

热休克转录因子 2 通过促进白细胞介素-10 的表达对肺癌发生的影响*

范敏娟¹, 钟云华², 沈 雯^{1△}, 袁开芬¹, 赵国厚¹, 王蜀昆¹, 温林俏¹

(1. 昆明医科大学第二附属医院呼吸科, 昆明 650101; 2. 云南省第一人民医院干疗科, 昆明 650101)

[摘要] **目的** 探讨热休克转录因子 2(HSF2)通过促进白细胞介素-10(IL-10)的表达对肺癌发生的影响。**方法** 选取 50 例肺癌患者的癌组织及癌旁组织,采用 RT-PCR、Western blot 和免疫组织化学法,分别检测 HSF2、IL-10 的 mRNA、蛋白的表达;在 A549 细胞中,以 siRNA 干扰 HSF2 的表达,采用 Western blot 法检测 IL-10 的表达水平。**结果** 与对应癌旁组织相比,肺癌组织中 76% (38/50) 病例的 HSF2 表达上调 ($P < 0.01$), 80% (40/50) 病例的 IL-10 表达上调 ($P < 0.01$), 蛋白水平和 mRNA 水平一致。肺癌组织中 IL-10 的表达上调与 HSF2 的表达上调呈正相关 ($R^2 = 0.9216$)。siRNA 干扰 HSF2 可减弱 A549 中 IL-10 的表达。**结论** HSF2 可通过促进 IL-10 的表达影响肺癌的发生。

[关键词] 肺肿瘤; 热休克转录因子 2; 白细胞介素-10; A549 细胞

[中图分类号] R734.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)01-0043-03

The impact of HSF2 on the development of lung cancer by promoting IL-10 expression*

FAN Minjuan¹, ZHONG Yunhua², SHEN Wen^{1△}, YUAN Kai feng¹, ZHAO Guohou¹, WANG Shukun¹, WEN Linqiao¹

(1. Department of Respiratory, The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming,

Yunnan 650101, China. 2. Department of the VIP Internal Medicine, The First People's

Hospital of Yunnan, Kunming, Yunnan 650031, China)

[Abstract] **Objective** To explore the impact of heat shock factor 2 (HSF2) on the development of lung cancer by promoting interleukin (IL)-10 expression. **Methods** 50 lung cancer tissues and adjacent normal tissues selected from 50 patients, the expression level of mRNA and protein of HSF2 and IL-10 were respectively detected by RT-PCR, Western blot and Immunohistochemistry; To interfere with expression of HSF2 in A549 cells by siRNA, the expression level of IL-10 was detected by Western blot. **Results** Compared with the adjacent normal tissues, HSF2 of 76% (38 of 50) cases were up-regulated ($P < 0.01$), IL-10 of 80% (40 of 50) cases were up-regulated ($P < 0.01$), protein level consistent with mRNA level. The up-regulation expression of IL-10 in lung cancer tissues and HSF2 positively correlated ($R^2 = 0.9216$). The expression of IL-10 in A549 cells was weakened through interference with HSF2 by siRNA. **Conclusion** HSF2 may contribute to the development of lung cancer by facilitating the expression of IL-10.

[Key words] lung neoplasms; heat shock factor 2; interleukin-10; A549 cell

肺癌发病机制较复杂,涉及多种细胞因子的改变,白细胞介素-10(IL-10)是一种重要的炎性细胞因子,主要来源于单核巨噬细胞和各种 T 细胞亚群,研究表明,随着肺癌分期越晚,IL-10 的表达水平越高^[1],IL-10 水平可预示肺癌病情的严重性。研究证实热休克转录因子 1(HSF1)与肿瘤的发生有关^[2],过表达 HSF1 可激活巨噬细胞 IL-10 基因的启动子诱导 IL-10 mRNA 的表达^[3]。HSF2 作为另一类转录因子,可以结合至热休克蛋白(HSP)90 的启动子区域上调其表达^[4],而 HSP90 α 在肺癌中高表达^[5]。可见,HSF2 与肺癌的发生有关。而且,在溃疡性结肠炎的研究中发现,HSF2 既可直接启动炎性因子的表达,也可通过炎症反应相关信号通路来调节炎性因子的生成^[6]。本研究通过检测肺癌组织和癌旁组织中 HSF2、IL-10 两种因子的 mRNA、蛋白的表达情况,观察 HSF2 对 IL-10 表达的影响,探讨 HSF2 通过促进 IL-10 的表达对肺癌发生的影响。

1 材料与方

1.1 材料 IL-10、HSF2 试剂盒(上海艾博抗生物有限公司),组织总 RNA 提取试剂盒、引物、实时荧光定量 PCR 检测试剂盒(北京天根生化科技有限公司),A549 细胞(中国科学院昆明细胞库),罗氏 siRNA 转染试剂盒(广州聚研生物科技有限公司),3%牛血清白蛋白、PVDF 膜、蛋白酶抑制剂、DMEM 培养

基(上海维森特生物技术有限公司),生物素化山羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶标记的链酶亲和素、RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司),DMEM 培养基、封闭用山羊血清、苏木精-伊红(HE)(北京索莱宝科技有限公司)等。

1.2 方法

1.2.1 标本来源及分组 标本从昆明医科大学第二附属医院及云南省第一人民医院获取。在手术获取肿瘤组织的同时,从距离肿瘤组织大于 6 cm 的组织中获取相应癌旁组织作为对照组,各获取标本 50 例。癌旁组织经过组织学分析确认没有肿瘤细胞浸润。所有患者术前均未经过任何治疗,取材时将所取组织用预冷的 DEPC 处理后的双蒸水冲洗两遍后,置于液氮中冷冻保存备用。标本的采集均征得患者本人及其家属的同意并签署手术同意书。

1.2.2 RT-PCR 检测 mRNA 使用组织总 RNA 提取试剂盒提取组织 RNA,第一链 cDNA 合成采用 cDNA 合成试剂盒。HSF2 RT-PCR 引物,如下:正向引物 5'-AAG TTC AGG CAG TGA TGG CA-3';反向引物 5'-TGC ACA GAA CTA GTG AAA AGA TCA-3'。IL-10 RT-PCR 引物,如下:正向引物 5'-ACA TCA AGG CGC ATG TGA AC-3';反向引物 5'-TAG AGT CGC CAC CCT GAT GT-3'。RT-PCR 以 GAPDH 为内参,其引物序列如下:正向引物 5'-GAA GGT CGG AGT CAA

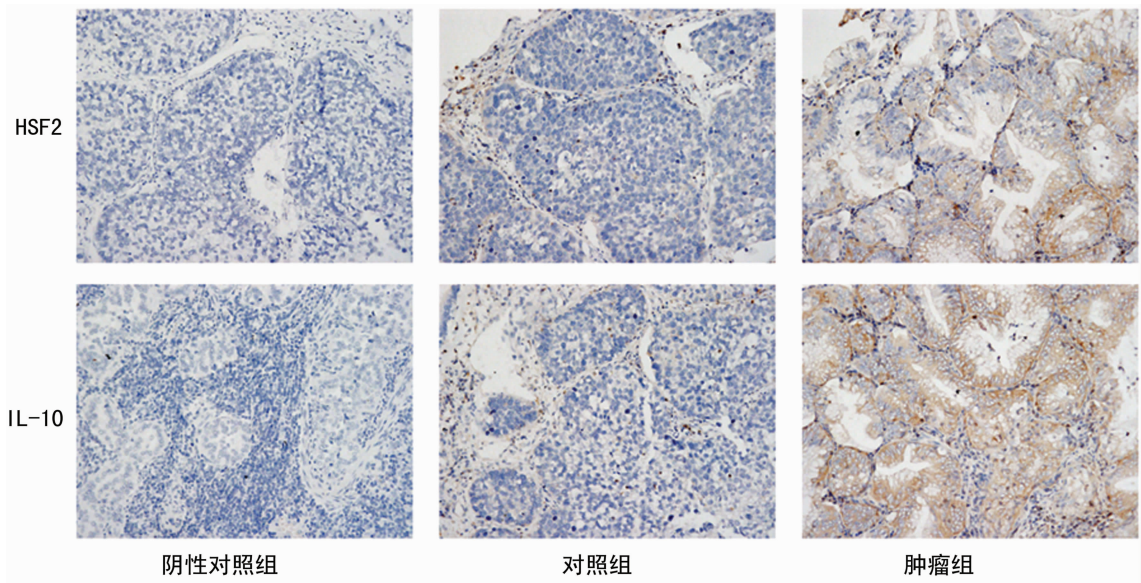


图 1 免疫组织化学检测肺癌组织及癌旁组织中 HSF2、IL-10 的表达(200×)

CGG AT-3'; 反向引物 5'-GAG GGA TCT CGC TCC TGG AAG-3'。PCR 条件如下: 预变性 95 °C 1 min; 变性 95 °C 15 s, 退火 60 °C 15 s, 延伸 72 °C 20 s, 循环 45 次。荧光数据用 Opticon Monitor 软件进行分析。

1.2.3 Western blot 检测蛋白质 肺癌及癌旁组织在匀浆后用 RIPA 裂解液进行裂解, 裂解液中包含蛋白酶抑制剂。取 50 μ g 蛋白质样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)电泳, 电转移至 PVDF 膜上。电泳条件为 80 V 15~20 min, 待样品进入分离胶后 120 V 电泳 40~60 min。电转移条件为 200 mA 1 h。转移后的 PVDF 膜用 3% 牛血清白蛋白封闭 1 h, 一抗(1:1 000)室温孵育过夜, 洗涤后用辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗孵育 1 h, 洗涤显影。

1.2.4 免疫组织化学检测组织蛋白质 病理标本取材后, 经 10% 中性甲醛固定、组织脱水、二甲苯透明、石蜡包埋切片, 接着进行 HE 染色和免疫组织化学染色, 标志物为 HSF2 和 IL-10, 光学显微镜下观察免疫组织化学检测结果。抗体表达于细胞膜、细胞质或细胞核, 呈棕黄色或棕褐色颗粒者为阳性细胞。每例切片阳性细胞数占同类细胞数的 10% 以上者视为阳性, 于 200× 镜下拍照。

1.2.5 细胞培养和转染 培养基为 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。将细胞培养于含有 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中。待细胞成对数期生长时转移于 6 孔板中, 每孔细胞数约 2×10^5 个, 细胞生长至 60%~80% 视野时, 开始转染试验。以 Lipofectamine 2000 为载体, 具体操作步骤按照 Invitrogen 公司提供的实验方案。

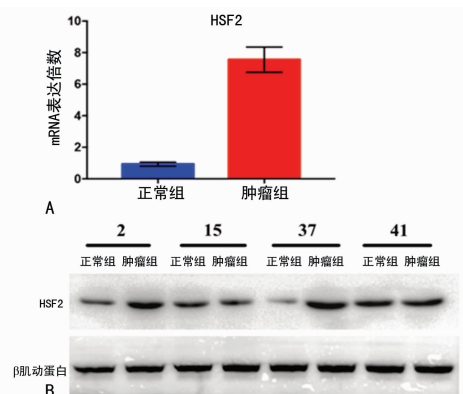
1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行数据分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 采用线性回归分析进行相关分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HSF2 在肺癌组织中表达上调 比较 50 例肺癌组织和其癌旁组织, RT-PCR 检测发现, 癌组织中 HSF2 mRNA 的表达明显高于癌旁组织, 占比为 76% (38/50) ($P < 0.01$)。Western blot 和免疫组织化学检测发现, 癌组织中 HSF2 蛋白水平也明显上调, 蛋白水平和 mRNA 水平一致, 见图 1、2。

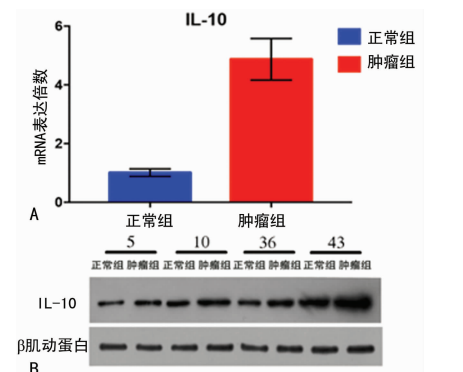
2.2 IL-10 在肺癌组织中表达上调 比较 50 例肺癌组织和其癌旁组织, RT-PCR 检测发现, 癌组织中 IL-10 mRNA 的表达

明显高于癌旁组织, 占比为 80% (40/50) ($P < 0.01$)。Western blot 和免疫组织化学检测发现, 癌组织中 IL-10 蛋白水平也明显上调, 蛋白水平和 mRNA 水平一致, 见图 1、3。



A: RT-PCR 检测 HSF2 的 mRNA 水平; B: Western blot 检测 HSF2 的蛋白水平

图 2 肺癌组织及癌旁组织中 HSF2 的表达



A: RT-PCR 检测 IL-10 的 mRNA 水平; B: Western blot 检测 IL-10 的蛋白水平

图 3 肺癌组织及癌旁组织中 IL-10 的表达

2.4 肺癌组织中 IL-10 的表达上调与 HSF2 的表达上调呈正相关 对肺癌组织的 IL-10 与 HSF2 的表达进行相关分析, 发现 IL-10 的表达上调和 HSF2 的表达上调呈线性正相关 ($R^2 = 0.9216$), 见图 4。

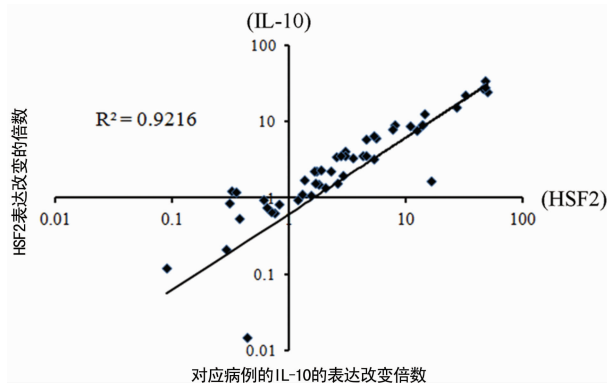


图 4 肺癌组织中 HSF2 与 IL-10 表达的相关分析

2.5 siRNA 干扰 HSF2 降低 A549 中 IL-10 表达 在 A549 细胞中,以 siRNA 干扰 HSF2 的表达,Western blot 检测发现,A549 表达 siRNA 后,HSF2 和 IL-10 的表达均明显降低,见图 5。

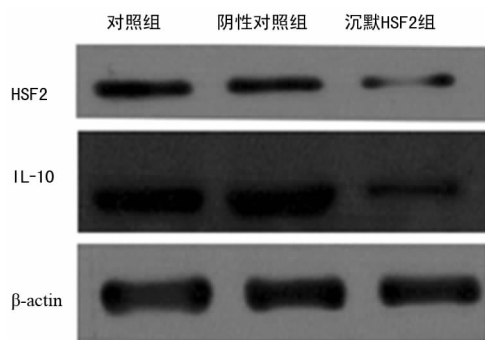


图 5 siRNA 干扰 HSF2 后 IL-10 的表达

3 讨 论

肺癌对人类健康危害极大,细胞微环境的改变可以促进肿瘤的发生^[7]。在细胞微环境的改变中,热休克反应是以基因表达变化为特征的一种防御适应反应,研究表明,HSF 在肿瘤的发生发展中扮演了重要角色。本研究发现 HSF2 在肺癌组织中高表达,表明 HSF2 与肺癌的发生有关。HSF2 被认为主要与机体的发育有关,近年来的研究发现肿瘤的发生和胚胎发育的早期有着非常多的相似性^[8],因此,肺癌中 HSF2 的表达上调也就显得较合理。

在肿瘤的发生过程中,另一个微环境的改变就是促炎性和抗炎性细胞因子比例的改变。IL-10 作为一种抗炎性细胞因子,在肿瘤的发病中具有重要作用,既可直接影响肿瘤细胞和间接抑制免疫细胞而有利于肿瘤生长,还可通过抑制肿瘤定居的巨噬细胞来抑制血管生成。在哺乳动物体内,IL-10 和自身受体结合可以磷酸化 Janus 激酶 1 (JAK1) 和酪氨酸激酶 2 (TYK2),进而激活信号传导及转录激活因子 3 (STAT3)。活化的 STAT3 通过激活淋巴细胞活化信号分子 (SLAM)、小异源二聚体基因 1 (SHP-1) 和细胞因子信号传导抑制蛋白 3 (SOCS3) 等介导 IL-10 的生物学功能^[9-10]。IL-10 可以抑制辅助性 T 细胞 1 (Th1) 细胞的生成和增殖,还可以抑制巨噬细胞、自然杀伤细胞 (NK 细胞) 的功能,使肿瘤得以逃逸而进一步发展。随着肿瘤发展,IL-10 的水平又会进一步升高。

研究发现血清 IL-10 的表达水平与非小细胞肺癌的发生成正相关,血清 IL-10 的水平可预示肺癌的预后^[11],也可为肿瘤的复发提供依据^[12]。当非小细胞肺癌患者的肿瘤切除后,血清 IL-10 水平会降低,认为肺癌组织本身可能促进了 IL-10 的生成,从而有利于肿瘤躲避机体的免疫监视,继而使肿瘤易

于发展及转移^[13]。梁晶^[14]研究发现 IL-10 参与肺癌患者微环境的构成,是导致肺癌免疫功能抑制的原因之一,可作为监控晚期肺癌患者免疫功能的参考指标。本研究发现肺癌组织中 IL-10 高表达,进一步说明肺癌组织可以促进 IL-10 的生成。因此,在肺癌患者中进行 IL-10 的监测,可间接掌握肺癌患者的病情,便于及时调整治疗方案,IL-10 的水平可作为肺癌病情严重性的生物标志物。

夏蜀娴等^[15]研究发现,溃疡性结肠炎患者中 HSF2 的表达水平增加,HSF2 可通过调控核因子-KB (NF-κB) 和丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 中的家族成员,参与炎性细胞因子的转录调控,而多种炎性细胞因子又可激活 NF-κB、MAPK 通路,其之间关系较紧密。本研究对 50 例肺癌组织的 HSF2 和 IL-10 的表达水平进行了相关分析,发现二者的表达呈正相关,siRNA 干扰 HSF2 可以降低 A549 中 IL-10 的表达,进一步说明 HSF2 可以调节肺癌细胞 IL-10 的表达。HSF2 促进 IL-10 的表达,可能有利于肺癌细胞躲避机体的免疫监视,进一步促进肿瘤的发生,但相关分子机制还有待深入研究。

综上所述,HSF2 和 IL-10 在肺癌组织中表达上调,HSF2 可促进 IL-10 的表达,可能有促于肺癌的发生、发展,而肺癌中 HSF2 是否可以结合到 IL-10 的启动子区域调控其表达还有待进一步的研究来揭示。

参考文献

- [1] 翟晋芳,杜凤兰,绳晋雅,等. 肺癌患者外周血调节性 T 细胞和 IL-10 的检测及其意义[J]. 中国肿瘤临床,2012,39(6):325-327.
- [2] JIANG S F, TU K L, FU Q, et al. Multifaceted roles of HSF1 in cancer [J]. Tumour Biol, 2015, 36 (7): 4923-4931.
- [3] ZHANG H L, ZHANG L L, YU F X, et al. HSF1 is a transcriptional activator of IL-10 gene expression in RAW264.7 macrophages [J]. Inflammation, 2012, 35(4): 1558-1566.
- [4] WILKERSON D C, SKAGGS H S, SARGE K D, et al. HSF2 binds to the Hsp90, Hsp27, and c-Fos promoters constitutively and modulates their expression [J]. Cell Stress Chaperones, 2007, 12(3):283-290.
- [5] 江倩,金蒙蒙,黄锐,等. 肺癌患者血浆热休克蛋白 90α 的表达及意义[J]. 实用医学杂志,2016,32(13):2129-2132.
- [6] CHEN Y Y, MA Z B, XU H Y, et al. IL-6/STAT3/SOCS3 signaling pathway playing a regulatory role ulcerative colitis carcinogenesis [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(8):12009-12017.
- [7] HU M, YAO J, CAI L, et al. Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers [J]. Nat Genet, 2005, 37(8):899-905.
- [8] MA Y L, ZHANG P, WANG F, et al. The relationship between early embryo development and tumourigenesis [J]. J Cell Mol Med, 2010, 14(12):2697-2701.
- [9] LOBO-SILVA D, CARRICHE G M, CASTRO A G, et al. Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation [J]. J Neuroinflammation, 2016, 13(1):297.
- [10] MANNINO M H, ZHU Z W, XIAO H P, et al. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer [J]. Cancer Lett, 2015, 367(2):103-107.

可减少对骨折端血供的影响,加快骨折愈合进程。本研究结果证实:(1)Robinson 2A、2B 型锁骨中段骨折患者行锁定加压接骨板内固定方案安全性优于克氏针及重建接骨板内固定两种方案;(2)锁定加压接骨板内固定用于 Robinson 2A、2B 型锁骨中段骨折具有操作简便、手术创伤小及术后恢复快等优势,有助于促进肩关节活动功能恢复,提高日常生活质量。

分析本研究并发症发生率,可得出以下结论:(1)锁定螺钉与钢板完全匹配无突起,从而降低了皮肤刺激症状发生^[15];(2)研究中出现 1 例皮肤刺激症状可能与螺钉锁定不够出现“冷凝结”有关。重建接骨板内固定方案中出现 3 例皮肤刺激症状,笔者认为骨折部位脂肪层较薄、螺钉较浅表是主要诱因;(3)克氏针及重建接骨板内固定治疗中均出现皮肤感觉异常,这与医源性锁骨上神经损伤密切相关。同时克氏针不能有效抵抗外力弯曲、旋转及尾部弯曲度不足并向内侧移动是造成骨折延迟愈合重要原因之一^[16],而行重建接骨板内固定患者骨折延迟愈合则可能与骨膜剥离范围过多有关;(4)三组患者术后疼痛评分比较,差异无统计学意义($P>0.05$),与以往研究结果不一致^[14],笔者认为这可能与软组织损伤程度、年龄及纳入样本量少等因素有关,还有待进一步研究证实。

综上所述,锁定加压接骨板内固定方案治疗 Robinson 2A、2B 型锁骨中段骨折可有效减少手术创伤、缩短骨折愈合时间、改善术后肩关节活动功能,并有助于避免术后并发症出现,临床价值优于克氏针及重建接骨板内固定方案。

参考文献

- [1] FIGUEIREDO G S, TAMAOKI M J, DRAGONE B, et al. Correlation of the degree of clavicle shortening after non-surgical treatment of midshaft fractures with upper limb function[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2015, 16(1):1-6.
- [2] 王卫,潘国标,王敏,等.解剖型锁定钢板治疗锁骨中段粉碎性骨折[J].临床骨科杂志,2012,15(4):479.
- [3] MUELLER T S, SOMMER C. Minimally invasive plate osteosynthesis of the distal tibia[J]. Oper Orthop Traumatol, 2012, 24(4/5):354-367.
- [4] 侯春林,王诗波,吴韬. 锁骨外科学[M]. 北京:人民军医出版社,2004:287.
- [5] 王锋,樊友亮,丁亮华,等. Herbert 螺钉与锁骨重建钢板治疗锁骨中段骨折的临床比较研究[J]. 中国骨与关节损伤杂志,2013,28(7):659-660.

- [6] VANBEEK C, BOSELLI K J, CADET E R, et al. Precontoured plating of clavicle fractures; decreased hardware-related complications? [J]. Clin Orthop Relat Res, 2011, 469(12):3337-3343.
- [7] TARNG Y W, YANG S W, FANG Y P, et al. Surgical management of uncomplicated midshaft clavicle fractures; a comparison between Titanium elastic nails and small Reconstruction plates[J]. J Shoulder Elbow Surg, 2012, 21(6):732-740.
- [8] ATEF A, EL-TANTAWY A. Management of open infected comminuted tibial fractures using Ilizarov concept[J]. Eur J Orthop Surg Traumatol, 2014, 24(3):403-408.
- [9] 吴树华,李云龙. 三种髓内固定方法治疗锁骨中段骨折的临床疗效分析[J]. 骨科, 2013, 4(2):97-99.
- [10] 王平,许红生,赵志江,等. 解剖型钢板治疗锁骨中段骨折[J]. 临床骨科杂志, 2012, 15(1):58-58.
- [11] KULSHRESTHA V, ROY T, AUDIGE L. Operative versus Nonoperative Management of Displaced Midshaft Clavicle Fractures: A Prospective Cohort Study[J]. J Orthop Trauma, 2011, 25(1):31-38.
- [12] JOU I M, CHIANG E P, LIN C J, et al. Treatment of unstable distal clavicle fractures with Knowles pin[J]. J Shoulder Elbow Surg, 2011, 20(3):414-419.
- [13] 邢武,关鹏飞,陈杰,等. 2 种内固定方式治疗锁骨中段粉碎性骨折的疗效分析[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2015, 30(11):1156-1158.
- [14] 李恩琪,袁天祥,马宝通,等. 锁骨骨折手术治疗与并发症控制研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2013, 21(20):2092-2094.
- [15] HOHMANN E, HANSEN T, TETSWORTH K. Treatment of neer type II fractures of the lateral clavicle using distal radius locking plates combined with TightRope augmentation of the coraco-clavicular ligaments[J]. Arch Orthop Trauma Surg, 2012, 132(10):1415-1421.
- [16] LENZA M, BUCHBINDER R, JOHNSTON R V, et al. Surgical versus conservative interventions for treating fractures of the middle third of the clavicle[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2013, 6(6):CD009363.

(收稿日期:2017-06-15 修回日期:2017-08-30)

(上接第 45 页)

- [11] UMEKAWA K, KIMURA T, KUDOH S, et al. Plasma RANTES, IL-10, and IL-8 levels in non-small-cell lung cancer patients treated with EGFR-TKIs[J]. BMC Res Notes, 2013, 6:139.
- [12] WANG Y C, SUNG W W, WU T C, et al. Interleukin-10 haplotype May predict survival and relapse in resected non-small cell lung cancer[J]. PLoS One, 2012, 7(7):e39525.

- [13] 陈葵. 非小细胞肺癌患者血清 IL-12、IL-10 测定的临床意义[D]. 合肥:安徽医科大学, 2012.
- [14] 梁晶. 肺癌患者外周血 Treg 细胞与 IL-10、TGF- β 检测及其临床意义[J]. 临床肺科杂志, 2015, 20(11):1980-1983.
- [15] 夏蜀娟, 缪应雷. HSF2 和促炎性细胞因子在溃疡性结肠炎中的表达[J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(30):4683-4690.

(收稿日期:2017-07-22 修回日期:2017-09-28)