

Th22、Th17 细胞与糖尿病肾病的相关性

刘志明, 化晓莉, 宰国田, 杨莉

南通大学附属南京江北人民医院检验科, 江苏 南京 210048

摘要: **目的** 对辅助性 T 细胞(Th)22、Th17 细胞及相应的细胞因子白介素(IL)-22、IL-17A 水平进行检测,分析其与糖尿病肾病的关系。**方法** 选取 2016 年 5 月至 12 月 108 例糖尿病肾病患者,分为大量白蛋白尿组(37 例)、微量白蛋白尿组(30 例)、正常白蛋白尿组(41 例),选取同期门诊体检健康者 35 例为对照组。采用流式细胞仪分析外周血中 Th22 (CD3⁺ CD8⁻ IL-17⁻ IL-22⁺)、Th17 细胞 (CD3⁺ CD8⁻ IL-17⁺ IL-22⁻) 比例,酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测血清 IL-22、IL-17A 水平。**结果** 随着疾病的加重,Th22、Th17 细胞的比例也随之上升。大量白蛋白尿组 Th22、Th17 阳性细胞的比例高于微量白蛋白尿组、正常白蛋白尿组和对照组(P 均 < 0.05)。微量白蛋白尿组 Th22、Th17 阳性细胞的比例高于对照组(P 均 < 0.05)。正常白蛋白尿组 Th22、Th17 细胞的比例虽高于对照组,但差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。大量白蛋白尿组 IL-17A、IL-22 水平高于微量白蛋白尿组、正常白蛋白尿组和对照组,差异有统计学意义(P 均 < 0.05);但微量白蛋白尿组、正常白蛋白尿组和对照组 IL-17A、IL-22 水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。Th17 细胞的比例、Th22 细胞的比例、IL-17A 和 IL-22 水平均与尿微量白蛋白水平呈正相关($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论** Th17 细胞、Th22 细胞以及相应的细胞因子 IL-17A 和 IL-22 与糖尿病肾病的发生与发展密切相关。

关键词: 糖尿病肾病; Th22 细胞; Th17 细胞; 尿白蛋白; 白介素-22; 白介素-17A

中图分类号: R 587.2 R 692.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2018)08-1029-04

Correlation of Th22 and Th17 cells with diabetic nephropathy

LIU Zhi-ming, HUA Xiao-li, ZAI Guo-tian, YANG Li

Department of Clinical Laboratory, Nanjing Jiangbei People's Hospital, Nanjing, Jiangsu 210048, China

Corresponding author: YANG Li, E-mail: 8371336@163.com

Abstract: Objective To detect T helper (Th) 22 and Th17 cells and the levels of their corresponding cytokines interleukin (IL)-22 and IL-17A and analyze their association with diabetic nephropathy. **Methods** A total of 108 patients with diabetic nephropathy from May 2016 to December 2016 were selected, and the patients were divided into macroalbuminuria group ($n = 37$), microalbuminuria group ($n = 30$), and normoalbuminuria group ($n = 41$). Thirty-five healthy persons in the medical examination at the same time were selected as control group. Flow cytometry was used to analyze the proportions of Th22 (CD3⁺ CD8⁻ IL-17⁻ IL-22⁺) cells and Th17 (CD3⁺ CD8⁻ IL-17⁺ IL-22⁻) cell in peripheral blood. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect serum IL-22 and IL-17A levels. **Results** With the aggravation of the disease, the proportions of Th22 and Th17 cells increases. The proportions of Th22 and Th17 cells in macroalbuminuria group were significantly higher than those in microalbuminuria group, normoalbuminuria group and control group (all $P < 0.05$). The proportions of Th22 and Th17 cells in microalbuminuria group were significantly higher than those in control group (all $P < 0.05$). The proportions of Th22 and Th17 cells in normoalbuminuria group were higher than those in control group, but the differences had not statistical significance (all $P > 0.05$). The levels of serum of IL-17A and IL-22 in macroalbuminuria group were significantly higher than those in microalbuminuria group, normoalbuminuria group and control group (all $P < 0.05$), while there were no significant differences in them among microalbuminuria group, normoalbuminuria group and control group (all $P > 0.05$). The proportions of Th22, the proportions of Th17 cells, IL-17A and IL-22 were positively correlated with urine microalbumin ($P < 0.05, P < 0.01$). **Conclusion** Th17 cells, Th22 cells and their corresponding cytokines IL-17A and IL-22 are closely related to the occurrence and development of diabetic nephropathy.

Key words: Diabetic nephropathy; Th22 cells; Th17 cells; Urine albumin; Interleukin-22; Interleukin-17A

糖尿病肾病(diabetic nephropathy)是糖尿病严重的微血管病变,在西方国家是导致患者终末期肾病(end-stage renal disease, ESRD)的主要原因。通常认为糖代谢紊乱、肾小球血液动力学改变是其肾功能损伤的主要诱因^[1-3],其机制尚未完全清晰。一系列的研究表明,炎症因素在糖尿病肾病的进展中起至关重要的作用^[4-5],认为 T 淋巴细胞参与糖尿病肾病的发生、发展进程^[6]。

Th22 细胞(CD3⁺CD8⁻IFN- γ ⁻IL-17⁻IL-22⁺T 细胞)为近来新发现的人类辅助性 T 细胞亚群,其特征是产生白介素(IL)-22 而不分泌干扰素 γ (IFN- γ)或 IL-17A。大量研究表明,IL-22 在慢性炎症性疾病、自身免疫性疾病(如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、免疫性血小板减少性紫癜等)中发挥着重要、复杂的作用^[7-8]。Th17 细胞(CD3⁺CD8⁻IL-17⁺IL-22⁻T 细胞)分泌标志性细胞因子 IL-17A 作为促炎性因子,而不分泌 IL-22,在多发性骨髓瘤、棘皮症等多种疾病患者的血清及组织中均能检测到高表达^[9-10]。至今,有关 Th22、Th17 细胞与糖尿病肾病免疫性炎症关系的研究报道较少,本研究拟对临床不同疾病程度糖尿病肾病患者和健康人外周血 Th22、Th17 细胞及相应细胞因子 IL-22、IL-17A 的水平进行检测,分析它们与糖尿病肾病的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 5 月至 12 月本院收治,符合 1999 年 WHO 诊断和分型标准的糖尿病肾病患者 108 例,男 54 例,女 54 例,年龄 37~84 岁;排除泌尿系感染、发热、运动等影响蛋白尿的因素,及其他原因引起的肾脏疾病、肿瘤等严重的系统性疾病者。根据尿白蛋白(Alb)水平将 108 例糖尿病肾病患者分为大量白蛋白尿组[Alb \geq 300 mg/24 h]、微量白蛋白尿组(30 mg/24 h \leq Alb<300 mg/24 h)、正常白蛋白尿组(Alb<30 mg/24 h)。选取同期门诊体检健康者 35 例为对照组,其中男 13 例,女 22 例,年龄 45~67 岁。

1.2 标本采集 采集各试验对象空腹静脉血,肝素钠抗凝血 5 ml 于流式细胞仪检测 Th17/Th22 细胞数量;未抗凝血 5 ml,分离血清后,-80℃保存用于检测 IL-17A、IL-22 等细胞因子。

1.3 Th17 细胞、Th22 细胞及细胞因子检测 取肝素钠抗凝血 250 μ l,用 250 μ l 含 RPMI-1640 培养液(Gibco 公司)等体积稀释到混合后 500 μ l,同时加入

500 \times Cell Stimulation Cocktail (eBioscience 公司) 1 μ l。在 37℃、5% CO₂ 培养箱刺激培养 4~5 h,期间相隔 1~2 h 混匀 1 次。收集体外刺激活化的外周血,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次。100 μ l 血加入 CD3-PC5、CD8a-PC7 各 5 μ l 室温避光温育 30 min。加入破膜剂 Fix-Perm reagent A,室温作用 15 min,2 ml PBS 洗涤,加入 Fix-Perm reagent B 100 μ l,分别加入 5 μ l 藻江蛋白(PE)标记的 IL-17/异硫氰酸荧光素(FITC)标记的 IL-22(IL17-PE/IL22-FITC)和同型对照抗体(eBioscience 公司),室温作用 20 min,洗涤后立即用 FC-500 流式细胞仪(Beckman-colouter 公司)检测。以 CD3⁺CD8⁻反向设门,至少计数 20 000 个细胞,记录 IL-17 和 IL-22 表达阳性细胞(Th17 细胞和 Th22 细胞)所占的比例。ELISA 试剂盒检测 IL-17A、IL-22(武汉伊艾博科技有限公司),其最低检测限分别为 15.6、7.8 pg/ml,遵照厂家说明书实施。

1.4 统计学方法 所有研究数据采用 SPSS 19.0 和 GraphPad Prism 5.01 软件进行统计分析。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间资料比较采用单因素方差分析。非正态分布的计量资料用中位数(第 25 百分位数~第 75 百分位数)[$M(P_{25} \sim P_{75})$]表示,比较采用秩和检验。率的比较采用 χ^2 检验;尿 Alb 与各项指标的相关性采用 Pearson 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组一般资料的比较 三组糖尿病肾病患者和对照组年龄、性别比较差异无统计学意义,三组糖尿病肾病患者糖化血红蛋白(HbA1c)比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。正常白蛋白尿组和微量白蛋白尿组糖尿病病程小于大量白蛋白尿组($P < 0.05$),但正常白蛋白尿组和微量白蛋白尿组组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 各组 Th22 和 Th17 阳性细胞所占比例 使用流式细胞仪检测各组 Th22 和 Th17 阳性细胞比例,见图 1。随着疾病的加重,Th22、Th17 细胞的比例也随之上升。大量白蛋白尿组 Th22、Th17 细胞的比例高于微量白蛋白尿组、正常白蛋白尿组和对照组(P 均 < 0.05)。微量白蛋白尿组 Th22、Th17 细胞的比例高于对照组(P 均 < 0.05)。正常白蛋白尿组 Th22、Th17 细胞的比例稍高于对照组,但差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。见表 2。

2.3 各组血清 IL-17A 和 IL-22 水平 大量白蛋白尿

表 1 各组一般资料比较

项目	对照组 (n=35)	正常白蛋白尿组 (n=41)	微量白蛋白尿组 (n=30)	大量白蛋白尿组 (n=37)
男/女 (例)	13/22	19/22	18/12	17/20
年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	56.4 ± 6.4	58.3 ± 9.4	57.4 ± 9.7	58.6 ± 10.2
糖尿病病程 (年, $\bar{x} \pm s$)	-	9.8 ± 6.4	11.6 ± 6.7	14.2 ± 5.4 ^{*#}
HbA1c (% , $\bar{x} \pm s$)	-	8.2 ± 1.7	8.6 ± 1.9	8.8 ± 2.0
尿 Alb [mg/24 h, M(P ₂₅ ~ P ₇₅)]	-	10.1 (6.8 ~ 16.0)	52.7 (33.0 ~ 96.5) [#]	402 (377.0 ~ 558.0) ^{*#}

注:与正常白蛋白尿组比较,[#]P<0.05;与微量白蛋白尿组比较,^{*}P<0.05。

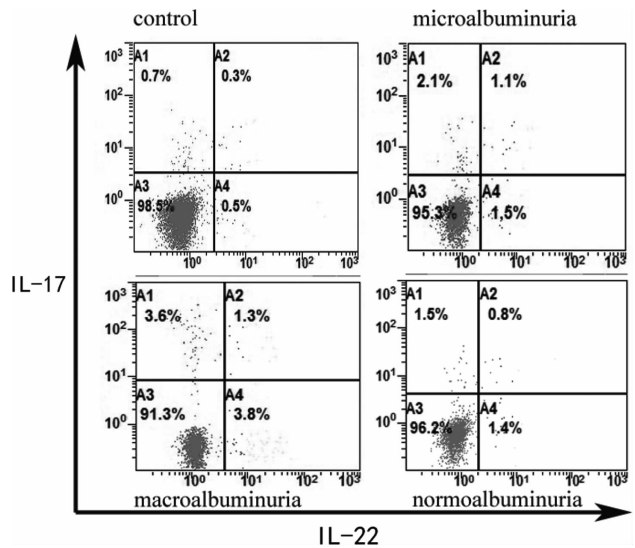
组 IL-17A、IL-22 水平高于微量白蛋白尿组、正常白蛋白尿组和对照组,差异有统计学意义 (P 均 < 0.05);但微量白蛋白尿组、正常白蛋白尿组和对照组 IL-17A、IL-22 水平差异无统计学意义 (P > 0.05)。见表 3。

2.4 尿 mAlb 与各项指标的相关性 mAlb 作为肾小球微血管病变早期的观察指标,也是国际公认的 Mogensen 分期的分期标准,对糖尿病患者发生大量蛋白尿及肾功能下降的风险均具有良好的预测价值。Th17 细胞的比例、Th22 细胞的比例、IL-17A 和 IL-22 水平均与尿 Alb 水平呈正相关 (P < 0.05, P < 0.01)。见表 4。

3 讨论

糖尿病肾病在 2 型糖尿病中患病率约为 15% ~ 25%,其肾功能损伤的主要诱因为糖代谢紊乱、肾小球血液动力学改变^[1-3]。研究表明,肾脏炎症对于促进糖尿病肾病的发生、发展至关重要,可能是糖尿病肾病持续发展的关键因素^[11]。

相对于熟知的 Th1、Th2、Th17 细胞,Th22 细胞为近来新发现的人类辅助性 T 细胞亚群,不表达其他淋巴细胞的特征性细胞因子,分泌 IL-22 的能力也不受其他免疫细胞影响^[12]。IL-22 是 Th22 细胞的主要效应因子,是 IL-10 细胞因子家族成员之一。Chen 等^[13]从糖尿病视网膜病变的患者中提取的外周血单个核细胞经刺激后产生 IL-22 的水平较正常对照组明显升高,说明 Th22 细胞可能参与糖尿病视网膜病变的发生。Zhao 等^[14]研究表明在肥胖及 2 型糖尿病患者中,IL-22 的水平及 Th22 细胞比例明显高于正常对照组。在糖尿病肾病研究领域相关报道较少。为此,本文测定糖尿病肾病患者外周血 Th22、Th17 细胞数量及血清 IL-22、IL-17A 的水平,结果显示,在大量白蛋白尿组 Th22、Th17 细胞比率及 IL-22、IL-17A 水平高于对照组,对照组与微量白蛋白尿组、正常白蛋白尿组比较无统计学差异。Th17 (%)、Th22 (%)、IL-17A 和 IL-22 与作为肾小球微血管病变早期观察指标尿微量白蛋白均呈正相关。这种现象说明,在



注:A1 像限为 Th17 (CD3⁺ CD8⁻ IL17⁺ IL22⁻) 阳性细胞所占比例;A2 像限为 Th17、Th22 双阳性细胞 (CD3⁺ CD8⁻ IL17⁺ IL22⁺) 所占比例;A3 像限为 Th17、Th22 双阴性细胞 (CD3⁺ CD8⁻ IL17⁻ IL22⁻) 所占比例;A4 像限为 Th22 (CD3⁺ CD8⁻ IL17⁻ IL22⁺) 阳性细胞所占比例。

图 1 各组的 Th17 和 Th22 流式细胞图

表 2 各组外周血 Th22、Th17 细胞所占百分比 (% , $\bar{x} \pm s$)

T 淋巴细胞	大量白蛋白尿组	微量白蛋白尿组	正常白蛋白尿组	对照组
Th22 细胞	2.57 ± 0.99	1.88 ± 0.74 ^{*#}	1.29 ± 0.44 [*]	0.82 ± 0.57 [*]
Th17 细胞	3.14 ± 1.36	2.32 ± 0.88 ^{*#}	1.70 ± 0.87 [*]	1.49 ± 0.68 [*]

注:与大量白蛋白尿组比较,^{*}P<0.05;与对照组比较,[#]P<0.05。

表 3 各组 IL-17A、IL-22 水平比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

细胞因子	大量白蛋白尿组	微量白蛋白尿组	正常白蛋白尿组	对照组
IL-17A	25.6 ± 15.2	16.7 ± 11.1 [*]	16.93 ± 10.8 [*]	11.6 ± 5.1 [*]
IL-22	39.3 ± 29.1	30.8 ± 11.6 [*]	25.77 ± 8.5 [*]	25.8 ± 8.6 [*]

注:与大量白蛋白尿组比较,^{*}P<0.05。

表 4 尿 Alb 与各指标间相关性

指标	相关系数	P 值
Th17 细胞的比例	0.456	<0.01
Th22 细胞的比例	0.606	<0.01
IL-17A	0.231	<0.05
IL-22	0.295	<0.01

糖尿病肾病患者中,Th22、Th17 细胞比率及 IL-22、IL-17A 的水平不是在肾小球屏障功能轻度受损时升高,而在肾小球屏障功能严重损伤时升高,提示在糖尿病肾病发生、发展中,某种机制使得 T 细胞亚群向这些

细胞转化, Th22、Th17 细胞及相应细胞因子发挥作用, 共同促进糖尿病肾病的形成, 但它们之间的相互作用机制需进一步研究。

总之, Th17 细胞、Th22 细胞、IL-17A 和 IL-22 与糖尿病肾病的发生密切相关。但有关的免疫机制缺乏深层次研究, 需进一步扩大研究。

参考文献

[1] Dronavalli S, Duka I, Bakris GL. The pathogenesis of diabetic nephropathy [J]. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2008, 4(8): 444 - 452.

[2] Gross JL, de Azevedo MJ, Silveiro SP, et al. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment [J]. *Diabetes Care*, 2005, 28(1): 164 - 176.

[3] Reutens AT. Epidemiology of diabetic kidney disease [J]. *Med Clin North Am*, 2013, 97(1): 1 - 18.

[4] Roohk HV, Zaidi AR, Patel D. Glycated albumin (GA) and inflammation: role of GA as a potential marker of inflammation [J]. *Inflamm Res*, 2018, 67(1): 21 - 30.

[5] Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(2): 98 - 107.

[6] Wu CC, Chen JS, Lu KC, et al. Aberrant cytokines/chemokines production correlate with proteinuria in patients with overt diabetic nephropathy [J]. *Clin Chim Acta*, 2010, 411(9/10): 700 - 704.

[7] Hu Y, Li H, Zhang L, et al. Elevated profiles of Th22 cells and corre-

lations with Th17 cells in patients with immune thrombocytopenia [J]. *Hum Immunol*, 2012, 73(6): 629 - 635.

[8] Lin J, Yue LH, Chen WQ. Decreased plasma IL-22 levels and correlations with IL-22-producing T helper cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus [J]. *Scand J Immunol*, 2014, 79(2): 131 - 136.

[9] Prabhala RH, Pelluru D, Fulciniti M, et al. Elevated IL-17 produced by TH17 cells promotes myeloma cell growth and inhibits immune function in multiple myeloma [J]. *Blood*, 2010, 115(26): 5385 - 5392.

[10] Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, et al. Interleukin-22, a Th17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis [J]. *Nature*, 2007, 445(7128): 648 - 651.

[11] Lim AK, Tesch GH. Inflammation in diabetic nephropathy [J]. *Mediators Inflamm*, 2012, 2012: 146154.

[12] Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, et al. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from Th-17, Th1 and Th2 cells [J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(8): 864 - 871.

[13] Chen H, Wen F, Zhang X, et al. Expression of T-helper-associated cytokines in patients with type 2 diabetes mellitus with retinopathy [J]. *Mol Vis*, 2012, 18: 219 - 226.

[14] Zhao R, Tang D, Yi S, et al. Elevated peripheral frequencies of Th22 cells: a novel potent participant in obesity and type 2 diabetes [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85770.

收稿日期: 2018 - 02 - 18 修回日期: 2018 - 03 - 04 编辑: 王国品

(上接第 1028 页)

[2] Erarslan E, Yüksel I, Haznedaroglu S. Acute liver failure due to non-exertional heatstroke after sauna [J]. *Ann Hepatol*, 2012, 11(1): 138 - 142.

[3] Navarro CS, Casa DJ, Belval LN, et al. Exertional Heat Stroke [J]. *Curr Sports Med Rep*, 2017, 16(5): 304 - 305.

[4] Inayat F, Virk HUH. Liver transplantation after exertional heatstroke-induced acute liver failure [J]. *Cureus*, 2016, 8(9): e768.

[5] Li D, Wang X, Liu B, et al. Exercises in hot and humid environment caused liver injury in a rat model [J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e111741.

[6] Carvalho AS, Rodeia SC, Silvestre J, et al. Exertional heat stroke and acute liver failure: a late dysfunction [J]. *BMJ Case Rep*, 2016: ber2016214434.

[7] 黄江燕, 董力, 邹贵勉, 等. 南战区军事训练中中暑因素的研究 [J]. *华南国防医学杂志*, 2014, 28(7): 697 - 698.

[8] Leon LR, Helwig BG. Heat stroke: role of the systemic inflammatory response [J]. *J Appl Physiol*, 2010, 109(6): 1980 - 1988.

[9] 陈阿楠. 氧化应激相关因子在高温、高强度军事训练的武警官兵血清中的表达研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2015.

[10] Zhou R, Tardivel A, Thorens B, et al. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(2): 136 - 140.

[11] Inoue Y, Shirasuna K, Kimura H, et al. NLRP3 regulates neutrophil functions and contributes to hepatic ischemia-reperfusion injury independently of inflammasomes [J]. *J Immunol*, 2014, 192(9): 4342 - 4351.

[12] Geng Y, Ma Q, Liu YN, et al. Heatstroke induces liver injury via IL-1 β and HMGB1-induced pyroptosis [J]. *J Hepatol*, 2015, 63(3): 622 - 633.

[13] Tong H, Tang Y, Chen Y, et al. HMGB1 activity inhibition alleviating liver injury in heatstroke [J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2013, 74(3): 801 - 807.

收稿日期: 2018 - 03 - 06 修回日期: 2018 - 03 - 30 编辑: 周永彬