

# TLR9 抑制剂对胃癌细胞 MGC803 分泌 IL-6 的作用

李锐<sup>1</sup>, 张艳丽<sup>1</sup>, 李亚兰<sup>1</sup>, 李秀萍<sup>2\*</sup>

(1. 宁夏医科大学, 银川 750004; 2. 宁夏医科大学总医院, 银川 750004)

**[摘要]** **目的:**探讨免疫系统蛋白 TLR9 在胃癌细胞 MGC803 中的表达及其抑制剂氯喹(chloroquine, CQ)作用胃癌细胞 MGC803 不同时间段对其分泌白细胞介素-6(IL-6)的影响。**方法:**应用免疫荧光染色的方法检测胃癌 MGC803 细胞中 TLR9 的表达;运用 CCK-8 法检测 CQ 作用细胞 24, 48, 72 h 后, 观察药物对细胞活性的影响;ELISA 方法检测不同浓度 CQ 作用 MGC803 细胞不同时间点后, 细胞上清液中 IL-6 的活性水平。**结果:**免疫荧光染色方法显示胃癌 MGC803 细胞上有 TLR9 的表达;CCK-8 法检测不同浓度的抑制剂作用细胞 3 个时间段后对细胞的生长均具抑制作用, 差异有显著性( $P < 0.05$ );ELISA 结果表明, 200 mg·L<sup>-1</sup> CQ 作用细胞 24, 48, 72 h 后均可抑制 IL-6 的表达, 而 50, 100 mg·L<sup>-1</sup> 的 CQ 仅在作用细胞 72 h 后抑制 IL-6 的表达, 且差异具显著性( $P < 0.05$ )。**结论:**胃癌细胞系 MGC803 表达有 TLR9;TLR9 抑制剂 CQ 可抑制 IL-6 的表达。

**[关键词]** 免疫系统蛋白 TLR9; 氯喹; 胃癌; 白细胞介素-6

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0267-04

## Research of TLR9 Inhibitor Influenced Release of IL-6 on Gastric Cancer Cell MGC803

LI Rui<sup>1</sup>, ZHANG Yan-li<sup>1</sup>, LI Ya-lan<sup>1</sup>, LI Xiu-ping<sup>2\*</sup>

(1. Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China;

2. General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression of TLR9 in gastric cancer cell line MGC803 and the influence of TLR9 inhibitor chloroquine (chloroquine, CQ) treated the MGC803 cell in different period on the secretion of interleukin-6 (IL-6). **Method:** To Measure TLR9 expression in MGC803 gastric cancer cell line by immunofluorescence staining. Observed the effect of CQ in MGC803 cell at 24, 48, 72 h by CCK-8 assay. The bioactivity of IL-6 in the MGC803 cell suspension treated with different concentration CQ in three period was detected by ELISA. **Result:** MGC803 cells expressed TLR9. Different concentration of CQ could inhibit the growth of MGC803 cells ( $P < 0.05$ ) at different time point. 200 mg·L<sup>-1</sup> CQ decreased the bioactivity of IL-6 in 24, 48, 72 h, but 50, 100 mg·L<sup>-1</sup> CQ suppressed IL-6 expression only after 72 h ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** MGC803 cells expressed TLR9 and TLR9 inhibitor CQ could inhibit IL-6 bioactivity.

**[Key words]** TLR9; CQ; gastric cancer; interleukin-6

近年来研究发现,在胃癌的发生、发展、浸润和转移的过程中,白细胞介素-6(IL-6)作为一种多效

性的细胞因子在胃癌的恶性进展中起着重要的作用。众多的文献报道多是关于胃癌患者血清中白介素水平的变化,而本文在细胞模型层面探讨 IL-6 在胃癌发生发展中的作用。

### 1 材料和方法

**1.1 细胞与试剂** MGC803 细胞为本室保存, RPMI-1640 培养基为 GIBCO 公司产品;CCK-8 试剂盒购自碧云天生物技术研究;胎牛血清购自北京元亨金马公司;TLR9 抑制剂 CQ 为美国 Sigma 公司

**[收稿日期]** 20121002(004)

**[基金项目]** 宁夏自然科学基金项目(NZ11100)

**[第一作者]** 李锐,在读硕士,检验师,从事肿瘤免疫方面研究, Tel:18295072128, E-mail:li Rui4081@163.com

**[通讯作者]** \*李秀萍,教授,硕士生导师,从事肿瘤免疫方面研究, Tel: 0951-6744208, E-mail: lxp6689@163.com

生产,IL-6 ELISA 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;TLR9 免疫荧光抗体购自美国 Abcam 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 免疫荧光染色技术检测 MGC803 细胞 TLR9 的表达** 培养细胞达到 70%~80% 时,用胰酶将细胞消化成单个的细胞悬液,之后将单个的细胞悬液逐滴加至六孔板中经消毒处理过的洁净玻片上,将六孔板放回至 37℃,5% 的二氧化碳培养箱中培养,过夜,至次日。第 2 日将培养好的细胞取出用 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 的 PBS 缓冲液清洗玻片上的单层细胞 3 次,每次 5 min,之后用 4% 的多聚甲醛固定细胞 20 min,再用 PBS 缓冲液清洗 3 次,每次 5 min,再用 0.5% triton-X100 作用细胞 5 min,之后用 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 的 PBS 缓冲液再洗涤单层细胞 3 次,每次 5 min,在避光环境下加入荧光素标志的 1:50 滴度的 TLR9 抗体,将六孔板放入避光的湿盒中并于 37℃ 水浴箱中孵育 90 min,用 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 的 PBS 缓冲液再洗涤单层细胞 3 次,每次 5 min,在避光环境下将玻片置于盛有一滴中性树胶的载玻片上,立即在荧光显微镜下观察 MGC803 细胞 TLR9 的表达情况。

**1.2.2 CCK-8 法检测细胞的增殖活性** 按常规的方法用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,在 37℃,5% 的二氧化碳培养箱中对 MGC803 细胞进行培养。选取处于对数生长期且活性大于 95% 的细胞进行实验。调整细胞密度为 5 × 10<sup>5</sup>/mL 加入 96 孔培养板。实验分为 4 组,加药组①:50 mg·L<sup>-1</sup> 的 CQ 组;加药组②:100 mg·L<sup>-1</sup> 的 CQ 组;加药组③:200 mg·L<sup>-1</sup> 的 CQ 组;细胞对照组:不含胎牛血清的 1640 培养液。每组设 3 个复孔,分别作用 24, 48, 72 h,在终止培养的前 2 h,每孔加入 20 μL 的 CCK-8 试剂,在酶标仪 450 nm 波长下测定各孔的吸光度(A)。

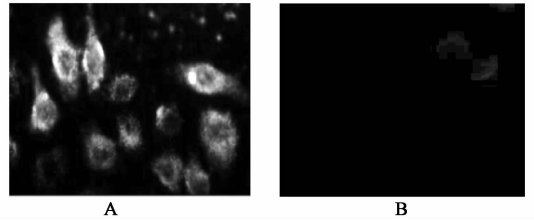
**1.2.3 ELISA 法检测细胞上清液中的 IL-6 的表达水平** 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,在 37℃,5% 的二氧化碳培养箱中对 MGC803 细胞进行培养。选取处于对数生长期且活性 >95% 的细胞进行实验。调整细胞密度为 5 × 10<sup>5</sup>/mL 加入 96 孔培养板。实验分为 4 组:同方法 1.2.2,观察不同浓度 CQ 作用细胞 72 h 后对 MGC803 细胞分泌 IL-6 的影响,每组设 3 个复孔;同时观察 200 mg·L<sup>-1</sup> 的 CQ 分别作用细胞 24, 48, 72 h 后检测 MGC803 细胞分泌 IL-6 的水平变化。终止培养时用加样枪轻轻吸取细胞上清液于 EP 管中, -20℃ 保存待检测,严

格按厂家说明书进行 IL-6 的检测。

**1.2.4 统计学处理** 全部资料采用 SPSS 18.0 的软件处理,应用单因素的方差分析进行统计,两组之间差异采用 LSD-t 检验,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 胃癌细胞 MGC803 有 TLR9 的表达** 应用免疫荧光染色检测方法观察到 MGC803 细胞上有 TLR9 的表达。结果见图 1。



A. 胃癌细胞; B. 对照组

图 1 免疫荧光方法检测到 MGC803 胞浆内有 TLR9 的表达 (×400)

**2.2 TLR9 抑制剂 CQ 对 MGC803 细胞增殖活性的影响** CQ 50, 100, 200 mg·L<sup>-1</sup> 的 CQ 均能抑制 MGC803 细胞增殖,且呈现时间和浓度依赖性 (P < 0.05),见表 1。

表 1 CQ 对 MGC803 细胞不同时间增殖活性的影响 (x̄ ± s)

分组	CQ /mg·L <sup>-1</sup>	A		
		24 h	48 h	72 h
加药①	50	0.756 ± 0.034 <sup>1)</sup>	0.443 ± 0.028 <sup>1)</sup>	0.323 ± 0.009 <sup>1)</sup>
加药②	100	0.675 ± 0.029 <sup>1)</sup>	0.422 ± 0.009 <sup>1)</sup>	0.312 ± 0.008 <sup>1)</sup>
加药③	200	0.465 ± 0.027 <sup>1)</sup>	0.421 ± 0.034 <sup>1)</sup>	0.309 ± 0.025 <sup>1)</sup>
对照	-	1.034 ± 0.055	1.215 ± 0.027	1.230 ± 0.050

注:与对照组比较<sup>1)</sup>P < 0.05。

**2.3 ELISA 法检测细胞上清液中 IL-6 的浓度** 用 50, 100, 200 mg·L<sup>-1</sup> 的 CQ 对 MGC803 细胞作用 72 h 后,未经 CQ 作用的 MGC803 细胞为对照组,采用 ELISA 法检测细胞上清液中 IL-6 的含量,结果见图 2。再用 200 mg·L<sup>-1</sup> 的 CQ 作用 MGC803 细胞 24, 48, 72 h,观察 CQ 对 IL-6 分泌水平的影响,结果见表 2。

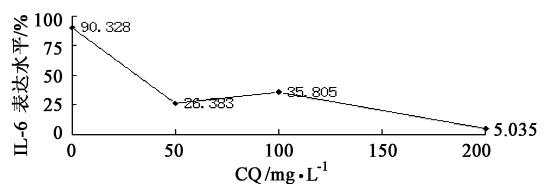


图 2 不同浓度 CQ 作用 MGC803 细胞 72 h 后 IL-6 水平

表 2 200 mg·L<sup>-1</sup> 的 CQ 在 3 个时间点  
对 IL-6 分泌水平的影响( $\bar{x} \pm s$ )

分组	剂量 /mg·L <sup>-1</sup>	IL-6/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$		
		24 h	48 h	72 h
CQ 加药	200	9.263 ± 0.852	8.398 ± 4.432	5.035 ± 1.272 <sup>1)</sup>
对照	0	6.668 ± 1.015	10.323 ± 8.049	90.328 ± 10.282

注:与对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ 。

结果显示,200 mg·L<sup>-1</sup> 的 CQ 在 3 个时间段均可抑制 IL-6 的活性,并呈现时间和浓度依赖性,差异具有显著性( $P < 0.01$ ),但 CQ 50,100 mg·L<sup>-1</sup> 在作用细胞 72 h 后才可抑制 IL-6 的释放。

### 3 讨论

倪冲等<sup>[1]</sup>发现乌骨藤中的活性成分对 MGC 细胞具有抗肿瘤的作用。王炎等<sup>[2]</sup>报道健脾解毒方通过调控 p38MAPK/ATF-2 信号通路,抑制 COX-2 启动子活性,是预防 *Helicobacter pylori* 诱发胃癌的机制之一。冯丽丽等<sup>[3]</sup>发现半夏泻心汤对胃癌的防治也有一定的应用。

前期的实验研究中,用 RT-PCR 检测到 MGC803 细胞中有 TLR9 mRNA 的表达<sup>[4]</sup>,Western-blot 的方法也检测到了胃癌细胞 MGC803 细胞中有 TLR9 蛋白的表达<sup>[5]</sup>。本次实验用免疫荧光染色的方法再次证实了 TLR9 大量表达于 MGC803 细胞的胞浆中,少量的表达于细胞核中,这与课题组前期的研究以及相关的文献报道一致。用 CCK-8 法检测 TLR9 受体的抑制剂 CQ 对胃癌细胞的增殖活性的影响,观察到随着 CQ 作用浓度和作用时间的变化,其抑制胃癌细胞的增殖作用越来越明显,呈现时间和浓度的依赖性。

CQ 在治疗自身免疫性疾病,病毒感染性疾病,抗肿瘤方面如在治疗肺癌 A549 细胞、人结肠癌和乳腺癌细胞甚至在治疗艾滋病方面也被人们发现具有重大的作用。作为一种抗疟疾的药物可通过抑制早起内体的酸化和成熟从而抑制 CpGODN 诱导的单核细胞的活化<sup>[6]</sup>。近年来被人们发现作为 TLR 的抑制剂也能够抑制肿瘤细胞的增殖,并逐步被应用临床试验当中显示出了明显的效果。本次试验发现 CQ 200 mg·L<sup>-1</sup> 作用于 MGC803 细胞 24 h 即可起到降低 IL-6 的作用,从而改善细胞生存的炎性环境,随着时间延伸至 72 h 时,50 mg·L<sup>-1</sup> 的 CQ 也能够明显降低 IL-6 的水平。

IL-6 是由多种细胞分泌的具多种生物学功能的细胞因子。一方面它能够以自分泌或者旁分泌的作

用直接作用于肿瘤细胞,另一方面它能够改变机体的微环境,如诱导急性反应,促进微血管的生成,调节机体对肿瘤细胞的免疫反应等等。IL-6 通过与细胞表面的受体结合后能够活化细胞内的信号转导从而启动一系列包括细胞周期调控蛋白等的基因表达,促使肿瘤血管的生成,肿瘤干细胞的无限增殖等等。Eldesoky 等<sup>[7]</sup>报道无论有无转移的结肠癌患者,IL-6 水平明显高于健康体检者,而且发现晚期患者 IL-6 水平远高于早期者。这与本研究的发现相一致,在本研究中发现当细胞培养至 72 h 时,上清液中的 IL-6 水平骤然升高。推测 IL-6 可能是一个晚期释放的细胞因子,这也在一定程度上解释了为什么胃癌等肿瘤病人在晚期时候癌细胞会有大面积的浸润和转移,可能是 IL-6 骤然释放,在机体内部形成了一个高度炎性的环境,使得更多的 Th0 型细胞向 Th2 型细胞转移,抑制了发挥抗肿瘤效应的 Th1 型细胞的功能,细胞免疫功能被抑制从而有利于肿瘤浸润和转移。任守忠等<sup>[7]</sup>发现应用中药制剂安胃丸可下调 NF- $\kappa$ B p65 的水平来抑制细胞因子的转录,释放,从而抑制炎症反应。熊永爱等<sup>[9]</sup>等研究也发现抑制 NF- $\kappa$ B 的活性,可以减少 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 等促炎因子的释放。

本研究观察到 CQ 这一弱碱性的药物能够显著地降低细胞上清液中 IL-6 的水平,可能机制为氯喹提供的弱碱性环境升高了细胞内包涵体的 pH,抑制了内涵体的酸化、成熟,进而抑制了肿瘤细胞 MGC803 细胞表面由 TLR9 介导的信号通路的转导,提示 TLR9 信号通路参与了胃癌的进展,但其具体机制有待本室进一步的探讨。

### [参考文献]

- [1] 倪冲,裴志东,张稼小,等. 乌骨藤中白桦酯酸的提取分离及抗肿瘤活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(9):172.
- [2] 王炎,刘宁宁,周利红,等. 健脾解毒方介导 p38MAPK 信号转导下调幽门螺杆菌诱导的胃癌细胞环氧合酶 2 启动子活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(14):105.
- [3] 冯丽丽,张爱平,董银平. 半夏泻心汤在胃癌防治中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(2):258.
- [4] 李煜淇,张艳丽,刘瑛. TLR9 在胃癌细胞上的表达及其作用的实验研究[J]. 宁夏医科大学学报,2010,32(7):770.
- [5] 马亚军,张艳丽,崔柳,等. TLR9 表达与胃癌临床病理特征关系的初步研究[J]. 宁夏医科大学学报,2012,34(2):125.

# 构树叶总黄酮对人肝癌细胞 HepG-2 增殖和凋亡的作用及其机制研究

朱开梅<sup>1</sup>, 姚丽新<sup>2</sup>, 刘建楠<sup>1</sup>, 桂劲松<sup>1</sup>, 顾生玖<sup>1\*</sup>

(1. 桂林医学院, 广西 桂林 541004; 2. 广西壮族自治区南溪山医院, 广西 桂林 541002)

**[摘要]** 目的:探讨构树叶总黄酮(TFBP)对人肝癌细胞(HepG-2)增殖和凋亡的作用。方法:采用细胞增殖实验(MTT法),取对数生长期 HepG-2,随机分为药物组和对照组,用 3,6,9,12 g·L<sup>-1</sup>不同质量浓度构树叶总黄酮作用 HepG-2,分别干预 24,48,72 h。通过流式细胞仪检测在以上质量浓度下作用细胞 48 h 后的细胞凋亡率,Western blot 法检测以上质量浓度构树叶总黄酮作用细胞 48 h 后 Bcl-2 基因、促凋亡基因 Bax 表达的情况。结果:各质量浓度构树叶总黄酮对 HepG-2 的生长有显著的抑制作用,呈明显的时间和剂量依赖性,经不同质量浓度的构树叶总黄酮作用 48 h 后 HepG-2 凋亡率显著增加,药物组与对照组比较为(0.478 ± 0.085 vs 0.498 ± 0.014; 0.354 ± 0.004 vs 0.498 ± 0.014; 0.218 ± 0.075 vs 0.498 ± 0.014)有显著性差异,  $P < 0.05$ , 抑癌基因 Bcl-2 表达量呈逐渐下降的趋势,促凋亡基因 Bax 表达量随着质量浓度的升高表达量呈现上升趋势。结论:构树叶总黄酮可以有效的抑制 HepG-2 的生长,诱导细胞凋亡,其诱导该细胞凋亡的作用可能是通过下调抑癌基因 Bcl-2 的表达,可为肝癌的生物学治疗提供新的方法。

**[关键词]** 构树叶总黄酮; 肝癌; 增殖; 凋亡

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0270-04

## Effects of Total Flavonoids of *Broussonetia papyrifera* on Proliferation and Apoptosis of Hepatocellular Carcinoma HepG-2 Cells

ZHU Kai-mei<sup>1</sup>, YAO Li-xin<sup>2</sup>, LIU Jian-nan<sup>1</sup>, GUI Jin-song<sup>1</sup>, GU Sheng-jiu<sup>1\*</sup>

(1. Guilin Medical University, Guilin 541004, China;

2. Nanxishan Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Guilin 541002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of total flavonoids of *Broussonetia papyrifera* on growth and apoptosis of hepatocellular carcinoma HepG-2 cells. **Method:** The MTT assay was used, and the hepatocellular carcinoma HepG-2 cells in logarithmic phase of growth were randomly divided into drug group and control group, with the concentration of 3, 6, 9, 12 g·L<sup>-1</sup> total flavonoids of *B. papyrifera* in hepatocellular

**[收稿日期]** 20120630(001)

**[基金项目]** 广西科技特派员专项(桂科攻 09321056, 桂科能 129825-21); 广西教育厅项目(201202ZD065); 桂林市科技攻关项目(20110106-5, 20120105-5, 20120105-16, 20120105-8)

**[第一作者]** 朱开梅, 硕士, 教授, 从事化学致病分子机制和药物防治研究, E-mail: glzkm@163.com

**[通讯作者]** \* 顾生玖, 博士, 教授, Tel: 13607733816, E-mail: 5899602@glmc.edu.cn

[6] Wang J, Zhou H, Zheng J, et al. The antimalarial artemisin in synergizes with antibiotics to protect against lethal live *Escherichia coli* challenge by decreasing proinflammatory cytokine release[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(7): 2420.

[7] Eldesoky A, Shouma A, Mosaad Y, et al. Clinical relevance of serum vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in patients with colorectal cancer [J].

Saudi J Gastroenterol, 2011, 17(3): 170.

[8] 任守忠, 郭建生, 李鑫, 等. 安胃丸对慢性胃炎大鼠血清炎症因子及胃黏膜核因子- $\kappa$ B 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4): 198.

[9] 熊永爱, 韩丽, 王森, 等. 氧化苦参碱干预 I $\kappa$ B- $\alpha$  蛋白对溃疡性结肠炎的治疗作用机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8): 152.

[责任编辑 邹晓翠]