

• 论 著 •

先天性胆管扩张症患者转化生长因子 $\beta 1$ 、白细胞介素-32 的表达水平及临床相关性分析*

吴宙光,王 斌[△],程 珍,张文杰,郑佳辰,李一帆

深圳市儿童医院普外二区,广东深圳 518026

摘要:**目的** 探讨先天性胆管扩张症(CBD)患者转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)和白细胞介素-32(IL-32)的表达水平及临床相关性研究。**方法** 选取该院儿科 2016 年 12 月至 2019 年 12 月住院收治的 CBD 患儿 72 例为研究组,行根治性手术治疗,另选取同期肝移植供体肝胆管组织正常的 40 例患者作为对照组。术后收集所有研究对象的肝组织和胆管组织标本,采用酶联免疫吸附试验法检测血清 TGF- $\beta 1$ 和 IL-32 水平,采用荧光定量 PCR 比较两组肝组织标本的 TGF- $\beta 1$ 和 IL-32 的 mRNA 相对表达水平,分析 CBD 患儿肝功能指标与血清 TGF- $\beta 1$ 、IL-32 的相关性,比较 CBD 患者胆管不同病理程度的 TGF- $\beta 1$ 和 IL-32 的表达情况。**结果** 研究组血清 TGF- $\beta 1$ 和 IL-32 水平较对照组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);研究组肝组织中 TGF- $\beta 1$ 和 IL-32 的 mRNA 相对表达水平较对照组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);Pearson 相关分析显示 CBD 患儿的血清 TGF- $\beta 1$ 、IL-32 与丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶及 γ -谷氨酰转移酶水平呈正相关,差异有统计学意义($P < 0.05$);CBD 患者胆管不同病理程度的 TGF- $\beta 1$ 、IL-32 表达水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** TGF- $\beta 1$ 和 IL-32 水平在 CBD 患者发生发展中发挥了重要的作用,有利于患者病情严重度的判断,为进一步防治治疗提供了重要的临床价值。

关键词:先天性胆管扩张症; 转化生长因子 $\beta 1$; 白细胞介素-32

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.05.007

中图法分类号:R726.5

文章编号:1673-4130(2021)05-0541-04

文献标志码:A

Expression levels of transformed growth factor $\beta 1$ and interleukin-32 and clinical correlation analysis in patients with congenital biliary dilation*

WU Zhouguang, WANG Bin[△], CHENG Zhen, ZHANG Wenjie, ZHENG Jiachen, LI Yifan

Second Department of General Surgery, Shenzhen Children's Hospital,

Shenzhen, Guangdong 518026, China

Abstract: Objective To investigate the expression levels and clinical correlation of transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) and interleukin-32 (IL-32) in patients with congenital biliary dilation (CBD). **Methods** A total of 72 children with CBD hospitalized in a hospital from December 2016 to December 2019 were selected as the study group and underwent radical surgical treatment. 40 patients with normal hepatobiliary duct tissue from liver transplantation donors during the same period were selected as the control group. Liver tissue and bile duct tissue specimens of all subjects were collected after the surgery. The levels of TGF- $\beta 1$ and IL-32 in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The mRNA relative expression levels of TGF- $\beta 1$ and IL-32 in liver tissue samples of the two groups were compared by fluorescence quantitative PCR. The correlation between liver function indexes and serum TGF- $\beta 1$ and IL-32 in children with CBD was analyzed, and the expression levels of TGF- $\beta 1$ and IL-32 in different pathological levels of bile duct in patients with CBD were compared. **Results** The levels of serum TGF- $\beta 1$ and IL-32 in the study group were significantly higher than those in the control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The mRNA relative expression levels of TGF- $\beta 1$ and IL-32 in the liver tissues of the study group were significantly higher than those of the control group, with statistical significance ($P < 0.05$). Pearson correlation analysis showed that

* 基金项目:2019 年度广东省医学科研基金立项项目(A2019541);2018 年度深圳市医疗卫生三名工程项目(SZSM201812055)。

作者简介:吴宙光,男,副主任医师,主要从事小儿微创普通外科基础与临床研究。 [△] 通信作者, E-mail:zhwuzhouguang@163.com。

本文引用格式:吴宙光,王斌,程珍,等.先天性胆管扩张症患者转化生长因子 $\beta 1$ 、白细胞介素-32 的表达水平及临床相关性分析[J]. 国际检验医学杂志,2021,42(5):541-544.

serum TGF- β 1, IL-32 were positively correlated with ALT, AST and γ -GGT levels ($P < 0.05$). The expression levels of TGF- β 1 and IL-32 in CBD patients with different pathological degrees of bile duct were compared, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The levels of TGF- β 1 and IL-32 play an important role in the development of CBD patients, which is conducive to the diagnosis of the severity of the disease, and provides important clinical value for further prevention and treatment.

Key words: congenital biliary dilation; transformed growth factor β 1; interleukin-32

先天性胆管扩张症(CBD)是一种良性的先天性胆道异常,以肝外和/或肝内胆管的囊性扩张为特征,该病通常发生在儿童时期,CBD常与胰胆交界处相关,并可与复发性胆管炎、肝硬化、胆总管结石、胰腺炎、胆管癌等长期并发症相关,表现为腹痛、呕吐和黄疸,大多数轻微儿童胆管炎患者可以保守治疗,而一些患有严重胆管炎的儿童需要胆汁引流,炎症得到控制后,行扩张胆管切除和肝管空肠吻合术^[1-2]。但术前或术后常引起各类并发症导致病情迁移,而寻找有效的治疗靶点对疾病的诊断及治疗十分重要。转化生长因子 β 1(TGF- β 1)属于转化生长因子家族的组成部分,主要介导细胞的生长、增殖和损伤修复^[2]。白细胞介素-32(IL-32)主要由病原体和促炎细胞因子诱导,在免疫细胞中发挥重要作用,IL-32作为细胞因子是细胞信号通路的重要组成部分,参与细胞生长、代谢、激素信号、免疫等多种生理功能的调节。早期研究表明IL-32调节细胞生长、代谢和免疫,参与肝胆等免疫炎症性疾病的病理调节或作为保护剂^[3-5]。本研究拟通过探讨CBD患儿中IL-32和TGF- β 1的表达水平及其与临床指标的相关性研究,为进一步早期识别和治疗该类疾病提供坚实的理论基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2016年12月至2019年12月本院儿科住院收治的CBD患儿72例为研究组,其中男42例、女30例,年龄为9个月至14岁,平均(7.2 $\pm$ 3.6)岁,另选取同期肝移植供体肝胆管组织正常的40例患者作为对照组,男26例、女14例,年龄为8个月至13岁,平均(7.0 $\pm$ 3.8)岁,两组年龄、性别、体质量、手术时间、出血量等一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。所有研究组均行手术根治性治疗,其中有2例急性梗阻性化脓性胆管炎患儿进行胆总管造瘘术引流后再行手术治疗。两组研究对象知情并签署知情同意书。

1.2 TGF- β 1、IL-32水平及病理组织检测 所有研究对象采集空腹静脉血液5~10 mL,1 000 r/min室温下离心后取上清液,-80℃保存。获取研究组的肝组织和胆管组织标本,4%多聚甲醛固定后,于4℃保存,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法对所有研究对象的血清TGF- β 1、IL-32水平进行检测,严格按照试剂盒步骤进行操作(武汉默沙克生物科技有限公司)。使用荧光定量PCR法检测肝组织TGF- β 1、IL-32的

mRNA相对表达水平,用Trizol法提取肝组织中RNA,逆转录为cDNA,采用荧光定量试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司)配合相应体系在CFX96 Touch荧光定量PCR仪上机反应(美国伯乐公司),TGF- β 1、IL-32的mRNA相对表达水平检测是基于基因表达阈值(Ct)的方法,即 $mRNA(2^{-\Delta\Delta Ct})$ 进行计算,样本间重复3次。将患儿胆管组织标本进行常规病理检测^[2],根据不同病理程度(HE染色)可分为黏膜上皮细胞脱落(中度、重度)、肉芽组织增生(中度、重度)、管壁增生肥厚(中度、重度)、炎症细胞浸润(中等、大量)。免疫组化检测包括石蜡切片、脱蜡、封闭、修复抗原,采用相应的TGF- β 1、IL-32抗体(上海赛默飞Invitrogen公司)进行检测,计算相应阳性细胞百分比。测定结果判读:在高倍镜下采用病理图像分析系统对免疫组化结果进行判定,胆囊壁、胆管壁切片中出现棕褐色或棕黄物为相应的TGF- β 1及IL-32抗体阳性,不显色则为阴性。

1.3 观察指标 两组研究对象的血清TGF- β 1、IL-32水平及其肝组织中mRNA相对表达水平进行比较,分析CBD患儿肝功能指标[丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、血清总胆汁酸(TBA)、 γ -谷氨酰转氨酶(γ -GGT)]与血清TGF- β 1、IL-32的相关性,以及CBD患者胆管不同病理程度的TGF- β 1和IL-32表达情况。

1.4 统计学处理 采用SPSS21.0软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,计数资料以频数(百分比)表示,两组间比较采用 χ^2 检验,采用Pearson相关分析比较CBD患儿肝功能指标与血清TGF- β 1、IL-32的相关性, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清TGF- β 1和IL-32水平及其肝组织中mRNA相对表达水平比较 研究组血清TGF- β 1和IL-32水平较对照组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1。荧光定量PCR显示,研究组肝组织中TGF- β 1和IL-32的mRNA相对表达水平较对照组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图1。

2.2 CBD患儿肝功能指标与血清TGF- β 1、IL-32的相关性 Pearson相关分析显示,CBD患儿的血清TGF- β 1、IL-32与ALT、AST及 γ -GGT水平呈正相

关($P<0.05$)。见表 2。

表 1 两组血清 TGF-β1 和 IL-32 水平比较($\bar{x}\pm s$, ng/L)			
组别	<i>n</i>	TGF-β1	IL-32
研究组	72	85.4±16.2	265.4±25.6
对照组	40	65.1±23.5	167.5±28.3
<i>t</i>		5.387	18.671
<i>P</i>		<0.05	<0.05

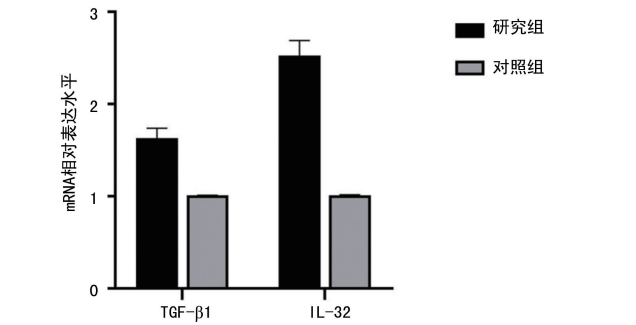


图 1 两组肝组织中 TGF-β1 和 IL-32 的 mRNA 相对表达水平比较

表 3 CBD 患者胆管不同病理程度的 TGF-β1 和 IL-32 表达情况[<i>n</i> (%)]									
病理程度	<i>n</i>	TGF-β1				IL-32			
		阴性	阳性	χ^2	<i>P</i>	阴性	阳性	χ^2	<i>P</i>
黏膜上皮细胞脱落									
中度	50	16(32.0)	34(68.0)	6.385	0.012	18(36.0)	32(64.0)	4.255	0.039
重度	22	1(4.5)	21(95.5)			2(9.0)	20(91.0)		
肉芽组织增生									
中度	44	18(40.9)	26(59.1)	4.182	0.041	20(45.5)	24(54.5)	4.281	0.039
重度	28	5(17.9)	23(82.1)			6(21.4)	22(78.6)		
管壁增生肥厚									
中度	43	11(25.6)	32(74.4)	6.109	0.032	13(30.2)	30(69.8)	4.391	0.036
重度	29	1(3.4)	28(96.6)			2(6.9)	27(93.1)		
炎症细胞浸润									
中等	32	7(21.9)	25(78.1)	4.938	0.026	8(25.0)	24(75.0)	4.391	0.036
大量	40	1(2.5)	39(97.5)			2(5.0)	38(95.0)		

3 讨 论

CBD 是儿童高发性的胆道畸形疾病,目前发病率逐年上升,其发病机制尚不清楚,主要机制是胆管与胰管在十二指肠壁外合流的先天性畸形的解剖学因素,由于十二指肠乳头括约肌无法控制住合流部引起胆汁与胰液的逆流,导致胆道及胰腺相关性病理改变^[6-8]。主要临床症状包括腹部上区包块、腹痛和黄疸,常合并胆囊炎、胆结石、胆道狭窄等症状,通常采用手术治疗,但存在多种并发症可能,甚至癌变^[2,7]。因此,寻找潜在血清学生物标志物,对于疾病的诊断和防治十分重要。

TGF-β1 是具有多种生物功能的细胞因子,在细胞的增殖、分化、瘢痕形成及免疫调节等方面至关重

表 2 CBD 患儿肝功能指标与血清 TGF-β1、IL-32 的相关性				
指标	TGF-β1		IL-32	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
ALT	0.514	0.008	0.552	0.005
AST	0.409	0.031	0.421	0.026
ALP	0.154	0.388	0.238	0.157
TBIL	0.209	0.156	0.215	0.189
DBIL	0.078	0.628	0.098	0.598
TBA	0.109	0.496	0.128	0.415
γ-GGT	0.528	0.001	0.624	<0.001

2.3 CBD 患者胆管不同病理程度的 TGF-β1 和 IL-32 的表达情况 CBD 患者胆管不同病理程度的 TGF-β1、IL-32 表达水平比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

要,机体出现损伤后,TGF-β1 在肌成纤维细胞中表达升高,而 TGF-β1 水平的升高又能促进细胞的增殖和分化,利于组织的损伤修复^[9]。TGF-β1 可诱导其他生长因子的生长促进胶原蛋白的合成,刺激纤维素生成,增强细胞与基质间的相互作用,同时能够减少细胞间基质蛋白的合成,下调金属蛋白酶的活性,促进组织生理修复,触发对组织的纤维化修复作用^[10]。TGF-β1 也可通过抑制过度的炎症,调节免疫炎症本身是组织修复的一个重要决定因素^[11]。另外,TGF-β1 还是诱导肝纤维化最重要的细胞因子,该细胞因子可通过 TGF-β1/Smad 信号传导通路直接激活肝卫星细胞,导致肝纤维化形成^[12]。研究表明,TGF-β1 在胆汁淤积性肝硬化、肝内胆管结石合并胆管狭窄患者

中表达升高主要促进其向胆管细胞增殖分化^[9,13]。本研究提示 TGF-β1 在 CBD 的表达上调,可促进胆道的纤维化增生^[2]。近期病理组织免疫组化研究表明 TGF-β1 在 CBD 的胆管壁明显高于胆囊壁,说明胆管壁的损伤在 CBD 患者中更为敏感^[2],但本研究尚未进行相关的亚组分析,今后需扩大样本和分组分析进一步证实。本研究还发现,研究组肝组织中 TGF-β1 和 IL-32 的 mRNA 相对表达水平较对照组明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);CBD 患者胆管不同病理程度的 TGF-β1、IL-32 表达水平比较,差异有统计学意义($P<0.05$),说明 TGF-β1 和 IL-32 水平参与了 CBD 疾病的发生发展,可通过促进胆道细胞增殖分化、促进组织的修复,调节炎症免疫功能,有利于病情程度的判定和监测。

IL-32 是一种新型的细胞因子,参与炎症和癌症的发生,其基因主要由 8 个小外显子组成,IL-32 最初是通过有丝分裂原和激活的自然杀伤细胞在激活的 T 细胞中选择性表达的,在各种人体组织和器官中广泛表达,如肺、肝脏、肌肉、肾脏、胰腺和大脑^[3]。既往研究表明,IL-32 在多种炎症性疾病患者中上调,是一种主要的促炎因子,由炎症反应诱导免疫调节反应^[3,5,14-15]。本研究中 CBD 患儿 IL-32 与病情严重程度明显相关,考虑 CBD 患儿中主要是大量炎症因子的释放导致肝细胞损伤,触发一系列的生物学反应,促进肝纤维化发生,出现胆道狭窄,从而引起胆道的胆管扩张。

本研究中 CBD 患儿的 TGF-β1、IL-32 水平与肝功能指标(ALT、AST 及 γ-GGT)呈正相关,与以往研究结果较为一致^[5]。其中 TGF-β1 可加重炎症反应和继发组织的纤维化^[9]。IL-32 水平升高与肝炎活动明显相关,主要是通过抑制核转录因子 κB 信号通路或加强协同刺激分子 B7-H6 与自然杀伤细胞表面受体 NKP30 相互作用,可促进 IL-32 的表达,促进肝细胞凋亡^[4]。肝功能指标(ALT、AST)在肝细胞受损时能够释放入血,是反映肝功能受损的常用指标^[16]。由于胆管扩张易引起炎症反应和胆道梗阻性黄疸^[4-5]。因此,CBD 患儿 TGF-β1、IL-32 水平与肝功能严重程度明显相关。

综上所述,TGF-β1、IL-32 水平在 CBD 患儿中及疾病进展起着重要作用,其代表肝损伤的炎症程度和纤维化水平,为 CBD 患儿寻求靶向针对 TGF-β1、IL-32 的新型药物治疗方法的设计开辟了新的途径。

参考文献

[1] SUN B, YU D, CHEN J, et al. Endoscopic biliary drainage management for children with serious cholangitis caused

by congenital biliary dilatation[J]. *Pediatr Surg Int*, 2018, 34(8):897-901.

[2] 李斌德, 颜禄斌, 沈阳, 等. 转化生长因子 β1 与碱性成纤维生长因子与儿童先天性胆管扩张症的关系[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(2):283-287.

[3] HONG J T, SON D J, LEE C K, et al. Interleukin 32, inflammation and cancer [J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 174(1):127-137.

[4] 王早宇, 张惠箴, 刘强, 等. IL-32、MMP-2 在胆道闭锁患儿肝组织中的检测意义[J]. *川北医学院学报*, 2019, 34(2):280-283.

[5] 吴宙光. 儿童先天性胆管扩张症胆总管组织中白介素(IL)-32 的表达及临床意义[J]. *肝胆外科杂志*, 2016, 24(1):49-52.

[6] 郭意男, 焦娇, 郭秋芳, 等. 先天性胆管扩张症研究进展[J]. *浙江医学*, 2018, 40(5):541-546.

[7] 中华医学会外科学分会胆道外科学组. 胆管扩张症诊断与治疗指南(2017 版)[J]. *中华消化外科杂志*, 2017, 16(8):767-774.

[8] 徐贺龙, 岳平, 李汛. 先天性胆管扩张症的诊疗进展[J]. *现代消化及介入诊疗*, 2019, 24(11):1215-1217.

[9] 谢伟选, 罗昆仑, 方征, 等. 转化生长因子 β1、Survivin 和 Caspase-3 蛋白在肝内胆管结石合并胆管狭窄患者组织中的表达及意义[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2019, 25(6):452-456.

[10] KIM K K, SHEPPARD D, CHAPMAN H A. TGF-β1 signaling and tissue fibrosis[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018, 10(4):a022293.

[11] XIA Y, YU B, MA C, et al. Yu Gan Long reduces rat liver fibrosis by blocking TGF-β1/Smad pathway and modulating the immunity[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106(1):1332-1338.

[12] LEE E H, PARK K I, KIM K Y, et al. Liquiritigenin inhibits hepatic fibrogenesis and TGF-β1/Smad with Hippo/YAP signal[J]. *Phytomedicine*, 2019, 62(1):152780.

[13] 杨博, 罗庆, 康权, 等. TNF-α、TGF-β1 在胆汁淤积性肝硬化中平衡调控肝脏干细胞分化[J]. *南方医科大学学报*, 2018, 38(4):375-383.

[14] 李奕璇, 朱红兰, 刘代顺. IL-32 在炎症相关性疾病中的研究进展[J]. *中国医药导报*, 2017, 14(12):47-51.

[15] DONG R, ZHENG Y, CHEN G, et al. miR-222 overexpression may contribute to liver fibrosis in biliary atresia by targeting PPP2R2A[J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2015, 60(1):84-90.

[16] YE Y, LI Z, FENG Q, et al. Downregulation of microRNA-145 may contribute to liver fibrosis in biliary atresia by targeting ADD3 [J]. *PLoS One*, 2017, 12(9):e0180896.