

肾癌分泌 IL-8 激活 ERK 促进间充质干细胞迁移的机制

毕良宽¹, 周楠², 刘成¹, 陆福鼎¹, 许可慰^{1,3*}

(中山大学孙逸仙纪念医院 1.泌尿外科, 2.妇产科, 3.体检中心, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】拟探讨肾癌内 IL-8 的分泌水平及其对骨髓间充质干细胞(MSC)的调节机制,探讨其在归巢中的作用机制。【方法】ELISA 法检测肾癌患者血清以及肾癌细胞分泌的 IL-8;免疫组织化学和 RT-PCR 检测 MSC 表面 IL-8 受体表达;迁移实验观察 IL-8 对 MSC 的迁移作用;Western blotting 法检测 IL-8 对 MSC 内 ERK 的激活作用。【结果】研究发现正常人群的血液中 IL-8 为 210.4 pg/mL,而肾癌患者血液中 IL-8 升高至 526.7 pg/mL,肾癌细胞株 786-O 和 ACHN 均可以分泌 IL-8;在 MSC 细胞中表达 IL-8 的受体基因 *CXCR2*,肾癌细胞分泌 IL-8 可以通过 *CXCR2* 受体促进 MSC 迁移。进一步研究发现,IL-8 刺激后可以明显提高 MSC 内 ERK 的磷酸化水平。【结论】肾癌可以分泌 IL-8 能够通过 *CXCR2* 受体激活 MSC 内 ERK 信号通路,进而促进 MSC 迁移归巢,这可能是肾癌促进 MSC 归巢的重要机制之一。

关键词: 肾癌;间充质干细胞;白细胞介素-8;磷酸化丝裂原活化蛋白激酶

中图分类号:R619

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2014)02-0182-05

Secretion of IL-8 from Renal Cell Carcinoma Promotes Mesenchymal Stem Cells Migration via Activation of ERK signaling

BI Liang-kuan¹, ZHOU Nan², LIU Cheng¹, LU Fu-ding¹, XU Ke-wei^{1,3*}

(Department of 1.Urology; 2. Gynaecology and Obstetrics; 3. Physical Examination Center, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】Mesenchymal stem cells (MSC) are multifunctional adult stem cells, which can be homing to tumors, play an important role in the tumor development and metastasis. However, how MSC home to renal cell carcinoma (RCC) remains unclear. 【Methods】The secretion of IL-8 from renal cancer patient and renal cancer cells was examined by ELISA method. The expression of IL-8 receptor was tested by RT-PCR and immunohistochemistry staining. The migration of MSC stimulated by IL-8 was detected by Migration assay. The phosphorylation of ERK by IL-8 in MSC was detected by Western blotting. 【Results】It was found that IL-8 was significantly increased in RCC patients. RCC cell lines 786-O and ACHN cells could secrete high levels of IL-8 respectively. IL-8 *CXCR2* receptor was highly expressed in MSC cells, the secretion of IL-8 by RCC cells could promote MSC migration through *CXCR2*. Further study demonstrated that IL-8 stimulation could significantly up regulated the phosphorylation of ERK via *CXCR2*. 【Conclusion】RCC cells could secrete IL-8, which could promote MSC migration through *CXCR2* by the activation of ERK signaling pathway. This may be one of the important mechanisms of the MSC homing to RCC tissues.

Key words: renal cell carcinoma (RCC); mesenchymal stem cells (MSC); interleukin-8 (IL-8); extracellular-signal-regulated kinases (ERK)

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(2):182-186]

间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSC) 是一种多功能干细胞,主要来源于骨髓和脂肪,故称之为骨髓或脂肪间充质干细胞^[1]。MSC 具有多向分化潜能,研究证实 MSC 可以分化为成骨细胞、软骨细胞、成纤维细胞和脂肪细胞^[2]。间充质

干细胞的特点是细胞表面高表达 CD105、CD73 和 CD90,低表达 CD34、CD45、CD11b,已有大量研究证实 MSC 可以治疗心肌梗死,脊髓损伤,骨损伤等^[3];最近研究发现, MSC 可以归巢至肿瘤组织并促进肿瘤的生长和发展^[4-5]。MSC 迁移进入肿瘤组

收稿日期:2013-11-05

基金项目:国家自然科学基金(81101519);中山大学青年教师培育项目(11ykpy33);中山大学孙逸仙纪念医院“逸仙人才”基金(2011年)

作者简介:毕良宽,副主任医师, E-mail: biliangk@sysu.edu.cn; * 通信作者, 许可慰, 主任医师, E-mail: xkw2005@163.com

织后可以通过促进肿瘤间质重构、促进肿瘤血管形成、抑制肿瘤局部机体免疫等,进而促进肿瘤的生长发展。肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)简称肾癌,是泌尿系常见的恶性肿瘤之一,最近研究表明在小鼠肾癌成瘤模型中发现 MSC 可归巢至肾癌组织^[6],但具体机制尚不清楚。肿瘤的发生发展和其微环境密切相关。肿瘤细胞可以产生一系列细胞因子,并通过细胞因子和其周围肿瘤间质细胞相互作用,形成适合肿瘤生长和转移的微环境。IL-8 是近年来研究较热的一个细胞因子,对许多细胞具有趋化作用,包括 MSC^[7]。乳腺癌可以分泌 IL-8^[8],并与其生长和转移密切相关^[9]。肾癌是否可以分泌 IL-8,目前尚不清楚。本课题拟通过细胞及分子实验研究肾癌对 IL-8 分泌情况,分析 IL-8 对 MSC 的调节作用,报道如下。

1 材料与方法

1.1 一般资料

随机抽取的肾癌患者及正常体检人群各 40 例。肾癌患者手术前抽取血液 5 mL,离心后,留取上清血清备用,所有肾癌组病例均为术后病理切片证实为肾透明细胞癌,年龄 40~78 岁,中位年龄 63 岁,其中女性 12 例,所选病例均无淋巴结转移。正常人群组血清取自随机选取的健康体检者,年龄 40~75 岁,中位年龄 60 岁,男女各 20 例。

1.2 材料

肾癌细胞株 786-O 和 ACHN 均购自美国 ATCC 公司;IL-8 ELISA 试剂盒、anti-IL-8、anti-CXCR2 和 SuperECL Plus 超敏发光液购于美国 Sigma 公司。phospho-Akt, Akt 和 phospho-ERK 抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司。ERK (sc-154), α -actin (sc8432), 抗体购于美国 Santa Cruz Biotechnology 公司。细胞培养皿及迁移实验试剂盒购于美国康宁(Corning)公司。DMEM-LG 培养基购于美国英韦创津广州分公司。胎牛血清(fetal calf serum, FCS)购于美国 Hyclone 公司。培养板购于美国 Corning 公司。PMSF、牛血清白蛋白成分购于 Genview 中国天津分公司。PVDF 膜购于美国 Millipore 公司。Western 及 IP 细胞裂解液由实验室配制。

1.3 细胞培养

肾癌细胞株 786-O 和 ACHN 细胞在含有青、

链霉素和 100 mL/L 血清的 RPMI 1640 培养液中,于 37 ℃、体积分数为 5%CO₂ 条件下培养。MSC 按我们以往报道方法培养^[10]。

1.4 ELISA

收集肾癌组及正常人群组血清各 20 例。收集肾癌细胞株 786-O 和 ACHN 细胞培养基上清。按照 Sigma 公司 IL-8 ELISA 试剂盒操作说明书检测 IL-8 含量。

1.5 细胞免疫荧光

生长良好的 MSC,乙醇固定后放入盖片染色缸, PBS 振洗后吹干。滴加稀释的 CXCR1 和 CXCR2 抗体,4 度冰箱过夜。滴加荧光素标记抗体,荧光显微镜下观察。

1.6 RT-PCR

NCBI 数据库中查询出 GAPDH、CXCR1 和 CXCR2 的 cDNA 序列,应用 Primer Express software 设计引物, CXCR1 上游引物 5' ACCATAGGA GGCCAACCCAAAATA 3', 下游引物 5' TCCATGC TGTGCCAAGAGTCA 3'; CXCR2 上游引物 5' CTACCTTCCAGTTCCTCATTTTT 3', 下游引物 5' ACATTTACAAGTTGCAGTTTTCAGC 3'。按 Total RNA Kit 说明书提取总 RNA,以 RNA 为模板,按照逆转录试剂盒(英韦创津公司)说明书进行逆转录,合成 cDNA。以制备的 cDNA 为模板,分别扩增 CXCR1、CXCR2 和 GAPDH。收集反应体系,电泳后,成像观察。

1.7 细胞迁移实验

细胞迁移实验方法参照 Corning 公司的操作指南。具体为:取 100 μ L EMC 稀释胶加入到细胞小室的上层小室中凝成固体。将生长状态良好 MSC 用胰酶消化细胞,细胞计数板进行细胞计数。在板孔(下室)中加入含或不含 Anti-IL-8 或 Anti-CXCR2 的条件的培养基,将小室置于板孔中,在细胞小室的上层加入的 1×10^5 细胞,100 ng/mL IL-8 刺激相应时间。按实验设计培养后。取出细胞小室。小室微孔膜下面的细胞用 50 mL/L 戊二醛固定,染色,置于显微镜下拍照,计数。

1.8 Western blotting

IL-8 组加入 IL-8 刺激 15、30、60 min; Anti-CXCR2 组预先加入 Anti-CXCR2 培养 30 min 后,再加入加入 IL-8 刺激 15、30、60 min。刺激时间达到后,收集细胞裂解液电泳。聚丙烯酰胺凝胶的考马斯亮蓝染色及脱色。转移到 PVDF 膜。封闭

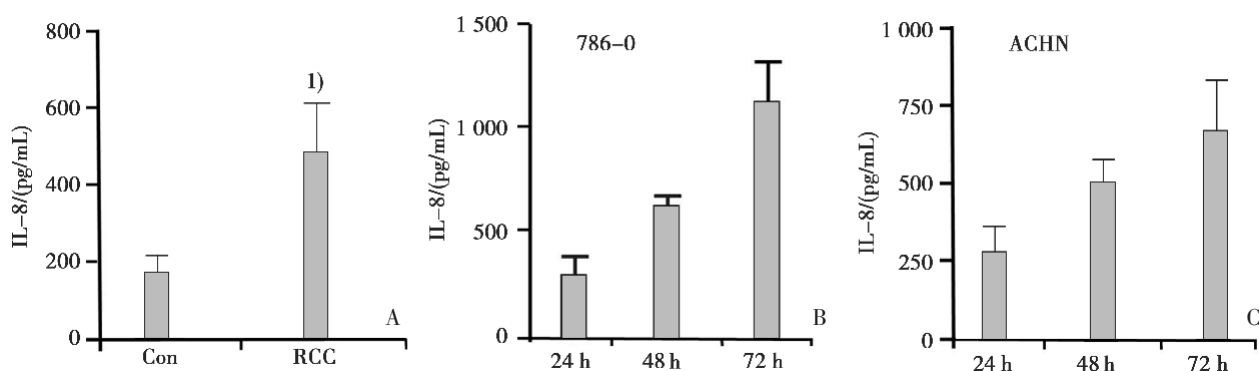


图 1 肾癌分泌 IL-8

Fig.1 RCC secretes IL-8

A: The level of IL-8 in the serum from control and RCC group was detected by ELISA, 1) t test, $P < 0.05$; B&C: Renal cell carcinoma cell line 786-O and ACHN cells were cultured for indicated time, IL-8 level were observed by ELISA.

后。相应一抗体 4℃ 孵育过夜,二抗室温 1 h。凝胶成像系统下成像。同法检测内参照 β -actin。

1.9 统计学分析

实验数据采用平均数 $\pm$ 标准差表示。实验数据输入 SPSS 13.0 软件,实验结果由 t 检验进行分析, $P < 0.05$ 被认为有统计学意义。

2 结 果

2.1 肾癌组织和肾癌细胞分泌 IL-8

如图 1a 所示,ELISA 方法检测发现肾癌患者血液中 IL-8 明显高于正常人群水平 (t 检验, $P < 0.05$)。为了进一步探讨肾癌患者中升高的 IL-8 是否由肾癌细胞分泌而来,我们体外培养肾癌细胞株 786-O 和 ACHN 两种细胞。两种细胞在培养了 24、48 和 72 h 后,收集上清用 ELISA 方法检测 IL-8 的水平。如图 1b 和 c 所示,两组细胞体外培养后均可以分泌 IL-8,且 786-O 细胞分泌水平更高。由此可见,肾癌组织和肾癌细胞分泌 IL-8,提示 IL-8 可能在肾癌中具有重要作用。

2.2 MSC (MSC) 高表达 CXCR2 受体,低表达 CXCR1 受体

如图 2a 所示,免疫荧光结果显示 MSC 高表达 CXCR2,而 CXCR1 表达偏低;RT-PCR 结果进一步证实 CXCR2 是 MSC 细胞表面主要受体,而 CXCR1 表达极低。

2.3 肾癌细胞通过分泌 IL-8 促进 MSC 转移

如图 3b 所示 CXCR2 抗体预处理组 MSC 的

迁移明显减低,这说明条件培养基中的 IL-8 通过 CXCR2 刺激 MSC 迁移。

2.4 IL-8 可以促进 MSC 内 ERK 的磷酸化水平升高

如图 4 所示:IL-8 刺激后可以明显提高 ERK 的磷酸化水平,这说明 IL-8 可以激活 MSC 内 ERK 信号通路。此外,当我们用 CXCR2 抗体封闭 CXCR2 后,MSC 内 ERK 的磷酸化水平明显降低。

3 讨 论

间充质干细胞(MSC)是一种多功能成体干细胞,其在肿瘤的发展、转移及耐药中起着重要作用。MSC 归巢至肿瘤是其与肿瘤相互作用的关键步骤。我们在本研究中发现 MSC 细胞表面高表达 IL-8 的受体 CXCR2,肾癌可以分泌 IL-8,并通过 CXCR2 受体促进 MSC 迁移。分子生物学实验结果证实 IL-8 刺激后可以明显提高 MSC 内细胞激酶 ERK 的磷酸化水平。由此可见,肾癌可以通过分泌 IL-8 与 MSC 相互作用,促进其迁移,这可能是肾癌促进 MSC 归巢的重要机制之一。

MSC 归巢到肿瘤是由于肿瘤微环境中存在的一系列可溶性炎症相关因子^[11]。研究表明,MSC 还可以可透过血脑屏障到达脑组织,这可能与中枢神经系统放射损伤释放炎症因子有关^[12]。我们在本研究证实肾癌患者血清中 IL-8 水平偏高,体外培养肾癌细胞可以大量分泌 IL-8。这说明肾癌可能通过释放 IL-8 进入肿瘤微环境,进而促进 MSC

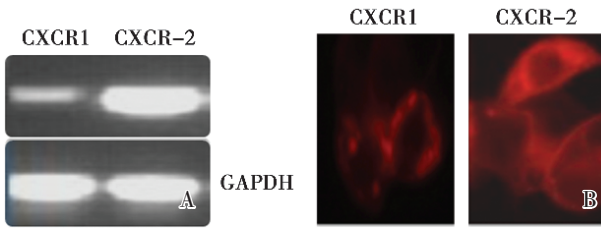


图 2 MSC 表面 CXCR1 和 CXCR2 的表达水平

Fig.2 The expression of CXCR1 and CXCR2 in MSC

The expression of CXCR1 and CXCR2 in MSC were identified by RT-PCR(A) and immunofluorescence stain(B).

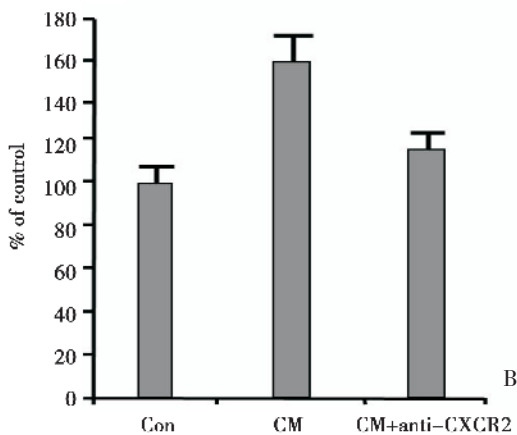
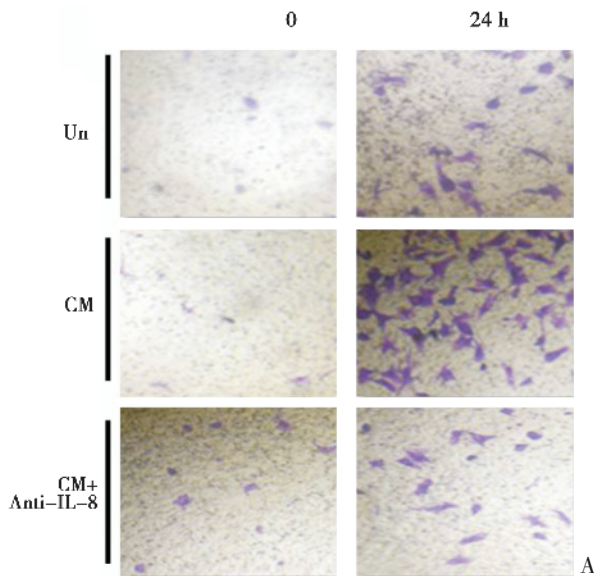


图 3 肾癌分泌 IL-8 通过 CXCR2 促进 MSC 迁移

Fig.3 RCC secreted IL-8 to promote MSC migration via CXCR2

A: The secretion of IL-8 in conditional medium from RCC cancer cells promoted MSC migration. B: The secretion of IL-8 in conditional medium from RCC cancer cells promoted MSC migration via CXCR2.

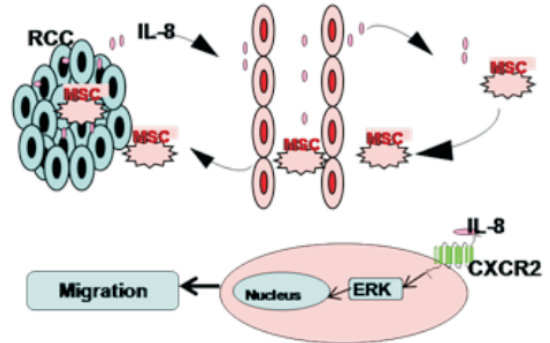
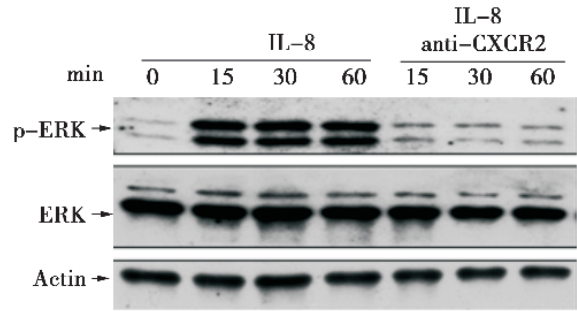


图 4 IL-8 调节 MSC 内 ERK 的磷酸化

Fig.4 IL-8 regulated the phosphorylation of ERK in MSC

786-O cells were stimulated with or without anti-CXCR2 for indicated time, and the phosphorylation level of ERK was observed by Western blotting. B. Proposal model: RCC secretes IL-8 to regulated the migration of MSC.

迁移至肿瘤, IL-8 在两种细胞之间起到桥梁的作用。研究表明 MSC 迁移至肿瘤后, 可以通过促进微血管形成、影响肿瘤基质, 分泌细胞因子等方面促进肿瘤发展^[13-14]。MSC 迁移到肿瘤后, 其可以通过改造肿瘤微循环环境, 自身分化为肌纤维母细胞、血管内皮细胞及调节机体自身的免疫反应等途径来促进肿瘤的生长、发展^[15]。

ERK 为细胞浆内一类丝/苏氨酸蛋白激酶, 参与调控细胞生长, 增殖以及迁移。许多外界刺激可以激活 ERK 发挥其生物学功能。IL-8 也称之为 CXCL8, 它是一个由多种细胞分泌的趋化因子。已有研究表明, 在肿瘤细胞内 IL-8 可以使 ERK 磷酸化, 从而促进肿瘤生长基转移^[16]。Jeun 等^[17]研究发现, 在脐血间充质干细胞中, 基质细胞衍生因子 1(SDF-1) 可以通过其受体 CXCR4 促进 Akt 和 ERK 磷酸化, 促进脐血间充质干细胞迁移。我们在本研究发现细胞因子 IL-8 刺激后, MSC 内 ERK 和 Akt 的磷酸化水平很快上升, 并维持较高水平,

这可能 MSC 发生迁移的重要起始环节。本研究对阐明肾癌微环境, 探讨新的肾癌治疗途径具有重要指导意义。

参考文献

- [1] Dimarino AM, Caplan AI, Bonfield TL, et al. Mesenchymal stem cells in tissue repair [J]. *Front Immunol*, 2011, 22(4): 201-209.
- [2] Kalinina NI, Sysoeva VY, Rubina KA, et al. Mesenchymal stem cells in tissue growth and repair [J]. *Acta Naturae*, 2009, 34(3): 30-37.
- [3] Augello A, De Bari C. The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells[J]. *Hum Gene Ther*, 2010, 21(9): 1226-1238.
- [4] Bianchi G, Borgonovo G, Pistoia V, et al. Immunosuppressive cells and tumour microenvironment: focus on mesenchymal stem cells and myeloid derived suppressor cells[J]. *Histol Histopathol*, 2000, 26(9): 941-951.
- [5] Loebinger MR, Kyratos PG, Turmaine M, et al. Magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells homing to pulmonary metastases using biocompatible magnetic nanoparticles[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(8): 8862-8867.
- [6] Gao P, Ding Q, Wu Z, et al. Therapeutic potential of human mesenchymal stem cells producing IL-12 in a mouse xenograft model of renal cell carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 1999, 290(8): 157-166.
- [7] Yang X, Hou J, Han Z, et al. One cell, multiple roles: contribution of mesenchymal stem cells to tumor development in tumor microenvironment[J]. *Cell Biosci*, 2013, 3(1): 5-16.
- [8] Li C, Guo S, Shi T. Role of NF- κ B activation in matrix metalloproteinase 9, vascular endothelial growth factor and interleukin 8 expression and secretion in human breast cancer cells [J]. *Cell Biochem Funct*, 2000, 31(4): 518-525.
- [9] Kim H, Choi JA, Park GS, et al. BLT2 up-regulates interleukin-8 production and promotes the invasiveness of breast cancer cells [J]. *PLoS One*, 2011, 7(1): e49186.
- [10] Bi LK, Tang B, Zhu B, et al. Systemic Delivery of IL-10 by Bone Marrow Derived Stromal Cells Has Therapeutic Benefits in Sepsis Therapy [J]. *Progress Biochem Biophys*, 2010, 37(9): 678-685.
- [11] Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, et al. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells [J]. *Gene Ther*, 2008, 15(9): 730-738.
- [12] 罗向阳, Mohi Rezvani, 夏焱, 等. 放射损伤对外源骨髓间充质干细胞迁徙定植的影响[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2008, 29(5): 512-515.
- [13] Luo XY, Mohi R, Xia Y, et al. Homing and migration of transplanted mesenchymal stem cells in irradiated central nervous system [J]. *J Sun Yat-Sen Univ: Med Sci*, 2008, 29(5): 512-515.
- [14] Kidd S, Spaeth E, Watson K, et al. Origins of the tumor microenvironment: quantitative assessment of adipose-derived and bone marrow-derived stroma [J]. *PLoS One*, 2007, 5(1): e30563.
- [15] Pasquet M, Golzio M, Mery E, et al. Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis [J]. *Int J Cancer*, 2000, 126(9): 2090-2101.
- [16] 朱磊, 姜晓峰. 间充质干细胞与肿瘤关系的研究进展 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2011, 18(4): 125-129.
- [17] Zhu L, Jiang XF. Role of mesenchymal Stem cells in tumor [J]. *Chin J Can Prev Treat*, 2011, 18(4): 125-129.
- [18] Waugh DJJ, Wilson C. The Interleukin-8 Pathway in Cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(9): 6735-6741.
- [19] Ryu CH, Park SA, Kim SM, et al. Migration of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells mediated by stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis via Akt, ERK, and p38 signal transduction pathways [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 398(9): 105-110.

(编辑 徐杰)