

• 论 著 •

丙型肝炎患者血清 IL-32 的表达与丙型肝炎病毒载量的关系^{*}

朱 磊,张平安[△]

(武汉大学人民医院检验科 430063)

摘要:**目的** 研究丙型肝炎患者血清白细胞介素 32(IL-32)的表达水平及与丙型肝炎病毒(HCV)载量的相关性,探讨 IL-32 在丙型肝炎中的发病机制。**方法** 70 例丙型肝炎患者血清中 IL-32 的表达水平采用 ELISA 检测,并检测丙型肝炎患者血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST),用 Roche 荧光定量 PCR 系统检测血清 HCV 载量,同时测定 40 例健康对照者血清中 IL-32 和 ALT、AST 表达水平。**结果** 丙型肝炎患者的血清 IL-32、ALT、AST 水平显著高于健康对照组($P<0.01$),呈正相关关系;丙型肝炎患者血清中 IL-32 水平与血清 HCV 载量呈正相关关系。**结论** IL-32 与丙型肝炎的发病密切相关,可能是因为 HCV 能够促进 IL-32 的合成与释放。

关键词:丙型肝炎; 白细胞介素 32; HCV 载量; 丙氨酸氨基转移酶; 天门冬氨酸氨基转移酶
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.02.012 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2017)02-0184-04

Relationship between serum IL-32 expression and hepatitis C virus load in patients with hepatitis C^{*}

ZHU Lei,ZHANG Ping'an[△]

(Department of Clinical Laboratory,the People's Hospital of Wuhan University,Wuhan,Hubei 430063,China)

Abstract:**Objective** To study the relationship between serum interleukin 32 (IL-32) expression and hepatitis C virus (HCV) load in patients with hepatitis C ,and to explore the role of IL-32 in the pathogenesis of HCV. **Methods** The expression level of IL-32 in 70 cases of patients with hepatitis C in serum was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA),and the serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were detected. Serum HCV viral load was detected by Roche fluorescence quantitative PCR system,and the expression levels of IL-32,ALT and AST were measured in 40 healthy control subjects. **Results** The levels of IL-32,ALT and AST in serum of patients with hepatitis C were significantly higher than those in healthy control group ($P<0.01$),and showed a positive correlation; there was a positive correlation between serum IL-32 level and serum HCV load in patients with hepatitis C. **Conclusion** IL-32 is closely related to the pathogenesis of hepatitis C,probably because HCV can promote the synthesis and release of IL-32.

Key words:hepatitis C; interleukin-32; HCV load; alanine aminotransferase; aspartate aminotransferase

丙型肝炎主要是由丙型肝炎病毒(HCV)感染引起,是一种具有病毒性的肝炎,其传播方式主要有 3 种,血液传播、性传播和母婴垂直传播^[1],主要对肝脏功能产生危害^[2]。根据世界卫生组织的统计,目前,全世界约有 3% 的人感染了 HCV,也就是说感染了 HCV 的人数近 1.8 亿人,感染者中无法清除 HCV 从而转为慢性病毒的携带者有 55%~85%,会导致慢性肝病发生,慢性肝病进一步发展为肝癌^[3]。HCV 会导致机体发生一系列炎症反应,最终会升高某些炎症因子^[4-6],最近统计研究发现 有 3.5 万例的丙型肝炎患者。在未来这一现象将更加严重,对患者的身体健康危害极大,可能导致相关社会和公共卫生问题的发生。

白细胞介素(IL)-32 是 2005 年 Kimetal 在用基因芯片方法研究 IL-18 可诱导基因时发现的一种新型 IL^[7]。新近研究表明,新发现的炎症因子 IL-32 参与机体的炎症反应^[8]。本文通过研究 70 例丙型肝炎患者血清中 IL-32 表达水平和血清 HCV 载量的关系,为探讨丙型肝炎的发病机制提供可靠的参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集武汉市三甲医院的丙型肝炎患者 70 例,所有患者不含其他肝病和其他疾病感染,患者未经干扰素等药物治疗,且 70 例患者均符合《病毒性肝炎防治方案》中的丙型

肝炎标准。健康对照组选用 40 例健康志愿者,其全部为正常献血员,以上受试者均签订知情同意书。两组受试者一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。调查对象基本信息见表 1。

表 1 调查对象基本信息

分组	性别	年龄(周岁)	例数(n)	民族
健康对照组	男	25~45	20	汉
	女	24~50	20	汉
丙型肝炎组	男	20~50	39	汉
	女	22~52	31	汉

1.2 标本采集 清晨空腹下使用空白采血管采集患者及健康对照者静脉血 5 mL,于常温下静置 2 h,凝固后,3 500 r/min 离心 10 min,取上清液,得到血清标本,低温保存。

1.3 血清 IL-32 水平测定 采用 ELISA 法检测血清 IL-32 的水平,人 ELISA 试剂盒购自美国 Genzyme 公司,严格按照说明书的步骤操作。

1.4 血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81102-002)。
作者简介:朱磊,男,检验技师,主要从事临床检验工作。 △ 通信作者,E-mail:zhangpingan@aliyun.com。

(AST)水平测定 提取丙型肝炎患者和健康对照者血清,采用全自动生化仪(深圳迈瑞生物公司)测定 ALT、AST 水平。

1.5 HCV 载量测定 提取丙型肝炎患者血清病毒 RNA,采用定量 PCR 方法测定,使用美国 Roche 公司生产的 LightCycler 型 PCR 检测仪检测,采用匹基公司生产的定量 PCR 试剂盒来测定血清中的病毒载量。

1.6 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计学软件进行有关统计学分析,计量资料结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。丙型肝炎患者血清 ALT、AST 和 IL-32 水平与健康对照组比较采用两独立样本 t

检验;IL-32 水平与血清病毒载量的相关性采用直线相关分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

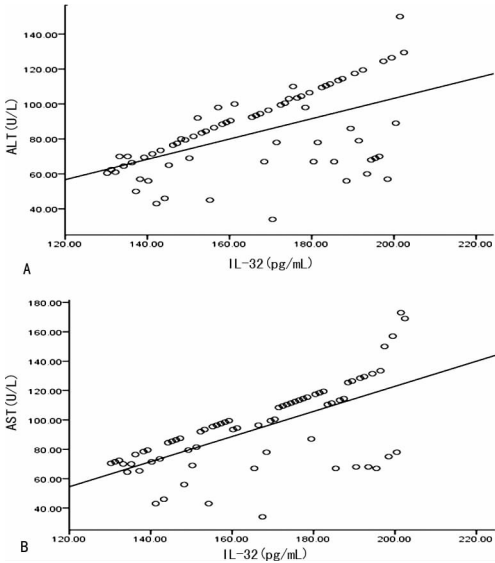
2 结 果

2.1 丙型肝炎患者血清 IL-32 表达水平与健康对照组比较 70 例丙型肝炎组患者血清中 ALT、AST、IL-32 的水平明显高于健康对照组,差异有统计学意义 ($P<0.01$);丙型肝炎组 AST/ALT 比值高于健康对照组,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 2。

表 2 丙型肝炎组与健康对照组血清 IL-32 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	ALT(U/L)	AST(U/L)	IL-32(pg/mL)	AST/ALT
健康对照组	40	25.35±12.53	29.47±20.16	79.79±39.40	1.07±0.15
丙型肝炎组	70	76.32±23.56	100.32±18.79	160.40±38.10	1.42±0.23

2.2 丙型肝炎患者血清 IL-32 水平与 ALT 和 AST 的相关性 70 例丙型肝炎患者的血清 IL-32 水平与 ALT 水平呈正相关关系($r=0.876, P<0.01$)。血清 IL-35 水平与 AST 水平呈正相关关系($r=0.943, P<0.01$),见图 1。



注:A 表示丙型肝炎与 ALT 的散点图;B 表示丙型肝炎与 AST 的散点图。

图 1 丙型肝炎患者血清 IL-32 水平与 ALT 和 AST 的相关性散点图

2.3 丙型肝炎患者血清 IL-32 水平与 HCV 载量的相关性 70 例丙型肝炎患者血清 IL-32 水平与 HCV 载量呈正相关关系($r=0.843, P<0.01$),70 例 HCV 载量的平均值为 $352\,000.00 \pm 2\,543.21$,见图 2。

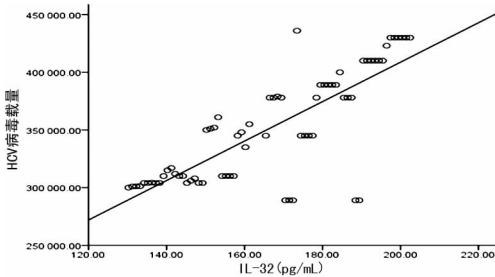


图 2 丙型肝炎患者血清 IL-32 水平与 HCV 载量的相关性散点图

3 讨 论

HCV 属于黄病毒科家族,它是一种具有包膜的含 960 个碱基的正义单链 RNA 基因的 RNA 病毒^[8],HCV 能够引起人体丙型肝炎的发生,目前对于其发病机制并不十分明确。有研究认为 HCV 的直接损伤是急性丙型肝炎的主要病因,宿主免疫的损伤作用可能与慢性丙型肝炎的发病机制有关,特异性体液免疫及细胞免疫可能发挥了重要作用^[9-10]。国外文献报道血清 HCV 水平与 ALT 水平呈正相关关系^[11],本研究结果也证实这一结论($P<0.01$),为进一步确定这种结论,本研究同时测定能反映肝功能的另一个指标——AST,发现血清 IL-32 水平与 AST 水平呈正相关关系($r=0.943, P<0.01$),这也说明 HCV 会引发肝脏发生疾病,引起肝细胞损害,导致血液中 ALT、AST 2 种转氨酶的水平比正常高 ($P<0.01$),对肝脏疾病的鉴别和诊断可以采用 AST/ALT 比值,对进一步了解病情变化具有十分重要的意义^[12]。国外有学者评价肝纤维化程度的高低,采用 AST/ALT 比值来判断,两者比值越大,就代表具有很高的肝脏纤维化程度,也表示越接近肝硬化^[13-14],本研究结果也表明 HCV 感染肝脏后其 AST/ALT 比值较正常高 ($P<0.05$)。

IL-32 是一种 IL 因子,研究较清楚的有 IL-32 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 ζ 6 种^[7,15],参与机体的炎症反应,其基因定位在含有 8 个小外显子的 16 号染色体上,IL-32 ϵ 和 IL-32 ζ 除了在活化的 T 细胞中表达外,其他细胞中还未见多量表达^[16]。主要由免疫细胞表达,但在一些炎症部位的组织中也有表达^[17]。IL-32 是一种通过促细胞分裂激活的淋巴细胞,IFN- γ 活化的上皮细胞,IL-12 和 IL-18 活化的自然杀伤细胞,再诱导产生细胞因子^[18]。IL-32 能提高多形核细胞转化成吞噬细胞的能力并杀灭细胞^[19]。若 IL-32 在 T 细胞中大量表达,就会诱导细胞凋亡^[17]和单核细胞的分化^[20],体外实验证实 IL-32 能通过环氧酶 1 途径抑制 HIV 和甲型流感病毒^[21-22],其他很多病毒如 HIV、流感病毒都能够上调 IL-32 的表达^[23],在研究有关乙型肝炎的问题中也发现 IL-32,乙型肝炎患者 IL-32 的血清水平也明显升高^[24],在本研究中,检测丙型肝炎患者血清中 IL-32 表达水平发现,其 IL-32 的水平为 (160.40 ± 38.10) pg/mL,较健康对照者的 (79.79 ± 39.40) pg/mL 显著升高 ($P<0.01$),从而表明 HCV 能在一定程度上引起机体的炎症反应发生,由此可知 IL-32 与丙型肝炎患者的肝脏炎症及纤维化程度密切相关^[25]。

本研究表明,丙型肝炎患者血清中 HCV 载量与 IL-32 水平呈相关性($r=0.843, P<0.01$),这也说明感染 HCV 以后机体会通过一系列反应来表现这种状态,如释放炎症因子 IL-32,所以丙型肝炎患者血清中 HCV 载量越多,释放的炎症因子也越多,有文献报道丙型肝炎的发病可能与多种细胞因子有关,过量的细胞因子可能对肝组织造成损伤^[26-27]。

综上所述,IL-32 与 HCV 所致肝脏细胞的炎症反应的发生关系十分密切,且在丙型肝炎的发病机制中,HCV 促进机体细胞因子 IL-32 的合成与释放。有研究证实流感病毒和乙型肝炎病毒(HBV)通过激活 CREB 和核转录因子 κ B(NF- κ B) 通路诱导 IL-32 的转录^[28],研究还证实 NF- κ B 的活化可促进 HBV 诱导产生 IL-32,因此推测,IL-32 在 HBV 感染的炎症应答过程起着重要作用^[29],其中 NF- κ B 和 CREB 信号途径发挥了重要作用,并且甲型流感病毒刺激产生的 IL-32 能反馈性地抑制病毒的复制^[30-31]。而且流感病毒还可通过改变 IL-32 表观遗传修饰,如降低 IL-32 启动子整体甲基化水平以及 CRE 位点的去甲基化来调节 IL-32 的表达^[32]。有研究证实,HCV 患者的血清中有特异的抗体能够识别 F 蛋白^[33],那么 F 蛋白与 IL-32 在丙型肝炎的发病过程中到底有什么联系,及 HCV 载量的关系。笔者将在下一步研究中来验证这一猜想,从而清楚丙型肝炎的发病机制,为治疗丙型肝炎奠定基础。

参考文献

[1] Chen SL, Morgan TR. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection[J]. Int J Med Sci, 2006, 3(2): 47-52.

[2] Kato N. Genome of human hepatitis C virus (HCV): gene organization, sequence diversity, and variation[J]. Microb Comp Genomics, 2000, 5(3): 129-151.

[3] Thomas DL. Global control of hepatitis C: where challenge meets opportunity[J]. Nat Med, 2013, 19(7): 850-858.

[4] Pimentel JP, Chaves DG, Araújo AR, et al. Anti-inflammatory/regulatory cytokine microenvironment mediated by IL-4 and IL-10 coordinates the immune response in hemophilia A patients infected chronically with hepatitis C virus[J]. J Med Virol, 2013, 85(6): 1009-1018.

[5] 孙鹭,黄蓉,牛华,等. Th17 相关细胞因子在丙型肝炎患者血清中的变化及意义[J]. 昆明医科大学学报, 2014, 35(8): 63-66.

[6] 魏新素,张平安,叶芳丽,等. 慢性丙型肝炎患者血清 IL-27, ALT 和 C 反应蛋白的检测与分析[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版), 2012, 6(23): 7802-7803.

[7] Kim SH, Han SY, Azam T, et al. Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNFalpha[J]. Immunity, 2005, 22(1): 131-142.

[8] 祝成亮,李艳,刘兴晖,等. 丙型肝炎病毒对白细胞介素 32 表达影响的研究[J]. 海南医学, 2014, 52(18): 2708-2709.

[9] Adinolfi LE, Utili R, Andreana A, et al. Serum HCV RNA levels correlate with histological liver damage and concur with steatosis in progression of chronic hepatitis C [J]. Dig Dis Sci, 2001, 46(8): 1677-1683.

[10] 陈辉,肖为民,张阳德. 肝细胞生长因子对肿瘤坏死因子- α 诱导的肝细胞的保护作用[J]. 中国现代医学杂志,

2002, 14(7): 4-7.

[11] Rosen HR, Miner C, Sasaki AW, et al. Frequencies of HCV-specific effector CD4⁺ T cells by flow cytometry: correlation with clinical disease stages[J]. Hepatology, 2002, 35(1): 190-198.

[12] 宿瑞俊,张军力,张保平,等. 慢性丙型肝炎病人血清 HCVRNA 含量与 ALT, AST, AST/ALT 水平相关性的比较研究[J]. 内蒙古医学院学报, 2009, 31(1): 36-39.

[13] Giannini E, Botta F, Testa E, et al. The 1-year and 3-month prognostic utility of the AST/ALT ratio and model for end-stage liver disease score in patients with viral liver cirrhosis[J]. Am J Gastroenterol, 2002, 97(11): 2855-2860.

[14] Ustündag Y, Bilezikçi B, Boyacıoğlu S, et al. The utility of AST/ALT ratio as a non-invasive demonstration of the degree of liver fibrosis in chronic HCV patients on long-term haemodialysis[J]. Nephrol Dial Transplant, 2000, 15(10): 1716-1717.

[15] Choi JD, Bae SY, Hong JW, et al. Identification of the most active interleukin-32 isoform [J]. Immunology, 2009, 126(4): 535-542.

[16] Goda C, Kanaji T, Kanaji S, et al. Involvement of IL-32 in activation-induced cell death in T cells[J]. Int Immunol, 2006, 18(2): 233-240.

[17] Li W, L IL, Mukhtar MM, et al. Activation of interleukin-32 Pro-in-fl ammatory pahtway in response to influenza A vims infection[J]. PLoS One, 2008, 3(4): e1985.

[18] Conti P, Youinou P, Theoharides TC. Modulation of autoimmunity by the latest interleukins (with special emphasis on IL-32)[J]. Autoimmun Rev, 2007, 6(3): 131-137.

[19] Lanzilli G, Falchetti R, Tricarico M, et al. In vitro effects of an immunostimulating bacterial lysate on human lymphocyte function [J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2005, 18(2): 245.

[20] Netea MG, Lewis EC, Azam T, et al. Interleukin-32 induces the differentiation of monocytes into macrophage-like cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(9): 3515-3520.

[21] Nold MF, Nold-Petry CA, Pott GB, et al. Endogenous IL-32 controls cytokine and HIV-1 production[J]. J Immunol, 2008, 181(1): 557-565.

[22] 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.

[23] 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.

[24] 张艳,许春梅,左维泽,等. 乙型肝炎患者外周血 T 细胞亚群、IL-32、IL-6 水平的变化及其临床意义[J]. 胃肠病学, 2010, 15(8): 471-474.

[25] Jung MY, Son MH, Kim SH, et al. IL-32gamma induces the maturation of dendritic cells with Th1-and Th17-polarizing ability through enhanced IL-12 and(下转第 189 页)

参考文献

- [1] Sluik D, Beulens JW, Weikert C, et al. Gamma-glutamyl-transferase, cardiovascular disease and mortality in individuals with diabetes mellitus[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2012, 28(3): 284-288.
 - [2] Aksakal E, Tanboga IH, Kurt M, et al. The relation of serum gamma-glutamyl transferase levels with coronary lesion complexity and long-term outcome in patients with stable coronary artery disease[J]. Atherosclerosis, 2012, 221(2): 596-601.
 - [3] Zorlu A, Yucel H, Bektasoglu G, et al. Increased γ -glutamyl transferase levels predict early mortality in patients with acute pulmonary embolism[J]. Am J Emerg Med, 2012, 30(6): 908-915.
 - [4] Whitfield JB. Serum gamma-glutamyltransferase and risk of disease[J]. Clin Chem, 2007, 53(1): 1-2.
 - [5] 杨胜利, 何秉贤, 何学兰. C-反应蛋白是急性冠状动脉综合征的一种危险因子[J]. 中华心血管病杂志, 2009, 30(5): 618-619.
 - [6] Drouet L, Bal DSC. Fibrinogen: factor and marker Of cardiovascular risk[J]. J Mal Vasc, 2002, 27: 143-156.
 - [7] 王景斌, 慕春言, 苏毅, 等. 阿托伐他汀用于冠心病的疗效分析[J]. 实用诊断与治疗杂志, 2003, 17(6): 485-486.
 - [8] Meade TW. Fibrinogen measurement to assess the risk of arterial thrombosis in individual patients: yes [J]. J Thromb Haemost, 2005, 3(4): 632-634.
 - [9] 杨晓云, 王琳, 汪培华. 冠状动脉综合征时血中 C 反应蛋白, 纤维蛋白原和白细胞的变化[J]. 中国心血管杂志, 2000, 16(11): 500-502.
 - [10] Paolicchi AM, Ghiozeni E. Images in cardiovascular medicine, human atherosclerotic plaques contain gamma2 glutamyl2 transferase enzyme activity [J]. Circulation, 2004, 109(11): 1440-1441.
 - [11] Ryu S, Chang Y, Kim DI, et al. Gamma-glutamyltransferase as a predictor of chronic kidney disease in nonhypertensive and nondiabetic korean men[J]. Clin Chem, 2007, 53(1): 71-77.
 - [12] Lim JS, Lee DH, Park JY, et al. A strong interaction between serum gamma-glutamyltransferase and obesity on the risk of prevalent type 2 diabetes: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey [J]. Clin Chem, 2007, 53(6): 1092-1098.
 - [13] Kazemi-Shirazi L, Endler G, Winkler S, et al. Gamma glutamyltransferase and long-term survival: is it just the liver? [J]. Clin Chem, 2007, 53(5): 940-946.
 - [14] Lee DH, Silventoinen K, Hu G, et al. Serum gamma-glutamyltransferase predicts non-fatal myocardial infarction and fatal coronary heart disease among 28 838 middle-aged men and women[J]. Eur Heart J, 2006, 27(18): 2170-2176.
 - [15] Ruttman E, Brant LJ, Concin H, et al. Gamma-glutamyltransferase as a risk factor for cardiovascular disease mortality: an epidemiological investigation in a cohort of 163 944 Austrian adults[J]. Circulation, 2005, 112(14): 2130-2137.
 - [16] Stojakovic T, Scharnagl H, Trauner M, et al. Serum gamma-glutamyl transferase and mortality in persons undergoing coronary angiography: the ludwigshafen risk and cardiovascular health study[J]. Atherosclerosis, 2010, 208(2): 564-571.
- (收稿日期: 2016-08-02 修回日期: 2016-10-08)
-
- (上接第 186 页)
- IL-6 production [J]. J Immunol, 2011, 186(12): 6848-6859.
 - [26] 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.
 - [27] Torre D, Zeroli C, Glola M, et al. Serum levels of interleukin1, interleukin-6, and tumor necrosis factor in patients with acute viral hepatitis[J]. Clin Infect Dis, 1994, 18: 194-201.
 - [28] Missale G, Ferrari C, Fiaccadori F. Cytokine mediators in acute inflammation and chronic course of viral hepatitis [J]. Ann Ital Med Int, 1995, 10(1): 14-18.
 - [29] 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.
 - [30] 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.
 - [31] 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.
 - [32] Li W, Sun W, Liu L, et al. IL-32: a host proinflammatory factor against influenza viral replication is upregulated by aberrant epigenetic modifications during influenza A virus infection[J]. J Immunol, 2010, 185(9): 5056-5065.
 - [33] Xu Z, Choi J, Yen TS, et al. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift [J]. EMBO J, 2001, 20(14): 3840-3848.
- (收稿日期: 2016-08-02 修回日期: 2016-10-08)