

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.01.002

激活 Toll 样受体 2 可以促进胃癌细胞中的 OXPHOS 和糖酵解 *

李雨哲¹ 季承博^{1,2} 刘友东¹ 顾琦晟¹ Brendan J. Jenkins² 于亮^{1,2} 李继坤^{1Δ}

(1 上海交通大学医学院附属上海市第一人民医院普外科 上海 201620;

2 哈德逊医学研究所 先天免疫与传染病中心 莫纳什大学临床科学学院分子转化科学系 维多利亚州克萊頓 3168)

摘要 目的: 调查 TLR 家族中哪种 TLR 受体的配体依赖性激活可引起胃癌细胞的代谢重编程。**方法:** 通过实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)和蛋白质印迹(WB)在一组人 GC 细胞中测量 TLR 家族成员的表达。通过进行 Seahorse 生物能测定以及测量 L-乳酸和活性氧(ROS)的产生,确定激动剂对不同 TLR(TLR2、4、9)诱导的人 GC 细胞的代谢变化;通过 RT-qPCR 在被刺激的 GC 细胞中分析了涉及氧化磷酸化和糖酵解的基因的表达;通过 Western 印迹表征 SOD2 的表达。**结果:** 由合成分子或全病原体抗原激活的 TLR2 信号传导增强了胃癌细胞中高表达 TLR2 的细胞株的糖酵解活性和线粒体呼吸,而配体诱导的 TLR4 和 TLR9 活化抑制了线粒体呼吸或细胞外酸化率。同时,涉及葡萄糖代谢和氧化还原系统调节的基因,例如 *HIF1A*, *PFKFB3* 和 *SOD2*,在 TLRs 下游被上调。**结论:** 由配体诱导的特定 TLRs 的激活介导了人类 GC 细胞中不同的代谢表型。TLR2 是唯一同时促进 OXPHOS 和糖酵解的家族成员,这可能导致肿瘤进展。

关键词: 胃癌;糖酵解;Toll 样受体;Toll 样受体激动剂;OXPHOS

中图分类号: R-33; R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2022)01-06-10

Activation of Toll-like Receptor 2 Via Specific Agonists Promotes OXPHOS and Glycolysis in Gastric Cancer Cells Rather than other Toll-like Receptors*

LI Yu-zhe¹, JI Cheng-bo^{1,2}, LIU You-dong¹, GU Qi-sheng¹, Brendan J. Jenkins², YU Liang^{1,2}, LI Ji-kun^{1Δ}

(1 Department of General Surgery, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai,

201620, China; 2 Centre for Innate Immunity and Infectious Diseases, Hudson Institute of Medical Research, Department of Molecular Translational Science, School of Clinical Sciences, Monash University, Clayton, Victoria, 3168, Australia)

ABSTRACT Objective: To investigate whose ligand dependent activation in the family of Toll-like receptor (TLR) is able to reprogram metabolism of gastric cancer. **Methods:** The mRNA and protein expression level of TLR family members in human GC cells were measured by RT-qPCR and Western blot respectively. Metabolic changes in human GC cells that were induced by agonists for various TLRs (TLR2, 4, 9) were quantified by Seahorse bioenergetic assay and production of L-lactate and ROS. The expressions of genes involved in the oxidative phosphorylation and glycolysis were also profiled in the stimulated GC cells by RT-qPCR. The protein expression level of SOD2 was quantified by Western blot. **Results:** The TLR2 signaling activated by either synthetic molecules or whole pathogen antigen significantly enhanced glycolytic activity and mitochondrial respiration in the cells with high level of TLR2, whereas ligand-induced activation of TLR4 and TLR9 inhibited mitochondrial respiration or extracellular acidification rate. Furthermore, the expression of genes involved in the glucose metabolism and redox system regulation, such as *HIF1A*, *PFKFB3* and *SOD2*, were upregulated. **Conclusion:** Our study revealed that activation of various TLRs would lead to different metabolic phenotypes in the human GC cells. Among them, TLR2 promotes both OXPHOS and glycolysis, which may contribute to the progression of gastric cancer.

Key words: Gastric cancer; Metabolism; Toll-like receptor; Toll-like receptor agonist; OXPHOS

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)01-06-10

前言

胃癌 (Gastric cancer, GC) 是世界上致死率最高的癌症之一,其发病率在东亚地区特别高^[1]。GC 的发生与病原微生物 (如幽门螺杆菌)感染后免疫系统失调有很强的联系,进而导致以胃炎,萎缩,肠化生,异型增生并逐步进展为腺癌为特征的过

程^[2]。病原性微生物参与胃肠道炎症和癌症发生主要与 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 相关, Toll 样受体是宿主先天和适应性免疫系统中关键的微生物传感器家族,也介导促进肿瘤发生的慢性炎症反应^[3]。TLR 具有独特的抗原识别域,可识别病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 以及宿主来源的病原体,并引发促炎反应^[3,4]。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81472236;81673034)

作者简介:李雨哲(1993-),男,硕士研究生,主要研究方向:外科学,E-mail: 1280537329@qq.com

Δ 通讯作者:李继坤,男,硕士生导师,教授,主要研究方向:胃肠外科,E-mail: lijikunphd@163.com,电话: 13386259836

(收稿日期:2021-04-27 接受日期:2021-05-23)

目前对该领域的研究集中在对微生物成分作出反应的免疫细胞上。但是,上皮细胞,尤其是胃肠道上皮细胞,是通过TLRs检测腔内病原体或微生物成分的一线宿主防御系统,也是固有免疫反应的重要参与者^[9]。上皮细胞中TLR信号的异常转导也可能导致疾病的许多进展^[6-8]。我们先前的研究显示,肠型GC的特征之一—TLR2表达的上调促进了胃上皮细胞的存活和增殖,而与炎症无关。TLR2在胃上皮癌细胞中的这种致癌活性与TLR2诱导的富含抗凋亡基因(例如BCL2A1, BCL3, BIRC3, CFLAR, IER3和TNFAIP3-10)的基因标签(gene signature)相关。此外,我们提供的证据表明,合成配体在具有高TLR2表达的人GC上皮细胞中诱导TLR2活化,同时增强了OXPHOS和糖酵解,以及SOD2强大的STAT3依赖性转录诱导作用。氧化还原线粒体蛋白表达的增强导致了更多的糖酵解表型,并抑制了TLR2诱导的氧化还原反应的活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生^[11]。与这些发现相吻合的是,TLR2-SOD2轴与胃癌患者高恶性和低生存率的多个临床参数有关^[11]。但是,尚不清楚其他微生物成分是否诱导了TLR信号激活,从而导致GC上皮细胞发生不同的代谢变化,进而影响细胞功能。

本研究拟通过使用各种TLR激动剂刺激人胃癌细胞,观察这些细胞中代谢表型的改变,从而验证其糖酵解和氧化磷酸化的能力是否会增加,并探讨与糖酵解、OXPHOS和线粒体蛋白有关的基因表达和TLR信号的关系。

1 材料和方法

1.1 细胞系培养

在含有10%胎牛血清(fetal calf serum, FCS), 1%青霉素-链霉素和1%L-谷氨酰胺的培养基Gibco RPMI 1640(赛默飞)中培养了人类细胞系AGS, AZ521, MKN28, N87, SNU16, TMK1(美国典型培养物保藏中心, ATCC), MKN1, MKN7, NUGC4(日本研究生物资源库)和SUN601(韩国细胞系库)。通过短串联重复序列分析(PowerPlex HS16 System kit, Promega)表征/鉴定细胞系,并在收到后6个月以内传代。常规测试细胞系的支原体污染(MycoAlert PLUS支原体检测试剂盒, Lonza)。

1.2 蛋白质提取和免疫印迹

使用具有磷酸酶和蛋白酶抑制剂混合物的RIPA裂解缓冲液(新赛美)提取细胞裂解物。还原并变性的裂解物在10-12% SDS-PAGE凝胶上电泳,然后转移至PVDF膜(Millipore)。使用针对TLR2, TLR9, SOD2(Cell Signaling Technology)和TLR4(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)的抗体进行免疫印迹。还使用了肌动蛋白(Sigma-Aldrich)和微管蛋白(Abcam)。蛋白条带使用Odyssey红外成像系统(LI-COR)进行可视化,并使用Image J软件进行定量。

1.3 RNA分离和基因表达分析

使用RNase Mini Kit(Qiagen)和DNase处理(Qiagen)从人GC细胞系中分离出总RNA(total RNA)。然后使用Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit(Roche)转录RNA。使用QuantStudio™6 Flex系统(ThermoFisher)进行实时定量PCR(qPCR)。将基因表达相对于管家基因18S的表达标准化。相对倍数变化通过QuantStudio™实时PCR软件使用比较阈值循环(CT)方法($2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法)进行转换。引物序列见表1^[11]。

表1 用于SYBR qPCR基因表达检测的引物序列
Table 1 Primer sequences used for SYBR qPCR gene expression assays

gene	forward 5→3	reverse 5→3
GCLC	ACTTCATTTCCTCAGTACCTTAACA	CCGGCTTAGAAGCCCTTGAA
GSS	GGAGGAAAGGCGAACTAGTGTT	GCAATACTCCCTCAGCCAGG
MT-ATP6	GCACAGTGATTATAGGCTTTC	CCTGCAGTAATGTTAGCGGT
MT-COX1	CAGGTTGAACAGTCTACCT	AAGAGGGGCGTTTGGTATTG
MT-CYTB	ATGACCCCAATACGCAAAACT	GGGAGGACATAGCCTATGAA
MT-ND1	CTACTCCTCATTGTACCCAT	GTGAAGAGTTTTATGGCGTC
HIF1A	ATCACCTCTTCGTCGCTTC	ACTTATCTTTTCTTGTCGTTCCG
HK2	TCCAGAGGAGAGGGGACTTT	TCATCGCCTTCCACCATGTC
PFKFB3	CCCTTCAGGAAAGCCTGTGG	GAACACTTTTGTGGGGACGC
PKM2	AATGCAGTCCTGGATGGAGC	CAAGTGGTAGATGGCAGCCT
CREB1	ACCAAGTTGTTGTTCAAGGTACT	ACATGTTACCATCTTCAAAGTACG
PRARGC1A	TCTGAGTCTGTATGGAGTGACAT	CCAAGTCGTTACATCTAGTTCA
TFAM	CGCTCCCCCTTCAGTTTTGT	CCAACGCTGGGCAATTCTTC
18S	CGGCTACCACATCCAAGGAA	GCTGGAATTACCGCGGCT

1.4 TLR刺激和检测试剂

GC细胞系一式三份在12孔板中生长(1×10⁵个细胞/孔)。过夜无血清饥饿后,将细胞用磷酸盐缓冲液(PBS对照),

Pam3CSK4(P3C, InvivoGen)10 μg/mL, 来自大肠杆菌O111:B4的脂多糖(LPS, Sigma)10 ng/mL, FSL-1(Pam2CGDPKH-PKSF, InvivoGen)1 μg/mL, 热灭活的单核细胞增生李斯特菌

(HKLM, InvivoGen) 10^7 - 10^8 细胞 / mL, ODN2006 (ODN7909, 刺激性 CpG ODN, B 级, InvivoGen) $2 \mu\text{M}$, 持续 24 h。还按照制造商的说明, 在 96 孔板中使用 MTT 测定法 (Invitrogen) 对 TLR 配体进行了细胞活力测定, 以进行细胞数目均一化。

1.5 生物动力学检测

使用 XFe-96 细胞外通量分析仪 (Seahorse 生物科学, Agilent) 测量实时氧气消耗率 (oxygen consumption rate, OCAR) 和细胞外酸化率 (extracellular acidification rate, ECAR)。细胞分别以不同数量铺板 (MKN1, 每孔 1.5×10^4 ; NUGC4, 每孔 2.5×10^4 ; AGS, 每孔 1×10^4)。在过夜饥饿后, 细胞被各种 TLR 配体刺激。在检测当天, 正常 RPMI 1640 介质被改为 Seahorse 测定介质, 具有 1 mM 丙酮、2 mM 谷氨酰胺和 10 mM 葡萄糖 (将 pH 值调整为 7.4), 并在检测前 1 小时在 37°C 无 CO_2 孵化器中孵育。检测试剂盒中的药物化合物在指示浓度下使用 (寡糖毒素, $1 \mu\text{M}$; FCCP, MKN1 为 $0.2 \mu\text{M}$, NUGC4 和 AGS 为 $0.5 \mu\text{M}$, 抗霉素 A 和转酮混合为 $0.5 \mu\text{M}$)。

1.6 L-乳酸检测和 ROS 测量

分析乳酸的产生, 以确定有氧糖酵解率。L-乳酸由乳酸检测试剂盒 (Abcam) 根据制造商的说明进行测量。乳酸生产通过测量 450 nm 的吸收量进行评估, 并使用从标准曲线的线性回归中获得的方程进行计算。根据试剂盒说明, 使用 ROS 检测试剂盒 (Abcam) 测量了全细胞的 ROS。该测定在黑暗中于 37°C

温育 60 分钟。从 96 孔的 FLUOstar Omega 酶标仪上测量 ROS 的荧光。

1.7 统计分析

所有数据均由 SPSS 21.0 和 GraphPad Prism 7 进行分析, 并表示为平均值 $\pm$ 标准差。使用 student's t 检验确定统计比较。单因素和多因素 Cox 回归模型用于分析患者预后的独立指标。生存分析采用 Kaplan-Meier 法和 log-rank 检验^[12]。 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌细胞系中 TLR2、TLR4 和 TLR9 的差异表达

本研究在人类胃癌细胞系检测了 TLR2、TLR4 和 TLR9 的 mRNA 和蛋白表达水平。实际上, TLR2、TLR4 和 TLR9 在 GC 细胞组中差异表达。MKN1 和 MKN7 的 TLR2 mRNA 表达最高, 而 TLR4 表达在 AGS、MKN1 和 N87 中高表达 (图 1A, B)。大多数 GC 细胞株在转录水平上表现出 TLR9 表达, 而在 MKN28 和 SNU601 中的表达高于其他细胞系 (图 1C)。此外, 如图 1D-F 所示, 通过 Western blot 证实了所有 TLRs 蛋白的表达水平。然后, 分别选择 MKN1 和 AGS 作为高 TLR2 和 TLR4 表达的细胞系的代表。在以下实验中, 选择 NUGC4 代表 TLR9 高表达的细胞系。

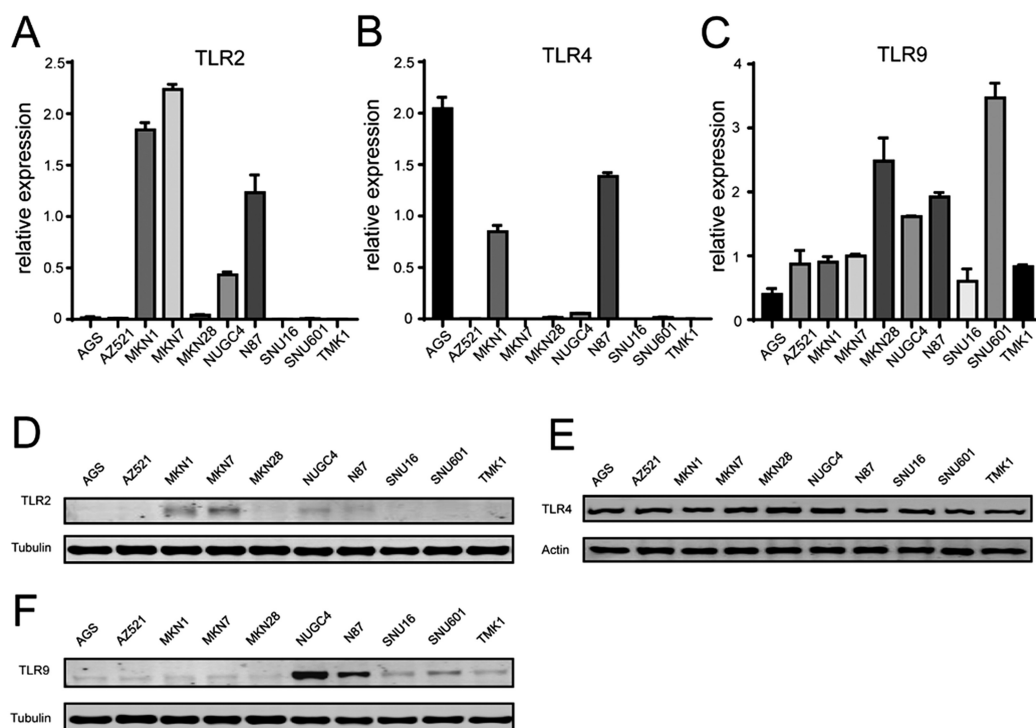


图 1 TLR2、TLR4 和 TLR9 在 GC 组织和细胞系中的表达

Fig. 1 Expression of TLR2, TLR4 and TLR9 in GC tissues and cell lines. (A-C) Relative mRNA expression of TLR2(A), TLR4(B) and TLR9(C) in a diversity of human gastric cancer cell lines. Protein expression of TLR2 (D), TLR4 (E) and TLR9 (F) in GC cell lines were detected by Western blot.

2.2 GC 细胞系中 TLR 的激活介导 OXPHOS 和糖酵解

为了评估 TLRs 是否调节人 GC 上皮细胞中的代谢变化, 将上述代表性细胞系用指示的 TLR 配体 (P3C (Pam3CSK4), LPS 或 CpG) 刺激 24 小时, 并进行生物能功能测定。TLR2 高表达株系 MKN1 具有增加的基础耗氧率 (OCR) (图 2B, 第 1 列)

且由质子离子载体 FCCP (解偶联剂) 诱导的 OCR (测量最大呼吸能力) 对 P3C 结合有反应 (图 2A)。备用呼吸能力 (SRC) (通过基础 OCR 和最大 OCR 之差计算得出的参数) 也得到了提高, 反映了细胞处理能量需求增加的能力增强 (图 2B, 列 3)。此外, 代表糖酵解活性的细胞外酸化率 (ECAR) (图 2B, 列 2) 和

通过细胞上清中来测量的 L-乳酸的产生(图 2G,列 1)都随着 P3C 的刺激而升高。与 TLR2 激活不同,经 LPS 刺激的具有 TLR4 高表达的 AGS 中的 ECAR 被下调,而 L-乳酸的产生没有变化。尽管 ECAR 和 FCCP 诱导的 SRC 发生了显著变化,但 LPS 诱导的 TLR4 激活对 OXPHOS 和 L-乳酸没有影响(图 2C,D,G)。相反,在具有高表达 TLR9 的细胞系 NUGC4 中,OXPHOS 和糖酵解均受到强烈抑制。如图 2E-G 所示,在 CpG 刺激 24 小时后,NUGC4 细胞的基础和最大 OCR、ECAR 和

SRC 均被下调。然后,本研究使用荧光信号在 TLR 激活后的不同细胞系中检测了 ROS 的产生。有趣的是,在 P3C 处理的 MKN1 中观察到 ROS 产生的降低,而与线粒体活性的增强无关,而 NUGC4 中的 ROS 在 CpG 刺激下被降低(图 2H)。本研究证实,这些结果不是由于细胞活力的差异造成(图 3A)。因此,这些数据表明在激活不同的 TLRs 信号通路后会诱导出多种代谢表型。

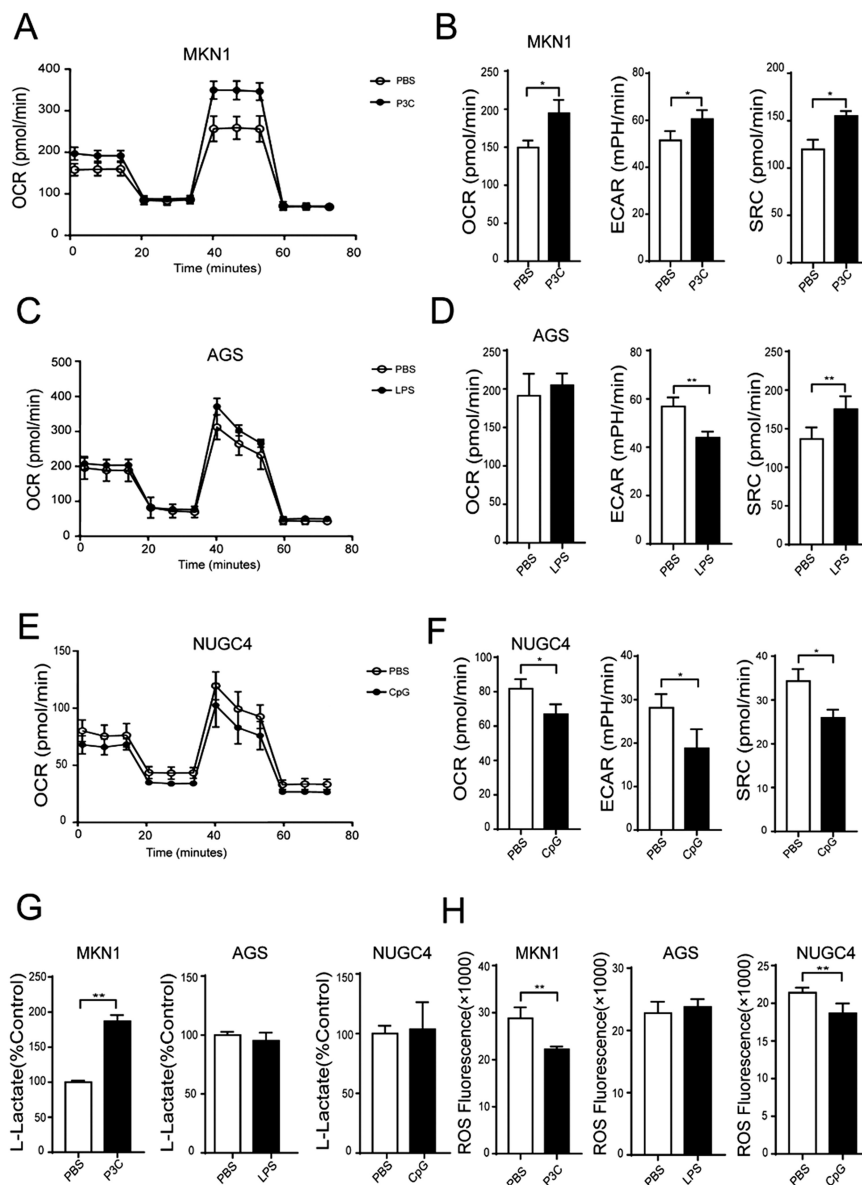


图 2 人 GC 细胞受各种 TLR 配体激活所产生的代谢表型和 ROS 的变化

Fig. 2 Alteration of the metabolic phenotype and ROS production in human GC cells stimulated by various TLR ligands. (A, C and E) Oxygen consumption rate was assayed using the Seahorse XF analyzer (Seahorse Bioscience) in GC cell lines, MKN1, AGS and NUGC4, stimulated with PBS, TLR2 ligand P3C (10 μ g/mL), TLR4 ligand LPS (10 ng/mL), TLR9 ligand CpG (2 μ M/mL) for 24 h following sequential treatment with compounds oligomycin, FCCP and a mix of antimycin A and rotenone. (B, D and F) basal oxygen consumption rate (basal OCR), basal extracellular acidification rate (basal ECAR) and spare respiratory capacity (SRC) were measured in GC cells. (G) L-lactate production was measured in cell supernatant treated with PBS or different TLR ligands respectively. (H) Total cellular ROS were measured using fluorescence-based ROS detection assay kits in two GC cell lines.

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

2.3 TLR2 在 GC 细胞系中促进 OXPHOS 和糖酵解,而不是其他 TLR 成员

除了这些 TLR 配体在各自的高表达 TLR 细胞中的作用外,我们还考虑了这些细胞系是否受到其他两种 TLR 激动剂

的影响。所有这些配体的使用浓度与之前相同。在 MKN1 中, LPS 和 CpG 降低了基于 OCR、ECAR 和 SRC 的 OXPHOS 和糖酵解能力(图 4A-B)。在 AGS 中, P3C 和 CpG 仅对 SRC 产生影响, 并显示出相反的改变(图 4C-D)。P3C 极大地增强了

NUGC4 细胞中 OXPHOS 和糖酵解的能力, 这是另一种可检测到 TLR2 表达的细胞系(图 1A, D), 而 LPS 的刺激没有明显影响(图 4E-F)。乳酸和 ROS 的产生显示在图 4G-H 中, 显示 TLR2 激动剂 P3C 在这些细胞系中变化最大。

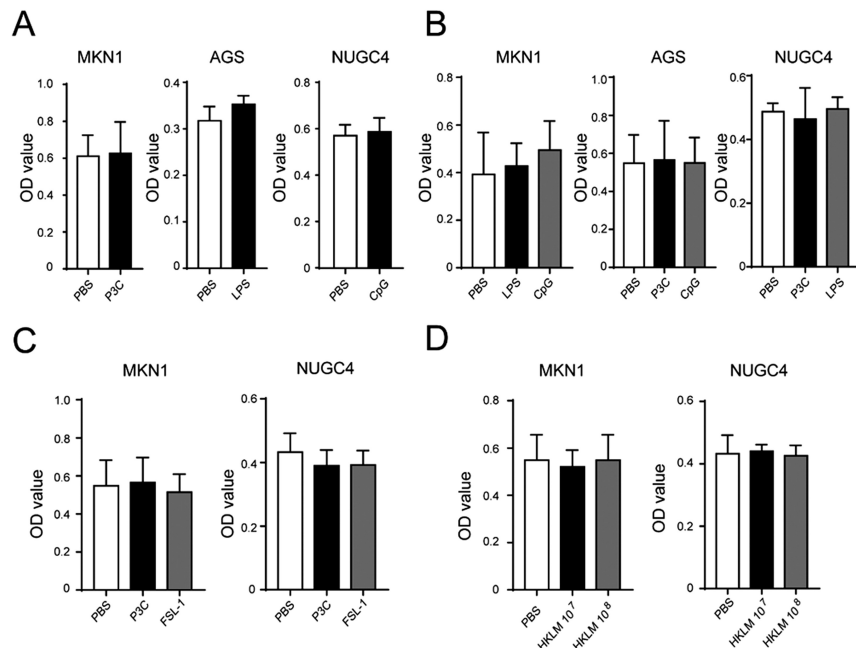


图 3 通过 MTT 测定法进行 Seahorse 细胞数目标标准化

Fig. 3 Seahorse cell number normalization was performed by MTT assay

2.4 来自不同来源的 TLR2 激动剂在 GC 细胞中诱导了可比的代谢表型

由于 Pam3CSK4 在 GC 细胞中诱导了更大的代谢变化, 本研究进一步测试了完整病原体裂解物或合成脂蛋白这两类不同 TLR2 配体是否对 MKN1 细胞产生相似的作用。以指定浓度 (FSL1: 1 μ g / mL; P3C: 10 μ g / mL) 加入 FSL-1 (一种被 TLR2 / 6 异二聚体识别的合成二酰基脂肽) 或 P3C (主要通过 TLR1 / 2 异二聚体识别) 持续 24 小时。与之前的观察一致, FSL-1 或 P3C 诱导的 TLR2 活化促进线粒体活性和糖酵解, OCR, SRC, ECAR 和 L-乳酸的产生均增加(如图 5A-B 所示)而在 FSL-1 或 P3C 刺激之后, 从 MKN1 上清液中的荧光信号检测到 ROS 的显著减少(图 5F)。此外, 在 P3C 和 FSL-1 处理后的 NUGC4 中也观察到了类似的代谢表型改变(Fig. 6A-B)。

本研究评估了整个病原体裂解物诱导的 TLR2 激活对细胞氧化应激水平和糖酵解活性的影响。根据文献报道, 热灭活李斯特菌 (Heat Killed *Listeria monocytogenes*, HKLM) 是一种以特定方法制备的细胞内革兰氏阳性细菌, 主要被用于靶向 TLR2^[16]。由制造商建议且文献中最常用的两种剂量为 10⁷ 个细胞 / mL 和 10⁸ 个细胞 / mL)。与前两种合成 TLR2 激动剂一致, OCR、ECAR、SRC 和乳酸的生成均以剂量依赖的方式显著增加(图 5C-D)。另外, 在 HKLM 刺激的两个 MKN1 细胞中, 细胞 ROS 水平均显著降低(图 5H)。此外, 在 NUGC4 中, 对较高剂量的 HKLM 也有类似的观察结果(参见图 2C-D)。HKLM 处理的 NUGC4 细胞的乳酸生成(图 6E, G)和细胞 ROS 水平(图 6F, H)显示出与 MKN1 类似的趋势。然而, 与未刺激的对照组相比, 在任何激动剂刺激的细胞系中细胞活力均未改变(图

3A-D)。综上所述, 合成的配体或细菌衍生的激动剂在具有可检测的 TLR2 表达的 GC 细胞系中激活固有的 TLR2 信号传导可引起强烈的代谢变化, 包括 OXPHOS 和糖酵解增强, 产酸量增加以及 ROS 水平降低。

2.5 TLR2 活化促进关键基因在控制生物能过程和重氧化系统的表达

为探索 TLR 激活在代谢重编程中的潜在机制^[17], 本研究考察了线粒体功能、糖酵解和氧化磷酸化等关键基因的表达。如图 7A 所示, 对合成配体处理 MKN1 细胞的 qPCR 分析表明, 与糖酵解有关的基因, 如丙酮酸激酶同工酶 M2 (pyruvate kinase isozyme M2, PKM2) 和 6-磷酸-2-激酶 / 果糖-2,6-双磷酸酶 3 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3, PFKFB3) 显著升高。P3C 刺激似乎对 OXPHOS 基因有更大的影响, 如环磷酸腺苷效应元件结合蛋白 1 (cyclic AMP-responsive element-binding protein 1, CREB1) 和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子 1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha, PPARGC1A) (图 7B)。此外, 线粒体染色体上的基因, 如线粒体编码的 ATP 合成酶 6 (mitochondrially encoded ATP synthase 6, MT-ATP6)、线粒体细胞色素 b (mitochondrial cytochrome b, MT-CYTB) 和线粒体编码的 NADH 脱氢酶 1 (mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 1, MT-ND1) 也被提升(图 7C)。

MKN1 细胞中低剂量或高剂量的 HKLM 刺激导致编码缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor 1 alpha, HIF1 α)、PKM2、己糖激酶 2 (hexokinase 2, HK2) (图 7D) 的基因表达显著升高。同样, 促进 OXPHOS 的基因 PPARGC1A 在两剂

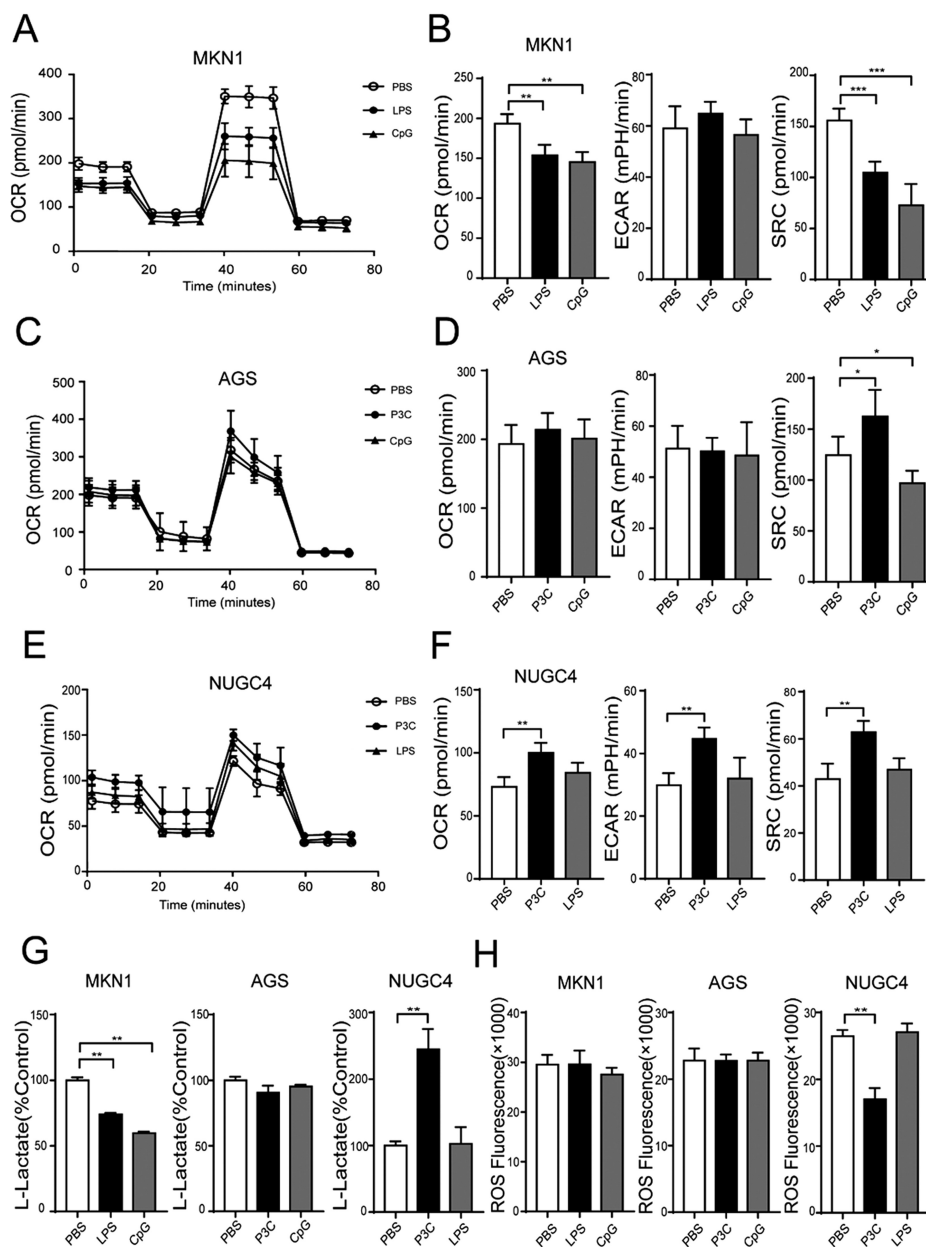


图4 细胞系由非特异性TLR激动剂激活所产生的代谢参数

Fig. 4 Cell lines were stimulated by non-specific TLR agonists and several metabolic parameters were shown.

(A-F) All those three cell lines MKN1, AGS and NUGC4 were stimulated by two of the TLR2, 4 and 9 agonists in the same manner as the specific TLR ligand did. OCR, ECAR and SRC were measured and compared in bar charts. (G-H) L-lactate and ROS production were detected in these cell lines.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

HKLM 处理细胞(图 7E)中显著增加。HKLM 的存在显著调节了我们研究的所有线粒体编码基因的表达(图 7F)。然而,不论观察到的生物能测定变化如何,HIF1A 和 PFKFB3 分别只在 LPS 刺激的高 TLR4 表达细胞系 AGS 和 CpG 刺激的高 TLR9 表达细胞系 NUGC4 中表达增高(图 2C-F,图 8A, B)。

本研究分析了其他抗氧化系统中涉及的关键基因,包括锰依赖型 SOD2 基因、谷氨酸-半胱氨酸连接酶催化亚基(glutamate-cysteine ligase catalytic subunit, GCLC)和谷胱甘肽合成酶(glutathione synthetase, GSS)。qPCR 显示,所有激动剂刺激 24 小时后在高 TLR2 表达细胞系 MKN1 细胞中 SOD2 转录增强(图 7G)。在 MKN1 和 NUGC4 细胞系中,SOD2 蛋白在某些配体引起的 TLR2 活化后表现出显著的增加,但未对另一些 TLR

激动剂刺激做出反应(图 7G-H)。相比之下,无论使用任何 TLR 激动剂,SOD2 的表达在 AGS 中未显示任何改变(图 7H)。综上所述,来自多个抗氧化系统的关键基因参与调节 TLR2 依赖性生物能改变。

3 讨论

免疫细胞氧化磷酸化和糖酵解之间的代谢重编程的发现为机体对微生物成分的免疫反应机制提供了重要思路^[17,18]。先前的研究表明,TLR2 的过度表达与晚期疾病的多个临床参数有关,包括远处转移、微血管侵犯以及胃癌的低生存率。TLR2 的激活可增强胃癌细胞中的 OXPHOS 和糖酵解。然而,关于其他 TLR 信号的代谢改变和癌症上皮细胞的相互作用,以及上

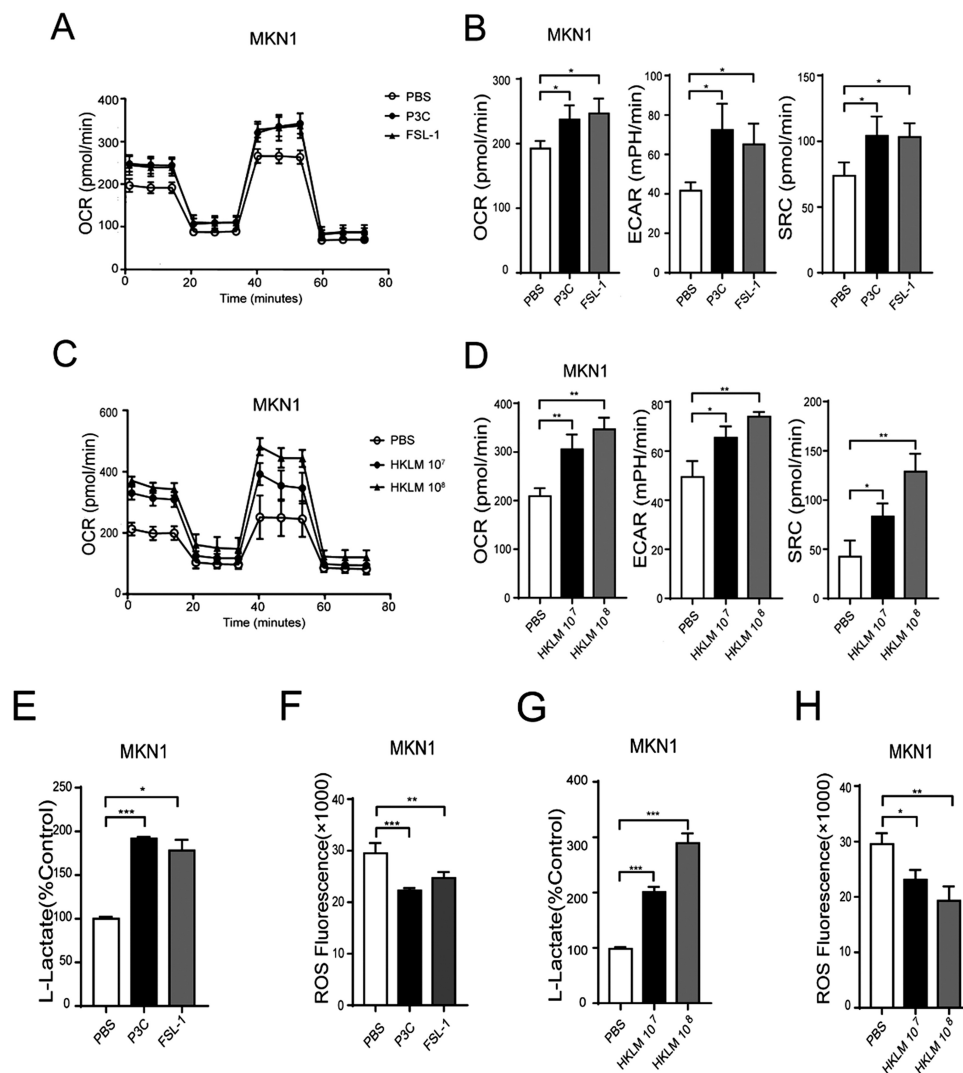


图 5 TLR2 配体的激活改变了人类 GC 细胞的代谢表型和 ROS 产生

Fig. 5 TLR2 ligands stimulation changed metabolic phenotype and ROS production in human GC cells. (A) MKN1 were stimulated with PBS, TLR2 ligand P3C (10 $\mu\text{g/mL}$) and FSL-1 (1 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h following sequential treatment with compounds oligomycin, FCCP and a mix of antimycin A and rotenone. (B) basal oxygen consumption rate (basal OCR), basal extracellular acidification rate (basal ECAR) and spare respiratory capacity (SRC) were measured in MKN1. (C) MKN1 was stimulated with PBS, HKLM (107 and 108 cells/mL) for 24 h then were measured by Seahorse XF96 analyzer in previous settings. (D) basal oxygen consumption rate (basal OCR), basal extracellular acidification rate (basal ECAR) and spare respiratory capacity (SRC) were measured in MKN1 cells. (E, G) L-lactate production was measured in cell supernatant treated with PBS, P3C, FSL-1 and HKLM. (F, H) Total cellular ROS were measured using fluorescence-based ROS detection assay kits in MKN1 cell lines. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

皮细胞中 TLR 异常活化如何影响疾病进展的机制, 仍然有待解答。

本研究证明了在各种 TLR 的激活中, TLR2 对代谢表型产生了最大的影响。无论是合成配体或病原体成分, TLR2 活化都促进糖酵解和氧化磷酸化。然而, 在特定的配体依赖方式下, 生物能测定中的观察结果仍然存在差异。例如, FSL-1 导致 TLR2/TLR6 异二聚体激活并没有表现出比 P3C 更显著的代谢表型诱导^[19]。此外, HKLM 对代谢改变的影响似乎比合成配体更显著, 这可能是由于在细胞中除 TLR2 外还存在多个细菌衍生分子的靶点^[16]。因此, 值得思考的是, 癌细胞多样的生物结构可能导致 TLR 信号产生多种不同的代谢表型以响应宿主防御反应, 从而影响感染相关癌症如胃癌的发病机制^[16]。

本研究发现细胞系对 TLR4 和 TLR9 配体的代谢变化的相反结果。研究表明, TLR4 在细胞表面定位, 而 TLR9 主要分

布在核内体和内质网^[20]。因此, TLR9 需要刺激物, 如微生物 DNA, 转运到核内体中产生反应^[21], 这与 TLR4 的触发机制完全不同。此外, TLR4 和 TLR9 都可以触发依赖 MyD88 通路, 但 TLR4 也可以触发非依赖 MyD88 通路, 即通过 β 干扰素 TIR 结构域衔接蛋白 (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β , TRIF), 导致干扰素调节因子 (interferon regulatory factor, IRF) 激活和抗病毒反应^[22]。这表明 TLR 信号的下游调节分子可能有所不同, 从而表现了不同的生物特征。此外, JAK-STAT3, JNK MAPK 和 NF- κ B 级联的参与促成了这种代谢变化^[11], 这可以被认为细胞自主效应, AGS 和 NUGC4 细胞系的突变也可能导致差异。综上所述, 我们发现 TLR2 活化主要促进线粒体呼吸和减少 ROS 产生以保护细胞, 而 CpG 抑制了 OXPHOS 和糖酵解的功能, 这可能基于对 TLR2 和 TLR9 不同作用的缘故。

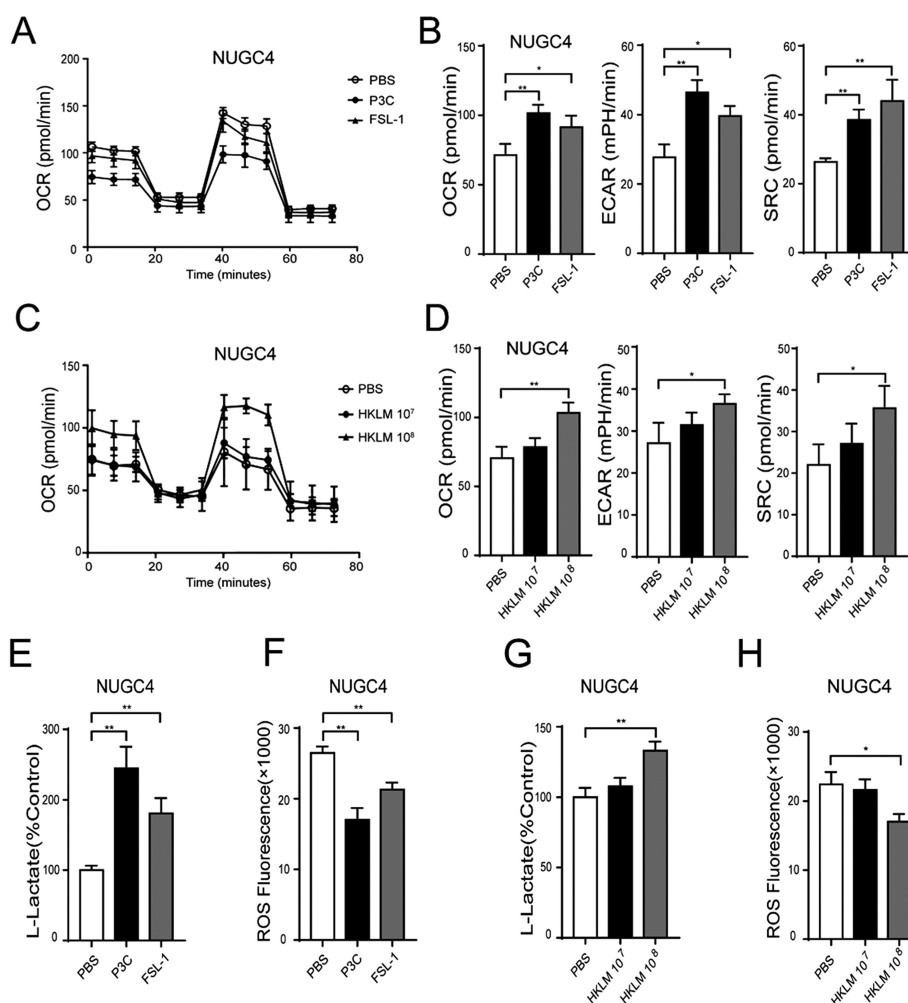


图6 NUGC4 受 TLR2 配体激活的的代谢改变

Fig. 6 Metabolic alteration of NUGC4 treated with TLR2 ligands. (A) NUGC4 were stimulated with PBS, TLR2 ligand P3C (10 μ g/mL) and FSL-1 (1 μ g/mL) for 24 h following sequential treatment with compounds oligomycin, FCCP and a mix of antimycin A and rotenone. (B) basal oxygen consumption rate (basal OCR), basal extracellular acidification rate (basal ECAR) and spare respiratory capacity (SRC) were measured in NUGC4. (C) NUGC4 was stimulated with PBS, HKLM (10⁷ and 10⁸ cells/mL) for 24 h then were measured by Seahorse XF96 analyzer in previous settings. (D) basal oxygen consumption rate (basal OCR), basal extracellular acidification rate (basal ECAR) and spare respiratory capacity (SRC) were measured in NUGC4 cells. (E, G) L-lactate production was measured in cell supernatant treated with PBS, P3C, FSL-1 and HKLM. (F, H) Total cellular ROS were measured using fluorescence-based ROS detection assay kits in two GC cell lines. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, **** P <0.0001.

本研究发现大多数编码线粒体蛋白的基因在 TLR2 激活后都被上调, 这表明电子传递链的成分和随后的 ATP 合成可能主要受 TLR2 而不是其他 TLR 激活的影响^[23,24]。有趣的是, LPS 和 CpG 强烈诱导 HIF1A 和 PFKFB3 转录 (图 6A,B)。这两种分子被广泛报道为控制不同细胞类型葡萄糖代谢的关键调节剂。在长期胰岛素和葡萄糖处理的人正常黑色素细胞的代谢转化中, 糖酵解通过增加 HIF1A 的转录和降低 PFKFB3 的转录而得到修饰^[25]。在癌细胞中, HIF1A 和 PFKFB3 在驱动葡萄糖代谢重编程时控制两个不同的调节途径, 这有助于限制 ROS 的产生以及在通过 MAPK14/p38 α 剥夺营养的情况下激活自噬作用^[26]。总之, 在不同的细胞条件和细胞类型的背景下, HIF1A 和 PFKFB3 在糖代谢中可能发挥不同的作用。

另外, 根据图 S2A-D, SOD2 表达受 TLR2 信号诱导而非 TLR4 或 TLR9。根据我们之前的研究, SOD2 上调可以维持 TLR2 诱导的代谢重编程后细胞氧化还原平衡^[11]。SOD2 表达升高还与胃癌和大肠癌的侵袭性和转移增加有关^[27,28]。SOD2

的各种修饰后表达上调直接影响线粒体中 mtH₂O₂ 的生成、积累和清除, 表明 SOD2 可能是 H₂O₂ 的主要生成者, 离开线粒体刺激可能促进更具攻击性的癌症表型的信号通路。我们先前的研究阐明了 SOD2 在氧化呼吸和糖酵解中的关键作用, 这很可能归因于 SOD2 对胃癌中细胞氧化还原平衡的调节。因此, TLR2-SOD2 轴可能是 GC 细胞中的其他 TLR 无法复制的特定途径。

尽管没有证据表明这项研究中的任何配体激活的 TLR 信号可以促进 GC 增殖或细胞活力, 如图 3A-D 所示, 但我们仍然不能排除 TLR 信号可能通过肿瘤微环境中不同细胞类型之间复杂的相互作用间接对癌上皮细胞产生致癌活性的可能性。需要进一步阐明 TLR 在肿瘤起始和进展中的非炎性作用, 例如增殖的增强。

我们目前的研究表明, 胃癌细胞中不同的 TLR 配体可以诱导多种代谢表型。合成配体和热灭活细菌的成分都以 TLR2 依赖的方式增强细胞氧化磷酸化和糖酵解作用并且多种介导

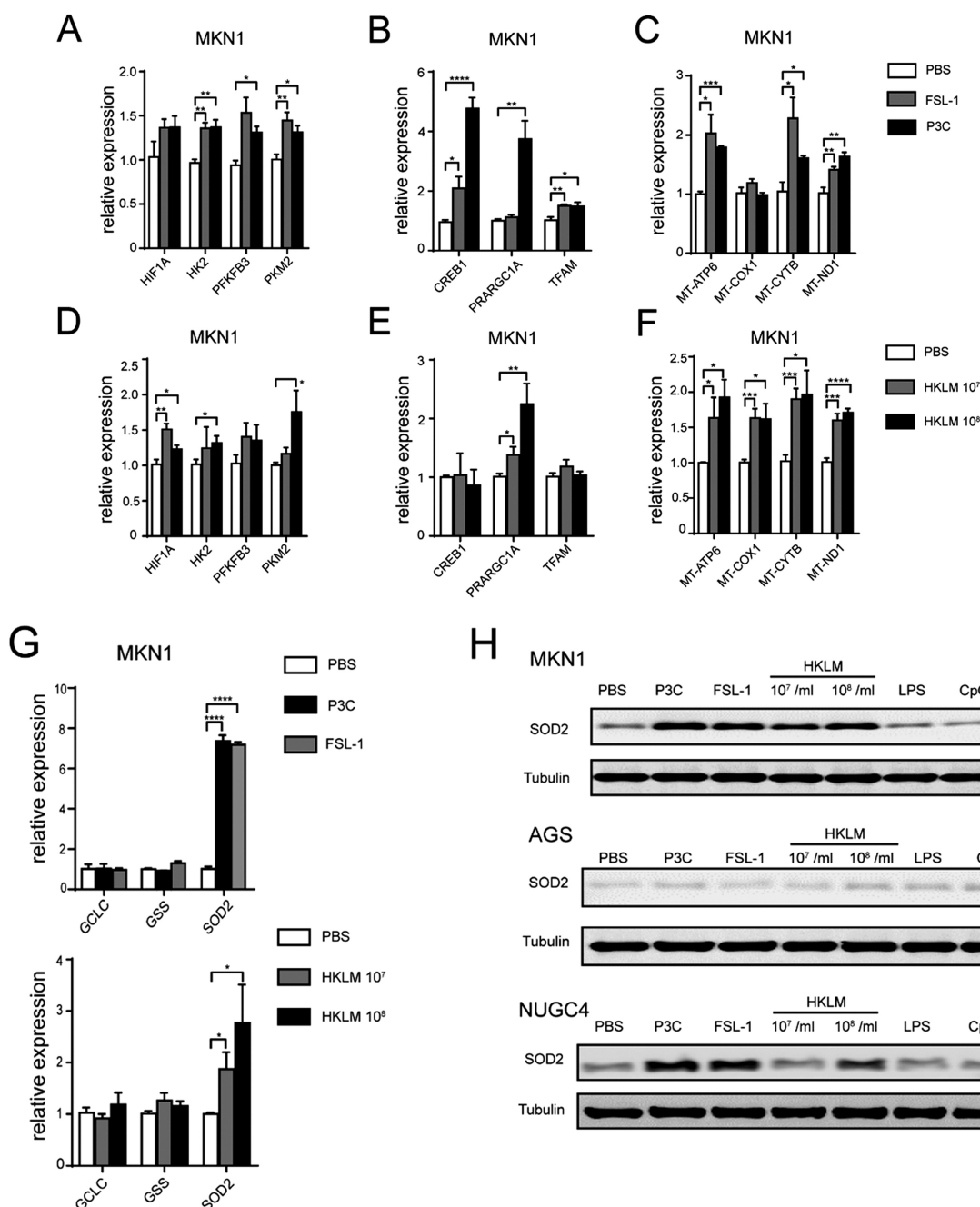


图7 代谢相关基因由于TLR2激活而改变

Fig. 7 Metabolism related genes were changed due to TLR2 stimulation. (A-F) qPCR expression analyses of several genes mediating glycolysis, oxidative phosphorylation and mitochondrial function in MKN1 cell treated by P3C, FSL-1 (A-C) and HKLM (D-F). (G) mRNA level of SOD2, GCLC and GSS in MKN1 treated with P3C, FSL-1 and HKLM. (H) Protein level of SOD2 in MKN1, AGS and NUGC4 cells treated with different TLR ligands.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

代谢功能的关键基因的表达被上调。

参考文献(References)

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. *Ca A Cancer Journal for Clinicians*, 2018, 68(1): 7-30
- [2] Fox JG, Wang TC. Inflammation, atrophy, and gastric cancer[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(1): 60-9
- [3] Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(5): 373-84
- [4] Hernandez C, Huebener P, Schwabe RF. Damage-associated molecular patterns in cancer: a double-edged sword [J]. *Oncogene*, 2016, 35(46): 5931-5941
- [5] Wells JM, Rossi O, Meijerink M, et al. Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011: 4607-14
- [6] Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Toll-like receptors and cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(1): 57-63
- [7] Pradere JP, Dapito DH, Schwabe RF. The Yin and Yang of Toll-like receptors in cancer[J]. *Oncogene*, 2014, 33(27): 3485-95
- [8] Vidya MK, Kumar VG, Sejian V, et al. Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals [J]. *Int Rev Immunol*, 2018, 37(1): 20-36

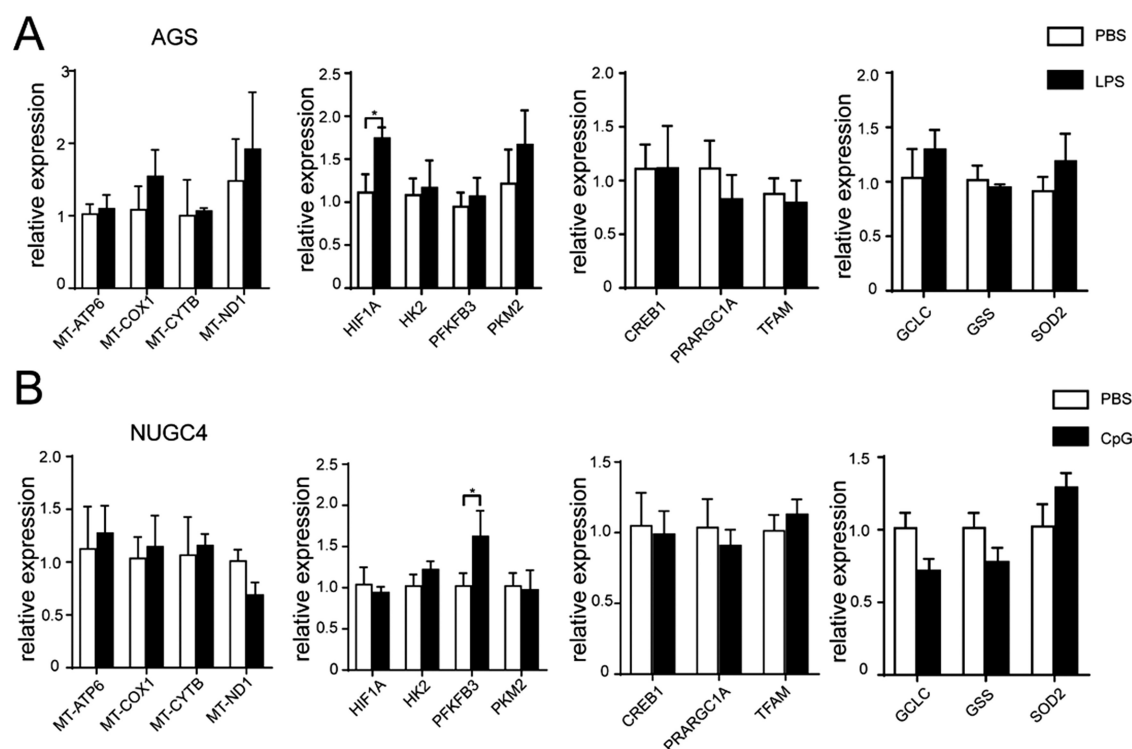


图 8 qPCR 显示代谢相关基因的改变

Fig. 8 Alterations of metabolism related genes were shown by qPCR. (A, B) qPCR expression analyses of several genes mediating mitochondrial function, glycolysis, oxidative phosphorylation and ROS reduction in TLR-activated human GC cells treated with associated TLR ligand. AGS was treated with TLR4 ligand LPS(A). NUGC4 was treated with TLR9 ligand CpG (B). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

- [9] Tye H, Kennedy CL, Najdovska M, et al. STAT3-driven upregulation of TLR2 promotes gastric tumorigenesis independent of tumor inflammation[J]. *Cancer Cell*, 2012, 22(4): 466-78
- [10] West AC, Tang K, Tye H, et al. Identification of a TLR2-regulated gene signature associated with tumor cell growth in gastric cancer[J]. *Oncogene*, 2017, 36(36): 5134-5144
- [11] Liu YD, Yu L, Ying L, et al. Toll-like receptor 2 regulates metabolic reprogramming in gastric cancer via superoxide dismutase 2 [J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(12): 3056-3069
- [12] Nagy A, Lanczky A, Menyhart O, et al. Author Correction: Validation of miRNA prognostic power in hepatocellular carcinoma using expression data of independent datasets[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 11515
- [13] Yuan X, Zhou Y, Wang W, et al. Activation of TLR4 signaling promotes gastric cancer progression by inducing mitochondrial ROS production[J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4: e794
- [14] West AC, Jenkins BJ. Inflammatory and non-inflammatory roles for Toll-like receptors in gastrointestinal cancer [J]. *Curr Pharm Des*, 2015, 21(21): 2968-77
- [15] Yu L, Wu D, Gao H, et al. Clinical Utility of a STAT3-Regulated miRNA-200 Family Signature with Prognostic Potential in Early Gastric Cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(6): 1459-1472
- [16] Flo TH, Halaas O, Lien E, et al. Human toll-like receptor 2 mediates monocyte activation by *Listeria monocytogenes*, but not by group B streptococci or lipopolysaccharide[J]. *J Immunol*, 2000, 164(4): 2064-9
- [17] Palsson-McDermott EM, O'Neill LA. The Warburg effect then and now: from cancer to inflammatory diseases [J]. *Bioessays* 2013, 35 (11): 965-73
- [18] Lachmandas E, Boutens L, Ratter JM, et al. Microbial stimulation of different Toll-like receptor signalling pathways induces diverse metabolic programmes in human monocytes[J]. *Nat Microbiol*, 2016, 2: 16246
- [19] Conejeros I, Gibson AJ, Werling D, et al. Effect of the synthetic Toll-like receptor ligands LPS, Pam3CSK4, HKLM and FSL-1 in the function of bovine polymorphonuclear neutrophils [J]. *Dev Comp Immunol*, 2015, 52(2): 215-25
- [20] Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses[J]. *Nat Immunol*, 2004, 5(10): 987-95
- [21] Varga MG, Shaffer CL, Sierra JC, et al. Pathogenic *Helicobacter pylori* strains translocate DNA and activate TLR9 via the cancer-associated cag type IV secretion system [J]. *Oncogene*, 2016, 35 (48): 6262-6269
- [22] Khajeh Alizadeh Attar M, Anwar MA, Eskian M, et al. Basic understanding and therapeutic approaches to target toll-like receptors in cancerous microenvironment and metastasis [J]. *Med Res Rev*, 2018, 38(5): 1469-1484
- [23] Uittenbogaard M, Brantner CA, Fang Z, et al. Novel insights into the functional metabolic impact of an apparent de novo m.8993T>G variant in the MT-ATP6 gene associated with maternally inherited form of Leigh Syndrome[J]. *Mol Genet Metab*, 2018, 124(1): 71-81
- [24] Zong WX, Rabinowitz JD, White E. Mitochondria and Cancer[J]. *Mol Cell*, 2016, 61(5): 667-676
- [25] Morvan D, Steyaert JM, Schwartz L, et al. Normal human melanocytes exposed to chronic insulin and glucose supplementation undergo oncogenic changes and methyl group metabolism cellular redistribution [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012, 302 (11): E1407-18

- 303-310
- [7] Zhou H, Ni Z, Li T, et al. Activation of FXR promotes intestinal metaplasia of gastric cells via SHP-dependent upregulation of the expression of CDX2[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(5): 7617-7624
- [8] Li T, Guo H, Li H, et al. MicroRNA-92a-1-5p increases CDX2 by targeting FOXD1 in bile acids-induced gastric intestinal metaplasia [J]. *Gut*, 2019, 68(10): 1751-1763
- [9] Liu X, Chen B, You W, et al. The membrane bile acid receptor TGR5 drives cell growth and migration via activation of the JAK2/STAT3 signaling pathway in non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Letters*, 2018, 412: 194-207
- [10] Hong J, Behar J, Wands J, et al. Role of a novel bile acid receptor TGR5 in the development of oesophageal adenocarcinoma [J]. *Gut*, 2010, 59(2): 170-180
- [11] Reich M, Deutschmann K, Sommerfeld A, et al. TGR5 is essential for bile acid-dependent cholangiocyte proliferation in vivo and in vitro [J]. *Gut*, 2016, 65(3): 487-501
- [12] Cao W, Tian W, Hong J, et al. Expression of bile acid receptor TGR5 in gastric adenocarcinoma [J]. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2013, 304(4): G322-G327
- [13] Aiello N M, Kang Y. Context-dependent EMT programs in cancer metastasis [J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2019, 216(5): 1016-1026
- [14] Guo C, Su J, Li Z, et al. The G-protein-coupled bile acid receptor Gpbar1 (TGR5) suppresses gastric cancer cell proliferation and migration through antagonizing STAT3 signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(33): 34402-34413
- [15] BERNSTEIN H, BERNSTEIN C, PAYNE C, et al. Bile acids as carcinogens in human gastrointestinal cancers [J]. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 2005, 589(1): 47-65
- [16] Nagathihalli N S, Beesetty Y, Lee W, et al. Novel Mechanistic Insights into Ectodomain Shedding of EGFR Ligands Amphiregulin and TGF- α : Impact on Gastrointestinal Cancers Driven by Secondary Bile Acids[J]. *Cancer Research*, 2014, 74(7): 2062-2072
- [17] Chen W D, Yu D, Forman B M, et al. Deficiency of G-protein-coupled bile acid receptor Gpbar1 (TGR5) enhances chemically induced liver carcinogenesis[J]. *Hepatology*, 2013, 57(2): 656-666
- [18] Hylemon P B, Zhou H, Pandak W M, et al. Bile acids as regulatory molecules[J]. *Journal of Lipid Research*, 2009, 50(8): 1509-1520
- [19] Pang C, Lalonde A, Godfrey T E, et al. Bile salt receptor TGR5 is highly expressed in esophageal adenocarcinoma and precancerous lesions with significantly worse overall survival and gender differences[J]. *Clin Exp Gastroenterol*, 2017, 10: 29-37
- [20] Keitel V, Häussinger D. TGR5 in cholangiocytes[J]. *Current Opinion in Gastroenterology*, 2013, 29(3): 299-304
- [21] Wang X, Tang J, CAO Q. The effects of chronic bile reflux on the gastric mucosa of rats [J]. *The Turkish Journal of Gastroenterology*, 2013, 24(3): 251-259

(上接第 15 页)

- [26] Desideri E, Vegliante R, Cardaci S, et al. MAPK14/p38alpha-dependent modulation of glucose metabolism affects ROS levels and autophagy during starvation[J]. *Autophagy*, 2014, 10(9): 1652-65
- [27] Toh Y, Kuninaka S, Oshiro T, et al. Overexpression of manganese superoxide dismutase mRNA may correlate with aggressiveness in gastric and colorectal adenocarcinomas [J]. *International Journal of Oncology*, 2000, 17: 107-119
- [28] Malafa M, Margenthaler J, Webb B, et al. MnSOD Expression Is Increased in Metastatic Gastric Cancer [J]. *Journal of Surgical Research*, 2000, 88(2): 130-134
- [29] Zou X, Santa-Maria CA, O'Brien J, et al. Manganese Superoxide Dismutase Acetylation and Dysregulation, Due to Loss of SIRT3 Activity, Promote a Luminal B-Like Breast Carcinogenic-Permissive Phenotype[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2016, 25(6): 326-36
- [30] Tao R, Coleman MC, Pennington JD, et al. Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily conserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress[J]. *Mol Cell*, 2010, 40(6): 893-904
- [31] Jin C, Qin L, Shi Y, et al. CDK4-mediated MnSOD activation and mitochondrial homeostasis in radioadaptive protection[J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 81: 77-87