

BMP9对人肺腺癌A549细胞侵袭、迁移的影响及机制的研究

王建华 唐治贵 袁永强 代红莹 王科*

(重庆医科大学附属永川医院检验科, 重庆 402160)

摘要 BMP9属于TGF- β 超家族的成员, 参与多种细胞的增殖、分化、凋亡、侵袭、转移过程。以人肺腺癌细胞A549作为目的细胞, 采用腺病毒体外感染方式, 外源性高表达BMP9。RT-PCR及Western blot检测重组细胞中BMP9的表达, 通过细胞划痕实验、Transwell侵袭实验检测AdBMP9细胞侵袭及迁移改变, RT-PCR及Western blot检测感染BMP9腺病毒后IL-6的mRNA和蛋白表达; Western blot检测PI3K/Akt信号通路中总Akt和磷酸化Akt蛋白的表达。结果显示: 与对照组细胞相比, 感染BMP9腺病毒后, A549中BMP9 mRNA和蛋白表达明显升高; 实验组划痕愈合率由对照的(85.4 \pm 2.1)%与(86.5 \pm 3.4)%上升至(97.4 \pm 2.6)%(P <0.05); 实验组穿膜细胞数由对照的(115.5 \pm 13.1)个与(123.3 \pm 14.9)个上升至(224.3 \pm 24.6)个(P <0.05); 与对照组细胞相比, AdBMP9组IL-6的表达上调, 磷酸化Akt蛋白表达上调。该研究表明, BMP9可能通过上调IL-6的表达, 激活PI3K/Akt信号通路, 促进人肺腺癌A549的侵袭、迁移。

关键词 骨形态发生9; 肺癌; 白细胞介6; PI3K/Akt信号通路

Effects and Possible Mechanisms of BMP9 on the Invasion and Migration of Human Lung Cancer A549 Cells

Wang Jianhua, Tang Zhigui, Yuan Yongqiang, Dai Hongying, Wang Ke*

(The Laboratory Department, Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China)

Abstract Bone morphogenetic protein 9 (BMP9), which belongs to the transforming growth factor- β superfamily, regulates a wide range of cellular responses including cell proliferation, differentiation, adhesion, migration, and apoptosis. Human lung cancer A549 cells were used as experiment cells and the over-expression of BMP9 was infected by adenovirus *in vitro*. RT-PCR and Western blot were used to detect the expression of BMP9 in recombinant AdBMP9 cells; To detect the changes of the recombinant AdBMP9 cells' invasion and migration, cell wounding assay and Transwell invasion assay were carried out. At last, RT-PCR and Western blot were used to detect the expression of IL-6, and Western blot was used to detect the expression of total Akt and phosphorylation Akt after BMP9 adenovirus infection. These results showed that BMP9 mRNA and protein were expressed in recombinant AdBMP9 cells; The healing rate of experimental group was increased from (85.4 \pm 2.1)% and (86.5 \pm 3.4)% in control groups to (97.4 \pm 2.6)% (P <0.05), and the number of invasion cells which moved across the matrix barrier in experimental

收稿日期: 2013-10-15 接受日期: 2013-12-05

国家自然科学基金(批准号: 30800658)和重庆医科大学附属永川医院院内课题(批准号: YJYB201313)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-85381632, E-mail: wk125@126.com

Received: October 15, 2013 Accepted: December 5, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30800658) and the Research Subject of Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University (Grant No.YJYB201313)

*Corresponding author. Tel: +86-23-85381632, E-mail: wk125@126.com

网络出版时间: 2014-01-20 16:15 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.02.0329.html>

group was increased from (105.5±13.1) and (113.3±14.9) in control groups to (224.3±24.6) ($P<0.05$). In comparison with the control groups, the expression of IL-6 and phosphorylated Akt were significantly increased in Ad-BMP9 group. We can draw the conclusion that BMP9 can promote the invasion and migration of lung cancer A549 cells possibly through up-regulation of IL-6 and activation of the PI3K/Akt cell signaling pathway.

Key words BMP9; lung cancer; IL-6; PI3K/Akt; cell signaling pathway

肺癌是临床上常见的恶性肿瘤之一,五年存活率明显低于临床上很多肿瘤^[1],而早期肺癌又不易被发现,临床上处于中晚期肺癌病人的治疗效果差,因此严重影响患者预后。BMP9(bone morphogenetic protein 9)又称为生长分化因子2,最近发现其在肿瘤中起着重要作用,文献报道BMP9在与异位激素相关的肿瘤中发挥着不同作用,如BMP9能促进卵巢癌生长,抑制前列腺癌和乳腺癌侵袭、迁移^[2-4]。肺癌是另一种与异位激素相关的肿瘤,结合目前文献报道和我们的前期研究,我们推测BMP9可能在肺癌的发生发展中起一定的作用。我们课题组通过免疫组化检测发现,BMP9在大多数肺癌病人中有表达,而且通过RT-PCR方法检测发现,肺癌A549中存在BMP9表达,由此课题组对BMP9在A549中具体作用及机制进行深入研究。IL-6是一种与肿瘤生长、侵袭、转移密切相关的细胞因子,其在大多数肿瘤中存在异常表达,IL-6表达升高能明显促进大多数肿瘤侵袭、迁移^[5-6]。随着研究的深入,其促进肿瘤恶性程度增加的分子机制不断被阐明,如IL-6可通过PI3K/Akt^[7-8]、JAK2/STAT3通路促进肿瘤转移^[9]。PI3K/Akt信号通路作为肿瘤学研究中一条经典的信号通路,在肿瘤生长、侵袭、迁移中起着重要作用,很多促进肿瘤侵袭、迁移的相关基因在发挥促进肿瘤恶性程度增加过程中的作用都与PI3K/Akt通路的激活有关^[10-11]。临床上治疗肿瘤的一类新型药物,就是针对肿瘤PI3K/Akt通路中分子靶点来设计的,通过抑制PI3K/Akt通路来发挥抑制肿瘤生长、侵袭、转移的作用。因此,本实验以肺癌A549细胞作为研究对象,探讨BMP9对A549细胞侵袭、迁移的影响及可能机制,为进一步探讨BMP9在肿瘤中的作用机制及寻找新的肺癌治疗靶点或抑制因子奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞和腺病毒

肺癌A549细胞(中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心),AdGFP和AdBMP9由美国芝加

哥大学分子肿瘤实验室何通川教授惠赠,本室保存。

1.2 主要试剂

Trizol购自美国Invitrogen公司,高糖型DMEM培养液购自Hyclone公司,M-MLV逆转录试剂盒购自美国Promega公司,引物由Invitrogen公司合成;Western blot及蛋白质提取相关试剂购自上海碧云天生物技术有限公司;磷酸化酶抑制剂、蛋白酶抑制剂购自瑞士Roche公司,BMP9兔多克隆抗体(sc-27821)、IL-6鼠单克隆抗体(sc-130326)购自Santa Cruz公司;总Akt鼠单克隆抗体(#2920)、磷酸化Akt兔单克隆抗体(Ser473, #4060)购自CST公司。

1.3 细胞培养

肺癌A549细胞用含10%胎牛血清的DMEM高糖培养液于37℃、5% CO₂温育箱中培养。待其贴壁生长至70%~80%的融合率时,用0.25%的胰酶进行消化、传代。

1.4 引物的设计

根据GenBank中登陆的BMP9(NM_0162041)和内参 β -actin(NM_001101.3)、IL-6(XM_005249746.1)序列设计引物,序列如下: BMP9基因上游引物: 5'-CTG CCC TTC TTT GTT GTC TT-3',下游引物: 5'-CCT TAC ACT CGT AGG CTT CAT A-3',产物长度322 bp。内参 β -actin基因上游引物: 5'-CAC CAC ACC TTC TAC AAT GAG C-3',下游引物: 5'-GTG ATC TCC TTC TGC ATC CTG T-3',扩增产物大小为695 bp。IL-6基因上游引物: 5'-TAG TGA GGA ACA AGC CAG AG -3',下游引物: 5'-TAC ATT TGC CGA AGA GCC-3',产物长度为234 bp。

1.5 腺病毒感染

取对数生长期细胞,按 3×10^6 接种于25 cm²培养瓶中,待细胞融合度达80%时加入腺病毒,设空白对照组(A549组)、AdGFP感染组和AdBMP9感染组3个组,8~12 h后细胞换液,放入温育箱中继续培养,加病毒24 h后观察荧光表达情况。

1.6 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)

Trizol法分别提取三组细胞总的RNA,逆转录合

成cDNA,以合成的cDNA为模板进行PCR反应。反应条件为:94 °C预变性5 min;94 °C变性30 s,55 °C退火30 s,72 °C延伸20 s,共30个循环;最后72 °C延伸10 min。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定。在GEL EQ凝胶成像仪上成像,成像结果用Quantity One软件进行分析,以目的基因条带的灰度值/内参条带灰度值表示目的基因mRNA相对表达量。

1.7 细胞总蛋白的提取及Western blot

取对数生长期A549细胞接种于培养皿(100 mm)中,待细胞融合度达到80%时加入适量腺病毒(感染效率约为30%)。8~12 h后换液,换成无血清DMEM高糖培养基,培养48 h后,将3组细胞的培养基弃去,用预冷的PBS洗两次,加入细胞裂解液RIPA(含蛋白酶抑制剂,磷酸酶抑制剂和1 mmol/L PMSF) 200 μL/培养皿(100 mm),冰上裂解30 min,12 000 r/min,4 °C离心15 min,小心吸取上清液至1.5 mL EP管中,检测蛋白浓度。取10 μL提取的蛋白进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,湿转法转膜,5%牛血清白蛋白37 °C封闭,滴加一抗(1:200)于4 °C孵育过夜,0.1% TBST洗膜10 min×3次,滴加二抗(1:5 000)于室温孵育1 h,0.1% TBST洗膜10 min×3次,最后加入化学发光显色液成像。GEL EQ凝胶成像仪上成像,成像结果用Quantity One软件进行分析,以目的基因条带的灰度值/内参条带灰度值表示目的基因蛋白相对表达量。

1.8 细胞划痕实验

6孔板每孔接种50 000细胞,待细胞融合度达到80%时加入腺病毒,8 h换液,24 h后观察细胞荧光表达情况。用移液器吸尽6孔板中培养基后用自制Maker笔划痕,PBS洗2次,加入含10%胎牛血清的DMEM培养基继续培养,在0 h和24 h照相观察划痕

愈合情况。通过测量多个点划痕宽度,计算平均划痕愈合率,比较几组细胞的划痕愈合情况。划痕愈合率(%)=(0 h划痕宽度-24 h划痕宽度)/0 h划痕宽度×100%。

1.9 细胞侵袭实验

实验采用24孔板悬挂式Transwell小室(Millicell生产),将ECM基质胶按1:7的比例用无血清DMEM稀释,取30 μL均匀涂在Transwell小室底部膜上室面,紫外线照射过夜,使基质胶自然聚合成凝胶。收获感染腺病毒24 h后的各组细胞,PBS洗2次,用无血清培养液重悬。将200 μL细胞悬液(5×10^5 /mL)加入上室,将含20%胎牛血清DMEM培养基600 μL加入24孔板下室,每组设3个复孔,在37 °C温育箱中培养24 h。取出小室,用湿棉签擦去膜上面未穿过膜的细胞,自然风干后无水乙醇固定,HE染色。最后在显微镜下照相,低倍镜下随机选取5个视野计数。最终以穿膜细胞的数目代表肺腺癌细胞A549的体外侵袭能力。

1.10 统计学分析

应用SPSS 19.0软件处理数据,所有数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,单因素两组间比较采用Student's *t* 检验进行统计学分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR、Western blot检测BMP9在各组细胞中的表达

RT-PCR结果显示,各组细胞中内参 β -actin基因表达一致,空白A549组BMP9 mRNA表达(0.135 ± 0.036)和AdGFP组BMP9 mRNA表达(0.113 ± 0.055)基本一致,而AdBMP9组BMP9 mRNA表达显著升高(0.457 ± 0.104)($P < 0.05$,图1A);Western blot结果显示,

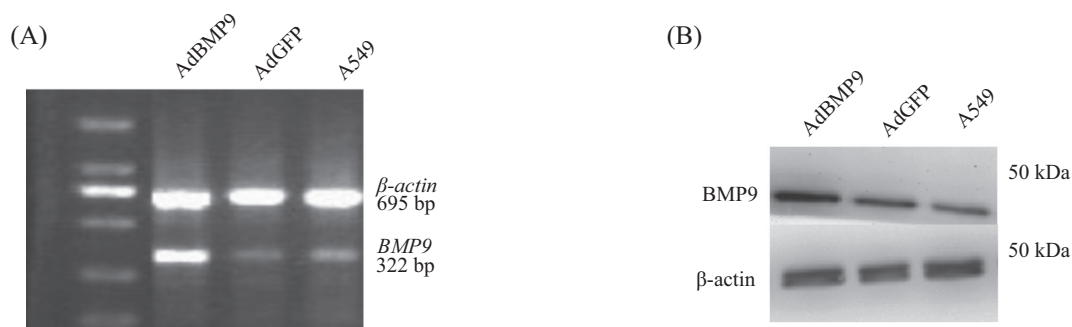


图1 RT-PCR和Western blot检测各组细胞中BMP9 mRNA和蛋白表达

Fig.1 The mRNA and protein expressions of BMP9 detected by RT-PCR and Western blot in each group

各组细胞中内参 β -action蛋白表达一致, 空白A549组BMP9蛋白表达(0.131 ± 0.059)和AdGFP组BMP9蛋白表达(0.152 ± 0.043)基本一致, 而AdBMP9组BMP9的蛋白表达明显升高(0.533 ± 0.088)($P < 0.05$, 图1B)。

2.2 BMP9对A549细胞体外迁移影响

BMP9腺病毒感染A549细胞, 划痕24 h后, Ad-BMP9组细胞划痕愈合率为(97.4 ± 2.6)%, 明显高于AdGFP组(85.4 ± 2.1)%和A549组(86.5 ± 3.4)%($P < 0.05$, 图2)。

2.3 BMP9对A549细胞体外侵袭能力影响

Transwell检测细胞侵袭能力, 实验组AdBMP9穿膜细胞数为(224.3 ± 24.6), 明显高于AdGFP组(115.5 ± 13.1)和A549组(123.3 ± 14.9)($P < 0.05$, 图3)。

2.4 BMP9对A549细胞IL-6的表达

RT-PCR结果显示, 各组A549细胞中内参 β -action的表达基本一致, AdBMP9组IL-6的表达(0.405 ± 0.098)较A549组(0.175 ± 0.048)和A549/AdGFP组(0.124 ± 0.033)显著升高($P < 0.05$)。Western blot进一步证实, IL-6在AdBMP9组中的表达(0.373 ± 0.035)明显高于A549组(0.143 ± 0.042)和A549/AdGFP组(0.115 ± 0.053)(图4), 从蛋白水平进一步验证RT-PCR的检测结果。

2.5 PI3K/Akt信号通路中Akt蛋白在感染BMP9腺病毒的A549中的表达

Western blot结果显示, 在三组细胞中Akt总的蛋白表达基本一致, 而磷酸化的Akt在实验组

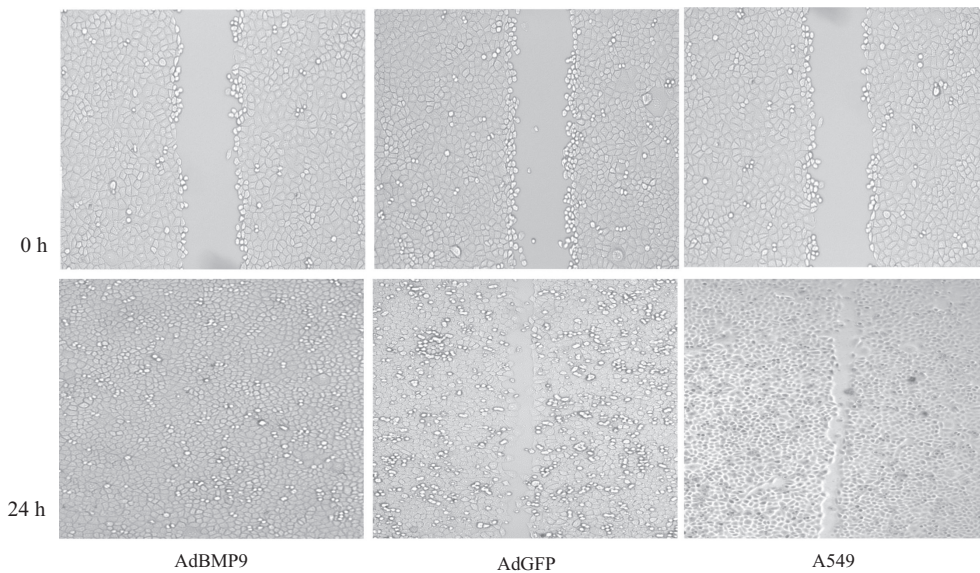


图2 BMP9表达上调对MDA-MB-231细胞迁移能力影响

Fig.2 The cells migration of A549 cells affected by over expression of BMP9

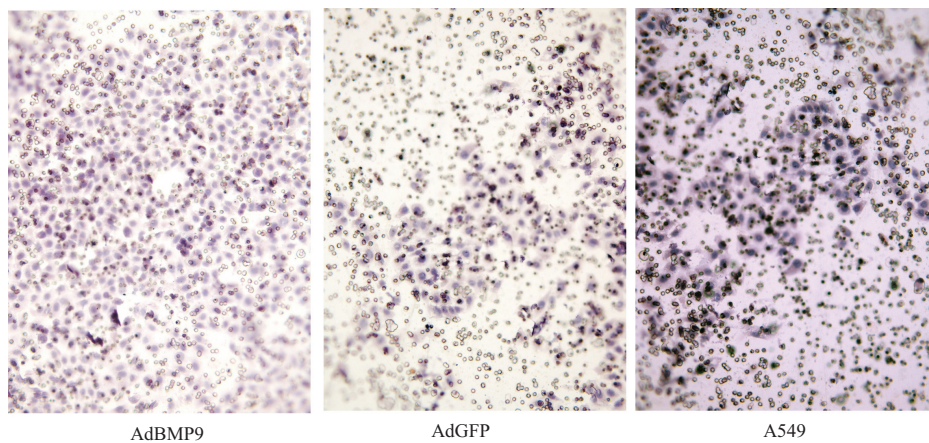


图3 BMP9表达上调对A549细胞侵袭能力影响

Fig.3 The invasion of A549 cells affected by over expression of BMP9

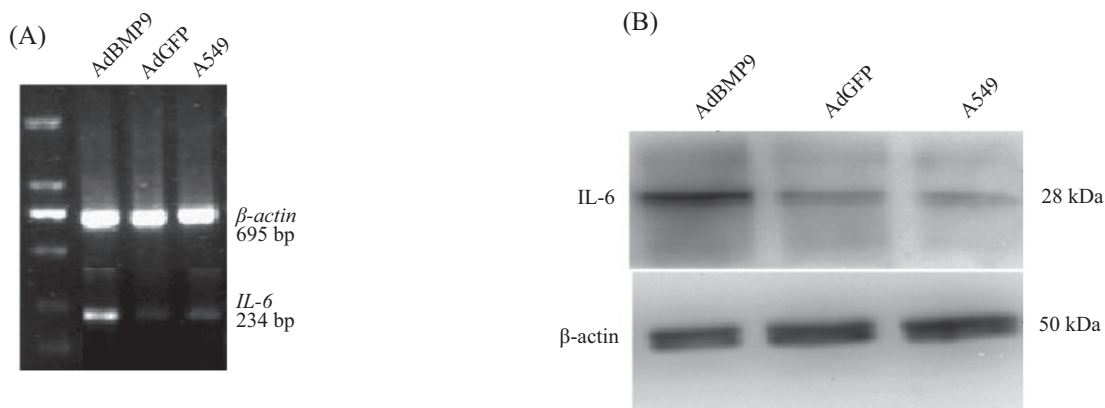


图4 IL-6 mRNA和蛋白在感染BMP9腺病毒后表达

Fig.4 The expressions pattern of IL-6 mRNA and protein in A549 infected with recombinant BMP9 adenovirus

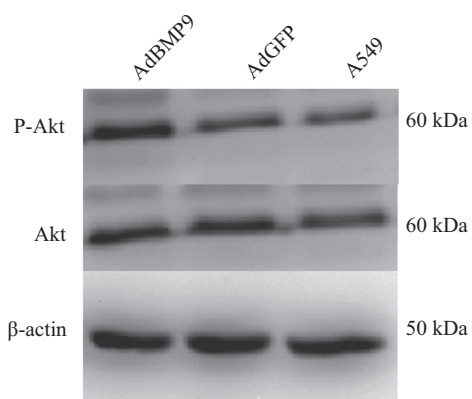


图5 Akt总的蛋白和磷酸化蛋白在各组细胞中表达

Fig.5 Expression of the total Akt and phosphorylated Akt protein levels in different groups of A549 cells by Western blot

AdBMP9的表达(0.673±0.105)高于空白组A549组(0.378±0.075)和对照实验组AdGFP组(0.417±0.066) ($P < 0.05$, 图5)。

3 讨论

近年来肺癌的发病率逐渐增高,在欧美和我国大城市中,肺癌的发病率已居男性各种肿瘤的首位,在全球因肺癌死亡的人数超过100万,并且每年新增病例120万^[1]。临床上,肺癌病人确诊时多为晚期,尽管各种治疗技术不断提高,但肺癌患者的预后仍很差,总体5年生存率低于20%^[2]。如何有效治疗肺癌,搞清楚其侵袭、转移机制尤为重要,当然这也是医学所面临的一大难题,值得大家深入研究。

BMP9是能够诱导间充质干细胞成骨分化的细胞因子,它属于TGF-β超家族一员,它以异源二聚体的形式从细胞分泌,以自分泌或旁分泌的形式作用

于自身及周围细胞,发挥多种生物学作用^[12-13]。目前发现,BMP9参与血管形成、骨的再生、葡萄糖和脂肪酸的代谢以及维持胚胎神经元的类胆碱分化、肝细胞内皮网状系统等。随着研究深入,发现BMP9在肿瘤中也起着重要作用,如BMP9能够抑制前列腺癌PC-3细胞的侵袭和迁移^[3],促进卵巢癌细胞增殖^[2]。我们课题组前期研究发现,BMP9抑制乳腺癌MDA-MB-231的侵袭、迁移。乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌都是一类与异位激素有关的肿瘤,但BMP9在其中起着不同的作用,这种机制尚不明确,肺癌作为临床上常见的肿瘤,它与激素异位分泌密切相关,我们课题组发现BMP9在肺癌A549有表达,那么BMP9在肺癌中又起着怎样作用呢?课题组由此进行了相关研究。

IL-6作为一种细胞因子,它可由多种细胞产生,发挥着广泛的生物学作用,与恶性肿瘤的发生发展密切相关。目前研究表明,IL-6主要与细胞增殖、凋亡、转移相关,如IL-6参与消化道恶性肿瘤(如结肠直肠癌、肝癌、食管癌、胃癌)以及卵巢癌、前列腺癌、乳腺癌、肺癌的转移过程。Maximilian等^[14]认为,IL-6在体内外能够促进恶性黑色素瘤生长,而且与STAT3基因相关。Daniel等^[15]研究发现,IL-6在前列腺癌的不同细胞系中,通过不同信号通路发挥作用,IL-6在前列腺癌细胞系DU145和PC3通过激活PI3K/Akt抑制P27/KIP1通路细胞调节点促进前列腺癌细胞生长、侵袭、迁移。Wang等^[16]研究发现,在IL-6在卵巢癌化疗过程中能诱导顺铂和紫杉醇耐药,而且通过激活PI3K/Akt通路,增加细胞耐药基因以及凋亡抑制基因表达。赖鸿绪课题组^[7]研究肝再生

过程中发现, IL-6通过JAK/PI3K/Akt/CREB信号通路诱导肝细胞凋亡相关基因*Mcl-1L*促进肝细胞凋亡。Tasnim等^[17]发现, IL-6能够作用于乳腺癌骨微环境促进乳腺癌溶骨性骨转移过程, 而且还与肿瘤血管形成、肿瘤细胞免疫逃逸过程相关。Caippe等^[18]研究发现, 雌二醇长期喂养去势小鼠, 去势小鼠血清IL-6表达明显增加, PI3K/Akt信号通路激活。Dethlefsen等^[19]进一步研究发现, IL-6在乳腺癌中发挥着不同作用, 这个与细胞表面是否有雌激素受体表达相关。周晓英课题组^[9]提出IL-6可通过JAK2/STAT3通路, 上调基质金属蛋白酶10促进A549侵袭、迁移过程, 并呈现剂量依赖性。Eda等^[20]证实, 在肺癌A549中IL-1 β 能通过激活PI3K通路上调IL-6表达发挥促肿瘤作用, 而不是通过传统的RAS信号通路。本课题组通过体外感染腺病毒方式在A549细胞中外源性高表达BMP9, RT-PCR和Western blot检测发现, IL-6表达明显上调, 结合文献报道IL-6能够促进A549侵袭、迁移, 以及课题组研究结果BMP9促进A549侵袭、迁移, 提示BMP9在肺癌中很可能是通过上调IL-6促进肺癌侵袭、迁移。当前研究认为, PI3K/Akt信号通路在肿瘤生长、侵袭、转移中起着重要作用, Akt异常激活是导致肿瘤易发生复发和转移的重要原因。在一些肿瘤中, IL-6能够激活PI3K/Akt信号通路来发挥促进肿瘤侵袭、迁移过程, 我们课题组通过Western blot检测发现, IL-6在AdBMP9组中表达升高, 同时磷酸化Akt蛋白表达也升高, 结果提示PI3K/Akt信号通路在感染BMP9腺病毒后被激活。结合目前的研究报道, IL-6能激活PI3K/Akt信号通路, BMP6能上调IL-6表达^[21]。BMP9与BMP6都属于TGF- β 超家族一员, 都能够通过经典BMP/SMAD促进成骨, 由此推测AdBMP9组磷酸化Akt表达升高很可能与IL-6表达升高有关。BMP9能显著促进A549侵袭、迁移与BMP9在乳腺癌和前列腺癌中发挥作用完全不同, 可能与BMP9作用下调细胞的信号通路的不同分子有关。BMP9、PI3K/Akt、IL-6三者之间具体联系、具体调控机制是需要我们深入研究的, 我们将进一步通过RNA干扰技术和加入信号通路拮抗剂的方法来阐明BMP9调控A549的分子机制, 这对阐明肺癌易发生转移的分子机制有着重要作用, 可以为深入研究肿瘤侵袭、转移机制并最终找到抑制肿瘤转移方法奠定基础。

参考文献 (References)

- Juergens RA, Brahmer JR. Adjuvant treatment in non-small cell lung cancer: Where are we now? *J Natl Compr Canc Netw* 2006; 4(6): 595-600.
- Herrera B, van Dinther M, Ten DP, Inman GJ. Autocrine bone morphogenetic protein-9 signals through activin receptor-like kinase-2/Smad1/Smad4 to promote ovarian cancer cell proliferation. *Cancer Res* 2009; 69(24): 9254-62.
- Ye L, Kynaston H, Jiang WG. Bone morphogenetic protein-9 induces apoptosis in prostate cancer cells, the role of prostate apoptosis response-4. *Mol Cancer Res* 2008; 6(10): 1594-606.
- 王科, 冯红蕾, 孙笑笑, 罗进勇, 张彦. 骨形态发生蛋白9抑制人乳腺癌MDA-MB-231细胞体外侵袭和迁移. *基础医学与临床* (Wang Ke, Feng Honglei, Sun Xiaoxiao, Luo Jinyong, Zhang Yan. BMP9 inhibits invasion and migration of human MDA-MB-231 cells *in vitro*. *Basic and Clinical Medicine*) 2011; 4: 360-5.
- Pang XH, Zhang JP, Zhang YJ, Yan J, Pei XQ, Zhang YQ, *et al*. Preoperative levels of serum interleukin-6 in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2011; 58(110/111): 1687-93.
- Collaud S, Stahel R, Inci I, Hillinger S, Schneiter D, Kestenholz P, *et al*. Survival of patients treated surgically for synchronous single-organ metastatic NSCLC and advanced pathologic TN stage. *Lung Cancer-J Iaslc* 2012; 78(3): 234-8.
- Chou CH, Lai SL, Chen CN, Lee PH, Peng FC, Kuo ML, *et al*. IL-6 regulates Mcl-1L expression through the JAK/PI3K/Akt/CREB signaling pathway in hepatocytes: Implication of an anti-apoptotic role during liver regeneration. *PLoS One* 2013; 8(6): e66268.
- Wegiel B, Bjartell A, Culig Z, Persson JL. Interleukin-6 activates PI3K/Akt pathway and regulates cyclin A1 to promote prostate cancer cell survival. *Int J Cancer* 2008; 122(7): 1521-9.
- Zhang X, Yin P, Di D, Luo G, Zheng L, Wei J, *et al*. IL-6 regulates MMP-10 expression via JAK2/STAT3 signaling pathway in a human lung adenocarcinoma cell line. *Anticancer Res* 2009; 29(11): 4497-501.
- Shimizu T, Kayamori T, Murayama C, Miyamoto A. Bone morphogenetic protein (BMP)-4 and BMP-7 suppress granulosa cell apoptosis via different pathways: BMP-4 via PI3K/PDK-1/Akt and BMP-7 via PI3K/PDK-1/PKC. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 417(2): 869-73.
- Chen X, Liao J, Lu Y, Duan X, Sun W. Activation of the PI3K/Akt pathway mediates bone morphogenetic protein 2-induced invasion of pancreatic cancer cells Panc-1. *Pathol Oncol Res* 2011; 17(2): 257-61.
- David L, Mallet C, Keramidas M, Lamande N, Gasc JM, Dupuis-Girod S, *et al*. Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circ Res* 2008; 102(8): 914-22.
- Upton PD, Davies RJ, Trembath RC, Morrell NW. Bone morphogenetic protein (BMP) and activin type II receptors balance BMP9 signals mediated by activin receptor-like kinase-1 in human pulmonary artery endothelial cell. *J Biol Chem* 2009; 284(23): 15794-804.
- Waldner MJ, Foersch S, Neurath MF. Interleukin-6—a key regulator of colorectal cancer development. *Int J Biol Sci* 2012; 8(9): 1248-53.
- Smith DA, Kiba A, Zong Y, Witte ON. Interleukin-6 and on-

- costatin-M synergize with the PI3K/AKT pathway to promote aggressive prostate malignancy in mouse and human tissues. *Mol Cancer Res* 2013; 11(10): 1159-65.
- 16 Wang Y, Li LZ, Ye L, Niu XL, Liu X, Zhu YQ, *et al.* Chemotherapy resistance induced by interleukin-6 in ovarian cancer cells and its signal transduction pathways. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2010; 45(9): 691-8.
- 17 Ara T, Declerck YA. Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. *Eur J Cancer* 2010; 46(7): 1223-31.
- 18 Calippe B, Douin-Echinard V, Laffargue M, Laurell H, Rana-Poussine V, Pipy B, *et al.* Chronic estradiol administration in vivo promotes the proinflammatory response of macrophages to TLR4 activation: Involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Immunol* 2008; 180(12): 7980-8.
- 19 Dethlefsen C, Hojfeldt G, Hojman P. The role of intratumoral and systemic IL-6 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 138(3): 657-64.
- 20 Eda H, Burnette BL, Shimada H, Hope HR, Monahan JB. Interleukin-1beta-induced interleukin-6 production in A549 cells is mediated by both phosphatidylinositol 3-kinase and interleukin-1 receptor-associated kinase-4. *Cell Biol Int* 2011; 35(4): 355-8.
- 21 Lee GT, Kwon SJ, Lee JH, Jeon SS, Jang KT, Choi HY, *et al.* Induction of interleukin-6 expression by bone morphogenetic protein-6 in macrophages requires both SMAD and p38 signaling pathways. *J Biol Chem* 2010; 285(50): 39401-8.