

原发性肾病综合征患儿血、尿 MIF 和 IL-1 β 与糖皮质激素反应异质性相关研究

邱 闪 董 晨 关凤军

摘 要 **目的** 探讨巨噬细胞移动抑制因子 (macrophage migration inhibitory fact, MIF)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 与原发性肾病综合征 (primary nephritic syndrome, PNS) 患儿糖皮质激素 (glucocorticoid, GC) 反应的相关性, 了解 MIF、IL-1 β 在原发性肾病综合征 GC 反应异质性中的意义。**方法** 选取 40 例初发肾病综合征患儿为研究对象, 根据随访 1 年的结果, 4 例患儿失访, 予以剔除, 36 例患儿按照对 GC 的疗效分为两组, GC 敏感型肾病综合征 (steroid-sensitive nephritic syndrome, SSNS) 组 22 例, GC 耐药型肾病综合征 (steroid-resistant nephritic syndrome, SRNS) 组 14 例, 另选 12 例健康体检儿童作为正常对照组, 各组入选儿童均于同一时间点分别收集外周静脉血 2ml、尿液 10ml 作为待测标本。采用酶联免疫吸附双抗体夹心法 (ELISA) 检测各组患儿血清、尿液 MIF 和 IL-1 β 蛋白表达水平, 并对其结果进行分析比较。**结果** GC 治疗前, SRNS 组患儿血清、尿液中 MIF、IL-1 β 蛋白表达水平高于 SSNS 组及正常对照组 ($P < 0.05$); GC 治疗 4 周时, SRNS 组和 SSNS 组患儿血清、尿液 MIF、IL-1 β 蛋白表达水平分别与治疗前比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); PNS 患儿血清 MIF 表达水平与 IL-1 β 表达水平呈正相关, 相关系数 $r_1 = 0.826$, $P_1 < 0.01$, 尿液 MIF 表达水平与 IL-1 β 表达水平也呈正相关, 相关系数 $r_2 = 0.548$, $P_2 < 0.01$ 。**结论** 不同 GC 反应 PNS 患儿血清、尿液 MIF 和 IL-1 β 蛋白表达水平有统计学差异, MIF 表达异常与 GC 应用密切相关, GC 应用可不同程度影响 GC 反应差异 PNS 患儿血清、尿液 MIF 表达水平, 并导致 IL-1 β 表达水平改变。

关键词 巨噬细胞移动抑制因子 白介素-1 β 肾病综合征 糖皮质激素耐药

[中图分类号] R69

[文献标识码] A

Primary Nephropathy in Blood, Urine MIF and IL-1 β and Glucocorticoid Response Heterogeneity Related Syndrome. Qiu Shan, Dong Chen, Guan Fengjun. Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Jiangsu 221002, China

Abstract **Objective** To probe into the correlations between Macrophage migration inhibitory factor (MIF), interleukin 1 β (IL-1 β) and Glucocorticoid (GC) reaction in children with primary nephrotic syndrome (PNS), in order to elaborate what role MIF and IL-1 β may play in SRNS and the mechanism involved. **Methods** Totally 40 patients with PNS without any GC treatment before admission were chosen as subjects, according to the results of 1 year of follow-up, 4 patients were lost to follow-up, rejected, thus the rest 36 cases were divided into two groups according to their response to an four-week course of oral prednisone: 22 cases in steroid sensitive nephrotic syndrome (SSNS) group, 14 cases steroid resistant nephrotic syndrome (SRNS) group, 12 healthy children were served as control. The peripheral blood lymphocytes were collected before GC treatment and after four weeks of the regular therapy. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) were used to test the expression level of MIF and IL-1 β in the blood and urine. **Results** MIF and IL-1 β expression level in the blood and urine in SRNS group were higher than those in SSNS and control group before glucocorticoid treatment and control ($P < 0.05$); MIF and IL-1 β expression level in the blood and urine could be found after glucocorticoid treatment in both SRNS group and SSNS group, higher than those before treatments ($P < 0.05$); Serum MIF from PNS were positive correlated with serum IL-1 β ($r_1 = 0.826$, $P_1 < 0.01$), urinary MIF from PNS were positive correlated with serum IL-1 β ($r_2 = 0.548$, $P_2 < 0.01$). **Conclusion** There was different MIF and IL-1 β protein expression in blood and urine of PNS with different GC response; MIF and IL-1 β and GC are closely associated with the resistance, at the same time, GC may affect MIF and the expression level of IL-1 β .

Key words Macrophage migration inhibitory factor; Interleukin 1 β ; Primary nephrotic syndrome; Glucocorticoid resistance

糖皮质激素 (GC) 是治疗原发性肾病综合征 (PNS) 的首选药物, 但不同患儿对 GC 反应存在一定

差别, 具体机制尚不清楚^[1]。GC 广泛应用于各种疾病中, 但 GC 与糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR) 结合后才能发挥其正性作用。目前, 较为肯定的是细胞因子作为炎性介质参与了肾小球疾病的损伤过程, 而 GC-GR 可抑制炎性细胞因子的生成

和释放,发挥抗炎作用。研究表明,一些炎性因子可诱发 GC 耐药,提示细胞因子可能反过来通过影响 GR,进而影响 GC 效应的发挥^[2]。MIF 与 GC 有独特的相互关系,GC 可双向调节 MIF 的分泌,且 MIF 作为上游调控细胞因子,可促进 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等细胞因子表达。因此,通过 MIF 独特的作用,研究 MIF 和 IL-1 β 与 GC 耐药的相关性具有重要意义。

资料与方法

1. 一般资料:收集 2012 年 5~2013 年 11 月笔者医院治疗的 40 例初发肾病综合征患儿,诊断均符合中华医学会儿科学分会肾脏病学组制定的诊断标准^[3],且之前未用过 GC 或至少 3 个月未用 GC 治疗,发病时无感染、外伤、心理应激及放射线接触病史。收集病例年龄 2~14 岁,其中男性 22 例,女性 18 例。根据随访的结果,4 例患儿失访,予以剔除,36 例患儿按照对 GC 的疗效分为两组,其中 SSNS 组 22 例,男性 12 例,女性 10 例,患儿平均年龄 5.3 ± 1.9 岁;SRNS 组 14 例,男性 9 例,女性 5 例,平均 6.0 ± 2.3 岁;另选 12 例健康体检儿童作为正常对照组,男性 8 例,女性 4 例,平均年龄 5.9 ± 2.1 岁。取外周静脉血前经笔者医院伦理委员会批准,所有受试对象签署知情同意书。PNS 患儿与正常对照组在年龄、性别中差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2. 实验分组:根据随访的结果,按照 PNS 患儿对 GC 治疗的反应不同,分为两组:①SSNS 组:指泼尼松足量 $2\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,最大量 $60\text{mg}/\text{d}$,分次口服 4 周,尿蛋白稳定转阴者;②SRNS 组:指泼尼松足量 $2\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,最大量 $60\text{mg}/\text{d}$,分次口服 4 周,尿蛋白仍为阳性者^[4]。

3. 研究方法:(1)标本收集:在 GC 治疗前及 GC 治疗 4 周时分别收集外周静脉血 2ml、尿液 10ml 作为检测标本,且同一病例血、尿标本于同一时间点采集。血标本以空腹时采集,抽血 2ml,置于肝素抗凝管中,密度梯度离心,2000r/min,20min,收集血清,置于 EP 管中待检;同时留取尿液 10ml,密度梯度离心法分离尿液,取其上清液;所有标本于 -80°C 低温冰箱保存,待检。(2)血清、尿液 MIF 和 IL-1 β 表达水平测定:采用 ELISA 方法检测 GC 治疗前、治疗 4 周时血清、尿液 MIF 和 IL-1 β 表达水平。人 MIF ELISA 试剂盒、人 IL-1 β ELISA 试剂盒由上海西唐生物科技有限公司提供。操作时严格按照试剂盒说明书进行,采用酶标仪在 450nm 读取吸光度(A)值,绘制标准曲线,据 A 值计算出各组血清及尿液标本 MIF 和 IL-1 β 表达水平。

4. 统计学方法:采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组内数据比较采用配对样本 t 检验,多组资料间比较采用单因素方差(One-Way ANOVA)分析,方差齐者采用 LSD 检验,方差不齐者采用 Tamhane's T_2 检验,各参数间的相关性分析采用 Pearson 相关性分析, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

结 果

1. 血清 MIF 和 IL-1 β 蛋白表达水平:SRNS 组患儿血清 MIF、IL-1 β 蛋白表达水平高于 SSNS 组及正常对照组($P < 0.01$,表 1)。SRNS 组和 SSNS 患儿治疗 4 周时血清 MIF 和 IL-1 β 蛋白表达较治疗前增加,且分别与治疗前相比较,差异有统计学意义($P < 0.05$,表 1)。

表 1 各组患儿血清 MIF 和 IL-1 β 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$,ng/L)

组别	<i>n</i>	MIF	IL-1 β
SRNS 组治疗前	14	$2.12 \pm 0.20^\Delta$	$59.45 \pm 2.41^\Diamond$
SSNS 组治疗前	22	$1.77 \pm 0.19^*$	$50.22 \pm 2.24^\bullet$
SRNS 组治疗后	14	$2.67 \pm 0.24^{\Delta\Delta}$	$68.43 \pm 1.95^{\Diamond\Diamond}$
SSNS 组治疗后	22	$2.15 \pm 0.18^{**}$	$57.17 \pm 3.78^{\bullet\bullet}$
正常对照组	12	1.67 ± 0.13	48.86 ± 2.26

GC 治疗前, $^\Delta$ 及 * 与正常对照组比较, $F = 22.849$, $P < 0.01$, $^\Diamond$ 及 $^\bullet$ 与正常对照组比较, $F = 89.544$, $P < 0.01$;GC 治疗 4 周时, $^{\Delta\Delta}$ 及 ** 与正常对照组相比, $F = 89.554$, $P < 0.01$, $^{\Diamond\Diamond}$ 及 $^{\bullet\bullet}$ 与正常对照组相比, $F = 139.938$, $P < 0.01$; ** 与 * 相比, $t = 13.643$, $P < 0.05$; $^{\Delta\Delta}$ 与 $^\Delta$ 相比, $t = 10.619$, $P < 0.05$; $^{\bullet\bullet}$ 与 $^\bullet$ 相比, $t = 10.003$, $P < 0.05$; $^{\Diamond\Diamond}$ 与 $^\Diamond$ 相比, $t = 14.590$, $P < 0.05$

2. 尿液 MIF 和 IL-1 β 蛋白表达水平:SRNS 组患儿尿液 MIF、IL-1 β 蛋白表达水平高于 SSNS 组及正常对照组($P < 0.01$,表 2),SRNS 组和 SSNS 患儿治疗 4 周时尿液 MIF 和 IL-1 β 蛋白表达较治疗前增高,且分别与治疗前相比较,差异有统计学意义($P < 0.05$,表 2)。

表 2 各组患儿尿液 MIF 和 IL-1 β 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$,ng/L)

组别	<i>n</i>	MIF	IL-1 β
SRNS 组治疗前	14	$1.72 \pm 0.20^\Delta$	$69.34 \pm 2.55^\Diamond$
SSNS 组治疗前	22	$1.53 \pm 0.21^*$	$51.99 \pm 3.15^\bullet$
SRNS 组治疗后	14	$2.13 \pm 0.21^{\Delta\Delta}$	$77.71 \pm 3.96^{\Diamond\Diamond}$
SSNS 组治疗后	22	$1.78 \pm 0.22^{**}$	$58.82 \pm 4.07^{\bullet\bullet}$
正常对照组	12	1.43 ± 0.42	50.92 ± 2.71

GC 治疗前, $^\Delta$ 及 * 与正常对照组比较, $F = 3.574$, $P < 0.01$, $^\Diamond$ 及 $^\bullet$ 与正常对照组比较, $F = 188.130$, $P < 0.01$;GC 治疗 4 周时, $^{\Delta\Delta}$ 及 ** 与正常对照组相比, $F = 19.845$, $P < 0.01$, $^{\Diamond\Diamond}$ 及 $^{\bullet\bullet}$ 与正常对照组相比, $F = 183.194$, $P < 0.01$; ** 与 * 相比, $t = 6.910$, $P < 0.05$; $^{\Delta\Delta}$ 与 $^\Delta$ 相比, $t = 15.785$, $P < 0.05$; $^{\bullet\bullet}$ 与 $^\bullet$ 相比, $t = 9.227$, $P < 0.05$; $^{\Diamond\Diamond}$ 与 $^\Diamond$ 相比, $t = 11.572$, $P < 0.05$

3. PNS 患儿血清、尿液 MIF 和 IL-1 β 之间的相关性:血清 MIF 蛋白表达与 IL-1 β 蛋白表达呈正相

关,其相关系数 $r_1 = 0.826$, $P_1 < 0.01$, 尿液 MIF 蛋白表达与 IL-1 β 蛋白表达同样呈正相关,其相关系数 $r_2 = 0.548$, $P_2 < 0.01$ 。

讨 论

多年来,GC 一直作为 PNS 的首选药物,发挥了重要作用,但不同患儿对 GC 的反应存在一定的差别,具体机制不明。随着 PNS 患儿数量的增多,临床治疗中发现,GC 治疗效应存在显著差别,部分患儿表现对 GC 敏感,而另一部分患儿表现对 GC 耐药甚至无效,使得 PNS 患儿的治疗越来越棘手。但 GC 耐药机制尚不清楚,目前多集中于研究糖皮质激素受体数量、结构的异常,GR β 表达异常,P-糖蛋白 170、多药耐药基因、11 β -羟基类固醇脱氢酶、GR 信号转录调控的异常等^[5-9]。GC 通过与 GR 结合,抑制前炎症介质和相关细胞因子的释放发挥抗炎作用。早年研究发现,一些细胞因子(如 IL-1 β 和 TNF- α)可以活化核转录因子激活蛋白-1(activator protein-1, AP-1)和核因子- κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B),抑制 GC-GR 复合体与糖皮质激素反应元件(glucocorticoid response element, GRE)的结合,导致 GR 减少而产生 GC 耐药^[10,11]。但研究多在炎性损伤方面,而具体与 GC 耐药并无深入研究。因此,本实验通过 MIF 和 GC 独特的关系,且 MIF 可作为 IL-1 β 的上游调控因子,试图研究细胞因子 MIF 和 IL-1 β 与 PNS 患儿 GC 耐药的相关性。

MIF 是一种前炎症因子,也是一种神经内分泌激素,同时还是 GC 生理活动的负反馈调节剂。MIF 与 GC 构成一对相互调节系统,共同调节机体的免疫及炎症反应。MIF 与 GC 有独特的相互关系,GC 可双向调节 MIF 表达,GC 能诱导 MIF 产生。通过实验观察,在 GC 抵抗型哮喘患者外周血中 MIF 呈高水平表达,从而证实了 MIF 与 GC 抵抗发病有一定的关系^[12]。本实验研究发现,PNS 组患儿血清、尿液 MIF 表达增高,提示 MIF 参与了 PNS 的发病。而 GC 发挥其抗炎作用一方面通过阻断 NF- κ B 转录活性,另一方面促进 I- κ B 合成,阻断 NF- κ B 向核内的转移。有研究报道,MIF 通过抑制 GC 诱导 I- κ B 合成,从而使转移入核内的 NF- κ B 增多,进一步促进炎症因子的表达。本实验结果中发现 PNS 患儿应用 GC 治疗后,体内 MIF 和 IL-1 β 表达增高,且 SRNS 组患儿较 SSNS 组增高明显,推测 MIF 可能通过某种途径参与 GC 耐药机制。由此表明,PNS 患儿体内 MIF 表达异常在 GC 耐药方面可能发挥一定的作用,具体机制

有待进一步研究。

MIF 作为上游调控因子,可增加多种炎症细胞因子的表达,如 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-2、IL-8 和 IFN- γ 等。IL-1 β 是一种重要的细胞因子和多肽调节因子,在细胞免疫激活中发挥生物学效应,在炎症疾病、免疫相关性疾病等方面发挥重要作用。本实验研究结果显示,SRNS 组患儿血清、尿液 IL-1 β 表达水平高于 SSNS 组和正常对照组,可能是 GC 耐药的原因之一。有研究表明,细胞因子 IL-1 β 和一些生长因子等可活化 AP-1 和 NF- κ B,从而抑制 GC-GR 复合体与 GRE 的结合,使 GC 的生物学效应降低,表现为耐药组患儿血 IL-1 β 表达明显高于激素敏感组^[11]。另外,MIF 是 IL-1 β 、IL-2、IL-8 等多种细胞因子的上游调控因子,可促进它们的产生,在促炎症疾病方面有协同作用。本研究发现,PNS 患儿体内 MIF 表达水平与 IL-1 β 表达水平有一定的相关性。因此,就 MIF 和 IL-1 β 与 GC 的关系而言,研究其与 GC 耐药的相关性具有重要意义,可能帮助判断 PNS 患儿对 GC 的疗效,在临床治疗中可能起指导作用。

本研究发现,PNS 患儿血清、尿液 MIF 和 IL-1 β 表达明显高于正常对照组,可能与 PNS 患儿免疫功能紊乱和疾病状态下自身抗原刺激,使 MIF 和 IL-1 β 产生增多有关,提示 MIF 和 IL-1 β 参与了 NS 的发病机制。SRNS 组患儿血清、尿液 MIF 和 IL-1 β 表达高于 SSNS 组和正常对照组,提示 MIF 和 IL-1 β 的存在减弱了 GC 的敏感度,GC 有抑制细胞因子释放的作用,说明生理浓度的 GC 可抑制 MIF 的释放,而高浓度的 GC 可促进 MIF 的分泌,与文献报道一致。GC 治疗前后 SRNS 组患儿血清、尿液 MIF 和 IL-1 β 表达均高于 SSNS 组,可能机制为 MIF 和 IL-1 β 作为炎症介质抑制 GR 功能,影响 GC-GR 复合物介导的生物学效应而致 GC 耐药。另外,PNS 患儿血清、尿液 MIF 表达与 IL-1 β 表达呈正相关,表明 SRNS 患儿体内 MIF 和 IL-1 β 这两种细胞因子表达显著增加,或者其降解减少,进一步说明其可能与 GC 耐药有关。由本实验结果可推测,细胞因子 MIF 和 IL-1 β 高表达可能与 PNS 患儿 GC 耐药有关,在治疗前可能对判断 PNS 患儿对 GC 治疗的效应提供一定的帮助。

本研究是通过检测细胞因子表达水平,进而发现 PNS 患儿 GC 耐药可能的机制。虽然发现 MIF 和 IL-1 β 这两种细胞因子与 GC 耐药可能有一定的相关

性,但没有进一步探讨其具体机制,同时由于研究样本数量有限,缺乏肾组织内相关细胞因子的表达,所以,后期工作可研究细胞因子在肾组织内的表达与GR的相关性,从而探讨细胞因子参与GC耐药具体的机制。目前,PNS患儿GC耐药有增加趋势,而GC耐药是PNS治疗中最大的困扰。所以,治疗GC耐药最好的选择是逆转耐药的根源,提高机体对GC的敏感度。本实验研究结果显示,动态监测血、尿MIF和IL-1 β 表达水平有助于PNS患儿预后判断和指导治疗方案的调整。因此,细胞因子在GC耐药机制中的作用有望成为今后研究的热点。

参考文献

- 1 Xu H, Chen K, Lin D, *et al.* Cerebral venous sinus thrombosis in adult nephrotic syndrome [J]. Clin Nephrol, 2010, 74 (2) : 144
- 2 Kinot T, Chrousos GP. Tumor necrosis factor alpha receptor and Fas - associated FLASH inhibit transcriptional activity of the glucocorticoid receptor by binding to and interfering with its interaction with p160 type nuclear receptor coactivators [J]. J Biol Chem, 2003, 278 (5) : 3023 - 3029
- 3 中华医学会儿科学分会肾脏病学组. 儿童常见肾脏疾病诊治循证指南激素敏感、复发/依赖肾病综合征诊治循证指南(试行) [J]. 中华儿科杂志, 2009, 47: 167 - 169
- 4 Behrman RE. Nelson text book of pediatrics [M]. 16th ed. Philadelphia: WB Sanders Co, 2000: 1500 - 1502
- 5 Goleva E, Jackson LP, Gleason M, *et al.* Usefulness of PBMCs to predict clinical response to corticosteroids in asthmatic patients [J]. J Allergy Clin Immunol, 2012, 129 (3) : 687 - 693
- 6 张碧丽, 李琛, 林书祥, 等. 糖皮质激素受体 mRNA 在儿童原发性肾病综合征中的表达意义 [J]. 天津医药, 2011, 38 (11) : 1037 - 1040
- 7 Panek M, Pietras T, Antczak A, *et al.* The N363S and I559N single nucleotide polymorphisms of the h - GR/NR3C1 gene in patients with bronchial asthma [J]. Int J Mol Med, 2012, 30 (1) : 142 - 150
- 8 Youssef DM, Elbehidy RM, Abdelhalim HS, *et al.* Soluble interleukin - 2 receptor and MDR1 gene expression levels as inflammatory biomarkers for prediction of steroid response in children with nephritic syndrome [J]. Iran J kidney Dis, 2011, 5 (3) : 154 - 161
- 9 Jafar T, Prasad N, Agarwal V, *et al.* MDR - 1 gene polymorphisms in steroid - responsive versus steroid - resistant nephritic syndrome in children [J]. Nephrol Dial Transplant, 2011, 26 (12) : 3968 - 3974
- 10 李久宏, 李波, 王颖, 等. 系统性红斑狼疮患者巨噬细胞移动抑制因子与糖皮质激素受体 β 的检测与意义 [J]. 中华风湿病学杂志, 2010, (14) 12: 847 - 848
- 11 乔丽, 李荣发, 曹礼应, 等. 激素抵抗肾病综合征患者激素受体及细胞因子的表达及意义 [J]. 西南国防医药, 2010, 20 (11) : 1188 - 1190
- 12 Greven D, Leng L, Bucala R. Autoimmune diseases: MIF as a therapeutic target [J]. Expert Opin Ther Targets, 2010, 14: 253 - 264

(收稿日期: 2014 - 03 - 05)

(修回日期: 2014 - 04 - 01)

PDGF、IL - 11 在男性强直性脊柱炎骨代谢中的作用研究

文 利 王国良 盛桐亮 陈 瑜

摘 要 目的 研究 AS 患者骨质疏松(OP)情况及血小板衍生生长因子(PDGF)、白细胞介素 - 11(IL - 11)在男性 AS 骨代谢中的作用。方法 AS 患者不同部位骨密度(BMD)应用双能 X 线吸收法(DXA)测定, AS 患者及对照组血清 PDGF、IL - 11 水平采用 ELISA 法检测, 并与不同部位 BMD 及临床指标之间进行相关性分析。结果 在 30 例 AS 患者中 OP 发生率为 36. 67%, AS 患者血清 IL - 11 水平($112 \pm 89 \text{ ng/L}$)显著低于正常对照组, PDGF 水平($44272 \pm 7078 \text{ ng/L}$)显著高于正常对照组。AS 患者 PDGF 与股骨颈、大转子骨密度、血小板计数(PLT)呈正相关($P < 0.05$), 与血清磷(P)呈负相关($P < 0.05$)。IL - 11 与腰椎 BMD 呈负相关($P < 0.05$)。结论 AS 患者 OP 发生率较高, 其继发 OP 与炎性相关的骨代谢异常有关, 多因素共同参与了 AS 骨代谢的调节。

关键词 强直性脊柱炎 骨密度 骨质疏松 白细胞介素 - 11 血小板衍生生长因子

[中图分类号] R593

[文献标识码] A

Role of IL - 11, PDGF in Bone Metabolism of Male Patients with Ankylosing Spondylitis. Wen Li, Wang Guoliang, Sheng Tongliang, *et*

作者单位: 311400 浙江省富阳市人民医院

通讯作者: 文利, 电子信箱: wenli1976@126. com