

PBMC 中 TLR1、TLR2、TLR6 在卵巢癌微环境中的作用研究*

徐娟¹, 娄鉴芳^{2,3}, 史新惠², 柯星², 张淑平², 吴梦², 孙瑞红^{2,3}, 黄蕾^{2,3}, 王芳^{2,3△}

(1. 江苏省泰州市人民医院检验科, 江苏泰州 225300; 2. 南京医科大学第一附属医院检验学部, 江苏南京 210029; 3. 国家临床检验重点专科建设单位, 江苏南京 210029)

摘要:目的 观察卵巢癌患者外周血单个核细胞(PBMC)与卵巢癌细胞共生长环境中, PBMC 中 Toll 样受体(TLR)信号通路活化情况及前炎症细胞因子表达水平, 研究 TLR1、TLR2 及 TLR6 在卵巢癌发生发展中的可能机制。方法 采用密度梯度离心法分离 PBMC, 利用 PBMC 和卵巢癌细胞系 SK-OV-3 共培养体系及抗 TLR1、TLR2、TLR6 抗体中和实验, RT-PCR 法检测细胞中前炎症细胞因子白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、IL-8, 肿瘤坏死因子(TNF)- α mRNA 表达水平; 利用免疫印迹试验检测 MyD88、TRAF6、TANK、核因子(NF)- κ B 和 P-NF- κ B 的表达水平。结果 卵巢癌患者 PBMC+SK-OV-3 Transwell 共培养组较 PBMC 单独培养组, TLR 信号通路蛋白 MyD88、TRAF6、TANK 及 P-NF- κ B 表达上调, IL-1 β 、IL-6 及 IL-8 前炎症细胞因子的 mRNA 表达水平明显增加(Fold=1.74, Fold=1.92, Fold=1.65, $P<0.05$), 而 TNF- α mRNA 表达水平无明显改变; 与 PBMC 单独培养组比较, 良性疾病患者及健康对照者 IL-1 β mRNA 表达水平明显下调(Fold=0.71, $P<0.05$; Fold=0.72, $P<0.05$), TNF- α 、IL-6、IL-8 mRNA 及 TLR 信号通路蛋白 MyD88、TRAF6、TANK 及 P-NF- κ B 均无明显改变。抗体中和实验显示, 卵巢癌患者 PBMC+SK-OV-3+Anti-hTLR1-IgG Transwell 共培养组、PBMC+SK-OV-3+Anti-hTLR2-IgG Transwell 共培养组、PBMC+SK-OV-3+Anti-hTLR6-IgG Transwell 共培养组中前炎症细胞因子 IL-1 β (Fold=0.16, Fold=0.31, Fold=0.29, $P<0.05$)、IL-6(Fold=0.14, Fold=0.20, Fold=0.28, $P<0.05$) mRNA 表达水平较 PBMC+SK-OV-3 Transwell 共培养组明显下调。结论 卵巢癌生长微环境中, TLR1/TLR2/TLR6 介导的信号通路活化是诱导卵巢癌患者 PBMC 中前炎症细胞因子表达上调的主要途径, 在卵巢癌的发生、发展中发挥一定作用。

关键词: 卵巢癌; Toll 样受体; 外周血单个核细胞; 肿瘤微环境

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.05.007 **中图法分类号:** Q786/R734.2

文章编号:1673-4130(2018)04-0537-06 **文献标识码:** A

Effect of TLR1, TLR2, TLR6 in PBMC from patients with ovarian cancer on tumor microenvironment*

XU Juan¹, LOU Jianfang^{2,3}, Shi Xinhui², KE Xing², ZHANG Shuping²,
WU Meng², SUN Ruihong^{2,3}, HUANG Lei^{2,3}, WANG Fang^{2,3△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Jiangsu Taizhou People's Hospital, Taizhou, Jiangsu 225300, China; 2. Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China; 3. Key Laboratory for Laboratory Medicine of Jiangsu Province of China, Nanjing, Jiangsu 210029, China)

Abstract: Objective To explore the pathogenesis of ovarian cancer by investigating the function of Toll-like receptor 1 (TLR1), TLR2 and TLR6 in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) from patients with ovarian cancer. **Methods** PBMC, SK-OV-3 co-culture system and anti-TLR1, anti-TLR2, anti-TLR6 mAb blocking experiment were used to explore the relationship between TLR1, TLR2 or TLR6 signaling and inflammation in ovarian cancer. Quantitative real-time PCR was used to measure interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8, and tumor necrosis factor (TNF)- α in the PBMC. MyD88, TRAF6, TANK, NF- κ B and P-NF- κ B were observed by Western blotting. **Results** In the PBMC and SK-OV-3 coculture system, we found the activation of TLR sig-

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81371894, 81272324); 国家临床检验重点专科建设项目基金资助; 江苏高校优势学科建设工程基金项目资助课题; 江苏省实验诊断学重点实验室基金项目(XK201114); 2017 年泰州市科技支撑计划(社会发展)项目(SSF20170218); 南通大学校级自然科学类科研基金项目(16ZY36); 泰州市人民医院院级课题(ZL201613)。

作者简介: 徐娟, 女, 主管技师, 主要从事肿瘤免疫及分子诊断研究。△ 通信作者, E-mail: shywf74@sina.com。

本文引用格式: 徐娟, 娄鉴芳, 史新惠, 等. PBMC 中 TLR1、TLR2、TLR6 在卵巢癌微环境中的作用研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(5): 537-542.

naling pathways, including significantly increased MyD88, TRAF6, TANK and P-NF- κ B levels following cocultured with SK-OV-3 in PBMC from ovarian cancer patients. PBMC derived from ovarian cancer patients led to a increase in IL-1 β , IL-6 and IL-8 mRNA levels after 24 hours of co-incubation with SK-OV-3 (Fold=1.74, Fold=1.92, Fold=1.65, $P < 0.05$), though there was no difference of TNF- α mRNA expression. In contrast to the ovarian cancer patients, coculture of PBMC derived from benign diseases controls and healthy normal controls decreased IL-1 β at the mRNA level (Fold=0.71, $P < 0.05$; Fold=0.72, $P < 0.05$), furthermore the expression of MyD88, TRAF6, TANK, P-NF- κ B, and NF- κ B showed no changes. PBMC which treated with anti-TLR1, anti-TLR2 or -TLR6 mAb could inhibit inflammatory IL-1 β (Fold=0.16, Fold=0.31, Fold=0.29, $P < 0.05$) and IL-6 (Fold=0.14, Fold=0.20, Fold=0.28, $P < 0.05$). **Conclusion** TLR1/TLR2/TLR6 in PBMC of ovarian cancer patients participate in the recognition of the factors.

Key words: ovarian cancer; Toll like receptor; peripheral blood mononuclear cell; tumor microenvironment

肿瘤微环境是肿瘤细胞诱导的,肿瘤周围存在的大量生长因子、趋化因子及基质降解酶等的综合体系^[1-2]。肿瘤微环境中大量的生长因子、蛋白水解酶及免疫炎症反应共同作用于肿瘤细胞表面,对肿瘤细胞的增殖、转移、分化等产生重要影响^[3]。肿瘤微环境中的免疫炎症反应可诱导多种细胞因子和细胞毒介导物的分泌,其不仅促进早期细胞病变,还可加速肿瘤细胞的浸润与转移^[4]。肿瘤微环境中的细胞因子多为抑制性细胞因子,如肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-6等,能激活相关信号通路,诱导其他炎症因子分泌,募集巨噬细胞及树突状细胞浸润肿瘤^[5],大量浸润的白细胞分泌细胞因子促进肿瘤微环境中血管形成,血管形成则可提供足够的营养物质,对肿瘤的生长与转移起促进作用。目前,肿瘤微环境与卵巢癌之间的关系已经越来越受到重视,已有研究发现,在体外将巨噬细胞与卵巢癌细胞 SK-OV-3 共培养后,巨噬细胞能提高卵巢癌细胞 SK-OV-3 中 TNF- α 的表达;在肿瘤细胞产生的集落刺激因子的诱导下,巨噬细胞合成表皮生长因子(EGF),促进卵巢癌细胞 SK-OV-3 迁移及侵袭^[6]。本课题组前期研究已表明卵巢癌患者外周血单个核细胞(PBMC)中 Toll 样受体(TLR)1、TLR2、TLR6 高表达,其在相应配体刺激下,前炎症细胞因子 IL-1 β 、IL-6 mRNA 表达水平明显增高,提示卵巢癌患者免疫细胞上高表达的 TLR 可能在卵巢癌的发生发展中发挥作用^[7],但其具体的功能及其作用机制尚需继续研究。本研究采用 Transwell 共培养体系体外模拟 PBMC 与卵巢癌细胞共生长环境,结合 TLR1、TLR2、TLR6 抗体中和实验,初步探索卵巢癌患者 PBMC 中高表达 TLR1、TLR2、TLR6 的功能及其作用机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012 年 4 月至 2013 年 2 月在南京医科大学第一附属医院河西分院就医的卵巢癌患者 8 例纳入卵巢癌组,平均年龄(55 \pm 11)岁;妇科良性疾病患者(子宫肌瘤)7 例纳入良性疾病组,平均年龄(53 \pm 12)岁;同期在本院体检健康的成年女性 8

例纳入健康对照组,平均年龄(51 \pm 10)岁。各组采集乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝外周血 10 mL。

1.2 仪器与试剂 ABI7500 荧光定量 PCR 仪,电泳系统及电泳转移槽购自美国 BIO-RAD 公司,凝胶成像系统购自美国 Koradk 公司。Anti-hTLR1-IgG、Anti-hTLR2-IgG、Anti-hTLR6-IgG 均购自美国 InvivoGen 公司,兔抗人-MyD88、兔抗人-P-核因子(NF)- κ B、兔抗人-NF- κ B、兔抗人-TRAF6 均购自美国 Cell Signaling 公司、鼠抗人-TANK 购自美国 Santa Cruz 公司。

1.3 方法

1.3.1 PBMC 的分离 Ficoll 淋巴细胞分离液(天津灏洋)密度梯度离心法分离 PBMC。

1.3.2 PBMC 与 SK-OV-3 共培养 组别设置:(1) PBMC 单独培养组;(2) PBMC+SK-OV-3 Transwell 共培养组。取对数生长期 SK-OV-3 细胞,以 0.25% 胰酶消化后,用含 10% 人 AB 血清、100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养液将细胞稀释成单细胞悬液,取 1×10^5 个细胞至 6 孔细胞培养板外室,轻摇培养板,使细胞分布均匀,外室液体终体积为 2.5 mL;用含 10% 人 AB 血清、100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养液洗涤重悬 PBMC,取 5×10^5 个细胞接种于 Transwell 培养内室,内室液体终体积为 500 μ L。同时设 PBMC 单独培养组为对照,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。收集 Transwell 内室细胞至 10 mL 玻璃离心管,1 000 r/min 离心 7 min,弃液;加适量磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞 2 次,每次 1 000 r/min 离心 7 min,弃液;—70 $^{\circ}$ C 冻存细胞。

1.3.3 TLR1、TLR2、TLR6 单克隆抗体中和实验 组别设置:(1) PBMC+SK-OV-3 Transwell 共培养组;(2) PBMC+SK-OV-3+Anti-hTLR1-IgG Transwell 共培养组;(3) PBMC+SK-OV-3+Anti-hTLR2-IgG Transwell 共培养组;(4) PBMC+SK-OV-3+Anti-hTLR6-IgG Transwell 共培养组。 5×10^5 的 PBMC 预先用 Anti-hTLR1-IgG(10 μ g/mL)、

Anti-hTLR2-IgG (10 μg/mL)、Anti-hTLR6-IgG (10 μg/mL) 抗体于 37 °C、5%CO₂ 培养箱孵育 1 h;按相应组别加入 SK-OV-3 细胞,37 °C 5%CO₂ 培养箱孵育 24 h,收集各组细胞后 1 000 r/min 离心 7 min,弃液,细胞团-70 °C 冻存待进行下一步实验。

1.3.4 RT-PCR miRNeasy Mini Kit(Qiagen 公司,美国)提取 RNA,PrimeScriptRT reagent Kit (TaKaRa 公司,日本)逆转录合成 cDNA,以 SYBR Premix

Ex Taq™ II 为荧光染料,β-actin 基因为内参照,进行前炎症细胞因子 IL-1β、IL-6、IL-8、TNF-α RT-PCR 检测(ABI 7500 型)。PCR 反应体系:2 μL cDNA,10 μL SYBR II,上下游引物各 1 μL,6 μL 去离子水;扩增程序如下:预变性 95 °C 30 s,1 个循环;95 °C 5 s,45 个循环,64 °C 延伸 34 s。本研究所涉及 PCR 引物序列见表 1。

表 1 前炎症细胞因子 IL-1β、IL-6、IL-8 及 TNF-α mRNA 检测中引物序列

引物名称	引物序列	引物长度(bp)	产物大小(bp)
IL-1β			
上游	CAC GAT GCA CCT GTA CGA TCA	21	120
下游	GTT GCT CCA TAT CCT GTC CCT	21	
IL-6			
上游	AAC CTG AAC CTT CCA AAG ATG G	22	865
下游	TCT GGC TTG TTC CTC ACT ACT	21	
IL-8			
上游	GCC TTC CTG ATT TCT GCA GCT	21	868
下游	TGC ACT GAC ATC TAA GTT CTT TAG CAC	27	
TNF-α			
上游	ATG AGC ACT GAA AGC ATG ATC C	22	822
下游	GAG GGC TGA TTA GAG AGA GGT C	22	
β-actin			
上游	TGG CAC CCA GCA CAA TGA A	19	186
下游	CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC A	25	

1.3.5 免疫印迹法检测 TLR 信号通路蛋白的表达 采用免疫印迹法检测 MyD88、TRAF6、TANK、NF-κB、P-NF-κB 等 TLR 信号通路蛋白的表达,冰浴裂解 PBMC,BCA 法测定蛋白质浓度,12%聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜、封闭、一抗、二抗孵育后检测相应蛋白表达量,详细操作参阅课题组前期文章^[8]。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件分析。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 卵巢癌生长微环境刺激 PBMC 中前炎症细胞因子表达上调 卵巢癌患者 PBMC+SK-OV-3 Transwell 共培养组 IL-1β、IL-6、IL-8 mRNA 表达水平明显高于 PBMC 单独培养组(Fold=1.74,Fold=1.92,Fold=1.65),差异有统计学意义($P < 0.05$),TNF-α mRNA 表达水平无明显性改变;而妇科良性疾病患者和健康对照者 PBMC+SK-OV-3 Transwell 共培养组较 PBMC 单独培养组,IL-1β mRNA 表达水平明显下调(Fold=0.71, $P < 0.05$;Fold=0.72, $P < 0.05$),

而 IL-6、IL-8 及 TNF-α mRNA 表达水平无明显改变,见表 2~4。扩增曲线和熔解曲线,见图 1、2。

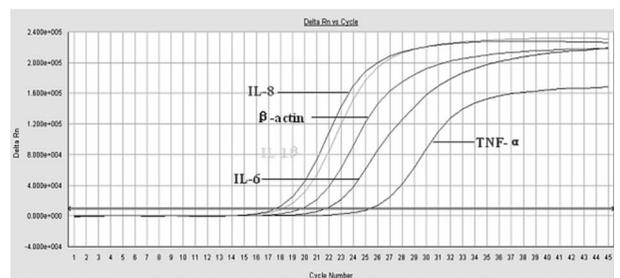


图 1 IL-1β、IL-6、IL-8、TNF-α 表达水平 S 型扩增曲线

2.2 卵巢癌生长微环境刺激 PBMC 中 TLR 信号通路活化 与 PBMC 单独培养组相比,卵巢癌患者 PBMC+SK-OV-3 Transwell 共培养组 TLR 信号通路蛋白 MyD88、TRAF6、TANK、P-NF-κB 表达量增加,见图 3;妇科良性疾病组和健康对照组 MyD88、TRAF6、TANK、P-NF-κB 表达量未见明显改变;卵巢癌患者 PBMC+SK-OV-3 Transwell 共培养组、妇科良性疾病 PBMC+SK-OV-3 Transwell 共培养组、健康对照 PBMC+SK-OV-3 Transwell 共培养组 NF-

κB 表达量均无明显改变。

2.3 TLR 信号通路活化介导卵巢癌生长微环境刺激 PBMC 中前炎症细胞因子表达上调 anti-TLR1、anti-TLR2、anti-TLR6 抗体预处理 PBMC 后, 卵巢癌患者 IL-1β mRNA 表达水平较 PBMC+SK-OV-3 Transwell 共培养组明显降低 (Fold=0.16, P<0.05; Fold=0.31, P<0.05; Fold=0.29, P<0.05)。IL-6 mRNA 表达水平具有相同变化趋势, 即加入 anti-TLR1、anti-TLR2、anti-TLR6 抗体组的 IL-6 mRNA 表达水平较 PBMC+SK-OV-3 Transwell 共培养组明显下调 (Fold=0.14, P<0.05; Fold=0.20, P<0.05; Fold=0.28, P<0.05), 见表 5。IL-8、TNF-α mRNA 表达水平在 PBMC+SK-OV-3 Transwell 共培养组、PBMC+SK-OV-3+Anti-hTLR1-IgG Transwell 共培养组、PBMC+SK-OV-3+Anti-hTLR2-IgG Transwell 共培养组、PBMC+SK-OV-3+Anti-

hTLR6-IgG Transwell 共培养组间无明显差异。PBMC+SK-OV-3+Anti-hTLR1-IgG Transwell 共培养组、PBMC+SK-OV-3+Anti-hTLR2-IgG Transwell 共培养组、PBMC+SK-OV-3+Anti-hTLR6-IgG Transwell 共培养组 TLR 信号通路蛋白 MyD88 TRAF6、TANK、NF-κB、P-NF-κB 表达水平亦低于 PBMC+SK-OV-3 Transwell 共培养组, 见图 4。

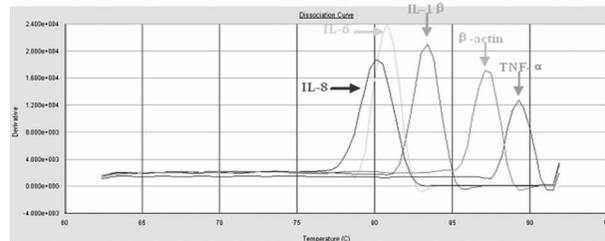


图 2 IL-1β、IL-6、IL-8、TNF-α mRNA 表达水平熔解曲线

表 2 Transwell 共培养体系卵巢癌组各项指标 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s, \Delta Ct$)

组别	n	IL-1β	IL-6	IL-8	TNF-α
PBMC 单独培养组	5	-1.36±0.98	1.39±0.99	-1.99±1.22	9.44±3.92
PBMC+SK-OV-3 Transwell 共培养组	5	-2.10±1.17	0.58±0.49	-2.68±1.15	7.54±2.00
t		-4.909	-3.14	-3.922	-1.143
P		0.002	0.012	0.017	0.297

表 3 Transwell 共培养体系良性疾病组各项指标 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s, \Delta Ct$)

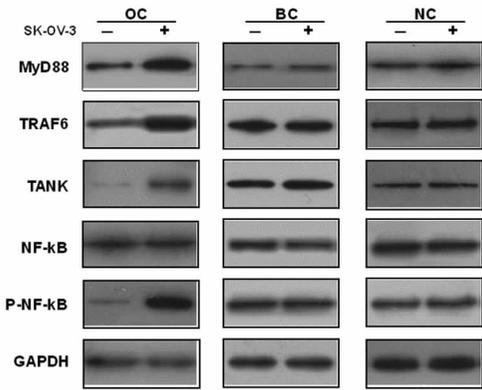
组别	n	IL-1β	IL-6	IL-8	TNF-α
PBMC 单独培养组	5	-0.51±1.30	2.80±1.31	-0.96±0.96	6.89±1.22
PBMC+SK-OV-3 Transwell 共培养组	5	0.05±1.63	3.52±1.96	-0.63±1.08	7.12±1.33
t		2.865	1.726	2.454	0.952
P		0.029	0.135	0.050	0.378

表 4 Transwell 共培养体系健康对照组各项指标 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s, \Delta Ct$)

组别	n	IL-1β	IL-6	IL-8	TNF-α
PBMC 单独培养组	5	1.08±1.30	4.29±2.66	0.16±1.37	7.14±2.00
PBMC+SK-OV-3 Transwell 共培养组	5	1.72±1.28	4.80±2.14	0.30±1.21	7.45±1.69
t		2.664	1.441	0.931	0.822
P		0.032	0.193	0.383	0.438

表 5 抗体中和实验中卵巢癌患者 PBMC 中各项指标 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s, \Delta Ct$)

组别	n	IL-1β	IL-6	IL-8	TNF-α
PBMC+SK-OV-3 Transwell 共培养组	5	0.06±0.96	3.18±0.78	-1.05±1.33	6.65±1.05
PBMC+SK-OV-3+Anti-hTLR1-IgG Transwell 共培养组	5	2.92±0.42	6.90±1.32	1.15±1.44	7.86±0.90
PBMC+SK-OV-3+Anti-hTLR2-IgG Transwell 共培养组	5	2.33±1.18	6.18±1.58	0.27±1.14	7.07±1.43
PBMC+SK-OV-3+Anti-hTLR6-IgG Transwell 共培养组	5	1.97±0.85	5.31±0.90	0.03±2.19	6.83±1.85
F		6.885	6.688	1.645	1.034
P		0.003	0.004	0.219	0.404



注:OC 为卵巢癌组,BC 为良性疾病组,NC 为健康对照组

图 3 免疫印迹试验检测 Transwell 共培养体系各组 TLR 信号通路蛋白的表达水平

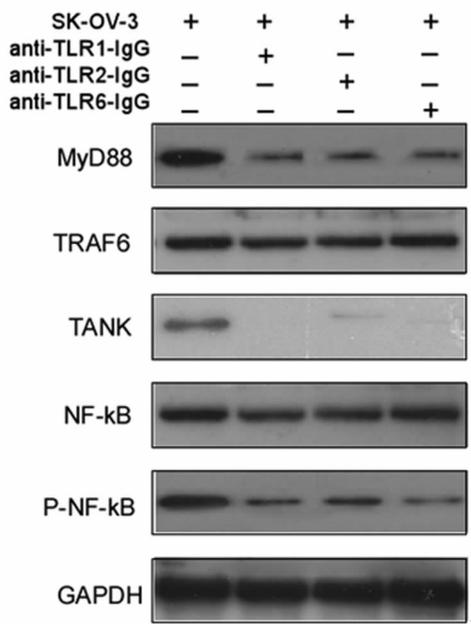


图 4 免疫印迹试验检测抗体中和实验中 TLR 信号通路蛋白的表达水平

3 讨 论

肿瘤炎症微环境、TLR、肿瘤的发生发展三者间的关系已受到越来越多的关注^[9-11]。KIM 等^[12]发现肿瘤细胞分泌的物质可作为 TLR 的天然配体,活化肿瘤浸润巨噬细胞上 TLR,诱导其分泌相关炎症细胞因子,促进肺癌的转移。

本研究利用 PBMC 与 SK-OV-3 Transwell 共培养体系,模拟 PBMC 与卵巢癌细胞共生长的体外微环境,对 PBMC 中前炎症细胞因子表达水平及 TLR 信号通路蛋白表达水平进行检测,并通过 TLR1、TLR2、TLR6 抗体中和实验初步探讨 TLR1、TLR2、TLR6 的功能及其作用机制。

采用 RT-PCR 分析卵巢癌患者、妇科良性疾病患者、健康对照者 PBMC 单独培养组及 PBMC+SK-OV-3 Transwell 共培养组中 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α mRNA 水平,发现卵巢癌患者 PBMC+SK-OV-3 Transwell 共培养组 IL-1 β 、IL-6、IL-8 mRNA 表达水平

明显高于 PBMC 单独培养组,TNF- α 则无明显性改变;良性疾病患者和健康对照者 PBMC+SK-OV-3 Transwell 共培养组 IL-1 β mRNA 表达水平较 PBMC 单独培养组明显降低;而妇科良性患者和健康对照者 PBMC 单独培养组与 PBMC+SK-OV-3 Transwell 共培养组 IL-6、IL-8、TNF- α mRNA 表达水平无明显性改变。IL-1 β 、IL-6、IL-8 作为前炎症细胞因子,在肿瘤微环境中对肿瘤细胞的增殖和存活具有至关重要的作用^[13-14]。

TLR 作为固有免疫系统识别病原相关分子模式(PAMP)的主要受体,需通过一系列接头蛋白介导信号转导,MyD88 是 TLR 信号通路中最重要的接头蛋白,多数 TLR 均可通过 MyD88 激活 TRAF6,TRAF6 被磷酸纤维素化后,诱导 TAK1 激活下游的 NF- κ B 信号通路,诱导前炎症细胞因子如 IL-1、IL-6、TNF- α 等基因的表达^[15-16]。研究表明 IL-1 β 的过量表达与慢性炎症、肿瘤的进展相关,其还可抑制抗肿瘤免疫,另外通过参与血管生成也可促进肿瘤形成^[17-19]。研究已证实 IL-6 可促进卵巢癌细胞增殖、侵袭、转移^[20]。但卵巢癌患者前炎症细胞因子的过量表达是否是 TLR 激活的结果尚未被探讨。

本研究利用免疫印迹试验检测了 PBMC 单独培养组及 PBMC+SK-OV-3 Transwell 共培养组 PBMC 中 MyD88、TRAF6、TANK、NF- κ B 及 P-NF- κ B 的蛋白表达水平,发现卵巢癌患者 PBMC+SK-OV-3 Transwell 共培养组 MyD88、TRAF6、TANK 及 P-NF- κ B 的表达水平较 PBMC 单独培养组明显增加,提示 SK-OV-3 生长环境中的存在某种小分子物质可活化 TLR 信号通路,促进相关炎症细胞因子表达上调。

卵巢癌患者 PBMC 中高表达的 TLR1、TLR2、TLR6 到底发挥什么作用? 这些小分子物质是否通过 TLR1/TLR2/TLR6 发挥作用仍需进一步探讨。通过抗体中和实验发现,TLR1/TLR2/TLR6 被中和后,卵巢癌患者 PBMC 中 IL-1 β 、IL-6 mRNA 表达水平较未加抗体组明显降低;MyD88、TRAF6、TANK、NF- κ B 及 P-NF- κ B 等 TLR 信号通路蛋白表达量亦明显低于未加抗体组。结果提示在卵巢癌生长微环境中,TLR1/TLR2/TLR6 介导的信号通路活化是诱导卵巢癌患者 PBMC 中前炎症细胞因子表达上调的主要途径,卵巢癌细胞生长环境中存在某种小分子物质通过作用于卵巢癌患者 PBMC 中高表达的 TLR1/TLR2/TLR6,活化 TLR 信号通路,诱导 IL-1 β 、IL-6 mRNA 表达水平上调,促进卵巢癌炎症微环境的形成和维持。在此实验中 IL-8 表达水平未发生改变,可能与没有同时阻断 TLR1/TLR2/TLR6 途径有关,也可能存在其他 TLR 信号通路在此过程中发挥一定作用,这些问题有待进一步探讨。

综上所述,卵巢癌患者 PBMC 中高表达的 TLR1、TLR2、TLR6 可能参与了卵巢癌炎症微环境的形成和维持,在卵巢癌的发生、发展中发挥一定作

用。但本研究中 SK-OV-3 细胞生长环境中所存在的作为天然 TLR 配体的小分子物质仍未知,需进一步探讨研究。

参考文献

- [1] HEDE K. Protection; studies highlight importance of tumor microenvironment[J]. *J Nat Cancer Inst*, 2004, 96(15):1120-1121.
- [2] 季芳,狄文. 肿瘤微环境影响卵巢癌生物学行为的研究进展[J]. *国际妇产科学杂志*, 2012, 39(4):352-355.
- [3] MBEUNKUI F, JOHANN D J. Cancer and the tumor microenvironment; a review of an essential relationship[J]. *Cancer Chem Pharm*, 2009, 63(4):571-582.
- [4] MANTOVANI A. Cancer: inflaming metastasis[J]. *Nature*, 2009, 457(7225):36-37.
- [5] SHANG G S, LIU L, QIN Y W. IL-6 and TNF- α promote metastasis of lung cancer by inducing epithelial-mesenchymal transition [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(6):4657-4660.
- [6] POLLARD J W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis[J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(1):71-78.
- [7] 徐娟,黄珮珺,潘世扬,等. 卵巢癌患者 TLR1、TLR2、TLR6 信号通路活化诱导 PBMC 前炎症细胞因子分泌[J]. *临床检验杂志*, 2013, 26(8):584-587.
- [8] 徐娟,潘世扬,姜鉴芳,等. 卵巢癌细胞株 SKOV3 对 THP-1 细胞 TLR 信号通路的作用[J]. *现代免疫学*, 2014, 34(1):29-35.
- [9] SEEWALDT V L. Cancer: destiny from density[J]. *Nature*, 2012, 490(7421):490-491.
- [10] RIDNOUR L A, CHENG R Y, SWITZER C H, et al. Molecular pathways: toll-like receptors in the tumor microenvironment—poor prognosis or new therapeutic opportunity[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(6):1340-1346.
- [11] BASITH S, MANAVALAN B, YOO T H, et al. Roles of

toll-like receptors in cancer: a double-edged sword for defense and offense[J]. *Arch Pharm Res*, 2012, 35(8):1297-1316.

- [12] KIM S, TAKAHASHI H, LIN W W, et al. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis[J]. *Nature*, 2009, 457(7225):102-106.
- [13] UEMATSU S, AKIRA S. Toll-like receptors and innate immunity[J]. *J Mol Med*, 2006, 84(9):712-725.
- [14] ALEXOPOULOU L, HOLT AC, MEDZHITOV R, et al. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-Kappa B by Toll-like receptor 3[J]. *Nature*, 2001, 413(6857):732-738.
- [15] O'NEILL L A. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily[J]. *Curr Top Microbiol*, 2002, 270:47-61.
- [16] HUANG Y, CAI B, XU M, et al. Gene silencing of Toll-like receptor 2 inhibits proliferation of human liver cancer cells and secretion of inflammatory cytokines[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7):e38890.
- [17] DINARELLO C A. A clinical perspective of IL-1 β as the gatekeeper of inflammation[J]. *Eur J Immunol*, 2011, 41(5):1203-1217.
- [18] ELKABETS M, RIBEIRO V S, DINARELLO C A, et al. IL-1 β regulates a novel myeloid-derived suppressor cell subset that impairs NK cell development and function[J]. *Eur J Immunol*, 2010, 40(12):3347-3357.
- [19] VORONOV E, CARMI Y, APTE R N. Role of IL-1-mediated inflammation in tumor angiogenesis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 601:265-270.
- [20] LO C W, CHEN M W, HSIAO M, et al. IL-6 trans-signaling in formation and progression of malignant ascites in ovarian cancer[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(2):424-434.

(收稿日期:2017-08-18 修回日期:2017-11-10)

(上接第 536 页)

- S, et al. Beyond the matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) biotyping workflow; in search of microorganism-specific tryptic peptides enabling discrimination of subspecies[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(14):4234-4241.
- [7] FUJIMURA Y, MIURA D. MALDI mass spectrometry imaging for visualizing in situ metabolism of endogenous metabolites and dietary phytochemicals[J]. *Metabolites*, 2014, 4(2):319-346.
- [8] 周宋元,黄颖,徐元宏. MALDI-TOF MS 技术在鉴定临床少见非发酵菌中的应用[J]. *中国现代医学杂志*, 2017, 27(9):69-73.
- [9] LUO Y, SIU G K, YEUNG A S, et al. Performance of the VITEK MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for rapid bacterial identification in two diagnostic centres in China[J]. *J*

Med Microbiol, 2015, 64(Pt 1):18-24.

- [10] 王冰,任晓庆,褚美玲,等. MALDI-TOF 质谱仪在临床常见细菌鉴定中的应用[J]. *国际检验医学杂志*, 2014, 35(16):2228-2230.
- [11] FOTHERGILLA A, KASINATHANA V, HYMANB J, et al. Rapid identification of bacteria and yeasts from positive-blood-culture bottles by using a lysis-filtration method and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrum analysis with the SARAMIS database[J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(3):805-809.
- [12] LAVERGNE R A, CHAUVIN P, VALENTIN A, et al. An extraction method of positive blood cultures for direct identification of *Candida* species by Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry[J]. *Med Mycol*, 2013, 51(6):652-656.

(收稿日期:2017-09-26 修回日期:2017-11-16)