

# TLR4 促进 HIF-1 $\alpha$ 的高活性在宫颈癌中的作用机制

杨 潇,王艳清,程艳香

(武汉大学人民医院,湖北 武汉 430060)

**摘要:** [目的] 研究 Toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4) 促进低氧诱导因子 1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 的高活性在宫颈癌中的作用及机制。[方法] 体外培养 SiHa 细胞, 分为空白对照组 (control 组)、脂多糖组 (LPS 组)、NF- $\kappa$ B 信号通路干预组 [吡咯烷二硫氨基甲酸 (PDTC)+LPS 组] 和 TLR4 信号干预组 (siTLR4+LPS 组) 共 4 组, 用 MTT 法、软琼脂形成实验观察各组细胞的活性增殖、克隆情况; 用免疫细胞化学染色法和 Western blot 法检测细胞内 HIF-1 $\alpha$  含量变化; DCFH-DA 法检测活性氧 (ROS) 含量变化; 光栅精化学发光法检测 NADPH 氧化酶含量变化。[结果] MTT 和软琼脂形成实验结果显示: 与 control 组相比, LPS 组细胞活性和增殖能力增强, PDTC+LPS 组无明显变化, siTLR4+LPS 组降低 ( $P<0.05$ ); 与 LPS 组相比, PDTC+LPS 组和 siTLR4+LPS 组细胞活性和增殖能力均降低 ( $P<0.05$ )。与 PDTC 组+LPS 组相比, siTLR4+LPS 组细胞活性显著减弱 ( $P<0.01$ )。免疫细胞化学染色和 Western blot 法结果显示: 与 control 组相比, LPS 组 HIF-1 $\alpha$  活性增强 ( $P<0.05$ ), siTLR4+LPS 组活性降低 ( $P<0.05$ ); 与 LPS 组相比, PDTC+LPS 组 HIF-1 $\alpha$  表达降低 ( $P<0.05$ ), siTLR4+LPS 组 HIF-1 $\alpha$  表达明显降低 ( $P<0.01$ ); 与 PDTC+LPS 组相比, siTLR4+LPS 组细胞 HIF-1 $\alpha$  活性减弱 ( $P<0.05$ )。NADPH 氧化酶和 ROS 活性检测结果显示: 与 control 组相比, LPS 组 NADPH 氧化酶和 ROS 活性增强 ( $P<0.05$ ), siTLR4+LPS 组降低 ( $P<0.05$ ), LPS 组与 PDTC+LPS 组无明显差异。与 PDTC+LPS 组相比, siTLR4+LPS 组 NADPH 氧化酶和 ROS 活性均降低 ( $P<0.05$ )。[结论] TLR4 可通过核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号途径促进宫颈癌的发生和发展, NADPH 氧化酶参与 TLR4 维持细胞内 HIF-1 $\alpha$  高活性, 而此过程与 NF- $\kappa$ B 信号无关, 这为研究宫颈癌的发生发展机制提供新的思路。

**关键词:** Toll 样受体 4; 宫颈肿瘤; 核因子- $\kappa$ B; 低氧诱导因子 1 $\alpha$ ; 活性氧

**中图分类号:** R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2016)12-0981-07

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2016.12.B001

## Mechanism of TLR4 in Promoting High Activity of HIF-1 $\alpha$ in Cervical Cancer

YANG Xiao, WANG Yan-qing, CHENG Yan-xiang

(Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

**Abstract:** [Objective] To study the role and mechanism of toll-like receptor 4 (TLR4) in promoting the activity of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in cervical cancer. [Methods] SiHa cells were cultured in vitro and divided into four groups: control group, lipopolysaccharide (LPS) group, pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC)+LPS group and siTLR4+LPS group. Active proliferation and cloning of the cells in each group were observed by MTT method and soft agar forming test. The change of HIF-1 $\alpha$  was detected with immunocytochemical staining and Western blot method. The change of reactive oxygen species (ROS) content and NADPH oxidase content were detected by DCFH-DA method and chemiluminescence method respectively. [Results] MTT and soft agar forming test showed that compared with control group, the cell activity and proliferation ability were enhanced in LPS group, PDTC+LPS group had no significant change, whereas decreased in siTLR4+LPS group ( $P<0.05$ ); compared with LPS group, the proliferation activity and cell activity in PDTC+LPS group and siTLR4+LPS group was decreased ( $P<0.05$ ); compared with the PDTC+LPS group, the cell activity of siTLR4+LPS group was significantly decreased ( $P<0.01$ ). Immunocytochemical staining and Western blot showed that compared with the control group, HIF-1 $\alpha$  activity in LPS group was enhanced ( $P<0.05$ ); HIF-1 $\alpha$  activity in siTLR4+LPS group was decreased ( $P<0.05$ ); compared with the LPS group, HIF-1 $\alpha$  activity in PDTC+LPS group and in

**基金项目:** 国家自然科学基金 (81302273); 湖北省卫生厅中医药科研项目 (2012Z-Y02); 湖北省卫计委一般面上项目 (WJ2015MB084); 湖北省科技厅科技项目支撑计划 (2015BCA313)

**通讯作者:** 程艳香, 副主任医师, 副教授, 博士; 武汉大学人民医院妇产科, 湖北省武汉市武昌区解放路 238 号 (430060); E-mail: doctornancy@qq.com

**收稿日期:** 2016-06-10; **修回日期:** 2016-08-10

siTLR4+LPS group was decreased ( $P<0.05$  and  $P<0.01$ ); compared with the PDTC+LPS group, HIF-1 $\alpha$  activity in siTLR4+LPS group was weakened ( $P<0.05$ ). NADPH oxidase and ROS detection results showed that compared with the control group, the activity of NADPH oxidase and ROS enhanced in LPS group ( $P<0.05$ ), decreased in siTLR4+LPS group ( $P<0.05$ ); and there were no significant differences between LPS group and PDTC+LPS group; compared with the PDTC+LPS group, the NADPH oxidase and ROS activity were decreased in siTLR4+LPS group ( $P<0.05$ ). [Conclusion] TLR4 may promote the occurrence and development of cervical cancer through NF- $\kappa$ B signaling pathway. NADPH oxidase may participate in the process of TLR4 to maintain the high intracellular activity of HIF-1 $\alpha$  and this process may be not related to NF- $\kappa$ B signal.

**Subject words:** toll-like receptor 4; cervical neoplasms; NF- $\kappa$ B; hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ ; reactive oxygen species

Toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4) 是脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 的天然受体, 是与肿瘤、炎症最密切的 TLR 家族成员之一。LPS 亦称内毒素, 是革兰阴性菌 (G<sup>-</sup>) 细胞壁外膜上的主要病原相关分子模式, TLR4 是 LPS 的主要模式识别受体, G<sup>-</sup> 释放的 LPS 进入机体后, TLR4/MD-2 复合物中的 MD-2 结合 LPS 后, 引起 TLR4 的低聚而活化, 将胞外信号导入胞内, 引起下游信号分子变化<sup>[1,2]</sup>。TLR4 主要通过 MyD88 的依赖性途径及核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号途径启动细胞活化过程来诱导炎症反应和肿瘤<sup>[3]</sup>。国内外研究证明, 宫颈癌细胞的生长失控与宫颈癌细胞内一个重要的转录因子——低氧诱导因子 1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 的过度激活密切相关<sup>[4]</sup>。前期研究已表明, TLR4 表达程度与宫颈癌的恶性程度密切相关, 宫颈癌中 TLR4 信号通路与 HIF-1 $\alpha$  的高表达正相关<sup>[5]</sup>。研究发现, 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 对维持细胞内 HIF-1 $\alpha$  高活性与宫颈癌细胞恶性生物学行为密切相关<sup>[6]</sup>。具体机制尚不明确。

本研究通过外源性的 LPS 和 siTLR4 干预 TLR4 信号通路并结合使用 NF- $\kappa$ B 信号通路阻断剂吡咯烷二硫氨基甲酸 (pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC), 来探讨 NF- $\kappa$ B 信号在 TLR4 信号促进肿瘤发生发展中的作用及 TLR4 维持宫颈癌细胞 HIF-1 $\alpha$  高活性的机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

宫颈癌细胞株 Siha 细胞株购自赛齐 (上海) 生物

工程有限公司; 胎牛血清、MEM 购于美国 Gibco 公司; 免疫组织化学染色 DAB 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司; Western blot 试剂盒购自 Invitrogen 公司; MTT 试剂盒购自碧云天生物科技有限公司; 蛋白定量试剂盒、活性氧检测试剂盒购自碧云天生物科技有限公司; 免疫荧光染色试剂盒购自北京中杉公司; HiPerFect 转染试剂购自 Qiagen 公司。兔抗人 HIF-1 $\alpha$  单克隆抗体、HRP 标记的羊抗兔 IgG 购于美国 Abcam 公司; HIF-1 $\alpha$  兔多克隆抗体和  $\beta$ -actin 兔多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司; NADPH、光泽精 (lucigenin)、LPS 和 PDTC 均购自美国 Sigma 公司; TLR4 siRNA 由上海吉玛生物有限公司设计合成。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 细胞培养

将宫颈癌细胞系 Siha 细胞置于含 10% 胎牛血清的 MEM 培养基中, 在 5% CO<sub>2</sub>、37℃、饱和湿度条件下培养, 每天换液 1 次, 待细胞生长良好并进入对数生长期后, 选择生长状态良好的细胞进行实验。

#### 1.2.2 实验分组及处理

宫颈癌细胞系随机分成 4 组: 空白对照组 (control 组)、脂多糖对照组 (LPS 组)、TLR4 信号干预组 (siTLR4+LPS 组) 和 NF- $\kappa$ B 信号通路干预组 (PDTC+LPS 组)。取对数生长期的 Siha 细胞用于实验, control 组为正常培养的 Siha 细胞, 不给予任何处理和刺激; LPS 组给予终浓度为 500 ng/ml 的 LPS 刺激, PDTC+LPS 组先给予终浓度 20 mmol/L 的 PDTC 作用 1 h 后再给予 LPS 刺激; siTLR4+LPS 组用 TLR4 siRNA 转染; 待细胞培养板 Siha 细胞融合度达到 50% 时进行转染, 转染液选用 QIAGEN 公司的

HiPerFect 转染试剂,转染成功后再加入 LPS 刺激。

### 1.2.3 MTT 法

将细胞以  $1 \times 10^4$  个/孔接种于 96 孔培养板,每组设 5 个复孔,在细胞对数生长期分别加入各组药物进行干预,并继续培养 1~4d。待细胞贴壁后,按检测时间点加入 MTT(10mg/ml)10 $\mu$ l,继续培养 4h 后终止培养,吸净培养液后每孔加 DMSO 200 $\mu$ l,振荡 10min 后将空白孔调零,于酶标仪 570nm 处分别测定各组的 OD 值,实验重复 3 次。以培养时间为横坐标,OD 为纵坐标,绘制细胞生长抑制曲线。

### 1.2.4 软琼脂集落培养实验

以含各组药物干扰剂的 MEM 培养液和等体积的 1%的低熔点琼脂糖(LPS)混合,取 4ml 均匀铺于 60mm 平皿内,静置 4 $^{\circ}$ C 10min,配制 0.6%的底层琼脂;待凝固后,取等体积的上述混合物和 1000 个/ml 的单细胞悬液迅速充分混合后,取 1ml 混合液铺在相应的底层琼脂上,制备上层琼脂。待室温环境下凝固后,放入含 5%CO<sub>2</sub> 的 37 $^{\circ}$ C 培养箱中继续培养 14d,观察细胞生长状况,计数各培养皿中细胞集落形成数,以肉眼可见大小的细胞团(含 500 个以上细胞)作为计数集落的标准。

### 1.2.5 免疫细胞化学染色检测 HIF-1 $\alpha$ 的表达

实验分组及细胞处理方法同上,并以 PBS 代替一抗其它步骤不变作为阴性对照。每组细胞处理结束后,细胞用 0.01mol/LPBS 冲洗 3 次,在室温环境下用 4%多聚甲醛固定 10min,再用 0.01mol/L PBS 洗 3 次,3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育 20min,再用 10%的封闭血清 37 $^{\circ}$ C 下封闭 30min。然后加入兔抗人 HIF-1 $\alpha$  抗体(稀释 1:200),4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜,次日用 PBS 浸洗 3 次后,加入 HRP 标记的羊抗兔二抗(稀释 1:300),37 $^{\circ}$ C 下孵育 1h,使用免疫组织化学 DAB 试剂盒进行显色处理,显微镜下观察结果。

### 1.2.6 Western blot 法检测细胞 HIF-1 $\alpha$ 的表达

实验分组及细胞处理方法同上。PBS 冲洗收获细胞后,用细胞裂解液提取各组细胞总蛋白,BCA 法定量后,进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜。转膜结束后,用含 5%脱脂奶粉的 TBST 封闭液室温封闭 1h。一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜(一抗  $\beta$ -action 和 HIF-1 $\alpha$  按 1:1000 稀释),次日用 PBS 浸洗 3 次后,加入 HRP 标记的羊抗兔二抗(稀释 1:300),37 $^{\circ}$ C 下孵育 1h,最后 X 线片曝光、显影和定影后观察结果。目的

蛋白的相对表达水平=目的蛋白的灰度值/ $\beta$ -actin 蛋白的灰度值,实验重复 3 次。

### 1.2.7 DCFH-DA 探针检测细胞中 ROS 含量

细胞接种于 96 孔板,实验分组及细胞处理方法同上,分别于 0、12、24、36、48h 检测 ROS。按检测时间点接种的细胞用含糖 Earle's 液洗 2 次,并用终浓度为 25 $\mu$ mol/L DCFH-DA 探针 37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 30min。30min 后再用含糖 Earle's 液清洗 2 次,FLUOstar Optima 酶标仪检测荧光,485nm 激发波长,520nm 发射波长。

### 1.2.8 光泽精化学发光法测定 NADPH 氧化酶活性

细胞接种于 96 孔板,实验分组及细胞处理方法同上,分别于 0、12、24、36、48h 检测 NADPH 氧化酶活性。按检测时间点,用 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,并刮下细胞。细胞悬液在 4 $^{\circ}$ C 以 2500g 离心 5min。取少量样本进行蛋白定量(BCA 法)。避光 96 孔板内各加入 50 $\mu$ l 细胞蛋白,5 $\mu$ l DMSO,5 $\mu$ mol/L 的光泽精,50mm/L 的 Tiron,再加入 NADPH 100 $\mu$ mol/l 启动反应,用化学发光检测仪进行结果检测。

## 1.3 统计学处理

检测数据均用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间计量资料的比较采用成组  $t$  检验,多样本均数间的比较采用单因素的方差分析, $P < 0.05$  为差异具有显著意义。所有数据采用 SPSS 13.0 软件包进行统计处理。

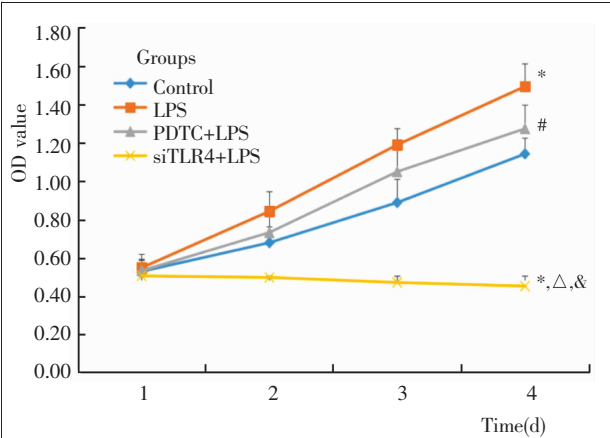
## 2 结 果

### 2.1 细胞生长状态测定

经 MTT 法测定细胞生长状态并绘制细胞生长曲线,结果显示(Table 1, Figure 1),检测不同干预措施作用于宫颈癌 Siha 细胞后,LPS 组细胞活性最强,PDTC+LPS 组、control 组、siTLR4+LPS 组细胞活性依次减弱。与 control 组相比,LPS 组细胞活性增强( $P=0.001$ ),LPS+PDTC 组无明显变化,siTLR4+LPS 组降低( $P=0.000$ );与 LPS 组相比,PDTC+LPS 组和 siTLR4+LPS 组细胞活性均减弱( $P=0.021$ ;  $P=0.000$ );与 PDTC+LPS 组相比,siTLR4+LPS 组细胞活性显著减弱( $P=0.000$ )。实验各组对宫颈癌细胞的抑制作用呈时间依赖性。可见 LPS 刺激宫颈癌细胞的生长,但抑制 TLR4 信号可抑制宫颈癌细胞的生长,抑制 NF- $\kappa$ B 信号对细胞生长也有抑制作用,但作用不如

Table 1 The analysis results of cell growth status in each group( $\bar{x}\pm s$ )

| Groups     | 1d        | 2d        | 3d        | 4d        |
|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Control    | 0.53±0.06 | 0.68±0.08 | 0.89±0.12 | 1.14±0.08 |
| LPS        | 0.55±0.07 | 0.84±0.10 | 1.19±0.09 | 1.50±0.12 |
| PDTC+LPS   | 0.53±0.06 | 0.73±0.10 | 1.05±0.15 | 1.27±0.12 |
| siTLR4+LPS | 0.51±0.06 | 0.50±0.05 | 0.47±0.06 | 0.45±0.05 |



Note:\*,compared with control group, $P<0.01$ ;#,compared with LPS group, $P<0.05$ , $\Delta$ : $P<0.01$ ;&;compared with PDTC+LPS group, $P<0.01$ .

Figure 1 The growth of Siha cells in each group by MTT method

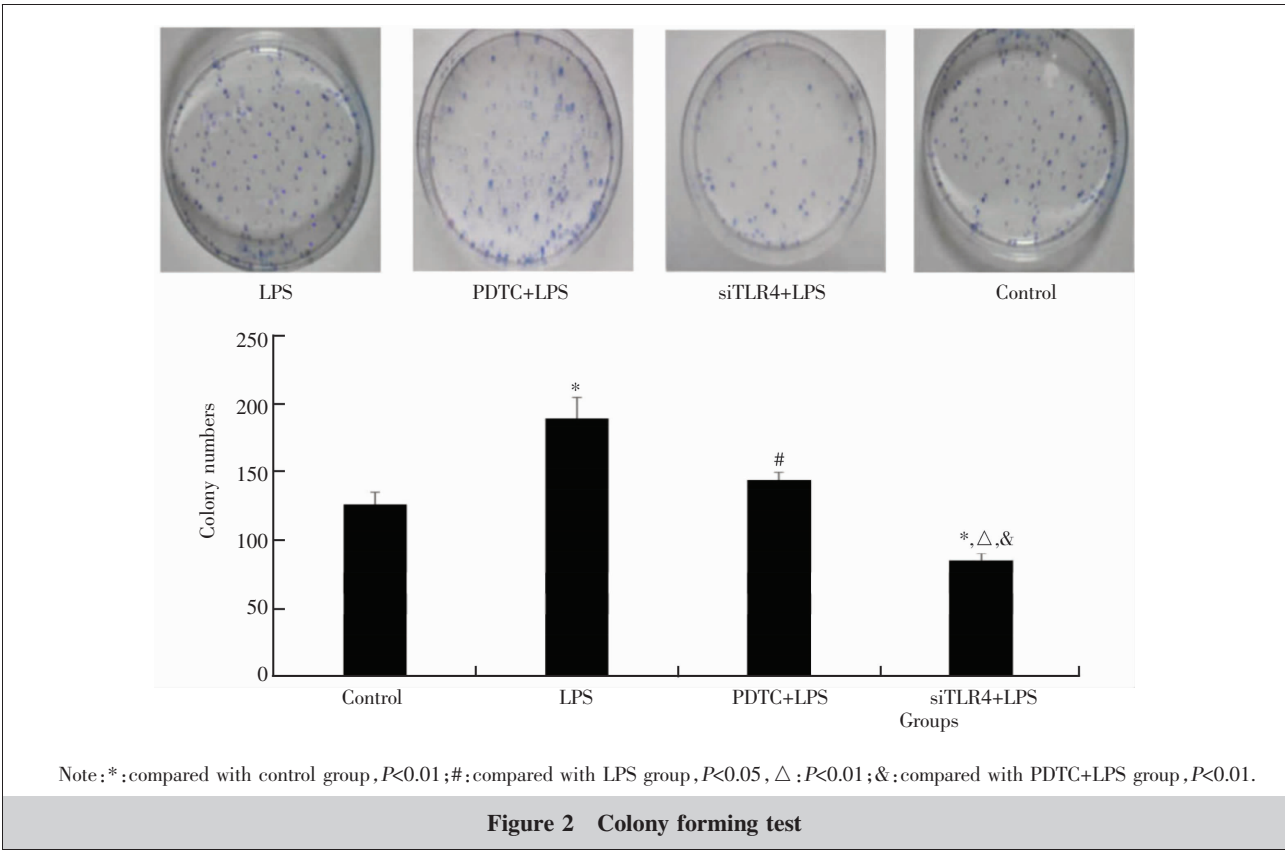
抑制 TLR4 信号作用显著,提示除 NF- $\kappa$ B 信号外,TLR4 信号可能主要通过其他途径影响宫颈癌细胞的生长。

2.2 集落形成实验结果

Control 组、LPS 组、PDTC+LPS 组、siTLR4+LPS 组 Siha 细胞集落形成数目分别是  $126.37\pm9.10$ 、 $189.35\pm15.27$ 、 $144.20\pm5.57$ 、 $85.37\pm5.11$ (Figure 2)。与 control 组相比,LPS 组细胞生长明显 ( $P=0.004$ ),siTLR4+LPS 组细胞生长受到抑制 ( $P=0.002$ )。与 LPS 组相比,PDTC+LPS 组抑制生长 ( $P=0.013$ ),siTLR4+LPS 组显著抑制细胞生长 ( $P=0.000$ )。与 PDTC+LPS 组相比,siTLR4+LPS 组细胞生长抑制 ( $P=0.01$ )。可见 LPS 能刺激宫颈癌细胞的生长,而抑制 NF- $\kappa$ B 信号、TLR4 信号途径均能抑制由 TLR4 信号诱导的宫颈癌细胞的生长,而抑制 NF- $\kappa$ B 信号后 Siha 细胞克隆生长抑制现象不如抑制 TLR4 信号明显,提示 TLR4 可主要通过其他信号途径影响宫颈癌细胞的生长。

2.3 HIF-1 $\alpha$  在 Siha 细胞的表达

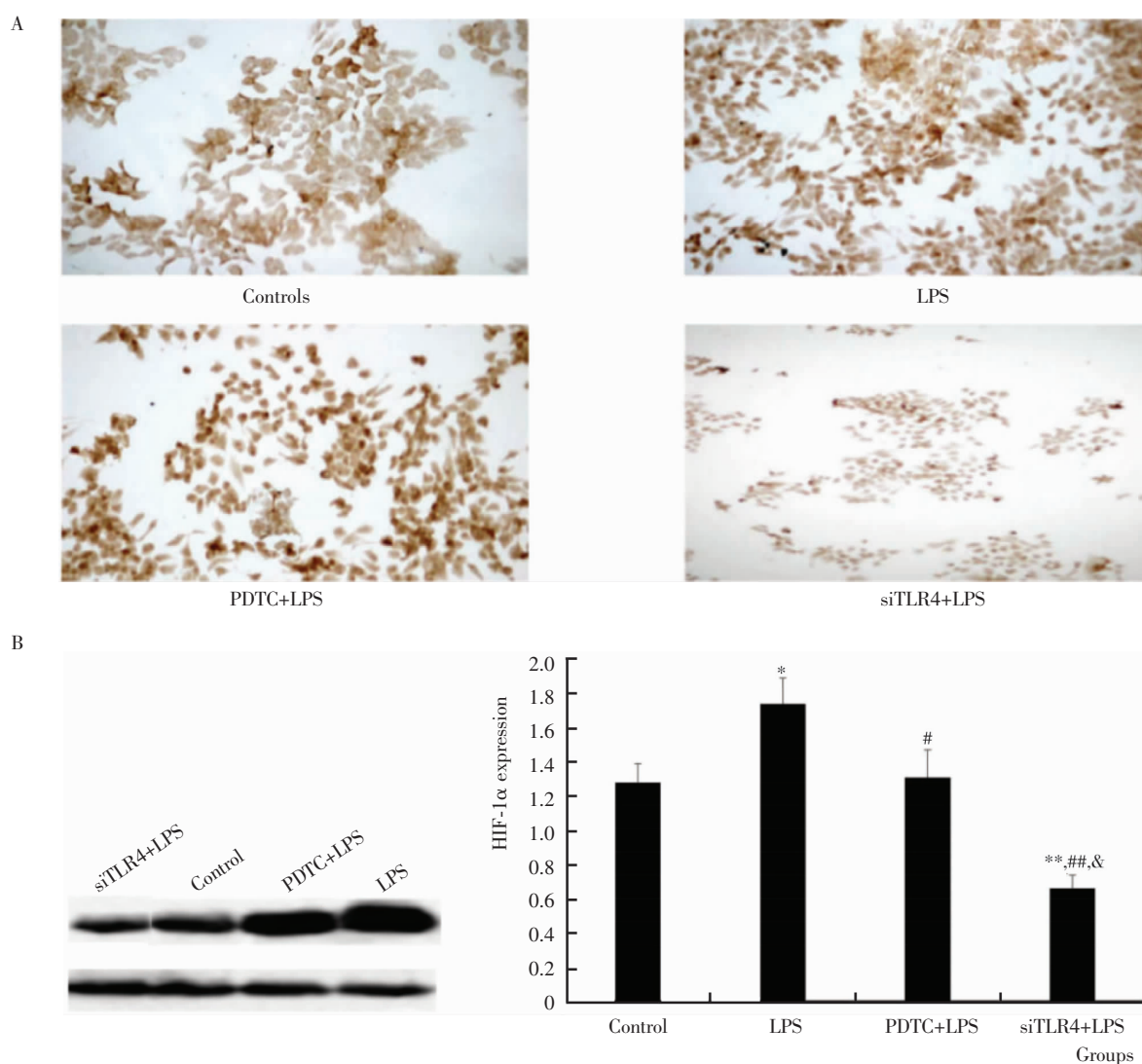
上述各种干预作用于宫颈癌 Siha 细胞,24h 后检测 HIF-1 $\alpha$  的含量,免疫细胞化学染色结果如图 3A(Figure 3A)所示,Western blot 结果如图 3B(Fig-



Note:\*,compared with control group, $P<0.01$ ;#,compared with LPS group, $P<0.05$ , $\Delta$ : $P<0.01$ ;&;compared with PDTC+LPS group, $P<0.01$ .

Figure 2 Colony forming test





A: Immunocytochemistry staining ( $\times 100$ ); B: Western blot analysis.

Note: \*: compared with control group,  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; #: compared with LPS group,  $P < 0.05$ ; ##:  $P < 0.01$ ; &: compared with PDTC+LPS group,  $P < 0.05$ .

**Figure 3 HIF-1 $\alpha$  expression in Siha cells**

ure 3B)所示。结果发现,HIF-1 $\alpha$ 主要定位于细胞浆和细胞核内;Western blot结果显示,与control组( $1.28 \pm 0.11$ )相比,LPS组HIF-1 $\alpha$ 表达( $1.74 \pm 0.15$ )升高( $P = 0.027$ ),而siTLR4+LPS组HIF-1 $\alpha$ 表达明显降低( $0.66 \pm 0.08$ ,  $P = 0.005$ );与LPS组相比,PDTC+LPS组HIF-1 $\alpha$ 表达降低( $1.31 \pm 0.16$ ,  $P = 0.048$ ),siTLR4+LPS组HIF-1 $\alpha$ 表达明显降低( $P = 0.000$ );siTLR4+LPS组与PDTC+LPS组比较,有显著差异( $0.66 \pm 0.08$  vs  $1.31 \pm 0.16$ ,  $P = 0.002$ )。结果表明,刺激TLR4信号可诱导HIF-1 $\alpha$ 表达,抑制TLR4信号可抑制HIF-1 $\alpha$ 表达,然而抑制NF- $\kappa$ B信号通路对HIF-1 $\alpha$ 的表

达有抑制作用,但作用不如抑制TLR4信号明显。

#### 2.4 NADPH氧化酶活性检测结果

宫颈癌Siha细胞内NADPH氧化酶活性检测,结果如表2(Table 2)。实验各组NADPH氧化酶活性呈时间依赖性递增趋势。随着时间的延长,与control组相比,LPS组和PDTC+LPS组NADPH氧化酶活性增强( $P < 0.05$ ),siTLR4+LPS组NADPH氧化酶活性降低( $P < 0.05$ );与LPS组相比,siTLR4+LPS组NADPH氧化酶活性降低( $P < 0.05$ ),而与PDTC+LPS组无明显差异。与PDTC+LPS组相比,siTLR4+LPS组NADPH氧化酶活性降低( $P < 0.01$ )。说明刺激

TLR4 信号能够提高 NADPH 氧化酶活性,抑制 TLR4 信号能抑制 NADPH 氧化酶活性,而抑制 TLR4 信号下游事件 NF- $\kappa$ B 的活化对 NADPH 氧化酶活性无明显作用。

## 2.5 ROS 活性检测结果

实验各组 ROS 含量变化基本呈时间依赖性递增趋势 (Table 3)。随着时间的延长,与 control 组相比, LPS 组和 PDTC+LPS 组 ROS 表达增强 ( $P < 0.05$ ), siTLR4 +LPS 组 ROS 活性降低 ( $P < 0.01$ ); 与 LPS 组相比, siTLR4 +LPS 组 ROS 活性降低 ( $P < 0.01$ ), 而与 PDTC+LPS 组无明显差异。与 PDTC+LPS 组相比, siTLR4 +LPS 组宫颈癌细胞内的 ROS 含量降低 ( $P < 0.01$ )。提示刺激 TLR4 信号能够促进宫颈癌细胞内活性氧的产生,抑制 TLR4 信号能抑制 ROS 的产生,但 NF- $\kappa$ B 信号对 ROS 的产生无明显作用。

## 3 讨论

HIF-1 $\alpha$  是促进恶性肿瘤发生发展的关键因子已经得到了广泛共识,其高表达与宫颈癌疗效密切相关<sup>[5]</sup>,但有关于 HIF-1 $\alpha$  高表达的机制目前并不清楚。已有研究表明, HIF-1 $\alpha$  的过度激活与脯氨酸羟化酶 (prolyl hydroxylase enzymes, PHDs) 活性抑制有显著相关性,低氧可以抑制 PHDs 活性,从而抑制 HIF-1 $\alpha$  的羟化,抑制 HIF-1 $\alpha$  的降解过程,使其与 HIF-1B 结合为 HIF-1,结合到不同基因的增强子或启动元件上,启动下游如血管内皮生长因子、葡萄糖转运蛋白 1 等靶基因的表达,这些基因参与肿瘤的生长,免疫逃逸等促进肿瘤细胞的增殖<sup>[7]</sup>。也有研究表明, NADPH 氧化酶稳定过度激活,使细胞内 ROS 水平稳定升高,持续维持肿瘤细胞常氧状态下 HIF-1 $\alpha$  的高活性状态,这可能是肿瘤治疗后复发的主要因素<sup>[6]</sup>。因此研究宫颈癌细胞内 HIF-1 $\alpha$  高活性的机制对治疗以及预防宫颈癌具有重要的作用。

Table 2 NADPH oxidase activity in Siha cells ( $\bar{x} \pm s$ )

| Groups                      | 0h              | 12h             | 24h             | 36h             | 48h             |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Control                     | 1.00 $\pm$ 0.09 | 1.00 $\pm$ 0.08 | 1.00 $\pm$ 0.06 | 1.00 $\pm$ 0.09 | 1.00 $\pm$ 0.07 |
| siTLR4+LPS <sup>a,b,c</sup> | 0.99 $\pm$ 0.06 | 0.75 $\pm$ 0.05 | 0.73 $\pm$ 0.10 | 0.71 $\pm$ 0.08 | 0.73 $\pm$ 0.09 |
| PDTC+LPS <sup>d</sup>       | 1.01 $\pm$ 0.07 | 1.17 $\pm$ 0.05 | 1.34 $\pm$ 0.04 | 1.38 $\pm$ 0.07 | 1.41 $\pm$ 0.06 |
| LPS <sup>e</sup>            | 0.95 $\pm$ 0.10 | 1.22 $\pm$ 0.08 | 1.38 $\pm$ 0.06 | 1.34 $\pm$ 0.06 | 1.41 $\pm$ 0.03 |

Note: a: compared with control group,  $P_{12h}=0.002$ ,  $P_{24h}=0.003$ ,  $P_{36h}=0.002$ ,  $P_{48h}=0.001$ ; b: compared with LPS group,  $P_{12h}=0.000$ ,  $P_{24h}=0.000$ ,  $P_{36h}=0.000$ ,  $P_{48h}=0.000$ ; c: compared with PDTC+LPS group,  $P_{12h}=0.000$ ,  $P_{24h}=0.000$ ,  $P_{36h}=0.000$ ,  $P_{48h}=0.000$ ; d: compared with control group,  $P_{24h}=0.001$ ,  $P_{36h}=0.000$ ,  $P_{48h}=0.000$ ; e: compared with control group,  $P_{12h}=0.028$ ,  $P_{24h}=0.000$ ,  $P_{36h}=0.001$ ,  $P_{48h}=0.000$ .

Table 3 Fluorescence intensity of ROS in Siha cells ( $\bar{x} \pm s$ )

| Groups                      | 0h              | 12h             | 24h             | 36h             | 48h             |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Control                     | 1.00 $\pm$ 0.14 | 1.00 $\pm$ 0.13 | 1.00 $\pm$ 0.14 | 1.00 $\pm$ 0.11 | 1.00 $\pm$ 0.15 |
| siTLR4+LPS <sup>a,b,c</sup> | 1.00 $\pm$ 0.11 | 0.63 $\pm$ 0.10 | 0.57 $\pm$ 0.08 | 0.52 $\pm$ 0.08 | 0.47 $\pm$ 0.09 |
| PDTC+LPS <sup>d</sup>       | 1.02 $\pm$ 0.13 | 1.25 $\pm$ 0.10 | 1.28 $\pm$ 0.09 | 1.39 $\pm$ 0.15 | 1.38 $\pm$ 0.16 |
| LPS <sup>e</sup>            | 1.02 $\pm$ 0.10 | 1.40 $\pm$ 0.13 | 1.46 $\pm$ 0.13 | 1.57 $\pm$ 0.15 | 1.55 $\pm$ 0.16 |

Note: a: compared with control group,  $P_{12h}=0.004$ ,  $P_{24h}=0.002$ ,  $P_{36h}=0.002$ ,  $P_{48h}=0.002$ ; b: compared with LPS group,  $P_{12h}=0.000$ ,  $P_{24h}=0.000$ ,  $P_{36h}=0.000$ ,  $P_{48h}=0.000$ ; c: compared with PDTC+LPS group,  $P_{12h}=0.000$ ,  $P_{24h}=0.000$ ,  $P_{36h}=0.000$ ,  $P_{48h}=0.000$ ; d: compared with control group,  $P_{12h}=0.030$ ,  $P_{24h}=0.016$ ,  $P_{36h}=0.005$ ,  $P_{48h}=0.012$ ; e: compared with control group,  $P_{12h}=0.003$ ,  $P_{24h}=0.001$ ,  $P_{36h}=0.001$ ,  $P_{48h}=0.002$ .

研究表明, TLR4 的表达与 HIF-1 $\alpha$  高活性密切相关,两者之间存在相互的正反馈作用,共同促进宫颈癌的发生和发展,但具体作用机制尚不清楚<sup>[8]</sup>。我们先前研究已证实,宫颈癌细胞中 TLR4 表达呈升高的趋势, HPV LPS 激活的 TLR4 信号有促进细胞增殖和抗凋亡的作用<sup>[9]</sup>。

目前许多研究认为 TLR4 信号依赖 NF- $\kappa$ B 的活化,抑制 HIF-1 $\alpha$  的降解来维持 HIF-1 $\alpha$  活性<sup>[10-12]</sup>。NF- $\kappa$ B 作为调节免疫和炎症重要的核转录因子,正常情况下其两个亚单位 p65 和 p50 与  $\kappa$ B 抑制蛋白 (I $\kappa$ B) 结合,以非活性状态存在于细胞质中。PDTC 是一种 NF- $\kappa$ B 信号通路阻断剂,能阻止 I $\kappa$ B 亚单位的降解,抑制 NF- $\kappa$ B 活化,同时也阻碍 NF- $\kappa$ B 向细胞核内的转移,从而阻断 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活,在转录水平上抑制 IL-1、TNF- $\alpha$  等炎性细胞因子的产生<sup>[13]</sup>。我们先前的研究已经证明常氧状态下宫颈癌组织中 HIF-1 $\alpha$  表达明显升高, ROS 特别是细胞内 NADPH 氧化酶来源的 ROS 增多参与维持细胞内 HIF-1 $\alpha$  高活性<sup>[14]</sup>。而 NADPH 氧化酶是否在 TLR4 信号维持 HIF-1 $\alpha$  高活性促进宫颈癌发生发展过程中发挥关键作用尚无相关报道。

因此本次实验选择宫颈癌 Siha 细胞株,通过干预 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 信号途径来检测宫颈癌细胞内 ROS、NADPH 氧化酶活性以及 HIF-1 $\alpha$  活性变化,以

探索 TLR4 致宫颈癌 HIF-1 $\alpha$  高活性的具体机制。实验结果表明, 实验各组 NADPH 氧化酶活性的变化与 ROS 含量的变化趋势基本一致, HIF-1 $\alpha$  含量变化与 ROS 含量变化趋势一致。与对照组相比, 用 LPS 刺激 TLR4 信号能显著促进宫颈癌细胞生长, HIF-1 $\alpha$  活性升高, 且 NADPH 氧化酶活性和 ROS 含量均升高; 用 siTLR4 沉默 TLR4 表达后, 能显著抑制宫颈癌细胞的生长, HIF-1 $\alpha$  活性、NADPH 氧化酶活性和 ROS 含量均下降。表明 TLR4 与宫颈癌的发生发展密切相关, 且在维持宫颈癌细胞内 HIF-1 $\alpha$  高活性中发挥重要作用, 其机制可能与 NADPH 氧化酶来源的活性氧有关。TLR4 信号激活后抑制 NF- $\kappa$ B 信号发现, 与单纯激活 TLR4 信号相比, 能抑制宫颈癌细胞的生长, 降低 HIF-1 $\alpha$  活性, 但抑制 NF- $\kappa$ B 信号不如抑制 TLR4 信号对宫颈癌细胞生长、HIF-1 $\alpha$  活性抑制作用明显。提示除 NF- $\kappa$ B 信号外, 另有其他途径参与 TLR4 信号转导通路促进宫颈癌细胞的发生和发展。抑制 TLR4 后 NADPH 氧化酶活性和 ROS 含量均下降, 而抑制 NF- $\kappa$ B 信号后 NADPH 氧化酶活性和 ROS 含量无明显变化。这进一步表明 TLR4 可主要通过 NADPH 氧化酶来源的活性氧, 参与维持 HIF-1 $\alpha$  高活性, 促进宫颈癌的发生和发展, 而此氧化还原过程非依赖 NF- $\kappa$ B 信号途径。

综上所述, 本实验证实了 NF- $\kappa$ B 信号通路在 TLR4 致宫颈癌的发生和发展中扮演重要作用, NF- $\kappa$ B 信号可促进宫颈癌细胞内 HIF-1 $\alpha$  的表达。我们发现在宫颈癌细胞中 TLR4 信号转导通路可主要通过激活 NADPH 氧化酶来源的 ROS 信号途径, 来维持宫颈癌细胞内 HIF-1 $\alpha$  高活性, 但 NF- $\kappa$ B 信号通路不参与此途径。这为研究 HIF-1 $\alpha$  高活性促进肿瘤发生和发展的机制提供新的依据。

## 参考文献:

- [1] Park BS, Song DH, Kim HM, et al. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex[J]. *Nature*, 2009, 458: 1191.
- [2] Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway[J]. *Cytokine*, 2008, 42 (2): 145.
- [3] Song J, Fan HJ, Li H, et al. Zingerone ameliorates lipopolysaccharide-induced acute kidney injury by inhibiting Toll-like receptor 4 signaling pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 772: 108–114.
- [4] Yllyharju J, Koivunen P. Hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylases: common and specific roles[J]. *Biol Chem*, 2013, 394(4): 435–448.
- [5] Cheng YX, Hu M, Chen L, et al. The mechanism of lipid raft mediating chemoresistance of cervical cancer[J]. *Saudi Med J*, 2012, 33(5): 508–514.
- [6] Niecknig H, Tug S, Reyes BD, et al. Role of reactive oxygen species in the regulation of HIF-1 by prolyl hydroxylase 2 under mild hypoxia [J]. *Free Radical Res*, 2012, 46 (6): 705–717.
- [7] Yang J, Chen S, Huang X, et al. Growth suppression of cervical carcinoma by pigment epithelium-derived factor via anti-angiogenesis [J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 9(12): 967–974.
- [8] Nothdurfter C, Tanasic S, Di Benedetto B, et al. Lipid raft integrity affects GABAA receptor, but not NMDA receptor modulation by psychopharmacological compounds[J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2012, 10(10): 1–11.
- [9] Cheng YX, Qi XY, Huang JL, et al. Toll-like receptor 4 signaling promotes the immunosuppressive cytokine production of human cervical cancer [J]. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2012, 33(3): 291–294.
- [10] Nishi K, Oda T, Takabuchi S, et al. LPS induces hypoxia-inducible factor 1 activation in macrophage-differentiated cells in a reactive oxygen species-dependent manner[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2008, 10(5): 983–995.
- [11] Tewari R, Choudhury SR, Ghosh S, et al. Involvement of TNF $\alpha$ -induced TLR4-NF- $\kappa$ B and TLR4-HIF-1 $\alpha$  feed-forward loops in the regulation of inflammatory responses in glioma[J]. *Mol Med (Berl)*, 2012, 90(1): 67–80.
- [12] Fo BL, Wen TL, Ying YJ, et al. Lipopolysaccharide supports maintaining the stemness of CD133+ hepatoma cells through activation of the NF- $\kappa$ B/HIF-1 $\alpha$  pathway[J]. *Cancer Lett*, 2016, 378: 131–141.
- [13] Austin DC, Strand DW, Love HL, et al. NF-kappa B and androgen receptor variant expression correlate with human BPH progression [J]. *Prostate*, 2016, 76(5): 491–511.
- [14] Cheng YX, Chen G, Hong L, et al. How does hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  participate in enhancing the glycolysis activity in cervical cancer?[J]. *Ann Diagn Pathol*, 2013, 17 (3): 305–311.