

• 论 著 •

IL-18 在糖尿病中引起肾损伤的机制探讨

张春雷, 吕 琪, 张书楠, 陈桂冰, 曾 巩, 孙惠力, 周小梅

(深圳市中医院检验科 518001)

摘 要:目的 研究糖尿病大鼠模型尿液中肾损伤分子-1(KIM-1)、IL-18 的表达, 观察糖尿病大鼠尿液中 KIM-1 的变化, 并探讨 IL-18 引起大鼠肾损伤的机制, 以及在肾损伤中所起的作用。方法 收集大鼠 24 周的 24 小时尿, 用酶联免疫吸附法检测正常对照组(Control)、糖尿病模型组(Diabetic)24 小时尿液中 KIM-1 和 IL-18 的表达水平。结果 正常对照组、糖尿病模型组中 KIM-1 的表达水平分别为 $(10.9 \pm 2.1) \text{ ng}$, $(119.1 \pm 23.9) \text{ ng}$; IL-18 的表达水平分别为 $(4.8 \pm 0.9) \text{ ng}$, $(57.0 \pm 8.4) \text{ ng}$ 。两个指标的正常对照组和糖尿病模型组之间差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 糖尿病大鼠晚期有肾脏损伤, IL-18 在其中起重要作用。

关键词: KIM-1; IL-18; 糖尿病大鼠模型; 糖尿病肾病; 酶联免疫吸附法

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.05.019

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)05-0573-03

Investigation of Interleukin-18 on kidney injury mechanisms

Zhang Chunlei, Lu qi, Zhang Shunnan, Chen Guibing, Zeng Gong, Sun Huili, Zhou Xiaomei

(Laboratory Science Department of Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, 518001)

Abstract: Objective To study the expression of urinary Kidney Injury Molecule-1(KIM-1) and IL-18 in urine of diabetic rats models, observe the change of KIM-1 on the kidney injury in diabetic rats models and investigate IL-18 on the injury mechanisms. **Methods** Collect rats urine from control group and diabetic models group on 24 weeks, detect the levels of urinary KIM-1 and IL-18 in control group and diabetic models group by ELISA. **Results** The levels of KIM-1 in control group and diabetic models group were $(10.9 \pm 2.1) \text{ ng}$, $(119.1 \pm 23.9) \text{ ng}$ and the levels of IL-18 were $(4.8 \pm 0.9) \text{ ng}$, $(57.0 \pm 8.4) \text{ ng}$ in 24h urine respectively. There is significant difference ($P < 0.05$) between control group and diabetic models group. **Conclusion** There has been kidney injury in rats when they were in advanced stage of diabetic and IL-18 may play an important role on kidney injury.

Key words: KIM-1; IL-18; diabetic rats models; diabetic nephropathy; ELISA

近年来,随着我国人口人均寿命延长,生活饮食习惯,结构的改变,糖尿病的患病率呈直线上升趋势,据最新统计,我国目前约有 5 000 万人正面临着糖尿病的威胁。而糖尿病肾病是糖尿病的重要并发症之一,并已成为糖尿病患者致死的主要原因。其发病机制包括代谢异常、血流动力学障碍及生长因子和遗传等多种因素的参与。近年来,有证据表明微炎症反应在糖尿病及糖尿病肾病发生、发展中发挥重要作用。本研究建立了糖尿病大鼠模型,检测了对照组、糖尿病模型组大鼠尿液中肾损伤分子-1(kidney injury molecule-1, KIM-1)与白细胞介素-18(interleukin-18, IL-18)的表达,旨在探讨在糖尿病引起肾损伤的肾病中, KIM-1 的变化情况, 以及炎症因子 IL-18 在其中所起的作用。为糖尿病肾病患者做出早期诊断并及时进行治疗提供依据, 阻断病情向不可逆蛋白尿阶段发展, 对提高患者今后的生存质量和减轻社会医疗经济负担具有及其重要的意义。

1 材 料

1.1 实验动物 II 级 SD 雄性大鼠, 体重在 200~230 g 之间, 由广州中医药大学实验动物中心提供。

1.2 实验仪器 大鼠代谢笼(Tecniplast, 意大利), ACCU-CHEK 血糖仪(罗氏公司, 德国), Elx800 全自动酶标仪(宝特公司, 美国)。

1.3 主要试剂 链脲佐菌素(Sigma 公司, 美国), 大鼠肾小球损伤分子 KIM-1 和 IL-18 ELISA 试剂盒, (CUSABIO BIO-TECH 公司, 美国)。

2 方 法

2.1 动物模型建立 雄性 SD 大鼠禁食 16 h 后将链脲佐菌素(临用前以 0.1 mol/L, pH 4.2 柠檬酸缓冲液溶解新鲜配置)按剂量 60 mg/kg 体重一次性腹腔注射, 注射后开始计算时间, 于开始注射后 72 h 后取大鼠尾静脉血测血糖, 凡血糖 $\geq 16.7 \text{ mmol/L}$ 确定为糖尿病大鼠模型制作成功。

2.2 实验分组 大鼠随机分为 2 组, 每组 30 只: (1) 对照组, 腹腔注射等体积的枸橼酸缓冲液; (2) 糖尿病模型组, 建模成功后, 予等体积生理盐水每日灌胃。所有大鼠自由饮食和饮水。动物饲养室恒温 21℃, 昼夜各 12 h。

2.3 待测标本的留取 于用药后 24 周, 大鼠放置于代谢笼内, 收集 24 h 尿液, 记录尿量, 于 -20℃ 冰箱保存, ELISA 方法测定大鼠尿 KIM-1、IL-18 水平, 同时测定大鼠血糖水平。

2.4 双抗体夹心 ELISA 法检测尿液 KIM-1、IL-18

2.4.1 试剂准备 洗涤液: 用蒸馏水 1:25 稀释洗涤液。标准品液配制: 临用前 15 min 将标准品以样品稀释液稀释至 1 mL, 盖好后静置 10 min 以上, 然后反复颠倒以助溶解, 最后做系列倍比稀释, 使其浓度成梯度递减。样品稀释液直接作为标准浓度 0 ng/mL。

2.4.2 建立标准曲线及样品测定 设标准孔 8 孔, 每孔中各加入标准品液 100 μL , 浓度由高到低, 用以建立标准曲线(KIM-1 和 IL-18 的标准曲线分别见图 1 和图 2)。待测品孔中每孔加入待测样品 100 μL , 将反应板置 37℃, 120 min。弃去液体, 甩干, 不用洗涤。每孔加生物素标记抗体工作液 100

μL , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 60 min。洗板 : 用稀释洗涤液将反应板充分洗涤 3 次, 每次浸泡 1~2 min, 甩干。每孔加入辣根过氧化物酶标记亲和素工作液 $100\text{ }\mu\text{L}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 60 min。洗板 : 用稀释洗涤液将反应板充分洗涤 5 次, 每次浸泡 1~2 min, 甩干。依序每孔加底物溶液 $90\text{ }\mu\text{L}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光显色 20 min。依序每孔加入终止液 $50\text{ }\mu\text{L}$ 。用酶标仪在 450 nm 处测吸光值。结果计算与判断: 所有 OD 值都减去空白值后再计算, 以标准品 OD 值作横坐标 (普通坐标), 标准品浓度作纵坐标 (对数坐标), 利用直线回归根据标准品的 OD 值计算出标准曲线公式, 将样品的 OD 代入方程式, 计算出样品浓度。

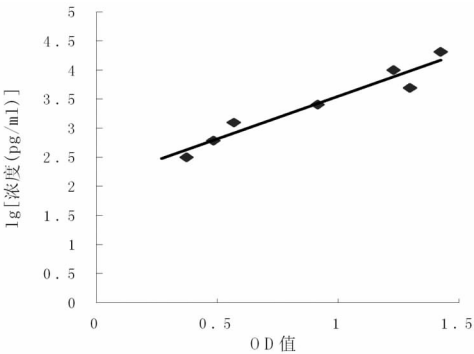


图 1 KIM-1 的标准曲线

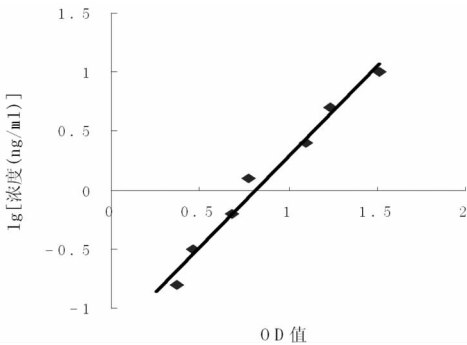


图 2 IL-18 的标准曲线

2.5 统计学处理 应用 SPSS for window 12.0 版的统计软件包作统计分析, 采用单因素方差分析, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结 果

正常对照组大鼠 24 周时 24 h 尿液 KIM-1 为 $(10.9\pm2.1)\text{ ng}$, 糖尿病模型组为 $(119.1\pm23.9)\text{ ng}$; 正常对照组 24 周时 24 h 尿液 IL-18 为 $(4.8\pm0.9)\text{ ng}$, 糖尿病模型组为 $(57.0\pm8.4)\text{ ng}$ 。在这两组指标中, 糖尿病模型组较正常对照组差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 1。

表 1 两试验组尿液中 KIM-1、IL-18 水平 ($\bar{x}\pm s$)				
组别	n	血糖 (mmol/L)	KIM(ng)	IL-18(ng)
对照组	20	5.9 ± 1.5	10.9 ± 2.1	4.8 ± 0.9
糖尿病模型组	20	27.5 ± 2.8^a	119.1 ± 23.9^a	57.0 ± 8.4^a

^a: 与对照组比较, $P<0.05$ 。

4 讨 论

当前糖尿病已成为影响人们健康的常见病。糖尿病引起的肾功能损害已占到 30% 左右。糖尿病的防治在临床上日益受到重视, 早期发现及早干预以逆转或延缓肾功能损害尤为重

要。但现目前对其发病的机制尚未完全阐明, 有关糖尿病肾病的发生机制众说纷纭, 其中炎症细胞因子在其发生、发展中的作用备受关注, 有学者认为长期体内微炎症状态及机体免疫功能紊乱可能是糖尿病肾病发病机制之一。因此, 本研究建立了糖尿病大鼠模型, 从大鼠血糖的检测结果看, 糖尿病大鼠模型制作成功, 同时设立了对照组, 同时检测 KIM-1 这一反映肾脏损伤的指标和 IL-18 这一细胞因子在各组别中的表达, 试图探讨 IL-18 在糖尿病大鼠模型中引起肾损伤的机制。

4.1 KIM-1 与肾脏损伤的关系 急、慢性肾脏疾病是临床常见疾病, 由于近曲小管对缺血、药物毒性等各种刺激均特别敏感, 使得近曲小管上皮细胞的损伤成为急、慢性肾脏疾病的主要特征之一^[1]。目前检测肾小管损伤的指标均因其自身特性而在临床应用中存在着不同问题, 如尿 N-乙酰- β -葡萄糖苷酶等虽能反映肾小管结构损伤, 但很大程度上受尿液理化性质的影响; 尿蛋白电泳能够很好的评估肾脏损伤部位^[2], 尿低分子量蛋白如 β_2 -微球蛋白等能反映肾小管重吸收功能, 但受蛋白排泄昼夜节律的影响而波动较大。因此, 肾小管损伤在早期往往缺乏准确的检查方法, 容易错过早期诊治时机^[3]。

肾损伤分子-1(KIM-1)是一种新近发现的蛋白质, 它是一种 I 型跨膜糖蛋白, 有一个类似免疫球蛋白分子结构域和粘蛋白结构域的外功能区^[4]。它在正常的肾脏中, 是不能被检测到的, 而它在肾小管缺血再灌注损伤时, 以及其他肾小管毒性物质例如顺铂、叶酸的作用下, 能明显被诱导生成^[5], 它已经证实缺血性^[6-7]和肾毒性^[5]的肾损伤中能被诱导出来。在急性缺血性肾小管坏死和肾细胞肿瘤的患者中有一表达, 肾脏缺血再灌注损伤后, KIM-1 首先在肿胀和扁平的肾皮质小管中表达, 且与肾小管损伤程度密切相关, 在肾损伤及恢复过程中持续升高^[6-7]。尿中 KIM-1 也能在早期先于其他指标被检测到, 用酶联免疫吸附法可定量, 且不受尿液理化性质的干扰, 表明尿 KIM-1 可作为一种无创、迅速、灵敏、特异和准确的检测早期肾损伤的方法^[8]。

因此在本试验中, 糖尿病大鼠尿 KIM-1 高于正常对照组, 表明在糖尿病模型组中, 大鼠有肾脏的损伤。

4.2 IL-18 在糖尿病中引起肾损伤的作用 IL-18 是 IL-1 细胞因子家族的一个成员。它可以在多种不同的细胞表达, 包括: 巨噬细胞、树突状细胞、角质形成细胞、成骨细胞、肠上皮细胞^[8]。IL-18 作为激活的 Th1 细胞的共刺激分子能上调 Th1 细胞、干扰素- γ 、 CD8^+ 细胞, NK 细胞的表达, 刺激 T 细胞增生, 调节 Th2 型免疫反应^[10]。以前研究表明, IL-18 在多种疾病中均有表达, 包括类风湿关节炎, 炎症肠病, 原发性肝硬化和自身免疫性肝炎^[11]。

糖尿病肾病是糖尿病的主要慢性并发症之一, 也是导致终末期肾病的主要病因之一。糖尿病肾病确切的发病机制不明, 目前认为受多方面因素的影响, 包括代谢因素、血流动力学因素、氧化应激、遗传因素等, 近年来炎症在糖尿病肾病的发病中受到越来越多的重视。肾脏固有细胞在病理状态下可以产肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-1、白细胞介素-6、一氧化氮等多种炎症因子, 这些因子又通过自分泌和旁分泌的方式使炎症效应不断引起炎症级联反应。糖尿病患者代谢紊乱, 在高血糖状态下, 许多血管活性物质、生长因子、炎症介质均发生了明显改变, 共同导致组织损伤。Pick 等^[12]认为糖尿病是一种自然免疫和低度炎症性疾病, 且提出 II 型糖尿病存在着细胞因子介

导的急性相反应的假说,急性相反应时血清中包括 C 反应蛋白在内的蛋白质水平将发生显著变化,被称为急性相蛋白质(此外还包括纤维蛋白、 α -酸性糖蛋白、 α -抗胰蛋白酶等)。细胞因子则是一类由免疫活性细胞产生的具有调节机体造血和免疫系统的生理功能的 α 分子多肽或蛋白,它们相互影响,相互制约,形成复杂的细胞因子调节网络参与炎症免疫。而且有研究表明 IL-18 与 C 反应蛋白等存在明显相关性^[13],提示 IL-18 也是一种炎性蛋白,并可作为炎症状态的一个标志物。因此,作者认为糖尿病患者中 IL-18 升高所反映的微炎症状态是导致肾脏损伤的主要原因,但这些炎症物质是怎样损伤到肾脏的结构,仍然需要进一步研究。

参考文献

- [1] Sheridan AM, Bonventre JV. Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2000, 9(4): 427-434.
- [2] 程申应, 李培林, 胡芳, 等. SDS-AGE 尿蛋白电泳对肾脏损伤部位的实验诊断分析[J]. 国际医学检验杂志, 2010, 31(3): 285-286.
- [3] Hewitt SM, Dear J, Star RA. Discovery of protein biomarkers for renal diseases[J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(7): 1677-1689.
- [4] van Timmeren MM, Bakker SJ, Vaidya VS, et al. Tubular kidney injury molecule-1 in protein-overload nephropathy[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2006, 291: 456-464.
- [5] Ichimura T, Hung CC, Yang SA, et al. Kidney injury molecule-1 (Kim-1): a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2004, 286(3): 552-563.
- [6] Ichimura T, Bonventre JV, Bailly V, et al. Kidney injury molecule-

1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury[J]. J Biol Chem, 1998, 273(7): 4135-4142.

- [7] Park KM, Byun JY, Kramers C, et al. Inducible nitric-oxide synthase is an important contributor to pro-longed protective effects of ischemic preconditioning in the mouse kidney[J]. J Biol Chem, 2003, 278(14): 27256-27266.
- [8] Vaidya VS, Ramirez V, Ichimura T, et al. Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2006, 290(2): 517-529.
- [9] Dinarello CA. IL-18: a Th1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family[J]. J Allergy Clin Immunol, 1999, 103(1): 11-24.
- [10] Swaak AJ, van den Brink HG, Aarden LA. Cytokine production (IL-6 and TNF α) in whole blood cell cultures of patients with systemic lupus erythematosus[J]. Scand J Rheumatol, 1996, 25(2): 233-238.
- [11] Li ZG, Mu R, Dai ZP, et al. T cell vaccination in systemic lupus erythematosus with autologous activated T cells[J]. Lupus, 2005, 14(15): 884-889.
- [12] Pick JC, Crock MA. Is type 2 diabetes mellitus a disease of the innate immune system[J]. Diabetologia, 1998, 41(8): 1241-1248.
- [13] 伍锦泉, 潘志铤, 陈玉平, 等. 慢性肾功能衰竭患者血浆白介素 18 水平与微炎症反应及动脉粥样硬化的关系[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2005, 3(8): 127-129.

(收稿日期: 2010-09-10)

(上接第 572 页)

IL-2 有关。

因此,化疗后序贯应用 DC 与 CIK 细胞免疫治疗是安全的,可明显改善化疗后肿瘤患者的机体免疫力,从而可能进一步发挥对残存肿瘤细胞零级动力学的杀伤作用,降低肿瘤复发的危险性,提高肿瘤的综合治疗效果。

参考文献

- [1] 王桂芝, 秦文华. 化疗对肿瘤患者淋巴细胞亚群的影响[J]. 中华全科医学, 2009, 7(12): 1307-1308.
- [2] 熊彪, 邹尤宝. 大肠癌患者外周血 T 细胞亚群和 NK 细胞活性检测的临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(10): 892-893.
- [3] 高碧燕, 金从国, 卢玉波, 等. 宫颈癌患者新辅助化疗与放疗前后外周血 T 细胞亚群变化的研究[J]. 实用癌症杂志, 2009, 24(3): 248-250.
- [4] Shebzukhov YV, Koroleva EP, Khlgatian SV, et al. Humoral immune response to thymidylate synthase in colon cancer patients after 5-FU chemotherapy[J]. Immunol Lett, 2005, 100(1): 88-93.
- [5] 匡志鹏, 梁安民. CIK 细胞和 DC 的免疫生物学特性及抗肿瘤研究进展[J]. 广西医科大学学报, 2006, 23(2): 338-340.
- [6] 魏绪仓, 连小云, 赵文理, 等. DC-CIK 细胞的生物学活性及抗淋巴

瘤细胞的作用[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2007, 28(3): 283-285.

- [7] Joshi PS, Liu JQ, Wang Y, et al. Cytokine-induced killer T cells kill immature dendritic cells by TCR-independent and perforin-dependent mechanisms[J]. J Leukoc Biol, 2006, 80(6): 1345-1353.
- [8] 江凤翔, 吴云林. DC-CIK 细胞抗肿瘤的基础研究及临床应用进展[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2007, 16(6): 618-620.
- [9] 徐艳, 刘丽娟, 高建梅. DC-CIK 细胞特异性抗肿瘤生物学活性研究[J]. 中国现代医生, 2010, 27(8): 8-10.
- [10] Chen BA, Li M, Sun ZY, et al. Killing activity in DC and CIK co-culture against hepatocarcinoma cells[J]. Zhong Guo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2006, 14(3): 543-546.
- [11] Wang QJ, Wang H, Pan K, et al. Comparative study on anti-tumor immune response of autologous cytokine-induced killer (CIK) cells, dendritic cells-CIK (DC-CIK), and semi-allogeneic DC-CIK[J]. Chin J Cancer, 2010, 29(7): 641-648.
- [12] Wei XC, Zhai XH, Han XR, et al. Biological activity of DC-CIK cells and its effect against leukemia cells in vitro[J]. Zhong Guo Shi Yan Xue Yi Xue Za Zhi, 2008, 16(5): 1150-1153.

(收稿日期: 2010-10-06)