

培养基的营养。(3)我们采用了独特的三通管装置,脐静脉一端用三通管连接并用丝线固定,充分利用了其阀门的作用,有利于脐静脉的冲洗、消化及灌洗;避免插入钝性针头对内皮细胞造成损伤甚至穿破脐静脉造成液体外漏,消化出的细胞纯度亦不高。脐静脉另一端直接用血管钳夹闭,不仅牢固,又节约了大量的时间,而其他方法如缝扎脐动脉等不仅浪费时间,且不一定牢靠。(4) I 型胶原酶 37℃ 消化时间在 10 ~ 15 min 为宜,时间太少,消化出的细胞太少;时间太长,细胞外的基质亦会一同被消化下来,混杂在细胞一起,影响 HUVECs 的贴壁。另外,配制好的胶原酶不宜存放过久,使用 -20℃ 存放超过 2 个月的胶原酶溶液消化出的细胞存活率大大降低,存活率最高只有 30%,可能是存放时间过久产生的细胞毒性的影响,因此,胶原酶最好新鲜配制, -20℃ 存放最好不要超过 1 个月。(5) HUVECs 本身为贴壁细胞,且其贴壁速度较快。通过实验观察发现,培养瓶未铺明胶和铺有明胶相比,细胞贴壁速度及贴比率无明显差异。因此,作者的实验中培养瓶均未预铺明胶。(6)为防止细胞污染,几乎所有的研究者常规在培养基中加入青链霉素双抗,经过多次的研究发现,不加双抗也不

会发生细胞污染,但操作过程中需严格注意无菌原则。(7)随着 HUVECs 传代次数的增加,特别是当细胞传至第 5 代后,细胞逐渐衰老,分裂增殖能力大幅度降低,这与其他研究结果相似<sup>[2,3]</sup>。有研究在培养基中加入内皮生长因子后,细胞可传至 10 代以上,但因其价格较为昂贵,笔者并未尝试使用<sup>[4]</sup>。

通过反复的尝试,三通管装置胶原酶灌注法模型可以获取较高纯度(可达 95% 以上)的 HUVECs,不仅为后续的相关研究奠定了基础,也为其他研究者提供了较好的模型。

#### 参考文献

- 1 张清,张玲玲.人脐静脉内皮细胞体外培养及相关研究[J].医学综述,2010,16(3):333-336
- 2 Cheung AL. Current protocols in microbiology [M]. Hanover: John Wiley & Sons, Inc, 2007: A.4B.1 - A.4B.8
- 3 Mitry RR, Hughes RD. Human cell culture protocols, methods in molecular biology [M]. Luxemburg: Springer Science + Business Media, LLC, 2012: 265 - 274
- 4 王志华,何志旭,汪浩文,等.人脐静脉血管内皮细胞的培养和鉴定[J].贵阳医学院学报,2006,31(6):499-501

(收稿日期:2012-11-08)

(修回日期:2012-11-29)

## SOCS3 和 Th1/Th2 相关细胞因子在非酒精性脂肪性肝病中的表达及意义

何蓓晖 陈芝芸 严茂祥 陈 瑜

**摘要** **目的** 研究 SOCS3 和 Th1/Th2 相关细胞因子在非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 中的表达及其相互关系和临床意义。**方法** 取 30 例 NAFLD 患者 (NAFLD 组) 和 30 例健康体检者 (对照组) 为研究对象,分别应用实时荧光定量 PCR 法 (RT-PCR) 法和 ELISA 法检测外周血 SOCS3 mRNA 和 Th1/Th2 相关细胞因子 IFN- $\gamma$ 、IL-4 的表达,观察并比较两组之间的差异。**结果** NAFLD 组 SOCS3 mRNA 的表达较对照组显著升高 ( $P < 0.01$ ); NAFLD 组 IFN- $\gamma$  的水平较对照组明显升高 ( $P < 0.01$ ), 而 IL-4 的水平则无明显变化 ( $P > 0.05$ )。**结论** NAFLD 患者外周血 Th1 型细胞因子占优势, Th1/Th2 失衡, IFN- $\gamma$  的大量表达导致炎症反应,进而促进了 NAFLD 的发生发展; SOCS3 可能是导致 NAFLD 进展的危险因素。

**关键词** 非酒精性脂肪性肝病 SOCS3 Th1/Th2 IFN- $\gamma$  IL-4

**Expression of SOCS3 and Cytokines of Th1/Th2 in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease.** He Beihui, Chen Zhiyun, Yan Maoxiang, et al. Zhejiang Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang 310006, China

**Abstract Objective** To observe the expression of SOCS3, IFN- $\gamma$  and IL-4 in serum of patients with nonalcoholic fatty liver dis-

基金项目:浙江省医药卫生科技计划基金资助项目(2011KYB058)

作者单位:310006 浙江省中医院消化研究室(何蓓晖、陈芝芸、严茂祥);310003 浙江大学医学院附属第一医院(陈瑜)

通讯作者:何蓓晖,电子邮箱:graf303@sina.com

ease, and to discuss the association between them. **Methods** The expression of IFN- $\gamma$  and IL-4 in serum of thirty patients with nonalcoholic fatty liver disease and in thirty healthy adults were detected by ELISA technique. SOCS3 mRNA levels in blood mononuclear cells were analyzed by RT-PCR technique. **Results** The levels of IFN- $\gamma$  and SOCS3 mRNA of NAFLD group were obviously higher than those of control group ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ , respectively), but the level of IL-4 was not different between the two groups. **Conclusion** Th1 is primary at the early satge of NAFLD. SOCS3 is a risk factor of NAFLD.

**Key words** NAFLD; SOCS3; Th1/Th2; IFN- $\gamma$ ; IL-4

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指除外过量饮酒和其他明确的损肝因素所致的,以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变为主要特征的临床病理综合征,包括单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、脂肪性肝硬化,甚至演变为肝细胞癌。NAFLD已经成为美国等发达国家和其他发展中国家最常见的肝脏疾病<sup>[1]</sup>,在美国成人的发病率约30%<sup>[2]</sup>;我国上海市、广东省和香港特别行政区成年人的发生率大约15%<sup>[3]</sup>,并且发生率还在逐年上升。近年来,Th1/Th2型细胞因子的平衡与NAFLD发生发展的关系,成为新的研究热点,Th1/Th2失衡,Th1类促炎细胞因子IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 大量表达<sup>[4]</sup>,可能引起NASH的发生发展。另外,研究发现SOCS(suppressor of cytokine signaling)家族中的亚型SOCS3参与了胰岛素抵抗、瘦素抵抗和NAFLD的发病过程<sup>[5]</sup>。本研究通过对NAFLD患者外周血中SOCS3mRNA表达和Th1/Th2相关细胞因子IFN- $\gamma$ 、IL-4水平的检测,研究其在NAFLD发病中的作用,并进一步探索NAFLD的发病机制。

资料与方法

1. 一般资料:收集2011年7~9月期间浙江省中医院体检中心和消化科门诊的符合2010年中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组制定的非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)诊断标准<sup>[6]</sup> NAFLD患者30例,并设同期健康体检者30例为对照组;其中NAFLD组:男性16例,女性14例,年龄28~59岁,平均年龄43.03±10.71岁;对照组:男性14例,女性16例,年龄24~59岁,平均年龄40.3±10.09岁。两组的性别、年龄差异无统计学意义,具有可比性。除外有大量饮酒史,自身免疫性肝病、病毒性肝炎、药物性肝病、肝豆状核变性等可导致脂肪肝的特定疾病。

2. 主要试剂与仪器:人IFN- $\gamma$ 、IL-4 ELISA检测试剂盒由联科生物技术有限公司产品,Trizol为美国Gibco公司产品,反转录试剂盒、Perfect Real Time-SYBR Premix EX Taq™试剂盒为宝生物工程(大连)有限公司产品;引物由上海生工生物工程技术有限公司合成:SOCS3上游引物:5'-CTC GCC ACC TAC TGA ACC CTC-3',下游引物5'-AAG CGG GGC ATC GTA CTG GT-3',扩增片段265bp;GAPDH上游引物:5'-TGA TGA CAT CAA GAA GGT GG-3',下游引物:5'-

TTA CTC CTT GGA GGC CAT GT-3',扩增片段244bp。ABI7900实时荧光定量PCR仪为美国ABI产品,ELX808酶标仪为BIOTEK产品,雅培Ci8200全自动生化分析仪为美国雅培产品,NanoDrop1000超微量核酸蛋白分析仪为美国Thermo产品。

3. 标本处理:所有受检者空腹8h以上,于清晨抽取静脉血5ml,分离血清,用于血脂、血清肝酶及细胞因子检测;抽取2ml抗凝血,分离单个核细胞,加入1ml Trizol试剂,置-70℃冰箱保存,备批量处理。

4. 检测方法:血脂及血清肝酶采用全自动生化仪检测;血清IFN- $\gamma$ 、IL-4水平采用ELISA法检测;SOCS3mRNA的表达采用RT-PCR法,从冰箱取出已加入1ml Trizol的血单个核细胞,复温,按照Trizol提取试剂说明书进行RNA提取,经鉴定无降解、纯度高,紫外分光光度仪测A260/A280比值在1.8~2.0之间,根据A260值计算总RNA浓度。以500ng总RNA为模板进行反转录,反转录反应产物于20 $\mu$ l反应体积(2 $\times$ SYBR10 $\mu$ l、10 $\mu$ mol/L浓度的10 $\mu$ mol/L上下引物各0.4 $\mu$ l、cDNA模板2 $\mu$ l、ddH<sub>2</sub>O补充体积至20 $\mu$ l)中进行PCR扩增,PCR反应条件:预变性:95℃ 3min;再95℃ 5s、60℃ 45s,共40个循环;溶解曲线分析:95℃ 15s,60℃ 15s,缓慢上升至95℃ 15s。以GAPDH作内参,相对表达量( $2^{-\Delta Ct} \times 10^3$ )来表示目的基因mRNA的表达水平( $\Delta Ct$ =目的基因Ct-内参Ct)。

6. 统计学方法:用SPSS 16.0统计软件进行统计分析,计量资料均以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用t检验,计数资料采用 $\chi^2$ 检验,相关采用Pearson检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. NAFLD患者生化指标变化:NAFLD组TG、TC、LDL、ALT、GGT水平均高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),NAFLD组HDL水平低于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表1。

表1 NAFLD患者血脂及血清肝酶学变化( $\bar{x} \pm s$ )

| 生化指标        | NAFLD组( $n=30$ ) | 对照组( $n=30$ ) |
|-------------|------------------|---------------|
| TG (mol/L)  | 2.74±0.81**      | 1.03±0.31     |
| TC (mol/L)  | 5.74±0.75**      | 3.99±0.47     |
| HDL (mol/L) | 1.28±0.22*       | 1.34±0.18     |
| LDL (U/L)   | 2.94±0.63**      | 2.06±0.43     |
| ALT (U/L)   | 30.33±15.78**    | 16.83±7.08    |
| GGT (U/L)   | 31.33±19.87**    | 13.57±12.24   |

与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

2. NAFLD 患者血清 IFN- $\gamma$ 、IL-4 含量的变化: NAFLD 组外周血 IFN- $\gamma$  的水平较对照组明显升高, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 而 IL-4 的水平则差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), IFN- $\gamma$ /IL-4 的比值较对照组明显升高( $P < 0.01$ ), 见表 2。

表 2 NAFLD 患者血清 IFN- $\gamma$ 、IL-4 的变化( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别      | IFN- $\gamma$ (pg/ml) | IL-4(pg/ml)      | IFN- $\gamma$ /IL-4 |
|---------|-----------------------|------------------|---------------------|
| NAFLD 组 | 60.36 $\pm$ 2.82 *    | 37.12 $\pm$ 2.88 | 1.62 $\pm$ 0.14 *   |
| 对照组     | 46.18 $\pm$ 2.95      | 38.93 $\pm$ 1.41 | 1.18 $\pm$ 0.07     |

与对照组比较, \*  $P < 0.01$

3. NAFLD 患者外周血 SOCS3mRNA 表达的变化: NAFLD 组 SOCS3mRNA 的表达较对照组显著升高, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 见图 1 ~ 图 5。

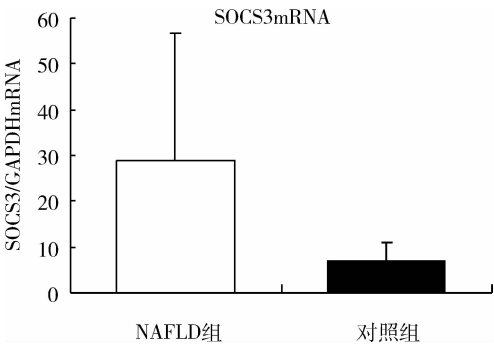


图 1 SOCS3mRNA 表达的变化

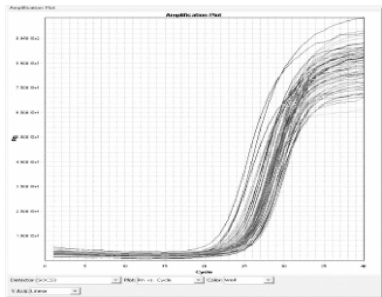


图 2 SOCS3 扩增曲线

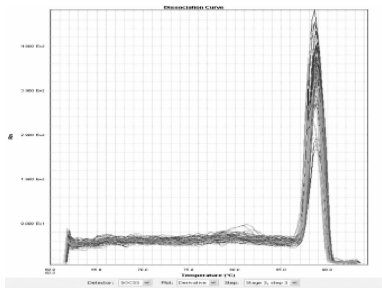


图 3 SOCS3 溶解曲线

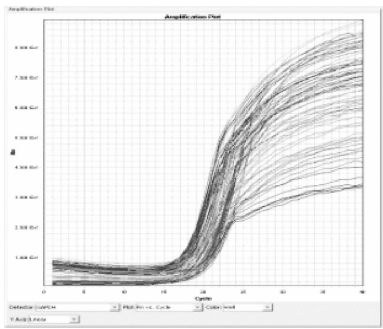


图 4 GAPDH 扩增曲线

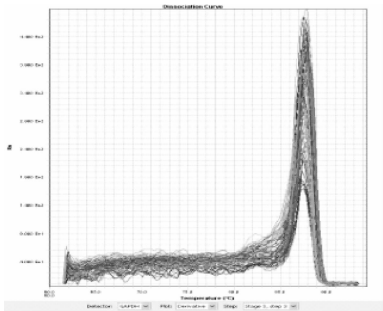


图 5 GAPDH 溶解曲线

4. SOCS3mRNA 相对表达与其他指标的相关分析: 相关分析显示: SOCS3 与 TG、TC、LDL、ALT、GGT、IFN- $\gamma$  呈明显正相关( $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ ); 与 IL-4 呈明显负相关( $P < 0.05$ ); 与 HDL 相关性不明显( $P > 0.05$ ), 相关系数见表 3。

表 3 SOCS3mRNA 相对表达与其他指标的相关分析

| 统计学分析 | TG    | TC    | LDL   | ALT   | GGT   | IFN- $\gamma$ | IL-4   |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------------|--------|
| $r$   | 0.431 | 0.394 | 0.307 | 0.360 | 0.563 | 0.497         | -0.327 |
| $P$   | 0.001 | 0.002 | 0.017 | 0.005 | 0.000 | 0.000         | 0.011  |

讨 论

NAFLD 的发病机制复杂, 目前尚未完全阐明。近年来, Th1/Th2 型细胞因子的平衡与 NAFLD 发生发展的关系, 成为新的研究热点。Th1 类细胞因子主要包括 IL-2、IL-12、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  等, 具有促炎症的作用。Th2 类细胞因子主要包括 IL-4、IL-6、IL-10、TGF- $\beta$  等细胞因子, 具有抗炎作用。目前多用 IFN- $\gamma$ 、IL-4 分别作为 Th1、Th2 极化的指针<sup>[7]</sup>。有研究表明在小鼠脂肪肝模型中用刀豆蛋白 A (conA) 刺激后, Th1 调节器 T-bet 明显上调, 而 Th2 调节器 GATA-3 则受到抑制, T-bet 是 IFN- $\gamma$  基因的转录激活剂, 同时能抑制 Th2 型细胞因子的产生, 并能将 Th2 反转为 Th1, 使 Th1 类细胞因子占优

势<sup>[8]</sup>。国外有学者证实在小儿 NAFLD 患者外周血中 IFN- $\gamma$  显著上升,存在 Th1 极化<sup>[9]</sup>。本研究发现在成人 NAFLD 患者外周血中 IFN- $\gamma$  显著升高,而 IL-4 含量未见明显变化,IFN- $\gamma$ /IL-4 比值升高,提示在 NAFLD 阶段表现为 Th1/Th2 失衡,其中 Th1 型细胞因子占优势。IFN- $\gamma$  是 Th1 型细胞分泌的一个重要的细胞因子,具有免疫调节、促炎症、抗增殖等生物学功能,它能激活巨噬细胞,产生细胞因子和氧自由基<sup>[10]</sup>。IFN- $\gamma$  作为一个重要的促炎症因子,表达量的上升可能会导致 NAFLD 疾病的进展。

SOCS 蛋白家族是一类新近发现的细胞因子信号转导抑制因子,SOCS 具有抑制 JAK-STAT 信号转导通路的作用,该通路信号转导的瀑布级联效应是许多细胞因子的胞内信号转导通路。SOCS 家族中的 SOCS3 参与了胰岛素抵抗、瘦素抵抗和 NAFLD 的发病过程。同时,SOCS3 升高是瘦素抵抗产生的基础,也是瘦素抵抗产生的标志,瘦素抵抗也是 NAFLD 发病的独立危险因素<sup>[11]</sup>。IFN- $\gamma$  是由 T 细胞产生,具有直接抵制肿瘤细胞增殖、增加表面 MHC 抗原和肿瘤坏死因子表达,抗肿瘤血管生成等多种抗肿瘤作用。IFN- $\gamma$  显著升高,可诱导 SOCS3 的表达,SOCS3 表达的上调会进一步加重胰岛素抵抗和瘦素抵抗,从而形成恶性循环,导致 NAFLD 的进展。本研究发现 NAFLD 患者 SOCS3mRNA 的表达较对照组显著升高,SOCS3mRNA 的高表达与 TG、TC、LDL、ALT、GGT、IFN- $\gamma$  呈显著正相关,提示 SOCS3 可能是 NAFLD 发病的危险因素,其作为 NAFLD 的一个潜在治疗靶点有很好的应用前景。

## 参考文献

- 1 Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease[J]. N Engl J Med,2002,346(16):1221-1231
- 2 McCullough AJ. Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis[J]. J Clin Gastroenterol,2006,40 Suppl 1: S17-S29
- 3 Fan JG, Farrell GC. Epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in China[J]. Hepatol,2009,50(1):204-210
- 4 陆金来,陈金联,陈明祥,等. T 辅助细胞亚群在大鼠非酒精性脂肪性肝病模型中的变化[J]. 世界华人消化杂志,2008,16(18):1962-1968
- 5 Chatterjee PK. Hepatic inflammation and insulin resistance in pre-diabetes - further evidence for the beneficial actions of PPAR- $\gamma$  agonists and a role for SOCS-3 modulation[J]. Br J Pharmacol,2010,160(8):1889-1891
- 6 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性肝病诊疗指南(2010 年修订版)[J]. 中华肝脏病杂志,2010,18(3):163-166
- 7 包瑛,雷春莲,史瑞明,等. 肺炎支原体下呼吸道感染及肺外并发症患儿外周血 T 细胞亚群检测及其临床意义[J]. 陕西医学杂志,2005,34(1):107-109
- 8 Kremer M, Hines IN, Milton RJ, Wheeler MD. Favored T helper 1 response in a mouse model of hepatosteatosis is associated with enhanced T cell mediated hepatitis[J]. Hepatology,2006,44:216-227
- 9 Ferreyra Solari NE, Inzaugarat ME, Baz P, et al. The role of innate cells is coupled to a Th1-polarized immune response in pediatric nonalcoholic steatohepatitis[J]. J Clin Immunol,2012,32(3):611-621
- 10 莫镜,崔其亮,姚君,等. 脂多糖对人肺微血管内皮细胞骨架及 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  表达的影响[J]. 广东医学,2011,32(21):2768-2770
- 11 Mori H, Hanada R, Hanada T, et al. Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity[J]. Nat Med,2004,10(7):739-743

(收稿日期:2012-05-25)

(修回日期:2012-06-25)

# SVV 和 PPV 预测 ARDS 患者液体反应的价值研究

朱 英 刘长文 胡 炜 朱克毅 陆 骏 胡伟航 郑永科 刘炳炜 王剑荣

**摘 要 目的** 心肺交互作用指标 SVV、PPV 能较好地预测机械通气患者液体反应,但其预测效能可能受潮气量和 PEEP 水平的影响,本研究旨在评价 SVV、PPV 预测 ARDS(实施小潮气量+PEEP 的保护性通气策略)患者液体反应的价值。**方法** 将 2009 年 7 月~2011 年 1 月期间入住笔者所在科室的 11 例 ARDS 患者纳入研究, PiCCO 进行动态血流动力学监测,记录基础 SVV、PPV、心排出量指数(CI)、血管外肺水指数(ELWI)、氧输送指数(DO<sub>2</sub>I)等数据后进行容量负荷试验:6% 羟乙基淀粉 250ml

基金项目:浙江省医药卫生科学研究基金资助项目(2009B128)

作者单位:310006 杭州市第一人民医院 ICU

通讯作者:刘长文,主任医师,电子信箱:liuchangwen3048@yahoo.cn