

原发性翼状胬肉患者泪液中 TNF- α 和 IFN- γ 的表达

程 燕,刘先宁,吴 洁,肖湘华,潘士印,朱秀萍

基金项目:陕西省社会发展科技攻关项目(No. 2015SF206);西安市卫生局课题项目(No. J2011004)

作者单位:(710002)中国陕西省西安市第一医院眼科 陕西省眼科研究所 陕西省眼科学重点实验室

作者简介:程燕,女,在读博士研究生,副主任医师,病区副主任,研究方向:角膜及眼表疾病。

通讯作者:吴洁,毕业于西安医科大学,硕士研究生,主任医师,副院长,研究方向:角膜及眼表疾病。wutu63@163.com

收稿日期:2017-08-21 修回日期:2017-12-22

TNF- α and IFN- γ in tear of patients with primary pterygium

Yan Cheng, Xian-Ning Liu, Jie Wu, Xiang-Hua Xiao, Shi-Yin Pan, Xiu-Ping Zhu

Foundation items: Shaanxi Province Social Development and Technology Research Project (No. 2015SF206); Xi'an Health Bureau Project (No. J2011004)

Department of Ophthalmology, Xi'an No. 1 Hospital; Shaanxi Institute of Ophthalmology; Shaanxi Key Laboratory of Ophthalmology, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Jie Wu. Department of Ophthalmology, Xi'an No. 1 Hospital; Shaanxi Institute of Ophthalmology; Shaanxi Key Laboratory of Ophthalmology, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China. wutu63@163.com

Received:2017-08-21 Accepted:2017-12-22

Abstract

• **AIM:** To study the roles of tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interferon gamma (IFN- γ) in pathogenesis of primary pterygium and to explore the mechanism of tears in pterygium.

• **METHODS:** Concentrations of TNF- α and interferon gamma IFN- γ were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in asymptomatic control group (30 eyes of 30 healthy volunteers) and 60 primary pterygium patients (30 eyes of the 30 progressive cases, 30 eyes of the 30 quiescent cases). The data was analyzed by analysis of variance.

• **RESULTS:** The concentration of TNF- α and IFN- γ in the patients with primary pterygium were statistically significant ($P < 0.05$), compared with the normal control group. Tear concentration of TNF- α was significantly higher in primary pterygium compared with the control group. Tear concentration of IFN- γ was significantly reduced in primary pterygium compared with the control group ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** TNF- α and IFN- γ may be important in the pathogenesis and development of pterygium tissues.

It can provide some new directions and ideas for the treatment of primary pterygium.

• **KEYWORDS:** tumor necrosis factor alpha; interferon gamma; primary pterygium

Citation: Cheng Y, Liu XN, Wu J, et al. TNF- α and IFN- γ in tear of patients with primary pterygium. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2018;18(2):376-378

摘要

目的:检测原发性翼状胬肉患者泪液中肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、 γ 干扰素(interferon gamma, IFN- γ)的含量,探讨翼状胬肉发生的泪液机制。

方法:用酶联免疫吸附方法(ELISA)对单眼原发性翼状胬肉患者60例60眼(静止期组30例30眼、活动期组30例30眼)和正常对照组健康志愿者30例30眼泪液中TNF- α 、IFN- γ 的含量进行定量测定,并进行统计学分析。

结果:原发性翼状胬肉患者患眼泪液中TNF- α 、IFN- γ 的含量与正常对照组比较,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。原发性翼状胬肉患者患眼泪液中TNF- α 含量均高于正常对照组,而IFN- γ 含量均低于正常对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

结论:泪液中TNF- α 、IFN- γ 含量的变化在促进翼状胬肉的发生发展中可能发挥重要作用,为原发性翼状胬肉的药物治疗提供了新思路。

关键词: TNF- α ; IFN- γ ; 原发性翼状胬肉

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.2.45

引用:程燕,刘先宁,吴洁,等. 原发性翼状胬肉患者泪液中TNF- α 和IFN- γ 的表达. 国际眼科杂志2018;18(2):376-378

0 引言

翼状胬肉是常见眼表疾病之一,目前普遍认为角膜缘干细胞受损是其主要发病因素,但确切机制仍不清楚。研究表明^[1-2],细胞因子参与翼状胬肉的发生和发展。而以往研究多是对翼状胬肉组织中的细胞因子进行检测,发现某些细胞因子如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)多表现为促增殖作用。泪液是与眼表关系密切的物质,泪液中的细胞因子对某些眼表疾病的发生发展具有促进作用^[3-4]。研究发现,部分眼病患者泪液中检测到具有抑制细胞增殖作用的细胞因子如 γ 干扰素(interferon gamma, IFN- γ)^[5]。本研究对一组原发性翼状胬肉患者泪液中的TNF- α 和IFN- γ 进行定量测定,旨在探讨翼状胬肉患者泪液中这两种细胞因子的变化,并对其在翼状胬肉发病中的作用进行分析,以期为临床中原发性翼状胬肉的药物治疗提供新的依据。

1 对象和方法

1.1 对象 选取2015-05/2017-05我院眼科门诊确诊为

单眼原发性翼状胬肉的患者 60 例 60 眼,原发性翼状胬肉静止期患者 30 例 30 眼为静止期组,其中男 17 例 17 眼,女 13 例 13 眼,年龄 35~70(平均 51.0±11.46)岁;原发性翼状胬肉活动期患者 30 例 30 眼为活动期组,其中男 14 例 14 眼,女 16 例 16 眼,年龄 41~68(平均 52.6±8.59)岁。另选取无眼表疾病的健康志愿者 30 例 30 眼作为正常对照组,其中男 13 例 13 眼,女 17 例 17 眼,年龄 32~65(平均 46.65±10.74)岁。纳入标准:(1)所有翼状胬肉患者均为单眼原发性翼状胬肉,无其它眼部、角膜及结膜病变,无眼外伤病史和自身免疫性疾病病史;(2)静止期胬肉组织较薄,无充血,含有少量纤维血管,头部相对平坦;(3)活动期胬肉组织相对较肥厚,充血明显,头部隆起;(4)正常对照组健康志愿者双眼均无眼表炎症性疾病,无眼外伤及自身免疫性疾病病史。本研究经本院伦理委员会审批通过,所有受试者均知情同意并自愿签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 泪液采集 通过 10 μ L 的玻璃毛细管在患眼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,每位受试者收集泪液 15 μ L,分装后置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存,并在 1mo 内完成检测。

1.2.2 TNF- α 和 IFN- γ 的测定 采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测泪液中 TNF- α 、IFN- γ 的含量。严格按试剂盒说明书操作进行操作:将抗人 TNF- α 、IFN- γ 的单克隆抗体包被于酶标板上,标准品和待测样品中的蛋白与单抗结合,加入生物素化的 TNF- α 、IFN- γ 抗体,形成免疫复合物连接在酶标板上,辣根过氧化物酶标记的卵白素与生物素结合,加入辣根酶底物 OPD 显色,加入终止液,在 450nm 处测 OD 值。以标准品浓度为横坐标,以 OD 值为纵坐标,以平滑线连接各标准品的坐标点,绘制标准曲线,通过样品的 OD 值可在标准曲线上查出其浓度。

统计学分析:采用 SPSS17.0 统计软件。计量资料采用均数 \pm 标准差的形式表示,三组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 泪液中 TNF- α 含量的比较 活动期组、静止期组、正常对照组泪液中 TNF- α 的含量分别为 387.50 \pm 40.41、326.10 \pm 41.75、263.73 \pm 24.56pg/mL,三组之间比较差异有统计学意义($F=26.807, P<0.001$)。三组之间两两比较发现,活动期组和静止期组泪液中 TNF- α 含量均高于对照组,差异有统计学意义($t=123.77, 62.37, P=0.0001, 0.003$),且活动期组泪液中 TNF- α 含量高于静止期组,差异有统计学意义($t=61.4, P=0.003$)。

2.2 泪液中 IFN- γ 含量的比较 活动期组、静止期组、正常对照组泪液中 IFN- γ 的含量分别为 142.90 \pm 12.00、174.49 \pm 18.78、212.69 \pm 34.11pg/mL,三组之间比较差异有统计学意义($F=28.105, P<0.001$)。三组之间两两比较发现,活动期组和静止期组泪液中 IFN- γ 含量均低于对照组,差异有统计学意义($t=69.8, 38.20, P=0.0001, 0.001$),且活动期组泪液中 IFN- γ 含量低于静止期组,差异有统计学意义($t=31.60, P=0.002$)。

3 讨论

翼状胬肉是局部球结膜纤维血管组织增生侵犯角膜的一种疾病,是临床上最常见的眼病之一,不仅影响美观,

而且给患者带来视力损害,至今尚没有一种发病机制学说受到公认^[6]。

细胞因子是由免疫细胞和相关细胞产生的具有调节细胞功能的高活性、多功能蛋白质多肽分子。近年来,细胞因子在翼状胬肉发病中的意义受到广泛重视^[7-8]。细胞因子可调节多种细胞功能,不仅存在于翼状胬肉组织中,泪液中的细胞因子作为眼表疾病的重要标志物,其浓度的变化也可能引起一系列炎症反应^[9-11]。文献报道^[12-13],干眼患者的结膜、泪腺组织和泪液中白细胞介素-6(IL-6)、TNF- α 等的含量均增加,且与干眼的严重程度呈正相关。过敏性角结膜炎患者泪液中 TNF- α 、白细胞介素-2(IL-2)等均明显升高,且与角膜、结膜体征的严重程度呈正相关^[14-15]。长期应用抗青光眼药物治疗的患者泪液中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6 和 TNF- α 均较正常对照组明显升高^[16]。以上研究结果表明对于各种眼部疾病,泪液中细胞因子的浓度可能均有变化,因此我们推测泪液中细胞因子的变化可能与原发性翼状胬肉的发生发展密切相关。

TNF- α 是由巨噬细胞和活化的单核细胞产生的重要的免疫调节因子,是细胞因子中的核心成员^[17]。适宜浓度的 TNF- α 可以调节机体的免疫功能,维持机体稳定状态,抵御致病因子。同时, TNF- α 也是一种炎症介质,促进纤维母细胞的增殖和新生血管的形成^[18],改变多种靶细胞的功能,诱导炎性细胞产生白细胞介素-1(IL-1)。TNF- α 也是炎症期间细胞迁移的主要调控因素,可触发产生其它炎性介质、诱导活性氧自由基和致炎性酶分子的产生和释放。研究表明在翼状胬肉上皮和基质中检测出 TNF- α 的过度表达^[19];翼状胬肉组织培养上清液中 TNF- α 的表达明显升高;TNF- α 能在体外促进翼状胬肉成纤维细胞增殖,且呈剂量依赖关系^[20]。本研究在活体状态下进一步揭示了泪液中 TNF- α 在翼状胬肉发病中的作用,发现原发性翼状胬肉患者泪液中 TNF- α 的含量远高于正常对照组,其中活动期患者泪液中 TNF- α 的浓度高于静止期患者,这提示泪液中的 TNF- α 在活体状态下也同样能够促进翼状胬肉成纤维细胞的增殖,促进新生血管的生成,导致翼状胬肉的发生和复发。翼状胬肉组织中大量的淋巴细胞、浆细胞等浸润造成 TNF- α 的分泌表达进一步增加, TNF- α 的分泌增强,又促使纤维母细胞、胶原纤维的增生和炎性细胞的浸润,从而形成恶性循环,导致翼状胬肉的进展。泪液中 TNF- α 的含量易通过外部因素进行调控,降低泪液中 TNF- α 浓度和抗 TNF- α 作用从而抑制翼状胬肉的增生是我们未来研究的主要方向。

干扰素是一类具有抗病毒、影响细胞生长和分化、调节免疫功能等活性的蛋白质。研究表明^[21], IFN- γ 具有较强的抗纤维增殖作用。干扰素抑制细胞增殖的机制目前尚不清楚,可能为通过抑制细胞蛋白质、DNA 的合成,导致细胞老化,其中干扰素主要通过作用于细胞有丝分裂的 G1 期,从而抑制 DNA 合成,使细胞的有丝分裂过程受到抑制。也有研究认为,干扰素抑制细胞分裂可能是由于其作用于细胞膜上的某些特殊受体,刺激腺苷酸环化酶,增加环磷酸腺苷(cAMP)水平,从而抑制细胞 DNA 合成和细胞分裂。于此同时,干扰素具有拮抗部分细胞因子的作用^[22],能够抑制成纤维细胞增殖、趋化^[23]和胶原蛋白的合成^[24],从而抑制新生血管的生成^[25]。常用的抗代谢药

物如5-氟尿嘧啶(5-Fu)、丝裂霉素(MMC)等虽能有效抑制瘢痕形成,但由于该类药物具有细胞毒性,若术中处理不当会导致严重的并发症,如角膜上皮缺损、浅层巩膜坏死等。干扰素作为生物制剂,性质稳定,小剂量使用对人眼组织及全身无毒副作用,并发症少。Salomon的研究证实干扰素 α -2b滴眼液应用于复发性翼状胬肉的治疗安全、有效^[26]。不同干扰素抗细胞增殖的能力不同,IFN- γ 抑制细胞生长活性的能力强于IFN- α 或IFN- β 。本研究对泪液中IFN- γ 的水平进行研究,正常对照组泪液中IFN- γ 的含量明显高于翼状胬肉组,并且随着翼状胬肉的进展,这种保护性泪液细胞因子的含量逐渐降低,提示IFN- γ 能够抑制翼状胬肉的发生和复发,为我们进一步探索应用干扰素相关药物治疗该类疾病奠定了重要的实验基础。进而,我们通过给予相应的药物治疗能够改变其泪液细胞因子浓度,从而延缓翼状胬肉的发生及复发,本课题就这个问题出发,观察了临床上原发性翼状胬肉患者泪液中常见的两种细胞因子TNF- α 、IFN- γ 的浓度与正常对照组之间的差异。以期原发性翼状胬肉的发病机制提供新的依据,同时为临床上翼状胬肉的药物疗法提供新的思路。

研究证实^[5],IFN- γ 对TNF- α 等诱导的成纤维细胞增殖具有抑制作用,该过程可能与通过信号通路网络抑制细胞因子增殖信号的传递有关。本研究提示,在翼状胬肉患者中TNF- α 随患者病情的发展呈现上升趋势,而作为负向调节因子的IFN- γ 则呈现下降趋势。这种此消彼长的现象提示,泪液中的各种细胞因子之间互相影响,互相制约,形成一个动态平衡的状态。任何一种因素引起这种平衡被打破,都会导致疾病的发生。因此,降低泪液中TNF- α 的浓度,提高IFN- γ 的含量可能成为药物治疗原发性翼状胬肉的一个新思路。

参考文献

- 1 郑姣,赵婷,杨庆国,等. 细胞因子在翼状胬肉发病机制中的表达及其作用研究新进展. 中华临床医师杂志(电子版) 2012;6(18):5608-5611
- 2 刘寨花,王万辉. 翼状胬肉患者泪液中表皮生长因子的含量分析. 中国斜视与小儿眼科杂志 2010;18(1):21-23
- 3 廉井财,顾丽琼,石海云,等. 准分子激光原位角膜磨镶术前泪液中TNF- α 、IL-2和NGF的表达. 上海交通大学学报(医学版) 2008;28(6):669-671
- 4 林意玲,江海鹰,梁轩伟,等. LASIK术后角膜愈合中几种细胞因子的调节机制的研究. 中华实验眼科杂志 2006;24(4):421-423
- 5 张俊华,金威尔,林颖,等. 细胞因子对翼状胬肉成纤维细胞增殖的影响. 眼视光学杂志 2000;2(1):49-52
- 6 李淑琳. 翼状胬肉发病机制的研究进展. 眼科研究 2009;27(3):248-252
- 7 范少君,陈元芝. 细胞生长因子与翼状胬肉的关系研究新进展. 眼科新进展 2014;34(5):494-496
- 8 Gum SI, Kim YH, Jung JC, et al. Cyclosporine A inhibits TGF- β 2-induced myofibroblasts of primary cultured human pterygium fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2017;482(4):1148-1153

- 9 Acera A, Rocha G, Vecino E, et al. Inflammatory markers in the tears of patients with ocular surface disease. *Ophthalmic Res* 2008;40(6):315-321
- 10 Li S, Sack R, Vijmasi T, et al. Antibody protein array analysis of the tear film cytokines. *Optom Vis Sci* 2008;85(8):653-660
- 11 Solomon A, Dursun D, Liu Z, et al. Pro- and anti-inflammatory forms of interleukin-1 in the tear fluid and conjunctiva of patients with dry-eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(10):2283-2292
- 12 Pflugfelder SC. Anti-inflammatory therapy for dry eye. *Am J Ophthalmol* 2004;137(2):337-342
- 13 Gao J, Morgan G, Tieu D, et al. ICAM-1 expression predisposes ocular tissues to immune-based inflammation in dry eye patients and Sjögrens syndrome-like MRL/lpr mice. *Exp Eye Res* 2004;78(4):823-835
- 14 Nivenius E, Montan PG, Chryssanthou E, et al. No apparent association between periorcular and ocular microcolonization and the degree of inflammation in patients with atopic keratoconjunctivitis. *Clin Exp Allergy* 2010;34(5):725-730
- 15 Leonardi A, Curnow SJ, Zhan H, et al. Multiple cytokines in human tear specimens in seasonal and chronic allergic eye disease and in conjunctival fibroblast cultures. *Clin Exp Allergy* 2010;36(6):777-784
- 16 Malvitte L, Montange T, Vejud A, et al. Measurement of inflammatory cytokines by multicytokine assay in tears of patients with glaucoma topically treated with chronic drugs. *Br J Ophthalmol* 2007;91(1):29-32
- 17 Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD. Identify of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 1985;316(6028):552-554
- 18 Tsai YY, Lee H, Tseng SH. Evaluation of TNF- α and IL-1 polymorphisms in Taiwan Chinese patients with pterygium. *Eye(Lond)* 2005;19(5):571-574
- 19 Kria L, Ohira A, Amemiya T. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor, platelet derived growth factor, transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha in the pterygium. *Acta Histochem* 1996;98(2):195-201
- 20 张国安,张俊华,金威尔,等. 生长因子和干扰素对翼状胬肉成纤维细胞增殖的影响. 解放军医学杂志 2000;25(3):220-221
- 21 蓝育青,葛坚,林明楷,等. MTT法检测干扰素-C对人眼Tenon囊成纤维细胞增殖的抑制效应. 实用医学杂志 2002;18(2):123-125
- 22 Latina MA. Interferon-gamma inhibits collagen synthesis by human tenon's capsule fibroblasts *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33(12):3479-3480
- 23 Gillies M, Su T, Sarossy M, et al. Interferon-alpha 2b inhibits proliferation of human Tenon Capsule fibroblasts. *Graefe Arch Clin Exp Ophthalmol* 1993;231(2):118-121
- 24 Low SQ, Kitada S, Lee DA. Interferon-gamma inhibits collagen synthesis by human tenon's capsule fibroblast *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32(11):2964-2969
- 25 Guyer DR, Adamis AP, Gragoudas ES, et al. Systemic antiangiogenic therapy for choroidal neovascularization. *Arch Ophthalmol* 1992;110(10):1383-1384
- 26 Esquenazi S. Treatment of early pterygium recurrence with topical administration of interferon alpha-2b. *Can J Ophthalmol* 2005;40(2):185-187