

网络出版时间: 2020/5/29 13:03 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200527.1643.009.html>

白细胞介素-11 对胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭的影响

纪兴虎, 卞尔保, 徐雅娣, 程 梦, 张正伟, 孙立波, 陈 杰, 赵 兵

摘要 目的 探讨白细胞介素-11(IL-11)在胶质瘤中的表达及其对胶质瘤增殖、迁移、侵袭的影响。方法 qRT-PCR 分别检测临床样本、胶质瘤细胞系及 IL-11 敲减质粒(shIL-11)转染后的人胶质瘤细胞系 SF126 中 IL-11 mRNA 的表达水平。shIL-11 或重组人 IL-11(rhIL-11)处理 SF126 细胞,用克隆形成实验检测细胞增殖能力,Transwell 实验检测胶质瘤细胞的迁移及侵袭能力。结果 胶质瘤组织及人胶质瘤细胞系中 IL-11 mRNA 的表达上调;克隆形成实验和 Transwell 实验结果表明 IL-11 的敲低抑制了胶质瘤细胞的增殖、迁移及侵袭;rhIL-11 处理 SF126 细胞促进了细胞的增殖、迁移及侵袭。结论 IL-11 在胶质瘤中表达上调并促进胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

关键词 胶质瘤; 白细胞介素-11; 增殖; 迁移; 侵袭

中图分类号 R 739.41

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)06-0865-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.06.009

胶质瘤是最常见的成人中枢神经系统恶性肿瘤,手术是最常见的治疗方法,术后常辅助放疗和化疗^[1]。但是由于肿瘤浸润生长的特点,手术不能完全切除,因此术后复发率和死亡率高^[2]。

白细胞介素 11(interleukin-11, IL-11)是系统发育相关细胞因子 IL-6 家族的一员。与该细胞因子家族的成员一样,IL-11 可以与广泛表达的 GPI30 亚基形成受体复合物,从而激活 JAK 信号转导子和 STAT3 通路^[3]。IL-11 是由多种细胞在炎症刺激下而产生,并参与刺激红细胞生成、神经发生和血小板的成熟。近年来的研究^[3-5]表明 IL-11 在多种肿瘤的生物医学进展中发挥巨大作用,其在肿瘤中的过表达促进肿瘤的增殖及迁移与侵袭能力。IL-11 在肿瘤中的作用受到许多学者的关注,然而 IL-11 在胶质瘤中是否发挥作用仍然没有研究报道。该研究前期实验显示,与正常脑组织相比,IL-11 在胶质瘤组

织中表达升高。为了进一步探索 IL-11 在胶质瘤中的作用机制,该实验以 SF126 细胞作为实验对象,探究了 IL-11 对胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂 IL-11 敲减质粒(shIL-11)由上海吉凯基因合成;IL-11 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成;重组人 IL-11(rhIL-11)(美国 Proteintech 公司),LipofectamineTM2000 及 TRIzol(美国 Invitrogen 公司),PrimeScriptTMRT Master Mix 逆转录试剂盒及 SYBR Green PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司),胎牛血清 FBS(美国 Gibco 公司),高糖培养基 DMEM(美国 Hyclone 公司),胰蛋白酶(上海碧云天科技公司),基质胶(美国 BD 公司),Transwell 小室(美国 Corning 公司)。

1.2 仪器 恒温培养箱(NAPCO-8800,美国 SHEL-LAB 公司),倒置显微镜(TS100,日本 Nikon 公司),超净工作台(SW-9800,苏州净化设备公司),逆转录仪(FlexCycler,德国 ANALYTIKJENA 公司),实时定量 PCR 仪(CFX ConnectTM,美国 Bio-rad 公司)。

1.3 细胞系及培养方法 人胶质瘤细胞 SF126 和正常人脑星形胶质细胞 HEB 购自上海中国科学院。细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 中(培养条件:37℃、5% CO₂ 恒温培养箱)。在倒置显微镜下观察,当细胞汇合率达到 80% 以上时进行细胞传代。

1.4 方法

1.4.1 qRT-PCR 实验检测细胞 mRNA 表达 用 TRIzol 法提取细胞总 RNA,并按 10 μl 反应体系进行逆转录:PrimeScriptTMRT Master Mix 2 μl,总 RNA 量 600 ng,加无酶水至 10 μl,根据逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录成 cDNA。最后以 cDNA 为模板使用对应引物进行目的基因的扩增,反应体系为 10 μl: cDNA 1.6 μl,特异性引物 3.2 μl,SYBR 5.2 μl。以 GAPDH 作为内参。引物序列如下:IL-11,5'-GCTGCAAGGTCAAGATGGTT-3'(正向引物)和 5'-GCTGGGTGGCGTTCTATC-3'(反向引物);GAPDH,

2020-04-02 接收

基金项目:安徽省重点研究与开发计划(编号:1804h08020270);国家自然科学基金(编号:81972348)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院神经外科,合肥 230601

作者简介:纪兴虎,男,硕士研究生;

赵 兵,男,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:aydzhb@126.com

5'-AGCAAGAGCACAAGAGGAAG-3' (正向引物) 和 5'-GGTTGAGCACAGGGTACTTT-3' (反向引物)。qRT-PCR 反应条件为: 预变性 95 °C、10 min, 变性 95 °C、15 s, 退火 60 °C、60 s, 循环 40 次。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算对应 mRNA 的表达。

1.4.2 shIL-11 质粒转染 SF126 细胞 将处于对数期生长的细胞接种于 6 孔板中 (1×10^6 个/ml), 于第 2 天细胞贴壁后按 Lip2000 试剂说明书转染 shIL-11, 于 4 h 后换液, PBS 清洗 6 孔板 2 次, 用含 10% FBS 的 DMEM 的培养基继续培养 48 h 后收集细胞进行后续实验。将 shIL-11 质粒转染后的 SF126 细胞设为 shIL-11 组, 并将转染空载质粒的细胞作为对照组即 NC 组。

1.4.3 克隆形成实验检测细胞增殖能力 取预处理的细胞胰酶消化, 按 1×10^3 个/孔接种于 6 孔板中, 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中继续培养 7 d (培养期间需更换培养基)。结束培养后, 倒掉培养基用 PBS 清洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定细胞 20 min, 再次用 PBS 清洗, 之后用 0.1% 结晶紫染色 30 min, 计算克隆细胞数。使用 ImageJ 软件计算克隆形成细胞数目, 每组设置 3 个重复孔。

1.4.4 Transwell 实验检测细胞迁移及侵袭能力 将预处理的细胞用胰酶消化, 并用无血清培养基制备成细胞悬液。将 100 μ l 含 5×10^4 个细胞的悬液加到小室上层, 在小室下层加入含 30% FBS 的培养基 600 μ l。于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中继续培养 24 h 后, 将小室取出, 用棉签擦去小室上层细胞, PBS 清洗 3 次, 加入 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min, 再次用 PBS 清洗小室, 用 0.1% 结晶紫染色 15 min, 清洗并晾干后于显微镜下观察, 统计穿膜细胞数目。细胞侵袭能力的检测需要预先在小室上层加入 1:5 稀释后的基质胶 (预先 4 °C 过夜融化), 并置于 37 °C 培养箱干燥 30 min, 待胶凝固后加入 1×10^5 个细胞于小室内, 培养 48 h, 之后的步骤与迁移实验相同。使用 ImageJ 软件计算穿膜细胞数目, 每组设置 3 个重复小室。

1.5 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件对结果进行分析, 每组数据重复 3 次, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组样本之间采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-11 在胶质瘤中的表达 收集临床胶质瘤样本与正常脑组织样本, 通过 qRT-PCR 分析 IL-11

的表达。结果显示 IL-11 在胶质瘤样本中的表达高于正常脑组织, 差异有统计学意义 ($t = 4.77$, $P < 0.01$), 见图 1A。在本研究中选取正常人脑星形胶质细胞 HEB 与人胶质瘤细胞 SF126, 并检测了两种细胞系中 IL-11 的 mRNA 表达水平, 结果显示 SF126 细胞的 IL-11 mRNA 相对表达水平高于 HEB 细胞, 差异有统计学意义 ($t = 13.43$, $P < 0.001$), 见图 1B。

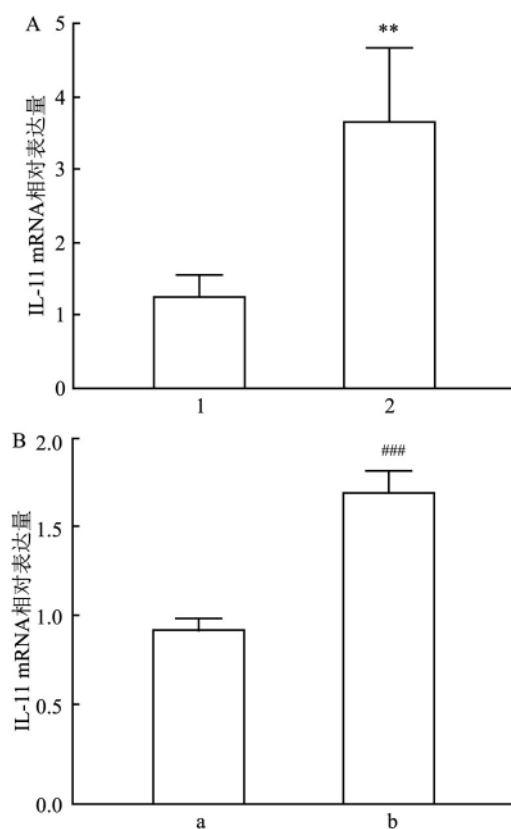


图1 IL-11在胶质瘤中的表达

A: 胶质瘤组织与正常脑组织中 IL-11 的相对表达量; B: IL-11 在 HEB 与 SF126 2 种细胞系中 mRNA 的表达量; 1: 正常脑组织; 2: 胶质瘤组织; a: HEB 细胞; b: SF126 细胞; 与正常脑组织比较: ** $P < 0.01$; 与 HEB 细胞比较: ### $P < 0.001$

2.2 qRT-PCR 法检测 shIL-11 转染胶质瘤细胞 SF126 后 IL-11 的表达 qRT-PCR 技术检测细胞 IL-11 的 mRNA 表达情况。如图 2 所示, 与 NC 组相比, shIL-11 组中 IL-11 的表达下调, 差异有统计学意义 ($t = 6.46$, $P < 0.05$)。表明 shIL-11 转染 SF126 细胞可成功下调细胞中 IL-11 表达水平。

2.3 IL-11 促进 SF126 细胞的增殖 克隆形成实验检测细胞的增殖能力。shIL-11 转染 SF126 细胞后将细胞培养于 6 孔板内, 于第 7 天进行检测。结果显示: shIL-11 组的克隆细胞数少于 NC 组, 差异有统计学意义 ($t = 4.40$, $P < 0.05$), 见图 3A、C。此

外,用 rhIL-11 (60 ng/ml) 处理 SF126 细胞并于 6 孔板内培养 7 d。克隆形成实验结果表明: IL-11 组克隆细胞数相对空白对照组增多,差异有统计学意义 ($t = 8.38$, $P < 0.01$),见图 3B、D。上述结果提示,IL-11 促进胶质瘤细胞的增殖能力。

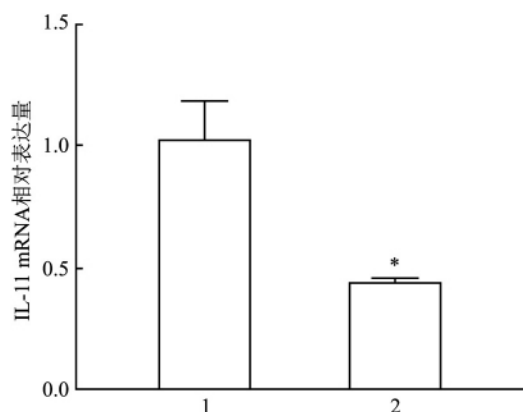


图2 shIL-11 转染 SF126 细胞后 IL-11 的相对表达量

1: NC 组; 2: shIL-11 组; 与 NC 组比较: * $P < 0.05$

2.4 IL-11 促进 SF126 细胞的迁移和侵袭能力

Transwell 实验检测细胞的迁移和侵袭能力。结果显示,与 NC 组相比,shIL-11 组细胞迁移能力受到抑制,差异有统计学意义 ($t = 5.96$, $P < 0.01$),见图 4A、C。与此相似,敲减处理后的 SF126 细胞侵袭能力同样被抑制,差异有统计学意义 ($t = 10.51$, $P < 0.001$),见图 4B、C。之后的研究中用浓度为 60 ng/ml 的 IL-11 处理 SF126 细胞。Transwell 结果显示,与空白对照组相比较,IL-11 组细胞的迁移数增加,差异有统计学意义 ($t = 8.38$, $P < 0.01$),见图 5A、C。相似的,与空白对照组比,IL-11 处理后的细胞侵袭细胞数增加,差异有统计学意义 ($t = 7.83$, $P < 0.01$),见图 5B、C。

3 讨论

胶质瘤是成人最常见且具高度侵袭性的原发性肿瘤^[6]。尽管近些年胶质瘤在治疗方面取得了不错的进展,但是由于肿瘤本身生长迅速且呈浸润性生长的特点,患者预后不理想且常规治疗的中位生存期不足 15 个月^[7]。肿瘤的高度浸润性是恶性胶质瘤最突出的生物学特征,也是引起肿瘤频繁复发和预后不佳的主要原因^[8]。因此,探讨胶质瘤增殖和侵袭的分子机制已成为胶质瘤诊断和治疗的热点。

IL-11 是 IL-6 细胞因子家族的一员,与该家族细胞成员共享受体亚基 gp130^[9]。IL-11 是在骨髓

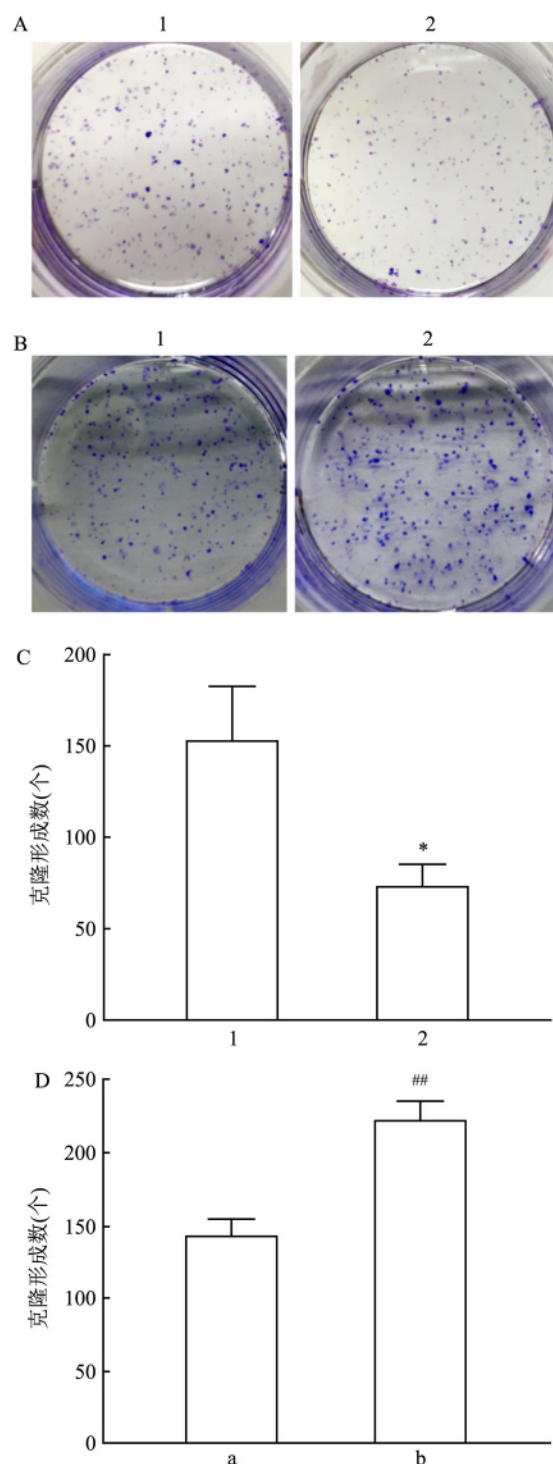


图3 IL-11 对 SF126 细胞增殖的影响

A、C: 克隆形成实验检测 shIL-11 转染 SF126 细胞对增殖的影响; B、D: 克隆形成实验检测 60 ng/ml IL-11 处理 SF126 细胞后对增殖的影响; 1: NC 组; 2: shIL-11 组; a: 空白对照组; b: IL-11 组; 与 NC 组比较: * $P < 0.05$; 与空白对照组比较: ## $P < 0.01$

基质细胞培养基中首次发现,之后的研究^[4]表明在成骨细胞、滑膜细胞、成纤维细胞、软骨细胞、滋养细胞、肝细胞、胃肠道上皮细胞等细胞中也有表达,但

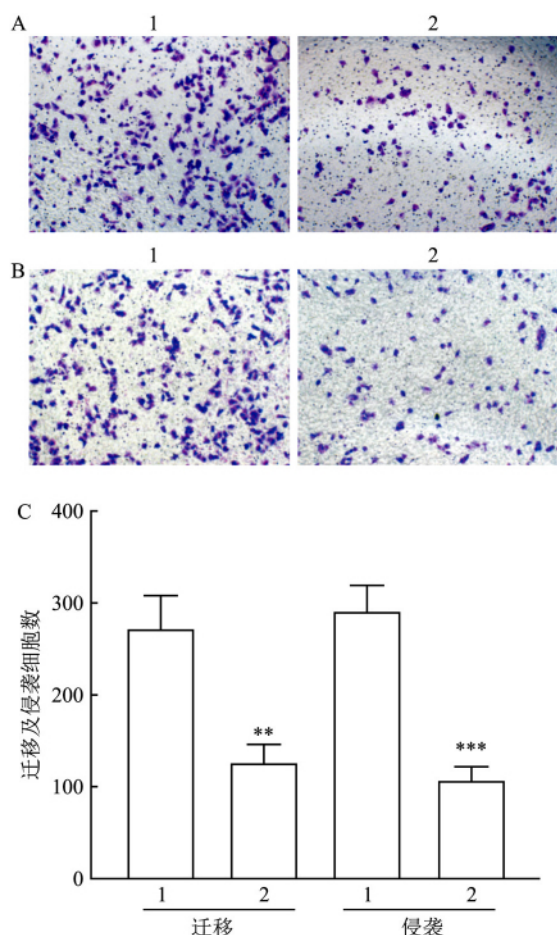


图4 shIL-11 转染 SF126 细胞对迁移和侵袭的影响 结晶紫染色 $\times 100$

A: shIL-11 转染 SF126 细胞对迁移的影响; B: shIL-11 转染 SF126 细胞对侵袭的影响; C: 迁移与侵袭实验数据统计图; 1: NC 组; 2: shIL-11 组; 与 NC 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

IL-11 分泌的主要来源仍不清楚。IL-11 是一种多效性细胞因子,传统上认为 IL-11 可以起到抗感染、抗凋亡的作用,也有促炎细胞因子的作用,提示其在免疫应答中的复杂功能^[4,10]。但是在近几年的研究^[4]中发现,IL-11 参与多种肿瘤的恶性进展,包括胃癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、乳腺癌和子宫内膜癌等。IL-11 在胃癌患者肿瘤组织中的表达水平升高是一种常见的现象,并与肿瘤的进展相关^[11]。Yang et al^[12] 研究发现,IL-11 在食管鳞癌中高表达且促进肿瘤的增殖和侵袭,而敲减 IL-11 可以抑制肿瘤的进展。在乳腺癌中 IL-11 的高表达将会促进乳腺癌的增殖与侵袭^[13]。此外,Liang et al^[14] 研究证明抑制 IL-11-STAT3 信号轴将会减少乳腺癌的生长和转移。然而 IL-11 是否参与胶质瘤增殖与侵袭过程仍未有研究报道。

在本研究中,qRT-PCR检测胶质瘤样本与正常

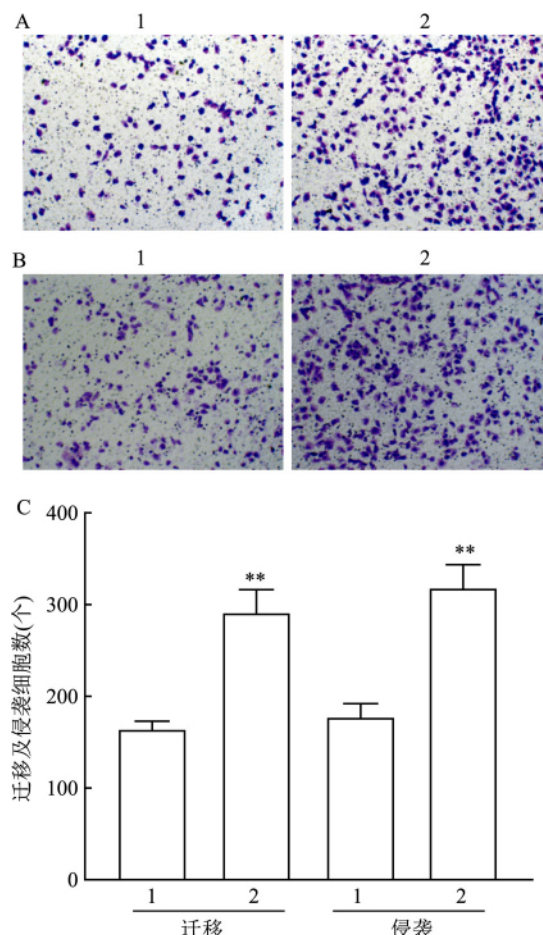


图5 IL-11 对 SF126 细胞迁移和侵袭的影响 结晶紫染色 $\times 100$

A: 60 ng/ml IL-11 处理 SF126 细胞对迁移的影响; B: 60 ng/ml IL-11 处理 SF126 细胞后对侵袭的影响; C: 迁移与侵袭实验数据统计图; 1: 空白对照组; 2: IL-11 组; 与空白对照组比较: ** $P < 0.01$

脑组织样本中 IL-11 的表达,结果显示胶质瘤中 IL-11 的表达高于正常脑组织。同样在胶质瘤细胞系中 IL-11 也呈现出高表达。为了探究 IL-11 在胶质瘤增殖、迁移与侵袭过程中所发挥的作用,本实验构建了 shIL-11 质粒用于敲低胶质瘤细胞中 IL-11 的表达。qRT-PCR 结果显示,与 NC 组比,shIL-11 组中 mRNA 表达下调。后续研究证明敲低 IL-11 可抑制 SF126 细胞的增殖、迁移与侵袭能力。此外,用 rhIL-11 处理 SF126 细胞,实验结果表明 IL-11 处理细胞后促进了胶质瘤细胞的增殖与侵袭性。

综上,本研究初步证明在胶质瘤中 IL-11 表达水平升高,而高表达的 IL-11 促进胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。但是 IL-11 是通过什么分子机制来促进胶质瘤的恶性进展仍没有研究。在之前的研究中,Liang et al^[14] 证明 IL-11 通过调节 STAT3 的表达来改变乳腺癌的迁移侵袭能力。因此在之后的研究中,课题组将深入探讨 IL-11 促进胶质瘤增殖和

侵袭能力的具体分子机制,为探索以 IL-11 为靶点的分子免疫治疗提供新的思路和方法。

参考文献

- [1] Reni M ,Mazza E ,Zanon S ,et al. Central nervous system gliomas [J]. *Crit Rev Oncol Hematol* ,2017 ,113: 213 – 34.
- [2] Zhang K ,Sun X ,Zhou X ,et al. Long non-coding RNA HOTAIR promotes glioblastoma cell cycle progression in an EZH2 dependent manner[J]. *Oncotarget* ,2015 ,6(1) : 537 – 46.
- [3] Grivennikov S I. IL-11: a prominent pro-tumorigenic member of the IL-6 family [J]. *Cancer Cell* ,2013 ,24(2) : 145 – 7.
- [4] Xu D H ,Zhu Z ,Wakefield M R ,et al. The role of IL-11 in immunity and cancer[J]. *Cancer Lett* 2016 ,373(2) : 156 – 63.
- [5] Yang L ,Gao Q ,Wu X ,et al. Long noncoding RNA HEGBC promotes tumorigenesis and metastasis of gallbladder cancer via forming a positive feedback loop with IL-11/STAT3 signaling pathway [J]. *J Exp Clin Cancer Res* 2018 ,37(1) : 186.
- [6] Tang F ,Wang H ,Chen E ,et al. LncRNA-ATB promotes TGF- β -induced glioma cells invasion through NF- κ B and P38/MAPK pathway [J]. *J Cell Physiol* ,2019 ,234(12) : 23302 – 14.
- [7] 徐雅娣 ,赵 兵 ,卞尔保 等. DNMT1 抑制剂 DC_517 对胶质瘤细胞增殖和侵袭的影响 [J]. *安徽医科大学学报* ,2019 ,54(11) : 1692 – 7.
- [8] Su R ,Cao S ,Ma J ,et al. Knockdown of SOX2OT inhibits the malignant biological behaviors of glioblastoma stem cells via up-regulating the expression of miR-194-5p and miR-122 [J]. *Mol Cancer* ,2017 ,16(1) : 171.
- [9] Ernst M ,Putoczki T L. Molecular pathways: IL11 as a tumor-promoting cytokine-translational implications for cancers [J]. *Clin Cancer Res* ,2014 ,20(22) : 5579 – 88.
- [10] 徐 峰 ,丁西平 ,殷 实. 白介素-11 在早期胃癌组织中的表达及临床意义 [J]. *安徽医科大学学报* 2016 ,51(9) : 1353 – 5.
- [11] Balic J J ,Garbers C ,Rose-John S ,et al. Interleukin-11-driven gastric tumorigenesis is independent of trans-signalling [J]. *Cytokine* ,2017 ,92: 118 – 23.
- [12] Yang S M ,Li S Y ,Hao-Bin Y ,et al. IL-11 activated by lnc-ATB promotes cell proliferation and invasion in esophageal squamous cell cancer [J]. *Biomed Pharmacother* ,2019 ,114: 108835.
- [13] Johnstone C N ,Chand A ,Putoczki T L ,et al. Emerging roles for IL-11 signaling in cancer development and progression: Focus on breast cancer [J]. *Cytokine Growth Factor Rev* ,2015 ,26(5) : 489 – 98.
- [14] Liang M ,Ma Q ,Ding N ,et al. IL-11 is essential in promoting osteolysis in breast cancer bone metastasis *via* RANKL-independent activation of osteoclastogenesis [J]. *Cell Death Dis* ,2019 ,10(5) : 353.

Effect of interleukin-11 on proliferation , migration and invasion of glioma cells

Ji Xinghu ,Bian Erbao ,Xu Yadi ,et al

(*Dept of Neurosurgery ,The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230601*)

Abstract Objective To investigate the expression of interleukin-11(IL-11) in glioma and its effect on glioma proliferation , migration and invasion. **Methods** qRT-PCR was performed to determine the expression levels of IL-11 in clinical samples , glioma cell lines and SF126 cells transfected with IL-11 knockdown plasmid. SF126 glioma cells were transfected with IL-11 knockdown plasmid (shIL-11) or treated with recombinant human IL-11 (rhIL-11) , and then the colony formation assay was performed to detect the proliferation of glioma cells , and Transwell assay was used to detect cell migration and invasion. **Results** The expression of IL-11 mRNA in glioma tissue was higher than that in normal brain tissue. Colony formation assay and transwell assay indicated that knockdown of IL-11 inhibited proliferation , migration and invasion of glioma cells. In contrast , SF126 cells treated with rhIL-11 significantly promoted proliferative , invasive and migratory capacity. **Conclusion** IL-11 is upregulated in glioma cells and promotes proliferation , migration and invasion ability.

Key words glioma; interleukin-11; proliferation; migration; invasion