

乳腺癌患者血清中白介素 35(IL-35)的表达及其临床意义*

陈雨欣, 谭婷婷, 宁明哲 (南京大学医学院附属鼓楼医院检验科, 南京 210008)

摘要:目的 探讨乳腺癌患者血清中白介素 35(interleukin-35, IL-35)的表达及其临床意义。方法 2015 年 1 月~2016 年 7 月期间南京市某三甲医院收治的 54 例乳腺恶性肿瘤患者为研究对象。乳腺癌病理分期: I 期 12 例, II 期 15 例, III 期 12 例, IV 期 15 例。另外选择健康者 54 例作为对照。ELISA 法比较患者及健康者血清中 IL-35 水平, 并对其与其病理分期及是否发生肿瘤转移进行相关性分析。结果 乳腺癌患者血清中 IL-35 水平为 21.07 ± 8.01 ng/ml, 显著高于健康人 (11.99 ± 5.30 ng/ml; $t=6.88$, $P<0.001$)。此外, 病理分期 I 期患者血清 IL-35 水平为 14.95 ± 6.52 ng/ml, II 期 IL-35 水平为 20.59 ± 8.15 ng/ml, III 期 IL-35 水平为 24.94 ± 6.64 ng/ml, IV 期 IL-35 水平为 23.35 ± 6.93 ng/ml。III 期和 IV 期乳腺癌患者血清 IL-35 水平均高于 I 期患者, 其差异均具有统计学意义 ($t=3.562$, $P=0.002$; $t=3.363$, $P=0.001$)。同时, 发生肿瘤转移的血清 IL-35 水平是 23.95 ± 6.95 ng/ml, 明显高于未发生肿瘤转移的血清 IL-35 水平 (18.19 ± 7.97 ng/ml; $t=2.779$, $P=0.008$)。最后, 乳腺癌患者血清中 IL-35 水平与其肿瘤病理分期 ($r=0.390$, $P=0.004$) 及肿瘤转移均呈正相关 ($r=0.361$, $P=0.008$)。结论 IL-35 水平与乳腺癌患者病理分期及发生肿瘤转移密切相关, 具有一定的诊断意义, 可以作为潜在的用于乳腺癌诊断的特异性标志物。

关键词: 乳腺癌; 白介素-35; 病理分期; 转移

中图分类号: R737.9; R730.43 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2017)02-092-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.02.025

Serological Interleukin-35 Level in Patients with Breast Cancer and Its Clinical Significance

CHEN Yu-xin, TAN Ting-ting, NING Ming-zhe

(Department of Clinical Laboratory, Nanjing Drum Tower Hospital

Affiliated to Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, China)

Abstract: **Objective** To investigate the level of serological interleukin-35 (IL-35) in breast cancer patients and its clinical significance. **Methods** From Jan 2015 to July 2016, serum of 55 patients with breast cancer were collected from a tertiary hospital of Nanjing. Their pathological stages were also analyzed, including 12 cases of stage I, 15 cases of stage II, 12 cases of stage III, and 15 cases of stage IV. Meanwhile, serum from 54 healthy individuals also selected. The level of serological IL-35 was determined by ELISA, and the IL-35 level, pathological stage and tumor metastasis were analyzed by correlation analysis. **Results** The serum IL-35 in patients with breast cancer was significantly elevated than health individuals. With the increase in pathological stage, IL-35 level in breast cancer patients with stage III and IV was significantly higher compared to patients with stage I breast cancer ($P<0.05$). Further, patients with breast cancer metastasis had increased level of IL-35, compared to breast cancer patients without tumor metastasis ($P<0.05$). Finally, Spearman correlation analysis indicated that the serum level of IL-35 in patients with breast cancer was positively correlated with the pathological stages ($r=0.390$, $P=0.004$) and tumor metastasis ($r=0.361$, $P=0.008$) of the patients, respectively. **Conclusion** High level of IL-35 was detected in serum from breast cancer patients, and its expression was highly correlated with pathological stage and tumor metastasis. Detection of IL-35 could be applied as a valuable potential biomarker for the diagnosis of breast cancer.

白介素-35(interleukin-35, IL-35)是一种白介素 12 (IL-12) 家族中新型细胞因子, 可以抑制效应 T 细胞的增殖, 并下调 Th17 细胞的发育和分化及细胞因子的分泌, 对抑制机体针对抗原和肿瘤的免疫应答具有重要的调节作用^[1]。近年研究显示, 白介素与机体免疫应答及不少常见恶性肿瘤的发病密切相关^[1~3], 并在很多慢性疾病中有潜在的诊断应用价值^[4,5]。然而, IL-35 在乳腺癌患者血清中的表达水平及其患者病情之间的关系尚不明了。本研究将比较乳腺癌患者与正常人血清中 IL-35

的表达差异, 并探讨患者血清 IL-35 水平与乳腺肿瘤的分期和转移的相关性, 以检验血清 IL-35 是否可以作为潜在的用于乳腺癌诊断的特异性标志物。

1 材料与方法

1.1 研究对象 2015 年 1 月~2016 年 7 月期间南京市某三甲医院收治的 54 例乳腺恶性肿瘤患者为研究对象, 患者年龄 31~65 岁, 中位年龄 51 岁, 均为女性。乳腺癌病理分期: I 期 12 例, II 期 15 例, III 期 12 例, IV 期 15 例。本研究均获受试者知情并签署知情同意书。同时以同期在该院体检的

* 作者简介: 陈雨欣(1986-), 女, 博士, 技师, 研究方向: 免疫学, Tel: 17714413628, E-mail: yuxin__chen2015@163.com。

女性健康者 54 例为对照组,年龄 37~63 岁,中位年龄 52 岁。患者与对照组在年龄、性别等方面无显著差异($P>0.05$)。研究对象纳入标准:年龄 30~65 岁;符合乳腺恶性肿瘤的疾病诊断标准;尚未接受抗肿瘤治疗,无重大慢性疾病(如严重心血管疾病、糖尿病等)。研究对象排除标准:自身免疫性疾病,严重感染者,有精神疾病史,糖尿病者,其他系统恶性肿瘤者;有乙醇药物滥用史,已经接受手术治疗或者化疗的乳腺癌患者。

1.2 试剂和仪器 IL-35 ELISA 试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司,实验步骤及结果判断均严格按照说明书提供的方法,读板使用 Bio-Rad 公司的 IMARK 酶标仪。

1.3 研究方法

1.3.1 标本采集:清晨空腹状态下抽取受试者外周静脉血 5 ml,1 600×g 离心 10 min,上清液收集在 EP 管中在 -80℃ 保存待测。

1.3.2 标本检测:采用酶联免疫吸附方法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测血清中 IL-35 的水平,严格按照试剂盒(上海酶联生物科技有限公司)说明书进行操作。在预先包被入白介素 35(IL-35)捕获抗体的包被微孔中,加入待测标本和不同浓度的标准品每个样品 2 个复孔。随后在每孔中加入辣根过氧化物酶标记的检测抗体,37℃ 孵育 1 h。清洗板 5 次。每孔加入底物 A、B 各 50 μ l,避光在 37℃ 孵育 15 min 加终止液,并轻拍平板使之混匀,用酶标仪在 450 nm 波长下测吸光度值。根据标准品的浓度绘制标准曲线,建立直线回归方程,并根据各微孔的吸光度值计算样品中 IL-35 含量。

1.4 统计学分析 利用 SPSS 22.0 版本,血清中 IL-35 检测结果用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。独立样本比较采用 t 检验,采用 Spearman 检验方法进行相关性分析; $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 正常人与乳腺癌患者血清中 IL-35 水平比较

利用 ELISA 方法检测健康女性血清中 IL-35 水平为 11.99 ± 5.30 ng/ml,而乳腺癌组血清 IL-35 水平为 21.07 ± 8.01 ng/ml。统计学分析显示乳腺癌组血清 IL-35 水平明显高于健康人组,差异具有统计学意义($t=6.88, P<0.001$)。

2.2 不同病理分期的乳腺癌患者中血清 IL-35 水平 病理分型 I 期患者血清 IL-35 水平为 14.95 ± 6.52 ng/ml, II 期患者血清 IL-35 水平为 20.59 ± 8.15 ng/ml, III 期患者血清 IL-35 水平为 24.94 ± 6.64 ng/ml, IV 期患者血清 IL-35 水平为 $23.35\pm$

6.93 ng/ml。当我们进行四组间两两比较时发现,病理分期 III 期患者血清中 IL-35 水平显著高于 I 期患者($t=3.562, P=0.002$)。IV 期患者血清中 IL-35 水平均显著高于 I 期患者($t=3.363, P=0.005$)。因此,不同病理分期的乳腺癌患者血清 IL-35 水平存在显著差异。患者病理分期越高,血清中 IL-35 水平也越高。

2.3 发生肿瘤转移与未发生肿瘤转移的乳腺癌患者中血清 IL-35 表达水平 未发生肿瘤转移的乳腺癌患者血清中 IL-35 水平是 18.19 ± 7.97 ng/ml,发生肿瘤转移的乳腺癌患者血清中 IL-35 水平是 23.95 ± 6.95 ng/ml。发生转移的患者血清中 IL-35 水平较未发生肿瘤转移患者组的 IL-35 水平高,差异具有显著性意义($t=2.779, P=0.008$)。因此,乳腺癌转移会影响乳腺癌患者血清中 IL-35 的表达水平。

2.4 乳腺癌患者中血清 IL-35 表达水平与年龄、病理分期及癌症转移的相关性分析 我们针对血清 IL-35 水平与年龄、病理分期及癌症转移进行 Spearman 相关性分析。发现血清中 IL-35 水平与乳腺癌的病理分期呈正相关($r=0.39, P=0.004$),与肿瘤发生转移事件也呈正相关($r=0.36, P=0.008$),但是与患者年龄无相关性($r=0.394, P=0.118$)。

3 讨论 IL-35 主要由 Treg 细胞分泌,通过 Jak-STAT 信号通路参与免疫功能的调节,是最重要的免疫抑制因子之一^[6]。已报道的 IL-35 的功能主要有两个方面:①IL-35 在体内免疫应答及自身免疫性疾病患者体内异常表达^[2,6],提示其可能与炎症及自身免疫病的发生有关;②IL-35 在某些肿瘤组织中也表达异常,提示其在肿瘤发展中也可能起到了重要的作用^[8,9]。最近的几项研究也探讨了 IL-35 在肿瘤诊断及预后中的意义。在非小细胞肺癌、结直肠癌、急性髓性白血病等恶性肿瘤中^[6,10~14],患者血清 IL-35 的水平较正常人明显上升,与淋巴结大小和病理分期呈正相关。有意思的是,IL-35 在甲状腺癌患者血清中呈现下降趋势^[9],提示不同肿瘤中 IL-35 的作用可能不完全相同。

在乳腺癌中,我们研究证实了 IL-35 在患者血清中的表达较正常人显著升高,同时其血清中含量与肿瘤的病理分期及转移正相关。其可能机制在于 IL-35 不仅可以直接抑制肿瘤微环境中的肿瘤免疫状态,引起癌细胞的免疫逃逸,同时还可以直接作用于肿瘤细胞,促进肿瘤的进展^[7]。在我们研究进行的同时,Chen 等^[15]人也发现血清 IL-23: IL-35 含量之比是一个重要的乳腺癌预后指标,但

是该研究没有具体阐述 IL-35 与病理分期和肿瘤转移的相关性。

研究发现在乳腺癌患者血清中 IL-35 水平明显升高,和临床乳腺肿瘤的病理分期和肿瘤转移呈正相关,有一定的诊断意义。本研究不足之处在于入组对象较少,同时缺少乳腺癌患者 5 年后生存率的数据。因此我们需要进行较大规模的临床队列研究,并做好肿瘤患者的随访工作以探明 IL-35 在乳腺癌肿瘤的进展及预后中的作用。

综上所述,IL-35 在乳腺癌患者血清中呈现高表达,同时与乳腺癌病理分期和恶性肿瘤转移密切相关。因此,血清 IL-35 表达水平具有一定的诊断意义,可以作为潜在的预测乳腺癌进展的肿瘤标志物。

参考文献:

- [1] 黄崇标,田野,崔焱,等.白细胞介素 35 在肿瘤发展中的作用[J].中国肺癌杂志,2016,19(4):230-235.
Huang CB, Tian Y, Cui Y, et al. Current research of the roles of IL-35 in tumor progression[J]. Chinese Journal of Lung Cancer, 2016, 19(4): 230-235.
- [2] 生媛,陈军浩,王庆飞,等.人外周血 IL-35 水平与乙型肝炎疫苗免疫效果相关性分析[J].细胞与分子免疫学杂志,2015,31(1):89-92.
Sheng Y, Chen JH, Wang QF, et al. IL-35 level of peripheral blood is correlated with the immune response to hepatitis B vaccine[J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2015, 31(1): 89-92.
- [3] 乔雪峰,黄志平,张宁,等. IL-18 基因启动子区-137G/C, -607G/T 2 个位点基因多态性与女性乳腺癌易感性 Meta 分析[J].现代检验医学杂志,2016,31(4):65-69,73.
Qiao XF, Huang ZP, Zhang N, et al. Association analysis of IL-18 gene promoter region -137G/C, -607G/T polymorphisms and susceptibility to sporadic breast cancer: meta-analysis[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(4): 65-69, 73.
- [4] 汤雯剑,罗浩,赵金涛.银屑病患者血清中 IL-10 与 IL-21 水平监测的临床应用[J].现代检验医学杂志,2015,30(2):65-67.
Tang WJ, Luo H, Zhao JT. Clinical application of IL-10 and IL-21 levels monitoring patients with psoriasis[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(2): 65-67.
- [5] 沈红艳,邓演超,徐湛,等.2 型糖尿病肾病患者外周血 IL-17 和 IL-22 mRNA 水平[J].现代检验医学杂志,2015,30(2):30-32,35.
Shen HY, Deng YC, Xu Z, et al. Levels of IL-17 and IL-22 mRNA in the blood of type 2 diabetic nephropathy patients[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(2): 30-32, 35.
- [6] Ma Y, Chen L, Xie G, et al. Elevated level of interleukin-35 in colorectal cancer induces conversion of T cells into iTreg by activating STAT1/STAT3[J]. Oncotarget, 2016, 7(45): 73003-73015.
- [7] 尹雪,任秀敏,刘春苗,等.变应性鼻炎患者 IL-35 对于 Treg/Th17 细胞平衡的调控作用[J].临床耳鼻喉头颈外科杂志,2016,30(3):213-216.
Yin X, Ren XM, Liu CM, et al. The regulatory effect of IL-35 on the balance of Treg/Th17 cells in allergic rhinitis patients[J]. Journal of Clinical Otorhinolaryngology Head Neck Surgery, 2016, 30(3): 213-216.
- [8] Turnis ME, Sawant DV, Szymczak-Workman AL, et al. Interleukin-35 limits anti-tumor immunity[J]. Immunity, 2016, 44(2): 316-329.
- [9] 叶卫丰,贺敏,苏建荣,等. IL-17 和 IL-35 在甲状腺癌患者血清中的水平及临床意义[J].临床和实验医学杂志,2015,14(1):32-35.
Ye WF, He M, Su JR. Serum IL-17, IL-35 levels and clinical significance in patients with thyroid cancer[J]. Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2015, 14(1): 32-35.
- [10] Long J, Guo H, Cui S, et al. IL-35 expression in hepatocellular carcinoma cells is associated with tumor progression[J]. Oncotarget, 2016, 7(29): 45678-45686.
- [11] Wang J, Tao Q, Wang H, et al. Elevated IL-35 in bone marrow of the patients with acute myeloid leukemia[J]. Human Immunology, 2015, 76(9): 681-686.
- [12] Nicholl MB, Ledgerwood CL, Chen X, et al. IL-35 promotes pancreas cancer growth through enhancement of proliferation and inhibition of apoptosis: evidence for a role as an autocrine growth factor[J]. Cytokine, 2014, 70(2): 126-133.
- [13] Jin L, Xu X, Ye B, et al. Elevated serum interleukin-35 levels correlate with poor prognosis in patients with clear cell renal cell carcinoma[J]. International Journal of Clinical Experimental Medicine, 2015, 8(10): 18861-18866.
- [14] Liu ZZ, Liu JQ, Shi Y, et al. Epstein-barr virus-induced gene 3-deficiency leads to impaired antitumor T-cell responses and accelerated tumor growth[J]. Oncoimmunology, 2015, 4(7): e989137.
- [15] Chen G, Liang Y, Guan X, et al. Circulating low IL-23: IL-35 cytokine ratio promotes progression associated with poor prognosis in breast cancer[J]. Am J Transl Res, 2016, 8(5): 2255-2264.

收稿日期:2017-01-01

修回日期:2017-01-25