

白细胞介素-6 对子宫颈癌细胞株 C-33A 增殖影响的研究



唐林, 王琪琳, 王平

四川大学华西第二医院急诊妇产科(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 在子宫颈癌中的作用。方法 将培养后的子宫颈癌细胞 C-33A 分为 IL-6 组和对照组, IL-6 组使用 IL-6 (50 ng/mL) 刺激, 对照组不加入 IL-6, 利用 MTT 比色法检测细胞增殖, 划痕实验检测细胞迁移, 实时荧光定量聚合酶链反应技术检测上皮钙黏着蛋白 (epithelial-cadherin, E-Cad)、神经钙黏着蛋白 (neural-cadherin, N-Cad)、波形蛋白 (vimentin)、转录因子 Snail1 (transcription factors-snail1, TFs-SNAIL1) 在 mRNA 水平上的表达, 蛋白质印迹法检测 E-Cad、N-Cad、Vimentin、TFs-SNAIL1 蛋白水平的表达。**结果** 与对照组比较, IL-6 组子宫颈癌细胞株 C-33A 增殖活性更高 (12 h: 0.388 ± 0.025 vs. 0.597 ± 0.057 ; 24 h: 0.547 ± 0.021 vs. 0.798 ± 0.036 ; 48 h: 0.745 ± 0.056 vs. 1.296 ± 0.122 ; 72 h: 1.074 ± 0.053 vs. 1.805 ± 0.113 ; $P < 0.05$), 迁移能力更强 (12 h: 1.057 ± 0.029 vs. 1.200 ± 0.045 ; 24 h: 1.189 ± 0.036 vs. 1.428 ± 0.181 ; 48 h: 1.273 ± 0.059 vs. 1.569 ± 0.143 ; 72 h: 1.409 ± 0.047 vs. 1.623 ± 0.170 ; $P < 0.05$), E-Cad mRNA 及蛋白的表达更低 (1.012 ± 0.098 vs. 0.483 ± 0.171 , $P < 0.01$; 1.032 ± 0.015 vs. 0.395 ± 0.119 , $P < 0.01$), N-Cad mRNA 及蛋白表达更高 (1.054 ± 0.106 vs. 1.465 ± 0.230 , $P < 0.01$; 1.040 ± 0.043 vs. 1.605 ± 0.128 , $P < 0.01$), vimentin mRNA 及蛋白表达更高 (1.050 ± 0.083 vs. 1.340 ± 0.099 , $P < 0.05$; 1.043 ± 0.062 vs. 1.430 ± 0.077 , $P < 0.05$), TFs-SNAIL1 mRNA 及蛋白表达更高 (1.058 ± 0.176 vs. 1.510 ± 0.229 , $P < 0.01$; 1.022 ± 0.015 vs. 1.470 ± 0.139 , $P < 0.01$)。**结论** IL-6 可能促进子宫颈癌细胞株 C-33A 的增殖、迁移和上皮-间质转化。

【关键词】 子宫颈癌; 白细胞介素-6; 细胞上皮-间质转换

Research on the effects of interleukin-6 in proliferation of cervical cancer cell C-33A

TANG Lin, WANG Qilin, WANG Ping

Emergency Department of Obstetrics and Gynecology, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, P. R. China

Corresponding author: WANG Ping, Email: wangping_886@126.com

【Abstract】 Objective To explore the role of interleukin-6 (IL-6) in cervical cancer cell C-33A. **Methods** The cervical cancer cells C-33A were divided into the IL-6 group and the control group after culture. The IL-6 group were treated with 50 ng/mL of recombinant IL-6 protein, and the control group were without IL-6. Then cell viability and cell migration were detected by MTT assay and wound-healing assay, respectively. The mRNA and protein expressions of epithelial-cadherin (E-Cad), neural-cadherin (N-Cad), vimentin and transcription factors-snail1 (TFs-SNAIL1) were analyzed by real time quantitative polymerase chain reaction and Western blot, respectively. **Results** Compared with the control group, in the IL-6 group the proliferation of cervical cancer cells C-33A was promoted (12 h: 0.388 ± 0.025 vs. 0.597 ± 0.057 ; 24 h: 0.547 ± 0.021 vs. 0.798 ± 0.036 ; 48 h: 0.745 ± 0.056 vs. 1.296 ± 0.122 ; 72 h: 1.074 ± 0.053 vs. 1.805 ± 0.113 ; $P < 0.05$), the relative migration ability of cervical cancer cell was promoted (12 h: 1.057 ± 0.029 vs. 1.200 ± 0.045 ; 24 h: 1.189 ± 0.036 vs. 1.428 ± 0.181 ; 48 h: 1.273 ± 0.059 vs. 1.569 ± 0.143 ; 72 h: 1.409 ± 0.047 vs. 1.623 ± 0.170 ; $P < 0.05$); meanwhile, compared with the control group, in the IL-6 group, the expression of E-Cad mRNA (1.012 ± 0.098 vs. 0.483 ± 0.171 , $P < 0.01$) and E-Cad protein (1.032 ± 0.015 vs. 0.395 ± 0.119 ; $P < 0.01$) decreased, the expression of N-Cad mRNA (1.054 ± 0.106 vs. 1.465 ± 0.230 , $P < 0.01$) and N-Cad protein (1.040 ± 0.043 vs. 1.605 ± 0.128 , $P < 0.01$) increased, the expression of vimentin

DOI: 10.7507/1002-0179.201803148

基金项目: 四川省卫生和计划生育委员会科研课题 (16PJ232)

通信作者: 王平, Email: wangping_886@126.com

mRNA (1.050 ± 0.083 vs. 1.340 ± 0.099 , $P<0.05$) and vimentin protein (1.043 ± 0.062 vs. 1.430 ± 0.077 , $P<0.05$) increased, and the expression of TFs-SNAIL1 mRNA (1.058 ± 0.176 vs. 1.510 ± 0.229 , $P<0.01$) and F β -SNAIL1 protein (1.022 ± 0.015 vs. 1.470 ± 0.139 , $P<0.01$) increased. **Conclusion** IL-6 may promote the proliferation, migration, and epithelial mesenchymal transition of cervical cancer cell C-33A.

【Key words】 Cervical cancer; Interleukin-6; Epithelial-mesenchymal transition

子宫颈癌是女性常见的肿瘤之一, 约占女性生殖系统恶性肿瘤发病率的 2/3, 居女性生殖器官恶性肿瘤发病的首位, 全球子宫颈癌新发病例数逐年上升, 年均增长率达 0.6%^[1], 严重影响妇女的身心健康。目前研究表明: 子宫颈癌的主要病因与人乳头状瘤病毒 (human papilloma virus, HPV) 感染有关, 主要为 HPV16 和 HPV18, 子宫颈癌的发生发展主要是从炎性改变到癌变的一个慢性炎症反应过程, 即子宫颈癌是一个与炎症反应相关的肿瘤, 与乙型肝炎病毒感染所致肝癌的发生发展过程类似^[2]。但绝大多数感染高危型 HPV 的女性并未发展为子宫颈癌, 因为机体自身免疫反应能够清除 HPV 并阻止宫颈病变发生发展^[3]。所以高危型 HPV 感染并非子宫颈癌发生发展的单一因素, 除已明确的相关因素如社会环境因素 (贫困、教育程度低、医疗资源匮乏地区等)、流行病学因素 (多个性伴侣、多产史、长时间口服避孕药、吸烟等) 外, 免疫缺陷以及局部免疫抑制也是子宫颈癌发生发展的重要因素^[4-6]。白细胞介素-6 (interleukin, IL-6) 是一种炎症因子, 由淋巴细胞、巨噬细胞等多种炎性细胞分泌^[7]。另外, 研究表明: 一些肿瘤细胞, 如肺癌、胃癌和子宫颈癌的肿瘤细胞也能分泌 IL-6, 在肿瘤发生发展的不同阶段, IL-6 既可以发挥抗肿瘤作用, 亦可以抑制肿瘤细胞增殖^[8-9]。为了深入研究 IL-6 与子宫颈癌的发生和发展之间的关系, 探讨其在子宫颈癌发生和发展过程中可能的生物学意义, 本研究利用重组人 IL-6 蛋白处理子宫颈癌细胞 C-33A, 旨在探究 IL-6 对子宫颈癌细胞增殖迁移以及上皮-间质转化的影响。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

子宫颈癌细胞株 C-33A 购自中国科学院上海细胞库, 脂质体 2000 购自美国 Life Technologies 公司, miScript SYBR Green PCR kit (200) 试剂盒购自德国 Qiagen 公司, 改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's modification of Eagle's medium, DMEM) 培养液、胎牛血清购自美国 Hyclone 公司, 含 Tween-20 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution with

Tween-20, PBST)、Tris 缓冲盐溶液 (tris buffered saline, TBS) 和含 Tween-20 的 TBS 缓冲液 (TBS with Tween-20, TBST) 购于美国 Amresco 公司, Western 发光底物 (ECL) 显示试剂盒购于美国 Cell Signaling Technology 公司, 重组人 IL-6 蛋白购自美国 ProSpec 公司, 上皮钙黏着蛋白 (epithelial-cadherin, E-Cad)、神经钙黏着蛋白 (neural-cadherin, N-Cad)、波形蛋白 (vimentin)、转录因子 Snail1 (transcription factors-snail1, TFs-SNAIL1) 检测试剂盒购于美国 Cell Signaling Technology 公司, mirPremier[®] microRNA Isolation 试剂盒购自美国 Sigma 公司, 光学显微镜为日本 Olympus 公司产品; GDS8000 凝胶成像分析系统购于美国 UVP 公司; ABI stepone plus 实时荧光定量聚合酶链反应 (real time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 仪为美国 Applied Biosystems 公司产品。

1.2 细胞培养

根据试剂盒说明操作, 按 1×10^5 个/孔将子宫颈癌细胞株 C-33A 接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中培养, 放置于 37℃、5% 二氧化碳的培养箱中。

1.3 MTT 检测细胞增殖活性

将子宫颈癌细胞株 C-33A 以密度为 5×10^3 个/孔种于 96 孔板中, 分为 2 组: IL-6 组和对照组, 各组接种 20 孔; 24 h 后于 IL-6 组加入 IL-6 (50 ng/mL) 处理, 对照组不加入 IL-6; 分别于作用 12、24、48、72 h 后进行 MTT 检测。MTT 检测方法参见文献 [10]。在 562 nm 波长处测定各孔吸光度值, 比较细胞的增殖活性。

1.4 细胞迁移实验

采用划痕实验检测子宫颈癌细胞株 C-33A 的迁移能力。在 6 孔板背, 均匀地划横取 10 条水平线, 大约每隔 0.8 cm 一道, 横穿过孔, 然后在孔中加入约 5×10^4 个细胞过夜; 第 2 天用 200 μ L 枪头垂至于背后的横线划痕, 不同孔使用同一只枪头; PBS 洗细胞, 在 IL-6 组加入无血清培养基及 IL-6, 对照组仅加入无血清培养基, 放入 37℃、5% 二氧化碳培养箱中培养, 于 12、24、48 和 72 h 后显微镜 ($\times 100$) 下观察拍照, 计算细胞间距离与对照组的

划痕的相对比值。

1.5 RNA 的提取和 RT-qPCR 检测 E-Cad、N-Cad、vimentin、TFs-SNAIL1 mRNA 的表达

将子宫颈癌细胞株 C-33A 以约 5×10^4 个细胞接种至 6 孔板中, IL-6 组及对照组各 20 个孔, 24 h 后于 IL-6 组加入 IL-6 (50 ng/mL) 处理, 对照组不加入 IL-6, 培养 48 h 后提取 RNA 及蛋白。根据试剂盒操作说明, 使用 mirPremier® microRNA Isolation 试剂盒提取子宫颈癌细胞 C-33A 总 RNA, 微量分光光度计测定 RNA 的纯度。检测 E-Cad、N-Cad、vimentin、TFs-SNAIL1 mRNA 的表达 RT-qPCR 方法参见文献[11]。

1.6 蛋白质印迹法检测 E-Cad、N-Cad、vimentin、TFs-SNAIL1 蛋白水平的表达

收集 IL-6 刺激 48 h 后子宫颈癌细胞株 C-33A 细胞, 提取其总蛋白, 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。湿转法将蛋白转至硝酸纤维素膜上, 脱脂牛奶封闭转印膜后, 将膜置于含有甘油醛-3-磷酸脱氢酶、E-Cal、N-Cal、vimentin、TFs-SNAIL1 一抗的封闭液中, 室温下放置 0.5 h 后, 4℃ 过夜, PBST 洗膜 2 次, TBST 脱色, TBS 漂洗, 然后加入二抗稀释液, 2 h 后取出转印膜, 加 ECL 底物显色液, 1 min 后拍照, 用 Image J 软件对蛋白条带进行灰度分析。

1.7 统计学方法

应用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计分析。计数资料以均数±标准差表示, 两组间比较采用 *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 IL-6 促进子宫颈癌细胞株 C-33A 的增殖

与对照组比较, IL-6 刺激子宫颈癌细胞株 C-33A 后 12、24、48、72 h, IL-6 组细胞的增殖能力明显增强, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 1。

2.2 IL-6 促进子宫颈癌细胞株 C-33A 的迁移能力

与对照组相比, IL-6 刺激子宫颈癌细胞株 C-33A 后 12、24、48、72 h, IL-6 组细胞的迁移能力增强, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 2。

2.3 IL-6 促进子宫颈癌细胞株 C-33A 间质上皮转化

IL-6 刺激子宫颈癌细胞株 C-33A 48 h 后, RT-qPCR 检测发现: 与对照组比较, 子宫颈癌细胞株 C-33A 的 E-Cad mRNA 表达下降, 而 N-Cad、vimentin 和 TFs-SNAIL1 mRNA 表达增加 (表 3); 蛋白质印迹检测表明: E-Cad 蛋白表达水平下降, 而 N-Cad、vimentin 和 TFs-SNAIL1 mRNA 表达水平增加 (表 4、图 1)。

3 讨论

炎症与肿瘤的关系一直是临床医学争议的话题。现有研究证明炎症反应在胃癌、膀胱癌等肿瘤的发生中发挥着重要作用。在癌前病变的细胞中, IL-1、IL-6、IL-8 等炎性细胞因子可诱导上皮细胞在基因水平的改变, 促其肿瘤的发生^[12], 通过表皮生长因子激活肿瘤干细胞转录因子核因子- κ B/转录激活因子 3 信号通路, 促进肿瘤细胞自我更新、生

表 1 IL-6 刺激后不同时间子宫颈癌细胞株 C-33A 的增殖情况 (562 nm 吸光度值) ($n=20, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | 0 h | 12 h | 24 h | 48 h | 72 h |
|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 对照组 | 0.298±0.013 | 0.388±0.025 | 0.547±0.021 | 0.745±0.056 | 1.074±0.053 |
| IL-6 组 | 0.305±0.013 | 0.597±0.057 | 0.798±0.036 | 1.296±0.122 | 1.805±0.113 |
| <i>t</i> 值 | 1.703 | 15.076 | 26.876 | 18.245 | 26.087 |
| <i>P</i> 值 | 0.097 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

表 2 IL-6 刺激后不同时间子宫颈癌细胞株 C-33A 的相对迁移能力 ($n=20, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | 0 h | 12 h | 24 h | 48 h | 72 h |
|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 对照组 | 0.999±0.012 | 1.057±0.029 | 1.189±0.036 | 1.273±0.059 | 1.409±0.047 |
| IL-6 组 | 1.001±0.012 | 1.200±0.045 | 1.428±0.181 | 1.569±0.143 | 1.623±0.170 |
| <i>t</i> 值 | 0.543 | 11.752 | 5.791 | 8.575 | 5.394 |
| <i>P</i> 值 | 0.590 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

表 3 IL-6 刺激后子宫颈癌细胞株 C-33A 的 E-Cad、N-Cad、vimentin 和 TFs-SNAIL1 mRNA 的相对达表水平 ($n=20, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | E-Cad | N-Cad | vimentin | TFs-SNAIL1 |
|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 对照组 | 1.012±0.098 | 1.054±0.106 | 1.050±0.083 | 1.058±0.176 |
| IL-6 组 | 0.483±0.171 | 1.465±0.230 | 1.340±0.099 | 1.510±0.229 |
| <i>t</i> 值 | 12.027 | 7.259 | 10.000 | 6.982 |
| <i>P</i> 值 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

表 4 IL-6 刺激后子宫颈癌细胞株 C-33A 的 E-Cad、N-Cad、vimentin 和 TFs-SNAIL1 蛋白的相对表达量 (n=20, $\bar{x}\pm s$)

| 组别 | E-Cad | N-Cad | vimentin | TFs-SNAIL1 |
|--------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 对照组 | 1.032±0.015 | 1.040±0.043 | 1.043±0.062 | 1.022±0.015 |
| IL-6 组 | 0.395±0.119 | 1.605±0.128 | 1.430±0.077 | 1.470±0.139 |
| t 值 | 23.660 | 18.749 | 17.524 | 14.240 |
| P 值 | 0.000 | 0.000 | 0.027 | 0.000 |

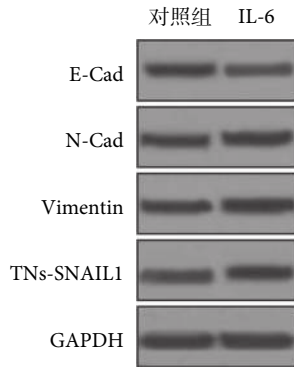


图 1 蛋白质印迹法检查 IL-6 刺激后子宫颈癌细胞株 C-33A 的 E-Cad、N-Cad、vimentin 和 TFs-SNAIL1 蛋白表达

长、增殖和转移,促进肿瘤的发生发展^[13]。IL-6 主要由淋巴细胞、巨噬细胞及成纤维细胞分泌,在体内的炎症反应和免疫调节中发挥重要作用^[10, 14-15]。本研究发现,IL-6 能够促进子宫颈癌细胞株 C-33A 的增殖和迁移,降低 E-Cad mRNA 和蛋白的表达,增加 N-Cad、vimentin 和 TFs-SNAIL1 mRNA 及蛋白表达,诱发间质上皮的转化进程。但在宫颈病变中 IL-6 其相关的信号转导通路尚不十分明确。有研究显示 IL-6 很可能是通过下调 miR-152 表达,诱导磷脂酰肌醇 3-激酶表达,从而激活磷脂酰肌醇激酶/丝氨酸激酶信号通路,调控细胞的增殖、迁移和上皮间质转化等过程,发挥致癌作用^[11]。本研究仅提示 IL-6 可能参与子宫颈癌的发生发展过程。另外,孙兰颖等^[16]在对不同类型的子宫颈癌组织切片中 IL-6 含量的测量研究显示:在子宫颈癌淋巴结转移者中的 IL-6 表达明显高于无淋巴结转移者,在中低分化组的表达明显高于高分化组的表达。提示 IL-6 与子宫颈癌的发生有关。

虽然炎症反应在子宫颈癌发生发展中的作用及调控机制目前并不十分清楚,但是,本研究表明了炎症细胞分泌的 IL-6 与子宫颈癌发生和发展有关,为进一步深入研究阐明炎症反应在子宫颈癌等上皮细胞肿瘤作用机制提供了参考,也可能为今后以炎症反应为靶向性的抗癌治疗开辟新的思路。

参考文献

1 Forouzanfar MH, Foreman KJ, Delossantos AM, et al. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010:

a systematic analysis. *Lancet*, 2011, 378(9801): 1461-1484.

2 Bouvard V, Baan R, Straif K, et al. A review of human carcinogens-Part B: biological agents. *Lancet Oncol*, 2009, 10(4): 321-322.

3 Insinga RP, Perez G, Wheeler CM, et al. Incident cervical HPV infections in young women: transition probabilities for CIN and infection clearance. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2011, 20(2): 287-296.

4 Torres-Poveda K, Burguete-Garcia AI, Cruz MA, et al. The SNP at-592 of human IL-10 gene is associated with serum IL-10 levels and increased risk for human papillomavirus cervical lesion development. *Infect Agent Cancer*, 2012, 7(1): 32-40.

5 Torres-Poveda K, Burguete-Garcia AI, Bahena-Roman M, et al. Risk allelic load in Th2 and Th3 cytokines genes as biomarker of susceptibility to HPV-16 positive cervical cancer: a case control study. *BMC Cancer*, 2016, 16: 330.

6 Zhang X, Zhang L, Tian C, et al. Genetic variants and risk of cervical cancer: epidemiological evidence, meta-analysis and research review. *BJOG*, 2014, 121(6): 664-673.

7 Castrilli G, Tatone D, Diodoro MG, et al. Interleukin 1-alpha and interleukin-6 promote the in vitro growth of both normal and neoplastic human cervical epithelial cells. *Br J Cancer*, 1997, 75(6): 855-859.

8 Iglesias M, Plowman GD, Woodworth CD. Interleukin-6 and interleukin-6 soluble receptor regulate proliferation of normal, human papillomavirus-immortalized, and carcinoma-derived cervical cells in vitro. *Am J Pathol*, 1995, 146(4): 944-952.

9 Wei LH, Kuo ML, Chen C, et al. The anti-role of interleukin-6 in human cervical cancer is mediated by up regulation of Mcl-1 through a PI3-K/Akt pathway. *Oncogene*, 2001, 20(41): 5799-5809.

10 Kumari N, Dwarakanath BS, Das A, et al. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumour Biol*, 2016, 37(9): 11553-11572.

11 孙杰,付立芳. IL-6 通过调控 miR-152/PIK3R3 通路促进胃癌细胞的增殖和上皮-间质转化. *中南大学学报:医学版*, 2017, 42(11): 1241-1247.

12 童丹,宋文静. IL-17、IL-6 和 TGF-β₁ 在宫颈上皮内瘤变和宫颈癌中的表达及临床意义. *中国妇幼保健*, 2014, 29(24): 3984-3986.

13 Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 2010, 140(6): 883-899.

14 Azarpira N, Dehghani M, Darai M. The interleukin-6 and vascular endothelial growth factor in hematopoietic stem cell transplantation. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 2012, 23(3): 521-525.

15 Bharti R, Dey G, Mandal M. Cancer development, chemoresistance, epithelial to mesenchymal transition and stem cells: a snapshot of IL-6 mediated involvement. *Cancer Lett*, 2016, 375(1): 51-61.

16 孙兰颖,李治田,武志钦,等. VEGF₁₆₅ 在宫颈癌中的表达及其二者的相互关系. *中国肿瘤临床*, 2005, 32(22): 1287-1289.

收稿日期: 2018-03-22 修回日期: 2018-04-10
 本文编辑: 孙艳梅