

白细胞介素-37对HepG2肝癌细胞增殖、凋亡和周期的影响



方 萍¹, 蔡德成², 孟 萍³, 王 蓉¹, 韩秀娟¹, 张成芳¹

1. 广州市花都区人民医院医学检验科 (广州 510800)

2. 南方医科大学第三附属医院妇产科 (广州 510000)

3. 广州市花都区人民医院中心实验室 (广州 510800)

【摘要】目的 探究白细胞介素-37 (interleukin-37, IL-37) 炎症抑制因子对 HepG2 肝癌细胞增殖、凋亡和周期的影响。**方法** 将 IL-37 的慢病毒表达载体 pCDH-CMV-MCS-IL37-copGFP-T2A-Puro (pCDH-IL-37 组) 与空白载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-T2A-Puro (pCDH 组) 分为实验组与对照组, 分别对两组进行病毒包装与嘌呤霉素筛选, 然后转染入体外培养的 HepG2 细胞。通过实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction, RT-qPCR) 检测转染后的 HepG2 细胞中的 IL-37 mRNA 表达水平。通过细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 法检测 IL-37 对 HepG2 细胞增殖的影响。通过流式细胞术检测 IL-37 对 HepG2 细胞周期及凋亡的影响。**结果** 经过慢病毒包装、感染和嘌呤霉素筛选, 荧光显微镜显示慢病毒表达载体成功转染到 HepG2 细胞中。RT-qPCR 结果显示, HepG2 细胞中 IL-37 相对表达水平高。CCK-8 法检测结果显示, 细胞培养 24 h、48 h、72 h 后, 与 pCDH 组比较, pCDH-IL-37 组细胞 450 nm 波长处的光密度 (optical density, OD), 即 OD₄₅₀, 吸光值明显降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.001$), 且随着培养时间的延长, 细胞存活率逐渐降低。流式细胞术检测细胞周期结果显示, 与 pCDH 组比较, pCDH-IL-37 组的 S 期细胞比率显著降低, G1 期细胞比率显著升高, 细胞周期被阻滞于 G1 期。流式细胞术检测细胞凋亡结果显示, pCDH-IL-37 组的细胞凋亡率显著高于 pCDH 组 ($9.833\% \pm 0.252\%$ vs. $4.867\% \pm 0.569\%$, $P < 0.001$)。RT-qPCR 结果显示, pCDH-IL-37 组 Caspase-3 与 Fas 的 mRNA 表达水平降低, 表明 IL-37 对 Caspase-3 与 Fas 诱导的凋亡可能具有抵抗作用。**结论** IL-37 在体外可以直接抑制肝癌细胞 HepG2 的增殖, 促进其凋亡, 将细胞周期阻滞在 G1 期, 并可能通过下调 Caspase-3 与 Fas 的表达, 对 Caspase-3 与 Fas 诱导的凋亡发挥抵抗作用。

【关键词】 白细胞介素-37; 肝癌; HepG2 细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡; 细胞周期

【中图分类号】 R 735.7 **【文献标识码】** A

Effects of interleukin-37 on proliferation, apoptosis and cycle of HepG2 hepatoma cells

FANG Ping¹, CAI Decheng², MENG Ping³, WANG Rong¹, HAN Xiujuan¹, ZHANG Chengfang¹

1. Department of Medical Laboratory, Huadu District People's Hospital of Guangzhou, Guangzhou 510800, China

DOI: 10.12173/j.issn.1004-4337.202409192

基金项目: 广州市花都区科技计划项目 (22-HDWS-034); 广州市花都区人民医院内科研基金项目 (2020C05)

通信作者: 方萍, Email: crystal10071@163.com

<https://slyyx.whuznhmedj.com/>

2. Department of Obstetrics and Gynecology, The Third Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510000, China

3. Central Laboratory, Huadu District People's Hospital of Guangzhou, Guangzhou 510800, China

Corresponding author: FANG Ping, Email: crystal10071@163.com

【Abstract】Objective To investigate the effect of interleukin-37 (IL-37) inflammatory inhibitor on the proliferation, apoptosis and cycle of HepG2 hepatoma cells. **Methods** The lentiviral expression vector pCDH-CMV-MCS-IL37-copGFP-T2A-Puro with the IL-37 (pCDH-IL-37 group) and blank vector pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-T2A-Puro (pCDH group) were divided into the experimental group and the control group, respectively. The two groups were screened for viral packaging and puromycin, respectively, and then transfected into HepG2 cells in vitro. The mRNA expression level of IL-37 in transfected HepG2 cells was determined by quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR). The effect of IL-37 on the proliferation of HepG2 cells was detected by cell counting kit-8 (CCK-8). The effects of IL-37 on the cycle and apoptosis of HepG2 cells were evaluated by flow cytometry. **Results** After lentivirus packaging, infection, and puromycin screening, fluorescence microscopy showed that the lentiviral expression vectors were successfully transfected into HepG2 cells. RT-qPCR showed a high level of IL-37 expression in HepG2 cells. The results of CCK-8 assay showed that after 24 h, 48 h and 72 h of cell culture, the optical density (OD) at 450 nm of cells in pCDH-IL-37 group was significantly lower than that in pCDH group. The difference was statistically significant ($P<0.001$), and the cell survival rate decreased gradually with the extension of culture time. Flow cytometry showed that compared with pCDH group, the ratio of S phase cells was significantly decreased in pCDH-IL-37 group, and the ratio of G1 phase cells was significantly increased, and the cell cycle was blocked in G1 phase. Flow cytometry showed that the apoptosis rate of pCDH-IL-37 group was significantly higher than that of pCDH group ($9.833\%\pm0.252\%$ vs. $4.867\%\pm0.569\%$, $P<0.001$). RT-qPCR results showed that mRNA expression levels of Caspase-3 and Fas were decreased in pCDH-IL-37 group, suggesting that IL-37 may have a resistance to Caspase-3 and Fas induced apoptosis. **Conclusion** IL-37 can directly inhibit the proliferation of HepG2 hepatoma cells in vitro, promote the apoptosis, and block the cell cycle in the G1 phase, and may play a role in the resistance to Caspase-3 and Fas induced apoptosis by down-regulating the expression of Caspase-3 and Fas.

【Keywords】 Interleukin-37; Hepatoma; HepG2 cells; Cell proliferation; Cell apoptosis; Cell cycle

原发性肝癌 (primary liver cancer, PLC) 是人类第六大常见恶性肿瘤, 居全球癌症相关死亡的第三位^[1]。肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是 PLC 的主要病理类型, 约占 PLC 的 80%~85%, 是全球面临的一项重大公共健康问题^[2]。由于 HCC 的恶性程度极高, 瘤体在肝脏内隐匿生长, 确诊时绝大多数患者往往已处于疾病晚期, 错过了最佳治疗时机^[3]。近十年来, 慢性炎症刺激在 HCC 的发生发展中发挥的关键作用已得到广泛证实^[4-7]。持续的病毒感染与肝脏的持续损伤和再生有关, 从而导致肝纤维化、肝硬化, 最终发展为 HCC。我国 HCC 患者中由乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染引起的

比例高达 86%, 慢性 HBV 感染导致的肝纤维化和肝硬化是我国 HCC 的主要病因^[8]。因此, 监测候选血清生物标志物是早期诊断、复发监测、预后评估和选择 HCC 治疗方法的有效途径。

白细胞介素-37 (interleukin 37, IL-37) 是白细胞介素-1 (interleukin 1, IL-1) 家族的成员之一, 可通过强大的抗炎抗肿瘤作用在感染性疾病、过敏性疾病、代谢性疾病、自身免疫性疾病和肿瘤发展过程中发挥重要保护作用^[9-11]。既往研究发现, IL-37 主要通过参与肿瘤微环境的免疫调节, 抑制肿瘤生长、血管生成及肿瘤细胞的迁移、侵袭和转移来发挥抗癌作用^[11]。然而, IL-37 在 HCC 中的分子机制尚不清楚。研究发

现,过表达 IL-37 的人肝癌细胞 Hep3B 在体外可以募集更多的自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK), IL-37 在体内可通过调节 CD57+NK 细胞的先天免疫作用介导肝细胞癌的抗肿瘤活性^[12]。Liu 等在人肝癌细胞 SMMC-7721 和 HepG2 细胞中发现,过表达 IL-37 通过将 HCC 限制在 G2/M 细胞周期而显著抑制肿瘤生长,但活细胞数量的减少不能归因于诱导凋亡,而是通过将磷酸化母亲 DPP 同源物 3 (phosphorylated mothers against decapentaplegic homolog 3, pSmad3) 信号从 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) / 连接区磷酸化的 Smad3 (linker-phosphorylated Smad3, pSmad3L) / 骨髓细胞瘤癌 (cellular-myelocytomatosis oncogene gene, c-Myc) 的致癌信号转化为 C-末端磷酸化的 Smad3 (C-terminally phosphorylated Smad3, pSmad3C) / P21 的肿瘤抑制信号来抑制肝细胞肿瘤的生长^[13]。Li 等的研究发现, IL-37 抑制了 HepG2 细胞的增殖,并可通过抑制磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K) / 蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) / 雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 通路诱导人肝癌细胞 SMMC-7721 和 Huh-7 细胞的自噬与凋亡^[14]。表达 IL-37 的牛痘病毒对人肝癌细胞 HepG2、HCCLM3、SMMC7721 与 Bel7402HCC 细胞均具有体外细胞毒作用^[15],被表达 IL-37 的牛痘病毒感染后,信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription3, STAT3) 的磷酸化水平降低,表明 STAT3 与 HCC 细胞的增殖、迁移和侵袭密切相关。Li 等发现 IL-37 在 HCC 组织和人肝癌细胞 HepG2 与 MHCC97H 中的表达降低^[16]。Guo 等发现在 HepG2 与 MHCC97H 细胞中, IL-37 可能通过抑制白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) / 八聚体结合转录因子 4 (octamer-binding transcription factor 4, Oct4) 途径抑制 HCC 的发展^[17]。IL-37 在人肝癌细胞 SMMC 7721 中通过调节肿瘤细胞在肿瘤微环境中促血管生成和抗血管生成因子的表达来发挥抗血管生成作用^[18]。上述研究大多数能证明 IL-37 可通过抑制细胞增殖来阻止 HCC 的发生,但在诱导细胞凋亡和周期阻滞方面仍存在不确定性,因此,本研究通过体外过表达细胞系,初步探讨 IL-37 对人肝癌 HepG2 细胞增殖、周期及凋亡的影响。

1 资料与方法

1.1 载体资料

人 IL-37 重组慢病毒表达载体为 pCDH-CMV-MCS-IL37-copGFP-T2A-Puro, 对照载体为 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-T2A-puro, 分别作为实验组 (pCDH-IL-37 组) 和对照组 (pCDH 组)。两种载体均购自广州 IGE 生物科技有限公司, psPAX2 和 pMD2G 质粒购自美国 ThermoFisher Scientific。

1.2 细胞培养

人 HepG2 细胞系和人 HEK293T 细胞系来源于中国科学院上海细胞生物学研究所模式培养细胞库。HepG2 细胞和 HEK293T 细胞在含有 10% 胎牛血清 (Gibco) 的 DMEM 培养基 (Gibco) 中, 37°C, 5% CO₂ 培养。

1.3 慢病毒包装和细胞系的建立

按照试剂说明书, 使用 polybrene (Polysciences) 将 pCDH-IL-37 或 pCDH 的载体质粒、psPAX2、pMD2G 三质粒共转染 293 T 细胞。72 h 后收集病毒上清, 并通过超速离心得到高滴度的慢病毒保存液, pCDH-IL-37 和 pCDH 滴度均为 1×10^9 TU/mL。分别使用含 pCDH-IL-37 质粒与 pCDH 质粒的病毒液感染人肝癌细胞系 HepG2, 在 5 mg/mL 聚乙烯 (Sigma) 存在下, 感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 30。感染 72 h 后, 用 2 μ g/mL 嘌呤霉素筛选细胞, 建立稳定的细胞系。

1.4 反转录和实时荧光定量聚合酶链式反应

采用高纯总 RNA 快速提取试剂盒 (BioTeke) 提取培养细胞总 RNA, 用紫外分光光度计测定 260 nm/280 nm 的吸光度值, 计算 RNA 的浓度和纯度。按照 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 试剂盒 (Vazyme) 说明书对总 RNA 进行逆转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板, 20 μ L 体系中加入下列组分: Hieff[®] qPCR SYBR[®] Green Master Mix (Low Rox Plus) 反应混合液 10.0 μ L, 上游引物 0.8 μ L, 下游引物 0.8 μ L, ddH₂O 7.4 μ L 和 cDNA 1 μ L。IL-37 上游引物: 5'-TTCTTTGCATTAGCCTCATCCTT-3', 下游引物: 5'-CGTGCTGATTCTTTTGGGC-3', 扩增片段长度 182 bp; Fas 上游引物: 5'-CTTCCCATCCTCCTGACCACCG-3', 下游引物: 5'-TCACTCGTAAACCGCTTCCCTC-3',

扩增片段长度 117 bp; Caspase-3 上游引物: 5'-GGACTGTGGCATTGAGACAGA-3', 下游引物: 5'-TCAAGCTTGTCGGCATACTGT-3', 扩增片段长度 189 bp; GAPDH 上游引物: 5'-AACGGATTTGCTCGTATTGGG-3', 下游引物: 5'-CCTGGAAGATGGTGATGGGAT-3', 扩增片段长度 211 bp。反应条件: 94℃ 预变性 1 min, 然后 94℃ 15 s、60℃ 20 s、72℃ 20 s, 40 个循环后 4℃ 保持。将 IL-37、Fas 与 Caspase-3 的表达量归一化为内参 GAPDH, 采用比较阈值循环 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 法计算 IL-37、Fas 与 Caspase-3 mRNA 的相对表达量。

1.5 细胞计数试剂盒-8实验

使用细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) (Beyotime) 按照说明书检测细胞增殖能力。细胞在 96 孔板中分别培养 4 h、24 h、48 h 和 72 h, 再向每孔 (100 μ L) 加入 10 μ L CCK-8 试剂, 细胞孵育 2 h, 记录 450 nm 处吸光值 (OD450)。实验组细胞存活率 = [(实验孔 OD450 - 空白孔 OD450) / (对照组 OD450 - 空白孔 OD450)] $\times$ 100%。实验重复 3 次。

1.6 细胞周期实验

细胞接种于 6 孔培养板转染 48 h 后, 收集细胞并用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 洗涤两次, 然后加入预冷 75% 乙醇重悬, 于 -20℃ 固定过夜。加入 PBS (含 50 μ g/mL 碘化丙啶), 100 μ g/mL RNaseA, (0.2% Triton X-100) 4℃ 避光孵育 30 min。使用 NovoCyte 2000R 流式细胞仪 (ACEA Biosciences) 检测 4×10^5 个细胞, 并使用 NovoExpress 1.2.4 软件进行分析, 软件自动计算细胞处于 G1 期、S 期和 G2 期的百分率。实验重复 3 次。

1.7 细胞凋亡实验

使用 Annexin V-APC /7AAD kit 试剂盒 (杭州联科生物技术股份有限公司), 按照说明书检测细胞凋亡情况。将生长良好的细胞用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化后使用预冷 PBS 洗涤一次。以 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个细胞/mL 的浓度在 $1 \times$ Binding Buffer 中重悬。在 100 μ L 的细胞悬液中加入 5 μ L Annexin V-APC 和 10 μ L 7AAD, 室温避光孵育 15 min。然后加入 485 μ L 预冷 $1 \times$ Binding Buffer, 立即使用 NovoCyte 2000R 流式细胞仪 (ACEA Biosciences) 检测染色细胞的数量。在

双变量流式分析的散点图上, 左下象限为正常细胞 (APC-/7AAD-), 左上象限为坏死的细胞 (APC-/7AAD+), 右下象限为早期凋亡细胞 (APC+/7AAD-), 右上象限为晚期凋亡细胞 (APC+/7AAD+)。使用 NovoExpress 1.2.4 软件进行数据分析, 软件自动分别计算四象限细胞比率, 细胞凋亡率为右下象限与右上象限比率之和。实验重复 3 次。

1.8 统计分析

应用 SPSS 20.0 软件进行数据分析。计量资料以均值和标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义 (检验水准 $\alpha = 0.05$), 多重比较使用 Bonferroni 校正, $P < 0.05/N$ 为差异有统计学意义 (N 为比较次数)。

2 结果

2.1 高表达 IL-37 的 HepG2 细胞建立与鉴定

病毒感染后的 HepG2 细胞在荧光显微镜下可观察到 80% 以上的细胞均有绿色荧光表达, 说明重组慢病毒载体成功感染 HepG2 细胞, 见图 1-A、图 1-B。分别提取两组细胞总 RNA, 采用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction, RT-qPCR) 检测两组细胞中 IL-37 mRNA 的相对表达量, 结果显示, pCDH-IL-37 组的 IL-37 mRNA 较 pCDH 组显著上调 (250.091 ± 8.630 vs. 1.000 ± 0.043 , $P = 4 \times 10^{-4}$), 提示已建立稳定高表达 IL-37 mRNA 的 HepG2 细胞, 见图 1-C。

2.2 IL-37 抑制 HepG2 细胞增殖

CCK-8 检测结果显示, 细胞培养 4 h 时, pCDH 组与 pCDH-IL-37 组的 OD450 无明显差异。但在培养 24 h 后, 与 pCDH 组相比, pCDH-IL-37 组细胞的 OD450 明显降低 ($P < 0.001$), 见图 2-A。随着培养时间的延长, 细胞存活率逐渐降低, 见图 2-B。说明提高 HepG2 细胞中 IL-37 的表达可抑制 HepG2 细胞的增殖, 见表 1、图 2。

2.3 IL-37 使细胞周期阻滞于第一间隙期

结果显示, pCDH-IL-37 组中细胞第一间隙期 (gap phase 1, G1 期) 细胞比率为 ($51.623\% \pm 0.548\%$), pCDH 组 G1 期细胞比率为 ($45.683\% \pm 0.803\%$), 差异有统计学意义 ($t = -10.586$, $P = 4.510 \times 10^{-4}$)。pCDH-IL-37 组

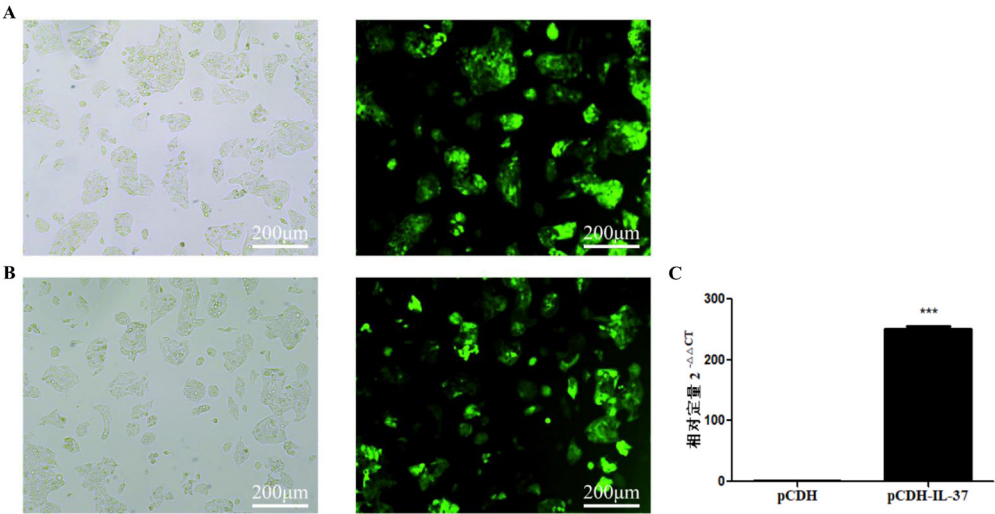


图1 高表达IL-37 mRNA的HepG2细胞的建立与鉴定

Figure 1. Establishment and identification of HepG2 cells with high IL-37 mRNA expression

注：A. pCDH组的绿色荧光表达情况（左：光镜，右：荧光显微镜）；B. pCDH-IL-37组的绿色荧光表达情况（左：光镜，右：荧光显微镜）；C. pCDH与pCDH-IL-37组的IL-37 mRNA相对定量情况，*** $P < 0.001$ 。

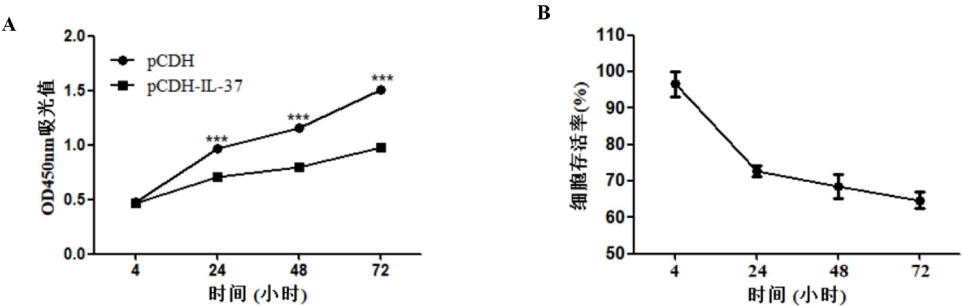


图2 IL-37可抑制HepG2细胞的增殖

Figure 2. IL-37 inhibits the proliferation of HepG2 cells

注：A. pCDH与pCDH-IL-37组4 h、24 h、48 h、72 h的OD450 nm吸光值比较，*** $P < 0.001$ ；B. pCDH-IL-37组的细胞存活率。

表1 pCDH组与pCDH-IL-37组OD450、凋亡率及细胞周期分布的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Comparison of OD450, apoptosis rate and cell cycle distribution between pCDH group and pCDH-IL-37 group ($\bar{x} \pm s$)

项目	pCDH组 (n=3)	pCDH-IL-37组 (n=3)	t值	P值
CCK-8[OD (450 nm)]				
4 h	0.479 ± 0.027	0.464 ± 0.038	0.586	0.590
24 h	0.965 ± 0.024	0.702 ± 0.011	17.709	6.000 × 10 ⁻⁵
48 h	1.158 ± 0.017	0.792 ± 0.027	20.017	3.700 × 10 ⁻⁵
72 h	1.502 ± 0.014	0.972 ± 0.030	27.781	1.000 × 10 ⁻⁵
凋亡率 (%)	4.867 ± 0.569	9.833 ± 0.252	-13.834	1.580 × 10 ⁻⁴
周期分布 (%)				
G1期	45.683 ± 0.803	51.623 ± 0.548	-10.586	4.510 × 10 ⁻⁴
S期	40.627 ± 1.508	36.327 ± 0.803	4.359	0.012
G2期	13.690 ± 0.747	12.050 ± 1.181	2.033	0.112

注：CCK-8, cell counting kit-8, 细胞计数试剂盒-8；OD, optical density, 光密度。*表示与阈值 (0.05/8=6.25 × 10⁻³, 比较次数为8) 比较具有显著差异。

细胞合成期 (synthesisphase, S 期) 细胞比率为 (36.327% ± 0.803%), pCDH 组 S 期细胞比率为 (40.627% ± 1.508%), 差异有统计学意义 ($t=4.359$, $P=0.012$)。与 pCDH 组相比, pCDH-IL-37 组的

S 期细胞比率显著降低, G1 期细胞比率显著升高, 提示细胞周期被阻滞于 G1 期。因此上调 HepG2 细胞中 IL-37 的表达, 可使细胞周期明显阻滞于 G1 期, S 期细胞数目明显减少, 细胞增殖受到抑

制。见表 1、图 3。

2.4 IL-37促进HepG2细胞凋亡

为探讨 IL-37 诱导的细胞周期阻滞是否与细胞凋亡有关,使用流式细胞术检测 pCDH 组与 pCDH-IL-37 组的细胞凋亡差异。结果显示,在 HepG2 细胞中,pCDH 组细胞凋亡率为 ($4.867\% \pm 0.569\%$),pCDH-IL-37 组细胞凋亡率为 ($9.833\% \pm 0.252\%$),差异有统计学意义 ($t=-13.834, P=1.580 \times 10^{-4}$);与 pCDH 组比较,pCDH-IL-37 组的细胞凋亡率显著升高,见

图 4-A—图 4-C。

2.5 IL-37抵抗Caspase-3与Fas诱导的凋亡

为探讨 IL-37 促进细胞凋亡的作用机制,使用 RT-qPCR 法检测细胞 Caspase-3 mRNA 与 Fas mRNA 表达水平。结果显示,pCDH-IL-37 组的 Caspase-3 mRNA (0.564 ± 0.182 vs. $1.000 \pm 0.153, P=0.034$) 与 Fas mRNA (0.568 ± 0.090 vs. $1.000 \pm 0.083, P=0.004$) 表达水平较 pCDH 组均明显降低,见图 4-D、图 4-E。

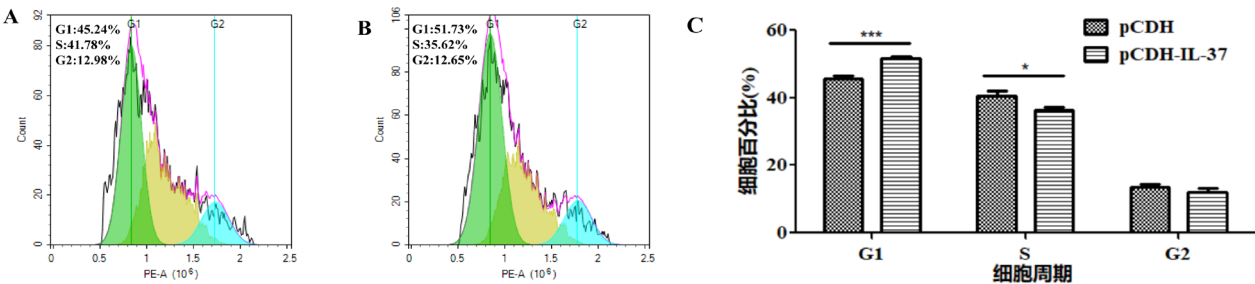


图3 IL-37使HepG2的细胞周期阻滞在G1期

Figure 3. IL-37 arrests the cell cycle of HepG2 in G1 phase

注: A. pCDH组的细胞周期流式结果; B. pCDH-IL-37组的细胞周期流式结果; C. pCDH与pCDH-IL-37组的细胞周期分布情况比较, *** $P<0.001$, * $P<0.05$ 。

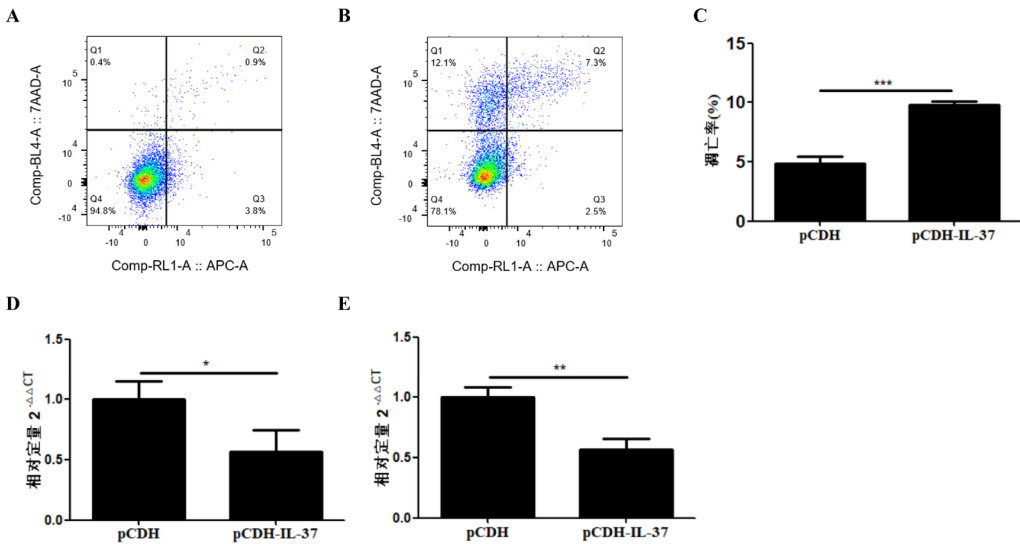


图4 IL-37促进HepG2细胞凋亡并抵抗Caspase-3与Fas诱导的凋亡

Figure 4. IL-37 promotes the apoptosis of HepG2 cells and resists the apoptosis induced by Caspase-3 and Fas

注: A. pCDH组的细胞凋亡流式结果; B. pCDH-IL-37组的细胞凋亡流式结果; C. pCDH与pCDH-IL-37组的细胞凋亡情况比较; D. pCDH与pCDH-IL-37组的Caspase-3 mRNA表达情况比较; E. pCDH与pCDH-IL-37组的Fas mRNA表达情况比较; *** $P<0.001$, ** $P<0.01$, * $P<0.05$ 。

3 讨论

IL-37 是一种能够有效抑制天然免疫和适应性免疫的新型细胞因子^[19]。IL-37 可显著抑制多种促炎因子,如 IL-6、白细胞介素-12 (interleukin-12,

IL-12)、 γ 干扰素等的表达,并在多种炎症疾病发展过程中起重要作用^[20-23]。除抗炎功能外,近年来,IL-37 与肿瘤的关系备受关注。HCC 是全球高发癌症之一,严重危害人类的健康。多数肝癌的发生始于 HBV、丙型肝炎病毒感染或酒精和各

种致癌物导致的肝脏炎症,其发生发展大多会经历肝炎-肝硬化-肝癌的转化过程。在 HCC 的发生发展中,慢性炎症是一个重要的促进因素^[4-7],这预示着具有强大抗炎能力的 IL-37 可能对 HCC 的发生有潜在的调控功能,如预防病毒性肝炎、减轻肝损伤、靶向肝纤维化与调节免疫微环境等。既往研究表明,IL-37 可通过抑制 HepG2 细胞增殖来阻止 HCC 的发生,但在诱导 HepG2 的细胞凋亡和周期阻滞方面尚未确定^[13-14]。

本研究通过慢病毒包装系统(293T+psPAX2+pMD2.G)对 IL-37 表达载体进行包装和感染筛选,最终获得高表达 IL-37 的 HepG2 细胞。采用 CCK-8、碘化丙啶与 Annexin V-APC/7AAD 细胞凋亡检测试剂盒,探讨 IL-37 对人肝癌 HepG2 增殖、细胞周期和凋亡的影响,为进一步研究 IL-37 在 HCC 发生发展中的作用机制奠定了基础。CCK-8 实验表明,高表达 IL-37 对细胞增殖的抑制作用明显强于对照细胞,与既往研究^[13-14]结论一致,即 IL-37 可以抑制 HepG2 细胞的生长。

细胞周期内有两个阶段最为重要,即 G1 期到 S 期和 G2 期到 M 期。G1 期是有丝分裂到 DNA 复制前的一段时期,在 DNA 合成之前。如果细胞周期在 G1 期被阻滞,细胞 DNA 合成和复制减少,增殖能力受到抑制。因此,本研究采用流式细胞术分析 IL-37 高表达细胞的 DNA 含量。本研究结果表明,G1 期细胞数量明显增加,而 S 期和 G2 期细胞数量减少,说明细胞被停滞在 G1 期,这可能意味着细胞的增殖能力受到抑制,导致细胞 DNA 合成和复制减少,这与 CCK-8 实验结果和 IL-37 的抗肿瘤作用相吻合。

细胞周期和细胞凋亡是细胞生命的两个基本过程,它们之间存在着复杂的相互作用。一方面,细胞凋亡可以导致细胞周期阻滞;另一方面,细胞周期的调控也可以影响细胞凋亡的发生^[24-26]。本研究采用流式细胞术分析了细胞凋亡的变化,结果显示,IL-37 可以显著促进 HepG2 细胞的凋亡,细胞凋亡率显著性增加,结合上述周期实验结果表明,IL-37 诱导的 HepG2 细胞的凋亡可能与细胞周期阻滞有关。Li 等的研究表明,IL-37 可以诱导细胞的凋亡,包括 SMMC-7721 和 Huh-7 细胞^[14]。然而,Liu 等的研究表明,IL-37 通过 G2 期而非 G1 期阻滞诱导细胞周期阻滞,活

细胞数量的减少不能归因于诱导 SMMC-7721 和 HepG2 细胞的凋亡^[13]。导致上述细胞周期阶段阻滞与细胞凋亡结果不一致的原因可能有两点:一是不同细胞株可能具有不同的细胞周期特征(如周期长度);二是细胞中存在复杂的信号通路或基因调控网络,同一基因在不同细胞株中可能参与不同的信号通路或调控网络,因此,即使过表达同一基因在不同细胞株中可能也会引起不同的细胞响应,如细胞周期的不同调控,而不同的细胞周期调控可诱导细胞凋亡通路的激活^[24-26]。

研究发现,许多信号通路激活了细胞凋亡通路^[27],细胞凋亡的通路主要包括线粒体通路和死亡受体通路,而诱导肿瘤细胞凋亡主要依赖线粒体通路^[28]。因此,本研究还检测了与线粒体通路相关的凋亡激活特定蛋白酶 Caspase-3、与死亡受体通路相关的 Fas mRNA 表达水平。结果显示,与 pCDH 组相比,pCDH-IL-37 组的 Caspase-3 与 Fas mRNA 表达降低,提示 IL-37 对 Caspase-3 与 Fas 诱导的凋亡可能具有抵抗作用,可能通过其他的调控通路来进行其凋亡应答。

综上所述,本研究结果表明 IL-37 对 HepG2 细胞的影响是增殖抑制、细胞 G1 期阻滞、细胞凋亡增加,可能抵抗 Caspase-3 与 Fas 诱导的凋亡。因此,IL-37 可能通过抑制细胞增殖、干扰细胞周期、减少 DNA 合成和复制与诱导细胞凋亡来介导抗 HCC 作用,或可成为 HCC 治疗的一个靶点。然而,其具体作用机制尚不清楚,且局限于较小的样本量,未来需要开展更大样本的研究,进一步深入探索 IL-37 是否参与 HCC 细胞的细胞周期和细胞凋亡的相互调控机制,以更好地理解 HCC 的发生与治疗。

参考文献

- 1 刘宗超,李哲轩,张阳,等. 2020 全球癌症统计报告解读[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2021, 7(2): 1-13. [Liu ZC, Li ZX, Zhang Y, et al. Interpretation on the report of Global Cancer Statistics 2020[J]. Journal of Multidisciplinary Cancer Management (Electronic Version), 2021, 7(2): 1-13.] DOI: 10.12151/JMCM.2021.02-01.
- 2 Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods[J]. Int J Cancer, 2019, 144(8): 1941-1953. DOI: 10.1002/ijc.31937.
- 3 Wang X, Zhang A, Sun H. Power of metabolomics in diagnosis and biomarker discovery of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology,

- 2013, 57(5): 2072–2077. DOI: [10.1002/hep.26130](#).
- 4 Umemura A, Park EJ, Taniguchi K, et al. Liver damage, inflammation, and enhanced tumorigenesis after persistent mTORC1 inhibition[J]. *Cell Metab*, 2014, 20(1): 133–144. DOI: [10.1016/j.cmet.2014.05.001](#).
- 5 Bishayee A. The role of inflammation and liver cancer[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 816: 401–435. DOI: [10.1007/978-3-0348-0837-8_16](#).
- 6 Zhong Z, Sanchez-Lopez E, Karin M. Autophagy, inflammation, and immunity: a Troika governing cancer and its treatment[J]. *Cell*, 2016, 166(2): 288–298. DOI: [10.1016/j.cell.2016.05.051](#).
- 7 Liao R, Li DW, Du CY, et al. Combined preoperative ALBI and FIB-4 is associated with recurrence of hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy[J]. *J Gastrointest Surg*, 2018, 22(10): 1679–1687. DOI: [10.1007/s11605-018-3810-1](#).
- 8 Wang M, Wang Y, Feng X, et al. Contribution of hepatitis B virus and hepatitis C virus to liver cancer in China north areas: experience of the Chinese National Cancer Center[J]. *Int J Infect Dis*, 2017, 65: 15–21. DOI: [10.1016/j.ijid.2017.09.003](#).
- 9 Su Z, Tao X. Current understanding of il-37 in human health and disease[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 696605. DOI: [10.3389/fimmu.2021.696605](#).
- 10 Jiang B, Zhou Y, Liu Y, et al. Research progress on the role and mechanism of IL-37 in liver diseases[J]. *Semin Liver Dis*, 2023, 43(3): 336–350. DOI: [10.1055/a-2153-8836](#).
- 11 Gu M, Jin Y, Gao X, et al. Novel insights into IL-37: an anti-inflammatory cytokine with emerging roles in anti-cancer process[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1278521. DOI: [10.3389/fimmu.2023.1278521](#).
- 12 Zhao JJ, Pan QZ, Pan K, et al. Interleukin-37 mediates the antitumor activity in hepatocellular carcinoma: role for CD57⁺ NK cells[J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 5177. DOI: [10.1038/srep05177](#).
- 13 Liu R, Tang C, Shen A, et al. IL-37 suppresses hepatocellular carcinoma growth by converting pSmad3 signaling from JNK/pSmad3L/c-Myc oncogenic signaling to pSmad3C/P21 tumor-suppressive signaling[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(51): 85079–85096. DOI: [10.18632/oncotarget.13196](#).
- 14 Li TT, Zhu D, Mou T, et al. IL-37 induces autophagy in hepatocellular carcinoma cells by inhibiting the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *Mol Immunol*, 2017, 87: 132–140. DOI: [10.1016/j.molimm.2017.04.010](#).
- 15 Zhang Z, Zhang J, Zhang Y, et al. Vaccinia virus expressing IL-37 promotes antitumor immune responses in hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Biochem Funct*, 2019, 37(8): 618–624. DOI: [10.1002/cbf.3438](#).
- 16 Li P, Guo H, Wu K, et al. Decreased IL-37 expression in hepatocellular carcinoma tissues and liver cancer cell lines[J]. *Oncol Lett*, 2020, 19(4): 2639–2648. DOI: [10.3892/ol.2020.11393](#).
- 17 Guo H, Li P, Su L, et al. Low expression of IL-37 protein is correlated with high Oct4 protein expression in hepatocellular carcinoma[J]. *Gene*, 2020, 737: 144445. DOI: [10.1016/j.gene.2020.144445](#).
- 18 Mei Y, Zhu Y, Teo HY, et al. The indirect antiangiogenic effect of IL-37 in the tumor microenvironment[J]. *J Leukoc Biol*, 2020, 107(5): 783–796. DOI: [10.1002/JLB.3MA0220-207RR](#).
- 19 Conti P, Carinci F, Lessiani G, et al. Potential therapeutic use of IL-37: a key suppressor of innate immunity and allergic immune responses mediated by mast cells[J]. *Immunol Res*, 2017, 65(5): 982–986. DOI: [10.1007/s12026-017-8938-7](#).
- 20 Nold MF, Nold-Petry CA, Zepp JA, et al. IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(11): 1014–1022. DOI: [10.1038/ni.1944](#).
- 21 Yang Y, Zhang ZX, Lian D, et al. IL-37 inhibits IL-18-induced tubular epithelial cell expression of pro-inflammatory cytokines and renal ischemia-reperfusion injury[J]. *Kidney Int*, 2015, 87(2): 396–408. DOI: [10.1038/ki.2014.295](#).
- 22 Bulau AM, Fink M, Maucksch C, et al. In vivo expression of interleukin-37 reduces local and systemic inflammation in concanavalin A-induced hepatitis[J]. *ScientificWorldJournal*, 2011, 11: 2480–2490. DOI: [10.1100/2011/968479](#).
- 23 Tete S, Tripodi D, Rosati M, et al. IL-37 (IL-1F7) the newest anti-inflammatory cytokine which suppresses immune responses and inflammation[J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2012, 25(1): 31–38. DOI: [10.1177/039463201202500105](#).
- 24 Ou HL, Hoffmann R, González-López C, et al. Cellular senescence in cancer: from mechanisms to detection[J]. *Mol Oncol*, 2021, 15(10): 2634–2671. DOI: [10.1002/1878-0261.12807](#).
- 25 Ahmed SA, Mendonca P, Elhag R, et al. Anticancer effects of fucoxanthin through cell cycle arrest, apoptosis induction, angiogenesis inhibition, and autophagy modulation[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(24): 16091. DOI: [10.3390/ijms232416091](#).
- 26 Shah MA, Abuzar SM, Ilyas K, et al. Ginsenosides in cancer: Targeting cell cycle arrest and apoptosis[J]. *Chem Biol Interact*, 2023, 382: 110634. DOI: [10.1016/j.cbi.2023.110634](#).
- 27 Nicolson GL. Metabolic syndrome and mitochondrial function: molecular replacement and antioxidant supplements to prevent membrane peroxidation and restore mitochondrial function [J]. *J Cell Biochem*, 2007, 100(6): 1352–1369. DOI: [10.1002/jcb.21247](#).
- 28 Adrain C, Creagh EM, Martin SJ. Defying death: showing Bcl-2 the way home[J]. *Nat Cell Biol*, 2003, 5(1): 9–11. DOI: [10.1038/ncb0103-9a](#).

收稿日期: 2024 年 09 月 27 日 修回日期: 2025 年 01 月 17 日
本文编辑: 张 苗 黄 笛

引用本文: 方萍, 蔡德成, 孟萍, 等. 白细胞介素-37对HepG2肝癌细胞增殖、凋亡和周期的影响[J]. 数理医药学杂志, 2025, 38(3): 178–185. DOI: [10.12173/j.issn.1004-4337.202409192](#).
Fang P, Cai DC, Meng P, et al. Effects of interleukin-37 on proliferation, apoptosis and cycle of HepG2 hepatoma cells[J]. *Journal of Mathematical Medicine*, 2025, 38(3): 178–185. DOI: [10.12173/j.issn.1004-4337.202409192](#).