

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.11.007

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.11.007>

## 炎症细胞因子 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8 对慢性阻塞性肺疾病模型小鼠肺癌生长及转移的影响

宋淑范, 辛平

(沈阳市第四人民医院呼吸内科, 沈阳 110000)

**[摘要]** **目的:** 通过建立小鼠模型, 模拟并观察慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)慢性炎症环境对肺癌生长及转移的影响, 检测并分析相关炎症细胞因子IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 和IL-8在这一过程中发挥的作用, 并探讨可能相关的信号通路。**方法:** 选用5~8周龄(20~25 g)的雄性C57/BL6小鼠, 用熏烟加气道滴注LPS的方法构建COPD模型, 在COPD模型的基础上注射Lewis肺癌(Lewis lung cancer, LLC)细胞建立COPD合并肺癌小鼠模型; 在COPD合并肺癌小鼠模型的基础上通过注射甲强龙控制慢性炎症, 以建立经甲强龙治疗的COPD合并肺癌小鼠模型。观察并比较经甲强龙治疗的COPD合并肺癌模型小鼠、未经甲强龙治疗的COPD合并肺癌模型小鼠以及单纯肺癌模型小鼠3组肿瘤的生长体积及转移灶数量。以正常小鼠作为对照, 用ELISA检测并比较单纯COPD小鼠、单纯肺癌小鼠、COPD合并肺癌小鼠、经甲强龙治疗的COPD合并肺癌小鼠血清IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8水平, 用Real-time PCR的方法检测这5组小鼠肺组织内上述炎症细胞因子相应的mRNA的表达水平, 并用Western印迹检测这5组小鼠肺组织内一些相关信号通路上的信号分子Stat3, ERK1/2, NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ 的活化比例。**结果:** 与单纯肺癌小鼠相比, COPD合并肺癌小鼠的中位生存期较短, 肺部病灶的体积较大, 肺部转移灶数量较多, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 而经甲强龙治疗的COPD合并肺癌小鼠, 这些改变都较未治疗组有所下降, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8在COPD合并肺癌肺组织及血清中的表达比例均较单纯肺癌组及单纯COPD组上调, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 其中IL-6在COPD合并肺癌小鼠肺组织内的表达水平较单纯肺癌及单纯COPD小鼠增加2倍以上, 且较正常对照组小鼠增加5倍以上, 上调比例较其他3种炎症细胞因子大, 而经甲强龙治疗的小鼠这些炎症细胞因子的水平均有所下降, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。COPD合并肺癌小鼠肺组织内相关的信号分子Stat3, NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ 的活化比例高于正常对照组、单纯肺癌组及单纯COPD组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 经甲强龙治疗的COPD合并肺癌小鼠肺组织匀浆内这3种信号分子的活化比例均较未治疗组有不同程度的下降, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论:** COPD慢性炎症环境可促进肺癌的生长及转移, 从而缩短肺癌小鼠的生存期, 使用甲强龙控制炎症反应后可抑制这种促进作用; IL-6, IL-8可能参与COPD慢性炎症环境对肺癌生长及转移的促进过程。

**[关键词]** 慢性阻塞性肺疾病; 肺癌; 小鼠模型; 肿瘤生长转移; 炎症细胞因子

收稿日期 (Date of reception): 2017-08-02

通信作者 (Corresponding author): 宋淑范, Email: sysongshufan@126.com

# Effect of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ and IL-8 on the growth and metastasis of lung cancer in chronic obstructive pulmonary disease

SONG Shufan, XIN Ping

(Department of Respiration Medicine, Fourth People's Hospital of Shenyang, Shenyang 110000, China)

## Abstract

**Objective:** To observe the influence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD)-like chronic inflammation on the growth and metastasis of lung cancer through a mouse model, analyze the role of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-8 in the progression, and to find the probable signaling pathway. **Methods:** We selected male C57/BL6 mice aged 5–8 weeks, weighted 20–25 g to establish a COPD-like mouse model by smoking and instilled intratracheally with LPS. Lewis lung cancer cells (LLC) were implanted by directly puncturing through the skin and intercostal space into the lung to establish a lung cancer model, and implanted into the lung of COPD-like mouse to establish a COPD combined with lung cancer model. Methylprednisolone was injected into COPD combined with lung cancer model to establish a methylprednisolone-treated model. We observed and compared the tumor size and metastases number of COPD-lung cancer mouse model, lung cancer mouse model and methylprednisolone-treated COPD-lung cancer mouse model. We detected the levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  in serum by ELISA, and the expression of their mRNA in lung using real-time PCR in each group. And we also detected the expression of some probable signal molecule (Stat3, ERK1/2, NF- $\kappa$ B, and I $\kappa$ B $\alpha$ ) in the lung of these 5 mice groups to find out the relative signaling pathway involved in the promoting process of chronic inflammation in COPD on the growth and metastasis of lung cancer. **Results:** Compared with lung cancer mice, the mice with lung cancer combined COPD had shorter median survival times, larger volumes of tumor nodules, and larger numbers of metastases, but if they were treated with methylprednisolone, all these changes come down, the differences were all statistically significant ( $P < 0.05$ ). The levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 in the COPD-lung cancer mice serum were significantly higher than COPD mice without lung cancer and lung cancer mice without COPD ( $P < 0.05$ ), and IL-6 increased much more sharply than other inflammatory cytokines in COPD-lung cancer mice, which increased about 2 times more than COPD mice and lung cancer mice, and 5 times more than control mice. In methylprednisolone-treated COPD-lung cancer mice, levels of all the inflammatory cytokines decreased. The activation ratios of Stat3, NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$  were significantly higher in COPD-lung cancer mice than control mice, COPD mice, and lung cancer mice ( $P < 0.05$ ), and significantly lower in methylprednisolone-treated COPD-lung cancer mice than untreated ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The chronic inflammatory environment can promote the growth and metastasis of lung cancer, and then shorten the survival of lung cancer in our mouse model, controlling the inflammation using methylprednisolone can inhibit the promoting effect of COPD on lung cancer. IL-6 and IL-8 play roles in the promoting effect of chronic inflammation in COPD mice on the growth and metastasis of lung cancer.

## Keywords

chronic obstructive pulmonary disease; lung cancer; mouse model; growth and metastasis; inflammatory cytokines

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)及肺癌是目前呼吸科发病率及病死率最高的两类疾病,且每年患病人数仍以惊人的速度提升。大量临床研究及流行病学调查<sup>[1]</sup>结果显示:50%~70%肺癌患者合并有COPD,而COPD会使肺癌发生的可能性增加4.5倍,且COPD患者罹患肺癌后的疾病进展比单纯肺癌患者快,前者比后者的一期肺癌复发的风险大两倍,病死率增加<sup>[2]</sup>。关于这一现象的解释,有学者<sup>[3]</sup>认为是由于COPD及肺癌有共同的环境致病危险因素,即吸烟暴露,且一些共有的易感基因也可同时参与COPD及肺癌的疾病进程,但这并不能很好地解释一些非吸烟患者、女性患者、戒烟患者等也发生COPD及肺癌,且他们的COPD病史也可促进肺癌的发生发展,因此关于COPD促进肺癌发生发展的具体机制目前仍不是很清楚。为了更好地解释COPD及肺癌之间的相互关系,美国心、肺、血液系统学会(the National Heart, Lung, and Blood Institute, NHLBI)及美国癌症学会(the National Cancer Institute, NCI)<sup>[4]</sup>提出:可以从病理生理学的角度分析COPD与肺癌之间的相关性,包括鉴定可能的生物标志物、分子信号通路及其可能共有的分子发病机制。慢性炎症是肺癌及COPD共有的病理生理特征<sup>[5-6]</sup>,各种炎症细胞及其释放的炎症因子、诱导的炎症反应等都可促进COPD及肺癌的发生及发展,但因临床研究的干扰因素较多,这一观点并未经确切证实。因此,本文拟通过建立小鼠模型,模拟并观察COPD慢性炎症环境对肺癌生长及转移的影响,检测并分析相关炎症细胞因子IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 和IL-8在这一过程中发挥的作用,并探讨可能相关的信号通路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

动物来源:雄性C57/BL6小鼠,5~8周龄,SPF级,体重180~220 g,购于中科院上海实验动物中心。实验设计经沈阳市第四人民医院伦理委员会同意。动物使用和处理遵照美国国立卫生署颁布的“实验动物关怀和使用指南”。动物饲养于洁净、温控、独立通风的上海中山医院实验动物中心,正常进食、饮水。LLC细胞株购于中科院上海实验动物中心。

主要实验试剂:LPS(大肠杆菌O55:B5)购于美国Sigma公司;香烟购于上海卷烟厂;甲强龙购于天津药业焦作有限公司;ELISA试剂盒(小鼠

IL-1 $\beta$ ,小鼠IL-6,小鼠TNF- $\alpha$ )购于美国R&D公司;小鼠白介素8(IL-8/CXCL8)ELISA试剂盒购于中国Cusabio公司;Acrylamide-Bis mix购于加拿大Bio Basic Inc公司;兔抗mAb磷酸-NF- $\kappa$ B p65,兔抗磷酸-p44/42 MAPK(Erk1/2)、兔抗Thr202/Tyr204、兔抗IgG、兔抗GAPDH(酶标抗体),兔抗NF- $\kappa$ B p65,兔抗p44/42 MAPK(Erk1/2)、兔抗磷酸-Stat3、兔抗Stat3 #4904、兔抗磷酸-I $\kappa$ B $\alpha$ 、兔抗I $\kappa$ B $\alpha$ 均购自美国Cell Signaling公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物模型的建立

利用烟熏加LPS气道内滴注的方法建立小鼠COPD模型,具体方法为:健康雄性C57/BL6小鼠80只,随机分为2组,即对照组( $n=40$ )与COPD组( $n=40$ )。1)对照组自由饮水和摄食,不做任何处理。2)COPD组小鼠置于自制的有机玻璃染毒箱(120 cm  $\times$  80 cm  $\times$  80 cm)内进行被动吸烟,每天2次,每次10支,每次持续30 min,2次之间间隔至少4 h,连续30 d,并在第1和14天气管内滴入2 mL/kg LPS(50  $\mu$ L),滴注LPS当天暂停吸烟2次。3)小鼠原位肺癌模型的建立:取对数生长期的LLC细胞株,10<sup>5</sup>个细胞/50  $\mu$ L PBS重悬,冰上备用。小鼠麻醉后,将左侧卧位固定在操作台上,备皮消毒。将50  $\mu$ L细胞悬液与50 mL Matrigel混匀后立即用胰岛素针在右腋前线肋弓上约1.5 cm沿肋间隙进针,进针深度约5 mm,回抽少量气体确认进入肺部。4)小鼠皮下肺癌模型的建立:取对数生长期的LLC细胞株,10<sup>5</sup>个细胞/50  $\mu$ L PBS重悬,冰上备用。小鼠麻醉后,仰卧位固定在操作台上,备皮消毒。将50  $\mu$ L细胞悬液与50  $\mu$ L Matrigel混匀后立即用胰岛素针在左侧腋下进针,注射细胞入皮下间隙层。5)小鼠肺癌转移模型的建立:取对数生长期的LLC细胞株,10<sup>5</sup>个细胞/50  $\mu$ L PBS重悬,冰上备用。小鼠不麻醉,尾部消毒、除毛后,通过尾静脉注LLC细胞10<sup>5</sup>个,建立小鼠肺癌转移模型。6)COPD合并肺癌小鼠模型的建立:COPD样小鼠模型烟雾暴露停止24 h后,经肺功能检测确认COPD小鼠模型建立成功,1周后用上诉方法往COPD样小鼠体内注射LLC细胞株建立肺癌原位、皮下及转移模型。7)经甲强龙治疗的COPD合并肺癌小鼠模型:COPD样小鼠模型烟雾暴露停止24 h后,经肺功能检测确认COPD小鼠模型建立成功,1周后用上诉方法往COPD样小鼠体内注射LLC细胞株建立肺癌原位、皮下及转移模型,注入肺癌细胞当天起每天腹腔注射甲强龙2 mg/kg体重至造



模结束。

### 1.2.2 小鼠肺组织病理学切片

COPD组小鼠、正常组小鼠、原位肺癌模型组、转移肺癌模型组每组10例, 麻醉后心脏取血处死, 备皮消毒后, 剪开皮肤, 暴露气管及两肺, 剪开气管并插入导管(20G静脉穿刺针), 退出针芯后将导管连一输液管, 输液管另一端连装有中性甲醛溶液的针筒, 液面高度距离小鼠约20 cm, 拔去枕芯后借助液体重力作用向小鼠肺内灌注甲醛, 见肺部膨隆即停止灌注, 总共灌注量约500  $\mu$ L, 结扎气管后取下肺组织, 进行常规石蜡包埋切片的制作与HE染色。皮下肺癌模型组小鼠10例, 麻醉、备皮消毒后, 剪开腋下皮肤, 钝性分离皮下组织, 完整取出肿瘤病灶, 进行常规石蜡包埋切片与HE染色。

### 1.2.3 小鼠生存周期观察

观察经甲强龙治疗及未经甲强龙治疗的COPD合并原位肺癌模型的小鼠生存期, 并与单纯原位肺癌模型组做比较, 每组20例, 以4周为观察截断时间, 分析各组生存曲线。

### 1.2.4 小鼠肺癌生长与转移的观察

比较单纯肺癌模型及COPD和合并肺癌模型肿瘤的生长及转移情况, 原位肺癌小鼠模型建模2周后, 心脏取血处死小鼠, 完整取出肺组织, 每组10例, 借助标尺, 肉眼观察肺部原发病灶体积大小及转移灶数量, 并拍照存档; 皮下肺癌小鼠模型建模3周后, 心脏取血处死小鼠, 完整皮下肿瘤组织, 每组10例, 借助标尺观察瘤体大小; 转移性肺癌小鼠模型建模4周后, 心脏取血处死小鼠, 完整取出肺组织, 肉眼观察肺部转移灶数量。

### 1.2.5 小鼠血清炎症细胞因子水平

COPD模型组小鼠、正常对照组小鼠、COPD合并原位肺癌模型组小鼠、经甲强龙治疗的COPD合并原位肺癌模型组小鼠, 每组20例, 小鼠麻醉后心脏取血, 血标本留于离心管内, 4  $^{\circ}$ C下2 000 r/min离心20 min, 留取血浆, -80  $^{\circ}$ C分装保存至行ELISA检测。用ELISA法检测小鼠血浆IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 和IL-8水平。检测步骤均严格按说明书操作。

### 1.2.6 实时荧光定量PCR检测IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 和IL-8的表达水平

COPD模型组小鼠、正常对照组小鼠、原位肺癌模型小鼠、COPD合并原位肺癌模型组小鼠、经甲强龙治疗的COPD合并原位肺癌模型组小鼠, 每组20例, 以GAPDH作为内参对照, 使用TaKaRa

公司的SYBRPremixExTaqTM试剂盒对组织标本中提取的RNA进行荧光定量PCR扩增, 分析IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 和IL-8 mRNA的表达水平。IL-1 $\beta$ 引物: 上游5'-CATCAGCACCTCTCAAGCAG-3', 下游5'-AGTCCACATTCAGCACAGGA-3'。IL-6引物: 上游5'-AGTGAGGAACAAGCCAGAGC-3', 下游5'-GCATTTGTGTTGGGTCAG-3'。TNF- $\alpha$ 引物: 5'-CCTGTGAGGAGGACGAACA-3', 下游5'-TTGAGCCAGAAGAGGTTGAG-3'。IL-8引物: 5'-CAGCCTTCCTGATTTCTGC-3', 下游5'-ACTTCTCCACAACCCCTCTGC-3'。内参基因GAPDH引物: 上游5'-CTTAGCACCCCTGGCCAAG-3', 下游5'-GATGTTCTGGAGAGCCCCG-3'。配制20  $\mu$ L反应体系: 2 $\times$  SYBRPremixExTaq<sup>TM</sup> 10  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L PCR上下游引物0.4  $\mu$ L, ROXReferenceDye (50 $\times$ ) 0.4  $\mu$ L, cDNA模板2.0  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 6.8  $\mu$ L。用ABI PRISM 7500快速实时荧光定量PCR扩增仪扩增cDNA并检测基因表达量。

### 1.2.7 小鼠肺组织 Western 印迹检测蛋白表达

取适量蛋白样品至1.5 mL Eppendorf管中, 加入适量ddH<sub>2</sub>O及4 $\times$ 上样缓冲液5  $\mu$ L, 保证蛋白上样量为50 mg, 总体积20  $\mu$ L, 将混合后的蛋白样品于沸水中水浴5 min使蛋白变性, 按一定顺序加入到上样孔中。恒压80 V至溴酚蓝指示条带跑至分离胶时, 改为恒压120 V, 至溴酚兰刚跑出分离胶即终止。具体步骤严格按照试剂盒说明进行, 用Multi Gauge软件分析条带灰度值并进行比较。选择IL-6相关信号分子蛋白作为目的蛋白进行检测, 因此需检测的蛋白包括: NF- $\kappa$ B, Phospho-I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$ , Phospho-ERK1/2, ERK1/2, Phospho-Stat3, Stat3以及内参基因GAPDH。

## 1.3 统计学处理

所有资料和数据均用SPSS17.0统计软件分析, 计量资料数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 生存分析用Kaplan-Meier法, 多组间比较采用单因素方差分析(one way-ANOVA检验), 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 COPD 模型小鼠及肺癌模型小鼠的肺组织病理切片 HE 染色结果

COPD模型小鼠肺组织行HE染色, 与正常组小鼠比较, COPD模型组小鼠肺泡间隔见大量炎症细胞浸润, 肺泡壁间隔增厚、断裂。原位肺

癌模型小鼠及转移性肺癌模型小鼠的肺组织病理切片也经HE染色, 镜下见支气管黏膜柱状上皮细胞纤毛丧失, 肺泡间隔炎性渗出, 肺内可见恶性肿瘤病灶, 高倍镜下见肿瘤细胞呈圆形或椭圆形, 胞浆丰富, 核大而畸形, 染色深, 可见异常核分裂象。皮下肺癌模型小鼠的肿瘤组织病理切片经HE染色后高倍镜下可见大量恶性肿瘤细胞(图1)。

## 2.2 肺癌小鼠生存曲线分析

记录单纯肺癌模型小鼠、COPD合并原位肺癌模型小鼠以及经甲强龙治疗的COPD合并原位肺癌模型小鼠的生存期, 作生存曲线并比较后发现: COPD合并原位肺癌小鼠中位生存期[(15.0 $\pm$ 0.97) d]明显缩短, 而经甲强龙治疗的小鼠的中位生存期[(20 $\pm$ 1.26) d]又较未治疗组延长, 但仍短于单纯肺癌小鼠[(23.0 $\pm$ 0.95) d], 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ , 图2)。

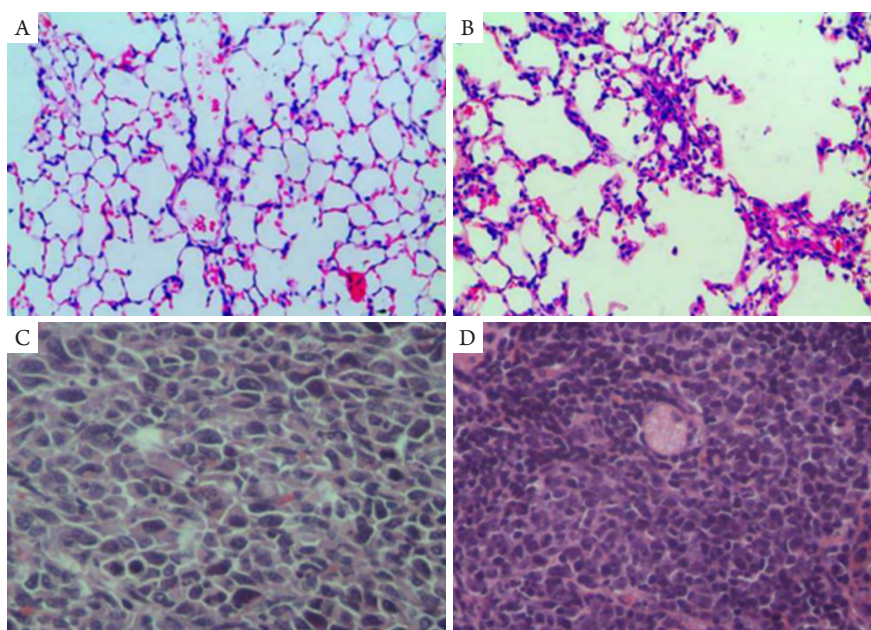


图1 小鼠的肺组织病理切片(HE,  $\times 100$ )

Figure 1 Lung tissue pathological sections (HE,  $\times 100$ )

(A)正常小鼠; (B)COPD小鼠; (C)原位肺癌模型小鼠; (D)皮下肺癌模型小鼠。

(A) Normal mice; (B) COPD mice; (C) Orthotopic lung cancer mice; (D) Subcutaneous lung cancer mice.

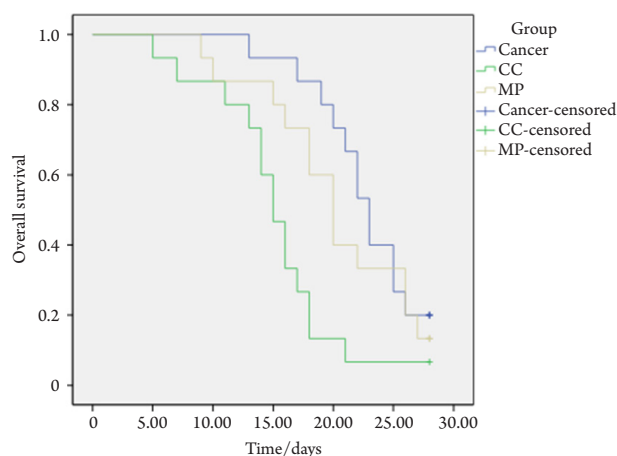


图2 各肺癌模型小鼠生存曲线

Figure 2 Survival curves of lung cancer model mice

### 2.3 肺癌小鼠肿瘤病灶体积及转移灶数量

与单纯原位肺癌小鼠模型相比, COPD合并原位肺癌小鼠模型组的肺部肿瘤体积较大, 肺内肿瘤转移灶数量增多, 且出现对侧转移, 而甲强龙治疗组肿瘤体积较未治疗组小, 肿瘤转移灶量也较未治疗组减少。与单纯皮下肺癌小鼠模型组相比, COPD合并原位肺癌小鼠模型组的肿瘤体积较大, 甲强龙治疗组的肿瘤体积较未治疗组小。与单纯肺癌转移小鼠模型组相比, COPD合并肺癌转移小鼠模型组双肺出现转移灶数量增多, 甲强龙治疗的小鼠双肺转移灶较未治疗组减少, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ , 表1)。

### 2.4 小鼠血清炎症细胞因子 IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 及 IL-8 水平的 ELISA 检测结果

COPD模型组小鼠血清中IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 及IL-8水平均较正常对照组小鼠增高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。而将两组血清炎症因子水平同COPD合并肺癌小鼠的血清炎症细胞因子水平进行比较后, COPD合并肺癌小鼠血清中4种炎症细胞因子水平均高于正常对照小鼠, 除TNF- $\alpha$ 以外其他3种炎症因子水平也均高于单纯COPD小鼠, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。经甲强龙治疗的COPD合并肺癌小鼠血清炎症因子水平均较未治疗组下降, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 表2)。

表2 小鼠血清炎症细胞因子检测结果( $n=20$ )

Table 2 Detection of inflammatory cytokines in serum of mice ( $n=20$ )

组别	IL-1 $\beta$ /(pg·mL <sup>-1</sup> )	IL-6/(pg·mL <sup>-1</sup> )	TNF- $\alpha$ /(pg·mL <sup>-1</sup> )	IL-8/(pg·mL <sup>-1</sup> )
正常对照组	1.32 ± 1.01	28.56 ± 3.85	1.24 ± 0.92	485.60 ± 82.03
COPD组	5.68 ± 1.59*	68.84 ± 26.22*	6.09 ± 1.60*	1003.95 ± 155.86*
单纯肺癌组	5.97 ± 2.55*	69.67 ± 16.78*	6.17 ± 1.75*	1112.63 ± 414.72*
COPD+单纯肺癌组	11.91 ± 2.83 <sup>&amp;</sup> <sup>§</sup>	165.25 ± 35.87 <sup>&amp;</sup> <sup>§</sup>	6.43 ± 3.18 <sup>&amp;</sup>	1799.51 ± 419.53 <sup>&amp;</sup> <sup>§</sup>
甲强龙治疗组	8.41 ± 2.36 <sup>†</sup>	71.02 ± 13.47 <sup>†</sup>	3.08 ± 0.77 <sup>†</sup>	1 231.69 ± 432.18 <sup>&amp;</sup> <sup>†</sup>

与正常对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与COPD组比较, <sup>&</sup> $P < 0.05$ ; 与单纯肺癌组比较, <sup>§</sup> $P < 0.05$ ; 与COPD+单纯肺癌组比较, <sup>†</sup> $P < 0.05$ 。

Compared with the normal control group, \* $P < 0.05$ ; compared with the COPD group, <sup>&</sup> $P < 0.05$ ; compared with the lung cancer group, <sup>§</sup> $P < 0.05$ ; compared with the COPD + lung cancer group, <sup>†</sup> $P < 0.05$ .

### 2.5 小鼠肺组织内信号通路相关蛋白活化比例的检测结果

虽然I $\kappa$ B $\alpha$ , ERK1/2和Stat3这三种信号分子在各组间的表达水平变化不大, 但相应Phospho-I $\kappa$ B $\alpha$ , Phospho-ERK1/2和Phospho-Stat3在COPD组及肺癌

表1 不同组间肿瘤体积大小及转移病灶的比较

Table 1 Comparison of tumor volume and metastasis between the different groups

类别	肿瘤体积/mm	肺部转移灶/例数
原位种植		
肺癌	0.83 ± 0.36	0.25 ± 0.16
COPD+肺癌	4.22 ± 0.60*	14.67 ± 2.91*
经甲强龙治疗	2.17 ± 0.44 <sup>#</sup>	6.33 ± 2.03 <sup>#</sup>
皮下种植		
肺癌	10.33 ± 2.27	—
COPD+肺癌	40.03 ± 0.35*	—
经甲强龙治疗	20.10 ± 0.21 <sup>#</sup>	—
经尾静脉种植		
肺癌	—	0.67 ± 0.30
COPD+肺癌	—	4.67 ± 0.88*
经甲强龙治疗	—	1.35 ± 0.35 <sup>#</sup>

与单纯肺癌模型组相比, \* $P < 0.05$ ; 与未经治疗的COPD合并肺癌模型组相比, <sup>#</sup> $P < 0.05$ 。

Compared with the lung cancer group, \* $P < 0.05$ ; compared with the COPD + lung cancer group without methylprednisolone treatment, <sup>#</sup> $P < 0.05$ .

组的表达水平均高于对照组; COPD合并肺癌组I $\kappa$ B $\alpha$ 及Stat3的活化比例均高于正常对照组、单纯肺癌组及单纯COPD组; 经甲强龙治疗的COPD合并肺癌组肺组织匀浆内这三种信号分子的活化比例均较未治疗组有不同程度的下降, 差异均有统计学意



义( $P<0.05$ )。同样, 细胞总NF- $\kappa$ B在各组肺组织匀浆内的表达水平变化差异不大, 但细胞核NF- $\kappa$ B的表达趋势同前3种磷酸化信号分子的表达趋势; 不过, 与其他经检测的信号分子不同, COPD合并肺

癌小鼠肺组织匀浆内ERK1/2的活化比例并不高于单纯肺癌小鼠, 反而有一定程度的下降, 差异均有统计学意义( $P<0.05$ ; 图3, 表3)。

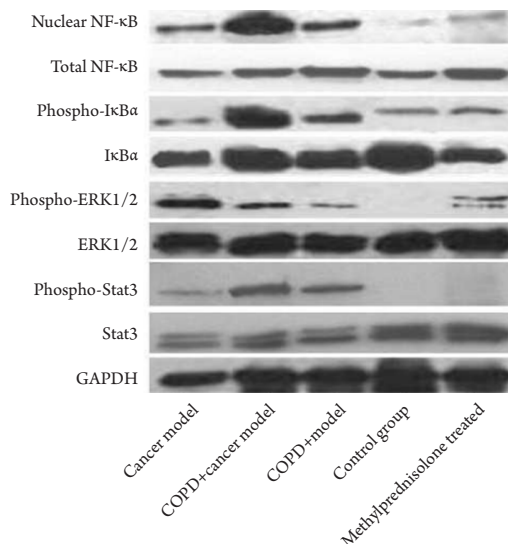


图3 小鼠肺组织相关信号分子蛋白表达量检测

Figure 3 Expression of signal-related molecular protein in lung tissue of mice

表3 小鼠肺组织相关信号分子蛋白表达量检测( $n=20$ )

Table 3 Expression of signal related molecular protein in lung tissue of mice ( $n=20$ )

组别	NF- $\kappa$ B	I $\kappa$ B $\alpha$	ERK1/2	Stat3
正常小鼠组	0.58 $\pm$ 0.04	0.38 $\pm$ 0.02	0.29 $\pm$ 0.01	0.26 $\pm$ 0.01
COPD小鼠组	0.96 $\pm$ 0.08*	0.51 $\pm$ 0.04*	0.30 $\pm$ 0.02*	0.41 $\pm$ 0.03*
单纯肺癌小鼠组	0.76 $\pm$ 0.06	0.40 $\pm$ 0.03	0.43 $\pm$ 0.03	0.37 $\pm$ 0.02
COPD+单纯肺癌小鼠组	1.62 $\pm$ 0.12 <sup>#</sup>	0.54 $\pm$ 0.05 <sup>#</sup>	0.37 $\pm$ 0.02 <sup>#</sup>	0.45 $\pm$ 0.03 <sup>#</sup>
甲强龙治疗组	0.78 $\pm$ 0.07* <sup>#</sup>	0.47 $\pm$ 0.03* <sup>#</sup>	0.31 $\pm$ 0.02* <sup>#</sup>	0.26 $\pm$ 0.01* <sup>#</sup>

与正常小鼠组相比, \* $P<0.05$ ; 与单纯肺癌小鼠组相比, <sup>#</sup> $P<0.05$ 。

Compared with the normal mice group, \* $P<0.05$ ; compared with the pure lung cancer mice group, <sup>#</sup> $P<0.05$ .

### 3 讨论

COPD及肺癌作为目前临床上发病率及病死率最高的两类呼吸道疾病, 它们之间的相关性已经被大多数临床研究所证实<sup>[7-9]</sup>。这些研究<sup>[10]</sup>结果表明: COPD可明显增加罹患肺癌的可能性, 并能促进肺癌的疾病进程, 增加肺癌复发及死亡的风险。本研究利用动物模型模拟COPD合并肺癌的慢性炎症环境, 在体探讨COPD对肺癌生长及转移的影响。本研究结果显示: COPD合并肺癌小鼠模

型较单纯肺癌小鼠模型的中位生存期延长, 提示COPD可加速肺癌的疾病进程。

COPD以各种炎症细胞及炎症因子参与的慢性炎症为基础, 从而破坏肺部结构, 引起气道重塑, 造成不可逆的气流受阻; 另外, 炎症细胞及炎症因子也可改变肺部微环境, 促进细胞的增殖分化, 并诱导上皮细胞发生上皮间质转化等肺癌相关的生物学行为, 导致肿瘤的发生, 并促进肿瘤的生长及转移<sup>[11]</sup>。糖皮质激素是抑制慢性炎症反应的一种有效物质, 它可抑制炎症细胞的迁

移和活化, 抑制炎症因子的生成及炎症因子的释放。有临床研究<sup>[12]</sup>发现吸入激素类药物控制炎症可减少COPD患者的肺癌发生, 这也从另一面证明炎症是COPD患者肺癌发生率及病死率增加的原因之一。本研究结果显示: 同一时间内, COPD合并肺癌小鼠肿瘤的生长体积及转移病灶数量均高于单纯肺癌小鼠, 而利用甲强龙治疗的COPD合并肺癌小鼠模型的肿瘤生长及转移会被抑制, 且甲强龙还可使COPD合并肺癌小鼠的生存期延长, 因此本文认为慢性炎症在COPD对肺癌生长及转移的促进过程中发挥了重要的作用, 这也提示控制慢性炎症对控制COPD合并肺癌患者的疾病进程有重要意义。

参与COPD疾病进程的炎症细胞因子主要是IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 及IL-8, 它们诱导炎症细胞的迁徙、刺激炎症因子的释放、激化氧化应激反应的发生, 从而促进COPD的发生及发展。另外, 这4种炎症因子还可直接或间接诱导气道上皮细胞增殖分化、调节细胞周期、诱发染色体重建、破坏细胞外基质并促进血管生成, 从而促进肿瘤的生长及转移<sup>[13-14]</sup>。本研究结果显示: IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 及IL-8在肺癌模型小鼠及COPD模型小鼠血清内的表达水平均高于正常对照组小鼠, 提示它们共同参与肺癌及COPD的疾病进程; 另外除TNF- $\alpha$ 外, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8在COPD合并肺癌小鼠血清内的表达水平又均高于单纯肺癌小鼠及单纯COPD小鼠, 提示其在COPD合并肺癌小鼠的疾病进程中发挥作用可能是COPD合并肺癌小鼠肿瘤生长及转移速度高于单纯肺癌小鼠的原因之一; 而经甲强龙治疗后的COPD合并肺癌小鼠, 这4种炎症因子的水平均较未治疗组有所下降, 提示其参与COPD合并肺癌小鼠的慢性炎症过程。因此, 本文认为IL-6及IL-8在COPD炎症环境促进肺癌生长及转移的过程中发挥重要的作用。根据Real-time PCR检测肺组织中这4种炎症因子mRNA的表达水平, 本研究发现IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8在COPD合并肺癌小鼠肺组织中的基因表达水平均较单纯COPD组及单纯肺癌组增加, 这说明COPD不仅可改变全身炎症环境, 且可改变肺部的局部炎症环境, 从而促进肿瘤的局部生长及别处转移。另外, 本研究还发现这几种炎症因子中尤以IL-6在COPD合并肺癌小鼠体内的表达水平增加明显, 较单纯肺癌及单纯COPD小鼠增加2倍以上, 且较正常对照组小鼠增加5倍以上, 提示IL-6可能在COPD慢性炎症环境促进肿瘤的生长及转移过程中发挥了更重要的作用。本研究对肺组织内这些信号通路相关的

信号分子Stat3, ERK及NF- $\kappa$ B的蛋白表达进行检测后发现, 这三者在单纯COPD小鼠及单纯肺癌小鼠肺组织内的活化比例较正常小鼠增加, 提示JAK/Stat3及Ras/MAPK均参与了COPD及肺癌的发生发展。另外, Stat3及NF- $\kappa$ B的表达在COPD合并肺癌小鼠肺组织内明显高于单纯肺癌及COPD小鼠, 而在经甲强龙治疗后的肺组织内的活化减少, 说明JAK/Stat3/NF- $\kappa$ B这一信号通路参与COPD炎症环境对肺癌的促进作用。但ERK1/2在COPD合并肺癌小鼠肺组织内的活化比例反而较单纯肺癌组降低, 这可能是由于Ras/MAPK信号通路对肺癌细胞的生物学行为具有双向调节作用, 它既可激活促进细胞的分化、增殖及生长, 还可激发一些肿瘤抑制基因, 并可促进肿瘤细胞的衰老、自噬及凋亡<sup>[15]</sup>。因此, 本研究认为IL-6可能参与COPD慢性炎症环境对肺癌生长及转移的促进作用。

综上所述, COPD慢性炎症环境可促进肺癌的生长及转移, 从而缩短肺癌小鼠的生存期, 使用甲强龙控制炎症反应后可抑制这种促进作用; IL-6和IL-8可能参与了COPD慢性炎症环境对肺癌生长及转移的促进过程。

## 参考文献

1. Zhai R, Yu X, Shafer A, et al. The impact of coexisting COPD on survival of patients with early-stage non-small cell lung cancer undergoing surgical resection[J]. *Chest*, 2014, 145(2): 346-353.
2. 杜建飞, 崔立春, 耿会生, 等. 慢性阻塞性肺疾病合并肺癌与单纯肺癌临床特征差异的分析[J]. *中华肺部疾病杂志(电子版)*, 2016, 9(3): 275-277.  
DU Jianfei, CUI Lichun, GENG Huisheng, et al. Retrospective analysis of clinical features differences for lung cancer patients with or without chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Chinese Journal of lung Disease. Electronic Edition*, 2016, 9(3): 275-277.
3. 黄晋博. 慢性阻塞性肺疾病与肺癌关系的临床研究[J]. *临床医药文献电子杂志*, 2016, 3(34): 6721.  
HUANG Jinbo. The clinical study of the relationship between chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer[J]. *Journal of Clinical Medical Literature, Electronic Edition*, 2016, 3(34): 6721.
4. 朱佑明, 陈文慧, 代华平. 肺癌患者发生肺栓塞的相关危险因素及对预后的影响[J]. *实用临床医药杂志*, 2016, 20(13): 25-28.  
ZHU Youming, CHEN Wenhui, DAI Huaping. Risk factors of pulmonary embolism in patients with lung cancer and its influence on prognosis[J]. *Journal of Clinical Medicine in Practice*, 2016, 20(13): 25-28.
5. 包晨, 杨冬. COPD合并肺癌的发病机制与治疗进展[J]. *国际呼*



- 吸杂志, 2016, 36(8): 607-611.
- BAO Chen, YANG Dong. Progress in pathogenesis and treatment of COPD combined with lung cancer[J]. International Journal of Respiration, 2016, 36(8): 607-611.
6. 金珊珊, 陈小岚, 王兴友, 等. 糖皮质激素与 COPD 合并肺癌[J]. 国际呼吸杂志, 2016, 36(1): 56-59.
- JIN Shanshan, CHEN Xiaolan, WANG Xingyou. Association between glucocorticoid and COPD combined with lung cancer[J]. International Journal of Respiration, 2016, 36(1): 56-59.
7. 汪治山, 吴勇德. 慢性阻塞性肺疾病合并肺癌108例临床分析[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(4): 966-967.
- WANG Zhishan, WU Yongde. Clinical analysis of 108 cases of chronic obstructive pulmonary disease complicated with lung cancer[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2016, 36(4): 966-967.
8. 伍超群, 任永永, 赵佳等. 云南省宣威地区慢性阻塞性肺病与肺癌的关系[J]. 基础医学与临床, 2015, 35(9): 1271-1275.
- WU Chaoqun, REN Yongyong, ZHAO Jia, et al. The relation between chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer in Xuanwei city, Yunnan province[J]. Basic & Clinical Medicine, 2015, 35(9): 1271-1275.
9. 王海涛, 许靖, 张舒, 等. 中国汉族人群COPD吸烟史患者HHIP 基因多态性与肺癌的相关性研究[J]. 西部医学, 2016, 28(8): 1118-1121.
- WANG Haitao, XU Jing, ZHANG Shu, et al. Association of HHIP gene polymorphism and lung cancer in Chinese Han population with COPD smoking history[J]. Medical Journal of West China, 2016, 28(8): 1118-1121.
10. García García Mdel C, Hernández Borge J, Pires Goncalves P, et al. Cancer in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) Patients[J]. Chest, 2014, 145(3 Suppl): 422A.
11. Sohal SS, Reid D, Soltami A, et al. Reticular basement membrane fragmentation and potential epithelial mesenchymal transition is exaggerated in the airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Respirology, 2010, 15(6): 930-938.
12. 张雪, 费霞, 张旻, 等. COPD患者糖皮质激素不敏感的发生机制和应对策略研究进展[J]. 国际呼吸杂志, 2016, 36(21): 1643-1647.
- ZHANG Xue, FEI Xia, ZHANG Min, et al. Development of pathogenetic mechanism and coping strategies in chronic obstructive pulmonary disease with glucocorticoid insensitivity[J]. International Journal of Respiration, 2016, 36(21): 1643-1647.
13. Adcock IM, Caramori G, Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer: new molecular insights[J]. Respiration, 2011, 81(4): 265-284.
14. Lee G, Walser TC, Dubinett SM. Chronic inflammation, chronic obstructive pulmonary disease, and lung cancer[J]. Curr Opin Pulm Med, 2009, 15(4): 303-307.
15. Deschênes-Simard X, Kottakis F, Meloche S. ERKs in cancer: friends or foes?[J]. Cancer Res, 2014, 74(2): 412-419.

本文引用: 宋淑范, 辛平. 炎症细胞因子 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8 对慢性阻塞性肺疾病模型小鼠肺癌生长及转移的影响[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(11): 2323-2331. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.11.007

**Cite this article as:** SONG Shufan, XIN Ping. Effect of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-8 on the growth and metastasis of lung cancer in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2017, 37(11): 2323-2331. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.11.007