

鼻咽癌细胞 5-8F 通过 TLR4 介导的信号通路对革兰氏阴性细菌脂多糖的反应性研究*

杨一新^{1,2)**} 杨云波^{3)**} 周 鸣²⁾ 周后德²⁾
向 波²⁾ 彭淑平²⁾ 李小玲²⁾ 沈守荣⁴⁾ 李桂源^{2)***}

⁽¹⁾广州医学院生物化学教研室, 广州 510082; ⁽²⁾中南大学肿瘤研究所, 长沙 410078;

⁽³⁾中南大学药学院, 长沙 410078; ⁽⁴⁾中南大学湘雅三医院, 长沙 410078)

摘要 鼻咽上皮细胞无时无刻不暴露和接触到共生微生物与病原微生物, 机体依靠天然防御系统和抗原识别的适应性免疫反应系统来进行自我保护. 慢性感染的重要毒力因素被认为是革兰氏阴性细菌细胞壁的主要成分脂多糖(LPS), 对 LPS 的识别与信号传导是宿主细胞抵御革兰氏阴性细菌的关键. 通过流式细胞术、RT-PCR 等研究发现, 5-8F 细胞可与 LPS 相结合并产生反应, 且其受 LPS 调节的机制是由于 5-8F 细胞中存在 LPS 受体分子如 CD14、TLR4 与 MD2 等的表达. 同时应用免疫荧光、蛋白质印迹、荧光素酶报告系统等研究发现, 5-8F 细胞可受到 LPS 的诱导而活化 TLR4 的下游信号传导通路. 5-8F 细胞在 LPS 的诱导下, 磷酸化 NF κ B p65 的表达增加, 并且使 NF κ B p65 活化迁移至核内. 研究还发现, LPS 增加 TNF- α 全长启动子活性, 同时 LPS 可使 5-8F 细胞中 TNF- α 的分泌增加, 从而介导炎症因子的释放. 因此, 5-8F 细胞可通过与 LPS 受体分子: CD14、TLR4 及 MD2 与 LPS 相结合并反应, 从而激活 TLR4 介导的 NF κ B 信号通路, 使炎症因子的释放增加, 导致鼻咽部的炎症反应诱发鼻咽癌.

关键词 脂多糖, 鼻咽癌细胞系, Toll 受体, 信号传导通路

学科分类号 R363.1, R392.1

鼻咽上皮细胞无时无刻不暴露和接触到共生微生物与病原微生物. 上皮细胞在长期的进化过程中形成了能对外来病原微生物进行识别、修饰以及传导信号的功能^[1,2]. 这些病原微生物的主要成分通常具有强大的抗原刺激能力, 可通过与细胞表面的受体相结合, 促进单核/巨噬细胞、中性粒细胞和淋巴细胞等活化并释放炎症介质, 导致炎症反应发生. 鼻咽上皮的表面通常覆盖了唾液、粘液和呼吸道分泌物等保护层, 使其避免与病原微生物直接接触. 但鼻咽上皮的保护层常常会受到众多因素的侵扰而遭到破坏. EB 病毒、呼吸道合胞病毒和外界有毒化学物质等有机会直接接触鼻咽上皮^[3], 导致鼻咽部的炎症反应, 是鼻咽癌发生发展的重要诱发因素.

脂多糖(LPS)是革兰氏阴性细菌细胞壁的主要成分, 同时也是激活巨噬细胞、中性粒细胞等的重要因素. LPS 及其介导的信号传导途径被认为是 LPS 所致疾病发生发展的重要因素^[4~6]. LPS 可与 LBP 或 sCD14 相结合, 或形成三联复合物与跨膜

Toll 受体(TLR)结合, 其中以 TLR2 及 TLR4 最为重要, 典型的信号传递的基本过程是: LPS-LBP-CD14 三联复合物吸引并激活一种接头蛋白——胚胎蛋白 MyD88, 活化的 MyD88 可结合 IL1 受体相关激酶 IRAK 和 IRAK2, 然后作用于肿瘤坏死因子受体相关因子(TRAF6)^[7,8], TRAF6 可作用于 NF κ B 诱导激酶(NIK), 最终使 I κ B 磷酸化并与 NF κ B 分离导致 NF κ B 的活化, 活化的 NF κ B 转运到胞核内启动靶基因的转录^[9].

虽然 LPS 所介导的信号传导通路在白细胞、上皮细胞及肠上皮细胞等细胞中均有报道, 但鼻咽上皮细胞是否对 LPS 也具有类似的反应及其信号传导通路如何则知之甚少. 因此, 我们在本研究中通过鼻咽癌上皮细胞 5-8F 对 LPS 的反应性研究来了解

*国家自然科学基金资助项目(30300201, 30470955, 30330560).

并列第一作者. * 通讯联系人.

Tel: 0731-4805446, Fax: 0731-4805383, E-mail: ligy@xysm.net

收稿日期: 2006-06-24, 接受日期: 2006-07-28

鼻咽上皮细胞中 LPS 所介导的信号传导通路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株与实验动物. 5-8F 细胞系是由中山大学肿瘤防治中心构建的高转移、低分化的鼻咽癌上皮细胞系, 以 RPMI1640 加 10% 的小牛血清培养. HEK293 细胞系为人胚肾上皮细胞系, 购自 ATCC, HEK293 细胞在加入 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中培养. 以上细胞均在 95% 湿度、5% CO₂、37℃ 条件下培养。

1.1.2 主要试剂. 大肠杆菌 0111:B4 LPS、FITC 标记的 LPS、Cy3 标记的羊抗鼠 / 兔二抗均购自美国 Sigma 公司, 尼龙膜由美国 Pall 公司提供, BCA 试剂盒购自美国 Pierce 公司, 荧光素酶报告系统及 β-gal 检测试剂盒由美国 Promega 公司提供. Taq 酶、DNA Marker 由大连宝生物公司提供, RPMI1640、DMEM 购自美国 GIBCO/BRL 公司, 小牛血清购自中国华美生物工程公司(SABC)公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒载体的构建. TNF-α 启动子(TNFP; -991 ~ 1) 是以 F: 5' TGGTACCAGCTCCTGGG-AGATATGGCCA 3'、R: 5' ACTCGAGGGGTGTGCCAACAACCTGCCTT 3' 为引物从人多种组织混合 DNA 为模板进行 PCR 扩增而来, 其条件为 94℃ 5 min; 94℃ 45 s, 59℃ 45 s, 72℃ 90 s, 30 个循环并 72℃ 以 10 min 结束. 将扩增产物克隆入 TA 克隆载体中并以 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切后定向克隆入 pGL3-Basic 荧光素酶报告载体中, 经酶切和测序鉴定正确后备用. NFκB-dependent 荧光素酶报告质粒是由李建建博士^[10](National Research Center and Beckman Research Institute, USA)构建, 即将包含有从 HIV 病毒中克隆的 2 个 NFκB 结合位点及启动子序列的 196 bp DNA 序列, 插入 pGL2-Basic 荧光素酶报告载体中. 其荧光素酶活性代表 NFκB 在细胞中被激活的程度。

1.2.2 LPS 结合实验.

a. 流式细胞术测定 LPS 与各类细胞的结合效率: 分别取生长状态良好、融合至 70%~80% 的实验细胞各 3 瓶, 胰酶消化并收集细胞, 调节细胞浓度至 1×10⁶/ml, PBS 洗涤, 离心, 用 FITC 标记的 LPS 于 37℃ 孵育 2 h, PBS 洗涤, 离心, 加入 10 mg/L PI, 室温处理 10 min 后, 立即流式细胞仪检测。

b. 荧光显微镜直接鉴定 LPS 与各类细胞的结合: 分别取生长状态良好的 2×10⁵ 个细胞接种到预先铺有盖玻片的 6 孔板中, 待细胞生长至 70%~80% 融合时, 弃培养基, 加入终浓度为 100 μg/L FITC 标记的 LPS, 37℃ 避光孵育 3 h, DAPI 染核, PBS 洗涤后在荧光显微镜下观察并照相记录结果。

1.2.3 RNA 的提取及 RT-PCR. 按照分子克隆进行 RNA 的提取与质量鉴定, 并用 DNase- I 消化 RNA 中痕量的 DNA, 逆转录 RNA 为 cDNA, 以下列引物进行 PCR 反应. TLR-4 F: 5' TGCGGGTTCT-ACATCAAA 3', R: 5' CCATCCGAAATTATAA-GAAAAGTC 3', 95℃ 30 s, 50℃ 45 s, 72℃ 45 s; MD-2 F: 5' GAAGCTCAGAAGCAGTATTGGGTC 3', R: 5' GGTGTTGTAGGATGACAAACTCC 3', 95℃ 30 s, 52℃ 45 s, 72℃ 45 s; GAPDH F: 5' CCACCCATGGCAAATTCATGGCA 3', R: 5' TCTAGA CGGCAGGTCAGGTCCACC 3', 在目的基因及内对照 GAPDH 的 PCR 平台期前结束 PCR. 采用下列参数进行 PCR: 94℃ 50 s; 59℃ 50 s; 72℃ 1 min; 10 个循环后加入 5 mmol/L GAPDH 上下游引物混合液 1 μl, 继续进行 25 个循环终止. 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 上样量 5 μl, 溴乙锭染色, 紫外灯下照相。

1.2.4 流式细胞术检测.

分别取生长状态良好、融合至 70%~80% 的实验细胞各 3 瓶, 胰酶消化并收集细胞, PBS 洗涤, 70% 乙醇固定. 调节细胞浓度至 1×10⁶/ml 后待用. 将固定过的细胞经 PBS 洗涤 2 次, 0.25% Triton X-100 处理 30 min, PBS 洗涤、离心, 加入 1:100 用 1% BSA 稀释的鼠抗人 CD14 4℃ 孵育过夜, 经 1% BSA 洗涤、离心, 加入标有 Cy3 羊抗鼠的 IgG 抗体 (用 1% BSA 以 1:100 稀释), 室温下避光孵育 30 min, 1% BSA 洗涤后加入含有 10 mg/L DAPI 室温处理至少 10 min 后, 立即流式细胞仪检测. 阴性对照采用同型非特异性抗体 (IgG) 替代鼠抗人的单克隆抗体, 其余处理步骤同上。

经上述处理后的细胞用 FACSsort 流式细胞仪 (Becton Dickson 公司) 进行检测. 经 488 nm 激光激发, 被标记细胞发射红色 (Cy3) 和绿色 (DAPI) 荧光, 同时分别被 FACSsort 流式细胞仪的不同透镜接收. 流式细胞仪接收的信号经 Cellquest 软件处理后可对检测细胞的荧光强度进行分析。

1.2.5 瞬时转染与荧光素酶分析. 接种 2×10⁵ 细胞于 6 孔板中, 完全培养基中细胞生长至 50%~70%

汇合期. 加入 8 μl 的脂质体于 100 μl 无血清培养基中混匀静置 15 min, 稀释 2 μg 的 DNA 于 100 μl 无血清培养基中, 混合上述脂质体与 DNA 稀释液, 室温放置 30 min; 分别用 Hanker's 液与无血清培养基洗涤细胞; 将上述混合物加入 6 孔板中, 然后再加 800 μl 无血清培养基, CO_2 培养箱中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5 h, 弃上清, 加入完全培养基继续培养 48 h. 加入 1 mg/L LPS 诱导 2 h 或不进行诱导, 按 Promega Dual luciferase assay kit 说明书裂解细胞并收集细胞蛋白, 12 000 g 离心 2 min, 在单光子检测管中加入 100 μl 发光底物, 立即加入 20 μl 蛋白质裂解液, 混匀并迅速在单光子检测仪上进行检测.

1.2.6 免疫荧光分析. 将 2×10^5 实验细胞种植于预先放置有灭菌盖玻片的 6 孔板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16~18 h 细胞融合至 70%~80%, 加入 1 mg/L LPS 诱导 2 h 或不进行诱导, 弃上清培养基, 预冷的 PBS 洗涤 3 次, 自然烘干, 1:1 的甲醇:丙酮固定 30 min, PBS 洗涤 3×15 min, 0.25% Triton X100 破膜 1 h, PBS 洗涤 3×15 min, 正常的同种异型血清封闭 1 h, 加入按 1:200 稀释的一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒过夜, PBS 洗涤 3×15 min, 加入 Cy3 标记的二抗室温避光孵育 1 h, PBS 洗涤 3×15 min, 1:1 000 DAPI 染核, 荧光显微镜观察并照相.

1.2.7 蛋白质印迹. 12%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质样本, 电转膜法将蛋白质样本转移到硝酸纤维素膜上, 封闭蛋白干粉 1 g, 加 0.02 mol/L PBST 100 ml, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h, 0.02 mol/L PBST 洗涤硝酸纤维素膜 5 min $\times$ 1 次, 抗体稀释液按 1:1 000 比例稀释相应的一抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 0.02 mol/L PBST 洗涤硝酸纤维素膜 5 min $\times$ 2 次, 0.02 mol/L PBST 按 1:1 000 比例稀释相应的酶标二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 0.02 mol/L PBST 洗涤硝酸纤维素膜 5 min $\times$ 4 次, ECL 发光试剂盒发光、压片、显影定影、扫描.

1.2.8 ELISA 法检测 TNF- α 的表达. ELISA 试剂盒购自博士德公司, 采用双抗体夹心法并按说明书进行操作, 在已封闭有 TNF- α 抗体的 ELISA 板中分别加入 TNF- α 标准品及待测样品, 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 90 min, 加入生物素标记的 TNF- α 抗体 37 $^{\circ}\text{C}$ 再作用 60 min, PBS 洗 3 次, 加入 ABC 液 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min, 然后 PBS 洗 5 次, 加入 TMB 底物 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光 15 min, 立即加入终止液, 并在 450 nm 波长的酶标仪上检测, 作标准曲线, 并得出样品中

TNF- α 的浓度.

2 结 果

2.1 5-8F 细胞中存在 LPS 受体的表达

细胞识别微生物的模式为相对保守分子模式——病原相关分子模式(PAMP), LPS 将信号传导进入细胞内主要依赖细胞表面的受体如 CD14、Toll 受体家族(TLRs)及其伙伴分子 MD2^[1]. 我们应用 RT-PCR 检测 5-8F 细胞中 TLR4 及 MD2 的表达情况, 结果表明, 5-8F 细胞中存在 TLR4 (413 bp) 及 MD2 (422 bp) 表达, 而对照细胞 HEK293T 细胞中 TLR4 及 MD2 的表达缺失或很低 (图 1a). 同时我们应用流式细胞仪检测了 5-8F 细胞中 CD14 的表达, 我们将上述细胞与 CD14 一抗孵育后加入标有 Cy3 羊抗鼠的 IgG 抗体 (用 1%BSA 以 1:100 稀释), 室温避光孵育 30 min 并加入 DAPI 室温处理后, 立即流式细胞仪检测. 阴性对照采用同型非特异性抗体 (IgG) 替代鼠抗人的单克隆抗体, 经上述处理后的细胞用 FACSsort 流式细胞仪 (Becton Dickson 公司) 进行检测. 从图 1 中我们可以看到, 5-8F 细胞中存在 CD14 的表达 (图 1b). 说明鼻咽癌细胞 5-8F 存在 LPS 受体分子, CD14, TLR4 和 MD2 的表达, 因此 5-8F 细胞具有识别 LPS 并能将信号传导入细胞内的能力.

2.2 5-8F 细胞可与 LPS 相结合

细胞可对 LPS 刺激发生反应的基本条件是细胞必须能与 LPS 相结合, 为了研究鼻咽癌细胞系能否与 LPS 相结合, 我们进行了 LPS 结合实验, 通过流式细胞仪与荧光显微镜观察 LPS 与 5-8F 细胞的结合能力.

2.2.1 流式细胞术检测 LPS 与 5-8F 细胞的结合. 流式细胞仪是检测细胞与 FITC 标记的 LPS 结合能力的较好方法, 灵敏度较高. 分别取生长状态良好的 5-8F 及 293T 细胞, 用 FITC 标记的 LPS 孵育, PBS 洗涤并立即流式细胞仪检测. 结果表明, 鼻咽癌细胞能较好地与 LPS 相结合 (图 2a, b). 而 HEK293T 细胞对 LPS 的结合能力较低, 这也为后面实验中 HEK293T 细胞缺乏对 LPS 刺激的反应性提供了证据.

2.2.2 荧光显微镜观察 LPS 与 5-8F 细胞的结合能力. 将细胞接种于预铺有盖玻片的 6 孔板中, 生长达 70%~80% 的融合, 加入 FITC 标记的 LPS 避光孵育后, 荧光显微镜观察. 结果显示, 鼻咽癌细胞 5-8F 可与 FITC 标记的 LPS 相结合 (图 2c).

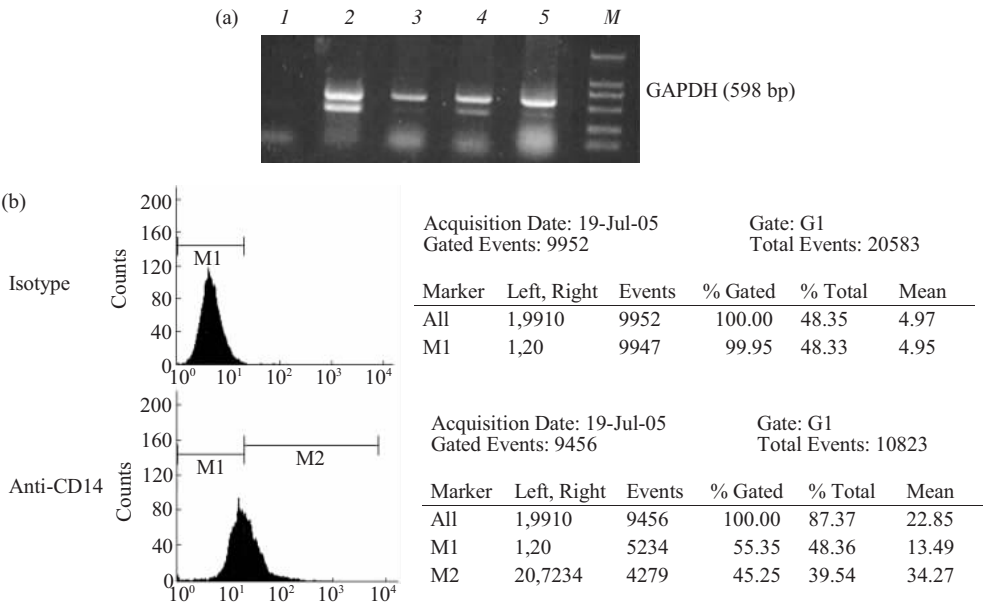


Fig. 1 The expression of CD14, TLR4 and MD2 in 5-8F cells

(a) RT-PCR analysis of TLR4 and MD2 expression. Expression of TLR4 (413 bp), MD2(422 bp) and GAPDH (598 bp) was analyzed by PCR after reverse transcription of total RNA from 5-8F and HEK293T cells. 1: H₂O, 2: 5-8F(TLR4), 3: HEK293T(TLR4), 4: 5-8F(MD2), 5: HEK293T(MD2), M: DL2000 marker. PCR with GAPDH primers was utilized as an internal control for the quality of the reverse transcriptase reaction. (b) Flow cytometry analysis of CD14. 5-8F cells (5×10⁵ cells/sample) were utilized for flow cytometry analysis using CD14 antibody and isotype serum and followed by Cy3-labeled secondary antibody conjugation for FACS measurement.

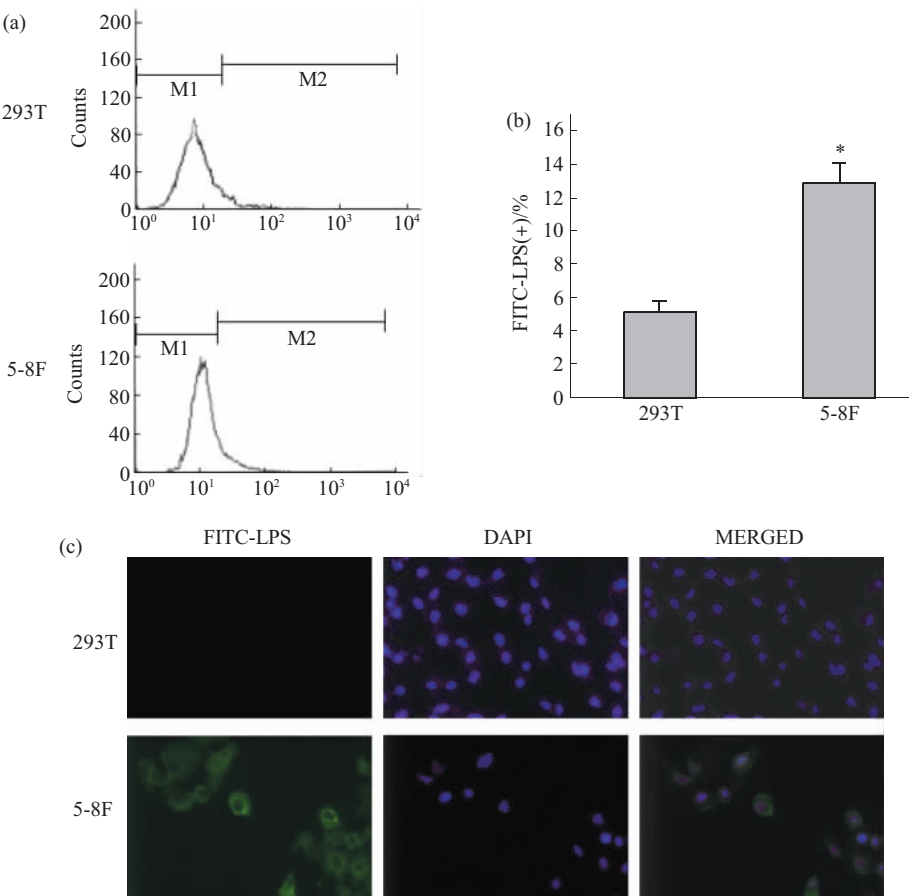


Fig. 2 FITC-LPS binding assay

(a) Flow cytometry analyse the FITC-LPS binding with HEK293T and 5-8F cells. (b) The percentage of FITC-LPS binding cells. (c) Fluorescence microscope analyse the FITC-labeled LPS binding with 293T and 5-8F cells. These data are representative experiments performed at least three times, and $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.01$ resting cells *vs* LPS stimulation.

2.3 NF κ B 信号通路是 LPS 与 5-8F 细胞反应后所介导的重要信号传导通路

NF κ B 信号传导通路是 LPS 所介导的信号传导通路最重要的下游通路, 大量的研究证明, LPS 可促进 NF κ B 特异性抑制因子 I κ B α 的降解, 并活化 NF κ B 的 DNA 结合能力, 活化的 NF κ B 迁移至核内, 在核内 NF κ B 核转录因子可诱导众多炎症相关的特异基因, 如 TNF- α 、IL6、IL8 等的表达^[12].

2.3.1 LPS 可刺激 5-8F 细胞 NF κ B 启动子的活性. 荧光素酶报告系统是研究基因功能在细胞信号传导通路中作用的重要实验方法, NF κ B-dependent 荧光素酶报告质粒是通过检测荧光素酶的活性来反映细胞中 NF κ B 的活性. 利用脂质体介导的瞬时转染 NF κ B-dependent 荧光素酶报告质粒, 转染 36 h 后加入 1 mg/L 的 LPS 作用 2 h, 结果发现, 鼻咽癌细胞 5-8F 在 LPS 刺激下使 NF κ B 活性增加 5.6 倍, 而 HEK293T 细胞则对 LPS 的刺激无反应性(图 3a).

2.3.2 LPS 可刺激 5-8F 细胞 NF κ B 的表达. 细胞在静息状态下 I κ B 与 NF κ B 结合使 NF κ B 处于非活化状态, NF κ B p65 存在于细胞浆中, 而当细胞受外界或其他的刺激使 I κ B 磷酸化, 磷酸化的 I κ B 即与 NF κ B 分离导致 NF κ B 的持续活化, 活化的 NF κ B 迁移至核内. Western blot 显示: 5-8F 细胞在 LPS 的诱导下磷酸化的 I κ B 表达增加而总的 I κ B 表达增加不明显, 此外, LPS 还诱导磷酸化的 NF κ B p65 表达增加, 但对总的 NF κ B p65 表达改变不明显(图 3b).

2.3.3 LPS 可刺激 5-8F 细胞 NF κ B 的活化入核. 我们应用免疫荧光实验发现, 处于静息状态下的鼻咽癌细胞中 NF κ B p65 大部分为非活化状态存在于细胞浆, 而当鼻咽癌细胞 5-8F 受到 LPS 的刺激 2 h 后, 细胞中的 NF κ B p65 可受到活化并大部分进入细胞核, 并激活其他的基因的转录调控(图 3c).

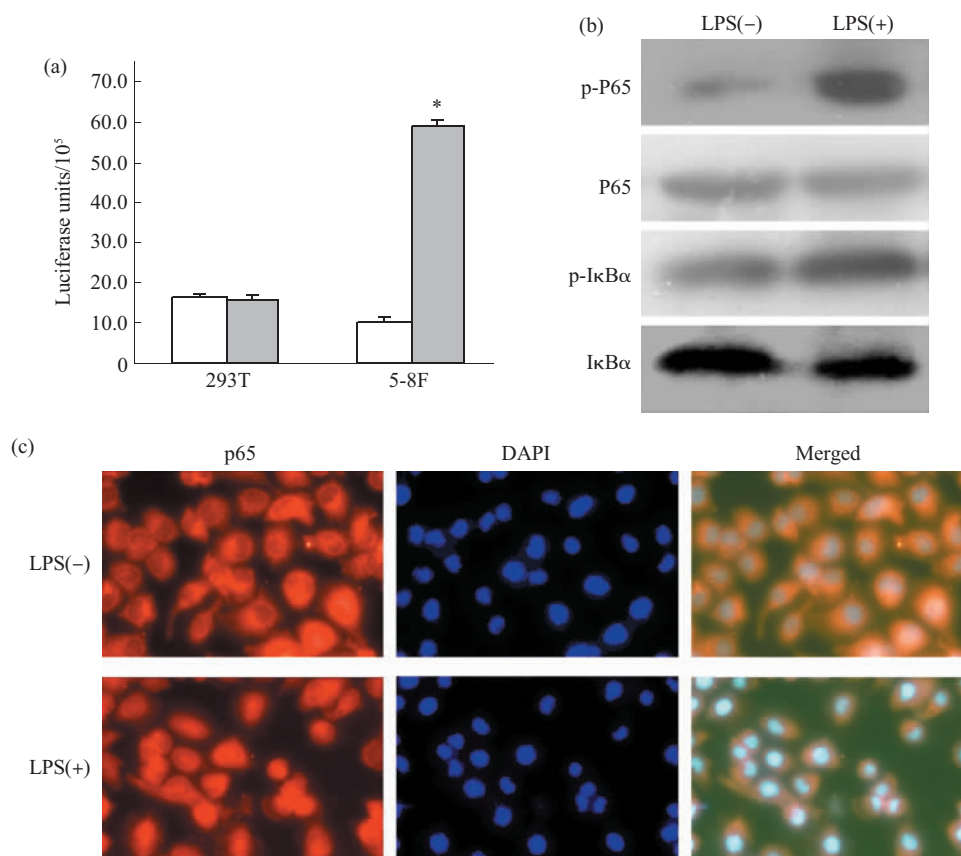


Fig. 3 5-8F cells do respond to LPS

(a) The luciferase activity of NF κ B after LPS stimulation in 5-8F and HEK293T cells. Cells were transfected with NF κ B dependent luciferase plasmid. 36 h after transfection, cells were incubated with LPS (1 mg/L) for 2 h and then cells were lysed for luciferase activity. □: LPS(-); ■: LPS(+). These data are representative experiments performed at least three times, and γ -error bars indicate the $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.01$ resting cells *vs* LPS stimulation. (b) The expression of NF κ B p65 and I κ B α and their activated pattern analysis with Western-blot in 5-8F cells. (c) Immunofluoresense analysis of NF κ B after LPS stimulation in 5-8F cells.

2.4 LPS 可刺激 5-8F 细胞中 TNF- α 的表达及启动子活性

TNF- α 是参与调节细胞炎症反应的重要的细胞因子, 是一种多功能的细胞因子, 能产生有利于机体的反应, 但有时也可对机体产生破坏性的反应。

我们以人的 gDNA 为模板进行 PCR 反应克隆了人 TNF- α 启动子(TNFP; -991~1), 将扩增产物克隆入 TA 克隆载体中并以 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切后定向克隆入 pGL3-Basic 荧光素酶报告载体中, 经酶切和测序鉴定表明载体构建正确(图 4a)。

我们将已构建好的 pGL3-Basic-TNF-Alpha 启

动子报告载体分别瞬时转染入 HEM293T 与 5-8F 细胞中, 用 1 mg/L LPS 诱导 2 h 或不诱导, 分别测定其蛋白质中荧光素酶的活性。结果显示, TNF-Alpha 启动子活性在 HEM293T 细胞中不受 LPS 的诱导, 但在 5-8F 细胞中其活性可受到 LPS 的诱导而升高(图 4b)

为了从蛋白质水平确定 LPS 是否对 TNF- α 的表达有诱导作用, 我们应用 ELISA 的方法测定了 5-8F 细胞系在 LPS 诱导时培养上清中 TNF- α 的蛋白质表达, 研究发现, LPS 可诱导 5-8F 细胞 TNF- α 的表达, 在 1 mg/L LPS 的培养上清中从 2.47 ng/L 上升到 13.27 ng/L(图 4c)。

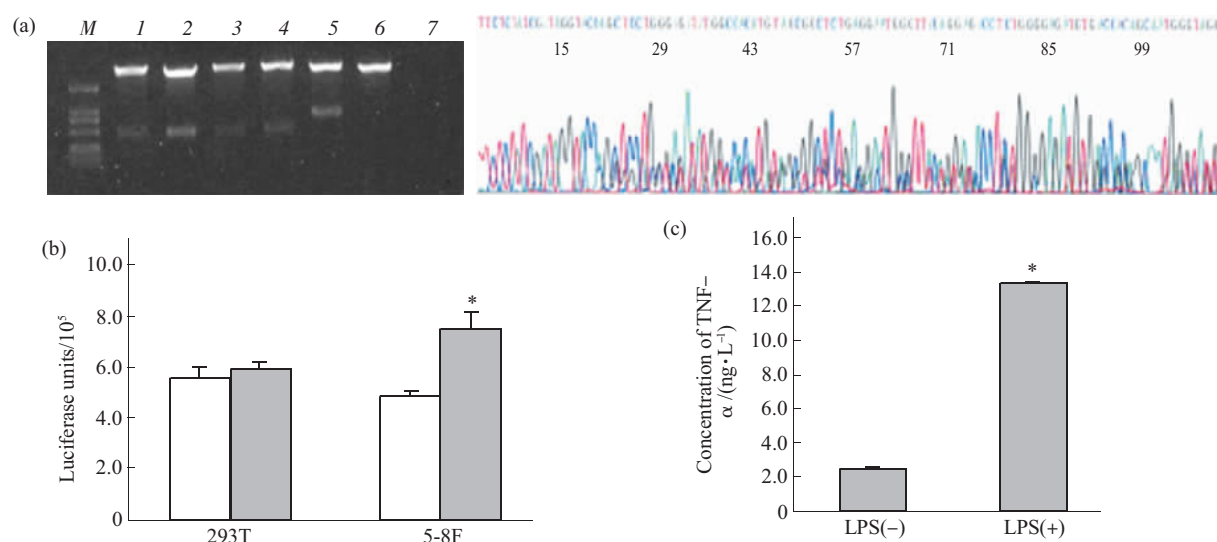


Fig. 4 The production of TNF- α was increased after LPS stimulation in 5-8F cells

(a) The construction of pGL3-Basic-TNF- α was identified with enzyme cutting and sequencing assay. 1~4 is the positive clone, M: DL2000. (b) Luciferase analysis of TNF- α promoter activity in the response of 5-8F cells to LPS. □: LPS(-); ■: LPS(+). (c) The relevant amount of TNF- α being produced in 5-8F cells after LPS stimulation. TNF- α production was determined with ELISA. These data were performed at least three times. y-error bars indicate the $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.01$ resting cells vs LPS stimulation cells.

3 讨 论

先天免疫系统识别微生物的相对保守分子模式——病原相关分子模式 (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) 主要依赖于 Toll 受体家族 (Toll-like receptors, TLRs) [13,14]。目前在人类已经发现有 10 个 TLRs, 在不同的微生物刺激下由不同的 TLRs 传导信号。不同 TLR 可以在一定程度上识别并区分不同类型的病原体。如 TLR2 识别肽聚糖等成分, TLR3 识别双链 RNA (dsRNA), TLR4 可识别细菌的脂多糖 (LPS), TLR5 识别鞭毛蛋白, TLR9 识别细菌 CpG DNA, 由于每个 TLR 相关的信号通路可能不是完全相同的,

这导致了各自不同生物学功能的发挥 [15]。

TLR4 多分布在巨噬细胞、B/T 淋巴细胞及脾脏、肝脏、肺脏及胎盘等组织中, LPS 首先与 LPS 结合蛋白 (LPS-binding protein, LBP) 结合, 然后再结合于细胞表面的 CD14 分子。CD14 通过 GPI 锚定于细胞膜。LPS 以 LPS-LBP-CD14 三体复合物形式活化 TLR4 信号传导 [16,17]。TLR4 分子由胞外区、胞膜区及胞内区三部分组成。胞外区富含亮氨酸, 可与 CD14 分子中的亮氨酸重复序列结合而介导蛋白质之间的相互作用。胞内区存在一段序列保守区, 该序列与 IL-1 受体的胞内区的保守序列有高度同源性, 被称之为 TIR。因此, TLR4 分子也属于 IL-1

受体超家族的成员. TIR 区域是 TLR4 与其下游蛋白激酶相互作用的关键部位. 最近的研究发现, TLR4 是存在于高尔基体中的蛋白质, Monick 等^[18]研究表明, 呼吸道上皮细胞由于低表达 TLR4 而对 LPS 的刺激耐受, 但当其受到呼吸道合胞病毒的感染后, 呼吸道上皮细胞中 TLR4 的表达从高尔基体中转移至细胞膜, 使细胞膜上 TLR4 的表达增加, 并对 LPS 的刺激高反应而分泌大量的炎症因子.

尽管 TLR4 是 LPS 刺激细胞反应的关键分子, 但其功能的发挥需要辅助分子 MD2 的协助. Abreu 等^[19]的研究发现, 肠上皮细胞 T84 及 Caco 细胞系对商品化的 LPS 刺激反应是由于该 LPS 中残留了少量的脂蛋白, 而脂蛋白可通过 TLR2 传导信号, 他们通过纯化 LPS 去掉其中的脂蛋白研究发现, 肠上皮细胞 T84 及 Caco 细胞系对纯化的 LPS 出现耐受, 而阳性对照人表皮微血管内皮细胞(human dermal microvessel endothelial cells, HMEC)对纯化的 LPS 仍然有反应, 进一步的研究表明, 肠上皮细胞 T84 及 Caco 细胞系对 LPS 的耐受是由于 T84 及 Caco 细胞中 TLR4 的低表达和不表达 MD2, 分别瞬时转染 TLR4 或 MD2 至肠上皮细胞中, 对 LPS 均无反应, 但将 TLR4 与 MD2 共转染肠上皮细胞, 其对 LPS 的反应可提高 100 多倍. MD2 是协助 TLR4 完成 LPS 信号传导通路的必不可少的因素. 我们通过 RT-PCR、流式细胞仪分析等发现, 鼻咽癌细胞 5-8F 存在 LPS 受体分子, TLR4、MD2 及 CD14 表达, 因此鼻咽癌细胞 5-8F 具有和 LPS 结合的能力. 我们通过进一步研究证实 5-8F 可与 LPS 相结合且发生反应.

NF κ B 信号传导通路是 LPS 所介导的信号传导通路的最重要的下游通路, TRAF6 可激活 NIK, 活化的 NIK 可进一步激活 NF κ B 抑制物的激酶 (inhibitor of NF κ B kinases, IKKs), 活化的 IKK 复合体 (IKK α 及 IKK β) 使得 NF κ B 复合物中的抑制成分 I κ B 磷酸化而脱颗粒, I κ B 是 NF κ B 特异性抑制因子, 在静息状态下与 NF κ B 结合使 NF κ B 处于非活化状态, 磷酸化的 I κ B 即与 NF κ B 分离导致 NF κ B 的持续活化, 活化的 NF κ B 迁移至核内, 在核内 NF κ B 核转录因子可诱导众多炎症相关的特异基因如 TNF、IL6、IL8 等的表达. 大量的研究证明 LPS 可促进 I κ B α 亚型的降解并活化 NF κ B 的 DNA 结合能力^[6,9].

LPS 促进细胞因子的合成与释放, 引发炎症反应, 单核巨噬细胞、树突状细胞等通过 LPS 的刺

激后, 经由胞内信号传导通路, IL1、IL6、IL8、IL12、TNF α 及 IFN γ 等细胞因子释放到胞外, 引起粒细胞、巨噬细胞趋化聚集, 毛细血管通透性增高, 淋巴细胞浸润等炎症反应, 发挥早期免疫应答的效应. 同时长期的慢性炎症是病原微生物致肿瘤发生的关键因素^[20,21]. 越来越多的证据表明, 炎症与肿瘤的发生发展密切相关, 长期的慢性炎症是胃癌、肝癌、肺癌、结直肠癌、前列腺癌的重要致病因素^[22]. 如胃癌的发生与幽门螺杆菌的细菌脂多糖激活 TRAF2、TRAF6, 进而激活 NIK 和 IKK, 从而使 NF κ B 的持续激活, 呈持续激活状态的 NF κ B 可使胃黏膜上皮细胞过度增殖而导致胃癌的发生^[23]. 我们研究发现, 鼻咽癌细胞 5-8F 在 LPS 刺激下使磷酸化 I κ B 表达增加, NF κ B 活化入核, 从而促进炎症因子 TNF- α 的表达.

因此, 鼻咽癌细胞 5-8F 存在 LPS 受体分子的表达, 可与 LPS 发生反应, 从而激活 TLR4 下游的 NF κ B 信号传导通路, 使炎症因子释放增加, 导致鼻咽部炎症反应. 我们通过研究 5-8F 细胞对革兰氏阴性细菌 LPS 的反应性及其机制的研究, 对阐明鼻咽部疾病特别是鼻咽部肿瘤的发生机制意义深远.

参考文献

- 1 Fearon D, Locksley R. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*, 1996, **272** (5258): 50~53
- 2 Martin T R. Recognition of bacterial endotoxin in the lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000, **23** (2): 128~132
- 3 Raab-Traub N. Epstein-barr virus in the pathogenesis of NPC. *Semin Cancer Biol*, 2002, **12** (6): 431~441
- 4 Beutler B, Rietschel E T. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol*, 2003, **3** (2): 169~176
- 5 Abreu M T, Thomas L S, Arnold E T, *et al.* TLR signaling at the intestinal epithelial interface. *J Endotoxin Res*, 2003, **9** (5): 322~330
- 6 Zhang F X, Kirschning C J, Mancinelli R, *et al.* Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. *J Biol Chem*, 1999, **274** (12): 7611~7614
- 7 Jiang Z, Georgel P, Du X, *et al.* CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nat Immunol*, 2005, **6** (6): 565~570
- 8 Diks S H, Richel D J, Peppelenbosch M P. LPS signal transduction: the picture is becoming more complex. *Curr Top Med Chem*, 2004, **4** (11): 1115~1126
- 9 Lee J H, Choi Y H, Kang H S, *et al.* An aqueous extract of *Platycodon radix* inhibits LPS-induced NF-kappaB nuclear translocation in human cultured airway epithelial cells. *Int J Mol Med*, 2004, **13**(6): 843~847

- 10 Li J J, Westergaard C, Ghosh P, *et al.* Inhibitors of both nuclear factor-kappa B and activator protein-1 activation block the neoplastic transformation response. *Cancer Research*, 1997, **57** (16): 3569~3576
- 11 Kennedy M N, Mullen G E, Leifer C A, *et al.* A complex of soluble MD-2 and lipopolysaccharide serves as an activating ligand for Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*, 2004, **279** (33): 34698~34704
- 12 Smith MF Jr, Mitchell A, Li G, *et al.* Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J Biol Chem*, 2003, **278** (35): 32552~32560
- 13 Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signaling. *Nature Rev Immunol*, 2004, **4** (7): 499~511
- 14 Coats S R, Reife R A, Bainbridge B W, *et al.* Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide antagonizes *Escherichia coli* lipopolysaccharide at toll-like receptor 4 in human endothelial cells. *Infect Immun*, 2003, **71** (12): 6799~6807
- 15 Underhill D M, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol*, 2002, **14** (1): 103~110
- 16 Pugin J, Schurer M C, Leturcq D, *et al.* Lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (7): 2744~2748
- 17 Palsson-McDermott E M, O'Neill L A. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology*, 2004, **113** (2): 153~162
- 18 Monick M M, Yarovinsky T O, Powers L S, *et al.* Respiratory syncytial virus up-regulates TLR4 and sensitizes airway epithelial cells to endotoxin. *J Biol Chem*, 2003, **278** (52): 53035~53044
- 19 Abreu M T, Vora P, Faure E, *et al.* Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol*, 2001, **167** (3): 1609~1616
- 20 Ristimaki A. Cyclooxygenase 2: from inflammation to carcinogenesis. *Novartis Found Symp*, 2004, **256**: 215~221
- 21 Karin M, Greten F R. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*, 2005, **5** (10): 749~759
- 22 Ballaz S, Mulshine J L. The potential contributions of chronic inflammation to lung carcinogenesis. *Clin Lung Cancer*, 2003, **5** (1): 46~62
- 23 Crowe S E. *Helicobacter* infection, chronic inflammation, and the development of malignancy. *Curr Opin Gastroenterol*, 2005, **21** (1): 32~38

The Study of Nasopharyngeal Carcinoma Cell 5-8F Responsiveness to Negative Gram's Lipopolysaccharide via TLR4-regulating Signaling Pathway*

YANG Yi-Xin^{1,2)*}, YANG Yun-Bo^{3)*}, ZHOU Ming²⁾, ZHOU Hou-De²⁾,
XIANG Bo²⁾, PENG Shu-Ping²⁾, LI Xiao-Ling²⁾, SHEN Shou-Rong⁴⁾, LI Gui-Yuan^{2)***}

¹⁾Department of Biochemistry, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510082, China;

²⁾Cancer Research Institute, Central South University, Changsha 410078, China;

³⁾Pharmacology School of Central South University, Changsha 410078, China;

⁴⁾The Third-Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract Nasopharynx epithelial cells are constantly exposed to both commensal and pathogenic micro-organisms. After being stimulated by some microbial, the nasopharynx epithelial cells secrete a lot of inflammatory factors that lead to the inflammation of nasopharynx and further result in the nasopharyngeal carcinoma and other disorders. LPS is the most important commensal or pathogenic bacteria constituents. It is related to the pathogenesis of a variety of disease. It has been shown that the 5-8F cells could bind with the FITC-labeling LPS for its expression of CD14, TLR4 and MD2 with flow cytometry and RT-PCR assay. With immunofluoresence, Western-blot and luciferase reporter system assay, it is indicated that LPS activated the TLR4 signaling pathway in 5-8F cells. Phospho-NFκB p65 expression was increased and entered into the nuclear in 5-8F cells with LPS inducement. Furthermore, after LPS stimulation, TNF-α promoter activity and the relevant amount of TNF-α being produced were increased in 5-8F cells. In conclusion, 5-8F cells expressed CD14, TLR4 and MD2 that are crucial for LPS binding. When nasopharynx epithelial cells were induced by LPS, they did respond to LPS via TLR4 signaling pathways and activated NFκB signaling pathway, which can further lead to nasopharynx inflammation and other nasopharynx disorders.

Key words lipopolysaccharide, nasopharyngeal carcinoma cells, toll-like receptors 4, signal transduction

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30300201, 30470955, 30330560).

**The two authors equally contributed to this paper.

***Corresponding author . Tel: 86-731-4805446, Fax: 86-731-4805383, E-mail: ligy@xysm.net

Received: June 24, 2006 Accepted: July 28, 2006