doi:10.11659/jjssx.09E016017

IL-17A 诱导非小细胞肺癌 A549 细胞分泌 CXCL12 的机制研究

胡 英[1],黄 英[2],杨永红[1] (1.重庆市巴南区第二人民医院呼吸科,重庆 401320;2.第三军医大学西南医院呼吸科,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 探讨 IL-17A 诱导非小细胞肺癌 A549 细胞分泌 CXCL12 的分子机制。**方法** 体外 IL-17A 刺激培养的非小细胞肺癌 A549 细胞,或预先加入 STAT3 抑制剂孵育 1 h 后再进行刺激,酶联免疫吸附试验检测 CXCL12 的水平,趋化实验检测中性粒细胞的趋化效果。**结果** A549 细胞经 IL-17A 刺激后,CXCL12 的分泌显著增加,与刺激前比较差异具有统计学意义($P<0.01$),并具有剂量和时间依赖性;加入 STAT3 抑制剂后可显著抑制 IL-17A 刺激 A549 细胞分泌的 CXCL12 水平,差异具有统计学意义($P<0.01$)。此外,IL-17A 作用 A549 细胞后的培养上清可诱导中性粒细胞的趋化,而加入 CXCL12 中和抗体预处理后趋化效果则显著下降。**结论** IL-17A 可通过 STAT3 信号途径诱导非小细胞肺癌 A549 细胞分泌 CXCL12,从而促进中性粒细胞的趋化。

[关键词] IL-17A;CXCL12;STAT3 信号;非小细胞肿瘤;A549 细胞
[中图分类号] R737.11 [文献标识码] A [收稿日期] 2016-09-12

Mechanism of IL-17A induced the secretion of CXCL12 in non-small cell lung cancer cell line A549

HU Ying[1], HUANG Ying[2], YANG Yong-hong[1] (1. Department of Respiration, Second People's Hospital of Banan, Chongqing 401320, China; 2. Department of Respiration, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the molecular mechanism of IL-17A induced the secretion of CXCL12 in non-small cell lung cancer cell line A549. **Methods** Cultured non-small cell lung cancer cell line A549 in vitro with recombination cytokine IL-17A or STAT3 signal pathway inhibitor pre-incubated for 1 hour, and then the level of CXCL12 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. And chemotaxis assay was used to analyze the chemotactic movement of neutrophil. **Results** After IL-17A stimulation, the secretion of CXCL12 by non-small cell lung cancer cell line A549 was significantly increased($P<0.01$), which is in a dose and time dependent manner. However, IL-17A induced the secretion of CXCL12 by A549 was significantly decreased after pre-incubated by the STAT3 inhibitor($P<0.01$). In addition, neutrophil could have chemotaxis by cell suspension obtained from IL-17A stimulated A549 cell line, but such chemotaxis would be declined while CXCL12 was neutralized. **Conclusion** IL-17A could induce the secretion of CXCL12 in non-small cell lung cancer cell line A549 through STAT3 signal pathway, so as to promote the chemotaxis of neutrophil.

Keywords: IL-17A;CXCL12;STAT3 signal;non-small cell tumor;A549 cell

白细胞介素 17A(interleukin-17A,IL-17A)是近年来发现的一种促炎细胞因子,由 $CD4^+$ T 细胞、$\gamma\delta^+$ T 细胞及肥大细胞等多个免疫细胞亚群所分泌,在慢性炎症和肿瘤的发生发展中起着重要作用[1-2]。早期文献报道 IL-17A 在肿瘤组织中的表达明显增加,并可通过作用于肿瘤细胞直接促进肿瘤的生长和转移,或者刺激肿瘤细胞分泌 VEGF-A 促进新生血管的形成[3-4]。最近研究发现,IL-17A 与促肿瘤中性粒细胞的浸润呈显著正相关,且肿瘤浸润的中性粒细胞并不表达 IL-17A的受体(IL-17 receptor,IL-17R)[5],由此提示 IL-17A 很可能通过诱导肿瘤细胞释放趋化因子,进而募集外周血中性粒细胞到肿瘤部位。在非小细胞肺癌中,肿瘤浸润的中性粒细胞明显增加且其高表达趋化因子受体 CXCR4,而且 CXCL12 作为 CXCR4 的唯一配体,可由肺癌细胞大量分泌,提示非小细胞肺癌来源的CXCL12可将CXCR4阳性的中性粒细胞趋化至肿瘤部位,进而发挥促肿瘤作用[6]。IL-17A 是否参与诱导肺癌细胞产生 CXCL12,进而影响中性粒细胞的趋化尚不明确。因此,我们拟通过在体外进行培养非小细胞肺癌 A549 细胞系,探讨 IL-17A 是否能够诱导肺癌细胞分泌 CXCL12,并进一步阐明其可能的分子机制。

[通信作者] 黄 英,E-mail:hga_83@sina.com

1 材料与方法

1.1 材料

重组人细胞因子 IL-17A 购自美国 Peprotech 公司,淋巴细胞分离液购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司,STAT3 抑制剂(FLLL32)购自上海碧云天生物技术有限公司,抗 IL-17R 阻断抗体购自美国 Biolegend 公司,CXCL12 中和抗体购自美国 RD 公司,红细胞裂解液购自北京天根生化科技有限公司,APC 标记的抗人 IL-17R 抗体及同型对照抗体购自美国 Biolegend 公司,CXCL12 ELISA 检测试剂盒购自美国 RD 公司,中性粒细胞趋化试剂盒购自美国 corning 公司,

RPIM 1640 培养基、胎牛血清以及胰酶均购自美国 Hyclone 公司,PBS 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。人非小细胞肺癌 A549 细胞购自中国科学院。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养　A549 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPIM 1640 培养基置于 37 ℃、5% 的 CO_2 孵箱中进行培养。

1.2.2　流式细胞术　培养的 A549 细胞经胰酶消化后,利用无菌 PBS 清洗 2 次,然后加入 APC 标记的抗人 IL-17R 抗体及对应的同型抗体,4 ℃孵育 30 min,随后再用 PBS 清洗 2 次,流式细胞仪检测 A549 细胞表达 IL-17R的情况。

1.2.3　CXCL12 的检测　按照 1×10^6/孔将 A549 细胞铺于 6 孔板中,加入不同浓度的重组人细胞因子 IL-17A进行刺激,或预先加入 10 μg/mL 的抗 IL-17R 抗体或 10 μM 的 STAT3 抑制剂 FLLL32 作用 1 h,然后换取新的培养基后再加入 IL-17A 刺激 24 h,收集培养上清并冻存于 −80 ℃,酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)检测上清液中 CXCL12 的水平。

1.2.4　中性粒细胞的分离　利用淋巴细胞分离液将外周血中的细胞进行分离,然后收集离心管中的最下层细胞;加入红细胞裂解液进行裂解,进行洗涤后最终留下的沉淀细胞即为中性粒细胞。

1.2.5　中性粒细胞的趋化　以 IL-17A 刺激 A549 细胞 24 h 后的培养上清与正常的含 10% 胎牛血清的 RPIM 1640 培养基以 1∶1 的比例进行混合,然后作为条件培养基加入到趋化孔的下室,或者在条件培养基中加入终浓度为 10 μg/mL 的 CXCL12 中和抗体后再加入到趋化孔的下室,而趋化孔的上室则按照 1×10^5/孔中性粒细胞加入,培养 5 h 后,收集下室的细胞进行计数。

1.3　统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行数据处理和统计学分析,数据用均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,2 组之间的比较采用独立样本 t 检验,多组之间采用方差分析。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义,$P<0.01$ 为差异具有极显著性统计学意义。

2　结果

2.1　IL-17A 受体在 A549 细胞中的表达

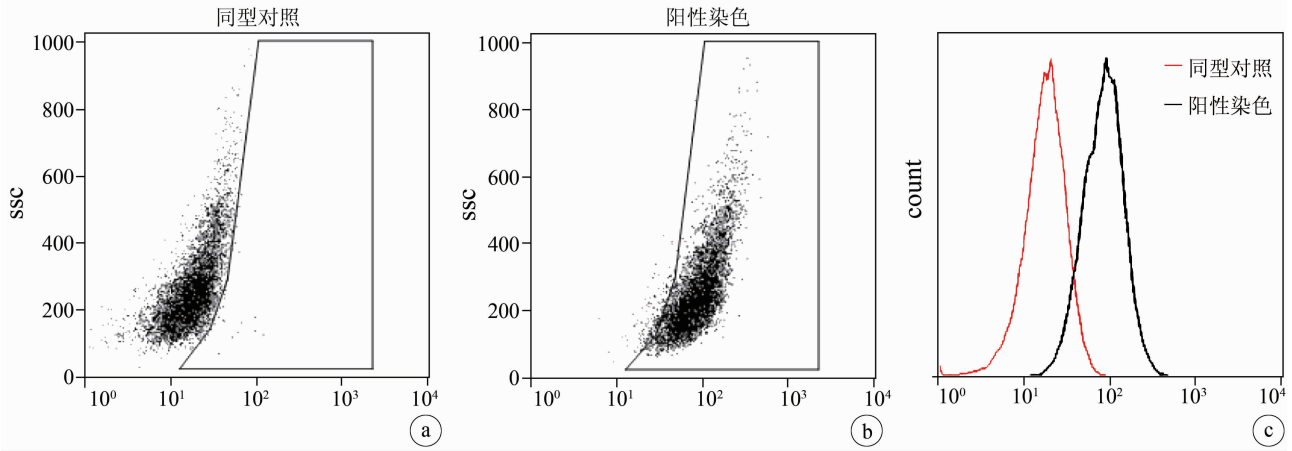
为了证实 A549 细胞是否表达 IL-17A 的受体,流式细胞术染色后对其进行检测,结果显示与同型对照组相比,经抗 IL-17R 阳性抗体染色的细胞峰值明显右移(图 1),表明 A549 细胞高表达 IL-17A 的受体。

2.2　A549 细胞经 IL-17A 刺激后培养上清中 CXCL12 的水平检测

ELISA 检测结果显示,A549 细胞经重组细胞因子 IL-17A 刺激后,其培养上清中 CXCL12 的水平高于未刺激组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。且随着 IL-17A刺激剂量的增加,A549 细胞分泌 CXCL12 的水平也逐渐增加(图 2a)。此外,以 10 ng/mL 的 IL-17A 刺激 A549 细胞,在不同时间点收集培养上清进行检测,结果显示:与第 0 h 相比,CXCL12 的水平在第 6 h 显著增加,差异具有统计学意义($P<0.05$),并且随着 IL-17A 刺激时间的延长,A549 细胞分泌 CXCL12 的水平也逐渐增加(图 2b);表明 IL-17A 可以剂量和时间依赖的方式诱导非小细胞肺癌 A549 细胞分泌趋化因子 CXCL12。

2.3　IL-17R-STAT3 信号通路调控 IL-17A 诱导的 CXCL12 水平

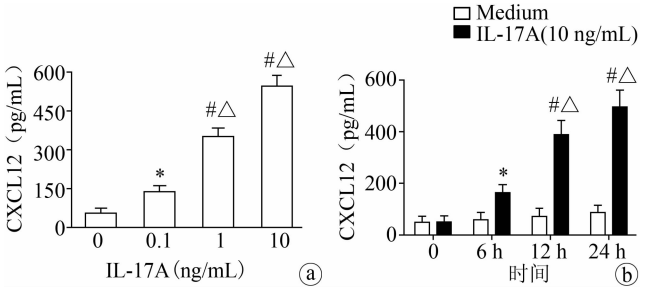
鉴于 IL-17A 可诱导 A549 细胞分泌 CXCL12,在体系中预先孵育抗 IL-17R 抗体后,再加入 IL-17A 进行刺激。结果显示,在 IL-17A 刺激的条件下,A549 细胞大量分泌CXCL12,然而利用抗IL-17R抗体阻断



a:IL-17R 同型对照抗体在 A549 细胞的染色;b:IL-17R 阳性抗体在 A549 细胞的染色;c:IL-17R 阳性抗体染色后峰值右移

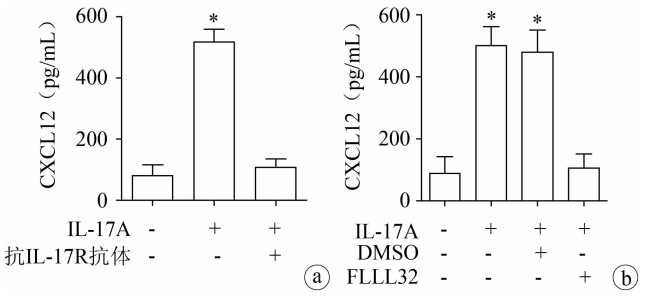
图 1　流式细胞术染色检测 IL-17R 在 A549 细胞的表达

IL-17A的受体后,CXCL12 的分泌量明显下降,差异具有统计学意义($P<0.01$),见图3a。此外,以终浓度为10 μM的 STAT3 信号通路抑制剂 FLLL32 预处理 A549 细胞 1 h 后,结果发现,在 IL-17A 的作用下,加入 STAT3 抑制剂组的 CXCL12 水平显著低于未加抑制剂组,差异具有统计学意义($P<0.01$),见图3b。这些结果表明 IL-17A 刺激 A549 细胞分泌 CXCL12 依赖于 IL-17R-STAT3 信号途径。



a:不同浓度 IL-17A 刺激 A549 细胞 24 h 后培养上清中 CXCL12 的水平 *:与 IL-17A 为 0 组比较,$P<0.05$;#:与 IL-17A 为 0 组比较,$P<0.01$;△:与 IL-17A 为 0.1 ng/mL 组比较,$P<0.01$;b:10 ng/mL 的 IL-17A 刺激 A549 细胞不同时间点培养上清中 CXCL12 的水平 *:与 0 h 比较,$P<0.05$;#:与 0 h 比较,$P<0.01$;△:与 6 h 比较,$P<0.01$

图2 IL-17A 刺激 A549 细胞分泌 CXCL12 的水平比较

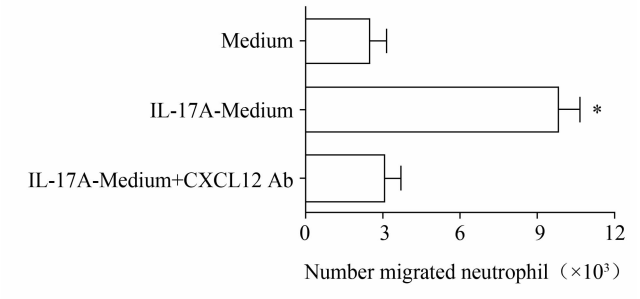


a:抗 IL-17R 抗体阻断对 IL-17A 刺激 A549 细胞分泌 CXCL12 的水平 *:与抗 IL-17R 抗体处理组比较,$P<0.01$;b:STAT3 信号抑制剂 FLLL32 预处理对 IL-17A 刺激 A549 细胞分泌 CXCL12 的水平 *:与 STAT3 信号抑制剂 FLLL32 预处理组比较,$P<0.01$

图3 抗 IL-17R 抗体阻断和 STAT3 信号抑制剂 FLLL32 对 IL-17A 诱导 A549 细胞分泌 CXCL12 的效果

2.4 IL-17A 诱导 A549 细胞分泌的 CXCL12 趋化中性粒细胞

为了验证 IL-17A 作用 A549 细胞 24 h 的培养上清是否可以诱导中性粒细胞的趋化,我们利用趋化小室的模型予以验证,在上室加入中性粒细胞,下室加入正常的培养基或者条件培养基进行趋化。结果显示,与加正常培养基的趋化下室相比,加有条件培养基的下室中性粒细胞数目明显增加;而在条件培养基中加入 CXCL12 中和抗体后,其趋化至下室的中性粒细胞数目则显著减少,差异具有统计学意义($P<0.01$),见图4。由此表明 IL-17A 可经诱导 A549 细胞分泌 CXCL12,进而诱导中性粒细胞的趋化。



*:与 IL-17A-Medium + CXCL12 Ab 处理组比较,$P<0.01$

图4 正常培养基(Medium)、条件培养基(IL-17A-Medium)和加有 CXCL12 中和抗体的条件培养基(IL-17A-Medium + CXCL12 Ab)对中性粒细胞的趋化效果

3 讨论

自 IL-17A 作为促炎症细胞因子被鉴定发现后,其在感染性疾病、自身免疫性疾病和肿瘤等多个疾病中得到了广泛研究[7-9]。大量研究表明:IL-17A 可通过抵抗病原菌的感染而在感染性疾病中发挥免疫保护作用;但在自身免疫性疾病中则通过进一步诱导其他炎症因子如 S100A8/9 等的分泌导致免疫损伤;在肿瘤中则可促进肿瘤细胞的增殖和转移,进而加快肿瘤的进程。

最近文献报道,IL-17A 不仅能够改变肿瘤细胞的生物学特性,而且还可以诱导肿瘤细胞释放促肿瘤相关细胞因子和趋化因子到胞外发挥作用[5,10]。Roy 等[11]发现在体内中和 IL-17A 后,小鼠骨和肺组织中 CXCL12 的水平显著下降,乳腺癌的转移能力也明显减弱;此外,Ferretti 等[12]在 B 细胞淋巴瘤中的研究显示 IL-17A 可诱导恶性 B 细胞聚集形成淋巴滤泡,此过程依赖于 CXCL12 的分泌水平。由此提示在肿瘤微环境中,IL-17A 可通过调控 CXCL12 的分泌进而影响肿瘤的进展。然而,IL-17A 是否能够直接作用于肿瘤细胞,进而诱导 CXCL12 的分泌并不清楚。因此,本研究以非小细胞肺癌 A549 细胞作为研究对象,在体外利用 IL-17A 刺激后检测细胞培养上清中 CXCL12 的水平。结果发现,IL-17A 可刺激 A549 细胞分泌大量的趋化因子 CXCL12,并且随着 IL-17A 刺激剂量的增加或者刺激时间的延长,其诱导 A549 细胞分泌 CXCL12 的能力也逐渐增强,由此表明 IL-17A 可通过直接作用于肿瘤细胞诱导趋化因子 CXCL12 的分泌。

IL-17A 通过作用于其相应的受体发挥功能[13]。本研究首先检测到 A549 细胞高表达 IL-17A 的受体 IL-17R;其次,利用抗 IL-17R 抗体阻断 IL-17A 与受体

的结合,发现 A549 细胞分泌 CXCL12 的能力显著下降,进一步证实 IL-17A 通过作用于 A549 细胞表面的相应受体 IL-17R 诱导了 CXCL12 的分泌。IL-17A 与 IL-17R 结合后,需要激活下游的级联信号,才能诱导目的基因转录并翻译成蛋白质后释放到胞外发挥作用。尽管文献报道包括 STAT 家族、MEK1/2、p38/MAPK 和 JNK 在内的多个信号均可介导 IL-17A 的下游信号,但是研究证实 STAT 家族中的 STAT3 才是 IL-17R 下游的关键转录信号转导与激活子,调控着 IL-17A 多个靶基因的表达[14]。因此,本研究利用 STAT3 信号通路抑制剂 FLLL32 预先处理 A549 细胞,使其胞内的 STAT3 转录信号失活,结果发现在均有 IL-17A 刺激的条件下,FLLL32 处理组细胞培养上清中的 CXCL12 水平明显下降,且其水平下降至与未刺激组持平,由此提示 IL-17A 可刺激非小细胞肺癌 A549 细胞释放 CXCL12,其由 IL-17R-STAT3 信号通路介导。

CXCL12 作为促肿瘤趋化因子,一方面通过与其受体 CXCR4 结合,促进肿瘤细胞的自我更新,从而有利于肿瘤的生长和转移[15];另一方面则通过诱导 CXCR4 阳性髓样细胞的趋化,进而募集促肿瘤髓样细胞到肿瘤微环境中[16]。最近文献报道,在肺癌中 CXCR4 阳性的中性粒细胞大量聚集[6],基于 CXCL12 在肺癌中的高表达,由此提示肺癌微环境中浸润的 CXCR4 阳性中性粒细胞很可能来源于 CXCL12 的趋化。那么,IL-17A 是否通过刺激肺癌细胞分泌 CXCL12,进而诱导 CXCR4 阳性中性粒细胞的趋化呢? 我们利用 IL-17A 刺激非小细胞肺癌 A549 细胞 24 h 后的培养上清在体外进行趋化实验,结果显示,该培养上清可显著诱导中性粒细胞的趋化,但加入 CXCL12 中和抗体处理后,其对中性粒细胞的趋化能力明显减弱,由此表明 IL-17A 可通过诱导 A549 细胞产生的 CXCL12 趋化中性粒细胞。由于该研究是在体外展开,对于在非小细胞肺癌微环境中,IL-17A 是否通过该途径诱导 CXCR4 阳性中性粒细胞的趋化,进而影响肿瘤的进程还有待进一步探讨。

综上所述,IL-17A 可通过其受体及下游 STAT3 信号通路诱导非小细胞肺癌 A549 细胞分泌 CXCL12,进而促进中性粒细胞的趋化。进一步全面阐明 IL-17A 在肺癌微环境中的促肿瘤功能,将为设计阻断 IL-17A 及其受体的免疫治疗方案提供实验依据。

[参考文献]

[1] Beringer A, Noack M, Miossec P. IL-17 in Chronic Inflammation: From Discovery to Targeting[J]. Trends Mol Med, 2016, 22(3): 230 – 241. doi: 10.3389/fphar.2016.00250.

[2] Zarogoulidis P, Katsikogianni F, Tsiouda T, et al. Interleukin-8 and interleukin-17 for cancer[J]. Cancer Invest, 2014, 32(5): 197 – 205. doi: 10.3109/07357907.2014.898156.

[3] Yang B, Kang H, Fung A, et al. The role of interleukin 17 in tumour proliferation, angiogenesis, and metastasis[J]. Mediators Inflamm, 2014, 2014: 623759. doi: 10.1155/2014/623759.

[4] Pan B, Shen J, Cao JY, et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis by stimulating VEGF production of cancer cells via the STAT3/GIV signaling pathway in non-small-cell lung cancer[J]. Sci Rep, 2015, 5: 16053. doi: 10.1038/srep16053.

[5] Amicarella F, Muraro MG, Hirt C, et al. Dual role of tumour-infiltrating T helper 17 cells in human colorectal cancer[J]. Gut, 2015. doi: 10.1136/gutjnl – 2015 – 310016.

[6] Eruslanov EB, Bhojnagarwala PS, Quatromoni JG, et al. Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer[J]. J Clin Invest, 2014, 124(12): 5466 – 5480. doi: 10.1172/JCI77053.

[7] Sparber F, LeibundGut-Landmann S. Interleukin 17-Mediated Host Defense against Candida albicans[J]. Pathogens, 2015, 4(3): 606 – 619. doi: 10.3390/pathogens4030606.

[8] Zhu S, Qian Y. IL-17/IL-17 receptor system in autoimmune disease: mechanisms and therapeutic potential[J]. Clin Sci (Lond), 2012, 122(11): 487 – 511. doi: 10.1042/CS20110496.

[9] Punt S, Langenhoff JM, Putter H, et al. The correlations between IL-17 vs. Th17 cells and cancer patient survival: a systematic review[J]. Oncoimmunology, 2015, 4(2): e984547. doi: 10.4161/2162402X.2014.984547.

[10] Yuan S, Zhang S, Zhuang Y, et al. Interleukin-17 Stimulates STAT3-Mediated Endothelial Cell Activation for Neutrophil Recruitment[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 36(6): 2340 – 2356. doi: 10.1159/000430197.

[11] Roy LD, Sahraei M, Schettini JL, et al. Systemic neutralization of IL-17A significantly reduces breast cancer associated metastasis in arthritic mice by reducing CXCL12/SDF-1 expression in the metastatic niches[J]. BMC Cancer, 2014, 14(1): 1 – 13. doi: 10.1186/1471 – 2407 – 14 – 225.

[12] Ferretti E, Di Carlo E, Ognio E, et al. Interleukin-17A promotes the growth of human germinal center derived non-Hodgkin B cell lymphoma[J]. Oncoimmunology, 2015, 4(10): e1030560. doi: 10.1080/2162402X.2015.1030560.

[13] Song X, Qian Y. The activation and regulation of IL-17 receptor mediated signaling[J]. Cytokine, 2013, 62(2): 175 – 182. doi: 10.1016/j.cyto.2013.03.014.

[14] Chen XW, Zhou SF. Inflammation, cytokines, the IL-17/IL-6/STAT3/NF-κB axis, and tumorigenesis[J]. Drug Des Devel Ther, 2015, 9: 2941 – 2946. doi: 10.2147/DDDT.S86396.

[15] Wald O, Shapira OM, Izhar U. CXCR4/CXCL12 axis in non small cell lung cancer (NSCLC) pathologic roles and therapeutic potential[J]. Theranostics, 2013, 3(1): 26 – 33. doi: 10.7150/thno.4922.

[16] Zhuang Y, Peng LS, Zhao YL, et al. CD8(+) T cells that produce interleukin-17 regulate myeloid-derived suppressor cells and are associated with survival time of patients with gastric cancer[J]. Gastroenterology, 2012, 143(4): 951 – 962. e8. doi: 10.1053/j.gastro.2012.06.010.

(编辑:周小林)