

## IL-17 在甲状腺乳头状癌中的表达与临床意义

屠 燕,沈美萍\*,秦瑞浩

(南京医科大学第一附属医院普外科,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:研究白细胞介素-17(IL-17)在人甲状腺乳头状癌组织中的表达,探讨 IL-17 在甲状腺乳头状癌发生发展中的作用。方法:采用 real-time RT-PCR、Western blot、免疫组织化学法检测 IL-17 在 60 例甲状腺乳头状癌、10 例结节性甲状腺肿和 10 例桥本氏病组织中的表达,应用统计学方法对其结果进行分析。结果:①甲状腺乳头状癌 IL-17 mRNA 水平高于结节性甲状腺肿,而低于桥本氏病,其中癌旁组织高于癌组织, $P < 0.05$ ;②Western blot 检测结果显示,IL-17 蛋白在结节性甲状腺肿基本不表达,甲状腺乳头状癌癌旁组织表达高于癌组织,但均低于桥本氏病( $P < 0.05$ );③免疫组化染色显示 IL-17 在甲状腺乳头状癌和桥本氏病均有表达,结节性甲状腺肿无表达,且甲状腺癌染成棕色的区域主要位于肿瘤边缘;④临床资料统计显示 IL-17 的表达与甲状腺乳头状癌患者的年龄、性别、肿瘤个数无关,与肿瘤直径、淋巴结转移以及 TNM 分期相关。结论:IL-17 在甲状腺乳头状癌表达增高,IL-17 可能通过影响多种细胞因子以及炎症细胞参与甲状腺癌的发生和发展。

**[关键词]** IL-17;甲状腺乳头状癌;促炎因子

**[中图分类号]** R736.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)04-485-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20130413

## The expression of IL-17 in papillary thyroid carcinoma and its clinical significance

Tu Yan, Shen Meiping\*, Qin Ruihao

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression of IL-17 in human thyroid papillary carcinoma tissues, and explore the role of IL-17 in the development of papillary thyroid cancer. **Methods:** Real-time RT-PCR, Western blot, immunohistochemistry assay were used to detect the expression of IL-17 in 60 cases of papillary thyroid carcinoma, 10 cases of nodular goiter, and 10 cases of Hashimoto's disease tissues. Statistics methods were applied to analyze the results. **Results:** ①The level of IL-17 mRNA in papillary thyroid carcinoma tissues was higher than that in nodular goiter tissues, and lower than that in Hashimoto's disease tissues. While the level in paraneoplastic tissues was higher than that in the cancerous tissue,  $P < 0.05$ ; ②IL-17 protein in nodular goiter tissues was rarely seen, but expressed in papillary thyroid cancer, higher in adjacent tissues and highest in Hashimoto's disease tissues by comparing the Western blot's gray value; ③Immunohistochemistry assay showed the expression of IL-17 in papillary thyroid cancer and Hashimoto's disease tissues, and no expression in nodular goiter tissues. The dyed brown areas in thyroid cancer were mainly located on the edge of the tumor; ④Clinical data statistics showed that the expression of IL-17 had no correlation with the patient's age, sex, tumor numbers, but related with tumor size, lymph node metastasis and TNM staging. **Conclusion:** The expression of IL-17 increases in papillary thyroid carcinoma tissues. It may be involved in the occurrence and development of thyroid cancer by interacting a variety of cytokines and inflammatory cells.

**[Key words]** IL-17; papillary thyroid carcinoma; pro-inflammatory cytokines

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(4): 485-489]

甲状腺癌是最常见的内分泌肿瘤,其发病率逐年上升,现已在女性肿瘤中排名第五<sup>[1-2]</sup>。甲状腺乳

头状癌(PTC)是甲状腺癌最常见的病理类型,约占80%以上<sup>[3]</sup>。众多研究发现,肿瘤微环境中存在各类炎症细胞以及炎症相关因子,这些细胞和因子与肿瘤细胞相互作用,影响肿瘤的生物学特征<sup>[4]</sup>。白细胞介素-17(IL-17)是一种新发现的促炎症细胞因子,

**[基金项目]** 国际科技合作计划—国际产学研合作项目(BZ2009053)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: nj\_shenmp@sina.com

在乳腺癌、肝癌、卵巢癌、胃癌等表达均增高<sup>[5]</sup>。本研究观察 IL-17 在人甲状腺乳头状癌组织中的表达,探讨 IL-17 在甲状腺乳头状癌发生发展中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

收集 2011 年 1~12 月南京医科大学第一附属医院普外科甲状腺手术标本 80 例。取新鲜肿瘤组织以及距肿瘤边缘 0.5 cm 以内的癌旁组织置于液氮保存,石蜡切片取自病理科。患者术前均未行任何治疗且不合并其他疾病。其中 60 例甲状腺乳头状癌,男 15 例,女 45 例,平均年龄( $46.99 \pm 13.47$ )岁,术后病理证实甲状腺乳头状癌(不合并结节性甲状腺肿和桥本氏病)。10 例结节性甲状腺肿,男 2 例,女 8 例,平均年龄( $52.70 \pm 12.52$ )岁。10 例桥本氏病,男 1 例,女 9 例,平均年龄( $37.60 \pm 7.57$ )岁,标本来源于因 PTC 行甲状腺全切术,肿瘤局限于一叶,术后病理证实对侧为慢性淋巴细胞性甲状腺炎,无癌变组织。

反转录试剂盒、定量 PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司,引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,兔抗人 IL-17 购自美国 Abcam 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 实时定量 RT-PCR

液氮冷冻组织研磨至粉末状,TRIzol 法提取组织总 RNA,逆转录后进行 Real-time PCR 检测 IL-17 的表达。人 IL-17 上游引物:5'-CCACCTCACCTTGGAAAT-3',下游引物:5'-GGACCAGGATCTCTTGCT-3'。人 GAPDH 为内参,上游引物:5'-GACCTGACCTGCCGTCTA-3',下游引物:5'-AGGAGTGGGTGTCGCTGT-3'。每个样本至少重复 3 次,每次设 3 个复孔。反应条件:预变性 95℃ 30 s;PCR 反应 95℃ 5 s,60℃ 30 s,40 个循环。收集数据并分析。

#### 1.2.2 Western blot

液氮冷冻组织研磨至粉末状,加入 1 ml 含蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液,冰上裂解,4℃ 12 000 r/min 5 min 离心取上清,加 1×SDS 上样缓冲液煮 5 min。变性聚丙烯酰胺不连续凝胶电泳(SDS-PAGE),蛋白质转移到 PVDF 膜,封闭液封闭 2 h,孵一抗,4℃ 过夜,弃一抗,1×TBST 洗膜 10 min × 3 次,室温孵二抗 2 h,弃二抗,1×TBST 洗膜 10 min × 3 次。ECL 显色,计算机图片采集,图像分析软件测定灰度值,统计分析。

#### 1.2.3 免疫组织化学染色

石蜡包埋组织切片,常规脱蜡水化,PBS 洗涤 2 min × 3 次,在 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中室温孵育 10 min,置于 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH6.0,抗原修复液)中,微波热修复 5 min,PBS 漂洗 2 min × 3 次;3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 覆盖切片组织阻断,室温孵育 10 min,PBS 洗 2 min × 3 次;滴加封闭用正常山羊血清工作液覆盖切片组织,室温孵育 20 min,直接甩干切片上液体;滴加一抗覆盖切片上的组织,4℃ 过夜;PBS 洗涤 2 min × 3 次,滴加二抗覆盖切片组织,37℃,10 min;PBS 洗涤 2 min × 3 次;滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液覆盖切片组织,37℃,10 min;PBS 洗涤 5 min × 5 次,滴加 DAB 显色,镜下观察染色并控制染色时间;苏木素染核 1 min 后自来水冲洗;盐酸乙醇分化 3 s 后镜下观察;自来水蓝化 10 min;梯度酒精脱水,无水乙醇中浸泡约 2 min;二甲苯中浸泡 5 min × 2 次;中性树胶封片,镜下观察。

免疫组化结果判定:染色阳性显示为棕黄色,选 10 个高倍镜视野中阳性的细胞数后取平均值:≤ 10% 的细胞有阳性染色定义为 IL-17 低表达组,> 10% 的细胞有阳性染色被定义为 IL-17 高表达组。

### 1.3 统计学方法

计量数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。两组间均数比较时,采用独立样本 *t* 检验。 $\chi^2$  检验分析甲状腺乳头状癌中 IL-17 表达和临床病理特征的相关性。统计学分析均以 SPSS13.0 统计软件进行处理, $P \leq 0.05$ (双侧)认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 IL-17 mRNA 在甲状腺良恶性疾病组织表达

为了检测 IL-17 mRNA 在甲状腺乳头状癌、结节性甲状腺肿、桥本氏病中的表达水平,采用 real-time RT-PCR 方法发现甲状腺乳头状癌 IL-17 mRNA 水平高于结节性甲状腺肿,而低于桥本氏病,其中癌旁组织高于癌组织(图 1)。

### 2.2 IL-17 蛋白在甲状腺良恶性疾病组织表达

应用 Western blot 方法检测 IL-17 在甲状腺乳头状癌、结节性甲状腺肿、桥本氏病中的蛋白表达水平,通过灰度值统计分析发现 IL-17 蛋白在结节性甲状腺肿基本不表达,甲状腺乳头状癌癌旁组织表达高于癌组织,但均低于桥本氏病(图 2)。

### 2.3 IL-17 在甲状腺良恶性疾病组织中的分布

采用免疫组织化学方法对甲状腺乳头状癌、结节性甲状腺肿、桥本氏病组织进行染色,发现 IL-17 在甲状腺乳头状癌和桥本氏病均有表达,结节性甲

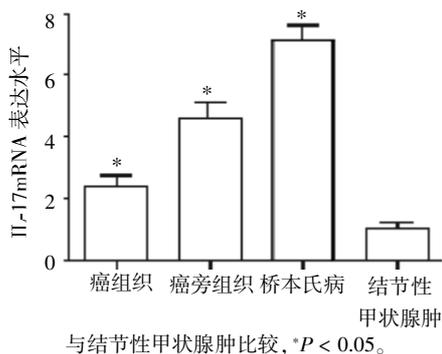
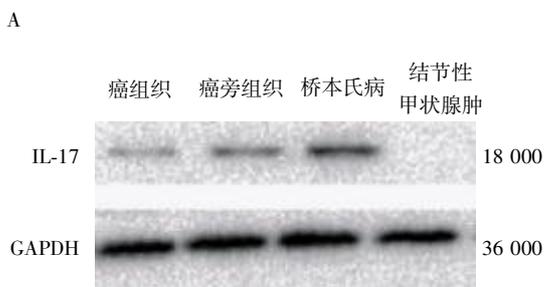


图 1 IL-17 mRNA 在甲状腺良恶性疾病组织中表达水平  
Figure 1 The expression of IL-17 mRNA in benign and malignant thyroid tissues

状腺肿无表达,且甲状腺癌染成棕色的区域主要位于肿瘤边缘(图 3)。



与结节性甲状腺肿比较, \* $P < 0.05$ 。

图 2 IL-17 蛋白在甲状腺良恶性疾病组织中表达水平

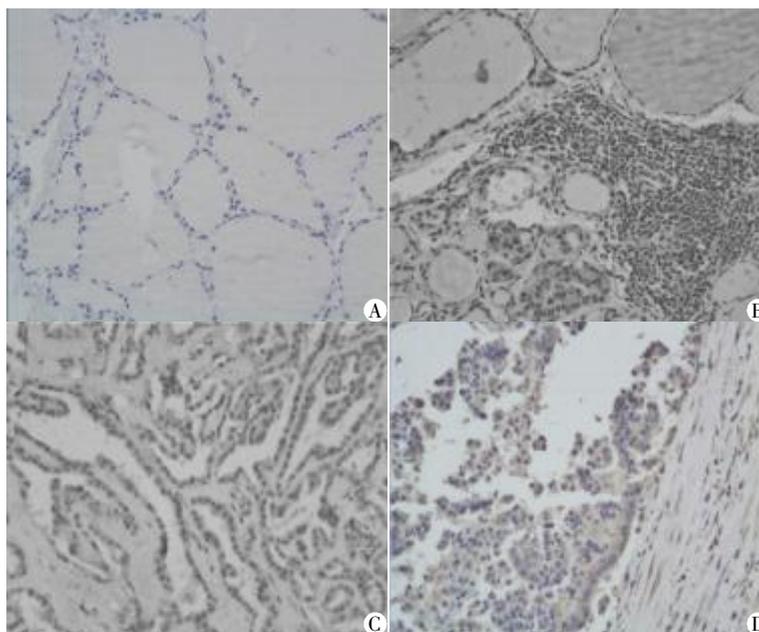
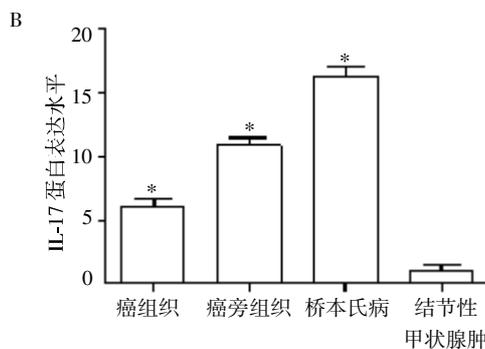
Figure 2 The expression of IL-17 protein in benign and malignant thyroid tissues

#### 2.4 甲状腺乳头状癌 IL-17 表达水平与患者临床病理特征的相关性

IL-17 的表达与甲状腺乳头状癌患者的年龄、性别、肿瘤个数无关,与肿瘤直径、淋巴结转移以及 TNM 分期相关(表 1)。

### 3 讨论

研究发现,IL-17 可由 Th17 细胞、 $\gamma\delta$  T 细胞、NK 细胞、中性粒细胞、嗜酸性细胞、肿瘤相关巨噬细胞分泌,也有报道称基质细胞也可分泌<sup>[6]</sup>。IL-17 通过 IL-17 受体(IL-17R)发挥作用,IL-17R 为 I 型跨膜蛋白,广泛表达于各种细胞<sup>[7]</sup>。间质细胞和骨髓源性细胞是 IL-17 的主要靶细胞,它可刺激这些靶细胞分泌各种促炎细胞因子、生长因子、趋化因子、



A: 结节性甲状腺肿; B: 桥本氏病; C: 甲状腺乳头状癌中心; D: 甲状腺乳头状癌旁组织。

图 3 IL-17 在甲状腺良恶性疾病组织中的分布( $\times 200$ )

Figure 3 The distribution of IL-17 in benign and malignant thyroid tissues( $\times 200$ )

表 1 甲状腺乳头状癌 IL-17 表达水平与患者临床病理特征的相关性

Table 1 The correlation between IL-17 and the patients clinical and pathological features of papillary thyroid carcinoma

临床病理特征	例数	IL-17		P 值
		高表达组	低表达组	
总计	60	37	23	
年龄(岁)				0.426
<45	30	17	13	
≥45	30	20	10	
性别				0.878
男	15	9	6	
女	45	28	17	
肿瘤直径(cm)				0.003
≤1	20	7	13	
>1	40	30	10	
肿瘤个数				0.276
单发	26	14	12	
多发	34	23	11	
淋巴结转移				0.018
无	18	7	11	
有	42	30	12	
TNM 分期				0.008
Stage I + II	43	22	21	
Stage III + IV	17	15	2	

组织重塑相关分子等。IL-17 通过诱导 CXC 趋化因子配体-1(CXCL1)、CXCL2、IL-6、粒细胞集落刺激因子(GM-CSF)分泌增加,介导中性粒细胞的聚集<sup>[8-10]</sup>; IL-17 可刺激 CC 趋化因子-20(CCL20)、血管生长因子(VEGF)表达增加,诱导肿瘤相关巨噬细胞(TAM)聚集<sup>[11-13]</sup>;IL-17 还可作用于基质金属蛋白酶(MMPs),影响细胞外基质破坏和组织损伤<sup>[14]</sup>。

现已发现,甲状腺癌肿瘤微环境中存在各种炎症细胞,如淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、树突状细胞。这些炎症细胞与甲状腺癌的关系亦很密切。甲状腺乳头状癌淋巴细胞浸润的发生率明显高于甲状腺良性肿瘤。调节 T 细胞的表达与肿瘤侵犯局部淋巴结有关,国外有学者运用免疫荧光技术对 100 例甲状腺乳头状癌患者的肿瘤浸润淋巴细胞亚群进行检测发现,原发肿瘤组织中调节 T 细胞的表达率与肿瘤淋巴结转移程度呈正相关,这提示调节 T 细胞在肿瘤组织中过量表达可能是导致肿瘤免疫逃逸、淋巴结转移的重要因素之一。巨噬细胞和树突状细胞也被证实存在于甲状腺乳头状癌<sup>[15]</sup>。树突状细胞被证实在分化差和未分化甲状腺癌的浸润较在乳头状癌中明显减少<sup>[16]</sup>,提示树突状细胞

在甲状腺癌中也起保护机体的作用。普遍认为肿瘤相关巨噬细胞(TAM)起促进肿瘤发展的作用<sup>[17]</sup>。Ryder 等<sup>[18]</sup>发现在分化差和未分化甲状腺癌中,TAM 密度高于其在分化较好的甲状腺癌中的密度,并且在分化差的甲状腺癌,升高的 TAM 密度和甲状腺癌包膜侵犯、甲状腺外组织癌细胞浸润、预后差存在正相关性。

IL-17 可能通过影响多种细胞因子以及炎症细胞参与甲状腺癌的发生发展,影响患者预后。本实验发现 IL-17 在甲状腺乳头状癌表达增高,免疫组化显示染色阳性区域主要位于肿瘤边缘,这与定量 PCR 和 Western blot 的结果相一致。这可能与分泌 IL-17 的细胞在癌旁组织的分布多于癌组织内有关。桥本氏病的病理特点是大量淋巴细胞浸润,IL-17 在其表达增高,Figueroa-Vega 等<sup>[19]</sup>已报道 IL-17 在桥本氏病患者甲状腺组织内大量表达,本实验结果与其一致。且临床发现,合并桥本的结节性甲状腺肿组,其甲状腺乳头状癌的发生率高于无合并桥本的结节性甲状腺肿组,并且乳头状癌的发生率和血 TSH 水平有关<sup>[20]</sup>。有学者推测桥本氏病可能就是甲状腺癌的癌前病变。本实验还发现 IL-17 与肿瘤直径、淋巴结转移以及 TNM 分期相关,而上述与 IL-17 有关联的多种炎性细胞和炎性因子也可促进淋巴结转移,影响患者预后,作者猜测 IL-17 通过与这些细胞以及因子的相互作用,影响肿瘤患者的临床病理特征。

关于 IL-17 与甲状腺癌的关系,需要研究的内容还很多,例如 IL-17 在除甲状腺乳头状癌以外的其他类型甲状腺癌表达情况如何;在甲状腺癌哪些类型的细胞可分泌 IL-17,其作用机制如何;IL-17 通过什么途径影响患者预后等等,需要更深层次的实验室研究与大样本量的临床病例资料统计分析。本实验通过研究 IL-17 在甲状腺乳头状癌的表达以及与临床特征的相关性,为炎症在甲状腺癌发生发展中的作用提供了一些数据,但为了寻求甲状腺癌的预防、诊断和治疗的新方法,还需要更多的探索与实践。

#### 【参考文献】

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(1): 10-29
- [2] Cramer JD, Fu P, Harth KC, et al. Analysis of the rising incidence of thyroid cancer using the surveillance, epidemiology and end results national cancer data registry [J]. Surgery, 2010, 148(6): 1147-1152, 1152-1153

- [3] Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, et al. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995[J]. *Cancer*, 1998, 83(12):2638-2648
- [4] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer; the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5):646-674
- [5] Maniati E, Soper R, Hagemann T. Up for Mischief IL-17/Th17 in the tumour microenvironment[J]. *Oncogene*, 2010, 29(42):5653-5662
- [6] Wang Z, Yuan Y, Zhuang H, et al. Hepatic haemangiomas; possible association with IL-17 [J]. *J Clin Pathol*, 2012, 65(2):146-151
- [7] Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, et al. Interleukin-17 family and IL-17 receptors[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003, 14(2):155-174
- [8] Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, et al. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages[J]. *Annu Rev Immunol*, 2007, 25:821-852
- [9] Shen F, Gaffen SL. Structure-function relationships in the IL-17 receptor; implications for signal transduction and therapy[J]. *Cytokine*, 2008, 41(2):92-104
- [10] Laan M, Prause O, Miyamoto M, et al. A role of GM-CSF in the accumulation of neutrophils in the airways caused by IL-17 and TNF-alpha[J]. *Eur Respir J*, 2003, 21(3):387-393
- [11] Takaya H, Andoh A, Makino J, et al. Interleukin-17 stimulates chemokine (interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1) secretion in human pancreatic periacinar myofibroblasts[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2002, 37(2):239-245
- [12] Numasaki M, Fukushi J, Ono M, et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth[J]. *Blood*, 2003, 101(7):2620-2627
- [13] 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
- [14] Li J, Lau GK, Chen L, et al. Interleukin 17A promotes hepatocellular carcinoma metastasis via NF-kB induced matrix metalloproteinases 2 and 9 expression[J]. *PLoS One*, 2011, 6(7):e21816
- [15] Scarpino S, Stoppacciaro A, Ballerini F, et al. Papillary carcinoma of the thyroid; hepatocyte growth factor (HGF) stimulates tumor cells to release chemokines active in recruiting dendritic cells[J]. *Am J Pathol*, 2000, 156(3):831-837
- [16] Ugolini C, Basolo F, Proietti A, et al. Lymphocyte and immature dendritic cell infiltrates in differentiated, poorly differentiated, and undifferentiated thyroid carcinoma [J]. *Thyroid*, 2007, 17(5):389-393
- [17] Sica A, Allavena P, Mantovani A. Cancer related inflammation; the macrophage connection [J]. *Cancer Lett*, 2008, 267(2):204-215
- [18] Ryder M, Ghossein RA, Ricarte-Filho JC, et al. Increased density of tumor-associated macrophages is associated with decreased survival in advanced thyroid cancer [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2008, 15(4):1069-1074
- [19] Figueroa-Vega N, Alfonso-Perez M, Benedicto I, et al. Increased circulating pro-inflammatory cytokines and Th17 lymphocytes in Hashimoto's thyroiditis [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(2):953-962
- [20] Fiore E, Rago T, Latrofa F, et al. Hashimoto's thyroiditis is associated with papillary thyroid carcinoma; role of TSH and of treatment with L-thyroxine [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2011, 18(4):429-437

[收稿日期] 2012-11-21