

# 白细胞介素-8在中枢神经系统白血病中的表达及其意义

陈海潮 冯康乐

急性白血病通常伴有中枢神经系统白血病(central nervous leukemia, CNSL)的发生,其难诊断和易复发的特性给临床工作造成了很大的困扰<sup>[1]</sup>。白细胞介素8(interleukin-8, IL-8)属于趋化因子家族系列之一,主要参与炎症、免疫反应及肿瘤的生长与转移<sup>[2,3]</sup>。然而,目前有关IL-8在中枢神经系统白血病中的表达及其对白血病细胞浸润中神经系统的机制尚且不清。本次研究检测急性白血病患血清中IL-8的表达水平,并探讨其对中枢神经系统浸润的影响。现报道如下。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2010年1月至2015年12月绍兴市中心医院收治的32例急性白血病患者,其中男性12例、女性20例;年龄11~59岁,平均年龄(38.34±8.15)岁。急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)18例,均为CNSL;急性髓细胞白血病(acute myeloid leukemia, AML)14例,未发生中枢神经系统浸润。若急性白血病患者脑脊液中白血病计数 $\geq 5/\mu\text{l}$ ,同时在脑脊液沉淀制片标本中有原、幼稚细胞,有或无中枢神经系统症状或体征,便可将其判定为CNSL。

1.2 方法 实验室常规指标检测采用深圳迈瑞BC-6800全自动血球分析仪和日立7600全自动生化分析仪进行检测;ELISA试剂盒购自R&D公司,并按照试剂盒说明书进行配制标准品及后续检测操作。外周血单个核细胞采用Ficoll淋巴细胞分离液,并于含10%胎牛血清的1640培养基中进行培养。采用 $\beta$ -catenin的SiRNA干扰Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路中 $\beta$ -catenin的表达,应用Western blot检测Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路中关键蛋白的表达水平,体外黏附、

穿膜及浸润实验检测白血病细胞黏附、穿膜及浸润能力。

1.2.1 MTT实验 取5 000个细胞于96孔板,加入不同浓度(0 ng/ml、25 ng/ml、50 ng/ml、100 ng/ml)IL-8刺激,培养6 d后,加50  $\mu\text{l}$  MTT(20 mg/ml),孵育4~6 h之后检测490 nm处各孔吸光度值(optical density, OD)。

1.2.2 体外黏附,穿膜和浸润实验 体外黏附和穿膜实验需将ECV304细胞包被好的96孔板,然后加入25 ng/ml IL-8刺激细胞24 h后检测OD值。浸润实验直接将IL-8刺激后的白血病单个核细胞加入带Matrigel的小室,24孔板内加500  $\mu\text{l}$ 含1%胎牛血清的培养基,培养48 h后计数下层液中迁移细胞数。

1.2.3 Western blot实验 采用蛋白裂解液提取细胞总蛋白,采用聚氰基丙烯酸正丁酯法测定蛋白浓度后,电泳和转膜,分别孵一抗和二抗,采用增强化学发光检测蛋白表达。

1.3 统计学方法 采用SPSS 10.0统计学软件进行数据分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。计量资料采用 $t$ 检验和Wilcoxon检验。设 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 急性白血病患者及其IL-8表达情况见表1

由表1可见, CNSL患者外周血IL-8表达明显高于非CNSL患者,差异有统计学意义( $t=9.47, P<0.05$ )。通过Wilcoxon检验分析,两组急性白血病患者的外周血白细胞计数、白蛋白含量比较,差异无统计学意义( $t$ 分别=0.21、0.11,  $P$ 均 $>0.05$ )。同时,在脑脊液中, CNSL患者白细胞计数明显高于非CNSL患者,差异有统计学意义( $t=5.10, P<0.05$ ),白蛋白水平及葡萄糖水平比较,差异无统计学意义( $t$ 分别=0.38、0.17,  $P$ 均 $>0.05$ )。

表1 两组急性白血病患者IL-8表达情况及一般情况分析

组别	IL-8/pg/mg	外周血		脑脊液		
		白细胞计数 / × 10 <sup>9</sup> /L	白蛋白 /g/L	白细胞计数 / × 10 <sup>9</sup> /L	白蛋白 /g/L	葡萄糖 /g/L
CNSL	267.22 ± 102.12*	4.55 ± 3.32	42.32 ± 11.24	10.91 ± 6.20*	336.34 ± 88.72	3.11 ± 1.01
非 CNSL	37.08 ± 12.31	4.32 ± 2.44	42.71 ± 8.30	0.00 ± 0.00	349.73 ± 105.70	3.16 ± 0.69

注:\*,与非 CNSL 比较,  $P < 0.05$ 。

2.2 IL-8可促进白血病细胞的增殖能力见图1

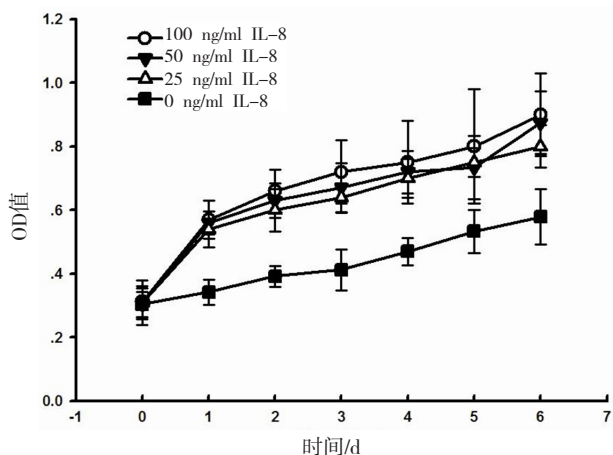


图1 MTT检测不同浓度IL-8刺激白血病细胞增殖能力

由图1可见,MTT实验结果表明:随着IL-8刺激浓度的升高,白血病细胞的增殖能力逐渐增强,IL-8剂量越大,白血病细胞增殖能力越强,25 ng/ml IL-8刺激24 h后即可观察到细胞数量的明显增加,与0 ng/mL IL-8刺激24 h后观察到的细胞数量相比,差异有统计学意义( $t=12.41, P < 0.05$ )。

2.3 IL-8可促进白血病细胞的体外黏附、穿膜及浸润能力见图2

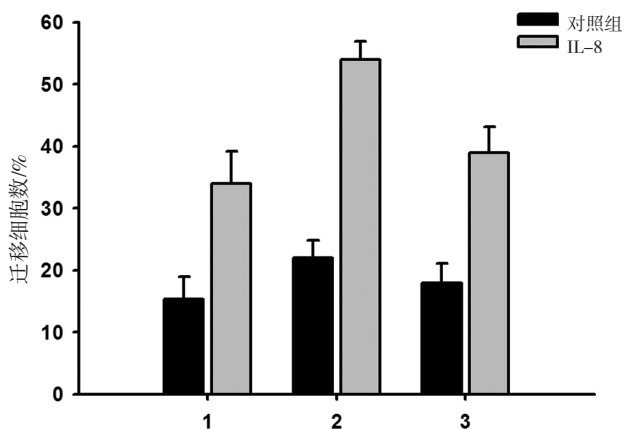


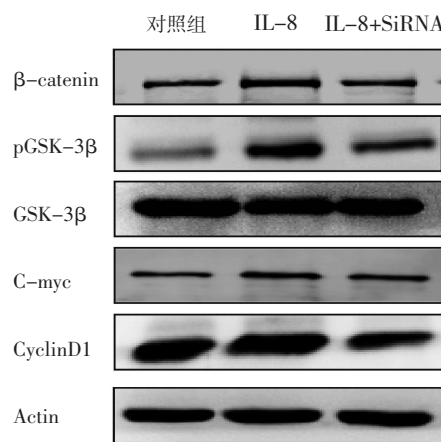
图2 IL-8明显增强白血病细胞体外黏附、穿膜及浸润能力

注:1为体外黏附实验;2为体外穿膜实验;3为体外浸润实验。

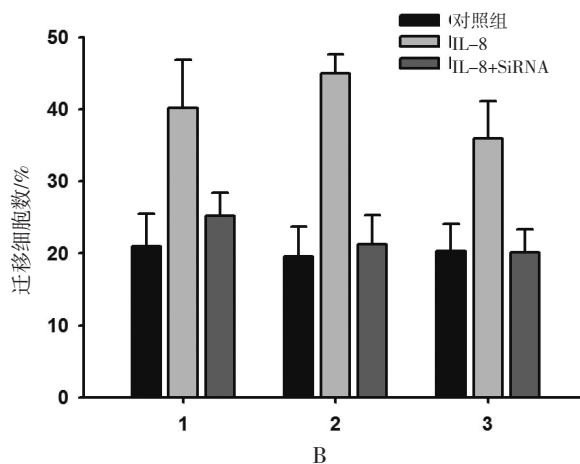
由图2可见,体外黏附、穿膜及浸润实验中,经IL-8刺激后的白血病细胞的黏附、穿膜及浸润能力明显均高于未经IL-8处理组,差异均有统计学意义

( $t$ 分别=14.30、22.31、18.25,  $P$ 均 $< 0.05$ )。

2.4 IL-8通过Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路影响白血病细胞的体外黏附、穿膜及浸润能力见图3



A



B

图3 IL-8通过Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路影响白血病细胞的体外黏附、穿膜及浸润能力

注:A为Western blot检测Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路关键蛋白表达情况;B为IL-8促进白血病细胞的体外黏附、穿膜及浸润能力受到Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路的调控。

由图3A可见,经IL-8处理后的细胞, $\beta$ -catenin, pGSK-3 $\beta$ 及其下游靶基因C-myc和cyclinD1的表达明显上调;当Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路被阻断后, $\beta$ -catenin, pGSK-3 $\beta$ 及其下游靶基因C-myc和CyclinD1的表达有所下调。由图3B可见, SiRNA干扰 $\beta$ -catenin后, Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路活性受到明

显抑制,IL-8促进白血病细胞的体外黏附、穿膜及浸润能力受到明显抑制。

### 3 讨论

近来有大量实验结果表明,IL-8与肿瘤生长侵袭有着密不可分的关系。Kim等<sup>[4]</sup>发现在肝癌中IL-8存在高表达,且与肝癌细胞的转移具有明显相关性。Wang等<sup>[5]</sup>提示了IL-8与乳腺癌的转移具有高度的相关性,乳腺癌恶性程度越高,其表达水平越高。IL-8的表达水平不仅与肿瘤微血管形成相关,还会随着肿瘤从早期到晚期的进展逐渐升高,与疾病的进展具有明显的相关性<sup>[6]</sup>,因而高表达IL-8的患者,其生存期明显缩短<sup>[7]</sup>。此外,IL-8与脑损伤也存在密不可分的关系<sup>[8]</sup>。本次研究结果显示,CNSL患者外周血高表达IL-8 ( $P < 0.05$ ),且体外实验进一步证实,IL-8可促进白血病细胞黏附、穿膜及浸润能力( $P$ 均 $< 0.05$ )。因此,外周血IL-8水平的检测可作为辅助诊断CNSL的指标之一。

研究发现,Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路的异常激活调控多种肿瘤细胞的迁徙和转移,如结肠癌、胃癌等<sup>[9,10]</sup>。为了进一步研究IL-8促进白血病细胞黏附、穿膜及浸润能力的分子机制,本次研究检测了Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路中关键蛋白的表达水平,结果发现,经IL-8处理后的细胞, $\beta$ -catenin,pGSK-3 $\beta$ 及其下游靶基因C-myc和cyclinD1的表达明显上调;当Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路被阻断后, $\beta$ -catenin,pGSK-3 $\beta$ 及其下游靶基因C-myc和cyclinD1的表达有所下调,由此可知,IL-8通过Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路影响白血病细胞的体外黏附、穿膜及浸润能力。然而其促进白血病细胞黏附、穿膜及浸润能力的机制同样需要其他信号通路的参与,因此有待进一步的研究。

综上所述,通过对比白血病细胞转移与未转移至中枢神经系统的急性白血病患者外周血血清中IL-8的表达水平,发现IL-8在CNSL患者外周血中存在明显性高表达;体外实验进一步验证IL-8可促进白血病细胞黏附、穿膜及浸润能力,并进一步研究证明Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路参与此过程的调控。因而初步证实IL-8可能作为CNSL的辅助诊断方法之一,

为临床上判定CNSL提供了新的诊断依据及方法。

### 参考文献

- 1 Jabbour EJ,Estey E,Kantarjian HM. Adult acute myeloid leukemia[J]. Mayo Clinic Proceedings Mayo Clinic,2006,81(2):247-260.
- 2 Gibbons D,Fleming P,Virasamin A,et al. Interleukin-8 production is a signatory T cell effector function of human newborn infants[J]. Nat Med,2014,20(10):1206-1210.
- 3 Tobler A,Moser B,Dewald B,et al. Constitutive expression of interleukin-8 and its receptor in human and lymphoid leukemia[J]. Blood,1993,82(8):2517-25.
- 4 Kim SS,Cho HJ,Won JH,et al. Interleukin-8 level as a prognostic marker in patients with hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma treated with transarterial chemoembolization[J]. Cytokine,2015,76(2):449-457.
- 5 Wang L,Tang C,Cao H,et al. Activation of IL-8 via PI3K/Akt-dependent pathway is involved in leptin-mediated epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer cells[J]. Cancer Biol Ther,2015,16(8):1220-1230.
- 6 Fujimoto J,Aoki I,Khatun S,et al. Clinical implications of expression of interleukin-8 related to myometrial invasion with angiogenesis in uterine endometrial cancers[J]. Ann Oncol,2002,13(3):430-434.
- 7 Khan MN,Wang B,Wei J,et al. CXCR1/2 antagonism with CXCL8/Interleukin-8 analogue CXCL8 (3-72)K11R/G31P restricts lung cancer growth by inhibiting tumor cell proliferation and suppressing angiogenesis[J]. Oncotarget,2015,6(25):21315-21327.
- 8 张秀丽,孙志扬. 白介素-6、白介素-8在大鼠脑损伤中的研究[J].全科医学临床与教育,2013,11(3):259-261.
- 9 Seth C,Ruiz I,Altaba A. Metastases and colon cancer tumor growth display divergent responses to modulation of canonical wnt signaling[J]. Plos one,2016,11(3):e0150697.
- 10 Ara H,Takagishi M,Enomoto A,et al. Role for duple in non-canonical wnt signaling during gastric cancer invasion and metastasis[J]. Cancer Sci,2016,107(2):133-139.

(收稿日期 2017-05-04)

(本文编辑 蔡华波)