

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.14.008

甲状腺乳头状癌中 TLR4 对 Foxp3 表达的调控作用分析

徐金锴 李宗禹 苏清华 赵 军 马建仓[△]

(西安交通大学第二附属医院 陕西 西安 710004)

摘要 目的:探讨人甲状腺乳头状癌(PTC)细胞中 TLR4 信号通路对 Foxp3 表达的调控作用。**方法:**以人甲状腺乳头状癌 K1 细胞株为实验材料,选用脂多糖(LPS)作为配体来激活 TLR4 信号通路,采用 RT-PCR 方法检测 LPS 在不同浓度(0, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和不同时间点(12, 24, 36, 48 h)Foxp3 的 mRNA 表达量,流式细胞术检测相应浓度和时间点的 Foxp3 蛋白和 TLR4 蛋白表达量的变化;加入 LPS 抑制剂多粘菌素 B(PMB)后 Foxp3 和 mRNA 和蛋白的表达量分别利用 RT-PCR 和流式细胞术检测。**结果:**10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 可以显著上调 PTC 细胞中 Foxp3 mRNA 和蛋白的表达量($P<0.05$),在第 24 小时达到最佳;LPS 作用下,TLR4 表达量上调;PMB 阻断 TLR4 信号通路后,Foxp3 蛋白表达量较未阻断组显著降低($P<0.05$)。**结论:**在甲状腺乳头状癌 K1 细胞株中,TLR4 作为上游信号调控因子,通过自身表达量改变,进而参与调控 Foxp3 的表达。

关键词:甲状腺乳头状癌;Toll 样受体 4;叉头蛋白 3;脂多糖

中图分类号:R736.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)14-2635-05

Regulation Analysis of Foxp3 Expression by TLR4 in Papillary Thyroid Carcinoma

XU Jin-kai, LI Zong-yu, SU Qing-hua, ZHAO Jun, MA Jian-cang[△]

(The Second Affiliated Hospital Of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710004, China)

ABSTRACT Objective: To investigate whether the expression of Foxp3 in human's Papillary thyroid carcinoma (PTC) cells could be regulated by TLR4 signaling pathway activation. **Methods:** We used human's thyroid carcinoma K1 cells as the research object, and choose lipopolysaccharide (LPS) as a ligand to activate TLR4 signaling pathway. The mRNA expression level of Foxp3 was detected by RT-PCR method in different LPS concentrations (0, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and at different time points (12, 24, 36, 48 h). The protein expression level of Foxp3 and TLR4 were detected by flow cytometry. The expression level of Foxp3 mRNA and protein were detected by RT-PCR and flow cytometry respectively after adding LPS inhibitor polymyxin B (PMB). **Results:** The mRNA level of Foxp3 was significantly increased by 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS at 24 hours ($P<0.05$). And the protein level of TLR4 was significantly increased by LPS activation. After the PMB blocking TLR4 signaling pathway, the expression of Foxp3 mRNA and protein were significantly decreased than that of without blocking group ($P<0.05$). **Conclusions:** In human's Papillary thyroid carcinoma (PTC) K1 cells, TLR4 as the upstream signaling molecules, it could be involved in regulation of Foxp3 by its own expression changed.

Key words: Papillary thyroid carcinoma; TLR4; Foxp3; Lipopolysaccharide

Chinese Library Classification(CLC): R736.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)14-2635-05

前言

甲状腺癌是当今人类发病率增加最快的头颈部肿瘤之一,其中最常见的是甲状腺乳头状癌(Papillary thyroid carcinoma, PTC),约占 85%^[1,2]。Foxp3 作为叉头状转录因子家族(Forkhead box protein, Fox)中的一员,是控制 Tregs 细胞(Regulatory T cells, Tregs)发育和行使功能的关键调节因子^[3]。研究证实 Foxp3+Tregs 参与了包括 PTC 在内的多种肿瘤的免疫逃逸,其数量与肿瘤的发展显著相关^[4]。TLR4 是 Toll 样受体(Toll like receptors, TLRs)蛋白家族中最先被发现一员,近年来的研究表明其在部分肿瘤细胞或者组织中也有表达^[5]。肿瘤细胞中的研究发现,TLR4 信号通路可以诱导免疫微环境中肿瘤

细胞的免疫耐受,从而促进肿瘤的免疫逃逸^[6-8]。有研究证实,当 LPS 激活 TLR4 信号通路后可显著增强 Tregs 的免疫抑制作用^[9],而 Foxp3 又是 Tregs 发挥功能的决定因子,因此我们推测 PTC 细胞中 Foxp3 蛋白的表达受到 TLR4 信号通路的调控。因此,我们以人 PTC K1 细胞株为研究对象,分别选用脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)活化和多粘菌素 B(Polymyxin, PMB)阻断 TLR4 信号通路,通过检测 Foxp3 在基因和蛋白水平表达量的变化,进而探讨 TLR4 信号通路对 Foxp3 表达的调控作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料及试剂

作者简介:徐金锴(1973-),硕士研究生,主治医师,主要研究方向:甲状腺疾病,E-mail: 13572880966@163.com,电话:13572880966

[△] 通讯作者:马建仓(1972-),副教授,副主任医师,主要研究方向:腺体疾病及血管疾病,E-mail: majiancangery@163.com

(收稿日期:2016-06-30 接受日期:2016-07-23)

人甲状腺癌 K1 细胞株为西安交通大学基础医学院癌症研究所保存提供。1640 培养基购自 Invitrogen 公司,胰酶购自 Sigma 公司,MLLV 反转录酶购自 Takara 公司, Anti-human TLR4/MD2 抗体购自 eBioscience 公司,小鼠抗人 Foxp3 单克隆荧光抗体、小鼠抗人 TLR4 单克隆荧光抗体和 Normal human IgG 购自 Santa 公司。

1.2 K1 细胞株的复苏和培养

取出保存于液氮罐中的 PTC K1 细胞,迅速于 37°C 水浴融化,经过低速离心 (1000 rpm, 5 min), 悬浮培养于含有 4 mL 25% 的新鲜小牛血清的 1640 培养液的 25 mL 的培养瓶中,置于恒温培养箱 (37°C, 5% CO₂) 中培养。待细胞融合度达到 70-80% 时,用 0.25% 的胰酶消化,并加入完全培养基中和,此后按 1:3 传代培养。

1.3 RT-PCR 检测 PTC 细胞中 Foxp3 mRNA 的表达

按照 LPS 浓度不同,共分为 5 组,浓度分别为 0、5、10、20、40 μg/mL,各组加入相应浓度 LPS 处理后,置于恒温培养箱中培养 24 h 后提取 RNA,检测 mRNA 表达量。按照检测时间点不同,共分为 5 组,除对照组 (0 h) 不加 LPS,其余 4 组菌各加入 10 μg/mL LPS 处理,分别在培养 0 h、12 h、24 h、36 h 和 48 h 时提取细胞 RNA,检测 mRNA 表达量。每组 3 个重复处理。

K1 细胞总 RNA 利用 TRIzol 方法提取,反转录成 cDNA,再以 cDNA 作为扩增的模板,常规 PCR 反应扩增目的基因片段,以 β-actin 作为内参基因。PCR 反应条件,β-actin: 94°C 预变性 2 min; 94°C 变性 30 s, 50°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 此阶段 25 次循环; 最后 72°C 延伸 10 min。Foxp3: 94°C 预变性 2 min; 94°C 变性 30 s, 58°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 此阶段 25 次循环; 最后 72°C 延伸 10 min。所用引物序列如下(表 1):

表 1 RT-PCR 各基因引物序列

Table 1 Primer sequences of the gene by RT-PCR

Gene	Primer sequence (5'-3')
Foxp3	F: GCCACCATGCCCAACCCAGGCCTGG
	R: TCAGGGGGCCAGGTGTAGGGTTGGAAC
β-actin	F: CTACAATGAGCTGCGTGTGG
	R: AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC

1.4 流式细胞术检测 PTC 下包中 Foxp3 和 TLR4 蛋白的表达

计数细胞为 1 × 10⁶, PBS 洗涤一次后 1 500 rpm 离心 3 min; 加入 4% 的多聚甲醛 500 μL 用以固定细胞,于 4°C 环境下孵育 30 min。然后用 PBS 清洗细胞,低速离心弃去上清;用破膜剂稀释 (1:100) 小鼠抗人 Foxp3 单克隆荧光抗体或用 PBS 稀释 (1:100) 小鼠抗人 TLR4 单克隆荧光抗体,再于 4°C 环境下孵育 60 min。PBS 洗涤 3 次后,加入 350 μL 2% 的多聚甲醛固定细胞,然后上流式细胞仪检测细胞内平均荧光强度 (MFI)。

1.5 统计学处理

数据统计处理采用统计学软件 SPSS17.0 软件完成,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,以 P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 LPS 最佳作用浓度分析

LPS 设置 5 个不同的浓度 (0, 5, 10, 20, 40 μg/mL) 分别作用于人甲状腺乳头状癌 K1 细胞, 24 h 后 RT-PCR 检测 Foxp3 mRNA 表达结果显示, 不同浓度 LPS (除 0 μg/mL) 作用下, Foxp3 mRNA 的表达均有上调, 但是以 10 和 20 μg/mL 时上调幅度显著, 较 LPS 0 μg/mL 组差异显著 (P < 0.05), 其中 LPS 浓度为 10 μg/mL 时, 上调作用最为明显, 见图 1。

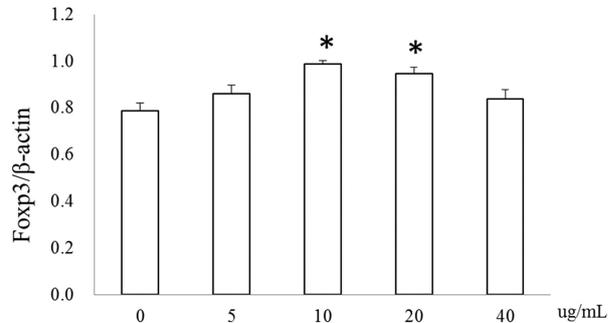


图 1 不同浓度 LPS 作用对 K1 细胞 Foxp3 mRNA 表达的影响

注: 与 0 μg/mL 相比, *P < 0.05。

Fig.1 The effect of different concentrations of LPS on mRNA expression of Foxp3 in K1 cells

Note: *P < 0.05, compared with LPS 0 μg/mL group.

2.2 LPS 最佳作用时间分析

以 10 μg/mL 作为 LPS 的有效浓度, 利用 RT-PCR 方法分别于第 12、24、36 和 48 h 时间点检测 Foxp3 mRNA 的表达量。检测结果显示, Foxp3 mRNA 的表达量在四个时间点均有不同程度的上调, 且在 24 h 时间点处达到最大值 (P < 0.05), 见图 2。这一结果提示在 LPS 激活了 K1 细胞的 TLR4 信号通路后, Foxp3 mRNA 表达上调的最佳时间为 24 h。

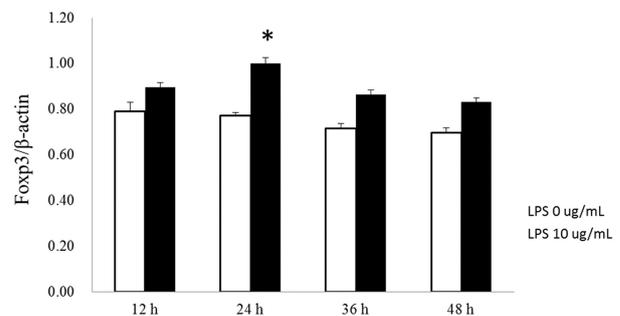


图 2 不同时间 K1 细胞中 Foxp3 mRNA 表达分析

注: 与 0 μg/mL 相比, *P < 0.05。

Fig.2 Analysis of Foxp3 mRNA expression at different time in K1 cells

Note: *P < 0.05, compared with LPS 0 μg/mL group.

2.3 最有效 LPS 浓度作用下最佳时间时 Foxp3 蛋白表达量分析

以 10 μg/mL 作为 LPS 的有效浓度刺激 K1 细胞, 在 24 h 处利用流式细胞术检测 Foxp3 蛋白的表达量。结果显示, LPS 浓度 10 μg/mL 组 (352 ± 18) 较 0 μg/mL 组 (267 ± 20) MFI 显著增强, 差异显著 (P < 0.05), 见图 3。这一结果在 RT-PCR 检测基础上进一步说明了激活 TLR4 信号通路调控 Foxp3 的表达上调。

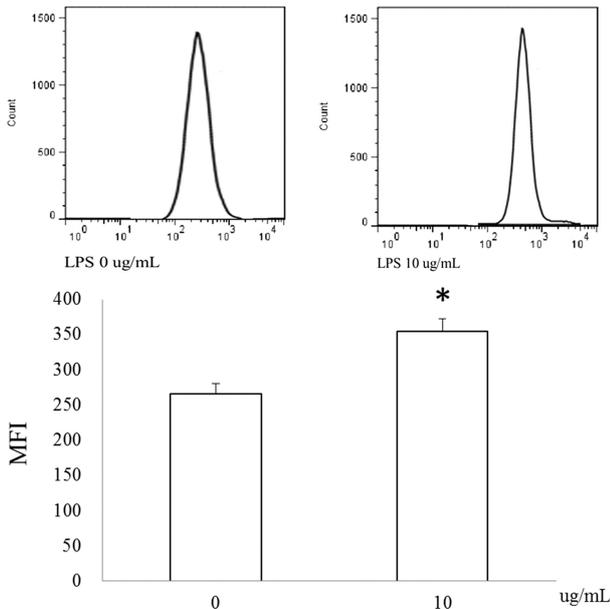


图3 最有效浓度LPS作用K1细胞Foxp3蛋白表达分析

Fig.3 Analysis of the most effective concentration of LPS on protein expression of Foxp3 in K1 cells

注:与0 μg/mL相比, *P<0.05。

Note: *P<0.05, compared with LPS 0 μg/mL group.

2.4 不同浓度LPS作用下TLR4蛋白表达变化

为进一步分析TLR4蛋白在调控K1细胞中Foxp3蛋白表达过程中的变化趋势,设置5个不同的浓度(0, 5, 10, 20, 40 μg/mL)的LPS分别作用于人甲状腺癌乳头状癌K1细胞,采用流式细胞术在最佳刺激时间24 h处检测对应浓度下TLR4蛋白表达量变化。结果显示LR4蛋白的表达量随着LPS浓度的升高而增大,但在10 μg/mL时表达量达到峰值,此后随着LPS浓度上升这种上调作用进入停滞期,见图4。10、20、40 μg/mL组相较于0 μg/mL组MFI值差异明显(P<0.05),但三组间无明显差异(P>0.05)。这表明,随着LPS激活作用增强,TLR4的表达量也随之增加,但这种上调作用有一定的限定。

2.5 PMB作用后Foxp3 mRNA表达量分析

上述研究结果表明LPS可以激活TRL4通路,上调TRL4的表达量,同时Foxp3的表达量也显示有上调的趋势。为进一步探究Foxp3表达的上调是否由TLR4信号通路激活而引起的,本研究选用50 μg/mL的PMB阻断TLR4信号通路的激活,再用最有效浓度的LPS(10 μg/mL)刺激K1细胞,利用RT-PCR检测阻断前后Foxp3 mRNA的表达量情况。结果显示,相较于未阻断组(LPS, 10 μg/mL),PMB阻断组中Foxp3 mRNA的表达量显著下降,差异具有统计学意义(P<0.05),见图5。这一结果表明PMB阻断TLR4信号通路的激活可抑制

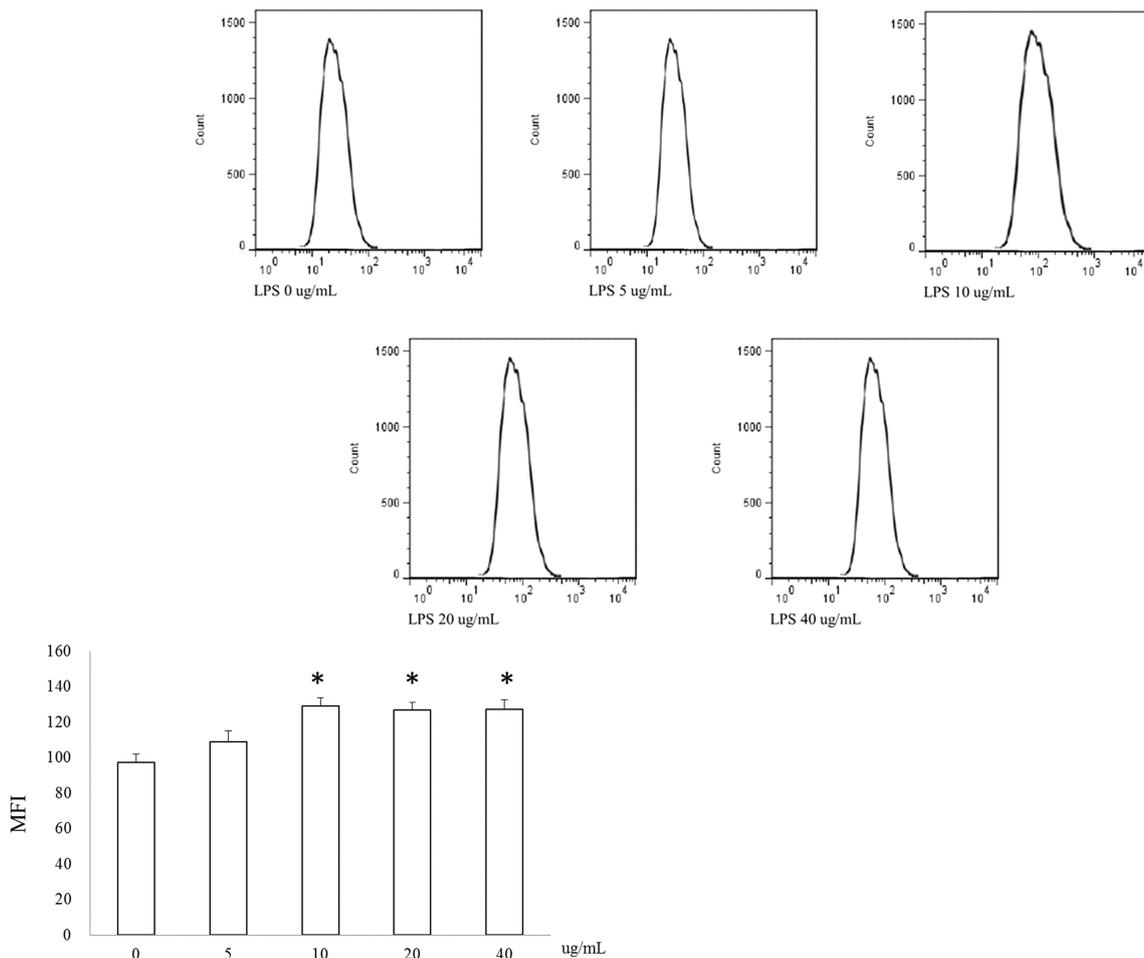


图4 LPS对K1细胞TLR4蛋白表达影响

Fig.4 The effect of LPS on protein expression of TLR4 in K1 cells

注:与0 μg/mL相比, *P<0.05. Note: *P<0.05, compared with LPS 0 μg/mL group

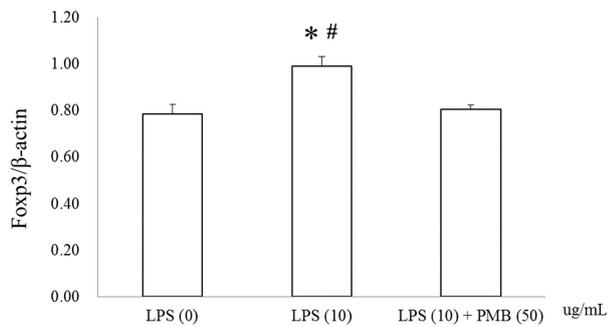


图 5 PMB 阻断 TLR4 信号通路前后 Foxp3 mRNA 表达分析

注: 与 0 μg/mL 相比, *P<0.05; 与 LPS(10)+PMB(50)组相比, #P<0.05.

Fig.5 Analysis of Foxp3 mRNA expression before and after the PMB blocking TLR4 signaling pathway

Note: *P<0.05, compared with LPS(0) group; #P<0.05, compared with LPS(10)+PMB(50) group.

Foxp3 mRNA 的表达上调。

2.6 PMB 作用后 Foxp3 蛋白表达量分析

为进一步在蛋白水平探究 Foxp3 表达的上调是否由 TLR4 通路激活而引起的,利用 PMB 阻断 TLR4 信号通路的激活,采用流式细胞术检测阻断前后 Foxp3 的表达变化。检测结果显示,当 PMB 阻断 TLR4 信号通路的激活后,Foxp3 蛋白的表达量显著下降,差异具有统计学意义(P<0.05),这与 mRNA 水平的变化是一致的,见图 6。蛋白水平的检测结果进一步证明了阻断 TLR4 信号通路的激活后可抑制 Foxp3 的表达上调。

3 讨论

Foxp3 作为控制 Tregs 细胞(Regulatory T cells)发育和行使功能的关键调节因子,在维持生物机体自身免疫过程中起着

重要作用^[10]。Foxp3 的功能减弱会导致 Tregs 细胞的减少,最终导致免疫系统发生自身免疫反应;但 Foxp3 功能过度表达又会抑制机体的正常免疫功能,从而导致免疫缺陷^[3]。有研究表明包括消化系统肿瘤、肺癌在内的多种恶性肿瘤细胞能够自身表达 Foxp3^[11-13],且证实 Foxp3+Tregs 参与了包括 PTC 在内的多种肿瘤的免疫逃逸^[3]。French 等^[14]的研究发现 Tregs 细胞介导的免疫抑制效应随着 PTC 肿瘤细胞的浸润而增强,这也说明了 Foxp3+Tregs 是通过其免疫抑制功能进而在 PTC 的发生过程中发挥作用的。但是,目前的研究中关于调控肿瘤细胞中 Foxp3 的表达机制并不是很明确。

TLR4 是 Toll 样受体家族中的一员,在多种肿瘤细胞中有表达^[5],且发现肿瘤细胞表面表达的 TLR4 蛋白与肿瘤的发生和恶化密切相关^[15,16]。肿瘤细胞中的研究发现,TLR4 信号通路可以诱导免疫微环境中肿瘤细胞的免疫耐受,从而促进肿瘤的免疫逃逸^[6-8]。而相关的体外研究也表明,TLR4 与 Tregs 的功能发生有着密切联系^[17,18],在 Tregs 中可以通过 LPS 激活 TLR4 信号通路,引发相关因子的释放,进而增强 Tregs 细胞的增殖和生存能力^[19],同时提高了 Tregs 的免疫抑制效率,促进了 Tregs 的免疫抑制效应^[20]。基于此,我们推测在 PTC 肿瘤细胞中,Foxp3+Tregs 参与的免疫逃逸是否是由于 TLR4 信号通路激活而引起的呢?为此,本研究以 LPS 作为配体激活 TLR4 信号通路,以及利用 PMB 作为阻断剂抑制 TLR4 信号通路,通过 Foxp3 蛋白的表达变化分析两者之间存在的关系。

结果显示,通过 LPS 的刺激作用,PTC 细胞中 Foxp3 的表达在基因水平和蛋白水平均发生显著上调,结果具有一致性。且 LPS 最佳作用浓度是 10 μg/mL,在第 24 小时作用效果达到最佳。这也初步表明了,PTC 细胞 TLR4 信号通路的激活可能诱导 Foxp3 的表达上调。为进一步证明 TLR4 信号通路上调

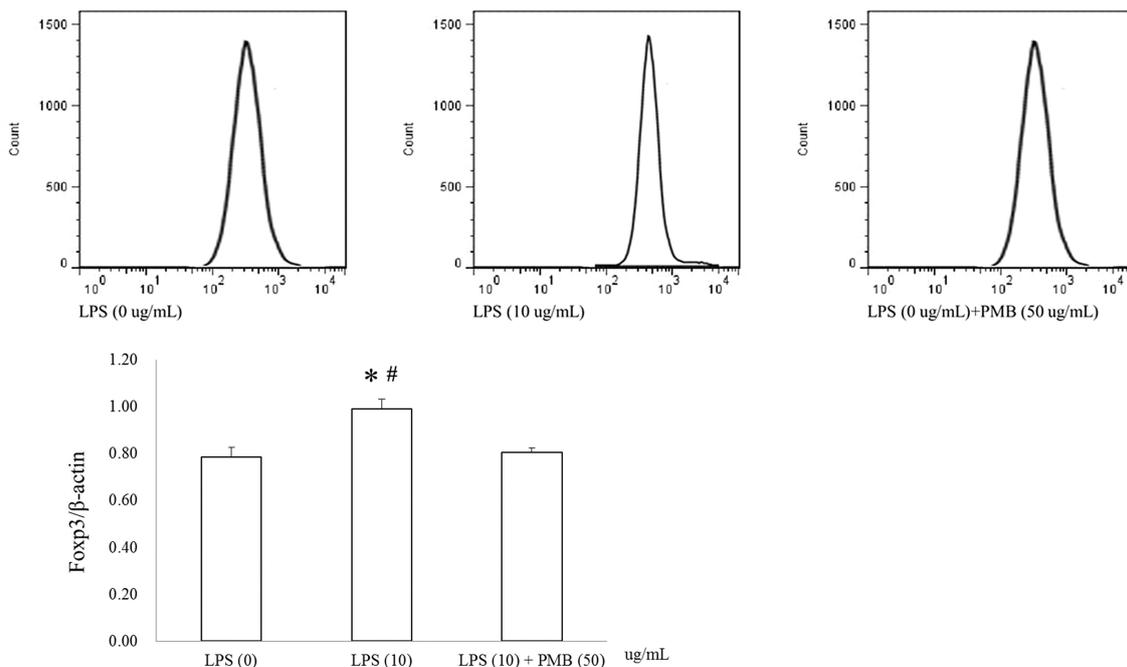


图 6 PMB 阻断 TLR4 信号通路前后 Foxp3 蛋白表达分析

注: 与 0 μg/mL 相比, *P<0.05; 与 LPS(10)+PMB(50)组相比, #P<0.05.

Fig.6 Analysis of Foxp3 protein expression before and after the PMB blocking TLR4 signaling pathway

Note: *P<0.05, compared with LPS(0) group; #P<0.05, compared with LPS(10)+PMB(50) group.

作用,本研究利用PMB阻断LPS对TLR4信号通路的激活作用,结果发现与激活组相比,Foxp3在基因和蛋白水平的表达均发生显著下调,与未加LPS激活剂组水平相近。这一结果说明,只有在TLR4信号通路被激活的情况下,Foxp3的表达才会发生上调。这也进一步证明TLR4对Foxp3的表达存在调控作用。而LPS对TLR4表达的影响结果显示,在一定范围内,TLR4的表达量会随着LPS激活作用的增强而增加,这与Foxp3的表达上调具有一致性。这一结果提示到,TLR4可能是通过上调自身蛋白的表达量,进一步对Foxp3的表达起到调控作用。

基于本研究结果,在人体PTC肿瘤局部微环境下,肿瘤细胞TLR4信号通路被激活,TLR4通过上调自身的表达水平,诱导了信号通路下游Foxp3的表达上调,进而促进肿瘤的免疫逃逸,加速了PTC的恶化。但TLR4信号通路调控Foxp3的表达这一途径,是否还有其他因子的参与,尚需进一步研究。Foxp3在临床上已被作为一个免疫治疗的靶点,本研究结果为降低Foxp3的表达来增强肿瘤免疫的疫苗制备提供了新的思路。

参考文献(References)

- [1] Padma S, Sundaram PS, Arun BP. Unusual presentation of warthin variant of papillary thyroid carcinoma with lymph nodal metastases in a patient of graves' disease[J]. J Cancer Res Ther, 2015, 11(3): 652
- [2] Cong Dan, He Meng-zi, Chen Si-liin, et al. Expression profiles of pivotal microRNAs and targets in thyroid papillary carcinoma: an analysis of the cancer genome atlas [J]. Onco Targets Ther, 2015, 8: 2271-2277
- [3] Ziegler SF. FOXP3: of mice and men[J]. Annu Rev Immunol, 2006, 24 (1): 209-226
- [4] Schneider T, Kimpfler S, Warth A, et al. Foxp3 regulatory T cells and natural killer cells distinctly infiltrate primary tumors and draining lymph nodes in pulmonary adenocarcinoma[J]. J Thorac Oncol, 2011, 6(3): 432-438
- [5] Li Ting-ting, Ogino S, Qian Zhi-rong. Toll-like receptor signaling in colorectal cancer: Carcinogenesis to cancer therapy [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(47): 17699-17708
- [6] Wang Li-juan, Zhao Yi, Qian Jian-fei, et al. Toll-like receptor-4 signaling in mantle cell lymphoma: effects on tumor growth and immune evasion[J]. Cancer, 2013, 119(4): 782-791
- [7] Goto Y, Arigami T, Kitago M, et al. Activation of Toll-like receptors 2, 3, and 4 on human melanoma cells induces inflammatory factors [J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(11): 3642-3653
- [8] Kim KH, Jo MS, Suh DS, et al. Expression and significance of the TLR4/MyD88 signaling pathway in ovarian epithelial cancers [J]. World J Surg Oncol, 2012, 10: 193
- [9] 历春. Foxp3在肺癌细胞中的作用及TLR4对其调控的研究[D]. 吉林: 吉林大学基础医学院, 2011
Li Chun. The study of Foxp3 in lung cancer and its regulation by TLR4 [D]. Jilin: College of Basic Medical Science, Jilin University, 2011
- [10] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science, 2003, 299 (5609): 1057-1061
- [11] Tao H, Mimura Y, Aoe K, et al. Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells [J]. Lung Cancer, 2012, 75(1): 95-101
- [12] Merlo A, Casalini P, Carcangiu ML, et al. FOXP3 expression and overall survival in breast cancer [J]. J Clin Oncol, 2009, 27(11): 1746-1752
- [13] Ladoire S, Arnould L, Mignot G, et al. Presence of Foxp3 expression in tumor cells predicts better survival in HER2-overexpressing breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy [J]. Breast Cancer Res Treat, 2011, 125(1): 65-72
- [14] French JD, Weber ZJ, Fretwell DL, et al. Tumor-associated lymphocytes and increased FocP3+ regulatory T cell frequency correlate with more aggressive papillary thyroid cancer [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2010, 95(5): 2325-2333
- [15] Wang EL, Qian ZR, Nakasono M, et al. High expression of Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88 signals correlates with poor prognosis in colorectal cancer[J]. Br J Cancer, 2010, 102(5): 908-915
- [16] Zhang Jian-jun, Wu He-shui, Wang Lin, et al. Expression and significance of TLR4 and HIF-1 α in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. world J Gastroenterol, 2010, 16(23): 2881-2888
- [17] Milkova L, Voelcker V, Forstreuter I, et al. The NF-kappaB signaling pathway is involved in the LPS/IL-2 induced upregulation of Foxp3 expression in human CD4+CD25high regulatory T cell [J]. Exp Dermatol, 2010, 19(1): 29-37
- [18] Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, et al. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide[J]. J Exp Med, 2003, 197(4): 403-411
- [19] Dang Shi-peng, Peng Yong-de, Ye Lei, et al. Stimulation of TLR4 by LMW-HA induces metastasis in human papillary thyroid carcinoma through CXCR7[J]. Clin Dev Immunol, 2013, 2013: 712561
- [20] Ikebe M, Kitaura Y, Nakamura M, et al. Lipopolysaccharide (LPS) increases the invasive ability of pancreatic cancer cells through the TLR4/MyD88 signaling pathway [J]. J Surg Oncol, 2009, 100(8): 725-731