

• 论 著 •

慢性肾脏病患者外周血单核细胞内 IL-37 水平及临床意义*

李超强¹, 朱凯欣², 黄美燕², 徐军发³

中山大学附属东华医院:1. 生殖医学科;2. 检验科, 广东东莞 523110;

3. 广东医科大学检验医学研究所, 广东东莞 523808

摘要:目的 探讨慢性肾脏病(CKD)患者外周血单核细胞内白细胞介素-37(IL-37)水平及临床意义。方法 收集 36 例 CKD 患者(CKD 组)和 22 例健康志愿者(对照组)的外周血,并根据治疗情况对 18 例 CKD 患者进行治疗前和治疗后亚组分析。用流式细胞术检测单核细胞内 IL-37 水平,用胶乳免疫比浊法检测 C 反应蛋白(CRP)水平,用全自动血液分析仪计数血液中中性粒细胞数(NE#)、淋巴细胞数(LY#)和单核细胞数(MO#),用全自动生化分析仪检测血清中尿素氮(BUN)、肌酐(CREA)、尿酸(UREA)和胱抑素 C(Cys-C),分析 CKD 患者外周血单核细胞内 IL-37 水平变化及与血液相关指标的相关性。结果 CKD 组外周血单核细胞内 IL-37 水平高于对照组,差异有统计学意义($t=7.147, P<0.05$);CKD 组血液 NE#、MO#、CRP、BUN、CREA、UREA 和 Cys-C 水平均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。患者外周血单核细胞内 IL-37 水平与 MO#($r=0.3964, P<0.05$)、NE#($r=0.3435, P<0.05$)和 CRP 水平($r=0.5076, P<0.05$)呈正相关。治疗后组外周血单核细胞内 IL-37 水平低于治疗前组,差异有统计学意义($t=3.290, P<0.05$);治疗后组血清 CRP、BUN、CREA 和 UREA 水平低于治疗前组,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 外周血单核细胞内 IL-37 水平在 CKD 患者体内升高,与其炎症指标有相关性,经治疗后水平下降,对 CKD 治疗有辅助性指导作用。

关键词:慢性肾脏病; 白细胞介素-37; 流式细胞术; 单核细胞; C 反应蛋白

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.06.001

中图法分类号:R692

文章编号:1673-4130(2021)06-0641-04

文献标志码:A

Level of IL-37 in peripheral blood monocytes and its clinical significance in chronic kidney disease*

LI Chaoqiang¹, ZHU Kaixin², HUANG Meiyang², XU Junfa³

1. Department of Reproductive Medicine; 2. Department of Clinical Laboratory, Donghua Hospital of Sun Yat-sen University, Dongguan, Guangdong 523110, China;

3. Institute of Laboratory Medicine, Guangdong Medical University, Dongguan, Guangdong 523808, China

Abstract: **Objective** To explore the level of interleukin (IL)-37 in peripheral blood monocytes and its clinical significance in chronic kidney disease (CKD). **Methods** Peripheral blood from 36 CKD patients (CKD group) and 22 healthy volunteer (control group) was collected, and subgroup analysis of before treatment and after treatment was performed in 18 cases of CKD. The level of IL-37 in monocytes was detected by Flow Cytometry. C-reactive protein (CRP) was analysed by Latex immunoturbidimetry. Neutrophils (NE#), lymphocytes (LY#) and monocytes (MO#) were calculated by automatic blood cell analyzer. Urea nitrogen (BUN), creatinine (CREA), uric acid (UREA) and cystatin C (Cys-C) were calculated by automatic biochemical analyzer. The changes of IL-37 level in monocytes of CKD patients and its correlation with blood related indexes were analysed. **Results** The level of IL-37 in monocytes in CKD group was obviously higher than that in control group, and the difference was statistically significant ($t=7.147, P<0.05$). The levels of NE#, MO#, CRP, BUN, CREA, UREA and Cys-C in CKD group were higher than those in control group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The level of IL-37 in monocytes positive correlated with MO# ($r=0.3964, P<0.05$) and NE# ($r=0.3435, P<0.05$), and the level of CRP ($r=0.5076, P<$

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81570009)。

作者简介:李超强,男,副主任技师,主要从事疾病免疫机制及生殖实验技术研究。

本文引用格式:李超强,朱凯欣,黄美燕,等.慢性肾脏病患者外周血单核细胞内 IL-37 水平及临床意义[J].国际检验医学杂志,2021,42

0.05)。The level of IL-37 in monocytes after treatment was significant lower than that before treatment, and the difference was statistically significant ($t = 3.290, P < 0.05$), and the levels of CRP, BUN, CREA, UREA after treatment were lower than those before treatment, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$)。 **Conclusion** The level of IL-37 in monocytes in blood is higher in CKD patients, and has a correlation with blood inflammatory indicators, which will become lower after treatment, and has a assistant guiding significance in CKD treatment.

Key words: chronic kidney disease; interleukin-37; Flow Cytometry; monocyte; C-reactive protein

慢性肾脏病(CKD)是临床常见病之一,2010 年我国 CKD 患病率超过 10.8%^[1]。CKD 病理表现为肾小球、肾小管炎性物质浸润及内皮细胞、系膜细胞不良增生,导致肾组织萎缩和纤维化。研究显示,CKD 患者血液中白细胞介素(IL)-6、IL-8 和胎盘转化生长因子(TGF)等细胞因子异常表达^[2-3]。IL-37 是一种新型细胞因子,在多种炎症疾病患者血浆中检出水平升高。笔者前期研究发现 CKD 患者血浆 IL-37 水平升高,有效治疗后血浆 IL-37 水平降低^[4]。但 IL-37 在 CKD 中的作用机制不明确,本研究通过检测 CKD 患者外周血单核细胞内 IL-37 水平,并分析血液相关指标,进一步探讨 IL-37 在 CKD 中的作用机制及临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 9 月至 2018 年 12 月中山市附属东华医院确诊的 36 例 CKD 患者作为 CKD 组,其诊断和分期标准依据 2014 年慢性肾脏病指南^[5],患者入院前未接受过治疗,未合并糖尿病、肝炎、肺结核、人类免疫缺陷病毒(HIV)感染及自身免疫性疾病。选取来自中山大学附属东华医院健康体检科的 22 例健康志愿者作为对照组。CKD 组中,男 20 例,女 16 例;年龄(47.92 ± 14.15)岁。对照组中,男 12 例,女 10 例;年龄(41.50 ± 10.77)岁。两组年龄、性别比例比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。将经药物或血液透析等治疗大于 10 d 的 18 例 CKD 患者进行治疗前后的比较。所有研究对象均知情同意并签署知情同意书。本研究通过中山大学附属东华医院医学伦理委员会批准。

1.2 仪器与试剂 人淋巴细胞分离液(天津市灏洋生物制品科技有限公司),1640 基础培养基(美国 Gibco 公司),IL-37 检测试剂(美国 BD 公司),尿酸(UREA)、尿素氮(BUN)、肌酐(CREA)试剂盒(德国罗氏公司),胱抑素 C(Cys-C)试剂盒(广州科方生物技术股份有限公司);流式细胞仪(美国 BD 公司),高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司),迈瑞 5180 全自动血液分析仪(中国迈瑞公司),COBAS C501 全自动生化分析仪(德国罗氏公司)。

1.3 血常规和 C 反应蛋白(CRP)水平检测 采集乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝血 3 mL,按照迈瑞 5180 全自动血液分析仪的操作方法进行相应血常规指标和 CRP 水平检测。

1.4 肾功能指标检测 采集肝素抗凝血 3 mL,分离出血清,按照 COBAS C501 全自动生化分析仪的操作方法进行 BUN、CREA、UREA 和 Cys-C 水平检测。

1.5 外周血单核细胞内 IL-37 水平检测

1.5.1 外周血单核细胞分离 采集 EDTA-K₂ 抗凝血 10 mL,300×g 离心 5 min,去血浆留血细胞沉淀。用等量无菌 1×磷酸缓冲盐溶液(PBS)稀释血细胞沉淀并混匀,在 15 mL 离心管中,于人淋巴细胞分离液的液面上方沿管壁缓慢加入等量血细胞悬液,300×g 离心 20 min。用无菌吸管吸取白膜层加入含 10% 1640 培养基 1×PBS 中,计数后,取 1×10^6 个细胞于两管流式上样管中,300×g 离心 5 min,弃上清液,染色后作流式细胞分析。

1.5.2 单核细胞内 IL-37 水平检测 按 IL-37 流式细胞试剂盒的操作方法进行,上机检测后,根据单核细胞在流式细胞仪中的前向散射(FSC)及侧向散射(SSC)散点图的特征,进行单核细胞的设门,记录标本单核细胞内 IL-37 水平。

1.6 统计学处理 采用统计软件 SPSS20.0 进行数据处理和统计分析,符合正态分布的计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用配对 t 检验或两独立样本 t 检验,不符合正态分布的计量数据用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,组间比较采用非参数检验;计数资料用频数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;用 Spearman 法进行相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外周血单核细胞内 IL-37 水平及其他指标情况 CKD 组外周血单核细胞内 IL-37 水平明显高于对照组,差异有统计学意义($t = 7.147, P < 0.05$)。CKD 组血液中性粒细胞数(NE#),单核细胞数(MO#),血清 CRP, BUN, CREA, UREA 和 Cys-C 水平均高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);两组淋巴细胞数(LY#)比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 患者治疗前后血液指标情况 18 例患者经治疗大于 10 d,平均 14.2 d,治疗后组外周血单核细胞内 IL-37 水平低于治疗前组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。治疗后组 BUN、CREA、UREA 和 CRP 水平均低于治疗前组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。治疗后组血清 Cys-C 水平,血液 MO#、NE#、LY# 与治疗前比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 1 CKD 组与对照组外周血单核细胞内 IL-37 水平及其他指标的比较[$M(P_{25}, P_{75})$]

项目	对照组($n=22$)	CKD 组($n=36$)	t	P
IL-37(%)	0.12(0.05,0.17)	0.64(0.41,1.07)	7.147	<0.000 1
MO#($\times 10^9/L$)	0.32(0.27,0.38)	0.39(0.23,0.66)	-1.980	0.048 0
LY#($\times 10^9/L$)	0.72(0.50,1.25)	0.72(0.56,1.13)	-0.024	0.981 0
NE#($\times 10^9/L$)	3.19(2.72,3.76)	4.59(3.95,5.66)	-4.632	<0.000 1
CRP(mg/L)	0.30(0.06, 0.44)	0.45(0.33,2.15)	-3.214	0.001 0
BUN(mmol/L)	4.61(4.03,5.04)	17.08(8.90,24.70)	6.099	<0.000 1
CREA(μ mol/L)	72.00(60.00,86.25)	488.00(259.50,749.75)	7.095	<0.000 1
UREA(μ mol/L)	331.00(297.75,370.00)	390.50(338.50,446.75)	-3.029	0.002 0
Cys-C(mg/L)	0.40(0.24,0.57)	4.08(2.89,5.28)	9.998	<0.000 1

表 2 治疗前后外周血单核细胞内 IL-37 水平及其他指标的比较[$M(P_{25}, P_{75})$]

项目	治疗前组($n=18$)	治疗后组($n=18$)	t	P
IL-37(%)	0.61(0.42,1.05)	0.36(0.26,0.60)	3.290	0.002 3
MO#($10^9/L$)	0.41(0.23,0.72)	0.38(0.24,0.51)	1.036	0.307 6
LY#($10^9/L$)	0.78(0.60,1.15)	0.73(0.57,1.18)	0.188	0.851 8
NE#($10^9/L$)	4.76(4.11,5.97)	4.48(3.91,5.76)	-0.823	0.411 0
CRP(mg/L)	0.51(0.35,2.31)	0.36(0.25,0.69)	-1.851	0.064 0
BUN(mmol/L)	19.72(10.27,26.10)	6.95(5.88,9.24)	4.517	<0.000 1
CREA(μ mol/L)	534.00(229.25,758.50)	143.00(78.00,292.00)	-3.275	0.001 0
UREA(μ mol/L)	396.00(331.75,500.00)	163.00(102.00,208.75)	-5.127	<0.000 1
Cys-C(mg/L)	3.64(2.47,5.05)	3.21(2.22,4.15)	0.855	0.398 7

2.3 患者外周血单核细胞内 IL-37 水平与其他血液指标的相关性 患者外周血单核细胞内 IL-37 水平与血液中 MO#($r=0.396\ 4, P<0.05$)、NE#($r=0.343\ 5, P<0.05$)及血清 CRP 水平($r=0.507\ 6, P<0.05$)呈正相关,与 LY#,血清 BUN、CREA、UREA 和 Cys-C 水平无相关性($P>0.05$)。

3 讨 论

CKD 是免疫炎性介质参与的自身免疫性疾病,细胞因子生成和激活是疾病形成和发展的重要基础。研究显示,IL-1、IL-6、IL-8、IL-17、转化生长因子- β (TGF- β)、人胰岛素生长因子 1(IGF-1)、血浆内皮素 1(ET-1)和内核因子- κ B(NF- κ B)等细胞因子异常分泌,可活化酪氨酸蛋白激酶(JAK)及信号转导子和转录激活子(STAT)信号途径,刺激肾组织内皮细胞、系膜细胞分泌单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等,加重肾组织炎性反应^[6-7]。IL-8 和 IL-17 还可直接诱导大量中性粒细胞和 T 细胞浸润肾小球,加重肾组织局部炎症和免疫损伤^[8]。TGF- β 可上调 Smad7 蛋白,激活 NF- κ B,诱导足细胞凋亡;也可促进 I 型胶原合成,直接诱导肾脏组织纤维化^[9]。ET-1、TGF- β 和 IGF-1 可作用于肾组织,使肾系膜细胞增生、细胞外基质堆积,肾小球动脉硬化,引起水钠潴留,造成水肿、高血压等临床症状^[10-11]。因此,多细

胞因子多途径参与了 CKD 的发生与发展。

本研究结果显示,CKD 患者外周血单核细胞内 IL-37 水平明显升高,经药物或血液透析治疗后单核细胞内 IL-37 水平下降,与 CKD 患者血浆 IL-37 水平的研究结果相似^[4]。提示血浆 IL-37 与单核细胞内 IL-37 有密切关系,血浆 IL-37 或来源于单核细胞^[12],且血浆和单核细胞中的 IL-37 均参与 CKD 的发生、发展。IL-37 在 CKD 中的机制可能为:可通过抑制 Toll 样受体激动剂,减少肾脏 IL-1 β 、IL-6、IL-18 和 TNF- α 等炎性细胞因子产生^[13];也可通过抑制 NL-RP3 炎性小体的激活,影响炎性细胞的募集和 Th1/Th2 平衡^[14];与 IL-18R α 链非竞争性地形成复合体,抑制 NF- κ B、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)等途径,使得 γ -干扰素(IFN- γ)的合成下调,抑制树突状细胞活性,从而延缓抗原提呈过程,抑制其免疫应答^[15]。此外,成熟的 IL-37 还可以进入细胞核与 Smad3 蛋白结合,形成复合体,调节基因转录来抑制促炎因子的产生。总之,IL-37 可通过抑制促炎因子表达、阻断信号转导、诱导抑炎因子表达等途径抑制炎症。因此,IL-37 检测是评估 CKD 治疗效果的辅助性指标。

血清中 BUN、CREA、UREA 和 Cys-C 联合检测能有效反映患者肾功能状况,是患者药物治疗或血液透析后常规检测的生化指标。本文跟踪检测 18 例患

者,结果显示,患者经药物或血液透析后,外周血单核细胞内 IL-37,血清 BUN、CREA、UREA 水平呈不同程度的降低,但血清 Cys-C 水平、血液 MO#、LY#、NE#变化不明显。这提示外周血单核细胞内 IL-37 水平降低与肾功能改善相关。本研究结果也显示,CKD 患者外周血单核细胞内 IL-37 水平与肾功能指标中 BUN、CREA、UREA、Cys-C 无相关性,这提示外周血单核细胞内 IL-37 水平与 CKD 进展不一定呈正相关,与之前研究结果相似^[4]。可能原因为跟踪例数少,没有对 CKD 的分期进行分析,但是随着 CKD 向终末期进展,机体并发症增多,自身免疫应答更紊乱,刺激 IL-37 表达的机制和途径也更复杂。

外周血中性粒细胞、单核细胞及淋巴细胞在炎症疾病中扮演着重要角色。炎症反应会使外周血 NE#、MO#和 LY#不同程度地升高,参与抵抗病原侵入、吞噬异物、杀灭病菌等,并释放大量的趋化因子、IL-1、IL-6、TNF- α 等。CRP 是急性时相反应蛋白,在机体发生炎症或感染后,血浆 CRP 水平会升高,而且在急性、亚急性与慢性病理状态下,CRP 有不同特征性的改变^[16]。CKD 是一个慢性炎症过程,患者体内炎症介质的持续存在和炎症反应刺激体内 NE#、MO#和 LY#反应性增多,参与肾组织的免疫防御,以阻止或延缓固有免疫及适应性免疫细胞的免疫应答^[14]。在相关性分析中,CKD 患者血液 NE#、MO#及血清 CRP 水平与单核细胞内 IL-37 水平呈正相关。提示 IL-37 与炎症细胞水平密切相关。此外,本研究发现 CKD 患者血液中 LY#略有升高,可能提示淋巴细胞更多转化为 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞,具有免疫性杀伤作用。抑炎因子 IL-37、炎症细胞、炎症因子等不断作用于肾脏组织,最终造成肾组织的免疫损伤及 CKD 形成。

综上所述,CKD 患者外周血单核细胞内 IL-37 水平升高,与血液 MO#、NE#及血清 CRP 水平呈正相关。经临床药物或血液透析有效治疗后,CKD 患者肾功能改善,外周血单核细胞内 IL-37 水平下降。

参考文献

[1] ZHANG L, WANG F, WANG L, et al. Prevalence of chronic kidney disease in China: a cross-sectional survey [J]. *Lancet*, 2012, 379(18): 815-822.

[2] GU Y Y, LIU X S, HUANG X R, et al. Diverse role of TGF- β in kidney disease[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8(5): 123.

[3] SHARA F R, BIAGIO R, PIETRO C, et al. Inflammation and oxidative stress in chronic kidney disease-potential therapeutic role of minerals, vitamins and plant-derived metabolites[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(1): 263-274.

[4] 李超强,张俊爱,朱凯欣,等. IL-37 在慢性肾脏疾病患者中表达及临床意义[J]. *国际检验医学杂志*, 2017, 38(21): 2947-2949.

[5] CARVILLE S, WONDERLING D, STEVENS P, et al. Early identification and management of chronic kidney disease in adults: summary of updated NICE guidance [J]. *BMJ*, 2014, 24(2): 4507-4513.

[6] MAI M F, JIANG Y L, WU X M, et al. Association of TGF- β 1, IL-4, and IL-10 polymorphisms with chronic kidney disease susceptibility: a Meta-analysis[J]. *Front Genet*, 2020, 11(2): 79-90.

[7] THOMAS E, SVEN-CHRISTIAN P, ANNA W, et al. Inflammation and premature ageing in chronic kidney disease[J]. *Toxins (Basel)*, 2020, 12(4): 227-231.

[8] KIU W I, DUCHATEAU-NGUYEN G, SOLIER C, et al. Cardiovascular risk markers associated with arterial calcification in patients with chronic kidney disease Stages 3 and 4[J]. *Clin Kidney J*, 2014, 7(2): 167-173.

[9] MENG X M, NIKOLIC-PATERSON D J, LAN H Y. TGF- β : the master regulator of fibrosis [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2016, 12(6): 325-338.

[10] BACH L A, HALE L J. Insulin-like growth factors and kidney disease[J]. *Am J Kidney Dis*, 2015, 65(2): 327-336.

[11] AGNALDO C, MARCIA B C, BIANCA C, et al. Antioxidant effect of endothelin-1 receptor antagonist protects the rat kidney against chronic injury induced by hypertension and hyperglycemia[J]. *J Bras Nefrol*, 2019, 41(4): 451-461.

[12] SHANNON Q, DEVENDRA K, AGRAWAL. Immunobiology of interleukin-37: mechanism of action and clinical perspectives[J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2014, 10(12): 1703-1709.

[13] HOFMANN J N, CORLEY D, ZHAO W K, et al. Chronic kidney disease and risk of renal cell carcinoma: differences by race[J]. *Epidemiology*, 2015, 26(1): 59-67.

[14] CAVALLI G, JUSTICE J N, BOYLE K E, et al. Interleukin 37 reverses the metabolic cost of inflammation, increases oxidative respiration, and improves exercise tolerance[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(9): 2313-2318.

[15] TENG X, HU Z, WEI X, et al. IL-37 ameliorates the inflammatory process in psoriasis by suppressing proinflammatory cytokine production[J]. *J Immunol*, 2014, 192(4): 1815-1823.

[16] MORICHIKA K, NAKACHI S, TOMOYOSE T, et al. Thromboembolism supervened on eosinophilia induced by mycoplasma pneumonia [J]. *Intern Med*, 2016, 55(18): 2741.