

IL-17 及其受体调控 DLL4-Notch 信号通路 影响甲状腺乳头状癌新生血管生成

宋 杨,杨见明

摘要 目的 研究白介素-17(IL-17)/白介素-17受体(IL-17R)调控 DLL4-Notch 信号通路影响甲状腺乳头状癌血管生成的机制。方法 建立甲状腺乳头状癌细胞(TPC-1)-内皮细胞共培养体系,检测 50 ng/ml IL-17 刺激剂对共培养系统中人脐静脉内皮细胞(HUVECs)增殖、迁移、成管能力的影响。Western blot 法检测共培养体系中 HUVECs DLL4-Notch 信号通路和血管新生蛋白表达水平。结果 50 ng/ml 重组人 IL-17A 干预可显著促进共培养体系中 HUVECs 的增殖、迁移和成管能力($P < 0.01$)。pLKO.1-EGFP-Puro-IL-17R 转染的 TPC-1 细胞共培养 HUVECs 经 50 ng/ml 重组人 IL-17A 干预 6 h 后,细胞中 DLL4、Notch、HES、HEY 和血管内皮细胞生长因子受体 1(VEGFR1)、血管内皮细胞生长因子受体 2(VEGFR2)的表达水平得到不同程度的上调,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。DLL4-Notch 通路抑制剂 DAPT 干预可显著抑制 IL-17 刺激剂对共培养体系细胞中 HES、HEY、VEGFR-1、VEGFR-2 蛋白表达增加作用($P < 0.01$)。结论 IL-17/IL-17R 可能通过 DLL4-Notch 信号通路促进甲状腺乳头状癌血管生成。

关键词 IL-17/IL-17R; DLL4-Notch 信号通路; 血管生成; 甲状腺乳头状癌

中图分类号 R 736.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)07-1146-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.07.014

甲状腺癌是内分泌系统常见的恶性肿瘤,依据病理组织特征,甲状腺癌有以下几种类型:甲状腺乳头状癌、甲状腺髓样癌、滤泡状甲状腺癌、甲状腺未分化癌。在所有甲状腺癌病理类型中甲状腺乳头状癌是所有最为常见的一种^[1]。部分甲状腺乳头状癌患者会发展到侵入邻近组织,预后较差。因此,阐明部分甲状腺乳头状癌侵袭转移的分子机制具有重要意义^[2-3]。在肿瘤侵袭转移的进程中,新生血管

生成是一个关键因素,也是甲状腺乳头状癌局部淋巴结转移和复发的主要因素^[4-5]。白细胞介素(interleukin, IL)-17 主要是 17 型 T 辅助细胞(Th17 细胞)表达的一种细胞因子。研究^[6]显示 IL-17 及其受体介导的信号通路参与血管生成和肿瘤的恶化。DLL4-Notch 信号传递途径参与诱导和挑选顶端细胞,在血管发生中扮演着重要角色^[7-8]。然而,甲状腺乳头状癌中 IL-17/白介素-17 受体(interleukin-17 receptor, IL-17R)以何种方式介导 DLL4-Notch 信号通路,对甲状腺乳头状癌新生血管生成产生影响尚不清楚。该研究构建共培养体系模型模拟肿瘤微环境,观察 TPC-1 对共培养体系中人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)的影响,探讨 TPC-1 与 HUVECs 之间的作用机制,为甲状腺乳头状癌的临床诊断和治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 甲状腺乳头状癌细胞(TPC-1)、HUVECs 购自中国科学院上海生科院细胞资源中心。TPC-1、HUVECs 用含 15% 的胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、100 U/ml 青霉素链霉素的 RPMI 1640 培养基于 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养。待细胞生长约 80% 融合度时进行相关实验。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 主要试剂 DMEM 高糖培养基(美国 HyClone 公司);FBS(浙江天杭生物科技有限公司);重组人 IL-17A(美国 Peprotech 公司);抗 DLL4、抗 Notch 多克隆抗体(美国 Immuno Way 公司);GAPDH 抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司);抗 IL-17R 多克隆抗体(英国 Abcam 公司);HES、HEY、VEGFR-1、VEGFR-2(美国 Cell Signaling 公司);山羊抗兔二抗(美国 ABclonal 公司);PMSF、RIPA 裂解液(强)、BCA 蛋白浓度检测试剂盒、5 × SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、胰酶、一抗稀释液、二抗稀释液(上海碧云天生物有限公司);Matrigel Basement Membrane Matrix、

2023-06-09 接收

基金项目:安徽省自然科学基金青年项目(编号:2008085QH423)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院耳鼻喉—头颈外科,合肥 230601

作者简介:宋 杨,女,助理研究员;

杨见明,男,主任医师,责任作者,E-mail:jmyang88@163.com

Transwell 小室(美国 Corning 公司);CCK-8 试剂盒、结晶紫(江苏碧云天生物技术研究所以)。

1.2.2 主要仪器 NAPCO-8800 型恒温细胞培养箱(美国 SHELLAB 公司);Olympus IX-71 型光学显微镜(日本奥林巴斯株式会社);Western blot 电泳仪(上海天能科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 建立肿瘤-内皮细胞共培养体系 将 5×10^4 个密度的 TPC-1 细胞接种在 Transwell 小室的 6 孔板底部, 1×10^5 个密度的 HUVECs 细胞接种在 Transwell 小室的上层,上、下室分别加入 2 ml 和 3 ml 含有 FBS 的 DMEM 细胞培养液,于 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中培养过夜。利用 Transwell 将 HUVECs 和 TPC-1 细胞置于同一培养体系中,构建肿瘤细胞与肿瘤血管内皮细胞共培养模型。

1.3.2 迁移实验检测 IL-17 刺激剂对共培养体系中 HUVECs 迁移能力的影响 该研究分为 2 组:NC-HUVECs 组(对照组)、IL-17A-HUVECs 组。制备细胞悬液,使用 24 孔 Transwell 系统(嵌套膜孔径 8 μm)。先于下层小室接种 TPC-1 细胞,12 h 后,于上层接种 HUVECs,2 种细胞接种密度均为 1×10^5 个。以 50 ng/ml 的重组人 IL-17A 干预细胞,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 6 h。培养完成后,取出小室,用 4% 的多聚甲醛固定、结晶紫染色,显微镜下观察并拍照,随机选择 3 个视野进行比较,实验重复 3 次。

1.3.3 体外成管实验检测 IL-17 刺激剂对共培养体系中 HUVECs 成管能力的影响 该研究分为 2 组:NC-HUVECs 组(对照组)、IL-17A-HUVECs 组。HUVECs 与 TPC-1 共培养 24 h,铺基质胶,模拟体内 HUVECs 迁移并形成血管的微环境。将 RPMI-1640 培养基与 Matrigel 基质胶以体积 1:9 的比例均匀混合,以每孔 50 μl 的量加入 96 孔板中,96 孔板在 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱内过夜备用,在基质胶中加入 HUVECs,取 3×10^3 /ml HUVECs 接种于 96 孔板中,设 3 个平行复孔。观察基质胶上 HUVECs 形成的小管并计数,3 d 后观察并照相,在倒置显微镜下任取 10 个视野计数成管数(个)。

1.3.4 CCK-8 法检测 IL-17 刺激剂对共培养体系中 HUVECs 增殖的影响 选用 TPC-1 细胞与 HUVECs 共培养,该研究分为 2 组:NC-HUVECs 组(对照组)、IL-17A-HUVECs 组。使用 96 孔 Transwell 系统(嵌套膜孔径 0.4 μm)。下层接种 4×10^3 个 TPC-1 细胞,12 h 后于上层接种 2×10^3 个 HUVECs。

50 ng/ml 重组人 IL-17A 干预细胞,共培养 6 h,每种处理设 3 个复孔。培养结束后,弃下层培养基,在上层每孔中加入 10 μl CCK-8 溶液,在细胞培养箱内孵育 1 h 后用酶标仪检测 450 nm 处吸光度值。

1.3.5 IL-17R 基因载体构建 本研究遵循设计原则,根据人 IL-17R 基因编码序列,设计干扰慢病毒及相关阴性对照,PCR 扩增得到目的基因 IL-17R cDNA 片段。纯化后经 Age I 酶切消化,对载体质粒进行酶切、线性化载体片段回收获得。酶切后连接产物利用 PCR 凝胶电泳鉴定,并对序列进行检测。

1.3.6 细胞转染 选取对数生长期的 TPC-1 细胞,胰酶消化,接种于 6 孔板中,设 pLKO.1-EGFP-Puro-IL-17R 组、pLKO.1-EGFP-Puro 空载体组及对照组。以感染复数(multiplicity of infection, MOI)等于 10 的指数转染细胞,继续培养 24 h 后,将 2 μl 的 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ poly-brene 加入转染细胞,根据细胞状态 10 h 换液 1 次。转染 72 h 后,GFP 荧光的时间和表达强度采用 GFP 荧光计数法观察来确定转染情况。转染成功后将各组细胞转移至细胞瓶中继续培养,得到稳定的细胞。6 h 后更换新鲜培养基,24 ~ 48 h 后观察 IL-17R 表达情况。Western blot 法、RT-PCR 法检测 IL-17 融合基因的表达。

1.3.7 RT-PCR 法检测 IL-17R 的表达情况 该研究分为 4 组:GFP-NC 组(对照组)、GFP-IL-17R-sh1 组、GFP-IL-17R-sh2 组、GFP-IL-17R-sh3 组。按试剂盒说明书步骤提取转染后各组细胞的总 RNA,将 RNA 逆转录成 cDNA。设计引物序列,将以含有扩增序列的 cDNA 为模板进行 PCR 反应。反应结束后记录各组实验结果,以 GAPDH 为内参,分析各组 IL-17R 的表达。

1.3.8 pLKO.1-EGFP-Puro-IL-17R 转染的 TPC-1 细胞和 HUVECs 体外双层共培养模型的建立 将 5×10^4 个密度的 HUVECs 接种在 Transwell 小室的 6 孔板底部,将 1×10^5 个密度的 pLKO.1-EGFP-Puro-IL-17R 转染的 TPC-1 细胞接种在 Transwell 小室的上层,上、下室分别加入 2 ml 和 3 ml 含有 FBS 的 DMEM 细胞培养液,于 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中培养过夜。利用 Transwell 将 HUVECs 细胞和 TPC-1 细胞置于同一培养体系中,构建肿瘤细胞与肿瘤血管内皮细胞共培养模型。

1.3.9 Western blot 法检测共培养体系中 DLL4-Notch 信号通路和血管新生蛋白表达水平 选用转染后的 TPC-1 细胞与 HUVECs 共培养,加入 50 ng/ml 的 IL-17 刺激剂。选用 TPC-1 细胞与 HUVECs 共

培养,加入 50 ng/ml 的 IL-17 刺激剂和 DLL4-Notch 通路抑制剂 DAPT。收集各组细胞,每组约 5×10^5 个,离心弃培养液,沉淀用 PBS 洗涤 2 次,弃上清液。按 1×10^6 个细胞加入 100 μ l RIPA 蛋白裂解液 + 1 μ l PMSF 蛋白酶抑制剂的比例裂解细胞。4 $^{\circ}$ C 倾卧 30 min 后,4 $^{\circ}$ C、14 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,-80 $^{\circ}$ C 保存备用,需在冰上完成以上操作。BCA 法蛋白定量,每泳道 20 μ l 蛋白上样进行 SDS-PAGE 电泳,在转移缓冲液中,以 200 mA 的电流转移到 PVDF 膜上。后封闭 2 h,再加入抗 DLL4、Notch、HES、HEY、VEGFR-1、VEGFR-2 抗体,均按照 1:1 000 进行稀释,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗涤后,以辣根过氧化物酶结合的二抗按照 1:5 000 进行稀释,室温孵育 2 h,ECL 试剂盒显色。用 Image-Pro plus 图像处理系统分析计算灰度值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数比较采用 t 检验,多组数据间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-17 刺激剂促进共培养系统中 HUVECs 迁移的能力 迁移实验结果显示,IL-17A-HUVECs 组细胞穿过小室底的细胞数高于 NC-HUVECs 组($t = 5.428, P < 0.01$)。可以发现与 NC-HUVECs 组比较,经 IL-17 刺激剂诱导后 HUVECs 的迁移能力得到显著增强,见图 1。

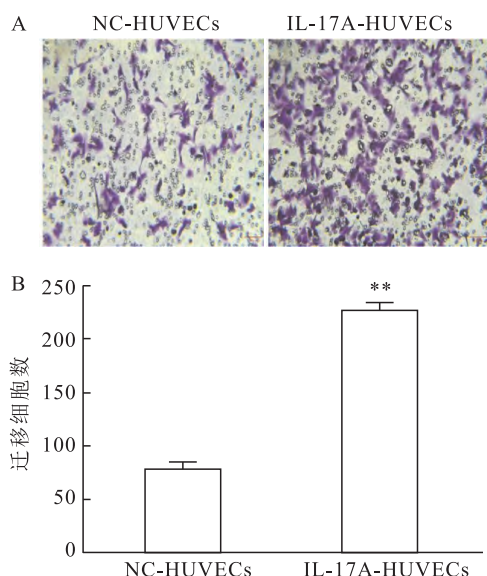


图1 重组人 IL-17A 对共培养系统中 HUVECs 迁移的影响 $\times 200$

A:倒置显微镜下细胞迁移图;B:细胞侵袭迁移率统计结果图;与 NC-HUVECs 组比较:** $P < 0.01$

2.2 IL-17 刺激剂促进共培养系统中 HUVECs 管腔生成的能力 管腔生成实验显示,IL-17A-HUVECs 组将加入 50 ng/ml IL-17 刺激剂的 TPC-1 细胞和 HUVECs 共培养后,IL-17A-HUVECs 组、NC-HUVECs 组管腔生成率为 $(120.92 \pm 8.75)\%$ 、 $(30.71 \pm 6.37)\%$,管腔生成能力得到显著增强,与 NC-HUVECs 组比较,差异有统计学意义($t = 8.758, P < 0.01$)。提示 IL-17 能够促进 HUVECs 的管腔生成能力,见图 2。

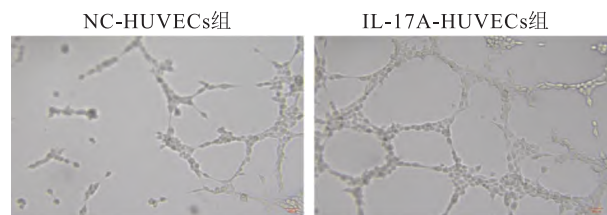


图2 重组人 IL-17A 对共培养系统中 HUVECs 管腔生成能力的影响 $\times 200$

2.3 IL-17 刺激剂促进共培养体系中 HUVECs 的增殖能力 CCK-8 法检测显示,IL-17 刺激剂干预浓度为 50 ng/ml 时,与 TPC-1 细胞共培养的 HUVECs 增殖能力显著增强,IL-17A-HUVECs 组与 NC-HUVECs 组比较,差异有统计学意义($t = 6.542, P < 0.01$)。IL-17 刺激剂干预可显著促进共培养体系中 HUVECs 的增殖能力,见图 3。

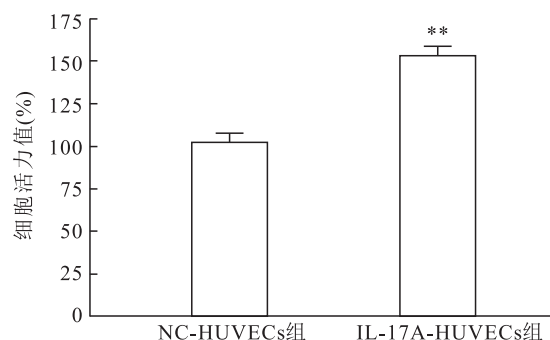


图3 重组人 IL-17A 对共培养系统中 HUVECs 增殖的影响
与 NC-HUVECs 组比较:** $P < 0.01$

2.4 RT-PCR 验证稳定细胞株中 IL-17R 的表达

采用 RT-PCR 实验观察 pLKO.1-EGFP-Puro-IL-17R 转染后的甲状腺乳头状癌 TPC-1 细胞株中 IL-17R mRNA 表达水平变化情况,结果显示:各组中 IL-17R mRNA 表达水平明显降低,差异有统计学意义($t = 7.197, P < 0.01$),其中 GFP-IL-17R-sh3 干扰效果最明显($P < 0.01$),效率最高,见图 4。

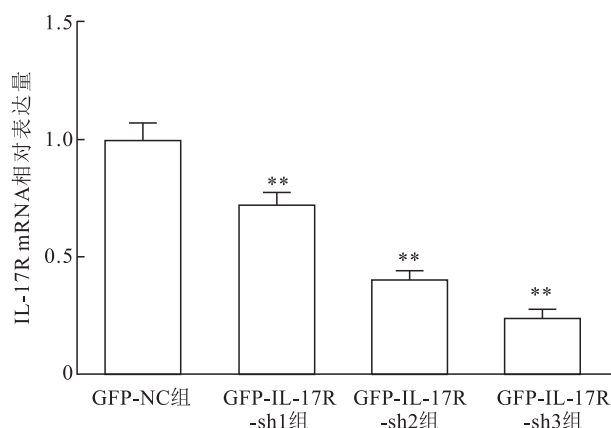


图4 TPC-1细胞转染pLKO.1-EGFP-IL-17R后
IL-17R mRNA的表达量
与GFP-NC组比较: ** $P < 0.01$

2.5 Western blot 法验证 IL-17R 蛋白的表达 采用 Western blot 法检测 pLKO.1-EGFP-Puro-IL-17R 转染后的甲状腺乳头状癌 TPC-1 细胞株中 IL-17R 蛋白表达变化,结果显示:与 GFP-NC 组比较,GFP-IL-17R-sh2、GFP-IL-17R-sh3 沉默组中 IL-17R 蛋白表达降低,差异有统计学意义 ($t = 7.268, P < 0.01$),其中 GFP-IL-17R-sh3 组沉默效率最高,见图 5。

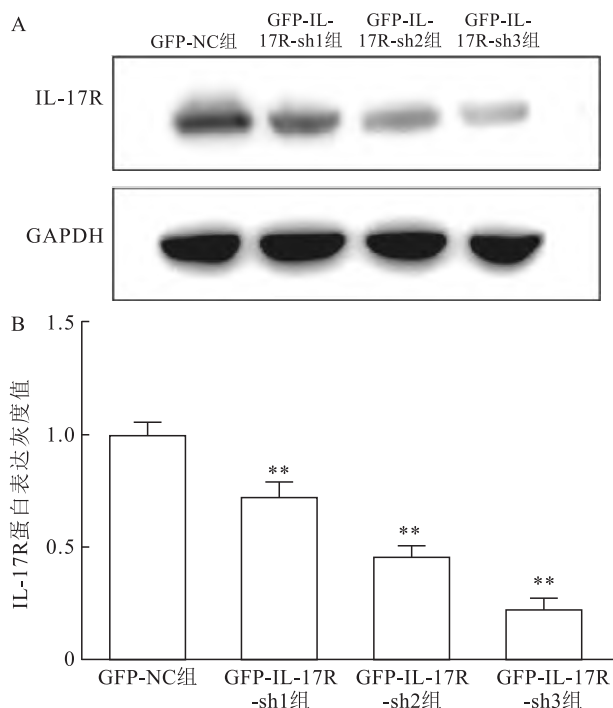


图5 Western blot 检测人甲状腺乳头状癌 TPC-1 细胞株转染
pLKO.1-EGFP-Puro-IL-17R 后 IL-17R 蛋白表达

A:沉默慢病毒转染细胞后 IL-17R 蛋白的表达;B:IL-17R 蛋白表达的灰度值统计结果图;与 GFP-NC 组比较: ** $P < 0.01$

2.6 调控 TPC-1 细胞 IL-17R 对甲状腺乳头状癌新生血管生成的影响 为了明确 IL-17/IL-17R 对甲状腺乳头状癌血管生成的影响,该研究采用 Western blot 实验观察 pLKO.1-EGFP-Puro-IL-17R 转染后的 TPC-1 细胞株共培养体系中 HUVEC 的 VEGFR-1、VEGFR-2 和 DLL4/Notch 信号通路中关键蛋白表达水平的变化情况。该研究分为三组:TPC-1 + HUVECs 组(对照组)、TPC-1 + HUVECs + sh-IL-17R 组、TPC-1 + HUVECs + sh-IL-17R + IL-17A 组。结果显示:sh-IL-17R 组中 DLL4、Notch、HES、HEY 和 VEGFR-1、VEGFR-2 蛋白表达降低,差异有统计学意义 ($t = 5.758, P < 0.01$);sh-IL-17R + IL-17 组经 50 ng/ml 重组人 IL-17A 干预 6 h 后,细胞中 DLL4、Notch、HES、HEY 和 VEGFR-1、VEGFR-2 的表达水平得到不同程度的上调,与 TPC-1 + HUVECs + sh-IL-17R 组比较,差异有统计学意义 ($t = 8.285, P < 0.01$),见图 6。

2.7 IL-17/IL-17R 可能通过激活 DLL4/Notch 信号通路促进甲状腺乳头状癌的血管生成 为了明确 DLL4/Notch 信号通路在 IL-17/IL-17R 促进甲状腺乳头状癌的血管生成的作用,在 IL-17 刺激剂下 TPC-1 细胞和 HUVECs 共培养体系中加入 DLL4-Notch 通路抑制剂 DAPT,分为 3 组:TPC-1 + HUVECs 组(对照组)、TPC-1 + HUVECs + IL-17A 组、TPC-1 + HUVECs + IL-17A + DAPT 组。Western blot 检测结果显示,与对照组比较,TPC-1 + HUVECs + IL-17A 组 HUVECs 中 DLL4、HES、HEY 和 VEGFR-1、VEGFR-2 蛋白表达均上调,差异有统计学意义 ($t = 4.852, P < 0.01$),TPC-1 + HUVECs + IL-17A + DAPT 组 HES、HEY 和 VEGFR-1、VEGFR-2 蛋白表达均低于 TPC-1 + HUVECs + IL-17 组,差异有统计学意义 ($t = 8.329, P < 0.01$),见图 7。

3 讨论

研究^[9]表明,血管生成在甲状腺乳头状癌的生长和转移中具有重要作用,与甲状腺癌发病密切相关。在肿瘤进展过程中,血管及淋巴管生成是最基本的因素,也是肿瘤微环境的重要组成部分。肿瘤的生长与转移需要血管生成提供必要的营养^[10]。很多研究在胰腺癌、乳腺癌、肺癌等恶性肿瘤中发现,在肿瘤致病和侵袭转移中,IL-17 及其受体介导的信号通路发挥重要作用。研究^[11]显示 IL-17 可以诱导肿瘤的新生血管生成,促进肿瘤细胞增殖,抑制

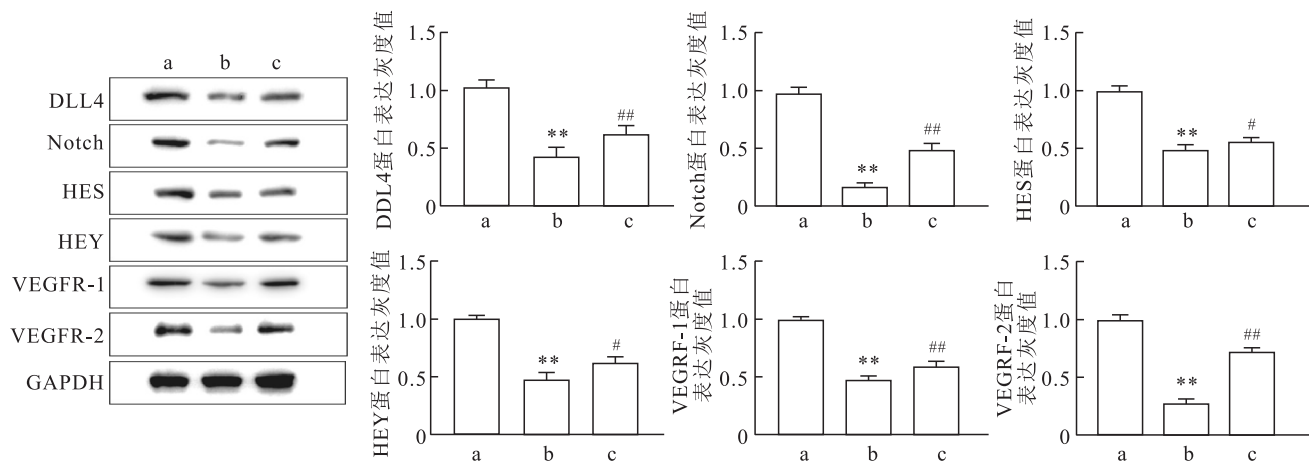


图6 Western blot 法检测 pLKO.1-EGFP-Puro-IL-17R 转染后的 TPC-1 细胞株共培养 HUVEC 体系中的 DLL4/Notch 信号通路相关分子蛋白表达

a: TPC-1 + HUVECs 组; b: TPC-1 + HUVECs + sh-IL-17R 组; c: TPC-1 + HUVECs + sh-IL-17R + IL-17A 组; 与 TPC-1 + HUVECs 组比较: * $P < 0.01$; 与 TPC-1 + HUVECs + sh-IL-17R 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

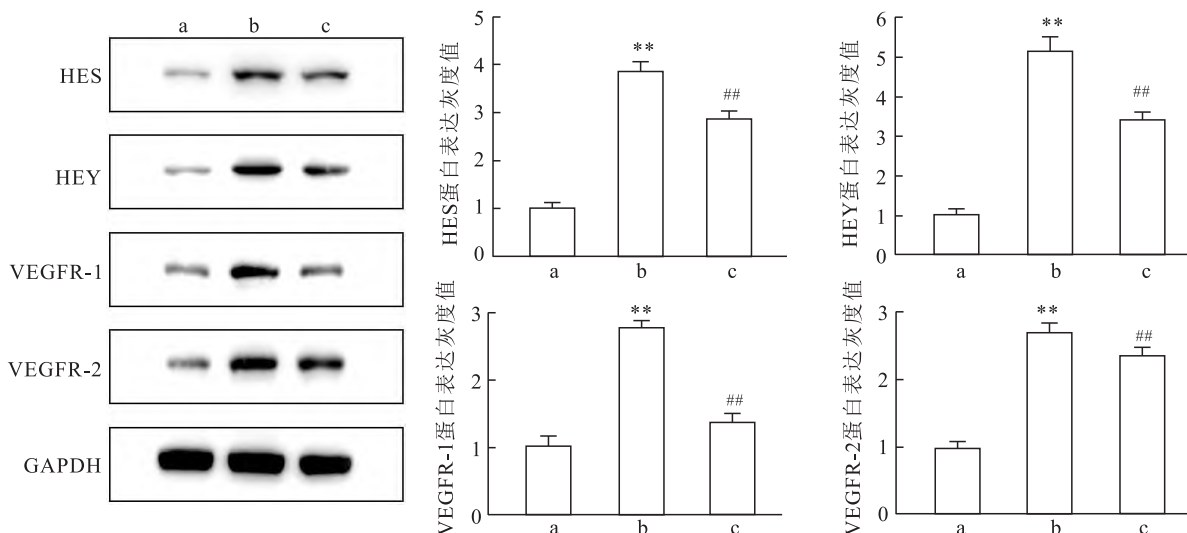


图7 Western blot 检测在 IL-17 刺激剂下 TPC-1 细胞和 HUVECs 共培养体系中加入 DLL4-Notch 通路抑制剂 DAPT 相关分子蛋白表达

a: TPC-1 + HUVECs 组; b: TPC-1 + HUVECs + IL-17A 组; c: TPC-1 + HUVECs + IL-17A + DAPT 组; 与 TPC-1 + HUVECs 组比较: * $P < 0.01$; 与 TPC-1 + HUVECs + IL-17A 组比较: # $P < 0.01$

细胞凋亡。本研究结果显示,在 TPC-1-HUVECs 共培养系统中,加入 50 ng/ml IL-17 刺激剂的 TPC-1 细胞与 HUVECs 共培养 6 h 后,可以发现经 IL-17 刺激剂诱导后 HUVECs 的迁移能力显著增强。CCK-8 法检测显示共培养体系中内皮细胞迁移能力显著高于共培养对照组,管腔生成实验发现,50 ng/ml 的 IL-17 刺激剂促进共培养体系中 HUVECs 的管腔生成能力。本研究通过细胞功能学实验观察到以重组人 IL-17A(50 ng/ml)为刺激剂可以促进 HUVECs 的迁移、增殖和管腔生成能力。多种信号通路参与调控肿瘤的血管生成,除最重要最典型的 VEGF 信号通路外,研究^[12]显示 DLL4-Notch 信号通路在这

其中也发挥了重要作用。研究^[13]表明 IL-17 刺激诱导少突胶质细胞的 NOTCH1 活化,导致炎症基因表达增强伴随着细胞增殖和成熟受损。IL-17 单克隆抗体 Secukinumab 联合 IL-35 可阻断 Notch 信号通路,与未治疗组比较,治疗用 IL-17 单克隆抗体 Secukinumab 联合 IL-35 可有效抑制 Notch 的下游基因信号通路(HES 和 HEY)的表达,同时还原肝癌细胞的侵袭性迁移能力^[14]。DLL4 是通过与 Notch 受体结合来完成肿瘤血管新生的调控。HES、HEY 是 Notch 信号通路的靶基因。在人类动脉血管内皮细胞的研究中,发现 HES、HEY 是 Notch 信号通路的脉管系统中下游效应因子,HES、HEY 的激活可以

促进血管生成细胞芽生,还能诱导血管形成模式的改变,很多研究^[15]表明调控肿瘤新生血管形成过程中 HES、HEY 可能发挥重要作用。为了明确 IL-17/IL-17R 对甲状腺乳头状癌血管生成的影响,该研究通过慢病毒 pLKO.1-EGFP-Puro-IL-17R 转染 TPC-1 细胞共培养 HUVECs,通过转染后 PCR 和 Western blot 检测验证转染是成功的,Western blot 检测 pLKO.1-EGFP-Puro-IL-17R 转染后的 TPC-1 细胞共培养 HUVECs 体系中的 DLL4-Notch 信号通路和血管新生蛋白表达水平,结果显示:sh-IL-17R + IL-17A 组经 50 ng/ml 重组人 IL-17A 干预 6 h 后,细胞中 DLL4、Notch、HES、HEY 和 VEGFR-1、VEGFR-2 的表达水平得到不同程度的上调,IL-17 可以逆转由于 IL-17R 沉默所导致 DLL4、Notch、HES、HEY 和 VEGFR-1、VEGFR-2 表达水平降低。提示 IL-17/IL-17R 可能激活 TPC-1 细胞共培养 HUVECs 中 DLL4/Notch 信号通路,促进甲状腺乳头状癌新生血管生成。为了明确 DLL4/Notch 信号通路在 IL-17/IL-17R 促进甲状腺乳头状癌的血管生成的作用,本研究在 IL-17 刺激剂下 TPC-1 细胞和 HUVECs 共培养体系中加入 DLL4-Notch 通路抑制剂 DAPT,Western blot 检测结果显示:TPC-1 + HUVECs + IL-17A + DAPT 组 HES、HEY 和 VEGFR-1、VEGFR-2 蛋白表达均显著低于 TPC-1 + HUVECs + IL-17 组。提示 DLL4/Notch 信号通路可能在 IL-17/IL-17R 促进甲状腺乳头状癌新生血管生成中起到重要作用。

综上所述,在 TPC-1-HUVECs 共培养系统中,IL-17/IL-17R 可以激活 DLL4/Notch 信号通路,然后诱导靶基因 HES、HEY 和 VEGFR-1、VEGFR-2 表达增加。IL-17 可以促进 TPC-1-HUVECs 共培养系统中 HUVECs 的迁移、增殖和管腔生成能力。所以,IL-17/IL-17R 可能通过 DLL4/Notch 信号通路促进甲状腺乳头状癌新生血管生成。

参考文献

- [1] Bergdorf K, Ferguson D C, Mehrad M, et al. Papillary thyroid carcinoma behavior: clues in the tumor microenvironment[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2019,26(6):601–14.
- [2] Ramia D C M. Multifocal papillary thyroid carcinoma[J]. *Am J Clin Pathol*, 2021,155(6):913.
- [3] Jung C K. Papillary thyroid carcinoma variants with tall columnar cells[J]. *J Pathol Transl Med*, 2020,54(1):123.
- [4] Ramjiawan R R, Griffioen A W, Duda D G. Anti-angiogenesis for cancer revisited: Is there a role for combinations with immunotherapy? [J]. *Angiogenesis*, 2017,20(2):185–204.
- [5] Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer [J]. *Oncology*, 2005,69 Suppl 3:4–10.
- [6] Razi S, Baradaran N B, Keshavarz-Fathi M, et al. IL-17 and colorectal cancer: From carcinogenesis to treatment[J]. *Cytokine*, 2019,116:7–12.
- [7] Pitulescu M E, Schmidt I, Giaimo B D, et al. Dll4 and Notch signalling couples sprouting angiogenesis and artery formation [J]. *Nat Cell Biol*, 2017,19(8):915–27.
- [8] Luo Z, Shang X, Zhang H, et al. Notch signaling in osteogenesis, osteoclastogenesis, and angiogenesis [J]. *Am J Pathol*, 2019,189(8):1495–500.
- [9] Chen Q, Yu W Y, Zhang H H, et al. PBX3 promotes tumor growth and angiogenesis via activation of AT1R/VEGFR2 pathway in papillary thyroid carcinoma[J]. *Biomed Res Int*, 2020,2020:8954513.
- [10] Yang Y, Cao Y. The impact of VEGF on cancer metastasis and systemic disease [J]. *Semin Cancer Biol*, 2022,86(Pt 3):251–61.
- [11] Darvishi B, Majidzadeh-A K, Ghadirian R, et al. Recruited bone marrow derived cells, local stromal cells and IL-17 at the front line of resistance development to anti-VEGF targeted therapies [J]. *Life Sci*, 2019,217:34–40.
- [12] Li J, Han R, Li J, et al. Analysis of molecular mechanism of YiqiChutan formula regulating DLL4-Notch signaling to inhibit angiogenesis in lung cancer [J]. *Biomed Res Int*, 2021,2021:8875503.
- [13] Wang C, Zhang C J, Martin B N, et al. IL-17 induced NOTCH1 activation in oligodendrocyte progenitor cells enhances proliferation and inflammatory gene expression [J]. *Nat Commun*, 2017,8:15508.
- [14] Li H, Zhang Y X, Liu Y, et al. Effect of IL-17 monoclonal antibody Secukinumab combined with IL-35 blockade of Notch signaling pathway on the invasive capability of hepatoma cells [J]. *Genet Mol Res*, 2016,15(2):1–16.
- [15] Hultgren N W, Fang J S, Ziegler M E, et al. Slug regulates the Dll4-Notch-VEGFR2 axis to control endothelial cell activation and angiogenesis [J]. *Nat Commun*, 2020,11(1):5400.

IL-17/IL-17R regulate DLL4-Notch signaling pathway in the angiogenesis of papillary thyroid carcinoma

Song Yang, Yang Jianming

(Dept of Otorhinolaryngology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To explore the effects of interleukin (IL)-17/interleukin-17 receptor (IL-17R) on the

肥大细胞调节巨噬细胞极化在炎症性肠病中的作用

余畋余^{1,2,3}, 刘道利¹, 汪朝晖¹, 胡霜久¹, 刘 斌¹

摘要 目的 探究肥大细胞(MC)在炎症性肠病过程中的作用和调节机制。方法 用野生型小鼠、MC缺陷小鼠和MC重建小鼠构建右旋葡聚糖硫酸钠诱导的炎症性肠病模型。采用甲苯胺蓝染色、流式细胞术、实时定量PCR、HE染色和Ki67免疫组化分析相关指标。结果 MC在重组人干细胞因子(Scf)和基质金属蛋白酶-9(Mmp-9)因子诱导下向肠道迁移和浸润。在小鼠炎症性肠病模型中,MC缺陷小鼠的肠黏膜绒毛结构完整性欠佳,肠道炎症较重且黏膜修复能力较差。MC重建后肠道炎症减轻且黏膜修复能力得以恢复。野生型小鼠组巨噬细胞M1/M2比率低于MC缺陷小鼠组。与M2型巨噬细胞相关的白细胞介素4(IL4)和白细胞介素10(IL10)在野生型小鼠组高于MC缺陷小鼠组,其他抑炎因子基因白细胞介素13(IL13)和转录因子Gata3野生型组也

较高,促炎因子基因诱导型一氧化氮合酶Inos则相反。结论 MC是通过极化巨噬细胞而发挥炎症性肠病过程中的抗感染和促进黏膜修复作用的。

关键词 肥大细胞;炎症性肠病;巨噬细胞;炎症因子;抑炎因子;极化

中图分类号 R 656

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)07-1152-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.07.015

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一组病因未明的累及全肠道的慢性非特异性炎症疾病,主要包括溃疡性结肠炎和克罗恩病。IBD主要病理特征为肠黏膜的损伤^[1],现主流研究观点认为其致病因素为免疫功能紊乱和上皮细胞屏障受损^[2-3]。肥大细胞(mast cell, MC)是源自骨髓前体细胞的先天免疫细胞,在干细胞因子(stem cell factor, SCF)的影响下成熟,并最终在肠道上皮内间隙中定居。作为前哨免疫细胞群的一员,MC是抵抗攻击的一线防御细胞,与肠道炎症活动密切相关^[4]。然而,MC在炎症性肠病过程中的作用和调节机制仍未有报道。该研究通过右旋葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulfate, DSS)诱导的IBD模型,构建野生型小鼠(以下简称WT小鼠)、MC缺陷小鼠(以下简称C-kit小鼠)和MC重建小鼠相关炎症癌症序列演变模型,探究MC在IBD过程中的作用和调节

2023-06-09 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:31741087);安徽医科大学校科研基金(编号:2021xkj089);安徽省重点研究与开发计划项目(编号:2022e07020053)

作者单位:¹安徽医科大学附属安庆市第一人民医院胃肠外科,安庆 246000

²安徽医科大学临床医学院,合肥 230000

³同济大学附属上海市第十人民医院普外科,上海 200000

作者简介:余畋余,男,硕士;

刘 斌,男,硕士,医师,责任作者, E-mail: beanleu2@163.com;

胡霜久,男,主任医师,责任作者, E-mail: hushuangjiu@163.com

angiogenesis of the endothelial cells co-cultured with cancer cells through DLL4-Notch signaling pathway and its molecular mechanism. **Methods** Cancer-endothelial cell co-culture model was established using the Transwell system. The effects of human recombinant IL-17A at 50 ng/ml on the migration of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in the co-culture system were determined, the proliferation and angiogenesis of HUVECs was observed in co-culture system stimulated by human recombinant IL-17A, the angiogenesis ability of HUVECs was tested by tube formation assay, the proliferation of HUVECs was detected using CCK-8 assay. The expression of DLL4-Notch signaling pathway and angiogenesis protein in each group were detected by Western blot. **Results** 50 ng/ml human recombinant IL-17A could promote the migration of HUVECs in co-culture system. Treatment with 50 ng/ml human recombinant IL-17A significantly enhanced the proliferation and angiogenesis ability of the HUVECs in co-culture system ($P < 0.01$). The expression of DLL4-Notch signaling pathway and angiogenesis-related proteins in co-culture system significantly increased compared with those in control group. **Conclusion** IL-17/IL-17R promotes DLL4-Notch signaling pathway in the angiogenesis of papillary thyroid carcinoma.

Key words IL-17/IL-17R; DLL4-Notch signaling pathway; angiogenesis; papillary thyroid carcinoma