

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.03.005

白介素 22 活化 STAT3 信号通路促进结直肠癌细胞的增殖及其可能机制

吴庭玉, 崔龙, 刘辰莹, 梁中林, 李金明(上海交通大学医学院附属新华医院 肛肠外科, 上海市 200092)

[摘要] **目的:**探究白介素 22(interleukin-22, IL-22)对结直肠癌细胞增殖的影响,并阐明其信号通路机制。**方法:**Real-time PCR 检测结直肠癌细胞 SW480 和 SW620 中 IL-22 受体 1(IL-22 receptor 1, *IL-22RI*) mRNA 的表达;采用不同质量浓度 IL-22(0、1、5、10 ng/ml)处理结直肠癌细胞,MTT 法及克隆形成实验检测 IL-22 对 SW480 和 SW620 细胞增殖的影响;IL-22 处理 SW480 和 SW620 细胞不同时间后,采用 Western blotting 检测其 STAT3、AKT、ERK、JNK、P38 蛋白磷酸化的情况;观察特异性 STAT3 磷酸化抑制剂 LLL12 处理是否影响 IL-22 诱导的结直肠癌细胞的促增殖效应。**结果:***IL-22RI* mRNA 在结直肠癌 SW480、SW620 细胞中均有表达。IL-22 剂量依赖性地促进 SW480 和 SW620 细胞增殖,10 ng/ml IL-22 作用后,SW480 与 SW620 细胞增殖倍数均明显增高[(5.18 ± 0.212) vs (2.64 ± 0.27)], (8.14 ± 0.61) vs (6.08 ± 0.096)];均 $P < 0.01$];且 IL-22 可提高 SW480 与 SW620 细胞克隆形成能力,细胞克隆数明显多于空白对照组[$(1\ 680.67 \pm 124.05)$ vs (730 ± 64.29)], $(2\ 668 \pm 116.37)$ vs $(1\ 294 \pm 171.61)$];均 $P < 0.01$]。Western blotting 证实 IL-22 能显著活化 STAT3 通路,而对 AKT、ERK、JNK、P-38 通路影响不明显;STAT3 抑制剂 LLL12 处理后,IL-22 对 SW480 和 SW620 细胞的促增殖效应明显减弱。**结论:**IL-22 通过活化 STAT3 信号通路促进结直肠癌细胞 SW480 和 SW620 的增殖。

[关键词] 结直肠癌;白介素 22;STAT3 通路;增殖

[中图分类号] R735.3; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2013)03-0284-05

Interleukin-22 promotes proliferation of colorectal cancer cells via STAT3 signaling activation and its possible mechanism

Wu Tingyu, Cui Long, Liu Chenying, Liang Zhonglin, Li Jinming (Department of Colorectal and Anal Surgery, XinHua Hospital Affiliated to School of Medicine of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200082, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of IL-22 on the proliferation of colorectal cancer cells and to illustrate its underlying molecular mechanism. **Methods:** The relative expression levels of IL-22 receptor 1 (*IL-22RI*) mRNA in colorectal cancer SW480 and SW620 cells were detected by real-time PCR. The different mass concentrations of IL-22 (0, 1, 5, 10 ng/ml) were used to treat colorectal cancer cells. The effect of IL-22 on the proliferation of SW480 and SW620 cells was analyzed by MTT assay and colony formation assay. SW480 and SW620 cells were stimulated with IL-22 for various time points and were subjected to Western blotting for the detection of protein phosphorylations, including STAT3, AKT, ERK, JNK and P38. Whether the specific inhibitor LLL12 blocking phosphorylation of STAT3 could promote the proliferation of colorectal cancer cells induced by IL-22 was observed. **Results:** *IL-22RI* mRNA was expressed in colorectal cancer cells (SW480, SW620). IL-22 can promote the proliferation of SW480 and SW620 cells in a dose-dependent manner. After the treatment with IL-22 (10 ng/ml), the cell proliferation folds were significantly increased (SW480: $[5.18 \pm 0.212]$ vs $[2.64 \pm 0.27]$, SW620: $[8.14 \pm 0.61]$ vs $[6.08 \pm 0.096]$, $P < 0.01$). Moreover, IL-22 enhanced the colony formation ability of SW480 and SW620 cells. The colony numbers of IL-22 treating group were significantly higher compared with the control group ($[1\ 680.67 \pm 124.05]$ vs $[730 \pm 64.29]$, $[2\ 668 \pm 116.37]$ vs $[1\ 294 \pm 171.61]$, $P < 0.01$). Western blotting demonstrated that STAT3 pathway can be activated after the

[基金项目] 上海市科委基础研究重大项目(No.10DJ1400504);上海交通大学医工交叉研究基金项目(No.YG2011MS32)。Project supported by the Basic Research Foundation from Science and Technology Commission of Shanghai (No.10DJ1400504), and the Biomedical Engineering Crossover Foundation of Shanghai Jiao Tong University (No.YG2011MS32)

[作者简介] 吴庭玉(1987-),男,重庆市人,硕士,主要从事结直肠肿瘤防治的基础与临床方面的研究。E-mail: wtyscu@163.com

[通信作者] 李金明(Li Jinming, corresponding author), E-mail: surgeonli2005@yahoo.com.cn

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20130605.1015.010.html>

treatment of IL-22. However, there was no significant alteration in AKT, ERK, JNK, P38 pathways. The proliferative effect of IL-22 can be attenuated after the treatment of STAT3 phosphorylation inhibitor LLL12. **Conclusion:** IL-22 may promote the proliferation of colon cancer SW480 and SW620 cells *via* STAT3 signaling pathway.

[**Key words**] colorectal cancer; interleukin-22(IL-22); STAT3 pathway; proliferation

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(3): 284-288]

结直肠癌的发生发展是一个受多因素、多步骤调控的复杂过程,尽管有人提出染色体异常、基因突变等多种学说,但炎症对肿瘤发生发展的促进作用已经得到临床和流行病学的证实^[1]。近年来新发现的白介素 22(interleukin-22, IL-22)属于 IL-10 家族的一员,由活性 T 细胞(主要为 Th2 细胞)分泌,主要作用于表达 IL-22 受体 1(IL-22 receptor 1, IL-22R1)的上皮细胞。人体的肠道、皮肤、支气管、肾脏的上皮组织由于大量表达 IL-22R1,是 IL-22 主要的靶细胞^[2-5]。IL-22 参与多种慢性炎症性疾病的调控,如溃疡性结肠炎、哮喘、银屑病等,在多种情况下,发挥抗炎或促炎的“双刃剑”作用^[6-8]。研究^[9-11]表明,IL-22 在不同肿瘤的发生发展中起重要作用。本课题旨在探究 IL-22 对结直肠癌细胞株 SW480 和 SW620 增殖的影响,并初步阐明其下游信号机制,为结直肠癌的免疫治疗提供新的思路和潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂

人结直肠癌细胞株 SW480、SW620 和肝癌细胞株 HepG2 购自 American Type Culture Collection (ATCC), 用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 DMEM 高糖培养液,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。重组人 IL-22 购自 Peprotech 公司, STAT3、p-STAT3、AKT、p-AKT、ERK、p-ERK、JNK、p-JNK、P38、p-P38、GAPDH 等抗体购自 Cell Signaling 公司, STAT3 磷酸化抑制剂 LLL12 购自 Millipore 公司。Vii 7 荧光 PCR 仪购自 Applied Biosystems 公司。

1.2 Real-time PCR 检测人结直肠癌细胞株中 IL-22R1 mRNA 的表达

采用 TRIzol 试剂盒提取 SW480 和 SW620 细胞总 RNA,取 800 ng RNA 按照 TaKaRa 反转录试剂盒说明进行随机引物反转录获 cDNA,按照 TaKaRa SYBR green real-time PCR 反应试剂盒说明书加样; IL-22R1 上游引物: 5'-AGCTCCAGGTCAACCGCAC-CTA-3', 下游引物: 5'-GCCAGGTGGGAACG-CAAATCA-3'; 然后进行目标片段扩增检测各组 IL-22R1 mRNA 的表达情况。

1.3 MTT 法检测 IL-22 对结直肠癌细胞株增殖的影响

将人结直肠癌细胞 SW480 和 SW620 消化后制成单细胞悬液,按 2×10^3 个/孔细胞接种于 96 孔板中,加入不同质量浓度的 IL-22 (0、1、5、10 ng/ml), 培养 3 d 后,每孔加入 5 mg/ml MTT 溶液 20 μl,继续培养 3 h,弃孔中培养液,各孔加入 150 μl DMSO 溶液,酶标仪测定波长 540 nm 处 D 值。细胞增殖倍数 = 培养 3 d 的 D 值 / 培养 0 d 的 D 值。

1.4 克隆形成法检测细胞的克隆形成能力

将人结直肠癌细胞 SW480 和 SW620 消化后制成单细胞悬液,按 1×10^3 个/孔细胞接种于 35 mm 培养皿中,10 ng/ml IL-22 处理 SW480 和 SW620 细胞,每隔 48 h 换液,培养 2 周后,结晶紫染色 4 h,拍照并观察克隆形成个数。

1.5 Western blotting 检测 IL-22 对信号通路蛋白活化的影响

SW480 和 SW620 细胞换成无血清培养液 12 h 后,加入 IL-22(10 ng/ml)处理 0、20、40、60 min,提取蛋白测定其浓度,并水浴变性 5 min,SDS 凝胶电泳后,转印到 PVDF 膜上,5 % 脱脂牛奶封闭 1 h,其中 STAT3、AKT、p-AKT、ERK、p-ERK、JNK、p-JNK、P38、p-P38、GAPDH 抗体的稀释度为 1:2 000, p-STAT3 抗体的稀释度为 1:1 000,加抗体后 4 °C 孵育过夜; TBST 漂洗后,加入 HRP 标记的抗兔 (1:5 000)或抗鼠 (1:5 000)IgG 二抗,孵育 1 h; 最后用化学发光法显色并拍照。

1.6 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,采用 SPSS13.0 软件进行分析,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 结直肠癌细胞株中 IL-22R1 mRNA 的表达

以肝癌细胞株 HepG2 作为 IL-22R1 的阳性对照^[19],采用 real-time PCR 法检测结直肠癌细胞株 SW480、SW620 中 IL-22R1 mRNA 的表达。结果(图 1)显示, IL-22R1 mRNA 在两种结直肠癌细胞株中均有表达。

2.2 IL-22 促进结直肠癌细胞株的增殖

MTT 实验检测结果(图 2A)显示,与未处理组相

比, 10 ng/ml IL-22 作用 72 h 后, 结直肠癌细胞株 SW480 和 SW620 的增殖倍数明显增加[(5.18 ± 0.212) vs (2.64 ± 0.27), (8.14 ± 0.612) vs (6.08 ± 0.096)]; 均 $P < 0.05$]。克隆形成实验结果(图 2B)显示, IL-22 具有促进克隆形成的能力。10 ng/ml IL-22 处理 SW480 和 SW620 细胞后, 2 周 IL-22 处理组的克隆数明显多于空白对照组[(1 680.67 ± 124.05) vs (730 ± 64.29) ; (2 668 ± 116.37) vs (1 294 ± 171.61)], 均 $P < 0.01$]。

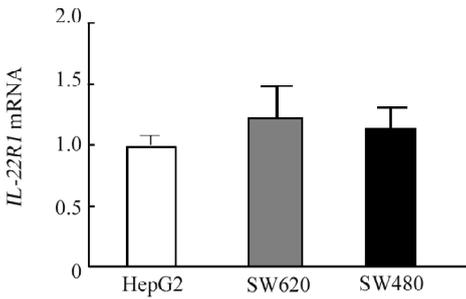


图 1 结直肠癌细胞株 SW480 和 SW620 中 IL-22RI mRNA 的表达

Fig. 1 Expression of IL-22RI mRNA in colorectal cancer SW480 and SW620 cells

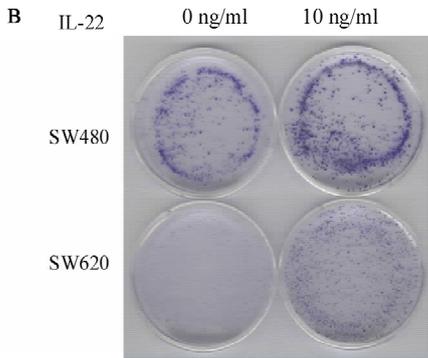
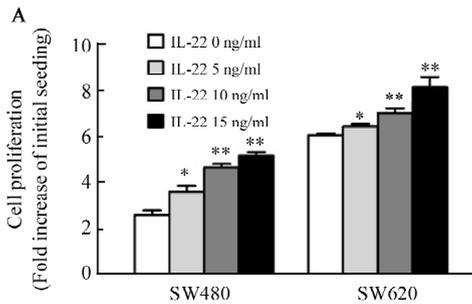


图 2 IL-22 促进结直肠癌细胞 SW480 和 SW620 的增殖
Fig. 2 IL-22 promoted the proliferation of colorectal cancer SW480 and SW620 cells

A: Effect of IL-22 on proliferation of SW480 and SW620 cells detected by MTT assay; B: Colony formation assay of IL-22 on SW480 and SW620 cells
 $* P < 0.05$, $** P < 0.01$ vs IL-22 0 ng/ml group

2.3 IL-22 活化结直肠癌细胞株 STAT3 通路

血清饥饿后, 10 ng/ml IL-22 分别作用 SW480 和 SW620 细胞 0、20、40、60 min, 采用不同通路的抗体检测各时间点各信号蛋白磷酸化的改变。结果(图 3)显示, SW480 细胞中的 STAT3 蛋白具有明显的磷酸化现象, AKT、ERK、JNK、P38 蛋白可见轻度活化; SW620 细胞在无血清培养的情况下几乎未见磷酸化的 STAT3, IL-22 处理后 STAT3 磷酸化十分明显, 而 AKT、ERK、JNK、P38 蛋白均未见明显活化。因此, IL-22 对结直肠癌细胞株 SW480 和 SW620 共同活化的通路为 STAT3, 其促增殖效应可能与该通路有关。

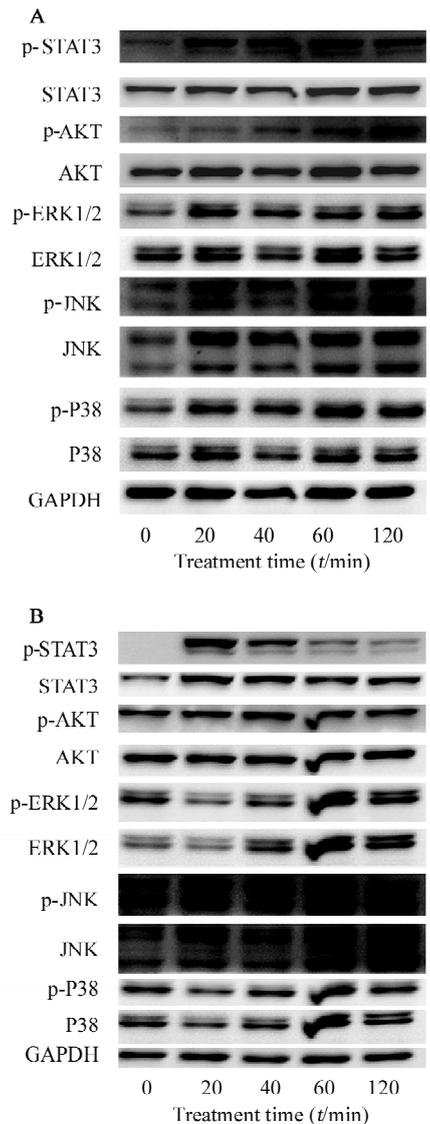


图 3 IL-22 对结直肠癌细胞株 SW480 和 SW620 信号通路蛋白磷酸化的影响

Fig. 3 Effect of IL-22 on phosphorylation of signaling proteins in colorectal cancer SW480 and SW620 cells
A: SW480; B: SW620

2.4 IL-22 的促增殖效应依赖 STAT3 通路的活化

为验证 IL-22 的促增殖效应是否依赖 STAT3 通路的活化,采用 STAT3 磷酸化特异性小分子抑制剂 LLL12 阻断 STAT3 的磷酸化,观察 IL-22 的促增殖效应是否减弱。结果(图 4)显示,IL-22(10 ng/ml)作用于 SW480 和 SW620 细胞,与空白对照组相比,细胞增殖倍数明显升高[(4.39 ± 0.19) vs (2.11 ± 0.15), (8.43 ± 0.30) vs (4.75 ± 0.19)];均 $P < 0.01$];以 LLL12 处理 SW480 和 SW620 细胞 2 h 后,再用 IL-22 处理,细胞增殖倍数明显降低[(1.55 ± 0.35) vs (4.39 ± 0.19), (3.69 ± 0.53) vs (8.43 ± 0.30)];均 $P < 0.01$ 。而 LLL12 处理组与空白对照组相比,差异无统计学意义。结果提示,LLL12 通过特异性抑制 STAT3 通路降低 IL-22 对结直肠癌细胞株 SW480 和 SW620 的促增殖效应。因此,IL-22 依赖 STAT3 通路的活化发挥对结直肠癌细胞株的促增殖作用。

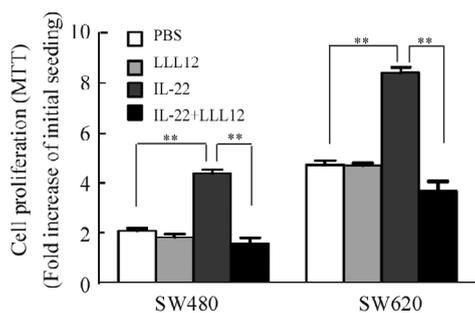


图 4 LLL12 抑制 IL-22 对结直肠癌 SW480 和 SW620 细胞的促增殖效应

Fig. 4 LLL12 inhibited proliferative effect of IL-22 on colorectal cancer SW480 and SW620 cells

** $P < 0.01$ vs PBS or IL-22 + LLL12 group

3 讨论

肿瘤微环境中的炎性细胞因子和肿瘤发生、发展过程密切相关,其中白介素扮演着重要的角色。研究^[12]证实,IL-6 增加炎性肠病患者结直肠肿瘤的发病率,并且具有促进结直肠癌细胞增殖以及抑制肿瘤干细胞凋亡的效应。IL-8 能促进肿瘤微环境中血管的生成,从而促进肿瘤的生长^[13-15]。IL-13 及其受体能介导肿瘤细胞发生转移^[16-18]。IL-22 作为新近发现的一种细胞因子,与肿瘤之间的关系近几年来逐渐被人们揭示,如何更好地了解 IL-22 的功能以及其和肿瘤之间的关系,已成为人们关注的热点。

点。

Radaeva 等^[19]的研究发现,IL-22 在肝癌的发生、发展中起到关键作用,在小鼠肝脏发生炎症的过程中,IL-22 的表达量升高,并且介导肝脏组织的增生修复,从而减弱炎症的损伤作用;而 IL-22 过量表达则会导致肿瘤的发生,IL-22 在此过程中通过 STAT3 通路促进肿瘤细胞的增殖,并抑制无血清培养情况下肿瘤细胞的凋亡。相反,Weber 等^[20]的研究发现,IL-22 通过抑制 ERK 和 AKT 通路的活化,使乳腺癌细胞的细胞周期停滞在 G₂/M 期,从而抑制乳腺癌细胞的生长。

IL-22R1 是 IL-22 的特异性结合受体,IL-22 仅与表达 IL-22R1 的细胞结合发挥生物学效应。本研究检测了结直肠癌细胞株 SW480、SW620 中 IL-22R1 的表达情况,发现其均表达 IL-22R1。通过 MTT 法和克隆形成实验证实,IL-22 能明显促进结直肠癌 SW480、SW620 细胞的增殖,并且呈剂量依赖性。通过检测 IL-22 作用后不同通路的相关蛋白磷酸化情况发现,STAT3 在结直肠癌细胞 SW480 和 SW620 中均有明显的活化,而 AKT、ERK、JNK、P38 在两个细胞株中的活化情况表现并不一致,推测 IL-22 的促增殖作用可能依赖 STAT3 通路。采用 LLL12 抑制剂阻断 STAT3 磷酸化后发现,IL-22 的促增殖作用明显减弱,证明 IL-22 依赖 STAT3 通路活化介导其对结直肠癌细胞 SW480 和 SW620 的促增殖效应。本研究发现,IL-22 通过活化 STAT3 通路促进结直肠癌细胞的增殖,但 STAT3 作为一种转录因子,其介导的靶基因表达尚不明确,具体的分子机制仍待深入研究。随着 IL-22 研究的不断深入,肿瘤微环境中的 IL-22 有可能成为结直肠肿瘤免疫治疗的一个潜在靶点。

[参考文献]

- Terzić J, Grivennikov S, Karin E, et al. Inflammation and colon cancer [J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(6): 2101-2114.
- Wolk K, Kunz S, Witte E, et al. IL-22 increases the innate immunity of tissues [J]. *Immunity*, 2004, 21(2): 241-254.
- Wolk K, Witte E, Wallace E, et al. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: A potential role in psoriasis [J]. *Eur J Immunol*, 2006, 36(5): 1309-1323.
- Cella M, Fuchs A, Vermi W, et al. A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity [J]. *Nature*, 2008, 457(7230): 722-725.
- Ma HL, Liang S, Li J, et al. IL-22 is required for Th17 cell-mediated pathology in a mouse model of psoriasis-like skin inflammation [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(2): 597.

- [6] Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, et al. Interleukin-22, a TH17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis [J]. *Nature*, 2006, 445(7128): 648-651.
- [7] Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides [J]. *J Exp Med*, 2006, 203(10): 2271-2279.
- [8] Puel A, Döffinger R, Natividad A, et al. Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type I [J]. *J Exp Med*, 2010, 207(2): 291-297.
- [9] Curd L, Favors S, Gregg R. Pro-tumour activity of interleukin-22 in HPAFII human pancreatic cancer cells [J]. *Clin Exp Immunol*, 2012, 168(2): 192-199.
- [10] Jiang R, Tan Z, Deng L, et al. Interleukin-22 promotes human hepatocellular carcinoma by activation of STAT3 [J]. *Hepatology*, 2011, 54(3): 900-909.
- [11] Zhuang Y, Peng LS, Zhao YL, et al. Increased intratumoral IL-22-producing CD4⁺ T cells and Th22 cells correlate with gastric cancer progression and predict poor patient survival [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2012, 61(11): 1965-1975.
- [12] Grivennikov S, Karin E, Terzic J, et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer [J]. *Cancer Cell*, 2009, 15(2): 103-113.
- [13] Chen JJ, Yao PL, Yuan A, et al. Up-regulation of tumor interleukin-8 expression by infiltrating macrophages its correlation with tumor angiogenesis and patient survival in non-small cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(2): 729-737.
- [14] Singh RK, Lokeshwar BL. The IL-8-regulated chemokine receptor CXCR7 stimulates EGFR signaling to promote prostate cancer growth [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(9): 3268-3277.
- [15] Végran F, Boidot R, Michiels C, et al. Lactate influx through the endothelial cell monocarboxylate transporter MCT1 supports an NF- κ B/IL-8 pathway that drives tumor angiogenesis [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(7): 2550-2560.
- [16] Fujisawa T, Joshi B, Nakajima A, et al. A novel role of interleukin-13 receptor α 2 in pancreatic cancer invasion, and metastasis [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(22): 8678-8685.
- [17] Barderas R, Bartolomé RA, Fernandez-Aceñero MJ, et al. High expression of IL-13 receptor α 2 in colorectal cancer is associated with invasion, liver metastasis, and poor prognosis [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(11): 2780-2790.
- [18] Fujisawa T, Joshi BH, Puri RK. IL-13 regulates cancer invasion and metastasis through IL-3R α 2 via ERK/AP-1 pathway in mouse model of human ovarian cancer [J]. *Int J Cancer*, 2012, 131(2): 344-356.
- [19] Radaeva S, Sun R, Pan H, et al. Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation [J]. *Hepatology*, 2004, 39(5): 1332-1342.
- [20] Weber GF, Gaertner FC, Erl W, et al. IL-22-mediated tumor growth reduction correlates with inhibition of ERK1/2 and AKT phosphorylation and induction of cell cycle arrest in the G₂-M phase [J]. *J Immunol*, 2006, 177(11): 8266-8272.
- [收稿日期] 2013 - 02 - 02 [修回日期] 2013 - 04 - 28
[本文编辑] 周玲琳

· 读者 · 作者 · 编者 ·

化学元素和核素符号规范书写的要求

化学符号虽然是化学专业的学术交流语言,但在生物医学领域也有很广泛的使用。化学符号的书写有其特殊的规律和要求,生物医学论文中必须重视化学符号书写的规范化。根据 GB3102.8 - 93《物理化学和分子物理学的量和单位》的规定,把化学元素和核素符号书写的规范要求介绍如下:

- (1) 元素或核素的单字母符号均用正体大写,双字母符号首字母正体大写,第二个字母用正体小写。
- (2) 核素的核子数(质子数)应标注在元素符号的左上角,例如:⁶⁰Co, ³²P, ^{99m}Tc, ¹²⁵I等;过去习惯把核子数标注在元素符号右上角的写法是错误的,例如:N¹⁴, Co⁶⁰等。
- (3) 离子价态的字符应标注在元素符号的右上角,例如:H⁺, Cl⁻, O²⁻, Mg²⁺, Al³⁺, PO₄³⁻等,不应写成O⁻², O⁻⁻, Mg⁺², Mg⁺⁺, Al⁺⁺⁺, PO₄⁻³等。
- (4) 激发态的字符(电子激发态用* ; 核子激发态用正体 m,也可用*)标注在元素或核素符号的右上角,例如:¹¹⁰Ag^m, ¹¹⁰Ag*, He*, NO*等。
- (5) 分子中核素的原子数标注在核素符号右下角,例如:H₂, FeSO₄等。
- (6) 质子数(原子序数)标注在元素符号左下角,例如:₈₂Pb, ₂₆Fe等。
- (7) 对于形状相似的元素符号、化合物的化学式符号,书写时应注意区分,如:Co(钴)—CO(一氧化碳),No(锘)—NO(一氧化氮),Ba(钡)—Ra(镭),Nb(铌)—Nd(钕)—Np(镎),HF(氟化氢)—Hf(铪)等。

(本刊编辑部)