

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

瞿 帅, 宋 杨, 梅金玉, 曹 卫, 陶 冶, 王雅堂, 杨见明

摘要 目的 探讨白细胞介素 17(IL-17) 及其受体调控酪氨酸激酶(JAK) /转录激活因子-3(STAT3) 信号通路促进喉癌血管生成的作用。方法 收集喉癌手术切除标本 70 例, 癌组织通过不同病理分级, 采取 70 例喉癌患者的外周血。采用 ELISA 法检测外周血中 IL-17、血管内皮生长因子 A(VEGF-A) 的浓度, 分析其与临床病理特征的关系。Western blot 法检测喉癌组织中 IL-17、IL-17 受体(IL-17R)、JAK1/2、p-JAK1/2、STAT3、p-STAT3、VEGF-A、环氧合酶-2(COX-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9) 等信号分子水平的变化。结果 喉癌患者血清中 IL-17、VEGF-A 的含量与喉癌的分化程度、淋巴结有无转移和 TNM 分期有关($P < 0.05$), Western blot 结果显示在喉癌发展的不同时期, 随着喉癌的恶化, IL-17、IL-17R 的表达逐渐增强, 相关信号通路分子 JAK1/2、p-JAK1/2、STAT3、p-STAT3、VEGF-A、COX-2、MMP-9 表达也显著增加。结论 IL-17 可能调控 JAK/STAT3 信号通路, 在喉癌的血管生成中起到重要的作用。

关键词 IL-17; 喉癌; JAK/STAT3

中图分类号 R 739.65

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)10-1464-04

喉癌是头颈部常见的恶性肿瘤, 以鳞状上皮细胞癌为主, 其发病率约占全身恶性肿瘤的 5.7% ~ 7.6%^[1]。研究^[2]表明, 血管生成是肿瘤侵袭转移的关键因素, 新生血管生成对于大多数实体瘤的发生发展, 以及复发转移都是必不可少的^[2]。目前生物治疗已成为一种备受关注的新型肿瘤治疗方法, 其中细胞因子基因治疗是研究热点^[3]。白细胞介素 17(interleukin 17, IL-17) 主要由 CD₄⁺ 记忆性 T 淋巴细胞、单核细胞等分泌^[4]。通过与受体特异性结合, 发挥促进炎症发展、免疫排斥、造血等功能, 在免疫调节和调控肿瘤细胞生长方面均有重要作用^[5], 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 及其受体能特异地结合并在肿瘤新

生血管生成过程中起着至关重要的作用。现已发现的 VEGF 家族成员包括 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E 和胎盘生长因子^[6]。环氧合酶(cyclooxygenase, COX) 是前列腺素生物合成的限速酶, 有 COX-1 和 COX-2 两种亚型, COX-2 为诱导性表达基因, 在前列腺癌、肺癌、消化道肿瘤中高表达^[7]。基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9) 是 MMPs 中最重要的酶之一, 肿瘤细胞的浸润转移能力与其产生蛋白酶降解细胞外基质和基底膜的能力密切相关^[8]。该研究收集行喉癌手术切除的患者标本 70 例, 采集外周血, 探讨 IL-17 及其受体(IL-17R) 促进喉癌血管生成的作用和机制。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2008 年 3 月 ~ 2013 年 3 月于安徽医科大学第二附属医院行喉癌手术切除的患者喉癌组织标本 70 例、癌旁组织和正常组织标本。喉癌组织分为低分化组、中分化组、高分化组和癌旁组。喉癌的分型分类、病理学分级及临床分期按国际抗癌协会 TNM 分类标准修订的方案统一进行分类。70 例喉鳞状细胞癌患者中, 男 51 例, 女 19 例; 年龄 43 ~ 75(60 ± 13.88) 岁; 高分化 21 例, 中分化 30 例, 低分化 19 例; 声门上型 15 例, 声门型 49 例, 声门下型 6 例。

1.2 血清的采集与保存 70 例喉癌患者于接受手术治疗前用干燥管采集空腹静脉血液 5 ml, 室温放置 30 min, 3 000 r/min 离心 15 min, 吸取上清液并冻存于 -20 °C 待测。喉癌患者的诊断需经细胞学或病理学检查证实, 为原发、初治的喉癌患者, 抽血前未接受手术、放疗、化疗、分子靶向及免疫生物等治疗。患者均知情并签署知情同意书。

1.3 试剂 兔抗人 IL-17、IL-17R 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司; 酪氨酸激酶(janus kinase, JAK) 1/2、p-JAK1/2、转录激活因子-3(signal transducer and activator of transcription, STAT3)、p-STAT3、VEGF-A、MMP-9、COX-2 抗体, 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗、山羊抗小鼠二抗购自美国 Santa Cruz 公司; RIPA 蛋白裂解液(强)、PMSF、BCA 蛋白浓度检测

2015-05-18 接收

基金项目: 安徽省科技厅重点资助课题(编号: 12070403060)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院耳鼻咽喉科, 合肥 230601

作者简介: 瞿 帅, 男, 硕士研究生;

杨见明, 男, 主任医师, 责任作者, E-mail: jmyang88@163.

com

试剂盒、30%聚丙烯酰胺凝胶单体储液(Acr-BIS)、Tris-HCl(pH=6.8)、10% SDS、过硫酸铵、TEMED、5×SDS-PAGE蛋白上样缓冲液、一抗、二抗稀释液购自上海碧云天生物有限公司;人IL-17和VEGF-A ELISA检测试剂盒均购自美国R&D公司。

1.4 ELISA法检测血清中IL-17和VEGF-A的水平 采用ELISA法检测受检者血清中IL-17、VEGF-A的水平。分别用抗人IL-17和VEGF-A单抗包被酶标板,采用标准品和样品中的IL-17、VEGF-A与单抗结合,加入生物素化的抗人IL-17、VEGF-A抗体形成免疫复合物连接,与板上辣根过氧化物酶标记的抗生物素蛋白链菌素与生物素结合。加入酶底物工作液,出现蓝色后加入硫酸终止液。最后采用全自动酶标仪(芬兰Thermo Labsystems公司)进行分析,根据标准曲线计算出待测样品中的浓度值,乘以稀释倍数得到最后结果。

1.5 Western blot法检测喉癌组织中IL-17、IL-17R、JAK1/2、p-JAK1/2、STAT3、p-STAT3、VEGF-A、MMP-9、COX-2等信号分子水平的变化

取各组喉癌组织150 μg,加入200 ml新鲜配制的RIPA裂解液(含蛋白酶抑制剂),收集组织,4℃、13 000 r/min离心15 min,将上清液移至另一离心管中,取部分样品用BCA法测定蛋白浓度。PVDF膜用TBST漂洗3次,每次5 min,加入含IL-17、IL-17R、JAK1/2、p-JAK1/2、STAT3、p-STAT3、VEGF-A、MMP-9、COX-2一抗的稀释液,摇床上4℃孵育过夜,洗涤后,继以辣根过氧化物酶结合的二抗室温孵育2 h,ECL试剂盒显色。用Image-Pro plus图像处理系统分析计算蛋白印迹值。

1.6 统计学处理 采用SPSS 16.0软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间均数的比较采用 t 检验,IL-17与VEGF-A相关关系采用线性相关分析。

2 结果

2.1 喉癌患者血清中IL-17、VEGF-A含量与喉癌患者临床特征的关系 IL-17、VEGF-A的含量与喉癌患者的分化程度、淋巴结有无转移和TNM分期有关($P < 0.05$),与年龄、性别、原发灶部位无关($P > 0.05$)。见表1。

2.2 喉癌患者血清IL-17水平与VEGF-A水平的相关性分析 相关分析结果表明,喉癌患者血清IL-17水平与VEGF-A水平呈正相关性($r = 0.88, P = 0.003$)。见图1。

表1 喉癌患者血清中IL-17、VEGF-A的含量与临床病理特征的关系($\text{pg/ml}, \bar{x} \pm s$)

项目	例数	IL-17	P 值	VEGF-A	P 值
年龄(岁)					
≤59	36	61.53 ± 5.88	0.347	541.42 ± 168.77	0.453
>59	34	59.30 ± 4.37		564.94 ± 164.31	
性别					
男	68	62.03 ± 5.27	0.53	572.92 ± 168.82	0.462
女	2	60.58 ± 5.85		546.25 ± 161.60	
原发灶部位					
声门型	48	60.30 ± 5.32	0.175	531.44 ± 123.67	0.573
非声门型	22	61.96 ± 5.98		571.43 ± 93.51	
分化程度					
高	22	79.65 ± 5.19	0.018	698.16 ± 140.10	0.015
中、低	48	62.14 ± 5.82		465.11 ± 165.02	
有无淋巴结转移					
有	37	62.75 ± 5.35	0.029	693.70 ± 168.09	0.001
无	33	50.28 ± 5.68		513.38 ± 166.11	
TNM分期					
I - II	43	59.84 ± 5.31	0.023	424.42 ± 162.25	0.045
III - IV	27	73.39 ± 5.68		571.30 ± 113.25	

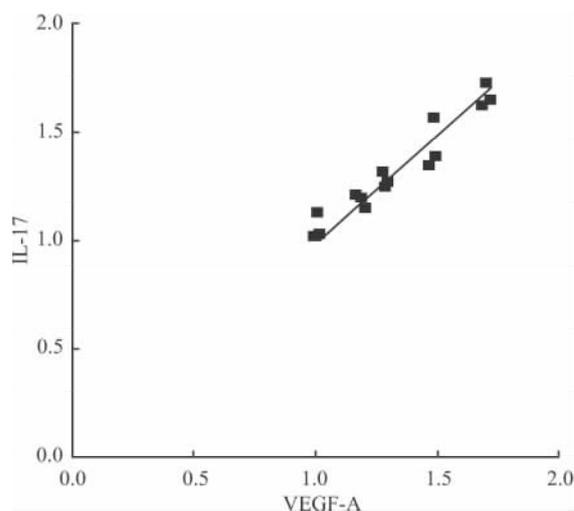


图1 喉癌患者血清IL-17的水平与VEGF-A水平相关性

2.3 IL-17对JAK/STAT3信号通路相关信号分子的调控 随着喉癌的发生和发展,在不同的喉癌分化组,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,VEGF-A、MMP-9、COX-2的表达随着分化的程度逐渐增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图2。

3 讨论

IL-17是主要由 CD_4^+ 记忆性T淋巴细胞、单核细胞等分泌的一种细胞因子,其在天然免疫和宿主防御中有特殊功能,在免疫调节和调控肿瘤细胞生

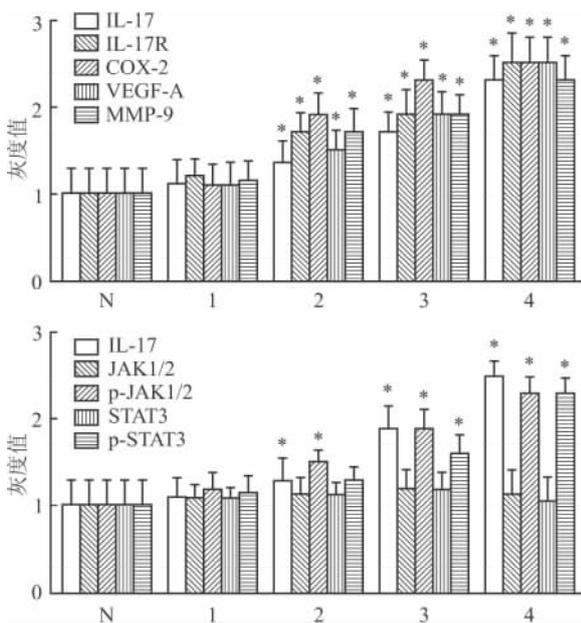
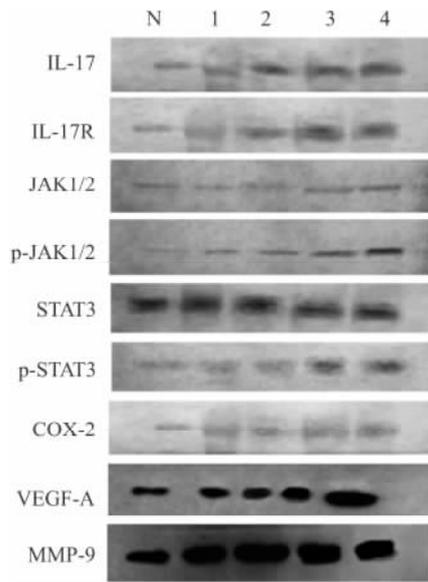


图2 Western blot 法检测不同病程中喉癌组织中 IL-17、IL-17R、JAK1/2、p-JAK1/2、STAT3、p-STAT3、VEGF-A、COX-2、MMP-9 的表达

N: 正常组; 1: 癌旁组; 2: 低分化组; 3: 中分化组; 4: 高分化组; 与正常组比较: * P < 0.05

长方面均有重要作用^[9]。研究^[10-12]显示,IL-17 是参与机体免疫监视和调控的重要分子,在肿瘤微环境中具有促进血管生成和肿瘤生长转移等作用,IL-17 在多种肿瘤组织中都呈现高表达,如前列腺癌、胃癌、原发性肝癌等。本研究结果显示,喉癌患者血清中 IL-17 的含量与喉癌患者的分化程度、淋巴结有无转移和 TNM 分期有关(P < 0.05),与年龄、性别、原发灶部位无关,这提示 IL-17 的表达可能在肿

瘤发展中起到重要作用。肿瘤血管生成取决于促血管生成和抗血管生成因子之间的平衡。VEGF 及其受体是最重要的促血管生成因子。其中 VEGF-A 发现最早、研究最深入、表达最广泛、含量最高^[6]。本实验中,喉癌患者血清中 VEGF-A 的含量与喉癌患者的分化程度、淋巴结有无转移和 TNM 分期有关(P < 0.05),与年龄、性别、原发灶部位无关,提示 VEGF-A 的表达与喉癌淋巴结转移密切相关。相关性分析结果表明,喉癌患者血清中 IL-17 的水平与 VEGF-A 水平呈正相关性(P = 0.003),研究^[10]显示,辅助性 T 细胞 17 分泌的 IL-17 与纤维细胞表面的 IL-17R 结合后,刺激纤维细胞产生多种促血管新生因子,形成新的脉管系统,其中最重要的因子就是 VEGF。本实验结果提示喉癌的发生发展中 IL-17 与新生血管形成有密切关系。

IL-17 被证实能够选择性的增强肿瘤细胞与内皮细胞中促血管作用。IL-17 在众多的肿瘤细胞中介导不同的信号转导途径,如有丝分裂原活化的蛋白激酶,核转录因子-κB 和 STAT3 途径^[12]。研究^[13]显示,由于 IL-17RA 可在多种肿瘤细胞表达,因此 IL-17 也可作用于多种肿瘤细胞,IL-17 对靶细胞的作用主要是通过调控 IL-17RA 下游靶基因表达。研究^[14]显示,在肝癌细胞中,IL-17 可以通过 JAKs/STATs 途径传导信号调节肿瘤细胞的浸润和转移,IL-17 可以诱导 JAK1/2/3、Tyk2 以及 STAT1~4 的磷酸化活化,其中 JAK2 最为重要,活化的 STAT 自胞质进入胞核,促进各种因子的转录。研究^[15]表明 IL-17 可以通过激活 AKT 信号,导致 IL-6 的产生。继而激活 JAK2/STAT3 信号,随后上调其下游靶 IL-8、MMP-9 和 VEGF。

本研究显示,随着喉癌的发生和发展,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,VEGF-A、MMP-9、COX-2 的表达随着分化的程度逐渐增加,差异有统计学意义(P < 0.05),研究^[7]显示,COX-2 在许多良性癌前病变和恶性肿瘤中均有高表达,且可能对细胞凋亡、血管形成和免疫抑制有影响,COX-2 还诱导 MMPs 表达,降解细胞外基质,促进肿瘤的转移。本实验表明 IL-17 结合 IL-17R 可能通过对 JAK/STAT3 信号通路调控 VEGF-A、MMP-9、COX-2 的表达。提示 IL-17 在喉癌的发生发展中起到重要的作用,IL-17 可能调控 JAK/STAT3 信号通路,在喉癌的血管生成中起到重要的作用。

参考文献

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2012, 62(1): 10–29.
- [2] Dirix P, Lambrecht M, Nuyts S. Radiotherapy for laryngeal squamous cell carcinoma: current standards [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2010, 10(9): 1461–9.
- [3] Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, et al. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments [J]. *Blood*, 2009, 114(6): 1141–9.
- [4] Steiner G E, Newman M E, Paikl D, et al. Expression and function of pro-inflammatory interleukin IL-17 and IL-17 receptor in normal, benign hyperplastic, and malignant prostate [J]. *Prostate*, 2003, 56(3): 171–82.
- [5] Ji Y, Zhang W. Th17 cells: positive or negative role in tumor? [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2010, 59(7): 979–87.
- [6] Hamerlik P, Lathia J D, Rasmussen R, et al. Autocrine VEGF VEGFR2-Neuropilin-1 signalling promotes glioma stem-like cell viability and tumor growth [J]. *J Exp Med*, 2012, 209(3): 507–20.
- [7] Kim H S, Moon H G, Han W, et al. COX2 overexpression is a prognostic marker for Stage III breast cancer [J]. *Brest Cancer Res Treat*, 2012, 132(1): 51–9.
- [8] Xiang L, Wang S, Jin X, et al. Expression of BMP2, TLR3, TLR4 and COX2 in colorectal polyps, adenoma and adenocarcinoma [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(5): 973–6.
- [9] Zhang Q, Liu S, Ge D, et al. Interleukin-17 promotes formation and growth of prostate adenocarcinoma in mouse models [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(10): 2589–99.
- [10] Zhang Q, Liu S, Zhang Q. Interleukin-17 promotes development of castration-resistant prostate cancer potentially through creating an immunotolerant and pro-angiogenic tumor microenvironment [J]. *Prostate*, 2014, 74(8): 869–79.
- [11] Wang L, Yi T, Kortylewski M. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway [J]. *J Exp Med* 2009, 206(7): 1457–64.
- [12] Gaffen S L. Structure and signalling in the IL-17 receptor family [J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(8): 556–67.
- [13] Su X, Ye J, Hsueh E C, et al. Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human Th17 cells [J]. *J Immunol*, 2010, 184(3): 1630–41.
- [14] Xu S, Cao X. Interleukin-17 and its expanding biological functions [J]. *Cell Mol Immunol*, 2010, 7(3): 164–74.
- [15] Gu F M, Li Q L, Gao Q, et al. IL-17 induces AKT-dependent IL-6/JAK2/STAT3 activation and tumor progression in hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Cancer*, 2011, 10(150): 1–13.

The role of IL-17 and its receptor in invasion and metastasis of laryngeal cancer

Qu Shuai, Song Yang, Mei Jinyu, et al

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

Abstract Objective To investigate IL-17 and its receptor regulate JAK/STAT3 signaling pathway in the angiogenesis of laryngeal cancer. **Methods** Serum levels of IL-17 and VEGF-A were determined in 70 laryngeal carcinoma patients using ELISA. The levels as well as clinicopathological features were analyzed. Western blot assay was used to detect the expressions of IL-17, IL-17R, JAK1/2, p-JAK1/2, STAT3, p-STAT3, VEGF-A, COX-2, MMP-9 in 70 cases of laryngeal carcinoma. Statistics methods were applied to analyze the results. **Results** Serum levels of both IL-17 and VEGF-A levels in patients were related to the degree of differentiation of laryngeal cancer, lymph node metastasis and TNM stage ($P < 0.05$), were unrelated to age, sex, primary tumor site. Western blot analysis showed that at different times in development of laryngeal cancer, with the deterioration of laryngeal cancer, IL-17, IL-17R expression gradually increased, JAK1/2, p-JAK1/2, STAT3, p-STAT3, VEGF-A, COX-2 and MMP-9 expressions were also significantly increased. **Conclusion** IL-17 may play an important role in angiogenesis of laryngeal cancer *via* regulating JAK/STAT3 signaling pathway.

Key words IL-17; laryngeal cancer; JAK/STAT3 signaling pathway