

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[△]

(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-κB (NF-κB)、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

文章编号:1673-4130(2018)13-1547-04

中图法分类号:R735.2

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[△]

(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^[1-2]。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^[3-4]。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^[5], 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)^[6-7]。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

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 Pepro-
tech 公司, 信号传导转录激活因子 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 Ex-
press 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 °C、5% CO₂ 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 °C 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 2×10^6 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 μ g/mL 的抗 IL-22R
抗体或 10 μ mol/L 的 NF- κ B 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 °C, 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。

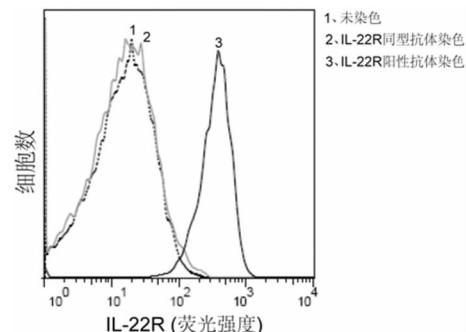


图 1 流式细胞术染色检测 IL-22R 在 AGS 细胞的表达

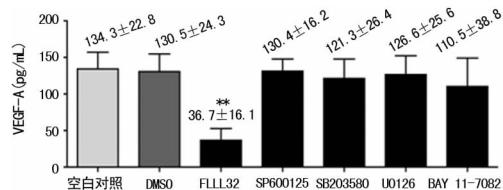
**2.2 IL-22 刺激 AGS 细胞后的培养上清液中
VEGF-A 水平检测** AGS 细胞经重组细胞因子 IL-
22 刺激后, 收集培养上清液进行 ELISA 检测。结果
显示 IL-22 可诱导 AGS 细胞大量分泌 VEGF-A, 且
AGS 细胞经 IL-22 以 0、1、10、100 ng/mL 剂量刺激
24 h 后, 培养上清液中的 VEGF-A 水平分别为
(24.6±15.3)、(58.4±21.8)、(112.3±34.2)、
(148.2±43.1) pg/mL, 差异有统计学意义 (P<
0.05)。进一步利用 10 ng/mL 的 IL-22 刺激 AGS 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- κ B
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) 或仅加入二甲基亚砜
(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^[8]。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^[9]。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^[10]。因此, 阐明 IL-22 在胃癌中的生物学功能, 有助于揭示炎癌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^[3]。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-κB 和 JNK 等多个信号通路参与调控 IL-22 的生物学活性^[11-12]。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-κB 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 的促癌功能。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

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

(下转第 1552 页)

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)^[12-15] 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%^[16];内蒙古地区 HLA-B2705 亚型占 49.40%,HLA-B2704 占 44.50%^[9];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 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 的比对及 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 基因高分辨率分型结果分析 [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]. Actas Dermo, 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)