

# 人白细胞介素-33 在肾细胞癌中高表达并通过 EMT 促进肾癌细胞的侵袭能力

杨 丽, 卢凯华\*, 查天麒, 张梅玲

(南京医科大学第一附属医院肿瘤科, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的: 研究人白细胞介素(interleukin, IL)-33 在肾细胞癌中的表达情况及在肾癌细胞 786-0 侵袭中的作用。方法: 应用免疫组化法检测 34 例不同级别肾脏细胞癌患者肾脏肿瘤组织及癌旁组织中 IL-33 表达水平; 应用细胞侵袭实验检测 IL-33 对肾癌细胞 786-0 侵袭的影响; 应用 Western blot 检测 IL-33 对肾癌细胞 786-0 上皮细胞间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关蛋白表达的影响。结果: 免疫组化结果显示, 与癌旁组织相比, 肾细胞癌患者肿瘤组织中 IL-33 水平明显升高, 半定量统计分析结果表明两者间存在统计学差异 ( $P < 0.001$ )。体外实验表明, IL-33 可促进 786-0 细胞侵袭; Western blot 结果显示, 用 IL-33 刺激 786-0 细胞后细胞内 E-cadherin 蛋白表达量明显降低, 而 vimentin 蛋白表达量明显升高。结论: IL-33 在肾细胞癌组织中表达明显升高, 并可能通过诱导肾癌细胞发生 EMT 进而提高肾癌细胞的侵袭能力。

**[关键词]** 人白细胞介素-33; 肾细胞癌; 侵袭; 上皮细胞间质转化

**[中图分类号]** R73.11

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2017)04-409-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20170405

## High expression of interleukin-33 in renal cell carcinoma which promoting cell invasion by EMT

Yang Li, Lu Kaihua\*, Zha Tianqi, Zhang Meiling

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

**[Abstract]** **Objective:** To detect the expression of interleukin(IL)-33 in renal cell carcinoma(RCC) and its effect on invasion of human 786-0 cells. **Methods:** IL-33 protein in 34 patients with different grades of RCC tissues and para-adjacent tissues was detected with immunohistochemistry assay. Transwell invasion assay was used to investigate the effect of IL-33 on invasion of 786-0 cells. Western blot assay was conducted to detect the markers of epithelial-mesenchymal transition(EMT) in 786-0 cells after IL-33 treatment. **Results:** IL-33 protein expression was significantly higher in RCC tissues compared to para-adjacent renal tissues ( $P < 0.001$ ). IL-33 enhanced 786-0 cells invasion *in vitro*. Moreover, the expression of E-cadherin was significantly decreased while the expression of vimentin was significantly increased after IL-33 treatment. **Conclusion:** IL-33 is overexpressed in RCC tissues and may contribute to renal cancer cells invasion by inducing EMT.

**[Key words]** interleukin-33; renal cell carcinoma; invasion; epithelial-mesenchymal transition

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(04): 409-412]

肾细胞癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤, 恶性程度较高, 然而其发生机制尚不明确<sup>[1]</sup>。患者在肾癌早期采取肾脏部分切除术后通常预后较好, 因此早期诊断肾癌具有重要意义<sup>[2]</sup>。白细胞介素(interleukin, IL)-33 是近年来发现的 IL-1 超家族的新成员, 已有

研究表明, IL-33 在肺癌、乳腺癌等多种肿瘤疾病中发挥着一定作用<sup>[3-4]</sup>。然而 IL-33 在肾细胞癌中的表达水平及其发挥的作用尚不清楚。本研究拟探讨 IL-33 在肾细胞癌中的表达情况及作用。

### 1 对象和方法

#### 1.1 对象

收集 2012 年 1 月—2016 年 10 月在南京医科

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81372397); 临床医学研究中心 2013(ZX13)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: 13605179453@126.com

大学第一附属医院行肾脏全切除术的 34 例肾细胞癌患者肾癌组织及癌旁组织标本。所有肾细胞癌标本及癌旁组织的病理结果均通过切片及特殊染色确认。本研究得到南京医科大学第一附属医院伦理委员会批准及患者本人同意并签署了知情同意书。

人肾癌细胞株 786-0 细胞由南京医科大学第一附属医院泌尿外科实验室提供；重组人 IL-33 细胞因子 (Pepro Tech 公司, 美国)；细胞培养用 RPMI 1640 培养基、胎牛血清(FBS)、0.25% 胰酶、双抗等 (Gibco 公司, 美国)；基质胶(BD 公司, 美国)；Transwell 小室(Millipore 公司, 美国)；IL-33、E-cadherin、vimentin 及  $\beta$ -actin 等抗体(Abcam 公司, 美国)；其余试剂购自北京碧云天公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 免疫组织化学染色

所有标本经 10%中性福尔马林固定,常规石蜡包埋,蜡块连续切片,切片厚 4  $\mu$ m。采用免疫组化 S-P 法染色<sup>[5]</sup>。兔抗人多克隆抗体 IL-33 为一抗,稀释浓度为 1:200。用 DAB 显色,苏木素复染。每个标本随机选取 4 个视野,应用 Image J 软件分析计算目标蛋白阳性染色平均积分光密度(IOD)相对表达量。

#### 1.2.2 细胞培养

肾癌细胞系 786-0 细胞接种在含有 10% FBS 和 1% 双抗 (青霉素/链霉素) 的 RPMI1640 培养基中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% 的 CO<sub>2</sub> 恒温孵育箱中进行培养。

#### 1.2.3 Transwell 小室侵袭实验

将基质胶用无血清培养基按 1:6 比例稀释,于接种细胞前 6 h 在 Transwell 小室内均匀平铺已稀释的基质胶,勿产生气泡。细胞计数后用无血清培养基重悬,实验组 Transwell 上室加含 10 ng/mL IL-33 的细胞悬液 300  $\mu$ L,细胞总数为 4.5 $\times$ 10<sup>4</sup> 个,对照组为不含 IL-33 的细胞悬液 300  $\mu$ L;下室均加入含 10% FBS 的培养基 700  $\mu$ L,后置于 37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养。18 h 后取出 Transwell 小室,用棉签擦去上室上面的非侵袭细胞,用 4% 多聚甲醛固定 15 min,结晶紫染色 30 min,PBS 洗净后晾干,于 100 倍倒置显微镜下计数侵袭至下室的细胞数量 (直径上 4 个视野),计算平均值。重复 3 次。

#### 1.2.4 Western blot

将细胞均匀接种于 6 孔板中,待细胞生长至 70%~80% 时更换为无血清培养基培养 12 h,然后实验组更换为含有 10 ng/mL 重组人 IL-33 细胞因子的无血清培养基,对照组更换无血清培养基,24 h 后收集细胞总蛋白,以 BCA 法检测蛋白浓度。两组

蛋白分别上样 10  $\mu$ g,电泳分离后转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。将 PVDF 膜置于 5% 脱脂奶粉溶液中封闭 3 h 后加入一抗(E-cadherin、vimentin,1:1 000 稀释; $\beta$ -actin,1:5 000 稀释)4 $^{\circ}$ C过夜。充分洗膜,加入相应二抗(1:4 000 稀释)后室温孵育 1 h,充分洗涤后曝光。采用 Image J 软件分析信号强度,以每组内参信号强度作为基准,校准各组蛋白表达的相对强度。实验重复 3 次。

### 1.3 统计学方法

应用 SPSS 22.0 软件分析,计量数据采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用方差分析,两两比较采用成组 SNK 检验,*P* $\leq$ 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肾细胞癌及癌旁组织中 IL-33 的表达

免疫组化结果显示,相比于癌旁组织,肾细胞癌组织中有明显棕黄色或棕褐色颗粒,表明 IL-33 表达明显增强。半定量分析结果显示:肾癌组织中 IL-33 平均积分光密度相对表达量为 38.4 $\pm$ 5.6,显著高于癌旁组织的 11.1 $\pm$ 3.0,差异有统计学意义 (*P* $<$ 0.001,图 1)。

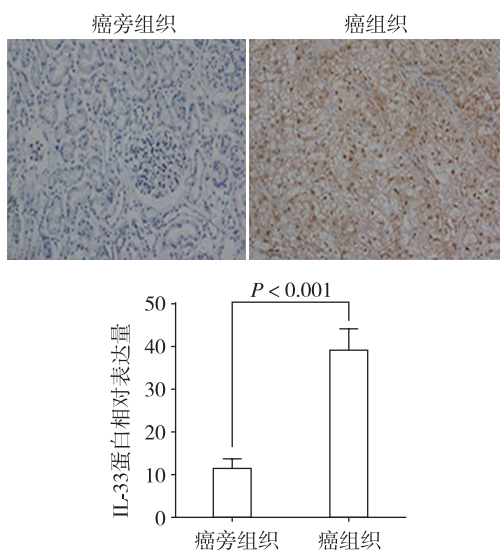


图 1 IL-33 在肾细胞癌组织中的表达情况(免疫组化,×200)  
Figure 1 Expression of IL-33 in renal cell carcinoma (IHC, ×200)

### 2.2 IL-33 表达与肾癌临床病理特征之间的关系

统计学分析显示,IL-33 表达水平与患者的病理类型、病理分级、性别、肿块大小、有无远处转移等临床病例资料之间无明显相关性(*P* $>$ 0.05,表 1)。

### 2.3 IL-33 刺激对肾癌细胞侵袭能力的影响

细胞侵袭实验结果表明,IL-33 可促进 786-0 细

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 renal cell carcinoma patients

| 临床病理特征 | 例数 | IL-33 相对 IOD 值 | P 值   |
|--------|----|----------------|-------|
| 病理类型   |    |                | -     |
| 透明细胞癌  | 32 | 38.3± 5.8      |       |
| 乳头状癌   | 2  | 39.4± 0.5      |       |
| 病理分级   |    |                | >0.05 |
| I ~ II | 18 | 38.5± 5.4      |       |
| III    | 13 | 38.4± 6.3      |       |
| IV     | 3  | 37.4± 3.8      |       |
| 性别     |    |                | >0.05 |
| 男      | 20 | 39.6± 5.6      |       |
| 女      | 14 | 36.7± 5.2      |       |
| 肿块大小   |    |                | >0.05 |
| <4 cm  | 8  | 41.3± 5.8      |       |
| ≥ 4 cm | 26 | 37.5± 5.3      |       |
| 远处转移   |    |                | >0.05 |
| M0     | 31 | 39.0± 5.6      |       |
| M1     | 3  | 34.1± 3.7      |       |

胞的侵袭。在分别用浓度 0、1、10、100 ng/ml 的 IL-33 刺激后,穿膜细胞数组间比较有明显差异( $P<0.05$ ), 1 ng/mL 组穿膜细胞数与 0 ng/mL 组比较无统计学差异,而浓度分别为 10、100 ng/mL 时的穿膜细胞数较 0 ng/mL 组明显增多,差异具有统计学意义,其中 10 ng/mL 组穿膜细胞数最高( $P<0.01$ ,图 2)。

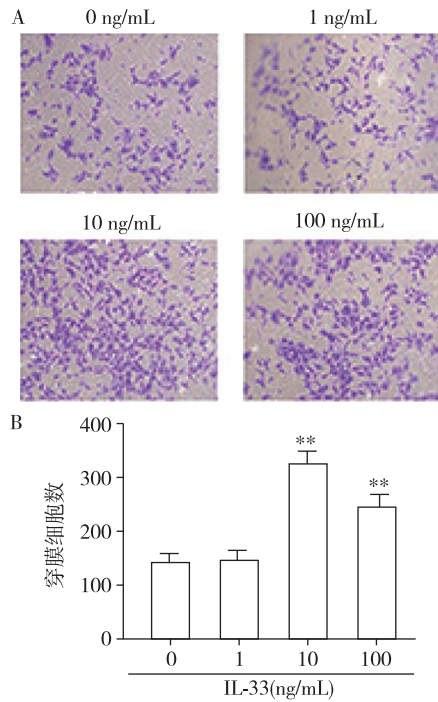
#### 2.4 IL-33 处理对 786-0 细胞表面标记蛋白的影响

Western blot 发现,786-0 细胞经过 10 ng/mL IL-33 刺激 24 h 后,上皮细胞标志蛋白 E-cadherin 表达量( $0.58\pm 0.07$ )与 0 ng/mL IL-33 组( $1.00\pm 0.06$ )比较明显下降( $P<0.01$ ),而间质标志蛋白 vimentin 表达量( $1.71\pm 0.08$ )与 0 ng/mL IL-33 组( $1.00\pm 0.08$ )比较明显升高( $P<0.001$ ,图 3)。

### 3 讨论

肾癌是我国常见的泌尿系统恶性肿瘤,病理类型可分为肾透明细胞癌、嗜色细胞癌、嫌色细胞癌、肾集合管癌、神经内分泌型肾癌等,其发病机制并不完全清楚,且预后较差<sup>[6]</sup>。手术是治疗早期肾细胞癌的有效手段,因此,早期诊断肾癌具有非常重要的意义<sup>[7]</sup>。

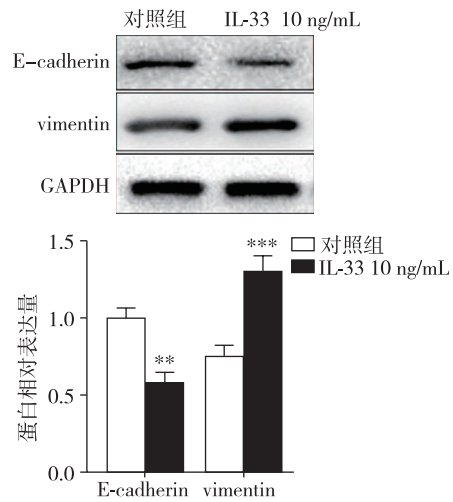
IL-33 是新近发现的 IL-1 家族新成员,与其受体结合后可激活 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 等信号通路,进而发挥作用<sup>[8-9]</sup>。近年研究表明,IL-33 在多种肿瘤中表



A: 结晶紫染色镜下观察结果( $\times 100$ ); B: 不同浓度 IL-33 刺激后 786-0 穿膜细胞数。与 0 ng/mL 组比较, \*\* $P<0.01$ ( $n=3$ )。

图 2 IL-33 促进肾癌细胞 786-0 的侵袭能力

Figure 2 IL-33 increased the invasion of 786-0 cells



与对照组比较, \*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$ ( $n=3$ )。

图 3 IL-33 上调 786-0 细胞 vimentin 蛋白表达,降低 E-cadherin 蛋白表达

Figure 3 IL-33 upregulated the expression of vimentin-while downregulated the expression of E-cadherin

达明显升高,如肺癌及脑胶质瘤等<sup>[3,10]</sup>。IL-33 与其 ST2 受体结合后可通过激活 ERK1/2 通路,从而促进胃癌细胞的转移和侵袭<sup>[11]</sup>。章建飞等<sup>[12]</sup>发现,IL-33 可通过激活 NF- $\kappa$ B 通路,促进胶质瘤细胞的侵袭。这些结果都表明,IL-33 在肿瘤组织中高表达,并可能参与肿瘤的发生与发展。本实验中,IL-33 在肾细



胞癌中表达明显升高,提示 IL-33 可能参与肾细胞癌的发生及发展。同时,细胞学实验也表明,IL-33 可明显促进肾癌细胞的侵袭能力,进一步证实 IL-33 在肾细胞癌的侵袭中可能扮演着重要角色。但是本实验病例数较少,还需今后扩大样本量并深入探究。

上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是指上皮细胞通过特定程序转化为具有间质表型细胞的生物学过程。通过 EMT,上皮细胞失去了细胞极性,失去与基底膜的连接等上皮表型,获得了较高的迁移与侵袭、抗凋亡和降解细胞外基质的能力等间质表型。EMT 是上皮细胞来源的恶性肿瘤细胞获得迁移和侵袭能力的重要生物学过程<sup>[13-15]</sup>。有研究证实,IL-33 可诱导肺癌细胞 A549 发生 EMT<sup>[16]</sup>。本实验中,肾癌细胞 786-0 经 IL-33 刺激后发生 EMT,进一步证实 IL-33 可能通过诱导肾癌细胞发生 EMT,进而促进肾细胞癌的侵袭与转移。

综上,IL-33 在肾细胞癌中表达明显升高,并可能通过诱导肾癌细胞发生 EMT 进而提高肾癌细胞的侵袭能力。因此,检测 IL-33 蛋白的表达可能成为评估肾细胞癌预后的一个重要方法,而降低 IL-33 水平可能对肾细胞癌的防治具有一定作用。然而,IL-33 在肾细胞癌中发挥作用的具体机制尚不明确,仍有待今后进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Nakaigawa N, Kondo K, Tateishi U, et al. FDG PET/CT as a prognostic biomarker in the era of molecular-targeting therapies; max SUVmax predicts survival of patients with advanced renal cell carcinoma[J]. BMC cancer, 2016, 16: 67
- [2] Shao P, Tang L, Li P, et al. Precise segmental renal artery clamping under the guidance of dual-source computed tomography angiography during laparoscopic partial nephrectomy[J]. Eur Urol, 2012, 62(6): 1001-1008
- [3] 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
- [4] Jovanovic IP, Pejnovic NN, Radosavljevic GD, et al. Interleukin-33/ST2 axis promotes breast cancer growth and metastases by facilitating intratumoral accumulation of immunosuppressive and innate lymphoid cells[J]. Int J Cancer, 2014, 134(7): 1669-1682
- [5] 汪俊, 刘绪忠, 韩志坚, 等. 人肾微血管内皮细胞转分化在移植肾间质纤维化形成中的作用[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2014, 34(9): 1149-1156
- [6] Siegel R, Ma JM, Zou ZH, et al. Cancer statistics, 2014[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1): 9-29
- [7] Alper I, Yüksel E. Comparison of acute and chronic pain after open nephrectomy versus laparoscopic nephrectomy: a prospective clinical trial[J]. Medicine(Baltimore), 2016, 95(16): e3433
- [8] Tominaga S. A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/c-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor[J]. FEBS Lett, 1989, 258(2): 301-304
- [9] Schmitz J, Owyang A, Oldham E, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines[J]. Immunity, 2005, 23(5): 479-490
- [10] Gramatzki D, Frei K, Cathomas G, et al. Interleukin-33 in human gliomas: Expression and prognostic significance[J]. Oncol Lett, 2016, 12(1): 445-452
- [11] 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
- [12] 章建飞, 曹文达, 汪璟, 等. 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[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2016, 36(6): 682-686
- [13] Pattabiraman DR, Brier B, Kober KI, et al. Activation of PKA leads to mesenchymal-to-epithelial transition and loss of tumor-initiating ability[J]. Science, 2016, 351(6277): aad3680
- [14] Seton-Rogers S. Epithelial-mesenchymal transition: Untangling EMT's functions[J]. Nat Rev Cancer, 2016, 16(1): 1
- [15] Wang WP, Sun Y, Lu Q, et al. Gankyrin promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis in NSCLC through forming a closed circle with IL-6/ STAT3 and TGF- $\beta$ / SMAD3 signaling pathway[J]. Oncotarget, 2017, 8(4): 5909-5923
- [16] 刘超, 郑金旭, 许姣, 等. IL-33/TLR4 信号通路在 A549 细胞上皮-间质转化中的作用[J]. 江苏大学学报(医学版), 2014, 24(4): 283-286

[收稿日期] 2016-12-23