

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.09.012

· 基础研究 ·

萝卜硫素通过 p-mTOR/p-S6 信号通路增强 CD8⁺ 记忆细胞前体细胞的分化

李红^{ab}, 张震^{ba}, 周斌^b, 吕全军^a, 张毅^b (郑州大学 a. 公共卫生学院; b. 第一附属医院生物细胞治疗中心, 河南郑州 450052)

[摘要] **目的:** 检测萝卜硫素(sulforaphane, SFN)对 CD8⁺ T 细胞分化、表型及胞内因子分泌的影响并探讨其可能的调控机制。**方法:** 在体外培养实验中, 按照 SFN 处理的剂量分为对照(0 μmol/L)组、SFN 10 μmol/L 组、SFN 20 μmol/L 组。采用流式细胞术检测 SFN 对 CD8⁺ T 细胞分化、表型及胞内因子分泌的影响以及 mTOR siRNA 对 CD8⁺ T 细胞 CD127 和 LKRG1 表达的影响; 采用 qRT-PCR 检测抗凋亡因子 Bcl-2 和 Bcl-6 的表达水平, Annexin-V/PI 双染法检测 SFN 对 CD8⁺ T 细胞凋亡的影响, Western blotting 检测信号通路蛋白 p-mTOR、p-S6 以及内参 β-actin 蛋白的表达。**结果:** SFN 促进 CD8⁺ 记忆细胞前体细胞的形成、显著降低 CD8⁺ T 细胞 PD-1 和 Tim-3 的表达水平($P < 0.01$)。同时, SFN 处理后抗凋亡基因 Bcl-2 和 Bcl-6 的表达显著增加、CD8⁺ T 细胞的凋亡受到显著抑制, p-mTOR 和 p-S6 蛋白表达水平也显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。此外, SFN 能够增加促炎性细胞因子 IL-2、IFN-γ、TNF-α 的分泌($P < 0.05$)。mTOR siRNA 能够显著增加 CD127 表达及降低 LKRG1 表达水平(均 $P < 0.01$)。**结论:** SFN 可能通过抑制 p-mTOR 信号通路促进 CD8⁺ 记忆细胞前体细胞的形成, 获得更多年轻化的 T 细胞, 为临床免疫细胞治疗提供新的思路。

[关键词] 萝卜硫素; p-mTOR/p-S6 信号通路; CD8⁺ 记忆细胞; 前体细胞

[中图分类号] R392.33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)09-0920-08

Sulforaphane enhances differentiation of memory precursor CD8⁺ cells by mTOR/p-S6 signaling pathway

LI Hong^{ab}, ZHANG Zhen^{ba}, ZHOU Bin^b, LYU QuanJun^a, ZHANG Yi^b (a. College of Public Health; b. Biotherapy Center of the First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of sulforaphane (SFN) on CD8⁺ T cells differentiation, phenotype and the secretion of intracellular cytokines, as well as to study the underlying molecular mechanism. **Methods:** In the *in vitro* culture experiment, the cells were categorized into control group, SNF 10 μmol/L group and SNF 20 μmol/L group according to the SNF concentration. The effect of SFN treatment on CD8⁺ T cells differentiation, phenotype and cytokine secretion were detected by flow cytometry, and the effect of mTOR siRNA on the expression of CD127 and LKRG1 in CD8⁺ T cells was also detected by flow cytometry. Expression of Bcl-2 and Bcl-6 were analyzed by qRT-PCR. The effect of SFN on apoptosis of CD8⁺ T cells was examined by Annexin-V/PI staining. The protein expressions of p-mTOR, p-S6 and β-actin were detected by western blotting. **Results:** SFN significantly promoted the formation of memory precursor CD8⁺ T cells and decreased the expression level of PD-1 and Tim-3 in CD8⁺ T cells ($P < 0.01$); meanwhile, after the treatment of SFN, the expressions of anti-apoptosis genes Bcl-2 and Bcl-6 were significantly increased while the apoptosis of CD8⁺ T cells was significantly inhibited and the protein expressions of p-mTOR and p-S6 were also significantly inhibited ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Moreover, mTOR siRNA could significantly increase the expression of CD127 and decrease the expression of LKRG1 (all $P < 0.01$). **Conclusion:** Sulforaphane promotes the formation of memory precursor CD8⁺ T cells possibly by inhibiting the p-mTOR signaling pathway, and this could obtain more T cells to provide new thoughts for clinical immunotherapy.

[Key words] sulforaphane(SFN); p-mTOR/p-S6 signaling pathway; memory CD8⁺ T cell; precursor cell

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(9): 920-927. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.09.012]

[基金项目] 河南省医学科技攻关计划资助项目(No.201702018)。Project supported by the Medical Science and Technology Key Project of Henan Province (No. 201702018)

[作者简介] 李红(1971-), 女, 硕士, 主管护师, 主要从事肿瘤免疫治疗的研究, E-mail: biotherapy5625@163.com; 张震(1989-), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事肿瘤免疫治疗的研究, E-mail: zhangzhen1989@163.com; Δ为共同第一作者

[通信作者] 吕全军(LYU Quanjun, corresponding author), 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事营养与食品卫生学的研究, E-mail: lqjnutr@zzu.edu.cn; 张毅(ZHANG Yi, co-corresponding author), 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要从事肿瘤免疫治疗的研究, E-mail: yizhang@zzu.edu.cn

近年来,随着人类生活方式以及周围环境的改变,癌症已经成为威胁人类健康和生命的主要危险因素。据国家癌症中心2017年最新中国肿瘤现状和趋势报告,中国癌症发病率约占全球的22%,发病人数全球第一;中国癌症死亡率约占全球27%,位居全球癌症死亡率的29位,高出全球平均水平17%;癌症已经成为导致死亡的第二大原因,仅次于心脑血管病。目前,药物治疗在癌症治疗中占据着重要的地位,但是抗癌药物都有毒性作用。因此,从天然产物中寻找安全、有效、低毒的抗癌药物已成为肿瘤治疗研究的热点。萝卜硫素(sulforaphane, SFN)是一种异硫氰酸酯类化合物^[1]。研究^[2-7]表明, SFN不仅有预防癌症的作用,同时具有抑制肿瘤生长、抗转移、抗氧化等作用。有研究^[8-11]显示, SFN与机体免疫有密切的关系,然而SFN对T细胞的分化及功能方面的影响尚不清楚。CD8⁺T细胞在机体免疫反应中扮演着重要的角色,急性感染或抗原刺激后初始状态的CD8⁺T细胞分化为效应性CD8⁺T细胞。随着抗原的清除,最终仅有5%~10%的效应性CD8⁺T细胞进一步分化为具有自我更新能力并长期生存的记忆性CD8⁺T细胞,以维持免疫内环境的稳态并在再次感染时发挥作用^[12]。近年来,过继性细胞免疫治疗逐渐成为肿瘤治疗的重要方法之一,并在临床研究及临床治疗中展示出显著的疗效^[13-14]。体外培养的免疫细胞大部分处于终末状态,限制了免疫治疗的疗效。如何获取分化程度低、抗肿瘤能力强的T细胞用于免疫治疗是目前研究的热点。本研究通过探讨SFN对T细胞分化、凋亡和胞内因子分泌的影响,推测SFN可能通过抑制p-mTOR信号通路从而促进CD8⁺记忆细胞前体细胞的形成,获得更多年轻化的T细胞,为临床免疫细胞治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂

DMEM高糖培养基、RPMI1640培养基购自美国Hyclone公司,胎牛血清购自美国Gibco公司,IL-2购自北京双鹭药业有限公司, SFN购自Sigma公司, Human CD8 microbeads和磁分选缓冲液(MACs Buffer)购自德国美天旎公司,淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品有限公司, Annexin-V binding buffer购自美国Biologend公司,免疫组化检测用一抗购自美国CST公司,二抗购自北京中杉金桥公司,流式抗体均购自美国Biologend公司。

1.2 提取健康人外周血单核细胞

无菌条件下采集健康供者外周血10 ml,采用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释至30 ml;另取15 ml淋巴细胞分离液至50 ml离心管中,用无菌移液管吸取血液混

合液,沿管壁缓慢叠加于分离液面上,2 500×g离心25 min;离心结束后小心吸取上、中层界面处白色云雾层,移入新的50 ml无菌离心管,加入PBS至50 ml离心管,洗涤PBMCs 2遍,收集PBMCs。

1.3 细胞免疫磁珠分选

PBMCs用10 ml磁分选缓冲液重悬、吹打、混匀,取10 ml细胞+10 ml锥虫蓝,显微镜下计数;1 500×g离心5 min;弃上清,按照 1×10^7 个细胞加入80 ml磁分选缓冲液,同时避光加入20 ml人CD8磁珠,混匀后4℃避光孵育20 min;用1 ml Buffer冲洗LS柱子后,将细胞悬浮于5 ml Buffer中并注入柱子中,阴性细胞流入收集管中,CD8⁺T细胞吸附在LS柱,加入缓冲液洗LS柱2次,再加入适量Buffer后用活塞将柱子内的细胞打入50 ml离心管,加Buffer至15 ml。1 500×g离心5 min,弃上清。CD8⁺T细胞重悬在RPMI 1640(含10% FBS)中,调整细胞密度至 2×10^6 个/ml,同时加入100 U IL-2、CD3/C28 beads,将细胞铺至24孔板中,置于5% CO₂、37℃细胞培养箱中过夜。萝卜硫素(5 mg/支)溶于1.4 ml DMSO中,配成20 mmol/L。次日按照分组要求加入SFN 0、10和20 mmol/L孵育。

1.4 mTOR siRNA转染

由上海吉马公司分别合成mTOR siRNA以及阴性对照(negative control, NC),按照说明书使用DEPC水将其配置成浓度为20 mmol/L的溶液后备用。mTOR siRNA序列:sense 5'-CCACCCGAAU-UGGCAGAUUTT-3', antisense 5'-AAUCUGCCAAU-UCGGGUGGTT-3';另外设计一条NC序列:5'-UUCUUCGAACGUGUCACG UTT-3', antisense 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'。将 1×10^6 个/ml的T细胞系铺于24孔板中,一组细胞转染NC与脂质体复合物,另一组细胞转染mTOR siRNA与脂质体复合物的混合液(体积比为1:1)。将细胞培养板放入37℃、5% CO₂培养箱中,48 h后收集部分细胞用于分析siRNA效率。采用荧光定量PCR检测NC组与mTOR siRNA组mTOR的表达水平。mTOR引物序列:上游引物5'-CAGGGACTTGAAGATGAAGGT-GAT-3';下游引物5'-GGAAACTTGCCTCTGGAT-GAG-3'。72 h后收集细胞进行表型检测。实验重复3次。

1.5 流式细胞术检测SFN对T细胞分化、表型、凋亡及T细胞功能的影响

收集细胞至1.5 ml EP管中计数,1 500×g离心5 min,取 1×10^6 个细胞,避光加入抗体:CD8-APC-cy7、CD45RA-APC、CD127-Percp和KLRG1-APC。震荡混匀后,置于4℃避光孵育15 min,加入1 ml PBS洗涤;1 500×g离心5 min,弃上清。加入200 ml PBS,重

悬细胞后转至流式管,上机检测 T 细胞分化、表型情况。收集 CD8⁺ T 细胞和经 SFN 处理的 CD8⁺ T 细胞,取 1×10⁵ 细胞用 PBS 离心洗涤 2 次,弃上清;每管加入 200 ml Annexin-V 结合缓冲液和 2 ml Annexin-V 抗体,4 °C 避光孵育 15 min 后,离心清洗 1 次;样品在检测前要置于冰上,上机前加入 2 ml PI,流式检测细胞凋亡情况。CD8⁺ T 细胞经佛波酯(PMA 1 mg/ml)、离子霉素(ionomycin 1 mg/ml)和阻断剂 BFA(1 mg/ml)在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 6 h;将细胞收集至 1.5 ml EP 管中,1 500×g 离心 5 min,弃上清,用含 2% FBS 的 PBS 洗涤细胞,避光加入表面抗体 CD8,孵育 20 min 后加入 200 ml 4% 多聚甲醛固定细胞 20 min,离心弃去多聚甲醛,每管加入 200 ml 破膜剂,避光孵育 30 min;离心后弃上清,加入胞内抗体 IFN-γ、IL-2、TNF-α 和 Granzyme-B 等,避光孵育 20 min,上机前用 200 ml PBS 重悬,检测 T 细胞功能。实验均重复 3 次。

1.6 Western blotting 检测 SFN 对信号通路蛋白表达的影响

收集不同处理组的 CD8⁺ T 细胞,PBS 洗涤 2 次,加入适量细胞裂解液,超声破碎细胞,离心:4 °C、12 000×g 离心 10 min,收集上清,使用 BCA 法检测蛋白浓度。加入 4×Loading buffer,煮沸 10 min,低速离心后使用。选择合适浓度的分离胶、5% 浓缩胶,制备 SDS-PAGE 胶,总蛋白的上样量一般为 20~30 mg;电泳以恒压进行(1.0~1.5 h)。电泳结束后将凝胶转移至电转板中、对齐滚压气泡后放入电转槽中,冰浴中以 200 mA 恒流电转 1~3 h。电转结束后,清洗 PVDF 膜 1 次,丽春红 S 染液中染色 3~5 min,根据蛋白大小剪膜、清洗、置于封闭液中,室温晃动 1 h。封闭结束后,TBST 清洗 3 次,每次 5 min。使用 5% BSA 将一抗(p-mTOR、p-S6、b-actin)稀释至合适浓度后,4 °C 摇动过夜。孵育结束后 TBST 清洗 3 次。加入二抗(中杉金桥)室温晃动孵育 1 h,TBST 清洗 3 次。ECL 发光孵育 2 min 后,应用凝胶成像系统拍照。实验重复 3 次。

1.7 qPT-PCR 检测 SFN 对抗凋亡基因 *Bcl-2* 和 *Bcl-6* 表达的影响

收集不同浓度 SFN 处理的 CD8⁺ T 细胞。采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA,并反转录成 cDNA。将 2 μl DNA 和 10 μl SYBER Green、10 mmol/L 的上游和下游引物各 0.8 μl 及无酶水加入到荧光定量板中,每孔 20 μl 体系。设置程序:95 °C 10 min;95 °C 10 s,60 °C 10 s,72 °C 10 s,40 个循环;溶解曲线;以 GAPDH 作为内参,记录每个反应的 Ct 值,以 2^{-ΔΔCt} 公式计算基因相对倍比关系。

表 1 qPT-PCR 引物序列

Tab.1 Sequences of qPT-PCR primers

Gene	Primer sequence
<i>GAPDH</i>	F 5'-GGAGCCAAAAGGGTCATCATCTC-3'
	R 5'-GAGGGGCCATCCACAGTCTTCT-3'
<i>Bcl-2</i>	F 5'-ATGTGTGTGGAGAGCGTCAAC-3'
	R 5'-GAGACAGCCAGGAGAAATCAA-3'
<i>Bcl-6</i>	F 5'-CGGAAGGGTCTGGTTAGTCC-3'
	R 5'-GCATTCTGGTTGAGGCTGTT-3'

1.8 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计学软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SFN 提高 CD8⁺ T 细胞分化能力

流式细胞术检测结果(图 1)显示,10、20 mmol/L SFN 处理后 CD8⁺ T 细胞 CD127 的表达明显高于对照组[(47.5±11.2)%、(55.5±9.9)% vs (25.8±3.8), $P < 0.01$];KLRG1 的表达低于对照组[(4.7±1.0)%、(3.0±0.8)% vs (14.2±2.0)%, $P < 0.05$]。

2.2 不同剂量 SFN 对 CD8⁺ T 细胞表面分子的影响

流式细胞术检测结果显示,10、20 mmol/L SFN 处理后,T 细胞表面抑制性分子 PD-1 的表达显著低于对照组[(12.80±1.11)%、(11.80±2.32)% vs (20.81±2.92)%, $P < 0.01$,图 2 A];Tim-3 的表达水平显著低于对照组[(19.40±1.72)%、(14.10±1.38)% vs (24.00±4.28)%, $P < 0.05$,图 2 B]。T 细胞表面活化性分子 CD28 及 CD69 的表达与对照组比较差异无统计意义($P > 0.05$,图 2 C、D)。表明 SFN 促进记忆性 CD8⁺ T 细胞形成并维持其活性。

2.3 SFN 明显提高 CD8⁺ T 细胞促炎性细胞因子的分泌

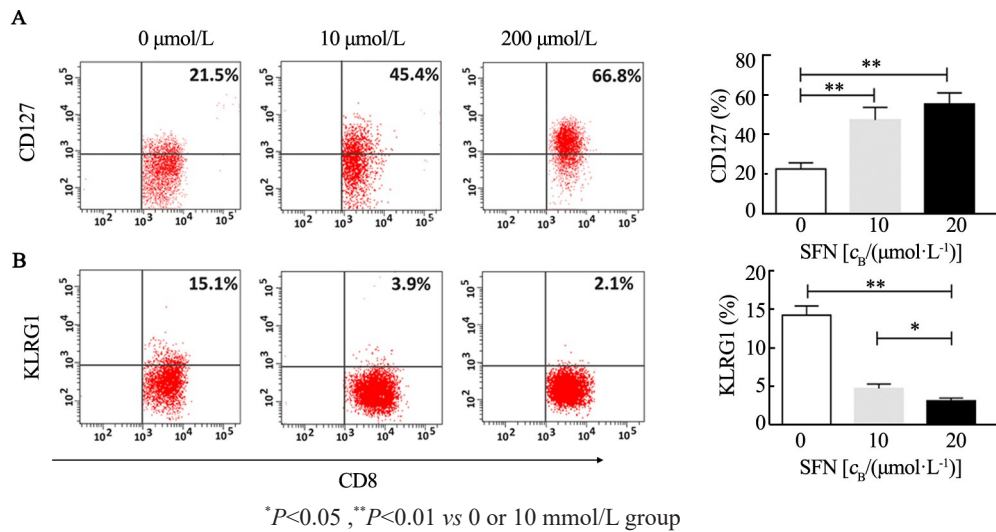
流式细胞术检测结果显示,10、20 mmol/L SFN 处理后,CD8⁺ T 细胞 IFN-γ(图 3A)、IL-2(图 3B)和 TNF-α(图 3C)的表达明显高于对照组[(22.60±7.15)%、(30.02±8.88)% vs (14.20±3.06)%;(16.00±2.50)%、(26.00±6.91)% vs (10.70±0.99)%;(18.40±2.50)%、(30.6±4.95)% vs (14.1±4.18)%],均 $P < 0.05$ 。表明 SFN 提高 CD8⁺ T 细胞促炎性细胞因子的分泌,提示 SFN 能够促进 T 细胞的抗肿瘤效应。

2.4 SFN 能够增加抗凋亡基因的表达并降低 CD8⁺ T 细胞凋亡率

qPT-PCR 检测结果(图 4A、B)显示,10、20 mmol/L SFN 处理后 *Bcl-2* 和 *Bcl-6* mRNA 的表达明显高于对

照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 流式细胞术检测结果(图 4C、D)显示, 采用 10 mmol/LSFN 处理后 48、72 h 的 CD8⁺ T 细胞的凋亡率均明显低于对照组 (均 $P <$

0.05)。表明 SFN 能够增加抗凋亡基因的表达并降低 CD8⁺T 细胞凋亡率, 有利于记忆性 T 细胞的生存。

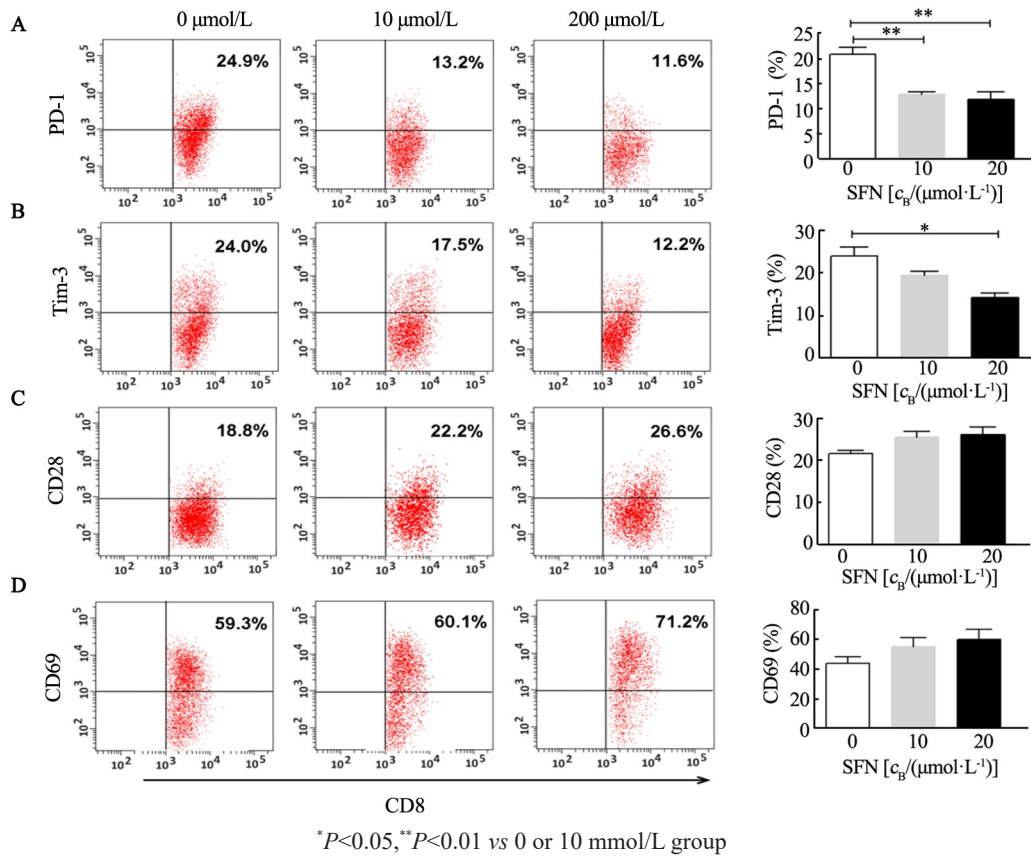


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 or 10 mmol/L group

A: CD127; B: KLRG1

图1 不同剂量SFN对CD8⁺T细胞分化的影响

Fig. 1 Effects of different concentrations of SFN on the differentiation of CD8⁺T cells



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 or 10 mmol/L group

A:PD-1; B: Tim-3; C: CD28; D: CD69

图2 不同剂量SFN对CD8⁺T细胞表面分子的影响

Fig. 2 Effects of different doses of SFN on the surface molecules of CD8⁺ T cells

2.5 SFN 通过 p-mTOR/ p-S6 通路影响 T 细胞的分化 Western blotting 检测结果(图 5A、B)显示, 10、

20 mmol/L SFN 处理 CD8⁺ T 细胞后, 与对照组相比, p-mTOR 和 p-S6 的表达水平显著下降(均 $P < 0.01$), 提

示SFN可能通过抑制信号通路中p-mTOR和p-S6蛋白的表达促进记忆前体CD8⁺T细胞形成;同时,流式细胞术检测结果(图5C)显示,采用mTOR siRNA处

理CD8⁺T细胞,结果发现CD127表达显著增高而KLRG1显著降低(均 $P<0.01$)。表明抑制mTOR的表达可以促进记忆前体T细胞的形成。

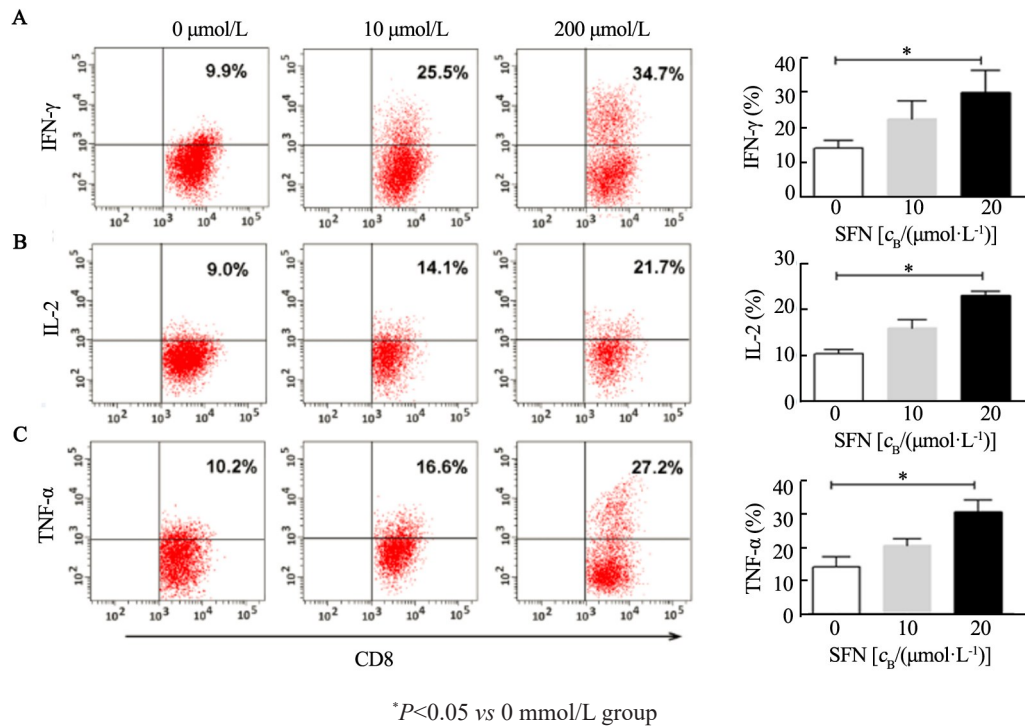


图3 不同剂量SFN对CD8⁺T细胞内因子分泌的影响

Fig.3 Effects of different doses of SFN on the cytokine secretion in CD8⁺T cells

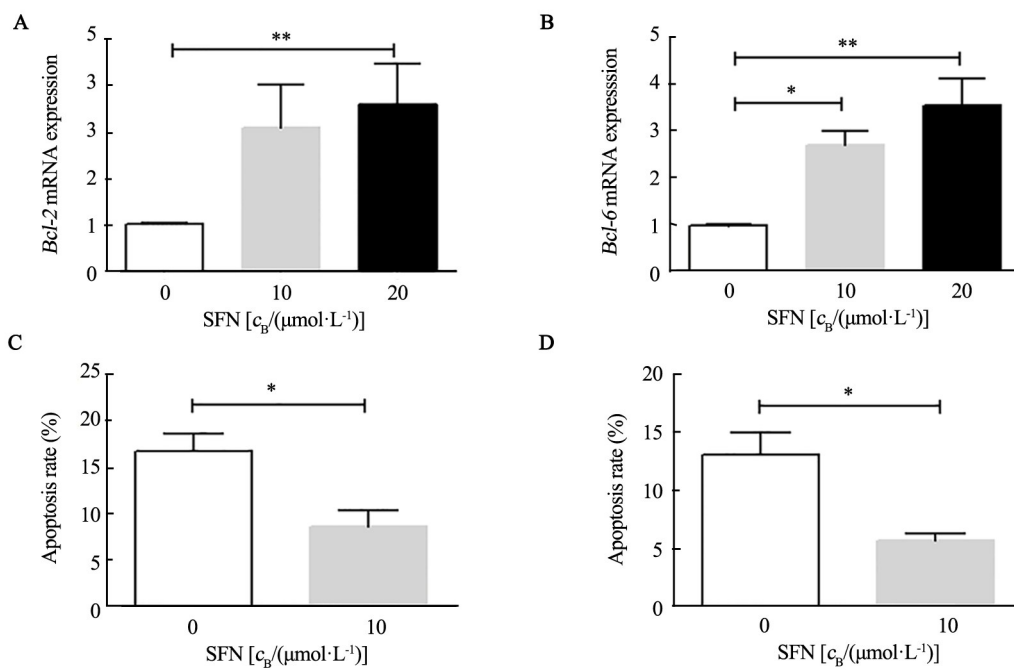
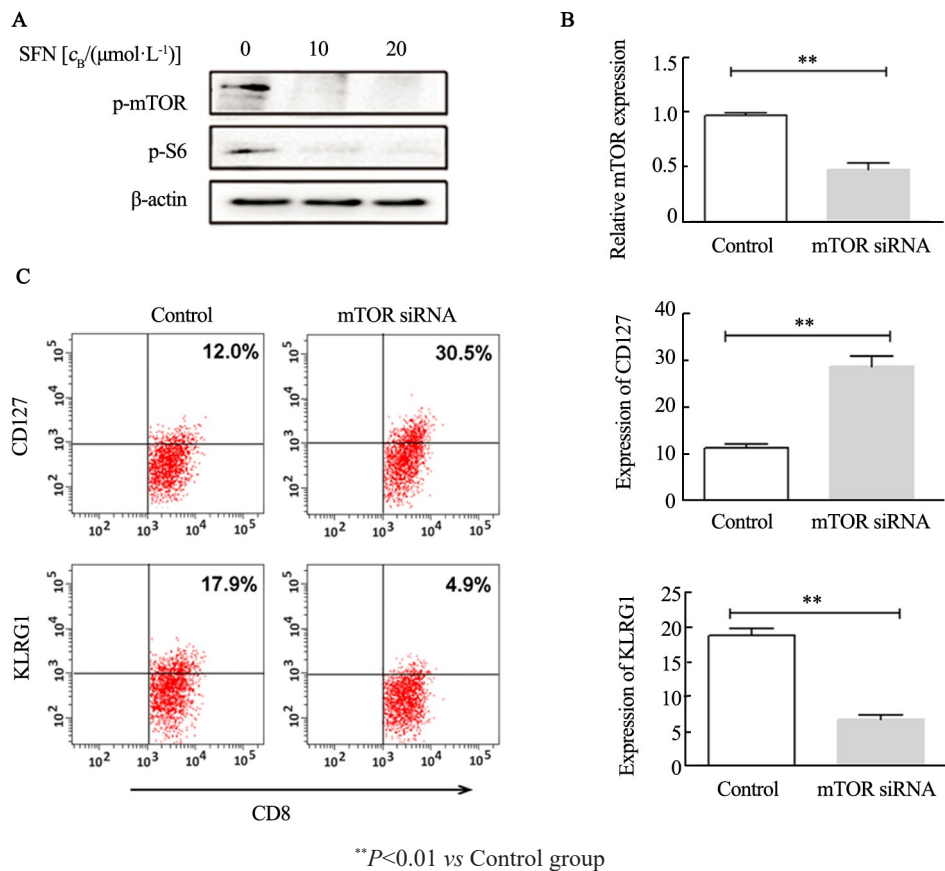


图4 SFN对抗凋亡基因Bcl-2和Bcl-6 mRNA表达及CD8⁺T细胞凋亡率的影响

Fig. 4 Effects of SFN on the expressions of Bcl-2 and Bcl-6 mRNA and apoptosis rate of CD8⁺T cells



A: p-mTOR、p-S6 and β -actin; B: Relative expression of mTOR siRNA; C: CD127 and KLRG1

图5 不同剂量SFN对p-mTOR、p-S6蛋白表达的影响及mTOR siRNA对CD8⁺T细胞中表面分子CD127和KLRG1影响
Fig.5 Effect of different doses of SFN on protein expressions of p-mTOR, p-S6 and the effect of mTOR siRNA on surface molecules CD127 and KLRG1 of CD8⁺T cells

3 讨论

SFN对食道癌、结肠癌、乳腺癌和肝癌等多种肿瘤具有很好的防治效果,因此被认为是蔬菜中最强的抗癌成分之一^[9]。随着对SFN深入而系统的研究,发现SFN与机体的免疫系统存在着一定的相互作用^[10]。已有文献^[9,11]报道,SFN能够增强NK细胞的细胞毒性,提高免疫治疗的临床疗效。然而,SFN对T细胞分化和功能影响的相关报道较少。因此,探讨SFN对T细胞表面标志物、分化表型、凋亡及胞内因子分泌的影响有重要意义。

当T细胞受到抗原刺激时,抗原特异性的T细胞在多种因素的作用下导致不同的分化命运,包括抗原暴露的时间、抗炎性因子以及共刺激信号的存在等。有研究^[15-17]显示,T细胞不同的分化程度及分化阶段与分子标志物CD127和KLRG1相关,例如短期效应性细胞SLECs(CD127^{lo}KLRG1^{hi})和长期记忆前体效应细胞MPEC(CD127^{hi}KLRG1^{lo}),这些细胞均分化来源于表达CD127^{lo}KLRG1^{lo}的早期效应性细

胞。有研究^[18]显示,来源于骨髓的一群具有干性的特异性CD8⁺T细胞高表达CD127,同时这些细胞具有早期记忆性T细胞的特征:KLRG1^{lo}及Bcl-2^{hi}和分泌TNF- α 等。本研究结果与上述文献报道基本一致。

此外,PAIARDINI等^[19]的研究同样证实,CD127影响T细胞分化命运和功能。记忆前体细胞均高度表达CD127,而效应性T细胞及终末分化T细胞表型为CD127^{lo}。已有文献^[20-21]报道,记忆前体细胞表达较高水平的CD127和较低水平的KLRG1。本结果显示,SFN处理后的CD8⁺T细胞高表达CD127及低表达KLRG1,提示SFN能够促进记忆前体细胞的形成。记忆性CD8⁺T细胞分泌IFN- γ 、IL-2和TNF- α 的能力优于初始状态及终末分化状态的CD8⁺T细胞^[22]。本研究发现,SFN处理后的CD8⁺T细胞分泌促炎性细胞因子IFN- γ 、IL-2和TNF- α 的水平增加。颗粒酶B(granzyme B)作为效应性细胞的标志物,在记忆前体细胞(KLRG1^{lo})中其表达水平上调^[23]。本研究中,采用SFN处理的CD8⁺T细胞分泌颗粒酶B的能力略优于对照组T细胞,但差异无统计学意义。本结果进一

步说明 SFN 能够促进记忆前体细胞形成, 增强其分泌促炎性细胞因子的能力。

在 T 细胞活化过程中伴随表面分子表达的变化。采用 SFN 处理后 CD8⁺ T 细胞 PD-1、Tim-3 表达水平显著降低, 而 CD69 的表达水平增加。抑制性受体 PD-1 在体外培养时作为 T 细胞活化的标志物, 但是输注到患者体内后, T 细胞 PD-1 的表达抑制其功能, 并促进 T 细胞的凋亡。另外一个抑制性受体 Tim-3 在耗竭的 T 细胞表面表达水平也增高, 这些抑制性受体能够抑制 T 细胞的分化使其走向衰老和凋亡。本研究发现, SFN 能够降低 CD8⁺ T 细胞凋亡比例。这些结果表明 SFN 在体外实验中不影响 T 细胞活化, 同时增加了其抗凋亡能力。T 细胞的分化受到一些关键信号通路的调控。已有文献[6,24]报道, 抑制 mTOR 及其下游信号通路 S6 能够促进记忆细胞分化。在我们的结果中观察到 SFN 能显著降低 p-mTOR 及 p-S6 蛋白的表达水平。上述结果表明, SFN 通过抑制 p-mTOR 及其下游 p-S6 进而促进 CD8⁺ 记忆细胞前体细胞的形成, 增强其抗凋亡能力。此外, 有文献[22]报道, 抑制 mTOR 通路可以促进干细胞样 T 细胞产生, 为进一步验证 mTOR 对记忆前体细胞分化的影响, 本研究采用 mTOR siRNA 处理 T 细胞发现 CD127 表达显著增高, 同时 KLRG1 表达显著降低。

综上所述, SFN 通过抑制 p-mTOR/p-S6 信号通路增强 T 细胞抗肿瘤效应、降低 T 细胞表面抑制性分子的表达水平及凋亡, 从而促进记忆前体细胞形成。采用 SFN 处理能够获得更多年轻化的 T 细胞, 为临床免疫治疗提供新的策略。

【参考文献】

- FAHEY J W, ZALCMANNA T, TALALAY P. Protection of humans by plant glucosinolates: efficiency of conversion of glucosinolates to isothiocyanates by the gastrointestinal microflora[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2012, 5(4): 603-611. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0538.
- MI L, WANG X, GOVIND S, et al. The role of protein binding in induction of apoptosis by phenethyl isothiocyanate and sulforaphane in human non-small lung cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(13): 6409-6416. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0340.
- CHO I S, LEW K L, XIAO H, et al. Sulforaphane-induced cell death in human prostate cancer cells is regulated by inhibitor of apoptosis family proteins and Apaf-1[J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(1): 151-162. DOI:10.1093/carcin/bgl144.
- NALLASAMY P, SI H, BABU P V, et al. Sulforaphane reduces vascular inflammation in mice and prevents TNF-alpha-induced monocyte adhesion to primary endothelial cells through interfering with the NF-kappaB pathway[J]. *J Nutr Biochem*, 2014, 25(8): 824-833. DOI:10.1016/j.jnutbio.2014.03.011.
- LI Y, ZHANG T, KORKAYA H, et al. Sulforaphane, a dietary component of broccoli/broccoli sprouts, inhibits breast cancer stem cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(9): 2580-2590. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-09-2937.
- SUPPIPAT K, PARK C S, SHEN Y, et al. Sulforaphane induces cell cycle arrest and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51251[2018-03-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4618677/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0051251.
- WOLF C R. Chemoprevention: increased potential to bear fruit[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(6): 2941-2943. DOI: 10.1073/pnas.071042698.
- THEJASS P, KUTTA N G. Immunomodulatory activity of sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate from broccoli (brassica oleracea)[J]. *Phytomedicine*, 2007, 14(7/8): 538-545. DOI: 10.1016/j.phymed.2006.09.013.
- SINGH S V, WARIN R, XIAO D, et al. Sulforaphane inhibits prostate carcinogenesis and pulmonary metastasis in TRAMP mice in association with increased cytotoxicity of natural killer cells[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(5): 2117-2125. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3502.
- SHIH Y L, WU L Y, LEE C H, et al. Sulforaphane promotes immune responses in a WEHI-3-induced leukemia mouse model through enhanced phagocytosis of macrophages and natural killer cell activities in vivo[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(5): 4023-4029. DOI: 10.3892/mmr.2016.5028.
- SUGANUMA H, FAHEY J W, BRYAN K E, et al. Stimulation of phagocytosis by sulforaphane[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 405(1): 146-151. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.01.025.
- YOUNGBLOOD B C, DAVIS W, AHMED R. Making memories that last a lifetime: heritable functions of self-renewing memory CD8 T cells[J]. *Int Immunol*, 2010, 22(10): 797-803. DOI: 10.1093/intimm/dxq437.
- PORTER D L, WANG W T, FREY N V, et al. Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia[J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(303): 303ra139. DOI: 10.1126/scitranslmed.aac5415.
- LI H, HUANG L, LIU L, et al. Selective effect of cytokine-induced killer cells on survival of patients with early-stage melanoma[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2017, 66(3): 299-308. DOI:10.1007/s00262-016-1939-x.
- KALLIESA, HAWKINS E D, HAWKINS E D, et al. Transcriptional repressor Blimp-1 is essential for T cell homeostasis and self-tolerance[J]. *Nat Immunol*, 2006, 7(5): 466-474. DOI: 10.1038/ni1321.
- JAMESON S C, MASOPUST D. Diversity in T cell memory: an embarrassment of riches[J]. *Immunity*, 2009, 31(6): 859-871. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.11.007.
- OBAR J J, JELLISONE R, SHERIDAN B S, et al. Pathogen-induced inflammatory environment controls effector and memory CD8⁺ T cell differentiation[J]. *J Immunol*, 2011, 187(10): 4967-4978. DOI: 10.4049/jimmunol.1102335.
- KUDERNATSCH R F, LETSCH A, GUERREIRO M, et al. Human bone marrow contains a subset of quiescent early memory CD8⁺ T cells characterized by high CD127 expression and efflux capacity[J]. *Eur J Immunol*, 2014, 44(12): 3532-3542. DOI: 10.1002/eji.201344180.

- [19] PAIARDINI M, CERVASI B, ALBRECHT H, et al. Loss of CD127 expression defines an expansion of effector CD8⁺ T cells in HIV-infected individuals[J]. *J Immunol*, 2015, 174(5): 2900-2909. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.11.909.
- [20] SARKAR S, KALIA V, HAINING W N, et al. Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates[J]. *J Exp Med*, 2008, 205(3): 625-640. DOI: 10.1084/jem.20071641.
- [21] KALIA V, SARKAR S, SUBRAMANIAM S, et al. Prolonged interleukin-2 α expression on virus-specific CD8⁺ T cells favors terminal-effector differentiation in vivo[J]. *Immunity*, 2010, 32(1): 91-103. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.11.010.
- [22] KERSH E N, FITZPATRICK D R, MURALI-KRISHN A K, et al. Rapid demethylation of the IFN- γ gene occurs in memory but not naive CD8 T cells[J]. *J Immunol*, 2009, 176(7): 4083-4093. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.11.010.
- [23] HESS MICHELINI R, DOEDENS A L, GOLDRATH A W, et al. Differentiation of CD8 memory T cells depends on Foxo1[J]. *J Exp Med*, 2013, 210(6): 1189-200. DOI: 10.1084/jem.20130392.
- [24] SCHOLZ G, JANDUS C, ZHANG L, et al. Modulation of mTOR signalling triggers the formation of stem cell-like memory T cells[J/OL]. *E Biol Med*, 2016, 4: 50-61[2018-03-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4776068/>. DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.01.019.

[收稿日期] 2018-02-19

[修回日期] 2018-05-29

[本文编辑] 王映红