白介素-6在人结肠癌LoVo细胞奥沙利铂耐药中的作用

魏 培[1]，黄洁鑫[2]，张矣桐[2]，李 娟[2]，刘安定[2]，周雪峰[2]，林逸伟[2]，王志勇[1,2] （广东医科大学 1. 分子诊断重点实验室；2. 医学检验学院，广东东莞 523808）

摘 要：目的 探讨白介素-6(IL-6)在人结肠癌细胞株奥沙利铂(L-OHP)耐药中的作用。**方法** 通过L-OHP诱导建立人结肠癌L-OHP耐药细胞株LoVo/L-OHP，分别用MTT法、免疫荧光及蛋白印迹检测细胞生长、IL-6表达。L-OHP联合IL-6或IL-6R抗体作用后，MTT法和克隆形成实验检测细胞增殖。**结果** 与LoVo细胞相比，LoVo/L-OHP细胞的耐药指数为10.4，IL-6表达上调。阻断IL-6可增强L-OHP对耐药细胞的杀伤作用，但阻断IL-6R后耐药细胞对L-OHP敏感性无明显改变。**结论** IL-6过表达与LoVo细胞L-OHP耐药相关，阻断IL-6而非IL-6R可增强耐药细胞对L-OHP敏感性。

关键词： 白介素-6；奥沙利铂；化疗耐药；结肠癌细胞

中图分类号： R 735.35 **文献标识码：** A **文章编号：** 2096-3610(2017)04-0337-05

Role of IL-6 in oxaliplatin-resistant LoVo human colon cancer cells

WEI Pei[1], HUANG Jie-xin[2], ZHANG Yi-tong[2], LI Juan[2], LIU An-ding[2], ZHONG Xue-feng[2], LIN Yi-wei[2], WANG Zhi-yong[1, 2] (1. Key Laboratory of Medical Molecular Diagnostics; 2. School of Medical Laboratory, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China)

Abstract: Objective To investigate the role of IL-6 in oxaliplatin (L-OHP)-resistant LoVo human colon cancer cells. Methods L-OHP-resistant LoVo/L-OHP cells were established by L-OHP induction, and cell growth and IL-6 expression were detected by MTT assay, immunofluorescence and Western blot, respectively. After treated with L-OHP and IL-6 or IL-6R antibody, cell proliferation was determined by MTT and colony forming assays. Results Compared with LoVo cells, resistance index against L-OHP was 10.4 fold, and IL-6 expression was upregulated in LoVo/L-OHP cells. IL-6 blockade enhanced the killing effect of L-OHP on the resistant cells, but IL-6R blockade had no impact. Conclusion IL-6 overexpression is associated with L-OHP resistance in LoVo cells. IL-6 blockade, but not IL-6R, can increase the sensitivity of resistant cells to L-OHP.

Key words: IL-6; oxaliplatin; chemotherapy resistance; colon cancer cell

结肠癌是发病率以及病死率均较高的恶性肿瘤[1-2]，严重威胁人类健康。多数结肠癌患者是因为肿瘤的并发症才被发现，就诊时多为3~4期，不宜进行手术切除，故化疗仍是临床结肠癌主要的治疗手段[3]。L-OHP是有高危复发患者和淋巴结转移患者的首选化疗药物，但其应用受到肿瘤耐药性的严重制约，因此逆转肿瘤耐药已成为提高L-OHP疗效的关键。近年研究发现，炎性因子在肿瘤细胞耐药中起着重要作用。IL-6是一种重要的炎性因子，其高表达及异常信号通路与结直肠癌预后密切相关[4]。已有研究表明，IL-6信号通路活化与结肠癌L-OHP耐药相关[5]，但IL-6所介导的信号通路中涉及分子较多，其在肿瘤耐药中的作用是否一致仍不清楚。本研究通过体外L-OHP作用人结肠癌LOVO细胞后建立其耐药株，检测IL-6的表达水平；并通过使用中和性抗体阻断IL-6及其受体，以分析IL-6在LOVO细胞L-OHP耐药中的作用。

1 材料和方法

基金项目： 国家自然科学基金青年基金资助项目(No.81503104)，广东医科大学大学生创新项目(No.2015ZYDC003、No.2015ZYDC004和2016ZZDC001)。

收稿日期： 2017-03-21；**修订日期：** 2017-05-24

作者简介： 魏 培(1982－)，女，博士，讲师。

通信作者： 王志勇，男，博士，讲师，E-mail：Zhiy_W@yeah.net。

万方数据

1.1 细胞和试剂

人结肠癌LOVO细胞株购自南京恩晶生物公司；DMEM培养基及胎牛血清购自美国Gibco公司；L-OHP购自大连美仑生物公司；小鼠抗人IL-6及IL-6R中和性抗体购自美国R&D公司，MTT细胞增殖试剂盒购自南京凯基生物公司；用于检测的兔抗人IL-6抗体及β-actin抗体购自恩晶生物公司；其它试剂均为分析纯。

1.2 细胞培养

人结肠癌LOVO细胞接种于含体积分数10%胎牛血清的DMEM中，在37 °C、5%CO_2的饱和湿度培养箱中常规培养。

1.3 细胞耐药诱导

对数生长期LOVO细胞以1×10^5个/mL密度接种于培养瓶中，37 °C、5% CO_2的饱和湿度培养箱中过夜培养。预实验得到L-OHP对LOVO细胞的IC50为(14.4±2.3) mg/L，因此最初加入含0.7 mg/L (1/20×IC50)L-OHP的培养液连续作用48 h，弃培养液；加入不含L-OHP的新鲜培养液继续培养，待细胞恢复正常生长后，再用相同质量浓度的L-OHP培养液再次作用细胞48 h。如此反复换液、传代，直至观察到细胞生长状态不受此质量浓度L-OHP影响。按此方法逐步提高L-OHP的质量浓度(每次递增1/20 IC50)，当细胞在含3.6 mg/L (1/4×IC50)L-OHP培养液中稳定生长时，以含14.4 mg/L L-OHP(IC50)培养液对细胞进行间断诱导，通过不断延长诱导时间(起始时间为0.5 h，每次递增0.5 h)，最终获得可在含14.4 mg/L L-OHP的培养液中稳定生长的LOVO/ L-OHP细胞。

1.3 耐药细胞形态观察

通过倒置相差显微镜观察亲本细胞与耐药细胞的形态学差别。

1.4 细胞生长曲线分析

分别取对数生长期的LOVO和LOVO/L-OHP细胞，以1×10^3个/孔接种到96孔培养板中(边缘孔用不含细胞培养基填充)，细胞培养5 d，每天分别计数2种细胞各3个孔的数量，取平均值，绘制细胞生长曲线。

1.5 免疫印迹

弃去培养液，用预冷PBS洗涤细胞，使用RIPA裂解液冰上裂解细胞，BCA蛋白定量后于10%的SDS-聚丙烯凝胶中进行电泳，之后湿转至PVDF膜上，将膜按目的蛋白分子量切成小条，含5%脱脂奶的PBST中室温封闭1 h，之后分别加入IL-6抗体(1: 500)及β-actin抗体(1: 2 000)4 ℃孵育过夜。PBST洗涤后加入HRP标记的兔抗小鼠二抗(1: 5 000)室温孵育1 h。洗涤后经增强型化学发光显色法暗室曝光，最后通过Quantity One软件对曝光条带进行灰度值分析。

1.6 免疫荧光

弃去培养液，加入1 mL 4%多聚甲醛溶液固定15 min。去固定液，洗涤液洗3次后用封闭液封闭60 min，之后加入稀释的IL-6抗体(1: 200)4 ℃孵育过夜。洗涤3次后加入Dylight488标记的羊抗兔二抗(1: 800)避光孵育60 min。回收二抗，洗涤3次并经DAPI染核，之后封片并在荧光显微镜下观察拍照。

1.7 MTT试验

分别取对数生长期的LOVO和LOVO/L-OHP细胞，以1×10^3个/孔接种到96孔培养板中(边缘孔用不含细胞培养基填充)，37 ℃、5% CO_2的饱和湿度培养箱中过夜培养。在LOVO和LOVO/L-OHP细胞化疗耐药性检测中，L-OHP和顺铂(cisplatin，DDP)分别以10、5 mg/L为起始质量浓度，倍比稀释5个质量浓度后作用72 h。在IL-6或IL-6R抗体联合L-OHP对LOVO/L-OHP细胞的生长抑制检测中，分组处理及加药质量浓度同克隆形成实验，处理时间为72 h。之后每孔加入50 μL MTT溶液，37 ℃孵育4 h，吸出上清液，每孔加入150 μL DMSO，平板摇床摇匀后于酶标仪读取A490值并计算细胞活力和耐药指数。

1.8 克隆形成试验

LOVO/L-OHP细胞消化制备单细胞悬液，以每100个/孔密度接种于含37 ℃预温培养液的12孔板中，常规培养过夜。分组处理[PBS处理组、5 mg/L对照抗体组、20 mg/L L-OHP组、5 mg/L IL-6抗体组、5 mg/L IL-6R抗体组、IL-6或IL-6R抗体(2.5 mg/L)与L-OHP(10 mg/L)联合组)]后，于37 ℃、5% CO_2的饱和湿度的细胞培养箱中培养观察。当出现肉眼可见的细胞克隆时终止培养，弃培养基后用PBS洗2次。然后加入4%多聚甲醛固定15 min后去固定液，最后0.1%结晶紫染色15 min，流水洗去染色液待空气干燥后计算克隆形成率。

1.8 统计学处理

采用SPSS13.0软件进行统计学处理，定量资料以$\bar{x}\pm s$表示，两组间比较采用t检验，多组间比较采用完全随机设计的单因素方差分析(ANOVA)，其中组间两两比较采用最小显著差法(LSD法)，若数据不满足参数检验条件则采用秩和检验，以$P<0.05$为

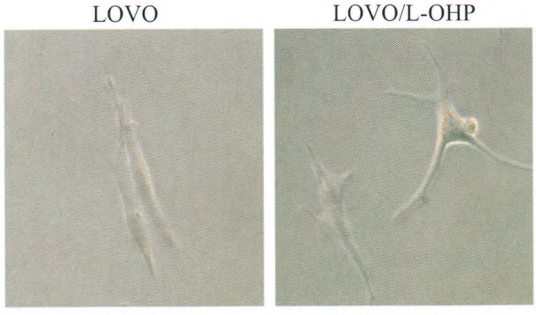
万方数据

差异有统计学意义。

2　结果

2.1　成功建立人结肠癌耐药细胞株LOVO/L-OHP

10个月后成功获得可在含14.4 mg/L L-OHP的培养基中稳定生长的耐药细胞LOVO/L-OHP。倒置相差显微镜下观察发现，与亲本细胞相比，耐药细胞呈细长且多有分叉(图1)。生长曲线分析可知，2种细胞培养1～5 d后，在各时间点耐药株细胞数目均较亲本株低，提示LOVO/L-OHP细胞增殖变慢(表1)。



与LOVO细胞相比，LOVO/L-OHP细胞形态呈现“细枝”样改变(200×)。

图1　LOVO/L-OHP细胞与LOVO细胞性状的比较

表1　不同时间点LOVO与LOVO/L-OHP细胞增殖情况(吸光度)的比较　($\bar{x}\pm s$，n=4)

时间/d	LOVO	LOVO/L-OHP
1	0.050±0.003	0.048±0.005
2	0.104±0.012	0.098±0.009
3	0.137±0.205	0.104±0.017[a]
4	0.177±0.018	0.133±0.006[b]
5	0.245±0.031	0.152±0.196[b]

同一时间点，两种细胞比较：[a]P<0.05，[b]P<0.01

2.2　LOVO/L-OHP细胞对L-OHP的耐药能力增强

MTT检测结果显示，随着L-OHP作用质量浓度的增加，其对亲本及耐药细胞的抑制效率逐渐增加，但同一药物质量浓度下，L-OHP对LOVO/L-OHP细胞的抑制率明显低于LOVO细胞。与L-OHP对LOVO细胞IC50[(14.4±2.3) mg/L]相比，LOVO/L-OHP细胞的IC50升高为(149.8±17.2) mg/L，耐药指数为10.4(图2A)。此外，LOVO/L-OHP细胞对铂类药物家族另一种药物DDP也显示出一定程度的耐受性，耐药指数为4.61(图2B)。

表2　不同L-OHP质量浓度对LOVO和LOVO/L-OHP细胞活力的影响　($\bar{x}\pm s$，%)

L-OHP质量浓度/(mg/L)	n	LOVO	LOVO/L-OHP
0	4	98.75±4.52	100.48±5.76
10	4	94.13±6.73	61.54±9.88[a]
20	4	86.68±3.42	39.25±8.22[a]
40	4	70.51±10.08	29.12±11.84[a]
80	4	52.47±9.58	14.56±4.29[a]
160	4	44.16±6.33	10.52±2.16[a]

同一L-OHP质量浓度下，两种细胞比较：[a]P<0.01

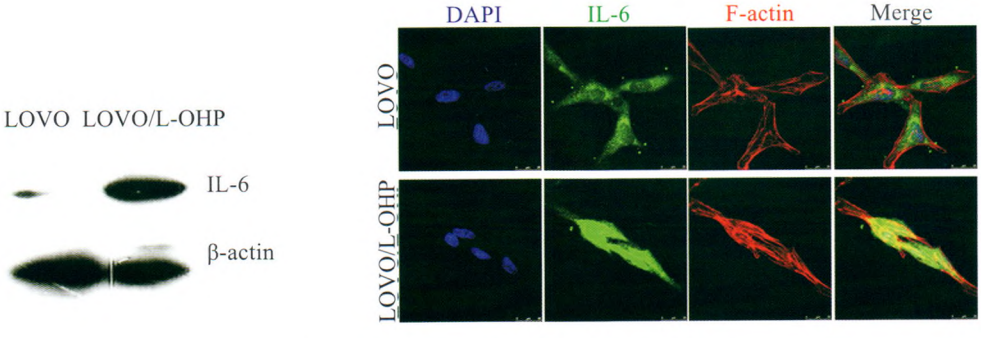
表3　不同DDP质量浓度对LOVO和LOVO/L-OHP细胞活力的影响　($\bar{x}\pm s$，%)

DDP质量浓度/(mg/L)	n	LOVO	LOVO/L-OHP
0	4	99.34±4.07	102.25±4.38
5	4	76.25±3.98	43.36±7.59[a]
10	4	63.75±6.54	15.86±4.62[a]
20	4	48.26±7.12	13.08±3.22[a]
40	4	24.25±7.66	14.33±3.26
80	4	7.65±1.84	8.78±1.14

同一DDP质量浓度下，两种细胞比较：[a]P<0.01

2.3　LOVO/L-OHP细胞高表达IL-6

蛋白印迹(图2A)检测结果显示，与LOVO细胞相比，LOVO/L-OHP细胞中IL-6表达水平升高(3.45±0.48)倍，差异有统计学意义(P<0.01)。免疫荧光结果也提示LOVO/L-OHP细胞中IL-6表达增强(图2B)。



A. 免疫印迹；B. 免疫荧光(400×)。

图2　两种细胞中IL-6的表达

万方数据

表4 LOVO和LOVO/L-OHP细胞中IL6相对表达量的比较 ($\bar{x}\pm s$，%)

细胞	n	相对表达量
LOVO	3	1.00±0.21
LOVO/L-OHP	3	3.64±0.88[a]

与LOVO细胞比较：[a]$P<0.01$

2.4 阻断IL-6而非IL-6R增强L-OHP对LOVO/L-OHP细胞的生长抑制

MTT(表5)及克隆形成试验(图3)检测结果显示，与对照抗体细胞相比，IL-6抗体与IL-6R抗体均可抑制LOVO/L-OHP细胞生长，与L-OHP单独作用相比，联合使用IL-6中和性抗体可明显增强其对LOVO/L-OHP细胞的生长抑制，但联用IL-6R抗体未能提高LOVO/L-OHP细胞对L-OHP的敏感性。

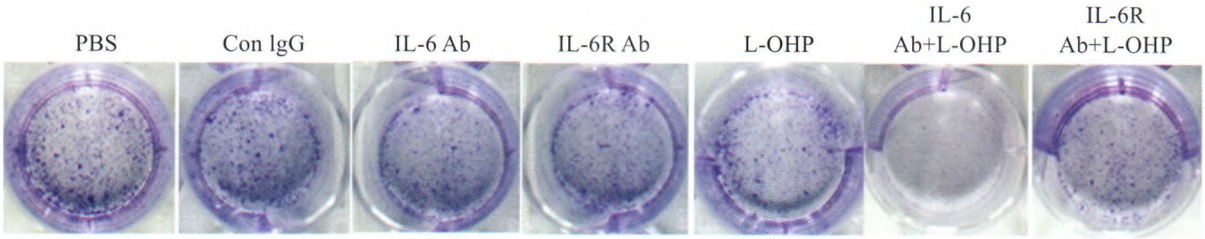


图3 克隆形成实验表明抑制IL-6增强L-OHP对LOVO/L-OHP细胞的生长抑制

表5 阻断IL6或IL6R对LOVO/L-OHP细胞活力的影响 ($\bar{x}\pm s$，%)

组别	n	相对表达量
PBS	4	100.05±7.80[c]
对照IgG	4	102.46±8.57[c]
IL6 Ab	4	78.75±4.62[a]
IL6R Ab	4	75.52±14.21[b]
L-OHP	4	86.47±16.22[a]
L6 Ab+L-OHP	4	51.12±4.36[bd]
IL6R Ab+L-OHP	4	84.34±9.06[a]

与对照IgG组比较：[a]$P<0.05$，[b]$P<0.01$；与L-OHP组比较：[c]$P<0.05$，[d]$P<0.01$

3 讨论

化疗仍是结肠癌患者主要的治疗手段，其中L-OHP是有高危复发患者和淋巴结转移患者的首选化疗药物，但临床上许多肿瘤患者在经历了数次有效的化疗后，最终难免复发、转移，其主要原因是肿瘤细胞对L-OHP产生了耐药性，因此逆转肿瘤耐药已成为提高L-OHP疗效的关键。建立耐药细胞株是研究肿瘤耐药机制的重要手段之一，本实验通过体外药物作用成功建立了人结肠癌耐L-OHP细胞株LOVO/L-OHP，发现LOVO/L-OHP细胞形态及生长速度较LOVO细胞均有明显改变；同时LOVO/L-OHP细胞对另一铂类药物DDP也表现出一定程度的耐药性。结合已有文献，我们分析交叉耐药性的出现可能是由于结肠癌细胞对铂类药物的耐药机制起码有部分是重叠的。本实验结果同时表明，与LOVO细胞相比，LOVO/L-OHP细胞具有更高的IL-6表达水平。这与Duan等[6]的研究结果类似，提示了IL-6可能作为一个重要的交叉点，在肿瘤铂类药物耐药中发挥作用。

近年研究发现，包括IL-6在内的炎性因子在肿瘤细胞耐药中起着重要作用。IL-6介导活化的信号通路可促进癌细胞生长、侵袭、血管形成及对抗药物治疗[7-8]，而靶向IL-6信号通路可抑制多种肿瘤生长并增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。如本课题组前期研究发现抑制IL-6可增强卡铂对结肠癌细胞LOVO的毒性作用[9]；Ying等[10]也发现IL-6R中和性抗体可提高结肠癌细胞对5-氟尿嘧啶的敏感性；而Spitzner等[11]则证实通过RNAi技术沉默IL-6下游分子STAT3的活性后，多种化疗药物对结肠癌细胞的抑制作用均明显增强。IL-6介导的信号通路涉及IL-6、IL-6R(包括一个受体亚基和2个gp130信号转导亚基)以及下游众多激酶分子[10]，虽然靶向其中任一重要环节均可能增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性，但这些分子在LOVO/L-OHP细胞中的作用是否一致仍未可知。本实验通过使用IL-6和IL-6R的中和性抗体，发现阻断IL-6而不是IL-6R，可逆转LOVO/L-OHP细胞的耐药性。对于此结果，我们推断耐药细胞在适应L-OHP作用的过程中，可能逐渐发生了IL-6与其它因子共用受体的信号模式来应对生存压力，Lee等[13]通过研究发现的“IL-6与FGFs公用受体”的现象，也在一定程度上说明我们推测的可靠性。但LOVO/L-OHP细胞中是否真的存在这种信号传递方式，还需我们进一步的实验证明。

万方数据

总之，本实验通过建立结肠癌L-OHP耐药细胞株LOVO/L-OHP，初步探讨了IL-6在其中的可能作用。不仅揭示了肿瘤细胞对铂类药物耐药机制的复杂性，更为重要的是指出靶向IL-6而非其受体可作为L-OHP治疗结肠癌的有效补充。

参考文献：

[1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65 (1): 5-29.

[2] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.

[3] 万得森，李进. 结肠癌临床实践指南(中国版). 2011版[EB/OL]. http://www.nccnchina.org/nccn-guidelines-china.aspx.

[4] Zhang G J, Adachi I. Serum interleukin-6 levels correlate to tumor progression and prognosis in metastatic breast carcinoma [J]. Anticancer Res, 1999, 19(2): 1427-1432.

[5] Chen C C, Chu C B, Liu K J, et al.Gene expression profiling for analysis acquired oxaliplatin resistant factors in human gastric carcinoma TSGH-S3 cells: The role of IL-6 signaling and Nrf2/AKR1C axis identification[J]. Biochem Pharmacol, 2013, 86(7): 872- 887.

[6] Duan S, Tsai Y, Keng P, et al. IL-6 signaling contributes to cisplatin resistance in non- small cell lung cancer via the up-regulation of anti-apoptotic and DNA repair associated molecules[J]. Oncotarget, 2015, 6(29): 27651-27660.

[7] Liao Q, Zeng Z, Guo X, et al.LPLUNC1 suppresses IL-6-induced nasopharyngeal carcinoma cell proliferation via inhibiting the Stat3 activation[J]. Oncogene, 2014, 33 (16): 2098-2109.

[8] Nagasaki T, Hara M, Nakanishi H, et al.Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction[J]. Brit J Cancer, 2014, 110(2): 469-478.

[9] Wang Z Y, Zhang J A, Wu X J, et al.IL-6 inhibition reduces STAT3 activation and enhances the antitumor effect of carboplatin[J]. Mediators Inflamm, 2016, 2016: 8026494.

[10] Ying J, Tsujii M, Kondo J, et al.The effectiveness of an anti-human IL-6 receptor monoclonal antibody combined with chemotherapy to target colon cancer stem-like cells[J]. Int J Oncol, 2015, 46(4): 1551-1559.

[11] Spitzner M, Roesler B, Bielfeld C, et al.STAT3 inhibition sensitizes colorectal cancer to chemoradiotherapy in vitro and in vivo[J]. Int J Cancer, 2014, 134(4): 997-1007.

[12] Shimazaki J, Goto Y, Nishida K, et al. In patients with colorectal cancer, preoperative serum interleukin-6 level and granulocyte/lymphocyte ratio are clinically relevant biomarkers of long-term cancer progression [J]. Oncology, 2013, 84(6): 356-361.

[13] Lee H J, Zhuang G, Cao Y, et al. Drug resistance via feedback activation of Stat3 in oncogene-addicted cancer cells[J]. Cancer Cell, 2014, 26(2): 207-221.

(上接第336页)

II induces endothelial xanthine oxidase activation: role for endothelial dysfunction in patients with coronary disease [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27(4): 943-948.

[11] Erusalimsky J D. Vascular endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology[J]. J Appl Physiol (1985), 2009, 106(1): 326-332.

[12] Majeski A E, Dice J F. Mechanisms of chaperone-mediated autophagy[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36(12): 2435-2444.

[13] Young A R, Narita M. Connecting autophagy to senescence in pathophysiology [J]. Curr Opin Cell Biol, 2010, 22(2): 234-240.

[14] Shan H, Guo D, Li X, et al. From autophagy to senescence and apoptosis in Angiotensin II-treated vascular endothelial cells[J]. APMIS, 2014, 122(10): 985-992.

[15] Crackower M A, Sarao R, Oudit G Y, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function[J]. Nature, 2002, 417(6891): 822-828.

[16] Milanovic D, Pesic V, Loncarevic-Vasiljkovic N, et al. The fas ligand/fas death receptor pathways contribute to propofol-induced apoptosis and neuroinflammation in the brain of neonatal rats[J]. Neurotox Res,2016, 30(3): 434-452.

万方数据