

# 聚多巴胺并木犀草素对细胞毒性淋巴细胞 肿瘤杀伤作用的影响

李程琳 王梓聿 曹丁元 国超凡 王爽 李玲

(青岛大学基础医学院, 山东 青岛 266071)

**[摘要]** **目的** 探讨聚多巴胺(PDA)并木犀草素(LUT)通过光热治疗对细胞毒性淋巴细胞(CTL)肿瘤杀伤作用的影响。**方法** 通过扫描电子显微镜(SEM)和接触角测定仪观察和测定合成 PDA 的表征。将 RAW264.7 细胞分为 Control 组、LPS 组(2  $\mu\text{g/L}$ )、PDA' 组(50 000  $\mu\text{g/L}$ ), 常规培养 48 h, 采用 CCK8 实验检测细胞活力, 通过流式细胞术检测 LUT 对 RAW264.7 细胞分化的影响。将雌性 C57BL/6 小鼠随机分为模型组、PDA 组、LUT 组以及 PDA+LUT 组, 各组小鼠的后背部均皮下注射 B16F10 黑色素瘤细胞, 建模后第 10 天在 PDA 组和 PDA+LUT 组建模小鼠肿瘤处注射 PDA 行光热治疗 1 次后, 对建模小鼠右大腿肌肉分别注射 PBS、PDA(2.5  $\mu\text{g/只}$ )、LUT(500  $\mu\text{g/只}$ )、PDA(2.5  $\mu\text{g/只}$ )+LUT(500  $\mu\text{g/只}$ ), 观察建模小鼠肿瘤生长以及存活情况。在治疗后第 3、7 天, 取各组建模小鼠脾脏制备单细胞悬液, 采用流式细胞术检测小鼠体内巨噬细胞分化和 T 细胞表达情况。**结果** SEM 观察到合成的 PDA 具有较强的吸附能力和亲水性, 并且 CCK8 实验检测结果显示 PDA 对细胞活力无影响( $P>0.05$ )。各组 RAW264.7 细胞的 CD206 和 iNOS 平均荧光强度差异有显著性( $F=30.72, 1\ 516.00, P<0.05$ )。注射或不注射 PDA 时, 则注射或不注射 LUT 小鼠的肿瘤大小和体内免疫细胞 iNOS、CD206、IFN- $\gamma^+$  CD4 $^+$ 、TNF- $\alpha^+$  CD8 $^+$  表达水平比较差异均有显著性( $F=23.10\sim 235.52, P<0.05$ ); 注射或不注射 LUT 时, 则注射或不注射 PDA 小鼠的肿瘤大小和体内免疫细胞 iNOS、CD206、CD4 $^+$  IFN- $\gamma^+$ 、CD8 $^+$  TNF- $\alpha^+$  表达水平比较差异均有显著性( $F=8.98\sim 200.67, P<0.05$ ); 建模小鼠中 PDA+LUT 组存活率与其他组相比显著提高( $\chi^2=9.70, P<0.01$ )。**结论** LUT 具有抑制小鼠巨噬细胞向 M2 分化并促进其向 M1 分化的作用, PDA 并 LUT 治疗可以有效抑制小鼠肿瘤生长, 提高生存率, 增强 CTL 的肿瘤杀伤作用。

**[关键词]** 黑色素瘤; 细胞系, 肿瘤; 光热疗法; 多巴胺; 聚合物; 木犀草素; 肿瘤逃逸; T 淋巴细胞, 细胞毒性

**[中图分类号]** R392.5; R739.5 **[文献标志码]** A

## EFFECTS OF POLYDOPAMINE COMBINED WITH LUTEOLIN ON TUMOR KILLING BY CYTOTOXIC LYMPHOCYTES LI

Chenglin, WANG Ziyu, CAO Dingyuan, GUO Chaofan, WANG Shuang, LI Ling (School of Basic Medicine, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

**[ABSTRACT]** **Objective** To explore the effects of polydopamine (PDA) plus luteolin (LUT) with photothermal therapy on tumor killing by cytotoxic lymphocytes (CTL). **Methods** The synthesized PDA was characterized by using a scanning electron microscope (SEM) and a contact angle analyzer. RAW264.7 cells were divided into control group, LPS group (2  $\mu\text{g/L}$ ), and PDA' group (50 000  $\mu\text{g/L}$ ). After 48 h culture, cell viability was determined by cell counting kit-8. The effect of LUT on the differentiation of RAW264.7 cells was determined by flow cytometry. Female C57BL/6 mice were randomly divided into model group, PDA group, LUT group, and PDA+LUT group. B16F10 melanoma cells were subcutaneously injected into the back of mice in each group. On the 10th day after modeling, the PDA and PDA+LUT groups received injection of PDA into the tumor as well as photothermal therapy. The mice in the four groups received injection of PBS, PDA (2.5  $\mu\text{g/piece}$ ), LUT (500  $\mu\text{g/piece}$ ), and PDA (2.5  $\mu\text{g/piece}$ ) plus LUT (500  $\mu\text{g/piece}$ ) into the muscle of the right thigh, respectively. We observed the tumor growth and survival of the model mice. On days 3 and 7 after treatment, the spleen of each mouse was taken to prepare a single cell suspension for analysis of macrophage differentiation and T cell expression by flow cytometry. **Results** SEM showed that the synthesized PDA had good adhesion and affinity for water. CCK8 showed that the PDA did not affect cell viability ( $P>0.05$ ). Significant differences were found in the mean fluorescence intensities of CD206 and iNOS between different groups of RAW264.7 cells ( $F=30.72, 1\ 516.00, P<0.05$ ). There were significant differences in tumor size and the expression levels of iNOS, CD206, IFN- $\gamma^+$  CD4 $^+$ , and TNF- $\alpha^+$  CD8 $^+$  of immune cells between mice with and without LUT injection, under the condition of either injecting or not injecting PDA ( $F=23.10\sim 235.52, P<0.05$ ). There were significant differences in tumor size and the expression levels of iNOS, CD206, IFN- $\gamma^+$  CD4 $^+$ , and TNF- $\alpha^+$  CD8 $^+$  of immune cells between mice with and without PDA injection, under the condition of either injecting or not injecting LUT ( $F=8.98\sim 200.67, P<0.05$ ). The survival rate of the PDA+LUT group was significantly higher than those of the other groups ( $\chi^2=9.70, P<0.01$ ).

**Conclusion** LUT could inhibit the differentiation of macrophages to M2 and promote the differentiation to M1 in mice. PDA combined with LUT could effectively inhibit tumor growth, improve survival

**[收稿日期]** 2022-11-19; **[修订日期]** 2023-01-18

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(82001754)

**[通讯作者]** 李玲, Email: lililing743@126.com

rate, and enhance the tumor-killing effect of CTL in mice.

**[KEY WORDS]** Melanoma; Cell line, tumor; Photothermal therapy; Dopamine; Polymers; Luteolin; Tumor escape; T-lymphocytes, cytotoxic

肿瘤细胞为躲避免疫清除而建立的免疫逃避机制,可使机体对肿瘤细胞产生免疫耐受<sup>[1-2]</sup>。如何打破免疫耐受,防止肿瘤患者术后复发是目前和未来临床治疗的难题<sup>[3]</sup>。放疗和化疗作为目前临床肿瘤治疗的标准疗法,在抑制肿瘤细胞生长的同时也破坏了自身免疫系统,不利于术后机体的免疫重建<sup>[4]</sup>。光热治疗是一种新兴的肿瘤治疗方法,也是国内外研究的热点,其治疗机理是可以在局部杀灭肿瘤细胞,并且对机体免疫系统损伤程度较轻<sup>[5-7]</sup>,但是肿瘤患者机体处于免疫耐受状态,经光热治疗后仍然无法避免肿瘤的复发<sup>[8]</sup>。既往研究发现,木犀草素(LUT)作为肿瘤疫苗佐剂,可以有效激活抗原提呈细胞(APC)和 CD8<sup>+</sup>T 细胞对于肿瘤细胞的杀伤功能<sup>[9]</sup>。目前在抗肿瘤治疗中,光热治疗联合佐剂的相关研究未见报道。新兴的光热材料如聚多巴胺(PDA),因其具有的良好光热转换效率、生物相容性、安全性高和易载药的特点<sup>[10]</sup>,在光热材料中被广泛应用。因此,本研究选用 PDA 与 LUT 联合治疗小鼠黑色素瘤,通过流式细胞术检测小鼠免疫水平,为抗肿瘤免疫机制激活提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验试剂

LUT(MB6799)购买于大连美伦生物科技有限公司,CCK-8 试剂盒 02571100 购买于上海雅酶生物科技有限公司,APC 抗小鼠 mouse CD11b 抗体 101212、PB450 抗小鼠 CD3 抗体 100334、FITC 抗小鼠 CD8a 抗体 100706、PE 抗小鼠 IFN- $\gamma$  抗体 505808、PE 抗小鼠 TNF- $\alpha$  抗体 506305、PE 抗小鼠 iNOS 抗体 696806、Alexa Fluor 700 抗小鼠 CD206 抗体 141734 购自美国 biolegend 公司。

### 1.2 实验动物与细胞

6~8 周的龄雌性 C57BL/6 小鼠购买于斯贝福(北京)生物技术有限公司,许可证:SCXK(京)2019-0010,将小鼠饲养于青岛大学医学部洁净动物室。RAW264.7 细胞系和 B16F10 黑色素瘤细胞购自中国科学院上海细胞资源中心。RAW264.7 细胞置于含体积分数 0.10 胎牛血清的 DMEM 高糖基础培养基中,B16F10 细胞置于含体积分数为 0.10 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,均培养于 37 °C、体积分数为 0.05 CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 PDA 的制备以及鉴定** 取 0.19 g Tris,加入 100 mL 双蒸水,搅拌 2 min,快速加入 0.121 g 盐酸多巴胺,用保鲜膜迅速封口,在保鲜膜上扎一个小孔,采用磁力搅拌器慢速搅拌 24 h,离心并用蒸馏水清洗 3 次,取最后一次离心所得底物,放入冰箱冷冻 12 h 后,放入冷冻干燥机冷冻 24 h 后,合成实验所需的 PDA 溶液。采用 Phenom ProX 扫描电子显微镜(SEM)观察 PDA 表征,使用接触角测定仪检测接触角的大小。

**1.3.2 CCK8 法检测 PDA 对 RAW264.7 细胞活性的影响** 取对数生长期 RAW264.7 细胞,胰酶消化,接种至 96 孔板,密度为每孔  $5 \times 10^8$  个细胞/L。待到细胞贴壁生长过夜以后,弃掉原培养液。将细胞分为 Control 组、脂多糖(LPS)组、PDA' 组,每组设 5 个复孔。Control 组细胞培养液不做任何处理,在 LPS 组、PDA' 组细胞的培养液中分别加入 LPS (2  $\mu$ g/L)、PDA(50 000  $\mu$ g/L),常规培养 48 h。每孔加入 CCK-8 试剂 100  $\mu$ L 孵育 2 h,以酶标仪测定波长 450 nm 处的吸光度。

**1.3.3 流式细胞术检测 LUT 对 RAW264.7 细胞分化的影响** 取对数生长期 RAW264.7 细胞,胰酶消化,接种至 96 孔板,密度为每孔  $5 \times 10^8$  个细胞/L。待到细胞贴壁生长至对数生长期后,弃掉原培养液。设置 Control 组、IL-4 组、LUT+IL-4 组,每组设 3 个复孔。Control 组细胞培养液不做任何处理,IL-4 组、LUT+IL-4 组细胞的培养液中分别加入 IL-4 (20  $\mu$ g/L)、LUT(6 670  $\mu$ g/L)+IL-4(20  $\mu$ g/L),常规培养 48 h,用 PE 抗小鼠 iNOS 抗体染色 30 min。设置 Control 组、LPS 组、LPS+LUT 组,每组 3 个复孔。Control 组细胞培养液不做任何处理,LPS 组、LPS+LUT 组细胞的培养液中分别加入 LPS (2  $\mu$ g/L)、LUT(6 670  $\mu$ g/L)+LPS(2  $\mu$ g/L),常规培养 48 h 以后,用 Alexa Fluor 700 抗小鼠 CD206 抗体染色 30 min,用 Beckman CytoFLEX 进行检测,以 FlowJo V10 软件分析各组小鼠体内巨噬细胞分化情况。

**1.3.4 动物分组及处理** C57BL/6 小鼠适应性喂养 1 周后,随机分为模型组、PDA 组、LUT 组以及 PDA+LUT 组,每组 16 只,每只小鼠背部皮下注射  $2 \times 10^6$  个 B16F10 细胞构建黑色素瘤小鼠模型。建

模第 10 天时,模型组和 LUT 组不注射 PDA,PDA 组以及 PDA+LUT 组小鼠在肿瘤局部注射 PDA (2.5  $\mu\text{g}/\text{只}$ ),并采用红外线仪(808 nm)照射肿瘤 5 min,照射 1 次后立即使用热成像仪采集小鼠热能图像。采集图像后立即对 LUT 组和 LUT+PDA 组小鼠右大腿肌肉处注射 LUT(500  $\mu\text{g}/\text{只}$ ),每天 1 次,连续 3 d,模型组和 PDA 组不注射 LUT。于治疗结束后第 2 天,每组小鼠随机取出 5 只,麻醉后脱颈处死,剖出黑色素瘤,测量计算黑色素瘤面积,计算公式为 $(\pi \times \text{长} \times \text{宽})/4$ 。另从每组小鼠中随机取出 5 只,常规饲养至治疗结束后第 14 天,观察和记录期间小鼠存活情况。

**1.3.5 流式细胞术检测各组小鼠脾脏组织中巨噬细胞的分化情况** 治疗结束后第 3 天,每组小鼠随机取出 3 只,麻醉后脱颈处死,剖离脾脏,放于 PBS 中用研磨棒研磨,以 1 500 r/min 离心 2 min,弃上清后加入红细胞裂解液,颠倒混匀后静置 3 min,再以 1 500 r/min 离心 2 min,弃上清后用 PBS 重悬,制备成单细胞悬液( $1 \times 10^{10}/\text{L}$ )。采用 APC 抗小鼠 mouse CD11b 抗体和 PE 抗小鼠 iNOS 抗体、Alexa Fluor 700 抗小鼠 CD206 抗体进行胞外染色。采用 Beckman CytoFLEX 检测细胞 iNOS 和 CD206 染色情况,通过 FlowJo V10 软件分析巨噬细胞分化情况。

**1.3.6 流式细胞术检测各组小鼠脾脏组织中 Th 和 CTL 水平** 治疗结束后第 7 天,每组小鼠随机取出 3 只,麻醉脱颈处死后剖离脾脏,于 PBS 中用研磨棒研磨,1 500 r/min 离心 2 min,弃上清液后加入红细胞裂解液,颠倒混匀静置 3 min,再 1 500 r/min 离心 2 min,弃上清后用含体积分数 0.10 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基重悬,制备成单细胞悬液(约  $1 \times 10^{10}$  个细胞/L)。脾细胞悬液置于含体积分数 0.10 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,加 10 000  $\mu\text{g}/\text{L}$  的 B16F10 抗原、1 000  $\mu\text{g}/\text{L}$  的 BFA,于 37  $^{\circ}\text{C}$  下常规培养 6 h。收集细胞,采用 PB450 抗鼠 CD3 抗体和 FITC 抗小鼠 CD8a 抗体 4  $^{\circ}\text{C}$  下染色 30 min,于 40 g/L 多聚甲醛中室温固定 8 min。PBS 洗涤后,以 0.2% 的 Triton X-100 4  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 30 min,分别用 PE 抗小鼠 IFN- $\gamma$  和 PE 抗小鼠 TNF- $\alpha$  染色 CD3 $^{+}$  T 细胞和 CD8 $^{+}$  T 细胞。使用 Beckman CytoFLEX 检测细胞 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  染色情况,使用 FlowJo V10 软件分析各组小鼠脾细胞 Th 和 CTL 水平。

**1.4 统计学分析**

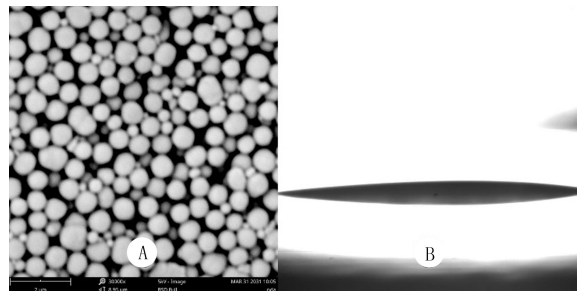
采用 GraphPad Prism 8.0.1 和 SPSS 软件进行

数据分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析或两因素析因设计方差分析,生存分析采用 Mantel-Cox 检验,以  $P < 0.05$  为差异有显著意义。

**2 结 果**

**2.1 PDA 的表征及对 RAW264.7 细胞活力的影响**

SEM 观察显示,合成的 PDA 为球形颗粒,直径均  $< 1 \mu\text{m}$ (图 1A),有较强的吸附能力;接触角测定显示其为锐角(图 1B),表示合成的 PDA 具有亲水性。Control 组、LPS 组、PDA' 组 RAW264.7 细胞的细胞活力分别为  $1.34 \pm 0.15$ 、 $0.52 \pm 0.08$ 、 $1.51 \pm 0.15$ ,组间比较差异有显著性( $F = 48.21, P < 0.05$ ),其中 LPS 组与 Control 组、PDA' 组比较差异均有显著性( $t = 7.58, 9.20, P < 0.05$ )。



A:SEM 显示结果,30 000 倍,B:PDA 涂层的接触角

**图 1 PDA 的表征**

**2.2 LUT 对 RAW264.7 细胞分化的影响**

流式细胞术检测结果显示,Control 组、IL-4 组、IL-4+LUT 组 RAW264.7 细胞 CD206 的表达水平分别为  $3 655.00 \pm 92.77$ 、 $7 329.00 \pm 1 108.00$ 、 $3 732.00 \pm 233.10$ 。单因素方差分析结果显示,各组间比较差异有显著意义( $F = 30.72, P < 0.05$ ),其中 IL-4 组与 IL-4+LUT 组、Control 组比较差异有显著性( $t = 6.72, 6.86, P < 0.05$ )。

Control 组、LPS 组、LPS+LUT 组中 iNOS 的表达水平分别为  $798.70 \pm 31.53$ 、 $3 583.00 \pm 84.79$ 、 $4 607.00 \pm 122.00$ 。各组间比较差异有显著性( $F = 1 516.00, P < 0.05$ ),三组间两两比较差异均有显著性( $t = 14.31 \sim 53.21, P < 0.05$ )。

**2.3 各组小鼠肿瘤大小的比较**

PDA 组和 PDA+LUT 组小鼠经红外线仪照射后,热成像仪观察到肿瘤部位呈现红色,模型组和 LUT 组小鼠肿瘤部位无变化(图 2)。治疗结束后第 2 天,模型组、PDA 组、LUT 组以及 PDA+LUT 组的肿瘤面积分别为( $171.30 \pm 10.52$ )、( $100.50 \pm 11.24$ )、( $88.28 \pm 7.08$ )、( $39.20 \pm 3.07$ ) $\text{mm}^2$ 。两因

素析因设计方差分析显示,PDA、LUT 及 PDA 与 LUT 交互作用均对肿瘤面积具有显著影响( $F_{PDA} = 242.30, F_{LUT} = 350.65, F_{PDA * LUT} = 7.95, P < 0.05$ )。单独效应分析显示,对小鼠注射或不注射 PDA 时,

则注射或者不注射 LUT 对肿瘤面积均有显著影响( $F = 126.52, 23.10, P < 0.05$ );对小鼠注射或不注射 LUT 时,则注射或不注射 PDA 对肿瘤面积均有显著影响( $F = 81.24, 169.00, P < 0.05$ )。

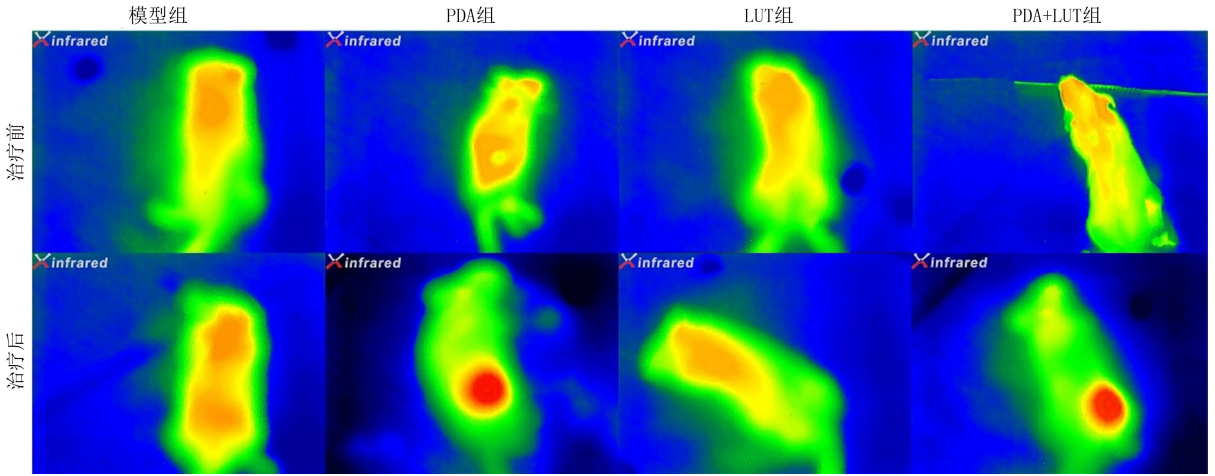


图2 各组小鼠治疗前后热成像仪观察到的肿瘤图像

### 2.4 各组小鼠生存率比较

治疗结束后第 14 天小鼠存活率的 Mantel-Cox 检验显示,PDA+LUT 组与其他 3 组比较差异均有显著性( $\chi^2 = 9.70, P < 0.05$ ),见图 3。

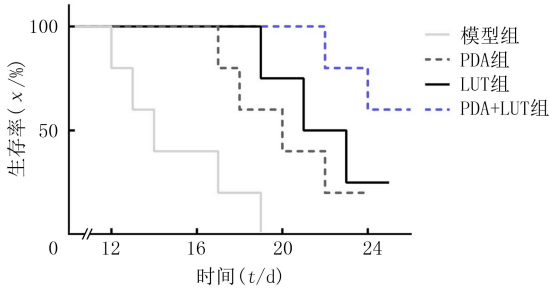


图3 各组建模小鼠生存曲线

### 2.5 PDA 并 LUT 治疗对各组小鼠脾脏巨噬细胞分化的影响

两因素析因设计方差分析显示,PDA、LUT 以及 PDA 与 LUT 交互作用对 iNOS 和 CD206 的表达水平均具有显著性影响( $F_{PDA} = 200.90, 220.01, F_{LUT} = 283.83, 272.34, F_{PDA * LUT} = 27.90, 27.04, P < 0.05$ )。单独效应分析显示,对小鼠注射或者不注射 PDA,则注射或不注射 LUT 对 iNOS 和 CD206 表达水平均具有显著影响( $F = 63.87 \sim 235.52, P < 0.05$ );对小鼠注射或不注射 LUT 时,则注射或不注射 PDA 对 iNOS 和 CD206 表达水平均有显著影响( $F = 39.54 \sim 200.67, P < 0.05$ ),见表 1。

### 2.6 PDA 并 LUT 对小鼠体内 CTL 肿瘤杀伤功能的影响

两因素析因设计的方差分析显示,PDA、LUT

以及 PDA 与 LUT 交互作用均对  $IFN-\gamma^+ CD4^+$  和  $TNF-\alpha^+ CD8^+$  细胞比例均具有显著性影响( $F_{PDA} = 59.48, 65.78, F_{LUT} = 181.38, 176.54, F_{PDA * LUT} = 6.00, 15.00, P < 0.05$ )。单独效应分析结果显示,对小鼠注射或不注射 PDA,则注射或不注射 LUT 对  $IFN-\gamma^+ CD4^+$  和  $TNF-\alpha^+ CD8^+$  细胞比例均有显著影响( $F = 44.31 \sim 147.23, P < 0.05$ );对小鼠注射或不注射 LUT 时,则注射或不注射 PDA 对  $IFN-\gamma^+ CD4^+$  和  $TNF-\alpha^+ CD8^+$  细胞比例均具有显著的影响( $F = 8.98 \sim 71.80, P < 0.05$ ),见表 1。

表 1 各组小鼠脾脏巨噬细胞标志荧光强度和 T 细胞标记阳性细胞百分率比较 ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

组别	荧光强度		阳性细胞比例( $\%$ )	
	iNOS	CD206	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$
模型组	860.30 ± 48.19	2 327.00 ± 166.40	0.55 ± 0.14	1.24 ± 0.14
PDA'组	1 483.00 ± 120.00	1 327.00 ± 8.66	1.76 ± 0.14	3.87 ± 0.86
LUT 组	1 339.00 ± 132.00	1 244.00 ± 29.94	3.09 ± 0.32	7.10 ± 0.31
PDA+LUT 组	2 531.00 ± 26.08	63.00 ± 34.77	5.36 ± 0.79	14.53 ± 1.94

## 3 讨 论

肿瘤免疫逃逸是指肿瘤细胞通过各种机制逃避免疫系统的识别和攻击,是肿瘤生存和发展的重要原因<sup>[11]</sup>。抑制肿瘤细胞的免疫耐受,激活人体自身的抗肿瘤免疫功能,一直是肿瘤治疗的研究方向和热点<sup>[12-13]</sup>。而传统治疗方法如化疗、放疗等,毒副作用大,患者难以耐受<sup>[14]</sup>,因此需要寻找更安全有效的抗肿瘤疗法。

研究表明,激活 APC 细胞是抑制肿瘤免疫耐受的关键<sup>[15]</sup>,因为 APC 细胞在体内的一个重要功能是促进抗原特异性免疫应答,是激活特异性杀伤肿瘤细胞功能的关键起始点<sup>[16]</sup>。在先前的研究中已经证实,LUT 可以促进体外巨噬细胞向 M1 方向极化<sup>[9]</sup>。巨噬细胞在调节肿瘤免疫微环境中发挥着重要作用<sup>[17-18]</sup>,其中 M1 巨噬细胞抑制肿瘤生长,而 M2 巨噬细胞促进肿瘤生长,使 M2 巨噬细胞复极化为 M1 巨噬细胞或者抑制 M2 巨噬细胞生成是治疗实体瘤的经典理论<sup>[19]</sup>。

光热治疗作为近年来新兴的肿瘤治疗手段,与传统手术切除肿瘤相比,虽然在治疗位置上具有局限性,但在抑制肿瘤细胞生长同时,会有大量肿瘤相关抗原(TSA)和肿瘤特异性抗原(TAA)的释放,可以诱导机体产生抗肿瘤的主动免疫应答<sup>[20-22]</sup>。此外,PDA 经近红外照射后产生的热能还有调节肿瘤免疫微环境和激活荷瘤小鼠免疫反应的作用<sup>[23]</sup>。PDA 作为生物材料已被广泛应用<sup>[24-26]</sup>,具有清除自由基、屏蔽紫外线、光热转化等功能<sup>[27]</sup>。本研究使用盐酸多巴胺合成 PDA,SEM 下显示其球形颗粒直径 $<1\ \mu\text{m}$ ,说明其吸附能力较强;通过接触角测定仪测定接触角,显示接触角为锐角,说明本研究合成的 PDA 具有亲水性;CCK-8 实验检测结果显示 PDA 组对于细胞活性没有影响,提示本研究合成的 PDA 生物相容性良好。

本研究以流式细胞术检测 LUT 对 RAW264.7 细胞分化的影响,结果显示 LUT+IL-4 组与 IL-4 组相比,M2 标志因子 CD206 表达水平明显下调,LUT+LPS 组与 LPS 组相比,M1 标志因子 iNOS 表达水平明显上调,提示在 RAW264.7 细胞系中 LUT 可以抑制 M2 的极化,并促进 M1 极化。本研究又通过构建黑色素瘤小鼠模型,验证 LUT 是否可以抑制 M2 极化并促进 M1 的极化,研究结果显示,PDA+LUT 组小鼠脾脏中 iNOS 表达水平明显上调,而 CD206 表达水平明显下调,再次说明 PDA 联合 LUT 治疗将会抑制小鼠体内巨噬细胞向 M2 极化。

本研究构建了黑色素瘤小鼠模型,发现不注射 PDA 的模型小鼠经过近红外线照射后,并不能在肿瘤部位聚集热能,而注射 PDA 的模型小鼠经过近红外线照射后,可在肿瘤部位聚集热能,从而起到杀灭肿瘤的作用。同时 PDA+LUT 组小鼠肿瘤增长速度与其他组比较显著减缓,并且其生存率与其他组比较显著延长,说明 PDA 并 LUT 治疗后会抑制

小鼠肿瘤生长并提高生存率,提示光热治疗后肿瘤部位会有大量抗原释放,与 LUT 共同作用下激活机体抗肿瘤免疫,起到抑制肿瘤生长的作用。巨噬细胞的 M2 极化是产生肿瘤免疫耐受的重要因素之一<sup>[28-29]</sup>,为了进一步证明打破 M2 免疫耐受的微环境后,CTL 是否被激活,本研究又通过流式细胞术检测治疗结束后第 7 天时小鼠脾脏组织,结果显示 PDA+LUT 组小鼠脾脏中  $\text{CD4}^+\text{IFN-}\gamma^+$  细胞比例与其他组比较显著上调,说明小鼠脾脏中 Th1 细胞增多。本研究同样以流式细胞术检测了治疗结束后第 7 天小鼠脾脏组织中  $\text{CD8}^+\text{TNF-}\alpha^+$  细胞的比例,发现 PDA+LUT 组与其他组的  $\text{CD8}^+\text{TNF}^+$  细胞比例比较显著上调,大量的杀伤相关细胞因子的产生,也预示着 PDA+LUT 组存在着较多被激活的  $\text{CD8}^+\text{T}$  细胞,并且有着较为强大的杀伤功能<sup>[30]</sup>,因此在 PDA 并 LUT 治疗促进巨噬细胞 M1 极化后,增强 Th1 以及 CTL 的功能,最终激活了机体的抗肿瘤免疫反应。

综上所述,本研究结果显示 PDA 并 LUT 联合治疗黑色素瘤模型小鼠以后,会诱导小鼠机体产生抗肿瘤的主动免疫应答,从而抑制巨噬细胞 M2 极化并且促进其向 M1 极化,增加小鼠脾脏组织内的  $\text{CD4}^+\text{IFN-}\gamma^+$  和  $\text{CD8}^+\text{TNF-}\alpha^+$  细胞比例,其抗肿瘤免疫作用可能是通过激活 Th1-CTL 发挥作用的。本研究为小鼠实体瘤消除后释放抗原激活机体免疫能力机制的研究提供了实验依据,也为抗肿瘤治疗提供了新思路。

**伦理批准和动物权利声明:**本研究涉及的所有动物实验均已通过青岛大学医学部伦理委员会的审核批准(文件号 QDUAE2022493)。所有实验过程均遵照《实验动物管理条例》的规定进行。

**作者声明:**李程琳、李玲、王梓聿、曹丁元、国超凡参与了研究设计;李程琳、王爽、李玲参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文。所有作者均声明不存在利益冲突。

## [参考文献]

- [1] PRENDERGAST G C. Immune escape as a fundamental trait of cancer: Focus on IDO[J]. *Oncogene*, 2008, 27(28):3889-3900.
- [2] PRENDERGAST G C, JAFFEE E M. Cancer immunologists and cancer biologists: Why we didn't talk then but need to now[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(8):3500-3504.
- [3] YIN S S, GAO F H. Molecular mechanism of tumor cell immune escape mediated by CD24/siglec-10[J]. *Front Immunol*, 2020, 11:1324.
- [4] KAKEJI Y, OSHIKIRI T, TAKIGUCHI G, et al. Multimo-

- dality approaches to control esophageal cancer: Development of chemoradiotherapy, chemotherapy, and immunotherapy [J]. *Esophagus*, 2021,18(1):25-32.
- [5] CHU K F, DUPUY D E. Thermal ablation of tumours: Biological mechanisms and advances in therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014,14(3):199-208.
- [6] LI L, YANG S, SONG L J, et al. An endogenous vaccine based on fluorophores and multivalent immunoadjuvants regulates tumor micro-environment for synergistic photothermal and immunotherapy[J]. *Theranostics*, 2018,8(3):860-873.
- [7] SHANG T Y, YU X Y, HAN S S, et al. Nanomedicine-based tumor photothermal therapy synergized immunotherapy [J]. *Biomater Sci*, 2020,8(19):5241-5259.
- [8] HOU X Y, TAO Y K, PANG Y Y, et al. Nanoparticle-based photothermal and photodynamic immunotherapy for tumor treatment[J]. *Int J Cancer*, 2018,143(12):3050-3060.
- [9] TIAN L, WANG S, JIANG S S, et al. Luteolin as an adjuvant effectively enhances CTL anti-tumor response in B16F10 mouse model[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021,94:107441.
- [10] GU Z J, ZHU S, YAN L, et al. Graphene-based smart platforms for combined cancer therapy[J]. *Adv Mater*, 2019,31(9):e1800662.
- [11] JIANG X J, WANG J, DENG X Y, et al. Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape[J]. *Mol Cancer*, 2019,18(1):10.
- [12] MELLMAN I, COUKOS G, DRANOFF G. Cancer immunotherapy comes of age[J]. *Nature*, 2011,480(7378):480-489.
- [13] HARARI A, GRACIOTTI M, BASSANI-STERBERG M, et al. Antitumour dendritic cell vaccination in a priming and boosting approach[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020,19(9):635-652.
- [14] ZENG Y. Advances in mechanism and treatment strategy of cancer[J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2018,64(6):1-3.
- [15] SMYTH M J, NGIOW S F, RIBAS A, et al. Combination cancer immunotherapies tailored to the tumour microenvironment[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016,13(3):143-158.
- [16] WILKE C M, KRYCZEK I, ZOU W P. Antigen-presenting cell (APC) subsets in ovarian cancer[J]. *Int Rev Immunol*, 2011,30(2-3):120-126.
- [17] LI S S, YU J L, HUBER A, et al. Metabolism drives macrophage heterogeneity in the tumor microenvironment[J]. *Cell Rep*, 2022,39(1):110609.
- [18] WANG H G, YUNG M M H, NGAN H Y S, et al. The impact of the tumor microenvironment on macrophage polarization in cancer metastatic progression[J]. *Int J Mol Sci*, 2021,22(12):6560.
- [19] XIA Y Q, RAO L, YAO H M, et al. Engineering macrophages for cancer immunotherapy and drug delivery[J]. *Adv Mater*, 2020,32(40):2002054.
- [20] HANNA M G Jr, PETERS L C. Specific immunotherapy of established visceral micrometastases by BCG-tumor cell vaccine alone or as an adjunct to surgery[J]. *Cancer*, 1978,42(6):2613-2625.
- [21] JAIN P K, LEE K S, EL-SAYED I H, et al. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: Applications in biological imaging and biomedicine[J]. *J Phys Chem B*, 2006,110(14):7238-7248.
- [22] NIE S, EMORY S R. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering[J]. *Science*, 1997,275(5303):1102-1106.
- [23] LI Y, HE L H, DONG H Q, et al. Fever-inspired immunotherapy based on photothermal CpG nanotherapeutics: The critical role of mild heat in regulating tumor microenvironment [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2018,5(6):1700805.
- [24] WANG Y T, HUANG Q, HE X, et al. Multifunctional melanin-like nanoparticles for bone-targeted chemo-photothermal therapy of malignant bone tumors and osteolysis[J]. *Biomaterials*, 2018,183:10-19.
- [25] ZHANG F, ZHANG Q, LI X Y, et al. Mussel-inspired dopamine-CuII coatings for sustained in situ generation of nitric oxide for prevention of stent thrombosis and restenosis [J]. *Biomaterials*, 2019,194:117-129.
- [26] LI X Y, LIU J X, YANG T, et al. Mussel-inspired "built-up" surface chemistry for combining nitric oxide catalytic and vascular cell selective properties [J]. *Biomaterials*, 2020, 241:119904.
- [27] LIU Y L, AI K L, LU L H. Polydopamine and its derivative materials: Synthesis and promising applications in energy, environmental, and biomedical fields[J]. *Chem Rev*, 2014,114(9):5057-5115.
- [28] FANG W L, ZHOU T, SHI H, et al. Progranulin induces immune escape in breast cancer via up-regulating PD-L1 expression on tumor-associated macrophages (TAMs) and promoting CD8<sup>+</sup> T cell exclusion[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021,40(1):4.
- [29] WEI C Y, ZHU M X, ZHANG P F, et al. PKC $\alpha$ /ZFP64/CSF1 axis resets the tumor microenvironment and fuels anti-PD1 resistance in hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2022,77(1):163-176.
- [30] CUI C, JOSHI N S, CRAFT J E. Neoantigen driven B cell and CD4<sup>+</sup> T follicular helper cell collaboration promotes robust anti-tumor CD8<sup>+</sup> T cell responses[J]. *J Immunol*, 2021,184(25):6101-6118.e13.