

# 白细胞介素 18 在胃癌中的表达及其临床意义

Expression of IL-18 in Gastric Cancer and Its Clinical Significance

FANG Ren-gui, WANG Jian-jun, WANG Xue-jun, et al.

方仁桂, 王建军, 王学军, 严世立, 李 定

(淳安县第一人民医院, 浙江 淳安 311700)

**摘要:** [目的] 探讨白细胞介素(IL-18)在胃癌组织及其外周血中的表达及其临床意义。[方法] 应用 RT-PCR 技术检测 35 例胃癌患者癌组织及癌旁正常组织中 *IL-18* mRNA 表达水平, 同时应用 ELISA 方法分析了 35 例患者术前及 35 例健康对照人群血液中 IL-18 蛋白表达水平。[结果] 胃癌患者及健康对照人群血液中 IL-18 表达水平分别为 619.7pg/ml 和 248.1pg/ml, 差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。胃癌患者外周血 IL-18 表达水平与患者的浸润程度、淋巴结转移等均不相关, 与肿块大小相关。胃癌及癌旁正常组织中 *IL-18* mRNA 表达水平分别为  $1.06 \pm 1.01$  及  $1.19 \pm 0.95$ , 两者差异没有统计学意义。[结论] IL-18 与胃癌的发生进展有一定的相关性。

**关键词:** 胃肿瘤; 白细胞介素 18(IL-18); RT-PCR; ELISA

**中图分类号:** R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)05-0333-03

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 在我国死亡率位居恶性肿瘤的第 2 位。大部分胃癌患者在临床确诊时已是进展期或晚期, 尽管实施了有效的手术及化疗、放疗, 但 5 年生存率依然不到 40%<sup>[1]</sup>。胃癌的发生发展是一个多基因多阶段的过程, 其中一些细胞因子的表达对肿瘤的影响日益受到重视。白细胞介素 18(IL-18) 是一类主要由巨噬细胞分泌的细胞因子。IL-18 的分泌表达水平与机体的免疫状态有着密切的关系, IL-18 作为细胞因子网络中的重要一员, 调节 Th1 和 Th2 细胞因子介导的免疫反应, 可增强 NK 和 CTL 细胞活性、促进 T 细胞增殖活化、增强 Fas 介导的细胞毒作用等多种生物学功能<sup>[2]</sup>。业已发现 IL-18 表达水平与胃癌发生发展有一定相关性, 但存在争议<sup>[3]</sup>。本研究应用 RT-PCR 技术对胃癌组织及癌旁正常组织中 *IL-18* mRNA 表达水平进行了检测, 同时应用 ELISA 检测了患者外周血中 IL-18 蛋白表达水平, 以探讨 IL-18 表达对胃癌发生发展的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 临床资料

选择 2009 年 7 月~2010 年 11 月淳安县第一人

民医院经病理确诊并接受手术切除的胃癌患者 35 例, 其中男性 20 例, 女性 15 例, 年龄 35~81 岁, 中位年龄 60 岁。所有胃癌患者术前均未接受任何治疗。本次研究对象入选标准: ①术后常规病理证实为原发性胃癌; ②病理资料保存完整, 包括切缘正常黏膜、胃癌原发灶、淋巴结转移灶、浸润深度、肿块大小等; ③术前未经化学药物治疗及放射治疗; ④术中能够获得患者的癌组织及正常切缘。

所有患者均进行标准的 D<sub>2</sub> 根治性手术, 脾脏未进行常规切除。其中, Borrmann I、II、III、IV 型分别为 2 例、9 例、20 例和 4 例; 浸润深度: T<sub>2</sub> 1 例, T<sub>3</sub> 30 例, T<sub>4</sub> 4 例; 淋巴结转移数: N<sub>0</sub> 10 例; N<sub>1</sub> 7 例; N<sub>2</sub> 10 例; N<sub>3</sub> 8 例。

### 1.2 标本采集

采集胃癌患者术前血液, 同时获取本院体检中心 35 例性别、年龄配对的正常对照血液。用淋巴细胞分离液分离血浆, 并保存于 -80℃ 冰箱备用。获取 35 例胃癌患者的胃癌组织及癌旁正常组织, 取得以上标本后短期保存于 -80℃。将组织在液氮下进行碾磨, 磨成粉末状, 收集备用, 保存于 -80℃。

### 1.3 ELISA 检测

采用 ELISA (Invitrogen ELISA kit KHC0181) 检测外周血 IL-18 表达水平, 按说明书进行。根据胃癌患者的 IL-18 血浆表达水平中位数 (629pg/ml) 分为两组,  $\geq 629$ pg/ml 为高水平表达, 而  $< 629$ pg/ml 为低

基金项目: 杭州市科技发展计划项目(20091233Q35)

收稿日期: 2012-03-26; 修回日期: 2012-04-09

水平表达。

#### 1.4 RT-PCR 检测

采用 Trizol 试剂(Invitrogen)抽提总 RNA, 取 2 $\mu$ g RNA 进行逆转录及 cDNA 合成。设计 *IL-18*、*GAPDH* 引物如下:

*IL-18* 上游引物: 5'-TCTTCATTGACCAAG-GAAATCGG-3';

*IL-18* 下游引物: 5'-CACAGAGATAGT-TACAGCCATACC-3';

*GAPDH* 上游引物: 5'-CTTAGCACCCCTGGC-CAAG-3';

*GAPDH* 下游引物: 5'-GATGTTCTGGA-GAGCCCCG-3'。

用 CybeGreen 染料进行定量 PCR, 定量 PCR 检测在 ABI Prism 7500 型荧光 PCR 仪上进行, 反应体积为 25 $\mu$ l, 内含 cDNA 2 $\mu$ l, 按说明书操作。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 10min, (95 $^{\circ}$ C 10s, 58 $^{\circ}$ C 20s, 72 $^{\circ}$ C 20s) $\times$ 40 个循环, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 4 $^{\circ}$ C。目的基因表达阳性的标本荧光定量扩增曲线呈现 S 型, 阴性标本则成不规则波浪线, 未见特异性条带。 $\Delta$ Ct=样本 Ct 均值-内参照 Ct 均值,  $\Delta\Delta$ Ct= $\Delta$ Ct-(随机阴性对照样品 Ct 均值-该样品内参照 Ct 均值)。样品起始 cDNA 量, 即 mRNA 量, 以相对 Ct 值的方法计算, 表示为  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。根据胃癌患者的 *IL-18* 组织表达水平,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  中位数 0.81 分为两组,  $\geq 0.81$  为高水平表达, 而  $< 0.81$  为低水平表达。

#### 1.5 统计学处理

采用 SPSS12.0 统计软件进行数据分析。计数资料均采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 胃癌患者与正常对照血液 *IL-18* 蛋白表达水平比较

结果显示正常对照 *IL-18* 平均表达水平为 248.1pg/ml, 而胃癌患者 *IL-18* 平均表达水平为 619.7pg/ml, 两者具有显著性差异 ( $P < 0.001$ )。对 35 例胃癌患者与临床参数之间的关系进行研究, 发现胃癌患者血液 *IL-18* 蛋白表达水平与肿瘤浸润深度、淋巴结转移等临床参数均无关, 而仅与肿块大小有关(表1)。

表 1 胃癌患者 *IL-18* 蛋白表达与临床参数之间的关系

| 临床参数      | 例数 | <i>IL-18</i> 表达水平 |               | P     |
|-----------|----|-------------------|---------------|-------|
|           |    | $\geq 629$ pg/ml  | $< 629$ pg/ml |       |
| 年龄(岁)     |    |                   |               |       |
| >58       | 18 | 11(61.1)          | 7(38.9)       | 0.318 |
| $\leq 58$ | 17 | 7(41.2)           | 10(58.8)      |       |
| 性别        |    |                   |               |       |
| 男性        | 20 | 10(50.0)          | 10(50.0)      | 1.000 |
| 女性        | 15 | 8(53.3)           | 7(46.7)       |       |
| 肿瘤部位      |    |                   |               |       |
| 贲门        | 7  | 3(42.9)           | 4(57.1)       | 0.223 |
| 胃体        | 5  | 1(20.0)           | 4(80.0)       |       |
| 胃窦        | 23 | 14(60.9)          | 9(39.1)       |       |
| 组织分化      |    |                   |               |       |
| 高/中分化     | 17 | 7(41.2)           | 10(58.8)      | 0.318 |
| 低/未分化     | 18 | 11(61.1)          | 7(38.9)       |       |
| 肿块大小(cm)  |    |                   |               |       |
| $\geq 5$  | 25 | 16(64.0)          | 9(36.0)       | 0.027 |
| $< 5$     | 10 | 2(20.0)           | 8(80.0)       |       |
| 浆膜浸润      |    |                   |               |       |
| 浸及浆膜      | 31 | 16(51.6)          | 15(48.4)      | 1.000 |
| 浸出浆膜      | 4  | 2(50.0)           | 2(50.0)       |       |
| 淋巴结转移     |    |                   |               |       |
| 是         | 25 | 14(56.0)          | 11(44.0)      | 0.471 |
| 否         | 10 | 4(40.0)           | 6(60.0)       |       |

注: 括号前为例数, 括号内为百分数。

### 2.2 胃癌组织与癌旁正常组织 *IL-18* mRNA 表达水平比较

对胃癌组织及癌旁正常组织 *IL-18* mRNA 表达水平研究发现, *IL-18* mRNA 水平在胃癌组织 ( $1.06 \pm 1.01$ ) 及癌旁正常组织 ( $1.19 \pm 0.95$ ) 中没有明显差异 ( $P = 0.884$ )。进一步分析胃癌组织中 *IL-18* mRNA 表达水平与临床参数的关系发现, *IL-18* mRNA 表达水平与患者的浸润程度、淋巴结是否转移等均不相关(表 2)。

## 3 讨论

胃癌是高发病率、高死亡率的恶性肿瘤, 东亚地区包括日本、韩国及中国等高发。为提高胃癌的检出率及早期胃癌的发现率, 日本进行胃镜普查, 从而使日本早期胃癌检出率达到 50% 以上, 胃癌患者生存期明显延长, 预后大大改善。目前, 我国胃癌患者发现时大多已属中晚期, 仅仅约 40% 患者能够进行手术治疗, 预后很差<sup>[4]</sup>。

目前对于早期发现胃癌及胃癌风险评估还没有

表 2 胃癌组织 IL-18 mRNA 表达水平与临床参数的关系

| 临床参数     | 例数 | IL-18 mRNA 表达水平 |          | P     |
|----------|----|-----------------|----------|-------|
|          |    | ≥0.81           | <0.81    |       |
| 年龄(岁)    |    |                 |          |       |
| >58      | 18 | 7(38.9)         | 11(61.1) | 0.181 |
| ≤58      | 17 | 11(64.7)        | 6(35.3)  |       |
| 性别       |    |                 |          |       |
| 男性       | 20 | 11(55.0)        | 9(45.0)  | 0.738 |
| 女性       | 15 | 7(46.7)         | 8(53.3)  |       |
| 肿瘤部位     |    |                 |          |       |
| 贲门       | 7  | 3(42.9)         | 4(57.1)  | 0.701 |
| 胃体       | 5  | 2(40.0)         | 3(60.0)  |       |
| 胃窦       | 23 | 13(56.5)        | 10(43.5) |       |
| 组织分化     |    |                 |          |       |
| 高/中分化    | 17 | 8(47.1)         | 9(52.9)  | 0.740 |
| 低/未分化    | 18 | 10(55.6)        | 8(44.4)  |       |
| 肿块大小(cm) |    |                 |          |       |
| ≥5cm     | 25 | 10(40.0)        | 15(60.0) | 0.060 |
| <5cm     | 10 | 8(80.0)         | 2(20.0)  |       |
| 浆膜浸润     |    |                 |          |       |
| 浸及浆膜     | 31 | 16(51.6)        | 15(48.4) | 1.000 |
| 浸出浆膜     | 4  | 2(50.0)         | 2(50.0)  |       |
| 淋巴结转移    |    |                 |          |       |
| 是        | 25 | 14(56.0)        | 11(44.0) | 0.471 |
| 否        | 10 | 4(40.0)         | 6(60.0)  |       |

注:括号前为例数,括号内为百分数。

很好的分子标志物。最近研究提示,IL-18 可能与肿瘤的发生发展有一定的相关性。对乳腺癌等恶性肿瘤的研究发现,IL-18 在肿瘤组织中高表达,而在癌周正常组织中低表达<sup>[5]</sup>。

为阐明 IL-18 表达与胃癌发生发展的关系,我们对胃癌患者及正常对照进行外周血 IL-18 表达水平测定,同时对胃癌组织及癌旁正常组织 IL-18

mRNA 表达水平进行测定。结果显示,在胃癌患者外周血中 IL-18 表达水平明显高于正常对照,两者差异具有统计学意义( $P<0.001$ )。对胃癌组织和癌旁正常组织 IL-18 mRNA 表达水平检测发现,两者没有明显差异。以上结果提示血液中 IL-18 表达水平可能可以作为胃癌诊断的辅助指标之一。胃癌组织和正常组织中 IL-18 mRNA 表达水平没有差异,可能与病例数相对偏少有关。

本实验初步研究了 IL-18 在胃癌患者中的表达情况,阐述了 IL-18 表达水平与肿瘤发生发展的相关性。可考虑进一步从动物实验中验证 IL-18 与胃癌发生发展的相关性,阐明机制。但是由于条件所限,本实验样本量不大,还可以进一步加大样本量证实。

### 参考文献:

- [1] 景晶晶,刘绘园,郝金宽,等. 2004~2010 年庄河地区胃癌死亡情况及趋势分析[J]. 中国肿瘤,2012,21(1):13-17.
- [2] Lédée N, Petitbarat M, Rahmati M, et al. New pre-conception immune biomarkers for clinical practice: interleukin-18, interleukin-15 and TWEAK on the endometrial side, G-CSF on the follicular side [J]. J Reprod Immunol, 2011, 88(2): 118-123.
- [3] Kang JS, Bae SY, Kim HR, et al. Interleukin-18 increases metastasis and immune escape of stomach cancer via the downregulation of CD70 and maintenance of CD44 [J]. Carcinogenesis, 2009, 30(12):1987-1996.
- [4] Leung WK, Wu MS, Kakugawa Y, et al. Screening for gastric cancer in Asia: current evidence and practice [J]. Lancet Oncol, 2008, 9(3): 279-287.
- [5] Srabović N, Mujagić Z, Mujanović-Mustedanagić J, et al. Interleukin 18 expression in the primary breastcancer tumour tissue [J]. Med Glas Ljek Komore Zenicko-doboj Kantona, 2011, 8(1): 109-115.