



树鼩 IL-2 TaqMan 探针实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立

黄晓燕¹ 徐娟¹ 王文广¹ 殷安国² 李晓飞¹ 孙晓梅¹ 夏雪山² 代解杰¹

(1. 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所, 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室, 树鼩种子资源中心, 云南 昆明 650118; 2. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南 昆明 650500)

【摘要】 目的 建立检测树鼩 IL-2 基因 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 方法。方法 以经 ConA 诱导培养的树鼩淋巴细胞总 RNA 为材料, 设计特异性引物, 通过 RT-PCR 技术克隆出树鼩 IL-2 基因, 以构建的树鼩 IL-2 基因质粒为标准品, 建立标准曲线, 并进行灵敏度检测。结果 建立了树鼩 IL-2 基因 mRNA 表达实时荧光定量 PCR 检测方法, 此法检测灵敏度高, 线性范围可达 $10^2 \sim 10^9$ 拷贝/ul。结论 成功建立了树鼩 IL-2 实时荧光定量 PCR 方法, 此方法灵敏度高、特异性强、检测周期短, 为探讨 IL-2 作用的分子作用机制奠定基础。

【关键词】 树鼩; IL-2; 实时荧光定量 PCR

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2013) 07-0036-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2013.007.009

Establishment of a real-time fluorescent quantitative RT-PCR assay for detection of tree shrew IL-2 gene

Huang Xiao-yan¹, Xu Juan¹, Wang Wen-guang¹, Yin An-guo¹, Li Xiao-fei¹, Sun Xiao-mei¹,
Xia Xue-shan², Dai Jie-jie¹

(1. Center of Tree Shrew Germplasm Resources, Institute of Medical Biology, the Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research and Development on Severe Infectious Diseases, Kunming 6501182. Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

【Abstract】 Objective To establish a real-time fluorescent quantitative RT-PCR assay to detect tree shrew (tupaibelangeri) IL-2. **Methods** Total RNA was isolated from Con A-stimulated tree shrews' spleen lymphocytes. The conservative encoding sequence of interleukin-2 (IL-2) was amplified by RT-PCR, and successfully cloned into pMD-19T vector. The established IL-2 gene vector was used as standard substance and the standard curves were established for the sensitivity evaluation. **Results** A real-time fluorescence quantitative method of fast, sensitive and reliable detection system was set up. The sensitivity of this method for creating IL-2 gene of tree shrew was $10^2 \sim 10^9$ copies. **Conclusions** A real-time fluorescence quantitative method of tree shrew IL-2 was successfully established. This sensitive method can serve as a molecular foundation for the study of IL-2 and its role in many clinical diseases.

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(编号: 2009BAI83B02-21; 2011BAI15B01-21; 2012BAI39B01); 云南省科技计划重点项目(编号: 2006PT07-2); 云南省应用基础上项目(编号: 2011FZ211)。

[作者简介] 黄晓燕, 女, 硕士研究生。研究方向: 人类疾病动物模型的建立。

[通讯作者] 代解杰, 男, 研究员, 项目负责人。Email: dj@imbcams.com.cn。

【Key words】 Tree shrew; IL-2; Real-time fluorescent quantitative RT-PCR assay

树鼩 (tree shrew *Tupaia belangeri*) 是一种生活在热带和亚热带地区的哺乳纲攀鼯类的小型动物,形态酷似松鼠,是灵长类动物的近亲^[1-3]。自上世纪 80 年代开始,就被相继用于多种人类疾病模型的建立,如丙型肝炎动物模型、乙型肝炎模型、手足口病模型^[4]及糖尿病模型等^[5],但是,目前尚缺乏评价这些模型的细胞免疫方面的检测指标,究其原因是对树鼩免疫细胞因子方面的研究及检测方法鲜有报道。

白细胞介素-2 (Interleukin-2, IL-2) 主要由激活淋巴细胞产生的一类 Th1 型细胞因子,在增强机体免疫功能,在抗肿瘤、抗毒素、免疫调节及感染性疾病的治疗中具有重要作用^[6]。IL-2 还可作为免疫佐剂用于某些淋巴组织增生性疾病及癌症的治疗^[7],且 IL-2 拮抗剂可用来抑制器官移植排斥反应^[8]。在人类医学方面,重组 IL-2 在提高免疫抗病机能、抗感染和治疗癌症等方面获得了广泛应用^[9]。人 IL-2 全长 cDNA 序列由 Taniguchi 等在 1983 年首次克隆出^[10],树鼩 IL-2 全长编码序列于 2013 年被克隆成功^[11]。

国外学者报道,在慢性及重型丙型肝炎感染者血清中 IL-2 水平明显上升,且上升幅度与病情的轻重和病程长短有密切关系^[12-14]。在手足口患儿血清中,IL-2 水平显著低于正常儿组,造成患儿 IL-2 水平降低的机理,可能是患儿细胞免疫水平受到抑制之故^[15]。在 1 型糖尿病患者血清中,IL-2 水平明显高于正常对照组,且与反映胰岛功能的 C 肽 (CP)、胰岛素呈负相关^[16]。但目前对检测树鼩 IL-2 方面的方法鲜有报道,致使缺乏对树鼩动物模型免疫细胞因子方面的评价指标,为此,本研究以确定的树鼩 IL-2 全长编码基因序列为模板,设计特异性引物和探针,并制备标准品和标准曲线,在分子水平建立实时荧光定量 PCR 检测树鼩 IL-2 的方法,为今后研究其在树鼩疾病模型中的免疫调节机理奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

F1 代树鼩来自中国医学科学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心(昆明)。树鼩实验动物生产许可证号 [SCXK(滇) K2013-0001],实验动物使用许可证号 [SYXK(滇) K2013-0001]。按实验动物

使用的 3R 原则给予实验动物人道的关怀。

1.2 树鼩 IL-2cDNA 的分子克隆

根据已报道的树鼩 IL-2cDNA 全长编码基因序列 (Genbank 登录号: KC261568),设计上下游引物扩增全长编码序列,(上游引物: 5'-ATGCACAAAATGCAACTCTTGTCTTG-3',下游引物: 5'-TCAACTCAGTGTGAAATGATGCTTTG-3')^[10]。

无菌采集树鼩外周血 2 mL,用 Ficoll-Paque™ PREMIUM (购自 GE Healthcare) 分离树鼩外周血淋巴细胞,经 1640 培养基培养、PHA 诱导 (1640 液、胎牛血清、PHA 购自 TAKARA) 后,收集淋巴细胞,提取细胞总 RNA (试剂盒购自 TIANGEN),将其反转录为 cDNA (Revert Aid H Minus First strand cDNA synthesis Kit 购自 Thermo),利用上述引物进行梯度 PCR (Dream Taq Green PCR Master Mix 购自 Thermo),循环参数为: 95℃ 3 min; 95℃ 30 s, 61℃ 30 s, 72℃ 45 s 35 个循环; 72℃ 10 min。用树鼩管家基因 GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 作为阳性对照。将胶回收后的 PCR 产物(胶回收试剂盒购自 TIANGEN)经 TA 克隆插入 pMD-19T 载体,转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,提取质粒经 BamH I 和 Hind III 双酶切鉴定后,由 invitrogen 公司进行双向测序。

1.3 标准品制备

以获得树鼩 IL-2 全长编码基因序列为模板,克隆其中最保守的一段 cDNA,构建质粒作为标准品模板,并根据此段设计特异性引物和探针,用来扩增 106 bp 的特异性片段,其扩增的 PCR 产物由 invitrogen 公司进行双向测序。其引物和探针由北京百泰克公司合成。IL-2mRNA 正向引物: 5'-TGCTCTCCAGGATGCTCAC-3'; 反向引物: 5'-AGCACTTTCTCCAGAGGTTTG-3'; 探针: 5' (FAM) -ATTTTATACACCCAGAAAGGCCACAG (TAMRA) -3'

标准品及标准曲线的建立: 通过下列公式计算 cDNA 浓度:

拷贝数 (copies/m) = 质量浓度 (ug/ul) × 阿佛加德罗常数 / 质粒分子量。阿佛加德罗常数为 6.02×10^{23} ; 质粒分子量 = 一个碱基对的分子量 (649) × 重组质粒总长度 (bp)。

制备 10^{10} copies/ul 数量级的溶液作为标准品原液,将原液进行 10 倍倍比稀释成 $10^9 \sim 10^1$ 梯度数量

级的标准品,进行实时荧光定量 PCR 检测,每个样品 3 次重复,在荧光定量 PCR 仪上扩增并进行检测(one-step PrimeScript RT-PCR kit 购自宝生物),扩增参数为:95℃ 10 s;95℃ 5 s,57℃ 30 s,40 个循环;72℃ 5 min。

1.4 PCR 扩增及退火温度的确定

根据本引物和探针特点分别设计退火温度 55℃、56℃、57℃、58℃ 确定其最佳退火温度。采用下列反应体系和条件,以 PMD-19T IL-6 质粒为模板应用 PCR 仪进行梯度扩增:dream Mix Taq 酶 25 uL、dH₂O 22 uL、Tupaia-IL-6 FP/RP 各自 1uL、模板 1uL,混合均匀。95℃ 3 min;95℃ 30 s,55~58℃ 30 s,72℃ 45 s,35 个循环;72℃ 10 min。扩增产物于 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 引物和探针浓度的确定

引物浓度:以相同条件下能够检测到的模板浓度最低,扩增产物条带单一、清晰为引物选择标准。以 100 nm、200 nm、300 nm 3 个不同浓度的 IL-2TaqMan PCR 上下游引物浓度,分别用同一浓度 IL-2 重组质粒为模板,共分为 4 个反应体系列组,同时进行 RT-PCR 扩增。反应体系为 25uL: Realtime PCR Master Mix 12.5 μL、Tupaia-IL-2 FP/RP 各自 1uL、DEPC 处理水 8.5 μL、模板 2 μL 混合均匀。95℃ 3 min;95℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 1 min,35 个循环;72℃ 10 min 扩增;4℃ 备用。扩增产物于 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

探针浓度:以相同模板浓度下循环阈值(Ct)最小、荧光信号比(Rn) 活度最大为探针选择标准。采用 2 μm、5 μm、10 μm 3 个探针浓度,分别用同一浓度 IL-2 重组质粒为模板,进行 Taqman PCR 检测。

反应体系为 25uL: 2X One Step RT-PCR Buffer II 12.5uL、Takara Ex Taq HS 0.5 uL、Primer Script RT Enzyme Mix II 0.5 uL、Tupaia-IL-2 FP/RP 各自 0.5 uL、Probe 溶液 1uL、模板 2 uL、Easy dilution 7.5 uL,混合均匀。95℃ 3 min;95℃ 10 s,57℃ 30 s,40 个循环;72℃ 5 分钟;4℃ 保存备用。

1.6 质粒拷贝数测定

测其质粒 A260/A280(1.8~2.0) 根据以下公式计算拷贝数:

拷贝数(copies/m) = 质量浓度(ug/uL) × 阿氏常数/质粒分子量。阿氏常数为 6.02×10^{23} ; 质粒分子量 = 一个碱基对的分子量(649) × 重组质粒总长度(bp)。

1.7 Taqman PCR 标准曲线的建立

将已知拷贝数的质粒按照 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^9$ 拷贝数浓度进行 10 倍梯度稀释,得到 5 个不同分子量的 PMD-19T 的对数值及其 Ct 值的对应关系绘制出定量标准曲线。

1.8 检测体系灵敏性的评价

将计算得到的标准重组质粒做 10 倍梯度稀释,拷贝数分别为 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 copies,得到动力学曲线,以 Ct 值 > 35 个循环为下限检测该体系的灵敏性。

2 结果

2.1 标准品 IL-2 PCR 扩增序列

以树鼩全长编码序列为模板,克隆其中最保守的一段来扩增 106bp 的特异性片段(图 1),构建质粒作为实时荧光定量方法的标准品,其 PCR 产物核苷酸序列为:

```
GCTCTCCAG GATGCTCACA TTTAAATTTT ATACACCCAG AAAGGCCACA 50
GAATTGAAAC ATCTTCAGTG TCTAGAAGAA GAACTCAAAC CTCTGGAGAA 100
AGTGCT 106
```

图 1 树鼩 IL-2 标准品核苷酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequences of tree shrew IL-2 standard product

2.2 最适退火温度的确定

通过电泳结果可知:55℃、56℃、57℃ 退火温度下都能得到 106bp 的扩增片段,以 57℃ 条件下电泳条件最清晰,条带位置正确无非特异扩增,因此本检测体系确定 $T_m = 57^\circ\text{C}$ (图 2)。

2.3 引物和探针浓度的确定

不同引物浓度下电泳结果显示:当引物为 200 nm 时是最低浓度,该浓度能很好地扩增目的片段

(图 3)。

观察扩增曲线和检测报告。通过不同探针浓度扩增曲线和 Ct 值显示,该检测体系在探针浓度为 2 μm 条件下 Ct 值最小,Rn 最大扩增曲线良好(图 4)。

2.4 Taqman PCR 标准曲线的建立

从图可知本检测体系标准曲线扩增曲线标准,线性关系良好,其斜率 = -3.149,截距 = 46.568, R^2

= 0.998。可得本检测体系线性方程为 $C_t = -3.149 \log(\text{copynumber}) + 46.568$ (图 5)。

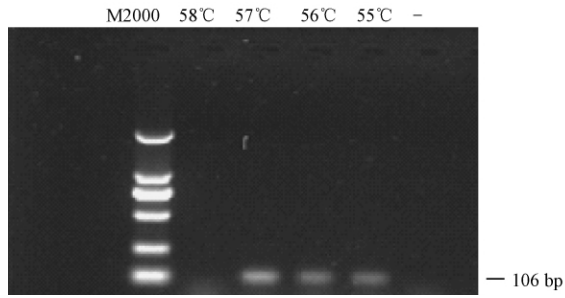


图 2 不同退火温度下树鼩 IL-2 重组质粒 PCR 产物电泳图

Fig. 2 The electrophoretogram of PCR product of tree shrew IL-2 recombinant plasmid with different anneal temperatures

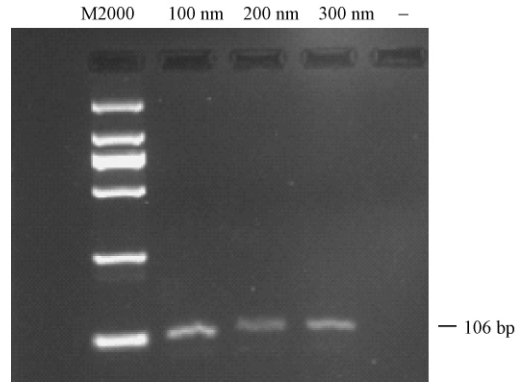
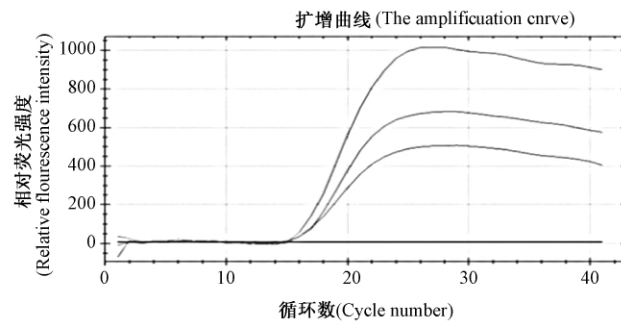


图 3 不同引物浓度下树鼩 IL-2 重组质粒 PCR 产物电泳图

Fig. 3 The electrophoretogram of PCR product of tree shrew IL-2 recombinant plasmid with different primer concentrations



		(C(t))	C(t)	C(t)
A01	FAM	14.43	14.43	0.000
C01	FAM	15.14	15.14	0.000
E01	FAM	14.95	14.95	0.000

图 4 不同探针浓度下树鼩 IL-2 扩增曲线

Fig. 4 The amplification curve of tree shrew IL-2 with different probe densities

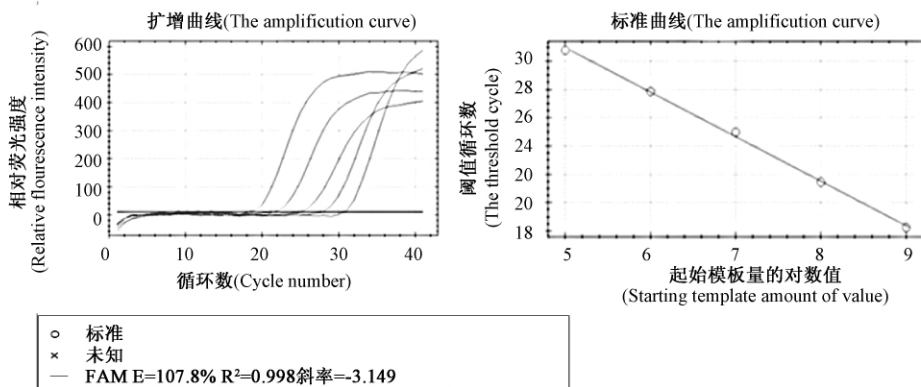


图 5 树鼩 IL-2 实时荧光定量标准曲线

Fig. 5 Real-time fluorescence quantitative PCR standard curve of tree shrew IL-2

2.5 检测体系灵敏性的评价

将计算得到的标准重组质粒做 10 倍梯度稀释, 拷贝数分别为 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 copies, 得到动力学曲线, 以 Ct 值 > 35 个循环为下限检测该体系的灵敏性。通过扩增曲线可知本检测体系可检测到 10^2 拷贝数级别(图 6)。

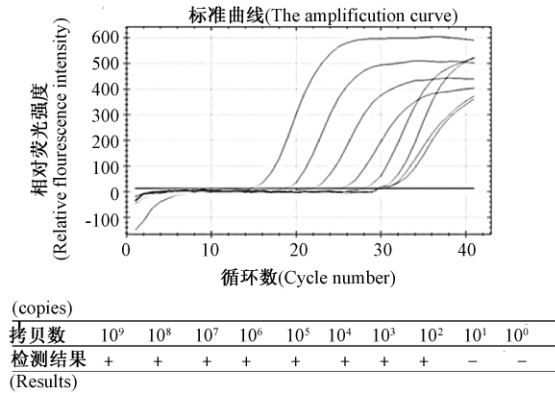


图 6 树鼩 IL-2 时荧光定量方法灵敏度检测

Fig. 6 The sensitivity detection of Real-time fluorescence quantitative PCR of tree shrew IL-2

3 讨论

随着非人灵长类实验动物资源的日益稀贵和实验动物小型化的发展趋势, 树鼩作为新兴的动物实验对象, 在人类重大疾病和重大传染病研究领域已经呈现广泛的前景。但目前尚缺乏树鼩细胞因子方面的检测手段, 致使其进一步的研究受阻。

IL-2 是最重要的一类 Th1 型细胞因子。机体内未活化的正常 T 细胞虽具有 IL-2 基因, 但是不分泌 IL-2, 只有当 T 细胞受到病毒等诱生剂诱导活化后, IL-2 基因才开始转录翻译, 因此, IL-2 可以作为 T 细胞活化的指针, 通过检测 IL-2 的含量可了解 T 细胞的活化水平, 从而为评价机体的细胞免疫状态提供可靠依据。

目前有许多技术可用于评价组织和血液中的细胞因子水平, 例如, 使用 ELISA、ELISPOT 和细胞内细胞因子染色等对细胞因子蛋白质水平进行评价^[17]; 使用 Northern 杂交、RNA 酶保护试验等对基因表达水平进行评价, 但是树鼩为新兴的实验动物, 针对其蛋白质水平检测的试剂盒尚未研制出来, 而在基因水平的 Northern 杂交、RNA 酶保护试验敏感性太低, 限制了它们的使用。实时荧光定量 RT-PCR 克服了上述缺点, 成为检测组织和血液中的细胞因子水平的最佳选择^[18]。

本实验选取树鼩 IL-2 编码序列中最为保守的一段 cDNA 序列, 构建质粒作为标准品模板, 并根据此段设计特异性引物和探针, 优化反应条件和扩增体系, 成功建立了树鼩 IL-2 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 检测方法。本研究中所建立的检测体系标准曲线扩增曲线标准, 线性关系良好, 其斜率高达 -3.149, 阈值循环数 (Ct) 与 PCR 体系中起始模板量的对数值之间存在良好的线性关系 ($R^2 = 0.998$), 扩增效率高 ($E = 107.8\%$), 检测灵敏度达 10^2 拷贝, 线性范围为 $10^2 \sim 10^9$ 拷贝。由此可见, 本实验建立的 Taqman 实时荧光定量方法特异性强, 灵敏度高, 重复性强, 且可靠准确。此 Taqman 实时荧光定量技术已成为用分子生物学研究微量细胞因子及其受体的重要方法, 在众多疾病中, Th1 细胞分泌 IL-2, 与 IL-2R 结合进一步上调 IL-2 而发挥致炎作用。所以本实验提供的树鼩 IL-2 TaqMan 探针实时荧光定量 RT-PCR 检测方法, 在评价树鼩动物模型和研究疾病发病机制、免疫调节机制、细胞因子动力学评价及疫苗、新药的研究方面有着重要的应用价值。

(本研究成果已申请专利, 专利受理号: 201310104794.1。)

参考文献:

- [1] Novacek MJ. 1992. Mammalian phylogeny: shaking the tree [J]. Nature, 356(6365): 121-125.
- [2] Sargis EJ. New views on tree shrews: the role of tupaiids in primate supraordinal relationships [J]. Evol Anthropol, 2004, 13(2): 56-66.
- [3] Nie W, Fu B, O'Brien PC, et al. Flying lemurs—the 'flying tree shrews'? Molecular cytogenetic evidence for a Scandentia/Dermoptera sister clade [J]. BMC Biol, 2008, 6: 18.
- [4] 王文广, 黄晓燕, 徐娟, 等. EV71 可感染幼龄中缅树鼩 [J]. 动物学研究 2012, 33(1): 7-13.
- [5] 黄晓燕, 徐娟, 孙晓梅, 等. 树鼩在人类疾病动物模型中应用研究进展 [J]. 实验动物科学, 2013, 30(2): 59-64.
- [6] Lenardo M J. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis [J]. Nature, 1991, 353(6347): 858-861.
- [7] Theze J, Alzari PM, Bertoglio J. Interleukin 2 and its receptors: recent advances and new immunological functions [J]. Immunology Today, 1996, 17(10): 481-486.
- [8] Church A C. Clinical advances in therapies targeting the interleukin-2 receptor [J]. QJM: An International Journal of Medicine, 2003, 96(2): 91-102.
- [9] Zelus D, Robinson-Rechavi M, Delacore M, et al. Fast evolution

(下转第 49 页)

本实验针对抗原性最强的 VP1 蛋白,选择保守片段,设计引物(引物 1)。建立的 EMCV RT-PCR 检测方法,其目的主要是用于长爪沙鼠、小鼠等实验动物的检测。

本试验检测 62 只沙鼠脑组织,结果均为阴性,可能与与取样(脑组织易自溶)、组织冻融等操作使 RNA 降解,导致检测阴性率上升有关。此次对 62 只长爪沙鼠 EMCV 的检测只是一个初步筛查结果,如果要确切了解我国长爪沙鼠对 EMCV 的感染情况,可能需要扩大检测样本量,并有必要用其他分子生物学检测方法或结合血清学检测方法来进行验证。

本实验通过特异性、敏感性、重复性、稳定性及初步应用实验结果,说明利用引物 1 建立的 RT-PCR 方法特异、敏感、可靠、稳定性、重复性好等特点。检测人工经腹腔途径感染的 6 只小鼠,有 5 只在脑组织、1 只在盲肠内容物中检测到 EMCV。6 只小鼠接种 EMCV 72h 后,E1 号小鼠出现死亡,剖检脑部有淤血;E2~E6 号小鼠出现被毛逆立,走路后肢迟缓,精神沉郁,剖检可见脑部淤血,其他组织无明显病变。本试验对 12 只送检小鼠脑、心、脾和胰腺组织进行检测时,67 号小鼠心脏组织检测出 EMCV 基因。以上结果均说明 EMCV 确实能感染小鼠^[7]。且经过本试验证实 EMCV 主要感染小鼠脑和心脏组织,盲肠内容物中也可检出 EMCV。同时也说明本试验建立的 RT-PCR 方法能用于沙鼠、小鼠等实验动物感染 EMCV 的检测。并为实验室开展 EMCV 核酸的检测及试剂盒的研制奠定了基础。

参考文献:

- [1] 冯育芳,邢进,王吉,等.普通环境长爪沙鼠肠道菌群的分离鉴定[J].实验动物科学,2012,29(3):27-30.
- [2] 刘先菊,扬帆,林树柱,等.长爪沙鼠 IgG 的纯化及抗血清的制备[J].中国比较医学杂志,2007,17(11):641-643.
- [3] 刘月环,吴旧生,施张奎.鼠肝炎病毒在长爪沙鼠消化系统的分布及其组织病理学改变[J].中国比较医学杂志,2007,17(4):197-200.
- [4] 聂金荣,聂朝晖.Z:ZCLA 长爪沙鼠培育及其生物学特性研究[J].医学研究通讯,2004,33(6):27-28.
- [5] 殷震,刘景华.动物病毒学(第 2 版)[M].北京:科学出版社,1997:514-516.
- [6] 田克恭.实验动物病毒性疾病[M].北京:中国农业出版社,1992,104-108.
- [7] Young-Sun Lee,¹ Na Li, Seungjin Shin, et al. Role of Nitric Oxide in the Pathogenesis of Encephalomyocarditis Virus-Induced Diabetes in Mice [J]. J Virol. 2009 August; 83(16): 8004-8011.
- [8] 刘勇,王海燕,张甲,等.小鼠 IFN- γ 基因的克隆及其分子佐剂作用的研究[J].实验动物与比较医学,2008,28(5):367-371.
- [9] Matsuzaki H, Doi K, Doi C, et al. Susceptibility of four species of small rodents to encephalomyocarditis (EMC) virus infection [J]. Jikken Dobutsu. 1989 Oct; 38(4): 357-61.
- [10] 刘亚兰,陈春花,许玉静,等.河北省猪场脑心肌炎病毒感染的血清学调查[J].中国人兽共患病学报,2010,26(3):252-254.
- [11] 冯若飞,韦鹏建,李向茸,等.猪脑心肌炎病毒 RT-PCR 检测方法的建立[J].《黑龙江畜牧兽医》科技报,2011 年 8 月(上):122-123.

(修回日期)2013-03-28

(上接第 40 页)

- of interleukin-2 in mammals and positive in ruminants. Journal of Molecular Evolution, 2000, 51(3): 234-244.
- [10] Taniguchi T. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2 [J]. Nature, 1983, 46: 302-305.
 - [11] 黄晓燕,李明利,徐娟,等.树鼩 IL-2 全长编码序列克隆及分子特征分析[J].动物学研究,2013,34(2):121-126.
 - [12] Bozkaya H, Bozdayi AM, Aslan N, et al. Circulating IL-2 and IL-10 in chronic active hepatitis C with respect to the response to IFN treatment. Infection, 2000, 28(5): 309-313.
 - [13] Fukuda R, Ishimura N, Ishara S, et al. Intrahepatic expression of pro-inflammatory cytokine mRNA and interferon efficacy in chronic hepatitis C. Liver, 1996, 16: 390-399.
 - [14] Napoli J, Bishop GA, McGuinness PH, et al. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. Hepatology,

1996, 24(4): 759-765.

- [15] 高万芹,手足口病患者血清 IL-2、TNF- α 和外周血 B 细胞及 T 淋巴细胞亚群检测的临床意义[J].放射免疫学杂志,2010,23(4):390-391.
- [16] 庞国象,陈玉华,武革,等.1 型糖尿病外周血 Th1/Th2 细胞因子表达水平的研究[J].中国医药指南,2008,6(16):11-14.
- [17] Garba M L, Flelinger J A. Intracellular cytokine staining for TGF- β [J]. Immunol Methods 2001, 258(1/2):193-198.
- [18] Payan R R, Medina M A, Parra S E, et al. Quantification of cytokine gene expression using an economical real-time polymerase chain reaction method based on SYBR green I [J]. Scand J Immunol 2003, 57(5):439-445.

(修回日期)2013-06-01