

## 过表达或抑制 IL-18 对大鼠深静脉血栓形成的影响

李光第,白云城,宋恩,周如丹,王扬,王宫泽,卜鹏飞,赵学凌\*

(昆明医科大学第一附属医院骨科,云南 昆明 650032)

**[摘要]** 目的:探讨白介素(interleukin,IL)-18 对大鼠深静脉血栓(deep vein thrombosis,DVT)模型血栓形成的影响。方法:构建 IL18-pCDH-GFP、IL18-LMP-shRNAmir1 病毒载体。SD 大鼠( $n=27$ )随机均分为 3 组。过表达组:尾静脉注入 IL-18 慢病毒过表达载体(IL18-pCDH-GFP,100  $\mu$ l);抑制组:注入 IL-18 逆转录病毒抑制载体(IL18-LMP-shRNAmir1,100  $\mu$ l);对照组:注入无菌生理盐水(100  $\mu$ l)。注射 24 h 后,SD 大鼠行狭窄法下腔静脉(inferior vena cava,IVC)血栓造模,造模后 24 h 解剖观察 IVC 血栓形成情况,并取材称量血栓重量及长度;血栓静脉管壁行实时荧光定量 PCR 检测 IL-18 表达情况。结果:IL18-pCDH-GFP、IL18-LMP-shRNAmir1 病毒载体的体外细胞实验具备理想的过表达率及抑制率。各组大鼠造模后 24 h 可见稳定血栓形成。IL-18 过表达组的平均成栓长度和重量较 IL-18 抑制组、对照组明显增加( $P < 0.05$ ),real-time PCR 结果显示过表达组中 IL-18 在大鼠静脉壁表达量明显增加( $F=3.784,P < 0.05$ )。结论:IL-18 表达量增加,对大鼠 DVT 造模后 IVC 血栓形成有促进作用,而表达减少亦对成栓有影响,其表达状况与深静脉血栓的发生、发展有关,IL-18 介导的促炎反应在静脉血栓疾病发病机制中可能起重要作用。

**[关键词]** 白介素-18;深静脉血栓;动物模型;促炎症反应

**[中图分类号]** R619+2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)03-367-06

**doi:**10.7655/NYDXBNS20150314

## Effects of IL-18 overexpression/inhibition on deep vein thrombosis formation in rats

Li Guangdi, Bai Yuncheng, Song En, Zhou Rudan, Wang Yang, Wang Gongze, Bu Pengfei, Zhao Xueling\*

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

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the influence of interleukin-18(IL-18) on the rat deep vein thrombosis (DVT). **Methods:** Viral vectors of IL18-pCDH-GFP/IL18-LMP-shRNAmir1 were constructed. SD rats( $n=27$ ) were randomly divided into IL-18 overexpression group, IL-18 inhibition group and control group which were injected with 100  $\mu$ l IL-18 overexpression lentivectors (IL18-pCDH-GFP), 100  $\mu$ l IL-18 inhibition retroviral vectors (IL18-LMP-shRNAmir1), 100  $\mu$ l saline, respectively, into the tail vein. All rats' inferior vena cava(IVC) were modeled as "stenosis" to promote IVC thrombosis after 24 h of injection. The weight and length of IVC thrombosis after 24 h of modeled were investigated, and the expression of IL-18 in the venous wall was measured by real-time PCR assay. **Results:** IL18-pCDH-GFP and IL18-LMP-shRNAmir1 vectors showed the ideal overexpression/inhibition rate *in vitro*. All groups had stabilized thrombus formation after modeled 24 h. The average length and weight of thrombus in the IL-18 overexpression group were significantly higher than those of other groups( $P < 0.05$ ). The level of IL-18 in the overexpression group was remarkably higher than that of other groups in the vessel wall( $F=3.784,P < 0.05$ ), which was proved by real-time PCR assay. **Conclusion:** IL-18 promotes thrombus formation in rats, and inhibition of IL-18 reduces the thrombus formation. IL-18 may be related to the development process of DVT and its proinflammatory effect may play a vital role in the pathogenesis of VTE.

**[Key words]** interleukin-18; deep vein thrombosis; animal models; proinflammatory

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(03):367-372]

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(30960389);国家自然科学基金资助项目(81060151);云南省卫生科技内设研究机构项目(2012ws0007);云南省科技厅重点新产品开发计划项目(2010BC010)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail:57224542@qq.com

深静脉血栓(deep venous thrombosis, DVT)是一种多因素疾病,包括血小板、内皮细胞、凝血、纤溶等功能异常和炎症反应中细胞因子的相互作用,以及致病基因、基因突变及基因间相互影响等诸多方面。DVT疾病发生、发展的复杂因素中,内皮细胞、血小板、炎症因子作用等已成为研究热点。近年来,静脉血栓栓塞(venous thromboembolism, VTE)中炎症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,炎症因子在VTE的发生、发展中具有重要作用<sup>[1]</sup>。上世纪末发现白介素(interleukin, IL)-18具备显著促炎作用<sup>[2-3]</sup>,它广泛参与生物体内的炎症反应和免疫反应调节等过程,尤其是在促进炎症因子释放及细胞因子相互作用方面具有重要作用。近年来,世界范围内IL-18与心血管系统疾病发病机制、作用机制等领域的相关研究,已取得一定进展<sup>[4-6]</sup>。探讨IL-18与DVT相关性的正式报道仍然较少。本研究构建了IL18-pCDH-GFP慢病毒过表达载体和IL18-LMP-shRNAmir1逆转录病毒抑制载体,在体外进行过表达和抑制率验证后,结合SD大鼠DVT模型进一步行动物体内研究,旨在为促炎因子与深静脉血栓发病机制的相关研究提供实验证据,现报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 动物及分组

SD大鼠27只,雄性、清洁级、体重200~250 g,昆明医科大学实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK(滇)2011-0004,饲养于昆明医科大学实验动物中心,室温20~25℃,湿度为50%~60%,光线、通风良好,自由饮水、进食;实验前均适应性喂养3~5 d。实验过程中对动物的处置符合2006年科技部《关于善待实验动物的指导性意见》的规定,所有动物实验均经昆明医科大学动物实验和伦理委员会批准。大鼠编号后按随机数字表随机分为3组,IL-18过表达组、IL-18抑制组和对照组,每组9只。

#### 1.1.2 试剂及仪器

慢病毒载体和逆转录病毒载体(Ambion公司,美国);转染试剂(QIAGEN公司,美国),TRIzol(Invitrogen公司,美国),逆转录试剂盒(TaKaRa公司,日本),荧光定量试剂盒(Fermentas公司,美国);荧光定量引物由美国Invitrogen公司合成;PVDF膜(Millipore公司,美国),一抗(Santa Cruz公司,美国),二抗IgG-HRP(Invitrogen公司,美国);ECL显色试剂盒(Bio-Rad公司,美国)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 细胞培养及传代

参照文献[7-8]培养原代大鼠成纤维细胞,进一步扩增、传代,0.25% EDTA胰酶37℃消化1 min,小心吸出胰酶,加入新鲜培养基中止消化并反复吹打至细胞脱落分散,将细胞悬液分别接种于3~4个新培养瓶中,补充培养基至4 ml/瓶,37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下静置培养、备用。

### 1.2.2 大鼠IL-18基因过表达/抑制载体的构建

IL-18慢病毒过表达载体构建:通过GenBank数据库搜索大鼠IL-18基因完整CDS序列,用BLAST分析寻找特异性设计引物(F-EcoR I:5'-CG-GAATTCATGGCTGCCATGTCAGAA-3',R-BamHI:5'-CGGGATCCCTAACTTTGATGTAAGTT-3',划线处为酶切位点,产物长度585 bp,退火温度56℃),引物设计软件为Primer 5.0。对大鼠IL-18基因行PCR扩增,基因扩增后进行胶回收实验,再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。

IL-18逆转录病毒抑制载体构建:搜索GenBank中大鼠IL-18基因序列,利用Oligoengine设计2条22个碱基的候选siRNA靶序列,筛选出G+C含量小于50%且与哺乳动物的其他基因没有同源性的最优siRNA靶序列,再根据MSCV-LMP病毒载体的特点,设计出相应的具有发夹结构的shRNA模板。将设计的Oligo片段送上海生工公司合成后按比例稀释,以规定引物(mir30F-Xho I:5'-CAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACACTGAGCG-3',R-EcoR I:5'-CTAAAGTAGCCCCTTGAATTC-GAGGCAGTAGGCA-3',划线处为酶切位点,退火温度52℃)进行PCR反应扩增。抑制片段扩增后,进行胶回收实验,再行琼脂糖凝胶电泳检测。将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。

### 1.2.3 过表达及抑制效率检测

IL-18过表达/抑制载体病毒包装、感染:病毒宿主细胞为293T细胞,大鼠成纤维细胞为感染细胞。pCDH-GFP(12 μg)的包装质粒为pCL-ECO(8 μg);转染大鼠IL18-pCDH-GFP过表达质粒,正常和转染空载体细胞为对照。MSCV-LMP(12.5 μg)包装质粒分别是pAPAX(7.5 μg)、pMD2.G(5.0 μg);分别转染大鼠IL18-LMP-shRNAmir1、2,正常和转染空载体细胞为对照。感染48~72 h后,通过载体荧光观察感染效率,并抽提RNA。

Real-time PCR 测定 mRNA 水平:TRIzol 抽提细胞总 RNA; 依据 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas 公司,美国)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,以大鼠 GAPDH 基因为内参 (IL-18: 上游 5' -TCTGTAGCTCCATGCTTTCCG -3', 下游:5' -GATCCTGGAGGTTGCA-GAAGA-3', 82 bp;GAPDH: 上游 5' -ACGGCAAG-TTCAACGGCACAG-3', 下游 5' -GACGCCAGTA-GACTCCACGACA-3', 146 bp)。荧光定量 PCR 检测相对表达量,依据 Maxima<sup>®</sup> SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2×)(Fermentas 公司,美国)操作。将引物稀释至 10 μmol/L;设计 96 孔板上样顺序,每个样品 3 个复孔,用水为模板作阴性对照;real-time PCR 扩增仪进行实验。结果分析:观察熔解曲线和扩增曲线,用软件 DataAssist<sup>™</sup> v3.0 Software(ABI)以 2<sup>-ΔΔCt</sup> 方法来对结果进行分析。ΔΔCt=(实验组 Ct<sub>目的基因</sub>-实验组 Ct<sub>管家基因</sub>)-(对照 Ct<sub>目的基因</sub>-对照 Ct<sub>管家基因</sub>)。

蛋白水平测定:收集各组大鼠成纤维细胞后添加 RIPA 裂解液,冰浴 30 min;4℃ 12 000 r/min 离心 5 min;取上清,用 BCA 法测定蛋白浓度。根据上样量一致的原则,每孔上样 60 μg 进行 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。

#### 1.2.4 动物造模

根据过表达及抑制效率检测实验结果,选用过表达/抑制效果好的病毒载体注射大鼠。IL-18 过表达组、IL-18 抑制组分别于大鼠尾静脉注射 100 μl IL-18 过表达、抑制病毒载体,对照组注射 100 μl 无菌生理盐水。SD 大鼠尾静脉注射 24 h 后,行狭窄法下腔静脉(inferior vena cava,IVC)血栓模型造模:经大鼠腹部正中切口进腹,将小肠牵向术野左侧,充分显露下腔静脉,打开后腹膜;确认左肾静脉下方 2 mm 处的下腔静脉结扎点,仔细游离下腔静脉,5-0 缝线辅助显露并逐一结扎左肾静脉以下的下腔静脉分支至髂静脉水平。结扎下腔静脉分支后,在结扎点穿过 5-0 缝线,另取 1 根 4-0 缝线与下腔静脉主干并排,5-0 缝线方结打结之后,谨慎抽出并排的 4-0 缝线,造成下腔静脉管腔狭窄。术后给予大鼠正常饮水进食,室温饲养。

大鼠造模 24 h 后,各组分别处死,解剖腹腔,观察下腔静脉血栓形成情况,并对下腔静脉进行实验取材;仔细分离血管壁和栓子(静脉管壁组织用于荧

光定量 PCR 检测),分别称量静脉血栓的长度、重量。real-time PCR 检测 IL-18 基因;TRIzol 抽提细胞总 RNA;依据 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒标准操作进行 cDNA 合成。实验方法依据 UltraSYBR Mixture(With ROX) (2×)(北京康为世纪公司)操作。大鼠 GAPDH 内参、特异性引物序列、数据分析方法等同 1.2.3。

#### 1.3 统计学方法

统计学分析采用 SPSS19.0 统计软件完成。计量资料采用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,比较组间数据采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法。取 95%可信区间, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠 IL-18 基因慢病毒过表达载体、逆转录病毒抑制载体构建

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。大鼠 IL18-pCDH-GFP 的测序结果,经 NCBI 中的 BLAST 在线工具比对,均为正确序列。

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;扩增大鼠 IL18-LMP-shRNAmir1、2 抑制载体,保存甘油菌,*Sac* II/*Xho* I 双酶切鉴定载体;酶切产物用 1%琼脂糖电泳检测,条带为 875 bp、7 019 bp 是属于阴性克隆;条带为 985 bp、7 019 bp 表明已插入目的条带,属于阳性克隆。每个载体挑取 2 个克隆,进行初步的酶切鉴定,阳性克隆送上海生工公司测序鉴定。大鼠 IL18-LMP-shRNAmir1、2 抑制载体测序结果以 NCBI 中的 BLAST 在线工具比对,均为正确序列。Oligo 1193~289 bp,Oligo 2189~285 bp 是比对中正确的判断位置。

### 2.2 过表达及抑制效率检测

包装和转染病毒 48 h 及 72 h 分别收集 2 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;在 293T 细胞中磷酸钙转染法包装病毒的转染效率可达 90%以上;收集病毒后,宿主细胞的感染效率可达 80%以上。

Real-time PCR 结果显示各项指标均符合相对定量分析要求,取 3 个复孔的 Ct 平均值为结果计算相对表达量,2<sup>-ΔΔCt</sup> 法分析待测基因在各组间的相对表达量差异倍数(图 1)。进行组间比较结果可见,IL-18 在过表达组的表达情况明显高于对照组及抑制组 ( $P < 0.05$ ),而抑制 1 组明显低于其余组,差异具统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

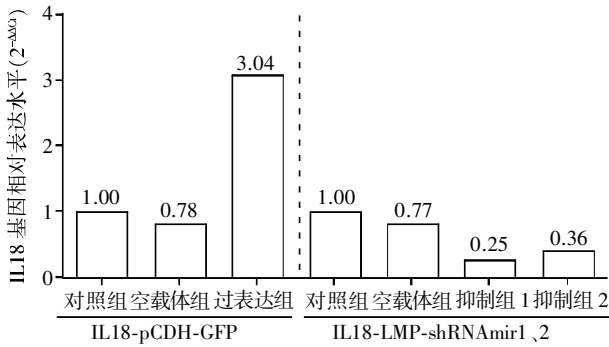


图1 real-time PCR 检测基因表达

Figure 1 Gene expression by real-time PCR assay

Western blot 检测结果可见过表达组及抑制 1 组表达强弱对比差异明显 (图 2)。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,根据相对表达水平公式:Ratio= target/ $\beta$ -actin 进行计算比较,可见 IL-18 表达水平在过表达组中明显增高,抑制 1 组中表现显著减低。以对照组为 1,分别计算其他处理组与对照组的比值,得到目的基因过表达率及抑制率 (表 1)。根据过表达及抑制效率检测情况,IL18-pCDH-GFP 过表达和 IL18-LMP-shRNA mir1 抑制载体作用效率较为理想,因此选用于后续动物实验。

### 2.3 大鼠造模情况

造模后各组 SD 大鼠存活情况均良好,未出现实验预设时间点外非正常死亡情况。麻醉效果满意,尾静脉注射过程均顺利,注射后观察大鼠生命活动平稳,可正常饮水、进食,尾部软组织无明显肿胀、缺血、坏死等情况。狭窄法血栓造模 24 h 后,各组大鼠正常存活,解剖观察发现下腔静脉造模处均有血栓形成,血栓形成率高,提示实验狭窄法造模成效佳。

### 2.4 IL-18 过表达、抑制大鼠 DVT 模型的血栓长度及重量

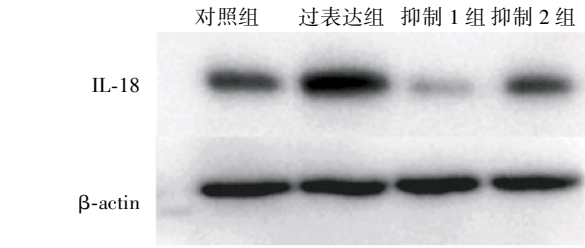
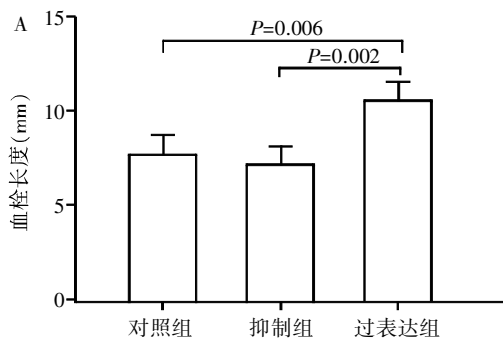


图2 IL-18 的蛋白表达

Figure 2 Expression of IL-18 protein

表 1 Western blot 检测 IL-18 基因的表达水平

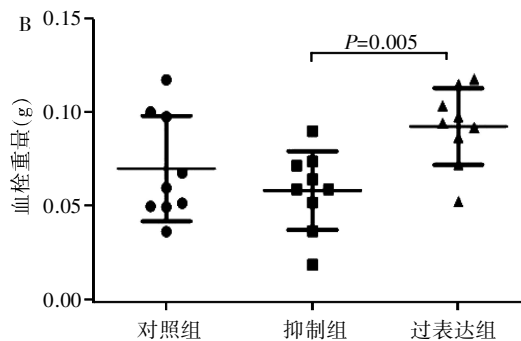
Table 1 Expression of IL-18 gene by Western blot

组别	IL-18 相对表达水平	相对表达率
对照组	0.46	1.00
过表达组	0.79	1.69
抑制 1 组	0.26	0.56
抑制 2 组	0.48	1.03

动物模型组织学观察证实,狭窄法造模后 24 h 下腔静脉成栓稳定。因此,在造模后 24 h 分别解剖各组大鼠。血栓组织观察情况如下:①血栓平均长度:过表达组 (10.41  $\pm$  1.80) mm、抑制组 (7.05  $\pm$  1.91) mm、对照组 (7.59  $\pm$  2.28) mm;组间比较可见 IL-18 过表达组明显高于其他两组,且差异有统计学意义 ( $F=7.268, P < 0.05$ );IL-18 抑制组比对照组成栓长度短,但差异不具统计学意义 (图 3A)。②平均血栓重量:过表达组 (0.092 6  $\pm$  0.020 3)g、抑制组 (0.058 5  $\pm$  0.020 9)g、对照组 (0.070 1  $\pm$  0.028 1)g。3 组间比较,差异有统计学意义 ( $F = 4.926, P < 0.05$ )。过表达组明显高于抑制组 ( $P = 0.005$ ),同时也高于对照组,但差异不具统计学意义 ( $P = 0.053$ )。对照组较抑制组成栓重量高,但差异不具统计学意义 (图 3B)。

### 2.5 大鼠血栓静脉壁荧光定量 PCR 结果

结果显示各项指标均符合相对定量分析要求,取 3 个复孔的 Ct 平均值为结果计算相对表达量,



A: 各组血栓长度比较; B: 各组血栓重量比较。

图3 大鼠模型成栓长度和重量

Figure 3 Length and weight of the thrombus in rat models

2<sup>-ΔΔCt</sup> 法分析静脉壁组织 IL-18 表达量相对差异倍数。组间比较结果可见,3 组差异有统计学意义( $F = 3.784, P < 0.05$ ,图 4)。IL-18 在过表达组的相对表达量明显高于对照组及抑制组( $P$  均  $< 0.05$ );抑制组与对照组间 IL-18 表达差异不具统计学意义( $P = 0.990$ )。

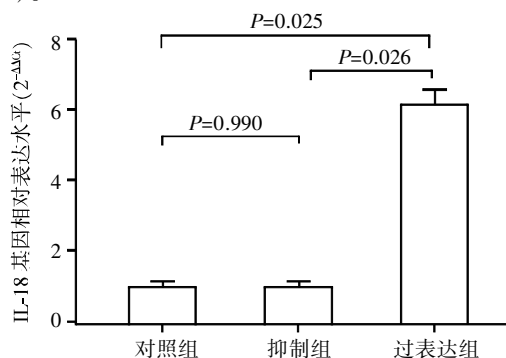


图 4 大鼠血栓静脉壁 IL-18 基因相对表达水平

Figure 4 Relative expression level of IL-18 gene in the vessel wall of inferior vena cava in rats

### 3 讨论

近年来,随着静脉血栓发病机制的不断深入,炎症作用与 DVT 形成的关联逐步得以深入阐释。研究证实,血栓形成过程中炎症细胞分泌多种细胞因子和炎症介质,作用于内源和外源性凝血系统,其与血栓疾病的发生、发展等均存在密切关系<sup>[9-10]</sup>。炎症反应与静脉血栓疾病间相互促进,炎症作用可引发静脉血栓,血栓疾病发生后又可刺激静脉管壁等发生炎症反应,从而进一步加剧血栓性疾病进程<sup>[11-12]</sup>。血栓形成的局部微环境中,血管内皮组织损伤后可分泌趋化因子促使白细胞到达炎症区域,参与炎症反应并分泌炎性介质如 IL-1、IL-6、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)等促进血栓形成<sup>[13]</sup>。IL-18 是 20 世纪末发现的促炎症细胞因子,其参与体内炎症反应和免疫反应调节等,具有多向生物学活性和功能,尤其是在促进炎性细胞因子释放及细胞因子相互作用方面具有重要作用;其通过与相应受体结合而发挥生物学效应。研究认为 IL-18 可作用于 Th1 等细胞,调节诱导其分化成熟、促进机体细胞免疫反应<sup>[14]</sup>,诱导淋巴细胞、NK 细胞产生干扰素(interferon, IFN)- $\gamma$ ,故早期研究中其又称为 IFN- $\gamma$  诱导因子;IFN- $\gamma$  的增加可促使 T 细胞产生 TNF- $\alpha$  等炎症因子,并进一步影响血栓形成起始过程中关键角色间的相互作用,如血管性假血友病因子(von Willebrand factor, vWF)、血小板膜糖蛋白 Ib $\alpha$ -IX-V (glycoprotein Ib $\alpha$ -IX-V, GPIb $\alpha$ -IX-V)等。近年来,IL-18

逐渐成为血栓性疾病的研究热点,国内外的相关研究主要集中于心血管系统疾病、动脉血栓疾病发病机制等领域<sup>[4-6]</sup>。本研究则主要探讨了 IL-18 与 DVT 形成的关系,观察对其进行过表达和抑制后静脉血栓形成是否受到明显影响。

本研究成功构建了大鼠 IL-18 基因的慢病毒过表达载体 IL18-pCDH-GFP、逆转录病毒抑制载体 IL18-LMP-shRNAmir1、2,感染体外培养的大鼠成纤维细胞;通过实时荧光定量 PCR 和 Western blot 的检测,对过表达及抑制效率进行了客观验证,发现 IL18-pCDH-GFP 过表达和 IL18-LMP-shRNAmir1 抑制载体作用效率较为理想,并选用于后续的体内动物实验。近年来,利用大鼠 DVT 模型进行的静脉血栓相关研究发现,IL-18 在下腔静脉结扎法造模的大鼠血浆中存在高表达,提示 IL-18 与 DVT 的疾病发展过程存在联系<sup>[15]</sup>;然而,该类研究未能阐明血中 IL-18 水平增高与 DVT 形成的因果关系。因此,为进一步探究两者间的相互影响及关联作用,将 SD 大鼠进行随机分组,通过注射前期构建的 IL-18 过表达和抑制表达病毒载体至大鼠静脉内,在动物活体静脉内引发 IL-18 基因的过表达和抑制状态。实验证实各组大鼠 IVC 血栓造模后 24 h 均为模型血栓形成的高峰期,于该时点对大鼠模型进行深静脉血栓组织的解剖取材;动物模型局部血栓组织分为栓体、静脉血管壁两部分进行观测比较。血栓长度和重量分析是血栓研究的重要内容,也是目前国内外血栓动物模型研究的重要方法<sup>[16]</sup>。栓体检测发现,IL-18 过表达大鼠血栓的平均长度和重量均明显高于抑制组和对照组;抑制组与对照组相比,虽然栓体的重量或长度均有所下降,但差异不具统计学意义。与此同时,对静脉血管壁进行的实时荧光定量结果也符合血栓形成状态的差异变化趋势。实验结果说明,体内 IL-18 基因处于低表达状态时,虽然可对血栓形成构成一定影响,但影响程度并不显著。静脉血栓的成因复杂多样<sup>[17-18]</sup>,仅仅抑制 IL-18 的表达对疾病的发展、转归等影响存在局限性。然而,本研究也观察到 IL-18 基因在静脉血管中表达水平增高,对静脉血栓疾病的发生、发展存在着客观而显著的促进作用。

综上所述,结合其他研究者的成果可见,IL-18 与 DVT 疾病的发生、发展等病理过程存在密切的联系;目的基因在机体中的表达增高,提示血栓疾病发生、进展的高风险率。本研究通过细胞和动物模型的研究验证了该见解的可靠性。IL-18 在 DVT 发病机制的研究中存在较高价值,有待对其影响静脉血栓

形成的相关病理生理过程、炎症信号转导通路等方面行进一步研究,也希望本研究能为下一步的深入探讨提供有效的实验室证据和基础。

[参考文献]

- [1] Marcel L, Poll T, Marcus S. Infection and inflammation as risk factors for thrombosis and atherosclerosis[J]. *Semin Thromb Hemost*, 2012, 38(5): 506-514
- [2] Ushio S, Namba M, Okura T, et al. Cloning of the cDNA for human IFN-gamma inducing factor, expression in *Escherichiacoli*, and studies on the biologic activities of the protein[J]. *J Immunol*, 1996, 156(11): 4274-4279
- [3] 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
- [4] He M, Cornelis MC, Kraft P, et al. Genome-Wide association study identifies variants at the IL18-BCO<sub>2</sub> locus associated with interleukin-18 levels[J]. *Arterioscler Thromb Vas Biol*, 2010, 30(4): 885-890
- [5] Pawlik A, Dziedziejko V, Kurzawski M, et al. Association between IL18 gene polymorphisms and the release of interleukin-18 from stimulated peripheral blood mononuclear cells[J]. *Biotechnology*, 2012, 26(3): 2987-2990
- [6] Toldo S, Mezzaroma E, O'Brien L, et al. Interleukin-18 mediates interleukin-1-induced cardiac dysfunction [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014, 306(7): H1025-H1031
- [7] Hewitson TD, Martic M, Kelynack KJ, et al. Thrombin is a pro-fibrotic factor for rat renal fibroblasts *in vitro* [J]. *Nephron Exp Nephrol*, 2005, 101(2): e42-e49
- [8] Weber SC, Gratopp A, Akanbi S, et al. Isolation and culture of fibroblasts, vascular smooth muscle and endothelial cells from the fetal rat ductus arteriosus[J]. *Pediatr Res*, 2011, 70(3): 236-241
- [9] 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
- [10] Lin PH, Barshes NR, Annambhotla S, et al. Advances in endovascular interventions for deep vein thrombosis [J]. *Expert Rev Med Devic*, 2008, 5(2): 153-166
- [11] Becattini C, Agnelli G. Pathogenesis of venous thromboembolism[J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2002, 8(5): 360-364
- [12] Reiter M, Bucek RA, Koca N, et al. Deep vein thrombosis and systemic inflammatory response: a pilot trial [J]. *Wien Klin Wochenschr*, 2003, 115(34): 111-114
- [13] Roumen-Klappe EM, Janssen MCH, 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
- [14] Novick D, Kim S, Kaplanski G, et al. Interleukin-18, more than a Th1 cytokine [J]. *Semin Immunol*, 2013, 25(6): 439-448
- [15] Mo J, Bai B, Li Y, et al. Expression of interleukin-18 in a rat model of deep vein thrombosis [J]. *J Cardiovasc Surg*, 2012, 53(5): 625-630
- [16] Von Bruhl ML, Stark K, Steinhart A, et al. Monocytes, neutrophils and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice *in vivo* [J]. *J Exp Med*, 2012, 209(4): 819-835
- [17] Bovill EG, Van Der Vliet A. Venous valvular stasis-associated hypoxia and thrombosis: what is the link? [J]. *Annu Rev Physiol*, 2011, 73: 527-545
- [18] Esmon CT, Esmon NL. The link between vascular features and thrombosis [J]. *Annu Rev Physiol*, 2011, 73: 503-514

[收稿日期] 2014-08-11