

白细胞介素-32和基质金属蛋白酶-2对原发性肝细胞癌的诊断价值

邹美银 朱勇根 汪美华 吴月平 俞冲

【摘要】目的 探讨白细胞介素(IL)-32和基质金属蛋白酶(MMP)-2对原发性肝细胞癌(PHC)的临床诊断价值。**方法** 选择38例PHC及32例肝硬化患者作为研究对象,采用酶联免疫吸附试验检测血清MMP-2和IL-32表达水平,分析其与甲胎蛋白(AFP)的相关性及对PHC的诊断价值。**结果** PHC患者血清MMP-2表达水平显著高于肝硬化及健康对照组($t = 4.012, 3.707, P = 0.000, 0.001$); PHC患者血清IL-32表达水平高于肝硬化及健康对照组($t = 3.265, 9.001, P = 0.002, 0.000$),肝硬化患者高于健康对照组($t = 6.876, P = 0.000$);血清MMP-2、IL-32和AFP预测PHC发生ROC面积为0.827、0.702和0.873;三者均能较好地预测PHC发生(P 均 < 0.05);以血清MMP-2、IL-32和AFP为参数,拟合预测PHC发生的Logistic二元回归方程,模型方程拟合优度高($\chi^2 = 0.714, P = 0.994$),准确率达到89.47%(34/38)。**结论** IL-32、MMP-2和AFP均能较好地预测PHC的发生,若三者联合作为预测因素,则准确性更高。

【关键词】 肝细胞癌; 白细胞介素-32, 金属蛋白酶-2

Diagnostic value of interleukin-32 and matrix metalloproteases-2 for primary hepatocellular carcinoma

ZOU Mei-yin, ZHU Yong-gen, WANG Mei-hua, WU Yue-ping, YU Chong. Department of Infectious Diseases, the Third Hospital of Nantong, Nantong 226006, China

Corresponding author: ZHU Yong-gen, Email: yonggenzhu@sina.com

【Abstract】Objective To explore the clinical value of interleukin (IL)-32, matrix metalloproteases (MMP)-2 for the diagnosis of primary hepatocellular carcinoma (PHC). **Methods** Total of 38 patients with PHC, 32 patients with liver cirrhosis and 20 healthy controls were enrolled in the study. IL-32, MMP-2 were detected by ELISA. The relationship between IL-32, MMP-2 and AFP and their predicting value for PHC were analyzed, respectively. **Results** The concentration of MMP-2 in the serum of patients with PHC was higher than that in patients with liver cirrhosis and healthy controls ($t = 4.012, 3.707; P = 0.000, 0.001$). The concentration of IL-32 in the serum of patients with PHC was higher than that in patients with liver cirrhosis and healthy controls ($t = 3.265, 9.001; P = 0.002, 0.000$), and that in patients with liver cirrhosis was higher than in healthy controls ($t = 6.876, P = 0.000$). The area under the ROC curves of MMP-2, IL-32, AFP in predicting PHC were 0.827, 0.702 and 0.873, respectively ($P < 0.05$). If taking MMP-2, IL-32 and AFP as parameter to predict occurrence of PHC, the logistic binary regression equation had high goodness-of-fit ($\chi^2 = 0.714, P = 0.909$), the accuracy was 89.47% (34/38). **Conclusions** MMP-2, IL-32 and AFP could predict occurrence of PHC, if taken as predictors together, would get very high accuracy.

【Key words】 Primary hepatocellular carcinoma; Interleukin-32; Matrix metalloproteases-2

原发性肝细胞癌(primary hepatocellular carcinoma, PHC)是人类常见的恶性肿瘤,据世界卫生组织2005年的统计结果显示肝癌仅次于肺癌和胃癌居癌症,其病死率位居第三位。而我国更是PHC的高发地区,每年死于肝癌约58.9万人,占全世界肝癌死亡人数的45%左右。在江苏启东地区,每年新发病例在60/10万人左右^[1]。PHC起病隐匿、发展快、

恶性程度高、转移早、生存时间短、预后极差,现有诊疗手段对早期诊断率低,手术前难以确定有无微小病灶转移,造成治疗手段预后效果较差。目前认为PHC的发生和发展是个多因素与多阶段的复杂过程,但细胞因子表达异常在PHC的发生发展中起到重要作用。因此,本研究选择最近发现的细胞因子白细胞介素(interleukin, IL)-32及基质金属蛋白酶(matrix metalloproteases, MMP)-2,作为研究对象,探讨其在PHC诊断中的价值。

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.06.006

基金项目:南通市社会发展项目(No. HS20120019)

作者单位:226006 南通市,南通市第三人民医院感染科

通讯作者:朱勇根, Email: yonggenzhu@sina.com

资料与方法

一、研究对象

本研究采用回顾性研究的方法,选择2008年5月至2012年6月于南通市第三人民医院住院的肝硬化和PHC患者共70例作为研究对象。其中男性54例,女性16例,年龄28~76岁,中位年龄52岁。其中肝硬化患者32例,均为静止性、代偿期肝硬化;PHC 38例,均为静止性、代偿期肝硬化基础。诊断标准均符合2010年修订的《慢性乙型肝炎防治指南》^[2]、2011年美国修订的《原发性肝细胞癌管理指南》^[3];同时排除合并人类免疫缺陷病毒、真菌、细菌等其他病原体感染;若因HBV、HCV干扰所致,排除已使用抗病毒药物者。随机抽取20例健康体检者作为对照组,其中男性11例,女性9例,年龄15~77岁。本研究获得患者和南通市第三人民医院医学伦理学委员会同意。

二、方法

1. 标本收集:入选病例于入院后第2天清晨自肘静脉采取空腹血标本约5 ml,分离血清保存在-70℃冰箱内,集中用于检测IL-32和MMP-2水平。同步留取血清标本测定丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、总胆红素(total bilirubin, TBil)、白蛋白(albumin, ALB)等肝功能指标、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)等指标。

2. 检测方法:7170A型全自动生化分析检测ALT、AST、TBil和ALB等肝功能指标,试剂盒

购自上海科华公司;BE COMPACT-X型血凝仪检测PT,试剂盒购自Biopool International公司;AXSYM化学发光仪检测AFP,试剂盒购自雅培公司。IL-32和MMP-2分别采用上海精美公司和美国BD公司试剂盒,采用酶联免疫吸附试验进行检测,用ELX800酶标仪读取A值。操作严格按试剂盒使用说明进行。

三、统计学处理

应用SPSS 16.0软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数比较用 t 检验,多组均数比较用方差分析,变量间相互关系采用Pearson直线相关分析,预测相关事件发生采用Logistic二元回归;应用MedCalc 9.5.5.0统计软件绘制受试工作者曲线(ROC曲线),计算最佳预测值、灵敏度、特异性。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、PHC、肝硬化患者肝功能指标和AFP水平
本研究中PHC、肝硬化病例ALT、AST、TBil和PT等肝功能指标差异无统计学意义($P > 0.05$),PHC患者AFP表达水平显著高于肝硬化患者($P < 0.05$),见表1。

二、各组患者血清MMP-2和IL-32水平

PHC患者血清MMP-2表达水平显著高于肝硬化及健康对照组($t = 4.012, 3.707, P = 0.000, 0.001$),肝硬化与健康对照组差异无统计学意义;PHC患者血清IL-32表达水平高于肝硬化患者及健康对照组($t = 3.265, 9.001, P = 0.002, 0.000$),肝硬化患者高于健康对照组($t = 6.876, P = 0.000$),见表2。

表1 PHC和肝硬化患者的肝功能指标和AFP水平($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	ALT (U/L)	AST (U/L)	TBil ($\mu\text{mol/L}$)
PHC组	34	82.41 \pm 81.34	66.65 \pm 19.53	29.67 \pm 13.73
肝硬化组	32	60.00 \pm 45.13	50.63 \pm 17.74	24.94 \pm 12.19
t		1.372	0.554	1.756
P		0.175	0.581	0.084

组别	例数	ALB (g/L)	PT (s)	AFP (ng/L)
PHC组	34	33.95 \pm 7.09	15.55 \pm 3.60	13083.73 \pm 2776.73
肝硬化组	32	36.86 \pm 4.69	14.95 \pm 2.15	17.15 \pm 16.76
t		1.977	0.796	4.706
P		0.053	0.429	0.000

表2 各组患者血清MMP-2和IL-32表达水平($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	MMP-2 (ng/ml)	IL-32 (ng/L)
PHC组	34	1.335 \pm 1.334	451.10 \pm 193.30
肝硬化组	32	0.385 \pm 0.353 ^a	320.48 \pm 158.49 ^a
对照组	20	0.487 \pm 0.308 ^a	75.50 \pm 11.23 ^{ab}
F		11.444	36.633
P		0.000	0.000

注:^a与PHC组相比, $P < 0.005$;^b与肝硬化组相比, $P = 0.000$

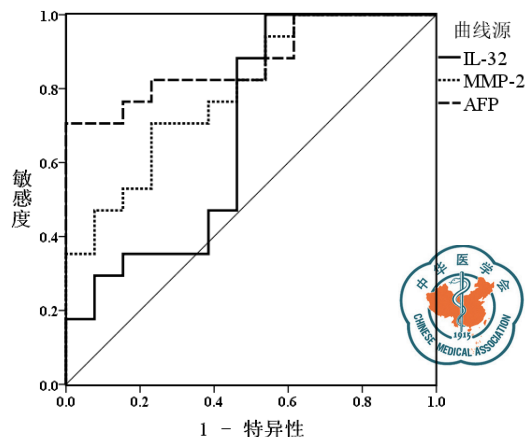


图1 MMP-2、IL-32和AFP预测PHC发生的ROC曲线

三、血清MMP-2、IL-32和AFP预测PHC发生的ROC分析

血清MMP-2、IL-32和AFP均能较好预测PHC发生 ($P < 0.05$), 三者差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表3和图1。

四、血清MMP-2、IL-32和AFP预测PHC的Logistic分析

以血清MMP-2、IL-32和AFP为参数, 拟合Logistic二元回归方程, 模型方程拟合优度高 ($\chi^2 = 0.714$, $P = 0.909$), 预测PHC发生的准确率达89.47% (34/38), 较AFP单独作为预测因子准确性明显提高。对PHC发生的预测拟合方程为:

$$\ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = -10.939 + 5.021 \times \text{MMP-2} + 0.13 \times \text{AFP} + 0.008 \times \text{IL-32}$$

讨 论

有研究表明, 慢性HBV携带患者发生PHC概率为(0.4~0.6)%/年^[4], 而乙型肝炎肝硬化患者发生PHC的概率高达(3~8)%/年, 为HBV携带者的100倍。目前筛选PHC最常见的血清指标为AFP, 但其灵敏度及特异性均不高, 如AFP以20 ng/ml为界限, 其灵敏度仅为60%, 即使以400 ng/ml为界限, 灵敏度也仅为66%, 特异性为82%, 阳性预测值为60%^[5], 本研究发现AFP预测肝硬化患者发生PHC的准确性为71.05%, 虽较先前研究略高, 但仍较低。鉴于全球每年约有100万人死于HBV感染所

致的肝功能衰竭、肝硬化和PHC。我国目前仍为乙型肝炎大国, 更是PHC的高发地区。因此, 寻找新的作为肝细胞癌患者的预测指标有着重要的临床意义。

MMP是一组蛋白水解酶, 能有选择的降解细胞外基质中多种成分, 分泌生长因子、细胞因子, 还能激活潜在的细胞因子、生长因子以及趋化因子, 清除细胞表面蛋白(如细胞因子受体、细胞黏附因子和尿激酶受体等), 由于这些潜在的活性, 其在细胞的浸润、转移、调节信号通路、血管生成以及炎症等多方面起到重要作用, 其中, MMP-2发挥着主导作用。有研究表明, 由于上述功能效应, MMP-2在乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌和胆管癌等多种恶性肿瘤中表达明显增多, 且与肿瘤的浸润程度和预后密切相关^[6]; 在胃癌中的研究更是表明其参与了血管生成拟态的形成^[7]。有关其在肝细胞癌中的作用也有相关报道, Zhang等^[8]研究发现, 肝癌细胞中MMP-2表达增加, 且显著高于正常肝细胞及癌旁组织, 提示其可作为侵袭和转移的指标, 且与复发几率和时间密切相关^[9-10], 抑制MMP-2后, 肝癌细胞的浸润转移特性明显减低^[11]; 使用microRNA-21可使MMP-2表达下降^[12], 抑制Hep-2细胞的致癌特性^[12]。但其是否可以作为PHC的预测指标, 目前尚鲜见相关报道。本研究发现, 在PHC患者血清中, MMP-2表达水平显著高于肝硬化和健康对照组, 研究结果进一步表明, MMP-2参与了PHC的发生。采用ROC曲线分析发现, MMP-2与传统AFP相比, 预

表3 MMP-2、IL-32和AFP预测PHC发生的ROC分析指标

指标	C-statistic	95%CI	Z statistic	P^a	最佳临界值	灵敏度(%)	特异性(%)	准确性(%)
MMP-2	0.827	0.692~0.920	4.809	0.000	0.70 ng/ml	70.59	81.25	73.68 (28/38)
IL-32	0.702	0.555~0.824	2.463	0.014	230.50 ng/L	88.24	50.00	57.89 (22/38)
AFP	0.873	0.736~0.955	6.217	0.000	60.52 ng/L	70.59	95.41	71.05 (27/38)

注: ^a与ROC = 0.5相比。

测PHC发生的ROC面积差异无统计学意义,提示其能作为在肝硬化基础上发生肝细胞癌的预测指标,但其特异性不及AFP。

2005年, Kim等^[13]利用基因芯片技术研究IL-18诱导高表达基因时,意外合成了NK4 cDNA,并成功提取出NK4重组蛋白,重组NK4蛋白表现出能诱导单核细胞产生IL-1 β 、TNF- α 的促进炎症反应的功能,故又将其命名为IL-32。其生物学功能主要表现为:①诱导T细胞凋亡;②参与调节NK正常功能;③诱导单核细胞向巨噬细胞分化;④诱导细胞因子和趋化因子产生;⑤促进炎症介质释放等。IL-32在肿瘤的的研究不多见。仅有的研究表明,在胃癌组织中高度表达,伴有转移胃癌组织中较未伴有转移胃癌组织中表达水平明显升高,可能是胃癌组织中IL-32表达增多,为致癌细胞逃脱宿主免疫提供了条件,重而促进肿瘤细胞转移^[14];在食道癌中的研究也发现,无论在肿瘤组织还是在血清标本中,IL-32均明显增多,提示IL-32参与了食管癌的发生与发展^[15];有研究认为IL-32可作为肾透明细胞癌发生的预测因素,且与复发、生存时间明确相关^[16];血液系统肿瘤研究也发现,骨髓异常增生综合征患者表达IL-32较健康人明显增多,但慢性粒细胞性白血病患者IL-32表达水平仅为健康人1/10,研究认为IL-32可最为区别骨髓异常增生综合征和慢性粒细胞性白血病的区别之一^[17]。但在PHC的研究仍鲜见,本研究发现,PHC患者血清IL-32表达水平显著高于肝硬化和健康对照组,提示IL-32也参与了PHC的发生发展,考虑可能为IL-32过度表达,通过NF- κ B途径刺激TNF- α 、IL-6和IL-1 β 产生增多,上调p38激酶,而增多的p38激酶通过抑制细胞的程序性死亡,诱导PHC发生。在预测PHC发生方面,IL-32与MMP-2、AFP有同等的预测价值,灵敏度较前两者高,但特异性及准确性偏低。

上述研究结果发现,MMP-2、IL-32和AFP在PHC患者中表达均明显升高,但其准确性较差。能否将上述与肿瘤发生发展有关的指标联合作为肝硬化基础上PHC发生的预测因子呢?为此,本研究采用Logistic二元回归的方法进行了分析。结果表明,若将三者联合作为预测PHC发生的预测因子,其准确性较单一因子明显提高,高达89.47%,模型方程拟合优度高,提示三者联合预测PHC发生有较

高的临床价值,当然,本研究纳入病例数仍偏少,仍有待扩大样本例数进一步研究。

综上所述,MMP-2和IL-32均能预测肝硬化基础上PHC的发生,如将上述二因子联合AFP预测PHC发生,将具有更高的临床意义。

参 考 文 献

- 1 吴孟超. 原发性肝癌治疗的进展及展望. 第二军医大学学报,2002,23(1):1-4.
- 2 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010年版). 中国肝脏病杂志:电子版,2011,3(1):40-56.
- 3 Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*,2011,53(3):1020-1022.
- 4 Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, et al. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: A prospective study of 22707 men in Taiwan. *Lancet*,1981,2(8256):1129-1133.
- 5 Fomer A, Reig M, Bruix J. Alpha-fetoprotein for hepatocellular carcinoma diagnosis: the demise of a brilliant star. *Gastroenterology*,2009,137(1):26-29.
- 6 Bauvois B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochim Biophys Acta*,2012,1825(1):29-36.
- 7 廖世平,高青. 血管生成拟态及相关蛋白Mig-7、MMP-2在胃癌组织中的表达及临床意义. *细胞与分子免疫学杂志*,2013,29(2):194-196.
- 8 Zhang Q, Pan X, Huang Z, et al. Osteopontin enhances the expression and activity of MMP-2 via the SDF-1/CXCR4 axis in hepatocellular carcinoma cell lines. *PLoS One*,2011,6(8):e23831.
- 9 Chen R, Cui J, Xu C, et al. The significance of MMP-9 over MMP-2 in PHC invasiveness and recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Ann Surg Oncol*,2012,19(Suppl 3):S375-S384.
- 10 Zhang Q, Chen X, Zhou J, et al. CD147, MMP-2, MMP-9 and MVD-CD34 are significant predictors of recurrence after liver transplantation in hepatocellular carcinoma patients. *Cancer Biol Ther*,2006,5(7):808-814.
- 11 Wang N, Zhu M, Tsao SW, et al. Up-regulation of TIMP-1 by genipin inhibits MMP-2 activities and suppresses the metastatic potential of human hepatocellular carcinoma. *PLoS One*,2012,7(9):e46318.
- 12 Ren J, Sun Y, Zhao X, et al. Downregulation of miR-21 regulates MMP-2 expression and suppress migration of Laryngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck Oncol*,2012,4(2):65.
- 13 Kim SH, Han SY, Azam T, et al. Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNF-alpha. *Immunity*,2005,22(1):131-142.
- 14 Ishigami S, Arigami T, Uchikado Y, et al. IL-32 expression is an independent prognostic marker for gastric cancer. *Med Oncol*,2013,30(2):472.
- 15 Yousif NG, Al-Amran FG, Hadi N, et al. Expression of IL-32 modulates NF-kappaB and p38 MAP kinase pathways in human esophageal cancer. *Cytokine*,2013,61(1):223-227.
- 16 Lee HJ, Liang ZL, Huang SM, et al. Overexpression of IL-32 is a novel prognostic factor in patients with localized clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Lett*,2012,3(2):490-496.
- 17 Marcondes AM, Mhyre AJ, Stirewalt DL, et al. Dysregulation of IL-32 in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia modulates apoptosis and impairs NK function. *Proc Natl Acad Sci USA*,2008,105(8):2865-2870.

(收稿日期: 2013-04-15)

(本文编辑: 孙荣华)