

自身免疫性干眼调节 T 细胞及细胞因子的表达

朱峰¹, 柯峰²

作者单位:¹(442000) 中国湖北省十堰市中医医院眼耳鼻喉科;²(442000) 中国湖北省十堰市人民医院眼科

作者简介:朱峰,男,主治医师,研究方向:白内障、青光眼。

通讯作者:柯峰,男,硕士,主治医师,研究方向:白内障、青光眼。2173581197@qq.com

收稿日期:2016-10-13 修回日期:2017-02-16

Experimental study on the expression of T cells and cytokines in the regulation of autoimmune dry eye

Feng Zhu¹, Feng Ke²

¹Department of Ophthalmology and Otolaryngology, Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shiyan 442000, Hubei Province, China; ²Department of Ophthalmology, Shiyan People's Hospital, Shiyan 442000, Hubei Province, China

Correspondence to: Feng Ke. Department of Ophthalmology, Shiyan People's Hospital, Shiyan 442000, Hubei Province, China. 2173581197@qq.com

Received:2016-10-13 Accepted:2017-02-16

Abstract

• **AIM:** To investigate the role of regulatory T cells in the pathogenesis of autoimmune dry eye and to analyze the expression of endogenous regulatory T cells and related cytokines in the lacrimal system to provide a more effective treatment for autoimmune dry eye disease treatment programs.

• **METHODS:** Rabbit lacrimal gland epithelial cells isolated and cultured for a period of time were separately cultured and mixed with isolated peripheral blood lymphocytes in a ratio of 1:1 and cultured with 5-Bromo-2-deoxyUridine (BrdU) to detect the proliferation of peripheral blood lymphocytes, and the activated autologous peripheral blood lymphocytes were transferred to donor rabbits via ear vein. The rabbits were used as the rabbit model of autoimmune dry eye and the normal rabbits which did not induce the disease as the control group. Before and after the experiment, tear film rupture time and tear secretion at 2,4,6,8wk, were observed. At 4 wk after the transfusion the rabbits were sacrificed for the collection of bilateral upper and lower lacrimal gland and conjunctiva, and pathological HE staining, and then extract the total RNA in lacrimal gland. The expression of IL-17, TNF- α , IL-6 and TGF- γ was detected.

• **RESULTS:** BrdU detected peripheral lymphocyte proliferation rate of 3.72. Compared with the normal group, the time of rupture of the tear film decreased (P

0.05), and the tear of the model group was significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$). The expression of IL-17, TNF- α , TGF- γ and IL-6 in the model group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). The expression of IL-10 and TGF- β was significantly lower than those of the control group ($P < 0.05$). The ratio of CD4⁺ CD25⁺ Treg cells in lacrimal gland tissue and spleen was higher in control group. The proportion of CD4⁺ CD25⁺ Treg cells in model group decreased ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** IL-17, TNF- α , IL-6 and TGF- γ play important roles in inflammatory reaction of lacrimal gland and the immunodepression active by CD4⁺ CD25⁺ Treg cells decreases when the rabbit model of dry eye is involved.

• **KEYWORDS:** dry eye CD4⁺ CD25⁺ Treg cell; Th17 cell; Sjögren syndrome; cytokine

Citation: Zhu F, Ke F. Experimental study on the expression of T cells and cytokines in the regulation of autoimmune dry eye. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2017;17(3):427-431

摘要

目的: 探究调节性 T 细胞在自身免疫性干眼发病中的作用,并对泪液系统内调节性 T 细胞及相关细胞因子的表达做出分析,为自身免疫性干眼病的治疗提供更加有效的治疗方案。

方法: 单独培养提纯分离出的兔泪腺上皮细胞一段时间后,将其与分离出的外周血淋巴细胞以 1:1 的比例混合进行培养,并用 5-脱氧尿嘧啶核苷(5-Bromo-2-deoxyUridine, BrdU)检测外周血淋巴细胞的增殖情况,将已激活的自体外周血淋巴细胞通过耳缘静脉回输供体兔体内,回输细胞后的供体兔将作为兔自身免疫性干眼模型组,未诱导发病的正常兔个体为对照组,观察实验前后兔角膜染色和 2、4、6、8wk 的泪膜破裂时间、泪液的分泌等情况,回输细胞 4wk 后处死,收集双侧上下泪腺和结膜,并进行病理 HE 染色,然后提取泪腺组织中的总 RNA,检测 IL-17、TNF- α 、IL-6、TGF- γ 的表达。

结果: BrdU 检测出的外周血淋巴细胞增值比率为 3.72,激活的外周血淋巴细胞回输体内会诱导产生兔自身免疫性干眼,与正常组比较,泪膜破裂时间减少,且差异具有统计学意义($P < 0.05$);模型组较对照组泪液分泌显著减少,且差异具有统计学意义($P < 0.05$);HE 染色显示在回输细胞 4wk 后,结膜组织和泪腺均有淋巴细胞浸润,检测发现模型组 IL-17、TNF- α 、IL-6、TGF- γ 的表达较对照组均有所增加,但 IL-10、TGF- β 的表达较对照组有所降低,且差异具有统计学意义($P < 0.05$);流式细胞术检测表明,在对照组中,泪腺组织和脾脏中 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细

胞比例较高,模型组 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例有所降低,且差异具有统计学意义($P<0.05$)。

结论:兔干眼模型发病时,CD4⁺CD25⁺Treg 细胞免疫抑制作用下降,IL-17、TNF- α 、IL-6、TGF- γ 等细胞因子在泪腺的炎症反应中都发挥着重要作用。

关键词:干眼 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞;Th17 细胞;干燥综合征;细胞因子

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.3.9

引用:朱峰,柯峰.自身免疫性干眼调节 T 细胞及细胞因子的表达.国际眼科杂志 2017;17(3):427-431

0 引言

干眼(dry eye)是一种炎症性的自身免疫眼病,是由于泪液的量或者流体动力学异常引起的眼表损害和泪膜不确定,进而导致眼部不适症状和视功能障碍的疾病^[1-3]。有研究表明,年龄在 40 岁以上的人容易引发干眼疾病,且患病率在 65 岁以上人群中更高^[4-5]。干眼会引起患者异物感、畏光等症状,甚至会引发角膜溃疡,对患者的生活质量造成严重的不良影响。干眼分为泪腺分泌不足和泪腺分泌正常性干眼两大类,泪腺分泌正常性干眼是指泪液排失过多。对于干眼患者及动物模型的大量研究发现,患者或动物的泪腺和眼表存在炎症反应,表现为 CD4⁺淋巴细胞的浸润。兔泪腺上皮细胞体外激活的淋巴细胞自体转移会诱导结膜炎,免疫炎症在干眼病中起主导作用。虽然人们已经认识到 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞与干眼发病有关,但是由于操作和伦理等问题,难以对人体 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞进行研究,因此需要建立一个合适的干眼动物模型来进行相关研究。小鼠泪腺体积较小,很难对其泪腺系统中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞进行研究,兔泪腺和角膜面积大,且有研究表明,兔泪腺系统中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞占结膜白细胞群的 11.00%,细胞数量多,可以作为干眼动物模型探究 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞在干眼发病中的影响。干眼的病情由轻到重连续发展,并且轻、中、重度间没有明显的分界线。干眼的治疗方案有很多,目前我国主要是采用人工泪液的替代疗法,此种方法虽然可以缓解患者症状,但却无法长期治愈,为了达到治愈的目的,我们必须对其发病机制有深入的了解^[6-7]。本文通过检测 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞的细胞因子表达情况,来探讨 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞和相关免疫调节性细胞因子的表达在防止干眼发病中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 新西兰兔为成年雌性,实验前对所有兔子进行眼科检查,记录兔眼的临床检查指标。饲养的环境必须符合医学实验动物环境的要求,把兔子随机分为模型组与对照组。入选标准:新西兰雌性成年兔个体;体质量 2.5~3kg;实验组中诱发干眼发病的方法均为回输外周血淋巴细胞使之发病。排除标准:患有其他眼病的新西兰兔;饲养过程中出现未成功诱导发病的实验组新西兰兔。

1.2 方法 单独培养提纯分离出的兔泪腺上皮细胞一段时间后,将其与分离出的外周血淋巴细胞以 1:1 的比例混合进行培养,并用 5-脱氧尿嘧啶核苷(5-Bromo-2-deoxyUridine, BrdU)检测外周血淋巴细胞的增殖情况,将已激活的自体外周血淋巴细胞通过耳缘静脉回输供体兔

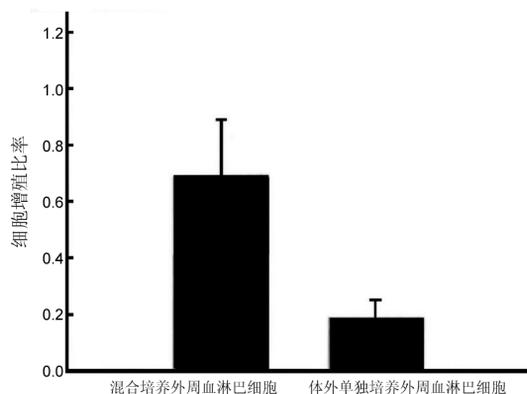


图 1 BrdU 检测淋巴细胞增殖实验。

体内,回输细胞后的供体兔将作为兔自身免疫性干眼模型组,未诱导发病的正常兔个体为对照组,观察实验前后兔角膜染色情况和 2、4、6、8wk 的泪膜破裂时间情况、泪液的分泌情况,回输细胞 4wk 后处死,收集双侧上下泪腺和结膜,并进行病理 HE 染色,然后提取泪腺组织中的总 RNA,检测 IL-17、TNF- α 、IL-6、TGF- γ 的表达。免疫磁珠分选 CD4⁺CD25⁺Treg,使用 real-time PCR 检测细胞因子 IL-6、IL-17、IL-10、TNF- α 、TGF- γ 、TGF- β 的表达情况,脾脏组织和泪腺组织中 CD4⁺CD25⁺Treg 的比例变化采用流式细胞仪检测,采用 BrdU 检测 CD4⁺CD25⁺Treg 对效应 T 细胞的抑制作用。

1.2.1 泪腺调节性 T 细胞检测 处死兔子后在超净工作台上取下兔子泪腺,置于 Has's 液的离心管中。把泪腺及携带的少量 Has's 液置于培养皿中培养,然后加入 Hank's 液吹打,组织悬液静置后弃掉上清液。将胶原酶消化液加入泪腺组织液中,观察组织块变化情况。取适量细胞消化液离心,取上清液。模型组和对照组取出相同数量的细胞置于流式管中。加入缓冲液后离心,用流式细胞仪检测细胞数量。重复试验 3 次,取平均值。

1.2.2 脾脏调节性 T 细胞检测 将处死后的兔子解剖后分离出脾脏,置于培养皿中研磨。加入 20mL Ficoll,离心,取中间雾状淋巴细胞层。用 RPMI-1640 培养基培养细胞,模型组和对照组取出相同数量的细胞置于流式管中。然后采用流式细胞仪计数。重复实验 3 次,取平均值。

统计学分析:应用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行分析处理,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,各时间点的组间差异比较采用独立样本 t 检验;各组的时间差异比较采用两两比较的 LSD- t 检验。不同的时间点重复测量泪膜破裂时间,采用重复测量数据的方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 自体淋巴细胞增殖检测结果 研究发现,BrdU 可以像胸腺嘧啶核苷一样掺入到细胞合成的 DNA 当中,只要细胞存在,这种 BrdU 就在细胞核的 DNA 中长期存在,其与抗体结合,再用底物检测免疫复合物,可以分析得出细胞的增殖比率,外周血淋巴细胞被自体泪腺细胞激活并且增殖,平均增殖比率为 3.72(图 1)。

2.2 泪膜破裂时间 研究表明,正常个体泪膜破裂时间为 $17.91\pm 1.28s$,干眼模型组在注射激活的淋巴细胞后 2wk 下降至 $8.03\pm 1.77s$,4wk 后为 $7.17\pm 1.40s$,6wk 后为 $8.06\pm 1.21s$,8wk 后为 $6.42\pm 1.41s$,模型组 2、4、6、8wk

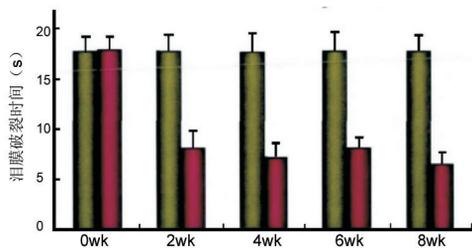


图2 兔泪膜破裂时间变化情况。

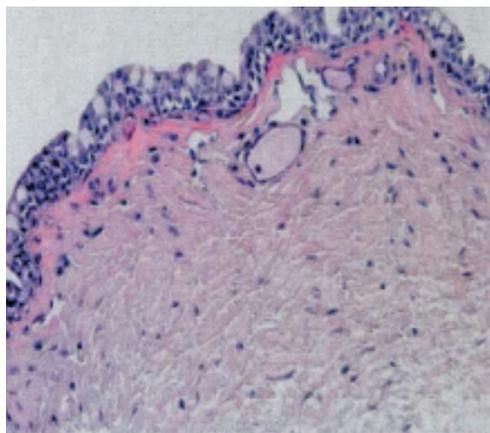


图3 正常组结膜 HE 染色(无明显炎症细胞浸染)。

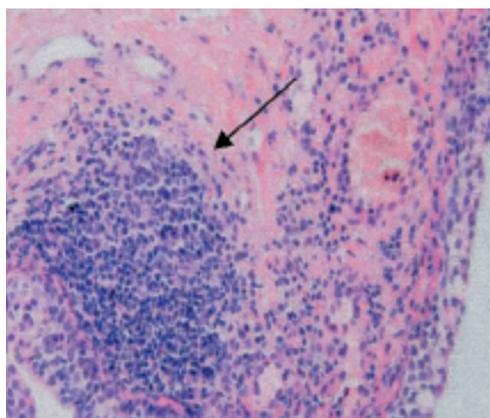


图4 干眼模型组中结膜 HE 染色可见大量淋巴细胞聚集。

的泪膜破裂时间与正常兔比较,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。组间差异比较:模型组 2wk 泪膜破裂时间与 4wk 时比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$);4wk 泪膜破裂时间与 6wk 时比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$);6wk 泪膜破裂时间与 8wk 时比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。对照组在观察期 BUT 保持稳定,与正常兔比较差异具有统计学意义($P < 0.05$),泪膜破裂时间 BUT 与泪膜的稳定性呈负相关(图 2)。

2.3 组织病理染色 结膜组织病理:取材球结膜及部分穹隆结膜,干眼模型组在 4wk 时取材,两种结膜中均可见大量被浸染的淋巴细胞,而且随时间延长,病理加重(图 3、4)。

2.4 细胞因子检测结果 干眼模型组泪腺组织中 IL-17、TNF- α 、IL-6、TGF- γ 的 mRNA 表达相对升高,而正常组 IL-10、TGF- β 的 mRNA 表达高于模型组。IL-17 mRNA 表达程度模型组高于正常组,对比差异具有统计学意义($t = 1.02, P = 0.03$)。TNF- α mRNA 表达程度模型组高于正常组,差异具有统计学意义($t = 1.25, P = 0.01$)。IL-6 mRNA 表达程度模型组高于正常组,差异具有统计学意义

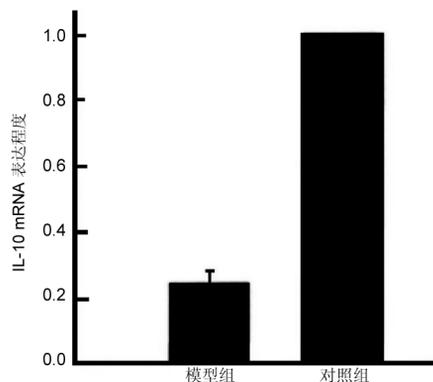


图5 泪腺组织中 IL-10 mRNA 表达。

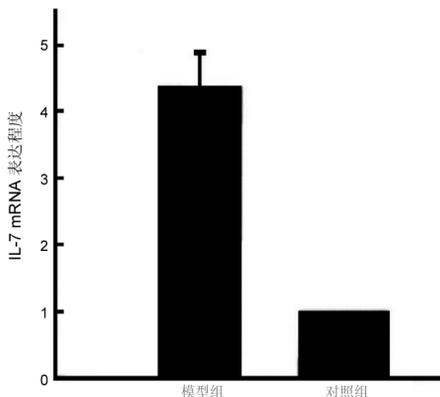


图6 泪腺组织中 IL-17 mRNA 表达。

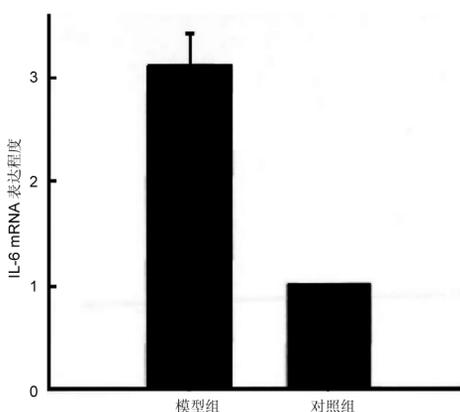


图7 泪腺组织中 IL-6 mRNA 表达。

义($t = 1.05, P = 0.02$)。TGF- γ mRNA 表达程度模型组高于正常组,差异具有统计学意义($t = 1.36, P = 0.01$)。IL-10 mRNA 表达程度正常组高于模型组,差异具有统计学意义($t = 1.24, P = 0.01$)。TGF- β mRNA 表达程度正常组高于模型组,差异具有统计学意义($t = 48, P = 0.02$,图 5~8)。

2.5 检测调节性 T 细胞 模型组和对照组泪腺组织中都能检测到调节性 T 细胞,对照组调节性 T 细胞平均占淋巴细胞 7%,而模型组中占 3.75%,对比差异具有统计学意义($P < 0.05$,表 1、2),在对照组中,泪腺组织和脾脏中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例较高,模型组 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例有所降低,且差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

干眼的发病机制主要包括细胞凋亡、激素水平异常、免疫炎症反应的影响等^[8-10]。干眼病的发病率逐渐上升,

表1 泪腺中正常对照组和模型组 CD4⁺Foxp3⁺T cell 比例

	模型组			对照组			P ₁	P ₂	P ₃
	实验组 1	实验组 2	实验组 3	对照组 1	对照组 2	对照组 3			
CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ T 细胞 (%)	3.5	3.8	4.1	6.8	7.2	6.5	0.01	0.02	0.01
IgG 类型细胞	0.3	0.2	0.5	0.2	0.3	0.4	0.02	0.01	0.02

表2 脾脏干眼模型组和正常对照组 CD4⁺Foxp3⁺T cel 比例

	模型组			对照组			P ₁	P ₂	P ₃
	实验组 1	实验组 2	实验组 3	对照组 1	对照组 2	对照组 3			
CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ T 细胞 (%)	6.8	7.0	7.2	11.8	10.5	12.3	0.03	0.02	0.02
IgG 类型细胞	0.3	0.2	0.3	0.2	0.3	0.4	0.02	0.02	0.01

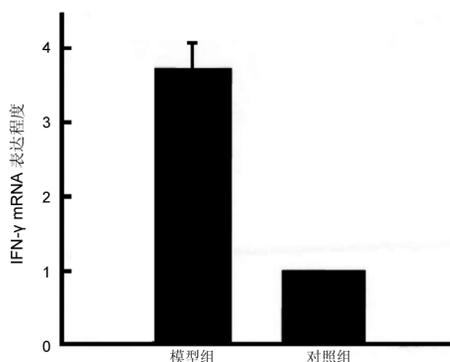


图8 泪腺组织中 IFN- γ mRNA 表达。

多见于自身免疫疾病相关的干眼病患者人群,例如 Sjögren's 综合征相关的干眼^[11-12]。干燥综合征主要是由于泪腺和唾液腺受损所致,发病的机制也复杂,至今仍不明确^[13-15]。理想动物模型则是研究干燥综合征的发病机制的基础。兔干眼动物模型则可以较为逼真地模拟人类综合征样干眼的临床特征和病理机制,CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞有免疫调节和免疫抑制两大功能,是维持机体自身免疫耐受的重要因素。研究表明,CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞和多种自身免疫性疾病的发病有密切关系^[16-17]。

本次实验探究了 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞和相关细胞因子在兔干眼模型之中的变化,研究结果显示:Brdu 检测出的外周血淋巴细胞增值比率为 3.72,激活的外周血淋巴细胞回输体内会诱导产生兔自身免疫性干眼,与正常组比较,泪膜破裂时间减少,且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);模型组较对照组泪液分泌显著减少,且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);HE 染色显示在回输细胞 4wk 后,结膜组织和泪腺均有淋巴细胞浸润,检测发现模型组 IL-17、TNF- α 、IL-6、TGF- γ 的表达较对照组均有所增加,但 IL-10、TGF- β 的表达较对照组有所降低,且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);流式细胞术检测表明,在对照组中,泪腺组织和脾脏中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例较高,模型组 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞比例有所降低,且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。干眼发病率逐年上升,其中较为严重的如 Sjögren's 综合征相关的干眼,有研究表明 Sjögren's 综合征兔干眼模型表现出泪液分泌减少,角结膜损伤,泪腺组织慢性淋巴细胞浸润,较为准确地模拟了人类 Sjögren's 综合征干眼的症状。CD4⁺CD25⁺Treg 细胞具有免疫抑制

和免疫调节两大功能,而 Th-17 细胞分泌的 IL-17 则会促进炎症反应,大量研究表明 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞和 Th-17 细胞与人类自身免疫病的发生之间存在密切关系,本次研究是在前人的大量研究基础上,借助合适的兔干眼模型探究 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞与干眼发病之间的关系。以上结果的出现主要是由于 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞在兔干眼发病过程中免疫抑制作用减弱,并且抑制了泪腺特异性效应 T 细胞的增殖^[18]。

综上所述,兔干眼模型在发病过程中,CD4⁺CD25⁺Treg 细胞免疫抑制作用下降,这一研究结果对预防干眼发病产生了重要影响,IL-17、TNF- α 、IL-6、TGF- γ 等细胞因子在泪腺的炎症反应中都发挥着重要作用。

参考文献

- 田国红,孙兴怀,李梦玮,等.以视神经病变为首发症状的原发性干燥综合征眼部特征分析.中国眼耳鼻喉科杂志 2015;15(3):170-174
- 黄鹤龄,李平,莫元外.炎性细胞因子在蒸发过强型干眼的发病机制中的作用.国际眼科杂志 2015;15(12):2177-2179
- 杨丽媛,边领斋,李雪,等.兔自身免疫性干眼模型的建立及泪腺炎症因子研究.眼科新进展 2015;35(9):810-815
- 高彩凤,陈慧瑾,靳瑛,等. Th17 相关细胞因子在干眼患者眼表的表达及其相关性研究.中华实验眼科杂志 2014;32(7):641-646
- Darabad RR, Suzuki T, Richards SM, et al. Does estrogen deficiency cause lacrimal gland inflammation and aqueous-deficient dry eye in mice? *Exp Eye Res* 2014;127(10):153-160
- Galor A, Gardener H, Pouyeh B, et al. Effect of a Mediterranean dietary pattern and vitamin D levels on Dry Eye syndrome. *Cornea* 2014;33(5):437-441
- 孙松,谈旭华,任天丽,等.干眼患者泪液及外周血中白细胞介素-6 表达水平检测及相关研究.中华实验眼科杂志 2013;31(2):186-190
- Hua R, Yao K, Hu Y, et al. Discrepancy between subjectively reported symptoms and objectively measured clinical findings in dry eye: a population based analysis. *BMJ Open* 2014;14(8):21-66
- Henrich CF, Ramulu PY, Akpek EK. Association of dry eye and inflammatory systemic diseases in a tertiary care-based sample. *Cornea* 2014;33(8):819-825
- Lv H, Pan Z, Hu S, et al. Relationship between CD4+CD25+Treg cells, Th17 cells and IL-6 and the prognosis of hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure: a meta-analysis. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2014;22(7):493-498
- Pierote BLF, Pereira EM. Thymus Output of CD4+CD25highTreg+ is Increased in Patients Carrying Leprosy Disease. *J Clin Exp Dermatol Res* 2015;25(7):49-83
- Chissumba RM, Silvabarbosa SD, Ângelo Augusto, et al. CD4 CD25

Treg cells in HIV/HTLV Co-infected patients with neuropathy: high expression of Alpha4 integrin and lower expression of Foxp3 transcription factor. *BMC Immunol* 2015;16(1):1-9

13 鲁志卿, 颜建华. CD4+CD25+Treg 细胞在视网膜母细胞瘤中表达. *中国实用眼科杂志* 2014;11(5):13-55

14 Doughty MJ. Fluorescein-Tear Breakup Time as an Assessment of Efficacy of Tear Replacement Therapy in DryEye Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ocular Surface* 2014;12(2):100-111

15 Moshirfar M, Pierson K, Hanamaikai K, et al. Artificial tears

potpourri: a literature review. *Clin Ophthalmol* 2014;8(3):1419-1433

16 李忱, 孙莹, 董振华, 等. T 细胞相关细胞因子在干燥综合征发病机制的研究进展. *医学研究杂志* 2014;43(6):13-16

17 Yi S, Oh J, Choi G, et al. The fate of heterotopic ossification associated with cervical artificial disc replacement. *Spine* 2014;39(25):2078-2083

18 Huang D, Luo Q, Yang H, et al. Changes of lacrimal gland and tear inflammatory cytokines in thyroid-associated ophthalmopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(8):4935-4943

中国科技核心期刊眼科学类期刊 2015 年主要指标及排名

刊名	总被引频次		影响因子		综合评价总分	
	数值	排名	数值	排名	数值	排名
中华眼科杂志	核心版 2037(扩展版 3690)	2(2)	核心版 1.075(扩展版 1.408)	1(1)	75.52	1
国际眼科杂志	核心版 2292(扩展版 4693)	1(1)	核心版 0.505(扩展版 0.988)	7(2)	47.46	2
眼科新进展	核心版 1184(扩展版 2151)	4(4)	核心版 0.573(扩展版 0.961)	4(3)	42.69	3
中华眼底病杂志	核心版 809(扩展版 1348)	6(6)	核心版 0.729(扩展版 0.928)	2(4)	42.30	4
中国实用眼科杂志	核心版 1527(扩展版 3336)	3(3)	核心版 0.548(扩展版 0.791)	6(6)	40.04	5
中华实验眼科杂志	核心版 928(扩展版 1508)	5(5)	核心版 0.412(扩展版 0.615)	9(8)	39.05	6
临床眼科杂志	核心版 485(扩展版 1179)	9(7)	核心版 0.467(扩展版 0.791)	8(6)	32.23	7
中华眼视光学与视觉科学杂志	核心版 613(扩展版 927)	7(8)	核心版 0.549(扩展版 0.783)	5(7)	26.20	8
眼科	核心版 497(扩展版 905)	8(9)	核心版 0.386(扩展版 0.483)	10(9)	17.19	9
中国斜视与小儿眼科杂志	核心版 295(扩展版 631)	10(10)	核心版 0.579(扩展版 0.891)	3(5)	16.88	10
10 种期刊平均值	1067		0.582			

国际眼科杂志社摘编自 2016 版《中国科技期刊引证报告》(核心版及扩展版)