

## IL-24 在口腔鳞状细胞癌中的表达及其临床意义

刘冲 李吉辰\* 赛音乌力吉 朴松林 曹博 赵大勇

(哈尔滨医科大学附属口腔医院口腔颌面外科 黑龙江 哈尔滨 150001)

**[摘要]** **目的:**研究白细胞介素-24 (IL-24)在口腔鳞状细胞癌(简称鳞癌)组织中的表达并探究其临床意义。**方法:**分别采用免疫组化和实时聚合酶链反应(Real-time PCR)技术的方法检测 75 例口腔鳞癌组织和 30 例正常口腔黏膜组织中 IL-24 的蛋白和基因表达。**结果:**免疫组化染色显示 IL-24 在口腔鳞癌组织中的阳性表达率 45.33%(34/75)低于正常口腔黏膜组织中的阳性表达率 70.00%(21/30)( $P=0.022$ )。IL-24 的表达与口腔鳞癌的组织分化程度( $P=0.002$ )、淋巴结转移( $P=0.033$ )、临床分期( $P=0.035$ )有密切相关性,与患者的性别( $P=0.917$ )、年龄( $P=0.812$ )、吸烟史( $P=0.720$ )、饮酒史( $P=0.847$ )及肿瘤生长部位( $P=0.959$ )无相关性。Real-time PCR 检测 IL-24 在不同病理分化时期口腔鳞癌组织和正常口腔黏膜组织中的基因表达水平,其高、中、低分化各组的平均表达水平分别为 0.688、0.302、0.153,均低于正常口腔黏膜组织中的平均表达水平 1.000( $P<0.001$ )。**结论:**IL-24 在口腔鳞癌组织中呈低表达,该因子的表达情况与临床信息具有一定相关性,可初步认定为口腔鳞癌的候补抑癌基因。

**[关键词]** 口腔鳞状细胞癌 白细胞介素-24 免疫组织化学 实时定量聚合酶链反应

**[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-7651(2018)06-0632-04

**[doi]** 10.13701/j.cnki.kqxyj.2018.06.014

**Expressions and Clinical Significances of IL-24 in Oral Squamous Cell Carcinoma.** LIU Chong, LI Ji-chen\*, SAI Yin Wu-liji, PIAO Song-lin, CAO Bo, ZHAO Da-yong. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, The Affiliated Hospital of Stomatology, Harbin Medical University, Harbin 150001, China.

**[Abstract]** **Objective:** To study the expressions and clinical significances of interleukin-24 (IL-24) in the oral squamous cell carcinoma (OSCC). **Methods:** The protein and gene expressions of IL-24 were detected respectively by immunohistochemistry and real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) technique method in 75 cases of OSCC patients and 30 cases of controls with normal oral mucosa tissues. The relationship between IL-24 expressions and the clinicopathologic features was analyzed. **Results:** Immunohistochemical staining showed that the positive expressions of IL-24 in the OSCC (45.33%, 34/75) were significantly lower than those of normal oral mucosa tissue (70.00%, 21/30)( $P=0.022$ ). The expressions of IL-24 were closely associated with the differentiation degree ( $P=0.002$ ), lymph node metastasis ( $P=0.033$ ) and clinical stage ( $P=0.035$ ), but they were not correlated with the gender ( $P=0.917$ ), age ( $P=0.812$ ), smoking history ( $P=0.720$ ), drinking history ( $P=0.847$ ), and the site of lesion ( $P=0.959$ ). Real-time PCR was used to detect the gene expressions of IL-24 in different pathological differentiation period of OSCC and in normal oral mucosa tissues. The average expressions of IL-24 in highly differentiated OSCC were 0.688, in moderately differentiated OSCC were 0.302, and in poorly differentiated OSCC were 0.153. All of them were lower than the average expressions of IL-24 in normal oral mucosa tissues, which were 1.000 ( $P<0.001$ ). **Conclusion:** The expressions of IL-24 in OSCC were lower than that in normal oral mucosa tissues. This gene has certain correlation with clinical information.

**[Key words]** Oral squamous cell carcinoma Interleukin-24 Immunohistochemistry Real-time PCR

口腔鳞状细胞癌(简称鳞癌)是一种主要发生于

颌面部皮肤及口腔黏膜的上皮性恶性肿瘤,约占颌面部恶性肿瘤的 90%以上<sup>[1]</sup>。其容易向周围正常组织浸润和早期发生淋巴结转移,目前以手术为主联合放疗、化疗是主要的治疗手段,但患者的生存质量及预后情况仍不甚理想<sup>[2]</sup>。白细胞介素-24 (IL-24)又称黑色素瘤分化相关基因-7(melano-

**基金项目** 黑龙江省留学归国科学基金(编号:LC2009C09)

**作者简介** 刘冲(1989~),女,山东人,硕士,住院医师,主要从事口腔颌面部肿瘤的基础研究与治疗。

**\* 通讯作者** 李吉辰, E-mail:lijichen@163.com

ma differentiation associated gene 7, MDA-7), 1995 年由美国哥伦比亚大学的 Jiang 等<sup>[3]</sup>通过差示杂交的方法从人干扰素 (IFN) -  $\beta$  和瑞香素 (mezerin, MEZ) 诱导的人类黑色素瘤细胞 HO-1 中获得的。近年有研究证明, IL-24 能诱导癌细胞凋亡、抑制癌细胞浸润和转移以及抑制肿瘤血管生成, 同时增加对放、化疗的敏感性<sup>[4]</sup>。IL-24 对黑色素瘤、卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、肠癌、肺癌、肝癌等多种肿瘤细胞的生长均有抑制效应, 而对正常组织细胞未见明显作用<sup>[5~8]</sup>。本研究通过分析 IL-24 的表达与口腔鳞癌临床病理参数之间的关系, 以为今后探究口腔鳞癌的发生发展、转移、预后以及肿瘤的治疗提供理论基础。

## 1 材料与方法

1.1 材料 选取 2015 年 6 月~2016 年 9 月期间就诊于哈尔滨医科大学附属口腔医院的 75 例口腔鳞癌患者的新鲜标本和石蜡标本作为研究对象, 其中男性 49 例, 女性 26 例, 年龄 37~84 岁, 平均年龄 (51.4 $\pm$ 10.7) 岁。病变范围包括舌、颊、牙龈、及口底, 病理分化程度: 高分化 38 例, 中低分化 37 例, 并根据 2002 年国际抗癌联盟 (UICC) 制订的 TNM 分期标准对口腔鳞癌进行临床分期。另收集 30 例正常口腔黏膜新鲜组织和石蜡标本作为实验对照。据病例资料显示, 所有患者术前均未行放、化疗等治疗, 且所有患者均采取口腔鳞癌完整病灶切除术加颈部淋巴结清扫术。

1.2 主要试剂 IL-24 兔抗人多克隆抗体 (26772-1-AP) (武汉三鹰生物技术有限公司), 免疫组织化学检测试剂盒、DAB 显色试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司); Trizol Reagent、反转录试剂盒、SYBR (赛默飞世尔科技有限公司)。

1.3 免疫组织化学检测 65 $^{\circ}$ C 烤箱中放入病理切片 60 min, 二甲苯脱蜡 30 min, 梯度酒精脱水后水洗 2 遍。现配 3%  $H_2O_2$  中 10 min, 蒸馏水洗 2 遍。行柠檬酸钠高压蒸汽抗原修复, 水洗 2 遍, PBS 冲洗 5 min $\times$ 3 次。滴加封闭液 37 $^{\circ}$ C, 60 min, 滴加

IL-24 多克隆抗体 (1:200), 4 $^{\circ}$ C 恒温过夜, PBS 冲洗 5 min $\times$ 3 次; 滴加二抗 37 $^{\circ}$ C, 30 min, PBS 冲洗 3 min $\times$ 3 次; DAB 试剂盒显色, 蒸馏水洗 5 min $\times$ 2 次。苏木素复染, 自来水冲洗 10 min, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 封片。

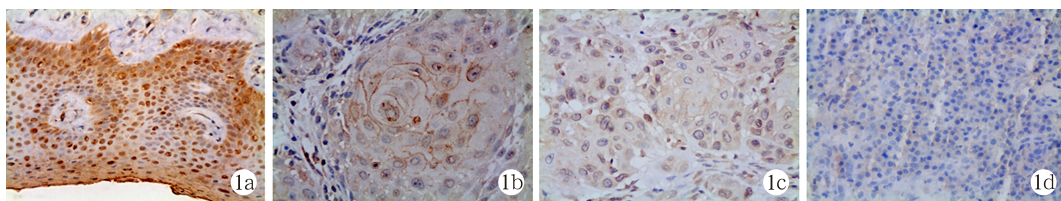
1.4 Real-time PCR 检测 用 TRIzol 法提取新鲜标本组织中的总 RNA 并检测浓度。按照 ABI 反转录试剂盒要求行逆转录。引物设计, IL-24 上游引物 5'-CACAGGCGTTTCTGCTATTC-3', 下游引物 5'-ATCCAGGTCAGAAGAATGTC-CAC-3', 产物长度为 101 bp;  $\beta$ -actin 上游引物 5'-TACCTCATGAAGATCCTCACC-3', 下游引物 5'-TTTCGTGGATGCCACAGGAC-3', 产物长度 268 bp。以逆转录得到的 cDNA 为模板, 按照 95 $^{\circ}$ C 10 min 预变性, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 共 40 个循环进行反应, 分析结果。

1.5 结果判读 免疫组化检测 IL-24 于口腔鳞癌组织中, 主要在细胞膜和细胞质中可见阳性表达, 染色为棕褐色颗粒。由 2 位病理科医师随机在 10 个高倍镜不重叠视野 ( $\times$ 400) 下观察每张切片, 每个视野计数 100 个细胞。采用双盲法, 以细胞阳性率和染色强度行半定量评分, 细胞阳性率以  $\leq$ 10% 为 0 分, >10%~25% 为 1 分, >25%~50% 为 2 分, >50% 为 3 分; 按染色程度评分: 无染色为 0 分, 浅黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分; 两者的得分之积判定结果:  $<$ 3 分计为阴性 (-),  $\geq$ 3 分计为阳性 (+)<sup>[9]</sup>。Real-time PCR 检测 IL-24 在口腔鳞癌组织中的基因表达低于正常组织。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 22.0 统计软件, 统计 IL-24 的表达率及相关临床信息和实时荧光定量检测数据, 资料采用  $\chi^2$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 免疫组化检测 IL-24 蛋白表达 在口腔鳞癌组织中, IL-24 主要表达于细胞膜和细胞质, 呈棕褐色。高分化组织中多处可见; 中分化组织中部分



1a: 正常口腔黏膜组织; 1b: 高分化口腔鳞癌组织; 1c: 中分化口腔鳞癌组织; 1d: 低分化口腔鳞癌组织

图 1 IL-24 在正常口腔黏膜及口腔鳞癌组织中的表达 ( $\times$ 400)

Fig. 1 The expression of IL-24 between normal oral mucosa tissues and OSCC ( $\times$ 400)

可见;低分化组织中未见明显染色;在正常口腔黏膜组织中,上皮细胞可见明显染色(图1)。IL-24在口腔鳞癌组织中的阳性表达率为45.33%(34/75)明显低于正常口腔黏膜组织中的阳性表达率70.00%(21/30)( $P=0.022$ ),见表1。

表1 IL-24在口腔鳞癌及正常口腔黏膜组织中的表达

Table 1 The expression of IL-24 between OSCC and normal oral mucosa tissues

组别	例数	IL-24		阳性率/%
		+	-	
口腔鳞癌组织	75	34	41	45.33*
正常口腔黏膜	30	21	9	70.00

注:与正常口腔黏膜组织相比,\* $P<0.05$

2.2 口腔鳞癌组织中IL-24的表达与临床病理参数关系 在口腔鳞癌组织中,IL-24的表达与组织分化程度、淋巴结转移及肿瘤临床分期有显著相关性( $P<0.05$ ),与患者性别、年龄、吸烟史、饮酒史及肿瘤生长部位无相关性,见表2。

表2 IL-24的表达与口腔鳞癌临床病理参数关系

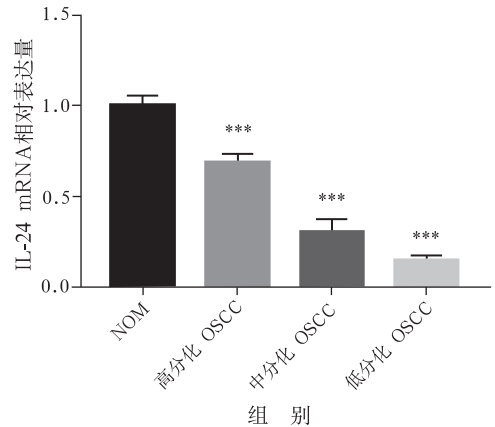
Table 2 Correlation between the expression of IL-24 and clinicopathologic features of OSCC

分组	例数	IL-24	
		+	-
性别			
男	49	22	27
女	26	12	14
年龄/岁			
≤60	32	14	18
>60	43	20	23
吸烟史			
是	38	18	20
否	37	16	21
饮酒史			
是	34	15	19
否	41	19	22
部位			
舌侧	34	16	18
颊侧	13	6	7
牙龈	15	7	8
口底	13	5	8
分化程度			
高分化	38	24	14*
中/低分化	37	10	27*
淋巴结转移			
否	50	27	23*
是	25	7	18*
临床分期			
I~II	43	24	19*
III~IV	32	10	22*

注:\* $P<0.05$

2.3 Real-time PCR检测IL-24基因表达 在不同病理分化时期的口腔鳞癌组和正常对照组中,Real-time PCR检测得到高分化组IL-24的平均

表达水平为0.688,中分化组平均表达水平为0.302,低分化组平均表达水平为0.153,均低于正常对照组中IL-24的平均表达水平1.000,具有统计学差异( $P<0.001$ ),见图2。



NOM:正常口腔黏膜组织 IL-24 的平均表达水平 1.000;高分化口腔鳞癌组织 IL-24 的平均表达水平为 0.688;中分化口腔鳞癌组织 IL-24 的平均表达水平为 0.302;低分化口腔鳞癌组织 IL-24 的平均表达水平为 0.153

图2 Real-time PCR检测IL-24的基因表达水平

Fig. 2 Real-time PCR to detect the gene expression of IL-24.

### 3 讨论

IL-24是近年来发现的具有细胞因子特性的抗肿瘤基因,能参与多种不同的信号通路,调节多种细胞的增殖分化、免疫效应、自噬效应,发挥诱导癌细胞凋亡、抑制癌细胞浸润和转移、抗血管生成、延缓血管钙化等作用<sup>[10,11]</sup>。IL-24正常表达于单核细胞、巨噬细胞等免疫细胞,但在肿瘤细胞中呈低表达。有体内和体外实验证明,上调IL-24能抑制肺癌、胰腺癌、乳腺癌、肝癌<sup>[12]</sup>、前列腺癌<sup>[13]</sup>等癌细胞生长,而对上皮细胞、纤维母细胞、星形胶质细胞、黑色素细胞或内皮起源的细胞等正常细胞却没有明显影响。目前在口腔鳞癌中关于IL-24的研究罕有报道。

本次研究通过免疫组化和Real-time PCR检测IL-24在口腔鳞癌组织中的表达。免疫组化显示口腔鳞癌组织IL-24的阳性表达率为45.33%(34/75),明显低于正常口腔黏膜组织的阳性表达率70.00%(21/30)( $P=0.022$ )。随着肿瘤组织分化程度降低,IL-24表达量相对减少甚至不表达( $P=0.002$ ),符合抑癌基因的基本条件。同时IL-24的表达与淋巴结转移( $P=0.033$ )、临床分期( $P=0.035$ )有密切关系;与性别( $P=0.917$ )、年龄( $P=0.812$ )、吸烟史( $P=0.720$ )、饮酒史( $P=0.847$ )以及肿瘤生长部位( $P=0.959$ )无明显相关性。

提示 IL-24 在口腔鳞癌组织中呈低表达,可以初步作为口腔鳞癌的候选抑癌基因。

Real-time PCR 显示,高分化口腔鳞癌组中 IL-24 的平均表达水平为 0.688,中分化组中平均表达水平为 0.302,低分化组中平均表达水平为 0.153,而正常黏膜对照组中 IL-24 的平均表达水平为 1.000( $P < 0.001$ ),表明 IL-24 在口腔鳞癌组织中的表达量明显低于正常口腔黏膜组织,同时表明 IL-24 表达量随组织分化程度降低而减少。此结论总体上与免疫组化及临床资料结果相一致,进一步证明了 IL-24 在口腔鳞癌中呈低表达,可初步将 IL-24 作为口腔鳞癌的候补抑癌基因。

有研究表明,IL-24 抑制癌细胞增殖并诱导凋亡可通过调控 MAPK/ERK、PI3K - AKT、NF- $\kappa$ B、JNK 和 AP-1 等多条信号通路,活化多个蛋白激酶,调控多个蛋白,抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2,增加促凋亡蛋白 Bax 的表达,上调执行凋亡机制的 caspase-3 / 7 蛋白酶的表达,阻断肿瘤细胞周期,诱导细胞凋亡<sup>[14,15]</sup>。目前,肿瘤治疗仍是世界难题,IL-24 作为一种新的抑癌基因,有望为口腔鳞癌的治疗提供理论方向,但其在口腔鳞癌中的作用及调控机制仍有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Sritippho T, Chotjumlong P, Iamaroon A, et al. Roles of human papillomaviruses and p16 in oral cancer [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 15 (15) : 6193-6200
- [2] Zhu G, Yu C, She L, et al. Metadherin regulation of vascular endothelial growth factor expression is dependent upon the PI3K/Akt pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. Medicin, 2015, 94(6) : 1-10
- [3] Jiang H, Lin JJ, Su ZZ, et al. Subtraction hybridization identifies a novel melanoma differentiation associated gene, mda-7, modulated during human melanoma differentiation, growth and progression [J]. Oncogene, 1995, 11(12) : 2477-2486
- [4] Zheng SY, Ge JF, Zhao J, et al. Adenovirus-mediated IL-24 confers radiosensitization to human lung adenocarci-

noma *in vitro* and *in vivo* [J]. Mol Biol Rep, 2015, 42(6) : 1069-1080

- [5] Menezes ME, Shen XN, Das SK, et al. MDA-7/IL-24 functions as a tumor suppressor gene *in vivo* in transgenic mouse models of breast cancer [J]. Oncotarget, 2015, 6(35) : 36928-36942
- [6] Panneerselvam J, Jin J, Shanker M, et al. IL-24 inhibits lung cancer cell migration and invasion by disrupting the SDF-1/CXCR4 signaling axis [J]. PLoS One, 2015, 10(3) : e0122439
- [7] Han B, Liu SH, Guo WD, et al. Notch1 downregulation combined with interleukin-24 inhibits invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(33) : 9727-9735
- [8] Ibrahim AM, Wang YH. Viro-immune therapy: A new strategy for treatment of pancreatic cancer [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(2) : 748-763
- [9] 马鸣, 魏思思, 武一鹏, 等. Mda-7/IL-24 与 C-myb 在 Burkitt 淋巴瘤中的表达及其相关性研究 [J]. 免疫学杂志, 2017, 33(8) : 691-696
- [10] 金松, 田立华, 苏勤, 等. IL-24 可能通过 CXCL12/CXCR4 信号轴抑制口腔鳞癌细胞迁移及侵袭能力 [J]. 口腔医学研究, 2017, 33(5) : 482-485
- [11] 高瑞伟, 赵国英, 刘秀香. 白细胞介素 24 在细胞分化中的研究进展 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(2) : 284-287
- [12] Huo W, Du M, Pan X, et al. MiR-203a-3p. 1 targets IL-24 to modulate hepatocellular carcinoma cell growth and metastasis [J]. FEBS Open Bio, 2017, 7(8) : 1085-1091
- [13] Yu D, Zhong Y, Li X, et al. ILs-3, 6 and 11 increase, but ILs-10 and 24 decrease stemness of human prostate cancer cells *in vitro* [J]. Oncotarget, 2015, 6(40) : 42687-42703
- [14] Hu CW, Yin GF, Wang XR, et al. IL-24 induces apoptosis via upregulation of RNA-activated protein kinase and enhances temozolomide-induced apoptosis in glioma cells [J]. Oncol Res, 2015, 22(3) : 159-165
- [15] Zhuo B, Wang R, Yin Y, et al. Adenovirus arming human IL-24 inhibits neuroblastoma cell proliferation *in vitro* and xenograft tumor growth *in vivo* [J]. Tumour Biol, 2013, 34(4) : 2419-2426

[收稿日期: 2017-12-20]

(本文编辑 李四群)