

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.20.018

IL-35 和 IL-37 在新型冠状病毒肺炎患者血浆中水平及临床意义^{*}王春晖¹, 杨逸露^{2#}, 曹碧红¹, 车玉传¹, 吴显劲^{1△}

1. 广东省惠州市中心人民医院检验中心, 广东惠州 516001; 2. 广东医科大学第一临床医学院, 广东湛江 524002

摘要:目的 探讨新型冠状病毒肺炎(COVID-19)患者血浆白细胞介素(IL)-35 和 IL-37 水平及临床意义。方法 收集 2020 年 2 月至 4 月在惠州市中心人民医院治疗的 45 例 COVID-19 患者的临床资料和血液标本, 进行血常规和细胞因子检测。结果 45 例患者各疾病时期的白细胞计数(WBC)、淋巴细胞计数(LYMPH)均较对照组减少($P < 0.05$), 而中性粒细胞计数(NEUT)和血小板计数(PLT)与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。患者组疾病早期和恢复期的 IL-35 水平均低于对照组($P < 0.05$), 而疾病早期和恢复期的 IL-35 水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$); 患者组疾病早期和恢复期的 IL-37 表达水平高于对照组($P < 0.05$), 随着病情好转 IL-37 水平逐渐降低, 恢复期 IL-37 水平低于疾病早期($P < 0.05$)。疾病早期的 IL-35 低水平和 IL-37 高水平能缩短病毒 RNA 转阴时间($P < 0.05$), 减少患者住院时间($P < 0.05$)。结论 IL-35、IL-37 通过调节和拮抗炎症反应来发挥保护作用, 从而维持机体免疫功能, 有望成为感染性疾病的治疗新靶点, 具有良好的临床应用价值。

关键词:新型冠状病毒肺炎; 白细胞介素-35; 白细胞介素-37**中图分类号:**R446.6**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2022)20-2812-04**Plasma levels and clinical significance of IL-35 and IL-37 in patients with COVID-19^{*}**WANG Chunhui¹, YANG Yilu^{2#}, CAO Bihong¹, CHE Yuchuan¹, WU Xianjin^{1△}

1. Center of Clinical Laboratory, Huizhou Central People's Hospital, Huizhou,

Guangdong 516001, China; 2. the First Clinical Medical College of

Guangdong Medical University, Zhanjiang, Guangdong 524002, China

Abstract: **Objective** To investigate the plasma concentrations of IL-35 and IL-37 in patients with COVID-19 and their clinical significance. **Methods** Clinical data and blood samples of 45 COVID-19 patients who treated in Huizhou Municipal Central Hospital from February to April 2020 were collected, and blood routine tests and cytokine tests were performed. **Results** Compared with the control group, the white blood cell count (WBC) and lymphocyte count (LYMPH) of the 45 patients in each disease stage decreased ($P < 0.05$), while the neutrophil count (NEUT) and platelet count (PLT) had no statistically significant difference compared with the control group ($P > 0.05$). The plasma IL-35 levels of the patient group both in the early stage of the disease and the recovery stage were lower than those of the control group ($P < 0.05$), but there was no statistically significant difference between the early stage of the disease and the recovery stage ($P > 0.05$); the expression level of IL-37 was higher than that of the control group ($P < 0.05$), with the improvement of the disease, the level of IL-37 gradually decreased, and the level in the recovery stage was lower than that in the early stage of the disease ($P < 0.05$). The low level of IL-35 and high level of IL-37 in the early stage of the disease can shorten the time for viral RNA negative conversion ($P < 0.05$) and reduce the hospitalization time of patients ($P < 0.05$). **Conclusion** IL-35 and IL-37 play a protective role by regulating and antagonizing inflammatory response, thus maintaining the immune function of the body, which are expected to be new therapeutic targets for infectious diseases and have good clinical application value.

Key words: COVID-19; interleukin-35; interleukin-37^{*} 基金项目: 广东省惠州市科技计划项目(200519104577412)。

作者简介: 王春晖, 男, 主管技师, 主要从事临床分子生物学检验的相关研究。 # 并列第一作者。 △ 通信作者, E-mail: 360846172

新型冠状病毒(SARS-CoV-2)于 2019 年 12 月在不明原因肺炎患者中被发现,该病毒能引起新型冠状病毒肺炎(COVID-19)^[1]。有研究显示,相较于普通肺炎患者,COVID-19 患者血清炎症因子水平增高,如白细胞介素(IL)-2、IL-2R、IL-6、IL-7、IL-10、粒细胞集落刺激因子(GSCF)和干扰素诱导蛋白-10(IP-10)等,病情严重者可发生“细胞因子风暴”。很多 COVID-19 重型患者的死亡是由于“细胞因子风暴”引起的严重并发症如急性呼吸窘迫综合征(ARDS)及多器官功能障碍综合征^[2-3]。目前临床上对于“细胞因子风暴”尚无特异性治疗手段,如何在疾病早期阶段控制“炎症风暴”,防止患者病情迅速恶化成为临床治疗有效的关键。IL-35 是 IL-12 家族的最新成员,由 IL-12p35 和 EBI3 β 链组成的异质二聚体,是一种免疫调节性细胞因子,在多种免疫相关疾病(如自身免疫疾病、病毒和细菌感染)以及肿瘤中发挥着关键作用^[4-5]。IL-37 是新发现的 IL-1 家族成员,是机体内有效的炎症抑制因子,有证据表明其在炎症性疾病中发挥重要作用^[6-7]。然而,IL-35、IL-37 的表达是否在 COVID-19 患者“炎症风暴”的转归中起关键性作用有待进一步研究。本课题组分析了惠州市中心人民医院收治的 COVID-19 患者的临床实验室常规检测数据,另外还检测了患者血浆 IL-35、IL-37 水平,旨在探讨 COVID-19 患者细胞因子网络平衡偏移的机制及临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将 2020 年 2—4 月在惠州市中心人民医院感染科隔离病区住院的 45 例 COVID-19 患者(均为轻型或普通型)纳入研究,其中男 21 例(46.7%)、女 24 例(53.3%),年龄(44.22 $\pm$ 18.85)岁。收集上述人群的临床资料和实验室相关检测数据。患者纳入标准(需同时满足以下 2 项)^[8]:(1)有流行病学史的 COVID-19 疑似病例;(2)鼻咽拭子等标本行实时荧光定量 PCR 检测,结果显示为病毒

RNA 阳性。采集研究对象不同时期外周静脉血标本,包括 2 mL EDTA-K₂ 抗凝全血和 5 mL 肝素锂抗凝全血。按采样时期分为疾病早期(住院首次抽血检测)、中期和恢复期(症状好转出院前)3 组。EDTA-K₂ 抗凝全血标本用于血常规项目检测;肝素锂抗凝血采用低速离心,收集血浆用于细胞因子检测。如血浆无法及时检测,则置于-70℃保存。另外,选取 30 例体检健康者作为对照组,其中男 12 例(40.0%)、女 18 例(60.0%),年龄(38.53 $\pm$ 14.32)岁。患者组和对照组性别、年龄比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。本研究经医院临床科研伦理委员会批准,并且获得患者知情同意。

1.2 方法 血常规检测采用日本 Sysmex 全自动血液分析仪 XN3000 及配套试剂检测,收集的实验室检测数据包括白细胞计数(WBC)、中性粒细胞计数(NEUT)、淋巴细胞计数(LYMPH)、血小板计数(PLT)等;血浆细胞因子(IL-35、IL-37)检测采用的酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自美国 OmnimAbs 公司,检测仪器为深圳市汇松科技发展有限公司生产的多功能酶标仪 MB-580。所有仪器使用和检验操作均严格按照标准操作规程和试剂说明书进行。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理,正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两样本均数比较采用 t 检验,两个以上样本均数比较采用方差分析,进一步两两比较采用 SNK- q 检验;非正态分布的计量资料以 $M(P_{25}\sim P_{75})$ 表示,组间比较采用非参数秩和检验;计数资料以率或百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血常规检测 与对照组比较,患者组各期外周血 WBC、LYMPH 减少($P<0.05$),而 NEUT、PLT 差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。患者经治疗后,恢复期 WBC、LYMPH 较疾病早期和疾病中期增加($P<0.05$)。

表 1 COVID-19 患者不同时期血常规参数检测结果[$M(P_{25}\sim P_{75})$, $\times 10^9/L$]

分组	<i>n</i>	WBC	NEUT	LYMPH	PLT
对照组	30	6.30(5.54~7.17)	3.34(2.92~4.28)	2.24(1.87~2.56)	230(199~265)
患者组	45	—	—	—	—
疾病早期		4.84(3.75~5.99)* Δ	2.94(2.18~3.73)	1.04(0.82~1.52)* Δ	224(160~259)
疾病中期		5.53(4.45~8.11)* Δ	3.69(2.39~6.21)	1.16(0.90~1.42)* Δ	241(185~300)
恢复期		5.68(4.84~6.98)*	3.56(2.87~4.36)	1.34(1.10~1.67)*	237(197~292)
<i>Z</i>		15.269	6.728	49.335	2.412
<i>P</i>		0.002	0.081	<0.001	0.491

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与恢复期比较, $\Delta P<0.05$;—表示该项无数据。

2.2 血浆细胞因子检测 各组间 IL-35、IL-37 水平比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。患者组疾病早期和恢复期 IL-35 水平均低于对照组($P<0.05$)，IL-37 水平均高于对照组($P<0.05$)；随着病情好转，患者组恢复期 IL-37 水平低于疾病早期($P<0.05$)，而恢复期 IL-35 水平与疾病早期比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

2.3 IL-35 和 IL-37 水平与临床结局的关系 以患者疾病早期 IL-35 和 IL-37 水平的中位数(53.42、384.66 pg/mL)作为临界值，将患者分为 IL-35/IL-37 高水平组和低水平组，分析其对病毒 RNA 检测结果转阴时间(病毒 RNA 转阴时间)和患者住院时间的影响。结果显示，IL-35 低水平的患者病毒 RNA 转阴时间和住院时间均短于 IL-35 高水平组($P<0.05$)，而

IL-37 高水平的患者病毒 RNA 转阴时间和住院时间明显短于 IL-37 低水平组($P<0.05$)，见表 3。

表 2 COVID-19 患者不同时期血浆细胞因子 IL-35 和 IL-37 检测结果[$M(P_{25} \sim P_{75})$, pg/mL]			
分组	<i>n</i>	IL-35	IL-37
对照组	30	120.01(92.90~260.83)	44.42(30.28~66.15)
患者组	45	—	—
疾病早期		53.42(25.34~82.00)*	384.66(199.27~562.59)* [△]
恢复期		46.95(17.90~69.86)*	204.49(78.81~414.39)*
<i>Z</i>		48.407	63.894
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注：与对照组比较，* $P<0.05$ ；与恢复期比较，[△] $P<0.05$ ；—表示该项无数据。

表 3 IL-35 和 IL-37 水平与临床结局的关系[$M(P_{25} \sim P_{75})$, d]

分组	<i>n</i>	病毒 RNA 转阴			住院		
		时间	<i>Z</i>	<i>P</i>	时间	<i>Z</i>	<i>P</i>
IL-35							
高水平组	22	9.50(6.75~13.00)	−2.322	0.020	11.50(8.75~15.25)	−2.379	0.017
低水平组	23	6.00(5.00~9.00)			8.00(7.00~12.00)		
IL-37							
高水平组	23	5.50(5.00~7.25)	−3.866	<0.001	7.50(7.00~9.25)	−3.947	<0.001
低水平组	22	10.00(8.00~13.00)			12.00(10.00~15.00)		

3 讨 论

由 SARS-CoV-2 感染引起的 COVID-19 给全球公共卫生带来严峻挑战^[9]。SARS-CoV-2 入侵宿主引发“过激”的免疫反应是其临床高致死性的主要机制，主要表现为“细胞因子风暴”，导致严重的急性肺损伤、ARDS，甚至多器官功能衰竭。临床研究证实，COVID-19 患者血清中细胞因子和趋化因子的表达水平与疾病预后密切相关^[10]。因此，促炎症因子和抗炎因子网络的平衡状态可能与疾病预后密切相关。

本课题组分析了 COVID-19 患者血浆标本中 IL-35 和 IL-37 的水平。结果显示，患者 IL-35 水平较健康者降低，但在病程中无明显变化。IL-35 低水平的患者病毒 RNA 阴性转化时间和住院时间更短。有研究发现，银屑病、慢性乙型肝炎患者的血浆 IL-35 水平低于健康者^[11-12]。IL-35 虽然是 IL-12 细胞因子家族的成员，在结构和组成上有许多相似之处，但在功能上有很大不同。IL-35 作为新型调节性细胞因子在免疫系统中发挥重要作用，其通过 IL-12RB2、GP130 信号通路进行调节，与受体结合后导致 EBI3 和 IL-12A 靶基因的表达，EBI3 可抑制 T 细胞的增殖和辅助性 T(Th)17 细胞的发育和分化，而 IL-12A 作为活化 T

细胞和自然杀伤细胞的生长因子，刺激 IFN- γ 的产生^[13-14]。本研究中患者血液中 LYMPH 减少，导致分泌 IL-35 的调节性 T(Treg)细胞或 B 细胞数量减少，可能是 IL-35 水平降低的原因之一，表明 IL-35 的水平可能受到免疫微环境的影响。

感染早期患者出现 IL-37 水平反应性升高，与相关研究结果一致^[9]。IL-37 水平反应性升高可能有利于拮抗“炎症风暴”，维持细胞因子的平衡状态，从而维持宿主免疫系统和重要器官的功能。经过临床治疗，患者进入恢复期后，出现了 IL-37 水平反应性降低的现象，表明体内炎症反应状态趋于稳定。本研究结果中，IL-37 高水平组患者的病毒 RNA 转阴时间和住院时间明显缩短，提示 IL-37 反应性升高可能抑制病毒复制，从而缩短了患者的住院时间。表明 IL-37 可能在 SARS-CoV-2 感染期间发挥保护作用，机体会随炎症反应水平动态调整抗炎反应水平。IL-37 高水平组有更好的临床转归或预后。高水平 IL-37 能够防止病情向重症发展，这可能是收治患者住院期间并未出现病情恶化的原因之一。相反，感染早期如未能启动抗炎反应可能会出现不良的临床预后。

细胞因子发挥功能是个复杂的相互作用网络。

研究发现 Toll 样受体(TLRs)是一种跨膜蛋白模式识别受体,其胞内区含有 TLRs 和 IL-1 受体家族特有的结构域 TIR。TLR3 识别进入体内的病毒双链 RNA,并通过诱导一系列反应来保护宿主免受病毒感染,如 I 型干扰素和细胞因子的产生、继发性 NK 细胞反应以及最终的细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)反应和抗体产生^[10,15]。IL-37 通过 SMAD3 信号通路的调节,抑制或减少 IL-1A、IL-1RN、IL-6 和 CCL12 等促炎细胞因子的产生,抑制树突细胞活化,从而抑制过度炎症所涉及的先天炎症和免疫反应。IL-37 可能是 IL-18 受体(IL-18R1/IL-1Rrp)的配体,还与 IL-18 结合蛋白(IL-18BP)结合,并通过它抑制 IL-18 的活性,作为早期 Th1 细胞因子反应的抑制剂^[16]。

本课题组初步探讨了 COVID-19 患者疾病过程中 IL-35 和 IL-37 的反应性。IL-35 作为调节性细胞因子在免疫和感染性疾病中发挥重要作用,未来有望作为免疫调节治疗的新靶点,可根据疾病中 IL-35 水平进行治疗或阻断。IL-37 作为重要的抗炎因子,对“细胞因子炎症风暴”的治疗至关重要,可成为临床转归的判断指标之一,可以为下一步的细胞因子网络平衡偏移的机制研究和免疫治疗提供参考依据。

参考文献

- [1] QI Z, YU Y. Epidemiological features of the 2019 Novel Coronavirus outbreak in China[J]. *Curr Top Med Chem*, 2020, 20(13): 1137-1140.
- [2] HUANG C, WANG Y, LI X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China[J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 497-506.
- [3] 陈蕾, 刘辉国, 刘威, 等. 2019 新型冠状病毒肺炎 29 例临床特征分析[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2020, 43(3): 203-208.
- [4] JORGE C, MARIANO M, EDGAR C C. Interleukin-35 is a critical regulator of immunity during helminth infections associated with multiple sclerosis[J]. *Immunology*, 2021, 164(3): 569-586.
- [5] ZHANG J, ZHANG Y, WANG Q, et al. Interleukin-35 in immune-related diseases: protection or destruction [J].

Immunology, 2019, 157(1): 13-20.

- [6] NOLD M F, NOLD-PETRY C A, ZEPP J A, et al. IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(11): 1014-1022.
- [7] CAVALLI G, DINARELLO C A. Suppression of inflammation and acquired immunity by IL-37 [J]. *Immunol Rev*, 2018, 281(1): 179-190.
- [8] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第八版)[S/OL]. (2020-08-19)[2021-09-07]. [http://www. nhc. gov. cn/cms-search/downloadFiles/a449a3e2c94d9a856d5faea2ff0f94. pdf](http://www.nhc.gov.cn/cms-search/downloadFiles/a449a3e2c94d9a856d5faea2ff0f94.pdf).
- [9] LI A, LING Y, SONG Z, et al. Correlation between early plasma interleukin 37 responses with low inflammatory cytokine levels and benign clinical outcomes in severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection[J]. *J Infect Dis*, 2021, 223(4): 568-580.
- [10] 王荣花, 郑志慧, 张雨茜, 等. 冠状病毒免疫逃逸机制研究进展[J]. *中国药科大学学报*, 2021, 52(1): 1-9.
- [11] LI T, GU M, LIU P, et al. Clinical significance of decreased interleukin-35 expression in patients with psoriasis[J]. *Microbiol Immunol*, 2018, 62(7): 454-461.
- [12] LI X, TIAN L, DONG Y, et al. IL-35 inhibits HBV antigen-specific IFN- γ -producing CTLs in vitro[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2015, 129(5): 395-404.
- [13] WIRTZ S, BILLMEIER U, MCHEDLIDZE T, et al. Interleukin-35 mediates mucosal immune responses that protect against T-cell-dependent colitis[J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(5): 1875-1886.
- [14] SHA X, MENG S, LI X, et al. Interleukin-35 inhibits endothelial cell activation by suppressing MAPK-AP-1 pathway[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(31): 19307-19318.
- [15] MATSUMOTO M, OSHIUMI H, SEYA T. Antiviral responses induced by the TLR3 pathway[J]. *Rev Med Virol*, 2011, 21(2): 67-77.
- [16] BAI J, LI Y, LI M, et al. IL-37 as a potential biotherapeutics of inflammatory diseases [J]. *Curr Drug Targets*, 2020, 21(9): 855-863.

(收稿日期: 2022-02-23 修回日期: 2022-05-29)