

原发性肾病综合征模型小鼠 IL-18 水平表达的研究

匡颖

作者单位:550002 贵阳市,贵州省人民医院中心实验室

【摘要】 目的 探讨白细胞介素-18 (interleukin-18, IL-18) 在微小病变型肾病综合征(minimal change nephropathy, MCN)模型小鼠免疫失调过程中的作用。**方法** 采用阿霉素单次尾静脉注射昆明种小鼠,诱导形成 MCN 模型,设置生理盐水对照组进行比较。测定两组小鼠第 1、2、4、6 周各时期 24 小时尿蛋白量(24 hours urinary protein quantity, 24 HUPQ)水平;于第 42 天检测两组小鼠血清总蛋白(total protein, TP)、白蛋白(albumin, ALB)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、肌酐(creatinine, Cr)、甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)的含量;并采用 ELISA 法检测两组小鼠血清、肾组织匀浆上清、脾淋巴细胞培养液上清 IL-18、INF- γ 、TNF- α 及 IL-4 水平。**结果** 模型组小鼠第 2、4、6 周 24 HUPQ 值均显著高于对照组,且差异均有统计学意义(P 均 <0.01)。模型组的 TP、ALB 水平较对照组均显著降低,TC、TG 水平均显著升高,且差异均有统计学意义(P 均 <0.01),而 BUN、Cr 水平两组间差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。模型组小鼠血清、肾组织匀浆上清、脾淋巴细胞培养液上清 IL-18 水平、INF- γ 和 TNF- α 的水平均显著高于对照组,而 IL-4 的水平则低于对照组,且差异均有统计学意义(P 均 <0.01)。**结论** IL-18 是参与小鼠 MCN 发病过程中重要的免疫因子。

【关键词】 微小病变型肾病;阿霉素;白细胞介素-18

The investigation on the level of interleukin-18 in mice model with minimal change nephropathy

KUANG Ying. The Central Laboratory, the People's Hospital of Guizhou Province, Guiyang 550002, China

【Abstract】 Objective To discuss the effect of interleukin-18(IL-18) in immune function disturbance of mice model with minimal change nephropathy (MCN). **Methods** MCN models were induced in Kunming type mice by injected adriamycin through tail vein, at the same time, saline solution was given to other mice in control group. The levels of 24 hours urinary protein quantity (24 HUPQ) in the 1st, 2nd, 4th, 6th weeks were detected. At around 42nd day, the levels of total protein(TP), albumin(ALB), blood urea nitrogen(BUN), creatinine (Cr), triglyceride(TG), total cholesterol(TC) were detected. At the same time, the levels of IL-18, INF- γ , TNF- α and IL-4 of the serum, kidney tissue homogenate supernatant and splenic lymphocyte culture fluid supernatant were detected by ELISA method. **Results** The levels of 24 HUPQ in 2, 4, 6 weeks in model group were higher than in control group and the differences all had statistical significance (P all <0.01). The results of serum TP, ALB in model group were lower than in control group, while the levels of TC, TG were higher than in control group and the differences all had statistical significance (P all <0.01). There were no statistical significance in the differences of the levels of Cr and BUN between the two groups (P all >0.05). The levels of IL-18, INF- γ , TNF- α in serum, kidney tissue homogenate supernatant and splenic lymphocyte culture fluid supernatant in model group were all higher than in control group, while the IL-4 levels were opposite and the differences all had statistical significance(P all <0.01). **Conclusion** IL-18 is the important immune factor in the development of MCN.

【Key words】 Minimal change nephropathy; Adriamycin; Interleukin-18

研究^[1]显示,细胞免疫反应、T 细胞激活以及肾间质炎症反应是肾病综合征(nephrotic syndrome, NS)发病的重要特征。多种血清活性成分,包括多种免疫活性细胞源性细胞因子,可能直接造成肾小球

损伤,是诱发临床大量蛋白尿的重要因素。IL-18 是一种重要的免疫调节因子,不仅参与先天性或特异性免疫调节,且与机体非免疫性预防机制以及炎症过程密切相关,在自身免疫性疾病的发病过程中具

有重要意义。本文研究以阿霉素(adriamycin, ADR)诱导肾病小鼠为实验模型^[2],观察微小病变型肾病综合征(minimal change nephropathy, MCN)小鼠 IL-18 水平的变化,研究其在 NS 发病中的生物学意义,同时为 NS 的治疗提供新的靶分子和新的研究方向。

1 材料与方法

1.1 MCN 模型小鼠的建立 选择雄性昆明种小鼠 36 只,体重 18~20 g,年龄 3~4 w。随机分为模型组 16 只,对照组 20 只。单次应用 ADR 溶液以 7.5 mg/kg 的剂量于尾静脉内注射模型组小鼠,对照组小鼠尾静脉内注射等容积生理盐水。观察小鼠生长情况 6 w,动态监测 24 小时尿蛋白量(24 hours urinary protein quantity, 24 HUPQ)及其他生化指标。

1.2 动态尿蛋白定性、定量检测 两组小鼠均于第 1、2、4、6 各周采集 24 h 尿液,动态监测各期 24 HUPQ。磺基水杨酸比浊法尿蛋白定性,显示模型组小鼠自第 3 周起均出现蛋白尿(++~+++);对照组均为(-)。以双缩脲比色法测定第 1、2、4、6 周各期两组小鼠 24 HUPQ。

1.3 模型组小鼠肾功能生化指标的检测 实验第 42 天,心脏采血法获取血清后,采用 Backman CK-7 型多功能全自动生化仪分别检测小鼠血清总蛋白(total protein, TP)、白蛋白(albumin, ALB)、肌酐(creatinine, Cr)、血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)及总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)含量。

1.4 肾组织匀浆的制备 实验第 42 天,小鼠心脏采血获取血清后,用 10%水合氯醛按 0.3 ml/100 g 体重剂量进行腹腔注射麻醉,剪去左背侧被毛,局部消毒,于背旁正中 1 cm 处纵切口,暴露单侧肾脏,钝性分离脂肪囊及肾包膜,去除脂肪囊及肾包膜,称重约 100 mg,加入 0.5 ml PBS 于冰浴下制作匀浆,以离心半径 6 cm,3000 r/min 离心 5 min,取 0.3 ml 上清,置于 -20 ℃冷藏备检细胞因子。

1.5 脾细胞的体外培养 两组小鼠饲养第 42 天时,采用心脏取血法处死,无菌取出脾脏,用眼科剪剪成 1 mm³ 的小块,用 0.25%的胰酶消化制备成单细胞悬液。之后用无菌水除去红细胞,以淋巴细胞培

养液(RPMI-1640, 每 100 ml 含 50 U 青霉素和 50 μg 链霉素, 2.5 mmol HEPES, 10 ml 小牛血清)调整脾细胞浓度至 1×10⁶/mL,加入 5 μg/mL ConA 作为刺激物,在 5% CO₂, 37 ℃的环境下,诱导 48 h 及 72 h,收集上清,用于细胞因子的检测。

1.6 细胞因子的检测 ELISA 法检测小鼠血清、肾组织匀浆上清、脾淋巴细胞培养液上清 IL-18 及 IL-4、INF-γ、TNF-α 含量。

1.7 统计学处理 实验数据采用 SPSS 12.0 统计软件进行处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数的比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组间 24 HUPQ 动态监测结果比较 结果显示,从注射 ADR 第 2 周起,模型组 24 HUPQ 各时段值均显著高于对照组,差异均有统计学意义(*P* 均 < 0.01),如表 1 所示。

表 1 两组小鼠 24 HUPQ 动态监测结果比较($\bar{x} \pm s$, mg)

组别	例数	0 d	2 w	4 w	6 w
对照组	20	3.04±0.12	3.00±0.16	3.13±0.22	3.03±0.15
模型组	16	3.01±0.20	8.97±2.85*	34.48±3.99*	30.46±2.65*

注: * 与对照组比较, *P* < 0.01

2.2 两组小鼠血清生化指标比较 由表 2 可见,与对照组相比,模型组小鼠的 TP、ALB 均显著降低且差异均有统计学意义(*P* 均 < 0.01);同时,模型组小鼠的 TG、TC 显著高于对照组且差异均有统计学意义(*P* 均 < 0.01)。两组间 Cr、BUN 两指标差异无统计学意义(*P* 均 > 0.05)。

2.3 两组小鼠间血清、肾组织匀浆上清、脾淋巴细胞培养液上清各细胞因子水平比较 模型组小鼠血清、肾组织匀浆上清、脾淋巴细胞培养液上清中 IL-18、INF-γ、TNF-α 水平均高于对照组,且差异均有统计学意义(*P* 均 < 0.01),而模型组各组织中 IL-4 低于对照组,且差异均有统计学意义(*P* 均 < 0.01)。见表 3~6。

3 讨论

研究^[3,4]证实,MCN 的主要发病机制是免疫性炎症介导的病理损伤,包括全身性自身免疫性疾病所致的肾脏病变和肾脏本身特发性免疫损伤。T 细胞

表 2 两组小鼠血清生化指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TP (g/L)	ALB (g/L)	BUN (mmol/L)	Cr (μmol/L)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)
对照组	20	57.61±1.79	30.09±4.28	6.91±0.26	17.24±1.22	0.71±0.03	2.92±0.07
模型组	16	32.92±1.74*	16.00±0.89*	7.01±0.72	16.97±1.03	3.31±0.30*	6.51±0.23*

注: * 与对照组比较, *P* < 0.01

表 3 两组小鼠血清 IL-18、IL-4、INF- γ 、TNF- α 水平比较($\bar{x}\pm s$, pg/mL)

组别	例数	IL-18	IL-4	INF- γ	TNF- α
对照组	20	414.20 $\pm$ 48.46	35.15 $\pm$ 6.27	81.30 $\pm$ 1.61	28.86 $\pm$ 1.51
模型组	16	1036.81 $\pm$ 91.03*	9.93 $\pm$ 2.87*	130.97 $\pm$ 2.38*	61.59 $\pm$ 1.74*

注: * 与对照组比较, $P < 0.01$

表 4 两组小鼠肾组织匀浆上清 IL-18、IL-4、INF- γ 、TNF- α 水平比较($\bar{x}\pm s$, pg/mL)

组别	例数	IL-18	IL-4	INF- γ	TNF- α
对照组	20	528.37 $\pm$ 45.65	54.73 $\pm$ 6.78	178.64 $\pm$ 9.92	61.23 $\pm$ 3.56
模型组	16	1384.68 $\pm$ 88.64*	15.89 $\pm$ 2.51*	285.36 $\pm$ 11.32*	148.76 $\pm$ 4.87*

注: * 与对照组比较, $P < 0.01$

表 5 两组小鼠脾淋巴细胞 48 h 培养液上清 IL-18、IL-4、INF- γ 、TNF- α 水平比较($\bar{x}\pm s$, pg/mL)

组别	例数	IL-18	IL-4	INF- γ	TNF- α
对照组	20	678.91 $\pm$ 25.31	68.54 $\pm$ 7.15	231.35 $\pm$ 7.75	91.24 $\pm$ 5.64
模型组	16	1722.38 $\pm$ 88.64*	26.71 $\pm$ 2.88*	735.86 $\pm$ 14.32*	385.44 $\pm$ 15.32*

注: * 与对照组比较, $P < 0.01$

表 6 两组小鼠脾淋巴细胞 72 h 培养液上清 IL-18、IL-4、INF- γ 、TNF- α 水平比较($\bar{x}\pm s$, pg/mL)

组别	例数	IL-18	IL-4	INF- γ	TNF- α
对照组	20	821.33 $\pm$ 15.89	65.27 $\pm$ 12.35	357.48 $\pm$ 4.68	125.36 $\pm$ 9.87
模型组	16	2015.29 $\pm$ 66.83*	32.54 $\pm$ 4.56*	918.35 $\pm$ 14.32*	436.28 $\pm$ 22.21*

注: * 与对照组比较, $P < 0.01$

功能紊乱与 NS 关系密切, 各种原发和继发肾小球疾病都存在着 Th1/Th2 失衡情况。MCN 病程中, IL-18 既可诱导 Th1 型免疫反应, 还参与调节 Th2 型反应, 具有极为重要的生物学意义。

本实验以 7.5 mg/kg 体重 ADR 尾静脉注射昆明种小鼠。注药后 2 w 时出现明显蛋白尿, 4 w 左右达高峰, 伴明显低蛋白血症、高胆固醇血症及胸、腹腔积液, 提示 MCN 小鼠模型建立成功。

研究结果显示, 模型组小鼠血清中 IL-18 水平及 INF- γ 、TNF- α 的含量明显高于注射生理盐水的对照组, 尤其肾组织匀浆上清、经 ConA 刺激增殖的脾淋巴细胞培养液上清中 IL-18 表达水平更为灵敏, 说明在疾病的活动期伴有高水平的 IL-18 的释放。相反, Th2 型细胞因子 IL-4 的表达量受抑制, 说明 Th1 和 Th2 型反应是相互拮抗的, IL-18 在促进 Th1 型细胞因子的释放时, 抑制 Th2 型因子产生。而 Th1/Th2 的免疫失衡, 导致肾脏免疫损伤。其机制^[9]可能是: ① IL-18 通过增加 IL-2R 的表达而促进 Th1 细胞的形成、诱导 Th1 细胞产生 INF- γ ; ② 能促进 IL-1 和 GM-CSF 产生; ③ 增强 NK 细胞的活性, 促进其释放穿孔素, 发挥杀伤作用; ④ 表达 Fas 配体, 增强 FasL 介导的细胞毒性; ⑤ 诱导 TNF- α 和多

种趋化因子的基因表达与蛋白质合成; ⑥ 同时抑制 Th2 类细胞因子的生成。

综上所述, 通过建立 MCN 小鼠模型, 多重比对在血清、肾组织匀浆上清及脾淋巴细胞培养液上清中 IL-18 的释放水平, 证实 IL-18 在 MCN 肾损伤免疫病程中起重要作用。随着免疫治疗技术的发展, 可以设想通过阻断 IL-18 的生成或拮抗其作用, 减少 IL-18 所致的多种促炎性细胞因子和凋亡相关因子的产生, 减轻对肾脏的损伤作用, 临床应用前景将无比广阔。

4 参考文献

1 Kohno K, Kataoka J, Ohtsuki T, et al. IFN- γ inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. J Immunol, 1997, 158:1541-1550.

2 YAO Hang-ping, ZHANG Li-hang, LENG Jian-hang, et al. Effect of recombinant Adenovirus-mediated Interleukin-18 gene transfection on immune response of peritoneal macrophages in mice. Journal of Zhejiang University(Medical Sciences), 2001, 30:248-251.

3 Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, et al. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cell, Th1 cells and B cells synergism with IL-18 for IFN- γ production. J Immunol, 1998, 161:3400-3407.

4 Smeltz RB, Chen J, Hu-Li J, et al. Regulation of interleukin (IL)-18 receptor alpha chain expression on CD4 (+) T cells during T helper Th1/Th2 differentiation. Critical down regulatory role of IL 24. J Exp Med, 2001, 194: 143-153.

5 Dayer JM. Interleukin-18, rheumatoid arthritis, and tissue destruction. J Clin Invest, 1999, 104: 1393-1401.

(收稿日期: 2011-03-09)

(本文编辑: 陈淑莲)

消 息

2011 北京第四届分子诊断大会暨展览会

由中国医药生物技术协会和国家外国专家局国外人才信息研究中心主办, 百奥泰国际会议(大连)有限公司承办的 2011 第四届分子诊断大会暨展览会将于 2011 年 9 月 22-24 日在北京国际会议中心隆重举行, 本届大会的主题是“走出症状诊断的误区”。

分子诊断大会暨展览会是国际性的专业盛会, 已经在我国上海、北京等地成功举办了三届, 均取得了圆满成功。邀请了来自世界 30 多个国家和地区的 1000 多名专家和企业家协会, 世界著名的试剂及仪器设备企业参展, 探讨交流分子诊断领域的前沿技术, 引领行业发展趋势。

2011 年第四届分子诊断暨展览会将邀请来自国内外著名公司的企业家、各大院校、医院、疾病控制中心、临床研究中心等机构的著名专家学者、行业组织领导人等专业人士参加会议并作精彩报告。丰富的会议日程将使与会同仁在良好的科技氛围中共同探讨对疾病预防、诊断和治疗方面的最新进展以及全球分子诊断技术市场的发展战略和最新趋势。大会内容将包括分子诊断前沿技术、肿瘤检测、传染病监测、其他重大疾病检测等几十个议题。

目前, 大会正在征集中国国内演讲人、会议论文、学术海报、展览商及赞助商。在此, 我们诚挚地欢迎您出席本届大会。通过面对面的交流, 您将获得最新资讯, 找到新的合作伙伴, 发现新的思路, 推动我国在该领域的发展。

1 联系人及联系方式

联系人: 孙丽 于海宁

电话: 0411-39674209; 39674209

传真: 0411-84796897; 84796897

E-mail: lilysun@bitconferences.com; calin@bitlifesciences.com

com

2 企业展览时间

展览时间: 2011 年 9 月 22-24 日 09:00-17:00

3 企业展览地点

展览地点: 北京国际会议中心(北京市朝阳区北四环中路 8 号)

4 企业展览范围

1) 常用试剂盒 核酸类诊断试剂盒、生化类诊断试剂盒、免疫类诊断试剂盒、ELISA 试剂、ELISPOT 试剂、RID 试剂、免疫组化试剂、western blot 试剂等;

2) 分子生物学检验试剂 分子诊断试剂(盒)、PCR 试剂(盒)、人类基因检测类试剂、生物芯片试剂等;

3) 其它检验试剂(盒) 组织细胞学检验试剂、变态反应诊断、遗传性疾病检验试剂等;

4) 临床血液学和体液学检验试剂 传染病免疫学诊断试剂、肿瘤标志物类试剂、细胞免疫检验测定试剂、激素类等;

5) 临床免疫学检验试剂 传染病免疫学诊断试剂、肿瘤标志物类试剂、细胞免疫检验测定试剂、激素类等;

6) 诊断仪器和设备 生化仪器、免疫仪器、微生物仪器、分子生物学仪器、PCR 仪器、血液分析系统、细菌分析系统、血气分析系统等;

7) 抗体、抗原及相关 抗体、第二抗体、抗体制备和纯化、抗体标记和纯化、抗体相关、抗原等;

8) 诊断用酶及小分子标记物 诊断用酶、小分子标记物等;

9) 相关产品 实验耗材、抗原抗体及标记物、生物技术应用、软件产品、专业期刊、出版物、光盘及杂志等;

10) 项目对接 欲在国内外寻求技术和产业合作的企业及个人项目展示、中小企业新技术和新产品信息介绍、招商信息, 我国政府招商团对本地创业环境及优惠政策的推介、医药孵化器和产业基地代表团项目联展、专利展览及招商引资等。

5 企业展览服务(会议提供如下服务)

①展台一个(展位规格为 3 m×3 m, 隔断半封闭隔音设计, 提供企业中英文名称肩板、洽谈桌一个、椅子 2 把、垃圾桶 1 个, 220 V 电源 1 个); ②赠送一张参会 A 票; ③在会议网站上链接参展公司 LOGO; ④在会议网站放置 200 字左右的企业介绍(中英对照)及联系方式; ⑤赠送会刊彩色插页广告一页; ⑥会后发放参展企业和参会人员通讯录。