

## · 论 著 ·

## 幽门螺杆菌相关性胃腺癌中 IL-37 的表达及意义

龚谋春, 方晓明, 姚 宁, 刘慧慧, 陈琪枫, 刘桂宝

**[摘要]** **目的** 探讨白细胞介素 37 (IL-37) 在幽门螺杆菌 (HP) 相关性胃腺癌 [HP (+) 胃腺癌] 中的表达及意义。**方法** 选取 2014 年 1 月至 2015 年 12 月解放军第 117 医院收治胃腺癌 78 例 (HP+ 46 例、HP- 32 例), 同期门诊 HP (+) 胃溃疡及 HP (-) 正常患者各 30 例。采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 定量检测各组血浆 IL-37 蛋白表达; Western blot 检测 HP (+) 和 HP (-) 胃腺癌组癌组织内 IL-37 蛋白表达。逆转录 (RT)-PCR 检测 HP (+) 与 HP (-) 胃腺癌组癌组织 IL-37 mRNA 表达。**结果** ①各组血浆 IL-37 蛋白表达情况: HP (-) 正常组与 HP (-) 胃腺癌组相比, 差异无统计学意义 ( $P>0.01$ ); HP (+) 溃疡组高于 HP (-) 正常组和 HP (-) 胃腺癌组, 差异均有统计学意义 ( $P<0.01$ ); HP (+) 胃腺癌组高于 HP (+) 溃疡组、HP (-) 正常组及 HP (-) 胃腺癌组, 差异均有统计学意义 ( $P<0.01$ )。②胃腺癌组癌组织内 IL-37 蛋白表达情况: HP (+) 组高于 HP (-) 组, 差异有统计学意义。③胃腺癌组癌组织内 IL-37 mRNA 表达情况: HP (+) 组高于 HP (-) 组, 差异有统计学意义 ( $P<0.01$ )。**结论** HP 感染后血浆 IL-37 升高, HP (+) 胃癌组织内 IL-37 蛋白及 mRNA 表达均升高; IL-37 表达升高与 HP (+) 胃腺癌的发生密切相关。

**[关键词]** 幽门螺杆菌; 胃腺癌; 白细胞介素 37

**[中图分类号]** R735.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1672-271X(2017)02-0153-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1672-271X.2017.02.010

## IL-37 level in HP positive patients with gastric adenocarcinoma

GONG Mou-chun, FANG Xiao-ming, YAO Ning, LIU Hui-hui, CHEN Qi-feng, LIU Gui-bao

(Department of General Surgery, the 117th Hospital of PLA, Hangzhou 310004, Zhejiang, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expression of interleukin-37 in Helicobacter pylori (HP) positive patients with gastric adenocarcinoma. **Methods** 78 cases of patients with gastric adenocarcinoma recruited in our hospital from January 2014 to December 2015 were selected. Among them, seventy-eight inpatients with gastric adenocarcinoma [HP (+) 46 cases, HP (-) 32 cases], and 30 outpatients with HP (+) gastric ulcer, and 30 outpatients with HP (-) were studied. The plasma IL-37 levels of each group were determined by ELISA. Western blot was used to test IL-37 protein in cancer tissue of HP (+) and HP (-) cases with gastric adenocarcinoma. And RT-PCR was used to test IL-37 mRNA in cancer tissue of HP (+) and HP (-) cases with gastric adenocarcinoma tissue. **Results** ① Expression of plasma IL-37 protein in each group; there were no statistically significant difference between HP (-) group and HP (-) cases with gastric adenocarcinoma ( $P>0.01$ ). It was increased significantly in the HP (+) ulcer group compared with HP (-) group and HP (-) cases with gastric adenocarcinoma ( $P<0.01$ ), and it was increased significantly in HP (+) cases with gastric adenocarcinoma compared with other groups ( $P<0.01$ ). ② Expression of IL-37 protein in gastric adenocarcinoma tissue; it was increased significantly in HP (+) cases with gastric adenocarcinoma compared with HP (-) cases with gastric adenocarcinoma ( $P<0.01$ ). ③ Expression of IL-37 mRNA level in gastric adenocarcinoma tissue; it was increased significantly in HP (+) cases with gastric adenocarcinoma compared with HP (-) cases with gastric adenocarcinoma ( $P<0.01$ ). **Conclusion** The plasma IL-37 level was increased when patients were infected by HP, and the expression of IL-37 protein and mRNA were increased significantly in gastric adenocarcinoma tissue of HP (+) patient with gastric adenocarcinoma. IL-37 might involved in the occurrence and development of gastric adenocarcinoma in patients with HP.

**[Key words]** Helicobacter pylori; Gastric adenocarcinoma; Interleukin-37

作者单位: 310004 杭州, 解放军第 117 医院普外科

通信作者: 方晓明, E-mail: FXM117@163.com

引用格式: 龚谋春, 方晓明, 姚 宁, 等. 幽门螺杆菌相关性胃腺癌中 IL-37 的表达及意义 [J]. 东南国防医药, 2017, 19(2): 153-156.

幽门螺杆菌 (HP) 感染是人类最高发的慢性细菌感染之一, 全世界范围内, 约有半数人口感染 HP。HP 感染与胃腺癌关系密切, 在 1994 年 WHO 就把 HP 列为胃腺癌 I 类致癌危险因素, 感染者发病率较非感染者高 3~6 倍<sup>[1-2]</sup>。白细胞介素 37

(IL-37)在炎症性疾病和自身免疫性疾病中呈高表达,研究表明,IL-37 具有强大抗炎能力,能够调节多种细胞因子表达和机体免疫功能<sup>[3-5]</sup>。胃腺癌是一个与慢性炎症密切相关的恶性肿瘤,我们检测了 IL-37 在这类胃腺癌血浆、癌组织及癌旁组织的表达情况,探讨 IL-37 与 HP 相关性胃腺癌发病的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象 2014 年 1 月至 2015 年 12 月在我科住院,有我院胃镜检查、<sup>14</sup>C 呼气试验结果及手术标本的胃腺癌 78 例[HP(+) 46 例、HP(-) 32 例],同期门诊 HP(+) 胃溃疡及 HP(-) 正常患者各 30 例,平均年龄为(61.8±6.0)岁。排除标准:妊娠,有影响全身的心血管、肾、肝等基础疾病,有合并其他肿瘤,有其他自身免疫性疾病,6 个月内有手术、外伤史,6 个月内合并急慢性感染及有药物使用史的患者。本研究方案经过我院伦理委员会批准,研究对象知情同意并签署知情同意书。<sup>14</sup>C 呼气试验及胃镜结果由我院消化科内镜中心完成,胃腺癌诊断由我院病理科完成。

1.2 方法

1.2.1 标本采集及处理 取入选病例清晨空腹 8 h 以上静脉血 3 mL,3000 r/min 离心 10 min,收集上清,于 -80 ℃ 冰箱保存待检。采用双抗体夹心 ELISA 法检测血浆 IL-37 水平,操作过程严格按照产品说明进行。IL-37 ELISA 试剂盒购自瑞士 Adipogen 公司,最低检测浓度为 10 pg/mL;胃癌组织切除离体后 5 min 内取肿瘤中央无坏死及出血部位组织,癌旁组织距肿瘤 5 cm 左右,组织大小均约 1 cm×0.5 cm×0.5 cm,经磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,立即置于液氮罐中保存,用于 IL-37 mRNA 水平和蛋白检测。切除、清扫大体标本送病理科检查。

1.2.2 Western blot 检测组织 IL-37 蛋白的表达水平 组织标本经过蛋白样品制备、蛋白定量、蛋白电泳、转膜、抗体杂交、发光检测后,结果以灰度值表示。检测所用的 IL-37 一抗为兔抗人单克隆抗体 IgG 购于美国 Abcam 公司。

1.2.3 逆转录 PCR 技术检测组织 IL-37 mRNA 的表达水平 取备用的组织,组织经过蛋白裂解液裂解、匀浆,TRIzol 试剂法提取总 RNA;最后逆转录为 cDNA。相关引物委托上海生工完成,IL-37 引物序列上游:5'-AGTGCTGCTTAGAAGACCCGG-3',下游:5'-AGAGTCCAGGACCAGTACTTTGTG A-3'。以 β 肌动蛋白(β-actin)作为内参照,其引物序列上游:

5'-TGGCACTCCAGCACAATGAA-3',下游:5'-CTA-AGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3'。反应体系为 20 μL,进行实时 PCR 反应。反应条件:采用两步法 PCR 扩增标准程序,预变性,95 ℃ 30 s;PCR 反应,95 ℃ 5 s,60 ℃ 31 s,40 个循环。记录循环阈值(Ct 值),以相对定量方法计算 IL-37 mRNA 的表达水平。

Western blot 检测 IL-37 蛋白表达,用 ImageJ2x 软件分析蛋白条带,IL-37 蛋白相对含量以目的蛋白灰度值与内参 GAPDH 灰度值的比值表示。RT-PCR 检测组织 IL-37 mRNA 表达,扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,用 Band Leader 3.0 凝胶图像分析系统分析,IL-37 mRNA 的值用 IL-37 与 β-actin 扫描密度值之比表示。

1.3 统计学分析 数据处理应用 IBM SPSS statistics 21 软件进行统计学分析,结果均以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间均数比较行方差分析后采用 Newman-keuls 检验,所有检验以双侧  $P < 0.01$  为差异有统计学意义。

2 结果

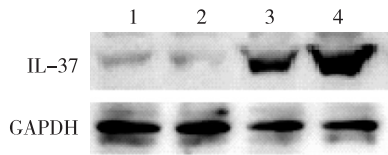
2.1 各组血浆 IL-37 蛋白表达情况 血浆 IL-37 蛋白水平由 HP(-) 正常组、HP(-) 胃腺癌组、HP(+) 溃疡组、HP(+) 胃癌腺组依次升高。HP(+) 溃疡组高于 HP(-) 正常组和 HP(-) 胃腺癌组,HP(+) 胃腺癌组高于其他组,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ );HP(-) 正常组和 HP(-) 胃腺癌组相比,差异无统计学意义( $P > 0.01$ ),见表 1。

表 1 各组血浆 IL-37 表达水平( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL)

组别	n	IL-37
HP(-) 正常组	30	19.51±4.61 <sup>*#</sup>
HP(-) 胃腺癌组	32	23.64±6.72 <sup>*#</sup>
HP(+) 溃疡组	30	66.11±20.92 <sup>*</sup>
HP(+) 胃癌腺组	46	78.97±24.67

与 HP(+) 胃癌腺组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.01$ ;与 HP(+) 溃疡组比较,<sup>#</sup> $P < 0.01$

2.2 胃腺癌组癌旁组织及癌组织 IL-37 蛋白表达情况 HP(+) 和 HP(-) 胃腺癌组癌旁组织及癌组织均有 IL-37 蛋白的表达,癌组织 IL-37 蛋白均高于癌旁组织,见图 1;分析条带光密度值,计算各组 IL-37 蛋白与 GAPDH 光密度的比值,HP(+) 胃腺癌组癌组织内 IL-37 蛋白表达高于 HP(-) 胃腺癌组癌组织,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见表 2。



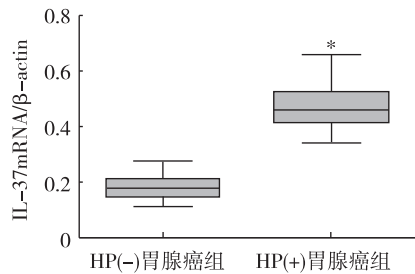
1,3:HP(-)胃腺癌组癌旁组织及癌组织;2,4:HP(+)胃腺癌组癌旁组织及癌组织。GAPDH:内参;IL-37:白细胞介素 37  
图 1 2 组胃腺癌癌旁组织及癌组织内 IL-37 蛋白电泳图

表 2 胃腺癌癌旁组织及癌组织 IL-37 蛋白表达 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	IL-37/GAPDH
HP(-)胃腺癌组	32	
癌旁组织		0.212±0.046
癌组织		0.764±0.063 *
HP(+)胃腺癌组	46	
癌旁组织		0.372±0.013
癌组织		1.330±0.065 **

与本组癌旁组织比较, \*  $P<0.01$ ; 与 HP(-)胃腺癌组癌组织比较, #  $P<0.01$

2.3 胃腺癌癌组织内 IL-37mRNA 表达 HP(+)胃腺癌组癌组织 IL-37 mRNA 表达显著高于 HP(-)胃腺癌组, 表达水平分别为 ( $0.4787\pm0.0707$ ) 和 ( $0.1817\pm0.0428$ ), 差异有统计学意义 ( $P<0.01$ )。见图 2。



与 HP(-)胃腺癌组比较, \*  $P<0.01$   
图 2 HP(+)与 HP(-)胃腺癌癌组织中 IL-37mRNA 表达

3 讨论

HP 感染是人类最高发的慢性细菌感染之一, 全世界范围内, 约有半数人口感染 HP。HP 感染与胃腺癌关系密切, 感染者发病率较非感染者高 3~6 倍。在 1994 年, WHO 就把 HP 列为胃腺癌 I 类致癌危险因素。当人体胃部黏膜表皮受到 HP 感染后容易造成局部区域细胞变性、坏死等, 引起胃部组织出现萎缩、分化障碍, 导致肠化生, 甚至引起异型增生, 最终演变为胃腺癌<sup>[6]</sup>。因此, HP

相关性胃腺癌是个与慢性炎症密切相关性恶性肿瘤, 这个过程是一个慢性反复的炎症过程<sup>[7-8]</sup>。白细胞介素 1 (IL-1) 家族被认为是调控炎症反应的重要因子, 可能与胃恶性肿瘤相关<sup>[9]</sup>。IL-37 是新近发现的 IL-1 家族中的一员, 在体内及体外均被证实能抑制多种促炎因子的表达, 具有强大抗炎能力<sup>[10]</sup>。已有研究表明, IL-37 在非小细胞肺癌中可抑制肿瘤血管生成的作用<sup>[11]</sup>, 我们对 IL-37 在 HP 相关性胃癌之间的关系作了初步探讨。

我们的研究发现, HP(-)组和 HP(+)胃腺癌组血浆 IL-37 表达无明显差异, HP(+)溃疡组血浆 IL-37 蛋白表达高于 HP(-)组和 HP(-)胃腺癌组。可以认为 HP 感染后胃组织存在慢性炎症, 血浆 IL-37 蛋白表达升高是机体炎症反应的表现。这与既往研究认为 IL-37 表达在炎症性疾病中表达增高相一致。我们还发现, HP(+)胃腺癌癌组织与 HP(-)胃腺癌癌组织标本相比, HP(+)胃腺癌组织内 IL-37 蛋白及 mRNA 表达均升高, 这提示从胃组织 HP 慢性感染开始至胃组织恶变的全过程中, 均存在 IL-37 表达升高这一改变。我们也检测了 2 组胃腺癌组癌组织与癌旁组织内 IL-37 蛋白表达, 发现胃腺癌组织中 IL-37 蛋白与癌旁组织相比均升高, 可能提示胃组织发生恶变后, 不管有无幽门螺杆菌感染, 均存在有包括免疫细胞的浸润在内的炎症性改变。

对 IL-37 转基因小鼠体内 DC 的活性研究发现, IL-37 可显著抑制经 LPS 刺激后树突状细胞 (dendritic cell, DC) 活性, 其机制为显著减少 DC 表面 CD86 和主要组织相容性复合物 II (MHC II) 的平均表达量 (由 73% 下降为 47%)<sup>[4]</sup>。在 HP 感染的慢性炎症过程中, 病情有浅表性胃炎-慢性萎缩性胃炎-肠化-异型增生-癌变的变化过程<sup>[12]</sup>。免疫监视的缺失在组织发生恶变过程中起到至关重要。DC 是免疫反应起始环节, 在免疫应答中起着关键的作用, 随着 IL-37 水平升高, DC 活性的功能减弱, 抑制了免疫细胞的趋化及关键的某些免疫反应, 可能是胃腺癌形成的因素之一。研究表明 IL-37 主要有两条作用途径: ①分泌到胞外通过 IL-18R 发挥作用; ②转运到细胞核内与 Smad3 等因子相互作用影响多个因子的转录<sup>[3]</sup>。在对胃癌的发病机制研究发现, Smad3 基因是一个重要环节, 敲除小鼠 Smad3 后发现, 小鼠胃小弯侧开始发生肠化生、侵袭性胃癌形成<sup>[13]</sup>。Smad3 过表达能显著减少胃腺癌细胞的成瘤性, 而表达减少则胃癌的发生率显著增高<sup>[14-15]</sup>。因此, 我们推测, HP(+)

胃腺癌中 IL-37 升高,可能与 Smad3 这个胃癌早期形成过程中的关键性信号通路相互作用有关。本研究期间中,未获得 HP(-) 正常胃组织标本,因此未进行正常胃组织与胃腺癌组织及癌旁组织 IL-37 蛋白与 mRNA 表达的比较。两者关系需进一步获得标本后验证。

总之,HP 相关性胃腺癌是与慢性炎症密切相关的恶性肿瘤,IL-37 作为重要的抗炎因子在 HP 的慢性感染过程中表达升高。HP(+) 胃腺癌病例血浆 IL-37 蛋白表达均高于正常病例、HP(+) 溃疡病例及 HP(-) 胃腺癌病例,HP(+) 胃腺癌癌组织内 IL-37 表达高于 HP(-) 胃腺癌组织。因此,IL-37 表达与 HP 相关性胃腺癌密切相关,在 HP 相关性胃腺癌的发生、发展中的作用及机制需进一步研究。

#### 【参考文献】

- [1] Conteduca V, Sansonno D, Lauletta G, *et al.* H. pylori infection and gastric cancer: state of the art (review) [J]. *Int J Oncol*, 2013,42(1):5-18.
- [2] Meng W, Bai B, Sheng L, *et al.* Role of Helicobacter pylori in gastric cancer: advances and controversies [J]. *Discov Med*, 2015,20(111):285-293.
- [3] Boraschi D, Lucchesi D, Hainzl S, *et al.* IL-37: a new anti-inflammatory cytokine of the IL-1 family [J]. *Eur Cytokine Netw*, 2011,22(3):127-147.
- [4] Nold MF, Nold-Petry CA, Zepp JA, *et al.* IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity [J]. *Nat Immunol*, 2010,11(11):1014-1022.
- [5] 张燕,熊霞. IL-37 及其与疾病相关性的研究进展 [J]. *基础医学与临床*, 2015,35(4):549-553.
- [6] Valenzuela MA, Canales J, Corvalán AH, *et al.* Helicobacter pylori-induced inflammation and epigenetic changes during gastric carcinogenesis [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(45):12742-12756.
- [7] 蔡慧,丁一波,马立业,等. 炎症信号网络及其关键分子事件在胃癌进化发育中的作用 [J]. *东南国防医药*, 2016,18(3):290-293.
- [8] 吴楠蝶,魏嘉,刘宝瑞. 胃癌分子靶向治疗的研究进展 [J]. *医学研究生学报*, 2014,27(12):1318-1322.
- [9] 向瑜,杨致邦,陈瀑,等. 白细胞介素-1B 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  基因多态性与胃溃疡、胃癌易感性的相关性 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2009,22(10):1010-1014.
- [10] Chen HM, Fujita M. IL-37: a new player in immune tolerance [J]. *Cytokine*, 2015,72(1):113-114.
- [11] Ge G, Wang A, Yang J, *et al.* Interleukin-37 suppresses tumor growth through inhibition of angiogenesis in non-small cell lung cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016,35(1):13.
- [12] 席银雪,宋鑫,陈洁,等. syndecan-1 在胃黏膜癌变不同阶段组织中的表达及意义 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2007,29(3):193-196.
- [13] Nam KT, O'Neal R, Lee YS, *et al.* Gastric tumor development in Smad3-deficient mice initiates from forestomach/glandular transition zone along the lesser curvature [J]. *Lab Invest*, 2012,92(6):883-895.
- [14] Han SU, Kim HT, Seong DH, *et al.* Loss of the Smad3 expression increases susceptibility to tumorigenicity in human gastric cancer [J]. *Oncogene*, 2004,23(7):1333-1341.
- [15] 王运涛,吴小涛,郑启新,等. 转化生长因子  $\beta$ 1/Smad3 促进大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的实验研究 [J]. *医学研究生学报*, 2007,20(7):689-692.

(收稿日期:2016-08-28; 修回日期:2017-02-18)

(本文编辑:叶华珍; 英文编辑:王建东)