

原发性肝癌患者炎性细胞因子检测的临床诊断价值

高洪元

作者单位:271000 泰安市,泰安市中医二院检验科

【摘要】 目的 探讨白介素 6(interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 、IL-10、IL-17、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)及 IL-27 在原发性肝癌患者血清中的水平及其与肝癌发生和转移的关系。方法 收集我院 2012 年 1 月-2014 年 12 月确诊的原发性肝癌患者 100 例,分为无转移组 48 例和肝转移组 52 例,采用 Luminex xMAP 技术检测血清细胞因子 IL-6、IL-1 β 、IL-10、IL-17、TNF- α 及 IL-27,并对数据进行统计分析。结果 肝转移组患者 IL-17 和 IL-27 水平均显著高于无转移组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。肝转移组患者中,仅 IL-17 与 IL-1 β 呈正相关($r = 0.275, P = 0.048$)。受试者工作特征曲线分析结果显示,IL-17 和 IL-27 诊断肝癌转移的曲线下面积分别为 0.664 和 0.818,最佳诊断 cutoff 值分别为 2.005 pg/mL 和 238.95 pg/mL,敏感性分别为 83.3%和 98.5%,特异性分别为 35.7%和 64.3%,阳性预测值分别为 58.1%和 62.1%,阴性预测值分别为 43.4%和 44.4%,约登指数分别为 35.7 和 62.8。结论 IL-17 和 IL-27 均为促进肝癌细胞生长的细胞因子,可作为预测肝癌转移及预后的有效指标。IL-27 对诊断肝癌转移的临床诊断性能指标水平平均高于 IL-17,对肝癌早期转移的诊断价值更好。

【关键词】 IL-6; IL-1 β ; IL-10; IL-17; TNF- α ; IL-27; 肝癌; 转移

doi: 10.3969/j.issn.1674-7151.2015.02.005

Clinical diagnosis value of inflammatory cytokines in patients with primary hepatocellular carcinoma

GAO Hong-yuan. Department of Clinical Laboratory, the Second Hospital of Taian Traditional Chinese Medicine, Taian 271000, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the levels of IL-6, IL-1 β , IL-10, IL-17, TNF- α and IL-27 in the serum of patients with primary hepatocellular carcinoma, and to explore their relationship with hepatocellular carcinoma. **Methods** 100 hepatocellular carcinoma patients were collected from January 2012 to December 2014 in our hospital, which were divided into non-metastasis group (48 cases) and hepatic metastasis group (52 cases). All cytokines were detected by Luminex xMAP technology, and all data were analyzed statistically. **Results** Levels of IL-17 and IL-27 in hepatic metastasis group were all higher than that of non-metastasis group, and the differences all had statistical significance ($P < 0.05$). In hepatic metastasis group, only IL-17 and IL-1 β had positive correlation ($r = 0.275, P = 0.048$). Receiver operating characteristic curve showed that the area under the curve of IL-17 and IL-27 detection of hepatocellular carcinoma metastasis was 0.664 and 0.818, respectively. And the cutoff value were 2.005 pg/mL and 238.95 pg/mL. The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and Youden index of IL-17 detection of hepatic metastasis were 83.3%, 35.7%, 58.1%, 43.4% and 35.7, respectively. The sensitivity, specificity, PPV, NPV and Youden index of IL-27 detection of hepatic metastasis were 98.5%, 64.3%, 62.1%, 44.4% and 62.8, respectively. **Conclusion** IL-17 and IL-27 are cytokines which promote occurrence, development and metastasis of hepatocellular carcinoma. IL-17 and IL-27 can be used as effective predictors of liver cancer metastasis and prognosis. The clinical diagnosis of performance indicators levels of IL-27 in hepatocellular carcinoma are all higher than that of IL-17, which has better diagnosis value to the early metastasis of hepatocellular carcinoma.

【Key words】 IL-6; IL-1 β ; IL-10; IL-17; TNF- α ; IL-27; Hepatocellular carcinoma; Metastasis

原发性肝癌是常见的恶性程度较高的肿瘤,其发病存在一定的区域分布特性,其中,在肝炎病毒流行的亚洲和非洲,发病率相对较高。常规的针对肝癌易感个体的普查可以明显延长很多患者的生存期,但是对于许多晚期肝癌患者来说,效果仍然不容乐

观。目前认为肿瘤炎性微环境可能影响肝癌患者的转归^[1]。而在肿瘤微环境中,细胞因子所起的作用非常重要,贯穿于肿瘤发展的全过程。细胞因子是由一组具有调控细胞生长、分化、免疫激活等作用的蛋白质或小分子所构成的物质^[2]。大多数细胞因子可由

单核-巨噬细胞、淋巴细胞、血管内皮细胞、成纤维细胞、血小板、肥大细胞、嗜碱性粒细胞等多种细胞产生。机体在炎症和免疫应答过程中会由相关细胞产生多种细胞因子,对炎症的发生发展起调节作用^[3]。不同的细胞因子在肿瘤的发生发展中所发挥的作用各有不同,有些抑制肿瘤的生长和扩散,有些却直接或间接地促进肿瘤的发生发展。近期研究^[4-7]表明,白介素 6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 、IL-10、IL-17、IL-27 及肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)均能够调节肿瘤微环境,促进肿瘤的发生发展,但国内对于上述细胞因子在肝癌早期转移中的作用研究较少。本文研究通过检测 IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-17、IL-27 及 TNF- α 这 6 种细胞因子在肝癌患者血清中的水平,探讨其与肝癌发生和转移的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集我院 2012 年 1 月-2014 年 12 月收治并经病理明确诊断的肝细胞癌患者 100 例,其中男性 56 例,女性 44 例,根据肝癌转移情况分为无转移组 48 例,肝转移组 52 例(门静脉转移、远处转移、淋巴结转移等),年龄 27~82 岁,中位年龄 43.5 岁。各组年龄、性别、HBeAg 状态、ChildPugh 评分等数据见表 1。

表 1 100 例肝癌患者的临床资料

指标	无转移组	肝转移组
中位年龄(岁)	41.2	43.8
性别(男/女)	26/22	30/22
血清 HBeAg 状态(+/-)	25/23	27/25
肝硬化(+/-)	21/27	32/20
肿瘤最大径(cm)	7.23 \pm 3.63	7.44 \pm 4.52
ChildPugh 评分	5.32 \pm 3.63	6.75 \pm 2.02

1.2 仪器与试剂 Luminex 200 液相芯片分析系统(美国 Luminex 公司),液相芯片六因子组合试剂盒(加拿大 eBioscience 公司),洗涤液(杭州莱兹生物有限公司),裂解液(杭州莱兹生物有限公司),细胞裂解液(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司),链霉亲和素-藻红蛋白(杭州莱兹生物有限公司)。

表 2 肝转移组与无转移组血清各细胞因子水平的比较($\bar{x}\pm s$, pg/mL)

组别	例数	IL-1 β	IL-6	IL-10	IL-17	TNF- α	IL-27
无转移组	48	3.93 \pm 2.07	6.61 \pm 4.63	7.77 \pm 5.49	2.67 \pm 2.53	6.30 \pm 4.02	255.49 \pm 94.33
肝转移组	52	4.11 \pm 1.95	6.80 \pm 5.39	8.70 \pm 4.77	5.56 \pm 2.85	8.14 \pm 6.06	353.19 \pm 177.55
<i>t</i> 值	-	2.841	2.836	2.162	4.370	2.892	3.375
<i>P</i> 值	-	0.753	0.756	0.520	0.000	0.211	0.015

1.3 方法

1.3.1 Luminex xMAP 技术检测血清细胞因子 将样本裂解液移至孵育板上,加入支持探针微球、支持延伸探针和缓冲液,55 $^{\circ}$ C 震荡孵育过夜;孵育结束后将孵育板放在磁力架上 1 min,当磁性微球聚集在底部时,吸取弃去上清;加入洗涤液,震荡洗涤 1 min 后,孵育板放在磁力架上 1 min,当磁性微球聚集在底部时,吸取弃去上清;此步骤重复洗 3 次;加入扩增延伸探针和标记探针,50 $^{\circ}$ C 震荡反应 1 h;孵育板放在磁力架上 1 min,吸取弃去上清;用洗涤液洗 2 次;加入链霉亲和素-藻红蛋白,50 $^{\circ}$ C 震荡反应 30 min;孵育板放在磁力架上 1 min,吸取弃去上清;用洗涤液清洗 2 次;加入洗涤液,震荡 5 min,在 Luminex 200 阅读仪上读取数据,得出检测结果。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计分析。计量资料的比较采用 *t* 检验;各指标间的相关性分析采用 Spearman 相关性分析;采用受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC) 曲线等临床诊断性能指标评估各指标的预测效能。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者血清各细胞因子水平的比较 除肝转移组 IL-17 和 IL-27 水平均显著高于无转移组,且差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)外,其余各指标两组间差异均无统计学意义(P 均 > 0.05),见表 2。

2.2 肝转移组各细胞因子水平的相关性分析 肝转移组的 6 种细胞因子中,IL-1 β 与 IL-17 呈正相关($r = 0.275, P = 0.048$),其余各指标间均无相关性,见表 3。

表 3 肝转移组各细胞因子的相关性分析

指标	IL-1 β	IL-6	IL-10	IL-17	IL-27	TNF- α
IL-1 β	-	0.079	0.079	0.275	0.601	0.078
IL-6	-	-	0.019	0.096	0.195	0.168
IL-10	-	-	-	0.096	0.195	0.094
IL-17	-	-	-	-	0.131	0.016
IL-27	-	-	-	-	-	0.083

2.3 IL-17 与 IL-27 对肝癌转移的预测 ROC 曲线

分析 IL-17 与 IL-27 两指标对肝癌转移的预测,如图 1 和表 4 所示,IL-17 和 IL-27 诊断肝癌转移的 AUC^{ROC} 分别为 0.664 和 0.818,最佳诊断 cutoff 值分别为 2.005 pg/mL 和 238.95 pg/mL,敏感性分别为 83.3% 和 98.5%,特异性分别为 35.7% 和 64.3%,阳性预测值 (positive predictive value, PPV) 分别为 58.1% 和 62.1%,阴性预测值 (negative predictive value, NPV) 分别为 43.4% 和 44.4%,约登指数分别为 35.7 和 62.8。IL-27 与 IL-17 对肝癌的转移均有一定的预测能力,IL-27 预测肝癌转移更好。

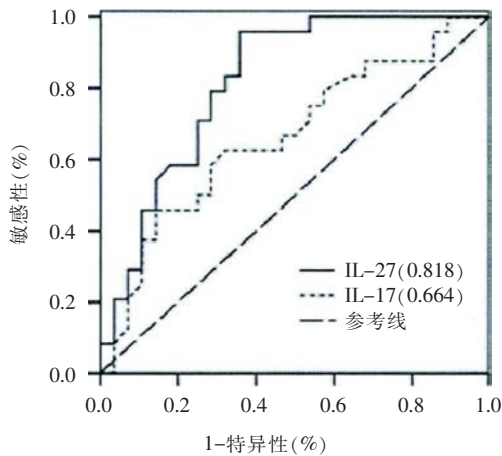


图 1 IL-27 和 IL-17 预测肝癌转移的 ROC 曲线

表 4 ROC 曲线等临床诊断性能评价指标对 IL-27 和 IL-17 诊断肝癌转移的预测分析

指标	IL-27	IL-17
AUC^{ROC}	0.818	0.664
cut off 值 (pg/mL)	238.95	2.005
敏感性 (%)	98.5	83.3
特异性 (%)	64.3	35.7
PPV (%)	62.1	58.1
NPV (%)	44.4	43.4
约登指数	62.8	35.7

3 讨论

肿瘤微环境是指肿瘤局部浸润的免疫细胞、间质细胞和所分泌的活性介质等与肿瘤细胞共同构成的局部内环境。肿瘤与其微环境之间的相互关系是现代肿瘤学研究的关键问题和热点^[8]。肿瘤微环境中包括免疫细胞,分为先天性免疫细胞(巨噬细胞、中性粒细胞、肥大细胞、树突状细胞和 NK 细胞等),和后天性免疫细胞(T 细胞、B 细胞)^[9]。这些免疫细胞通过分泌细胞因子或趋化因子、产生基质金属蛋白酶类因子、分泌抗体或直接作用等方式和肿瘤细胞发生关联,并在肿瘤的发生和发展中发挥着促进

和免疫监视的双重作用,而且不同的免疫细胞、不同免疫细胞亚群以及各种免疫效应分子在不同的肿瘤中也扮演着多种角色。研究^[10]发现肝癌周围组织中包含了多种炎症或免疫相关细胞。这些细胞和癌细胞间存在直接的细胞间联系,或通过细胞因子及趋化因子而建立联系。因此,认识肿瘤微环境对于认识肿瘤的发生、发展及转移等有着重要的意义,而且对提高肿瘤早期转移的诊断、预后评估也有重要作用。

细胞因子是具有调控细胞生长、分化、免疫激活等作用的一类蛋白质或小分子机体。在炎症和免疫应答过程中会产生多种细胞因子,并发挥着不同功能。多种细胞因子在肿瘤的发生、发展和转移中扮演着重要角色,其可由单核巨噬细胞、淋巴细胞、内皮细胞、成纤维细胞等多种细胞产生^[11]。细胞因子之间存在着相互促进或者相互抑制的作用。

IL-17 具有促进多种肿瘤生长的作用,这些肿瘤包括纤维肉瘤、结肠癌、皮肤癌、非小细胞肺癌。IL-17 对肿瘤的作用具有多样性,由于所研究的不同肿瘤免疫源性和肿瘤种属模型不同,IL-17 具有对肿瘤促进和肿瘤抑制两种不同作用。因此需要对 IL-17 的临床研究来证实其在肿瘤进展、肿瘤患者预后中的具体作用。刘立国^[12]研究发现肝癌术后复发组较非复发组术前血清 IL-17 水平高,且 IL-17 是肝癌术后复发及生存的独立危险因素,他推测 IL-17 可能是潜在的预测肝癌患者预后的指标,认为 IL-17 有希望作为肝癌的治疗靶点。

IL-27 与 IL-23、IL-12 共同组成 IL-12 分子家族,具有复杂的生物学功能,在抗感染免疫,抗肿瘤免疫以及自身免疫病中发挥着重要的作用。IL-27 是异二聚体,主要由抗原提呈细胞产生,是 EB13(与 IL-12P40 亚基同源)和 P28(与 IL-12P35 亚基同源)通过二硫键组成异二聚体,而 P28 在不与 EB13 结合时无 IL-27 的生物学活性,IL-27 主要参与中性粒细胞、DC 细胞的增殖、成熟及趋化过程^[13]。IL-27 与肿瘤的关系也具有两面性:一方面,有文献^[14]报道 IL-27 具有抗肿瘤的作用,其作用机制主要通过抑制调节性 T 细胞的分化和血管生成,调节性 T 细胞的主要作用是抑制机体的抗肿瘤免疫和促进血管生成;另一方面,IL-27 能够通过 IL-10 和程序性死亡受体-1 发挥其促肿瘤的作用。IL-27 的抗肿瘤作用以结肠癌、颅内神经胶质瘤报道为多。IL-27 可以直接作用于 CD8⁺T 细胞,以 T-bet 依赖和非依赖性的途径促进细胞毒性淋巴细胞增殖,伴随粒酶 B 表达增高,并轻微上调穿孔素(细胞毒效应的一种重要的

效应分子)表达。然而,IL-27 在肝癌中可能起到促进肿瘤生长的作用。有研究^[6]发现,IL-27 在肝癌患者血清中的水平显著高于对照组,这也是国内首次报道 IL-27 在肝癌早期诊断中的临床意义。

本研究对 100 例原发性肝癌患者的 6 种常见的细胞因子进行检测,结果显示,52 例肝转移组患者中只有 IL-17 和 IL-27 水平均显著高于 48 例无转移组患者,差异均有统计学意义(P 均 <0.05)。说明 IL-17 和 IL-27 均参与了肝癌的发生发展及癌细胞的转移,起到了促进肿瘤发展的作用。肝转移组患者的 IL-1 β 、IL-6、IL-10 和 TNF- α 水平也均高于无转移组患者,但差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。说明上述细胞因子虽然也对肝癌的发生发展起到促进作用,但在肝癌转移后升高幅度不大,因此不能作为肝癌早期转移的检测指标。

对肝转移患者中 6 种细胞因子的相关性分析结果显示,只有 IL-1 β 与 IL-17 呈正相关,其余细胞因子间均无相关性。IL-1 β 为促炎型细胞因子,与 IL-17 共同作用起到促进肝癌细胞生长的作用。IL-27 虽然也起到了促进肝癌细胞生长的作用,但与其他细胞因子均无相关性,说明 IL-27 在促进肝癌发生发展的过程中独立发挥作用。

采用 ROC 曲线评价 IL-17 和 IL-27 对肝癌转移的诊断效能,结果显示,IL-17 的 $AUC^{ROC}=0.664$, IL-27 的 $AUC^{ROC}=0.818$, 最佳诊断 cutoff 值分别为 2.005 pg/mL 和 238.95 pg/mL,敏感性分别为 83.3% 和 98.5%,特异性分别为 35.7% 和 64.3%,PPV 分别为 58.1% 和 62.1%,NPV 分别为 43.4% 和 44.4%,约登指数分别为 35.7 和 62.8。IL-27 的 AUC^{ROC} 及其他临床诊断性能评价指标水平均高于 IL-17,说明虽然 IL-17 和 IL-27 都可作为评价肝癌是否出现转移的指标,但 IL-27 的预测效果应更好。

综上,IL-17 和 IL-27 均为促进肝癌细胞生长的细胞因子,可作为预测肝癌转移及预后的有效指标。其中 IL-27 对检测肝癌细胞转移的灵敏度、特异性均高于 IL-17,可作为肝癌转移早期诊断及治疗的监测指标。

4 参考文献

1 孙义长. 调节性 T 细胞和 Th17 细胞在肝癌中的研究进展. 医学信

息, 2012, 25: 608-610.

- 2 李宝华, 何蓓晖, 潘高辉. 白细胞介素 17 在原发性肝癌中的表达及意义. 中国卫生检验杂志, 2012, 11: 2405-2409.
- 3 党倩丽, 陈超, 杜篷, 等. 人乳头瘤病毒基因分型液态芯片的构建. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, 24: 461-464.
- 4 侍阳, 宋庆伟, 于生才, 等. 肝癌模型大鼠肝硬化期 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的水平变化及作用机制. 中国老年学杂志, 2013, 33: 5663-5665.
- 5 张志强, 贺杰峰, 张瑜, 等. 大鼠实验性肺癌组织中 Treg 细胞与 TGF- β 1、IL-10 水平的相关性分析. 中华普通外科杂志, 2014, 29: 382-384.
- 6 范莎莎, 李爱民, 李荣, 等. IL-17 在肺癌患者血清中表达增高对肺癌诊断的研究. 湖南师范大学自然科学学报, 2014, 37: 19-23.
- 7 范莎莎, 李荣, 陈逢生, 等. IL-27 在肺癌患者血清中表达增高对肺癌诊断的研究. 中国医师杂志, 2014, 16: 904-906.
- 8 Koel-Simmelink MJ, Vennegoor A, Killestein J, et al. The impact of pre-analytical variables on the stability of neurofilament proteins in CSF, determined by a novel validated SinglePlex Luminex assay and ELISA. J Immunol Methods, 2014, 402: 43-49.
- 9 McDonald LT, Russell DL, Kelly RR, et al. Hematopoietic stem cell-derived cancer-associated fibroblasts are novel contributors to the pro-tumorigenic microenvironment. Neoplasia, 2015, 17: 434-448.
- 10 Markowitz GJ, Michelotti GA, Diehl AM, et al. Inflammatory models drastically alter tumor growth and the immune microenvironment in hepatocellular carcinoma. Sci Bull (Beijing), 2015, 60: 762-772.
- 11 Grenzi PC, de Marco R, Silva RZ, et al. Antibodies against denatured HLA class II molecules detected in luminex-single antigen assay. Hum Immunol, 2013, 74: 1300-1303.
- 12 刘立国. 术前血清中细胞因子含量与肝癌切除术后预后相关性探讨. 北京协和医学院, 2012.
- 13 Duan Y, Jia Y, Wang T, et al. Potent therapeutic target of inflammation, virus and tumor: focus on interleukin-27. Int Immunopharmacol, 2015, 26: 139-146.
- 14 Mengelle C, Mansuy JM, Prere MF, et al. Simultaneous detection of gastrointestinal pathogens with a multiplex Luminex-based molecular assay in stool samples from diarrhoeic patients. Clin Microbiol Infect, 2013, 19: E458-E465.

(收稿日期: 2015-04-06)

(本文编辑: 李霖)

(上接第 121 页)

term survival analysis of nasopharyngeal carcinoma by plasma Ep-

stein-Barr virus DNA levels. Cancer, 2013, 119: 963-970.

(收稿日期: 2015-04-21)

(本文编辑: 李霖)