

网络出版时间: 2017-5-22 17:45 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170522.1745.001.html>

◇基础医学研究◇

脂多糖对人肝内胆管上皮细胞 IL-6/STAT3 信号通路的影响

朱明远 余宏铸

摘要 目的 探讨脂多糖(LPS)对正常人肝内胆管上皮细胞(HiBECs)白介素(IL)-6/STAT3信号通路的影响。方法

HiBECs细胞常规体外培养,使用不同浓度的LPS(0、0.1、1、2、4、8 μg/ml),分别作用该细胞24、48、72 h后,ELISA法检测IL-6的表达水平,确定LPS的最适刺激浓度及最佳刺激时间,再以其进行后续实验;RT-qPCR法测定c-Myc mRNA、Mcl-1 mRNA的表达情况;Western blot法测定p-STAT3/STAT3蛋白比例及c-Myc、Mcl-1蛋白的表达情况。结果LPS能够促进HiBECs细胞IL-6分泌,并且在4 μg/ml、24 h时IL-6的分泌量达最大($F=16.492, 17.763, P<0.001, P<0.01$);LPS刺激HiBECs细胞后,c-Myc mRNA、Mcl-1 mRNA表达上调($P<0.01$);p-STAT3/STAT3蛋白比例增高($P<0.05$) c-Myc($P<0.001$)、Mcl-1($P<0.05$)蛋白表达增多。结论LPS能够激活HiBECs细胞IL-6/STAT3信号通路,并且可能通过该信号通路促进Mcl-1、c-Myc的表达。

关键词 脂多糖;IL-6;信号转导和转录活化因子3;Mcl-1;c-Myc

中图分类号 R 349.54

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)07-0941-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.07.001

肝内胆管细胞癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)是指起源于二级以上肝内胆管上皮细胞的恶性肿瘤,是继肝细胞性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)后第二大常见的原发性肝脏恶性肿瘤,约占所有类型胆管癌的8%^[1],并可能与革兰阴性菌导致的胆道感染有关。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是该类细菌胞壁中特有的化学成分,能够促进人肝内胆管上皮细胞(human intrahepatic biliary epithelial cells, HiBECs)分泌白介素(interleukin, IL)-6^[2]。目前的研究^[3]证实,IL-6/信号转导与转录激活因子3(signal transducer and activator of

transcription 3, STAT3)信号通路与包括ICC在内的多种恶性肿瘤的发病机制有关。关于该信号通路的研究,既往已有相关动物模型及肿瘤细胞株中的实验^[4-5],但未见在正常细胞株中的实验。该研究拟在体外培养条件下,使用LPS刺激HiBECs,检测IL-6/STAT3信号通路中相关基因及蛋白质的表达情况,以期进一步明确正常胆管细胞的感染与ICC之间可能存在的相关机制,为其防治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 HiBECs购自上海拜力生物科技有限公司;RPMI 1640培养基、胎牛血清购自美国Gibco公司;人IL-6 ELISA试剂盒购自上海源叶生物科技有限公司;LPS购自美国Sigma公司;RIPA裂解液、鼠抗β-actin购自上海碧云天生物技术有限公司;兔抗Mcl-1单克隆抗体、兔抗c-Myc单克隆抗体、兔抗磷酸化的STAT3(phosphorylation-STAT3, p-STAT3)单克隆抗体、兔抗STAT3单克隆抗体购自美国Abcam公司;山羊抗鼠二抗、山羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物有限公司;MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction试剂盒、PrimeScript™ II 1st Strand cDNA合成试剂盒、SYBR® Fast qPCR Mix购自日本TaKaRa公司。

1.2 细胞培养 在RPMI 1640培养基中加入10%胎牛血清、青霉素(100 U/ml)、链霉素(100 μg/ml)形成完全培养基。用该完全培养基在37℃、5%CO₂环境下对HiBECs细胞进行培养,当细胞汇合度达70%~80%时进行传代。

1.3 ELISA 为测定LPS刺激对HiBECs细胞IL-6表达的影响,并进一步明确LPS的时效量效关系,采用ELISA法检测IL-6的表达水平。将细胞以每孔 1×10^5 /ml接种于24孔板,每孔1 ml,过夜贴壁,弃上清液。换成含有不同浓度LPS(0、0.1、1、2、4、8 μg/ml)的培养基,分别培养24、48、72 h后收上清液,按ELISA试剂盒说明书检测IL-6的表达水平。

1.4 RT-qPCR 取处理后的HiBECs细胞,用RNA提取试剂盒提取细胞的总RNA,逆转录成cDNA

2017-04-10 接收

基金项目:安徽省年度重点科研计划项目(编号:1301043034)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院肝胆外科,合肥 230022

作者简介:朱明远,男,硕士研究生;

余宏铸,男,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: hong-zhu.620929@aliyun.com

后,采用荧光定量 PCR 方法检测 *c-Myc*、*Mcl-1* mRNA 表达情况。特异性引物序列由上海生工生物工程公司合成,引物序列见表 1。PCR 反应条件:94 °C 预变性 30 s,1 个循环,随后 94 °C 变性 5 s,60 °C 退火延伸 20 s,共 50 个循环。

表 1 引物序列

基因	引物序列(5'-3')	片段长度 (bp)
<i>Mcl-1</i>	F:AGAGGAGGAGGAGACGAGTTGTA	101
	R:TGCCATTGGCTTTGTGTC	
<i>c-Myc</i>	F:GTCAGTTCGGAAGGCTGTA	161
	R:AATCGGAGTTGGAATCAGTCAC	
β -actin	F:CCTCCGCTTTGCCGATCC	120
	R:GGATCTTCATGAGTACTCAGTC	

1.5 Western blot 细胞接种于 6 孔板,孵育过夜,将细胞分为对照组和药物处理组。药物处理组加入含 LPS (4 $\mu\text{g/ml}$) 的 RPMI 1640 培养基,对照组加入 RPMI 1640 培养基,刺激 24 h。待处理结束后,使用冰 PBS 洗涤 2 遍,RIPA 裂解液(含 PMSF 1 $\mu\text{mol/L}$)冰上裂解 30 min。12 000 r/min、4 °C、离心 10 min,上清液即总蛋白。采用 Lowry 法测定蛋白浓度。加入 4 \times 上样 Buffer 混合,沸水浴中煮沸 5 min。经 SDS-PAGE 分离后转印至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后,孵育 STAT3 (1 :1 000)、p-STAT3 (1 :100 000)、*c-Myc* (1 :10 000)、*Mcl-1* (1 :1 500)、 β -actin (1 :1 000) 一抗,4 °C 过夜。TBST 洗涤 3 遍,然后在 37 °C 条件下,再分别孵育 HRP 标记的抗兔、抗鼠二抗 1 h,TBST 洗涤 3 遍,使用化学发光法进行曝光。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行数据分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组数据间比较采用 *t* 检验,多组数据间比较采用随机区组方差分析。

2 结果

2.1 LPS 对 IL-6 表达的影响 ELISA 结果显示:LPS 刺激能够促进 IL-6 分泌,并呈一定的时效量效关系,见表 2。同时观察到当 LPS 浓度为 4 $\mu\text{g/ml}$ ($F=16.492, P<0.001$),刺激 24 h 时 ($F=17.763, P<0.01$),IL-6 的浓度达高峰,并且随着浓度的升高,时间的延长,IL-6 的浓度逐渐降低,见图 1。因此,后续实验均采用 LPS 4 $\mu\text{g/ml}$ 、刺激 24 h 的实验结果。

2.2 LPS 刺激对 *c-Myc* mRNA、*Mcl-1* mRNA 表达的影响 RT-qPCR 结果显示,与对照组相比,LPS (4

$\mu\text{g/ml}$ 、24 h) 作用于 HiBECs 细胞后,*c-Myc* mRNA、*Mcl-1* mRNA 表达明显上调,差异有统计学意义 ($P<0.01$)。见图 2。

表 2 LPS 刺激对 HiBECs 细胞 IL-6 分泌的影响 (pg/ml $n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h
对照	28.25 \pm 1.22	27.33 \pm 1.97	26.06 \pm 1.59
药物处理 ($\mu\text{g/ml}$)			
0.1	35.54 \pm 1.48	34.76 \pm 2.29	28.91 \pm 1.87
1	41.88 \pm 2.51 **	37.32 \pm 3.09 **	31.13 \pm 3.61 **
2	43.17 \pm 2.68 ***	40.65 \pm 2.93 ***	35.89 \pm 2.64 ***
4	51.48 \pm 2.44 ***	43.16 \pm 4.34 ***	37.80 \pm 3.36 ***
8	44.35 \pm 3.40 **	34.42 \pm 2.33 **	33.76 \pm 2.55 **

与对照组比较: ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

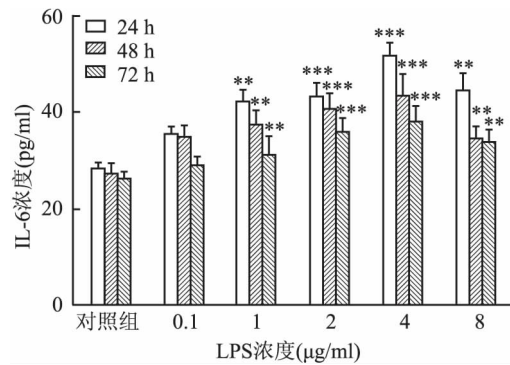


图 1 ELISA 检测 LPS 分别作用不同时间后对 HiBECs 细胞分泌 IL-6 的影响

与对照组比较: ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

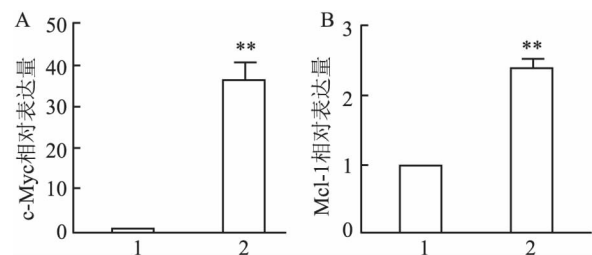


图 2 RT-qPCR 检测 LPS 刺激对 *c-Myc* mRNA、*Mcl-1* mRNA 表达的影响

A:*c-Myc*; B:*Mcl-1*; 1:对照组; 2:药物处理组 (4 $\mu\text{g/ml}$); 与对照组比较: ** $P<0.01$

2.3 LPS 刺激对 p-STAT3/STAT3 蛋白比例及 *c-Myc*、*Mcl-1* 蛋白表达的影响 Western blot 结果显示,应用 LPS (4 $\mu\text{g/ml}$ 、24 h) 处理细胞后,与对照组相比,p-STAT3/STAT3 蛋白比例及 *c-Myc*、*Mcl-1* 蛋白相对表达量均显著增高,差异有统计学意义 ($P<0.05, P<0.001, P<0.05$),见图 3。

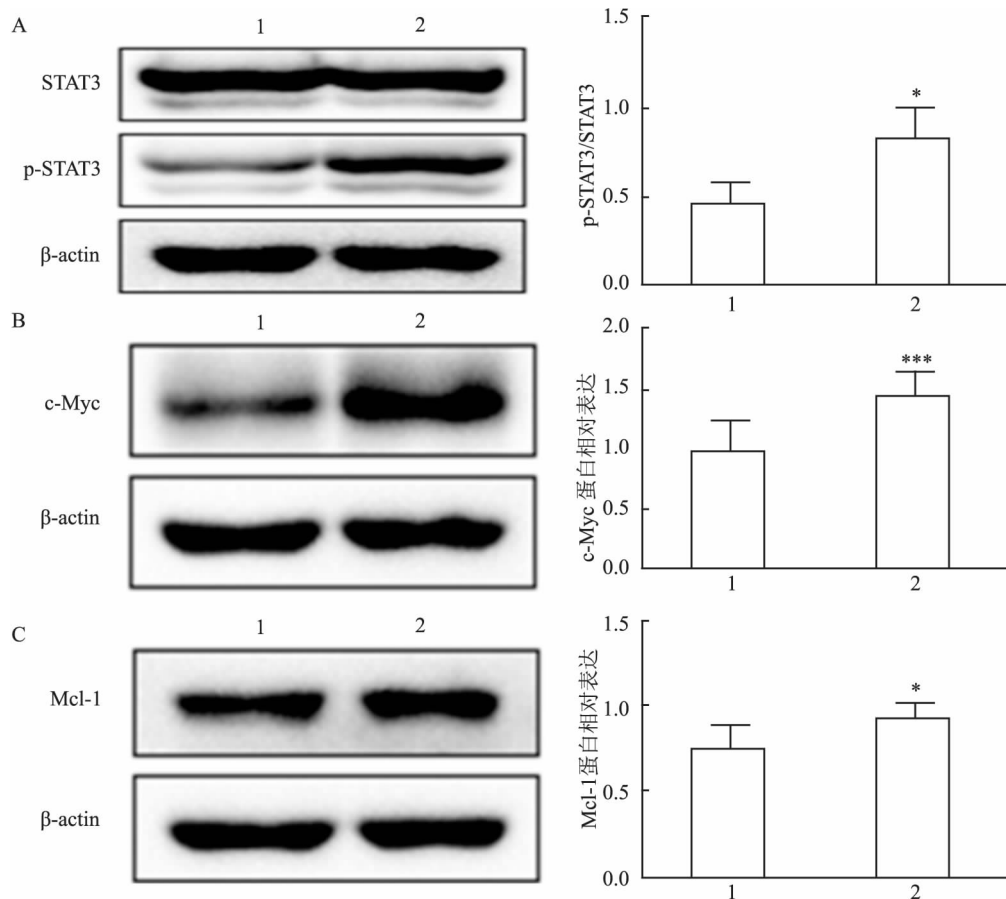


图3 Western blot法检测p-STAT3/STAT3蛋白比例及c-Myc、Mcl-1蛋白表达情况

A:p-STAT3/STAT3;B:c-Myc;C:Mcl-1;1:对照组;2:药物处理组(4 μg/ml);与对照组比较:* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$

3 讨论

在我国,肝内胆管结石是ICC发生的重要危险因素。据报道,有5.2%的肝内胆管结石的患者可能最终发展成ICC^[6]。这可能与结石引起的胆汁淤积及反复胆道感染有关;长期的慢性炎症使肝内胆管上皮细胞暴露于多种炎症介质中,如LPS、IL-6、IL-1 β 和肿瘤坏死因子 α ;这些细胞因子是胆管细胞损伤和增殖的基础。LPS作为革兰阴性菌细胞壁的重要组成部分,主要依赖TLR4/NF- κ B信号通路的介导,促进多种炎症因子的释放,包括IL-6、IL-1和肿瘤坏死因子 α ^[7]。IL-6是衔接炎症和肿瘤最为重要的炎症因子,通过结合细胞表面IL-6R受体,转而与细胞质膜蛋白gp130结合形成二聚体,激活JAK,进而使STAT3蛋白发生磷酸化,激活STAT3信号通路,启动下游相关靶基因转录,如细胞抗凋亡基因(Bcl-2、Mcl-1、Bcl-xl),细胞增殖基因(c-Myc),促血管生成的血管内皮生长因子等,从而发挥其对细胞增殖、凋亡、分化等的调控作用^[3,8]。

IL-6同时也是一种强效的胆管细胞促分裂

素^[9],当胆管细胞受到炎症刺激时,可通过自分泌或旁分泌的方式产生。相关研究^[10]表明,在胆管癌患者的血清和肿瘤基质中,IL-6的表达显著增高。同时,在其他多种胆道系统疾病患者的血清和胆管中,也存在LPS、IL-6表达增高现象,包括胆道感染和胆汁淤积,且随着LPS的降低也将导致IL-6表达减少^[4]。本研究中,与对照组相比,LPS处理组IL-6水平明显增高,LPS能够促进IL-6的分泌,这与相关报道^[2]的结果一致。同时,本研究还确定了LPS的时效量效关系,为后续实验奠定了基础。但和既往研究^[4]结果存在差异,这可能是实验方法及实验对象的不同所造成。

STAT3是STAT家族中最重要的成员,在多种恶性肿瘤及细胞株中存在STAT3的组成性激活,持续活化的STAT3在肿瘤的发生发展过程中发挥关键作用。既往研究^[5]证实,在胆管癌细胞中,STAT3的激活主要依赖IL-6信号的介导,使用抗IL-6抗体能够完全抑制STAT3的磷酸化。相关动物模型^[4]证实,LPS也能通过诱导IL-6/STAT3信号通路的激活,促进胆管上皮细胞增殖。本研究中,LPS处理组

较对照组 p-STAT3 蛋白比例显著增高,充分说明存在 STAT3 的激活,LPS 刺激能够激活 IL-6/STAT3 信号通路,与既往研究^[4]结果一致。可见,不管在细胞水平还是动物水平,LPS 诱导均能激活 IL-6/STAT3 信号通路,从而对下游相关基因进行调控,发挥相应的生理作用。

c-Myc 和 Mcl-1 均属于癌基因,既往对其研究主要集中在恶性肿瘤。c-Myc 是 Myc 基因家族中的一员。在胆管癌中,IL-6 诱导 c-Myc 基因的快速激活主要依赖 STAT3 信号的介导^[11]。同时体外实验证实,下调 c-Myc 的表达有助于降低胆管癌细胞的侵袭性^[12]。表明 c-Myc 在胆管癌的发生发展过程中发挥着重要的作用。而 Mcl-1 是 Bcl-2 家族中的一员,主要通过抗凋亡发挥相应的生理作用。相关研究^[1,5,13]表明,在胆管癌中,IL-6 能够通过 AKT、MAPK、STAT3 信号通路提高 Mcl-1 的表达,可见 IL-6 能够通过多种信号通路调节 Mcl-1 的表达,不同信号通路之间可能存在一定的联系。而本研究则在正常肝内胆管上皮细胞中探讨了 LPS 对 IL-6/STAT3 信号通路活性及其相关下游因子表达的影响。本研究显示,LPS 诱导不仅能激活 IL-6/STAT3 信号通路,而且在 mRNA 和蛋白水平上同时提高了 c-Myc 和 Mcl-1 的表达。结果表明炎症刺激在促使正常胆管上皮细胞向肿瘤细胞转化的过程中,可能扮演了重要的角色。后续研究中,将采用通路阻断实验进一步明确阻断 IL-6/STAT3 信号通路激活对其相关下游基因表达的影响,为肝内胆管结石相关 ICC 的预防及治疗提供实验依据。

综上所述,本研究对 HiBECs 细胞中 IL-6/STAT3 信号通路进行了初步探讨,证实了 LPS 能够诱导该信号通路激活,并可能通过该信号通路上调 c-Myc 和 Mcl-1 的表达。提示了 IL-6/STAT3 信号通路可能是介导炎症和 ICC 的重要枢纽。

参考文献

[1] Rizvi S, Gores G J. Pathogenesis, diagnosis, and management of

cholangiocarcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2013, 145(6): 1215-29.
[2] Park J, Gores G J, Patel T. Lipopolysaccharide induces cholangiocyte proliferation *via* an interleukin-6-mediated activation of p44/p42 mitogen-activated protein kinase[J]. *Hepatology*, 1999, 29(4): 1037-43.
[3] Sia D, Tovar V, Moeini A, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: pathogenesis and rationale for molecular therapies[J]. *Oncogene*, 2013, 32(41): 4861-70.
[4] Chen L P, Cai M, Zhang Q H, et al. Activation of interleukin-6/STAT3 in rat cholangiocyte proliferation induced by lipopolysaccharide[J]. *Dig Dis Sci*, 2009, 54(3): 547-54.
[5] Isomoto H, Kobayashi S, Werneburg N W, et al. Interleukin 6 up-regulates myeloid cell leukemia-1 expression through a STAT3 pathway in cholangiocarcinoma cells[J]. *Hepatology*, 2005, 42(6): 1329-38.
[6] Zhu Q D, Zhou M T, Zhou Q Q, et al. Diagnosis and surgical treatment of intrahepatic hepatolithiasis combined with cholangiocarcinoma[J]. *World J Surg*, 2014, 38(8): 2097-104.
[7] Chen S, Xiong J, Zhan Y, et al. Wogonin inhibits LPS-induced inflammatory responses in rat dorsal root ganglion neurons *via* inhibiting TLR4-MyD88-TAK1-mediated NF-kappaB and MAPK signaling pathway[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2015, 35(4): 523-31.
[8] Momtaz S, Niaz K, Maqbool F, et al. STAT3 targeting by polyphenols: Novel therapeutic strategy for melanoma[J]. *Biofactors*, 2016: [Epub ahead of print].
[9] Zhu H, Han C, Lu D, et al. miR-17-92 cluster promotes cholangiocarcinoma growth: evidence for PTEN as downstream target and IL-6/Stat3 as upstream activator[J]. *Am J Pathol*, 2014, 184(10): 2828-39.
[10] Rizvi S, Gores G J. Molecular pathogenesis of cholangiocarcinoma[J]. *Dig Dis*, 2014, 32(5): 564-9.
[11] Brighenti E, Calabrese C, Liguori G, et al. Interleukin 6 downregulates p53 expression and activity by stimulating ribosome biogenesis: a new pathway connecting inflammation to cancer[J]. *Oncogene*, 2014, 33(35): 4396-406.
[12] Li Z R, Wu Y F, Ma C Y, et al. Down-regulation of c-myc expression inhibits the invasion of bile duct carcinoma cells[J]. *Cell Biol Int*, 2011, 35(8): 799-802.
[13] Wang B, Chen L, Chang H T. Potential diagnostic and prognostic biomarkers for cholangiocarcinoma in serum and bile[J]. *Biomark Med*, 2016, 10(6): 613-9.

Effect of lipopolysaccharide on IL-6/STAT3 signal pathway in human intrahepatic biliary epithelial cells

Zhu Mingyuan, Yu Hongzhu

(Dept of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the expression of IL-6/STAT3 signal pathway induced by lipopolysaccharide

网络出版时间: 2017-5-22 17:45 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170522.1745.002.html

Src 激酶和 p38 激酶在乙酰肝素酶促进人胃癌细胞迁移和侵袭中的作用及相互关系

胡灵丹, 那日苏*, 马秀梅, 李时荣

摘要 目的 探讨 Src 激酶和 p38 激酶在乙酰肝素酶促进人胃癌细胞迁移和侵袭中的作用及相互关系。方法 实验设正常对照组(细胞未作其他处理)、人乙酰肝素酶重组蛋白处理组(5、10 $\mu\text{g/ml}$)以及提前 3 h 加入 Src 激酶特异性抑制剂 pp2(5 $\mu\text{mol/L}$)或 p38 激酶特异性抑制剂 SB 203580(1 $\mu\text{mol/L}$)再加入人乙酰肝素酶重组蛋白(10 $\mu\text{g/ml}$)作用 24 h 组。利用划痕损伤实验和 Transwell 小室基质侵袭实验分别检测各处理组对人胃癌 MGC-803 细胞迁移和侵袭能力的影响;Western blot 法检测各处理组对人胃癌 MGC-803 细胞、高表达乙酰肝素酶的人胃癌 SGC-7901 细胞和乙酰肝素酶表达被下调的 SGC-7901-Heparanase(-)细胞中 Src 激酶、p38 激酶、磷酸化 Src 激酶(p-Src)和磷酸化 p38 激酶(p-p38)蛋白表达的影响。结果 与正常对照组比较,5 和 10 $\mu\text{g/ml}$ 人乙酰肝素酶重组蛋白均能明显增强人胃癌 MGC-803 细胞迁移和侵袭能力($P < 0.05$);与未加抑制剂的人乙酰肝素酶重组蛋白比较,抑制剂 pp2 和 SB 203580 均能削弱人乙酰肝素

酶重组蛋白增强的人胃癌 MGC-803 细胞的迁移和基质侵袭能力($P < 0.05$)。10 $\mu\text{g/ml}$ 人乙酰肝素酶重组蛋白促进人胃癌 MGC-803 细胞 Src 激酶和 p38 激酶的磷酸化,而 SGC-7901-Heparanase(-)细胞中磷酸化的 Src 激酶和 p38 激酶表达水平较 SGC-7901 细胞明显下调($P < 0.01$);抑制剂 pp2 和 SB 203580 对人胃癌 SGC-7901 细胞中乙酰肝素酶蛋白表达无明显影响;在人胃癌 SGC-7901 细胞和 MGC-803 细胞中,Src 激酶的抑制剂 pp2 抑制磷酸化 p38 蛋白的表达,而 p38 激酶的抑制剂 SB 203580 对磷酸化 Src 蛋白表达无明显影响。结论 乙酰肝素酶可能通过促进 Src 激酶磷酸化或 p38 激酶的磷酸化或先促进 Src 激酶磷酸化再促进 p38 激酶的磷酸化,从而促进人胃癌细胞迁移和侵袭能力。乙酰肝素酶-Src 激酶磷酸化-p38 激酶磷酸化可能是人胃癌细胞内存在的与细胞迁移和侵袭有关的信号转导通路。

关键词 胃癌;乙酰肝素酶;Src 激酶;p38 激酶

中图分类号 R 361.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)07-0945-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.07.002

2017-03-13 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:30660065);中支地学校匹配经费(编号:X206017001)

作者单位:内蒙古医科大学附属医院病理科,呼和浩特 010059

作者简介:胡灵丹,女,硕士研究生;

马秀梅,女,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: doctor-maxiumei0471@126.com

* 对本文具有同等贡献

乙酰肝素酶(heparanase)是目前发现的哺乳动物细胞中唯一能切割细胞外基质中硫酸乙酰肝素蛋白多糖(heparan sulfate proteoglycans, HSPGs)侧链硫酸乙酰肝素(heparan sulfate, HS)的内源性糖苷内切酶。前期研究^[1]显示,乙酰肝素酶的高表达与胃癌

(LPS) on human intrahepatic biliary epithelial cells (HiBECs) *in vitro*. **Methods** The HiBECs were cultured *in vitro*. The cells were stimulated by LPS at different concentrations (0, 0.1, 1, 2, 4, 8 $\mu\text{g/ml}$) and different time (24, 48, 72 h). The expression of IL-6 was measured by ELISA to determine the best concentration and time of LPS. Then we chose the best concentration and time of LPS to intervene the cells in the further experiments. The levels of mRNA expression of c-Myc and Mcl-1 were detected by fluorescence quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR). The proportion of p-STAT3/STAT3 protein and the expression of c-Myc and Mcl-1 protein in HiBECs were analyzed by Western blot. **Results** LPS upregulated the expression of IL-6, and reached its peak at 4 $\mu\text{g/ml}$ and 24 h ($F = 16.492, 17.763, P < 0.001, P < 0.01$). LPS increased the mRNA expression of c-Myc and Mcl-1 ($P < 0.01$). Meanwhile, The ratio of p-STAT3/STAT3 ($P < 0.05$) protein and the expression of c-Myc ($P < 0.001$) and Mcl-1 ($P < 0.05$) protein were upregulated after stimulating with LPS. **Conclusion** The IL-6/STAT3 signal pathway can be activated by LPS in HiBECs, and LPS may promote the expression of c-Myc and Mcl-1 through this signal pathway.

Key words lipopolysaccharide; IL-6; STAT3; Mcl-1; c-Myc