

急性前葡萄膜炎患者血清 IL-35 和 TGF- β_1 表达水平及临床意义

樊爱芳¹, 白惠玲², 刘勤², 王芄莹¹, 苏萌², 张书²

引用: 樊爱芳, 白惠玲, 刘勤, 等. 急性前葡萄膜炎患者血清 IL-35 和 TGF- β_1 表达水平及临床意义. 国际眼科杂志 2021; 21(1):160-163

基金项目: 甘肃省人民医院科研基金项目(No.17GSSY7-2)

作者单位:¹(730000) 中国甘肃省兰州市, 甘肃中医药大学;
²(730000) 中国甘肃省兰州市, 甘肃省人民医院眼科

作者简介: 樊爱芳, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼表疾病、葡萄膜炎。

通讯作者: 刘勤, 毕业于兰州大学, 学士, 主任医师, 硕士研究生导师, 门诊部主任, 研究方向: 眼表疾病、眼视光学. summliu@126.com

收稿日期: 2020-06-11 修回日期: 2020-12-04

摘要

目的: 研究急性前葡萄膜炎患者血清 IL-35、TGF- β_1 表达水平变化及两者之间的相关性, 探讨 IL-35、TGF- β_1 在急性前葡萄膜炎中的临床意义。

方法: 纳入 2018-05/2019-05 在甘肃省人民医院眼科确诊的急性前葡萄膜炎患者 30 例作为急性前葡萄膜炎组, 同期进行体检的健康人 30 例作为健康对照组, 采用 ELISA 法检测两组受检者血清 IL-35、TGF- β_1 表达水平, 并根据改良的 EIU 临床评分标准评估急性前葡萄膜炎严重程度。

结果: 急性前葡萄膜炎患者血清 IL-35、TGF- β_1 表达水平显著高于健康对照组 (均 $P < 0.05$), 且急性前葡萄膜炎患者血清 IL-35、TGF- β_1 水平与疾病严重程度无明显相关性 ($r_s = 0.087, 0.044$, 均 $P > 0.05$), 但血清 IL-35 与 TGF- β_1 表达水平呈正相关 ($r_s = 0.637, P < 0.001$)。

结论: 血清 IL-35、TGF- β_1 水平变化与急性前葡萄膜炎的发生和发展密切相关, 可能在急性前葡萄膜炎中协同发挥免疫抑制作用。

关键词: 白细胞介素-35; 转化生长因子- β_1 ; 急性前葡萄膜炎; 细胞因子; 自身免疫性疾病; 人类白细胞抗原-B27

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2021.1.33

Serum IL-35 and TGF- β_1 expression levels in patients with acute anterior uveitis and their clinical significance

Ai-Fang Fan¹, Hui-Ling Bai², Qin Liu², Peng-Xuan Wang¹, Meng Su², Shu Zhang²

Foundation item: Research Fund Project of Gansu Provincial Hospital (No.17GSSY7-2)

¹Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, Gansu Province, China; ²Department of Ophthalmology, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Correspondence to: Qin Liu. Department of Ophthalmology, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. summliu@126.com

Received: 2020-06-11 Accepted: 2020-12-04

Abstract

• **AIM:** To study the changes of serum IL-35 and TGF- β_1 expression levels and the correlation between them in patients with acute anterior uveitis, and to explore the clinical significance of IL-35 and TGF- β_1 levels in patients with acute anterior uveitis.

• **METHODS:** Thirty patients with acute anterior uveitis confirmed in the Department of Ophthalmology of Gansu Provincial Hospital into 2018-05/2019-05 were selected as the case group, and thirty healthy patients who received physical examination at the Gansu Provincial Hospital during the same period were selected as the control group. Serum IL-35 and TGF- β_1 expression levels between the two groups were detected by Elisa. Modified endotoxin-induced uveitis (EIU) clinical standard was used for the severity of acute anterior uveitis.

• **RESULTS:** Serum IL-35 and TGF- β_1 expression levels in the acute anterior uveitis group were significantly higher than that in the healthy control group (all $P < 0.05$), and there was no significant correlation between serum IL-35 and TGF- β_1 levels as well as the severity of acute anterior uveitis ($r_s = 0.087, 0.044$, all $P > 0.05$). There was a significant positive correlation between serum IL-35 and TGF- β_1 expression levels in patients with acute anterior uveitis ($r_s = 0.637, P < 0.001$).

• **CONCLUSION:** The expression levels of IL-35 and TGF- β_1 in serum are closely related to the occurrence and development of acute anterior uveitis and may play a synergistic role in immunosuppression in acute anterior uveitis.

• **KEYWORDS:** interleukin-35; transforming growth factor- β_1 ; acute anterior uveitis; cytokines; autoimmune disease; human leucocyte antigen-B27

Citation: Fan AF, Bai HL, Liu Q, et al. Serum IL-35 and TGF- β_1 expression levels in patients with acute anterior uveitis and their clinical significance. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2021;21(1):160-163

0 引言

急性前葡萄膜炎是一类病因及发病机制非常复杂的疾病,多项研究表明细胞因子的变化与前葡萄膜炎的发病、转归息息相关^[1]。白细胞介素(IL)-35是一种异二聚体蛋白,主要由Treg和Breg细胞分泌,是IL-12细胞因子家族的新成员,IL-35由EBI3和IL-12的p35亚基共价连接,IL-35受体(IL-35R)由IL-12Rβ2(IL-12R组分)和gp130(IL-27R组分)组成,IL-35与IL-35R结合后,通过激活JAK(janus activation kinase)家族成员、信号转导子和转录激活子(STAT)家族成员的活化和核易位来传递信号,在免疫调节反应中形成抑炎放大效应^[2-3]。到目前为止,IL-35作为一种免疫调节因子已经在多种自身免疫性疾病中被研究,但IL-35并不完全是一种单纯的抗炎细胞因子,它在不同炎症动物模型或人Treg细胞中的作用仍然是矛盾的^[4],IL-35在实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveitis,EAU)小鼠中呈现了免疫抑制作用^[2],但IL-35在人类葡萄膜炎中的意义有待进一步研究。此外,Treg细胞还分泌转化生长因子-β(transforming growth factor-β,TGF-β),TGF-β₁是其中的一种亚型,目前对于TGF-β₁的研究比较明确,是人体内一种重要的抗炎细胞因子,在葡萄膜炎的进展中具有重要的抑制作用^[5]。因此本研究检测了急性前葡萄膜炎患者血清IL-35、TGF-β₁的表达水平,并分析两者之间的相关性,评价其在急性前葡萄膜炎中的作用。

1 对象和方法

1.1 对象 纳入2018-05/2019-05在甘肃省人民医院眼科确诊的急性前葡萄膜炎患者30例作为急性前葡萄膜炎组,包括HLA-B27+患者19例(63%,其中合并强直性脊柱炎2例,骶髂关节炎1例,反应性关节炎1例),特发性前葡萄膜炎11例(37%);男17例,女13例;平均年龄 36.43 ± 14.73 岁。根据2005年国际葡萄膜炎研究工作组分类^[6]及《我国急性前葡萄膜炎临床诊疗专家共识(2016年)》诊断标准^[7],通过患者病史,结合裂隙灯检查、实验室检查确诊。纳入标准:首次发病,病程3mo内,符合急性前葡萄膜炎的诊断标准。排除标准:(1)继发于全葡萄膜炎的前葡萄膜炎;(2)合并其他眼部疾病及反复发作史;(3)近1mo内服用抗生素、糖皮质激素、免疫抑制剂等;(4)合并感染性疾病的患者;(5)合并糖尿病及严重肾功能不全者。纳入同期在本院体检的健康人30例作为健康对照组,其中男16例,女14例,平均年龄 44.27 ± 18.34 岁。排除近1mo内服用抗生素、糖皮质激素、免疫抑制剂等受检者。两组受检者性别和年龄比较差异无统计学意义($\chi^2=0.067, P=0.795; t=1.824, P=0.073$)。本研究获得甘肃省人民医院伦理委员会批准(2019-204),所有受检者均知情同意并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 血清样本收集 两组受检者均于清晨空腹时,肘静脉取非抗凝血5mL,室温下自然凝固后,置37℃温育箱孵育1h,离心机3000r/min离心15min,小心吸取血清于EP管中,封口,标记后保存于-80℃冰箱备用。

1.2.2 ELISA测定血清IL-35和TGF-β₁水平 采用人TGF-β₁、IL-35 ELISA试剂盒(江苏菲亚生物科技有限公

司,中国)以双抗体夹心法测定血清IL-35、TGF-β₁水平。按照试剂盒说明书完成实验,根据标准品通过ELISA Calc软件绘制标准曲线,计算样本浓度。

1.2.3 前葡萄膜炎严重程度评分 根据Hoekzema等^[8]改良的EIU临床评分标准,在裂隙灯下判定炎症情况。评分标准:虹膜充血轻度为1分,重度为2分;前房闪辉轻度为1分,重度为2分;前房渗出轻度为1分,重度为2分;前房积脓轻度为1分,重度为2分;瞳孔缩小轻度为1分,重度为2分;总分为10分。

统计学分析:采用SPSS 24.0统计学软件对数据进行统计学分析。计量资料采用Shapiro-Wilk法进行正态分布检验,血清细胞因子数据资料呈偏态分布,用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表达,两组受检者血清细胞因子质量浓度差异比较采用Mann-Whitney *U*检验。血清IL-35与TGF-β₁表达水平的相关性及两者表达水平与疾病严重程度(改良的EIU评分)的相关性均采用Spearman秩相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

急性前葡萄膜炎患者血清IL-35、TGF-β₁的表达水平明显高于健康对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$,表1)。按照改良的临床评分标准对纳入的急性前葡萄膜炎患者疾病严重程度进行评分,最高分为9分,其中0~3分者9例,4~6分者17例,7~9分者4例。相关性分析结果显示,急性前葡萄膜炎患者血清IL-35、TGF-β₁水平与疾病程度均无明显相关性($r_s = 0.087, 0.044, P = 0.647, 0.818$),但血清IL-35与TGF-β₁表达水平呈正相关($r_s = 0.637, P < 0.001$,图1)。

3 讨论

急性前葡萄膜炎病因及发病机制复杂,按病因主要分为感染性和非感染性两大类,非感染性多见于血清阴性椎关节病伴发的急性前葡萄膜炎(多数HLA-B27抗原阳性)、HLA-B27抗原相关的急性前葡萄膜炎和特发性急性前葡萄膜炎。本研究纳入患者以非感染性为主,其发病机制多数观点认为是由于各种原因使机体自身免疫功能紊乱引起的细胞因子变化,在急性前葡萄膜炎的发生发展中发挥重要的作用。Treg细胞是控制体内自身免疫反应的T细胞的一个子集,其主要分泌TGF-β、IL-10、IL-35,在调节免疫反应的平衡、预防自身免疫性和过敏性疾病以及移植后的耐受性诱导等方面发挥着重要作用^[9]。TGF-β₁是一种重要的免疫抑制性细胞因子,在人体免疫平衡中具有重要作用,其表达水平变化对炎症发生、发展和复发具有非常重要的免疫调控作用。葡萄膜炎患者的临床症状缓解与血清TGF-β₁和IL-10水平显著升高密切相关,并且与Treg细胞数量呈正相关^[10],TGF-β₁的增加对炎症反应发挥着非常重要的负向调控作用。另外,Th17/Treg及相关细胞因子平衡也在葡萄膜炎发生发展过程中具有重要作用,Th17和Treg相关因子可以协同表达,最终趋向于恢复免疫平衡^[11]。因此,本研究中观察到TGF-β₁在急性前葡萄膜炎患者血清表达升高,提示TGF-β₁的增加可能是炎症反应中促炎因子释放,刺激其表达发挥免疫抑制功能。

IL-35是IL-12家族成员,其成员还包括IL-12、IL-23、

表1 两组受检者血清 IL-35 和 TGF-β₁ 表达水平

[M(P₂₅, P₇₅), ng/L]

组别	例数	IL-35	TGF-β ₁
急性前葡萄膜炎组	30	77.28 (53.64, 107.75)	815.04 (613.06, 1023.45)
健康对照组	30	62.06 (41.95, 79.70)	718.28 (547.08, 818.76)
U		606.5	600.0
P		0.021	0.026

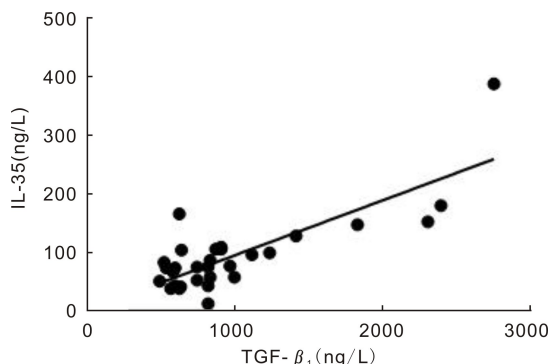


图1 急性前葡萄膜炎患者血清 IL-35 与 TGF-β₁ 表达水平的相关性。

IL-27, 主要在抗原提呈细胞 (APCs) 中表达, 如巨噬细胞、单核细胞和树突状细胞, 这些细胞因子具有独特的多向性, 在 T 细胞中起着重要作用, 而具有生物活性的 IL-35 主要由 CD4⁺Foxp3⁺Treg 细胞分泌, 与 IL-12 家族其他成员不同的是, IL-35 可以抑制 CD4⁺ 效应 T 细胞 (包括 Th1、Th2 和 Th17), 诱导幼稚 T 细胞转化为 iT_H17 细胞发挥抑炎作用^[3,12]。IL-35 在小鼠中的 Treg、CD8⁺T、γδT 细胞中持续表达, 是一种抑制 T 细胞增殖和预防自身免疫性疾病的免疫调节剂^[3]。而 IL-35 在人体组织及 CD4⁺Foxp3⁺Treg 细胞中不具有持续性表达, 而是在炎症刺激下表达, 因此, 人 IL-35 的功能似乎是全面抑制炎症, 而不是启动预防炎症^[4,13]。迄今为止, 多数关于 IL-35 效应的研究都是在小鼠实验模型中进行的, Wang 等^[2] 和 Kang 等^[14] 发现 IL-35 (rIL-35 或者 i-35 外泌体) 可以改善 EAU 小鼠的症状, 并伴有 Th17 和 Th1 细胞的显著减少和 Breg 及 Treg 细胞的扩增, 另外 IL-35 缺乏或 IL-35 信号通路缺失的小鼠会发展为严重的 EAU。关于人类自身免疫性疾病的报道多集中在原发性干燥综合征 (Sjögren's Syndrome, SS)^[15]、系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE)^[16]、银屑病性关节炎^[17]、类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA)^[18-19] 等, 在人葡萄膜炎中的报道较少。Abu El-Asrar 等^[20] 在自身免疫性葡萄膜炎患者房水细胞因子表达谱分析中发现 IL-35 参与了 HLA-B27 相关性葡萄膜炎的免疫调节反应。有研究表明, RA 患者血清 IL-35 高水平与疾病缓解显著相关, 病程较长也可能导致血清 IL-35 水平显著升高^[19]。此外, 在 Treg 细胞与 CD4⁺ 效应 T 细胞共同培养时, 发现 EBI3 和 p35 mRNA 的表达明显上调^[21], CD4⁺ 效应 T 细胞的存在可能是诱导 IL-35 产生的信号传递机制之一。本研究结果显示, 与健康对照组相比, IL-35 在急性前葡萄膜炎患者血清中表达明显升高, 但与疾病严重程度无明显相关性, 提示 IL-35 水平的升高, 可能是炎症发展时 CD4⁺Th 细胞及其促炎因子上调,

其代偿性升高发挥免疫调节作用。此外, 急性前葡萄膜炎患者血清 IL-35 表达水平与免疫抑制因子 TGF-β₁ 的表达水平呈正相关, 提示两者可能协同发挥免疫抑制作用。

综上所述, IL-35 主要通过诱导 Treg 和 Breg 细胞扩增, 增加抑炎因子, 抑制 CD4⁺ 效应 T 细胞相关促炎因子来调节免疫功能, 缓解疾病症状。也有研究表明 IL-35、TGF-β₁ 的升高与疾病的活动状态及病程长短相关, 这可能与不同疾病的发病机制或其参与的信号通路不同有关。IL-35、TGF-β₁ 在免疫调节反应中可能协同发挥作用, 但其如何在急性前葡萄膜炎中发挥作用, 需要进一步在 Th17 及 Treg 细胞层面及分子机制中详细研究, 为新的治疗方法提供理论依据。

参考文献

- Weinstein JE, Pepple KL. Cytokines in uveitis. *Curr Opin Ophthalmol* 2018; 29(3): 267-274
- Wang RX, Yu CR, Dambuzza IM, et al. Interleukin - 35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nat Med* 2014; 20(6): 633-641
- Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 2007; 450(7169): 566-569
- Bardel E, Larousserie F, Charlot-Rabiega P, et al. Human CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells do not constitutively express IL-35. *J Immunol* 2008; 181(10): 6898-6905
- 徐晓芳, 吕嘉华. 对自身免疫性葡萄膜炎大鼠调节性 T 淋巴细胞变化的观察. *眼科研究* 2008; 26(11): 841-844
- Jabs DA, Nussenblatt RB, Rosenbaum JT, et al. Standardization of uveitis nomenclature for reporting clinical data. Results of the First International Workshop. *Am J Ophthalmol* 2005; 140(3): 509-516
- 中华医学会眼科学分会眼免疫学组. 我国急性前葡萄膜炎临床诊疗专家共识(2016年). *中华眼科杂志* 2016; 52(3): 164-166
- Hoekzema R, Verhagen C, van Haren M, et al. Endotoxin-induced uveitis in the rat. The significance of intraocular interleukin-6. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33(3): 532-539
- 贺莉, 喻京生. 调节性 T 细胞等关键免疫负向调节因子与自身免疫性葡萄膜炎相关性的研究进展. *中华眼科医学杂志* 2018; 8(2): 76-81
- Gilbert RM, Zhang X, Sampson RD, et al. Clinical Remission of Sight-Threatening Non-Infectious Uveitis Is Characterized by an Upregulation of Peripheral T-Regulatory Cell Polarized Towards T-bet and TIGIT. *Front Immunol* 2018; 9: 907
- Yin X, Liu B, Wei H, et al. Activation of the Notch signaling pathway disturbs the CD4(+)/CD8(+), Th17/Treg balance in rats with experimental autoimmune uveitis. *Inflamm Res* 2019; 68(9): 761-774
- Kochetkova I, Golden S, Holderness K, et al. IL-35 stimulation of CD39+ regulatory T cells confers protection against collagen II-induced arthritis via the production of IL-10. *J Immunol* 2010; 184(12): 7144-7153

13 Li X, Mai J, Virtue A, *et al.* IL-35 is a novel responsive anti-inflammatory cytokine--a new system of categorizing anti-inflammatory cytokines. *PLoS One* 2012; 7 (3): e33628
14 Kang M, Choi JK, Jittayasothorn Y, *et al.* Interleukin 35-Producing Exosomes Suppress Neuroinflammation and Autoimmune Uveitis. *Front Immunol* 2020; 11: 1051
15 Guo J, Gu M, Zhang W, *et al.* Aberrant IL-35 levels in patients with primary Sjogren's syndrome. *Scand J Immunol* 2018; 88(5): e12718
16 He D, Liu M, Liu B. Interleukin-35 as a New Biomarker of Renal Involvement in Lupus Nephritis Patients. *Tohoku J Exp Med* 2018; 244 (4): 263-270
17 Li Y, Wu S, Li Y, *et al.* Interleukin - 35 (IL - 35) inhibits proliferation and promotes apoptosis of fibroblast - like synoviocytes

isolated from mice with collagen-induced arthritis. *Mol Biol Rep* 2016; 43(9): 947-956
18 Ning X, Jian Z, Wang W. Low Serum Levels of Interleukin 35 in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Tohoku J Exp Med* 2015; 237(2): 77-82
19 Li Y, Yao L, Liu S, *et al.* Elevated serum IL-35 levels in rheumatoid arthritis are associated with disease activity. *J Investig Med* 2019; 67 (3): 707-710
20 Abu El-Asrar AM, Berghmans N, Al-Obeidan SA, *et al.* Local Cytokine Expression Profiling in Patients with Specific Autoimmune Uveitic Entities. *Ocul Immunol Inflamm* 2020; 28(3): 453-462
21 Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(7): 523-532

国际眼科杂志中文版(IES)近5年影响因子趋势图

