

## Toll 样受体 4 活化增强乳腺癌细胞株 MCF-7 侵袭力的研究

王涛<sup>1</sup>, 王波<sup>2</sup>, 温会燕<sup>3</sup>, 颜洁<sup>3</sup>, 何春燕<sup>3</sup>, 朱雪明<sup>3</sup>, 杨欢<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>常州市中心血站检测中心, 江苏 常州 213000; <sup>2</sup>苏州大学附属第二医院肿瘤科, <sup>3</sup>检验科, 江苏 苏州 215004)

**[摘要]** 目的:研究 Toll 样受体 4(TLR4)在人类乳腺癌 MCF-7 细胞株中的表达及在肿瘤增殖和转移中的作用。方法:脂多糖(LPS)刺激 MCF-7 细胞株, RT-PCR、Real-time PCR、FCS 和 Western blotting 检测 TLR4 在 mRNA 和蛋白水平表达变化; MTT 检测细胞增殖; RT-PCR 和 real-time PCR 检测基质金属蛋白酶(MMP-2)、MMP-9 和血管内皮生长因子(VEGF)的 mRNA 表达并用 ELISA 检测培养上清中其蛋白表达水平; Western blot 检测 TLR4 信号传导通路下游蛋白 MyD88 的表达; CBA 测定细胞培养上清的炎性细胞因子; 划痕实验检测癌细胞的生物学侵袭力。结果:实验表明, LPS 刺激 MCF-7 细胞株能明显上调 TLR4 mRNA 和蛋白表达( $P < 0.05$ )。MTT 结果显示, LPS 对癌细胞增殖没有影响。LPS 激活 TLR4 后, MMP-2、MMP-9 和 VEGF 在 mRNA 和蛋白水平的表达均明显上调( $P < 0.05$ )。划痕实验表明, LPS 能显著增强 MCF-7 细胞株的划痕愈合能力。此外, LPS 能诱导 TLR4 信号通路下游 MyD88 蛋白表达的显著上调( $P < 0.05$ ), IL-6 的分泌增多( $P < 0.05$ )。结论: LPS 能明显增强 MCF-7 细胞株 TLR4 的表达, 增强癌细胞的侵袭力。

**[关键词]** Toll 样受体 4; MCF-7; 转移

**[中图分类号]** R737.9

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2016)05-533-06

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20160505

## Stimulation of toll-like receptor 4 promotes human breast cancer cell MCF-7 invasiveness

Wang Tao<sup>1</sup>, Wang Bo<sup>2</sup>, Wen Huiyan<sup>3</sup>, Yan Jie<sup>3</sup>, He Chunyan<sup>3</sup>, Zhu Xueming<sup>3</sup>, Yang Huan<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Clinical Laboratory, the Blood Center of Changzhou, Changzhou 213000; <sup>2</sup>Department of Oncology; <sup>3</sup>Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, China)

**[Abstract]** **Objective:** This study investigated the expression and biological role of toll-like receptor-4(TLR4) in human breast cancer proliferation and metastasis. **Methods:** Lipopolysaccharide(LPS) was used to stimulate MCF-7, expression of TLR4 mRNA and protein was analyzed by RT-PCR, Real-time PCR, FCS and Western blotting; MMP-2, MMP-9 and VEGF were measured by RT-PCR and Real-time PCR on the mRNA levels and ELISA on the protein levels; MyD88 was analyzed by Western blotting; The cytokines in the supernatants were measured by CBA; The cell proliferation was analyzed by MTT; The invasion was analyzed by wound healing assay. **Results:** Using LPS to stimulate MCF-7, TLR4 mRNA and protein increased obviously. However, the proliferation had no significant changes. In addition, the activation of TLR4 promoted the expression of MMP-2, MMP-9 and VEGF notably. LPS promoted the invasion of MCF-7. Moreover, the stimulation of LPS significantly increased the expression of MyD88, and caused the secretion of IL-6. **Conclusion:** This study indicated that TLR4 may participate in the progression and metastasis of human breast cancer.

**[Key words]** TLR4; MCF-7; metastasis

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(05):533-538]

近年来研究发现, Toll 样受体(TLRs)在鼠和人

类的多种肿瘤细胞上有表达, 并且在肿瘤的发生、发展、转移、增殖、抗凋亡等方面都起到了重要的作用。研究表明, TLR4 在乳腺癌细胞中的表达较高, 与乳腺癌细胞的增殖凋亡有较大关系<sup>[1]</sup>。本文用 TLR4 的配体脂多糖(LPS)刺激人乳腺癌 MCF-7 细

**[基金项目]** 江苏省检验医学重点实验室开放课题资助 (JSKLM-2014-004)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: sdfeyjyk@126.com

胞株,探讨 TLR4 在人乳腺癌侵袭转移方面的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

LPS(*Escherichia coli* 0111:B4, Sigma 公司, 美国)配制成 1 mg/mL 储存在 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 试验时配到所需浓度。

人乳腺癌细胞株 MCF-7(上海中科院细胞库)。用含 20%胎牛血清(Biochrom 公司, 德国)和 10%重组胰岛素的 DMEM 培养液(Gibco 公司, 美国), 置于 $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度培养箱中培养。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 实验分组

实验(LPS)组采用的 LPS 刺激, 刺激浓度和时间见下述实验方法, 对照(Control)组用生理盐水替代 LPS。每组实验重复 3 次。

#### 1.2.2 RT-PCR 和 real-time PCR

LPS (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 处理对数生长期的 MCF-7 细胞, 常规培养 48 h。收集两组各  $2.0 \times 10^6$  个细胞, 总 RNA 用 TRIzol 试剂(Invitrogen 公司, 美国)分离。将

总 RNA 的浓度调整为 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  分装, 置于 $-80^{\circ}\text{C}$  保存备用。以 2  $\mu\text{g}$  RNA 为模板, 构建 M-MLV 逆转录反应体系 (Thermo 公司, 美国), 按说明书操作得 cDNA,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。按说明书构建 50  $\mu\text{L}$  RT-PCR 反应体系(Thermo 公司, 美国)。各引物用 Prime5.0 设计, 上海生工生物技术公司合成(表 1), 配制成 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  备用。反应参数: 预变性  $94^{\circ}\text{C}$ , 5 min; 变性  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 s; 退火 30 s [退火温度: GAPDH,  $55^{\circ}\text{C}$ ; TLR4,  $58^{\circ}\text{C}$ ; 血管内皮生长因子(VEGF),  $57^{\circ}\text{C}$ ; 基质金属蛋白酶(MMP-9),  $61^{\circ}\text{C}$ ; MMP-2,  $57^{\circ}\text{C}$ ]; 延伸  $72^{\circ}\text{C}$ , 10 min; 共 35 个循环。取扩增产物 8  $\mu\text{L}$  上样于 1.2% 的琼脂糖凝胶(EB 终浓度为 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 中电泳, 凝胶成像仪紫外透射鉴定产物, Image J 软件用于图像灰度分析。按说明书构建 20  $\mu\text{L}$  real-time PCR 反应体系(Thermo 公司, 美国)。在 CFX Connect™ real-time PCR Detection System (BIO-RAD 公司, 美国) 上进行扩增, 循环参数除延伸为  $72^{\circ}\text{C}$  30 s 外, 其余同 RT-PCR, 循环数为 40 个。根据所得 CT 值应用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法计算各基因产物的相对表达量。

表 1 PCR 反应引物

Table 1 PCR primers for genes

基因	引物序列(5'→3')	扩增长度(bp)
GAPDH	forward: GGATTTGGTCGTATTGGG	205
	reverse: GGAAGATGGTGATGGGATT	
TLR4	forward: GAGCCGTTGGTGTATCTTTGA	166
	reverse: CTCCCATTCCAGGTAGGTGTT	
MMP-2	forward: AGAGACAGTGGATGATGCCTTT	220
	reverse: ATCGTCATCAAAATGGGAGTCT	
MMP-9	forward: GTGCTGGGCTGCTGCTTTGCTG	303
	reverse: GTCGCCCTCAAAGGTTTGAAT	
VEGF	forward: GAGGAGCAGTTACGGTCTGT	371
	reverse: GTAGCTCGTGCTGGTGT CA	

#### 1.2.3 FCS 检测细胞表面 TLR4 表达

收集两组各  $5 \times 10^5$  个细胞[实验组 LPS(2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 刺激 24 h], 转入流式管, PBS 5 mL, 洗涤 2 次, 室温离心 1 000 r/min 5 min, 弃去 PBS; 加入 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  纯化兔抗人 TLR4 抗体(Santa Cruz 公司, 美国)5  $\mu\text{L}$ , 混匀, 放置 30 min(空白对照不加一抗, 其余操作相同); 加入 3 mL PBS, 离心 1 000 r/min 5 min, 重复 3 次后弃去上清; 加入 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  PE 标记 IgG 羊抗兔二抗(R&D 公司, 美国)5  $\mu\text{L}$ , 混匀,  $4^{\circ}\text{C}$  避光放置 30 min; 加入 3 mL PBS, 离心 1 000 r/min 5 min, 重复 3 次后弃去上清; 每管加入 500  $\mu\text{L}$  PBS, 混匀成单个细胞悬液后进行流式细胞仪(FACS calibur; Becton Dickinson

公司, 美国)测定。

#### 1.2.4 MTT 法检测细胞增殖

按  $1 \times 10^6/\text{孔}$  将 MCF-7 细胞接种于 96 孔板, 待细胞贴壁后, 更换培养基, 并向实验孔内加入不同浓度 LPS, 浓度分别为: 2、10 和 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 重复 3 孔, 共重复接种 5 块板, 分别培养 24、48、72、96 和 120 h 后每孔加入 20  $\mu\text{L}$  MTT 溶液 (5 mg/mL)(Sigma 公司, 美国),  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 4 h 后, 去除培养上清, 每孔加入 200  $\mu\text{L}$  DMSO,  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min 溶解细胞内的甲瓖, 用酶标仪 (340 st; Anthos Zenyth, Salzburg 公司, 澳大利亚)测定 570 nm 处的吸光度。

#### 1.2.5 划痕实验

按  $1 \times 10^6$ /孔将 MCF-7 细胞接种于 12 孔板内,实验孔 LPS 刺激浓度为  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。常规培养 48 h 待细胞生长融合成片后,用  $100 \mu\text{L}$  枪头小心在每个培养孔底均匀的做一划痕并拍照。继续培养,每经 24 h 取出拍照,图片用 Image J 软件分析,划痕愈合比率为刺激后划痕面积比初始划痕面积,比值越小,说明划痕愈合越快。

### 1.2.6 ELISA 方法检测 VEGF、MMP-9 和 MMP-2

按  $2 \times 10^6$ /孔将 MCF-7 细胞接种于 6 孔板,实验孔 LPS 刺激浓度分别为 2、10、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,每孔重复 3 次,培养 48 h 后,收集各孔上层培养液。按照试剂盒(R&D, Minneapolis, MN, 美国)操作说明进行测定。以双蒸水校零,用酶标仪读取各孔 450 nm 下吸光度值。将各样品和标准品吸光度值减去 0 pg/mL 孔吸光度值,绘制标准曲线,求出线性回归方程,计算各浓度值,进行统计分析。

### 1.2.7 Western blotting 方法检测 TLR4 和 MyD88

MCF-7 经 LPS ( $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 处理 48 h 后,各组收集  $1 \times 10^6$  个细胞,用预冷的 PBS 洗涤 2 次,加入  $100 \mu\text{L}$  RIPA 裂解液(Beyotime 公司,上海),冰上裂解 40 min,  $4^\circ\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min,取上清。用 BCA Protein Assay Kit(Beyotime)测定两组提取的总蛋白浓度,调整加样量,用 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳;转膜至 BioTrace PVDF membrane(Pall Life Sciences, Ann Arbor, MI, 美国);5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h;兔抗人 TLR4 抗体 (1:1 000; Abcam, Cambridge, MA, 美国)、兔抗 MyD88 抗体 (1:500, Boster 公司,武汉)和兔抗 GAPDH 抗体 (1:5 000, Abcam, Cambridge, MA, 美国)  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜;用 TBST 洗 3 次,每次 10 min;辣根过氧化物酶标记的抗兔 IgG 抗体 (1:5 000, Bioworld, Dublin, OH, 美国)室温孵育 2 h;用 TBST 洗 3 次,每次 10 min;用 chemiluminescence system (Amersham Pharmacia Biotech, Bucks, 英国)检测结果,Image J 软件用于图像灰度分析。

### 1.2.8 FCS 检测细胞因子

按  $2 \times 10^6$ /孔将 MCF-7 细胞接种于 6 孔板,实验孔 LPS 刺激浓度分别为 2、10、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,每孔重复 3 次,培养 48 h 后,收集各孔上层培养液。按 CBA human Th1/Th2 cytokine kit (BD 公司,美国)说明处理标本,用流式细胞仪进行测定;细胞因子绝对含量由 BD Cell-Quest software 分析。

### 1.3 统计学方法

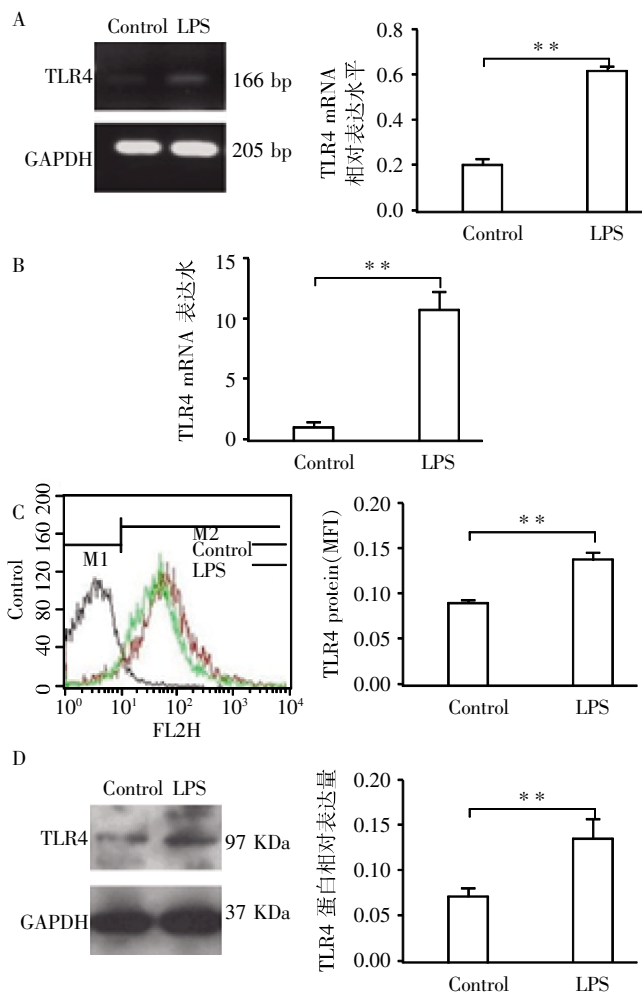
采用 GraphPad Prism software 进行统计分析,计数以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。各指标间的比较

采用 *t* 检验或 ANOVA 检验,  $P \leq 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 LPS 对 MCF-7 细胞株 TLR4 基因表达的影响

RT-PCR 检测结果显示,人乳腺癌细胞株 MCF-7 表达 TLR4; LPS 刺激后,TLR4 mRNA 水平表达增多(图 1A); real-time PCR 定量检测显示,经 LPS 刺激后, MCF-7 细胞株 TLR4 mRNA 表达升高  $10.51 \pm 1.73$  倍 ( $P < 0.01$ , 图 1B)。在蛋白表达水平, FCS 检测结果显示,经 LPS 刺激后, TLR4 蛋白表达峰明显右移,平均荧光强度(MFI)明显增高,细胞表面 TLR4 蛋白表达升高 ( $P < 0.01$ , 图 1C)。Western blot 检测 TLR4 蛋白表达明显增多(图 1D)。



A: RT-PCR 检测,  $**P < 0.01$ ; B: real-time PCR 定量检测,  $**P < 0.01$ ; C: FCS 检测,  $**P < 0.01$ ; D: Western blot 检测,  $**P < 0.01$ 。

图 1 LPS ( $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 刺激 MCF-7 细胞株 48 h 后 TLR4 的表达

Figure 1 Expression of TLR4 in MCF-7 after stimulation with LPS ( $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 48 h

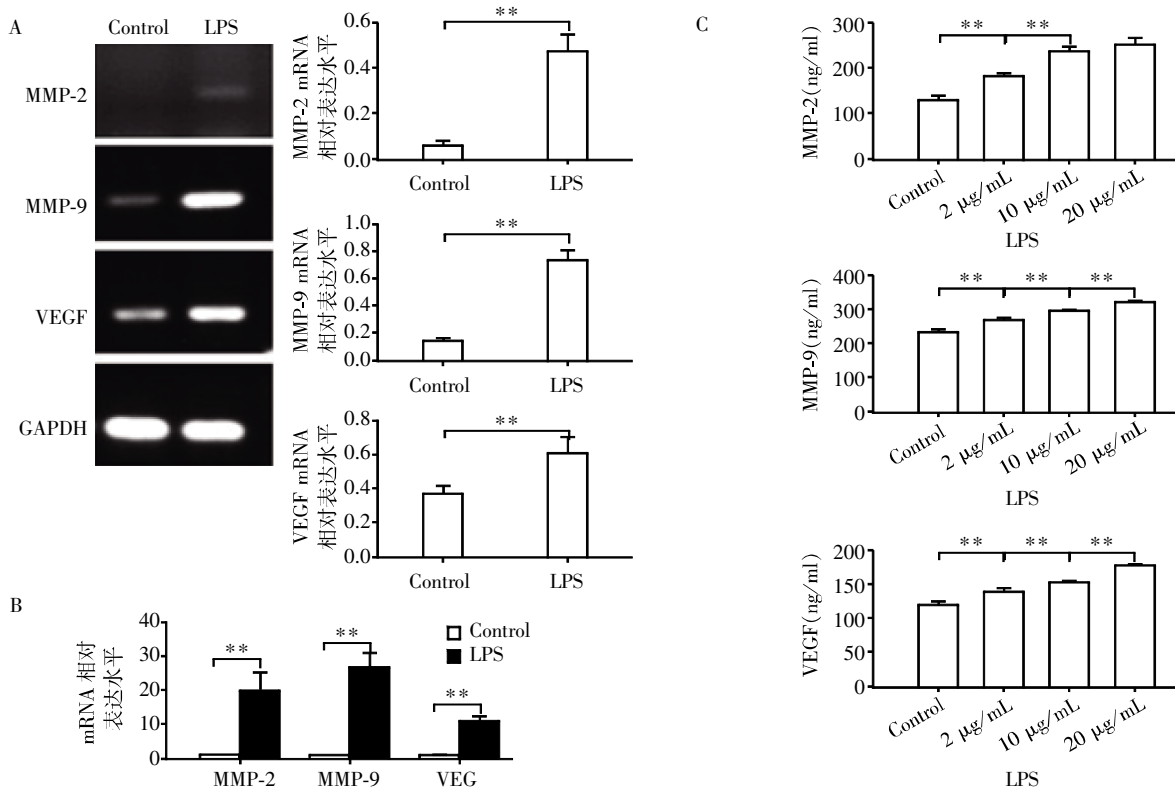
### 2.2 LPS 对 MCF-7 细胞株转移相关基因 MMP-2、MMP-9、VEGF 表达的影响

RT-PCR 检测显示, LPS 刺激后, 肿瘤转移相关基因 MMP-2、MMP-9 和 VEGF 的 mRNA 表达明显增加(图 2A)。real-time PCR 检测显示: LPS 刺激后, MMP-2 mRNA 表达升高  $20.00 \pm 4.92$  倍 ( $P < 0.01$ ), MMP-9 mRNA 表达升高  $26.48 \pm 5.03$  倍 ( $P < 0.01$ ) 和 VEGF mRNA 表达升高  $11.84 \pm 0.80$  倍 ( $P < 0.01$ , 图 2B); ELISA 检测显示, 培养上清 MMP-2、MMP-9 和 VEGF 产量在一定 LPS 浓度范围内随

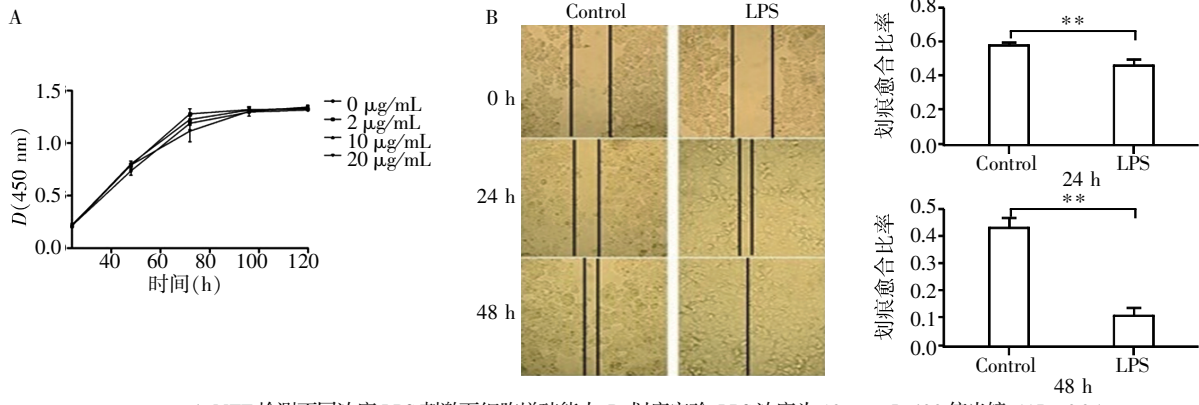
刺激浓度增加而增加 ( $P < 0.01$ ), 刺激浓度达到  $20 \mu\text{g}/\text{mL}$  时, 与  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  相比 MMP-2 的表达增加已无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 图 2C)。

### 2.3 LPS 对 MCF-7 细胞株的增殖及体外划痕愈合能力的影响

MTT 检测结果显示, 不同浓度的 LPS 刺激, 细胞的增殖没有明显的变化(图 3A)。划痕实验显示, 经 LPS 刺激后, 细胞划痕愈合速度明显提高, 且细胞生长形态变化明显, 贴壁生长状态更为明显(图 3B)。



A: RT-PCR 检测, \*\* $P < 0.01$ ; B: real-time PCR 检测, \*\* $P < 0.01$ ; C: ELISA 检测, \*\* $P < 0.01$ 。  
图 2 LPS (2 μg/mL) 刺激对肿瘤转移相关基因 MMP-2、MMP-9、VEGF 表达的影响  
Figure 2 LPS (2 μg/mL) up-regulated MMP-2, MMP-9 and VEGF production by MCF-7

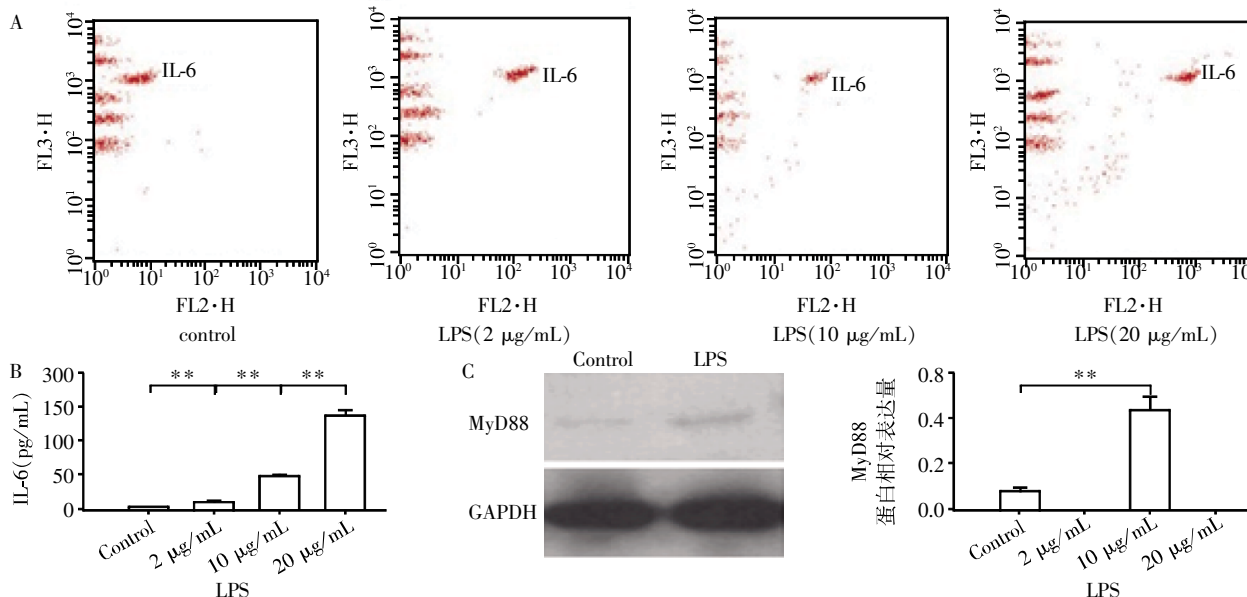


A: MTT 检测不同浓度 LPS 刺激下细胞增殖能力; B: 划痕实验, LPS 浓度为  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ , 400 倍光镜, \*\* $P < 0.05$ 。  
图 3 MTT 实验和划痕愈合实验  
Figure 3 MTT assay and Wound-healing assay

### 2.4 LPS 对 MCF-7 细胞株 MyD88 表达及细胞因子分泌的影响

CBA 流式检测显示,细胞培养上清检测到 IL-6,

且产量随 LPS 刺激浓度增加而增加( $P < 0.01$ ,图 4A、B)。Western blot 检测显示,LPS 能明显的增强 MyD88 的表达(图 4C)。



A:流式检测细胞因子典型图片;B:IL-6 定量分析,\*\* $P < 0.01$ ;C: Western blot 检测 MyD88,\*\* $P < 0.01$ 。

图 4 LPS 增强 IL-6 及 MyD88 的表达

Figure 4 LPS promotes MyD88 and IL-6 production

### 3 讨论

虽然乳腺癌的治疗技术进步较大,但有效控制癌转移仍是一个难题。西方国家中,乳腺癌已成为女性最常见的恶性肿瘤,有高达 90%的死亡患者发生癌细胞远处转移,最常见的转移部位是肺、骨和肝脏<sup>[2]</sup>。在亚洲国家,100 000 人中有 9.5 位女性因乳腺癌死亡,在中国为 3.4~5.7<sup>[3]</sup>。因此,对乳腺癌转移机制的探讨有重大意义。

TLRs 属于白介素-1 受体(IL-1R)超家族,为 I 型跨膜蛋白受体,介导下游反应存在 2 条信号通路,即 MyD88 依赖性通路和 MyD88 非依赖性通路<sup>[4]</sup>。TLRs 不仅在免疫细胞上表达,在小鼠和人肿瘤细胞上也广泛表达。许多研究表明,TLRs 能促进肿瘤的进展<sup>[5-7]</sup>。

本研究表明,TLR4 和 MyD88 在人乳腺癌肿瘤细胞株 MCF-7 中均有表达,且经 LPS 刺激后,两者表达均上调。

侵袭穿透基膜是癌细胞从原发位置游离并远处转移的关键步骤<sup>[8]</sup>。本研究中,划痕修复实验显示,LPS 刺激使 MCF-7 细胞的划痕愈合速度明显提高,且显微镜下观察细胞的贴壁生长状态更为明显。

许多研究表明,癌细胞上 MMP-2 和 MMP-9 的

高表达,以及细胞因子自分泌的增加都会影响癌细胞黏附功能及侵袭能力<sup>[9-10]</sup>。另外,VEGF 和 MMP-9 被认为是癌细胞黏附和侵袭不可缺少的细胞因子<sup>[11]</sup>。本研究显示,LPS 激活 TLR4 后,MMP-2、MMP-9 和 VEGF 的产量增多,且在一定范围内随 LPS 浓度的增加而增多。炎症反应与肿瘤转移能力的联系已被确认<sup>[12]</sup>。慢性感染和炎症是肿瘤形成和进展最重要的后天和环境因素<sup>[13]</sup>。IL-6 不仅能促进乳腺癌的进展及渗出<sup>[14-15]</sup>,还可使对肿瘤的免疫反应识别发生偏移,导致肿瘤对免疫反应产生耐受<sup>[16]</sup>。本研究显示,LPS 刺激能增加 MCF-7 细胞培养上清中 IL-6 的产量,且在一定范围内随 LPS 浓度的增加而增多。有研究表明,LPS 预处理 TLR4 阳性/MyD88 阳性套细胞淋巴瘤细胞后,IL-10 和 VEGF 分泌增多,抑制了 T 细胞的增殖和细胞毒性,导致套细胞淋巴瘤细胞增殖和免疫逃避<sup>[17]</sup>。结合本研究中 MyD88 表达上调的结果,可以推断,TLR4/ MyD88 传导通路有助于 MCF-7 细胞株通过自分泌细胞因子增强侵袭活力。提示 TLR4/ MyD88 传导通路可能是 TLR4 介导乳腺癌细胞转移的重要分子机制。

此外,MTT 结果显示,LPS 刺激对 MCF-7 细胞的增殖没有明显影响。说明 LPS 对 MCF-7 细胞侵袭力的作用可能不是通过增强细胞增殖能力实现的。

综上所述,本研究证实 LPS 刺激 TLR4 能显著增强 MCF-7 细胞株的侵袭能力,TLR4 在人乳腺癌的转移过程中可能发挥重要的作用,TLR4/MyD88 通路可能成为乳腺癌抗转移治疗的新突破点。

#### [参考文献]

- [1] Yang H,Zhou H,Feng P,et al. Reduced expression of Toll-like receptor 4 inhibits human breast cancer cells proliferation and inflammatory cytokines secretion [J]. *Exp Clin Cancer Res*,2010,29:92
- [2] Steeg PS. Tumor metastasis;mechanistic insights and clinical challenges[J]. *Nat Med*,2006,12:895-904
- [3] Binns C,Low W,Lee MK. Breast cancer;an increasing public health problem in the Asia pacific region[J]. *Asia-Pac J Public Health*,2013,25:364-367
- [4] Hoshino K,Kaisho T,Iwabe T,et al. Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation [J]. *Int Immunol*,2002,14 (10): 1225-1231
- [5] Rakoff-Nahoum S;Medzhitov R. Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88[J]. *Science*,2007,317:124-127
- [6] Naugler WE,Sakurai T,Kim S,et al. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production[J]. *Science*,2007,317:121-124
- [7] Liao SJ,Zhou YH,Yuan Y,et al. Triggering of Toll-like receptor 4 on metastatic breast cancer cells promotes avb3-mediated adhesion and invasive migration [J]. *Breast Cancer Res Treat*,2012,133:853-863
- [8] Pantel K,Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade[J]. *Nat Rev Cancer*,2004,4:448-456
- [9] Wang G,Wang W,Zhou J,et al. Correlation between telomerase activity and matrix metalloproteinases 2 expression in gastric cancer[J]. *Cancer Biomark*,2013,13: 21-28
- [10] Di Domenico M,Ricciardi C,Fusco A,et al. Anti-VEGF therapy in breast and lung mouse models of cancers[J]. *Biomed Biotechnol*,2011,2011:928-947
- [11] Kim SH,Cho NH,Kim K,et al. Correlations of oral tongue cancer invasion with matrix metalloproteinases (MMPs)and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression[J]. *Surg Oncol*,2006,93:330-337
- [12] Mirnezami A,Mirnezami R,Chandrakumaran K,et al. Increased local recurrence and reduced survival from colorectal cancer following anastomotic leak;systematic review and meta-analysis [J]. *Ann Surg*,2011,253:890-899
- [13] Beachy PA,Karhadkar SS,Berman DM. Mending and malignancy[J]. *Nature*,2004,431:402
- [14] Schafer ZT,Brugge JS. IL-6 involvement in epithelial cancers[J]. *Clin Invest*,2007,117:3660-3663
- [15] Sansone P,Storci G,Tavolari S,et al. IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland [J]. *Clin Invest*, 2007,117:3988-4002
- [16] Wang S,Yang J,Qian J,et al. Tumor evasion of the immune system;inhibiting p38 MAPK signaling restores the function of dendritic cells in multiple myeloma [J]. *Blood*,2006,107:2432-2439
- [17] Wang L,Zhao Y,Qian J,et al. Toll-like receptor-4 signaling in mantle cell lymphoma [J]. *Cancer*,2012,119: 782-791

[收稿日期] 2016-01-13

本刊邮发代号 28-61

网址: <http://jnmn.njmu.edu.cn>