

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.19.005

白细胞介素-35 与 2 型糖尿病患者并发血管病变的相关性分析*

庄 岚¹, 崔世维², 于建秀¹, 朱静和^{3△}

1. 江苏省盐城市滨海县人民医院检验科, 江苏盐城 224500; 2. 南通大学附属医院
内分泌科, 江苏南通 226000; 3. 江苏省盐城市滨海县人民医院内分泌科, 江苏盐城 224500

摘 要:目的 探讨白细胞介素(IL)-35 与 2 型糖尿病(T2DM)患者并发血管病变的相关性。方法 选取 60 例 T2DM 并发动脉粥样硬化(AS)患者纳入 T2DM+AS 组, 60 例 T2DM 无 AS 患者纳入 T2DM 组, 同时选择门诊健康体检人员 60 例纳入对照组。采用 Luminex200 流式荧光检测分析仪测定 3 组研究对象血清 IL-35 水平。结果 与对照组[8.13(3.90~10.16)μg/L]相比, T2DM 组[4.01(2.24~7.69)μg/L]和 T2DM+AS 组[2.52(2.01~6.41)μg/L]血清 IL-35 水平降低, 且 T2DM+AS 组降低更明显, 明显低于 T2DM 组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。Spearman 相关分析提示 T2DM+AS 组患者血清 IL-35 水平与颈动脉内膜中层厚度(cIMT)呈负相关($r=-0.357\ 2, P=0.005\ 1$); 血清低密度脂蛋白胆固醇、空腹血糖、C 反应蛋白水平与 cIMT 呈正相关($r=0.341\ 4, P=0.007\ 6; r=0.275\ 8, P=0.033\ 0; r=0.352\ 2, P=0.005\ 8$)。Logistic 回归分析提示 IL-35 可能是 T2DM 是否伴 AS 的保护因素。结论 提高糖尿病患者血清 IL-35 水平, 可能是预防 T2DM 并发 AS 的可选途径之一。

关键词:白细胞介素-35; 2 型糖尿病; 颈动脉内膜厚度; 动脉粥样硬化

中图分类号:R543.4

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)19-2767-04

Correlation between interleukin-35 and vascular lesions in type 2 diabetes mellitus patients*

ZHUANG Lan¹, CUI Shiwei², YU Jianxiu³, ZHU Jinghe^{3△}

1. Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Binhai County, Yancheng, Jiangsu 224500, China; 2. Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226000, China; 3. Department of Endocrinology, People's Hospital of Binhai County, Yancheng, Jiangsu 224500, China

Abstract:Objective To investigate the correlation between interleukin-35 (IL-35) and vascular lesions in type 2 diabetes mellitus (T2DM) patients. **Methods** A total of 60 patients with T2DM without atherosclerosis (AS) were enrolled into T2DM group, and 60 patients with T2DM and AS were enrolled into T2DM+AS group, and 60 healthy person were selected as control group. The serum concentration of IL-35 was detected by Luminex200 in three groups. **Results** Compared to that of control group [8.13(3.90~10.16)μg/L], the serum concentration of IL-35 was lower in T2DM group [4.01(2.24~7.69)μg/L], and even lower in T2DM+AS group [2.52(2.01~6.41)μg/L]. The serum concentration of IL-35 correlated negatively with intima-media thickness (cIMT) in T2DM+AS patients ($r=-0.357\ 2, P=0.005\ 1$), however, there were positive correlations between the serum concentration of low density lipoprotein cholesterol, fasting plasma glucose, C-reactive protein with cIMT ($r=0.341\ 4, P=0.007\ 6; r=0.275\ 8, P=0.033\ 0; r=0.352\ 2, P=0.005\ 8$). Logistic regression analysis suggested that IL-35 might be a protective factor for T2DM with AS. **Conclusion** To increase the serum IL-35 concentration in T2DM patients, which might be one of the alternative way to prevent T2DM complicated with AS.

Key words:interleukin-35; type 2 diabetes; carotid intima thickness; atherosclerosis

2 型糖尿病(T2DM)是一种以轻度慢性炎症、高血糖、高脂血症和胰岛 β 细胞功能障碍为主要特征的临床综合征^[1], 也被认为是动脉粥样硬化(AS)发生、发展的一个重要危险因素^[2]。并发血管病变已成为

* 基金项目:南京医科大学江苏康达医药卫生发展研究院科研立项(2017NJMKUD022)。

作者简介:庄岚,女,主管技师,主要从事临床检验研究。△ 通信作者,E-mail:18961911898@163.com。

T2DM 患者发病和死亡的主要原因之一。颈动脉是 AS 最常发生的血管,也可作为测量的窗口。白细胞介素(IL)-35 是一种具有抗炎性能的细胞因子,已被证明可抑制多种炎症性疾病的发生、发展^[3]。但 IL-35 在 T2DM 并发 AS 中的作用仍然有待研究。本研究通过分析 IL-35 与 T2DM 患者血管病变的相关性,探讨其在 T2DM 并发 AS 疾病过程中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将 2018 年 7—11 月在滨海县人民医院内分泌科诊断为 T2DM 的 120 例患者作为研究对象,其中 60 例 T2DM 并发 AS 患者纳入 T2DM+AS 组,60 例 T2DM 无 AS 患者纳入 T2DM 组。另选择同期门诊健康体检者 60 例纳入对照组。T2DM 诊断与分类参照《中国 2 型糖尿病防治指南》^[4],有高血糖症状(口干、口渴、多尿和体质量减轻)和随机血糖 ≥ 11.1 mmol/L,或空腹血糖(FPG) ≥ 7.0 mmol/L,或标准化口服葡萄糖耐量试验餐后 2 h 血糖 ≥ 11.1 mmol/L。排除标准:严重的肝、肾功能障碍者;心功能等级 3~4 级者;系统性免疫疾病患者;慢性炎症性疾病或肿瘤患者;严重糖尿病并发症或 2 个月内处于急性应激状态者;服用过他汀类药物者。对照组中男 30 例,女 30 例;平均年龄(52.5 ± 4.5)岁。T2DM 组中男 30 例,女 30 例;平均年龄(52.3 ± 4.2)岁。T2DM+AS 组中男 31 例,女 29 例,平均年龄(53.7 ± 5.6)岁。3 组研究对象性别构成比、平均年龄比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。研究对象本人或家属均自愿参与本研究,并签署知情同意书,本研究获得本院伦理委员会批准后进行。

1.2 仪器与试剂 EMD Millipore 公司细胞因子 IL-35 检测试剂盒;Luminex 公司 Luminex200 流式荧光检测分析仪,日本东芝彩色多普勒超声诊断仪,美国雅培 I1000 全自动免疫分析仪,Olympus AU2700 全自动生化分析仪及配套检测试剂。

1.3 方法

1.3.1 基本资料收集 收集所有研究对象体质量指数(BMI)、收缩压(SBP)、舒张压(DBP)等资料。

1.3.2 血液标本检测 采集所有研究对象空腹肘静脉血 4 mL,其中 2 mL 血液标本采用 Olympus AU2700 全自动生化分析仪检测 FPG、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、糖化血红蛋白(HbA1c)、C 反应蛋白(CRP)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)等指标。2 mL 血液标本立即 $1\,000 \times g$ 离心 10 min,收集血清,存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,采用 Luminex 200 流式荧光检测分析仪检测 IL-35 水平,检测前需将样品完全融化并充分混匀,所有操作严格按照试剂说明书进行,每份标本检测两次,取均值。采用雅培 I1000 全自动生化分析仪检测胰岛

素(INS)水平。

1.3.3 颈总动脉超声检查 患者平卧休息约 10 min,患者的头部取与测量方向相反的方向,采用彩色多普勒超声诊断仪测量患者颈总动脉、颈动脉分叉、颈外动脉和颈内动脉任何节段中的颈动脉内膜中层厚度(cIMT),在两侧各测 2 个点,取平均值。颈动脉斑块形成或 $cIMT > 0.9$ mm 定义为颈部 AS 病变。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行统计学分析,呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,多组间中的两两比较采用 SNK-*q* 检验;偏态分布计量资料以中位数(百分位数) $[M(P_{25} \sim P_{75})]$ 表示,多组间比较采用 Kruskal-wallis 检验,多组间中的两组比较采用 Mann-Whitney U 检验;计数资料以例数或率表示,组间比较采用 χ^2 检验;相关分析采用 Pearson 相关;AS 影响因素分析采用 Logistic 回归分析,以 T2DM 是否伴有 AS 为因变量(1=伴 AS,0=不伴 AS),以 SBP、DBP、INS、TG、TC、HDL-C、LDL-C、HbA1c、FPG、CRP、IL-35 为自变量做二元 Logistic 回归分析,自变量进入方法采用前进法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组研究对象各项临床资料比较 与对照组比较,T2DM 组和 T2DM+AS 组 SBP、DBP、FPG、INS、TC、TG、LDL-C、HbA1c、CRP 及 cIMT 升高,HDL-C 降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。TC、TG、HbA1c、LDL-C 及 cIMT 在 T2DM+AS 组升高更明显,HDL-C 降低更明显,T2DM+AS 组与 T2DM 组相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 3 组研究对象血清 IL-35 水平比较 对照组、T2DM 组及 T2DM+AS 组血清 IL-35 水平分别为 $8.13(3.90 \sim 10.16)$ 、 $4.01(2.24 \sim 7.69)$ 、 $2.52(2.01 \sim 6.41)$ $\mu\text{g/L}$ 。与对照组比较,T2DM 组及 T2DM+AS 组血清 IL-35 水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),且 T2DM+AS 组 IL-35 水平降低更明显,与 T2DM 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 T2DM+AS 组患者各指标与 cIMT 的相关性分析 T2DM+AS 组患者血清 IL-35 水平与 cIMT 呈负相关($r = -0.357\,2, P = 0.005\,1$);血清 LDL-C、FPG、CRP 水平与 cIMT 呈正相关($r = 0.341\,4, P = 0.007\,6; r = 0.275\,8, P = 0.033\,0; r = 0.352\,2, P = 0.005\,8$)。见图 1。

2.4 影响 T2DM 伴 AS 的 Logistic 多因素回归分析 通过 Logistic 回归分析发现,IL-35 和 LDL-C 是影响 T2DM 伴 AS 的主要因素($P < 0.05$)。IL-35 和 LDL-C 的比值比(OR)分别为 $0.621、13\,685.407; 95\%CI$ 分别为 $0.412 \sim 0.938、233.870 \sim 800\,832.250$ 。说明 IL-35 可能是 T2DM 是否伴 AS 的保护因素,LDL-C

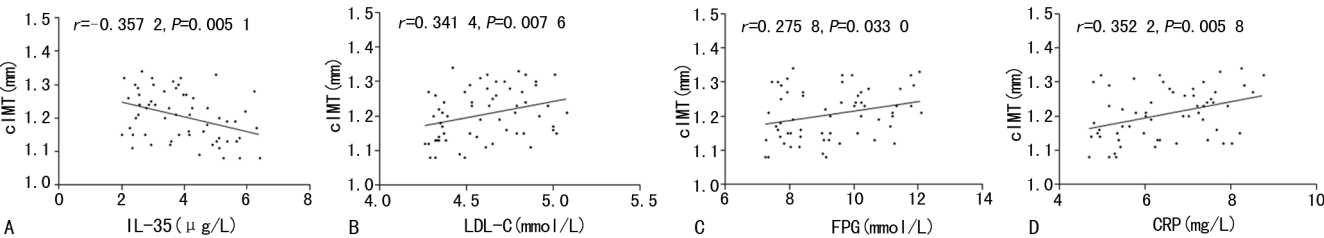
可能是 T2DM 是否伴 AS 的危险因素,结果见表 2。

表 1 3 组研究对象各项临床资料比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	BMI(kg/m ²)	SBP(mm Hg)	DBP(mm Hg)	FPG(mmol/L)	INS(mIU/mL)	TC(mmol/L)
对照组	60	23.67±2.96	131.00±9.40	73.00±5.80	5.12±0.67	9.25±1.54	4.58±0.61
T2DM 组	60	24.53±3.13	136.00±11.30*	75.00±6.70*	9.57±2.27*	10.57±2.65*	5.72±0.72*
T2DM+AS 组	60	24.85±3.22	138.00±11.60*	76.00±6.60*	9.68±2.43*	11.21±2.76*	6.19±0.52*△
F/χ ²		2.317	6.674	3.440	105.900	10.570	106.300
P		0.102	0.002	0.034	<0.001	<0.001	<0.001

组别	n	TG(mmol/L)	HDL-C(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)	HbA1c(%)	CRP(mg/L)	cIMT(mm)
对照组	60	1.35±0.27	1.73±0.260	2.65±0.52	5.36±2.03	1.02±0.11	0.52±0.04
T2DM 组	60	1.63±0.36*	1.50±0.15*	4.13±0.36*	8.24±2.88*	6.29±1.11*	0.87±0.08*
T2DM+AS 组	60	2.13±0.42*△	1.15±0.20*△	4.67±0.41*△	10.70±3.54*△	6.73±2.04*	1.21±0.13*△
F/χ ²		74.170	118.000	346.500	51.540	336.100	860.500
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与 T2DM 组比较,△ $P<0.05$



注:A 为 IL-35 与 cIMT 的相关性分析;B 为 LDL-C 与 cIMT 的相关性分析;C 为 FPG 与 cIMT 的相关性分析;D 为 CRP 与 cIMT 的相关性分析

图 1 T2DM+AS 组患者各项指标与 cIMT 的相关性分析

表 2 IL-35、LDL-C 与 T2DM 伴 AS 的关系

变量	β	SE	P	OR	95%CI
IL-35	-0.047	0.210	0.024	0.621	0.412~0.938
LDL-C	9.524	2.076	0.000	13 685.407	233.870~800 832.250

3 讨论

T2DM 的慢性并发症可分为大血管并发症和微血管并发症,大血管并发症包括心脑血管和外周动脉疾病,微血管并发症最常见的是视网膜病变、肾脏病变和神经病变。随着这些慢性并发症发生率的增加,T2DM 患者的病死率也随之增加^[5]。颈动脉是 AS 最常受影响的血管,可作为测量的窗口。AS 的早期症状包括颈动脉内膜层厚度增加。超声测量 cIMT 可反映早期 AS 和血管重构状态。

IL-35 是由 CD4⁺ Foxp3⁺ T 调节细胞(Tregs)产生的新型抑制性细胞因子,是 Tregs 发挥抑制功能所必需的细胞因子^[6-7]。IL-35 是 IL-12 细胞因子家族中新确定的异二聚体蛋白,由 IL-12 p35 和 EBI3 亚基组成,是具有抗炎性能的细胞因子^[8]。有研究表明,IL-35 参与炎症性肠病、自身免疫性糖尿病、关节炎、自身免疫性脑脊髓炎和气道炎症等多种炎症性疾病的过程。本研究发现,T2DM 组及 T2DM+AS 组患

者血清中 IL-35 水平降低,且 T2DM+AS 组患者血清 IL-35 下降更明显,可能是由于 T2DM 患者外周血中 Treg 细胞比例明显降低,分泌 IL-35 减少^[9]。LIN 等^[10]发现急性冠状动脉综合征患者 IL-35 水平下降。动物实验发现 IL-35 在具有 AS 病变的载脂蛋白 E 敲除(ApoE^{-/-})小鼠中呈现低水平表达^[11]。这些研究表明 IL-35 可能参与 T2DM 并发 AS 的发展。

此外,Spearman 相关分析发现 T2DM+AS 组患者血清 IL-35 水平与 cIMT 呈负相关;血清 LDL-C、FPG、CRP 水平与 cIMT 呈正相关。Logistic 回归分析发现,IL-35 可能是 T2DM 是否伴 AS 的保护因素,LDL-C 可能是 T2DM 是否伴 AS 的危险因素,提示 T2DM 患者 AS 的发生可能与 IL-35 生物学作用减弱有关。AS 是动脉的慢性炎症性疾病,涉及炎症和自身免疫过程^[12]。研究 IL-35 在 AS 发展中的作用的最早报道之一来自于通过免疫组化检测人 AS 病变中 IL-35 亚基的表达,发现在损伤的内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞中能检测到 IL-35 EBI3 亚基^[13]。遗传学研究表明 IL-35 与 AS 疾病中早期冠状动脉疾病的风险降低有关^[14]。总之,这些结果表明,IL-35 是 AS 病变中有潜在价值的生物标志物,也可能作为治疗 AS 的潜在治疗靶点。在 ApoE^{-/-}小鼠 AS 模型中,发现 IL-35 的外源性治疗能明显减轻 ApoE^{-/-}小鼠 AS

病变^[15],也支持了这一观点。

综上所述,本次研究表明,与对照组相比,T2DM 并发 AS 患者血清 IL-35 水平降低;Logistic 回归分析发现,IL-35 可能是 T2DM 是否伴 AS 的保护因素,LDL-C 可能是 T2DM 是否伴 AS 的危险因素,提示 T2DM 患者 AS 的发生可能与 IL-35 生物学作用减弱有关。因此,通过调控 T2DM 并发 AS 患者的 IL-35 水平,可能是延缓 T2DM 患者 AS 相关血管并发症的新途径。但是,AS 疾病是一种多因素疾病,本研究仅分析了 IL-35 在 T2DM 与 T2DM 并发 AS 患者中的表达,且本次研究样本量小,仍需大量体内外试验来进一步深入阐明 IL-35 在 T2DM 合并 AS 中的作用机制。

参考文献

- [1] AHMED M, DE WINTHER M P, BOSSCHE J V. Epigenetic mechanisms of macrophage activation in type 2 diabetes[J]. *Immunobiology*, 2017, 222(10): 937-943.
- [2] YANG W, LI Y, WANG J Y, et al. Circulating levels of adipose tissue-derived inflammatory factors in elderly diabetes patients with carotid atherosclerosis: a retrospective study[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2018, 317(1): 75-79.
- [3] RHEE S Y, KIM Y S. Peripheral arterial disease in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Diabetes Metab J*, 2015, 39(4): 283-290.
- [4] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2013 年版)[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2014, 30(10): 447-498.
- [5] PARK S Y, CHIN S O, RHEE S Y, et al. Cardio-ankle vascular index as a surrogate marker of early atherosclerotic cardiovascular disease in Koreans with type 2 diabetes mellitus[J]. *Diabetes Metab J*, 2018, 42(4): 285-295.
- [6] LI X, MAI J, VIRTUE A, et al. IL-35 is a novel responsive anti-inflammatory cytokine—a new system of categorizing anti-inflammatory cytokines[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33628.
- [7] CHATURVEDI V, COLLISON L W, GUY C S, et al.

Cutting edge: human regulatory T cells require IL-35 to mediate suppression and infectious tolerance[J]. *J Immunol*, 2011, 186(12): 6661-6666.

- [8] DIXON K O, VAN DER KOOIJ S W, VIGNALI D A, et al. Human tolerogenic dendritic cells produce IL-35 in the absence of other IL-12 family members[J]. *Eur J Immunol*, 2015, 45(6): 1736-1747.
- [9] YUAN N, ZHANG H F, WEI Q, et al. Expression of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells, interleukin 10 and transforming growth factor β in newly diagnosed type 2 diabetic patients[J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2018, 126(2): 96-101.
- [10] LIN Y, HUANG Y, LU Z, et al. Decreased plasma IL-35 levels are related to the left ventricular ejection fraction in coronary artery diseases [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52490.
- [11] WANG B, DAI S, DONG Z, et al. The modulation of endoplasmic reticulum stress by chemical chaperone upregulates immune negative cytokine IL-35 in apolipoprotein e-deficient mice[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e87787.
- [12] LI X, FANG P, YANG W Y, et al. IL-35, as a newly proposed homeostasis-associated molecular pattern, plays three major functions including anti-inflammatory initiator, effector, and blocker in cardiovascular diseases [J]. *Cytokine*, 2019, 122: 30169-30172.
- [13] KEMPE S, HEINZ P, KOKAI E, et al. Epstein-barr virus-induced gene-3 is expressed in human atheroma plaques[J]. *Am J Pathol*, 2009, 175(1): 440-447.
- [14] POSADAS-SÁNCHEZ R, PÉREZ-HERNÁNDEZ N, ANGELES-MARTINEZ J, et al. Interleukin 35 polymorphisms are associated with decreased risk of premature coronary artery disease, metabolic parameters, and IL-35 levels; the genetics of atherosclerotic disease (GEA) study[J]. *Mediat Inflamm*, 2017, 2017: 6012795.
- [15] TAO L, ZHU J, CHEN Y, et al. IL-35 improves Treg-mediated immune suppression in atherosclerotic mice [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(4): 2469-2476.

(收稿日期:2019-03-14 修回日期:2019-05-21)

(上接第 2766 页)

- [5] 曹欢. 缺氧在精索静脉曲张导致不育中的研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2013.
- [6] 郭辉, 李洁, 胡文莉, 等. 部队官兵精索静脉曲张患者睾丸动脉 RI、PI 与精液质量相关性分析[J]. *空军医学杂志*, 2019, 35(1): 10-12.
- [7] 杨晓丽, 郭玲玲, 王云燕, 等. 体质量指数与不孕症患者性激素六项水平的相关性分析[J]. *山西医药杂志*, 2019, 48(11): 1267-1268.
- [8] 徐文峰, 徐硕, 马捷, 等. 高效液相色谱法用于丙酸睾酮注射液的含量测定[J]. *中国医药导报*, 2016, 13(30): 134-137.
- [9] 高学勇, 林珊, 韩咪莎. 淫羊藿苷对环磷酰胺诱导生精障

碍大鼠下丘脑-垂体-睾丸轴的影响[J]. *解剖学杂志*, 2018, 41(2): 147-151.

- [10] 王一蓉, 周志宏, 汤长发. 补肾益元方对运动性低血睾酮大鼠 HPG 轴的影响及有效成分测定[J]. *中成药*, 2019, 41(4): 923-926.
- [11] 龙艳芳, 王新蕾, 王明璞, 等. 雄激素干预成年雄性大鼠中动脉阻断模型大鼠脑组织 Bcl-2、Bax 与 Cyt-C 的表达[J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(27): 4344-4349.
- [12] ZEDAN H, EL-MEKHLAFI A, EL-NOWEIH A M, et al. Soluble Fas and gonadal hormones in infertile men with varicocele[J]. *Fertil Steril*, 2009, 91(2): 420-424.

(收稿日期:2019-02-02 修回日期:2019-05-10)