

网络出版时间: 2018-2-11 11:56 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180210.0835.011.html>

◇基础医学研究◇

TLR7 激活上调细胞周期蛋白表达促进 Hela 细胞增殖

刘莉 李磊 顾亚男 周宏 罗欣 张胜权

摘要 目的 探讨 Toll 样受体 7 (TLR7) 信号通路激活对人宫颈癌 Hela 细胞周期蛋白表达及对细胞增殖的影响。方法 使用不同浓度的 Gardiquimod 经过不同的时间刺激 Hela 细胞,采用 MTS 比色法分析其对 Hela 细胞增殖的影响;采用流式细胞仪检测同一浓度的 TLR7 激动剂 Gardiquimod 经过不同的时间刺激 Hela 细胞后对 Hela 细胞周期的影响;Western blot 分析 Gardiquimod 经过不同的时间刺激 Hela 细胞后对细胞周期蛋白 Cyclin B1、Cyclin E 表达水平的影响。结果 TLR7 的激活促进 Hela 细胞增殖,并呈时间和浓度依赖性;Gardiquimod 可时间依赖性增加细胞周期在 S 期的比例;Cyclin B1、Cyclin E 的表达水平随着 Gardiquimod 作用时间的增加而增加。结论 TLR7 激动剂 Gardiquimod 可能通过上调细胞周期蛋白 Cyclin B1、Cyclin E 表达水平,进而促进 Hela 细胞增殖。

关键词 TLR7; Hela 细胞; Gardiquimod; 细胞周期蛋白; 细胞增殖

中图分类号 R 737.33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)02-0167-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.02.001

宫颈癌在世界上是第二个主要引起女性癌症死亡的疾病^[1],引起女性宫颈癌的主要原因是人乳头状瘤病毒感染。此外,一些其他的致病因子,例如普通细菌、病毒和原生动物病原体感染女性生殖道引起黏膜炎症参与宫颈癌的发生^[2]。

Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 是一种重要的模式识别受体广泛表达在天然免疫系统,是一类 I 型跨膜糖蛋白,由胞外区、跨膜区和胞质区组成。TLRs 在固有免疫和获得性免疫中扮演着重要的角色。Toll 样受体 7 (TLR7) 是 Toll 样受体家族成员之一,位于核内体表面^[3],能够识别单链 RNA,包括人类免疫缺陷病毒、流感病毒、水疱性口炎病毒

等^[4-5]。TLRs 家族的信号机制是依赖于胞质区的接头蛋白分子和激酶进行信号转导。根据接头蛋白的不同,可以分为衔接蛋白 (MyD88) 依赖性和非依赖性途径。定位于胞内的 TLR7 与配体识别后,募集 TIR 结构域,激活有丝分裂原激活蛋白激酶和核转录因子 (NF- κ B) 信号途径,进而调控促炎性细胞因子基因的表达,发挥其抗病毒及抗肿瘤作用^[6-7]。咪唑喹啉类 (Imiquimod) 是一种新型的具有核苷类似物结构的家族成员之一,可以激活 TLR7 信号通路,但其机制尚不完全清楚。咪唑喹啉衍生物 (Gardiquimod) 与 Imiquimod 都是 TLR7 激动剂,能够激活 TLR7 信号途径,但与 Imiquimod 相比较, Gardiquimod 在肿瘤治疗中展现出更大的潜在发展性^[8]。前期研究^[9]显示 Gardiquimod 能够促进 Hela 细胞增殖,该研究进一步探讨了 Gardiquimod 激活 TLR7 通路促进 Hela 细胞增殖的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂 Hela 细胞购自美国 ATCC 公司;胎牛血清和 DMEM 购自美国 Gibco 公司;胰酶、RIPA 裂解液、青霉素链霉素溶液及周期试剂盒购自中国上海碧云天生物公司;MTS 试剂盒及 Gardiquimod 购自美国 Sigma 公司;Cyclin B1、Cyclin E 及 β -actin 均购自美国 Abcam 公司;二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人宫颈癌细胞 Hela 生长于含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素链霉素溶液的 DMEM 培养液中,在 37 °C、5% CO₂ 恒温恒湿培养箱内传代培养。

1.2.2 细胞增殖实验 (MTS) 胰酶消化收集 Hela 细胞,并调整细胞悬液浓度为 3×10^4 /ml,分别接种于 96 孔板,每孔 100 μ l,培养箱贴壁 24 h,加入 Gardiquimod 药液,使终浓度为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 μ g/ml,并设对照组 (0 μ g/ml),继续培养 72 h 后加入 MTS 试剂,放入温箱孵育 3 h 后用酶标仪检测 490 nm 处吸光度。同上述方法种 96 孔板,加入

2017-11-19 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: 刘莉,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

终浓度为 $2 \mu\text{g/ml}$ 的 Gardiquimod 药液,作用时间分别为 1~5 d,对照组培养液加入相同浓度的 PBS,5 d 后加入 MTS 试剂,放入温箱孵育 3 h 后用酶标仪检测 490 nm 处吸光度。根据对照组数值计算每组细胞存活率。

1.2.3 细胞周期检测 胰酶消化收集 Hela 细胞并调整细胞悬液浓度为 $5 \times 10^4/\text{ml}$,分别接种于 12 孔板,每孔加入 1 ml,培养箱贴壁 24 h,加入终浓度为 $2 \mu\text{g/ml}$ 的 Gardiquimod 药液,作用时间分别为 1~5 d,对照组培养液加入相同浓度的 PBS。胰酶消化再次收集细胞,按照周期试剂盒操作指南,室温下避光染色 30 min,流式细胞仪检测细胞周期,采用 Flowjo 软件分析细胞周期,实验重复 3 次。

1.2.4 Western blot 检测周期蛋白 Cyclin B1、Cyclin E 的表达 胰酶消化收集 Hela 细胞,并调整细胞悬液浓度为 $5 \times 10^4/\text{ml}$,分别接种于 24 孔板,每孔加入 0.5 ml,待细胞长到 80% 汇合时加入终浓度为 $2 \mu\text{g/ml}$ 的 Gardiquimod 药液,作用时间分别为 0.2、0.5、1、3、6、12、24 h 并设置对照组。培养后收集每组细胞总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,按 $10 \mu\text{l}$ /孔上样量加入 10% 凝胶孔中,依次进行:电泳(浓缩胶 60 V,分离胶 120 V 约 2 h)、转移(300 mA 恒流 1.5 h)、封闭(5% 的脱脂牛奶常温封闭 2 h)、孵育一抗(4 °C 孵育过夜)、孵育二抗(常温摇床孵育 2 h)、Thermo Scientific SuperSignal West Pico Trial Kit 化学发光底物显影,分析周期蛋白的表达。

1.3 统计学处理 采用 SPSS Statistics 统计软件进行统计分析,所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,多组均数比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Gardiquimod 促进 Hela 细胞增殖 随着 Gardiquimod 药物浓度的增加,细胞相对存活率呈明显的上升趋势,当 Gardiquimod 药液浓度为 $2 \mu\text{g/ml}$ 时 Hela 细胞相对存活率最大(130%),与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。当 Gardiquimod 药物浓度一定时,随着作用时间的增加,细胞相对存活率增加,在第 5 天相对存活率最大(135%),与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 Gardiquimod 对 Hela 细胞周期的影响 当 Gardiquimod 药物浓度($2 \mu\text{g/ml}$)一定时,随着时间的增加,Hela 细胞周期中的 S 期呈逐渐上升趋势,第 2、4、5 天实验组细胞 DNA 平均含量为 14.85%、

16.06% 和 19.09%,与对照组(10.96%)相比差异有统计学意义($F = 32.997, P < 0.05$)。 G_0/G_1 期随着作用时间的增加呈现下降的趋势,第 2、4、5 天实验组细胞 DNA 平均含量为 74.36%、74.01% 和 73.11%,与对照组(81.85%)相比差异有统计学意义($F = 54.585, P < 0.05$)。而 G_2/M 期细胞无明显变化。见图 2。

2.3 周期蛋白 Cyclin B1、Cyclin E 的表达 Western blot 结果显示经 Gardiquimod 处理 Hela 细胞后,随着时间的增加,细胞内 Cyclin B1、Cyclin E 蛋白的含量明显增加,各实验组与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3。

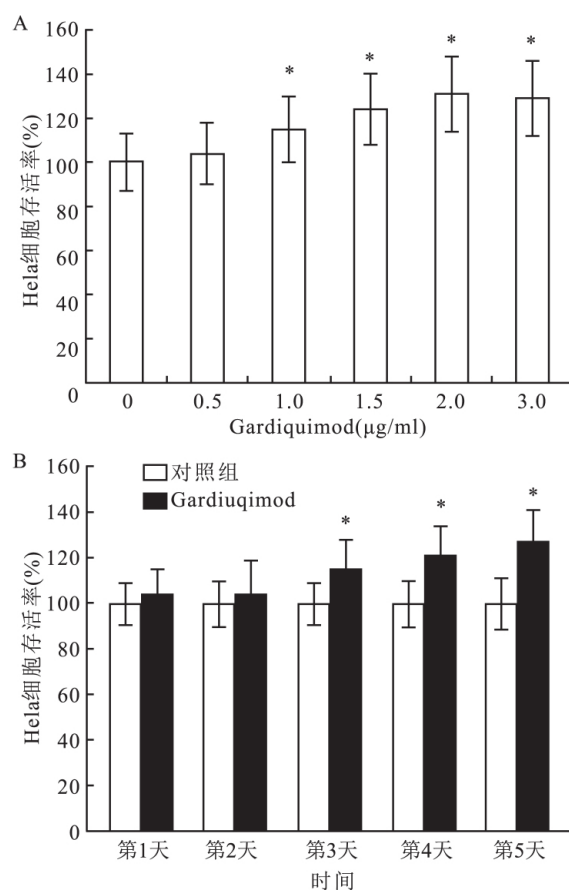


图1 MTS分析 Gardiquimod 不同浓度和不同时间对 Hela 细胞增殖的影响

A: 不同浓度的 Gardiquimod 作用 Hela 细胞 72 h 后对细胞增殖的影响; B: Gardiquimod ($2 \mu\text{g/ml}$) 作用 Hela 细胞不同时间后对细胞增殖的影响; 与对照组 ($0 \mu\text{g/ml}$) 比较: * $P < 0.05$

3 讨论

TLRs 通过识别保守的病原体相关的分子位点,例如细菌的脂多糖、脂肽,或者是细菌和病毒的 DNA、RNA 等,诱发获得性免疫反应。此外 TLR7 还广泛表达于多种组织和细胞,包括 DC、B、T 细胞等。

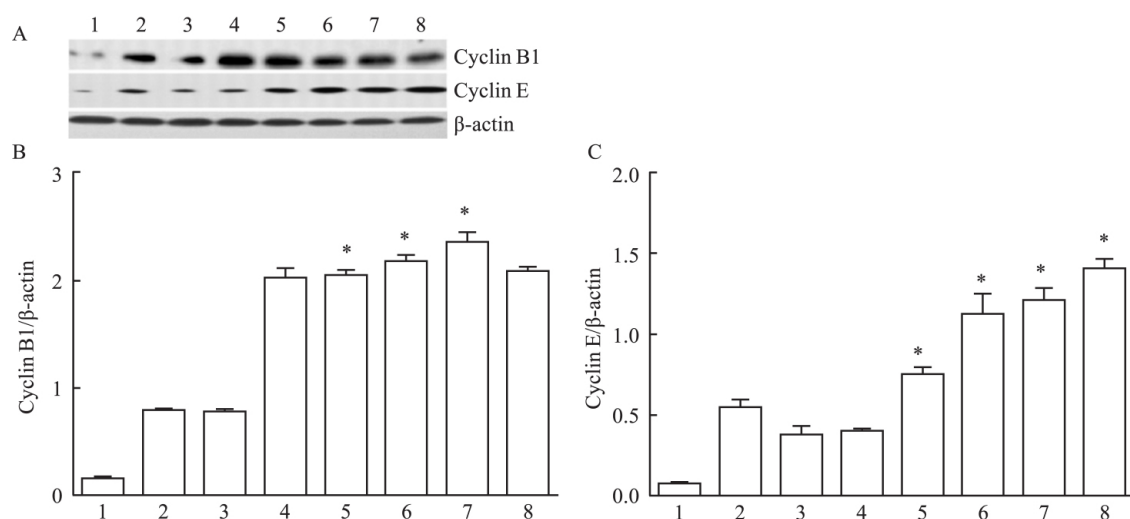
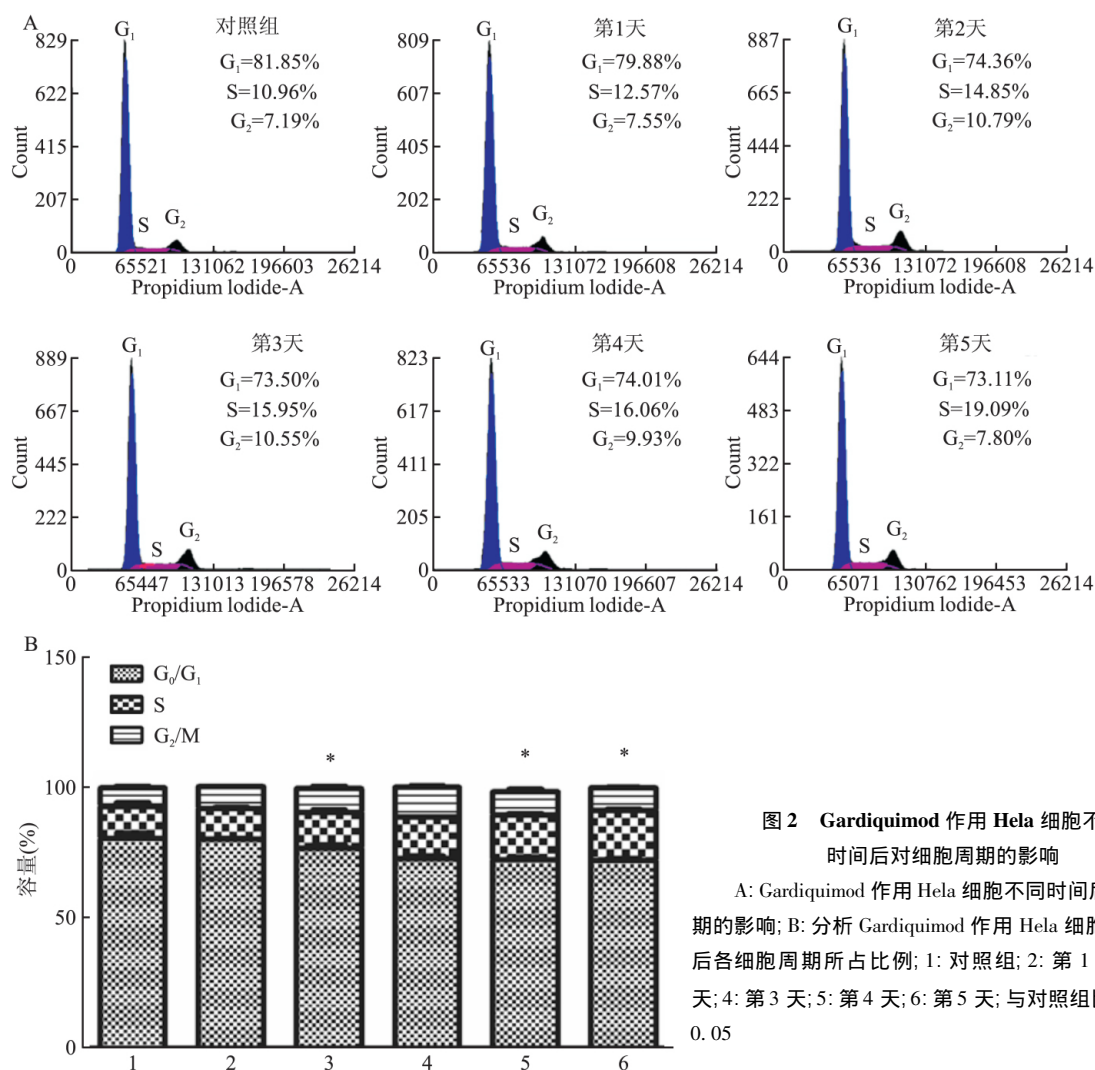


图3 Western blot 分析 Cyclin B1、Cyclin E 的表达

A: Gardiquimod 作用 HeLa 细胞不同时间后对 Cyclin B1、Cyclin E 表达的影响; B: 分析 Cyclin B1 的表达; C: 分析 Cyclin E 的表达; 1: 对照组; 2: 0.2 h; 3: 0.5 h; 4: 1 h; 5: 3 h; 6: 6 h; 7: 12 h; 8: 24 h; 与对照组比较: * $P < 0.05$

TLR7 激活后可诱导多种炎症因子表达,包括白介素-10、白介素-12、白介素-23、干扰素 γ 、白介素-2 等。研究^[10]显示 TLR7 的激活在人乳头状瘤病毒感染引起的癌症治疗中通过增加巨噬细胞和 NK 细胞的活性从而抑制肿瘤的增殖。Gardiquimod, TLR7 激动剂,在鼠科动物前列腺癌和膀胱癌中对肿瘤的增殖具有抑制作用并且在细胞周期的 G2/M 期产生阻滞作用^[11]。然而,本研究显示:当 Gardiquimod 作用 Hela 细胞后 S 期 DNA 增加明显,细胞增殖旺盛。国外研究^[12]显示, Cyclin E 经常在肿瘤细胞中过度表达,这种过度表达与乳腺癌患者的生存率下降有关。本研究显示:细胞周期蛋白 Cyclin B1、Cyclin E 随着 Gardiquimod 作用时间的增加而增加,TLR7 信号通路激活后引起细胞周期的改变,周期蛋白水平也随之改变。Cyclin B1、Cyclin E 的上调可能参与 TLR7 信号通路的激活从而促进 Hela 细胞增殖。这一研究结果提示 Gardiquimod 对不同的肿瘤可能存在不同的作用,甚至是相反的结果,具体机制待进一步研究。

综上所述, Gardiquimod 引起 Hela 细胞周期和周期蛋白发生了变化,并对 Hela 细胞的增殖起到了一定的促进作用,首次发现了 TLR7 的激活与宫颈癌细胞增殖的相关关系,为研究宫颈癌提供了一个新的思路。

参考文献

[1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A, et al. Cancer Statistics 2017 [J].

- CA Cancer J Clin 2017 67(1): 7-30.
- [2] Ogilvie G, Nakisige C, Huh W K, et al. Optimizing secondary prevention of cervical cancer: Recent advances and future challenges [J]. Int J Gynaecol Obstet 2017, 138 (Suppl 1): 15-9.
- [3] Maeda K, Akira S. TLR7 Structure: Cut in Z-Loop [J]. Immunity, 2016 45(4): 705-7.
- [4] Sepehri Z, Kiani Z, Alavian S M, et al. The link between TLR7 signaling and hepatitis B virus infection [J]. Life Sci 2016, 158: 63-9.
- [5] Lebold K M, Jacoby D B, Drake M G, et al. Toll-like receptor 7-targeted therapy in respiratory disease [J]. Transfus Med Hemother 2016 43(2): 114-9.
- [6] Ntoufa S, Vilia M G, Stamatiopoulos K, et al. Toll-like receptors signaling: A complex network for NF-kappaB activation in B-cell lymphoid malignancies [J]. Semin Cancer Biol 2016, 39: 15-25.
- [7] Landström M. The TAK1-TRAF6 signalling pathway [J]. Int J Biochem Cell Biol 2010 42(5): 585-9.
- [8] 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.
- [9] 李磊, 程丰伟, 王芳, 等. TLR7 激活对 Hela 细胞增殖的影响 [J]. 安徽医科大学学报 2014 49(7): 910-2.
- [10] Chi H, Li C M, Zhao F S, et al. Anti-tumor activity of toll-like receptor 7 agonists [J]. Front Pharmacol 2017 8: 304.
- [11] Han J H, Lee J, Jeon S J, et al. In vitro and in vivo growth inhibition of prostate cancer by the small molecule imiquimod [J]. Int J Oncol 2013 42(6): 2087-93.
- [12] Samai P, Pyenson N, Jiang W, et al. Co-transcriptional DNA and RNA cleavage during type III CRISPR-cas immunity [J]. Cell, 2015 161(5): 1164-74.

Activation of TLR7 up-regulation expression level of cyclins and promotes Hela cell proliferation

Liu Li, Li Lei, Gu Yanan, et al

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

Abstract Objective To explore the effects of TLR7 agonist-Gardiquimod on the proliferation and cell cycle of activation of TLR7 in Hela cells. **Methods** The cells were treated with different concentration of Gardiquimod for different times. MTS was performed to detect the impact of Gardiquimod on the proliferation of Hela cells. Cell cycle were detected by flow cytometry analysis after treatment with different times of Gardiquimod and Western blot was used to analyze the expression of Cyclin B1 and Cyclin E. **Results** The activation of TLR7 could facilitate the proliferation of Hela cells and existing dose and time dependence. Flow cytometry indicated that activation of TLR7 could arrest the cell cycle in S phase and Western blot demonstrated that treatment with Gardiquimod could increase expression of Cyclin B1 and Cyclin E in a time dependence manner. **Conclusion** The activation of TLR7 may promote proliferation of Hela cells via increasing the expression of Cyclin B1 and Cyclin E.

Key words TLR7; Hela cells; Gardiquimod; Cyclin; cell proliferation