

文章编号 (Article ID): 1009-2137(2011)04-0975-04

· 论著 ·

ITP 患者脾细胞分泌 IL-18 及 IL-18 结合蛋白的研究

单宁宁, 王欣, 姜玉杰, 隋潇徽, 李颖, 刘新, 侯明¹山东大学附属省立医院血液科, 山东济南 250021; ¹ 山东大学齐鲁医院血液肿瘤科, 山东济南 250012

摘要 本研究旨在探讨特发性血小板减少性紫癜 (ITP) 脾脏单个核细胞培养后 IL-18、IL-18 结合蛋白 (binding protein, BP)、IFN- γ 、IL-4 等细胞因子的表达及其临床意义。常规无菌制备脾单个核细胞, 置含 PHA (phytohemagglutinin) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养; 分析 ITP 患者及正常对照者脾单个核细胞分泌细胞因子的差异。结果表明: 脾单个核细胞培养 48 小时后, ITP 患者 IL-18 和 IFN- γ 的含量较正常对照者明显升高; IL-18BP 含量两组间差异无统计学意义 ($p=0.646$); IL-4 低于检测限。结论: IL-18、IL-18BP 等细胞因子表达失衡在 ITP 的免疫紊乱和发生发展中起着一定的作用。

关键词 特发性血小板减少性紫癜; 白介素 18; 白介素 18 结合蛋白

中图分类号 R554.6

文献标识码 A

Secretion of IL-18 and IL-18 Binding Protein from Splenocytes of ITP Patients *In Vitro*

SHAN Ning-Ning, WANG Xin, JIANG Yu-Jie, SUI Xiao-Hui, LI Ying, LIU Xin, HOU Ming¹Department of Hematology, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong Province, China; ¹ Center of Haematology and Oncology, Shandong University Qilu Hospital, Jinan 250012, Shandong Province, China

Corresponding Author: HOU Ming, Professor. Tel: (0531) 82168326. E-mail: houming@medmail.com.cn

Abstract This study was aimed to investigate the expression and clinical significance of IL-18, IL-18 binding protein (IL-18BP), IFN- γ and IL-4 secreted from splenocytes of patients with idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) *in vitro*. Spleen mononuclear cells (MNC) were prepared by using routine sterile method, and were cultured in RPMI 1640 complete medium containing 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHA, 10% fetal calf serum at 37 $^{\circ}\text{C}$ and 5% CO_2 . The levels of IFN- γ , IL-4, IL-18 and IL-18BP secreted from MNC of ITP patients and normal controls were determined after culture for 48 hours. The results showed that after culture of spleen MNC for 48 hours, the levels of IL-18 and IFN- γ were significantly higher in patients with ITP than that in controls, but the levels of IL-18BP was not significantly elevated in ITP patients. The level of IL-4 was below the detectable limit of the assay used. It is concluded that imbalance between IL-18 and IL-18BP may play an important role in pathogenesis of ITP, and regulation of balance between IL-18 and IL-18BP may be a therapeutic approach against ITP.

Key words idiopathic thrombocytopenic purpura; interleukin 18; interleukin 18 binding protein

J Exp Hematol 2011; 19(4):975-978

特发性血小板减少性紫癜 (idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP) 是一种自身免疫性出血性疾病。大量实验研究表明, ITP 的发病与细胞免疫功能异常关系密切。尽管 B 细胞过度增殖、活化和成熟产生多种针对血小板的自身抗体导致血小板破坏增多是 ITP 发病的直接原因, 但 T 细胞亚群功能异常和细胞因子比例失调导致 B 细胞激活才可能是 ITP 的主要发病机制^[1-4]; 在部分情况下细胞毒性 T 细胞可以直接导致 ITP 患者的血小板溶解^[3]。脾脏是破坏血小板的重要器官和场所, 切除脾脏可以去掉产生抗体的器官和破坏血小板的场所, 使外周血中的血小板上升^[5,6]。Th1 过度极化是导致 ITP 发生的重要机制已得到大多数学者的证实。但作为 T

细胞炎症介质的强有力的诱导者白介素 18 (interleukin 18, IL-18) 在 ITP 发病中的作用尚不完全清楚。本课题前期研究亦发现, 活动期 ITP 患者血清中 IL-18 表达明显高于正常对照者和缓解期患

基金项目: 泰山学者基金, 国家自然科学基金 (编号 30570779, 30600259, 30770922, 30800491, 30801258, 30971278, 81070396, 81070408, 81070407, 81070411), 973 计划 (编号 2011CB503906), 全国优秀博士论文基金 (编号 200561), 新世纪高校杰出人才基金 (编号 NCET-07-0514), 教育部重点项目 (编号 109097), 卫生部临床学科重点项目 2010-2012, 山东省自然科学基金 (编号 ZR2009CM001, ZR2010HQ002), 山东省临床医学中心基金, 山东省医学领军人才基金, 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金 (编号 2008BSO3009) 和山东大学自主创新基金 (编号 2009TS053)

通讯作者: 侯明, 教授, 博士生导师。电话: (0531) 82168326。E-mail: houming@medmail.com.cn

2011-02-14 收稿; 2011-03-01 接受

者, IL-18 天然拮抗剂白介素 18 结合蛋白 (interleukin 18 binding protein, IL-18BP) 的含量在 ITP 患者急性期虽略有升高, 但无显著性差异, IL-18/IL-18BP 明显失衡^[8,9]。为进一步探讨 IL-18、IL-18BP 等在培养的 ITP 脾细胞中的表达及其临床意义, 本研究检测了 10 例 ITP 患者及其正常对照者脾脏(外伤脾切除)脾细胞培养后 IL-18, IL-18BP, IFN- γ , IL-4 的表达。

材料和方法

研究对象

山东大学附属省立医院和山东大学齐鲁医院 2007 年 12 月 - 2008 年 12 月 ITP 患者行外科手术切除脾脏标本 10 例, 男 4 例, 女 6 例, 年龄 18 - 87 岁, 中位数 30.5 岁; 病程 7 - 62 个月, 中位数 20.5 个月。另选 2001 年 1 月 - 2008 年 12 月因创伤性脾破裂而手术切除的正常脾标本 4 例作对照, 其中男 3 例, 女 1 例, 年龄 26 - 58 岁, 中位数 31.5 岁(表 1)。本项研究得到山东大学附属省立医院和山东大学齐鲁医院伦理委员会的批准, 受试者均获知情同意。

Table 1. Clinical characteristics of ITP patients and controls

Patient no.	Sex/Age (year)	Course of disease (month)	Control no.	Sex/Age (year)	Time of splenectomy
1	M/40	62	1	M/36	2008 - 11
2	F/87	16	2	M/27	2009 - 04
3	F/45	45	3	F/58	2007 - 12
4	F/57	19	4	M/26	2009 - 05
5	F/33	27			
6	F/18	22			
7	F/25	18			
8	M/28	17			
9	M/22	32			
10	M/23	7			

ITP; idiopathic thrombocytopenic purpura.

脾淋巴细胞培养

常规无菌制备脾细胞悬液, 小心加入淋巴细胞分离液中, 2 000 r/min 离心 20 分钟, 吸取淋巴细胞层, 用不含胎牛血清的 RPMI 1640 培养液洗涤 3 遍, 收集淋巴细胞后, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 稀释至浓度为 1×10^6 /L, 置含 PHA (phytohemagglutinin, 植物血凝素) 10 μ g/ml, 10% 胎牛血清的 RPMI

1640 完全培养液中, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养 48 小时, 留取细胞悬液及淋巴细胞于 -70 $^{\circ}$ C 保存待测。标本均未经反复冻融。

ELISA 检测

用 IL-18、IFN- γ 和 IL-4 试剂盒(美国 Usclife 公司产品)和 IL-18BP 试剂盒(R&D 公司产品), ELISA 双抗体夹心法检测细胞悬液中 IL-18, IL-18BP, IFN- γ 及 IL-4 水平, 严格按照试剂盒说明操作。每个试验设 8 个复孔, 重复 2 板。

实时定量聚合酶链反应 (RT-PCR) 测定

TRIzol 试剂提取脾淋巴细胞总 RNA。应用 ABI PRISM 7500 序列检测系统和 SYBRw Green (Toyobo, Osaka, Japan) PCR 试剂盒进行实时定量 PCR。内参 (β -actin) 及 IL-18, IL-18BP, IFN- γ 及 IL-4 的上下游引物见表 2。循环参数设定如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 15 分钟后 95 $^{\circ}$ C 变性 15 秒, 60 $^{\circ}$ C 退火 15 秒 (IL-18, IFN- γ , IL-4, β -actin), 62 $^{\circ}$ C 退火 15 秒 (IL-18BP), 72 $^{\circ}$ C 延伸 35 秒, 连续 40 个循环。每个标本重复 3 次, 所有的 PCR 产物均经溶解曲线分析以分辨目的产物与非特异产物以及引物二聚体, 并且再经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳证实。

统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件包进行分析, RT-PCR 结果应用 REST(c) 分析软件统计^[10]。

Table 2. Primers and conditions for RT-PCR experiments

Gene	Sequence (5'→3')	T (°C)	Product length (bp)
IL-18	GCTTGAATCTAAAATTATCAGTC	60	341
	GAAGATTCAAATTGCATCTTAT		
IL-18BP	TGGGAGATGTAGCCGACCTT	62	470
	GCCCCCGACCCCTCTATTCA		
IFN- γ	TTGGCTTAATTCCTCTCGGAAACG	60	120
	CGCTACATCTGAATGACCTGC		
IL-4	AGCAGTCCACAGGCACAAG	60	110
	TACTCTGGTTGGCTTCCTCAC		
β -actin	TTGCCGACAGGATGCAGAA	60	101
	GCCGATCCACACGGAGTACT		

结 果

ITP 患者脾单个核细胞培养后细胞因子的变化
ELISA 测定结果显示, ITP 患者 IL-18 的含量较正常

对照者明显升高 ($p=0.0404$); ITP 患者中脾单个核细胞悬液中 IFN- γ 水平与正常对照者有显著性差异 ($p=0.0058$); IL-18BP 含量两组间差异无统计学意义 ($p=0.3252$); IL-4 低于检测限 (图 1)。

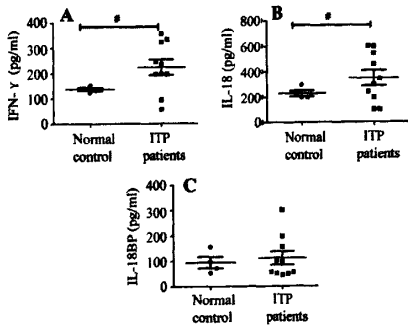


Figure 1. Expressions of IFN- γ , IL-18 and IL-18BP in spleen mononuclear cells from normal controls and ITP patients. Human spleen mononuclear cells were stimulated with PHA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 48 hours. Thereafter, IFN- γ (A), IL-18 (B) and IL-18BP (C) were determined by ELISA. The expressions of IFN- γ and IL-18 were much high in ITP than that in normals controls. There is no significant difference of IL-18BP between two groups. * $p < 0.05$, compared with normal controls.

IL-18、IL-18BP 和 IFN- γ 的表达

RT-PCR 检测结果显示, ITP 患者 IL-18 和 IFN- γ 的基因表达较正常对照明显升高; 与正常对照者相比, ITP 患者 IL-18BP mRNA 表达虽略有升高, 但差异无统计学意义 ($p > 0.05$) (图 2)。

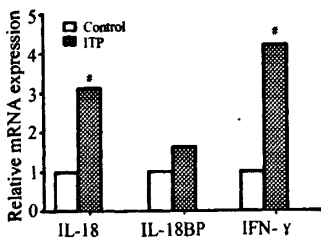


Figure 2. Relative mRNA expressions of IFN- γ , IL-18 and IL-18BP in spleen from normal controls and ITP patients. Human spleen mononuclear cells were stimulated with PHA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 48 hours. Thereafter, IFN- γ , IL-18 and IL-18BP were determined by RT-PCR. * $p < 0.05$, compared with normal controls.

讨 论

ITP 是一种自身免疫性出血性疾病。大量实验研究

表明, ITP 的发病与细胞和体液免疫功能异常关系密切。B 细胞产生多种血小板自身抗体介导血小板破坏增多是 ITP 发病的直接原因。抗体包被的血小板由于被网状内皮系统的细胞快速清除而寿命短暂, 特别是在脾和肝。包被较重的血小板由肝吞噬细胞清除, 而包被较轻的血小板则通过肝再经脾而被清除^[6], Isaka^[11] 检测了 ITP 患者血小板的存活率、生成率及清除部位。结果发现, 血小板的清除率 (肝脏和脾脏清除血小板总和) 与其存活率呈反比; 外周血小板数和血小板生成率与清除率之比呈正相关。因此, 脾脏是破坏血小板的重要器官和场所, 切除脾可去掉产生抗体的器官和破坏血小板的场所, 使外周血中的血小板上升。

近年研究表明, 自身免疫性疾病的发生与机体免疫内环境平衡紊乱有关, 而 Th1 与 Th2 细胞间平衡是维持免疫内环境稳定的中心环节。多数研究认为, ITP 患者呈 Th1 优势反应模式, 而 Th1 优势反应除可促进抗体产生外, 还能直接促进淋巴细胞的细胞毒作用。细胞免疫功能异常与 ITP 的发展、转归有显著关系。作为 T 细胞炎症介质的强有力的诱导者, IL-18 通过刺激 Th1 反应、诱导严重免疫紊乱, 从而参与一些免疫疾病的发生发展。

IL-18, 一种强烈的 Th-1 反应诱导剂, 能诱导 T 细胞和 NK 细胞产生 IFN- γ , 促进 Th1 细胞因子极化, 参与 Th1 优势性调节失衡性自身免疫性疾病的发生发展。与 IL-18R 结合, 通过 IL-1 受体相关激酶途径诱导 NF- κB 结合 DNA 信息, 促进 INF- γ 等 Th1 细胞相关因子的释放而导致 Th1/Th2 失衡的发生。IL-18BP 是近年来新发现的一种内源性 IL-18 拮抗剂, 主要存在于循环中, 通过与 IL-18 受体 (IL-18R) 竞争性结合 IL-18 而发挥其抑制 IL-18 生物活性的作用, 三者形成负反馈调节。IL-18/IL-18BP 在系统性红斑狼疮、风湿性关节炎等自身免疫性疾病发病机制中的作用已有研究。本课题前期研究亦发现, 活动期 ITP 患者血清中 IL-18 表达显著高于正常对照组和缓解期组, 与 IFN- γ 的表达显著正相关 ($p < 0.05$), 而与患者年龄, 性别及血小板数量无明显相关性。IL-18BP 的含量与正常对照组无显著性差异, IL-18/IL-18BP 明显失衡^[8,9]。而作为破坏血小板的重要器官和场所-脾脏单个核细胞培养后 IL-18、IL-18BP 及其 INF- γ 和 IL-4 的表达尚不清楚。本研究首次证实, 脾脏单个核细胞培养后 IL-18 表达明显升高, IL-18BP 表达虽略有升高, 但不能完全结合升高的 IL-18, IL-18/IL-18BP 失衡, 导致 ITP 病变进展。

目前研究资料表明, Th1/Th2 细胞的平衡是体内体液免疫及细胞免疫间重要的调节枢纽, 在自身免疫病的发生发展过程中起重要作用。在生理条件下, 机体 Th1/Th2 细胞的免疫功能处于动态平衡, 一旦这种平衡发生偏离, 机体就会趋向疾病状态。本研究还测定了患者脾脏淋巴细胞培养后中 Th1 细胞因子 $INF-\gamma$ 和 Th2 细胞因子 IL-4 的表达。结果证实, ITP 患者脾脏脾脏淋巴细胞培养后 IL-18、 $IFN-\gamma$ 等 Th1 因子的基因表达明显高于正常对照组, 可能是由于 ITP 患者体内免疫紊乱, 不能有效下调 Th1 免疫应答, 从而产生 IL-18 和 $IFN-\gamma$ 等 Th1 细胞因子能力增强, 导致 Th1 极化。

本研究表明, IL-18/IL-18BP 失衡是 ITP 活动中的重要病理过程, 阻断 IL-18 信号通路或应用内外源性 IL-18 拮抗剂有望成为治疗 ITP 尤其是难治性 ITP 的新途径。

参 考 文 献

- 1 Ogawara H, Handa H, Morita K, *et al.* High Th1/Th2 ratio in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol*, 2003;71(4):283 - 288
- 2 Wang T, Zhao H, Ren H, *et al.* Type 1 and type 2 T-cell profiles in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Haematologica*, 2005;90(7):914 - 923
- 3 Olsson B, Andersson PO, Jernås M, *et al.* T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Nat Med*, 2003; 9(9):1123 - 1124
- 4 黄玉, 李薇, 杨波等. 成人难治及复发 ITP 的个体化治疗及研究进展. *中国实验血液学杂志*, 2009;17(6):1609 - 1615
- 5 邱志勇, 杨少光, 陈振平等. 脐带组织源间充质干细胞调控 ITP 患者脾脏细胞释放抗血小板抗体的体外研究. *中国实验血液学杂志*, 2008;16(6):1372 - 1375
- 6 Dameshek W, Miller EB. The megakaryocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura, a form of hypersplenism. *Blood*, 1946; 1: 27 - 52
- 7 Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, *et al.* Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood*, 2009;113(11):2386 - 2393
- 8 Shan NN, Zhu XJ, Wang Q, *et al.* High-dose dexamethasone regulates interleukin-18 and interleukin-18 binding protein in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Haematologica*, 2009; 94(11): 1603 - 1607
- 9 Shan NN, Zhu XJ, Peng J, *et al.* Interleukin 18 and interleukin 18 binding protein in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*, 2009;144(5):755 - 761
- 10 Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST(c)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 2002;30(9):1 - 10
- 11 Diggs LW, Hewlett JS. A study of the bone marrow from 36 patients with idiopathic hemorrhagic, thrombopenic purpura. *Blood*, 1948; 3(10): 1090 - 1104