

新疆维吾尔族干眼症与趋化因子受体-5 的相关性研究

朱俊雕¹, 陈雪燕², 陈雪艺¹

作者单位:¹(830054)中国新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市,新疆医科大学第一附属医院眼科;²(830006)中国新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市沙区炉院街社区卫生服务中心(三建医院)五官科
作者简介:朱俊雕,硕士,主治医师,研究方向:眼底病。
通讯作者:陈雪艺,硕士,主任医师 研究方向:眼底病. ykcangel@163. com
收稿日期:2011-10-25 修回日期:2011-11-25

Correlation study of dry eye syndrome and chemotactic factor receptor-5 in Xinjiang Uygur nationality

Jun-Diao Zhu¹, Xue-Yan Chen², Xue-Yi Chen¹

¹Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumchi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China;²Department of Ophthalmology and Otolaryngology, Community Health Service Center of Luyuan Street in Sha District, Urumchi 830006, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Correspondence to: Xue-Yi Chen, Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumchi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. ykcangel@163. com
Received: 2011-10-25 Accepted: 2011-11-25

Abstract

• **AIM:** To explore the expression and clinical significance of chemotactic factor receptor-5 (CCR5) of dry eye syndrome patients conjunctival epithelium in Xinjiang Uygur nationality.
• **METHODS:** Thirty dry eye syndrome cases (60 eyes) in the outpatient of the first affiliated hospital of Xinjiang Medical University and thirty non-dry eye syndrome cases (60 eyes) were selected, and the conjunctival epithelial cells in dry eye syndrome and non-dry eye syndrome cases were obtained by impression cytology methods, and then immersed into the centrifugal tube with corresponding number respectively and the expression of CCR5 in conjunctival epithelium of dry eye syndrome and non-dry eye syndrome cases were detected by immunohistochemical method.
• **RESULTS:** Positive expression rate of CCR5 in dry eye syndrome cases was more obvious than that in non-dry eye syndrome cases ($P < 0.05$). Expression rate of CCR5 in dry eye syndrome cases was negatively correlated with Schirmer I test and break-up time (BUT); however it was positively related with corneal fluorescence staining.
• **CONCLUSION:** CCR5 plays an inflammatory mediators role in dry eye syndrome mechanism and its expression level reflects the progress of dry eye syndrome.

• **KEYWORDS:** dry eye syndrome; chemotactic factor receptor-5; impression cytology

Zhu JD, Chen XY, Chen XY. Correlation study of dry eye syndrome and chemotactic factor receptor-5 in Xinjiang Uygur nationality. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(1):43-45

摘要

目的:探讨新疆维吾尔族干眼症患者结膜上皮细胞的趋化因子受体-5 (CCR5) 的表达及临床意义。
方法:在新疆医科大学第一附属医院眼科门诊选择符合诊断、纳入和排除标准的干眼症患者 30 例 60 眼和正常人 30 例 60 眼,采用结膜印记细胞学的方法获取干眼症患者和正常人的结膜上皮细胞后,分别浸入有对应编号的离心管中,并应用免疫组织化学印记细胞学细胞涂片的方法检测正常人和干眼症患者结膜上皮细胞中 CCR5 的表达。
结果:干眼症组患者结膜上皮细胞中 CCR5 的阳性表达率均高于正常人 ($P < 0.05$),且该因子的表达与 BUT 和 Schirmer I 试验均呈负相关,与角膜荧光素染色呈正相关。
结论:在干眼症发生的机制中,CCR5 起到炎症介质的作用,其表达水平变化反映了干眼症的进展过程。
关键词:干眼症;趋化因子受体-5;印记细胞学
DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2012.01.13

朱俊雕,陈雪燕,陈雪艺.新疆维吾尔族干眼症与趋化因子受体-5 的相关性研究. 国际眼科杂志 2012;12(1):43-45

0 引言

2007 年国际干眼病专题研究会赋予干眼症的最新定义是:泪液和眼球表面的多因素疾病能引起患眼不适、视觉障碍和泪膜不稳定,损害眼球表面,伴有泪膜渗透性增加和眼表炎症^[1]。其病因繁多,发病机制较为复杂,既往研究表明,炎症在干眼症的发生、发展中起到关键性作用,但趋化性细胞因子受体-5 (CCR5) 介导的炎症反应在干眼症的演变过程中扮演的角色及具体作用机制尚不明确。CCR5 主要由 Th1 细胞表达,典型的 Th1 细胞因子包括 IFN, TNF- α , IL-2^[2] 和 IL-1 β 。它们是巨噬细胞分泌的一种炎症因子,对炎症免疫反应具有重要的调节作用。肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 也是由巨噬细胞分泌产生,具有广泛的生物活性,可诱导产生 IL-1, 活性氧自由基和致炎性酶分子,且可调控细胞黏附、趋化和炎症期间细胞迁移的作用。我们通过免疫组织化学的方法检测干眼症患者和正常人结膜上皮细胞中 CCR5 表达的水平,旨在探讨 CCR5 在干眼症发病机制中的作用。

1 对象和方法

1.1 对象 选取 2010-05/2011-01 我院门诊就诊的符合纳入、诊断、排除标准的干眼症患者 30 例 60 眼,其中男 19 例,

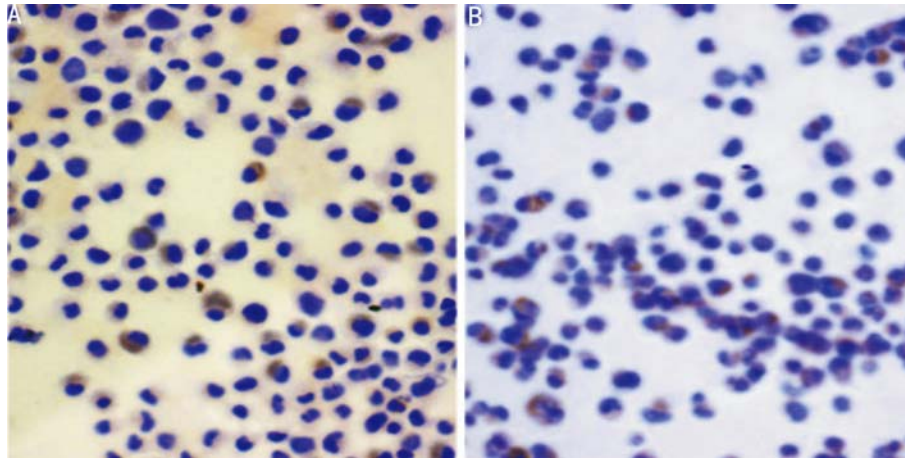


图1 结膜上皮细胞中趋化因子受体-5的表达(SABC×400) A:正常人;B:干眼症组。

女11例,年龄21~75(平均48.3±12.6)岁。另选择同期健康体检者30例60眼为对照,其中男19例,女11例,年龄21~75(平均42.6±13.4)岁。年龄、性别分别与干眼症患者相匹配。纳入标准:(1)有典型的干眼症状;(2)有显著的眼部症状,包括视疲劳、异物感、干涩感、眼酸痛、烧灼感、畏光流泪等。排除标准:有风湿病、糖尿病、近期做过外眼手术。有干眼症状的患者行干眼症3项检查:(1)泪液分泌试验(Schirmer I试验):泪液试纸条湿长<10mm/5min为阳性;(2)泪膜破裂时间(BUT):<10s为异常;(3)角膜结膜荧光素染色。症状加检查结果两项阳性者诊断为干眼症。

1.2 方法

1.2.1 临床检查

两组均行 BUT 和角膜荧光素染色检查及 Schirmer I 试验,分别记录 BUT 和角膜荧光素染色检查的评分及 Schirmer I 试验滤纸的湿度长度。Schirmer I 试验:(1)撕开包装袋,用小镊子将泪液检测滤纸条(天津晶明新技术开发有限公司)取出。(2)从开口处用小镊子折叠成直角,夹在下眼睑内侧 1/3 处的结膜囊内,另一端垂直挂在下眼睑外部,轻闭双眼稍向上视,可以随意瞬目。(3)5min 时取出滤纸条,2min 后再观察滤纸的湿度长,湿长在 10~25mm 之间为正常(不包括反折),<10mm 及 >25mm 者为异常,但老年人 <10mm 者,若无症状仍属于正常。BUT 和角膜荧光素(天津晶明新技术开发有限公司)染色检查:将浸润荧光素钠的部分放在下睑结膜囊内,嘱闭合眼睑,使荧光素均匀分布于角膜表面,充分暴露角膜,用钴蓝光照射,在裂隙灯下观察,从最后一次瞬目开始计时,记录泪膜上出现第 1 个破裂点的时间,重复测定 3 次,取平均值,BUT 值 <10s 判定为异常。角膜荧光素染色评分将角膜分为 4 个象限:每个象限无染色为 0,有染色分为轻度、中度和重度 3 个等级;<4 个点为轻度,4~8 个点为中度,>8 个点为重度。若各个象限点数不均匀,以多者为标准。以上各检查方法正常为 0 分,轻度为 1 分,中度为 2 分,重度为 3 分。通过以上检查将干眼症分为轻、中、重度 3 级(表 1)。

1.2.2 免疫组织化学法检测结膜上皮细胞中趋化因子受体-5 的表达

将 4mm×1mm 大小的乙酸纤维素薄膜纸条消毒后,用眼科无齿镊夹住乙酸纤维素薄膜一角轻轻置于患者颞侧球结膜表面,用玻璃棒轻压 3~5min 后取出,浸放在装有 1mL PBS 液的离心管中,重复取标本 2 次,待薄膜

表 1 干眼症的分级标准

分类	相关症状(分)	泪膜破裂时间(s)	角膜荧光素染色(分)	泪液分泌实验(mm/5min)
正常	0	≥10	0	≥10
轻度	1~3	7~9	1~4	7~9
中度	4~6	4~6	5~8	4~6
重度	7~9	0~3	9~12	0~3

表 2 干眼症和正常人的 CCR5 的阳性表达率 ($\bar{x} \pm s, \%$)

分组	n(例)	CCR5 阳性表达率	F	P
正常人	30	27.9±5.79	4.883	<0.001
轻度干眼症	10	28.1±3.48		
中度干眼症	10	30.4±6.78 ^a		
重度干眼症	10	35.2±5.89 ^b		

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 正常人。

稍干后,用 950mL/L 丙酮固定 5min,置于 -80℃ 超低温冰箱保存备用。采用 SABC 免疫组织化学检测试剂盒(北京中杉金桥生物有限公司)分别检测干眼症和正常人的结膜上皮细胞 CCR5 的阳性表达率。每张载玻片在 DAB 显色试剂(武汉博士德生物工程有限公司)显色之前用显微镜计数,并得出了正常组、干眼组结膜上皮细胞的个数 M,显色后计数出显色的个数 N,最后 M/N 得出 CCR5 的阳性表达率。

统计学分析:CCR5 的阳性表达率通过公式“= DEGREES (ASIN(SQRT(P)))”转化成正态的计量资料,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件进行方差分析,各组间的两两比较采用 SNK-q 法,指标间相关性分析采用 Pearson 相关分析,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组结膜上皮细胞的趋化因子受体-5 的表达

干眼症组患者结膜上皮细胞中 CCR5 的阳性表达率均高于对照组(P<0.05,表 2)。

2.2 上皮细胞的趋化因子受体-5 表达与临床检查指标的相关性

干眼症组患者结膜上皮细胞中 CCR5 的表达与 BUT 和 Schirmer I 试验均呈负相关($r = -0.164, P = 0.01$; $r = -0.120, P = 0.002$),与角膜荧光素染色呈正相关($r = 0.604, P = 0.00$,图 1)。

3 讨论

近年来随着社会经济的发展和人们生活水平的提高,干眼症的发病率有明显增高趋势。目前研究认为干眼症发病原因和机制复杂多样,可能包括年龄、性激素失调、自身免疫性疾病、角膜接触镜的配戴、炎症、神经调节异常和病毒损害等^[1,3]。CCR5 是近年来发现的一个 G 蛋白偶联的细胞趋化因子受体,全长包括 352 个氨基酸,具有 G 蛋白偶联受体所共有的 7 个跨膜保守区。当 CCR5 与特异的配体巨噬细胞炎症蛋白 1 α (MIP-1 α) 和 MIP-1 β 及调节正常活化 T 细胞的分泌蛋白 RANTES 结合后,激活 G 蛋白并最终引起 Ca²⁺ 浓度的上升及蛋白激酶 C 的活化,表现出白细胞的趋化性及炎症反应等各种生理功能^[4]。多数研究普遍认为干眼症是一种与细菌无关的眼表慢性炎症,而 IL 和 TNF 等炎症趋化因子介导的炎症反应在干眼症的发病机制中起到了重要的作用。目前已证实 Th1 和 Th2 细胞表面存在一些区别。例如,属于免疫球蛋白超家族的 CD26/LAG-3 以及 CCR5 主要由 Th1 表达,而 CCR3 和 CCR4 则与 Th2 有关。典型的人 Th1 细胞因子包括 IFN γ , TNF β 和 IL-2^[2],它们的刺激可以引起结膜杯状细胞数量的减少和功能的下降,使其分泌黏蛋白减少。而黏蛋白是泪膜的主要成分,具有维持泪膜稳定、保持正常光滑的眼表光学界面、润滑眼表和防止病原微生物入侵的重要作用^[5]。有研究认为泪膜的稳定性与结膜上皮炎症状态和增生情况密切相关,而这种由细胞因子受体介导的炎症反应可能为各种类型干眼症的共同发病机制^[6]。为进一步明确炎症及促炎因子 CCR5 受体在干眼发病中的作用,我们观察比较了干眼症患者和正常人结膜上皮细胞中 CCR5 表达水平的变化,结果显示干眼症组患者结膜上皮细胞中 CCR5 的阳性表达率均高于对照组 ($P < 0.05$),说明 CCR5 是干眼症发生的炎性介质,在干眼症的发生、发展过程中起着非常重要的作用。

目前诊断干眼的检查方法有许多种,例如 Schirmer I

试验、BUT 检查及荧光素染色检查等。BUT 检查用于评价角膜前泪膜的稳定性;荧光素染色检查反映角膜结膜上皮细胞缺损。本研究结果显示,干眼症组患者结膜上皮细胞的 CCR5 的表达与 BUT 和 Schirmer I 试验均呈负相关,与角膜荧光素染色呈正相关,表明 CCR5 参与了泪膜稳定性下降和眼表损害的过程,其表达水平变化反映了干眼症的进展过程。综上所述,CCR5 是干眼症发生的炎性介质,其表达水平变化反映了干眼症的进展过程。因此,研究 CCR5 在干眼症发生、发展中的具体作用机制,对干眼症的预防、治疗及防止复发具有重要的临床意义。

本研究的局限性主要表现在以下几个方面:(1) 纳入研究的对象主要来自新疆医科大学第一附属医院眼科的门诊患者,而不是人群抽样调查,因而样本的代表性对本研究有一定的影响。(2) 纳入的研究对象来自日照时间长、空气湿度小的隔壁干旱地区,故研究对象的地域性和特殊性也影响研究结果的普遍性。(3) 由于用来收集治疗的调查表没有把外眼疾病与眼科手术史列入调查项目,在一定程度上造成了研究信息的客观性。

参考文献

- 1 Lemp M, Baudouin C, Baum J, *et al.* The definition and classification of dry eye disease: report of the definition and classification subcommittee of the international dry eye workshop. *Ocul Surf* 2007;5(2):75-92
- 2 Ivan Roitt, Jonathan Brostoff, David Male(著). 周光炎(译). 免疫学. 北京:人民卫生出版社. 2002:126
- 3 刘祖国. 干眼症的发病机制. *眼科* 2005;14(5):342-345
- 4 Raport CJ, Gosling J, Schweickart VL, *et al.* Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1beta, and MIP-alpha. *J Biol Chem* 1996;271(29):17161-17166
- 5 蔡蓉蓉, 张朝然. 粘蛋白与干眼症. *眼科研究* 2008;26(11):877-880
- 6 Bacman S, Berra A, Sterirr-Borda L, *et al.* Muscarinic acetylcholine receptor antibodies as a new marker of dry eye Sjogren syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(2):321-327