

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.18.021

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220518.1424.006.html\(2022-05-18\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220518.1424.006.html(2022-05-18))IL-17A、IL-6、IFN- γ 在卵巢癌的表达情况及相关性研究*殷美琴¹,王永霞^{1△},秦智娟¹,李美琴¹,马宗丽¹,沈晓健²,薛卫红¹,沙红兰¹

(如皋市人民医院:1.妇产科;2.病理科,江苏南通 226500)

[摘要] **目的** 探讨白细胞介素(IL)-17A、IL-6、干扰素(IFN)- γ 蛋白在卵巢癌组织的表达情况及相关性。**方法** 选取 2017 年 5 月至 2020 年 5 月如皋市人民医院就诊的 50 例患者为研究对象,其中 30 例上皮性卵巢癌患者作为卵巢癌组,20 例卵巢上皮性良性肿瘤患者作为良性肿瘤组,另选取同期因子宫肌瘤行全子宫+附件切除术且卵巢正常的 20 例患者作为对照组。苏木素-伊红(HE)染色观察 3 组卵巢组织病理结构,免疫组织化学染色分析卵巢组织 IL-17A、IL-6、IFN- γ 蛋白的表达情况,ELISA 检测血清 IL-17A、IL-6、IFN- γ 表达水平,并分析 IL-17A、IL-6、IFN- γ 三者间的相关性。**结果** 对照组卵巢组织无明显异常,良性肿瘤组卵巢有炎性细胞浸润,卵巢癌组肿瘤细胞大小不一,形态各异。IL-17A 在对照组、良性肿瘤组呈弱阳性表达,在卵巢癌组呈强阳性表达,与血清表达水平一致。IL-6 在对照组呈弱阳性表达,在良性肿瘤组呈中等阳性表达,在卵巢癌组呈强阳性表达,与血清表达水平一致。IFN- γ 在对照组和良性肿瘤组呈强阳性表达,在卵巢癌组呈弱阳性表达,与血清表达水平一致。IL-17A 和 IL-6 呈强正相关关系($r=0.9918$),IL-17A 和 IFN- γ 呈强负相关关系($r=-0.9774$)。**结论** IL-17A、IL-6 和 IFN- γ 可能协同参与了卵巢癌的发生、发展。

[关键词] 卵巢癌;白细胞介素-17A;白细胞介素-6; γ 干扰素;免疫组织化学;酶联免疫吸附测定**[中图分类号]** R711.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)18-3166-06Expression and correlation of IL-17A, IL-6 and IFN- γ protein in ovarian cancer*YIN Meiqin¹, WANG Yongxia^{1△}, QIN Zhijuan¹, LI Meiqin¹, MA Zongli¹,
SHEN Xiaojian², XUE Weihong¹, SHA Honglan¹

(1. Department of Obstetrics and Gynecology; 2. Department of Pathology, the People's Hospital of Rugao, Nantong, Jiangsu 226500, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression and correlation of interleukin (IL)-17A, IL-6 and interferon (IFN)- γ protein in ovarian cancer tissue. **Methods** A total of 50 patients treated in the People's Hospital of Rugao from May 2017 to May 2020 were selected as the subjects, including 30 patients with epithelial ovarian cancer as the ovarian cancer group and 20 patients with benign ovarian tumor as the benign tumor group. Another 20 patients with normal ovaries who underwent the total hysterectomy plus adnexal resection for hysteromyoma in the same period were selected as the control group. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological structure of the ovarian tissues in the three groups. Immunohistochemical analysis was used to detect the expressions of IL-17A, IL-6 and IFN- γ proteins in the tissues. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the expression levels of IL-17A, IL-6 and IFN- γ in serum. The correlations among IL-17A, IL-6 and IFN- γ protein were analyzed. **Results** There was no obvious abnormality in the ovarian tissue of the control group. The inflammatory cell infiltration was found in the benign tumor group, and the tumor cells were of different sizes and shapes in the ovarian cancer group. IL-17A was weakly positively expressed in the benign tumor group and the control group. IL-17A was strongly positively expressed in the ovarian cancer group, which was consistent with that in serum. IL-6 was weakly positively expressed in the control group, moderately positively expressed in the benign tumor group, and strongly positively expressed in the ovarian cancer group, which was consistent with that in serum. IFN- γ was

* 基金项目:江苏省南通市科技计划指导性项目(MSZ1943);江苏省如皋市科技计划项目(2019-45)。 作者简介:殷美琴(1973-),副主任医师,学士,主要从事妇科肿瘤研究。 △ 通信作者, E-mail:158403596@qq.com。

strongly positively expressed in the control group and the benign tumor group, weakly positively expressed in the ovarian cancer group, which was consistent with that in serum. There was a strong positive correlation between IL-17A and IL-6 ($r=0.9918$), and a strong negative correlation between IL-17A and IFN- γ ($r=-0.9774$). **Conclusion** IL-17A, IL-6 and IFN- γ might synergistically involve in the occurrence and process of ovarian cancer.

[Key words] ovarian tumor; interleukin-17A; interleukin-6; interferon- γ ; immunohistochemistry; enzyme-linked immunosorbent assay

卵巢癌对女性健康的威胁日趋严重,病死率是妇科肿瘤之首^[1-2]。这与现今依然缺乏早期筛查手段及有效的治疗措施密切相关。研究已经发现卵巢癌的生存率与肿瘤分期密切相关,分期越高,生存率越低^[3]。因此,卵巢癌的早期诊断尤为重要。

炎症在肿瘤中的作用被广泛关注^[4]。白细胞介素(IL)-17A 是一种重要的炎症介质^[5],一方面可以诱导 IL-6、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)等表达,另一方面又能同肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等协同作用,放大其致炎效应。但目前只发现 IL-17A 在炎症反应、自身免疫性疾病、部分肿瘤中发挥重要作用,与卵巢癌相关的研究较少。IL-6 则是机体免疫应答和炎症反应的双重调节因子,参与多种肿瘤的发生、发展。干扰素(IFN)具有广泛的生物学功能,可以调节机体免疫、参与抗肿瘤等,IFN- γ 能够抑制肿瘤血管生成和肿瘤生长。目前关于细胞因子和卵巢癌的研究集中在对卵巢癌患者血清相关因子的测定,对卵巢癌组织中细胞因子表达水平的研究较少,且尚未发现 IL-17A、IL-6、IFN- γ 三者在卵巢癌中关系的研究。因此,本研究采用免疫组织化学分析检测对照组织、卵巢良性上皮性肿瘤、卵巢癌组织中 IL-17A、IL-6、IFN- γ 蛋白的表达情况,通过 ELISA 检测血清 IL-17A、IL-6、IFN- γ 蛋白的表达水平,最后分析 IL-17A、IL-6、IFN- γ 蛋白三者间的相关性,以期对卵巢癌的早期诊断及抗卵巢癌的药物靶点提供新思路,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2017 年 5 月至 2020 年 5 月如皋市人民医院就诊的 50 例患者为研究对象,其中 30 例上皮性卵巢癌患者作为卵巢癌组,20 例卵巢上皮性良性肿瘤患者作为良性肿瘤组,另选取同期因子宫肌瘤行全子宫+附件切除术且卵巢正常的 20 例患者作为对照组。卵巢癌患者纳入标准:(1)30~70 岁;(2)所有病例均符合卵巢癌病理分类标准和 2014 年国际妇产科联盟(FIGO)分期标准诊断标准;(3)手术均按 2015 年美国国立综合癌症网络(NCCN)卵巢癌指南规范的卵巢癌分期手术或卵巢癌减瘤术;(4)手术前均未行化疗、放疗及免疫治疗。卵巢癌患者排除标准:(1)肿瘤非卵巢原发;(2)正在服用免疫抑制剂、免疫调节剂及糖

皮质激素者;(3)存在恶性肿瘤、自身免疫性疾病等其他疾病者。本研究经医院医学伦理委员会批准,所有患者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂

DAB 显色试剂盒(AR1002)、聚合辣根过氧化物酶(HRP)标记抗小鼠 IgG(SV0001)、聚合 HRP 标记抗兔 IgG(SV0002)购自武汉博士德生物工程有限公司;抗 IL-17A 抗体(ab79056)、抗 IL-6 抗体(ab9324)、抗 IFN- γ 抗体(IFNG/466,ab218426)、人 IL-17A ELISA Kit(ab216167)、人 IL-6 ELISA Kit(ab178013)、人 IFN- γ ELISA Kit(ab46025)购自英国 Abcam 公司。

1.2.2 石蜡切片

将组织常规方法制作石蜡切片,切片厚度 4 μm 。

1.2.3 苏木素-伊红(HE)染色

常规程序脱蜡染色,其中苏木素液染色约 10 min,水洗蓝化 20 min,伊红液染 1 s。

1.2.4 免疫组织化学染色

切片脱蜡至水。过氧化氢(H_2O_2)孵育 10 min,ddH₂O 洗涤 5 min。枸橼酸盐抗原微波炉热修复。磷酸盐缓冲液(PBS)洗净 5 min。5%BSA 室温孵育 20 min。滴加一抗(IL-17A 抗体 1:200 稀释,IL-6 抗体 1:1000 稀释,IFN- γ 抗体 1:500 稀释),4℃孵育过夜。PBS 洗 3 次,每次 3 min,二抗 37℃孵育 30 min。PBS 洗 3 次,每次 3 min,DAB 显色液。避光显色,蒸馏水终止显色。苏木素染色 10 min。纯水蓝化 20 min。50%、70%、80%、95%和无水乙醇梯度脱水,每道 2 min。二甲苯透明,中性树脂封片,晾干,拍照。

1.2.5 结果判断

切片于低倍镜下观察,选择卵巢癌较密处就进一步观察。高倍镜下,观察 5 个视野,阳性表达为细胞质呈棕黄色。用 Image. pro plus 6.0 处理图片,获得吸光度(A)值。

1.2.6 ELISA 检测血清 IL-17A、IL-6、IFN- γ 水平

每孔加入 50 μL 标准品和样品,再加 50 μL 抗体 Cocktail,室温孵育 2 h。洗涤 10 s $\times$ 3 次。加入 100 μL TMB Development Solution 避光孵育 10 min。加入 100 μL Stop Solution,1 min 后在 A450 nm 处读数。

1.3 统计学处理

采用 SPSS16.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 t 检验,相关性检验使用 Spearman 秩和相关性分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

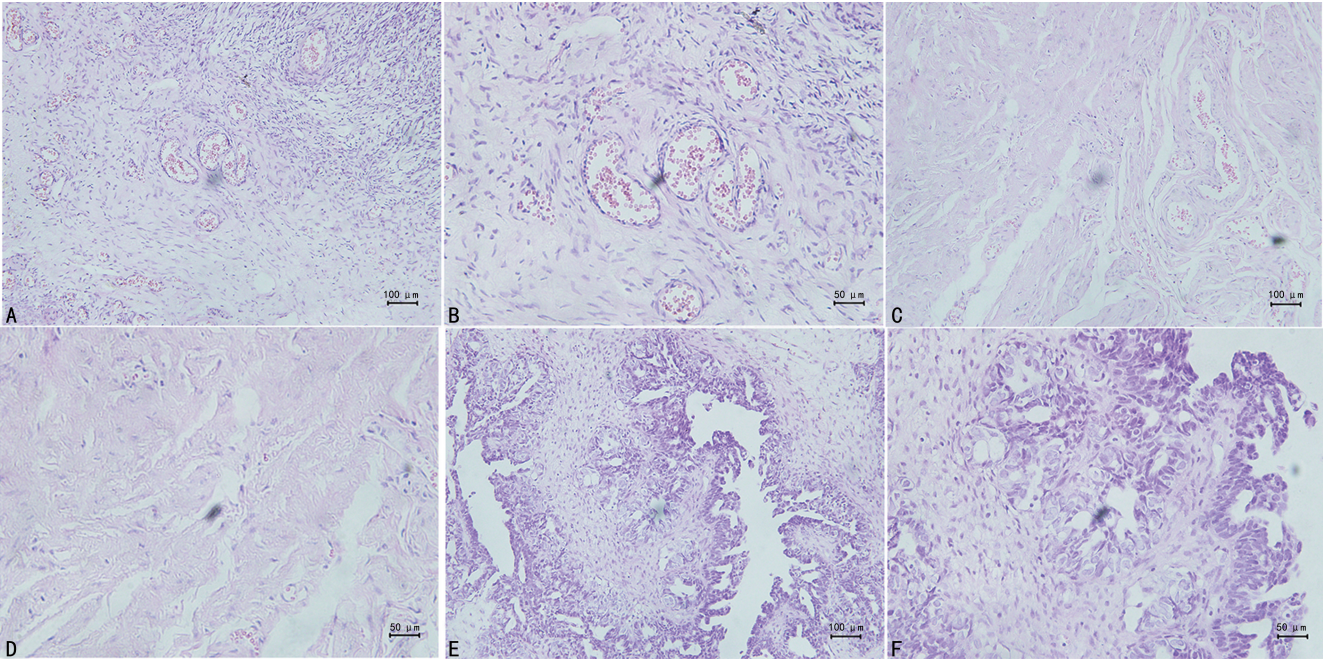
2.1 不同卵巢组织的形态观察

对照组卵巢组织无明显异常,良性肿瘤组卵巢有部分炎性细胞浸润,卵巢癌组肿瘤细胞大小不均,形

态各异,且排列杂乱无序,癌细胞核大且多呈卵圆形,核仁较为明显,核分裂相比较多,可见少量核固缩,细胞分化程度偏低,见图 1。

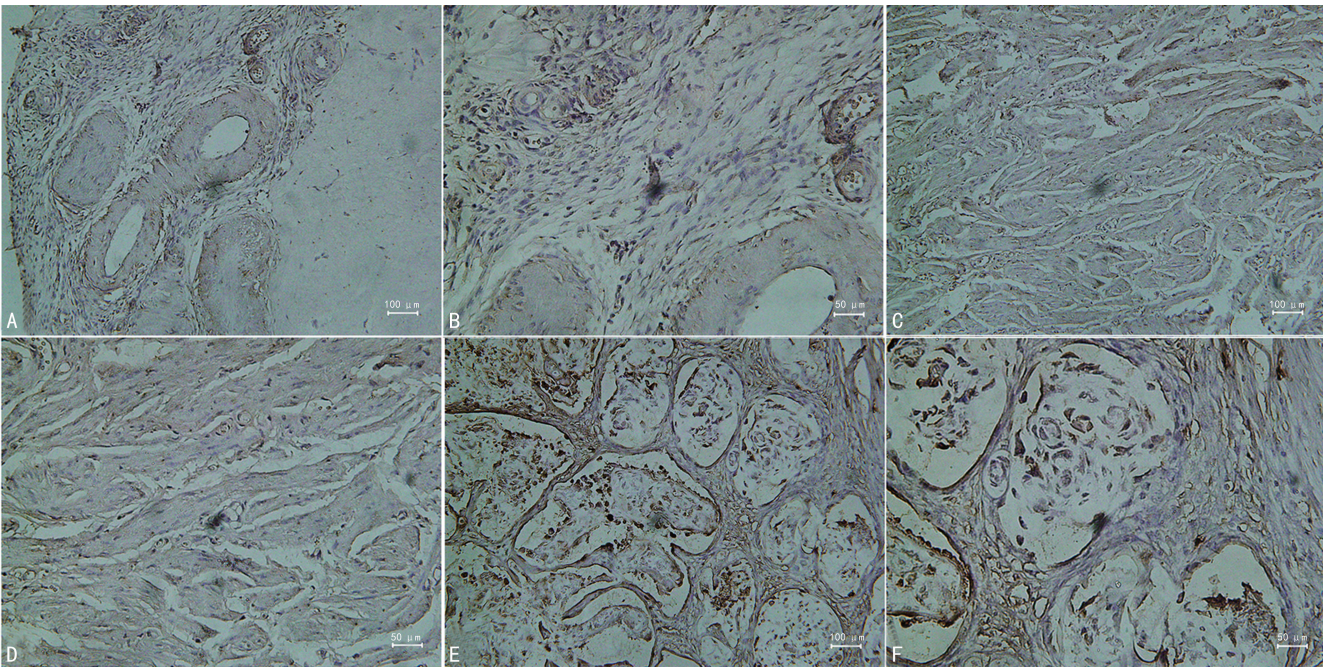
2.2 IL-17A 在不同卵巢组织表达情况

IL-17A 在对照组呈弱阳性,表达强度为 0.147 ± 0.025 ;在良性肿瘤组亦呈弱阳性,表达强度为 0.159 ± 0.028 ;在卵巢癌组呈强阳性,表达强度为 0.386 ± 0.024 ,3 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 2。



A、B:对照组;C、D:良性肿瘤组;E、F:卵巢癌组。

图 1 HE 染色观察不同卵巢组织的形态



A、B:对照组;C、D:良性肿瘤组;E、F:卵巢癌组。

图 2 免疫组织化学染色观察 IL-17A 在不同卵巢组织表达情况

2.3 ELISA 检测血清 IL-17A 表达水平

对照组血清 IL-17A 表达水平为(31.99±5.69)pg/mL,良性肿瘤组为(33.99±7.12)pg/mL,卵巢癌组为(63.72±8.28)pg/mL,3 组比较差异有统计学意义($P<0.05$),见图 3。

2.4 IL-6 在不同卵巢组织中的表达情况

IL-6 在对照组呈弱阳性,表达强度为 0.148±0.033;在良性肿瘤组呈中等阳性,表达强度为 0.257±0.026;在卵巢癌组呈强阳性,表达强度为 0.410±0.033,3 组比较差异有统计学意义($P<0.05$),见图 4。

2.5 ELISA 检测血清 IL-6 表达水平

对照组血清 IL-6 表达水平为(27.08±8.54)pg/

mL,良性肿瘤组为(55.53±9.22)pg/mL,卵巢癌组为(153.45±17.5)pg/mL,3 组比较差异有统计学意义($P<0.05$),见图 5。

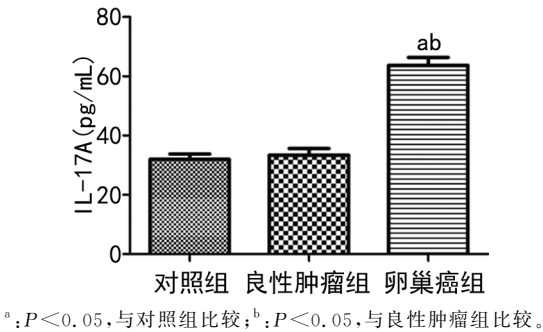
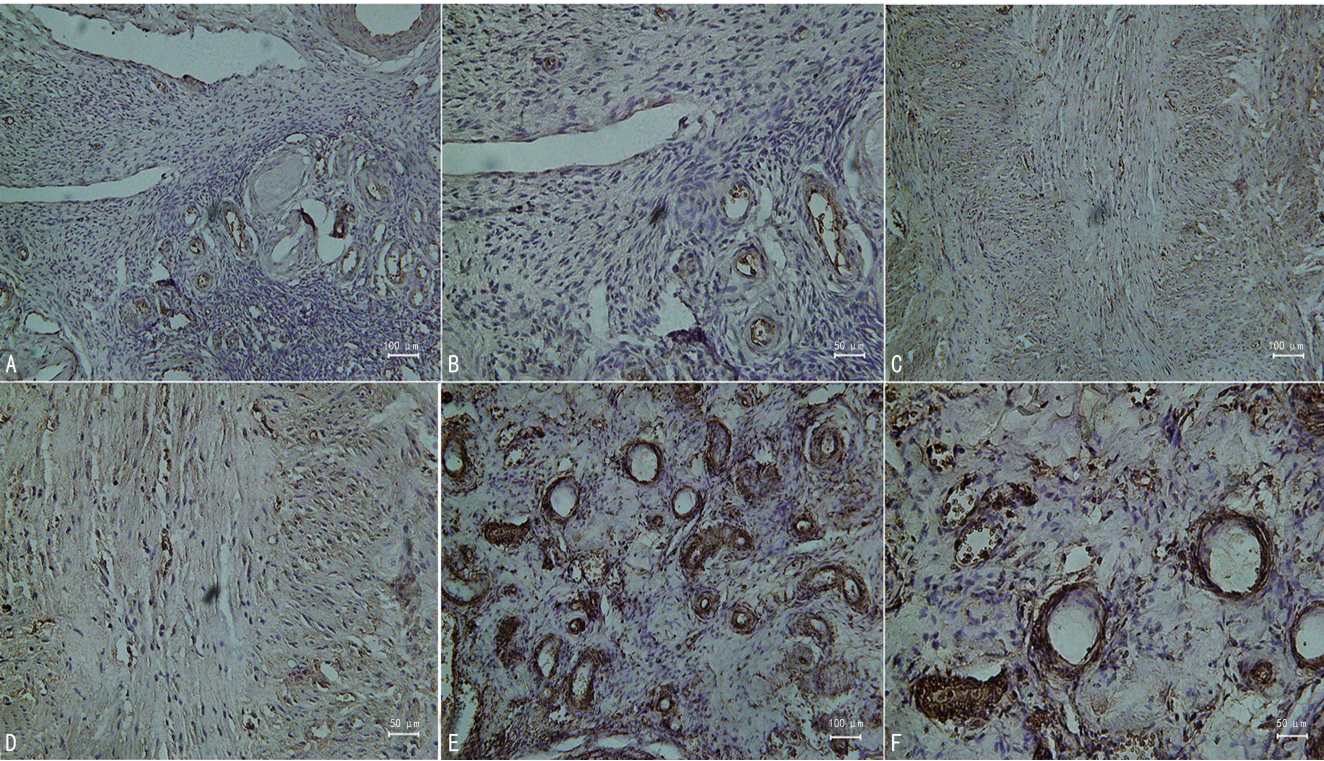


图3 3组血清 IL-17A 表达水平比较



A,B:对照组;C,D:良性肿瘤组;E,F:卵巢癌组。

图4 免疫组织化学染色观察 IL-6 在不同卵巢组织中的表达情况

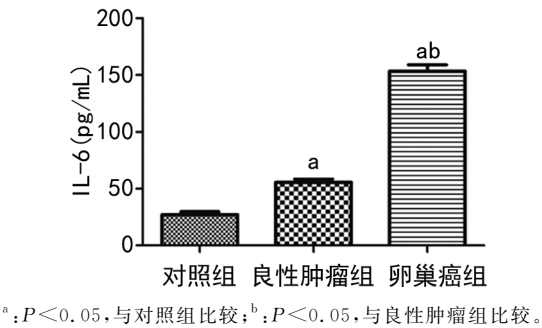


图5 3组血清 IL-6 表达水平比较

2.6 IFN-γ 在不同卵巢组织中的表达情况

IFN-γ 在对照组呈强阳性,表达强度为 0.398±0.025;在良性肿瘤组亦呈强阳性,但弱于对照组,表

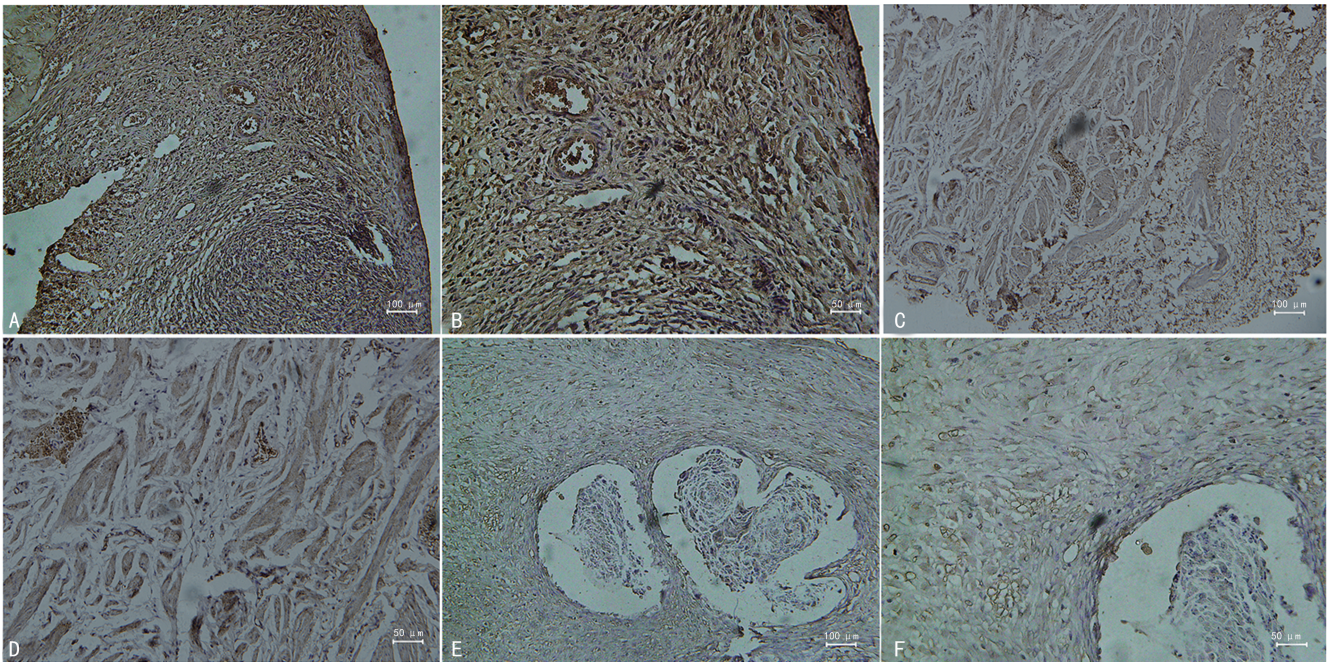
达强度为 0.301±0.035;在卵巢癌组呈弱阳性,表达强度为 0.144±0.036,3 组比较差异有统计学意义($P<0.05$),见图 6。

2.7 ELISA 检测血清 IFN-γ 的表达水平

对照组血清 IFN-γ 的表达水平为(142.97±20.79)pg/mL,良性肿瘤组为(111.89±17.40)pg/mL,卵巢癌组为(78.47±16.03)pg/mL,3 组比较差异有统计学意义($P<0.05$),见图 7。

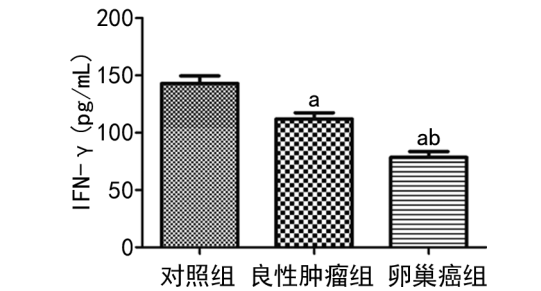
2.8 IL-17A、IL-6、IFN-γ 的相关性分析

IL-17A 和 IL-6 呈强正相关关系($r=0.9918$), IL-17A 和 IFN-γ 呈强负相关关系($r=-0.9774$)。



A、B:对照组;C、D:良性肿瘤组;E、F:卵巢癌组。

图 6 免疫组织化学染色观察 IFN- γ 在不同卵巢组织中的表达情况



^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与良性肿瘤组比较。

图 7 3 组血清 IFN- γ 表达水平比较

3 讨 论

现今,卵巢癌的早期诊断和治疗效果还不尽人意,虽然手术方式有所改进且化疗药物不断更新,但晚期卵巢癌患者的 5 年生存率并无明显提高。同时,卵巢癌的发生、发展机制仍不甚清楚,还需深入研究影响卵巢癌增殖、侵袭、转移和分化的相关因素及分子机制,为临床的早期诊断和治疗提供新的思路。

许多上皮性肿瘤均有一个重要标志,即潜在的慢性感染伴随持续的固有免疫细胞活化,该过程的发生常常早于疾病的发生并参与肿瘤的发生、发展^[6]。而固有免疫细胞则是引起感染及炎症相关性肿瘤基质中的重要组分。而当前慢性持续性的炎症已成为恶性肿瘤新的热门标记性特征。因此,研究卵巢癌患者肿瘤微环境中的免疫和炎症反应是了解卵巢癌发生、发展的关键所在。

IL-17A 是由 CD4⁺ T 细胞中的辅助型 T 细胞(Th)17 细胞亚群分泌的一种细胞因子,可以诱导某些细胞中 TNF- α 、IL-1、IL-6 等促炎因子的表达,进而

参与炎症反应、抗感染反应等。IL-17A 的表达水平也被一系列因素调节,如被抗原呈递细胞分泌的 IL-6 和 IL-1 调节。另外,IFN- γ 在 IL-17A 的调节中也起到重要作用,DMBA/TPA 通过诱导 IFN- γ 的表达刺激 IL-17A 的分泌从而促进乳头瘤的进展。但在 IFN^{-/-} 的小鼠中,B16 黑色素瘤的生长较野生型小鼠明显增强,且 IL-17A 有更高的表达。由此推断 IFN- γ 可能在不同肿瘤类型中对 IL-17A 的表达起不同调节作用。现有研究表明 IL-17A 在多种肿瘤中表达升高,如乳腺癌^[7]、胆囊癌^[8]、非小细胞肺癌^[9] 等,且促进癌细胞的增殖、迁移和侵袭。在本研究中,IL-17A 在对照组、良性肿瘤组表达水平较低,且两组间无差异;而在卵巢癌组表达水平升高,这与 IL-17A 在多种肿瘤中的表达趋势一致。

IL-6 来源广泛,单核巨噬细胞、活化的 T 细胞、B 细胞等都可以产生 IL-6。IL-6 是机体免疫应答和炎症反应的重要调节因子,其在机体内的生物学作用与其表达水平间具有两面性。当 IL-6 处于低水平时,有利于机体的免疫调节;而当其处于高水平时,就会严重影响细胞因子间正常的协同作用,从而引起细胞因子功能紊乱,进而引发各种疾病。IL-6 的过度产生在多种癌症细胞中普遍存在,同时在癌症患者中伴随着血清 IL-6 水平的明显上升。近些年国际国内研究表明,IL-6 介导的信号通路与乳腺癌^[10]、肝癌^[11]、胃癌^[12] 等常见肿瘤的发生、发展均密切相关,且参与肿瘤的侵袭、转移、预后及复发^[13]。此外,IL-6 还可增加卵巢癌细胞的黏附性、趋化性和化学促进性及总的

侵袭力^[14]。本研究 3 组 IL-6 在卵巢组织和血清均有所表达,且随恶性程度加重呈递增趋势。这与 IL-6 处于低水平时,有利于机体的免疫调节,而在肿瘤中常常过度表达一致。

IFN- γ 是多功能细胞因子,参与抗感染、抗肿瘤等多种生物学事件。IFN- γ 一方面可以增强自然杀伤(NK)细胞和 T 细胞的活性,从而促进 Th1 型细胞因子的分泌,这有利于激活抗肿瘤免疫途径;另一方面高浓度 IFN- γ 或持续性低剂量的 IFN- γ 又有利于形成肿瘤细胞免疫逃逸微环境,说明 IFN- γ 对肿瘤的调控存在多面性。现研究一般认为当 Th1 功能较强时,机体的细胞免疫可有效抑制肿瘤细胞的活力^[15],反之亦然。本研究中,IFN- γ 在对照组呈强阳性,在良性肿瘤组亦呈强阳性,但弱于对照组,而在卵巢癌组呈弱阳性,说明在卵巢癌中 Th1 功能较弱,肿瘤细胞活力较强。

综上所述,IL-17A、IL-6 和 IFN- γ 参与了卵巢癌的发生,且三者间有一定的关联,有成为卵巢癌早期检测和分子靶向的可能,但三者间具体的作用机制,以及如何促进卵巢癌的发生还有待深入研究。

参考文献

- [1] ZHOU X F, LIU M, DENG G M, et al. lncRNA LOC102724169 plus cisplatin exhibit the synergistic anti-tumor effect in ovarian cancer with chronic stress [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 24: 294-309.
- [2] HE C F, HUANG F X, ZHANG K J, et al. Establishment and validation of an RNA binding protein-associated prognostic model for ovarian cancer [J]. *J Ovarian Res*, 2021, 14(1): 27.
- [3] LOWE K A, CHIA V M, TAYLOR A, et al. An international assessment of ovarian cancer incidence and mortality [J]. *Gynecol Oncol*, 2013, 130(1): 107-114.
- [4] SINGH N, BABY D, RAJGURU J P, et al. Inflammation and cancer [J]. *Ann Afr Med*, 2019, 18(3): 121-126.
- [5] SIMONE V D E, FRANZÈ E, RONCHETTI G, et al. Th17-type cytokines, IL-6 and TNF- α synergistically activate STAT3 and NF- κ B to promote colorectal cancer cell growth [J]. *Oncogene*, 2015, 34(27): 3493-503.
- [6] RAZMKHAH M, ABTAHI S, GHADERI A. Mesenchymal stem cells, immune cells and tumor cells crosstalk: a sinister triangle in the tumor microenvironment [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2019, 14(1): 43-51.
- [7] SONG X L, WEI C R, LI X Q. The potential role and status of IL-17 family cytokines in breast cancer [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 95: 107544.
- [8] CHEN K L, TANG H W, ZHU P F, et al. Interleukin 17A promotes gallbladder cancer invasiveness via ERK/NF-kappa B signal pathway mediated epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *J Cancer*, 2020, 11(15): 4406-4412.
- [9] WANG R R, YANG L, ZHANG C Q, et al. Th17 cell-derived IL-17A promoted tumor progression via STAT3/NF-kappa B/Notch1 signaling in non-small cell lung cancer [J]. *Oncoimmunology*, 2018, 7(11): e1461303.
- [10] TSOI H, MAN ELLEN P S, CHAU K M, et al. Targeting the IL-6/STAT3 signalling cascade to reverse tamoxifen resistance in estrogen receptor positive breast cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(7): 1511.
- [11] AL-BAKHEIT A, ABU-QATOUSEH L. Sulforaphane from broccoli attenuates inflammatory hepcidin by reducing IL-6 secretion in human HepG2 cells [J]. *J Funct Foods*, 2020, 75: 104210.
- [12] LU G F, TIAN S Y, SUN Y, et al. NEK9, a novel effector of IL-6/STAT3, regulates metastasis of gastric cancer by targeting ARHGEF2 phosphorylation [J]. *Theranostics*, 2021, 11(5): 2460-2474.
- [13] LI J, LAN T, ZHANG C, et al. Reciprocal activation between IL-6/STAT3 and NOX4/Akt signalings promotes proliferation and survival of non-small cell lung cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(2): 1031-1048.
- [14] JIANG Y, HAN S, CHENG W, et al. NFAT1-regulated IL-6 signalling contributes to aggressive phenotypes of glioma [J]. *Cell Commun Signal*, 2017, 15(1): 54.
- [15] XU B, YU L, ZHAO L Z. Curcumin up regulates T helper 1 cells in patients with colon cancer [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(4): 1866.