

慢性肾病患者抗氧化低密度脂蛋白抗体水平与炎症细胞因子表达的相关性研究

赖钰明, 张 琴[△] (四川省绵阳市三台县医院肾脏内科 621100)

【摘要】 目的 探讨慢性肾病患者抗氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)抗体水平与炎症细胞因子表达的相关性。**方法** 收集慢性肾病患者 50 例, 以及健康体检者 10 例(对照组)作为研究对象。检测研究对象血浆抗 ox-LDL 抗体水平, 根据检测结果将慢性肾病患者分为高滴度组(抗 ox-LDL 抗体滴度 $\geq 23 \mu\text{g/mL}$, $n=21$)和低滴度组(抗 ox-LDL 抗体滴度 $< 23 \mu\text{g/mL}$, $n=29$), 比较各组炎症细胞因子[干扰素(IFN)- α 、IFN- β 、IFN- γ 、白细胞介素(IL)-6、IL-10、IL-12]基因表达水平。**结果** 与对照组相比, 高滴度组和低滴度组 IFN- α 、IFN- β 和 IFN- γ 均明显升高($P<0.05$)。低滴度组 IL-6 和 IL-10 较对照组有明显升高($P<0.05$), 但高滴度组与对照组差异无统计学意义($P>0.05$); 高滴度组和低滴度组 IL-12 水平均明显高于对照组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 慢性肾病患者血中抗 ox-LDL 抗体升高程度与多个炎症细胞因子表达水平具有一定相关性, 检测慢性肾病患者血中抗 ox-LDL 抗体水平对了解疾病进程有重要的临床价值。

【关键词】 慢性肾病; 氧化低密度脂蛋白; 细胞因子

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.20.041 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)20-3075-03

Correlation study between the anti-ox-LDL antibody level and cytokine expression in patients with chronic kidney disease

LAI Yu-ming, ZHANG Qin[△] (Department of Nephrology, County Hospital of Santai, Mianyang, Sichuan 621100, China)

【Abstract】 Objective To explore the relationship of the anti-ox-LDL antibody level and cytokine expression in patients with chronic kidney disease. **Methods** 50 cases of patients with chronic kidney disease were enrolled, and 10 healthy people were selected as control group. The plasma levels of anti-ox-LDL antibody were detected. According to the results, the patients with chronic kidney disease were divided into high titer group (anti-ox-LDL antibody $\geq 23 \mu\text{g/mL}$, $n=21$) and low titer group (anti-ox-LDL antibody $< 23 \mu\text{g/mL}$, $n=29$). The gene expression levels of inflammatory cytokines (IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-6, IL-10 and IL-12) in each group were compared. **Results** Comparing with control group, the levels of IFN- α , IFN- β and IFN- γ significantly increased in both high titer group and low titer group ($P<0.05$). The levels of IL-6 and IL-10 of low titer group were significantly higher than control group ($P<0.05$), however, those of high titer group were not significantly different from control group ($P>0.05$). The IL-12 levels of higher titer group and low titer group were significantly lower than that of control group ($P<0.05$). **Conclusion** The increase of anti-ox-LDL antibody in patients with chronic kidney disease related with the expression of many inflammatory cytokines. The detection of anti-ox-LDL antibody was important to understand the progression of chronic kidney disease.

【Key words】 chronic renal disease; oxidatively modified low-density lipoprotein; cytokine

血脂异常多见于免疫低下患者, 如肾移植和骨髓移植患者, 且他们更易出现动脉粥样硬化^[1]。研究表明, 在免疫抑制患者中, 心血管疾病导致的病死率高出健康人群 10 倍, 其中氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)在急性心肌梗死中表达上调, 由 ox-LDL 引发的动脉粥样硬化是导致内源性功能失调的关键因素^[2]。ox-LDL 通过多种生物学活性引发动脉粥样硬化, 包括影响一氧化氮合成、活化 T 淋巴细胞、诱导促粥样化效应因子表达, 同时 ox-LDL 可活化单核细胞并诱导转化生长因子 β (TGF- β) 上调, 促进疾病进展^[3]。

细胞因子在慢性肾病发生和发展中起重要作用, 研究表明, 慢性肾病患者血清白细胞介素(IL)-6 水平明显高于健康人, 同时血清白细胞介素(IL)-8、IL-10 和 IL-18 水平也明显高于健康人, 表明细胞因子在慢性肾病患者疾病进程中有重要作用^[4]。目前关于 ox-LDL 的研究多集中于器官移植患者和肿瘤患者中, 而慢性肾病患者中抗 ox-LDL 抗体阳性水平与炎症

细胞因子的相关性研究较少。本研究选取 50 例慢性肾病患者作为研究对象, 并以健康成年人作为对照, 研究血浆抗 ox-LDL 抗体水平与炎症细胞因子[干扰素(IFN)- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IL-6、IL-10、IL-12]表达的关系, 报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2009 年 6 月至 2013 年 5 月在本医院确诊为慢性肾病的患者 50 例, 以及 10 例健康体检者(对照组)作为研究对象。抽取患者和健康对照者抗凝血 2 mL, 1 500 r/min 离心 5 min 分离血浆, 于 4℃ 保存待测。

1.2 方法

1.2.1 血浆抗 ox-LDL 抗体检测 检测试剂盒购自上海研吉生物有限公司(货号 DRE10046)。(1)标准品的稀释与加样: 在酶标包被板上设 10 个标准品孔, 按试剂盒说明书进行倍比稀释(稀释浓度分别为 180、120、60、30、15 $\mu\text{g/L}$)。(2)加样: 分别设空白对照孔和待测样品孔, 空白对照孔不加样品及酶标

试剂,其余各步操作相同,在酶标包被板的待测样品孔中先加样品稀释液 40 μ L,然后再加待测样品 10 μ L。(3)温育:用封板膜封板后置 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min。(4)加酶:除空白对照孔外,每孔加入酶标试剂 50 μ L。(5)显色:每孔先加入显色剂 A 50 μ L,再加入显色剂 B 50 μ L,37 $^{\circ}$ C 避光显色 15 min。(10)终止:每孔加终止液 50 μ L,终止反应(此时蓝色立刻转为黄色)。(11)测定:以空白对照孔调零,检测 450 nm 波长下各孔的吸光度(OD),测定应在加入终止液后 15 min 以内进行。

1.2.2 RNA 提取 采用 Trizol 法提取 RNA:(1)在细胞中加入 1 mL Trizol 试剂,15~30 $^{\circ}$ C 下静置 5 min 后加入 0.2 mL 氯仿;(2)室温静置 3 min 后,12 000 $\times$ g 离心 15 min,弃上清液并加入 0.5 mL 异丙醇;(3)室温静置 10 min 后,12 000 $\times$ g 离

心 10 min,弃上清液并加入 75%乙醇,12 000 $\times$ g 离心 5 min;(4)弃上清液,空气干燥后,加入 100 μ L 灭菌后的超纯水溶解。

1.2.3 PCR 检测 反转录试剂盒试剂盒(FSQ101)购自北京天根生物公司以完成 cDNA 合成,反转录 PCR 条件:65 $^{\circ}$ C 5 min,37 $^{\circ}$ C 15 min,98 $^{\circ}$ C 5 min。定量 PCR 试剂盒购自北京天根生物公司(FP202),PCR 条件:95 $^{\circ}$ C 30 s;95 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s。共 40 个循环;55~95 $^{\circ}$ C 采集熔解曲线。扩增反应采用贝克曼定量 PCR 仪完成。PCR 扩增引物见表 1,其中 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参。定量 PCR 结果采用 Bio-Rad iQ5 软件进行分析,按照文献采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析^[7]。

表 1 PCR 扩增引物

基因	正向引物(5'~3')	反向引物(5'~3')	GenBank 号
IFN- α	AGA GTG CTG GAG TTC AGG ATA	AAG GTG GAT GAT TGC TAA GTG T	AJ271718
IFN- β	CAG CAA TTT TCA GTG TCA GAA	TCA TCC TGT CCT TGA GGC AGT	M28622
IFN- γ	CCA ACG CAA AGC AAT ACA TGA	CGC TTC CCT GTT TTA GCT GC	J00219
IL-6	GAC CCA ACC ACA AAT GCC A	GTC ATG TCC TGC AGC CAC TG	M14584
IL-10	GGT GAT GCC CCA AGC TGA	TCC CCC AGG GAG TTC ACA	U16720
IL-12	CTG GCC GTG GCT CTC TTG	CCT TGG CAA AAC TGC ACC TT	NM_000584
GAPDH	GAA GGT GAA GGT CGG AGT C	GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC	J04038

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件包进行统计学分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。GraphPad Prism 软件用于图像制作。

2 结 果

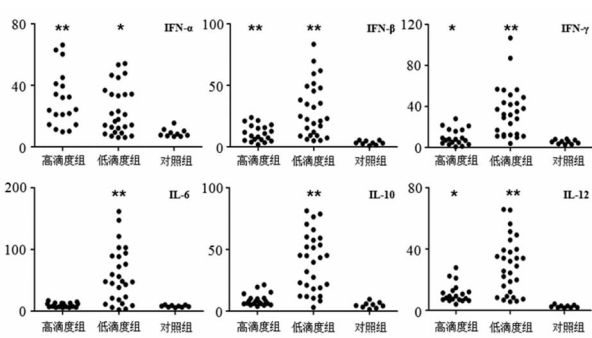
2.1 各组研究对象一般资料比较 本研究共纳入慢性肾病患者 50 例,按照抗 ox-LDL 抗体滴度将其分为高滴度组(抗 ox-LDL 抗体滴度 ≥ 23 μ g/mL, $n=21$)和低滴度组(抗 ox-LDL 抗体滴度 <23 μ g/mL, $n=29$)。高滴度组中性粒细胞水平较低滴度组及对照组略有升高,淋巴细胞则降低,其他指标无明显差异($P>0.05$),见表 2。

表 2 各组研究对象一般资料比较($\bar{x}\pm s$)

项目	高滴度组 ($n=21$)	低滴度组 ($n=29$)	对照组 ($n=10$)
年龄(岁)	50.53 $\pm$ 11.7	45.6 $\pm$ 10.2	40.4 $\pm$ 12.1
体质量(kg)	53.7 $\pm$ 12.4	57.5 $\pm$ 11.2	52.8 $\pm$ 14.4
血常规			
中性粒细胞(%)	67.6 $\pm$ 13.3	58.3 $\pm$ 8.4	56.2 $\pm$ 7.3
嗜酸性粒细胞(%)	3.2 $\pm$ 2.1	4.1 $\pm$ 2.3	4.2 $\pm$ 1.6
嗜碱性粒细胞(%)	1.1 $\pm$ 0.15	0.72 $\pm$ 0.32	0.63 $\pm$ 0.18
红细胞计数($\times 10^{12}$ /L)	4.31 $\pm$ 5.3	4.53 $\pm$ 5.1	5.01 $\pm$ 1.9
血小板计数($\times 10^9$ /L)	312 $\pm$ 88	267 $\pm$ 76	287 $\pm$ 66
白细胞计数($\times 10^9$ /L)	5.4 $\pm$ 3.9	6.0 $\pm$ 2.6	5.7 $\pm$ 4.2
淋巴细胞(%)	14 $\pm$ 4.3	26 $\pm$ 5.1	24 $\pm$ 7.6
单核细胞(%)	6.1 $\pm$ 4.3	6.6 $\pm$ 3.7	7.1 $\pm$ 4.8
血红蛋白(g/L)	121 $\pm$ 66	132 $\pm$ 49	127 $\pm$ 46

2.2 慢性肾病患者中炎性细胞因子基因表达变化 与对照组相比,高滴度组和低滴度组 IFN- α 、IFN- β 和 IFN- γ 均明显升高($P<0.05$)。低滴度组 IL-6 和 IL-10 较对照组有明显升高

($P<0.05$),但高滴度组与对照组差异无统计学意义($P>0.05$);高滴度组和低滴度组 IL-12 水平均明显高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 1。



注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图 1 各组炎性细胞因子基因表达情况

3 讨 论

慢性肾病的发病率呈逐步上升趋势,该病具有进展迅速、筛查手段匮乏等特点,如未及时治疗,将迅速发展至终末期肾衰,并可导致心血管疾病等多种严重并发症。传统诊断方法常以血肌酐和蛋白尿作为监测肾功能的指标,但这 2 项指标的缺点在于难以准确反映肾脏受损程度^[5]。目前已发现多个与慢性肾病发生、发展密切相关的生物学标志物,如胱抑素 C、不对称二甲基精氨酸、肝型脂肪酸结合蛋白,以及与心血病并发病相关的标志物,包括心肌肌钙蛋白、脑钠肽、C 反应蛋白、脂联素等,均在慢性肾病早期诊断中显示出良好的应用前景^[6]。

ox-LDL 是导致血脂异常及心血管疾病的重要因子之一,其致病机制为单核细胞分泌多个趋化因子,在活性氧参与下氧化为 ox-LDL;同时还通过上调内皮细胞因子,增加血小板聚集影响凝血系统,从而促进心血管疾病进展。ox-LDL 还通过细

脂毒性作用,加速血液单核细胞进入内膜使细胞损伤加剧。血浆 ox-LDL 水平升高可增加动脉壁基质表达,促进动脉粥样硬化发生;ox-LDL 还可通过直接或间接灭活一氧化氮的作用使内皮细胞功能调节异常^[7]。但 ox-LDL 在慢性肾病中的研究还较少,对其在慢性肾病发生、发展中的作用也尚未清楚。

IL-6、IL-8 和 IL-10 等炎性细胞因子主要由单核或巨噬细胞产生,是参与机体炎性反应和一系列生理过程的重要因子。刘从江等^[8]研究表明,慢性肾病患者 IL-6、IL-8、IL-10、IL-18 的基因表达水平明显高于对照组,其机制是由于肾组织内炎性细胞浸润、多种细胞因子及氧自由基等共同作用从而引起肾组织结构受损。范广忠等^[9]研究也发现,IL-6、IL-8、TNF- α 等炎性细胞因子在早期糖尿病肾病患者中的表达水平明显升高,表明炎性细胞因子在慢性肾病的病理进程中有重要作用。本研究选取 50 例慢性肾病患者进行血清抗 ox-LDL 抗体检测,并根据检测结果将患者分为高滴度组和低滴度组,用定量 PCR 法检测患者多个炎性细胞因子的基因表达情况,结果提示抗 ox-LDL 抗体滴度升高似乎在慢性肾病患者中是一种保护性因素,可延缓炎性反应的发生。Yang 等^[10]研究也发现,血浆 ox-LDL 水平变化与白血病患者多个细胞因子和趋化因子的表达呈明显负相关。但根据本研究结果就下此结论为时过早,在后续研究中将根据 ox-LDL 血浆水平并结合炎性细胞因子水平,监测患者病情进展及其对治疗效果和预后的影响,并根据临床队列研究得出 ox-LDL 与肾病进展的相关性,从而指导临床实践。

参考文献

- [1] Chadban S, Chan M, Fry K, et al. The CARL guidelines. Protein requirement in adult kidney transplant recipients [J]. *Nephrology (Carlton)*, 2010, 15 Suppl 1: S68-71.
- [2] Diao Y, Li H, Li H, et al. Association of serum levels of lipid and its novel constituents with the different stages of esophageal carcinoma[J]. *Lipids Health Dis*, 2009, 8(1): 48.
- [3] Li H, Diao YT, Li HQ, et al. The association between serum levels of oxLDL-IgG and oxLDL-IgM autoantibody with adult acute myeloblastic leukaemia[J]. *Lipids Health Dis*, 2010, 9(1): 11.
- [4] Antonov AS, Munn DH, Kolodgie FD, et al. Aortic endothelial cells regulate proliferation of human monocytes in vitro via a mechanism synergistic with macrophage colony-stimulating factor. Convergence at the cyclin E/p27 (Kip1) regulatory checkpoint[J]. *J Clin Invest*, 1997, 99 (12): 2867-2876.
- [5] Vassalotti JA, Stevens LA, Levey AS. Testing for chronic kidney disease: a position statement from the National Kidney Foundation[J]. *Am J Kidney Dis*, 2007, 50 (2): 169-180.
- [6] Zahran A, El-Husseini A, Shoker A. Can cystatin C replace creatinine to estimate glomerular filtration rate? A literature review[J]. *Am J Nephrol*, 2007, 27 (2): 197-205.
- [7] 岳福仁. 氧化型低密度脂蛋白与动脉粥样硬化关系的研究[J]. *菏泽医学专科学校学报*, 2012, 24(1): 67-69.
- [8] 刘从江, 李芬, 张磊, 等. 慢性肾病患者细胞因子测定的临床意义[J]. *放射免疫学杂志*, 2008, 21(6): 514-515.
- [9] 范广忠, 高文杰, 郑雪峰, 等. 检测糖尿病肾病患者血清细胞因子的意义[J]. *中国实用医刊*, 2012, 39(13): 33-35.
- [10] Yang HQ, Qiu FQ, Jin K, et al. High plasma levels of oxidatively modified low-density lipoproteins are associated with the suppressed expression of immunomodulatory molecules in patients with hematological malignancies [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(6): 2394-2400.

(收稿日期: 2015-05-15 修回日期: 2015-08-10)

(上接第 3074 页)

- [2] Yang JC, Kang JH, Guan YF. The mechanisms linking adiposopathy to type 2 diabetes[J]. *Front Med*, 2013, 7(4): 433-444.
- [3] Janikiewicz J, Hanzelka K, Kozinski K, et al. Islet β -cell failure in type 2 diabetes--Within the network of toxic lipids[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 460(3): 491-496.
- [4] Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism[J]. *Lancet*, 2010, 375(9733): 2267-2277.
- [5] Boden G. Obesity, insulin resistance and free fatty acids [J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2011, 18(2): 139-143.
- [6] 谢朝欢, 何艳红. 游离脂肪酸和超敏反应蛋白在 2 型糖尿病中的应用[J]. *检验医学与临床*, 2013, 10(18): 2464-2465.
- [7] 唐琴. 糖尿病人群中胰岛素和游离脂肪酸水平的相关性研究[J]. *检验医学与临床*, 2015, 12(15): 2239-2240.

- [8] 张研, 袁莉. 不同类型血脂紊乱对 2 型糖尿病患者胰岛素抵抗和胰岛功能的影响[J]. *中国医师杂志*, 2005, 7(7): 892-895.
- [9] Steinberg GR, Dyck DJ, Calles-Escandon J, et al. Chronic leptin administration decreases fatty acid uptake and fatty acid transporters in rat skeletal muscle[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(11): 8854-8860.
- [10] Pereira S, Park E, Mori Y, et al. FFA-induced hepatic insulin resistance in vivo is mediated by PKCdelta, NADPH oxidase, and oxidative stress[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2014, 307(1): E34-46.
- [11] Kim JK, Fillmore JJ, Chen Y, et al. Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, 98(13): 7522-7527.
- [12] 卜石, 杨文英, 王昕. 脂毒性对大鼠胰岛细胞凋亡的作用[J]. *中华糖尿病杂志*, 2004, 12(6): 433-436.