

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.02.019

## IL-17 在原发性肝癌组织中的表达及其临床意义

王平, 武传星<sup>△</sup>, 吕凌, 张峰(南京医科大学第一附属医院 肝移植中心, 卫生部活体肝移植重点实验室, 江苏南京 210029)

[摘要] 目的: 探讨 IL-17 在原发性肝癌组织中的表达及其临床意义。方法: 23 例原发性肝癌患者、9 例肝良性肿瘤患者均为本院 2009 年 3 月至 2010 年 12 月的住院患者, 采集手术切除肝癌组织、相应癌旁组织以及良性肿瘤组织标本。ELISA 检测患者血清中 IL-17 表达水平, real-time PCR 检测组织中 IL-17、ROR- $\gamma$ t mRNA 的表达水平, 免疫组化检测 IL-17 蛋白在肝癌组织中的表达。结果: 肝癌患者血清 IL-17 表达水平明显高于良性肿瘤对照组。Real-time PCR 检测结果显示, 肝癌组织中 IL-17、ROR- $\gamma$ t mRNA 的表达明显高于癌旁和正常肝组织( $P < 0.05$ )。免疫组化结果显示, 肝癌组织及癌旁组织中 IL-17 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。结论: IL-17 在肝癌组织中高表达, 有可能作为肝癌诊断及治疗的新靶点。

[关键词] IL-17; 肝癌; 免疫组织化学

[中图分类号] R735.7; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)02-0216-04

## Expression and clinical significance of IL-17 in primary human hepatocellular carcinoma tissues

WANG Ping, WU Chuan-xing<sup>△</sup>, LV Ling, ZHANG Feng (Liver Transplantation Center, Key Laboratory of Living Donor Liver Transplantation of the Health Ministry, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University; Nanjing 210029, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression and clinical significance of IL-17 in primary human hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods:** In the present study 23 primary HCC patients and 9 benign liver tumor patients were collected from the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, with the tumor tissues and paracancerous tissues obtained by surgery. The serum IL-17 level was measured by ELISA, the expression of IL-17, ROR- $\gamma$ t mRNA in HCC tissues were detected by real-time PCR, and the protein expression of IL-17 in HCC tissues was examined by immunohistochemistry method. **Results:** The serum IL-17 level was greatly higher in HCC patients compared with that in benign liver tumor patients. Real-time PCR results showed that the expression levels of IL-17, ROR- $\gamma$ t mRNA were significantly higher in cancer tissues than in the peritumoral and normal liver tissues ( $P < 0.05$ ). Immunohistochemistry results showed that the expression of IL-17 protein was greatly higher in the cancer and peritumoral tissues than that in the normal liver tissues, and that in the cancer tissues was higher than that in the peritumoral tissues. **Conclusion:** IL-17 is highly expressed in HCC tissues, which may provide a new target in the diagnosis and therapy of HCC.

[Key words] IL-17; hepatocellular carcinoma (HCC); immunohistochemistry

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(2): 216-219]

[基金项目] 江苏省兴卫工程医学领军人才项目(No. 135-43)。Project supported by the Leading Medical Talent Foundation from Xinwei Project of Jiangsu Province (No. 135-43)

[作者简介] 王平(1966-),男,江苏省南京市人,博士生,主要从事肝脏肿瘤分子生物学方面的研究。E-mail: wuwpzhy@163.com; 武传星(1980-),男,山东省临沂市人,硕士,主治医师,主要从事肝胆肿瘤和肝移植免疫方面的研究。E-mail: doc\_zf@163.com, <sup>△</sup>并列第一作者。

[通信作者] 张峰(ZHANG Feng, corresponding author), E-mail: zhangf@njmu.edu.cn

IL-17 是一种主要由活化的 CD4<sup>+</sup>T 细胞分泌的炎症细胞因子,这类细胞又命名为 Th17 细胞<sup>[1-2]</sup>。越来越多的研究证明,IL-17 在肿瘤的发生、发展中具有一定的影响和作用<sup>[3]</sup>。原发性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,死亡率高,预后差。本实验拟对 IL-17 与肝癌的关系作一初步探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 病例资料

32 例均为 2009 年 3 月至 2010 年 12 月本院住院患者,其中 9 例为肝良性肿瘤患者,23 例经化验、B 超、CT 确诊为肝癌患者,且为肝切除后病理所证实。肝癌患者中男性 15 例,女性 8 例,年龄 32 岁 ~ 78 岁,平均为 (56.7 ± 3) 岁。全部病例均患有不同程度的肝病,术前均未接受包括经肝动脉栓塞化疗在内的其他治疗。

### 1.2 标本收集

新鲜肝癌组织取自术后肿瘤及癌旁 1 cm 外肝组织,避开坏死区,标本置于液氮中保存,再置于 -70 °C 冰箱备用。部分标本用 10% 甲醛固定,石蜡包埋,待免疫组化染色。患者全血标本于术前抽取 6 ml,然后在 4 °C 3 600 × g 离心 10 min,收集血清,并置于 -80 °C 保存。

### 1.3 主要实验试剂及仪器

TRIzol 试剂购于 Invitrogen 公司, Anti-IL-17( H-132 ) 兔抗人多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。实时聚合酶链反应( real-time PCR ) 试剂盒购于 TaKaRa 公司, 白细胞介素( IL-17 ) 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 real-time PCR 仪购自 Applied Biosystem 公司。

### 1.4 ELISA 检测血清中 IL-17 表达水平

取 -80 °C 保存的血清自然解冻,采用双抗体夹心 ELISA 法检测血清细胞因子 IL-17 水平,检测步骤严格按照说明书进行。

### 1.5 Real-time PCR 检测 IL-17 和 ROR- $\gamma$ t mRNA 的表达水平

IL-17、ROR- $\gamma$ t 和 GAPDH 引物由上海英俊生物有限公司合成。IL-17 上游引物为 5'-CTCCAGAAG-GCCCTCAGACTAC-3', 下游引物为 5'-GGTC-CAGCTTTCCCTCCGCATTG-3'; ROR- $\gamma$ t 上游引物为 5'-CCGCTGAGAGGGCTTCAC-3', 下游引物为 5'-TGCAGGAGTAGGCCACATTACA-3'; GAPDH 上游引物为 5'-TGTGTCCGTGGATCTGA-3', 下游引物为 5'-CCTGCTTACCACCTTCTTGA-3'。采用 TRIzol

试剂提取总 RNA,并检测 RNA 的纯度和浓度。取 RNA 2  $\mu$ l,按照 real-time PCR 试剂盒进行逆转录反应获得 cDNA,并置于 -20 °C 保存、备用。检测 IL-17、ROR- $\gamma$ t mRNA 表达的反应体系共 20  $\mu$ l,其中 DNA 染料 SYBR Green Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II ( 2 × ) 10  $\mu$ l、引物各 0.6  $\mu$ l、cDNA 2  $\mu$ l 以及 dH<sub>2</sub>O 6.8  $\mu$ l,并设置 IL-17、ROR- $\gamma$ t 和 GAPDH 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 个复孔。实验结果按照 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 方法来分析,  $\Delta\Delta$ Ct =  $\Delta$ Ct( IL-17 ) -  $\Delta$ Ct( GAPDH ), 或  $\Delta\Delta$ Ct =  $\Delta$ Ct( ROR- $\gamma$ t ) -  $\Delta$ Ct( GAPDH )。

### 1.6 免疫组化检测 IL-17 蛋白在肝癌组织中的表达

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。

### 1.7 统计学处理

采用 SPSS 统计软件( 13.0 版 ) 处理,所得数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,进行方差分析,  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肝癌患者外周血清中 IL-17 的水平

原发性肝癌患者血清中 IL-17 [ ( 7.01 ± 0.51 ) pg/ml ] 明显高于良性肿瘤患者 [ ( 3.38 ± 0.37 ) pg/ml ], 两组的差异有统计学意义 (  $P < 0.05$  )。

### 2.2 IL-17 蛋白在肝癌组织中的表达

免疫组化法检测 IL-17 蛋白在肝癌组织中的表达,23 例肝癌患者癌组织标本的表达明显高于癌旁组织,9 例良性肿瘤患者肝组织 IL-17 表达基本为阴性( 图 1 )。



图 1 肝癌组织中 IL-17 的表达( ×200 )

Fig. 1 Expression of IL-17 on liver cancer tissues( ×200 )  
A: Normal tissues; B: Adjacent tissues; C: Liver cancer tissues

### 2.3 肝癌组织中 IL-17、ROR- $\gamma$ t mRNA 的表达

Real-time PCR 检测结果显示,原发性肝癌患者癌及癌旁组织中的 IL-17、ROR- $\gamma$ t mRNA 的相对表达量高于良性肿瘤组,两组的差异有统计学意义

( $P < 0.05$ );原发性肝癌患者癌组织中 IL-17、ROR- $\gamma$ t mRNA 的相对表达量高于原发性肝癌患者癌旁组织,两组的差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图2)。

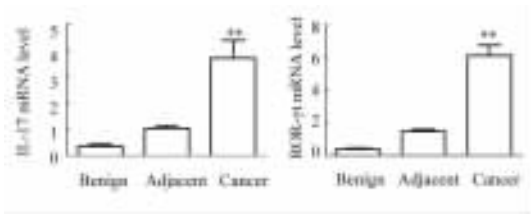


图2 肝癌组织中 IL-17、ROR- $\gamma$ t mRNA 的表达

Fig. 2 Expressions of IL-17 and ROR- $\gamma$ t mRNA on liver cancer tissues

\*\*  $P < 0.01$  vs benign tumor tissues or cancer adjacent tissues

### 3 讨论

IL-17 主要由 CD4<sup>+</sup>T 细胞分泌,这类细胞命名为 Th17 细胞<sup>[4]</sup>。Th7 是近年来发现的一种新型 CD4<sup>+</sup>T 辅助细胞,它不同于以往的 Th1 和 Th2 细胞。Th17 细胞主要通过分泌 IL-17 参与炎症、自身免疫性疾病、肿瘤、移植排斥反应的病理过程<sup>[1,5]</sup>。

NF- $\kappa$ B、STAT3 信号通路及 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\gamma$  等重要的细胞因子参与肝癌相关病理过程,被认为是肝癌治疗的新靶点<sup>[6-9]</sup>。IL-17 与这些信号通路关系密切,与细胞因子有着密切的关系,其在肿瘤中的作用已初步明确<sup>[10]</sup>。动物模型中,IL-17 虽然出现抗肿瘤与促肿瘤两种看似矛盾的结果,但大多研究<sup>[11-14]</sup>显示,其在肿瘤早期具有抗肿瘤作用,后期随着细胞分泌量的增多与肿瘤的恶性程度呈正相关。从相关研究<sup>[11-14]</sup>来看,其抗肿瘤作用胜于促肿瘤作用,具体机制正成为研究的热点。原发性肝癌为最常见的肿瘤之一,预后很差,肿瘤环境影响其转归。本研究对 HCC 患者的组织及其外周血标本进行分析,结果显示肿瘤组织内 IL-17 显著高于癌旁组织,细胞因子也相应升高。另外研究结果推测其可能与肝癌的转移有一定相关性,其机制尚待进一步研究。

本研究显示,原发性肝癌患者血清细胞因子 IL-17 水平明显升高,表明 IL-17 参与肝癌的发生、发展过程并起了一定作用。免疫组化检测结果也表明,IL-17 在肝癌组织中高表达,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-17 参与了肝癌的病理过程。

新型转录因子维甲酸受体相关孤儿受体  $\gamma$  的

胸腺异构体(ROR- $\gamma$ t)是 Th17 细胞的特征性转录因子,可诱导编码 Th17 细胞基因的表达,是 Th0 细胞向 Th17 细胞分化的可靠依据<sup>[15-16]</sup>。为了进一步研究原发性肝癌患者血清及癌组织中 IL-17 水平升高与 Th17 细胞关系,本研究通过 real-time PCR 检测各组肝组织中 IL-17、ROR- $\gamma$ t mRNA 的表达。结果表明原发性肝癌患者肝癌组织中 IL-17、ROR- $\gamma$ t mRNA 的表达较相应的癌旁组织及对照组肝组织明显升高,证实了 IL-17 在基因水平也参与了肝癌的病理过程。

有研究结果显示,IL-17 的促炎症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<sup>[5]</sup>。IL-17 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、抑制排斥反应等<sup>[17-20]</sup>。肝脏免疫微环境的特殊性、IL-17 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癌发生和发展中的作用值得进一步深入探讨,同时 IL-17 的作用机制也值得深入研究。

### [参考文献]

- [1] Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, et al. Th17: An effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties [J]. *Immunity*, 2006, 24(6): 677-688.
- [2] Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation [J]. *Immunity*, 2008, 28(4): 454-467.
- [3] Zhang JP, Yan J, Xu J, et al. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients [J]. *J Hepatol*, 2009, 50(5): 980-989.
- [4] Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity [J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(4): 345-350.
- [5] Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation [J]. *Immunity*, 2004, 21(4): 467-476.
- [6] Grivennikov SI, Karin M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF- $\kappa$ B collaboration and crosstalk in cancer [J]. *Cytokine Growth Factor*, 2011, 21(1): 11-19.
- [7] Bai L, Mao GP, Cao CP. Effects of inflammatory cytokines on the recurrence of liver cancer after an apparently curative operation [J]. *J Dig Dis*, 2007, 8(3): 154-159.
- [8] Jakobs TC, Mentrup B, Schmutzler C, et al. Proinflammatory cytokines inhibit the expression and function of human type I 5'-deiodinase in HepG2 hepatocarcinoma cells [J]. *Eur J Endocrinol*, 2002, 146(4): 559-566.
- [9] Schell SR, Wessels FJ, Abouhamze A, et al. Pro- and anti-inflammatory cytokine production after radiofrequency ablation of unresectable hepatic tumors [J]. *J Am Coll Surg*, 2002, 195(6): 774-781.

[ 10 ] Ye ZJ, Zhou Q, Gu YY, et al. Generation and differentiation of IL-17-producing CD4<sup>+</sup> T cells in malignant pleural effusion [ J ]. J Immunol, 2008, 185( 10 ): 6348-6354.

[ 11 ] Ma Y, Aymeric L, Locher C, et al. Contribution of IL-17-producing  $\gamma\delta$ T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy [ J ]. J Exp Med, 2007, 11( 3 ): 151-155.

[ 12 ] Ma C, Dong X. Colorectal cancer-derived Foxp3<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> T cells suppress tumor specific CD8<sup>+</sup> T cells [ J ]. Scand J Immunol, 2004, 122( 3 ): 254-259.

[ 13 ] Takeuchi A, Dejima T, Yamada H, et al. IL-17 production by gammadelta T cells is important for the antitumor effect of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin treatment against bladder cancer [ J ]. Eur J Immuno, 2001, 41( 1 ): 246-251.

[ 14 ] Wilke CM, Kryczek I, Wei S, et al. Th17 cells in cancer: Help or hindrance [ J ]? Carcinogenesis, 2007, 22( 5 ): 154-159.

[ 15 ] Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells [ J ]. Cell, 2006, 126( 6 ): 1121-1133.

[ 16 ] Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, et al. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma [ J ]. Immunity, 2008, 28( 1 ): 29-39.

[ 17 ] Ye C, Li WY, Zheng MH, et al. T-helper 17 cell: A distinctive cell in liver diseases [ J ]. Hepatol Res, 2004, 18( 5 ): 354-359

[ 18 ] Wang L, Chen S, Xu K. IL-17 expression is correlated with hepatitis B related liver diseases and fibrosis [ J ]. Int J Mol Med, 2008, 27( 3 ): 385-392.

[ 19 ] Hammerich L, Heymann F, Tacke F. Role of IL-17 and Th17 cells in liver diseases [ J ]. Clin Dev Immunol, 2011, 33( 2 ): 345-360.

[ 20 ] Lafdil F, Miller AM, Ki SH, et al. Th17 cells and their associated cytokines in liver diseases [ J ]. Cell Mol Immunol, 2010, 7( 4 ): 250-254.

[ 收稿日期 ] 2010 - 12 - 20 [ 修回日期 ] 2011 - 02 - 30

[ 本文编辑 ] 韩 丹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 正确使用数的修约规则

在生物医学领域的各种研究中,对实验测定和计算所得的数据往往都要进行修约。过去习惯使用“四舍五入法”进行数的修约,该方法是不正确的,我们应将其废除。根据国家标准《出版物上数字用法的规定》,数的修约应遵照“四舍六入”的法则进行,具体介绍如下:

- (1) 数的修约规则的简明口诀: 4 舍 6 入 5 看后, 5 后有数便进 1, 5 后为 0 看左数, 左数奇进偶舍弃。
- (2) 数的修约操作示例见表 1。

表 1 数的修约操作示例

口 诀	示 例	
	已知数	修约数( 设保留 1 位小数 )
4 舍 6 入 5 看后	5.741 8	5.7
	5.761 8	5.8
5 后有数便进 1	5.751 8	5.8
5 后为 0 看左数		
左为奇数要进 1	5.750 0	5.8
左为偶数则舍弃	5.650 0	5.6
	5.050 0	5.0( 0 为偶数 )
无论舍弃多少位	5.745 46	5.7( 不是由 5.7455→
均须一次修完毕		5.746→5.75→5.8 )

( 本刊编辑部 )