

• 论著-实验研究 •

抑制 TLR4 表达在雷公藤内酯醇增强胃癌 BGC823 细胞对 5-FU 敏感性中的作用*

耿静¹ 张树贤¹ 孙运良¹

[摘要] 目的:观察雷公藤内酯醇(TPL)是否可通过抑制 Toll 样受体 4(TLR4)表达以增强胃癌 BGC823 细胞对 5-FU 的敏感性,并分析其相关的下游分子机制。方法:采用 CCK-8 法检测不同浓度 TPL 以及 TPL 联合 5-FU 对 BGC823 细胞的增殖的影响。将 BGC823 细胞分为对照组、5-FU 组(仅予 5-FU)、TPL+5-FU 组以及脂多糖(LPS)+TPL+5-FU 组;Hoechst33258 染色观察细胞凋亡形态学变化,流式细胞仪检测细胞凋亡率,Western blot 检测 TLR4、磷酸化 AKT(p-AKT)、Survivin、活性 Caspase-3 蛋白表达。结果:TPL 可呈浓度-时间依赖性的抑制 BGC823 细胞增殖。与 5-FU 组比较,TPL 联合 5-FU 后对 BGC823 细胞的抑制率明显增加($P < 0.01$),其 5-FU 的半数抑制浓度(IC_{50})显著降低($P < 0.01$)。与 5-FU 组比较,TPL+5-FU 组凋亡细胞数和细胞凋亡率均显著增加($P < 0.01$);而 LPS+TPL+5-FU 组凋亡细胞数以及细胞凋亡率均较 TPL+5-FU 组显著下降($P < 0.05$)。TPL+5-FU 组的 TLR4、p-AKT、Survivin 蛋白表达均较 5-FU 组下降,而活性 Caspase-3 蛋白表达增加;与 TPL+5-FU 组比较,LPS+TPL+5-FU 组的 p-AKT、Survivin 蛋白表达增加,活性 Caspase-3 蛋白表达减少。结论:TPL 具有增强 BGC823 细胞对 5-FU 敏感性的作用,其机制与抑制 TLR4 表达,进而阻断 PI3K/AKT 通路、下调 Survivin 表达并促进 Caspase-3 活化有关。

[关键词] 雷公藤内酯醇;Toll 样受体 4;胃癌;磷酸化 AKT;活性 Caspase-3

DOI:10.3969/j.issn.1671-038X.2022.04.05

[中图分类号] R735.2 **[文献标志码]** A

Triptolide enhances the sensitivity of gastric cancer BGC823 cells to 5-FU by suppressing TLR4 expression

GENG Jing ZHANG Shuxian SUN Yunliang

(Department of Gastroenterology, First People's Hospital of Lianyungang, Lianyungang, Jiangsu, 222000, China)

Corresponding author: SUN Yunliang, E-mail: 13961316909@163.com

Abstract Objective: To observe whether triptolide (TPL) could enhance the sensitivity of gastric cancer BGC823 cells to 5-FU by inhibiting the expression of Toll like receptor 4 (TLR4), and analyze the related downstream molecular mechanisms. **Methods:** The CCK-8 method was used to detect the effects of different concentrations of TPL and TPL combined with 5-FU on the proliferation of BGC823 cells. BGC823 cells were divided into control group, 5-FU group, TPL + 5-FU group and lipopolysaccharide (LPS) + TPL + 5-FU group; Hoechst33258 staining was used to observe the apoptosis morphological changes and flow cytometry was used to detect the cell apoptosis rate. TLR4, phosphorylated Akt (p-Akt), Survivin and Caspase-3 protein expression were detected by Western blot. **Results:** TPL could inhibit the proliferation of BGC823 cells in a concentration-time dependent manner. Compared with the 5-FU group, the inhibition rate of the TPL combined with 5-FU group on BGC823 cells increased significantly ($P < 0.01$), and the half inhibitory concentration (IC_{50}) of 5-FU decreased significantly ($P < 0.01$). Compared with the 5-FU group, the number of apoptotic cells and apoptosis rate of the TPL+5-FU group were significantly increased ($P < 0.01$); However, the number of apoptotic cells and cell apoptosis rate of the LPS+ TPL + 5-FU group were significantly lower than those of the TPL + 5-FU group ($P < 0.05$). The TLR4, p-Akt and Survivin protein expression of the TPL+5-FU group were higher than those of the 5-FU group, and the expression of active Caspase-3 protein increased. Compared with the TPL+5-FU group, the p-Akt and Survivin protein expression of the LPS+ TPL + 5-FU group increased, but active Caspase-3 protein ex-

*基金项目:连云港市卫生健康委指导性科研项目(No:ZD1903)

¹连云港市第一人民医院消化内科(江苏连云港,222000)

通信作者:孙运良,E-mail:13961316909@163.com

pression reduced. **Conclusion:** TPL can enhance the sensitivity of BGC823 cells to 5-FU, its mechanism is related to inhibiting TLR4 expression, blocking the PI3K/AKT pathway, down regulating Survivin expression and promoting Caspase-3 activation.

Key words triptolide; Toll like receptor 4; gastric cancer; phosphorylated AKT; active Caspase-3

胃癌当前的化疗方案仍以 5-氟尿嘧啶(5-Fluorouracil, 5-FU)为基础,但机体的耐药性使 5-FU 的应用受到了一定的限制,如何增强胃癌细胞对 5-FU 的敏感性已成为目前亟需解决的临床问题。雷公藤内酯醇(Triptolide, TPL)已被证实具有广谱的抗肿瘤作用,而且能增加其他化疗药物的敏感性^[1-4]。Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)在多种肿瘤细胞呈高表达,且高表达的 TLR4 与肿瘤细胞的化疗耐药密切相关^[5-9]。但目前关于 TPL 是否可通过抑制 TLR4 表达从而增强其他化疗药物的敏感性尚报道较少。本研究通过 TPL 与 5-FU 作用于体外培养的胃癌 BGC823 细胞,观察 TPL 是否可通过抑制 TLR4 表达增强 BGC823 细胞对 5-FU 的敏感性,并分析其相关的下游分子机制,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

人胃癌细胞株 BGC823 购自美国 ATCC 公司。TPL 为上海融禾医药科技发展有限公司产品(纯度 $\geq 98.0\%$,批号:120416)。5-FU 购自上海旭东海普药业有限公司(批号:FA150606)。LPS 为 Sigma 公司产品(批号: # 028M4022V)。CCK-8 试剂盒(批号:C0042)、AnnexinV-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(批号:C1062M)、Hoechst 33258(批号 20180425)均为碧云天公司产品。磷酸化 AKT(p-AKT)单克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司(批号: # 4060), TLR4(批号: 0284381)、Survivin(批号:A0609)、活性 Caspase-3 多克隆抗体(批号:J1107)为 Santa Cruz 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 BGC823 细胞在含有 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液中,37℃、5% CO₂ 条件下培养,培养液中含青霉素、链霉素各 100 U/mL。

1.2.2 CCK-8 法检测 BGC823 细胞增殖 将处于对数生长期的 BGC823 细胞以 5×10^3 /孔的细胞浓度加入 96 孔板,并分别加入终浓度为 0、2.5、5、10、20、40 ng/mL 的 TPL 继续培养 48 或 72 h,以 CCK-8 法检测细胞增殖。为了检测 TPL 联合 5-FU 对 BGC823 增殖的影响,将细胞分为:① 5-FU 组:分别加入终浓度为 0、3.125、6.25、12.5、25、50 $\mu\text{g/mL}$ 的 5-FU; ② TPL+5-FU 组:以 10 ng/mL 的 TPL 分别联合 0、3.125、6.25、12.5、25、50 $\mu\text{g/mL}$ 的 5-FU; ③ LPS+TPL+5-FU 组:以 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS 预处理 4 h 后,再以 10 ng/mL 的 TPL 分别联合 0、3.125、6.25、12.5、25、

50 $\mu\text{g/mL}$ 的 5-FU。将各组细胞继续培养 48 h 后,每孔加入 10 μL 的 CCK-8 试剂,继续培养 4 h,在酶联免疫检测仪波长 490 nm 处测量各孔的吸光值(A 值),细胞抑制率(%) = $1 - (\text{实验孔 A 值} / \text{空白对照孔 A 值}) \times 100\%$ 。

采用金氏公式 $q = E(a+b) / (Ea+Eb - Ea \times Eb)$ 来评价两药联合后的交互作用,其中 Ea 、 Eb 与 $E(a+b)$ 分别代表 a、b 两药单独及联合应用时对细胞的抑制率。当 $q > 1.15$,两药具有协同作用; q 为 0.85~1.15 时,两药具有单纯相加作用; $q < 0.85$,两药相互拮抗。

1.2.3 Hoechst33258 染色观察细胞凋亡 将 BGC823 细胞以 5×10^5 /孔接种于 6 孔板后分为 4 组。① 对照组:不加任何处理因素;② 5-FU 组:加入 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 5-FU; ③ TPL+5-FU 组:加入 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 5-FU 联合 10 ng/mL 的 TPL; ④ LPS+TPL+5-FU 组:以 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS 预处理 4 h 后,再加入 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 5-FU 联合 10 ng/mL 的 TPL。将各组细胞继续培养 24 h 后,弃去培养液,采用 Hoechst33258 染色,荧光显微镜观察细胞凋亡形态变化。

1.2.4 流式细胞仪检测 BGC823 细胞凋亡 将 BGC823 细胞分别以 1×10^5 /孔接种于 24 孔板,待细胞贴壁后,按 1.2.3 方法分为 4 组,继续培养 24 h 后收集各组细胞,以 Annexin V-FITC 标记后,通过流式细胞仪检测细胞的凋亡。

1.2.5 Western blot 检测 BGC823 细胞 TLR4、p-AKT、Survivin、活性 Caspase-3 蛋白表达 将 BGC823 细胞按上述方法分为 4 组或经不同浓度的 TPL 处理 24 h 后,收集细胞,提取细胞总蛋白,蛋白分析系统(Bio-Rad)测定蛋白浓度,上样于 20% SDS-PAGE 电泳,电转移到硝酸纤维素膜。室温下用含 5% 脱脂奶粉的 1×TBS 封膜 2 h。分别加入 TLR4、p-AKT、Survivin、活性 Caspase-3 抗体,4℃ 孵育过夜,洗膜后加入相应的辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗,室温孵育 2 h,ECL 显影。结果用凝胶图像软件分析系统对胶片扫描,与内参照 β -actin 进行比较。

1.3 统计学方法

所有数据均应用 SPSS 11.0 统计软件包进行分析,计量资料以 $\bar{X} \pm S$ 表示,采用 t 检验与方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TPL 对 BGC823 细胞增殖及 TLR4 表达的影响 实验结果显示,TPL 对 BGC823 细胞的抑制

率随着 TPL 浓度的增加和作用时间的延长而逐渐增加,表明 TPL 呈时间依赖性抑制 BGC823 细胞增殖(图 1a);Western blot 的结果显示,随着浓度的增加,TPL 可明显抑制 BGC823 细胞 TLR4 蛋白表达(图 1b)。

2.2 TPL 联合 5-FU 对 BGC823 细胞增殖及 TLR4 表达的影响

与 5-FU 组比较,随着 5-FU 浓度的增加,TPL+5-FU 组对 BGC823 细胞的抑制率明显增加(图 2a);TPL+5-FU 组 5-FU 对 BGC823 细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)为(3.52±0.35)μg/mL,显著低于 5-FU 组的(26.549±2.12)μg/mL(P<0.01);金氏公式计算 10 ng/mL 的 TPL 联合 3.125、6.25、12.5、25、50 μg/mL 5-FU 的 q 值分别为 1.17、1.18、1.19、1.16、1.16。以上结果表明,TPL 具有增强 BGC823 细胞对 5-FU 敏感性的作用,可协同抑制 BGC823 细胞的增殖。Western blot 的结果显示(图 2b),TPL+5-FU 组 BGC823 细胞 TLR4 蛋白表达较对照组与 5-FU 组均明显减少,提示抑制 TLR4 表达可能是 TPL 增强 BGC823 细胞对 5-FU 敏感性作用的重要机制。研究结果还显示,经过 LPS 预处理后激活 TLR4 后,LPS+TPL+5-FU 组对 BGC823 细胞的抑制率较 TPL+5-FU 组明显下降(图 2a),其 5-FU 的 IC₅₀ 为(12.76±1.27)μg/mL,显著高于 TPL+5-FU 组(P<0.01),且其 TLR4 蛋白表达也较 TPL+5-FU 组增加(图 2b),进一步证实 TPL 可通过抑制 TLR4 增加 BGC823 细胞对 5-FU 的敏感性。

2.3 TPL 联合 5-FU 对 BGC823 细胞凋亡形态的影响

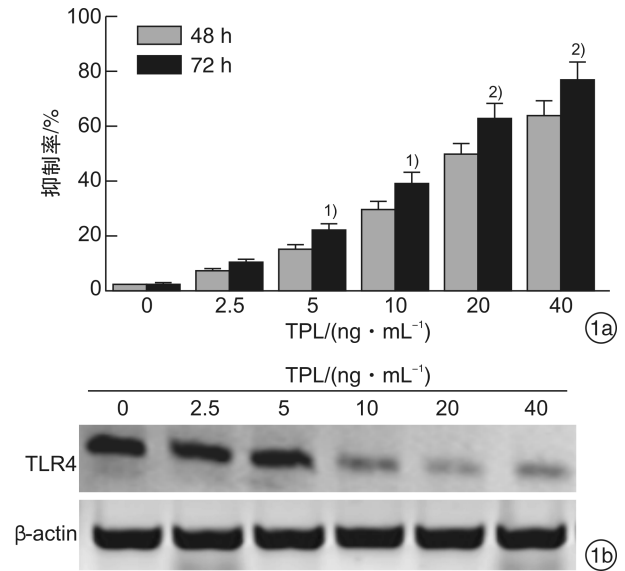
Hoechst33258 染色结果显示(图 3),荧光显微镜下,5-FU、TPL+5-FU 以及 LPS+TPL+5-FU 组的细胞均出现了细胞核浓缩亮染以及凋亡小体形成等典型的细胞凋亡形态学改变。但 TPL+5-FU 组凋亡细胞数较 5-FU 组明显增加;而经过 LPS 预处理后,LPS+TPL+5-FU 组凋亡细胞数较 TPL+5-FU 组明显减少。

2.4 TPL 联合 5-FU 对 BGC823 细胞凋亡率的影响

5-FU、TPL+5-FU 以及 LPS+TPL+5-FU 组的细胞凋亡率分别为(16.3±2.3)%、(26.7±2.9)%和(19.6±2.2)%,均显著高于对照组的(2.1±0.3)%(均 P<0.01,图 4)。与 5-FU 组比较,TPL+5-FU 组凋亡细胞数显著增加(P<0.01);而 LPS+TPL+5-FU 组凋亡细胞数较 TPL+5-FU 组显著下降(P<0.05)。

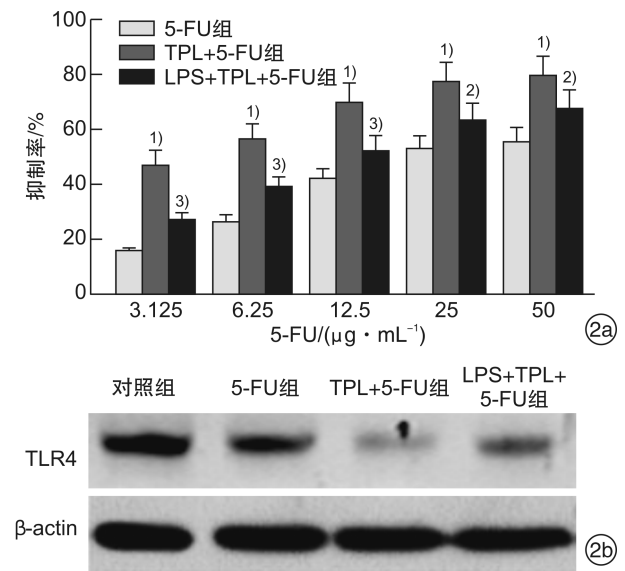
2.5 TPL 联合 5-FU 对 BGC823 细胞 p-AKT、Survivin、活性 Caspase-3 表达的影响

Western blot 的结果显示(图 5),TPL+5-FU 组的 p-AKT、Survivin 蛋白表达均较 5-FU 组下降,而活性 Caspase-3 蛋白表达增加。与 TPL+5-FU 组比较,LPS+TPL+5-FU 组的 p-AKT、Survivin 蛋白表达增加,活性 Caspase-3 蛋白表达减少。



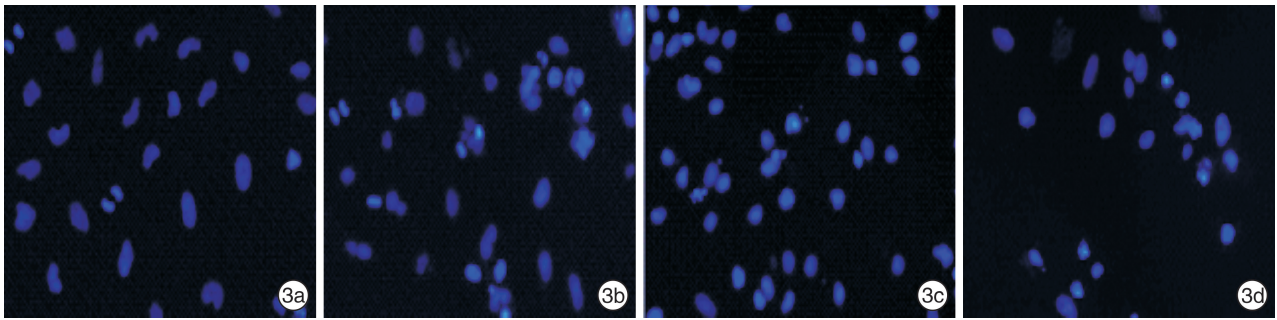
1a:不同浓度 TPL 对 BGC823 细胞的抑制率;与培养 48 h 组比较,¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;1b:不同浓度 TPL 对 BGC823 细胞 TLR4 蛋白表达的影响。

图 1 TPL 对 BGC823 细胞增殖及 TLR4 表达的影响



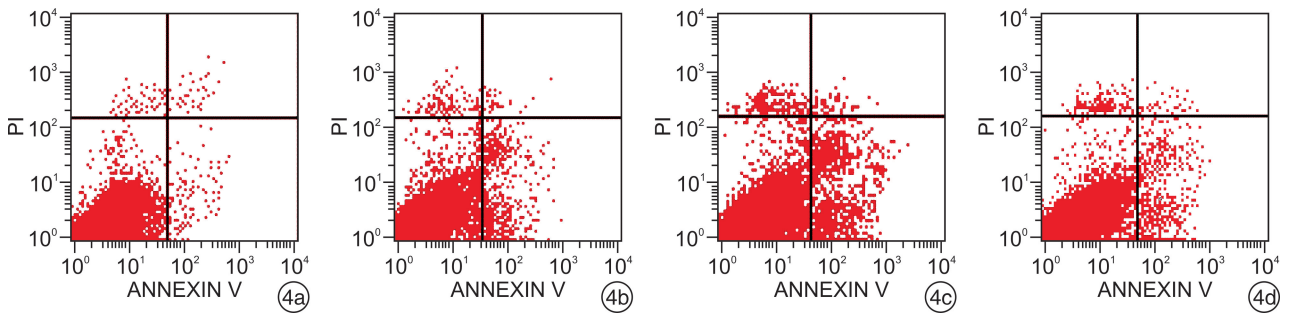
2a:不同浓度 5-FU 及是否联合 TPL 对 BGC823 细胞的抑制率;与 5-FU 组比较,¹⁾P<0.01;与 TPL+5-FU 组比较,²⁾P<0.05,³⁾P<0.01;2b:5-FU 是否联合 TPL 对 BGC823 细胞 TLR4 蛋白表达的影响。

图 2 TPL 联合 5-FU 对 BGC823 细胞增殖及 TLR4 表达的影响



3a:对照组;3b:5-FU组;3c:TPL+5-FU组;3d:LPS+TPL+5-FU组。

图 3 TPL 联合 5-FU 对 BGC823 细胞凋亡形态的影响



4a:对照组;4b:5-FU组;4c:TPL+5-FU组;4d:LPS+TPL+5-FU组。

图 4 TPL 联合 5-FU 对 BGC823 细胞凋亡率的影响

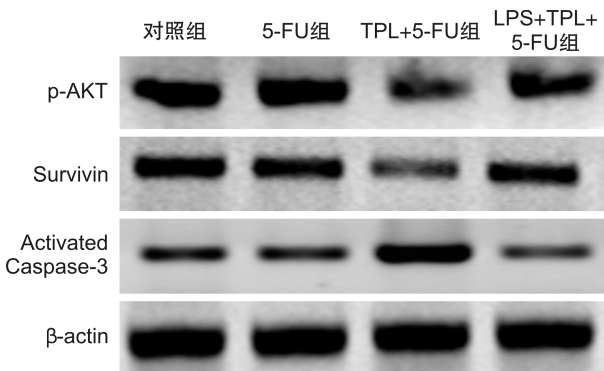


图 5 TPL 联合 5-FU 对 BGC823 细胞 p-AKT、Survivin、活性 Caspase-3 表达的影响

3 讨论

TPL 是我国中药雷公藤的主要活性成分,大量的研究发现,TPL 具有多靶点的抗肿瘤作用,其机制与抑制细胞增殖、促进细胞凋亡、抗肿瘤血管生成等有关^[1-4]。近年的研究还表明,TPL 可增强肿瘤细胞对其他化疗药物的敏感性^[9]。Huang 等^[3]的研究结果显示,TPL 不仅能够抑制卵巢癌 SKOW3 细胞的增殖,联合顺铂后还具有协同作用,能显著增强顺铂对卵巢癌细胞的增殖抑制作用。Yang 等^[4]通过体内外实验发现,低剂量的 TPL 可明显增强羟基喜树碱对膀胱癌细胞的增殖抑制及凋亡诱导作用,而且没有明显的不良反应。本研究结果显示,TPL 不仅可呈浓度-时间依赖性

的抑制 BGC823 细胞增殖,且小剂量 TPL 联合 5-FU 后可协同抑制 BGC823 细胞增殖、诱导细胞凋亡,表明 TPL 具有增强 BGC823 细胞对 5-FU 敏感性的作用。

尽管已有大量研究表明 TPL 具有增强其他化疗药物敏感性的作用,但其相关的分子机制仍有待于进一步明确。本研究发现,TPL 可抑制 BGC823 细胞 TLR4 表达,且 TPL+5-FU 组在抑制 BGC823 细胞增殖、促进细胞凋亡的同时,TLR4 表达较 5-FU 组明显下降;然而经 LPS 预处理激活 TLR4 后,LPS+TPL+5-FU 组对 BGC823 细胞的增殖抑制以及凋亡诱导作用较 TPL+5-FU 组明显下降。这些结果提示,TPL 可通过抑制 TLR4 表达增强 BGC823 细胞对 5-FU 的敏感性。Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)是一类跨膜受体蛋白,其中 TLR4 是目前研究较多的 TLRs 家族成员。在 TLR4 信号传导途径中,LPS 可识别并结合 TLR4,进而产生信号转导。目前的研究已证实,TLR4 在多种肿瘤细胞中呈高表达,不仅参与了多种肿瘤的发生、发展,且与肿瘤细胞的化疗耐药密切相关^[5-9]。Zhang 等^[5]通过全基因组微阵列分析发现,TLR4 信号通路与结肠癌对 5-FU 的敏感性密切相关,TLR4 信号通路被激活后,可促进 BIRC3 基因表达,进而降低结肠癌细胞对 5-FU 的敏感性。Ma 等^[9]的研究结果证实,TLR4 表达与胰腺癌 PANC-1 细胞对吉西他滨的耐药有关,

TPL可通过抑制TLR4表达进而增强PANC-1细胞对吉西他滨的敏感性。此外已有研究发现,紫杉醇具有激活TLR4信号通路,也是TLR4的重要配体,可诱导多种细胞因子表达,从而降低肿瘤细胞对紫杉醇的药物敏感性^[6]。

关于TLR4过度表达是如何促进肿瘤细胞的发生发展以及化疗耐药的下游机制目前尚未完全阐明。研究表明,在TLR4促肿瘤的机制中,PI3K/AKT通路起到了重要的作用,TLR4可激活PI3K/AKT通路,持续激活的PI3K/AKT通路能够诱导Survivin表达并抑制Caspase-3活性,从而在促进肿瘤的发生、发展及其耐药过程中起到重要的作用^[10-11]。我们的研究也发现,在抑制TLR4表达的同时,TPL+5-FU组BGC823细胞p-AKT、Survivin表达较5-FU组明显减少,而活性Caspase-3表达明显增加;LPS+TPL+5-FU组p-AKT、Survivin表达较TPL+5-FU组显著增加,而活性Caspase-3表达明显减少。以上结果提示,TPL具有抑制BGC823细胞TLR4表达,进而阻断PI3K/AKT通路、下调Survivin表达并促进Caspase-3活化的作用。

总之,我们的研究发现,TPL具有促进BGC823细胞对5-FU敏感性的作用,其机制与TPL抑制TLR4表达,进而激活PI3K/AKT通路,下调Survivin表达并促进Caspase-3活化有关。但TPL增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性的机制涉及到多方面的因素,抑制TLR4表达可能只是其中的一种形式,其相关的分子机制仍有待于进一步明确。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wang S, Jiang H, Wang J, et al. Superior in vitro anti-cancer effect of biomimetic paclitaxel and triptolide co-delivery system in gastric cancer [J]. *J Biomed Res*, 2021, 35(4): 327-338.
- [2] Deng QD, Lei XP, Zhong YH, et al. Triptolide suppresses the growth and metastasis of non-small cell lung cancer by inhibiting β -catenin-mediated epithelial-mesenchymal transition [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(9): 1486-1497.
- [3] Huang G, Hu H, Zhang Y, et al. Triptolide sensitizes cisplatin-resistant human epithelial ovarian cancer by inhibiting the phosphorylation of AKT [J]. *J Cancer*, 2019, 10(13): 3012-3020.
- [4] Yang Y, Zhang LJ, Bai XG, et al. Synergistic antitumour effects of triptolide plus gemcitabine in bladder cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 1307-1316.
- [5] Zhang S, Yang Y, Weng W, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes chemoresistance to 5-fluorouracil by upregulation of BIRC3 expression in colorectal cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 14.
- [6] Bates M, Spillane CD, Gallagher MF, et al. The role of the MAD2-TLR4-MyD88 axis in paclitaxel resistance in ovarian cancer [J]. *PLoS One*, 2020, 15(12): e0243715.
- [7] Szajnik M, Szczepanski MJ, Czystowska M, et al. TLR4 signaling induced by lipopolysaccharide or paclitaxel regulates tumor survival and chemoresistance in ovarian cancer [J]. *Oncogene*, 2009, 28(49): 4353-4363.
- [8] Sun T, Liu Y, Li M, et al. Administration with hyperoside sensitizes breast cancer cells to paclitaxel by blocking the TLR4 signaling [J]. *Mol Cell Probes*, 2020, 53: 101602.
- [9] Ma JX, Sun YL, Yu Y, et al. Triptolide enhances the sensitivity of pancreatic cancer PANC-1 cells to gemcitabine by inhibiting TLR4/NF- κ B signaling [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(6): 3750-3760.
- [10] Liu R, Chen Y, Liu G, et al. PI3K/AKT pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(9): 797.
- [11] Wang J, Lv X, Guo X, et al. Feedback activation of STAT3 limits the response to PI3K/AKT/mTOR inhibitors in PTEN-deficient cancer cells [J]. *Oncogenesis*, 2021, 10(1): 8.

(收稿日期:2022-01-10)