

白细胞介素 18 在激素耐药型肾病综合征 外周血单个核细胞中的表达及意义

姜红堃, 罗钢, 姜红

(中国医科大学附属第一医院儿科, 辽宁 沈阳 110001)

[摘要] 目的 通过研究原发性肾病综合征(PNS)患儿血清白细胞介素 18(IL-18)水平及其在外周血单个核细胞(PBMC)中的表达,探讨 IL-18 在激素耐药型肾病综合征(SRNS)发生、发展中的可能机制。方法 采用 ELISA 法及 RT-PCR 法测定 40 例正常儿童及 39 例激素敏感型肾病综合征(SSNS)、27 例 SRNS 血清 IL-18 蛋白水平及 PBMC mRNA 表达。双缩脲法检测 24 h 尿蛋白量。全自动生化分析仪检测血清总胆固醇(T-Ch)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL)、总蛋白(TP)及白蛋白(Alb)含量。结果 ①与正常对照组相比,治疗前 SSNS、SRNS 血清 IL-18 蛋白水平及 PBMC IL-18 mRNA 表达均明显增高($P < 0.05$);与 SSNS 相比,SRNS 上述指标均增高($P < 0.05$);SSNS 及 SRNS 之间血清 Alb,TP,T-Ch,TG 水平及 24 h 尿蛋白量差异无显著性($P > 0.05$),SRNS 血清 LDL 水平较 SSNS 高($P < 0.05$)。②治疗后 SRNS 组血清 IL-18 蛋白水平及 PBMC IL-18 mRNA 表达均高于 SSNS 组及正常对照组($P < 0.05$);SSNS 组与正常对照组比较差异无显著性($P > 0.05$)。③治疗后 SSNS 组血清 IL-18 蛋白水平及 PBMC IL-18 mRNA 表达较治疗前明显下降($P < 0.05$)。而 SRNS 组治疗前、后无明显变化($P > 0.05$)。结论 PNS 激素耐药与 IL-18 血清水平及 PBMC mRNA 表达明显升高有关,IL-18 的过度分泌在 SRNS 的发生发展中发挥一定作用。

[中国当代儿科杂志,2009,11(5):337-340]

[关键词] 肾病综合征;白细胞介素 18;激素耐药;儿童
[中图分类号] R692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)05-0337-04

Interleukin-18 expression in peripheral blood mononuclear cells in children with steroid-resistant nephrotic syndrome

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

Abstract: Objective To examine serum concentration of interleukin-18 (IL-18) and IL-18 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in children with primary nephrotic syndrome (PNS) and explore the possible role of IL-18 in steroid-resistant nephrotic syndrome (SRNS). **Methods** Sixty-six children with newly diagnosed PNS, including 39 cases of steroid sensitive nephrotic syndrome (SSNS) and 27 cases of SRNS, were enrolled. Forty healthy children were used as a normal control group. Blood samples were collected before and 8 weeks after glucocorticoid treatment. Serum concentration of IL-18 was measured using ELISA. IL-18 mRNA expression in PBMCs was detected by the RT-PCR method. The amount of 24-hr urine protein was measured by the biuret method. Serum contents of total cholesterol (T-Ch), triglyceride (TG), low density lipoprotein (LDL), total protein (TP), and albumin (Alb) were measured by the automatic biochemistry analyzer. **Results** Serum concentration of IL-18 and IL-18 mRNA expression in PBMCs in the SSNS and the SRNS groups were significantly higher than those in the normal control group before treatment ($P < 0.05$). The SRNS group had increased serum protein concentration of IL-18 and IL-18 mRNA expression in PBMCs compared with the SSNS group before treatment ($P < 0.05$). Serum LDL content in the SRNS group was also significantly higher than that in the SSNS group before treatment ($P < 0.05$). After treatment, serum concentration of IL-18 and IL-18 mRNA expression in PBMCs in the SRNS group were significantly higher than those in the SSNS and the normal control groups ($P < 0.05$). Serum concentration of IL-18 and IL-18 mRNA expression in PBMCs in the SSNS group were significantly reduced after treatment, but the alterations of IL-18 were not observed in the SRNS group after treatment. **Conclusions** SRNS was associated with increased serum IL-18 concentration and IL-18 mRNA expression in PBMCs. Overproduction of IL-18 may play a role in the development of SRNS. [Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (5):337-340]

Key words: Nephrotic syndrome; Interleukin-18; Steroid-resistance; Child

[收稿日期]2008-07-10;[修回日期]2008-08-22
[基金项目] 辽宁省教育厅基金项目资助(20122160);沈阳市科委基金项目资助(沈科发 2005,45 号)
[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,女,教授,主任医师,中国医科大学第一医院儿科,邮编:110001。

原发性肾病综合征(primary nephrotic syndrome,PNS)是小儿最常见的肾小球疾病。其预后很大程度上取决于患儿对糖皮质激素(glucocorticoid,GC)治疗敏感或耐药程度。激素耐药型肾病综合征(steroid-resistant nephrotic syndrome,SRNS)是小儿获得性终末期肾病(ESRD)最常见原因。近年SRNS的发病呈上升趋势,约占PNS患儿的23%^[1]。有研究表明Th1与Th2相互作用与激素耐药有关^[2]。白细胞介素-18(IL-18)为Th1类细胞因子,其与肾病综合征激素耐药的相关性尚无定论。本研究旨在观察IL-18在激素敏感型肾病综合征(steroid-sensitive nephrotic syndrome,SSNS)及SRNS患儿血清水平及外周血单个核细胞(PBMC)mRNA的表达,以探讨其在PNS激素耐药中可能发挥的作用。

1 对象与方法

1.1 研究对象

病例组:选取2006年3月至2008年3月在我院儿科住院、资料齐全的PNS患者66例。男35例,女31例;年龄2~16岁,平均8.5岁。临床诊断和分型参照2000年中华医学会儿科学分会肾脏病学组制定的《小儿肾小球疾病的临床分类、诊断及治疗》诊断标准^[3]。所有患者均为初发、之前未用过激素及其他免疫抑制剂,排除继发性因素,且无任何并发症。66例PNS患儿经正规GC治疗8周后,分为SSNS 39例及SRNS 27例。25例SRNS患儿进行肾活检,系膜增生性肾小球肾炎(MsPGN) 15例,局灶节段性肾小球硬化(FSGS) 4例,微小病变型肾病(MCD) 3例,硬化性肾小球肾炎(SGN) 2例,膜增生性肾小球肾炎(MPGN) 1例。

正常对照组:为40例门诊健康体检儿童,男22例,女18例,年龄3~15岁,平均8.2岁。

1.2 实验方法

1.2.1 标本采集 分别采集正常对照组及病例组治疗前及治疗后第8周静脉血2 mL、肝素抗凝血5 mL。

1.2.2 ELISA试剂盒检测静脉血IL-18水平 2 mL静脉血分离血清,人IL-18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 RT-PCR检测PBMC IL-18 mRNA表达 分离静脉血单个核细胞,加Trizol裂解液(GIBCO BRL USA公司),提取总RNA。按照逆转录试剂盒手册操作,合成cDNA。IL-18引物序列:上游5'-

CGCCTCAAACCTTCCAAA-3',下游5'-AGG GTCA-CAGCCAGCCCTC-3',产物长度335 bp;β-actin:上游5'-CCGTCTTCCCCTCCATCG-3',下游5'-GTCCCAGTT-GGTGACGATGC-3',产物长度155 bp;循环条件:94℃预变性3 min,94℃ 45 s、63.5℃ 1 min、72℃ 1 min 30 s,循环35次,72℃延伸7 min。产物经琼脂糖凝胶电泳(BIO-RAD美国伯乐公司电泳仪),溴化乙锭染色,经1D柯达凝胶扫描分析成像系统分析照相。计算IL-18与β-actin扩增条带强度的比值。PCR反应在Biometra T Gradient梯度PCR扩增仪上进行。反转录试剂盒、Taq DNA聚合酶、dNTP、DNA Marker DL 2000购于大连TAKARA公司。

1.2.4 24 h尿蛋白量及血生化指标的检测 双缩脲法测定治疗前SSNS及SRNS患儿24 h尿蛋白量,全自动生化分析仪检测血清总胆固醇(T-Ch)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL)、总蛋白(TP)及白蛋白(Alb)含量。

1.3 统计学处理

所有数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验,利用SPSS 13.0统计软件进行统计学分析。多组间比较先进行方差分析(F 检验),组间两两比较采用LSD法。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 治疗前后各组血清IL-18蛋白水平及PBMC IL-18 mRNA表达

三组血清IL-18蛋白水平及PBMC IL-18 mRNA表达SRNS组>SSNS组>正常对照组;SRNS组与SSNS组、正常对照组比较,差异有显著性($P < 0.05$);SSNS组与正常对照组比较,差异有显著性($P < 0.05$)。经正规激素治疗8周后,治疗后SSNS组IL-18血清水平及PBMC mRNA表达量较治疗前明显下降,差异有显著性($P < 0.05$)。而SRNS组与治疗前比较各项指标无明显变化。SRNS组血清IL-18蛋白水平及PBMC IL-18 mRNA表达高于SSNS组及正常对照组,差异均有显著性($P < 0.05$);SSNS组与正常对照组比较差异无显著性(表1,图1)。

2.2 治疗前各组血清24 h尿蛋白量及血清TG,T-Ch,LDL,TP,Alb水平

比较治疗前SSNS组、SRNS组24 h尿蛋白量及血清TG,T-Ch,TP,Alb水平,两组间差异无显著性。SRNS患儿血清中LDL水平较SSNS患儿高,差异有显著性($P < 0.05$,表2)。

表 1 治疗前后各组血清 IL-18 含量及 PBMC IL-18 mRNA 表达 (x±s)

组别	例数	治疗前		治疗后	
		IL-18 蛋白 (pg/mL)	IL-18 mRNA	IL-18 蛋白 (pg/mL)	IL-18 mRNA
正常对照	40	43.55 ± 19.67	0.37 ± 0.09	43.55 ± 19.67	0.37 ± 0.09
SSNS	39	235.36 ± 130.21 ^a	1.35 ± 0.22 ^a	43.6 ± 20.1	0.33 ± 0.11
SRNS	27	400.26 ± 155.92 ^{a,b}	2.91 ± 0.33 ^{a,b}	388.6 ± 167.18 ^{a,b}	3.13 ± 0.37 ^{a,b}
F 值		40.24	19.73	39.26	19.76
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

a: 与正常对照组比较, *P* < 0.05; b: 与 SSNS 组比较, *P* < 0.05

表 2 治疗前各组 24 h 尿蛋白量及血清 TG, T-Ch, LDL, TP, Alb 水平 (x±s)

分组	例数	24 h 尿蛋白 (mg/kg · d)	TG (mmol/L)	T-Ch (mmol/L)	LDL (mmol/L)	TP (g/L)	Alb (g/L)
SSNS 组	39	104.6 ± 18.5	4.31 ± 0.33	13.23 ± 4.32	5.32 ± 1.02	31.23 ± 1.72	14.78 ± 7.13
SRNS 组	27	103.7 ± 18.3	3.99 ± 0.35	14.98 ± 5.25	12.84 ± 1.21 ^a	32.21 ± 1.98	17.97 ± 8.15

a: 与 SSNS 组比较, *P* < 0.05

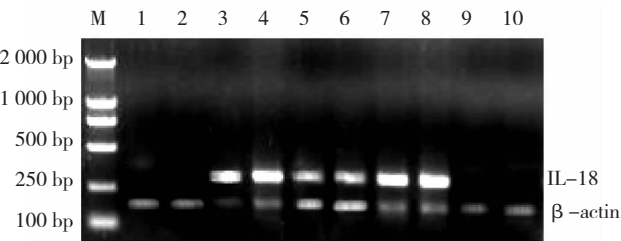


图 1 治疗前后各组 IL-18 mRNA 表达 M: Marker; 1,2: 正常对照组; 3,4: 治疗前 SRNS 组; 5,6: 治疗前 SSNS 组; 7,8: 治疗后 SRNS 组; 9,10: 治疗后 SSNS 组

3 讨论

大量研究发现肾病综合征激素耐药可能与免疫遗传背景的差异有关。近年来, Th1 与 Th2 相互作用及其平衡与 PNS 激素耐药的关系日益受到关注。IL-18 是一种 Th1 类前炎症细胞因子, 主要由激活的单核巨噬细胞产生, 是 IL-1 超家族成员之一。具有强大的诱生 IFN-γ, TNF-α 等的能力, 在介导细胞浸润、炎症反应和组织损伤中起到不可忽视的作用, 是多种免疫性疾病的重要发病因子。在肾脏病领域, 很多学者研究认为 IL-18 主要作为致炎因子而发挥肾脏损伤作用。Edelstein^[4] 研究发现, 急性肾脏损伤时, 尿中 IL-18 水平显著升高, 且早于血清肌酐及尿素氮变化, 认为 IL-18 可作为早期诊断急性肾脏损伤的敏感标志物。Vanholder 等^[5] 认为在慢性肾脏疾病中血清 IL-18 增高明显强烈提示此类透析患者预后不良。还有研究表明, 微小病变型肾病综合征急性期时血清及尿中 IL-18 水平较缓解期增高^[6,7]。有学者利用 IL-18 抗体干预微小病变肾病小鼠, 发现 24 h 后尿蛋白量明显降低, 肾组织学

损伤减轻^[8]。Sugiyama 等^[9] 的研究发现, IL-18 受体缺失型 BSA 诱导的肾小球肾炎小鼠, 较非缺失型肾小球肾炎小鼠其蛋白尿明显减低。以上研究均证实 IL-18 在 PNS 的发病中可能发挥重要作用。本研究发现, 治疗前 SSNS 及 SRNS 24 h 尿蛋白量无明显差异, 推测 PNS 发生时肾小球及肾小管间质内活化的 T 淋巴细胞及单核巨噬细胞分泌的 IL-18 等大量炎性介质破坏了肾小球基底膜机械及电荷屏障, 导致大量蛋白尿。Bakr 等^[10] 的研究显示, SRNS 患儿 PBMC 培养上清液中 TNF-α 产生明显增多, 并认为 TNF-α ≥ 50 μg/L 对激素耐药的预测率为 93.2%; Aviles 等^[11] 研究发现, SRNS 患儿 IL-2 mRNA 表达增加。本研究结果显示, 激素治疗前血清 IL-18 蛋白水平及 PBMC IL-18 mRNA 表达 SRNS 组 > SSNS 组 > 正常对照组; 治疗后, SRNS 组 IL-18 蛋白水平及 PBMC IL-18 mRNA 表达与治疗前无明显变化, 远高于治疗后 SSNS 组。推测可能原因为 SRNS 时 IL-18 明显增高, 一方面直接损伤肾小球基底膜、促进肾小球脏层上皮细胞增生、加速新月体形成^[12]; 另一方面作为上游细胞因子, 可刺激产生大量 TNF-α, IL-2, IFN-γ, VPF 因子等, 这些细胞因子均有较明确的促肾损伤作用^[13,14]; GC 可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^[15], 明显增高的 IL-18 可能会削弱 GC 对这些细胞因子的分泌抑制作用, 从而导致对 GC 治疗不敏感。

此外, Kobayashi^[16] 的研究发现, 利用血浆置换法清除 SRNS 患者血清中 LDL 可增加淋巴细胞摄取糖皮质激素的能力, 从而改善对激素治疗的敏感

性,认为高脂血症可能是导致 SRNS 的重要机制之一。本研究发现与 SSNS 患儿相比,SRNS 血清中 LDL 水平升高明显,与此研究相符。Mitsuoka 等^[17]将凝集素样氧化 LDL 受体-1(LOX-1)的 cDNA 转染至 HEK-293T 细胞中,分别在有/无 IL-18 的条件下培养,发现在 IL-18(10 ~ 100 ng/mL)的刺激下可溶性 LOX-1(sLOX-1)可呈 3 ~ 4 倍增高,其程度与 IL-18 浓度及培养时间正相关。由此推测,SRNS 时明显增高的 IL-18 可刺激 sLOX-1 大量释放,同时血清 LDL 水平相应升高,二者协同作用导致 PNS 激素耐药。

综上,IL-18 在 PNS 激素耐药的发病中发挥重要作用。调节血清 IL-18 水平及表达可能是治疗 SRNS 的潜在途径。以后的研究中我们将进一步扩大 SSNS,SRNS 的研究数量,以期在 PNS 发病早期通过对 IL-18 水平的测定来预测 PNS 激素耐药风险,为早期准确选择治疗方案、防止长期蛋白尿对肾脏的损伤提供新途径。

[参 考 文 献]

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

[2] Tain YL, Chen TY, Yang KD. Implications of serum TNF-beta and IL-13 in the treatment response of childhood nephrotic syndrome[J]. *Cytokine*, 2003, 21(3):155-159.

[3] 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.

[4] Edelstein CL. Biomarkers of acute kidney injury[J]. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2008, 15(3):222-234.

[5] Vanholder R, van Laecke S, Glorieux G. What is new in uremic toxicity[J]. *Pediatr Nephrol*, 2008, 23(8):1211-1221.

[6] Kiliř-Pstrusińska K, Medyńska A, Zwolińska D, Wawro A. Interleukin-18 in urine and serum of children with idiopathic nephrotic syndrome[J]. *Kidney Blood Press Res*, 2008, 31(2):122-126.

[7] 姜红堃,姜红,孙桂莲,罗钢. 小儿类固醇敏感肾病综合征甲泼尼龙冲击治疗对白介素 18 表达的影响[J]. *中国医科大学学报*, 2006, 35(5):527-529.

[8] 陈珊琳,王彩霞,肖林生. 白细胞介素 18 抗体对小鼠微小病变型阿霉素肾病的治疗作用[J]. *中华儿科杂志*, 2007, 45(11):869-870.

[9] Sugiyama M, Kinoshita K, Kishimoto K, Shimazu H, Nozaki Y, Ikoma S, et al. Deletion of IL-18 receptor ameliorates renal injury in bovine serum albumin-induced glomerulonephritis[J]. *Clin Immunol*, 2008, 128(1):103-108.

[10] Bakr A, Shokeir M, El-Chenawi F, El-Husseni F, Abdel-Rahman A, El-Ashry R. Tumor necrosis factor-alpha production from mononuclear cells in nephrotic syndrome[J]. *Pediatr Nephrol*, 2003, 18(6):516-520.

[11] Aviles DH, Matti Vehaskari V, Manning J, Ochoa AC, Zea AH. Decreased expression of T-cell NF-kappa p65 subunit in steroid-resistant nephrotic syndrome[J]. *Kidney Int*, 2004, 66(1):60-67.

[12] Kitching AR, Tipping PG, Kurimoto M, Holdsworth SR. IL-18 has IL-12-independent effects in delayed type hypersensitivity: studies in cell-mediated crescentic glomerulonephritis [J]. *J Immunol*, 2000, 165(8):4649-4657.

[13] Bagga A, Mantan M. Nephrotic syndrome in children[J]. *Indian J Med Res*, 2005, 122(1):13-28.

[14] Pawlak K, Mysliwiec M, Pawlak D. Oxidative stress, phosphate and creatinine levels are independently associated with vascular endothelial growth factor levels in patients with chronic renal failure [J]. *Cytokine*, 2008, 43(1):98-101.

[15] 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.

[16] Kobayashi S. Applications of LDL-apheresis in nephrology[J]. *Clin Exp Nephrol*, 2008, 12(1):9-15.

[17] Mitsuoka H, Kume N, Hayashida K, Inui-Hayashiada A, Aramaki Y, Toyohara M, et al. Interleukin 18 stimulates release of soluble lectin-like oxidized LDL receptor-1(sLOX-1)[J]. *Atherosclerosis*, 2009, 202(1):176-182.

(本文编辑:吉耕中)