

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00808

白介素 13 在胆管闭锁和先天性胆管扩张患儿外周血及肝组织中的表达

刘 磊, 田洪孝*

泰安市妇幼保健院外一科, 泰安 271000

[关键词] 胆道闭锁; 白介素 13; 先天性胆管扩张

[中图分类号] R 657.4

[文献标志码] B

[文章编号] 0258-879X(2015)07-0808-03

Expression of interleukin-13 in peripheral blood and liver of infants with biliatry atresia or congenital biliary dilatation

LIU Lei, TIAN Hong-xiao*

Department of Surgery, Maternity and Child Care Hospital of Taian, Taian 271000, Shangdong, China

[Key words] biliary atresia; interleukin-13; congenital biliary dilatation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(7): 808-810]

胆管闭锁是新生儿阻塞性黄疸最常见的原因之一,以肝内外胆管闭锁和梗阻性黄疸为特点, Kasai 手术是其一线治疗方法,但最终仍有 70% 成功应用 Kasai 手术治疗的患儿发展为肝硬化,需要接受肝移植治疗^[1-2]。胆管闭锁发病机制至今未明,研究多认为与肝内炎症反应,尤其是激活的 CD4⁺ 细胞 Th1 亚型及其分泌的细胞因子介导的特异性炎症有关^[3-5],有研究认为 CD4⁺ 细胞 Th2 亚型所分泌的细胞因子在胆管闭锁的发病过程中也起着重要作用^[6]。先天性胆管扩张也是临床较常见的小儿胆管发育畸形,有报道胆管闭锁和胆管扩张可能具有共同的病因学基础^[7]。白介素-13(IL-13)是一种多功能细胞因子,主要由 II 型 T 辅助细胞、肥大细胞、嗜碱性细胞和单核巨噬细胞等在活化状态下分泌,对单核细胞、B 细胞、树突状细胞及内皮细胞等具有多种生物学效应,可调节免疫应答、炎症反应等^[8-9]。本研究观察了 IL-13 在胆管闭锁及先天性胆管扩张患儿外周血及肝组织中的表达情况,初步探讨其在先天性胆管疾病发病中的意义。

1 资料和方法

1.1 研究对象 样本均来自本院 2011 年至 2013 年住院病例。胆管闭锁 12 例,胆管扩张 10 例。所有胆

管闭锁及胆管扩张病例均经手术探查及病理证实。胆管闭锁组男 5 例,女 7 例,平均年龄(2.5±0.3)个月,胆管扩张组男 5 例,女 5 例,平均年龄(20.2±9.8)个月。所有全血标本均在清晨空腹时抽取,离心 10 min,提取血清,-80℃ 保存。获取肝组织穿刺活检标本后置于 4% 甲醛溶液或冻存于-80℃。本研究方案经我院伦理委员会批准,胆管闭锁和胆管扩张患儿监护人均签署知情同意书。

1.2 主要试剂 IL-13 ELISA 试剂盒及单克隆抗体购自美国 R&D 公司;RNA 提取试剂盒购自北京天根有限公司;反转录及荧光定量试剂盒购自日本 TaKaRa 公司。

1.3 血清 IL-13 水平检测 采用 ELISA 法,按照试剂盒说明书进行。于波长 450 nm 的酶标仪上读取各孔的光密度(D)值,绘制标准曲线,在标准曲线上查找对应的浓度范围。

1.4 肝组织 IL-13 mRNA 表达的检测 采用荧光定量 RT-PCR 法。IL-13 和内参对照 β-actin 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。β-actin 引物上游:5'-CAT CTC TTG CTC GAA CTC CA-3',下游:5'-ATC ATG TTT GPH AAC CTT CAA CA-3',产物大小为 300 bp。IL-13 引物上游:5'-CGG TCA TTG CTC TCA CTT GCC TT-3',下游 5'-TTA CCC CTC

[收稿日期] 2014-12-15 [接受日期] 2015-06-15

[作者简介] 刘 磊, 主治医师. E-mail: wp12366@126.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 0538-6621702, E-mail: thx725@sina.com

CCT AAC CCT CCT T-3',产物大小为 500 bp。按照 RNA 提取试剂盒说明书,提取肝组织内总 RNA,并进行 RNA 样品的检测。按照反转录及荧光定量试剂盒说明书,将提取的 RNA 反转录转化为 cDNA,并进行 PCR 扩增,采用标准曲线相对定量法进行结果分析。

1.5 肝组织中 IL-13 蛋白表达的检测 采用蛋白质印迹法。液氮法提取蛋白,-80℃保存待用。稀释并定量组织蛋白样品,使用时取样品 20 μL,行 SDS-PAGE,PVDF 转膜,脱脂牛奶封闭,依次加入一抗(IL-13 鼠抗人单克隆抗体)、二抗及显色剂后,于暗室中显影、定影,凝胶成像系统扫描条带灰度值,β-actin 作为内参照,计算蛋白质表达水平。

1.6 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验对两组间进行比较。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 患儿血清 IL-13 水平 胆管闭锁患儿血清 IL-13 水平为(154.50±18.23) ng/L,低于胆管扩张患儿[(268.20±19.30) ng/L],差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 患儿肝组织 IL-13 的表达 胆管闭锁患儿肝组织中 IL-13 mRNA 及蛋白表达量分别为 0.015 0±0.002 1和 0.344 6±0.015 0,均低于胆管扩张患儿(0.032 0±0.005 0,0.576 5±0.021 5),差异均有统计学意义($P < 0.05$)。蛋白质印迹检测结果见图 1。

特征性细胞因子包括 IL-2、IFN-γ、TNF-α 和 IL-12, Th2 特征性细胞因子包括 IL-4、IL-5 和 IL-13。

IL-13 调控着表面抗原的表达、抗体依赖性细胞毒性、单核细胞形态的改变和细胞因子合成;并诱导单核巨噬细胞的分化,抑制其产生致炎细胞因子和趋化因子(如 IL-1β、IL-6、IL-8、TNF-α 等);同时 IL-13 促进单核巨噬细胞产生 IL-1 受体拮抗蛋白,参与抑制炎症反应^[9]。

本研究采用 ELISA 技术检测 IL-13 在胆管闭锁和胆管扩张患儿外周血中的表达,发现胆管闭锁患儿血清 IL-13 表达水平[(154.50±18.23) ng/L]明显低于胆管扩张患儿[(268.20±19.30) ng/L],差异有统计学意义($P < 0.01$)。有报道健康体检儿童[0.5~4(2.3±0.9)岁]血清 IL-13 水平为(77.27±18.16) ng/L^[10]。本组胆管闭锁或胆管扩张患儿血清 IL-13 水平是健康体检儿童的数倍之多,提示胆管闭锁和胆管扩张患儿较正常儿童免疫应答反应水平增加。进一步采用 RT-PCR 和蛋白质印迹法检测 IL-13 在胆管闭锁和胆管扩张患儿肝组织中的表达,发现类似于外周血中的表达趋势,胆管闭锁患儿肝组织中 IL-13 的表达在基因和蛋白水平均明显低于胆管扩张患儿,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

免疫应答起因于 Th1 和 Th2 作用之间的平衡,是维持正常免疫功能和身体健康的基础。胆管闭锁患儿血清及肝组织中 Th2 特征性细胞因子 IL-13 表达水平均低于胆管扩张患儿,提示 IL-13 在胆管闭锁和胆管扩张这两类先天性胆管疾病发病中有不同的作用和意义。鉴于本研究样本量有限,尚需积累更多资料,进一步进行深入研究。

[参考文献]

- [1] Hartley J L, Davenport M, Kelly D A. Biliary atresia [J]. Lancet, 2009, 374: 1704-1713.
- [2] 沈 楨, 郑 珊. 儿童肝移植的远期预后[J]. 中华小儿外科杂志, 2010, 31: 145-147.
- [3] 黄 磊, 魏明发, 冯杰雄, 袁继炎, 王小林. 胆道闭锁汇管区炎性细胞浸润及其细胞因子的表达研究. [J] 中华小儿外科杂志, 2007, 28: 575-578.
- [4] Mack C L, Tucker R M, Sokol R J, Karrer F M, Kotzin B L, Whittington P F, et al. Biliary atresia is associated with CD4⁺ Th1 cell-mediated portal tract inflam-

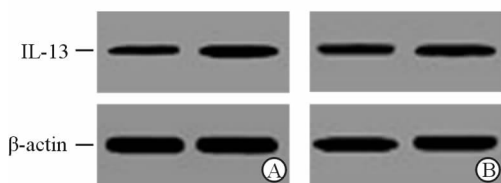


图 1 胆管闭锁(A)和先天性胆管扩张(B)患儿肝组织 IL-13 的表达(蛋白质印迹法)

3 讨论

肝内炎症反应主要是 CD4⁺ 细胞 Th1 亚型及其所分泌的细胞因子介导的特异性炎症过程。天然 CD4⁺ 细胞遇到外来抗原后可分化为 Th1 细胞和 Th2 细胞,激活的炎症细胞又会各自分泌特异性细胞因子。Th1

mation[J]. *Pediatr Res*, 2004, 56:79-87.

[5] Harada K, Nakanuma Y. Biliary innate immunity in the pathogenesis of biliary diseases[J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2010, 9:83-90.

[6] Li J, Bessho K, Shivakumar P, Mourya R, Mohanty S K, Dos Santos J L, et al. Th2 signals induce epithelial injury in mice and are compatible with the biliary atresia phenotype[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121: 4244-4256.

[7] Ando K, Miyano T, Fujimoto T, Ohya T, Lane G, Tawa T, et al. Sibling occurrence of biliary atresia and biliary dilatation[J]. *J Pediatr Surg*, 1996, 31: 1302-1304.

[8] Morse M A, Lysterly H K, Li Y. The role of IL-13 in generation of dendritic cells *in vitro*[J]. *J Immunother*, 1999, 22: 506-513.

[9] Minty A, Chalcn P, Deroq J M, Dumont X, Guillemot J C, Kaghad M, et al. Interleukin-13 is a new human lymphokin regulating inflammatory and immune response[J]. *Nature*, 1993, 362: 248-250.

[10] 范楚平,何庆南,彭华保,张碧清. 儿童哮喘患儿血清 IL-18 与 IL-13 水平变化的研究[J]. *中国医师杂志*, 2008,10:676-677.

[本文编辑] 魏学丽

· 消息 ·

第二军医大学荣获 2015 年“上海市专利工作示范单位”

2015 年 6 月,经上海市知识产权局评审我校获批 2015 年“上海市专利工作示范单位”。我校的成功入选,既是上海市知识产权局对我校知识产权工作的认可,也是我校坚持科技创新、注重知识产权管理的直接体现。

近年来,我校高度重视知识产权工作,专利申请量持续增长。截止到 2014 年 12 月 31 日,我校作为第一专利权人共拥有有效专利 922 件,其中有效发明专利 426 件、有效实用新型专利 484 件、有效外观专利 12 件。有效国防专利 6 件,国际专利 3 件。

我校将以荣获“上海市专利工作示范单位”为动力,进一步强化技术创新工作和知识产权管理工作,以市场为导向,充分发挥示范单位的带头作用,引领和推动技术的创新发展。