

• 临床检验研究论著 •

I 型糖尿病患者外周血中骨桥蛋白与 IL-12 的表达及临床意义*

陈武嘉¹, 何金花^{1△}, 陈顺仪¹, 黎毓光¹, 韩泽平¹, 冯洁萍²
(番禺区中心医院: 1. 检验科; 2. 肾内科, 广东广州 511400)

摘要:目的 探讨 I 型糖尿病患者外周血中骨桥蛋白(OPN)与 IL-12 的表达及临床意义。方法 选取 2011~2012 期间于本院诊治的 I 型糖尿病患者 50 例。并收集同期健康体检者 50 名作为对照组。采用 ELISA 法检测血浆中 OPN 和 IL-12 的水平, 并运用实时荧光定量 RT-PCR 检测外周血单个核细胞中 OPN 和 IL-12 基因的表达水平。结果 I 型糖尿病患者外周血中 OPN 与 IL-12 水平均高于对照组(t 值分别为 40.7、33.7, $P<0.05$)。I 型糖尿病患者外周血中单个核细胞中 OPN 与 IL-12 mRNA 表达水平与对照组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$)。I 型糖尿病患者外周血中 OPN 与 IL-12 水平呈正相关($r^2=0.936$, $P=0.00$)。结论 I 型糖尿病发生与骨桥蛋白和 IL-12 表达有关, 骨桥蛋白与 IL-12 水平呈正相关。

关键词:糖尿病, 1 型; 骨桥蛋白; 白细胞介素 12; 基因表达
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.05.005 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2013)05-0522-02

The expression and clinical significance of osteopontin and IL-12 in diabetes*

Chen Wujia¹, He Jinhua^{1△}, Chen Shunyi¹, Li Yuguang¹, Han Zeping¹, Feng Jieping²

(1. Department of Laboratory; 2. Nephrology department, Panyu Center Hospital, Guangzhou, Guangdong 511400, China)

Abstract: Objective To study the expression of osteopontin(OPN)and interleukin-12 and analyze their roles in the pathogenesis of diabetes. **Methods** 50 patients with diabetes type I diagnosed and treated in the hospital from 2011 to 2012 were enrolled, and 50 health controls were also enrolled from medical examination center during the same period. OPN and IL-12 levels were measured by ELISA kits. The mononuclear cells were collected from peripheral blood, and the expression levels of OPN and IL-12 gene were detected by real time fluorescent quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. **Results** In diabetes group, levels of OPN and IL-12 were markedly higher than those of healthy control($t=40.7, 33.7$ respectively, $P<0.05$). The gene expression level of OPN and IL-12 mRNA were higher than control group($P<0.05$). IL-12 were positively correlated with OPN levels($r^2=0.936$, $P=0.00$). **Conclusion** OPN and IL-12 levels in peripheral blood of diabetes patients are closely related to the diabetes degree.

Key words: diabetes mellitus, type 1; osteopontin; interleukin-12; gene expression

I 型糖尿病是由于某些因素导致的 Th1 细胞活动增强、Th2 细胞活动减弱、胰岛 B 细胞损害的自身免疫性疾病^[1]。在细胞免疫中骨桥蛋白(OPN)具有 Th1 型细胞因子的功能, 能诱导树突状细胞分泌大量的白细胞介素, 同时能刺激巨噬分泌 IL-12, 与许多自身免疫性疾病如多发性硬化、风湿性关节炎、糖尿病等有关^[2]。本研究主要通过检测 I 型糖尿病患者外周血中骨桥蛋白与 IL-12 的变化, 并进一步分析其相关性, 为揭示 I 型糖尿病发病机制提供线索。

1 资料与方法

1.1 一般资料 新诊断 I 型糖尿病患者 50 例, 男 27 例, 女 23 例, 年龄 35~77 岁。均符合美国糖尿病协会(ADA)的糖尿病诊断标准, 病程小于 3 个月, 未合并其他慢性疾病。健康组 50 例, 性别、年龄与 I 型糖尿病组匹配。I 型糖尿病家族史阴性。所有患儿及健康对照组均抽取空腹静脉血 3 mL, 检测空腹血糖、糖化血红蛋白。

1.2 仪器与试剂 检测 OPN 试剂盒购自日本 IBL 公司; 检测 IL-12 的 ELASA 试剂盒来购自美国 RD 公司; TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司; M-MLV 逆转录酶购自 Promega 公司; Taq 酶、Genefinder 染料购自 MBI 公司; RealMasterMix 购自 TaKaRa 公司。

1.3 方法

1.3.1 ELASA 检测 所有标本血浆 OPN 和 IL-12 的检测按照说明书操作。

1.3.2 外周血单个核细胞制备 待检者外周血 3 mL, 乙二胺四乙酸抗凝, 以磷酸盐缓冲液 1:1 稀释, 层叠于淋巴细胞分离液上, 400×g 离心 20 min, 收集界面白膜细胞层, 磷酸盐缓冲液洗涤 2 遍, 加入 1 mL 的 TRIzol 试剂, 混匀。

1.3.3 总 RNA 的提取 1 mL 的 TRIzol 试剂后加入氯仿 0.2 mL 剧烈振荡 15 s 再静置 3 min, 4℃、12 000×g 离心 15 min。将上层无色水相层移入新的导管内, 加入异丙醇 0.5 mL 混匀, 室温静置 10 min, 4℃、12 000×g 离心 10 min。弃上清液, 沉淀用 1 mL 75% 乙醇洗涤, 4℃ 7 500×g 离心 5 min, 倒掉乙醇后稍微干燥, 加入双蒸水溶解, -70℃ 保存。逆转录前用分光光度计测定 RNA 浓度。

1.3.4 逆转录反应 取 4 μL 5×M-MLV 缓冲液、0.75 μL 引物、2.5 mmol/L dNTPs、5 mmol/L MgCl₂、1 μL RNA 酶抑制剂、0.5 μL M-MLV 逆转录酶、2 μL 总 RNA, 用蒸馏水补足到 20 μL, 混匀后于 37℃ 反应 1 h, 95℃ 反应 10℃ min。

1.3.5 实时荧光定量 RT-PCR 反应在密闭的的白色荧光定量专用八排管中进行。25 μL 的反应体系: 模板 1 μL, 上下游引物各 1 μL, 11.25 μL 的 SYBRgreen 混合染料, 补足无 RNA 酶的水至 25 μL。混匀后, 放入热循环仪中进行反应。GAPDH 上游引物: 5'-AGT GCC AGC CTC GTC TCA TA-3', 下游引物: 5'-TTG AAC TTG CCG TGG GTA GA-3' 扩增片段大小为 296 bp; OPN 上游引物: 5'-TGG CCG AGG TGA TAG TGT GGT TTA-3', 下游引物: 5'-TCT CAT CAT TGG CTT

* 基金项目: 广东省科技厅社会发展项目(2011BA080702011); 广州市番禺区科技局科技计划项目(2011-Z-03-24)。 作者简介: 陈武嘉, 男, 医师, 主要从事临床检验基础研究。 △ 通讯作者, E-mail: 332518579@qq.com。

TCC GCT TAT-3', 扩增片段大小为 250 bp; IL-12 上游引物: 5'-AGA CCC AGG AAT GTT CCC AT-3', 下游引物: 5'-CAA CTC CCA TTA GTT ATG AA-3', 扩增片段大小 260 bp。条件设置如下: 95 ℃ 15 s 预变性, 95 ℃ 变性 4 s, 60 ℃ 退火 15 s, 72 ℃ 延伸 15 s 共 45 个循环。所有的样本检测均包含一个不加模板的阴性对照, 以排除假阳性的结果。共 45 个循环, 所有的样本检测均包含一个不加模板的阴性对照, 以排除假阳性的结果。计算参照文献^[3], 通过计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值来比较对照组和实验组的目的基因 mRNA 相对表达量的差异。

1.3.6 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理, 两组间 IL-12 及 OPN 水平差异的比较采用两样本均数 *t* 检验, IL-12 与 OPN 关系分析采用 Pearson 相关性分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 对照组与 I 型糖尿病患者外周血浆中 OPN 与 IL-12 水平检测 I 型糖尿病患者外周血中 OPN 高达 (996.7 ± 46.3) ng/mL, 高于对照组的 (460.3 ± 38.3) ng/mL, 差异具有统计学意义 (*t* = 40.7, *P* < 0.05)。I 型糖尿病患者外周血中 IL-12 水平 (137.9 ± 21.3) pg/mL 高于对照组 (98.2 ± 19.8) pg/mL, 差异具有统计学意义 (*t* = 33.7, *P* < 0.05)。

2.2 对照组与 I 型糖尿病患者外周血中单个核细胞中 OPN 与 IL-12 mRNA 表达水平 OPN 基因 PCR 产物的溶解曲线峰值在 78.0 ℃, IL-12 基因 PCR 产物的溶解曲线峰值在 80 ℃, GAPDH 的峰值在 85 ℃。溶解曲线分析可见只有单峰值, 排除了非特异性扩增。Livak 等^[3]设计的一种比较阈值法来测定目的基因的相对表达量 (目的基因的相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta C_t}$), *C_t* 值的含义是: 每个反应管内的荧光信号到达所设定的阈值时所经历的循环数, $\Delta\Delta C_t = (C_{t_{\text{目的基因}}} - C_{t_{\text{管家基因}}})_{\text{实验组}} - (C_{t_{\text{目的基因}}} - C_{t_{\text{管家基因}}})_{\text{对照组}}$, 表示基因的差异表达倍数。

组别	$\Delta\Delta C_t$		$2^{-\Delta\Delta C_t}$	
	IL-12	OPN	IL-12	OPN
对照组	3.57	2.03	0.08	0.24
I 型糖尿病患者	1.80	0.39	0.29*	0.76**

*: *P* < 0.05, 与对照组比较。

2.3 对照组与 I 型糖尿病患者外周血 OPN、IL-12 水平的关系 I 型糖尿病患者外周血中 OPN 与 IL-12 水平均明显升高, 笔者进一步研究了这两种细胞因子是否存在着相关性, 通过 Pearson 相关性分析表明 I 型糖尿病患者外周血中 OPN 与 IL-12 水平与对照组中呈正相关 (*Y* = 0.878 + 0.887*X*, *r*² = 0.936, *P* = 0.00)。

3 讨 论

I 型糖尿病是在遗传易感基因的基础上, 在环境因素作用下, 引发机体自身免疫功能紊乱, 导致胰岛细胞损伤和破坏^[4]。I 型糖尿病是 T 淋巴细胞介导的胰岛细胞特异性损伤和胰岛素分泌不足的自身免疫性疾病, 许多免疫细胞参与 I 型糖尿病发生。OPN 是一种含精氨酸, 甘氨酸一天冬氨酸的分泌型磷酸化糖蛋白, 它可表达于肾小管、间质及球旁器, 介导单核巨噬细胞的趋化, 参与一氧化氮信号途径的调节。肾素-血管紧张素系统、转化生长因子-β、蛋白尿及高血糖可诱导 OPN 生成,

促进细胞外基质合成并抑制其降解, 参与肾小管间质损伤及糖尿病肾病的进展^[5-6]。在细胞免疫中骨桥蛋白具有 Th1 型细胞因子的功能, 能诱导树突状细胞分泌大量的白细胞介素, 同时能刺激巨噬分泌 IL-12, 与许多自身免疫性疾病如多发性硬化、风湿性关节炎、糖尿病等有关^[2]。IL-12 是使 TH1/TH2 平衡的一个重要因子, 研究已经证明了 IL-12 是 I 型糖尿病发病的关键因子。在非肥胖型糖尿病 (NOD) 小鼠动物模型中, 持续应用 IL-12 可以加速 NOD 小鼠糖尿病病情地进展, IL-12 参与了 I 型糖尿病的发病^[7]。

本研究发现 I 型糖尿病患者中血浆中 OPN 与 IL-12 水平明显高于健康对照组, 差异具有统计学意义。研究还进一步发现, 外周血单个核细胞中 OPN 与 IL-17 基因表达水平明显高于健康对照组。血浆中 OPN 与 IL-12 水平呈正相关性, 本研究的结果表明 OPN 能促进淋巴细胞细胞产生 IL-12。

在 I 型糖尿病患者中血浆中 OPN 与 IL-12 水平明显增高, OPN 可能促进 IL-12 的表达, 引起嗜中性粒细胞等的游走和趋化, 导致胰岛 B 细胞的坏死与凋亡。另外, 细胞因子之间存在着复杂的相互调节作用, TNF-α 能促进淋巴细胞产生 OPN, 从而诱导产生大量的促炎性细胞因子如 IL-12 和趋化因子^[8]。因此, 在临床测定 OPN、IL-12 活性在监测疾病的进展、及治疗等方面具有一定的意义^[9-11]。

参考文献

[1] Ichiki Y, He XS, Shimoda S, et al. T cell immunity in hepatitis B and hepatitis C virus infection: implications for autoimmunity[J]. Autoimmun Rev, 2005, 4(2): 82-95.

[2] Renkl AC, Wussler J, Ahrens T, et al. Osteopontin functionally activates dendritic cells and induces their differentiation toward a Th1-polarizing phenotype[J]. Blood, 2005, 106(3): 946-955.

[3] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method[J]. Methods, 2001; 25(4): 402-408.

[4] Cho YM, Kim JT, Ko KS, et al. Fulminant type 1 diabetes in Korea: high prevalence among patients with adult-onset type 1 diabetes[J]. Diabetologia, 2007, 50(11): 2276-2279.

[5] Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, et al. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease[J]. Science, 2001, 294(5547): 1731-1735.

[6] Verhulst A, Persy VP, Van Rompay AR, et al. Osteopontin synthesis and localization along the human nephron[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(5): 1210-1218.

[7] Airoidi I, Guglielmino R, Carra G, et al. The interleukin-12 and interleukin-12 receptor system in normal and transformed human B lymphocytes[J]. Haematologica, 2002, 87(4): 434-442.

[8] Diao H, Iwabuchi K, Li L, et al. Osteopontin regulates development and function of invariant natural killer T cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(41): 15884-15889.

[9] 温宇明. 骨桥蛋白在不同分期糖尿病肾病患者肾组织中的表达[J]. 岭南急诊医学杂志, 2012, 17(3): 184-186.

[10] 张筠, 王建平. 骨桥蛋白与糖尿病肾病关系的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(3): 598-600.

[11] 许瑞艳, 东野光. 糖尿病患者血清中 IL-18 和 IL-12 的变化[J]. 中国现代医生, 2009, 47(12): 34.