

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.06.005

· 基础研究 ·

## IL-6 经 PI3K/Akt 通路诱导卵巢癌细胞对他莫西芬耐药

赵雅琛<sup>1</sup>, 孙旻<sup>2a, Δ</sup>, 黄素辉<sup>3a</sup>, 杨静<sup>3a</sup>, 王越<sup>3a</sup>, 李玲<sup>3b</sup>, 郭小芹<sup>3a</sup>, 李艳秋<sup>2b</sup> (1. 天津中医药大学研究生院, 天津 300196; 2. 武警后勤学院附属医院 a. 妇产科, b. 检验科, 天津 300162; 3. 武警后勤学院 a. 病原生物与免疫学教研室, b. 药理学教研室, 天津 300309)

**[摘要]** **目的:**探讨 IL-6 诱导卵巢癌细胞对他莫西芬(tamoxifen, TAM)耐药的分子机制。**方法:**构建内源性过表达 IL-6 的人卵巢癌 A2780 细胞系和内源性抑制 IL-6 表达的人卵巢癌 CAOV-3 细胞, 50 ng/ml 外源性 IL-6 预处理 A2780 细胞(A2780/perIL-6 细胞), Western blotting 检测内/外源 IL-6 对卵巢癌细胞 ER $\alpha$  Ser167 位磷酸化水平的影响; IL-6 与 PI3K 抑制剂 Wortmannin 单独或联合作用于 A2780 细胞, Western blotting 检测其对 A2780 细胞 Akt 磷酸化和 ER $\alpha$  磷酸化的影响; MTT 法检测 Wortmannin 和内/外源 IL-6 对 A2780 细胞 TAM 敏感性的影响; 荧光素酶报告基因检测卵巢癌细胞 ER $\alpha$  的转录活性, 并分析其可能涉及的信号通路。**结果:**外源性及内源性过表达 IL-6 可明显促进 A2780 细胞 ER $\alpha$  Ser167 位点磷酸化水平(均  $P < 0.01$ ), 而内源性抑制 IL-6 表达则可降低 CAOV-3 细胞 ER $\alpha$  Ser167 位点的磷酸化水平( $P < 0.01$ ); Wortmannin 可阻断 IL-6 诱导的 A2780 细胞对 TAM 的耐药及 ER $\alpha$  的磷酸化( $P < 0.05$ ); IL-6 可促进细胞 ER $\alpha$  的转录活性( $P < 0.01$ ), 而 Wortmannin 并不能阻断 IL-6 对 ER $\alpha$  的转录活性的影响( $P > 0.05$ )。**结论:**IL-6 可经 PI3K/Akt 通路引起 ER $\alpha$  磷酸化从而活化 ER 信号通路, 进而诱导卵巢癌细胞对 TAM 耐药。

**[关键词]** 卵巢癌; 白细胞介素-6; 他莫西芬; 耐药; 雌激素受体; PI3K/Akt 通路

**[中图分类号]** R737.31; R730.54

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2017)06-0601-07

## IL-6 induces tamoxifen resistance in ovarian cancer cells through PI3K/Akt pathway

ZHAO Yali<sup>1</sup>, SUN Yang<sup>2a, Δ</sup>, HUANG Suhui<sup>3a</sup>, YANG Jing<sup>3a</sup>, WANG Yue<sup>3a</sup>, LI Ling<sup>3b</sup>, GUO Xiaoqin<sup>3a</sup>, LI Yanqiu<sup>2b</sup> (1. Graduate School, Tianjin Chinese Traditional Medical University, Tianjin 300193, China; 2. a. Department of Gynecology and Obstetrics, b. Department of Laboratory, Hospital affiliated to Logistics College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China; 3. a. Department of Pathogenic Biology and Immunology, b. Department of Pharmacology, Logistics College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300309, China)

**[Abstract]** **Objective:** This study aimed to explore the mechanism of tamoxifen (TAM) resistance caused by IL-6 in ovarian cancer cells. **Methods:** Human ovarian cancer A2780 cell line that endogenously over-expressing IL-6 and human ovarian cancer CAOV-3 cell line that exogenously depleting IL-6 were constructed; exogenous IL-6 (50 ng/ml) were used for pretreatment of A2780 cells (A2780/perIL-6 cells), and Western blotting was used to detect the effect of endogenous/exogenous IL-6 on the phosphorylation level of ER $\alpha$  Ser167 in ovarian cancer cells; IL-6 and/or Wortmannin (PI3K inhibitor) were used to treat A2780 cells and western blotting was used to detect their effect on the phosphorylation of Akt and ER $\alpha$ ; MTT assay was used to detect the effect of Wortmannin and endogenous/exogenous IL-6 on the sensitivity of

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 81572852, No. 81502256);天津市自然科学基金资助项目(No. 12JCZDJC26300);武警后勤学院科学技术研究资助项目(No. 2015ZXKF05, No. WHB201404, No. WHB201505)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81273520, No. 81502256), the Great Program of the Science Foundation of Tianjin (No. 12JCZDJC26300), and the Great Program for Science and Technology in Logistics College of Chinese People's Armed Police Forces (No. 2015 ZXKF05, No. WHB201404, No. WHB201406)

**[作者简介]** 赵雅琛(1988-),女,硕士生,主要从事妇科肿瘤的临床和基础研究, E-mail: 931672708@qq.com; 孙旻(1975-),女,博士,主治医师,主要从事妇科肿瘤的基础和临床研究, E-mail: sywaxia@163.com。Δ共同第一作者

**[通信作者]** 郭小芹(GUO Xiaoqin, corresponding author),博士,讲师,主要从事妇科肿瘤的免疫调控机制的研究, E-mail: guoxiaoqinlet@163.com; 李艳秋(LI Yanqiu, co-corresponding author),博士,副主任技师,主要从事临床肿瘤免疫的研究, E-mail: liyanqiu@126.com

**[优先发表]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170603.1027.014.html>

A2780 cells to TAM; luciferase reporter assay was performed to detect transcription activity of ER $\alpha$  in ovarian cancer cells, and to explore the possible signaling pathway. **Results:** Both exogenous and endogenous over-expression of IL-6 could obviously increase the level of ER $\alpha$  Ser167 phosphorylation in A2780 cells ( all  $P < 0.01$  ), while endogenous depletion of IL-6 could reduce the level of ER $\alpha$  Ser167 phosphorylation in CAOV-3 cells (  $P < 0.01$  ). It also found that wortmannin ( PI3K inhibitor ) could significantly antagonize IL-6-induced TAM resistance and phosphorylation of ER $\alpha$  Ser167. IL-6 promoted ER $\alpha$  transcription activity, while this activation was not blocked by the PI3K-specific inhibitor wortmannin. **Conclusion:** These results indicate that IL-6 could induce ER $\alpha$  phosphorylation by triggering PI3K/Akt signaling pathway to activate the ER pathway, and thereby induce the resistance of ovarian cancer cells to TAM.

[ **Key words** ] ovarian cancer; interleukin-6 ( IL-6 ); tamoxifen ( TAM ); resistance; estrogen receptor ( ER ); PI3K/Akt pathway

[ Chin J Cancer Biother, 2017, 24( 6 ): 601-607. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.06.005 ]

卵巢癌是妇科三大恶性肿瘤之一,作为雌激素依赖性肿瘤,雌激素与雌激素受体( estrogen receptor, ER )的相互作用可促进其发生发展。他莫西芬( tamoxifen, TAM )是目前临床上治疗乳腺癌最具代表性的抗雌激素药物,有研究<sup>[1-3]</sup>发现,ER $\alpha$  的表达水平及其活化程度与乳腺癌细胞生长及其对 TAM 耐药密切相关。作为一种炎性细胞因子,IL-6 水平升高与卵巢癌的不良预后及化疗敏感性差密切相关<sup>[4-6]</sup>。笔者前期研究<sup>[7]</sup>证实,卵巢癌细胞自分泌 IL-6 的水平与其对 TAM 的敏感性呈负相关。人卵巢腺癌 A2780 细胞不分泌 IL-6 但表达其受体,且对 TAM 治疗敏感,人乳突状卵巢腺癌 CAOV-3 细胞高表达 IL-6 及其受体,但对 TAM 耐药,而 IL-6 分泌水平与卵巢癌细胞 ER $\alpha$  特异性位点[ 丝氨酸( Ser )167 位 ]的磷酸化水平相一致。因此,为进一步探讨 IL-6 诱导卵巢癌细胞对 TAM 耐药的机制,本研究在前期工作的基础上,利用已建立的 IL-6 过表达或抑制表达的卵巢癌细胞模型,观察 IL-6 对卵巢癌细胞 ER $\alpha$  特异性位点的磷酸化水平及 ER $\alpha$  转录活性的影响,同时探讨其可能的分子机制。本文为深入研究 IL-6 在诱导卵巢癌细胞对抗雌激素治疗发生耐药的分子机制,从而为逆转卵巢癌内分泌治疗耐药提供新的治疗靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

人卵巢腺癌 A2780 细胞和人乳突状卵巢腺癌 CAOV-3 细胞均购自美国 ATCC,本实验室保存。重组人 IL-6 购自美国 R&D 公司,DMSO、TAM、MTT 购自美国 Sigma 公司,抗 Akt、抗磷酸化 Akt( Ser473 )抗体及抗磷酸 ER $\alpha$  ( Ser167 )抗体均购自美国 CST 公司,抗  $\beta$ -actin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司,Wortmannin( PI3K 抑制剂 )购自美国 Calbiochem 公

司,Lipofectamine™ 2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司,荧光素酶检测试剂盒购自美国 Promega 公司。

### 1.2 细胞培养、转染及 IL-6 预处理

A2780 细胞不分泌 IL-6 但表达其受体,而 CAOV-3 细胞高表达 IL-6 及其受体。本研究将带有正义和反义 IL-6 cDNA 的表达载体 pcDNA3.1( + )-ssIL-6 和 pcDNA3.1( + )-asIL-6 分别转染至 A2780 细胞和 CAOV-3 细胞中,经 G418 加压筛选分别获得中度和高度表达 IL-6 的 2 个 A2780 细胞克隆( A2780/ssIL-6M 和 A2780/ssIL-6H )和 IL-6 中度和高度抑制表达的 2 个 CAOV-3 细胞克隆( CAOV-3/asIL-6Mi 和 CAOV-3/asIL-6Hi )。同时将空载体分别转染至上述两种细胞,经筛选后作为阴性对照,即 A2780/pcDNA3.1( + )和 CAOV-3/pcDNA3.1( + )。另外,应用 50 ng/ml IL-6 作用于 A2780 细胞,连续处理 10 d,期间每 2 d 更换 1 次新鲜的培养液并加入相同浓度的 IL-6,经上述处理的细胞命名为 IL-6 预处理的 A2780 细胞( A2780/preIL-6 细胞 )。A2780 及其转染细胞用含有 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液培养,CAOV-3 及其转染细胞用含 15% FBS 的 RPM I 1640 培养液培养。上述培养液均含有 100 U/ml 青霉素和 100  $\mu$ g/ml 链霉素。

### 1.3 Western blotting 检测内、外源 IL-6 对卵巢癌细胞 Akt 和 ER $\alpha$ Ser167 位磷酸化水平的影响

上述细胞经 RIPA 细胞裂解液作用后,离心取上清,经 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。40  $\mu$ g 蛋白经 10% SDS-PAGE 分离后电转移至 PVDF 滤膜上。滤膜经室温封闭 1 h 后,加入一抗 4  $^{\circ}$ C 旋转孵育过夜,再与 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h,TBST 洗涤后采用化学发光底物检测试剂盒进行检测。结果应用 Bio-Rad 公司的 Quantity One 软件进行分析,以  $\beta$ -actin 或总蛋白为内参照,以磷酸

化蛋白/总蛋白或靶蛋白/ $\beta$ -actin 灰度的比值作为蛋白的相对表达量, 进行半定量检测。

将 A2780 细胞接种到 100 mm 培养皿中, 培养过夜后更换含有 5% FBS 和 Wortmannin (100、200 nmol/L) 或 DMSO 的培养液, 30 min 后加入 50 ng/ml 的 IL-6 或 0.1% BSA-PBS 细胞因子稀释液, 作用 6 h 后提取蛋白, 通过 Western blotting 方法检测 Akt 和 ER $\alpha$  (Ser167) 磷酸化水平以及总 Akt 和  $\beta$ -actin 表达水平。

#### 1.4 MTT 法检测内、外源 IL-6 对卵巢癌细胞 TAM 敏感性的影响

将 A2780/preIL-6 细胞(培养液中含 50 ng/ml 的 IL-6)和 A2780/ssIL-6H 接种到 96 孔板中( $4 \times 10^3$  个细胞/孔, 100  $\mu$ l/孔), 培养 24 h 后更换含有 Wortmannin (100、200 nmol/L) 或 DMSO 的培养液(均含 5% FBS), 30 min 后加入 1 000 nmol/L TAM 和 1 nmol/L 雌二醇(estradiol, E2), 加入 DMSO 作为对照, 作用 48 h, 在结束培养前 4 h 离心弃上清后加入 MTT 溶液(0.5 g/L, PBS 配制) 100  $\mu$ l/孔, 于 37  $^{\circ}$ C 5%  $\text{CO}_2$  孵箱内继续培养 4 h, 离心弃上清后加入 0.04 mol/L 盐酸异丙醇 100  $\mu$ l/孔, 充分振荡至细胞内的紫蓝色结晶完全溶解, 置酶标仪上测定波长为 490 nm 的光密度  $D$  值, 以  $D$  值代表细胞增殖水平。

#### 1.5 荧光素酶报告基因检测内、外源 IL-6 对卵巢癌细胞 ER $\alpha$ 转录活性的影响

将 A2780 细胞和 CAOV-3 细胞及其稳定转染的细胞株接种于 12 孔板, 细胞汇合至 90% ~ 95% 进行转染。根据脂质体 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 的说明书, 将带有荧光素酶报告基因的 ERE-TK-Luc 重组质粒(2  $\mu$ g)和  $\beta$ -gal 质粒(1  $\mu$ g)共转染至卵巢癌细胞中。转染 24 h 后, A2780 细胞经不同终浓度 IL-6 (5、25、50 ng/ml)处理后, 37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$  孵箱内继续培养 24 h。制备细胞裂解液, 利用荧光素酶检测试剂盒测定样品荧光素酶活性。同时在酶标仪上检测 420 nm 波长处  $D$  值, 测定  $\beta$ -gal 活性, 以两者之比作为荧光素酶的相对活性。

采用相同方法对 A2780 细胞和 A2780/ssIL-6H 进行转染, 24 h 后更换含有 Wortmannin (200 nmol/L) 或 DMSO 的培养液, 作用 30 min 后加入 25 ng/ml IL-6 (仅在 A2780 细胞中)作用 24 h, 制备细胞裂解液, 分别测定荧光素酶活性和  $\beta$ -gal 活性。

#### 1.6 统计学处理

采用 SPSS16.0 统计软件, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组均数比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较

采用 LDS(最小显著法)检验, 以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 内、外源 IL-6 均可提高卵巢癌细胞 ER $\alpha$ Ser167 的磷酸化水平

Western blotting 检测结果(图 1)显示, 经外源性 IL-6 刺激后, A2780 细胞 ER $\alpha$  Ser167 的磷酸化水平(pER $\alpha$ )较对照组明显增加( $P < 0.01$ ), 且呈剂量依赖性(图 1A); 同时, A2780/ssIL-6M 和 A2780/ssIL-6H 两组细胞 ER $\alpha$  磷酸化水平均较 A2780/pcDNA3.1(+ )细胞明显升高( $P < 0.01$ ), 以 A2780/ssIL-6H 细胞的 ER $\alpha$  磷酸化水平最高, 而未转染细胞 A2780 与 A2780/pcDNA3.1(+ )细胞两组间 ER $\alpha$  磷酸化水平无明显差异( $P > 0.05$ ), 如图 1B; 与此相反, CAOV-3/asIL-6Mi 和 CAOV-3/asIL-6Hi 细胞与 CAOV-3/pcDNA3.1(+ )细胞相比, ER $\alpha$  磷酸化水平均明显降低( $P < 0.01$ ), 如图 1C。

### 2.2 IL-6 诱导的 A2780 细胞 Akt 磷酸化可被 Wortmannin 阻断

Wortmannin (100、200 nmol/L)处理 A2780 细胞, 30 min 后再加入 IL-6。Western blotting 检测结果(图 2)显示, 与对照组比较, IL-6 (50 ng/ml)单独处理组 p-Akt 水平明显增加( $1.00 \pm 0.22$  vs  $7.50 \pm 0.63$ ,  $P < 0.01$ ), 而 100、200 nmol/L Wortmannin 阻断组(联合 IL-6)中 p-Akt 水平均较 IL-6 单独处理组明显降低( $4.97 \pm 0.48$ ,  $3.13 \pm 0.54$  vs  $7.50 \pm 0.63$ ,  $P < 0.01$ ), 且阻断作用具有剂量依赖性。单独 200 nmol/L Wortmannin 处理组 p-Akt 水平与对照组无显著差异( $0.95 \pm 0.14$  vs  $1.00 \pm 0.22$ ,  $P > 0.05$ )。

### 2.3 Wortmannin 可阻断内、外源 IL-6 诱导的 A2780 细胞对 TAM 耐药

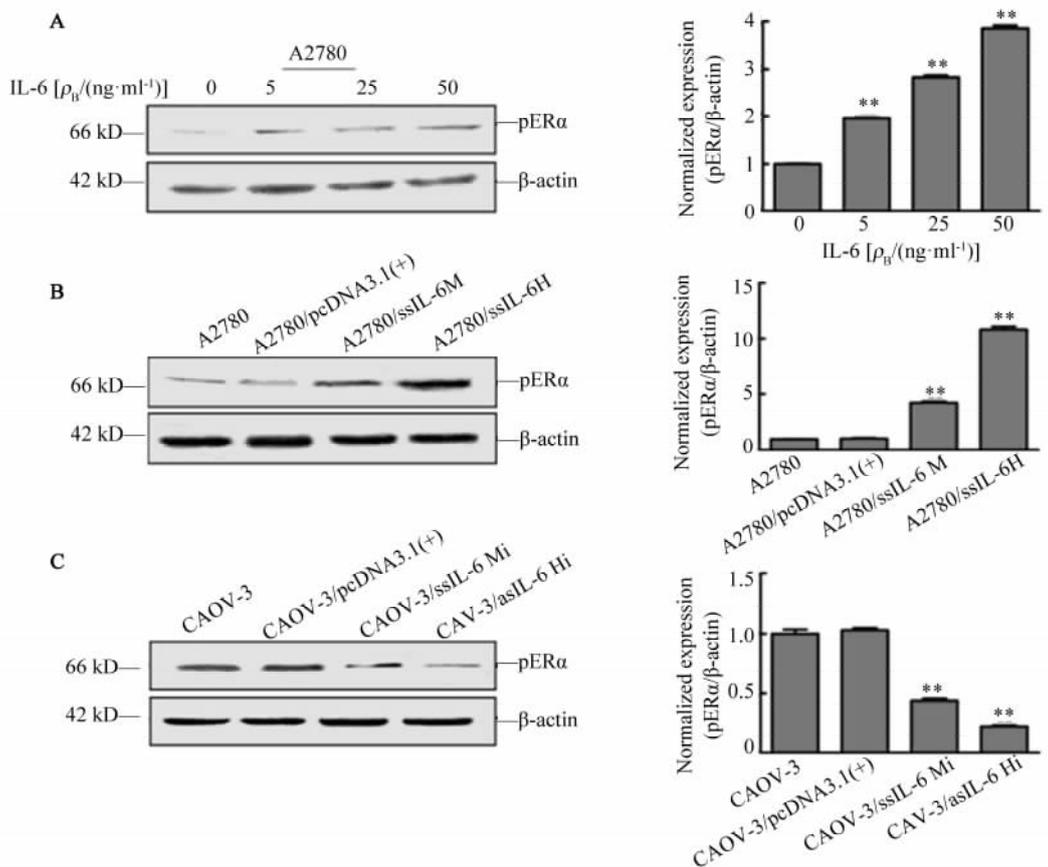
MTT 实验检测结果(图 3)显示, 在 A2780/preIL-6 细胞中, Wortmannin 联合 TAM + E2 组的细胞增殖水平均显著低于 TAM + E2 组(均  $P < 0.05$ ), 而单独 100、200 nmol/L Wortmannin 处理组细胞增殖水平与对照组无显著差异(均  $P > 0.05$ )。说明 Wortmannin 可阻断 IL-6 诱导的 A2780 细胞对 TAM 的耐药, 且阻断作用具有剂量依赖性(图 3A)。同样, 在内源性高表达 IL-6 的 A2780/ssIL-6H 细胞中, Wortmannin 发挥相似的阻断作用(图 3B)。

### 2.4 Wortmannin 可降低 IL-6 诱导的 A2780 细胞 ER $\alpha$ Ser167 磷酸化水平

Western blotting 检测结果(图 4)显示, 与对照组相比, IL-6 可明显促进 A2780 细胞 ER $\alpha$  Ser167 的

磷酸化水平(  $1.00 \pm 0.19$  vs  $8.13 \pm 0.82$ ,  $P < 0.01$  ), 而 Wortmannin 可阻断 IL-6 对 ER $\alpha$  磷酸化水平的诱导作用(  $3.29 \pm 0.27$  vs  $8.13 \pm 0.82$ ,  $P < 0.01$  )。单

独 Wortmannin 处理组 ER $\alpha$  磷酸化水平与对照组无显著差异(  $1.04 \pm 0.38$  vs  $1.00 \pm 0.19$ ,  $P > 0.05$  )。



A: Effects of exogenous IL-6 on ER $\alpha$  phosphorylation in A2780 cells;  
 B: Effects of endogenous IL-6 overexpression on ER $\alpha$  phosphorylation in A2780 cells;  
 C: Effects of endogenous IL-6 depletion on ER $\alpha$  phosphorylation in CAOV-3 cells  
 \*\*  $P < 0.01$  vs IL-6 (0 ng/ml) group or the control vector-transfected A2780 (CAOV-3) group

图1 外源性及内源性 IL-6 均提高卵巢癌细胞 ER $\alpha$  Ser167 位磷酸化水平

Fig. 1 Both exogenous and endogenous IL-6 increase phosphorylation of ER $\alpha$  Ser167 in ovarian cancer cells

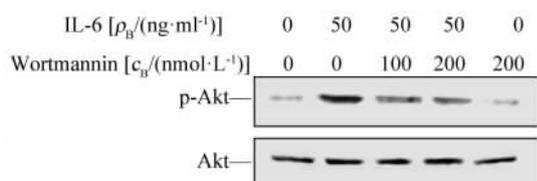


图2 Wortmannin 对 IL-6 诱导的卵巢癌细胞 Akt 磷酸化的抑制作用

Fig. 2 Inhibitory effects of wortmannin on IL-6 induced phosphorylation of Akt in A2780 cells

机制不是通过 PI3K/Akt 通路

雌激素与 ER $\alpha$  结合后可诱导 ER $\alpha$  发生核转位,进而与靶基因启动子上的雌激素应答元件( estrogen response element, ERE)结合,促进转录活性及卵巢癌细胞的生长。为进一步探讨 IL-6 是否影响卵巢癌细胞 ER $\alpha$  的转录活性及其可能的分子机制,将 ERE-TK-Luc 质粒转染至 A2780 细胞,荧光素酶报告基因检测结果(图 5A)发现,IL-6 可明显促进 A2780 细胞 ER $\alpha$  的转录活性(  $P < 0.01$  ),且具有剂量依赖性。随后利用 ssIL-6 转染的 A2780 细胞进一步证实,与未转染细胞和空载体转染对照组相比, A2780/ss-IL-6 ER $\alpha$  的转录活性均明显升高(  $P <$

2.5 IL-6 促进卵巢癌细胞 ER $\alpha$  的转录活性的分子

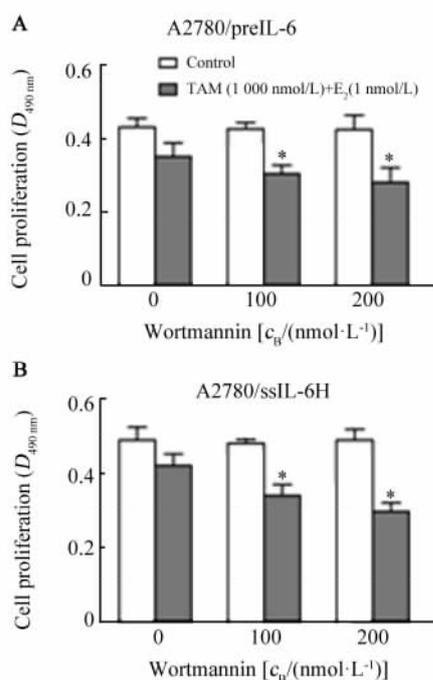
0.01, 图 5B); as-IL-8 转染的 CAOV-3 细胞 ER $\alpha$  的转录活性较未转染细胞和空载体转染对照组则明显降低 ( $P < 0.01$ , 图 5C)。进一步研究发现, 经 Wortmannin 作用 30min 后再加入 IL-6, 与 IL-6 单独作用组相比, ER $\alpha$  的转录活性无明显变化 ( $P > 0.05$ , 图 6A); 而在 A2780/ssIL-6 细胞中, Wortmannin 对 IL-6 诱导的 ER $\alpha$  的转录活性也无明显阻断作用 ( $P > 0.05$ , 图 6B)。

### 3 讨论

TAM 是目前临床上治疗乳腺癌的首选内分泌治疗药物, 它可作为配体竞争性地与 ER $\alpha$  结合, 从而阻断雌激素的转录激活效应。因此, ER $\alpha$  可作为临床上乳腺癌内分泌治疗敏感性预测的重要指标<sup>[8,9]</sup>。然而卵巢癌患者中虽有 40%~60% 表达 ER $\alpha$ , 但仅有 7%~18% 的患者对 TAM 治疗有效<sup>[10]</sup>。目前对于卵巢癌对抗雌激素治疗发生耐药的机制尚不清楚。

IL-6 是一种多效性细胞因子。近年来的研究<sup>[4,6]</sup>表明, 卵巢癌患者高表达 IL-6, IL-6 水平升高与卵巢癌的发生、发展及不良预后密切相关。笔者前期研究<sup>[7]</sup>发现, 在 4 种常见的人卵巢癌细胞系中, 细胞自分泌 IL-6 水平与其对 TAM 的敏感性呈负相关, 而与卵巢癌细胞 ER $\alpha$  Ser167 的磷酸化水平相一致, 提示 IL-6 水平和 ER $\alpha$  磷酸化水平可能与卵巢癌对 TAM 耐药有关。在临床和实验研究<sup>[11-14]</sup>中均发现, TAM 耐药的乳腺癌中存在高水平的 ER $\alpha$  Ser167 位点的磷酸化, 而 Ser167 位点的磷酸化将通过促进 ER $\alpha$  与配体、DNA 以及共激活因子结合的能力, 进而促进雌激素的激动作用。Guo 等<sup>[15]</sup>认为, ER $\alpha$  Ser167 位点经核因子  $\kappa$ B 抑制蛋白激酶  $\epsilon$  (inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase  $\epsilon$ , IKK $\epsilon$ ) IKK $\epsilon$  磷酸化后可上调周期蛋白 cyclin D 的水平并诱导乳腺癌对 TAM 耐药。本研究进一步发现 IL-6 可明显促进 A2780 细胞 ER $\alpha$  Ser167 位的磷酸化水平, 而内源性抑制 IL-6 的 CAOV-3 细胞中 ER $\alpha$  Ser167 位的磷酸化水平则明显降低, 表明 IL-6 可能经配体非依赖方式影响 ER $\alpha$  的磷酸化水平进而诱导卵巢癌细胞对 TAM 耐药。

IL-6 与其受体结合后可通过激活 PI3K/Akt、Ras/MEK/MAPK 等信号通路而发挥效应。研究<sup>[16-18]</sup>表明, 乳腺癌患者原、继发 TAM 耐药中存在不同程度的 Akt 活性增加, 这种激酶可通过直接引起 ER $\alpha$  Ser167 位的磷酸化而激活 ER 信号从而对 TAM 产生耐药性。Akt 过表达将增加 ER $\alpha$  Ser167 位的磷酸化水平, 降低乳腺癌细胞对 TAM 的敏感性, 而通过 RNA 干扰抑制 Akt 后则降低 ER $\alpha$  Ser167 位的磷酸化水平并恢复细胞对 TAM 的敏感性<sup>[19]</sup>。本研究证实, IL-6 可诱导卵巢癌细胞中 Akt 的活化, Wortmannin (PI3K 抑制剂) 可明显阻断 IL-6 诱导的卵巢癌对 TAM 的耐药作用, 同时该阻断剂对 IL-6 诱导的 ER $\alpha$  磷酸化水平也具有明显的阻断作用。因此, 笔者推测 IL-6 可能通过 PI3K/Akt 通路引起 ER $\alpha$  磷酸化从而活化 ER 信号通路, 进而诱导卵巢癌对 TAM 耐药。



A: Effects of Wortmannin on IL-6-mediated TAM resistance in A2780 cells pretreated with IL-6 (A2780/preIL-6);

B: Effects of Wortmannin on IL-6-mediated TAM resistance in ssIL-6-transfected A2780 cells (A2780/ssIL-6H)

\*  $P < 0.05$  vs Control group;

图3 Wortmannin 减轻 IL-6 诱导的 A2780/preIL-6 和 A2780/ssIL-6H 细胞 TAM 耐药

Fig. 3 Wortmannin attenuates IL-6-mediated TAM resistance in A2780/preIL-6 and A2780/ssIL-6H cells

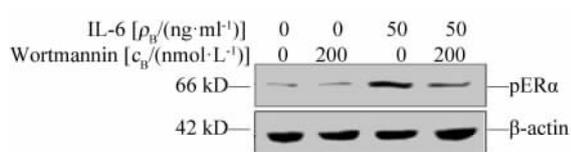
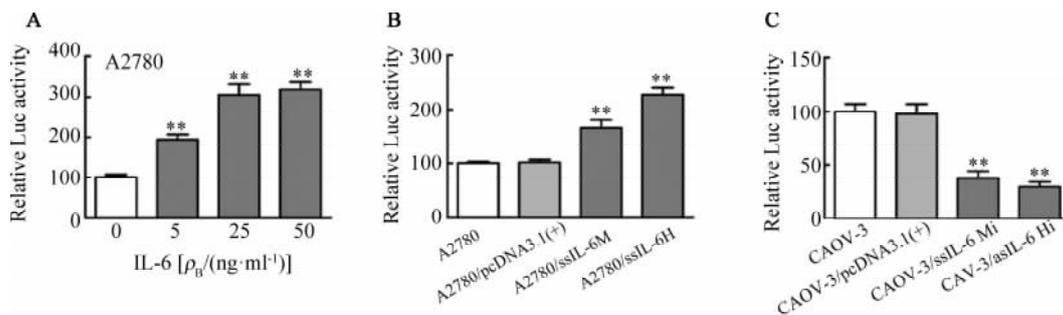


图4 Wortmannin 抑制 IL-6 诱导的 A2780 细胞 ER $\alpha$  Ser167 磷酸化水平

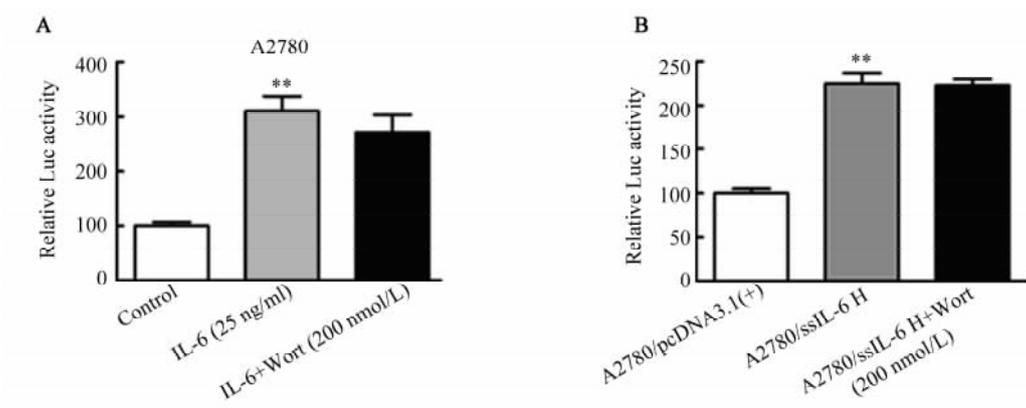
Fig. 4 Wortmannin inhibits IL-6-induced phosphorylation of ER $\alpha$  Ser167 in A2780 cells



A: Effects of exogenous IL-6 on ERα transcription activity in A2780 cells;  
 B: Effects of endogenous IL-6 overexpression on ERα transcription activity in A2780 cells;  
 C: Effects of endogenous IL-6 depletion on ERα transcription activity in CAOV-3 cells  
 \*\* P < 0.01 vs IL-6( 0 ng/ml )group or the control vector-transfected A2780 ( CAOV-3 ) group

图 5 外源性及内源性 IL-6 对 A2780 细胞 ERα 转录活性的影响

Fig. 5 Effects of exogenous and endogenous IL-6 on ERα transcription activity in ovarian cancer cells



A: Effects of Wortmannin on IL-6-mediated ERα transcription activity in A2780 cells;  
 B: Effects of Wortmannin on IL-6-mediated ERα transactivation activity in ssIL-6-transfected A2780 cells ( A2780/ssIL-6H )  
 \*\* P < 0.01 vs control group or the control A2780/pcDNA3.1( + ) group

图 6 Wortmannin 对 IL-6 诱导的 A2780 细胞 ERα 转录活性的影响

Fig. 6 Effects of wortmannin on IL6-induced ERα transcription activity in ovarian cancer cells

SPEIRS 等<sup>[20]</sup>在乳腺癌上皮细胞中研究发现, IL-6 可诱导 ERα 的转录活性, 而且这一效应可被 IL-6 受体( gp130 )的抗体阻断。笔者在本研究也发现外源性刺激或内源性过表达 IL-6 均可促进卵巢癌细胞中 ERα 的转录活性, 但 Wortmannin 对 IL-6 诱导的 ERα 转录活性并无明显的阻断作用, 这一结果提示 IL-6 可能通过其他信号通路促进 ERα 的转录活性, 如 Ras/MEK/MAPK 通路等, 而 IL-6 通过 PI3K/Akt 通路活化 ERα, 随后通过其他方式如促进 ERα 与共激活因子的相互作用等诱导卵巢癌细胞对 TAM 耐药。

本研究结果显示, IL-6 可经 PI3K/Akt 通路引起 ERα 磷酸化后活化 ER 信号通路, 进而诱导卵巢癌

细胞对 TAM 耐药, 表明卵巢癌自分泌 IL-6 与 ER 通路的交互作用在卵巢癌内分泌治疗耐药中发挥重要作用, 为以 IL-6 和 ER 为双靶点治疗耐药性卵巢癌提供了新的思路。

[ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] DE LEEUW R, NEEFJES J, MICHALIDES R. A role for estrogen receptor phosphorylation in the resistance to tamoxifen[ J ]. Int J Breast Cancer, 2011, 2011: 232435. DOI: 10. 4061/2011/232435.  
 [ 2 ] KIM J, LEE J, JANG S Y, et al. Anticancer effect of metformin on estrogen receptor-positive and tamoxifen-resistant breast cancer cell lines[ J ]. Oncol Rep, 2016, 35( 5 ):2553-2560. DOI: 10. 3892/or. 2016. 4675.

- [ 3 ] 牛秀珑,叶路,毛立群,等. 雌激素受体亚型对乳腺癌 MCF-7 细胞生长及微环境中 Th 平衡的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2011, 18( 5 ): 490-495. DOI: 10. 3872/j. issn. 1007-385x. 2011. 05. 005.
- [ 4 ] WANG Y, LI L, GUO X, et al. Interleukin-6 signaling regulates anchorage-independent growth, proliferation, adhesion and invasion in human ovarian cancer cells[J]. Cytokine, 2012, 59( 2 ): 228-236. DOI: 10. 1016/j. cyto. 2012. 04. 020.
- [ 5 ] SUH Y A, JO S Y, LEE H Y, et al. Inhibition of IL-6/STAT3 axis and targeting Axl and Tyro3 receptor tyrosine kinases by apigenin circumvent taxol resistance in ovarian cancer cells[J]. Int J Oncol, 2015, 46( 3 ): 1405-1411. DOI: 10. 3892/ijo. 2014. 2808.
- [ 6 ] KIM B, KIM H S, KIM S, et al. Adipose stromal cells from visceral and subcutaneous fat facilitate migration of ovarian cancer cells via IL-6/JAK2/STAT3 pathway[J]. Cancer Res Treat, 2017, 49( 2 ): 338-349. DOI: 10. 4143/crt. 2016. 175.
- [ 7 ] 王越,郭小芹,牛秀珑,等. 卵巢癌细胞 IL-6、IL-8 分泌与他莫西芬敏感性及 MAPK、Akt 活性和 ER 特异性位点磷酸化水平的关系[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26( 1 ): 21-24.
- [ 8 ] JORDAN V C. The role of tamoxifen in the treatment and prevention of breast cancer[J]. Curr Prob Cancer, 1992, 16( 3 ), 129-176.
- [ 9 ] ESMEKAYA M A, KAYHAN H, YAGCI M, et al. Effects of electroporation on tamoxifen delivery in estrogen receptor positive ( ER + ) human breast carcinoma cells [ J ]. Cell Biochem Biophys, 2017, 75( 1 ):103-109. DOI: 10. 1007/s12013-016-0776-z.
- [ 10 ] BARDIN A, HOFFMANN P, BOULLE N, et al. Involvement of estrogen receptor  $\beta$  in ovarian carcinogenesis[J]. Cancer Res, 2004, 64( 16 ): 5861-5869. DOI: 10. 1158/0008-5472. CAN-04-0552.
- [ 11 ] VENDRELL J A, BIECHE I, DESMETZ C, et al. Molecular changes associated with the agonist activity of hydroxy-tamoxifen and the hyper-response to estradiol in hydroxy-tamoxifen-resistant breast cancer cell lines[J]. EndocrRelat Cancer, 2005, 12( 1 ): 75-92. DOI: 10. 1677/erc. 1. 00899.
- [ 12 ] KIRKEGAARD T, WITTON C J, McGLYNN L M, et al. AKT activation predicts outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen[J]. J Pathol, 2005, 207( 2 ): 139-146. DOI: 10. 1002/path. 1829.
- [ 13 ] LIKHTE V S, STOSI F, KIM K, et al. Kinase-specific phosphorylation of the estrogen receptor changes receptor interactions with ligand, deoxyribonucleic acid, and coregulators associated with alterations in estrogen and tamoxifen activity[J]. Mol Endocrinol, 2006, 20( 12 ): 3120-3132. DOI: 10. 1210/me. 2006-0068.
- [ 14 ] DANIEL A R, GAVIGLIO A L, KNUTSON T P, et al. Progesterone receptor-B enhances estrogen responsiveness of breast cancer cells via scaffolding PELP1 and estrogen receptor-containing transcription complexes[J]. Oncogene, 2015, 34( 4 ): 506-515. DOI: 10. 1038/onc. 2013. 579.
- [ 15 ] GUO J P, SHU S K, ESPOSITO N N, et al. IKK $\epsilon$  phosphorylation of estrogen receptor a Ser-167 and contribution to tamoxifen resistance in breast cancer[J]. J Bio Chem, 2010, 285( 6 ): 3676-3684. DOI: 10. 1074/jbc. A109. 078212.
- [ 16 ] SILVA J, CAVAZOS D A, DONZIS E, et al. Akt-induced tamoxifen resistance is associated with altered FKHR regulation[J]. Cancer Invest, 2007, 25( 7 ): 569-573. DOI: 10. 1080/07357900701513538.
- [ 17 ] FUJIKI N, KONNO H, KANEKO Y, et al. Estrogen response element-GFP ( ERE-GFP ) introduced MCF-7 cells demonstrated the coexistence of multiple estrogen-deprivation resistant mechanisms [ J ]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2014, 139( 1 ):61-72. DOI: 10. 1016/j. jsbmb. 2013. 08. 012.
- [ 18 ] RIVERSO M, KORTENKAMP A, SILVA E, et al. Non-tumorigenic epithelial cells secrete MCP-1 and other cytokines that promote cell division in breast cancer cells by activating ERalpha via PI3K/Akt/mTOR signaling[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2014, 53( 5 ): 281-294. DOI: 10. 1016/j. biocel. 2014. 05. 023.
- [ 19 ] GLAROS S, ATANASKOVA N, ZHAO C, et al. Activation function-1 domain of estrogen receptor regulates the agonistic and antagonistic actions of tamoxifen[J]. Mol Endocrinol, 2006, 20( 5 ): 996-1008. DOI: 10. 1210/me. 2005-0285.
- [ 20 ] SPEIRS V, KERIN M J, WALTON D S, et al. Direct activation of oestrogen receptor-a by interleukin-6 in primary cultures of breast cancer epithelial cells[J]. Br J Cancer, 2000, 82( 7 ): 1312-1316. DOI: 10. 1054/bjoc. 1999. 1097.
- [ 收稿日期 ] 2017 - 01 - 16 [ 修回日期 ] 2017 - 03 - 17  
[ 本文编辑 ] 王映红

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 文稿中统计学符号规范化书写的要求

本刊严格遵守国家标准 GB 3358 - 93《统计学术语》的有关规定。为此,请作者书写统计学符号时注意以下要求:(1)样本的算术平均数用英文小写  $\bar{x}$ ,不用大写  $X$ ,也不用 Mean 或  $M$ ;(2)标准差用英文小写  $s$ ,不用 SD;(3)标准误用英文小写  $s_x$ ,不用 SE;(4)  $t$  检验用英文小写  $t$ ;(5)  $F$  检验用英文大写  $F$ ;(6)卡方检验用希腊文小写  $\chi^2$ ;(7)相关系数用英文小写  $r$ ;(8)自由度用希腊文小写  $\nu$ ;(9)样本数用英文小写  $n$ ;(10)概率用英文大写  $P$ ;(11)以上符号  $\bar{x}$ 、 $s$ 、 $s_x$ 、 $t$ 、 $F$ 、 $\chi^2$ 、 $r$ 、 $\nu$ 、 $n$ 、 $P$  均为斜体。请作者注意遵照执行。

(本刊编辑部)