

## 论著·基础研究

## 白细胞介素 22 诱导胃癌细胞 AGS 分泌 VEGF-A 的机制研究

罗秀英, 钟巧玲<sup>△</sup>

(重庆市巴南区第二人民医院检验科, 重庆 400054)

**摘要:**目的 探讨白细胞介素 22 (IL-22) 诱导胃癌细胞 AGS 分泌血管内皮生长因子 A (VEGF-A) 的分子机制。方法 IL-22 刺激体外培养的胃癌细胞系 AGS 细胞, 或预先加入不同的信号通路抑制剂作用 1 h 后再利用 IL-22 进行刺激, 酶联免疫吸附试验检测细胞培养上清液中 VEGF-A 的水平。结果 AGS 细胞经 IL-22 刺激后, VEGF-A 的分泌显著增加, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 且具有剂量和时间依赖性; 加入信号传导转录激活因子 3 (STAT3) 抑制剂预孵育后, IL-22 诱导 AGS 细胞分泌的 VEGF-A 水平显著下降, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。但核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)、c-Jun 氨基末端激酶 (JNK)、丝裂原活化细胞外信号调节激酶 1/2 (MEK1/2) 和 p38 丝裂原激活蛋白激酶 (p38/MAPK) 抑制剂预孵育的 VEGF-A 水平比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结论 IL-22 可能经 STAT3 信号通路诱导 AGS 细胞分泌 VEGF-A, 从而有助于胃癌的进展。

**关键词:** 白细胞介素 22; 血管内皮生长因子 A; 信号传导转录激活因子 3

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.13.004

**中图法分类号:** R735.2

**文章编号:** 1673-4130(2018)13-1547-04

**文献标识码:** A

**The mechanism of interleukin-22 induced the secretion of vascular endothelial growth factor A in gastric cancer cell line AGS**

LUO Xiuying, ZHONG Qiaoling<sup>△</sup>

(Department of Clinical Laboratory, the Second People's Hospital of Banan District, Chongqing 400054, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the mechanism of interleukin-22 (IL-22) induced the secretion of vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) in gastric cancer cell line AGS. **Methods** Gastric cancer cell line AGS were cultured in vitro, and recombination cytokine IL-22 were added, or signal pathway inhibitor were pre-incubated with AGS for 1 hour and then IL-22 were added, the level of VEGF-A were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** Compared with the unstimulated group, the secretion of VEGF-A in IL-22-stimulated group was significantly increased, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ), which was in a dose and time dependent manner. In addition, IL-22-stimulated the secretion of VEGF-A by AGS was significantly decreased while pre-incubated by the signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) inhibitor, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ), but such effect was not observed while AGS were pre-incubated with the nuclear factor kappa B inhibitor, c-Jun N-terminal kinase inhibitor, mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor and p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, there was no statistical significance ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** IL-22 could induce the secretion of VEGF-A in gastric cancer cell line AGS via STAT3 signal pathway, which may contribute to tumor progression.

**Key words:** interleukin-22; vascular endothelial growth factor A; signal transducers and activators of transcription 3

白细胞介素 22 (IL-22) 是一种新近发现的促炎细胞因子, 可由 T 细胞、自然杀伤细胞及天然样淋巴细胞等多个免疫细胞分泌, 在自身免疫性疾病、感染性疾病、特别是肿瘤的发生发展中发挥重要作用<sup>[1-2]</sup>。有研究报道 IL-22 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基质金属蛋白, 有利于肿瘤细

胞的远端转移<sup>[3-4]</sup>。最近研究发现, 肿瘤中分泌 IL-22 的 T 细胞水平与微血管密度相关标志物 CD34 的表达密切相关<sup>[5]</sup>, 提示 T 细胞来源的 IL-22 很可能参与诱导新生血管的形成。在胃癌微环境中, 胃癌细胞可高表达 IL-22 的受体并分泌血管内皮生长因子 A (VEGF-A)<sup>[6-7]</sup>。基于 VEGF-A 是肿瘤微环境中新生血管形成的关键, 本研究拟利用 IL-22 刺激体外培养

作者简介: 罗秀英, 女, 主管技师, 主要从事临床血液学检验研究。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail: 304437574@qq.com。

本文引用格式: 罗秀英, 钟巧玲. 白细胞介素 22 诱导胃癌细胞 AGS 分泌 VEGF-A 的机制研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(13): 1547-1549.

的胃癌细胞系 AGS 细胞并检测 VEGF-A 水平,探讨 IL-22 是否能够诱导胃癌细胞分泌 VEGF-A,并进一步阐明其可能的调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料 重组人细胞因子 IL-22 购自美国 Peprotech 公司,信号传导转录激活因子 3(STAT3)抑制剂 (FLLL32)、核因子-κB(NF-κB)抑制剂 (BAY 11-7082)、丝裂原活化细胞外信号调节激酶 1/2(MEK1/2)抑制剂 (U0126)、p38 丝裂原激活蛋白激酶 (p38/MAPK)抑制剂 (SB203580)和 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK)抑制剂 (SP600125)购自美国 MedChem Express 公司,无荧光标记的抗人 IL-22 受体(IL-22R)阻断抗体、藻红蛋白荧光素(PE)标记的抗人 IL-22R 染色抗体及同型对照染色抗体购自美国 Biolegend 公司,VEGF-A 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒购自美国 RD 公司,F12 培养基、胎牛血清及胰酶均购自美国 Hyclone 公司,磷酸缓冲盐溶液(PBS)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。细胞株为人胃癌细胞系 AGS 细胞购自中国科学院。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 AGS 细胞用含 10%胎牛血清的 F12 培养基置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中进行培养。

1.2.2 流式细胞术 AGS 细胞经胰酶消化后,利用无菌 PBS 清洗 3 次,然后加入藻红蛋白荧光素(PE)标记的抗人 IL-22R 抗体及相的同型抗体,4℃ 孵育 30 min 后用 PBS 清洗 2 次,随后 4%的多聚甲醛固定 15 min,再用 PBS 清洗 2 次,流式细胞仪检测 AGS 细胞表达 IL-22R 的情况。

1.2.3 VEGF-A 检测 将 AGS 细胞以 2×10<sup>6</sup> 个/孔铺于 6 孔板中,加入不同浓度的重组人细胞因子 IL-22 进行刺激,或预先加入 10 μg/mL 的抗 IL-22R 抗体或 10 μmol/L 的 NF-κB 抑制剂(BAY 11-7082)、MEK1/2 抑制剂 (U0126)、STAT3 抑制剂 (FLLL32)、p38/MAPK 抑制剂 (SB203580)和 JNK 抑制剂(SP600125)作用 1 h,然后去除孔中的培养基,再加入新的培养基后利用 IL-22 刺激 24 h,收集细胞培养上清液并冻存于-20℃,ELISA 检测上清液中的 VEGF-A 水平。每次实验 AGS 细胞铺板均为 3 个平行复孔,并重复 3 次实验。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行数据的统计学处理和分析,所得数据均服从正态分布且方差齐性,数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用独立样本 T 检验比较两组之间的差异,多组之间的比较采用单因素方差分析。P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 IL-22R 在 AGS 细胞中的表达 IL-22 通过其相应的受体发挥功能,利用流式细胞术染色进行检测,结果显示经同型对照抗体染色的 AGS 细胞未见峰值的右移,而经 PE 标记的抗人 IL-22R 阳性抗体染

色的细胞峰值则明显右移,由此表明 AGS 细胞高表达 IL-22 的受体。见图 1。

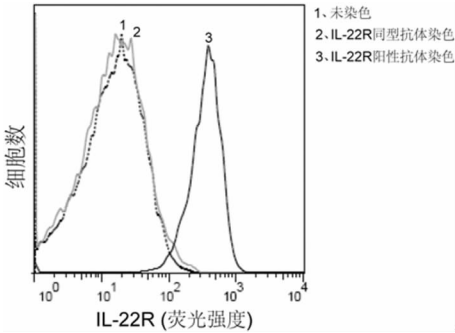


图 1 流式细胞术染色检测 IL-22R 在 AGS 细胞的表达

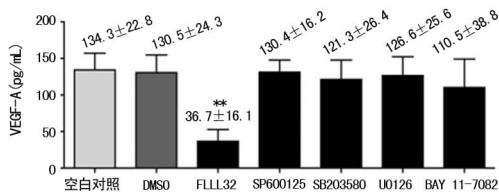
2.2 IL-22 刺激 AGS 细胞后的培养上清液中 VEGF-A 水平检测 AGS 细胞经重组细胞因子 IL-22 刺激后,收集培养上清液进行 ELISA 检测。结果显示 IL-22 可诱导 AGS 细胞大量分泌 VEGF-A,且 AGS 细胞经 IL-22 以 0、1、10、100 ng/mL 剂量刺激 24 h 后,培养上清液中的 VEGF-A 水平分别为 (24.6±15.3)、(58.4±21.8)、(112.3±34.2)、(148.2±43.1) pg/mL,差异有统计学意义 (P<0.05)。进一步利用 10 ng/mL 的 IL-22 刺激 AGS 细胞,并于不同的时间点检测 VEGF-A 的分泌,结果发现随着 IL-22 刺激时间的延长,AGS 细胞分泌 VEGF-A 的水平逐渐增加,见表 1,由此表明 IL-22 可以剂量和时间依赖的方式诱导 AGS 细胞分泌 VEGF-A。

表 1 不同时间 IL-22 刺激 AGS 细胞分泌 VEGF-A 水平比较

| 时间(h) | 空白对照 (ng/mL) | VEGF-A (pg/mL) | IL-22 (ng/mL) |
|-------|--------------|----------------|---------------|
| 0     | 27.0±18.4    | 24.6±15.3      | 30.1±16.7     |
| 12    | 31.3±22.1    | 58.4±21.8      | 57.0±20.2     |
| 24    | 32.9±21.4    | 112.3±34.2     | 119.4±32.8    |
| 48    | 37.5±19.5    | 148.2±43.1     | 126.7±30.6    |

2.3 IL-22R-STAT3 信号途径参与调控 IL-22 诱导的 VEGF-A 分泌 鉴于 IL-22 可刺激 AGS 细胞分泌 VEGF-A,进一步分析其中可能的分子机制。结果显示在 IL-22 刺激的条件下,AGS 细胞分泌的 VEGF-A 水平为(118.3±18.0) pg/mL,但是当利用抗 IL-22R 的阻断抗体阻断 IL-22R 后,IL-22 刺激 AGS 细胞分泌的 VEGF-A 水平仅为(39.4±11.1) pg/mL,二者比较差异有统计学意义 (P<0.05)。此外,利用 NF-κB 抑制剂 (BAY11-7082)、MEK1/2 抑制剂 (U0126)、STAT3 抑制剂 (FLLL32)、p38/MAPK 抑制剂 (SB203580)和 JNK 抑制剂(SP600125)预处理 1 h,预处理 AGS 细胞 1 h 后,再利用 IL-22 进行刺激,结果发现,与未加抑制剂(空白对照)或仅加入二甲亚砜(DMSO)的 AGS 细胞分泌的 VEGF-A 水平相比,加

入 STAT3 抑制剂(FLLL32)处理的 AGS 细胞分泌的 VEGF-A 水平显著下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 2,而加入其他抑制剂处理与未加抑制剂(空白对照)或仅加入二甲基亚砜(DMSO)的 AGS 细胞分泌的 VEGF-A 水平比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。这些结果提示 IL-22 通过 IL-22R-STAT3 信号途径诱导 AGS 细胞分泌 VEGF-A。



注: \*\*  $P < 0.05$ ,与空白对照或仅加入 DMSO 比较

图 2 不同信号通路抑制剂对 IL-22 诱导 AGS 细胞分泌 VEGF-A 水平比较

### 3 讨 论

自 IL-22 作为免疫细胞来源的促炎因子被鉴定发现后,其在胃癌、结直肠癌和肝癌等多个肿瘤中的研究得到了深入探讨<sup>[8]</sup>。大量研究证实肿瘤浸润的 T 细胞主导 IL-22 的分泌,而 IL-22 则通过其特异性的受体发挥功能<sup>[9]</sup>。肿瘤微环境中的 IL-22 可诱导肿瘤干细胞的增殖,促进肿瘤细胞的转移,进而导致肿瘤的不断进展<sup>[10]</sup>。因此,阐明 IL-22 在胃癌中的生物学功能,有助于揭示炎症转化以及炎症促肿瘤转移的相关分子机制,为胃癌的免疫治疗提供新的理论依据和思路。

IL-22R 作为传递 IL-22 信号的受体,仅表达于健康或者恶变的上皮细胞表面,而在免疫细胞及其他间质细胞则无表达<sup>[3]</sup>。早期研究证实,胃癌原代细胞可高表达 IL-22R,继而主导 IL-22 的功能;然而胃癌原代细胞难以分离纯化,极大地限制了 IL-22 的生物学功能研究。此外,目前尚未见到关于胃癌细胞系表达 IL-22R 的研究报道。因此,本研究利用荧光标记的抗 IL-22R 的抗体并结合流式细胞术,首次证实胃癌细胞系 AGS 细胞高表达 IL-22R,提示 AGS 细胞可作为体外研究 IL-22 功能的靶细胞,进而深入探讨其可能的分子调控机制。

本研究首次发现 AGS 细胞经 IL-22 刺激后可大量分泌促血管生成因子 VEGF-A,并随着 IL-22 的刺激剂量或者刺激时间的增加,其诱导 AGS 细胞分泌 VEGF-A 的能力也逐渐增强。此外,加入抗 IL-22R 抗体阻断 IL-22 与其受体的相互作用,结果发现 AGS 细胞分泌的 VEGF-A 水平显著下降。IL-22 与 IL-22R 结合后,必须通过激活下游的级联信号途径,才能诱导 VEGF-A 的转录和翻译。目前,已有研究报道 STAT3、p38/MAPK、MEK1/2、NF- $\kappa$ B 和 JNK 等多个信号通路参与调控 IL-22 的生物学活性<sup>[11-12]</sup>。因此,本研究加入这些信号通路的抑制剂,以期探讨 IL-

22 诱导 AGS 细胞分泌 VEGF-A 的可能机制。结果发现在均有 IL-22 作用的条件下,预先加入 STAT3 信号通路抑制剂 FLLL32 的 AGS 细胞培养上清液中 VEGF-A 的水平显著低于未加抑制剂的 AGS 细胞培养上清液中 VEGF-A 的水平,而 NF- $\kappa$ B 抑制剂 BAY 11-7082、MEK1/2 抑制剂 U0126、Sp38/MAPK 抑制剂 SB203580 和 JNK 抑制剂 SP600125 处理的 AGS 细胞培养上清液中 VEGF-A 的水平与未加抑制剂的 AGS 细胞培养上清液中 VEGF-A 的水平相当,由此表明在体外培养的 AGS 细胞中,IL-22 诱导的 VEGF-A 分泌由 IL-22R-STAT3 信号通路所介导。基于肿瘤中表达 IL-22 的 T 细胞水平与微血管密度呈正相关且 VEGF-A 能够诱导新生血管的形成,提示在胃癌微环境中,IL-22 可能通过诱导 VEGF-A 的分泌参与调控肿瘤中血管的形成,进而促进胃癌的进程。

### 4 结 论

本研究通过体外实验证实 IL-22 可通过 IL-22R 及其下游 STAT3 信号通路诱导胃癌细胞分泌 VEGF-A,进而有利于胃癌的发生发展。该研究是探讨 IL-22 在胃癌中生物学作用的有力补充,揭示了 IL-22 不仅能够直接促进胃癌细胞的增殖和转移,而且还可以通过诱导胃癌细胞分泌促血管生成因子 VEGF-A,进一步加强 IL-22 的促瘤功能。因此,全面阐明 IL-22 在胃癌中的促肿瘤功能及相关的分子机制,将为靶向设计阻断 IL-22 及其下游信号的免疫治疗方案提供新的实验证据。

### 参考文献

- [1] PERUSINA L M, LIN Y, FANG J, et al. Biological and pathological activities of interleukin-22 [J]. J Mol Med (Berl), 2016, 94(5): 523-534.
- [2] EYERICH K, DIMARTINO V, CAVANI A. IL-22 and IL-22 in immunity: Driving protection and pathology [J]. Eur J Immunol, 2017, 47(4): 607-614.
- [3] LIM C, SAVAN R. The role of the IL-22/IL-22R1 axis in cancer [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2014, 25(3): 257-271.
- [4] JI Y, YANG X, LI J, et al. IL-22 promotes the migration and invasion of gastric cancer cells via IL-22R1/AKT/MMP-9 signaling [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(7): 3694-3703.
- [5] KUANG D M, XIAO X, ZHAO Q, et al. B7-H1-expressing antigen-presenting cells mediate polarization of protumorigenic Th22 subsets [J]. J Clin Invest, 2014, 124(10): 4657-4667.
- [6] ZHUANG Y, PENG L S, ZHAO Y L, 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.

相似。

人类白细胞抗原是已知人类最复杂的显性多态遗传系统,近年来随着基因分型技术的发展,证实 HLA-B27 不是单一抗原,而是由多种等位基因所构成的亚型构成,现已确定有 44 个等位基因,这些亚型存在着人种和地区的差异,同时不同的亚型虽然可能只相差 1 个或几个氨基酸,但却显示出对 AS 的易感性和抗性,因此对疑似 AS 患者进行 HLA-B27 分型检测,有助于 AS 的诊断和鉴别诊断。本研究对 39 例 HLA-B27 阳性标本检测结果显示 HLA-B2704 亚型占 82.05%,HLA-B2705 亚型占 17.95%。国内不同地区(包括湖南、上海、陕西、四川)<sup>[12-15]</sup>的相关报道结果均显示 AS 患者 HLA-B27 的亚型以 B2704 和 B2705 为主,其中 B2704 占大多数;而山东地区 HLA-B2705 亚型占 63.33%,HLA-B2704 占 36.67%<sup>[16]</sup>;内蒙古地区 HLA-B2705 亚型占 49.40%,HLA-B2704 占 44.50%<sup>[9]</sup>;有可能存在南北地区的差异。而深圳地区外来人口很多,大多数来自中国南方地区,因此本研究结果与上述的 4 个南方地区的结果相符,主要以 HLA-B2704 为主。由于本研究的样本数太少,临床资料不是很全,未进行亚型与临床特征的相关性分析,根据已有的研究暂未发现亚型与临床特征如病程、活动度、分期等有明显的相关性。

4 结 论

荧光定量 PCR 染料法和流式细胞法都是检测 HLA-B27 的好方法,特异度好、准确度高。相比之下,荧光定量 PCR 染料法还具有设备通用性强,对样本要求低,制备简单,高通量等特点,加上还能同时进行分型检测,因此具有很好的临床推广价值和应用前景。

参考文献

[1] ROSTOM S, DOUGADOS M, GOSSEC L, et al. New tools for diagnosing spondyloarthritis [J]. J Int Bone Spine, 2010, 77(2): 108-114.

[2] 杨霄鹏, 惠玲. 人类白细胞抗原 B27 的实验室诊断[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2015, 7(4): 276-279.

[3] 刘毓刚, 李琳, 吴丽娟, 等. 流式细胞法检测人类白细胞抗原 B27/B7 表达在诊断强直性脊柱炎中的价值[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(2): 138-140.

[4] 洪俊, 饶永彩. 流式 HLA-B27 测定法在强直性脊柱炎诊断中的临床价值[J]. 职业与健康, 2012, 28(6): 693-695.

[5] 卢峰, 上官莉娟, 陈涛, 等. 流式细胞仪检测 HLA-B27 在强直性脊柱炎筛查中的应用及分析[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(13): 1779-1783.

[6] DUANQ M, PUAPAIROJ C, ROMPHRUK A, et al. HLA-B \* 27 subtypes in Northern and Northeastern Thais, Karens, and Bamars determined by a high-resolution PCR-SSP technique [J]. Tissue Antigens, 2009, 73(6): 590-594.

[7] 闻海丰, 冯忠军, 韩文龙, 等. 实时荧光聚合酶链反应熔解曲线检测人类白细胞抗原 B27 方法建立及评价[J]. 临床荟萃, 2015, 30(6): 674-676.

[8] 侯伟, 许晓东. 2 种 HLA-B27 检测方法在强直性脊柱炎诊断中的比较[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(24): 3398-3400.

[9] 白世杰, 托娅, 张保平, 等. 流式细胞术与 PCR-SSP 法检测 HLA-B27 的对比及 HLA-B27 亚型的研究[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(5): 586-587.

[10] 刘巧灵, 范春梅, 苏丽丽. HLA-B27 抗原检测与基因检测在强直性脊柱炎诊断中的应用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2017, 33(6): 826-828.

[11] 叶阿里, 窦亚玲, 孔令君, 等. 实时荧光 PCR 法和流式细胞术检测 HLA-B27 的结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(7): 892-894.

[12] MA H J, HU F P. Diversity of human leukocyte antigen-B27 alleles in Han population of Hunan province, southern China[J]. Tissue Antigens, 2006, 68(2): 163-166.

[13] 汪薇, 李志强. HLA-B \* 27 基因亚型与强直性脊柱炎临床特征的相关性[J]. 临床输血与检验, 2010, 12(1): 31-35.

[14] 王华, 甄拴平, 党丽君, 等. 强直性脊柱炎与 HLA-B27 基因亚型的相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(14): 1954-1956.

[15] 黄波, 万小涛, 张有辉. 强直性脊柱炎患者 HLA-B27 及基因亚型检测分析[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(21): 3052-3053.

[16] 宋永红, 李文超, 吕红娟, 等. 山东地区强直性脊柱炎患者 HLA-B27 基因高分辨分型结果分析[J]. 现代检验医学杂志, 2007, 22(2): 66-67.

(收稿日期: 2017-11-21 修回日期: 2018-02-22)

(上接第 1549 页)

[7] LIN C, ZHANG Z, XU Y, et al. High tumor vascular endothelial growth factor expression is associated with poorer clinical outcomes in resected T3 gastric adenocarcinoma[J]. Am J Clin Pathol, 2016, 146(3): 278-288.

[8] BLAKE S J, TENG M W. Role of IL-17 and IL-22 in autoimmunity and cancer[J]. Acta Derm, 2014, 105 (Suppl 1): 41-50.

[9] JIA L, WU C. The biology and functions of Th22 cells [J]. Adv Exp Med Biol, 2014, 841(1): 209-230.

[10] 张轶, 李晓英, 师雷锋. 白细胞介素 22 在疾病中的作用

[J]. 免疫学杂志, 2017, 8(1): 711-716.

[11] SAALIM M, RESHAM S, MANZOOR S, et al. IL-22: a promising candidate to inhibit viral-induced liver disease progression and hepatocellular carcinoma[J]. Tumour Biol, 2016, 37(1): 105-114.

[12] YANG X, ZHENG S G. Interleukin-22: a likely target for treatment of autoimmune diseases[J]. Autoimmun Rev, 2014, 13(6): 615-620.

(收稿日期: 2017-11-21 修回日期: 2018-02-22)