

IL-17 及其相关分子在胃癌组织中的表达和相关性分析

陈锦霞,单保恩,李清靖,刘英姿,国丽茹,高立平,陈伟,李巧霞
(河北医科大学第四医院,河北 石家庄 050011)

摘要: [目的] 检测 IL-17 与趋化因子在胃癌组织中的表达,探讨 IL-17 在胃癌组织中聚集及其促胃癌进展的作用机制。 [方法] 收集 35 例手术切除胃癌组织标本,包括癌组织和非癌对照组织,采用荧光定量 RT-PCR 法检测 IL-17 及趋化因子 CCL2、CCL7、CCL17、CCL20、CCL22、CXCL2 和 CXCL5 mRNA 的表达;分析 IL-17 与表达增高的趋化因子的相关性;采用免疫组织化学染色法,检测胃癌组织内 CD34 和 CD66b 的表达。 [结果] 与非癌对照组织相比,胃癌组织中 IL-17 和趋化因子 CCL2、CCL7、CCL20、CCL22 mRNA 表达显著增高 ($P<0.05$),而趋化因子 CCL17、CXCL2 和 CXCL5 mRNA 表达在两组间无明显差异 ($P>0.05$)。胃癌组织中 IL-17 mRNA 表达水平升高与趋化因子 CCL20、CCL22 mRNA 表达水平升高明显相关 ($r=0.7901, P=0.0038; r=0.9683, P<0.0001$),而与趋化因子 CCL2、CCL7 mRNA 表达水平升高无明显相关性 ($P>0.05$)。IL-17 mRNA 高表达组胃癌组织内 CD34 和 CD66b 的表达水平明显高于 IL-17 mRNA 低表达组 ($P<0.05$)。 [结论] 胃癌组织内 IL-17 表达增高可能与胃癌组织高表达细胞因子 CCL20、CCL22,趋化 Th17 细胞由外周循环向肿瘤募集有关,增高的 IL-17 通过促进新生血管生成和中性粒细胞浸润促进肿瘤进展。

关键词: 胃肿瘤;Th17 细胞;IL-17;CCLx

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2019)06-0537-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.06.B009

Expression of IL-17 and Related Chemokines in Gastric Cancer Tissues and Their Relation to Cancer Progression

CHEN Jin-xia, SHAN Bao-en, LI Qing-jing, LIU Ying-zi, GUO Li-ru, GAO Li-ping, CHEN Wei, LI Qiao-xia

(The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression of IL-17 and related chemokines in gastric cancer tissues and their relation to cancer progression. [Methods] Tissue samples of gastric cancer and normal gastric mucosa were collected from 30 patients with gastric cancer. The mRNA expression of IL-17, and chemokines CCL2, CCL7, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL2, CXCL5 were detected by qRT-PCR. The correlation between expression IL-17 and chemokines was determined by liner regression analysis. The expression of CD34 and CD66b in gastric cancer tissues were examined by immunohistochemical staining. [Results] Compared to normal mucosa, the mRNA expressions of IL-17, CCL2, CCL7, CCL20 and CCL22 in cancer tissues were significantly up-regulated ($P<0.05$), while no difference was observed in mRNA expression of CCL17, CXCL2 and CXCL5 ($P>0.05$). The high expression of IL-17 mRNA in tumor tissues were positively correlated with the expression of CCL20 ($r=0.7901, P=0.0038$) and CCL22 ($r=0.9683, P<0.001$), but not correlated with CCL2 and CCL7 ($P>0.05$). Furthermore, the expressions of CD34 and CD66b in gastric cancer with high expression of IL-17 mRNA were significantly higher than those with low expression of IL-17 mRNA. [Conclusion] The up-regulated expression of IL-17 mRNA in tumor tissues is associated with overexpression of CCL20 and CCL22 mRNA, indicating that IL-17 may promote tumor progression by inducing neovascularization and neutrophil infiltration.

Subject words: gastric cancer; Th17 cells; IL-17; CCLx

IL-17 是一种主要由活化的 T 细胞产生的致炎

性细胞因子,主要参与炎症及自身免疫性疾病的发生发展过程^[1]。作为肿瘤炎症免疫微环境的重要组成部分,IL-17 在肿瘤发生发展中的作用也越来越受到关注^[2]。文献报道^[3,4]IL-17 在多种恶性肿瘤组织中的表达明显升高,但 IL-17 与肿瘤免疫之间的关系尚无定论。IL-17 高表达的人宫颈癌细胞^[5]、卵巢癌^[6]、

基金项目: 河北省自然科学基金(H2016206209);河北省人才工程培养经费项目(A201401251);河北省政府资助临床医学优秀人才项目

通信作者: 李巧霞,主任医师,教授,硕士生导师,博士;河北医科大学第四医院临床生物细胞室,河北省石家庄市健康路 12 号(050011);E-mail: 759767368@qq.com

收稿日期: 2018-06-20; **修回日期:** 2018-09-22

纤维肉瘤、浆细胞瘤和肥大细胞瘤在裸鼠皮下成瘤后,具有明显的促瘤活性;相反,在同系的免疫正常小鼠体内,IL-17却具有明显的抗瘤活性^[7]。提示,IL-17在肿瘤免疫中所发挥的作用取决于机体的免疫背景、肿瘤类型及组织器官微环境等诸多因素^[8,9]。

趋化因子及其受体在淋巴细胞的迁徙募集过程中起重要作用^[10]。CD34与CD66b为血管内皮细胞和多形核嗜中性粒细胞(PMN)的表面特异性分子标志^[11],在多种肿瘤中CD34阳性的血管内皮细胞与CD66b阳性的中性粒细胞数量与患者预后密切相关。

本课题组前期研究发现^[12],胃癌组织内Th17/IL-17表达水平显著增高,并与患者TNM分期、淋巴结转移、肿瘤分化程度相关,提示Th17/IL-17的聚集可能促进了胃癌的进展,但相关机制还不清楚。本研究旨在探讨IL-17在胃癌组织中的聚集及其促胃癌进展的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

Trizol 购自 Invitrogen 公司;ReverAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit,SYBR Premix Ex TaqTM II 试剂盒购自 Takara 公司;PCR 引物购自上海捷瑞生物工程有限公司;免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;鼠抗人 CD66b 抗体购自 Santa Cruz 公司;兔抗人 CD34 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司;其它试剂为国产分析纯。

1.2 临床资料和本 标 本

收集 2010 年 7 月至 2012 年 4 月河北医科大学第四医院胃癌住院患者 35 例(年龄 24~78 岁,平均年龄 52 岁,不伴有糖尿病、高血压、心血管疾病、妊娠、急慢性感染、结缔组织疾病和既往其他恶性肿瘤)组织标本,包括胃癌组织、癌旁对照组织(距癌组织边缘≥5 cm)。所有患者未行免疫抑制、放射及化学药物治疗。所有病例经过组织病理学证实。所有标本均在手术切除后,一部分置于液氮中冷冻保存用于提取总 RNA,一部分迅速固定于 4%多聚甲醛溶液中室温保存用于制备组织切片。

1.3 荧光定量 RT-PCR 检测胃癌组织及淋巴结组织中趋化因子 mRNA 表达

取液氮冻存的组织标本,Trizol 法提取组织总 RNA。使用ReverAidTM First Strand cDNA Synthesis

Kit 将总 RNA 反转录成 cDNA。使用 SYBR Premix Ex TaqTM II 试剂盒进行荧光定量 PCR。预变性:94℃,30s 后;PCR 反应 40 个循环(94℃,5s,60℃,30s)。以 GAPDH 作为参照基因,根据待测基因和内参的循环数 CT 值,按照公式:相对值=2^{-ΔΔCT} 计算出待测样本待测基因相对于内参基因的相对表达量。PCR 所用引物序列为,IL-17:上游 5'-gccatagtaag-gcaggaa-3',下游 5'-gtgaggtggatcggtgtag-3';CCL2:上游 5'-tctgtgcctgctgctcatag-3',下游 5'-cttctgtggtgattcttcta-3';CCL7:上游 5'-ttgctcagccagtggtgatt-3',下游 5'-gacagtggctactgggtgc-3';CCL17:上游 5'-ccccttagaa-gctgaagacg-3',下游 5'-gggtgaggagcttcaaga-3';CCL20:上游 5'-attattgtggcttcacacg-3',下游 5'-ccaagtctgtttg-gatttc-3';CCL22:上游 5'-tgattacgtccgttaccgtct-3',下游 5'-agtaggtcttctattggtca-3';CXCL2:上游 5'-agat-caatgtgacggcaggg-3',下游 5'-cgaaacctctctgcttaacaca-3';CXCL5:上游 5'-ctecggatctccaattctcg-3',下游 5'-cttcccgttcttcaggagg-3';GAPDH:上游 5'-acctgacctgc-cgtctagaa-3',下游 5'-tcaccaccctgtgctgta-3'。

1.4 分组方法

为了分析胃癌组织内 IL-17 表达与微血管密度的相关性,依据 IL-17 mRNA 表达的中位数(5.401)将胃癌组织标本分为 IL-17 高表达和低表达两组(分别为 12 例和 13 例),并采用免疫组化技术检测了血管内皮特异性抗原 CD34 和 CD66b 的表达,计数 5 个高倍镜视野下血管内皮细胞与粒细胞数量。

1.5 免疫组织化学染色检测胃癌组织中 CD34 和 CD66b 的表达

石蜡切片常规脱蜡至水,用 3%甲醇过氧化氢溶液避光修复 20min;加入正常山羊血清,37℃孵育 45min;分别滴加兔抗人 CD34 抗体或鼠抗人 CD66b 抗体,4℃孵育过夜;分别滴加生物素化羊抗兔或羊抗鼠 IgG,37℃孵育 30min;滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,37℃孵育 30min;DAB 显色 3~5min,蒸馏水终止显色;苏木素复染细胞核 3min,水性封片剂封片,显微镜下观察。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。各组间均数比较行单因素方差分析(ANOVA),方差齐时用最小显著差法(least significant difference, LSD),方差不齐时用 Dunnett T3

法作两两比较;IL-17 与趋化因子之间的关联性采用 Pearson 相关分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌组织中 IL-17 和趋化因子 mRNA 表达情况

荧光定量 RT-PCR 结果显示,与非癌对照组织相比,胃癌组织中 IL-17 和趋化因子 CCL2、CCL7、CCL20、CCL22 mRNA 表达显著增高($P<0.05$);而趋化因子 CCL17、CXCL2 和 CXCL5 mRNA 表达在两组之间无明显差异($P>0.05$)。见 Table 1。

2.2 胃癌组织中 IL-17 与趋化因子 mRNA 表达相关性分析

对上述有统计学意义的趋化因子进行分析,胃癌组织中 IL-17 mRNA 表达水平升高与趋化因子 CCL20、CCL22 mRNA 表达水平升高明显相关($P<0.05$);而与趋化因子 CCL7、CCL2 mRNA 表达水平升高无明显相关性($P>0.05$)(Figure 1)。

2.3 胃癌组织中 CD34 的表达变化

免疫组化分析结果显示,IL-17 mRNA 高表达组 CD34+ 血管内皮细胞数为 72.0 ± 8.3 ,低表达组为 58.0 ± 7.5 ;IL-17mRNA 高表达组 CD34 表达明显高于 IL-17 mRNA 低表达组($P<0.05$)(Figure 2)。

2.4 胃癌组织中 CD66b 的表达变化

免疫组化分析结果显示,IL-17 mRNA 高表达组 CD66b+ 粒细胞计数为 50.0 ± 7.6 ,低表达组为 12.0 ± 2.3 ;IL-17 mRNA 高表达组 CD66b 的表达明显高于 IL-17 mRNA 低表达组($P<0.01$)(Figure 3)。

3 讨论

本课题组前期研究结果显示,胃癌组织内 IL-17 及其主要来源细胞 Th17 细胞水平明显增高^[12]。淋巴细胞

Table 1 Relative expression levels of cytokines mRNA in gastric cancer tissue

Cytokines	Tumor tissues	Tumor-free tissues
IL-17	$5.358\pm 1.253^*$	1
CCL2	$5.851\pm 1.186^*$	1
CCL7	4.869 ± 1.555	1
CCL17	4.587 ± 3.650	1
CCL20	$9.289\pm 2.002^*$	1
CCL22	$14.804\pm 2.396^*$	1
CXCL2	2.197 ± 1.379	1
CXCL5	3.998 ± 2.898	1

Note: Data were expressed as mean \pm SD, * $P<0.05$

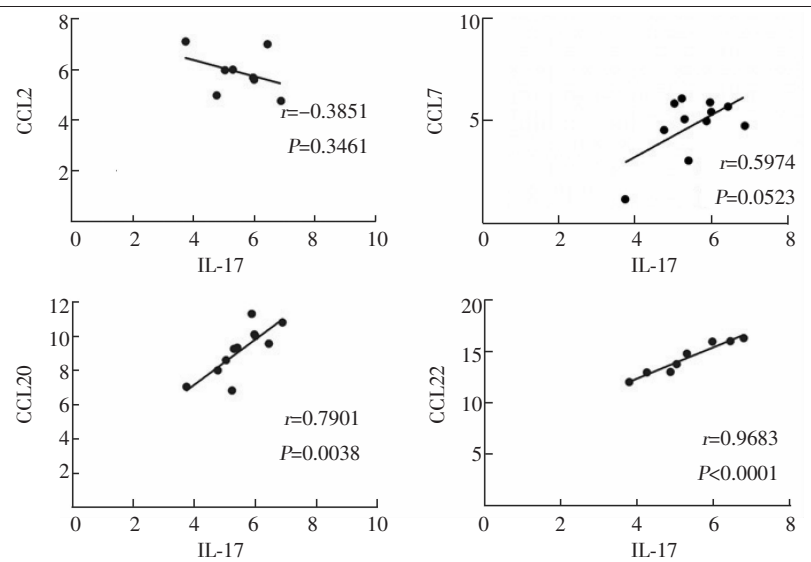
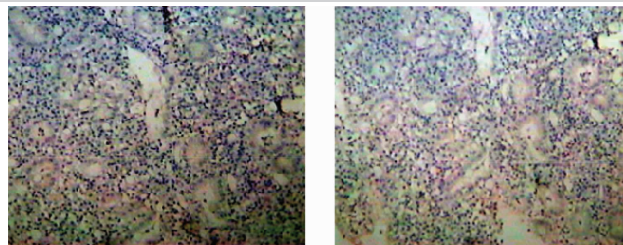


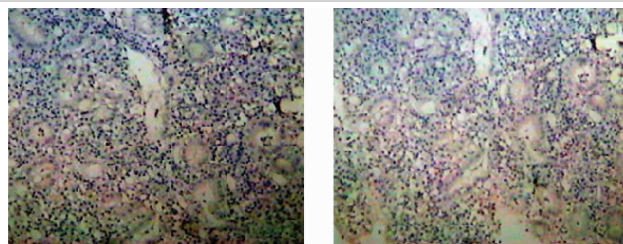
Figure 1 Correlation of IL-17 mRNA expression and CCL2, CCL7, CCL20 and CCL22 mRNA expression in gastric cancer



IL-17 high group(x200)

IL-17 low group(x200)

Figure 2 The CD34 expression in gastric cancer



IL-17 high group(x200)

IL-17 low group(x200)

Figure 3 The CD66b expression in gastric cancer

的迁移很大程度上受趋化因子及其受体调控^[10]。Th17 细胞表达两种特征性趋化因子受体 CCR4 和 CCR6^[13,14]。这些分子的高表达与 Th17/IL-17 在胃癌组织中的表达和定位有无关系?为了阐明这一问题,本研究检测了胃癌组织中 IL-17、CCL2、CCL7、CCL17、CCL20、CCL22、CXCL2、CXCL5 的 mRNA 表达,结果发现,与对照组织相比,胃癌组织中 IL-17、CCL2、CCL7、CCL20、CCL22 mRNA 表达显著升高;Pearson 相关分析显示,胃癌组织中 IL-17 表达增高与趋化因子 CCL20、CCL22 表达增高明显相关;而与趋化因子 CCL2、CCL7 表达增高无明显相关性。CCL20 特异性受体为 CCR6,CCL22 特异性受体为 CCR4,提示,胃癌组织内 IL-17 表达增高可能与胃癌组织高表达 CCL20、CCL22 与 Th17 细胞上特异受体结合,趋化 Th17 细胞由外周循环向肿瘤募集有关。文献^[3,15,16]报道肝细胞癌患者和恶性胸膜瘤患者中,CCL20 和 CCL22 能够趋化 Th17 细胞由外周循环向肿瘤部位聚集结果一致。

我们的前期研究结果显示^[12],胃癌组织中 IL-17 mRNA 表达水平与患者的 TNM 分期有关。患者 TNM 分期越高肿瘤组织内 IL-17 mRNA 表达水平越高,提示 IL-17 在肿瘤组织的高表达可能促进了胃癌患者的病情进展。为了进一步探讨 IL-17 促进胃癌进展的机制,本研究检测了胃癌组织中 CD34 和 CD66b 的表达。CD34 是内皮组织的特异性标志物,其表达水平反映新生血管生成情况^[17],CD66b 是中性粒细胞的特异性标记物,其表达水平反映了中性粒细胞的浸润情况。进一步依据本研究中 IL-17 mRNA 表达中位数将胃癌患者分为两组,IL-17 高表达组和 IL-17 低表达组,通过分析两组患者的 CD34 和 CD66b 的表达,结果显示:IL-17 高表达组 CD34 和 CD66b 的表达水平显著高于 IL-17 低表达组,提示 IL-17 可能通过促进肿瘤组织内新生血管生成和中性粒细胞浸润促进肿瘤进展。

总之,全面了解 IL-17 在胃癌组织表达增高及其促进胃癌进展的可能机制,将有可能为寻找预防和治疗胃癌的免疫治疗新靶点提供理论依据和参考。

参考文献:

[1] Frieder J, Kivelevitch D, Haugh I, et al. Anti-IL-23 and anti-IL-17 biologic agents for the treatment of immune-mediated inflammatory conditions [J]. Clin Pharmacol Ther, 2018, 103(1): 88-101.

[2] Qian X, Chen H, Wu X, et al. Interleukin-17 acts as double-edged sword in anti-tumor immunity and tumorigenesis [J]. Cytokine, 2017, 89: 34-44.

[3] Zhang JP, Yan J, Xu J, et al. Increased intra-tumoral IL-17 producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients [J]. J Hepatol, 2009, 50(5): 980-989.

[4] Zhang B, Rong G, Wei H, et al. The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 374(3): 533-537.

[5] Xue J, Wang Y, Chen C, et al. Effects of Th17 cells and IL-17 in the progression of cervical carcinogenesis with high-risk human papillomavirus infection [J]. Cancer Med, 2018, 7(2): 297-306.

[6] Miyahara Y, Odunsi K, Chen W, et al. Generation and regulation of human CD4+ IL-17-producing T cells in ovarian cancer [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(40): 15505-15510.

[7] Zhong F, Cui D, Tao H, et al. IL-17A-producing T cells and associated cytokines are involved in the progression of gastric cancer [J]. Oncol Rep, 2015, 34(5): 2365-2374.

[8] Zhang B, Rong G, Wei H, et al. The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 374(3): 533-537.

[9] Iida T, Iwahashi M, Katsuda M, et al. Tumor infiltrating CD4+ Th17 cells produce IL-17 in tumor microenvironment and promote tumor progression in human gastric cancer [J]. Oncol Rep, 2011, 25(5): 1271-1277.

[10] Alkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? [J] Lancet, 2001, 357(9255): 539-545.

[11] Shen M, Hu P, Donskov F, et al. Tumor-associated neutrophils as a new prognostic factor in cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. PLoS One, 2014, 9(6): e98259.

[12] Li Q, Li Q, Chen J, et al. Prevalence of Th17 and Treg cells in gastric cancer patients and its correlation with clinical parameters [J]. Oncol Rep, 2013, 30(3): 1215-1222.

[13] Zhang JP, Yan J, Xu J, et al. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients [J]. Hepatol, 2009, 50(5): 980-989.

[14] Derhovanessian E, Adams V, Hahnel K, et al. Pretreatment frequency of circulating IL-17 + CD4 + T-cells, but not Tregs, correlates with clinical response to whole-cell vaccination in prostate cancer patients [J]. Int J Cancer, 2009, 125(6): 1372-1379.

[15] Singh SP, Zhang HH, Foley JF, et al. Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6 [J]. Immunol, 2008, 180(1): 214-221.

[16] Ye ZJ, Zhou Q, Gu YY, et al. Generation and differentiation of IL-17-producing CD4+ T cells in malignant pleural effusion [J]. J Immunol, 2010, 185(10): 6348-6354.

[17] Jayson GC, Hicklin DJ, Ellis LM. Antiangiogenic therapy-evolving view based on clinical trial results [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2012, 9(5): 297-303.