

· 论著 ·

## L-12P35, P40 和 IFN- $\gamma$ 在胆道闭锁小鼠模型肝脏组织中的表达

杨 璞 汤绍涛 曹国庆 董 宁

**【摘要】** 目的 检测小鼠胆道闭锁(biliary atresia, BA)模型肝脏 IL-12p35, p40, IFN- $\gamma$  mRNA 的表达情况, 探索其在 BA 发病中的作用。方法 采用腹腔注射 RRV 病毒建立 Balb/c 新生小鼠 BA 模型, 其中胆道闭锁组(BA 组)45 只, 对照组 24 只(腹腔注射病毒培养液)。应用 RT-PCR 方法检测小鼠模型肝脏中 IL-12p35, p40, IFN- $\gamma$  mRNA 的表达。结果 与对照组相比, BA 组肝内 IL-12p35, p40, IFN- $\gamma$  mRNA 的表达水平均明显高于对照组,  $P < 0.01$ , 在第 9 天时 IFN- $\gamma$  表达水平达峰值( $13.340 \pm 0.539$ ), IL-12p35, IL-12p40 也同时达峰值, 分别为( $47.629 \pm 2.041$ )和( $45.987 \pm 2.06$ ), 之后, IL-12p35 和 IFN- $\gamma$  表达均下降, 但 IL-12p40 表达仍维持在较高水平。结论 IL-12P35, P40 及 IFN- $\gamma$  mRNA 表达水平在 BA 发病过程中明显升高, IL-12P35, P40 在 BA 发病机制中可能与调节 gamma 干扰素(IFN- $\gamma$ )的分泌相关。

**【关键词】** 胆道闭锁 / 病理学; 肝 / 病理学; 白细胞介素 12 / 分析; 干扰素 II 型 / 分析

The expression of IL-12P35, P40 and IFN- $\gamma$  in the liver of experimental biliary atresia. YANG Ying, TANG Shao-tao, CAO Guo-qing, et al. Department of Pediatric Surgery, Union Hospital of Huazhong College of Science and Technology, Wuhan 430022, China

**【Abstract】** Objective To explore function and expression of IL-12p35, p40 and IFN- $\gamma$  mRNA in the liver of biliary atresia (BA) mice. Methods Mice Models of BA were induced by infecting with RRV intraperitoneally, 45 mice were BA group, 24 mice were infected with 2%FCS-MEM as control. Expression of IL-12p35, p40 and IFN- $\gamma$  mRNA in livers of mice were detected with RT-PCR. Results As to the control group, the expressions of IL-12p35, p40 and IFN- $\gamma$  mRNA in the liver of BA mice were much higher than those in control group ( $P < 0.01$ ) and peaked at the 9th days after inoculating of RRV (IFN- $\gamma$ :  $13.340 \pm 0.539$ ; IL-12p35:  $47.629 \pm 2.041$ ; p40:  $45.987 \pm 2.06$ ). Then the expressions of IFN- $\gamma$  and IL-12p35 decreased, while the expression of IL-12p40 remained to a high level. Conclusions The expression of IL-12p35, p40 and IFN- $\gamma$  increased in the liver of BA mice, maybe the externalization of IFN- $\gamma$  is related with IL-12p35, p40 in the pathogenesis of BA.

**【Key words】** Biliary Atresia/PA; Liver/PA; Interleukin-12/AN; Interferon Type II/AN

近年来研究表明, 免疫炎症反应在胆道闭锁(biliary atresia, BA)发病过程中起着至关重要的作用, 一些研究<sup>[1,2]</sup>证明,  $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )在 BA 的发生发病过程中起关键作用。已知白细胞介素 12(IL-12)是自身免疫炎症反应中的重要因子, 并与 IFN- $\gamma$  之间有正反馈调节作用。本研究拟对胆道闭锁肝脏组织中 IL-12p35, p40 和 IFN- $\gamma$  进行定量测定, 以探讨 IL-12 在胆道闭锁中的作用。

### 材料与方法

#### 一、病毒、动物和主要试剂

病毒为恒河猴轮状病毒 RRV MU10086(美国辛西那提大学小儿外科 Mack CL 教授赠送)。MA104 细胞用于病毒的滴定和培养(购自第四军医大学细胞学实验室)。动物 Balb/c 小鼠, 5 周龄, 无特定病原体级(specific pathogen free, SPF)(购自同济医学院实验动物中心)。Trizol(购自上海华舜生物工程有 限 公 司); DNA 荧光染料 SYBR Green I, 引物, RNA 酶抑制剂, Taq 酶, 10 × buffer, 5 × buffer(购自上海英骏生物技术有限公司)。

作者单位: 华中科技大学附属协和医院小儿外科(武汉, 430030), 通讯作者: 汤绍涛, E-mail: tshaotao83@126.com, 该课题为湖北省卫生厅资助项目(项目号 2005JX2B19), 湖北省自然科学基金资助项目(项目号 2006ABA159)

小鼠 IFN- $\gamma$  引物序列为:5'-TCAAGTGGCAT AGATGGGAAG-3' (sense);5'-GACGCTTAT-GTTGTTGCTGATG-3'(antisense), 小鼠 IL-12p35 引物序列:5'-CTATGGTCAGCGTTCCAACAGC-3' (sense);5'- GTTTCGGGACTGGCTAAGACACC-3' (antisense), 小鼠 IL-12p40 引物序列:5'-CCTCTTC-CCTGTCGCTAACTC-3' (sense);5'-CCAGTCCAC-CTCTACAACATAAAC-3'(antisense), 内参物 GAPDH 引物序列为:5'-GATGCTGA AGGTCCGTCTG-3' (sense);5'-GAGGTC AATGAAGGGGTCTG-3' (anti-sense)。

二、模型建立<sup>[3]</sup>

将 Balb / c 小鼠 24 只, 按照雄雌比例 1 : 3 分笼饲养, 待生下第 1 胎新生鼠后随机分为 2 组, 并在 24 h 内腹腔给药。对照组给予腹腔注射病毒培养液 20  $\mu$ L, 实验组腹腔注射 20  $\mu$ L PFU = 106 的轮状病毒。分别在 3 d、6 d、9 d、14 d、21 d 观察小鼠体重变化、无毛区黄疸情况及大小便颜色, 并行剖腹探查, 取肝脏和胆管组织作连续切片行 HE 染色。

三、实时荧光定量 PCR (Real-Time PCR) 检测 IL-12p35, p40 及 IFN- $\gamma$  mRNA

于剖腹探查时即取小鼠肝脏组织置于 -70℃ 保存备用, 取齐标本后, 每份称量 50 mg 置于玻璃匀浆器中, 加 500  $\mu$ L Trizol 试剂进行匀浆, 匀浆后得到组织 mRNA 标本转移到 1.5 mL 的 EP 管中, 对 mRNA 标本进行 Real Time PCR。

在逆转录酶的作用下, 将 mRNA 逆转录成 cDNA 分子。逆转录反应体系为: H<sub>2</sub>O 5.5  $\mu$ L, 引物 1.0  $\mu$ L (50  $\mu$ g / mL), 模版 RNA 6.0  $\mu$ L, 混合后至 70℃ 5 min, 立即冰浴。后加入 RNasin 0.5  $\mu$ L (40U /  $\mu$ L), 5  $\times$  Buffer 4.0  $\mu$ L, 10mM dNTP 2.0  $\mu$ L, RTase 1.0  $\mu$ L (200U /  $\mu$ L), 置于逆转录仪, 设定 42℃ 60 min, 95℃ 5 min, 进行逆转录反应。

Real-Time PCR 反应体系为: CDNA 1  $\mu$ L, 10X Buffer 5  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> (25mM) 7  $\mu$ L, dNTP (10Mm) 1  $\mu$ L, F

(20pmol /  $\mu$ L) 0.8  $\mu$ L, R (20pmol /  $\mu$ L) 0.8  $\mu$ L, SYBR Green I 1  $\mu$ L, Taq 酶 (5U /  $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, H<sub>2</sub>O 32.9  $\mu$ L 混匀后置于 RT-PCR 仪内设定 94℃ 3 min, (94℃ 30 s, 53℃ 30 s, 73℃ 30 s) 进行 50 个循环。

所有产物均被 FTC-2000 荧光实时定量 PCR 仪收集, 并存入其附件 (电脑) 及分析软件中, 以内参物 GRAPH 的表达量为参照标准, 按照以下公式计算每组中各个样本 IL-12p35, p40, IFN- $\gamma$  mRNA 的相对表达量, 各组最终结果用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 形式列表表示: 待测样品相对表达量 =  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ;  $\Delta C_t = \Delta C_t$  内参 -  $\Delta C_t$  待测样品;  $\Delta C_t$  内参 =  $C_t$  阴性标本 -  $C_t$  内参;  $\Delta C_t$  待测样品 =  $C_t$  阴性标本 -  $C_t$  代测样品

$C_t$  值是指每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数,  $C_t$  值与 mRNA 的表达水平成负相关, 即  $C_t$  值增加, IL-12p35, p40 和 IFN- $\gamma$  mRNA 的表达水平下降。

四、统计学方法

所有数据用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 SPSS 13.0 统计学软件进行  $t$  检验。  $P < 0.05$ , 为差异有统计学意义。

结 果

一、接种 RRV 后小鼠 BA 的发生率

实验组 87 只, 接种病毒后 63 只出现发育迟缓和胆汁淤积等症状, 肝脏和胆管光镜观察及切片行 HE 染色诊断为 BA (图 1), 成功率为 77.8% (63 / 81)。截至第 14 天共死亡 47 只鼠, 第 21 天时仅剩 1 只雄性小鼠。对照组 27 只, 自然死亡 3 只, 无一例出现发育迟缓和胆汁淤积症状。取实验组中符合 BA 诊断标准的鼠 45 只以及对照组 24 只小鼠肝脏进行 IL-12p35, p40 及 IFN- $\gamma$  mRNA 检测。

二、IL-12p35, p40 及 IFN- $\gamma$  mRNA 在胆道闭锁小鼠肝脏组织中的表达

连续观察 IL-12p35, p40 和 IFN- $\gamma$  mRNA 在胆

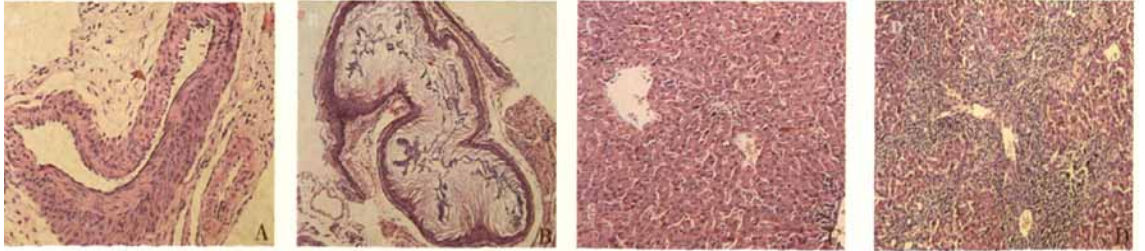


图 1 A、正常胆管; B、BA 胆管呈闭锁状态, 内皮细胞破坏、不规则增生, 伴炎性细胞浸润 (100  $\times$ ); C、正常肝脏汇管区炎症细胞极少; D、BA 肝脏中见汇管区炎症细胞 (蓝色部分的细胞) 明显浸润 (100  $\times$ )。

道闭锁小鼠肝脏组织中的表达情况,发现三者表达均从第 3 天开始增高,均高于对照组小鼠( $P < 0.01$ ),至第 9 天时达峰值,IFN- $\gamma$  表达水平为  $13.340 \pm 0.539$ , IL-12p35 为  $47629 \pm 2041$ , IL-12p40 为  $45987 \pm 206$ ,之后,IFN- $\gamma$  和 IL-12p35 水平开始下降,但 IL-12p40 仍维持在较高水平,见表 1,图 2。

表 1 不同时间点 IL-12p35, p40, IFN- $\gamma$  mRNA 表达水平的变化

时间	对照组(2- $\Delta\Delta G$ )			BA 组(2- $\Delta\Delta G$ )		
	n IL-12p35	IL-12p40	IFN- $\gamma$	n IL-12p35	IL-12p40	IFN- $\gamma$
第 3 天	$5.436 \pm 0.80$	$4.54 \pm 1.18$	$0.22 \pm 0.04$	$9.1752 \pm 1.26$	$15.92 \pm 1.23$	$3.32 \pm 0.06$
第 6 天	$4.396 \pm 0.40$	$4.30 \pm 1.20$	$0.226 \pm 0.01$	$13.821 \pm 2.21$	$27.57 \pm 1.89$	$6.51 \pm 0.49$
第 9 天	$6.512 \pm 0.41$	$4.98 \pm 0.65$	$0.39 \pm 0.010$	$12.763 \pm 2.04$	$45.99 \pm 2.06$	$13.34 \pm 0.54$
第 14 天	$4.387 \pm 0.77$	$3.68 \pm 0.28$	$0.49 \pm 0.07$	$10.932 \pm 1.67$	$36.46 \pm 1.22$	$4.62 \pm 0.75$
第 21 天	$5.324 \pm 0.30$	$3.15 \pm 0.26$	$0.51 \pm 0.05$	14.43	35.29	1.88

注:两组 IL-12p35 相比:第 3 天,  $t = 21.01$ ;  $P < 0.01$ ;第 6 天:  $t = 21.45$ ;  $P < 0.01$ ;第 9 天:  $t = 49.78$ ;  $P < 0.01$ ;第 14 天:  $t = 17.45$ ;  $P < 0.01$ ;第 21 天:  $t = 34.22$ ;  $P < 0.01$ 。两组 IL-12p40 相比:第 3 天:  $t = 15.79$ ;第 6 天:  $t = 22.89$ ;第 9 天:  $t = 46.97$ ;第 14 天:  $t = 52.11$ ;第 21 天:  $t = 112.6$ ,均  $P < 0.01$ 。两组 IFN- $\gamma$  相比:第 3 天:  $t = 181.21$ ;第 6 天:  $t = 56.59$ ;第 9 天:  $t = 86.49$ ;第 14 天:  $t = 24.21$ ;第 21 天:  $t = 38.19$ ,均  $P < 0.01$

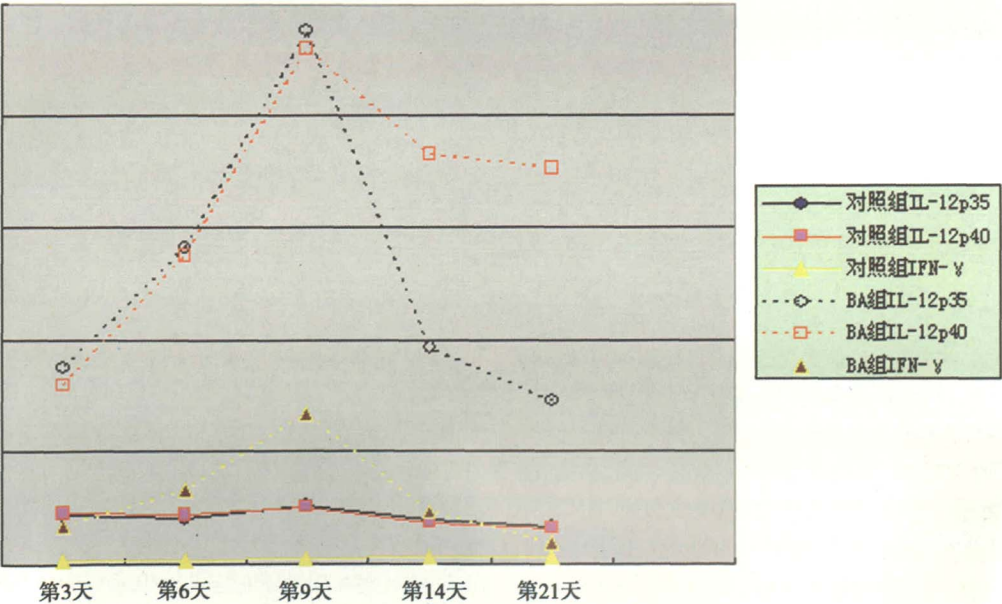


图 2 IL-12p35, p40, IFN- $\gamma$  mRNA 表达水平的变化

讨论

近年来许多研究认为 BA 是病毒感染诱发了机体的炎症和免疫反应<sup>[4-6]</sup>。研究者通过对比研究 BA 与其它类似症状的小儿淤胆性疾病,发现仅在 BA 肝脏汇管区有大量 Kupffer(枯否细胞)、CD $_4$ +T、CD $_8$ +T 细胞和 NK 细胞等浸润,IFN- $\gamma$  和 IL-12 p40 等过度表达,提示胆管上皮及汇管区炎性细胞浸润和促炎因子的释放可能是 BA 胆管损伤的始动因素<sup>[7-9]</sup>。研究证明,在胆道闭锁的炎性环境中,肝脏内 kupffer 细胞活化后所分泌的 IL-12 促进 Th1 细胞的分化

和活化。IL-12 等细胞因子可以促使原始 CD $_4$ +Th 细胞分化为 Th1 细胞,Th1 细胞活化后可以释放 IFN- $\gamma$ 。Shivakumar 等<sup>[10]</sup>应用 RRV 建立 Balb/c IFN- $\gamma$  基因缺失鼠 BA 模型,感染后虽出现早期胆管炎症和黄疸,但不久症状消失,肝外胆管保持开放。将 IFN- $\gamma$  基因缺失鼠病毒感染后再腹腔注射重组 IFN- $\gamma$ ,小鼠又出现 BA 表现,与野生小鼠类似。而 Joachim F 等<sup>[11]</sup>用 RRV 病毒感染 I 型干扰素受体,II 型干扰素受体(IFN- $\gamma$  R)基因敲除鼠和野生鼠,结果显示 IFN- $\gamma$  R 的缺失可明显降低胆道闭锁小鼠胆汁淤积的恢复。两项研究结果虽有矛盾,但是均提示 IFN- $\gamma$  及其受体在新生鼠肝外胆管损

伤和闭锁的形成机制中发挥着关键作用。


IL-12 主要由巨噬细胞、单核细胞、树突细胞、朗罕细胞和角质细胞等产生,具有多种生物学功能,诱导 Th1 细胞和 NK 细胞分泌 IFN- $\gamma$ 、IL-2; 加强 NK、LAK 细胞和杀伤性 T 细胞的细胞毒性,是连接机体先天性免疫力和后天获得性免疫力的桥梁<sup>[56]</sup>。IL-12 由不同基因编码的两个亚单位 p35 和 p40 结合形成 IL-12p70 异源二聚体形式,IL-12 才具生物学活性,而 p40 亚基相结合形成(p40)<sub>2</sub> 同源二聚体则通过竞争 IL-12 受体,抑制 IL-12 的生物学作用<sup>[6]</sup>。在 BA 中,肝门结缔组织以及肝内胆管周围浸润的炎性细胞主要为淋巴细胞、巨噬细胞以及嗜伊红细胞,巨噬细胞和活化的 Kupffer 细胞可以产生大量 IL-12,从而使其在 BA 中发挥重要作用。Sujit Kumar Mohanty 等<sup>[10]</sup>利用 RRV 病毒感染 IL-12 基因敲除鼠,研究表明,IL-12 的缺失并不能完全阻止 IFN- $\gamma$  的产生,也不能阻止胆道闭锁发生进展,但是却增加了 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\alpha$  及 IFN- $\gamma$  的产生,免疫反应主要基于嗜中性粒细胞,显示为 Th1 细胞免疫应答。IL-12 最重要的功能就是调整 Th1/Th2 细胞的平衡<sup>[10]</sup>,促进 Th1 细胞分泌大量 IFN- $\gamma$ 。而 IFN- $\gamma$  可抑制 IL-4 的抗 IL-12 的作用,使 Th2 转化为 Th1 细胞,分泌更多 IFN- $\gamma$ 。IFN- $\gamma$  还能直接或间接影响 Th1 细胞发育,为 T 细胞提供一种共刺激信号,上调 IL-12 的表达,二者的正反馈调节作用使机体在遭遇病毒侵袭时,以 Th1 细胞应答为主,共同抵挡病毒侵袭。

本实验利用轮状病毒感染 Balb/c 新生鼠建立胆道闭锁模型,取其肝脏标本动态检测其中 IL-12P35、P40、IFN- $\gamma$  的 mRNA 含量。结果显示实验组 IL-12P35、P40 及 IFN- $\gamma$  在病毒感染第 3 天同时增高,均高于对照组,分别为 IL-12P35( $17.52 \pm 1.26$  vs  $4.36 \pm 0.80$ ), IL-12P40( $15.92 \pm 1.23$  vs  $4.54 \pm 1.18$ ), IFN- $\gamma$  ( $3.32 \pm 0.06$  vs  $0.22 \pm 0.04$ ),到第 9 天达峰值,分别为 IL-12P35: $47.63 \pm 2.04$ , IL-12P40: $45.99 \pm 2.06$ , IFN- $\gamma$ :  $13.34 \pm 0.54$ ,说明 IL-12P35、P40 很有可能在体内形成异源二聚体 p70,从而发挥 IL-12 的生物学作用,促进 IFN- $\gamma$  的分泌,而在第 9 天之后 IL-12p35 和 IFN- $\gamma$  表达均下降,而 IL-12p40 虽稍有下降,但仍维持在较高水平,说明

此时可能 IL-12p40 形成 (p40)<sub>2</sub>, 从而抑制了 IL-12 的生物学活性。这一结论提示在胆道闭锁的发病过程中,IL-12 通过诱导 Th1 细胞的分化,分泌大量 IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$  与其受体识别后通过 IFN- $\gamma$  R2 引起细胞内信号转导事件,诱导严重的免疫应答,最终引起肝内外胆管损伤、闭塞,最终迅速导致进行性不可逆的肝脏纤维化。

## 参 考 文 献

- Shivakumar P, Campbell KM, Sabla GE, et al. Obstruction of extrahepatic bile ducts by lymphocytes is regulated by IFN- $\gamma$  in experimental biliary atresia [J]. J Clin Invest, 2004, 114: 322-329.
- Leeb T, Dolle K, Haase B. Sequence analysis of the porcine IFNAR1 and IFNGR2 genes [J]. Cytogenet Genome Res, 2006, 2: 134-137.
- 马亚贞, 汤绍涛, 童强松, 等. 轮状病毒致胆道闭锁动物模型的建立 [J]. 中华小儿外科杂志, 2007, 12: 659-662.
- 汤绍涛, 童强松, 毛永忠, 等. 胆道闭锁患儿血清 sICAM-1 与 IL-18 的变化及临床意义 [J]. 中华小儿外科杂志, 2004, 6: 531-533.
- 汤绍涛, 阮庆兰. 胆道闭锁与细胞因子 [J]. 中华小儿外科杂志, 2003, 1: 85-87.
- Mack CL. The pathogenesis of biliary atresia: evidence for a virus-induced autoimmune disease [J]. Semin Liver Dis, 2007, 3: 233-242.
- Kotba MA, Henawy AE, Talaath S, et al. Immune-mediated liver injury: prognostic value of CD4+, CD8+, and CD68+ in infants with extrahepatic biliary atresia [J]. J Pediatric Surg, 2005, 40: 1252-1257.
- Bezerra JA. Potential etiology of biliary atresia [J]. Pediatr Transplantation, 2005, 9: 646-651.
- Heinzel F P, Hujer A M, Ahmed F N, et al. In vivo production and function of IL-12 p40 homodimers [J]. J Immunol, 1997, 158: 4381-4388.
- Mohanty SK, Shivakumar P, Sabla G, Bezerra JA. Loss of interleukin-12 modifies the pro-inflammatory response but does not prevent duct obstruction in experimental biliary atresia [J]. BMC Gastroenterol, 2006, 19(6): 14.
- Murphy KM, Ouyang W, Farrar JD, et al. Signaling and transcription in T helper development [J]. Annu Rev Immunol, 2000, 18: 451-494.

作者: 杨瑛, 汤绍涛, 曹国庆, 董宁  
作者单位: 华中科技大学附属协和医院小儿外科, 武汉, 430030  
刊名: 临床小儿外科杂志   
英文刊名: JOURNAL OF CLINICAL PEDIATRIC SURGERY  
年, 卷(期): 2008, 7(6)  
被引用次数: 1次

## 参考文献(11条)

1. 汤绍涛;阮庆兰 胆道闭锁与细胞因子[期刊论文]-中华小儿外科杂志 2003(01)
2. 汤绍涛;童强松;毛永忠 胆道闭锁患儿血清sICAM-1与IL-18的变化及临床意义[期刊论文]-中华小儿外科杂志 2004(06)
3. 马亚贞;汤绍涛;童强松 轮状病毒致胆道闭锁动物模型的建立[期刊论文]-中华小儿外科杂志 2007(12)
4. Leeb T;Dolle K;Haase B Sequence analysis of the porcine IFNAR1 and IFNGR2 genes 2006(2)
5. Murphy KM;Ouyang W;Farrar JD Signaling and transcription in T helper development 2000(0)
6. Mohanty SK;Shivakumar P;Sabla G;Bezerra JA Loss of interleukin-12 modifies the pro-inflammatory response but does not prevent duct obstruction in experimental biliary atresia 2006(06)
7. Heinzel F P;Hujer A M;Ahmed F N In vivo production and function of IL-12 p40 homodimers 1997
8. Bezerra JA Potential etiology of biliary atresia 2005(5)
9. Kotba MA;Henawy AE;Talaatb S Immune-mediated liver injury:prognostic value of CD4+, CD8+, and CD68+ in infants with extrahepatic biliary atresia 2005(8)
10. Mack CL The pathogenesis of biliary atresia:evidence for a virus-induced autoimmune disease 2007(3)
11. Shivakumar P;Campbell KM;Sabla GE Obstruction of extrahepatic bile ducts by lymphocytes is regulated by IFN-gamma in experimental biliary atresia 2004(3)

## 引证文献(1条)

1. 晏青, 卞鹰, 康权 胆道闭锁与病毒感染和免疫反应的相关研究[期刊论文]-细胞与分子免疫学杂志 2010(6)

本文链接: [http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_lcxewkzz200806008.aspx](http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_lcxewkzz200806008.aspx)

授权使用: 黔南民族师范学院(gnnzsfxy), 授权号: 7b152dd3-1120-4287-b097-9eda00b828aa

下载时间: 2011年5月5日