

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.01.017

# 原发性肝细胞癌患者 PBMC 中 IL-22 和 IL-17 mRNA 的表达及其临床意义

## IL-22 and IL-17 mRNA expression and clinical significance in PBMC in patients with hepatocellular carcinoma

陈洪涛, 杨智, 吴诗品(暨南大学第二临床医学院深圳市人民医院 感染内科, 广东 深圳 518020)

**[摘要]** **目的:**探讨原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) IL-22 和 IL-17 mRNA 的表达水平及其临床意义。**方法:**收集 2011 年 4 月至 10 月暨南大学医学院附属深圳市人民医院感染内科临床确诊为 HCC 患者 40 例, 所有患者均为乙型肝炎表面抗原阳性。同时选取来自本科室健康人的外周静脉血 20 例作为对照。以常规淋巴细胞分层液密度梯度离心法分离得到 PBMCs, 采用 RT-PCR 法检测 HCC 患者组和健康人对照组 PBMCs IL-22 和 IL-17 mRNA 的表达水平。**结果:**与健康人对照组相比, HCC 患者组 IL-22 mRNA 表达水平明显下降( $0.309 \pm 0.044$  vs  $0.560 \pm 0.029$ ,  $P < 0.01$ ), 而 IL-17 mRNA 的表达水平则显著升高( $0.682 \pm 0.048$  vs  $0.541 \pm 0.038$ ,  $P < 0.01$ )。**结论:**IL-17 mRNA 的高表达可能参与 HCC 的发生、发展, 而 IL-22 mRNA 低表达可能与 HCC 患者的近期预后不佳有关。

**[关键词]** 肝细胞肝癌; 免疫; IL-22; IL-17

**[中图分类号]** R735.7; R730.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2015)01-0096-03

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)在全球恶性肿瘤中排第五位, 5 年生存率仅 9%。全球每年新发肝癌病人数约 65 万, 其中一半以上发生在我国。乙型肝炎病毒(hepatitis B Virus, HBV)在我国的高流行是导致我国 HCC 高发生率的重要因素。我国 HCC 患者血清中 HBV 阳性率高达 90%。人群 HBsAg 阳性者, 其患肝癌的相对危险性为 HBsAg 阴性者的 10~50 倍。HBV 活动复制引发的肝脏长期慢性迁延性炎症是导致 HCC 发生的最直接原因。Th1、Th2、Treg、Th17、Th22 等特异性免疫细胞及其分泌的细胞因子参与了慢性 HBV 感染的免疫病理过程, 其中 IL-17 及 IL-22 分别是慢性乙肝特异性免疫中肝细胞损伤及再生修复效应的代表<sup>[1,4]</sup>。本课题组前期研究<sup>[5]</sup>提示, IL-17、IL-22 水平在慢性乙型肝炎患者中表达水平较健康对照组显著升高( $P=0.000$ ), 而它们在 HCC 中的表达水平如何变化, 尚未见报道。本实验研究 IL-22 及 IL-17 在 HCC 患者 PBMCs 中的表达情况, 探讨其在 HCC 发生、发展中的免疫病理作用及可能的临床意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本及主要试剂

收集 2011 年 4 月至 10 月暨南大学医学院附属深圳市人民医院感染内科临床确诊为 HCC 患者 40 例(Edmondson 分期: III~IV 期), 其中男性 28 例, 女性 12 例, 平均年龄( $58 \pm 14$ )岁。所有 HCC 患

者均为 HBsAg 阳性, 诊断符合 2001 年中国抗癌协会肝癌专业委员会修订的肝癌临床诊断标准; 并在入院第 2 天采取空腹静脉血。同时选取来自本科室健康人的外周静脉血 20 例作为对照。HCC 患者在采血前均已签署知情同意书。

淋巴细胞分离液购于天津市 GBD 公司, RT-PCR 试剂盒、DNA Marker 均购于美国 Fermentas 公司, PCR 引物由天津金斯瑞公司合成, Mastercycler gradient PCR 仪购自德国 EPPENDORF 公司, 电泳仪和凝胶成像分析系统均购自美国 BIORAD 公司。

### 1.2 标本采集与 PCR 引物设计

抽取 HCC 患者组和健康人对照组人群外周静脉血 3~4 ml, 用常规淋巴细胞分层液密度梯度离心法分离 PBMCs。按 Trizol 说明书提取 PBMC 中总 RNA, 75% 乙醇洗涤 RNA 沉淀,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。根据 Gene Bank 检索的基因序列, 利用 Premier 5 软件分别设计 IL-22、IL-17 和  $\beta$ -actin 引物, 所有引物由天津金斯瑞公司合成。引物序列如下: IL-22(扩增片

**[基金项目]** 广东省卫生厅立项课题资助项目(No. B2011283)。Project supported by the Research Project of the Health Bureau of Guangdong Province(No. B2011283)。

**[作者简介]** 陈洪涛(1977-), 男, 湖北丹江口市人, 硕士, 主治医师, 主要从事原发性肝癌的基础与生物治疗临床研究, E-mail: 843139770@qq.com

**[通信作者]** 吴诗品(Wu Shipin, corresponding author), E-mail: wuponem@126.net

段长度 254 bp)上游引物:5'-TCTTGGTACAGGGAG-GAGC-3',下游引物:5'-CCTATCAGATTGAGGGAAC-3';IL-17(扩增片段长度 366 bp)上游引物:5'-GCAGGCACAACTCATCCAT-3',下游引物:5'-GGGCGAAAATGGTTACGAT-3'; $\beta$ -actin(扩增片段长度 186 bp)上游引物:5'-CGGGAAATCGTGCCTGACAT-3',下游引物:5'-CAGGAAGCAAGGCTGGAA-GA-3'。

### 1.3 RT-PCR 检测两组人群中 PBMCs IL-22 和 IL-17 mRNA 的表达水平

以提取的总 RNA 12  $\mu$ l 为模板合成 cDNA,以 cDNA 为模板分别扩增 IL-22 和 IL-17 基因片段,并以  $\beta$ -actin 作为内部参照系统。PCR 采用同管扩增法。反应步骤:每管先加入目的基因上下游引物各 1  $\mu$ l,加入内参  $\beta$ -actin 的上下游引物各 1  $\mu$ l,进行 PCR 反应 28 个循环(反复摸索其平台期),即得 PCR 产物。PCR 反应条件为:93  $^{\circ}$ C, 2 min(启动);94  $^{\circ}$ C, 30 s(变性);55  $^{\circ}$ C, 30 s(退火);72  $^{\circ}$ C, 45 s(延伸);再从变性开始循环共 28 次,最后一循环延伸 5 min。PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳,在凝胶成像系统中拍照分析。

### 1.4 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件,计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间均数比较采用  $t$  检验, $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HCC 患者及健康人对照组 PBMC 中 IL-22 mRNA 的表达

RT-PCR 扩增结果(图 1)分析显示,与健康人对照组相比,HCC 患者组 IL-22 mRNA 的表达水平明显下降[(0.309  $\pm$  0.044) vs (0.560  $\pm$  0.029)], $P < 0.000$  ]。

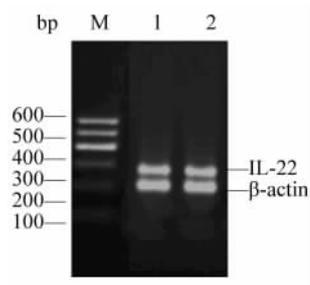


图 1 HCC 患者和健康对照组 IL-22 表达的电泳条带  
泳道 1 为 HCC; 泳道 2 为健康对照

### 2.2 HCC 患者及健康人对照组 PBMC 中 IL-17 mRNA 的表达

RT-PCR 检测结果(图 2)显示,与健康人对照组相比,HCC 患者组 IL-17 mRNA 的表达水平显著上调[(0.682  $\pm$  0.048) vs (0.541  $\pm$  0.038)], $P < 0.000$  ]。

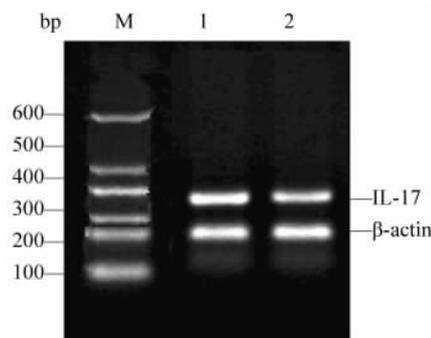


图 2 HCC 患者和健康对照组 IL-17 表达水平  
泳道 1 为 HCC; 泳道 2 为健康对照

## 3 讨论

IL-17 与 IL-22 是参与肝脏免疫病理的两种重要细胞因子。前者主要由 Th17 细胞分泌,具有强效的致炎特性;后者主要由 Th22 细胞分泌,被证明有较好的肝细胞保护效应。既往研究<sup>[6-7]</sup>认为,由 Th1 细胞反应导致的炎症损伤目前已被证明更多的是依赖于 Th17 细胞的作用。Th17 细胞可被肝内 Kupffer 细胞激活,与 HCC 患者生存率减低及肿瘤浸润进展正相关<sup>[8-9]</sup>。IL-22 是近年重新被认识的细胞因子,Th22 分泌量约占 IL-22 水平的 65%<sup>[10]</sup>,其余由 Th1、Th17 细胞分泌。IL-22 作用特点有别于其它淋巴细胞:作用对象不是免疫细胞,而是肝脏等表达 IL-22R1 的组织细胞。动物试验<sup>[10-13]</sup>表明,IL-22 对肝损伤有直接的保护效应。

动物试验<sup>[14-17]</sup>观察表明,IL-17 可以促进荷瘤小鼠肿瘤血管再生而增强肿瘤浸润、促进肿瘤生长。在肿瘤患者,也观察到肿瘤进展时外周血和肿瘤组织内 Th17 细胞增加<sup>[15,18]</sup>,并且肿瘤内 Th17 细胞水平与肿瘤微血管密度相关。本研究发现,HCC 患者外周 IL-17 表达水平比健康对照组明显升高,与目前多数研究结论相一致,结果提示,IL-17 可能参与 HCC 的发生、发展;但 IL-17 在中度、重度慢性乙型肝炎患者中的表达水平却与 HBV 相关性 HCC 患者表达水平相比,无统计差异性<sup>[19]</sup>,表明 IL-17 可能是通过对肝细胞长期慢性的炎性刺激作用

参与 HCC 的发生、发展,是慢性迁延性肝炎的结局。

近年的研究<sup>[10-13]</sup>表明,IL-22 对 T 细胞介导的肝脏炎性损伤有保护效应,这与 IL-17 的致炎效应截然相反。IL-22 对肝细胞保护作用机制目前仍不完全清楚。本研究发现 HCC 患者外周血 IL-22 表达水平显著低于健康对照组;这一现象与本课题组以往实验观察到的 IL-22 在慢性乙型病毒性肝炎患者中表达水平显著上升的现象截然相反<sup>[5]</sup>,后者提示肝细胞炎性损伤的同时伴随一定程度的肝细胞再生。本课题组既往研究<sup>[5]</sup>表明,仅在重型肝炎(肝组织严重损伤及再生水平低下)时 IL-22 表达水平低于(与健康对照组无统计学差异)。HCC 患者 IL-22 水平低下,可能同样提示患者近期预后不佳。HCC 患者外周血 IL-22 表达水平低下,可能的原因有:所研究的 HCC 患者临床分期为 III - IV 期,住院时的肝功能储备均较差,肝组织毁损严重,IL-22 水平低下可能是本身严重肝损伤的原因。

综上,本研究提示,IL-17 水平持续性增高是肝脏慢性迁延性炎症的表现,高水平 IL-17 可能参与 HCC 的发生、发展;晚期 HCC 患者 IL-22 水平下降可能是预后不佳的表现。

[ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] Sun HQ, Zhang JY, Zhang H, et al. Increased Th17 cells contribute to disease progression in patients with HBV-associated liver cirrhosis [ J ]. *J Viral Hepat*, 2012, 19( 6 ): 396-403.

[ 2 ] Wu W, Li J, Chen F, et al. Circulating Th17 cells frequency is associated with the disease progression in HBV infected patients [ J ]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2010, 25( 4 ): 750-757.

[ 3 ] Matsumoto A, Kanai T, Mikami Y, et al. IL-22-producing RORγt-dependent innate lymphoid cells play a novel protective role in murine acute hepatitis [ J ]. *PLoS ONE*, 2013, 8( 4 ): e62853.

[ 4 ] Pan CX, Tang J, Wang XY, et al. Role of Interleukin-22 in liver diseases [ J ]. *Inflamm Res*, 2014, 63( 7 ): 519-525.

[ 5 ] 杨智, 陈洪涛, 张毅, 等. IL-22 和 IL-17 mRNA 在慢性 HBV 感染者 PBMCs 中的表达及其意义 [ J ]. *世界华人消化杂志*, 2012, 20( 34 ): 3380-3384.

[ 6 ] Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming [ J ]. *Nat Rev Immunol*,

2008, 8( 5 ): 337-348.

[ 7 ] Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 T cells [ J ]. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19( 3 ): 281-286.

[ 8 ] Kuang DM, Peng C, Zhao Q, et al. Tumor-activated monocytes promote expansion of IL-17-producing CD8<sup>+</sup> T cells in hepatocellular carcinoma patients [ J ]. *J Immunol*, 2010, 185( 3 ): 1544-1549.

[ 9 ] Zhang JP, Yan J, Xu J, et al. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients [ J ]. *J Hepatol*, 2009, 50( 5 ): 980-989.

[ 10 ] Wolk K, Witte E, Witte K, et al. Biology of interleukin-22 [ J ]. *Semin Immunopathol*, 2010, 32( 1 ): 17-31.

[ 11 ] Sara Trifari, Charles D Kaplan, Elise H Tran, et al. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from TH-17, TH1 and TH2 cells [ J ]. *Nat Immunol*, 2009, 10( 8 ): 864-872.

[ 12 ] Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, et al. IL-22 but not IL-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation [ J ]. *Immunity*, 2007, 27( 4 ): 647-659.

[ 13 ] Brand S, Dambacher J, Beigel F, et al. IL-22-mediated liver cell regeneration is abrogated by SOCS-1/3 overexpression in vitro [ J ]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 292( 4 ): G1019-G1028.

[ 14 ] Langowski JL, Kastelein RA, Oft M. Swords into plowshares: IL-23 repurposes tumor immune surveillance [ J ]. *Trends Immunol*, 2007, 28( 5 ): 207-212.

[ 15 ] Langowski JL, Zhang X, Wu L, et al. IL-23 promotes tumor incidence and growth [ J ]. *Nature*, 2006, 442( 7101 ): 461-465.

[ 16 ] Numasaki M, Fukushi J, Ono M, et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth [ J ]. *Blood*, 2003, 101( 7 ): 2620-2627.

[ 17 ] Tartour E, Fossiez F, Joyeux I, et al. Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice [ J ]. *Cancer Res*, 59( 15 ): 3698-3704.

[ 18 ] Kryczek I, Wei S, Zou L, et al. Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment [ J ]. *J Immunol*, 2007, 178( 11 ): 6730-6733.

[ 19 ] 杨智. 慢性 HBV 感染者 PBMCs 中 IL-22、IL-17、T-bet、GATA3 和 Foxp3 表达及其意义 [ D ]. 广州: 暨南大学医学院, 2012: 19-20.

[ 收稿日期 ] 2014 - 09 - 02 [ 修回日期 ] 2014 - 12 - 05  
[ 本文编辑 ] 阮芳铭

