

文章编号 1006-8147(2019)05-0436-04

论著

IL-6 诱导卵巢癌细胞对他莫西芬产生耐药的实验研究

马晓霞^{1,2}, 孙 旻³, 马 瑞², 崔志坤², 王 越², 郭小芹², 邓为民¹

(1.天津医科大学免疫学系, 天津 300070; 2.武警后勤学院病原生物学教研室, 天津 300309; 3.武警特色医学中心妇产科, 天津 300163)

摘要 目的:研究 IL-6 在诱导卵巢癌细胞对他莫西芬(TAM)产生耐药中的作用。方法:选择 A2780(不分泌 IL-6,但表达其受体,且对 TAM 敏感)和 CAOV3(高表达 IL-6 及其受体,且对 TAM 耐药)细胞作为研究模型,应用重组 IL-6 短期处理或将 ss/as IL-6 基因稳定转染至 A2780(该数据已有文章发表)及 CAOV3 细胞,通过 MTT、RT-PCR、ELISA 等观察内源性 IL-6 是否影响卵巢癌细胞对 TAM 的敏感性。结果:经稳定转染得到 IL-6 中、高抑制表达的 2 个 CAOV3/asIL-6 细胞克隆,与空载体转染细胞 CAOV3/pcDNA3.1+相比,IL-6 分泌水平分别下降了 63.82%和 75.69%($P<0.05$),其 IL-6 mRNA 水平与其分泌水平相似;外源性 IL-6 处理及内源性过表达 IL-6 均可诱导 A2780 细胞对 TAM 产生耐药,而内源性抑制 IL-6 表达则可恢复 CAOV3 细胞对 TAM 的敏感性。结论:IL-6 可诱导卵巢癌细胞对 TAM 产生耐药,IL-6 有可能是卵巢癌抗雌激素治疗耐药中的重要一环,有望成为逆转卵巢癌抗雌激素治疗耐药的重要靶点。

关键词 IL-6; 卵巢癌细胞; 基因稳定转染与克隆筛选; 抗雌激素治疗耐药

中图分类号 R737.31

文献标志码 A

IL-6 induces ovarian cancer cell resistance to tamoxifen

MA Xiao-xia^{1,2}, SUN Yang³, MA Rui², CUI Zhi-kun², WANG Yue², GUO Xiao-qin², DENG Wei-min¹

(1.Department of Immunology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Logistics University of People's Armed Police Force, Tianjin 300309, China; 3.Department of Gynecology and Obstetrics, Armed Police Characteristic Medical Center, Tianjin 300163, China)

Abstract **Objective:** To explore the effect of tamoxifen resistance caused by exogenous and endogenous IL-6 in ovarian cancer cells. **Methods:** A2780 and CAOV3 cells were used as research models; we retreated with exogenous IL-6 to obtain A2780/preIL-6 cells. The antisense IL-6 gene was stably transfected into CAOV3 cells, and the IL-6 mRNA and IL-6 secretion levels of stably transfected cells were detected by RT-PCR and ELISA. Ovarian cancer cell activity was measured by MTT assay. **Results:** CAOV3/asIL-6 with different IL-6 secretion levels were stably transfected, and their IL-6 secretion levels were decreased by 63.82% and 75.69%, respectively, compared with their untransfected cells CAOV3 ($P<0.05$), and its IL-6 mRNA level was consistent with its secretion level; Exogenous IL-6, endogenous overexpression of IL-6 induced resistance to tamoxifen in A2780 cells, whereas inhibition of IL-6 expression restored the sensitivity of CAOV3 cells to tamoxifen. **Conclusion:** IL-6 can induce tamoxifen resistance in ovarian cancer cells. IL-6 may be an important part of anti-estrogen resistance in ovarian cancer, and it is expected to be an important factor in reversing the anti-estrogen resistance of ovarian cancer.

Key words interleukin-6; ovarian cancer cells; gene stable transfection and clonal screening; anti-estrogen treatment resistance

卵巢癌是妇科三大恶性肿瘤之一,病发隐匿,大部分患者确诊时已属晚期,因此卵巢癌是妇科肿瘤中病死率最高的恶性肿瘤。作为雌激素依赖性肿瘤,雌激素与雌激素受体(estrogen receptor, ER)的相互作用可促进其发生发展^[1-3]。他莫西芬(tamoxifen, TAM)是目前临床上治疗乳腺癌最具代表性的抗雌激素药物,卵巢癌与乳腺癌虽然同为雌激素依赖性

肿瘤,但二者对抗雌激素治疗反应不同。约 2/3 ER α 阳性的乳腺癌患者对 TAM 治疗有效,而卵巢癌患者有 40%~60%表达 ER α ,但仅有 7%~18%的患者对抗雌激素治疗有效,因此,探讨卵巢癌在抗雌激素治疗中发生耐药的机制具有重要意义^[4]。IL-6 是由多种细胞产生的一种炎症性细胞因子,临床资料显示,卵巢癌患者 IL-6 的高表达与不良预后及化疗敏感性差密切相关^[5-6]。本课题组研究发现,卵巢癌细胞自分泌 IL-6 的水平与其对 TAM 的敏感性呈负相关。不分泌 IL-6 的 A2780 细胞对 TAM 敏感;而高分泌 IL-6 的 CAOV3 细胞对 TAM 耐药^[7]。IL-6 是否影响卵巢癌细胞对 TAM 的敏感性?本研究对内

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81502256,81572852);天津市自然科学基金重点项目(18JCZDJC33200,18YFZCSY00040)
作者简介 马晓霞(1993-),女,硕士在读,研究方向:肿瘤免疫;通信作者:邓为民, E-mail: dengweimin@tmu.edu.cn; 郭小芹, E-mail: guoxiaoqinlet@163.com。

源性及外源性 IL-6 在诱导卵巢癌抗雌激素治疗耐药中的作用进行初步研究,从而为解决卵巢癌内分泌治疗耐药这一难题提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料、试剂 二甲基亚砜(DMSO):Sigma 公司产品;噻唑蓝(thiazolylblue,MTT):Sigma 公司产品。美国 GIBCO 公司产品:RPMI/1640 培养基、活性碳处理的 FBS(sFBS);中美合资兰州民海生物工程有限公司产品:胎牛血清(FBS);美国 R&D 公司:重组人 IL-6、人 IL-6 ELISA 试剂盒;美国 Invitrogen 公司产品:LipofectamineTM2000、G418;TaKaRa 产品:M-MLV(RNase H-)逆转录酶、2×Premix Taq;100bp DNA LadderMarker 产自天根生化科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞系和细胞培养 人卵巢腺癌细胞(A2780)和人乳突状卵巢腺癌细胞(CAOV3)均为美国 ATCC 公司产物,前者购自南京凯基生物科技发展有限公司,后者为本室保留。前者用含有 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液培养,后者用含 10% FBS 的 DMEM 培养液培养,该培养液含有 100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素。

1.2.2 基因转染克隆的筛选与鉴定 A2780 细胞不分泌 IL-6 但表达其受体,而 CAOV3 细胞高表达 IL-6 及其受体。前期工作^[7]获得中度和高度表达 IL-6 的 2 个 A2780 细胞克隆(A2780/ssIL-6M 和 A2780/ssIL-6H)及 A2780/pcDNA3.1+。本研究将带有反义 IL-6 cDNA 的表达载体 pcDNA3.1+/asIL-6 转染至 CAOV3 细胞中,细胞转染 48 h 后,应用 G418(浓度为 600 μg/mL)进行加压筛选获得的阳性转染细胞克隆经扩大培养后分别收取培养上清和细胞进行 ELISA 和 RT-PCR 鉴定,获得 IL-6 中度和高度抑制表达的 2 个 CAOV3 细胞克隆(CAOV3/asIL-6Mi 和 CAOV3/asIL-6Hi)。同时将空载体转染至 CAOV3 细胞作为阴性对照,为 CAOV3/pcDNA3.1+。

1.2.3 IL-6 的 ELISA 检测 取对数生长期的上述卵巢癌细胞,调整各种细胞浓度为 1×10^5 /mL,接种于 12 孔细胞培养板中,1 mL/孔,37 ℃、50 mL/L CO₂ 孵箱中培养 48 h 后,收集培养上清,按照 ELISA 试剂盒的说明书检测培养上清中 IL-6 的含量。

1.2.4 RT-PCR 反应 总 RNA 的提取的流程参照 TRizol 试剂(美国 Invitrogen)说明书。逆转录反应条件参照 M-MLV 逆转录酶说明书进行,引物序列 IL-6 如下:IL-6: forward 5'-TTGACAAACAAA TTCGGTACA-3',reverse 5'-GAGGTGCCCATGC TACA-3' (497 bp);β-actin:sense5'-TGGAATCCT

GTGGCATCCATGAAAC-3',antisense 5'-TAAAACG CAGCTCAGTAACAGTCC-3' (350 bp)。PCR 反应体系:cDNA 1.0 μL,2×PremixTaq 10 μL,上、下游引物各 10 pmol,加双蒸水至总体积 20 μL。PCR 反应的程序如下:预变性,94 ℃ 5 min;变性,94 ℃ 30 s;退火,59 ℃ 45 s;延伸,72 ℃ 1 min,设定 34 个循环。反应终止时,吸取 5 μL PCR 反应液在浓度为 12 g/L 琼脂糖凝胶中进行电泳。结果使用 Quantity One 软件(Bio-Rad 公司)分析,内参是 β-actin,使用靶基因/β-actin 的光密度比值对 mRNA 进行相对定量。

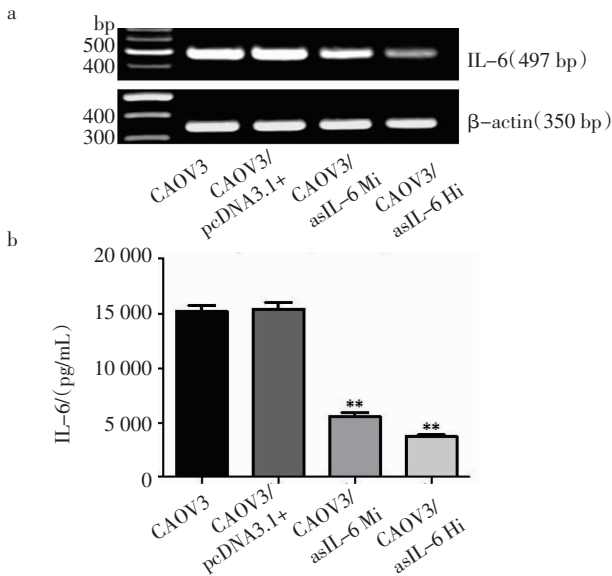
1.2.5 MTT 试验检测细胞活性 应用终浓度 50 ng/mL IL-6 作用于 A2780 细胞,连续处理 10 d,期间每 2 d 更换 1 次新鲜的培养液并加入相同浓度的 IL-6,经上述处理的细胞命名为 IL-6 预处理的 A2780 细胞(A2780/preIL-6 细胞)。将 A2780/preIL-6、A2780 细胞分别接种到 96 孔板中 (4×10^4 /mL),100 μL/孔,37 ℃、50 mL/L CO₂ 孵箱中培养 24 h 后弃去培养液,更换含有 50 mL/L FBS 的培养液,A2780/preIL-6 细胞先加入 20 μL 终浓度为 50 ng/mL 的 IL-6,然后与 A2780 细胞一起分别加入不同浓度的 TAM(0.1、1、10、100、1 000 nmol/L),30 min 后加入雌二醇(E2 终浓度为 1 nmol/L)。每个浓度设 5 个平行孔,并以 TAM 的稀释液乙醇作为对照。37 ℃、50 mL/L CO₂ 孵箱中培养 48 h 后,在结束培养前 4 h 离心弃上清后加入 MTT 溶液(0.5 g/L,PBS 配制),于 37 ℃、50 mL/L CO₂ 孵箱内继续培养 4 h,离心弃 MTT 溶液后加入 DMSO 100 μL/孔,充分振荡至细胞内的紫蓝色结晶完全溶解,置酶标仪上测定波长为 490 nm 时的吸光度(A)值。同时,内源性过表达 IL-6 的 A2780/ssIL-6 及抑表达 IL-6 的 CAOV3/asIL-6 细胞,同样采取上述方法检测其细胞活性。

1.3 统计学处理 统计学分析使用 SPSS17.0 软件包进行统计学分析,最终结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LDS 法,*P* < 0.05 具有统计学差异。

2 结果

2.1 asIL-6 基因转染卵巢癌细胞克隆筛选的鉴定 由图 1a 可见,与空载体转染细胞 CAOV3/pcDNA3.1+相比,IL-6 中、高抑制表达的 2 个 CAOV3 细胞克隆,其 IL-6 分泌水平分别下降了 63.82% 和 75.69% (*P* < 0.01),命名为 CAOV3/asIL-6Mi 和 CAOV3/asIL-6Hi 细胞,而未转染细胞 CAOV3 与空载体转染细胞 CAOV3/pcDNA3.1+相比 IL-6 分泌水平无明显差异。上述稳定转染细胞克隆的 IL-6 mRNA 水

平与其分泌水平相一致(图 1b)。

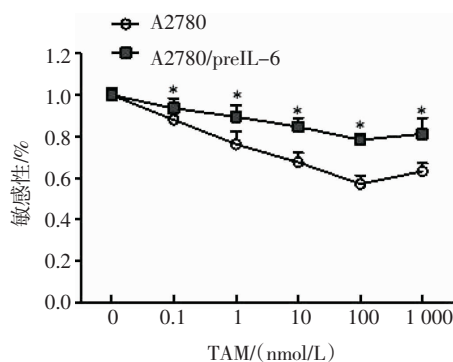


a and b. Expressions of IL-6 mRNA and protein IL-6 in CAOV3/asIL-6 cells
** $P < 0.01$, compared with CAOV3/pcDNA3.1+

图 1 asIL-6 基因转染 CAOV3 细胞克隆的 IL-6 表达水平

Fig 1 The level of IL-6 expression in asIL-6-transfected CAOV3 cell

2.2 外源 IL-6 可以诱导 A2780 细胞对 TAM 产生耐药 由图 2 可见,经不同浓度的 TAM(0.1、1、10、100、1 000 nmol/L)作用后,A2780/preIL-6 细胞增殖水平均显著高于 A2780 细胞(均 $P < 0.05$)。说明外源性 IL-6 可以诱导 A2780 细胞对 TAM 产生耐药。



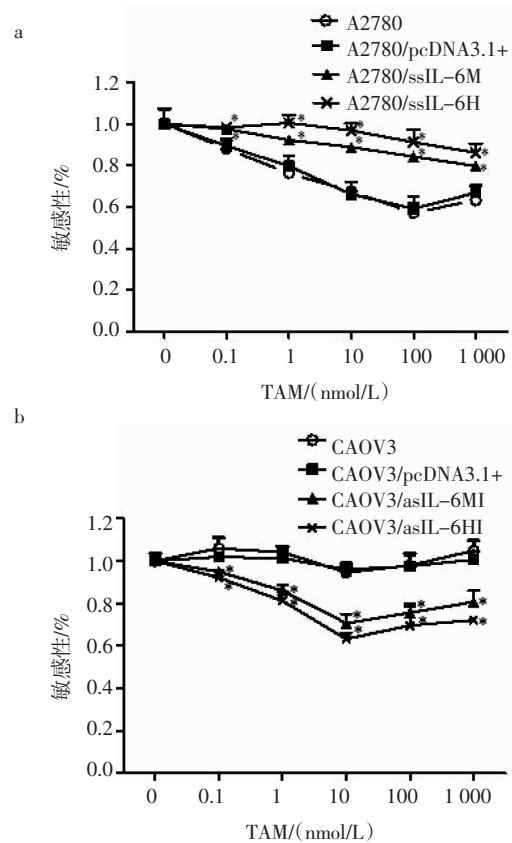
* $P < 0.05$, compared with the parental A2780

图 2 外源性 IL-6 影响 A2780 细胞对他莫西芬的敏感性(MTT 法)

Fig 2 MTT assay for the effect of exogenous IL-6 on the sensitivity of A2780 cells to tamoxifen

2.3 内源性 IL-6 影响卵巢癌细胞对 TAM 的敏感性 如图 3a 所示,经不同浓度 TAM 作用后,A2780/ssIL-6M 和 A2780/ssIL-6H 细胞的增殖水平均较空载体转染细胞 A2780/pcDNA3.1+明显增加(均 $P < 0.05$),与未转染细胞 A2780 和空载体转染细胞 A2780/pcDNA3.1+比较,细胞增殖水平无明显差异。表明内源性过表达 IL-6 可诱导 A2780 细胞对

TAM 产生耐药。而抑制内源性 IL-6 表达可恢复 CAOV3 细胞对 TAM 的敏感性,如图 3b 所示,与空载体转染细胞 CAOV3/pcDNA3.1+相比,CAOV3/asIL-6Mi 和 CAOV3/asIL-6Hi 细胞增殖水平均显著下降(均 $P < 0.05$)。未转染细胞 CAOV3 和空载体转染细胞 CAOV3/pcDNA3.1+相比,细胞增殖水平无明显差异。上述结果提示 IL-6 可诱导卵巢癌细胞对 TAM 产生耐药。



a and b. Sensitivity of A2780/ssIL-6 or CAOV3/asIL-6 cells to tamoxifen;
* $P < 0.05$, compared with the vector-transfected A2780 or CAOV-3 cells

图 3 内源性 IL-6 影响卵巢癌细胞对他莫西芬的敏感性(MTT 法)

Fig 3 MTT assay for the effect of endogenous IL-6 on the responsiveness of ovarian cancer cells to tamoxifen

3 讨论

卵巢癌的发病率仅次于宫颈癌和子宫内膜癌列居妇科恶性肿瘤第 3 位,而病死率在女性生殖系统癌症中高居首位。作为一种雌激素依赖性肿瘤,流行病学表明雌激素替代治疗可增加卵巢癌的发病风险;与正常绝经后妇女相比,绝经后卵巢癌患者血清中雌激素水平更高。一直以来,他莫西芬是卵巢癌抗雌激素治疗的首选药物。抗雌激素药物可作为配体竞争性地与 ER 结合,通过诱导 ER 构象改变而使 ER 的 DNA 结合区不能与靶基因上的雌激素反应元件(estrogen response element, ERE)结合,由此阻断了雌激素的转录激活效应。但根据受体状态

进行内分泌治疗的效果不佳^[8-10],具体机制尚不清楚。

IL-6 是一种多功能细胞因子,其与多种肿瘤的发生、发展关系密切。IL-6 通过影响细胞的粘附性和活动力、血栓形成、肿瘤特异性抗原的表达及肿瘤细胞的增殖而影响肿瘤的发生和发展。临床资料表明卵巢癌患者高表达 IL-6,其腹水中的水平明显高于血清,IL-6 水平升高与卵巢癌的不良预后及化疗敏感性差相关^[5]。体外实验证明 IL-6 可增加卵巢癌细胞的粘附性、趋化性及总侵袭力;卵巢癌细胞产生的 IL-6 是一种潜在的前血管生成因子;并可通过促进 MMP-9 分泌而提高其致癌性^[6,11]。目前,国内外对 IL-6 在雄激素依赖性肿瘤前列腺癌细胞生长和抗雄激素治疗中作用及相关机制的研究相对较多。对 IL-6 在雌激素依赖性肿瘤乳腺癌和卵巢癌细胞生长中的作用报道较少,如有研究表明 IL-6 对乳腺癌细胞生长有抑制作用^[12],但对其转移却有促进作用;研究发现 IL-6 不仅可促进卵巢癌细胞生长,同时还证明雌激素对卵巢癌细胞的促生长作用有部分是 IL-6 介导的^[13-14]。

本课题组前期研究发现,人卵巢癌细胞自分泌 IL-6 水平与其对 TAM 的敏感性呈负相关,提示 IL-6 可能在卵巢癌内分泌治疗耐药中发挥作用。本研究利用内源性和外源性 IL-6 处理的卵巢癌细胞作为模型,观察 IL-6 在卵巢癌细胞对 TAM 敏感性中的作用。结果表明,外源性 IL-6 和内源性过表达 IL-6 均可明显促进卵巢癌细胞的增殖水平,提示 IL-6 可诱导卵巢癌细胞对 TAM 产生耐药,而抑制内源性 IL-6 表达则明显降低卵巢癌细胞的增殖水平,表明抑制 IL-6 表达可恢复卵巢癌细胞对 TAM 的敏感性。

本研究从正反两方面证实 IL-6 可诱导卵巢癌细胞对 TAM 产生耐药,对 IL-6 在诱导卵巢癌细胞对 TAM 产生耐药中的作用进行初步探讨,不仅有助于帮助笔者预测治疗的疗效,而且有望为逆转卵巢癌抗雌激素治疗耐药提供新的靶点。然而 IL-6 诱导卵巢癌细胞抗雌激素治疗产生耐药的分子机制尚不清楚,有待进一步研究。

参考文献:

[1] de Leeuw R, Neefjes J, Michalides R. A role for estrogen receptor

- phosphorylation in the resistance to tamoxifen[J]. *Int J Breast Cancer*, 2011, 2011:232435
- [2] Kim J, Lee J, Jang S Y, et al. Anticancer effect of metformin on estrogen receptor-positive and tamoxifen-resistant breast cancer cell lines[J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(5): 2553
- [3] 牛秀琰,叶路,毛立群,等.雌激素受体亚型对乳腺癌 MCF-7 细胞生长及微环境中 Th 平衡的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2011, 18(5): 490
- [4] Sisay M, Edessa D. PARP inhibitors as potential therapeutic agents for various cancers: focus on niraparib and its first global approval for maintenance therapy of gynecologic cancers[J]. *Gynecol Oncol Res Pract*, 2017, 4:18
- [5] Penson R T, Kronish K, Duan Z, et al. Cytokines IL-1 beta, IL-2, IL-6, IL-8, MCP-1, GM-CSF and TNF alpha in patients with epithelial ovarian cancer and their relationship to treatment with paclitaxel[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2000, 10(1): 33
- [6] Nilsson M B, Langley R R, Fidler I J. Interleukin-6, secreted by human ovarian carcinoma cells, is a potent proangiogenic cytokine[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(23): 10794
- [7] 王越,郭小芹,牛秀琰,等.卵巢癌细胞 IL-6、IL-8 分泌与他莫西芬敏感性及 MAPK、Akt 活性和 ER 特异性位点磷酸化水平的关系[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26(1): 21
- [8] 李芳菲,郭飞,田文艳,等.难治性卵巢癌的内分泌治疗[J]. *中国妇产科临床杂志*, 2018, 19(1): 89
- [9] Trabert B, Brinton L A, Anderson G L, et al. Circulating estrogens and postmenopausal ovarian cancer risk in the women's health initiative observational study[J]. *Cancer Epidemiol Biomark Prevent*, 2016, 25(4): 648
- [10] 王建六,宋文月,刘俊英,等.上皮性卵巢癌内分泌治疗体外实验研究[J]. *肿瘤*, 2001(3): 166
- [11] Kulbe H, Thompson R, Wilson J L, et al. The inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha generates an autocrine tumor-promoting network in epithelial ovarian cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(2): 585
- [12] Shen W H, Zhou J H, Broussard S R, et al. Proinflammatory cytokines block growth of breast cancer cells by impairing signals from a growth factor receptor[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(16): 4746
- [13] Auersperg N, Ziltener H. Re: reproductive hormone-induced, STAT3-mediated interleukin 6 action in normal and malignant human ovarian surface epithelial cells[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2002, 94(16): 1255
- [14] Syed V, Ulinski G, Mok S C, et al. Reproductive hormone-induced, STAT3-mediated interleukin 6 action in normal and malignant human ovarian surface epithelial cells[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2002, 94(8): 617

(2018-11-24 收稿)