

非透析终末期尿毒症患者血清对外周血单个核细胞 IL-18 分泌的影响

侯 静, 刘 进, 李 莹(四川省泸州医学院附属医院肾内科 646000)

【摘要】 目的 探讨非透析终末期尿毒症(ESRD)患者混合血清及不同分子质量血清对外周血单个核细胞(PBMCs)、白细胞介素 18(IL-18)分泌的影响。**方法** 分离非透析 ESRD 患者混合血清,采用超滤离心装置分离非透析 ESRD 患者不同分子质量血清,同时用 Ficoll 密度梯度离心分离 14 例非透析 ESRD 患者 PBMCs,将非透析 ESRD 患者不同分子质量的血清与非透析 ESRD 患者 PBMCs,共同培养 72 h,用酶联免疫吸附分析(ELISA)检测试验对象的血清和培养上清液中 IL-18 浓度。**结果** (1)非透析 ESRD 患者外周血 IL-18 含量显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.001$);(2)非透析 ESRD 患者大分子质量血清刺激同源 PBMCs 分泌 IL-18 较高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 分子质量大于 10 000 U 的尿毒症毒素是刺激 PBMCs 引起 IL-18 分泌增加的主要毒素,提示大分子质量尿毒症毒素可能是导致非透析 ESRD 患者微炎症反应状态的独立危险因素。

【关键词】 尿毒症血清; 外周血单个核细胞; 白细胞介素 18

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.20.026

中图分类号:R446.11;R586

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2010)20-2226-02

Effects of ESRD non-dialysed patients' serum on secretion of IL-18 in peripheral blood mononuclear cells HOU Jing, LIU Jin, LI Ying. Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of different molecular weight serum of end stage renal disease (ESRD) non-dialysed patients on the production of IL-18 in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). **Methods** PBMCs from 14 ESRD non-dialysed patients were isolated by the density gradient centrifugation and cultured with different molecular weight sera from uremic patients for 72 h. The levels of IL-18 in serum and supernatant were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** (1) Serum IL-18 level in ESRD non-dialysed patients was significantly higher than that of the controls [$(564.74 \pm 285.19) \text{ pg/mL}$ vs $(100.40 \pm 73.20) \text{ pg/mL}$, $P < 0.001$]; (2) After incubation with different molecular weight of uremic serum, the secretion of IL-18 in PBMCs was significantly higher in molecular weight $> 10\,000 \text{ D}$ group ($P < 0.05$). **Conclusion** The uremic toxin with molecular weight $> 100\,000 \text{ D}$ is the main toxin to promote the production of IL-18 in PBMCs, which may be an independent risk factor of ESRD non-dialysed patients' microinflammatory state.

【Key words】 uremic serum; PBMCs; IL-18

白细胞介素 18 (Interleukin18, IL-18) 是一种主要由单核巨噬细胞产生的促炎细胞因子,可诱导 Th1 细胞和 NK 细胞产生大量干扰素($\text{IFN-}\gamma$),促进多种炎症反应细胞因子和细胞毒效应因子的产生^[1],加重炎症反应状态和组织器官损伤。国内外的研究表明,未行血液透析(HD)的慢性肾衰竭(CRF)患者血浆 IL-18 水平及外周血单个核细胞(PBMCs)IL-18 mRNA 表达量均较健康人显著增高,同时尿毒症患者 PBMCs 是预活化的,尿毒症血清可刺激 PBMCs、IL-18 的分泌^[2-4]。到底何种尿毒症毒素刺激 PBMCs、IL-18 的分泌尚未明确。本研究借鉴国外 Rampino 等^[5]混合培养的方法,选择非透析终末期尿毒症(ESRD)患者不同分子质量尿毒素血清作为干预因素,体外培养观察其对 PBMCs 分泌 IL-18 水平的影响,从而为有效清除相关尿毒症毒素,改善 ESRD 患者的炎症反应状态,减少并发症发生提供一种治疗思路。

1 材料与方

1.1 材料 RPMI-1640 培养基为 Hyclone 公司产品;小牛血清(FCS)为杭州四季青生物材料工程有限公司产品;IL-18 ELISA 试剂盒购于日本 MBL 公司。

1.2 病例选择 健康对照组 14 例,男 8 例,女 6 例,年龄 20~57 岁,平均 (37.40 ± 10.25) 岁,均为本院健康体检者。非透析

ESRD 患者 14 例,男 9 例,女 5 例,年龄 21~56 岁,平均 (37.47 ± 10.41) 岁,选自本院肾内科住院患者。病因均为慢性肾小球肾炎患者,并排除由糖尿病、高血压、多囊肾等继发性疾病引起的肾病。所有病例均符合终末期肾病的诊断标准,血清肌酐(Scr) $> 707 \mu\text{mol/L}$ 。试验前未行替代治疗,并排除感染、肝功能异常、近 3 月输血或注射促红细胞生成素等患者。

1.3 血清制备 常规抽取 14 例健康人及 14 例非透析 ESRD 患者清晨空腹静脉血 2 mL,分离血清,无菌条件下分别混匀、灭活,于 -20°C 保存。另取部分 ESRD 患者血清混匀后用 5 000 和 10 000 相对分子质量的超滤离心装置分离成 3 个组分: $< 5\,000$ 组、 $5\,000 \sim 10\,000$ 组、 $> 10\,000$ 组,用于试验。

1.4 PBMCs 的分离与培养 和不同血清成分对其分泌 IL-18 的影响 (1)空腹采静脉血 8 mL,肝素抗凝,采用 Ficoll 密度梯度离心获取外周血单个核细胞及 RPIM-1640 重悬细胞,使其最终浓度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$,0.4% 台盼蓝染液,染色作活细胞率鉴定(活细胞大于 95%)。(2)取细胞悬液 0.9 mL 与按下列分组不同血清 0.1 mL 加入 24 孔培养板中, 37°C 、5% CO_2 孵育 72 h。A 组:非透析 ESRD 患者 PBMCs+非透析 ESRD 患者小于 5 000 D 血清;B 组:非透析 ESRD 患者 PBMCs+非透析 ESRD 患者 5 000~10 000 D 血清;C 组:非透析 ESRD 患者

PBMCs+非透析 ESRD 患者大于 10 000 D 血清。72 h 后离心收集培养上清液,于-70 ℃下储存。使用 ELISA 法行 IL-18 水平检测(IL-18 ELISA 定量试剂盒灵敏度为 12.5 pg/mL,严格按试剂盒说明书操作)。各组 PBMCs 培养上清液测得 IL-18 水平减去相应的刺激血清测得 IL-18 水平后所得的值,即为各组 PBMCs 培养 72 h 后实际分泌的 IL-18 水平。

1.5 统计学方法 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析。根据资料特征,方差齐性用 *t* 检验,方差不齐则采用 *t'* 检验。分析变量间的关系用单因素相关分析。

2 结 果

2.1 健康对照组和非透析 ESRD 患者外周血清 IL-18 水平比较 非透析 ESRD 患者外周血清 IL-18 为(564.74±285.19) pg/mL,较健康对照组(100.40±73.20)pg/mL 明显升高,见表 1。

表 1 健康对照组和非透析 ESRD 组血清 IL-18 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	IL-18 水平(pg/mL)
健康对照组	14	100.40±73.20
非透析 ESRD 组	14	564.74±285.19*

注:与健康组比较,**P*<0.001。

2.2 非透析 ESRD 患者不同分子质量血清对非透析 ESRD 患者 PBMCs 分泌 IL-18 水平的影响 相对分子质量小于 5 000 血清组刺激 PBMCs 分泌 IL-18 最低,而 5 000~10 000 血清组和大于 10 000 血清组刺激 PBMCs 分泌 IL-18 较高,以相对分子质量大于 10 000 血清组最高。

3 讨 论

1995 年日本学者 Okamura 等^[6]首次从灭活痤疮丙酸杆菌(propionibacterium acnes)中毒性休克的小鼠肝脏中发现一种由应激诱生的蛋白,这种细胞因子可诱导 Th1 细胞和自然杀伤细胞(natural killer,NK)产生干扰素 γ (IFN- γ),曾被称为 IFN- γ 诱生因子(Interferon gamma inducing factor,IGIF),1996 年正式命名为 IL-18。本文结果发现,健康人体含有一定量的 IL-18,而尿毒症患者血清中的 IL-18 水平较健康人明显增高,与陈婷等^[4]研究结果一致。研究已发现,IL-18 在缺血再灌注(I/R)、同种异体移植排斥、感染、自身免疫状态以及恶性肿瘤^[7]等众多肾脏疾病过程中扮演重要角色。过量的 IL-18 可引起免疫功能紊乱、加重炎性反应,与尿毒症患者急慢性并发症如发热、贫血、营养不良、心血管疾病、淀粉样变性可能有关。有效降低血浆中 IL-18 的水平,可能降低 ESRD 患者的各类并发症,改善生活质量,延长患者寿命。

非透析 ESRD 患者血清中到底何种分子质量尿毒症毒素刺激自体 PBMCs 分泌 IL-18 的作用最强,尚不明确。尿毒症毒素种类繁多,目前约有 200 种以上,按其生化特性及在透析中的性状可分为 3 大类:小分子、中分子、大分子毒性物质^[8]。本研究将非透析 ESRD 患者的血清使用超滤离心装置分离为:<5 000、5 000~10 000、>10 000 3 个不同组分的血清,分别和非透析 ESRD 患者 PBMCs 混合培养,结果使用单因素方差分析,在非透析 ESRD 患者不同分子质量血清刺激下,大分子质量尿毒症毒素较中、小分子质量尿毒症毒素血清刺激 PBMCs 分泌 IL-18 的作用更强。提示在临床工作中促进大分子尿毒症毒素的清除,有助于减轻对 PBMCs 的刺激,减少 IL-18 的分泌,从而有效控制并发症发生。目前尚没有非常有效的清除大分子尿毒症毒素的方法^[9-10]。新近开发的生物相容性较

好的吸附剂如 BetaSorbTM,能吸附 β_2 -微球蛋白和细胞因子;高通量透析(High-Flux)及联机血液透析滤过(On-Line-HDF)对中、大分子物质清除率较高,大大地改善了尿毒症患者的生活质量及远期预后,但因其清除毒素的效率低于毒素在体内增长速度,仍有大量毒素在体内蓄积,远期并发症发生率仍然高;生物人工肾即肾小管辅助设施(Renal tubule assist device,RAD),是将经细胞工程处理过的人 109 肾小管上皮细胞植入空心纤维透析器内并令其单层生长于纤维内膜表面,这些小管上皮细胞具有一定转运、内分泌、代谢功能,故可同时模拟人体肾小球和肾小管功能,但该技术条件要求高、耗资巨大、商业化大规模生产受限制,目前难以推广。

总之,有效清除尿毒症毒素,尤其有效促进中、大分子毒素的清除,以减轻患者的微炎性反应状态,减少近期和远期并发症,提高患者长期存活率,是临床医生今后应该进一步研究的课题。

参考文献

[1] Puren AJ,Fantuzzi G,Gu Y,et al. Interleukin-18 and IL-1 beta via TNFalpha production from non-CD14⁺ human blood mononuclear cells[J]. J Clin Invest,1998,101(3): 711-721.

[2] 许勇芝,唐德燊,梁东,等. 慢性肾衰患者外周血 IL-18 mRNA 表达及血液透析对其表达的影响[J]. 上海免疫学杂志,2003,23(1):56-58.

[3] Uchimura T,Motomiya Y,Okamura H,et al. Marked increases in macrophage colony - stimulating factor and interleukin - 18 in maintenance hemodialysis patients ;compara tive study of advanced glycation end products[J]. Carboxymethyl Pentosidine Nephron,2002,90(4): 401-407.

[4] 陈婷,陈孝文,唐德燊,等. 尿毒症血清对外周血单个核细胞 IL-18 表达及分泌水平的影响[J]. 中国中西医结合杂志 2003,4(11):629-632.

[5] Rampino T,Libetta C,De-Simone W,et al. Hemodialysis stimulates hepatocyte growth factor release[J]. Kidney Int,1998,53(5):1382-1388.

[6] Okamura H,Tsutsui H,Komatsu T,et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN gamma production by T cells[J]. Nature,1995,378(6552):88-91.

[7] Leung BP,Culshaw S,Gracie JA,et al. A role for IL-18 in neutrophil activation [J]. J Immunol,2001,167: 2879-2886.

[8] 叶任高. 内科学[M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社,2004: 542-551.

[9] Beerenhout CH,Luik AJ,Jeuken-Mertens SG,et al. Pre-dilution on-line hemofiltration vs low-flux hemodialysis;a randomized prospective study [J]. Nephrol Dial Transplant,2005,20(6):1155-1163.

[10] Van Tellingen A,Schalkwijk CG,Teerlink T,et al. Influence of different hemodialysis modalities on AGE peptide levels;intradialytic versus long-term results[J]. Nephron Clin Pract,2005,100(1):5-7.