

IL-18在系统性红斑狼疮肾损害患者外周血中过度表达

米向斌, 谭国珍, 曾凡钦

(中山大学附属第二医院皮肤科, 广东 广州 510120)

摘要: 【目的】探讨 IL-18 在系统性红斑狼疮(SLE)肾损害发生发展中的作用。【方法】采用 RT-PCR 及 ELISA 法测定了 20 例 SLE 患者(其中 10 例伴有肾损、10 例无肾损)及 10 例健康人的外周血单个核细胞(PBMC)表达 IL-18 mRNA 和血清 IL-18 蛋白水平。【结果】SLE 肾损组和非肾损组、健康对照组 PBMC 的 IL-18 mRNA 表达分别为 1.35 ± 0.30 、 0.91 ± 0.27 、 0.69 ± 0.17 。SLE 肾损组和非肾损组、健康对照组血清 IL-18 蛋白水平分别为: (799 ± 237) pg/mL、 (163 ± 53) pg/mL、 (114 ± 39) pg/mL。SLE 肾损患者血清 IL-18 蛋白、PBMC 的 IL-18 mRNA 平均表达水平较健康人、非肾损 SLE 患者显著增高; SLE 非肾损患者血清 IL-18 蛋白、PBMC 的 IL-18 mRNA 表达水平也高于健康对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。【结论】IL-18 的过度表达可能在 SLE 特别是狼疮性肾损害过程中起着一定作用。

关键词: 系统性红斑狼疮; 白细胞介素-18; 外周血单个核细胞

中图分类号: R593.24+1

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)01-0063-03

Over expression of Interleukin-18 in Systemic Lupus Erythematosus Patients with Renal Damage

MI Xiang-bin, TAN Guo-zheng, ZENG Fan-qin

(Department of Dermatology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-Sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To study the crucial role of IL-18 in systemic lupus erythematosus (SLE) patients with renal damage. 【Methods】 The levels of serum IL-18 and expression of IL-18 mRNA in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) from 20 SLE patients (10 SLE patients with renal damage, 10 SLE patients without renal damage) and 10 healthy controls were evaluated by ELISA and RT-PCR. 【Results】 The levels of IL-18 mRNA of PBMC from SLE patients with and without renal damage, healthy control were: 1.35 ± 0.30 , 0.91 ± 0.27 , and 0.69 ± 0.17 . The serum IL-18 levels of SLE patients with and without renal damage, healthy control were: (799 ± 237) pg/mL, (163 ± 53) pg/mL and (114 ± 39) pg/mL. The levels of serum IL-18 and expression of IL-18 mRNA in PBMC from SLE with renal damage were several times of the levels in healthy controls and SLE without renal damage, compared with healthy controls, it also significantly increased in SLE patients without renal damage (respectively, $P < 0.05$). 【Conclusions】 Increased expression and secretion of IL-18 in peripheral blood may play a role in the pathogenesis of SLE patients, especially SLE patients with renal damage.

Key words: systemic lupus erythematosus; interleukin-18; peripheral blood mononuclear cell

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(1): 63-65; 74]

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是免疫紊乱引起的经典的自身免疫疾病。细胞因子分泌和复杂网络的调控异常在SLE免疫紊乱发生和病理损伤中起着重要作用^[1]。作为T细胞炎症介质的强有力的诱导者,白细胞介素18(interleukin 18, IL-18)通过同时刺激Th1和

Th2反应、诱导严重免疫紊乱,从而参与一些免疫疾病的发生发展^[2]。但是,IL-18在SLE的疾病进程和系统损伤中的作用还没有得到清楚的了解。本实验从基因表达和蛋白水平两个层次研究IL-18在SLE,特别是伴有肾损害的SLE患者外周血中的表达,旨在探讨IL-18在SLE的系统损害,特别

收稿日期: 2006-07-28

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(05001781)

作者简介: 米向斌(1975-),女,山西寿阳人,博士;曾凡钦,教授,博士生导师,通讯作者。E-mail: f_q_zeng@163.com

是肾损害中的作用。

1 材料和方法

1.1 研究对象

本科 2005 年 10 月至 2006 年 2 月收治的 SLE 患者 20 例, 均符合美国风湿学会 1997 年修订的 SLE 诊断标准。其中, 临床出现蛋白尿者称为 SLE 肾损患者, 反之为 SLE 非肾损患者。共检测了 SLE 肾损患者 10 例, 为我科住院患者, 女性 9 例, 男性 1 例; SLE 非肾损患者 10 例, 为我科门诊随访患者, 均为女性; 健康对照组 10 例, 皆为我院体检中心健康体检者, 家族中无自身免疫疾病史, 女性 8 例, 男性 2 例。各组在性别和年龄构成上差别无统计学意义。

1.2 单个核细胞总 RNA 的提取

收集晨间空腹无抗凝血 4 mL、肝素抗凝血 6 mL。收集血清于 -20℃ 保存待测。抗凝血细胞用灭菌 PBS 重悬后用 Ficoll 密度梯度分离液分离单个核细胞 (PBMC)。PBMC 的 RNA 提取采用 Trizol Reagent (Invitrogen 公司), 紫外分光光度计测定 RNA 浓度及纯度。

1.3 cDNA 的逆转录合成

取 RNA 2 μg 逆转录, Oligo (DT 18) 10 μL, 加 DEPC 水至 30 μL, 70℃ 5 min, 立即冰浴。再加入 5× 逆转录缓冲溶液 2.5 μL, dNTP 2.0 μL, RNA 酶抑制剂 1 μL, 逆转录酶 M-MLV (Promega 公司) 2 μL, 加 DEPC 水至总体积 50 μL。42℃ 60 min, 70℃ 10 min, 立即冰浴, 得到产物为 cDNA。

1.4 引物的合成

IL-18: 上游引物序列 ATGGC TGAAC CAGTA G, 下游引物序列 TCTAC AGTCA GAATC AGTCA T, 产物片段大小为 225 bp; α -肌动蛋白: 上游引物序列 GATGA GATTG GCATG GCTTT, 下游引物序列 CTCAA GTTGG GGGAC AAAAA, 产物片段大小为 431 bp。所有引物均由上海英俊生物工程公司合成。

1.5 PCR 扩增

PCR 反应总体积 25 μL, 包括: 10×PCR 缓冲液 2.5 μL, 2.5 mmol/L dNTP 2.0 μL, 上游引物 0.5 μL, 下游引物 0.5 μL, TaqDNA 聚合酶 (Takara 公司) 0.25 μL, cDNA 3 μL, 加灭菌水至总体积 25 μL。

1.6 IL-18 mRNA 表达的半定量分析

PCR 产物 5 μL, 6×Loading Buffer 1 μL 以及 Syber Green 0.5 μL 混匀后, 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 紫外线下用 UVI 凝胶成像系统成像, 用 UVI 凝胶图像分析软件分析各个目的片段的亮度。以 α -肌动蛋白作为内参照半定量, 各样本目的基因表达强度 = 样本亮度值 / α -肌动蛋白亮度值。

1.7 IL-18 蛋白水平用 ELISA 法检测

人 IL-18 ELISA 定量试剂盒为美国 R&D 公司产品, 灵敏度为 pg/mL。操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.8 统计分析

应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间差异采用 One-Way ANOVA 方法。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SLE 患者和健康人外周血单个核细胞的 IL-18 mRNA 的表达水平

SLE 肾损组、SLE 非肾损组、健康对照组外周血 PBMC 的 IL-18 mRNA 的表达水平分别为: 1.35 ± 0.30 , 0.91 ± 0.27 , 0.69 ± 0.17 。SLE 肾损患者 IL-18 mRNA 平均表达水平显著高于 SLE 非肾损患者和健康人; SLE 非肾损组较健康对照组 IL-18 mRNA 表达也有所升高, 差异有统计学意义 ($F = 11.749$, $P = 0.003$)。

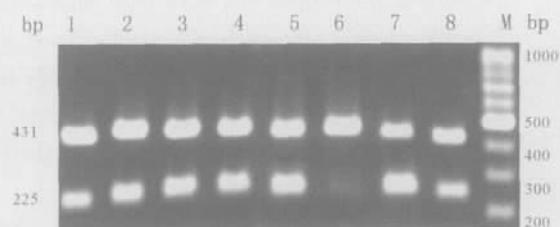


图 1 SLE 患者和正常人 PBMC IL-18 mRNA 表达量
Fig.1 IL-18 mRNA level in PBMC from SLE patients and healthy control

1,2: healthy controls; 3,4,5: SLE without nephritis; 6,7,8: SLE with nephritis

2.2 SLE 患者和健康人血浆的 IL-18 蛋白分泌水平

SLE 肾损组、SLE 非肾损组、健康对照组血浆 IL-18 蛋白水平分别为: (799 ± 237) pg/mL, (163 ± 53) pg/mL, (114 ± 39) pg/mL。SLE 肾损患者血浆 IL-18

蛋白水平较健康人以及 SLE 非肾损组明显增高达 3-6 倍; SLE 非肾损组较健康人血浆 IL-18 水平也有增高, 差异有统计意义 ($F=18.644, P=0.000$)。

3 讨 论

3.1 IL-18 诱导的免疫紊乱参与了 SLE 的疾病进程和系统损伤

IL-18 是 IL-1 细胞因子家族的一个成员。它可以在多种不同的细胞表达, 包括: 巨噬细胞、树突状细胞、角质形成细胞、成骨细胞、肠上皮细胞。在人和鼠, IL-18 可以促进 Th1、CD8⁺ 和 NK 细胞的增殖和 IFN- γ 的产生。作为 Th1 细胞活化的共刺激信号, 它可以诱导 IL-12R 表达和协同 IL-12 的刺激 IFN- γ 的产生。在缺乏 IL-12 时, IL-18 对 T 细胞的介导效应不仅限于 Th1 分化, 还可以促进 Th2 细胞因子的产生^[3]。近年来的资料显示 IL-18 通过同时诱导 Th1、Th2 的免疫紊乱, 特别是强烈的诱导 IFN- γ 作用, 参与了 SLE 的疾病进程和系统损伤^[4]。

动物试验发现: 与野生型 MRL 鼠相比, MRL/lpr 狼疮鼠血清 IL-18 明显升高; 用 IL-18 单独处理或者是 IL-18 和 IL-12 共同处理的 MRL/lpr 鼠出现蛋白尿升高、肾小球肾炎和脉管炎。这些效应同时伴有抗 ds-DNA 抗体和炎性细胞因子的产生增加。此外, IL-18 处理鼠出现了面部炎性蝴蝶斑、凋亡加速和皮疹中 Ig 沉积^[5]。这提示 IL-18 可能在 SLE 各系统免疫损伤中起着一定作用。本试验也发现 SLE 肾损害以及无肾损害的 SLE 患者血清 IL-18 分泌和 PBMC 表达 IL-18 mRNA 水平较正常人均明显升高; Amerio 等^[6,7]也发现活动期 SLE 患者血清中 IL-18 水平升高约是正常人的 6-7 倍, 是非活动期 SLE 患者的两倍; 而且在患者疾病动态过程中, IL-18 水平的变化与 SLE DAI、抗 ds-DNA 抗体滴度的变化有很好的相关性^[6,7]。这说明 IL-18 参与了 SLE 的疾病进程和系统损伤。

3.2 IL-18 在 SLE 的肾脏损害过程中起着一定作用

本试验结果显示: SLE 伴肾损患者外周血 PBMC 表达 IL-18 和血清 IL-18 分泌较无肾损害 SLE 患者显著增高。这部分结果和学者们发现狼疮性肾炎患者外周血单个核细胞上调 IL-18 的表达

相吻合^[8]。而且, 体外培养伴肾损狼疮患者外周血单个核细胞发现, 不仅较无肾损狼疮患者和健康人相比上调表达 IL-18, 而且 IL-18 的过度表达和肾脏肾小球炎症分级有关^[9]。肾脏肾小球局部 IL-18 的过剩也进一步支持了细胞因子 IL-18 在 SLE 肾损害中起着潜在致病性作用^[10]。这可能提示 IL-18 在 SLE 的系统损伤, 特别是肾脏损害的过程中发挥一定作用。

Bossu 等用 IL-18 cDNA 疫苗对幼龄 lpr 鼠进行了重复多次免疫后, 免疫过的鼠产生了针对 IL-18 的自身抗体, 并且淋巴细胞的活化增殖、IFN- γ 产生以及肾脏损害明显减少。同时这些接受 IL-18 疫苗接种鼠的死亡率也明显下降^[11]。这些研究进一步支持了 IL-18 在 SLE 的免疫紊乱和各系统损伤中(特别是肾损害)起着一定的作用; 也提示我们减少 IL-18 产生和活性可能是 SLE 治疗, 尤其是狼疮性肾损害治疗的一个策略和方向。

参考文献:

- [1] KYTTARIS V C, JUANG Y T, TSOKOS G C. Immune cells and cytokines in systemic lupus erythematosus: an update [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2005 Sep, 17(5): 518-522.
- [2] 伍锦泉, 潘志铄, 陈玉平, 等. 慢性肾功能衰竭患者血浆白细胞介素 18 水平与微炎症反应及动脉粥样硬化的关系 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2005, 26(3S): 127-129.
- [3] PARK M C, PARK Y B, LEE S K. Elevated interleukin-18 levels correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus [J]. *Clin Rheumatol*, 2004, 23(3): 225-229.
- [4] 黎莉, 陈顺乐, 沈南. 初发 SLE 病人 Th1/Th2 及调控因子 IL-18 基因研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2002, 18(5): 360-364.
- [5] ESFANDIARI E, MCINNES I B, LINDOP G, et al. A proinflammatory role of IL-18 in the development of spontaneous autoimmune disease [J]. *J Immunol*, 2001, 167(9): 5338-5247.
- [6] AMERIO P, FREZZOLINI A, ABENI D, et al. Increased IL-18 in patients with systemic lupus erythematosus: relations with Th-1, Th-2, pro-inflammatory cytokines and disease activity. IL-18 is a marker of disease activity but does not correlate with pro-inflammatory cytokines [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2002, 20(4): 535-538.

(下转第 74 页 to page 74)

- cryopreservation in 1,2-propanediol [J]. *Hum Reprod*, 1999, 14 (8):2061-2068.
- [6] SALEHNIYA M, ABBASIAN MOGHADAM E, REZAZADEH VELOJERDI M. Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue[J]. *Fertil Steril*, 2002, 78 (3):644-645.
- [7] OKTAY K, NUGENT D, NEWTON H, et al. Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue[J]. *Fertil Steril*, 1997, 67(3):481-486.
- [8] ISACHENKO E, ISACHENKO V, RAHIMI G, et al. Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2003, 108(2):186-193.
- (编辑 张恩健)

(上接第 65 页 from page 65)

- [7] MOSAAD Y M, METWALLY S S, AUF F A, et al. Proinflammatory cytokines (IL-12 and IL-18) in immune rheumatic diseases: relation with disease activity and autoantibodies production[J]. *Egypt J Immunol*, 2003, 10 (2): 19-26.
- [8] CALVANI N, RICHARDS H B, TUCCI M, et al. Up-regulation of IL-18 and predominance of a Th1 immune response is a hallmark of lupus nephritis [J]. *Clin Exp Immunol*, 2004, 138(1): 171-178.
- [9] WONG C K, HO C Y, LI E K, et al. Elevated production of interleukin-18 is associated with renal disease in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Clin Exp Immunol*, 2002, 130(2): 345-351.
- [10] CALVANI N, TUCCI M, RICHARDS H B, et al. Th1 cytokines in the pathogenesis of lupus nephritis: The role of IL-18 [J]. *Autoimmun Rev*, 2005, 4(8): 542-548.
- [11] BOSSU P, NEUMANN D, DEL GIUDICE E, et al. IL-18 cDNA vaccination protects mice from spontaneous lupus-like autoimmune disease [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(24): 14181-14186.
- (编辑 刘清海)

(上接第 69 页 from page 69)

- of disease[J]. *Ann Neurol*, 2001, 50(6): 699-707.
- [7] LI J, ADAMS L D, WANG X, et al. Regulator of G protein signaling 5 marks peripheral arterial smooth muscle cells and is downregulated in atherosclerotic plaque[J]. *J Vasc Surg*, 2004, 40(3):519-528.
- [8] OHARA R, MURPHY E P, WHITEHEAD A S, et al. Local expression of the serum amyloid A and formyl peptide receptor-like 1 genes in synovial tissue is associated with matrix metalloproteinase production in patients with inflammatory arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(6):1788-1799.
- [9] CUI Y, LE Y, YAZAWA H, et al. Potential role of the formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) in inflammatory aspects of Alzheimer's disease [J]. *J Leukoc Biol*, 2002, 72(4): 628-635.
- [10] ABS T S, SUNDT T M 3rd, TUNG W S, et al. Altered patterns of gene expression distinguishing ascending aortic aneurysms from abdominal aortic aneurysms: complementary DNA expression profiling in the molecular characterization of aortic disease[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003, 126(2):344-357.
- [11] UEDA K, ARAKAWA H, NAKAMURA Y. Dual-specificity phosphatase 5 (DUSP5) as a direct transcriptional target of tumor suppressor p53 [J]. *Oncogene*, 2003, 22 (36):5586-5591.
- (编辑 刘清海)