

葡萄膜炎患者外周血单个核细胞分泌细胞因子的研究

唐红,徐皓,刘娟

作者单位:(710054)中国陕西省西安市,武警陕西总队医院眼科
作者简介:唐红,女,主治医师,研究方向:葡萄膜炎。
通讯作者:唐红. ytyt915@163. com
收稿日期:2011-03-22 修回日期:2011-04-07

Study of cytokines produced by peripheral blood mononuclear cells in uveitis

Hong Tang, Hao Xu, Juan Liu

Department of Ophthalmology, Shaanxi General Hospital of Armed Police Forces, Xi'an 710054, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Hong Tang. Department of Ophthalmology, Shaanxi General Hospital of Armed Police Forces, Xi'an 710054, Shaanxi Province, China. ytyt915@163. com

Received:2011-03-22 Accepted:2011-04-07

Abstract

• **AIM:** To study the possible mechanism of uveitis by evaluating the expression of cytokines produced by peripheral blood mononuclear cells.

• **METHODS:** Peripheral blood was drawn from 30 patients with uveitis and 20 normal people. After separation and short term culture of the mononuclear cells, the amount of IFN- γ , TNF- α and IL-10 in the supernatant were evaluated respectively with ELISA.

• **RESULTS:** The amount of IFN- γ and TNF- α produced by peripheral blood mononuclear cells from the patients were much higher than that in the normal people ($P < 0.05$), and they both correlated well with disease activity of uveitis. IL-10 expression in that of uveitis was little higher than normal control with no statistical significance.

• **CONCLUSION:** The elevated expression of IFN- γ and TNF- α by peripheral blood mononuclear cells may play important role in the pathogenesis of uveitis.

• **KEYWORDS:** uveitis; cytokine

Tang H, Xu H, Liu J. Study of cytokines produced by peripheral blood mononuclear cells in uveitis. *Gujī Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(5):814-816

摘要

目的:通过研究葡萄膜炎患者的外周血单个核细胞分泌的多个细胞因子水平,探讨葡萄膜炎可能的发病机制。

方法:取30例葡萄膜炎患者及20例健康对照外周血,分离出单个核细胞后短期培养,通过酶联免疫反应(ELISA)检测上清IFN- γ ,TNF- α 和IL-10的水平。

结果:葡萄膜炎患者外周血单个核细胞分泌的IFN- γ 和TNF- α 含量较正常对照显著增高($P < 0.05$),而且与葡萄膜炎患者病情严重程度密切相关;IL-10在葡萄膜炎患者外周血单个核细胞培养上清中表达水平较健康对照略高,无统计学差异($P > 0.05$)。

结论:本实验证实了葡萄膜炎患者外周血单个核细胞分泌的IFN- γ ,TNF- α 水平较高,与病情相关,提示其在葡萄膜炎发病中的重要作用。

关键词:葡萄膜炎;细胞因子

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2011.05.020

唐红,徐皓,刘娟.葡萄膜炎患者外周血单个核细胞分泌细胞因子的研究.国际眼科杂志2011;11(5):814-816

0 引言

葡萄膜炎是一组累及葡萄膜、视网膜、视网膜血管及玻璃体的炎性病变,多反复发作,产生严重的并发症,为失明的主要原因之一。其确切致病机制迄今尚不清楚,目前越来越多的证据表明其主要是一种免疫和自身免疫反应过程,在炎症和免疫反应过程中,细胞因子起着重要的调节作用。我们对葡萄膜炎患者的外周血中的单个核细胞进行研究,通过分析其分泌的细胞因子的性质,旨在探讨葡萄膜炎可能的发病机制。

1 对象和方法

1.1 对象 选取葡萄膜炎患者30例,全部病例均为2010-03/2011-01于武警陕西总队医院眼科就诊的患者。其中男19例,女11例,年龄17~61(平均33.5)岁。所有患者均依据国际葡萄膜炎研究组的病因学分类标准进行诊断。其中全葡萄膜炎患者为9例,前葡萄膜炎患者10例,中后葡萄膜炎患者4例,后葡萄膜炎患者7例。正常对照为20例体检正常者,男11例,女9例,年龄20~55(平均34.2)岁。疾病严重程度评分标准:睫状充血(1分),房水细胞或房闪阳性(1分),角膜后沉着物(1分),虹膜粘连(1分),玻璃体有细胞或者视网膜病变(1分),计算总分。其中7例患者评分5分,6例为4分,4例为3分,7例为2分,6例为1分。试剂:人IFN- γ ,TNF- α 和IL-10的ELISA试剂盒购自BD Bioscience公司(USA);RPMI 1540培养液和Hank's缓冲液购自Gibco公司(USA)。

1.2 方法

1.2.1 外周血单个核细胞分离与培养 收集葡萄膜炎患者及健康对照外周血5mL,置于含有肝素钠的离心管中。用Hank's液1:1稀释后,将其缓慢加入等体积的淋巴细胞分离液中。常温下1500r/min离心15min,小心吸取中间白膜层即为外周血单个核细胞。用Hank's液洗涤2次后,以不含有胎牛血清低糖DMEM培养液重悬细胞,并调整

细胞浓度为 10^9 细胞数/L。将细胞悬液以 $200\mu\text{L}$ /孔加入 96 孔板中,每份标本均设 3 个复孔。将 96 孔板置于 37°C 的细胞培养箱中,3d 后取出,收集上清进行检测。

1.2.2 酶联免疫吸附试验 收集细胞培养上清,用不含血清的低糖 DMEM 1:1 稀释后,按试剂盒的说明进行操作,每个样品做 3 个复孔,使用 MRX-HD2 型全自动酶标仪(美国)进行检测分析。

统计学分析:实验结果用 SPSS 13.0 for Windows 软件分析,采取 Student's *t* 检验及 Spearman 相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异显著性判定标准。

2 结果

2.1 外周血单个核细胞培养的上清中 IFN- γ 表达 与健康对照外周血相比($5.53 \pm 2.74\mu\text{g/L}$),葡萄膜炎患者外周血单个核细胞分泌炎性细胞因子 IFN- γ ($20.03 \pm 8.52\mu\text{g/L}$)的水平显著升高($P < 0.05$)。

2.2 外周血单个核细胞培养的上清中 TNF- α 表达 检测 TNF- α 的表达也发现,葡萄膜炎患者外周血单个核细胞分泌的 TNF- α 为 $28.65 \pm 10.54\mu\text{g/L}$,较正常健康对照($10.35 \pm 3.48\mu\text{g/L}$)显著升高($P < 0.05$)。

2.3 外周血单个核细胞培养的上清中 IL-10 表达 IL-10 在葡萄膜炎患者外周血单个核细胞培养上清中表达水平($60.58 \pm 12.06\text{ng/L}$)较健康对照($54.3 \pm 8.23\text{ng/L}$)略高,但两者相比无统计学差异($P > 0.05$)。

2.4 相关分析 用 Spearman 相关分析对上述细胞因子表达与病情评分进行相关分析发现,IFN- γ 与 TNF- α 的表达与葡萄膜炎患者病情严重程度密切相关,成正相关关系(IFN- γ 与病情评分: $r = 0.508, P < 0.05$; TNF- α 与病情评分: $r = 0.489, P < 0.05$),即病情严重的患者其外周血单个核细胞培养上清中分泌的 IFN- γ 与 TNF- α 较多。而 IL-10 与患者病情严重程度无明显相关($r = 0.117, P > 0.05$)。

3 讨论

葡萄膜炎是临床最常见的眼部疾病,其发病机制被认为是针对特定眼部蛋白的抗原特异性 T 细胞介导的自身免疫反应^[1,2]。其中 T 细胞在其中起到重要作用,一般认为葡萄膜炎是由 Th1 细胞介导的疾病^[3]。实验研究表明,致葡萄膜炎 T 细胞群体的活性与其受抗原刺激后产生 IFN- γ 的能力有关。在所分离的致敏 T 细胞群体中,具有产生 IFN- γ 的细胞具有致葡萄膜炎活性,反之亦然。除了 IFN- γ ,其他还有很多细胞因子也参与了葡萄膜炎的发病。TNF 也是 Th1 反应的主要炎症介质,应用 TNF 注射动物可诱导出以急性炎症、血管损伤和纤维蛋白沉积为特征的迟发型超敏反应(Th1 反应),在眼部可引发葡萄膜炎等细胞介导的自身免疫性疾病。Santos Lacomba 等^[4]发现活动期葡萄膜炎患者的血清及房水中 TNF 水平明显高于对照组,其中血清 TNF 水平与葡萄膜炎复发相关,表明 TNF 在葡萄膜炎的发病中起关键作用。而目前抗 TNF 制剂治疗眼内炎症的临床应用结果也显示出良好的应用前景^[5,6]。同时,许多实验证据表明,细胞因子 IL-10 是介导实验性自身免疫性葡萄膜视网膜炎(experimental auto immune uveoretinitis, EAU)自然恢复的机制之一。在 EAU 动物模型中发现,使用外源性 IL-10 可以阻止 EAU 的发生,使用

抗 IL-10 抗体可使 EAU 病情加重,体外研究也发现,IL-10 能够完全抑制致葡萄膜炎 Th1 细胞的功能,TGF- β 可能共同参与了其抑制功能^[7]。另外,Th17 细胞在葡萄膜炎发病中也起到重要作用^[8]。

我们的实验发现,葡萄膜炎患者外周单个核细胞培养上清中 IFN- γ 及 TNF- α 的表达升高。这些实验结果进一步证实了葡萄膜炎由 Th1 细胞介导的疾病,IFN- γ 与 TNF- α 可能发挥着重要的致炎作用。IFN- γ 与 TNF- α 作为一种致炎因子在病情严重并活动的患者中表达升高,而 IL-10 作为抑制炎症的因子,可能有负反馈升高,来抑制体内炎症。这与 Curnow 等^[9]所作的多种炎症因子在葡萄膜炎患者中的表达呈相关性相一致。TNF- α 是一种促炎症细胞因子,主要由活化的单核细胞和巨噬细胞产生,少量由 T 细胞产生。TNF- α 具有介导炎症反应和免疫调节作用,其效应包括促使淋巴细胞活化、纤维母细胞增生,影响其他细胞因子、趋化因子、前列腺素、金属蛋白酶等,通过促进血管生成作用于脉管系统,上调黏附分子的表达,影响白细胞穿越内皮细胞。研究发现如果中和 TNF- α ,其他前炎症细胞因子如 IL-1 也被抑制,推测 TNF- α 在许多免疫介导的疾病中可能处在中心的位置^[10]。一般认为,TNF- α 可激活淋巴细胞,趋化白细胞浸润至炎症组织,诱导其它细胞因子、一氧化氮、前列腺素、黏附分子和金属蛋白酶等分子的生成,诱导眼内 Fas/FasL 介导的细胞凋亡,调控免疫系统;如果体内 TNF 过度生成和分泌,可激发眼内炎症,而中和过量的 TNF- α 则可抑制炎症。我们的实验也从另一方面证实了这一点。

IL-10 主要由 Th2 型细胞产生,但有些 Th1 型细胞、B 细胞和肥大细胞也产生 IL-10。IL-10 通过抑制核因子 κB 进而抑制 Th1 细胞产生 TNF- α , IL-2, IFN- γ 等。IL-10 还可降低单核细胞 HLA-DR 抗原和 B7 等协同刺激分子的表达,抑制 Th1 细胞介导的淋巴细胞活性,抑制 NO 合成和 PGE₂ 产生等。此外,IL-10 也能下调 TNFR 的密度,提高 TNF- α 诱导的 sTNFR-75 的释放,从而阻止了 TNF- α 诱导的 PGE₂ 的产生。但是,我们检测到患者与正常健康对照中水平无明显差异,一方面是检测方法有其局限性,患者个体炎症状态差异大、受检时间不一等,可导致不同结果,另一方面 IL-10 是介导 EAU 自然恢复的机制之一,内源性 IL-10 不仅参与恢复期,而且还可阻止眼局部自身免疫的发生。我们选取的患者处于不同炎症期,IL-10 可能会有反馈性的升高来起到抑制炎症作用,但这种升高还不足以完全抑制炎症。

总之,我们的实验证实了葡萄膜炎患者外周血单个核细胞分泌的 IFN- γ 与 TNF- α 的高表达,与病情相关,提示其在葡萄膜炎发病中的重要作用。进一步研究细胞因子在葡萄膜炎发病中所起到的作用,不仅仅能进一步揭示葡萄膜炎的免疫学发病机制,而且也为进一步探讨葡萄膜炎新的免疫学治疗方法提供了线索。

参考文献

- 1 Whitcup SM, Nussenblatt RB. Immunologic mechanisms of uveitis. *Arch Ophthalmol* 1997;115:520-525
- 2 Commodaro AG, Bueno V, Belfort R Jr, et al. Autoimmune uveitis: The associated proinflammatory molecules and the search for immunoregulation. *Autoimmun Rev* 2011;10(4):205-209

- 3 Xu H, Rizzo LV, Silver PB, *et al.* Uveitogenicity is associated with a Th1 like lymphokine profile; cytokine dependent modulation of primary and committed T cells in EAU. *Cell Immunol* 1997;178(1):69-78
- 4 Santos Lacomba M, Marcos Martin C, Gailardo Galera JM, *et al.* Aqueous humor and serum tumor necrosis factor-alpha in clinical uveitis. *Ophthalmic Res* 2001;33(5):251-255
- 5 Suhler EB, Smith JR, Wertheim MS, *et al.* A prospective trial of infliximab therapy for refractory uveitis: preliminary safety and efficacy outcomes. *Arch Ophthalmol* 2005;123(7):903-912
- 6 Rabinovich CE. Use of tumor necrosis factor inhibitors in uveitis. *Curr Opin Rheumatol* 2007; 19(5):482-486
- 7 Commodaro AG, Peron JP, Genre J, *et al.* IL-10 and TGF-beta immunoregulatory cytokines rather than natural regulatory T cells are associated with the resolution phase of Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) syndrome. *Scand J Immunol* 2010;72(1):31-37
- 8 Yoshimura T, Sonoda KH, Ohguro N, *et al.* Involvement of Th17 cells and the effect of anti-IL-6 therapy in autoimmune uveitis. *Rheumatology (Oxford)* 2009;48(4):347-354
- 9 Curnow SJ, Falciani F, Durrani OM, *et al.* Multiplex bead immunoassay analysis of aqueous humor reveals distinct cytokine profiles in uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(11):4251-4259
- 10 Davis JC Jr. Understanding the role of tumor necrosis factor inhibition in ankylosing spondylitis. *Semin Arthritis Rheum* 2005; 34(4): 668-677
-

ISI、SCI 和 SCIE 的相互关系

ISI (Institute for Scientific Information) 为美国科技信息研究所,SCI (Science Citation Index) 和 SCIE (Science Citation Index Expanded) 分别为科学引文索引和科学引文索引扩展板(即网络版)。SCI 和 SCIE 均为 ISI 创建的全世界最著名检索系统和最权威的期刊或成果的评价工具。

我国科技部决定从 2000 年起,SCI 论文统计的检索系统改为 SCIE,也就是说作者论文被 SCIE 收录就算是被国际三大检索系统之首的 SCI 收录了。我国通常将 SCI 和 SCIE 收录的期刊统称为 SCI 收录期刊(论文),对于作者来说两者具有同等效力。

IJO 编辑部