

干眼患者结膜上皮细胞及泪液中 IRF4 和 sST2 的表达情况及临床意义

陈耀华, 顾佩霞

引用: 陈耀华, 顾佩霞. 干眼患者结膜上皮细胞及泪液中 IRF4 和 sST2 的表达情况及临床意义. 国际眼科杂志 2023; 23(6): 904-907

作者单位: (226001) 中国江苏省南通市中医院眼科
作者简介: 陈耀华, 毕业于南通大学, 硕士研究生, 副主任医师, 副主任, 研究方向: 白内障、儿童验光。
通讯作者: 陈耀华. chenyaohua198201@163.com
收稿日期: 2022-11-19 修回日期: 2023-05-16

摘要

目的: 探讨干眼患者结膜上皮细胞及泪液中干扰素调节因子 4 (IRF4)、可溶性致癌抑制因子 2 (sST2) 表达情况及其临床意义。

方法: 选取本院 2019-01/2021-12 期间收治的 94 例干眼患者作为干眼组, 同期选取 97 例行眼科检查的体检者作为对照组, 收集研究对象结膜上皮细胞及泪液, 记录临床指标泪膜破裂时间 (BUT)、角膜荧光素染色 (CFS) 评分、基础泪液分泌试验 (S I t)。采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测结膜上皮细胞 IRF4、sST2 水平, 采用酶联免疫吸附 (ELISA) 法检测泪液 IRF4、sST2 水平, 采用 Pearson 法分析干眼患者结膜上皮细胞及泪液中 IRF4、sST2 水平与临床指标的相关性。

结果: 干眼组治疗前结膜上皮细胞及泪液中 IRF4、sST2 水平均显著高于对照组 ($P < 0.001$)。干眼患者治疗 4wk 后结膜上皮细胞及泪液中 IRF4、sST2 水平均显著低于治疗前 ($P < 0.001$)。干眼患者治疗 4wk 后 BUT、S I t 显著增加, CFS 评分显著降低 ($P < 0.001$)。干眼患者治疗前结膜上皮细胞及泪液中 IRF4、sST2 水平与治疗前 CFS 评分均呈正相关, 与治疗前 BUT、S I t 均呈负相关 ($P < 0.001$)。

结论: 干眼患者结膜上皮细胞及泪液中 IRF4、sST2 水平均升高, 且与干眼临床指标 BUT、S I t、CFS 评分均呈显著相关性, 有潜力成为干眼新的治疗靶点。

关键词: 干眼; 干扰素调节因子 4 (IRF4); 可溶性致癌抑制因子 2 (sST2); 结膜上皮细胞; 泪液

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2023.6.04

Expression and clinical significance of interferon regulatory factor 4 and soluble suppression of tumorigenesis 2 in conjunctival epithelial cells and tears of patients with dry eye

Yao-Hua Chen, Pei-Xia Gu

Department of Ophthalmology, Nantong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Yao-Hua Chen. Department of Ophthalmology, Nantong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. chenyaohua198201@163.com
Received: 2022-11-19 Accepted: 2023-05-16

Abstract

• **AIM:** To investigate the expression and clinical significance of interferon regulatory factor 4 (IRF4) and soluble suppression of tumorigenesis 2 (sST2) in conjunctival epithelial cells and tears of patients with dry eye.

• **METHODS:** A total of 94 patients with dry eye who admitted to our hospital from January 2019 to December 2021 were selected as the dry eye group, and 97 physical examiners who underwent ophthalmic examination were selected as the control group at the same time. The conjunctival epithelial cells and tears of the subjects were collected, and the clinical indicators, including tear film break-up time (BUT), corneal fluorescein staining (CFS) score, and Schirmer I test (S I t) were recorded. The levels of IRF4 and sST2 in conjunctival epithelial cells were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), and the levels of IRF4 and sST2 in tears were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Pearson method was used to analyze the correlation between IRF4 and sST2 levels in conjunctival epithelial cells and tears and clinical indicators of dry eye patients.

• **RESULTS:** The levels of IRF4 and sST2 in conjunctival epithelial cells and tears in dry eye group before treatment were significantly higher than those in control group ($P < 0.001$). The levels of IRF4 and sST2 in conjunctival epithelial cells and tears of dry eye patients at 4wk after treatment were significantly lower than those before treatment ($P < 0.001$). The BUT and S I t of dry eye patients increased significantly at 4wk after treatment, and the CFS score decreased significantly ($P < 0.001$). The levels of IRF4 and sST2 in conjunctival epithelial cells and tears of dry eye patients before treatment were positively correlated with CFS score before treatment and negatively correlated with BUT and S I t before treatment ($P < 0.001$).

• **CONCLUSION:** The levels of IRF4 and sST2 in conjunctival epithelial cells and tears of patients with dry eye are increased, and are significantly correlated with BUT, S I t and CFS scores, which has potential to become a new therapeutic target for dry eye.

• **KEYWORDS:** dry eye; interferon regulatory factor 4 (IRF4); soluble suppression of tumorigenesis 2 (sST2); conjunctival epithelial cells; tear

Citation: Chen YH, Gu PX. Expression and clinical significance of interferon regulatory factor 4 and soluble suppression of tumorigenesis 2 in conjunctival epithelial cells and tears of patients with dry eye. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2023; 23 (6): 904-907

0 引言

干眼是临床常见眼科疾病,是因外界因素造成泪液动力学及质量异常改变,使得泪膜稳定性降低、眼表出现损害的疾病^[1-2]。干眼发病受性别及年龄等因素影响,在女性中的患病率高于男性,并且随着年龄的增长而增加,其对患者视觉功能、日常生活活动、专业工作和生活质量均有很大影响^[3]。干扰素调节因子 4(interferon regulatory factor 4, IRF4)是 T 细胞分化和功能的关键调节因子,可通过介导辅助性 T 细胞 17(Thelp17, Th17)参与免疫反应平衡,进而影响原发性干燥综合征的发生发展^[4]。可溶性致癌抑制因子 2(soluble suppression of tumorigenesis 2, sST2)是 ST2 亚型之一,而 ST2 属于白介素-1 受体家族,可通过与白介素-33 特异性结合参与原发性干燥综合征等自身免疫性疾病的发生发展^[5]。然而目前仍缺乏 IRF4、sST2 在干眼临床应用中的研究。因此,本研究通过检测 94 例干眼患者治疗前后结膜上皮细胞及泪液中 IRF4、sST2 水平及临床指标,探讨 IRF4、sST2 在干眼中的临床价值。

1 对象和方法

1.1 对象 选取本院 2019-01/2021-12 期间收治的 94 例干眼患者作为干眼组,男 40 例,女 54 例,年龄 18~70(平均 45.63±7.95)岁;同期选取 97 例行眼科检查的体检者作为对照组,男 41 例,女 56 例,年龄 18~72(平均 45.21±7.92)岁。纳入标准:(1)干眼患者诊断标准符合《中国干眼专家共识:定义和分类(2020 年)》^[6],且接受干眼检查者;(2)临床资料记录完整者。排除标准:(1)近 3mo 内有眼部活动性炎症,或近 1wk 内使用过滴眼液者;(2)有角膜移植及准分子激光屈光手术等眼部手术史者;(3)有精神障碍疾病或无法配合完成检查者;(4)有变应性疾病、代谢性疾病或其他重症疾病者。所有体检者及干眼患者均对本研究知情了解,并自愿参加,研究均在本院临床医学伦理委员会审核通过后进行。

1.2 方法

1.2.1 结膜上皮细胞收集及结膜上皮细胞 IRF4 和 sST2 水平检测 结膜上皮细胞收集:治疗前后分别采用盐酸丙美卡因滴眼液(国药准字:HJ20160133)对患者患眼表面进行麻醉,无菌显微镊消毒后夹取梯形硝酸纤维膜,轻敷于研究对象眼颞侧、上下方球结膜,10s 左右后放入微量离心管中,加入 RLT 缓冲液(含 1%巯基乙醇),置于冰箱低温保存。采用 Trizol 试剂(武汉纯度生物科技有限公司,货号:CD-102523GM)提取标本中总 RNA,使用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,使用紫外分光光度计检测 RNA 质量($1.8 < A_{260/280} < 2.1$ 判定 RNA 质量合格),逆转录试剂盒(上海齐源生物科技有限公司,货号:QYK-12849)将 RNA 逆转录为 cDNA,以 GAPDH 为内参基因,采用实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)法(ABI 7500 型 qRT-PCR 仪,美国 ABI 公司)检测 IRF4、sST2 水平。参数条件为:95℃ 预变性 5min;95℃ 变性 1min,60℃ 退火 30s,72℃ 延伸 30s,循环 40 次。反应体系

为:cDNA 0.4μL,上下游引物(10μmol/L)各 1.0μL,ROX II(50×)(上海翌圣生物科技股份有限公司,货号:10200ES60)0.4μL,SYBR Green PCR Mastermix(2×)(北京伊塔生物科技有限公司,货号:YT8081)10μL,ddH₂O 7.2μL。所有样本进行 3 次重复,循环结束后采用 2^{-ΔΔCT}法计算 IRF4、sST2 mRNA 相对表达量,引物序列见表 1。

1.2.2 泪液收集及泪液 IRF4 和 sST2 水平检测 泪液样本收集:使用 0.9%生理盐水 60μL 注射液滴入研究对象治疗前后结膜囊中,让生理盐水与泪液充分混合后,分别收集患眼中分泌的泪液放置于离心管中,混匀后放 -20℃ 冰箱保存待测。采用酶联免疫吸附(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)法检测泪液 IRF4(试剂盒购自武汉菲恩生物科技有限公司,货号:EH9468)、sST2(试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,货号:E-EL-H6082)水平,操作步骤均严格按照试剂盒说明进行。

1.2.3 临床指标检测 泪膜破裂时间(break up time, BUT):所有研究对象下睑涂抹荧光素钠 1μL,使其均匀涂抹于角膜表层,之后裂隙灯照射(钴蓝光)观察角膜,嘱研究对象瞬目后保持不动,观察其泪膜上第 1 个破裂点记为泪膜破裂时间,实验重复 3 次取平均值。角膜荧光素染色(cornea fluorescein staining, CFS)评分:所有研究对象结膜囊中滴入荧光素钠 1μL,0.9%生理盐水冲洗后,裂隙灯(钴蓝光)照射下观察角膜,瞳孔中心作为中心点,角膜分为 4 个象限,依据染色情况评估角膜破损程度(片状染色 3 分,密集点状染色 2 分,离散点状染色 1 分,无染色 0 分)。基础泪液分泌试验(Schirmer I test, S I t):嘱研究对象眼球上翻,在下眼眼中外 1/3 处结膜囊内放泪液分泌试纸,眼睛轻闭 5min 后读取试纸湿润长度。

1.2.4 治疗方法 给予患者 0.1%玻璃酸钠滴眼液(注册号:H20130583,规格 5 毫升/支)进行治疗,1 次 1 滴,每天 4 次,2wk 为 1 个疗程,持续 4wk。

统计学分析:将研究所得数据采用 SPSS 25.0 统计学软件统计分析。计量资料经正态检验后均符合正态分布,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表达,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,组内前后比较采用配对样本 *t* 检验;采用 Pearson 法分析干眼患者结膜上皮细胞及泪液中 IRF4、sST2 水平与临床指标的相关性。*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组治疗前结膜上皮细胞及泪液中 IRF4 和 sST2 水平比较 干眼组治疗前结膜上皮细胞及泪液中 IRF4、sST2 水平均显著高于对照组,差异均有统计学意义(*P*<0.001),见表 2。

2.2 干眼患者治疗前后结膜上皮细胞及泪液中 IRF4 和 sST2 水平比较 干眼患者治疗 4wk 后结膜上皮细胞及泪液中 IRF4、sST2 水平均显著低于治疗前,差异均有统计学意义(*P*<0.001),见表 3。

2.3 干眼患者治疗前后临床指标比较 干眼患者治疗 4wk 后 BUT、S I t 显著增加,CFS 评分显著降低,差异均有统计学意义(*P*<0.001),见表 4。

2.4 干眼患者结膜上皮细胞及泪液中 IRF4 和 sST2 水平与临床指标的相关性 Pearson 相关分析结果显示,干眼患者治疗前结膜上皮细胞及泪液中 IRF4、sST2 水平与治疗前 CFS 评分均呈正相关,与治疗前 BUT、S I t 均呈负相关(*P*<0.001),见表 5。

表1 qRT-PCR引物序列

基因名称	上游引物 5'-3'	下游引物 5'-3'
IRF4	CCTTCGATAGACTCATGGTG	CGTGCATCTATGCGAGTGGTCG
GAPDH	GACGTCGAGGTGCATCGACG	CGCTAGCTCCGTGGAGACTCAC
sST2	GCATACTACCACTGTCCGGAC	GCCCTGACCACTGTGGGTACGT
GAPDH	TGTGAACCGACGTCAGTCATG	CCTTCGGACACTAGCAGTGCAC

表2 两组治疗前结膜上皮细胞及泪液中 IRF4 和 sST2 水平比较

组别	例数	结膜上皮细胞		泪液	
		IRF4 mRNA	sST2 mRNA	IRF4 (ng/mL)	sST2 (ng/mL)
对照组	97	1.01±0.23	1.02±0.24	5.40±0.76	18.14±3.76
干眼组	94	1.74±0.30	2.16±0.35	8.79±1.04	55.13±12.61
<i>t</i>		18.908	26.323	25.778	27.652
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:对照组:同期行眼科检查的体检者。

表3 干眼患者治疗前后结膜上皮细胞及泪液中 IRF4 和 sST2 水平比较

组别	例数	结膜上皮细胞		泪液	
		IRF4 mRNA	sST2 mRNA	IRF4 (ng/mL)	sST2 (ng/mL)
治疗前	94	1.74±0.30	2.16±0.35	8.79±1.04	55.13±12.61
治疗 4wk	94	1.29±0.28	1.46±0.42	6.10±0.83	30.15±5.04
<i>t</i>		10.632	12.414	10.601	17.834
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表4 干眼患者治疗前后临床指标比较

时间	例数	BUT(s)	CFS 评分(分)	S I t(mm/5min)
治疗前	94	5.06±1.12	3.92±0.75	4.60±0.98
治疗 4wk	94	8.59±1.79	3.20±0.72	5.31±1.04
<i>t</i>		16.209	6.714	4.817
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

表5 干眼患者结膜上皮细胞及泪液中 IRF4 和 sST2 水平与临床指标的相关性

指标	统计值	结膜上皮细胞		泪液	
		IRF4 mRNA	sST2 mRNA	IRF4	sST2
BUT	<i>r</i>	-0.492	-0.499	-0.504	-0.503
	<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
CFS 评分	<i>r</i>	0.502	0.496	0.492	0.489
	<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
S I t	<i>r</i>	-0.493	-0.482	-0.487	-0.506
	<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

3 讨论

干眼作为一种临床常见眼病,其临床症状主要包括眼疲劳、眼干涩、有异物感、畏光、视觉质量降低等,发病率相对较高^[7-8]。最近一项基于人口的研究发现,50 岁以上的所有成年人的患病率为 11.3%,75 岁以上的女性的患病率高达 22.8%^[9]。基于此,我们可以预计,随着人口老龄化干眼的患病率将继续增加。医院就诊、药物治疗和手术的直接成本以及生产力下降、生活质量下降和一般功能损害的间接成本也使干眼成为一个巨大的经济负担^[10]。

干眼的系统诊断和监测可以通过已被验证过的疾病体征和症状测量来实现,但缺乏特异性的检查方法^[11]。眼表面由结膜、角膜及角结膜组成,存在许多免疫性炎症细胞,是发生免疫反应和炎症反应的潜在部位,但由于正常眼表面由多种调控机制有序调节其免疫和炎症反应,因此其外观并不表现出炎症反应^[12-13]。IRF4 最初被确定为负责产生特异性控制免疫反应的转录因子,在静止 T 细胞中通常不存在,在 CD4⁺T 细胞中与其他转录因子的 DNA 结合,且与其他因子相互作用直接调控免疫抑制基因的核心网络^[14-15]。本研究结果显示,干眼患者结膜上皮细胞及泪液中 IRF4 水平增加。Xiao 等^[4]通过分析 IRF4 在原发性干燥综合征中的作用机制,认为 IRF4 水平增加可能影响 Th17 水平增加,而 Th17 分泌的细胞因子会进一步促进细胞黏附因子、炎症细胞因子等相关因子水平增加,引发炎症恶性循环,破坏眼表面泪膜的稳定性,最终介导干眼的免疫炎症反应,促进疾病进展。然而陈自佳等^[16]研究显示,原发性干燥综合征患者与健康对照组血清 IRF4 水平比较差异无统计学意义,可能与其选取样本量或研究对象个体差异等有关。

sST2 可与白介素-33 结合,经由核因子及细胞分裂素活化蛋白激酶激活诱使 Th2 细胞分泌大量细胞因子进而调节机体炎症反应^[17-18]。研究显示,sST2 水平异常升高与类风湿关节炎等自身免疫疾病的活动度密切相关^[19]。基于既往研究推测干眼患者眼表面最初的炎症水平增加使得结膜上皮细胞及泪液中 sST2 水平增加,通过激活其相关通路进而促进肥大细胞激活,诱使炎症因子大量分泌,加快炎症反应,从而构成导致干眼疾病恶化的炎症循环。本研究结果显示,干眼患者治疗 4wk 后结膜上皮细胞及泪液中 IRF4、sST2 水平显著降低。提示 IRF4、sST2 可能对评估干眼治疗效果有重要作用,今后可以此为基础进

一步深入探讨二者在干眼预后中的预测价值。同时提示临床医师对于眼部检测时结膜上皮细胞及泪液中 IRF4、sST2 水平异常升高的患者需给予密切关注,以避免眼部疾病的发生和恶化。S I t、BUT 及 CFS 评分均是反映干眼患者病情程度及临床症状的重要指标^[20]。而本研究对干眼患者临床指标进行比较分析,结果显示治疗前 IRF4、sST2 水平与治疗前临床指标 S I t、BUT 及 CFS 评分均相关。推测干眼患者经长期免疫因子及炎症因子侵蚀浸润,眼表皮免疫微环境破坏,IRF4、sST2 水平增加,临床症状加重。

综上所述,干眼患者结膜上皮细胞及泪液中 IRF4、sST2 水平均高于眼部健康人群。经治疗后,IRF4、sST2 水平显著降低,S I t 值增加,BUT 延长且 CFS 评分降低,IRF4、sST2 与 S I t、BUT 及 CFS 评分均显著相关。IRF4、sST2 可能与眼表面的免疫反应和炎症反应存在某些联系,参与干眼的发生发展,但具体生物机制尚不明确,有待进一步探讨。

参考文献

- 1 Wang MTM, Muntz A, Mamidi B, et al. Modifiable lifestyle risk factors for dry eye disease. *Cont Lens Anterior Eye* 2021;44(6):101409
- 2 Jackson CJ, Gundersen KG, Tong L, et al. Dry eye disease and proteomics. *Ocul Surf* 2022;24(1):119-128
- 3 Wang MT, Muntz A, Wolffsohn JS, et al. Association between dry eye disease, self-perceived health status, and self-reported psychological stress burden. *Clin Exp Optom* 2021;104(8):835-840
- 4 Xiao F, Rui K, Han M, et al. Artesunate suppresses Th17 response via inhibiting IRF4-mediated glycolysis and ameliorates Sjögren's syndrome. *Signal Transduct Target Ther* 2022;7(1):274-283
- 5 Soyfo MS, Nicaise C. Pathophysiologic role of Interleukin-33/ST2 in Sjögren's syndrome. *Autoimmun Rev* 2021;20(3):102756
- 6 亚洲干眼协会中国分会,海峡两岸医药卫生交流协会眼科学专业委员会眼表与泪液病学组,中国医师协会眼科医师分会眼表与干眼学组. 中国干眼专家共识:定义和分类(2020年). *中华眼科杂志* 2020;56(6):418-422
- 7 Papas EB. The global prevalence of dry eye disease: A Bayesian view.

- Ophthalmic Physiol Opt* 2021;41(6):1254-1266
- 8 Hakim FE, Farooq AV. Dry Eye Disease: An Update in 2022. *JAMA* 2022;327(5):478-479
- 9 O'Neil E, Henderson M, Massaro-Giordano M, et al. Advances in dry eye disease treatment. *Curr Opin Ophthalmol* 2019;30:166-178
- 10 Wu JH, Wu XM, Zhang H, et al. Dry eye disease among mongolian and han older adults in grasslands of northern China: prevalence, associated factors, and vision-related quality of life. *Front Med (Lausanne)* 2021;8:788545
- 11 Boccardo L. Self-reported symptoms of mask-associated dry eye: a survey study of 3,605 people. *Cont Lens Anterior Eye* 2022;45(2):101408
- 12 Chen YH, Dana R. Autoimmunity in dry eye disease - An updated review of evidence on effector and memory Th17 cells in disease pathogenicity. *Autoimmun Rev* 2021;20(11):102933
- 13 Bustamante-Arias A, Ruiz Lozano RE, Rodriguez-Garcia A. Dry eye disease, a prominent manifestation of systemic autoimmune disorders. *Eur J Ophthalmol* 2022;32(6):3142-3162
- 14 Alvisi G, Brummelman J, Puccio S, et al. IRF4 instructs effector Treg differentiation and immune suppression in human cancer. *J Clin Invest* 2020;130(6):3137-3150
- 15 Wong RWJ, Ong JZL, Theardy MS, et al. IRF4 as an oncogenic master transcription factor. *Cancers* 2022;14(17):4314
- 16 陈自佳, 韦尼. 原发性干燥综合征瘀毒证与涎腺超声表现及血清 IRF4-BAFF-CXCL13 水平的相关性研究. *世界中西医结合杂志* 2020;15(8):1536-1539,1543
- 17 Sharma PP, Seshagiri DV, Nagappa M, et al. Role of altered IL-33/ST2 immune axis in the immunobiology of Guillain-Barré syndrome. *Eur J Neurol* 2022;29(7):2074-2083
- 18 Homsak E, Gruson D. Soluble ST2: a complex and diverse role in several diseases. *Clin Chim Acta* 2020;507:75-87
- 19 张伟, 郭慧娟, 刘运洪, 等. 类风湿关节炎患者血清中 sST2 水平与疾病活动度的相关性. *西部医学* 2021;33(7):1069-1072
- 20 李俊杰, 谢擎, 孙志敏. 重组人表皮生长因子滴眼液联合卡波姆眼用凝胶对白内障超声乳化吸除术后干眼症患者炎症及氧化应激水平的影响. *广西医学* 2020;42(1):33-36,40