

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.29.020
文章编号: 1005-8982 (2017) 29-0094-03

溃疡性结肠炎患者外周血中 IL-32 表达水平及其意义

陈亮¹, 汪启斌¹, 董荣坤¹, 黄建朋², 汪彪¹, 张健¹,
王佩¹, 甘云辉¹, 张征¹, 梁俊¹

(1. 湖北医药学院附属人民医院 胃肠外科, 湖北 十堰 442200; 2. 中山大学附属第七医院 胃肠外科, 广东 深圳 518107)

摘要: **目的** 检测溃疡性结肠炎 (UC) 患者外周血中白细胞介素 32 (IL-32) 表达水平, 分析 IL-32 表达水平与 UC 严重程度的关系。 **方法** 入组 50 例 UC 患者 (UC 组, 根据病情分为轻、中、重度) 及 30 例健康体检者 (对照组), 分别收集 UC 组和对照组患者的外周血, 用 Trizol 提取外周血中淋巴细胞总 RNA, 实时聚合酶链反应检测 IL-32 mRNA 表达水平; 用酶联免疫吸附法检测外周血中 IL-32 蛋白表达水平, 比较两组外周血中 IL-32 表达水平, 以及轻、中、重度 UC 患者 IL-32 表达水平。 **结果** UC 患者外周血中 IL-32 mRNA 和蛋白表达水平与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 重度 UC 患者外周血中 IL-32 表达水平与轻、中度比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 **结论** UC 患者外周血中 IL-32 表达增高, IL-32 可能参与 UC 的发病。

关键词: 溃疡性结肠炎; 白细胞介素 32; 外周血

中图分类号: R574.62

文献标识码: A

Expression of serum IL-32 level in patients with ulcerative colitis and its significance

Liang Chen¹, Qi-bin Wang¹, Rong-kun Dong¹, Jian-peng Huang², Biao Wang¹,
Jian Zhang¹, Pei Wang¹, Yun-hui Gan¹, Zheng Zhang¹, Jun Liang¹

(1. Department of Gastrointestinal Surgery, Renmin Hospital of Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442200, China; 2. Department of Gastrointestinal Surgery, the Seventh Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Shenzhen, Guangdong 518107, China)

Abstract: Objective To investigate serum IL-32 level in patients with ulcerative colitis (UC) and its relationship with the severity of UC. **Methods** Fifty UC patients (16 mild cases, 20 moderate cases and 14 severe cases) and 30 healthy controls were enrolled in the present study. Peripheral blood of the UC patients and the healthy controls was collected respectively. Total RNA in PBMCs was extracted by TRIzol Reagent. IL-32 mRNA expression level was detected by real-time PCR. IL-32 protein expression level in serum was assayed by ELSIA. Difference in IL-32 expression level between the UC and control groups was compared using student's *t* test. Differences in IL-32 expression level among the mild, moderate and severe UC groups were compared using analysis of variance. **Results** Serum IL-32 expression level of the UC patients was higher than that of the healthy controls both at RNA and protein levels ($P < 0.05$). Serum IL-32 expression in the severe UC group was statistically higher than that in the moderate and mild UC groups, respectively ($P < 0.05$). **Conclusions** Serum IL-32 expression in UC

收稿日期: 2016-03-07

[通信作者] 黄建朋, E-mail: aiabao999@163.com

patients is increased. IL-32 might be involved in the pathogenesis of UC.

Keywords: ulcerative colitis; IL-32; peripheral blood

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是慢性、非特异性、肠道炎症性疾病,病变主要累及乙状结肠和直肠,亦可累及全部结肠,肠道炎症常反复发生,易引起中毒性结肠扩张、癌变等并发症,其发病机制尚未完全明确^[1]。目前研究认为,肠壁黏膜免疫调节异常、持续肠道感染及细胞因子等与 UC 的发病密切相关。白细胞介素 32 (Interleukin-32, IL-32) 是一种促炎症细胞因子,可以活化核转录因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)、激活子蛋白-1 (activator protein 1, AP-1)、分裂原激活的蛋白激酶 (mitogen activated protein kinases, MAPK) 信号通路诱导肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素 8 (Interleukin-8, IL-8) 等细胞因子表达,与风湿性关节炎等炎症性疾病的发病密切相关^[2-4]。因此,本研究收集 UC 患者外周血标本,检测 IL-32 表达水平,分析其与 UC 患者病情严重程度

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2013 年 9 月-2014 年 9 月在湖北医药学院附属人民医院消化内科、胃肠外科诊断为 UC 的患者 50 例。其中,男性 20 例,女性 30 例;年龄 20 ~ 65 岁,平均 (40.8 ± 8.6) 岁。UC 的诊断标准参照《2010 年世界胃肠病学组织关于炎症性肠病诊断和治疗的实践指南》^[5] 制定的诊断标准。UC 患者根据病情进行分级:轻度 16 例,中度 20 例,重度 14。对照组 30 例为本院体检中心体检的健康居民。其中,男性 14 例,女性 16 例;年龄 19 ~ 62 岁,平均 (40.2 ± 7.8) 岁。两组患者在性别、年龄上比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

1.2 标本收集

UC 组和对照组于晨起采空腹肘静脉血 10 ml,取 4 ml 放入非抗凝干燥无菌真空管中,室温静置 1 h 自行凝固,1 300 r/min 离心 15 min,取上清液分装于离心管内,置于 -80℃ 冰箱低温冷冻保存。取 6 ml 放入含肝素的无菌抗凝管, Ficoll 密度梯度离心法直接分离和纯化外周血单个核细胞。

1.3 RNA 提取及实时聚合酶链反应

用 Trizol 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司) 提取细

胞总 RNA,具体步骤按说明书操作。用逆转录试剂盒 (日本 Toyobo 公司) 将提取的细胞总 RNA 逆转录为 cDNA,按说明书操作。然后用实时聚合酶链反应 (real-time polymerase chain reaction, real-time PCR) Faststart Universal SYBR Green Master (Rox) 试剂盒 (瑞士 Roche 公司) 扩增,按说明书操作。扩增 IL-32 正向引物:5' -CGACTTCAAAGAGGGCTACC-3',反向引物:5' -GAGTGAGCTCTGGGTGCTG-3'^[6]。用 β -actin 作为内参,应用 SYBR Green 荧光染料进行 real-time PCR 反应,获得各组织标本的扩增曲线,计算机分析 Ct 值。基于 Ct 值来评估检测样品变化的相对值。

1.4 酶联免疫吸附法

血清中 IL-32 蛋白表达水平用美国 Biolegend 公司的酶联免疫吸附法试剂盒检测,具体步骤按说明书操作。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组比较用 t 检验,多组比较用方差分析,两两比较用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 UC 患者外周血中 IL-32 mRNA 表达增高

UC 组 IL-32mRNA 表达水平为 (3.07 ± 0.29),对照组为 (1.00 ± 0.12),经 t 检验,差异有统计学意义 ($t = 6.157, P = 0.009$),UC 组 IL-32 mRNA 表达水平高于对照组。见图 1。

2.2 UC 患者外周血中 IL-32 蛋白表达增高

UC 组 IL-32 蛋白表达水平为 (156.67 ± 23.33) pg/ml,对照组为 (48.337 ± 4.41) pg/ml,经 t 检验,差异有统计学意义 ($t = 4.562, P = 0.010$),UC 组 IL-32 蛋白表达水平高于对照组。见图 2。

2.3 不同病情程度 UC 患者血清 IL-32 表达水平比较

轻度患者血清 IL-32 表达水平为 (116.67 ± 15.28) pg/ml,中度患者为 (153.33 ± 15.26) pg/ml,重度患者为 (223.34 ± 25.17) pg/ml,经方差分析,差异有统计学意义 ($F = 24.030, P = 0.001$),重度患者 IL-32 表达水平高于轻、中度患者。

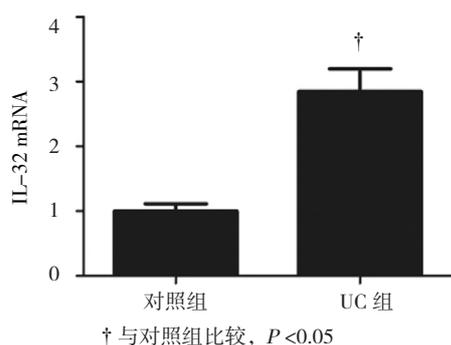


图 1 两组患者外周血中 IL-32 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

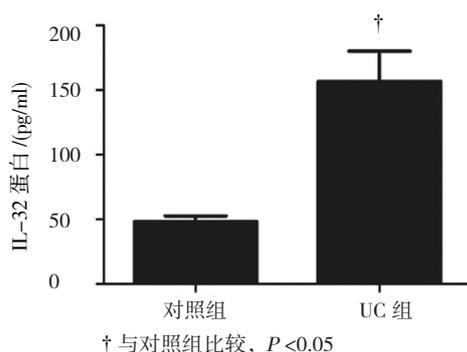


图 2 两组患者外周血中 IL-32 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

本研究发现 UC 患者外周血中 IL-32 表达水平升高, 且 IL-32 表达水平随着 UC 病情严重程度增加而升高。UC 是一种炎症性肠病, 主要特点是直肠、乙状结肠等反复发作的炎症, 可引起癌变、出血等并发症, 其发病机制尚未完全明确。目前研究认为, 免疫调节异常在 UC 发病中发挥重要作用。细胞因子在免疫调节中起关键作用, 细胞因子表达异常与多种免疫性疾病的发病密切相关。比如风湿性关节炎患者关节腔中 IL-32 表达增高, 与风湿性关节炎的发病密切相关^[4]。因此, 笔者推测 IL-32 可能参与 UC 的发病。

IL-32 是一种新发现的促炎症细胞因子, 可以通过活化 NF- κ B、AP-1、p38MAPK 信号通路, 诱导单核细胞、巨噬细胞、上皮细胞等表达 TNF- α 、IL-6、

IL-8 及白细胞介素 1 β 等细胞因子, 而白细胞介素 1 β 、TNF- α 及干扰素- γ 等细胞因子均可诱导肠上皮细胞等表达 IL-32, 相互影响导致肠内细胞因子网络活化, 免疫调节异常, 最终导致炎症性肠损伤, 发生炎症性肠病^[2-3, 7-8]。

最新研究发现, 肠上皮细胞表达 IL-32, 炎症性肠病肠组织中 IL-32 表达升高, 认为促炎症细胞因子 IL-32 可能涉及炎症性肠病的发病^[7-8]。本研究发现, UC 患者外周血中 IL-32 表达升高, 且表达水平随病情严重程度增加而升高, 因此笔者认为 IL-32 可能参与 UC 发病, 笔者的研究进一步证实 IL-32 在 UC 发病中的作用。

综上所述, 本研究发现 UC 患者外周血中 IL-32 表达升高, 且 IL-32 表达水平随着 UC 病情严重程度增加而升高, 因此笔者认为 IL-32 可能参与 UC 的发病。

参考文献:

- [1] BANNAGA A S, SELINGER C P. Inflammatory bowel disease and anxiety: links, risks, and challenges faced[J]. Clin Exp Gastroenterol, 2015, 8(1): 111-117.
- [2] VENKATESHA S H, DUDICS S, ACHARYA B, et al. Cytokine-modulating strategies and newer cytokine targets for arthritis therapy[J]. Int J Mol Sci, 2014, 16(1): 887-906.
- [3] ZHOU Y, ZHU Y. Important role of the IL-32 inflammatory network in the host response against viral infection[J]. Viruses, 2015, 7(6): 3116-3129.
- [4] ALSALEH G, SPARSA L, CHATELUS E, et al. Innate immunity triggers IL-32 expression by fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2010, 12(4): R135.
- [5] CHARLES N. B, MICHAEL F, KRABSHUIS J.H, et al. World gastroenterology organization practice guidelines for the diagnosis and management of IBD in 2010[J]. Chinese Journal of Gastroenterology, 2010, 15(9): 548-558.
- [6] KOBAYASHI H, LIN P C. Molecular characterization of IL-32 in human endothelial cells[J]. Cytokine, 2009, 46(3): 351-358.
- [7] SHIOYA M, NISHIDA A, YAGI Y, et al. Epithelial overexpression of interleukin-32alpha in inflammatory bowel disease[J]. Clin Exp Immunol, 2007, 149(3): 480-486.
- [8] KIM S. Interleukin-32 in inflammatory autoimmune diseases[J]. Immune Netw, 2014, 14(3): 123-127.

(童颖丹 编辑)