

• 临床探讨 •

脂多糖对胃癌细胞 mir-146a-5p、mir-335-5p 及 TLR<sub>1~10</sub> 受体表达的影响\*侯金霞<sup>1</sup>, 王宏伟<sup>2</sup>, 李海龙<sup>3,4</sup>

(1. 甘肃省人民医院检验中心, 兰州 730000; 2. 甘肃中医药大学附属医院检验科, 兰州 730000;

3. 甘肃中医药大学临床检验基础教研室, 兰州 730000; 4. 甘肃省中医方药挖掘与创新转化重点实验室/  
甘肃省中药新产品创制工程实验室, 兰州 730000)

**摘要:**目的 研究胃癌细胞在受到脂多糖干预后, TLR<sub>1~10</sub> 受体及上游调控分子 mir-335-5p 和 mir-146a-5p 的表达规律。  
**方法** PCR Array 筛选结合实时荧光定量 PCR 检测验证 TLR<sub>1~10</sub> mRNA 在不同分化程度胃癌细胞中的表达; 实时荧光定量 PCR 检测不同浓度的脂多糖 (终浓度分别为 0.1、1.0、10.0、100.0 μg/mL) 干预胃癌 SGC-7901、BGC-823 细胞和 GES-1 细胞 12、24、48 h 后, mir-335-5p、mir-146a-5p 及 TLR<sub>1~10</sub> 的表达。**结果** 实时荧光定量 PCR 检测验证表明, 除 TLR<sub>1</sub>、TLR<sub>3</sub>、TLR<sub>5</sub> 外, 其余的 Toll 样受体 mRNA 在不同分化程度胃癌细胞中的表达相对于正常胃黏膜上皮 GES-1 细胞出现明显上调; 不同浓度的脂多糖干预胃癌 SGC-7901、BGC-823 细胞和 GES-1 细胞 12、24、48 h 后, 相对于未干预胃癌细胞, mi-335-5p 和 mir-146a-5p 的表达明显下调; 在 SGC-7901 细胞中, 除 TLR<sub>3</sub>、TLR<sub>4</sub> 外, 其他 TLR 受体在不同浓度脂多糖干预后, 均有不同程度的上调表达; 在 BGC-823 细胞中, TLR<sub>1</sub>、TLR<sub>4</sub>、TLR<sub>6</sub> 受体仅在高浓度脂多糖干预时, 上调表达, 其他 TLR 受体在不同浓度脂多糖干预后, 均有不同程度的上调表达; 在 GES-1 细胞, 所有 TLR<sub>1~10</sub> 在不同浓度脂多糖干预后均有明显上调表达。**结论** 脂多糖干预胃癌细胞, 可诱导 mir-335-5p、mir-146a-5p 下调表达和 Toll 样受体 mRNA 上调表达, Toll 样受体 mRNA 上调表达可能与 mir-335-5p、mir-146a-5p 下调有关。

**关键词:** 胃癌; Toll 样受体; 脂多糖; mir-146a-5p; mir-335-5p**DOI:**10.3969/j.issn.1672-9455.2016.15.033 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2016)15-2158-05

炎症与肿瘤关系密切, 可能参与了肿瘤的发生、发展, 促进肿瘤的侵袭与转移。胃癌的发生与慢性炎症密切相关, 幽门螺杆菌(HP)感染-浅表性胃炎-萎缩性胃炎-异型增生-胃癌是典型的炎症与癌症相关的例子。TLRs 是一类进化上高度保守的 I 型跨膜蛋白家族, 通过识别微生物成分, 在宿主第一线防御中起重要作用。TLRs 是识别表达于病原体上保守的, 且与致病相关的分子-病原相关分子模式。近来许多研究表明, Toll 样受体在包括胃癌在内的诸多炎症相关性肿瘤, 如胃癌、肝癌、结直肠癌、宫颈癌等中呈现高表达<sup>[1-4]</sup>。在胃癌中, Toll 样受体高表达与 HP 感染和胃癌的诸多生物学行为如侵袭转移有着密切的关系<sup>[5-9]</sup>。炎症环境下, 例如 HP 感染后, 由其分泌的脂多糖通过 TLR<sub>4</sub> 属病原相关分子模式, 是天然的脂多糖受体。然而, 其他的 TLRs 受体在胃癌中的高表达的原因及影响胃癌生物学行为的机制尚不明确。另外, 是否有脂多糖诱导非编码 RNA 参与其中, 进而调控 Toll 样受体的表达, 影响胃癌的生物学行为关系尚不明确。mir-335-5p 和 mir-146a-5p 是本题组在前期发现的胃癌抑癌基因, 炎性环境下, 脂多糖可以调控 mir-335-5p 和 mir-146a-5p 在胃癌中的表达, 进而影响 Toll 样受体的表达。本研究拟通过脂多糖干预胃癌细胞, 观察 mir-335-5p、mir-146a-5p 及 Toll 样受体在胃癌中的表达, 并借助于生物信息学的方法, 探讨炎症环境下, miRNA 参与调控胃癌细胞迁移的机制。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 细胞株: 胃癌 SGC-7901、BGC-823、MGC-803、HGC-27、MKN-45 以及 GES-1 细胞购自中国科学院上海细胞库和上海和元生物公司。

**1.2 试剂和仪器** 高糖 DMED 培养基购自健顺生物公司, 胎牛血清购自杭州四季青公司。所用逆转录试剂盒 (TaKaRa 036A)、PCR 扩增试剂盒购自大连宝生物公司, 定制 PCR 芯片购自 Toll 样受体信号通路于楚天生物公司, 脂多糖脂多糖购于 SIGMA 公司, mRNA 引物由上海生工合成 (序列信息见表 1), miRNA 引物由广州复能基因公司合成。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 细胞培养** 用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM, 加入青霉素 (100 U/mL)、链霉素 (100 U/mL), 在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中常规培养细胞。每隔 2~3 d 换完全培养基, 待细胞密度达 90% 左右时按 1:2 比例传代。取对数期的细胞用于下一步试验。

**1.3.2 PCR Array 筛选 Toll 样受体信号通路差异表达的基因** 以 PCR Array 基因芯片筛选 Toll 样受体信号通路在胃癌细胞 MGC-803、SGC-7901、BGC-823、HGC-27、MKN-45 与正常胃黏膜上皮 GES-1 细胞之间差异表达的有关基因。采用 Trizol 试剂抽提取总 RNA, 具体操作按说明书进行。提取的总 RNA 经微量核酸测定仪检测吸光度 A 值, 并计算 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>。检测合格的总 RNA 经逆转录后获得 cDNA, 稀释后与扩增试剂混匀, 按每孔 25 μL 加入 PCR 芯片检测孔, 离心后上机进行扩增反应, 检测 Toll 样受体信号通路相关的基因表达, 反应结束, 利用仪器配套软件采集计算每张 PCR 芯片各孔 CT 值。最后, 采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 方法比较相应基因的表达量变化。

**1.3.3 实时荧光定量 PCR 检测验证 TLR<sub>1~10</sub> mRNA 的表达** 采用实时荧光定量 PCR 验证检测不同分化程度胃癌细胞 MGC-803、SGC-7901、BGC-823、AGS 与正常胃黏膜上皮 GES-

\* 基金项目: 甘肃省科技厅自然科学基金 B 类计划项目 (1310RJZA099)。

1 细胞之间差异表达的 TLR<sub>1~10</sub> mRNA 的表达。采用 Trizol 试剂从细胞中提取总 RNA。提取完成后,进行逆转录反应,反应条件如下:37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s;而后进行 PCR 反应;条件:预变性 95 ℃ 10 s,变性 95 ℃ 10 s,变性 95 ℃ 15 s,退火 60 ℃ 20 s,40 个循环。扩增反应结束后进行溶解曲线分析,判断产物是否有非特异性扩增;分析扩增曲线,计算 *Ct* 值,以  $\beta$ -actin 作为内参基因,实时荧光定量 PCR 试验采用相对定量法计算各基因表达量,通过  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算各组间 mRNA 表达水平差异(对照组基因表达量设为 1),实验重复 3 次。扩增引物由上海生工合成。见表 1。

表 1 基因名称及引物序列信息

| 基因名称                 | 碱基序列 (方向为 5'~3')         |
|----------------------|--------------------------|
| TLR <sub>1</sub> -F  | ATTCAGTTTCCCACCCATCG     |
| TLR <sub>1</sub> -R  | GCCAGCCCTCTAACACTTCA     |
| TLR <sub>2</sub> -F  | TGATGCTGCCATTCTCATTC     |
| TLR <sub>2</sub> -R  | GCCACTCCAGGTAGGTCTTG     |
| TLR <sub>3</sub> -F  | TCCACCACCAGCAATACAAC     |
| TLR <sub>3</sub> -R  | AAGCCAAGCAAAGGAATCG      |
| TLR <sub>4</sub> -F  | AGCCGAAAGGTGATTGTTGT     |
| TLR <sub>4</sub> -R  | CACGACTGCTCAGAAACTGC     |
| TLR <sub>5</sub> -F  | TCTGTGGTCTCTCTGATGCTG    |
| TLR <sub>5</sub> -R  | TCCCAAATGAAGGATGAAGG     |
| TLR <sub>6</sub> -F  | CCCACTCCAAGACTGAAAGC     |
| TLR <sub>6</sub> -R  | CCAGCAAACACTCATCAAGC     |
| TLR <sub>7</sub> -F  | CAACTGACCACTGTCCCTGA     |
| TLR <sub>7</sub> -R  | GCAACTGGAAGGCATCTTG      |
| TLR <sub>8</sub> -F  | CTCCAGCAGTTTCTCGTCT      |
| TLR <sub>8</sub> -R  | TCAGCAGCAGTGTCGAAG       |
| TLR <sub>9</sub> -F  | TACAACCGCATCGTCAAAC      |
| TLR <sub>9</sub> -R  | CAGGTGGCTGAAGGTATCG      |
| TLR <sub>10</sub> -F | TAAATGCGGGAAGAAATCCA     |
| TLR <sub>10</sub> -R | TGAATCTGACCATCCAACCA     |
| Beta-actin-F         | GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA  |
| Beta-actin-R         | GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG |

**1.3.4 脂多糖干预胃癌细胞和 GES-1 细胞** 将对数生长期的胃癌细胞 SGC-7901、BGC-823、和 GES-1 细胞用对照组(只加无血清培养液),脂多糖干预组(终浓度为 0.1、1.0、10.0、100.0  $\mu\text{g/mL}$ ),干预 48 h,并以 10  $\mu\text{g/mL}$  分别干预 12、24、48 h。

**1.3.5 实时荧光定量 PCR 检测脂多糖干预后 mir-335-5p 和 mir-146a-5p 的表达** 脂多糖干预胃癌细胞 SGC-7901、BGC-823 和 GES-1 细胞 12、24、48 h 后,提取各组的总 RNA,对 miRNA 进行加尾反应和逆转录反应,条件为 37 ℃ 60 min,85 ℃ 5 s,4 ℃;稀释各组 cDNA 后进行 PCR 反应,反应条件设置为 95 ℃ 10 min,95 ℃ 15 s,60 ℃ 30 s,65 ℃ 30 s,经过 40 个循环完成 PCR 扩增,对各组反应生成的 *Ct* 值,进行归一化处理后,按照  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  相对定量法计算每个 miRNA 的相对表达量。(对照组基因表达量设为 1),试验重复 3 次。miRNA 扩增引物由广州复能基因公司合成。

**1.3.6 miRNA 靶基因预测和靶基因富集信号通路分析** 对 mir-335-5p 和 mir-146a-5p 的靶基因使用 miRWALK 网站的生物信息学软件进行预测分析,对所检索到的靶基因使用 DAVID6.7 软件进行 KEGG Pathway 信号通路富集分析,富集聚类分析采用 Fisher 精确检验,检验水准为  $\alpha=0.05$ 。

**1.3.7 实时荧光定量 PCR 检测脂多糖干预后 Toll 样受体 mRNA 的表达** 脂多糖干预胃癌细胞 SGC-7901、BGC-823 和 GES-1 细胞 12、24、48 h 后,提取各组的总 RNA,进行逆转录反应和扩增反应,反应条件和基因表达量计算同 1.3.3。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS17.0 统计软件处理数据,计量资料数据以  $\bar{x}\pm s$  表示,采用单因素方差分析比较多组之间的差异,以  $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

2 结 果

**2.1 不同分化程度胃癌细胞相对于正常胃黏膜上皮 GES-1 细胞的 TLR<sub>1~10</sub> 表达** PCR Array 筛选 Toll 样受体信号通路差异表达的基因显示,在不同分化程度胃癌细胞中,TLR<sub>1~10</sub> 表达 mRNA 有不同程度的上调表达(见图 1,其中红色表示上调表达)。实时荧光定量 PCR 检测验证表明,除 TLR<sub>1</sub>、TLR<sub>3</sub>、TLR<sub>5</sub> 外,其余的 Toll 样受体 mRNA 在不同分化程度胃癌细胞相对于正常胃黏膜上皮 GES-1 细胞出现明显上调。见表 2。

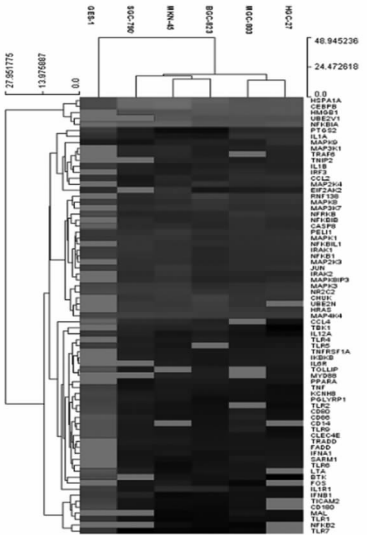


图 1 不同分化程度胃癌细胞的 Toll 样受体信号通路聚类分析结果

**2.2 脂多糖对胃癌细胞中 mir-335-5p 和 mir-146a-5p 表达的影响** 实时荧光定量 PCR 检测显示,不同浓度的脂多糖(终浓度为 0.1、1.0、10.0、100.0  $\mu\text{g/mL}$ )干预胃癌 SGC-7901、BGC-823 细胞和 GES-1 细胞 24 h 后,相对于未干预胃癌细胞, mir-335-5p 和 mir-146a-5p 明显下调表达。见表 3。

**2.3 mir-335-5p 和 mir-146a-5p 的靶基因预测和靶基因富集信号通路分析** 经过使用 miRWALK 网站的生物信息学软件进行预测分析,对所检索到的靶基因使用 DAVID6.7 软件进行 KEGG Pathway 信号通路富集分析后发现, mir-335-5p 和 mir-146a-5p 的部分靶基因都富集于 Toll 样受体信号通路, CD80、CXCL8、FADD、IRAK1、IRF5、IRF7、NFKB1、SPP1、STAT1、TRAF6、MYD88、TLR<sub>2</sub>、TLR<sub>3</sub>、TLR<sub>4</sub> 和 TLR<sub>7</sub> 为 mir-146a-5p 的预测靶基因, CD14、CXCL8、CXCL9、FOS、IFNA21、IKKBK、IL6、LBP、MAP3K8、MAPK1、NFKBIA、

PIK3CA、SPP1、TLR<sub>4</sub>、TLR<sub>1</sub>、TRAF6、MYD88、TLR<sub>1</sub>、TLR<sub>2</sub>、TLR<sub>4</sub>、TLR<sub>8</sub> 和 TLR<sub>10</sub> 为 mir-335-5p 的预测靶基因。

表 2 不同分化程度胃癌细胞的 TLR<sub>1~10</sub> 的表达结果 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 基因                | GES-1     | AGS                    | SGC-7901               | BGC-823                 | MGC-803                 |
|-------------------|-----------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| TLR <sub>1</sub>  | 1.00±0.00 | 0.49±0.10 <sup>*</sup> | 0.76±0.16▲             | 0.81±0.19               | 0.77±0.05▲              |
| TLR <sub>2</sub>  | 1.00±0.00 | 3.60±0.50 <sup>*</sup> | 4.57±1.00 <sup>*</sup> | 4.62±0.57 <sup>*</sup>  | 20.79±5.46 <sup>*</sup> |
| TLR <sub>3</sub>  | 1.00±0.00 | 2.21±0.45 <sup>*</sup> | 1.34±0.31▲             | 0.85±0.21               | 0.08±0.01 <sup>*</sup>  |
| TLR <sub>4</sub>  | 1.00±0.00 | 4.75±1.10 <sup>*</sup> | 2.17±0.55 <sup>*</sup> | 33.20±4.86 <sup>*</sup> | 1.98±0.68 <sup>*</sup>  |
| TLR <sub>5</sub>  | 1.00±0.00 | 1.93±0.63 <sup>*</sup> | 0.34±0.10 <sup>*</sup> | 0.22±0.05 <sup>*</sup>  | 0.33±0.07 <sup>*</sup>  |
| TLR <sub>6</sub>  | 1.00±0.00 | 0.42±0.09 <sup>*</sup> | 1.85±0.41 <sup>*</sup> | 1.24±0.39▲              | 1.24±0.31▲              |
| TLR <sub>7</sub>  | 1.00±0.00 | 1.26±0.87 <sup>*</sup> | 1.69±0.44 <sup>*</sup> | 1.59±0.61               | 5.94±1.03 <sup>*</sup>  |
| TLR <sub>8</sub>  | 1.00±0.00 | 0.91±0.39              | 2.65±0.60 <sup>*</sup> | 1.94±0.68 <sup>*</sup>  | 5.87±0.42 <sup>*</sup>  |
| TLR <sub>9</sub>  | 1.00±0.00 | 0.33±0.17 <sup>*</sup> | 1.44±0.67 <sup>*</sup> | 2.21±0.70 <sup>*</sup>  | 1.58±0.29 <sup>*</sup>  |
| TLR <sub>10</sub> | 1.00±0.00 | 1.78±0.99 <sup>*</sup> | 1.90±0.10 <sup>*</sup> | 1.99±0.46 <sup>*</sup>  | 2.73±0.83 <sup>*</sup>  |

注:胃癌细胞与 GES-1 比较,▲ $P<0.05$ ,<sup>\*</sup> $P<0.001$ 。

表 3 脂多糖对胃癌细胞中 mir-146a-5p 和 mir-335-5p 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, \mu\text{g/mL}$ )

| 细胞株      | miRNA       | 对照组         | 0.1                      | 1.0                      | 10.0                     | 100.0                    |
|----------|-------------|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| SGC-7901 | mir-146a-5p | 1.000±0.000 | 0.660±0.410△             | 0.730±0.350▲             | 0.310±0.140 <sup>*</sup> | 0.160±0.100 <sup>*</sup> |
|          | mir-335-5p  | 1.000±0.000 | 1.340±0.660△             | 0.850±0.340              | 0.250±0.060 <sup>*</sup> | 0.120±0.040 <sup>*</sup> |
| BGC-823  | mir-146a-5p | 1.000±0.000 | 0.450±1.000△             | 0.120±0.100 <sup>*</sup> | 0.250±0.080 <sup>*</sup> | 0.250±0.100 <sup>*</sup> |
|          | mir-335-5p  | 1.000±0.000 | 0.010±0.004 <sup>*</sup> | 0.012±0.005 <sup>*</sup> | 0.040±0.010 <sup>*</sup> | 0.002±0.000 <sup>*</sup> |
| GES-1    | mir-146a-5p | 1.000±0.000 | 0.056±0.020 <sup>*</sup> | 0.048±0.010 <sup>*</sup> | 0.050±0.010 <sup>*</sup> | 0.040±0.010 <sup>*</sup> |
|          | mir-335-5p  | 1.000±0.000 | 0.177±0.060 <sup>*</sup> | 0.085±0.040 <sup>*</sup> | 0.065±0.020 <sup>*</sup> | 0.013±0.005 <sup>*</sup> |

注:各浓度干预组与对照组比较,▲ $P<0.05$ ,△ $P<0.01$ ,<sup>\*</sup> $P<0.001$ 。

表 4 脂多糖对胃癌细胞 SGC-7901 中 TLR<sub>1~10</sub> 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, \mu\text{g/mL}$ )

| mRNA              | 对照组       | 0.1/24 h               | 1.0/24 h               | 10.0/24 h              | 100.0/24 h             | 10.0/12 h              | 10.0/48 h              |
|-------------------|-----------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| TLR <sub>1</sub>  | 1.00±0.00 | 0.93±0.16              | 1.19±0.44▲             | 1.30±0.35▲             | 1.73±0.18 <sup>*</sup> | 1.04±0.29              | 1.48±0.42△             |
| TLR <sub>2</sub>  | 1.00±0.00 | 0.98±0.40              | 0.95±0.16              | 3.10±1.26 <sup>*</sup> | 4.30±0.53 <sup>*</sup> | 3.13±0.85 <sup>*</sup> | 7.14±0.68 <sup>*</sup> |
| TLR <sub>3</sub>  | 1.00±0.00 | 0.33±0.16 <sup>*</sup> | 0.47±0.14 <sup>*</sup> | 0.79±0.26▲             | 1.07±0.40              | 0.90±0.28              | 0.59±0.28 <sup>*</sup> |
| TLR <sub>4</sub>  | 1.00±0.00 | 0.77±0.18▲             | 0.96±0.12              | 0.78±0.24▲             | 1.39±0.16△             | 0.52±0.17 <sup>*</sup> | 0.22±0.08 <sup>*</sup> |
| TLR <sub>5</sub>  | 1.00±0.00 | 2.15±0.37 <sup>*</sup> | 2.37±0.63 <sup>*</sup> | 3.68±1.23 <sup>*</sup> | 4.88±1.12 <sup>*</sup> | 3.89±0.79 <sup>*</sup> | 2.05±0.42 <sup>*</sup> |
| TLR <sub>6</sub>  | 1.00±0.00 | 0.96±0.32              | 1.44±0.33△             | 1.77±0.40 <sup>*</sup> | 2.02±0.48 <sup>*</sup> | 1.73±0.39 <sup>*</sup> | 1.78±0.70 <sup>*</sup> |
| TLR <sub>7</sub>  | 1.00±0.00 | 0.67±0.22△             | 1.21±0.22▲             | 5.81±1.70 <sup>*</sup> | 5.93±2.61△             | 3.98±1.27 <sup>*</sup> | 2.51±1.03 <sup>*</sup> |
| TLR <sub>8</sub>  | 1.00±0.00 | 1.10±0.37              | 2.20±0.78 <sup>*</sup> | 4.44±0.30 <sup>*</sup> | 9.33±3.30 <sup>*</sup> | 4.28±1.23 <sup>*</sup> | 3.64±1.65 <sup>*</sup> |
| TLR <sub>9</sub>  | 1.00±0.00 | 1.08±0.48              | 1.23±0.49▲             | 2.89±1.37 <sup>*</sup> | 4.06±0.95 <sup>*</sup> | 1.79±0.32△             | 3.37±1.37 <sup>*</sup> |
| TLR <sub>10</sub> | 1.00±0.00 | 2.11±0.26 <sup>*</sup> | 2.75±0.74 <sup>*</sup> | 4.84±1.08 <sup>*</sup> | 6.86±1.74 <sup>*</sup> | 2.32±1.11 <sup>*</sup> | 1.75±0.69 <sup>*</sup> |

注:各浓度干预组与对照组比较,▲ $P<0.05$ ,△ $P<0.01$ ,<sup>\*</sup> $P<0.001$ 。

表 5 脂多糖对胃癌细胞 BGC-823 中 TLR<sub>1~10</sub> 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, \mu\text{g/mL}$ )

| mRNA             | 对照组       | 0.1/24 h   | 1.0/24 h               | 10.0/24 h              | 100.0/24 h               | 10.0/12 h              | 10.0/48 h              |
|------------------|-----------|------------|------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|
| TLR <sub>1</sub> | 1.00±0.00 | 0.93±0.24  | 0.94±0.16              | 1.21±0.24▲             | 1.94±0.30 <sup>*</sup>   | 1.05±0.33              | 1.76±0.38△             |
| TLR <sub>2</sub> | 1.00±0.00 | 0.92±0.17  | 2.00±0.73 <sup>*</sup> | 3.42±0.56 <sup>*</sup> | 6.14±1.62 <sup>*</sup>   | 1.28±0.32▲             | 1.49±0.50△             |
| TLR <sub>3</sub> | 1.00±0.00 | 0.89±0.17  | 1.44±0.35△             | 2.08±0.71 <sup>*</sup> | 7.45±1.55 <sup>*</sup>   | 9.03±2.32 <sup>*</sup> | 5.66±0.70 <sup>*</sup> |
| TLR <sub>4</sub> | 1.00±0.00 | 1.34±0.37△ | 1.60±0.33 <sup>*</sup> | 1.72±0.59 <sup>*</sup> | 14.32±3.10 <sup>*</sup>  | 1.09±0.29              | 1.67±0.28△             |
| TLR <sub>5</sub> | 1.00±0.00 | 2.50±1.25△ | 4.96±1.82 <sup>*</sup> | 3.84±0.56 <sup>*</sup> | 38.67±10.95 <sup>*</sup> | 2.75±0.43 <sup>*</sup> | 1.47±0.33 <sup>*</sup> |

续表 5 脂多糖对胃癌细胞 BGC-823 中 TLR<sub>1~10</sub> 表达的影响( $\bar{x}\pm s, \mu\text{g/mL}$ )

| mRNA              | 对照组         | 0. 1/24 h                | 1. 0/24 h                | 10. 0/24 h               | 100. 0/24 h                | 10. 0/12 h               | 10. 0/48 h               |
|-------------------|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| TLR <sub>6</sub>  | 1. 00±0. 00 | 0. 51±0. 16 <sup>△</sup> | 0. 56±0. 12 <sup>△</sup> | 1. 09±0. 45              | 3. 50±0. 66 <sup>*</sup>   | 0. 53±0. 13 <sup>△</sup> | 0. 77±0. 10 <sup>△</sup> |
| TLR <sub>7</sub>  | 1. 00±0. 00 | 2. 11±0. 55 <sup>*</sup> | 2. 40±1. 04 <sup>*</sup> | 4. 67±2. 11 <sup>*</sup> | 12. 37±2. 88 <sup>*</sup>  | 2. 24±0. 28 <sup>*</sup> | 1. 11±0. 37              |
| TLR <sub>8</sub>  | 1. 00±0. 00 | 2. 37±0. 64 <sup>*</sup> | 3. 41±1. 98 <sup>*</sup> | 7. 13±1. 38 <sup>*</sup> | 49. 95±19. 23 <sup>*</sup> | 1. 98±0. 12 <sup>*</sup> | 2. 36±0. 42 <sup>*</sup> |
| TLR <sub>9</sub>  | 1. 00±0. 00 | 1. 44±0. 70 <sup>△</sup> | 1. 92±0. 19 <sup>△</sup> | 2. 82±0. 45 <sup>*</sup> | 23. 81±5. 97 <sup>*</sup>  | 0. 75±0. 12 <sup>▲</sup> | 0. 88±0. 31              |
| TLR <sub>10</sub> | 1. 00±0. 00 | 1. 12±0. 43              | 2. 70±0. 92 <sup>*</sup> | 2. 02±0. 47 <sup>*</sup> | 10. 23±2. 61 <sup>*</sup>  | 2. 45±0. 40 <sup>*</sup> | 3. 53±0. 82 <sup>*</sup> |

注:各浓度干预组与对照组比较,▲ $P<0. 05$ ,△ $P<0. 01$ ,<sup>\*</sup> $P<0. 001$ 。

表 6 脂多糖对胃癌细胞 GES-1 中 TLR<sub>1~10</sub> 表达的影响( $\bar{x}\pm s, \mu\text{g/mL}$ )

| mRNA              | 对照组         | 0. 1/24 h                | 1. 0/24 h                | 10. 0/24 h               | 100. 0/24 h               | 10. 0/12 h                | 10. 0/48 h                |
|-------------------|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| TLR <sub>1</sub>  | 1. 00±0. 00 | 2. 30±0. 23 <sup>*</sup> | 2. 80±0. 38 <sup>*</sup> | 3. 70±0. 85 <sup>*</sup> | 4. 25±0. 94 <sup>*</sup>  | 5. 38±0. 60 <sup>*</sup>  | 4. 65±0. 73 <sup>*</sup>  |
| TLR <sub>2</sub>  | 1. 00±0. 00 | 1. 51±0. 59 <sup>*</sup> | 2. 39±0. 56 <sup>*</sup> | 3. 83±0. 64 <sup>*</sup> | 13. 34±3. 84 <sup>*</sup> | 2. 98±0. 48 <sup>*</sup>  | 5. 47±1. 53 <sup>*</sup>  |
| TLR <sub>3</sub>  | 1. 00±0. 00 | 6. 27±1. 41 <sup>*</sup> | 4. 91±0. 72 <sup>*</sup> | 2. 08±0. 71 <sup>*</sup> | 5. 69±1. 39 <sup>*</sup>  | 13. 76±2. 41 <sup>*</sup> | 9. 19±1. 00 <sup>*</sup>  |
| TLR <sub>4</sub>  | 1. 00±0. 00 | 2. 74±0. 19 <sup>*</sup> | 2. 45±0. 15 <sup>*</sup> | 3. 18±0. 96 <sup>*</sup> | 3. 55±0. 88 <sup>*</sup>  | 3. 29±0. 70 <sup>*</sup>  | 4. 10±0. 87 <sup>*</sup>  |
| TLR <sub>5</sub>  | 1. 00±0. 00 | 3. 17±0. 86 <sup>*</sup> | 2. 15±0. 26 <sup>*</sup> | 2. 60±0. 79 <sup>*</sup> | 7. 61±1. 48 <sup>*</sup>  | 9. 86±1. 48 <sup>*</sup>  | 8. 08±1. 65 <sup>*</sup>  |
| TLR <sub>6</sub>  | 1. 00±0. 00 | 4. 24±1. 12 <sup>*</sup> | 3. 94±0. 62 <sup>*</sup> | 3. 25±1. 20 <sup>*</sup> | 8. 74±1. 15 <sup>*</sup>  | 10. 67±0. 99 <sup>*</sup> | 9. 19±0. 77 <sup>*</sup>  |
| TLR <sub>7</sub>  | 1. 00±0. 00 | 2. 08±0. 52 <sup>*</sup> | 2. 99±0. 34 <sup>*</sup> | 4. 39±0. 89 <sup>*</sup> | 6. 37±0. 70 <sup>*</sup>  | 8. 85±1. 99 <sup>*</sup>  | 26. 78±1. 29 <sup>*</sup> |
| TLR <sub>8</sub>  | 1. 00±0. 00 | 1. 88±0. 60 <sup>*</sup> | 6. 23±1. 28 <sup>*</sup> | 7. 74±1. 29 <sup>*</sup> | 20. 91±4. 67 <sup>*</sup> | 17. 90±3. 98 <sup>*</sup> | 23. 41±4. 67 <sup>*</sup> |
| TLR <sub>9</sub>  | 1. 00±0. 00 | 1. 59±0. 32 <sup>*</sup> | 1. 20±0. 24 <sup>▲</sup> | 2. 27±0. 32 <sup>*</sup> | 9. 55±2. 10 <sup>*</sup>  | 13. 10±3. 68 <sup>*</sup> | 13. 51±1. 31 <sup>*</sup> |
| TLR <sub>10</sub> | 1. 00±0. 00 | 2. 75±1. 01 <sup>*</sup> | 2. 11±0. 26 <sup>*</sup> | 2. 34±0. 58 <sup>*</sup> | 6. 87±1. 75 <sup>*</sup>  | 4. 38±2. 17 <sup>*</sup>  | 4. 84±1. 09 <sup>*</sup>  |

注:各浓度干预组与对照组比较,▲ $P<0. 05$ ,△ $P<0. 01$ ,<sup>\*</sup> $P<0. 001$ 。

**2.4 脂多糖干预后, GES-1 细胞和胃癌 SGC-7901、BGC-823 细胞 TLR<sub>1~10</sub> mRNA 表达** 实时荧光定量 PCR 检测显示,不同浓度的脂多糖(终浓度为 0. 1、1. 0、10. 0、100. 0  $\mu\text{g/mL}$ )干预胃癌 SGC-7901、BGC-823 细胞和 GES-1 细胞 12、24、48 h 后,相对于未干预对照组,在 SGC-7901 细胞,除 TLR<sub>3</sub>、TLR<sub>4</sub> 外,其他 TLR 受体在不同浓度脂多糖干预后,均有不同程度的上调表达;在 BGC-823 细胞,TLR<sub>1</sub>、TLR<sub>4</sub>、TLR<sub>6</sub> 受体仅在高浓度脂多糖干预时,上调表达,其他 TLR 受体在不同浓度脂多糖干预后,均有不同程度的上调表达;在 GES-1 细胞,所有 TLR<sub>1~10</sub> 在不同浓度脂多糖干预后均明显上调表达。见表 4~6。

3 讨 论

miRNAs 是一类内源性非编码 RNA,长约 20~25 个核苷酸,普遍存在于多细胞生物中,通过与靶基因的 mRNA 3'-UTR 结合或互补结合,抑制靶基因 mRNA 的转录或翻译发挥其生物学功能。近年来的研究显示 miRNAs 分子能够调控约 2/3 人类蛋白的表达,几乎参与细胞生命活动的每个环节,包括调控个体发育、细胞凋亡、细胞增殖和分化等生命活动<sup>[10-11]</sup>。大量的研究证实 miRNA 与胃癌的发生发展、侵袭转移、对化疗药物耐药、临床病理特征等关系十分密切。miRNA 已经成为特异性的胃癌分子标记物之一,mir-335-5p 和 mir-146a-5p 是近年来受到学术界广泛关注的重要抑癌基因胃癌分子标记物。众多的研究表明,mir-146a-5p 在胃癌组织相对于癌旁组织呈现低表达,临床病理意义研究和体外试验表明,mir-146a-5p 的下调表达与胃癌的侵袭转移和静脉血管侵犯相关,也与胃癌肿瘤体积大小和分化程度相关<sup>[12-13]</sup>。本课题组

在前期研究也发现,mir-335-5p 和 mir-146a-5p 在不同分化程度的胃癌细胞 AGS、SGC-7901、MKN-45、MKN-28、MGC-803、BGC-823 和 HGC-27 中明显下调表达,在胃癌组织相对于癌旁组织也呈现下调表达,并且 mir-335-5p 和 mir-146a-5p 的下调其表达与淋巴侵袭转移有关<sup>[14-15]</sup>。

由此,本研究推测胃癌中高表达的 Toll 样受体及其下游的信号通路分子与 mir-335-5p 和 mir-146a-5p 的低表达有着密切的联系,胃癌中低表达的 mir-335-5p 和 mir-146a-5p 可能是 Toll 样受体在胃癌中的高表达的原因之一,从而介导了胃癌的发生发展,侵袭转移。本研究发现,在受到脂多糖的干预后,胃癌细胞 SGC-7901、MGC-803 和 BGC-823 中的 mir-335-5p 和 mir-146a-5p 的表达量出现不同程度下调表达,而 Toll<sub>1~10</sub> 样受体 mRNA 的表达量出现不同程度的上调表达。由此,结合生物信息学分析和试验结果,可以设想脂多糖干预诱导胃癌中低表达的 mir-335-5p 和 mir-146a-5p 可能是 Toll 样受体在胃癌中的高表达的原因之一,从而进一步参与导致胃癌的生物学行为的变化。

有文献报道指出 HP 感染或者 HP 可以通过其释放的脂多糖调控 miRNA 及其靶基因达到影响胃癌的生物学行为<sup>[16-19]</sup>。在炎症发生过程中,尤其是 HP 释放的炎症因子可以诱导机体产生一些氧化应激因子如活性氧(ROS)和活性氮(RNS),持续的炎症(慢性炎症)使细胞长期暴露在 ROS/RNS 环境中,后者将导致基因组改变(DNA 链断裂和碱基修饰)或导致 DNA 甲基转移酶活性或组蛋白去乙酰化的酶活性改变。这些表观遗传变化通过某些基因的表达异常,最终参与了胃癌的生物学行为<sup>[20-24]</sup>。

综上所述,本研究使用脂多糖干预胃癌细胞,模拟了胃癌细胞所处的炎症微环境,结果表明,脂多糖可诱导抑癌基因 mir-335-5p, mir-146a-5p 下调表达和 Toll 样受体 mRNA 上调表达, Toll 样受体 mRNA 上调表达可能与抑癌基因 mir-335-5p 和 mir-146a-5p 的下调表达有关。这一结果提示,在研究炎症微环境对胃癌生物学行为的影响中,要充分注意非编码 RNA 对 Toll 样受体信号通路的影响。

## 参考文献

- [1] Li TT, Ogino S, Qian ZR. Toll-like receptor signaling in colorectal cancer: carcinogenesis to cancer therapy [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(47):17699-17708.
- [2] Leake I. Hepatocellular carcinoma. Treatment potential of targeting Toll-like receptors in HCC [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2014, 11(9):518.
- [3] Husseinzadeh N, Davenport SM. Role of toll-like receptors in cervical, endometrial and ovarian cancers; a review [J]. *Gynecol Oncol*, 2014, 135(2):359-363.
- [4] Moyat M, Velin D. Immune responses to helicobacter pylori infection [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(19):5583-5593.
- [5] Smith SM. Role of toll-like receptors in helicobacter pylori infection and immunity [J]. *World J Gastrointest Pathophysiol*, 2014, 5(3):133-146.
- [6] Wang TR, Peng JC, Qiao YQ, et al. Helicobacter pylori regulates TLR<sub>4</sub> and TLR<sub>9</sub> during gastric carcinogenesis [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(10):6950-6955.
- [7] Uno K, Kato K, Shimosegawa T. Novel role of toll-like receptors in helicobacter pylori-induced gastric malignancy [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(18):5244-5251.
- [8] 陈战, 涂永久, 郭明, 等. 胃癌组织中 Toll 样受体 4/9 的表达与肿瘤病理分期和转移的相关性 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2011, 18(2):201-205.
- [9] Yang H, Wang B, Yan J, et al. Toll-Like receptor 2 promotes invasion by SGC-7901 human gastric carcinoma cells and is associated with gastric carcinoma metastasis [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2014, 44(2):158-166.
- [10] Dany A. MicroRNAs: small RNAs with big effects [J]. *Transplantation*, 2010, 90(2):105-112.
- [11] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs [J]. *Science*, 2001, 294(5543):853-858.
- [12] Kogo R, Mimori K, Tanaka F, et al. Clinical significance of miR-146a in gastric cancer cases [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(13):4277-4284.
- [13] Yao QY, Cao ZW, Tu CT, et al. MicroRNA-146a acts as a metastasis suppressor in gastric cancer by targeting WASF2 [J]. *Cancer Lett*, 2013, 335(1):219-224.
- [14] Li H, Xie S, Liu M, et al. The clinical significance of downregulation of mir-124-3p, mir-146a-5p, mir-155-5p and mir-335-5p in gastric cancer tumorigenesis [J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(1):197-208.
- [15] Li ZR, Li DJ, Zhang GY, et al. Methylation-associated silencing of MicroRNA-335 contributes tumor cell invasion and migration by interacting with RASA1 in gastric cancer [J]. *Am J Cancer Res*, 2014, 4(6):648.
- [16] Noto JM, Peek RM. The role of microRNAs in helicobacter pylori pathogenesis and gastric carcinogenesis [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2011, 1:21.
- [17] Zhou XY, Xia Y, Li L, et al. MiR-101 inhibits cell growth and tumorigenesis of Helicobacter pylori related gastric cancer by repression of SOCS2 [J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16(1):160-169.
- [18] Zhou X, Xu G, Yin C, et al. Down-regulation of miR-203 induced by helicobacter pylori infection promotes the proliferation and invasion of gastric cancer by targeting CASK [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(22):11631-11640.
- [19] Zhou XY, Li L, Su J, et al. Decreased miR-204 in H. pylori-associated gastric cancer promotes cancer cell proliferation and invasion by targeting SOX4 [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7):e101457.
- [20] Wang F, Meng WB, Wang BY, et al. Helicobacter pylori-induced gastric inflammation and gastric cancer [J]. *Cancer Lett*, 2014, 345(2):196-202.
- [21] Na HK, Woo JH. Helicobacter pylori induces hypermethylation of CpG islands through upregulation of DNA methyltransferase: possible involvement of reactive oxygen/nitrogen species [J]. *J Cancer Prev*, 2014, 19(4):259-264.
- [22] Niu YM, Desmarais TL, Tong ZH, et al. Oxidative stress alters global histone modification and DNA methylation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 82(15):22-28.
- [23] Chiba T, Marusawa H, Ushijima T. Inflammation-associated cancer development in digestive organs: mechanisms and roles for genetic and epigenetic modulation [J]. *Gastroenterology*, 2012, 143(3):550-563.
- [24] Niwa T, Toyoda T, Tsukamoto T, et al. Prevention of helicobacter pylori-induced gastric cancers in gerbils by a DNA demethylating agent [J]. *Cancer Prev Res*, 2013, 6(4):263-270.

(收稿日期:2016-04-02 修回日期:2016-06-13)