

## 珍珠梅黄酮纳米粒抑制脂多糖诱发肝癌细胞的炎性作用

邵葵阳, 张璇, 焦文君, 张斯琳, 张学武\*

(延边大学医学院, 吉林 延吉 133002)

**摘要:** 探讨珍珠梅黄酮纳米粒 (5,2',4'-trihydroxy-6,7,5'-trimethoxy flavone nanoparticle, TTF1-NP) 抑制脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱发人肝癌 HepG2 细胞的炎性作用及调控机制。采用 LPS 诱发人肝癌 HepG2 细胞的炎症模型; MTT 比色法检测 TTF1-NP 对人肝癌 HepG2 细胞增殖作用; Western blot 法检测 TTF1-NP 对 LPS 诱发的 HepG2 细胞炎性反应的 TLR4 和 IL-6 及 AKT/mTOR 信号通路关键蛋白的表达作用。结果显示, TTF1-NP 能够抑制 LPS 引起的人肝癌 HepG2 细胞增殖, 抑制 TLR4 蛋白表达及 AKT 和 mTOR 蛋白的磷酸化, 抑制炎症因子 IL-6 和 IL-8 表达; TTF1-NP 抑制胰岛素引起的 AKT/mTOR 信号通路的活化 and TLR4 蛋白的表达, 从而降低 IL-6 和 IL-8 蛋白水平。研究表明, TTF1-NP 抑制 LPS 诱导的人肝癌 HepG2 细胞的炎性反应, 其作用机制可能与 AKT/mTOR 信号通路有关。

**关键词:** 珍珠梅黄酮纳米粒; 肝癌; 炎症; 蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 10-1549-05

## Anti-inflammatory effect of TTF1-NP on lipopolysaccharide stimulated human hepatocellular carcinoma cells

SHAO Kui-yang, ZHANG Xuan, JIAO Wen-jun, ZHANG Si-lin, ZHANG Xue-wu\*

(Medical College, Yanbian University, Yanji 133002, China)

**Abstract:** The study was designed to test the role of 5,2',4'-trihydroxy-6,7,5'-trimethoxy flavone nanoparticle (TTF1-NP) on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory response, and to explore the anti-inflammatory mechanism in human hepatocellular carcinoma cells. Inflammatory responses were induced in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells with LPS; Proliferation effect of TTF1-NP in LPS-stimulated HepG2 cells were detected by MTT assay; The expression of TLR4, AKT/mTOR signaling related proteins and IL-6 were detected by Western blot assay. The results showed that TTF1-NP inhibited the proliferation of HepG2 cells induced by LPS in a dose-dependent manner; TTF1-NP inhibited the expression of TLR4, the activation of AKT and mTOR, and expression of IL-6 in a dose-dependent manner; TTF1-NP inhibited the activation of AKT/mTOR signaling pathway and TLR4 proteins leading to suppression of IL-6 expression in HepG2 cells stimulated by insulin. These results suggest that TTF1-NP inhibited inflammatory responses from LPS treatment with a potential mechanisms in the inhibition of AKT/mTOR pathway.

**Key words:** 5,2',4'-trihydroxy-6,7,5'-trimethoxy flavone nanoparticle; liver cancer; inflammation; AKT/mTOR signaling pathway

收稿日期: 2017-05-03; 修回日期: 2017-06-21.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81460617).

\*通讯作者 Tel: 86-433-2435102, Fax: 86-433-2435104,

E-mail: zhangxuewu@ybu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0432

我国是原发性肝癌高发大国, 每年约有 47 万人死于原发性肝癌, 占全球死亡人数的 1/2<sup>[1]</sup>, 严重威胁人类的健康。应用化疗药物是肝癌患者重要的治疗手段之一, 但大部分的化疗药物毒副作用较大<sup>[2, 3]</sup>, 因此从天然植物中寻找高效低毒的分子靶向治疗药

物, 已经成为现阶段抗肝癌药物研究的重要方向。5,2',4'-三羟基-6,7,5'-三甲氧基黄酮纳米粒 (5,2',4'-trihydroxy-6,7,5'-trimethoxy flavone nanoparticle, TTF1-NP) 是以体内可生物降解材料硬脂酸为载体, 制备的生物体可降解吸收的抗肿瘤单体化合物<sup>[4]</sup>。课题组前期研究发现, TTF1-NP 具有抗肿瘤生物学活性, 其作用机制与诱导细胞凋亡和抑制肿瘤血管生成有关<sup>[5,6]</sup>, 此外, TTF1-NP 对二乙基亚硝胺诱发大鼠原发性肝癌形成过程中的炎症因子也有调节作用<sup>[7]</sup>。

炎症反应是生物体常见的病理生理现象, 慢性炎症反应能够促进肿瘤的形成, 与肿瘤的恶性程度和预后有关。炎症反应在肝癌的形成和发展过程中也起着关键的作用<sup>[8]</sup>, 一方面长期的慢性肝炎能够促进原发性肝癌的形成, 另一方面肝病患者血清中的脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 浓度较高<sup>[9]</sup>, LPS 能够通过细胞表面特异性受体 Toll 样受体 4 (TLR4) 结合, 活化 TLR4 介导的肿瘤促增殖信号转导通路, 促进肝癌细胞增殖<sup>[10]</sup>, 加快肿瘤的恶性化进程。蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (protein kinase B/the mammalian target of Rapamycin, AKT/mTOR) 信号通路是调控肿瘤细胞增殖和细胞凋亡的经典通路<sup>[11,12]</sup>, 近几年研究发现, 该通路不仅参与调控肿瘤细胞生长, 还能够通过与转录因子的相互作用调节肿瘤细胞炎症微环境, 影响肿瘤-炎症反应过程<sup>[13,14]</sup>。

本研究利用 LPS 刺激建立人肝癌 HepG2 细胞炎症反应模型, 检测 TTF1-NP 的抗炎作用, 明确其分子调控机制。为原发性肝癌患者分子靶向药物的研究提供新的探索方向, 也为 TTF1-NP 的开发应用提供理论依据。

## 材料与方法

**实验细胞** 人肝癌 HepG2 细胞购于南京凯基生物制品有限公司。

**实验药品与试剂** TTF1-NP 由延边大学药学院关丽萍教授惠赠。SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒购自北京索莱宝试剂公司; ECL 发光试剂盒购自 Merck Millipore 公司; 小牛血清和青链霉素购自美国 Gibco 公司; DMEM 培养液和胰酶均购自 Invitrogen 公司; IL-6、IL-8、TLR4、AKT、p-AKT、mTOR 和 p-mTOR 抗体均购自英国 Abcam 公司;  $\beta$ -Actin 购自北京博奥森生物技术有限公司; 羊抗兔 IgG、羊抗小鼠 IgG 购自中杉金桥; MTT 粉购自美国 Sigma 公司; pg-LPS 购自法国 InvivoGen 公司; 胰岛素 (insulin) 溶液购于碧云天生物技术有限公司。

**实验仪器** 电泳仪 (DYY-7C)、转膜仪 (DYCZ-40D) (北京市六一仪器厂产品); UVP 凝胶成像仪 (Biospectrum, 美国 UVP 凝胶成像系统有限公司); 超净工作台 (C1109C)、CO<sub>2</sub> 培养箱 (COR-1150) (上海智城分析仪器制造有限公司); 光镜 (日本 Olympus 公司); 酶标仪 (日本 TECAN 公司)。

**细胞培养及分组** 人肝癌 HepG2 细胞培养于 DMEM 培养液中 (含 10% 胎牛血清、100 u·mL<sup>-1</sup> 青霉素及 0.1 g·L<sup>-1</sup> 链霉素), 培养条件为 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、湿度 95%, 细胞生长对数期进行传代、备用。细胞分为未用任何药物干预的空白对照组 (NT)、LPS (10 g·L<sup>-1</sup>) 处理组 (LPS), 不同浓度的 TTF1-NP (5、10 和 20  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>) 加药组 (LPS+TTF1-NP)、AKT/mTOR 信号通路激活剂 insulin (1 g·L<sup>-1</sup>) 组。

**MTT 比色法检测细胞增殖** 对数生长期的人肝癌 HepG2 细胞, 取适量胰酶进行消化, 制成细胞悬液, 以细胞数  $1 \times 10^4$  个/孔接种于 96 孔板中, 每孔细胞悬液 200  $\mu$ L。待细胞贴壁后, 弃去原孔内的培养液, 分别加入不同剂量的 LPS 或 TTF1-NP 分别培养 12、24、48 和 72 h, 每孔内分别加入 MTT 溶液 (5 g·L<sup>-1</sup>) 20  $\mu$ L, 继续培养 4 h, 弃去孔内溶液, 每孔内加入二甲亚砜 (DMSO) 180  $\mu$ L, 避光移至酶标仪内, 充分震荡 10 min 后, 测定 490 nm 处各孔内吸光度 OD 值, 计算细胞生长抑制率, 细胞生长抑制率 (%) =  $(1 - OD_{\text{样本}} / OD_{\text{阴性对照组}}) \times 100\%$ 。

**Western blot 检测** 提取各实验组全蛋白。根据 BSA 法测定各个实验组蛋白样品浓度。制备凝胶, 每孔依次上样, 电泳 (80 V, 60~90 min), 转膜 (100 V, 30~60 min)。取出 PVDF 膜浸泡在 5% 脱脂奶粉中, 室温封闭 2 h。分别加入抗体 (IL-6、IL-8、TLR4、AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR 和  $\beta$ -actin) 4 °C 过夜, TBST 清洗 PVDF 膜, 滴加二抗, 室温 2 h, TBST 清洗, ECL 显影液孵育 5 min, 显影并拍照。应用 Image J 软件对所得条带进行灰度分析。

**数据处理** 所有数据均采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用单因素方差分析统计,  $P < 0.05$  有显著性统计意义,  $P < 0.01$  有极显著性统计意义。

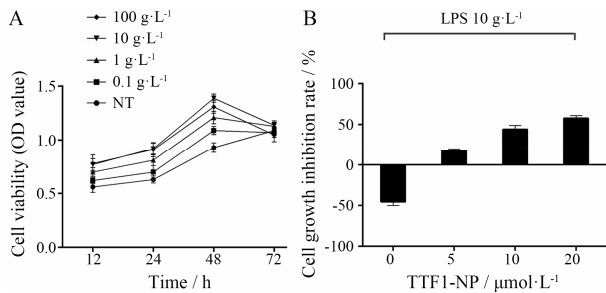
## 结果

### 1 TTF1-NP 对人肝癌 HepG2 细胞增殖作用

MTT 检测结果显示, 加入不同浓度 LPS (0.1、1 和 10 g·L<sup>-1</sup>) 刺激人肝癌 HepG2 细胞后, 细胞相对活力上升, 在 0.1~10 g·L<sup>-1</sup> LPS 作用范围内表现出浓度

依赖性 (图 1A),  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  LPS 可促进 HepG2 细胞生长, 但作用不明显。在 12、24 和 48 h 内不同浓度的 LPS 刺激后 HepG2 细胞相对活力明显升高 (图 1A), 在 12~48 h 内 LPS 促进人肝癌 HepG2 细胞增殖, 具有时间依赖性。由于  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  LPS 作用 48 h 对 HepG2 细胞的促增殖作用最明显, 因此以  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  LPS 刺激 48 h 为实验用模型诱导剂量。

不同浓度 TTF1-NP ( $5$ 、 $10$  和  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 对 LPS ( $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 刺激后人肝癌 HepG2 生长有抑制作用, 其生长抑制率随 TTF1-NP 浓度升高逐渐上升, 有剂量依赖性 (图 1B)。



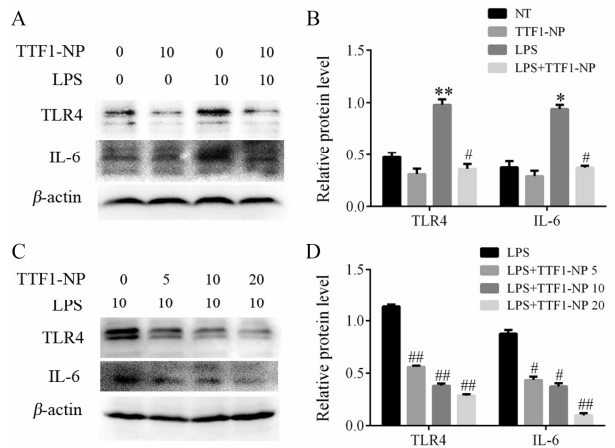
**Figure 1** Effect of TTF1-NP on cell viability in LPS induced HepG2 cells. A: HepG2 cells were treated with LPS ( $0.1$ ,  $1$ ,  $10$  and  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 12, 24, 48 and 72 h, cell relative viability assays were measured by MTT; B: HepG2 cells were treated with TTF1-NP ( $5$ ,  $10$  and  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 48 h after simulated by LPS ( $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). LPS: Lipopolysaccharide; NT: Non-treated; TTF1-NP: 5,2',4'-Trihydroxy-6,7,5'-trimethoxy flavone nanoparticle

## 2 TTF1-NP 对人肝癌 HepG2 细胞炎症因子的表达作用

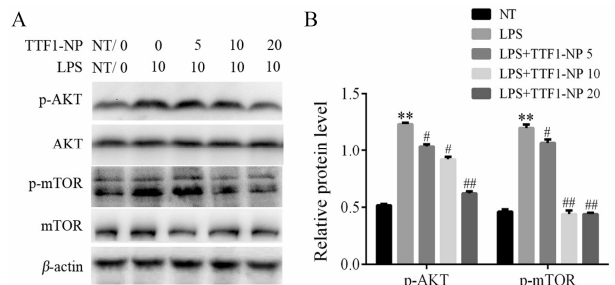
Western blot 检测发现, TTF1-NP 对 HepG2 细胞炎症受体蛋白 TLR4 和炎症因子 IL-6 表达有抑制作用 (图 2A), 但与 NT 组比较差异不显著; TTF1-NP 对 LPS 刺激后 TLR4 和 IL-6 表达有显著抑制作用 (图 2A), 与 LPS 组比较有统计学意义 (图 2B); TTF1-NP 明显抑制 LPS 刺激后 HepG2 炎症受体蛋白 TLR4 和炎症因子 IL-6 表达 (图 2C), 表现为剂量依赖性。与 LPS 组比较, 差异显著, 有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ) (图 2D)。

## 3 TTF1-NP 对 AKT/mTOR 信号通路关键蛋白表达的作用

Western blot 检测发现, LPS ( $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 可促进 p-AKT 和 p-mTOR 蛋白的表达 (图 3A), 与 NT 组比较, 有统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (图 3B)。不同浓度的 TTF1-NP 可以抑制 LPS 刺激后的人肝癌 HepG2 细胞 p-AKT 和 p-mTOR 蛋白表达 (图 3A), 有剂量依赖性。



**Figure 2** Effects of TTF1-NP on LPS induced protein levels of TLR4 and IL-6 in HepG2 cells. HepG2 cells were pretreated with LPS ( $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) or/and treated with TTF1-NP ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 48 h. A: Western blot; B: Quantification analysis. HepG2 cells were pretreated with LPS ( $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and then treated with various concentrations ( $5$ ,  $10$  and  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) of TTF1-NP for 48 h. C: Western blot; D: Quantification analysis.  $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs NT; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs LPS

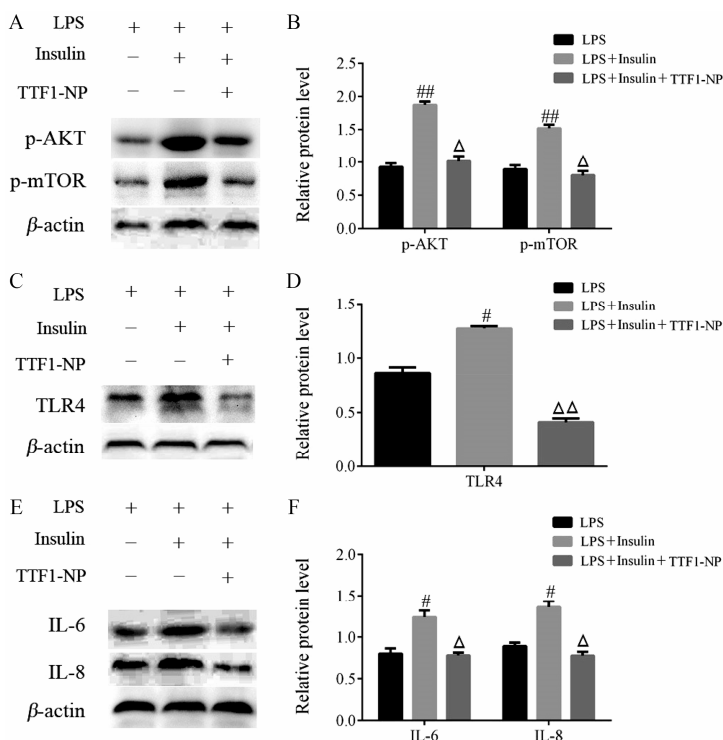


**Figure 3** Effects of TTF1-NP on LPS induced key protein levels of AKT/mTOR pathway in HepG2 cells. HepG2 cells were pretreated with LPS ( $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and then treated with various concentrations ( $5$ ,  $10$  and  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) of TTF1-NP for 48 h. A: Western blot; B: Quantification analysis.  $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$  vs NT; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs LPS

与 LPS 组比较, 有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ) (图 3B)。

## 4 TTF1-NP 对 insulin 刺激后 AKT/mTOR 通路蛋白及炎症反应的作用情况

Western blot 检测发现, TTF1-NP 显著抑制了 insulin 活化的 p-AKT 和 p-mTOR 蛋白表达 (图 4A), 与 insulin 组比较, 具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ) (图 4B); Insulin 对炎症受体蛋白 TLR4 表达也有促进作用, TTF1-NP 抑制以上作用 (图 4C), 与 insulin 组比较, 具有显著性差异 ( $P < 0.01$ ) (图 4D); TTF1-NP 能够显著抑制 insulin 引起的炎症因子 IL-6 和 IL-8 的表达 (图 4E), 与 insulin 组比较, 具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ) (图 4F)。



**Figure 4** Effects of TTF1-NP on AKT/mTOR pathway and inflammation responses of LPS and insulin pretreated in HepG2 cells. HepG2 cells were pretreated with LPS ( $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and insulin ( $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) then treated with TTF1-NP ( $20 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 48 h. A, C, E: Western blot; B, D, F: Quantification analysis.  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$ . # $P<0.05$ , ## $P<0.01$  vs LPS;  $\Delta P<0.05$ ,  $\Delta\Delta P<0.01$  vs LPS+insulin

### 讨论

原发性肝癌是严重威胁人类生命健康的恶性肿瘤之一，研发高效低毒的靶向分子治疗药物具有重要现实意义。慢性炎症参与肝癌的发生和发展过程，本课题组<sup>[15]</sup>也在前期研究中发现，间歇饲喂 DEN 诱发大鼠原发性肝癌形成过程中，有大量炎性细胞浸润，低氧诱导因子和炎症因子 IL-10 活化表达。炎症因子能够直接作用于免疫调节细胞，影响免疫细胞正常功能，又能够调节细胞内信号因子，影响细胞内信号通路，从而促进肝癌的恶性进展。因此，通过抑制炎症反应抑制原发性肝癌的发展是新的研究方向。

LPS 刺激是诱发体外炎症模型最常用的方法之一<sup>[16]</sup>，其诱导发生的炎症反应与 TLRs 家族调控有关。TLR4 是 TLRs 家族重要成员，也是与肿瘤-炎症反应关系密切的最主要调节因子，广泛存在于多种细胞表面。有学者<sup>[17]</sup>报道，LPS 通过识别特异性受体 TLR4，形成受体复合物，触发细胞内信号级联反应，调控细胞内信号转录因子，最终诱导 IL-6、IL-8 和 TNF- $\alpha$  等炎症因子释放<sup>[18-21]</sup>。本研究检测发现类似结果，TTF1-NP 抑制 LPS 的促人肝癌 HepG2 细胞增殖作用，抑制 TLR4 表达，并能抑制炎症因子 IL-6 表达。

TLR4 是 LPS 诱发炎症反应的重要识别受体，其介导的炎症反应与 AKT/mTOR 信号通路密切相关。

AKT/mTOR 信号通路是调控肿瘤细胞增殖、生长和代谢的重要转导途径<sup>[22]</sup>，近几年研究发现，该信号通路参与调节肿瘤细胞的炎症反应<sup>[23]</sup>。Sun 等<sup>[24]</sup>研究发现，LPS 促进胰腺癌细胞 TLR4 信号转导的活化，促进 AKT 的磷酸化，利用 siRNA 技术沉默 TLR4 和 PI3K/AKT 抑制剂 LY294002 均可抑制 LPS 诱发的肿瘤细胞的增殖和血管生成等生物学反应。本研究利用 Western blot 技术检测 AKT/mTOR 信号通路关键分子 AKT、mTOR、p-AKT 和 p-mTOR 蛋白的表达变化发现，LPS 促进 p-AKT 和 p-mTOR 蛋白表达，TTF1-NP 可逆转以上作用。因此推测，TTF1-NP 通过抑制 AKT/mTOR 信号通路活化，影响炎症因子释放。

为进一步研究 TTF1-NP 通过 AKT/mTOR 通路对炎症因子的调节作用，本研究加入 AKT/mTOR 信号通路活化剂 insulin。Insulin 是生物体内重要的糖激素蛋白，能够与细胞膜上特异受体结合诱发 PI3K 变构、激活 PI3K，PI3K 在功能上是 AKT 活化的首要调控者<sup>[25]</sup>。本研究发现，insulin 促进 AKT/mTOR 信号通路蛋白表达，促进 TLR4 蛋白表达和炎症因子释放，TTF1-NP 抑制 insulin 活化的 AKT/mTOR 信号通路，抑制肝癌细胞的炎症因子表达。

炎症反应在肿瘤的恶性进展中扮演重要角色，参与了恶性肿瘤发生、发展、侵袭和转移等病理过程，

抑制炎症反应成为治疗肿瘤的新策略。本研究结果显示, TTF1-NP 能够抑制 LPS 诱发人肝癌 HepG2 细胞的炎性反应, AKT/mTOR 信号通路发挥了重要作用。今后将进一步结合体内实验深入研究 TTF1-NP 的抗炎作用机制, 为 TTF1-NP 的开发利用提供可靠的实验依据, 为抗肿瘤药物的研究提供新的方向。

## References

- [1] Salhab M, Canelo R. An overview of evidence-based management of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis [J]. *J Cancer Res Ther*, 2011, 7: 463–475.
- [2] Johnson PJ. Hepatocellular carcinoma: is current therapy really altering outcome? [J]. *Gut*, 2002, 51: 459–462.
- [3] Palmer DH, Hussaln SA, Johnson PJ. Systemic therapies for hepatocellular carcinoma [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2004, 13: 1555–1568.
- [4] Li Y, Cui FD, Zhang XW. Preparation of flavonoids loaded solid lipid nanoparticles from *Sorbaria sorbifolia* [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药)*, 2012, 23: 2549–2550.
- [5] Xiao B, Liu C, Liu BT, et al. TTF1-NPs induce ERS-mediated apoptosis and inhibit human hepatoma cell growth *in vitro* and *in vivo* [J]. *Oncol Res*, 2016, 23: 311–320.
- [6] Liu RR, Zhang X, Xiao B, et al. Mechanism of TTF1-NP induced implanted hepatoma tumor apoptosis in nude mice by endoplasmic reticulum stress pathway [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 403–407.
- [7] Ma ZH, Zhang K, Zang Y, et al. Growth inhibition of TTF1-NP for PHC through the CHOP pathway of ERS in rats [J]. *Acta Univ Med Yan Bian (延边大学学报)*, 2015, 38: 83–86.
- [8] Cui LM, Zhang K, Ma DJ, et al. Protein expression under sustained activation of signal transducer and activator of transcription 3 in diethylnitrosamine induced rat liver carcinogenesis [J]. *Oncol Lett*, 2014, 8: 608–614.
- [9] Janssen WJ, Henson PM. Cellular regulation of the inflammatory response [J]. *Toxicol Pathol*, 2012, 40: 166–173.
- [10] Schwabe RF, Seki E, Brenner DA. Toll-like receptor signaling in the liver [J]. *Gastroenterology*, 2006, 130: 1886–1900.
- [11] Wang L, Zhu R, Huang Z, et al. Lipopolysaccharide-induced toll-like receptor 4 signaling in cancer cells promotes cell survival and proliferation in hepatocellular carcinoma [J]. *Dig Dis Sci*, 2013, 58: 2223–2236.
- [12] Li H, Hu J, Wu S, et al. Auranofin-mediated inhibition of PI3K/AKT/mTOR axis and anticancer activity in non-small cell lung cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 3548–3558.
- [13] Zhao CC, Gu KS. Involvement of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in epirubicin-induced apoptosis and anti-proliferation of Jurkat cells [J]. *Chin Clin Oncol (临床肿瘤学杂志)*, 2012, 17: 780–784.
- [14] Lee DF, Kuo HP, Chen CT, et al. IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis *via* the mTOR pathway [J]. *Cell*, 2007, 130: 440–455.
- [15] Liu T, Song DQ, Zhang LY, et al. The effect of zinc on inflammatory reaction in rats with focal cerebral ischemia/reperfusion [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 892–897.
- [16] Liu J, Abate W, Xu J, et al. Three-dimensional spheroid cultures of A549 and HepG2 cells exhibit different lipopolysaccharide (LPS) receptor expression and LPS-induced cytokine response compared with monolayer cultures [J]. *Innate Immun*, 2011, 17: 245–255.
- [17] Sato Y, Goto YJ, Narita N, et al. Cancer cells expressing Toll-like receptors and the tumor microenvironment [J]. *Cancer microenviron*, 2009, 2: 205–214.
- [18] Echavarría R, Mayaki D, Neel JC, et al. Angiopoietin-1 inhibits toll-like receptor 4 signalling in cultured endothelial cells: role of miR-146b-5p [J]. *Cardiovasc Res*, 2015, 106: 465–477.
- [19] Liu YT, Li T, Xu EJ, et al. Effects of LPS on proliferation, apoptosis and secretion of cytokines of hepatocellular carcinoma cell line HepG2 [J]. *Acta Univ Med Anhui (安徽医科大学学报)*, 2015, 50: 604–607.
- [20] Raza H, John A, Shafarin J. Potentiation of LPS-induced apoptotic cell death in human hepatoma HepG2 cells by aspirin *via* ROS and mitochondrial dysfunction: protection by *N*-acetyl cysteine [J]. *PLoS One*, 2016, 11: e0159750.
- [21] Yang S, Li R, Qu X, et al. Fosinoprilat alleviates lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation by inhibiting TLR4/NF- $\kappa$ B signaling in monocytes [J]. *Cell Immunol*, 2013, 284: 182–186.
- [22] Tian B, Zhao Y, Liang T, et al. Curcumin inhibits urothelial tumor development by suppressing IGF2 and IGF2-mediated PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *J Drug Target*, 2017, 25: 624–636.
- [23] Ding Y, Zhang J, Wang R. Inhibition of tissue transglutaminase attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation in glial cells through AKT/mTOR signal pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89: 1310–1319.
- [24] Sun Y, Wu C, Ma J, et al. Toll-like receptor 4 promotes angiogenesis in pancreatic cancer *via* PI3K/AKT signaling [J]. *Exp Cell Res*, 2016, 347: 274–282.
- [25] Yao H, Han X, Han X. The cardioprotection of the insulin-mediated PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2014, 14: 433–442.