

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.14.018

VKC 患儿与正常儿童泪液中细胞因子表达的比较

渠继芳^{1,2} 李旌¹ 张琦¹ 李欣洁¹ 赵培泉^{1,Δ}

(1 上海交通大学医学院附属新华医院眼科 上海 200092; 2 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心眼科 上海 200127)

摘要 目的:比较 VKC 患儿与正常儿童泪液中细胞因子白细胞介素-4(IL-4), 白细胞介素-5(IL-5)和白细胞介素-13(IL-13)的表达量的变化, 以及分析两组之间有无统计学差异。 **方法:**收集 10 例春季角结膜炎(VKC)患儿与 16 例正常受试者(CT)的泪液; 采用液体芯片技术测量两组泪液中 IL-4, IL-5, IL-13 的浓度, 使用 U 检验来比较两组之间的差异有无统计学意义。 **结果:**VKC 组泪液中 IL-4 的浓度为 1.09 ± 0.73 pg/mL, IL-5 的浓度为 1.68 ± 1.43 pg/mL, IL-13 的浓度为 1.90 ± 1.59 pg/mL; 与正常受试者(CT)相比, 明显升高, 两组之间比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。 **结论:**分析 VKC 患儿泪液中的细胞因子在了解 VKC 的发病机制中可能可以起到重要的作用, 以及可以提供新的治疗方向。

关键词: 春季角结膜炎; 细胞因子; 泪液

中图分类号: R779.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)14-2683-03

Expression of Cytokine VKC Compared in the Tears of Children and Normal Children

QU Ji-fang^{1,2}, LI Jin¹, ZHANG Qi¹, LI Xin-jie¹, ZHANG Pei-quan^{1,Δ}

(1 Department of Ophthalmology, Xinhua Hospital affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, 200092, China;

2 Department of Ophthalmology, Shanghai Children's Medical Center affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, 200127, China)

ABSTRACT Objective: To compare the concentrations of IL-4, IL-5 and IL-13 in tear samples from active VKC patients and normal subjects (CT). **Methods:** Tear samples were collected from 16 normal subjects and 10 active VKC patients. Cytokine concentrations were measured by Bio-Plex Pro™ magnetic color-bead-based multiplex assay. Mann Whitney U test was used to compare the differences between two groups. **Results:** The concentrations of IL-4, IL-5, IL-13 were significantly increased in active VKC patients compared with normal subjects (CT). **Conclusions:** The tear concentrations of the three cytokines from the VKC group were significantly higher, which may indicate VKC is related to the increase of cytokines and may provide new treatments.

Key words: Vernal keratoconjunctivitis (VKC); Cytokines; Tears

Chinese Library Classification(CLC): R779.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)14-2683-03

前言

近年来随着全球变应性疾病发病率的逐年上升, 儿童过敏性结膜炎也越来越引起眼科学者们重视。儿童过敏性结膜炎(Allergic conjunctivitis, AC)是由变应原激发的、由 IgE 介导的眼部炎症疾病, 主要由 I 型及 IV 型超敏反应引起, 是儿童非感染性眼表疾病^[1-3]。春季角结膜炎(VKC)是其中的一种季节性、反复发作的免疫性角结膜炎, 以结膜巨大乳头、充血、角膜病变为特征, 常见于青春前期儿童, 有潜在致盲性。目前 VKC 的诊断主要依据临床特点, 实验室检查, 甚至病理学检查。已经在 VKC 患者的血清、结膜和泪水中检测到多种细胞和介质, 可能

和 VKC 的发病机制有关^[4-7]。本研究的目的在于检测春季角结膜炎(VKC)患儿泪液中 IL-4, IL-5, IL-13 这三种细胞因子的浓度并与正常受试者(CT)进行比较, 以探讨其与春季角结膜炎的关系及临床意义。

1 对象与方法

1.1 对象

春季角结膜炎(VKC)组患儿选择: 主要参照《眼科全书》^[8]的诊断标准。疾病的症状包括: 眼痒、流泪、畏光、异物感、反复眼红、晨起粘稠样分泌物等。常规裂隙灯检查, 观察体征包括: 上、下睑结膜乳头和滤泡、分泌物、结膜充血、结膜水肿、角膜缘改变、角膜上皮改变、眼睑和球周组织水肿等。10 例 VKC 患儿均来自本院眼科 2012 年 4~8 月门诊就诊患者, 年龄 6~12 岁, 平均年龄 9 岁, 男 8 例, 女 2 例; 病程 1 月~5 年。患儿在此次发病确诊 VKC 之前一月内均未使用任何局部或口服药物。正常对照组(CT)选择标准: 患者无眼部不适主诉, 裂隙灯检查眼表形态结构无异常; 一月内未应用影响泪液的药物。CT 组 16 例, 年龄 5~12 岁, 平均年龄 9 岁, 男 7 例, 女 9 例。

作者简介: 渠继芳(1973-), 女, 硕士, 主治医师, 从事儿童眼表疾病方面的研究, E-mail: rachelqu@163.com

Δ通讯作者: 赵培泉(1965-), 男, 主任医师, 教授, 博士后; 博士、硕士生导师, 从事眼科疾病诊治方面的研究,

Email: zhaopeiquan@126.com

(收稿日期: 2013-12-21 接受日期: 2014-01-20)

1.2 病史采集

完成问卷调查包括个人信息,结膜炎病史,过敏性疾病史,家族史。

1.3 方法

所有实验对象和家长都被事先告知本实验的目的,并经过同意后采集泪液。泪液标本的采集:嘱受试者向鼻上象限注视,使用环氧乙烷消毒后的自吸式玻璃毛细管 (10 ICALIBRATED PIPETS, Drummond)。在下睑结膜囊泪阜处虹吸采集泪液(未使用表面麻醉药物或其他化学性药物),收集泪液约 5l。操作者需提醒受试者勿眨眼,操作时毛细管尽量不接触眼表面,以免引起反射性流泪从而影响检查结果。Ep 管分装,储存在 -80℃ 低温冰箱中直到进一步分析。采用伯乐的液体芯片技术 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA),测定 IL-4, IL-5, IL-13 这三种细胞因子的浓度。伯乐公司 (Bio-Rad) 的液体芯片技术,是用磁珠与特异性的抗体相结合,抗体再与泪液中的细胞因子结合,从而分离不同的细胞因子。由于磁珠本身有不同的颜色标记(红外光颜色分类),而细胞因子/抗体结合后又带有特异性

发光集团,这样就可以在同一个样本中同时定量检测多种细胞/炎症因子的浓度。浓度低于检测下限被定义为不可测得。

1.4 统计学处理

应用 SPSS 18.0 统计软件包进行统计学处理。在统计细胞因子浓度差异上,用 Mann Whitney U 检验,未用 Bonferroni 来进行校正。均设定 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

VKC 组 10 人,男 8 例,女 2 例,有角膜改变的有 3 人;CT 组 16 人,男 7 例,女 9 例。VKC 组泪液中 IL-4 的浓度为 1.09 ± 0.73 pg/mL;正常对照组 IL-4 浓度为 0.49 ± 0.43 pg/mL,两组之间比较差异有统计学意义 ($P=0.009$)。IL-5 的浓度为 1.68 ± 1.43 pg/mL;正常对照组 IL-5 浓度为 0.77 ± 0.81 pg/mL,两组之间比较差异有统计学意义 ($P=0.025$)。IL-13 的浓度为 1.90 ± 1.59 pg/mL;正常对照组 IL-13 浓度为 0.91 ± 0.88 pg/mL,两组之间比较差异有统计学意义($P=0.011$)。见表 1。

表 1 两组泪液中细胞因子浓度比较(pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of cytokine concentrations in the tears of two groups(pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

	IL-4	IL-5	IL-13
VKC group (n=10)	1.09 ± 0.73	1.68 ± 1.43	1.90 ± 1.59
CT group (n=16)	0.49 ± 0.43	0.77 ± 0.81	0.91 ± 0.88
P	0.009	0.025	0.011

3 讨论

春季角结膜炎(VKC)是一种发生在结膜的慢性,双侧,卡他性的炎症,常常在春天和夏天好发于儿童^[9-11]。多见于男性患儿,首次发病多小于 10 岁,可在青春期得到缓解。本次研究 VKC 组患儿男性 8 例,女性 2 例;年龄 6~12 岁,平均年龄 9 岁,与报道一致^[12]。VKC 的特征是存在巨大的乳头体结膜、角膜病变和轻微到严重眼痒。VKC 的临床诊断是通常依据历史和临床检查。细胞因子检测是判断机体免疫功能的一个重要指标,因而具有重要的实验室研究价值,同时还可能在临床上有诸多实用价值、包括许多疾病的诊断、病程观察、疗效判断及细胞因子治疗监测等。IL-4 是由活化的 T 细胞产生,促进并活化 B 细胞增殖,Ig 产生和类别转换为 IgE 和 IgG,是一种 CD4⁺T 细胞亚群的自分泌生长因子^[13];促进肥大细胞增殖;增强巨噬细胞功能,是变应性反应的关键介质。IL-4 的功能是诱导 B 细胞从分泌性 IgM 转向产生 IgE^[14]。IL-13 由活化的 T 细胞产生。刺激 B 细胞增殖和 CD23 的表达,抑制单核-巨噬细胞炎症性细胞因子产生^[15]。IL-4, IL-13 是 IgE 合成中起重要作用的细胞因子。IL-5 由活化的 T 细胞产生,诱导 B 细胞分化成为抗体分泌细胞,IgA 合成以及协同 IL-2 促进 CTL 分化^[16]。医学界认为,嗜酸性粒细胞在人体内的增殖和活跃是引发过敏性哮喘和特应症等过敏症的原因之一。此前的研究显示,免疫系统中的淋巴 T 细胞产生的 IL-5 能促使嗜酸性粒细胞活跃^[17]。IL-3,特别是 IL-5 与能促进嗜酸性粒细胞的生长,分化,迁移,粘附及活化^[18]。大多数 VKC 病人显示 Th2 型细胞因子显著增加,特别是

IL-4 和 IL-5。这些研究结果与不同实验室的报告一致^[19-20]。

泪液的有形成分中 90% 以上为蛋白质,包括酶类和细胞因子,在眼表免疫防疫系统中起着重要的作用。皮克(pg)或那克(ng)量的细胞因子就可发挥相应的活性。通过研究细胞因子的免疫网络调节,可以更好地理解完整的免疫系统调节机制,并且有助于指导细胞因子作为生物应答调节剂(biological response modifier, BRM)应用于临床治疗免疫性疾病。但是,由于细胞因子在体内的含量甚微,给细胞因子的检测带来困难。相对而言,眼泪样本容易收集,VKC 病人和提供有价值的信息在微分撕裂细胞学和水平的炎症介质有疑问的时候,更多的临床和实验室测试可能是有用的确定诊断。

我们通过液体芯片技术检测 VKC 组和正常对照人群泪液中 IL-4, IL-5 以及 IL-13 含量对比,可以看出,VKC 组泪液中 3 种细胞因子的含量显著增高,经统计学分析,差异均具有显著性意义。由此推测春季角结膜炎的发病机制与细胞因子的增加及免疫反应有关。

通过比较多种细胞因子的含量是一种新的方法,可以用于了解许多细胞因子参与过敏性疾病的机制,并最终帮助寻找新的明确的抗过敏治疗方法。但是由于本实验的局限性,对 3 种细胞因子在 VKC 病损过程中是如何发挥作用未进行深入的研究,进一步研究三种细胞因子在发病过程中如何发挥作用以及如何对细胞因子的分泌进行有效的调控,此对 VKC 的诊断、治疗及防止复发具有重要的意义。

参考文献(References)

[1] 范玉香,赵俊华,冯雪艳,等. 儿童干眼与过敏性结膜炎临床分析[J].

- 中国实用眼科杂志, 2012, 30(2):171-173
- Fan Yu-xiang, Zhao Jun-hua, Feng Xue-yan, et al. Primary survey of dry eye in children and allergic conjunctivitis[J]. Chinese Journal of Practical Ophthalmology(CJPO), 2012, 30(2):171-173
- [2] 周浩, 周行涛, 瞿小妹, 等. 奥洛他定治疗儿童过敏性结膜炎合并瞬目频繁的疗效观察[J]. 眼科, 2009, 18(4):272-274
- Zhou Hao, Zhou Xing-tao, Qu Xiao-mei, et al. Treating allergic conjunctivitis combined with frequently winking in children usingolopatadine [J]. Ophthalmology in China, 2009, 18(4):272-274
- [3] Mimura T, Usui T, Yamagami S, et al. Relation between total tear IgE and severity of acute seasonal allergic conjunctivitis [J]. Curr Eye Res, 2012, 37 (10): 864-870
- [4] Rachdan D, Anijeet DR, Shah S. Atopic keratoconjunctivitis: present day diagnosis[J]. Br J Ophthalmol, 2012, 96 (11): 1361-1362
- [5] Calkavur S, Olukman O, Ozturk AT, et al. Epidemic adenoviral keratoconjunctivitis possibly related to ophthalmological procedures in a neonatal intensive care unit: lessons from an outbreak[J]. Ophthalmic Epidemiol, 2012, 19 (6): 371-379
- [6] Fan NW, Lin PY, Chen TL, et al. Treatment of microsporidial keratoconjunctivitis with repeated corneal swabbing[J]. Am J Ophthalmol, 2012, 154 (6): 927-933
- [7] Zicari AM, Nebbioso M, Zicari A, et al. Serum levels of IL-17 in patients with vernal keratoconjunctivitis: a preliminary report[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2013, 17(9): 1242-1244
- [8] 李凤鸣. 眼科全书[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996:1314-1317
- Li Feng-ming. Ophthalmic book[M]. Beijing: People's Health Publishing House, 1996:1314-1317
- [9] Hartley C, Donaldson D, Smith KC, et al. Congenital keratoconjunctivitis sicca and ichthyosiform dermatosis in 25 Cavalier King Charles spaniel dogs. Part I: clinical signs, histopathology, and inheritance[J]. Vet Ophthalmol, 2012, 15(5): 315-326
- [10] Ibrahim OM, Matsumoto Y, Dogru M, et al. In vivo confocal microscopy evaluation of meibomian gland dysfunction in atopic-keratoconjunctivitis patients[J]. Ophthalmology, 2012, 119 (10): 1961-1968
- [11] Flynn TH, Manzouri B, Tuft SJ. Ocular surface squamous neoplasia in an immunosuppressed patient with atopic keratoconjunctivitis [J]. Int Ophthalmol, 2012, 32 (5): 471-473
- [12] 乐琦骅, 洪佳旭, 朱文卿, 等. 激光共聚焦显微镜观察春季角结膜炎患者的角膜形态变化[J]. 中华眼科杂志, 2011, 47(5):416-422
- Le Qi-hua, Hong Jia-xu, Zhu Wen-qing, et al. Morphological characteristics of cornea in patients with vernal keratoconjunctivitis by in vivo laser scanning confocal microscopy[J]. Chinese Journal of Ophthalmology, 2011, 47(5): 416-422
- [13] 周慧, 朱丽影, 迟立君, 等. CD4+CD25+FoxP3+ 调节性 T 细胞与黑龙江省 HIV/AIDS 患者病情相性的研究 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(21):4031-4035
- Zhou Hui, Zhu Li-ying, Chi Li-jun, et al. The Frequency of CD4+CD-25+FoxP3+ Regulatory T Cells Correlates to the Disease Progress of HIV/AIDS in Heilongjiang Province[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(21):4031-4035
- [14] Hartley C, Barnett KC, Pettitt L, et al. Congenital keratoconjunctivitis sicca and ichthyosiform dermatosis in Cavalier King Charles spaniel dogs. Part II: candidate gene study [J]. Vet Ophthalmol, 2012, 15 (5): 327-332
- [15] 闫云霞, 王燕青, 周兆山, 等. 柴胡渗湿汤对哮喘大鼠血清中 IL-5 及 IL-13 影响的实验研究[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(7):1251-1256
- Yan Yun-xia, Wang Yan-qing, Zhou Zhao-shan, et al. Study on the Effects of Radix Bupleuri Dampness-Percolating Decoction on Serum IL-5 & IL-13 in Rat Asthma Model[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(7): 1251-1256
- [16] Garcia G, Taillé C, Laveneziana P, et al. Anti-interleukin-5 therapy in severe asthma[J]. Eur Respir Rev, 2013, 22(129):251-257
- [17] Aggarwal R, Bansal D, Bansal F, et al. Interleukin-5, interleukin-6, interleukin-8 and tumour necrosis factor- α levels obtained with in 24-h of admission do not predict high-risk infection in children with febrile neutropenia[J]. Indian J Med Microbiol, 2013, 31(3):226-229
- [18] Lee EJ, Lee SJ, Kim S, et al. Interleukin-5 enhances the migration and invasion of bladder cancer cells via ERK1/2-mediated MMP-9/NF- κ B/AP-1 pathway: involvement of the p21WAF1 expression [J]. Cell Signal, 2013, 25(10):2025-2038
- [19] Cingu AK, Cinar Y, Turku FM, et al. Effects of vernal and allergic conjunctivitis on severity of keratoconus [J]. Int J Ophthalmol, 2013, 6(3):370-374
- [20] Nye M, Rudner S, Bielory L. Emerging therapies in allergic conjunctivitis and dry eye syndrome[J]. Expert Opin Pharmacother, 2013, 14 (11):1449-1165