

### 【临床研究】

作者简介:陈晓燕(1986-),女,河南平顶山人,硕士,住院医师,主要从事消化道肿瘤研究。

免疫抑制因子<sup>[5-6]</sup>,CXCL8 在甲状腺癌及卵巢癌中均能够促进癌细胞的侵袭、迁移及转移<sup>[7-8]</sup>。而 CXCL8 在结直肠癌中的表达及发挥的作用尚未详细地阐述,因此,本研究拟探讨 CXCL8 在结直肠癌中的表达,分析其与结直肠癌患者临床病理参数的相关性,进一步阐述 CXCL8 是否可以作为结直肠癌患者的理想免疫治疗靶点。

## 1 资料和方法

**1.1 一般资料** 选取 2014 年 11 月至 2016 年 11 月于郑州大学附属郑州中心医院胃肠外科行手术切除的 60 例结直肠癌患者的癌组织及对应的癌旁正常黏膜组织(癌旁组织)为研究对象。所有病例均经病理学确诊,术前均未行放射、化学治疗等干预。所有标本均在手术进行中收集且经患者知情同意。

**1.2 主要试剂与仪器** RNAiso plus、反转录试剂盒、SYBR®Premix Ex Taq™ II 购自日本 TAKARA 公司,免疫组织化学试剂盒购自中国东源生物科技有限公司,CXCL8 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司。聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)仪购自美国 Agilent 公司,高通量组织破碎仪购自宁波新芝生物科技股份有限公司,Nanodrop 核酸蛋白测定仪购自美国 Thermo Scientific 公司,倒置显微镜购自美国 Leica 公司,引物均由上海生工生物工程有限公司合成。内参磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase,GAPDH)上游引物序列:5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3',下游引物序列:5'-TGCTGAAGACGCCAGTGG-3',引物大小 138 bp;CXCL8 上游引物序列:5'-GTTGTAGGGTTGC-CAGATGC-3',下游引物序列:5'-TTCTCCCGTG-CAATATCTAGG-3',引物大小 190 bp。

**1.3 实时荧光定量聚合酶链反应检测 CXCL8 mRNA 在结直肠癌组织和癌旁组织中的表达** 将结直肠癌组织和癌旁组织分别匀浆后室温静置 5 min;4 ℃ 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,取上清液;加入 500 μL 氯仿,震荡 2 min,室温孵育 5 min;4 ℃ 12 000 r·min<sup>-1</sup>,离心 15 min,取上清液;加入 500 μL 异丙醇,震荡 2 min,室温孵育 10 min;4 ℃ 12 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,弃上清液,加 1 mL 体积分数 75% 乙醇,涡旋混匀,4 ℃ 12 000 r·min<sup>-1</sup>离心 5 min,弃上清液;干燥后加适量焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate,DEPC)水溶解 RNA。Nanodrop 核酸蛋白测定仪检测 RNA 浓度及纯度。反转录反应严格按照试剂盒说明书操作,反应条件为 37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s,4 ℃ 短暂保存;得到的 cDNA 于 -20 ℃ 冻存备用。以反转录提取的 cDNA 作为

模板,应用 SYBR®Premix Ex Taq™ II 试剂盒进行 PCR;反应条件为 95 ℃ 10 min;95 ℃ 10 s,60 ℃ 10 s,72 ℃ 10 s,40 个扩增循环;应用美国 Agilent Mx3005P 仪器行定量检测和溶解曲线分析,每个样本反应均设 3 个复孔。实验均重复 3 次,计算均值。

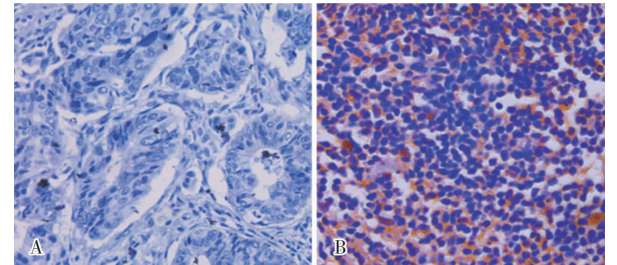
**1.4 免疫组织化学染色法检测 CXCL8 蛋白在结直肠癌组织和癌旁组织中的表达** 分别固定组织,包埋,烤片;将切片依次在 8 mol·L<sup>-1</sup>二甲苯中浸泡 15 min,体积分数 100%、95%、90%、80%、70%、60%、50% 乙醇梯度脱水;流水冲洗 2 min,抗原修复,室温冷却 2 h;体积分数 3% 过氧化氢室温孵育 10 min。磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline,PBS)洗 3 次;滴加试剂 A 封闭,室温孵育 30 min;滴加一抗 50~70 μL,湿盒中 4 ℃ 孵育过夜;室温恢复 1 h,PBS 洗 4 次;滴加试剂 B,室温孵育 30 min;PBS 洗 1 次;滴加试剂 C,孵育 15 min,PBS 洗 3 次;滴加 50 μL 新配制二氨基联苯胺(diaminobenzidine,DAB),显色 0.5~2.0 min,流水冲洗 2 min 终止显色;滴加 50 μL 苏木精,染色 15 min,流水冲洗 10 min;依次在体积分数 50%、60%、70%、80%、90%、95%、100% 乙醇中浸泡 1 min,二甲苯中浸泡 15 min;中性树胶封片;拍照并保存图像。免疫组织化学结果判读:由 2 名经验丰富的病理科医师对结果进行判定。CXCL8 蛋白阳性表达呈棕黄色,主要定位于细胞膜和(或)细胞质中。在 400 倍镜下观察,随机取 5 个视野,采用染色强度和阳性细胞百分比进行评分;染色强度分为 4 级,阴性:0 分;弱阳性:1 分;阳性:2 分;强阳性:3 分。阳性细胞百分比分为 5 级,0 分:阳性细胞 < 5%;1 分:5% ≤ 阳性细胞 < 25%;2 分:25% ≤ 阳性细胞 < 50%;3 分:50% ≤ 阳性细胞 < 75%;4 分:阳性细胞 ≥ 75%。染色强度和阳性细胞百分比所得分数乘积即为每张切片的得分;0~1 分:阴性(-);2~3 分:弱阳性(+);≥4 分:阳性(++)。弱阳性和阳性统一判定为阳性。

**1.5 统计学处理** 应用 SPSS 17.0 软件及 Prism5 软件进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 *t* 检验;计数资料以百分比表示,采用  $\chi^2$  检验;*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 CXCL8 mRNA 在结直肠癌组织及癌旁组织中的表达** CXCL8 mRNA 在结直肠癌组织和癌旁组织中的表达分别为 157.6 ± 26.2 和 42.7 ± 9.6, CXCL8 mRNA 在结直肠癌组织中的表达显著高于癌旁组织,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

**2.2 CXCL8 蛋白在结直肠癌组织及癌旁组织中的表达** 结果见图 1。在癌旁组织中, CXCL8 阴性表达 45 例(75.0%), 弱阳性表达 15 例(25.0%); 在癌组织中, CXCL8 阴性表达 10 例(16.7%), 阳性表达 50 例(83.3%)。CXCL8 蛋白在结直肠癌组织中的阳性表达率高于癌旁组织, 差异有统计学意义( $\chi^2=41.10, P<0.01$ )。



A:癌旁组织;B:癌组织。  
图 1 CXCL8 在结直肠癌组织和癌旁组织中的表达(免疫组织化学法, ×400)

Fig.1 Expression of CXCL8 in colorectal tumor tissues and marginal tissues ( immunohistochemical method, ×400)

**2.3 CXCL8 与结直肠癌患者临床病理参数的相关性分析** 结果见表 1。CXCL8 在结直肠癌组织中的表达与淋巴结转移、肿瘤分期有关( $P<0.01, P<0.05$ ), 与年龄、性别及结直肠癌分化程度无相关性( $P>0.05$ )。

表 1 CXCL8 与结直肠癌患者临床病理参数的相关性分析  
Tab.1 Correlation analysis between CXCL8 and clinicopathological parameters of patients with colorectal cancer

变量	n	CXCL8		$\chi^2$	P
		阴性/例(%)	弱阳性或阳性/例(%)		
年龄					
≤60 岁	21	11(52.4)	10(47.6)	0.24	>0.05
>60 岁	39	23(59.0)	16(41.0)		
性别					
男	38	21(55.3)	17(44.7)	0.07	>0.05
女	22	13(59.1)	9 (40.9)		
淋巴结转移					
未转移	33	31(93.9)	2(6.1)	41.40	<0.01
转移	27	3 (11.1)	24(88.9)		
肿瘤分期					
I ~ II 期	38	30(78.9)	8 (21.1)	21.10	<0.05
Ⅲ ~Ⅳ期	22	4 (18.2)	18(81.8)		
分化程度					
I	25	16(64.0)	9 (36.0)	0.90	>0.05
Ⅱ ~Ⅲ	35	18(51.4)	17(48.6)		

3 讨论

结直肠癌发病率极高,从全球来看,每年诊断为结直肠癌的病例大约 140 万,约 60.8 万患者发生死

亡<sup>[9]</sup>。在过去的十年中,尽管结直肠癌的诊断及治疗已经取得了进展,但是,结直肠癌患者的整体生存率并没有显著提高<sup>[10]</sup>。结直肠癌是由于表观遗传及基因改变导致的,主要包括致癌基因、肿瘤抑制基因、错配修复基因及结肠黏膜细胞中的细胞周期调控基因,这些因素的改变会推动结直肠癌发生及发展的关键途径<sup>[9-10]</sup>。

肿瘤微环境在肿瘤的发生及发展过程中起着重要作用<sup>[4]</sup>,在肿瘤微环境中除了肿瘤细胞外,还有多种免疫抑制因子和免疫抑制细胞,它们均能促进肿瘤的进展<sup>[11-12]</sup>。有文献报道,细胞因子参与了肿瘤的发生和转移<sup>[13]</sup>。有研究报道, CXCL8 能够促进卵巢癌细胞的侵袭及转移<sup>[8]</sup>,也能促进胃癌的进展<sup>[14]</sup>,同时 CXCL8 还可以预测胰腺癌患者的预后<sup>[15]</sup>。在结直肠癌中,肿瘤细胞能够选择性上调细胞因子的表达<sup>[16-17]</sup>,并且,有大量临床研究表明,细胞因子在结直肠癌的发生、发展及转移过程中发挥了重要的作用<sup>[18]</sup>。本研究结果显示, CXCL8 蛋白和 mRNA 在结直肠癌组织中的表达显著高于癌旁组织,并且 CXCL8 在发生淋巴结转移、肿瘤分期为 III ~ IV 期的结直肠癌患者中的阳性表达率均明显高于未发生淋巴结转移及肿瘤分期为 I ~ II 期的患者,故作者认为 CXCL8 与结直肠癌的发生、发展相关。

综上所述, CXCL8 在结直肠癌的发生及发展过程中发挥了重要作用,可能作为判断结直肠癌患者预后的一个指标。

参考文献:

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65 (1) : 5-29.

[2] 寇卫政, 杨晓煜, 褚秀峰, 等. 消癌平注射液联合 CapeOX 方案治疗晚期结直肠癌疗效观察 [J]. *新乡医学院学报*, 2016, 33 (6) : 500-503.

[3] HOLZEL D, ECKEL R, ENGEL J. Colorectal cancer metastasis. Frequency, prognosis, and consequences [J]. *Chirurg*, 2009, 80 (4) : 331-340.

[4] HENDRY S A, FARNSWORTH R H, SOLOMON B, et al. The role of the tumor vasculature in the host immune response: implications for therapeutic strategies targeting the tumor microenvironment [J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 621.

[5] LIU Q, LI A, TIAN Y, et al. The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2016, 31: 61-71.

[6] ALFARO C, TEIJEIRA A, ONATE C, et al. Tumor-produced interleukin-8 attracts human myeloid-derived suppressor cells and elicits extrusion of neutrophil extracellular traps ( NETs ) [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22 ( 15 ) : 3924-3936.

[7] VISCIANO C, LIOTTI F, PREVETE N, et al. Mast cells induce epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell features in human

thyroid cancer cells through an IL-8-Akt-Slug pathway[J]. *Oncogene*,2015,34(40):5175-5186.

[ 8 ] LI Y,LIU L,YIN Z,*et al.* Effect of targeted silencing of IL-8 on in vitro migration and invasion of SKOV3 ovarian cancer cells[J]. *Oncol Lett*,2017,13(2):567-572.

[ 9 ] MAHASNEH A,AL-SHAHERI F,JAMAL E. Molecular biomarkers for an early diagnosis, effective treatment and prognosis of colorectal cancer: current updates[J]. *Exp Mol Pathol*,2017,102(3):475-483.

[ 10 ] VERMA M,KUMAR V. Epigenetic biomarkers in colorectal cancer[J]. *Mol Diagn Ther*,2017,21(2):153-165.

[ 11 ] ALTARA R,MALLAT Z,BOOZ G W,*et al.* The CXCL10/CXCR3 axis and cardiac inflammation: implications for immunotherapy to treat infectious and noninfectious diseases of the heart[J]. *J Immunol Res*,2016,2016:4396368.

[ 12 ] BIALAS M,FISZER D,ROZWADOWSKA N,*et al.* The role of IL-6,IL-10,TNF-alpha and its receptors TNFR1 and TNFR2 in the local regulatory system of normal and impaired human spermatogenesis[J]. *Am J Reprod Immunol*,2009,62(1):51-59.

[ 13 ] KAKINUMA T,HWANG S T. Chemokines, chemokine receptors,

and cancer metastasis[J]. *J Leukoc Biol*,2006,79(4):639-651.

[ 14 ] LIN Y C,WEI P L, TSAI Y T,*et al.* Pb(2)(+) induced IL-8 gene expression by extracellular signal-regulated kinases and the transcription factor, activator protein 1, in human gastric carcinoma cells[J]. *Environ Toxicol*,2015,30(3):315-322.

[ 15 ] CHEN Y,SHI M,YU G Z,*et al.* Interleukin-8, a promising predictor for prognosis of pancreatic cancer[J]. *World J Gastroenterol*,2012,18(10):1123-1129.

[ 16 ] GHADJAR P,RUBIE C,AEBERSOLD D M,*et al.* The chemokine CCL20 and its receptor CCR6 in human malignancy with focus on colorectal cancer[J]. *Int J Cancer*,2009,125(4):741-745.

[ 17 ] BREW R,ERIKSON J S, WEST D C,*et al.* Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells *in vitro* [J]. *Cytokine*,2000,12(1):78-85.

[ 18 ] BAILEY C,NEGUS R,MORRIS A,*et al.* Chemokine expression is associated with the accumulation of tumour associated macrophages (TAMs) and progression in human colorectal cancer[J]. *Clin Exp Metastasis*,2007,24(2):121-130.

( 本文编辑:杨 博 英文编辑:杨 博 )

( 上接第 504 页 )

离病灶,因此,术中对施术者提出了更高的技术要求。首先,应构建良好有效的操作空间,确保术野暴露充分<sup>[8]</sup>;其次,要预防重要神经和血管损伤,确保分离层次清晰,术中勿对甲状腺过度牵拉,在切断腺体、血管时,可通过电刀慢凝防止出血;再者,术野止血要彻底,以预防术后出血,术后经前胸壁切口留置术野引流管,外接负压吸引壶以适当加压止血<sup>[9]</sup>;最后,防止皮下积液、积气,尽可能将二氧化碳压力调节至 6 ~ 8 mmHg,手术结束后二氧化碳充分排出<sup>[10]</sup>。

综上所述,腔镜甲状腺手术治疗良性甲状腺疾病临床疗效佳,手术创伤小,手术时间短,患者术后恢复快,并发症少,颈前无瘢痕,美容效果佳,且安全性较高。

参考文献:

[ 1 ] 黄飞,蔡小勇,卢榜裕,等.单孔腋下入路腔镜手术在甲状腺良性疾病中的临床应用[J]. *中国内镜杂志*,2014,20(7):678-683.

[ 2 ] 双剑博,王渭滨.甲状腺良性结节微创治疗进展[J/EB]. *转化医学电子杂志*,2017,4(4):83-86. DOI:10.3969/j.issn.2095-6894.2017.04.021.

[ 3 ] 黄广恒.甲状腺良性肿瘤腔镜辅助下小切口甲状腺手术治疗的临床效果研究[J]. *中国现代药物应用*,2015,9(22):60-61.

[ 4 ] 肖光云,王红梅,罗德富.双侧乳晕入路腔镜甲状腺手术治疗良性甲状腺疾病临床效果观察[J]. *河北医学*,2014,20(1):74-77.

[ 5 ] 龚根强,曹亮,帖小妮.腔镜甲状腺手术治疗良性甲状腺疾病疗效观察[J]. *陕西医学杂志*,2015,44(12):1652-1653.

[ 6 ] 章建全.甲状腺结节微创治疗新理念[J]. *现代实用医学*,2015,27(3):279-282.

[ 7 ] 牟坤,董世平,王少渊,等.良性甲状腺疾病应用腔镜甲状腺手术治疗的疗效研究[J/EB]. *世界最新医学信息文摘:电子版*,2017,17(33):54. DOI:10.3969/j.issn.1671-3141.2017.33.027.

[ 8 ] 张永玉.腔镜甲状腺手术治疗甲状腺良性结节的技巧[J]. *中国伤残医学*,2015,23(17):73-74.

[ 9 ] 张小兵,张万宇,卢强,等.经乳晕入路腔镜甲状腺手术治疗甲状腺良性疾病的效果及安全性[J]. *中国当代医药*,2017,24(2):42-44,47.

[ 10 ] 张思远,卿伯华,段群欢.单孔腋下入路腔镜手术治疗甲状腺良性疾病的观察研究[J]. *微创医学*,2017,12(3):406-407.

( 本文编辑:徐自超 英文编辑:徐自超 )