

网络出版时间: 2024-07-18 14:07:08 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240717.1656.028>

CAFs 促进 ADH1B 甲基化对卵巢癌细胞增殖及侵袭的影响

李泽莲¹, 季维雪², 杨媛媛¹, 肖兰³, 曹云霞¹

摘要 目的 探讨肿瘤相关成纤维细胞(CAFs)分泌的IL-6对卵巢癌细胞增殖及侵袭的影响及机制。方法 收取新鲜离体上皮性卵巢癌及正常卵巢上皮组织,分离纯化获得CAF及正常卵巢成纤维细胞(NFs);蛋白质印迹和免疫荧光实验检测上皮细胞和成纤维细胞标志物 α -平滑肌动蛋白(α -SMA)、上皮型钙黏附素(E-cadherin)表达;收集CAF和NFs培养上清液与卵巢癌SKOV3细胞建立间接共培养体系,细胞分为SKOV3单独培养(SKOV3)组、SKOV3与NFs上清液(NFs)组及SKOV3与CAF上清液(CAFs)组;细胞免疫组化检测SKOV3细胞共CAF及NFs上清液培养后乙醇脱氢酶1B(ADH1B)表达;甲基化特异性PCR(MSP)、逆转录实时荧光定量PCR(RT-qPCR)、酶联免疫吸附试验(ELISA)及蛋白质印迹实验分别检测甲基化抑制剂5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-dC)干预前后各组细胞ADH1B mRNA表达及甲基化状态、信号转导和激活因子3(STAT3)蛋白磷酸化水平;细胞计数试剂盒8(CCK-8)法及Transwell实验分别检测IL-6抑制剂LMT-286及重组IL-6(rhIL-6)对细胞增殖及侵袭能力的影响。结果 肿瘤成纤维细胞中高表达 α -SMA,极低表达E-cadherin;相比较SKOV3组及NFs组,CAF组ADH1B mRNA及蛋白表达明显下调,同时CAF组细胞上清液中IL-6水平较SKOV3组及NFs组明显升高;5-Aza-dC作用后ADH1B甲基化部分逆转;三组细胞ADH1B mRNA和蛋白表达均增加,CAF组STAT3磷酸化水平下降;LMT-286及rhIL-6干预均仅抑制或促进CAF组细胞增殖和侵袭,而SKOV3组和NFs组无明显改变。结论 CAFs通过IL-6/STAT3信号通路增强ADH1B甲基化促进卵巢癌细胞增殖和侵袭。

关键词 乙醇脱氢酶1B;甲基化;5-氮杂-2'-脱氧胞苷;白细胞介素-6;卵巢癌;细胞增殖

中图分类号

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)08-1377-08

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.08.013

卵巢癌是女性生殖系统常见三大恶性肿瘤之一,是一种高度异质性肿瘤,常发生转移和复发,预后极差^[1]。表观遗传修饰包括DNA甲基化、组蛋白修饰等。大量研究^[2]表明表观遗传学改变与卵巢癌发生、发展密切相关。乙醇脱氢酶1B(alcohol dehydrogenase 1B, ADH1B)是一种含锌金属酶类,是短链醇代谢的关键酶,调控乙醇^[3]和脂肪酸^[4]等短链醇的代谢。有研究^[5]报道ADH1B低表达可能与肝细胞癌的不良预后相关;因甲基化导致的ADH1B下调与乳腺癌不良预后相关^[6]。最新有研究^[7]认为ADH1B可作为一种肿瘤间充质抑制剂用于肿瘤治疗,但目前尚无肿瘤间质中ADH1B与卵巢癌的相关报导。该研究基于前期对ADH1B的研究,分离和培养了原代人卵巢癌肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)及正常卵巢成纤维细胞(normal fibroblasts, NFs),建立CAF及NFs与卵巢癌SKOV3细胞的间接共培养模型,旨在探讨肿瘤间质中ADH1B甲基化影响卵巢癌细胞增殖和侵袭的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 细胞株为卵巢癌SKOV3细胞,由安徽医科大学第一附属医院妇产科实验室保存。患者新鲜卵巢癌肿瘤标本:纳入30例年龄45~65岁上皮性卵巢癌患者的组织标本,其来源于2020年1月—2021年12月在安徽医科大学第一附属医院接受手术切除,术前未接受放疗、化疗或免疫治疗,临床分期II~IV期,术后病理诊断为上皮性卵巢癌;对应收集25例新鲜上皮性卵巢组织标本,其来源于同期48~65岁因良性疾病(子宫肌瘤)行全子宫双附件切除。所有患者均知情同意,并经安徽医科大学第一附属医院伦理委员会批准(编号: PJ2017-0704)。主要试剂:DNA纯化试剂盒购于德国Qiagen公司;去甲基化试剂5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-dC)购于美国Sigma公司;IL-6受体抑制剂LMT-286购于美国MCE公司;IL-6 ELISA试剂盒和重组白细胞介素6(recombinant human interleukin-6, rhIL-6)购自美国R&D公司;

2024-06-01 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(编号: 81603138)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院妇产科, 合肥 230022

²华东师范大学附属芜湖医院妇产科, 芜湖 241001

³中国科学技术大学第一附属医院(安徽省立医院)妇科, 合肥 230031

作者简介: 李泽莲, 女, 主治医师;

曹云霞, 女, 主任医师, 教授, 责任作者, E-mail: caoyunxia@126.com

DMEM 培养基、PBS 购自美国 Hyclone 公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和小牛血清 (calf serum, CS) 购自美国 GIBCO 公司; TRIzol 试剂购自美国 InvitroGen 公司; 逆转录实时荧光定量 PCR (reverse transcription quantitative real-time PCR, RT-qPCR) 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; 上皮型钙黏附素 (E-cadherin)、 α -平滑肌动蛋白 (alpha-smooth muscle actin, α -SMA) 检测试剂以及 ADH1B 兔多克隆抗体购自英国 Abcam 公司; 信号转导和激活因子 3 (signal transducers and activators of transcription 3, STAT3) 及 p-STAT3 抗体购自美国 Cell Signaling 公司; 细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8) 检测试剂盒购自上海碧云天有限公司; 免疫组化试剂盒购自北京中山公司。

1.2 方法

1.2.1 CAFs 及 NFs 的分离纯化及细胞培养 将从手术室取得的新鲜标本在无菌低温条件下快速运送至实验室, 在无菌操作台中进行实验, 首先将标本尽量剪碎, 与胶原酶充分混合, 置于 37 °C 温箱中, 消化时间为 2 h 左右, 加入 20% 胎牛血清浓度的 DMEM 培养基终止消化, 离心, 将上层含酶的培养基吸出弃掉, 留取底部细胞沉淀加入适量 20% 胎牛血清浓度的 DMEM 培养基接种于培养瓶中, 观察细胞生长情况, 待细胞浓度 80% 时根据上皮细胞和成纤维细胞对酶耐力不同的特性使用细胞时间差酶消化法使两者分开, 纯化成纤维细胞, 使用第 3~9 代成纤维细胞及其上清液行后续实验。

1.2.2 免疫荧光实验鉴定卵巢癌 CAFs 将对数生长期的成纤维细胞相同方法传代到共聚焦培养皿中进行实验, 首先 PBS 清洗去除含血清的培养基, 用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 再次用 PBS 清洗去除多余固定剂, 1% BSA 封闭 30 min, 再次清洗去除 BSA, 加入 1:100 的一抗 α -SMA 4 °C 冰箱孵育过夜, PBS 清洗去除一抗, DAPI 避光孵育 10 min, PBS 洗 2 遍, 动作轻柔, 最后用抗荧光淬灭剂封片液 (10 μ l) 封片 (注意排空气泡), 共聚焦显微镜观察拍照。

1.2.3 间接共培养体系建立 采用第 3~9 代成纤维细胞用于共培养中上清液收取, 即 PBS 洗去含血清的培养基, 更换成为无血清的培养基培养对数生长期的成纤维细胞, 培养时间为 24 h, 饥饿后的成纤维细胞形态变得更加细长, 此时将其上清液收取, 离心, 去除细胞杂质备用, 在本实验中将 SKOV3 细胞与上述收取的成纤维细胞上清液进行实验 (血清浓度调成 10%, 培养时间为 24 h)。

1.2.4 细胞爬片制作及免疫组化 使用 0.1% 胰蛋白酶消化呈对数生长期细胞, 接种于培养皿 (有盖玻片) 中, 培养 24~48 h, PBS 冲洗后采用 4% 多聚甲醛固定 10 min, 中性树胶封片, -20 °C 存储备用; 于 -20 °C 取出细胞爬片, 室温中风干, 使用 0.3% Triton X-100 的 PBS 液透化处理 15 min, PBS 冲洗, 双氧水封闭内源性过氧化物酶 5~10 min; 正常羊血清封闭 15 min; ADH1B 的一抗 (1:100), 磷酸盐缓冲液代替一抗, 作为阴性对照。每张玻片随机选择 5 个高倍视野 ($\times 400$), 棕黄色颗粒标记在细胞膜上和胞质中为阳性细胞, 用免疫细胞化学评分 (immunohistochemical score, HIS) 法进行评分, 计算阳性细胞数和着色程度, 取均值。

1.2.5 细胞分组及干预 细胞分 3 组, 分别为 SKOV3 单独培养 (SKOV3) 组, SKOV3-NFs (NFs) 组及 SKOV3-CAF (CAF) 组, 各组细胞分别接种于 12 孔板, 孵育 24 h, 细胞密度至 70%~80% 融合后行实验。5-Aza-dC 作用浓度为 10 μ mol/L, LMT-286 作用浓度为 60 μ mol/L, rhIL-6 作用浓度 (40 μ g/L), 均干预 48 h。

1.2.6 DNA 甲基化特异性 PCR 使用 DNA 甲基化修饰试剂盒处理以甲基化修饰 DNA。扩增反应流程: 预变性 (95 °C, 12 min); 变性 (94 °C, 30 s), 退火 (58 °C), 延伸 (72 °C, 45 s), 共进行 45 个循环; 延伸 (72 °C, 10 min), 2% 琼脂糖凝胶电泳产物。ADH1B 甲基化特异性 PCR (methylation specific PCR, MSP) 甲基化引物序列: Forward, 5'-CCAGG-GATTAGGAGTGGACC-3'; Reverse, 5'-GGAGGGGA-AGAGCAGTTGTC-3'。未甲基化引物序列: Forward, 5'-CAGTGTGAAAATGCAGAG-3'; Reverse, 5'-GT-GACCTTGGCAACGTTA-3'。根据条带情况解读甲基化状态: ① 仅出现甲基化条带, 提示完全甲基化; ② 同时出现甲基化和非甲基化条带, 为部分甲基化; ③ 仅出现非甲基化条带, 为未甲基化。

1.2.7 RT-qPCR 检测 ADH1B mRNA 表达 收集经或未经 5-Aza-dC (10 μ mol/L) 处理的各组 SKOV3 细胞, TRIzol 法提取 RNA 后反转录成 cDNA 以行荧光定量。ADH1B 引物为: Forward 5'-GTGGACAAGC-GTCATCGTAGG-3'; Reverse 5'-TTCCAGGTGCGTCC-AGTCAGTAG-3'。 β -actin 引物: Forward 5'-AGAAG-GCTGGGGCTCATTG-3'; Reverse 5'-AGGGGCCAT-CCACAGTCTTC-3'。2 ^{$\Delta\Delta C_T$} 法计算 ADH1B 基因 mRNA 表达, 实验重复 3 次。

1.2.8 ELISA 检测细胞培养上清液中 IL-6 水平

以 1×10^5 个/ml 密度将正常 NFs、卵巢癌成纤维细胞和 SKOV3 细胞接种到 6 孔板中, 培养待细胞增至 70% 密度, 更换 DMEM 培养基(无血清)继续培养 24 h, 后离心收集培养上清液, 使用 IL-6 ELISA 试剂盒测定, 重复 2 次。根据阳性蛋白对照绘制标准曲线, 取 450 nm 处吸光度值, 计算 IL-6 蛋白浓度。

1.2.9 去甲基化药物的细胞毒性检测 按 1×10^4 个/孔浓度细胞接种至 96 孔板, 培养 24 h。CCK-8 法检测细胞增殖: 使用或不使用 5-Aza-dC(10 $\mu\text{mol/L}$) 处理 SKOV3 细胞 48 h, 按 100 : 1 比例加 CCK-8 工作液, 培养 1 h, 酶标仪以 450 nm 波长检测吸光度。

1.2.10 蛋白质印迹实验检测 E-cadherin、ADH1B、STAT3 及 p-STAT3 蛋白表达 RIPA 裂解液裂解 SKOV3 细胞, BCA 法检测 SKOV3 细胞蛋白量, 10% SDS-PAGE 电泳分离, 后转于 PVDF 膜跑胶分离蛋白。快速封闭液封闭 15 min, 一抗孵育过夜(4 $^{\circ}\text{C}$), 清洗后二抗孵育 2 h(室温), 成像系统观察印迹并拍照, Image J 软件统计 E-cadherin、ADH1B、STAT3 及 p-STAT3 蛋白的表达。

1.2.11 IL-6 抑制剂及重组 IL-6 的细胞毒性检测 按 1×10^4 个/孔浓度接种 SKOV3 细胞至 96 孔板, 继续培养 24 h。LMT-286 60 $\mu\text{mol/L}$ 及 rhIL-6 40 $\mu\text{g/L}$ 分别干预 SKOV3 细胞 48 h, 按 100 : 1 比例加 CCK-8 工作液, 培养 1 h, 酶标仪(450 nm 波长)检测吸光度值。

1.2.12 IL-6 抑制剂和重组 IL-6 对体外细胞侵袭的影响 制备各组单细胞悬液, 并将细胞重悬于无血清培养基中, 将 200 μl 细胞浓度为 8×10^3 个/ml 的细胞加入 Transwell 的上室, 将 500 μl 含 10% 小牛血清的培养基加入下室。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱培养 48 h, 然后加入乙醇固定, 使用结晶紫染色, 风干后计数下室细胞数, 实验重复 3 次, 结果取平均值。

1.3 统计学处理 利用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 通过 *t* 检验和方差分析行统计分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤成纤维细胞 α -SMA 和 E-cadherin 表达水平 为检测分离培养的 NFs 和 CAFs 纯度, 选取传至第 3 代的 NFs 和 CAFs 细胞, 免疫荧光染色结果(图 1A)显示, NFs 和 CAFs 均表达成纤维细胞标志物 α -SMA, 但 CAFs 中的 α -SMA 表达水平显著高于 NFs, 表明 CAFs 具有更高的肌成纤维细胞特性。

Western blot 方法检测 NFs 和 CAFs 细胞中极低表达上皮标志物 E-cadherin, 定量分析结果表明, NFs 和 CAFs 之间 E-cadherin 的表达水平无显著差异(图 1B)。结果表明, NFs 和 CAFs 细胞成功分离获取, CAFs 具有更高的 α -SMA 表达, 符合其活化成纤维细胞的特性, 同时两种细胞类型均表现出低 E-cadherin 表达的典型成纤维细胞特征。

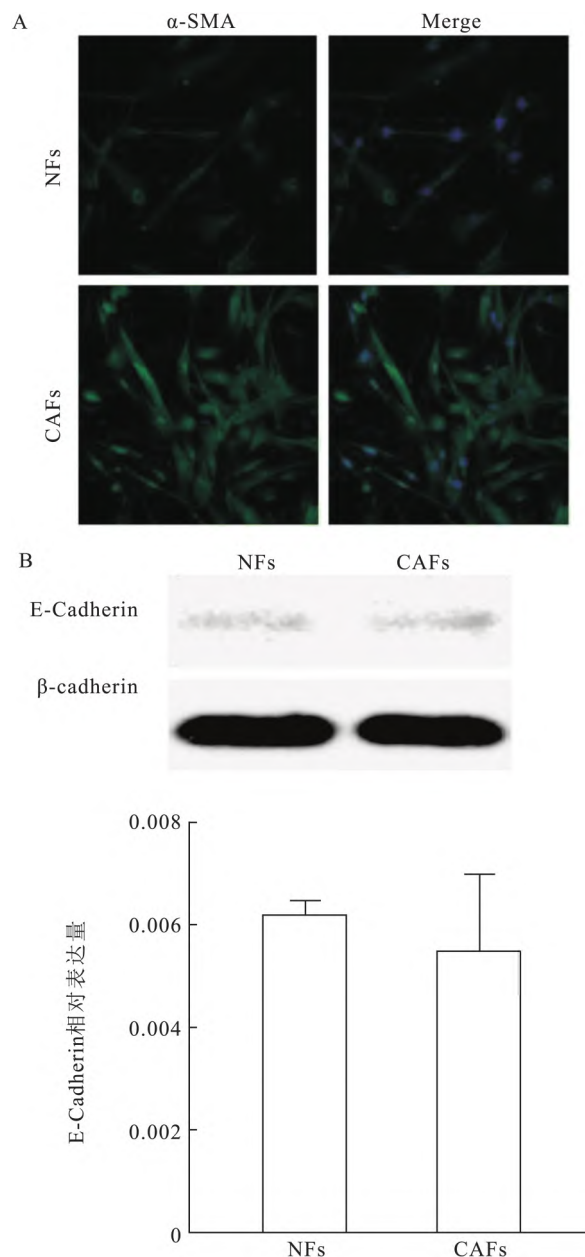


图1 肿瘤成纤维细胞 α -SMA 和 E-cadherin 表达

A: NFs 和 CAFs 细胞 α -SMA 蛋白表达 $\times 40$; 蓝色荧光: DAPI 染色 NFs 和 CAFs 细胞核; 绿色荧光: FITC 荧光二抗标记 NFs 和 CAFs 中 α -SMA; B: NFs 及 CAFs 中 E-cadherin 蛋白及其相对表达比较

2.2 细胞 ADH1B 免疫组化检测 结果显示, 三组细胞 HIS 值分别为 (3.17 ± 0.06)、(2.72 ± 0.11) 及

(1.88 ± 0.81) 分 相比较 SKOV3 组及 NFs 组 ,CAF_s 组中 ADH1B 表达整体降低 ($F = 533.1$, $P < 0.0001$) (图 2A、B) ,提示 CAF 细胞可以降低 SKOV3 细胞中 ADH1B 的表达。

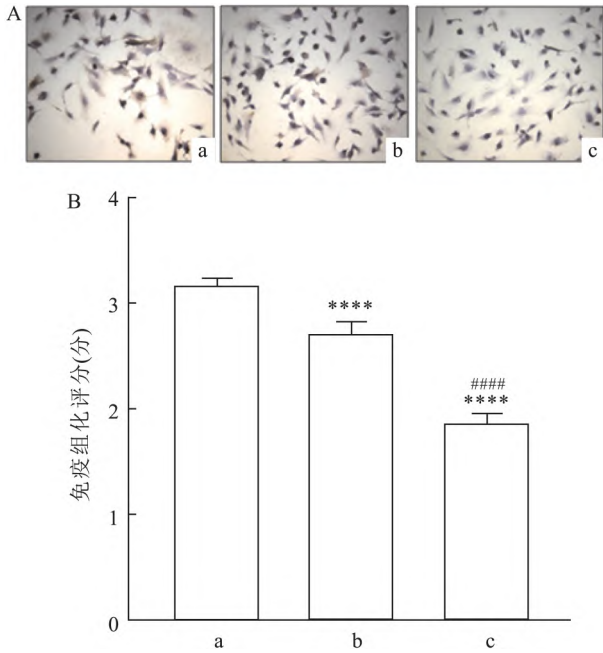


图2 细胞 ADH1B 免疫组化检测结果比较

A: 各组细胞 ADH1B 蛋白表达 ×20; B: 各组细胞 ADH1B 蛋白免疫组化评分比较; a: SKOV3 组; b: NF_s 组; c: CAF_s 组; 与 SKOV3 组比较: **** $P < 0.0001$; 与 NF_s 组比较: #### $P < 0.0001$

2.3 5-Aza-dC 对 ADH1B 启动子甲基化的影响 3 组细胞中 ADH1B 启动子均处于完全甲基化状态 , 其中 ,CAF_s 组 ADH1B 启动子甲基化程度最高; 但使用 5-Aza-dC (10 μmol/L) 处理 3 组细胞 48 h 后 3 组细胞中 ADH1B 基因启动子均出现非甲基化带 , 且甲基化带未完全消失 表明 3 组细胞中 ADH1B 启动子甲基化均在一定程度上被逆转。见图 3。

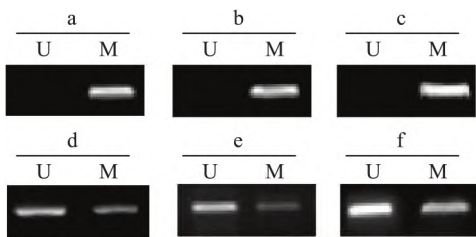


图3 3 组细胞经 5-Aza-dC 处理前后 ADH1B 基因启动子甲基化

a: SKOV3 对照组; b: NF_s 组; c: CAF_s 组; d: 5-Aza-dC 处理 SKOV3 组 e: 5-Aza-dC 处理 NF_s 组; f: 5-Aza-dC 处理 CAF_s 组; U: 非甲基化; M: 甲基化

2.4 5-Aza-dC 对 ADH1B mRNA 表达影响 结果

显示 5-Aza-dC (10 μmol/L) 处理 3 组细胞 48 h ,SKOV3 及 NF_s 组 ADH1B mRNA 均明显升高 ,而 CAF_s 组中 ADH1B mRNA 升高更为显著 ($t_{SKOV3} = 13.70$, $t_{NFs} = 99.80$, $t_{CAF_s} = 101.50$, $P < 0.0001$) 。见图 4。

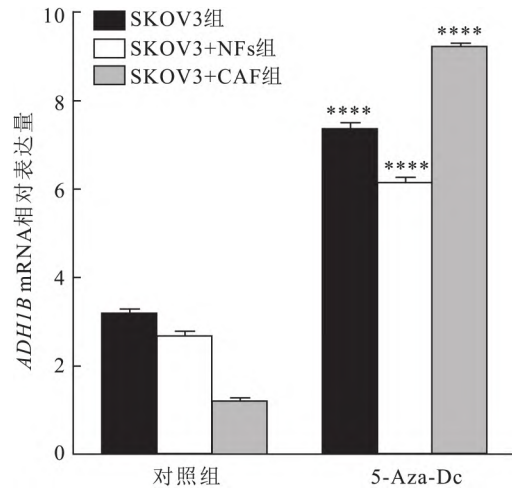


图4 细胞中 ADH1B mRNA 表达水平比较
与对照组比较: **** $P < 0.0001$

2.5 细胞上清液中 IL-6 水平比较 ELISA 结果显示 与 SKOV3 组相比 ,CAF_s 组 IL-6 水平升高 ,差异有统计学意义 ($t = 42.95$, $P < 0.0001$) ,提示 CAF_s 可促进卵巢癌肿瘤微环境中 IL-6 分泌。见图 5。

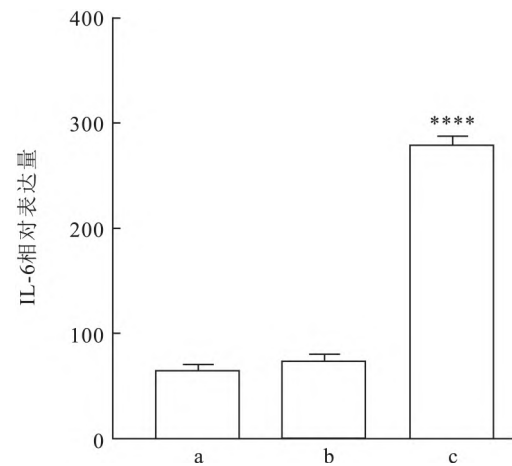


图5 各组细胞上清液中 IL-6 蛋白表达

1: SKOV3 组; 2: NF_s 组; 3: CAF_s 组; 与 SKOV3 组比较: **** $P < 0.0001$

2.6 蛋白质印迹检测 ADH1B、T-STAT3 及 p-STAT3 蛋白表达情况 结果显示 ,未经 5-Aza-dC 作用的 3 组细胞中 ADH1B 蛋白均处低表达状态; 5-Aza-dC (10 μmol/L) 作用后 3 组细胞中 ADH1B 蛋白均表达增加 ($t_{SKOV3} = 7.65$, $t_{NFs} = 14.57$, $t_{CAF_s} =$

20.08, $P < 0.0001$), CAFs 组 p-STAT3/T-STAT3 水平下降 ($t_{\text{CAFs}} = 13.47, P < 0.0001$), 而 SKOV3 及 NFs 组 p-STAT3/T-STAT3 水平改变差异无统计学意义 ($t_{\text{SKOV3}} = 1.52, t_{\text{NFs}} = 6.67, P > 0.05$)。见图 6。

2.7 IL-6 抑制剂及重组 IL-6 对细胞存活率影响

IL-6 通路抑制剂 LMT-286 (60 $\mu\text{mol/L}$) 干预后, 相比较 SKOV3 空白对照组, NFs 及 SKOV3 组细胞增殖能力改变差异无统计学意义, CAFs 组的细胞存活数

目减少 ($F = 169.0, P < 0.0001$), 见图 7A; 而 rhIL-6 干预后, 相比较 SKOV3 空白对照组, NFs 及 SKOV3 组细胞增殖能力改变差异无统计学意义, CAFs 组细胞存活数目增加 ($F = 17.16, P < 0.01$), 见图 7B。

2.8 IL-6 抑制剂及重组 IL-6 对细胞侵袭能力影响

镜下检测结果显示 IL-6 通路抑制剂 LMT-286 (60 $\mu\text{mol/L}$) 干预后, 相比较 SKOV3 空白对照组, NFs 及 SKOV3 组穿过微孔膜的细胞数目差异无统计学意

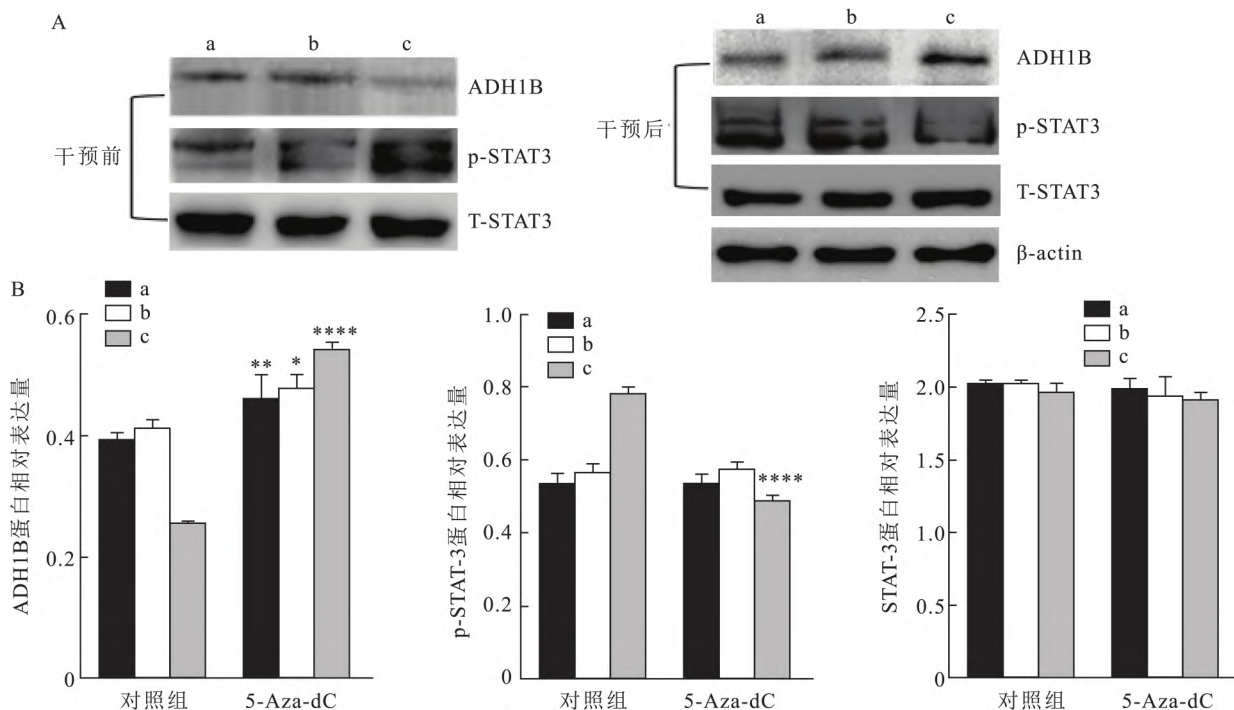


图6 各组细胞 ADH1B、T-STAT3 及 p-STAT3 蛋白表达

A: 5-Aza-dC 处理前后各组细胞 ADH1B、p-STAT3 及 T-STAT3 蛋白表达; B: 5-Aza-dC 处理前后各组细胞 ADH1B、p-STAT3 及 T-STAT3 蛋白相对表达比较; a: SKOV3 组; b: NFs 组; c: CAFs 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

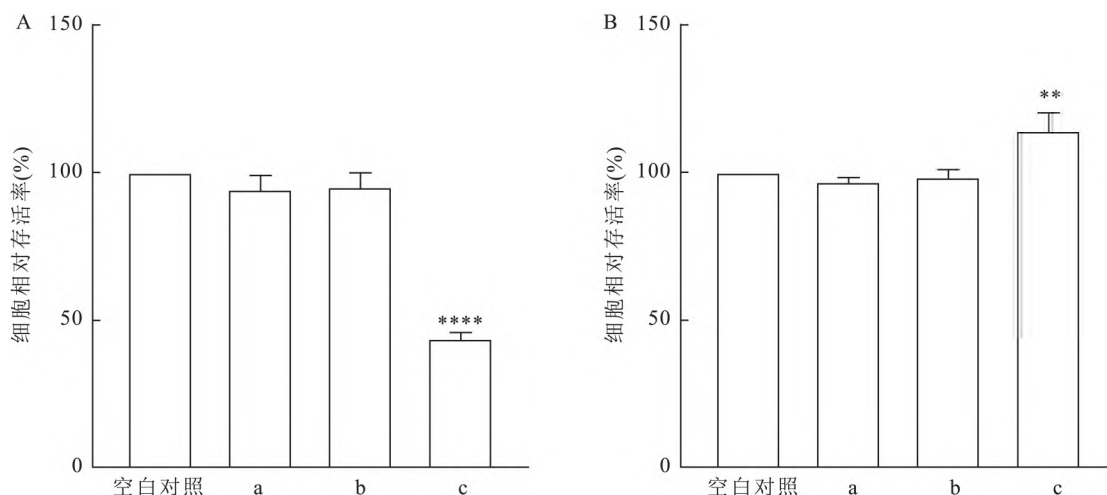


图7 CCK-8 法检测 LMT-286 及 rhIL-6 干预各组细胞增殖情况

A: LMT-286 干预; B: rhIL-6 干预; a: SKOV3 组; b: NFs 组; c: CAFs 组; 与空白对照组比较: ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$

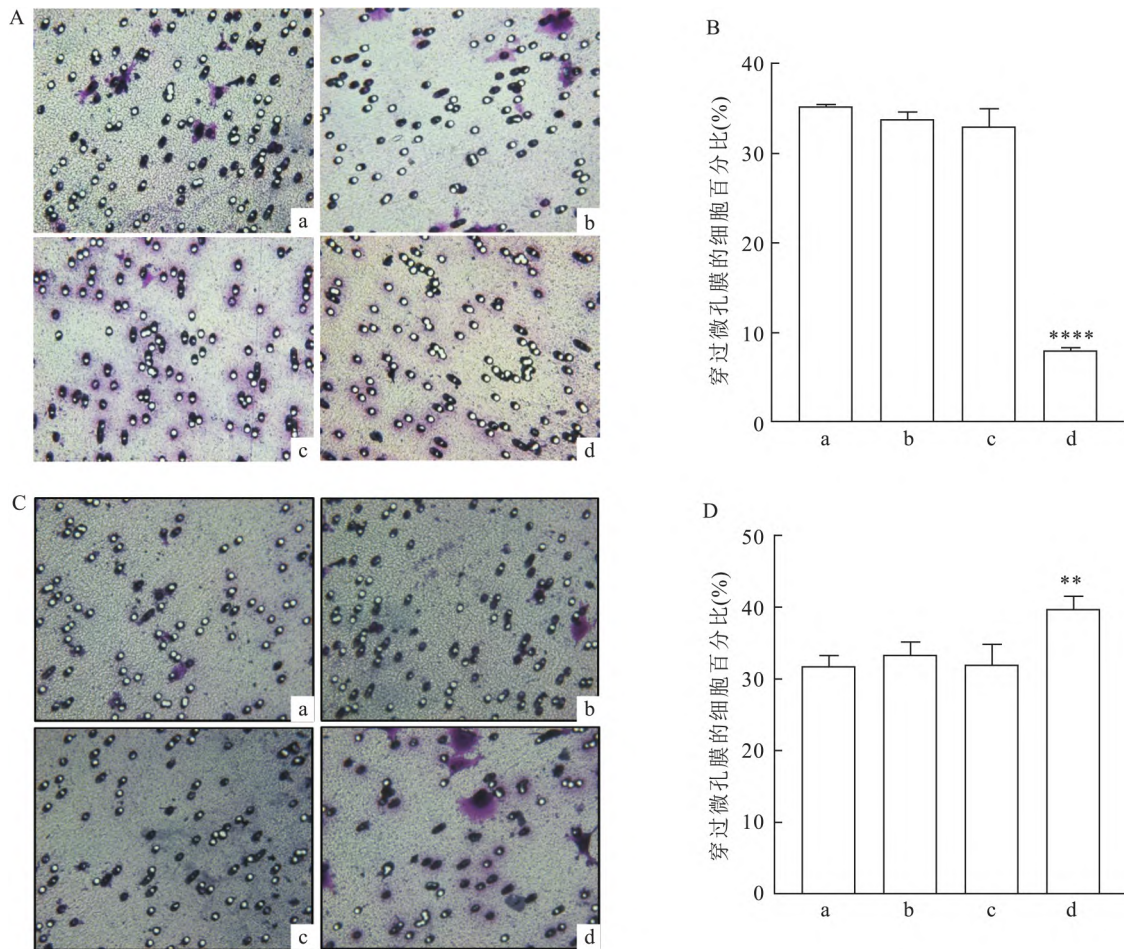


图8 镜下 LMT-286 及 rhIL-6 干预后对各组细胞侵袭能力检测情况

A: LMT-286 干预各组细胞侵袭能力 结晶紫染色 ×400; B: LMT-286 干预各组穿过微孔膜细胞百分比比较; C: rhIL-6 干预各组细胞侵袭能力 结晶紫染色 ×400; D: rhIL-6 干预各组穿过微孔膜细胞百分比比较; a: 空白组; b: SKOV3 组; c: NFs 组; d: CAFs 组; 与空白对照组比较: ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$

义,而 CAFs 组穿过微孔膜的细胞数目减少,差异有统计学意义($F = 472.9, P < 0.0001$),见图 8A、B; 而 rhIL-6($40 \mu\text{g/L}$) 干预后,相比较 SKOV3 空白对照组, NFs 及 SKOV3 组穿过微孔膜的细胞数目差异无统计学意义,而 CAFs 组穿过微孔膜的细胞数目却增加,差异有统计学意义($F = 15.50, P < 0.01$),见图 8C、D。

3 讨论

作为乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase , ADH) 家族一员, ADH1B 基因编码 I 类 ADH 的 β 亚基, 构成功能性酶蛋白的主要亚基。一项肿瘤模型研究^[8]证实多种肿瘤中均存在 ADH1B 基因表达差异; Li et al^[9] 研究发现几乎所有癌症类型中 ADH1B 表达均被抑制, 细胞体外实验^[10] 也证明 ADH1B 主要作为抑癌基因发挥作用。肿瘤细胞 DNA 异常甲基

化是常见表观遗传学改变, DNA 异常甲基化可抑制基因转录, 解除抑癌基因抑癌作用。CAFs 是存在于肿瘤间质中活化的成纤维细胞^[11]。近年来有研究^[12]表明表观遗传因素可驱动成纤维细胞转化为 CAFs, CAFs 细胞 DNA 甲基化异常与肿瘤发生发展相关^[13]。本课题前期研究提示 ADH1B 基因甲基化在上皮性卵巢癌发生发展中发挥重要作用, 其机制有待进一步研究^[14]。

本研究分离得到 CAFs 和 NFs 后, 利用 Western blot 和免疫荧光检测了上皮及成纤维细胞标志物表达水平, 结果表明肿瘤成纤维细胞中高表达 α -SMA、极低表达 E-cadherin。为分析 CAFs 对卵巢癌发生发展的影响及机制, 该研究建立了 CAFs 与卵巢癌细胞间接共培养体系, 运用细胞免疫组化及 RT-qPCR 实验结果检测到 SKOV3 与 CAFs 共培养后细胞中 ADH1B 表达进一步下降; 甲基化特异 PCR

结果表明经 5-Aza-dC 作用的 3 组细胞 *ADH1B* 甲基化状态在一定程度上被逆转, 尤以 CAFs 组 *ADH1B* 最显著。以上结果提示 CAFs 促进卵巢癌恶性表型的机制可能与改变细胞中 *ADH1B* 甲基化水平有关。

实体肿瘤所处的慢性炎性微环境的特征在于存在炎症细胞和促炎性细胞因子^[15], IL-6 是卵巢癌炎性分泌网络的关键调控因子, 促进卵巢癌细胞侵袭、转移及耐药等恶性生物学行为^[16]; 另有研究^[17]表明肿瘤局部 CAFs 是 IL-6 升高的旁分泌来源。转录活化因子 STAT3 是细胞内重要的信号转导分子, 在细胞存活增殖中起重要作用, IL-6 在分泌增加后可迅速活化 JAK/STAT3 信号通路^[18]。为探讨 *ADH1B* 异常甲基化驱动卵巢癌恶性表型的作用机制, 本研究采用 ELISA 及蛋白质印迹法分别检测细胞上清液中 IL-6 及 IL-6 下游 STAT3 通路, 与 SKOV3 及 NFs 组相比, CAFs 组 IL-6 和 p-STAT3 水平均有所升高, *ADH1B* 蛋白表达下调。5-Aza-dC 处理后, CAFs 组 p-STAT3 水平显著降低, *ADH1B* 蛋白表达明显提高, 而 SKOV3 及 NFs 组仅有 *ADH1B* 蛋白表达升高, p-STAT3 水平则无明显改变, 从而表明 CAFs 使下游 IL-6/STAT3 通路活化; CCK-8 和 Transwell 实验结果则提示 IL-6 通路抑制剂 LMT-28 及 rhIL-6 仅对 CAFs 组细胞增殖及侵袭能力有显著抑制或促进作用。

综上所述, CAFs 分泌的 IL-6 可促进 STAT3 的磷酸化, 诱导卵巢癌细胞 *ADH1B* 甲基化促进卵巢癌细胞增殖和侵袭。通过阻断 IL-6 信号通路及逆转 *ADH1B* 甲基化诱导其重新表达有望抑制卵巢癌进展。该研究也为去甲基化药物用于间充质肿瘤的临床治疗提供一定基础理论依据。

参考文献

- [1] Veneziani A C, Gonzalez-Ochoa E, Alqaisi H, et al. Heterogeneity and treatment landscape of ovarian carcinoma[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2023, 20(12): 820-42.
- [2] Gong G, Lin T, Yuan Y, et al. Integrated analysis of gene expression and DNA methylation profiles in ovarian cancer[J]. *J Ovarian Res*, 2020, 13(1): 30.
- [3] Wall T L, Luczak S E, Hiller-Sturmhöfel S. Biology, genetics, and environment: underlying factors influencing alcohol metabolism[J]. *Alcohol Res*, 2016, 38(1): 59-68.
- [4] Teng L, Li Z, Shi Y, et al. Development and validation of a microenvironment-related prognostic model for hepatocellular carcinoma patients based on histone deacetylase family integrated analysis of gene expression and DNA methylation profiles in ovarian cancer[J]. *Transl Oncol*, 2022, 26: 101547.
- [5] Liu X, Li T, Kong D, et al. Prognostic implications of alcohol dehydrogenases in hepatocellular carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1): 1204.
- [6] Wu J, Chen J, Zhang Y, et al. ADH2 is downregulated by methylation and acts as a novel biomarker for breast carcinoma prognosis[J]. *Ann Clin Lab Sci* 2021 51(1): 12-21.
- [7] Villéger R, Chulkina M, Mifflin R C, et al. Loss of alcohol dehydrogenase 1B in cancer-associated fibroblasts: contribution to the increase of tumor-promoting IL-6 in colon cancer[J]. *Br J Cancer*, 2023, 128(4): 537-48.
- [8] Galinsky K, Bhatia G, Loh P R, et al. Fast principal-component analysis reveals convergent evolution of ADH1b in Europe and East Asia[J]. *Am J Hum Genet*, 2016, 98(3): 456-72.
- [9] Li Q G, He Y H, Wu H, et al. A normalization-free and nonparametric method sharpens large-scale transcriptome analysis and reveals common gene alteration patterns in cancers[J]. *Theranostics*, 2017, 7(11): 2888-99.
- [10] Ebrahimi V, Soleimani A, Ebrahimi T, et al. Epigenetic modifications in gastric cancer: focus on DNA methylation[J]. *Gene*, 2020, 742: 144577.
- [11] Chen Y, McAndrews K M, Kalluri R. Clinical and therapeutic relevance of cancer-associated fibroblasts[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(12): 792-804.
- [12] Albregues J, Bertero T, Grasset E, et al. Epigenetic switch drives the conversion of fibroblasts into proinvasive cancer-associated fibroblasts[J]. *Nat Commun* 2015, 6: 10204.
- [13] Vizoso M, Puig M, Carmona F J, et al. Aberrant DNA methylation in non-small cell lung cancer-associated fibroblasts[J]. *Carcinogenesis*, 2015, 36(12): 1453-63.
- [14] 季维雪, 孙磊, 江玉, 等. *ADH1B* 基因甲基化与卵巢癌细胞增殖及凋亡的研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(8): 1274-8.
- [15] Galdiero M R, Marone G, Mantovani A, et al. Cancer inflammation and cytokines[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018, 10(8): a028662.
- [16] Szulc-Kielbik I, Kielbik M, Nowak M, et al. The implication of IL-6 in the invasiveness and chemoresistance of ovarian cancer cells. Systematic review of its potential role as a biomarker in ovarian cancer patients[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1876(2): 188639.
- [17] Goulet C R, Champagne A, Bernard G, et al. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of bladder cancer cells through paracrine IL-6 signalling[J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 137.
- [18] Johnson D E, O'Keefe R A, Grandis J R. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(4): 234-48.

Effects of CAFs promoting ADH1B methylation on ovarian cancer cells proliferation and invasion

Li Zelian¹, Ji Weixue², Yang Yuanyuan¹, Xiao Lan³, Cao Yunxia¹

(¹Dept of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Gynecology and Obstetrics, Wuhu Hospital, East China Normal University, Wuhu 241001;

³Dept of Gynecology, The First Affiliated Hospital of USTC, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230031)

Abstract Objective To explore the influence of IL-6 secreted by cancer-associated fibroblasts (CAF) on promoting the proliferation and invasion of ovarian cancer cells and the possible mechanisms. **Methods** CAFs and normal ovarian fibroblasts (NFs) were isolated and cultured respectively from epithelial ovarian cancer and normal ovarian epithelial tissues. Cell markers alpha-smooth muscle actin (α -SMA), E-cadherin were detected by Western blot and immunofluorescence. CAFs and normal ovarian fibroblasts (NFs) were collected and cultured, and their supernatants were used to establish an indirect co-culture system with ovarian cancer SKOV3 cells, including SKOV3 cells alone (SKOV3) group, SKOV3 combined with the supernatants of NFs (NFs) group and SKOV3 combined with the supernatants of CAFs (CAF) group. Cell immunohistochemistry was used to detect the expression of alcohol dehydrogenase 1B (ADH1B) in SKOV3 cells co-cultured with the supernatant of CAFs or NFs. Before and after treatment with the methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC), methylation-specific PCR (MSP), Reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and Western blot were used to detect the mRNA level and methylation status of ADH1B, and the phosphorylation level of signal transducers and activators of transcription 3 (p-STAT3). The cell counting kit-8 (CCK-8) method and Transwell assay were used to investigate the effects of the IL-6 inhibitor LMT-286 and recombinant human interleukin-6 (rhIL-6) on cell proliferation and invasion. **Results** The protein levels of α -SMA was highly expressed, however, CAFs and NFs cells almost lacked the E-cadherin protein. Compared with the SKOV3 and NFs groups, CAFs group exhibited significantly downregulated mRNA and protein expression of ADH1B. After treatment with 5-Aza-dC, ADH1B methylation was partially reversed, and the mRNA and protein expression of ADH1B increased in all groups. The phosphorylation level of STAT3 proteins was significantly reduced in CAFs group, while there were no significant changes in SKOV3 and NFs groups. Intervention with LMT-286 and rhIL-6 only inhibited or promoted the proliferation and invasion of cells in CAFs group, while there were no significant changes in SKOV3 and NFs groups. **Conclusion** CAFs can enhance the methylation of ADH1B in ovarian cancer cells via IL-6/STAT3 pathway, and may promote the proliferation and invasion.

Key words alcohol dehydrogenase 1B; methylation; 5-aza-2'-deoxycytidine; IL-6; ovarian cancer; cell proliferation