

白细胞介素-35 在脓毒症病情评估及预后中的应用

程高翔, 方长太, 查君敬, 黄利娟, 陈园园

(安徽医科大学附属安庆医院重症医学科, 安徽 安庆 246000)

摘要: **目的** 通过观察脓毒症病人血清白细胞介素-35(IL-35)的变化规律,探讨其与感染的关系及对疾病预后的影响。**方法** 采用前瞻性研究方法,选择 67 例脓毒症病人为脓毒症组;同时选择符合全身炎症反应综合征(SIRS)但无感染病人(30 例)以及健康志愿者(30 例)作为对照。于病人入重症医学科(ICU)3 h 内取血,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 IL-35、降钙素原(PCT),并计算急性生理学及慢性健康状况评分系统 II(APACHE II)评分,根据病人入院后 28 d 生存结局,比较存活组(57 例)与死亡组(40 例)病人之间 IL-35 水平的差异。采用多种非参数方法分析脓毒症病人 IL-35 与上述指标的相关性;获得 IL-35 诊断脓毒症及预后判断的价值。**结果** 脓毒症病人血清 IL-35 较 SIRS 组及健康对照组明显升高[0.43(0.25)比 0.24(0.09)、0.15(0.00) ng · L⁻¹, $Z = 7.862$, $P < 0.01$], PCT 较 SIRS 组明显升高[6.92(23.44)比 2.09(1.53) μg · L⁻¹, $Z = -2.038$, $P < 0.05$],健康组、SIRS 组、脓毒症组的 APACHE II 评分、PCT、IL-35 水平随疾病严重程度加深而升高,且脓毒症组 IL-35 与 APACHE II 评分($r = 0.587$, $P < 0.001$)、PCT($r = 0.691$, $P < 0.001$)均呈显著正相关,此外,ROC 分析知:以 IL-35 = 0.30 ng · L⁻¹ 为阈值,其预测死亡预后的灵敏度 = 0.722,特异性 = 0.759,曲线下面积 $AUC = 0.735$,提示 IL-35 对脓毒症预后预测价值较好。**结论** 脓毒症病人血清 IL-35 较 SIRS 组及健康对照组明显上升,且与 PCT 水平呈正相关,对感染有诊断意义;血清 IL-35 与 APACHE II 评分呈正相关,故其水平随 APACHE II 评分升高而升高,而且死亡组 IL-35 水平较存活组明显升高,IL-35 水平的高低对脓毒症病人的预后具有重要提示意义。

关键词: 白细胞介素-35;脓毒症;降钙素原;免疫;调节性 T 细胞

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.04.022

Application research of Interleukin-35 in sepsis correlated with condition evaluation and prognosis

CHENG Gaoxiang, FANG Changtai, ZHA Junjing, HUANG Lijuan, CHEN Yuanyuan

(Intensive Care Unit, Anqing Hospital of Anhui Medical University, Anqing, Anhui 246000, China)

Abstract: Objective To observe the changes of interleukin-35 (IL-35) in sepsis patients' serum for finding the relationship of the levels

基金项目:安徽医科大学校科研基金(2015xkj069)

通信作者:方长太,男,主任医师,硕士生导师,研究方向:急危重症, E-mail:fangchangtai@163.com

- [9] THOMSEN M, DAHL M, LANGE P, et al. Inflammatory biomarkers and comorbidities in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2012, 186(10): 982-988.
- [10] METTE T, TRULS SYLVAN I, JACOB LOUIS M, et al. Inflammatory biomarkers and exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease [J]. JAMA, 2013, 309(22): 982-988.
- [11] 隆海燕, 罗红, 陈平, 等. 慢性阻塞性肺疾病患者血清 CRP 和 IL-18 与肺功能及生活质量的相关性 [J]. 中南大学学报(医学版), 2011, 36(11): 1090-1096.
- [12] 庞国菊, 刘怀平. 血清 α1-抗胰蛋白酶和 C 反应蛋白水平与慢性阻塞性肺疾病的相关性研究 [J]. 检验医学, 2013, 28(10): 882-884.
- [13] AKSU F, CAPAN N, AKSU K, et al. C-reactive protein levels are raised in stable Chronic obstructive pulmonary disease patients independent of smoking behavior and biomass exposure [J]. J Thorac Dis, 2013, 5(4): 414-421.
- [14] 李向欣, 赵鹏程. 老年慢性阻塞性肺疾病急性加重期血清降钙素原/C-反应蛋白检测的临床意义 [J]. 中国实验诊断学, 2014, 10(6): 909-911.
- [15] 桂心, 谢小红, 张仁荣, 等. 慢性阻塞性肺疾病合并脑梗死患者

血清同型半胱氨酸、C 反应蛋白、D-二聚体的临床意义及相关因素分析 [J]. 实用医学杂志, 2015, 21(18): 3024-3026.

- [16] FULTON AS, HILL AM, WILLIAMS MT, et al. Paucity of evidence for a relationship between long-chain omega-3 fatty acid intake and chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review [J]. Nutr Rev, 2015, 73(9): 612-623.
- [17] BHATT SP, DRANSFIELD MT. Chronic obstructive pulmonary disease and cardiovascular disease [J]. Transl Res, 2013, 162(4): 237-251.
- [18] 张杰, 张颖, 余其贵, 等. 老年慢性阻塞性肺疾病急性发作患者血清中血管内皮因子变化及其意义 [J]. 安徽医药, 2014, 18(1): 109-112.
- [19] DÍAZ O, PARADA A, RAMOS C, et al. C-Reactive protein levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Rev Med Chil, 2012, 140(5): 569-578.
- [20] AGARWAL R, ZAHEER MS, AHMAD Z, et al. The relationship between C-reactive protein and prognostic factors in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Multidiscip Respir Med, 2013, 8(1): 63.

(收稿日期: 2016-07-20, 修回日期: 2016-08-26)

of IL-35 and the infection, and the significance of IL-35 in predicting the prognosis of sepsis. **Methods** A prospective clinical study was conducted. Sixty-seven patients with sepsis were enrolled. Thirty healthy volunteers and thirty patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS) were enrolled as healthy control and SIRS groups. The levels of IL-35, procalcitonin (PCT) were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) within 3 h after admitted to ICU. The acute physiology and chronic health evaluation II (APACHE II) score was calculated. Then, the patients were assigned into 28-day death group and survival group, and the levels of IL-35 were compared. The relationship between the levels of IL-35 and each parameter was analyzed by various non-parametric methods. The multi-factor Logistic regression analysis was used in the diagnosis of sepsis severity and prognosis of independent factors.

Results Serum IL-35 in sepsis patients was significantly increased compared with that of the control group [$\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$; 0.43 (0.25): 0.24 (0.09), 0.15 (0.00), $Z = 7.862, P < 0.01$]. PCT was significantly increased compared with that of the SIRS group [$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 6.92 (23.44): 2.09 (1.53), $Z = -2.038, P < 0.05$]. With exacerbation of illness, APACHE II score, the values of PCT and the level of IL-35 were gradually increased. Both IL-35 and APACHE II or PCT had significant positive correlation ($r = 0.587, P < 0.001$ or $r = 0.691, P < 0.001$). Besides, from ROC curve, the threshold of IL-35 was $0.30 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, the sensitivity of prognosis of death was 0.722, the specificity was 0.759, the area under the ROC curve was 0.735, which prompted that IL-35 had good prognostic values to sepsis. **Conclusions** The level of Serum IL-35 in sepsis patients was increased compared with the SIRS group and healthy control group, and it has positive correlation with PCT, which plays an important role in diagnosing infection. The level of serum IL-35 in sepsis patients has positive correlation with APACHE II. With the increasing of APACHE II, the levels of IL-35 are increased and it in death group is significantly increased than alive group, and it has important significance to the prognosis of patients with sepsis.

Key words: Interleukin-35; Sepsis; Procalcitonin; Immune; Treg

脓毒症是严重创伤、烧伤、休克、感染、大手术后常见的并发症,进一步发展可导致脓毒症休克、多脏器功能衰竭(MODS),治疗效果差,病情凶险,病死率高,其发病率仍存在上升的趋势^[1-2]。过去认为,脓毒症是由感染所致过度的炎性反应,即全身炎性反应综合征(SIRS)。现在通过对脓毒症发病机制的进一步了解和研究发现脓毒症病人病情中机体不是总处于免疫激活状态,在早期阶段,机体为促炎反应为主,经历过初始高炎性反应阶段后病人逐渐进入后期的免疫抑制阶段^[3],表现淋巴细胞的大量凋亡、增殖能力下降等免疫反应,从而增加机体易感性,且Nishizuka等^[4]就发现了T细胞有潜在的免疫抑制活性,因此进一步的研究侧重于淋巴细胞的过度凋亡造成的免疫抑制是脓毒症病理生理机制的关键环节^[5-6]。相关研究显示白细胞介素-35(IL-35)是最新发现的免疫抑制细胞因子,能抑制效应T细胞增殖、Th17细胞、IL-47的合成及分化,以及维持外周免疫耐受等方面发挥重要作用,主要由调节性T细胞(Treg)产生,而且可能为关键性细胞因子在Treg发挥最大的免疫抑制功能中^[7]。最新研究提示IL-35参与脓毒症的发生发展,可作为一个具有优势的免疫抑制性治疗因子在炎性、自身免疫疾病以及其他免疫紊乱的疾病中^[8],但是目前尚缺乏系统研究。本研究拟通过观察脓毒症病人血清IL-35水平,探讨其与SIRS病人及健康人群的差异,以期揭示IL-35在诊断脓毒症以及对脓毒症预后的预测意义。

1 资料与方法

1.1 病例入选及排除标准 采用前瞻性临床研究方法。入选2015年11月—2016年10月安徽医科大学附属安庆医院重症医学科(ICU)收治的脓毒症病人进行研究,病例组入选标准:年龄 ≥ 18 岁;在重症医学科存活时间 ≥ 24 h;符合2014年中国脓毒症指南制定的脓毒症诊断标准。排除标准:6个月内使用过影响免疫功能的药物,自身免疫性疾病、急性心脑血管疾病、慢性肾功能衰竭、血液系统疾病、恶性肿瘤或免疫缺陷疾病等。本研究已获安徽医科大学附属安庆医院医学伦理委员会批准,病人或其近亲属对本研究方案已签署知情同意书。

1.2 病例分组 根据病人入选时病情分为脓毒症组(67例),以及进入重症医学科时符合SIRS诊断标准,且无感染证据的病人(SIRS组,30例)及健康志愿者(对照组,30例)作为对照。

1.3 样本采集 所有病人及对照组在入ICU后即进行急性生理与慢性健康状况(APACHE II)评分并立即抽取10 mL外周静脉血,于室温下静置20 min,然后置于离心机中离心30 min,离心速率为 $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ (离心半径7.5 cm),取血清至EP管后保存于 -80°C 冰箱以备检验使用。同时留取样本,检测降钙素原(PCT)、血常规及血生化。抽取健康志愿者10 mL外周静脉血,离心后置于 -80°C 冰箱保存。

1.4 观察及检测指标 于病人入重症医学科(ICU)后记录病人的生命体征、急性生理学与慢性健康状况评分系统II(APACHE II)评分,并观察病

人病情变化。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 IL-35、降钙素原(PCT)及血常规、血生化检测,试剂盒购自上海拜力科技有限公司产品,按照说明书进行操作。

1.5 统计学方法 本研究采取 SPSS 20.0 软件进行统计分析,对于偏态分布数据用中位数及四分位数间距[$M(QR)$]表示,采用 Mann-whitney 秩和检验比较两组间数据;采用 Kruskal-wallis 秩和检验比较多组间的数据。计数资料的比较采用 χ^2 检验,采用 Spearman 进行相关性分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况比较 脓毒症组、SIRS 组、对照组性别、年龄比较,均差异无统计学意义($P > 0.05$)。此外,入组标准已排除基础疾病和近期所用其它药物,故此三组基线指标相对一致,有可比性。见表 1。

表 1 三组一般情况比较

组别	例数	男性/例(%)	年龄/岁, $M(QR)$
对照组	30	14(46.7)	64(25)
脓毒症组	67	35(52.2)	67(25)
SIRS 组	30	15(50.0)	71(17)
$\chi^2(Z)$ 值		0.260	(3.290)
P 值		0.878	0.193

2.2 病人入 ICU 时 APACHE II 评分、PCT 和 IL-35 比较 脓毒症组、SIRS 组、IL-35 水平较健康对照组明显升高,且脓毒症组 IL-35 明显高于 SIRS 组(均 $P < 0.01$),脓毒症组 PCT 水平较 SIRS 组明显升高($P < 0.05$)。分析得出,APACHE II 评分、PCT、IL-35 水平在脓毒症组中较 SIRS 组及对照组明显升高,均差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。并采用 Spearman 相关性分析,结果显示脓毒症组 IL-35 水平与 APACHE II 评分及 PCT 水平呈正相关(分别为 $r = 0.587$, $P < 0.01$; $r = 0.691$, $P < 0.01$),提示 IL-35 水平在脓毒症病人中随着 APACHE II 评分及 PCT 水平的升高而升高。见表 2。

表 2 各组 APACHE II 评分及血中 PCT、IL-35 比较/ $M(QR)$

组别	例数	APACHE II 评分/分	PCT/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	IL-35/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
对照组	30	3.50(1.00)	—	0.15(0.00)
脓毒症组	67	16.00(8.00)	6.92(23.44)	0.43(0.25)
SIRS 组	30	15.00(6.00)	2.09(1.53)	0.24(0.09)
Z 值		-7.871	-2.038	-7.862
P 值		<0.001	0.042	<0.001

2.3 死亡组 IL-35 水平与存活组 IL-35 水平比较

根据病人入院后 28 d 生存结局,死亡组 IL-35 水平与存活组 IL-35 水平比较明显升高,且差异有统计学意义($P < 0.01$),表明 IL-35 水平越高表明病人预后则越差。见表 3。

表 3 不同预后病人血清 IL-35 水平比较

组别	例数	IL-35/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$, $M(QR)$
存活组	57	0.22(0.22)
死亡组	40	0.44(0.26)
Z 值		-4.366
P 值		<0.001

2.4 IL-35 指标水平的预后诊断价值分析 将存活组 57 例,死亡组 40 例的 IL-35 水平进行 ROC 分析,得 ROC 曲线如图 1。对应的预测阈值点为 $0.283 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$,实取 $0.30 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在此阈值点,理论预测灵敏度 = 0.722,特异性 = 0.759。曲线下面积 $AUC = 0.735$ 。提示该指标的预测价值较好。以两组共 97 例病人的实测 IL-35 水平数据做比对:存活组(或死亡组)均有约 90% 以上的病人分别在 0.30 之下(或之上)。提示该指标有一定的实践意义。

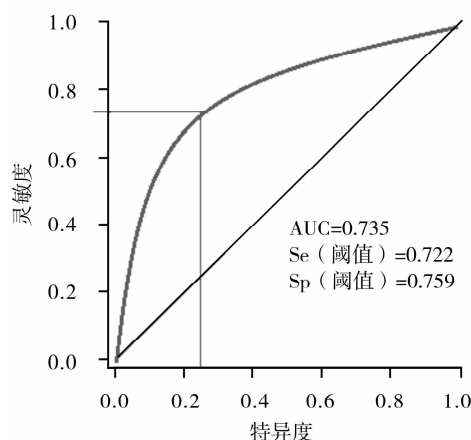


图 1 IL-35 指标死亡预测诊断的 ROC 曲线

3 讨论

IL-35 作为最新发现的免疫抑制细胞因子,属于 IL-12 细胞因子家族,对免疫系统和免疫反应有负向抑制作用,主要由 Treg 细胞产生,是 Treg 细胞介导的免疫调节作用所必需的细胞因子,在 Treg 细胞功能发挥中以及抗炎性反应中起重要作用。IL-35 在体外直接抑制效应 T(Teff) 细胞增殖,且其抑制能力与 Treg 细胞中 IL-35 的大量表达相关^[9]。小鼠体内实验表明,体内 IL-35 的表达缺失降低了 Treg 细胞的抑制功能^[7]。而 Treg 细胞为具有调节

功能的成熟 T 细胞亚群,在脓毒症复杂的免疫调控网络中发挥负向调节作用,使不合适的免疫反应被抑制,免疫应答的范围、程度及作用时间缩小,抑制效应细胞免疫活性的发挥及增殖^[10]。本研究通过检测脓毒症病人血清 IL-35 水平,探讨 IL-35 在脓毒症中的变化规律。本研究发现,脓毒症组与 SIRS 组 IL-35 水平较健康对照组明显上升,提示全身炎症反应状态时 IL-35 升高。本研究显示,脓毒症病人 IL-35 水平与 PCT 水平有正相关性($r = 0.691, P < 0.001$),而有研究表明,PCT 是特异性较高的炎症指标在脓毒症早期的诊断和与 SIRS 鉴别时,且革兰阴性杆菌导致的全身感染时,PCT 升高更加明显^[11-13]。在非感染性疾病时,PCT 升高不明显(不超过 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)。也有研究表明^[14],胆系感染引起的胰腺炎时 PCT 水平明显比非胆系感染引起的胰腺炎要高,与传统炎症指标相比,说明 PCT 能准确反映促炎因子升高情况^[15]。并且疾病严重程度、转归及预后 PCT 亦能反映^[16]。因此得出 IL-35 也可以反映感染的存在以及对疾病严重程度、转归及预后的判断。本研究还显示脓毒症病人血清 IL-35 水平较 SIRS 组及健康对照组逐层上升,且其水平与 APACHE II 评分呈正相关($r = 0.587, P < 0.001$),其差异有统计学意义,已有大量研究显示脓毒症病人 APACHE II 评分越高,预后越差,由此推断 IL-35 水平与 APACHE II 评分一样能反映脓毒症病人的预后;且根据病人生存结局可看出死亡组 IL-35 水平明显高于存活组,表明血清 IL-35 水平能够提示脓毒症时病人感染的严重程度及预后结局。并且从 ROC 曲线图可知,IL-35 灵敏度 = 0.722,特异性 = 0.759,曲线下面积 $AUC = 0.735$,提示该指标的预测价值较好。有研究显示,通过免疫调理升高抗炎因子 IL-10 水平,降低促炎因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平,提高体液免疫中 IgG 水平及细胞免疫中 CD4^+ T 淋巴细胞水平,脓毒症病人的生存率升高^[17]。提示免疫调理或对 IL-35 相关免疫通路进行干预,病人的预后可能得到改善。综上所述可以得到 IL-35 在脓毒症诊断以及对脓毒症预后的提示方面均存在意义。本研究为观察性研究,由于设置了两组对照,因此较难进行多因素分析,在随后的进一步研究中,会增大样本量,对影响脓毒症和 SIRS 的预后因素进行进一步的多因素分析。

参考文献

- [1] BOOMER JS, TO K, CHANG KC, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure [J]. JAMA, 2011, 306(23):2594-2605.
- [2] STEARNS-KUROSAWA DJ, OSUCHOWSKI MF, VALENTINE C, et al. The pathogenesis of sepsis [J]. Annu Rev Pathol, 2011, 6: 19-48.
- [3] RITTIRSCH D, FLIERL MA, WARD PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis [J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(10):776-787.
- [4] NISHIZUKA Y, SAKAKURA T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice [J]. Science, 1969, 166(3906):753-755.
- [5] BANTEL H, SCHULZE-OSTHOFF K. Cell death in sepsis: a matter of how, when, and where [J]. Crit Care, 2009, 13(4):173.
- [6] LESLIE M. Immunology. Stalling sepsis [J]. Science, 2012, 337(6098):1036.
- [7] COLLISON LW, WORKMAN CJ, KUO TT, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function [J]. Nature, 2007, 450(7169):566-569.
- [8] 刘芬, 文丽君, 刘海燕. IL-35 研究进展 [J]. 免疫学杂志, 2011, 28(7):630-632.
- [9] COLLISON LW, PILLAI MR, CHATURVEDI V, et al. Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35-and IL-10-dependent manner [J]. J Immunol, 2009, 182(10):6121-6128.
- [10] JIANG LN, YAO YM, SHENG ZY. The role of regulatory T cells in the pathogenesis of sepsis and its clinical implication [J]. J Interferon Cytokine Res, 2012, 32(8):341-349.
- [11] TANG BM, ESLICK GD, CRAIG JC, et al. Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: systematic review and meta-analysis [J]. Lancet Infect Dis, 2007, 7(3):210-217.
- [12] 刘慧琳, 刘桂花, 马青变. 降钙素原对急诊脓毒症患者早期诊断的价值 [J]. 中国危重病急救医学, 2012, 24(5):298-301.
- [13] 邢豫宾, 戴路明, 赵芝焕, 等. 血清降钙素原和常用炎症指标结合 SOFA 评分对脓毒症早期诊断和预后价值的评价 [J]. 中国危重病急救医学, 2008, 20(1):23-28.
- [14] 高艳霞, 李莉, 李毅, 等. 降钙素原在急性胰腺炎病情判断中的意义 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2014, 20(3):201-204.
- [15] 杜斌, 陈德昌, 潘佳琦, 等. 降钙素原与白介素-6 的相关性优于传统的炎症指标 [J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(8):474-477.
- [16] 俞娅芬, 陈德昌, 宋秀琴. 早期诊断严重脓毒症脓毒性休克研究进展 [J]. 中国急救医学, 2007, 27(2):154-156.
- [17] 黄顺伟, 管向东, 陈娟, 等. 免疫调理治疗改善脓毒症炎症因子、体液和细胞免疫以及预后的作用 [J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版), 2009, 3(10):1645-1652.

(收稿日期:2016-11-01, 修回日期:2016-12-27)