

IL-36在结缔组织病相关间质性肺疾病患者血清中的表达水平及临床意义

朱云龙^{1,2}, 郑洁³, 高圳昱², 黄侠², 翟鑫超², 蔡德慧², 苏林冲^{2*}

¹湖北民族大学医学部, 湖北 恩施

²湖北民族大学附属民大医院风湿免疫科, 湖北 恩施

³武穴市第一人民医院呼吸与危重症医学科, 湖北 武穴

收稿日期: 2025年4月6日; 录用日期: 2025年4月28日; 发布日期: 2025年5月7日

摘要

目的: 通过检测原发性干燥综合征、系统性硬化症以及类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)等结缔组织病相关间质性肺疾病(connective tissue disease associated interstitial lung disease, CTD-ILD)患者血清中白细胞介素-36 (interleukin-36, IL-36) (包括IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ , IL-36Ra和IL-38)的表达水平, 评估IL-36作为CTD-ILD潜在生物标志物的价值, 为CTD-ILD的早期筛查、分层管理及靶向治疗提供新型生物标志物筛选策略和探索发病机制提供理论支撑。方法: 本研究纳入2024年5~12月湖北民族大学附属民大医院风湿免疫科确诊的111例CTD患者, 依据是否合并间质性肺疾病(interstitial lung disease, ILD), 将患者分为CTD-ILD组(56例)和结缔组织病未合并间质性肺疾病(connective tissue disease-non interstitial lung disease, CTD-NILD)组(55例); 同时纳入55名同期健康体检者作为健康对照组。采用酶联免疫吸附试验检测各组的血清IL-36表达水平, 并收集所有研究对象的一般临床资料, 以及CTD患者的实验室检验结果和肺高分辨率计算机断层扫描结果。采用IBM SPSS Statistics 27.0统计软件对所有数据进行统计分析。结果: (1) IL-36 α 、IL-36 β 、IL-36 γ 、IL-38在CTD患者血清中的表达水平均高于健康人群, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$); IL-36Ra在CTD患者血清中的表达水平低于健康人群, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。 (2) IL-36 β 、IL-36 γ 、IL-38在CTD-ILD患者血清中的表达水平均高于CTD-NILD患者, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); IL-36Ra在CTD-ILD患者血清中的表达水平低于CTD-NILD患者, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。通过受试者工作特征曲线分析得知, 血清IL-36 β 、IL-38、IL-36 β +IL-38从CTD中识别出ILD的曲线下面积分别为0.780、0.734、0.855, 特异度分别为96.4%、92.7%、76.4%, 敏感度分别为48.2%、44.6%、85.7%。 (3) CTD-ILD患者的血清IL-36Ra表达水平与血沉呈负相关($r = -0.352, P = 0.008$); 结论: (1) 血清IL-36 β 、IL-38可能是诊断CTD-ILD的潜在生物标志物, 且二者联合诊断可明显提高敏感度。 (2) IL-36激动剂和受体拮抗剂的失衡可能在CTD及其相关ILD的病理生理过程中发挥调控作用。

关键词

结缔组织病, 间质性肺疾病, IL-36, IL-38

*通讯作者。

Serum Interleukin-36 Expression Level and Clinical Significance in Patients with Connective Tissue Disease Associated Interstitial Lung Disease

Yunlong Zhu^{1,2}, Jie Zheng³, Zhenyu Gao², Xia Huang²,
Xinchao Zhai², Dehui Cai², Linchong Su^{2*}

¹Health Science Center, Hubei Minzu University, Enshi Hubei

²Department of Rheumatology, Minda Hospital of Hubei Minzu University, Enshi Hubei

³Pulmonary and Critical Care Medicine, Wu Xue NO.1 Peopleshopital, Wuxue Hubei

Received: Apr. 6th, 2025; accepted: Apr. 28th, 2025; published: May 7th, 2025

Abstract

Objective: By measuring serum levels of interleukin-36 (IL-36) isoforms (including IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ , IL-36Ra, and IL-38) in patients with connective tissue disease-associated interstitial lung disease (CTD-ILD)—specifically primary Sjögren's syndrome, systemic sclerosis, and rheumatoid arthritis (RA)—this study aims to evaluate the value of IL-36 as a potential biomarker, thereby providing novel screening strategies for early detection, stratified management, and targeted therapy of CTD-ILD, while also advancing mechanistic insights into its pathogenesis. **Methods:** This study enrolled 111 patients with CTD diagnosed in the Department of Rheumatology and Immunology at Minda Hospital of Hubei Minzu University between May and December 2024. Participants were stratified into two groups based on interstitial lung disease (ILD) comorbidity status: the CTD-ILD group (56 cases) and the connective tissue disease-non interstitial lung disease (CTD-NILD) group (55 cases). A cohort of 55 healthy individuals undergoing routine physical examinations during the same recruitment period was concurrently enrolled as the healthy control (HC) group. Serum IL-36 expression levels in each group were measured using enzyme-linked immunosorbent assay, and general clinical data of all subjects were collected, along with laboratory test results of CTD patients and pulmonary high-resolution computed tomography findings. Statistical analysis of all data was performed using IBM SPSS Statistics 27.0 statistical software. **Results:** (1) The serum expression levels of IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ , and IL-38 in CTD patients were significantly higher than those in HC group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$); whereas IL-36Ra levels were lower in CTD patients compared to HC group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). (2) the serum levels of IL-36 β , IL-36 γ , and IL-38 in the CTD-ILD group were elevated compared to the CTD-NILD group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$); while IL-36Ra levels were reduced in CTD-ILD patients, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Receiver operating characteristic curve analysis revealed that serum IL-36 β , IL-38, and IL-36 β + IL-38 exhibited areas under curve (AUC) of 0.780, 0.734, and 0.855, respectively, for distinguishing ILD from CTD, with specificities of 96.4%, 92.7%, and 76.4%, and sensitivities of 48.2%, 44.6%, and 85.7%. (3) In CTD-ILD patients, serum IL-36Ra concentrations were inversely associated with erythrocyte sedimentation rate ($r = -0.352$, $P = 0.008$). **Conclusion:** (1) Serum IL-36 β and IL-38 may serve as potential biomarkers for diagnosing CTD-ILD, and their combined detection significantly improves sensitivity. (2) The imbalance between IL-36 agonists and receptor antagonists may play a regulatory role in the pathophysiological processes of CTD and associated ILD.

Keywords

Connective Tissue Disease, Interstitial Lung Disease, IL-36, IL-38

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

结缔组织病(connective tissue disease, CTD)是指一类可累及多个系统、以免疫介导的器官功能障碍为特征的全身性自身免疫病,包括系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)、特发性炎性肌病、系统性硬化症(systemic sclerosis, SSc)、类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)、原发性干燥综合征(primary Sjögren's syndrome, pSS)等[1]。间质性肺疾病(interstitial lung disease, ILD)是一组主要累及肺间质和肺泡腔、导致肺泡-毛细血管功能单位丧失的弥漫性疾病[2] [3]。ILD 是包括 RA 和 SSc 在内的各种 CTD 的严重肺部并发症,也是导致 CTD 患者死亡的主要原因[4]。队列研究显示,结缔组织病相关间质性肺疾病(connective tissue disease associated interstitial lung disease, CTD-ILD)患者的中位生存期为 6.5 年,较未合并 ILD 的 CTD 患者缩短 41%,且 ILD 相关死亡率高达 12.4% [5] [6]。CTD-ILD 早期临床表现缺乏特异性,且 ILD 常呈亚临床起病并具快速进展倾向,若进展至肺纤维化期则呈现不可逆性病理改变,早期发现 CTD 中的 ILD 并制定适当的治疗方案对改善预后至关重要[7]。白细胞介素-36(interleukin-36, IL-36)是白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)超家族的一个亚家族,包括三种激动剂 IL-36 α 、IL-36 β 、IL-36 γ ,二种受体拮抗剂 IL-36Ra 和 IL-38 [8]。虽然 IL-36 在急性和慢性炎症中(病毒感染、细菌感染、慢性皮肤炎症、关节炎、肠道炎症等)的作用已被证实[9],但对其在纤维化疾病中的作用知之甚少,现有研究表明 IL-36 可能是炎症和纤维化之间的桥梁[10]。IL-36 及其受体在肺纤维化发病机制中发挥重要作用,IL-36 激动剂(可能以 IL-36 β 和 IL-36 γ 为主)可通过调节免疫细胞募集和激活来促进肺纤维化[10]。体外实验表明 IL-38 过表达减轻了博来霉素诱导的小鼠的肺部炎症和纤维化损伤,减少了促炎和促纤维化细胞因子包括 IL-1 β 、IL-6、IL-17A 和肿瘤坏死因子 α 的产生,增加了抗炎细胞因子 IL-1 受体拮抗剂的释放[11]。近年来的研究表明,IL-36 在 RA、SSc、pSS、SLE 等 CTD 中异常表达[12],而关于 IL-36 在 CTD-ILD 患者血清中表达水平的报道甚少。近几年, Zhang 等研究发现 IL-36 α 、IL-36 γ 在 CTD-ILD 患者血清中的表达水平显著高于健康人群[13]。此外, Zheng 等报道显示 IL-36 α 、IL-36 γ 在 RA-ILD 患者血浆中显著升高,可作为 RA-ILD 诊断的血清生物标志物,且血浆 IL-36 γ 与 RA-ILD 患者的预后相关[14]。本研究的目的是探讨血清 IL-36 表达水平与 CTD-ILD 的关系,评估 IL-36 作为 CTD-ILD 潜在生物标志物的价值,为 CTD-ILD 的早期筛查、分层管理及靶向治疗提供新型生物标志物筛选策略和探索发病机制提供理论支撑。

2. 材料与方法

2.1. 研究对象

选取 2024 年 5~12 月湖北民族大学附属民大医院风湿免疫科确诊的 111 例 CTD 患者,依据是否合并 ILD,将患者分为 CTD-ILD 组(56 例)和结缔组织病未合并间质性肺疾病(connective tissue disease-non interstitial lung disease, CTD-NILD)组(55 例),CTD-ILD 患者包括 RA-ILD (26 例)、pSS-ILD (12 例)及 SSc-ILD (18 例),CTD-NILD 患者包括 RA-NILD (26 例)、pSS-NILD (19 例)及 SSc-NILD (10 例)。同时纳入 55 名

同期健康体检者作为健康对照(healthy control, HC)组。本研究经湖北民族大学附属民大医院伦理委员会审查批准(伦理批件号: Y2024004), 所有研究对象均在获得知情同意并签署知情同意书后入组。

纳入标准: (1) CTD 患者均符合下列现行国际风湿病学会修订的 CTD 诊断标准: ① SSc 符合 2013 年美国风湿病学会(American college of rheumatology, ACR)/欧洲抗风湿病联盟(European league against rheumatism, EULAR)联合发布的分类标准诊断[15]; ② RA 参照 2010 年 ACR/EULAR 修订的分类诊断标准[16]; ③ pSS 采用 2016 年 ACR/EULAR 提出的分类诊断标准[17]。(2) CTD-ILD 诊断参考 2018 年《中国结缔组织病相关间质性肺病诊断和治疗专家共识》[18]。(3) 年龄 ≥ 18 岁。排除标准: (1) 合并慢性阻塞性肺疾病、肺部良恶性肿瘤、支气管扩张症、肺结核、肺部感染等肺部疾病的患者; (2) 过敏性肺炎、结节病、尘肺、放射性肺炎等原因引起的 ILD; (3) 合并心功能衰竭、肝功能衰竭以及肾功能衰竭等严重脏器功能障碍的患者; (4) 有其他部位恶性肿瘤病史的患者; (5) 妇女及孕妇; (6) 合并传染性疾病的患者, 如艾滋病、梅毒、肝炎等; (7) 合并有精神方面疾病、不愿意配合的患者。

2.2. ILD 的临床评估

由一名盲法处理的资深放射科主任医师, 依据国际半定量肺高分辨率计算机断层扫描(high-resolution computed tomography, HRCT)评估标准对 ILD 累及范围进行分级(1 级, 0%~25%; 2 级, 26%~50%; 3 级, 51%~75%; 4 级, 76%~100%) [19]。

2.3. 临床资料的收集

收集所有研究对象的民族、年龄、性别、吸烟史等一般临床资料, 以及 CTD 患者的实验室检验结果(血沉(erythrocyte sedimentation rate, ESR)、C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、中性粒细胞百分比(neutrophil percentage, NEU%)、血红蛋白、血小板计数等)和肺 HRCT 结果。

2.4. 样本的收集

征得研究对象知情同意后, 由临床科室护士采集所有研究对象空腹肘部静脉血 5 mL 装入采血管中, 4000 rpm (转每分钟)条件下离心 20 分钟, 离心后谨慎吸取上清液分离血清, 分装后于 -80°C 冰箱冻存待测。采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测所有研究对象的血清 IL-36 (包括 IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ , IL-36Ra 和 IL-38)浓度水平, 试剂购自泉州市睿信生物科技有限公司, 严格遵循制造商操作手册进行 ELISA 检测, 每批次实验均设置质控样本。

2.5. 统计分析

采用 IBM SPSS Statistics 27.0 统计软件对所有数据进行统计分析, 使用 GraphPad Prism 10.1.2 软件用于绘图。所有计量资料均行正态性检验, 符合正态者以均数 $\pm$ 标准差表示, 组间比较采用 t 检验(方差齐)或校正 t 检验(方差不齐), 多组间方差齐时行单因素方差分析, 否则选用非参数检验; 非正态数据用中位数(四分位距)描述, 组间差异分析采用 Mann-Whitney U 或 Kruskal-Wallis H 检验。计数资料以频数(百分比)表示, 组间比较应用 χ^2 检验或 Fisher 精确检验。变量相关性通过 Pearson 或 Spearman 相关系数评估。通过受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic, ROC)曲线分析评估血清 IL-36 对 CTD-ILD 的诊断效能。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3. 结果

3.1. 研究对象的基本临床资料特征对比

三组间性别、年龄、吸烟史及民族分布的基线特征均无统计学差异($P > 0.05$), CTD-ILD 组与 CTD-

NILD 组的病程无统计学差异($P > 0.05$), 详见表 1。CTD-ILD 组与 CTD-NILD 组疾病构成比无统计学差异($P > 0.05$), 详见表 2。

Table 1. Comparison of general clinical data of the three groups

表 1. 三组间一般临床资料比较

组别	HC (n = 55)	CTD-ILD (n = 56)	CTD-NILD (n = 55)	P 值
年龄(岁)	59.0 (56.0, 63.0)	61.5 (56.0, 69.0)	60.0 (56.0, 66.0)	0.268
性别(女), n (%)	43 (78.2)	41 (73.2)	45 (81.8)	0.550
吸烟者, n (%)	6 (10.9)	7 (12.5)	5 (9.1)	0.846
病程(年)	-	4.5 (2.0, 10.0)	5.0 (2.0, 10.0)	0.811
汉族, n (%)	43 (78.2)	44 (78.6)	42 (76.4)	0.957

注: -, 表示没有数据。

Table 2. Comparison of disease composition between CTD-ILD group and CTD-NILD group

表 2. CTD-ILD 组与 CTD-NILD 组疾病构成比较

分组	CTD-ILD (n = 56)	CTD-NILD (n = 55)	χ^2 值	P 值
RA, n (%)	26 (46.43)	26 (47.27)	0.008	0.929
pSS, n (%)	12 (21.43)	19 (34.55)	2.372	0.124
SSc, n (%)	18 (32.14)	10 (18.18)	2.867	0.090

3.2. CTD-ILD 组与 CTD-NILD 组实验室指标差异性分析

CTD-ILD 组和 CTD-NILD 组患者的 ESR、CRP、NEU%、血红蛋白、血小板计数均无统计学差异($P > 0.05$), 详见表 3。

Table 3. Comparison of laboratory indicators between CTD-ILD group and CTD-NILD group

表 3. CTD-ILD 组与 CTD-NILD 组实验室指标比较

实验室指标	CTD-ILD (n = 56)	CTD-NILD (n = 55)	t/Z 值	P 值
ESR (mm/h)	64.88 $\pm$ 35.16	52.49 $\pm$ 35.42	-1.849	0.067
CRP (mg/L)	12.32 (3.23, 37.32)	5.00 (3.00, 18.70)	-1.433	0.152
NEU% (%)	67.28 $\pm$ 11.74	63.75 $\pm$ 10.98	1.636	0.105
HGB (g/L)	118.39 $\pm$ 17.78	115.25 $\pm$ 16.17	0.972	0.333
PLT (10^9 /L)	257.57 $\pm$ 87.22	252.96 $\pm$ 110.07	0.245	0.807

3.3. 三组间血清 IL-36 表达水平比较

研究结果显示 IL-36 α 在 CTD-ILD 组、CTD-NILD 组及 HC 组血清中的表达水平分别为 80.78 (71.68, 93.18) pg/mL、77.69 (65.95, 93.14) pg/mL、68.54 (54.43, 77.77) pg/mL, Kruskal-Wallis H 检验显示组间差异具有统计学意义($H = 30.097, P < 0.001$)。由多重比较可知, IL-36 α 在 CTD-ILD 组和 CTD-NILD 组血清中的表达水平均高于 HC 组, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$); IL-36 α 在 CTD-ILD 组与 CTD-NILD 组血清中的表达水平无统计学差异($P = 0.246 > 0.05$) (见图 1(A))。

IL-36 β 在 CTD-ILD 组、CTD-NILD 组及 HC 组血清中的表达水平分别为 83.01 (69.41, 96.66) pg/mL、

64.52 (51.02, 79.69) pg/mL、47.06 (37.45, 56.14) pg/mL, Kruskal-Wallis H 检验显示组间差异具有统计学意义($H = 84.396, P < 0.0001$)。由多重比较可知, IL-36 β 在 CTD-ILD 组血清中的表达水平高于 CTD-NILD 组和 HC 组, 各组间血清 IL-36 β 表达水平差异均具有统计学意义($P < 0.05$) (见图 1(B))。

IL-36 γ 在 CTD-ILD 组、CTD-NILD 组及 HC 组血清中的表达水平分别为 132.34 (110.45, 151.08) pg/mL、116.41 (97.57, 135.78) pg/mL、92.89 (76.75, 109.52) pg/mL, Kruskal-Wallis H 检验显示组间差异具有统计学意义($H = 57.471, P < 0.001$)。由多重比较可知, IL-36 γ 在 CTD-ILD 组血清中的表达水平高于 CTD-NILD 组和 HC 组, 各组间血清 IL-36 γ 表达水平差异均具有统计学意义($P < 0.05$) (见图 1(C))。

IL-36Ra 在 CTD-ILD 组、CTD-NILD 组及 HC 组血清中的表达水平分别为 1.33 (0.99, 1.58) ng/mL、1.43 (1.28, 1.77) ng/mL、1.95 (1.59, 2.23) ng/mL, Kruskal-Wallis H 检验显示组间差异具有统计学意义($H = 55.912, P < 0.001$)。由多重比较可知, IL-36Ra 在 CTD-ILD 组血清中的表达水平低于 CTD-NILD 组和 HC 组, 各组间血清 IL-36Ra 表达水平差异均具有统计学意义($P < 0.05$) (见图 1(D))。

IL-38 在 CTD-ILD 组、CTD-NILD 组及 HC 组血清中的表达水平分别为 35.50 ± 6.72 pg/mL、 29.75 ± 5.43 pg/mL、 24.55 ± 5.13 pg/mL, Kruskal-Wallis H 检验(方差不齐)显示组间差异具有统计学意义($H =$

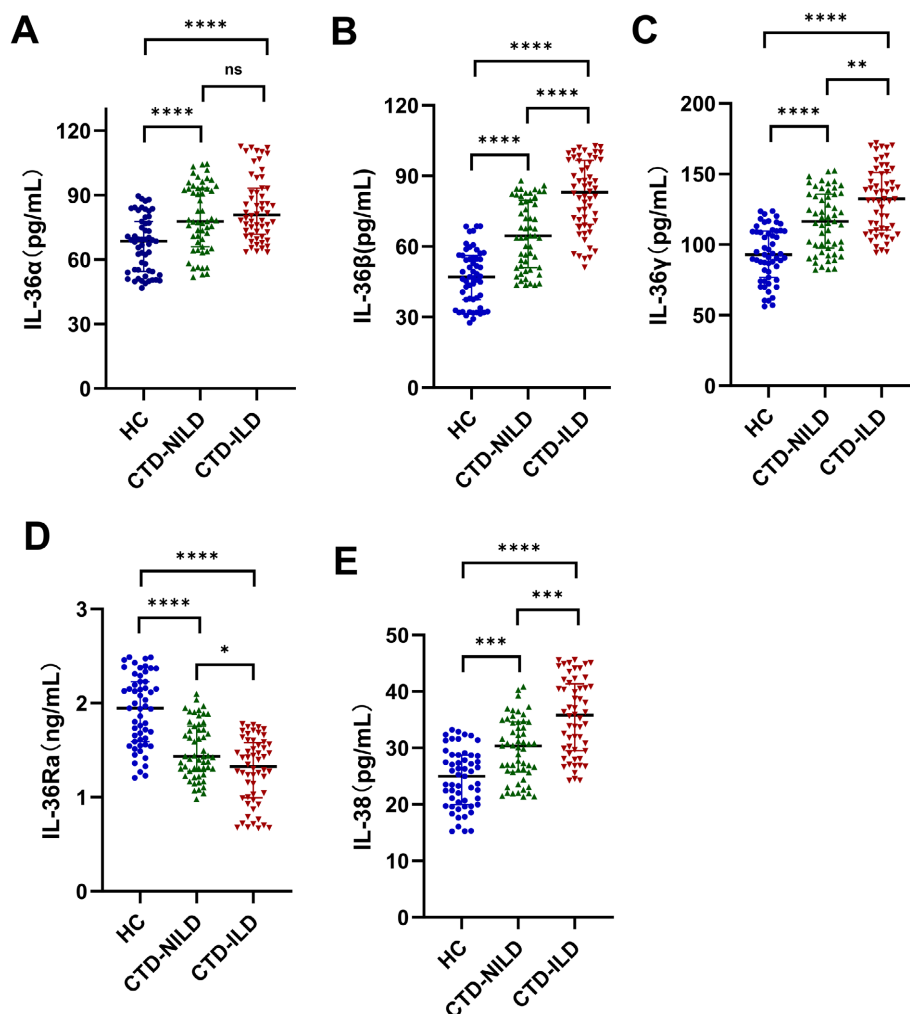


Figure 1. Serum IL-36 expression levels were compared between the three groups. Note: ns means the result is not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

图 1. 三组间血清 IL-36 表达水平比较。注: ns 表示结果不显著, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

58.173, $P < 0.001$)。由多重比较可知, IL-38 在 CTD-ILD 组血清中的表达水平高于 CTD-NILD 组和 HC 组, 各组间血清 IL-38 表达水平差异均具有统计学意义($P < 0.05$) (见图 1(E))。

3.4. CTD-ILD 亚组间的血清 IL-36 表达水平比较

研究结果显示 IL-36 α 、IL-36 β 、IL-36 γ 、IL-36Ra、IL-38 在 RA-ILD 组、pSS-ILD 组及 SSc-ILD 组血清中的表达水平差异均无统计学意义(P 均 > 0.05), 详见表 4。

Table 4. Comparison of serum IL-36 expression levels among CTD-ILD subgroups
表 4.CTD-ILD 亚组间的血清 IL-36 表达水平比较

指标	RA-ILD (n = 26)	pSS-ILD (n = 12)	SSc-ILD (n = 18)	H/F 值	P 值
IL-36 α (pg/mL)	80.20 (72.99, 98.12)	75.39 (65.22, 106.13)	83.33 (73.98, 91.74)	1.026	0.599
IL-36 β (pg/mL)	82.77 $\pm$ 14.52	76.73 $\pm$ 16.99	83.19 $\pm$ 14.70	0.799	0.455
IL-36 γ (pg/mL)	132.47 $\pm$ 23.23	135.49 $\pm$ 24.98	129.59 $\pm$ 22.95	0.230	0.795
IL-36Ra (ng/mL)	1.27 (0.99, 1.57)	1.37 (0.98, 1.63)	1.43 (0.99, 1.58)	0.484	0.785
IL-38 (pg/mL)	35.18 $\pm$ 6.19	37.78 $\pm$ 6.89	34.41 $\pm$ 7.33	0.953	0.392

3.5. 血清 IL-36 与实验室检验指标的相关性分析

研究结果显示 CTD-ILD 患者的血清 IL-36Ra 表达水平与 ESR 呈负相关($r = -0.352, P = 0.008 < 0.05$), 与 CRP、NEU%、血红蛋白、血小板计数、病程均无相关性(P 均 > 0.05)。CTD-ILD 患者的血清 IL-36 α 、IL-36 β 、IL-36 γ 、IL-38 表达水平与 ESR、CRP、NEU%、血红蛋白、血小板计数、病程均无相关性(P 均 > 0.05), 详见表 5。

Table 5. Correlation between serum IL-36 and laboratory markers in patients with CTD-ILD
表 5. 血清 IL-36 与 CTD-ILD 患者实验室指标相关性

指标	ESR		CRP		NEU%		血红蛋白		血小板计数		病程	
	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
IL-36 α	-0.223	0.098	0.036	0.791	0.047	0.730	-0.026	0.850	-0.165	0.224	-0.108	0.430
IL-36 β	0.108	0.429	0.165	0.225	0.223	0.099	0.200	0.140	0.092	0.500	-0.043	0.751
IL-36 γ	0.075	0.585	0.159	0.242	0.096	0.481	-0.201	0.138	0.052	0.701	-0.198	0.143
IL-36Ra	-0.352	0.008	-0.215	0.111	-0.032	0.817	0.027	0.843	0.038	0.779	-0.185	0.173
IL-38	0.118	0.387	0.026	0.847	-0.054	0.690	0.080	0.556	-0.029	0.832	-0.171	0.208

3.6. 血清 IL-36 与肺部 HRCT 所示 ILD 严重程度的相关性分析

研究结果显示 CTD-ILD 患者的血清 IL-36 α 、IL-36 β 、IL-36 γ 、IL-36Ra 及 IL-38 表达水平与肺部 HRCT 所示 ILD 严重程度(依据国际半定量 HRCT 评估标准对 ILD 累及范围进行分级, 分级越高, ILD 越严重)均无相关性(见图 2(A)-(E)), 所有 $P > 0.05$ 。

3.7. 血清 IL-36 诊断 CTD-ILD 的 ROC 曲线

以诊断 CTD-ILD 为状态变量, 以血清 IL-36 表达水平为检验变量绘制 ROC 曲线, 结果显示血清 IL-36 β 、IL-36 γ 、IL-36Ra、IL-38 从 CTD 中识别出 ILD 的最佳截断值分别为 84.56 pg/mL、102.59 pg/mL、

1.04 ng/mL、37.02 pg/mL，特异度分别为 96.4%、38.2%、98.2%、92.7%，敏感度分别为 48.2%、91.1%、28.6%、44.6%，约登指数分别为 0.446、0.293、0.268、0.374，曲线下面积(area under curve, AUC)及其 95% 置信区间(confidence interval, CI)分别为 0.780 (0.696, 0.863)、0.685 (0.588, 0.783)、0.652 (0.551, 0.754)、0.734 (0.642, 0.825)。血清 IL-36 β 联合 IL-38 诊断 CTD-ILD 的特异度为 76.36%，敏感度为 85.71%，约登指数为 0.621，AUC 及其 95%CI 为 0.855 (0.785, 0.924) (见图 3)。

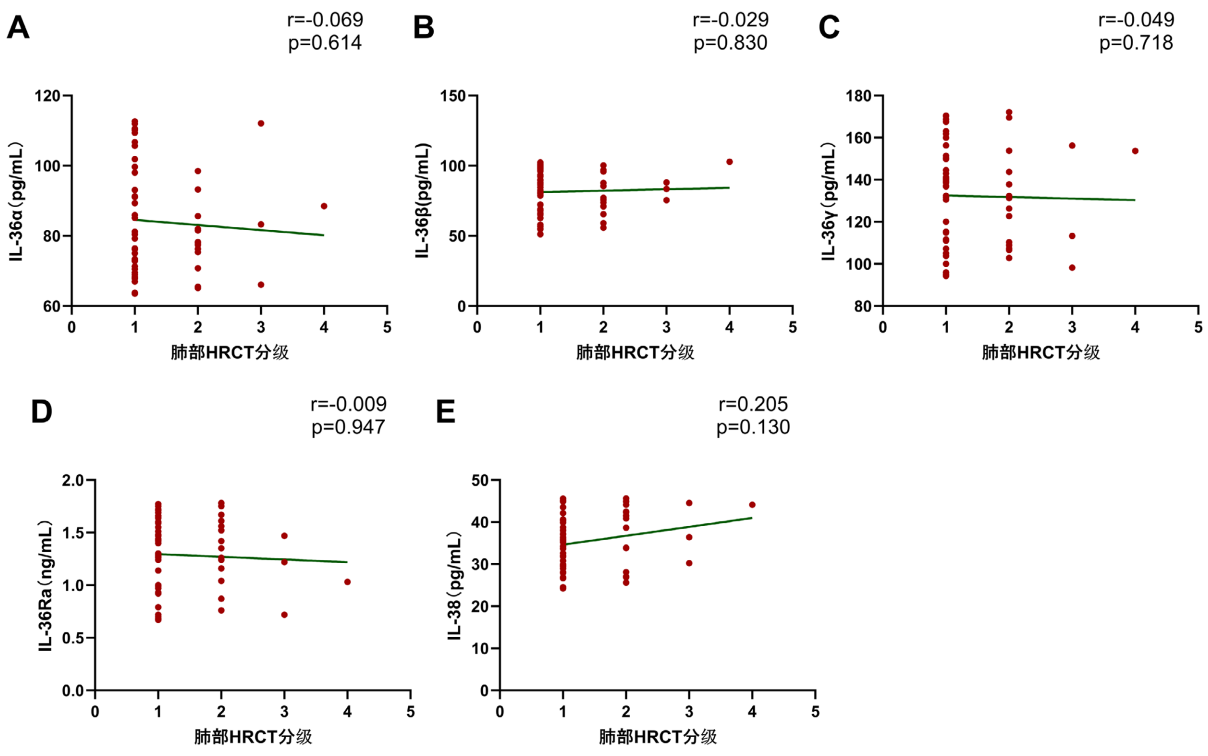


Figure 2. Correlation analysis of serum IL-36 expression level and severity of ILD on pulmonary HRCT in RA-ILD patients
图 2. CTD-ILD 患者血清 IL-36 表达水平与肺部 HRCT 所示 ILD 严重程度的相关性分析

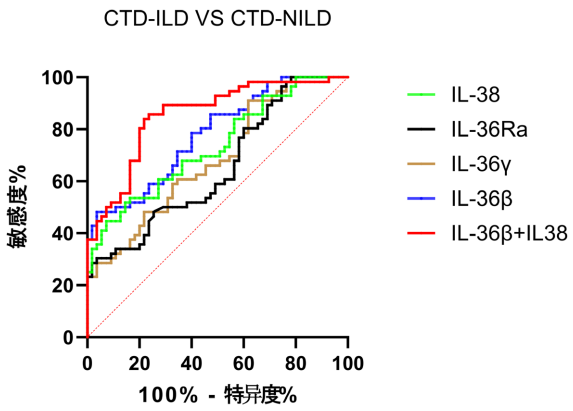


Figure 3. ROC curves of IL-36 for CTD-ILD diagnosis
图 3. IL-36 诊断 CTD-ILD 的 ROC 曲线

4. 讨论

ILD 是一组根据病因、临床、放射和组织病理特征分类的弥漫性实质性肺疾病[20]。CTD 相关 ILD

和特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是 ILD 的常见类型[21]。IPF 是一种慢性进行性间质性肺炎,典型特征为进行性呼吸困难、肺功能下降甚至呼吸衰竭[22]。最常与 ILD 相关的 CTD 包括 SSc、RA、IIM 和 pSS。ILD 是 CTD 最常见的临床表现之一,也可能是未被识别的 CTD 首次和唯一表现[23]。CTD-ILD 的病理生理机制尚未完全阐明,目前普遍认为是在遗传易感性、环境暴露因素以及表观遗传因素等共同作用下,先天性及适应性免疫系统的异常激活引发多种促炎细胞因子过度释放,通过破坏肺泡上皮细胞稳态,导致肺成纤维细胞的活化和增殖,分化为肌成纤维细胞,引起细胞外基质过度沉积,最终导致不可逆的肺纤维化,但是细胞因子在此过程中的调控机制仍存在争议[24]。

活化后的 IL-36 激动剂可与 IL-36R 结合形成二元复合物,随后募集 IL-1 受体辅助蛋白(IL-1 receptor accessory protein, IL-1RAcP)构建成三元复合物,然后 IL-36R 和 IL-1RAcP 的细胞内 Toll/IL-1 受体结构域相互作用,允许髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88)、IL-1 受体相关激酶和 Toll 相互作用蛋白的招募,激活核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B)和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路,诱导各种炎症介质的表达,加剧炎症应答[9] [25]。活化后的 IL-36Ra 可与 IL-36R 结合从而阻断 MyD88 依赖性信号通路活化,限制炎症信号传导[27]。IL-38 可以与 IL-36R 或 IL-1R1 结合阻止 MAPK、NF- κ B 等信号的传导[26]。现有研究证实 IL-36 在炎症疾病、自身免疫性疾病、纤维化疾病等疾病中发挥着重要作用[27]-[29]。本研究扩展了 IL-36 (包括 IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ , IL-36Ra 和 IL-38)的临床应用,旨在辅助 CTD-ILD 患者的诊断。

目前有小样本(针对中国人,纳入了 CTD-ILD 患者 19 例、IPF 患者 16 例和健康对照组 27 名)的研究结果显示 CTD-ILD 患者血清中的 IL-36 α 、IL-36 γ 表达水平显著高于健康人群[13],这与我们目前的发现一致。本研究以更大的样本量(纳入了 56 例 CTD-ILD 患者、55 例 CTD-NILD 患者和 55 名健康对照)证实,IL-36Ra 在 CTD-ILD 患者血清中的表达水平低于 CTD-NILD 患者及健康人群,而他们的研究显示 IL-36Ra 在 CTD-ILD 患者与健康人群血清中的表达水平无统计学差异,这与我们目前的研究不同。这可能与样本量不同、纳入 CTD-ILD 患者的种类差异,不同来源的 ELISA 检测试剂盒或实验条件有关。有研究发现 IL-36 α 在 pSS 患者血清和唾液腺组织中的表达水平显著升高,受体拮抗剂 IL-36Ra 在 pSS 患者唾液腺中的表达下降,而受体拮抗剂 IL-38 却相反呈表达上升,这可能与免疫系统试图抵消 IL-36 的不平衡激活有关[30]。本研究还发现 CTD 患者血清中的 IL-36 β 、IL-38 表达水平平均显著高于健康人群,CTD-ILD 患者血清中的 IL-36 β 、IL-36 γ 、IL-38 表达水平平均显著高于 CTD-NILD,IL-36Ra 在 CTD-ILD 患者血清中的表达水平低于 CTD-NILD 患者,但 CTD-ILD 患者与 CTD-NILD 患者的血清 IL-36 α 表达水平无统计学差异。

CTD-ILD 起病隐匿,临床表现个体差异大,迄今为止,尚无有效的根治方法。所以需要找到新的非侵入性生物标志物,可以预测有 ILD 风险的 CTD 患者或者识别出已患有 ILD 的 CTD 患者。本研究探讨了 IL-36 在 CTD-ILD 患者与 CTD-NILD 患者血清中的表达差异,发现 CTD-ILD 患者的血清 IL-36 β 、IL-36 γ 、IL-38 表达水平高于 CTD-NILD 患者,CTD-ILD 患者的血清 IL-36Ra 的表达水平低于 CTD-NILD 患者。通过 ROC 分析得知,血清 IL-36 β 、IL-36 γ 、IL-36Ra、IL-38 诊断 CTD-ILD 的 AUC 分别为 0.780、0.685、0.652、0.734,其中 IL-36 β 、IL-38 诊断 CTD-ILD 的 AUC 大于 0.7。因此,血清 IL-36 β 、IL-38 可能是诊断 CTD-ILD 的潜在生物标志物,且血清 IL-36 β 和 IL-38 联合诊断可明显提高敏感度(AUC 为 0.855)。

本研究结果显示血清 IL-36 α 、IL-36 β 、IL-36 γ 、IL-36Ra 及 IL-38 在 CTD-ILD 亚组(RA-ILD 组 26 例、pSS-ILD 组 12 例及 SSc-ILD 组 18 例)之间的表达水平均无统计学差异。但部分组别样本量少,存在潜在混杂因素(如年龄、民族、性别、病程、ESR、CRP 等),可能对血清 IL-36 检测结果的准确性产生干扰。为了验证我们的初步结果,需要进一步的大规模甚至多中心的研究。

我们的研究还发现 CTD-ILD 患者的血清 IL-36Ra 表达水平与血沉呈负相关, 其中 pSS-ILD 患者的血清 IL-36Ra 表达水平与血沉呈负相关, 而 RA-ILD、SSc-ILD 患者的血清 IL-36Ra 表达水平与血沉无相关性。目前关于 CTD-ILD 患者的血清 IL-36Ra 表达水平与血沉相关性的研究甚少。可能原因分析如下: IL-36Ra 是 IL-36 的天然拮抗剂, 通过抑制 IL-36 激动剂介导的 NF- κ B 和 MAPK 通路活化, 减少促炎因子(如 IL-6、IL-8 等)的释放[26]。而 ESR 是一个非特异性的炎症指标, 通常与体内炎症水平正相关, 其升高主要反映全身炎症状态, 而 IL-36Ra 水平降低可能削弱对炎症的抑制, 导致炎症活动增强(ESR $\uparrow$)。由于掺杂了 CRP、纤维蛋白原、免疫球蛋白、用药史等混杂因素, 可能会影响研究结果, 需进一步大样本、多中心研究以及更为深入的机制探索分析评估血清 IL-36Ra 表达水平与血沉相关性。

依据国际半定量 HRCT 评估标准对 CTD 患者相关的ILD累及范围进行分级, 本研究纳入 1 级的 CTD-ILD 患者 38 例, 2 级的 CTD-ILD 患者 14 例, 3 级的 CTD-ILD 患者 3 例, 4 级 CTD-ILD 患者 1 例。研究结果显示 IL-36 α 、IL-36 β 、IL-36 γ 、IL-36Ra 及 IL-38 在 CTD-ILD 患者血清中的表达水平与肺部 HRCT 所示ILD严重程度均无相关性。但由于纳入的 2 级、3 级和 4 级 CTD-ILD 患者较 1 级少太多, 这导致了偏倚, 需要进一步的大规模甚至多中心的研究进行分析血清 IL-36 与肺部 HRCT 所示ILD严重程度的相关性, 包括需要纳入更多的 2 级、3 级、4 级 CTD-ILD 患者。

综上所述, 血清 IL-36 β 、IL-38 可能是诊断 CTD-ILD 的潜在生物标志物, 且二者联合诊断可明显提高敏感度, IL-36 激动剂和受体拮抗剂的失衡可能在 CTD 及其相关ILD的病理生理过程中发挥调控作用。

基金项目

湖北省自然科学基金项目(2014CFC1123)。

参考文献

- [1] Shao, T., Shi, X., Yang, S., Zhang, W., Li, X., Shu, J., *et al.* (2021) Interstitial Lung Disease in Connective Tissue Disease: A Common Lesion with Heterogeneous Mechanisms and Treatment Considerations. *Frontiers in Immunology*, **12**, Article 684699. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.684699>
- [2] Wijsenbeek, M., Suzuki, A. and Maher, T.M. (2022) Interstitial Lung Diseases. *The Lancet*, **400**, 769-786. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(22\)01052-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(22)01052-2)
- [3] 石青, 杨明夏. 间质性肺疾病合并肺癌的研究进展[J]. 临床肺科杂志, 2023, 28(8): 1251-1255.
- [4] Wells, A.U. (2021) New Insights into the Treatment of CTD-ILD. *Nature Reviews Rheumatology*, **17**, 79-80. <https://doi.org/10.1038/s41584-020-00567-x>
- [5] Sun, D., Wang, Y., Liu, Q., Wang, T., Li, P., Jiang, T., *et al.* (2022) Prediction of Long-Term Mortality by Using Machine Learning Models in Chinese Patients with Connective Tissue Disease-Associated Interstitial Lung Disease. *Respiratory Research*, **23**, Article No. 4. <https://doi.org/10.1186/s12931-022-01925-x>
- [6] Chen, L., Zhu, M., Lu, H., Yang, T., Li, W., Zhang, Y., *et al.* (2022) Quantitative Evaluation of Disease Severity in Connective Tissue Disease-Associated Interstitial Lung Disease by Dual-Energy Computed Tomography. *Respiratory Research*, **23**, Article No. 47. <https://doi.org/10.1186/s12931-022-01972-4>
- [7] Xu, L., Wang, F. and Luo, F. (2022) Rituximab for the Treatment of Connective Tissue Disease-Associated Interstitial Lung Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Pharmacology*, **13**, Article 1019915. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1019915>
- [8] Neurath, M.F. (2020) IL-36 in Chronic Inflammation and Cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **55**, 70-79. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.06.006>
- [9] Han, Y., Huard, A., Mora, J., da Silva, P., Brüne, B. and Weigert, A. (2020) IL-36 Family Cytokines in Protective versus Destructive Inflammation. *Cellular Signalling*, **75**, Article ID: 109773. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109773>
- [10] Elias, M., Zhao, S., Le, H.T., Wang, J., Neurath, M.F., Neufert, C., *et al.* (2021) IL-36 in Chronic Inflammation and Fibrosis—Bridging the Gap? *Journal of Clinical Investigation*, **131**, e144336. <https://doi.org/10.1172/jci144336>
- [11] Xu, Z., Yuan, X., Gao, Q., Li, Y. and Li, M. (2020) Interleukin-38 Overexpression Prevents Bleomycin-Induced Mouse Pulmonary Fibrosis. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **394**, 391-399. <https://doi.org/10.1007/s00210-020-01920-3>

- [12] Chen, W., Yu, X., Yuan, X., Chen, B., Cai, N., Zeng, S., *et al.* (2021) The Role of IL-36 in the Pathophysiological Processes of Autoimmune Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, **12**, Article 727956. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.727956>
- [13] Zhang, Q., Guo, L., Song, X., Lv, C., Tang, P., Li, Y., *et al.* (2022) Serum IL-36 Cytokines Levels in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Connective Tissue Disease-Associated Interstitial Lung Diseases. *Clinica Chimica Acta*, **530**, 8-12. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2022.02.015>
- [14] Zheng, W., Hu, X., Zou, M., Hu, N., Song, W., Wang, R., *et al.* (2022) Plasma IL-36 α and IL-36 γ as Potential Biomarkers in Interstitial Lung Disease Associated with Rheumatoid Arthritis: A Pilot Study in the Chinese Population. *Inflammation*, **46**, 285-296. <https://doi.org/10.1007/s10753-022-01733-x>
- [15] van den Hoogen, F., Khanna, D., Fransen, J., Johnson, S.R., Baron, M., Tyndall, A., *et al.* (2013) 2013 Classification Criteria for Systemic Sclerosis: An American College of Rheumatology/European League against Rheumatism Collaborative Initiative. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **72**, 1747-1755. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204424>
- [16] Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A.J., Funovits, J., Felson, D.T., Bingham, C.O., *et al.* (2010) 2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria: An American College of Rheumatology/European League against Rheumatism Collaborative Initiative. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **69**, 1580-1588. <https://doi.org/10.1136/ard.2010.138461>
- [17] Shiboski, C.H., Shiboski, S.C., Seror, R., Criswell, L.A., Labetoulle, M., Lietman, T.M., *et al.* (2016) 2016 American College of Rheumatology/European League against Rheumatism Classification Criteria for Primary Sjögren's Syndrome: A Consensus and Data-Driven Methodology Involving Three International Patient Cohorts. *Arthritis & Rheumatology*, **69**, 35-45. <https://doi.org/10.1002/art.39859>
- [18] 中国医师协会风湿免疫科医师分会风湿病相关肺血管/间质病学组, 国家风湿病数据中心. 2018 中国结缔组织病相关间质性肺病诊断和治疗专家共识[J]. 中华内科杂志, 2018, 57(8): 558-565.
- [19] Zhou, A., Tang, H., Peng, W., Wang, Y., Tang, X., Yang, H., *et al.* (2023) KL-6 Levels in the Connective Tissue Disease Population: Typical Values and Potential Confounders—A Retrospective, Real-World Study. *Frontiers in Immunology*, **14**, Article 1098602. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1098602>
- [20] Mira-Avendano, I., Abril, A., Burger, C.D., Dellaripa, P.F., Fischer, A., Gotway, M.B., *et al.* (2019) Interstitial Lung Disease and Other Pulmonary Manifestations in Connective Tissue Diseases. *Mayo Clinic Proceedings*, **94**, 309-325. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2018.09.002>
- [21] Broens, B., Duitman, J., Zwezerijnen, G.J.C., Nossent, E.J., van der Laken, C.J. and Voskuyl, A.E. (2022) Novel Tracers for Molecular Imaging of Interstitial Lung Disease: A State of the Art Review. *Autoimmunity Reviews*, **21**, Article ID: 103202. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2022.103202>
- [22] Richeldi, L., Collard, H.R. and Jones, M.G. (2017) Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *The Lancet*, **389**, 1941-1952. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)30866-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)30866-8)
- [23] Mittoo, S., Gelber, A.C., Christopher-Stine, L., Horton, M.R., Lechtzin, N. and Danoff, S.K. (2009) Ascertainment of Collagen Vascular Disease in Patients Presenting with Interstitial Lung Disease. *Respiratory Medicine*, **103**, 1152-1158. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2009.02.009>
- [24] Wells, A.U. and Denton, C.P. (2014) Interstitial Lung Disease in Connective Tissue Disease—Mechanisms and Management. *Nature Reviews Rheumatology*, **10**, 728-739. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.149>
- [25] 何明欣, 张华, 周向东, 等. 白细胞介素-1 受体相关激酶通过 TLR-4/MyD88 信号通路调控内毒素诱导的气道黏液高分泌[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2022, 21(1): 50-54.
- [26] Ngo, V.L., Kuczman, M., Maxim, E. and Denning, T.L. (2021) IL-36 Cytokines and Gut Immunity. *Immunology*, **163**, 145-154. <https://doi.org/10.1111/imm.13310>
- [27] 汪存艺, 胡济安, 施洁琚. 白介素-36 在关节炎性疾病中的作用[J]. 浙江大学学报(医学版), 2023, 52(2): 249-259.
- [28] 杨薇, 钟波. IL-36 细胞因子在炎性疾病与肿瘤中的作用机制[J]. 中国细胞生物学学报, 2022, 44(4): 737-746.
- [29] Sachin, K.L., Arnold Greving, C.N. and Towne, J.E. (2022) Role of IL-36 Cytokines in Psoriasis and Other Inflammatory Skin Conditions. *Cytokine*, **156**, Article ID: 155897. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2022.155897>
- [30] Ciccia, F., Accardo-Palumbo, A., Alessandro, R., Alessandri, C., Priori, R., Guggino, G., *et al.* (2015) Interleukin-36 α Axis Is Modulated in Patients with Primary Sjögren's Syndrome. *Clinical and Experimental Immunology*, **181**, 230-238. <https://doi.org/10.1111/cei.12644>