

· 论 著 ·

IL-17A 诱导胃癌细胞 SGC-7901 分泌 CXCL13 机制研究

丁子蓉

(江苏省海安中医院检验科, 江苏南通 226600)

摘要:目的 探讨白细胞介素 17A(IL-17A)诱导胃癌细胞 SGC-7901 分泌 CXCL13 的分子机制。方法 体外培养胃癌细胞 SGC-7901, 利用 IL-17A 刺激或预先加入信号通路抑制剂孵育后再进行 IL-17A 刺激。刺激后采用酶联免疫吸附法检测培养上清 CXCL13 水平。结果 SGC-7901 细胞经 IL-17A 刺激后, CXCL13 分泌水平显著增加($P < 0.05$), 且具有剂量和时间依赖性。信号转导与转录激活因子-3(STAT3)抑制剂预孵育, 可显著抑制 IL-17 诱导 SGC-7901 细胞分泌 CXCL13($P < 0.05$), 核因子 κ B(NF- κ B)、丝裂原活化蛋白激酶/细胞外调节蛋白激酶 1/2(MEK1/2)、p38/丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)抑制剂则无显著抑制作用。结论 IL-17A 可通过 STAT3 信号通路诱导胃癌细胞 SGC-7901 分泌 CXCL13, 从而发挥免疫调节作用。

关键词: 白细胞介素 17A; IL-17A; CXCL13; SGC-7901 细胞; 信号转导与转录激活因子-3; STAT3

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.24.027

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)24-3432-03

The mechanism of IL-17A induced the secretion of CXCL13 in gastric cancer cell line SGC-7901

DING Zirong

(Clinical Laboratory, Hospital of Traditional Chinese Medicine of Haian, Nantong, Jiangsu 226600, China)

Abstract: Objective To study the molecular mechanism of interleukin-17A(IL-17A) induced the secretion of CXCL13 in gastric cancer cell line SGC-7901. **Methods** SGC-7901 cells were stimulated by recombination cytokine IL-17A, or SGC-7901 were pre-incubated with signal pathway inhibitor for 1 hour and then stimulated by IL-17A, the level of CXCL13 were detected by using enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** After IL-17A stimulation, the secretion of CXCL13 by SGC-7901 cells was significantly increased($P < 0.05$), which was with dose and time dependence. IL-17A-induced secretion of CXCL13 could be inhibited when SGC-7901 were pre-incubated with STAT3 inhibitor($P < 0.05$). However, such effect was not observed while SGC-7901 were pre-incubated with NK- κ B, MEK1/2, p38/MAPK and JNK inhibitors. **Conclusion** IL-17A could induce the secretion of CXCL13 in gastric cancer cell line SGC-7901 by activating STAT3 signal pathway, which might play regulation role in gastric cancer.

Key words: IL-17A; CXCL13; SGC-7901 cells; STAT3

白细胞介素 17A(IL-17A)是由 T 细胞分泌的一种促炎症细胞因子,在胃癌、结直肠癌等消化道肿瘤的发生、发展过程中起着重要作用^[1-2]。分泌 IL-17A 的 CD4⁺ T 细胞(Th17 细胞)在胃癌组织明显增多,并通过 IL-17A 直接促进胃癌细胞的生长和转移,或通过刺激胃癌细胞分泌血管内皮细胞生长因子-A(VEGF-A)介导新生血管的形成^[3-5]。IL-17A 也可诱导正常上皮细胞以及肿瘤细胞分泌多种趋化因子,募集并趋化具有促肿瘤活性的髓系来源抑制细胞(MDSCs)至肿瘤部位,进而抑制抗肿瘤 T 细胞的功能;在胃癌组织中,IL-17A 水平与 MDSCs 数量呈正相关^[6]。胃癌组织高表达趋化因子受体 CXCR5,而 CXCL13 作为 CXCR5 唯一配体,可由正常上皮细胞和肿瘤细胞大量分泌^[7]。IL-17A 是否参与诱导胃癌细胞分泌 CXCL13,进而影响 MDSCs 趋化,尚未明确。因此,本研究以胃癌细胞系 SGC-7901 为研究模型,探讨 IL-17A 是否能够诱导胃癌细胞分泌 CXCL13,以进一步阐明其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料 重组人 IL-17A 购自美国 Peprotech 公司,信号转导与转录激活因子-3(STAT3)抑制剂(FLLL32)、核因子 κ B(NF- κ B)抑制剂(BAY 11-7082)、丝裂原活化蛋白激酶/细胞外调节蛋白激酶 1/2(MEK1/2)抑制剂(U0126)、p38/丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)抑制剂(SB203580)和 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)抑制剂(SP600125)购自上海碧云天生物技术有限公司,藻红素(PE)标记的抗人 IL-17 受体(IL-17R)抗体及同型对照抗体购自美国 Biologend 公司,酶联免疫吸附法(ELISA)

CXCL13 检测试剂盒购自美国 RD 公司,RPIM1640 培养基、胎牛血清及胰酶均购自美国 Hyclone 公司,二甲基亚砜(DMSO)购自美国 Sigma 公司,磷酸盐缓冲液(PBS)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。人胃癌细胞系 SGC-7901 购自中国科学院。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 采用含 10% 胎牛血清的 RPIM1640 培养基,37 °C、5% CO₂ 条件下培养 SGC-7901 细胞。

1.2.2 IL-17R 检测 SGC-7901 培养细胞经胰酶消化后,采用无菌 PBS 洗 1 次,加入 PE 标记的抗人 IL-17R 抗体及相应的同型抗体,4 °C 孵育 20 min;无菌 PBS 洗 2 次,采用流式细胞仪检测 SGC-7901 细胞 IL-17R 表达情况。

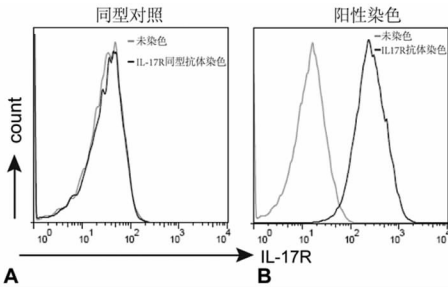
1.2.3 CXCL13 检测 按 2×10^6 个细胞/孔将 SGC-7901 细胞接种于 6 孔板中,加入不同浓度的 IL-17A 处理 24 h;收集培养液上清,采用 ELISA 法检测 CXCL13 水平,明确 IL-17A 处理剂量与 CXCL13 分泌水平的关系。按 2×10^6 个细胞/孔将 SGC-7901 细胞接种于 6 孔板中,加入浓度为 10 ng/mL 的 IL-17A 处理 24 h;在试验起始时及加入 IL-17A 6、12、24 h 时,收集培养液上清,采用 ELISA 法检测 CXCL13 水平,明确 IL-17A 处理时间与 CXCL13 分泌水平的关系。将抑制剂 FLLL32、BAY11-7082、U0126、SB203580、SP600125 按 10 μ mol/L 的浓度分别加入不同的培养孔中,再按 2×10^6 个细胞/孔将 SGC-7901 细胞接种于培养孔中,作用 1 h,更换培养基后加入 IL-17A 处理 24 h;对照组设置两组,分别为空白培养

基对照和 DMSO 对照;收集培养液上清,采用 ELISA 法检测 CXCL13 水平,明确不同抑制剂的作用效应。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行数据处理和统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为比较差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-17R 在 SGC-7901 细胞中的表达 采用 PE 标记的抗人 IL-17R 抗体及同型对照抗体对 SGC-7901 细胞进行流式细胞术染色检测,结果显示,同型对照抗体染色细胞未见峰值改变,抗 IL-17R 阳性抗体染色细胞峰值明显右移,表明胃癌细胞系 SGC-7901 高表达 IL-17R,见图 1。



注:A 为 IL-17R 同型对照抗体染色;B 为 IL-17R 阳性抗体染色。

图 1 流式细胞术染色检测 IL-17R 在 SGC-7901 细胞的表达

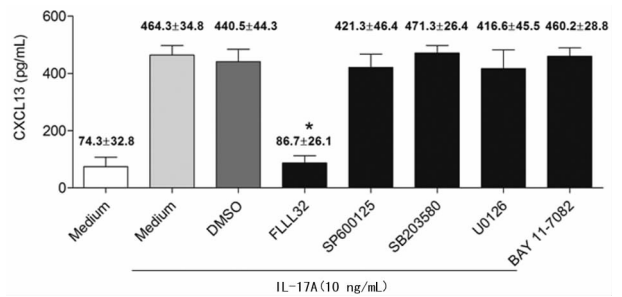
2.2 IL-17A 诱导 SGC-7901 细胞分泌 CXCL13 的检测 ELISA 检测结果显示,SGC-7901 细胞经浓度为 0、1、5、10 ng/mL IL-17A 处理 24 h 后,CXCL13 分泌水平分别为 38.5 ± 11.5 、 108.4 ± 23.1 、 292.3 ± 22.5 、 417.1 ± 31.8 pg/mL,提示 SGC-7901 细胞经 IL-17A 刺激后,CXCL13 表达水平明显升高 ($P < 0.05$),并且随着 IL-17A 剂量增加,CXCL13 水平也逐渐增加 ($P < 0.05$)。以 10 ng/mL IL-17A 处理 SGC-7901 细胞,在不同时间点收集培养上清进行检测,结果显示,与 0、6 h 未刺激组相比,同时点 IL-17A 刺激组 CXCL13 水平明显增加 ($P < 0.05$);随着 IL-17A 刺激时间延长,SGC-7901 细胞分泌 CXCL13 水平逐渐增加,见表 1。IL-17A 以剂量和时间依赖的方式诱导 SGC-7901 细胞分泌 CXCL13。

表 1 IL-17A 刺激 SGC-7901 细胞不同时间点 CXCL13 水平比较 (pg/mL)

时间(h)	空白培养基	IL-17A(10 ng/mL)
0	37.0 ± 22.5	35.6 ± 13.8
6	49.3 ± 18.3	$105.0 \pm 30.3^{\#}$
12	52.6 ± 20.9	$289.4 \pm 34.4^{\Delta}$
24	57.5 ± 17.9	$446.7 \pm 35.2^{\nabla}$

注:与空白培养基处理 0 h 比较, $^{\#} P < 0.05$;与空白培养基处理 6 h 比较, $^{\Delta} P < 0.05$;与 IL-17A 处理 6 h 比较, $^{\nabla} P < 0.05$ 。

2.3 不同抑制剂对 IL-17A 诱导分泌 CXCL13 的调控作用 在 SGC-7901 细胞培养体系中分别加入 10 μ mol/L 的 STAT3 抑制剂 FLLL32、NF- κ B 抑制剂 BAY 11-7082、MEK1/2 抑制剂 U0126、p38/MAPK 抑制剂 SB203580 和 JNK 抑制剂 SP600125 预处理 1 h,再加入 10 ng/mL IL-17A 作用 24 h,结果显示,FLLL32 组 CXCL13 水平明显低于未加抑制剂组或 DMSO 组 ($P < 0.05$),BAY 11-7082 组、U0126 组、SB203580 组和 SP600125 组与未加抑制剂组或 DMSO 组比较差异无统计学意义(见图 2)。IL-17A 刺激 SGC-7901 细胞分泌 CXCL13 依赖 STAT3 信号通路。



注:*表示与除未加入 IL-17A 及抑制剂的空白培养基组以外的其他研究组比较, $P < 0.05$;第 1 个 Medium 表示未加入 IL-17A 及抑制剂的空白培养基组;第 2 个 Medium 表示加入 IL-17A 但未加入抑制剂的培养基对照组;其他各组为相应的抑制物处理组。

图 2 不同信号通路抑制剂对 IL-17A 诱导 SGC-7901 细胞分泌 CXCL13 的影响

3 讨论

Th17 细胞作为不同于 Th1 和 Th2 细胞的 T 细胞亚群,在自身免疫性疾病、感染性疾病和肿瘤中得到了广泛的研究^[8-10]。Th17 细胞通过效应因子 IL-17A 抑制病原菌定植,因此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,Th17 细胞则通过诱导 S100A8/9 等促炎症因子的级联放大反应,导致组织病理性损伤;在肿瘤中,IL-17A 不仅可维持肿瘤细胞的干细胞特性,而且能够诱导肿瘤细胞的上皮间质转化,从而加快肿瘤进程。

除影响肿瘤细胞生物学功能外,IL-17A 还可诱导肿瘤细胞释放促瘤细胞因子和趋化因子到胞外发挥作用^[6,11]。Ferretti 等^[12]对淋巴瘤的研究中发现,IL-17A 可诱导恶变的 B 细胞聚集形成淋巴滤泡,此过程依赖于 CXCL13 和 CXCL12 的分泌水平。此外,Lu 等^[13]对食管鳞状细胞癌的研究显示,IL-17A 可刺激食管癌细胞分泌趋化因子 CXCL13,认为肿瘤组织中的 IL-17A 可通过诱导 CXCL13 的分泌影响肿瘤的进程。

然而,IL-17A 是否能够诱导胃癌细胞分泌 CXCL13 并不清楚。因此,本研究以胃癌细胞系 SGC-7901 作为研究对象,首先检测到该细胞系高表达 IL-17A 相应受体,表明 SGC-7901 细胞是 IL-17A 的靶细胞;利用重组细胞因子 IL-17A 刺激 SGC-7901 细胞,对培养上清的检测结果显示,IL-17A 刺激可明显诱导 SGC-7901 细胞分泌 CXCL13,而且诱导效应随着刺激浓度升高和刺激时间延长而明显增强。因此,本研究证实 IL-17A 可刺激胃癌细胞 SGC-7901 分泌趋化因子 CXCL13。

IL-17A 结合受体后,必须通过活化下游的级联信号途径,才能诱导胃癌细胞分泌 CXCL13。已有研究证实,NF- κ B、STAT3、MEK1/2、p38/MAPK 和 JNK 等多个信号途径均参与调控 IL-17A 的功能^[14]。因此,本研究采用上述信号通路的抑制剂对 SGC-7901 细胞进行预处理,阻断其胞内信号转导通路后,再给予 IL-17A 刺激。研究结果显示,经 STAT3 抑制剂处理后,SGC-7901 细胞培养 CXCL13 分泌水平显著下降,而 NF- κ B、MEK1/2、p38/MAPK 和 JNK 抑制剂处理未对 CXCL13 分泌水平产生显著影响,提示 IL-17A 刺激 SGC-7901 细胞分泌 CXCL13 可能依赖于 STAT3 信号通路的介导。胃癌组织中浸润的 MDSCs 高表达 CXCL13 受体 CXCR5,提示在胃癌微环境中,IL-17A 诱导产生的 CXCL13 可趋化 CXCR5 阳性 MDSCs 进入肿瘤部位,进而促进胃癌的发生、发展^[7]。

综上所述,IL-17A 可通过 STAT3 信号途径诱导胃癌细胞分泌 CXCL13,进而影响肿瘤的进程。全面研究 IL-17A 在胃癌中的促肿瘤功能,能够为探索针对 IL-17A 的胃癌免疫治疗方案提供新的思路。

筛不合格^[10]或发生献血不良反应^[11]的风险,又可以让献血者合理安排时间,有序而快捷地完成单采血小板捐献,同时预约工作人员可根据献血者预约情况,有针对性的及时进行招募和控制采集,既主动又灵活。预约岗位根据单采血小板当天及近期临床血小板使用情况,提前进行电话预约、招募或劝退。(6)通过加强献血者地管理并深入交流,发展一批已多次成功捐献单采血小板献血者,使他们成为固定献血者,成为应急小组成员。合理安排紧急小组成员之间的献血时间间隔,确保团队成员随时响应,应急献血,从而有效地保持团队的应急能力。

5 目前预约献血模式的进展

现已统计了重庆地区近半年的单采血小板临床需求状况,探索临床使用量的规律,初步建立重庆地区单采血小板库存管理。开展学校及机采成分科献血现场问卷调查,调查重庆地区市民预约献血模式情况。通过分析调查报告,统计献血者对预约方式的不同需求,利用中心的血液采集管理系统有针对性的进行招募和预约,建立符合单采血小板献血者不同需求的多种预约方式。从 2016 年 5 月开始逐渐启动预约献血模式,通过微信、电话及短信方式预约捐献单采血小板共计 6 148 人次,预约献血率从 27.05% 逐渐上升至 61.60%。现已建立微信公众平台及预约电话三部,可根据重庆地区献血者不同特点和临床预约情况招募或劝退。预约献血模式刚刚起步,也出现了许多相应的问题,例如重复招募、预约成功率等一系列问题,还需进一步摸索和改进。

参考文献

[1] 孙友岭,王玮,张琼琼,等.单采血小板服务模式建立的探

(上接第 3433 页)

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.

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

[3] Jiang YX, Yang SW, Li PA, et al. The promotion of the transformation of quiescent gastric cancer stem cells by IL-17 and the underlying mechanisms [J]. Oncogene, 2017, 36(9): 1256-1264.

[4] Li TJ, Jiang YM, Hu YF, et al. Interleukin-17-Producing Neutrophils Link Inflammatory Stimuli to Disease Progression by Promoting Angiogenesis in Gastric Cancer [J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(6): 1575-1585.

[5] Wu X, Yang T, Liu X, et al. IL-17 promotes tumor angiogenesis through Stat3 pathway mediated upregulation of VEGF in gastric cancer[J]. Tumour Biol, 2016, 37(4): 5493-5501.

[6] Wu P, Wu D, Ni C, et al. $\gamma\delta$ T17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer[J]. Immunity, 2014, 40(5): 785-800.

[7] Ding Y, Shen J, Zhang G, et al. CD40 controls CXCR5-induced recruitment of myeloid-derived suppressor cells to gastric cancer[J]. Oncotarget, 2015, 6(36): 38901-38911.

讨[J]. 临床输血与检验, 2015, 17(4): 350-353.

[2] 李军, 卢树培. 2015 年重庆市主城区单采血小板献血者初筛不合格原因分析[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(3): 408-409.

[3] 赵会霞, 姜志, 王作艳. 志愿者协助招募单采血小板献血者效果探讨[J]. 中国输血杂志, 2015, 28(3): 241-243.

[4] 陈涵薇, 林卉, 谢松丽. 武汉地区单采血小板献血者招募、保留策略[J]. 中国输血杂志, 2015, 28(7): 825-827.

[5] 赵会霞, 单晓丽, 单玉. 从全血献血者中招募单采献血者再次捐献情况分析[J]. 齐鲁医学杂志, 2016, 31(1): 39-40.

[6] 曾毅, 卢涛, 淳洁, 等. 高校学生无偿献血数据分析及影响因素调查[J]. 中国输血杂志, 2015, 28(5): 574-576.

[7] 赵宏祥, 戴为人, 袁秀珍, 等. 机采血小板献血者的招募与管理[J]. 中国卫生质量管理, 2010, 17(5): 88-89.

[8] 潘修银. 预约献血者招募方法的探讨[J]. 中国输血杂志, 2010, 23(1): 63-64.

[9] 陆韬宏, 孟妍, 张晰. 微信公众平台在无偿献血宣传招募中的运用[J]. 中国输血杂志, 2015, 28(8): 902-904.

[10] 郑丽萍, 李铁军, 陈黎. 机采血小板献血者淘汰原因分析及对策[J]. 临床血液学杂志, 2014, 27(10): 829-831.

[11] 李军, 夏代全, 李明海. 如何降低机采血小板献血者献血不良反应的发生[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(13): 1895-1896.

(收稿日期: 2017-06-21 修回日期: 2017-09-15)

[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.

[9] Gaffen SL, Jain R, Garg AV, et al. The IL-23-IL-17 immune axis; from mechanisms to therapeutic testing[J]. Nat Rev Immunol, 2014, 14(9): 585-600.

[10] 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.

[11] 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.

[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.

[13] Lu L, Weng C, Mao H, et al. IL-17A promotes migration and tumor killing capability of B cells in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Oncotarget, 2016, 7(16): 21853-21864.

[14] Song X, Qian Y. The activation and regulation of IL-17 receptor mediated signaling[J]. Cytokine, 2013, 62(2): 175-182.

(收稿日期: 2017-07-21 修回日期: 2017-09-25)