

FK506 对实验性过敏性结膜炎细胞因子表达的影响

钟 晖,方 旺,陈凌燕,张 莉,王 莉,肖诗艺

基金项目:中国深圳市科技计划资助项目(No. 201003155)
作者单位:(518026)中国广东省深圳市,深圳市儿童医院眼科
作者简介:钟晖,男,医学博士,副主任医师,研究方向:小儿眼科、眼表疾病与免疫。
通讯作者:方旺,男,医学博士,主治医师,研究方向:小儿眼科、眼表疾病与免疫. 15986669736@139.com
收稿日期:2011-11-03 **修回日期:**2012-01-20

Influence of FK506 on the cytokine expression in experimental allergic conjunctivitis

Hui Zhong, Wang Fang, Ling-Yan Chen, Li Zhang, Li Wang, Shi-Yi Xiao

Foundation item: Shenzhen Science and Technology Program, China (No. 201003155)
Department of Ophthalmology, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen 518026, Guangdong Province, China
Correspondence to: Wang Fang. Department of Ophthalmology, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen 518026, Guangdong Province, China. 15986669736@139.com
Received: 2011-11-03 Accepted: 2012-01-20

Abstract

• **AIM:** To investigate the immunomodulatory mechanism of FK506 on the local Th1/Th2 balance in mice model of experimental allergic conjunctivitis.

• **METHODS:** Experimental allergic conjunctivitis model was established through peritoneal injection of phosphate buffered saline (PBS) in SPF level Balb/c mice. In all, 80 mice were equally divided into 4 groups: model group, Dexamethasone (DM) group, FK506 group, and normal group. Fifteen days after the introduction of experimental allergic conjunctivitis, DM group and FK506 group mice were treated by 1g/L Dexamson eyedrops and FK506 eyedrops respectively, four times a day. Samples from one eye of the mice were used for histological study, while samples from the other eye were used for detection of interleukins.

• **RESULTS:** The strong positive rate (SPR) of eosinophilic granulocyte and CD4⁺ lymphocyte were both 85% in model group. SPR of eosinophilic granulocyte was 50%, and CD4⁺ lymphocyte was 40% in DM group. SPR of eosinophilic granulocyte was 30%, and CD4⁺ lymphocyte was 40% in FK506 group. The level of IL-4, IL-6, IL-10, IL-2, IL-12, IFN- γ were significantly higher in model group compared with normal group ($F = 11.278, P = 0.000$), while IL-4/IFN- γ , IL-6/IFN- γ , IL-10/IFN- γ were also significantly higher than normal group ($F = 8.965, P = 0.000$). The level of IL-4, IL-6, IL-10 was significantly lower in DM group

compared with model group ($F = 13.972, P = 0.000$), the level of IL-12 significantly higher ($F = 6.408, P = 0.002$), while the level of IL-2 and IFN- γ showed no significant change ($F = 1.824, P = 0.306$). The level of IL-4, IL-6, IL-10 was significantly decreased in FK506 group compared with model group ($F = 10.582, P = 0.000$), the level of IL-12 was significantly increased ($F = 9.643, P = 0.001$), while the level of IL-2 and IFN- γ showed no significant change ($F = 2.529, P = 0.407$). The level of IL-4, IL-6, IL-10 was significantly reduced in FK506 group compared with DM group ($F = 11.281, P = 0.000$), the level of IL-12 was significantly increased ($F = 8.634, P = 0.003$), while the level of IL-2 and IFN- γ showed no significant change ($F = 0.756, P = 0.305$).

• **CONCLUSION:** The suppressive effect of FK506 on eosinophilic granulocyte and CD4⁺ lymphocyte was evidently stronger than that of Dexamethasone. FK506 can shift the local Th1/Th2 balance of experimental allergic conjunctivitis toward Th2 direction with better effect than that of Dexamethasone.

• **KEYWORDS:** FK506; experimental allergic conjunctivitis; cytokines

Zhong H, Fang W, Chen LY, et al. Influence of FK506 on the cytokine expression in experimental allergic conjunctivitis. *Guji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(3):410-412

摘要

目的:探讨FK506对过敏性结膜炎动物模型局部Th1/Th2免疫平衡的调控作用机制。

方法:选取SPF级Balb/c鼠80只,腹腔注射卵白蛋白磷酸缓冲液(PBS)诱导动物模型。实验动物分设4组:阳性对照组(模型组)20只、地塞米松滴眼组(DM组)20只、FK506滴眼组(FK506组)20只和阴性对照组(正常组)20只。动物模型诱导成功后第15d开始,地塞米松组和FK506组分别给予局部1g/L地塞米松滴眼液和1g/L FK506滴眼液,4次/d。大鼠1眼标本用于组织学检测,对侧眼标本用于细胞因子检测。

结果:模型组嗜酸性粒细胞及CD4⁺淋巴细胞强阳性率均为85%。DM组CD4⁺淋巴细胞强阳性率为50%,嗜酸性粒细胞强阳性率为40%。FK506组CD4⁺淋巴细胞强阳性率为30%,嗜酸性粒细胞强阳性率为40%。模型组IL-4, IL-6, IL-10, IL-2, IL-12和IFN- γ 水平明显高于正常组($F = 11.278, P = 0.000$),而且IL-4/IFN- γ , IL-6/IFN- γ , IL-10/IFN- γ 比值也明显高于正常组($F = 8.965, P = 0.000$)。DM组IL-4, IL-6, IL-10水平较模型组明显降低($F = 13.972, P = 0.000$), IL-12水平上升($F = 6.408, P = 0.002$), IL-2和IFN- γ 水平无明显变化($F = 1.824, P = 0.306$)。FK506组IL-4, IL-6和IL-10水平较模型组明显降低($F =$

10.582, $P = 0.000$), IL-12 水平上升 ($F = 9.643, P = 0.001$), IL-2 和 IFN- γ 水平无明显变化 ($F = 2.529, P = 0.407$)。FK506 组 IL-4, IL-6 和 IL-10 水平较 DM 组明显降低 ($F = 11.281, P = 0.000$), IL-12 水平上升 ($F = 8.634, P = 0.003$), IL-2 和 IFN- γ 水平无明显变化 ($F = 0.756, P = 0.305$)。

结论:FK506 对嗜酸性粒细胞及 CD4⁺ 淋巴细胞的抑制作用明显强于地塞米松。FK506 可促使过敏性结膜炎小鼠局部 Th1/Th2 淋巴细胞失衡向 Th2 方向漂移,而且其效果优于地塞米松。

关键词:FK506; 实验性过敏性结膜炎; 细胞因子

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2012.03.10

钟晖,方旺,陈凌燕,等. FK506 对实验性过敏性结膜炎细胞因子表达的影响. 国际眼科杂志 2012;12(3):410-412

0 引言

过敏性结膜炎是一种儿童常见的眼表疾病^[1-3],其发病的确切机制尚不完全清楚。既往的研究表明:过敏性结膜炎涉及 IgE 介导的免疫机制,也有体液和细胞介导的免疫机制^[4,5]。IgE 介导 I 型变态反应的病理生理过程并未完全清楚,但主要表现为晚期的炎症反应。本研究拟通过 FK506 对过敏性结膜炎动物模型局部 Th1/Th2 细胞因子的检测,以揭示过敏性结膜炎的免疫学机制,探讨免疫抑制剂治疗该病的可能机制。本研究将可能阐明过敏性结膜炎的免疫学背景,为研制新的治疗和预防药物提供重要靶点。

1 材料和方法

1.1 材料 成年健康 Balb/c 雄性小鼠 80 只(由暨南大学医学院试验动物中心提供),鼠龄 6~8wk,体质量 15~20g,所有小鼠右眼标本用于组织学检测,左眼标本用于细胞因子检测。卵白蛋白磷酸缓冲液(PBS,含卵白蛋白 100 μ g,硫酸铝钾 10~20 μ g, pH = 7.4)。ELISA 试剂盒由广州雅怡生物科技有限公司提供。一抗工作液为鼠抗人 CD4⁺ 工作液,由广州佰默生物科技有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 诱导动物模型 给 Balb/c 鼠腹腔注射卵白蛋白磷酸缓冲液(PBS)1mL(含卵白蛋白 100 μ g,硫酸铝钾 10~20 μ g, pH = 7.4)免疫。14d 后,各眼滴 1mol/L DDT 10~20 μ L,以消除结膜黏液屏障,提高致敏效果。

1.2.2 实验分组 实验动物分设 4 组:阳性对照组(模型组)20 只、地塞米松滴眼组(DM 组)20 只、FK506 滴眼组(FK506 组)20 只和阴性对照组(正常组)20 只。动物模型诱导成功后第 15d 开始,地塞米松组和 FK506 组分别给予局部 1g/L 地塞米松滴眼液和 1g/L FK506 滴眼液,4 次/d。大鼠 1 眼标本用于组织学检测,对侧眼标本用于细胞因子检测。

1.2.3 细胞因子的检测 IL-4 水平的检测:按 ELISA 试剂盒说明进行,在抗 IL-4 单克隆抗体包被的酶标板上,分别加入标本及不同浓度的标准品(100 μ L/孔),室温(20~25 $^{\circ}$ C)孵育 120min,洗板 4 次,加入辣根过氧化物酶标记的抗 IL-4 单克隆抗体(100 μ L/孔),室温孵育 60min,洗板 4 次,加显色剂,避光室温 10~30min,加终止液,混匀,5min 内用酶标仪吸光度(A)值,绘制标准曲线,查出标本浓度。IL-2, IL-12, IL-6, IL-10 和 IFN- γ 水平的检测方法按试剂盒说明同上步骤进行。

表 1 各组嗜酸性粒细胞及 CD4⁺ 淋巴细胞免疫染色评分 只

组别	嗜酸性粒细胞染色				CD4 ⁺ 淋巴细胞染色			
	0分	1分	2分	3分	0分	1分	2分	3分
对照组	19	1	0	0	19	1	0	0
模型组	0	3	14	3	0	3	15	2
DM 组	2	8	6	4	0	12	16	2
FK506 组	4	10	6	0	4	8	8	0

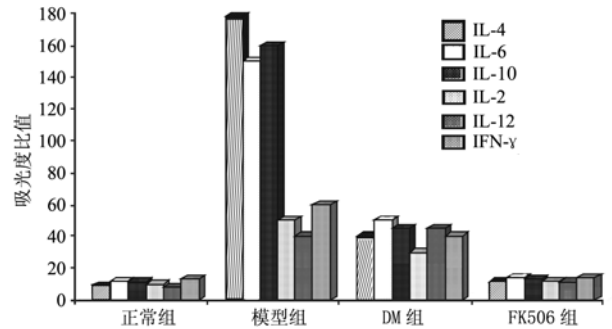


图 1 各实验组细胞因子结果。

1.2.4 组织学检测 冰冻切片 4~8 μ m,室温放置 30min 后,入 4 $^{\circ}$ C 丙酮固定 10min, PBS 洗, 5min \times 3 次,用过氧化氢孵育 5~10min,消除内源性过氧化物酶的活性。蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5min \times 2 次,然后用 50~100mL/L 正常山羊血清(PBS 稀释)封闭,室温孵育 10min。滴加鼠抗人 CD4⁺ 工作液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1~2h 或 4 $^{\circ}$ C 过夜。PBS 冲洗, 5min \times 3 次。滴加适量生物素标记二抗工作液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 10~30min。PBS 冲洗, 5min \times 3 次。滴加适量的辣根酶或碱性磷酸酶标记的链霉卵白素工作液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 \times 30min。PBS 冲洗, 5min \times 3 次。显色剂显色 3~15min(DAB)。结果按以下标准判断:染色呈阴性记为 0 分;组织染色较弱,阳性细胞 < 25%,记为 1 分;染色呈阳性, 25% \leq 阳性细胞数 < 50%,记分为 2 分;组织染色程度较强,阳性细胞 \geq 50%,记分为 3 分;记分 \geq 2 分,为强阳性。

2 结果

阴性对照组(正常组)中仅 1 只小鼠的嗜酸性粒细胞及 CD4⁺ 淋巴细胞染色评分为 1 分,其余为 0 分,模型组所有小鼠的嗜酸性粒细胞及 CD4⁺ 淋巴细胞均为阳性,其中 85% 为强阳性(二者有显著性差异, $P = 0.000$)。DM 组所有小鼠的 CD4⁺ 淋巴细胞均为阳性(仅 50% 为强阳性),嗜酸性粒细胞 90% 为阳性(仅 40% 为强阳性)。FK506 组 80% 小鼠的 CD4⁺ 淋巴细胞均为阳性(仅 30% 为强阳性),嗜酸性粒细胞 80% 为阳性(仅 40% 为强阳性),见表 1。

FK506 实验组干预前(模型组)IL-4, IL-6, IL-10, IL-2, IL-12 和 IFN- γ 水平明显高于阴性对照组 ($F = 11.278, P = 0.000$),而且 IL-4/IFN- γ , IL-6/IFN- γ 和 IL-10/IFN- γ 比值也明显高于阴性对照组 ($F = 8.965, P = 0.000$)。DM 干预后 IL-4, IL-6 和 IL-10 水平较干预前(模型组)明显降低 ($F = 13.972, P = 0.000$), IL-12 水平上升 ($F = 6.408, P = 0.002$), IL-2 和 IFN- γ 水平无明显变化 ($F = 1.824, P = 0.306$)。FK506 干预后 IL-4, IL-6 和 IL-10 水平较干预前(模型组)明显降低 ($F = 10.582, P = 0.000$), IL-12 水平上升 ($F = 9.643, P = 0.001$), IL-2 和 IFN- γ 水平无明显变化 ($F = 2.529, P = 0.407$)。FK506 干预后 IL-4, IL-6, IL-10 水平较 DM 干预后明显降低 ($F = 11.281, P = 0.000$), IL-12 水平上升 ($F = 8.634, P = 0.003$), IL-2 和 IFN- γ 水平无明显变化 ($F = 0.756, P = 0.305$, 图 1)。

3 讨论

本组实验免疫组织化学检测结果示模型组所有小鼠的嗜酸性粒细胞及 CD4⁺ 淋巴细胞均为阳性,其中 85% 为强阳性,明显高于正常组,这与文献报道的基本一致^[6-10],进一步证实了过敏性结膜炎是 IgE 介导的 I 型变态反应,嗜酸性粒细胞阳离子蛋白(ECP)是嗜酸性粒细胞活性标志物并损害黏膜上皮。嗜酸性粒细胞碱性蛋白也能引起严重变态反应性损害。本实验 FK506 组结果基本接近正常组,而明显低于 DM 组。说明 FK506 对嗜酸性粒细胞及 CD4⁺ 淋巴细胞的抑制作用明显强于 DM。Fukushima^[11] 的一项研究显示,过敏性结膜炎结膜肥大细胞比正常对照组升高 61%,主要为类促胰酶和胃促胰酶阳性的肥大细胞。Swamy 等^[12] 的一项研究表明:过敏性结膜炎患者血浆、泪液总 IgE 和特异性 IgE 升高;嗜酸性粒细胞、ECP 和嗜酸性粒细胞蛋白(EPX)明显升高;结膜淋巴滤泡中表达 CD23, CD21 和 CD40 活性的 B 淋巴细胞被激活,提示这类 B 淋巴细胞可能是合成 IgE 的前体细胞,结膜可能对 IgE 合成起促进作用。

本研究细胞因子的检测结果提示 Th2 型细胞因子(IL-4, IL-6 和 IL-10)参与了过敏性结膜炎的重要病理生理过程,这与文献中报道的结果是一致的^[13,14]。IgE 和嗜酸性粒细胞介导的免疫反应依赖 Th2 亚群中 CD4⁺ T 细胞的激活,CD4⁺ T 细胞能辅助 B 淋巴细胞合成 IgE。研究提示抗原呈递细胞上的共刺激分子 B7 和 T 细胞表面的 CD28 是抗原呈递和产生 Th2 免疫反应的关键^[15-18]。Langerhans 细胞广泛表达 B7-2,与 CD28 相互作用可以介导 Th2 免疫反应^[19,20]。Th2 细胞分泌 IL-4 和 IL-6, IL-4 对 IgE 同型转换和促进嗜酸性粒细胞的趋化是必需的,IL-6 能激活嗜酸性粒细胞。FK506 作为分子胶将钙调磷酸酶-钙调蛋白与 FK506-FKBP 粘合在一起,抑制了细胞内钙调磷酸酶活性,通过抑制 Th 细胞释放 IL-2, IL-3, IL-4 和 IFN- γ 等活性因子及 IL-2R 表达,使 T 细胞的增殖和免疫活性受到抑制,产生与药物相关的抑制效应。FK506 直接抑制 TNF- α 基因转录,抑制 B 细胞活化^[21]。

本研究中模型组 Th2/Th1 比例升高,表明过敏性结膜炎小鼠局部 Th1/Th2 淋巴细胞失衡向 Th2 方向漂移;而 FK506 实验组 Th1/Th2 比例均趋向正常大鼠水平。因此检测过敏性结膜炎局部 Th1/Th2 细胞因子水平的变化不仅有助于认识过敏性结膜炎发生的免疫学机制,而且可以通过人为调整 Th1/Th2 平衡设计相应的治疗方案,甚至可以开发新型免疫调节药物。
致谢:感谢广州中医药大学第一附属医院冀建平博士在本研究中给予的大力支持和帮助。

参考文献

- 1 费文雷,陈家棋. 春季角结膜炎的研究进展. 眼科新进展 2003;23(5):377-379
- 2 刘祖国,肖启国. 过敏性结膜炎的诊治. 中华眼科杂志 2004;40(7):500-502
- 3 Abelson MB, Granet D. Ocular allergy in pediatric practice. *Curr Allergy Asthma Rep* 2006;6(4):306-311
- 4 徐岩,陈祖基. 变应性结膜炎动物模型. 眼科研究 2001;19(2):181-183
- 5 Kubo M, Ozaki A, Tanaka S, et al. Role of suppressor of cytokine signaling in ocular allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006;6(5):361-366
- 6 Offiah I, Calder VL. Immune mechanisms in allergic eye diseases: what is new? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2009;9(5):477-481
- 7 Wong AH, Barg SS, Leung AK. Seasonal and perennial allergic conjunctivitis. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2009;3(2):118-127
- 8 Kumar S. Vernal keratoconjunctivitis: a major review. *Acta Ophthalmol* 2009;87(2):133-147
- 9 Leonardi A, Motterle L, Bortolotti M. Allergy and the eye. *Clin Exp Immunol* 2008;153(Suppl 1):17-21
- 10 Niederkorn JY. Immune regulatory mechanisms in allergic conjunctivitis: insights from mouse models. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008;8(5):472-476
- 11 Fukushima A. Roles of T-cells in the development of allergic conjunctival diseases. *Cornea* 2007;26(9 Suppl 1):S36-40
- 12 Swamy BN, Chilov M, McClellan K, et al. Topical non-steroidal anti-inflammatory drugs in allergic conjunctivitis: meta-analysis of randomized trial data. *Ophthalmic Epidemiol* 2007;14(5):311-319
- 13 Micera A, Lambiase A, Bonini S. The role of neuromediators in ocular allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008;8(5):466-471
- 14 Choi SH, Bielory L. Late-phase reaction in ocular allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008;8(5):438-444
- 15 Choi H, Lee SB. Nonseasonal allergic conjunctivitis in the tropics: experience in a tertiary care institution. *Ocul Immunol Inflamm* 2008;16(4):141-145
- 16 Manzouri B, Flynn T, Ohbayashi M, et al. The dendritic cell in allergic conjunctivitis. *Ocul Surf* 2008;6(2):70-78
- 17 Jun J, Bielory L, Raizman MB. Vernal conjunctivitis. *Immunol Allergy Clin North Am* 2008;28(1):59-82
- 18 Bielory L, Friedlaender MH. Allergic conjunctivitis. *Immunol Allergy Clin North Am* 2008;28(1):43-58
- 19 Bielory L. Ocular allergy overview. *Immunol Allergy Clin North Am* 2008;28(1):1-23
- 20 Bonini S, Gramiccioni C, Bonini M, et al. Practical approach to diagnosis and treatment of ocular allergy: a 1-year systematic review. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007;7(5):446-469
- 21 Leonardi A, De Dominicis C, Motterle L. Immunopathogenesis of ocular allergy: a schematic approach to different clinical entities. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007;7(5):429-435