

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.04.010

IL-6 在胶质母细胞瘤的表达及作用机制研究 *

王德佳¹ 杨 波² 高 星¹ 刘惠苗³ 解冰川³

(1 承德市中心医院 神经内科 河北 承德 067000; 2 承德市中心医院 生殖医学科 河北 承德 067000;

3 河北医科大学第一医院 神经内科 河北 石家庄 050031)

摘要 目的:探讨白介素 6(IL-6)在胶质母细胞瘤(GBM)中的表达,并探讨其高表达的作用机制,以期阐明 GBM 发生发展潜在分子机制。**方法:**采用免疫组化检测表皮生长因子受体 3 (EGFRvIII) 阳性和阴性 GBM 组织 IL-6 的相对表达。以恶性胶质瘤细胞 U87MG 为研究对象,构建表达 EGFRvIII 的 U87MG-EGFRvIII 细胞,用 IL-1 β 分别处理 U87MG、U87MG-EGFRvIII 细胞,ELISA 检测 IL-6 分泌量。采用 EGFR 下游效应通路 p38MAPK、MK2、MEK1/2、JNK 抑制剂 SB、sc-48、PD、SP 预处理细胞 1 小时,IL-1 β 刺激细胞后,检测各组 IL-6 分泌量变化。将 IL-1 β 处理后的 U87MG-EGFRvIII 细胞记为 IL-1 β 组,以不做任何处理细胞记为 Control 组,用联合 SB、sc-48 处理的 IL-1 β 细胞依次命名为 IL-1 β +SB 和 IL-1 β +sc-48 组,western blot 检测 p38MAPK-MK2 通路蛋白和 IL-6 蛋白表达,qPCR 检测 IL-6 mRNA 表达。**结果:**IL-6 在 EGFRvIII 阳性 GBM 组织中普遍高表达,在 EGFRvIII 阴性 GBM 组织中普遍低表达。EGFRvIII 可在未受 IL-1 β 刺激的恶性胶质瘤细胞中上调 IL-6 基础分泌,也可在 IL-1 β 刺激情况下进一步促进 IL-6 分泌。在 U87MG 细胞中,所有通路抑制剂对 IL-6 分泌均无影响;在 U87MG-EGFRvIII 细胞中 p38 MAPK-MK2 通路抑制剂 SB 和 sc-48 明显抑制 IL-1 β 诱导的 IL-6 分泌,而 MEK1/2、JNK 抑制剂 PD 和 SP 则无明显影响。IL-1 β 能够诱导 p38MAPK-MK2 通路激活,诱导细胞内 IL-6 表达增加,联合 SB、sc-48 处理细胞后,p38MAPK-MK2 通路活性降低,细胞内 IL-6 表达降低。**结论:**癌基因 EGFRvIII 能够上调恶性胶质瘤细胞中 IL-6 基础分泌,IL-1 β 可进一步刺激 IL-6 分泌,其机制可能与 p38MAPK-MK2 通路激活有关。

关键词:白介素 6;胶质母细胞瘤;p38MAPK;MK2

中图分类号:R739.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)04-651-06

Expression and Potential Mechanisms of IL-6 in Malignant Glioma Cells*

WANG De-jia¹, YANG Bo², GAO Xing¹, LIU Hui-miao³, XIA Bing-chuan³

(1 Department of neurologyneurology, Central Hospital of Chengde, Chengde, Hebei, 067000, China;

2 Department of reproductive medicine, Central Hospital of Chengde, Chengde, Hebei, 067000, China;

3 Department of neurologyneurology, First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei, 050031, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the mechanism of IL-6 overexpression in malignant glioma cells and clarify the potential molecular mechanism of GBM development. **Methods:** The relative level of IL-6 in EGFRvIII positive and negative GBM tissues were detected by immunohistochemistry. U87MG-EGFRvIII cells expressing EGFRvIII were constructed from U87MG malignant glioma cells. U87MG and U87MG-EGFRvIII cells were treated with IL-1 β , and the secretion of IL-6 was detected by ELISA. The cells were pretreated with p38MAPK, MK2, MEK1/2, JNK inhibitor SB, sc-48, PD and SP for 1 hour, the changes of IL-6 secretion were measured after IL-1 β treated. IL-1 β -treated U87MG-EGFRvIII cells were recorded as IL-1 β group, and U87MG-EGFRvIII cells were recorded as control group with no treatment. IL-1 β cells treated with SB or sc-48 were named as IL-1 β + SB and IL-1 β + sc-48 group, respectively. The expression of p38MAPK-MK2 pathway protein and IL-6 protein were detected by western blot. The expression of IL-6 mRNA was detected by qPCR. **Results:** IL-6 is generally high expressed in EGFRvIII-positive GBM tissues compared with that in EGFRvIII-negative GBM tissues. U87MG cells expressing the oncogene EGFRvIII were successfully constructed. The oncogene EGFRvIII can upregulate IL-6 basal secretion in glioma cells, and further promote IL-6 secreting under the stimulation of IL-1 β . In U87MG cells, all inhibitors had almost no effect on IL-6 secretion; p38 MAPK-MK2 pathway inhibitors SB, sc-48 significantly inhibited IL-1 β -induced IL-6 secretion in U87MG-EGFRvIII cells while MEK1/2, JNK inhibitor PD, SP had no significant effect. IL-1 β -treated cells could induce the activation of p38MAPK-MK2 pathway and induce the expression of intracellular IL-6. The activity of p38MAPK-MK2 pathway and the expression of IL-6 were inhibited after IL-1 β combined with SB and sc-48. **Conclusion:** The oncogene EGFRvIII can upregulate IL-6 basal secretion in glioma cells with no IL-1 β treatment, and further promote the secretion of IL-6 under the stimulation of IL-1 β , which may be re-

* 基金项目:河北省卫生厅科研基金项目(20130580)

作者简介:王德佳(1981-),男,硕士研究生,副主任医师,研究方向:主要从事神经内科疾病诊疗,

E-mail:kloofishgood@163.com,电话:13131436934

(收稿日期:2018-04-08 接受日期:2018-04-30)

lated to the activation of p38MAPK-MK2 pathway. Our research revealing that glioma cells may form inflammatory microenvironment through endogenous (EGFRvIII) and exogenous (IL-1 β) factors, and provides the possibility for further improvement of brain-permeable and anti-inflammatory inhibitors targeting p38 MAPK, MK2 to improve the progression of aggressive gliomas.

Keyw ords: IL-6; GBM; p38MAPK; MK2

Chinese Library Classification(CLC): R739.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)04-651-06

前言

神经胶质瘤是最常见最致命的实体瘤之一, 约占脑肿瘤50%, 其中多形性胶质母细胞瘤 (Glioblastoma multiforme, GBM)的恶性度极高,患者预后极差,五年生存率极低^[1,2]。GBM中通常含有高水平的炎性细胞因子, 形成肿瘤炎性微环境,特别是 IL-1 β 、IL-6、IL-8 可维持 GBM 细胞干性, 促进细胞增殖、血管生成和侵袭^[3,4]。据研究报道,约 50% GBM 中存在组成型活性的表皮生长因子受体变体 III (EGFRvIII)^[5], 致癌基因 EGFRvIII 表达与 IL-6 过量产生和 EGFR 效应蛋白 Akt 活性增加有关^[6,7]。肿瘤浸润小胶质细胞和星形胶质细胞可分泌 IL-6^[8,9], 其中机制可能是 GBM 细胞高表达的 IL-1 β 通过增强促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路促进 IL-6 的产生^[10,11]。因此, IL-6 的产生是由涉及多个肿瘤和微环境的信号转导诱导的。然而,目前对 GBM 中 IL-6 产生研究几乎完全基于单独使用癌症或神经胶质细胞模型进行,而没有考虑结合肿瘤-微环境的相互作用。

本研究通过免疫组化分别检测 EGFRvIII 阳性和阴性 GBM 组织中 IL-6 表达,根据先前文献报道^[9],在恶性胶质瘤细胞 U87MG 中构建表达 EGFRvIII 的 U87MG-EGFRvIII 细胞,用 IL-1 β 刺激来研究胞内 EGFRvIII 和胞外 IL-1 β 因子刺激对细胞 IL-6 分泌影响,以期揭示 GBM 中肿瘤-微环境的相互作用机制,为临床寻找脑渗透性特异抑制剂治疗 GBM 提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人恶性胶质瘤细胞系 U87MG 购自中国医学科学院上海细胞库,胎牛血清、青链霉素、DMEM 培养基、0.25%胰蛋白酶、PBS 均为美国 Gibco 公司产品;pcDNA/TO 质粒和 Zeocin 购自美国 Invitrogen 公司;人重组 IL-1 β 为 R&D Systems 产品;p38 MAPK、JNK、MEK1/2 抑制剂 SB (SB203580)、SP(SP600125)、PD (PD098059) 购自美国 Sigma Aldrich 公司,MK2 抑制剂 sc-48 (#204048) 购自美国 Santa Cruz 公司;兔抗人 p-p38 MAPK、p38 MAPK、MK2、IL-6 抗体、鼠抗人 GAPDH 抗体、抗鼠或兔的 HRP 偶联二抗均为 Cell Signaling Technology 公司产品;鼠抗人 EGFR 抗体为美国 Invitrogen 公司产品;兔抗人 EGFRvIII 克隆抗体购自 PL Laboratories 公司;OptEIA Human IL-6 ELISA 检测试剂盒购自美国 BD 公司。

1.2 临床标本

收集医院 2012 年 5 月-2015 年 2 月经手术切除并保存完好的 GBM 石蜡标本 124 例,年龄 26-70 岁(平均 49.24 岁),所有标本均按照 2007 年 WHO 制定的中枢神经系统肿瘤病理分

类标准进行分类,并经至少两名病理科医师诊断,患者术前未经任何形式的治疗^[12]。采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶 (Streptavidin Peroxidase Conjugated Method, SP) 免疫组化法对 GBM 标本中 EGFRvIII 蛋白进行检测。本研究所多有实验操作均得的医院伦理委员会批准,并得到患者及其家属知情同意。

1.3 细胞培养

U87MG 细胞用含 10%胎牛血清、1%青霉素和链霉素的 DMEM 培养基,置于 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞长至约 80%融合度时,弃去旧培养液,无菌 PBS 洗涤 2 次,加入适量 0.25%胰蛋白酶于 37℃ 细胞培养箱中孵育消化 2 min,显微镜下观察细胞变圆、边界分明时,加入 3 mL 含 10%胎牛血清的完全培养液进行终止消化,移液枪轻轻吹下细胞并移入无菌离心管中,1000 rpm 离心 3 min,弃上清,用适量完全培养液重悬细胞,按一定比例接种到细胞培养板中进行后续实验。

1.4 细胞转染及稳定株筛选

利用 EGFRvIII 特异引物进行 qPCR 扩增得到 EGFRvIII cDNA, 并克隆至 pcDNA/TO 质粒中, 构建 pcDNA/TO-EGFRvIII 过表达载体。EGFRvIII 扩增引物为: 正向引物 5'-CCTCCGCTGAATTTTGTCTT, 和反向引物 3'-GCCGCGTAGATTTCTAGGTT。

U87MG 细胞培养至对数期后, 按照 1.1 中消化细胞,取 5×10⁵ 个接种于 6 孔板中,将培养液补足至 2 mL,培养过夜待细胞融合度达到 60%时, 根据 Lipofectamine® 2000 转染试剂操作步骤,将 pcDNA/TO-EGFRvIII 转染至 U87MG 细胞中。转染 48 小时后, 培养液中加入 100ug/ml 的 zeocin 溶液进行筛选,每隔 2 天更换新鲜培养液。待细胞长至 80%融合度时,将细胞消化并有限稀释法培养单克隆细胞,待细胞克隆长大后进行鉴定并保种。

1.5 细胞因子 IL-6 分泌检测

取 5×10⁴ 个 U87MG 和 U87MG-EGFRvIII 细胞接种于 24 孔板中, 分别用 0、5、10、20、40 ng/mL 的 IL-1 β 处理 24 小时,收集上清液, 按照 BD OptEIA Human IL-6 试剂盒说明书通过 ELISA 法检测各组细胞 IL-6 分泌量。将 U87MG 和 U87MG-EGFRvIII 接种于 24 孔板中,实验饥饿 2 小时,分别用 10 μ M 的 p38 MAPK (SB203580, SB)、MK2 (sc-221948, sc-48)、MEK1/2 (PD98059, PD)、JNK (SP600125, SP)抑制剂预处理 1 小时,以不做任何处理细胞作为 Control 组,用 10 ng/mL 的 IL-1 β 处理 24 小时后,ELISA 检测各组细胞 IL-6 分泌量。

1.6 Western blot 检测

取 2×10⁵ 个对数生长期 U87MG-EGFRvIII 细胞接种至 6 孔细胞培养板中,用 10 ng/mL 的 IL-1 β 处理记为 IL-1 β 组,以 IL-1 β 联合 10 μ M SB 或 sc-48 处理记为 IL-1 β +SB 组、IL-1 β +sc-48 组,无任何处理细胞作为 Control 组。处理后,取适

量细胞用冷的 PBS 洗 2 次,加入适量 RIPA 裂解液冰上裂解 30 分钟,4℃,12000 rpm 离心 10 min,取上清并用 BCA 蛋白定量试剂盒检测各组蛋白浓度。取适量蛋白样品与 5× Loading buffer 及 PBS 混合配成上样缓冲液,95℃ 金属浴煮 5 分钟使蛋白变性,10% SDS-PAGE 胶进行电泳并转至 PVDF 膜上,5%脱脂牛奶封闭 2 小时,用抗 EGFR、p-p38MAPK、p38MAPK、MK2、IL-6、GAPDH 一抗稀释液孵育过夜,用相应二抗稀释液室温孵育 2 小时,ECL 发光液对蛋白条带进行显影。以 GAPDH 表达为内参,Image J 软件分析各组蛋白相对表达量。

1.7 qPCR 检测

如 1.5 中方法处理细胞后,TRIzol 分离提取 Control 组、IL-1β 组、IL-1β+SB 组和 IL-1β+sc-48 组细胞总 RNA,Nanodrop 2000 检测各组 RNA 浓度。按照 Script II reverse transcriptase 逆转录试剂盒说明书将各组 mRNA 逆转录成 cDNA,用 2× SYBR green master mix 试剂盒与 RT-PCR 仪上检测各组细胞 IL-6、GAPDH mRNA 相对表达量。以 GAPDH 为内参,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法来计算各组细胞中 IL-6 mRNA 相对表达水平。IL-6

引物:F-5'-ACAACCACGGCCTTCCTACTT-3',R:5'-CACGATT-TCCAGAGAACATGTG-3';GAPDH 引物:F:5'-GCTCCTCT- GTTCGACAGTCA-3',R:5'-ACCTTCC CCATGGTGTCT-GA-3'。

1.8 统计学处理

实验数据用均数标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS22.0 进行统计学分析,多组差异比较采用单因素方差分析,两组数据采用独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GBM 组织中 IL-6 的表达

经免疫组化检测,124 例 GBM 组织中 EGFRvIII 阴性 60 例,阳性 64 例,阳性率约为 52%(64/124)(图 1A)。如图 1B 所示,EGFRvIII 阴性 GBM 组织中 IL-6 表达水平为 0.56 ± 0.51 ,而 EGFRvIII 阳性 GBM 组织中 IL-6 表达水平为 1.95 ± 1.53 。与 EGFRvIII 阴性 GBM 组织相比,EGFRvIII 阳性 GBM 组织中 IL-6 表达明显增加(图 1)。

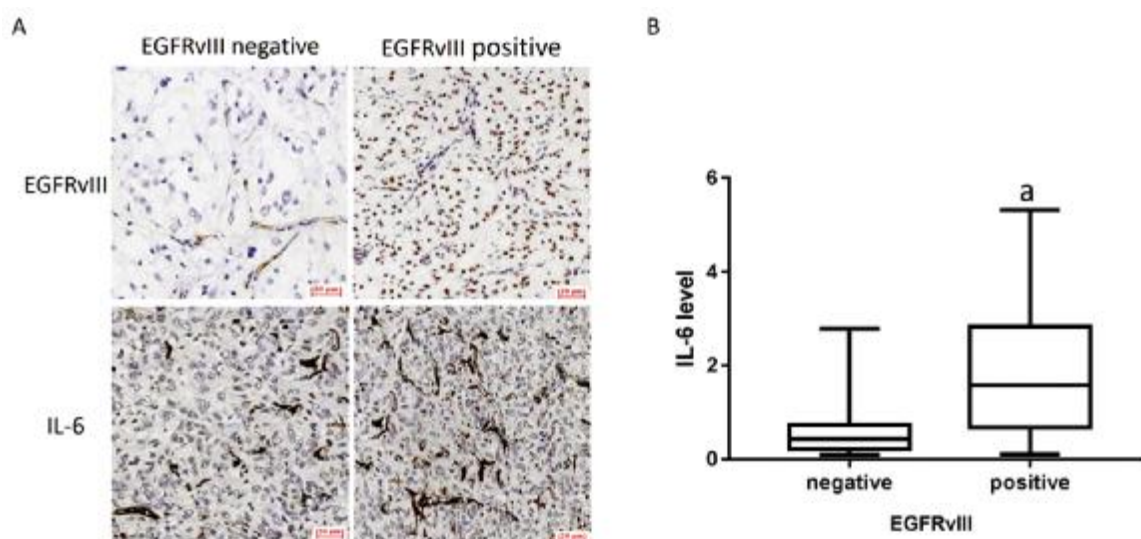


图 1 GBM 组织中 IL-6 的表达

A:免疫组化检测 EGFRvIII 阴性与阳性 GBM 组织中 IL-6 表达;B:EGFRvIII 阴性与阳性 GBM 组织中 IL-6 相对表达水平;

a:与 negative 组相比,* $P < 0.05$ 。

Fig.1 IL-6 expression in GBM tissues

A: The expression of IL-6 in EGFRvIII negative and positive GBM tissues was detected by immunohistochemistry; B: The relative expression level of IL-6 in EGFRvIII negative and positive GBM tissues; a: Compared with negative group, * $P < 0.05$.

2.2 稳定表达 EGFRvIII 的 U87MG 细胞的构建

为研究 IL-6 在 GBM 中高表达机制,我们构建了表达 EGFRvIII 的 U87MG-EGFRvIII 细胞,结果如图 2 所示,U87MG 细胞不表达 EGFRvIII,U87MG-EGFRvIII 细胞检测到 EGFRvIII 高表达,提示细胞构建成功。

2.3 IL-1β 对 U87MG-EGFRvIII 细胞 IL-6 分泌的影响

如图 3 所示,0、5、10、20、40 ng/mL 组 U87MG 细胞 IL-6 分泌量依次为: 35.33 ± 6.51 、 49.33 ± 5.13 、 65.67 ± 7.77 、 79.00 ± 6.56 、 87.00 ± 4.00 ,U87MG-EGFRvIII 细胞 IL-6 分泌量为: 178.00 ± 8.60 、 233.67 ± 12.50 、 311.67 ± 36.50 、 307.67 ± 34.36 、 356.00 ± 62.22 。经单因素方差分析,各组 U87MG 细胞间 IL-6 分泌及各组 U87MG-EGFRvIII 细胞间 IL-6 分泌比较差异具有

统计学意义($P < 0.05$)。与 U87MG 细胞各组相比,IL-1β 能够刺激 U87MG-EGFRvIII 细胞分泌约四倍量的 IL-6,差异均具有统计学意义($P < 0.05$);与 U87MG-EGFRvIII 细胞 0 ng/mL 组相比,5、10、20、40 ng/mL 组 IL-6 分泌均明显增加,而 U87MG-EGFRvIII 细胞 10、20、40 ng/mL 组间无明显差异,故后续选择 10 ng/mL IL-1β 进行实验。癌基因 EGFRvIII 可在未受 IL-1β 刺激的恶性胶质瘤细胞中上调 IL-6 基础分泌,也可在 IL-1β 刺激情况下进一步促进 IL-6 分泌。

2.4 p38 MAPK-MK2 通路抑制剂对恶性胶质瘤细胞 IL-6 分泌的影响

EGFR 下游效应通路可能在 IL-1β 诱导 IL-6 分泌中起作用,利用 EGFR 下游通路抑制剂联合 IL-1β 处理细胞,结果如

图4所示。Control组、SB组、sc-48组、PD组、SP组,U87MG细胞IL-6分泌量依次为:45.67±8.62、41.33±4.04、39.33±5.51、49.00±10.44、52.67±8.02;U87MG-EGFRvIII细胞IL-6分泌量为:249.67±46.20、56.00±8.00、52.33±9.61、233.67±36.02、251.33±56.16。U87MG细胞各组IL-6分泌比较差异无统计学意义,而U87MG-EGFRvIII细胞各组IL-6分泌相比具有统计学差异($P<0.05$)。在U87MG-EGFRvIII细胞中,与Control组相比,p38MAPK和MK2抑制剂SB、sc-48显著降低了IL-1 β 诱导IL-6分泌,而Mek1/2和JNK抑制剂PD、SP则对IL-6分泌无明显影响。由此可知,在U87MG细胞中,p38MAPK-MK2通路抑制剂几乎不影响IL-6分泌,而在U87MG-EGFRvIII细胞中p38MAPK-MK2通路抑制剂则明显抑制IL-1 β 诱导的IL-6分泌。

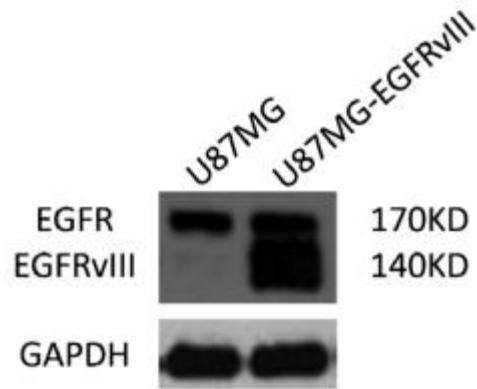


图2 western blot 检测细胞中EGFRvIII的表达

Fig.2 The expression of EGFRvIII in cells was detected by western blot assay

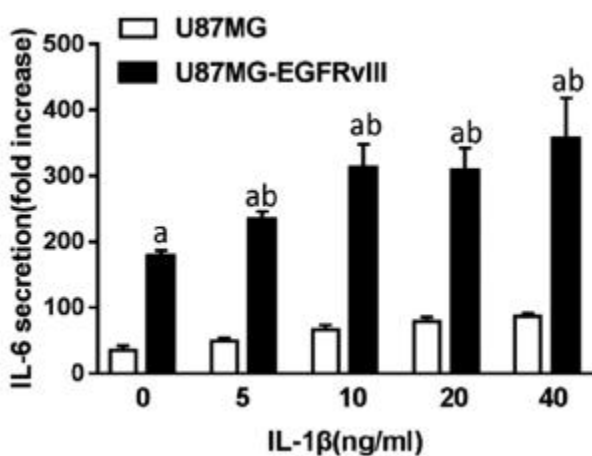


图3 U87MG-EGFRvIII细胞IL-6分泌

a:与U87MG细胞相比, $P<0.05$;b:与U87MG-EGFRvIII 0 ng/mL组相比, $P<0.05$

Fig.3 The secretion of IL-6 in U87MG-EGFRvIII cells

a: $P<0.05$ compared to U87MG cells; b: $P<0.05$ compared to U87MG-EGFRvIII 0 ng/mL group

2.5 IL-1 β 对p38MAPK-MK2通路活性的影响

如图5所示,Control、IL-1 β 、IL-1 β +SB、IL-1 β +sc-48组U87MG-EGFRvIII细胞中p-p38相对表达依次为:0.49±0.03、1.08±0.05、0.42±0.04、1.04±0.05;p38表达水平为:1.87±0.08、1.92±0.12、1.92±0.09、1.92±0.09;p-MK2的相对表达依次为:0.29±0.03、1.20±0.16、0.25±0.04、0.17±0.02。U87MG-EGFRvIII细胞Control、IL-1 β 、IL-1 β +SB、IL-1 β +sc-48组p-p38和p-MK2表达比较差异具有统计学意义($P<0.05$),而四组p38表达比较差异无统计学意义($P>0.05$)。与Control组相比,IL-1 β 诱导U87MG-EGFRvIII细胞中p-p38和p-MK2蛋白表达明显升高($P<0.05$),而p38蛋白表达无明显影响($P>0.05$)。IL-1 β +SB组p-p38和p-MK2表达与IL-1 β 组比较差异具有统计学意义,IL-1 β +sc-48组p-MK2表达与IL-1 β 组比较差异具有统计学意义($P<0.05$),而p-p38表达差异不显著,表明p38MAPK和MK2抑制剂SB与sc-48抑制了IL-1 β 对p38MAPK-MK2通路的诱导激活。由此可知,IL-1 β 可诱导U87MG-EGFRvIII细胞中p38MAPK-MK2通路激活。

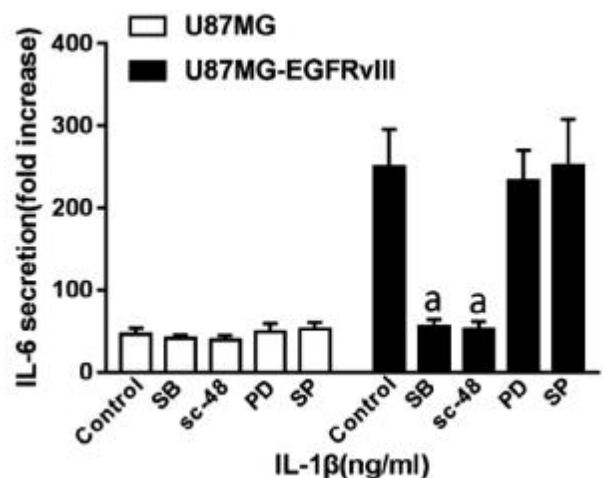


图4 EGFR下游通路抑制剂对IL-1 β 诱导IL-6分泌的影响

a:与U87MG-EGFRvIII Control组相比, $P<0.05$

Fig.4 Effect of EGFR downstream pathway inhibitors on IL-1 β -induced IL-6 secretion

a: $P<0.05$ compared to U87MG-EGFRvIII Control group

2.6 p38MAPK-MK2抑制剂对恶性胶质瘤细胞中IL-6 mRNA表达影响

如图6所示,Control、IL-1 β 、IL-1 β +SB、IL-1 β +sc-48组U87MG-EGFRvIII细胞中IL-6蛋白的相对表达分别为:0.14±0.03、0.43±0.02、0.21±0.03、0.21±0.04;IL-6 mRNA相对表达分别为:1.00±0.00、84.00±11.36、11.67±2.52、12.67±2.52。Control、IL-1 β 、IL-1 β +SB、IL-1 β +sc-48组U87MG-EGFRvIII细胞中IL-6蛋白和mRNA表达比较差异具有统计学意义。与Control组相比,IL-1 β 能够诱导细胞中IL-6蛋白和mRNA表达明显增加($P<0.05$)。与IL-1 β 组相比,p38MAPK和MK2抑制剂SB与sc-48能够抑制IL-1 β 对IL-6蛋白和mRNA表达诱导作用($P<0.05$)。结果表明,IL-1 β 可刺激U87MG-EGFRvIII细胞中IL-6表达,机制可能是通过诱导p38MAPK-MK2通路的激活。

3 讨论

GBM是原发于中枢神经系统肿瘤,具有无限增殖并侵犯

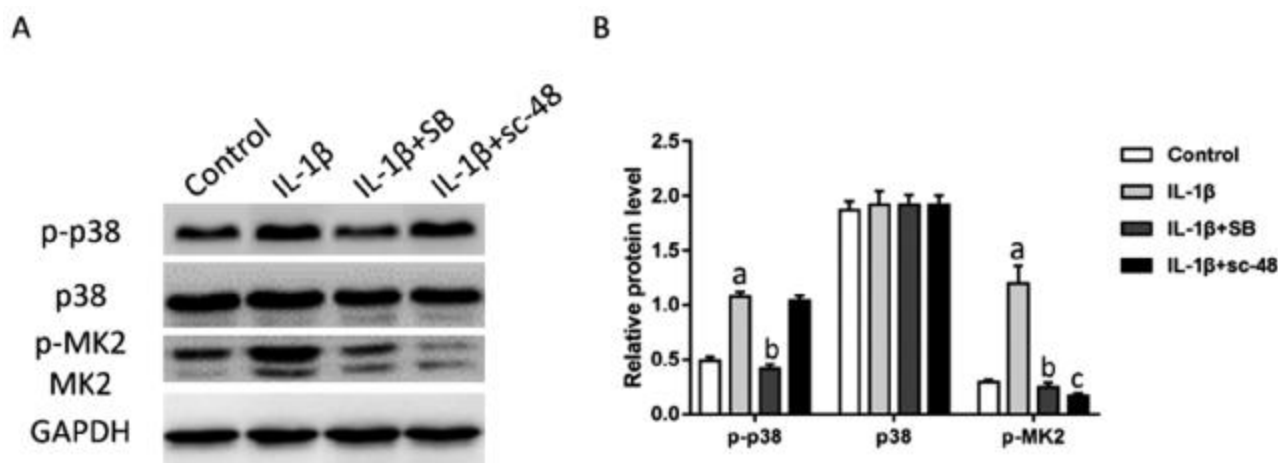


图5 p38MAPK-MK2 通路蛋白表达

A: western blot 检测 p-p38、p38、p-MK2 蛋白表达; B: p-p38、p38、p-MK2 相对表达水平; 注: a: 与 Control 组相比, $^aP<0.05$; b: 与 IL-1 β 组相比, $^bP<0.05$; c: 与 IL-1 β 组相比, $^cP<0.05$

Fig.5 p38MAPK-MK2 pathway protein expression

A: The protein levels of p-p38, p38 and p-MK2 were measured by western blot; B: The relative expression levels of p-p38, p38 and p-MK2; a: $^aP<0.05$ compared with Control group; b: -1 β group, $^bP<0.05$; c: $^cP<0.05$ compared to the IL-1 β group

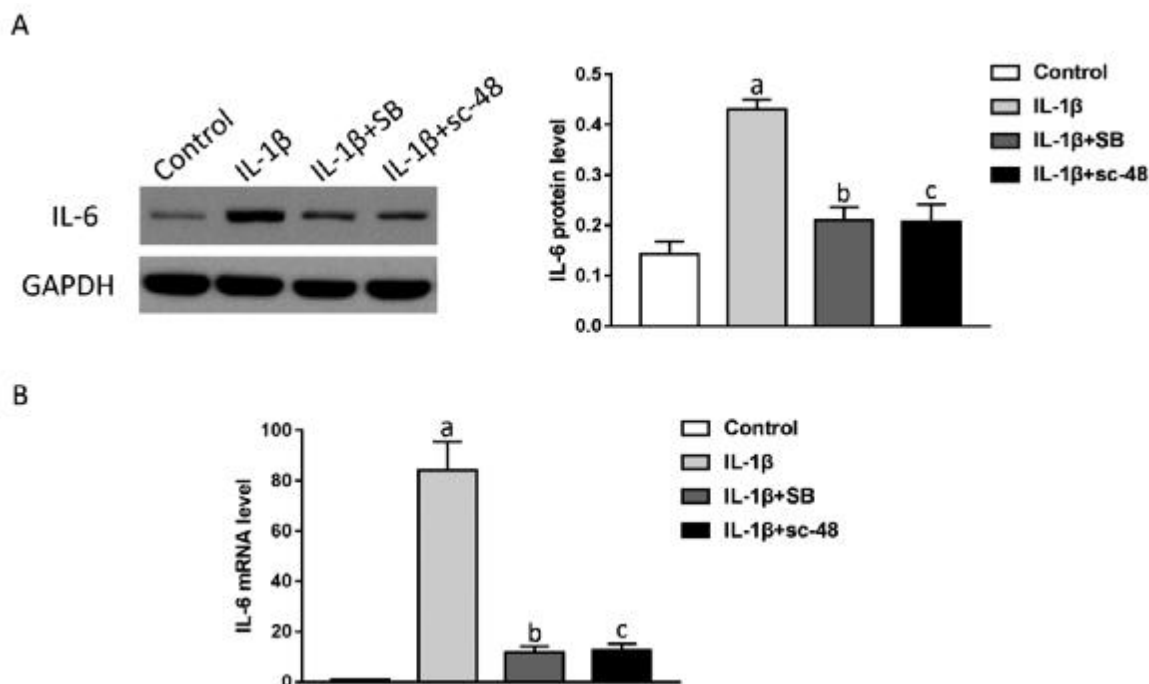


图6 细胞内 IL-6 蛋白与 mRNA 表达

A: western blot 检测 IL-6 蛋白表达; B: qPCR 检测 IL-6 mRNA 表达; 注: a: 与 Control 组相比, $^aP<0.05$; b、c: 与 IL-1 β 组相比, $^bP<0.05$, $^cP<0.05$

Fig.6 Intracellular IL-6 protein and mRNA expression

A: IL-6 protein expression was detected by western blot; B: IL-6 mRNA expression was detected by qPCR; a: $^aP<0.05$ compared to Control group; b, c: $^bP<0.05$, $^cP<0.05$ compared to IL-1 β group

周围正常脑组织特征,恶性程度极高,是最致命的脑部肿瘤^[13-15]。目前,GBM 的治疗方式主要有手术、放疗、化疗、免疫治疗、基因治疗等,但受到脑部放射剂量、药物难以穿过血脑屏障等因素限制,患者预后仍然很差^[16-20]。近年来研究表明炎症因子在肿瘤的发生发展及转移过程中起着重要的作用^[21-22]。IL-6 作为一个炎症因子在促炎和抗炎中起着双重调节作用,而且其表达异常还会导致多种癌症发生,如肝癌^[23]、前列腺癌^[24]、肺癌^[25]、乳腺癌^[26]等。研究报道,IL-6 可以激活 JAK/STAT3 信号,促进肿瘤

发生和转移^[27-28]。刘雅奇^[16]等发现 IL-6 可通过促进胶质瘤细胞 STAT3 磷酸化进而增强胶质瘤细胞增生侵袭能力。GBM 中通常含有高水平的炎性细胞因子,这些炎性细胞因子对于维持 GBM 细胞干性、促进细胞增殖、血管生成和侵袭至关重要,如 IL-1 β 、IL-6 等^[28]。然而,IL-6 在 GBM 中高表达的机制仍未完全阐明。

表皮生长因子受体(EGFR)是多种受体通路的重要介体,具有信号会聚点的作用,一旦被激活将导致胞内下游信号通路激

活,包括 MAPK、Akt 和 JNK 通路,从而诱导细胞增殖、血管生成、肿瘤侵袭、转移及细胞凋亡抑制^[29]。EGFR 酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKIs)是目前针对 EGFR 治疗非小细胞肺癌的主要靶向药物^[30]。近年来研究显示 GBM 中存在 EGFR 基因重排、扩增、突变现象,约 50% GBM 患者存在 EGFRvIII 突变,其异常表达与肿瘤生长、侵袭和治疗抵抗有关^[31]。本研究采用免疫组化检测了 124 例 GBM 组织,其 EGFRvIII 阳性率约为 52% (64/124),与上述文献结果一致。EGFRvIII 突变是指 EGFR 胞外缺失了 267 个氨基酸,导致其与配体结合能力而丧失、胞内酪氨酸激酶组成性激活,进而持续激活下游效应通路转导,致使肿瘤细胞恶性表型明显增强^[5]。EGFRvIII 是一个特异的治疗肿瘤靶标,仅表达于恶性肿瘤细胞中^[32],且其表达与 IL-6 过量产生有关^[33]。IL-1 β 也是 GBM 中重要的炎症因子,在 GBM 中通常高表达,其可激活细胞 MAPK 信号促进 IL-6 产生^[34]。在 GBM 中,内源的 EGFRvIII 和外源 IL-1 β 因子形成肿瘤-炎症微环境,是否参与诱导 IL-6 表达尚未阐明。

本研究以人恶性胶质瘤细胞 U87MG 为研究对象,构建了表达 EGFRvIII 的 U87MG-EGFRvIII 细胞,结果显示 EGFRvIII 可上调恶性胶质瘤细胞中 IL-6 基础分泌,IL-1 β 刺激可进一步促进 IL-6 分泌。利用 EGFR 效应通路 p38MAPK、MK2、MEK1/2、JNK 通路抑制剂处理细胞,其均不影响 U87MG 细胞 IL-6 分泌。而在 U87MG-EGFRvIII 细胞中,p38 MAPK-MK2 通路抑制剂 SB、sc-48 明显抑制 IL-1 β 诱导 IL-6 分泌,MEK1/2、JNK 抑制剂 PD、SP 则无明显影响,提示 IL-1 β 可能通过诱导 U87MG-EGFRvIII 细胞中 p38 MAPK-MK2 通路激活发挥作用。本研究检测了 IL-1 β 刺激后细胞中 p38MAPK-MK2 蛋白和 IL-6 表达变化,p-p38、p-MK2 和 IL-6 表达显著增加,联合 p38MAPK-MK2 抑制剂 SB、sc-48 处理后,p-p38、p-MK2 和 IL-6 表达均明显降低。

综上所述,EGFRvIII 可上调恶性胶质瘤细胞中 IL-6 基础分泌,IL-1 β 刺激可进一步促进 IL-6 分泌,其机制可能与 p38MAPK-MK2 通路激活有关,GBM 可能通过内源 EGFRvIII 和外源 IL-1 β 因子形成肿瘤-炎症微环境促进 IL-6 表达。

参考文献(References)

- [1] 李晓明.人脑胶质瘤中 DEC1 的表达对烷化剂替莫唑胺化疗敏感性影响的分子机制[D].第四军医大学,2016
- [2] 祝剑虹,王汉东,樊友武,等.胶质瘤干细胞靶向治疗的新领域[J].中华神经外科疾病研究杂志,2015,14(5): 471-474
- [3] Yeung YT, McDonald KL, Grewal T, et al. Interleukins in glioblastoma pathophysiology: implications for therapy[J]. British Journal of Pharmacology. 2013, 168(3): 591-606
- [4] 袁锐,艾文兵.多形性胶质母细胞瘤免疫治疗研究进展[J].山东医药,2017,57(29): 101-103
- [5] 陈明,孙红宇,文荣朝,等.稳定表达 EGFRvIII 的 U87MG 细胞株的建立与鉴定[J].数理医药学杂志,2010,23(5): 516-518
- [6] Liu X, Liu K, Qin J, et al. C/EBP β promotes angiogenesis through secretion of IL-6, which is inhibited by genistein, in EGFRvIII-positive glioblastoma[J]. International Journal of Cancer Journal International Du Cancer, 2015, 136(11): 2524
- [7] Stec W J, Rosiak K, Siejka P, et al. Cell line with endogenous EGFRvIII expression is a suitable model for research and drug development purposes[J]. Oncotarget, 2016, 7(22): 31907-31925

- [8] 唐丽娜,许小明,李艳红.炎症因子与阿尔茨海默病的相关性研究进展[J].中国老年学,2016,36(17): 4378-4380
- [9] 刘培雯,牛娟,徐陶,等.嘌呤 P2Y 受体激动剂 ADP β S 对脊髓来源小胶质细胞产生 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的刺激作用[J].神经解剖学杂志,2016,32(6): 711-716
- [10] Liu X, Ye F, Xiong H, et al. IL-beta Induces IL-6 production in retinal Muller cells predominantly through the activation of P38 MAPK/NF-kappa B signaling pathway [J]. Experimental Cell Research, 2015, 331(1): 223-231
- [11] Xia Y, Khoi P N, Yoon H J, et al. Piperine inhibits IL-1 β -induced IL-6 expression by suppressing p38 MAPK and STAT3 activation in gastric cancer cells[J]. Molecular & Cellular Biochemistry, 2015, 398 (1-2): 147-156
- [12] 姚晶晶,马东林,尹洪芳.胶质瘤诊治相关分子标志物研究进展[J].中华病理学杂志,2017,46(7): 509-511
- [13] Pei J, Moon KS, Pan S, et al. Proteomic Analysis between U87MG and U343MG-A Cell Lines: Searching for Candidate Proteins for Glioma Invasion[J]. Brain Tumor Research & Treatment, 2014, 2(1): 22
- [14] 李云涛,陈谦学,吴庭枫,等. Rho 激酶在胶质瘤侵袭调控中作用的研究进展[J].浙江临床医学,2015, (8): 1418-1420
- [15] 丁德智,侯现增,刘广存.复发性胶质母细胞瘤的研究进展[J].新医学,2016,47(12): 797-802
- [16] 刘雅琦,顾金海,孟锐,等.重组人白细胞介素-6 对胶质瘤细胞 U87 增生侵袭的影响[J].中国老年学,2015,35(10): 2617-2619
- [17] 杨昌霖,金林春,葛海涛,等.胶质瘤的免疫治疗策略及进展[J].现代生物医学进展,2016,16(6): 1191-1194
- [18] 郑贵贵,卢晓闻,许烈鹏,等.脑胶质瘤的基因治疗研究进展[J].转化医学电子杂志,2017,4(7): 68-76
- [19] 夏亮,吴斌,冯方,等.脑胶质瘤靶向治疗现状分析[J].医学理论与实践,2016,29(20): 3463-3464
- [20] 白洁,高晨,何灵,等.高级别胶质瘤临床诊疗进展[J].医学综述,2017,23(15): 2978-2982
- [21] 姚凤,杨海霞.炎症因子在肿瘤发生发展及转移过程中的作用分析[J].药品评价,2016, (b12): 203-203
- [22] 计蓓,徐靖宇,虞必光.肿瘤坏死因子- α 在恶性肿瘤发生发展中的作用及研究进展[J].贵州医药,2013,37(4): 370-372
- [23] Tsui KH, Wang SW, Chung LC, et al. Mechanisms by Which Interleukin-6 Attenuates Cell Invasion and Tumorigenesis in Human Bladder Carcinoma Cells [J]. BioMed Research International, 2013, 2013 (1): 791212
- [24] 张开平,梁朝朝,陈先国,等. IL-6、NF- κ B 在前列腺癌组织中表达及其临床意义[J].安徽医科大学学报,2016,51(6): 893-896
- [25] 刘涓,孙威. IL-6 和 IGF-1 在非小细胞肺癌组织的表达与临床意义[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2015,24(5): 399-403
- [26] 胡金华,张耀晴,朱斌.乳腺癌患者血清 VEGF、TNF- α 和 IL-6 的表达与预后的相关分析[J].现代肿瘤医学,2015, (5): 639-642
- [27] Wang S, Zhang W. Genetic variants in IL-6/JAK/STAT3 pathway and the risk of CRC [J]. Tumour Biology the Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology & Medicine, 2016, 37 (5): 6561-6569

(下转第 689 页)

- sion[J]. Neoplasia, 2018, 20(11): 1161-1174
- [14] Hwang KT, Han W, Lee SM, et al. Prognostic influence of 3-dimensional tumor volume on breast cancer compared to conventional 1-dimensional tumor size[J]. Ann Surg Treat Res, 2018, 95(4): 183-191
- [15] Moorman AM, Bourez RL, de Leeuw DM, et al. Pre-operative Ultrasoundographic Evaluation of Axillary Lymph Nodes in Breast Cancer Patients: For Which Group Still of Additional Value and in Which Group Cause for Special Attention?[J]. Ultrasound Med Biol, 2015, 41(11): 2842-2848
- [16] Pujani M, Khan S, Hassan MJ, et al. Coexistence of metastatic breast carcinoma and primary tuberculosis in axillary lymph nodes: a report of a rare case[J]. Breast Dis, 2015, 35(3): 195-198
- [17] Seyednejad N, Kuusk U, Wiseman SM. Axillary reverse lymphatic mapping in breast cancer surgery: a comprehensive review[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2014, 14(7): 771-781
- [18] Nagashima S, Sakurai K, Suzuki S, et al. Axillary Lymph Nodes Metastases from Occult Breast Cancer Recurrence at Ten Years after Resection--Case Report [J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2015, 42(12): 1776-1778
- [19] Liang Y, Yi L, Liu P, et al. CX3CL1 involves in breast cancer metastasizing to the spine via the Src/FAK signaling pathway [J]. J Cancer, 2018, 9(19): 3603-3612
- [20] Hu C, Fan F, Qin Y, et al. Redox-Sensitive Folate-Conjugated Polymeric Nanoparticles for Combined Chemotherapy and Photothermal Therapy Against Breast Cancer [J]. J Biomed Nanotechnol, 2018, 14(12): 2018-2030
- [21] Jiang L, Gilbert J, Langley H, et al. Breast cancer detection method, diagnostic interval and use of specialized diagnostic assessment units across Ontario, Canada [J]. Health Promot Chronic Dis Prev Can, 2018, 38(10): 358-367
- [22] Berardi DE, Bessone MI, Motter A, et al. Involvement of protein kinase C α and δ activities on the induction of the retinoic acid system in mammary cancer cells[J]. Mol Carcinog, 2015, 54(10): 1110-1121
- [23] Magaki M, Ishii H, Yamasaki A, et al. A high-fat diet increases the incidence of mammary cancer in Ha-ras proto-oncogene transgenic rats[J]. J Toxicol Pathol, 2017, 30(2): 145-152
- [24] Rossetti S, Ren M, Visconti N, et al. Tracing anti-cancer and cancer-promoting actions of all-trans retinoic acid in breast cancer to a RAR α epigenetic mechanism of mammary epithelial cell fate[J]. Oncotarget, 2016, 7(52): 87064-87080
- [25] Razek AA, Lattif MA, Denewer A, et al. Assessment of axillary lymph nodes in patients with breast cancer with diffusion-weighted MR imaging in combination with routine and dynamic contrast MR imaging[J]. Breast Cancer, 2016, 23(3): 525-532
- [26] Beek MA, Verheul NC, Luiten EJ, et al. Two decades of axillary management in breast cancer[J]. Br J Surg, 2015, 102(13): 1658-1664
- [27] Al-Hilli Z, Hieken TJ, Boughey JC. Axillary Ultrasound in the Management of the Newly Diagnosed Breast Cancer Patient [J]. Breast J, 2015, 21(6): 634-641
- [28] Zhou X, Zheng Z, Xu C, et al. Disturbance of Mammary UDP-Glucuronosyltransferase Represses Estrogen Metabolism and Exacerbates Experimental Breast Cancer[J]. J Pharm Sci, 2017, 106(8): 2152-2162
- [29] Yoshizawa K, Yuki M, Kinoshita Y, et al. Characterization of mammary adenocarcinomas in male rats after N-methyl-N-nitrosourea exposure--Potential for human male breast cancer model[J]. Exp Toxicol Pathol, 2016, 68(5): 263-270
- [30] 寇德强,迟崇巍,徐虎,等. 吡喹酮联合亚甲蓝在乳腺癌前哨淋巴结活检中的临床应用 [J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(19): 3686-3689
- (上接第 656 页)
- [28] Chang Q, Bournazou E, Sansone P, et al. The IL-6/JAK/Stat3 feed-forward loop drives tumorigenesis and metastasis [J]. Neoplasia, 2013, 15(7): 848
- [29] 陈敏. 非小细胞肺癌患者 EGFR 突变状态与临床分期的关系及 EGFR-TKIs 疗效预测因素探索的多中心临床回顾性研究[D]. 南方医科大学, 2016
- [30] 黄东明, 冯国生. 分子靶向药物联合治疗 EGFR-TKIs 继发性耐药肺癌的研究进展[J]. 中国临床新医学, 2016, 9(8): 748-752
- [31] 吴秀奇, 蒋华, 李宗海. 成胶质细胞瘤中 EGFR 靶向治疗耐药机制的研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43(2): 224-228
- [32] 郭雪玲. EGFRvIII 多肽致敏的 DC-CTL 对 EGFRvIII $^{+}$ 胶质瘤细胞的体外杀伤作用[D]. 河南大学, 2014
- [33] Liu X, Liu K, Qin J, et al. C/EBP β promotes angiogenesis through secretion of IL-6, which is inhibited by genistein, in EGFRvIII-positive glioblastoma [J]. International Journal of Cancer, 2015, 136(11): 2524-2534