

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.14.007

CD4⁺T 细胞中 IL-18 激活的 NF-κB 信号通路与 PBC 发病机制的相关性研究^{*}

赵二川¹,李红梅²,任智晶²,何宇晴²,王明珠³,叶震旋²,周雯婧²,张 华^{2△}
(1. 贵州医科大学临检教研室,贵阳 550004;2. 贵州省人民医院检验科,贵阳 550002;
3. 贵阳护理职业学院检验系,贵阳 550081)

[摘要] **目的** 探讨白细胞介素(IL)-18 及其活化的 CD4⁺T 细胞中核转录因子 kappa B(NF-κB)信号通路与原发性胆汁性肝硬化(PBC)发病机制的相关性。**方法** 采用荧光定量 PCR、酶联免疫吸附试验(ELISA)、流式细胞术、免疫磁珠分选及细胞培养、Western bolt 等方法,分别检测贵州省人民医院 32 例 PBC 患者(PBC 组)及 32 名健康人(健康对照组)外周血单个核细胞 IL-18 mRNA、血浆 IL-18、CD4⁺T 细胞表面 IL-18Rα、CD4⁺T 细胞增殖率及其 NF-κB 信号通路中 IκBα 及 NF-κB p65 蛋白。**结果** PBC 组血浆中 IL-18 水平明显高于健康对照组($P<0.05$);PBC 组 IL-18 mRNA 的相对表达量较健康对照组差异有统计学意义($P<0.05$)。PBC 组表达 IL-18R 的 CD4⁺T 细胞百分率高于健康对照组($P<0.05$)。经 IL-18 刺激 PBC 组 CD4⁺T 细胞增殖率明显高于健康对照组($P<0.01$)。给予 IL-18 刺激后,各组中 IκBα 蛋白相对表达量相均有所下降、NF-κB p65 蛋白相对表达量均有所上调,且 PBC 组更加明显($P<0.01$)。**结论** IL-18 通过激活 CD4⁺T 细胞中 NF-κB 信号通路参与 PBC 的发病。

[关键词] 肝硬化,胆汁性;T 淋巴细胞;抗原,CD4;白细胞介素 18;原发性胆汁性肝硬化;NF-κB 信号通路
[中图分类号] R446.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)14-1892-05

Correlation analysis of NF-κB signaling pathway activated by IL-18 in CD4⁺T cells and the pathogenesis of PBC^{*}
Zhao Erchuan¹,Li Hongmei²,Ren Zhijing²,He Yuying²,Wang Mingzhu³,Ye Zhenxuan²,Zhou Wenjing²,Zhang hua^{2△}
(1. Clinical Laboratory,Guizhou Medical University Guiyang,Guizhou 550004,China;2. Department of Medical Laboratory,Guizhou Provincial People's Hospital,Guiyang,Guizhou 550002,China;
3. Department of Medical Laboratory,Guiyang Nursing Vocational College,Guiyang,Guizhou 550081,China)

[Abstract] **Objective** To explore the correlation between NF-κB signaling pathways activated by IL-18 in CD4⁺T cells and the pathogenesis of PBC. **Methods** We detected the expression of IL-18 mRNA in PBMCs,IL-18 level in plasma,receptor IL-18R on surface of CD4⁺T cell,proliferation rate of CD4⁺T cell and its NF-κB signaling pathway protein IκBα and NF-κB p65 by qRT-PCR,ELISA,flow cytometry,MACS and Western blot on 32 cases of patients with PBC (PBC group) and 32 healthy people (control group) in Guizhou provincial people's hospital. **Results** The level of IL-18 in PBC group was significantly higher than that in control group ($P<0.05$). The relative expression of IL-18 mRNA in PBC group was significantly higher than that in control group ($P<0.05$). The percentage of CD4⁺T cells expressing IL-18Rα in PBC group was higher than that in control group ($P<0.05$). The proliferation rate of CD4⁺T cells stimulated by IL-18 in PBC group was significantly higher than that in healthy control group ($P<0.01$). The relative expression levels of NF-κB p65 protein were up-regulated in IL-18,and the expression of IκBα protein in each group was significantly increased,especially in PBC group ($P<0.01$). **Conclusion** IL-18 can activate NF-κB signal pathway in CD4⁺T cells and participate in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis.

[Key words] liver cirrhosis, biliary; T-lymphocytes; antigens, CD4; interleukin-18; primary biliary cirrhosis; nuclear factor-kappa signaling pathway

原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis,PBC)是自身免疫性肝病(autoimmune liver diseases,AILD)中最常见的一种,以肝脏门脉周围淋巴细胞浸润、胆管上皮细胞特异性损伤及血清中出现高滴度抗线粒体抗体(anti-mitochondrial antibody,AMA)为特征。其病因及发病机制尚不完全清楚,可能与遗传易感性及环境等因素有关^[1]。熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid,UDCA)是惟一被美国肝病学会、食品药品监督管理局(FDA)批准的用以治疗 PBC 的药物,可以延长疾病早期患者的生存期,但仍有约 40% 的患者对其应答欠佳^[2],最终需要肝移植。白细胞介素(IL)-18 是一种来源于单核巨噬细胞的细胞因子,为 IL-1 家族成员,通过与 IL-18 受体(IL-18R)结合

发挥其生物学功能^[3],IL-18Rα 亚单位在应答中起关键作用。研究表明,IL-18 参与系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、原发性干燥综合征等自身免疫病的发病,但 IL-18 与 PBC 发病机制的研究国内尚鲜见报道^[4-5]。IL-18 在体内可激活多条细胞信号转导途径,核转录因子 kappa B(NF-κB)信号通路就是其中之一。NF-κB 信号通路被报道证实与多种自身免疫病的发病机制相关,但其是否与 PBC 的发病机制有关联目前暂未见报道。本课题拟通过检测 PBC 患者外周血 IL-18 相关指标,并通过检测 IL-18 刺激 PBC 患者 CD4⁺T 细胞的增殖变化及 NF-κB 信号通路的激活状态,探讨 IL-18 介导的免疫炎症反应及其相关 NF-κB 信号通路在 PBC 发病中的作用。

^{*} 基金项目:贵州省科学技术厅项目(黔科合 LH 字[2014]7008 号)。 作者简介:赵二川(1989—),在读硕士,主要从事临床检验诊断学方面研究。 △ 通信作者,E-mail:780837482@qq.com。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2014 年 11 月至 2016 年 3 月贵州省人民医院门诊及住院 PBC 患者 32 例为 PBC 组,其中男 9 例,女 23 例,符合美国肝病学会(AASLD)于 2009 年推荐的诊断标准^[6]。选择 2014 年 11 月至 2016 年 3 月期间该院体检健康人 32 例为健康对照组,其中男 8 例,女 24 例。年龄、性别与 PBC 组相匹配。排除标准:肝内外局灶性病变或梗阻,原发性硬化性胆管炎(PSC)或自身免疫性肝炎(AIH),病毒性、酒精性、药物性或妊娠相关性肝病,合并其他自身免疫性、系统性疾病致肝脏受累等疾病。所有患者均知情同意。

1.2 材料与试剂 逆转录试剂盒及 Tiangen SYBR Green I 染料试剂盒购自北京天根公司;PCR 引物由上海生工合成;Anti-Human CD4-FITC 购自美国 BD 公司;IL-18R α 及 IgG1 κ 抗体购自 eBscience 公司;IL-18 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自联科生物技术有限公司;抗人 CD4T 细胞磁珠、磁珠分选(MACS)分选柱及缓冲液购自德国 Miltenyi Biotec 公司;胎牛血清及 IL-18 重组蛋白购自美国 Gibco 公司;细胞培养试剂盒(CCK-8)购自日本 Dojindo 公司细胞,核蛋白/浆蛋白抽提试剂盒购自上海生物工程公司;Tubulin 抗体购自江苏碧云天公司;兔抗人多克隆 IkBa 蛋白抗体及鼠抗人 NF- κ B p65 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

1.3 方法

1.3.1 收集外周血血浆及单个核细胞 取患者乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝外周血 2 mL,3 500 r/min 离心 5 min,每管 500 μ L,收集两管离心分离的血浆;其余全血采用人外周血淋巴细胞分离液,并用 Ficoll 法分离外周血单个核细胞(PBMC)。

1.3.2 荧光定量 PCR 检测 IL-18 mRNA 相对表达量 采用 Trizol 法提取细胞 RNA,紫外分光光度计检测其纯度及浓度,取 1 μ g 逆转录为 cDNA 进行 PCR 反应。根据 GeneBank 中人 IL-18 序列(Gene ID:3606)设计引物,IL-18(153 bp):上游引物 5'-TCA AGA CCA GCC TGA CCA ACA T-3';下游引物 5'-GCT CAC CAC AAC CTC TAC CTC C-3'。以 β -actin 作为内参, β -actin(185 bp):上游引物 5'-GCC AAC ACA GTG CTG TCT-3';下游引物 5'-CAC ATC TGC TGG AAG GTG-3'。采用 SYBR Green 染料,通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析 IL-18 mRNA 相对表达量。每个样本做 3 个复孔,扩增条件:95 $^{\circ}$ C 15 min;95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,40 cycle。

1.3.3 流式细胞术检测 IL-18R 每份标本设置同型对照管和检测管,均加入乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝外周静脉血 50.0 μ L;两管同时加入 CD4-FITC 抗体 5.0 μ L,漩涡混合器充分混匀,室温避光孵育 15 min;两管同时加入红细胞裂解液 1 000.0 μ L,充分混匀,室温避光孵育 10 min,至全血透亮;两管均加入磷酸盐缓冲液(PBS)1 000.0 μ L,充分混匀,1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,重复本次操作 1 次。检测

管加入 IL-18R α 抗体 5.0 μ L,同型对照管加入 IgG1 κ 抗体 2.5 μ L,充分混匀,室温避光孵育 15 min。两管均加入 PBS 1 mL,充分混匀,1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,重复本次操作 1 次。弃去上清液,加入 PBS 2 mL,充分混匀,上机检测。

1.3.4 ELISA 法检测血浆 IL-18 严格按照 IL-18 ELISA 试剂盒说明书进行检测,酶标仪 450 nm/630 nm 波长测定光密度(OD)值。

1.3.5 CD4⁺T 细胞分选、培养及增殖试验 分离出 PBMC 后,利用人工磁性分选方法及抗人 CD4⁺T 细胞磁珠进一步分选出人外周血 CD4⁺T 细胞,并通过流式细胞术检测细胞分选纯度。以细胞数 1×10^5 /孔接种于 96 孔板,每组设 3 个复孔,每孔 100 μ L。设置空白组:不含细胞的 RPMI 1640 培养液+PHA(5.00 μ g/mL)+IL-2(0.01 μ g/mL);对照组:含有细胞的 RPMI 1640 培养液+PHA(5.00 μ g/mL)+IL-2(0.01 μ g/mL);试验组:含有细胞的 RPMI 1640 培养液+PHA(5.00 μ g/mL)+IL-2(0.01 μ g/mL)+IL-18(100 ng/mL)进行细胞增殖,试验组在加入 IL-18 前,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂ 预培养 1 d;加入 IL-18 后,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂ 培养 3 d;其余组相同条件下培养 4 d,加入 CCK-8 试剂孵育 4 h 后用酶标仪检测各组 OD 值。

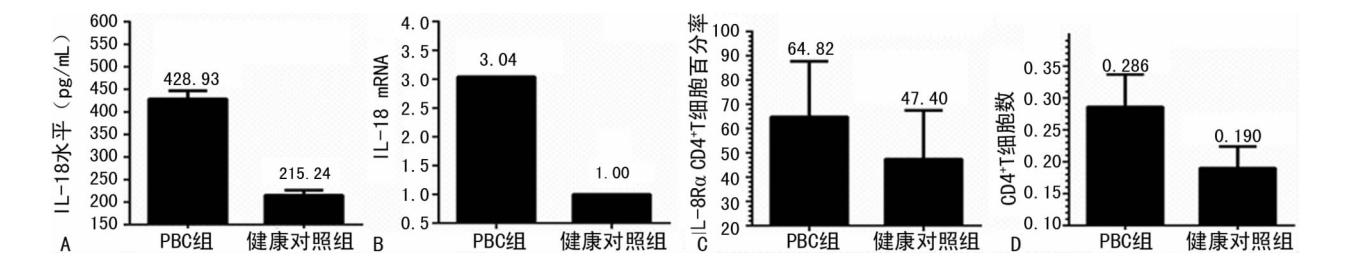
1.3.6 Western blot 检测 按上 1.3.5 所示进行分组细胞培养,试验组在加入 IL-18 前,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂ 预培养 1 d;试验组加入 IL-18 后,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂ 培养 30 min,收集各组细胞。以核蛋白/浆蛋白抽提试剂盒分别提取细胞胞质蛋白及细胞核蛋白,以二喹啉甲酸法(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(增强型)检测蛋白浓度,每个样本选取等量蛋白(35 μ g),依次进行电泳、转膜、封闭、抗体孵育等步骤,最终利用电化学发光(ECL)发光液显色,采用 Image J 软件对图像进行分析,检测 IkBa 和 NF- κ B p65 蛋白表达情况。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 版统计学软件对数据进行统计分析。计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,不符合正态分布时采用秩和检验;计数资料用率表示,组间采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

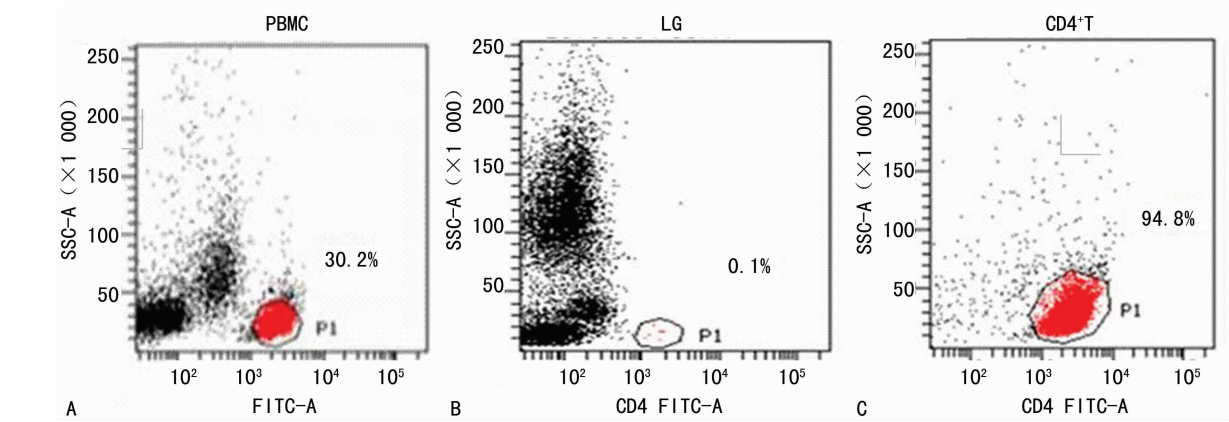
2.1 IL-18 及 IL-18 mRNA 的检测结果 PBC 组血浆中 IL-18 的水平明显高于健康对照组($P<0.05$);PBC 组 IL-18 mRNA 的相对表达量较健康对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1A~B。

2.2 CD4⁺T 细胞纯度及百分率并行细胞计数的结果 PBC 组表达 IL-18R α 的 CD4⁺T 细胞百分率高于健康对照组($P<0.05$,图 1C)。经流式细胞术检测,可以看出经磁珠分选后的细胞纯度高且分选完全(图 2)。经磁珠分选后细胞计数,1 mL 全血中 CD4⁺T 细胞计数,PBC 组中的 CD4⁺T 细胞量与健康对照组相比明显升高($P<0.05$),见图 1D。



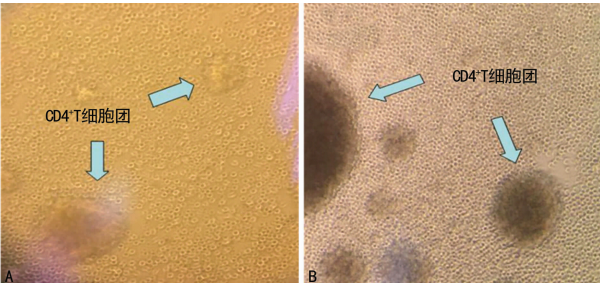
A: 两组血浆中 IL-18 表达水平;B: 两组 PBMC 中 IL-18 mRNA 的表达情况;C: 表达 IL-18R α 的 CD4⁺T 细胞百分率;D: 磁珠分选后,1 mL 全血中 CD4⁺T 细胞计数。

图 1 两组 IL-18 和 CD4⁺ 细胞检测结果



A:磁珠分选前 PBMC 中 CD4⁺T 细胞百分数;B:磁珠分选后细胞滤液中 CD4⁺T 细胞百分数;C:磁珠分选 CD4⁺T 细胞纯度。

图 2 流式细胞术检测结果



A: IL-18 刺激前 PBC 组 CD4⁺T 细胞;B: IL-18 刺激后 PBC 组 CD4⁺T 细胞。

图 3 镜下 IL-18 刺激前后 CD4⁺T 细胞的增殖(×200)

2.3 CD4⁺T 细胞增殖率 磁珠分选并培养 CD4⁺T 细胞,经 IL-18 刺激后 PBC 组 CD4⁺T 细胞均被刺激增殖,PBC 组增殖率明显高于健康对照组,差异有统计学意义($P<0.01$),见表

1、图 3。
2.4 Western blot 检测 IκBα、NF-κB p65 蛋白表达水平 未给予 IL-18 刺激时,PBC 组 IκBα 蛋白表达量明显低于健康对照组,NF-κB p65 蛋白表达量明显高于健康对照组($P<0.01$)。给予 IL-18 刺激后,各组中 IκBα 蛋白相对表达量相均有所下降、NF-κB p65 蛋白相对表达量均有所上调,且 PBC 组更加明显($P<0.01$),见表 2,图 4。

表 1 IL-18 对 CD4⁺T 细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s,n=5$)

组别	IL-18(-)OD 值	IL-18(+)OD 值	增殖率(%)
健康对照组	0.570±0.055	0.637±0.051	11.85±0.026
PBC 组	0.629±0.108	0.779±0.103	24.83±0.053 ^a

IL-18(-): 未经 IL-18 刺激;IL-18(+): 经 IL-18 刺激后;^a: $P<0.01$,与健康对照组比较。

表 2 各组蛋白经 IL-18 刺激前后表达相对灰度值($\bar{x}\pm s,n=5$)

组别	IκBα 蛋白			NF-κB p65 蛋白		
	IL-18(-)	IL-18(+)	下调率(%)	IL-18(-)	IL-18(+)	下调率(%)
PBC 组	0.570±0.109 ^a	0.376±0.100 ^a	34.37 ^a	0.605±0.044 ^a	0.972±0.087 ^a	61.35 ^a
健康对照组	0.893±0.046	0.757±0.063	15.25	0.429±0.046	0.524±0.013	23.91

IL-18(-): 未经 IL-18 刺激;IL-18(+): 经 IL-18 刺激后;^a: $P<0.05$,与健康对照组比较。

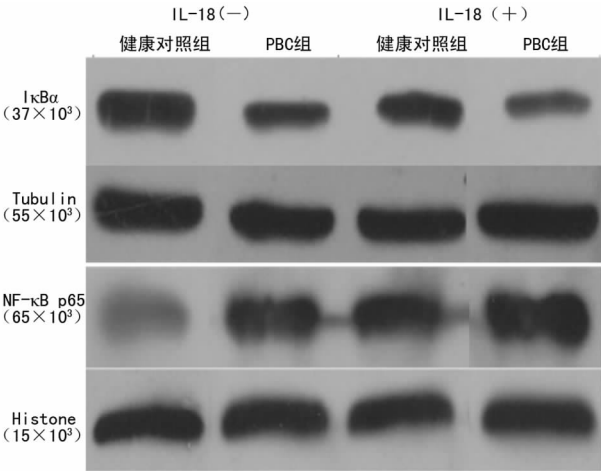


图 4 两组 Western blot 条带

3 讨 论

PBC 是一种以肝内小胆管渐进性破坏导致慢性胆汁淤

积、汇管区炎症、纤维化并可能导致肝硬化最终发展为肝衰竭为特征的 AID^[7]。其可能是环境因素与遗传因素相互作用的结果^[1,8]。UDCA 作为唯一被美国 FDA 批准的用以治疗 PBC 的药物可以防止门脉高压、食管静脉曲张并延迟需要肝移植的时间^[9],对于处于第 1 或第 2 阶段的患者,经 UDCA 治疗,其生存率与年龄相一致的健康者相接近^[10],但并非对所有的患者都有效^[11],最终需要肝移植。需要指出的是,经国内外专家取得共识,如经早期诊断及规范化治疗,大部分患者不一定会发展至肝硬化,然而“肝硬化”的名字会给患者在工作及生活上带来较大精神压力,建议将“原发性胆汁性肝硬化”更名为“原发性胆汁性胆管炎”^[12]。

本研究分别检测了 PBC 组 PBMC 中 IL-18 mRNA 相对表达量、表达 IL-18Rα 的 CD4⁺T 细胞百分率及血浆中 IL-18 水平,结果显示其各项指标表达水平较健康对照组均明显升高,提示 IL-18 与 PBC 的发病相关且其可能通过 CD4⁺T 细胞介导 PBC 的发病。IL-18 是 1995 年发现的具有诱导干扰素 γ (IFN-γ)高水平表达作用的细胞因子,其可通过多种途径促进

Th1 型免疫反应,如诱导 Th1 细胞和 NK 细胞产生 IFN- γ ,与 IL-12 具有协同作用,诱导 Th1 细胞产生 IFN- γ ^[13-14]。IL-18 还可促进新生 CD4⁺T 细胞的增殖,并诱导 CD4⁺T 细胞极化为 Th1 细胞,进一步分泌 IFN- γ 。研究表明,PBC 患者血清中的细胞因子以 Th1 细胞分泌的 IL-2、IFN- γ 、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 升高为主,而作为炎性细胞因子的 IFN- γ 介导的炎症反应是 PBC 肝脏病理损伤的原因之一。而 IL-18 能诱导 CD4⁺T 细胞增殖、极化为 Th1 细胞并分泌 IFN- γ 。因此,IL-18 在增强 Th1 型免疫应答上起着重要调节作用。另据 Joshi 等^[15]的研究,浸润于肝组织汇管区的 T 淋巴细胞以 CD4⁺T 细胞居多,且原位杂交分析 PBC 患者汇管区表达 IFN- γ mRNA 明显增加,并总结了 PBC 肝浸润淋巴细胞中以 Th1 为主。而有关 IL-18 在 PBC 中的研究却很少报道。Yamano 等^[16]虽然对 PBC 患者血清中的 IL-18 做了相关研究,本研究结果与其相符合,但其并没有深入到基因水平,也没有对其相关信号通路进行研究,而本研究恰好弥补了这方面的不足,更加全面。IL-18R 可表达于 Th1 细胞表面而 Th2 细胞不表达,由 α 、 β 两个亚单位组成。研究报道,IL-18R 的 α -亚单位缺失的小鼠不能与 IL-18 产生反应,表明受体 α -亚单位在应答反应中起关键作用^[17-18]。结合 PBC 患者 CD4⁺T 细胞中以 Th1 型细胞占主导作用的免疫学特点及 IL-18 在 T 细胞免疫中的生物学作用,提示 IL-18 与 CD4⁺T 细胞表面 IL-18R α 结合,从而发挥其增殖 T 细胞功能并促进其极化为 Th1 细胞,介导 Th1 型细胞免疫,从而攻击胆管上皮细胞发生炎症坏死,并导致肝内胆汁淤积,造成肝脏的病理损伤。

在细胞增殖实验中,运用免疫磁珠分选法对外周血 PBMC 中的 CD4⁺T 细胞进行分离,用流式细胞术对分选后的细胞进行纯度测定,结果显示磁珠分选的细胞纯度高并且分选完全,为后续实验奠定基础。运用 CCK-8 法进行预实验时,在未添加 IL-2 和植物血凝素 (PHA) 的情况下,细胞不仅不增殖而且存活率低、病死率高,在细胞培养基内加入 PHA 及 IL-2 可有效促进细胞的增殖、分化。使用 PHA 和 IL-2 诱导 T 淋巴细胞增殖是科研实验中最常用的免疫学方法。目前研究表明,IL-2 信号转导依靠 Janus 激酶-信号转导子和转录激活因子 (JAK-STAT) 信号转导途径。IL-2 与其受体结合后,通过活化蛋白酪氨酸激酶 JAK1 及 JAK3 激活信号转导及转录激活因子 STAT5,活化的 STAT5 进入细胞核后可促使细胞进入分裂周期^[19]。IL-2 信号转导途径与本实验研究 IL-18 激活 CD4⁺T 细胞 NF- κ B 信号途径并不一致,未对本实验造成干扰。以 IL-18 重组蛋白对经 IL-2 及 PHA 作用后的 CD4⁺T 细胞进行体外刺激实验,结果表明,相对于未经 IL-18 刺激而言,PBC 组与健康对照组 CD4⁺T 细胞均增殖,提示 IL-18 可以促进 CD4⁺T 细胞的增殖。PBC 组增殖更为明显,且前期实验证实 PBC 患者外周血中表达 IL-18R α 的 CD4⁺T 细胞增多,进一步证实 PBC 患者外周血中存在大量增殖能力强、对 IL-18 刺激敏感度高的 CD4⁺T 细胞。

IL-18 可以通过 NF- κ B 通路、JAK/STAT 通路、C-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 通路等多条信号转导通路发挥其促炎作用。其中 NF- κ B 是机体内重要的核转录因子,参与多种生理病理过程,由 p50 和 p65 两个多肽链单位组成异源二聚体,其中 p65 是抑制蛋白 I κ B 的结合部位,参与转录的起始调节。在细胞的细胞质中,p65 与 I κ B 稳定结合,被外来因素刺激后,I κ B 磷酸化降解,NF- κ B 随即被活化进入细胞核内。I κ B 家族为 NF- κ B 抑制蛋白,I κ B α 作为 I κ B 家族 9 个成员中最为经典的成

员^[20],在 NF- κ B 活化过程中是作用最强的负反馈因子。静息状态下,其能够与 NF- κ B p65 稳定结合,接受刺激冲动时能快速活化与之解离,故 I κ B α 是研究 NF- κ B 信号通路激活状态的最佳指标。因此,本试验选择与 I κ B 可以稳定结合的 NF- κ B p65 及 I κ B α 作为 NF- κ B 信号通路是否活化的检测指标。对未经 IL-18 刺激的各项研究细胞质蛋白 I κ B α 和核蛋白 NF- κ B p65 进行 Western blot 检测,结果显示 PBC 组细胞质蛋白 I κ B α 明显低于健康组、核蛋白 NF- κ B p65 明显高于健康组,提示 PBC 患者 CD4⁺T 细胞中 NF- κ B 信号通路处于相对较高的激活状态。外源性给予 IL-18 刺激后,PBC 组 CD4⁺T 细胞胞质蛋白 I κ B α 表达进一步降低,胞核蛋白 NF- κ B p65 表达进一步增高,证实在 PBC 患者 CD4⁺T 细胞中 NF- κ B 信号通路可以被 IL-18 高度激活。因此,本研究推测在 PBC 患者体内,由于 IL-18 的增高导致 CD4⁺T 细胞中 NF- κ B 信号通路的高度激活,产生大量炎性因子,这些因子共同作用引起肝内胆管上皮细胞的损伤,肝内胆汁淤积症状逐渐加重,最终引起 PBC 的发生。

总的来说,本研究进一步证实了 IL-18 与 PBC 发病的相关性,并表明其可以通过介导 CD4⁺T 细胞的 NF- κ B 信号通路的激活参与 PBC 的细胞免疫炎症反应,这提示 IL-18 的干预有可能成为 PBC 有效治疗新的靶点。介于其发病机制的复杂性且仍有约 1/3 患者对 UDCA 应答欠佳而最终需要进行肝移植^[21],对 PBC 研究十分必要,有关其与信号传导通路及天然免疫的关系,需进一步研究。

参考文献

- [1] Corpechot C,Chretien Y,Chazouilleres OA. Demographic, lifestyle, medical and familial factors associated with primary biliary cirrhosis[J]. J Hepatol, 2010, 53(1): 162-169.
- [2] Carey EJ, Ali AH, Lindor KD. Primary biliary cirrhosis [J]. Lancet, 2015, 386(10003): 1565-1575.
- [3] Gracie JA, Robertson SE, McInnes IB. Interleukin-18[J]. J Leukoc Biol, 2003, 73(2): 213-224.
- [4] Nakamura K, Asano Y, Taniguchi TA, et al. Serum levels of interleukin-18-binding protein isoform a: clinical association with inflammation and pulmonary hypertension in systemic sclerosis[J]. J Dermatol, 2016, 43(8): 912-918.
- [5] Kuwano K, Maeyama T, Inoshima I, et al. Increased circulating levels of soluble Fas ligand are correlated with disease activity in patients with fibrosing lung diseases[J]. Respiriology, 2002, 7(1): 15-21.
- [6] Carey EJ, Ali AH, Lindor KD. Primary biliary cirrhosis [J]. Hepatology, 2015, 50(1): 291-308.
- [7] Bowlus CL, Gershwin ME. The diagnosis of primary biliary cirrhosis [J]. Autoimmun Rev, 2014, 13(4/5): 441-444.
- [8] Juran BD, Lazaridis KN. Environmental factors in primary biliary cirrhosis [J]. Semin Liver Dis, 2014, 34(3): 265-272.
- [9] Huet PM, Vincent C, Deslaurier JA, et al. Portal hypertension and primary biliary cirrhosis: effect of long-term ursodeoxycholic acid treatment [J]. Gastroenterology, 2008, 135(5): 1552-1560.
- [10] Corpechot C, Carrat F, Bahr A, et al. The effect of ur-

- sodeoxycholic acid therapy on the natural course of primary biliary cirrhosis[J]. *Gastroenterology*, 2005, 128(2):297-303.
- [11] Huet PM, Vincent C, Deslauniers J, et al. Portal hypertension in primary biliary cirrhosis (PBC): a reversible condition? Yes, but not in all UDCA treated patients[J]. *Hepatol Res*, 2009, 39(10):1032-1038.
- [12] Beuers U, Gershwin ME, Gish RG, et al. Changing nomenclature for PBC: From 'cirrhosis' to 'cholangitis'[J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2015, 39(5):57-59.
- [13] Jacques A, Bleau C, Turbide C, et al. A synergistic interferon-gamma production is induced by mouse hepatitis virus in interleukin-12 (IL-12)/IL-18-activated natural killer cells and modulated by carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAM) 1a receptor[J]. *Immunology*, 2009, 128 Suppl 1:S551-561.
- [14] Pintaric M, Gerner W, Saalmueller A. Synergistic effects of IL-2, IL-12 and IL-18 on cytolytic activity, perforin expression and IFN-gamma production of porcine natural killer cells[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2008, 121(1/2):68-82.
- [15] Joshi S, Cauch-Dudek K, Wanless IR, et al. Primary biliary cirrhosis with additional features of autoimmune hepatitis: response to therapy with ursodeoxycholic acid[J]. *Hepatology*, 2002, 35(2):409-413.
- [16] Yamano T, Higashi T, Nouse K, et al. Serum interferon-gamma-inducing factor/IL-18 levels in primary biliary cirrhosis[J]. *Clin Exp Immunol*, 2000, 122(2):227-231.
- [17] Debets R, Timans JC, Churakowa T, et al. IL-18 receptors, their role in ligand binding and function: anti-IL-1RAcPL antibody, a potent antagonist of IL-18[J]. *J Immunol*, 2000, 165(9):4950-4956.
- [18] Kinoshita K, Yamagata T, Nozaki Y, et al. Blockade of IL-18 receptor signaling delays the onset of autoimmune disease in MRL-faslpr mice[J]. *J Immunol*, 2004, 173(8):5312-5318.
- [19] Haddad JJ, Saade NE, Safieh-Garabedian B. Interleukin-10 and the regulation of mitogen-activated protein kinases: are these signalling modules targets for the anti-inflammatory action of this cytokine[J]. *Cell Signal*, 2003, 15(3):255-267.
- [20] Manavalan B, Basith S, Choi YM, et al. Structure-function relationship of cytoplasmic and nuclear IkappaB proteins: an in silico analysis[J]. *PLoS One*, 2010, 5(12):e15782.
- [21] Trivedi PJ, Hirschfield GM. Treatment of autoimmune liver disease: current and future therapeutic options[J]. *Ther Adv Chronic Dis*, 2013, 4(3):119-141.

(收稿日期:2016-11-26 修回日期:2017-01-16)

(上接第 1891 页)

红景天与维生素 E 目前均已广泛应用于抗疲劳的治疗与预防中,而本研究将两种药物联合起来通过实验小鼠进行研究分析,充分发挥两种药物的自身优势,证实了两种药物联合应用在小鼠动物模型中的安全性与有效性,但由于本次动物试验仅仅针对用药(连续用药 2 周)后的 4 周进行研究,研究时间段较短,且并未在运动期间给药,因此在今后研究中将在运动前及运动期间均给予药物治疗,有望取得更好的效果;与此同时小鼠的膳食营养对骨骼肌损伤的保护作用未进行研究,也将在今后进一步探讨。此外,既往研究表明红景天具有很强的调节免疫功效^[9],本课题组将对免疫功能与肌肉损伤方面进一步研究,为日后的临床实践提供完善的理论基础。

参考文献

- [1] 薄海,彭朋,秦永生,等.低氧复合运动对大鼠骨骼肌线粒体含量的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2014, 30(8):1461-1466.
- [2] 杨海平.低氧、运动对大鼠骨骼肌细胞凋亡及 bcl-2、bax 表达的影响[J]. *中国运动医学杂志*, 2006, 25(6):706-709.
- [3] 苏全生,田野,孙君志,等.大鼠运动性骨骼肌损伤后血液白细胞介素-6、肌酸激酶及其同工酶的时相性变化[J]. *中国运动医学杂志*, 2006, 25(2):176-180.
- [4] 王明月,叶圣权,邵贺.维生素 E 联合维生素 C 对急性行军后骨骼肌损伤的保护作用[J]. *实用药物与临床*, 2016, 19(6):739-742.
- [5] 姚卓贤,冯凯.红景天口服液对大鼠心肌细胞缺氧耐受性的影响研究[J]. *中国药业*, 2016, 25(9):38-40.
- [6] 尹博,马丁,陈鹤,等.红景天对异丙肾上腺素(ISO)致大鼠急性心肌缺血的保护作用[J]. *复旦学报(医学版)*, 2015, 42(1):72-76.
- [7] 吴翊馨,张海平,高岩,等.口服 Vitamin E 对离心运动后大鼠骨骼肌损伤的影响[J]. *中国实用护理杂志*, 2013, 29(27):11-14.
- [8] Beaton LJ, Allan DA, Tarnopolsky MA, et al. Contraction-induced muscle damage is unaffected by vitamin E supplementation[J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2002, 34(5):798-805.
- [9] 宋永红,孙雪文,孟朝辉.红景天煎剂对运动性疲劳损伤运动员血清 MDA、SOD、NGF、MBP 及 BFGF 水平的影响[J]. *中国生化药物杂志*, 2015, 35(8):119-121.
- [10] 李伟.高山红景天素对运动性疲劳大鼠脑组织自由基代谢及相关指标的影响[D].兰州:西北师范大学,2013.
- [11] 田振军,石磊,刘小杰.过度训练对大鼠血清 CK、LDH、SOD、SDH 活性及 UMb 含量影响的研究[J]. *中国运动医学杂志*, 2000, 19(1):49-50.
- [12] 李焕春,肖国强.热应激适应与骨骼肌损伤保护[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(11):2139-2142.
- [13] 赵福临,刘瑞学,徐美华.乳酸和肌酸激酶及其同工酶监测长跑运动员体能消耗和肌肉损伤[J]. *福建医科大学学报*, 2008, 42(4):359-361.

(收稿日期:2016-11-25 修回日期:2017-01-13)