

◇ 基础医学研究 ◇

## Gardiquimod 对 HepG2 细胞中 VEGF 和 TIMP1 表达的影响

程丰伟 李 磊 王 芳 金 锐 罗 欣 张胜权

**摘要** 目的 研究 Toll 样受体 7 (TLR7) 的配体 Gardiquimod 对 HepG2 细胞中血管内皮生长因子 (VEGF) 和基质金属蛋白酶抑制剂 1 (TIMP1) mRNA 表达的影响,并分析其激活的信号通路。方法 HepG2 细胞经不同时间的 Gardiquimod (2  $\mu\text{g/ml}$ ) 处理后,提取细胞总 RNA 和总蛋白,RT-PCR 分析 VEGF 和 TIMP1 转录水平的变化;Western blot 分析丝裂原蛋白激活激酶-胞外信号调节激酶 (MAPKs-ERK1/2) 信号通路,并通过 MAPKs-ERK1/2 特异性阻断剂 PD98059 阻断相应的信号途径,进而分析两者的相关性。结果 HepG2 细胞中表达 TLR7,但较外周血单个核细胞 (PBMC) 较少。Gardiquimod 刺激 HepG2 10 min 后下调细胞中 VEGF mRNA 的表达,而刺激细胞 30 min 后 TIMP1 mRNA 的表达有明显的上调;Western blot 结果显示,细胞中的 ERK1/2 的磷酸化水平明显降低;并且 ERK1/2 的特异性抑制剂 (PD98059) 能有效抑制 HepG2 细胞中 ERK1/2 磷酸化作用。结论 TLR7 激活能够下调 HepG2 细胞中 VEGF 的表达,并与 ERK1/2 信号通路相关;同时 TLR7 激活上调 TIMP1 的表达,但与 ERK1/2 信号通路无相关性。

**关键词** TLR7; VEGF; TIMP1; HepG2; Gardiquimod

**中图分类号** R 34

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2014)05-0561-04

Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 是一类重要模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRR), 不仅参与先天性免疫,而且在获得性免疫中也发挥重要作用。TLR7 能识别某些天然小分子抗病毒化合物和病毒单链 RNA (single-stranded RNA, ssRNA) 激活髓系分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 依赖的信号通路,介导抗病毒免疫反应<sup>[1]</sup>。并且,TLR7 亦可识别一些人工合成的咪唑啉类或鸟苷酸衍生物类的小分子化合物,如 R848 和 Gardiquimod 等。近年来研究<sup>[2]</sup>显示 TLR7

不仅仅表达于免疫细胞,而且在部分癌细胞中也有表达,特别在血液肿瘤以及皮肤肿瘤中关于 TLR7 的研究常见报道,具体作用尚不明确,但 TLR7 与肿瘤的发生、迁移等密切相关。研究<sup>[3]</sup>显示 TLR7 激活后具有促某些抗肿瘤的细胞因子表达,并对某些肿瘤的侵袭、转移有一定抑制作用。临床上将 TLR7 激动剂咪喹莫特作为治疗血液系统肿瘤的方法,明显减轻了慢性淋巴细胞白血病患者肿瘤的皮肤浸润;TLR7 配体咪喹莫特作用于原发性皮肤肿瘤后能激活核因子  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) 信号途径并且诱导促炎症因子以及相关细胞因子的表达<sup>[4]</sup>。但 TLR7 对肝癌细胞中一些相关炎症因子表达的影响尚不清楚,该研究以 HepG2 细胞为模式细胞,观察 TLR7 激活后细胞中血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和基质金属蛋白酶抑制剂 1 (matrix metallo-proteinase inhibitor 1, TIMP1) 表达的变化,并分析其相关的信号途径。

### 1 材料与方法

**1.1 细胞与试剂** HepG2 细胞株由本实验室冻存;外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 细胞提取于新鲜血液。Gardiquimod、PD98059 购于美国 Sigma 公司;TLR7 及  $\beta$ -actin 抗体购于美国 Santa Cruz 公司;ERK1/2 及 p-ERK1/2 抗体购于美国 Cell signaling 公司;RT-PCR 试剂购于日本 TaKaRa 公司;逆转录试剂购于加拿大 Fermentas 公司;新生小牛血清、DMEM 培养基购于美国 Gibco 公司;引物合成由上海生工生物工程有限公司完成。

**1.2 引物** 登陆 NCBI 网站检索 GAPDH、VEGF、TIMP1 基因序列 (Human), Primer Premier 5.0 软件设计 3 对引物,见表 1。

**1.3 细胞培养** 将冻存的 HepG2 细胞复苏并接种于 25 ml 的培养瓶中,加入 5 ml 含 10% 小牛血清并加入双抗 (青霉素与链霉素) 的 DMEM 培养液,置 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^{\circ}\text{C}$  细胞培养箱中培养。细胞传代 2~3 次后,状态较佳时,使用胰酶消化细胞并将之接种于

2014-01-05 接收

基金项目:国家自然科学基金 (编号:81271748)

作者单位:安徽医科大学生物化学与分子生物学教研室,合肥 230032

作者简介:程丰伟,男,硕士研究生;

张胜权,男,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: sqz36@yahoo.com

24 孔细胞培养板 浓度约为  $5 \times 10^4$  /孔;待细胞全部贴壁后换无血清的 DMEM 培养并加入 Gardiquimod (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 刺激 时间分别为 10、30 min、1、3、6、12、24、36 h 并设置空白对照。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')
GAPDH	F: AGATCATCAGCAATGCCTCCTG
	R: ATGGCATGGACTGTGGTCATG
VEGF	F: CTCTACCTCCACCATGCCAAGT
	R: TCGATTGGATGGCAGTAGCTG
TIMP1	F: TCTGCAATTCGGACCTCGTC
	R: CTGTTCCAGGGAGCCACAAA

**1.4 RT-PCR 分析 VEGF mRNA 和 TIMP1 mRNA 水平的变化** 提取 24 孔细胞板中加药刺激后细胞的总 RNA 逆转录 PCR (步骤遵循试剂盒说明书) 合成 cDNA 模板以备下步使用。配制 RT-PCR 体系如下: 每份加入 SYBR Premix Ex Taq II ( $2 \times$ ) 10  $\mu\text{l}$  上游引物 0.4  $\mu\text{l}$  ,下游引物 0.4  $\mu\text{l}$  ,Rox Reference Dye II ( $50 \times$ ) 0.4  $\mu\text{l}$  ,上一步保存的 cDNA 模板 2  $\mu\text{l}$  ,ddH<sub>2</sub>O 6.8  $\mu\text{l}$  ,总共 20  $\mu\text{l}$  体系,以 GAPDH 为内参,上机(7500 型荧光定量 PCR 仪)检测。

**1.5 Western blot 分析** 提取 24 孔细胞板中加药刺激后细胞总蛋白,  $-20^\circ\text{C}$  储存备用。配制 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶,每孔上样 10  $\mu\text{l}$  ,设置 60 V 电压进行 Tris 甘氨酸电泳缓冲液电泳,至溴酚蓝超出分离胶后将电压调至 120 V,待溴酚蓝至凝胶底部 结束电泳。设置 150 mA,湿转法将蛋白质冰上转移至 PVDF 膜上,时间为 3 h。将 PVDF 膜置于 5% 脱脂牛奶中室温封闭 2 h,置于相应的一抗中,  $4^\circ\text{C}$  结合过夜,取出 PVDF 膜, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,置于相应的二抗中室温结合 2 h; TBST 洗膜 3 次,加入 ECL 发光剂,显影压片。抗体浓度如下,抗  $\beta$ -actin: 一抗 1 : 5 000, 二抗 1 : 5 000; 抗 p-ERK: 一抗 1 : 1 000, 二抗 1 : 10 000; 抗 TLR7: 一抗 1 : 500, 二抗 1 : 5 000。

**1.6 统计学处理** 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,不同时间点之间的比较采用方差分析,组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

**2.1 TLR7 在 HepG2 细胞的表达** 提取 HepG2 细胞的总蛋白, Western blot 检测细胞中 TLR7 蛋白的

表达,设置 PBMC 作为对照组。结果显示 TLR7 在 HepG2 细胞中表达,但表达量较 PBMC 略少,见图 1。

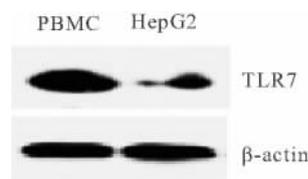


图 1 Western blot 分析 TLR7 蛋白在 HepG2 细胞以及 PBMC 中的表达

**2.2 不同时间的 Gardiquimod 对 HepG2 细胞 VEGF 和 TIMP1 的 mRNA 表达的影响** TLR7 配体 Gardiquimod 刺激 HepG2 细胞后 RT-PCR 分析 VEGF mRNA 和 TIMP1 mRNA 表达水平的变化。检测结果显示, TIMP1 mRNA 水平在 36 h 内较空白对照组明显上调,并且在 6 h 达到峰值; VEGF mRNA 水平在 36 h 内较空白组显著降低,在 6 h 表达水平又有一个短暂的回升,并在 1 h 时降至最低,见图 2。

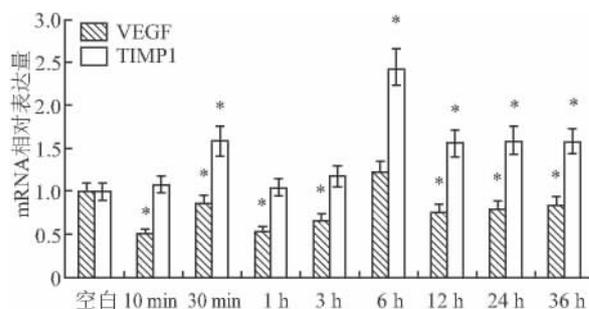


图 2 Gardiquimod (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 对 HepG2 细胞中 VEGF、TIMP1 mRNA 表达量的影响 与空白对照组比较: \*  $P < 0.05$

**2.3 Western blot p-ERK1/2 的表达量较空白组显著降低** 6 h 内呈时间依赖性,并在 6 h 表达最弱,见图 3。

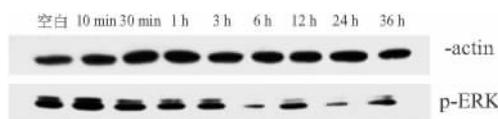


图 3 Western blot 分析 p-ERK1/2 蛋白表达

**2.4 Gardiquimod 与 PD98059 协同刺激 HepG2 细胞后对细胞中 VEGF mRNA 和 TIMP1 mRNA 表达的影响** RT-PCR 检测显示: ① PD98059 刺激

HepG2 细胞后, 细胞中 VEGF mRNA 的表达量较空白对照组有下降的趋势, 见图 4, 而 Gardiquimod 刺激细胞后也下调 VEGF mRNA 的表达量(图 2), 并且磷酸化的 ERK1/2 的表达量有明显的下调趋势(图 3), 由此推断, Gardiquimod 刺激细胞的过程可能与 ERK1/2 信号途径相关。② PD98059 下调 TIMP1 mRNA 的表达(图 4), 但是 Gardiquimod 刺激细胞后下调 ERK1/2 的磷酸化并上调 TIMP1 mRNA 的表达(图 2、3), 提示 Gardiquimod 上调 TIMP1 的表达与 ERK1/2 信号途径可能无相关性。

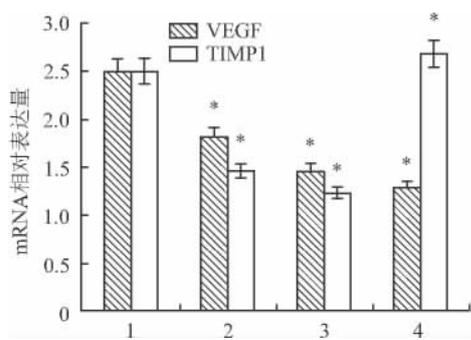


图 4 PD98059 和 Gardiquimod 协同刺激后 HepG2 细胞中 VEGF mRNA 和 TIMP1 mRNA 的相对表达量

1: 空白对照组(同等培养条件未加入 Gardiquimod 以及 PD98059); 2: PD98059 (100  $\mu\text{mol/L}$ ) 作用 1 h; 3: PD98059 (100  $\mu\text{mol/L}$ ) 作用 1 h 后加入 Gardiquimod (2  $\mu\text{g/ml}$ ) 刺激 6 h; 4: Gardiquimod (2  $\mu\text{g/ml}$ ) 作用 6 h; 与空白对照组比较: \*  $P < 0.05$

## 2.5 特异性抑制剂对细胞中信号通路的影响

Western blot 检测结果表明, p-ERK1/2 的特异性抑制剂 PD98059 (100  $\mu\text{mol/L}$ ) 能有效抑制 HepG2 细胞中 ERK1/2 磷酸化作用, 见图 5。

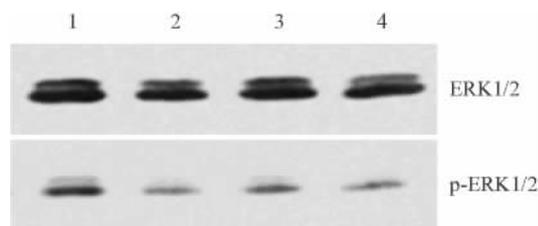


图 5 特异性抑制剂对 HepG2 细胞中 ERK1/2 磷酸化的影响

1: 空白对照组; 2: PD98059; 3: PD98059 + Gardiquimod [加药顺序为先加入 PD98059 1 h 后再加入 Gardiquimod (2  $\mu\text{g/ml}$ ) 作用 3 h]; 4: Gardiquimod

## 3 讨论

近年来研究<sup>[5]</sup>表明肝癌细胞中高表达 VEGF, 后者在肿瘤组织中促进血管生成, 对于肿瘤细胞的

增殖、迁移均不可或缺。基质金属蛋白酶家族 (MMPs) 及基质金属蛋白酶抑制剂家族 (TIMPs) 作为一对相辅相成的细胞因子, 与肿瘤增殖、侵袭和转移密不可分<sup>[6]</sup>。细胞外基质 (ECM) 是肿瘤侵袭和转移的重要组织屏障, MMPs 则是突破这个屏障最有效的裂解酶。TIMPs 家族在 ECM 中可以抑制 MMPs 的活性, 主要方式是通过与 MMPs 结合成紧密的非共价键复合物, 从而调节 MMPs 的表达<sup>[7-8]</sup>。丝裂原激活蛋白激酶 (MAPK) 是真核生物信号传递中最重要的途径之一, MAPK 接收胞外信号后活化, 进入细胞核中激活相应的靶基因, 参与基因表达调控、细胞质功能活动等。MAPK 可促进血管内皮细胞的增殖以及新血管生成, 是肿瘤发生和转移中的重要因素<sup>[9]</sup>。ERK1/2 是 MAPK 4 个最主要的亚族之一。有研究<sup>[10-11]</sup>表明 ERK1/2 在肝癌以及前列腺癌等多种肿瘤组织中均出现活性增强或者表达异常, 而且, 有研究<sup>[12]</sup>表明 ERK1/2 抑制剂可以将乳腺癌、卵巢癌和骨肉瘤等肿瘤细胞阻断在 S 期, 抑制肿瘤细胞增殖和生长; 胃癌组织中 ERK1/2 和 VEGF 表达呈正相关, 两者在胃癌的发生、发展中共同促进了肿瘤的浸润和转移<sup>[13]</sup>。因此, ERK1/2 表达调控异常与肿瘤的发生有着密切关系。

本研究提示 2  $\mu\text{g/ml}$  的 Gardiquimod 刺激 HepG2 细胞 VEGF mRNA 水平显著下降, 并在 1 h 时达到最低; 并且细胞中 TIMP1 mRNA 水平显著上升, 并在 6 h 时达到峰值。磷酸化 ERK1/2 的表达量呈逐渐下降的趋势, 一定周期内具有时间依赖性, 在 6 h 时达到最低。以上结果提示 TLR7 激活可能对 HepG2 细胞的增殖、迁移和侵袭有着一定程度的抑制作用; 抑制剂研究结果提示, Gardiquimod 下调细胞中 VEGF 的表达可能与 ERK1/2 的磷酸化相关, 下调 p-ERK 可能是 Gardiquimod 抑制 HepG2 细胞 VEGF 表达的一个重要途径。Gardiquimod 上调 TIMP1 的表达这一效应具体是通过哪些信号途径, 有待进一步研究。并且, Gardiquimod 对 HepG2 细胞的凋亡、迁移是否能发挥一定的生物学作用, 还有待进一步的探讨。

## 参考文献

- [1] Lund J, Alexopoulou L, Sato A, et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A 2004, 101(15):5598-603.
- [2] Huang B, Zhao J, Li H, et al. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance [J]. Cancer Res 2005,

- 65(12):5009-14.
- [3] Meyer T, Stockfleth E. Clinical investigations of Toll-like receptors agonists [J]. *Expert Opin Investig Drugs* 2008, 17(7):1051-65.
- [4] Schön M P, Schön M. TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy [J]. *Oncogene*, 2008, 27(2):190-9.
- [5] 刘尧, 王长振, 刘明华, 等. VEGF/VEGFR 信号转导通路在肝癌靶向治疗中的研究进展 [J]. *中国免疫学杂志* 2013, 29(1):97-101.
- [6] 宋仕茂, 何晓文. MMP-9 及 TIMP-1 在非小细胞肺癌中的表达和意义 [J]. *现代肿瘤医学* 2013, 21(9):1978-81.
- [7] Sehgal G, Hua J, Bernhard E J, et al. Requirement for matrix metalloproteinase-9 (galatinase B) expression in metastasis by murine protatecarcinoma [J]. *Am J Pathol* 1998, 152(2):591-6.
- [8] 李莉, 张声林, 华等. 基质金属蛋白酶和组织金属蛋白酶抑制剂表达失衡与胃癌浸润转移的关系 [J]. *癌症* 2002, 21(3):305-10.
- [9] Hamon B, Hamon P, Bovier-Lapierre M, et al. A child with resistance to thyroid hormone without thyroid hormone receptor gene mutation: a 20-year follow up [J]. *Thyroid* 2008, 18(1):35-44.
- [10] Branca M, Ciotti M, Santini D, et al. Activation of the ERK/MAP kinase pathway in cervical intraepithelial neoplasia is related to grade of the lesion but not to high-risk human papillomavirus, virus clearance, or prognosis in cervical cancer [J]. *Am J Clin Pathol* 2004, 122(6):902-11.
- [11] Albanell J, Codony-Servat J, Rojo F, et al. Activated extracellular signal-regulated kinases: association with epidermal growth factor receptor/transforming growth factor alpha expression in head and neck squamous carcinoma and inhibition by anti-epidermal growth factor receptor treatments [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(17):6500-10.
- [12] 吴凤娟, Diwa Koirala, 刘斯婕, 等. 新型噻唑并三嗪类化合物 R001 抑制 ERK1/2 磷酸化的抗肿瘤作用 [J]. *现代生物医学进展* 2012, 29(12):5638-42.
- [13] 王琦, 梁涛, 张更棉, 等. 胃癌中 ERK-1、VEGF 的表达及相关性分析 [J]. *西部医学* 2013, 25(2):230-4.

## Effects of Gardiquimod on the expression of VEGF and TIMP1 in HepG2 cells

Cheng Fengwei, Li Lei, Wang Fang, et al

(Dept of Biochemistry and Molecular Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To investigate the effect of Toll-like receptor 7 (TLR7) ligand Gardiquimod on vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA and matrix metallo-proteinase inhibitor 1 (TIMP1) mRNA in HepG2 cells, and to analyze their activated signal transduction pathways. **Methods** Extracted total RNA and total protein of cultured HepG2 cells, which were treated with Gardiquimod (2  $\mu$ g/ml) for different time. The mRNA expression of VEGF and TIMP1 was measured by Real-time PCR, and analyzed the ERK1/2 signal transduction pathway by using Western blot. And to use the specific inhibitor of ERK1/2 (PD98059) to block corresponding signaling pathways, then the correlation was analyzed. **Results** TLR7 was expressed in HepG2 cells, but less than that in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). After the HepG2 cells were treated with Gardiquimod for 10 min, the mRNA of VEGF in the cells was obviously reduced. However, when the cells were treated with Gardiquimod for 30 min, the mRNA of TIMP1 in HepG2 cells was obviously increased. Western blot results indicated that the phosphorylation of ERK1/2 in the cells was obviously downregulated. What's more, the specific inhibitor of ERK1/2 (PD98059) could effectively suppress the phosphorylation of ERK1/2 in HepG2 cells. **Conclusion** TLR7 activation downregulates the expression of VEGF in HepG2 cells, and associates with ERK1/2 signal pathway; TLR7 activation raises the expression of TIMP1 at the same time, which is not related with ERK1/2 signal pathway.

**Key words** TLR7; VEGF; TIMP1; HepG2; Gardiquimod