

[文章编号] 1000-4718(2006)12-2471-03

肾病综合征患儿 PMN 凋亡与细胞因子、粘附分子关系的探讨

叶中绿¹, 黄秀兰¹, 陈日玲¹, 庞伟君²(广东医学院附属医院¹ 儿科, ² 检验科, 广东 湛江 524001)

[摘要] 目的: 观察肾病综合征(NS)患儿周围血中性粒细胞(PMN)凋亡的变化,并检测周围血中细胞因子IL-8、IL-6、TNF- α 、NO和粘附分子P-选择素(P-sel)、细胞间粘附分子-1(ICAM-1)的水平,探讨细胞因子和粘附分子对PMN凋亡的影响。方法: 采用流式细胞术检测28例NS病人周围血PMN凋亡,ELISA法检测细胞因子和粘附分子水平。结果: 活动期NS患者PMN凋亡率明显低于健康人对照组和缓解期NS患者,缓解期NS患者PMN凋亡率与对照组无明显差别,不同病情活动期NS患者之间PMN凋亡有显著差异,活动期NS患者周围血中IL-8、IL-6、TNF- α 、NO、P-sel、ICAM-1水平均高于对照组和缓解组,且与PMN凋亡呈负相关,与病情呈正相关。缓解组患者IL-8、IL-6、TNF- α 、NO、P-sel和ICAM-1水平与对照组无显著差异。结论: NS患者PMN凋亡延迟,且与病情及疗效密切相关。炎性细胞因子产生过多、免疫细胞粘附分子表达上调可能是导致PMN凋亡延迟的重要机制,适度调控PMN凋亡有可能会改善NS预后。

[关键词] 肾病综合征; 细胞凋亡; 细胞因子类; 中性白细胞

[KEY WORDS] Nephrotic syndrome; Apoptosis; Cytokines; Neutrophils

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

肾病综合征(nephrotic syndrome, NS)的临床和病理均较为复杂,但发病机制却不清楚,大多认为NS患儿体内存在一定的免疫功能失调和由此所致的组织炎症反应及损伤。中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophils, PMN)是一类主要的炎症细胞,直接参与炎症性损伤,PMN凋亡是受自身调控的,一旦凋亡失调,则可存活时间延长从而加重组织损伤。现已发现NS患者有单个核细胞凋亡延迟现象,以及细胞因子在肾炎性损伤中起着重要的作用等^[1]。为了探讨PMN凋亡在NS发病中的作用,以及细胞因子和粘附分子对PMN凋亡的影响,我们检测了28例NS患者周围血PMN凋亡的变化,并同时测定炎性细胞因子IL-8、IL-6、TNF- α 、NO和粘附分子P-sel、ICAM-1的水平。

材 料 和 方 法

1 材料

新确诊NS患者28例,男17例、女11例,年龄3-14岁,平均9岁,病程7d-1个月。全部病例符合《儿科学》第六版中的诊断标准^[2]。并根据该标准将28例NS患者分为单纯型(16例)和肾病型(12例),以及上述病例经正规系统治疗后尿蛋白持续消失(缓解组)20例,正常对照儿童20例来自门诊。

2 仪器和试剂

流式细胞仪(Epics-profile II型, Beckman Coulter公司), Σ 960型全自动酶标仪(Metertech Inc), RPMI-1640培

养基(Gibco公司),胎牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所),淋巴细胞分离液(帮定公司),NO试剂盒(南京建成生物工程研究所),IL-8、TNF- α 和IL-6 ELISA试剂盒、P-sel ELISA试剂盒和ICAM-1 ELISA试剂盒(深圳晶美生物工程有限公司)等。

3 样品收集和中性粒细胞的分离

分别在病人入院时和治疗缓解后取静脉血10 mL用肝素抗凝,取3 mL分离血浆用于测定细胞因子和粘附分子,其余用于分离PMN,方法为:取肝素抗凝血加1/4体积的6% dextran(分子量200 kD),混匀后斜置30-45 min,使红细胞下沉。取上层按1:1体积比叠加到淋巴细胞分离液上,500 r/min水平离心30 min,将沉淀细胞用0.83% NH₄Cl溶液破除红细胞。Hanks液洗细胞3次,计数并调整细胞浓度。细胞经涂片染色分类见PMN纯度>93%,台盼蓝拒染法显示细胞活力>96%。将分离的PMN悬于含10% FBS血清的RPMI-1640培养液中,并使细胞浓度为 2×10^9 cells/L。置5% CO₂、37℃培养箱中培养,24 h后取细胞检测PMN凋亡。

4 PMN 凋亡检测

采用流式细胞术检测PMN凋亡。取培养后PMN用pH 7.4 PBS洗涤2次,调整细胞浓度为 2×10^9 cells/L。加入碘化丙啶(PI),室温避光放置30 min,流式细胞术进行DNA凋亡分析。

5 细胞因子和粘附分子的检测

NS患者周围血IL-8、TNF- α 、IL-6、P-sel和ICAM-1均采用ELISA法检测, Σ 960型酶标仪测定结果。NO采用

[收稿日期]2005-03-22 [修回日期]2005-07-22

Tel: 0759-2387424; E-mail: Lzy8151@sohu.com

硝酸还原酶法,通过测定 NO₂⁻ 和 NO₃⁻,并计算两者的比值得到 NO 的含量。

6 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件处理,两组间比较采用 *t* 检验,多组间先进行确实数据的方差分析,再用 *D* 检验进行组间比较。PMN 凋亡与细胞因子及粘附分子相关性采用单因素直线相关分析。

结 果

1 NS 患者和正常人 PMN 凋亡

活动期 NS 患儿 PMN 凋亡率明显低于健康人对照组和缓解期 NS 患儿,且与病情呈正相关,肾炎型肾病则较单纯型肾病凋亡率升高,缓解期患儿 PMN 凋亡与对照组无显著差别,见表 1。

2 NS 患儿周围血中细胞因子水平的变化

不同病情 NS 患儿周围血中细胞因子水平不同,NS 活动期患儿周围血 IL-8、TNF- α 、IL-6 和 NO 水平均显著高于

对照组和缓解期患者,且与病情呈正相关,其中肾炎型组较单纯型组要显著升高,见表 2。

3 NS 患者周围血 P-sel 和 ICAM-1 水平的变化

NS 活动期患者周围血 P-sel、ICAM-1 均显著高于对照组和缓解期患者,且与病情呈正相关,其中肾炎型组较单纯型组要显著升高,见表 3。

表 1 NS 患儿和正常儿童的 PMN 凋亡水平

Tab 1 The apoptosis of PMN in NS children and normal children (%. $\bar{x} \pm s$)

| Group | n | Apoptosis of PMN |
|-------------------|----|----------------------------|
| Active stage | 28 | 45.62 ± 13.22 |
| Simple type NS | 16 | 58.36 ± 11.84 [△] |
| Nephritic type NS | 12 | 46.09 ± 6.62 |
| Relieve stage | 20 | 63.13 ± 7.85* |
| Control | 20 | 65.39 ± 6.36* |

* *P* < 0.05 vs active stage group; [△] *P* < 0.01 vs nephritic type NS.

表 2 不同病情 NS 患儿周围血中细胞因子水平的变化

Tab 2 Changes of cytokine levels in periphery blood in different type of NS children ($\bar{x} \pm s$)

| Group | n | IL-8 (ng/L) | TNF- α (ng/L) | IL-6 (ng/L) | NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻ (μ mol/L) |
|-------------------|----|---------------------------|----------------------|-----------------------------|---|
| Active stage | 28 | 101.68 ± 24.96* | 162.78 ± 19.93* | 172.73 ± 32.59* | 95.84 ± 21.51* |
| Simple type NS | 16 | 76.18 ± 4.67 [△] | 150.33 ± 9.83 | 141.08 ± 11.44 [△] | 73.63 ± 10.11 [△] |
| Nephritic type NS | 12 | 98.61 ± 8.96 | 158.97 ± 14.24 | 170.72 ± 22.63 | 94.42 ± 11.96 |
| Relieve stage | 20 | 57.32 ± 8.23 | 132.02 ± 15.98 | 64.46 ± 13.85 | 69.81 ± 11.27 |
| Control | 20 | 52.57 ± 7.19 | 134.52 ± 9.54 | 63.92 ± 10.25 | 65.20 ± 12.56 |

* *P* < 0.01 vs control and relieve stage; [△] *P* < 0.01 vs nephritic type NS.

表 3 不同病情 NS 患儿周围血 P-sel 和 ICAM-1 的含量变化

Tab 3 Levels of adhesion molecule in periphery blood in different type of NS children ($\bar{x} \pm s$. μ g/L)

| Group | n | P-sel | ICAM-1 |
|-------------------|----|---|--------|
| Active stage NS | 28 | 32.46 ± 5.58* 372.82 ± 50.34* | |
| Simple type NS | 16 | 22.33 ± 5.58 [△] 310.17 ± 16.86 [△] | |
| Nephritic type NS | 12 | 32.94 ± 5.02 375.61 ± 30.59 | |
| Relieve stage NS | 20 | 23.08 ± 4.15 234.31 ± 17.75 | |
| Control | 20 | 18.17 ± 3.45 227.03 ± 27.63 | |

* *P* < 0.01 vs control and relieve stage NS; [△] *P* < 0.01 vs nephritic type NS.

4 NS 患者周围血 PMN 凋亡与细胞因子和粘附分子的相关性

经单因素直线相关分析处理显示,活动期 NS 患者周围血 PMN 凋亡与细胞因子 IL-8 (*r* = -0.7583, *P* < 0.01), IL-6 (*r* = -0.5872, *P* < 0.01), TNF- α (*r* = -0.5635, *P* < 0.01), NO₂⁻/NO₃⁻ (*r* = -0.6854, *P* < 0.01) 和粘附分子 P-sel (*r* = -0.7118, *P* < 0.01)、ICAM-1 (*r* = -0.5961, *P* < 0.01) 的水平均呈负相关。

讨 论

肾病综合征(NS)患儿可能是由于各种原因激活体内免

疫系统,细胞因子网络的平衡受到破坏,各种炎症细胞活化、粘附分子表达异常,释放多种炎性因子而导致的慢性病变过程,近年来各种炎症细胞、细胞因子和粘附分子在 NS 发病中的作用倍受重视。中性粒细胞(PMN)内容物具有组织毒性及酶解基质蛋白的作用,同时可产生多种炎性介质,如前列腺素、白三烯、血小板活化因子和活性氧介导和放大炎症反应,因此,PMN 是炎症过程中引起组织损伤的重要细胞^[3]。凋亡的中性粒细胞被巨噬细胞吞噬、清除,一方面使 PMN 不释放内容物,另一方面也缩短了 PMN 介导炎症反应的时间,所以 PMN 凋亡是机体自我限制炎症反应的一种重要方式^[4]。

本结果显示活动期 NS 患儿 PMN 凋亡率不仅明显低于对照组,也明显低于缓解期患儿,且单纯型与肾炎型 NS 患儿 PMN 凋亡有显著差异。由于 PMN 凋亡抑制就会使 PMN 在血液循环和炎症部位的作用时间延长,并释放活性介质,加剧炎症反应或细胞因子的作用,进一步引起肾小球滤过膜的损伤,可见 PMN 凋亡延迟可能与肾病综合征蛋白尿形成有重要关系,甚至与 NS 的发病和转归有关。

PMN 凋亡受抑的原因尚未完全明了,可能与多种炎性细胞因子表达失调有关。本文发现活动期 NS 患者周围血中 IL-8、IL-6、TNF- α 和 NO 以及粘附分子 P-sel、ICAM-1 的含量显著高于正常人和缓解期病人,并与临床分型及轻重呈

正相关,与 PMN 凋亡呈负相关。IL-8、TNF- α 、IL-6 和 NO 主要由活化的单核-巨噬细胞、血管内皮细胞等产生,这些细胞因子是重要的白细胞趋化和活化因子,可能它们参与 PMN 凋亡的调节,使其存活时间延长,从而介导炎症反应^[5], TNF- α 还可以导致血浆中带负电荷的蛋白质的渗漏而出现蛋白尿^[6]。P-sel 主要表达于活化的血小板和内皮细胞的表面,介导白细胞与血管内皮细胞的起始粘附; ICAM-1 主要表达与内皮细胞和其它免疫细胞表面,通过与其配体 LFA-1 (CD11a/CD18) 和 Mac (CD11b/CD18) 的结合,可介导单核细胞和中性粒细胞游出血管。有发现 NS 患儿不仅周围血中 P-sel 和 ICAM-1 含量增高,在肾组织中表达也增高,在 NS 发病中 P-sel 和 ICAM-1 对 PMN 的作用主要表现为趋化、活化作用同时可抑制 PMN 凋亡。因此 P-sel 和 ICAM-1 也可能延长 PMN 存活时间,直接或间接参与对肾组织的损伤。

本研究结果提示 NS 患者体内 PMN 凋亡延迟,使得 PMN 的生物学功能寿命得到了延长,可能是 NS 患者炎症性损伤或导致肾小球通透性增高的重要原因之一,各种炎性细胞因子产生过多、各种免疫细胞粘附分子表达上调可能是导致 PMN 凋亡延迟的重要机制。

[参 考 文 献]

- [1] 王迎伟,徐静华,汤仁仙,等. 抗胸腺细胞血清性肾炎模型大鼠肾小球中 C5b-9 的沉积及 NO、TNF α 含量分析[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(1): 54-59.
- [2] 杨锡强,易著文 主编. 儿科学[M]. 第 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004. 367-373.
- [3] Logan MR, Odemuyiwa SO, Moqbel R. Understanding exocytosis in immune and inflammatory cells: The molecular basis of mediator secretion[J]. J Allergy Clin Immunol, 2003, 111(5): 923-932.
- [4] Simon HU. Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation[J]. Immunol Rev, 2003, 193(1): 101-110.
- [5] Vainer B, Nielsen OH. Chemotactic properties of ICAM-1 and PECAM-1 on neutrophil granulocytes in nephrotic syndrome: effects of prednisolone and mesalazine[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2000, 14(8): 1023-1031.
- [6] 郑景晨,倪连松,汪大望,等. 糖尿病大鼠肾脏细胞因子基因表达初步研究[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(1): 137-138,144.

(上接第 2470 页)

因子如 TNF α 和 IL-10 等。TNF α 可损伤肝细胞、诱发炎症反应,并可促进纤维增生,而 IL-10 则有抗炎与抗纤维化的作用^[4,5]。由于 IL-10 主要来源于炎性浸润中的淋巴细胞和单核细胞,故在炎性浸润明显时 IL-10 在肝内水平的不断升高,达到一定水平后又使炎症反应得到抑制,如抑制淋巴细胞增殖和促使单核细胞凋亡^[6]等,IL-10 生成又逐渐减少,以致 IL-10 对 TNF α 与 TGF β 抑制作用减弱,而使 TNF α 和 TGF β 合成与释放增多,从而导致肝纤维化日趋严重。

本实验结果提示,在肝硬化形成过程中肠源性内毒素血症可激发促炎、促纤维化因子与抗炎、抗纤维化因子的合成与释放,二者相互制约,影响肝硬化的进程。其中促炎、促纤维化因子 TNF α 始终起着主导作用。随着病程进展,血浆 IL-10 含量逐渐减低,其抗炎抗纤维化作用逐渐减弱,最终导致肝硬化的发生和发展。

[参 考 文 献]

- [1] 韩德五. 内毒素与肝功能不全[J]. 中国病理生理杂志, 1986, 2(1): 39-43.

- [2] 韩德五,马学惠,赵元昌. 肝硬化动物模型的研究[J]. 山西医药杂志, 1979, 4(1): 1-5.
- [3] Jarvelainen HA, Fang C, Ingelman-Sundberg M, et al. Effect of chronic coadministration of endotoxin and ethanol on rat liver pathology and proinflammatory and anti-inflammatory cytokine [J]. Hepatology, 1999, 29(5): 1503-1510.
- [4] Moine OH, Louis H, Demols A, et al. Cold liver ischemia-reperfusion injury critically depends on liver T cells and is improved by donor pretreatment with interleukin-10 in mice[J]. Hepatology, 2000, 31(6): 1266-1274.
- [5] Moore KW, Malefyt Rene de W, Coffman RL, et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor[J]. Annu Rev Immunol, 2001, 19(2): 683-765.
- [6] Estaquier J, Amaosen JC. A role for T-helper type-1 and type-2 cytokines in the regulation of human monocyte apoptosis[J]. Blood, 1997, 4: 1618-1625.