

# ILC2s 与糖尿病肾病血液透析患者机体内“代谢综合征”状态的关系研究

路萍<sup>1</sup>, 许化溪<sup>2</sup>

(1. 江苏大学附属人民医院肾内科, 镇江 212002; 2. 江苏大学医学院免疫学与免疫检验系, 镇江 212002)

**【摘要】目的:**探讨 II 型固有淋巴细胞(group II innate lymphoid cells, ILC2s)与糖尿病肾病血液透析患者机体内代谢综合征(metabolic syndrome, MS)状态的关系。**方法:**对江苏大学附属人民医院 105 例血液透析患者进行研究, 其中糖尿病肾病 40 例, 非糖尿病肾病 65 例, 收集临床资料, 进行人体指标测量, 血糖、血脂指标测定, 以同期单纯 2 型糖尿病患者 35 例、门诊健康体检者 30 例作为对照。实时荧光定量 PCR 检测外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)中 ILC2s 相关因子的 mRNA 表达水平; 流式细胞术检测 ILC2s 的百分比; ELISA 法检测血浆 ILC2s 相关细胞因子 IL-5 和 IL-13 的蛋白表达水平。**结果:**糖尿病肾病血透组患者 MS 的患病率为 87.5%, 较健康对照组(0%), 2 型糖尿病组(57.10%)和非糖尿病肾病血透组(50.80%)明显升高( $\chi^2=53.084, P=0.000$ ); ILC2s 特征性转录因子 ROR $\alpha$ , 膜受体 T1/ST2、IL-17B, 细胞因子 IL-5、IL-13 的 mRNA 表达水平均较健康对照组升高( $P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.004$ ), ILC2s 相关细胞因子 IL-5、IL-13 的蛋白表达水平均较健康对照组升高( $P=0.012, P=0.076$ ); 流式细胞术检测的 ILC2s% 较其余 3 组升高( $F=185.287, P=0.000$ ); logistic 回归分析发现伴随 ILC2s 活性增强, 糖尿病肾病血透组患者存在代谢综合征的概率较其余 3 组增加, 相关性分析提示 ILC2s 与糖尿病肾病血液透析患者腰围和甘油三酯水平呈正相关( $r=0.356, r=0.462; P=0.024, P=0.003$ )。**结论:**糖尿病肾病血液透析患者有较高的 MS 患病率, ILC2s 在糖尿病肾病血液透析患者机体内表现为优势活化状态, ILC2s 相关因子可能通过对腹型肥胖、脂质代谢的影响, 而参与糖尿病肾病血液透析患者 MS 状态的形成。

**【关键词】**ILC2s; 糖尿病肾病; 代谢综合征; 血液透析

**【中图分类号】**R692.5

**【文献标志码】**A

**【收稿日期】**2018-07-31

## Relationship between ILC2s and metabolic syndrome in hemodialysis patients with diabetic nephropathy

Lu Ping<sup>1</sup>, Xu Huaxi<sup>2</sup>

(1. Department of Nephrology, Affiliated People's Hospital, Jiangsu University;

2. Department of Immunology, School of Medicine, Jiangsu University)

**【Abstract】Objective:** To investigate the relationship between type 2 innate lymphoid cells(ILC2s) and metabolic syndrome(MS) in hemodialysis patients with diabetic nephropathy(DN). **Methods:** A total of 105 hemodialysis patients in our hospital were enrolled in this study, including 40 DN patients (hemodialysis+DN group) and 65 patients with non-diabetic nephropathy (hemodialysis+NDN group). The clinical data were collected. Anthropometric parameters, blood glucose, and blood lipids were measured. And 35 patients with type 2 diabetes alone(diabetes group) and 30 outpatients receiving physical examination(healthy control group) were selected as control. The mRNA expression levels of ILC2s related factors in peripheral blood mononuclear cells were determined by quantitative real-time PCR. ILC2s% was measured by flow cytometry. The protein expression levels of ILC2s related cytokines(interleukin[IL]-5 and IL-13) in plasma were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results:** The hemodialysis+DN group had a significant-

**作者介绍:**路萍, Email: lp8012@163.com,

研究方向: 血液净化学基础与临床。

**基金项目:** 江苏省检验医学重点实验室开放基金资助项目(编号: JSKLM2014012); 镇江市 2014 年度社会发展科技支撑资助项目(编号: SH2014051)。

**优先出版:** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190604.0922.004.html>  
(2019-06-04)

ly higher incidence rate of MS compared with the healthy control group, the diabetes group, and the hemodialysis+NDN group (87.5% vs. 0%, 57.10%, and 50.80%,  $\chi^2=53.084, P=0.000$ ). Compared with the healthy control group, the hemodialysis+DN group had significantly higher mRNA expression levels of ILC2s characteristic transcription factor ROR- $\alpha$ , membrane receptor

T1/ST2, IL-17B, IL-5, and IL-13 ( $P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.004$ ) and had significantly higher protein expression levels of IL-5 and IL-13 ( $P=0.012, P=0.076$ ). The flow cytometry results showed that the hemodialysis+DN group had a significantly higher ILC2s% than the other three groups ( $F=185.287, P=0.000$ ). Logistic regression analysis showed that with the increasing ILC2s activity, the hemodialysis+DN group had a higher probability of MS than the other three groups. Correlation analysis indicated that ILC2s was positively correlated with waist circumference and triglyceride level in hemodialysis patients with DN ( $r=0.356, P=0.024; r=0.462, P=0.003$ ). **Conclusion:** Hemodialysis patients with DN have a higher prevalence of MS. ILC2s appears to be the dominant activation state in hemodialysis patients with DN. ILC2s related factors may be involved in the formation of MS in hemodialysis patients with DN through the effects on abdominal obesity and lipid metabolism.

**[Key words]** ILC2s; diabetic nephropathy; metabolic syndrome; hemodialysis

终末期肾脏病(尿毒症)是目前我国六大集中高发重大疾病之一,主要治疗方式依赖血液透析。糖尿病肾病是近年来导致终末期肾脏病快速增长的重要基础疾病。在 2 型糖尿病、慢性肾脏病、血液透析患者机体内均普遍存在代谢综合征(metabolic syndrome, MS)的一个或多个危险因素组分,同时上述疾病也被认为是慢性炎症性疾病,接受血液透析治疗的终末期 2 型糖尿病肾病患者更是上述几类疾病的结合体。从 MS 这一整体概念出发,探讨这一共性问题的可能作用机制,寻找该类基础疾病的有效干预靶点,临床意义重大。

既往研究发现,终末期肾脏病患者可表现为 Th2 优势活化状态<sup>[1-3]</sup>。II 型固有淋巴细胞(group II innate lymphoid cells, ILC2s)是近年来发现的具有适应性免疫功能的新型固有免疫细胞,可激活并维持 Th2 型细胞免疫应答<sup>[4]</sup>。ILC2s 与炎症及脂代谢等密切相关<sup>[5-7]</sup>。ILC2s 在糖尿病肾病血液透析患者机体内活性状态如何?是否也参与了糖尿病肾病血液透析患者机体内 MS 状态的形成?

本文拟通过分析 ILC2s 与糖尿病肾病血液透析患者 MS 状态的关系,以进一步发现 ILC2s 对该类患者 MS 状态的可能影响,为从代谢免疫的上游领域对终末期糖尿病肾病进行早期、综合性的、个体化的预防、干预及治疗提供理论依据。

## 1 研究对象和方法

### 1.1 研究对象

选取 2013 年 11 月 1 日至 2016 年 12 月 30 日在江苏大学附属人民医院血液净化中心登记并已接受维持性血液透析治疗超过 3 个月、透析接近体质量、尿素下降率(urea re-

duction ratio, URR) $>60\%$ 且单室尿素清除指数(urea clearance index, Kt/V)为 1.2~1.4,病情稳定的终末期肾脏病患者 105 例(糖尿病肾病患者 40 例,非糖尿病肾病患者 65 例,其中慢性肾小球疾病 41 例,高血压肾损害 20 例,梗阻性肾病 2 例,原因不明 2 例),在该院内内分泌科首次确诊且尚未进行任何治疗的单纯 2 型糖尿病患者 35 例及同期门诊健康体检者 30 例。所有研究对象均排除严重的原发性心、肺、消化道、神经系统疾病、遗传性疾病、肿瘤、结缔组织病等,自愿参与本研究并签署同意书,初诊 2 型糖尿病患者需排除同时伴发糖尿病肾病及慢性肾脏病。本研究获得江苏大学附属人民医院伦理委员会审议通过(批准号为 SQ20140085)。所有透析机类型为德国费森尤斯 4008B,透析器型号为日本旭化成 15 L,透析过程中均应用低分子肝素钙进行抗凝。

### 1.2 研究方法

1.2.1 人体指标及血压测量 所有研究对象清晨空腹、免冠、穿单衣并脱鞋情况下测量身高、体质量和腰围,应用 2 mm 刻度台式汞柱式血压计测量血压,测量前半小时避免吸烟及剧烈运动,安静休息 10 min 后,取坐位,测量血压 3 次,每次间隔 5 min,取 3 次测量水平的平均值作为其血压值。

1.2.2 实验室常规指标测定 美国 AU5800 全自动生化仪应用酶比浊法测定甘油三酯(triglyceride, TG),直接法测定高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C),己糖激酶法测定空腹血糖(fasting blood glucose, FBG),所有检测过程均经过严格质控。

1.2.3 ILC2s 相关因子的 mRNA 表达水平测定 取 EDTA-K2 抗凝外周静脉血 2 mL, Ficoll-泛影葡胺密度离心法分离 PBMC, 异硫氰酸胍-酚-氯仿法提取总 RNA, 应用 ReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR RT Kit 试剂盒(ToYoBo 公司)反转录合成 cDNA, 应用 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> 试剂盒(Takara 公司)实时荧光定量 PCR 检测 PBMC 中 ILC2s 相关因子的 mRNA 表达水平,总反应体系 10  $\mu$ L,所有步骤严格按照试剂盒说明书操作,由生工生物工程(上海)股份有限公司进行引物设计和合成,引物序列见表 1。所有目的基因的 mRNA 表达水平均通过与内参抗体  $\beta$ -actin mRNA 的表达水平进行校准,并通过

目的基因与内参基因  $\beta$ -actin mRNA 表达水平的相对变化进行判断和统计分析。

1.2.4 流式细胞术检测 ILC2s 的百分比 分离 PBMC 后,取部分调整细胞数至  $1 \times 10^6$  个/mL,加入荧光基团异硫氰酸荧光素标记的 Lineage 抗体(lin角度-fluorescein isothiocyanate, LIN-FITC),藻红蛋白标记的抗诱导性共刺激分子(inducible costimulatory-phycoerythrin, ICOS-PE),别藻蓝蛋白标记的 ST2 抗体(ST2-allophycocyanin, ST2-APC),应用 BD Accuri<sup>®</sup> C6 流式细胞仪检测 ILC2s 的百分比并分析结果,获得数据。

1.2.5 ELISA 法检测血浆中细胞因子 IL-5 和 IL-13 按试剂盒说明书严格进行操作,所有样本均重复测定 3 次,根据标准曲线计算平均含量。

1.2.6 代谢综合征的确定 以 2005 年美国胆固醇教育计划成人治疗组第三次指南(American Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III, NCEP ATP III)对 MS 定义如下<sup>[6]</sup>;以下 5 项包含 3 项及以上者即为 MS:①中心性肥胖:腰围  $\geq 102$  cm(华人男性为 90 cm)或  $\geq 88$  cm(华人女性为 80 cm);②高甘油三酯血症: TG  $\geq 1.7$  mmol/L;③高密度脂蛋白: HDL-C  $< 1.03$  mmol/L(男)或  $< 1.3$  mmol/L(女);④血压异常:收缩压(systolic blood pressure, SBP)  $\geq 130$  mmHg 或舒张压(diastolic blood pressure, DBP)  $\geq 85$  mmHg;⑤空腹血糖  $\geq 5.6$  mmol/L 或已接受药物治疗。

### 1.3 统计学处理

应用 SPSS 17.0 统计学分析软件,计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两

两比较采用 LSD 法。定性资料用百分比表示,定性资料间比较采用卡方检验。应用熵权法对 ILC2s 相关因子标准化处理后进行综合,并 logistic 回归分析 ILC2s 与糖尿病肾病血液透析患者是否存在 MS 的关系。各定量指标之间的关系比较应用 Pearson 相关性分析,检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 4 组研究对象 MS 相关临床指标比较

4 组研究对象的年龄和性别构成无明显差异。与健康对照组相比,糖尿病肾病血透组、2 型糖尿病组、非糖尿病肾病血透组患者均有较长的腰围( $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ),较多 MS 危险因素组分个数( $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ),较高的 MS 患病率( $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ),糖尿病肾病血透组、2 型糖尿病组患者 SBP、DBP、FBG 水平升高( $P=0.000, P=0.089; P=0.000, P=0.002; P=0.005, P=0.000$ ),HDL-C 水平降低( $P=0.000, P=0.000$ ),非糖尿病肾病血透组 SBP、DBP 水平升高( $P=0.000, P=0.000$ ),HDL-C 水平降低( $P=0.000$ );与 2 型糖尿病组相比,糖尿病肾病血透组患者有较高的 MS 患病率( $P=0.003$ ),较多 MS 危险因素组分个数( $P=0.000$ ),SBP 水平升高( $P=0.000$ ),而 TG、FBG 水平则降低( $P=0.001, P=0.000$ ),非糖尿病肾病血透组 SBP 水平升高( $P=0.000$ ),FBG 水平降低( $P=0.000$ );与非糖尿病肾病血透组比较,糖尿病肾病血透组患者有较高 MS 的患病率( $P=0.000$ ),较多的 MS 组分个数( $P=0.000$ ),FBG 水平升高( $P=0.001$ )。见表 2。

表 1 ILC2s 相关因子引物序列

基因	上游引物	下游引物
ROR $\alpha$	CTGACGAGGACAGGAGTAGG	GTGCGCAGACAGAGCTATTC
IL-17RB	CTTGGTGGCCTTCAACAAGC	AGAGCCCACCGTTCAATGTG
TI/ST2	AGATGAGTCACTGGCATACG	GAGAGGCTGGCTGTTGTATT
IL-13	GGCTGAGGTCTAAGCTAAGG	GACAGCTGGCATGTAAGTGTG
IL-5	ACTCTCCAGTGTGCCTATTC	CTGCTGATAGCCAATGAGAC
$\beta$ -actin	TGGCACCCAGCACAAATGAA	CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA

表 2 4 组研究对象代谢综合征相关临床指标比较

参数	健康对照组	2型糖尿病组	糖尿病肾病血透组	非糖尿病肾病血透组	$F/\chi^2$ 值	P 值
年龄(岁)	50.833 $\pm$ 6.086	51.000 $\pm$ 7.332	52.825 $\pm$ 5.118	52.600 $\pm$ 4.908	1.280	0.283
男/女	17/13	26/9	29/11	49/16	3.839	0.279
腰围(cm)	75.467 $\pm$ 6.580	85.886 $\pm$ 8.777	86.250 $\pm$ 6.084	85.138 $\pm$ 5.285	20.181	0.000
TG(mmol/L)	1.297 $\pm$ 0.574	2.613 $\pm$ 2.794	1.520 $\pm$ 0.894	1.744 $\pm$ 0.683	5.609	0.001
HDL-C(mmol/L)	1.485 $\pm$ 0.350	1.128 $\pm$ 0.256	1.098 $\pm$ 0.554	1.075 $\pm$ 0.261	9.528	0.000
SBP(mmHg)	118.000 $\pm$ 14.657	125.457 $\pm$ 11.743	151.950 $\pm$ 22.221	150.461 $\pm$ 17.952	37.846	0.000
DBP(mmHg)	71.333 $\pm$ 7.184	78.514 $\pm$ 5.987	82.25 $\pm$ 10.92	81.23 $\pm$ 10.08	10.029	0.000
FBG(mmol/L)	5.205 $\pm$ 0.412	10.503 $\pm$ 3.482	6.795 $\pm$ 3.285	5.187 $\pm$ 0.682	46.066	0.000
MS 组分个数	0.600 $\pm$ 0.724	2.571 $\pm$ 0.917	3.375 $\pm$ 0.838	2.446 $\pm$ 0.936	59.236	0.000
MS 患病率(%)	0	57.10	87.50	50.80	53.084	0.000

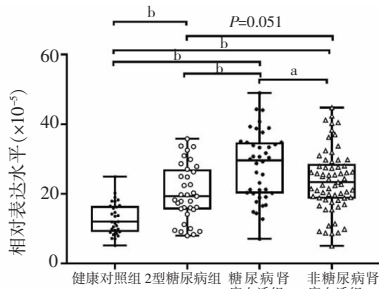
2.2 4 组研究对象 ILC2s 相关因子的比较及相关性分析

2.2.1 4 组研究对象 PBMC 中 ILC2s 相关因子表达水平比较  
与健康对照组相比,糖尿病肾病血透组患者 ILC2s 特征性转录因子维甲酸相关孤核受体  $\alpha$  (retinoic acid receptor related orphan receptor  $\alpha$ , ROR $\alpha$ ), 膜受体 T1/ST2、白细胞介素-17B (interleukin-17 B, IL-17B), 细胞因子白细胞介素-5 (interleukin 5, IL-5)、白细胞介素-13 (interleukin 13, IL-13) 的 mRNA 表达水平升高 ( $P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.004$ ), 2 型糖尿病组患者 ROR $\alpha$ 、T1/ST2、IL-17B、IL-5 的 mRNA 表达水平升高 ( $P=0.001, P=0.028, P=0.000, P=0.000$ ),

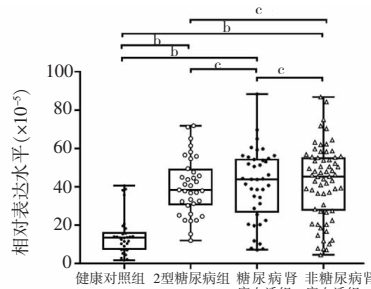
非糖尿病肾病血透组患者 ROR $\alpha$ 、T1/ST2、IL-17B、IL-5、IL-13 的 mRNA 表达水平升高 ( $P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.017$ ); 与 2 型糖尿病组相比,糖尿病肾病血透组患者转录因子 ROR $\alpha$ 、膜受体 T1/ST2、细胞因子 IL-5 的 mRNA 表达水平明显升高 ( $P=0.000, P=0.004, P=0.000$ ), 非糖尿病肾病血透组患者 ROR $\alpha$ 、T1/ST2、IL-5 的 mRNA 表达水平升高 ( $P=0.051, P=0.000, P=0.000$ ); 与非糖尿病肾病血透组比较,糖尿病肾病血透组患者转录因子 ROR $\alpha$  的 mRNA 表达水平升高 ( $P=0.013$ ); 糖尿病肾病血透组患者 ILC2s 相关细胞因子 IL-5、IL-13 的蛋白表达水平均较健康对照组升高 ( $P=0.012, P=0.076$ )。见表 3、图 1。

表 3 4 组研究对象外周血 ILC2s 相关因子的表达水平比较

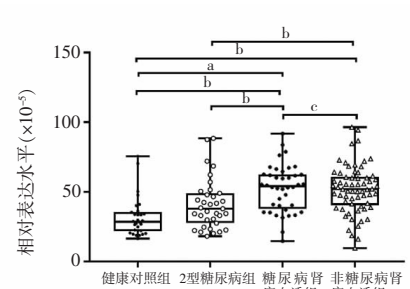
组别	ROR $\alpha$ ( $\times 10^{-5}$ )	T1/ST2 ( $\times 10^{-5}$ )	IL-17B ( $\times 10^{-5}$ )	IL-5 ( $\times 10^{-5}$ )	IL-13 ( $\times 10^{-5}$ )	IL-5 (pg/mL)	IL-13 (pg/mL)
健康对照组	12.952 $\pm$ 4.657	31.832 $\pm$ 14.096	14.837 $\pm$ 10.581	7.799 $\pm$ 2.449	42.198 $\pm$ 22.546	2.534 $\pm$ 0.936	29.799 $\pm$ 7.788
2型糖尿病组	20.324 $\pm$ 8.090	41.103 $\pm$ 17.912	40.462 $\pm$ 15.065	23.006 $\pm$ 9.984	49.542 $\pm$ 19.612	2.433 $\pm$ 1.066	30.775 $\pm$ 7.832
糖尿病肾病血透组	28.032 $\pm$ 9.876	52.564 $\pm$ 16.790	41.153 $\pm$ 18.816	34.965 $\pm$ 12.006	56.830 $\pm$ 22.577	3.113 $\pm$ 1.171	33.515 $\pm$ 9.058
非糖尿肾病血透组	23.803 $\pm$ 8.901	51.817 $\pm$ 17.349	42.469 $\pm$ 19.356	34.172 $\pm$ 12.083	53.127 $\pm$ 18.451	2.788 $\pm$ 0.681	32.627 $\pm$ 11.103
F 值	19.891	12.702	20.188	52.179	3.212	3.865	1.166
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.024	0.010	0.324



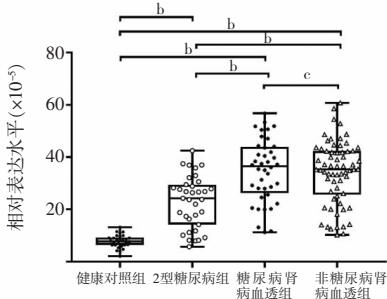
A. ROR $\alpha$  mRNA 表达水平比较



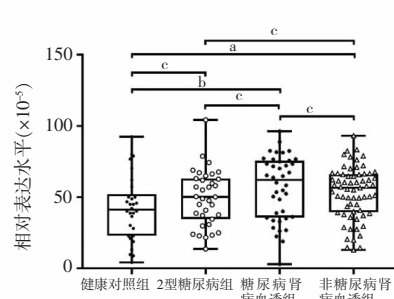
B. IL-17B mRNA 表达水平比较



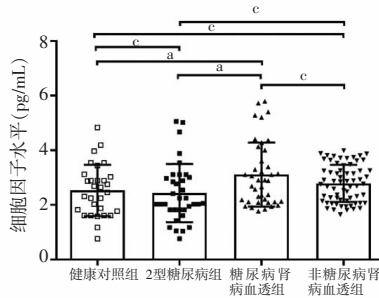
C. T1/ST2 mRNA 表达水平比较



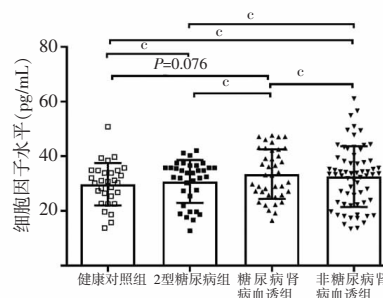
D. IL-5 mRNA 表达水平比较



E. IL-13 mRNA 表达水平比较



F. IL-5 蛋白表达水平比较



G. IL-13 蛋白表达水平比较

注: a,  $P<0.05$ ; b,  $P<0.01$ ; c: 无统计学差异

图 1 外周血 ILC2s 相关因子的表达水平比较

2.2.2 4 组研究对象 ILC2s 相关因子的关系 相关性分析提示,伴随着 ILC2s 特征性转录因子 ROR $\alpha$  的 mRNA 表达水平升高,膜受体 T1/ST2、IL-17B,细胞因子 IL-5、IL-13 的 mRNA 表达水平也升高,且 T1/ST2、IL-17B、IL-5、IL-13 的 mRNA 表达水平彼此分别呈正相关;ELISA 法检测的 4 组研究对象血浆 IL-5 和 IL-13 的蛋白表达水平呈正相关,如图 2 所示。

2.3 流式细胞术检测 ILC2s 的百分比

分离 PBMC 后,以 Lin<sup>-</sup>ICOS<sup>+</sup>ST2<sup>+</sup> Cells(%) 圈定 ILC2s 细胞,同时对 4 组研究对象阳性细胞百分比进行检测,健康对照组、2 型糖尿病组、糖尿病肾病血透组、非糖尿病肾病血透组 ILC2s 的百分比分别为(3.448  $\pm$  1.046)%、(9.919  $\pm$  0.489)%、(10.794  $\pm$  2.517)%及(9.804  $\pm$  0.872)%。与健康对照组比较,糖尿病肾病血透组、2 型糖尿病组及非糖尿病肾病血透组患者 ILC2s 的百分比均升高( $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ),差异具有统计学意义( $F=185.287, P=0.000$ );与 2 型糖尿病组比较,糖尿病肾病血透组患者的 ILC2s 的百分比升高( $P=0.009$ );与非糖尿病肾病血透组比较,糖尿病肾病血透组患者 ILC2s 的

百分比升高( $P=0.001$ ),如图 3 所示。

2.4 应用熵权法理论讨论 ILC2s 相关因子与所有研究对象“是否存在 MS”的关系

熵的概念源于热力学,是对系统状态不确定性的一种度量。熵值法是一种客观赋权方法。它通过计算指标的信息熵,根据指标的相对变化程度对系统整体的影响来决定指标的权重。由于应用实时荧光定量 PCR 检测 PBMC 中 ILC2s 相关因子的 mRNA 表达水平彼此存在正相关,故应用熵权法理论将各因子 mRNA 表达水平标准化处理后进行综合,得到综合变量 Z1,ELISA 法所测得的蛋白水平 IL-5、IL-13 彼此呈正相关,故用熵权法理论对两因子标准化处理后进行综合,得到综合变量 Z2,用获得的综合变量 Z1、Z2(表 4)与所有研究对象“是否存在 MS”的关系进行回归分析。与健康对照组比较,糖尿病肾病血透组患者综合变量 Z1、Z2 均升高( $P=0.000, P=0.036$ ),2 型糖尿病组、非糖尿病肾病血透组患者综合变量 Z1 均升高( $P=0.001, P=0.000$ );与 2 型糖尿病组比较,糖尿病肾病血透组患者综合变量 Z1、Z2 升高( $P=0.000,$

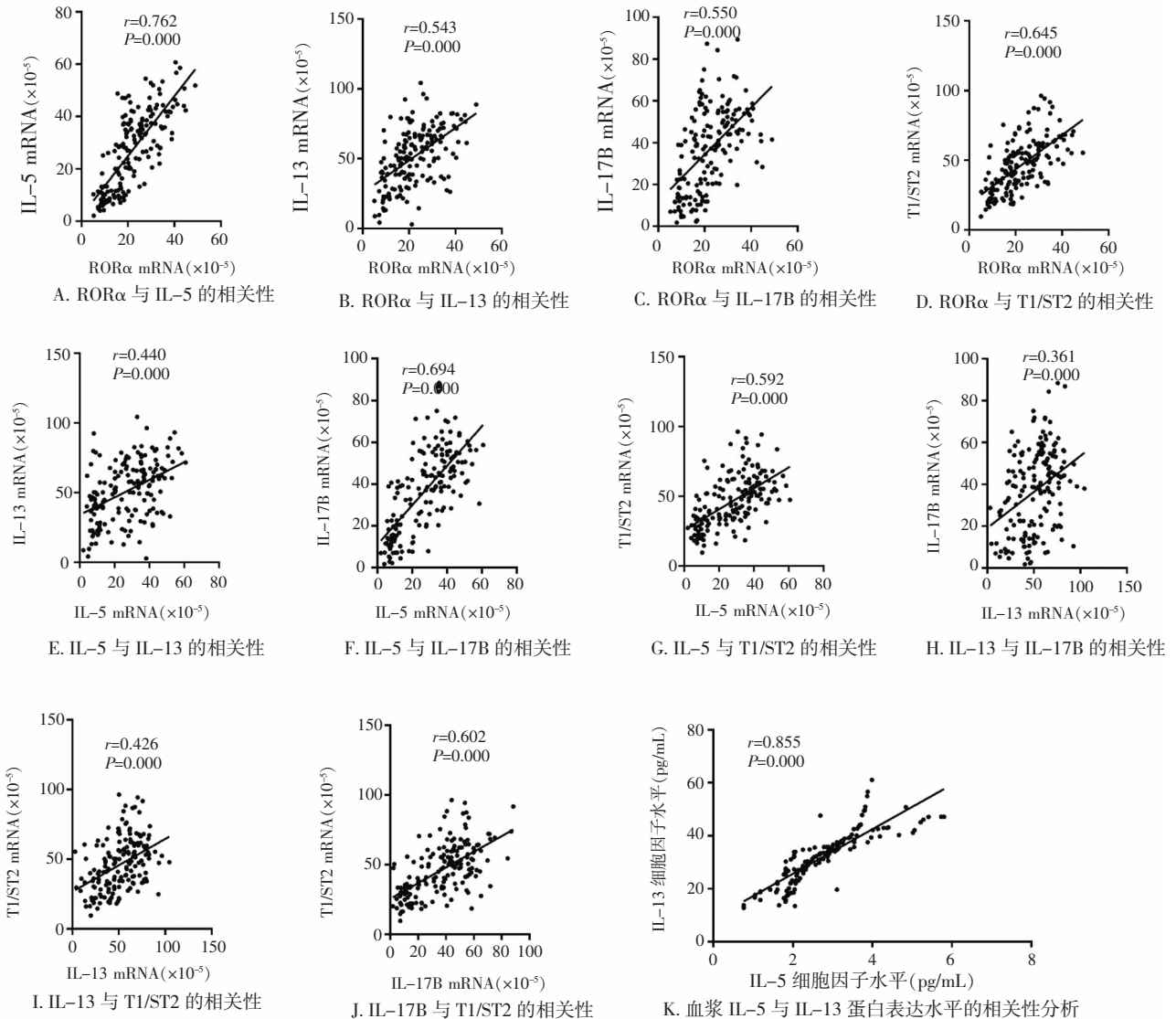


图 2 4 组研究对象 ILC2s 相关因子的关系

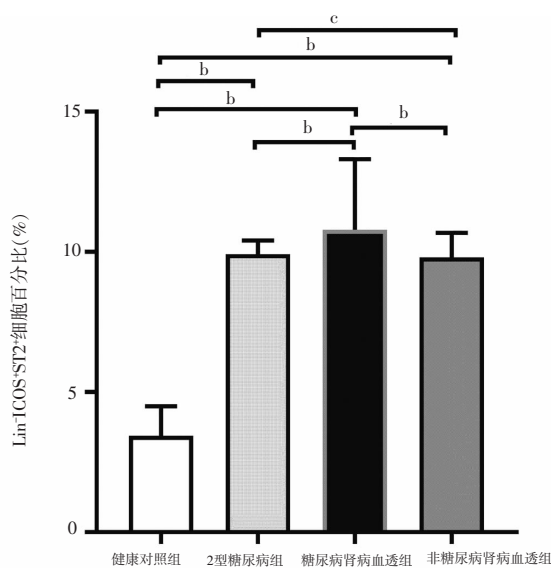
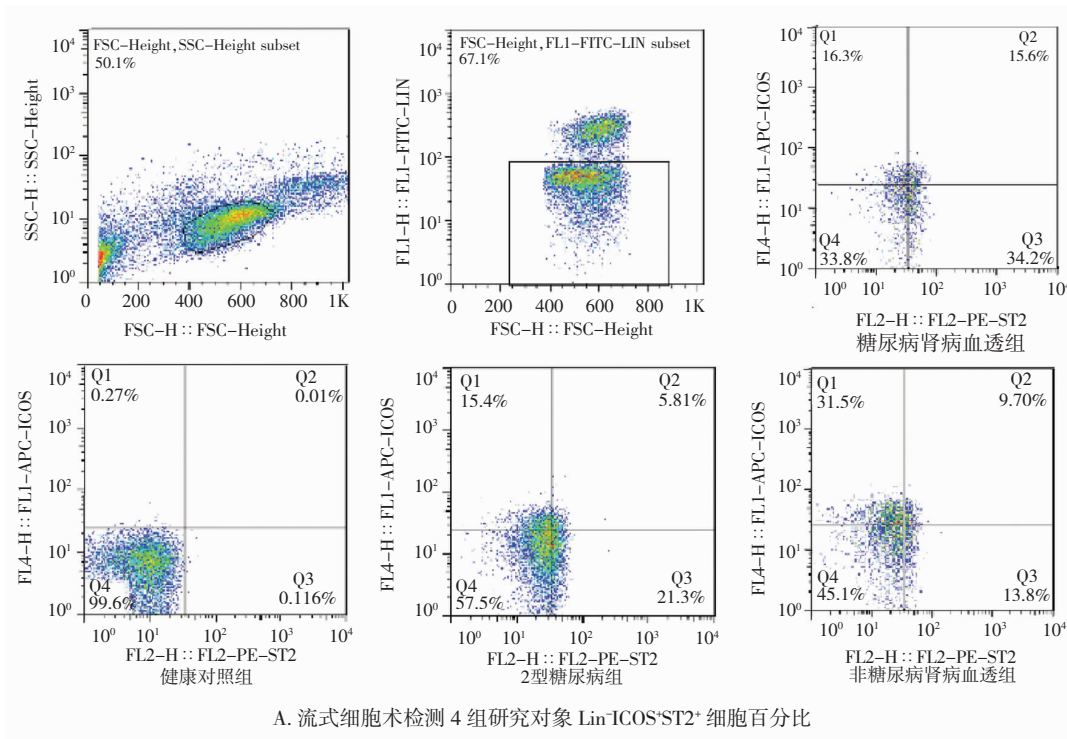
$P=0.031$ ), 非糖尿病肾病血透组患者综合变量  $Z1$  升高 ( $P=0.000$ )。

在分析前先将年龄进行分组, 30~40 岁为一组, 41~50 岁为一组, 51~60 岁为一组, 接下来分两步进行 logistic 回归: 首先运用独立样本  $t$  检验(对连续性变量  $Z1$ 、 $Z2$ )和卡方检验(对分类变量性别和年龄段)进行单因素分析, 探讨“性别”“年龄”对“是否存在 MS”的影响; 而后对经单因素分析有统计学意义(或接近统计学意义)的自变量进行 logistic 回归, 探求外周血 ILC2s 相关因子对所有研究对象“是否存在 MS”的影响, 如存在影响, 则进一步进行分组回归, 探讨 ILC2s 相

关因子对哪一组人群“存在 MS”的概率影响更大。

2.4.1 单因素分析 以  $Z1$  与  $Z2$  为变量, “是否存在 MS”为因变量, 探讨  $Z1$  和(或) $Z2$  与“是否存在 MS”的关系, 综合变量  $Z1$ : “Levene’s Test for Equality of Variances” $P=0.509$ , 方差具有齐次性,  $t$  减压(双尾) $P=0.000$ , 差异有统计学意义, 说明综合变量  $Z1$  对因变量“是否存在 MS”有显著影响; 综合变量  $Z2$ : “Levene’s Test for Equality of Variances” $P=0.519$ , 方差具有齐次性,  $t$  减压(双尾) $P=0.000$ , 差异有统计学意义, 说明综合变量  $Z2$  对“是否存在 MS”具有较大影响。

综上可得, ILC2s 相关因子 mRNA 表达水平和(或)蛋白



注: a,  $P < 0.05$ ; b,  $P < 0.01$ ; c: 无统计学差异

图 3 流式细胞术检测 4 组研究对象的 ILC2s 百分比

含量的升高对 4 组研究对象“是否存在 MS”有显著影响。

2.4.2 列联表分析(卡方检验) 以“性别”和“年龄”为变量,“是否存在 MS”为因变量,探讨性别和(或)年龄与“是否存在 MS”的关系(表 5、表 6)。

4 组研究对象的性别构成无明显差异( $\chi^2=3.839, P=0.279$ , 表 5), 性别与“是否存在 MS”的 Pearson 卡方对应的  $P=0.218$ , 说明性别与“是否存在 MS”无关。

故以  $Z_1$  和  $Z_2$  为自变量,“是否存在 MS”为因变量进行 logistic 回归分析, 结果提示伴随  $Z_1$  和  $Z_2$  的升高, 研究对象“存在 MS”的概率增加,  $Z_1$ 、 $Z_2$  分别代表 ILC2s 的 mRNA 表达水平和蛋白水平。换言之, ILC2s 相关因子的升高会导致“存在 MS”的概率增加。回归方程为  $\hat{P}$  (存在 MS) =  $\frac{\exp(-3.157+6.234Z_1+2.133Z_2)}{1+\exp(-3.157+6.234Z_1+2.133Z_2)}$ ; 回归分析结果如下(表 7)。

表 4 4 组研究对象综合变量  $Z_1$ 、 $Z_2$  分组比较结果

参数	健康对照组	2型糖尿病组	糖尿病肾病血透组	非糖尿病肾病血透组	F 值	P 值
$Z_1$	0.199 ± 0.083	0.306 ± 0.119	0.481 ± 0.151	0.455 ± 0.146	36.722	0.000
$Z_2$	0.352 ± 0.171	0.354 ± 0.175	0.447 ± 0.203	0.407 ± 0.184	2.252	0.084

表 5 4 组研究对象的性别构成情况

		健康对照组	2型糖尿病组	糖尿病肾病血透组	非糖尿病肾病血透组	合计
性别	男	计数	17	26	29	49
		组别中的 (%)	56.7	74.3	72.5	75.4
		性别中的 (%)	14.0	21.5	24.0	40.5
		总数的 (%)	10.0	15.3	17.1	28.8
	女	计数	13	9	11	16
		组别中 (%)	43.3	25.7	27.5	24.6
		性别中 (%)	26.5	18.4	22.4	32.7
		总数 (%)	7.6	5.3	6.5	9.4
合计	计数	30	35	40	65	170
	总数的 (%)	17.6	20.6	23.5	38.2	100

注: 4 组研究对象的年龄段分布无明显差异( $\chi^2=8.899, P=0.179$ ), 年龄与“是否存在 MS”的 Pearson 卡方对应的  $P=0.34$ , 说明年龄与“是否存在 MS”无关

表 6 4 组研究对象的年龄段分布情况

		健康对照组	2型糖尿病组	糖尿病肾病血透组	非糖尿病肾病血透组	合计	
年龄组(岁)	30~40	计数	2	3	0	5	
		年龄组中的 (%)	40.0	60.0	0.0	0.0	100.0
		组别中的 (%)	6.7	8.6	0.0	0.0	2.9
	41~50	计数	13	13	16	26	
		年龄组的 (%)	19.1	19.1	23.5	38.2	100.0
		组别中的 (%)	43.3	37.1	40.0	40.0	40.0
	51~60	计数	15	19	24	39	
		年龄组中的 (%)	15.5	19.6	24.7	40.2	100.0
		组别中的 (%)	50.0	54.3	60.0	60.0	57.1
合计	计数	30	35	40	65	170	
	总数的 (%)	17.6	20.6	23.5	38.2	100.0	

表 7 ILC2s 相关因子与“是否存在 MS”的 logistic 回归分析

	回归系数	标准误	统计量	自由度	P 值	风险	95%CI	
							下界	上界
$Z_1$	6.234	1.286	23.484	1	0.000	509.554	40.952	6 340.182
$Z_2$	2.133	1.084	3.873	1	0.049	8.444	1.009	70.692
常数	-3.157	0.586	29.053	1	0.000	0.043		

既然同上 ILC2s 相关因子的升高会导致“存在 MS”的概率增加,接下来进行分组 logistic 回归分析,探讨 ILC2s 对哪一组研究对象影响效果更明显(因为健康对照组 MS 的患病率为 0,故不在讨论之列),结果发现 2 型糖尿病组、糖尿病肾病血透组、非糖尿病肾病血透组的 Z1 和 Z2 的系数均为正,但是糖尿病肾病血透组系数最大,Z1 系数为 11.344,Z2 的系数为 7.830,在糖尿病肾病血透组中,Z1 和 Z2 对“是否存在 MS”影响最大。

2.5 ILC2s 与糖尿病肾病血液透析组患者 MS 各危险因素组分的关系

在对健康对照组、2 型糖尿病组、糖尿病肾病血透组、非糖尿病肾病血透组这 4 组研究对象的分别比较中发现,糖尿病肾病血透组患者相对于其他 3 组研究对象具有较多的“MS 危险因素组分个数”,较高的“存在 MS”的概率,ILC2s 相关因子的 mRNA 及蛋白表达水平均增加;该结论与熵权法对所有研究对象的分析讨论结果相一致,故本部分进一步讨论

ILC2s 与终末期糖尿病肾病患者哪些 MS 危险因素组分有关系。

2.5.1 糖尿病肾病血液透析组患者 ILC2s 相关因子的关系 糖尿病肾病血透组患者 ILC2s 特征性转录因子 ROR $\alpha$  的 mRNA 表达水平与膜受体 T1/ST2、IL-17RB,细胞因子 IL-5、IL-13 的 mRNA 表达水平呈正相关,T1/ST2、IL-17RB、IL-5、IL-13 的 mRNA 表达水平彼此也分别呈正相关,与之前对 4 组所有研究对象的分析结果一致。ELISA 法所测定的糖尿病肾病血透组患者血浆 IL-5 和 IL-13 的蛋白表达水平彼此呈正相关,与之前对 4 组所有研究对象的分析结果一致。如图 4 所示。

2.5.2 ILC2s 与糖尿病肾病血液透析组患者 MS 各危险因素组分的相关性分析 由于终末期糖尿病肾病组患者 ILC2s 相关因子彼此呈正相关,与对所有研究对象的分析结果一致,故仍利用熵权法对终末期糖尿病肾病组患者 ILC2s 相关的 5 个因子的 mRNA 表达水平标准化后进行综合,得到综合变量

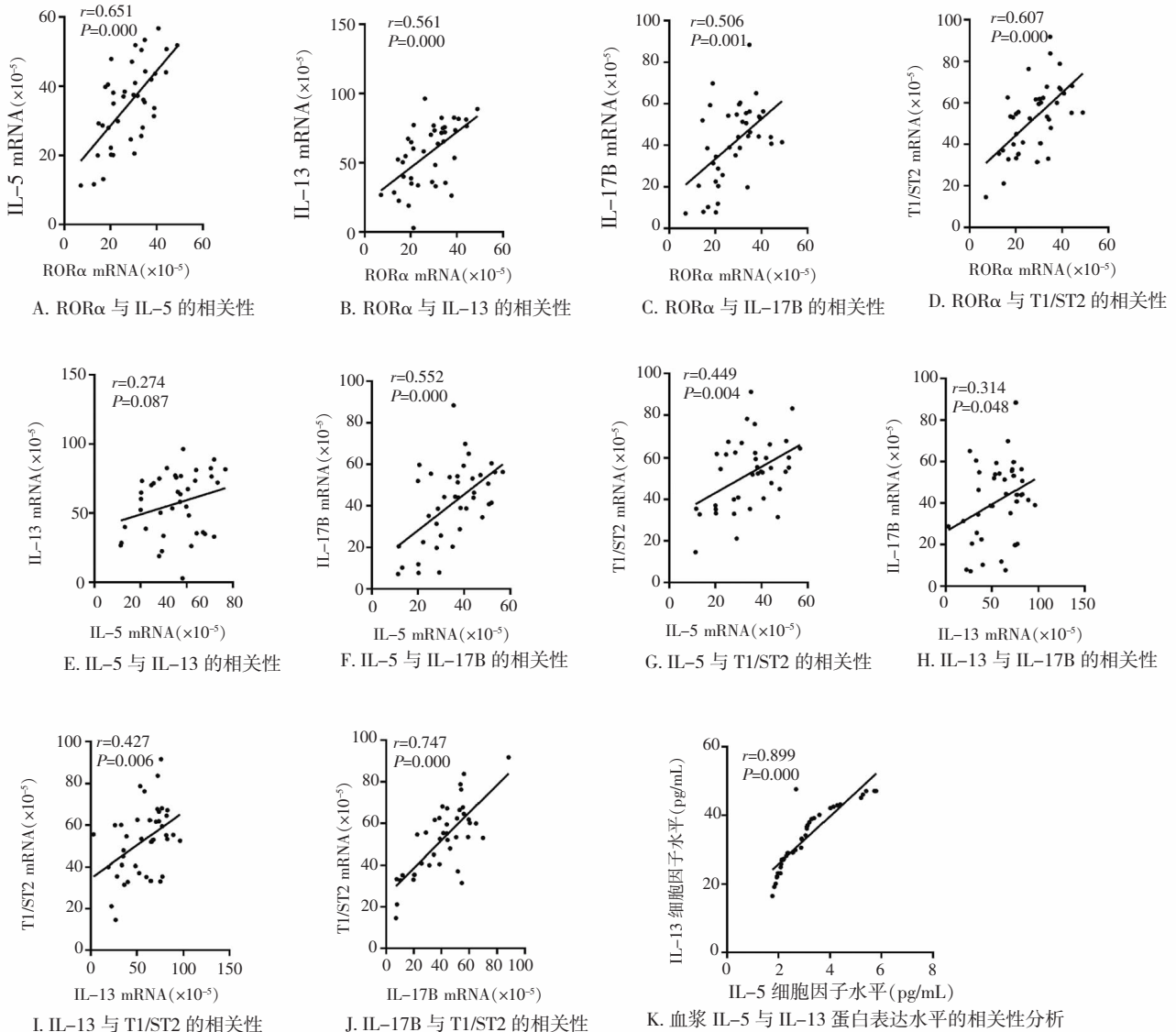


图 4 糖尿病肾病血液透析组患者 ILC2s 相关因子的关系



$Z1_{DN}$ , 将血浆细胞因子 IL-5 和 IL-13 蛋白表达水平标准化进行综合, 得到综合变量  $Z2_{DN}$ , 接下来, 应用综合变量  $Z1_{DN}$  和  $Z2_{DN}$  与 MS 各危险因素组分的关系进行讨论。

综合变量  $Z1_{DN}$  和  $Z2_{DN}$  分别与终末期糖尿病肾病血液透析患者腰围和 TG 呈正相关, 即 ILC2s 可能通过对腹型肥胖和血脂的影响而参与了终末期糖尿病肾病血液透析患者 MS 状态的形成。如图 5 所示。

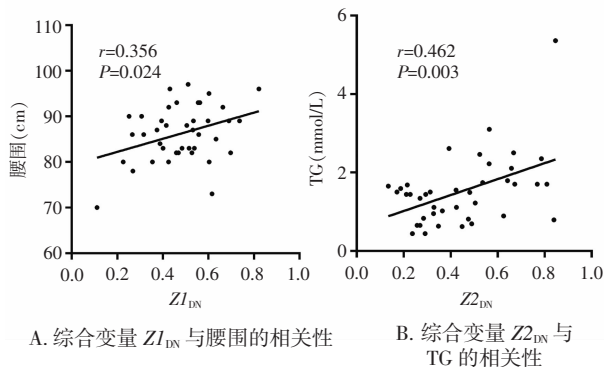


图 5 糖尿病肾病血液透析患者 ILC2s 与代谢综合征各危险因素组分的相关性分析

### 3 讨论

全世界面临着透析人群迅速增长的趋势。据统计, 2015 年全球透析人数为 280 万人, 比 2014 年增长 6%。预计至 2030 年全球透析人数将增长至 648 万人左右, 新增的患者主要来源于以中国为代表的亚太地区, 其中糖尿病肾病是近年来终末期肾脏病患者中增长最快的原发病之一<sup>[8-10]</sup>。针对糖尿病肾病血液透析人群的机制学研究, 对血液透析人群整体均有着深远意义。

糖尿病肾病的整个病程中均伴有糖代谢紊乱, 同时脂质代谢异常、高血压等发生率也较高, 这些均是 MS 的危险因素组分及相关因素。本研究发现, 2 型糖尿病患者、糖尿病肾病血液透析患者、非糖尿病肾病血液透析患者代谢综合症的患病率均较健康对照组明显升高, 与以往研究结果一致<sup>[11-13]</sup>。其中, 糖尿病肾病血液透析患者 MS 的患病率升高尤为显著。故本研究从“MS”这一整体概念出发进行机制学研究, 探讨 ILC2s 对糖尿病肾病血液透析患者 MS 状态的可能影响。

Th1/Th2 细胞平衡状态对机体免疫稳态的调节中起到重要作用。Libetta 等<sup>[14]</sup>研究提出终末期肾脏病

可表现为 Th2 优势活化状态, 接下来许多研究也得到了相似的结论<sup>[2-3, 14]</sup>。ILC2s 是激活并维持 Th2 型细胞免疫应答的天然免疫细胞, 在连接天然免疫系统和适应性免疫系统中起到桥梁作用<sup>[4]</sup>。既往针对 ILC2s 的研究, 多集中在如支气管哮喘、寄生虫感染、特异性皮炎等慢性过敏性及炎症性疾病<sup>[15-18]</sup>。近年来, 许多研究发现 ILC2s 在促进白色脂肪棕色化上也具有重要的调节作用<sup>[19-21]</sup>。接受维持性血液透析治疗的终末期糖尿病肾脏病患者机体内同时存在脂质代谢紊乱和慢性炎症状态, ILC2s 在该类患者机体内活性状态如何? 目前, 国内外针对血液透析及糖尿病肾病体内 ILC2s 状态的研究报道不多; 针对 ILC2s 相关因子与终末期糖尿病肾病糖脂代谢紊乱等的关系研究, 也鲜见报道。

ILC2s 活化的主要途径是在接受 IL-33 或 IL-25 刺激后, 通过与 ILC2s 表面的特异性受体 T1/ST2 或 IL-17B 的结合, 刺激其产生和分泌 IL-5 和 (或) IL-13, ILC2s 特征性的核转录因子 ROR $\alpha$  也同时表达上调<sup>[22]</sup>。本研究在对 ILC2s 相关因子的分组比较中发现, 血液透析患者尤其是糖尿病肾病血液透析患者 ILC2s 相关因子的 mRNA 及蛋白表达水平大部分较健康对照组升高, 提示 ILC2s 在糖尿病肾病血液透析患者机体内表现为优势活化状态, 与既往对终末期肾脏病的研究结果基本一致。

为研究 ILC2s 与糖尿病肾病血液透析患者机体内 MS 状态的关系, 本研究首先对所有研究对象实时荧光定量 PCR 检测的 PBMC 中 ILC2s 相关因子的 mRNA 表达水平标准化后应用熵权法进行综合, 得到综合变量  $Z1$ 。然后, 将 ELISA 法所测得的蛋白水平 ILC2s 相关血浆细胞因子 IL-5、IL-13 标准化后用熵权法进行综合, 得到综合变量  $Z2$ 。此后进行 logistic 回归分析发现, ILC2s 对所有研究对象“是否存在 MS”有显著影响, 且伴随着 ILC2s 相关因子 mRNA 和 (或) 蛋白含量的升高, 所有研究对象“存在 MS”的概率增加。这一趋势在糖尿病肾病血液透析组患者中表现最明显。该结果与本文分组讨论的结果相一致, 进一步说明糖尿病肾病血液透析患者机体内存在 ILC2s 活性增强状态, 且 ILC2s 活性增强参与了终末期糖尿病肾病患者 MS 状态的形成。

本研究进一步分析了 ILC2s 的活性状态与糖

尿病肾病血液透析患者 MS 各危险因素组分的关系,结果显示糖尿病肾病血液透析组患者 ILC2s 与腰围、TG 水平呈正相关。由此推测,ILC2s 相关因子活性增强可能通过对患者腹型肥胖和对脂质代谢的影响参与终末期糖尿病肾病患者 MS 状态的形成。

综上所述,“代谢综合征”状态在终末期糖尿病肾病血液透析患者中广泛存在。ILC2s 相关因子在该类患者机体内表现为活性增强状态,且 ILC2s 相关因子的活性增强可能通过对腹型肥胖和血脂的影响而参与终末期糖尿病肾病患者“代谢综合征”多个危险因素组分异常聚集状态的形成,从免疫的角度对终末期糖尿病肾病患者机体内的代谢紊乱状态这一整体进行干预,尤其对体脂分布状态的有效干预和治疗将为临床上对血液透析领域精准治疗方案的制定及实施提供新的思路和有益的补充。

### 参 考 文 献

- [1] Libetta C, Rampino T, Dal-Canton A. Polarization of T-helper lymphocytes toward the Th2 phenotype in uremic patients[J]. *Am J Kidney Dis*, 2001, 38(2): 286–295.
- [2] 袁 瑾, 牛建英, 孙吉平. 重组人生长激素对慢性肾衰竭患者 T 淋巴细胞的免疫调节作用[J]. *山西医科大学学报*, 2015, 46(2): 139–143.
- [3] 孙占朋, 李 欣, 杨 焰, 等. ILC2 通过激活 STAT6 和分泌 IL-13 调节慢性肾功能衰竭患者的免疫功能[J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(7): 1301–1305.
- [4] Leslie M. Immunology. Crossover immune cells blur the boundaries[J]. *Science*, 2012, 336(6086): 1228–1229.
- [5] Martinez-Gonzalez I, Steer CA, Takei F. Lung ILC2s link innate and adaptive responses in allergic inflammation[J]. *Trends Immunol*, 2015, 36(3): 189–195.
- [6] Bouchery T, Kyle R, Camberis M, et al. ILC2s and T cells cooperate to ensure maintenance of M2 macrophages for lung immunity against hookworms[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6970.
- [7] Ding X, Luo Y, Zhang X, et al. IL-33-driven ILC2/eosinophil axis in fat is induced by sympathetic tone and suppressed by obesity[J]. *J Endocrinol*, 2016, 231(1): 35–48.
- [8] 张伟明, 钱家麒. 上海市透析登记及其结果分析[J]. *中国血液净化*, 2012, 11(5): 233–236.
- [9] 赵新菊, 王 琰, 甘良英, 等. 北京市新增维持性血液透析患者的人口统计学及病因构成的变迁[J]. *中国血液净化*, 2014, 3(13): 185–189.
- [10] 徐冷楠, 赵 班, 王海涛, 等. 单中心 20 年间维持性血液透析患者首次透析原因分析[J]. *中国血液净化*, 2017, 16(3): 162–166.
- [11] 林 沁, 项协隆, 庄永泽, 等. 慢性肾功能不全非透析患者代谢综合征的发生率[J]. *中华高血压杂志*, 2011, 19(9): 873–877.
- [12] 王旭亮, 陈江华. 维持性血透患者代谢综合征患病率分析[J]. *中国保健营养*, 2017, 27(28): 1004–7484.
- [13] 谭锦玲. 代谢综合征与 2 型糖尿病慢性并发症的相关性探讨[J]. *中国现代医生*, 2017, 55(14): 41–43.
- [14] Moser B, Roth G, Brunner M, et al. Aberrant T cell activation and heightened apoptotic turnover in endstage renal failure patients; a comparative evaluation between non-dialysis, haemodialysis, and peritoneal dialysis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 308(3): 581–585.
- [15] 袁琳洁, 陈诗皓, 安 高, 等. IL-33 诱导的小鼠过敏原非依赖性哮喘样模型肺组织免疫细胞及亚群的变化[J]. *首都医科大学学报*, 2016, 37(5): 561–567.
- [16] Zheng H, Zhang X, Castillo EF, et al. Leptin enhances TH2 and ILC2 responses in allergic airway disease[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(42): 22043–22052.
- [17] Bouchery T, Kyle R, Camberis M, et al. ILC2s and T cells cooperate to ensure maintenance of M2 macrophages for lung immunity against hookworms[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6970–6970.
- [18] Imai Y, Yasuda K, Sakaguchi Y, et al. Skin-specific expression of IL-33 activates group 2 innate lymphoid cells and elicits atopic dermatitis-like inflammation in mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(34): 13921–13926.
- [19] Lee MW, Odegaard JI, Mukundan L, et al. Activated type 2 innate lymphoid cells regulate beige fat biogenesis[J]. *Cell*, 2015, 160(1–2): 74–87.
- [20] Rao RR, Long JZ, White JP, et al. Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis[J]. *Cell*, 2014, 157(6): 1279–1291.
- [21] Brestoff JR, Kim BS, Saenz SA, et al. Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity[J]. *Nature*, 2015, 519(7542): 242–246.
- [22] Wong SH, Walker JA, Jolin HE, et al. Transcription factor ROR $\alpha$  is critical for nuocyte development[J]. *Nat Immunol*, 2012, 13(3): 229–236.

(责任编辑:唐秋姗)