

文章编号 1006-8147(2020)06-0518-03

论 著

IL-17A 可以促进卵巢癌的腹腔转移

李岩¹, 牛秀琰², 郁春艳¹, 陈燕¹, 沈洋洋¹, 邓为民¹

(1.天津医科大学基础医学院免疫学系, 国家教育部免疫微环境与疾病重点实验室, 天津 300070; 2.中国人民武装警察部队特色医学中心勤务环境皮肤疾病防治研究所, 天津 300162)

摘要 目的:探讨白细胞介素(IL)-17A对卵巢癌(OvCa)腹腔转移的影响。方法:以C57BL/6为遗传背景的野生型(WT)小鼠和IL-17A缺陷(IL-17A^{-/-})小鼠为研究对象,腹腔注射同基因小鼠OvCa细胞系ID8,检测内源性IL-17A对OvCa腹腔种植瘤生长的影响。应用MTT法检测不同浓度的重组小鼠IL-17A(rmIL-17A)对ID8细胞增殖的影响;应用划痕实验检测不同浓度的rmIL-17A对ID8细胞迁移能力的影响;应用Transwell侵袭实验检测不同浓度的rmIL-17A对ID8细胞侵袭能力的影响。结果:与IL-17A^{-/-}小鼠相比,WT小鼠腹腔内肠系膜、腹膜后淋巴结、脾脏和肾脏表面等处均见密集瘤结节转移灶,且腹腔内瘤结节数量显著增多(均 $P<0.01$)。体外实验结果显示,与对照组相比,不同浓度的rmIL-17A对ID8细胞增殖无影响(均 $P>0.05$);与对照组相比,10 ng/mL的rmIL-17A作用6 h后可促进ID8细胞迁移,1 ng/mL和10 ng/mL的rmIL-17A作用12 h后可显著促进ID8细胞迁移(均 $P<0.05$);与对照组相比,干预24 h后,1 ng/mL和10 ng/mL的rmIL-17A对ID8细胞的侵袭能力均有促进作用(均 $P<0.05$)。结论:IL-17A可以促进卵巢癌的腹腔转移。

关键词 IL-17A; 卵巢癌; 转移; 侵袭

中图分类号 R737.31

文献标志码 A

IL-17A promotes intraperitoneal metastasis of ovarian cancer

LI Yan¹, NIU Xiu-long², YU Chun-yan¹, CHEN Yan¹, SHEN Yang-yang¹, DENG Wei-min¹

(1.Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Key Laboratory of Diseases and Microenvironment of Ministry of Education of China, Tianjin 300070, China; 2.Department of Prevention, Therapy of Skin Disease in the Security Environment, Characteristic Medical Center of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China)

Abstract Objective: To investigate the effect of interleukin-17A (IL-17A) on intraperitoneal metastasis of ovarian cancer (OvCa).

Methods: Wild-type (WT) mice and IL-17A-deficient (IL-17A^{-/-}) mice with C57BL/6 genetic background were used as research subjects. The effect of endogenous IL-17A on OvCa intraperitoneal metastasis was evaluated by intraperitoneal injection of syngeneic mouse ovarian cancer cell line ID8. MTT assay was used to detect the effect of recombinant mouse IL-17A (rmIL-17A) on ID8 cells proliferation. Wound healing assay was used to detect the effect of rmIL-17A on ID8 cells migration. Transwell invasion assay was used to detect the effect of rmIL-17A on the invasion ability of ID8 cells. **Results:** Compared with IL-17A^{-/-} mice, much denser tumor nodules were observed on the surface of mesentery, retroperitoneal lymph nodes, spleen and kidney in WT mice, and the number of nodules in the abdominal cavity was significantly increased (all $P<0.01$). In vitro results showed that rmIL-17A had no effect on ID8 cells proliferation. Compared with control group, rmIL-17A at 10 ng/mL could promote the migration of ID8 cells after 6 h, and rmIL-17A at 1 ng/mL and 10 ng/mL could significantly promote the migration of ID8 cells after 12 h (all $P<0.05$). Compared with control group, after 24 hours of intervention, 1 ng/mL and 10 ng/mL rmIL-17A both promoted the invasion of ID8 cells (all $P<0.05$). **Conclusion:** IL-17A can enhance the intraperitoneal metastasis of OvCa.

Key words IL-17A; ovarian cancer; metastasis; invasion

卵巢癌(ovarian cancer, OvCa)是女性生殖系统三大恶性肿瘤之一,转移和耐药使OvCa的5年生存率为30%左右,病死率居于女性生殖系统恶性肿瘤的首位^[1]。研究发现,OvCa患者体内白细胞介素17A(interleukin-17A, IL-17A)水平增高,且与肿瘤

进展密切相关^[2]。IL-17A是IL-17细胞因子家族中(IL-17A~IL-17F)最早被发现也最具有代表性的一员,是一种多效性炎症因子,主要通过IL-17RA发挥作用^[3-4]。同时有研究表明IL-17A是血管生成因子,IL-17A在肿瘤组织中的高表达与肿瘤的血管生成有密切联系,而血管生成又与肿瘤转移侵袭密切相关^[5]。腹腔转移是OvCa最常见的转移方式^[6],但IL-17A在OvCa腹腔转移中的作用及其相关机制未见报道,需进一步研究。

基金项目 天津市科技计划项目(18YFZCSY00040);天津市教委重点项目(2016YD01)

作者简介 李岩(1996-),女,硕士在读,研究方向:肿瘤免疫;通信作者:邓为民, E-mail: dengweimin@tmu.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 材料 小鼠 OvCa 细胞系 ID8 细胞由堪萨斯大学医疗生殖中心惠赠;C57BL/6 遗传背景的野生型(WT)小鼠购自中国军事医学科学院实验动物中心;C57BL/6 遗传背景的 IL-17A^{-/-}小鼠购自日本东京理科大学生物医学科学研究所动物疾病模型中心;DMEM 培养基购自中国南京凯基生物科技发展有限公司;胎牛血清(FBS)购自美国 GIBCO 公司;rmIL-17A 购自美国 PeproTech 公司;四甲基偶氮唑盐(MTT)和人工基底膜基质凝胶 Matrigel 购自美国 BD 公司;Transwell 小室购自美国 Corning 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 ID8 细胞以含 10% FBS 的 DMEM,置于 5% CO₂、37℃培养箱中常规培养。

1.2.2 小鼠体内实验 将 ID8 细胞注射于 6 周龄雌性 WT 小鼠和 IL-17A^{-/-}小鼠腹腔内($5 \times 10^6/200 \mu\text{L}$ /鼠, $n=6$ 只),6 周后颈椎脱臼处死小鼠,打开腹腔,观察瘤结节生成情况,计数并拍照。

1.2.3 MTT 实验 将 ID8 细胞接种于 96 孔板中($4 \times 10^3/100 \mu\text{L}$ /孔)。24 h 后更换培养液,加入 1 ng/mL、10 ng/mL rmIL-17A,同时对对照组加入等体积的生理盐水,所有组设置 5 个平行孔;继续培养 12 h、24 h、48 h。培养结束前 4 h,避光加入 MTT(终浓度 0.5 mg/mL)。培养结束后离心弃上清,加入 DMSO (100 μL /孔),酶标仪检测波长为 490 nm 的光密度值(OD₄₉₀)。

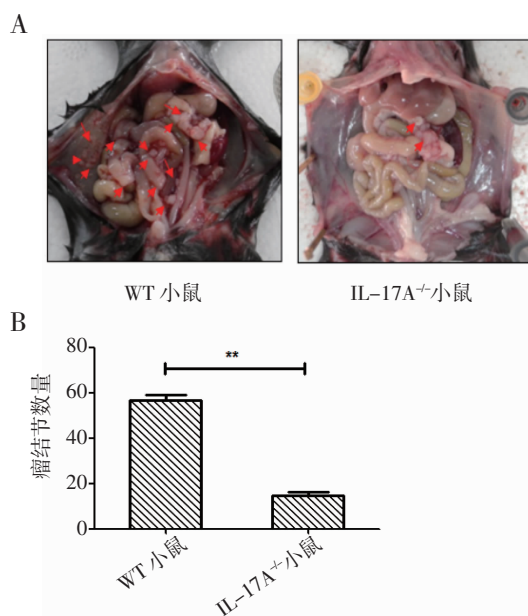
1.2.4 细胞划痕实验 将 ID8 细胞接种于 12 孔板中($2 \times 10^5/\text{mL}$ /孔);待细胞贴壁后,划线,清洗去除脱落细胞;加入含 2%FBS 的 DMEM 培养基(1 mL/孔),加入 1 ng/mL、10 ng/mL rmIL-17A,同时对对照组加入等体积的生理盐水。分别于 0 h、6 h、12 h、24 h 在显微镜下拍照,应用 Quantity One 4.5.6 软件分析各组划痕间距。

1.2.5 Transwell 侵袭实验 将 ID8 细胞接种于铺有 Matrigel 胶的 Transwell 上室($5 \times 10^4/200 \mu\text{L}$ /孔);在下室加入 500 μL 含 1%FBS 的 DMEM 培养基,同时加入 1 ng/mL、10 ng/mL rmIL-17A,同时对对照组加入等体积的生理盐水,常规培养 24 h。培养结束后,取出上室,进行漂洗,并拭去未穿膜的细胞,以 4% 多聚甲醛固定,用 0.1% 结晶紫染色液染色,显微镜下拍照并统计穿膜细胞数。

1.3 统计学处理 使用 GraphPad prism 5 进行统计学分析并绘图,最终结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 内源性 IL-17A 促进小鼠 OvCa 腹腔内广泛生长 在接种 ID8 细胞 6 周后处死小鼠,结果发现,WT 小鼠腹腔内肠系膜、脾脏、肾脏表面和腹膜后淋巴结处可见密集转移灶;而 IL-17A^{-/-}小鼠腹腔内仅横膈部位有较密集转移灶,肠系膜、脾脏和肾脏表面可见极少转移灶(图 1A 箭头所示)。WT 组小鼠腹腔内瘤结节数量明显高于 IL-17A^{-/-}组小鼠 (56.67 ± 5.37 vs. 14.37 ± 3.68 , $P < 0.01$,图 1B)。



注:A:小鼠腹腔内瘤结节分布情况;B:小鼠腹腔内瘤结节计数统计分析结果;IL-17A: 白细胞介素-17A;与 IL-17A^{-/-}小鼠相比,** $P < 0.01$

图1 内源性 IL-17A 促进小鼠 OvCa 腹腔内成瘤

Fig 1 Endogenous IL-17A promoted tumor formation of OvCa in abdomen in mice

2.2 rmIL-17A 对 ID8 细胞增殖的作用 MTT 实验结果表明,rmIL-17A 不影响 ID8 细胞的增殖。如图 2 所示,在 0~48 h 内 ID8 细胞增殖能力均呈增加趋势,但与对照组相比,不同浓度的 rmIL-17A 对 ID8 细胞增殖没有影响($P > 0.05$)。

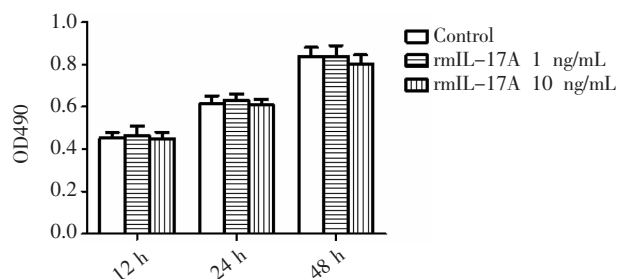
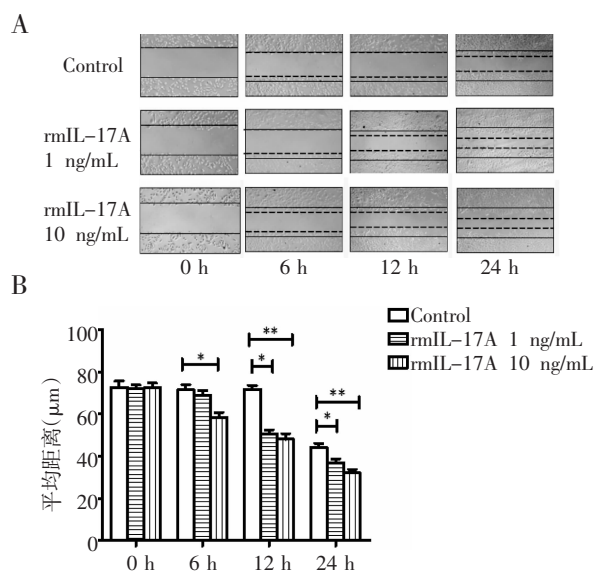


图2 rmIL-17A 对 ID8 细胞增殖的作用

Fig 2 Effects of rmIL-17A on the proliferation of ID8 cells

2.3 rmIL-17A 对 ID8 细胞迁移的作用 细胞划痕实验结果表明,rmIL-17A 可促进 ID8 细胞迁移。如图 3 所示,与对照组相比,10 ng/mL 的 rmIL-17A 作用 6 h 后可促进 ID8 细胞迁移($P<0.05$),1 ng/mL 和 10 ng/mL 的 rmIL-17A 作用 12 h 后可显著促进 ID8 细胞迁移(对照组:71.67±2.62;1 ng/mL 组:50.67±2.49;10 ng/mL 组:48.00±3.74;均 $P<0.01$)。

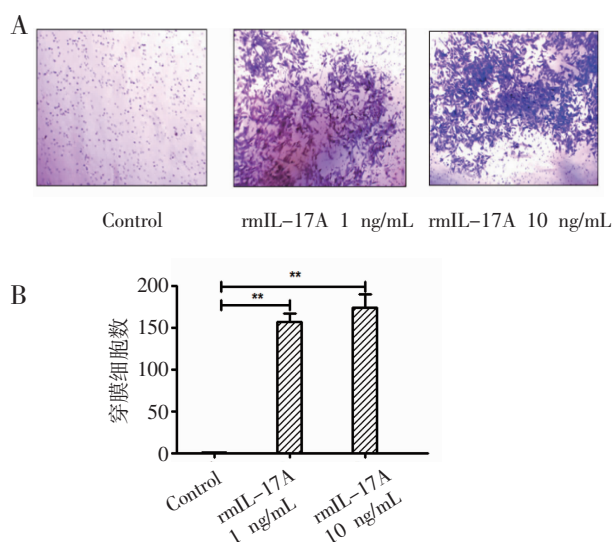


注:A:显微镜下结果(10×);B:迁移距离的统计分析结果;IL-17A:白细胞介素-17A;与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$

图3 rmIL-17A 对 ID8 细胞迁移能力的作用

Fig 3 Effects of rmIL-17A on the migration of ID8 cells

2.4 rmIL-17A 对 ID8 细胞侵袭能力的作用 Transwell 侵袭实验结果表明,rmIL-17A 可促进 ID8 细胞的侵袭能力(图 4A)。



注:A:各组穿膜细胞显微镜下结果(10×);B:各组穿膜细胞数的统计分析结果;IL-17A:白细胞介素-17A;与对照组相比,** $P<0.01$

图4 rmIL-17A 对 ID8 细胞侵袭能力的作用

Fig 4 Effects of rmIL-17A on the invasion of ID8 cells

如图 4B 所示,干预 24 h 后,1 ng/mL rmIL-17A 组穿膜细胞数为 153.00±9.41,10 ng/mL rmIL-17A 组穿膜细胞数为 169.00±10.89,而对照组仅为 0.33±0.47(均 $P<0.01$)。

3 讨论

转移是晚期 OvCa 患者死亡的主要原因之一^[7-9]。但目前对 OvCa 转移、侵袭的机制还不甚了解,而 OvCa 细胞转移、侵袭和腹腔内生长是决定 OvCa 腹腔转移的重要步骤^[10-12]。本研究通过体内、体外实验研究,证实 IL-17A 可以促进 OvCa 的腹腔转移。

体外划痕实验表明,rmIL-17A 可以促进 ID8 细胞的迁移。此外,体外的侵袭实验表明 rmIL-17A 可以促进 ID8 细胞的侵袭。有研究表明,IL-17A 可以通过上调基质金属蛋白酶(MMP)-2 和 MMP-9 表达,增强人肺腺癌 A549 细胞的侵袭能力^[13]。但关于 IL-17A 对 OvCa 侵袭能力的影响还未见报道,需要进一步探索其机制。

本研究以相同基因背景的 IL-17A^{-/-}小鼠和 WT 小鼠为荷瘤动物模型,检测内源性 IL-17A 对腹腔内 OvCa 生长的影响。发现 WT 组小鼠腹腔内瘤结节数量明显高于 IL-17A^{-/-}组小鼠,肿瘤转移灶明显多于 IL-17A^{-/-}组小鼠,表明内源性 IL-17A 可以促进 OvCa 细胞在腹腔内的生长和转移。然而,体外 MTT 实验结果表明,无论低浓度(1 ng/mL)或高浓度(10 ng/mL)的 rmIL-17A 都不影响 ID8 细胞的增殖。体内、外实验结果矛盾的原因,可能与 IL-17A 具有促进血管生成的作用相关^[14-15]。文献报道在 OvCa 的组织切片中 IL-17A 呈现强阳性,加速了 OvCa 的血管生成^[16],而血管生成在肿瘤转移中扮演着不可或缺的角色,新生血管可以为肿瘤提供所需的营养和氧气^[17]。此外,研究表明,脂肪酸结合蛋白(FABP)4 可以介导脂肪酸进入肿瘤细胞,进行 β 氧化,为肿瘤细胞生长和腹腔转移提供能量^[18]。本课题组以前的结果发现 FABP4 是 IL-17A 激活的下游效应蛋白,IL-17A 可能通过促进 FABP4 表达而促进脂肪酸进入肿瘤细胞发挥作用^[2],这可能是 IL-17A 促进卵巢癌腹腔转移的另一个机制。

综上所述,本研究通过体内、体外研究,证实 IL-17A 可以促进 OvCa 的腹腔转移,为 OvCa 腹腔转移的临床干预提供了新的思路 and 策略。

参考文献:

- [1] Lin J, Wang Y C, Sun Z J, et al. 3-acetyl-11-keto-beta-boswellic acid decreases the malignancy of taxol resistant human ovarian cancer by inhibiting multidrug resistance (MDR) proteins function[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 116: 108992

(下转第 525 页)

参考文献:

- [1] World Health organization. World malaria report 2019[R]. Geneva: World Health organization, 2019
- [2] Tuteja R. Malaria—an overview[J]. FEBS J, 2007, 274(18):4670
- [3] Vander Jagt D L, Hunsaker L A, Campos N M, et al. D-lactate production in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*[J]. Mol Biochem Parasitol, 1990, 42(2):277
- [4] Joet T, Eckstein-Ludwig U, Morin C, et al. Validation of the hexose transporter of *Plasmodium falciparum* as a novel drug target [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(13):7476
- [5] Itani S, Torii M, Ishino T. D-Glucose concentration is the key factor facilitating liver stage maturation of plasmodium[J]. Parasitol Int, 2014, 63(4):584
- [6] Bouyer G, Reininger L, Ramdani G, et al. *Plasmodium falciparum* infection induces dynamic changes in the erythrocyte phospho-proteome[J]. Blood Cells Mol Dis, 2016, 100(58):35
- [7] Meireles P, Sales-Dias J, Andrade C M, et al. GLUT1-mediated glucose uptake plays a crucial role during *Plasmodium hepatic* infection[J]. Cell Microbiol, 2017, 19(2):e12646
- [8] Lee E E, Ma J, Sacharidou A, et al. A protein kinase C phosphorylation motif in GLUT1 affects glucose transport and is mutated in GLUT1 deficiency syndrome[J]. Mol Cell, 2015, 58(5):845
- [9] Zhao Y X, Wieman H L, Jacobs S R, et al. Mechanisms and methods in glucose metabolism and cell death[J]. Methods Enzymol, 2008, 442(22):439
- [10] Penkler G, Du Toit F, Adams W, et al. Construction and validation of a detailed kinetic model of glycolysis in *Plasmodium falciparum*[J]. FEBS J, 2015, 282(8):1481
- [11] Slavic K, Krishna S, Derbyshire E T, et al. Plasmodial sugar transporters as anti-malarial drug targets and comparisons with other protozoa[J]. Malar J, 2011, 10(1):165
- [12] Slavic K, Delves M J, Prudêncio M, et al. Use of a selective inhibitor to define the chemotherapeutic potential of the plasmodial hexose transporter in different stages of the parasite's life cycle[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(6):2824
- [13] Shi Y G. Common folds and transport mechanisms of secondary active transporters[J]. Annu Rev Biophys, 2013, 42(1):51
- [14] Deng D, Xu C, Sun P, et al. Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1[J]. Nature, 2014, 510(753):121
- [15] Blo dgett D M, De Zutter J K, Levine K B, et al. Structural basis of GLUT1 inhibition by cytoplasmic ATP[J]. J Gen Physiol, 2007, 130(2):157
- [16] Andrisse S, Patel G D, Chen J E, et al. ATM and GLUT1-S490 phosphorylation regulate GLUT1 mediated transport in skeletal muscle[J]. PLoS One, 2013, 8(6):e66027

(2020-06-19 收稿)

(上接第 520 页)

- [2] Yu C Y, Niu X L, Du Y R, et al. IL-17A promotes fatty acid uptake through the IL-17A/IL-17RA/p-STAT3/FABP4 axis to fuel ovarian cancer growth in an adipocyte-rich microenvironment[J]. Cancer Immunol Immunother, 2020, 69(1):115
- [3] Monteleone I, Pallone F, Monteleone G. Th17-related cytokines: new players in the control of chronic intestinal inflammation[J]. BMC Med, 2011, 9:122
- [4] Xing X, Yang J, Yang X, et al. IL-17A induces endothelial inflammation in systemic sclerosis via the ERK signaling pathway[J]. PLoS One, 2013, 8(12):e85032
- [5] Numasaki M, Tsukamoto H, Tomioka Y, et al. A heterodimeric cytokine, consisting of IL-17A and IL-17F, promotes migration and capillary-like tube formation of human vascular endothelial cells[J]. Tohoku J Exp Med, 2016, 240(1):47
- [6] Li S S, Li C K, Tang M Y, et al. Modeling ovarian cancer multicellular spheroid behavior in a dynamic 3D peritoneal microdevice[J]. J Vis Exp, 2017, (120):27
- [7] Chen Z J, Zhang Z, Xie B B, et al. Clinical significance of up-regulated lncRNA NEAT1 in prognosis of ovarian cancer[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(16):3373
- [8] Beltran E G, Denisenko T V, Zhivotovsky B, et al. Tudor staphylococcal nuclease: biochemistry and functions[J]. Cell Death Differ, 2016, 23(11):1739
- [9] Liang H, Yu T, Han Y, et al. LncRNA PTAR promotes EMT and invasion-metastasis in serous ovarian cancer by competitively binding miR-101-3p to regulate ZEB1 expression[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1):119
- [10] Azais H, Mordon S, Collinet P. Intraperitoneal photodynamic therapy for peritoneal metastasis of epithelial ovarian cancer. Limits and future prospects[J]. Gynecol Obstet Fertil Senol, 2017, 45(4):249
- [11] Ladanyi A, Mukherjee A, Kenny H A, et al. Adipocyte-induced CD36 expression drives ovarian cancer progression and metastasis[J]. Oncogene, 2018, 37(17):2285
- [12] Nakamura K, Sawada K, Kinose Y, et al. Exosomes promote ovarian cancer cell invasion through transfer of CD44 to peritoneal mesothelial cells[J]. Mol Cancer Res, 2017, 15(1):78
- [13] Sugauchi F, Orito E, Kato H. The complete nucleotide sequences of serotype 'O' and 'A' Indian vaccine strains of foot-and-mouth disease virus[J]. Arch Virol, 2011, 156(11):2117
- [14] Jayakumar A, Bothwell ALM. Functional diversity of myeloid-derived suppressor cells: the multitasking hydra of cancer[J]. J Immunol, 2019, 203(5):1095
- [15] Chen Y, Zhong M, Yuan G, et al. Interleukin-17 induces angiogenesis *in vitro* via CXCL8 and CCL2 in retinal pigment epithelium[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(3):4627
- [16] Ohman A W, Hasan N, Dinulescu D M. Advances in tumor screening, imaging, and avatar technologies for high-grade serous ovarian cancer[J]. Front Oncol, 2014, 4:322
- [17] Worzfeld T, Pogge E, Huber M, et al. The unique molecular and cellular microenvironment of ovarian cancer[J]. Front Oncol, 2017, 7:24
- [18] Nieman K M, Kenny H A, Penicka C V, et al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth[J]. Nat Med, 2011, 17(11):1498

(2020-06-16 收稿)