

TLR4 mAb 对人正常肝内胆管上皮细胞 LPS - TLR4 - NF - κ B 通路的影响

刘 辉, 余宏铸, 韩 珑, 王正林

摘要 目的 对脂多糖 (LPS) 及 Toll 样受体 4 单克隆抗体 (TLR4 mAb) 作用于体外培养的人肝内胆管细胞 (HiBEC) 后其 TLR4 mRNA 和核转录因子- κ B (NF- κ B) mRNA 的表达情况进行了研究。方法 体外培养 HiBEC, 采用 RT-PCR 法检测经 LPS 和不同浓度的 TLR4 mAb 作用后, HiBEC 细胞株中 TLR4 mRNA 和 NF- κ B mRNA 的表达情况。结果 LPS 可上调 HiBEC 中 TLR4 mRNA 和 NF- κ B mRNA 的表达 ($P < 0.05$); 而 LPS 作用于 TLR4 mAb 处理后的 HiBEC 中其 TLR4 mRNA 和 NF- κ B mRNA 的表达下调; 高质量浓度 TLR4 mAb 使 NF- κ B mRNA 的表达下调更明显 ($P < 0.05$)。结论 LPS 能上调 HiBEC 中 TLR4 mRNA 和 NF- κ B mRNA 的表达; 而 TLR4 mAb 则能拮抗 LPS 对 HiBEC 的刺激作用, 下调

TLR4 mRNA 和 NF- κ B mRNA 的表达。

关键词 脂多糖; Toll 样受体 4 单克隆抗体; Toll 样受体 4; 核转录因子- κ B

中图分类号 R 349.54

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2015) 07 - 0946 - 04

肝内胆管细胞癌 (intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC) 是一类来源于肝内二级胆管以上的胆管上皮细胞恶性肿瘤^[1], 在原发性肝癌中占第二位, 约为 5% ~ 30%, 仅次于肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC)。台湾超过 70% 的 ICC 患者合并肝内胆管结石, 日本 6% ~ 8% 的 ICC 患者手术切除标本中发现了肝内胆管结石。研究^[2]显示, 肝内胆管结石患者中有 3% ~ 10% 的患者最终会发生 ICC, 肝内胆管结石是 ICC 的危险因素之一。关于脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) - Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) - 核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 经典炎症通路在人肝内胆管细胞 (human intrahepatic biliary epithelial cell, HiBEC) 中的作用研

2015 - 04 - 23 接收

基金项目: 2013 年安徽省年度重点科研计划项目 (编号: 1301043034)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院肝胆外科, 合肥 230022

作者简介: 刘 辉, 男, 硕士研究生;

余宏铸, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: hong-zhu.620929@aliyun.com

The effect of PPAR δ agonist-GW501516 on the differentiation of rats bone marrow stromal stem cells

Tao Xiaoyan, Pan Tianrong, Zhong Xing, et al

(Dept of Endocrinology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the effect of peroxisome proliferators-activated receptor δ (PPAR δ) agonist GW501516 on the adipogenic and osteogenic differentiation of rats bone marrow stromal stem cells (BMSCs).

Methods Rat BMSCs were cultured using whole marrow adhesion method. The biomarkers on the cell membrane were identified using flow cytometry. BMSCs were randomly divided into PPAR δ agonist group and control group. The expression of osteoblast differentiation markers (alkaline phosphatase, osteocalcin) and adipocyte differentiation markers (ap2, fat vitronectin) were detected using Real-time PCR after osteogenic and adipogenic induced culture. Mineralized nodules and lipid droplets were detected using alizarin red and oil red O staining. **Results** Compared with the control group, cells in PPAR δ agonist group had more expression of osteoblast differentiation markers and less expression of adipocyte differentiation markers. There were more mineralized nodules and fewer lipid droplets in the PPAR δ agonist group. **Conclusion** PPAR δ agonist can promote osteogenic differentiation of BMSCs, and inhibit their differentiation into adipocytes direction.

Key words osteoporosis; PPAR δ ; bone marrow stem cells; cell differentiation

究^[3-5]较少。该试验通过体外细胞培养,研究 LPS 及 TLR4 单克隆抗体(TLR4 monoclonal antibodies, TLR4 mAb)作用于体外培养的 HiBEC 后其的 TLR4 和 NF- κ B 的表达情况,以探讨 LPS 是否通过 TLR4 影响 HiBEC 中 TLR4 和 NF- κ B 的表达情况以及 LPS-TLR4-NF- κ B 通路在 HiBEC 中的作用,为下一步寻找特异性的药物阻止受胆管结石长期刺激的胆管壁细胞发生癌变提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 HiBEC 购自上海雷蒂生物科技发展有限公司; RPMI-1640 培养基购自美国 Invitrogen 公司; 四季青胎牛血清购自浙江天杭生物技术公司; LPS、DEPC 购自美国 Sigma 公司; TLR4 mAb 购自美国 eBioscience 公司; 逆转录试剂盒购自美国 Thermo 公司; PCR 反应液 6 × Loading buffer 购自日本 TaKa-Ra 公司; 氯仿、无水乙醇溶液、异丙醇溶液均购自上海苏懿化学试剂有限公司; 核酸染料 goldview 购自北京赛百盛公司; 所有引物由 primer 5.0 软件设计,由上海生工生物工程公司合成(表 1)。所有仪器由安徽医科大学中心实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 HiBEC 培养 RPMI-1640 培养基中添加 15% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素为完全培养基,将 HiBEC 接种于培养瓶中,置于 37 °C、5% CO₂、95% 湿度的培养箱中培养。当细胞生长密度达 80% 换成不含青霉素、链霉素,含 15% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中继续培养。

1.2.2 实验分组 预实验显示 HiBEC 在 4 μg/ml LPS、1 μg/ml TLR4 mAb、3 μg/ml TLR4 mAb 作用 24 h 的条件下,活性没有产生不可逆性改变,细胞数量没有发生改变,显微镜下观察细胞形态无明显改变,细胞核未见萎缩。将 HiBEC 培养至第 4 代,然后分成以下 6 组:对照组(仅加培养液);A 组(加入终质量浓度为 4 μg/ml 的 LPS);B 组(加入终质量浓度为 1 μg/ml TLR4 mAb);C 组(加入终质量浓度为 3 μg/ml 的 TLR4 mAb);D 组(终质量浓度为 1 μg/ml 的 TLR4 mAb 预处理 24 h,再加入终质量浓度为 4 μg/ml 的 LPS 作用 6 h);E 组(终质量浓度为 3 μg/ml 的 TLR4 mAb 预处理 24 h,再加入终质量浓度为 4 μg/ml 的 LPS 作用 6 h)。将以上 6 组细胞放入 37 °C、5% CO₂ 的培养箱内培养。

1.2.3 RT-PCR 检测 收集细胞于 1.5 ml 离心管内,去除上层培养液。加入 TRIzol 试剂充分裂解,

依次加入氯仿、异丙醇、75% 乙醇溶液 4 °C 离心,弃上清液,室温干燥 30 min 后用 30 ~ 50 μl DEPC 水溶解,在 55 °C 下促进溶解 10 min,置于 -80 °C 保存备用。用逆转录试剂盒将提取的 RNA 反转录成单链 cDNA,再行 RT-PCR,用比较 Ct 法(ΔΔCt)分析结果。TLR4、NF- κ B 和 GAPDH 引物见表 1。

表 1 TLR4、NF- κ B 和 GAPDH 引物序列

靶基因	引物序列 (5'-3')	片断长度(bp)
TLR4	F: GAACGAATGGAATGTGCAACAC R: AGCCAGCAAGAAGCATCAGG	178
NF- κ B	F: CAATGCCCTTTTCGACTACGC R: AGCCCTCAGCAAATCCTCCA	274
GAPDH	F: GTGAAGGTCGGAGTCAACGGAT R: CCTGGAAGATGGTGTGGGATT	226

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 TLR4 mRNA 的表达 RT-PCR 法检测结果显示,与对照组比较,A 组 LPS 作用于 HiBEC 后,TLR4 mRNA 表达明显上调 ($P < 0.05$);而 B、C、D、E 组 TLR4 mRNA 表达与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);与 A 组比较,B、C、D、E 组 TLR4 mRNA 表达均明显下调 ($P < 0.05$);B 组和 C 组 TLR4 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$);D 组和 E 组 TLR4 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1A。组间差异有统计学意义 ($F = 69.989, P < 0.05$)。

2.2 NF- κ B mRNA 的表达 RT-PCR 法检测结果显示,与对照组比较,A 组 LPS 作用于 HiBEC 后,NF- κ B mRNA 表达明显上调 ($P < 0.05$);与 A 组比较,B、C、D、E 组 NF- κ B mRNA 表达均明显下调 ($P < 0.05$);与 D 组比较,E 组 NF- κ B mRNA 表达下调 ($P < 0.05$)。见图 1B。组间差异有统计学意义 ($F = 31.737, P < 0.05$)。NF- κ B 的扩增曲线见图 2。

3 讨论

通常情况下,炎症通过聚集炎症细胞来保护感染或受损组织,同时将其隔离,以防止感染的扩散,并且一旦炎症消退,正常组织功能通常可以恢复。然而,在某些情况下,炎症无法消退,长期慢性炎症刺激可促进肿瘤细胞的生长、存活和血管生成^[6]。胆道感染主要以革兰阴性细菌感染为主,而 LPS 是

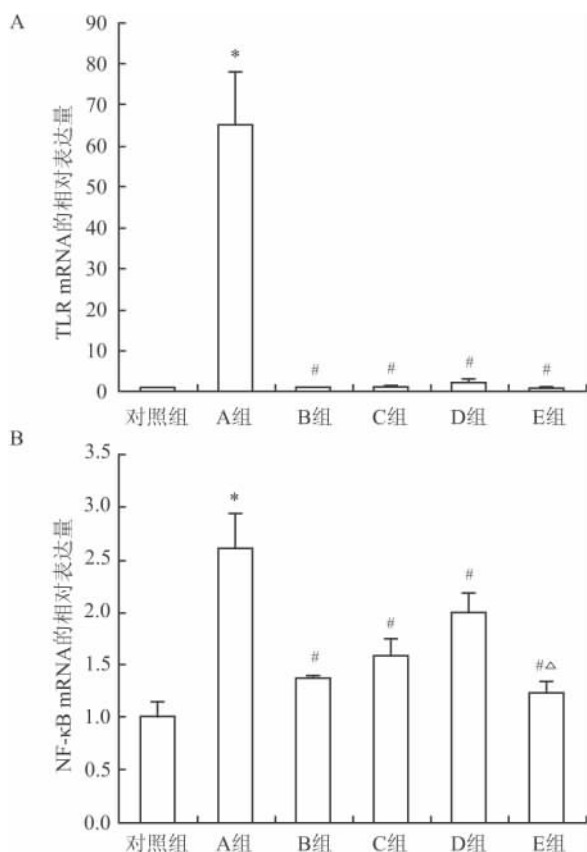


图1 TLR4 mRNA、NF-κB mRNA 的相对表达量

A: TLR4 mRNA; B: NF-κB mRNA; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 A 组比较: # $P < 0.05$; 与 D 组比较: Δ $P < 0.05$

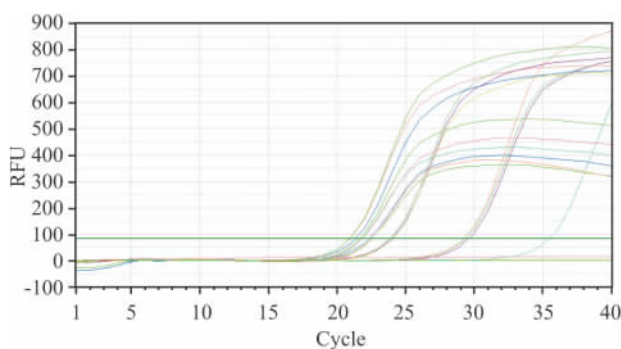


图2 NF-κB 的扩增曲线

革兰阴性细菌细胞壁中的主要成分,也是致病的主要成分。LPS、LPS 结合蛋白、CD14 形成三体复合物后可以结合 TLR4/髓样分化蛋白 2 复合体,将 LPS 的刺激信号向细胞内转导激活下游信号传导通路。Toll 样受体 (Toll like receptors, TLRs) 是一种可以介导机体损伤修复的细胞表面感受器,在癌细胞的免疫逃逸中起重要作用。TLR4 是 TLRs 中的一种亚型,在肿瘤细胞和组织中的表达率是 TLRs 中最高的,推测其在肿瘤的发生和进展中起着重要的作

用^[7]。TLR4 与 LPS 结合后可以激活 NF-κB,激活的 NF-κB 与炎症、细胞转化、肿瘤细胞存活、增殖、侵袭、血管生成和转移有关。NF-κB 是致癌物质的主要传感器之一^[8]。

研究^[9]显示 TLR4 和 NF-κB 在肝内胆管结石相关的 ICC 组织中呈高表达。这表明 TLR4 和 NF-κB 在 HiBEC 癌变的过程中起着重要的作用。TLR4 mAb 可以结合 HiBEC 细胞上的 TLR4,从而阻止 LPS 与 TLR4 的结合,进而抑制 LPS 诱导的 NF-κB 的活化及相应炎症介质的产生。研究^[10-11]显示下调 NF-κB 的表达可以向下调节炎症并由此向下调节肿瘤发生的整个过程,因此 NF-κB 抑制剂具有潜在的预防和治疗癌症的作用。

Yung et al^[12]通过体外培养胃癌细胞株 TSGH 9201,发现 TLR4、p38 MARK 和 NF-κB 的激活可以上调抵抗素诱导的基质细胞衍生因子-1 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1)。SDF-1 参与了胃癌的发生、刺激血管生成,有利于肿瘤细胞转移到远处器官。而 TLR4 竞争性拮抗剂可以抑制 TLR4,下调 NF-κB 的表达,抑制抵抗素诱导的 SDF-1 的表达。Yung et al 认为抑制 TLR4 可能是治疗抵抗素导致的胃癌的治疗方法。本研究显示,LPS (4 μg/ml) 作用于 HiBEC 6 h 后,TLR4 和 NF-κB 表达水平明显增加。由此推测 HiBEC 中 LPS 的作用机制可能是通过 LPS-TLR4-NF-κB 通路将 LPS 刺激信号向细胞内转导,进而导致 NF-κB 磷酸化和核转位^[13]。为证实这一推测,本研究将 TLR4 mAb 作为 TLR4 的阻断剂,对 LPS-TLR4-NF-κB 这一重要通路进行封闭。结果显示采用 LPS (4 μg/ml) 作用于 TLR4 mAb 预处理之后的 HiBEC,其 TLR4 较 A 组表达下调;且 LPS 作用于不同质量浓度 TLR4 mAb 预处理之后的 HiBEC,TLR4 的表达随 TLR4 mAb 浓度的升高而进一步下调,但两者之间差异无统计学意义。在用 LPS 对 HiBEC 进行刺激之前给予 TLR4 mAb 预处理 24 h,则其 NF-κB 表达较 A 组下调,提示 TLR4 mAb 的作用机制可能是通过预先与 HiBEC 表面的 TLR4 结合,形成抗原抗体复合物,使得后来的 LPS 不能与 TLR4 结合,进而阻断下游信号转导通路,影响 LPS 刺激后产生相应的炎症因子。本研究还显示 NF-κB 在 E 组中表达较 D 组下调 ($P < 0.05$),推测可能存在量效关系。以上结果说明 LPS 可能是通过 LPS-TLR4-NF-κB 通路上调 TLR4 和 NF-κB 的表达,并可能与肿瘤的发生发展有关,而 TLR4 mAb 可以拮抗 LPS 对 HiBEC 的刺激作用,阻止细胞内的

信号传导。

综上所述,本研究提示 LPS 作用于体外培养的 HiBEC 后,TLR4 mRNA 和 NF- κ B mRNA 表达上调;使用 TLR4 mAb 后能拮抗 LPS 对 HiBEC 中 TLR4 和 NF- κ B 的作用。推测 LPS 对 TLR4 和 NF- κ B 的影响可能是通过结合 HiBEC 表面 TLR4 来实现,而 TLR4 mAb 可以封闭细胞膜上的 TLR4 受体,进而阻止 LPS 向 HiBEC 内的信号转导,下调 NF- κ B 的表达。本研究结果为研制新的抗 LPS 药物提供了一定的理论依据;为下一步寻找特异性的药物阻止受胆管结石长期刺激的胆管壁细胞发生癌变提供前期实验依据。

参考文献

- [1] Sempoux C, Jibara G, Ward S C, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: new insights in pathology[J]. *Semin Liver Dis* 2011 31(1): 49-60.
- [2] Tyson G L, El-Serag H B. Risk factors for cholangiocarcinoma[J]. *Hepatology* 2011 54(1): 173-84.
- [3] Chen S, Xiong J, Zhang Y, et al. Wogonin inhibits LPS-induced inflammatory responses in rat dorsal root ganglion neurons *via* inhibiting TLR4-MyD88-TAK1-mediated NF- κ B and MAPK signaling pathway[J]. *Cell Mol Neurobiol* 2015 35(4): 523-31.
- [4] Zhang S, Yang N, Ni S, et al. Pretreatment of lipopolysaccharide (LPS) ameliorates D-GalN/LPS induced acute liver failure through TLR4 signaling pathway[J]. *Int J Clin Exp Pathol* 2014, 7(10): 6626-34.
- [5] Park M Y, Mun S T. Carnosic acid inhibits TLR4-MyD88 signaling pathway in LPS-stimulated 3T3-L1 adipocytes[J]. *Nutr Res Pract* 2014 8(5): 516-20.
- [6] Grivennikov S I, Greten F R, Karin M. Immunity, inflammation and cancer[J]. *Cell* 2010 140(6): 883-99.
- [7] Basith S, Manavalan B, Yoo T H, et al. Roles of toll-like receptors in cancer: a double-edged sword for defense and offense[J]. *Arch Pharm Res* 2012, 35(8): 1297-316.
- [8] Aggarwal B B, Sung B. The relationship between inflammation and cancer is analogous to that between fuel and fire [J]. *Oncology (Williston Park)* 2011 25(5): 414-8.
- [9] 陈佳,余宏铸,王正林,等. TLR4 和 NF- κ B 在肝内胆管结石相关的肝内胆管细胞癌中的表达及临床意义[J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(5): 625-8.
- [10] Gupta S C, Kim J H, Prasad S, et al. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals[J]. *Cancer Metastasis Rev* 2010 29(3): 405-34.
- [11] Gupta S C, Sundaram C, Reuter S, et al. Inhibiting NF- κ B activation by small molecules as a therapeutic strategy[J]. *Biochim Biophys Acta* 2010 1799(10-12): 775-87.
- [12] Hsieh Y Y, Shen C H, Huang W S, et al. Resistin-induced stromal cell-derived factor-1 expression through Toll-like receptor 4 and activation of p38 MAPK/ NF- κ B signaling pathway in gastric cancer cells[J]. *J Biomed Sci* 2014 21: 59.
- [13] Lorne E, Dupont H, Abraham E. Toll-like receptors 2 and 4: initiators of non-septic inflammation in critical care medicine[J]. *Intensive Care Med* 2010 36(11): 1826-35.

Effect of TLR4 mAb on the normal intrahepatic of bile duct epithelial cells of human LPS-TLR4-NF- κ B pathway

Liu Hui, Yu Hongzhu, Han Long, et al

(Dept of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To observe the expression of Toll-like receptor 4 (TLR4), nuclear factor- κ B (NF- κ B) induced by lipopolysaccharide (LPS) and Toll-like receptor 4 monoclonal antibodies (TLR4 mAb) in normal human intrahepatic biliary epithelial cells (HiBEC) *in vitro*. **Methods** We cultured HiBEC *in vitro*. The cells were stimulated by LPS and different concentrations of TLR4 mAb. The levels of mRNA expression of TLR4 and NF- κ B were detected by reverse transcription PCR (RT-PCR). **Results** LPS increased the mRNA expression of TLR4 and NF- κ B ($P < 0.05$). TLR4 mAb reduced the mRNA expression of TLR4 and NF- κ B ($P < 0.05$) after LPS-stimulated HiBEC. High concentrations of TLR4 mAb reduced the mRNA expression of NF- κ B ($P < 0.05$) after LPS-stimulated HiBEC *in vitro*. **Conclusion** The mRNA expression of TLR4 and NF- κ B is increased after LPS-stimulated HiBEC. TLR4 mAb antagonize the role of LPS on TLR4 and NF- κ B and reduce the mRNA expression of TLR4 and NF- κ B.

Key words lipopolysaccharide; Toll-like receptor 4 monoclonal antibodies; Toll-like receptor 4; nuclear factor- κ B