

4 参考文献

- Shortman K, Heath WR. Immunity or tolerance? That is the question for dendritic cells. *Nat Immunol* 2001;2:988-989
- Hawiger D, Lutz MB. Dendritic cells induces Peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 2001;194:769-80
- Wang FS, Xing LH, Liu MX, Zhu CL, Li HW, Li ZY, Wang SF, Zhang B, Jing L. Dysfunction of peripheral blood dendritic cells from patients with chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2001;7:537-541
- Kakumu S, Ito S, Ishikawa T, Mita Y, Tagaya T, Fukusawa Y, Yoshioka K. Decreased function of peripheral blood dendritic cells in patients with hepatocellular carcinoma with hepatitis B and C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:431-436
- 杜清友, 刘明旭, 王福生. CIK 细胞体外抗肝癌细胞的作用. 中国癌症杂志 2001;11:325-328
- 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝病杂志 2000;8:324-329
- Nestle FO, Aljagic S, Gillife M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D. Vaccination of melanoma patients with peptide or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998;4:328-332
- Oelke M, Mochrle U, Chen JL, Behringer D, Cerundolo V, Lindemann A, Mackensen A. Generation and purification of CD8+ Melan-A-specific cytotoxic T lymphocytes for adoptive transfer in tumor immunotherapy. *Clin Can Res* 2000;6:1997-2005
- Akbar SM, Horrike N, Onji M, Hino O. Dendritic cells and chronic hepatitis virus carriers. *Intervirology* 2001;44:199-208
- Shimizu Y, Guidotti LG, Fowler P, Chisari FV. Dendritic cell immunization breaks cytotoxic T lymphocytes tolerance in hepatitis B virus transgenic mice. *J Immunol* 1998;161:4520-4529

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

结直肠癌趋化因子IL-8的表达与血管形成的关系

杨春康, 陈道达, 张惠灏, 许东坡, 田源, 张景辉

杨春康, 张惠灏, 许东坡, 福建医科大学附属第一医院肿瘤外科 福建省福州市 350005
 陈道达, 田源, 张景辉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院 湖北省武汉市 430022
 福建省教育厅科研基金资助项目, No. 1A00205
 通讯作者: 杨春康, 350005, 福建省福州市, 福建医科大学附属第一医院肿瘤外科. chunkang@pub5.fz.fj.cn.
 收稿日期: 2004-12-31 接受日期: 2005-02-02

摘要

目的: 检测结直肠癌组织中趋化因子和血管内皮生长因子(VEGF)的表达及血管密度, 研究趋化因子IL-8的表达与肿瘤血管形成的关系, 判断其临床应用价值。

方法: 采用RT-PCR方法检测新鲜结直肠癌组织标本中趋化因子IL-8 mRNA的表达; 采用免疫组织化学方法检测结直肠癌组织中趋化因子IL-8蛋白、VEGF的表达及血管密度(CD34)。

结果: 12例结直肠癌组织经RT-PCR检测均可出现趋化因子IL-8 mRNA的表达, 40例结直肠癌组织IL-8蛋白表达的阳性率为87.5%, IL-8的表达与结直肠癌肿瘤MVD密切相关, IL-8表达强者, 其肿瘤血管密度高。(阳性组: 37.715 ± 6.710 ; 阴性组: 32.88 ± 5.8130 ; $t = 2.436$; $P = 0.02$, $r = 0.367$)。12例结直肠癌组织的IL-8 mRNA的表达与其相对应的肿瘤组织MVD密切相关($r = 0.839$, $P = 0.001$)。

结论: 结直肠癌组织趋化因子IL-8的表达参与调节肿瘤的血管形成, IL-8增强肿瘤血管的形成。

杨春康, 陈道达, 张惠灏, 许东坡, 田源, 张景辉. 结直肠癌趋化因子IL-8的表达与血管形成的关系. 世界华人消化杂志 2005;13(7):899-901
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/899.asp>

0 引言

血管形成在肿瘤的生长和转移中起着重要的作用, 研究表明^[1]血管形成与肿瘤生长转移密切相关. 趋化因子家族^[2]因其特殊的结构而具有调节血管形成的作用, 我们将探讨结直肠癌趋化因子IL-8的表达与血管形成的关系及其对结直肠癌肿瘤生物学行为的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 40例患者平均年龄 56 ± 12 岁(35-70), 男27例, 女13例, 直肠癌24例, 结肠癌16例, 其中淋巴结或远处转移者有22例. 高分化腺癌19例、中分化腺癌15例、低分化腺癌6例. IL-8 RT-PCR检测试剂及免疫组化抗体, 免疫组化试剂盒均购自福州迈新公司. 抗CD34抗体用于检测血管密度, 购自福州迈新公司, 抗VEGF抗体购自北京中山公司。

1.2 方法 术中取新鲜结直肠癌组织标本, 共40例, 置-80℃液氮中保存, 待RT-PCR检测及IL-8的免疫组织化学检测, 收集相应的正常组织为对照组。

RT-PCR按常规方法进行检测, PCR反应条件为: 先90℃变性5 min, 后设置95℃变性1 min, 60℃退火

及引物延伸2.5 min, 循环35轮. 趋化因子IL-8的引物序列:5' primer:5' -ATG ACT TCC AAG CTG GCC GTG GCT-3';3' primer:5' -TCT CAG CCC TCT TCA AAA ACT TCTC-3';IL-8相对分子质量 M_r 289.

1.2.1 免疫组织化学检测 将新鲜保存的40例结直肠癌组织标本及其正常组织行冰冻切片, 切片厚度约6 μm , 置-80℃冰箱中待用. 采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶免疫组化染色超敏试剂盒检测IL-8的表达情况. CD34及VEGF的免疫组织化学检测:将冰冻切片后的结直肠癌组织用40 g/L甲醛固定后, 石蜡包埋并切片, 厚约3 mm. 采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶免疫组化方法检测CD34及VEGF的表达情况.

1.2.2 检测结果计数 将所照的结直肠癌组织RT-PCR结果电泳条带扫描输入计算机系统, 进行条带密度扫描并数字化.

1.2.3 IL-8免疫组化染色结果的判定 光学显微镜下, 根据染色反应的强度, 按其阳性细胞的数量及染色深度分别记为0-3分, 并根据这两项指标的积分为四种, 即阴性为0分;阳性(+)为2分, 阳性(++)为3-4分, 强阳性(+++)为5-6分. 其中阳性细胞数<50%为1分, 50-80%为2分, >80%为3分, 染色深度以多数细胞的呈色反应为准. 二者都为细胞质着色, 为便于统计按肿瘤细胞着色强度及阳性细胞分布范围分为二个等级;以10-30%细胞呈弱、中等强度阳性反应为标准, 分为阴性和阳性.

1.2.4 微血管密度计数 切片在100倍光镜下挑选微血管分布最高区, 在200倍视野下计数5个视野中被CD34染成棕色的血管数目, 取其平均值作为微血管密度(MVD), 每一与邻近的微血管明显分离的阳性染色的血管内皮细胞或血管内皮细胞簇都视为独立的微血管^[3]

统计学处理 统计分析采用SPSS10.0软件. 对MVD的比较用两组独立标本的 t 检验, 对mRNA与MVD之间的关系用Spearman's s 检验.

2 结果

2.1 结直肠癌组织标本中趋化因子IL-8mRNA的表达 从已收集的40例标本中选18例进行三种趋化因子的RT-PCR反应, 另取想对应的正常结直肠组织4例, 结肠癌肝转移组织1例, 炎性肉芽肿1例作对照. 18例标本中均有IL-8 mRNA的表达. 可以看出IL-8 mRNA的相对分子质量与预期的(289)一致(图1).

2.2 结直肠癌组织标本中趋化因子IL-8蛋白的表达 40例结直肠癌组织中, IL-8表达的阳性率为20%(20/40). 在阳性表达的组织中, 着色部位多数位于肿瘤细胞质中, 部分位于核周, 着色由浅至深分布不均. 在一些浸润的免疫细胞, 血管内皮细胞也出现IL-8蛋白的表达. 结直肠正常黏膜组织IL-8的表达多数集中绒毛表面且多数呈弱阳性表达.

2.3 结直肠癌组织血管内皮生长因子(VEGF)的表达 VEGF均为胞质着色, 表达产物多定位于结直肠癌肿瘤细胞胞质内, 部分微血管内皮细胞亦有弱阳性表达, 结直肠正常黏膜仅弱阳性表达, 按前述计数方法, VEGF表达的

阳性率为57.5%(23/40).

2.4 结直肠癌组织血管密度(MVD)的分布 结直肠癌组织总的血管密度为 34.90 ± 5.98 /高倍视野, 新生血管多位于肿瘤组织内的间质中或肿瘤组织边缘.

2.5 趋化因子IL-8表达与肿瘤MVD的关系 IL-8的表达与结直肠癌肿瘤MVD密切相关, IL-8表达强者, 其肿瘤血管密度高. ($t = 2.44$, $P = 0.02$, $r = 0.367$. 阳性: 37.72 ± 6.71 ;阴性: 32.88 ± 5.81)

2.6 结直肠癌趋化因子IL-8 mRNA表达与肿瘤MVD的关系 Spearman's s 检验表明:12例结直肠癌组织的IL-8 mRNA的表达与其相对应的肿瘤组织MVD密切相关($r = 0.839$, $P = 0.001$).

2.7 结直肠癌组织VEGF表达与肿瘤MVD的关系 结直肠癌组织VEGF表达阳性及阴性的血管密度分别为 37.657 ± 6.610 /高倍视野、 32.106 ± 5.414 /高倍视野, 经 t 检验, VEGF的表达与肿瘤MVD密切相关($t = 4.124$, $P = 0.00$, $r = 0.556$), 表明VEGF阳性者, 其肿瘤组织血管密度高.

2.8 结直肠癌肿瘤MVD的形成与结直肠癌转移的关系 发生转移的结直肠癌其平均MVD为 38.241 ± 7.119 /高倍视野, 未发生转移的平均MVD为 31.700 ± 3.785 /高倍视野($t = 3.508$, $P = 0.001$, $r = 0.495$). 表明结直肠癌MVD的形成与结直肠癌的转移密切相关, MVD高者, 其转移发生率增高.

3 讨论

趋化因子IL-8在结直肠癌的肿瘤血管形成中起重要的作用. IL-8的表达与结直肠癌的肿瘤MVD呈正相关, 即IL-8可

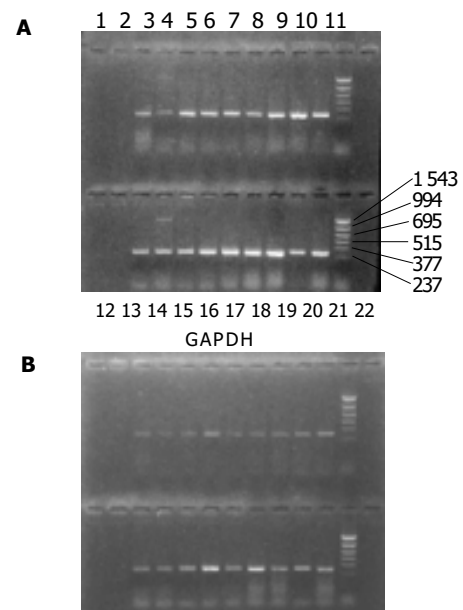


图1 结直肠癌肿瘤组织中IL-8 mRNA的表达. A: 结直肠癌肿瘤组织及正常黏膜组织IL-8 mRNA的表达; 1、2、12、13: 正常结直肠组织, 14:炎性肉芽肿, 3: 结肠癌肝转移组织, 4: 直肠息肉.5-11, 15-22: 结直肠癌肿瘤组织; B: 磷酸甘油醛脱氢酶的表达, RT-PCR方法阳性对照.

促进肿瘤血管的形成. IL-8 属于趋化因子的 CXC 家族, 其蛋白分子质量为 8 ku, 并且在结构上具有 ELR 基序, 即含有一个由谷氨酸-亮氨酸-精氨酸组成的氨基酸序列, 决定了 IL-8 具有调节血管形成的作用, 即 IL-8 能够趋化血管内皮细胞, 有促进血管形成的作用. 而像 IP-10, PF4 等 CXC 趋化因子因不含有 ELR 这个基序, 则有抑制血管形成的作用^[2]. 因此, 正是 CXC 趋化因子这种结构上的不同, 才使具有调节血管形成的作用. 当这些趋化因子在局部表达失衡时, 其在各种病理 (包括肿瘤) 或生理状态下则起重要的作用. 如在卵巢肿瘤^[4]、前列腺癌^[5]、胃癌^[6]等肿瘤的研究中均发现肿瘤组织的血管形成与 IL-8 表达的升高有关. 而在肺癌的另一项研究中则发现 IP-10 能抑制肿瘤血管生成从而抑制肺癌的生长与转移^[7].

VEGF 是一种 34-42 ku 的蛋白, 能增加微血管的通透性, 刺激内皮细胞分裂, 增加组织因子和某些蛋白酶的生成, 他刺激血浆蛋白如纤维蛋白的渗出, 并在细胞外基质沉积, 成为肿瘤基质和新生的毛细血管网络基础^[8], 是某些实体瘤的重要血管生成因子. 本研究显示结直肠癌组织能表达 VEGF, 且 VEGF 的表达与肿瘤 MVD 密切相关 ($t = 4.124, P = 0.00$), 表明 VEGF 的表达能促进结直肠癌的血管形成, 从而促进了结直肠癌的生长、转移. 在黑色素瘤^[9]、头颈部磷癌^[10]等的研究中也得出同样的结论.

虽然 IL-8 与 VEGF 同为血管调节因子, 对结直肠癌的血管形成均起作用, 但他们的调节机制并不一定相同. IL-8 除了调节血管形成之外, 他还具有免疫调节作用, 能够影响肿瘤的微环境. 在卵巢肿瘤的研究中, 人们发现 IL-8 对血管的调节作用比 VEGF 更大^[4], 总之, 调节血管形成的因子众多, 各个因子在其中的具体作用仍需进一步研究.

血管形成在肿瘤生长转移中起重要的作用, 因此抗血管形成就成为抗肿瘤治疗中的一个重要环节. 而趋化因子

IL-8 的这种与肿瘤血管形成的关系就有可能成为抗肿瘤治疗的靶点之一, 具有重要的临床意义.

4 参考文献

- Garcea G, Lloyd TD, Gescher A, Dennison AR, Steward WP, Berry DP. Angiogenesis of gastrointestinal tumours and their metastases--a target for intervention? *Eur J Cancer* 2004;40:1302-1313
- Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, Strieter RM. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol* 2000;68:1-8
- Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M, Belien JA, de Waal RM, Van Marck E, Magnani E, Weidner N, Harris AL, Dirix LY. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer* 2002;38:1564-1579
- Kassim SK, El-Salahy EM, Fayed ST, Helal SA, Helal T, Azzam Eel-D, Khalifa A. Vascular endothelial growth factor and interleukin-8 are associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients. *Clin Biochem* 2004;37:363-369
- Kim SJ, Uehara H, Karashima T, Mccarty M, Shih N, Fidler IJ. Expression of interleukin-8 correlates with angiogenesis, tumorigenicity, and metastasis of human prostate cancer cells implanted orthotopically in nude mice. *Neoplasia* 2001;3:33-42
- Kitadai Y, Takahashi Y, Haruma K, Naka K, Sumii K, Yokozaki H, Yasui W, Mukaida N, Ohmoto Y, Kajiyama G, Fidler IJ, Tahara E. Transfection of interleukin-8 increases angiogenesis and tumorigenesis of human gastric carcinoma cells in nude mice. *Br J Cancer* 1999;81:647-653
- Arenberg DA, White ES, Burdick MD, Strom SR, Strieter RM. Improved survival in tumor-bearing SCID mice treated with interferon-gamma-inducible protein 10 (IP-10/CXCL10). *Cancer Immunol Immunother* 2001;50:533-538
- Scavelli C, Vacca A, Di Pietro G, Dammacco F, Ribatti D. Crosstalk between angiogenesis and lymphangiogenesis in tumor progression. *Leukemia* 2004;18:1054-1058
- Rofstad EK, Halsor EF. Vascular endothelial growth factor, interleukin 8, platelet-derived endothelial cell growth factor, and basic fibroblast growth factor promote angiogenesis and metastasis in human melanoma xenografts. *Cancer Res* 2000;60:4932-4938
- Eisma RJ, Spiro JD, Kreutzer DL. Role of angiogenic factors: coexpression of interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in patients with head and neck squamous carcinoma. *Laryngoscope* 1999;109:687-693

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第十届全国肝癌学术会议征文通知

本刊讯 为交流各地肝癌临床和基础研究进展, 进一步提高肝癌的诊疗水平, 中国抗癌协会专业委员会将于 2005-09-21/2005-09-23 在江西省南昌市举办第十届全国肝癌学术会议, 现将征文范围及要求公布如下:

1 征文范围及要求

肝癌相关的病因、流行病学、基础及临床研究论文, 不接纳已发表的论文和综述. 征文应包括全文及 500 字以内的论文摘要 (包括目的、方法、结果、结论), 并加盖负责单位认可的公章.

2 论文寄送地址

上海市医学院路 136 号, 复旦大学肝癌研究所 任正刚 收, 邮编: 200032. 欢迎通过 E-mail 投稿, E-mail: renzg@zshospital.com 或 zgren@zshospital.net.