

人白细胞介素-33 在胶质瘤中高表达并能促进胶质瘤细胞 U251 的侵袭作用

章建飞,曹文达,汪璟,王清,鲁晓杰*

(南京医科大学附属无锡二院神经外科,江苏 无锡 214002)

[摘要] 目的:探讨人白细胞介素(interleukin,IL)-33 在胶质瘤中的表达及在胶质瘤细胞 U251 侵袭中的作用。方法:采用免疫组化法检测了 16 例正常脑组织及 86 例不同级别胶质瘤标本 IL-33 蛋白的表达情况;应用 Transwell 小室检测 IL-33 对 U251 侵袭的影响;应用 Western blot 检测 IL-33 对胶质瘤细胞 NF- κ B 及其磷酸化状态的影响。结果:免疫组化结果显示,IL-33 在胶质瘤组织中表达高于正常脑组织(54.65% vs. 6.25%, $P < 0.001$)。IL-33 在低级别胶质瘤(WHO I、II 级)和高级别胶质瘤(WHO III、IV 级)组织中的阳性表达率分别为 17.4%和 68.3%($P < 0.001$)。体外胶质瘤细胞的功能试验中,IL-33 能促进 U251 细胞的侵袭($P < 0.05$),并伴随 NF- κ B 蛋白表达上调($P < 0.05$)。结论:IL-33 在胶质瘤中高表达,IL-33 可能通过促进胶质瘤细胞 NF- κ B 磷酸化,从而促进胶质瘤细胞的侵袭能力,对 IL-33 作用机制的进一步研究将为胶质瘤的临床治疗提供新思路。

[关键词] 人白细胞介素-33;胶质瘤细胞;侵袭

[中图分类号] R73-37

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)06-682-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20160608

IL-33 expression is increased in human glioma and promotes U251 glioma cells invasion

Zhang Jianfei, Cao Wenda, Wang Jing, Wang Qing, Lu Xiaojie*

(Department of Neurosurgery, Wuxi Second Hospital Affiliated to NJMU, Wuxi 214002, China)

[Abstract] **Objective:** To detect the expression of human interleukin-33(IL-33) in glioma and study its effects on invasion of human U251 glioma cells. **Methods:** Immunohistochemistry was performed to detect IL-33 protein expression in 16 normal brain tissues and 86 patients with different grades of gliomas. Transwell assay was conducted to study the effect of IL-33 on invasion of U251 glioma cells. Western blotting assays were performed to investigate changes in NF- κ B expression and its phosphorylation status after IL-33 treatment. **Results:** IL-33 protein expression was significantly higher in glioma tissues compared with normal brain tissues (54.65% vs 6.25%, $P < 0.001$). The expression of IL-33 in low-grade(WHO I and II) glioma and high-grade(WHO III and IV) glioma was 17.4% and 68.3%($P < 0.001$), respectively. IL-33 enhanced U251 cellular invasion($P < 0.05$) in vitro, and the protein expression of NF- κ B was increased($P < 0.05$). **Conclusion:** IL-33 is frequently overexpressed in glioma tissues, and may contribute to glioma cell invasion by up-regulation of NF- κ B phosphorylation.

[Key words] human interleukin-33; glioma cells; invasion

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(06):682-686]

白细胞介素(interleukin,IL)-33 是最近发现的一种细胞因子,属于 IL-1 超家族的一员^[1]。研究发现,IL-33 可以通过其受体 ST2 及相关信号转导蛋白,将活化信号传递到细胞内,激活 MAPK、NF- κ B、ERK1/2 和 JNK 等,引起前炎症性因子如 IL-1、IL-6、

肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)和 CCL2 等的释放^[2-4]。除了前炎症性因子外,IL-33 还能增加基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)2、MMP3 和 MMP9 的表达^[5-6]。近年来关于 IL-33 的研究进展迅速,特别是与肿瘤的侵袭密切相关。但 IL-33 在胶质瘤的功能和作用机制目前尚不是十分清楚。本研究拟探讨 IL-33 对胶质瘤 U251 分子生物学行为的影响及机制。

[基金项目] 无锡市医管中心重大项目(YGZXZ1406)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:xiaojieluwuxi@163.com

1 材料和方法

1.1 材料

收集南京医科大学附属无锡二院 2012 年 1 月—2014 年 12 月胶质瘤组织标本共 86 例,及 16 例正常脑组织标本。所有标本的病理结果通过切片及免疫组化确认,分为低级别胶质瘤(WHO I、II 级)和高级别胶质瘤(WHO III、IV 级)。本研究得到患者本人及南京医科大学附属无锡二院伦理委员会的同意。人类胶质瘤细胞 U251 为本实验室冻存。

胎牛血清、DMEM 高糖培养基、0.25%胰酶、双抗(Gibco 公司,美国);重组人 IL-33(Pepro Tech 公司,美国);总蛋白提取试剂盒和蛋白含量检测试剂盒(南京凯基生物公司),Western blot 凝胶配置试剂盒(上海碧云天公司),Transwell 小室(Coring 公司,美国);IL-33 一抗、GAPDH 一抗(Millipore 公司,美国),HRP-羊抗兔 IgG 二抗(北京中杉金桥公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

U251 细胞接种于含有 10%胎牛血清和 1%双抗(青霉素/链霉素)的 DMEM 高糖培养基中,置于 37℃ 5%的 CO₂ 恒温孵育箱中进行培养。

1.2.2 RNA 提取和 RT-PCR

通过 TRIzol 提取所有组织的 RNA,具体提取步骤参照试剂盒说明书,然后通过反转录试剂盒将 RNA 转录成 cDNA,最终运用 SYBR Green 定量 PCR 试剂盒进行定量检测分析,IL-33 引物:上游 5'-GACTCCTCCGAACACAGAGC-3',下游 5'-CCCAGC-TTGAAACACAAGGC-3'。所有实时定量反应均在 CFX96 RT-qPCR 机器上进行,每个反应设 3 个复孔。数据用 2^{-ΔΔCt} 法分析。

1.2.3 Western blot

将 U251 培养在 60 mm 的培养皿中,当实验组细胞融合 70%~80%时,加入 IL-33(50 ng/mL)处理细胞 30 min;将细胞用 PBS 洗 2 次,再加入蛋白裂解液(冰上操作),置于摇床充分裂解 15 min;吸入 EP 管中,15 000 r/min 4℃离心 15 min;取上清液采用 BCA 法测定蛋白浓度。对照组细胞同样处理。蛋白样品在 10% SDS-PAGE 中电泳,然后将蛋白转移至 PVDF 膜,室温下 5%脱脂奶粉封闭 1 h,加一抗(anti-IL-33、anti-GAPDH)4℃过夜,然后在室温下加 HRP 标记的二抗孵育 1 h。常规 ECL 曝光、扫描成像,用 Gelpro32 软件计算灰度值并进行统计学分析。

1.2.4 Transwell 小室侵袭实验

将 BD 基质胶用无血清培养基稀释至 10 mg/mL,取 100 μL 铺在孔径为 8 μm 的聚碳酸酯滤膜 Transwell 小室内,避免产生气泡,37℃聚合 2 h;将处于对数生长期的 U251 细胞用 PBS 洗 3 遍,胰酶消化后用无血清培养基重悬;上室加 1×10⁵ 个细胞,总体积 200 μL,下室加 600 μL 含 0、25、50 ng/mL 的 IL-33 及含 10%胎牛血清的培养基,置 37℃ 5%CO₂ 培养箱中培养 48 h;取出小室,棉签擦净上室细胞并用 PBS 洗 3 遍,90% 乙醇固定 30 min,0.1% 结晶紫染色 30 min,PBS 清洗 3 遍;显微镜下取 6 个随机视野拍照、计数。

1.2.5 免疫组织化学

所有标本均经 4%甲醛固定,常规石蜡包埋,蜡块连续切片,片厚 4 μm。采用免疫组化 S-P 法染色,一抗为兔抗人 IL-33 多克隆抗体(1:100 稀释),DAB 显色,苏木素复染。

结果判定:根据肿瘤细胞内棕黄色阳性反应百分率和染色程度进行综合判定分析。阳性百分率在 100 倍视野下每 200 个肿瘤细胞中阳性细胞所占百分比,随机做 5 次。阳性率计分标准:0 分(阳性百分率 0%),1 分(1%~33%),2 分(34%~66%),3 分(67%~100%)。染色程度记分标准:无染色、浅黄色、棕黄色、棕褐色分别计为 0、1、2、3 分。两种方法得分的乘积为 0、1、2、3、4、6、9。将得分结果分为-(0 分)、+(1~2 分)、++(3~4 分)、+++ (6~9 分)4 个等级,其中乘积>3 分者判定为阳性表达,乘积≤3 分者判定为阴性表达。

1.3 统计学方法

运用 SPSS18.0 统计软件进行分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数比较采用 *t* 检验,分类资料比较采用卡方检验,*P* ≤ 0.05 为差异有统计学意义。

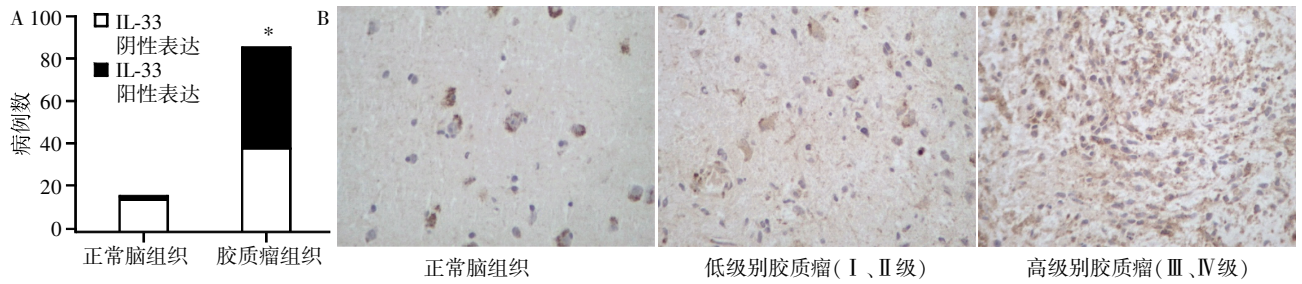
2 结果

2.1 IL-33 在胶质瘤组织中高表达

免疫组化结果显示,相比于正常脑组织,癌组织中有较多棕黄色或棕褐色颗粒,表明 IL-33 表达明显增强。IL-33 在 86 例胶质瘤及 16 例正常脑组织中的阳性率分别为 54.65%和 6.25%,差异有统计学意义(*P* < 0.001,图 1)。

2.2 IL-33 表达水平与胶质瘤临床病理特征的关系

分析 IL-33 表达水平与患者的性别、年龄、肿块大小、KPS 评分以及 WHO 分级之间的关系。根据肿瘤分化级别分组,IL-33 表达阳性率在肿瘤低级别



A: 正常脑组织和胶质瘤组织中的 IL-33 的表达情况,与正常脑组织比较, * $P < 0.001$; B: 镜下观察 IL-33 的表达情况(免疫组化染色, $\times 200$)。

图 1 IL-33 在胶质瘤组织中的表达情况

Figure 1 Expression of IL-33 in glioma tissues

(WHO I、II 级)组及高级别(WHO III、IV 级)组中分别为 17.4%和 68.3%;根据 KPS 评分分组,高 KPS 评分组阳性率为 61.54%,低 KPS 评分组阳性率为 33.33%;经 χ^2 检验均存在统计学差异(表 1)。这表明,IL-33 高表达与高级别胶质瘤($P < 0.001$) 和低 KPS 评分($P = 0.024$)密切相关。然而高表达 IL-33 与患者的性别、年龄、肿块大小无明显相关性($P > 0.05$,表 1)。

2.3 IL-33 上调了 U251 细胞中 p-NF- κ B 及 NF- κ B 蛋白的表达

Western blot 检测发现,经过 50 ng/mL IL-33 处理 60 min 的 U251 细胞,p-NF- κ B(3.70 ± 0.09)、NF- κ B(0.95 ± 0.04)表达水平与 0 ng/mL IL-33 组(2.06 ± 0.03 、 0.54 ± 0.04)比较明显升高($P < 0.05$,图 2)。

2.4 IL-33 促进胶质瘤细胞的侵袭

Transwell 结果显示,IL-33 明显促进了 U251 细胞的侵袭。在含 0、25、50 ng/mL IL-33 趋化作用下,细胞穿膜数分别为(52 ± 9)、(216 ± 7)、(433 ± 23)个,组间比较差异显著($P < 0.001$),并呈现一定的剂量依赖性(图 3)。

3 讨论

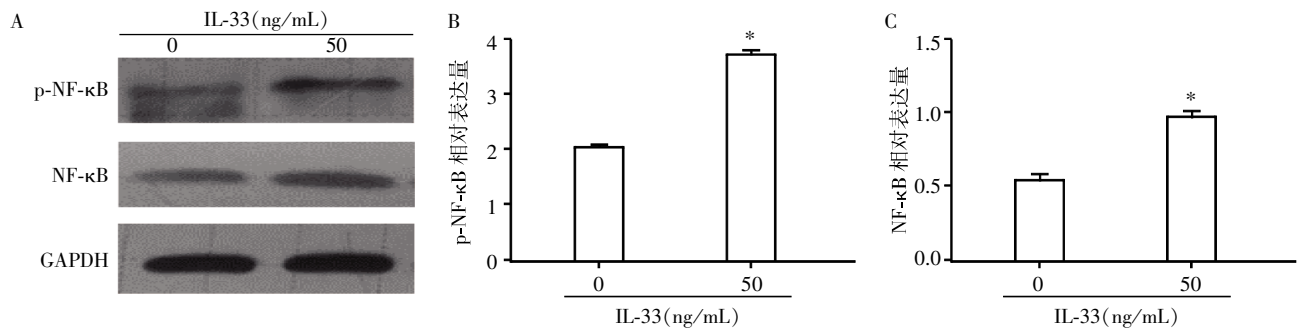
胶质瘤是来源于中枢神经系统的原发性恶性

表 1 IL-33 表达与临床病理特征之间的关系

Table 1 Relationship between expression of IL-33 and clinic pathological features in glioma patients

临床病理特征	例数	IL-33[n(%)]		P 值
		阴性表达	阳性表达	
WHO 分级				<0.001
I	10	9(90.00)	1(10.00)	
II	13	10(76.92)	3(23.08)	
III	29	15(51.72)	14(48.28)	
IV	34	5(14.71)	29(85.29)	
性别				0.984
男	44	20(45.45)	24(54.54)	
女	42	19(45.24)	23(54.76)	
年龄				0.952
≤ 50 岁	46	21(45.65)	25(54.35)	
> 50 岁	40	18(45.00)	22(55.00)	
肿块大小				0.886
≤ 5 cm	49	22(44.90)	27(55.10)	
> 5 cm	37	17(45.95)	20(54.05)	
KPS 评分				0.024
≤ 90	65	25(38.46)	40(61.54)	
> 90	21	14(66.67)	7(33.33)	

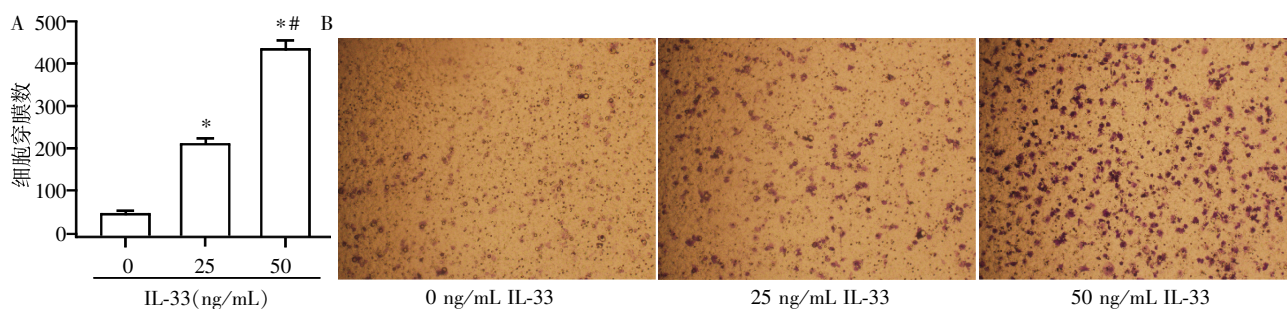
肿瘤,发病原因尚不清楚^[7]。目前胶质瘤治疗方式主要有手术、化学治疗、放射治疗等,但其预后仍不理想,平均生存期也只有 14.6 个月^[8]。胶质瘤的发展与炎症息息相关^[9],研究表明胶质瘤的微环境受到



A: Western blot 检测 p-NF- κ B 及 NF- κ B 蛋白的表达;B、C: 蛋白表达定量分析结果。与对照组比较, * $P < 0.05$ ($n = 3$)。

图 2 IL-33 上调 U251 细胞 p-NF- κ B 及 NF- κ B 的蛋白表达

Figure 2 IL-33 up-regulated the expressions of p-NF- κ B and NF- κ B in U251 glioma cells



A:不同浓度 IL-33 作用下 U251 细胞的穿膜数。与 0 ng/mL IL-33 组比较, * $P < 0.001$;与 25 ng/mL IL-33 组比较, ** $P < 0.001$ ($n = 3$);B:结晶紫色镜下观察结果。

图 3 IL-33 促进 U251 人胶质瘤细胞的侵袭能力

Figure 3 IL-33 increased the invasion of U251 glioma cells

了包括炎症细胞、胶质细胞及髓样细胞等多种细胞的影响^[10]。此外,炎症通过作用于肿瘤微环境有助于肿瘤细胞的演化,从而促进肿瘤增殖、血管形成以及侵袭等^[11]。

IL-33 属于 IL-1 家族成员,它可以通过由位于细胞膜表面的模型受体 ST2 及相关信号转导蛋白 Acp 受体复合物,将活化的信号传递到胞内,从而激活 NF- κ B 和 MAPK^[12]。同时,IL-33 作为一种核前体,当细胞受损时,IL-33 就开始释放,可能扮演着警报素的作用;而它由胞内分泌的方式产生,还能作为 NF- κ B 基因转录的负调节蛋白^[13]。目前许多研究表明,IL-33 可能是许多疾病的治疗靶点,包括自身免疫性疾病^[14]、过敏性炎症^[13]、寄生性疾病^[15-16]以及病毒性感染^[17-18]。

最近研究发现,IL-33 与多种肿瘤有关。与正常对照相比,在胃癌、肝癌、子宫肌瘤、肺癌、大肠癌以及乳腺癌患者的血清和癌组织中,IL-33 的表达均上调^[5,19-23]。更重要的是,IL-33 的表达已经被确认可以判断多种肿瘤的预后。在头颈部鳞状细胞癌患者中,IL-33 的高表达预示着预后不佳^[24]。在非小细胞肺癌中,IL-33 则有望成为判断预后的指标^[22]。然而在胶质瘤中,IL-33 的临床意义还不清楚。

作为一个多功能的前炎症性因子,有研究发现 IL-33 通过激活 ST2-ERK1/2 通路上调 MMP-3 和 IL-6 的表达,从而促进胃癌细胞的转移和侵袭^[6]。最近 Fang 等^[25]通过抑制 IL-33 基因的表达发现,大鼠胶质瘤 C6 细胞的生长速度下降及克隆形成减少;此外,IL-33 还与胶质瘤 C6 细胞的转移有关,同时还参与调节一些胶质瘤相关的生长因子和趋化因子。这些细胞学研究都说明了 IL-33 在胶质瘤中扮演重要角色。因此本研究对 IL-33 在人胶质瘤细胞

中的作用进行了初步探讨,研究表明 IL-33 在胶质瘤组织中高表达,与组织学分级、KPS 评分有关,说明 IL-33 是胶质瘤发生发展过程中一个重要的细胞因子。同时细胞学研究提示,IL-33 可能通过 NF- κ B 的磷酸化促进了胶质瘤细胞 U251 的侵袭。因此检测该细胞因子的表达,不仅能够为胶质瘤免疫组化诊断提供重要手段,同时有可能成为判断胶质瘤恶性程度及评估预后的新指标。然而 IL-33 发挥作用的具体机制不甚明了,期待今后的进一步研究。

[参考文献]

- [1] Onda H, Kasuya H, Takakura K, et al. Identification of genes differentially expressed in canine vasospastic cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1999, 19(11): 1279-1288
- [2] Ali S, Huber M, Kollwe C, et al. IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(47): 18660-18665
- [3] Moulin D, Donzé O, Talabot-Ayer D, et al. Interleukin (IL)-33 induces the release of pro-inflammatory mediators by mast cells[J]. Cytokine, 2007, 40(3): 216-225
- [4] Hu WT, Li MQ, Liu W, et al. IL-33 enhances proliferation and invasiveness of decidual stromal cells by up-regulation of CCL2/CCR2 via NF- κ B and ERK1/2 signaling [J]. Mol Hum Reprod, 2014, 20(4): 358-372
- [5] Liu X, Zhu L, Lu X, et al. IL-33/ST2 pathway contributes to metastasis of human colorectal cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 453(3): 486-492
- [6] Yu XX, Hu Z, Shen X, et al. IL-33 promotes gastric cancer cell invasion and migration via ST2-ERK1/2 pathway[J]. Dig Dis Sci, 2015, 60(5): 1265-1272
- [7] Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, et al. Epidemiology and molecular pathology of glioma [J]. Nat Clin Pract Neurol, 2006, 2(9): 494-503

- [8] Cloughesy TF, Cavenee WK, Mischel PS. Glioblastoma: from molecular pathology to targeted treatment[J]. *Annu Rev Pathol*, 2014, 9(1): 1-25
- [9] Sowers JL, Johnson KM, Conrad C, et al. The role of inflammation in brain cancer[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 816(1): 75-105
- [10] Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, et al. The brain tumor microenvironment[J]. *Glia*, 2011, 59(8): 1169-1180
- [11] Mantovani A, Allavena P, Sica A, et al. Cancer-related inflammation[J]. *Nature*, 2008, 454(7203): 436-444
- [12] Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family[J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(2): 103-110
- [13] Cayrol C, Girard JP. IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy[J]. *Curr Opin Immunol*, 2014, 31(1): 31-37
- [14] Wang S, Ding L, Liu SS, et al. IL-33: a potential therapeutic target in autoimmune diseases[J]. *J Investig Med*, 2012, 60(8): 1151-1156
- [15] Hung LY, Lewkowich IP, Dawson LA, et al. IL-33 drives biphasic IL-13 production for noncanonical type 2 immunity against hookworms[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(1): 282-287
- [16] Rostan O, Gangneux JP, Piquet-Pellorce C, et al. The IL-33/ST2 axis is associated with human visceral leishmaniasis and suppresses Th1 responses in the livers of BALB/c mice infected with *Leishmania donovani* [J]. *MBio*, 2013, 4(5): e00313-e00383
- [17] Liang Y, Jie Z, Hou L, et al. IL-33 induces neutrophils and modulates liver injury in viral hepatitis[J]. *J Immunol*, 2013, 190(11): 5666-5675
- [18] Rostan O, Arshad MI, Piquet-Pellorce C, et al. Crucial and diverse role of the interleukin-33/ST2 axis in infectious diseases[J]. *Infect Immun*, 2015, 83(5): 1738-1748
- [19] Sun P, Ben Q, Tu S, et al. Serum interleukin-33 levels in patients with gastric cancer[J]. *Dig Dis Sci*, 2011, 56(12): 3596-3601
- [20] Zhang P, Liu XK, Chu Z, et al. Detection of interleukin-33 in serum and carcinoma tissue from patients with hepatocellular carcinoma and its clinical implications[J]. *J Int Med Res*, 2012, 40(5): 1654-1661
- [21] Santulli P, Even M, Chouzenoux S, et al. Profibrotic interleukin-33 is correlated with uterine leiomyoma tumour burden[J]. *Hum Reprod*, 2013, 28(8): 2126-2133
- [22] Hu LA, Fu Y, Zhang DN, et al. Serum IL-33 as a diagnostic and prognostic marker in non-small cell lung cancer[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(4): 2563-2566
- [23] Liu J, Shen JX, Hu JL, et al. Significance of interleukin-33 and its related cytokines in patients with breast cancers[J]. *Front Immunol*, 2014, 5(1): 141
- [24] Chen SF, Nieh S, Jao SW, et al. The paracrine effect of cancer-associated fibroblast-induced interleukin-33 regulates the invasiveness of head and neck squamous cell carcinoma[J]. *J Pathol*, 2013, 231(2): 180-189
- [25] Fang KM, Yang CS, Lin TC, et al. Induced interleukin-33 expression enhances the tumorigenic activity of rat glioma cells[J]. *Neuro Oncol*, 2014, 16(4): 552-566

[收稿日期] 2015-11-13