

DOI:10.13350/j.cjpb.220718

• 临床研究 •

术后金黄色葡萄球菌感染调控 TLR2/PI3K 通路 对甲状腺癌细胞凋亡及自噬的影响

吴渊*, 严宏

(福建中医药大学附属人民医院颈部甲状腺乳腺外科, 福建福州 350001)

【摘要】 目的 探究甲状腺术后切口感染的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* bacteremia, SAB)调控 Toll 样受体 2(Toll-like receptor 2, TLR2)/PI3K 转导通路对甲状腺癌(thyroid carcinoma, TC)细胞凋亡及自噬的影响。方法 随机收集接受甲状腺切除术且术后出现 SAB 感染的 TC 患者 83 例作为感染组,另随机选择同期未出现感染的 TC 患者 83 例作为对照组,采用 RT-qPCR 检测患者外周血中 TLR2 和 LC3B mRNA 的表达水平,并通过 Pearson 相关性检验分析二者的相关性。TC 细胞 SW1736 分为对照组、SAB 组和 SAB+C29 组。以菌胞比为 0.1:1 的比例加入 SAB,通过 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 C29 抑制 TLR2 蛋白功能后检测各组细胞增殖、凋亡、自噬以及 PI3K 磷酸化水平。结果 感染组患者外周血中 TLR2 和 LC3B mRNA 的水平均显著高于对照组($P < 0.05$),且 TLR2 mRNA 和 LC3B mRNA 水平呈正相关($r = 0.482, P < 0.05$)。SAB 组的细胞活力、自噬和 PI3K 磷酸化水平显著高于对照组,凋亡率显著低于对照组(均 $P < 0.05$)。SAB+C29 组的细胞活力、自噬和 PI3K 磷酸化水平显著低于 SAB 组,凋亡率显著高于 SAB 组(均 $P < 0.05$)。结论 甲状腺术后切口感染的 SAB 通过上调 TLR2/PI3K 通路而促进 TC 细胞自噬并抑制其凋亡。

【关键词】 甲状腺切除术;甲状腺癌;金黄色葡萄球菌;自噬

【中图分类号】 R378.11

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)07-0827-04

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Jul. ;17(7):827-830.]

The effect of *Staphylococcus aureus* bacteremia on the apoptosis and autophagy of thyroid cancer cells by TLR2/PI3K pathway after thyroidectomy

WU Yuan, YAN Hong (Department of Neck Thyroid and Breast Surgery, People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350001, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of *Staphylococcus aureus* bacteremia (SAB) on thyroid carcinoma (TC) cell apoptosis by regulating TLR2/PI3K transduction pathway after thyroidectomy incision infection and autophagy. **Methods** 83 TC patients who underwent thyroidectomy and had SAB infection after surgery were randomly selected as infection group, and 83 TC patients without infection during the same period were randomly selected as control group. RT-qPCR was used to detect TLR2 and LC3B mRNA in peripheral blood of patients. The expression levels were analyzed by Pearson correlation test. TC cells SW1736 were divided into control group, SAB group and SAB+C29 group. SAB was added at a ratio of 0.1:1 to cell ratio, and 50 $\mu\text{mol/L}$ of C29 was used to inhibit the function of TLR2 protein, and then the proliferation, apoptosis, autophagy and PI3K phosphorylation levels of cells in each group were detected.

Results The levels of TLR2 and LC3B mRNA in the peripheral blood of the infected group were significantly higher than those of the control group ($P < 0.05$), and the levels of TLR2 mRNA and LC3B mRNA were positively correlated ($r = 0.482, P < 0.05$). The cell viability, autophagy and PI3K phosphorylation levels in the SAB group were significantly higher than those in the control group, and the apoptosis rate was significantly lower than that in the control group (all $P < 0.05$). The cell viability, autophagy and PI3K phosphorylation levels in the SAB+C29 group were significantly lower than those in the SAB group, and the apoptosis rate was significantly higher than that in the SAB group ($P < 0.05$).

Conclusion After thyroidectomy, incision-infected SAB promotes autophagy and inhibits apoptosis of TC cells by up-regulating the TLR2/PI3K pathway.

【Key words】 thyroidectomy; thyroid cancer; *Staphylococcus aureus*; autophagy

* 甲状腺癌(thyroid carcinoma, TC)占有所有肿瘤的 1.7%,手术切除是现阶段治疗 TC 最常用和有效的方法^[1]。虽然 TC 患者术后 5 年生存率在 90%以上,但仍有许多因素导致肿瘤复发^[2]。切口感染是手术常见

* **【通讯作者(简介)】** 吴渊(1984-),男,福建福州人,硕士研究生,主治医师,主要从事甲乳外科相关研究。
E-mail: khakicc123c@163.com

并发症,其中金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* bacteremia, SAB)感染是接受 TC 切除术患者感染的主要病原体^[3]。SAB 会激活 Toll 样受体 2(Toll-like receptor 2, TLR2)/PI3K 通路,从而导致局部的免疫炎症反应^[4]。此外,有研究发现 TLR2/PI3K 通路的激活会促进 TC 细胞的增殖并抑制其凋亡^[5]。SAB 也会诱导细胞的自噬从而促进 SAB 的侵袭和感染^[6]。而自噬也是导致 TC 细胞存活和凋亡抑制的重要因素。更重要的是, SAB 感染会提高癌症的发生风险^[7],提示 TC 术后的 SAB 感染可能影响 TC 细胞的自噬和凋亡导致肿瘤复发,但关于 SAB 对 TC 细胞自噬、凋亡的影响仍不明确。本研究采用 TC 细胞感染 SAB 的方法,通过检测细胞增殖、凋亡,以及 LC3B、Beclin1 和 PI3K 蛋白的磷酸化水平,分析甲状腺术后切口感染的 SAB 调控 TLR2/PI3K 通路对 TC 细胞凋亡及自噬的影响。

对象与方法

1 病例

随机收集 2016 年 1 月-2020 年 12 月在本院接受甲状腺切除术且术后出现 SAB 感染的 TC 患者 83 例作为感染组,其中男 24 例,女 59 例,年龄 31~58 岁,平均(41.03±3.16)岁。另随机选择同期接受 TC 切除术且术后未出现感染的 TC 患者 83 例作为对照组,其中男 25 例,女 57 例,年龄 32~56 岁,平均(39.82±3.43)岁。两组患者性别、年龄构成等具有可比性。

纳入标准:(1)术后经病理学检测确诊为 TC;(2)年龄 30~60 岁;(3)参照卫生部 2001 年印发的《医院感染诊断标准(试行)》^[8],患者术后出现 SAB 感染。排除标准:(1)入组前接受过其他抗肿瘤治疗;(2)合并其他恶性肿瘤以及无法控制的慢性疾病;(3)合并其他类型的免疫疾病、血液学疾病和内分泌疾病。

本研究经医院伦理委员会批准,患者签署知情同意书。

2 主要实验材料

人 TC 细胞 SW1736 和 SAB 菌株 NCTC8325(ATCC[®] CCL-185)购于美国 ATCC 公司;DMEM 培养基血清和抗体购于美国 Invitrogen 公司;TLR2 通路抑制剂 C29 购于美国 MedChemExpress 公司;Trizol 和 RNeasy Mini 试剂盒购于德国 QIAGEN GmbH 公司;SYBR Premix Ex Taq[™] 试剂盒购于 TaKaRa(中国)公司;兔单克隆 LC3B 一抗(#ab239416)、兔单克隆 Beclin1 一抗(ab207612)、兔多克隆 PI3K 一抗(ab154598)、兔单克隆 p-PI3K 一抗(ab278545)以及山羊抗兔二抗购于美国 Abcam 公司;PVDF 膜购于美国 Millipore 公司;ECL 显色试剂盒和 Nanodrop

2000 仪器购于美国 Thermo Fisher 公司;细胞凋亡试剂盒(Annexin V-FITC 和 PI)购于耶森中国公司。PCR 仪(ABI7900)购于美国 ABI 公司;流式细胞仪购于美国 Becton 公司。

3 方法

3.1 细胞分组及处理 将 SW1736 细胞接种于 DMEM 培养基(含 10%胎牛血清、0.1 mg/ml 的链霉素和 100 U/ml 的青霉素),在 5%CO₂ 培养箱中于 37 °C 和 45%湿度下培养。

SW1736 细胞分为对照组、SAB 组和 SAB+C29 组。SAB 组和 SAB+C29 组根据文献^[9]的方法在培养基中加入终浓度为 1×10⁵ CFU/ml 的 SAB(菌胞比为 0.1:1)孵育 24 h;SAB+C29 组在加入 SAB 前,培养基中加入终浓度为 50 μmol/L 的 C29 预培养 24 h 以抑制 TLR2 蛋白功能和下游信号的转导^[10]。

3.2 RT-qPCR 检测 TLR2 和 LC3B mRNA 利用 Trizol 提取外周血中总 RNA,使用 Nanodrop 2000 进行定量。采用 RNeasy Mini 试剂盒进行逆转录,逆转录产物通过 SYBR Premix Ex Taq[™] 进行 RT-qPCR 反应。反应条件:95 °C 2 min,58 °C 20 s,72 °C 20 s,共 40 个循环。以 GAPDH 为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 TLR2 和 LC3B mRNA 的相对表达量。

3.3 CCK-8 检测细胞增殖活力 将 100 μl 细胞悬液添加到 96 孔板中,分别在孵育 24 h 和 48 h 每孔加入 10 μl CCK-8 溶液孵育 2 h。在 450 nm 波长下,用酶标仪检测每个孔的 A₄₅₀ 值。

3.4 流式细胞术检测细胞凋亡 将细胞用 1×PBS 洗涤并悬浮于 100 μl 结合缓冲液中;加入 5 μl Annexin V-FITC 和 10 μl PI,室温下置黑暗中孵育 10~15 min;加入 400 μl 结合缓冲液,于 1 h 内通过流式细胞仪检测细胞凋亡率。

3.5 Western blot 检测 LC3B、Beclin1 和 PI3K 细胞裂解后于 4 °C、12 000 r/min(离心半径 10 cm)离心 5 min,收集上清总蛋白。取 40 μg 蛋白进行 10% SDS-PAGE 电泳并将其转移到 PVDF 膜上,加入 5%脱脂牛奶室温封闭 2 h;加入 1:500 稀释的 LC3B、Beclin1、p-PI3K 和 PI3K 抗体,4 °C 下孵育 8 h,洗涤;加入二抗(1:2 000 稀释),室温孵育 1 h,洗涤后显色,并进行 ECL 可视化处理,以 GAPDH 作为内参分析 LC3B、Beclin1 蛋白水平以及 PI3K 蛋白的磷酸化水平。

3.6 统计学处理 使用 SPSS 19.0 进行统计学分析。计量资料以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间两两比较采用 *t* 检验;通过 Pearson 相关性检验分析 TLR2 mRNA 和 LC3B mRNA 的相关性。*P*<0.05 为差异具有统计学意义。

结果

1 SAB 感染对 TC 患者术后 TLR2 和 LC3B mRNA 的影响

感染组患者外周血中 TLR2 和 LC3B mRNA 相对表达量分别为 1.00 ± 0.17 和 1.00 ± 0.18 , 对照组分别为 3.24 ± 0.46 和 3.05 ± 0.52 , 差异均有统计学意义 (t 值分别为 34.054 和 29.438, 均 $P < 0.01$), 且感染组患者外周血中 TLR2 mRNA 和 LC3B mRNA 相对表达量呈正相关 ($r = 0.482, P < 0.05$)。

2 SAB 感染通过 TLR2 对 TC 细胞活力的影响

表 1 显示, 与对照组相比, SAB 感染后, SW1736 细胞活力增加, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 SAB 组相比, SAB 和 C29 共同处理后, SW1736 细胞活力下降, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果表明, SAB 感染能够提高 SW1736 细胞活力。然而抑制 TLR2 蛋白功能后, 能够减弱 SAB 对 SW1736 细胞活力的作用。

表 1 SAB 感染通过 TLR2 对 TC 细胞活力的影响
Table 1 The effect of SAB infection on TC cell viability through TLR2 (A_{450} value)

组别 Group	24 h A_{450} ($\bar{x} \pm s$)	48 h A_{450} ($\bar{x} \pm s$)
对照组	0.58 ± 0.06	1.03 ± 0.11
SAB 组	0.72 ± 0.08^a	1.34 ± 0.15^a
SAB+C29 组	$0.63 \pm 0.07^{a,b}$	$1.15 \pm 0.12^{a,b}$

注: ^a 与对照组比较, $P < 0.05$; ^b 与 SAB 组比较, $P < 0.05$ 。
Notes: ^a Compared with control group, $P < 0.05$; ^b Compared with SAB group, $P < 0.05$.

3 SAB 感染通过 TLR2 对 TC 细胞凋亡的影响

图 1 显示, SAB 组细胞凋亡率为 $(3.25 \pm 0.36)\%$, 与对照组凋亡率 $(5.92 \pm 0.58)\%$ 比较差异有统计学意义 ($t = 5.930, P < 0.05$), SAB+C29 组细胞凋亡率 $(5.14 \pm 0.55)\%$, 与 SAB 组比较差异有统计学意义 ($t = 7.216, P < 0.05$)。

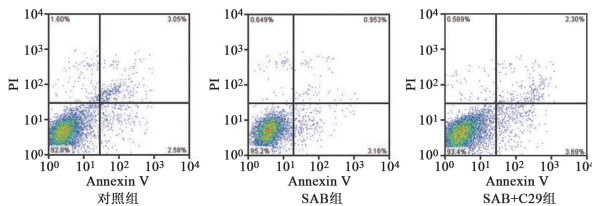


图 1 流式细胞术检测 SAB 感染通过 TLR2 对 TC 细胞凋亡的影响
Fig. 1 Flow cytometry to detect the effect of SAB infection on TC cell apoptosis through TLR2

4 SAB 感染通过 TLR2 对 TC 细胞自噬的影响

图 2 和表 2 显示, SAB 组自噬标志蛋白 LC3B 和 Beclin1 的表达水平显著高于对照组 ($t = 6.356, P < 0.05$), SAB+C29 组的 LC3B 和 Beclin1 蛋白水平显著低于 SAB 组 ($t = 9.201, P < 0.05$)。

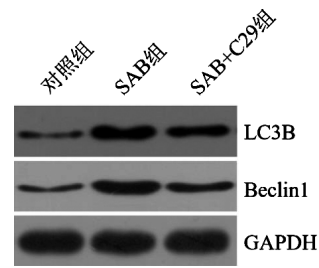


图 2 Western blot 检测 SAB 感染通过 TLR2 对 TC 细胞自噬标志蛋白 LC3B 和 Beclin1 表达水平的影响

Fig. 2 Western blot detection of the effect of SAB infection through TLR2 on the expression levels of autophagy marker proteins LC3B and Beclin1 in TC cells

表 2 SAB 感染通过 TLR2 对 TC 细胞自噬标志蛋白 LC3B 和 Beclin1 表达水平的影响

Table 2 The effect of SAB infection through TLR2 on the expression levels of autophagy marker proteins LC3B and Beclin1 in TC cells

组别 Group	LC3B ($\bar{x} \pm s$)	Beclin1 ($\bar{x} \pm s$)
对照组	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.08
SAB 组	4.05 ± 0.38^a	3.75 ± 0.34^a
SAB+C29 组	$2.12 \pm 0.20^{a,b}$	$1.98 \pm 0.19^{a,b}$

注: ^a 与对照组比较, $P < 0.05$; ^b 与 SAB 组比较, $P < 0.05$ 。

Notes: ^a Compared with control group, $P < 0.05$; ^b Compared with SAB group, $P < 0.05$.

5 SAB 感染通过 TLR2 对 TC 细胞中 PI3K 激活的影响

图 3 显示, SAB 组的 p-PI3K/PI3K 为 1.82 ± 0.19 , 与对照组的 0.52 ± 0.05 比较差异有统计学意义 ($t = 10.116, P < 0.05$), SAB+C29 组 p-PI3K/PI3K 为 1.06 ± 0.12 , 与 SAB 组的 1.82 ± 0.19 比较差异有统计学意义 ($t = 8.306, P < 0.05$)。

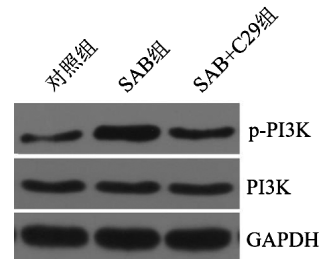


图 3 Western blot 检测 SAB 感染通过 TLR2 对 TC 细胞中 PI3K 蛋白磷酸化的影响

Fig. 3 Western blot detection of the effect of SAB infection on PI3K protein phosphorylation in TC cells through TLR2

讨论

TC 是内分泌系统常见恶性肿瘤, 我国 TC 患者较多, 且发病率呈上升趋势^[11]。TC 的发生多与遗传异常和环境因素有关, 近年来尽管新药和手术策略不断应用于临床, 但复发和转移仍是影响 TC 患者预后的重要因素^[12]。

目前, 手术仍是治疗 TC 的主要方法, 但是甲状腺切除后会出现一系列炎症反应、感染、氧化应激等生理

学过程,其中感染对于 TC 的影响仍不清楚^[13]。已知细菌和病毒感染是多种恶性肿瘤的致病因素,如长期幽门螺旋杆菌感染会导致胃黏膜细胞的癌变^[14]。TC 患者手术后经常发生感染,其中 SAB 是常见病原体之一,感染可能影响手术预后,但是影响机制仍不清楚^[15]。已有研究表明,利用 SAB 与宫颈癌以 0.1:1 的比例接种后,会促进宫颈癌细胞的增殖能力^[9]。本研究结果显示,SAB 与 TC 细胞以 0.1:1 的比例接种可显著提高 TC 细胞的增殖活力并抑制其凋亡。说明 SAB 感染会抑制 TC 细胞的凋亡并促进细胞增殖活力,提示甲状腺切除术后,切口感染 SAB 可能导致残留 TC 细胞的增殖,从而影响 TC 的复发。

SAB 会被细胞表面的受体蛋白 TLR2 识别,进而引起机体免疫炎症反应^[16]。TLR2 识别病原体后会激活细胞内的 PI3K 通路,促进 PI3K 的磷酸化激活,进而调节细胞的增殖、凋亡,TLR2 会通过激活 PI3K 通路激活自噬,从而缓解铂类药物对肾组织的损伤^[17]。研究表明,SAB 也具有促进自噬的作用,SAB 会通过诱导自噬促进 SAB 在细胞中的存活,并抑制机体免疫系统对 SAB 的清除^[18]。自噬是细胞对抗外界刺激的自我保护方式,由 LC3B 参与形成的自噬小体会将受损的细胞器递送至溶酶体降解,降解生成的小分子物质会被细胞重新利用^[19]。为分析 SAB 感染是否会影响 TC 患者的自噬水平,本研究分别检测了甲状腺切除术后感染和未感染的 TC 患者外周血中 TLR2 和自噬标志基因 LC3B mRNA 的水平。结果显示,SAB 感染患者外周血中 TLR2 mRNA 和 LC3B mRNA 水平均显著高于未感染者,并且二者呈正相关。细胞实验结果也显示,SAB 会促进 TC 细胞中 PI3K 的磷酸化激活,并提高自噬标志蛋白 LC3B 和 Beclin1 的表达。挽救实验结果显示,利用 C29 阻断 TLR2 的功能不但会阻断 SAB 对 PI3K 的激活作用,还会阻断 SAB 对自噬的促进作用,从而抑制 TC 细胞的增殖并促进其凋亡。本研究结果在细胞水平上说明了 SAB 会通过 TLR2 促进 TC 细胞中 PI3K 通路的激活,进而促进自噬并抑制凋亡,促进 TC 的进展。

然而,本研究也有一定的局限性。首先,细胞实验的体外环境和体内环境具有很大差异,SAB 感染也会影响机体中的其他细胞以及免疫系统,SAB 感染对 TC 细胞的影响仍需要动物实验验证。此外,SAB 通过 TLR2/PI3K 调节 TC 细胞自噬和凋亡的作用和机制也需要进一步的动物实验验证。

综上所述,甲状腺术后切口感染的 SAB 通过上调 TLR2/PI3K 通路而促进 TC 细胞的自噬并抑制凋亡。防止甲状腺术后切口感染 SAB 可能改善 TC 患者预后。

【参考文献】

- [1] Araque KA, Gubbi S, Klubo-Gwiezdzinska J. Updates on the management of thyroid cancer[J]. *Horm Metab Res*, 2020, 52(8):562-577.
- [2] Schlumberger M, Lebouilleux S. Current practice in patients with differentiated thyroid cancer[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2021, 17(3):176-188.
- [3] 李占结, 陈文森, 刘成成, 等. 甲状腺癌根治术手术部位感染聚集的流行病学调查[J]. *中国感染控制杂志*, 2019, 18(9):824-829.
- [4] Akhtar M, Shaukat A, Zahoor A, et al. Hederacoside-C inhibition of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis via TLR2 & TLR4 and their downstream signaling NF- κ B and MAPKs pathways *in vivo* and *In vitro*[J]. *Inflammation*, 2020, 43(2):579-594.
- [5] Yoo HK, Park H, Hwang HS, et al. Ganglioside GT1b increases hyaluronic acid synthase 2 via PI3K activation with TLR2 dependence in orbital fibroblasts from thyroid eye disease patients [J]. *BMB Rep*, 2021, 54(2):136-141.
- [6] 杨彬, 王邳杰, 么宏强, 等. UVRAG 调控金黄色葡萄球菌诱导的细胞自噬及其细菌的胞内存活[J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(8):914-918.
- [7] Chai W, Ye F, Zeng L, et al. HMGB1-mediated autophagy regulates sodium/iodide symporter protein degradation in thyroid cancer cells[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1):325-329.
- [8] 李占结, 陈文森, 刘成成, 等. 甲状腺癌根治术手术部位感染聚集的流行病学调查[J]. *中国感染控制杂志*, 2019, 18(9), 824-829.
- [9] 胡小冬, 崔洁, 唐素兰, 等. 金黄色葡萄球菌 L 型对宫颈癌细胞生长的影响[J]. *蚌埠医学院学报*, 2017, 42(11):1436-1438.
- [10] Mistry P, Laird MH, Schwarz RS, et al. Inhibition of TLR2 signaling by small molecule inhibitors targeting a pocket within the TLR2 TIR domain[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(17):5455-5460.
- [11] Wang J, Yu F, Shang Y, et al. Thyroid cancer: incidence and mortality trends in China, 2005-2015[J]. *Endocrine*, 2020, 68(1):163-173.
- [12] Webb C, Cronin P, Gupta N, et al. Is thyroid cancer prognosis affected by solid organ transplantation[J]. *Surgery*, 2021, 169(1):58-62.
- [13] 郑建伟, 蔡淑艳, 宋慧敏, 等. 甲状腺全切除术第一天血清全段甲状腺激素水平评估术后发生永久性甲状腺功能减退症的价值[J]. *中华外科杂志*, 2020, 58(8):E010-E014.
- [14] Choi JJ, Kim CG, Lee JY, et al. Family history of gastric cancer and *Helicobacter pylori* treatment[J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(5):427-436.
- [15] 李占结, 陈文森, 刘成成, 等. 甲状腺癌根治术手术部位感染聚集的流行病学调查[J]. *中国感染控制杂志*, 2019, 12(9):824-829.
- [16] Kamohara A, Hirata H, Xu X, et al. IgG immune complexes with *Staphylococcus aureus* protein A enhance osteoclast differentiation and bone resorption by stimulating Fc receptors and TLR2[J]. *Int Immunol*, 2020, 32(2):89-104.
- [17] Shen Q, Zhang X, Li Q, et al. TLR2 protects cisplatin-induced acute kidney injury associated with autophagy via PI3K/Akt signaling pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(3):4366-4374.
- [18] Geng N, Wang X, Yu X, et al. *Staphylococcus aureus* avoids autophagy clearance of bovine mammary epithelial cells by impairing lysosomal function[J]. *Front Immunol*, 2020, 11(2):746-749.
- [19] Park E, Chung SW. ROS-mediated autophagy increases intracellular iron levels and ferroptosis by ferritin and transferrin receptor regulation[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(11):822-827.

【收稿日期】 2022-02-10 【修回日期】 2022-05-07