

· 临床研究 ·

激素敏感型肾病综合征患儿 甲基泼尼松龙冲击前后白介素 13 的表达

姜红堃,姜红,罗钢,孙桂莲

(中国医科大学附属第一医院 儿科, 辽宁 沈阳 110001)

[摘 要] 目的 观察白介素 13(IL-13)在小儿类固醇敏感肾病综合征(SRNS)中的变化及甲基泼尼松龙冲击治疗(MPT)对 IL-13 表达的影响,探讨其在 SRNS 发病中的作用。方法 分别采用 ELISA 法及 RT-PCR 法测定 20 例正常儿童及 28 例 SRNS 患儿 MPT 前、结束后 2 d、5 d、尿蛋白转阴后 2 周血清 IL-13 水平及外周血单个核细胞(PBMC) IL-13 mRNA 水平。采用双缩脲法对 SRNS 患儿检测 24 h 尿蛋白量。结果 血清 IL-13 蛋白水平及 PBMC IL-13 mRNA 表达 MPT 前明显高于 MPT 结束后 5 d 组、尿蛋白转阴后 2 周组及正常对照组,差异有显著性(均 $P < 0.01$);MPT 结束后 5 d 组较正常对照组高,差异有显著性($P < 0.05$); MPT 前与结束后 2 d 比较差异无显著性($P > 0.05$)。尿蛋白转阴后 2 周组血清 IL-13 蛋白水平及 PBMC IL-13 mRNA 表达与正常对照组比较无统计学意义。SRNS 患儿血清中 IL-13 水平与 24 h 尿蛋白量呈正相关。结论 SRNS 患儿血清 IL-13 及其基因表达异常, MPT 对 SRNS 患儿 IL-13 在蛋白合成和基因转录两个水平上可能有抑制作用。

[中国当代儿科杂志,2007,9(6):533-536]

[关 键 词] 肾病综合征;白介素 13;甲基泼尼松龙;冲击治疗;儿童
[中图分类号] R692 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2007)06-0533-04

Interleukin-13 expression before and after pulse treatment with methylprednisolone in children with steroid-responsive nephrotic syndrome

JIANG Hong-Kun, JIANG Hong, LUO Gang, SUN Gui-Lian. Department of Pediatrics, First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China (Email: ssdgyz@163.com)

Abstract: Objective To study serum concentration and mRNA expression of interleukin-13 (IL-13) in children with steroid-responsive nephrotic syndrome (SRNS) and the effect of methylprednisolone pulse therapy (MPT) on IL-13 expression. **Methods** Twenty-eight children with SRNS were enrolled in this study. Serum protein level of IL-13 was measured using ELISA and IL-13 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was detected with RT-PCR before MPT, 2 and 5 days after MPT, and 2 weeks after disappearance of proteinuria following MPT. Twenty-four urinary protein was measured with the biuret assay. Twenty healthy children were used as controls. **Results** Serum IL-13 levels (38.48 ± 13.01 pg/mL vs 5.18 ± 2.71 pg/mL) and PBMC IL-13 mRNA expression (1.31 ± 0.23 vs 0.36 ± 0.07) before MPT in SRNS patients were significantly higher than in the controls. After 5 days of MPT and 2 weeks after disappearance of proteinuria following MPT, serum IL-13 levels (15.33 ± 7.81 and 5.35 ± 2.12 pg/mL respectively) and PBMC IL-13 mRNA expression (0.89 ± 0.26 and 0.33 ± 0.08 respectively) were significantly reduced ($P < 0.01$). Serum IL-13 levels and PBMC IL-13 mRNA expression in SRNS patients 2 weeks after disappearance of proteinuria following MPT were reduced to control levels, but remained at a higher level than controls 5 days after MPT. A positive correlation was found between serum levels of IL-13 and 24-hour urinary protein in SRNS patients before ($r = 0.75$, $P < 0.01$) and after 2 and 5 days of MPT ($r = 0.68$, $r = 0.71$ respectively; $P < 0.05$). **Conclusions** Serum IL-13 levels and PBMC IL-13 mRNA expression in children with SRNS increase. MPT can inhibit the expression of protein and mRNA of IL-13 in these patients.

[Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9 (6):533-536]

Key words: Nephrotic syndrome; Interleukin-13; Methylprednisolone; Pulse treatment; Child

原发性肾病综合征是小儿常见的肾小球疾病, 其主要病理类型为微小病变肾病, 大部分患儿对糖皮质激素治疗敏感, 为类固醇敏感性肾病综合征 (steroid-responsive nephrotic syndrome, SRNS), 其发

[收稿日期]2007-04-04;[修回日期]2007-05-15
[基金项目] 辽宁省教育厅基金(20122160)。
[作者简介] 姜红堃,女,博士研究生,讲师,主治医师。主攻方向:小儿肾脏病。
[通讯作者] 姜红,主任医师,博士生导师。中国医科大学第一医院儿科,邮编 110001。

病机制尚不十分清楚。近年来有关肾脏疾病时细胞因子网络的研究日益广泛深入。白介素-13 (interleukin-13, IL-13) 作为一种 Th2 类细胞因子, 对单核巨噬细胞、中性粒细胞等具有多种生物学活性, 如抑制炎症细胞产生、调节机体免疫功能活性等。其在 SRNS 中的作用尚无定论, 在甲基泼尼松龙冲击治疗 (methylprednisolone pulse therapy, MPT) 前后的变化尚未见报道。本实验检测了 SRNS 患儿 MPT 前后血清中 IL-13 水平及外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) IL-13 mRNA 表达, 并探讨其与尿蛋白的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

实验组 (分 MPT 前组、MPT 后 2 d 组、5 d 组、尿蛋白转阴后 2 周组): 选取 2005 年 3 月至 2006 年 9 月在我院儿科住院资料齐全 SRNS 患者 28 例。全部病例按全国儿科肾脏病科研协作组制定的诊断标准判定^[1], 之前未用过糖皮质激素或至少 3 个月内未用过糖皮质激素及其他免疫抑制剂治疗。男 17 例, 女 11 例, 平均年龄 11.5 (9 ~ 15) 岁。对照组: 20 例, 均为门诊健康体检儿童, 男 13 例, 女 7 例, 平均年龄 9.8 (6 ~ 15) 岁。

1.2 实验方法

1.2.1 标本采集 MPT (甲基泼尼松龙每日 15 ~ 30 mg/kg 静脉滴注, 连续 3 d; 然后隔日口服泼尼松) 前和 MPT 后 2 d、5 d、尿蛋白转阴后 2 周分别采集静脉血 2 mL 和肝素抗凝血 5 mL。

1.2.2 ELISA 试剂盒检测静脉血 IL-13 2 mL 静脉血分离血清, 人 IL-13 试剂盒购自美国 Bender 公司, 晶美公司分装, 参照使用说明操作检测。

1.2.3 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测外周血单个核细胞 IL-13 mRNA 表达 分离静脉血单个核细胞, 加 Trizol 裂解液 (购于 GIBCO BRL USA 公司), 提取总 RNA; 按照逆转录试剂盒手册操作, 合成 cDNA。逆转录反应按以下条件进行: 65℃ 1 min, 30℃ 5 min, 15 ~ 30 min 内匀速升温, 65℃ 30 min, 98℃ 5 min, 5℃ 5 min; PCR 扩增: β-actin 引物序列: Upward primer: 5'-GATTGCCTCAGGACATTTTCAG-3'; Downward primer: 5'-GATTGCTCAGACATTTTCTG-3'; 产物长度为 690 bp。IL-13 引物序列 Upward primer: 5'-CGCCTCAAACCTTCCAAA-3'; Downward primer: 5'-AGGCTCACAGCCAGCCCTC-3', 产物长度为 407 bp。Biometra T Gradient 梯度

PCR 扩增仪按以下条件进行 PCR 反应: 94℃ 变性 3 min 后, 以 94℃ 45 s、63.5℃ 1 min、72℃ 1 min 30 s 的顺序循环 35 次, 最后 72℃ 延伸 7 min, 产物在 4℃ 储存待测。产物经琼脂糖凝胶电泳 (BIO-RAD 美国伯乐公司电泳仪), 溴化乙啶染色, 经 1D 柯达凝胶扫描分析成像系统分析照相。逆转录试剂盒、Taq DNA 聚合酶、dNTP、DNA Marker DL2000 购于大连 TAKARA 公司。PBMC IL-13 mRNA 的表达用所测产物的条带强度与内参对照 β-actin 条带强度的比值来表示。

1.2.4 尿蛋白量测定 对 SRNS 患者分别于 MPT 前、MPT 后 2 d、5 d 留取晨尿, 采用双缩脲法测定 24 h 尿蛋白量。

1.3 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验, 利用 SPSS11.5 统计软件进行统计学分析, *P* < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 MPT 前、后血清 IL-13 水平及 PBMC IL-13 mRNA 的表达

MPT 前组、MPT 结束后 2 d 组、5 d 组血清 IL-13 含量及 PBMC IL-13 mRNA 表达较正常对照组增高, 差异有显著性 (*P* < 0.05); 尿蛋白转阴后 2 周组与正常对照组比较差异无显著性 (*P* > 0.05)。MPT 结束后 2 d 组血清 IL-13 及 PBMC IL-13 mRNA 含量与 MPT 前组相比, 差异无显著性 (*P* > 0.05); MPT 结束后 5 d 组、尿蛋白转阴后 2 周组血清 IL-13 及 PBMC IL-13 mRNA 含量与 MPT 前组相比均降低, 差异有显著性 (均 *P* < 0.01); MPT 后 5 d 组血清 IL-13 含量及 PBMC IL-13 mRNA 含量比对照组增高 (*P* < 0.05)。见表 1。从电泳图中可见, MPT 前组扩增产物量明显比正常对照组、MPT 后 5 d 组、尿蛋白转阴后 2 周组增多, IL-13 mRNA 条带明显增强。见图 1。

表 1 各组血清 IL-13 含量及 IL-13 mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$)				
分组	例数	IL-13 蛋白 (pg/mL)	IL-13 mRNA	24 h 尿蛋白量 (mg/kg)
正常对照	20	5.18 ± 2.71	0.36 ± 0.07	—
治疗前	28	38.48 ± 13.01 ^a	1.31 ± 0.23 ^a	114.6 ± 19.2
MPT 后 2d	28	40.01 ± 10.01 ^a	1.29 ± 0.18 ^a	93.6 ± 20.3
MPT 后 5d	28	15.33 ± 7.81 ^{b,c}	0.89 ± 0.26 ^{b,c}	25.2 ± 10.3
转阴后 2 周	28	5.35 ± 2.12 ^c	0.33 ± 0.08 ^c	—

^a 与正常对照组比较, *P* < 0.01, ^b *P* < 0.05; ^c 与 MPT 前比较, *P* < 0.01

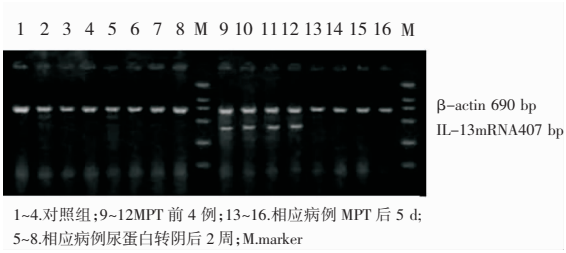


图1 治疗前后病例与对照 IL-13mRNA 表达电泳结果

2.2 MPT 前、后 24 h 尿蛋白量的变化

MPT 前组血清 IL-13 含量与 24 h 尿蛋白量正相关($r=0.75, P<0.01$); MPT 后 2 d 组、5 d 组血清 IL-13 含量与 24 h 尿蛋白量呈正相关($r=0.68, r=0.71$, 均 $P<0.05$)。

3 讨论

目前关于小儿肾病综合征的病因学研究主要集中在免疫因子介导及肾小球结构的遗传学因素两方面^[2]。在免疫功能异常方面,细胞因子调节失衡尤其是 Th1/Th2 比例失衡是目前较公认的导致原发性肾病综合征的主要原因之一^[3]。IL-13 是一种多效性的 Th2 类细胞因子,对单核巨噬细胞、中性粒细胞、B 淋巴细胞、血管内皮细胞等具有多种生物学活性,如抑制炎症细胞的产生、调节机体的免疫功能及抗肿瘤活性。增多的 IL-13 通过下调致炎细胞因子表达,加强 IL-1 受体拮抗剂的合成,抑制趋化因子所致的 T 淋巴细胞趋化运动,使炎症及免疫损伤区域局限;同时 IL-13 还可抑制 Th1 细胞活化,减少 IL-12 及 IFN- α 的产生;Matsumoto 等^[4]体外试验表明,加入外源性人重组 IL-13 可抑制自发性和脂多糖活化的 IgA 肾病患者外周血单核细胞分泌 TNF 和 IL-8,且呈剂量依赖关系。并认为其在肾脏疾病中的发生发展中主要起到防御作用。

本研究发现,治疗前组 SRNS 患儿血清中 IL-13 水平增高,其 PBMC IL-13 mRNA 表达增强,而尿蛋白转阴后 2 周二者均降至正常。与 Yap 等^[5]的研究相符。说明 IL-13 基因表达及蛋白分泌水平的变化在肾脏组织损害的调节中可能起一定作用。针对肾病综合征大鼠肾组织的研究表明^[6],早在肾病综合征尚未出现蛋白尿阶段,即有与巨噬细胞相关的细胞因子产生增多,尤其是 TNF- α ;此外还发现以 Th2 细胞为主的少量 T 淋巴细胞浸润,同时观察到 Th1 细胞因子下调。说明大鼠肾病综合征的发生与

免疫功能异常有关,巨噬细胞及 Th2 淋巴细胞参与其中。由此结果推测,在肾病综合征时肾脏固有细胞以及局部浸润的单核巨噬细胞分泌的炎症介质如 IL-1, IL-8, TNF 及黏附分子等分泌增加,IL-13 作为一种 Th2 细胞分泌的免疫调节性细胞因子,在这些炎症因子刺激后促使 PBMC 活化,从而 IL-13 mRNA 表达增强、IL-13 水平增高,反过来抑制单核巨噬细胞等一些炎症细胞的浸润及其炎症介质的释放,同时也相对抑制了 Th1 细胞的作用,有利于 Th2 发育途径。Chen 等^[7]研究表明,肾病急性期的 IL-13 的表达上调与单核细胞 CD14 表达受抑制,前炎症细胞因子的产生下调有关。

但也有研究表明^[8],IL-13 可以促进离子穿过肾小球脏层上皮细胞单层,从而破坏电荷屏障;也可以影响蛋白转运、提高肾小球脏层上皮细胞(GVEC)基侧表面蛋白分解、直接损伤肾小球脏层上皮细胞^[9];本研究发现 SRNS 患者 MPT 前及 MPT 后 2 d 组、5 d 组血清中 IL-13 含量与 24 h 尿蛋白量正相关,而正常对照组及尿蛋白转阴 2 周组尿蛋白量均正常,推测可能与上述因素有关。

糖皮质激素作为一种免疫抑制剂,广泛应用于治疗肾病综合征,其作用机制尚不十分清楚。本研究发现,用甲基泼尼松龙冲击治疗后 5 d 及尿蛋白转阴后 2 周的 SRNS 患者血清中 IL-13 含量及外周血单个核细胞 IL-13 mRNA 表达均低于 MPT 前,差异有显著性。说明糖皮质激素不但减少致炎细胞因子的产生,同时抗炎细胞因子 IL-13 亦相应减少。推测其原因为:激素可以通过改变小血管的通透性和淋巴细胞表面分子结构,使循环池内淋巴细胞再分布,外周血淋巴细胞减少,其中 Th 细胞亚群(包括 Th1、Th2)下降更明显^[10,11];它还通过抑制单核细胞内信息传递,而抑制单核细胞的激活及细胞因子的产生,使 Th2 细胞活化障碍^[12];肾病综合征患者经免疫抑制治疗后,肾脏致炎因子减少,免疫状态相对稳定,IL-13 继发性分泌表达下降。IL-13 水平变化一定程度上可提示病情变化,反映治疗效果。

本研究发现,甲基泼尼松龙冲击治疗后 2 d,血清中 IL-13 水平及外周血单个核细胞 mRNA 表达与治疗前相比,差异无显著性。其原因可能为细胞因子在体内的作用方式为瀑布效应,其作用范围广、持续时间长;体内细胞因子之间作用复杂,并非为简单的一对一关系,激素的免疫抑制作用,在体内发挥尚需一个过程;而激素作用时间较短,细胞表达尚未被抑制或只是部分被抑制^[13]。而经治疗后 5 d 上述指标降低,与治疗前相比差异有显著性,说明糖皮质

激素对 SRNS 患者 IL-13 表达有影响。

甲基泼尼松龙冲击治疗可以缩短 SRNS 达缓解的时间^[14,15]。本实验发现,用甲基泼尼松龙冲击治疗后 5 d 的 SRNS 患者血清中 IL-13 含量及 mRNA 表达即低于治疗前,且差异显著,表明甲基泼尼松龙冲击疗法可较快的抑制 IL-13 表达及分泌。这为甲基泼尼松龙冲击治疗 SRNS 的有效性提供了新的理论依据。另外,在本实验中治疗后 5 d 组的血清 IL-13 含量虽然比治疗前明显降低,但与正常对照组比较仍有统计学差异,这提示我们甲基泼尼松龙冲击后仍需口服泼尼松维持治疗,Opastirakul 等^[14]研究发现,若立即停用甲基泼尼松龙则肾病短期内复发的几率明显增高。

综上所述,IL-13 可能参与人类肾病综合征的免疫炎症过程。其血清蛋白水平及 PBMC mRNA 表达的变化与 SRNS 病程及转归密切相关。甲基泼尼松龙冲击疗法可较快抑制 IL-13 的表达及分泌,但 IL-13 表达异常究竟是肾病综合征发病的原因、结果抑或二者兼而有之尚待进一步探讨。

[参 考 文 献]

[1] 中华医学会儿科学分会肾脏病学组. 小儿肾小球疾病的临床分类、诊断及治疗[J]. 中华儿科杂志, 2001, 39(12): 746-749.

[2] Schachter AD. The pediatric nephrotic syndrome spectrum: clinical homogeneity and molecular heterogeneity[J]. *Pediatr Transplant*, 2004, 8(4): 344-348.

[3] Romagnis S. Th1/Th2 cells[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 1999, 5(4): 285-294.

[4] Matsumoto K. Interleukin-13 inhibits cytokines secretion by blood monocytes from patients with IgA nephropathy[J]. *Nephron*, 1997, 75(3): 295-302.

[5] Yap HK, Cheung W, Murugasu B, Sim SK, Seah CC, Jordan SC. Th1 and Th2 cytokine mRNA profile in childhood nephrotic syndrome: evidence for increased IL-13 mRNA expression in relapse[J]. *J Am Soc Nephrol*, 1999, 10(3): 529-537.

[6] Le Berre L, Herve C, Buzelin F, Usal C, Souillou JP, Dantal J. Renal macrophage activation and Th2 polarization precedes the development of nephrotic syndrome in Buffalo/Mna rats[J]. *Kidney Int*, 2005, 68(5): 2079-2090.

[7] Chen SP, Cheung W, Heng CK, Jordan SC, Yap HK. Childhood nephrotic syndrome in relapse is associated with down-regulation of monocyte CD14 expression and lipopolysaccharide-induced tumour necrosis factor-alpha production[J]. *Clin Exp Immunol*, 2003, 134(1): 111-119.

[8] Van Den Berg JG, Aten J, Claessen N, Di jkink L, Wijdenes J, Lakiss FG, Weening JJ. Interleukin-4 and interleukin-13 act on glomerular vixceral epithelial cells[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2000, 11(3): 413-422.

[9] Van Den Berg JG, Aten J, Annink C, Ravesloot JH, Weber E, Weening JJ. Interleukin-4 and -13 promote basolateral secretion of H(+) and cathepsin L by glomerular epithelial cells[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002, 282(1): F26-33.

[10] Diaz-Cazorla M, Perez-Sala D, Ros J. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in human mesangial cells-transcriptional inhibition by IL-13[J]. *Eur J Biochem*, 1999, 260(1): 268-274.

[11] Miao L, Sun J, Yuan H, Jia Y, Xu Z. Combined therapy of low-dose tacrolimus and prednisone in nephrotic syndrome with slight mesangial proliferation[J]. *Nephrology*, 2006, 11(5): 449-454.

[12] Gero L. Treatment of nephrotic syndrome in the adult[J]. *Orv Hetil*, 2006, 147(48): 2313-2318.

[13] Polenakovic M, Greevska L, Dzikova S. 20 years after methylprednisolone/chlorambucil treatment in idiopathic membranous nephropathy stage II-III with nephrotic syndrome[J]. *Prilozi*, 2006, 27(2): 5-12.

[14] Opastirakul S, Chartapisak W. Methylprednisolone treatment in children with nephrotic primary focal segmental glomerulosclerosis[J]. *J Med Assoc Thai*, 2006, 89(12): 2145-2149.

[15] 卢宏柱,李祥民. 激素敏感型肾病综合征患儿血及尿白细胞介素-18 增高及其临床意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2003, 5(5): 466-468.

(本文编辑:吉耕中)