

IL-23 和 IL-17 在结直肠癌患者中的表达及意义

王建升 吕元鹏 孟军涛 宋津晓 张立志 帖彦清

摘要 目的:检测结直肠癌患者外周血和肿瘤组织中 IL-23、IL-17 的含量,探讨其与临床病理特征的相关性。**方法:**24 例对照组和 56 例结直肠癌患者组。用 ELISA 法检测患者和对照组外周血及患者正常黏膜组织与肿瘤组织培养液中的 IL-23、IL-17 水平。**结果:**结直肠癌患者外周血和肿瘤组织培养液中 IL-23 和 IL-17 水平分别高于相应的对照组 ($P<0.01$) 和正常黏膜组 ($P<0.05$)。结直肠癌患者外周血中 IL-17 水平与淋巴结转移情况及 TNM 分期相关 ($P<0.05$),但 IL-23 水平与患者各项临床病理参数无相关性 ($P>0.05$)。肿瘤组织培养液中 IL-17 水平与肿瘤分化程度、淋巴结转移情况及 TNM 分期相关 ($P<0.05$),而 IL-23 水平仅与 TNM 分期相关 ($P<0.05$)。**结论:**IL-23 和 IL-17 可能参与了结直肠癌进展的免疫病理过程。

关键词 结直肠癌 IL-23 IL-17

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.20132006

Expression and clinical significance of IL-23 and IL-17 in patients with colorectal cancer

Jiansheng WANG, Yuanpeng LV, Juntao MENG, Jinxiao SONG, Lizhi ZHANG, Yanqing TIE

Correspondence to: Jiansheng WANG; E-mail: wjsxjr@126.com

Department of Clinical Laboratory, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, China.

Abstract Objective: This study was conducted to investigate the levels of IL-23 and IL-17 in sera and tumor tissues and to analyze their association with clinico-pathological parameters in patients with colorectal cancer (CRC). **Methods:** A total of 24 healthy subjects and 56 patients with CRC were recruited in this study. Enzyme-linked immunosorbent assay was performed to measure the concentrations of IL-23 and IL-17 in the sera of CRC patients and healthy controls and in cultured normal tissues and tumor tissues from CRC patients. **Results:** The levels of serum IL-23 and IL-17 were significantly higher in CRC patients than in healthy controls ($P<0.01$). The supernatant levels of IL-23 and IL-17 in tumor tissues were significantly higher than in normal tissues ($P<0.05$). Serum IL-17 level was correlated with tumor location, lymph node metastasis, and TNM stage ($P<0.05$), whereas serum IL-23 level showed no correlation with all clinico-pathological parameters ($P>0.05$). Tumor supernatant IL-17 level was correlated with tumor differentiation, lymph node metastasis, and TNM stage ($P<0.05$), whereas tumor supernatant IL-23 level was correlated only with TNM stage ($P<0.05$). **Conclusion:** IL-23 and IL-17 may be involved in the immuno-pathogenesis of CRC progression.

Keywords: colorectal neoplasm, IL-23, IL-17

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是最常见的一类恶性肿瘤,其发生发展是一个多步骤、多阶段的过程,在这个过程中已证实有细胞因子网络调控的严重失衡,如结直肠癌患者有 Th1 相关的细胞因子向 Th2 相关的细胞因子漂移。而且血清中 Th1/Th2 相关的细胞因子在“腺瘤—腺癌”顺序中的早期就出现明显的异常,被认为是评估临床预后很重要的免疫学指标^[1]。

IL-23 和 IL-17 是一类促炎性细胞因子,参与了脑、肺、皮肤和胃肠道等多种组织的慢性炎症^[2]。尽管 IL-23 在 Th17 细胞的初始分化中并不起主要作用,但其存在却有利于维持 Th17 细胞的增殖和存活,IL-23 的缺失可使 Th17 细胞产生其特征因子 IL-17

的能力大大减低^[3]。最近的证据表明 IL-23/IL-17 轴也参与了多种肿瘤的发生发展^[4-5]。为探讨 IL-23/IL-17 轴在结直肠癌进展中的作用,本研究用 ELISA 检测了结直肠癌患者外周血,正常黏膜组织和肿瘤组织培养液中 IL-23 和 IL-17 水平的变化情况,并分析其与临床病理特征的相关性。

1 材料与方法

1.1 临床资料

标本来源于河北省人民医院 2010 年 6 月至 2013 年 3 月结直肠腺癌患者 56 例,其中男 28 例、女 28 例;年龄 43 ~ 86 岁,平均 (65.1±11.6) 岁。全部患者的标本在收集前均未行放疗、化疗、生物治疗及中西医结合治疗。所有病例均经病理诊断证实且确定其病理

分型。选择健康志愿者24例为对照,男12例、女12例;年龄42~83岁,平均(63.3±11.9)岁。所有受试者均签署知情同意书,并报伦理委员会批准。

1.2 方法

受试对象于清晨抽取空腹外周血5 mL, 3 000转/分离心,取血清储存于-80℃以备用。正常黏膜组织和癌组织来自29例手术切除的结直肠癌患者,其中正常黏膜组织至少远离癌组织5 cm。将新鲜分离的正常黏膜组织和肿瘤组织分别剔取脂肪和血块后,称重,用含双抗的D-Hank's液清洗3次,用手术剪将组织剪成小块,放入24孔培养板中,往每孔加入含双抗的RPMI 1640完全培养液,置于37℃,CO₂孵箱中培养24 h后收集培养液于离心管中,13 500转/分,离心,吸取上清液储存于-80℃以备用。用双抗体夹心法进行人IL-17和IL-23的ELISA检测。操作过程均按ELISA试剂盒(eBioscience)说明书进行。细胞因子的浓度以pg/mL表示。

1.3 统计学分析

所有数据采用SPSS 17.0软件包进行统计学分析,结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示。计量资料采用 t 检验;相关分析采用Pearson相关分析法。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结直肠癌患者和健康对照外周血中IL-23和

IL-17水平的检测

结直肠癌患者血清中IL-23和IL-17水平显著高于健康对照组(表1)。结直肠癌患者血清中IL-17水平与患者年龄、性别、肿瘤大小及分化程度无关($P>0.05$),与淋巴结转移及TNM分期(直肠)呈负相关($P<0.05$),即有淋巴转移者IL-17水平低于无淋巴结转移者,IL-17水平随着TNM分期(直肠)增加反而减少。另外,也发现血清中IL-17水平与肿瘤位置有关,即在结肠(升结肠、横结肠和降结肠)中的表达水平高于直肠或乙状结肠($P<0.05$)。结直肠癌患者血清中IL-23水平与患者的各项临床病理参数无相关性($P>0.05$,表2)。

2.2 结直肠癌患者正常黏膜组织和肿瘤组织中IL-23和IL-17水平的检测

结直肠癌患者肿瘤组织培养液中IL-23和IL-17水平高于正常黏膜组(表1)。结直肠癌患者肿瘤组织培养液中IL-17水平与患者年龄、性别、肿瘤大小无关($P>0.05$),与淋巴结转移及TNM分期呈正相关($P<0.05$)。但肿瘤组织培养液中IL-17水平还与肿瘤的分化程度有关,即低分化者IL-17水平高于相应的高、中分化者。结直肠癌患者肿瘤组织培养液中IL-23水平与患者年龄、性别、肿瘤位置、肿瘤大小、分化程度及淋巴结转移无关($P>0.05$),仅与TNM分期呈正相关($P<0.05$,表3)。

表1 结直肠癌患者和对照组外周血及患者的正常黏膜组织与肿瘤组织中IL-23和IL-17浓度

Table 1 Levels of IL-23 and IL-17 in peripheral blood of CRC patients, healthy subjects, cultured normal tissues, and tumor tissues from CRC patients

Cytokines (pg/mL)	Healthy controls (Serum)	CRC patients (Serum)	<i>t</i>	<i>P</i>	Normal tissues (Supernatant)	Tumor tissues (Supernatant)	<i>t</i>	<i>P</i>
IL-23	18.78±2.52	53.99±4.61	-4.815	<0.001	235.44±12.31	284.23±19.91	-2.084	0.043
IL-17	5.13±0.77	12.61±1.60	-3.287	0.001	164.24±12.20	255.95±30.31	-2.781	0.027

表2 结直肠癌患者血清中IL-17和IL-23水平与临床病理参数的关系

Table 2 Associations of serum IL-17 and IL-23 with clinico-pathological parameters in CRC patients

Parameters	<i>n</i>	IL-17 (pg/mL)	<i>t</i>	<i>P</i>	IL-23 (pg/mL)	<i>t</i>	<i>P</i>
Gender			1.345	0.186		1.458	0.151
Male	28	14.74±2.81			60.65±7.37		
Female	28	10.47±1.47			47.33±5.38		
Age (years)			-0.494	0.625		-1.226	0.225
≤60	21	13.77±3.44			61.25±8.34		
>60	35	11.91±1.55			49.63±5.38		
Tumor size (cm ³)			0.879	0.383		0.949	0.347
<5	31	11.34±1.77			50.06±5.28		
≥5	25	14.18±2.84			58.87±7.80		

表2 结直肠癌患者血清中 IL-17 和 IL-23 水平与临床病理参数的关系 (续表2)

Table 2 Associations of serum IL-17 and IL-23 with clinico-pathological parameters in CRC patients (Continued table 2)

Parameters	<i>n</i>	IL-17 (pg/mL)	<i>t</i>	<i>P</i>	IL-23 (pg/mL)	<i>t</i>	<i>P</i>
Tumor location			-2.062	0.039		-1.841	0.066
Colon (Right to left)	17	16.25±3.53			68.47±11.04		
Rectum	29	11.23±2.16			40.70±3.77		
Tumor differentiation			1.247	0.218		-0.537	0.593
Well, moderate	39	11.30±1.58			55.64±5.34		
Poor	17	15.61±3.82			50.22±9.17		
Lymph node metastasis			2.076	0.043		1.379	0.174
No	29	15.37±2.27			59.98±7.56		
Yes	27	9.64±2.14			47.56±4.90		
TNM stage							
Colon			1.036	0.310		0.795	0.434
I - II	14	16.46±3.51			74.32±11.69		
III -IV	13	11.52±3.23			61.74±10.54		
Rectum			2.386	0.024		0.848	0.404
I - II	11	17.33±4.14			44.81±7.64		
III -IV	18	7.51±2.01			38.19±3.97		

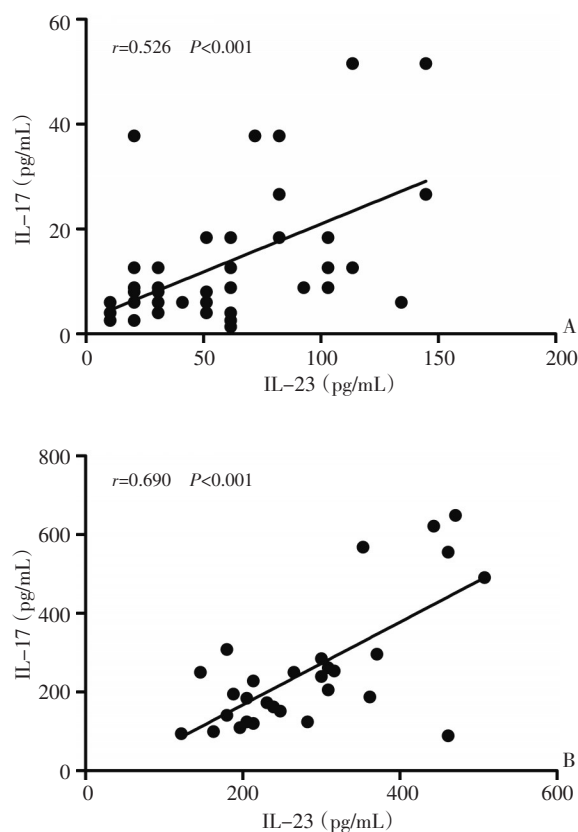
表3 结直肠癌患者肿瘤组织培养液中 IL-17 和 IL-23 水平与临床病理参数的关系

Table 3 Associations of tumor supernatant IL-17 and IL-23 with clinico-pathological parameters in CRC patients

Parameters	<i>n</i>	IL-17 (pg/mL)	<i>t</i>	<i>P</i>	IL-23 (pg/mL)	<i>t</i>	<i>P</i>
Gender			-0.485	0.632		-1.042	0.306
Male	15	241.57±41.66			264.21±24.41		
Female	14	271.37±45.39			305.69±31.83		
Age (years)			-1.162	0.262		-0.936	0.358
≤60	12	301.02±58.92			306.46±35.06		
>60	17	224.14±30.08			268.55±23.46		
Tumor size (cm ³)			0.542	0.592		-0.577	0.569
<5	15	239.87±34.48			295.47±29.80		
≥5	14	273.18±51.79			272.19±26.88		
Tumor location			-0.719	0.478		0.202	0.842
Colon	12	229.77±36.28			289.10±35.57		
Rectum	17	274.43±53.22			280.80±23.83		
Tumor differentiation			-2.309	0.029		0.051	0.960
Well, moderate	19	212.26±27.54			284.93±23.21		
Poor	10	353.05±68.18			282.69±40.36		
Lymph node metastasis			-2.486	0.023		-1.599	0.122
No	14	185.85±20.17			252.16±24.70		
Yes	15	321.38±50.66			314.17±29.53		
TNM stage			-2.121	0.047		-2.463	0.021
I - II	13	193.29±20.25			236.05±20.22		
III -IV	16	306.87±49.56			323.38±29.12		

2.3 结直肠癌患者外周血和肿瘤组织中 IL-23 和 IL-17 相关性分析

结直肠癌患者外周血和肿瘤组织中 IL-23 水平分别与 IL-17 水平呈正相关(图 1)。



A. Peripheral blood; B. Tumor tissues

图1 结直肠癌患者外周血和肿瘤组织中 IL-23 和 IL-17 水平的相关性

Figure 1 Correlations between the levels of IL-23 and IL-17 in peripheral blood (A) and tumor tissues (B) of CRC patients

3 讨论

IL-23 和 IL-17 是一类促炎性细胞因子,其不但参与了慢性炎症和多种自身免疫性疾病的发生发展,而且也参与了肿瘤相关的炎症反应和肿瘤的发展^[4-5]。IL-23 被认为是肠道炎症反应的始动者,能引起炎症细胞因子级联反应,致肠道中 IL-17、IL-6、IL-22 表达水平增高,从而加剧炎症反应^[6]。IL-23 也被看做一种与癌相关的细胞因子,如上调 MMP-9 的表达,增强血管的形成,阻止杀伤性 T 细胞的浸润及抑制其功能的发挥,从而促进肿瘤的生长^[7]。IL-17 能增强炎症细胞因子如 IL-1、IL-6、IL-23 的表达,从而加剧炎症反应^[8-9]。IL-17 能刺激结肠癌细胞分泌 VEGF 而间接促进血管的形成,通过抑制 CD8⁺T 细胞和增强髓系来源的抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)进入肿瘤组织而促进肿瘤的发

展,它在结肠癌患者的表达增多预示患者的不良预后^[10-11]。在产生肠毒素的脆弱类杆菌(ETBF)引发的肠炎和结肠癌鼠模型中,ETBF 能引起较强的 Th17 细胞介导的炎症免疫反应,这种炎症反应导致肠炎和结肠肿瘤的形成,用抗体阻断 IL-17 和 IL-23 受体,就能抑制 ETBF 引发的肠炎和结肠肿瘤的发生,表明 IL-23/IL-17 轴在炎症肠癌的发生中起主要作用^[12]。

有研究者检测了结直肠癌患者外周血或肿瘤组织中 IL-17 和 IL-23 的表达情况,然而可能是由于不同研究者所使用技术手段不同或所收集的生物样品的差异,各个的检测结果常常不一致。Wägsäter 等^[13]用 ELISA 检测 IL-17 在结直肠癌患者正常组织、肿瘤组织及患者和健康对照外周血中的表达情况,发现 IL-17 在这几组间并无统计学差异,且外周血和肿瘤组织中 IL-17 水平与患者的年龄、性别及 Duke 分期无相关性,故认为 IL-17 在结直肠癌中所起的作用不大。Cui 等^[14]发现尽管进展期结直肠癌患者的肿瘤组织中 IL-17 表达高于早期患者,但二者并无统计学差异,肿瘤组织中 IL-17 水平与患者的年龄、性别、淋巴结转移情况及 Duke 分期无相关性。但 Radosavljevic 等^[15]则发现结直肠癌患者血清中 IL-17 水平明显高于健康对照,推测患者外周血 IL-17 水平升高是由于肿瘤组织产生的 IL-17 释放入血而致,故作者认为 IL-17 可作为一个诊治结直肠癌有价值的肿瘤标志物。国内资料表明,结直肠癌患者外周血中 IL-17 水平和结直肠癌的发生、发展密切相关,其水平随着结直肠癌的进展和肿瘤负荷的增加而升高^[16-17]。Stanilov 等^[18]表明结直肠癌患者外周血中 IL-23 水平高于健康对照,肿瘤组织中 IL-23p19 mRNA 表达水平也高于相应的自身正常黏膜组织。结直肠癌患者在化疗前后血液中仍保持高水平的 IL-23,但其并不与疾病的严重程度呈正相关,其病理意义目前不是太清楚^[19]。本研究结果表明,结直肠癌患者外周血中 IL-17 和 IL-23 水平明显高于健康对照,肿瘤组织培养液中 IL-17 和 IL-23 水平也高于相应的正常黏膜组织。通过对结直肠癌患者 IL-17 和 IL-23 水平与临床病理参数进行分析,发现外周血中 IL-17 水平与肿瘤位置、淋巴结转移及 TNM 分期(直肠)呈负相关,而肿瘤组织培养液中 IL-17 水平与肿瘤分化程度、有无淋巴结转移及 TNM 分期呈正相关。外周血中 IL-23 水平与患者各项临床病理参数无相关性,但肿瘤组织培养液中 IL-23 水平仅与 TNM 分期呈正相关。相关性分析表明,结直肠癌患者外周血和肿瘤组织中 IL-23 水平分别与 IL-17 水平呈正相关,暗示 IL-23/IL-17 轴可能参与了结直肠癌进展的免疫病理过程。另外,

发现外周血和肿瘤组织中 IL-17 和 IL-23 水平在结肠癌进展中变化趋势不一致,这一结果也提示仅检测外周血中细胞因子的变化情况是不能准确反映组织局部细胞因子的分泌状况,只有联合检测外周血和组织中的细胞因子水平才能清晰且全面地反映在疾病进展中细胞因子的变化情况。

总之,更好地了解 IL-23/IL-17 轴在结直肠癌发展过程中作用,将能大大激励更深入对结直肠癌发展中免疫机理的研究和探索,也有助于为该类疾病的特异性防治及从免疫调节的角度治疗此类疾病提供新的思路。

参考文献

- 1 Cui G, Florholmen J. Polarization of cytokine profile from Th1 into Th2 along colorectal adenoma-carcinoma sequence: implications for the biotherapeutic target[J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2008, 7(2): 94-97.
- 2 Geremia A, Jewell DP. The IL-23/IL-17 pathway in inflammatory bowel disease[J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2012, 6(2): 223-237.
- 3 Stritesky G, Yeh N, Kaplan MH. IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage[J]. *J Immunol*, 2008, 181(9): 5948-5955.
- 4 Grivennikov SI, Wang K, Mucida D, et al. Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth[J]. *Nature*, 2012, 491(7423):254-258.
- 5 Shi Y, Lin H, Cui J, et al. The role of interleukin-17A in colorectal tumorigenesis[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2013, 28(6):429-432.
- 6 Wang K, Karin M. Common flora and intestine: A carcinogenic marriage[J]. *Cell Logist*, 2013, 3(1):e24975.
- 7 Langowski JL, Zhang X, Wu L, et al. IL-23 promotes tumour incidence and growth[J]. *Nature*, 2006, 442(7101):461-465.
- 8 van Nieuwenhuijze AE, van de Loo FA, Walgreen B, et al. Synergism between GM-CSF and IL-17 causes enhanced joint pathology via the production of IL-6 and IL-23[J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73 (Suppl 1):A24.
- 9 Ma S, Cheng Q, Cai Y, et al. IL-17A produced by $\gamma\delta$ T cells promotes tumor growth in Hepatocellular Carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2014, [Epub ahead of print].
- 10 Numasaki M, Fukushi J, Ono M, et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth[J]. *Blood*, 2003, 101(7):2620-2627.
- 11 Liu J, Duan Y, Cheng X, et al. IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 407(2):348-354.
- 12 Wu S, Rhee KJ, Albesiano E, et al. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses[J]. *Nat Med*, 2009, 15(9):1016-1022.
- 13 Wägsäter D, Löfgren S, Hugander A, et al. Expression of interleukin-17 in human colorectal cancer[J]. *Anticancer Res*, 2006, 26 (6B): 4213-4216.
- 14 Cui G, Yuan A, Goll R, et al. IL-17A in the tumor microenvironment of the human colorectal adenoma-carcinoma sequence[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2012, 47(11):1304-1312.
- 15 Radosavljevic G, Ljubic B, Jovanovic I, et al. Interleukin-17 may be a valuable serum tumor marker in patients with colorectal carcinoma[J]. *Neoplasma*, 2010, 57 (2):135-144.
- 16 Huang WG, Chen RC, Xiang JL, et al. Expressions of serum IL-17 and IL-6 of patients with colorectal carcinoma and their clinical significance[J]. *ZHONGLIU*, 2012, 32(6):458-460. [黄伟刚,陈荣策,项嘉亮,等.结直肠癌患者血清中 IL-17 和 IL-6 的表达及其临床意义[J]. *肿瘤*, 2012, 32(6):458-460.]
- 17 Wang MJ, Sun SP, Qian kq, et al. Preliminary studies on the serum IL-17 and TGF- β levels and their correlations with tumor incidence and progression in colorectal cancer patients[J]. *Chin J Clin Oncol*, 2013, 40(13):767-769. [王梦洁,孙苏平,钱科卿,等.结直肠癌患者血清 IL-17 和 TGF- β 浓度及其相关性的初步研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2013, 40(13):767-769.]
- 18 Stanilov N, Miteva L, Mintchev N, et al. High expression of Foxp3, IL-23p19 and survivin mRNA in colorectal carcinoma[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2009, 24(2):151-157.
- 19 Adamo V, Franchina T, Minciullo PL, et al. Role of interleukin-23 circulating levels increase in resected colorectal cancer before and after chemotherapy: preliminary data and future perspectives[J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226 (11):3032-3034.

(2013-11-26 收稿)

(2014-03-21 修回)

(本文编辑:周晓颖)

作者简介

王建升 肿瘤学博士,主管技师。研究方向为肿瘤免疫学。

E-mail: wjsxjr@126.com

