

TLR1、TLR2 和 TLR6 在卵巢癌患者 PBMC 细胞亚群中的表达和功能初探

徐娟¹,王芳¹,娄鉴芳¹,史新惠¹,黄蕾¹,张淑平¹,柯星¹,孙瑞红¹,彭启松^{2*}

(¹南京医科大学第一附属医院检验学部,江苏南京 210029;²南京医科大学附属江宁医院检验科,江苏南京 211100)

[摘要] 目的:观察 TLR1(Toll-like receptors 1)、TLR2 和 TLR6 在卵巢癌患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)亚群中的表达水平,初步探索 TLR1、TLR2 和 TLR6 在卵巢癌发生发展中的作用机制。方法:收集 13 例卵巢癌患者、13 例女性妇科良性疾病患者及 13 例同期健康体检女性 EDTA 抗凝外周全血,采用流式细胞仪分别检测 3 组单核细胞、CD4⁺T 淋巴细胞、CD8⁺T 淋巴细胞、B 淋巴细胞中 TLR1、TLR2 和 TLR6 表达水平;TLR1、TLR2 和 TLR6 相应配体(Pam3CSK4、HKLM、FSL-1)分别刺激 3 组 PBMC,采用 real-time PCR 检测 PBMC 中前炎症细胞因子 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α mRNA 水平。结果:3 组细胞亚群中 TLR1、TLR2 和 TLR6 均有表达,且主要表达于单核细胞;卵巢癌组单核细胞中 TLR1、TLR2、TLR6 的表达率分别为 69.13%、59.43%、52.99%,显著高于良性疾病组(34.34%、25.32%、15.21%)和健康对照组(36.31%、26.63%、16.43%),差异具有统计学意义($P < 0.05$);良性疾病组与健康对照组间无显著性差异;3 组间 CD4⁺T 淋巴细胞、CD8⁺T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞中 TLR1、TLR2、TLR6 的表达率无显著性差异;3 组经 TLR2 的配体 HKLM 刺激 24 h 后,卵巢癌组 IL-1 β mRNA 表达水平显著高于良性疾病组和健康对照组($F = 2.05, P < 0.05; F = 2.19, P < 0.05$),良性疾病组与健康对照组无显著差异;卵巢癌组 IL-6 mRNA 表达水平显著高于良性疾病组和健康对照组($F = 1.40, P < 0.05; F = 1.99, P < 0.05$),良性疾病组与健康对照组无显著差异;3 组间 IL-8 及 TNF- α mRNA 表达水平无显著性差异。3 组经 TLR6 配体 FSL-1 刺激 24 h 后,卵巢癌组 IL-6 mRNA 表达水平显著高于良性疾病组和健康对照组($F = 1.30, P < 0.05; F = 1.69, P < 0.05$),良性疾病组与健康对照组间无显著性差异;3 组间 IL-1 β 、IL-8 及 TNF- α mRNA 表达水平无显著性差异。TLR1 配体 Pam3CSK4 刺激 24 h 后,3 组间 IL-1 β 、IL-6、IL-8 及 TNF- α mRNA 表达水平无显著差异。结论:卵巢癌患者单核细胞中高表达的 TLR1、TLR2、TLR6 介导的前炎症细胞因子的上调,在卵巢癌炎症微环境的形成和维持中发挥重要作用。

[关键词] 卵巢癌;Toll 样受体;外周血单个核细胞;前炎症细胞因子

[中图分类号] Q786;R734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)12-1638-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20141203

Expression and function of TLR1, TLR2 and TLR6 in PBMC from patients with ovarian cancer

Xu Juan¹, Wang Fang¹, Lou Jianfang¹, Shi Xinhui¹, Huang Lei¹, Zhang Shuping¹, Ke Xing¹, Sun Ruihong¹, Peng Qisong^{2*}

(¹Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Blood Transfusion, the Affiliated Jiangning Hospital of NJMU, Nanjing 211100, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the pathogenesis of ovarian cancer by investigating the expression of Toll-like receptor 1 (TLR1), TLR2 and TLR6 in patients with ovarian cancer. **Methods:** We collected peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 13 ovarian cancer patients, 13 benign diseases controls, and 13 healthy normal controls. The expression levels of TLR1, TLR2 and TLR6 were measured by flow cytometry in monocytes, CD4⁺T lymphocytes, CD8⁺T lymphocytes and B lymphocytes. Quantitative real-time PCR was used to measure IL-1 β , IL-6, IL-8, and TNF- α in the collected from cells treated with TLR1, TLR2 or TLR6 ligands. **Results:** TLR1, TLR2 and TLR6 were all expressed in PBMC and they were elevated in monocytes from all three groups. The expression of TLR1, TLR2 and TLR6 from monocytes were higher ($P < 0.05$) in ovarian cancer patients (69.13%, 59.43%, 52.99%, respectively) as compared with be-

[基金项目] 国家自然科学基金(30901344, 81272324);江苏省实验诊断学重点实验室基金(XK 201114)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: pengqs520@163.com

nign disease controls (34.34%, 25.32%, 15.21%, respectively) and healthy normal controls (36.31%, 26.63%, 16.43%, respectively), there was no difference between benign disease controls and the healthy normal controls. While between CD4⁺T cells, CD8⁺T cells, as well as among B cells, no significant difference was found. In concordance with the above results, there was an observable increased expression of inflammatory cytokine interleukin-1 β (IL-1 β) upon stimulated by HKLM (TLR2 ligand) in ovarian cancer patients compared to benign disease controls and healthy normal controls ($F = 2.05, P < 0.05; F = 2.19, P < 0.05$), while no significant difference was noticed between benign disease controls and healthy normal controls; IL-6 was also up-regulated in ovarian cancer patients ($F = 1.40, P < 0.05; F = 1.99, P < 0.05$) when compared with benign disease controls and healthy normal controls, while no significant difference was observed between benign disease controls and healthy normal controls; Furthermore, there were differences in IL-8, TNF- α among three groups. Conditioned medium with FSL-1 (TLR6 ligand) induced higher amounts of IL-6 expression in ovarian cancer patients than benign disease controls and healthy normal controls ($F = 1.30, P < 0.05; F = 1.69, P < 0.05$), while no difference was found between benign disease controls and healthy normal controls. In particular, all three groups did not show significant up-regulation of IL-1 β , IL-8 or TNF- α production in response to FSL-1 stimulation. Moreover, stimulated with Pam3CSK4 (TLR1/2 ligand), IL-1 β , IL-6, IL-8 or TNF- α didn't show significant up-regulation among all three groups. **Conclusion:** TLR1, TLR2 and TLR6 were highly expressed in monocytes from ovarian cancer patients, and inflammatory reaction mediated by IL-1 β , IL-6 may play an important role in driving ovarian tumor progression.

[Key words] ovarian cancer; Toll like receptor; PBMC; pro-inflammatory cytokines

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(12): 1638-1643]

卵巢癌由于起病隐匿, 早期诊断困难, 进展迅速, 70%~80%的卵巢癌患者发现时已为晚期, 且术后易复发, 其病死率高居妇科恶性肿瘤之首^[1], 故卵巢癌的发生发展机制一直受到密切关注, 国内外学者进行大量探索与研究, 认为卵巢癌的发生是多因素共同作用的结果, 慢性炎症、妊娠、家族史、感染等因素在卵巢癌发生发展中起关键作用, 其中慢性炎症受到越来越多的关注^[2-3]。

Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 是近年来发现的一类进化比较保守的模式识别受体^[4]。迄今, 在哺乳动物中已经发现 15 种 TLRs, 其中人类有 10 种, 小鼠 13 种^[5], 作为联系固有免疫与适应性免疫的桥梁, 其能特异地识别病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 如细菌脂多糖、胞壁酸、肽聚糖、病原微生物核酸等, 在机体先天免疫应答、组织修复及组织损伤引发炎症反应等过程中发挥着至关重要的作用^[6-7]。

本研究明确了卵巢癌患者单核、CD4⁺T、CD8⁺T、B 细胞亚群中 TLR1、TLR2 及 TLR6 的表达情况, 通过 TLRs 配体刺激实验分析了高表达的 TLR1、TLR2、TLR6 在介导前炎症因子表达中的功能, 并与妇科良性疾病患者及健康对照者进行比较, 初步探索 TLR1、TLR2 和 TLR6 在卵巢癌发生发展中的作用机制。

1 对象和方法

1.1 对象

卵巢癌患者 13 例, 妇科良性疾病患者 13 例,

于 2011 年 4 月~2012 年 4 月在南京医科大学第一附属医院河西分院就医, 并经病理诊断证实, 平均年龄分别为 (55 \pm 14) 岁、(53 \pm 13) 岁。健康对照组为同期在南京医科大学第一附属医院收集的健康体检成年女性 13 例, 平均年龄为 (51 \pm 14) 岁。分别采集 3 组研究对象静脉血, EDTA-K₂ 抗凝。

溶血素及荧光抗体 anti-human CD4、anti-human CD8、anti-human CD14、anti-human CD19 (BD 公司, 美国)、anti-human CD281 (TLR1) PE、anti-human CD282 (TLR2) FITC (eBioscience 公司, 美国)、PE anti-human CD286 (TLR6, Biolegend 公司, 美国); 流式细胞仪 (FACS flow cytometer, BD 公司, 美国); 前炎症细胞因子引物由上海赛百盛公司合成。

1.2 方法

1.2.1 标本的采集和处理

用 EDTA-K₂ 抗凝管真空采集静脉血 4 ml; 混匀后每个流式上样管加入 EDTA 抗凝的全血 100 μ l。

1.2.2 全血细胞表面 TLRs 受体标记

对 3 组样本的全血应用以下单抗组合进行染色: ① FITC/PE 标记 CD4/TLR1、CD8/TLR1、CD19/TLR1、CD4/TLR6、CD8/TLR6、CD19/TLR6; ② APC/PE 标记 CD14/TLR1、CD14/TLR6; ③ PE/FITC 标记 CD4/TLR2、CD8/TLR2、CD19/TLR2; ④ APC/FITC 标记 CD14/TLR2; ⑤ 空白管不加入任何荧光素标记的单克隆抗体。每种单克隆抗体 5 μ l, 室温避光孵育 20 min。加入溶血素 900 μ l 室温 12 min, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清。加入 2 ml PBS 悬浮, 室温 1 200 r/min 离心 5 min, 洗涤 2 次。加入

100 μ l PBS 重悬, FACS CELLQUEST 软件进行检测分析。

1.2.3 FACS 分析 3 组单核、CD4⁺ T、CD8⁺ T、B 细胞亚群中 TLR1、TLR2、TLR6 表达

用前向散射角(FSC)及侧向散射角(SSC)确定淋巴细胞群, 分别以 CD14⁺单核细胞、CD4⁺T 淋巴细胞、CD8⁺T 淋巴细胞、CD19⁺ B 淋巴细胞为门, 分析 TLR1、TLR2、TLR6 表达。

1.2.4 TLRs 配体刺激

采用淋巴细胞分离液(天津灏洋)分离, 将各组重悬于含 10%人 AB 血清 RPMI-1640 中, 以 1×10^5 个/孔培养于 96 孔板, 100 μ l/孔, 加入 TLR1、TLR2 和 TLR6 配体刺激剂 Pam3CSK4、HKLM、FSL-1, 终浓度分别为 1 μ g/ml、 1×10^8 cells/ml、1 μ g/ml; 每组均设 3 复孔, 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养 24 h, 收集细胞悬液, 1 500 r/min 离心 7 min, 弃上清, 收集细胞, 提取 RNA, 继续后续实验或置 -70 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.5 RNA 提取及 RT-PCR

采用 miRNeasy Mini Kit(Qiagen 公司, 美国)提取的 RNA, 用 PrimeScript^{RT} reagent Kit(TaKaRa 公司, 日本)逆转录合成 cDNA, 以 SYBR Premix Ex TaqTM II 为荧光染料, β -actin 基因为内参照, 进行前炎症细胞因子 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 基因实时荧光定量 PCR 检测(ABI 7500 型)。PCR 引物序列见表 1; PCR 反应体系: 模板 cDNA 2 μ l, SYBR II 10 μ l, 上下游引物各 1.0 μ l, 去离子水 6 μ l; 扩增程序如下: 预变性 95 $^{\circ}$ C 30 s 1 个循环; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 45 个循环, 64 $^{\circ}$ C 延伸 34 s。

1.3 统计学方法

细胞表面 TLR1、TLR2、TLR6 表达结果均以阳性细胞的百分比表示。实验数据采用 SPSS16.0 进行分析。正态分布数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表

示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 卵巢癌组、妇科良性疾病组及健康对照组各细胞亚群 TLR1、TLR2 及 TLR6 的表达情况

FACS 分析卵巢癌组、妇科良性疾病组及健康对照组中单核、CD4⁺ T、CD8⁺ T、B 细胞亚群中 TLR1、TLR2 及 TLR6 的表达情况, 根据前散射和侧散射将外周血白细胞分为 3 群, 即多型核粒细胞、淋巴细胞和单核细胞。结果显示(表 2~4), 卵巢癌组、妇科良性疾病组、健康对照组的中均有 TLR1、TLR2 及 TLR6 表达, 且主要表达于单核细胞。利用单因素方差分析和两两比较对数据进行统计学分析发现, 3 组单核细胞中 TLR1、TLR2 及 TLR6 的表达率较 CD4⁺ T、CD8⁺ T、B 细胞中 TLR1、TLR2 及 TLR6 的表达率均显著增高, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 卵巢癌组、妇科良性疾病组、健康对照组中 TLR1、TLR2 及 TLR6 表达率比较

单核细胞中(图 1), 卵巢癌组 TLR1、TLR2、TLR6 的表达率分别为 69.13%、59.43%、52.99%, 妇科良性疾病组 TLR1、TLR2、TLR6 的表达率分别为 34.34%、25.32%、15.21%, 健康对照组 TLR1、TLR2、TLR6 的表达率分别为 36.31%、26.63%、16.43%, 经单因素方差分析和两两比较, 卵巢癌组 TLR1、TLR2、TLR6 表达率显著高于妇科良性疾病组和健康对照组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 妇科良性疾病组与健康对照组间无显著性差异。

CD4⁺ T 淋巴细胞、CD8⁺ T 淋巴细胞和 B 细胞中, 卵巢癌组、妇科良性疾病组及健康对照组间 TLR1、TLR2、TLR6 的表达率均无显著性差异。

2.3 HKLM、FSL-1 诱导卵巢癌患者中 IL-1 β 、IL-6

表 1 前炎症细胞因子 IL-1 β 、IL-6、IL-8 及 TNF- α mRNA 检测中引物序列
Table 1 PCR primers used for the detection of IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α

基因		引物序列(5'→3')	引物长度(bp)	产物大小(bp)
IL-1 β	上游	CACGATGCACCT GTACGATCA	21	120
	下游	GTTGCTCCATATCCTGTCCCT	21	
IL-6	上游	AACCTGAACCTCCAAAGATGG	22	865
	下游	TCTGGCTTGTTCCTCACTACT	21	
IL-8	上游	GCCTTCCTGATTTCTGCAGCT	21	868
	下游	TGCACTGACATCTAAGTTCTTTAGCAC	27	
TNF- α	上游	ATGAGCACTGAAAGCATGATCC	22	822
	下游	GAGGGCTGATTAGAGAGAGGTC	22	
β -actin	上游	TGGCACCCAGCACAATGAA	19	186
	下游	CTA AGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA	25	

表 2 卵巢癌患者各细胞亚群中 TLR1、TLR2、TLR6 的表达率

Table 2 Expression profile of TLR1, TLR2, TLR6 in from ovarian cancer patients (% , $\bar{x} \pm s$)

分组	TLR1	TLR2	TLR6
单核细胞	69.13 ± 5.74	59.43 ± 4.83	52.99 ± 2.75
CD4 ⁺ T 淋巴细胞	1.00 ± 0.09*	0.85 ± 0.11*	0.82 ± 0.07*
CD8 ⁺ T 淋巴细胞	0.60 ± 0.04*	0.33 ± 0.05*	0.55 ± 0.08*
B 淋巴细胞	0.64 ± 0.06*	0.06 ± 0.04*	0.45 ± 0.04*

与单核细胞比较, **P* < 0.05。

表 3 妇科良性疾病患者各细胞亚群中 TLR1、TLR2、TLR6 的表达率

Table 3 Expression profile of TLR1, TLR2, TLR6 in from benign disease controls (% , $\bar{x} \pm s$)

分组	TLR1	TLR2	TLR6
单核细胞	34.34 ± 4.09	25.32 ± 5.91	15.21 ± 2.31
CD4 ⁺ T 淋巴细胞	0.93 ± 0.14*	0.91 ± 0.99*	0.79 ± 0.05*
CD8 ⁺ T 淋巴细胞	0.61 ± 0.04*	0.34 ± 0.05*	0.62 ± 0.04*
B 淋巴细胞	0.63 ± 0.06*	0.05 ± 0.03*	0.42 ± 0.07*

与单核细胞比较, **P* < 0.05。

表 4 健康对照者各细胞亚群中 TLR1、TLR2、TLR6 的表达率

Table 4 Expression profile of TLR1, TLR2, TLR6 in from normal healthy controls (% , $\bar{x} \pm s$)

分组	TLR1	TLR2	TLR6
单核细胞	36.31 ± 8.66	26.63 ± 6.40	16.43 ± 2.59
CD4 ⁺ 淋巴细胞	0.90 ± 0.11*	0.82 ± 0.10*	0.77 ± 0.04*
CD8 ⁺ T 淋巴细胞	0.61 ± 0.03*	0.31 ± 0.06*	0.57 ± 0.08*
B 淋巴细胞	0.67 ± 0.04*	0.06 ± 0.03*	0.41 ± 0.07*

与单核细胞比较, **P* < 0.05。

mRNA 表达水平上调

为进一步探索卵巢癌患者中高表达的 TLR1、TLR2、TLR6 的功能, 分别用 TLR1、TLR2、TLR6 的配体 Pam3CSK4、HKLM、FSL-1 刺激卵巢癌组、妇科良性疾病组及健康对照组, 利用荧光定量 PCR 技术检测 3 组在 TLRs 配体刺激后 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 的 mRNA 表达水平。扩增曲线见图 2, 熔解曲线见图 3。

利用单因素方差分析和 LSD 两两比较进行统计学分析, 结果显示 (图 4), 各组经 TLR2 配体 HKLM 刺激 24 h 后, 卵巢癌组中 IL-1 β mRNA 表达水平显著高于良性疾病组和健康对照组 ($F = 2.05, P < 0.05; F = 2.19, P < 0.05$), 良性疾病组与健康对照组无显著差异; 卵巢癌组 IL-6 mRNA 表达水平亦高于良性疾病组和健康对照组 ($F = 1.40, P < 0.05; F = 1.99, P < 0.05$), 良性疾病组与健康对照组无显著差异; IL-8、TNF- α mRNA 表达水平在

3 组间不存在组间差异。

TLR6 配体 FSL-1 刺激 24 h 后, 卵巢癌组 IL-6 mRNA 表达水平显著高于良性疾病组和健康对照组 ($F = 1.30, P < 0.05; F = 1.69, P < 0.05$), 良性疾病组与健康对照组间无显著性差异; 3 组 IL-1 β 、IL-6、IL-8 mRNA 表达水平无显著性差异。

TLR1 配体 Pam3CSK4 刺激 24 h 后, 3 组 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α mRNA 表达水平无显著性改变。

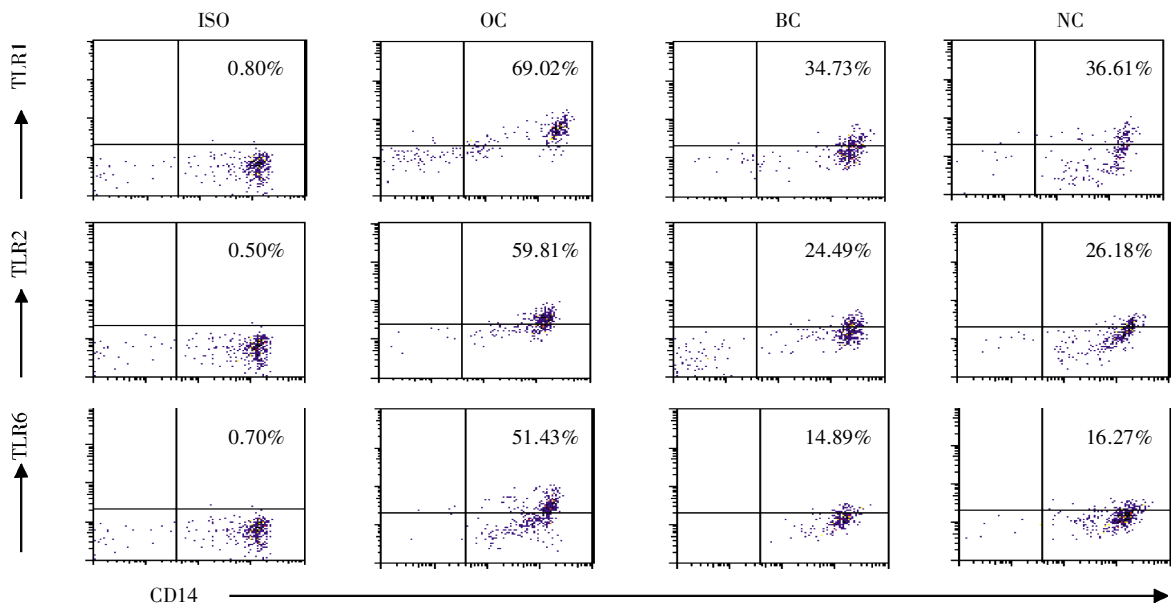
3 讨论

TLRs 在体内分布广泛, 不仅表达于各种上皮和内皮细胞如肠上皮、泌尿生殖道上皮等, 还大量表达于各种免疫细胞, 包括单核细胞、巨噬细胞、DCs 和粒细胞。TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、TLR6、TLR10 表达于细胞表面, TLR3、TLR7、TLR8、TLR9 则主要表达于细胞内 [8]。研究发现人类 TLR1、TLR2、TLR6 mRNA 主要表达于单核细胞、单核细胞来源的未成熟树突状细胞 (iDC) 及粒细胞表面 [9-10]。不同的 TLRs 分子特异性识别相关的病原体相关分子模式 (PAMPs), TLR2 常与 TLR1 或 TLR6 组成异源二聚体参与多种配体的识别 [11]。

本课题组前期研究结果表明 [12], 卵巢癌组、妇科良性疾病组及健康对照组中 TLR1~TLR9 mRNA 均有表达, 与健康对照组比较, 卵巢癌组 TLR2、TLR6 mRNA 表达水平显著高于健康对照组, 其中 TLR2 显著高于妇科良性疾病组。为全面、客观地了解卵巢癌患者中高表达的 TLRs 在各细胞亚群中的表达情况, 本研究利用 FACS 技术对卵巢癌患者、妇科良性疾病患者及女性健康对照者单核细胞、CD4⁺T、CD8⁺T、B 淋巴细胞中 TLR1、TLR2、TLR6 的表达情况进行检测, 结果显示卵巢癌患者、妇科良性疾病患者和女性健康对照者中 TLR1、TLR2 和 TLR6 主要表达于单核细胞, 卵巢癌组单核细胞中 TLR1、TLR2、TLR6 的表达率显著高于妇科良性疾病组和健康对照组, 而妇科良性疾病组与健康对照组间无显著差异。

相关研究已证实外周血单核细胞来源的巨噬细胞能提高卵巢癌细胞中炎症因子的局部浓度 [13], 是肿瘤微环境中参与炎症反应的重要细胞之一 [14-15], 故本研究中卵巢癌组单核细胞中高表达的 TLR1、TLR2、TLR6 可能参与卵巢癌肿瘤微环境中的炎症反应, 对卵巢癌的发生发展起调节作用。

近年来, 炎症与肿瘤的研究受到越来越多的关



ISO:对照,OC:卵巢癌组,BC:良性疾病组,NC:健康对照组。

图 1 FACS 检测各组单核细胞中 TLR1、TLR2 及 TLR6 表达率

Figure 1 Representative flow cytometry dot plots of monocytes from ovarian cancer patients, benign disease controls and healthy normal controls

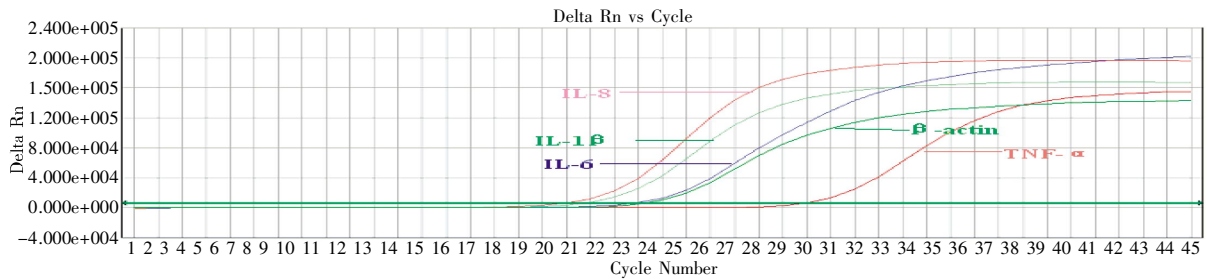


图 2 荧光定量 PCR 检测各组 IL-1β、IL-6、IL-8、TNF-α mRNA 表达水平 S 型扩增曲线

Figure 2 Amplification plot of IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α by real-time PCR

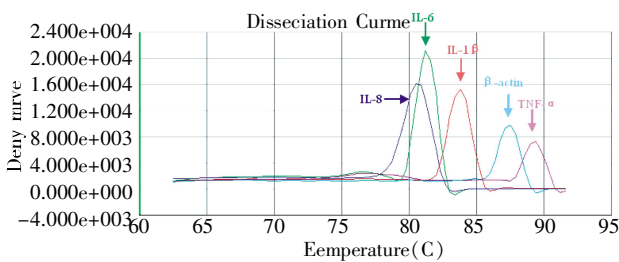


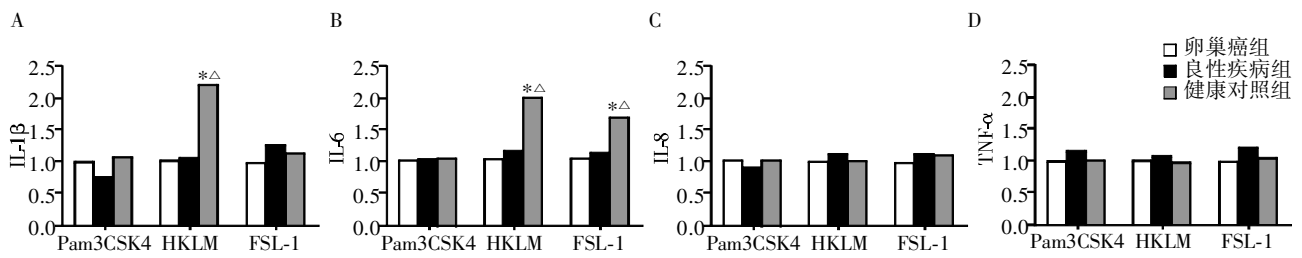
图 3 荧光定量 PCR 检测各组 IL-1β、IL-6、IL-8、TNF-α mRNA 表达水平溶解曲线

Figure 3 Melting curve of IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α by real-time PCR

注^[16],如幽门螺杆菌感染所致的慢性胃炎与胃癌、卵巢子宫内膜异位与卵巢癌、慢性支气管炎与肺癌等^[17]。TLRs 作为 NF-κB 的潜在激活剂,被认为是联系炎症与肿瘤的桥梁^[18]。Kim 等^[19]通过研究证实肿瘤浸润巨噬细胞通过 TLR2、TLR6 介导的信号通路活化、诱导前炎症细胞因子 IL-6、TNF-α 分泌,在肿瘤的转移中发挥重要作用。

本研究用 TLR1、TLR2 及 TLR6 配体 Pam3CSK4、HKLM、FSL-1 分别刺激培养卵巢癌组、妇科良性疾病组及健康对照组的,结果发现卵巢癌组经 HKLM 刺激 24 h 后,IL-1β、IL-6 mRNA 表达水平显著高于良性疾病组和健康对照组;经 TLR6 配体刺激 24 h 后,IL-6 mRNA 表达水平亦显著高于良性疾病组和健康对照组;而 TLR1 配体刺激 24 h 后,IL-1β、IL-6、IL-8、TNF-α mRNA 表达水平均未出现显著改变,这可能是 TLR1 未与 TLR2 形成异二聚体,不能有效识别相关配体所导致。研究阐明^[15]IL-1β 参与卵巢细胞的发育、成熟、排卵及妊娠等环节,IL-6 与上皮性卵巢癌肿瘤微环境的形成、卵巢肿瘤细胞的转移、肿瘤免疫抑制等密切相关^[20-21]。因此卵巢癌患者中高表达的 TLRs 所介导的 IL-1β、IL-6 表达水平上调可能参与调节卵巢癌肿瘤微环境的形成及肿瘤免疫抑制。

以上结果说明,卵巢癌患者、妇科良性病患



与健康对照组比较, * $P < 0.05$; 与妇科良性疾病组比较, $\Delta P < 0.05$ ($n=13$)。

图 4 荧光定量 PCR 检测 TLR1、TLR2、TLR6 配体刺激各组中 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α mRNA 表达水平

Figure 4 The fold induction of IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α from upon differential stimulation by ligands of TLR1, TLR2 and TLR6 in ovarian cancer patients compared to benign disease controls and healthy normal controls

者和女性健康对照者中 TLR1、TLR2、TLR6 主要分布于单核细胞, 且卵巢癌患者单核细胞中 TLR1、TLR2、TLR6 高表达, 经相关配体刺激作用后, 前炎症细胞因子 IL-1 β 、IL-6 mRNA 表达水平上调, 提示卵巢癌患者单核细胞中高表达的 TLR1、TLR2、TLR6 介导的前炎症细胞因子的持续上调, 在卵巢癌炎症微环境的形成和维持中发挥重要作用, 但其具体作用机制有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Muccioli M, Sprague L, Nandigam H, et al. Toll-like receptors as novel therapeutic targets for ovarian cancer [J]. *ISRN Oncology*, 2012, 2012: 642141

[2] Cannistra SA. Cancer of the ovary [J]. *The New England Journal of Medicine*, 2004, 351: 2519-2529

[3] Maccio A, Madeddu C. Inflammation and ovarian cancer [J]. *Cytokine*, 2012, 58: 133-147

[4] Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition in the innate immune response [J]. *The Biochemical Journal*, 2009, 420(1): 1-16

[5] Schreiber G, Tel J, Sliepen KH, et al. Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets; implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy [J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*: CII, 2010, 59: 1573-1582

[6] Sasai M, Yamamoto M. Pathogen recognition receptors; ligands and signaling pathways by toll-like receptors [J]. *International Reviews of Immunology*, 2013, 32: 116-133

[7] Beutler BA. TLRs and innate immunity [J]. *Blood*, 2009, 113: 1399-1407

[8] Gillaux C, Mehats C, Vaiman D, et al. Functional screening of TLRs in human amniotic epithelial cells [J]. *Journal of Immunology*, 2011, 187: 2766-2774

[9] Alexopoulou L, Thomas V, Schnare M, et al. Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice [J]. *Nature Medicine*, 2002, 8: 878-884

[10] Nakao Y, Funami K, Kikkawa S, et al. Surface-expressed

TLR6 participates in the recognition of diacylated lipopeptide and peptidoglycan in human cells [J]. *Journal of Immunology*, 2005, 174: 1566-1573

[11] Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, et al. TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family [J]. *Gene*, 1999, 231: 59-65

[12] 徐娟, 潘世扬, 黄珮珺, 等. Toll 样受体在卵巢癌发生发展中作用机制的初步探讨 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2013, 33(1): 6

[13] Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2004, 4: 71-78

[14] Severi T, van Malenstein H, Verslype C, et al. Tumor initiation and progression in hepatocellular carcinoma: risk factors, classification, and therapeutic targets [J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2010, 31: 1409-1420

[15] Allavena P, Sica A, Solinas G, et al. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages [J]. *Critical Reviews in Oncology/hematology*, 2008, 66(1): 1-9

[16] Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer [J]. *Nature*, 2002, 420: 860-867

[17] Chen R, Alvero AB, Silasi DA, et al. Cancers take their Toll--the function and regulation of Toll-like receptors in cancer cells [J]. *Oncogene*, 2008, 27: 225-233

[18] Huang B, Zhao J, Li H, et al. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance [J]. *Cancer Research*, 2005, 65: 5009-5014

[19] Kim S, Takahashi H, Lin WW, et al. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis [J]. *Nature*, 2009, 457: 102-106

[20] Lo CW, Chen MW, Hsiao M, et al. IL-6 trans-signaling in formation and progression of malignant ascites in ovarian cancer [J]. *Cancer Research*, 2011, 71: 424-434

[21] Lane D, Matte I, Rancourt C, et al. Prognostic significance of IL-6 and IL-8 ascites levels in ovarian cancer patients [J]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 210

[收稿日期] 2014-06-19