

· 临床研究 ·

不同类型过敏性结膜炎患者眼表组织中白细胞介素-4、5 和 13 的表达

姚娟 李冰 郑晓汾

【摘要】 背景 过敏性结膜炎的发病机制尚未完全明确。研究表明,白细胞介素-4(IL-4)、IL-5 和 IL-13 在过敏性结膜炎中发挥重要作用,但这些因子对不同类型的过敏性结膜炎患者的作用是否一致尚有待证明。

目的 探讨 IL-4、IL-5 和 IL-13 在不同类型过敏性结膜炎患者眼表组织中的表达及其在不同类型过敏性结膜炎发病中的作用。**方法** 采用前瞻性队列研究设计。纳入 2013 年 4 月至 2014 年 9 月在山西省眼科医院就诊的春季角结膜炎(VKC)患者 20 例 40 眼、季节性过敏性结膜炎(SAC)患者 20 例 40 眼和常年性过敏性结膜炎(PAC)患者 20 例 40 眼,并纳入同期健康志愿者 20 人 40 眼作为正常对照。用消毒刮刀在上睑结膜刮取结膜上皮细胞,分别采用免疫组织化学法、实时荧光定量 PCR 法检测结膜上皮细胞中 IL-4、IL-5 和 IL-13 蛋白及其 mRNA 的表达;采用 1 μ l 毛细玻璃管于受试者下睑颞侧睑缘处吸取泪液 4 μ l, Luminex 液相芯片测定受试者泪液中 IL-4、IL-5 和 IL-13 的表达。**结果** 免疫组织化学法染色表明,VKC 组、SAC 组和 PAC 组患者结膜上皮细胞的细胞质中均可见到 IL-4、IL-5 和 IL-13 的阳性表达,而在正常对照组受试者结膜上皮细胞中未发现 IL-4、IL-5 和 IL-13 的表达。以正常对照组 IL-4、IL-5 和 IL-13 mRNA 的表达量为对照,VKC 组、SAC 组和 PAC 组中 IL-4 mRNA 的相对表达量分别为 4.11 ± 1.24 、 2.71 ± 0.71 和 2.00 ± 0.80 ,IL-5 mRNA 的相对表达量分别为 4.02 ± 0.43 、 2.07 ± 0.45 和 1.47 ± 0.50 ,IL-13 mRNA 的相对表达量分别为 6.44 ± 0.66 、 4.35 ± 1.26 和 2.39 ± 0.86 ,4 个组间 IL-4、IL-5 和 IL-13 mRNA 相对表达量的总体比较差异均有统计学意义($F=51.32$ 、 220.18 、 162.49 ,均 $P<0.01$);其中 VKC 组 IL-4、IL-5 和 IL-13 mRNA 的相对表达量明显高于 SAC 组和 PAC 组,SAC 组 IL-4、IL-5、IL-13 mRNA 的相对表达量高于 PAC 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。正常对照组受试者泪液中未检测到 IL-4、IL-5 和 IL-13 表达,VKC 组泪液中 IL-4、IL-5 和 IL-13 蛋白质量浓度分别为 (14.06 ± 3.50) 、 (10.88 ± 1.82) 和 (34.28 ± 8.42) pg/ml,SAC 组分别为 (7.71 ± 0.65) 、 (5.10 ± 1.33) 、 (23.77 ± 6.29) pg/ml,PAC 组分别为 (3.30 ± 1.50) 、 (2.43 ± 1.28) 和 (17.67 ± 4.28) pg/ml,组间总体比较差异均有统计学意义($F=200.29$ 、 260.49 、 128.23 ,均 $P<0.01$);其中 VKC 组 IL-4、IL-5、IL-13 蛋白质量浓度明显高于 SAC 组和 PAC 组,SAC 组 IL-4、IL-5 和 IL-13 蛋白质量浓度明显高于 PAC 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。**结论** IL-4、IL-5 和 IL-13 参与多种类型过敏性结膜炎的发病,但在不同类型过敏性结膜炎患者中眼表的表达均有差异。

【关键词】 过敏性结膜炎/免疫; T 淋巴细胞; 眼部炎症/免疫; 白细胞介素-4; 白细胞介素-5; 白细胞介素-13; 人; 上皮细胞/眼; 泪液

Expressions of interleukin-4, 5 and 13 in ocular surface with different types of allergic conjunctivitis Yao Juan, Li Bing, Zheng Xiaofen. Shanxi Eye Hospital, Taiyuan 030002, China
Corresponding author: Zheng Xiaofen, Email: zxfjd@163.com

[Abstract] Background The pathogenesis of allergic conjunctivitis has not been clearly established. Current researchers indicate that interleukin-4 (IL-4), IL-5 and IL-13 may play an important role in allergic conjunctivitis. But whether the roles of these inflammatory factors are same in different types of allergic conjunctivitis remains unclear. **Objective** This study was to investigate the expressions of IL-4, IL-5 and IL-13 in ocular surface with different types of allergic conjunctivitis. **Methods** A prospective cohort study was designed. Eighty individuals were recruited in Shanxi Eye Hospital from April 2013 to September 2014, including 20 patients with vernal

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.10.013

基金项目:山西省自然科学基金项目(2013011059-6)

作者单位:030002 太原,山西省眼科医院

通信作者:郑晓汾,Email:zxfjd@163.com

keratoconjunctivitis (VKC), 20 patients with seasonal allergic conjunctivitis (SAC), 20 patients with perennial allergic conjunctivitis (PAC) and 20 normal healthy subjects. Surficial tissues were binocularly scraped using disinfected scraper from upper eyelid conjunctiva, and 4 μ l of tear fluid was obtained with capillary tube. The expressions of IL-4, IL-5 and IL-13 protein and mRNA in the conjunctival epithelial cells were detected by immunohistochemistry and real-time fluorescence quantitative PCR. The IL-4, IL-5 and IL-13 concentrations in tear fluid were assayed by Luminex method. This study complied with Declaration of Helsinki and the research protocol was approved by the Shanxi Eye Hospital Ethics Committee. Written informed consent was obtained from each subject prior to entering the cohort.

Results IL-4, IL-5 and IL-13 were positively expressed in cytoplasm of conjunctival epithelial cells in the VKC group, SAC group and PAC group, but the expressions of IL-4, IL-5 and IL-13 were absent in the normal control group. The relative expression levels of IL-4 mRNA were 4.11 ± 1.24 , 2.71 ± 0.71 and 2.00 ± 0.80 ; the relative expression levels of IL-5 mRNA were 4.02 ± 0.43 , 2.07 ± 0.45 and 1.47 ± 0.50 ; and the relative expression levels of IL-13 mRNA expression levels were 6.44 ± 0.66 , 4.35 ± 1.26 and 2.39 ± 0.86 in the VKC group, SAC group and PAC group, showing significant differences among the 4 groups ($F=51.32, 220.18, 162.49$, all at $P<0.01$). The relative expression levels of IL-4, IL-5 and IL-13 mRNA were significantly higher in the VKC group than those in the SAC group and PAC group; and those in the SAC group were significantly elevated in comparison with the PAC group (all at $P<0.05$). No IL-4, IL-5 and IL-13 were detected in the tear fluid in the normal control group; while the concentrations of IL-4, IL-5 and IL-13 in the tear fluid were (14.06 ± 3.50) , (10.88 ± 1.82) and (34.28 ± 8.42) pg/ml in the VKC group, and (7.71 ± 0.65) , (5.10 ± 1.33) , (23.77 ± 6.29) pg/ml in the SAC group as well as (3.30 ± 1.50) pg/ml, (2.43 ± 1.28) pg/ml and (17.67 ± 4.28) pg/ml in the PAC group, showing significant differences among the 3 groups ($F=200.29, 260.49, 128.23$, all at $P<0.01$). IL-4, IL-5 and IL-13 concentrations in the tear fluid were significantly higher in the VKC group than those in the SAC group and PAC group, and those in the SAC group were significantly raised in comparison with the PAC group (all at $P<0.01$).

Conclusions IL-4, IL-5 and IL-13 participate in the pathogenesis of multiple allergic conjunctivitis, but their expressions in the ocular surficial tissue are discriminatory in different types of allergic conjunctivitis.

[Key words] Conjunctivitis, allergic/immunology; T-lymphocytes; Inflammatory, ocular/immunology; Interleukin-4; Interleukin-5; Interleukin-13; Humans; Epithelium, eye; Tear

过敏性结膜炎是局部组织和机体对抗原物质的非特异性免疫反应,由 IgE 或 T 淋巴细胞介导,其主要症状为眼痒和异物感。研究发现,过敏反应是由抗原激活的过度放大的免疫级联反应,导致辅助性 T 细胞 1 (T helper cell 1, Th1)/Th2 平衡的破坏,主要是 Th2 细胞增多^[1-2]。抗原特异的 Th2 细胞分泌白细胞介素-4 (interleukin-4, IL-4)、IL-5、IL-13 等细胞因子^[3],促进 IgE 的合成,诱导嗜酸性粒细胞的增多及黏液分泌的增加,从而在过敏性结膜炎的发病过程中发挥作用^[4]。关于过敏性结膜炎的发病机制至今还有许多问题有待阐明, Th2 细胞亚群在过敏性疾病中的作用是目前研究的热点之一。以往关于过敏性结膜炎的研究多聚焦于基础实验阶段,而对 IL-4、IL-5、IL-13 等重要信号传递分子在眼表的表达变化研究甚少。中国研究者曾对重度春季角结膜炎 (vernal keratoconjunctivitis, VKC) 患者的局部组织进行组织病理学研究,但缺乏对轻中度过敏性结膜炎患者的相关研究。本研究中检测临床上较常见的 3 种类型过敏性结膜炎患者结膜细胞中 IL-4、IL-5 和 IL-13 的表达情况,探讨 Th2 细胞亚群相关因子在过敏性角结膜炎发生和进展中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料

采用前瞻性队列研究设计,连续收集 2013 年 4 月至 2014 年 9 月在山西省眼科医院就诊的 VKC 患者 20 例 40 眼、季节性过敏性结膜炎 (seasonal allergic conjunctivitis, SAC) 患者 20 例 40 眼和常年性过敏性结膜炎 (perennial allergic conjunctivitis, PAC) 20 例 40 眼,另收集同期健康志愿者 20 人 40 眼为正常对照。诊断标准^[5]: (1) SAC: 眼痒,结膜充血,双眼发病,有季节性。(2) PAC: 眼痒,结膜充血,双眼发病,无季节性。(3) VKC: 结膜充血、水肿,双眼发病,多见于儿童和青少年。所有就诊患者均详细采集家族史、过敏源接触史、用药史、个人过敏史、接触镜配戴史以及发病的年龄、季节、时间及病程等^[6],患者均接受常规裂隙灯显微镜检查,并借助于细胞学刮片法确诊。参照文献^[7]的标准排除以下患者: (1) 有其他角膜结膜疾病史者。(2) 有湿疹、特异性皮炎、荨麻疹、系统性红斑狼疮、风湿性关节炎等全身变态反应性疾病史者。(3) 有泪液或泪道系统疾病史者。(4) 有眼部用药及手术史

者。(5)有角膜接触镜配戴史者。本研究经山西省眼科医院伦理委员会批准(批准号:2013064),并严格遵循赫尔辛基宣言,所有患者进入队列前均由患者本人或其家属签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色法检测结膜上皮细胞中 IL-4、IL-5 和 IL-13 的表达

受试者双眼用盐酸丙美卡因滴眼液(美国爱尔康公司)点眼 1~2 次行眼表面麻醉,每次间隔 3 min。受试者取坐位,用棉签蘸去眼表分泌物和内外眦液体,翻转眼睑暴露睑结膜,用消毒刮刀在上睑结膜表面刮取组织,然后受试眼用妥布霉素滴眼液(美国爱尔康公司)点眼以预防感染。将刮取的标本立即均匀地平铺在黏性载玻片上,以免细胞重叠变形或厚薄不均。涂片自然干燥 10 min 后放入体积分数 95% 乙醇中固定 20 min,滴加体积分数 0.2% Triton (0.01 mmol/L PBS 稀释 Triton X-100 配制而成)溶液孵育 20 min。采用免疫组织化学两步法进行染色,一抗分别采用兔抗人 IL-4、IL-5、IL-13 (1:500, 1 μg/ml) 多克隆抗体稀释液(北京博奥森公司),于 4℃ 冰箱孵育过夜,常温复温 30 min,滴加辣根酶标记山羊抗兔二抗孵育 30 min, DAB 显色,苏木素染色,梯度乙醇脱水(95%、100% 各 2 次),二甲苯透明,封片。以抗体稀释液代替一抗为阴性对照。400 倍光学显微镜下观察染色结果并拍照。细胞质中显示棕褐色颗粒判定为阳性结果。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 法检测结膜上皮细胞中 IL-4、IL-5、IL-13 mRNA 的相对表达量

用盐酸丙美卡因滴眼液点眼行受试眼表面麻醉,用无菌显微镊夹取消毒的梯形硝酸纤维膜(两底分别为 8 mm 和 10 mm,高为 5 mm,美国 PALL 公司)分别轻敷于受试者眼颞侧、上方和下方球结膜 10 s 后,迅速放入装有 350 μl 含体积分数 1% β-巯基乙醇 RLT 缓冲液的微量离心管中,置于 -80℃ 超低温冰箱中保存备用。同一受试者双眼标本合并为一个样本。搜集足够样本后常温融化,根据试剂盒(RNeasy Micro or Mini kit,美国 Qiagen 公司)说明书提取总 RNA,逆转录成 cDNA(QuantiTect Reverse Transcription Kit,美国 Qiagen 公司),行实时荧光定量 PCR(StepOne Plus,美国 ABI 公司)检测,反应体系总体积为 25.0 μl,包含 2.0 μl cDNA, 1.5 μl IL-4 (Hs00174122_m1)、IL-5 (Hs01548712_g1)、IL-13 (Hs00174379_m1) 探针或 GAPDH (hs99999905_m1), 12.5 μl master mix (QuantiTect Probe PCR kit,美国 Qiagen 公司)和 9.0 μl 去离子水。PCR 反应条件:95℃ 预变性 15 min;94℃ 变性 15 s,60℃ 退火 1 min,

共 40 个循环。以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析 IL-4、IL-5、IL-13 mRNA 相对表达量的变化^[8-9]。

1.2.3 Luminex 法检测泪液中 IL-4、IL-5、IL-13 质量浓度

采用 1 μl 毛细玻璃管于受试者下睑颞侧睑缘处吸取泪液,双眼各取 4 μl,合并为一个样本,迅速放入装有 6 μl 质量分数 1% 牛血清蛋白的微量离心管中,置于 -80℃ 超低温冰箱中保存备用。应用测定缓冲液将泪液标本按照 1:1 稀释,细胞因子检测严格按照 Luminex 液相芯片试剂盒说明书操作。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件(软件序列号:5487304923,美国 SPSS 公司)进行统计分析。本研究各测量指标的数据资料经 Kolmogorov-Smirnov 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用均衡独立分组多水平研究设计,正常对照组、VKC 组、SAC 组和 PAC 组结膜上皮细胞中 IL-4、IL-5、IL-13 mRNA 的相对表达量和泪液中蛋白质量浓度值的总体差异比较采用单因素方差分析;各组间均数经 Levene 检验证实方差不齐 ($P < 0.001$),用 Welch 法进行校正,组间均数的多重比较采用 Dunnett T3 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组结膜上皮细胞中 IL-4、IL-5、IL-13 的表达及定位

各类过敏性结膜炎组患者结膜上皮细胞中均可检测到 IL-4、IL-5、IL-13 的阳性表达,表现为细胞质中棕褐色颗粒,而正常对照组结膜上皮细胞未发现棕褐色颗粒(图 1)。各类过敏性结膜炎患者结膜上皮细胞质中 IL-4、IL-5、IL-13 的表达量较正常对照组增多。阴性对照片未见细胞出现棕褐色颗粒。

2.2 各组结膜上皮细胞中 IL-4、IL-5、IL-13 mRNA 的表达

正常对照组、VKC 组、SAC 组和 PAC 组受试者结膜上皮细胞中 IL-4、IL-5 和 IL-13 mRNA 表达量的总体比较,差异均有统计学意义 ($F = 51.32、220.18、162.49$,均 $P < 0.001$),其中与正常对照组相比, VKC 组、SAC 组和 PAC 组结膜上皮细胞中 IL-4、IL-5 和 IL-13 mRNA 的相对表达量均明显增加,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);VKC 组结膜上皮细胞中 IL-4、IL-5 和 IL-13 mRNA 的相对表达量明显高于 SAC 组和 PAC 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);SAC 组结膜上皮细胞中 IL-4、IL-5、IL-13 mRNA 的相对表达量明显高于 PAC 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$) (表 1)。

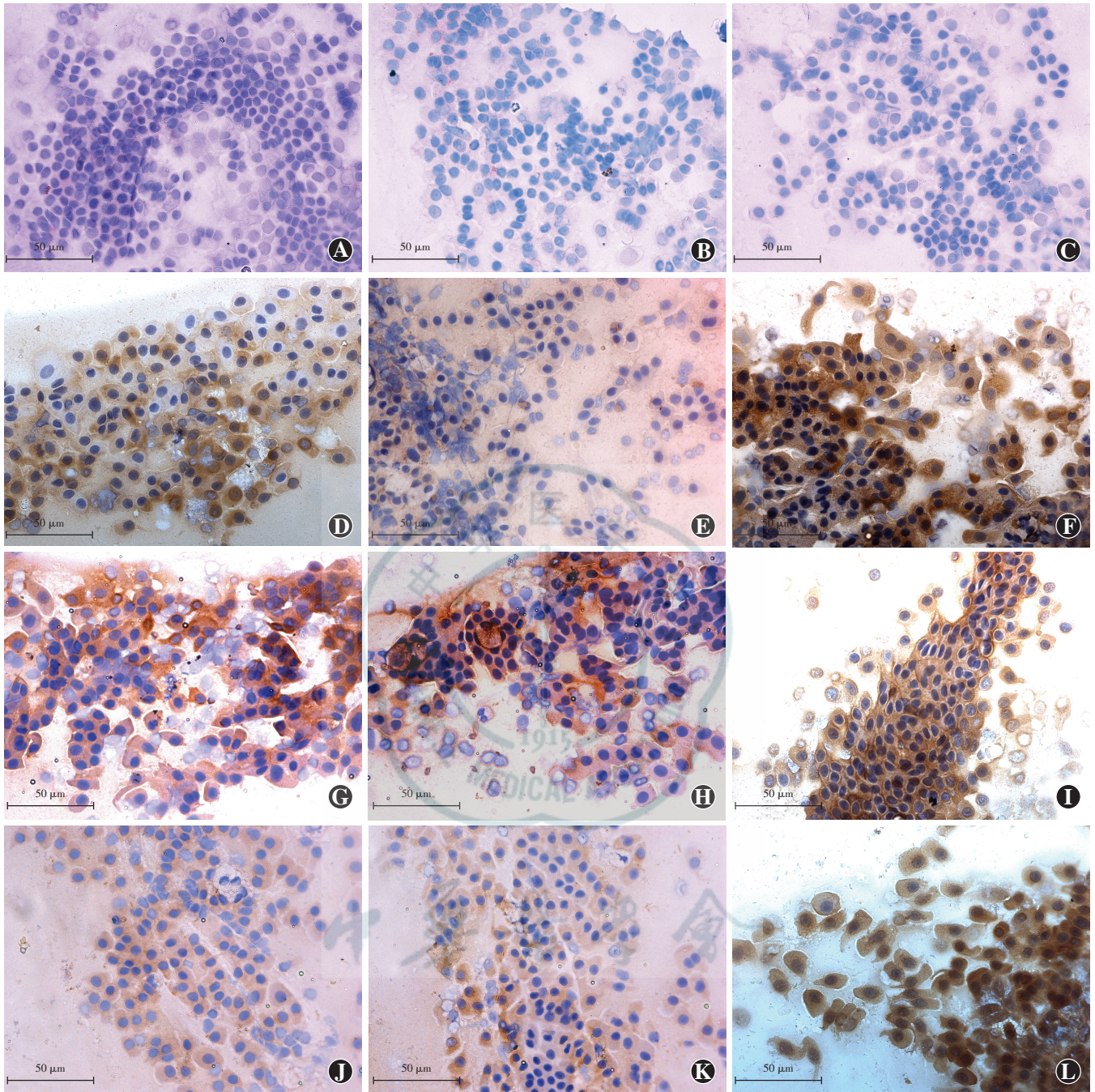


图 1 各类过敏性结膜炎患者结膜上皮细胞的免疫组织化学染色 (DAB ×400, 标尺 = 50 μm) A: 正常对照组结膜上皮细胞中未见 IL-4 蛋白表达 B: 正常对照组结膜上皮细胞中未见 IL-5 蛋白表达 C: 正常对照组结膜上皮细胞中未见 IL-13 蛋白表达 D: VKC 组结膜上皮细胞的细胞质中 IL-4 蛋白呈阳性表达 E: VKC 组结膜上皮细胞中 IL-5 蛋白呈阳性表达 F: VKC 组结膜上皮细胞中 IL-13 蛋白呈阳性表达 G: SAC 组患者结膜上皮细胞的细胞质中 IL-4 蛋白呈阳性表达 H: SAC 组患者结膜上皮细胞的细胞质中 IL-5 蛋白呈阳性表达 I: SAC 组患者结膜上皮细胞的细胞质中 IL-13 蛋白呈阳性表达 J: PAC 组患者结膜上皮细胞的细胞质中 IL-4 蛋白呈阳性表达 K: PAC 组患者结膜上皮细胞的细胞质中 IL-5 蛋白呈阳性表达 L: PAC 组患者结膜上皮细胞的细胞质中 IL-13 蛋白呈阳性表达

2.3 各组受试者泪液中 IL-4、IL-5、IL-13 质量浓度比较

正常对照组受试者泪液标本中未检测到 IL-4、IL-5 和 IL-13。VKC 组、SAC 组和 PAC 组患者泪液标本中均可检出 IL-4、IL-5 和 IL-13, VKC 组、SAC 组和 PAC 组泪液中 IL-4、IL-5、IL-13 质量浓度的总体比较差异

均有统计学意义 ($F = 200.29, 260.49, 128.23$, 均 $P < 0.01$), 其中 VKC 组患者泪液中 IL-4、IL-5 和 IL-13 质量浓度明显高于 SAC 组和 PAC 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$), SAC 组患者泪液中 IL-4、IL-5 和 IL-13 的质量浓度明显高于 PAC 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$) (表 2)。

表 1 各组受试者结膜组织中 IL-4、IL-5 和 IL-13 mRNA 相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s, 2^{-\Delta\Delta Ct}$)

组别	例数	IL-4 mRNA	IL-5 mRNA	IL-13 mRNA
正常对照组	20	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
VKC 组	20	4.11±1.24 ^a	4.02±0.43 ^a	6.44±0.66 ^a
SAC 组	20	2.71±0.71 ^{ab}	2.07±0.45 ^{ab}	4.35±1.26 ^{ab}
PAC 组	20	2.00±0.80 ^{abc}	1.47±0.50 ^{abc}	2.39±0.86 ^{abc}
F		51.32	220.18	162.49
P		<0.01	<0.01	<0.01

注:与各自的正常对照组比较,^a $P<0.05$;与各自的 VKC 组比较,^b $P<0.05$;与各自的 SAC 组比较,^c $P<0.05$ (单因素方差分析,Dunnett T3 检验) IL:白细胞介素;VKC:春季角结膜炎;SAC:季节性过敏性结膜炎;PAC:常年性过敏性结膜炎

表 2 各组受试者泪液中 IL-4、IL-5、IL-13 质量浓度的比较 ($\bar{x} \pm s, \text{pg/ml}$)

组别	例数	IL-4	IL-5	IL-13
正常对照组	20	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
VKC 组	20	14.06±3.50	10.88±1.82	34.28±8.42
SAC 组	20	7.71±0.65 ^a	5.10±1.33 ^a	23.77±6.29 ^a
PAC 组	20	3.30±1.50 ^{ab}	2.43±1.28 ^{ab}	17.67±4.28 ^{ab}
F		200.29	260.49	128.23
P		<0.01	<0.01	<0.01

注:与各自的 VKC 组比较,^a $P<0.01$;与各自的 SAC 组比较,^b $P<0.01$ (单因素方差分析,Dunnett T3 检验) IL:白细胞介素;VKC:春季角结膜炎;SAC:季节性过敏性结膜炎;PAC:常年性过敏性结膜炎

3 讨论

过敏性结膜炎是门诊较常见的眼表疾病之一。据报道,在中国中部地区过敏性结膜炎所占的比例最高,为 45.1%,在北部、南部、西南和中北部地区的比例分别为 8.0%、18.1%、1.1% 和 18.1%^[5]。中国过敏性结膜炎前三位分别是 SAC、PAC 和 VKC,SAC 和 PAC 为主要类型,占 74.4%;VKC 在儿童的比例为 22.3%,明显高于成人的 8.3%。特应性角膜结膜炎和巨乳头性结膜炎的比例不到 10%。本研究选取了常见的 3 种类型过敏性结膜炎进行研究。

过敏性结膜炎发病原因十分复杂,是多细胞、多因子共同参与的结果。有关研究表明,过敏性结膜炎是 IgE 介导的 I 型变态反应和 CD4⁺聚集 Th2 介导的细胞免疫反应共同作用的结果^[10]。过敏原通过眼表屏障后,最初引起 B 细胞和巨噬细胞对其的吞噬。细胞内的过敏原碎片被传递到过敏原特异性 Th2 细胞表面,并诱导其分泌 IL-4、IL-5、IL-13 等细胞因子。Th2 细胞因子亚群可协助产生 IgE 抗体并能诱导 B 细胞、肥大细胞及嗜酸性粒细胞等增多^[11]。嗜碱性粒细胞及肥大细胞与 IgE 抗体相连后被激活,并分泌各种炎性介质,如组胺、嗜酸性粒细胞趋化因子、花生四烯酸代谢

产物等,从而引起各种临床过敏症状^[12]。近年研究结果表明,IL-4 是 IgE 合成过程中最重要的调节因子,能促进 T 细胞、B 细胞的增生和分化,在调节受抗原刺激的 T 细胞分化过程中起核心作用,使分化后的 T 细胞产生 IL-4、IL-5、IL-10 和 IL-13 等细胞因子,刺激内皮细胞表达血管内皮细胞黏附分子 1 等,增加淋巴细胞、单核细胞及嗜酸性粒细胞与 IL-4 结合的能力^[13]。IL-5 可协同 IL-4 刺激 B 细胞合成 IgE,诱导嗜酸性粒细胞活化、增生、分化和移行;抑制嗜酸性粒细胞的凋亡,延长其存活时间^[14]。IL-13 主要由活化的 Th2 细胞分泌,参与 T 细胞和 B 细胞的发育,调节 Th2 细胞的功能,促进 IgE 的合成,诱导嗜酸性粒细胞游走,在过敏性疾病的发病中发挥重要作用^[15-16]。Wills-Karp^[17] 研究提示,IL-13 在过敏反应中的驱动作用可能大于 IL-4,其参与维持 Th2 型细胞因子的表达,是使 Th1/Th2 平衡倾向于 Th2 应答的主要诱导因子^[18]。

以往的研究临床样本较少,方法较单一,研究者多采用酶联免疫吸附试验(ELISA 法)或流式细胞技术检测患者泪液中细胞因子的质量浓度。本研究中同时采用免疫组织化学、real-time PCR、泪液 Luminex 液相芯片测定正常人群和 3 种类型过敏性结膜炎患者结膜上皮细胞及泪液中 IL-4、IL-5 和 IL-13 的表达。Luminex 液相芯片技术是一种基于有色微球理论的检测方法,是集流式技术、荧光微球、激光、数字信号处理技术及传统化学技术为一体的新型生物分子高通量检测技术^[19-20],具有高通量、高灵敏度、高特异性等优点。本研究中经 Luminex 液相芯片技术检测到在 3 种类型过敏性结膜炎患者泪液中 IL-4、IL-5、IL-13 蛋白质质量浓度均有不同程度的升高,而在正常对照组中均未检测到,并且在 VKC 患者泪液中 3 种因子表达均明显高于 SAC 患者和 PAC 患者,3 种因子在 SAC 患者泪液中的表达也高于 PAC 患者。本研究中,real-time PCR 检测采用的是 Taqman 探针法,特异性强,灵敏度高。通过 Taqman 探针法亦检测到了 3 种类型过敏性结膜炎患者结膜上皮细胞中 IL-4、IL-5、IL-13 mRNA 均有表达,而且较正常人群中均有显著升高,VKC 患者中 IL-4、IL-5、IL-13 mRNA 的相对表达量明显高于 SAC 患者和 PAC 患者,SAC 患者的表达量显著高于 PAC 患者。本研究表明,IL-4、IL-5 和 IL-13 作为过敏性结膜炎的重要炎性因子,不仅参与了 VKC、SAC、PAC 的发病,而且提示这些炎性因子的表达水平与病情严重程度呈正相关。在这 3 种结膜炎中,VKC 的症状和体征最为严重,多见于儿童,发病急,常反复发作,严重时可损害视力,VKC 患者中 IL-4、IL-5 和 IL-13

的表达均显著高于其他类型过敏性结膜炎; SAC 和 PAC 发病较 VKC 缓慢, 属于慢性过敏性结膜炎, 其症状及体征均较 VKC 轻, 常合并其他过敏性疾病, 如过敏性鼻炎、哮喘及过敏性皮炎等, 在这 2 种类型的患者中 IL-4、IL-5、IL-13 的表达均较正常人群增加, 但其表达水平均低于 VKC。SAC 与 PAC 的主要区别在于其过敏症状是否长年存在。由于 PAC 病程长, 久治不愈, 需长年应用药物, 并可能存在不规范用药, 使患者产生耐药性, 所测出的 IL-4、IL-5、IL-13 水平较 SAC 患者有所降低。

综上所述, 本研究中通过对 3 种类型过敏性结膜炎患者泪液及结膜上皮细胞的检测, 从蛋白和基因表达水平验证了 IL-4、IL-5 和 IL-13 在活体人结膜上皮细胞中的表达, 这些结果不仅反映了 Th2 炎性细胞及其细胞因子的表达水平与患者眼部临床症状相一致, 也印证了致敏原触发 Th2 型细胞产生炎性细胞因子并导致过敏性结膜炎这一机制。国外大多数研究是利用过敏性结膜炎动物模型、正常人眼角膜上皮细胞体外培养等手段进行的, 对 Th2 型细胞亚群的作用机制有了一定的认识, 但这些方法仅限于模拟人体发病的相似环境状态; 本研究直接以人眼活体结膜组织细胞为研究对象, 证实了 IL-4、IL-5、IL-13 在不同类型过敏性结膜炎患者中的表达变化。总之, IL-4、IL-5 和 IL-13 作为 Th2 细胞所分泌的重要炎性因子, 在 VKC、SAC 和 PAC 患者眼表表达上调, 但是其在不同类型过敏性结膜炎中所起的作用是否相同, 有待进行更深入的研究。深入了解 IL-4、IL-5 和 IL-13 在不同类型过敏性结膜炎发病中的具体作用机制, 为过敏性结膜炎的药物治疗提供了一种新的思路。

参考文献

- [1] Elenkov IJ. Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance[J]. Ann N Y Acad Sci, 2004, 1024: 138-146. doi: 10.1196/annals.1321.010.
- [2] Nguyen TH, Casale TB. Immune modulation for treatment of allergic disease[J]. Immunol Rev, 2011, 242(1): 258-271. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01034.x.
- [3] Yao X, Zha W, Song W, et al. Coordinated regulation of IL-4 and IL-13 expression in human T cells; 3C analysis for DNA looping[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 417(3): 996-1001. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.12.069.
- [4] Ziegler SF. The role of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in allergic disorders[J]. Curr Opin Immunol, 2010, 22(6): 795-799. doi: 10.1016/j.coi.2010.10.020.
- [5] 李莹, 张潇, 吕岚, 等. 过敏性结膜炎的流行病学及奥洛他定滴眼液开放性多中心治疗的初步效果[J]. 眼科, 2008, 17(3): 166-170.
- [6] Dinowitz M, Rescigno R, Bielory L. Ocular allergic diseases; differential diagnosis, examination techniques, and testing[J]. Clin Allergy Immunol, 2000, 15: 127-150.
- [7] 刘善宝. 免疫学概论[M]//李凤鸣. 眼科全书: 眼科学总卷. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 545-546.
- [8] Yoon KC, De Paiva CS, Qi H, et al. Expression of Th-1 chemokines and chemokine receptors on the ocular surface of C57BL/6 mice; effects of desiccating stress[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(6): 2561-2569. doi: 10.1167/iops.07-0002.
- [9] De Paiva CS, Corrales RM, Villarreal AL, et al. Corticosteroid and doxycycline suppress MMP-9 and inflammatory cytokine expression, MAPK activation in the corneal epithelium in experimental dry eye[J]. Exp Eye Res, 2006, 83(3): 526-535. doi: 10.1016/j.exer.2006.02.004.
- [10] Chigbu DI. The pathophysiology of ocular allergy: a review[J]. Cont Lens Anterior Eye, 2009, 32(1): 3-15. doi: 10.1016/j.clae.2008.07.003.
- [11] 韩睿, 林爱华, 朱可建, 等. 过敏性疾病患者血清 Th1/Th2 细胞因子和趋化因子测定及其意义[J]. 浙江大学学报: 医学版, 2009, 38(4): 352-356. doi: 10.3785/j.issn.1008-9292.2009.04.005.
- [12] Busse WW, Lemanske RF. Asthma[J]. N Engl J Med, 2001, 344(5): 350-362. doi: 10.1056/NEJM200102013440507.
- [13] Motomura Y, Morita H, Moro K, et al. Basophil-derived interleukin-4 controls the function of natural helper cells, a member of ILC2s, in lung inflammation[J]. Immunity, 2014, 40(5): 758-771. doi: 10.1016/j.immuni.2014.04.013.
- [14] Fulkerson PC, Schollaert KL, Bouffi C, et al. IL-5 triggers a cooperative cytokine network that promotes eosinophil precursor maturation[J]. J Immunol, 2014, 193(8): 4043-4052. doi: 10.4049/jimmunol.1400732.
- [15] Martins LE, Reis VM. IL-13: a marker of chromium contact allergy[J/OL]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2013, 27(3): e390-393 [2015-03-23]. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jdv.12005/full>. doi: 10.1111/jdv.12005.
- [16] Niranjan R, Rayapudi M, Mishra A, et al. Pathogenesis of allergen-induced eosinophilic esophagitis is independent of interleukin (IL)-13[J]. Immunol Cell Biol, 2013, 91(6): 408-415. doi: 10.1038/iecb.2013.21.
- [17] Wills-Karp M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis[J]. Immunol Rev, 2004, 202: 175-190. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.00215.x.
- [18] 魏捷, 蒋华. 器官培养法保存大鼠角膜移植术后 Th1/Th2 细胞因子和 T 细胞亚群表达的研究[J]. 中华实验眼科杂志, 2012, 30(2): 121-126. doi: 10.3760/cam.j.issn.2095-0160.2012.02.008.
- [19] Dunbar SA, Vander ZC, Oliver KG, et al. Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAP system[J]. J Microbiol Methods, 2003, 53(2): 245-252. doi: 10.1016/S0167-7012(03)00028-9.
- [20] Kuramitz H. Magnetic microbead-based electrochemical immunoassays[J]. Anal Bioanal Chem, 2009, 394(1): 61-69. doi: 10.1007/s00216-009-2650-y.

(收稿日期: 2015-07-17)

(本文编辑: 刘艳 张宇)

读者·作者·编者

欢迎订阅《中华实验眼科杂志》

《中华实验眼科杂志》为中国科技论文统计源期刊、中国中文核心期刊和 CSCD 核心期刊, 月刊, 96 面, 每月 10 日出版, 每期定价 16 元, 邮发代号: 36-13, 国内外公开发售, 欢迎到各地邮局或直接与本刊编辑部联系订阅。联系电话: 0371-65580157。

(本刊编辑部)