

nuocytes 相关因子与规律血液透析治疗糖尿病肾病 患者并发症发生的相关性及免疫学机制分析

张灿伟 郭立中 周威

[摘要] 目的 分析 nuocytes 相关因子与糖尿病肾病(DN)患者血液透析治疗后并发症发生的相关性及其可能的免疫学机制。方法 采用前瞻性研究,选取64例行血液透析治疗的DN患者为观察组,同期选取40例行常规体检的健康人员为对照组,比较两组外周血单个核细胞中 nuocytes 相关因子 mRNA 表达情况。根据DN患者治疗后是否出现并发症,分为并发症组与无并发症组,比较两组外周血单个核细胞中 nuocytes 相关因子 mRNA 表达量的差异,并采用 Pearson 相关性分析出现并发症的DN患者 nuocytes 相关因子之间的相关性。结果 观察组白细胞介素-5(IL-5) mRNA 表达量较对照组明显升高($t=21.55, P<0.05$),而两组白细胞介素-13(IL-13) mRNA、膜受体白细胞介素-33受体(T₁/ST₂) mRNA、白细胞介素-17受体B(IL-17 RB) mRNA、视黄酸受体相关孤儿核受体 α (ROR α) mRNA 表达量比较,差异无统计学意义(t 分别=1.39、1.57、1.26、0.98, P 均 >0.05)。随访6个月,观察组中出现呼吸道感染性疾病19例。相比无并发症组,并发症组 IL-13 mRNA、IL-17 RB mRNA 和 ROR α mRNA 表达量均明显增高(t 分别=11.88、17.48、4.68, P 均 <0.05),而两组 IL-5 mRNA 和 T₁/ST₂ mRNA 表达量比较,差异无统计学意义(t 分别=1.26、1.71, P 均 >0.05)。经 Pearson 相关性分析发现,发生并发症的DN患者细胞因子 IL-5 mRNA、IL-13 mRNA、nuocytes 膜受体 IL-17 RB mRNA 与转录因子 ROR α mRNA 表达量均存在正相关关系(r 分别=0.71、0.80、0.84, P 均 <0.05)。结论 经血液透析治疗的DN患者体内出现慢性致敏状态,并且 nuocytes 相关因子的发生和发展与DN患者血液透析治疗后呼吸道感染性疾病的发生可能存在一定关系。

[关键词] 糖尿病肾病; 血液透析; nuocytes 相关因子; 并发症; 呼吸道感染; 免疫学机制

Correlation between nuocytes relative factors and the complications in diabetic nephropathy patients treating with routine hemodialysis and its immunological mechanism analysis ZHANG Canwei, GUO Lizhong, ZHOU Wei. Department of Nephrology, People's Hospital of Lin'an District in Hangzhou City, Hangzhou 311300, China.

[Abstract] **Objective** To analyze the correlation between nuocytes relative factors and the complications in diabetic nephropathy patients treating with routine hemodialysis and its immunological mechanism. **Methods** A prospective study was carried out to select 64 DN patients receiving routine hemodialysis treatment in our hospital as observation group, and 40 healthy people receiving routine physical examination in our hospital as control group. The mRNA expression of nuocytes factors in peripheral blood mononuclear cells between two groups were compared. According to whether occurred complications or not, the patients in observation group were divided into the complication group and the non-complication group. The mRNA expression of nuocytes factors in the peripheral blood mononuclear cells of the two groups were compared, and pearson correlation analysis was used to analyze the correlation between nuocytes factors and complications. **Results** The mRNA expression of interleukin-5 (IL-5) was significantly increased in the observation group when comparing with the control group ($t=21.55, P<0.05$), while there was no significant differences in the mRNA expression of interleukin-13 (IL-13), interleukin-33 receptor (T₁/ST₂), interleukin-17 receptor B (IL-17 RB), and retinoic acid receptor-related orphan receptor α (ROR α) between the two groups ($t=1.39, 1.57, 1.26, 0.98, P>0.05$). After following-up for 6 months, 19 cases of respiratory tract infectious diseases appeared in the observation group. The mRNA expression levels of IL-13, IL-17 RB and ROR α were significantly increased in the complication group when comparing with the non-complication group.

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2019.012.006

作者单位: 311300 浙江杭州, 杭州市临安区人民医院肾内科

通讯作者: 郭立中, Email: chen6680731@163.com

tion group ($t=11.88, 17.48, 4.68, P<0.05$), while there was no significant differences in IL-5 mRNA and T_1/ST_2 mRNA expression levels between the two groups ($t=1.26, 1.71, P>0.05$). The pearson correlation analysis showed that the expression levels of cytokines IL-5 mRNA, IL-13 mRNA, and nuarray receptor IL-17 RB mRNA were positively correlated with transcription factor ROR mRNA in DN patients with complications ($r=0.71, 0.80, 0.84, P<0.05$). **Conclusion** Chronic allergenic state may be observed in DN patients treated with hemodialysis, and the generation and development of nupolarized state may be related to the occurrence of respiratory tract infectious disease after hemodialysis.

[Key words] diabetic nephropathy; hemodialysis; nuocytes relative factors; complication; respiratory infection; immunological mechanism

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)体内代谢紊乱机制较复杂,是终末期肾病中治疗难度大、预后不佳的一种主要类型,因此研究该病的发病机制具有重要的临床意义。既往对 nuocytes 相关因子的研究报道多见于过敏性疾病^[1]、炎症性疾病^[2]、传染性疾病^[3]和支气管哮喘^[4]等。而有关 nuocytes 的“跨界”特性与DN的发病和并发症的发生是否存在密切关系,目前尚未完全明确,并且关于该方面的研究报道甚是少见。为此,本次研究通过前瞻性研究,分析 nuocytes 相关因子与DN患者血液透析治疗后并发症发生的相关性及其可能的免疫学机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采用前瞻性研究,选取2016年1月至2018年12月杭州市临安区人民医院行血液透析治疗的64例DN患者为观察组,其中男性51例、女性13例;年龄35~69岁,平均(53.05±9.45)岁。纳入患者:均符合DN的诊断标准^[5],且接受人工肾规律血液透析治疗至少3个月;既往无严重急慢性疾病;本人或家属知情同意。排除以下患者:合并严重心、脑、肺、肝等其它重要脏器功能不全;伴有恶性肿瘤、多囊肾、移植肾、结缔组织疾病、骨折、风湿病、血液系统疾病等;合并精神性疾病;依从性差,不愿配合、失访、中途退出。同期选取40例于本院

行常规体检的健康人员为对照组,其中男性30例、女性10例;年龄31~65岁,平均(51.13±8.94)岁。两组性别和年龄比较,差异均无统计学意义(P 均>0.05)。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法 观察组患者均用聚砜膜透析器进行血液透析,透析液流速为500 ml/min,血流速度为200~250 ml/min,每周透析2~3次。随访6个月,记录患者并发症的发生情况。

1.2.2 nuocytes 相关因子的检测 采集研究对象清晨空腹外周静脉血5 ml,经常规抗凝后取血浆,离心处理,分离外周血单个核细胞,裂解细胞,冷冻保存。提取总RNA,逆转录为cDNA,采用聚合酶链反应试剂盒(由美国Promege公司生产)检测 nuocytes 相关因子包括:细胞因子[白细胞介素-5(interleukin-5, IL-5)、白细胞介素-13(interleukin-13, IL-13)]及膜受体白细胞介素-33受体(T_1 /suppression of tumorigenicity 2, T_1/ST_2)、白细胞介素-17受体B(interleukin-17 receptor B, IL-17 RB)及转录因子视黄酸受体相关孤核受体 α (retinoic acid receptor-related orphan receptor α , ROR α)的mRNA表达量。引物序列见表1,以 β -actin为内参照,对目的基因的相对表达量进行定量分析。

表1 各引物上、下游序列及产物大小

引物	上游序列	下游序列	产物大小/bp
IL-5	5'-ACT CTC CAG TGT GCC TAT TC-3'	5'-CTG CTG ATA GCC AAT GAG AC-3'	101
IL-13	5'-GGC TGA GGT CTA AGC TAA GG-3'	5'-GAC AGC TGG CAT GTA CTG TG-3'	368
T_1/ST_2	5'-AGA TGA GTC ACT GGC ATA CG-3'	5'-GGA TCC TCA AGC AAT GTG AC-3'	216
IL-17 RB	5'-CTT GGT GGC CTT CAA CAA GC-3'	5'-AGA GCC GAC CGT TCA ATG TG-3'	200
ROR α	5'-CTG ACG AGG ACA GGA GTA GG-3'	5'-GTG CGC AGA CAG AGC TATT C-3'	204

1.3 统计学方法 采用SPSS 23.0版统计学软件。计量资料用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示并采用 t 检验;

计数资料用例数或[例(%)]表示并采用 χ^2 检验。采用Pearson相关性分析DN患者并发症 nuocytes 相关

因子之间的相关性。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 nuocytes 相关因子表达量的比较见表 2

表 2 观察组与对照组 nuocytes 相关因子表达量的比较

组别	IL-5 mRNA	IL-13 mRNA	T ₁ /ST ₂ mRNA	IL-17 RB mRNA	ROR α mRNA
观察组	2.77 ± 0.58*	0.50 ± 0.15	1.15 ± 0.20	1.68 ± 0.42	1.38 ± 0.31
对照组	0.75 ± 0.15	0.46 ± 0.13	1.09 ± 0.17	1.58 ± 0.35	1.32 ± 0.29

注:*,与对照组比较, $P < 0.05$ 。

由表 2 可见,观察组 IL-5 mRNA 表达量较对照组明显升高 ($t=21.55$, $P < 0.05$),而两组 IL-13 mRNA、T₁/ST₂ mRNA、IL-17 RB mRNA、ROR α mRNA 表达量比较,差异均无明显统计学意义 (t 分别=1.39、1.57、1.26、0.98, P 均 > 0.05)。

2.2 观察组有无并发症的患者 nuocytes 相关因子表达量比较 随访 6 个月,观察组中出现呼吸道感染性疾病 19 例。将观察组患者分为并发症组 19 例和无并发症组 45 例,两亚组患者 nuocytes 相关因子表达量比较见表 3。

表 3 观察组中两亚组患者 nuocytes 相关因子表达量比较

组别	IL-5 mRNA	IL-13 mRNA	T ₁ /ST ₂ mRNA	IL-17 RB mRNA	ROR α mRNA
并发症组	2.84 ± 0.52	0.83 ± 0.18*	1.21 ± 0.22	1.78 ± 0.23*	1.58 ± 0.33*
无并发症组	2.67 ± 0.48	0.43 ± 0.09	1.12 ± 0.18	1.04 ± 0.11	1.21 ± 0.27

注:*,与无并发症组比较, $P < 0.05$ 。

由表 3 可见,与无并发症组比较,并发症组 IL-13 mRNA、IL-17 RB mRNA 和 ROR α mRNA 表达量均明显增高 (t 分别=11.88、17.48、4.68, P 均 < 0.05),而两组患者 IL-5 mRNA 和 T₁/ST₂ mRNA 表达量的比较,差异均无统计学意义 (t 分别=1.26、1.71, P 均 > 0.05)。

2.3 发生并发症的 DN 患者 IL-5 mRNA、IL-13 mRNA、IL-17 RB mRNA 与 ROR α mRNA 表达的相关性 经 Pearson 相关性分析发现,发生并发症的 DN 患者外周血单个核细胞中细胞因子 IL-5 mRNA、IL-13 mRNA、nuocytes 膜受体 IL-17 RB mRNA 与转录因子 ROR α mRNA 的表达量均存在正相关关系 (r 分别=0.71、0.80、0.84, P 均 < 0.05)。

3 讨论

DN 是 2 型糖尿病患者常见的一种微血管并发症,其发病机制较为复杂,与高血糖、遗传因素所引起的代谢异常等方面密切相关^[6]。DN 可谓是一种炎症状态,而免疫细胞在 DN 发生、发展和恶化过程中可能发挥着重要作用。研究指出,血液透析^[7]、终末期肾衰竭^[8]及 2 型糖尿病^[9]患者体内均具有微炎症状态的特点,而规律血液透析的 DN 是上述几种疾病极端化的表现,因此对 DN 患者的研究可能更容易发现 nuocytes 相关因子在此类疾病中具有免疫性机制。

作为外周血中的一种固有免疫细胞,nuocytes

分化和成熟时由 Notch 信号转导途径和转录因子 ROR α 所决定。随着临床研究的不断深入,已有研究发现 nuocytes 作为一种“跨界细胞”,是天然免疫细胞中的主要成员之一,而具有适应性免疫细胞才表现出的功能,分布于免疫反应中的空窗期,尽管不会独立引起发病,但具有加重免疫反应和增强机体损伤程度的功能^[10]。并且,随着研究的不断拓展,已有研究指出 nuocytes 的极化状态在甲状腺功能亢进^[11]、病毒性肝炎^[12]和胃癌^[13]等多种疾病发生和发展的病理过程中起到重要作用。IL-5 是以活化的 Th2 细胞为主要来源,IL-5 在维持嗜酸性粒细胞发育和生存、刺激嗜酸性粒细胞迁移至肺部炎症区域、黏膜免疫等方面发挥重要作用,可导致局部甚至全身性过敏性炎症反应^[14]。IL-33 在 Th2 型免疫反应中具有关键性作用,而分布于 nuocytes 细胞表面的 T₁/ST₂ 和 IL-17 RB 是 IL-33 的天然受体,可诱导并分泌多种细胞因子,如 IL-5 和 IL-13 等,具有刺激 Th2 细胞适应性免疫应答的作用^[15]。

本研究发现,观察组 IL-5 mRNA 表达量较对照组明显升高,而两组 IL-13 mRNA、T₁/ST₂ mRNA、IL-17 RB mRNA、ROR α mRNA 表达量比较,并无明显差异。为了进一步研究 nuocytes 相关因子与 DN 患者血液透析治疗后并发症的发生是否存在相关性,本研究经随访 6 个月发现,观察组中出现呼吸

道感染性疾病19例;并且,相比无并发症组,并发症组 IL-13 mRNA、IL-17 RB mRNA 和 ROR α mRNA 表达量均明显增高,而两组患者 IL-5 mRNA 和 T_H1/ST₂ mRNA 表达量的比较,并无明显差异。结果提示,经血液透析治疗的DN患者体内出现与过敏性疾病和支气管哮喘类似的慢性致敏状态,而患者致敏状态的程度与治疗后呼吸道感染性疾病的发生可能存在一定关系。同时,本研究经 Pearson 相关性分析发现,发生并发症的DN患者外周血单个核细胞中细胞因子 IL-5 mRNA、IL-13 mRNA、nuocytes 膜受体 IL-17 RB mRNA 与转录因子 ROR α mRNA 的表达量均存在正相关关系(P 均 <0.05)。以上提示,nuocytes 极化状态的发生和发展可能是相关因子在共同作用下协同参与DN患者血液透析治疗后呼吸道感染性疾病的发生。

综上所述,经血液透析治疗的DN患者体内出现慢性致敏状态,并且 nuocytes 极化状态的发生和发展与DN患者血液透析治疗后呼吸道感染性疾病的发生可能存在一定关系。

参考文献

- 1 蔺林,戴飞,魏瑾瑾,等.nuocyte细胞体外诱导变应性鼻炎小鼠初始T细胞向Th2细胞的分化[J].临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2018,32(20):54-58.
- 2 Seo DH, Che X, Kwak MS, et al. Interleukin-33 regulates intestinal inflammation by modulating macrophages in inflammatory bowel disease[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 851.
- 3 Rostan O, Arshad MI, Piquet-Pellorce C, et al. Crucial and diverse role of the interleukin-33/ST2 axis in infectious diseases[J]. Infect Immun, 2015, 83(5): 1738-1748.
- 4 张梦莹,徐芸芸,吴静,等.哮喘小鼠肺组织Nuocytes增多与GITR-GITRL表达的关系[J].江苏大学学报(医学版), 2015, 25(4): 277-281.
- 5 中华医学会糖尿病学分会微血管并发症学组.糖尿病肾病防治专家共识(2014年版)[S].中华糖尿病杂志,2014,6(11):792-801.
- 6 阮园,王绍冠,王溢苏,等.血浆生长分化因子-15水平与2型糖尿病肾病分期的相关性研究[J].全科医学临床与教育,2018,16(2):137-140.
- 7 de Sequera P, Corchete E, Bohorquez L, et al. Residual renal function in hemodialysis and inflammation[J]. Ther Apher Dial, 2017, 21(6): 592-598.
- 8 Mitsides N, Cornelis T, Broers NJH, et al. Extracellular overhydration linked with endothelial dysfunction in the context of inflammation in haemodialysis dependent chronic kidney disease[J]. PLoS One, 2017, 12(8): e0183281.
- 9 Kawamura T, Umemura T, Umegaki H, et al. Effect of renal impairment on cognitive function during a 3-year follow up in elderly patients with type 2 diabetes: Association with microinflammation[J]. J Diabetes Investig, 2014, 5(5): 597-605.
- 10 蔺林,陈峥,戴飞,等.Orai1蛋白体外干预对小鼠nuocyte细胞功能的影响[J].中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2019, 25(1): 41-46.
- 11 Ji X, Bie Q, Liu Y, et al. Increased frequencies of nuocytes in peripheral blood from patients with Graves hyperthyroidism[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(11): 7554-7562.
- 12 Shen Z, Yang H, Yang S, et al. Hepatitis B virus persistence in mice reveals IL-21 and IL-33 as regulators of viral clearance[J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 2119.
- 13 Bie Q, Zhang P, Su Z, et al. Polarization of ILC2s in peripheral blood might contribute to immunosuppressive microenvironment in patients with gastric cancer[J]. J Immunol Res, 2014, 2014(1): 923135.
- 14 路萍,徐芸芸,苏兆亮,等.糖尿病肾病患者II型固有淋巴细胞(ILC2)活性增强参与代谢综合征多组分聚集状态形成[J].细胞与分子免疫学杂志,2017,33(6):820-825.
- 15 Wang C, Liu Q, Chen F, et al. IL-25 promotes Th2 immunity responses in asthmatic mice via nuocytes activation[J]. PLoS One, 2016, 11(9): e0162393.

(收稿日期 2019-06-27)

(本文编辑 蔡华波)