

血清 GM-CSF IL-18 在急性肾损伤中的相关性及对急性肾损伤的预测作用

林 鑫, 刘 鹏, 董 蓉, 周朝敏, 袁 静, 查 艳

基金项目: 贵州省科技计划项目(编号:黔科合 LH 字[2016]7171,黔科合基础[2017]1102)

作者单位: 550002 贵阳,贵州省人民医院(国家卫生健康委员会肺脏免疫性疾病重点实验室)肾内科(林 鑫,董 蓉,周朝敏,袁 静,查 艳); 550002 贵阳,贵州省中医药大学第一附属医院手术室(刘 鹏)

作者简介: 林 鑫(1981-),男,医学博士,副主任医师,研究方向:急慢性肾损伤的防治及标志物研究。E-mail:linxingysy@163.com

【摘要】 目的 探讨血清粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白介素-18(IL-18)在急性肾损伤(AKI)中的相关性及对 AKI 的预测作用。**方法** 选取 SPF 级 Wistar 大鼠 30 只,采用随机数字表法将其分为假手术组(SHAM 组, $n=5$)和 AKI 模型组(AKI 组, $n=25$)。检测两组在 0、24、48、72、96 h 时间点的血清肌酐(SCr)、IL-18、GM-CSF 的水平变化,分析其相关性。**结果** 在造模后,AKI 组出现了肾小管间质细胞坏死及炎症细胞浸润情况,AKI 组在 0、24、48、72、96 h 时间点的肾小管损伤评分呈先升高后降低的变化,在 48 h 时间点的肾小管损伤评分最高。AKI 组 24~96 h 时间点的肾小管损伤评分均高于 SHAM 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。AKI 组 SCr 水平随时间呈持续升高趋势;而 IL-18、GM-CSF 水平呈先上升后下降的变化。SHAM 组 SCr、IL-18、GM-CSF 水平在不同时间点变化不显著。AKI 组在造模后 48、72、96 h 的 SCr 水平显著高于 SHAM 组($P<0.05$);AKI 组在造模后 48 h 和 72 h 的 IL-18、GM-CSF 水平显著高于 SHAM 组($P<0.05$)。Pearson 相关分析结果显示,AKI 组血清 IL-18 水平与 SCr、GM-CSF 呈正相关($P<0.05$)。**结论** 在大鼠 AKI 模型中,血清 GM-CSF 与 IL-18 呈正相关,其峰值出现早于 SCr,可作为预测 AKI 发生的标志物。

【关键词】 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子; 白介素-18; 急性肾损伤; 炎症

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1674-3806(2020)09-0878-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2020.09.07

Correlation between serum concentrations of GM-CSF and IL-18 in acute kidney injury and their predictive roles in acute kidney injury LIN Xin, LIU Juan, DONG Rong, et al. Department of Nephrology, Guizhou Provincial People's Hospital (Key Laboratory of Pulmonary Immunological Diseases of National Health Commission of China), Guiyang 550002, China

【Abstract】 Objective To explore the correlation between serum concentrations of granulocyte-macrophage colony stimulating factor(GM-CSF) and interleukin-18(IL-18) in acute kidney injury(AKI) and their predictive roles in AKI. **Methods** Thirty specific pathogen free(SPF) Wistar rats were selected and divided into sham operation group(SHAM group, $n=5$) and AKI model group(AKI group, $n=25$) by random number table method. The varied levels of serum creatinine(SCr), IL-18 and GM-CSF were detected in the two groups at the time points of 0 h, 24 h, 48 h, 72 h and 96 h, and their correlation was analyzed. **Results** After modeling, renal tubulointerstitial cell necrosis and inflammatory cell infiltration occurred in the AKI group. The scores of renal tubular injury in the AKI group at the time points of 0 h, 24 h, 48 h, 72 h and 96 h were increased at first and then decreased. The scores of renal tubular injury at the time point of 48 h were the highest. The scores of renal tubular injury in the AKI group from 24 h to 96 h time points were higher than those in the SHAM group, and the differences were statistically significant($P<0.05$). The levels of SCr in the AKI group showed a trend of continuous increase over time, while the levels of IL-18 and GM-CSF increased at first and then decreased. The levels of SCr, IL-18 and GM-CSF in the SHAM group did not change significantly at different time points. The levels of SCr in the AKI group were significantly higher than those in the SHAM group 48, 72 and 96 hours after modeling($P<0.05$). The levels of IL-18 and GM-CSF in the AKI group were significantly higher than those in the SHAM group 48 and 72 hours after modeling($P<0.05$). The results of

Pearson correlation analysis showed that the level of serum IL-18 was positively correlated with SCr and GM-CSF in the AKI group ($P < 0.05$). **Conclusion** In the rat AKI model, serum GM-CSF is positively correlated with IL-18, and its peak value appears earlier than that of SCr, which can be used as a marker to predict the occurrence of AKI.

[Key words] Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF); Interleukin-18 (IL-18); Acute kidney injury (AKI); Inflammation

急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 是临床常见且严重的疾病,在发达国家其 7 d 病死率为 10% ~ 12%^[1,2]。使用血清肌酐 (serum creatinine, SCr) 水平来诊断 AKI 有许多缺点,其可因年龄、性别和肌肉含量不同而发生变化。而且,发生明显的肾损伤后一段时间 SCr 水平才升高,存在延迟情况。研究提示^[3,4],一系列的蛋白质和生化标志物被证明是有前途的生物标志物,可精准和早期识别严重肾小管损伤,包括 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶 (N-acetyl-β-D-glucosaminidase, NAG)、白介素-18 (interleukin-18, IL-18)、肾脏损伤分子-1 (kidney injury molecule-1, KIM-1)、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C (cystatin C, Cys C) 和中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白 (neutrophil gelatinase-associated apolipoprotein, NAGL) 等。IL-18 是一种器官缺血时产生的炎症介质,已有研究^[5]发现,肾小管损伤后,尿 IL-18 浓度在 6 h 内开始升高,峰值在 12 ~ 18 h。我们前期的研究^[6]提示,尿 IL-18 水平在预测 AKI 方面有良好的诊断效能,且明显优于 SCr。粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) 是一种多功能的细胞因子,可刺激粒细胞、巨噬细胞和树突状细胞的增殖分化,还具有重要的免疫调节作用。有研究^[7]提示 GM-CSF 在缺血再灌注 AKI 中水平增高。GM-CSF、IL-18 同为炎症因子,且二者具有一定关联性,但目前鲜有研究联合应用两者对 AKI 进行诊断和预测。鉴于此,本研究分析了 GM-CSF 在 AKI 中表达水平的变化及其与 IL-18 的相关性,探讨其作为 AKI 诊断标志物的潜在可能。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂 选取健康雄性无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级 Wistar 大鼠 30 只,体重 250 ~ 320 g [购于重庆腾鑫生物技术有限公司,许可证号:SCXK (军)2012-0011]。肌酐检验试剂盒购于美国 Bioassay Systems 公司;IL-18、GM-CSF 检验试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司;HE 染色试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组与造模 使用随机数字表法将 30 只 Wistar 大鼠分为假手术组 (SHAM 组, $n = 5$) 和 AKI

模型组 (AKI 组, $n = 25$)。假手术组:应用 1% 戊巴比妥腹腔注射麻醉,剑突至耻骨联合之间沿腹白线打开腹腔,找到肾脏,仅分离肾动脉,不夹闭,关闭腹腔,安静饲养。AKI 模型组^[8]:应用 1% 戊巴比妥腹腔注射麻醉,剑突至耻骨联合之间沿腹白线打开腹腔,找到肾脏以无创动脉夹夹闭双侧肾脏动脉 45 min (在预试验阶段确定最佳缺血时间为 45 min),之后去夹恢复灌注,关闭腹腔,安静饲养。两组于术后 0、24、48、72、96 h 尾静脉采血各 1 ml。其中 AKI 组每个时间点对 5 只大鼠进行采血,并处死后取肾组织;SHAM 组于 96 h 时间点采血后处死,取肾组织。血样以 3 000 r/min 条件离心 10 min,取血清, -70 ℃ 保存备用。

1.2.2 SCr、IL-18、GM-CSF 检测 严格按照试剂盒说明书对 SCr、IL-18、GM-CSF 进行检测操作,使用美国 Thermo 公司的 Multiskan FC 型酶标仪进行检测。

1.2.3 肾脏病理检测 处死大鼠,取部分肾组织,10% 中性甲醛固定,常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,制作成 2 μm 石蜡切片。切片于 65℃ 条件下烤 1 h,二甲苯脱蜡,经乙醇复水。严格按照 HE 染色试剂盒说明书步骤对肾组织进行染色。于光镜下观察肾结构病理改变。以坏死、扩张或细胞肿胀的小管百分比为基础,按 0 ~ 4 分进行肾小管损伤评分^[9]:0 分, <5%;1 分, 5% ~ 25%;2 分, 26% ~ 50%;3 分, 51% ~ 75%;4 分, >75%。每只小鼠样本在显微镜下至少随机选择 10 个视野 (×400) 进行盲法评估,并计算平均分。

1.3 统计学方法 应用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用单因素方差分析,重复测量数据的组间比较采用重复测量方差分析。采用 Pearson 相关分析探讨两因子间的相关性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组肾脏病理变化情况及肾小管损伤评分比较 在造模后,AKI 组出现了肾小管间质细胞坏死及炎症细胞浸润情况,AKI 组在 0、24、48、72、96 h 时间点的肾小管损伤评分呈先升高后降低的变化,在 48 h 时间点的肾小管损伤评分最高。AKI 组 24 ~

96 h 时间点的肾小管损伤评分均高于 SHAM 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1,表 1。

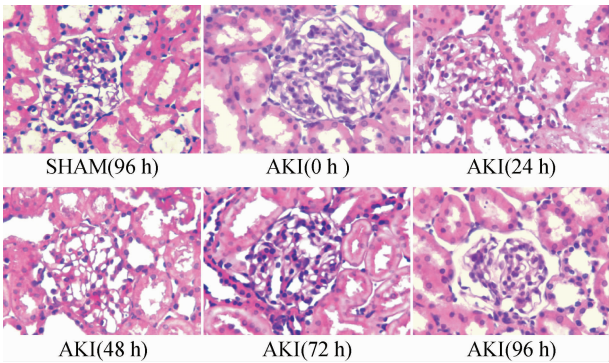


图 1 SHAM 组与 AKI 组大鼠不同时间点的肾组织切片所见图(HE, ×400)

表 1 各组大鼠肾小管损伤评分比较[($\bar{x} \pm s$), 分]

组 别	例数	肾小管损伤评分
SHAM 组	5	0.90 ± 0.22
AKI(0 h)组	5	1.23 ± 0.26
AKI(24 h)组	5	1.95 ± 0.35 *
AKI(48 h)组	5	2.88 ± 0.21 *
AKI(72 h)组	5	1.77 ± 0.21 *
AKI(96 h)组	5	1.76 ± 0.29 *

注: $F = 33.743, P = 0.000$;与 SHAM 组比较, * $P < 0.05$

2.2 两组大鼠不同时间点 SCr、IL-18、GM-CSF 水平比较 AKI 组 SCr 水平随时间呈持续升高趋势;而 IL-18、GM-CSF 水平呈先上升后下降的变化,且均在 72 h 达到峰值。SHAM 组 SCr、IL-18、GM-CSF 水平在不同时间点变化不显著,两组变化趋势差异有统计学意义($P < 0.05$)。AKI 组在造模后 48、72、96 h 的 SCr 水平显著高于 SHAM 组($P < 0.05$);AKI 组在造模后 48 h 和 72 h 的 IL-18、GM-CSF 水平显著高于 SHAM 组($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两组大鼠不同时间点 SCr、IL-18、GM-CSF 水平比较[($\bar{x} \pm s$)

组 别	例数	时间点	SCr(mg/dl)	IL-18(pg/ml)	GM-CSF(pg/ml)
AKI 组	25	0 h	0.563 ± 0.0958	5.132 ± 0.5587	60.328 ± 4.6780
		24 h	0.750 ± 0.0447	6.635 ± 0.3909	85.778 ± 6.1885
		48 h	0.964 ± 0.0522	8.239 ± 0.7860	102.460 ± 9.0559
		72 h	1.166 ± 0.0594	10.868 ± 1.1479	125.782 ± 5.4415
		96 h	1.312 ± 0.0563	6.575 ± 1.8493	44.718 ± 3.4621
SHAM 组	5	0 h	0.574 ± 0.0456	4.884 ± 0.7601	61.620 ± 9.2449
		24 h	0.642 ± 0.0778	5.120 ± 0.9381	59.398 ± 8.9775
		48 h	0.658 ± 0.2626 *	5.277 ± 0.7140 *	67.570 ± 2.8246 *
		72 h	0.571 ± 0.1976 *	5.038 ± 0.6278 *	55.719 ± 5.5004 *
		96 h	0.607 ± 0.0738 *	4.673 ± 0.4473	59.893 ± 9.8683
$F_{组间}$	—		16.321	15.600	53.052
$F_{时间}$	—		102.001	92.562	135.903
$F_{组间 \times 时间}$	—		16.554	13.208	56.844
$P_{组间}$	—		0.000	0.000	0.000
$P_{时间}$	—		0.000	0.014	0.000
$P_{组间 \times 时间}$	—		0.000	0.000	0.000

注:与 AKI 组同时间点比较, * $P < 0.05$

2.3 AKI 组大鼠 SCr、IL-18、GM-CSF 的相关性分析结果 Pearson 相关分析结果显示,AKI 组血清 IL-18 水平与 SCr、GM-CSF 呈正相关($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 AKI 组大鼠 SCr、IL-18、GM-CSF 的相关性分析结果(r)

指 标	SCr	IL-18	GM-CSF
SCr	—	0.758 *	0.325
IL-18	0.758 *	—	0.867 *
GM-CSF	0.325	0.867 *	—

注: * $P < 0.05$

3 讨论

3.1 AKI 是住院患者常见和复杂的问题,其发生显著增加了患者病死率,部分也导致了慢性肾脏病的产生^[10]。目前,肾脏替代治疗是 AKI 有效且主要的治疗手段,但这也增加了患者的经济负担。肾脏损害的早期识别、诊断对于 AKI 的预防和治疗至关重要,可避免肾脏损害的持续进展。因此探索新的 AKI 早期生物标志物具有重要的临床意义^[11]。

3.2 炎症反应、氧化应激、内质网应激、线粒体损伤和自噬是 AKI 发生的主要机制,其中炎症反应是 AKI 发生、发展的中心环节,在肾脏缺血再灌注损伤中扮演关键角色,可加重肾小管上皮细胞损伤、微循环障碍,导致肾内低氧,影响肾脏的及时修复。另外,缺血再灌注损伤可引起远端肾小管损伤及肾间质的炎性细胞浸润,并且其损伤程度可随时间的延长不断加重。炎性介质、内皮细胞和白细胞的粘附蛋白表达上调可导致炎性细胞浸润和附着肾脏组织,而聚集的炎性细胞又会进一步释放炎性介质和粘附蛋白,从而造成更多的炎性细胞的浸润和局部炎性细胞的堆积^[12]。因此,不少研究倾向于从炎症环节去筛选合适的 AKI 生物学标志物,而 IL-18 则是目前研究较多的标志物之一,并已应用于临床实践^[13]。

3.3 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞、肥大细胞、内皮细胞、成纤维细胞等均可产生 GM-CSF。其中 T 细胞和巨噬细胞一般在免疫应答或炎症介质刺激过程中直接产生 GM-CSF;而内皮细胞、成纤维细胞可能通过白介素-1(interleukin-1, IL-1)和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)的诱导而产生 GM-CSF^[14]。人体内有多种细胞存在 GM-CSF 受体,如粒细胞、红细胞、巨核细胞等的前体细胞,以及成熟的中性粒细胞、单核细胞、吞噬细胞、树突状细胞、浆细胞等。GM-CSF 在激活免疫反应中起重要作用,可促进粒细胞、巨噬细胞的增殖、分化及功能成熟,提高宿主的防御能力^[15,16];还可活化巨噬细胞产生补体以介

导吞噬作用,并增强成熟巨噬细胞的吞噬能力和抗原呈递功能,调节 IL-1、IL-18 等细胞因子的分泌^[17]。另外,GM-CSF 不仅可以刺激中性粒细胞增殖,还能促进 TNF、白介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 的表达,增强炎症反应^[14]。

3.4 GM-CSF、IL-18 同为炎症因子,且二者具有一定相关性。IL-18 能增强 Th1 细胞上功能性 FasL 的表达,选择性地增强 FasL 介导的 Th1 细胞毒作用,进而增强 GM-CSF 活性^[14,18]。肾小球的壁层细胞和间质浸润的炎性细胞均可分泌 GM-CSF。有动物实验研究^[19]证实,在以炎症为主的新月体肾炎中,GM-CSF 表达显著增加,而敲除 GM-CSF 基因后,小鼠的新月体比例、CD3⁺ T 细胞、单核巨噬细胞、蛋白尿、SCr 水平均低于对照组。Lu 等^[7]的研究证实,经氯磷酸盐脂质体干预的巨噬细胞/树突细胞耗竭小鼠缺血模型中,GM-CSF 表达下调,AKI 发生率下降,提示 GM-CSF 可能为潜在的 AKI 治疗靶点。本研究结果显示,在 AKI 发生、发展的过程中,肾小管损伤积分、SCr 水平、炎症标志物达到高峰的时间点并不一致;肾小管损伤积分在 AKI 发生后 48 h 达到峰值;血清 IL-18、GM-CSF 则在 72 h 达到峰值,随后出现回落;而 SCr 则呈持续上升趋势。另外,本研究结果还显示,在 AKI 的发展过程中 GM-CSF 与 IL-18 呈正相关关系。

综上所述,在大鼠 AKI 模型中,血清 GM-CSF、IL-18 水平在 72 h 内逐渐升高,其高峰值早于 SCr 出现,提示其有可能作为 AKI 的潜在标志物。但本研究仅为缺血再灌注动物研究,不能代表其他的 AKI 类型,同时也未能分析氧化应激等其他机制对结果的影响,也未能排除因 SHAM 组大鼠反复抽血对结果造成的影响。因此,本研究结论仍需大样本量的前瞻性临床试验加以验证。

参考文献

- 1 Sawhney S, Marks A, Fluck N, et al. Intermediate and long-term outcomes of survivors of acute kidney injury episodes: a large population-based cohort study[J]. *Am J Kidney Dis*, 2017,69(1):18-28.
- 2 Chertow GM, Burdick E, Honour M, et al. Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005,16(11):3365-3370.
- 3 Lieske JC, Kashani K, Kellum J, et al. Use of biomarkers to detect and manage acute kidney injury: has progress stalled? [J]. *Clin Chem*, 2020,66(2):271-276.
- 4 李秀元,高金霞,韩鹏飞,等.血清 NGAL 水平变化在大鼠不同程

- 度急性肾损伤中的早期诊断价值[J]. *中国临床新医学*,2019,12(4):392-395.
- 5 Wajda J, Dumnicka P, Maraj M, et al. Potential prognostic markers of acute kidney injury in the early phase of acute pancreatitis[J]. *Int J Mol Sci*, 2019,20(15):3714.
- 6 Lin X, Yuan J, Zhao Y, et al. Urine interleukin-18 in prediction of acute kidney injury: a systemic review and meta-analysis [J]. *J Nephrol*, 2015,28(1):7-16.
- 7 Lu L, Faubel S, He Z, et al. Depletion of macrophages and dendritic cells in ischemic acute kidney injury[J]. *Am J Nephrol*, 2012,35(2):181-190.
- 8 Maarouf OH, Uehara M, Kasinath V, et al. Repetitive ischemic injuries to the kidneys result in lymph node fibrosis and impaired healing [J]. *JCI Insight*, 2018,3(13):e120546.
- 9 Yang B, Lan S, Dieudé M, et al. Caspase-3 is a pivotal regulator of microvascular rarefaction and renal fibrosis after ischemia-reperfusion injury[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2018,29(7):1900-1916.
- 10 Singbartl K, Kellum JA. AKI in the ICU: definition, epidemiology, risk stratification, and outcomes[J]. *Kidney Int*,2012,81(9):819-825.
- 11 Soni SS, Cruz D, Bobek I, et al. NGAL: a biomarker of acute kidney injury and other systemic conditions [J]. *Int Urol Nephrol*, 2010,42(1):141-150.
- 12 Bonavia A, Singbartl K. A review of the role of immune cells in acute kidney injury [J]. *Pediatr Nephrol*, 2018,33(10):1629-1639.
- 13 Pickering JW, Endre ZH. Bench to bedside: the next steps for biomarkers in acute kidney injury [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2016,311(4):F717-F721.
- 14 Becher B, Tugues S, Greter M. GM-CSF: from growth factor to central mediator of tissue inflammation [J]. *Immunity*, 2016,45(5):963-973.
- 15 Shiom A, Usui T. Pivotal roles of GM-CSF in autoimmunity and inflammation [J]. *Mediators Inflamm*, 2015,2015:568543.
- 16 Alexander WS. In vivo at last: demonstrating the biological credentials and clinical potential of GM-CSF [J]. *Exp Hematol*, 2016,44(8):669-673.
- 17 Lavin Y, Mortha A, Rahman A, et al. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues [J]. *Nat Rev Immunol*, 2015,15(12):731-744.
- 18 黄雨晴. IL-18 与脓毒症关系的研究进展 [J]. *中国临床新医学*, 2018,11(5):503-507.
- 19 van Nieuwenhuijze A, Koenders M, Roelvelde D, et al. GM-CSF as a therapeutic target in inflammatory diseases [J]. *Mol Immunol*, 2013,56(4):675-682.

[收稿日期 2020-05-30][本文编辑 余军 吕文娟]

本文引用格式

林鑫,刘鹏,董蓉,等.血清 GM-CSF IL-18 在急性肾损伤中的相关性及对急性肾损伤的预测作用[J]. *中国临床新医学*,2020,13(9):878-881.