



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.07.023  
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.07.023  
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(7):1043-1045.

· 简要论著 ·

# 原发性肝癌患者外周血中 IL-32 表达水平及意义研究

杨生虎<sup>1</sup>, 李晓峰<sup>1</sup>, 秦伟<sup>1</sup>, 陈亮<sup>2</sup>

(1. 青海大学附属医院 腹部腔镜外科, 青海 西宁 810001; 2. 湖北医药学院附属人民医院 普通外科, 湖北 十堰 442200)

## 摘要

**目的:** 探讨原发性肝癌患者外周血中 IL-32 表达水平及临床意义。

**方法:** 选择 40 例原发性肝癌患者(肝癌组)与 20 例健康体检者(对照组), 收集两组的外周血, 用 TRIzol 试剂提取外周血中淋巴细胞总 RNA, 分别用 real-time PCR 与 ELISA 检测 IL-32 mRNA 与蛋白的表达, 分析肝癌患者 IL-32 表达水平与 AFP 表达水平的相关性。

**结果:** 肝癌组患者外周血中 IL-32 表达在 RNA 及蛋白质水平均高于对照组(均  $P < 0.05$ ); 原发性肝癌患者外周血中 IL-32 表达水平与 AFP 表达水平呈正相关( $r = 0.583$ ,  $P < 0.05$ )。

**结论:** 原发性肝癌患者外周血中 IL-32 表达增高, IL-32 可能与原发性肝癌的发病密切相关。

## 关键词

肝肿瘤 / 病理学; 白细胞介素 32; 相关性分析

中图分类号: R735.7

原发性肝癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一, 是全球第三位肿瘤相关死亡的疾病, 其进展快、预后差、易复发, 术后 5 年生存率约为 30%~40%<sup>[1-2]</sup>。我国是原发性肝癌的高发地区, 每年死于原发性肝癌的患者约 58.9 万人。原发性肝癌的发生、发展是多种因素、多个阶段的复杂过程, 乙肝病毒感染、丙肝病毒感染、酒精等与肝癌的发生、发展密切相关。近年的研究认为机体免疫系统失调在原发性肝癌的发生、发展中起重要作用, 细胞毒性 T 细胞、CD4<sup>+</sup>T 细胞、Treg 细胞、NK 细胞等免疫细胞及 IL-8、TNF- $\alpha$  等细胞因子均涉及原发性肝癌的发病<sup>[3-4]</sup>。白细胞介素 32 (IL-32) 是一种促炎症细胞因子, 可诱导 TNF- $\alpha$ 、IL-8 等细胞因子表达, 与胃癌<sup>[5]</sup>、乳腺癌<sup>[6]</sup>的发病密切相关。乙肝病毒<sup>[7]</sup>、丙肝病毒<sup>[8]</sup>可诱导 IL-32 表达, 慢性乙型病毒性肝炎、丙型病毒性肝炎患者肝组织及外周血中 IL-32 表达增高, 且其表达水平与肝组织炎症、纤维化程度呈正相关<sup>[8-9]</sup>。因此, 本研究收集原发性肝癌患者外周血, 检测 IL-32 表达水平, 并分析其与甲胎蛋白 (AFP) 的

相关性, 探讨 IL-32 在原发性肝癌发病中的作用。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

青海大学附属医院肝胆外科 2013 年 2 月—2014 年 10 月收治的 40 例原发性肝癌患者(肝癌组), 其中男 25 例, 女 15 例; 年龄 29~70 岁, 平均年龄(49.5  $\pm$  20.2) 岁。诊断标准参照美国肝病学会 2011 年修订的《肝细胞癌管理指南》<sup>[10]</sup>, 排除合并 HIV 病毒、真菌等其他病原体感染。对照组为 20 例在青海大学附属医院体检中心体检的健康人, 男 12 例, 女 8 例; 年龄 23~65 岁, 平均(44.6  $\pm$  15.3) 岁。两组在性别、年龄上比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 1.2 标本收集及 AFP 检测

肝癌组和对照组均于晨起采空腹肘静脉血 10 mL, 6 mL 放入含肝素的无菌抗凝管, 用 Ficoll 密度梯度离心法分离和纯化外周血单个核细胞。4 mL 放入非抗凝干燥无菌真空管中, 室温静置 60 min 自行凝固, 然后以 1 200 r/min 离心 10 min, 收集上清液并分装于 EP 管内, 置 -80  $^{\circ}$ C 冰箱低温冷冻保存。AFP 检测采用雅培 AXSYM 化学发光仪, 试剂盒购自雅培公司, 按说明书操作。

收稿日期: 2015-04-16; 修订日期: 2015-06-14。

作者简介: 杨生虎, 青海大学附属医院副主任医师, 主要从事腹部外科基础及临床疾病方面的研究。

通信作者: 秦伟, Email: 421490927@qq.com

### 1.3 总RNA提取及 real-time PCR

细胞总RNA用TRIzol试剂盒按说明书提取(Invitrogen公司)。将提取的总RNA用反转录试剂盒(Toyobo公司)反转录为cDNA,具体步骤按说明书操作。用Real-time PCR Faststart Universal SYBR Green Master (Rox)试剂盒(Roche公司)按说明书操作步骤扩增。扩增IL-32的引物如下<sup>[11]</sup>: 5'-CGA CTT CAA AGA GGG CTA CC-3', 5'-GAG TGA GCT CTG GGT GCT G-3'。

### 1.4 ELISA 检测

ELISA试剂盒(BioLegend公司)检测血清中IL-32蛋白表达水平。具体步骤按说明书操作。

### 1.5 统计学处理

分析数据用SPSS 17.0软件。两组间均数比较采用 $t$ 检验,相关性分析采用Pearson相关性分析法。 $P<0.05$ 为是有统计学差异。

## 2 结 果

### 2.1 原发性肝癌患者外周血中 IL-32 mRNA 表达

收集肝癌组及对照组外周血, Ficoll密度梯度离心法分离提取外周血淋巴细胞, TRIzol提取细胞总RNA, 反转录试剂盒转录为cDNA, 用real-time PCR检测IL-32 mRNA表达水平。结果显示肝癌组IL-32 mRNA表达高于对照组, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ) (图1)。

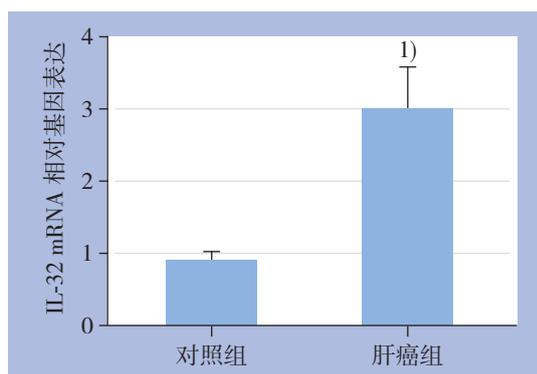


图1 外周血中IL-32 mRNA表达水平 注: 1) 与对照组比较,  $P<0.05$

### 2.2 原发性肝癌患者外周血中 IL-32 蛋白表达

收集肝癌组及对照组外周血, 离心获得血清, ELSIA检测IL-32蛋白表达水平。结果显示肝癌组IL-32蛋白表达水平高于对照组, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ) (图2)。

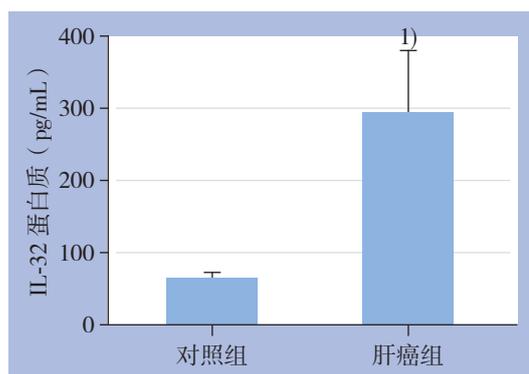


图2 外周血中IL-32蛋白质表达水平 注: 1) 与对照组比较,  $P<0.05$

### 2.3 原发性肝癌患者外周血中 IL-32 表达水平与 AFP 的相关性

原发性肝癌患者AFP的检测值为(13 180.25 ± 2 653.74) ng/L。Pearson相关性分析显示, 外周血中IL-32表达水平与AFP值呈正相关( $r=0.583$ ,  $P<0.05$ )。

## 3 讨 论

原发性肝癌发病率高, 预后差, 我国是原发性肝癌的高发地区, 其发生、发展是多种因素、多个阶段的复杂过程。目前的研究认为机体免疫系统失调在原发性肝癌的发生、发展中起重要作用, 细胞毒性T细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞、Treg细胞、NK细胞等免疫细胞及IL-8、TNF- $\alpha$ 等细胞因子均涉及原发性肝癌的发病<sup>[3-4]</sup>。本研究结果显示原发性肝癌患者外周血中IL-32表达增高, 且IL-32表达水平与AFP值呈正相关。IL-32是一种促炎症细胞因子, 而炎症与肿瘤的发生发展密切相关, 研究证实IL-32在胃癌、乳腺癌的发生发展中起重要作用<sup>[5-6]</sup>。因此笔者推测IL-32可能与原发性肝癌的发生发展密切相关。

最新的研究证实原发性肝癌患者肝组织中IL-32表达增高, 认为IL-32参与原发性肝癌的发病, 并推测IL-32可作为原发性肝癌的诊断指标<sup>[12]</sup>。本研究证实原发性肝癌患者外周血中IL-32表达增高, 且其表达水平与AFP呈正相关; 以前的研究证实大多数原发性肝癌患者血清AFP表达增高, 检测AFP可作为原发性肝癌诊断、监控治疗反应的指标<sup>[13-14]</sup>。因此, 本研究进一步证实IL-32可能参与原发性肝癌的发生发展, 并可作为原发性肝癌的

诊断指标。接下来须扩大样本量,明确IL-32作为原发性肝癌诊断指标的可行性及敏感性。AFP主要在胎儿肝中合成,出生后表达量逐渐下降,但当肝细胞发生癌变时,肝细胞又恢复产生这种蛋白质的功能,随着病情恶化AFP在血清中的含量会急剧增加;乙肝病毒、丙肝病毒等均可诱导肝细胞表达IL-32增高,慢乙肝、慢丙肝是引起肝癌的主要原因,且肝癌患者IL-32表达亦增高,因此肝癌发生时肝细胞表达IL-32增高、又恢复产生AFP的能力,这或许是IL-32与AFP表达呈正相关的原因之一,两者之间是否互相影响其表达有待进一步研究证实。

IL-32是一种促炎症细胞因子,可以诱导淋巴细胞等免疫细胞表达TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$ 等细胞因子<sup>[15-16]</sup>,而TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 等细胞因子亦可诱导肝细胞表达IL-32<sup>[8]</sup>,原发性肝癌患者外周血中IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 等细胞因子表达增高,与原发性肝癌的发病密切相关<sup>[3-4]</sup>,乙肝病毒感染、丙肝病毒感染是引起肝癌发生的重要因素,而乙肝病毒<sup>[7]</sup>、丙肝病毒<sup>[8]</sup>均可诱导IL-32表达增高。因此我们推测乙肝病毒、丙肝病毒感染后诱导IL-32等细胞因子表达增高,增高的IL-32与TNF- $\alpha$ 、IL-6等细胞因子互相影响,导致免疫紊乱,引起体内细胞因子网络活化,参与原发性肝癌发生发展。

综上所述,本研究发现原发性肝癌患者外周血中IL-32表达增高,其表达水平与AFP呈正相关;IL-32可能与原发性肝癌的发病密切相关。

#### 参考文献

- [1] Aravalli RN, Steer CJ, Cressman EN. Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2008, 48(6):2047-2063.
- [2] Shi L, Feng Y, Lin H, et al. Role of estrogen in hepatocellular carcinoma: is inflammation the key?[J]. *J Transl Med*, 2014, 12:93. doi: 10.1186/1479-5876-12-93.
- [3] Aravalli RN. Role of innate immunity in the development of hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(43):7500-7514.
- [4] Mossanen JC, Tacke F. Role of lymphocytes in liver cancer[J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2(11):e26468.

- [5] Tsai CY, Wang CS, Tsai MM, et al. Interleukin-32 increases human gastric cancer cell invasion associated with tumor progression and metastasis[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(9):2276-2288.
- [6] Wang S, Chen F, Tang L. IL-32 promotes breast cancer cell growth and invasiveness[J]. *Oncol Lett*, 2015, 9(1):305-307.
- [7] Pan X, Cao H, Lu J, et al. Interleukin-32 expression induced by hepatitis B virus protein X is mediated through activation of NF-kappaB[J]. *Mol Immunol*, 2011, 48(12/13):1573-1577.
- [8] Moschen AR, Fritz T, Clouston AD, et al. Interleukin-32: a new proinflammatory cytokine involved in hepatitis C virus-related liver inflammation and fibrosis[J]. *Hepatology*, 2011, 53(6):1819-1829.
- [9] Xu Q, Pan X, Shu X, et al. Increased interleukin-32 expression in chronic hepatitis B virus-infected liver[J]. *J Infect*, 2012, 65(4):336-342.
- [10] Bruix J, Sherman M, American Association for the Study of Liver Diseases. Management of hepatocellular carcinoma: an update[J]. *Hepatology*, 2011, 53(3):1020-1022.
- [11] Kobayashi H, Lin PC. Molecular characterization of IL-32 in human endothelial cells[J]. *Cytokine*, 2009, 46(3):351-358.
- [12] Kang YH, Park MY, Yoon DY, et al. Dysregulation of overexpressed IL-32alpha in hepatocellular carcinoma suppresses cell growth and induces apoptosis through inactivation of NF-kappaB and Bcl-2[J]. *Cancer Lett*, 2012, 318(2):226-233.
- [13] Grimm CF, Ortmann D, Mohr L, et al. Mouse alpha-fetoprotein-specific DNA-based immunotherapy of hepatocellular carcinoma leads to tumor regression in mice[J]. *Gastroenterology*, 2000, 119(4):1104-1112.
- [14] Schafer DF, Sorrell MF. Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 1999, 353(9160):1253-1257.
- [15] Dinarello CA, Kim SH. IL-32, a novel cytokine with a possible role in disease[J]. *Ann Rheum Dis*, 2006, 65(Suppl 3):iii61-64.
- [16] Kim SH, Han SY, Azam T, et al. Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNFalpha[J]. *Immunity*, 2005, 22(1):131-142.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 杨生虎, 李晓峰, 秦伟, 等. 原发性肝癌患者外周血中IL-32表达水平及意义研究[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(7):1043-1045. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.07.023

Cite this article as: YANG XH, LI XF, QIN W, et al. Expression and significance of IL-32 in serum of primary hepatocellular carcinoma[J]. *Chin J Gen Surg*, 2015, 24(7):1043-1045. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.07.023