

IL-33 在头颈鳞状细胞癌中的表达 及与预后的相关性*

林瀚青¹ 文译辉¹ 文卫平¹

[摘要] **目的:**探讨头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)患者组织中 IL-33 的表达情况与肿瘤临床病理特征及患者预后的相关性。**方法:**手术获取 20 例 HNSCC 患者肿瘤组织及对应癌旁正常组织,应用实时荧光定量 PCR、免疫组织化学检测 IL-33 在不同组织中的表达;选取就诊于中山大学附属第一医院的 107 例 HNSCC 患者进行随访,通过免疫组织化学评估肿瘤组织 IL-33 的表达与肿瘤临床病理特征及预后的关系。**结果:**正常组织中 IL-33 主要表达于上皮细胞,正常组织 IL-33 mRNA 以及蛋白表达明显高于肿瘤组织;T3~4 期及晚期(Ⅲ~Ⅳ)患者肿瘤组织中 IL-33 表达水平比 T1~2 期及早期(Ⅰ~Ⅱ)低,高分化肿瘤组织中 IL-33 水平高于中分化及低分化组;IL-33 高表达组比低表达组患者预后好。多因素分析显示 IL-33 水平能够作为预测 HNSCC 预后的独立指标。**结论:**IL-33 与 HNSCC 患者肿瘤进展及预后密切相关,可作为独立预测指标,具有较大的临床价值。

[关键词] 头颈部肿瘤;癌,鳞状细胞;白细胞介素 33;预后

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2018.12.004

[中图分类号] R739.91 **[文献标志码]** A

Correlation between prognosis and IL-33 expression in head and neck squamous cell carcinoma

LIN Hanqing WEN Yihui WEN Weiping

(Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou Key Laboratory of Otorhinolaryngology, Guangzhou, 510080, China)

Corresponding author: WEN Weiping, E-mail: wenwp@mail.sysu.edu.cn

Abstract Objective: To determine the correlation between the expression of IL-33 and significance in cancer biological and patient's prognosis in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). **Method:** Twenty pairs of tumor tissue and adjacent normal tissue were collected. qRT-PCR and immunohistochemistry (IHC) were used to detect the expression of IL-33 mRNA and protein in tissues. Correlation between IL-33 expression with clinicopathologic features of 107 HNSCC patients were analyzed. **Result:** IL-33 mRNA and protein expression levels in normal tissue were higher than paired tumor tissue. IL-33 level was significantly lower in patients with advanced T stages, lymph node metastases and advanced clinical stages, IL-33 expression was higher in well-differentiated tumor than moderate or poor differentiated tumor. Low IL-33 expression predicts poor prognosis. Multivariate analysis indicated that IL-33 expression was an independent predictive factor. **Conclusion:** IL-33 is related with the clinicopathological features in HNSCC and could be an independent predictor of HNSCC prognosis.

Key words Head and neck neoplasms; carcinoma, squamous cell; interleukin-33; prognosis

头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)是世界上第六大常见的肿瘤类型^[1]。大量研究表明,肿瘤的发生发展与慢性炎症相关^[2]。IL-33 是 IL-1 家族的成员,在多种慢性炎症性疾病中表达升高^[3-4]。而 IL-33 的唯一受体 ST2 在多种免疫细胞表面均有表达^[5-6],提示 IL-33 能够影响局部微环境的免疫状态,可能与肿瘤发生发展相关。本研究以实时荧光定量 PCR、免疫组织化学方法探讨 IL-33 在 HNSCC 中的表达情况,并分析其与患者临床病理

指标以及预后之间的相关性,为 IL-33 在 HNSCC 发展中的作用提供理论基础。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集中山大学附属第一医院 2017-01—2017-06 手术切除并病理证实的 HNSCC 患者 20 例,其中喉癌 15 例,下咽癌 5 例;所有患者均收集肿瘤组织及对应癌旁组织(距离肿瘤组织>2 cm)。选取 2005-01—2007-11 就诊于中山大学附属第一医院的 HNSCC 患者 107 例(喉癌 68 例,下咽癌 24 例,口咽癌 10 例,鼻窦鳞状细胞癌 5 例)进行随访;所有患者标本均经多聚甲醛固定并石蜡包埋切片;患者临床分期按照 2008 国际抗癌联盟指南(Union of

* 基金项目:广东省自然科学基金(No: 2015A030310236, No: 2017A030310362)

¹ 中山大学附属第一医院耳鼻咽喉科医院 广州市耳鼻咽喉科学重点实验室(广州,510080)

通信作者:文卫平, E-mail: wenwp@mail.sysu.edu.cn

International Cancer Control 2008, UICC-2008) 进行划分, 见表 1。本研究已通过本院伦理委员会批准及知情同意豁免。患者随访时间均依据 NCCN 头颈部鳞状细胞癌治疗指南, 即初始治疗后第 1 年 1~3 个月随访 1 次; 第 2 年 2~4 个月随访 1 次; 第 3~5 年 4~6 个月随访 1 次; 5 年以后每年随访 1 次。随访内容包括耳鼻咽喉科专科检查以及影像学检查。

1.2 主要试剂

主要试剂包括: 人 IL-33 抗体 (R&D Systems), RNA 逆转录试剂盒 (TaKaRa), SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒 (Roche)。

1.3 方法及评估指标

1.3.1 免疫组织化学染色 肿瘤组织及癌旁正常组织均用石蜡包埋并切片, 按说明书进行 IL-33 染色。使用 Axio Scan Z1 全自动数字玻片扫描系统扫描整张玻片, 以细胞核内棕褐色染色为 IL-33 阳性表达。在 400 倍视野下, 随机选择 5 个区域计数阳性细胞, 取平均值进行统计分析。

1.3.2 实时荧光定量 PCR 人 IL-33 引物序列: F: 5'-GGA AGAACACAGCAAGCAAAGCCT-3', R: 5'-TAAGGCCAGAGCGGAGCTTCATAA -3'; 内参基因 GAPDH 引物序列: F: 5'-TTCGACAGTCAGCG-CATCTTCTT-3', R: 5'-GCCCAATACGACCAAATC-CGTTGA -3'。取出保存于 Trizol 的组织块放入研钵中充分研磨, 随后转入 EP 管中离心去除杂质以及 DNA, 超微量紫外分光光度计测量 RNA 浓度。按照逆转录试剂盒说明书配制逆转录体系, 按说明书操作得到 cDNA。按荧光定量 PCR 试剂盒说明配置相应反应体系, 三步法进行扩增, 实验数据应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法处理。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件包进行统计分析。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 描述, 均数比较采用 Student's *t*-test, 组间比较采用 Bonferroni 法校正。生存分析使用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线, 并行 Log-

rank 检验。多因素分析采用 Cox 比例风险模型。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-33 mRNA 及蛋白在 HNSCC 及癌旁组织中的表达情况

通过 qRT-PCR 检测 20 例 HNSCC 肿瘤组织及对应癌旁正常组织的 IL-33 mRNA 相对表达量, IL-33 mRNA 在癌旁正常组织中的表达高于肿瘤组织 ($P < 0.01$), 见图 1。免疫组织化学显示正常组织及肿瘤组织中均有 IL-33 表达。IL-33 在正常组织中主要表达于上皮, 且阳性细胞数量明显高于肿瘤组织, 见图 2。

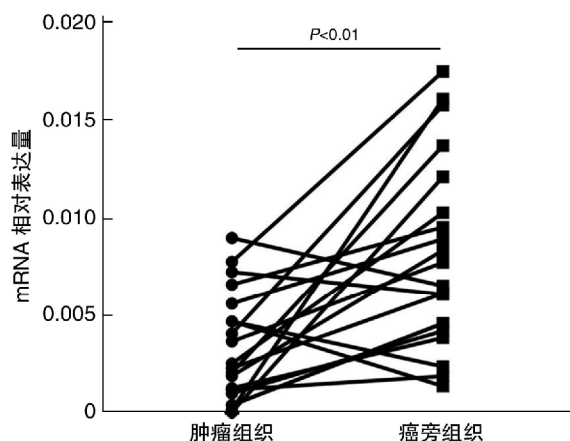
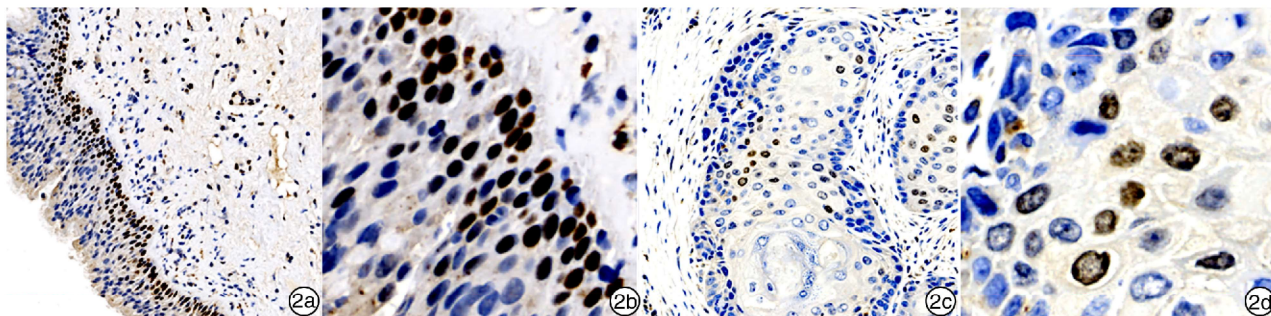


图 1 实时荧光定量 PCR 分析 IL-33 mRNA 在肿瘤组织及对应癌旁组织中的表达

2.2 IL-33 表达水平与肿瘤临床病理特征的相关性

免疫组织化学检测肿瘤组织中 IL-33 的表达情况并分析其与临床病理特征的相关性。IL-33 阳性细胞数量与患者肿瘤分化程度、肿瘤 T 分期、N 分期以及临床 TNM 分期差异均有统计学意义 (表 1); 对肿瘤分化程度进行组间比较, 高分化组 IL-33 水平高于中分化及低分化组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。



2a: 癌旁正常上皮 (×100); 2b: 癌旁正常上皮 (×400); 2c: 对应肿瘤组织 (×100); 2d: 对应肿瘤组织 (×400)。

图 2 免疫组织化学检测 IL-33 的表达情况

表 1 107 例 HNSCC 患者 IL-33 水平与临床病理指标的关系

临床病理特征	例数	IL-33 阳性细胞数量	P 值
肿瘤分化程度			
高分化	42	4.793±2.347	<0.01
中分化	40	3.195±2.133	
低分化	25	2.144±1.404	
T 分期			
T1~2	74	4.077±2.413	<0.01
T3~4	33	2.455±1.628	
N 分期			
N0	84	3.974±2.312	<0.01
N1~2	23	2.126±1.713	
临床 TNM 分期 (UICC-2008)			
I~II	67	4.269±2.356	<0.01
III~IV	40	2.418±1.739	

2.3 IL-33 表达水平与患者预后的相关性

107 例 HNSCC 患者组织中 IL-33 阳性细胞平均每视野下 0~9.2 个, 中位数 3.4 个。根据 IL-33 阳性细胞中位数将患者分成 IL-33 高表达组 (53 例) 及 IL-33 低表达组 (54 例), 采用 Log-rank 法比较患者生存期。IL-33 高表达组患者总生存期显著高于低表达组 ($P<0.01$), 见图 3a; IL-33 高表达组患者无进展生存期也高于低表达组 ($P<0.01$), 见图 3b。同时将单因素中有意义的指标纳入 Cox 比例风险模型进行多因素分析, 结果显示肿瘤临床分期 ($P<0.01$) 以及 IL-33 水

平 ($P<0.01$) 是预测 HNSCC 患者预后的独立因素 (表 2)。

3 讨论

已有大量证据表明, 慢性炎症环境与肿瘤发生发展密切相关^[2], 在 HNSCC 中, 吸烟、酗酒等因素造成的局部慢性炎症和肿瘤发生直接相关, 并且能够通过细胞因子影响肿瘤微环境造成肿瘤侵袭、迁移和转移^[7]。因此肿瘤微环境中各类细胞因子的浸润在肿瘤发展中扮演重要角色。本研究探讨了细胞因子 IL-33 在 HNSCC 中的表达并分析了其与患者临床病理指标及预后的相关性, 发现其与 HNSCC 临床指标存在重要关联, 且与患者预后正相关。

IL-33 是一类具有免疫调节功能的细胞因子, 主要由上皮细胞、内皮细胞或成纤维细胞表达^[8]。IL-33 通常在细胞受到损伤或坏死时释放, 因此 IL-33 也被称为机体“警戒素”^[9], 目前的研究表明其在包括溃疡性结肠炎、哮喘、关节炎在内的多种慢性炎症中起重要作用^[3,10-11], 但有关 IL-33 与肿瘤发生发展的研究较少。由于 IL-33 主要由上皮细胞以及内皮细胞分泌, 因此我们猜测 IL-33 可能与来源于鳞状上皮的 HNSCC 有着重要关联。本研究首先分析了 20 例 HNSCC 患者的肿瘤组织以及对对应癌旁正常组织, 发现正常组织的 IL-33 mRNA 水平较肿瘤组织更高, 同时免疫组织化学提示正常组织的鳞状上皮是 IL-33 的主要来源, 而肿瘤细胞的 IL-33 显著低于正常组织, 提示 IL-33 可能参与了 HNSCC 的发生发展。

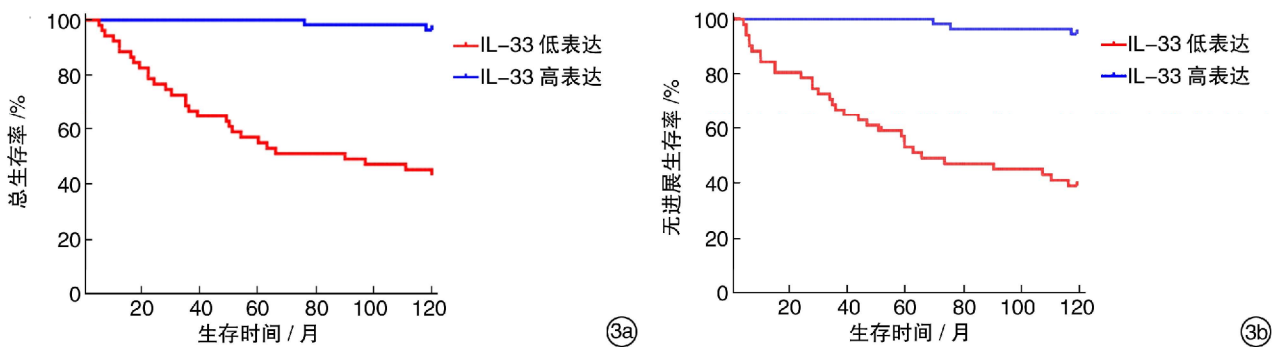


图 3 107 例 HNSCC 患者的总生存曲线(3a)以及无进展生存曲线(3b)比较

表 2 HNSCC 预后的多因素分析

变量	回归系数	标准误	Wald	P 值	比值比	95% 置信区间
病理分级	0.27	0.42	0.40	>0.05	1.31	0.57~2.97
T 分期	0.62	0.59	0.11	>0.05	1.06	0.34~3.37
N 分期	-0.39	0.49	0.63	>0.05	0.68	0.26~1.77
临床分期	-1.15	0.39	8.62	<0.01	0.32	0.15~0.68
IL-33 水平	3.41	1.02	11.13	<0.01	30.14	4.08~222.98

IL-33 在 HNSCC 发展中所起的作用与其生物学特性有着重要关联。作为体内的“警戒素”, IL-33 的释放能够刺激机体对肿瘤的免疫反应, 促进 CD8⁺ T 细胞或者 NK 细胞对肿瘤产生杀伤力^[12]。Matzinger^[13]认为, 这种警戒机制的缺失会是肿瘤逃避免疫监测的重要手段, 因此我们假设 IL-33 的表达水平与 HNSCC 的进展存在关联。本研究回顾分析了 107 例 HNSCC 患者的临床病理特征与组织 IL-33 表达的相关性, 结果显示 IL-33 水平在 T3~4 期或晚期(临床 III~IV 期)患者组织中的表达显著低于 T1~2 期或早期(I~II 期)患者; 淋巴结转移的患者局部 IL-33 水平也明显低于未发生转移者; 而在肿瘤的病理分化上, IL-33 在肿瘤高分化的患者组织中的水平也高于中分化及低分化患者; 进一步对患者的预后进行分析发现 IL-33 高表达患者预后明显优于低表达组。同时, 多因素分析结果显示 IL-33 水平是预测 HNSCC 患者预后的独立因素。这些结果提示 IL-33 在肿瘤组织中的缺失与肿瘤进展以及不良预后有着紧密关联。

既往的研究表明, IL-33 能够促进组织微环境中的 Th2 型炎症反应^[14], 并且也能提升树突状细胞对 CD8⁺ T 细胞杀伤功能的诱导作用^[15]。因此, 我们仍需进一步研究 IL-33 对于 HNSCC 局部微环境中免疫细胞的具体调节作用。综上所述, IL-33 参与了 HNSCC 的进展, 局部 IL-33 高表达提示患者的良好预后。IL-33 能够作为 HNSCC 的独立预测指标, 具有较大的临床价值。

参考文献

- [1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65:87-108.
- [2] CRUSZ S M, BALKWILL F R. Inflammation and cancer: advances and new agents [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2015, 12:584-596.
- [3] PREFONTAINE D, LAJOIE-KADOCH S, FOLEY S, et al. Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells [J]. *J Immunol*, 2009, 183:5094-5103.
- [4] YASUDA K, MUTO T, KAWAGOE T, et al. Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109:3451-3456.
- [5] LOHNING M, STROEHMANN A, COYLE A J, et al. T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95:6930-6935.
- [6] WALZL G, MATTHEWS S, KENDALL S, et al. Inhibition of T1/ST2 during respiratory syncytial virus infection prevents T helper cell type 2 (Th2)-but not Th1-driven immunopathology [J]. *J Exp Med*, 2001, 193:785-792.
- [7] CURRY J M, SPRANDIO J, COGNETTI D, et al. Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Semin Oncol*, 2014, 41:217-234.
- [8] SCHMITZ J, OWYANG A, OLDHAM E, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines [J]. *Immunity*, 2005, 23:479-490.
- [9] MOUSSION C, ORTEGA N, GIRARD J P. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin' [J]? *PLoS One*, 2008, 3:e3331.
- [10] SCHIERING C, KRAUSGRUBER T, CHOMKA A, et al. The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine [J]. *Nature*, 2014, 513:564-568.
- [11] PASTORELLI L, GARG R R, HOANG S B, et al. Epithelial-derived IL-33 and its receptor ST2 are dysregulated in ulcerative colitis and in experimental Th1/Th2 driven enteritis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107:8017-8022.
- [12] GAO X, WANG X, YANG Q, et al. Tumoral expression of IL-33 inhibits tumor growth and modifies the tumor microenvironment through CD8⁺ T and NK cells [J]. *J Immunol*, 2015, 194:438-445.
- [13] MATZINGER P. The danger model: a renewed sense of self [J]. *Science*, 2002, 296:301-305.
- [14] CHEN C C, KOBAYASHI T, IJIMA K, et al. IL-33 dysregulates regulatory T cells and impairs established immunologic tolerance in the lungs [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 140:1351-1363. e7.
- [15] DOMINGUEZ D, YE C, GENG Z, et al. Exogenous IL-33 Restores Dendritic Cell Activation and Maturation in Established Cancer [J]. *J Immunol*, 2017, 198:1365-1375.

(收稿日期:2018-04-15)