论著

文章编号:1000-5404(2013)04-0302-05

IL-6对食管癌细胞侵袭迁移及上皮间质转化的影响

臧春宝,曹 姝,李 芳,陈兴月,李少林 (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院放射医学教研室)

[摘要] **目的** 研究白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)对食管癌Eca-109细胞增殖、侵袭迁移及上皮间质转化的影响,探讨其作用机制。**方法** 用不同浓度(0、25、50和100 ng/mL)的IL-6处理Eca-109细胞,采用MTT法检测细胞增殖,细胞划痕实验、Transwell小室实验检测细胞迁移侵袭能力,荧光定量PCR检测E-cadherin、N-cadherin、Vimentin和Twist1 mRNA的表达,Western blot检测Stat3、p-Stat3、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin和Twist1蛋白表达。**结果** 与对照组(0 ng/mL)比较,IL-6处理组(25、50、100 ng/mL)在IL-6作用后第1~5天Eca-109细胞增殖增加,呈量效-时效关系($P<0.05$, $P<0.01$)。IL-6各浓度(0、25、50 ng/mL)组24 h细胞迁移距离分别为(18.20±0.89)、(23.77±0.40)和(25.27±0.93) mm,与对照组(0 ng/mL)比较,IL-6处理组(25、50 ng/mL) Eca-109细胞体外迁移距离明显增加($P<0.05$, $P<0.05$)。IL-6各浓度(0、25、50 ng/mL)组穿过Matrigel胶的细胞分别为(70.33±2.36)、(103.00±3.51)、(118.00±4.00)个/视野,与对照组(0 ng/mL)比较,IL-6处理组(25、50 ng/mL) Eca-109细胞体外穿过Matrigel胶的细胞数量明显增加($P<0.05$, $P<0.05$)。荧光定量PCR结果显示,与对照组(0 ng/mL)相比,IL-6处理(25、50 ng/mL)组N-cadherin、Vimentin和Twist1 mRNA达增加($P<0.05$, $P<0.05$),E-cadherin mRNA表达降低($P<0.05$)。Western blot结果显示,与对照组(0 ng/mL)相比,IL-6各处理(25、50 ng/mL)组p-Stat3、N-cadherin、Vimentin和Twist1蛋白表达增加,E-cadherin蛋白表达降低,Stat3蛋白表达没有明显改变。**结论** IL-6可提高食管癌Eca-109细胞体外增殖、侵袭、迁移能力,促进上皮间质转化过程,其机制可能通过活化Stat3蛋白,上调Twist1的表达,进一步调控EMT蛋白(E-cadherin、N-cadherin和Vimentin)的表达。

[关键词] IL-6;食管癌;Stat3;上皮间质转化;侵袭迁移

[中图法分类号] R392.11;R730.23;R735.1 [文献标志码] A

Effects of interleukin-6 on invasion, migration and epithelial-mesenchymal transition in human esophageal carcinoma cells

Zang Chunbao, Cao Shu, Li Fang, Chen Xingyue, Li Shaolin (Department of Radiation Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effects of interleukin-6 (IL-6) on the cell proliferation, invasion, migration and epithelial-mesenchymal transition in human esophageal carcinoma cells. **Methods** The human esophageal carcinoma Eca-109 cells were treated with IL-6 at a dose of 0, 25, 50 and 100 ng/mL, cell proliferation, migration and invasion were detected by MTT assay, cell scratch test and Transwell chamber assay respectively. The mRNA expression of E-cadherin, N-cadherin, Vimentin and Twist1 were evaluated by real-time quantitative PCR. The protein expression levels of Stat3, p-Stat3, E-cadherin, N-cadherin, Vimentin and Twist1 were detected by Western blotting. **Results** Compared with control group (0 ng/mL IL-6 treatment), the cell proliferation was in a dose- and time-dependent manner when the Eca-109 cells were treated by IL-6 at 25, 50 and 100 ng/mL for 1 to 5 d ($P<0.05$, 0.01). IL-6 at 0, 25 and 50 ng/mL resulted in cell 24-hour migration distance of 18.20±0.89, 23.77±0.40 and 25.27±0.93 mm respectively, with the 2 later doses significantly longer than the former ($P<0.05$). IL-6 of above doses also resulted in the number of 24-hour Matrigel-permeating Eca-109 cells of 70.33±2.36, 103.00±3.51 and 118.00±4.00 /HP, respectively,

[基金项目] 国家自然科学基金(81171365)

[通信作者] 李少林,电话:023-68485060,E-mail: lishaolin@cqmu.edu.cn

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121211.1308.008.html(2012-12-11)

with the number in the 2 later groups significantly larger than in the former group ($P < 0.05$). Real time RT-PCR showed that the mRNA expression levels of N-cadherin, Vimentin and Twist1 were significantly increased and the mRNA expression level of E-cadherin was decreased in IL-6 treatment groups (25 and 50 ng/mL), significantly different from those in 0 ng/mL group ($P < 0.05$). Western blotting showed that the protein levels of p-Stat3, N-cadherin, Vimentin and Twist1 were significantly increased, and that of E-cadherin was decreased, while that of Stat3 had no change in IL-6 treatment groups (25 and 50 ng/mL) when compared with 0 ng/mL group ($P < 0.05$). **Conclusion** IL-6 promotes the cell proliferation, invasion, migration and epithelial mesenchymal transition in human esophageal carcinoma cells by constitutively activating Stat3, up-regulating Twist1, and regulating EMT proteins (E-cadherin, N-cadherin and Vimentin).

[**Key words**] interleukin-6; esophageal carcinoma; Stat3; epithelial-mesenchymal transition; invasion/migration

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81171365). Corresponding author: Li Shaolin, Tel: 86-23-68485060, E-mail: lishaolin@cqmu.edu.cn

肿瘤微环境与肿瘤的发生、发展密切相关,细胞因子在微环境中起到关键作用[1]。白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)是一种多功能的细胞因子,通过调控Jak/Stat3信号通路在食管癌中起到抗凋亡作用[2];血清中IL-6可作为食管癌诊断的标志物[3]。上皮间质转化[4](epithelial mesenchymal transition, EMT)是指上皮细胞失去极性和上皮细胞特征并获得间质样表型及侵袭潜能的现象,其在肿瘤侵袭和转移潜能中发挥着关键性的作用。食管癌发病率高、5年生成率低。全球食管癌癌新发病例48万,死亡病例40万[5];我国每年发病人数约为25万,占全球每年发病人数一半以上[6],5年生存率只有10% ~25%[7]。关于IL-6是否能促进食管癌细胞侵袭迁移和EMT的发生,目前尚不清楚。本研究以食管癌Eca-109细胞为研究对象,观察IL-6对食管癌Eca-109细胞增殖、侵袭、迁移及上皮间质转化的影响,并探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人食管癌Eca-109细胞购于中国科学院上海细胞库。RPMI-1640培养基和胎牛血清购于Hyclone;Recombinant human IL-6购于Peprotech;抗体Stat3、p-Stat3(pS705)、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin购于Epitomics;抗体Twist1购于Santa cruz;抗体β-actin购于北京四正柏;辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG购于联科生物;Transwell小室(8 μm)购于Millipore;Matrigel胶购于BD公司;MTT试剂盒、全蛋白提取试剂盒、ECL检测试剂盒购于凯基生物;Giemsa染液购于南京建成;RNA提取试剂盒、反转录试剂盒、荧光定量PCR试剂盒购于大连宝生物。

1.2 细胞培养及药物配制

Eca-109细胞,常规培养于含有10%胎牛血清的RPMI1640培养基中,置于37 ℃,5% CO_2孵箱内培养。100 μg Recombinant human IL-6溶于1 mL PBS中,按照实验分组分别配制成0、25、50、100 ng/mL浓度。

1.3 MTT检测Eca-109细胞的增殖

将对数期Eca-109细胞接种于96孔板中,细胞密度为2×10^3/孔细胞,待细胞贴壁后换成含不同浓度(0、25、50、100 ng/mL)IL-6的培养基培养,各浓度梯度设6个复孔,分别在加入药物后1、2、3、4、5 d按照试剂盒说明加入MTT常规培养4 h,加入DMSO 150 μL,最后酶标仪上检测各孔490 nm波长处的光密度值[$D(490)$]。

1.4 细胞划痕实验

取对数期各组细胞(IL-6 0、25、50 ng/mL作用24 h)接种于6孔板中,细胞密度为5×10^3/孔细胞,待细胞贴壁成单层细胞后,用消毒的10 μL枪头均匀划4条横线,用PBS洗去划下的细胞,换成含1.5%胎牛血清的培养基培养,各浓度梯度设3个复孔,置于37 ℃,5% CO_2孵箱内培养。显微镜下观察并拍下0、24、48 h划痕愈合的照片,用Image pro plus软件测量各组细胞迁移距离,每组实验重复3次。

1.5 细胞侵袭实验

Matrigel胶4 ℃过夜解冻,用无血清预冷的1640培养按照1∶8的比例稀释Matrigel胶,将100 μL稀释后Matrigel胶加入transwell小室内,小室放入24孔板中,37 ℃孵育4 h使其成凝胶状,取对数期各组细胞(IL-6 0、25、50 ng/mL作用24 h),用无血清培养基调整成1×10^6/mL的细胞悬液,取0.2 mL加入上室,下室加入0.6 mL含10%胎牛血清的培养基,每组3个复孔,常规培养24 h后,取出小室,用棉签擦去Matrigel胶和未穿过的细胞,多聚甲醛固定,吉姆萨染色,400倍镜下拍照,计数细胞的数量,每组实验重复3次。

1.6 荧光定量PCR检测

取对数期各组细胞(IL-6 0、25和50 ng/mL作用24 h),按

照 RNA 提取试剂盒及反转录试剂盒说明，提取各种细胞 RNA 并反转录为 cDNA。采用 SYBR Green 染料法进行实时定量 PCR 反应，以 GAPDH 为内参基因，采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算基因的相对表达水平，各基因的引物由大连宝生物设计合成，引物序列见表 1。

1.7 Western blot 检测

采用全蛋白提取试剂盒提取各组细胞蛋白，并进行定量。按照每孔 50 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳，然后将蛋白转印到 PVDF 膜上，用含 5% 脱脂奶粉的 PBST 封闭 1 h，加入一抗 4 ℃过夜，一抗稀释比例（Stat3 1∶2 000、p-Stat3 1∶2 000、E-cadherin 1∶2 000、N-cadherin 1∶2 000、Vimentin 1∶2 000、Twist1 1∶500），二抗 37 ℃孵育 1 h，ECL 化学发光，Bio-Rad 凝胶成像系统采集图像，Quantity one 软件进行灰度值分析，每组实验重复 3 次。

表 1 设计用于荧光定量 PCR 的引物序列

基因	引物序列（5′～3′）
E-Cadherin	上游 TTGCTACTGGAACAGGGACACT
	下游 GGAGATGTATTGGGAGGAAGGTC
N-Cadherin	上游 CATCCTGCTTATCCTTGTGCTG
	下游 CTGGTCTTCTTCTCCTCCACCTT
Vimentin	上游 AAGGAGGAAATGGCTCGTCAC
	下游 CTCAGGTTCAGGGAGGAAAAGT
Twist1	上游 AGCAAGATTCAGACCCTCAAGC
	下游 CTCCATCCTCCAGACCGAGAA
GAPDH	上游 TGACTTCAACAGCGACACCCA
	下游 CACCCTGTTGCTGTAGCCAAA

1.8 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS 14.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 IL-6 促进 Eca-109 细胞体外增殖

MTT 实验结果显示（表 2），相对于对照组（0 ng/mL），IL-6 各处理组（25、50 和 100 ng/mL）的 $D(490)$ 值均增加，且随着 IL-6 的浓度增大、作用时间增加而增加，呈现量效-时效关系（$P<0.05$，$P<0.01$）。

表 2 不同时间与不同浓度 IL-6 对食管癌 Eca-109 细胞增殖的影响
$[D(490), n=6, \bar{x} \pm s]$

IL-6 浓度	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
0 ng/mL	0.22 ± 0.03	0.32 ± 0.02	0.45 ± 0.02	0.65 ± 0.04	1.00 ± 0.08
25 ng/mL	0.25 ± 0.03	0.36 ± 0.01[a]	0.56 ± 0.04[a]	0.80 ± 0.04[a]	1.27 ± 0.04[b]
50 ng/mL	0.25 ± 0.02	0.40 ± 0.02[a]	0.62 ± 0.04[a]	0.92 ± 0.06[b]	1.40 ± 0.04[b]
100 ng/mL	0.26 ± 0.03	0.42 ± 0.03[a]	0.70 ± 0.02[a]	1.08 ± 0.06[b]	1.64 ± 0.04[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 0 ng/mL IL-6 比较

2.2 IL-6 提高 Eca-109 细胞体外迁移能力

细胞划痕实验结果见图 1。对照组（0 ng/mL）24 h 细胞迁移距离为（18.20 ± 0.89）mm，而 25、50 ng/mL IL-6 处理组细胞迁移距离分别为（23.77 ± 0.40）、（25.27 ± 0.93）mm。相对于对照组，IL-6 各处理组 Eca-109 细胞体外迁移距离增加（$P<0.05$）。且随着 IL-6 的浓度增大而增大，呈现量效关系。

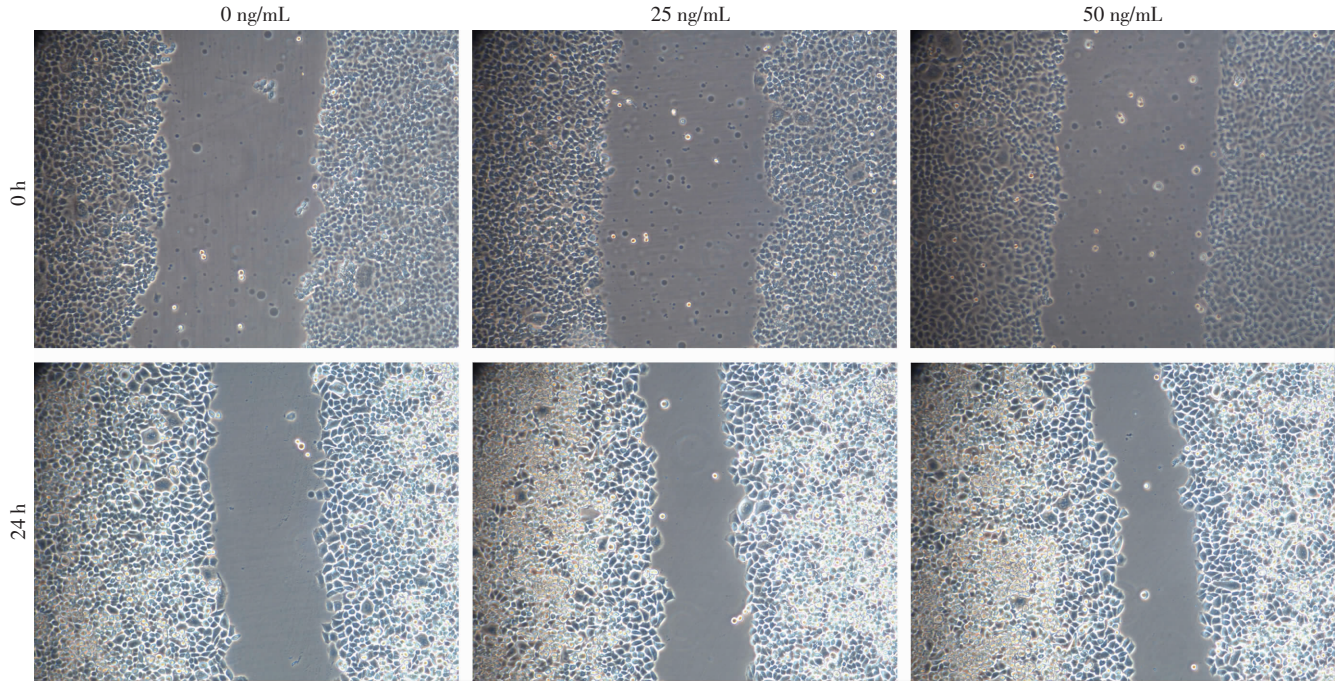
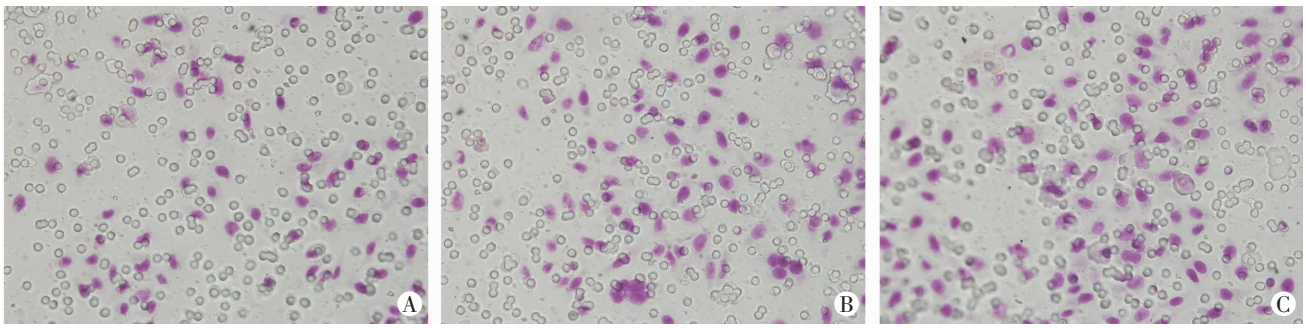


图 1 细胞划痕实验检测不同时间与不同浓度 IL-6 对 Eca-109 细胞迁移能力的影响 （LM ×100）



A:0 ng/mL IL-6;B:25 ng/mL IL-6;C:50 ng/mL IL-6

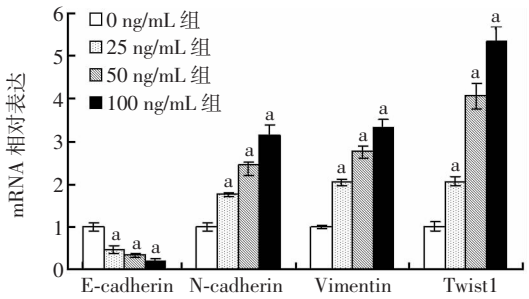
图 2　不同浓度 IL-6 处理 24 h 对 Eca-109 细胞侵袭能力的影响　(LM ×400)

2.3　IL-6 增加 Eca-109 细胞体外侵袭能力

Transwell 小室侵袭实验结果见图 2。对照组(0 ng/mL) 24 h 细胞穿过 Matrigel 胶的细胞为(70.33 ± 2.36)/视野,而 25 ng/mL和 50 ng/mL IL-6 处理组穿过 Matrigel 胶的细胞为(103.00 ± 3.51)/视野和(118.00 ± 4.00)/视野。相对于对照组,IL-6 各处理组 Eca-109 细胞体外穿过 Matrigel 胶的数量增加($P<0.05$),且随着 IL-6 的浓度增大而增大,呈现量效关系。

2.4　IL-6 对 Eca-109 细胞 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 和 Twist1 mRNA 表达的影响

实时荧光定量 PCR 法,结果见图 3。与对照组(0 ng/mL)比较,IL-6 各处理组(25 和 50 ng/mL) E-Cadherin mRNA 表达降低,而 N-Cadherin、Vimentin 和 Twist1 mRNA 表达增高,呈现量效关系($P<0.05$)。

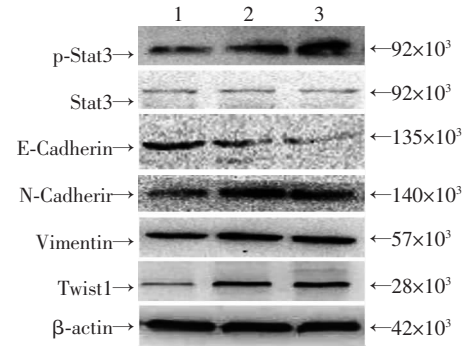


a:$P<0.05$,与 0 ng/mL 组比较

图 3　实时荧光定量 PCR 检测不同浓度 IL-6 对 Eca-109 细胞 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 和 Twist1 mRNA 相对表达

2.5　IL-6 对 Eca-109 细胞 Stat3、p-Stat3、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 和 Twist1 表达的影响

Western blot 结果见图 4。与对照组(0 ng/mL)比较,IL-6 各处理组(25 和 50 ng/mL) p-Stat3 表达增加,Stat3 的表达无明显改变。与对照组比较,IL-6 各处理组(25、50 ng/mL)组 E-Cadherin表达降低,而 N-Cadherin 和 Vimentin、Twist1 表达增加,呈现量效关系。



1、2、3 分别为 0、25、50 ng/mL IL-6 组

图 4　Western blot 检测 IL-6 对 Eca-109 细胞 Stat3、p-Stat3、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 和 Twist1 的表达

3　讨论

白细胞介素-6[8](interleukin-6, IL-6)是一种多功能的生物活性多肽物质,主要来源于单核巨噬细胞,部分来自于 T、B 淋巴细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞,某些肿瘤细胞也能产生 IL-6。IL-6 在多种肿瘤中异常表达,IL-6 直接作用于肿瘤细胞,促进增殖、抗凋亡[8]。IL-6 通过其受体传导激活 Jak/Stat3 信号通路,形成 Stat3(信号转导和转录活化因子 3,Signal transducers and activators of transcription 3)二聚体继而转座入核调节其转录活性,Stat3 是细胞信号转导通路 Jak/Stat3 途径的关键转录因子,在细胞增殖和分化中起到关键作用[9]。IL-6 通过调控 Jak/Stat3 信号通路在食管癌中起到抗凋亡作用[2],血清中 IL-6 可作为食管癌诊断的标志物[3]。Jak2/Stat3 信号通路已被证实与多种肿瘤发生、发展密切相关,其在食管癌高表达,且与预后差成正相关[10]。而 IL-6 在食管癌增殖、侵袭、迁移和 EMT 中的作用,及其确切机制尚不清楚。

本研究显示,IL-6 各浓度处理组 Eca-109 细胞体外增殖增加,体外迁移和侵袭能力增加,且随着 IL-6

的浓度增大,促进作用增大,呈现量效关系,该结果与文献[11-12]报道一致。提示 IL-6 促进食管癌Eca-109 细胞体外增殖,增加食管癌 Eca-109 细胞体外迁移和侵袭的能力。

EMT 的主要特征包括细胞形态从上皮型转化为间质型、上皮细胞标志分子下调(如 E-cadherin)和间质细胞标志分子的上调(如 N-cadherin 和 vimentin)[4]。在发生上皮间质转化的过程中,E-cadherin 表达的抑制发挥关键性的作用,参与抑制 E-cadherin 表达、诱导 EMT 的主要转录因子包括锌指转录抑制因子 Snail、Slug 和基础螺旋-环-螺旋转录因子 Twist1,信号转导通路在上皮间质转化的过程中起到重要作用,如 TGF-β、Wnt/β-catenin、PI3K/AKT/GSK-3β、IL-6/Jak/Stat3[11-12]等。

EMT 在肿瘤侵袭和转移中起到关键性的作用[4],我们研究发现 IL-6 促进食管癌 Eca-109 细胞体外迁移和侵袭的能力,推测 IL-6 是否通过诱导食管癌 Eca-109 细胞发生 EMT,从而促进食管癌细胞侵袭迁移的能力。本课题采用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测 E-Cadherin、N-Cadherin、Vimentin 和 Twist1 mRNA 和蛋白的表达情况。结果表明 IL-6 在 mRNA 和蛋白上调间质细胞标志分子 N-Cadherin、Vimentin 和 EMT 转录因子 Twist1 的表达,下调上皮细胞标志分子 E-Cadherin蛋白表达。结果提示,IL-6 通过诱导食管癌 Eca-109 细胞发生 EMT,从而促进体外迁移和侵袭的能力,此结果部分解释了 IL-6 促进食管癌 Eca-109 细胞迁移和侵袭的机制。为进一步明确 IL-6 诱导食管癌 Eca-109 细胞发生 EMT 的机制,本研究采用 Western blot 检测 Stat3、p-Stat3 的表达,结果显示 IL-6 作用后,p-Stat3 表达增加,而 Stat3 的表达无明显改变,表明 IL-6 活化 Stat3,激活 Jak2/Stat3 信号通路,诱导食管癌 Eca-109 细胞发生 EMT,这一结果与文献[11-12]报道一致。

综上所述,本研究证实 IL-6 在体外可促进 Eca-109 增殖、侵袭、迁移,诱导食管癌 Eca-109 细胞发生 EMT 改变,其机制可能通过激活 Jak2/Stat3 信号通路诱导食管癌 Eca-109 细胞 EMT 过程,进一步促进肿瘤侵袭和迁移。提示 IL-6 在食管癌细胞侵袭迁移和 EMT 过程中起到重要的作用,这为靶向 IL-6 抗肿瘤转移作用提供了体外实验证据。

参考文献:

[1] Talbot L J, Bhattacharya S D, Kuo P C. Epithelial-mesenchymal transition, the tumor microenvironment, and metastatic behavior of epithelial malignancies[J]. Int J Biochem Mol Biol, 2012, 3(2): 117-136.

[2] Leu C M, Wong F H, Chang C, *et al*. Interleukin-6 acts as an anti-apoptotic factor in human esophageal carcinoma cells through the activation of both STAT3 and mitogen-activated protein kinase pathways [J]. Oncogene, 2003, 22(49): 7809-7818.

[3] Lukaszewicz-Zajac M, Mroczko B, Kozlowski M, *et al*. Higher importance of interleukin 6 than classic tumor markers (carcinoembryonic antigen and squamous cell cancer antigen) in the diagnosis of esophageal cancer patients [J]. Dis Esophagus, 2012, 25(3): 242-249.

[4] Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, *et al*. Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance [J]. Cancer Sci, 2010, 101(2): 293-299.

[5] Jemal A, Bray F, Center M M, *et al*. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.

[6] 钟钏, 谭家驹, 徐致祥. 食管癌流行病学病因学研究进展 [J]. 河南预防医学杂志, 2011, 22(1): 1-10, 17.

[7] Herskovic A, Russell W, Liptay M, *et al*. Esophageal carcinoma advances in treatment results for locally advanced disease: review [J]. Ann Oncol, 2012, 23(5): 1095-1103.

[8] 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.

[9] Sansone P, Bromberg J. Targeting the interleukin-6/Jak/stat pathway in human malignancies[J]. J Clin Oncol, 2012, 30(9): 1005-1014.

[10] You Z, Xu D, Ji J, *et al*. JAK/STAT signal pathway activation promotes progression and survival of human oesophageal squamous cell carcinoma[J]. Clin Transl Oncol, 2012, 14(2): 143-149.

[11] Yadav A, Kumar B, Datta J, *et al*. IL-6 promotes head and neck tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition *via* the JAK-STAT3-SNAIL signaling pathway [J]. Mol Cancer Res, 2011, 9(12): 1658-1667.

[12] Sullivan N J, Sasser A K, Axel A E, *et al*. Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells [J]. Oncogene, 2009, 28(33): 2940-2947.

(**收稿**:2012-09-27;**修回**:2012-10-22)

(编辑 汪勤俭)