

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.06.015

实验研究

六君子汤对食管癌 EC-9706 细胞株树突状细胞成熟的影响

吴耀松, 尹素改, 任闪闪, 王朋辉, 尚艺婉, 陈玉龙*

(河南中医药大学, 河南省郑州市金水东路龙子湖高校园区, 450026)

摘要 目的 观察六君子汤对食管癌微环境中树突状细胞的影响及可能作用机制。方法 用 Ficoll 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞, 体外诱导培养树突状细胞, 分为正常培养基组 (正常培养)、肿瘤培养基组 (30% 食管癌 EC-9706 细胞株培养上清)、六君子汤组 (30% 六君子汤干预食管癌 EC-9706 细胞株培养上清)。7 天后采用流式细胞术检测 3 组树突状细胞表面标志物 CD80、CD86、CD1a; MTT 法检测淋巴细胞增殖情况, 计算刺激指数; LDH 释放法检测细胞毒 T 淋巴细胞 (CTL) 杀伤力, 计算特异杀伤率; ELISA 法检测白细胞介素 12 (IL-12) 含量, Western blot 法检测 STAT3 及 p-STAT3 蛋白表达。结果 与正常培养基组比较, 肿瘤培养基组树突状细胞表面标志物 CD80、CD86、CD1a 降低, 刺激指数及 CTL 的特异杀伤率降低, IL-12 含量减少, STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。而六君子汤组较肿瘤培养基组树突状细胞 CD80、CD86、CD1a 增加, 刺激指数及 CTL 特异杀伤率升高, IL-12 分泌增加, STAT3 和 p-STAT3 蛋白减少 ($P < 0.05$)。结论 六君子汤可通过影响食管癌细胞的微环境而使树突状细胞的成熟和免疫活性发生改变, 其机制可能与调节 STAT3 信号通路有关。

关键词 食管癌; 树突状细胞; 六君子汤; 细胞增殖; 细胞毒 T 淋巴细胞

有研究认为, 脾胃不和是肿瘤发生、发展的重要机制, 脾胃虚弱证是肿瘤疾病常见证候之一^[1]。六君子汤是健脾和胃的代表方剂, 前期我们观察到六君子汤能改善食管癌小鼠生存质量、保护脏器, 防治食管组织损害; 对人血外周单个核细胞有很强激活作用, 明显抑制食管癌细胞株 Eca109 和 HepG2 生长; 其机制可能与改善免疫功能失衡、抑制信号转导和转录激活因子 3 (STAT3) 蛋白表达和蛋白磷酸化有关^[2-3]。树突状细胞是目前机体内功能最强的抗原提呈细胞, 是一类杀瘤活性强和抗癌谱广的新型抗肿瘤效应细胞^[4]。但在肿瘤微环境中, 树突状细胞多出现非成熟状态, 影响了其功能^[5]。本文通过体外实验, 观察六君子汤对食管癌微环境中树突状细胞成熟的影响, 并从 STAT3 信号通路探索其可能机制, 报道如下。

1 材料及方法

1.1 细胞株

食管癌 EC-9706 细胞株, 由河南中医药大学分子生物实验中心提供。

1.2 药物及制备

六君子汤组成: 人参: 白术: 茯苓: 甘草: 陈皮: 清半夏 = 2: 3: 2: 2: 2: 3 (比例依据《医学正传》), 药物购于河南中医药大学第三附属医院。各药粉碎成粉后混匀, 70% 乙醇, 以 M (药物重量): V (70% 乙醇体积) = 1: 8 比例混匀, 真空回流, 取上清液, 回收乙醇, 置无醇味后浓缩药液, 浓缩至体积大约与生药总重量相当, 即每毫升含 1g 生药。量取上述浓缩液 (1/20 体积) 作为 70% 乙醇部位, 余下浓缩液 (19/20 体积) 与乙酸乙酯体积比为 2: 1 进行萃取, 萃取 6 次减压回收乙酸乙酯后, 低温真空干燥, 刮药、称重, -20℃ 冰箱保存备用。

1.3 主要试剂及仪器

人外周血淋巴细胞分离液 (Solarbio 公司, 批

基金项目: 国家自然科学基金 (81373535, 81173177)

* 通讯作者: cyl72621@163.com, (0371) 65680206

号: 20150115-0660); RPMI 1640 (Solarbio 公司, 批号: 20140828); 胎牛血清 (浙江天杭生物科技有限公司, 批号: 140509); 人重组肿瘤坏死因子 α (rhTNF- α , 批号: 0607B25)、人重组粒细胞和巨噬细胞集落刺激因子 (rhGM-CSF, 批号: 0601B30)、人重组白细胞介素 4 (rhIL-4, 批号: 0603B16)、人重组白细胞介素 2 (rhIL-2, 批号: 3639CY11), 均为 PeproTech 公司产品; PE-抗 CD80 (批号: 12-0809-41)、PE-抗 CD86 (批号: 12-0869-42)、FITC-抗 CD1a (批号: 11-0019-41), 均为 eBioscience 公司产品; 丝裂霉素 (Sigma 公司, 货号 69824); MTT 试剂盒 (美国 Sigma 公司, 批号: M8180); 10% NP-40 液 (BioVision 公司, 批号: 2111-400); RIPA 裂解液 (Solarbio 公司, 批号: 20160922); 鼠抗人 STAT3 (Abcam 公司, 批号: GR220711-4); 鼠抗人 p-STAT3 (Abcam 公司, 批号: GR241638-4); 兔抗鼠 Tublin (Protein-tech 公司, 批号: 20536-4-AP); 白细胞介素 12 (IL-12) ELISA 检测试剂盒 (Boster 公司, 批号: 1321177925)。

CO₂ 培养箱 (Galaxy170R 型, Eppendorf 公司); 冷冻高速离心机 (HERAEUS MULTIFUGEX1R 型, Thermo 公司); 低速离心机 (ROTINA35 型, Hettich 公司); 流式细胞仪 (FACSCalibur 型, BD 公司); 酶标仪 (ELx800 型, Bio-Tek 公司); 倒置显微镜 (Axiovert 25 型, ZEISS 公司)。

1.4 六君子汤干预食管癌 EC-9706 细胞培养

食管癌 EC-9706 细胞于含 10% 胎牛血清完全培养基中培养, 置于 37℃ 饱和湿度, 体积分数为 5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 2~3 天换液 1 次, 细胞长到 80% 时传代 1 次, 取对数生长期细胞用于实验。以 EC-9706 细胞 1×10^6 /孔接种于培养皿, 于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱培养 24 h, 加入终浓度六君子汤乙酸乙酯提取物 93.00 μ g/ml, 对照组为完全培养液。继续培养 48 h。收集上清, 离心, -20℃ 冰箱保存备用。

1.5 树突状细胞培养及鉴定

取健康人外周血 (健康志愿者, 受试者知情同意), 用 Ficoll 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞, 用含 10% 自体血清的 RPMI 1640 完全培养基将所得细胞重悬, 细胞浓度为 2.5×10^6 个/ml, 以每孔 2 ml 加入 6 孔培养板中。将培养板置入 37℃、5% CO₂ 培养箱中, 孵育 4 h 后, 吸弃培养上清, 去除非贴壁细胞, 每孔加入含 rhGM-CSF 和

rhIL-4 (GM-CSF 100 ng/ml, IL-4 50 ng/ml) 的 RPMI 1640 完全培养基 2 ml, 隔天半量换液, 第 6 天加入 TNF- α 100 U/ml 诱导 24 h。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 流式细胞术检测树突状细胞表面标志物 CD80、CD86 及 CD1a 水平 六君子汤干预 EC-9706 细胞条件下对树突状细胞成熟的影响

树突状细胞分离和诱导如上, 在树突状细胞培养的未成熟期 (第 2 天末), 分为正常培养基组 (正常培养)、肿瘤培养基组 (30% EC-9706 培养上清)、六君子汤组 (30% 六君子汤干预 EC-9706 培养上清), 诱导 7 天后, 收集各组细胞, 流式细胞仪检测其相关表型 CD80、CD86、CD1a。

1.6.2 MTT 法检测淋巴细胞增殖情况 淋巴细胞的体外分离培养: 用 Ficoll 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞, PBS 洗涤 3 次, 1500 r/min 离心 15 min, 37℃、5% CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养 6 h, 收集悬浮细胞, 作为反应细胞, 调整浓度至 2×10^6 个/ml 细胞。加入含有终浓度 200 U/ml IL-2, 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养液重悬于 25 ml 培养瓶中培养 5 天。收集不同组培养 7 天的树突状细胞, 调整其细胞浓度为 1×10^5 个/ml 细胞, 加入终浓度为 25 μ g/ml 的丝裂霉素于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养孵育 1 h。

树突状细胞作为刺激细胞, 淋巴细胞作为效应细胞, 用含 10% 胎牛血清 RPMI 1640 完全培养基调整刺激细胞 (5×10^3) 与效应细胞 (1×10^5) 靶效比为 1:20, 另设淋巴细胞组 1×10^5 个/孔, 树突状细胞 5×10^3 个/孔, 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中孵育 96 h, MTT 法检测细胞活性, 计算刺激指数^[8]。刺激指数 = (实验孔 OD 值-刺激细胞 OD 值) / 效应细胞 OD 值。

1.6.3 LDH 释放法检测细胞毒 T 淋巴细胞 (CTL) 的杀伤力 收集不同组培养 7 天的树突状细胞, 负载经反复冻融制备的 EC-9706 细胞抗原 (1×10^8 个/ml 反复冻融 3 次), 24 h 后与 CTL 细胞按 1:20 比例共同培养, 4 天后收集悬浮细胞。用不含血清培养基调细胞浓度为 1×10^6 个/ml 的 CTL 细胞悬液作为效应细胞。取对数生长期 EC-9706 细胞作为靶细胞, 用不含血清培养基调整细胞浓度分别为 1×10^5 、 5×10^4 、 2×10^4 个/ml 加入 96 孔板, 加入 CTL 细胞和 EC-9706 细胞各 100 μ l, 使其效靶比分别为 10:1、20:1、50:1, 设效应细胞组

自然释放孔 (1×10^5 个/孔)、靶细胞组自然释放孔 (和实验组靶细胞数一致)、靶细胞最大释放孔 (和实验组靶细胞数一致, 加入 1% NP-40 液)、培养基背景孔。置于 5% CO_2 、37℃ 培养箱培养 4h 后, 2500 r/min 离心 10 min。LDH 释放法检测 CTL 杀伤活性, 从各孔取出 50 μl 上清移入 96 孔板对应孔中, 每孔加入反应底物 50 μl , 室温避光放置 30 min 后, 加入终止液 50 μl /孔。用酶标仪测定各孔在波长 490 nm 的吸光值, 计算特异杀伤率。特异杀伤率 (%) = (实验孔 OD 值 - 靶/效应细胞自然释放孔 OD 值) / (最大释放孔 OD 值 - 自然释放 OD 值) [8]。

1.6.4 ELISA 法检测 IL-12 水平, Western blot 法检测 STAT3 及 p-STAT3 蛋白表达 诱导 7 天后, 离心收集各组细胞上清和细胞, 细胞上清用于 IL-12 检测, 细胞用于提取蛋白。ELISA 法检测 IL-12, Western blot 法测定 STAT3 蛋白表达。细胞总蛋白的提取: 细胞裂解液 RIPA 提取细胞总蛋白, BCA 法检测样品蛋白浓度。配胶、SDS-PAGE 电泳、200mA 转膜至 PVDF 膜、5% 脱脂奶粉室温封闭 1h、加入 p-STAT3、STAT3 一抗孵育过夜、二抗 (1: 5000) 室温孵育 1h。用化学发光法显色, 凝胶成像系统分析结果。目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白表达量/同一样本内参表达量。

1.7 统计学方法

使用 SPSS 17.0 数据统计软件。实验数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较用单因素方差分析, 两两比较用 LSD-t 检验, 以 $P < 0.05$ 有统计学意义。回归分析进行曲线拟合, 应用概率法计算半数抑制率。

2 结果

2.1 树突状细胞培养及鉴定结果

在显微镜下观察刚分离的单个核贴壁细胞呈规则球形, 细胞膜表面光滑。加入细胞因子后 3 天, 细胞呈半贴壁, 可见树突样细胞, 形状不规则。培养至第 5 天, 成簇出现, 成集落样, 树突状细胞增多。7 天到成熟后细胞增大, 树突增长。分别在不成熟期 (第 2 天末) 和成熟期 (第 7 天末) 进行树突状细胞表型检测发现, 成熟期的 CD80、CD86、CD1a 明显高于不成熟期 ($P < 0.01$), 见表 1。

2.2 六君子汤干预 EC-9706 细胞条件下对树突状细胞成熟的影响

表 2 示, 肿瘤培养基组细胞表型 CD80、

CD86、CD1a 均较正常培养基组降低 ($P < 0.05$), 而六君子汤组细胞表型 CD80、CD86、CD1a 均明显高于肿瘤培养基组, 但仍低于正常培养基组 ($P < 0.05$)。

表 1 不同时期树突状细胞表型检测结果比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

时间	样本数	CD80	CD86	CD1a
不成熟期	4	60.56 $\pm$ 13.38	66.18 $\pm$ 13.12	71.82 $\pm$ 15.39
成熟期	4	14.33 $\pm$ 1.57*	13.28 $\pm$ 3.23*	11.21 $\pm$ 4.11*

注: 与不成熟期比较, * $P < 0.01$

表 2 各组细胞表型 CD80、CD86、CD1a 比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	CD80	CD86	CD1a
正常培养基组	9	60.37 $\pm$ 11.21	65.16 $\pm$ 10.64	73.32 $\pm$ 15.15
肿瘤培养基组	9	35.62 $\pm$ 8.34*	30.60 $\pm$ 9.12*	36.89 $\pm$ 9.85*
六君子汤组	9	46.83 $\pm$ 8.58* Δ	42.79 $\pm$ 7.32* Δ	48.51 $\pm$ 10.45* Δ

注: 与正常培养基组比较, * $P < 0.05$; 与肿瘤培养基组比较, $\Delta P < 0.05$

2.3 六君子汤干预 EC-9706 细胞条件下对树突状细胞刺激淋巴细胞增殖的影响

正常培养基组刺激指数为 (5.32 $\pm$ 0.33)%, 肿瘤培养基组刺激指数为 (1.18 $\pm$ 0.64)%, 六君子汤组刺激指数为 (3.38 $\pm$ 0.97)%。与正常培养基组比较, 肿瘤培养基组刺激指数降低 ($P < 0.05$), 而六君子汤组刺激指数较肿瘤培养基组增强, 但仍弱于正常培养基组 ($P < 0.05$)。

2.4 六君子汤干预 EC-9706 细胞条件下对树突状细胞刺激 CTL 杀伤作用的影响

表 3 示, 肿瘤培养基组在各浓度配比下 CTL 的特异杀伤率低于正常培养基组 ($P < 0.05$), 而六君子汤组在各浓度配比下较肿瘤培养基组提高了 CTL 的特异杀伤率 ($P < 0.05$), 且高于正常培养基组 ($P < 0.05$)。

表 3 各组树突状细胞刺激细胞毒 T 淋巴细胞不同浓度配比下特异杀伤率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	10 : 1	20 : 1	50 : 1
正常培养基组	6	25.46 $\pm$ 6.38	33.71 $\pm$ 6.16	48.42 $\pm$ 6.32
肿瘤培养基组	6	12.78 $\pm$ 3.45*	18.86 $\pm$ 5.52*	32.18 $\pm$ 6.57*
六君子汤组	6	32.73 $\pm$ 6.19* Δ	41.65 $\pm$ 7.20* Δ	57.18 $\pm$ 8.16* Δ

注: 与正常培养基组比较, * $P < 0.05$; 与肿瘤培养基组比较, $\Delta P < 0.05$

2.5 六君子汤干预 EC-9706 细胞条件下对树突状细胞 IL-12 含量和 STAT3 蛋白表达的影响

表 4 示, 与正常培养基组相比, 肿瘤培养基组 IL-12 含量减少, STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 与肿瘤培养基组比较, 六君子汤组 IL-12

含量升高, STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。

表 4 各组细胞 IL-12 含量和 STAT3、p-STAT3 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	IL-12 (pg/ml)	STAT3	p-STAT3
正常培养基组	6	118.65 ± 6.89	0.55 ± 0.09	0.23 ± 0.05
肿瘤培养基组	6	72.31 ± 7.63*	0.98 ± 0.11*	0.42 ± 0.03*
六君子汤组	6	98.97 ± 7.84 [△]	0.47 ± 0.06 [△]	0.18 ± 0.05 [△]

注: IL-12, 白细胞介素 12; 与正常培养基组比较, * $P < 0.05$; 与肿瘤培养基组比较, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

食管癌属于中医学“噎膈”范畴,其发病初期病机以本虚邪盛为主,中晚期则以正气虚弱为主,正气虚弱贯穿整个食管癌发病的全程。在肿瘤发病早期,脾胃虚弱患者占有很高比例,即使是移植瘤动物模型,也具有体重减轻、饮食减少、大便异常等脾胃虚弱证表现^[10-11]。中医学认为,脾胃为后天之本,气血生化之源,胃为水谷之海,人体气血的生化,津液的输布全赖中焦脾胃之气。脾胃不和导致人体气生成障碍,正气虚弱,气机升降失调,进一步导致痰、瘀、毒等病理因素的产生,进而引发癌症。健脾和胃法及其方药为临床治疗食管癌(噎膈)所常用,六君子汤是健脾和胃法的代表方,是辅助治疗肿瘤的有效方剂^[12-14]。本研究从食管癌细胞与免疫调节关键细胞——树突状细胞的关系角度进行研究,经过 7 天的诱导,树突状细胞成熟标志物明显增多,可用于后续实验。

树突状细胞是机体免疫应答的主要启动者,具有独特的抗原提呈和免疫激发功能,在肿瘤的发生发展和免疫治疗中发挥着重要的作用。树突状细胞根据树突状细胞功能以及表面分子表达的不同,分为未成熟树突状细胞和成熟树突状细胞两个阶段。未成熟树突状细胞表面表达低水平的主要组织相容性复合体 2 类分子和共刺激分子,只有较弱的激活 T 细胞的能力。与之相反,成熟树突状细胞失去摄取和加工抗原的能力,而获得激活初始型 T 细胞的能力,即提呈抗原的能力^[15-16]。因此,树突状细胞具有启动 T 细胞免疫的所有必需的特性。已经证实,肿瘤患者的血清、组织培养上层或肿瘤细胞与造血祖细胞共同培养可以抑制树突状细胞的成熟^[17-20]。

本研究发现,食管癌 EC-9706 细胞条件培养基可明显影响树突状细胞成熟,减少树突状细胞刺激淋巴细胞增殖,抑制 IL-12 分泌和树突状细胞刺激

下 CTL 杀伤作用,提示食管癌细胞分泌的一些物质可以导致树突状细胞功能低下。而六君子汤可以减弱肿瘤条件培养基这种作用,提高树突状细胞的成熟比例和激活 CTL 的能力。

STAT3 信号通路在树突状细胞的分化、成熟及迁移过程中具有相当重要的作用,其参与调控了多种与机体免疫炎症反应密切相关物质,包括多种细胞因子如 IL-12、趋化因子和多种受体的表达^[21-22]。本实验结果发现,食管癌细胞条件培养基可以促进树突状细胞 STAT3、p-STAT3 蛋白表达,而六君子汤条件培养基可以减少树突状细胞中 STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达。分析其原因可能由于六君子汤减少了对树突状细胞刺激,减弱了 STAT3 信号通路活化。

总之,六君子汤通过影响食管癌细胞的微环境而使树突状细胞的成熟和免疫活性发生改变,有效地干预了肿瘤细胞对树突状细胞的影响,而 STAT3 通路参与了这些变化,其分子作用机制有待深入研究。

参考文献

- [1] 刘瑞,花宝金. 调理脾胃法防治肿瘤的理论基础及分子机制 [J]. 中医杂志, 2013, 54(18): 1608-1611.
- [2] 陈玉龙,苗艳艳,司富春. 健脾和胃类方对肿瘤细胞生长抑制的比较研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(3): 112-115.
- [3] 尹素改,王慧慧,吴耀松,等. 六君子汤提取物对食管癌 Eca109 细胞的增殖抑制作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(1): 163-166.
- [4] 周凌,尹素改,吴耀松,等. 六君子汤对食管癌细胞株 EC9706 致血管生成的影响 [J]. 中成药, 2015, 37(6): 1165-1169.
- [5] 吕翠田,董志斌,陈玉龙. 六君子汤对 4-硝基喹啉-1-氧化物诱导食管癌小鼠免疫调节的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(7): 2831-2834.
- [6] SONG K, XU L, ZHANG W, et al. Laminarin promotes anti-cancer immunity by the maturation of dendritic cells [J]. Oncotarget, 2017, 8(24): 38554-38567.
- [7] ANGUILLÉ S, SMITS EL, BRYANT C, et al. Dendritic cells as pharmacological tools for cancer immunotherapy [J]. Pharmacol Rev, 2015, 67(4): 731-753.
- [8] 赵鸿,古涛,王翔,等. 白细胞介素-10 诱导的大鼠树突状细胞体外免疫功能的研究 [J]. 中华实验外科杂志, 2003, 20(5): 450-452.
- [9] 樊卫平,谢艳云,宋玉靖,等. WT1-235 肽体外抗肿瘤效应研究 [J]. 免疫学杂志, 2011, 27(5): 377-380.

- [10] 崔姗姗, 高小玲, 王慧慧, 等. 六君子汤提取物抑制食管癌 Ec9706 细胞增殖及其对信号转导和转录活化因子 3 信号通路的影响 [J]. 中国全科医学, 2016, 19 (24): 2948-2952.
- [11] 司富春, 陈玉龙, 徐晓宇, 等. 古代中医文献对食管癌的认识 [J]. 河南中医, 2005, 25 (6): 77-79.
- [12] 司富春, 刘紫阳. 食管癌中医证型和用药规律分析 [J]. 中医学报, 2012, 27 (6): 655-657.
- [13] 吕翠田, 牛亚南, 陈玉龙, 等. 食管癌中医证素特点及组合规律的文献研究 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26 (10): 2457-2459.
- [14] 陈玉龙, 司富春. 中医药治疗食道癌方药分析 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19 (2): 401-402.
- [15] CHEN K, WANG JM, YUAN R, et al. Tissue-resident dendritic cells and diseases involving dendritic cell malfunction [J]. Int Immunopharmacol, 2016, 34: 1-15. doi: 10.1016/j.intimp.2016.02.007.
- [16] KLECHEVSKY E. Functional diversity of human dendritic cells [J]. Adv Exp Med Biol, 2015, 850: 43-54. doi: 10.1007/978-3-319-45774-0_4.
- [17] LIU J, LU G, LI Z. Distinct compartmental distribution of mature and immature dendritic cells in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Pathol Res Pract, 2010, 206 (9): 602-606.
- [18] TRAN JANCO JM, LAMICHHANE P, KARYAMPUDI L, et al. Tumor-infiltrating dendritic cells in cancer pathogenesis [J]. J Immunol, 2015, 194 (7): 2985-2991.
- [19] KIERTSCHER SM, LUO J, DUBINETT SM, et al. Tumors promote altered maturation and early apoptosis of monocyte-derived dendritic cells [J]. J Immunol, 2000, 164 (3): 1269-1276.
- [20] HOSSZU KK, VALENTINO A, VINAYAGASUNDARAM U, et al. DC-SIGN, C1q, and gC1qR form a trimolecular receptor complex on the surface of monocyte-derived immature dendritic cells [J]. Blood, 2012, 120 (6): 1228-1236.
- [21] LEE EJ, LEE SJ, KIM JH, et al. Radiation inhibits interleukin-12 production via inhibition of c-Rel through the interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway in dendritic cells [J]. PLoS One, 2016, 11 (1): e0146463.
- [22] OHNO Y, KITAMURA H, TAKAHASHI N, et al. IL-6 down-regulates HLA class II expression and IL-12 production of human dendritic cells to impair activation of antigen-specific CD4⁺ T cells [J]. Cancer Immunol Immunother, 2016, 65 (2): 193-204.

Effect of *Liujunzi Decoction* (六君子汤) on Inhibition of Dendritic Cell Maturation in Esophageal Cancer EC-9706 Cell Line

WU Yaosong, YIN Sugai, REN Shanshan, WANG Penghui, SHANG Yiwan, CHEN Yulong

(Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou, 450026)

ABSTRACT Objective To observe the effect of *Liujunzi Decoction* (LD, 六君子汤) on dendritic cells in esophageal microenvironment and explore the potential mechanism. **Methods** Peripheral blood mononuclear cells were isolated by Ficoll density gradient centrifugation and cultured in vitro, and then the dendritic cells were induced. The dendritic cells were divided into a normal culture medium group (normal culture), a tumor culture medium group (30% esophageal cancer EC-9706 cell culture supernatant), and a LD group (30% LD intervened esophageal cancer EC-9706 cell line culture supernatant). Seven days later, dendritic cell surface markers CD80, CD86 and CD1a in these three groups were detected by flow cytometry. The proliferation of lymphocytes was detected by MTT assay and the stimulation index was calculated. LDH release assay was used to detect the lethality of cytotoxic T lymphocyte (CTL) to calculate the specific killing rate. The content of interleukin-12 (IL-12) was detected by ELISA, and the expressions of STAT3 and p-STAT3 proteins by Western blot. **Results** Compared with those in the normal medium group, levels of CD80, CD86 and CD1a decreased, the stimulation index and CTL specific killing rate decreased, the content of IL-12 decreased and the expressions of STAT3 and p-STAT3 increased in the tumor culture medium group ($P < 0.05$). Compared with those in the tumor culture medium group, levels of CD80, CD86 and CD1a increased, the stimulation index and CTL specific killing rate increased, the secretion of IL-12 increased, and the expressions of STAT3 and p-STAT3 decreased in LD group ($P < 0.05$). **Conclusion** LD could change the maturation and immunological activity of dendritic cells by affecting the microenvironment of esophageal cancer cells, which may be related to the regulation of STAT3 signaling pathway.

Keywords esophageal cancer; dendritic cells; *Liujunzi Decoction* (六君子汤); cell proliferation; cytotoxic T lymphocytes

(收稿日期: 2017-04-26; 修回日期: 2017-11-29)

编辑: 邓 媛