

原发性免疫性血小板减少症患者脾脏中白细胞介素 18 及其结合蛋白的表达

单宁宁 王欣 朱效娟 彭军 侯明

【摘要】目的 探讨白细胞介素(IL)18 及 IL-18 结合蛋白(IL-18BP)在原发性免疫性血小板减少症(ITP)脾脏中的表达及其临床意义。**方法** 收集山东大学齐鲁医院和山东大学附属省立医院 2007 年 12 月至 2008 年 12 月 ITP 患者行外科手术治疗的脾切除标本($n=12$)及另取的因创伤性脾破裂而行手术切除的患者的正常脾标本($n=10$),应用免疫组化和免疫荧光技术检测 2 组脾脏组织中 IL-18、IL-18BP 的表达;反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测脾脏 IL-18、IL-18BP、干扰素(IFN) γ 、IL-4 等细胞因子的 mRNA 表达。**结果** 免疫组化及免疫荧光结果显示 IL-18 在 ITP 组患者中阳性率为 100% (12/12),高于对照组表达率(90.0%, 9/10);IL-18BP 在 ITP 组患者阳性率为 83.3% (10/12),高于对照组脾脏中阳性率(60.0%, 6/10)。ITP 组患者脾脏中 IL-18 mRNA 表达为对照组的 6.0 倍($P<0.05$),虽 IL-18BP 的 mRNA 含量亦有升高,但不能代偿明显升高的 IL-18 的含量。ITP 患者 IFN- γ mRNA 表达是对照组 10.2 倍,而 IL-4 mRNA 表达较对照组低,为对照组的 41.7%,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。**结论** IL-18/IL-18BP 在 ITP 的免疫紊乱和发生发展中起着一定的作用,提示通过增加 IL-18BP 含量拮抗 IL-18 的产生及活性可能是 ITP 治疗的一个新的策略和方向。

【关键词】 紫癜,血小板减少性,特发性; 白细胞介素 18; 白细胞介素 18 结合蛋白

Role of IL-18/IL-18BP balance in spleen of patients with primary immune thrombocytopenia
SHAN Ning-ning*, WANG Xin, ZHU Xiao-juan, PENG Jun, HOU Ming. *Department of Hematology, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, China
Corresponding author: HOU Ming, Centre for Hematological Oncology, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China, Email: houming@medmail.com.cn

【Abstract】Objective To investigate the role of IL-18 and IL-18BP balance in the spleens of patients with primary immune thrombocytopenia (ITP). **Methods** A total of 12 active ITP patients and 10 normal controls were recruited. Their expressions of IL-18 and IL-18BP were measured by immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence. The mRNA expressions of IL-18, IL-18BP, IFN- γ and IL-4 were studied by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in all subjects. **Results** The positive rate of IL-18 was higher in the ITP patients than that of the normal control group (100% vs 90.0%). And the positive rate of IL-18BP was higher in the ITP patients than that of the normal control spleen (83.3% vs 60.0%). The relative amount of mRNA gene expression of IL-18 was increased 6.0-fold in active patients compared to controls ($P<0.05$). But the elevated mRNA content of IL-18BP failed to compensate for the sharply elevated content of IL-18. As compared with the normal control group, the expression level of IFN- γ mRNA expression was significantly increased 10.2-fold in ITP patients ($P<0.05$). The decrease observed in IL-4 was 41.7% in active patients compared to controls ($P<0.05$). **Conclusion** The IL-18/IL-18BP imbalance plays an important role in pathogenesis of ITP and its correction may become a potential therapeutic target for ITP.

DOI:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2011.04.006

基金项目:国家重点基础研究发展(973)计划(2011CB503906);国家自然科学基金(30570779、30600259、30770922、30800491、30801258、30971278、81070396、81070408、81070407、81070411);卫生部临床学科重点项目(2010-2012);教育部重点项目(109097);山东省自然科学基金(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(2008BS03009);山东大学自主创新基金(2009TS053)

作者单位:250021 济南,山东大学附属山东省立医院血液科(单宁宁、王欣),保健科(朱效娟);山东大学齐鲁医院血液科(彭军、侯明)

通信作者:侯明,250012,Email: houming@medmail.com.cn

[Key words] Purpura, thrombocytopenic, idiopathic; Interleukin-18; Interleukin 18 binding protein

原发性免疫性血小板减少症 (primary immune thrombocytopenia, ITP) 是一种免疫介导的血小板减少综合征, B 淋巴细胞过度增殖、活化和成熟产生多种针对血小板的自身抗体, 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。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^[1-2]。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。Th1 过度极化是导致 ITP 发生的重要机制^[3,4], 作为 T 细胞炎症介质的强有力的诱导者, 白细胞介素 (IL)18 通过刺激 Th1 反应、诱导严重免疫紊乱。大量研究证实 IL-18 及其天然拮抗剂 IL-18 结合蛋白 (IL-18BP) 在自身免疫性疾病的发生、发展中发挥重要的作用。在系统性红斑狼疮、风湿性关节炎等自身免疫性疾病的患者和动物模型中^[5] 已经检测出上述因子 mRNA 和蛋白质的表达失衡, 在 ITP 患者脾脏中的表达尚少见报道, 本研究旨在探讨 IL-18/IL-18BP 在 ITP 脾脏中的表达及其临床意义。

对象与方法

一、对象

收集山东大学齐鲁医院和山东大学附属省立医院 2007 年 12 月至 2008 年 12 月 12 例 ITP 患者行外科手术治疗的脾切除标本, 其中男 4 例, 女 8 例, 年龄 18 ~ 87 岁, 中位年龄 33.0 岁, 中位病程 24.5 个月 (7.0 ~ 62.0 个月); 另选 2001 年 1 月至 2008 年 12 月 10 例因创伤性脾破裂而行手术切除的患者的正常脾标本作对照研究, 其中男 6 例, 女 4 例, 年龄 16 ~ 58 岁, 中位年龄 33.5 岁。本项研究得到山东大学齐鲁医院和山东大学附属省立医院伦理委员会的批准, 受试者均签署知情同意书。

二、方法

1. 免疫组化检测: 标本经 10% 甲醛固定, 石蜡包埋, 厚 4 μm 连续切片, 70 °C 烤片 60 min; 二甲苯脱蜡 2 次; 梯度乙醇至水充分冲洗, 进行抗原修复; 3% 过氧化氢孵育消除内源性过氧化物酶活性; 5% 牛奶进行抗原封闭 30 min。取稀释相应比例的一抗 (兔抗 IL-18 抗体及兔抗 IL-18BP 抗体均购自美国

Abcam 公司) 4 °C 孵育过夜, 置湿盒中。磷酸盐缓冲液 (PBS) 替代一抗为阴性对照; 倾去一抗液体, 切片在 PBS 缓冲液充分冲洗; 二抗 (购自北京中杉金桥生物技术有限公司) 37 °C 孵育 30 min, DAB 显色, 充分水洗, 苏木精复染, 脱水, 中性树胶封片, 显微镜下观测。

2. 免疫荧光检测: 步骤同前, 标本加入一抗过夜后, 滴加适当稀释的间接荧光抗体, 置湿盒中, 37 °C 30 ~ 60 min; PBS 洗 2 次, 双蒸水洗 1 次; 甘油缓冲液封片, 荧光显微镜下观察。

3. 实时定量反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 测定: 常规制备脾细胞悬液, 小心加入淋巴细胞分离液中, 2000 r/min 离心 20 min, 吸取单个核细胞层, 用不含胎牛血清的 RPMI1640 培养液洗涤 3 遍, 留取单个核细胞待 -70 °C 保存待测, 标本均未经反复冻融。TRIzol 试剂提取脾单个核细胞总 RNA。实时定量 PCR 应用 ABI PRISM 7500 序列检测系统, 采用 SYBRw Green (日本 Toyobo 公司) PCR 试剂盒, 内参 (β-肌动蛋白) 及 IL-18、IL-18BP、干扰素 (IFN)γ 及 IL-4 的上下游引物见表 1。循环参数设定如下: 95 °C 15 min, 95 °C 15 s, 60 °C 15 s (IL-18、IFN-γ、IL-4、β-肌动蛋白)/62 °C 15 s (IL-18BP), 72 °C 35 s, 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。

表 1 RT-PCR 引物及反应条件

基因	序列(5'→3')	退火温度 (°C)	产物 (bp)
IL-18	GCTTGAATCTAAATTATCACTC	60	341
	GAAGATTCAAATTGCATCTTAT		
IL-18BP	TGGGAGATGTAGCCGACCTT	62	470
	GCCCCGACCCCTCTATTTC		
IFN-γ	TTGGCTTAATTCTCTCGGAAACG	60	120
	CGCTACATCTGAATCACCTGC		
IL-4	AGCACTTCCACAGGCACAAG	60	110
	TACTCTGGTTGCCTTCCTTCAC		
β-肌动蛋白	TTGCCGACAGGATGCAGAA	60	101
	GCCGATCCACACGGAGTACT		

注: IL: 白细胞介素; IL-18BP: 白细胞介素 18 结合蛋白; IFN: 干扰素, 下同

三、统计学处理

采用 SPSS13.0 软件包进行分析, 数据先经正

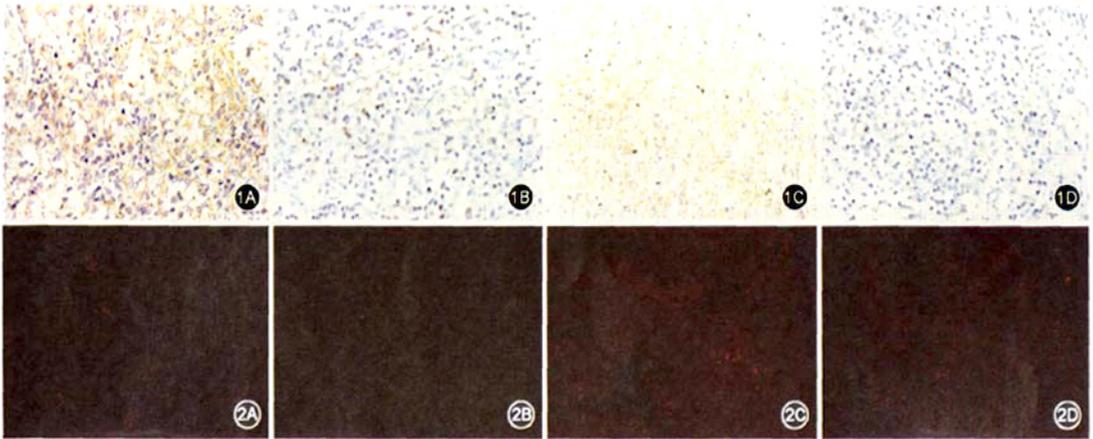


图 1 免疫组化法检测原发免疫性血小板减少症(ITP)患者脾脏中 IL-18、IL-18BP 表达 S-P 法 ×400 1A. ITP 组 IL-18 蛋白呈棕黄色颗粒,强阳性,位于脾淋巴细胞胞质及细胞外;1B. 对照组 IL-18 蛋白弱阳性,位于脾淋巴细胞胞质及细胞外;1C. ITP 组 IL-18BP 蛋白呈棕黄色颗粒,强阳性,位于脾淋巴细胞胞质及细胞外;1D. 对照组 IL-18BP 蛋白弱阳性,位于脾淋巴细胞胞质及细胞外 图 2 免疫荧光法检测脾脏中 IL-18、IL-18BP 的表达 ×100 2A. IL-18 蛋白呈红色荧光,在 ITP 患者脾脏中高表达;2B. IL-18 蛋白在正常对照脾脏中不表达或低表达;2C. IL-18BP 蛋白呈红色荧光,在 ITP 患者脾脏中高表达;2D. IL-18BP 蛋白在正常对照脾脏低表达

态分布检验和方差齐性检验,若符合正态分布和方差齐性的条件,则进行 *t* 检验分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。RT-PCR 结果应用 REST[®] 分析软件统计^[6]。

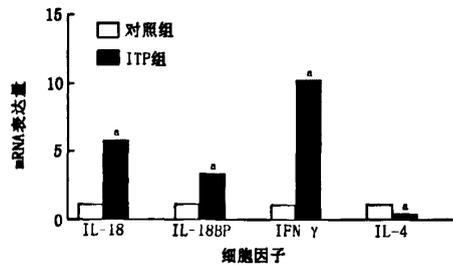
结 果

1. ITP 患者脾脏中 IL-18 和 IL-18BP 的表达:免疫组化及免疫荧光结果显示 IL-18 及 IL-18BP 在 ITP 患者脾脏中的表达明显高于正常对照组(图 1, 2)。IL-18 在 ITP 组患者阳性率 100% (12/12), 其中弱阳性(+)3 例,强阳性(++)9 例;在对照组脾脏中阳性率 90.0% (9/10), 其中弱阳性(+)8 例,强阳性(++)1 例。IL-18BP 在 ITP 组患者阳性率 83.3% (10/12), 其中弱阳性(+)3 例,强阳性(++)7 例;在对照组脾脏中阳性率 60.0% (6/10), 6 例均为弱阳性(+)。

2. ITP 患者脾脏中细胞因子的 mRNA 表达:RT-PCR 检测脾单个核细胞中细胞因子 mRNA 显示 ITP 组患者 IL-18 的表达是对照组的 6.0 倍,IL-18BP 的表达是对照组的 3.0 倍;Th1 细胞因子 IFN- γ 表达高于对照组,而 Th2 细胞因子 IL-4 的含量明显低于对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$, 图 3)。ITP 患者 IL-18/IL-18BP 的比值是正常对照组 2.0 倍,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

讨 论

ITP 是一种 Th 调节失衡的自身免疫性疾病,由



注:与同一指标对照组比较,* $P < 0.05$

图 3 各组脾单个核细胞内细胞因子及转录因子的表达

于 T 细胞亚群的平衡失调导致活化 T 细胞产生的细胞因子发生偏移,从而诱导 B 淋巴细胞异常增生,产生大量抗体,促进细胞毒性 T 细胞活化等一系列免疫效应性病理损伤。Th1 相关细胞因子的增高引起 Th1 型反应,进一步诱导巨噬细胞激活、补体形成和细胞毒细胞活性增加,终致引起巨核细胞成熟障碍及血小板的破坏。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 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-12 相似,但发挥作用却不依赖于两者。与白细胞介素 18 受体(IL-18R)结合,通过 IL-1 受体相关激酶途径诱导核因子(NF) κ B 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 为 Novick 等^[7] 新近发现的一种糖蛋白,属于

免疫超家族成员,能抑制 IL-18 诱导 Th1 细胞产生 INF- γ ,降低 INF- γ 对 NF- κ B 的激活作用,是 IL-18 的天然拮抗剂,与 IL-18 协调作用参与细胞免疫反应。IL-18/IL-18BP 在其他自身免疫性疾病如系统性红斑狼疮、风湿性关节炎的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 的含量在 ITP 患者急性期虽略有升高,但差异无统计学意义,IL-18/IL-18BP 明显失衡^[8,9]。而脾脏作为破坏血小板的重要器官和场所,其 IL-18, IL-18BP 及 INF- γ 和 IL-4 的表达尚不清楚。本研究证实 IL-18 和 IL-18BP 在 ITP 患者脾脏中蛋白表达和基因水平均明显升高,而轻微增高的 IL-18BP 不能完全结合升高的 IL-18 表达,IL-18/IL-18BP 表达失衡,导致 ITP 病变进展。

此外本研究测定了患者脾脏中 Th1 细胞因子 INF- γ 和 Th2 细胞因子 IL-4 的表达。Th1/Th2 细胞的平衡在自身免疫病的发生发展过程中起重要作用,其平衡失调与 ITP 的发生发展有关。Th1 和 Th2 可相互调节,影响免疫应答的格局。它们来自共同的前体细胞 Th0,在不同的细胞因子、抗原等因素的影响下,可发生 Th1 与 Th2 的转换。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。Panitsas 等^[10]研究表明 ITP 的发病机制是以细胞免疫紊乱为中心的,尤其是 T 细胞发挥重要作用。T 细胞功能紊乱表现的 Th1 优势反应,不仅介导体液免疫异常、产生自身抗体,还能直接促进淋巴细胞的细胞毒作用。本研究结果证实 ITP 患者脾脏中 IL-18、IFN- γ 等 Th1 因子的基因表达明显高于正常对照组,而 Th2 细胞因子(IL-4)的表达则明显下降,进一步证实

ITP 是一种 Th1 极化性自身免疫性疾病。

本研究表明 IL-18/IL-18BP 表达失衡是 ITP 活动中的重要病理过程,提高 IL-18BP 的水平可能有效地拮抗 IL-18 的致炎作用,从而缓解 ITP 的病程进展。评估 ITP 患者 IL-18/IL-18BP 的平衡有利于进一步理解 ITP 的发病机制,IL-18BP 可能提供一个新的治疗靶点。

参 考 文 献

- [1] Dameshek W, Miller EB. The megakaryocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura, a form of hypersplenism. *Blood*, 1946, 1: 27-52.
- [2] 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, 113:2386-2393.
- [3] Ogawara H, Handa H, Morita K, et al. High Th1/Th2 ratio in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol*, 2003, 71 :283-288.
- [4] Wang T, Zhao H, Ren H. Type 1 and type 2 T-cell profiles in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Haematologica*, 2005, 90: 914-923.
- [5] Tucci M, Quatraro C, Lombardi L, et al. Glomerular accumulation of plasmacytoid dendritic cells in active lupus nephritis; role of interleukin-18. *Arthritis Rheum*, 2007, 58:251-262.
- [6] Michael W, Graham W, Dempfle HL. Relative expression software tool (REST ©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30:1-10.
- [7] Novick D, Kim SH, Fantuzzi G, et al. Interleukin-18 binding protein; a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity*, 1999, 10:127-136.
- [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: 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, 144:755-761.
- [10] Panitsas FP, Theodoropoulou M, Kouraklis A, et al. Adult chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) is the manifestation of a type-1 polarized immune response. *Blood*, 2004, 103:2645-2647.

(收稿日期:2010-09-07)

(本文编辑:赵景辉)

· 读者·作者·编者 ·

本刊有关文稿中法定计量单位的书写要求

本刊法定计量单位具体使用参照 1991 年中华医学会编辑出版部编辑的《法定计量单位在医学上的应用》一书。注意单位名称与单位符号不可混合使用,如 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{天}^{-1}$ 应改为 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;组合单位符号中表示相除的斜线多于 1 条时,应采用负数幂的形式表示,如 $\text{ng}/\text{kg}/\text{min}$ 应采用 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 的形式;组合单位中斜线和负数幂亦不可混用,如前例不宜采用 $\text{ng}/\text{kg} \cdot \text{min}^{-1}$ 的形式。在首次出现不常

用的法定计量单位处用括号加注与旧制单位的换算系数,下文再出现时只列法定计量单位。人体及动物体内的压力单位使用 mm Hg 或 $\text{cm H}_2\text{O}$,但文中首次出现时用括号加注 ($1 \text{ mm Hg} = 0.133 \text{ kPa}$)。正文中时间的表达,凡前面带有具体数据者应采用 d 、 h 、 min 、 s ,而不用天、小时、分钟、秒。统计学符号一律用斜体字母。