

· 论 著 ·

# Toll 样受体 4 在胃癌中的表达及其临床意义

胡承浩<sup>1</sup>, 罗清钦<sup>2</sup>, 张丹峰<sup>3</sup>, 吴峰<sup>1</sup>, 王丹<sup>1</sup>, 王科<sup>1</sup>, 陈宇<sup>1</sup>, 段奇文<sup>1</sup>

1. 湖北省十堰市太和医院 湖北医药学院附属医院肿瘤科, 湖北 十堰 442000;

2. 湖北省十堰市太和医院 湖北医药学院附属医院防保感控处, 湖北 十堰 442000;

3. 湖北省十堰市太和医院 湖北医药学院附属医院乳腺甲状腺外科, 湖北 十堰 442000

**摘要:** **目的** 探讨胃癌组织中 Toll 样受体 4 (TLR4) 的表达和微血管密度状况及其临床意义。**方法** 收集 2012 年 1 月至 2016 年 1 月手术切除的 30 例胃癌患者的肿瘤组织标本, 根据复发情况将其分为复发组 ( $n = 12$ ) 和未复发组 ( $n = 18$ ), 并取 30 例患者癌旁正常组织作为对照组 ( $n = 30$ )。通过查阅病历、手术记录等方式搜集患者一般资料以及临床信息; 分别采用逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR)、CD34 标记的血管计数法测定三组中 TLR4 mRNA 表达及微血管密度。**结果** RT-PCR 结果显示, 对照组组织中 TLR4 mRNA 相对表达量分别低于复发、未复发组 ( $P$  均  $< 0.05$ ), 复发、未复发组两组间无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。血管计数结果显示, 三组间微血管密度存在统计学差异 ( $P < 0.01$ ), 且呈对照组 [ $(12.46 \pm 2.71)$  个/视野]  $<$  未复发组 [ $(26.34 \pm 3.98)$  个/视野]  $<$  复发组 [ $(30.15 \pm 4.11)$  个/视野] ( $P$  均  $< 0.05$ )。TLR4 mRNA 相对表达量与患者淋巴结转移及临床 TNM 分期相关 ( $P$  均  $< 0.01$ ), 微血管密度与肿瘤分化程度、淋巴结转移及临床 TNM 分期相关 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。Spearman 等级相关分析结果显示, TLR4 mRNA 相对表达量与微血管密度间呈正相关 ( $r = 0.526, P < 0.05$ )。**结论** TLR4 可能通过影响肿瘤微血管的生长、增加患者的微血管密度, 从而参与胃癌的发生与发展。

**关键词:** 胃癌; Toll 样受体 4; 微血管密度; 复发; 淋巴结转移; TNM 分期

**中图分类号:** R 735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2018)04-0459-04

## Expression of Toll-like receptor 4 in gastric cancer and its clinical significance

HU Cheng-hao, LUO Qing-qin, ZHANG Dan-feng, WU Feng, WANG Dan, WANG Ke, CHEN Yu, DUAN Qi-wen

Department of Oncology, Taihe Hospital, Affiliated to Hubei Medical College, Shiyan, Hubei 442000, China

Corresponding author: DUAN Qi-wen, E-mail: duanqiwen@taihehospital.com

**Abstract: Objective** To investigate the expression of Toll-like receptor 4 (TLR4) in gastric cancer tissues and the situation of microvascular density and its clinical significance. **Methods** Tumor tissue specimens of 30 cases of gastric cancer surgically excised from January 2012 to January 2016 were collected and divided into recurrence group ( $n = 12$ ) and non-recurrence group ( $n = 18$ ) according to whether there were recurrence, and the paracancerous tissue of the above cases was taken as the control group ( $n = 30$ ). General data and clinical information of the patients were collected by consulting case history and surgical records, and so on. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression of TLR4 mRNA in tissues, and CD34 labeled blood vessel counting method was used to detect microvascular density in tissues. **Results** RT-PCR result showed that the relative expression level of TLR4 mRNA in paracancerous tissue of control group was significantly lower than those in cancer tissue of recurrence group and non-recurrence group (all  $P < 0.05$ ), while there was no significant difference in them between recurrence group and non-recurrence group ( $P > 0.05$ ). Blood vessel counting method showed that there were significant differences in microvascular densities among three groups ( $P < 0.01$ ), according to control group [ $(12.46 \pm 2.71)$  / field of view], non-recurrence group [ $(26.34 \pm 3.98)$  / field of view], recurrence group [ $(30.15 \pm 4.11)$  / field of view] in ascending order (all  $P < 0.05$ ). The relative expression level of TLR4 mRNA was associated with lymph node metastasis and clinical TNM staging (all  $P < 0.01$ ), and the microvascular density was associated with differentiation degree of cancer tissues, lymph node metastasis and clinical TNM staging ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). Spearman rank correlation analysis showed that TLR4 mRNA relative expression level was significantly positively correlated with microvascular density ( $r = 0.526, P < 0.05$ ). **Conclusion** TLR4 may be involved in the occurrence and development of gastric cancer by affecting tumor microvascular growth and increasing tumor

microvascular density.

**Key words:** Gastric cancer; Toll-like receptor 4; Microvascular density; Recurrence; Lymph node metastasis; TNM staging

消化系统的恶性肿瘤中,胃癌的发生率较高<sup>[1]</sup>,虽然外科手术以及免疫和化学疗法等技术进步十分显著,但胃癌患者术后 5 年生存率仍然未超过 50%,其死亡率依然处于较高水平。研究胃癌转移和侵袭的分子生物学机制,能够对胃癌的发展和预后的研究提供科学根据,也可对胃癌的临床诊断及靶向治疗起到积极作用。Toll 样受体(Toll-like-receptor, TLR)4 是一种已发现的与肿瘤关系极为紧密的蛋白<sup>[2]</sup>,在结直肠癌、乳腺癌等恶性肿瘤的表达较高,然而其参与肿瘤发生发展的机制仍不十分明确<sup>[3-4]</sup>。相关报道表明,实体肿瘤的发展会受到新生血管的显著影响,肿瘤的生长、转移、预后与微血管密度之间的关系十分紧密,微血管密度是恶性肿瘤生物学行为的关键指标<sup>[5]</sup>。本研究通过检测 TLR4 mRNA 及微血管密度的表达量,以探讨二者之间的相关性及其参与胃癌发生、发展的作用机制。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012 年 1 月至 2016 年 1 月在我院手术切除的 30 例胃癌患者肿瘤组织以及距肿瘤 5 cm 处癌旁组织标本,经病理证实全部癌旁组织均为正常胃组织。

1.2 收入标准与排除标准 (1)入组标准:①病理明确诊断为胃癌;②手术完整切除肿瘤;③临床资料完整;④术前未接受任何治疗;⑤术后按照 TNM 分期标准进行正规放、化疗等综合治疗。(2)排除标准:①存在其他恶性肿瘤病史;②有胃肠道手术病史;③有严重心、肺等疾病;④资料不全。

1.3 研究对象的分组 根据随访中患者复发情况,将我院手术切除的 30 例胃癌患者肿瘤组织分为复发组( $n=12$ )及未复发组( $n=18$ ),此外将上述 30 例胃癌患者的癌旁正常组织作为对照组( $n=30$ )。

### 1.4 观察指标

1.4.1 资料收集 搜集患者年龄、性别、体质量指数(BMI)等一般资料,通过查阅手术记录、影像学资料记录患者肿瘤位置、分化程度、有无淋巴结转移以及临床 TNM 分期等。

1.4.2 逆转录聚合酶链式反应法(RT-PCR)测定组织中 TLR4 mRNA 的表达量 提取胃癌和癌旁组织,添加 Trizol 试剂提取总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 纯度和浓度。使用 1  $\mu$ l M-MuLV 逆转录反应体

系合成 cDNA,42  $^{\circ}$ C 下反应 1 h。PCR 反应条件如下:94  $^{\circ}$ C,5 min(预变性);94  $^{\circ}$ C 变性 15 s,58  $^{\circ}$ C 退火 30 s( $\beta$ -actin 退火 60 s),72  $^{\circ}$ C 延伸 20 s,循环次数为 40 次;72  $^{\circ}$ C,10 min(延伸)。PCR 扩增产物于 1.5% 琼脂糖中进行电泳,通过凝胶成像和分析处理系统照相。各目的条带与内参  $\beta$ -actin 的灰度比值通过 Image-ProPlus 5.1 软件进行分析,进行相对量的计算。RT-PCR 中 TLR4 的引物序列如下:正向:5'-TGG ATA CGT TTC CTT ATA AG-3'、反向:5'-GAA ATG GAG GCA CCC CTT C-3'。

1.4.3 血管计数法测定组织中微血管密度 采用福州市迈新生物技术开发公司生产的小鼠抗人 CD34 单抗即用型抗体对切片进行染色。CD34 主要在血管内皮细胞膜表达,被染成棕色的血管内皮细胞或血管内皮细胞簇或结构不相连的分支结构作为 1 个血管计数,排除厚壁血管或管径  $>50$   $\mu$ m 的血管。低倍镜下( $\times 200$ )选取血管密集区,在高倍镜下( $\times 400$ )随机选择 5 个不同视野计算微血管个数,微血管密度为 5 个视野中微血管计数的平均值。

1.5 统计学处理 本研究中数据采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD- $t$  检验;TLR4 mRNA 表达与微血管密度的相关性采用 Spearman 等级相关分析。检验水准取  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

2.1 胃癌患者临床基本资料 30 例胃癌患者的肿瘤发生部位包括贲门、胃体、胃窦及幽门,其中高、中、低度分化的患者数分别为 9、8、13 例,有 16 例患者发生淋巴结转移;TNM 分期结果显示,13 例患者处于 I/II 期,17 例患者处于 III/IV 期;随访结果显示,有 12 例患者出现复发情况。见表 1。

2.2 不同组织中 TLR4 mRNA 表达量比较 RT-PCR 结果显示,三组组织中 TLR4 mRNA 相对表达量差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),且对照组低于复发组和未复发组( $P$  均  $< 0.05$ );复发组和未复发组间无统计学差异( $P > 0.05$ )。见表 2。

2.3 不同组织中微血管密度比较 血管计数结果显示,三组组织中微血管密度值总体比较及两两比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),且呈对照组  $<$  未复发组  $<$  复发组。见表 2。

表 1 30 例胃癌患者临床病理资料

病理参数	例 (%)	病理参数	例 (%)		
肿瘤部位	贲门	9(30.00)	淋巴结转移 有	16(53.33)	
	胃体	6(20.00)		无	14(46.67)
	胃窦	8(26.67)	TNM 分期	I + II 期	13(43.33)
	幽门	7(23.33)		III + IV 期	17(56.67)
分化程度	高分化	9(30.00)	复发情况	是	12(40.00)
	中度分化	8(26.67)		否	18(60.00)
	低分化	13(43.33)			

表 2 不同组织中 TLR4 mRNA 相对表达量及微血管密度比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	TLR4 mRNA	微血管密度(个/视野)
复发组	12	1.48 ± 0.08	30.15 ± 4.11
未复发组	18	1.27 ± 0.06	26.34 ± 3.98 <sup>①</sup>
对照组	10	0.47 ± 0.03 <sup>①②</sup>	12.46 ± 2.71 <sup>①②</sup>
F 值		10.287	13.255
P 值		<0.01	<0.01

注:与复发组比较,<sup>①</sup> $P < 0.05$ ;与未复发组比较,<sup>②</sup> $P < 0.05$ 。

表 3 30 例胃癌组织中 TLR4 mRNA 相对表达量与临床病理参数的关系 ( $\bar{x} \pm s$ )

病理参数	例数	TLR4 mRNA	t 值	P 值	
性别	男性	16	1.33 ± 0.12	0.022	>0.05
	女性	14	1.29 ± 0.13		
年龄(岁)	<55	13	1.30 ± 0.10	0.028	>0.05
	≥55	17	1.32 ± 0.09		
肿瘤部位	贲门 + 胃体	15	1.35 ± 0.06	2.631	>0.05
	胃窦 + 幽门	15	1.27 ± 0.11		
分化程度	高、中度分化	17	1.26 ± 0.16	0.504	>0.05
	低分化	13	1.33 ± 0.08		
淋巴结转移	是	16	1.40 ± 0.10	8.621	<0.01
	否	14	1.21 ± 0.06		
TNM 分期	I + II 期	13	1.19 ± 0.08	8.374	<0.01
	III + IV 期	17	1.39 ± 0.09		

表 4 30 例胃癌组织中微血管密度表达水平与临床病理参数的关系 ( $\bar{x} \pm s$ )

病理参数	例数	微血管密度	t 值	P 值	
性别	男性	16	28.15 ± 3.76	0.080	>0.05
	女性	14	28.06 ± 3.80		
年龄(岁)	<55	13	27.91 ± 3.26	0.154	>0.05
	≥55	17	28.28 ± 4.02		
肿瘤部位	贲门 + 胃体	15	27.73 ± 4.10	0.363	>0.05
	胃窦 + 幽门	15	28.59 ± 3.72		
分化程度	高、中度分化	17	25.31 ± 3.16	2.671	<0.05
	低分化	13	31.49 ± 4.03		
淋巴结转移	是	16	31.88 ± 4.17	4.628	<0.01
	否	14	23.45 ± 2.87		
TNM 分期	I + II 期	13	24.36 ± 2.99	2.082	<0.05
	III + IV 期	17	30.02 ± 3.80		

2.4 TLR4 mRNA 相对表达量与胃癌患者临床病理参数的关系 TLR4 mRNA 相对表达量与患者淋巴结转移及临床 TNM 分期相关( $P$  均  $< 0.01$ ),未发现 TLR4 mRNA 相对表达量与患者年龄、性别、肿瘤部位及分化程度之间的相关性( $P$  均  $> 0.05$ )。见表 3。

2.5 微血管密度表达水平与胃癌患者临床病理参数的关系 微血管密度与患者分化程度、淋巴结转移以及临床 TNM 分期相关( $P < 0.05, P < 0.01$ ),未发现微血管密度与患者性别、年龄、肿瘤部位之间的相关性( $P$  均  $> 0.05$ )。见表 4。

2.6 TLR4 mRNA 相对表达量与微血管密度的相关性 Spearman 等级相关分析结果显示,TLR4 mRNA 相对表达量与微血管密度间呈正相关( $r = 0.526, P < 0.05$ )。

### 3 讨论

胃癌是全世界死亡率第 4 位、发病率第 2 位的恶性肿瘤,其主要发生于胃黏膜上皮细胞。胃癌的发生、发展受到众多因素的影响,其过程主要是经过慢性胃炎、胃黏膜肠上皮化生、异性增生,最终发生癌变等<sup>[6]</sup>。TLR 蛋白家族于 1984 年首次在果蝇体内发现,是一类重要的模式识别受体<sup>[7]</sup>,能够识别病原某些内源性配体和相关的分子模式而进行信号传导进而释放出炎症介质,在人体免疫系统的作用十分重要<sup>[8-10]</sup>。

TLR4 是 TLR 蛋白家族中被研究最为普遍者,其在所有的细胞系中均有分布,而在宿主防御功能的细胞表达则更为普遍<sup>[11-12]</sup>,是已知的与肿瘤联系最为紧密的 TLR 家族成员。TLR4 能够判断危险相关模式分子及病原相关模式分子,向宿主发出危险信号并在早期固有免疫系统中进行调节,因为其在肿瘤发生、免疫应答及炎症调节等生物学进程中的作用,众多肿瘤学研究正在加深对 TLR4 的了解。由于胃癌的发病机制包含大量的分子途径,因此 TLR4 对胃癌作用机制的研究尚不明确<sup>[13-14]</sup>。故而,探讨 TLR4 对胃癌的发生、发展、转移以及治疗中的影响机制对于临床应用意义重大。本研究中未复发组患者癌组织中 TLR4 mRNA 相对表达量为  $1.27 \pm 0.06$ ,低于复发组的  $1.48 \pm 0.08$ ,两组癌组织中 TLR4 mRNA 相对表达量均显著高于癌旁组织中的  $0.47 \pm 0.03$ 。关于肠癌的研究表明,癌组织中 TLR4 表达水平显著高于癌旁组织,TLR4 诱导肠癌肝转移及腹膜转移的机制可能是通过参与肿瘤免疫逃逸、诱导免疫抑制因子和趋化因子的表达<sup>[15]</sup>。本研究分析 TLR4 mRNA 相对表达量与胃癌患者临床参数结果显示,其与患者淋巴结转移及临床 TNM 分期相关,提示 TLR4 参与了胃癌的发生与发展,与国内外研究结论基本一致。

微血管密度是指对肿瘤血管最密集处进行计数来定量评估新生的肿瘤血管,其新生的微血管数量能够影响肿瘤的浸润以及侵袭。20 世纪 70 年代初,研

究人员首次观察到肿瘤生长和转移对新生血管的形成存在依赖性,而该论点已被证实<sup>[16]</sup>。新生的肿瘤微血管可呈窦状、点状、条索状,高倍镜下管壁薄,有时仅见幼稚的内皮细胞,仅有不完整基底且膜肌层缺乏,胞间存在裂隙,是判断肿瘤诱导血管生成能力的重要标志,也能够影响肿瘤的预后<sup>[17-18]</sup>。本研究中血管计数结果显示,胃癌患者癌旁组织中微血管密度 $[(12.46 \pm 2.71)$  个/视野] < 未复发组癌组织 $[(26.34 \pm 3.98)$  个/视野] < 复发组癌组织 $[(30.15 \pm 4.11)$  个/视野];还显示微血管密度与肿瘤分化程度、淋巴结转移及临床 TNM 分期相关,说明微血管密度与胃癌患者的疾病程度及预后相关。血管可以提供肿瘤生长所需要的营养,并排泄其自身代谢产物。伴随瘤体的增大,肿瘤血管生成能够显著影响肿瘤的生长、浸润及转移,若要满足肿瘤的成长需求,则需要大量新生血管网提供足够的血供<sup>[19]</sup>。在一些相关报道中发现,血管内皮生长因子(VEGF)的表达会在 TLR 的影响下加快血管生成的速度,因此对 TLR 信号中的 VEGF 进行调控能够产生抑制肿瘤发展的效果<sup>[20]</sup>。本研究经 Spearman 等级相关分析证实,TLR4 mRNA 相对表达量与微血管密度呈显著正相关。

综合本研究结果可以看出,胃癌患者肿瘤组织组织中 TLR4 mRNA 表达量及微血管密度均与患者淋巴结转移情况及临床 TNM 分期相关;微血管密度还与患者肿瘤分化程度及复发有关,且 TLR4 mRNA 表达量与微血管密度具有显著正相关性。因此,TLR4 可能通过影响肿瘤微血管的生长、增加患者的微血管密度,从而参与胃癌的发生与发展。

## 参考文献

- [1] 中华医学会消化内镜学分会,中国抗癌协会肿瘤内镜学专业委员会. 中国早期胃癌筛查及内镜诊治共识意见[J]. 中国消化杂志,2014,34(7):433-448.
- [2] Thada S, Valluri VL, Gaddam SL. Influence of Toll-like receptor gene polymorphisms to tuberculosis susceptibility in humans [J]. Scand J Immunol,2013,78(3):221-229.
- [3] Lin YC, Huang DY, Chu CL, et al. The tyrosine kinase Syk differentially regulates Toll-like receptor signaling downstream of the adaptor molecules TRAF6 and TRAF3 [J]. Sci Signal,2013,6(289):ra71.
- [4] 郑丽华,程忠平. TLR4 及其在卵巢癌细胞增殖调控中的研究进展[J]. 中国妇幼健康研究,2014,25(1):168-171.
- [5] 夏娟,刘建平,刘智. 肿瘤转移相关基因 1 在食管鳞癌中的表达及其与微血管生成的关系分析[J]. 中国当代医药,2015,22(33):17-20,24.
- [6] 李达周,邹文斌,王雯,等. 早期胃癌的病程及不同治疗方法对

- 其转归的影响[J]. 中国实用内科杂志,2014,34(4):427-432.
- [7] 杨权,刘慰华,黄俊,等. TLR2 配体促进 THP-细胞表达多种趋化因子[J]. 热带医学杂志,2017,17(6):711-713,722.
- [8] Guo H, Chen Y, Hu X, et al. The regulation of toll-like receptor 2 by miR-143 suppresses the invasion and migration of a subset of human colorectal carcinoma cells [J]. Molecular Cancer,2013,12(1):77.
- [9] Yang H, Wang B, Wang T, et al. Toll-like receptor 4 prompts human breast cancer cells invasiveness via lipopolysaccharide stimulation and is overexpressed in patients with lymph node metastasis [J]. PLoS One,2014,9(10):e109980.
- [10] Ren W, Wang Z, Hua F, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 regulates LPS-induced TLR4/MD-2 pathway activation and inflammation in alveolar macrophages [J]. Inflammation,2015,38(1):384-393.
- [11] 吕宝军,侯冰宗,王晓鸿,等. TLR4、NF- $\kappa$ B 和 AP-1 在乳腺癌中的表达及其与临床病理特征的相关性研究[J]. 中华普通外科学文献(电子版),2011,5(6):508-511.
- [12] Wang Z, Dong B, Feng Z, et al. A study on immunomodulatory mechanism of Polysaccharopeptide mediated by TLR4 signaling pathway [J]. BMC Immunol,2015,16:34.
- [13] Fuchs CS, Tomasek J, Yong CJ, et al. Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial [J]. Lancet, 2014, 383(9911):31-39.
- [14] Riddell JR, Bshara W, Moser MT, et al. Peroxiredoxin 1 controls prostate cancer growth through Toll-like receptor 4-dependent regulation of tumor vasculature [J]. Cancer Res, 2011, 71(5):1637-1646.
- [15] Rutkowski MR, Stephen TL, Svoronos N, et al. Microbially driven TLR5-dependent signaling governs distal malignant progression through tumor-promoting inflammation [J]. Cancer Cell, 2015, 27(1):27-40.
- [16] 满晓华,孙运良,龚燕芳,等. Toll 样受体 4 在胰腺癌组织中的表达及其与肿瘤血管生成的关系[J]. 中华胰腺病杂志,2012,12(3):167-169.
- [17] 熊磊,甘卫东,樊祥山. 微血管密度与肾细胞癌预后关系的研究进展[J]. 中华腔镜泌尿外科杂志(电子版),2016,10(4):60-64.
- [18] 陈义钢,顾琛,周宏,等. 转移抑制基因 1 和微血管密度在胆囊癌中的表达及其临床意义[J]. 中国现代医学杂志,2017,27(7):46-49.
- [19] Zhang D, Li YH, Mi M, et al. Modified apple polysaccharides suppress the migration and invasion of colorectal cancer cells induced by lipopolysaccharide [J]. Nutr Res,2013,33(10):839-848.
- [20] 沈令广,黄庆功,李俊银,等. 血小板源性生长因子 B 在非小细胞肺癌中的表达及其与微血管密度的关系[J]. 中国现代医学杂志,2011,21(16):1841-1844.

收稿日期:2017-11-09 修回日期:2017-12-27 编辑:王国品