

· 临床研究 ·

自身免疫性视网膜病变患者血清细胞因子表达变化及其与临床特征的相关性分析

刘谦 曾惠阳 张敬学 曹凯 张子俊 侯思梦

首都医科大学附属北京同仁医院 北京同仁眼科中心 北京市眼科研究所 眼科学与视觉科学北京市重点实验室, 北京 100005

通信作者: 曾惠阳, Email: zhydr@hotmail.com

【摘要】 目的 分析自身免疫性视网膜病变(AIR)患者血清细胞因子的表达变化及其与疾病诊断和临床特征的关联。**方法** 采用前瞻性病例对照研究,连续收集 2018 年 9 月至 2023 年 12 月在北京同仁医院眼科确诊的 AIR 患者 45 例 90 眼;选取同时时间段内年龄匹配的对照组 43 例 86 眼,包括疾病对照组原发性视网膜色素变性患者 21 例 42 眼和健康对照组 22 例 44 眼。记录 AIR 患者主要临床指标,包括最佳矫正视力(BCVA)、视野平均偏差(MD)、中央视网膜厚度、全视野视网膜电图(ff-ERG)最大混合反应振幅及潜伏期时长等参数。采用 Luminex 多因子检测或酶联免疫吸附实验检测受试者血清中 21 种细胞因子的表达水平,并比较各组间血清细胞因子质量浓度的差异;分析细胞因子与各临床指标及细胞因子与 AIR 诊断的关联。**结果** 在 AIR 患者中,Th1 型细胞因子或受体[包括 γ 干扰素(IFN- γ)、白细胞介素(IL)-8、C-X-C 基序趋化因子配体(CXCL)9 和 CXCL10]及 Th17 型细胞因子(包括 IL-17 及 IL-6)表达升高。AIR 组、疾病对照组和健康对照组促炎细胞因子/趋化因子 IL-6、IL-8、CXCL10、IL-10、IFN- γ 、IL-17、C-X3-C 基序趋化因子配体 1(CX3CL1)、CXCL9 质量浓度总体比较差异均有统计学意义($H=10.823、10.816、9.633、10.103、23.670、16.493、9.050、9.253$,均 $P<0.05$),其中与疾病对照组和健康对照组相比,AIR 组患者 IFN- γ 水平明显升高,差异均有统计学意义(均 $P=0.001$);与健康对照组相比,AIR 组患者血清 IL-6、IL-8、CXCL10、IL-10、IL-17、CXCL9 水平明显升高,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);AIR 组患者血清 CX3CL1 水平较疾病对照组明显升高,差异有统计学意义($P=0.039$)。AIR 患者血清中 IFN- γ 表达水平明显高于健康对照组和疾病对照组,但其未显示出与 AIR 诊断的关联性($OR=1.402,95\%CI:0.710\sim2.870,P=0.245$)。多层混合效应回归模型分析结果显示,AIR 患者血清 IL-8 和 CXCL9 表达水平与 LogMAR BCVA 均呈正相关($\beta=0.028,P=0.033;\beta=0.023,P=0.003$);C-C 基序趋化因子配体 11 表达水平与 ERG a 波潜伏期时长呈正相关($\beta=13.950,P<0.001$);肿瘤坏死因子 α 表达水平与视野 MD 值呈正相关($\beta=6.310,P=0.002$);粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子与 ERG a 波、粒细胞集落刺激因子与 ERG b 波振幅均呈负相关($\beta=-152.700,P<0.001;\beta=-14.790,P=0.003$)。**结论** AIR 患者血清中多种 Th1 及 Th17 型细胞因子/趋化因子表达水平升高,并与疾病严重程度相关。

【关键词】 视网膜疾病;细胞因子;临床特征;自身免疫性视网膜病变**基金项目:** 国家自然科学基金(81100675);北京市自然科学基金(7192034);北京市眼科研究所重点突破项目(2019006)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20240702-00173

Correlation between serum cytokine expression and clinical characteristics in patients with autoimmune retinopathy

Liu Qian, Zeng Huiyang, Zhang Jingxue, Cao Kai, Zhang Zijun, Hou Simeng

Beijing Institute of Ophthalmology, Beijing Tongren Eye Center, Beijing Ophthalmology & Visual Sciences Key Laboratory, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100005, China

Corresponding author: Zeng Huiyang, Email: zhydr@hotmail.com

[Abstract] Objective To investigate the expressions of serum cytokines in patients with autoimmune retinopathy (AIR), and their association with disease diagnosis as well as clinical features. **Methods** A prospective

case-control study was conducted. A total of 90 eyes of 45 AIR patients were consecutively collected in Beijing Tongren Hospital from September 2018 to December 2023. Additionally, age-matched 43 controls (86 eyes) were enrolled, consisting of 21 patients (42 eyes) with retinitis pigmentosa as a disease control group and 22 healthy subjects (44 eyes) as a normal control group. The main clinical outcome measures included best-corrected visual acuity (BCVA), mean deviation (MD) of visual field, central retinal thickness and the maximal response amplitude and implicit time of full-field electroretinography (ff-ERG). A total of 21 serum cytokines were detected by Luminex multiple cytokines assay or ELISA. Differences in serum cytokine concentrations of among groups, the correlation between cytokine levels and clinical outcomes, and the contribution of cytokines to the diagnosis of AIR were analyzed. This study adhered to the Declaration of Helsinki. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Beijing Tongren Hospital (No. TRECKY2018-048). Written informed consent was obtained from each subject. **Results** In AIR patients, the expression levels of Th1-type cytokines or receptors (including interferon- γ [IFN- γ], interleukin [IL]-8, C-X-C motif chemokine ligand [CXCL]9, and CXCL10) and Th17-type cytokines (including IL-17 and IL-6) were elevated. There were statistically significant overall differences in pro-inflammatory cytokines/chemokines (IL-6, IL-8, CXCL10, IL-10, IFN- γ , IL-17, C-X-C motif chemokine ligand 1 [CXCL]1, CXCL9) among the three groups ($H=10.823, 10.816, 9.633, 10.103, 23.670, 16.493, 9.050, 9.253$; all $P<0.05$). Compared with the disease control group and the healthy control group, the IFN- γ level was significantly increased in the AIR group (both $P=0.001$). Compared with the healthy control group, the serum levels of IL-6, IL-8, CXCL10, IL-10, IL-17, and CXCL9 in the AIR group were significantly elevated (all $P<0.05$). The serum level of CXCL1 was significantly higher in the AIR group than in the disease control group ($P=0.039$). The serum level of IFN- γ was significantly higher in the AIR group than in the healthy control and disease control groups, but no association with AIR diagnosis was found ($OR=1.402, 95\%CI: 0.710-2.870, P=0.245$). Multilevel mixed-effects regression modeling analysis showed that the serum levels of IL-8 and CXCL9 in AIR patients were positively correlated with LogMAR BCVA ($\beta=0.028, P=0.033; \beta=0.023, P=0.003$). The C-C motif chemokine ligand 11 level was positively correlated with implicit time of ERG a-wave ($\beta=13.950, P<0.001$). The tumor necrosis factor- α level was positively correlated with MD value of visual field ($\beta=6.310, P=0.002$). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor was negatively correlated with the amplitude of ERG a-wave and granulocyte colony-stimulating factor was negatively correlated with ERG b-wave amplitude ($\beta=-152.700, P<0.001; \beta=-14.790, P=0.003$). **Conclusions** Serum Th1 and Th17-type cytokines/chemokines may be involved in the pathogenesis of AIR and are related to disease severity.

[Key words] Retinal diseases; Cytokines; Clinical features; Autoimmune retinopathy

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81100675); Beijing Municipal Natural Science Foundation (7192034); Key Research Program of Beijing Institute of Ophthalmology (2019006)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20240702-00173

自身免疫性视网膜病变(autoimmune retinopathy, AIR)是一类罕见的由免疫介导的视网膜变性疾病,主要表现为亚急性进行性视力下降、视网膜电图(electroretinography, ERG)异常以及血清存在抗视网膜抗体(anti-retinal antibody, ARA)^[1]。根据病因不同, AIR 分为副肿瘤相关性 AIR (paraneoplastic autoimmune retinopathy, pAIR) 和非副肿瘤相关性 AIR (non-paraneoplastic autoimmune retinopathy, npAIR)。AIR 确切的发病机制不明,一般认为与肿瘤细胞或微生物侵入机体产生抗体,并与视网膜蛋白发生交叉反应,进而攻击感光细胞相关。由于临床体征不明显,血清 ARA 成为目前唯一用于协助诊断 AIR 的生物学标志物。然而,多项研究结果显示,ARA 检测的特异性较低,该抗体不仅存在于 AIR 患者血清中,也存在于

其他视网膜变性患者、无眼部疾病的系统性自身免疫性疾病患者,甚至健康人血清中^[1-5]。不仅如此,针对降低抗体水平的治疗策略对 AIR 患者的疗效亦显示出明显的个体差异^[6-8],提示可能存在其他因素在该病致病机制中发挥作用。由于自身免疫性疾病,包括 AIR,是源于免疫系统功能障碍导致的炎症过程。有研究观察细胞因子或外周血单个核细胞在 AIR 中的改变,发现与健康人相比, AIR 患者血清中白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)和 C-X-C 基序趋化因子配体 9(C-X-C motif chemokine ligand 9, CXCL9)水平升高,淋巴细胞增多,并对重要的 ARA——恢复蛋白刺激反应性增强^[9-12],提示促炎细胞因子和淋巴细胞可能在 AIR 致病中发挥作用。然而,上述研究存在较多局限性,包括样本量较小(小于 20 例),纳入患者种类单一

(仅为 npAIR), 目标检测因子少(仅 6 个细胞因子), 以及缺乏细胞因子与疾病诊断、主要临床体征的关联分析等。针对上述问题, 本研究扩大 AIR 患者样本量并纳入不同疾病亚型, 对已确诊 pAIR 及 npAIR 患者、与 AIR 有较多临床体征重叠的疾病对照组原发性视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)患者及健康对照组(健康人群)血清进行 21 种细胞因子检测, 并与疾病诊断及重要临床体征进行关联分析, 旨在更全面地探讨 AIR 患者血清细胞因子在发病机制中的作用、对疾病诊断的价值及其与疾病严重程度的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

采用前瞻性病例对照研究, 连续收集 2018 年 9 月至 2023 年 12 月就诊于北京同仁医院眼科的 AIR 患者 45 例 90 眼为 AIR 组, 其中 pAIR 患者 19 例 38 眼, npAIR 患者 26 例 52 眼。由于目前尚缺乏国际统一的 AIR 诊疗指南, 本研究中 npAIR 患者纳入标准采用 2016 年美国葡萄膜炎协会发布的 npAIR 诊疗专家共识^[13]。基本诊断标准: 无明显原因导致的双眼视功能异常; ERG 异常(伴或不伴视野异常); 存在血清 ARA; 无明显眼底病变或引起视功能丢失的视网膜变性性疾病; 无明显眼内炎症。支持诊断标准: 出现闪光感、暗点、色盲、夜盲或畏光; 有个人或家族性系统自身免疫性疾病; 视力变化较快(急性或亚急性)。pAIR 患者除存在系统肿瘤外, 其诊断标准与 npAIR 大致相同。排除标准: (1) 有遗传性视网膜变性个人或家族史、青/少年时期夜盲史、典型感染性或非感染性葡萄膜炎病史或合并系统性自身免疫性疾病史者; (2) 曾使用奎宁或其他可能导致视网膜变性的药物、曾行全身糖皮质激素或免疫抑制剂治疗、近 3 个月内曾行糖皮质激素注射者。选取同时间段内年龄匹配的对照组 43 例 86 眼, 包括疾病对照组 RP 患者 21 例 42 眼和健康对照组 22 例 44 眼。健康人群界定为无明显眼部疾病(白内障除外)、无明显视功能异常以及不存在系统性自身免疫性疾病史。AIR 组、疾病对照组和健康对照组年龄分别为 (53.6 ± 11.0) 、 (43.6 ± 9.5) 和 (46.3 ± 7.8) 岁, 男性占比分别为 53.3% (24/45)、33.3% (7/21) 和 31.8% (7/22), 各组年龄、男性占比的比较, 差异均无统计学意义 ($F = 5.675$, $P = 0.126$; $\chi^2 = 1.990$, $P = 0.695$)。本研究遵循《赫尔辛基宣言》, 研究方案经北京同仁医院伦理委员会批准(批文号: TRECKY2018-048), 所有受试者均自愿签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 血清样本收集 经受试者肘静脉抽取静脉血 3 ml, 置于 EDTA 抗凝管内, 离心半径 15 cm, 1 500 r/min 离心 5 min, 分离出血清至 EP 管中, 置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。检测时, 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 解冻至融化。

1.2.2 眼科检查 主要临床指标的检测由固定的检查人员进行标准化操作。(1) 最佳矫正视力(best corrected visual acuity, BCVA) 使用国际视力表检测, 将小数视力转换为 LogMAR 视力进行统计分析。(2) Humphrey 视野(Humphrey visual field, HVF) 检查 采用 Humphrey 自动视野计(HFA II 750, 德国蔡司公司)检测平均偏差(mean deviation, MD)。(3) 中央视网膜厚度(central retinal thickness, CRT) 使用频域 OCT(spectral domain optical coherence tomography, SD-OCT)(德国海德堡公司)测量。(4) 全视野 ERG(full field ERG, ff-ERG) 使用视网膜电生理仪(GT-2008V, 重庆 Gotech 公司)记录最大杆锥细胞混合反应(DA 3.0 Max)参数, 主要包括 a 和 b 波的振幅及潜伏期时长。

1.2.3 Luminex 多因子检测法 检测受试者血清中细胞因子水平 采用 Luminex 人预混多因子检测试剂盒(Cat. No. LXSAH-19, 美国 R&D 公司), 取 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 解冻的血清 $50\text{ }\mu\text{l}$, 加入到 $150\text{ }\mu\text{l}$ 提前制备好的样品稀释液中混匀。在 96 孔板中加入 1 倍偶联单抗微球 $50\text{ }\mu\text{l}$ /孔。将标准品及样品加入到孔板中并做复孔, 孵育 30 min 并洗涤 3 次后, 孵育二抗 30 min, 清洗后加入 $50\text{ }\mu\text{l}$ /孔 PE 荧光染料避光孵育 15 min。再次清洗后, 通过 Luminex 200 液相芯片仪(美国 R&D 公司)进行检测, 根据标准曲线读取数据, 并进行统计分析。该试剂盒检测的因子包括 C-C 基序趋化因子配体 2(C-C motif chemokine ligand 2, CCL2)、CCL3、CCL4、CCL7、CCL11、C-X3-C 基序趋化因子配体 1(C-X3-C motif chemokine ligand 1, CX3CL1)、CXCL9、CXCL10、粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)、 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-17 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)。

1.2.4 酶联免疫吸附法 测定受试者血清中 CCL-5 和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)水平 由于上述 Luminex 试剂盒不包括这 2 种细胞因子, 故单独进行检测。血清 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 解冻, 采用酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay,

ELISA)试剂盒(美国 R&D 公司)以双抗体夹心法检测受试者血清中细胞因子浓度。按照试剂盒说明书完成实验。通过 ELISA Calc 软件绘制标准品曲线,计算样品质量浓度。

1.3 统计学方法

采用 SAS 9.4 软件进行统计分析。计量资料经 Shapiro-Wilk 检验证实符合正态分布者以 $\bar{x} \pm s$ 表示,3 个组各指标总体比较采用单因素方差分析;不符合正态分布者以 $M(Q_1, Q_3)$ 表示,3 个组各指标总体比较采用 Kruskal-Wallis H 检验,多重比较采用 Wilcoxon 检验。计数资料数据以频数和百分比表示,3 个组各指标比较采用 χ^2 检验。采用多层混合效应回归模型分析 AIR 患者血清细胞因子与临床指标的相关性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用多重 Logistics 回归分析验证细胞因子是否影响 AIR 诊断时,应用了多重比较,根据 Bonferroni 原则校正显著性阈值。 $P < 0.004$ ($0.05/12$) 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 受试者临床特征

在 AIR 患者中,95.6% (86/90) 患眼视力下降,平均 LogMAR BCVA 为 0.95 ± 0.40 。AIR 患者眼底可见视网膜血管变细、视网膜色素上皮紊乱或视盘苍白(图 1A)。眼底自发荧光常表现为黄斑中心凹周围高自发荧光环(图 1B),约占 52.2% (47/90)。SD-OCT 中最常见的改变是椭圆体带破坏(占 100%),其次是外界膜及外核层变薄(图 1C);70.0% (63/90) 患眼 CRT 变薄,平均 CRT 为 228.0 ($195.0, 255.3$) μm 。本研究中仅对 BCVA ≥ 0.1 的患者(62.2%, 56/90)进行视野检查,常见的视野缺损类型是向心性缩窄,占受检眼的 67.9% (38/56),视野平均 MD 值为 17.0 ± 10.1 。AIR 患者眼部 ERG 反应均显示异常,表现为 a 和 b 波潜伏期延迟或振幅下降。其中 a 波潜伏期平均为 26.02 ($22.85, 35.85$) ms,振幅平均为 28.25 ($12.60, 112.95$) μV ; b 波潜伏期平均为 54.65 ($49.26, 639.15$) ms,振幅平均为 52.40 ($6.60, 178.65$) μV 。

2.2 各组各血清细胞因子表达水平比较

在 AIR 患者中,Th1 型细胞因子或受体(包括 IFN- γ 、IL-8、CXCL9 和 CXCL10)和 Th17 型细胞因子(包括 IL-17 及 IL-6)表达升高。3 个组间促炎细胞因子/趋化因子 IL-6、IL-8、CXCL10、IL-10、IFN- γ 、IL-17、CX3CL1 和 CXCL9 质量浓度总体比较差异均有统计学意义($H = 10.823, 10.816, 9.633, 10.103, 23.670, 16.493, 9.050, 9.253$, 均 $P < 0.05$),其中与疾病对照组

和健康对照组相比,AIR 组患者 IFN- γ 水平均显著升高,差异均有统计学意义(均 $P = 0.001$);与健康对照组相比,AIR 组患者血清 IL-6、IL-8、CXCL10、IL-10、IL-17 和 CXCL9 水平均明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);AIR 组患者血清 CX3CL1 水平较疾病对照组明显升高,差异有统计学意义($P = 0.039$),较健康对照组略低,差异无统计学意义($P > 0.05$)(表 1)。

2.3 AIR 患者血清细胞因子与 AIR 诊断的关联性分析

在研究的各细胞因子中,AIR 患者血清 IFN- γ 明显高于健康对照组和疾病对照组,但其未显示出与 AIR 诊断的关联性($OR = 1.402, 95\% CI: 0.710 \sim 2.870, P = 0.245$)。

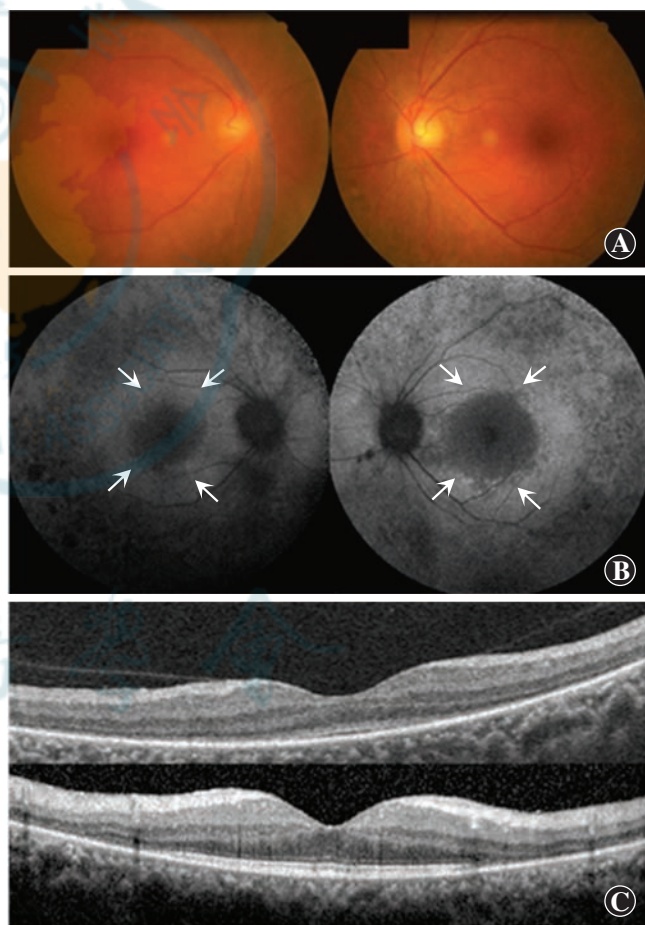


图 1 AIR 患者的影像学特征 A:患者彩色眼底照相可见视网膜血管变细、视网膜色素上皮紊乱或视盘颜色变淡 B:眼底自发荧光表现为围绕黄斑中心凹周围的高自发荧光环(箭头) C:SD-OCT 显示视网膜外层缺失,包括外界膜、椭圆体带及外核层

Figure 1 Multi-modal imaging features of patients with AIR A: Thinning of retinal blood vessels, disorder of retinal pigment epithelium, or pale color of the optic disc by fundus photography B: Hyperautofluorescence ring (arrows) surrounding the macula by fundus autofluorescence C: Loss of outer retinal segments including outer limiting membrane, ellipsoid zone and the outer nuclear layer on SD-OCT image

表 1 各组血清各细胞因子水平比较 [$M(Q_1, Q_3)$, pg/ml]
Table 1 Comparison of serum cytokine levels among three groups [$M(Q_1, Q_3)$, pg/ml]

组别	例数	IL-6	IL-8	CXCL10	IL-10	IFN- γ	IL-17
AIR 组	45	0.63(0.00,5.09)	3.01(1.91,6.38)	15.10(8.47,28.31)	0.40(0.09,0.58)	18.16(6.80,22.16)	21.20(5.71,60.05)
疾病对照组	21	0.10(0.00,0.57)	2.61(2.16,2.71)	10.23(6.98,17.12)	0.33(0.18,0.46)	0.00(0.00,0.00) ^a	2.43(1.03,4.88)
健康对照组	22	0.00(0.00,0.00) ^a	1.48(0.79,2.23) ^a	8.72(8.48,9.38) ^a	0.00(0.00,0.00) ^a	0.00(0.00,0.00) ^a	1.11(0.94,1.86) ^a
H 值		10.823	10.816	9.633	10.103	23.670	16.493
P 值		0.024	0.025	0.036	0.021	0.001	0.009

组别	例数	CX3CL1	CXCL9	IL-1 β	TNF- α	CCL2	CCL3
AIR 组	45	192.96(102.96,832.33)	82.44(76.73,112.75)	1.53(0.45,2.79)	0.66(0.03,1.49)	69.42(41.79,142.52)	17.01(10.94,51.21)
疾病对照组	21	107.33(66.01,157.56) ^a	80.26(78.15,98.00)	1.18(0.32,2.04)	0.62(0.03,1.15)	69.30(51.34,100.09)	19.60(0.00,31.19)
健康对照组	22	252.25(136.23,1756.23)	70.98(77.24,78.26) ^a	1.31(0.62,1.98)	0.00(0.00,0.44)	39.78(32.51,60.22)	0.00(0.00,18.40)
H 值		9.050	9.253	0.496	7.522	8.672	8.713
P 值		0.039	0.037	0.855	0.109	0.070	0.070

组别	例数	CCL4	CCL5	CCL11	G-CSF	GM-CSF	VEGF
AIR 组	45	31.00(15.44,54.43)	58.32(18.40,95.54)	39.30(25.63,63.14)	3.07(0.24,5.61)	2.00(1.08,2.31)	84.56(36.55,264.77)
疾病对照组	21	17.13(19.27,29.18)	93.00(27.63,118.12)	40.18(21.25,67.11)	3.68(2.08,7.61)	1.69(1.21,1.78)	115.28(68.35,208.08)
健康对照组	22	14.37(17.22,34.56)	79.18(49.22,123.33)	27.02(18.01,32.19)	0.48(0.15,2.12)	1.98(0.84,2.99)	110.37(65.32,159.02)
H 值		5.030	6.804	7.540	5.199	4.520	4.871
P 值		0.297	0.191	0.113	0.269	0.498	0.479

注:与 AIR 组相比,^a $P<0.05$ (Kruskal-Wallis H 检验,Wilcoxon 检验) AIR:自身免疫性视网膜病变;IL:白细胞介素;CXCL:C-X-C 基序趋化因子配体;IFN- γ : γ 干扰素;CX3CL1:C-X3-C 基序趋化因子配体 1;TNF- α :肿瘤坏死因子 α ;CCL:C-C 基序趋化因子配体;G-CSF:粒细胞集落刺激因子;GM-CSF:粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子;VEGF:血管内皮生长因子
Note:Compared with AIR group,^a $P<0.05$ (Kruskal-Wallis H test, Wilcoxon test) AIR: autoimmune retinopathy; IL: interleukin; CXCL: C-X-C motif chemokine ligand; IFN- γ : interferon- γ ; CX3CL1: C-X3-C motif chemokine ligand 1; TNF- α : tumor necrosis factor- α ; CCL: C-C motif chemokine ligand; G-CSF: granulocyte colony-stimulating factor; GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; VEGF: vascular endothelium growth factor

2.4 AIR 患者血清细胞因子水平与临床特征的相关性分析

多层混合效应回归模型分析结果显示,AIR 患者血清 IL-8 和 CXCL9 表达水平与 LogMAR BCVA 均呈正相关($\beta=0.028,P=0.033;\beta=0.023,P=0.003$);CCL11 表达水平与 ERG a 波潜伏期时长呈正相关($\beta=13.950,P<0.001$);TNF- α 表达水平与视野 MD 值呈正相关($\beta=6.310,P=0.002$);GM-CSF 与 ERG a 波、G-CSF 与 ERG b 波振幅均呈负相关($\beta=-152.700,P<0.001;\beta=-14.790,P=0.003$)。各细胞因子与 CRT 均无明显相关性(均 $P>0.05$)。

3 讨论

迄今为止,AIR 的发病机制仍不明确,因此其诊断及治疗仍面临挑战。尽管 ARA 的存在被认为是致病核心,但其是否直接致病或如何导致感光细胞死亡并不清楚。越来越多的证据提示,除了 ARA,可能还存在其他因子在 AIR 致病机制中发挥作用。本研究结果显示,在 AIR 患者血清中,细胞因子/趋化因子 IFN- γ 、IL-6、IL-8、IL-10、IL-17、CXCL9 和 CXCL10 表达水平较

健康人明显升高,致炎因子 TNF- α 、IL-8、CXCL9、CCL11、G-CSF 和 GM-CSF 表达水平与视功能恶化密切相关,提示血清细胞因子在疾病的发生和发展中发挥重要作用,可能作为 AIR 的另一生物学标志物。

Detrick 等^[11]对 18 例 npAIR 患者血清进行 IL-1 β 、IL-6、GM-CSF、IFN- γ 、CXCL9 和 IL-10 检测,结果显示患者 IL-6 和 CXCL9 的表达水平较正常人明显升高,提示这 2 种细胞因子在 AIR 的致病机制中发挥作用。本研究中对 45 例不同亚型 AIR 患者进行了 21 种细胞因子/趋化因子的检测,为了评估其诊断价值,除了健康对照组,还纳入了与 AIR 临床体征重叠的疾病对照组(RP 患者)。本研究结果显示,与健康人群相比,AIR 患者血清 Th1 型特征性细胞因子 IFN- γ 、Th1 型趋化因子 CXCL9 和 CXCL10,以及 IL-8 及 IL-10 表达水平均显著升高。上述发现与 Detrick 等^[11]的研究结果部分一致,不同的是,本研究发现 AIR 中 IFN- γ 及 IL-10 水平亦明显升高。存在差异的原因可能与样本量大小、自身免疫性疾病受检人群种族异质性及检测方法不同有关。在另一项研究中,Heckenlively 等^[14]用恢复蛋白抗体在体外刺激 AIR 患者淋巴细胞观察上清

中 IFN- γ 及 IL-10 的浓度变化,发现 AIR 患者 IFN- γ 升高,而 IL-10 与正常对照组水平相当或降低。本研究纳入的恢复蛋白抗体阳性 AIR 患者仅占 6.7% (3/45),大部分为 α -enolase 抗体(占 88.89%)和/或 CA-II 抗体(占 46.67%)阳性的患者,因此不同抗体诱导淋巴细胞产生不同细胞因子可能是结果不一致的原因。虽然血清 ARA 的存在与细胞因子表达的关系还不十分确切,但不同抗体诱导 AIR 患者外周血单个核细胞产生不同种类细胞因子或浓度差异的可能性仍很大。此外,尽管 IL-10 是一种抗炎细胞因子,但 IL-10 升高亦可见于炎症风暴和其他炎症性疾病中^[15]。总之,本研究虽未显示变化显著的细胞因子在 AIR 诊断中具有价值,但患者血清中 Th1 型细胞因子/趋化因子表达增强部分显示与主要临床特征相关,提示 Th1 型免疫反应在 AIR 的病理过程中发挥重要作用。

本研究中,AIR 患者血清 IL-17 水平与健康对照组相比明显升高。IL-17 是由 Th17 细胞分泌的特征性细胞因子。大量研究表明,Th17 细胞及 IL-17 与多种自身免疫性病变,包括葡萄膜炎的发生有关,是促进炎症反应的关键介质^[16]。IL-17 具有强大的刺激 T 细胞的功能,并可促进多种与 Th17 细胞分化、调节及效应功能相关的细胞因子产生,后者包括 IL-6、IL-10、IL-22、IL-23 和 TNF- α 等,并与这些因子共同作用增强其致炎效应,促进视网膜组织损伤。本研究结果证实,除了 IL-17 外,AIR 患者血清中 IL-6 及 IL-10 水平也显著升高,且 TNF- α 表达与 AIR 患者视功能损伤相关,提示 Th17 型免疫反应可能单独或联合 Th1 型免疫反应共同在 AIR 致病机制中发挥作用。

本研究着重分析了 AIR 患者血清细胞因子表达与 BCVA、HVF、ff-ERG 和 CRT 等主要临床体征之间的关联,结果显示 IL-8 和 CXCL9、CCL11、GM-CSF、G-CSF 以及 TNF- α 水平升高分别与视力下降、ERG 反应受损以及 HVF 恶化显著相关,而与 CRT 的关联并不明显。值得注意的是,Derick 等^[11]研究证实 IL-6 在 npAIR 中具有致病作用且与疾病严重程度(基于 ERG 反应受损粗略分级)存在关联。而 Deaner 等^[17]使用 IL-6 抗体对 8 例伴有黄斑囊样水肿的 npAIR 患者进行治疗,OCT 结果显示黄斑水肿减轻并出现椭圆体带部分恢复。然而,本研究 AIR 队列中并未发现 IL-6 与所观察临床指标(包括 ERG 反应和 CRT)之间存在显著关联,可能与纳入样本量大小、观察指标,如 ERG 受损参数选择不同相关。鉴于椭圆体带面积作为 AIR 的解剖学指标可能比 CRT 更为敏感,在后续研究中将成为重点观察的指标。

本研究存在一定局限性,由于 AIR 为罕见病,虽然纳入患者较既往文献报道明显增加,但其样本量仍有待进一步扩大,并增加更灵敏、更特异的临床观察指标,如椭圆体带面积,以获得更精确的结果。尽管如此,本研究仍清楚地表明 AIR 患者与对照组血清细胞因子表达谱之间存在显著差异,且与临床特征相关。

综上,本研究结果表明 AIR 患者血清中 Th1 及 Th17 型细胞因子/趋化因子表达升高,并与疾病严重程度密切相关,但各细胞因子在 AIR 发病机制中的作用仍有待进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 刘谦:参与研究实施、论文撰写;曾惠阳:参与试验设计、论文修改及定稿;张敬学:协助试验设计、Luminex 检测;曹凯、张子俊:参与数据分析;侯思梦:AIR 患者部分临床特征检测、临床资料收集及总结

参考文献

- [1] Grange L, Dalal M, Nussenblatt RB, et al. Autoimmune retinopathy[J]. Am J Ophthalmol, 2014, 157(2): 266–272. DOI: 10.1016/j.ajo.2013.09.019.
- [2] Adamus G. Are anti-retinal autoantibodies a cause or a consequence of retinal degeneration in autoimmune retinopathies? [J]. Front Immunol, 2018, 9: 765. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00765.
- [3] Zeng HY, Liu Q, Peng XY, et al. Detection of serum anti-retinal antibodies in the Chinese patients with presumed autoimmune retinopathy[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2019, 257(8): 1759–1764. DOI: 10.1007/s00417-019-04359-2.
- [4] Heckenlively JR, Aptsiauri N, Nusinowitz S, et al. Investigations of antiretinal antibodies in pigmentary retinopathy and other retinal degenerations[J]. Trans Am Ophthalmol Soc, 1996, 94: 179–200; discussion 200–206.
- [5] Shimazaki K, Jirawuthiworavong GV, Heckenlively JR, et al. Frequency of anti-retinal antibodies in normal human serum [J]. J Neuroophthalmol, 2008, 28(1): 5–11. DOI: 10.1097/WNO.0b013e318167549f.
- [6] Dutta Majumder P, Marchese A, Pichi F, et al. An update on autoimmune retinopathy [J]. Indian J Ophthalmol, 2020, 68(9): 1829–1837. DOI: 10.4103/ijo.ijO_786_20.
- [7] Davoudi S, Ebrahimiadib N, Yasa C, et al. Outcomes in autoimmune retinopathy patients treated with rituximab [J]. Am J Ophthalmol, 2017, 180: 124–132. DOI: 10.1016/j.ajo.2017.04.019.
- [8] Armbrust KR, Fox AR, Jeffrey BG, et al. Rituximab for autoimmune retinopathy: results of a phase I/II clinical trial [J]. Taiwan J Ophthalmol, 2021, 11(1): 64–70. DOI: 10.4103/tjo.tjo_32_20.
- [9] Stanwyck LK, Chan W, Sood A, et al. Correlation of immunological markers with disease and clinical outcome measures in patients with autoimmune retinopathy[J]. Transl Vis Sci Technol, 2020, 9(7): 15. DOI: 10.1167/tvst.9.7.15.
- [10] Lundy SK, Nikoipour E, Karoukis AJ, et al. T helper 1 cellular immunity toward recoverin is enhanced in patients with active autoimmune retinopathy[J]. Front Med (Lausanne), 2018, 5: 249. DOI: 10.3389/fmed.2018.00249.
- [11] Detrick B, Gangaputra S, Palsgrove DN, et al. Elevated serum levels of IL-6 and CXCL9 in autoimmune retinopathy (AIR) patients [J]. J Neuroimmunol, 2018, 316: 74–79. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2017.12.014.
- [12] Stansky E, Biancotto A, Dagur PK, et al. B cell anomalies in autoimmune retinopathy (AIR) [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2017, 58(9): 3600–3607. DOI: 10.1167/iov.17-21704.
- [13] Fox AR, Gordon LK, Heckenlively JR, et al. Consensus on the diagnosis and management of nonparaneoplastic autoimmune retinopathy using a modified Delphi approach[J]. Am J Ophthalmol, 2016, 168: 183–190.

- DOI:10.1016/j.ajo.2016.05.013.
- [14] Heckenlively JR, Lundy SK. Autoimmune retinopathy: an immunologic cellular-driven disorder[J]. Adv Exp Med Biol, 2018, 1074: 193-201. DOI:10.1007/978-3-319-75402-4_24.
- [15] Shekhawat J, Gauba K, Gupta S, et al. Interleukin-6 perpetrator of the COVID-19 cytokine storm[J]. Indian J Clin Biochem, 2021, 36(4): 440-450. DOI:10.1007/s12291-021-00989-8.
- [16] Balamurugan S, Das D, Hasanreisoglu M, et al. Interleukins and cytokine biomarkers in uveitis[J]. Indian J Ophthalmol, 2020, 68(9): 1750-1763. DOI:10.4103/ijo.IJO_564_20.
- [17] Deaneer JD, Jaffe GJ, Keenan RT, et al. Anti-interleukin-6 antibodies for autoimmune retinopathy with macular edema[J]. Ophthalmol Retina, 2022, 6(1): 91-93. DOI:10.1016/j.oret.2021.08.008.
- (收稿日期:2025-04-10 修回日期:2025-08-21)
- (本文编辑:刘艳 施晓萌)

· 病例报告 ·

SPATA7 基因新变异致 Leber 先天性黑矇一家系

杜婉丽¹ 吴彩云¹ 马小英¹ 郝胜菊² 惠玲³ 范玉洁¹ 张庆华²¹甘肃省妇幼保健院眼科,兰州 730050;²甘肃省妇幼保健院医学遗传中心,兰州 730050;³甘肃省出生缺陷与罕见病临床医学研究中心,兰州 730050

通信作者:张庆华,Email:0929zhangqh@163.com

基金项目:甘肃省自然科学基金(21JR1RA042);兰州市人才创新创业项目(2018-RC-95);甘肃省科技计划(21JR7RA680)

Novel SPATA7 mutations caused Leber congenital amaurosis: a case report

Du Wanli¹, Wu Caiyun¹, Ma Xiaoying¹, Hao Shengju², Hui Ling³, Fan Yujie¹, Zhang Qinghua²¹Department of Ophthalmology, Gansu Provincial Maternity and Child-Care Hospital, Lanzhou 730050, China;²Medical Genetics Center, Gansu Provincial Maternity and Child-Care Hospital, Lanzhou 730050, China;³Gansu Provincial Clinical Research Center for Birth Defects and Rare Diseases, Lanzhou 730050, China

Corresponding author: Zhang Qinghua, Email:0929zhangqh@163.com

Fund program: Natural Science Foundation of Gansu(21JR1RA042); Lanzhou Talent Innovation and Entrepreneurship Project (2018-RC-95); Gansu Science and Technology Plan Project (21JR7RA680)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20220803-00360

先证者男,足月顺产,出生后新生儿眼病筛查提示双眼视网膜出血(图1A),1月龄复查,双眼视网膜出血吸收,未见眼部其他异常;6月龄时视觉发育评估,发现患儿不能追视红球移动,瞳孔对光反射正常,检影验光未见异常,彩色眼底照相未见异常(图1B),双眼视网膜电图(electroretinogram,ERG)检查未引出波形,考虑先天性黑矇,建议行基因检测,患儿监护人拒绝。1岁时患儿仍不追视,并喜欢指压眼球,眼科检查双眼瞳孔对光反射正常,红球及灯光追视不能,彩色眼底照相未见异常(图1C),双眼ERG为熄灭型(图2)。先证者父母视力均正常,眼底检查未见异常,未行ERG检查,非近亲结婚,否认家族史。再次建议行基因检测,获得先证者父母知情同意。收集先证者及其父母外周血样本,经全血基因组DNA提取,采用IlluminaNextSeq 500测序平台对先证者及母亲进行包含850个致病基因的外显子靶向测序。数据经过质量控制,去除低质量的读长,然后根据测序质量、变异质量对检测到的单核苷酸多态性、插入缺失进行过滤和筛选得到20X覆盖度的高质量可靠变异及拷贝数变异等变异。目标基因变异位点应用人类基因变异数据库(HGMD)及单核苷酸多态性数据库(dbSNP)、千人基因组(1000 Genomes)数据库和基因组整合数据库(gnomAD)等进行查询,参考人类基因组版本为GRCh37/hg19,根据美国医学遗传学与基因组学学会(American College of Medical Genetics and Genomics,ACMG)2015年发布的基因变异解读标准和指南进行致病性判读。通过变异

位点致病性分析,确认候选致病变异位点。对可疑致病位点进行Sanger测序和荧光定量PCR验证家系共分离分析。

该家系检测到SPATA7基因(NM_018418)的2个杂合变异:11号外显子的无义变异c.1195C>T(p.Q399X)和5~9号外显子的重复变异。根据ACMG指南,c.1195C>T(p.Q399X)为无义变异,可能导致基因功能丧失,属于非常强的致病性证据(PVS1);该变异在gnomAD和千人基因组等数据库中均未被收录,在正常人群数据库中的频率为(-),为低频变异,属于中等致病性证据(PM2);患者临床表型或家族史高度特异于单一遗传基础的疾病,符合Leber先天性黑矇(Leber congenital amaurosis,LCA),属于支持致病性证据(PP4),经家系验证分析为父源性变异,因此该变异初步判定为致病性变异(PVS1+PM2+PP4)。根据ACMG指南,第5~9号外显子重复变异在gnomAD和千人基因组等数据库中均未被收录,在正常人群中为低频变异,属于中等致病性证据(PM2);该变异符合隐性遗传病,与另一致病变异反式存在(与另一个致病变异组成复合杂合),属于中等致病性证据(PM3);患者临床表型或家族史高度特异于单一遗传基础的疾病,符合LCA,属于支持致病性证据(PP4),经家系验证分析为母源性变异,因此该变异初步判定为临床意义未明变异(PVS1+PM2+PP4)。上述2个变异均未在HGMD等变异数据库收录,为新变异(图3,4),患者SPATA7基因型与临床表型吻合,确诊为LCA型(LCA3)。