

## 2型糖尿病肾病患者外周血 IL-17 和 IL-22 mRNA 水平\*

沈红艳<sup>a</sup>, 邓演超<sup>a</sup>, 徐湛<sup>a</sup>, 鹿璐<sup>a</sup>, 梁军<sup>b</sup>

(徐州市中心医院 a. 检验科; b. 内分泌科, 江苏徐州 221006)

**摘要:**目的 研究2型糖尿病(T2DM)患者肾脏不同病变时期外周血 IL-17 和 IL-22 mRNA 水平,探索糖尿病肾病(DN)患者 IL-17 和 IL-22 基因表达水平与肾脏病变的关系。方法 实验包括60名2型T2DM患者和20名正常对照者(NC),其中糖尿病患者包括:无蛋白尿组(NA,  $n=22$ )、微量清蛋白尿组(MA,  $n=18$ )和糖尿病肾病组(DN,  $n=20$ )。采用实时荧光定量PCR方法检测 IL-17 和 IL-22 mRNA 水平,分析各组外周血 IL-17 和 IL-22 mRNA 水平差异。结果 DN组 IL-17 和 IL-22 mRNA 水平显著高于 MA 组, NA 组和 NC 组差异有统计学意义( $P<0.01$ ); MA, NA 和 NC 三组之间 IL-17 和 IL-22 mRNA 差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论 在2型糖尿病肾病外周血中 IL-17 和 IL-22 mRNA 水平升高, IL-17 和 IL-22 可能在 DN 病变中发挥作用。

**关键词:**白介素-17;白介素-22;糖尿病肾病

中图分类号:R587.1;R392.11 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2015)02-030-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2015.02.009

### Levels of IL-17 and IL-22 mRNA in the Blood of Type 2 Diabetic Nephropathy Patients

SHEN Hong-yan<sup>a</sup>, DENG Yan-chao<sup>a</sup>, XU Zhan<sup>a</sup>, LU Lu<sup>a</sup>, LIANG Jun<sup>b</sup>

(a. Department of Clinical Laboratory; b. Department of Endocrinology,

Xuzhou Central Hospital, Jiangsu Xuzhou 221006, China)

**Abstract:** Objective To investigate levels of IL-17 and IL-22 mRNA in the blood of type 2 diabetes (T2DM) patients with the different stages of kidney injury and explore the relationship between the gene expression levels of IL-17, IL-22 and renal lesions in patients with diabetic nephropathy (DM). Methods Subjects included 60 T2DM patients with or without kidney injury and 20 normal controls (NC,  $n=20$ ). Diabetes patients were divided into 3 groups by level of urinary albumin to creatinine ratio (ACR): no proteinuria group (NA,  $ACR<30$  mg/g,  $n=22$ ), microalbuminuria group (MA,  $30$  mg/g  $< ACR<300$  mg/g,  $n=18$ ) and diabetic nephropathy group (DN,  $ACR>300$  mg/g,  $n=20$ ). Quantitative Real-Time RT-PCR was used to detect IL-17 and IL-22 mRNA levels. Analysis differences of IL-17 and IL-22 mRNA levels among NA, MA, DN and NC groups. Results The levels of IL-17 and IL-22 mRNA were significantly higher in DN group than that in MA, NA and NC group ( $P<0.01$ , respectively). However, there were not significant difference among MA, NA and NC group ( $P>0.05$ , respectively). Conclusion Levels IL-17 and IL-22 mRNA were increased in blood of T2DM patients with nephropathy. IL-17 and IL-22 may play role in the pathogenicity of diabetic nephropathy.

**Keywords:** interleukin 17; interleukin 22; diabetic nephropathy

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是2型糖尿病并发症(type 2 diabete, T2DM)的一个常见类型,是导致慢性肾病、终末肾病的原因之一。糖尿病肾病的致病机制复杂,多种因素参与它的发生和发展。最近研究显示,糖尿病肾病是一个炎症参与的过程,与细胞因子介导的炎症反应关系密切。白介素-17(interleukin 17, IL-17)和白介素-22(interleukin 22, IL-22)是 Th17 细胞和 Th22 细胞分泌的主要细胞因子,它们在多种炎症性疾病中起重要作用,但是在2型糖尿病肾病中作用还不清楚。本文研究在糖尿病肾脏病变不同时期-微量清蛋白尿期和肾病期,患者外周血 IL-17, IL-22 mRNA

水平,分析糖尿病肾病患者 IL-17, IL-22 基因表达水平变化。

#### 1 材料和方法

1.1 研究对象 2013年6月~12月经徐州市中心医院确诊的2型糖尿病患者60例,包括无清蛋白尿(NA)组( $ACR<30$  mg/g, ACR:尿清蛋白与肌酐比值)20例,男:女:11:9,年龄 $58.8\pm12.0$ 岁;微量清蛋白尿(MA)组( $30$  mg/g  $< ACR<300$  mg/g)18例,男:女:10:8,年龄 $56.3\pm14.9$ 岁;糖尿病肾病(DN)组( $ACR>300$  mg/g,尿蛋白定性试验阳性)22例,男:女:12:10,年龄 $56.5\pm11.1$ 岁。同时选取20名健康体检者作为正常对

\* 基金项目:徐州市中心医院博士(硕士)创新团队科技项目(项目编号:XZS2012090)。

作者简介:沈红艳(1976-),女,硕士,副主任技师,主要研究方向:分子免疫诊断, Tel:0516-85790102, E-mail:jjeshyan2006@126.com。

通讯作者:梁军,硕士生导师,主任医师, E-mail:mwlj521@163.com。

照(NC),男:女:9:11,年龄 $53.1 \pm 10.4$ 岁。上述受试者均无其他肾脏疾病、炎症性或免疫性疾病。所有受试者签署知情同意书,并经徐州市中心医院伦理委员会同意。

**1.2 引物、主要试剂及仪器** 根据 GenBank 中 IL-17(NM002190), IL-22 (NM020525) 和  $\beta$ -actin (NM001101) 特异基因序列设计实验用引物, IL-17 上游引物 5'-5-TACTACAACCGATCCACCTC-3', 下游引物 5'-GGACAGAGTTCATGTGG-TAG-3'; IL-22 上游引物 5'-TTCCAGCAGC-CCTATATCAC-3', 下游引物 5'-GCATATAAG-GCTGGAACCTATC-3';  $\beta$ -actin 上游引物 5'-CT-GGGACGACATGGAGAAAATC-3', 下游引物 5'-ATAGCACAGCCTGGATAGCAAC-3', 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。主要试剂: TRIzol (Invitrogen, 美国), SYBR Prime Script RT-PCR Kit II (荧光定量 RT-PCR 试剂) (TaKaRa, 大连宝生物), 人淋巴细胞分离液(北京索莱宝)。仪器: DA 7600 荧光定量 PCR 仪(广州达安); Quawell Q3000 紫外分光光度计(美国)。

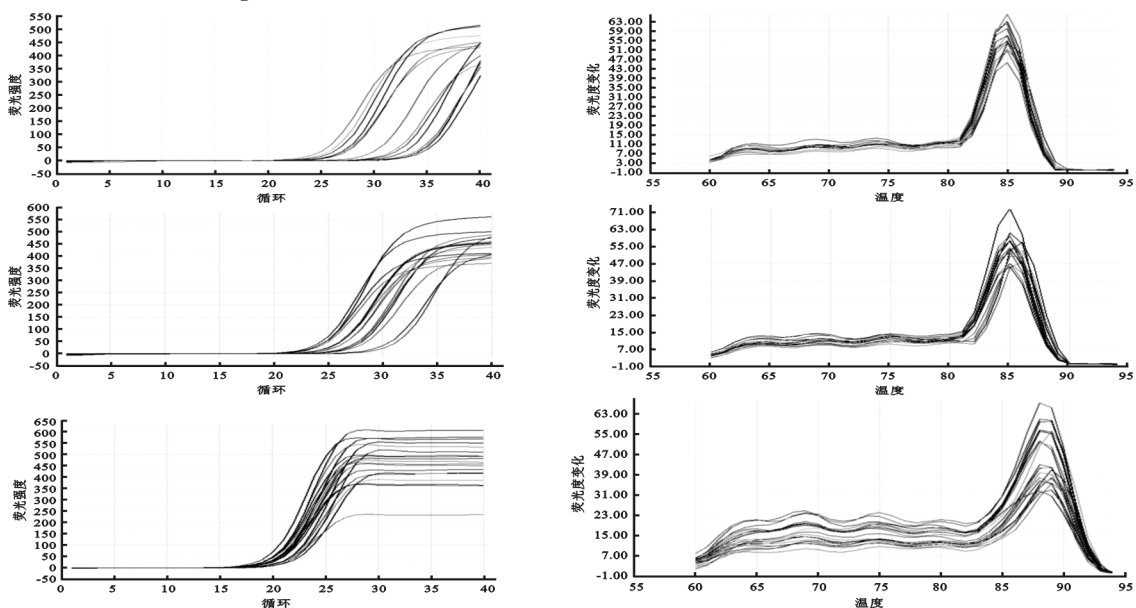
**1.3 实验方法** 取淋巴细胞分离液 4 ml 放入离心管, 轻轻加入 4 ml 稀释的受试者 EDTA 抗凝血(全血 2 ml + 2 ml 生理盐水), 3 000 r/min 离心 15 min, 取中间白膜层用生理盐水清洗 2 遍即得到外周血单个核细胞(PBMC)。在 PBMC 中加入 1 ml TRIzol 颠倒混匀, 室温放置 5 min, 加入 0.2 ml 氯仿, 用力震荡 15 s, 室温下放置 3 min, 12 000 g/min 4℃ 离心 15 min; 取上层水相, 加 0.5 ml 异丙醇, 室温放置 10 min, 12 000 g/min 4℃ 离心 10 min, 弃上清, 加 1 ml 75 g/dl 乙醇洗涤, 涡旋混合,

7 500 g/min 4℃ 离心 5 min, 弃上清, 室温干燥, 50  $\mu$ l DEPC 处理水溶解。提取的总 RNA 经紫外分光光度计检测,  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  比值在 1.7~2.0 之间符合要求。取总 RNA 4  $\mu$ l, 加入 Oligo dT 0.5  $\mu$ l (终浓度 25 pmol), 无 RNA 酶水 3  $\mu$ l, 混匀, 70℃ 5 min, 冰上冷却, 然后加 5 $\times$  逆转录酶缓冲液 2  $\mu$ l, 逆转录酶混合物 I 0.5  $\mu$ l, 37℃ 15 min, 最后 85℃ 10 s, 得到 cDNA。取 cDNA 2  $\mu$ l, SYBR Premix Ex TaqTM II 10  $\mu$ l, ROX Reference Dye (50 $\times$ ) 0.4  $\mu$ l, 加扩增上下游引物各 1  $\mu$ l, 加双蒸水到 20  $\mu$ l 放 PCR 仪扩增。PCR 反应条件:  $\beta$ -actin 95℃ 30 s, 95℃ 5 s, 58℃ 30 s 40 循环; IL-17 95℃ 30 s, 95℃ 5 s, 56℃ 30 s, 40 循环; IL-22 95℃ 30 s, 95℃ 5 s, 56℃ 30 s, 40 循环。扩增结束后进行熔解度实验: 开始温度 55℃, 结束温度 95℃, 上升速度 0.1℃/s。每份标本各重复 2 次。用  $\beta$ -actin 做参照基因, 用  $2^{-\Delta\text{CT}}$  公式计算 IL-17 和 IL-22 的相对基因表达。

**1.4 统计学分析** 使用 SPSS16.0 统计软件包进行分析, 数据采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 各组间 IL-17 和 IL-22 mRNA 水平采用 Kruskal-Wallis (Mann-Whitney U 检验两两比较) 检验进行分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 IL-17, IL-22 和  $\beta$ -actin 的荧光定量 PCR 扩增曲线和溶解度曲线** IL-17, IL-22 和  $\beta$ -actin 的定量 PCR 扩增曲线为典型 S 型曲线, 熔解度实验显示为一很窄单峰,  $T_m$  值分别为 85.2℃, 85.7℃ 和 88.6℃, 说明无引物二聚体和非特异性产物形成, 见图 1。



A 和 B 为 IL-17; C 和 D 为 IL-22; E 和 F 为  $\beta$ -actin。

图 1 IL-17, IL-22 和  $\beta$ -actin 的扩增曲线和溶解度曲线

2.2 各组 IL-17, IL-22 mRNA 水平 各组 PBMC 中 IL-17 和 IL-22 的 mRNA 相对表达水平可通过公式  $2^{-\Delta CT}$  公式计算, 其中  $\Delta CT = CT_{\text{目标基因}} - CT_{\text{参照基因}}$ 。各组 PBMC 中 IL-17mRNA 的相对表达水平见图 2A, 无蛋白尿(NA)组  $0.015 \pm 0.010$ , 微量清蛋白尿(MA)组  $0.017 \pm 0.011$ , 糖尿病肾病(DN)组  $0.037 \pm 0.031$ , 正常对照(NC)组  $0.017 \pm 0.009$ , 差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 15.438$ ,  $P = 0.001$ ); 各组 IL-22 的 mRNA 相对表达水平见图

2B; 无蛋白尿(NA)组  $0.018 \pm 0.011$ , 微量清蛋白尿(MA)组  $0.022 \pm 0.017$ , 糖尿病肾病(DN)组  $0.056 \pm 0.052$ , 正常对照(NC)组  $0.026 \pm 0.021$ , 差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 17.837$ ,  $P < 0.001$ )。经 Mann-Whitney U 检验两两比较分析, 糖尿病肾病组 IL-17 和 IL-22 mRNA 均高于其他各组 ( $P$  均  $< 0.01$ ), 但 MA, NA 和 NC 三组之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

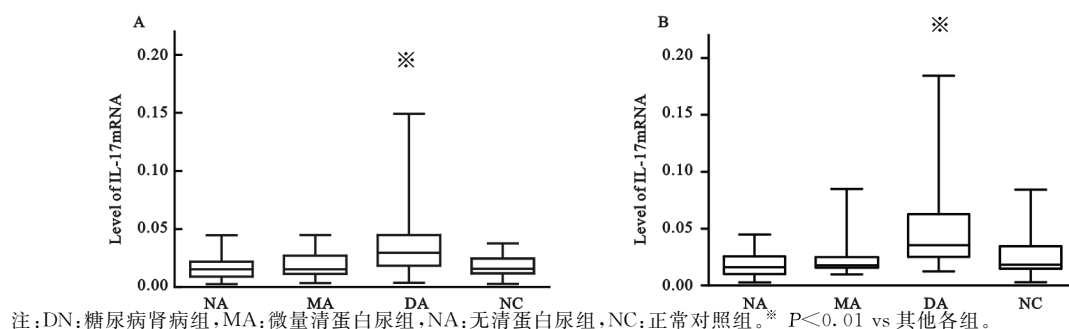


图2 各组 PBMC 中 IL-17 和 IL-22 mRNA 相对表达水平

3 讨论 糖尿病肾病是终末期肾病常见原因, 病理特征是肾小球结构肥大, 基底膜增厚, 细胞外基质积累, 临床上可表现在不同程度的蛋白尿及肾功能损伤。糖尿病肾病的致病机制复杂, 持续高糖状态、氧化应激增加和血流动力学改变被认为是糖尿病肾病发生的主要原因, 但临床研究表明, 严格控制血糖和血压仅对部分糖尿病肾病有一定的缓解作用, 糖尿病肾病患者仍会缓慢进展至终末期肾衰。近年来, 炎症学说在糖尿病肾病发病机制中的作用备受关注, 糖尿病肾病被认为是一个炎症参与的过程, 伴有多种细胞因子升高介导的炎症反应<sup>[1]</sup>。

IL-17 和 IL-22 是 Th17 细胞和 Th22 细胞分泌的主要细胞因子, Th17 和 Th22 是新的不同于 Th1, Th2 和 Treg 的 CD4<sup>+</sup> T 细胞亚型, 由初始 CD4<sup>+</sup> T 细胞在不同的细胞因子和环境因素下发育而来。研究发现, IL-17 和 IL-22 在炎症性疾病中起重要作用。IL-17 能够广泛地诱生出 T 细胞和单核细胞产生其他炎症细胞因子如 IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  等<sup>[2]</sup>, 并能促进补体 C3 等急性期反应蛋白的产生, 诱导炎症反应<sup>[3]</sup>。IL-22 和 IL-22R 相互作用, 可激活 IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  和 IL-6 基因表达, 促进炎症的发生<sup>[4]</sup>。另外, IL-22 还与组织增生和重塑有关, IL-22 不仅能诱导人角质细胞和成纤维细胞样滑膜细胞增生<sup>[5]</sup>, 还可以促进 TGF- $\beta$ 1 介导的上皮细胞-间充质细胞转换<sup>[6]</sup>。

我们实验结果显示, 在糖尿病患者中, 肾病组外周血中 IL-17 和 IL-22 mRNA 水平显著高于微

量清蛋白尿组、尿清蛋白正常组及正常对照组, 而后三组之间 IL-17 和 IL-22 mRNA 水平无显著差异, 这说明, IL-17 和 IL-22 mRNA 水平在肾脏严重损伤时升高。已知糖尿病早期肾脏损伤临床主要表现为微量清蛋白尿, 如果病情持续发展, 就会发展为糖尿病肾病期, 肾脏出现细胞外基质积累、纤维化形成和结构重塑而导致原有的结构破坏, 肾脏屏障功能和滤过功能破坏, 临床出现大量蛋白尿及肾功能障碍。我们数据显示, IL-17 和 IL-22 mRNA 水平在肾脏早期损伤时无明显升高, 而在肾病期明显升高, 提示 IL-17 和 IL-22 可能受某些因素的影响而升高, 并可能参与糖尿病肾病的致病。

文献报道, 在糖尿病肾病的进展过程中, 常伴有大量淋巴细胞, DCs, 单核细胞/巨噬细胞浸润, 活化的浸润细胞能合成和分泌一些炎症性细胞因子及纤维化形成细胞因子<sup>[7]</sup>。这也许与 IL-17 和 IL-22 mRNA 的表达升高有关。已经证实, 在 IL-1 $\beta$  和 IL-23 存在下, 人类初始 CD4<sup>+</sup> T 细胞分化为 Th17 细胞, 分泌 IL-17, IL-21 和 IL-22 等细胞因子<sup>[8]</sup>; 在 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的作用下, 人类初始 T 细胞分化为 Th22, 主要分泌 IL-22<sup>[9]</sup>。研究也发现, 在糖尿病心血管并发症中 Th17 和 Th22 细胞升高<sup>[10]</sup>。然而, 由于不同疾病的发生发展有其特殊性, IL-17 和 IL-22 在糖尿病肾病中升高的准确原因、机制及所起作用还需要进一步研究。

参考文献:

(下转 35 页)

白有的增高( $\beta$ 区带的 $\beta 2$ -MG, $\gamma$ 区带的C反应蛋白),有的降低( $\beta$ 区带的TRF, $\gamma$ 区带的免疫球蛋白)所以总体变化不大。经单次透析治疗后患者蛋白电泳图谱有所改善,清蛋白百分比略有升高,其它区带均有所下降,尤其以 $\alpha 1$ 区带下降最为明显,说明机体的炎症状态较透析前有所缓解。透析一个月后患者体内的 $\alpha 1$ 球蛋白和 $\alpha 2$ 球蛋白百分比均较透析前明显下降,说明患者体内的炎症状态进一步得到了缓解,而清蛋白及 $\beta$ 区带无明显增减。 $\gamma$ 球蛋白的百分比与对照组及透析前都有显著的增高,可能是由于体内的免疫球蛋白水平在透析后升高造成的,这在一定程度上也证明了机体的免疫功能得到了一定的改善。当然,蛋白电泳技术所测定的仅仅是各区带蛋白占总蛋白的百分比,特异性不是很强,如果想观察某种特定蛋白质的变化必需借助于其它方法对其进行测定。

综上所述,我们通过对尿毒症患者透析前后其血清蛋白电泳图谱的变化进行分析可知血液透析在一定程度上改善了患者机体的炎症状态,增强了机体的免疫功能。

#### 参考文献:

- [1] 李中,黄承胜,徐敏,等.高通量血液透析对维持性血液透析患者免疫功能的影响[J].中国医师进修杂志(综合版),2011,34(25):10-13.  
Li Z, Huang CS, Xu M, et al. Effect of high-flux hemodialysis on immune state in maintenance hemodialysis patients[J]. Chin J Postgrad Med, 2011, 34(25): 10-13.
- [2] Formica M, Bosticardo G. Dialysis adequacy and Kt/V[J]. Gior Ital Nefrol, 2011, 28(2): 152-156.
- [3] 郑法雷,章有康,陈香美,等.肾脏病临床与进展[M].北京:人民军医出版社,2005:239-257.  
Zheng FL, Zhang YK, Chen XM, et al. Clinical and Progress of Kidney Disease[M]. Beijing: People's Army Medical Press, 2005: 239-257.
- [4] Buscher AK, Buscher R, Hauffa BP, et al. Alterations in appetite-regulating hormones influence protein-energy wasting in pediatric patients with chronic kidney disease[J]. Pediatric Nephrology, 2010, 25(11): 2295-2301.
- [5] 王海燕.肾脏病学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2008:1897-1899.  
Wang HY. Nephrology[M]. 3th Ed. Beijing: People's Health Press, 2008: 1897-1899.
- [6] 毛诗海,程训民,杨松,等.尿毒症维持性血液透析患者超敏C反应蛋白检测临床应用[J].蚌埠医学院学报,2012,37(3):292-293.  
Mao SH, Cheng XM, Yang S, et al. The clinical application of high-sensitivity C reactive protein level in maintenance hemodialysis patients[J]. J Bengbu Med Coll, 2012, 37(3): 292-293.
- [7] 李永新,尹青松,汪小娇,等.尿毒症维持性血液透析患者T细胞亚群监测的临床意义探讨[J].医药论坛杂志,2012,33(2):5-7,10.  
Li YX, Yin QS, Wang XJ, et al. Clinical significance the survey of T cell subsets in maintenance hemodialysis patients with uremia[J]. J Medical Forum, 2012, 33(2): 5-7, 10.
- [8] 孙续禄.尿毒症患者维持性血液透析对氧化应激及免疫功能的影响[J].中国医疗前沿,2013,8(12):56,20.  
Sun XL. The oxidative stress and immune function's effect of uremia patients with maintenance hemodialysis[J]. National Medical Frontiers of China, 2013, 8(12): 56, 20.
- [9] 龚英峰.肾病患者血清蛋白电泳图谱分析[J].中国疗养医学杂志,2012,21(1):33-34.  
Gong YF. Analysis of serum protein electrophoresis pattern in kidney patients[J]. Chin J Convalescent Med, 2012, 21(1): 33-34.
- [10] 周新,涂植光.临床生物化学和生物化学检验[M].3版.北京:人民卫生出版社,2004:48-58.  
Zhou X, Tu ZG. Clinical Biochemistry and Biochemical Tests[M]. 3th Ed. Beijing: People's Health Press, 2004: 48-58.

收稿日期:2014-09-18

修回日期:2015-01-11

(上接32页)

- [1] Duran-Salgado MB, Rubio-Guerra AF. Diabetic nephropathy and inflammation[J]. World J Diabetes, 2014, 5(3): 393-398.
- [2] Jacobo P, Guazzone VA, Jarazo-Dietrich S, et al. Differential changes in CD4+ and CD8+ effector and regulatory T lymphocyte subsets in the testis of rats undergoing autoimmune orchitis[J]. Journal of Reproductive Immunology, 2009, 81(1): 44-54.
- [3] Sugihara T, Kobori A, Imaeda H, et al. The increased mucosal mRNA expressions of complement C3 and interleukin-17 in inflammatory bowel disease[J]. Clin Exp Immunol, 2010, 160(3): 386-393.
- [4] 孙奇. IL-2炎症性疾病关键因子[J].免疫学杂志, 2011, 27(9): 821-825.  
Sun Q. IL-2: the key cytokine in inflammatory diseases[J]. Immunological Journal, 2011, 27(9): 821-825.
- [5] Hijnen D, Knol EF, Gent YY, et al. CD8(+) T cells in the lesional skin of atopic dermatitis and psoriasis patients are an important source of IFN- $\gamma$ , IL-13, IL-17 and IL-22[J]. J Invest Dermatol, 2013, 133(4): 973-979.
- [6] Johnson JR, Nishioka M, Chakir J, et al. IL-22 contributes to TGF- $\beta 1$ -mediated epithelial-mesenchymal transition in asthmatic bronchial epithelial cells[J]. Respir Res, 2013(14): 118.
- [7] Kanasaki K, Taduri G, Koya D. Diabetic nephropathy: the role of inflammation in fibroblast activation and kidney fibrosis[J]. Front Endocrinol(Lausanne), 2013(4): 7.
- [8] Cosmi L, De Palma R, Santarlasci V, et al. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+ CD4+ T cell precursor[J]. J Exp Med, 2008, 205(8): 1903-1916.
- [9] Trifari S, Spits H. IL-22-producing CD4+ T cells: middle-men between the immune system and its environment[J]. Eur J Immunol, 2010, 40(9): 2369-2371.
- [10] Zhao RX, Li WJ, Lu YR, et al. Increased peripheral proinflammatory T helper subsets contribute to cardiovascular complications in diabetic patients[J]. Mediators Inflamm, 2014(2014): 596967.

收稿日期:2014-10-30

修回日期:2015-01-03