

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.05.008

白细胞介素-18 与深静脉血栓疾病的相关性研究

李光第, 宋 恩, 赵学凌, 白云城, 彭 志, 周如丹[△]

(昆明医科大学第一附属医院骨科, 昆明 650032)

摘要:目的 探讨白细胞介素-18(IL-18)的表达变化与深静脉血栓疾病(DVT)发生、发展的相关性及其临床意义。方法 收集临床 DVT 病例(DVT 组, $n=40$)、实验对照组($n=40$)、健康对照组($n=20$)的血液,以 ELISA 法检测其中 IL-18 的表达并分析差异;培养原代培养的人脐静脉内皮细胞(HUVECs)行目标蛋白免疫荧光检测明确其定位;构建人 IL-18 过表达和干扰病毒载体(IL-18-pCDH-GFP, IL-18-LMP-shRNAmir1)感染 HUVECs 并进行基因表达谱芯片检测和 KEGG Pathway 等生物信息技术,分析 IL-18 与疾病的相关性。结果 人血 ELISA 检测发现在 DVT 组和两对照组中 IL-18 的表达差异均有统计学意义($F=11.248, P<0.01$);实验对照组与健康对照组之间 IL-18 的表达差异无统计学意义($P>0.05$);免疫荧光检测显示目标蛋白定位于细胞质;人 IL-18 过表达和干扰载体经病毒转染后感染 HUVECs;基因芯片检测发现与正常细胞比较,过表达载体 IL-18-pCDH-GFP 感染细胞有 17 条信号通路下调、16 条上调;干扰载体 IL-18-LMP-shRNAmir1 感染细胞有 23 条信号通路下调、9 条上调。结论 IL-18 对 HUVECs 有确切影响,同时与 DVT 疾病密切相关,有望作为深静脉血栓疾病临床预测诊断的候选分子标记物。

关键词: 静脉血栓形成;白细胞介素 18;分子标记物;人脐静脉内皮细胞

中图分类号:R619

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2015)05-0600-05

Correlation between interleukin-18 and deep venous thrombosis disease

Li Guangdi, Song En, Zhao Xueling, Bai Yuncheng, Peng Zhi, Zhou Rudan[△]

(Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650032, China)

Abstract: **Objective** To investigate the correlation between IL-18 and deep venous thrombosis disease and its clinical significance. **Methods** To detect the expression of IL-18 by ELISA, we collected the blood samples of DVT patients as the experimental group($n=40$) compared to the control group($n=40$) and normal group($n=20$). IL-18 over expression/interference vectors were constructed and transfected human vein endothelial cells, analyzed by microarray and KEGG Pathway as biology information technology. Then discuss the association between IL-18 and DVT. **Results** Results of ELISA showed that compared with control group and normal group, the expression of IL-18 gene in DVT patient were up-regulated($F=11.248, P<0.01$). Compared with normal group, the IL-18 expression in control group have not been significantly up-regulated($P>0.05$). Immunofluorescence detected IL-18 gene expression in cytoplasm of human umbilical vein endothelial cells(HUVECs). According to the microarray analysis we found in the IL18-pCDH-GFP transfected cells 17 signaling pathways were down-expressed while 16 signaling pathways were up-expressed. Compared with normal group cells, in the IL18-LMP-shRNAmir1 transfected cells 23 signaling pathways were down-expressed and 9 signaling pathways were up-expressed. **Conclusion** Based on the above experimental data, it is very clear that IL-18 influenced HUVECs and plays an important role in DVT, it is possible to predict the diagnosis of DVT and act as candidate molecular markers.

Key words: deep venous thrombosis; interleukin-18; biomarker; human umbilical vein endothelial cells

深静脉血栓(deep venous thrombosis, DVT)的诊断主要依赖影像学 and 有限的实验室检查,在血栓形成之后方能明确,以致无法针对性地进行预防和治疗。如能预测诊断,可实现更有针对性的预防、更早有效地治疗,减少危害。随着分子生物学技术的发展,DVT 疾病中炎症细胞因子的参与及其在早期瀑布式反应中重要的激活作用得到广泛关注,越来越多的证据表明,炎症反应在静脉血栓疾病的发生、发展中起到了关键的作用^[1]。白细胞介素-18(interleukin-18, IL-18)是上世纪 90 年代末发现的前炎症细胞因子^[2-3],它参与体内炎症反应和免疫反应调节过程,尤其是在促进炎症细胞因子释放及细胞因子之间相互作用方面具有重要作用。本文对 IL-18 与下肢 DVT 的相关性进行研究,通过临床患者血中 IL-18 基因 ELISA 检测初步探讨疾病相关性,随后进一步行细胞及分子生物学实验研

究,结合基因芯片等生物信息学手段,为 IL-18 与 DVT 发生、发展相关性的研究提供有效证据。

1 材料与方 法

1.1 一般资料 本院 2012~2013 年骨科、血管外科、呼吸内科等相关科室中 DVT 病例 40 例、实验对照组 40 例、健康对照组 20 例,共 100 例血液标本。参考《静脉血栓栓塞症预防的 NICE 指南》(2012 年)和《美国胸科医师协会抗栓与血栓预防临床实践指南-深静脉血栓形成的诊断》(2012 年第 9 版)制订 DVT 诊断标准。DVT 组:符合临床诊断标准的下肢 DVT 患者;实验对照组:骨科人工关节置换、脊柱术后无血栓诊断患者;健康对照组:健康志愿标准。为控制非试验因素干扰和影响,各组纳入者满足(1)年龄大于 15 岁;(2)无家族遗传性血栓病史;(3)无自身免疫性疾病、急性炎症、全身免疫反应综合征

作者简介:李光第(1981—),住院医师,博士,主要从事骨科常见疾病、深静脉血栓疾病的基础与临床研究。 [△] 通讯作者, E-mail: kitypk@qq.com。

(SIRS)、肿瘤、怀孕等；(4)未服用抗凝药物。

1.2 材料 ELISA 试剂盒购于 Ebioscience 公司；过表达慢病毒载体及逆转录病毒载体购于 Ambion 公司；转染试剂购于 Qiagen 公司；TRIzol、二抗 IgG-HRP 购于 Invitrogen 公司；逆转录试剂盒购于 Fermentas 公司；琼脂糖凝胶电泳试剂购于 Omega 公司；荧光定量引物由 Invitrogen 公司合成；荧光定量试剂盒购于 Fermentas 公司；聚偏氟乙烯(PVDF)膜购于 Millipore 公司；一抗购于 Santan 和康为公司；ECL 显色试剂盒、Real-time PCR 用 96 孔板及膜购于 Bio-Rad 公司。各规格离心管、枪尖、PCR 管购于 Axygen 公司；X 光片购于柯达公司；人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)原代及传代培养耗材购于 Corning 公司。

1.3 收集血清 无抗凝剂生化管/EDTA 真空采血管收集空腹静脉血 3~4 mL, 3 000 r/min, 4 °C 离心 10 min。分离血清/血浆, 冻存管 -80 °C 保存。

1.4 ELISA 检测 IL-18 ELISA 检测步骤按 Ebioscience 试剂盒说明书标准操作。按试剂盒标准品绘制标准曲线。标准曲线方程为 $Y=0.0008X+0.0095$ 其中 X 为吸光度值、 Y 为浓度对数, 可据其计算样本实际浓度。预实验随机选择 1 个样本进行梯度稀释(100、200、400 及 800 倍), 稀释后 OD 值依次为: 0.876 9、0.413 2、0.097 6、0.001 3; 可见稀释 200 倍 OD 值在标准曲线范围, 是最佳血清稀释浓度。

1.5 HUVECs 细胞培养及免疫荧光检测 原代 HUVECs 组在 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养。免疫荧光检测: HUVECs 制成 2×10^4 /mL 细胞悬液, 制作细胞爬片; 以抗人 IL-18 孵育, FITC 标记二抗与之结合, 激光共聚焦荧光显微镜拍照观察 IL-8 蛋白在 HUVECs 中的定位, 设置 3 次平行实验。

1.6 人 IL-18 慢病毒过表达载体构建 通过 GenBank 数据库搜索人 IL-18 基因完整 CDS 序列, Primer5.0 软件设计特异性引物(正向引物: 5'-GCA AGC TTA TGC CTT GTG TTC AGG CG-3', 反向引物: 5'-GCC TCG AGT TAG AAA GGT AAG GTG TC-3', 产物长度 582 bp, 退火温度 60 °C), 对人 IL-18 基因进行 PCR 扩增。然后进行胶回收实验, 再行琼脂糖凝胶电泳检测; 收集胶回收的目的片段和质粒载体进行连接, 以 pCDH-GFP 为测序引物进行测序。

1.7 人 IL-18 逆转录病毒干扰载体构建 逆转录病毒 Oligo 片段扩增; 搜索 GenBank 中人 IL-18 基因序列, 利用 Oligo-engine 设计 2 条 22 个碱基的候选 siRNA 靶序列, 再根据 MSCV-LMP 逆转录病毒载体的特点, 设计出相应的具有发夹结构的 shRNA 模板。将设计片段送生物工程合成部合成 Oligo 片段并按比例稀释, 用规定引物(正向引物: 5'-CAG AAG GCT CGA GAA GGT ATA TTG CTG TTG ACA GTG AGC G-3', 反向引物: 5'-CTA AAG TAG CCC CTT GAA TTC CGA GGC AGT AGG CA-3', 退火温度 52 °C)进行 PCR 反应扩增。干扰片段扩增后, 进行胶回收实验, 再进行琼脂糖凝胶电泳检测。把胶回收的目的片段和质粒载体进行连接, 以 LMP 为测序引物进行测序。

1.8 过表达及抑制效率检测

1.8.1 过表达/干扰载体病毒包装、感染 病毒宿主细胞为 293T 细胞, HUVECs 为感染细胞。pCDH-GFP(12.0 g)的包装质粒为 pCL-ECO, 用量 8.0 g; 转染人 IL-18-pCDH-GFP 过表达质粒(过表达组), 正常和转染空载体细胞分别作为实验对

照组和正常对照组。MSCV-LMP(12.5 g)包装质粒分别是: pAPAX(7.5 g)、pMD2. G(5 g); 分别转染人 IL-18-LMP shRNA-Amir1、2(干扰 1、2 组), 正常和转染空载体细胞分别作为实验对照 2 组和正常对照组; 总感染 48~72 h 后, 通过载体荧光观察感染效率, 并抽提点 RNA。

1.8.2 real-time PCR 测定 mRNA 水平 TRIzol(Invitrogen)抽提细胞总 RNA; 依据 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas)试剂盒标准操作进行 cDNA 合成。通过 GenBank 基因数据库搜索基因的完整 mRNA 序列, 用 BLAST 分析寻找特异性引物, 引物设计软件为 primer 5.0, 以人-actin 基因为内参(IL-18 正向引物: 5'-TCA AGA CCA GCC TGA CCA ACA-3, 反向引物: 5'-CTC ACC ACA ACC TCT ACC TCCG-3', 152 bp; β -actin 正向引物: 5'-ACG GCA AGT TCA ACG GCA CAG-3', 反向引物: 5'-GAC GCC AGT AGA CTC CAC GACA-3', 180 bp)。荧光定量 PCR 检测相对表达量, 依据 Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix(2×)(Fermentas)操作。将引物稀释至 10 μ M; 设计 96 孔板上样顺序, 每个样品做 3 个重复, 用水为模板作阴性对照; real time PCR 扩增仪进行实验。结果分析: 观察溶解曲线和扩增曲线, 用软件 DataAssist™ v3.0 Software(ABI)以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对结果进行分析。 $\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ 目的基因} - Ct \text{ 管家基因}) \text{ 实验组} - (Ct \text{ 目的基因} - Ct \text{ 管家基因}) \text{ 对照组}$ 。

1.8.3 蛋白水平测定 细胞总蛋白提取: 收集各组 HUVECs 后添加含 PMSF(Sigma 公司)的 RIPA 裂解液(Beyotime), 冰浴 30 min; 4 °C, 12 000 r/min 离心 5 min; 取上清液, 用 BCA 法测定计算蛋白浓度。蛋白印迹法(Western blot)分析目标蛋白的表达情况, Bio-Rad 膜成像系统下显色成像并用 Quantity One 软件对比分析。

1.9 人 IL-18 细胞系过表达\沉默后转录谱变化 按前文转染步骤进行实验, 收获转染了人的 IL18-LMP-shRNAmir1、IL18-pCDH-GFP 的细胞和未转染细胞作为对照, 提取总 RNA, 进行基因表达谱芯片分析, 每样品 1 张芯片, 共 3 个基因芯片; 样本送至康成生物进行基因芯片检测。

1.10 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件完成统计学分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间数据比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 Tukey 及 Scheffe 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ELISA 检测人血中 IL-18 的表达情况 检测 100 例血清样品中 IL-18 基因的水平, 编号 1~40 为 DVT 组, 41~80 为实验对照组, 81~100 为正常对照组。单因素方差分析显示: DVT 组 IL-18 检测值明显高于两对照组, 差异均有统计学意义($P=0.001$); 两对照组间差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 人 IL-18 在各组中的差异($\bar{x} \pm s$)

组别	n	OD 值	IL-18(ng/mL)
DVT 组	40	0.8684 ± 0.31	207.46 ± 78.63
实验对照组	40	0.6237 ± 0.22 ^a	150.03 ± 56.11 ^a
正常对照组	20	0.5884 ± 0.23 ^a	138.54 ± 61.10 ^a

^a: $P < 0.05$, 与 DVT 组比较。

2.2 HUVECs 培养及免疫荧光检测 培养原代 HUVECs 并

进行传代。早期细胞贴壁多呈小三角形、球形,少数细胞伸展呈短梭型,单个或团簇存在;此后细胞呈单层,互不重叠,呈铺路石样排列。HUVECs 细胞爬片重复 3 次免疫荧光均显示 IL-18 目标蛋白定位于 HUVECs 细胞质,见图 1。

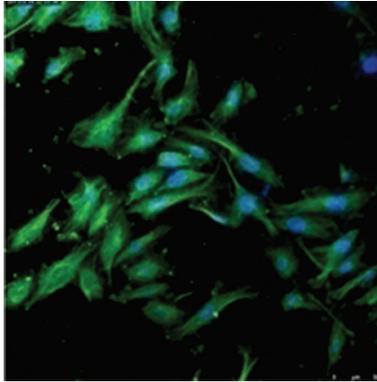


图 1 免疫荧光激光共聚焦检测($\times 800$)

2.3 人 IL-18 基因慢病毒过表达载体、逆转录病毒干扰载体构建

2.3.1 逆转录病毒过表达载体构建

PCR 扩增人 IL-18 基因,琼脂糖电泳清晰可见单一的目的条带;本研究选取慢病毒载体 pCDH-GFP 中, *EcoR* I 和 *Bam* H I 两个酶切位点来连接载体与目的基因。人 IL-18-pCDH-GFP 的测序结果,经 NCBI 中的 BLAST 在线工具比对,均为正确序列。

2.3.2 逆转录病毒干扰载体构建

据逆转录病毒 LMP 质粒载体特点,选 *Xho* I 和 *EcoR* I 酶切位点进行连接;扩增人 IL-18-LMP-shRNAmir1、2 干扰载体, *Sac* II / *Xho* I 双酶切后酶切产物经 1% 琼脂糖电泳检测;条带在 985 bp/7 019 bp 表明已插入目的条带,属于阳性克隆。阳性克隆送上海生工测序部测序鉴定。人 IL-18-LMP-shRNAmir1、2 干扰载体测序结果,以 NCBI 中的 BLAST 在线工具比对测序结果,均为正确序列。

2.4 过表达及抑制效率检测

2.4.1 病毒包装及感染

包装和转染病毒 48 h 及 72 h 分别收集两次病毒原液,用病毒原液 2~5 mL 感染宿主细胞,48 h 后观察感染情况;磷酸钙转染法在 293T 细胞长包装病毒的转染效率可以达到 90%,甚至更高;病毒收集后,感染宿主细胞的感染效率可达 80% 以上;载体都携带绿色荧光蛋白标签,可见实验转染及感染均呈高效。

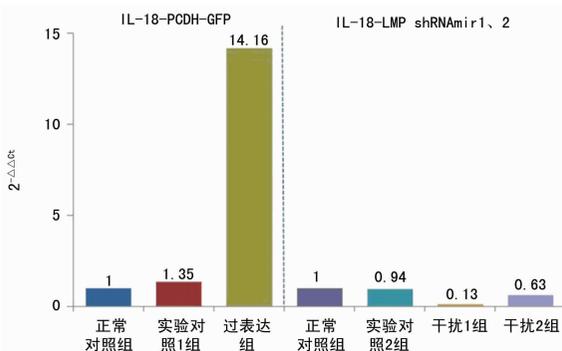


图 2 real-time PCR 检测基因的表达水平

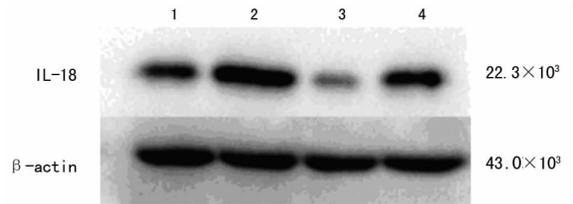
2.4.2 real-time PCR 结果

$2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析待测基因在实验各组间的相对表达量差异倍数。组间比较结果显示,IL-18 在过表达组的表达情况明显高于正常对照组及干扰 1、2 组 ($P < 0.05$),而干扰 1 组明显低于其余组,差异均有统计学意义

($P < 0.05$)。见图 2。

2.4.3 蛋白印迹检测结果

采用 Quantity One 软件对膜成像系统拍下的 Western blot 结果图片进行分析,读取条带相应光密度值后,根据公式:相对表达水平(ratio)=目标蛋白/ β -actin 进行计算,结果显示 IL-18 表达水平在过表达组中明显增高,干扰 1 组中明显减低,见图 3、表 2。以正常对照组为 1,分别计算其他处理组与正常对照组的比值,得到目的基因相对过表达率,见图 4。



1: 正常组;2: 过表达组;3: 干扰 1 组;4: 干扰 2 组。

图 3 IL-18 的蛋白表达水平

表 2 Western blot 检测 IL-18 蛋白的相对表达水平

组别	相对表达水平
正常对照组	0.43
过表达组	0.70
干扰 1 组	0.28
干扰 2 组	0.54

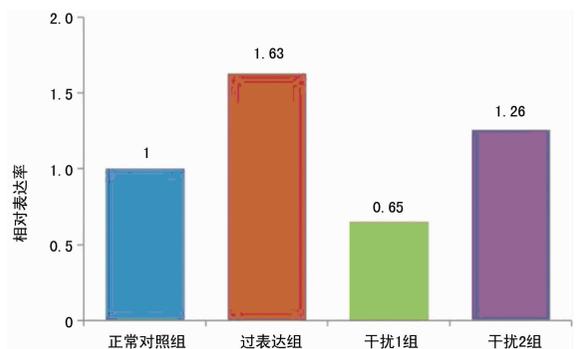
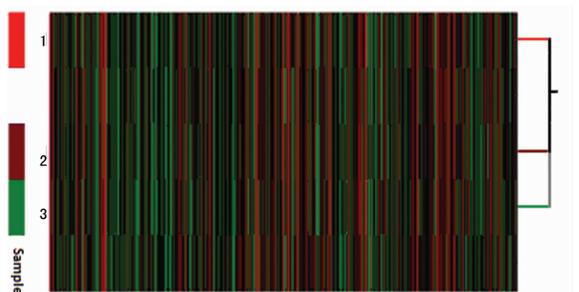


图 4 目的基因相对过表达率



1: 正常人静脉内支细胞;2: IL-18-PCDH-GFP 转染细胞;3: IL-18-LMP shRNA-Amir1 转染细胞。

图 5 基因芯片热谱图

2.5 人 IL-18 细胞系过表达或沉默后转录谱变化

根据 real-time PCR 和 Western blot 实验结果,选取过表达组、干扰 1 组、正常对照组细胞进行基因表达谱芯片分析,每样品做 1 张芯片,共 3 个基因芯片。图 5 为基因芯片检测到的所有表达变化的基因热谱图,其中红色表示相对高表达,绿色代表相对低表

达。同时根据 KEGG Pathway 分析过表达组及干扰 1 组与正常对照组比较发现:过表达组细胞上调的基因共 164 个、涉及 16 条信号通路;下调的基因共 177 个、涉及 17 条信号通路。干扰 1 组细胞上调的基因有 94 个、涉及 9 条信号通路;下调的基因有 290 个、涉及 23 条信号通路。

3 讨 论

DVT 是一种多因素疾病,包括致病基因、基因突变及基因间相互影响和炎性反应中细胞因子的相互作用、凝血功能等诸多方面。静脉血栓形成的复杂因素中,内皮细胞、血小板、炎症因子参与等诸多方面已成为 DVT 疾病研究的热点。国内外炎症与血栓相关研究主要集中于动脉疾病,研究炎症与静脉血栓形成间的相互作用机制仍在探索,相关文献报道甚少。炎症反应一方面有防御性的保护作用;另一方面炎症过于强烈时,则可使损伤放大、加重,产生序列性连锁反应引发血栓性疾病^[4-6]。血栓形成的局部微环境中,受损内皮分泌趋化因子,趋化白细胞到达炎症区域参与炎症反应,并分泌 IL-1、IL-6、TNF- α 等炎性介质促进血栓形成^[7]。炎症因子与血栓的形成有较为密切的关系^[8]。血栓形成过程中,炎症细胞分泌多种细胞因子和炎症介质作用于内、外源性凝血系统^[9],可刺激内皮细胞,诱发组织因子表达,激活凝血途径,引起炎症使体内 C-反应蛋白(CRP)含量增加,形成循环相加成效应。

IL-18 是上世纪 90 年代末新发现的前炎症细胞因子,具有多种生物学活性和功能,它参与炎症反应和免疫反应调节过程,尤其是对促炎性细胞因子释放及细胞因子相互作用具有重要意义。发现至今,国内外 IL-18 的相关研究主要集中于心血管系统疾病进展和发病机制等领域,已取得一定成果;然而关于 IL-18 与 DVT 相关性研究,国内外一直罕见报道。研究共收集 DVT 患者、实验对照组及正常对照组 100 例血液样本。ELISA 检测发现 DVT 组较两对照组血清中 IL-18 的水平明显增高,且差异有统计学意义($P < 0.05$)。据研究结果可见 IL-18 在创伤、手术等情况下,血液检测较健康人有一定程度增高;临床确诊的下肢 DVT 患者血液中 IL-18 表达水平明显上升,说明其与下肢 DVT 疾病有明确的相关性。IL-18 可诱导 T 淋巴细胞、巨噬细胞、NK 细胞生成 IFN- γ ,而 IFN- γ 可以抑制血管平滑肌的增殖、生长及胶原合成,促使 SMC 吞噬(OX-LDL)增多;还可以诱导血管内皮细胞表达细胞间黏附分子(VCAM)和血管内皮黏附因子(ICAM),促进血管和细胞、细胞和细胞间黏附,加速疾病发展^[10]。Chandrasekar 等^[11]研究表明心脏微血管内皮细胞(HCMEC)存在 IL-18 表达,并可以激活细胞凋亡信号通路诱导内皮细胞凋亡,引起心肌炎症性病变和损伤。许多早期炎性反应在造血与非造血系细胞中 IL-18 可以被检测到,已有报道巨噬细胞、血管内皮细胞、平滑肌细胞、中性粒细胞、树突细胞、NK 细胞、角质细胞等中均有 IL-18 表达^[12-15]。

本研究进行了临床患者血样的 IL-18 检测,为后期细胞、分子层面等机制研究提供有效实验证据。临床血样研究发现 IL-18 和下肢 DVT 疾病有明确相关性,有望成为 DVT 预测、诊断、疾病研究的分子标记物。因此,本研究继续对 IL-18 作为 DVT 疾病标记物在分子、细胞水平上进行探索。实验进行了 IL-18 与 HUVECs 的相关研究,免疫荧光检测证实 IL-18 定位与 HUVECs 细胞质中。随后构建 IL-18-pCDH-GFP 慢病毒过表达载体和 IL-18-LMP-shRNAmir1、2 逆转录病毒抑

制载体转染 HUVECs,用 real-time PCR 和 Western blot 对转染/感染率进行检测,选定较为理想的 IL-18-pCDH-GFP 和 IL-18-LMP-shRNAmir1 感染 HUVECs 进一步行基因表达谱芯片检测。基因芯片检测结果结合 KEGG Pathway 分析与正常 HUVECs 比较:过表达载体感染细胞上调基因共 164 个,涉及 16 条信号通路;干扰载体感染细胞下调基因有 290 个,涉及 23 条信号通路。IL-18 是具有多向生物学活性和功能的细胞因子,不仅在心血管疾病、免疫性疾病、肿瘤疾病、胃肠系统疾病以及呼吸系统疾病等多种疾病^[16-20]的发生、发展过程中发挥重要作用。大量研究证实内皮细胞受损后与静脉内血栓性疾病联系紧密,本研究进行了临床血样检测、细胞分子层面的初步探索,研究结果证实 IL-18 的过表达及抑制等变化对 HUVECs 正常功能有确切影响,说明其与下肢 DVT 疾病的发生、发展存在联系,然而其作用机制至今尚未阐明。其表达变化与 DVT 疾病的相互关系仍需进一步探讨,针对其生物活性、作用及调节机制等仍有待深入研究。深静脉血栓疾病的预测诊断、病程进展机制等是国内外研究者的关注热点,而 IL-18 是值得关注的炎症细胞因子,可为探寻疾病早期诊断分子标记物提供新的选择。

参考文献:

- [1] Levi M, van der Poll T, Schultz M. Infection and inflammation as risk factors for thrombosis and atherosclerosis [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2012, 38(5): 506-514.
- [2] Okamura H, Nagata K, Komatsu T, et al. A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the livers of mice causes endotoxic shock [J]. *Infect Immun*, 1995, 63(10): 3966-3972.
- [3] 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.
- [4] Goon PK, Watson T, Shantsila E, et al. Standardization of circulating endothelial cell enumeration by the use of human umbilical vein endothelial cells [J]. *J Thromb Haemost*, 2007, 5(4): 870-872.
- [5] 孙慧琳, 湛奕, 刘珍珍, 等. 人脐静脉内皮细胞的原代培养及鉴定 [J]. *广东医学*, 2012, 33(6): 744-746.
- [6] Strukova S. Blood coagulation-dependent inflammation. Coagulation-dependent inflammation and inflammation-dependent thrombosis [J]. *Front Biosci*, 2006, 11(2): 59-80.
- [7] Roumen-Klappe EM, Janssen MC, Van Rossum J, et al. Inflammation in deep vein thrombosis and the development of post-thrombotic syndrome: a prospective study [J]. *J Thromb Haemost*, 2009, 7(4): 582-587.
- [8] Jezovnik MK, Poredos P. Idiopathic venous thrombosis is related to systemic inflammatory response and to increased levels of circulating markers of endothelial dysfunction [J]. *Int Angiol*, 2010, 29(3): 226-231.
- [9] Lin PH, Barshes NR, Annambhotla S, et al. Advances in endovascular interventions for deep vein thrombosis [J].

- Expert Rev Med Devices, 2008, 5(2): 153-166.
- [10] Samnegard A, Hulthe J, Silveira A, et al. Gender specific associations between matrix metalloproteinases and inflammatory markers in post myocardial infarction patients [J]. *Atherosclerosis*, 2009, 202(2): 550-556.
- [11] Chandrasekar B, Vemula K, Surabhi RM, et al. Activation of intrinsic and extrinsic proapoptotic signaling pathways in interleukin-18-mediated human cardiac endothelial cell death[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(19): 20221-20233.
- [12] Matsui K, Yoshimoto T, Tsutsui H, et al. Propionibacterium acnes treatment diminishes CD4⁺ NK1, 1⁺ T cells but induces type 1 T cells in the liver by induction of IL-12 and IL-18 production from Kupffer cells[J]. *J Immunol*, 1997, 159(1): 97-106.
- [13] Leung BP, Culshaw S, Gracie JA, et al. A role for IL-18 in neutrophil activation[J]. *J Immunol*, 2001, 167(5): 2879-2886.
- [14] Dziedziczko V, Kurzawski M, Paczkowska E, et al. The impact of IL-18 gene polymorphisms on mRNA levels and interleukin-18 release by peripheral blood mononuclear cells[J]. *Postepy Hig Med Dosw(Online)*, 2012, 66(66): 409-414.
- [15] Du G, Ye L, Zhang G, et al. Human IL-18, IL-2 fusion protein as a potential antitumor reagent by enhancing NK cell cytotoxicity and IFN- γ production[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138(10): 1727-1736.
- [16] Blankenberg S, Luc G, Ducimetiere P, et al. Interleukin-18 and the risk of coronary heart disease in European men: the Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction[J]. *Circulation*, 2003, 108(20): 2453-2459.
- [17] Sánchez E, Palomino-Morales RJ, Ortego-Centeno N, et al. Identification of a new putative functional IL-18 gene variant through an association study in systemic lupus erythematosus[J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(19): 3739-3748.
- [18] Ovsyannikova IG, Haralambieva IH, Kennedy RB, et al. Genetic variation in IL-18R1 and IL-18 genes and Interferon γ ELISPOT response to smallpox vaccination: an unexpected relationship[J]. *J Infect Dis*, 2013, 208(9): 1422-1430.
- [19] Wong CK, Ho AW, Tong PC, et al. Aberrant activation profile of cytokines and mitogen-activated protein kinases in type 2 diabetic patients with nephropathy[J]. *Clin Exp Immunol*, 2007, 149(1): 123-131.
- [20] Ho LP, Davis M, Denison A, et al. Reduced interleukin-18 levels in BAL specimens from patients with asthma compared to patients with sarcoidosis and healthy control subjects[J]. *Chest*, 2002, 121(5): 1421-1426.

(收稿日期: 2014-11-08 修回日期: 2014-12-10)

(上接第 599 页)

- cycle regulation by the NEK family of protein kinases [J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(Pt 19): 4423-4433.
- [3] Bowers AJ, Boylan JF. Nek8, a NIMA family kinase member, is overexpressed in primary human breast tumors[J]. *Gene*, 2004, 328: 135-142.
- [4] Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle kinases in cancer [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2007, 17(1): 60-65.
- [5] Tsunoda N, Kokuryo T, Oda K, et al. Nek2 as a novel molecular target for the treatment of breast carcinoma[J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(1): 111-116.
- [6] Nassirpour R, Shao L, Flanagan P, et al. Nek6 mediates human cancer cell transformation and is a potential cancer therapeutic target[J]. *Mol Cancer Res*, 2010, 8(5): 717-728.
- [7] Holland PM, Milne A, Garka K, et al. Purification, cloning, and characterization of Nek8, a novel NIMA-related kinase, and its candidate substrate Bicd2[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(18): 16229-16240.
- [8] Liu S, Lu W, Obara T, et al. A defect in a novel Nek-family kinase causes cystic kidney disease in the mouse and in zebrafish[J]. *Development*, 2002, 129(24): 5839-5846.
- [9] Manning DK, Sergeev M, Van Heesbeen RG, et al. Loss of the ciliary kinase Nek8 causes left-right asymmetry defects[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2013, 24(1): 100-112.
- [10] Otto EA, Trapp ML, Schultheiss UT, et al. NEK8 mutations affect ciliary and centrosomal localization and may cause nephronophthisis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(3): 587-592.
- [11] Zalli D, Bayliss R, Fry AM. The Nek8 protein kinase, mutated in the human cystic kidney disease nephronophthisis, is both activated and degraded during ciliogenesis[J]. *Hum Mol Genet*, 2012, 21(5): 1155-1171.
- [12] Habbig S, Bartram MP, Sägmüller JG, et al. The ciliopathy disease protein NPHP9 promotes nuclear delivery and activation of the oncogenic transcriptional regulator TAZ [J]. *Hum Mol Genet*, 2012, 21(26): 5528-5538.
- [13] Choi HJ, Lin JR, Vannier JB, et al. NEK8 links the ATR-regulated replication stress response and S phase CDK activity to renal ciliopathies[J]. *Mol Cell*, 2013, 51(4): 423-439.
- [14] Jackson PK. Nek8 couples renal ciliopathies to DNA damage and checkpoint control[J]. *Mol Cell*, 2013, 51(4): 407-408.
- [15] Chan WL, Yuo CY, Yang WK, et al. Transcribed pseudogene ϕ PPM1K generates endogenous siRNA to suppress oncogenic cell growth in hepatocellular carcinoma[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(6): 3734-3747.

(收稿日期: 2014-08-27 修回日期: 2014-10-16)