

# IL-6对卵巢癌细胞 bcl-2、cyclinD1 和 VEGF 表达的影响

仇会会<sup>1</sup>, 叶丽平<sup>1</sup>, 温有锋<sup>2</sup>, 李丹<sup>1</sup>, 宋佳<sup>1</sup>

(辽宁医学院基础医学院 1. 病理生理学教研室; 2. 解剖学教研室, 辽宁 锦州 121000)

**摘要:**目的 探讨白介素 6 (IL-6) 对卵巢癌 SKOV3 细胞株中 B-细胞淋巴瘤 2 (Bcl-2)、细胞周期蛋白 D1 (CyclinD1) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 的影响。方法 不同浓度 IL-6 作用于细胞, 找出 IL-6 最佳作用浓度。在 IL-6 最佳浓度基础上, 加不同浓度的 AG490。MTT、流式细胞术、RT-PCR、Western blotting 检测细胞增殖、凋亡及细胞 Bcl-2、CyclinD1、VEGF mRNA 和蛋白表达。结果 IL-6 (0、10、20 ng/mL) 对细胞的作用呈浓度依赖性, 促进细胞增殖, 抑制其凋亡 ( $P < 0.01$ ); Bcl-2、CyclinD1、VEGF 蛋白和 mRNA 表达增加 ( $P < 0.01$ ), 48 h 与 24 h 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。AG490 (0、20、40、80  $\mu\text{mol/L}$ ) 对细胞的作用呈浓度依赖性, 抑制细胞增殖, 促进其凋亡 ( $P < 0.01$ ); Bcl-2、CyclinD1、VEGF 蛋白和 mRNA 表达下调 ( $P < 0.01$ ), 48 h 与 24 h 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结论 IL-6 通过调节 STAT3 通路, 调节细胞 Bcl-2、CyclinD1 和 VEGF 的表达, 从而促进卵巢癌细胞的增殖, 抑制其凋亡。

**关键词:** 白介素-6; 卵巢癌; B-细胞淋巴瘤 2; 细胞周期蛋白 D1; 血管内皮生长因子

中图分类号: R737.3

文献标志码: A

## Effects of IL-6 on the expressions of bcl-2, cyclinD1 and VEGF in ovarian cancer cells

QIU Huihui<sup>1</sup>, YE Liping<sup>1</sup>, WEN Youfeng<sup>2</sup>, LI Dan<sup>1</sup>, SONG Jia<sup>1</sup>

(1. Department of Pathophysiology; 2. Department of Anatomy, College of Basic Medicine, Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of interleukin-6 (IL-6) on the expressions of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), CyclinD1 (CyclinD1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in epithelial ovarian cancer SKOV3 cells.

**Methods** The optimal concentration of IL-6 was determined by treating SKOV3 cells with IL-6 of diverse concentrations. In addition to IL-6 of the optimal concentration, AG490 of diverse concentrations were also used. The proliferation and apoptosis of cells, and the mRNA and protein expressions of Bcl-2, CyclinD1, and VEGF were detected by MTT, flow cytometry, RT-PCR and Western blotting. **Results** IL-6 promoted proliferation and inhibited apoptosis of the cells ( $P < 0.01$ ), and increased the mRNA and protein expressions of Bcl-2, CyclinD1 and VEGF ( $P < 0.01$ ). The effects of IL-6 (0, 10, 20 ng/mL) were in a concentration-dependent way. There were significant differences between 48 h and 24 h ( $P < 0.01$ ). AG490 inhibited proliferation and promoted apoptosis of the cells ( $P < 0.01$ ), and depressed the mRNA and protein expressions of Bcl-2, CyclinD1 and VEGF ( $P < 0.01$ ). The effects of AG490 (0, 20, 40, 80  $\mu\text{mol/L}$ ) were in a concentration-dependent way. There were no significant differences between 48 h and 24 h ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** IL-6 promotes the gene transcription and expressions of Bcl-2, CyclinD1 and VEGF by promoting the phosphorylation of STAT3, and then enhances the proliferation and inhibits apoptosis of ovarian cancer cells.

**Key words:** Interleukin-6; Ovarian cancer; B-cell lymphoma-2; CyclinD1; Vascular endothelial growth factor

卵巢癌是女性生殖系统常见肿瘤。白介素 6 (interleukin-6, IL-6) 在肿瘤中高表达,可促进肿瘤细胞增殖及侵袭能力<sup>[1-3]</sup>。虽然肿瘤细胞的生长需要 IL-6 介导,但 IL-6 并不直接诱导肿瘤细胞增殖与侵袭。IL-6 可通过激活信号转导和转录激活因子 3 (signal transducers and activators of transcription 3, STAT3) 信号转导途径作用于细胞<sup>[4-5]</sup>, STAT3 信号通路在多种肿瘤细胞中起到重要作用<sup>[6-7]</sup>。关于卵巢癌细胞中 IL-6 与 STAT3 通路及下游 B 细胞淋巴瘤 2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、细胞周期蛋白 D1 (CyclinD1)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 之间的关系尚不清楚。本实验应用特异性 JAK 激酶 (Janus kinase) 抑制剂 AG490 抑制 STAT3 的磷酸化<sup>[8]</sup>,分析 IL-6 是否通过 STAT3 通路调节下游 Bcl-2、CyclinD1、VEGF 的表达。

## 1 材料与方法

1.1 材料 人卵巢腺癌 SKOV3 细胞株购自北京翠竹生物科技有限责任公司,1640 培养基、胎牛血清购自美国 Hyclone 公司,IL-6 购自美国 PeproTech 公司,AG490 购自英国 Abcam 公司,兔抗人 Bcl-2、CyclinD1、VEGF、 $\beta$ -actin 购自北京博奥森公司,Trizol 购自上海生工公司,RT-PCR 试剂盒、引物购自大连宝生物工程有限公司,Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人卵巢癌 SKOV3 细胞置于含 10% 胎牛血清的 1640 培养基中,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 常

规培养。

1.2.2 分组 IL-6 组:IL-6 终浓度为 0、10、20、40 ng/mL;IL-6 + AG490 组:选择 IL-6 最佳作用浓度 20 ng/mL,AG490 终浓度为 0、20、40、80、160  $\mu$ mol/L。

1.2.3 MTT 法检测细胞增殖 细胞消化制成细胞悬液,密度调至  $4 \times 10^4$  个/mL,接种于 96 孔板,每孔 200  $\mu$ L,常规培养。贴壁后药物处理,培养 24、48 h。各孔加 200  $\mu$ L 浓度为 5 mg/mL 的 MTT,37 °C 孵育 4 h,弃上清,加 150  $\mu$ L DMSO,摇床 10 min,待结晶溶解,用酶联免疫检测仪 490 nm 波长检测各孔光吸收值。根据测得数值计算细胞增殖率和增殖抑制率:增殖率 = (处理组光吸收值/对照组光吸收值 - 1)  $\times$  100%,增殖抑制率 = (1 - 处理组光吸收值/对照组光吸收值)  $\times$  100%。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡 细胞药物处理,培养 24、48 h,用不含 EDTA 的胰酶消化细胞。2 000 rpm 离心 5 min,PBS 洗涤 2 遍,离心后收集  $3 \times 10^5$  个细胞。分别加入 500  $\mu$ L Binding Buffer、5  $\mu$ L Annexin V-ITC 及 5  $\mu$ L Propidium Iodide,混匀,室温避光反应 15 min,流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.5 RT-PCR 检测细胞 Bcl-2、CyclinD1、VEGF mRNA 的表达 细胞药物处理,培养 24、48 h,收集细胞。Trizol 法提取总 RNA,紫外分光光度计测 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>,约为 1.8 ~ 2.0。取 1  $\mu$ L 总 RNA,按 RT-PCR 试剂盒说明逆转录合成 cDNA,合成条件:42 °C 30 min,95 °C 5 min,5 °C 5 min。cDNA 产物 PCR 扩增,引物及反应条件见表 1。120 V 下,1.5% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪下观察照相。Image J 图像分析软件分析电泳条带灰度值,以各组与  $\beta$ -actin 灰度值比表示该组 mRNA 相对表达量。

表 1 PCR 引物序列

引物名称	序列(5'-3')	反应条件	扩增片段长度(bp)
Bcl-2	上游	94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环	505
	下游		
CyclinD1	上游	94 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环	415
	下游		
VEGF	上游	94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环	539
	下游		
$\beta$ -actin	上游		304
	下游		

1.2.6 Western blotting 检测细胞 Bcl-2、CyclinD1、VEGF 蛋白的表达 细胞药物处理,培养 24、48 h,收集细胞。加细胞裂解液提取总蛋白,BCA 法对蛋

白定量,按得出蛋白量将蛋白样品、TBS、RSB 加入干净 EP 管,煮沸 4 min,备用。制备 12% 分离胶和 5% 浓缩胶,每孔加 20  $\mu$ L 样品后电泳,转至 PVDF

膜,封闭液封闭,加一抗(1:400)4℃孵育过夜。TBST洗3次,二抗(1:1000)摇床杂交1h,洗膜后加ECL试剂显色,扫描图像。Image J图像分析软件分析蛋白条带灰度值,以各组与β-actin灰度值比表示该组蛋白相对表达量。

1.3 统计学处理 采用SPSS 17.0软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,样本间比较采用重复测量资料的方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 细胞增殖情况 IL-6促进细胞增殖,作用呈浓度依赖性,24h与48h差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),20 ng/mL与40 ng/mL差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图1。浓度为20 ng/mL的IL-6与AG490联合,抑制细胞增殖,作用与AG490呈浓度依赖性,24h与48h、80 μmol/L与160 μmol/L差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图2。

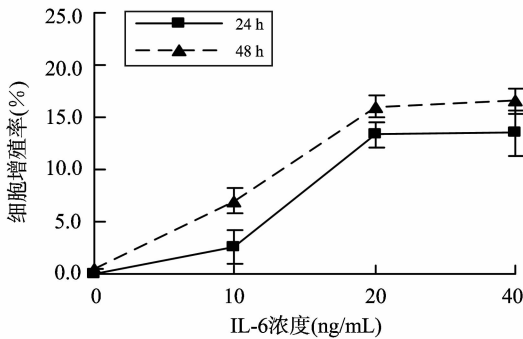


图1 细胞增殖率曲线  
Fig.1 The cell proliferation rate curves

2.2 细胞凋亡情况 IL-6抑制细胞凋亡,对细胞的作用呈浓度依赖性,24h与48h、20 ng/mL与40 ng/mL差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表2。浓度为20 ng/mL的IL-6与AG490联合,促进细胞凋亡( $P < 0.01$ ),对细胞的作用与AG490呈浓度依赖性,24h与48h、80 μmol/L与160 μmol/L差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表3。

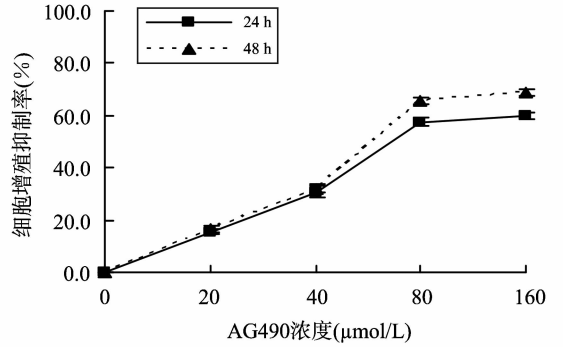


图2 细胞增殖抑制率曲线  
Fig.2 The cell proliferation inhibition rate curves

表2 IL-6对细胞凋亡的影响( $\bar{x} \pm s$ )

IL-6浓度 (ng/mL)	细胞凋亡率 (%)	
	24 h	48 h
0	15.09 ± 0.81	16.33 ± 0.60
10	11.67 ± 0.24*	11.42 ± 0.48*
20	4.32 ± 0.13*	4.05 ± 0.12* <sup>Δ</sup>
40	4.26 ± 0.14	3.75 ± 0.45* <sup>Δ</sup>

\* $P < 0.01$  vs 0 ng/mL组; <sup>Δ</sup> $P < 0.01$  vs 10 ng/mL组。

表3 IL-6与AG490对细胞凋亡的影响( $\bar{x} \pm s$ )

AG490浓度 (μmol/L)	细胞凋亡率 (%)	
	24 h	48 h
0	4.21 ± 0.13	3.93 ± 0.27
20	15.08 ± 0.12*	18.76 ± 0.44*
40	37.08 ± 0.16*	42.87 ± 0.30* <sup>Δ</sup>
80	69.63 ± 0.61*	78.82 ± 0.56* <sup>Δ#</sup>
160	70.01 ± 0.45	80.03 ± 0.23* <sup>Δ#</sup>

\* $P < 0.01$  vs 0 μmol/L组; <sup>Δ</sup> $P < 0.01$  vs 20 μmol/L组; <sup>#</sup> $P < 0.01$  vs 40 μmol/L组。

### 2.3 细胞 Bcl-2、CyclinD1、VEGF mRNA 表达情况

IL-6促进Bcl-2、CyclinD1、VEGF mRNA的表达,作用呈浓度依赖性,24h与48h差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),20 ng/mL与40 ng/mL差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图3。浓度为20 ng/mL的IL-6与AG490联合,抑制细胞Bcl-2、CyclinD1、VEGF mRNA的表达,作用与AG490呈浓度依赖性,24h与48h、80 μmol/L与160 μmol/L差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图4。

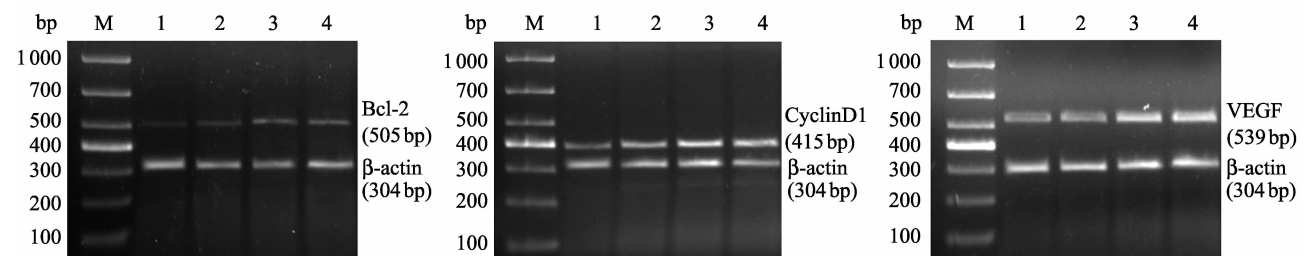


图3 IL-6对细胞Bcl-2、CyclinD1、VEGF mRNA表达的影响  
M:Marker; 1~4:IL-6浓度分别为0、10、20、40 ng/mL。

Fig.3 Effects of IL-6 on the expressions of Bcl-2, CyclinD1, and VEGF mRNA in cells  
M:Marker; 1-4: The concentrations of IL-6 were 0, 10, 20 and 40 ng/mL respectively.

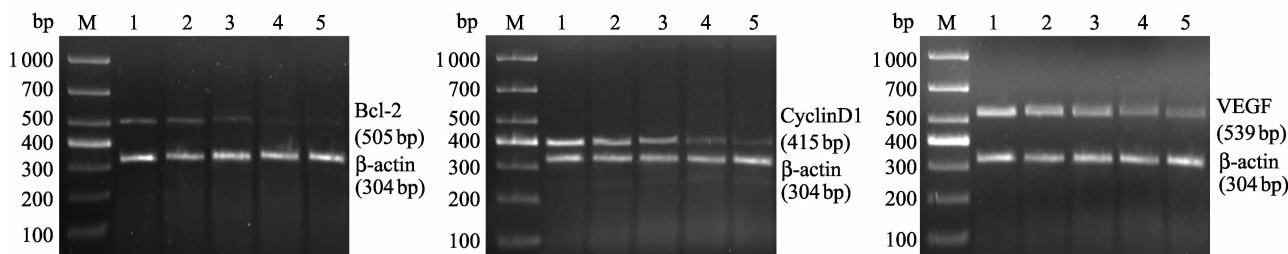


图4 IL-6与AG490对细胞Bcl-2、CyclinD1、VEGF mRNA表达的影响

M:Marker; 1~5:AG490浓度分别为0、20、40、80、160  $\mu\text{mol/L}$ 。

Fig. 4 Effects of IL-6 and AG490 on the expressions of Bcl-2, CyclinD1, and VEGF mRNA in cells

M:Marker; 1-5: The concentrations of AG490 were 0, 20, 40, 80 and 160  $\mu\text{mol/L}$  respectively.

#### 2.4 细胞Bcl-2、CyclinD1、VEGF蛋白表达情况

IL-6促进细胞Bcl-2、CyclinD1、VEGF蛋白的表达,作用呈浓度依赖性,24 h与48 h差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),20 ng/mL与40 ng/mL差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图5。浓度为20 ng/mL的IL-6与AG490联合,抑制细胞Bcl-2、CyclinD1、VEGF蛋白的表达,作用与AG490呈浓度依赖性,24 h与48 h,80  $\mu\text{mol/L}$ 与160  $\mu\text{mol/L}$ 差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图6。

过SH2结构域与酪氨酸磷酸化残基相结合,在JAK激酶作用下,Y705位发生磷酸化,STAT3信号途径被激活<sup>[10-13]</sup>,进而调控下游Bcl-2、CyclinD1和VEGF的表达。其中Bcl-2是BCL-x家族中有代表性的抑制凋亡基因,可抑制多种肿瘤细胞的凋亡,延长肿瘤细胞的生存时间<sup>[14-15]</sup>;CyclinD1对细胞周期起着精确的调控作用,当表达上调时,会导致细胞增殖失控<sup>[16]</sup>。肿瘤的生长、侵袭及转移依赖于新生血管的形成,VEGF除了作为形成新生血管所必需的生长因子外,还对肿瘤的生长、侵袭、转移起着决定性作用<sup>[17]</sup>。

本实验用不同浓度IL-6作用于细胞,发现IL-6促进卵巢癌细胞的增殖,抑制其凋亡,且Bcl-2、CyclinD1和VEGF表达均增加,这些作用与IL-6呈浓度依赖关系,其最佳作用浓度为20 ng/mL。为进一步证实IL-6对Bcl-2、CyclinD1、VEGF的调节是否与STAT3有关,本实验在IL-6最佳作用浓度前提下,加入特异性JAK激酶抑制剂AG490,抑制JAK激酶活性,从而抑制STAT3的活化,抑制STAT3信号通路<sup>[18-19]</sup>,观察到卵巢癌细胞的增殖受到抑制,凋亡被促进,Bcl-2、CyclinD1、VEGF的表达均下调。表明IL-6在体外对卵巢癌细胞的作用与STAT3通路、下游的Bcl-2、CyclinD1以及VEGF基因有关<sup>[20]</sup>,且与IL-6呈浓度依赖性,提示IL-6与STAT3通路对卵巢癌细胞的增殖与凋亡起着重要的作用,阻断这一通路可以有效抑制卵巢癌细胞的增殖,促进其凋亡,为治疗卵巢癌提供了理论依据。

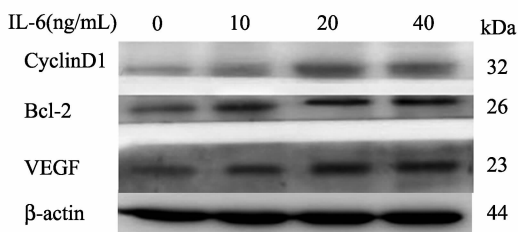


图5 IL-6对细胞Bcl-2、CyclinD1、VEGF蛋白表达的影响

Fig. 5 Effects of IL-6 on the expressions of Bcl-2, CyclinD1 and VEGF protein in cells

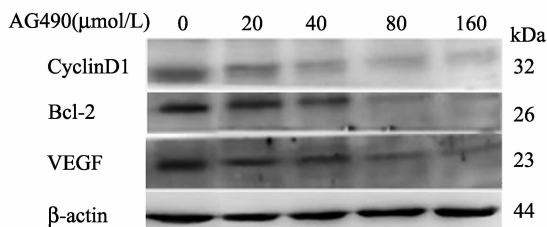


图6 IL-6与AG490对细胞Bcl-2、CyclinD1、VEGF蛋白表达的影响

Fig. 6 Effects of IL-6 and AG490 on the expressions of Bcl-2, CyclinD1 and VEGF protein in cells

### 3 讨论

STAT3信号转导途径最早发现于免疫系统调控方面,在多种恶性肿瘤中STAT3被异常激活,提示该信号途径可能与肿瘤有着密切的关系<sup>[9]</sup>。IL-6是多功能细胞因子,在卵巢癌细胞中高表达,当与IL-6受体结合后,可引起与受体相耦联的JAK激酶相互作用而活化。大量STAT3蛋白单体聚集,并通

#### 参考文献:

- [1] 杨光, 裴正军, 刘君, 等. 白细胞介素6促进人胰腺癌细胞的侵袭及机制探讨[J]. 中华肝胆外科杂志, 2011, 17(1):50-54.
- [2] Shinriki S, Jono H, Ueda M, et al. Interleukin-6 signaling regulates vascular endothelial growth factor-C synthesis and lymphangiogenesis in human oral squamous cell carcinoma[J]. J Pathol, 2011, 225(1):142-150.

- [3] Azevedo A, Cunha V, Teixeira A L, et al. IL-6/IL-6R as a potential key signaling pathway in prostate cancer development[J]. *World J Clin*, 2011, 2(12):384-396.
- [4] Dijkgraaf E M, Welters M J, Nortier J W, et al. Interleukin-6/interleukin-6 receptor pathway as a new therapy target in epithelial ovarian cancer [J]. *Curr Pharm Des*, 2012, 18(25):3816-3827.
- [5] 郭玉琪, Zhenfeng Duan, 张展. IL-6/STAT3 信号转导通路及其在肿瘤靶向治疗中的作用[J]. *国际肿瘤学杂志*, 2011, 38(6):427-429.
- [6] Tu Y, Zhong Y, Fu J, et al. Activation of JAK/STAT signal pathway predicts poor prognosis of patients with gliomas[J]. *Med Oncol*, 2011, 28(1):15-23.
- [7] 张斌, 钟德珩, 王群伟, 等. JAK/STAT 信号通路 with 肝细胞性肝癌的肿瘤进展和预后的相关性研究[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26(4):368-370.
- [8] Aittomaki S, Pesu M. Therapeutic targeting of the Jak/STAT pathway[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2014, 114(1):18-23.
- [9] Song L, Turkson J, Karras J G, et al. Activation of STAT3 by receptor tyrosine kinase and cytokines regulates survival in human non-small cell carcinoma cells[J]. *Oncogene*, 2003, 22(27):4150-4165.
- [10] Neurath M F, Finotto S. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2011, 22(2):83-89.
- [11] Sansone P, Bromberg J. Targeting the interleukin-6/Jak/stat pathway in human malignancies[J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(9):1005-1014.
- [12] Vainchenker W, Constantinescu S N. JAK/STAT signaling in hematological malignancies [J]. *Oncogene*, 2013, 32(21):2601-2613.
- [13] Yang J, Chatterjee-Kishore M, Staugaitis S M, et al. Novel roles of unphosphorylated STAT3 in oncogenesis and transcriptional regulation[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(3):939-947.
- [14] Triantafyllou K, Kitsanta P, Karamanolis D G, et al. Epithelial cell turnover, p53 and bcl-2 protein expression during oncogenesis of early and advanced gastric cancer in a western population [J]. *Dig Liver Dis*, 2008, 40(1):39-45.
- [15] 李杰, 郝洪岭, 薛丽英, 等. COX-2、bcl-2、Caspase-3 在弥漫大 B 细胞淋巴瘤中表达的意义[J]. *白血病·淋巴瘤*, 2009, 18(4):223-225.
- [16] Bienvenu F, Jirawatnotai S, Elias J E, et al. Transcriptional role of cyclinD1 in development revealed by a genetic-proteomic screen[J]. *Nature*, 2010, 463(7279):374-378.
- [17] 朱志华, 戎铁华, 曾灿光, 等. I ~ II 期非小细胞肺癌组织中 VEGF 的表达和微血管密度与预后的关系[J]. *癌症*, 2005, 24(7):865-869.
- [18] Zhang H, Zhang D, Luan X, et al. Inhibition of the signal transducers and activators of transcription (STAT) 3 signalling pathway by AG490 in laryngeal carcinoma cells [J]. *J Int Med Res*, 2010, 38(5):1673-1681.
- [19] Yu R X, Hu X M, Xu S Q, et al. Effects of fucoxanthin on proliferation and apoptosis in human gastric adenocarcinoma MGC-803 cells via JAK/STAT signal pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 657(1-3):10-19.
- [20] Huang C, Yang G, Jiang T, et al. Effects of IL-6 and AG490 on regulation of Stat3 signaling pathway and invasion of human pancreatic cancer cells in vitro [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29(1):51.

(编辑:周英智)

(上接第 16 页)

- [17] Marques-Vidal P, Bastardot F, von Känel R, et al. Association between circulating cytokine levels, diabetes and insulin resistance in a population-based sample[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2013, 78(2):232-241.
- [18] Kraakman M J, Allen T L, Whitham M, et al. Targeting gp130 to prevent inflammation and promote insulin action[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2013, 15(Suppl 3):170-175.
- [19] El-Kadre L J, Tinoco A C. Interleukin-6 and obesity: the crosstalk between intestine, pancreas and liver[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2013, 16(5):564-568.
- [20] 赵飞, 张燕, 王贵菊, 等. 血清瘦素、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、IL-6 在高脂诱导肥胖大鼠胰岛素抵抗中的作用[J]. *山东大学学报:医学版*, 2006, 44(8):815-818.
- [21] 李占清, 崔翔宇, 伊雪, 等. N-乙酰半胱氨酸对大鼠心脏移植缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2013, 30(5):995-998.
- [22] Tartaglia L A, Dembski M, Weng X, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R [J]. *Cell*, 1995, 83(7):1263-1271.
- [23] 代喆, 徐焱成, 季振中, 等. 氧化应激对脂肪细胞脂联素、瘦素、抵抗素和内脏脂肪素表达的影响[J]. *中国糖尿病杂志*, 2009, 1(1):43-46.

(编辑:徐苗蓁)