR. The cells were treated with Gardiquimod (3 μ g/ml) at different times, the expression of IL-15 at mRNA level by Real-time PCR. Western blot was performed to analyze the phosphorylation level changes of phosphatidylinositol kinase serine/threonine kinase (PI3K-AKT) protein in BxPC-3 cells stimulated by TLR7 ligand Gardiquimod. **Results** Western blot and Real-time PCR results showed that compared with peripheral blood mononuclear cells (PBMC), TLR7 presented weak expression in BxPC-3 cells. Gardiquimod could increase the expression of IL-15 in BxPC-3 cells. TLR7 agonist could activate the PI3K-AKT signaling pathway. **Conclusion** Gardiquimod can up-regulate the expression of IL-15 and this effect can be associated with PI3K-AKT signaling pathway.

Key words TLR7; Gardiquimod; interleukin-15; PI3K-AKT; BxPC-3