

结膜松弛症泪液中细胞因子的检测

项敏泓¹, 张兴儒¹, 张迅轶², 庄凤君¹, 李玲¹, 李青松¹, 沈江帆²

基金项目: 中国上海市卫生局中医药科研基金资助项目(No. 2008Q006)

作者单位: (200062) 中国上海市, 上海中医药大学附属普陀医院¹眼科; ²核医学科

作者简介: 项敏泓, 女, 硕士, 主治医师。

通讯作者: 项敏泓. xiangminhong@sohu.com

收稿日期: 2010-05-10 修回日期: 2010-08-09

Tears cytokines in conjunctivochalasis

Min-Hong Xiang¹, Xing-Ru Zhang¹, Xun-Yi Zhang²,
Feng-Jun Zhuang¹, Ling Li¹, Qing-Song Li¹, Jiang-Fan Shen²

Foundation item: Traditional Chinese Medicine Research Foundation Project of Health Bureau, Shanghai, China (No. 2008Q006)

¹Department of Ophthalmology; ²Department of Nuclear Medicine, Putuo Hospital, Traditional Chinese Medical University, Shanghai 200062, China

Correspondence to: Min-Hong Xiang. Department of Ophthalmology, Putuo Hospital, Traditional Chinese Medical University, Shanghai 200062, China. xiangminhong@sohu.com

Received: 2010-05-10 Accepted: 2010-08-09

Abstract

• **AIM:** To analyze the expression changes of tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-8 (IL-8) in conjunctivochalasis tears.

• **METHODS:** Tears samples were obtained from 25 conjunctivochalasis cases and 13 normal controls. Fifteen microliters of tears were collected by microcapillary tubes from each eye. The tear concentrations of TNF- α , IL-6 and IL-8 were analyzed by radioimmunoassay method and compared the statistical difference between conjunctivochalasis and normal controls.

• **RESULTS:** The concentration of TNF- α in conjunctivochalasis patients was 19.05 ± 6.35 ng/mL, in normal control group was 14.13 ± 7.76 ng/mL; conjunctivochalasis concentration of IL-6 was 13.16 ± 8.97 pg/mL, normal control group concentration of IL-6 was 4.24 ± 3.97 pg/mL; conjunctivochalasis concentration of IL-8 was 34.40 ± 20.73 pg/mL, normal control group concentration of IL-8 was 18.31 ± 11.62 pg/mL. The difference between the two groups was significant ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** Radioimmunoassay method could detect levels of cytokines in tears. The tear concentrations of the three cytokines from the conjunctivochalasis group were significantly higher, which may indicate conjunctivochalasis is related to the increase of cytokines and immune response.

• **KEYWORDS:** conjunctivochalasis; tumor necrosis factor α ; interleukin-6; interleukin-8; radioimmunoassay; tear

Xiang MH, Zhang XR, Zhang XY, et al. Tears cytokines in conjunctivochalasis. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(9):1702-1703

摘要

目的: 分析结膜松弛症泪液中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 和白细胞介素-8 (IL-8) 的表达量的变化。

方法: 收集 25 例结膜松弛症患者和 13 例正常对照组的泪液样本, 毛细管从每眼收集 15 μ L 泪液, 采用放射免疫测定法测定结膜松弛症组和正常对照组的泪液中 TNF- α , IL-6 和 IL-8 的浓度并进行统计学分析。

结果: 结膜松弛症患者 TNF- α 浓度为 19.05 ± 6.35 ng/mL, 正常对照组 TNF- α 浓度为 14.13 ± 7.76 ng/mL; IL-6 浓度为 13.16 ± 8.97 pg/mL, 正常对照组 IL-6 浓度为 4.24 ± 3.97 pg/mL; IL-8 浓度为 34.40 ± 20.73 pg/mL, 正常对照组 IL-8 浓度为 18.31 ± 11.62 pg/mL; 两组之间比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

结论: 应用放射免疫的方法可检测泪液中的细胞因子含量, 结膜松弛症泪液中三种细胞因子的含量显著增高提示结膜松弛症可能与细胞因子的增加及免疫反应有关。

关键词: 结膜松弛症; 肿瘤坏死因子 α ; 白细胞介素-6; 白细胞介素-8; 放射免疫测定法; 泪液

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.09.020

项敏泓, 张兴儒, 张迅轶, 等. 结膜松弛症泪液中细胞因子的检测. 国际眼科杂志 2010;10(9):1702-1703

0 引言

结膜松弛症 (conjunctivochalasis, CCh) 是年龄相关性老年人常见眼病, 随着人口老龄化加快, 患者日趋增多。患者主诉眼部干涩、异物感、泪溢, 严重病例伴有刺痛、灼痛感、角膜溃疡或结膜下出血等, 影响眼视觉和生活质量^[1,2]。前期研究发现结膜松弛症泪液中羊齿状结晶减少, 泪液中黏蛋白异常。同时伴有结膜杯状细胞数量的减少, 从而导致泪液分泌异常、泪膜稳定性下降、泪液排泄延缓^[3,4]。但是, 结膜松弛症泪液的成分改变特别是泪液中细胞因子的变化趋势目前还未见相关报道。我们采用放射免疫测定法检测已明确诊断的结膜松弛症患者和正常人的泪液样本, 比较两组差异。对结膜松弛症患者泪液中肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和白细胞介素-8 (interleukin-8, IL-8) 的表达量进行测定, 旨在进一步了解结膜松弛症泪液中细胞因子的特异性改变, 从而探索结膜松弛症的发病机制。

1 对象和方法

1.1 对象 结膜松弛症组病例选择^[1]: 按结膜松弛症诊断标准入选病例^[5]; 排除角膜、泪腺及泪点异常, 冲洗泪道不通畅, 有睑缘内、外翻及倒睫的病例; 无影响泪液学异常的其他眼病及全身性疾病, 也无眼部手术史, 3mo 内未应用影响泪液的药物。正常对照组选择^[1]: 患者无眼部不适主诉。裂隙灯检查眼表形态结构无异常。3mo 内未应用影

响泪液的药物。随机年龄配对对照。收集 2009-01/2009-06 病例资料,其中结膜松弛症组 25 例 25 眼,男 10 例,女 15 例,年龄 65 ~ 81 (平均 70. 95) 岁。按张兴儒诊断分级标准^[5]: I 级 3 眼, II 级 9 眼, III 级 10 眼, IV 级 3 眼。正常对照组 13 例 13 眼,男 6 例,女 7 例,年龄 68 ~ 85 (平均 71. 64) 岁。TNF- α , IL-6, IL-8 放射免疫试剂盒 (美国西门子公司)。IMMULITE1000 化学发光仪 (美国西门子公司), 自吸式毛细管 (国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 方法 人泪液标本均根据自愿的原则,通过 10 μ L 的玻璃毛细管在下睑结膜囊泪阜处虹吸采集泪液 (未使用表面麻醉药物或其他化学性药物),尽量不接触眼表,每个病例收集 15 μ L 泪液,Ep 管分装,置 -80 $^{\circ}$ C 冷冻冰箱保存。采用平衡法标记聚苯乙烯试管,分别为总数 (T)、非特异结合 (NSB)、最大结合 (SO) 和样本 (U)。加样。室温放置 20min 后,离心。设置 γ 计数器各参数后,按放射免疫测定法程序要求将各测定管放入测定架上,按次序进行测定。测量结束,处理数据,打印出待测样品结果进行分析。

统计学分析:使用 SPSS 12.0 统计学软件进行统计处理,采用两样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

结膜松弛症患者 TNF- α 浓度为 19.05 ± 6.35 ng/mL; 正常对照组 TNF- α 浓度为 14.13 ± 7.76 ng/mL, 两组之间比较差异有统计学意义 ($t = -2.054, P < 0.048$)。结膜松弛症患者 IL-6 浓度为 13.16 ± 8.97 pg/mL; 正常对照组 IL-6 浓度为 4.24 ± 3.97 pg/mL, 两组之间比较差异有统计学意义 ($t = -3.398, P < 0.002$)。结膜松弛症患者 IL-8 浓度为 34.40 ± 20.73 pg/mL; 正常对照组 IL-8 浓度为 18.31 ± 11.62 pg/mL, 两组之间比较差异有统计学意义 ($t = -2.194, P < 0.036$)。

3 讨论

结膜松弛症是年龄相关性老年性常见眼病。Mimura 等^[2]查东京医科大学医院就诊的 1416 例 1 ~ 94 岁人群,结膜松弛症患病率为 85.24%。李青松调查上海市曹杨新村街道 ≥ 60 岁 2110 例 4220 眼中有 930 例 1762 眼患有结膜松弛症,患病率为 44.08%,其患病率随着年龄增大而增高,呈现年龄相关性眼病^[1]。

泪液是一种复杂的生物复合体,其有形成分中 90% 以上为蛋白质,包括酶类和细胞因子,其在眼表免疫防疫系统中起着重要的作用^[6]。Stern 等^[7]认为尽管干眼症的病因多种多样,但最终眼表的损害都是经过细胞因子受体介导的炎症过程。细胞因子多数细胞活化后,可产生多种多样的参与炎症、免疫、细胞生长、凋亡、分化和创伤修复的低分子量蛋白,这些蛋白被称为细胞因子,皮克 (pg) 或那克 (ng) 量的细胞因子就可发挥相应的活性。

肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor - α , TNF- α) 具有诱导肿瘤细胞死亡和整个肿瘤发生缺血性坏死的功能, TNF- α 是细胞黏附和趋化的主要介质,主要负责炎症期间细胞迁移的调控,其他主要效应还包括:触发产生炎症脂质介质、诱导活性氧自由基和致炎性酶分子的产生和释放。Oshida 等^[8]检测到干眼患者泪液中 TNF- α 浓度在 8 ~ 1500 pg, 浓度高的患者荧光素染色评分高,而正常人泪液中未见有表达,这表明泪液中 TNF- α 含量与角膜上皮受损正相关,暗示 TNF- α 也是干燥性角结膜炎发生的炎性介质。

白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 是一种调节炎症反应的细胞因子,是 T 细胞和 B 细胞功能的重要调节因子,可刺激造血细胞的生长和分化。免疫病理结果显示干眼患者结膜上皮多种炎性因子增高,而 IL-6 是最有价值的^[9],在 SS 患者,唾液和血清中 IL-6 含量也增高^[10]。

Kathleen 等进行了一项随机、双盲的临床试验,给予中至重度干眼患者 0.5g/L 环孢霉素 A 点眼,RT-PCR 测定结膜上皮 IL-6 含量,6mo 后显著下降,更加证实了 IL-6 是很明显的炎症标志因子^[11]。

白细胞介素 8 (interleukin-8, IL-8) 是被称为趋化因子的多肽家族介质的家族成员之一,IL-8 通过炎症反应早期所产生的其他细胞因子而间接受到调控。Nakamura 等^[12]采用显微毛细管法收集 270 例正常人泪液,测定 IL-8 等炎性因子在泪液中的含量并列出具体的数值,为以后的进一步研究提供了基础数值,Pflugfelder 等^[13]发现干燥性角结膜炎的患者,IL-1, IL-6 和 IL-8 在泪液中的含量均比正常人显著增高,并与结膜杯状细胞密度呈负相关,在 6 例患者局部应用可的松 2wk 后,患者眼部刺激症状减轻,泪液中 IL-8 RNA 水平显著下降。

我们通过放射免疫的方法检测结膜松弛症组和正常对照组人群泪液中 TNF- α , IL-6, IL-8 含量对比,可以看出,结膜松弛症组泪液中 3 种细胞因子的含量显著增高,经统计学分析,差异均具有显著性意义。由此推测结膜松弛症也与细胞因子的增加及免疫反应有关。但是由于本实验的局限性,对 3 种细胞因子在结膜松弛症病损过程中是如何发挥作用未进行深入的研究,因此,进一步研究三种细胞因子在发病过程中如何发挥作用以及如何对细胞因子的分泌进行有效的调控,此对结膜松弛症的预防、治疗及防止复发具有重要的意义。

综上所述,放射免疫测定法可实现高效、快速、高通量、高灵敏度的筛查泪液细胞因子。结膜松弛症组与正常对照组泪液蛋白存在差异,此为揭示结膜松弛症发病机制提供非常有价值的线索,并获得诊断结膜松弛症有价值的指标,同时为治疗提供指导方向。

参考文献

- 1 李青松,张兴儒,邹海东,等.上海市曹杨新村街道 60 岁及以上人群结膜松弛症流行病学调查.中华眼科杂志 2009;45(9):793-798
- 2 Mimura T, Yamagami S, Usui T, et al. Changes of Conjunctivochalasis with age in a hospital-based study. *Am J Ophthalmol* 2009;147(1):171-177
- 3 项敏泓,张兴儒,李青松,等.结膜松弛症泪液功能改变的观察.中华眼科杂志 2009;45(6):556-557
- 4 Di Pascuale MA, Espana EM, Kawakita T, et al. Clinical characteristics of conjunctivochalasis with or without aqueous tear deficiency. *Br J Ophthalmol* 2004;88(3):388-392
- 5 张兴儒,李青松,项敏泓.结膜松弛症的诊断与治疗.中华眼科杂志 2010;46(1):88-91
- 6 Zhou L, Beuerman RW, Foo Y, et al. Characterisation of human tear proteins using high-resolution mass spectrometry. *Ann Acad Med Singapore* 2006;35(6):400-407
- 7 Stern ME, Beuerman RW, Fox RI, et al. The pathology of dry eye the interaction between the ocular surface and lacrimal glands. *Cornea* 1998;17(6):584-589
- 8 Oshida T, iwata M, Sakimoto T, et al. Tumor necrosis factor-alpha in tears of patients with Sjogren syndrome. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 2004;108(5):297-301
- 9 Pflugfelder SC. Anti-inflammatory therapy for dry eye. *Am J Ophthalmol* 2004;137(2):337-342
- 10 Tishler M, Yaron I, Shirazi I, et al. Increased salivary interleukin-6 levels in patients with primary Sjogren's syndrome. *Rheumatol Int* 1999;18(4):125-127
- 11 Turner K, Pflugfelder SC, Ji Z, et al. Interleukin-6 levels in the conjunctival epithelium of patients with dry eye disease treated with cyclosporine ophthalmic emulsion. *Cornea* 2000;19(4):492-496
- 12 Nakamura Y, Sotozono C, Kinoshita S. Inflammatory cytokines in normal human tears. *Curr Eye Res* 1998;17(6):673-676
- 13 Pflugfelder SC, Jones D, Ji Z, et al. Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjogren's syndrome keratoconjunctivitis sicca. *Curr Eye Res* 1999;19(3):201-211