

· 论 著 ·

[文章编号]1000-8861(2013)01-0019-05

## IL-18BP 重组蛋白对 TNF- $\alpha$ 诱导的人脐静脉内皮细胞的作用研究

李 刚, 贺芙云<sup>△</sup>, 常 贺, 黄明山, 王 焱\*

**[摘 要]** 目的 探讨人重组白细胞介素-18 结合蛋白(rhIL-18BP)对肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )诱导的内皮细胞炎症、凋亡的影响。方法 体外培养人脐静脉内皮细胞(HUVECs),用 20 ng/ml 的 TNF- $\alpha$  和不同质量浓度的 rhIL-18BP 孵育相应时间,提取 mRNA 并用 PCR 及实时定量 PCR 检测细胞因子(IL-6、IL-8)、黏附分子(ICAM-1、VCAM-1)的 mRNA 表达;ELISA 法检测细胞上清液中细胞因子(IL-6、IL-8)、可溶性黏附分子(sICAM-1、sVCAM-1)的蛋白含量;流式细胞术检测细胞凋亡的变化。结果 1) IL-18BP 可以抑制 TNF- $\alpha$  诱导的人脐静脉内皮细胞中炎症因子的表达;2) IL-18BP 能抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 HUVECs 的凋亡。结论 rhIL-18BP 对 TNF- $\alpha$  诱导的内皮炎症反应有抑制作用,并可以抑制 TNF- $\alpha$  诱导的内皮细胞凋亡。

**[关键词]** 白细胞介素-18 结合蛋白;人脐静脉内皮细胞;炎症;凋亡;肿瘤坏死因子- $\alpha$

**[中图分类号]** R966

**[文献标识码]** A

## The effect of IL-18 binding protein on the inflammation and apoptosis of TNF- $\alpha$ -induced HUVECs

LI Gang<sup>1</sup><sup>△</sup>, HE Fuyun<sup>1</sup><sup>△</sup>, CHANG He<sup>1</sup>, HUANG Mingshan<sup>1,2</sup>, WANG Yan<sup>1,2</sup>\*

1. Xiamen Heart Center, Zhongshan Hospital, Xiamen University, Xiamen 361004, China; 2. Medical College, Xiamen University, Xiamen 361004; 3. Xiehe Medical College, Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China

\*Corresponding Author: WANG Yan, E-mail: wy@medmail.com.cn

<sup>△</sup>These authors contributed equally to this study and share first authorship.

**[Abstract]** We aim to investigate the effects of interleukin-18 binding protein (IL-18BP) on the inflammation and apoptosis of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). HUVECs were treated with 20 ng/ml TNF- $\alpha$  and different concentrations of IL-18BP for corresponding times. The mRNA expressions of IL-6, IL-8, ICAM-1, and VCAM-1 were detected by PCR and Real-time PCR; the protein expressions of IL-6, IL-8, sICAM-1, and sVCAM-1 were detected by ELISA. And the apoptosis was detected by flow cytometry detection. The results showed IL-18BP down-regulated the mRNA and protein expressions of IL-6, IL-8, ICAM-1, and VCAM-1. Furthermore, IL-18BP suppressed cell apoptosis of TNF- $\alpha$ -induced HUVECs. These results demonstrate that IL-18BP could inhibit the inflammatory response of endothelial cells to TNF- $\alpha$ , which suggested that IL-18BP exerts potential anti-inflammatory effect in modulating various inflammatory processes such as atherosclerosis.

**[Key words]** IL-18 binding protein; Human umbilical vein endothelial cell; Inflammation; Apoptosis; TNF- $\alpha$

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是由炎症因子和趋化因子介导的全身和局部的炎症和免疫反应性疾病<sup>[1]</sup>。内皮细胞的炎症、增殖及凋亡参与动脉粥样硬化逐渐形成及其发展<sup>[2]</sup>。研究和保护内皮细胞对防治 AS 具有重要的意义。

IL-18(interleukin 18)是一种多效能的细胞因子,

属于 IL-1 超家族成员,它可诱导 T 细胞和自然杀伤细胞产生 IFN- $\gamma$ , 并在 Th1 免疫应答中起重要作用。研究发现<sup>[3-4]</sup>,多效能前炎症因子白介素 18 积极参与了 AS 斑块的形成和发展过程,并与急性冠状动脉综合征(ACS)的发生关系密切<sup>[1,5]</sup>,并且提出血清 IL-18 的水平可能对冠心病患者的诊断及预后具有重要参考价值,是预测冠脉事件的一个独立的炎症因子,其预测价值高于血脂、C 反应蛋白(CRP)和 IL-6<sup>[4]</sup>。IL-18 通过 IL-18 受体 alpha (IL-18R alpha) 和 IL-18 受体 beta(IL-18R beta)起作用,其中 IL-18R alpha 是配体结合链,IL-18R beta 介导 IL-18 的信号传导,可溶性 IL-18 结合蛋白通过结合 IL-18,阻止 IL-18 与其受体

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81270294);福建省自然科学基金项目(2012J01415);厦门市科技计划项目(3502Z20124054)

作者单位:361004,厦门大学附属中山医院厦门市心脏中心(李刚,贺芙云,常贺,黄明山,王焱);361005,厦门大学医学院(王焱);350108 福州,福建医科大学协和临床医学院(黄明山)

\*通信作者:王焱,Tel:13860488088,E-mail:wy@medmail.com.cn

<sup>△</sup>共同第一作者

IL-18R alpha 及 IL-18R beta 结合从而拮抗 IL-18 的作用。白介素 18 结合蛋白(IL-18BP)还能消除 IL-18 诱导的 IFN- $\gamma$  和 IL-8 的产生以及对核因子的激活。IL-18 结合蛋白(IL-18BP)是存在于体内的天然的 IL-18 活性抑制剂,能够与 IL-18 高亲和力特异结合并拮抗其相关生物学功能的蛋白因子<sup>[6-9]</sup>。

本实验探讨 IL-18BP 对肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )诱导的内皮细胞的炎症因子、凋亡的影响,从而阐明 IL-18BP 在治疗动脉粥样硬化中的潜在作用。

## 1 材料与方法

**1.1 试剂** 人 IL-18a 结合蛋白重组蛋白购自 Sino Biological 公司。低糖 DMEM 培养基和胎牛血清、双抗(新西兰 Hyclone 公司)、bFGF(美国 Peprotech 公司)胰蛋白酶和人 TNF- $\alpha$  重组蛋白(美国 Sigma 公司)、Trizol(美国 Invitrogen)。逆转录试剂盒(德国 Fermentas 公司)、SYBR Green PCR 混合液(日本 TaKaRa 公司)、ELISA 试剂盒购自(中国达科为),Annexin V 联合 PI 细胞凋亡流式检测试剂盒购自(美国 Invitrogen),所用其他试剂均为进口或国产分析纯级。

**1.2 仪器** CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(美国 ThermoForma 公司)。7300 型荧光实时定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

**1.3 人脐静脉内皮细胞培养及分组** 胰酶消化法分离新鲜人脐带的脐静脉内皮细胞,用含有 10%胎牛血清、100 U/ml 的青霉素、100  $\mu$ g/ml 的链霉素、10 ng/ml 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的 DMEM 低糖培养基,置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。相差显微镜下人脐静脉内皮细胞呈铺路卵石状,用免疫染色方法鉴定其因子呈抗原阳性。

**1.4 实验分组** 取培养的 3~8 代细胞随机分组,实验分为 5 组:①空白对照组;②TNF- $\alpha$  诱导组:加入 20 ng/ml TNF- $\alpha$ ;③TNF- $\alpha$ +低浓度 IL-18BP 组:加入 20 ng/ml TNF- $\alpha$ +62.5 ng/ml IL-18BP;④TNF- $\alpha$ +中浓度 IL-18BP 组:加入 20 ng/ml TNF- $\alpha$ +125 ng/ml IL-18BP;⑤TNF- $\alpha$ +高浓度 IL-18BP 组:加入 20 ng/ml TNF- $\alpha$ +250 ng/ml IL-18BP。各组各设 6 个复孔。

**1.5 PCR 检测不同作用时间的 IL-18BP 对 TNF- $\alpha$  诱导的内皮细胞 mRNA 表达的影响** 培养液中加入 TNF- $\alpha$  和 IL-18BP,使 TNF- $\alpha$  终质量浓度 20 ng/ml,IL-18BP 终质量浓度为 125 ng/L,分别孵育 2、4、6、12 h 后,Trizol 提取细胞总 RNA,测定浓度后,按照反转录试剂盒说明书取 RNA 2  $\mu$ g 进行反转录,取反转录产物 0.05  $\mu$ l 按照 PCR 试剂盒说明书要求建立反应体

系,充分混合后置于 PCR 仪上进行扩增,琼脂糖凝胶电泳,结果以 GAPDH 为内参进行对比。PCR 循环的条件如下:预热 95  $^{\circ}$ C 3 min(1 个循环);解链 95  $^{\circ}$ C 10 s,退火 58  $^{\circ}$ C 30 s,延伸 72  $^{\circ}$ C 60 s(34 个循环),最终冷却至 12  $^{\circ}$ C。

**1.6 荧光实时定量 PCR** 细胞计数后,按  $1 \times 10^6$  cells/well 接种于细胞培养板中,继续培养 24 h,待细胞融合至 80%后进行实验。实验分组如上所述。继续孵育 4 h,收集细胞,提取总 RNA。按照反转录试剂盒说明将提取的总 RNA 进行反转录。荧光实时定量 PCR 采用 20  $\mu$ l 反应体系,其中含有 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II(2 $\times$ ) 10  $\mu$ l,ROX Reference Dye (50 $\times$ ) 0.4  $\mu$ l,反转录产物 4  $\mu$ l,上下游引物(终浓度为 10 nmol/L)各 0.5  $\mu$ l,dH<sub>2</sub>O 3.6  $\mu$ l。反应条件为:95  $^{\circ}$ C 12 min 进行预变性,然后两步法进行扩增,95  $^{\circ}$ C 10 s $\rightarrow$ 58  $^{\circ}$ C 40 s,42 个循环。mRNA 的表达水平通过与 GAPDH 的表达水平相比来进行定量和标准化。每一个对照组的 mRNA 水平都标准化为 1。结果将目的基因的 Ct 用 GAPDH 的 Ct 值进行标准化,根据比较法计算基因表达相对量,采用公式  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算基因表达的相对倍数变化。引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 和实时定量 PCR 引物列表

Tab 1 Primer sequences used for RT-PCR and Real-time PCR analysis

Gene	Primer sequence
IL-6	Forward 5'-CCA TCG GCG AGG ATAG TTC TG-3'
	Reverse 5'-TCT ACA TTC GAT GTT CAA TGC TCC A-3'
IL-8	Forward 5'-ACA CTG CGC CAA CAC AGA AAT TA-3'
	Reverse 5'-TTT GCT TGA AGT TTC ACT GGC ATC-3'
ICAM-1	Forward 5'-CTT GAT GGG CAG TCA ACA GCT A-3'
	Reverse 5'-ACA GCT GGC TCC CGT TTC A-3'
VCAM-1	Forward 5'-GGG AAC ACA TCT ACG CTG ACA A-3'
	Reverse 5'-GGC CAC TCA AAT GAA TCT CTG GA-3'
GAPDH	Forward 5'-GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC-3'
	Reverse 5'-TGG TGA AGA CGC CAG TGG A-3'

**1.7 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 IL-1、IL-6、IL-8、sICAM-1、sVCAM-1** 内皮细胞传 3~8 代后进行分组,将血管内皮细胞以  $2 \times 10^5$ /ml 接种于 6 孔培养板中,每孔 2 ml 培养基,每组设 6 个复孔,药物处理 24 h 后,收集细胞培养上清液,上清液离心,分装,-80  $^{\circ}$ C 冻存。根据 ELISA 法测定培养液中 IL-6、IL-8、sICAM-1、sVCAM-1 的含量,按照说明书操作检测。

**1.8 Annexin V 联合 PI 流式细胞术检测细胞凋亡情况** 将血管内皮细胞以  $2 \times 10^4$ /ml 接种于 96 孔培养板

中,每孔 200  $\mu$ l,每组设 6 个复孔,根据上述实验分组将 TNF- $\alpha$  和含不同浓度 IL-18BP 的培养液分别与 HUVECs 继续培养 48 h 后,胰酶消化细胞、离心,按试剂盒方法加染料,上流式细胞仪检测。

**1.9 统计学分析** 采用统计软件包 Graphpad Prism 5.0 统计软件对计量资料进行方差分析,数据均以均数 $\pm$ 标准差表示,两组间的统计分析采用 unpaired T test, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 不同时间 IL-18BP 对 TNF- $\alpha$  诱导的 HUVECs 各炎症因子 mRNA 表达均有下调** 给予 rhIL-18BP (125 ng/ml) 2、4、6、12 h 后各细胞因子和黏附分子的 mRNA 表达相对于相应时间的 TNF- $\alpha$  组均有不同程度的下降,而在 2 h 和 4 h 下降程度相对比较显著,故本实验后期实时定量 PCR 均选用 4 h 作为实验时间,如图 1 所示。

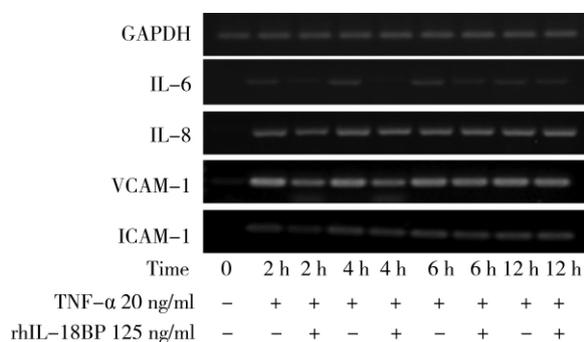


图 1 不同时间点 IL-6、IL-8、VCAM-1 及 ICAM-1 的表达  
Fig 1 The mRNA expression of IL-6, IL-8, VCAM-1, and ICAM-1 at different time points detected by RT-PCR

**2.2 不同剂量 IL-18BP 可下调 TNF- $\alpha$  诱导的 HUVECs 细胞因子 mRNA 表达** 用 TNF- $\alpha$  诱导后, HUVECs 中 IL-6 和 IL-8 mRNA 表达分别增加至正常组的(433.3 $\pm$ 204.5)倍和(150.1 $\pm$ 25.57)倍,而加入不同质量浓度的 rhIL-18BP(62.5、125、250 ng/ml)后,均有不同程度的下调,低剂量组(62.5 ng/ml)对下调至(123.2 $\pm$ 85.47)倍和(120.59 $\pm$ 7.27)倍,但差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),中剂量组(125 ng/ml)下调至(95.32 $\pm$ 64.49)倍( $P < 0.05$ , vs TNF- $\alpha$  group)和(106.41 $\pm$ 28.77)倍( $P > 0.05$ , vs TNF- $\alpha$  group),高剂量(250 ng/ml)下调至(78.39 $\pm$ 35.78)倍( $P < 0.01$ , vs TNF- $\alpha$  group)和(60.83 $\pm$ 30.06)倍( $P < 0.01$ , vs TNF- $\alpha$  group),如表 2 所示。

**2.3 不同剂量 IL-18BP 可下调 TNF- $\alpha$  诱导的 HUVECs 黏附分子 mRNA 表达** 如表 3, HUVECs 在 TNF- $\alpha$  诱导后中黏附分子 ICAM-1 和 VCAM-1 mRNA 表达增加至正常组的(131.2 $\pm$ 22.52)倍和(180.7 $\pm$

69.69) 倍,而加入低剂量组(62.5 ng/ml)对下调至(125.4 $\pm$ 32.21)倍和(163.5 $\pm$ 37.20)倍,但差异均无统计学意义。中剂量组(125 ng/ml)下调至(84.56 $\pm$ 26.89)倍( $P < 0.05$ , vs TNF- $\alpha$  group)和(100.9 $\pm$ 65.29)倍( $P > 0.05$ , vs TNF- $\alpha$  group),高剂量(250 ng/ml)下调至(66.09 $\pm$ 29.78)倍( $P < 0.01$ , vs TNF- $\alpha$  group)和(80.15 $\pm$ 39.13)倍( $P < 0.05$ , vs TNF- $\alpha$  group)。

表 2 各组 IL-6 和 IL-8 mRNA 实时定量 PCR 表达结果  
Tab 2 Relative mRNA expressions of IL-6 and IL-8 detected by Real time PCR

Group	rhIL-18BP concentration/(ng·ml <sup>-1</sup> )	mRNA expression(folds)	
		IL-6	IL-8
Blank control	-	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0
TNF- $\alpha$	-	433.3 $\pm$ 204.5	150.1 $\pm$ 25.57
TNF- $\alpha$ +low level rhIL-18BP	62.5	123.2 $\pm$ 85.47	120.59 $\pm$ 7.27
TNF- $\alpha$ +medium level rhIL-18BP	125	95.32 $\pm$ 64.49 <sup>a</sup>	106.41 $\pm$ 28.77 <sup>b</sup>
TNF- $\alpha$ +high level rhIL-18BP	250	78.39 $\pm$ 35.78 <sup>b</sup>	60.83 $\pm$ 30.06 <sup>b</sup>

a)  $P < 0.05$ , b)  $P < 0.01$ , vs TNF- $\alpha$  group.

表 3 各组 ICAM-1 和 VCAM-1 mRNA 实时定量 PCR 表达结果  
Tab 3 Relative mRNA expressions of ICAM-1 and VCAM-1 detected by Real time PCR

Group	rhIL-18BP concentration/(ng·ml <sup>-1</sup> )	mRNA expression(folds)	
		ICAM-1	VCAM-1
Blank control	-	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0
TNF- $\alpha$	-	131.2 $\pm$ 22.52	180.7 $\pm$ 69.69
TNF- $\alpha$ +low level rhIL-18BP	62.5	125.4 $\pm$ 32.21	163.5 $\pm$ 37.20
TNF- $\alpha$ +medium level rhIL-18BP	125	84.56 $\pm$ 26.89 <sup>a</sup>	100.9 $\pm$ 65.29
TNF- $\alpha$ +high level rhIL-18BP	250	66.09 $\pm$ 29.78 <sup>b</sup>	80.15 $\pm$ 39.13 <sup>a</sup>

a)  $P < 0.05$ , b)  $P < 0.01$ , vs TNF- $\alpha$  group.

**2.4 IL-18BP 可降低 TNF- $\alpha$  诱导的 HUVECs 细胞上清液中细胞因子蛋白质量浓度** 如表 4, 细胞上清液细胞因子蛋白表达结果与 mRNA 表达趋势一致,空白对照组 IL-6 和 IL-8 质量浓度较低,分别为(68.37 $\pm$ 4.021) pg/ml 和(67.48 $\pm$ 4.922) pg/ml,用 TNF- $\alpha$  诱导后, HUVECs 上清液 IL-6 和 IL-8 质量浓度增加至(676.2 $\pm$ 18.79) pg/ml 和(3 159 $\pm$ 46.29) pg/ml,加入不同剂量 rhIL-18BP 后 IL-6 和 IL-8 均有不同程度下调,其中高剂量(250 ng/ml)降至(508.5 $\pm$ 24.07) pg/ml ( $P < 0.001$ , vs TNF- $\alpha$  group)和(2 817 $\pm$ 197.7) pg/ml ( $P < 0.01$ , vs TNF- $\alpha$  group)。

**2.5 IL-18BP 可降低 TNF- $\alpha$  诱导的 HUVECs 细胞上清液中可溶性黏附分子蛋白表达** 如表 5, 细胞上清液中可溶性黏附分子蛋白表达结果与 mRNA 表达趋势一致,空白对照组 sICAM-1 和 sVCAM-1 质量浓度较

低,分别为(44.41±13.58) pg/ml 和(0±0) pg/ml,用TNF-α 诱导后,HUVECs 上清液 sICAM-1 和 sVCAM-1 质量浓度增加至(3 512±126.6) pg/ml 和(367.3±36.84) pg/ml,加入不同剂量 rhIL-18BP 后 sICAM-1 和 sVCAM-1 均有不同程度下调,其中高剂量(250 ng/ml)降至(3 022±124.4) pg/ml ( $P < 0.001$ , vs TNF-α group)和(195.0±32.29) pg/ml( $P < 0.01$ , vs TNF-α group)。

表 4 各组细胞上清中 IL-6 和 IL-8 质量浓度

Tab 4 Protein concentrations of IL-6 and IL-8 in cell culture supernatant detected by ELISA

Group	rhIL-18BP concentration/(ng·ml <sup>-1</sup> )	protein concentration/(pg·ml <sup>-1</sup> )	
		IL-6	IL-8
Blank control	-	68.37±4.021	67.48±4.922
TNF-α	-	676.2±18.79	3159±46.29
TNF-α+low level rhIL-18BP	62.5	640.1±40.95	3164±35.73
TNF-α+medium level rhIL-18BP	125	572.1±32.24 <sup>a</sup>	3031±38.76
TNF-α+high level rhIL-18BP	250	508.5±24.07 <sup>a</sup>	2817±197.7 <sup>a</sup>

a)  $P < 0.01$ , vs TNF-α group.

表 5 各组细胞上清中 sICAM-1 和 sVCAM-1 质量浓度

Tab 5 Protein concentrations of sICAM-1 and sVCAM-1 in cell culture supernatant detected by ELISA

Group	rhIL-18BP concentration/(ng·ml <sup>-1</sup> )	protein concentration/(pg·ml <sup>-1</sup> )	
		sICAM-1	sVCAM-1
Blank control	-	44.41±13.58	0±0
TNF-α	-	3512±126.6	367.3±36.84
TNF-α+low level rhIL-18BP	62.5	3428±112.6	351.3±43.06
TNF-α+medium level rhIL-18BP	125	3228±109.2 <sup>a</sup>	324.8±56.80 <sup>a</sup>
TNF-α+high level rhIL-18BP	250	3022±124.4 <sup>a</sup>	195.0±32.29 <sup>a</sup>

a)  $P < 0.01$ , vs TNF-α group.

**2.6 不同剂量 IL-18BP 可抑制 TNF-α 诱导的 HUVECs 细胞凋亡** 用 TNF-α 和 IL-18BP 孵育 HUVECs 48 h 后,与空白对照组相比,TNF-α 能升高 HUVECs 的凋亡。而加入不同质量浓度的 IL-18BP (62.5、125、250 ng/ml)后,可以不同程度地拮抗 TNF-α 对 HUVECs 的凋亡作用(各组均  $P < 0.01$ , vs TNF-α group),并呈剂量依赖性,如图 2 所示。

### 3 讨论

IL-18 是 IFN-γ 诱导因子<sup>[10-11]</sup>,能诱导 T 细胞和自然杀伤细胞产生干扰素-γ,并能与 IL-12 协同,促进 IL-1、TNF-α 等促炎因子、促进 IL-8、巨噬细胞炎症蛋白-1 等趋化因子的产生;诱导细胞和自然杀伤细胞表达 Fas 配体等,参与免疫反应的调节;IL-18 作为促炎症因子,能诱导细胞间黏附分子(ICAM-1)、

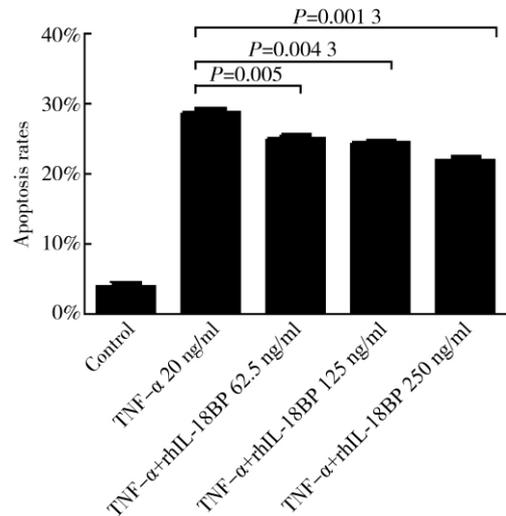


图 2 不同药物处理后细胞凋亡结果

Fig 2 Apoptosis rates of HUVECs detected by flow cytometry

血管细胞 VCAM-1 和 IL-1β 的产生,而这些都在 AS 的发展中起着重要的作用<sup>[12-17]</sup>。研究发现 IL-18 水平升高是一项反映机体炎症状态的敏感标志物,国外有学者<sup>[18]</sup>提出 IL-18 水平升高是冠心病的独立危险因素之一,并证实 IL-18 在 AS 发生、发展及斑块破裂中起重要的作用<sup>[5,19-21]</sup>。

IL-18 作为一种多效细胞因子,广泛参与心血管系统疾病的发生发展<sup>[6,22]</sup>。研究发现与 IL-18 受体有关的蛋白质有 3 种,IL-18Rα 和 IL-18Rβ 及 IL-18 结合蛋白(IL-18BP),IL-18BP 能够与 IL-18 以高亲和力特异性结合<sup>[6,22]</sup>,在体外消除 IL-18 诱导的 IFN-γ 和 IL-8 的生成及对 NF-κB 的激活<sup>[23]</sup>,拮抗其相关生物学功能。使用 IL-18BP 抑制 IL-18 表达,可能成为防治冠状动脉粥样硬化的新策略。目前白介素 18 结合蛋白在糖尿病、自身免疫性疾病的发生的研究较多,但在 AS 中的作用研究比较少,本研究通过检测 IL-18BP 对 TNF-α 诱导的内皮细胞中炎症因子的表达及细胞凋亡的影响,阐述了 IL-18BP 具有减轻内皮损伤过程中的炎症反应的作用,并对 TNF-α 诱导的内皮细胞凋亡具有拮抗作用。

本文结果显示,给予 20 ng/ml 的 TNF-α 诱导后可明显上调 HUVECS 中细胞因子和黏附分子(IL-6、IL-8、ICAM-1、VCAM-1)mRNA 及蛋白表达增加,并增加内皮细胞的凋亡,加入不同剂量的 IL-18BP 可不同程度地抑制 TNF-α 诱导的炎症因子(IL-6、IL-8、ICAM-1、VACM)mRNA 及蛋白的表达,同时对 TNF-α 诱导的内皮细胞凋亡具有拮抗作用,且呈剂量依赖性。上述结果表明 IL-18BP 可以抑制内皮细胞损伤后炎症相关因子的产生,拮抗 TNF-α 抑制内皮细胞的凋亡的作用,这说明 IL-18BP 在内皮损伤过程中

发挥了抗炎作用。

越来越多的结果表明, IL-18BP 具有拮抗 IL-18 生物学活性的作用, 是 IL-18 天然的内在的拮抗剂。研究 IL-18 生物拮抗剂, 对于调控 IL-18 相关的疾病及其信号转导和生物学功能都具有重要的应用价值和理论意义。而 IL-18 参与了多种炎症和自身免疫疾病, 机体虽然有天然的拮抗物, 但在病理情况下, 其含量往往不足, 需要补充 IL-18BP, 因此这是一种比较有开发前景的细胞因子, 有助于进一步明确心血管系统等 IL-18 相关的疾病的发病机制, 协助临床诊断与治疗。IL-18 生物学活性已基本阐明, 但是对于 IL-18BP 的全部生物活性、作用机制及调控机制有待于进一步深入研究。

#### 【参考文献】

- [1] Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis[J]. *Circulation*, 2002, 105(9): 1135-1143.
- [2] Onat D, Brillon D, Colombo PC, et al. Human vascular endothelial cells: a model system for studying vascular inflammation in diabetes and atherosclerosis[J]. *Curr Diab Rep*, 2011, 11(3): 193-202.
- [3] Narins CR, Lin D, Burton PB, et al. Interleukin-18 and interleukin-18 binding protein levels before and after percutaneous coronary intervention in patients with and without recent myocardial infarction[J]. *Am J Cardiol*, 2004, 94(10): 1285-1287.
- [4] 常贺, 李刚, 张乐, 等. IL-18, IL-12 及相关因子在大鼠实验性自身免疫性心肌炎心肌中的表达时程和特征[J]. *免疫学杂志*, 2010, 26(6): 502-506.
- [5] Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A, et al. Expression of interleukin-18 in human atherosclerotic plaques and relation to plaque instability[J]. *Circulation*, 2001, 104(14): 1598-1603.
- [6] 姚翠微, 张军峰, 刘华锋, 等. IL-18 通过 JNK 途径诱导肾小管上皮细胞转分化[J]. *免疫学杂志*, 2009, 25(6): 629-631, 637.
- [7] Dinarello CA. Targeting interleukin 18 with interleukin 18 binding protein[J]. *Ann Rheum Dis*, 2000, 59(Suppl 1): i17-i20.
- [8] Ludwiczek O, Kaser A, Novick D, et al. Plasma levels of interleukin-18 and interleukin-18 binding protein are elevated in patients with chronic liver disease[J]. *J Clin Immunol*, 2002, 22(6): 331-337.
- [9] Corbaz A, Ten HT, Herren S, et al. IL-18-binding protein expression by endothelial cells and macrophages is up-regulated during active crohn's disease[J]. *J Immunol*, 2002, 168(7): 3608-3616.
- [10] Okamura H, Tsutsi 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.
- [11] Ushio S, Namba M, Okura T, et al. Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein[J]. *J Immunol*, 1996, 156(11): 4274-4279.
- [12] Fantuzzi G, Puren AJ, Harding MW, et al. Interleukin-18 regulation of interferon gamma production and cell proliferation as shown in interleukin-1 beta-converting enzyme (caspase-1)-deficient mice[J]. *Blood*, 1998, 91(6): 2118-2125.
- [13] Kohka H, Yoshino T, Iwagaki H, et al. Interleukin-18/interferon-gamma-inducing factor, a novel cytokine, up-regulates ICAM-1 (CD54) expression in KG-1 cells[J]. *J Leukoc Biol*, 1998, 64(4): 519-527.
- [14] Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, et al. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses [J]. *Annu Rev Immunol*, 2001, 19: 423-474.
- [15] Puren AJ, Fantuzzi G, Gu Y, et al. Interleukin-18 (ifngamma-inducing factor) induces IL-8 and IL-1beta via tnfa production from non-CD14+ human blood mononuclear cells[J]. *J Clin Invest*, 1998, 101(3): 711-721.
- [16] Takeda K, Tsutsui H, Yoshimoto T, et al. Defective NK cell activity and Th1 response in IL18-deficient mice [J]. *Immunity*, 1998, 8(3): 383-390.
- [17] Xu D, Chan WL, Leung BP, et al. Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper (Th) type 1 but not Th2 cells[J]. *J Exp Med*, 1998, 188(8): 1485-1492.
- [18] Thompson SJ, Stephens JW. A common interleukin 18 haplotype is associated with higher body mass index in subjects with diabetes and coronary heart disease [J]. *Metabolism*, 2007, 56(5): 662-669.
- [19] 李崇剑, 高润霖, 杨跃进, 等. 易损斑块的病理生理机制及其检验的研究[J]. *中华心血管病杂志*, 2004, 32(6): 570-572.
- [20] Gerdes N, Sukhova GK, Libby P, et al. Expression of interleukin (IL)18 and IL-18 receptor on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for atherogenesis[J]. *J Exp Med*, 2002, 195(2): 245-257.
- [21] Blankenberg S, Luc G, Ducimetière P, et al. Interleukin-18 and the risk of coronary heart disease in european men: the prospective epidemiological study of myocardial infarction (prime)[J]. *Circulation*, 2003, 108(20): 2453-2459.
- [22] Kimura T, Kato Z, Ohnishi H, et al. Expression, purification and structural analysis of human IL-18 binding protein: a potent therapeutic molecule for allergy [J]. *Allergol Int*, 2008, 57(4): 367-376.
- [23] Novick D, Kim SH, Fantuzzi G, et al. Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response[J]. *Immunity*, 1999, 10(1): 127-136.

(收稿日期: 2012-09-18; 修回日期: 2012-10-31)

(编辑 侯瑞)