

网络出版时间: 2017-9-8 12:37 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170908.1237.012.html>

IL-17 调控 IL-6/IL-6R/JAK1/STAT3 信号通路 影响喉癌细胞的侵袭和转移

季加标 宋 杨 杨 明 杨见明

摘要 目的 研究白介素(IL)-17通过IL-6/IL-6R/JAK1/STAT3信号通路调控人源性高分化喉癌细胞(Hep-2)侵袭、转移。方法 以Hep-2细胞为研究对象,设IL-17刺激剂0、1、50、100 ng/ml浓度组,Western blot法检测不同分组在IL-17的刺激下,Hep-2细胞中IL-6、IL-6R、JAK1、p-JAK1、STAT3、p-STAT3的表达变化。迁移、侵袭实验观察IL-17的刺激对Hep-2细胞侵袭、转移的影响。结果 Western blot实验中,在IL-17刺激下,1、50、100 ng/ml浓度组较0 ng/ml

浓度组Hep-2细胞的IL-6、IL-6R、p-JAK1、p-STAT3的表达明显增加($P < 0.01$),50、100 ng/ml浓度组较1 ng/ml浓度组Hep-2细胞的IL-6、IL-6R、p-JAK1、p-STAT3的表达明显增加($P < 0.01$),100 ng/ml浓度组较50 ng/ml浓度组Hep-2细胞的IL-6R、p-JAK1、p-STAT3的表达明显增加($P < 0.01$);各组间JAK1、STAT3的表达无明显变化。侵袭与迁移实验显示IL-17可以促进Hep-2细胞的侵袭和转移。结论 IL-17可能通过IL-6/IL-6R/JAK1/STAT3信号通路促进Hep-2细胞的侵袭和转移。

关键词 IL-17; IL-6/IL-6R/JAK1/STAT3信号通路; 喉癌

中图分类号 R 739.65

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)11-1637-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.012

2017-05-31 接收

基金项目: 安徽高校自然科学基金项目(编号: KJ2015A140)

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: 季加标,男,硕士研究生;

杨见明,男,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: jmy-ang88@163.com

喉癌是头颈部常见的恶性肿瘤,96%~98%为鳞状细胞癌,男性患病优势,约占男性肿瘤的

NS2 activates TLR7 during infection of A549 and inhibits the expression of IFN

Wang Minmin, Sun Tao, Yuan Xiaoling, et al

(Dept of Microbiology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the role of nonstructural protein NS2 in respiratory syncytial virus (RSV) infected human type II alveolar epithelial cells (A549) activated TLR7 during the signal transduction. **Methods** This study divided into normal control group, RSV infection group, RSV NS2 small interfering RNA silencing (NS2 siRNA) group and TLR7 agonists (resiquimod, R848) group. A549 cells in each group were infected with different time points and culture supernatant were collected. The expression of TRIF, TRAF6 and p-I κ B- α protein in each group was detected by Western blot at different time points. Type I interferon (IFN)- α , IFN- β in cell culture supernatant of each group detected by enzyme-linked immunosorbent method (ELISA). **Results** In the normal control group, the expression of TRIF, TRAF6 and p-I κ B- α was low, with the infection time increased, the expression of them increased. In NS2 siRNA group, the expression of the three proteins increased compared with the normal control group, but decreased compared with RSV infection group. In RSV infection group and NS2 siRNA group, the IFN- α , IFN- β level increased compared with normal control group and was time-dependent, the difference was statistically significant ($P < 0.01$); In TLR7 agonists group, the IFN- α , IFN- β level increased gradually with the infection time increased compared with RSV infection group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** NS2 activates TLR7 in the process of A549 infection, and inhibits the expression of IFN- α and IFN- β .

Key words A549 cell; NS2; respiratory syncytial virus; Toll-like receptor 7; siRNA

2.4%^[1]。喉癌的治疗目前是手术结合放化疗,手术的方式有喉部分或全喉切除,术后患者的呼吸、吞咽、发声功能受损,生活质量下降,而生物治疗则可以避免手术对喉带来的破坏。影响肿瘤预后的因素主要是局部复发及转移,因此发现与喉癌局部复发和淋巴结转移相关的肿瘤标志物是至关重要的^[2]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)家族参与血管发育以及淋巴管形成^[3]。VEGF有5种亚型,包括VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E。

白细胞介素(interleukin, IL)-17主要是17型T辅助细胞(Th17细胞)表达的一种细胞因子^[4]。IL-17最初被认为在慢性炎症性疾病中起重要作用,随后发现其参与癌症的发生和血管生成^[5]。IL-6是具有多种功能的促炎症细胞因子,包括产生抗体、T细胞活化、B细胞分化和破骨细胞激活^[6]。本课题组前期研究^[7]表明,随着喉癌的发生和发展,喉癌中IL-17、IL-17R的表达逐渐增强,信号通路分子JAK(janus kinase, 酪氨酸激酶)1/2、p-JAK1/2、转录激活因子(signal transducer and activator of transcription, STAT)3、p-STAT3的表达也呈增强趋势。然而,喉癌中IL-17以何种方式介导JAK1和STAT3高表达进而对喉癌的侵袭和转移产生影响尚不清楚。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 人源性高分化喉癌细胞(Hep-2)购自南京凯基生物科技发展有限公司,以FBS体积分数为10%的DMEM为培养基,置于37℃、5%CO₂的条件下培养,1~2d换液1次。

1.2 试剂 DMEM/HIGH GLUCOSE购自美国HyClone公司;胎牛血清(FBS)购自浙江天杭生物科技有限公司;重组人IL-17A购自美国PEPROTECH公司;抗IL-6、抗JAK1、抗p-JAK1多克隆抗体购自美国Immuno Way公司;抗IL-6R多克隆抗体购自英国Abcam公司;STAT3、p-STAT3购自美国Cell Signaling公司;β-actin抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司;山羊抗兔二抗购自美国ABclonal公司;RIPA裂解液(强)、PMSF、BCA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、胰酶、一抗稀释液、二抗稀释液均购自上海碧云天生物有限公司;Transwell小室、Matrigel Basement Membrane Matrix购自美国Corning公司。

1.3 仪器 SW-9800型超净工作台购自苏州泰安空气技术有限公司;NAPCO-8800型恒温细胞培养

箱购自美国SHELLAB公司;Olympus IX-71型光学显微镜购自日本奥林巴斯株式会社;Western blot电泳仪(Tanon)购自上海天能科技有限公司;GraphPad Prism 6图像处理软件;Image-Pro plus图像处理系统。

1.4 Western blot法检测在IL-17刺激下Hep-2细胞中IL-6、IL-6R、JAK1、p-JAK1、STAT3、p-STAT3分子表达的变化 将Hep-2细胞消化后,以相同的量分别接种于4个培养瓶中,用不含血清的DMEM培养,分别向其中加入不同浓度的IL-17(0、1、50、100 ng/ml)处理6h,弃去培养液;收集细胞,加蛋白裂解液提取细胞蛋白;BCA试剂盒蛋白定量;每泳道加15 μl蛋白与上样缓冲液的混合样本进行SDS-PAGE电泳;在转移缓冲液中,以200 mA恒定的电流转移到PVDF膜上;用5%脱脂牛奶封闭2h,洗膜后将其放入一抗中,一抗的IL-6、JAK1、p-JAK1、STAT3、p-STAT3为1:1 000稀释,一抗的IL-6R为1:500稀释;在4℃条件下震荡孵育过夜;洗膜,以1:2 000辣根过氧化物酶结合的二抗室温孵育2h,ECL试剂盒显色。用Image-Pro plus图像处理系统分析计算Western blot灰度值。

1.5 迁移实验检测在IL-17刺激下Hep-2细胞的迁移能力变化 制备细胞悬液,将细胞以1×10⁵个/ml的密度接种在Transwell小室中,设用含IL-17 50 ng/ml的无血清的DMEM培养的细胞为实验组。对照组上室中加入无血清的DMEM培养,对照组与实验组的下室中分别加入含25% FBS的培养基,在37℃、5% CO₂条件下培养24h。培养完成后,取出小室,用4%的多聚甲醛固定、结晶紫染色,显微镜下观察并拍照,随机选择3个视野进行比较。

1.6 侵袭实验检测在IL-17刺激下Hep-2细胞的侵袭能力变化 制备细胞悬液,设用含IL-17 50 ng/ml的无血清的DMEM培养的细胞为实验组。取出储存在-20℃的基质胶,在4℃下过夜融化,用预冷的无血清DMEM以2:1比例稀释的基质胶加入Transwell的上室底部,并在37℃下通过温育凝胶。将细胞以4×10⁵个/ml的密度接种于上室中,对照组上室中加入无血清的DMEM培养,对照组与实验组的下室中分别加入含25% FBS的培养基,在37℃、5% CO₂条件下培养48h。在4%多聚甲醛中固定30 min,结晶紫染色30 min,蒸馏水洗涤,在显微镜下观察并拍照。随机选择3个视野进行比较。

1.7 统计学处理 采用SPSS 16.0软件进行分析,两组均数的比较采用方差检验;多组数据之间的相

互比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度的 IL-17 刺激 Hep-2 细胞时 IL-6、IL-6R、JAK1、p-JAK1、STAT3、p-STAT3 的表达
 在 Western blot 实验中,用不同浓度 (0、1、50、100 ng/ml) 的 IL-17 刺激 Hep-2 细胞 随着 IL-17 浓度的升高,1、50、100 ng/ml 浓度组较 0 ng/ml 浓度组 Hep-2 细胞的 IL-6、IL-6R、p-JAK1、p-STAT3 的表达明显增加 ($t = -4.461, P < 0.01$) 50、100 ng/ml 浓度组较 1 ng/ml 浓度组 Hep-2 细胞的 IL-6、IL-6R、p-JAK1、p-STAT3 的表达明显增加 ($t = -5.472, P < 0.01$) 100 ng/ml 浓度组较 50 ng/ml 浓度组 Hep-2 细胞的 IL-6R、p-JAK1、p-STAT3 的表达明显增加 ($t = -3.283, P < 0.01$)。各组间 JAK1、STAT3 蛋白表达无明显变化。见图 1。

2.2 IL-17 对 Hep-2 细胞迁移能力的影响 在迁

移实验中,实验组、对照组细胞穿过小室底的细胞平均数分别为 (137.42 ± 6.15)、(52.40 ± 4.28),实验组细胞穿过小室底的细胞数高于对照组,差异有统计学意义 ($t = -3.437, P < 0.01$)。见图 2。

2.3 IL-17 对 Hep-2 细胞侵袭能力的影响 在侵袭实验中,实验组、对照组细胞穿过小室底的细胞数平均数分别为 (87.43 ± 4.13)、(36.40 ± 2.28),实验组细胞穿过小室底的细胞数高于对照组,差异有统计学意义 ($t = -7.642, P < 0.01$)。见图 3。

3 讨论

目前,喉癌的临床治疗主要采取以手术为主的多学科综合治疗,在彻底根除肿瘤病变的同时尽量保留和重建喉的功能^[1]。这种治疗破坏了喉的正常解剖结构。细胞因子疗法已普遍用于肿瘤的免疫治疗^[8]。细胞因子疗法避免了手术对喉解剖结构的破坏,保护了上呼吸道、消化道的完整,从而保持其原有的生理功能,会提高患者的生存质量。

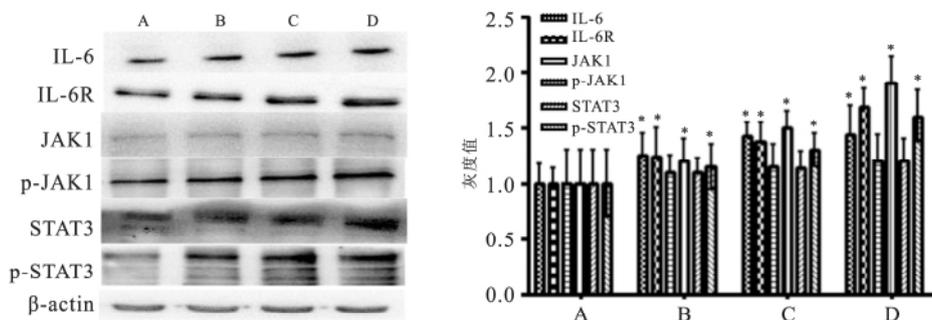


图 1 不同浓度 IL-17 刺激下 Hep-2 细胞的蛋白表达

A: 0 ng/ml 浓度组; B: 1 ng/ml 浓度组; C: 50 ng/ml 浓度组; D: 100 ng/ml 浓度组

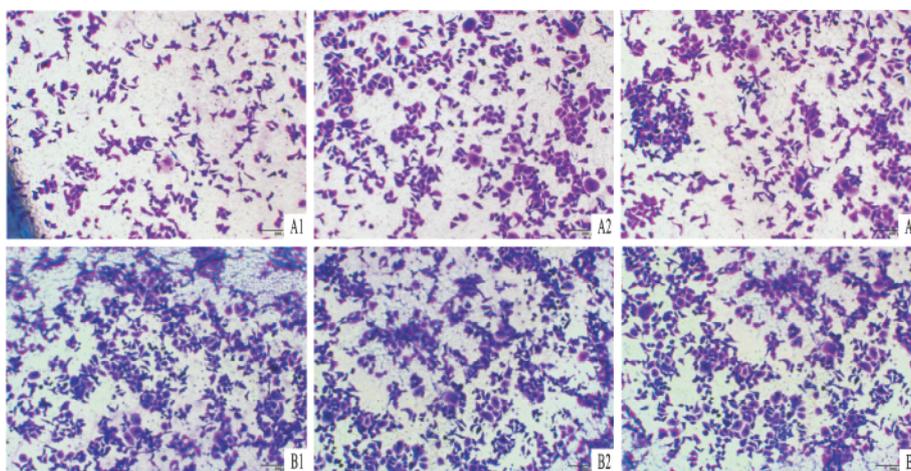


图 2 细胞迁移实验结果 结晶紫染色 × 400

A1 ~ A3: 对照组; B1 ~ B3: 实验组

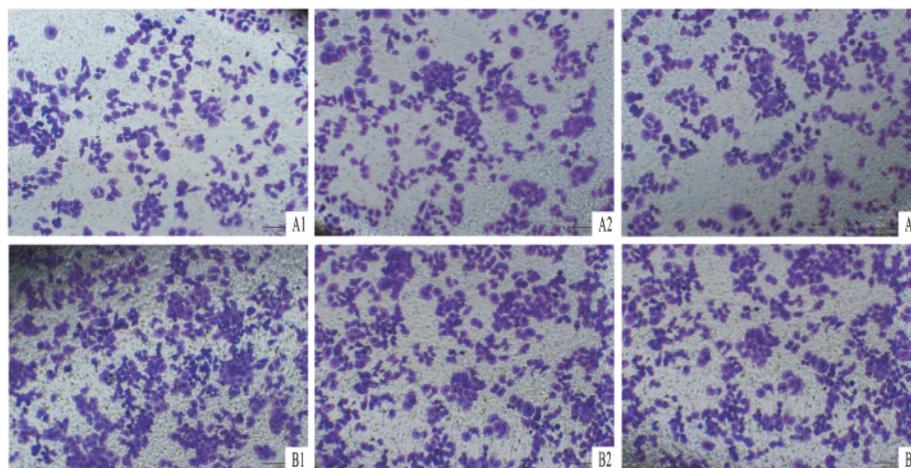


图3 细胞侵袭实验结果 结晶紫染色×400
A1 ~ A3: 对照组; B1 ~ B3: 实验组

本课题组前期研究^[7]表明,随着喉癌的发生和发展,喉癌中 IL-17、IL-17R 的表达逐渐增强,信号通路分子 JAK1/2、p-JAK1/2、STAT3、p-STAT3 的表达也呈增强趋势。本研究显示,随着刺激剂 IL-17 浓度的提高,Hep-2 细胞中 IL-6、IL-6R 信号分子的表达逐渐增加,这说明在 Hep-2 细胞中,IL-17 可以介导 IL-6、IL-6R 的高表达。其中,Western blot 结果显示,在 50 ng/ml 浓度组与 100 ng/ml 浓度组间,IL-6 的表达差异无统计学意义,推测这与 Hep-2 细胞中 IL-6 的表达进入一个平台期有关。前期研究^[7]表明,恶性程度越高的喉癌组织中 IL-17 的表达量越多;随着 IL-17 浓度的增加,Hep-2 细胞的 IL-6、IL-6R 信号分子的表达逐渐增强,表明随着喉癌恶性程度的增加,IL-6、IL-6R 信号分子的表达增强。在骨髓成纤维细胞中,IL-17 刺激产生炎症趋化因子 IL-6 和 IL-8^[9]。IL-17 在肝癌细胞中的作用是通过诱导 IL-6 的高表达激活蛋白激酶 B 信号通路,进而 IL-6 激活 JAK2/STAT3 信号通路^[10]。

JAK 是一种酪氨酸激酶,有三种亚型,分别为 JAK1、JAK2、JAK3^[11]。本课题组前期研究^[7]显示,随着喉癌恶性程度的增加,JAK、p-JAK 的表达增强。本研究显示,主要是 p-JAK1 表达增强。p-JAK1 是 JAK1 的磷酸化形式,即是 JAK1 的活化形式。研究^[12]显示,在骨髓瘤中,IL-6 与 IL-6R 结合,激活受体相关的 JAK 的二聚体化,JAK 活化后可导致 STAT3 磷酸化,二聚体化,转位至细胞核,并与 DNA 结合诱导基因的表达。而本研究在 Hep-2 细胞中亦观察到,随着 IL-17 浓度的增加,p-JAK1、p-STAT3

的表达逐渐增强。结合以上,提示 IL-17 可以促进 Hep-2 细胞中 IL-6、IL-6R、p-JAK1、p-STAT3 的表达。

在胃癌中,IL-6 可以介导 JAK/STAT3/VEGF-C 信号通路,促进胃癌生长、侵袭和淋巴管生成^[13]。在肿瘤发生和发展过程中,肿瘤的一个重要的标志性生物特征为新生血管增生以及侵袭和转移^[14]。所以,本实验课题接下来会继续研究 Hep-2 在 IL-17 的作用下 p-STAT3 表达增高以后,Hep-2 细胞中 VEGF 的水平是怎样变化的,以及喉癌组织中 IL-17 的水平与 VEGF 水平之间的关系。

肿瘤的恶性程度越高,其迁移、侵袭的能力越强;恶性程度越高的喉癌组织中 IL-17 的表达量增加;IL-17 可以促进 Hep-2 细胞中 IL-6、IL-6R、p-JAK1、p-STAT3 的表达。所以,IL-6、IL-6R、p-JAK1、p-STAT3 分子可能在 Hep-2 细胞的迁移、侵袭中发挥重要作用。本研究通过细胞的行为学实验观察到以 IL-17(50 ng/ml)为刺激剂培养 Hep-2 细胞,可以促进 Hep-2 细胞的迁移和侵袭。

综上所述,在 Hep-2 细胞中,IL-17 可以介导 IL-6、IL-6R 的高表达,然后诱导下游信号通路分子 JAK1、STAT3 的磷酸化,即 p-JAK1、p-STAT3 表达增加。在 Hep-2 细胞迁移实验、侵袭实验中,IL-17 可以促进 Hep-2 的转移和侵袭。所以,IL-17 与 IL-17R 结合,可能影响 IL-6、IL-6R 的表达,然后调控 JAK1/STAT3 信号分子通路促进 Hep-2 细胞的侵袭和转移。IL-17 可能通过 IL-6/IL-6R/JAK1/STAT3 信号通路促进 Hep-2 细胞的侵袭和转移。

参考文献

- [1] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会头颈外科组, 李晓明. 喉癌外科手术及综合治疗专家共识[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2014, 49(8): 620-6.
- [2] 宋盼盼, 钱晓云, 周函, 等. 上皮钙黏蛋白和神经钙黏蛋白以及 β -连环蛋白在喉鳞状细胞癌中的表达及临床意义[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2016, 51(6): 440-5.
- [3] Lapeyreprost A, Terme M, Pernot S, et al. Immunomodulatory activity of VEGF in cancer[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2017, 330: 295-342.
- [4] Amatya N, Garg A V, Gaffen S L. IL-17 signaling: the Yin and the Yang[J]. *Trends Immunol*, 2017, 38(5): 310-22.
- [5] Li T J, Jiang Y M, Hu Y F, et al. Interleukin-17-producing neutrophils link inflammatory stimuli to disease progression by promoting angiogenesis in gastric cancer[J]. *Clin Cancer Res* 2017, 23(6): 1575-85.
- [6] Kobayashi T, Ishida K, Yoshie H. Increased expression of interleukin-6 (IL-6) gene transcript in relation to IL-6 promoter hypomethylation in gingival tissue from patients with chronic periodontitis[J]. *Arch Oral Biol*, 2016, 69: 89-94.
- [7] 瞿帅, 宋杨, 梅金玉, 等. IL-17 及其受体调控 JAK/STAT3 信号通路促进喉癌血管生成的作用[J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(10): 1464-7.
- [8] Yang L, Liu H, Zhang L, et al. Effect of IL-17 in the development of colon cancer in mice[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(6): 4929-36.
- [9] Xiong H, Wei L, Peng B. IL-17 stimulates the production of the inflammatory chemokines IL-6 and IL-8 in human dental pulp fibroblasts[J]. *Int Endod J* 2015, 48(6): 505-11.
- [10] Gu F M, Li Q L, Qiang G, et al. IL-17 induces AKT-dependent IL-6/JAK2/STAT3 activation and tumor progression in hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Cancer* 2011, 10: 150.
- [11] Chen B, Liu Y, Zhang Y, et al. IL-21 is positively associated with intervertebral disc degeneration by interaction with TNF- α through the JAK-STAT signaling pathway[J]. *Inflammation*, 2017, 40(2): 612-22.
- [12] Pedranzini L, Dechow T, Berishaj M, et al. Pyridone 6, a pan-Janus-activated kinase inhibitor, induces growth inhibition of multiple myeloma cells[J]. *Cancer Res* 2006, 66(19): 9714-21.
- [13] Zhao G, Zhu G, Huang Y, et al. IL-6 mediates the signal pathway of JAK-STAT3-VEGF-C promoting growth, invasion and lymphangiogenesis in gastric cancer[J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(3): 1787-95.
- [14] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-74.

IL-17 regulates IL-6/IL-6R/JAK1/STAT3 signaling pathway in invasion and metastasis of laryngeal carcinoma

Ji Jiabiao, Song Yang, Ying Ming, et al

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

Abstract Objective To investigate the effect of interleukin (IL) -17 on the invasion and metastasis of Hep-2 cells through IL-6/IL-6R/JAK1/STAT3 signaling pathway. **Methods** The concentration of IL-17 stimulated agent was 0, 1, 50 and 100 ng/ml in 0, 1, 50, 100 ng/ml concentration group. The expression of IL-6, IL-6R, JAK1, p-JAK1, STAT3 and p-STAT3 in Hep-2 cells were detected by Western blot. We observed the migration and invasion of laryngeal carcinoma cells stimulated by interleukin-17. **Results** The expression of IL-6, IL-6R, p-JAK1 and p-STAT3 in 1, 50, 100 ng/ml concentration group was significantly higher than that in the 0 ng/ml concentration group ($P < 0.01$). The expression of IL-6R, p-JAK1 and p-STAT3 in 50, 100 ng/ml concentration group was significantly higher than that in the 1 ng/ml concentration group ($P < 0.01$). The expression of IL-6, IL-6R, p-JAK1 and p-STAT3 in 100 ng/ml concentration group was significantly higher than that in the 50 ng/ml concentration group ($P < 0.01$). There was no significant change in the expression of JAK1 and STAT3 between the groups. In the invasion and migration experiments, IL-17 can promote the invasion and migration of Hep-2 cells. **Conclusion** IL-17 may promote the invasion and metastasis of Hep-2 cells through IL-6/IL-6R/JAK1/STAT3 signaling pathway.

Key words IL-17; IL-6/IL-6R/JAK1/STAT3 signaling pathway; laryngeal carcinoma