

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.21.004

TLR2 通过 PI3K/Akt 和 NF- $\kappa$ B 通路促进结肠癌细胞增殖、迁移、侵袭\*杨 宾<sup>1</sup>, 董 明<sup>2</sup>, 杨得振<sup>2</sup>, 赵 静<sup>2</sup>, 梁 飞<sup>1 $\Delta$</sup> 

1. 陕西省咸阳市泾阳县医院普通外科, 陕西咸阳 713700; 2. 陕西中医药大学附属医院肿瘤外科, 陕西咸阳 712000

**摘要:**目的 探讨 Toll 样受体 2 (TLR2) 通过 PI3K/Akt 和 NF- $\kappa$ B 通路促进结肠癌细胞增殖、迁移、侵袭发生的机制。方法 于陕西省咸阳市泾阳县医院普通外科采集 20 例配对的结肠癌组织及正常癌旁组织, 其中男 12 例, 女 8 例, 采用免疫组化染色法检测人结肠癌组织及正常癌旁组织中 TLR2 表达。采用 TLR2 激动剂 Pam3Cys (P3C) (0.1, 1.0, 10.0  $\mu$ g/mL) 处理 SW480 及 HCT116 细胞作为观察组 (P3C 组), 未作处理的细胞作为空白对照组。采用细胞计数试剂盒 (CCK-8) 检测人结肠癌细胞株 HCT116、SW480 增殖情况。采用划痕试验及 Transwell 小室检测细胞迁移能力及侵袭能力。采用蛋白免疫印迹法检测 TLR2 对结肠癌细胞 PI3K/Akt 和 NF- $\kappa$ B 通路的影响。**结果** 免疫组化染色结果显示: 结肠癌组织中 TLR2 蛋白表达阳性率为 80% (16/20), 明显高于正常癌旁组织的 35% (7/20,  $P < 0.05$ )。划痕试验结果显示: HCT116 经 P3C 处理后 48 h 迁移率显著高于 0 h 迁移率 ( $P < 0.05$ ); SW480 经 P3C 处理后 48 h 迁移率显著高于 0 h 迁移率 ( $P < 0.05$ )。Transwell 试验结果显示: HCT116 经 P3C 处理后穿透基底膜细胞数明显高于空白对照组 ( $P < 0.01$ ); SW480 经 P3C 处理后穿透基底膜细胞数明显高于空白对照组 ( $P < 0.01$ )。采用 10.0  $\mu$ g/mL P3C 刺激 HCT116、SW480 细胞, 随着时间推移 TLR2 蛋白表达逐渐升高, 磷酸化 Akt 及 NF- $\kappa$ B 表达显著升高。**结论** TLR2 高表达于结肠癌组织, 可通过 PI3K/Akt 和 NF- $\kappa$ B 通路促进肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭。

**关键词:** Toll 样受体 2; PI3K/Akt; NF- $\kappa$ B; 结肠癌; 增殖; 迁移; 侵袭

中图法分类号: R656.9

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2019)21-3086-04

## TLR2 promotes proliferation, migration and invasion of colon cancer cells through PI3K/Akt and NF-kappa B pathways\*

YANG Bin<sup>1</sup>, DONG Ming<sup>2</sup>, YANG Dezhen<sup>2</sup>, ZHAO Jing<sup>2</sup>, LIANG Fei<sup>1 $\Delta$</sup> 

1. Department of General Surgery, Jingyang County Hospital, Xianyang, Shaanxi 713700, China;

2. Department of Oncology Surgery, Affiliated Hospital of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi 712000, China

**Abstract: Objective** To explore the mechanism of TLR2 promoting the proliferation, migration and invasion of colon cancer cells through PI3K/Akt and NF- $\kappa$ B pathways. **Methods** Twenty matched cases of colon cancer tissues and normal paracancerous were collected from the department of general surgery of Jingyang County Hospital in Shaanxi Province, including 12 males and 8 females, and the TLR expression was detected by adopting the immunohistochemical staining method. SW480 and HCT116 cells were treated with TLR2 agonist Pam3Cys (P3C) (0.1, 1.0, 10.0  $\mu$ g/mL) as the observation group and untreated cells as the blank control group. The cell counting kit (CCK-8) was used to detect the proliferation of human colon cancer cell lines HCT116 and SW480. The scratch test and Transwell chamber were used to detect the cell migration and invasion abilities. The effects of TLR2 signal on the PI3K/Akt and NF- $\kappa$ B pathway in colon cancer cells were detected by Western blot. **Results** The immunohistochemical staining results showed that the positive rate of TLR2 protein expression in colon cancer tissues was 80% (16/20), which was significantly higher than 35% (7/20) in normal paracancerous tissues ( $P < 0.05$ ). The scratch test results showed that the 48 h migration rate of the HCT116 treated with P3C was significantly higher than the 0 h migration rate ( $P < 0.05$ ), and that of the SW480 treated with P3C was significantly higher than the 0 h migration rate ( $P < 0.05$ ). The Transwell experiment results showed that the number of basement membrane penetrating cells in the HCT116 treated with P3C was significantly higher than that in the blank control group ( $P < 0.01$ ); the number of basement membrane penetrating cells in the SW480 treated with P3C was significantly higher than that in the blank con-

\* 基金项目: 陕西省卫生健康科研基金项目 (2018E018); 陕西省咸阳市科技成果推广计划 (2018KT-43)。

作者简介: 杨宾, 男, 副主任医师, 主要从事普通外科疾病的临床与基础研究。  $\Delta$  通信作者, E-mail: 453893274@qq.com。

control group ( $P < 0.01$ ). HCT116 and SW480 cells were stimulated by 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  P3C, the expression of TLR2 protein was increased with time elapse, and the expression of phosphorylated Akt and NF- $\kappa\text{B}$  was increased significantly. **Conclusion** TLR2 colon cancer is highly expressed in colon cancer, which can promote the proliferation, migration and invasion of cancer cells through PI3K/Akt and NF- $\kappa\text{B}$  pathways.

**Key words:** TLR2; PI3K/Akt; NF- $\kappa\text{B}$ ; colon cancer; proliferation; migration; invasion

结肠癌是目前世界上常见的恶性肿瘤之一,好发于直肠与乙状结肠交界处,其发病率和病死率分别居第 3 位和第 4 位,以 40~50 岁年龄发病率最高,男女之比为(2~3):1<sup>[1]</sup>。多数患者就诊时已属于中晚期,错过最佳治疗时期,对患者生命健康构成严重威胁<sup>[2]</sup>。结肠癌发病机制尚未完全明确,目前认为其发病与高脂肪及低纤维素饮食相关<sup>[3]</sup>。早期结肠癌患者无任何症状,随着肿瘤细胞扩散及转移,患者逐渐出现腹胀、消化不良、排便习惯改变、腹痛、黏液便、贫血、乏力及消瘦,甚至出现恶病质<sup>[4]</sup>。临床常采用手术治疗辅以放化疗治疗结肠癌患者,但患者 5 年生存率小于 50%,且预后较差,易反复发作<sup>[5]</sup>。Toll 样受体 2(TLR2)作为 Toll 样受体(TLR)家族蛋白成员之一,可参与诱导细胞内信号级联反应并激活免疫炎症反应<sup>[6]</sup>。临床研究显示 TLR2 可表达于绝大多数结肠癌病例中,在结肠癌组织中其表达显著上调,且其高表达与结肠癌患者整体生存率显著相关<sup>[7]</sup>。PI3K/Akt 信号通路是细胞相应胞外生存和生长的信号转导途径,其受多种机制高度调控,调节异常可导致信号活动增加,这与一系列疾病如肿瘤密切相关<sup>[8]</sup>。核因子  $\kappa\text{B}$ (NF- $\kappa\text{B}$ )信号通路可参与调控早期免疫反应及炎症反应各阶段的许多分子,其错误调节可导致自身免疫性疾病、慢性炎症及多种肿瘤<sup>[9]</sup>。本研究旨在探讨 TLR2 通过 PI3K/Akt 和 NF- $\kappa\text{B}$  通路促进结肠癌细胞增殖、迁移、侵袭的机制。细胞计数试剂盒 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 试验结果显示:随着 TLR2 激动剂 P3C 水平增加,细胞增殖明显增强。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 人结肠癌细胞株 HCT116、SW480 (中科院上海细胞库)。于陕西省咸阳市泾阳县医院普通外科采集 20 例配对的结肠癌组织及正常癌旁组织,其中男 12 例、女 8 例,平均年龄(59.71 $\pm$ 10.29)岁。本研究经该院伦理委员会审批通过;并与患者签订知情同意书。

**1.2 主要试剂** RIPA 细胞裂解液(北京百奥莱博科技有限公司)、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司),蛋白酶和磷酸酶抑制剂(ThermoFisher Scientific 公司),免疫组化即用型 SABC-POD(兔 IgG)试剂盒(博士德生物科技有限公司),CCK-8 试剂盒(武汉艾美捷科技有限公司),PMSF 蛋白酶抑制剂(上海碧云天生物技术有限公司),Western blot 封闭液(上海碧云天生物技术有限公司),ECL 发光液(Millipore 公司),Transwell 小室

(Corning 公司)。

**1.3 方法** (1)采用免疫组化染色法检测人结肠癌组织及正常癌旁组织中的 TLR2 表达。采用 10%中性甲醛固定标本,然后将标本进行脱水、包埋、切片、浸泡、脱蜡、水化及修复处理。加一抗 1:200 后 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜,次日加辣根过氧化物酶进行二抗孵育。在显微镜 400 倍视野下,随机选取 5 个视野进行观察,对阳性细胞百分比进行评分: $\leq 5\%$  为 0 分; $> 5\% \sim 25\%$  为 1 分; $> 25\% \sim 50\%$  为 2 分; $> 50\% \sim 75\%$  为 3 分; $> 75\%$  为 4 分。对染色强度进行评分:无色为 0 分;淡黄色为 1 分;黄色为 2 分;棕黄色为 3 分。评分结果由阳性细胞百分比与染色强度相乘而得,0~4 分为阴性表达,5~12 分为阳性表达。(2)采用 TLR2 激动剂 Pam3Cys (P3C) (0.1、1.0、10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 处理 SW480 及 HCT116 细胞作为观察组(P3C 组),未作处理的细胞作为空白对照组。(3)采用 CCK-8 检测人结肠癌细胞株 HCT116、SW480 增殖情况。将两者种植于 96 孔板内,置于 37 $^{\circ}\text{C}$  细胞培养箱中过夜。将细胞进行处理后每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 试剂,于 37 $^{\circ}\text{C}$  条件下孵育 1 h,采用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度值。(4)采用划痕试验及 Transwell 小室检测细胞迁移能力及侵袭能力。采用 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  P3C 处理 SW480 及 HCT116 细胞,于 200 倍显微镜下随机选取 5 个视野,计算穿透基底膜的细胞数,取平均数。(5)采用蛋白免疫印迹法检测 TLR2 信号对结肠癌细胞 PI3K/Akt 和 NF- $\kappa\text{B}$  通路的影响。在 RIPA 细胞裂解液中加入 PMSF 蛋白酶抑制剂,然后低温裂解细胞,提取蛋白质,采用凝胶电泳分离蛋白质,将其转移到聚偏氟乙烯膜中,于室温下密封 1 h;在 4 $^{\circ}\text{C}$  条件下一抗孵育,次日室温下进行二抗孵育,采用化学免疫发光法显影,最后对所提取蛋白进行灰度定量。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 23.0 软件对数据进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用  $t$  检验,多组间比较采用单因素方差分析;计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验;以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 结肠癌组织及正常癌旁组织中 TLR2 蛋白表达阳性率比较** 免疫组化染色结果显示:结肠癌组织中 TLR2 蛋白表达阳性率为 80% (16/20),正常癌旁组织 TLR2 蛋白表达阳性率为 35% (7/20),结肠癌组织中 TLR2 蛋白表达阳性率明显高于正常癌旁组织,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 1。

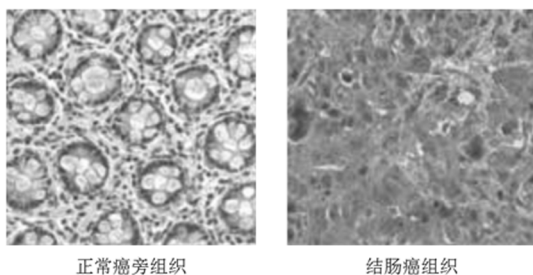


图 1 结肠癌组织及正常癌旁组织中 TLR2 表达情况比较

**2.2 TLR2 在结肠癌细胞增殖中的作用** CCK-8 试验结果显示:随着 TLR2 激动剂 P3C 水平增加,细胞增殖明显增强。见表 2。

表 2 TLR2 在结肠癌细胞增殖中的作用 ( $\bar{x} \pm s$ )

P3C 水平 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	HCT116		SW480	
	增殖	<i>P</i>	增殖	<i>P</i>
0	1.003 $\pm$ 0.002		1.002 $\pm$ 0.003	
0.1	1.069 $\pm$ 0.060	0.059*	1.064 $\pm$ 0.054	0.054*
1.0	1.439 $\pm$ 0.049	<0.001*	1.240 $\pm$ 0.039	<0.001*
10.0	1.860 $\pm$ 0.075	<0.001*	1.507 $\pm$ 0.040	<0.001*

注:\*代表与 P3C 水平为 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时 HCT 116、SW480 增殖水平比较的 *P* 值

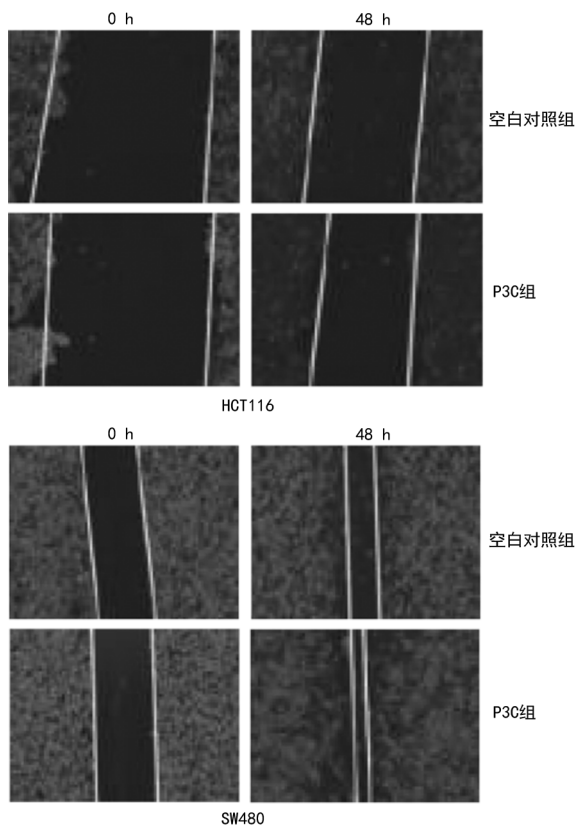


图 2 TLR2 在结肠癌细胞迁移中的作用

**2.3 TLR2 在结肠癌细胞迁移中的作用** 划痕试验结果显示:HCT116 经 P3C 处理后 48 h 迁移率 [(65.44 $\pm$ 16.63)%]显著高于 0 h 迁移率 [(33.44 $\pm$ 12.43)%],差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );SW480 组经 P3C 处理后 48 h 迁移率 [(73.11 $\pm$ 12.89)%]显著高于 0 h 迁移率 [(46.78 $\pm$ 7.24)%],差异有统计学意

义 ( $P < 0.05$ )。见图 2。

**2.4 TLR2 在结肠癌细胞侵袭中的作用** Transwell 试验结果显示:HCT116 经 P3C 处理后穿透基底膜细胞数 [(58.11 $\pm$ 5.81)个]显著高于空白对照组 [(19.81 $\pm$ 3.41)个],差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ );SW480 经 P3C 处理后穿透基底膜细胞数 [(81.41 $\pm$ 5.41)个]显著高于空白对照组 [(31.41 $\pm$ 3.81)个],差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见图 3。

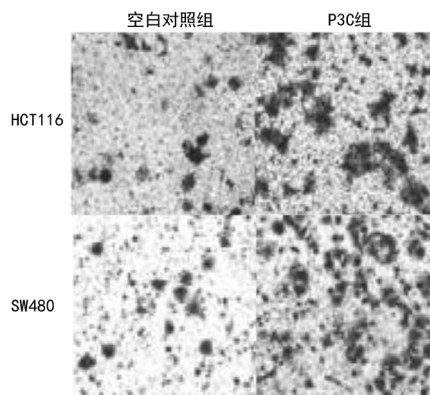


图 3 TLR2 在结肠癌细胞侵袭中的作用

**2.5 TLR2 信号对结肠癌细胞 PI3K/Akt 和 NF- $\kappa$ B 通路的影响** 采用 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  P3C 刺激 HCT116、SW480 细胞,随着时间推移 TLR2 蛋白表达逐渐升高,磷酸化 Akt 及 NF- $\kappa$ B 表达显著升高。见图 4。

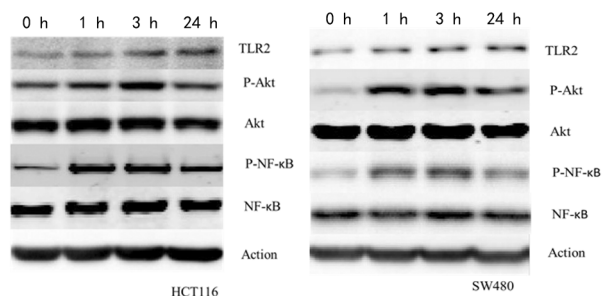


图 4 TLR2 信号对结肠癌细胞 PI3K/Akt 和 NF- $\kappa$ B 通路的影响

### 3 讨论

炎症与结肠癌的发生、发展密切相关,临床研究显示 TLR 家族蛋白在肿瘤非特异性免疫中的作用显著<sup>[10]</sup>。TLR 是一种可识别多种外源性病原体 and 自身内源性配体的人体免疫受体,当肿瘤发生时,其产生被 TLR 识别的受体并通过 TLR 信号进行转导,最终刺激抗肿瘤免疫反应的发生。由此可知 TLR 在肿瘤免疫监测中具有重要意义。TLR2 是一种可触发炎症相关肿瘤免疫炎症反应的 I 型跨膜转运蛋白,其可作为一种固有免疫传感器,在肿瘤发生、发展过程中具有重要作用。临床研究显示,TLR 功能障碍与多种炎症相关疾病有关,各种 TLR 激动剂和拮抗剂也越来越受到重视<sup>[11]</sup>。例如,TLR2 拮抗剂 OPN305 已被用作胃癌和骨髓增生异常综合征临床试验的潜在治疗靶点<sup>[12]</sup>。TLR2 表达上调可增加胃癌患病风险,其基



因多态性与肿瘤的发生、发展密切相关。

临床研究显示,TLR2 高表达与结肠癌患者生存率呈显著相关,在结肠癌的发生和发展中起着重要作用,病原体刺激宿主引发宿主炎症反应并伴随正常细胞损害<sup>[13]</sup>。目前人们认为促进肿瘤细胞增殖对机体损伤修复具有重要作用,同时也将增加基因突变速率<sup>[14]</sup>。这可能是 TLR2 信号通路与肿瘤炎症反应之间的一种特殊联系。为支持这种观点,本研究采用免疫组化染色法检测人结肠癌细胞株 HCT116、SW480 中 TLR2 表达,结肠癌组织中 TLR2 蛋白表达阳性率为 80% (16/20),显著高于正常癌旁组织的 35% (7/20) ( $P < 0.05$ )。说明 TLR2 在结肠癌患者中显著上调。同时本研究采用 CCK-8 试验、划痕试验及 Transwell 试验检测 TLR2 对人结肠癌细胞株 HCT116、SW480 增殖、迁移及侵袭的影响。结果显示:随着 TLR2 激动剂 P3C 水平增加,细胞增殖明显增强;HCT116 组 48 h 迁移率 [(65.44 ± 16.63)%] 显著高于 0 h 迁移率 [(33.44 ± 12.43)%],差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );SW480 组经 P3C 处理后 48 h 迁移率 [(73.11 ± 12.89)%] 显著高于 0 h 迁移率 [(46.78 ± 7.24)%],差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );HCT116 组穿透基底膜细胞数 [(58.11 ± 5.81) 个] 显著高于对照组 [(19.81 ± 3.41) 个],差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ );SW480 组穿透基底膜细胞数 [(81.41 ± 5.41) 个] 显著高于对照组 [(31.41 ± 3.81) 个],差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。说明 TLR2 对结肠癌细胞增殖、迁移及侵袭具有促进作用。PI3K/Akt 信号通路具有抑制结肠癌细胞凋亡并促进细胞生长的作用;而 NF-κB 信号通路可通过 Wnt 通路和信号转导子与活化子 3 (STAT3) 通路促进结肠癌细胞增殖<sup>[15]</sup>,这与本文研究结果一致。本研究采用蛋白免疫印迹法检测 HCT116、SW480 细胞中 TLR2 蛋白表达与 PI3K/Akt 及 NF-κB 的关系,结果显示随着时间推移 TLR2 蛋白表达逐渐升高,磷酸化 Akt 及 NF-κB 表达显著升高。说明 TLR2 高表达与 PI3K/Akt 及 NF-κB 通路关系密切。

综上所述,TLR2 高表达于结肠癌组织,可通过 PI3K/Akt 和 NF-κB 通路促进肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭。

### 参考文献

[1] TIE J, WANG Y, TOMASETTI C, et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer [J]. *Sci Transl Med*, 2017, 11(2):117-118.

[2] HSIAO K Y, LIN Y C, GUPTA S K, et al. Noncoding effects of circular RNA CCDC66 promote colon cancer growth and metastasis [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(9): 2339-2345.

[3] ABRAMS T A, BRIGHTLY R, MAO J, et al. Patterns of adjuvant chemotherapy use in a population-based cohort of patients with resected stage II or III colon cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 29(24):3255-3262.

[4] HUANG J Z, CHEN M, GAO X C, et al. A peptide encoded by a putative lncRNA HOXB-AS3 suppresses colon cancer growth [J]. *Molecular Cell*, 2017, 68(1):171-184.

[5] MATHUR R, ALVER B H, ROMAN A K, et al. ARID1A loss impairs enhancer-mediated gene regulation and drives colon cancer in mice [J]. *Nat Genet*, 2017, 49(2): 296-302.

[6] MODHIRAN N, WATTERSON D, BLUMENTHAL A, et al. Dengue virus NS1 protein activates immune cells via TLR4 but not TLR2 or TLR6 [J]. *Immunol Cell Biol*, 2017, 95(5):491-502.

[7] FRANCK G, MAWSON T, SAUSEN G, et al. Flow perturbation mediates neutrophil recruitment and potentiates endothelial injury via TLR2 in mice-implications for superficial erosion [J]. *Circ Res*, 2017, 121(1):31-40.

[8] LIANG H, MOKRANI A, CHISOMO-KASIYA H, et al. Dietary leucine affects glucose metabolism and lipogenesis involved in TOR/PI3K/Akt signaling pathway for juvenile blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* [J]. *Fish Physiol Biochem*, 2019, 45(2):719-732.

[9] LONG L, PANG X X, LEI F, et al. SLC52A3 expression is activated by NF-κB p65/Rel-B and serves as a prognostic biomarker in esophageal cancer [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(1):1-19.

[10] MURO K. Systemic chemotherapy for metastatic colorectal cancer -Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) Guidelines 2016 for treatment of colorectal cancer [J]. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi*, 2017, 114(7):1217-1223.

[11] MUKHERJEE S P, BONDARENKO O, KOHONEN P, et al. Macrophage sensing of single-walled carbon nanotubes via Toll-like receptors [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 1115-1123.

[12] WANG Y, WANG Q, LI Y, et al. Mmm-derived lipid-associated membrane proteins activate IL-1β production through the NF-κB pathway via TLR2, MyD88, and IRAK4 [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):4349-4358.

[13] BLEDOV Y A, BLACK M, CHERNIS J, et al. Ethanol Consumption in Mice Lacking CD14, TLR2, TLR4, or MyD88 [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2017, 41(3):516-530.

[14] BENSON A B 3RD, VENOOK A P, CEDERQUIST L, et al. Colon Cancer, Version 1. 2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2017, 15(3):370-398.

[15] REN L, LI Z, DAI C, et al. Chrysophanol inhibits proliferation and induces apoptosis through NF-κB/cyclin D1 and NF-κB/Bcl-2 signaling cascade in breast cancer cell lines [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(3):4376-4382.