

2014, 14(6):19-21.

- 13 Moraloglu O, Tonguc E, Var T, et al. Treatment with oxytocin antagonists before embryo transfer may increase implantation rates after IVF[J]. Reprod Biomed Online, 2010, 21(3): 338-343.
- 14 李健和,易利丹,彭六保,等.间苯三酚的药理作用与临床应用[J].中国新药与临床杂志,2011,30(7):494-499.
- 15 Andersen FA. Amended final safety assessment of polyvinyl acetate[J]. Int J Toxicol, 1996(2): 166-176.
- 16 刘梅兰,陈 慧,范 涛,等.间苯三酚用于妊娠 20 周前先兆流产治疗的多中心临床研究[J].热带医学杂志,2013,13(8): 961-963.
- 17 李 欧.间苯三酚对孕 20 周前先兆流产治疗效果的影响分析[J].中国卫生标准管理,2016,7(16):98-99.
- 18 王兴红.间苯三酚治疗晚期先兆流产 30 例临床观察[J].中国临床新医学,2009,2(12):1303-1304.
- 19 Xu A, Li Y, Zhu L, et al. Inhibition of endometrial fundocervical wave by phloroglucinol and the outcome of in vitro fertilization[J]. Reprod Biol, 2013, 13(1): 88-91.
- [收稿日期 2018-01-04][本文编辑 蓝斯琪]

课题研究 · 论著

血清白细胞介素-35 在不同病理类型原发性肝癌中的表达情况比较

宋经清, 姚银龙, 徐邦浩, 郭 雅, 彭民浩, 邓忠南, 文 张

基金项目: 广西壮族自治区教育厅高校科技项目(编号:LX20140557)

作者单位: 535000 广西,钦州市第二人民医院普通外科(宋经清,邓忠南); 530021 南宁,广西医科大学第一附属医院肝胆外科(姚银龙,徐邦浩,郭 雅,彭民浩,文 张)

作者简介: 宋经清(1981-),男,医学硕士,主治医师,研究方向:普通外科疾病的诊治。E-mail:songjingqing58@163.com

通讯作者: 文 张(1980-),男,医学博士,副主任医师,硕士研究生导师,研究方向:肝胆外科及肝脏移植外科。E-mail:wenzgxmu@163.com

【摘要】 目的 比较血清白细胞介素-35(IL-35)在不同病理类型原发性肝癌患者外周血中的表达情况。方法 收集广西医科大学第一附属医院肝胆外科 2012-01~2013-01 经病理确诊的 52 例肝细胞癌患者,6 例肝内胆管细胞癌患者,5 例混合型肝癌患者及 12 例肝良性肿瘤患者(对照组),采用酶联免疫吸附法检测患者外周血中 IL-35 表达水平。结果 肝细胞癌组、肝内胆管细胞癌组、混合型肝癌组的 IL-35 的表达水平明显高于对照组($P<0.05$),肝细胞癌组 IL-35 的表达水平高于肝内胆管细胞癌组($P<0.05$),混合型肝癌组的 IL-35 的表达水平和肝内胆管细胞癌组无明显差异($P>0.05$)。结论 IL-35 在肝细胞癌中呈高表达,IL-35 有可能成为区分不同病理类型原发性肝癌的分子标记物。

【关键词】 白细胞介素-35; 肝癌; 酶联免疫吸附法

【中图分类号】 R 735.7 【文献标识码】 A 【文章编号】 1674-3806(2018)06-0547-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2018.06.08

Comparison of the expressions of serum interleukin-35 in different pathological types of primary liver cancer

SONG Jing-qing, YAO Yin-long, XU Bang-hao, et al. Department of General Surgery, the Second People's Hospital of Qinzhou City, Guangxi 535000, China

【Abstract】 Objective To compare the expressions of interleukin-35(IL-35) in peripheral blood of the patients with different pathological types of primary liver cancer. Methods 52 patients with hepatitis B virus(HBV) associated hepatocellular carcinoma(HCC) were collected in the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University from January 2012 to January 2013. 12 patients with benign liver tumors were enrolled as the control group and 6 patients with intrahepatic cholangiocarcinoma(ICC) and 5 patients with mixed liver cancer were also enrolled. The expression of IL-35 in plasma was detected by enzyme-linked immuno sorbent assay(ELISA) method. Results The

expressions of IL-35 were greatly higher in the HCC group, ICC group and mixed liver cancer group compared with those in the control group ($P < 0.05$). The expression of IL-35 was greatly higher in the HCC group compared with that in the ICC group ($P < 0.05$). There was no significant difference in the expression level of IL-35 between the mixed liver cancer group and the ICC group ($P > 0.05$). **Conclusion** IL-35 is highly expressed in HCC, and may be a molecular marker for differentiating the different pathological types of primary liver cancer.

[Key words] Interleukin-35 (IL-35); Hepatocellular carcinoma; Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA)

白细胞介素-35 (interleukin-35, IL-35) 是白细胞介素-12 (interleukin-12, IL-12) 家族中成员之一^[1]。IL-35 是由 Ebi3 和 IL-12p35 两种亚基组成的异源二聚体, IL-35 主要是由 CD4 + CD25 + Foxp3 + 调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Treg) 诱导表达, 因此 IL-35 可能是 Treg 细胞发挥其免疫功能的重要因子。IL-35 能通过刺激 CD4 + CD25 + T 细胞的分化以及抑炎性细胞因子 IL-10 的增殖而发挥其免疫抑制的作用^[2]。研究表明 IL-35 在多种恶性肿瘤中表达, 如肺癌^[3]、胰腺癌^[4]、结直肠癌^[5]、鼻咽癌^[6]、胃癌^[7]; 这些研究表明, IL-35 的表达参与多种肿瘤的发展和预后, IL-35 可能参与肿瘤细胞免疫逃逸的过程。有文献报道 IL-35 参与肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 的疾病进展过程, 然而, 对于 IL-35 主要发挥促进 HCC 进展亦或是发挥抑制肿瘤发展的作用, 目前仍存在争议^[8,9]。对于 IL-35 在不同病理类型的原发性肝癌表达情况比较, 鲜见文献报道。本研究旨在比较 IL-35 在不同病理类型原发性肝癌的表达情况。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2012-01 ~ 2013-01 就诊于广西医科大学第一附属医院肝胆外科 75 例患者, 所有标本均经病理学检查确诊。其中 52 例为乙肝相关性 HCC; 6 例为肝内胆管细胞癌 (intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC); 5 例为混合型肝癌; 12 例为肝良性肿瘤 (肝血管瘤及肝脏局灶性结节性增生, 为对照组)。男 52 例, 女 23 例, 年龄 16 ~ 75 (46.09 ± 13.02) 岁。所有患者术前均未接受包括经肝动脉栓塞化疗在内的其他治疗。

1.2 方法

1.2.1 标本收集 各组患者均于清晨空腹外周静脉采血 2 ml, 静置 1 h 后, 离心分离血清放置 -20°C 保存备用。

1.2.2 操作步骤与浓度计算 (1) 酶联免疫吸附法 (ELISA) 操作步骤: ①取出试剂盒, 于室温 ($20 \sim 25^{\circ}\text{C}$) 放置 15 ~ 30 min。实验过程应在室温 ($20 \sim 25^{\circ}\text{C}$) 内进行。②取出酶标板, 按照标准品标准蛋

白的次序分别加入 50 μl 的标准品标准蛋白溶液于空气微孔中。③每孔加待测标本 50 μl , 空白对照加入 50 μl 的蒸馏水。加样时, 控制加样速度, 避免第一孔和最后一孔之间的时间间隔过大, 否则将会导致不同的预孵育时间, 从而影响实验的准确性以及重复性; 一般加样时间控制在 10 min 之内。④除空白对照以外, 每孔加入 100 μl 酶标记溶液, 胶口密封以后, 37°C 孵育反应 1 h。样品要在密闭的容器内进行孵育, 保持其温度与湿度。⑤用洗涤液充分清洗酶标板 5 次 $\times 3$ min。保持各孔有足够的水压。⑥将洗涤后的酶标板用吸水纸彻底拍干。洗涤过程中反应孔中的残留的洗涤液应在滤纸上充分拍干。同时, 要消除板底残留的液体和手指痕迹, 避免影响最后的酶标仪读数。⑦加入显色剂 A、B 液各 50 μl /孔, $20 \sim 25^{\circ}\text{C}$ 避光反应 15 min, 加入底物后定时观察反应孔的颜色变化, 如果颜色比较深, 提前终止反应。⑧加入终止液 50 μl /孔, 终止反应, 静置 5 min。⑨ 30 min 内在波长 450 nm 比色酶标仪上读取各孔的 OD 值。(2) 浓度计算: 以 OD 值为横坐标, 标准物的浓度为纵坐标, 计算出标准曲线的直线回归方程式后将样品的 OD 值代入方程式, 计算出组织中 IL-35 的浓度。

1.3 统计学方法 应用 SPSS22.0 统计软件进行数据处理, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用方差分析, 两两比较采用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

HCC 组 IL-35 浓度为 (3087.16 ± 339.52) pg/ml, ICC 组 IL-35 浓度为 (2776.03 ± 224.45) pg/ml, 混合型肝癌组 IL-35 浓度为 (2813.06 ± 223.47) pg/ml, 对照组 IL-35 浓度为 (2410.13 ± 287.97) pg/ml。HCC 组、ICC 组、混合型肝癌组的 IL-35 浓度与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。HCC 组的 IL-35 浓度与 ICC 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), HCC 组的 IL-35 浓度与混合型肝癌组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), ICC 组的 IL-35 浓度与混合型肝癌组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1, 图 1。

表 1 HCC、ICC、混合型肝癌组及对照组肿瘤组织中 IL-35 浓度比较[$(\bar{x} \pm s)$, pg/ml]

组 别	例数	IL-35
HCC 组	52	3087.16 ± 339.52 ^{*#}
ICC 组	6	2776.03 ± 224.45 [*]
混合型肝癌组	5	2813.06 ± 223.47 [*]
对照组	12	2410.13 ± 287.97
<i>F</i>	—	15.474
<i>P</i>	—	0.000

注:与对照组比较,^{*} $P < 0.05$;与 ICC 组比较,[#] $P < 0.05$

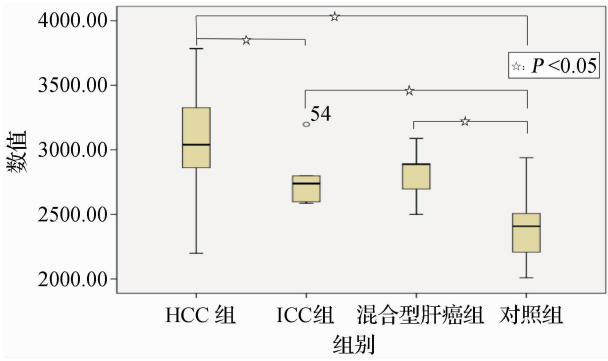


图 1 HCC、ICC、混合型肝癌组及对照组中 IL-35 的浓度(pg/ml)比较图

3 讨论

3.1 原发性肝癌是目前我国排名第四位的常见恶性肿瘤及第三位的肿瘤致死病因,严重威胁我国人民的生命和健康^[10,11]。原发性肝癌主要包括 HCC、ICC 和混合型三种不同病理类型。乙型肝炎病毒感染是肝癌的主要致病原因之一^[12],其他因素引起肝脏慢性炎症致肝硬化也是原发性肝癌发生的基础。ICC 是起源于肝内胆管上皮的恶性肿瘤,发病率逐年增高^[13]。Wu 等^[14]首次发现 ICC 中存在成纤维细胞生长因子受体 2(fibroblast growth factor receptor 2, FGFR2)融合基因。也有研究发现,FGFR2 融合基因出现在所有 ICC 患者中,而在 HCC 中没有发现,说明 FGFR2 融合基因可能是 ICC 特征性的遗传学改变^[15]。此型预后较 HCC 差。混合型肝细胞胆管细胞癌(CHC)是一种同时包含 HCC 和 ICC 成分的原发性肝脏肿瘤。1903 年 Wells 首次报道了混合型肝脏原发恶性肿瘤。Theise 等^[16]证明混合型肝癌来源于肝祖细胞的观点。此型术前诊断困难,误诊率高,预后差。

3.2 IL-35 是 IL-12 家族的新成员。2007 年 Collison 等^[1]首先报道了 IL-35 的结构及其免疫抑制功能,IL-35 主要由 CD4 + Foxp3 + Treg 产生。近年的研究

结果^[17,18]发现 IL-35 可由单核细胞、T 细胞、活化的 B 细胞及某些肿瘤细胞,通过激活 Jak-STAT 信号通路参与免疫功能的调节^[19]。IL-35 是一种免疫抑制因子,可以通过 Treg IL-10 的分泌抑制 CD4⁺效应 T 细胞。IL-35、转化生长因子-β(TGF-β)、白细胞介素-10(IL-10)是最重要的三种免疫抑制因子^[20]。近年来随着 IL-35 研究的不断深入,Collison 等^[21]于 2010 年报道了一群新的 Treg,定义为 IL-35 诱导性 Treg(iTr35 细胞)。其本质特征 iTr35 细胞仅能被 IL-35 诱导产生,不由抑制性细胞因子如 IL-10 或者 TGF-β 诱导产生。因此,IL-35 可能在介导感染性耐受或者肿瘤免疫逃逸中起到了重要作用。

3.3 本研究旨在初步探讨比较 IL-35 在不同类型的原发性肝癌患者中的表达情况,结果发现肝癌患者外周血中 IL-35 异常高表达。HCC 组、ICC 组及混合型肝癌组 IL-35 浓度分别为(3087.16 ± 339.52)pg/ml、(2776.03 ± 224.45)pg/ml 和(2813.06 ± 223.47)pg/ml;对照组 IL-35 浓度为(2410.13 ± 287.97)pg/ml。HCC 组、ICC 组及混合型肝癌组中 IL-35 的水平较对照组明显高表达,三组分别与对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。通过上述结果可以得出,IL-35 在肝脏恶性肿瘤组中的表达水平较肝良性肿瘤组明显增高,可以得出 IL-35 在肝恶性肿瘤的发生与发展中起到重要的作用。IL-35 在原发性 HCC 组中的表达水平比 ICC 组明显增高,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);IL-35 在原发性 HCC 组中的表达水平和混合型肝癌组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);IL-35 在混合型肝癌组中的表达水平和 ICC 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。IL-35 在原发性 HCC 中表达较另外的两种类型肝癌明显增高,在未来 IL-35 可能作为一种鉴别不同类型肝癌的特异性分子标记物。

3.4 Zeng 等^[5]研究发现结直肠癌患者中 IL-35 的表达水平与肿瘤的恶性程度及临床分期呈正相关;Fan 等^[7]发现胃癌患者中 IL-35 能刺激 Ki-67 和 Bcl-2 的高表达,可能参与调节胃癌细胞的增殖和凋亡,加速肿瘤的进展,因此他们认为 IL-35 表达水平与肿瘤大小及肿瘤浸润深度相关。研究发现,IL-35 可作用于多种不同类型的肿瘤细胞,直接抑制肿瘤微环境的肿瘤免疫状态,引起肿瘤免疫逃逸,刺激肿瘤细胞增殖^[4]、抑制肿瘤细胞凋亡^[22]及促进肿瘤血管生成^[23],IL-35 通过多种途径促进肿瘤的进展。目前对于 IL-35 的作用机制仍未完全阐述清楚,需要进一步研究证实。

3.5 有研究显示,IL-35 不仅在肝癌患者的血清中表达,在肝癌组织中也有明显表达^[8],IL-35 可能会成为早期筛查肿瘤的一个标记物,同时对肿瘤的诊断及预测预后有一定的意义。综上所述,IL-35 可以直接作用于肿瘤细胞本身,能促进肿瘤细胞增殖、抑制细胞凋亡和促进肿瘤血管生成,因此,若能阻断 IL-35 信号通路,减少或消除 IL-35 分泌,有可能抑制肿瘤细胞增殖、减少肿瘤血管生成,从而抑制肿瘤生长及进展。到目前为止,IL-35 与肝癌相关的文献中,都是研究 HCC 中 IL-35 的表达,鲜见关于 IL-35 在不同类型肝癌中表达是否有不同。本研究对不同类型肝癌中 IL-35 的表达进行了初步研究。但本研究中纳入样本数量有限,研究周期偏短,有待进一步扩大病例样本,做深入探讨。

参考文献

- Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function[J]. *Nature*, 2007, 450(7169):566–569.
- Pankratz S, Bittner S, Herrmann AM, et al. Human CD4 + HLA-G + regulatory T cells are potent suppressors of graft-versus-host disease in vivo[J]. *FASEB J*, 2014, 28(8):3435–3445.
- Nishino R, Takano A, Oshita H, et al. Identification of Epstein-Barr virus-induced gene 3 as a novel serum and tissue biomarker and a therapeutic target for lung cancer[J]. *Clini Cancer Res*, 2011, 17(19):6272–6286.
- Nicholl MB, Ledgewood CL, Chen X, et al. IL-35 promotes pancreas cancer growth through enhancement of proliferation and inhibition of apoptosis: evidence for a role as an autocrine growth factor[J]. *Cytokine*, 2014, 70(2):126–133.
- Zeng JC, Zhang Z, Li TY, et al. Assessing the role of IL-35 in colorectal cancer progression and prognosis[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(9):1806–1816.
- Zhang Y, Sun H, Wu H, et al. Interleukin 35 is an independent prognostic factor and a therapeutic target for nasopharyngeal carcinoma[J]. *Contemp Oncol(Pozn)*, 2015, 19(2):120–124.
- Fan YG, Zhai JM, Wang W, et al. IL-35 over-expression is associated with genesis of gastric cancer[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(7):2845–2849.
- Long J, Guo H, Cui S, et al. IL-35 expression in hepatocellular carcinoma cells is associated with tumor progression[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(29):45678–45686.
- 吴友祥, 路远, 晏彬, 等. 血清白细胞介素-35 水平对索拉菲尼联合非规则性肝切除术治疗的原发性肝癌患者临床疗效及预后的影响[J]. *广西医学*, 2017, 39(6):782–785.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2):87–108.
- Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2):115–132.
- Annweiler C, Schott AM, Berrut G, et al. Vitamin D and ageing: neurological issues[J]. *Neuropsychobiology*, 2010, 62(3):139–150.
- Esnaola NF, Meyer JE, Karachristos A, et al. Evaluation and management of intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Cancer*, 2016, 122(9):1349–1369.
- Wu YM, Su F, Kalyanasundaram S, et al. Identification of targetable FGFR gene fusions in diverse cancers[J]. *Cancer Discov*, 2013, 3(6):636–647.
- Sia D, Losic B, Moeini A, et al. Massive parallel sequencing uncovers actionable FGFR2-PPHLN1 fusion and ARAF mutations in intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Nat Commun*, 2015, 6:6087.
- Theise ND, Yao JL, Harada K, et al. Hepatic 'stem cell' malignancies in adults: four cases[J]. *Histopathology*, 2003, 43(3):263–271.
- Sha X, Meng S, Li X, et al. Interleukin-35 inhibits endothelial cell activation by suppressing MAPK-AP-1 pathway[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(31):19307–19318.
- Delgoffe GM, Vignali DAA. Interleukin-35: A Novel Mediator of Peripheral Tolerance [M]. *Cytokine Frontiers*. Springer Japan, 2014:377–387.
- Vignali DA, Kuchroo VK. IL-12 family cytokines: immunological playmakers[J]. *Nat Immunol*, 2012, 13(8):722–728.
- Sawant DV, Hamilton K, Vignali DA. Interleukin-35: expanding its job profile[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2015, 35(7):499–512.
- Collison LW, Chaturvedi V, Henderson AL, et al. IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(12):1093–1101.
- Liao KL, Bai XF, Friedman A. Mathematical modeling of interleukin-35 promoting tumor growth and angiogenesis[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10):e110126.
- Tao Q, Pan Y, Wang Y, et al. Regulatory T cells-derived IL-35 promotes the growth of adult acute myeloid leukemia blasts[J]. *Int J Cancer*, 2015, 137(10):2384–2393.

[收稿日期 2018-03-15][本文编辑 黄晓红]