



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.07.004
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.07.004
China Journal of General Surgery, 2023, 32(7):994-1003.

· 专题研究 ·

血清白细胞介素34与肝癌肝移植临床预后的关系及其作用机制

田秉璋, 姜世豪, 陈云, 李吉滨, 黄怀银, 刘初平, 周宁

(湖南师范大学附属第一医院/湖南省人民医院 肝胆外科/肝胆胰肠疑难病诊疗中心, 湖南长沙 410011)

摘要

背景和目的: 肝移植在肝癌的治疗中发挥了越来越重要的作用。目前移植术后肿瘤复发与转移的临床问题尚未解决。本研究旨在分析白细胞介素34 (IL-34) 表达与肝癌肝移植受者预后、肿瘤复发与转移的关系, 并探讨其在肝癌生长和转移中的作用机制。

方法: 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测 93 例肝癌肝移植受者术前血清中 IL-34 表达情况, 用统计学方法分析 IL-34 表达与临床病理特征和预后的关系; 用受试者工作特征 (ROC) 曲线分析 IL-34 检测肿瘤复发和转移的诊断价值。取雄性 5~6 周龄 NOD/SCID 小鼠建立人源性肝癌原位移植瘤模型, 并随机分为 4 组, 分别腹腔注射不同浓度的 IL-34 (5、10、35 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (干预组) 及等量生理盐水 (对照组), 1 次/d, 共 2 周。比较 10 周后各组小鼠总体生存率、移植瘤体积与质量、肺组织转移情况; 用 Western blot 检测各组移植瘤中细胞增殖相关蛋白 (Ki-67 与 PCNA)、肿瘤转移相关蛋白 (MMP-2 与 MMP-9)、上皮-间充质转化 (EMT) 相关蛋白 (E-cadherin、vimentin 和 snail) 的表达。

结果: 经 5 年随访, 93 例肝癌肝移植受者中肿瘤复发 27 例、转移 9 例、死亡 45 例。肿瘤复发和转移患者中 IL-34 表达水平明显低于肿瘤未复发和未转移患者 (均 $P<0.05$); IL-34 低表达与肿瘤复发、转移、血管侵犯呈负相关 (均 $P<0.05$); IL-34 低表达患者 5 年总体生存率和无瘤生存率明显低于 IL-34 高表达患者 (均 $P<0.05$)。IL-34 低表达、肿瘤复发与转移是影响总体生存率的独立危险因素 (均 $P<0.05$)。血清 IL-34 检测肿瘤复发与转移曲线下面积 (AUC) 分别为 0.93 与 0.79, 优于甲胎蛋白 (AFP)。与对照组比较, 3 个 IL-34 干预组小鼠总体生存率增加, 移植瘤体积与重量减少, 肺组织转移率和转移灶数量降低, 移植瘤中 Ki-67、PCNA、MMP-2、MMP-9、vimentin、snail 蛋白表达水平降低而 E-cadherin 表达水平增加, 且均呈浓度依赖性 (均 $P<0.05$)。

结论: 血清 IL-34 低表达与肝癌肝移植受者不良预后、肿瘤复发与转移密切相关。IL-34 具有对抗肝癌生长与转移的作用, 机制可能与抑制细胞增殖和 EMT 有关。

关键词

肝肿瘤; 肝移植; 白细胞介素 34; 预后

中图分类号: R735.7

基金项目: 湖南省肝胆胰肠疾病治疗能力提升项目子课题基金资助项目 (湘卫医政医管处便函 [2019] 118 号); 湖南省临床医疗技术创新引导基金资助项目 (2020SK50916, 2021SK50913); 湖南省长沙市科技计划基金资助项目 (kq2004117)。

收稿日期: 2022-09-20; **修订日期:** 2023-04-20。

作者简介: 田秉璋, 湖南省人民医院主任医师, 主要从事肝胆胰外科基础与临床方面的研究 (姜世豪为共同第一作者)。

通信作者: 周宁, Email: zhouning565@hunnu.edu.cn

Association of serum interleukin 34 with clinical prognosis in liver cancer transplant recipients and its mechanism of action

TIAN Bingzhang, JIANG Shihao, CHEN Yun, LI Jibin, HUANG Huaiyin, LIU Chuping, ZHOU Ning

(Department of Hepatobiliary Surgery/Center for Diagnosis and Treatment of Complex Hepatobiliary, Pancreatic, and Intestinal Diseases, the First Affiliated Hospital of Hunan Normal University/Hunan Provincial People's Hospital, Changsha 410011, China)

Abstract

Background and Aims: Liver transplantation has become increasingly crucial in treating liver cancer. However, the clinical issue of tumor recurrence and metastasis after transplantation remains unresolved. This study aimed to analyze the relationship between interleukin 34 (IL-34) expression and the prognosis, tumor recurrence, and metastasis in liver cancer transplant recipients. It also aimed to explore its role in the growth and metastasis of liver cancer.

Methods: The expression of preoperative serum IL-34 of 93 liver cancer transplant recipients was detected using the ELISA method. Statistical methods were used to analyze the relationship between IL-34 expression and clinicopathologic characteristics and prognosis. The diagnostic value of IL-34 in detecting tumor recurrence and metastasis was analyzed using the receiver operating characteristic (ROC) curve. Human hepatocellular carcinoma orthotopic xenograft models were established in male 5-6-week-old NOD/SCID mice, which were randomly divided into four groups and intraperitoneally injected with different concentrations of IL-34 (5, 10, 35 $\mu\text{g}/\text{kg}$) or an equal amount of saline (control group) once daily for a total of two weeks. After ten weeks, the overall survival rate, tumor volume and mass, and lung tissue metastasis of the mice in each group were compared. Western blot was used to detect the expression of cell proliferation-related proteins (Ki-67 and PCNA), tumor metastasis-related proteins (MMP-2 and MMP-9), and epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related proteins (E-cadherin, vimentin, and snail) in the transplanted tumors of each group.

Results: After a 5-year follow-up, among the 93 liver cancer transplant recipients, 27 cases experienced tumor recurrence, 9 cases experienced metastasis, and 45 cases died. The expression levels of IL-34 in patients with tumor recurrence or metastasis were significantly lower than those without tumor recurrence or metastasis (both $P < 0.05$). Low expression of IL-34 was negatively correlated with tumor recurrence, metastasis, and vascular invasion (all $P < 0.05$). The 5-year overall survival rate and tumor-free survival rate of patients with low IL-34 expression were significantly lower than those with high IL-34 expression (both $P < 0.05$). Low expression of IL-34 and tumor recurrence and metastasis were independent risk factors for overall survival (all $P < 0.05$). The area under the curve (AUC) for serum IL-34 in detecting tumor recurrence and metastasis was 0.93 and 0.79, respectively, superior to AFP. Compared with the control group, the overall survival rate of mice in the three IL-34 intervention groups increased, tumor volume and weight decreased, lung tissue metastasis rate and number of metastatic lesions decreased, and the expression levels of Ki-67, PCNA, MMP-2, MMP-9, vimentin, and snail proteins in the transplanted tumors decreased. In contrast, the expression level of E-cadherin increased, all of which showed a concentration-dependent relationship (all $P < 0.05$).

Conclusion: Low expression of serum IL-34 is closely associated with adverse prognosis, tumor recurrence, and metastasis in liver cancer transplant recipients. IL-34 inhibits the growth and metastasis of liver cancer, possibly through the inhibition of cell proliferation and EMT.

Key words

Liver Neoplasms; Liver Transplantation; Interleukin-34; Prognosis

CLC number: R735.7

原发性肝癌是一种高度侵袭的恶性肿瘤，常发生于慢性肝病和肝硬化患者，是全球癌症相关死亡的第三大原因^[1]。自从 Mazzaferro 等在 1996 年开创性应用肝移植成功治疗肝癌以来，越来越多的移植肿瘤学研究表明肝移植是肝癌的最佳治疗方法^[2-3]。我国每年肝癌肝移植例数占肝移植总例数的 30%~40%，而术后肿瘤复发和转移是当前制约肝癌肝移植发展的核心瓶颈，也是移植学界亟待解决的主要难题^[4]。白细胞介素 34 (interleukin 34, IL-34) 是 2008 年发现的一种新型细胞因子，参与调控骨髓细胞分化、增殖和存活，同时也与各种炎症和恶性肿瘤的发生发展密切相关^[5-7]。目前有关 IL-34 在肝癌肝移植复发与转移中的作用尚不清楚。本研究从临床血清样本分析 IL-34 表达与肝癌肝移植受者预后、肿瘤复发与转移的关系；并在小鼠人源性肝癌原位移植瘤模型中探讨 IL-34 在肝癌生长与转移中的作用机制，以期改善肝癌肝移植的临床诊疗提供研究基础。

1 资料(材料)与方法

1.1 临床血清标本采集及随访

收集 2013 年 6 月—2017 年 3 月在湖南省人民医院肝胆外科经肝移植术治疗的 93 例肝癌患者血清标本。采集患者术前、空腹 12 h 以上外周血 5 mL，无须抗凝，静置后离心分离血清，随后放入 -70 °C 保存。男性 64 例，女性 29 例；年龄 38~62 岁、平均年龄为 (48.53 ± 7.61) 岁。纳入标准：(1) 符合肝移植手术治疗标准的原发性肝癌；(2) 手术方式为经典原位肝移植术；(3) 随访数据完整。排除标准：(1) 肝癌患者伴有血管侵犯、淋巴结转移及肝外转移，无肝移植手术指征；(2) 患者伴有严重心、肝、肺、肾、脑功能障碍，凝血功能异常或出血倾向，无法耐受手术者；(3) 术后失访患者。通过医疗病案记录获取汇总患者临床资料，包括年龄、性别、肝硬化、肿瘤大小、组织学类型、分化程度、巴塞罗那分期 (BCLC) 以及甲胎蛋白 (AFP) 水平等。术后通过门诊就诊方式随访，时间间隔 2~3 个月，通过影像学相关检查监测肿瘤复发与转移、血管侵犯等情况，随访截止时间为 2022 年 2 月 28 日。总体生存期为开始随访至患者出现死亡的时间。无瘤生存期为开始随访至患者出现肿瘤复发的时间。本研究已获得湖南省人民医院医学研究伦理委员会批准 (批号：20170116)，所有患者

均已签署书面知情同意书。

1.2 主要试剂

人 IL-34 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒购于加拿大 Bioaim Scientific 公司；人 IL-34 重组蛋白购自美国 R&D 公司；人肝癌 Hep3B 细胞购自美国保藏物中心 (ATCC)；抗体购自美国 CST 公司：细胞增殖抗原 (Ki-67, 货号 9129)、基质金属蛋白酶 2 (MMP-2, 货号 87809)、MMP-9 (货号 13667)、波形蛋白 (vimentin) (货号 5741)、蜗牛同源物 1 样 1 蛋白 (snail, 货号 3879)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH; 货号 5174)，小鼠源性一抗：增殖细胞核抗原 (PCNA, 货号 2586)、钙黏附蛋白 E (E-cadherin; 货号 14472)。

1.3 ELISA 法检测血清 IL-34

将血清标本加入涂有 IL-34 抗体的 96 孔板，37 °C 孵育 2 h。辣根过氧化物酶偶联的 IL-34 二抗继续 37 °C 孵育 2 h。四甲基联苯胺 37 °C 孵育 30 min。采用酶标仪测量各孔在 450 nm 处的吸光度值。参照标准曲线，计算各血清样本 IL-34 表达水平。

1.4 实验动物饲养

100 只雄性 NOD/SCID 小鼠购自中国赛业生物公司 (周龄：5~6 周，体质量：20~25 g) 在 SPF 级环境中饲养，温度 22~25 °C、相对湿度 50%、黑暗/光照周期：12 h/12 h，噪声低于 50 dB，自由进食与饮水。本研究动物实验严格遵循“3R 原则”，并已获得湖南省人民医院医学研究伦理委员会批准 (编号：20170116)。

1.5 小鼠人源性肝癌原位移植瘤模型构建

小鼠禁食、禁水 4 h，以 35 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射进行麻醉。待成功后，参照文献^[8]以 Hep3B 细胞制作肝癌原位移植瘤模型。具体操作为：用基质胶将 Hep3B 细胞调整至 6×10^7 /mL。常规备皮、消毒，用眼科剪沿腹部正中中线从剑突向下做一约 1.5~2.0 cm 的纵向切口，使用细弯钩暴露肝左叶，用微量注射针吸取 50 μ L Hep3B 细胞，沿肝叶长轴方向与肝面平行 20° 角进针，缓慢注入肝组织中。之后用无菌棉签压迫止血，5 mL/kg 庆大霉素腹腔注射抗感染，并使用 4-0# 非吸收性缝合线依次缝合腹膜和皮肤。

1.6 实验分组和干预处理

小鼠造模成功后，随机分成对照组和低、中、高 IL-34 干预组，每组 18 只。以低、中、高剂量 IL-34 (5、10、35 μ g/kg) 腹腔注射，对照组腹腔注射等量生理盐水，1 次/d，共 2 周。每周采用小

动物B超成像仪对接肿瘤动物进行观察,记录肿瘤生长。饲养10周后对所有小鼠进行安乐死处理,获取肝脏和肺脏,并剥离肝脏中的移植瘤,采用微型游标卡尺测量移植瘤大小,并计算体积,按公式: $V = (a \times b^2) / 2$, 其中“a”代表肿瘤最长直径,“b”代表肿瘤最短直径。

1.7 苏木精-伊红(HE)染色

将新鲜的肺脏组织用4%多聚甲醛37℃固定48h,经脱水、石蜡包埋、制片、脱蜡、水化过程处理。之后苏木精染液37℃染色7min,0.3%酸性酒精分化30s,伊红染液染色30s。最后用封固剂封固盖玻片,采用光学显微镜观察。

1.8 Western blot检测

取新鲜的移植瘤组织,用含有1%蛋白酶抑制剂的裂解液提取总蛋白。将各组总蛋白浓度定量为 $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。制作12%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶,每孔上样 $40 \mu\text{g}$ 总蛋白,常规电泳分离,然后将蛋白转移到PVDF膜。将膜使用5%脱脂牛奶封闭2h,于一抗4℃孵育过夜,抗体工作稀释倍数如下:Ki-67(1:1 000)、PCNA(1:1 000)、MMP-2(1:1 000)、MMP-9(1:500)、E-cadherin(1:2 000)、vimentin(1:2 500)、snail(1:1 000)、GAPDH(1:1 000)。将膜与二抗(1:2 000)37℃孵育60min。利用超灵敏ECL检测试剂进行显色,采用凝胶成像系统进行图片拍照。以GAPDH蛋白为参照,通过Image J软件分析目的蛋白表达水平。

1.9 统计学处理

采用SPSS 27.0软件进行统计学分析。半定量资料采用 χ^2 检验进行统计学比较。计量资料以均

数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用t检验进行两组之间的统计学比较;采用单因素方差分析进行 ≥ 3 组之间的统计学比较,事后两两比较采用Bonferroni法。采用Kaplan-Meier曲线与Log-rank检验分析IL-34表达与5年总体生存率和无瘤生存率的关系。采用单因素与多因素Cox回归模型评估总体生存率的影响因素。采用受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线分析IL-34和AFP检测肿瘤复发和转移的曲线下面积(AUC)、敏感度以及特异度。 $P < 0.05$ 界定为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝癌肝移植受者血清IL-34表达水平及其与临床病理特征之间的关系

93例肝癌肝移植术后,肿瘤复发27例、转移9例、死亡45例,复发率为29.03%、转移率为9.68%、病死率为48.39%。ELISA检测结果显示,肿瘤复发患者血清IL-34表达水平明显低于肿瘤未复发患者 [$(10.19 \pm 1.16) \text{ pg/mL}$ vs. $(13.53 \pm 1.92) \text{ pg/mL}$, $P < 0.05$];肿瘤转移患者血清IL-34表达水平明显低于肿瘤未转移患者 [$(10.48 \pm 1.45) \text{ pg/mL}$ vs. $(12.78 \pm 2.26) \text{ pg/mL}$, $P < 0.05$] (图1)。以血清IL-34表达的中位数值(12.23 pg/mL),将93例肝癌肝移植受者分为两组:低表达组47例与高表达组46例。 χ^2 检验分析发现,IL-34低表达与肿瘤复发、转移、血管侵犯呈负相关(均 $P < 0.05$),但与年龄、性别、肝硬化、肿瘤大小、组织学类型、分化程度、BCLC分期、AFP水平无相关(均 $P > 0.05$) (表1)。

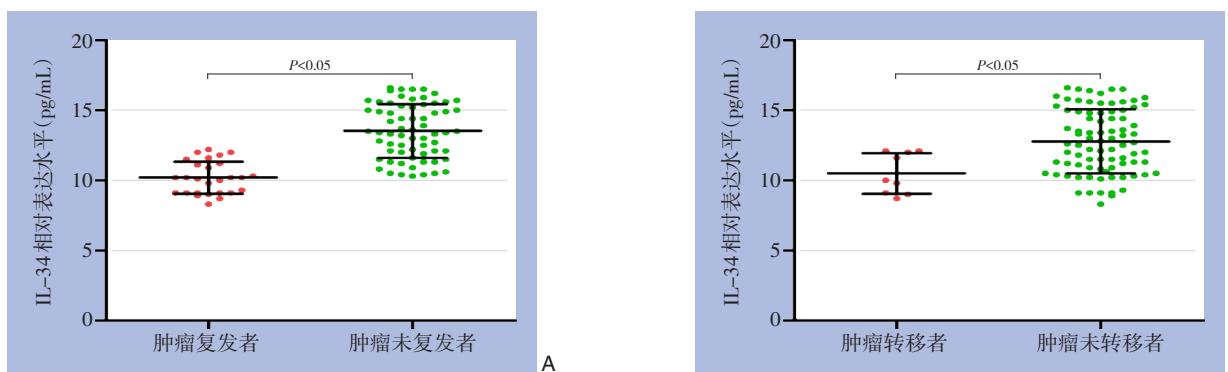


图1 肝癌肝移植受者血清IL-34表达水平 A: 肿瘤复发者与未复发者血清IL-34表达比较; B: 肿瘤转移者与未转移者血清IL-34表达比较

Figure 1 Expression levels of IL-34 in the serum of liver cancer transplant recipients A: Comparison of IL-34 expression in the serum of patients with tumor recurrence and those without recurrence; B: Comparison of IL-34 expression in the serum of patients with tumor metastasis and those without metastasis

表1 血清IL-34表达水平与肝癌肝移植受者临床病理特征之间的关系[n(%)]

临床病理特征	例数(n)	低表达	高表达	χ^2	P	临床病理特征	例数(n)	低表达	高表达	χ^2	P
年龄(岁)						AFP(ng/mL)					
<60	60	34(36.56)	26(27.96)	2.54	0.11	<20	13	6(6.45)	7(7.53)	0.12	0.73
≥60	33	13(13.98)	20(21.51)			≥20	80	41(44.09)	39(41.94)		
性别						BCLC分期					
男	64	29(31.18)	35(37.63)	2.24	0.13	0	38	17(18.28)	21(22.58)	0.87	0.35
女	29	18(19.35)	11(11.83)			A	55	30(32.26)	25(26.88)		
肝硬化						肿瘤复发					
否	53	23(24.73)	30(32.26)	2.51	0.11	否	66	28(30.11)	38(40.86)	5.99	0.01
是	40	24(25.81)	16(17.20)			是	27	19(20.43)	8(8.60)		
组织学类型						肿瘤转移					
肝细胞癌	85	42(45.16)	43(46.24)	0.50	0.48	否	84	38(40.86)	46(49.46)	9.75	<0.01
肝内胆管细胞癌	8	5(5.38)	3(3.23)			是	9	9(9.68)	0(0.0)		
肿瘤大小(cm)						血管侵犯					
<3	51	23(24.73)	28(30.11)	1.34	0.25	否	72	32(34.41)	40(43.01)	4.74	0.03
≥3	42	24(25.81)	18(19.35)			是	21	15(16.13)	6(6.45)		
分化程度											
良好/中等	63	30(32.26)	33(35.48)	0.67	0.42						
差	30	17(18.28)	13(13.98)								

2.2 肝癌肝移植受者血清IL-34表达水平与预后的关系

Kaplan-Meier曲线分析结果显示,血清IL-34低表达患者5年总体生存率和无瘤生存率低于IL-34高表达患者(均 $P<0.05$)(图2)。单因素Cox回归模型分析结果显示,高BCLC分期、肿瘤复发与转移、血管侵犯以及IL-34低表达是影响总体生存率的危险因素(均 $P<0.05$);多因素Cox回归模型分析结果显示,IL-34低表达、肿瘤复发与转移是影响总体生存率的独立危险因素(均 $P<0.05$)(表2)。

2.3 血清IL-34检测肝癌肝移植受者肿瘤复发与转移的诊断价值

ROC曲线分析结果显示,血清IL-34和AFP检测肿瘤复发的AUC分别为0.93与0.69,敏感度分别为80.45%与62.17%,特异度分别为82.19%与64.83%,血清IL-34对肿瘤复发的诊断价值优于AFP($P<0.05$);血清IL-34和AFP检测肿瘤转移AUC分别为0.79与0.56,敏感度分别为62.41%与51.89%,特异度分别为65.16%与55.42%。血清IL-34对肿瘤转移的诊断价值优于AFP(图3)。

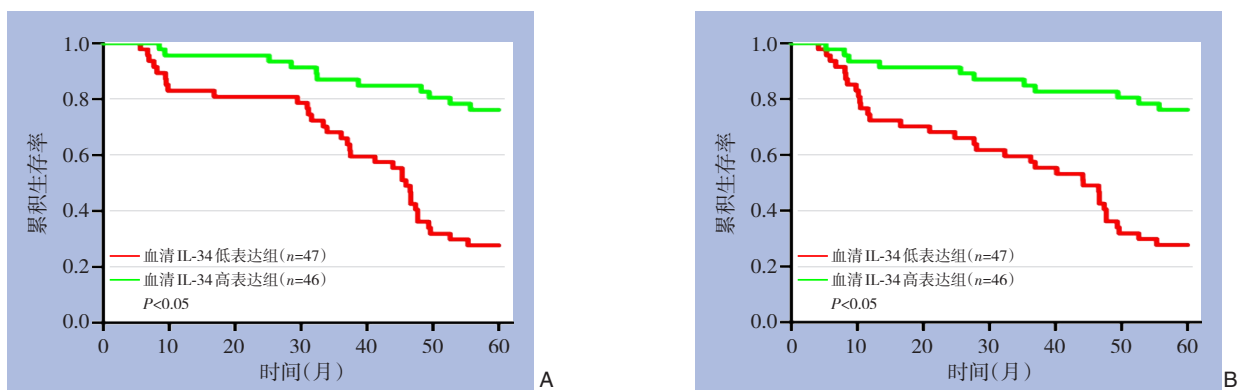


图2 Kaplan-Meier曲线分析血清IL-34表达水平与肝癌肝移植受者生存率 A: 总体生存率; B: 无瘤生存率

Figure 2 Kaplan-Meier curve analysis of the relationship between serum IL-34 expression levels and survival rates in liver cancer transplant recipients A: Overall survival rate; B: Tumor-free survival rate

表2 肝癌肝移植受者总体生存率影响因素的Cox回归模型分析

Table 2 Cox regression model analysis of factors influencing overall survival rate in liver cancer transplant recipients

因素	单因素		多因素	
	HR(95% CI)	P	HR(95% CI)	P
年龄(≥60岁 vs. <60岁)	1.29(0.52~1.87)	0.35	—	—
性别(女 vs. 男)	0.70(0.33~1.15)	0.74	—	—
肝硬化(是 vs. 否)	0.93(0.41~1.74)	0.69	—	—
组织学类型(肝内胆管细胞癌 vs. 肝细胞癌)	1.16(0.45~1.76)	0.67	—	—
肿瘤大小(≥3 cm vs. <3 cm)	1.25(0.61~1.94)	0.41	—	—
分化程度(差 vs. 良好/中等)	1.44(0.68~2.75)	0.26	—	—
AFP(≥20 ng/mL vs. <20 ng/mL)	0.51(0.29~1.28)	0.90	—	—
BCLC分期(A期 vs. 0期)	2.83(1.30~6.32)	<0.01	1.70(0.81~3.47)	0.12
肿瘤复发(是 vs. 否)	3.21(1.45~7.72)	<0.01	2.63(1.29~5.15)	<0.01
肿瘤转移(是 vs. 否)	3.09(1.32~7.55)	<0.01	2.25(1.16~4.30)	<0.01
血管侵犯(是 vs. 否)	2.65(1.24~5.87)	0.008	1.79(0.88~3.14)	0.10
IL-34表达(低 vs. 高)	4.28(2.35~7.82)	<0.01	1.81(1.10~3.73)	0.02

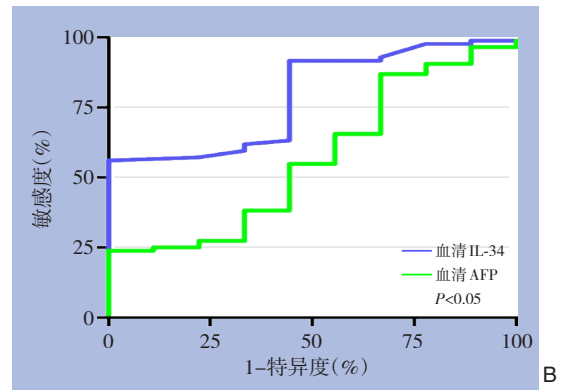
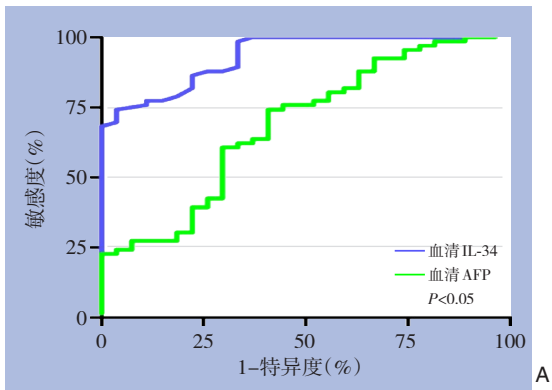


图3 ROC曲线分析血清IL-34和AFP检测对肝癌肝移植受者预后的诊断价值 A: 肿瘤复发; B: 肿瘤转移

Figure 3 ROC curve analysis of the diagnostic value of serum IL-34 and AFP in predicting the prognosis of liver cancer transplant recipients A: Tumor recurrence; B: Tumor metastasis

2.4 IL-34对人源性肝癌原位移植瘤小鼠预后的影响

与对照组比较,低、中、高IL-34干预组小鼠总体生存率增加,且高IL-34干预组>中IL-34干预组>低IL-34干预组(均P<0.05)(图4)。

2.5 IL-34对人源性肝癌原位移植瘤生长的影响

与对照组比较,低、中、高IL-34干预组小鼠移植瘤体积与质量减少,并且移植瘤中Ki-67和PCNA蛋白表达水平降低,差异均有统计学意义(均P<0.05)。上述指标变化量高IL-34干预组>中IL-34干预组>低IL-34干预组,差异均有统计学意义(均P<0.05)(图5-6)。

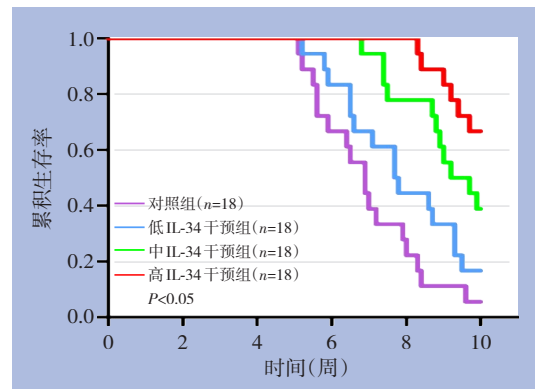


图4 Kaplan-Meier曲线分析各组小鼠总体生存率

Figure 4 Kaplan-Meier curve analysis of the overall survival rate in each group of mice

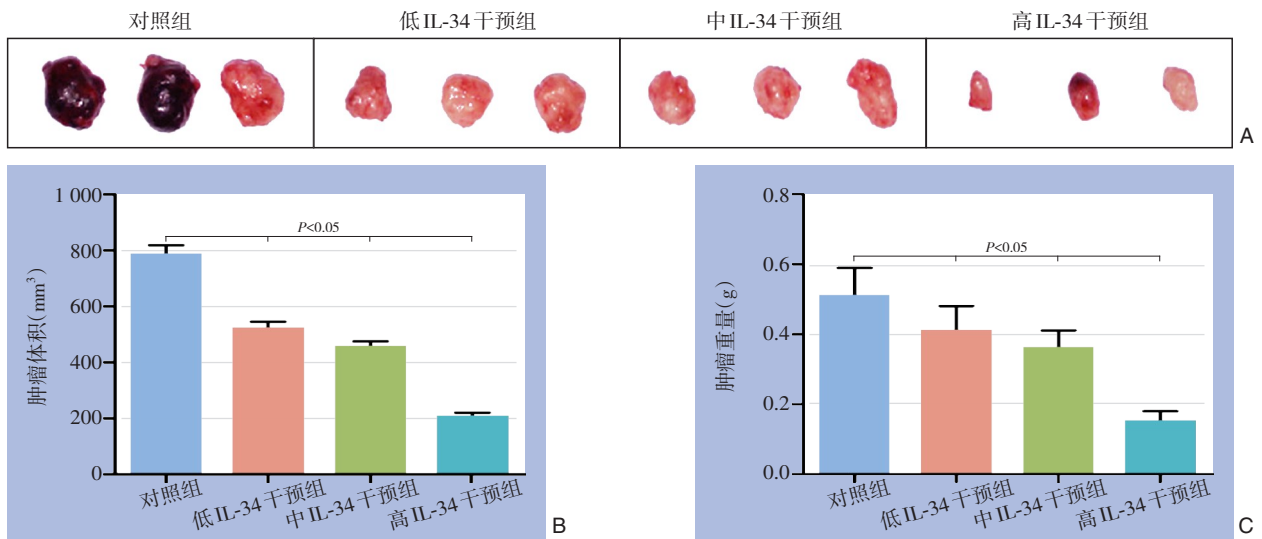


图5 各组小鼠移植瘤比较 A: 移植瘤外形; B: 移植瘤体积; C: 移植瘤质量

Figure 5 Comparison of transplanted tumors among different groups of mice A: Tumor morphology; B: Tumor volume; C: Tumor mass

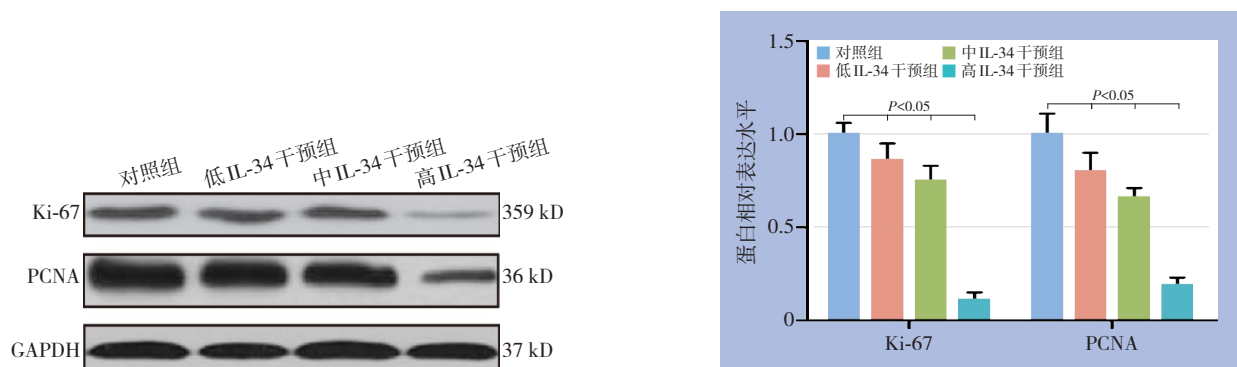


图6 各组小鼠移植瘤中Ki-67和PCNA蛋白表达水平

Figure 6 Expression levels of Ki-67 and PCNA proteins in transplanted tumors among different groups of mice

2.6 IL-34对人源性肝癌原位移植瘤转移的影响

与对照组比较,低、中、高IL-34干预组小鼠移植瘤肺组织转移率和转移灶数量降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),并且移植瘤中MMP-2、MMP-9、vimentin、snail蛋白表达水平降低,而

E-cadherin蛋白表达水平增加,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。上述指标变化量高IL-34干预组>中IL-34干预组>低IL-34干预组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$) (图7-8)。

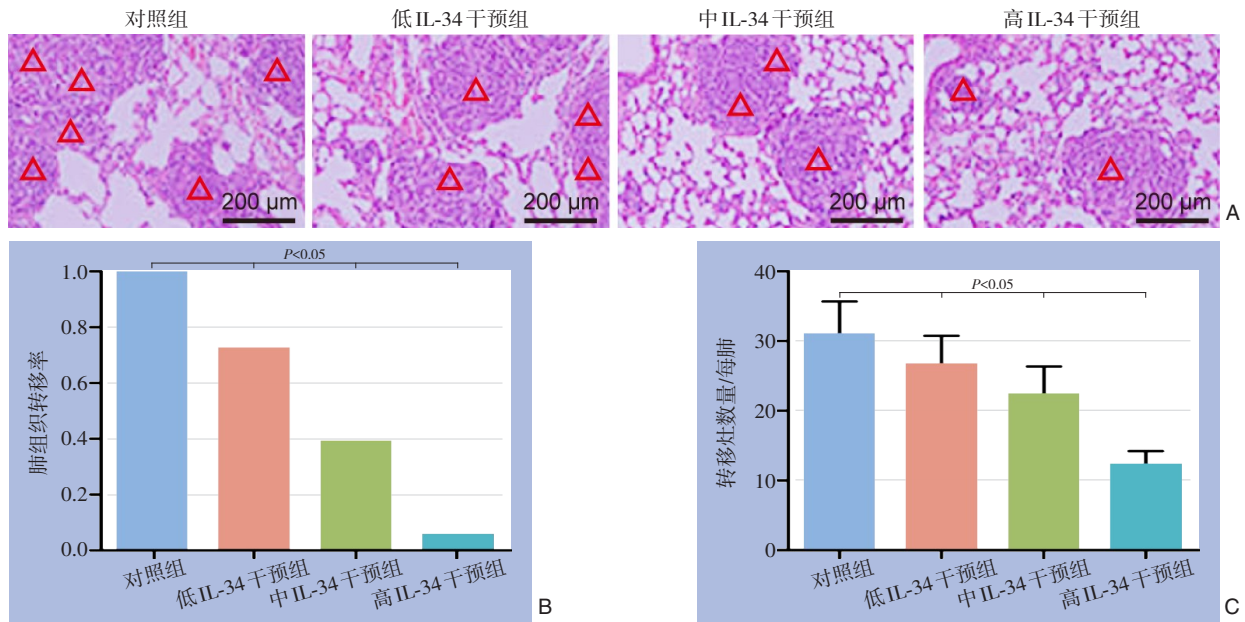


图7 各组小鼠移植瘤肺转移病理比较 A: HE染色(×400); B: 转移率; C: 转移灶数量

Figure 7 Pathological comparison of lung metastasis in transplanted tumors among different groups of mice A: HE staining (×400); B: Metastasis rate; C: Number of metastatic foci

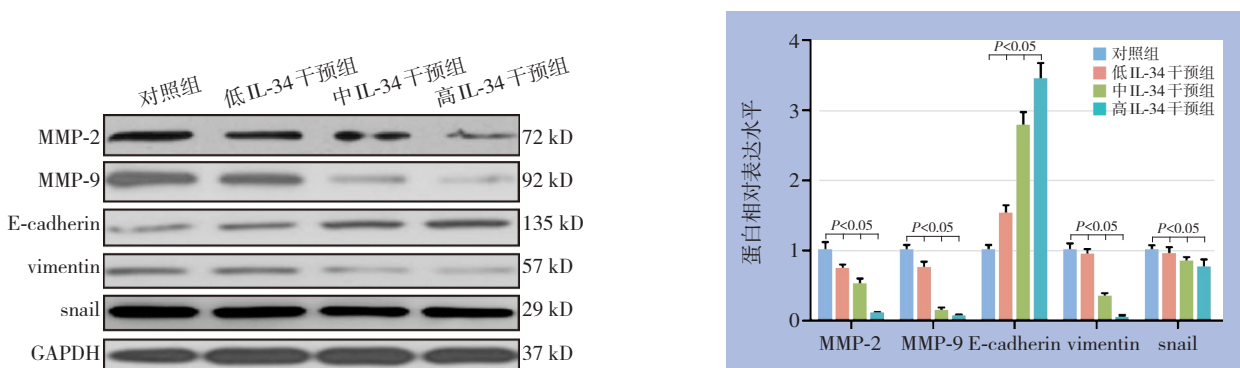


图8 各组小鼠移植瘤中MMP-2、MMP-9、E-cadherin、vimentin以及snail蛋白表达水平

Figure 8 Expression levels of MMP-2, MMP-9, E-cadherin, vimentin, and snail proteins in transplanted tumors among different groups of mice

3 讨论

目前肝癌肝移植术后肿瘤复发问题尚未解决。本研究中肝移植受者肝癌复发率为29.03%，与国外多中心研究结果基本一致^[9]；肝移植受者5年病死率为48.39%，与国内大型器官移植中心报道结果相近^[10]，但高于欧美等发达国家水平，其原因在于有较多的中期肝癌患者接受了肝移植治疗，引起术后肿瘤转移风险增加，从而降低了肝移植预后。因此，在我国当前国情之下，如何建立有效的肿瘤复发转移监测体系，以期早发现、早干预是移植学界的研究热点和难点。

白介素(IL)家族成员作为一类重要的细胞因子，其表达异常与肝癌生长和转移密切相关。例如，Hu等^[11]研究发现IL-36在肝癌患者癌组织中表达下降，与肿瘤远处转移相关。Deng等^[12]研究揭示肝癌患者癌组织中IL-8表达上调，与肿瘤大小和分化程度相关。Xi等^[13]研究报道IL-26高表达与肝癌患者微血管侵犯相关。IL-34在多种恶性肿瘤^[7]、自身免疫性疾病^[14]以及神经退行性疾病^[15]中表达上调并发挥重要调控作用。本研究发现肝癌肝移植术后肿瘤复发和转移患者中IL-34表达水平较肿瘤未复发和未转移患者降低，并且IL-34低表达与肿瘤复发、转移、血管侵犯呈负相关，提示IL-34

可能具有对抗肝癌复发和转移的作用。既往研究报道,弥漫性大B细胞淋巴瘤^[16]、三阴性乳腺癌^[17]以及直肠癌^[18]中IL-34表达与不良预后相关。本研究发现,IL-34低表达患者5年总体生存率和无瘤生存率低于IL-34高表达患者,并且IL-34低表达、肿瘤复发与转移是影响总体生存率的独立危险因素,与Noda等^[19]研究结果一致,提示IL-34可以作为肝癌肝移植受者预后的监测指标。

鉴于肝癌生物学特性复杂,除了AFP这一经典指标外^[20],需要开发更敏感的分子生物学指标对肝移植术后肿瘤复发和转移进行检测。目前报道的一些新蛋白标志物,如脱- γ -羧基凝血酶原^[21]、骨桥蛋白^[22]以及热休克蛋白90 α ^[23]等,其敏感度与特异度并不十分理想。本研究发现,血清IL-34检测肿瘤复发与转移AUC优于AFP,提示IL-34有作为预测肿瘤复发与转移的生物标志物的潜力。研究结果仍有待大样本、多中心、前瞻性研究进一步验证。

一些研究^[24]报道显示,IL-34合成增加会促进肿瘤发生与进展,但另外一些研究^[25]显示IL-34也具有出抗癌作用。为了明确IL-34在肝癌肝移植术后肿瘤复发与转移中的功能,本研究采用NOD/SCID小鼠建立人源性肝癌原位移植瘤模型,并给予低、中、高IL-34干预处理,发现IL-34干预增加小鼠总体生存率,减少移植瘤体积与重量,降低肺组织转移率和转移灶数量,并且高IL-34干预组>中IL-34干预组>低IL-34干预组,表明IL-34抑制肝癌生长与转移。该结果与Kong等^[26]和Irie等^[27]研究报道IL-34促进肝癌生长与转移的观点相悖,原因可能有以下几点:(1)动物品系不同;(2)肝癌细胞异质性;(3)IL-34干预方式不同。Ki-67是细胞有丝分裂的标志物,与肿瘤生长密切相关^[28]。PCNA是一种非组胺核蛋白,是细胞分裂的特异性标志物,与肿瘤增殖行为有关^[29]。作为MMP家族中的重要成员,MMP-2和MMP-9蛋白与淋巴浸润、肿瘤复发与转移密切相关^[30]。E-cadherin、vimentin、snail蛋白是上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的主要标志物,在肿瘤转移中起重要作用^[31]。本研究发现,IL-34干预降低移植瘤中Ki-67、PCNA、MMP-2、MMP-9、vimentin、snail蛋白表达,并增加E-cadherin蛋白表达,也从分子水平证实IL-34具有对抗肝癌复发与转移的作用。

综上所述,本研究发现血清IL-34低表达与肝癌肝移植受者不良预后、肿瘤复发与转移相关。IL-34具有对抗肝癌复发与转移的作用,机制可能与抑制细胞增殖和EMT有关。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:田秉璋、周宁负责实验设计、数据整合和分析以及论文撰写;周宁、姜世豪、陈云、李吉滨、黄怀银负责样本收集和实验实施,刘初平、周宁负责论文修改和校正。

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2022[J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72(1):7-33. doi: 10.3322/caac.21708.
- [2] Reichman TW, Bhati CS, Battula NR. Obtaining optimal long-term outcomes from liver transplantation for hepatocellular cancer[J]. *Dig Dis Sci*, 2019, 64(4): 976-984. doi: 10.1007/s10620-019-05550-5.
- [3] 肖亮,周乐杜. 肝癌外科治疗理念的革新与挑战[J]. *中国普通外科杂志*, 2021, 30(7): 753-760. doi: 10.7659/j. issn. 1005-6947.2021.07.001.
Xiao L, Zhou LD. Concept innovations and challenges in surgical treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *China Journal of General Surgery*, 2021, 30(7): 753-760. doi: 10.7659/j. issn. 1005-6947.2021.07.001.
- [4] 郑树森,程启阳,耿磊,等. 肝癌肝移植术后肝癌复发研究新进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2019, 28(7):773-778. doi: 10.7659/j. issn.1005-6947.2019.07.001.
Zheng SS, Cheng QY, Geng L, et al. Tumor recurrence after liver transplantation for hepatocellular carcinoma: recent research progress[J]. *China Journal of General Surgery*, 2019, 28(7): 773-778. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2019.07.001.
- [5] Lelios I, Cansever D, Utz SG, et al. Emerging roles of IL-34 in health and disease[J]. *J Exp Med*, 2020, 217(3): e20190290. doi: 10.1084/jem.20190290.
- [6] Ge Y, Huang M, Yao YM. Immunomodulation of interleukin-34 and its potential significance as a disease biomarker and therapeutic target[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(9): 1835-1845. doi: 10.7150/ijbs.35070.
- [7] Franzè E, Stolfi C, Troncone E, et al. Role of interleukin-34 in cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(1): 252. doi: 10.3390/cancers12010252.
- [8] Nishino H, Hollandsworth HM, Sugisawa N, et al. Sutureless surgical orthotopic implantation technique of primary and metastatic cancer in the liver of mouse models[J]. *In Vivo*, 2020, 34(6):3153-3157. doi: 10.21873/invivo.12149.

- [9] Verna EC, Patel YA, Aggarwal A, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: management after the transplant[J]. *Am J Transplant*, 2020, 20(2):333-347. doi: 10.1111/ajt.15697.
- [10] 高本见, 罗佳, 刘莹, 等. 挽救性肝移植与再次肝切除治疗术后复发性肝癌疗效对比的Meta分析[J]. *中国普通外科杂志*, 2020, 29(1):1-10. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2020.01.001.
- Gao BJ, Luo J, Liu Y, et al. Clinical efficacy of salvage liver transplantation versus repeat hepatectomy for recurrent hepatocellular carcinoma after hepatectomy: a Meta-analysis[J]. *China Journal of General Surgery*, 2020, 29(1):1-10. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2020.01.001.
- [11] Hu M, Tong Y, Fang HS, et al. IL36 indicating good prognosis in human Hepatocellular Carcinoma[J]. *J Cancer*, 2020, 11(21):6248-6255. doi: 10.7150/jca.47106.
- [12] Deng YY, Ning ZJ, Hu ZY, et al. High interleukin-8 and/or extracellular signal-regulated kinase 2 expression predicts poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(5):5215-5224. doi: 10.3892/ol.2019.10907.
- [13] Xi ZF, Jeong S, Wang CC, et al. Expression of IL-26 predicts prognosis of patients with hepatocellular carcinoma after surgical resection[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2019, 18(3):242-248. doi: 10.1016/j.hbpd.2019.03.006.
- [14] Freuchet A, Salama A, Bézie S, et al. IL-34 deficiency impairs FOXP3+ Treg function in a model of autoimmune colitis and decreases immune tolerance homeostasis[J]. *Clin Transl Med*, 2022, 12(8):e988. doi: 10.1002/ctm2.988.
- [15] Chhetri G. Emerging roles of IL-34 in neurodegenerative and neurological infectious disease[J]. *Int J Neurosci*, 2023, 133(6):660-671. doi: 10.1080/00207454.2021.1963962.
- [16] Noyori O, Komohara Y, Nasser H, et al. Expression of IL-34 correlates with macrophage infiltration and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Clin Transl Immunology*, 2019, 8(8):e1074. doi: 10.1002/cti2.1074.
- [17] Kajihara N, Kitagawa F, Kobayashi T, et al. Interleukin-34 contributes to poor prognosis in triple-negative breast cancer[J]. *Breast Cancer*, 2020, 27(6):1198-1204. doi: 10.1007/s12282-020-01123-x.
- [18] Kobayashi T, Baghdadi M, Han N, et al. Prognostic value of IL-34 in colorectal cancer patients[J]. *Immunol Med*, 2019, 42(4):169-175. doi: 10.1080/25785826.2019.1691429.
- [19] Noda Y, Kawaguchi T, Korenaga M, et al. High serum interleukin-34 level is a predictor of poor prognosis in patients with non-viral hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatol Res*, 2019, 49(9):1046-1053. doi: 10.1111/hepr.13350.
- [20] Özdemir F, Baskiran A. The importance of AFP in liver transplantation for HCC[J]. *J Gastrointest Cancer*, 2020, 51(4):1127-1132. doi: 10.1007/s12029-020-00486-w.
- [21] Tayob N, Kanwal F, Alsarraj A, et al. The Performance of AFP, AFP-3, DCP as Biomarkers for Detection of Hepatocellular Carcinoma (HCC): A Phase 3 Biomarker Study in the United States[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2023, 21(2):415-423. doi: 10.1016/j.cgh.2022.01.047.
- [22] Zhang Y, Gao J, Bao Y, et al. Diagnostic accuracy and prognostic significance of osteopontin in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma: a Meta-analysis[J]. *Biomarkers*, 2022, 27(1):13-21. doi: 10.1080/1354750X.2021.2008009.
- [23] Su K, Liu YL, Wang P, et al. Heat shock protein 90 α is a potential prognostic and predictive biomarker in hepatocellular carcinoma: a large-scale and multicenter study[J]. *Hepatol Int*, 2022, 16(5):1208-1219. doi: 10.1007/s12072-022-10391-y.
- [24] Li CH, Chen ZM, Chen PF, et al. Interleukin-34 promotes the proliferation and epithelial-mesenchymal transition of gastric cancer cells[J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2022, 14(10):1968-1980. doi: 10.4251/wjgo.v14.i10.1968.
- [25] Liu ZX, Chen WJ, Wang Y, et al. Interleukin-34 deficiency aggravates development of colitis and colitis-associated cancer in mice[J]. *World J Gastroenterol*, 2022, 28(47):6752-6768. doi: 10.3748/wjg.v28.i47.6752.
- [26] Kong F, Zhou K, Zhu T, et al. Interleukin-34 mediated by hepatitis B virus X protein via CCAAT/enhancer-binding protein α contributes to the proliferation and migration of hepatoma cells[J]. *Cell Prolif*, 2019, 52(6):e12703. doi: 10.1111/cpr.12703.
- [27] Irie T, Yoshii D, Komohara Y, et al. IL-34 in hepatoblastoma cells potentially promote tumor progression via autocrine and paracrine mechanisms[J]. *Cancer Med*, 2022, 11(6):1441-1453. doi: 10.1002/cam4.4537.
- [28] Yang C, Zhang J, Ding M, et al. Ki67 targeted strategies for cancer therapy[J]. *Clin Transl Oncol*, 2018, 20(5):570-575. doi: 10.1007/s12094-017-1774-3.
- [29] Cardano M, Tribioli C, Prosperi E. Targeting Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) as an Effective Strategy to Inhibit Tumor Cell Proliferation[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2020, 20(4):240-252. doi: 10.2174/1568009620666200115162814.
- [30] Niland S, Riscanevo AX, Eble JA. Matrix Metalloproteinases Shape the Tumor Microenvironment in Cancer Progression[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23(1):146. doi: 10.3390/ijms23010146.
- [31] Bakir B, Chiarella AM, Pitarresi JR, et al. EMT, MET, Plasticity, and Tumor Metastasis[J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30(10):764-776. doi: 10.1016/j.tcb.2020.07.003.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 田秉璋, 姜世豪, 陈云, 等. 血清白细胞介素34与肝癌肝移植临床预后的关系及其作用机制[J]. *中国普通外科杂志*, 2023, 32(7):994-1003. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.07.004

Cite this article as: Tian BZ, Jiang SH, Chen Y, et al. Association of serum interleukin 34 with clinical prognosis in liver cancer transplant recipients and its mechanism of action[J]. *Chin J Gen Surg*, 2023, 32(7):994-1003. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.07.004