

IL-18 及 IL-18 结合蛋白在再生障碍性贫血患者血清的表达及临床意义

熊勤¹

[摘要] 目的:探讨白细胞介素 18(IL-18)及 IL-18 结合蛋白(IL-18BP)在再生障碍性贫血(AA)患者血清的表达及临床意义。方法:采用 ELISA 法检测 25 例 AA 患者(AA 组)和 25 名正常人(对照组)血清 IL-18 及 IL-18BP 水平,实时定量 RT-PCR 方法检测 IL-18 及 IL-18BP 的 mRNA 表达。结果:AA 组血清 IL-18 水平为(363.5±150.5) pg/ml,较对照组(178.6±100.2) pg/ml 明显升高($P<0.01$),重型 AA 患者的 IL-18 水平(442.5±124.1) pg/ml 较慢性 AA 患者的 IL-18 水平(319.2±158.3) pg/ml 提高更加明显($P<0.05$);AA 组血清 IL-18BP 水平(1694.2±516.3) pg/ml 较对照组(1082.6±468.7) pg/ml 明显升高($P<0.05$),IL-18/IL-18BP 比值在 AA 组明显升高($P<0.05$)。RT-PCR 结果证实 AA 组 IL-18 和 IL-18BP 较对照组均明显升高,IL-18/IL-18BP 比值升高。结论:IL-18 及 IL-18BP 与 AA 的发生和发展及其免疫机制异常密切相关,IL-18/IL-18BP 平衡对临床诊治具有重要意义。

[关键词] 白细胞介素 18;白细胞介素 18 结合蛋白;贫血,再生障碍性

[中图分类号] R556 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1004-2806(2013)06-0401-03

Expression and clinical significance of serum IL-18 and IL-18 binding protein in aplastic anemia patients

XIONG Qin

(Hanchuan People's Hospital, Hanchuan, 431600, China)

Corresponding author: XIONG Qin, E-mail: xiongqin@163.com

Abstract Objective: To investigate the expression and clinical significance of serum interleukin-18(IL-18) and IL-18 binding protein (IL-18BP) in aplastic anemia (AA) patients. **Method:** Serum IL-18 and IL-18BP levels of 25 cases of AA patients and 25 healthy people were detected by ELISA, and IL-18 and IL-18BP mRNA expression was detected by real-time quantitative RT-PCR. **Result:** Compared with the normal control group (178.6±100.2) pg/ml, serum IL-18 levels of AA was (363.5±150.5) pg/ml, which was significantly higher ($P<0.01$). The level of IL-18 in patients with severe AA (442.5±124.1) pg/ml was obviously higher than that of chronic AA patients (319.2±158.3) pg/ml. serum IL-18BP of AA (1694.2±516.3) pg/ml was significantly higher than that of normal control group (1082.6±468.7) pg/ml ($P<0.05$). IL-18/IL-18BP ratio was significantly higher in AA patients. RT-PCR results confirmed that IL-18 and IL-18BP of AA patients were significantly increased when comparing with the normal control group, and IL-18/IL-18BP ratio increased. **Conclusion:** IL-18 and IL-18BP might have a close relation to the occurrence and development of AA as well as its immune mechanisms. IL-18/IL-18BP balance might be of important significance for clinical diagnosis and treatment.

Key words interleukin-18; interleukin-18 binding protein; aplastic anemia

研究表明,细胞免疫紊乱可引发造血功能衰竭,Th1 与 Th2 细胞间平衡是维持免疫内环境稳定的重要环节,Th1 过度表达是导致再生障碍性贫血(AA)发生的重要机制,作为 T 细胞炎症介质的强力诱导,IL-18 通过刺激 Th1 反应诱导严重免疫紊乱。白细胞介素 18(IL-18)及其拮抗剂 IL-18 结合蛋白(IL-18BP)在免疫紊乱相关疾病的发生发展中具有重要作用^[1]。在系统性红斑狼疮、风湿性关节炎、免疫性血小板减少性紫癜等疾病患者中已经检测出 IL-18/IL-18BP 在 mRNA 和蛋白表达水平失

衡。本文对 25 例 AA 患者和 25 名正常人血清 IL-18 和 IL-18BP 的蛋白和基因水平进行检测,探讨 AA 的发生发展与 IL-18 及 IL-18BP 的表达水平之间的联系和临床意义。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取 2012-03—2012-09 我院门诊及住院 AA 患者 25 例,中位年龄 35(14~60)岁。其中 12 例为重型 AA 患者,男 6 例,女 6 例;中位年龄 35(14~60)岁;慢性 AA 患者 13 例,男 7 例;女 6 例,中位年龄 34(16~59)岁。选举本院健康体检者 25 例。其中男 15 例,女 10 例;中位年龄 37(15~54)岁,均无血液系统相关疾病史。

¹ 汉川市人民医院(湖北汉川,431600)

通信作者:熊勤,E-mail:xiongqin@163.com

1.2 标本采集

取患者及健康对照者的肝素抗凝静脉血 10 ml, 250 g 离心 10 min, 采用淋巴细胞分离外周血单个核细胞 (PBMNC), 血浆及 PBMNC - 80°C 冻存备用。

1.3 仪器与试剂

IL-18 ELISA 试剂盒为美国 uscnlife 公司产品, IL-18BP ELISA 试剂盒为美国 RD 公司产品; 淋巴细胞分离液为上海试剂公司产品; cDNA 逆转录试剂盒为美国 RD 公司产品; ABI PRISM 7500 荧光定量 PCR 仪为美国 Applied Biosystems 公司产品; SYBRw Green PCR 试剂盒为日本 Toyobo 公司产品。

1.4 RT-PCR 测定

TRIzol 试剂提取 PBMNC 总 RNA。应用 ABI PRISM 7500 荧光定量 PCR 仪, 采用 SYBIw Green 为双链 DNA 特异性染料。反应体系为: 0.5 nmol/L 上下游引物 (表 1), 10 μl SYBRw Green, 0.5 nmol/L cDNA, 总体积为 20 μl。循环参数设定如下: 95°C 5 min, 95°C 15 s, 60°C 15 s (IL-18, β-actin), 62°C 15 s (IL-18BP), 72°C 35 s, 40 个循环。实验重复 3 次, 所有的 PCR 产物均溶解曲线分析以分辨目的产物与非特异性产物以及引物二聚体, 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳证实。

表 1 RT-PCR 引物

基因名称	序列(5'-3')	产物长度 /bp
IL-18	F: GCTTGAATCTAAATTAT-CAGTC R: GAAGATTCAAATTGCAT-CTTAT	341
IL-18BP	F: TGGGAGATGTAGCCGAC-CTT R: GCCCCCGACCCTCTATTT-CA	470
β-actin	F: TTGCCACAGGATGCAG-AA R: GCCCATCCACACGGAGT-ACT	101

注: F 为上游引物, R 为下游引物。

1.5 ELISA 法检测

ELISA 双抗体夹心法检测血浆中 IL-18 及 IL-18BP 的水平。IL-18 ELISA 试剂盒最低检测限度为 15.5 ng/L, IL-18BP 试剂盒最低检测限度为 66 g/L。操作按照试剂盒说明书进行。

1.6 统计学处理

采用统计学软件 SPSS13.0 进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。RT-PCR 的定量结果采用 REST 软件

分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

IL-18 和 IL-18BP 水平与年龄、性别、WBC、HGB、PLT 无显著相关。在患者血清中的表达见表 2。

AA 组 PBMNC 中 IL-18 mRNA 表达水平为对照组的 (4.2 ± 1.5) 倍 (P < 0.05), 且重型 AA 患者的 IL-18 mRNA 水平 (5.3 ± 1.2) 较慢性 AA 患者 (4.5 ± 1.6) 升高更为明显 (P < 0.05)。AA 组 IL-18BP mRNA 的表达较对照组升高 (2.1 ± 1.8) 倍, 差异有统计学意义, 而重型 AA 患者的 IL-18BP mRNA 水平与慢性 AA 患者的差异无统计学意义 (P > 0.05)。

AA 组血浆 IL-18/IL-18BP 比值 (0.25 ± 0.23) 较对照组 (0.12 ± 0.07) 升高, 差异有统计学意义 (P < 0.05), 重型 AA 患者 (0.27 ± 0.28) 与慢性 AA 患者 (0.28 ± 0.15) 相比差异无统计学意义 (P > 0.05)。AA 组 IL-18/IL-18BP mRNA 表达比值 (2.25 ± 1.35) 与对照组 (0.89 ± 0.25) 相比亦明显升高 (P < 0.05)。

表 2 AA 患者血清 IL-18 和 IL-18BP 水平的比较

组别	例数	IL-18	IL-18BP
对照组	25	178.6 ± 100.2	1082.6 ± 468.7
AA 组	25	363.5 ± 150.5 ²⁾	1694.2 ± 516.3 ¹⁾
重型 AA	12	442.5 ± 124.1 ³⁾	1865.2 ± 524.1
慢性 AA	13	319.2 ± 158.3	1645.2 ± 487.6

与对照组比较, ¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01; 与慢性 AA 组比较, ³⁾P < 0.05。

3 讨论

IL-18 是 1996 年正式命名的细胞因子, 主要由单核巨噬细胞产生, 是一种强有力的免疫调节因子, 其结构与 IL-1 相似, 功能与 IL-2 相似, 能诱导 T 细胞、NK 细胞产生 IFN-γ 促进 Th1 细胞因子的大量表达, 参与自身免疫性疾病的产生进程和转归^[2]。IL-18 与 IL-18R 结合, 通过 IL-1 受体相关激酶途径活化肿瘤坏死因子受体相关因子 6 诱导 NF-κB 结合 DNA 信息, 促进 γ 干扰素等 Th1 细胞相关因子的释放而导致 Th1/Th2 失衡的发生。IL-18BP 是最近发现的内源性 IL-18 拮抗剂, 可与 IL-18 呈高亲和力结合, 从而阻断 IL-18 诱导 IFN-γ 的产生及 NF-κB 的活化。而 IFN-γ 本身又可诱导 IL-18BP 水平的提高, 提示可能存在一个内源性的 IFN-γ 的调节反馈环^[3]。IL-18 还可增强 Th1 细胞的 FasL 表达, 增强 FasL 介导细胞毒效应, 促使 T、B 细胞发生凋亡, 而凋亡细胞数量与自身免疫系统疾

(下转第 404 页)

表 1 主要科室的人均红细胞使用量 U

科精通	2011 年	2012 年
心外科	4.6	3.4
血液科	1.5	1.3
骨科	1.5	0.9
肝胆外科	1.9	1.3
胃肠外科	1.2	0.9
妇科	0.4	0.4
神经外科	0.7	0.6
ICU	1.3	0.9
胰腺外科	1.3	1.0
泌尿外科	0.4	0.3

3 讨论

我院制定并执行的临床输血申请分级管理制度是 2012 年起我院建立的众多科学合理用血制度之一,其目的是为了全面节约临床用血。我们从观念上对临床科室进行科学合理用血的宣传和培训,更新输血知识,摒弃旧的输血观念^[2];建立临床用血分级管理审核制度,严格掌握输血指征从源头上对临床进行规范,让有限的血液资源用在最需要的患者身上。同时,我院积极开展多种方式的自体血回输^[3]。用血量总量排名第一的心外科,是我省最大的心血管疾病外科治疗中心,每年有 500 余台心脏手术应用回收式自体输血,2012 年半年人均红细胞输注量较之去年同期下降了 26.7%。另外我院

(上接第 402 页)

病活动性相关,因而 IL-18 在免疫系统和疾病的自我调节过程中具有重要作用。IL-18 及 IL-18/IL-18BP 复合体的局部水平在决定 IL-18 的生物活性方面有重要作用。AA 患者造血功能衰竭的发生、发展与免疫机制特别是细胞免疫机制关系密切,IL-18 作为 T 细胞炎症介质的强力诱导者通过刺激 Th1 反应和诱导免疫紊乱,参与免疫性疾病的产生。我们分析了 AA 患者血清 IL-18 水平及 PBMNC 中 IL-18 基因的表达,结果显示重型 AA 组 IL-18 表达显著高于对照组和慢性 AA 组。IL-18BP 水平在 AA 患者急性期虽有升高,但轻度升高的 IL-18BP 不能完全结合升高的 IL-18 表达,IL-18/IL-18BP 比值明显失衡,导致 AA 疾病进展^[4]。部分 AA 患者经治疗缓解后 IL-18 水平下降、IL-18BP 水平升高、IL-18/IL-18BP 比值明显下降,推测经有效治疗后 IL-18BP 的表达升高,从而抑制 IL-18 等 Th1 细胞因子的转录而对其表达进行调控,从而降低 IL-18 等 Th1 细胞因子水平,缓解了由 IL-18 水平增高导致的 IL-18/IL-18BP 失衡,降低了其在 AA 过程中的致炎作用^[5]。

IL-18/IL-18BP 比值失衡是 AA 重要病理过

是湖北省微创外科医学临床研究中心的挂靠单位,微创手术占整体手术量的 23.6%。用血总量较大的骨科,2012 年上半年人均红细胞使用量较之 2011 年大幅下降了 40.4%,为全院人均红细胞用量降幅最大的科室。内科方面,我院血液内科是国家临床重点专科,为华中地区最大的综合性血液疾病诊疗中心之一,在保证一般治疗的情况下严格把握输血指征,2012 年上半年出院人数较 2011 年同期增长了 49%的情况下,人均红细胞使用量下降了 17.5%。

在血液供应紧张时期,制定并执行临床科学合理用血管理制度,在保证满足患者急救用血的情况下,科学安排患者的一般治疗及手术用血,在一定程度上缓解了医院临床用血的紧张,同时节约了稀缺的血液资源,而且促进了临床科学合理用血的发展。

参考文献

- [1] 陈雪. 循证输血医学的实践[J]. 国际输血及血液学杂志, 2010, 33(5): 456-458.
- [2] 纪光伟, 杨春. 成分输血与外科临床[J]. 中华外科杂志, 2008, 46(1): 7-8.
- [3] 刘铜军, 于惠秋. 临床输血技术的进步与无血外科手术[J]. 中华胃肠外科杂志, 2011, 14(3): 222-223.

(收稿日期: 2012-12-02)

程, 重塑 IL-18/IL-18BP 平衡可有效拮抗 IL-18 的致炎作用, 有效延缓 AA 患者的病程进展。对 AA 患者 IL-18/IL-18BP 比值进行分析有助于研究 AA 的发病机制, 对临床诊治具有积极指导意义。

参考文献

- [1] BRODSKY R A, JONES R J. Aplastic anaemia[J]. Lancet, 2005, 365: 1647-1656.
- [2] SHAO Z, CHU Y, ZHANG Y, et al. Treatment of severe aplastic anemia with an immunosuppressive agent plus recombinant human granulocytemacrophage colony stimulating factor and erythropoietin[J]. Am J Hematol, 1998, 59: 185-191.
- [3] 和虹, 邵宗鸿. 再生障碍性贫血患者的 T 淋巴细胞研究进展[J]. 中华血液学杂志, 1999, 20(10): 553-555.
- [4] TUCCI M, QUATRARO C, LOMBARDI L, et al. Glomerular accumulation of plasmacytoid dendritic cells in active lupus nephritis: role of interleukin-18[J]. Arthritis Rheum, 2007, 58: 251-262.
- [5] NOVICK D, KIM SH, FANTUZZI G, et al. Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response[J]. Immunity, 1999, 10: 127-136.

(收稿日期: 2012-10-13)