

# 异基因造血干细胞移植患者泪液中 IL-36 的表达情况及其与眼表微环境的相关性分析

王仡宁<sup>1,2</sup>, 李德鹏<sup>3</sup>, 张玲<sup>1</sup>, 黄小雨<sup>1</sup>, 阴小月<sup>1,2</sup>, 张照委<sup>1</sup>, 郭建新<sup>2</sup>

引用:王仡宁,李德鹏,张玲,等. 异基因造血干细胞移植患者泪液中 IL-36 的表达情况及其与眼表微环境的相关性分析. 国际眼科杂志 2023;23(7):1173-1178

作者单位:<sup>1</sup>(221004)中国江苏省徐州市,徐州医科大学研究生学院;(221000)中国江苏省徐州市,徐州医科大学附属医院<sup>2</sup>眼科;<sup>3</sup>血液科

作者简介:王仡宁,在读硕士研究生,研究方向:角膜及眼表疾病。

通讯作者:郭建新,毕业于山东大学,硕士,硕士研究生导师,副教授,主任医师,研究方向:角膜及眼表疾病. Guojianxin\_724@126.com;李德鹏,毕业于徐州医科大学,硕士,硕士研究生导师,副教授,主任医师,研究方向:骨髓异常增生综合征、再生障碍性贫血. lidpeng30@163.com

收稿日期:2022-11-21 修回日期:2023-06-12

## 摘要

**目的:**通过检测异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)患者泪液中 IL-36( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ )的表达情况,研究其与眼表微环境的相关性,并进一步分析其表达与眼部移植物抗宿主病(oGVHD)的关系。

**方法:**前瞻性研究。选取 2020-01 就诊于我院血液科,行 allo-HSCT 患者 35 例 70 眼,另选取年龄、性别相匹配的健康志愿者 35 例 70 眼做为正常对照组。allo-HSCT 组受检者术后随访 3 次,每 3mo 1 次,对术后是否出现眼部症状的受检者分为 oGVHD 组和非 oGVHD(Non-oGVHD)组。对受试者进行眼表疾病指数(OSDI)问卷调查、泪液分泌试验(Schirmer 试验)、泪膜破裂时间(TBUT)、角膜荧光素钠染色(FL)、结膜印迹细胞学染色(CIC)评估眼表状况,并用 ELISA 检测受检者泪液中 IL-36( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ )表达水平。

**结果:**正常对照组中,IL-36( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ )表达水平分别为 74.32 $\pm$ 5.27、70.02 $\pm$ 8.43、97.41 $\pm$ 8.66pg/mL;allo-HSCT 组中,IL-36( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ )基线表达水平分别为 77.27 $\pm$ 7.03、74.53 $\pm$ 7.53、100.77 $\pm$ 9.74pg/mL,两组比较无差异( $t=1.648$ 、 $1.954$ 、 $1.262$ ,均  $P>0.05$ )。Non-oGVHD 组不同时间点 IL-36 $\alpha$ 、IL-36 $\beta$ 、IL-36 $\gamma$  比较均无差异( $P>0.05$ ),oGVHD 组不同时间点 IL-36 $\alpha$ 、IL-36 $\beta$ 、IL-36 $\gamma$  比较均有差异( $P<0.05$ )。与 Non-oGVHD 组相比,oGVHD 组不同时间点的 IL-36 $\alpha$ 、IL-36 $\beta$  均明显升高(均  $P<0.05$ )。oGVHD 组泪液中 IL-36( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ )表达水平与 OSDI 评分、FL、CIC 呈正相关,与 TBUT、Schirmer 试验呈负相关(均  $P<0.05$ )。

**结论:**检测泪液中 IL-36( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ )水平对 allo-HSCT 后 oGVHD 的诊断有重要意义;在 oGVHD 患者眼部不适症状出现之前,IL-36( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ )已在 oGVHD 患者泪液中高表达,且与眼表参数存在相关性。

**关键词:**异基因造血干细胞移植;眼部移植物抗宿主病;眼表微环境;白细胞介素-36(IL-36 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ )  
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2023.7.22

## Analysis of interleukin - 36 expression in tears of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation patients and its correlation with the ocular surface microenvironment

Yi-Ning Wang<sup>1,2</sup>, De-Peng Li<sup>3</sup>, Ling Zhang<sup>1</sup>, Xiao-Yu Huang<sup>1</sup>, Xiao-Yue Yin<sup>1,2</sup>, Zhao-Wei Zhang<sup>1</sup>, Jian-Xin Guo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduate School, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, <sup>3</sup>Department of Hematology, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China

**Correspondence to:** Jian-Xin Guo. Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China. Guojianxin\_724@126.com; De-Peng Li. Department of Hematology, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China. lidpeng30@163.com

Received:2022-11-21 Accepted:2023-06-12

## Abstract

• **AIM:** To detect the expression of interleukin(IL)-36 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) in tears of patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT), investigate its correlation with ocular surface microenvironment, and further analyze the relationship between its expression and ocular graft-versus-host disease(oGVHD).

• **METHODS:** Prospective study. A total of 35 patients (70 eyes) underwent allo-HSCT in the hematology department of our hospital in January 2020 were selected, and 35 healthy volunteers (70 eyes) with appropriate age and gender were selected as normal control group. The patients in the allo-HSCT group were followed up 3 times after operation once every 3mo. The subjects with postoperative ocular symptoms were divided into oGVHD and Non-oGVHD group. Ocular surface disease index (OSDI) questionnaire, Schirmer test, tear break-up time (TBUT), corneal fluorescein staining (FL), and conjunctival impression cytology (CIC) was conducted in three groups. Furthermore, the expression levels of IL-36 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) in tears were detected by ELISA.

• **RESULTS:** In the normal control group, IL-36 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) expression levels were  $74.32 \pm 5.27$ ,  $70.02 \pm 8.43$ ,  $97.41 \pm 8.66$  pg/mL, respectively; in the allo-HSCT group, IL-36 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) baseline expression levels were  $77.27 \pm 7.03$ ,  $74.53 \pm 7.53$ ,  $100.77 \pm 9.74$  pg/mL, with no statistically significant differences between the two groups ( $t = 1.648, 1.954, 1.262$ , all  $P > 0.05$ ). There were no significant differences in IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$  and IL-36 $\gamma$  in Non-oGVHD group at different time points ( $P > 0.05$ ), while there were significant differences in IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$  and IL-36 $\gamma$  in oGVHD group at different time points ( $P < 0.05$ ). Compared with Non-oGVHD group, the levels of IL-36 $\alpha$  and IL-36 $\beta$  at different time points were significantly increased in oGVHD group (all  $P < 0.05$ ). IL-36 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) of oGVHD group was positively correlated with OSDI score, FL and CIC, while it was negatively correlated with TBUT and Schirmer test (all  $P < 0.05$ ).

• **CONCLUSION:** Evaluation of levels of tear IL-36 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) can be of significance in diagnosing oGVHD after allo-HSCT. IL-36 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) is highly expressed in the tears of oGVHD patients before the onset of ocular symptoms, and it is correlated with the ocular surface parameters.

• **KEYWORDS:** allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; ocular graft-versus-host disease; ocular surface microenvironment; interleukin-36(IL-36 $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )

**Citation:** Wang YN, Li DP, Zhang L, et al. Analysis of interleukin-36 expression in tears of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation patients and its correlation with the ocular surface microenvironment. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2023; 23(7): 1173-1178

## 0 引言

同种异基因造血干细胞移植(allogeneic hematopoietic stem cell transplantation,allo-HSCT)是目前治疗多种血液系统疾病最常见的治疗方法<sup>[1]</sup>。但移植抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)仍是影响接受allo-HSCT患者成功率及威胁其预后最主要且最严重的并发症,据统计约有40%~60%接受造血干细胞移植患者发生<sup>[2-3]</sup>。眼部移植抗宿主病(ocular graft-versus-host disease, oGVHD)影响眼前段及眼后段,其中,最主要影响眼前节。对于oGVHD何时发生及其具体病理机制,尚不十分明确。现有的研究认为oGVHD发病与供体淋巴细胞相关,是T效应细胞自身免疫中枢耐受的结果<sup>[4]</sup>。此外,还有研究认为oGVHD发病与T细胞亚群的变化、B细胞失调、细胞因子的改变等有关<sup>[5]</sup>。白细胞介素(interleukin, IL)因在免疫细胞的成熟、活化、增殖过程中发挥重要的免疫调节作用<sup>[6]</sup>,因此,在IL水平进行监测及干预,对oGVHD进行诊断及治疗十分重要。白细胞介素-36(interleukin-36, IL-36)是IL-1家族新成员,由3个生物学功能相似的分子IL-36 $\alpha$ 、IL-36 $\beta$ 和IL-36 $\gamma$ 组成<sup>[7]</sup>。近期,有研究发现,人白细胞抗原-B27(human leukocyte antigen-B27, HLA-B27)相关性急性前葡萄膜炎和特发性急性前葡萄膜炎患者的房水和血清中可发现改良的IL-1家族谱细胞因子,包括IL-36<sup>[8-9]</sup>,且IL-36相关细胞因子被发现参与了纤维化的发病机制<sup>[10]</sup>。但是关于IL-36在oGVHD患者泪液中的表达水平及与患者临床

表现的相关性有待研究。因此,本研究对行allo-HSCT患者泪液中IL-36( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ )表达水平、眼表微环境各指标及联合结膜印迹细胞学染色(CIC)进行动态监测及术后随访,为oGVHD的诊断及治疗提供新的生物标志物。

## 1 对象和方法

**1.1 对象** 本研究为前瞻性研究。选取2020-01就诊于我院血液科,经血液科医师确诊的可行allo-HSCT的患者35例70眼,其中男21例,女14例,年龄18~52(平均 $35 \pm 9.73$ )岁。另选取年龄、性别相匹配的健康志愿者35例70眼作为正常对照组。本研究经徐州医科大学伦理委员会批准(批件号:XYFY2020-KL020-01),受试者均签署知情同意书,受试者、项目参与人仔细阅读知情同意书后,签名并注明日期。

**1.1.1 纳入标准** (1)就诊于我院血液科,经血液科医师确诊的可行allo-HSCT的患者;(2)年龄 $\geq 18$ 岁;(3)双眼前节无异常;(4)未经过任何眼部治疗。

**1.1.2 排除标准** (1)在纳入研究前6mo给予外用治疗,包括外用类固醇、环孢素、治疗性隐形眼镜使用;(2)存在眼表疾病,如干眼(dry eye, DE)、结膜炎、角膜炎、泪道、泪腺疾病;(3)存在其他眼部疾病及其可能影响眼表状态,包括高度近视、高眼压症、青光眼和视网膜疾病;(4)合并其他全身疾病影响眼表稳态者,包括糖尿病、干燥综合征、系统性红斑狼疮、银屑病;(5)进行过任何眼部手术;(6)存在精神系统疾病或配合不佳或拒绝参加者;(7)绝经期女性。

**1.2 方法** 正常对照组及allo-HSCT患者在移植开始前7~9d和allo-HSCT后3、6、9mo均接受了全面的眼科检查,包括视力、眼压、裂隙灯检查眼表、散瞳检查眼底。每次就诊前使用眼表疾病指数(ocular surface disease index score, OSDI)量表对眼部不适的主观症状进行评分,同时对患者进行眼表微环境相关检查[包括泪液分泌试验(Schirmer试验)、角膜荧光素钠染色(cornea fluorescein staining, FL)<sup>[11]</sup>、泪膜破裂时间(tear break-up time, TBUT)]、结膜印迹细胞学染色(conjunctival impression cytology, CIC)观察结膜杯状细胞与结膜上皮细胞<sup>[12-13]</sup>,采用改良Nelson分级对其进行评分<sup>[14]</sup>,以及使用酶联免疫吸附法(ELISA)检测泪液中炎性因子IL-36( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ )的表达情况。根据国际眼部移植抗宿主病共识工作组标准(International Chronic Ocular Graft-versus-Host-Disease Consensus Group, ICCGVHD)与国际泪膜和眼表协会干眼工作组第二次会议(Tear Film and Ocular Surface Society Dry Eye Workshop II, TFOS DEWS II),分别由血液学科医生和眼科医生做出全身性和眼部GVHD的诊断<sup>[15]</sup>,该标准基于Schirmer试验、角膜染色、结膜染色、干眼症状和系统性GVHD的存在。考虑GVHD可能累及多系统多组织,本研究根据德国/奥地利/瑞士慢性移植抗宿主病(cGVHD)临床实践共识会议(German/Austrian/Swiss Consensus Conference on Clinical Practice in cGVHD, GAS CC)标准对其进行疾病分级<sup>[16-17]</sup>。在每次就诊期间,告知患者眼部GVHD的发生率和潜在的严重后遗症,以及眼部干涩不适、光敏感、流泪、异物感、疼痛、发红、肿胀、分泌物增多或视力下降等警告信号。对患者随访9mo,在随访过程中,当检查患者眼表出现异常时,即使患者没有临床症状,应对其进行治疗。

**1.2.1 Schirmer 试验** 在无眼表麻醉下进行,嘱患者静

坐,采用泪液检测滤纸,末端折叠 5mm,轻轻置于下睑结膜中外 1/3 交界处,尽量避免刺激角膜引起反射性泪液分泌,嘱患者闭眼 5min,取出滤纸静置 2min 后观察,观察滤纸浸润长度。滤纸浸润长度 <10mm 为轻度,<5mm 为中度,<2mm 为重度。

**1.2.2 TBUT 和 FL** 将 1 $\mu$ L 2% 荧光素钠液体滴入结膜囊后眨眼 3 次,以 s 为单位记录 TBUT,即自最后一次瞬目后睁眼至角膜出现第一个黑斑记录时间,正常 >10s, 5s < TBUT <10s 为可疑,<5s 为异常。90s 后,角膜上皮完整性在裂隙灯显微镜下用钴蓝色滤光片分级,将角膜分为 4 个象限,分别进行评分。如前所述评估等级,简述如下:无染色,0 分;轻微点状染色少于 30 个斑点,1 分;点状染色超过 30 个斑点,但不扩散,2 分;严重的弥漫性染色,但没有阳性斑块,3 分;阳性荧光素斑块,4 分;4 个象限的分数相加为最终得分(总计为 16 分)<sup>[11,18]</sup>。

**1.2.3 CIC** 将醋酸纤维滤膜预先剪成直边为 4mm $\times$ 6mm $\times$ 9mm 大小的梯形备用。盐酸奥布卡因滴眼液点眼 1 次,5min 后,用棉签吸去穹窿部泪液。将其粗糙面贴于颞下侧角膜缘外 1mm 处的球结膜表面,轻轻加压,用玻棒轻轻按压 3~5s 后用无齿镊将滤纸从尖端小心剥离。95% 酒精固定 10~30min,4 $^{\circ}$ C 冰箱保存<sup>[14]</sup>。采用 PAS 联合苏木素染色法。各组分析眼表结膜上皮鳞状化生程度及杯状细胞密度,采用改良 Nelson 分级。

**1.2.4 泪液中炎症因子 IL-36 三种亚型水平检测** 泪液取样:用 Schirmer 条取样泪液。将滤纸以直角折叠并使用镊子放置在下穹窿内测 2/3 和外侧 1/3 之间,然后将其放置在 0.2mL EP 管中,收集后立即储存在 -80 $^{\circ}$ C 下。提取泪液<sup>[19]</sup>:将湿润长度的条带剪成碎片后加入 200 $\mu$ L 磷酸盐缓冲液(PBS),离心震荡 1h 后取 100 $\mu$ L 上清液保存在聚丙烯管中置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。两眼的泪液混合在一起,采用 ELISA(试验程序遵循制造商的说明)测定泪液中 IL-36 $\alpha$ 、IL-36 $\beta$ 、IL-36 $\gamma$  水平。所有定量数据均行 3 次取平均值,所有检查与标本取样均由同一名经验丰富的眼科医师完成。

统计学分析:采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,计量资料经 Shapiro-Wilk 正态性检验,符合正态分布的资料均采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,不同时点指标比较采用重复测量数据的方差分析,进一步的两两比较采用 LSD-*t* 检验,组间比较采用独立样本 *t* 检验。采用 Pearson 相关性分析对各指标间的相关性进行分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 一般情况** 受检患者的清髓调理方案:白血病包括:羟基脲 40mg/kg,阿糖胞苷 2.0g/m<sup>2</sup>,白舒非 0.8mg/kg,环磷酰胺 1.8g/m<sup>2</sup>,司莫司汀 250mg/m<sup>2</sup>,即复宁 2.5mg/kg;再生障碍性贫血包括:氟达拉滨 30mg/m<sup>2</sup>,环磷酰胺 30mg/kg,即复宁 3.75mg/kg。调理方案的选择基于患者的年龄、既往治疗、共病和恶性肿瘤的状态。所有患者均接受甲氨蝶呤和霉酚酸酯预防 GVHD。

研究期间 5 例因病情加重去世,6 例失访,共纳入 24 例 48 眼 allo-HSCT 患者,其中男 10 例,女 14 例,年龄 18~52(平均 34.04 $\pm$ 9.15)岁;正常对照组 35 例 70 眼,其中男 17 例,女 18 例,年龄 18~48(平均 33.34 $\pm$ 8.47)岁,两组年龄、性别比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。对 24

例完成术前及术后 3 次随访的患者进行眼表参数和生化参数的统计分析见表 1。

## 2.2 炎症因子 IL-36 三种亚型水平分析

**2.2.1 术前 allo-HSCT 组与正常对照组 IL-36 三种亚型水平比较** 使用 ELISA 检测各组受检者泪液中 IL-36( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ )的表达水平结果显示,与正常对照组相比,allo-HSCT 组 IL-36( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ )术前基线表达水平更高,其中,无论在正常对照组还是 allo-HSCT 组,以 IL-36 $\gamma$  表达水平最高,见表 2。

**2.2.2 oGVHD 组与 Non-GVHD 组不同时点 IL-36 三种亚型水平比较** allo-HSCT 组受检者术后随访 3 次,每 3mo 1 次,对术后是否出现眼部症状的受检者分为 oGVHD 组(8 例)和非 oGVHD(Non-oGVHD,16 例)组。两组间不同时点 IL-36( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ )水平经双因素重复测量方差分析结果显示,IL-36 $\alpha$ 、IL-36 $\beta$  在不同时点、分组、时点与分组的交互效应上均有统计学意义(IL-36 $\alpha$ : $F_{\text{时点}} = 47.018$ , $F_{\text{分组}} = 325.416$ , $F_{\text{时点}\times\text{分组}} = 45.600$ ,均  $P < 0.01$ ;IL-36 $\beta$ : $F_{\text{时点}} = 103.606$ , $F_{\text{分组}} = 107.577$ , $F_{\text{时点}\times\text{分组}} = 98.052$ ,均  $P < 0.01$ ),IL-36 $\gamma$  在不同时点上有统计学意义( $F = 4.491$ , $P = 0.019$ ),在不同分组、时点与分组的交互效应上无统计学意义( $F_{\text{分组}} = 2.975$ , $P_{\text{分组}} = 0.099$ ;  $F_{\text{时点}\times\text{分组}} = 3.138$ , $P_{\text{时点}\times\text{分组}} = 0.058$ ),见表 3。

**2.2.3 oGVHD 组和 Non-oGVHD 组内不同时点泪液中 IL-36 三种亚型水平比较** Non-oGVHD 组组内不同时点 IL-36 $\alpha$ 、IL-36 $\beta$ 、IL-36 $\gamma$  两两比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。oGVHD 组组内不同时点 IL-36 三种亚型水平两两比较结果显示,术后 6、9mo 时 IL-36 $\alpha$ 、IL-36 $\beta$  均明显高于术前、术后 3mo;术后 9mo 时 IL-36 $\alpha$ 、IL-36 $\beta$  均明显高于术后 6mo;术后 3mo 时 IL-36 $\beta$  明显高于术前。术后 6、9mo 时的 IL-36 $\gamma$  均明显高于术前,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 3。

**2.2.4 oGVHD 组和 Non-oGVHD 组间不同时点泪液中 IL-36 三种亚型水平比较** 术前,术后 3、6、9mo, oGVHD 组与 Non-oGVHD 组 IL-36 $\gamma$  比较,差异无统计学意义( $t = 0.377$ , $P = 0.710$ ;  $t = 1.717$ , $P = 0.100$ ;  $t = 2.018$ , $P = 0.056$ ;  $t = 2.827$ , $P > 0.05$ );术前,术后 3、6、9mo, oGVHD 组 IL-36 $\alpha$ 、IL-36 $\beta$  均明显高于 Non-oGVHD 组,差异有统计学意义(IL-36 $\alpha$ : $t = 4.111$ , $P = 0.001$ ;  $t = 4.374$ , $P < 0.001$ ;  $t = 12.517$ , $P < 0.001$ ;  $t = 9.925$ , $P < 0.001$ ; IL-36 $\beta$ : $t = 2.216$ , $P = 0.037$ ;  $t = 4.497$ , $P < 0.001$ ;  $t = 9.080$ , $P < 0.001$ ;  $t = 12.225$ , $P < 0.001$ ),见表 3。

**2.2.5 术后 oGVHD 组受检者泪液中 IL-36 三种亚型与临床参数的相关性** 在所有研究对象和对照对象中,观察到双眼的临床参数与眼部症状相似,8 例 oGVHD 患者的眼表损害程度均为轻度,CIC 结果见图 1,Nelson 分级为 0~2 级。故本研究记录了两只眼睛眼表参数的平均值与受检者术后泪液中 IL-36( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ )的水平,采用 Pearson 相关性分析对各指标间的相关性进行分析显示, oGVHD 患者泪液中 IL-36( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ )表达水平与眼表参数具有相关性。术后 3mo 时,IL-36 $\beta$  与 FL 不具有相关性( $r = 0.707$ , $P = 0.050$ ),IL-36 $\gamma$  与 TBUT 呈正相关( $r = 0.775$ , $P = 0.024$ );术后 6mo,IL-36 $\alpha$  与 TBUT 不具有相关性( $r = -0.635$ , $P = 0.091$ )。其余随访时间,IL-36( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ )与 OSDI 评分、FL、CIC 呈正相关,与 TBUT、Schirmer 试验呈负相关(均  $P < 0.05$ ),见表 4。

表1 24例 allo-HSCT 患者的基本信息

编号	年龄(岁)	性别	诊断	移植类型	aGVHD			cGVHD		
					有/无	涉及系统	发病时间(mo)	有/无	涉及系统	发病时间(mo)
1	33	M	AML	BMT	无			无		
2	29	M	SAA	BMT	无			有	眼部+口腔	9
3	52	F	AML	BMT	无			有	眼部	9
4	41	M	ALL	PBSCT	有	胃肠道	3	无		
5	34	M	MDS	BMT	无			有	皮肤	9
6	34	M	AML	BMT	无			无		
7	18	F	AML	PBSCT	无			无		
8	28	F	SAA	PBSCT	无			无		
9	36	F	MDS	BMT	无			无		
10	46	M	AML	PBSCT	有	皮肤	3	有	眼部+口腔+皮肤	9
11	48	M	SAA	BMT	无			有	皮肤	9
12	32	M	SAA	BMT	无			有	皮肤	9
13	26	F	AML	BMT	无			无		
14	45	M	ALL	BMT	有	眼部	3	有	眼部+口腔+皮肤	9
15	51	F	MDS	BMT	无			有	眼部	9
16	37	M	MDS	BMT	无			无		
17	33	F	MDS	BMT	无			有	眼部	9
18	35	M	AML	PBSCT	无			无		
19	31	M	CML	PBSCT	无			有	眼部+口腔	9
20	31	F	AML	BMT	无			有	眼部+口腔	9
21	24	F	ALL	BMT	无			有	口腔	9
22	26	F	MDS	BMT	无			无		
23	23	M	MDS	PBSCT	无			无		
24	24	M	AML	PBSCT	无			无		

注:aGVHD:急性移植物抗宿主病;cGVHD:慢性移植物抗宿主病;M:女性,F:男性;AML:急性髓系白血病;SAA:重型再生障碍性贫血;MDS:骨髓增生异常综合征;ALL:急性淋巴细胞白血病;CML:慢性髓系白血病;PBSCT:外周血干细胞移植;BMT:骨髓移植。

表2 术前 allo-HSCT 组与正常对照组 IL-36 三种亚型水平比较

( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL)

组别	例数	IL-36 $\alpha$	IL-36 $\beta$	IL-36 $\gamma$
allo-HSCT 组	24	77.27 $\pm$ 7.03	74.53 $\pm$ 7.53	100.77 $\pm$ 9.74
正常对照组	35	74.32 $\pm$ 5.27	70.02 $\pm$ 8.43	97.41 $\pm$ 8.66
<i>t</i>		1.648	1.954	1.262
<i>P</i>		0.106	0.057	0.213

注:正常对照组:年龄、性别相匹配的健康志愿者。

表3 不同时间 oGVHD 组和 Non-oGVHD 组泪液中 IL-36 三种亚型水平比较

( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL)

时间	IL-36 $\alpha$		IL-36 $\beta$		IL-36 $\gamma$	
	oGVHD 组	Non-oGVHD 组	oGVHD 组	Non-oGVHD 组	oGVHD 组	Non-oGVHD 组
术前	82.66 $\pm$ 2.45	74.58 $\pm$ 7.05	78.98 $\pm$ 5.70	72.30 $\pm$ 7.48	96.45 $\pm$ 5.37	97.89 $\pm$ 10.05
术后 3mo	85.49 $\pm$ 3.77	74.48 $\pm$ 6.55	83.84 $\pm$ 5.18 <sup>a</sup>	72.98 $\pm$ 5.75	103.88 $\pm$ 7.55	98.08 $\pm$ 7.90
术后 6mo	99.77 $\pm$ 3.19 <sup>a,c</sup>	75.07 $\pm$ 5.07	89.46 $\pm$ 4.24 <sup>a,c</sup>	73.30 $\pm$ 4.05	105.77 $\pm$ 7.63 <sup>a</sup>	98.77 $\pm$ 6.98
术后 9mo	124.51 $\pm$ 13.89 <sup>a,c,e</sup>	74.82 $\pm$ 3.94	122.55 $\pm$ 11.02 <sup>a,c,e</sup>	73.24 $\pm$ 4.20	106.15 $\pm$ 4.59 <sup>a</sup>	98.83 $\pm$ 6.52

注:<sup>a</sup>*P*<0.05 vs 术前;<sup>c</sup>*P*<0.05 vs 术后 3mo;<sup>e</sup>*P*<0.05 vs 术后 6mo。

### 3 讨论

GVHD 为 allo-HSCT 术后的常见并发症,根据美国国立卫生研究院(National Institutes of Health,NIH)的共识标准,以往根据临床症状的发病时间将移植物抗宿主病分为急性或慢性<sup>[20-21]</sup>。然而,在 2005 年,NIH 发布共识表示根据临床表现来定义急性和慢性移植物抗宿主病<sup>[22]</sup>。cGVHD 较多见,通常发生在病程晚期,常累及多器官系统,致残率和致死率均较高,是影响 HSCT 治疗效果的主

要障碍<sup>[23-24]</sup>。眼部是 cGVHD 主要靶器官之一。眼部受累的常见表现可与 DE 相似。但是 oGVHD 临床症状较普通 DE 更为复杂,显著影响患者的视力和生活质量<sup>[25]</sup>。

oGVHD 的发病机制尚不十分明确,根据 oGVHD 目前研究得出的发病机制,炎症是 DE 发生的核心,减轻眼表的炎症是其治疗中必不可少的一步,如环孢素滴眼液有益于抗炎治疗<sup>[26]</sup>。在 GVHD 患者中,正确识别眼部受累对

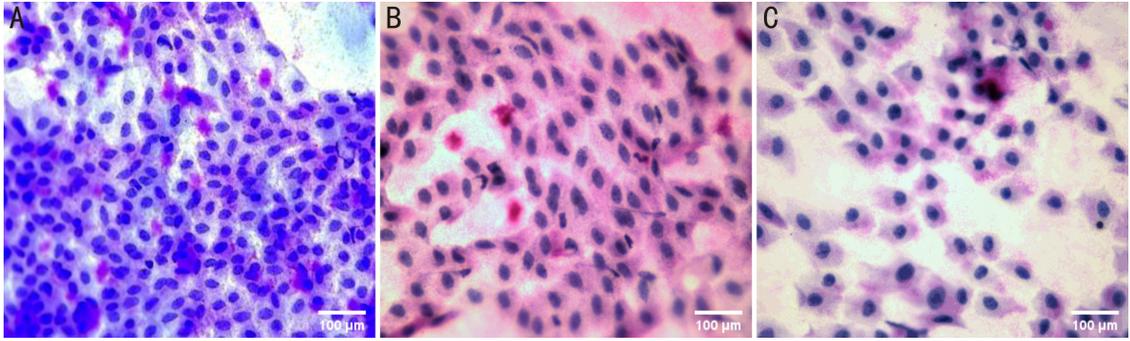


图1 CIC 图片 A:正常,结膜上皮细胞小而圆,细胞间连接紧密,杯状细胞 $>500/\text{mm}^2$ ,形态大而圆;B:1级,轻度鳞状上皮化生,结膜上皮细胞较大,细胞间距较0级大,细胞大,核小,杯状细胞  $350\sim 500/\text{mm}^2$ ,形态较0级无明显变化;C:2级,中度鳞状上皮化生,结膜上皮细胞大,分辨率,细胞间距更大,细胞核小,杯状细胞严重减少  $100\sim 350/\text{mm}^2$ 。

表4 oGVHD 组受检者术后泪液中 IL-36 三种亚型与临床参数的相关性分析

炎症因子	时间	OSDI 评分	Schirmer 试验	TBUT	FL	CIC
		P/r	P/r	P/r	P/r	P/r
IL-36 $\alpha$	术后 3mo	0.048/0.710	0.021/-0.786	0.040/-0.729	0.036/0.680	0.011/0.829
	术后 6mo	0.002/0.901	0.038/-0.736	0.091/-0.635	0.045/0.718	0.015/0.811
	术后 9mo	0.003/0.886	$<0.001/-0.969$	0.026/-0.767	0.024/0.775	0.002/0.913
IL-36 $\beta$	术后 3mo	0.006/0.695	0.022/-0.801	0.045/-0.718	0.050/0.707	0.015/0.811
	术后 6mo	$<0.001/0.951$	$<0.001/-0.972$	0.019/-0.793	0.001/0.935	0.001/0.932
	术后 9mo	0.023/0.780	0.020/-0.790	0.001/-0.934	0.019/0.792	0.008/0.848
IL-36 $\gamma$	术后 3mo	0.035/0.742	0.043/-0.722	0.024/0.775	0.015/0.807	0.005/0.873
	术后 6mo	0.010/0.832	0.004/-0.879	0.031/-0.754	0.009/0.838	0.036/0.739
	术后 9mo	0.019/0.791	0.030/-0.364	0.021/-0.787	0.003/0.885	0.001/0.916

于全身性疾病严重程度评估也至关重要,迄今为止,眼科医生尚无眼部特异性生物标志物。

CIC 是一种简单易行的眼表细胞学检查方法,主要通过检查眼表疾病中结膜上皮杯状细胞的改变及鳞状上皮化生程度,分析眼表上皮细胞的病理学改变。本研究通过 CIC 观察 allo-HSCT 患者的结膜上皮细胞、结膜杯状细胞,发现 oGVHD 患者有不同程度的鳞状上皮化生,杯状细胞密度减少,这些可能是影响泪膜层稳定性的重要因素,并且杯状细胞的密度可能反映了眼表面的整体健康状况,这与 Kinoshita 等<sup>[27]</sup>研究者观点一致。并且有研究表明 oGVHD 患者主要靶组织是结膜与泪腺,并发现结膜纤维化的病理改变与其临床表现有关<sup>[28]</sup>,一旦由于眼表面上的微环境(包括杯状细胞,其除了产生黏蛋白外还具有免疫调节功能)的紊乱而导致内环境稳定失调,眼表面就变成免疫高级部位<sup>[29]</sup>。对于 allo-HSCT 术后于眼科随访的患者,应对其进行 CIC 检查,进一步评估其眼表状态。

近年来,国内外学者对 oGVHD 患者泪液中 IL 因子表达水平进行检测,以求发现与 oGVHD 发病相关的生物标志物,用于预测 oGVHD 的发生及早期治疗干预。研究发现,IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-7 在 oGVHD 患者泪液中表达增高,并与患者临床严重程度相关<sup>[30]</sup>。此外, Sridevi 等同样发现与 Non-oGVHD 和健康对照相比, oGVHD 患者泪液中 IL-6、IL-8、IL-10、IL 12AP70、IL-17A 等细胞因子表达升高<sup>[19]</sup>。IL-36 是新发现的一类细胞因子,IL-36 细胞因子家族是 IL-1 家族的一部分。由 IL-36 $\alpha$ 、IL-36 $\beta$ 、IL-36 $\gamma$  和天然的拮抗剂 IL-36Ra 组成<sup>[31]</sup>,主要分布在皮肤、肺脏、关节、肠道、肾脏和大脑中,可由单核/巨噬细胞、T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、角质细胞、M2 细胞、朗格汉斯细胞等

多种细胞产生<sup>[32]</sup>。据报道,IL-36 $\gamma$  在银屑病、炎性肠病、关节炎、系统性红斑狼疮等多种炎症性疾病动物模型和患者体液中也报道表达增高,并能促进 IL-17、IL-20、IL-22、IL-23、TNF 和 IFN- $\gamma$  等炎症因子产生,这些证据均提示 IL-36 是一类“促炎细胞因子”<sup>[31,33-35]</sup>。

本研究发现,与正常对照组和 Non-oGVHD 组相比, oGVHD 患者泪液中 IL-36( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ) 显著升高,以 IL-36( $\alpha$ 、 $\beta$ ) 更明显,且在两组间不同时点 IL-36( $\alpha$ 、 $\beta$ ) 表达具有统计学意义,可能因为 IL-36 $\gamma$  在术前已呈高表达,而在眼表微环境受损的情况下升高趋势不明显,这与 Li 等<sup>[36]</sup>研究者发现一致。allo-HSCT 患者 IL-36( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ) 术前基线表达水平较正常对照组较高,这可能提示我们,原发疾病致机体免疫功能受损对 IL-36( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ) 的表达可能存在影响。对 oGVHD 组患者术后 IL-36( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ) 的表达水平与眼表参数进行分析,结果显示,IL-36 细胞因子表达水平与 OSDI 评分、FL、CIC 呈正相关,与 TBUT、Schirmer 试验呈负相关。如前所述,IL-36 是一类促炎细胞因子,根据此次研究结果, oGVHD 眼表微环境受损可能与其异常表达有关;无相关性临床参数与样本量偏少有关。本研究发现,在 oGVHD 眼部症状出现之前,IL-36( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ) 因子已出现高表达,随时间推移呈现增高趋势,且与 Non-oGVHD 组有统计学意义,且与临床眼表参数有相关性,这可能提示我们,在 oGVHD 眼表不适症状出现之前,眼表稳态结构可能已被破坏;IL-36 细胞因子可能是 oGVHD 的早期敏感指标。

IL-36 在许多器官/组织(包括皮肤、肺和肠道)中表达及其受体参与炎症反应<sup>[37]</sup>。在上皮细胞和特异性免疫细胞上观察到 IL-36 上调,诱导细胞进一步激活和分泌细

胞因子和趋化因子,导致多种免疫细胞募集和激活<sup>[38]</sup>。在急性葡萄膜炎的房水中检测到高度升高,与自身反应性T细胞免疫反应有关<sup>[8]</sup>,表明IL-36参与了针对致病性入侵的宿主免疫的发展。本研究观察到oGVHD的泪液中IL-36( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ )升高。尽管oGVHD的发病涉及非感染性原因,但本研究数据表明,oGVHD的发病机制与微环境中的宿主免疫介导的炎症有关。此外,我们发现IL-36和眼表微环境参数之间存在相关性,这进一步支持了IL-36可能参与了oGVHD发病机制。

综上,本研究认为检测泪液中IL-36细胞因子对allo-HSCT后oGVHD的诊断有重要意义,警醒我们定期随访allo-HSCT手术的患者,即使他们没有眼部症状。本研究中样本数量相对较少,无法全面研究不同严重程度oGVHD各临床变量的差异。另外,未来可进一步研究IL-36细胞因子与已证实存在oGVHD患者泪液中有诊断价值的炎症因子的关系。

#### 参考文献

- 1 Takami A. Hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Int J Hematol* 2018;107(5):513-518
- 2 Kim SK. Ocular graft vs. host disease. *Ocul Surf* 2005;3(4 Suppl):S177-S179
- 3 Shikari H, Antin JH, Dana R. Ocular graft-versus-host disease: a review. *Surv Ophthalmol* 2013;58(3):233-251
- 4 Carreno-Galeano JT, Dohlman TH, Kim S, et al. A review of ocular graft-versus-host disease: pathophysiology, clinical presentation and management. *Ocul Immunol Inflamm* 2021;29(6):1190-1199
- 5 Nguyen HD, Kuril S, Bastian D, et al. T-cell metabolism in hematopoietic cell transplantation. *Front Immunol* 2018;9:176
- 6 Palomo J, Dietrich D, Martin P, et al. The interleukin (IL)-1 cytokine family-Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases. *Cytokine* 2015;76(1):25-37
- 7 Ngo VL, Kuczma M, Maxim E, et al. IL-36 cytokines and gut immunity. *Immunology* 2021;163(2):145-154
- 8 Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* 2013;39(6):1003-1018
- 9 Zhao BB, Chen W, Jiang R, et al. Expression profile of IL-1 family cytokines in aqueous humor and sera of patients with HLA-B27 associated anterior uveitis and idiopathic anterior uveitis. *Exp Eye Res* 2015;138:80-86
- 10 Melton E, Qiu HY. Interleukin-36 cytokine/receptor signaling: a new target for tissue fibrosis. *Int J Mol Sci* 2020;21(18):6458
- 11 Lemp MA. Report of the national eye institute/industry workshop on clinical trials in dry eyes. *Clao J* 1995;21(4):221-232
- 12 Nelson JD, Havener VR, Cameron JD. Cellulose acetate impressions of the ocular surface. *Arch Ophthalmol* 1983;101(12):1869-1872
- 13 Zuazo F, López-Ponce D, Salinas-Toro D, et al. Conjunctival impression cytology in patients with normal and impaired OSDI scores. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2014;89(10):391-396
- 14 吴兵, 杨建, 马平. 结膜印迹细胞学检查在干眼症诊断中的特异性研究. *国际眼科杂志* 2012;12(9):1788-1789
- 15 Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, et al. National institutes of health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. the 2014 diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015;21(3):389-401.e1
- 16 Nair S, Vanathi M, Mukhija R, et al. Update on ocular graft-versus-host disease. *Indian J Ophthalmol* 2021;69(5):1038-1050
- 17 Dietrich-Ntoukas T, Cursiefen C, Westekemper H, et al. Diagnosis and treatment of ocular chronic graft-versus-host disease: report from

- the german-austrian-swiss consensus conference on clinical practice in chronic GVHD. *Cornea* 2012;31(3):299-310
- 18 Pauly A, Brignole-Baudouin F, Labbé A, et al. New tools for the evaluation of toxic ocular surface changes in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(12):5473-5483
- 19 Nair S, Vanathi M, Mahapatra M, et al. Tear inflammatory mediators and protein in eyes of post allogeneic hematopoietic stem cell transplant patients. *Ocul Surf* 2018;16(3):352-367
- 20 Espana EM, Shah S, Santhiago MR, et al. Graft versus host disease: clinical evaluation, diagnosis and management. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2013;251(5):1257-1266
- 21 Hessen M, Akpek EK. Ocular graft-versus-host disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012;12(5):540-547
- 22 Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11(12):945-956
- 23 Fall-Dickson JM, Pavletic SZ, Mays JW, et al. Oral complications of chronic graft-versus-host disease. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2019;2019(53):lgz007
- 24 MacDonald KP, Hill GR, Blazar BR. Chronic graft-versus-host disease: biological insights from preclinical and clinical studies. *Blood* 2017;129(1):13-21
- 25 梁媛, 徐哲. 慢性眼部移植抗宿主病相关干眼的研究与治疗现状. *国际眼科杂志* 2022;22(12):2016-2021
- 26 Chun YH, Beak JU, Kim HS, et al. Topical cyclosporine pretreatment of ocular surface in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Ocul Pharmacol Ther* 2018;34(9):628-632
- 27 Kinoshita S, Kiorpes TC, Friend J, et al. Goblet cell density in ocular surface disease. A better indicator than tear mucin. *Arch Ophthalmol* 1983;101(8):1284-1287
- 28 Ogawa Y, Shimmura S, Dogru M, et al. Immune processes and pathogenic fibrosis in ocular chronic graft-versus-host disease and clinical manifestations after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cornea* 2010;29(Suppl 1):S68-S77
- 29 Barnett BP, Afshari NA. Dupilumab-associated mucin deficiency (DAMD). *Trans Vis Sci Tech* 2020;9(3):29
- 30 Qiu YA, Hu BH, Peng RM, et al. Tear cytokines as biomarkers for acute ocular graft-versus-host disease. *Cornea* 2022;41(11):1405-1411
- 31 Walsh PT, Fallon PG. The emergence of the IL-36 cytokine family as novel targets for inflammatory diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2018;1417(1):23-34
- 32 Chen WJ, Yu X, Yuan XR, et al. The role of IL-36 in the pathophysiological processes of autoimmune diseases. *Front Pharmacol* 2021;12:727956
- 33 Yuan ZC, Xu WD, Liu XY, et al. Biology of IL-36 signaling and its role in systemic inflammatory diseases. *Front Immunol* 2019;10:2532
- 34 Zhou L, Todorovic V. Interleukin-36: structure, signaling and function. *Adv Exp Med Biol* 2021;21:191-210
- 35 Boutet MA, Nerviani A, Pitzalis C. IL-36, IL-37, and IL-38 cytokines in skin and joint inflammation: a comprehensive review of their therapeutic potential. *Int J Mol Sci* 2019;20(6):1257
- 36 Li JM, Lu R, Zhang Y, et al. IL-36 $\alpha$ /IL-36RA/IL-38 signaling mediates inflammation and barrier disruption in human corneal epithelial cells under hyperosmotic stress. *Ocul Surf* 2021;22:163-171
- 37 Bassoy EY, Towne JE, Gabay C. Regulation and function of interleukin-36 cytokines. *Immunol Rev* 2018;281(1):169-178
- 38 Ding LP, Wang XH, Hong XP, et al. IL-36 cytokines in autoimmunity and inflammatory disease. *Oncotarget* 2018;9(2):2895-2901