

聚乙二醇干扰素 α -2a 治疗慢性乙型肝炎患者外周血 IL-32 的表达水平及意义

刘永萍 顾慧华 徐晶 郑燕 黄伟 赵春 刘雁

杭州市西溪医院肝病科 310023

通信作者:刘雁,Email:lyliu2068@sina.com,电话:0571-86481528

【摘要】 目的 阐明经治疗的慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者外周血 IL-32 的表达水平,探讨 IL-32 水平与谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、白蛋白(ALB)及 HBV DNA 载量的相关性。**方法** 选择干扰素治疗 CHB 患者 30 例以及健康对照者 30 例,TRIzol 法提取外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)总 RNA,应用实时荧光定量 PCR 检测 IL-32 mRNA 的表达水平,并与患者 ALT、AST、ALB 和 HBV DNA 进行统计学分析。**结果** 干扰素治疗 CHB 患者外周血 IL-32 的 mRNA 表达水平显著低于健康对照者($P=0.000$),且与血清 ALT、AST 呈正相关($P=0.035, P=0.032$),与 ALB 和 HBV DNA 载量无相关性($P=0.856, P=0.580$)。**结论** 经干扰素治疗 CHB 患者 IL-32 mRNA 表达水平显著降低,IL-32 水平与肝脏炎症程度相关。

【关键词】 白细胞介素-32;慢性乙型肝炎;聚乙二醇 α -2a;肝脏;炎症

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.01.018

IL-32 expression in peripheral blood mononuclear cells of chronic hepatitis B virus-infected patients with PEG IFN- α -2a treated and its significance

Liu Yongping, Gu Huihua, Xu Jing, Zheng Yan, Huang Wei, Zhao Chun, Liu Yan

Department of Hepatology, Xixi Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310023, China

Corresponding author: Liu Yan, Email: lyliu2068@sina.com, Tel:0086-571-86481528

【Abstract】 Objective To investigate the expression level of IL-32 in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and its correlation with serum biochemical indices of liver function test and HBV DNA load in chronic hepatitis B (CHB) patients with PEG IFN- α -2a treated.**Methods** Thirty CHB patients with PEG IFN- α -2a treated (CHB group) and thirty normal health donors (health group) were enrolled in the study. Total RNA in PBMCs was extracted by using TRIzol. Then IL-32 mRNA level was assayed by using Real-time PCR. The correlation between IL-32 and ALT, AST, TBIL, HBV DNA load was analyzed using pearson's correlation analysis, respectively. **Results** IL-32 expression level in CHB group was significantly lower than that of health group. Moreover, the difference between them was statistically significant ($P=0.000$). IL-32 level was positively correlated with serum ALT and AST, respectively ($P=0.035, P=0.032$), but was not correlated with ALB and HBV DNA load ($P=0.856, P=0.580$). **Conclusions** IL-32 expression level was decreased in CHB patients with PEG IFN- α -2a Treated and was associated with the severity of inflammation.

【Key words】 Interleukin-32; Chronic Hepatitis B; PEG IFN- α -2a; Liver; Inflammation

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.01.018

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是影响我国人民健康的主要传染病之一。持续的慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)可能会演变为肝硬化和肝癌等。然而其发病机制迄今未完全明确,除与 HBV 的变异、宿主的年龄、性别和免疫状态有密切关系外,也与机体对病毒的清除能力和机体的免疫功能密切相关。固有免疫及适应性免疫均

参与了 HBV 感染后肝细胞的损伤^[1-2],细胞因子在 HBV 感染引起的肝损伤中发挥重要作用。

IL-32 是一种重要的促炎症细胞因子,主要来源于 NK 细胞、T 细胞、上皮细胞和单核细胞等,在固有免疫和天然免疫中都扮演着重要的角色^[3]。对于 IL-32 在乙型肝炎方面的研究,有报道指出 HBx 蛋白诱导 IL-32 的表达,且在未治疗 CHB 患者肝脏

组织中是高表达的^[4-5]。IL-32 具有免疫保护作用,可能在炎症反应中起放大效应^[6],在丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)、人乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV)引起的炎症性疾病中发挥重要作用^[7-8]。而 IL-32 如何发挥免疫保护的防御作用却尚不明确。本研究主要通过荧光定量的方法研究长效干扰素治疗 CHB 患者外周血单核细胞中 IL-32 的 mRNA 表达水平并分析 IL-32 与患者血清 ALT、AST、ALB 和 HBV DNA 载量的相关性。

1 对象与方法

1.1 研究对象

杭州市西溪医院肝病科 2015 年 9 月至 2017 年 12 月收治的 CHB 患者 30 例。采用聚乙二醇干扰素 α -2a180 μ g(上海罗氏制药有限公司)皮下注射,每周 1 次,疗程 48 周。另入选 30 名年龄、性别与入组病例相匹配的健康志愿者作为对照,两组差异无统计学意义($P>0.05$),所有病例诊断符合《慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)》标准^[9],排除其他肝炎病毒感染、合并自身免疫性肝炎、酒精性肝病等。本研究经杭州市西溪医院医学伦理委员会批准,所有入选患者和健康志愿者均签署知情同意书。

1.2 实验方法

1.2.1 外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs):

收集入选患者及健康志愿者 6 ml EDTA 抗凝血,2800 \times g 离心 10 min,同时准备 2 管 4 ml RPMI-1640 培养基和 1 管 4 ml Ficioll 淋巴细胞分离液;分离血浆后,用巴氏吸管将中间的淋巴细胞层吸取转移至其中 1 管 4 ml RPMI-1640 培养基中,并分别补足至 8 ml,缓慢铺入 4 ml Ficioll 淋巴细胞分离液中,3 000 \times g,离心 20 min 缓升缓降;离心后分 4 层,小心吸取云雾层淋巴细胞转至另 1 管 4 ml RPMI-1640 培养基中,继续加入 1640 补足至 12 ml,1800 \times g 离心 10 min;弃去上清;重新加入 1640 培养基重悬并补足至 12 ml,2 000 \times g 离心 10 min;弃去上层培养基后加入 1 ml TRIzol 混匀,转至 2 ml 冻存管低温保存。

1.2.2 RNA 提取与反转录:

TRIzol 低温冻存的 PBMC 细胞,加入 0.2 ml 的氯仿,摇晃 15 s 混匀后室温放置 2~3 min,然后 4 $^{\circ}$ C 12 000 \times g 离心 15 min;从上层水相中吸出约 400 μ l 的 RNA,加入 500 μ l 异丙醇,静置 10 min,12 000 \times g 离心 10 min;弃上清,用 75%酒精 1 ml 洗涤,7 500 \times g 离心 5 min,干

燥 RNA,用 RNase-free water 溶解 RNA。

逆转录 RT-PCR 采用 TaKaRa 的 PrimeScriptTM RT reagent Kit(RR047A)按说明书操作。反应程序为:37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min,然后 95 $^{\circ}$ C 孵育 5 min。反转录结束后将 cDNA 保存于 4 $^{\circ}$ C 备用,长期保存需至于-20 $^{\circ}$ C。

1.2.3 SYBR qPCR 检测 mRNA 相对表达水平:

采用 TaKaRa 的 SYBR[®] Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) (RR420 A),冰上融化 SYBR[®] Premix Ex Taq (2 \times Conc.)、ROX Reference Dye II (50 \times Conc.)、Primers 和 RNase-free Water 等试剂,然后按说明书推荐反应体系配制 PCR 反应液,在 96 孔板使用 ROX Reference Dye II 校正的 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies) 进行,反应程序为:95 $^{\circ}$ C 30 s 预变性,95 $^{\circ}$ C 5 s 变性,60 $^{\circ}$ C 34 s 退火加延伸进行 40 轮循环。

根据 NCBI 报道的 IL-32 及其主要异构体的剪切模式,Real-time PCR 引物(PrimerBank ID 61658637c1)设计在跨外显子 6 和 7 连接区域 78 bp。上游引物 IL-32-F:5'-TGCGCGCTTATTATGAG GAGC-3',下游引物 IL-32-R:5'-CTCGGCACCGT AATCCATCTC-3'。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 进行统计学数据分析,采用 Pearson 分析进行相关性分析。用 t 检验进行两组间比较,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 入组患者一般情况和临床特点

本研究共纳入 30 例经治 CHB 患者,具体临床特征详见表 1。男 19 例,女 11 例,年龄 25~48 岁,平均年龄 33.2 \pm 6.3 岁。均为聚乙二醇干扰素 α -2a 治疗中患者。

表 1 30 例入组慢性乙型肝炎患者的基本特征

Tab.1 The basic characteristics of 30 chronic hepatitis

B patients	
特征	患者(n=30)
性别(男/女)	19/11
年龄(岁)	33.2 \pm 6.3
谷丙转氨酶(ALT, Units/L)	169.8 \pm 147.7
谷草转氨酶(AST, Units/L)	103.0 \pm 93.6
白蛋白(ALB, g/L)	46.7 \pm 4.8
HBV DNA 载量(HBV DNA, lg IU/ml)	6.61 \pm 7.01

2.2 经治 CHB 患者外周血 IL-32 mRNA 表达

收集实验组与健康对照组外周血,分离 PBMCs,提取细胞总 RNA,反转录成 cDNA,实时荧光定量 PCR 检测 IL-32 mRNA 表达水平。采用 $\Delta\Delta CT$ 方法分析基因的相对表达量。结果如图 1 显示,实验组 IL-32 mRNA 表达显著低于健康对照组,差异具有统计学意义($P=0.000$)。

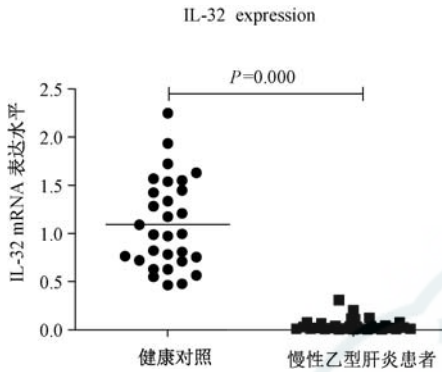


图 1 经聚乙二醇干扰素 α -2a 治疗的慢性乙型肝炎患者外周血单核细胞中 IL-32 mRNA 表达水平

Fig.1 The expression level of IL-32 mRNA in peripheral blood mononuclear cells of chronic hepatitis B patients treated by PEG IFN- α -2a

2.3 干扰素治疗 CHB 患者外周血 IL-32 水平与肝功能指标的相关性分析 见图 2,实验组外周血 IL-32 mRNA 表达水平与血清 ALT ($r=0.386, P=0.035$) 和 AST ($r=0.393, P=0.032$) 呈明显正相关。与血清 ALB ($r=0.035, P=0.856$) 和血清 HBV DNA 载量 ($r=0.105, P=0.580$) 无显著相关性。结果显示 IL-32 表达水平与肝脏损伤程度密切相关。

3 讨论

IL-32 曾经被命名为自然杀伤细胞转录本 4 (NK4),是一种促炎症细胞因子,位于人基因组 16 号染色体上,基因表达存在多种剪接异构现象^[3],其中 IL-32 α 是转录本最多的一种,而 IL-32 γ 的转录

本最长,也是最有生物活性的一种^[10]。IL-32 是一种重要的多功能细胞因子,在一些自身免疫性和炎症性疾病中都扮演着重要的角色,与多种疾病的发生有关^[11],IL-32 主要存在于 NK 细胞、T 细胞、上皮细胞和单核细胞等。在一些病变的炎症组织中也有表达,可以诱导 IL-1 β 、IL-6、IL-8、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、巨噬细胞炎症蛋白 2 等细胞因子的表达^[3]。IL-32 在类风湿性关节炎中与 TNF- α 、IL-1 β 、IL-18 等炎症因子的表达密切相关^[12]。IL-32 α 在肠道炎症性疾病中诱导大量炎症因子表达从而参与炎症病理进程^[13]。在艾滋病和流感患者血清中 IL-32 表达水平显著高于正常人^[14-15]。在丙型肝炎的研究中发现,IL-32 的表达可以被 HCV 感染诱导,且表达量与 HCV 相关的肝炎、肝癌和肝纤维化有密切的关系^[7, 16]。

目前国内外大多数报道表明细胞因子水平的高低可能与 HBV 感染的临床分型、预后有关,对于 IL-32 在乙型肝炎方面的研究报道较少。Xu 等^[17] 研究指出 CHB 患者肝脏中 IL-32 的表达水平与病情的严重程度和血清 ALT 水平呈正相关,同时,在 HBV 感染过程中,促炎症因子的调控网络可导致肝脏的损伤^[7]。体外肝细胞系研究中证实,细胞凋亡是 IL-32 诱导的肝损伤的重要机制^[17]。最近研究发现,乙肝相关急慢性肝衰竭患者中 IL-32 表达水平与肝脏病变的严重程度呈正相关^[18]。此外,研究还证实了 HBV 诱导产生 IL-32 的机制是 HB 蛋白通过激活 NF- κ B 诱导表达的。对于 IL-32 的抗病毒作用,肝癌细胞系中过表达 IL-32 γ 或用 rhuIL-32 γ 治疗 HBV 感染的细胞,IL-32 γ 并没有改变病毒复制,而在 PBMCs, Jurkat T 细胞或 THP-1 细胞中, rhuIL-32 γ 能够诱导作为抗病毒因子 IFN- λ 1 的产生从而控制 HBV 的复制。同样,感染 HBV 的患者,呈现出血清和肝组织中 IL-32 和 IFN- λ 1 水平较高,且呈正相关。

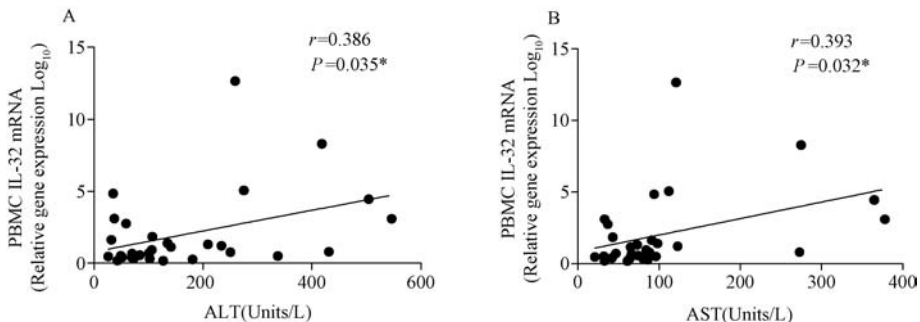


图 2 慢性乙型肝炎患者 IL-32 mRNA 水平与肝功能指标的相关分析

Fig.2 The correlation of IL-32 mRNA level and liver function in chronic hepatitis B patients

表明 IL-32 γ 通过诱导 IFN- λ 1 呈现抗病毒的作用^[19]。

在 IL-32 与 HBV 感染的相关性方面,研究表明急性乙型肝炎/CHB 患者 IL-32 表达水平较健康对照者有着明显的不同。急性乙肝患者中 IL-32 的表达水平显著高于 CHB 患者,并且在 CHB 患者中随着病情的加重患者 IL-32 的水平相应升高的也更加明显。而本研究发现 IL-32 在聚乙二醇干扰素治疗的 CHB 患者外周血中的表达水平则是显著低于健康对照者。结果提示 IL-32 可能也参与了 HBV 感染性疾病进展过程中的免疫调控,IL-32 可能是 CHB 治疗过程中介导和调节多种炎症因子的核心分子,可能成 CHB 诊治的潜在靶点。

利益冲突 所有作者均申明不存在利益冲突

作者贡献声明 刘永萍:实验操作、论文撰写;徐晶、郑燕、黄伟:数据整理、统计学分析;赵春、顾慧华、刘雁:研究指导、论文修改、经费支持

参考文献

- [1] Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response [J]. *Annu Rev Immunol*, 2001, 19: 65-91. DOI: 10.1146/annurev.immunol.19.1.65.
- [2] Rehermann B. Chronic infections with hepatotropic viruses; mechanisms of impairment of cellular immune responses [J]. *Semin Liver Dis*, 2007, 27(2): 152-160. DOI: 10.1055/s-2007-979468.
- [3] Kim SH, Han SY, Azam T, et al. Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNF α [J]. *Immunity*, 2005, 22(1): 131-142. DOI: 10.1016/j.immuni.2004.12.003.
- [4] Pan X, Cao H, Lu J, et al. Interleukin-32 expression induced by hepatitis B virus protein X is mediated through activation of NF- κ B [J]. *Mol Immunol*, 2011, 48(12-13): 1573-1577. DOI: 10.1016/j.molimm.2011.03.012.
- [5] 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. DOI: 10.1016/j.jinf.2012.05.009.
- [6] Netea MG, Azam T, Lewis EC, et al. Mycobacterium tuberculosis induces interleukin-32 production through a caspase-1/IL-18/interferon-gamma-dependent mechanism [J]. *PLoS Med*, 2006, 3(8): e277. DOI: 10.1371/journal.pmed.0030277.
- [7] 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. DOI: 10.1002/hep.24285.

- [8] Lee S, Kim JH, Kim H, et al. Activation of the interleukin-32 pro-inflammatory pathway in response to human papillomavirus infection and over-expression of interleukin-32 controls the expression of the human papillomavirus oncogene [J]. *Immunology*, 2011, 132(3): 410-420. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2010.03377.x.
- [9] 中华医学会肝病学会与中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010年版) [J]. *中华肝脏病杂志*, 2011, 19(1): 13-24. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2011.01.007.
- [10] Choi JD, Bae SY, Hong JW, et al. Identification of the most active interleukin-32 isoform [J]. *Immunology*, 2009, 126(4): 535-542. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2008.02917.x.
- [11] Joosten LA, Heinhuis B, Netea MG, et al. Novel insights into the biology of interleukin-32 [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(20): 3883-3892. DOI: 10.1007/s00018-013-1301-9.
- [12] Joosten LA, Netea MG, Kim SH, et al. IL-32, a proinflammatory cytokine in rheumatoid arthritis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(9): 3298-3303. DOI: 10.1073/pnas.0511233103.
- [13] Andoh A, Yaqi Y, Shioya M, et al. Mucosal cytokine network in inflammatory bowel disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(33): 5154-5161. DOI: 10.3748/wjg.14.5154.
- [14] Li W, Liu Y, Mukhtar MM, et al. Activation of interleukin-32 pro-inflammatory pathway in response to influenza A virus infection [J]. *PLoS One*, 2008, 3(4): e1985. DOI: 10.1371/journal.pone.0001985.
- [15] Rasool ST, Tang H, Wu J, et al. Increased level of IL-32 during human immunodeficiency virus infection suppresses HIV replication [J]. *Immunol Lett*, 2008, 117(2): 161-167. DOI: 10.1016/j.imlet.2008.01.007.
- [16] Hou J, van Oord G, Groothuisink ZM, et al. Gene expression profiling to predict and assess the consequences of therapy-induced virus eradication in chronic hepatitis C virus infection [J]. *J Virol*, 2014, 88(21): 12254-12264. DOI: 10.1128/JVI.00775-14.
- [17] 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. DOI: 10.1016/j.jinf.2012.05.009.
- [18] Zou Y, Bao J, Pan X, et al. NKP30-B7-H6 interaction aggravates hepatocyte damage through up-regulation of interleukin-32 expression in hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure [J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0134568. DOI: 10.1371/journal.pone.0134568.
- [19] Li Y, Xie J, Xu X, et al. Inducible interleukin 32 (IL-32) exerts extensive antiviral function via selective stimulation of interferon λ 1 (IFN- λ 1) [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(29): 20927-20941. DOI: 10.1074/jbc.M112.440115.

(收稿日期:2018-03-18)

(本文编辑:吕新军)