

六味地黄丸增效小鼠黑色素瘤 HSV-tk/GCV 自杀基因疗法的免疫机制

张文静, 赵婷秀, 王惠琪, 易华, 占玉娟, 张文博, 陈佳薇, 王坤, 杜标炎(广州中医药大学基础医学院, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 明确六味地黄丸是否增强单纯疱疹病毒核糖核酸酶/更昔洛韦(HSV-tk/GCV)自杀基因疗法对小鼠黑色素瘤的免疫杀伤效果, 并对其相关机制进行探索。**方法** 采用 Western Blot 实验、免疫荧光实验检测六味地黄丸对缝隙连接蛋白 43(Cx43)表达水平及膜定位的影响; 通过荧光染料、钙黄绿素荧光传输实验检测六味地黄丸对小鼠黑色素瘤细胞 B16(B16 细胞)缝隙连接通讯(GJIC)功能的影响; PI/Hoechst 染色实验检测 CD8⁺ T 细胞对 B16 细胞的免疫杀伤效果; CD8⁺ T 细胞激活实验观察 GJIC 在六味地黄丸增强对小鼠黑色素瘤免疫杀伤中的作用。**结果** 自杀基因疗法联合六味地黄丸治疗较单独应用自杀基因疗法能更显著地抑制肿瘤生长; Western Blot 及免疫荧光实验显示六味地黄丸组 Cx43 表达明显上调, 荧光传输实验显示六味地黄丸组 B16 细胞 GJIC 功能显著增强; PI/Hoechst 染色实验显示, 六味地黄丸组 CD8⁺ T 细胞对 B16 细胞的免疫杀伤效果更加显著, 阻断 Cx43 后, 对 B16 细胞的免疫杀伤效果则被逆转, 同时 CD8⁺ T 细胞的激活也被减弱。**结论** 六味地黄丸可通过上调 B16 细胞中 Cx43 的表达, 改善 GJIC 功能, 促进肿瘤抗原的交叉提呈, 更强地激活 CD8⁺ T 细胞以增强其对肿瘤细胞的免疫杀伤效果。

关键词: 六味地黄丸; 黑色素瘤; 缝隙连接通讯功能; 自杀基因; 树突状细胞; 小鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)08-1120-09

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.08.009

Immune Mechanism of *Liuwei Dihuang Wan* to Synergize HSV-tk/GCV Suicide Gene Therapy for Melanoma in Mice

ZHANG Wenjing, ZHAO Tingxiu, WANG Huiqi, YI Hua, ZHAN Yujuan, ZHANG Wenbo, CHEN Jiawei, WANG Kun, DU Biaoan (1. School of Basic Medical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: Objective To determine whether *Liuwei Dihuang Wan* (LWDHW) can actually enhance the immune killing effect of suicide gene therapy on melanoma of mice *in vivo* and *in vitro*, and explore the related mechanisms.

Methods Western Blot and immunofluorescence assays were used to detect the effect of LWDHW on Cx43 expression level and membrane positioning. The Lucifer Yellow staining assay was used to determine the effect of LWDHW on the GJIC function of B16 cells. PI/Hoechst staining was used to measure the immune killing effect of CD8⁺ T cells on B16 melanoma cells. CD8⁺ T cell activation was determined by CD69 staining followed with flow cytometry detection. **Results** Suicide gene system combined with LWDHW treatment can inhibit tumor growth more significantly than HSV-tk/GCV system alone. Western Blot and immunofluorescence results showed that the expression of Cx43 in the LWDHW group was significantly up-regulated, and the Lucifer Yellow staining assay

收稿日期: 2021-01-19

作者简介: 张文静, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药抗肿瘤药理。Email: wenjingz2021@163.com。通信作者: 杜标炎, 男, 博士, 教授, 研究方向: 中药抗肿瘤药理。Email: dubiaoan@gzucm.edu.cn。王坤, 男, 博士, 讲师, 研究方向: 中药抗肿瘤药理。Email: wangkun@gzucm.edu.cn。
基金项目: 国家自然科学基金项目(81873146); 广州中医药大学 2020 年大学生创新创业训练计划项目(202010572002、S202010572101、202010572265)。

showed that GJIC function of B16 cells in the LWDHW group was significantly enhanced. PI/Hoechst staining showed that the immune killing effect on B16 cells in the LWDHW group was more obvious. After blocking Cx43 by Gap19-TFA, the immune killing on B16 cells was reversed and CD8⁺ T cells activation was also impaired.

Conclusion LWDHW improved the GJIC function by increasing the expression of Cx43 in B16 cells, promoting the cross-presentation of tumor antigens, thereby priming T cells more strongly to enhance the immune killing effect on melanoma cells.

Keywords: *Liuwei Dihuang Wan*; melanoma; gap junction communication function; suicide gene; dendritic cell; mice

肿瘤自杀基因疗法因其具有“旁观者效应”已被用于多种肿瘤治疗的探索。单纯疱疹病毒核苷激酶(HSV-tk)自杀基因被转导进入细胞后,可表达功能性 HSV-tk,诱导无毒的更昔洛韦(GCV)转化为有毒的 GCV-三磷酸化化合物,抑制 DNA 合成,从而导致细胞死亡^[1-2]。GCV 除可杀死 tk 阳性细胞外,还可同时对同体系中的 tk 阴性细胞造成杀伤,从而放大抗癌效应,此现象称为“旁观者效应”^[3-5]。“旁观者效应”涉及缝隙连接、免疫和细胞凋亡等机制。其旁观者的免疫机制不仅能够杀伤临近的肿瘤细胞,对远处转移的肿瘤细胞也能进行远距离的免疫杀伤^[6]。

缝隙连接蛋白(connexin, Cx)是细胞之间存在的孔道,是细胞缝隙连接通讯(gap junction intercellular communication, GJIC)的基本结构蛋白。缝隙连接(GJs)在免疫系统中扮演着重要的角色^[7],参与抗原的交叉提呈,允许小的线状多肽在相邻细胞之间扩散^[8],也是肿瘤浸润性树突状细胞(DC)获取抗原的重要方式,而 DC 则是激活初始 CD8⁺ T 细胞转变为细胞毒性 T 细胞杀伤肿瘤细胞的唯一途径。由此可知, GJIC 很可能在 DC 介导的肿瘤免疫杀伤中发挥着重要作用。然而, GJIC 缺失是许多人类肿瘤的共同特征^[9-10]。研究证实 Cx43 在黑色素瘤进展过程中会发生丢失^[11]。因此,上调 Cx43 表达水平,恢复肿瘤细胞间 GJIC 功能很可能可通过促进 DC 介导的抗原提呈来增强对黑色素瘤的杀伤作用^[12-13]。本课题组前期研究^[14-15]显示,六味地黄丸可上调黑色素瘤和肝癌细胞 Cx 表达,改善 GJIC 功能。据此推测六味地黄丸可上调小鼠黑色素瘤 Cx43 表达,改善 GJIC 功能,促进肿瘤抗原提呈,促进 T 细胞活化,从而增强免疫杀伤效应^[16-17]。故本研究通过体内外多种实验方法检测六味地黄丸对 Cx43 蛋白表达以及 GJIC 功能的影响,并探讨其增效自杀基因治疗旁观者效应

的免疫机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株及培养 小鼠黑色素瘤细胞 B16(B16 细胞)购于中国科学院细胞库;小鼠黑色素瘤-单纯疱疹病毒核苷激酶/更昔洛韦自杀基因细胞(B16-HSV-tk/GCV, B16-tk⁺)为本实验室前期构建。细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中,置于 37 ℃, 5% CO₂ 培养箱中培养至对数生长期,用胰酶消化传代培养。

1.2 动物 SPF 级 C57BL/6 小鼠,雄性,5~6 周龄,体质量 22~25 g,广州中医药大学实验动物中心,合格证号:SCXK(粤)2018-0034。饲养于广州中医药大学基础医学院(中西医结合基础实验动物中心),使用许可证号:SYXK(粤)2018-0182。实验经广州中医药大学实验动物伦理委员会审查和批准。

1.3 药物与试剂 RPMI1640 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清,美国 Gibco 公司;β-actin、Cx43 抗体,美国 CST 公司;青/链霉素双抗,美国 Hyclone 公司;CCK8,美国 Selleck 公司;六味地黄丸,北京同仁堂有限公司(国药准字 Z11021283);更昔洛韦(GCV),美国 Sigma 公司;二甲基亚砜(DMSO),广州试剂厂。荧光染料 Calcein-AM(编号: C3099)、DiI(编号: V22885),美国 Invitrogen 公司;Hoechst(编号: C1026),碧云天公司;碘化丙啶(PI)染料、CD69-FITC(编号: 557392),美国 BD 公司;CD8a-APC(编号: 155006),美国 Biolegend 公司;Gap19-TFA(编号: HY-P1136A),美国 MCE 公司。

1.4 仪器 BB150 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司);Eclipse TS100-F 型倒置显微镜(日本尼康公司);SW-CJ-1F 型超净工作台(苏州安泰设备厂);Cence L600 型电动离心机(湖南湘仪仪器有限公司);GeneSpeed 1730R 型高速离心机(上海基因科技

有限公司); LSM800 激光共聚焦显微镜、Zeiss Axio Observer 3 荧光显微镜(德国蔡司公司); GIS 数码凝胶图像处理系统(上海天能科技有限公司); EnSpire 多功能酶标仪(新加坡 PerkinElmer 公司)。

1.5 六味地黄丸水提物的制备 参照本课题组前期制备方法^[18], 将六味地黄丸打粉, 过筛, 称取 1 g 溶于 40 mL 双蒸水中, 振荡混匀, 超声 30 min; 以离心半径 14 cm、4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收集上清液。重复上述步骤 1 次, 收集 2 次的上清液。旋转蒸发, 通风橱悬干过夜, 于 -80 ℃ 保存。使用时, 在超净工作台内用超纯水进行溶解, 配置成 20 mg·mL⁻¹ 的母液, 过滤(0.22 μm)后 PCR 管分装并于 -20 ℃ 冰箱保存。

1.6 六味地黄丸在体对自杀基因疗法旁观者效应的影响 实验分 4 组, 分别为对照组、六味地黄丸(LWDHW)组、GCV 组、GCV 联合 LWDHW 组。根据预试验确定 GCV 小鼠腹腔注射用量为 125 mg·kg⁻¹, 六味地黄丸的灌胃剂量为 300 mg·kg⁻¹。取对数生长期 B16 细胞、B16-tk⁺ 细胞, 0.25% 胰酶消化后, 离心, 用 PBS 重悬后调整细胞密度。小鼠右前肢腋下接种 B16-tk⁺ 细胞悬液 0.1 mL(每毫升 2×10⁶ 个细胞), 左前肢腋下接种 B16 细胞悬液 0.1 mL(每毫升 2×10⁶ 个细胞), 接种第 2 天开始灌胃六味地黄丸, 成瘤当天开始注射 GCV 溶液, 每天 1 次。GCV 注射至第 16 天结束给药, 观察肿瘤的体积和质量。

1.7 六味地黄丸在体对 B16 细胞 Cx43 表达的影响 瘤体组织剪碎放入 1 mL 含 1% 蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液中, 置于冰上, 组织研磨棒研磨至无肉眼可见的黑色素细胞后转移至 1.5 mL EP 管中, 1 mL 针管反复抽打彻底裂解释放蛋白。于 4 ℃, 以离心半径 8.43 cm、12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 吸取上清至新的 1.5 mL EP 管, BCA 蛋白定量后, 进行 Western Blot 检测。

1.8 凋亡细胞染色检测六味地黄丸对自杀基因疗法杀伤效应的影响 B16-tk⁺ 细胞在六味地黄丸(0、100、400 μg·mL⁻¹)作用 48 h 后, 用 GCV(30 μg·mL⁻¹)杀伤, 与骨髓来源的半成熟 DC 细胞、脾脏 CD8⁺ T 细胞及 B16 细胞共培养。48 h 后 PBS 洗掉漂浮细胞, 用 Hoechst、PI 染色, 培养箱孵育 10 min, 清洗细胞后, 倒置荧光显微镜下观察。每组随机拍摄 7 个视野, 并进行细胞计数。

1.9 Western Blot 检测六味地黄丸对 B16 细胞 Cx43 的作用 B16 细胞经六味地黄丸(1、1.56、6.25、

25、100、400 μg·mL⁻¹)处理 48 h, PBS 洗 3 次, 使用 RIPA 裂解液充分裂解 15 min, 将细胞转移至 1.5 mL EP 管中。于 4 ℃, 以离心半径 8.43 cm、12 000 r·min⁻¹, 离心 10 min, 吸取上清液即为细胞的总蛋白, 使用 BCA 蛋白定量法进行蛋白浓度测定, 并调整为同一浓度。每孔上样 20 μL, 二抗孵育后, 洗膜, 滴加显影液进行显影拍摄, 以条带灰度值与 β-action 的相对比值表示蛋白的表达水平。

1.10 间接免疫荧光检测六味地黄丸对 B16 细胞 Cx43 的作用 B16 细胞以每孔 3×10⁴ 个接种于细胞爬片, 设对照组, 六味地黄丸低浓度组(100 μg·mL⁻¹)、高浓度组(400 μg·mL⁻¹), 48 h 后, 4% 多聚甲醛在室温条件下固定 10 min, PBS 洗 3 次, 封闭液室温封闭 6 h, 使用 Cx43 抗体(1:150 稀释), 在湿盒内 4 ℃ 孵育过夜。第 2 天进行荧光二抗(1:1 000 稀释), 室温孵育 1 h, 滴加封片剂封片; 使用 LSM800 共聚焦激光扫描显微镜(×630)进行观察并采集图片。每组样本随机取 6 个高倍视野, 采用盲法拍摄图像并进行评分。

1.11 刮擦/染料转移实验 B16 细胞用胰酶消化后, 在 35 mm 玻璃底培养皿中培养, 获得融合单层(1.5×10⁵)细胞。六味地黄丸(0、100、400 μg·mL⁻¹)处理 48 h, PBS 洗涤后, 用刀片刮擦 3 条裂痕, 洗去脱落细胞, 将贴壁细胞暴露在含有荧光黄(2 mmol·L⁻¹)的染料溶液中, 15 min 后弃除染液。因刮擦而受伤的细胞被荧光黄染色, 染色的细胞通过 Cx 通道将染料转移到相邻细胞, 清洗后, 在共聚焦激光显微镜(×100)下检查染料转移情况。

1.12 荧光示踪法检测 GJIC 功能 设对照组、六味地黄丸低(100 μg·mL⁻¹)、六味地黄丸高(400 μg·mL⁻¹)浓度组的 B16 细胞作为供体细胞; 另设未处理的 B16 细胞作为受体细胞接种于 Confocal 小皿。48 h 后, 供体细胞用 Calcein-AM(5 μmol·L⁻¹)、DiI(5 μmol·L⁻¹)共孵育 30 min。将供体细胞接种于完全融合的受体细胞, 比例为 1:100, 继续培养 12 h 形成稳定的缝隙连接, 以 4% 多聚甲酸固定 20 min, 用激光共聚焦显微镜(×400)进行拍照。

1.13 Cx43 抑制剂反证实验 B16-tk⁺ 细胞分别用六味地黄丸(0、100、400 μg·mL⁻¹)处理 48 h, 用 GCV(30 μg·mL⁻¹)杀伤。选择六味地黄丸(100、400 μg·mL⁻¹)处理过的细胞各 1 个孔, 加入 Cx43 抑制剂 Gap19-TFA(250 μmol·L⁻¹)。用培养箱孵育 4 h 后与骨髓来源的 DC 细胞(提前用 500 ng·mL⁻¹ LPS 诱导 24 h)、脾

脏 CD8⁺ T 细胞进行共培养, 24 h 后收集悬浮细胞与 B16 细胞共培养, 48 h 后 PBS 洗掉漂浮细胞, 用 Hoechst、PI 染色, 培养箱孵育 10 min, 清洗细胞后, 倒置荧光显微镜下观察。每组随机拍摄 7 个视野, 并对荧光细胞进行计数。

1.14 CD8⁺ T 细胞激活实验 实验方法同“1.13”项下。悬浮细胞与 B16 细胞共培养 48 h, 收集悬浮细胞进行流式抗体染色(CD8a-PE、CD69-FITC), 用 BD Fortessa 流式细胞仪进行分析检测。

1.15 统计学处理方法 使用 SPSS 23.0 统计软件进行统计学分析, 数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间均数比较采用 One-way ANOVA 方法, 两组间比较采用两个独立样本均数的 *t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 六味地黄丸对自杀基因治疗的增效作用 结果见图 1。肉眼观察可见六味地黄丸联合 GCV 组肿瘤明显小于对照组及六味地黄丸、GCV 组。从成瘤开始每天测量肿瘤体积大小, 结果显示六味地黄丸联合 GCV 组肿瘤生长速度最为缓慢, 见图 2。六味地黄丸联合 GCV 组肿瘤质量明显低于对照组、GCV 组($P < 0.01$), 见图 3。以上结果表明六味地黄丸能够增强在体小鼠黑色素瘤自杀基因疗法的旁杀伤效应。

2.2 六味地黄丸在体对 B16 细胞 Cx43 蛋白表达的影响 结果见图 4。与对照组相比, 六味地黄丸联合 GCV 组 B16 细胞高表达 Cx43 蛋白($P < 0.05$), 提示六味地黄丸可能通过上调 Cx43 蛋白的表达增强 GJIC 功能, 从而增加 DC 细胞对肿瘤抗原的摄取及递呈, 以激活更强的杀伤性 T 细胞反应。

2.3 PI/HoeChst 染色实验检测六味地黄丸对 T 细胞杀伤 B16 细胞的影响 结果见图 5。与对照组比较, 六味地黄丸组 PI 阳性细胞比例明显升高($P < 0.001$), 提示六味地黄丸可增强 T 细胞对肿瘤细胞的免疫杀

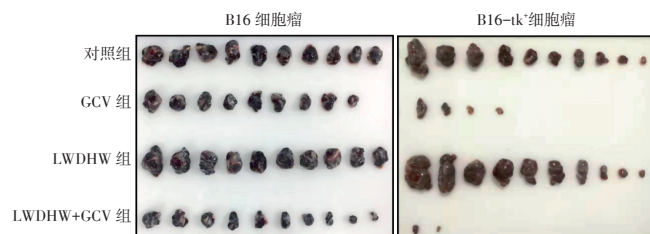


图 1 六味地黄丸(LWDHW)联合自杀基因治疗对小鼠黑色素瘤生长的影响

Figure 1 Effects of LWDHW combined with suicide gene therapy on the growth of melanoma in mice

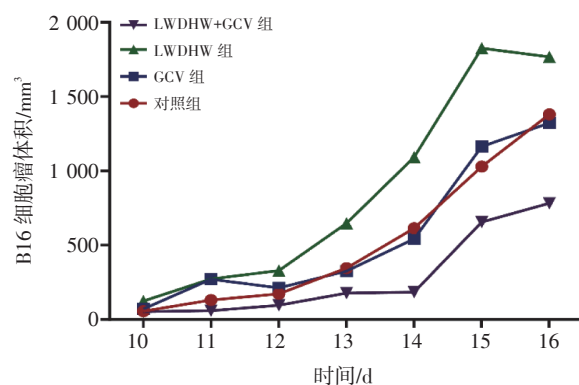
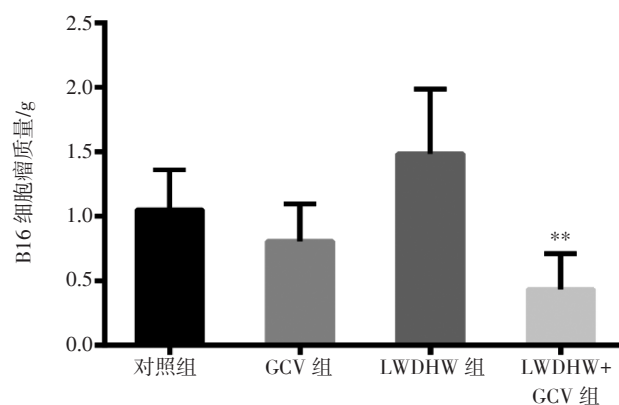


图 2 六味地黄丸(LWDHW)联合自杀基因治疗对小鼠黑色素瘤体积的影响($n=10$)

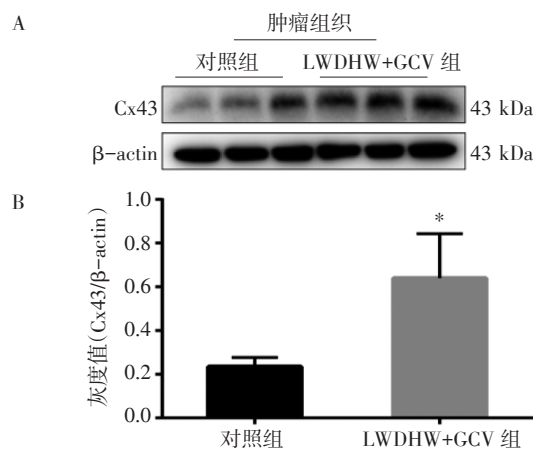
Figure 2 Effect of LWDHW combined with suicide gene therapy on tumor volume of melanoma in mice($n=10$)



注: GCV 组: 更昔洛韦组。与对照组和 GCV 组比较, ** $P < 0.01$

图 3 六味地黄丸(LWDHW)联合自杀基因治疗对肿瘤质量的影响($n=10$)

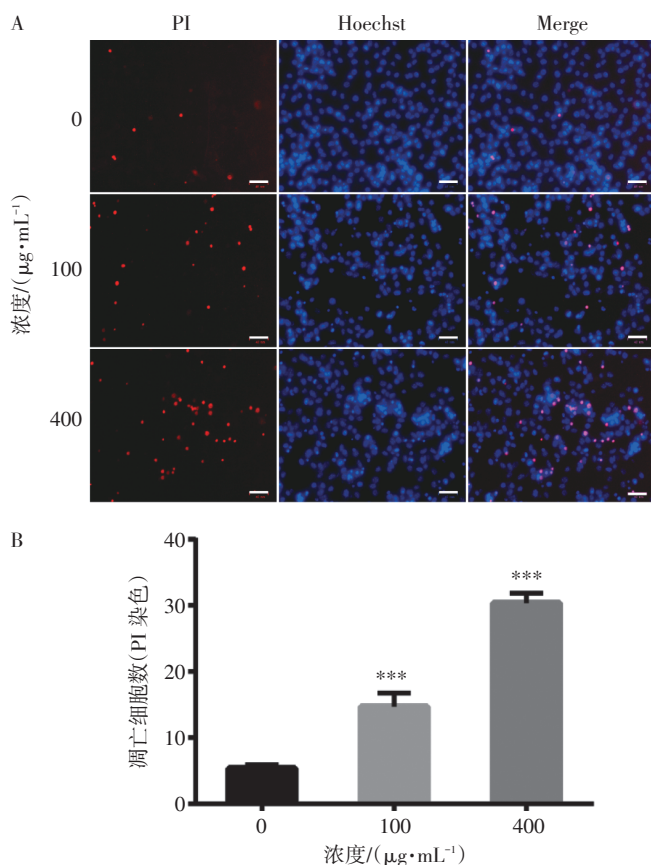
Figure 3 Effect of LWDHW combined with suicide gene therapy on tumor weight of melanoma in mice($n=10$)



注: GCV 组: 更昔洛韦组。与对照组比较, * $P < 0.05$

图 4 六味地黄丸(LWDHW)在体对 B16 细胞 Cx43 蛋白表达的影响($n=3$)

Figure 4 Effect of LWDHW on Cx43 expression of B16 melanoma cells in mice($n=3$)



注：红色荧光为 PI 阳性细胞；蓝色荧光为 Hoechst 蓝染的细胞核；Merge 为合并图。与对照组(0 µg·mL⁻¹)比较，*** $P < 0.001$

图 5 六味地黄丸体外对 T 细胞杀伤 B16 黑色素瘤细胞的影响($n=7$)

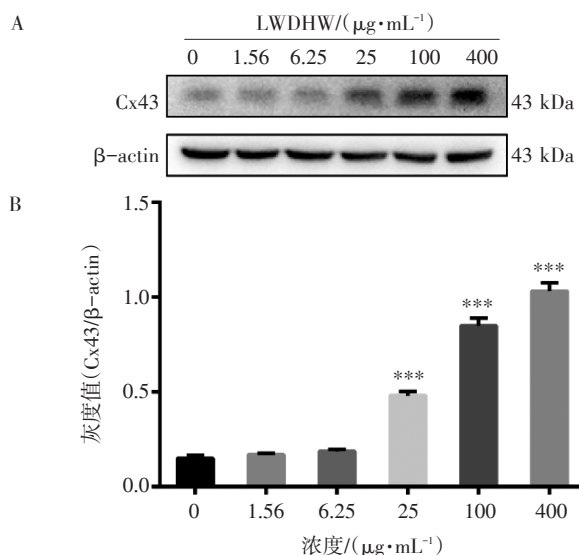
Figure 5 Effect of LWDHW on T cell killing B16 melanoma cells *in vitro* ($n=7$)

伤作用。鉴于六味地黄丸对 Cx43 蛋白表达的影响，初步考虑其免疫杀伤增强的机制为 GJIC 功能的增强促进 DC 细胞对肿瘤抗原的交叉提呈，GJIC 是 DC 细胞获取抗原的重要途径，GJIC 功能的增强使 DC 细胞获取到更多的抗原，从而激活更强的 T 细胞杀伤反应。

2.4 体外检测六味地黄丸对 B16 细胞 Cx43 表达的影响

2.4.1 Western Blot 法检测六味地黄丸对 Cx43 的影响 结果见图 6。六味地黄丸处理后，B16 细胞中 Cx43 表达水平明显升高($P < 0.001$)，并呈良好的浓度依赖性，提示六味地黄丸可以通过上调 Cx43 表达来恢复 B16 细胞的 GJIC 功能。

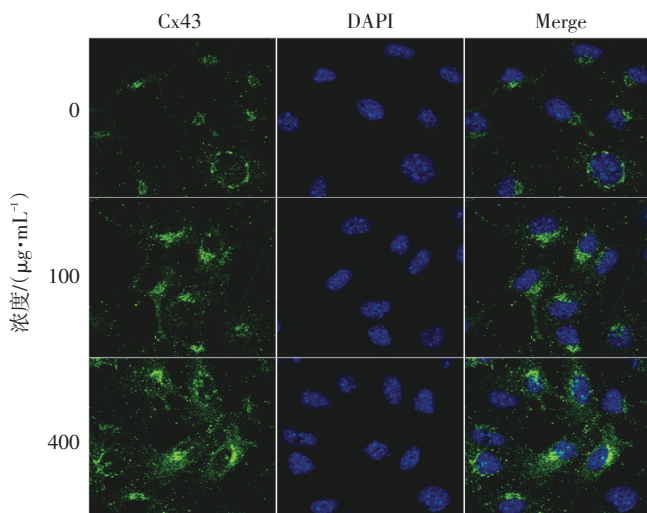
2.4.2 免疫荧光实验检测六味地黄丸对 Cx43 细胞定位的影响 结果见图 7。对照组 B16 细胞 Cx43 的表达量较少，且多靠近细胞核；六味地黄丸组 B16 细胞随着浓度的提高，Cx43 在细胞胞膜上显示出浓



注：与对照组(0 µg·mL⁻¹)比较，*** $P < 0.001$

图 6 六味地黄丸(LWDHW)对 B16 细胞 Cx43 表达的影响($n=3$)

Figure 6 Effect of LWDHW on Cx43 expression of B16 melanoma cells ($n=3$)



注：绿色荧光为 Cx43 蛋白；蓝色荧光为 DAPI 蓝染的细胞核；Merge 为合并图

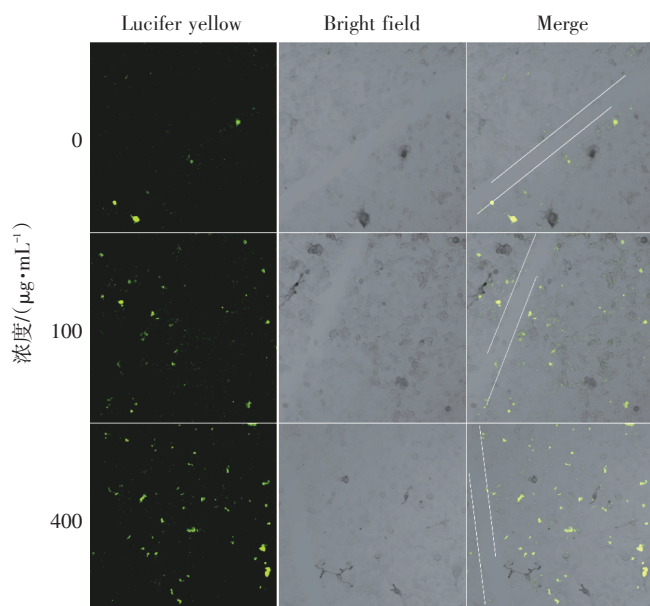
图 7 六味地黄丸对 B16 细胞中 Cx43 定位的影响

Figure 7 Effect of LWDHW on Cx43 Localization in B16 melanoma Cells

度依赖性的表达上调，表明六味地黄丸可上调 Cx43 并促使其在细胞膜的定位。

2.5 六味地黄丸对 B16 细胞 GJIC 功能的影响

2.5.1 荧光黄染色实验 结果见图 8。荧光黄是一种可通过缝隙连接进行传输的染料，对照组擦痕边缘只有很少量的荧光传输；六味地黄丸各组在细胞周围的荧光传输量较多，且有浓度依赖性的增强，表明六味地黄丸不仅上调了 Cx43 表达，并且增强了 GJIC 功能。



注: Lucifer yellow 为荧光黄染料从受伤细胞扩散到周围细胞; Bright field 为明场下拍摄视野; Merge 为合并图

图 8 六味地黄丸对 B16 细胞 GJIC 功能的影响(荧光黄染色)

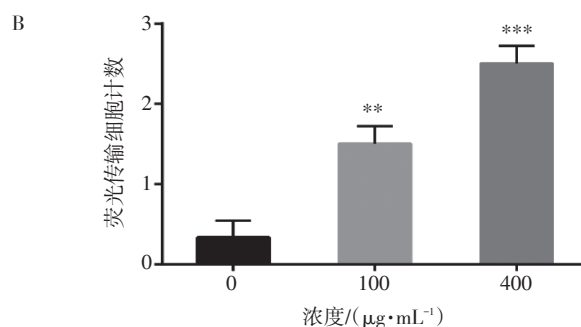
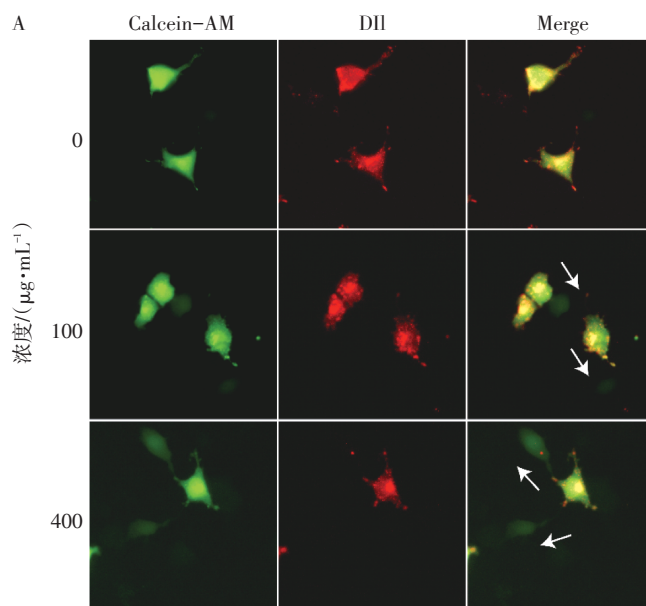
Figure 8 Effect of LWDHW on GJIC function of B16 melanoma cells(Lucifer yellow staining experiment)

2.5.2 钙黄绿素荧光传输实验 Calcein-AM 是一种可以通过缝隙连接进行传输的染料,而 DiI 不能够通过缝隙连接进行传输,用此 2 种染料同时染 B16 细胞来检测 GJIC 功能,结果见图 9。对照组的供体细胞在受体细胞周围进行微弱的荧光传输,六味地黄丸组供体细胞在受体细胞中则可通过缝隙连接进行较强的荧光传输,证明六味地黄丸可上调 B16 细胞中 Cx43 介导的 GJIC 功能。

2.6 阻断 GJIC 功能对六味地黄丸增强自杀基因疗法免疫杀伤效应的影响 结果见图 10。荧光显微镜观察检测显示,对照组 T 淋巴细胞对 B16 杀伤很微弱;六味地黄丸组的凋亡细胞则明显增多, T 细胞杀伤效应明显增强;在使用 Cx43 抑制剂 Gap19-TFA 后,六味地黄丸组 T 细胞杀伤效应明显减弱,表明六味地黄丸可通过改善 GJIC 功能,激活旁杀伤效应的免疫机制,从而增强免疫杀伤效应,其具体机制很可能是通过增强 GJIC 功能来促进 DC 细胞对肿瘤抗原的获取,从而启动更强的 T 细胞杀伤反应。

2.7 流式细胞术检测六味地黄丸对 CD8⁺ T 细胞活化的影响

2.7.1 六味地黄丸对 CD8⁺ T 细胞活化的影响 结果见图 11。与对照组比较,六味地黄丸组的 CD8⁺ T 细胞



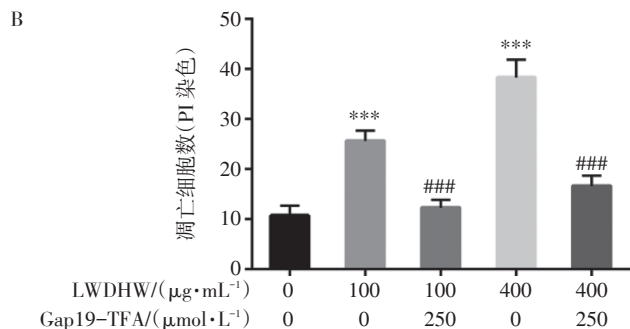
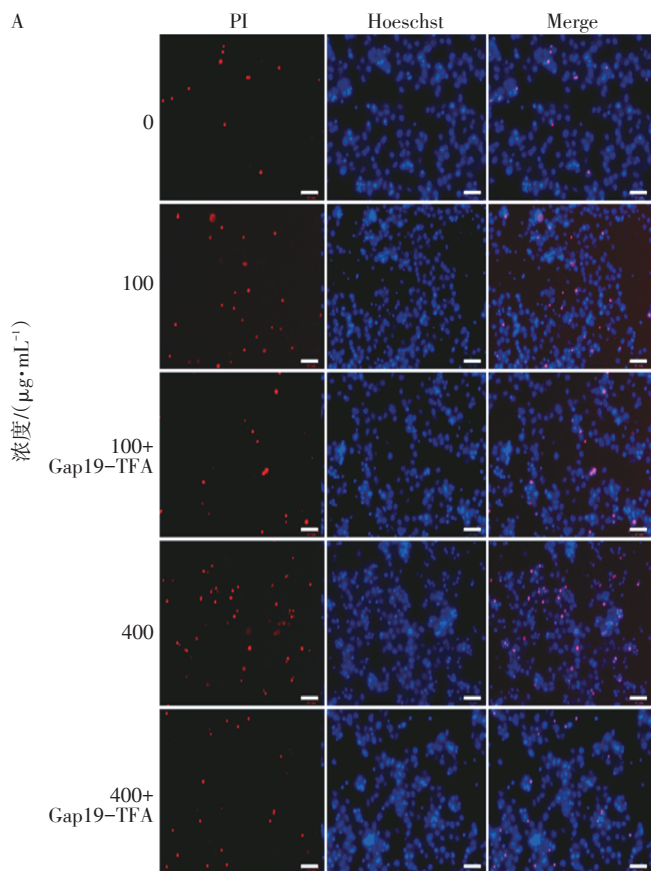
注: 绿色荧光为 Calcein-AM 染色; 红色荧光为 DiI 染色; Merge 为合并图。与对照组(0 μg·mL⁻¹)比较, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001

图 9 六味地黄丸对 B16 细胞 GJIC 功能的影响(钙黄绿素/DiI 染色, *n*=7)

Figure 9 Effect of LWDHW on GJIC function of B16 melanoma cells(Calcein-AM/DiI staining experiment, *n*=7)

CD69 荧光强度增强(*P* < 0.001)。CD69 是 CD8⁺ T 细胞活化的细胞表面标志物,其荧光强度增强表示 CD8⁺ T 细胞活化程度升高。该结果表明当用六味地黄丸处理过的 B16-tk⁺细胞提供抗原时,可以促进 T 淋巴细胞的活化,这很可能是由于六味地黄丸上调了 Cx43 介导的 GJIC 功能,从而增加了 DC 细胞对肿瘤抗原的获取所致。

2.7.2 阻断 GJIC 功能对六味地黄丸促进 CD8⁺ T 细胞活化的影响 结果见图 12。与对照组比较,六味地黄丸组的 CD8⁺ T 细胞 CD69-FITC 荧光强度增强(*P* < 0.001),使用 Cx43 抑制剂 Gap19-TFA 阻断 GJIC 后, CD69-FITC 荧光强度明显减弱(*P* < 0.001),表明六味地黄丸可通过上调 Cx43 介导的 GJIC 功能促进 DC 细胞对 CD8⁺ T 细胞的活化。



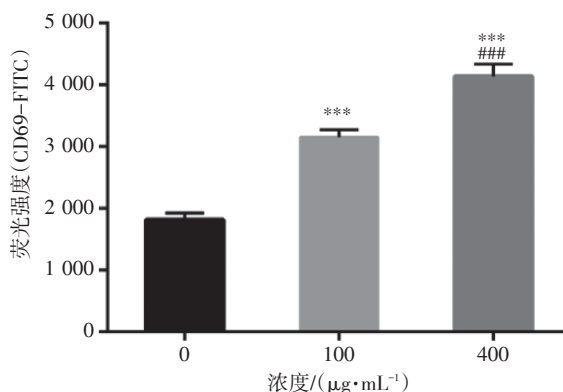
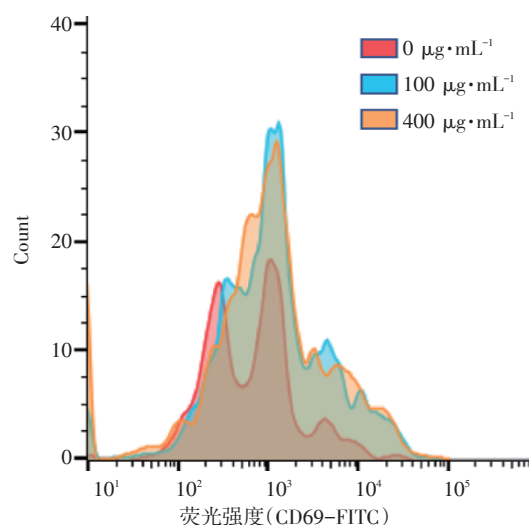
注：红色荧光为 PI 红染的凋亡细胞；蓝色荧光为 Hoeschst 蓝染的细胞核；Merge 为合并图。与对照组比较，*** $P<0.001$ ；与相同浓度 LWDHW 组比较，### $P<0.001$

图 10 六味地黄丸(LWDHW)通过上调 GJIC 增强对 B16 细胞的免疫杀伤作用($n=7$)

Figure 10 LWDHW enhanced the immune killing effect of B16 melanoma cells by up-regulating GJIC function($n=7$)

3 讨论

黑色素瘤在皮肤恶性肿瘤中约占 3%，其发病率在世界范围内呈上升趋势^[19-20]。多数患者发现黑色素瘤时已为中晚期，传统的手术，放、化疗等治疗效果不佳，且易复发，寻求新的治疗方法具有重要意义。自杀基因疗法被证明是安全有效的新的肿瘤治疗方法^[21]，但由于体内转染效率较低，单纯自杀基因



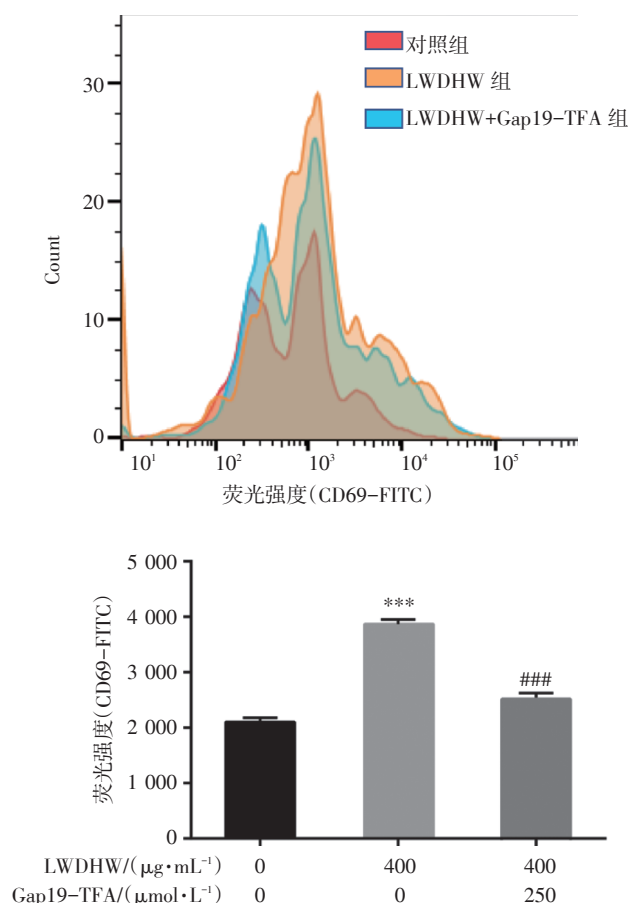
注：红色为对照组；蓝色、橙色分别为高、低浓度的 LWDHW 组(100、400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)；与对照组比较，*** $P<0.001$ ；与低浓度 LWDHW 组比较，### $P<0.001$

图 11 六味地黄丸(LWDHW)对 CD8^+ T 细胞活化的影响($n=3$)

Figure 11 Effect of LWDHW on activation of CD8^+ T cells($n=3$)

治疗难以达到完全清除肿瘤的目的。已有的研究表明联合治疗是增强自杀基因治疗效果的有效方法^[22]。中药复方具有广泛的药理效应，且具有多靶点的作用特点，与自杀基因疗法的旁观者效应的多重机制十分吻合^[23-25]。根据中医久病及肾理论及肿瘤患者的临床表现，肾阴虚证是晚期恶性肿瘤的病理基础之一。六味地黄丸是滋阴补肾经典名方，前期研究^[13,26]结果显示，六味地黄丸能增强自杀基因疗法的治疗效果，同时能促进缝隙连接蛋白表达及增强缝隙连接通讯功能。缝隙连接(GJs)在免疫系统中扮演着重要的角色，参与抗原的交叉提呈。凋亡细胞产生的特异性抗原肽可以通过 GJs 传递到邻近的 DC 细胞，通过交叉递呈，激活 CD8^+ T 细胞，引起免疫杀伤^[27-29]。

本研究采用小鼠黑色素瘤自杀基因系统(B16-



注：红色为对照组；橙色为 LWDHW 组；蓝色为 LWDHW 联合 Cx43 抑制剂组。与对照组比较，*** $P < 0.001$ ；与 LWDHW 组比较，### $P < 0.001$

图 12 六味地黄丸(LWDHW)通过上调 GJIC 功能促进 CD8⁺ T 细胞的活性($n=3$)

Figure 12 LWDHW promoted the activation of CD8⁺ T cells by up-regulating GJIC function($n=3$)

HSV-tk/GCV)移植瘤模型，于小鼠双侧腋下移植黑色素瘤(左侧为 B16-tk⁺细胞，右侧为 B16 细胞)，以更昔洛韦(GCV)杀伤 B16-tk⁺细胞提供肿瘤抗原肽，监测右侧 B16 细胞瘤生长情况，结果发现六味地黄丸联合 GCV 能够增强自杀基因旁观者效应。通过体外 DC 细胞、CD8⁺ T 细胞与 B16 细胞共培养实验发现六味地黄丸的确能够增强其免疫杀伤效应；进一步用蛋白印迹、免疫荧光、染料传输实验证明了六味地黄丸能够通过上调 B16 细胞 Cx43 表达水平，增强其 GJIC 功能，故推测其增效作用可能与 GJIC 功能介导的肿瘤抗原交叉提呈相关。继而通过 Cx43 抑制剂反证实验及 CD8⁺ T 细胞激活检测实验明确了六味地黄丸确实可以通过上调 GJIC 来增强 CD8⁺ T 细胞的活化，从而发挥更强的免疫杀伤作用。综上所述，六

味地黄丸通过上调 Cx43，增强了 B16 细胞的 GJIC 功能，促进了 DC 细胞对肿瘤抗原的交叉提呈，触发了更强的 T 细胞杀伤反应，从而达到了对黑色素瘤的免疫杀伤增强效果。

参考文献：

- [1] MURTY S, LABANIEH L, MURTY T, et al. PET reporter gene imaging and Ganciclovir-Mediated ablation of chimeric antigen receptor T cells in solid tumors[J]. Cancer Research, 2020, 80(21): 4731-4740.
- [2] XIAO J, ZHANG G, LI B, et al. Dioscin augments HSV-tk-mediated suicide gene therapy for melanoma by promoting connexin-based intercellular communication[J]. Oncotarget, 2017, 8(1): 798.
- [3] FONDELLO C, AGNETTI L, VILLAVARDE M S, et al. The combination of bleomycin with suicide or interferon- β gene transfer is able to efficiently eliminate human melanoma tumor initiating cells[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2016, 83: 290-301.
- [4] ROSSI U A, GIL-CARDEZA M L, VILLAVARDE M S, et al. Interferon- β gene transfer induces a strong cytotoxic bystander effect on melanoma cells[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2015, 72: 44-51.
- [5] AL HOSSAIN J, YSTAAS L, TALASIL K, et al. P08. 42 Long-term treatment with Valganciclovir improves lentiviral suicide gene therapy for glioblastoma[J]. Neuro-Oncology, 2017, 19(Suppl 3): 63.
- [6] KURIYAMA S, TSUJINOUE H, YOSHIJI H. Immune response to suicide gene therapy[J]. Methods Mol Med, 2004, 90: 353-369.
- [7] Neijssen J, Herberts C, Drijfhout J W, et al. Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions[J]. Nature, 2005, 434: 83-88.
- [8] KING T J, BERTRAM J S. Connexins as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2005, 1719(1/2): 146-160.
- [9] MESNIL M, CRESPIEN S, AVANZO J L, et al. Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2005, 1719(1/2): 125-145.
- [10] HAASS N K, SMAILEY K S, HERLYN M. The role of altered cell-cell communication in melanoma progression[J]. Journal of molecular histology, 2004, 35(3): 309-318.
- [11] 纪玉婷, 杨燕, 郑荣生, 等. 慢病毒介导稳定高表达Cx32的Huh7细胞系建立及其对细胞增殖的影响[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(2): 284-289.
- [12] GEORGIKOU C, YIN L, GLADKICH J, et al. Inhibition of miR30a-3p by sulforaphane enhances gap junction intercellular communication in pancreatic cancer[J]. Cancer Letters, 2020, 469: 238-245.
- [13] 易华, 王坤, 邹一丹, 等. 六味地黄丸调控肝癌 CBRH7919 细胞

- Cx43 表达的体外研究[J]. 广州中医药大学学报, 2017, 34(06): 872-877.
- [14] 张小贺. 六味地黄丸对恶性黑色素瘤细胞 Cx 表达及 GJIC 的影响[D]. 广州: 广州中医药大学, 2008.
- [15] ELGUETA R, TOBAR J A, SHOJI K F, et al. Gap junctions at the dendritic cell-T cell interface are key elements for antigen-dependent T cell activation[J]. *The Journal of Immunology*, 2009, 183(1): 277-84.
- [16] MENDOZA-NARANJO A, BOUMA G, PEREDA C, et al. Functional gap junctions accumulate at the immunological synapse and contribute to T cell activation[J]. *The Journal of Immunology*, 2011, 187(6): 3121-3132.
- [17] TITTARELLI A, MENDOZA-NARANJO A, FARÍAS M, et al. Gap junction intercellular communications regulate NK cell activation and modulate NK cytotoxic capacity[J]. *The Journal of Immunology*, 2014, 192(3): 1313-1319.
- [18] 赵婷秀, 曹迪, 茆文莉, 等. HPLC-QTOF-MS分析六味地黄丸不同部位的化学成分[J]. *中药新药与临床药理*, 2018, 29 (4): 489-496.
- [19] ERIKSSON H, FROHM N M, JÄRÅS J, et al. Prognostic factors in localized invasive primary cutaneous malignant melanoma: results of a large population-based study[J]. *British Journal of Dermatology*, 2015, 172(1): 175-186.
- [20] CHE G, HUANG B, XIE Z, et al. Trends in incidence and survival in patients with melanoma, 1974- 2013[J]. *American Journal of Cancer Research*, 2019, 9(7): 1396.
- [21] MAURY S, ROSENZWAJG M, REDJOUL R, et al. Lymphodepletion followed by infusion of suicide genetransduced donor lymphocytes to safely enhance their antitumor effect: a phase I/II study[J]. *Leukemia*, 2014, 28(12): 2406-2410.
- [22] PRADOS J. How is gene transfection able to improve current chemotherapy? the role of combined therapy in cancer treatment[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2012, 19(12): 1870-1888.
- [23] KLAMMER H, MLADENOV E, LI F, et al. Bystander effects as manifestation of intercellular communication of DNA damage and of the cellular oxidative status[J]. *Cancer letters*, 2015, 356(1): 58-71.
- [24] MENEZES M E, SHEN X N, DAS S K, et al. MDA-7/IL-24 functions as a tumor suppressor gene in vivo in transgenic mouse models of breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2015, 6 (35): 36928-36942.
- [25] ROBE P A, NGUYEN KHAC M, JOLOIS O, et al. Dexamethasone inhibits the HSV-tk/ganciclovir bystander effect in malignant glioma cells[J]. *BMC Cancer*, 2005, 5: 32.
- [26] 易华, 苏俊芳, 李雪, 等. 基于Cx32探讨六味地黄丸增效自杀基因抗肝癌的缝隙连接机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(1): 76-81.
- [27] KISZNER G, BALLA P, WICHMANN B, et al. Exploring differential connexin expression across melanocytic tumor progression involving the tumor microenvironment[J]. *Cancers*, 2019, 11(2): 165.
- [28] GLEISNER M A, NAVARRETE M, HOFMANN F, et al. Mind the gaps in tumor immunity: Impact of connexin-mediated intercellular connections[J]. *Frontiers in immunology*, 2017, 8: 1067.
- [39] HOFMANN F, NAVARRETE M, ÁLVAREZ J, et al. Cx43-gap junctions accumulate at the cytotoxic immunological synapse enabling cytotoxic T lymphocyte melanoma cell killing[J]. *International journal of molecular sciences*. 2019, 20(18): 4509.

(编辑: 梁进权)