



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2021.08.014

http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2021.08.014

· 论著 ·

髓样分化蛋白-2 及 Toll 样受体 4 在星形细胞瘤中的表达及临床意义

方亮 李得生

【摘要】 目的 检测不同级别星形细胞瘤中髓样分化蛋白-2(MD2)和 Toll 样受体 4(TLR4)的表达,并探讨其临床意义。**方法** 收集 2019 年 1 月~2020 年 8 月于山东国欣颐养集团新汶中心医院接受手术切除治疗的低级别星形细胞瘤(LGA)患者 50 例及高级别星形细胞瘤(HGA)患者 50 例,所有患者的肿瘤组织样本于术中离体后立刻保存于液氮中,采用免疫组化法检测肿瘤组织中 TLR4、MD2、髓样分化因子 88(MYD88)和肿瘤坏死因子(TNF- α)的表达水平,采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)法检测肿瘤组织中 TLR4、MD2、MYD88 和 TNF- α 的 mRNA 表达水平。采用 Pearson 线性相关分析探讨 TLR4、MD2 与下游因子 MYD88 和 TNF- α 的相关性。**结果** HGA 组患者肿瘤组织中 TLR4、MD2、MYD88、TNF- α 及其 mRNA 的表达水平均高于 LGA 组($P < 0.01$)。星形细胞瘤患者 MYD88 和 TNF- α 的表达水平与 TLR4、MD2 均呈正相关($P < 0.05$)。**结论** MD2、TLR4 在 HGA 中表达水平高于 LGA,同时下游关键信号因子 MYD88 和 TNF- α 表达水平也高于 LGA,且 MD2、TLR4 的表达水平与 MYD88 和 TNF- α 的表达水平显著相关,提示 MD2、TLR4 在星形细胞瘤发生发展中具有重要的作用。

【关键词】 髓样分化蛋白-2; Toll 样受体 4; 星形细胞瘤; 髓样分化因子 88; 肿瘤坏死因子 α

[中图分类号] R739.41

[文献标识码] A

Toll 样受体 4(TLR4)是一种在感染和炎症中起重要作用的受体,在哺乳动物中,Toll 样受体高度保守,可参与非特异性免疫^[1]。研究表明,TLR4 还参与了恶性肿瘤的发生发展过程,并在肿瘤免疫逃逸中发挥关键作用^[2]。在炎症反应中,髓样分化蛋白-2(MD2)是起连接作用的重要蛋白,和 TLR4 结合后与脂多糖(LPS)共同参与炎症免疫反应。星形细胞瘤是一种恶性程度很高的恶性肿瘤,预后较差,死亡率较高,且目前常规的外科手术等手段无法根治高级别星形细胞瘤(HGA)。TLR4-MD2 作为神经炎症发生的主要信号,其发生发展与神经炎症反应、基因突变等密切相关^[3],但目前在星形细胞瘤的研究中尚未见明确报道。本研究采用免疫组化法和实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)法检测不同级别星形细胞瘤组织中 TLR4、MD2 的蛋白和 mRNA 表达水平及下游关键信号因子中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、髓样分化因子 88(MYD88)蛋白和 mRNA 表达水平,并探讨其临床意义。

对象与方法

1. 对象:收集 2019 年 1 月~2020 年 8 月于山东国欣颐养集团新汶中心医院接受手术切除的低级别星形细胞瘤(LGA,WHO I 级、II 级)患者 50 例及 HGA(WHO III 级、IV 级)患者 50 例,所有患者术后经病理组织检查证实为星形细胞瘤^[4]。按照 WHO 分级标准^[4],I 级患者中毛细胞型星形细胞瘤 14 例,室管膜下巨细胞型星形细胞瘤 9 例;II 级患者中弥漫型星形细胞瘤 16 例,少突胶质细胞瘤 11 例;III 级患者中间变星形细胞瘤 9 例,间变少突胶质细胞瘤 10 例;IV 级患者中胶质母细胞瘤 31 例。排除标准:(1)术前接受化疗或放疗;(2)临床资料缺失;(3)肝肾功能不全。本研究通过山东国欣颐养集团新汶中心医院伦理委员会审核批准。

2. 方法

(1)免疫组化法检测 TLR4、MD2、MYD88 和 TNF- α 的表达水平:所有患者肿瘤组织样本于术中离体后立刻保存于液氮中。肿瘤组织经甲醛固定、石蜡包埋、切片后采用 EnVision 试剂盒进行免疫组化染色。TLR4、

MD2、MYD88 和 TNF- α 的单克隆抗体购于 Abcam 公司(产品号: ab13556、ab24182、ab135693、ab6671), 阴性对照采用血清代替一抗, 空白对照采用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗。在 400 倍显微镜下, 采用 5 个不同的视野进行阳性细胞观察, 对染色程度(阴性着色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 浅褐色为 2 分, 深褐色为 3 分)和阳性范围(0~25% 为 1 分, 26~50% 为 2 分, 51~75% 为 3 分, 76~100% 为 4 分)进行评分, 表达水平等于 2 项评分的乘积。

(2) qRT-PCR 检测肿瘤组织中 TLR4、MD2、MYD88 和 TNF- α 的 mRNA 表达水平: 液氮保存的新鲜冰冻肿瘤组织用研钵研磨后, 采用 Trizol 法提取组织总 RNA。使用 RNA simple Total RNA Kit 逆转录试剂盒(美国 Thermo 公司)逆转录合成 cDNA, 反应体系 25 μ l。参照 qRT-PCR 试剂盒说明书操作, 采用 20 μ l 反应体系, cDNA 模板 1 μ l, 引物设计采用 Primer 5 软件进行设计, GAPDH 作为内参, 引物序列由上海生工生物公司合成。检测不同级别星形细胞瘤组织中 TLR4、MD2、MYD88 和 TNF- α 的 mRNA 表达水平。每组设置 3 个复孔检测。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列
TLR-4	上游引物 5'-AGGATGATGCCAGGATGATGTC-3'
	下游引物 5'-TCAGGTCCAGGTTCTTGTTGAG-3'
MD2	上游引物 5'-TTGGGTCTGCAACTCATC-3'
	下游引物 5'-TCAGATCCTCGGCAATAC-3'
MYD88	上游引物 5'-GCGTTTCGATGCCTTCATCTG-3'
	下游引物 5'-GGCCTTCTAGCCAACCTCTTT-3'
TNF- α	上游引物 5'-CACAGTGAAGTGTGGCAAC-3'
	下游引物 5'-AGGAAGGCCTAAGGTCCACT-3'
GAPDH	上游引物 5'-CAGGAGGCATTGCTGATGAT-3'
	下游引物 5'-GAAGGCTGGGCTCATTT-3'

3. 统计学处理: 应用 SPSS20.0 软件进行统计分

析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 t 检验。采用 *Pearson* 线性相关分析探讨 TLR4、MD2 与下游因子 MYD88 和 TNF- α 的相关性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 两组患者肿瘤组织中 TLR4、MD2、MYD88 和 TNF- α 表达水平比较: HGA 组患者肿瘤组织中 TLR4 (9.92 ± 1.93)、MD2 (7.27 ± 1.90)、MYD88 (8.76 ± 2.64) 及 TNF- α (10.26 ± 1.71) 的表达水平均高于 LGA 组 (6.38 ± 1.70 , 5.99 ± 1.57 , 7.05 ± 1.86 , 4.13 ± 1.09), 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 1。

2. 两组患者肿瘤组织中 TLR4、MD2、MYD88 和 TNF- α 的 mRNA 表达水平比较: HGA 组患者肿瘤组织中 TLR4 (1.64 ± 0.49)、MD2 (2.52 ± 0.70)、MYD88 (1.93 ± 0.54) 和 TNF- α (2.56 ± 0.73) 的 mRNA 表达水平均高于 LGA 组患者 (0.98 ± 0.25 , 1.37 ± 0.38 , 1.00 ± 0.26 , 0.99 ± 0.23), 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3. 星形细胞瘤患者 TLR4、MD2 与 MYD88 和 TNF- α 的相关性分析: *Pearson* 线性相关分析结果显示, 星形细胞瘤患者 MYD88 表达水平与 TLR4 ($r = 0.397$)、MD2 ($r = 0.501$) 均呈正相关, TNF- α 表达水平与 TLR4 ($r = 0.478$)、MD2 ($r = 0.426$) 均呈正相关 ($P < 0.001$)。

讨 论

炎症反应是人类在进化过程中形成的抵御外界病原体入侵的重要保护机制, 然而越来越多的证据表明, 许多高危因素可引起炎症反应的发生, 而慢性炎症的长期存在可造成许多疾病的发生^[5]。相关研究发现, 肿瘤组织中浸润了大量的白细胞, 因此将肿瘤的研究和炎症反应相结合, 一般炎症反应中炎症因子表达种类较多, 如 TNF、白细胞介素 (IL)-1/6、前列腺素

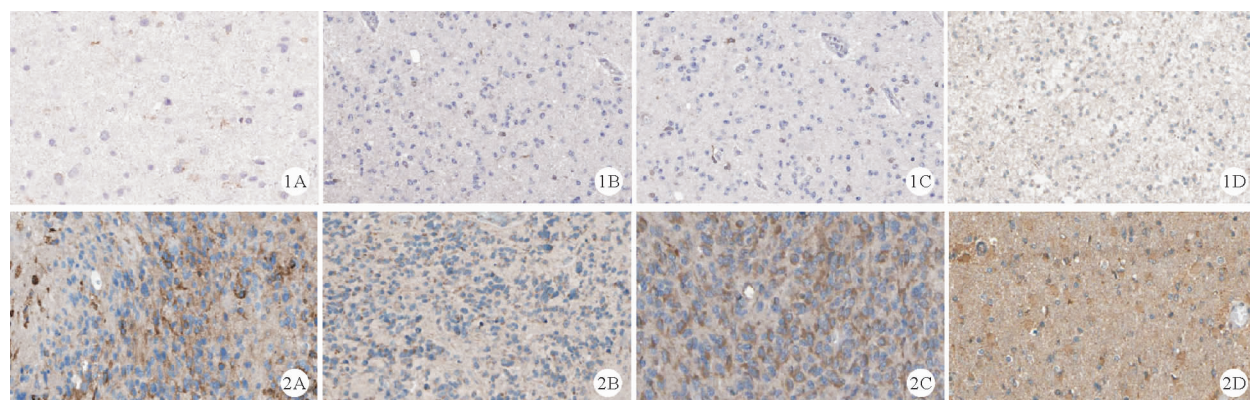


图 1 LGA 组患者肿瘤组织中 TLR4、MD2、TNF- α 和 MYD88 的表达情况 (A: TLR4; B: MD2; C: TNF- α ; D: MYD88; $\times 400$)

图 2 HGA 组患者肿瘤组织中 TLR4、MD2、TNF- α 和 MYD88 的表达情况 (A: TLR4; B: MD2; C: TNF- α ; D: MYD88; $\times 400$)

(PG)、趋化因子配体 2 (CCL2)、IL-8 等,这些炎症因子可以转移到病灶,形成正反馈的恶性循环^[6]。在肿瘤进展的研究中发现,微环境中浸润的炎症细胞和炎症微环境可造成肿瘤细胞的增殖,凋亡的减少,除此之外,这些浸润的炎症细胞还可影响肿瘤的产生,通过对 T 细胞、自然杀伤细胞的抑制促进肿瘤的进展^[7]。

颅内 HGA 是一种恶性程度极高的肿瘤,在星形细胞瘤的研究中同样发现炎症反应起重要作用^[8],TLR4 及其附属蛋白 MD2 是介导 LPS 信号的关键通路^[9],与 LPS 引起的神经炎症反应密切相关。LPS 与 TLR4 的结合还需要 MD2 的介导,MD2 是表达在胞膜上的一种蛋白,研究发现,单独的 TLR4 无法与 LPS 结合,而 MD2 和 TLR4 共转染后可很好的介导 LPS 的炎症反应,且同时激活下游的核因子(NF)- κ B 和 MAPK 信号^[10-11]。Dziarski 等^[12]发现,MD2 不仅可以增强 TLR4 介导的 LPS 反应,还可以增强革兰阳性菌的肽聚糖、磷脂酸反应,拓宽了 TLR4 对于 LPS 结构的识别范围。Rajamanickam 等^[13]研究发现,MD2 抑制剂 L6H21 可通过阻断 TLR4-MD2/NF- κ B 信号通路来抑制结肠肿瘤的侵袭和转移。Kanczkowski 等^[14]研究报道,TLR4-MD2 信号与肾上腺肿瘤的发生、发展有一定关联。

接头蛋白 MYD88 在 TLR4-MD2 通路中扮演重要角色,Kawai 等^[15]研究发现,MYD88 缺失小鼠对 LPS 具有抵抗性,且这些小鼠腹腔提取的巨噬细胞无法被 LPS 识别产生促炎因子 IL-6、TNF- α 等,然而 LPS 刺激这些巨噬细胞后,仍能激活 NF- κ B 和 MAPK 家族成员。说明 MYD88 缺失小鼠仍然对 LPS 刺激有一定的反应性,所以 MYD88 是关键的 TLR4-MD2 下游信号因子。TNF- α 作为较为关键的炎症因子,于 1975 年发现,被称为是前炎症细胞因子,启动了炎症反应的关键,可在神经免疫和炎症中发挥重要作用,影响血管内皮细胞和肿瘤血管的增生、炎症反应,还可以促进黏附分子在内皮细胞的表达,引起白细胞的黏附、聚集,从而激活小胶质细胞^[16]。TNF- α 也是 TLR4-MD2 信号下游关键的炎症因子,其表达同样与胶质瘤的恶性程度相关^[17-18]。

因此,我们推断 TLR4-MD2 的高表达介导的炎症反应可能与星形细胞瘤的发生和发展密切相关。本研究发现,与 LGA 组比较,HGA 组肿瘤组织中 TLR4 和 MD2 呈高表达,且 HGA 组肿瘤组织中 TLR4 与 MD2 的 mRNA 的表达水平均高于 LGA 组,均提示 TLR4 与 MD2 表达水平升高参与了肿瘤的进展。下游关键的 MYD88 表达与 TLR4-MD2 表达相一致,MYD88 与 TLR4 结合可传递炎症信号。

综上,我们发现星形细胞瘤中 TLR4-MD2 信号、下游 MYD88 及关键炎症因子 TNF- α 的表达与肿瘤恶性程度相关,这为星形细胞瘤的发生发展提供新的研究方向,后续可进行深入研究,为星形细胞瘤的诊治提供思路。

参 考 文 献

- [1] Lai JL, Liu YH, Liu C, et al. Indirubin Inhibits LPS-Induced Inflammation via TLR4 Abrogation Mediated by the NF- κ B and MAPK Signaling Pathways[J]. *Inflammation*, 2017, 40(1):1-12.
- [2] Källberg E, Vogl T, Liberg D, et al. S100A9 Interaction with TLR4 Promotes Tumor Growth[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3):e34207-e34211.
- [3] 张国霞,周爱玲,张贵萍,等. 大鼠海马神经元 TLR4 介导的 MyD88 依赖途径在神经炎症中的作用[J]. *中国应用生理学杂志*, 2013, 29(1):42-46.
- [4] 魏社鹏,赵继宗. 2016 年 WHO 中枢神经系统肿瘤分类解读[J]. *中华神经医学杂志*, 2017, 16(5):529-536.
- [5] 张路,姚平. 炎症因子及氧化应激在糖尿病肾病中的作用[J]. *临床内科杂志*, 2018, 35(2):141-142.
- [6] Ren Y, Sagers JE, Landegger LD, et al. Tumor-Penetrating Delivery of siRNA against TNF α to Human Vestibular Schwannomas[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):12922-12930.
- [7] Balachandran VP, Cavnar MJ, Zeng S, et al. Imatinib potentiates anti-tumor T cell responses in gastrointestinal stromal tumor through the inhibition of IdO[J]. *Nat Med*, 2011, 17(9):1094-1100.
- [8] Pierscianek D, Ahmadipour Y, Michel A, et al. Preoperative Survival Prediction in Patients With Glioblastoma by Routine Inflammatory Laboratory Parameters[J]. *Anticancer Res*, 2020, 40(2):1161-1166.
- [9] Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response[J]. *Nature*, 2000, 406(6797):782-787.
- [10] Rhee SH, Jones BW, Toshchakov V, et al. Toll-like receptors 2 and 4 activate STAT1 serine phosphorylation by distinct mechanisms in macrophages[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(25):22506-22512.
- [11] Schnabl B, Brandl K, Fink M, et al. A TLR4/MD2 fusion protein inhibits LPS-induced pro-inflammatory signaling in hepatic stellate cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 375(2):210-214.
- [12] Dziarski R, Wang Q, Miyake K, et al. MD-2 enables Toll-like receptor 2 (TLR2)-mediated responses to lipopolysaccharide and enhances TLR2-mediated responses to Gram-positive and Gram-negative bacteria and their cell wall components[J]. *J Immunol*, 2001, 166(3):1938-1944.
- [13] Rajamanickam V, Yan T, Xu S, et al. Selective targeting of the TLR4 co-receptor, MD2, prevents colon cancer growth and lung metastasis[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(8):1288-1302.
- [14] Kanczkowski W, Tymoszek P, Ehrhart-Bornstein M, et al. Abrogation of TLR4 and CD14 expression and signaling in human adrenocortical tumors[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(12):421-429.
- [15] Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, et al. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes[J]. *J Immunol*, 2001, 167(10):5887-5894.
- [16] Shiraki A, Oyama J, Komoda H, et al. The glucagon-like peptide 1 analog liraglutide reduces TNF- α -induced oxidative stress and inflammation in endothelial cells[J]. *Atherosclerosis*, 2012, 221(2):375-382.
- [17] Ben Haij N, Leghmari K, Planès R, et al. HIV-1 Tat protein binds to TLR4-MD2 and signals to induce TNF- α and IL-10[J]. *Retrovirology*, 2013, 10(1):123-126.
- [18] 季列,孙祥冬,徐军. 血清 MCP-1、IL-6、TNF- α 表达在脑胶质瘤患者手术疗效评价中的应用[J]. *脑与神经疾病杂志*, 2018, 26(6):389-392.

(收稿日期:2021-05-04)

(本文编辑:余晓曼)