论著

文章编号:1000-5404(2011)17-1812-04

IL-17和STAT3在结直肠癌组织中的表达及临床意义

温玉婷[1],刘 伟[1],杨爱军[1],王晨昱[1],李 敏[1,2],王金穗[3] (730000 兰州,兰州大学基础医学院病理学研究所[1];730000 兰州,甘肃省新药临床前研究重点实验室[2];730000 兰州,甘肃省人民医院病理科[3])

[摘要] **目的** 检测IL-17和STAT3在结直肠癌组织中的表达,探讨其与结直肠癌临床病理特征和肿瘤血管生成的关系。**方法** 应用免疫组织化学S-P法检测94例结直肠癌组织和31例正常肠黏膜组织中IL-17、STAT3蛋白的表达,并应用CD34标记微血管计算MVD。**结果** 免疫组化结果显示IL-17主要表达在结直肠癌组织中的肿瘤细胞和肠黏膜固有层淋巴细胞胞浆内,阳性表达率明显高于正常肠黏膜($P<0.01$);IL-17的表达与结直肠癌分化程度和Dukes分期有关($P<0.05$)。STAT3在结直肠癌组织中的表达显著高于其在正常肠黏膜中的表达($P<0.01$),且与肿瘤细胞分化程度、淋巴结转移和Dukes分期有关($P<0.05$)。IL-17和STAT3在结直肠癌组织中的表达与MVD有关($P<0.05$)。Spearman等级相关分析表明IL-17和STAT3在结直肠癌组织中的表达呈正相关($r=0.251$,$P=0.015$)。**结论** IL-17和STAT3在结直肠癌组织中高表达,可能在结直肠癌的血管生成和肿瘤的发生、发展中起重要的作用。

[关键词] 结直肠癌;免疫组织化学;IL-17;STAT3
[中图法分类号] R735.3+5;R735.3+7;R392.3 [文献标志码] A

Expression of IL-17 and STAT3 in colorectal cancer tissue and its clinical significance

Wen Yuting[1], Liu Wei[1], Yang Aijun[1], Wang Chenyu[1], Li Min[1,2], Wang Jinsui[3] ([1]Department of Pathology, Basic Medical College, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu Province, 730000; [2]Key Laboratory of Preclinical Study for New Drugs of Gansu Province, Lanzhou, Gansu Province, 730000; [3]Department of Pathology, Gansu Provincial People's Hospital, Lanzhou, Gansu Province, 730000, China)

[**Abstract**] **Objective** To detect the expression of IL-17 and STAT3 in colorectal cancer (CRC) tissue and explore their relation with its clinicopathological features and angiogenesis. **Methods** Expression of IL-17 and STAT3 in 94 CRC tissue samples and 31 normal intestinal mucosa tissue samples was detected by immunohistochemistry SP method and microvessel density (MVD) was counted according to the number of CD34- marked microvessels. **Results** Immunohistochemistry showed that the IL-17 was mainly expressed in cytoplasm and lymphocytes of normal intestinal mucosa tissue samples, and its positive expression rate was significantly higher in CRC tissue samples than in normal intestinal mucosa samples ($P<0.01$). The expression of IL-17 was related with the CRC cell differentiation and Dukes stage ($P<0.05$). The expression level of STAT3 was significantly higher in CRC tissue samples than in its adjacent normal tissue samples ($P<0.01$), which was related to the CRC cell differentiation, lymphatic metastasis and Dukes stage ($P<0.05$). The expression of IL-17 and STAT3 in CRC tissue samples was related with MVD ($P<0.05$). Spearman stage correlation analysis showed that the expression of IL-17 was positively related with that of STAT3 in CRC tissue samples ($r=0.251$, $P=0.015$). **Conclusion** Over-expression of IL-17 and STAT3 in CRC tissue may play an important role in the angiogenesis and carcinogenesis of CRC.

[**Key words**] colorectal cancer; immunohistochemistry; IL-17; STAT3

Supported by the Youth Innovation Research Fund for Interdisciplince of Lanzhou University (LZUJC200918). Corresponding author: Li Min, Tel: 86-931-8915021, E-mail: limin@lzu.edu.cn

结直肠癌(colorectal carcinoma, CRC)是我国大中城市发病率居第二、三位的恶性肿瘤,虽然采取了包括手术、放化疗在内的一系列综合治疗,但其治疗效果仍然不理想。IL-17(Interleukin-17)是一种具有强烈致炎性作用的细胞因子,主要由Th17细胞产生,在多种炎症性疾病[1]和自身免疫性疾病中发挥着重要作用。那么IL-17是否也参与肿瘤的发生、发展?由于肿瘤类型和实验模型的不同,目前关于IL-17在肿瘤中的

[基金项目] 兰州大学交叉学科青年创新研究基金(LZUJC200918)
[通信作者] 李 敏,电话:(0931) 8915021,E-mail:limin@lzu.edu.cn

作用存在两种截然不同的观点。有学者认为 IL-17$^+$ 细胞聚集在肿瘤组织中,刺激抗肿瘤的免疫应答[2]。但也有多项研究表明 IL-17 具有促进肿瘤血管生成,有助于肿瘤的发生、发展[3]。最近有报道信号转导和转录激活因子 3(signal transducers and transcription activators 3, STAT3)蛋白在肿瘤微环境中能够调控 Th17 细胞的分化,促进 IL-17 的分泌[4]。为此,我们研究了 IL-17、STAT3 在结直肠癌中的表达及 IL-17$^+$ 细胞在结肠癌组织的分布情况,探讨两者在结直肠癌血管生成,肿瘤发生、发展过程中潜在的生物学意义。

1 资料与方法

1.1 标本来源及临床资料

收集甘肃省人民医院病理科 2008 年 6 月至 2009 年 9 月期间手术切除的 94 例结直肠癌标本。其中男性 56 例,女性 38 例,年龄 27~80 岁,中位年龄 56 岁。按照 2000 年版世界卫生组织消化系统肿瘤分类标准对以上标本进行组织学分型和病理分级。其中按组织学类型分:Ⅰ级,高分化管状和乳头状腺癌 1 例;Ⅱ级,中分化腺癌 67 例;Ⅲ级,低分化腺癌和印戒细胞癌 26 例。按部位分,左半结肠癌 11 例,右半结肠癌 5 例,直肠癌 78 例。按有无淋巴结转移分,有转移 42 例,无转移 52 例。同时取 31 例正常肠黏膜组织(癌灶边缘 5 cm 以外的组织)作为对照。所有患者术前均未接受放疗、化疗及免疫治疗。

1.2 主要试剂和细胞

兔抗人 IL-17 多克隆抗体(Santa Cruz 公司,浓缩型);兔抗人 STAT3 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司,浓缩型);鼠抗人 CD34 单克隆抗体(即用型)、通用型 SP-9000 试剂盒、DAB 显色试剂盒(以上试剂均购自北京中杉金桥生物科技有限公司)。

1.3 实验方法及结果判断

实验方法:采用免疫组织化学 S-P 法。所有载玻片预先经多聚赖氨酸防脱片处理。组织标本经过 10% 福尔马林固定,常规石蜡包埋,4 μm 连续切片。脱蜡水化后,于 pH 6.0 枸橼酸盐缓冲液中微波加热进行抗原修复。其余步骤严格按试剂盒说明书操作(IL-17 抗体工作浓度为 1∶75,STAT3 抗体工作浓度为 1∶50)。PBS 代替一抗作阴性对照,由试剂公司提供的照片作阳性对照。

结果判断:IL-17、STAT3 组织切片显示以胞浆染色为淡黄色至棕褐色颗粒者为阳性。于光学显微镜(400 倍)下随机选取 3 个有代表性的不同视野,每个视野的得分由阳性染色细胞所占面积和细胞染色强度两者计分之和来判断。染色面积计分为:阳性染色细胞 <5% 计 0 分;5~25% 计 1 分;26~50% 计 2 分;>50% 计 3 分。细胞染色强度:不染色计 0 分;淡黄色计 1 分;棕黄色计 2 分;棕褐色计 3 分。若两种计分之和≤2 则为阴性表达,>2 则为阳性表达。(-)为阴性,(+)为弱阳性表达,(++)~(+++)为强阳性表达。400 倍高倍镜下随机选取 3 个视野计数肠黏膜固有层阳性细胞,取其平均值作为判断肠黏膜固有层内 IL-17 的表达情况的标准。

微血管密度(microvascular density, MVD)采用 CD34 单克隆抗体标记血管内皮细胞进行记数判断。CD34 阳性表达主要在血管内皮细胞的胞浆和胞膜,呈棕黄色颗粒状。先在 40 倍视野下选取肿瘤组织内微血管最密集处,然后在 400 倍视野下计数 3 个不同区域的微血管数,取其平均值作为 MVD 值。

1.4 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学处理采用 SPSS 13.0 统计软件。计数资料比较采用 χ^2 检验,计量资料比较采用 t 检验,相关性采用 Spearman 等级相关分析。

2 结果

2.1 IL-17 在结直肠癌及正常肠黏膜组织中的表达

IL-17 在结直肠癌组织中的肿瘤细胞及肠黏膜固有层淋巴细胞胞浆中呈阳性表达,阳性表达率为 60.6%(57/94),明显高于其在正常肠黏膜组织中的表达($P<0.01$)。结直肠癌肠黏膜固有层内阳性细胞数为(22.1±7.5),而正常肠黏膜固有层内阳性细胞数为(7.8±4.6),两者相比存在显著性差异($P<0.01$)。IL-17 的表达与结直肠癌患者的性别、年龄、淋巴结转移、浸润深度和生长部位无关,但与肿瘤细胞的分化程度和 Dukes 分期有关,差异具有统计学意义($P<0.05$,表 1、2,图 1)。

2.2 STAT3 在结直肠癌及正常肠黏膜组织中的表达

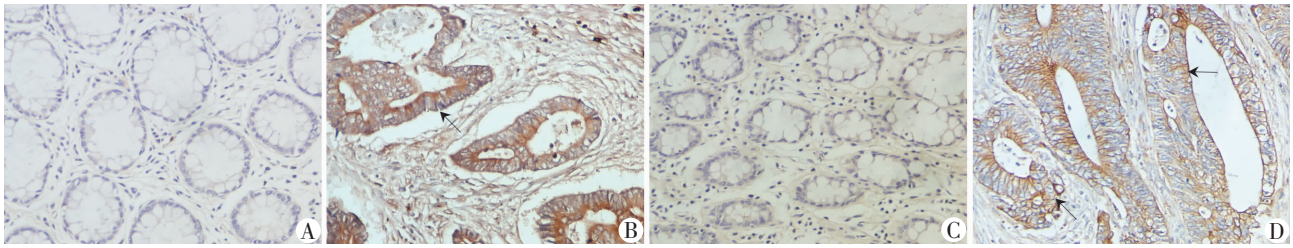
STAT3 在结直肠癌组织中的肿瘤细胞胞浆中表达,阳性表达率为 69.1%(65/94),显著高于其在正常肠黏膜组织中的表达($P<0.01$)。STAT3 与结直肠癌患者的性别、年龄、浸润深度和生长部位无关,但与肿瘤细胞的分化程度、淋巴结转移和 Duke's 分期有关,差异具有统计学意义($P<0.05$;表 1、2,图 1)。

表 1 IL-17、STAT3 表达与结直肠癌临床病理特征的关系

项目	例数	IL-17				STAT3			
		-	+ ~ +++	χ^2	P	-	+ ~ +++	χ^2	P
性别									
男性	56	23	33	0.170	0.680	19	37	0.615	0.433
女性	38	14	24			10	28		
年龄(岁)									
>60	34	16	18	1.322	0.250	12	22	0.493	0.483
≤60	60	21	39			17	43		
分化程度									
中-高分化	68	31	37	3.993	0.046	26	42	6.284	0.012
低分化	26	6	20			3	23		
淋巴结转移									
无	52	24	28	2.249	0.134	21	31	4.958	0.026
有	42	13	29			8	34		
浸润深度									
T_1+T_2	14	6	8	0.084	0.772	8	6	0.702	0.402
T_3+T_4	80	31	49			21	59		
Duke's 分期									
A+B	55	27	28	5.257	0.022	23	32	7.474	0.006
C+D	39	10	29			6	33		
肿瘤部位									
左半结肠	11	6	5	2.347	0.309	5	6	1.444	0.486
右半结肠	5	3	2			1	4		
直肠	78	28	50			23	55		

表 2 IL-17 和 STAT3 在结直肠癌及正常肠黏膜组织中的表达

组织类型	例数	IL-17				STAT3			
		-	+ ~ +++	χ^2	P	-	+ ~ +++	χ^2	P
正常肠黏膜	31	22	9	9.344	0.002	27	4	29.822	0.000
肿瘤组织	94	37	57			29	65		

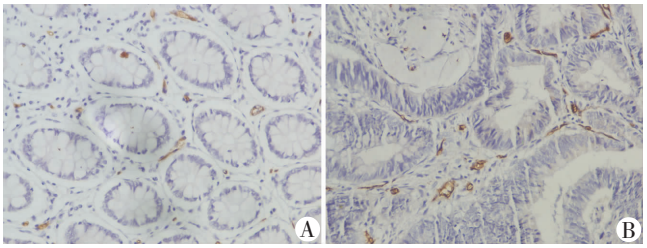


A:IL-17在正常肠黏膜组织中阴性表达;B:IL-17在结直肠癌组织中阳性表达;C:STAT3在正常肠黏膜组织中阴性表达;D:STAT3在结直肠癌组织中阳性表达 箭头示阳性细胞

图1 IL-17及STAT3在结直肠癌组织和正常肠黏膜组织中的表达 (S-P ×200)

2.3 结直肠癌中IL-17、STAT3蛋白表达与MVD的相关性分析

CD34表达于血管内皮细胞胞浆和胞膜上,呈棕黄色染色(图2)。以CD34阳性表达为标记检测MVD,统计分析结果显示:IL-17阴性表达者MVD为(20.3±7.1),而IL-17阳性表达者MVD为(25.9±9.2),两者相比较具有较显著的差异($P<0.05$)。STAT3阴性表达者MVD为(18.2±6.3),而STAT3阳性表达者MVD为(26.1±8.8),两者相比较具有较显著的差异($P<0.01$)。94例结直肠癌组织中的IL-17和STAT3共同阳性表达的为50.0%(47/94),共同阴性表达的为20.2%(19/94)。Spearman等级相关分析显示IL-17和STAT3在结直肠癌组织中的表达呈正相关($r=0.251$,$P=0.015$)。



A:正常肠黏膜组织;B:结直肠癌组织

图2 CD34在结直肠癌组织和正常肠黏膜组织中的表达 (S-P ×200)

3 讨论

IL-17是近年来发现的具有强致炎性作用的细胞因子,其分布局限,主要由活化的T淋巴细胞分泌,包括$CD4^+CD45RO^+$ T细胞、$CD8^+$ T细胞和γδT细胞等。其中,$CD4^+$ T细胞亚群中Th17细胞是IL-17的主要来源细胞[5]。但最近研究发现多种细胞均可以产生IL-17,如上皮细胞、血管内皮细胞等。Moseley等[6]发现哮喘患者经抗原刺激后,其外周血和支气管肺泡灌洗液(BALF)中嗜酸性粒细胞分泌IL-17增多,提示嗜酸性粒细胞也是IL-17的一个重要来源。Steiner等[7]通过免疫组化和RT-PCR法研究发现IL-17在正常前列腺组织中表达极少,且局限在淋巴细胞,而在79%的前列腺增生组织及58%的前列腺癌组织中高表达。IL-17主要由前列腺上皮细胞产生,另外,淋巴细胞浸润到肌细胞及腺细胞后也能分泌IL-17。

近年来研究发现在多种炎症相关的肿瘤组织和外周血中发现IL-17高表达,主要分布在Th17细胞中,而肿瘤细胞不表达IL-17。Zhang等[8]发现胃癌患者外周血中Th17细胞数量升高,而且在晚期胃癌肿瘤组织中,Th17细胞相关因子(IL-17、IL-23p19)的mRNA表达水平和外周血中IL-17蛋白含量均显著增加。Wu等[9]发现AML患者的外周血中Th17细胞数及其分泌的IL-17含量明显高于正常人;但当患者经过化疗后,外周血中Th17细胞数和IL-17含量减少。Miyahara等[10]研究发现,多种肿瘤患者外周血、骨髓、脾脏中Th17细胞数明显增加,肿瘤组织中Th17细胞数增加最为明显。我们在另一部分实验中,57.1%(4/7)IL-17 mRNA在结直肠癌患者外周血单个核细胞(PBMC)中有表达,其表达率明显高于健康人(数据未发表)。虽然在多种肿瘤中发现IL-17有升高的现象,但其在肿瘤中的作用仍不清楚。一些研究认为IL-17在肿瘤中高表达,能够招募免疫细胞的聚集,促进抗肿瘤细胞毒性T细胞应答,从而抑制肿瘤的生长[2]。但也有研究认为,Th17细胞通过诱导多种促血管生成因子的产生,促进肿瘤血管生成,从而加剧肿瘤的发生[3]。

本实验94例结直肠癌组织免疫组化结果显示,IL-17主要表达在结直肠癌组织中的肿瘤细胞和肠黏膜固有层淋巴细胞胞浆中,明显高于其在正常肠黏膜中的表达,并与结直肠癌分化程度、Dukes分期有关和结直肠癌微血管密度有关,提示IL-17参与了结直肠癌的血管生成和进展。IL-17在肿瘤细胞中表达的现象以下研究报道中也有提出:Chang等[11]发现IL-17在非小细胞性肺癌(NSCLC)肿瘤细胞胞浆中有表达,而在正常组织中没有表达;并且IL-17 mRNA在转染了人乳头瘤病毒HPV16E6基因的肺腺癌H1299细胞株中也有表达。IL-17在人乳腺癌肿瘤细胞和肿瘤浸润淋巴细胞的胞浆中均有表达,在癌旁组织中不表达[12]。Wagsater等[13]通过免疫组化法发现IL-17蛋白在65%(13/20)的结直肠癌组织中有表达,主要定位于结直肠癌肿瘤细胞和淋巴细胞,同时部分正常肠黏膜上皮细胞和固有层淋巴细胞也表达IL-17;并且IL-17在这些细胞中的表达强度没有明显差异。因此,

我们推测肿瘤细胞有可能产生 IL-17。但由于免疫组化法的局限性,还需进一步研究证明。

信号转导和转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3,STAT3)是 STATs 家族的成员之一,是一种重要的核转录因子,具有强烈促进肿瘤细胞增殖、抑制凋亡作用,与肿瘤的发生、发展和演进密切相关。最近有报道称 VEGF 直接由 STAT3 调节,调控肿瘤血管生成[14]。在 Th17 细胞分化过程中,STAT3 可以在 IL-6、IL-21、TGF-β、IL-23 等多种细胞因子作用下,通过 YAK 或丝氨酸激酶诱导,成为磷酸化 STAT3 并形成二聚体进入细胞核,可能直接结合于 IL-17 启动子上调节其转录,从而促进 Th17 细胞的分化[4,15]。Chaudhry 等[16]体外研究发现 STAT3 基因缺陷的 T 细胞向 Th17 细胞的分化程度明显减少。Wang 等[17]通过 IL-17 基因敲除小鼠,发现内源性的 IL-17 可促进黑色素瘤及膀胱癌的生长;IL-17 作用于肿瘤细胞本身或周围的间质细胞,促进其分泌 IL-6;IL-6 继而激活 STAT3 信号通路,上调抗肿瘤细胞凋亡、促进增殖和促血管生成基因;通过 IL-6 活化 STAT3 途径,IL-17发挥了促进肿瘤生长转移的作用。肿瘤微环境能招募 T 淋巴细胞到达病变部位,并在肿瘤细胞和基质细胞分泌的多种细胞因子作用下使 STAT3 活化,促进初始 $CD4^+$ T 细胞向 Th17 细胞分化成熟、扩增,并释放出 IL-17[4]。游离的 IL-17 与肿瘤细胞上的 IL-17 受体(IL-17R)特异性结合后激活,作用于多种细胞,使它们分泌更高水平的 VEGF、PGE1、PGE2 等促血管生成因子,诱导血管内皮细胞迁移及血管索的形成,促进肿瘤血管生成[3]。

本实验免疫组化结果证实 STAT3 主要表达在结直肠癌组织中的肿瘤细胞,其阳性表达率明显高于其在正常肠黏膜组织,与结直肠癌分化程度、Dukes 分期和淋巴结转移有关,并与肿瘤微血管密度相关,提示 STAT3 可能在结直肠癌的血管生成与进展密切相关。Spearman 等级相关分析结果为 94 例结直肠癌组织中 IL-17 与 STAT3 的表达呈正相关($r = 0.282$, $P < 0.05$),提示 IL-17 与 STAT3 的高表达可能在结直肠癌血管生成和发生、发展中起到重要的作用。

总之,IL-17 及其相关信号通路可能作为炎症相关性肿瘤微环境中的重要因子,参与了结直肠癌的发生。IL-17 与结直肠癌病情进展和患者预后的关系,以及同其他细胞因子的互相作用,外源性药物对其影响有待进一步研究。IL-17 有可能作为评价结直肠癌病情和治疗疗效与否的一个新的免疫学标准。但相关的临床应用及标准方案都尚未见明确报道。进一步研究 IL-17 家族的信号转导机制和调节途径会为治疗结直肠癌开辟新的思路。

参考文献:

[1] 罗媛,郭红,边巍,等. IL-17 多态性与慢性萎缩性胃炎的相关性研究[J]. 第三军医大学学报,2010,32(6):525-528.
[2] Benchetrit F, Ciree A, Vives V, *et al*. Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism[J]. Blood, 2002, 99(6): 2114-2121.
[3] Numasaki M, Watanabe M, Suzuki T, *et al*. IL-17 enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis[J]. J Immunol, 2005, 175(9): 6177-6189.
[4] 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): 1630-1641.
[5] Lockhart E, Green A M, Flynn J L. IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection[J]. J Immunol, 2006, 177(7): 4662-4669.
[6] Moseley TA, Haudenschild D R, Rose L, *et al*. Interleukin-17 family and IL-17 receptors[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2003, 14(2): 155-174.
[7] 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): 171-182.
[8] Zhang B, Rong G, Wei H, *et al*. The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 374(3): 533-537.
[9] Wu C, Wang S, Wang F, *et al*. Increased frequencies of T helper type 17 cells in the peripheral blood of patients with acute myeloid leukaemia[J]. Clin Exp Immunol, 2009, 158(2): 199-204.
[10] Miyahara Y, Odunsi K, Chen W, *et al*. Generation and regulation of human $CD4^+$ IL-17-producing T cells in ovarian cancer[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(40): 15505-15510.
[11] Chang Y H, Yu C W, Lai L C, *et al*. Up-regulation of interleukin-17 expression by human papillomavirus type 16 E6 in nonsmall cell lung cancer[J]. Cancer, 2010, 116(20): 4800-4809.
[12] 杨丽娟. Th17 细胞抗肿瘤作用及其机制研究[D]. 石家庄:河北医科大学,2010.
[13] Wagsater D, Lofgren S, Hugander A, *et al*. Expression of interleukin-17 in human colorectal cancer[J]. Anticancer Res, 2006, 26(6B): 4213-4216.
[14] Zhu B H, Zhan W H, Li Z R, *et al*. (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits growth of gastric cancer by reducing VEGF production and angiogenesis[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(8): 1162-1169.
[15] Kortylewski M, Xin H, Kujawski M, *et al*. Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by Stat3 signaling in the tumor microenvironment[J]. Cancer Cell, 2009, 15(2): 114-123.
[16] Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, *et al*. $CD4^+$ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner[J]. Science, 2009, 326(5955): 986-991.
[17] Wang L, Yi T, Kortylewski M, *et al*. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway[J]. J Exp Med, 2009, 206(7): 1457-1464.

(**收稿**:2011-03-15;**修回**:2011-04-25)
(编辑 汪勤俭)