

非小细胞肺癌组织及细胞中 IL - 35 的表达

张 玉¹ 张城城^{1,2} 董利菊¹ 沙 泉¹

摘要 目的 探讨白细胞介素 35(IL-35) 在非小细胞肺癌组织和细胞中的表达及其对肺癌细胞生物学功能的影响。方法 免疫组化法检测 IL-35 在 74 例非小细胞肺癌组织中的表达,分析 IL-35 表达与非小细胞肺癌临床病理特征的相关性; RT-PCR 法检测 IL-35 在不同肺癌细胞中的表达水平; CCK-8 法、划痕试验和 Transwell 实验分别检测 IL-35 对细胞增殖和迁移侵袭能力的影响。结果 免疫组化和 RT-PCR 检测结果表明, IL-35 在非小细胞肺癌组织的表达水平明显上调($P < 0.05$),在肺癌细胞系中均有不同程度表达。IL-35 表达与肿瘤分期、淋巴结转移成正相关($P < 0.05$),与患者性别、年龄、组织类型、分化程度及远端转移等均无相关性($P > 0.05$)。外源性 IL-35 的刺激作用促进肺癌细胞的增殖和迁移侵袭。结论 IL-35 在非小细胞肺癌组织和细胞中高表达,并促进肺癌细胞的增殖与迁移侵袭,可以作为临床肺癌基因治疗的靶向指标。

关键词 非小细胞肺癌; 白细胞介素-35; 增殖; 迁移; 侵袭
中图分类号 R734.2

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2019) 07 - 1082 - 06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2019.07.016

随着恶性肿瘤发病率与死亡率的逐年增加,人类健康受到了严重威胁。肺癌已经成为男性发病率和死亡率最高的恶性肿瘤^[1]。虽然肺癌的研究近年来已取得一定进展,但是非小细胞肺癌(non-small lung cancer, NSCLC) 发现时多已处于中晚期,5 年生存率并未显著提高^[2]。白细胞介素 35(interleukin-35, IL-35) 是新发现的白细胞介素 12(interleukin-12, IL-12) 家族成员,由 EB 病毒诱导基因 3(epstein-barr virus-induced gene 3, EBV3) 和 P35 组成的异源二聚体,主要在免疫细胞中表达^[3]。研究^[4-6]显示, IL-35 在肝癌、胰腺癌、结直肠癌等多种肿瘤组织中高表达,参与肿瘤的发生发展与转移。但 IL-35 在 NSCLC 中的表达情况知之甚少。该研究拟通过分析 IL-35 在 NSCLC 中的表达和与患者预后的关系,以及对肺癌细胞生物学功能的影响,阐明 IL-35 在 NSCLC 发生、发展中的可能作用,为肺癌的靶向治疗提供新的作用靶点。

1 材料与方 法

1.1 病例资料 收集安徽医科大学第一附属医院普胸外科 2015 年 1 ~ 12 月的 74 例 NSCLC 患者石蜡包埋的肺癌组织,被研究者临床资料完整,手术前

2019 - 02 - 01 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81273245)

作者单位: ¹安徽医科大学免疫学教研室及过敏与免疫研究中心,合肥 230032

²安徽医科大学第一附属医院耳鼻喉头颈外科,合肥 230022

作者简介: 张 玉,女,硕士研究生;

沙 泉,女,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: qsha2@yahoo.com

Statistical significance was significant ($\chi^2 = 27.610, P < 0.001$). Western blot results showed that the content of BCLAF1 protein in PDAC was higher than that in adjacent tissues, and the difference was statistically significant ($P < 0.001$). Overexpression of BCLAF1 in pancreatic cancer cells significantly increases the invasion and migration ability of pancreatic cells, and at the same time promotes the proliferation of cancer cells. The expression level of BCLAF1 in pancreatic ductal adenocarcinoma was significantly correlated with clinical tumor characteristics such as tumor size, TNM stage, lymph node metastasis, clinical stage and prognosis. Kaplan-Meier survival analysis showed that the high expression survival time of BCLAF1 was significantly lower than that of BCLAF1 ($\chi^2 = 17.419, P < 0.01$). Multivariate analysis of COX regression showed that BCLAF1 and TNM staging were independent factors influencing the prognosis of pancreatic cancer. **Conclusion** The expression level of BCLAF1 protein is significantly increased in PDAC, and the proliferation rate of PANC-1 cells transfected with pcDNA3.1-BCLAF-1 plasmid is improved. Its detection contributes to the early diagnosis and prognosis assessment of pancreatic ductal adenocarcinoma.

Key words pancreatic ductal adenocarcinoma; BCLAF1; immunohistochemistry; Western blot; CCK-8

均未行放化疗。NSCLC 患者男 47 例,女 27 例;年龄 43~84(61.31±8.49)岁,其中腺癌 41 例,非腺癌 33 例。根据国际肺癌 TNM 标准分期:T1+T2 者 55 例,T3+T4 者 19 例;淋巴结转移:N0+N1 者 54 例,N2+N3 者 20 例;远处转移 M0 者 65 例,M1 者 9 例。选择同期入院治疗的肺部良性病变患者石蜡包埋的肺组织 25 例,设为对照组,男 14 例,女 11 例;年龄 21~68(45.92±15.06)岁,其中肺大疱 7 例,硬化性血管瘤 5 例,错构瘤 4 例,支气管扩张 4 例,其他 5 例。

1.2 主要试剂 免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;RNA 提取试剂盒购自台湾 GeneMark 生物公司;逆转录及 SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒均购自南京 Vazyme 公司;人肺腺癌细胞株 A549、NCI-H1975 和 PC-9 为本单位免疫学省级重点学科实验室保存;正常人肾上皮细胞 HEK293 由安徽医科大学寄生虫学教研室馈赠;DMEM 细胞培养基购自以色列 BI 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物公司;Transwell 小室购自美国 Corning 公司;CCK-8 购自上海贝博生物公司;IL-35 的亚基 EB13 和 P35 抗体购自美国 Abcam 公司;人重组 IL-35 蛋白购自美国 PeproTech 公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组化法检测 IL-35 两个亚基在 NSCLC 组织中的表达 采用 SP 法,以 PBS 代替一抗作阴性对照。首先组织切片经二甲苯脱蜡,梯度酒精(100%、95%、75%)水化。柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)于高压锅中加热煮沸,放入切片,盖上压力气阀至喷气后 1~3 min 进行抗原修复,3% H₂O₂ 孵育 10 min,以阻断内源性过氧化物酶活性。PBS 冲洗,然后一抗 4℃ 孵育过夜,PBS 冲洗,二抗 37℃ 孵育 30 min,DAB 显色冲洗。最后苏木精复染,酒精脱水,二甲苯透明,树脂封片,镜检并拍照记录。免疫组化结果判断:本实验采用许良中^[7]的方法,根据细胞着色程度和阳性细胞占观察细胞百分比的评分乘积进行半定量。随机选取 5 个 400 倍视野,每个视野计数 100 个细胞,按着色程度评分:无着色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。按阳性细胞占观察细胞百分比评分:无阳性细胞为 0 分,阳性细胞≤10% 为 1 分,11%~50% 为 2 分,51%~75% 为 3 分,>75% 为 4 分。将两项得分结果相乘:0~2 分为阴性(-),3~5 分为弱阳性(+),6~8 分为中度阳性(++),>8 分为强阳性(+++)。其中-定义为蛋白阴性,+~+++定义为蛋白

阳性。

1.3.2 细胞培养与传代 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,于 37℃、5% CO₂、相对湿度 90% 的培养箱中培养,隔天换液,显微镜下观察细胞形态,若为单层紧密状态时,用 EDTA-胰蛋白酶消化,收集对数生长期的细胞用于后续实验。

1.3.3 RT-PCR 法检测细胞中 IL-35 亚基表达水平

分别收集对数生长期的 A549、NCI-H1975、PC-9 和 HEK293 细胞,提取总 RNA 作为模板并逆转录生成 cDNA 进行 RT-PCR。EB13:上游引物:5'-CCT-TCATTGCCACGTACAGG-3',下游引物:5'-GGGCTT-GATGATGTGCTCTG-3',扩增长度为 206 bp;P35:上游引物:5'-TCAGAATTCGGCAGTGACT-3',下游引物:5'-AGTCCCATCCTTCTTTCCC-3',扩增长度为 163 bp。内参为 β-actin,PCR 反应预变性温度:95℃,5 min,1 个循环。循环反应温度:95℃,10 s;60℃,30 s;40 个循环。溶解曲线温度:95℃,15 s;60℃,60 s;95℃,15 s,1 个循环。

1.3.4 CCK-8 法检测细胞增殖能力 取对数生长期的 A549 细胞,计数细胞:每 100 μl 细胞数为 2 000~5 000 个,加入到 96 孔板中,待细胞贴壁,分别用 2、10、50 ng/ml 的 IL-35 刺激 48 h 后,每孔中加入 10 μl CCK-8 溶液,继续培养 1~4 h,于酶标仪 450 nm 波长处测吸光度(A)值。

1.3.5 划痕实验和 Transwell 小室测细胞迁移侵袭能力 划痕实验:取对数生长期的 A549 细胞,胰酶消化,在 6 孔板中加入 5×10⁵ 个细胞,37℃ 培养过夜。用无菌枪头缓慢划痕,用 PBS 清洗细胞 2~3 次去除浮起的细胞。对照组加入含 0.5% 血清的 DMEM 培养基,IL-35 组在加入含 0.5% 血清的 DMEM 培养基的同时,加入 50 ng/ml 的 IL-35,放入 37℃ 培养,按 0、12、24 h 取样,拍照。Transwell 实验:A549 细胞用 50 ng/ml 的 IL-35 刺激 24 h 后,胰酶消化制成 5×10⁵ 个/ml 的细胞悬液。在小室上层加入 20 μl Matrigel 覆盖整个聚碳酸酯膜后自然晾干。下层加入含 10% 血清的 DMEM 培养基 600 μl,上层加入 200 μl 不含血清的 A549 细胞悬液,37℃ 继续培养 24 h,多聚甲醛固定 30 min,0.1% 结晶紫染色 15~20 min,显微镜下拍照计数。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,其中定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验;IHC 中 IL-35 的表达和临床病理特征之间的关系用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法;IL-35 亚基 EB13 和 P35 表达量间相关性用 Spearman 相关分

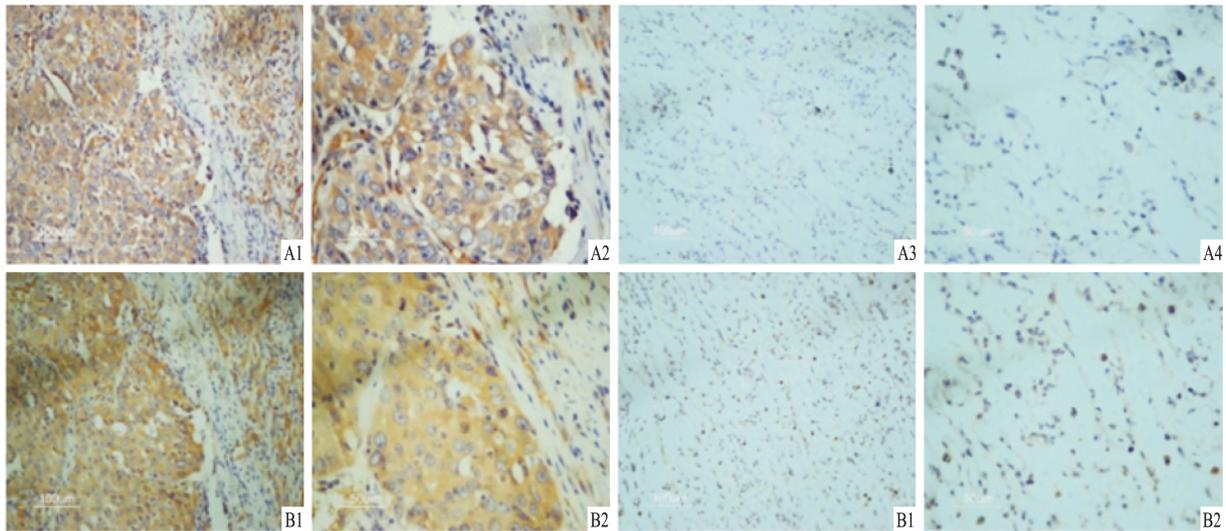


图1 NSCLC 和肺部良性病变组织中 EB13 和 P35 的表达

A: EB13; B: P35; 1、2: 肺癌组织; 3、4: 肺部良性病变; 1、3: ×200; 2、4: ×400

析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-35 在 NSCLC 组织中的表达 免疫组化连续切片法染色结果显示, NSCLC 组织中 EB13 和 P35 的表达水平明显高于肺部良性病变者(图1), 且 EB13 和 P35 在空间分布和表达水平上有很强的相关性($r_s = 0.770, P < 0.001$), 见表1, 所以这两者的表达可以代表 IL-35 的表达水平。将 IL-35 表达定义为 EB13 和 P35 都为(+/++) , 其余情况为 IL-35 不表达。免疫组化结果表明 NSCLC 组织中可能高表达 IL-35。统计分析显示, IL-35 表达与肿瘤 T 分期 ($\chi^2 = 5.129, P < 0.05$)、淋巴结转移 ($\chi^2 = 8.761, P < 0.01$) 呈正相关性, 与患者性别 ($\chi^2 = 0.667, P > 0.05$)、年龄 ($\chi^2 = 0.746, P > 0.05$)、组织类型 ($\chi^2 = 1.66, P > 0.05$)、分化程度 ($\chi^2 = 0.688, P > 0.05$) 及远端转移 ($P > 0.05$) 等无相关性(表2), 以上结果提示: IL-35 可能是肺癌的潜在标志物。

表1 IL-35 两个亚基在 74 例 NSCLC 中表达的相关性

P35	EB13				总计	rs 值	P 值
	-	+	++	+++			
-	5	1	0	0	6	0.770	<0.001*
+	7	13	4	0	24		
++	0	1	26	4	31		
+++	0	1	8	4	13		
总计	12	16	38	8	74		

* 采用 Spearman 相关性分析

表2 IL-35 表达与 NSCLC 病理特征的相关性(n)

临床病理参数	n	IL-35		χ^2 值	P 值
		+	-		
性别					
男	47	25	22	0.667	0.414
女	27	17	10		
年龄(岁)					
<65	48	29	19	0.746	0.388
≥65	26	13	13		
组织类型					
腺癌	41	26	15	1.66	0.198
非腺癌	33	16	17		
分化程度					
高/中	33	21	12	0.688	0.407
低	30	16	14		
肿瘤 T 分期					
T1 + T2	55	27	28	5.129	0.024
T3 + T4	19	15	4		
淋巴结转移					
-	41	17	24	8.761	0.003
+	33	25	8		
远端转移					
-	65	34	31	-	0.069
+	9	8	1		

2.2 IL-35 亚基在肺癌细胞和 HEK293 中的表达

以人肾上皮细胞 HEK293 为对照, 通过 RT-PCR 法检测 IL-35 亚基 EB13 和 P35 在不同肺癌细胞系中的表达。结果显示, IL-35 亚基在肺癌细胞系 A549、H9175、PC-9 中的表达水平与人正常细胞 HEK293 细胞有差异(图2), 表明 IL-35 可能在肺癌的进展中发挥重要作用。

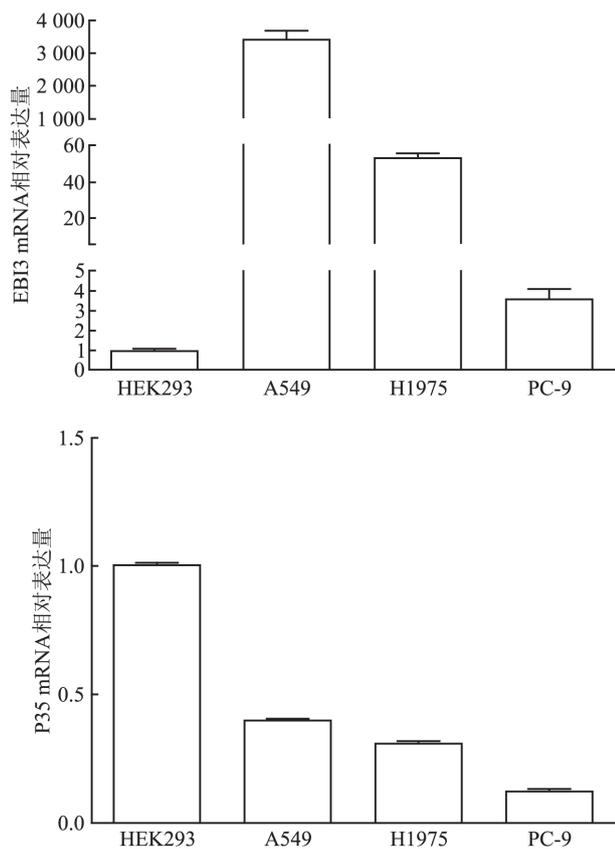


图2 EB13和P35在不同肺癌细胞系和正常细胞中的表达

2.3 IL-35对A549肺癌细胞增殖的影响 鉴于IL-35在A549细胞中表达量最高,且易培养,因此选择A549细胞作为后续研究对象。不同浓度的人重组外源性IL-35蛋白作用于A549细胞48 h后,通过CCK-8法检测显示,50 ng/ml的IL-35可明显促进A549肺癌细胞的增殖,与0 ng/ml比较,差异有统计学意义($P < 0.001$),见图3。

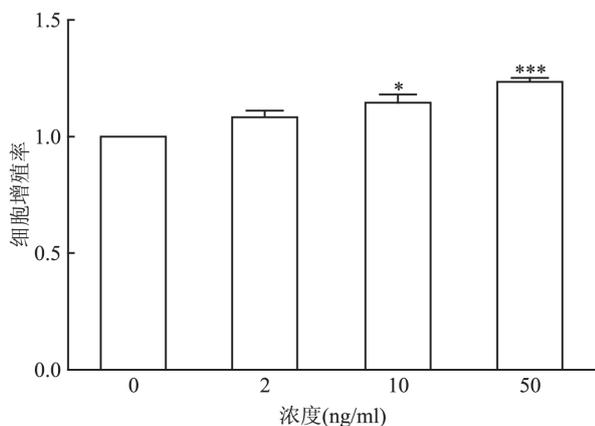


图3 不同浓度IL-35对A549细胞活力的影响
与0 ng/ml组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

2.4 IL-35对A549细胞迁移和侵袭能力的影响

采用划痕实验于0、12、24 h分别检测50 ng/ml的IL-35对A549细胞迁移能力的影响,结果显示,IL-35具有一定的促进肺癌细胞迁移的能力,与对照组比较,24 h后划痕相对宽度明显降低,差异有统计学意义($P < 0.001$),见图4A、4B。Transwell小室实验结果显示,IL-35具有一定的促进肺癌细胞侵袭的作用,与对照组比较,IL-35组侵袭细胞数量明显增加,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图4C、4D。由此可推测IL-35可明显促进A549细胞的迁移和侵袭。

3 讨论

肺癌是发病率和死亡率增长最快,对人类健康和生命威胁最大的恶性肿瘤之一。肺癌好发于支气管黏膜上皮,病因至今尚不完全明确。随着医疗水平的提高,肺癌的治疗方法日益丰富,已发展成为手术为主,放疗、化疗和免疫治疗等治疗手段为辅的综合性治疗,但NSCLC确诊时多已属于晚期,总体预后情况仍不容乐观^[8-9]。随着分子生物学的不断发展,基因治疗已成为肿瘤治疗的研究热点,而寻找有效的靶基因尤为重要。研究证实,白细胞介素能影响包括肿瘤细胞在内的多种细胞的增殖、成熟、黏附及转移等多方面生理过程。大量动物实验结果显示,IL-12对肝癌、肾细胞癌等多种癌症具有防治效果,可增强免疫应答,发挥抗肿瘤作用^[10]。

IL-35是IL-12家族的最新成员,主要由Treg细胞分泌,在单核细胞、T细胞、B细胞及肿瘤细胞等多种类型细胞上表达,通过激活JAK-STAT信号通路参与免疫功能的调节,除了直接抑制肿瘤微环境的肿瘤免疫状态,引起免疫逃逸,IL-35还能直接作用于某些肿瘤细胞促进肿瘤的进展^[11]。Wang et al^[12]研究发现,IL-35在B细胞淋巴瘤、黑色素瘤及鼻咽癌等多种肿瘤组织和肿瘤细胞系中都有表达。有研究^[13]证实IL-35在急性髓系白血病中,除了能诱发肿瘤的免疫逃逸机制外,也能直接促进肿瘤增殖及抑制肿瘤凋亡。一项NSCLC研究^[14]显示,NSCLC患者血浆IL-35水平较正常对照人群明显升高,且血浆IL-35高表达水平与较差的TNM分期及淋巴结转移显著相关,单因素及多因素分析显示血浆IL-35是NSCLC患者的独立预后因素。由此可见,IL-35可能在肿瘤的发生、发展过程中发挥重要

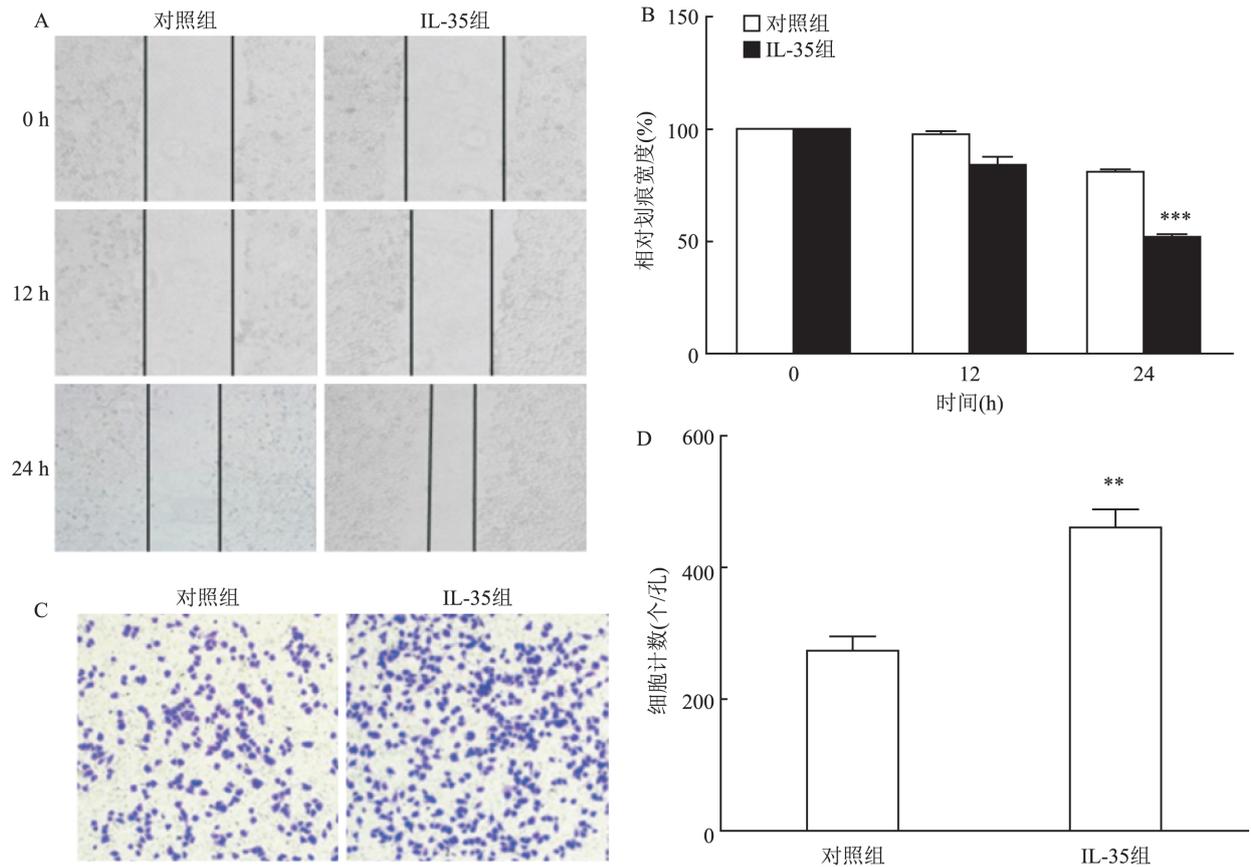


图4 IL-35对A549细胞迁移和侵袭的影响

A: 显微镜下细胞迁移能力的差异 ×50; B: 划痕愈合的相对定量分析; 与对照组比较: *** P < 0.001; C: 显微镜下细胞侵袭能力的差异 × 100; D: 细胞侵袭数目的定量分析; 与对照组比较: ** P < 0.01

作用。

本研究通过免疫组化法检测 NSCLC 患者和对照组组织中 IL-35 的表达水平,结果显示 NSCLC 患者组织中 IL-35 的表达明显高于肺部良性病变患者,初步表明 IL-35 在 NSCLC 患者组织中异常高表达。通过统计分析 74 例 NSCLC 患者组织中 IL-35 表达差异与临床病理特征之间的相关性得出: IL-35 表达与肿瘤分期、淋巴结转移呈正相关性,与患者性别、年龄、组织类型、分化程度及远端转移等均无相关性,而复发和早期转移是 NSCLC 预后不良的主要因素,说明 IL-35 的高表达水平和患者的不良预后相关,提示其可能影响 NSCLC 的发生、发展。接着通过体外细胞功能学实验证实,人重组 IL-35 蛋白能明显促进肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭,表明 IL-35 在 NSCLC 中可能是一种新的促癌不良因子,参与肺癌的不良进程。因此,IL-35 可以作为一个新的有效的治疗靶点,应用于临床和靶向药物的研发。

综上所述,IL-35 在 NSCLC 中高表达,并促进肺癌细胞的增殖、迁移与侵袭,为深入研究 IL-35 对肿瘤的作用提供了线索,IL-35 可能是一种 NSCLC 诊断和预后判断的新型标志物,但是 IL-35 发挥促癌作用的具体分子机制仍待进一步研究。

参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China 2015[J]. CA Cancer J Clin 2016, 66(2): 115 - 32.
- [2] 汪硕敏, 顾康生. 血清癌胚抗原、铁蛋白和糖基抗原 199 在非小细胞肺癌诊断中的临床价值[J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(9): 1444 - 7.
- [3] Wang R X, Yu C R, Dambuzza I M, et al. Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease [J]. Nat Med 2014, 20(6): 633 - 41.
- [4] Long J, Guo H, Cui S, et al. IL-35 expression in hepatocellular carcinoma cells is associated with tumor progression[J]. Oncotarget 2016, 7(29): 45678 - 86.
- [5] Huang C, Li N, Li Z, et al. Tumour-derived interleukin 35 pro-

- motes pancreatic ductal adenocarcinoma cell extravasation and metastasis by inducing ICAM1 expression[J]. *Nat Commun* 2017 8(1): 14035–49.
- [6] Ma Y, Chen L, Xie G, et al. Elevated level of interleukin-35 in colorectal cancer induces conversion of T cells into iTreg35 by activating STAT1/STAT3[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(45): 73003–15.
- [7] 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判定标准[J]. *中国癌症杂志*, 1996, 6(4): 229–31.
- [8] 陈晴晴, 束军, 谢庆书, 等. 二甲双胍丁酸盐对人肺腺癌 A549 细胞增殖、凋亡与迁移能力的影响[J]. *安徽医科大学学报* 2018, 53(2): 171–5.
- [9] Teixid C, Karachaliou N, Gonz Lez-Cao M, et al. Erratum to assays for predicting and monitoring responses to lung cancer immunotherapy[J]. *Cancer Biol Med* 2015, 12(2): 87–95.
- [10] 李晓东, 杨小龙. 白细胞介素 12 与消化系统肿瘤的相关性[J]. *医学综述* 2014, 20(11): 1977–9.
- [11] 黄崇标, 田野, 崔焱, 等. 白细胞介素 35 的在肿瘤发展中的作用[J]. *中国肺癌杂志* 2016, 19(4): 230–5.
- [12] Wang Z, Liu J Q, Liu Z, et al. Tumor-derived IL-35 promotes tumor growth by enhancing myeloid cell accumulation and angiogenesis[J]. *J Immunol* 2013, 190(5): 2415–23.
- [13] Tao Q, Pan Y, Wang Y, et al. Regulatory T cells-derived IL-35 promotes the growth of adult acute myeloid leukemia blasts[J]. *Int J Cancer* 2015, 137(10): 2384–93.
- [14] Gu X, Tian T, Zhang B, et al. Elevated plasma interleukin-35 levels predict poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer[J]. *Tumour Biol* 2015, 36(4): 2651–6.

Expression of IL – 35 in non – small cell lung cancer tissues and cells

Zhang Yu¹, Zhang Chengcheng^{1,2}, Dong Liju¹, et al

(¹Dept of Immunology Allergy and Immunology Research Center,

Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Dept of Otolaryngology Head and

Neck Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the expression of interleukin-35 (IL-35) in non-small cell lung cancer tissues and cells and its effect on the biological function of lung cancer cells. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the expression of IL-35 in 74 non-small cell lung cancer tissues, and the correlation between IL-35 expression and clinicopathological features of non-small cell lung cancer was analyzed. RT-PCR was used to detect the expression of IL-35 in different lung cancer cell lines. The proliferation, migration and invasion ability of cells were assessed by CCK-8 assay, Scratch assay and Transwell assay after the stimulation of IL-35, respectively. **Results** The result of immunohistochemistry showed that IL-35 expression was significantly up-regulated in non-small cell lung cancer tissues ($P < 0.05$), and RT-PCR found that IL-35 was expressed on lung cancer cell lines with different degrees. The expression of IL-35 was positively correlated with tumor stage and lymph node metastasis ($P < 0.05$). However, it was not related with gender, age, tissue type, differentiation degree and distant metastasis ($P > 0.05$). The stimulation of exogenous IL-35 promoted the proliferation, migration and invasion of lung cancer cells. **Conclusion** IL-35 is highly expressed in non-small cell lung cancer tissues and cells, and promotes the proliferation, migration and invasion of lung cancer cells. It can be used as a target for clinical gene therapy of lung cancer.

Key words non-small cell lung cancer; interleukin-35; proliferation; migration; invasion