

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 24520101153276

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**IL-18BP 重组蛋白对 TNF- α 诱导的人脐静
脉内皮细胞炎症、凋亡的作用研究**

**The effect of IL-18 binding protein on the inflammation and
apoptosis on TNF- α -induced HUVECs**

贺 芙 云

指导教师姓名: 王焱 教授

专 业 名 称: 内科学—心血管

论文提交日期: 2013 年 月

论文答辩时间: 2013 年 月

学位授予日期: 2013 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（）课题（组）的研究成果，获得（）课题（组）经费或实验室的资助，在（）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

研究背景: 动脉粥样硬化(AS)是一种炎症性疾病,内皮损伤是其形成的起始环节。白细胞介素 18(IL-18)是多效能的前炎症因子,能够诱导 T 淋巴细胞产生 γ -干扰素(IFN- γ),在天然和适应性免疫系统中起着重要的作用。研究表明,IL-18 参与了 AS 斑块的形成和发展过程。白细胞介素 18 结合蛋白(IL-18BP)是一种可溶性蛋白,因其能够以高亲和力与 IL-18 结合而抑制 IL-18 相关的生物活性。目前,白细胞介素-18 结合蛋白(IL-18BP)在内皮损伤过程的作用还尚不清楚。

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- α)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 20ug/ml 的 TNF- α 和不同浓度的人重组 IL-18 结合蛋白(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)及粘附分子(ICAM、VACM)的表达;ELISA 法检测细胞上清液中细胞因子(IL-6、IL-8)及可溶性粘附分子(sICAM、sVACM)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- α 诱导的人脐静脉内皮细胞炎症因子的表达。2) IL-18BP 能抑制 TNF- α 诱导的 HUVECs 的凋亡。

结论: IL-18BP 对 TNF- α 诱导的内皮炎症反应有抑制作用,同时可抑制 TNF- α 诱导的 HUVECs 的凋亡,从而阐明 IL-18BP 在不同的炎症过程中比如动脉粥样硬化中具有潜在的调节作用。

关键词: IL-18 结合蛋白; 内皮细胞; 炎症; 凋亡;

Abstract

Background: Atherosclerosis is an inflammatory disease. Endothelial dysfunction is important and primal pathological process in atherosclerosis. Interleukin 18 (IL-18) is a pleiotropic proinflammatory cytokine that is found to induce the production of interferon-gamma (IFN- γ) in T lymphocytes, and plays an important role in innate and adaptive immune systems. It was proved that IL-18 has important effect in the formation and development of atherosclerosis. Interleukin-18 binding protein (IL-18BP) is a kind of soluble protein, it can bind to IL-18 with high affinity and inhibit IL-18-related biological activity. However, there is a paucity of data regarding the anti-inflammatory action of IL-18BP in endothelial dysfunction.

Objective: In this study, we investigated the effect of IL-18BP on the inflammation and apoptosis of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) induced by tumor necrosis factor- α (TNF- α).

Methods: HUVECs were treated with 20ng/mL TNF- α and different concentrations of IL-18BP (62.5, 125, 250ng/mL) for corresponding time, the mRNA expression of IL-6, IL-8, ICAM, VACM were detected by PCR and Real-time PCR.; The cytokine of IL-6, IL-8 and adhesion molecule of ICAM, VACM protein expression were detected by ELISA; The apoptosis was detected by flow cytometry detection.

Results: The results showed IL-18BP down-regulated IL-6, IL-8, ICAM, VACM mRNA and protein expression in TNF- α -induced HUVECs. Furthermore, IL-18BP suppressed cells apoptosis of HUVECs induced by TNF- α .

Conclusion: Taken together, these results demonstrate that IL-18BP inhibited the inflammatory response of endothelial cells to the stimulation of TNF- α . It suggested that IL-18BP exert potential anti-inflammatory effect in modulate various inflammatory processes such as atherosclerosis.

Key words: IL-18 binding protein; Endothelial cells; Inflammation ; Apoptosis;

目 录

第一章 前言	1
1.1 动脉粥样硬化的概述	1
1.1.1 内皮细胞与动脉粥样硬化.....	2
1.1.2 脂质与动脉粥样硬化.....	3
1.1.3 单核巨噬细胞与动脉粥样硬化.....	3
1.1.4 T 淋巴细胞与动脉粥样硬化	4
1.1.5 平滑肌细胞与动脉粥样硬化.....	5
1.1.6 血小板与动脉粥样硬化.....	5
1.2 IL-18BP 的概述	6
1.3 IL-18BP 与相关疾病的关系	9
1.3.1 IL-18BP 在动脉粥样硬化及冠心病中潜在治疗作用.....	9
1.3.2 IL-18BP 在糖尿病中的预防及治疗作用.....	10
1.3.3 IL-18BP 与其他疾病的关系	11
1.4 本论文研究的意义和主要内容	12
第二章 实验材料与方法	14
2.1 实验材料	14
2.1.1 实验器材.....	14
2.1.2 实验试剂.....	15
2.1.3 主要试剂的配置.....	16
2.2 实验方法	17
2.2.1 人脐静脉内皮细胞的培养与鉴定.....	17
2.2.2 细胞因子及粘附分子的 mRNA 表达	18
2.2.3 细胞因子及粘附分子的蛋白表达.....	22
2.2.4 细胞凋亡实验.....	23
第三章 结果与分析	25
3.1 人脐静脉内皮细胞的培养与鉴定实验结果	25

3.1.1 培养细胞的形态学观察.....	25
3.1.2 免疫组织化学染色鉴定.....	25
3.1.3 小结.....	26
3.2 IL-18BP 对 TNF-α 诱导的 HUVECs 中细胞因子表达的影响	27
3.2.1 不同作用时间的 IL-18BP 对 TNF- α 诱导的 HUVECs 中 mRNA 表达的 影响.....	27
3.2.2 不同剂量的 IL-18BP 对 TNF- α 诱导的 HUVECs 中 mRNA 表达的 影响.....	28
3.2.3 IL-18BP 可降低 TNF- α 诱导的 HUVECs 的细胞上清液中细胞因子及可 溶性粘附分子蛋白浓度.....	30
3.2.4 不同剂量的 IL-18BP 可抑制 TNF- α 诱导的 HUVECs 的凋亡.....	31
3.2.5 小结.....	32
第四章 讨论与展望	34
4.1 讨论	34
4.2 结论	36
4.3 不足与展望	37
参考文献	39
缩略语表	43
致谢.....	54

Catalogue

Chapter1 Introduction.....	1
1.1 Overview of atherosclerosis.....	1
1.1.1 Endothelial cells and atherosclerosis.....	2
1.1.2 Lipids and atherosclerosis.....	3
1.1.3 Mononuclear phagocytes and atherosclerosis.....	3
1.1.4 T lymphocytes and atherosclerosis.....	4
1.1.5 Smooth muscle cells and atherosclerosis.....	5
1.1.6 Platelets and atherosclerosis.....	5
1.2 Overview of IL-18 binding protein.....	6
1.3 Relation of diseases and atherosclerosis.....	9
1.3.1 IL-18 and atherosclerosis and coronary disease.....	9
1.3.2 IL-18 and diabetes mellitus.....	10
1.3.3 IL-18 and other diseases.....	11
1.4 The main subject of research content.....	12
Chapter 2 Materials and methods.....	14
2.1 Materials.....	14
2.1.1 Experiment equipment.....	14
2.1.2 Experiment reagents.....	15
2.1.3 Configuration of the main reagents.....	16
2.2 Methods.....	17
2.2.1 Culture and identification of human umbilical vein endothelial cell.....	17
2.2.2 mRNA expression of cytokines and adhesion molecules.....	18
2.2.3 Protein expression of cytokines and adhesion molecules.....	22
2.2.4 Cell apoptosis.....	23
Chapter 3 Experimental results and analyse.....	25
3.1 The results of Culture and identification of human umbilical vein	

endothelial cell.....	25
3.1.1 Morphology of cultured HUVECs.....	25
3.1.2 Immunocytochemistry of HUVECs.....	25
3.1.3 Summary.....	26
3.2 Effects of IL-18BP on expression of cytokines in TNF-α-induced HUVECs.....	27
3.2.1 Different time of IL-18BP on mRNA expression of inflammatory factor in TNF- α -induced HUVECs.....	27
3.2.2 Effects of IL-18BP on mRNA expression of inflammatory factor in TNF- α -induced HUVECs	28
3.2.3 Effects of IL-18BP on protein expression of inflammatory factor in TNF- α -induced HUVECs.....	30
3.2.4 IL-18BP can inhibit cell apoptosis in TNF- α -induced HUVECs	31
3.2.5 Summary.....	32
Chapter 4 Discussion and expectation.....	34
4.1 Discussion.....	34
4.2 Conclusion.....	36
4.3 Shortage and expectation.....	37
References of paper.....	39
Table of Abbreviation.....	43
Acknowledgement.....	54

第一章 前言

1.1 动脉粥样硬化的概述

动脉粥样硬化 (ather osclerosis , AS)是众多心脑血管疾病共同的病理基础,也是心血管系统疾病中最常见的疾病,其发病率和死亡率已超过肿瘤性疾病而跃居世界第一,严重危害人类健康。据报道,在 AS 特征病变出现之前,人类从很小的年龄开始动脉就会出现弥散性内膜增厚,因此儿童时期的 AS 病变应引起高度重视。AS 动脉粥样硬化是一种多因性疾病,它与环境、代谢、基因等多种因素相关,流行病学调查表明高血压、血脂异常、糖尿病、肥胖、吸烟、饮酒等是发生 AS 的危险因素。AS 的发生发展包括脂质入侵、血小板活化、血栓形成、内膜损伤、炎症反应、氧化应激、血管平滑肌细胞 (VSMC)激活、选择性基质代谢及血管重建等。由于其病因复杂,动脉粥样硬化病变发展缓慢,过去多是对其危险因素(高血脂,高血压,高血糖等进行研究),后来才逐步转向对动脉壁的有关细胞成分(内皮、平滑肌及单核/巨噬细胞)、细胞因子、生长因子和分子生物学方面的研究,近年来这方面的研究发展迅速。从上世纪 70 年代起一些流行病学研究就已肯定胆固醇,尤其是 LDL 胆固醇为冠心病独立危险因素。80 年代末,LDL 引发动脉粥样硬化的机制取得重大突破,LDL 的氧化修饰假说及炎症假说已被公认。从 80 年代后期,尤其是 90 年代,进行的众多大规模临床试验结果认为,降低血 LDL 胆固醇水平可显著降低冠心病及急性冠脉事件的发生率以及冠心病的死亡率。这不仅在人群水平验证了胆固醇与冠心病发病的关系,而且为冠心病的防治提供了行之有效的对策。AS 慢性炎症学说,认为炎症反应贯穿 AS 病变全程,是对 AS 病变的新认识,使人们由重视斑块大小衍生为重视斑块性质。1976 年, Rusell 提出损伤——反应学说,他认为各种危险因素(血压变化、血糖波动、过度紧张、抑郁、高血脂等)造成动脉内膜损伤,为 AS 始动阶段,渐渐斑块形成致血管狭窄而致供血之远端缺血。该理论强调冠心病发病与斑块大小有关,因此临床上按斑块大小来确定病变严重性。1989 年, Muller 研究证明斑块稳定性是急性冠状动脉病变主因。提出“斑块稳定”一词,并提出 AS 斑块由寂静向不稳定、易破原因为:(1)危险因素在

破裂部位致炎症反应。(2) 1995 年, shah 证明巨噬细胞释放基质金属蛋白酶 MMPS, 溶解细胞外基质, 致斑块破裂。因此, 对 AS 发病由重视斑块大小到注重“斑块稳定性”是近年来的重大进展。虽经历了近一个世纪的研究, 很多学者也提出了关于 AS 发病机制的不同学说, 如脂质浸润假说、单克隆假说、血栓形成假说、损伤-反应假说、切应力假说等, 这些学说都尚不能完全解释 AS 所有的发病基础^[1]。目前, Rusell 提出的“损伤-反应假说”得到大多数学者的支持, 该学说认为 AS 是一个慢性炎症性疾病, 在随后的大量的临床和基础研究结果也证实这一观点, 在 AS 斑块中存在大量的炎症相关细胞, 内皮功能不全、白细胞浸润、血管平滑肌细胞增生迁移、泡沫细胞形成等促使了 AS 的发生、发展。如图 1 所示。

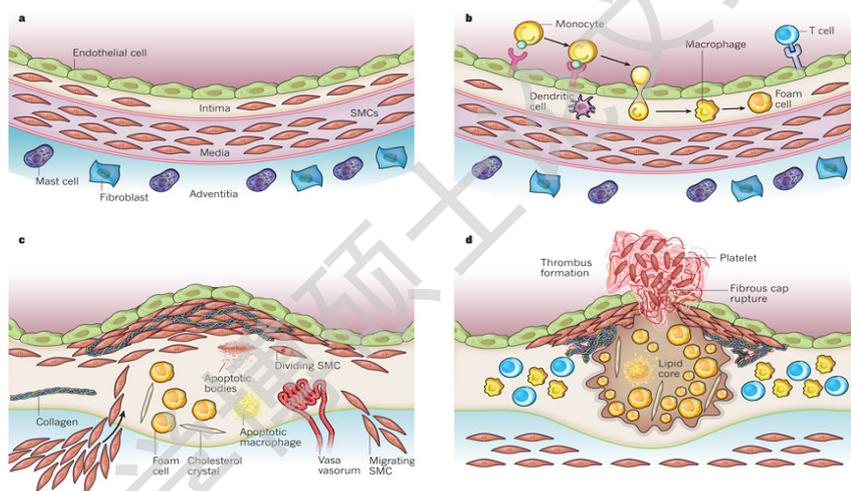


图 1 动脉粥样硬化的发展过程。

Figure 1 Stages in the development of atherosclerotic lesions.

1.1.1 内皮细胞与动脉粥样硬化

内皮是所有心血管危险因素共同的靶点, 在可见的 AS 斑块出现前很长时间血管内皮功能损伤就早已形成。血管内皮细胞 (endothelial cell, EC) 受损是 AS 发生的起始环节。EC 不仅仅是血液与血管壁之间一层半透性屏障, 还具有内分泌及旁分泌功能, 可产生和分泌几十种生物活性物质, 发挥调节血管张力、抗凝血和抗炎等重要的生理功能。在 AS 危险因素的作用下引起 EC 结构和功能损伤, EC 结构被破坏, 其半透性屏障受损, 通透性增高, 大量血中低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 进入内膜下沉积, 并经氧化修饰形成氧化型

低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL); EC 表面粘附分子表达增加并释放多种炎症因子和趋化蛋白, 如白细胞介素类 (interleukin, IL)、单核细胞趋化蛋白 (monocyte chemoattractant protein 1, MPC-1)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等, 从而促进单核细胞、淋巴细胞和血小板等在其表面的粘附、聚集、激活; EC 还可以释放多种生长调节因子, 包括成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF), 血小板源性生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF), 胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factors, IFG-I), β -转化生长因子 (transforming growth factor- β , TGF- β) 等, 刺激平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC) 和单核巨噬细胞增生, 促进 AS 的发展。最新研究发现, 内皮细胞特异性的细胞表面蛋白 Tie -1 在内皮细胞过表达时, 可通过 p38 依赖的机制上调血管细胞黏附分子-1, E-selectin 和细胞间黏附分子, 同时可促进单核细胞黏附到内皮细胞上, 从而促进内皮细胞炎症反应的发生。

1.1.2 脂质与动脉粥样硬化

大量研究证明, AS 的病理改变始于儿童青少年时期, 且与血脂水平, 特别是血浆胆固醇及三酰甘油水平密切相关。脂质和脂肪酸的沉积是内皮细胞功能障碍和 AS 形成过程中重要的病理机制。研究发现, 与正常动脉相比, 有 AS 斑块的动脉载脂蛋白 C1 和载脂蛋白 E 的蛋白和基因表达均明显升高, 这可能是 AS 形成的原因而不单单是一种结果。高脂血症在 AS 发病中的作用机制除直接引起内皮细胞损伤外, 主要是使内皮细胞的通透性增加, 这与低密度脂蛋白 (LDL) 的氧化修饰成为氧化性低密度脂蛋白 (ox-LDL) 有关。当 ox-LDL 穿过未受损的内皮时, 血浆 LDL 被运输到内皮下间隙进行氧化修饰。LDL 被氧化可使血液中的脂质易于沉积在内膜, 引起巨噬细胞的清除反应和中膜 VSMC 的增生形成粥样斑块。以上变化可最终导致动脉内膜脂纹、纤维斑块和 (或) 粥样斑块的形成。

1.1.3 单核巨噬细胞与动脉粥样硬化

在 AS 病变的各个阶段都伴有大量的单核巨噬细胞浸润。生理状态下的动脉组织中的巨噬细胞很少, EC 损伤诱导血液中的单核细胞粘附、聚集, 继而通

过内皮间隙进入内膜，并在内膜下转化为巨噬细胞。巨噬细胞产生的活性氧和脂肪酶可使 LDL 氧化形成 ox-LDL，同时，巨噬细胞通过 A 型清道受体摄取 ox-LDL，介导天然免疫反应，并形成巨噬细胞源性泡沫细胞，大量泡沫细胞堆积在一起形成脂质条纹，从而导致粥样斑块的形成。摄取 ox-LDL 后，巨噬细胞被刺激可产生多种细胞因子进一步加剧单核细胞聚集、巨噬细胞的增殖以及 SMC 细胞的迁移、增殖，促使 AS 不断进展，如巨噬细胞分泌巨噬细胞集落刺激因子（macrophage-colony stimulating factor, M-CSF）和粒巨细胞集落刺激因子（granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF）诱导单核细胞增殖，PDGF-AA、PDGF-BB、肝素结合样表皮生长因子（heparin-binding epidermal growth factor, HB-EGF）等诱导 SMC 增殖，血管内皮生长因子和转化生长因子诱导 EC 增殖，M-CSF、GM-CSF、MPC-1 和 ox-LDL 可吸引其他单核细胞，血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）和 FGF 吸引 EC，TGF- β 、PDGF 和 FGF 吸引 SMC 向病灶部聚集。此外，巨噬细胞分泌的基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)可降解斑块中的胶原和细胞外基质，使 AS 斑块纤维帽变薄，不稳定性增加。巨噬细胞不但介导天然免疫反应，还可通过将外源性抗原呈递给 T 淋巴细胞使继发性免疫系统被激活，从而加重血管炎性反应。

1.1.4 T 淋巴细胞与动脉粥样硬化

AS 斑块中存在 CD4⁺和 CD8⁺两种 T 淋巴细胞，其中以 CD4⁺的辅助性 T 细胞（Th1）居多。研究显示，可能与单核细胞分泌的 IL-2 刺激淋巴细胞增殖有关。激活的 T 淋巴细胞可以释放干扰素- γ （interferon- γ , INF- γ ）、GM-CSF β 和 TNF- α ，活化吸引巨噬细胞，导致斑块增大。细胞外基质（extracellular matrix, ECM）在维持动脉正常组织结构与功能中起着重要作用。生理情况下，ECM 处于不断代谢更新、降解重塑的动态平衡中。ECM 的合成减少，降解增多，使纤维帽变薄，是导致 AS 斑块易于破裂的主要原因。AS 斑块“肩部”等易损区域中存在 T 淋巴细胞，被激活后分泌 INF- γ 可以显著抑制 SMC 胶原基因表达，从而减少 ECM 的合成。此外，斑块中的巨噬细胞和 SMC 可表达的 CD40 受体，而激活的 T 淋巴细胞可表达 CD40 配体，这种 CD40-CD40L 的相互作用可明显增强巨噬细胞和 SMC 分泌的 MMPs 活性，从而增多 ECM 的降解。

1.1.5 平滑肌细胞与动脉粥样硬化

激活的 EC、泡沫细胞等都能产生促进血管 SMC 迁移和增殖的信号分子，使 SMC 从中膜移入内膜。SMC 向内膜迁移、增殖，成为 AS 斑块的主要细胞，并促进 AS 病变继续发展。SMC 表面有 LDL 受体，可摄取 LDL 及极低密度脂蛋白（very low density lipoprotein, VLDL）而形成 SMC 源性泡沫细胞；进入中膜的 VSMC 发生表型转换，既由收缩型（胞浆内含大量肌丝及致密体）转变为合成型（含丰富粗面内质网、核蛋白及线粒体），AS 中呈合成型改变的 SMC，分泌大量的胶原纤维、弹力纤维、蛋白多糖构成斑块的间质成分。SMC 通过合成血管活性物质和炎症因子，如 TNF、IL-6 等促进白细胞增殖，诱导 EC 表达粘附分子。此外，SMC 还可合成释放多种生长调节因子（如 PDGF、FGF 和平滑肌细胞源性趋化因子），促进更多的中膜 SMC 向病灶迁移和增殖。体内 VSMC 的增殖与凋亡处于动态平衡，正常情况下 SMC 仅有少量凋亡。在 AS 早期，SMC 大量增殖，其增殖速度远远超过凋亡速度，促进了斑块纤维帽的形成、发展。在 AS 晚期，SMC 的增殖速度下降，其凋亡速度远远超过增殖速度，促使纤维帽破裂，从而导致心血管事件的发生。

1.1.6 血小板与动脉粥样硬化

动脉内皮细胞损伤后，可促进血小板黏附到受损的内皮细胞上，从而促进 PDGF 的释放，导致肌内膜细胞不断增生，最终导致胶原合成，形成 AS 斑块。在 AS 血栓形成的最终阶段，血小板的黏附、活化和聚集可导致动脉闭塞和继发性缺血。血小板在 AS 中的作用主要表现在：（1）任何形式的内皮损伤，均能使血小板大量黏附聚集于内皮局部，激活凝血系统，引起血栓形成；通路发挥作用。（2）分泌和释放多种活性物质，如 PDGF、血小板第 4 因子、B 血栓球蛋白等对 VSMC 及单核细胞均具有强烈的化学趋化作用，参与 VSMC 游出、增殖及修饰主动脉内膜，吸引单核细胞黏附内皮。有学者指出 PDGF 具有趋化成纤维作用和促进单核细胞增殖各自的抗原决定簇，在致 AS 过程中起重要作用。（3）静脉内皮细胞能产生一氧化氮和前列环素，并不断在肺内释放，调节血小板的功能。研究发现，与 AS 炎症反应过程密切相关的血小板内皮黏附细胞分子-1 也是重要的血小板抑制剂，其可能通过对酪氨酸激酶连接受体的负反馈调节从而对血小板起到微弱的调节作用。

1.2 IL-18BP 的概述

IL-18 是 1995 年 OkamuraH 等^[2]从热灭活痤疮丙酸杆菌和脂多糖共同处理过的小鼠肝提取物中纯化出来的物质,起初因发现其能诱导免疫细胞产生 IFN- γ ,故命名为 IFN- γ 诱生因子。人的 IL-18 主要由巨噬细胞产生(如单核巨噬细胞,肝脏的 Kupffer 细胞等),内皮细胞系统也能分泌 IL-18(如小肠内皮细胞、皮肤角质细胞、口腔内皮细胞等),在成人胰腺、肾脏、脾脏、骨骼肌、肝脏、肺脏中均发现有 IL-18 mRNA 的表达。IL-18 的生物学特性主要是:(1) 可促进 Th1 细胞分泌 IFN- γ 、IL-2、GM-CSF 等相关因子,诱导 T 细胞增殖;(2) 增强 Fas-FasL 系统介导 Th1、NK、CTL 细胞的细胞毒作用;(3) 促进巨噬细胞分泌 TNF- α 水平提高;(4) 同时还有抗感染等、抗肿瘤等作用。近年来,IL-18 与多种疾病的关系的研究很多。特发性血小板减少性紫癜 (idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP)是一种出血性自身免疫性疾病,该病的特点是患者体内抗血小板抗体增多,血小板破坏过多而出血。其发病机制目前尚未完全明了,但确认与免疫应答异常有关。最近研究显示,ITP 患者 IL-18 含量与血小板数量之间呈明显负相关,IL-18 含量越高,血小板数量越少,推测 IL-18 与 ITP 发病程度密切相关,进一步表明血浆 IL-18 水平在 ITP 发病机制上起着重要的作用^[3]。急性脑梗死是在动脉粥样硬化基础上发生的严重疾病,主要是由于脑动脉粥样斑块破裂、表面破损或出现裂纹,继而出血和血栓形成,在此过程 IL-18 起重要作用^[4],同 IL-1 相同,IL-18 通过核因子 κ B 途径促进部分致炎基因的转录合成,它还可以诱导趋化因子和另外多种细胞因子的表达,从而发挥致炎效应间接参与脑损伤过程^[5]。近年来越来越多的研究结果表明,炎症反应几乎贯穿整个动脉粥样硬化发生、发展乃至破裂的全过程,炎症与免疫在易损斑块的发生、演变及破裂过程中起着重要作用,炎症与冠心病的关系得到确认,而 IL-18 作为细胞因子中重要的前炎症因子,参与了 AS 斑块发生、发展及破裂的整个过程,在冠心病的发展中起非常重要的作用。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。

白介素 18 结合蛋白(IL-18BP)是 1999 年确定的一种能够与 IL-18 以高亲和力特异性结合,并拮抗其相关生物学功能的蛋白因子。它以早期 Th1 细胞因

子抑制剂的形式参与 Th1 应答的调控^[6]。另外,通过抑制 γ -干扰素而增加天然的和 IL-1 诱导的前列腺素(PGE2)产量,而 PGE2 能促进树突状细胞和 Th0 细胞的 Th2 应答,并抑制 T 细胞产生 Th1 相关的细胞因子^[7]。IL-18BP 基因在人的心、肺、胎盘^[6]、脾脏和结肠组织均有表达,其表达水平受 γ -干扰素(IFN- γ)的调节。此外研究表明,IL-18BP 与一些病毒编码的蛋白(如 MC53 和 MC54 等)具有相似的结构特征^[8],提示这些病毒编码的蛋白拮抗感染时产生的炎症反应,可能与此类病毒逃逸机体免疫机制有关。

1997 年 Novick^[9]等从人尿中分离出一种可与 IL-18 相结合的蛋白质,这首次提出 IL-18 结合蛋白的概念。将其命名为可溶性 IL-18 受体(SIL-18R),它的分子量为 38 kD,位于细胞膜外,并与位于细胞膜内的 IL-1Rrp(IL-18R α)结合形成 IL-18 受体复合物。序列分析证实人和鼠的 IL-18 结合蛋白基因分别为 585 bp 和 582 bp。人的 IL-18BP 由 164 个氨基酸组成,包括 30 个氨基酸组成的信号肽序列,有 4 个潜在的 N-糖基化位点,成熟肽为 134 个氨基酸,亲水性和疏水性预测分析证明 IL-18BP 没有跨膜区。鼠的 IL-18BP 有 163 个氨基酸组成,包括一个 28 个氨基酸的信号肽,也含有 4 个 N-糖基化位点。它们两者之间的氨基酸同源率为 60.8%^[6]。在基因调控方面,IL-18 基因具有组成性和可诱导性的两个不同的启动子,并受到不同刺激物的诱导。IL-18 基因的启动子中没有 TATA 基序,而且在其 3'非编码区没有典型的富含 AU 的序列^[10]。而 IL-18BP 在体内一般是组成性分泌表达,其基因的表达水平受 IFN- γ 调节^[11],表达的调控机制目前还不清楚。IL-18BP 基因在体内表达非常广泛,Northern 印迹分析表明,IL-18BP mRNA 可在脑、肝脏、肾脏和骨骼肌等组织中表达,在心脏、肺和胎盘中有很强的表达,属于 Ig 超家族成员。

IL-18 在结构上与 IL-1 β 相似,其前体肽没有活性,经 IL-1 β 转型酶(胱冬肽酶-1, Caspase-1)切割为成熟蛋白^[12,13]。而 IL-18BP 是一种在结构特征上有别于 IL-1 和 IL-18 受体家族的组成性表达的新蛋白因子,具有胞外 Ig 样受体结构特征,这个 Ig 功能域与 IL-1 受体中第 3 个 Ig 功能域只有很小的同源性。序列预测分析表明 IL-18BP 中没有跨膜区。研究发现 IL-18 与 IL-18BP 在溶液中以 1:1 的比例结合,IL-18 中的三个关键氨基酸残基 L5/K53/S55 与 IL-18BP 中的三个关键氨基酸残基 F93/Y97/F104 相互作用^[14],这种相互作用具

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库