

# 实时荧光定量PCR检测IL-8 mRNA在大肠癌的表达

周文鹏, 樊青霞, 范魁生, 王瑞林, 吴金民

**背景资料**  
近年来研究表明, 趋化因子与肿瘤生长和转移有密切关系, 因此, 本文应用实时荧光定量PCR法检测大肠癌患者癌组织IL-8 mRNA表达, 并分析其与临床病理因素之间关系。

周文鹏, 樊青霞, 范魁生, 王瑞林, 郑州大学医学院第一附属医院肿瘤科 河南省郑州市 450052  
吴金民, 浙江大学医学院附属邵逸夫医院肿瘤中心 浙江省杭州市 310016  
作者贡献分布: 周文鹏, 樊青霞, 范魁生, 王瑞林, 吴金民对此文所作贡献两均等; 此课题由吴金民, 周文鹏, 樊青霞, 范魁生, 王瑞林设计; 研究过程由周文鹏, 樊青霞, 范魁生, 王瑞林作完成; 研究所用新试剂及分析工具由吴金民提供; 数据分析由樊青霞, 范魁生, 王瑞林完成; 本论文写作由周文鹏, 吴金民及樊青霞完成。  
通讯作者: 王瑞林, 450052, 河南省郑州建设东路1号, 郑州大学医学院第一附属医院. zhw peng@sohu.com  
电话: 0371-68011778  
收稿日期: 2007-07-19 修回日期: 2007-12-28

## Expression of interleukin-8 mRNA in patients with colorectal carcinoma detected by real-time quantitative PCR

Wen-Peng Zhou, Qing-Xia Fan, Kui-Sheng Fan, Rui-Lin Wang, Jin-Min Wu

Wen-Peng Zhou, Qing-Xia Fan, Kui-Sheng Fan, Rui-Lin Wang, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China  
Jin-Min Wu, Oncology Center, Sir Run Run Shaw Hospital of Zhejiang University, Hangzhou 310016, Zhejiang Province, China  
Correspondence to: Rui-Lin Wang, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 1 Jianshe Eastern Road, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. zhw peng@sohu.com  
Received: 2007-07-19 Revised: 2007-12-28

### Abstract

**AIM:** To investigate the IL-8 mRNA expression in cancerous tissue from patients with colorectal carcinoma and to evaluate its clinic significance.

**METHODS:** Fluorescent quantitative PCR (FQ-PCR) was used to detect the IL-8 mRNA expression in cancerous tissue from 56 patients with colorectal carcinoma and to observe its relationship with pathologic parameters.

**RESULTS:** The expression of IL-8 mRNA was significantly higher in cancerous tissue from patients with colorectal carcinoma than in normal tissue ( $1.106 \pm 0.420$  vs  $0.792 \pm 0.374$ ,  $P < 0.05$ ). IL-8 mRNA expression was closely related with the pathologic parameters, such as presence of venous invasion, lymph node metastasis, histo-

logical type, liver metastasis and clinicopathological stage (Dukes) ( $P < 0.05$ ). However, tumor site was not significantly related to the age and sex of the patients.

**CONCLUSION:** IL-8 mRNA expression is significantly correlated with the biological behavior of colorectal carcinoma. The high expression of IL-8 may be related with the occurrence and progress of colorectal cancer.

**Key Words:** Colorectal carcinoma; Interleukin-8; Fluorescent quantitative PCR

Zhou WP, Fan QX, Fan KS, Wang RL, Wu JM. Expression of interleukin-8 mRNA in patients with colorectal carcinoma detected by real-time quantitative PCR. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(4): 450-453

### 摘要

**目的:** 探讨大肠癌组织IL-8 mRNA表达及其临床意义。

**方法:** 用实时荧光定量PCR检测56例大肠癌组织及癌旁正常组织IL-8 mRNA表达, 分析IL-8 mRNA表达与大肠癌临床病理因素之间的关系。

**结果:** 癌组织和癌旁正常组织IL-8 mRNA表达有显著差异( $1.106 \pm 0.420$  vs  $0.792 \pm 0.374$ ,  $P < 0.05$ )。癌组织IL-8 mRNA表达与淋巴结转移、组织学类型、血管侵犯、肝转移及肿瘤病理分期密切相关, 与肿瘤部位、肿瘤大小、及患者的性别和年龄等无关。

**结论:** IL-8高表达同大肠癌生物学行为密切相关, 可能与大肠癌的发生、发展及预后有关。

**关键词:** 大肠肿瘤; 白细胞介素8; 实时荧光定量聚合酶链式反应

周文鹏, 樊青霞, 范魁生, 王瑞林, 吴金民. 实时荧光定量PCR检测IL-8 mRNA在大肠癌的表达. *世界华人消化杂志* 2008; 16(4): 450-453  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/450.asp>

### 0 引言

趋化因子是一组对白细胞有趋化作用和激活功

**同行评议者**  
高泽立, 副教授, 上海交通大学医学院附属第三人民医院感染科

能的细胞因子. 近年来研究表明, 趋化因子与肿瘤生长和转移有密切关系, 其中研究较为深入的是白介素-8(IL-8). 在许多肿瘤组织中均可检测到IL-8蛋白质分泌及其mRNA表达, 而在其相应正常组织IL-8不表达或呈低表达状态, 说明IL-8与肿瘤发生、发展有关. 因此, 我们应用实时荧光定量PCR法检测大肠癌患者癌组织IL-8 mRNA表达, 并分析其与临床病理因素之间关系.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2002-07/2004-07浙江大学附属邵逸夫医院肿瘤外科的住院大肠癌患者56例. 男33例, 女23例. 年龄31-85(中位年龄55)岁. 所有标本均经过病理证实. 其中, 结肠癌22例, 直肠癌34例. 组织学类型: 乳头状腺癌7例, 管状腺癌44例, 黏液腺癌5例. 我们将乳头状腺癌和高、中分化腺癌定为分化好型, 将低分化及黏液腺癌定为分化差型. 临床病理分期按Dukes分期. 全部病例术前均未接受化疗及放疗. FQD-33A荧光定量PCR仪由杭州大和热磁电力有限公司提供. 总RNA抽提试剂盒和M-MuLV逆转录酶购自Promega公司. 逆转录实时荧光定量PCR试剂购自Roche公司.

### 1.2 方法

**1.2.1 引物设计与合成:** 引物和探针在GenBank查到基因序列, 使用软件Primer-Express2.0进行设计. IL-8上游引物: 5'-AGAGTGGACCACTGCGC-3', 下游引物: 3'-ACATCCCAACGGTCTACGTTA-5', 扩增片段为251 bp; GAPDH上游引物为5'-GAAGATGGTGATGGGATTT-3', 下游引物为5'-CAAGCTTCCGTTCTCAGCC-3', 扩增产物长226 bp. 上述引物均由上海博亚生物技术服务公司合成.

**1.2.2 标本制备、RNA提取和cDNA合成:** 标本采集后迅速放至液氮中冷冻, -80℃保存. 使用TRIzol RNA提取液, 按照其说明书对大肠癌组织和癌旁正常组织提取总RNA, 通过甲醛变性凝胶电泳定性和紫外分光光度仪定量. 取总RNA 1 μg, 进行逆转录, 按照说明书进行cDNA合成, 所得cDNA置于-20℃保存. GAPDH和IL-8 mRNA的PCR反应: 反应体系为25 μL, 10×PCR Buffer 2.5 μL, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.5 μL, 10 mmol/L dNTP 0.5 μL, 10 nmol/L Primer 1 μL/L, 1 nmol/L probe 2.5 μL, 5 μL/L Taq 0.25 μL, cDNA 2.5 μL, 无菌双蒸水15 μL, 反应条件: 94℃变性5 min, 94℃ 30 s, 58℃ 45 s, 72℃ 30 s, 共40个循环,

循环结束后72℃延伸10 min, 每个标准品和标本均作复管PCR反应.

**1.2.3 PCR产物定量的校正和判定分析:** 采用GAPDH作为内参照. IL-8 mRNA和GAPDH mRNA根据标准曲线得出mRNA的分子拷贝数. 用GAPDH的拷贝数作为校正基数, 即目的基因mRNA精确含量 = 目的基因CT值/内参照GAPDH CT值, 以此比值作统计处理. 根据FQ-PCR原理, 被激发的荧光信号达到一定阈值后被荧光探头采集, 最后将其转换成CT值, 该数值与扩增片段的实际拷贝数呈反比, 即CT值越低, 实际拷贝数含量越高.

**统计学处理** 各数据均以mean±SD表示, 进行配对t检验, 应用SPSS11.0统计软件对所得数据进行统计学处理, 以P<0.05为有显著性差异.

## 2 结果

**2.1 IL-8在大肠癌组织和癌旁正常组织中的表达** 大肠癌癌旁正常组织和大肠癌组织均表达IL-8 mRNA, 其表达水平分别为 $1.306 \pm 0.448$ 和 $1.028 \pm 0.456$ , 大肠癌组织IL-8 mRNA表达明显高于癌旁正常组织(P<0.05).

**2.2 癌组织IL-8表达与大肠癌临床病理指标的关系** IL-8 mRNA在乳头状腺癌和管状腺癌组织中的表达明显高于黏液腺癌组织( $1.106 \pm 0.420$  vs  $0.792 \pm 0.374$ , P<0.05). 在有淋巴结转移者中的表达明显低于无淋巴结转移者(P<0.05). 肝脏转移者IL-8 mRNA表达低于无肝脏转移者( $0.756 \pm 0.328$  vs  $1.103 \pm 0.424$ , P<0.05). 按大肠癌Dukes分期标准, 本组A期和B期20例, C期和D期36例. C、D期IL-8 mRNA表达平均指数为 $0.891 \pm 0.349$ , A、B期为 $1.223 \pm 0.449$ , 前者IL-8 mRNA表达明显低于后者(P<0.05, 表1).

## 3 讨论

浸润、转移及复发是肿瘤生物学主要特性, 具有重要的临床意义, 因而备受关注. 而血管形成在肿瘤浸润、复发及转移过程中有非常重要的作用. 肿瘤的持续生长必须依赖新生血管的形成, 如果肿瘤不能血管化, 生长至2-3 mm便发生退化. 血管化不仅能通过“灌注”效应促进肿瘤生长, 并为肿瘤细胞进入血液循环和转移提供可能, 在肿瘤形成中起着重要的作用<sup>[1]</sup>. 目前的研究显示, IL-8参与肿瘤血管形成, IL-8与肿瘤的浸润、转移密切相关<sup>[2-5]</sup>. Lee *et al*<sup>[6]</sup>检测35例胃癌患者癌组织和癌旁正常组织中的IL-8表达, 癌组织中IL-8表达显著高于癌旁正常组织, 随

研发前沿  
血管化不仅能通过“灌注”效应促进肿瘤生长, 而且能为肿瘤细胞进入血液循环和转移提供可能, 在肿瘤形成中起重要的作用. 目前的研究显示, IL-8参与肿瘤血管形成, IL-8与肿瘤的浸润、转移密切相关.

**创新盘点**  
本文对IL-8 mRNA与大肠癌的研究提供了一定的理论基础。

表 1 IL-8 mRNA与大肠癌临床病理指标

	<i>n</i>	IL-8 mRNA
性别		
男	33	0.997 ± 0.390
女	23	1.072 ± 0.441
年龄		
>55	39	1.073 ± 0.426
<55	17	0.926 ± 0.360
肿瘤大小(cm)		
>5	27	0.921 ± 0.353
<5	29	1.143 ± 0.436
肿瘤部位		
结肠	22	0.945 ± 0.385
直肠	34	1.081 ± 0.385
组织类型		
高分化	42	1.106 ± 0.420
低分化	14	0.792 ± 0.374 <sup>a</sup>
血管侵犯		
有	27	0.866 ± 0.379
无	29	1.179 ± 0.439 <sup>a</sup>
淋巴结转移		
有	31	0.889 ± 0.347
无	25	1.202 ± 0.467 <sup>a</sup>
肝转移		
有	12	0.756 ± 0.328
无	44	1.103 ± 0.424 <sup>a</sup>
Dukes分期		
A/B	20	1.223 ± 0.449
C/D	36	0.891 ± 0.349 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>*P*<0.05.

着病理分期的升高, IL-8的表达也逐步升高, 二者有显著相关性. 同时IL-8的表达与病理分型也有显著的相关性, 而IL-8的高表达与胃癌患者的生存时间有显著负相关性, 这表明IL-8的表达在预测胃癌癌变过程中是非常重要的有效的指标. 研究者在肺癌<sup>[7-9]</sup>和卵巢癌<sup>[10]</sup>、乳腺癌<sup>[11]</sup>、肝癌<sup>[12]</sup>等也得出了类似的结果, 提示IL-8参与肿瘤的发生和发展. 本研究显示, 大肠癌患者癌组织IL-8 mRNA表达强度明显高于正常组织, 而且随着大肠癌临床病理分期的升高而明显上升, 呈显著正相关, 癌组织IL-8 mRNA的高表达与血管侵犯、淋巴结转移和肝脏转移呈显著正相关, 提示IL-8参与大肠癌的浸润和转移.

研究表明IL-8除参与肿瘤血管形成外, 还通过阻滞细胞凋亡<sup>[13]</sup>、促进细胞和细胞及细胞和基质间黏附<sup>[14]</sup>、自分泌<sup>[15-16]</sup>、上调基质金属蛋白酶<sup>[17]</sup>及通过调节EGFR<sup>[18]</sup>等作用而参与肿瘤的发生发展. 由于IL-8与血管形成及肿瘤生长

密切相关, Inoue *et al*<sup>[19]</sup>用IL-8反义cDNA全序列抑制肿瘤组织血管形成和肿瘤转移, 而Hjortoe *et al*<sup>[20]</sup>用乳腺癌细胞系MDA-MB-231接种动物, 对产生肿瘤的动物分别用抗IL-8抗体和对照抗体处理, 结果表明, 与对照组相比, 抗IL-8抗体处理的肿瘤生长明显延缓, 出现转移时间明显延长. Zhang *et al*<sup>[21]</sup>研究前列腺癌细胞PC-3MM2时也有类似发现. 提示IL-8可成为抗肿瘤治疗的一个新的靶点.

#### 4 参考文献

- Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86: 353-364
- Murphy C, McGurk M, Pettigrew J, Santinelli A, Mazzucchelli R, Johnston PG, Montironi R, Waugh DJ. Nonapical and cytoplasmic expression of interleukin-8, CXCR1, and CXCR2 correlates with cell proliferation and microvessel density in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 4117-4127
- Luppi F, Longo AM, de Boer WL, Rabe KF, Hiemstra PS. Interleukin-8 stimulates cell proliferation in non-small cell lung cancer through epidermal growth factor receptor transactivation. *Lung Cancer* 2007; 56: 25-33
- Takehara H, Iwamoto J, Mizokami Y, Takahashi K, Ootubo T, Miura S, Narasaka T, Takeyama H, Omata T, Shimokobe K, Ito M, Matsuoka T. Involvement of cyclooxygenase-2--prostaglandin E2 pathway in interleukin-8 production in gastric cancer cells. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 2188-2197
- Trevino JG, Gray MJ, Nawrocki ST, Summy JM, Lesslie DP, Evans DB, Sawyer TK, Shakespeare WC, Watowich SS, Chiao PJ, McConkey DJ, Gallick GE. Src activation of Stat3 is an independent requirement from NF-kappaB activation for constitutive IL-8 expression in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Angiogenesis* 2006; 9: 101-110
- Lee KH, Bae SH, Lee JL, Hyun MS, Kim SH, Song SK, Kim HS. Relationship between urokinase-type plasminogen receptor, interleukin-8 gene expression and clinicopathological features in gastric cancer. *Oncology* 2004; 66: 210-217
- Tas F, Duranyildiz D, Oguz H, Camlica H, Yasasever V, Topuz E. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and interleukin-8 (IL-8) levels in small cell lung cancer. *Cancer Invest* 2006; 24: 492-496
- Henriquet C, Gougat C, Combes A, Lazennec G, Mathieu M. Differential regulation of RANTES and IL-8 expression in lung adenocarcinoma cells. *Lung Cancer* 2007; 56: 167-174
- Tas F, Duranyildiz D, Oguz H, Camlica H, Yasasever V, Topuz E. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and interleukin-8 (IL-8) levels in small cell lung cancer. *Cancer Invest* 2006; 24: 492-496
- Lokshin AE, Winans M, Landsittel D, Marrangoni AM, Velikokhatnaya L, Modugno F, Nolen BM, Gorelik E. Circulating IL-8 and anti-IL-8 autoantibody in patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2006; 102: 244-251
- Derin D, Soydinc HO, Guney N, Tas F, Camlica H, Duranyildiz D, Yasasever V, Topuz E. Serum IL-8

- and IL-12 levels in breast cancer. *Med Oncol* 2007; 24: 163-168
- 12 Lin Q, Huang MS, Hu B, Dong M, Wen JY, Wu XY. Serum levels of macrophage migration inhibitory factor and interleukin-8 in hepatocellular carcinoma patients: their correlations with tumor progression and prognosis. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2007; 15: 463-464
- 13 Abdollahi T, Robertson NM, Abdollahi A, Litwack G. Identification of interleukin 8 as an inhibitor of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in the ovarian carcinoma cell line OVCAR3. *Cancer Res* 2003; 63: 4521-4526
- 14 Barshishat M, Ariel A, Cahalon L, Chowers Y, Lider O, Schwartz B. TNFalpha and IL-8 regulate the expression and function of CD44 variant proteins in human colon carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis* 2002; 19: 327-337
- 15 Huang J, Yao JL, Zhang L, Bourne PA, Quinn AM, di Sant'Agnese PA, Reeder JE. Differential expression of interleukin-8 and its receptors in the neuroendocrine and non-neuroendocrine compartments of prostate cancer. *Am J Pathol* 2005; 166: 1807-1815
- 16 Kamohara H, Takahashi M, Ishiko T, Ogawa M, Baba H. Induction of interleukin-8 (CXCL-8) by tumor necrosis factor-alpha and leukemia inhibitory factor in pancreatic carcinoma cells: Impact of CXCL-8 as an autocrine growth factor. *Int J Oncol* 2007; 31: 627-632
- 17 Watanabe H, Iwase M, Ohashi M, Nagumo M. Role of interleukin-8 secreted from human oral squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Oncol* 2002; 38: 670-679
- 18 Luppi F, Longo AM, de Boer WI, Rabe KF, Hiemstra PS. Interleukin-8 stimulates cell proliferation in non-small cell lung cancer through epidermal growth factor receptor transactivation. *Lung Cancer* 2007; 56: 25-33
- 19 Inoue K, Slaton JW, Kim SJ, Perrotte P, Eve BY, Bar-Eli M, Radinsky R, Dinney CP. Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastasis in human bladder cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 2290-2299
- 20 Hjortoe GM, Petersen LC, Albrektsen T, Sorensen BB, Norby PL, Mandal SK, Pendurthi UR, Rao LV. Tissue factor-factor VIIa-specific up-regulation of IL-8 expression in MDA-MB-231 cells is mediated by PAR-2 and results in increased cell migration. *Blood* 2004; 103: 3029-3037
- 21 Zhang F, Lee J, Lu S, Pettaway CA, Dong Z. Blockade of transforming growth factor-beta signaling suppresses progression of androgen-independent human prostate cancer in nude mice. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 4512-4520

同行评价  
本文所用方法先进, 数据可靠, 引用参考文献得当。

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 世界华人消化杂志电子杂志的开放存取出版

本刊讯 《世界华人消化杂志》采取开放存取出版方式, 自1995年起, 发表的文章可以在线免费阅读全文 (<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>). 自2003-04-15至2007-12-31, 电子版的点击次数为21762951, 平均每天点击12743次. 总下载次数280505, 平均每天下载164次. (世界胃肠病学杂志社 2008-02-08)