

· 短篇论著 ·

IL-8 及其受体在原发性肝癌中的表达及其意义

王吉荣 武传星

【摘要】 目的 探讨 IL-8 及受体在肝癌组织中的表达及其临床意义。**方法** ELISA 检测血清中 IL-8 表达水平, RT-PCR 检测 IL-8 mRNA 及受体 CXCR1、CXCR2 mRNA 的表达水平, 免疫组化检测 IL-8 在肝癌组织中的表达。**结果** 肝癌患者血清 IL-8 表达明显高于良性肿瘤患者($P < 0.05$)。RT-PCR 肝癌组织中 IL-8 mRNA 及其受体 CXCR1、CXCR2 mRNA 的表达明显高于癌旁和正常肝组织($P < 0.05$)。免疫组化肝癌组织及癌旁组织中 IL-8 表达均高于正常肝脏组织, 且肝癌组织中表达明显高于癌旁组织($P < 0.05$)。**结论** IL-8 在肝癌组织中高表达, 在肝癌的发生发展中起重要的作用, 其受体 CXCR1、CXCR2 mRNA 的表达也相应升高, 可作为临床诊断的新指标及其治疗的新靶点。

【关键词】 肝肿瘤; 白细胞介素 8; 免疫组织化学

IL-8 来源于巨噬细胞、成纤维细胞、上皮细胞、内皮细胞、肝细胞等, 其生物活性是吸引和激活中性粒细胞, 促进中性粒细胞趋化、脱落, 释放溶酶体, 加强炎症保护、促进 T 细胞趋化游走, 加强免疫反应^[1]。越来越多的实验证明, IL-8 及其受体在肿瘤的发生、发展中具有一定的影响和作用^[1-2]。本文拟对 IL-8 及其配体与肝癌的关系作一初步探讨。

一、资料与方法

1. 一般资料: 32 例均为 2008 年 3 月至 2011 年 12 月本院住院患者, 9 例为肝良性肿瘤患者(无肝炎肝硬化等肝病基础), 其余经化验、超声、CT 确诊, 行肝切除术后病理提示为肝细胞性肝癌。男 15 例, 女 8 例, 年龄 32~78 岁, 平均年龄为 56.7 岁。全部病例均有不同程度的肝病, 术前均未接受包括经肝动脉栓塞化疗在内的任何其他治疗。

2. 标本来源: 取肿瘤及癌旁约 1 cm 外的肝组织, 避开坏死区, 标本置于液氮中保存, 再置于 -70 °C 冰箱备用。部分用甲醛固定, 石蜡包埋, 待免疫组化染色。全血于术前抽取 6 ml, 然后在 4 °C 下, 离心半径为 16 cm, 3600 r/min 离心 10 min, 收集血清, 并置于 -80 °C 保存、备用。

3. 主要实验试剂及仪器: Trizol 试剂购于 Invitrogen 公司; 实时聚合酶链反应(PCR)试剂盒购于 TaKaPa 公司, IL-8 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自美国 R&D 公司。生化检测仪购自 Olympus 公司, ABI prism 7300 实时 PCR 仪购自 Applied biosystem 公司。Anti-IL-8 兔抗人多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。

4. 血清 IL-8 水平的测定: 采用双抗体夹心 ELISA 法, 取 -80 °C 保存的血清, 自然解冻后进行检测, 检测步骤严格按照说明书进行; 组织中 IL-8 mRNA 及其受体 CXCR1、CXCR2 mRNA 表达检测: 采用 RT-PCR 法, IL-8、CXCR1、CXCR2 和 GAPDH 引物由上海英俊生物有限公司合成。IL-8 上游引物为: 5'-AGAGTGGACCACACTGCGC-3', 下游引物为: 5'-ACATCCCAACGGTC-TACGTTA-3'; CXCR1 上游引物为: 5'-AGAGGGAATGTAATGGTGC-3', 下游引物为: 5'-AGCAATAGTGGGAAGTGGGT-3'; CXCR2 上游引物为: 5'-CATCTCGTTCTCGGTTTATCAG-3', 下游引物为:

5'-ATTCCCAAAGACCCACTCAT-3'; GAPDH 上游引物为: 5'-GAAGATGGTGATGGGATTT-3', 下游引物为: 5'-CAAGCTTC-CCGTTCTCAGCC-3'。采用 Trizol 试剂提取总 RNA, 并检测 RNA 的纯度和浓度。取 RNA 2 μl, 按照实时 PCR 试剂盒进行反转录反应获得 cDNA, 并置于 -20 °C 保存、备用。检测 IL-8 mRNA 其受体 CXCR1、CXCR2 mRNA 表达的反应体系共 20 μl, 其中 DNA 染料 SYBR Green premix Ex Taq™ II (2 ×) 10 μl, 引物各 0.6 μl, cDNA 2 μl 以及 dH₂O 6.8 μl, 并设置 IL-8、CXCR1、CXCR2 和 GAPDH 各三个标准品, 制作标准曲线判断扩增效率是否一致, 并且每个样品设 3 个复空; 免疫组化: ABC 试剂盒分别购自 Vector 公司, 免疫组化操作步骤按试剂盒说明进行, 显微镜下观察染色强度, 以 PBS 代替一抗做阴性对照, 已知阳性切片为阳性对照。

5. 统计学分析: 采用 SPSS 13.0 统计软件处理, 所得结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 进行方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 血清中 IL-8 细胞因子的水平: 原发性肝癌患者血清中 IL-8 的含量明显高于对照组的患者, 两组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图 1)。

2. IL-8 在肝癌组织中的表达: 免疫组化检测 IL-8 在肝癌组织中的表达, 32 例标本中 23 例肝癌患者癌组织中的表达明显高于癌旁组织。9 例对照组 IL-8 表达基本为阴性($P < 0.05$, 图 2)。

3. IL-8 mRNA 及其配体 CXCR1、CXCR2 mRNA 基因的表达: 原发性肝癌患者癌及癌旁组织中的 IL-8 mRNA 及其配体 CXCR1、CXCR2 mRNA 的相对表达量高于正常对照组, 组间比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 原发性肝癌患者癌组织 IL-8 mRNA 及其配体 CXCR1、CXCR2 mRNA 的相对表达量高于原发性肝癌患者癌旁组织, 两组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图 3)。

三、讨论

IL-8 主要由巨噬细胞、成纤维细胞、上皮细胞、肥大细胞等分泌, 是一个具有多功能、多细胞来源的趋化性细胞因子, 对中性粒细胞、T 淋巴细胞、嗜碱粒细胞具有趋化作用, 在炎症、自身免疫性疾病、移植排斥反应中发挥重要作用, IL-8 又和肿瘤的发生有关, 可刺激肿瘤细胞增殖, 诱导肿瘤细胞移动, 并且作为肿瘤血管发生因子, 加速新生血管的形成, 进而促进肿瘤的发生和转移^[3-5]。

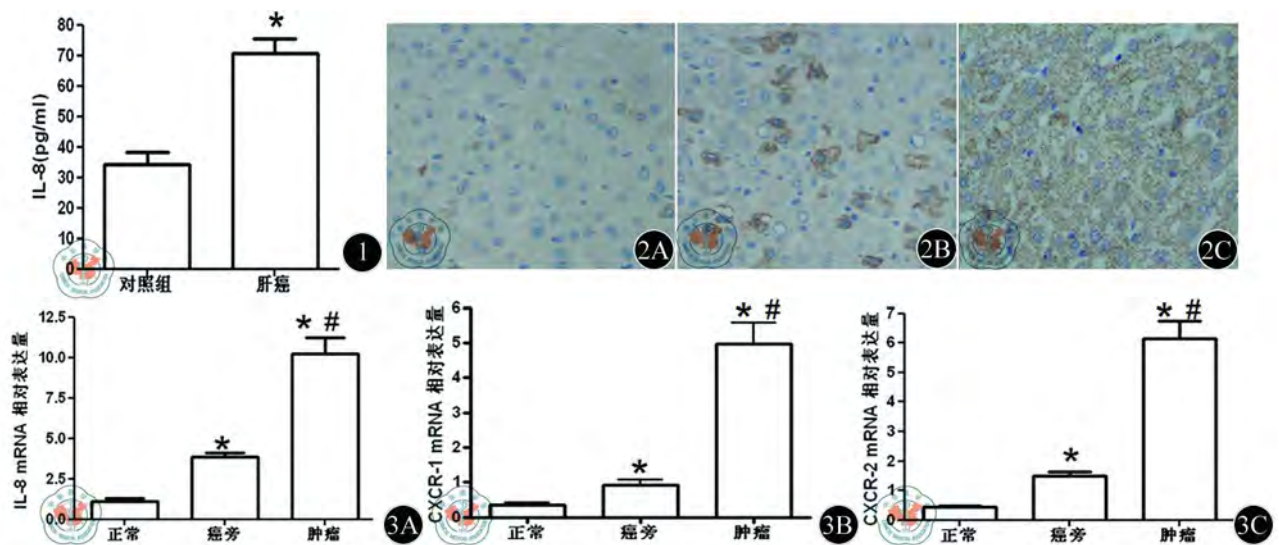


图1 血清中IL-8细胞因子的含量。与正常对照组比较, * $P < 0.05$ 图2 IL-8免疫组化($\times 400$)。2A: 正常; 2B: 癌旁; 2C: 肿瘤。 图3 各组IL-8, CXCR1, CXCR2 mRNA的相对表达量。与正常组比较, * $P < 0.05$, 与癌旁组比较, # $P < 0.05$

本研究显示,原发性肝癌患者血清IL-8水平明显升高,表明IL-8在肝癌的发生、发展过程中参与并起了一定作用。并且免疫组化检查结果也表明,IL-8在肝癌组织中高表达,癌组织中的表达明显高于癌旁组织及良性肿瘤对照组患者。以上结果均表明IL-8参与了肝癌的病理生理过程。IL-8受体属于具有7段跨膜区的G蛋白偶联受体(CPCR)家族,IL-8与其结合后发挥生物活性,目前已知至少有两种:I型受体(CXCR1)和II型受体(CXCR2)。IL-8促进中性粒细胞聚集脱颗粒发挥其生物学活性。在肿瘤细胞、上皮细胞、活化的中性粒细胞、肿瘤相关巨噬细胞中IL-8及其受体高表达,暗示IL-8在肿瘤微环境中发挥一定的调节作用。IL-8和粒细胞趋化蛋白-2复合体激活CXCR1,而CXCR2可由相关的生长癌基因、中性粒细胞激活活、粒细胞趋化蛋白-2等物质激活^[1,6],然后IL-8发挥致肿瘤生长,血管发生等生物学活性的作用。为了进一步研究原发性肝癌患者癌组织中IL-8水平升高是否也伴有CXCR1、CXCR2水平的变化,本研究通过实时PCR检测各组肝组织中IL-8、CXCR1、CXCR2 mRNA的表达,结果表明原发性肝癌患者肝癌组织中IL-8、CXCR1、CXCR2 mRNA的表达较相应的癌旁组织、对照组表达明显升高,推测IL-8及其受体CXCR1、CXCR2参与了肝癌的病理生理过程。

IL-8可激活可上游信号通路:(1)影响转录因子表达;(2)通过蛋白翻译在蛋白组学中调节细胞转录;(3)通过蛋白翻译后修饰调节细胞结构的变化。在其对下游的信号通路作用中IL-8促进内皮细胞的血管生成,促进肿瘤细胞、内皮细胞增殖生长和迁移^[1]。IL-8的这些信号通路又与各细胞因子有着密切的关系,其在肿瘤中的作用也已初步明确^[5,7]。IL-8具有促进肿瘤生长、肿瘤转移、血管生成的作用。药物和其他因素激活的IL-8大量分泌对肿瘤化疗有一定的抑制效应。本组对肝癌患者癌组织及其外周血标本进行分析,结果显示肿瘤组织内IL-8显著高于癌旁组织,血清中细胞因子也相应升高。

有研究结果显示IL-8的致瘤、促血管生成作用表现在可诱导促炎症细胞因子、趋化因子、基质金属蛋白酶表达和急性期反应蛋白的产生,引起组织细胞浸润和组织破坏^[1,3,6]。因此推测通过干预IL-8在肿瘤细胞中的表达是一个前景广阔的治疗方

法。IL-8参与多种肝脏疾病的发生发展,如病毒性肝炎,酒精性肝病,肝脏肿瘤,移植排斥反应等^[8-11]。肝脏免疫微环境的特殊性,IL-8炎症细胞因子与肝脏免疫活性细胞之间的相互关系及其在肝脏免疫中的作用值得进一步深入探讨,同时IL-8在肝癌中的作用机制也值得深入研究。

参考文献

- [1] Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*, 2008, 14: 6735-6741.
- [2] Zhang Y, Wang L, Zhang M, et al. Potential mechanism of interleukin-8 production from lung cancer cells: an involvement of EGF-EGFR-PI3K-Akt-Erk pathway. *J Cell Physiol*, 2012, 227: 35-43.
- [3] Ren Y, Poon RT, Tsui HT, et al. Interleukin-8 serum levels in patients with hepatocellular carcinoma: correlations with clinicopathological features and prognosis. *Clin Cancer Res*, 2003, 9: 5996-6001.
- [4] Chen JJ, Yao PL, Yuan A, et al. Up-regulation of tumor interleukin-8 expression by infiltrating macrophages: its correlation with tumor angiogenesis and patient survival in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2003, 9: 729-737.
- [5] Alexandrakis MG, Coulocheri SA, Bouros D, et al. Evaluation of inflammatory cytokines in malignant and benign pleural effusions. *Oncol Rep*, 2000, 7: 1327-1332.
- [6] Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro Oncol*, 2005, 7: 122-133.
- [7] Tachibana Y, Nakamoto Y, Mukaida N, et al. Intrahepatic interleukin-8 production during disease progression of chronic hepatitis C. *Cancer Lett*, 2007, 251: 36-42.
- [8] McClain CJ, Barve S, Deaciuc I, et al. Cytokines in alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis*, 1999, 19: 205-219.
- [9] Mirodzhov GK, Odinaev RI, Sattarova MI. Cytokines in chronic hepatitis C. *Klin Med (Mosk)*, 2009, 87: 13-17.
- [10] Zhou L, Liu J, Luo F. Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 2006, 12: 1175-1181.
- [11] Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, et al. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology*, 2000, 32: 169-173.

(收稿日期:2012-07-27)

(本文编辑:马超)