

· 临床研究 ·

# 干眼与 CC 趋化因子受体 5 和 CXCR3 趋化因子受体 3 及其配体介导的炎症反应的关系

张宏 孙勇 安晓 陈雪艺

**【摘要】** **背景** 干眼患者泪液分泌功能的持续异常导致眼表和泪腺处于长期炎性细胞浸润状态,炎症反应刺激淋巴细胞增生以产生对泪腺的免疫攻击,且炎症本身亦干扰腺体的正常分泌,其中趋化因子及其受体对淋巴细胞趋化、聚集到炎症部位起着关键的作用。 **目的** 分析干眼患者眼表细胞中 CC 趋化因子受体 5 (CCR5)、CXCR3 趋化因子受体 3 (CXCR3) 及其配体的表达变化,探讨以 CCR5、CXCR3 为特征的 Th1 细胞诱导的迟发性变态反应在干眼发生和发展中的机制。 **方法** 采用前瞻性研究方法。纳入 2012 年 6—12 月在新疆医科大学第一附属医院眼科确诊的干眼患者 30 例 60 眼及年龄和性别匹配的健康志愿者 30 人 60 眼,受试者均接受泪膜破裂试验 (BUT)、基础泪液分泌试验 I (S I t) 和角膜结膜荧光素染色检查。采用结膜印记细胞学的方法获取 2 个组受试者的结膜上皮细胞,应用流式细胞术分析 2 个组受试者结膜组织 CCR5、CXCR3 表达阳性细胞率;应用 real-time PCR 对受检者结膜中正常 T 细胞表达和分泌调节活性因子 (RANTES)、巨噬细胞炎性蛋白 (MIP)-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、 $\gamma$  干扰素诱导的单核因子 (MIG)、 $\gamma$  干扰素诱导蛋白 10 (IP10) 及干扰素诱导 T 细胞  $\alpha$  趋化因子 (I-TAC) mRNA 的相对表达量进行检测,比较干眼组和健康对照组受试者间 CCR5、CXCR3 及其配体表达的差异,分析 CCR5、CXCR3 阳性表达率与 BUT、S I t 及角膜结膜荧光素染色评分的关系。 **结果** 干眼组 BUT、S I t 值分别为 (2.90  $\pm$  1.37) s 和 (4.00  $\pm$  2.49) mm/5 min,明显低于健康对照组的 (8.56  $\pm$  4.69) s 和 (11.31  $\pm$  5.23) mm/5 min,差异均有统计学意义 ( $t=3.172, 2.186$ , 均  $P<0.05$ );干眼组角膜结膜荧光素染色评分及 CCR5 和 CXCR3 的阳性表达率分别为 0.90  $\pm$  0.57、(3.38  $\pm$  0.66)% 和 (2.64  $\pm$  0.47)%,均明显高于对照组的 0.14  $\pm$  0.06、(2.12  $\pm$  0.21)% 和 (1.12  $\pm$  0.11)%,差异均有统计学意义 ( $t=2.297, 3.151, 5.454$ , 均  $P<0.05$ )。干眼组 CCR5 阳性细胞率与 BUT、S I t 值均呈负相关 ( $r=-0.473, -0.385$ , 均  $P<0.05$ ),CXCR3 阳性细胞率与 BUT、S I t 值均呈负相关 ( $r=-0.753, -0.684$ , 均  $P<0.05$ );CCR5 与 CXCR3 阳性细胞率及角膜结膜荧光素染色评分均呈正相关 ( $r=0.231, 0.336$ , 均  $P<0.05$ )。干眼组 RANTES、MIP-1 $\alpha$ 、MIG 和 IP10 mRNA 的相对表达量明显高于健康对照组,差异均有统计学意义 ( $t=3.091, 2.894, 2.688, 2.245$ , 均  $P<0.05$ ),而 2 个组间 MIP-1 $\beta$  和 I-TAC mRNA 相对表达量的差异均无统计学意义 ( $t=0.512, 1.979$ , 均  $P>0.05$ )。CCR5 阳性细胞率与结膜中 RANTES 和 MIP-1 $\alpha$  mRNA 相对表达量均呈正相关 ( $r=0.473, 0.285$ , 均  $P<0.05$ ),而 CCR5 与 MIP-1 $\beta$  则无明显相关性 ( $r=0.214, P>0.05$ )。CXCR3 阳性细胞率与 MIG 和 IP10 mRNA 相对表达量均呈正相关 ( $r=0.553, 0.314$ , 均  $P<0.05$ );CXCR3 与 I-TAC mRNA 的相对表达量间无明显相关 ( $r=0.364, P>0.05$ )。 **结论** 干眼的发生可能伴随着炎性细胞的长期浸润,以 CCR5、CXCR3 为标志的 Th1 型细胞及自然杀伤细胞诱导的迟发性变态反应可能是导致干眼眼表损伤的主要原因,CCR5 和 CXCR3 及其配体可作为调节干眼组织免疫炎症反应的靶点。

**【关键词】** 干眼; 趋化因子; 受体; 结膜/代谢; 流式细胞术; 实时定量 PCR; 人

## Association between dry eye and inflammatory response mediated by CCR5 and CXCR3 and their ligands

Zhang Hong, Sun Yong, An Xiao, Chen Xueyi. Department of Ophthalmology, Affiliated First Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China

Corresponding author: Chen Xueyi, Email: ykcangel@126.com

**[Abstract]** **Background** Sustained abnormal tear secretion in dry eye patients may lead to ocular surface and lacrimal glands in the state of long-term inflammatory cell infiltration. Lacrimal gland suffers immune attack by lymphoproliferative, and inflammation interferes normal gland secretion, in which chemokines and their receptors on lymphocytes play a key role. **Objective** This study was to investigate the inflammation mechanism of delayed

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.07.013

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目(2011211A082)

作者单位:830054 乌鲁木齐,新疆医科大学第一附属医院眼科(张宏、安晓、陈雪艺);200240 上海交通大学生物医学工程学院(孙勇)

通信作者:陈雪艺, Email: ykcangel@126.com

allergy induced by Th1 cell in the development of dry eye. **Methods** Sixty eyes of 30 patients with dry eye and matched 30 healthy volunteers were enrolled in Affiliated First Hospital of Xinjiang Medical University from June to December in 2012. Schirmer I test (S I t), break up time (BUT) of tear and corneal fluorescence stain (FLS) were performed on the subjects, and conjunctiva epithelial cells were obtained using cytological method of conjunctiva imprinting. Positive cell rates of CC chemokine receptor 5 (CCR5) and CXC chemokine receptor 3 (CXCR3) were detected by flow cytology, and the relative expression levels of regulated upon activation of normal T cells expressed and secreted (RANTES), macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$ , monokine induced by interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (MIG), interferon- $\gamma$  inducible protein 10 (IP10) and interferon-inducible T-cell  $\alpha$  chemoattractant (I-TAC) mRNA were quantitatively assayed by real-time PCR. Differences of the positive rates of CCR5, CXCR3 and ligands were compared between dry eye group and normal control group. Relationship between the positive rates of CCR5, CXCR3 and BUT, S I t, FLS scores was analyzed. **Results** The values of BUT, S I t were (2.90 $\pm$ 1.37) seconds and (4.00 $\pm$ 2.49) mm/5 minutes in the dry eye group, which were significantly lower than (8.56 $\pm$ 4.69) seconds and (11.31 $\pm$ 5.23) mm/5 minutes in the normal control group ( $t=3.172, 2.186$ , both at  $P<0.05$ ). FLS scores, positive rates of CCR5 and CXCR3 were 0.90 $\pm$ 0.57, (3.38 $\pm$ 0.66) % and (2.64 $\pm$ 0.47) % in the dry eye group, showing significant elevations in comparison with 0.14 $\pm$ 0.06, (2.12 $\pm$ 0.21) % and (1.12 $\pm$ 0.11) % in the normal control group ( $t=2.297, 3.151, 5.454$ , all at  $P<0.05$ ). In the dry eye group, the masculine rate of CCR5 was negatively correlated with BUT and S I t ( $r=-0.473, -0.385$ , both at  $P<0.05$ ). The masculine rate of CXCR3 was negatively correlated with BUT and S I t ( $r=-0.753, -0.684$ , both at  $P<0.05$ ). No considerable correlations between the positive rate of CCR5 with the positive rate of CXCR3 or FLS scores ( $r=0.231, 0.336$ , both at  $P<0.05$ ). The relative expression levels of RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIG and IP10 mRNA in the dry eye group were significantly higher than those in the normal control group ( $t=3.091, 2.894, 2.688, 2.245$ , all at  $P<0.05$ ), but there were no significant differences in the relative expression levels of MIP-1 $\beta$  and I-TAC mRNA between the two groups ( $t=0.512, 1.979$ , both at  $P>0.05$ ). The positive correlations were seen between the masculine rate of CCR5 with the relative expression of RANTES or MIP-1 $\alpha$  mRNA ( $r=0.473, 0.285$ , both at  $P<0.05$ ), but there was no obvious correlation between the masculine rate of CCR5 and the MIP-1 $\beta$  mRNA expression ( $r=0.214, P>0.05$ ). In addition, the masculine rate of CXCR3 was positive correlated with the expressions of MIG and IP10 mRNA ( $r=0.553, 0.314$ , both at  $P<0.05$ ), whereas the masculine rate of CXCR3 was not related to the expression of I-TAC mRNA ( $r=0.364, P>0.05$ ). **Conclusions** Dry eye is probably along with the long-term infiltration of inflammatory cells. The delayed allergy induced by Th1 cells and the nature killed cells is probably the primary cause to xerophthalmia. CCR5, CXCR3 and their ligands might be the regulative targets in the inflammation mechanism of dry eye.

**[Key words]** Dry eye; Chemokines; Receptors, chemokines; Conjunctiva/metabolism; Flow cytometry; Real-time PCR; Humans

干眼是多因素疾病,可由性激素失衡、物理损伤、手术等因素引起<sup>[1-3]</sup>。泪膜的持续异常对眼表造成机械性损伤,改变细胞的修复或防御机制,导致眼表和泪腺的炎性细胞浸润,这种持续性炎症状态是干眼发生的关键因素。炎症刺激淋巴细胞的增生,对泪腺产生免疫攻击,同时炎症自身也干扰泪腺的正常分泌,其中趋化因子及其受体对淋巴细胞趋化、聚集到炎症部位起关键作用<sup>[4-5]</sup>。研究表明 Th1 细胞在趋化因子作用下表现出 CC 趋化因子受体 5 (CC chemokine receptor 5, CCR5) 和 CXC 趋化因子受体 3 (CXC chemokine receptor 3, CXCR3) 的特征,因此这 2 个受体可作为活化的 Th1 细胞的表面标志物<sup>[6-7]</sup>。CCR5 是巨噬细胞炎性蛋白 (macrophage inflammatory protein, MIP)-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、正常 T 细胞表达和分泌调节活性因子 (regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted, RANTES) 的受体,以剂量依赖的方式诱导 Th1 细胞迁移<sup>[8]</sup>。CXCR3 在活化的 Th1 细胞和自然杀伤细胞上高表达,通过与其配体  $\gamma$  干扰素诱导蛋白

(interferon  $\gamma$ -inducible protein-10, IP10) 及干扰素诱导 T 细胞  $\alpha$  趋化因子 (interferon-inducible T-cell  $\alpha$  chemoattractant, I-TAC) 结合,触发免疫调节信号通路<sup>[9]</sup>。目前关于干眼眼表炎症的免疫机制仍是研究热点。本研究中观察干眼患者 CCR5、CXCR3 及其配体的表达与干眼相关检查结果的相关性,探讨新疆维吾尔自治区干眼发病与炎性细胞浸润的关系。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

**1.1.1 研究对象** 采用前瞻性研究方法,纳入 2012 年 6—12 月在新疆医科大学第一附属医院确诊的干眼患者 30 例 60 眼,另纳入同期健康志愿者 30 人 60 眼作为健康对照组。干眼患者的纳入标准:(1)有典型的干眼症状。(2)符合下列检查中 2 项以上者:泪液分泌试验 I (Schirmer I test, S I t) $<10$  mm/5 min;泪膜破裂时间 (break up time, BUT) $<10$  s;角膜结膜荧光素染色异常者。本研究获得新疆医科大学第一附属医院

伦理委员会审核批准(审批号:20121115-01),受检者均签署知情同意书。干眼组中男 6 例,女 24 例,年龄 42~53 岁,平均(47±11)岁;健康对照组中男 6 人,女 24 人,年龄 34~58 岁,平均(42±15)岁,2 个组间年龄及性别构成比差异均无统计学意义(均 $P>0.05$ )。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 鼠抗人 CCR5 抗体(561745)、鼠抗人 CXCR3 抗体(560928)(美国 BD 公司);1640 培养液、Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司);M-MuLV 逆转录试剂盒(美国 MBI 公司)。泪液检测滤纸条(天津晶明新技术开发有限公司);FACS Calibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司);ABI 7500 型实时定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 临床检查** 受试者均行 BUT、角膜结膜荧光素染色及 S I t 检查。将浸有荧光素的纸片钠放入下结膜囊内,闭合眼睑使荧光素均匀分布于角膜表面,然后暴露角膜,裂隙灯显微镜下用钴蓝光观察,在末次瞬目开始计时,记录泪膜上出现第 1 个破裂点的间隔时间,测量 3 次,取其平均值。将角膜分为 4 个象限进行角膜结膜荧光素染色评分,每个象限为 0~3 分。无染色者为 0 分;1~30 个着色点为 1 分;30 个点状着色但染色未融合者为 2 分;角膜点状着色融合、丝状分泌物及溃疡者为 3 分。用镊子将泪液检测滤纸条折叠成直角,一端夹在下眼睑内侧 1/3 处的结膜囊内,另一端则悬挂于下眼睑外部,自然瞬目。5 min 后取滤纸条,记录滤纸条的浸润长度,浸润长度在 10~25 mm 者为正常,<10 mm 或>25 mm 者均为异常。若为老年人<10 mm,且无其他眼部症状者仍视为正常。

**1.2.2 结膜上皮细胞采集** 将 4 mm×4 mm 的乙酸纤维素薄膜纸条消毒并干燥,用眼科无齿镊夹住其一角置于颞侧球结膜表面,玻璃棒轻压 3~5 min 后取出,浸入 1 ml 1640 培养液,重复上述步骤以保证黏附足够的细胞。6 h 后离心管中乙酸纤维素膜经 PBS 冲洗、振荡,然后取出行细胞计数,将细胞密度调整为  $1 \times 10^5$ /ml,即刻行流式细胞术检测。

**1.2.3 流式细胞仪检测趋化因子受体阳性细胞比例** 取 500  $\mu$ l 细胞悬浮液分别加入 40  $\mu$ l 稀释后的用 FITC 标记的鼠抗人 CCR5 抗体和 40  $\mu$ l PE 标记的鼠抗人 CXCR3 抗体,避光存放 20 min,离心半径 10 cm,1 200 r/min 离心 8 min, PBS 清洗,分别在流式细胞仪检测和分析,读取细胞数  $1 \times 10^4$  个,用鼠抗人 IgG<sub>1</sub> 作为对照抗体。

**1.2.4 Real-time PCR 法测定结膜组织中 RANTES、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、膜免疫球蛋白、IP10 及 I-TAC mRNA**

的相对表达 乙酸纤维素膜经无菌 PBS 反复冲洗,12 000 r/min 离心 5 min,可见团块状白色结膜上皮细胞沉淀,小心吸除上清,加入 1 ml Trizol 试剂提取 RNA,采用 M-MuLV 逆转录试剂盒合成 cDNA,引物序列见表 1。Real-time PCR 反应总体积为 20.0  $\mu$ l,含 cDNA 1.0  $\mu$ l,10  $\mu$ mol/L 引物 0.8  $\mu$ l,SYBR Select Master Mix 10.0  $\mu$ l,双蒸水 8.2  $\mu$ l,在 ABI 7500 型实时定量 PCR 上检测。反应程序为糖基化酶 50  $^{\circ}$ C 活化 2 min,AmpliTag UP 活化,95  $^{\circ}$ C 预变性 2 min,95  $^{\circ}$ C 变性 15 s,60  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,循环 40 次。以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  公式进行计算,GAPDH 为内参。健康对照组数据行归一化处理。

表 1 Real-time PCR 引物序列

基因	Genebank 登录号	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
GAPDH	NM_002046.4	F:GACAGTCAGCCGATCTTCT R:GCGCCAATACGACCAAAATC	104
MIP-1 $\alpha$ /CCR3	NM_002983.2	F:CTGACACTCGAGCCACATT R:AGAAGTGGTTGCAGAGAGCC	103
MIP-1 $\beta$ /CCR4	NM_002984.2	F:GCTTCCTCGCAACTTTGTG R:GCGGAGAGGAGTCTCTGAGTA	249
RANTES/CCR5	NM_002985.2	F:CAGTCGTCTTTGTCAACCGA R:CGGGTGGGTAGGATAGTGA	194
MIG/CXCR9	NM_002416.1	F:GATTGGTGGCCAGTTAGCCT R:CCACCGGACAGCACTCTAAA	165
IP-10/CXCR10	NM_001565.3	F:CCTGCAAGCAATTTTGTTCCA R:TGTGGTCCATCCTTGAAGC	192
I-TAC/CXCR11	NM_005409.4	F:GCATAGCCCTGGGCTAAAA R:AGCCTTGCTTCTCGATT	157

注:GAPDH:三磷酸甘油醛脱氢酶;MIP:巨噬细胞炎性蛋白;CCR:CC 趋化因子受体;RANTES:受激活调节正常 T 细胞表达和分泌因子;MIG: $\gamma$  干扰素诱导的单核因子;IP10: $\gamma$  干扰素诱导蛋白 10;I-TAC:干扰素诱导 T 细胞  $\alpha$  趋化因子;CXCR:CXC 趋化因子受体

## 1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism5.0 统计学软件进行统计分析。本研究中各检测指标的数据资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用均衡分组两水平试验设计,2 个组组间 BUT、S I t 结果和角膜结膜荧光素染色评分以及 RANTES、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、MIG、IP10 及 I-TAC mRNA 相对表达量的差异比较均采用独立样本  $t$  检验。CCR5 阳性率和 CXCR3 阳性率与各项干眼相关检查结果或各细胞因子相对表达量间的关系分析采用 Pearson 直线相关分析。采用双尾检验法,检验水平  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 各组受试者干眼相关检查结果的比较

干眼组患者 BUT、S I t 值分别为  $(2.90 \pm 1.37)$  s 和  $(4.00 \pm 2.49)$  mm/5 min,明显低于健康对照组的

(8.56 ± 4.69) s 和 (11.31 ± 5.23) mm/5 min, 差异均有统计学意义 ( $t = 3.172, P = 0.005; t = 2.186, P = 0.047$ ); 角膜结膜荧光素染色评分、CCR5 阳性率和 CXCR3 阳性率分别为  $0.90 \pm 0.57$ 、 $(3.38 \pm 0.66)\%$  和  $(2.64 \pm 0.47)\%$ , 均显著高于阳性对照组的  $0.14 \pm 0.06$ 、 $(2.12 \pm 0.21)\%$  和  $(1.12 \pm 0.11)\%$ , 差异均有统计学意义 ( $t = 2.297, P = 0.042; t = 3.151, P = 0.017; t = 5.454, P = 0.003$ ) (图 1)。

### 2.2 CCR5、CXCR3 阳性表达率与 BUT、S I t、角膜结膜荧光素染色的相关性

干眼组和健康对照组受检者结膜组织中 CCR5 mRNA 的阳性表达率分别为  $(3.38 \pm 0.66)\%$  和  $(2.12 \pm 0.21)\%$ , CXCR3 的阳性表达率分别为  $(2.64 \pm 0.47)\%$  和  $(1.12 \pm 0.11)\%$ 。干眼组 CCR5 阳性细胞率与 BUT、S I t 值均呈负相关 ( $r = -0.473, P < 0.05; r = -0.385, P < 0.05$ ), CXCR3 阳性细胞率与 BUT、S I t 均呈显著负相关 ( $r = -0.753, P < 0.05; r = -0.684, P < 0.05$ ); CCR5 与 CXCR3 阳性细胞率和角膜结膜荧光素染色评分均呈正相关 ( $r = 0.336, P < 0.05; r = 0.231, P < 0.05$ ) (图 2)。

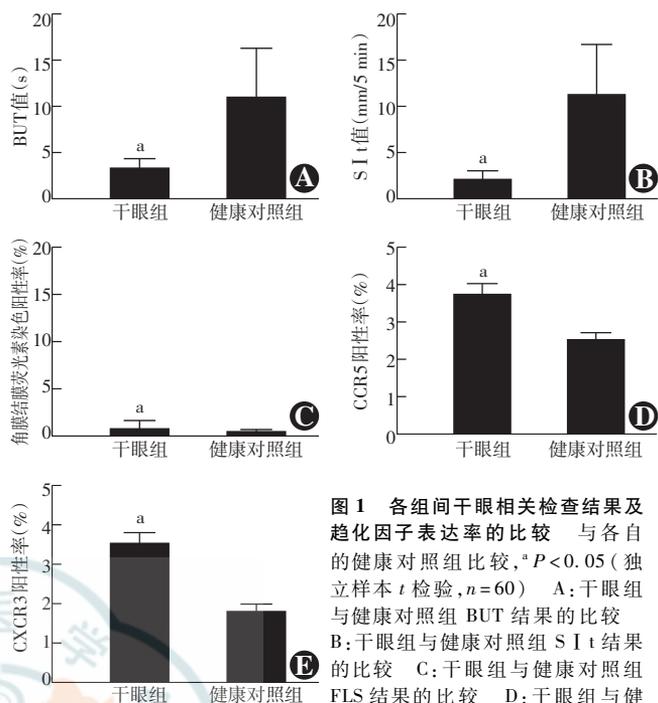


图 1 各组间干眼相关检查结果及趋化因子表达率的比较 与各自的健康对照组比较, \* $P < 0.05$  (独立样本  $t$  检验,  $n = 60$ ) A: 干眼组与健康对照组 BUT 结果的比较 B: 干眼组与健康对照组 S I t 结果的比较 C: 干眼组与健康对照组 FLS 结果的比较 D: 干眼组与健康对照组间 CCR5 阳性表达率的比较 E: 干眼组与健康对照组间 CXCR3 阳性表达率的比较 BUT: 泪膜破裂时间; S I t: 泪液分泌试验 I; CCR: CC 趋化因子受体; CXCR: CXC 趋化因子受体

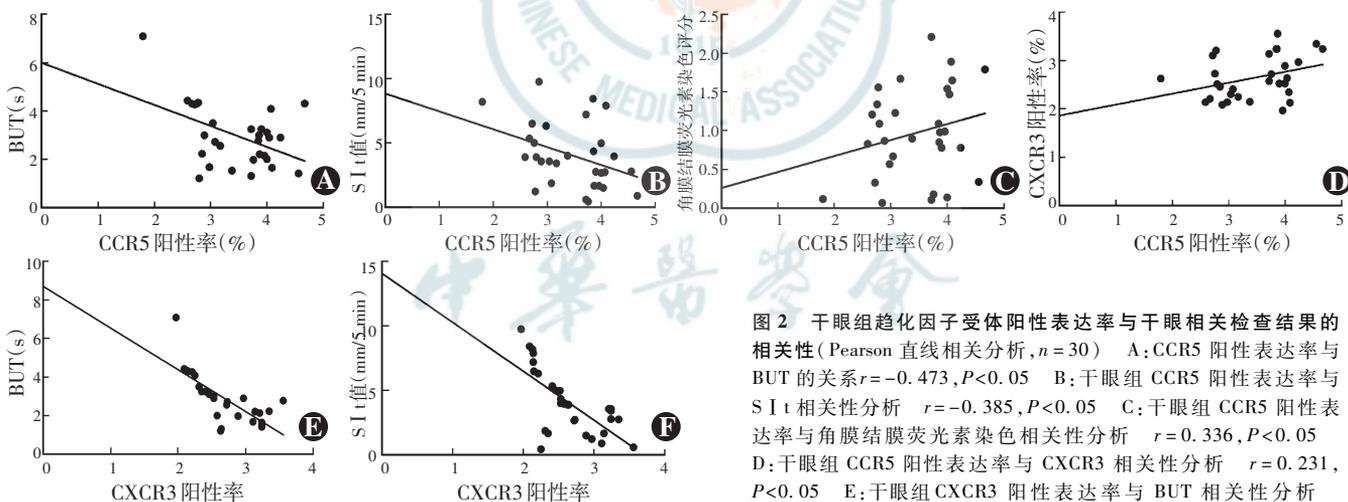


图 2 干眼组趋化因子受体阳性表达率与干眼相关检查结果的相关性 (Pearson 直线相关分析,  $n = 30$ ) A: CCR5 阳性表达率与 BUT 的关系  $r = -0.473, P < 0.05$  B: 干眼组 CCR5 阳性表达率与 S I t 相关性分析  $r = -0.385, P < 0.05$  C: 干眼组 CCR5 阳性表达率与角膜结膜荧光素染色相关性分析  $r = 0.336, P < 0.05$  D: 干眼组 CCR5 阳性表达率与 CXCR3 相关性分析  $r = 0.231, P < 0.05$  E: 干眼组 CXCR3 阳性表达率与 BUT 相关性分析  $r = -0.753, P < 0.05$  F: 干眼组 CXCR3 阳性表达率与 S I t 相关性分析  $r = -0.684, P < 0.05$  CXCR: CXC 趋化因子受体; S I t: 泪液分泌试验 I; CCR: CC 趋化因子受体; BUT: 泪膜破裂时间

### 2.3 2 个组受检者趋化因子基因相对表达量的差异及其与 CCR5、CXCR3 表达阳性率的关系

健康对照组受检者各因子检测结果均设为 1, 干眼组 RANTES、MIP-1 $\alpha$ 、MIG 及 IP10 mRNA 相对表达量分别为健康对照组的 4.573、7.931、2.610 和 6.860 倍, 差异均有统计学意义 ( $t = 3.091, 2.894, 2.688, 2.245$ , 均  $P < 0.05$ ), 而 2 个组间 MIP-1 $\beta$ 、I-TAC mRNA 的相对表达量为 1.360 倍和 0.685 倍, 组间相对表达量差异均无统计学意义 ( $t = 0.512, 1.979$ , 均  $P > 0.05$ )

(图 3)。CCR5 阳性细胞率与 RANTES、MIP-1 $\alpha$  均呈正相关 ( $r = 0.473, P < 0.05; r = 0.285, P < 0.05$ ); CCR5 表达阳性率与 MIP-1 $\beta$  mRNA 表达无明显相关性 ( $r = 0.214, P > 0.05$ )。CXCR3 阳性细胞率与 MIG、IP10 mRNA 的相对表达量均呈正相关 ( $r = 0.553, P < 0.05; r = 0.314, P < 0.05$ ), 而与 I-TAC 无明显相关性 ( $r = 0.364, P > 0.05$ ) (表 3)。

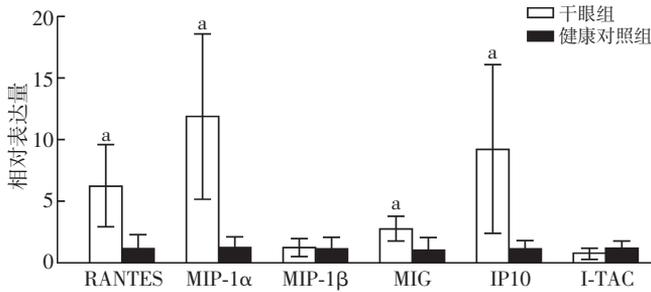


图 3 干眼组与健康对照组各细胞因子表达差异 与健康对照组比较, <sup>a</sup>*P*<0.05 RANTES:受激活调节正常 T 细胞表达和分泌因子; MIP:巨噬细胞炎性蛋白; MIG:IFN- $\gamma$  诱导的单核因子; IP10: $\gamma$  干扰素诱导蛋白 10; I-TAC:干扰素诱导 T 细胞  $\alpha$  趋化因子

表 3 CCR5、CXCR3 阳性率与各自趋化因子配体 mRNA 相对表达量的相关性 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值)

配体	CCR5 阳性率 (%)		配体	CXCR3 阳性率 (%)	
	<i>r</i>	<i>P</i>		<i>r</i>	<i>P</i>
RANTES	0.473	<0.05	MIG	0.553	<0.05
MIP-1 $\alpha$	0.285	<0.05	IP10	0.314	<0.05
MIP-1 $\beta$	0.214	>0.05	I-TAC	0.364	>0.05

注:CCR:CC 趋化因子受体;CXCR:CXC 趋化因子受体;RANTES:受激活调节正常 T 细胞表达和分泌因子;MIP:巨噬细胞炎性蛋白;MIG: $\gamma$  干扰素诱导的单核因子;IP10: $\gamma$  干扰素诱导蛋白 10;I-TAC:干扰素诱导 T 细胞  $\alpha$  趋化因子

### 3 讨论

眼表组织的 T 淋巴细胞浸润是导致干眼的重要因素,目前尚不清楚干眼是长期慢性过程还是短暂的自身免疫应激反应。研究表明,趋化因子超家族及其受体在炎症发生和炎性细胞浸润过程中起重要作用。Oshida 等<sup>[10]</sup>,发现干眼患者泪液中肿瘤坏死因子- $\alpha$  和白细胞介素-6 质量浓度增高,且与角膜上皮受损的程度平行,这 2 种细胞因子均由 Th1 细胞分泌和表达。朱俊雕等<sup>[11]</sup>发现 CCR5 在新疆维吾尔族干眼患者中起到炎性介质的作用,其表达水平的变化反映了干眼的进展。田明霞等<sup>[12]</sup>在动物模型中证明角膜上皮细胞的凋亡伴随着大量炎性细胞因子的分泌及炎性细胞的浸润。Abha 等<sup>[13]</sup>研究发现,CCR5 表达的上调与干眼症状明显相关,且 CCR5 通过抗原递呈细胞结合到其同源受体,诱导极化的细胞因子,如白细胞介素-12 等,促进 T 细胞分化为 Th1 细胞。

Th1 细胞的浸润、募集及活化伴随着 CCR5、CXCR3 及其配体的表达上调,既往研究证明,该类趋化因子受体及其配体是自身免疫的标志物。趋化因子受体属于跨膜的 G 蛋白偶联受体,其胞外结构与配体结合可导致胞内 G 蛋白结构同时改变,导致磷酸化的 G $\alpha$ 、G $\beta$  表达,从而激活细胞内丝裂原活化蛋白激酶通路,但该通路的激活与干眼患者眼表自身免疫应答相

互作用的机制鲜见研究。

本研究中发现干眼组 CCR5 和 CXCR3 的阳性细胞率均高于健康对照组,与 BUT、SIt 均呈正相关,而与角膜结膜荧光素染色评分呈负相关,CCR5 和 CXCR3 的升高可能是由于 Th1 细胞的长期浸润诱导迟发性变态反应所致;此外,细胞中 CCR5 与 RANTES、MIP-1 $\alpha$  mRNA 的表达水平均呈正相关,CXCR3 与 MIG、IP10 mRNA 的表达水平均呈正相关,说明趋化因子受体与配体同时在局部表达能激活免疫反应。本研究中发现,CXCR3 与 I-TAC 间无相关性,可能是由于 CXCR3 仅由炎症区 CD4<sup>+</sup> 或 CD8<sup>+</sup> 浸润的 T 细胞所表达,或本身参与此炎症反应的 T 细胞数目较少所致<sup>[14]</sup>。

综上所述,趋化因子及其受体的高表达激活 T 淋巴细胞的炎性机制是干眼的直接诱因,已标记 CCR5、CXCR3 的 Th1 细胞和自然杀伤细胞的浸润在干眼眼表损伤中发挥重要作用,可作为干眼临床诊断及预测的指标。

### 参考文献

- [1] Azcarate PM, Venincasa VD, Galor A, et al. Androgendeficiency and dry eye syndrome in the aging male[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 7(3):5046-5053. doi:10.1167/iovs.14-14689.
- [2] Holroyd S, Shepherd ML. Alzheimer's disease: a review for the ophthalmologist[J]. Surv Ophthalmol, 2001, 45(6):516-524.
- [3] 池滢,王荫华,杨柳.阿尔茨海默病视网膜视神经纤维丢失的临床观察[J].中华眼科杂志,2010,46(2):134-139. doi:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2010.02.009.
- [4] Pflugfelder SC. Anti-inflammatory therapy for dry eye[J]. Am J Ophthalmol, 2004, 7(2):337-342.
- [5] Bucolo C, Musumeci M, Musumeci S, et al. Acidic mammalian chitinase and the eye; implications for ocular inflammatory diseases [J/OL]. Front Pharmacol, 2011, 25(2):43 [2015-03-23]. http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2011.00043. doi:10.3389/fphar.2011.00043.
- [6] Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic [J]. Nature, 1998, 392(6676):565-568. doi:10.1038/ni.f.214.
- [7] 皱文军,武志峰,项晓丽,等.人类白细胞抗原-B27 阳性急性前葡萄膜炎患者外周血中 Th 细胞亚群的表达及意义[J].中华实验眼科杂志,2012,30(12):1118-1121. doi:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.12.017.
- [8] 张蕾,张虹,宋国祥.泪腺腺样囊性癌中基质金属蛋白酶-2,9 的表达及其意义[J].中华眼科杂志,2013,49(1):58-63. doi:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2013.01.015.
- [9] 褚利群,董宁,肖林,等.房水和血清中单核细胞趋化蛋白-1 和巨噬细胞游走抑制因子变化与 2 型糖尿病视网膜病变的关系[J].中华实验眼科杂志,2012,30(12):1122-1126. doi:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.12.018.
- [10] Oshida T, Iwata M, Sakimoto T, et al. Tumornecrosis factor-alpha in tears of patients with Sjögren syndrome [J]. Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 2004, 108(5):297-301.
- [11] 朱俊雕,陈雪燕,陈雪艺.新疆维吾尔族干眼症与趋化因子受体-5 的相关性研究[J].国际眼科杂志,2012,12(1):43-45. doi:10.3969/j.issn.1672-5123.2012.01.13.
- [12] 田明霞,王传富.暴露性干眼大鼠模型角膜上皮细胞凋亡相关基因的表达[J].眼科新进展,2006,6(10):747-750. doi:10.3969/j.issn.1003-5141.2006.10.008.
- [13] Abha G, Marta S, Stefano B, et al. Chemokine receptor CCR5 expression in conjunctival epithelium of patients with eye syndrome [J]. Lab Sci, 2006, 124(5):710-716. doi:10.1001/archoph.124.5.710.
- [14] 吴剑,肖汀,王志华,等.银屑病皮损中 CXCL11/I-TAC 及其受体 CXCR3 的表达[J].中国免疫学杂志,2009,25(5):462-467.

(收稿日期:2015-05-24)

(本文编辑:尹卫靖)