

网络出版时间: 2018-9-25 14:31 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180921.1451.006.html>

IL-17 调控 PI3K/AKT/FAS/FASL 信号通路 抑制 Hep-2 细胞凋亡

杨明 宋杨 张红健 季加标 杨见明

摘要 目的 研究白介素-17(IL-17)对 Hep-2 细胞凋亡的影响,阐明 IL-17 通过 PI3K/AKT 信号通路在抑制 Fas/FasL 信号通路从而抑制 Hep-2 细胞凋亡的部分机制。方法 以正常 Hep-2 细胞为对照组,50 ng/ml 200-17(IL-17 刺激剂)为实验组,流式细胞仪检测 200-17 对 Hep-2 细胞凋亡率的影响。以 Hep-2 细胞为对照组,不同浓度 200-17(1、50、100 ng/ml)为实验组,Western blot 法检测 200-17 作用 6 h 后各组 Hep-2 细胞中 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、Fas、FasL 蛋白的表达。结果 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测结果显示,对照组和实验组凋亡率逐渐增高,与对照组比较,加 50 ng/ml 200-17 作用 6、12、24 h 后, Hep-2 凋亡率均降低, 200-17 作用 6 h 后与对照组比,实验组 Hep-2 细胞凋亡率降低最明显。Western blot 结果显示不同浓度(0、1、50、100 ng/ml)的 200-17 刺激 Hep-2 细胞后,随着 200-17 浓度的升高, Hep-2 细胞中 p-PI3K、p-AKT 蛋白的表达逐渐增加,差异有统计学意义($P < 0.01$); PI3K、AKT 蛋白表达差异无统计学意义。与对照组比较,1、50、100 ng/ml 组 200-17 刺激 6 h 后 Hep-2 细胞内 Fas、FasL 蛋白表达降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 IL-17 可能通过 PI3K/AKT/Fas/FasL 信号通路抑制 Hep-2 细胞凋亡。

关键词 IL-17; PI3K/AKT/FAS/FASL 信号通路; Hep-2 细胞
中图分类号 R 739.65

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)11-1681-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.11.006

喉癌是头颈部最常见的恶性肿瘤之一,其发病率占头颈部肿瘤的三分之一,病理类型以鳞状细胞癌为主^[1]。临床上喉癌的治疗主要以手术治疗或者手术联合放化疗为主,患者的喉功能如吞咽、发音功能受到不同程度的影响,并降低患者生活质量,研究新的治疗方案如免疫治疗对此类患者具有很大的前景^[2]。白介素-17(interleukin-17, IL-17)是一种由

CD4+ T Th17 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、自然杀伤 T 细胞(NKT)、TCR β + Th17 细胞分泌的促炎细胞因子^[3]。IL-17 在肿瘤免疫中发挥重要作用,研究^[4]表明 IL-17 通过促进肿瘤血管生成促进肿瘤生长和转移。研究^[5]显示 IL-17 可以抑制 Lewis 肺癌荷瘤小鼠 MDSCs 细胞(髓系来源的抑制细胞)的凋亡。课题组前期研究^[6]结果表明 IL-17 可以通过调控 IL-6/IL-6R/JAK1/STAT3 信号通路影响喉癌细胞的侵袭和转移。然而 IL-17 对喉癌细胞凋亡的影响及其具体机制查阅国内外相关文献尚未见报道,该研究在前期研究基础上,重点研究 IL-17 对喉癌细胞凋亡的影响及体外机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 上皮样细胞 Hep-2 细胞,属于人源性高分化喉癌细胞系,呈单层贴壁生长状态,购自南京凯基生物科技发展有限公司。常规细胞培养基(RPMI 1640 + 10% 胎牛血清 + 100 mg/L 青霉素 + 100 mg/L 链霉素)培养 Hep-2 细胞,置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱孵育,1~2 d 传代或者换液一次。

1.2 试剂 200-17(IL-17 刺激剂,对 IL-17 具有生长刺激作用)购自美国 PEPROTECH 公司;胎牛血清购自美国 Gibco 公司;RPMI1640 培养液购自美国 HyClone 公司;抗 PI3K 单克隆抗体、抗 p-PI3K 抗体购自美国 Abcam 公司;抗 Fas 抗体、抗 FasL 抗体、抗 AKT 抗体、抗 p-AKT 抗体购自美国 CST 公司;抗 β -actin 抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司;山羊抗兔二抗、山羊抗鼠二抗购自美国 ABClonal 公司;Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司;BCA 法蛋白浓度检测试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、蛋白 Marker、胰酶、一抗稀释液、二抗稀释液、ECL 荧光剂(显影剂)均购自上海碧云天生物有限公司。

1.3 仪器 NAPCO-8800 型恒温细胞培养箱购自美国 SHELLAB 公司;SW-9800 型超净工作台购自苏州泰安空气技术有限公司;Western blot 电泳仪(Tanon)购自上海天能科技有限公司;CytoFLEX 流

2018-07-16 接收

基金项目:安徽省高校自然科学基金项目(编号: KJ2015A324)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院耳鼻喉头颈外科,合肥 230601

作者简介:杨明,女,硕士研究生;

杨见明,男,副教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: jmyang88@163.com

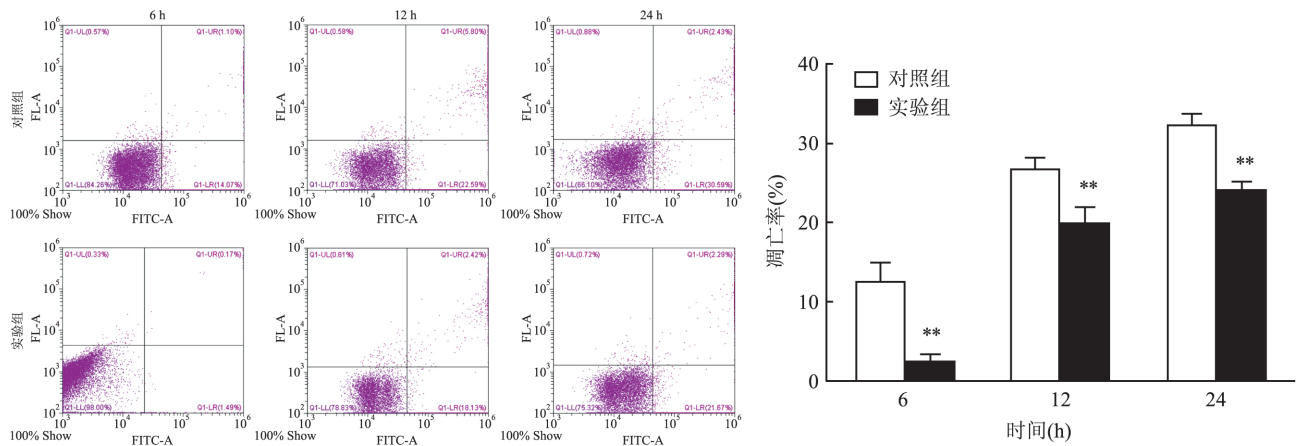


图1 流式细胞术检测 IL-17 对 Hep-2 细胞凋亡的影响
与对照组比较: ** $P < 0.01$

式细胞仪购自美国 BECKMAN COULTER 公司。GraphPad Prism 6 图像处理软件; Image-Pro plus 图像处理系统。

1.4 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测 将 Hep-2 细胞消化后以相同的量接种到 6 孔板中(接种 6 孔,每孔细胞数为 1×10^6) ,待细胞贴壁后,弃去培养液,用 PBS 洗 2 次,对照组加入 RPMI1640,实验组加入含 50 ng/ml 200-17 的 RPMI1640,分别处理 6、12、24 h 后胰酶消化细胞,收集至 15 ml 离心管中,300 g 4 °C 离心 5 min,弃去上清液,用 400 μ l PBS 洗涤 2 次,Annexin V-FITC/PI 双荧光(FITC 50 mg/L,PI 50 mg/L) 避光染色 10 min,CytoFLEX 流式细胞仪检测,CytExpert 分析软件分析检测结果。

1.5 Western blot 法检测不同浓度 200-17 刺激 Hep-2 细胞后 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、Fas、FasL 蛋白表达的变化 将对数生长期的 Hep-2 细胞消化后以相同的量接种 6 孔板中(接种四孔,每孔细胞数大约为 1×10^6) ,待细胞贴壁后,弃去培养液,用 PBS 洗 2 次,在 4 个孔中分别加入含不同浓度 200-17 (0、1、50、100 ng/ml) 的 RPMI1640 处理 6 h,弃去培养液,4 °C 预冷 PBS 清洗细胞,培养板中加入蛋白裂解液(含 PMSF 及磷酸化酶抑制剂)充分裂解细胞,13 000 r/min 4 °C 离心 20 min,吸取上清液;BCA 试剂盒检测蛋白浓度后分装保存。根据测定的蛋白浓度加入相应体积的总蛋白样品和 $5 \times$ loading buffer(比例为 4:1) 混匀后在干浴锅中 100 °C 煮 10 min,蛋白变性后的样本于 -20 °C 冰箱中保存。每泳道加 20 μ g 蛋白样本进行 SDS-PAGE 凝胶电泳;分离凝胶中的蛋白并转移至 PVDF 膜。用 5% 脱脂牛奶室温摇床上封闭 2 h。TBST 洗涤 4 次,

每次 5 min,分别与抗 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、Fas、FasL、 β -actin 抗体 4 °C 下孵育过夜。TBST 洗涤 4 次,每次 5 min,将膜置于相对应二抗内室温摇床下孵育 1 h,TBST 洗涤 5 min $\times$ 4 次后,ECL 化学发光底物显影检测蛋白。用 Image-Pro plus 图像处理系统分析计算 Western blot 灰度值。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数的比较采用 t 检验;多组数据之间的相互比较采用方差分析。所有实验至少重复 3 次。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-17 刺激不同时间后 Hep-2 细胞的凋亡率

通过 Annexin V-FITC/PI 双染法检测 200-17 作用 6、12、24 h 后 Hep-2 细胞的凋亡率。结果显示,对照组和实验组凋亡率逐渐增高,与对照组相比,加 50 ng/ml 200-17 作用 6、12、24 h 后,Hep-2 凋亡率均降低,200-17 作用 6 h 后与对照组比较,实验组 Hep-2 细胞凋亡率降低最明显。6 h 对照组凋亡率为 $(12.56 \pm 2.51) \%$,6 h 实验组凋亡率为 $(2.47 \pm 0.96) \%$,12 h 对照组凋亡率为 $(26.79 \pm 1.48) \%$,12 h 实验组凋亡率为 $(19.79 \pm 2.16) \%$,24 h 对照组凋亡率为 $(32.35 \pm 1.3) \%$,24 h 实验组凋亡率为 $(24.10 \pm 1.17) \%$ 。采用 t 检验比较,差异有统计学意义($t = 4.629$, $P < 0.01$)。见图 1。

2.2 不同浓度 200-17 刺激 Hep-2 细胞时 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、Fas、FasL 蛋白的表达 用不同浓度(0、1、50、100 ng/ml) 的 200-17 刺激 Hep-2 细胞,随着 200-17 浓度的升高,Hep-2 细胞中 p-PI3K、p-AKT 蛋白的表达逐渐增加,差异有统计学

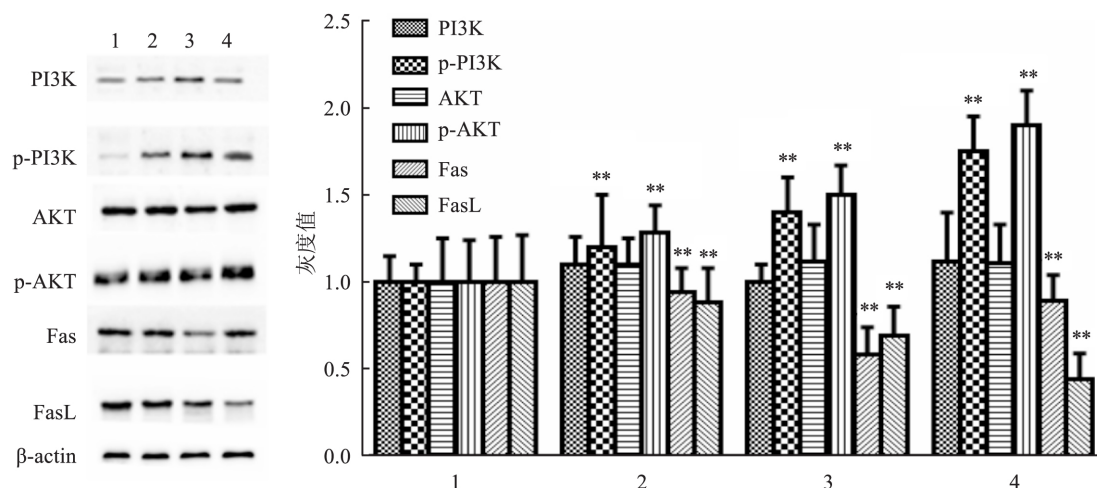


图2 不同浓度 IL-17 刺激下 Hep-2 细胞中 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、Fas、FasL 分子表达的变化

1: 0 ng/ml 200-17 组; 2: 1 ng/ml 200-17 组; 3: 50 ng/ml 200-17 组; 4: 100 ng/ml 200-17 组; 与 0 ng/ml 200-17 组比较: ** $P < 0.01$

意义 ($P < 0.01$); PI3K、AKT 蛋白表达差异无统计学意义。与 0 ng/ml 组相比, 1、50、100 ng/ml 组 200-17 刺激后 Hep-2 细胞内 Fas、FasL 蛋白表达降低 ($t = -3.258, -2.738, P < 0.01$)。随着 200-17 浓度升高, FasL 表达逐渐降低; 与对照组、1 ng/ml 组相比, 100 ng/ml 组 Fas 蛋白表达降低, 然而与 50 ng/ml 组相比, Fas 表达增高 ($t = -4.247, P < 0.01$)。见图 2。

3 讨论

喉鳞状细胞癌是头颈部最常见的恶性肿瘤之一, 占全身恶性肿瘤的 1% ~ 2.5%^[7]。目前喉癌的主要治疗方法包括手术、放疗、手术联合放疗/化疗的综合治疗^[2]。手术治疗后患者发音功能重建效果不佳, 部分患者喉功能完全损失, 对患者生存质量造成较大影响, 开发新的治疗方案如免疫治疗非常有必要^[8]。

IL-17 是一种由多种细胞分泌的促炎细胞因子, IL-17 与其受体结合后, 可以作用于巨噬细胞、T 细胞、上皮细胞、内皮细胞等多种细胞, 诱导 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 等多种促炎因子和 CXCL-4、CXCL-8、CXCL-10、MCP-1 等趋化因子从而发挥促炎作用, 同时 IL-17 与自身免疫性疾病、感染性疾病、肿瘤的发生发展密切相关^[9-10]。研究^[9]表明 IL-17 通过激活 Src/PI3K/Akt/nuclear factor- κ B (NF- κ B)、MAPK、Stat3、COX-2 信号通路在调控肿瘤生长、参与肿瘤血管生成及侵袭与转移中发挥重要作用。磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)-丝氨酸苏氨酸激酶(AKT) 信号通路

与肿瘤的发生发展密切相关, 是与细胞增殖和细胞凋亡关系最密切的信号通路之一, 并有望成为恶性肿瘤治疗的新靶点^[11]。头颈部肿瘤中 PI3K 信号通路的异常激活能促进肿瘤的异常增殖及肿瘤的发生发展^[11-12]。研究^[13]显示在星形胶质瘤细胞中 IL-17 能够激活 PI3K/AKT 信号通路。本研究用不同浓度 IL-17 刺激 Hep-2 细胞后, 采用 Western blot 分析 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达, 结果显示, 采用不同浓度 (0、1、50、100 ng/ml) IL-17 处理 Hep-2 细胞 6 h 后, 随着浓度增加, p-PI3K、p-AKT 表达逐渐增加, 呈浓度依赖性。提示 IL-17 能够激活 Hep-2 细胞中 PI3K/AKT 信号通路。

Fas 和 FasL (Fas 配体) 分别是肿瘤坏死因子 (TNF) 受体和 TNF 家族成员, Fas 介导的凋亡途径是肿瘤细胞凋亡的主要途径之一, Fas 与 FasL 的结合导致 caspase 级联反应进而导致细胞凋亡^[14]。Fas 介导的凋亡途径在免疫监视和维持体内平衡中起关键作用, 并且是药物诱导的凋亡的介质^[14]。研究^[15]显示磷酸化 AKT 能够活化 Forkhead 家族成员 FOXO 转录因子, 下调 FasL 诱导的凋亡过程。Western blot 结果显示, 与对照组相比, 实验组 p-AKT 表达逐渐增加, Fas、FasL 表达降低, 此结果支持磷酸化 AKT 下调 FasL 的表达从而下调 Fas 介导的凋亡途径的观点。与对照组、1 ng/ml 组比较, 100 ng/ml 组 Fas 蛋白表达降低, 然而与 50 ng/ml 组相比, Fas 表达增高, 考虑可能与 Fas 的表达在 200-17 浓度为 50、100 ng/ml 时进入平台期有关^[16]。采用流式细胞术检测细胞凋亡, 结果显示, 与对照组相比, 采用

50 ng/ml 200-17 处理 Hep-2 细胞 6、12、24 h 后, Hep-2 细胞凋亡率减少。结合以上, 本研究的结果提示, IL-17 可以抑制 Hep-2 细胞凋亡。

参考文献

- [1] Shetty A V, Wong D J. Systemic treatment for squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. *Otolaryngol Clin North Am*, 2017 50(4): 775–82.
- [2] Marur S, Forastiere A A. Head and neck squamous cell carcinoma: update on epidemiology, diagnosis, and treatment [J]. *Mayo Clin Proc*, 2016 91(3): 386–96.
- [3] Amatya N, Garg A V, Gaffen S L. IL-17 signaling: the Yin and the Yang [J]. *Trends Immunol*, 2017 38(5): 310–22.
- [4] Li F J, Cai Z J, Yang F, et al. Th17 expression and IL-17 levels in laryngeal squamous cell carcinoma patients [J]. *Acta Otolaryngol*, 2016 136(5): 484–90.
- [5] Wang J, Zhang Y, Yin K, et al. IL-17A weakens the antitumor immunity by inhibiting apoptosis of MDSCs in Lewis lung carcinoma bearing mice [J]. *Oncotarget*, 2017 8(3): 4814–25.
- [6] 季加标, 宋 杨, 杨见明, 等. IL-17 调控 IL-6/IL-6R/JAK/STAT3 信号通路影响喉癌细胞的侵袭和转移 [J]. *安徽医科大学学报* 2017 50(10): 1464–7.
- [7] Ma H, Lian R, Wu Z, et al. MiR-503 enhances the radiosensitivity of laryngeal carcinoma cells *via* the inhibition of WEE1 [J]. *Tumour Biol*, 2017 39(10): 1010428317706224.
- [8] Steuer C E, El-Deiry M, Parks J R, et al. An update on larynx cancer [J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(1): 31–50.
- [9] Song Y, and Yang J M. Role of interleukin (IL) -17 and T-helper (Th) 17 cells in cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017 493(1): 1–8.
- [10] Xu S, Cao X. Interleukin-17 and its expanding biological functions [J]. *Cell Mol Immunol*, 2010 7(3): 164–74.
- [11] Parsons R. Human cancer, PTEN and the PI-3 kinase pathway [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2004, 15(2): 171–6.
- [12] Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival [J]. *J Cell Mol Med*, 2005. 9(1): 59–71.
- [13] Yi H, Bai Y, Zhu X, et al. IL-17A induces MIP-1 α expression in primary astrocytes *via* Src/MAPK/PI3K/NF- κ B pathways: implications for multiple sclerosis [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2014 9(5): 629–41.
- [14] Strasser A, Jost P J, Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system [J]. *Immunity*, 2009 30(2): 180–92.
- [15] Tia N, Singh A K, Pandey P, et al. Role of Forkhead Box O (FOXO) transcription factor in aging and diseases [J]. *Gene*, 2018 648: 97–105.
- [16] Caraher E M, Parenteau M, Gruber H, et al. Flow cytometric analysis of intracellular IFN- γ , IL-4 and IL-10 in CD3(+) 4(+) T-cells from rat spleen [J]. *Immunol Methods*, 2000 244(1–2): 29–40.

IL – 17 inhibits apoptosis of Hep – 2 cell lines through modulating PI3K/AKT/FAS/FASL signaling pathway

Yang Ming, Song Yang, Zhang Hongjian, et al

(Dept of Otorhinolaryngology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the effect of interleukin-17 (IL-17) on the apoptosis of Hep-2 cells and to elucidate the mechanism by which IL-17 inhibits the apoptosis of Hep-2 cells by inhibiting the Fas/FasL signaling pathway through the PI3K/AKT signaling pathway. **Methods** Normal Hep-2 cells were used as the control group, and 50 ng/ml 200-17 (IL-17 stimulant) was used as the experimental group. The effect of 200-17 on the apoptosis rate of Hep-2 cells was detected by flow cytometry. Hep-2 cells were grouped into control group, 1 ng/ml 200-17 group, 50 ng/ml 200-17 group and 100 ng/ml 200-17 group. Western blot was used to detect the expression of PI3K, p-PI3K, AKT, p-AKT, Fas and FasL in Hep-2 cells after 6 h stimulation with different concentrations of 200-17. **Results** Annexin V-FITC/PI cell apoptosis assay results showed that the apoptosis rate of Hep-2 cells in the control and experimental groups increased gradually. Compared with the control group, the apoptosis rate of Hep-2 decreased after adding 50 ng/ml 200-17 for 6 h, 12 h, and 24 h. After 6 hour treatment with 200-17, the apoptosis rate of Hep-2 cells were significantly lower than that of the control group. The results of Western blot showed that the expressions of p-PI3K and p-AKT protein in Hep-2 cells were significantly increased with the increase of IL-17 concentration ($P < 0.01$). The expression of PI3K and AKT had no significant change in each group. Compared with the control group, the expressions of Fas and FasL proteins in 1 ng/ml group, 50 ng/ml group and 100 ng/ml group were significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** IL-17 may inhibit the apoptosis of Hep-2 cells through modulating PI3K/AKT/FAS/FASL signaling pathway.

Key words IL-17; PI3K/AKT/FAS/FASL signaling pathway; Hep-2 cells