

脑胶质瘤 IL-6/IL-6R 自分泌或旁分泌环路的存在及意义

胡永生¹, 张庆林¹, 田志刚², 魏海明², 李刚³, 庞琦¹, 王成伟¹, 张建华², 冯进波², 许晓群²

摘要:目的 研究脑胶质瘤中 IL-6/IL-6R 自分泌或旁分泌环路的存在和意义。方法 采用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法检测白细胞介素 6 (IL-6) 和 IL-6 受体 (IL-6R) 基因在脑胶质瘤细胞株、脑胶质瘤组织标本和正常人脑胶质细胞中的表达。结果 2 株脑胶质瘤细胞株均有 IL-6 和 IL-6R 的表达, 52 例脑胶质瘤组织标本中有 38 例 (73.1%) 表达 IL-6, 44 例 (84.6%) 表达 IL-6R, 33 例 (63.5%) 同时表达 IL-6 和 IL-6R。人脑正常胶质细胞仅有 IL-6 基因弱表达, 而无 IL-6R 表达。结论 脑胶质瘤可能存在 IL-6/IL-6R 自分泌或旁分泌环路, 此环路与肿瘤的恶性增殖有关。

关键词: 胶质瘤; 白细胞介素 6; 白细胞介素 6 受体; 环路; 逆转录聚合酶链反应

中图分类号: R730.264 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578 (2001) 06-0429-03

The Autocrine or Paracrine Interleukin-6/Interleukin-6 Receptor Loop in Gliomas

HUYong-sheng, ZHANGQin-glin, TIANZhi-gang, et al

Department of Neurosurgery, The Second Affiliated Hospital of Shandong Medical University, Jinan 250033, China

Abstract: Objective To evaluate the significance of the autocrine or paracrine interleukin-6/interleukin-6 receptor loop in gliomas. **Methods** We detected IL-6 and IL-6R gene in adult cerebral tissue, cerebellar tissue, 2 glioma cell lines and 52 human glioma tissues specimens with different malignancy degree. A complementary DNA copy of total RNA was synthesized and amplified with specific primers using the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) method. **Results** The experiments revealed that both C6 and SHG-44 glioma cell lines expressed IL-6 and IL-6R. It was positive of IL-6 gene in 38 samples (73.1%) and positive of IL-6R gene in 44 samples (84.6%) respectively. There were 33 (63.5%) glioma tissues specimens that coexpressed IL-6 and IL-6R gene. Moreover, the positive rate and intensity of the two gene expression was related to the malignancy degree of gliomas. On the other hand, the expression of IL-6 was weakly positive in adult cerebral and cerebellar tissue, but IL-6R was negative. **Conclusion** Our results indicate that IL-6 and IL-6R probably play an important role in the genesis and development of human glioma. Maybe there is IL-6/IL-6R autocrine or paracrine loop in gliomas.

Keywords: Glioma; Interleukin-6; Interleukin-6 receptor; Loop; Reverse transcription polymerase chain reaction

白细胞介素 6 (IL-6) 和 IL-6 受体 (IL-6R) 在肿瘤发生发展中的作用越来越受到重视。脑胶质瘤是否也存在 IL-6/IL-6R 自分泌或旁分泌环路及其意义如何更是引起了广大学者的兴趣, 我们采用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 技术检测了脑胶质瘤 IL-6 和 IL-6R 基因的表达情况, 并对其意义进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 研究对象

1.1.1 脑胶质瘤细胞株 脑星形细胞瘤细胞株 SHG-44 和鼠脑胶质瘤细胞株 C6, 均为本实验室常规保存。

1.1.2 脑胶质瘤组织标本 52 例标本取自山东医科大学第二附属医院和第一附属医院神经外科手术病人, 术前均未接受过放疗、化疗或免疫治疗。男 27 例, 女 25 例。年龄 6~78 岁, 平均 35.8 岁。病理类型: 星形细胞瘤 Ⅱ级 4 例, 星形细胞瘤 Ⅲ级 6 例, 星形细胞瘤 Ⅳ级 4 例, 间变型星形细胞瘤 19 例, 多形性胶质母细胞瘤 9 例, 少突胶质细胞瘤 3 例, 脉

收稿日期: 2000-03-06; 修回日期: 2000-05-09

基金项目: 山东省医药卫生“九五”攻关课题 (鲁卫攻关 08)

作者单位: 1. 250033 济南, 山东大学第二医院神经外科; 2. 山东省肿瘤生物治疗研究中心; 3. 山东大学齐鲁医院神经外科

络丛乳头状瘤 1 例,室管膜瘤 2 例,髓母细胞瘤 4 例。

1.1.3 人脑正常胶质组织 于脑深部良性肿瘤病人术中取自远离肿瘤部位的正常大脑和小脑组织各一份。

1.2 标本处理及细胞总 RNA 提取

细胞株传代扩增后收获 1×10^6 个以上细胞;所取新鲜胶质瘤组织标本和正常脑组织标本大小约 1 cm^3 ,需仔细去除血管及坏死组织;上述处理过的标本可在 -70°C 冻存备用。细胞总 RNA 的提取采用异硫氰酸胍一步法^[1]。

1.3 检测指标及引物

基因	序列	长度	合成单位
-actin	5' GTGGGCGCC- CCAGGCACCA3' 5' CTCCTTAATGT- CACGCACGATTT3'	520bp	中国科学院 上海植物生 化研究所
IL-6	5' CCGAATTCAT- GATTGACAAAACAAATTCCGG3' 5' CGCGGATCCTTA- CATTGCGCAAGAG3'	511bp	上海 Sangon 生物工程公 司
IL-6	5' CATTGC- CATTGTTCTGAGGTTTC3' 5' AGTAGTCTG- TATTGCTGATGTC3'	251bp	上海 Sangon 生物工程公 司

表 3 脑胶质瘤细胞株 IL-6 和 IL-6R 基因的表达

病理类型	例数	IL-6		IL-6R		IL-6 ⁺		IL-6 ⁻		IL-6 ⁺		IL-6 ⁻	
		+++++	+++	++	+	+++++	+++	++	+	IL-6R ⁺	IL-6R ⁻	IL-6R ⁺	IL-6R ⁻
星形细胞瘤 级	4	0	2	0	2	1	1	0	2	1	1	1	1
星形细胞瘤 级	6	1	4	0	1	4	1	1	0	5	1	0	0
星形细胞瘤 级	4	0	2	1	1	2	2	0	0	3	1	0	0
间变型星形细胞瘤	19	3	6	5	5	9	5	3	2	13	4	1	1
多形性胶质母细胞瘤	9	3	3	1	2	5	1	1	2	5	2	2	0
少突胶质细胞瘤	3	0	2	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0
脉络丛乳头状瘤	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
室管膜瘤	2	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0
髓母细胞瘤	4	1	1	1	1	2	1	0	1	3	0	0	1
合计	52	8	22	8	14	26	13	5	8	33	11	5	3

注:+++ 为强表达 ++ 为一般表达 + 为弱表达 - 为无表达

2.2 脑胶质瘤组织 IL-6 和 IL-6R 基因的表达(表 3)

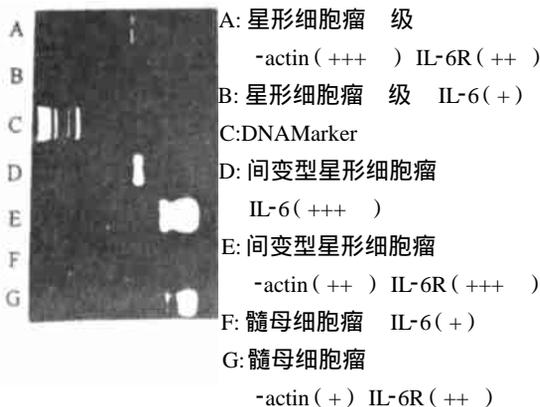


图 1 RT-PCR 检测脑胶质瘤 IL-6 和 IL-6R 基因的电泳结果

52 例肿瘤标本中 38 例有 IL-6 表达,占 73.1%;44 例有 IL-6R 的表达,占 84.6%; 有 33 例同时

以 -actin 为内参照,IL-6、IL-6R 及 -actin 的引物序列见表 1。

1.4 逆转录反应

逆转录酶 M-MLV, 购自 GIBCO 公司。取 $5 \sim 10 \mu\text{g}$ 细胞总 RNA, 加入 $0.1 \text{ MDTT}2 \mu\text{l}, 4 \times \text{dNTP}$ (10 mM 每种) $1 \mu\text{l}, \text{M-MLV} 1 \mu\text{l}$ (200 u), 下游引物 $\text{P}_2 1 \mu\text{l}$ (50 pmol/L), 总反应体积 $20 \mu\text{l}$ 。37 作用 1h 后, 95°C 10min 灭活 M-MLV。

1.5 PCR 反应

在 $20 \mu\text{l}$ RT 反应产物中, 加入 25 mM $\text{g-Cl}_2 8 \mu\text{l}, 4 \times \text{dNTP} 1 \mu\text{l}$, 上游引物 $\text{P}_1 1 \mu\text{l}$, 总反应体积为 $98 \mu\text{l}; 95^\circ\text{C}$ 5min 后, 加入 TaqDNA 聚合酶 $2 \mu\text{l}$ ($1 \text{ u}/\mu\text{l}$)。循环条件为 94°C 1min, 58°C 1min, 72°C 1min, 循环 35 次, 最后 72°C 延长 7min。

1.6 1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察 PCR 结果。

2 结果

2.1 脑胶质瘤细胞株 IL-6 和 IL-6R 基因的表达(表 2)

细胞株	-actin	IL-6	IL-6R
C6	++	+++	+
SHG-44	++	+++	++

注:+++ 为强表达 ++ 为一般表达 + 为弱表达

表达 IL-6 和 IL-6R, 占 63.5%。IL-6 和 IL-6R RT-PCR 结果的琼脂糖凝胶电泳见图 1。

2.3 人正常大脑组织及小脑组织只有 IL-6 弱阳性表达, 而无 IL-6R 的表达。

3 讨论

IL-6/IL-6R 的表达和调节与许多肿瘤的发生发展有关, 已经证实多发性骨髓瘤、卡勃齐肉瘤、白血病、肾癌、前列腺癌、肝癌、乳腺癌、食管癌等肿瘤组织中均有 IL-6 和 IL-6R 的异常表达, 而且很可能存在 IL-6/IL-6R 的自分泌或旁分泌作用^[2,3]。目前研究比较深入和肯定的是 IL-6/IL-6R 在多发性骨髓瘤中的作用, 实验证明多发性骨髓瘤的发生发展依赖 IL-6/IL-6R 自分泌环路的存在, 这是多发性骨髓瘤细胞恶性增殖并引起骨质破坏等临床表现的

关键环节^[4]。

近来,许多学者也观察到脑胶质瘤细胞株、脑胶质瘤组织、肿瘤周围浸润淋巴细胞以及正常胶质细胞中都有 IL-6 的异常分泌和表达^[5,6],初步推测脑胶质瘤的发生发展可能与 IL-6/IL-6R 有关。Goswami 等^[6]采用免疫荧光染色方法证实在多形性胶质母细胞瘤细胞株 U87MG 中有 IL-6 和 IL-6R 的共同表达,提示多形性胶质母细胞瘤存在促进肿瘤增殖的 IL-6/IL-6R 自分泌环路。LiuJ 等^[7]检测 12 例髓母细胞瘤组织标本和 3 株髓母细胞瘤细胞株,发现 11 例肿瘤标本和 3 个细胞株均有全套的 IL-6 传导基因 IL-6R 和 gp130 的表达,但无 1 例有 IL-6 表达;另外还发现外源性 IL-6 对肿瘤细胞的生长有明显的促进作用。因此,认为髓母细胞瘤本身虽无 IL-6 的表达和产生,但由于其存在 IL-6R,可以对肿瘤周围浸润淋巴细胞和胶质细胞产生的 IL-6 发生反应,通过 IL-6/IL-6R 旁分泌途径促进肿瘤的生长。

本组实验结果进一步证实不仅脑胶质瘤细胞株同时存在 IL-6 和 IL-6R,而且脑胶质瘤组织标本中 IL-6 与 IL-6R 的共同表达率亦达 63.5%,这为脑胶质瘤中 IL-6/IL-6R 自分泌环路的的存在提供了直接证据,是对前人观察结果的肯定和完善。另外,实验表明脑胶质瘤标本 IL-6R 的表达率高达 84.6%,而正常脑胶质细胞和肿瘤周围浸润淋巴细胞均能分泌 IL-6,它可以结合脑胶质瘤细胞的 IL-6R 构成 IL-6/IL-6R 的旁分泌环路,促进肿瘤的生长。因此,我们的结果提示脑胶质瘤很可能存在 IL-6/IL-6R 的自分泌或旁分泌环路。

IL-6/IL-6R 的自分泌或旁分泌环路的的存在,为脑胶质瘤的免疫治疗提供了新的思路和途径,我们可以通过各种方法阻断这种分泌环路以达到抑制肿瘤生长的目的,抗人 IL-6 单克隆抗体和抗人 IL-6R 单克隆抗体的成功制备和应用为其提供了可能^[8]。初步实验结果表明抗 IL-6 单抗或抗 IL-6R 单抗都能阻断多形性胶质母细胞瘤的 IL-6/IL-6R 环路,抑制肿瘤细胞的增殖^[6]。在多发性骨髓瘤的治疗研究中,应用各种药物或抗体来干扰或阻断 IL-6/IL-

6R 环路的临床试验已经取得了可喜的疗效^[9]。此外,IL-6R 由两个亚基构成,一般认为 IL-6 需先结合细胞膜上的 IL-6R 亚基,才能与亚基结合发挥生物学效应。可溶性 IL-6R (sIL-6R)的研究也为我们提供了另一种思路^[10],可以通过构建一种能与 IL-6 结合但不能与 IL-6R 亚基结合的 sIL-6R 的突变体,使其作为 IL-6 的拮抗物与膜受体竞争结合 IL-6,阻断 IL-6/IL-6R 之间形成自分泌或旁分泌环路,抑制肿瘤的恶性增殖。有关利用生物技术构建针对 IL-6/IL-6R 分泌环路的拮抗剂的试验研究工作也正在进行中。

参考文献:

- [1] Chomezynski P, et al. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. Anal Biochem, 1987, 162 (1): 156.
- [2] Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family cytokines[J]. Annu Rev Immunol, 1997, 15 (4): 797-819.
- [3] Ogata A, Nishimoto N, Yoshizaki K. Advances in interleukin-6 therapy[J]. Rinsho Byori, 1999, 47 (4): 321-326.
- [4] Villunger A, Egler A, Kos M, et al. Constituents of autocrine IL-6 loop promote cell lines and their targeting for suppression of neoplastic growth by antibody strategies[J]. Int J Cancer, 1996, 65 (4): 498-505.
- [5] Candi E, Knight RA, Spinedi A, et al. A possible growth factor role of IL-6 in neuroectodermal tumours[J]. J Neurooncol, 1997, 31 (1-2): 115-122.
- [6] Goswami G, Gupta A, Sharma SK. Interleukin-6 mediated autocrine growth promotion in human glioblastoma multiforme cell line U87MG[J]. J Neurochem, 1998 Nov, 71 (5): 1837-1845.
- [7] Liu J, Li H, Hamou MF, et al. Growth promoting effect of IL-6 on medulloblastoma cells in vitro[J]. Chung Hua Chun g Liu Tsai Chih, 1995, 17 (4): 271-274.
- [8] Kalai M, Montero-Julian FA, Brakenhoff JP, et al. Analysis of the mechanism of action of anti-human interleukin-6 and anti-human interleukin-6 receptor neutralising monoclonal antibodies[J]. Eur J Biochem, 1997, 249 (3): 690-700.
- [9] Chen YH, Shiao RT, Labatogoy JM, et al. Modulation of interleukin-6/interleukin-6 receptor cytokine loop in the treatment of multiple myeloma[J]. Leuk Lymphoma, 1997, 27 (1-2): 11-23.
- [10] Jablonska E. Soluble IL-6 receptors[J]. Postepy Hig Med Dosw, 1998, 52 (2): 133-138.

(贺文校对)