

- 8 Lee YM, Park YJ, Lee SJ, *et al.* Tissue engineered bone formation using chitosan/tricalcium phosphate sponges. *J Periodontol*, 2000, 71: 410 - 417
- 9 Meinel L, Hofmann S, Karageorgiou V, *et al.* Engineering Cartilage-like tissue using human mesenchymal stem cells and silk protein scaffolds. *Biotechnol Bioeng*, 2004, 88(3): 379 - 391
- 10 Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop*, 1991, 9(5): 641 - 650
- 11 Guo X, Du J, Zheng Q, *et al.* Expression of transforming growth factor beta 1 in mesenchymal stem cells: potential utility in molecular tissue engineering for osteochondral repair. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2002, 22(2): 112 - 115
- 12 Wakitani S, Mitsuoka T, Nakamura N, *et al.* Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: two case reports. *Cell Transplant*, 2004, 13(5): 595 - 600
- 13 杨亚冬, 张文元, 房国坚, 等. 巢式 PCR 扩增性别决定基因序列检测兔骨髓间充质干细胞移植治疗关节软骨缺损的修复组织来源. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(37): 7341 - 7344
- (收稿: 2010 - 11 - 15)
- (修回: 2011 - 05 - 31)

HLA - B₂₇ 相关急性前葡萄膜炎患者 IL - 10、IL - 23、TNF - α 、INF - γ 的水平分析

郑美琴 王毓琴 向圣锦 李 艳

摘 要 目的 观察 HLA - B₂₇ 相关急性前葡萄膜炎(AAU)患者治疗前后外周血中 IL - 10、IL - 23、TNF - α 、INF - γ 等指标的变化, 以期为此类患者的预防和治疗提供有益的思路。方法 应用 ELISA 法检测技术, 对 AAU 患者外周血血浆中上述 4 种因子水平进行检测, 用 PCR 法对患者进行 HLA - B₂₇ 基因检测。结果 41 例 HLA - B₂₇ 相关 AAU 患者外周血中发作期各指标分别是 IL - 10(461.3 $\pm$ 34.5 pg/ml)、IL - 23(457.1 $\pm$ 35.6 pg/ml)、TNF - α (228.8 $\pm$ 23.6 pg/ml)、INF - γ (34.4 $\pm$ 2.8 pg/ml) 经糖皮质激素及复方龙胆泻肝胶囊治疗后缓解期各指标均显著低于急性发作期($P < 0.01$), 分别为 IL - 10(145.7 $\pm$ 29.8 pg/ml)、IL - 23(123.1 $\pm$ 30.9 pg/ml)、TNF - α (61.2 $\pm$ 20.1 pg/ml)、INF - γ (12.0 $\pm$ 2.2 pg/ml), 缓解期与健康对照组比较无统计学差异($P > 0.05$), 其中 INF - γ 、IL - 10、TNF - α 略高于健康对照组, IL - 23 略低于健康对照组。所有 41 例患者全部为 HLA - B₂₇ 基因阳性, 对照组 37 例中有 1 例(2.7%) 阳性。结论 糖皮质激素结合复方龙胆泻肝胶囊能显著调节 HLA - B₂₇ 相关葡萄膜炎患者体内的细胞因子水平, 改善患者体内的免疫失衡状态, 有效地抑制炎症。

关键词 急性前葡萄膜炎 HLA - B₂₇ 细胞因子

Investigation of IL - 10, IL - 23, TNF - α , INF - γ in Patients with HLA - B₂₇ Related Acute Anterior Uveitis. Zheng Meiqin, Wang Yuqin, Xiang Shengjin, Li Yan. The Affiliated Eye Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325027, China

Abstract Objective To study the changes of the levels of IL - 10, IL - 23, TNF - α , INF - γ in the plasma of patients with HLA - B₂₇ related acute anterior uveitis(AAU). **Methods** The method of sequece special prime polymerase chain reaction (SSP - PCR) was used to detect HLA - B₂₇. The ELISA technology was applied to detect IL - 10, IL - 23, TNF - α , INF - γ in the plasma of patients. **Results** In 41 patients with AAU, during the uveitis acute period, levels of IL - 10(461.3 $\pm$ 34.5 pg/ml), IL - 23(457.1 $\pm$ 35.6 pg/ml), TNF - α (228.8 $\pm$ 23.6 pg/ml), INF - γ (34.4 $\pm$ 2.8 pg/ml) expression in peripheral blood of the patients were higher than those in the normal volunteers($P < 0.01$), and were decreased after treatment with corticosteroids and fufanglongdanxieganjiaonang. The difference between patients during the uveitis remission period and healthy controls wasn't significant($P > 0.05$). In patients with AAU, 41 patients(100%) were with HLA - B₂₇ gene and 1(2.7%) of 37 normal objectives was with HLA - B₂₇ gene. **Conclusion** Corticosteroids and fufanglongdanxieganjiaonang have significantly intervention effect on the expression of cytokines in the patients with HLA - B₂₇ related acute anterior uveitis. It can improve immunity and effectively restrain the inflammation.

Key words Acute anterior uveitis; HLA - B₂₇; Cytokine

基金项目: 浙江省教育厅科研项目(Y200908607); 浙江省中医药科技项目(2010ZB105); 温州市科技局科研项目(Y20090187)

作者单位: 325027 温州医学院附属眼视光医院

葡萄膜炎是一类常见的致盲眼病, 受到国际范围内广泛的关注。急性前葡萄膜炎是一种最常见的葡萄膜炎, 病因和类型多种多样, HLA - B₂₇ 相关性前葡萄膜炎是其中之一。愈来愈多的证据表明, 在葡萄膜

炎发病过程中有多种与 Th 细胞亚群的分化、功能激活及抑制相关的细胞因子参与。因此用此类细胞因子或激素等治疗葡萄膜炎已取得一定效果。但是,细胞因子在血浆内的半衰期短,需要连续静脉滴注大量细胞因子才能有所疗效,往往使患者表现出严重的不良反应,而大剂量、长时间激素治疗也存在严重不良反应,因此需要找到更好的治疗方法^[1]。现代药理研究表明,许多清热解毒、活血化瘀中药同样具有抗炎及免疫调节功能,它们在防治急慢性炎症方面已显示明显疗效,这些抗炎中药与抑制炎性细胞产生炎性因子有关。因此中药在治疗葡萄膜炎的优势越来越突出。为揭示急性前葡萄膜炎患者经中西医结合治疗前后体内免疫状态的改变,本研究选取了与 Th 增殖、分化、成熟及调节等相关的 4 种细胞因子(包括 IL-10、IL-23、TNF-α、INF-γ)作为糖皮质激素结合复方龙胆泻肝胶囊治疗 HLA-B₂₇ 相关性 AAU 作用机制研究的观察指标。现将研究结果报道如下。

对象与方法

1. 对象:全部病例为 2009 年 11 月~2010 年 5 月来温州医学院附属眼视光医院葡萄膜炎专科和中医眼科的患者,均为急性前葡萄膜炎活动期且重度炎症患者,共 41 例,排除全身性疾病和眼部肿瘤患者,其中单眼 32 例,双眼 9 例,男性 26 例,女性 19 例,年龄 17~64 岁(平均 37.8 岁),病程 2~6 天,平均 4.2 天;治疗后缓解期(3 个月无复发)患者 38 例,有 3 例患者脱落;另选取 37 例健康体检者作为对照,其中男性 20 例,女性 17 例,年龄 17~69 岁(平均 41.5 岁)。所有患者的诊断根据 2008 年杨培增教授主编的《葡萄膜炎诊断和治疗》中的标准^[2]。考虑到 HLA-B₂₇ 阳性与否对 AAU 患者的临床表现及发病机制均有一定的影响,本研究全部选取 HLA-B₂₇ 阳性患者^[3]。

2. 方法:(1)治疗方法:①西药治疗(参照杨培增教授的葡萄膜炎诊断与治疗^[2]):全部病例局部均给予 1% 阿托品充分散瞳(合并产生粘连者用散瞳合剂球结膜下注射),地塞米松眼液滴眼,特别严重的加用泼尼松 30mg 晨起顿服,病情好转后激素用量逐渐减少,连续观察 3 个月。0.1% 地塞米松滴眼剂(q1h~q2h),同时用阿托品(tid)充分散瞳,3~5 日炎症减轻后 0.1% 地塞米松滴眼剂(qid)维持 5~7 天,同时改用美多丽(托吡卡胺、盐酸去氧肾上腺素)散瞳(tid),随着炎症的

进一步减轻,逐渐减少至停用,基本持续 2~3 周。考虑到葡萄膜炎的发病机制、病程变化等的不同,治疗不能完全格式化,所以治疗过程中原则按照上述给药方案,但仍有部分随着病情的改变作适当的调整;②中药治疗:中医理论将患者分为肝经风热型、肝胆实热型、肝胆湿热型、阴虚火旺型等,本组选取肝胆实热型患者,采用复方龙胆泻肝胶囊,服用方法:每天 3 次,每次 4 颗,共服 2 周。复方龙胆泻肝胶囊的基本药物组成:由龙胆、黄芩、栀子、泽泻、木通、车前子、当归、生地黄、柴胡、生甘草组成,具有清肝胆、利湿热之功效。药理研究表明具有抗炎、抗过敏、增强免疫功能、利尿、镇痛等多种药理作用。(2)标本采集:出现急性前葡萄膜炎症状后 2~6 天(平均 4.2 天),并且在近 2 周内都没有用任何眼药,没有服用激素或者免疫抑制剂药物患者,采集外周血 5.0ml,用 EDTA-K₂ 抗凝,其中 2.0ml 用于检测 HLA-B₂₇,3.0ml 以 3000r/min 离心留取血浆,置于-70℃ 保存,集中测定 4 种因子水平。急性发作患者在中西医结合治疗 3 周缓解后,采集静脉血,处理同上。(3)HLA-B₂₇ 检测:用 PCR 法,由温州医学院迪安医学检验中心完成。(4)IL-10、IL-23、TNF-α、INF-γ 浓度检测:采用双抗体夹心 ELISA 法,试剂购自北京北方伟业发展有限公司,由美国 R & D 公司生产。具体操作按照试剂盒说明书进行,每个样品做复孔,使用科华 ST-360 全自动酶标仪进行检测分析。IL-10、IL-23、TNF-α、INF-γ 的标准曲线最高浓度分别是 800、1000、1400、400pg/ml。(5)统计学处理:采用 SPSS 16.0 统计软件包对数据进行统计处理。各组间均数比较采用方差分析和 *q* 检验,各指标相关性分析采用线性回归方法。

结 果

1. 所有患者 HLA-B₂₇ 全部阳性,健康体检者有 1 例阳性。

2. HLA-B₂₇ 相关 AAU 患者外周血中发作期各指标分别是 IL-10 (461.3 ± 34.5pg/ml)、IL-23 (457.1 ± 35.6pg/ml)、TNF-α (228.8 ± 23.6pg/ml)、INF-γ (34.4 ± 2.8pg/ml) 经治疗后缓解期各指标均显著低于急性发作期 (*P* < 0.05),分别为 IL-10 (145.7 ± 29.8pg/ml)、IL-23 (123.1 ± 30.9pg/ml)、TNF-α (61.2 ± 20.1pg/ml)、INF-γ (12.0 ± 2.2pg/ml),缓解期与健康对照组比较无统计学差异 (*P* > 0.05),其中 INF-γ、IL-10、TNF-α 略高于健康对照组,IL-23 略低于健康对照组(表 1)。

表 1 葡萄膜炎患者外周血清中 IFN-γ、IL-10、IL-23、TNF-α 4 种因子测定结果比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	IFN-γ	IL-10	IL-23	TNF-α
健康对照	37	10.6 ± 1.9	125.7 ± 26.2	127.3 ± 26.2	43.0 ± 15.5
缓解期	38	12.0 ± 2.2*	145.7 ± 29.8*	123.1 ± 30.9*	61.2 ± 20.1*
急性期	41	34.4 ± 2.8 [▲]	461.3 ± 34.5 [▲]	457.1 ± 35.6 [▲]	228.8 ± 23.6 [▲]
<i>F</i>		30.6	32.8	24.8	25.2
<i>P</i>		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

经 *q* 检验后缓解期与发作期比较差异具有显著性,**P* < 0.01;健康对照与发作期比较差异具有显著性,[▲]*P* < 0.01

3. 各指标的相关性分析,4 种因子浓度均呈正相关。具体见图 1 ~ 图 4。

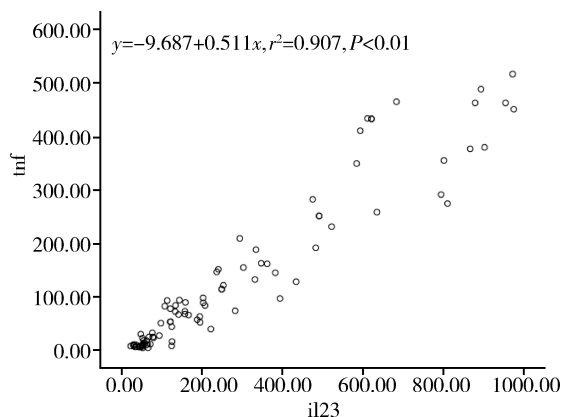


图 1 TNF- α 与 IL-23 的相关性分析

$$r^2 = 0.907, P < 0.01$$

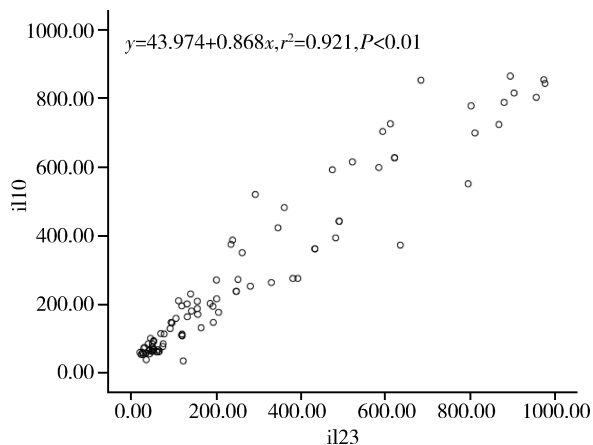


图 2 IL-10 与 IL-23 的相关性分析

$$r^2 = 0.921, P < 0.01$$

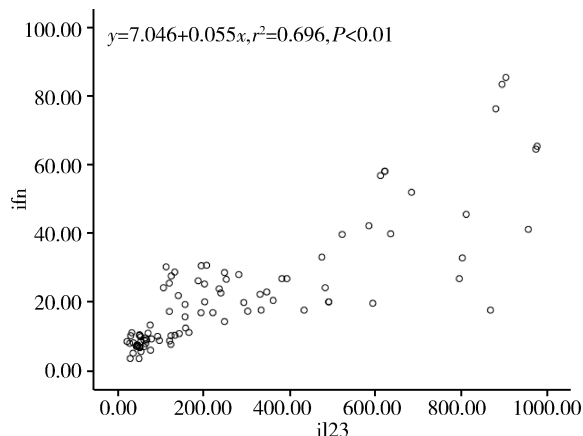


图 3 IFN- γ 与 IL-23 呈正相关

$$r^2 = 0.696, P < 0.01$$

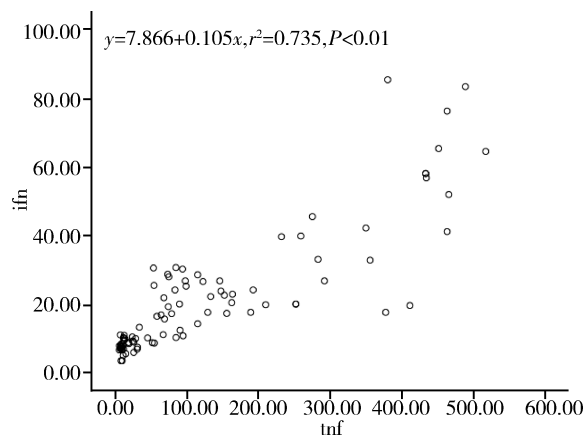


图 4 IFN- γ 与 TNF- α 呈正相关

$$r^2 = 0.735, P < 0.01$$

讨 论

动物实验表明,实验性自身免疫性葡萄膜炎(EAU)与 Th 的分化有密切关系,是一种 Th1 细胞亚群介导的自身免疫性疾病^[4]。现代药理研究表明,许多清热解毒活血化瘀的中药具有抗炎、改善血液循环及免疫调节功能,它们在防治急慢性炎症方面已显示出较好的疗效,也已经有人将这些中药用在葡萄膜炎患者身上取得了较理想的效果,且不良反应明显减弱,无不主诉,所以中药治疗葡萄膜炎的优势越来越突出。但是中药对葡萄膜炎治疗作用的机制研究大多处在动物实验阶段,临床应用研究较少,其中对葡萄膜炎患者体内 Th 细胞亚群的调节作用研究更是少之又少。本研究选取与 Th 细胞亚群的分化、功能激活及抑制相关的代表性细胞因子 4 种,观察 HLA-B₂₇ 相关 AAU 患者经中西医结合治疗后缓解并在 3 个月内无复发者外周血中上述指标的变化。

IFN- γ 、TNF- α 等由 Th1 细胞分泌,参与细胞免疫,其中最重要的细胞因子是 IFN- γ ,它可以活化 M Φ ,刺激吞噬活性增强,也可以抑制 Th2 细胞增殖^[4]。本研究结果显示,AAU 患者急性发作期 IFN- γ 、TNF- α 水平显著高于缓解期,说明 AAU 患者体内存在 Th1 的高度活化。同时高浓度的 IFN- γ 活化 M Φ ,刺激吞噬活性增强,而活化的 M Φ ,又可以分泌更多的 TNF- α ,导致机体细胞免疫水平进一步增强,病情加重,病程加长。经地塞米松和复方龙胆泻肝胶囊治疗后,两种因子水平均显著下降,机体细胞免疫水平得到抑制,趋向于免疫平衡。直到 3 个疗程结束后,患者体内 IFN- γ 、TNF- α 水平继续降低,但尚未恢复到正常水平,提示此类患者体内持续存在一定程度的 Th1 高活性状态,这可能也是 AAU 患者容易

复发的原因。另外在治疗过程中,患者病情好转后逐渐减少激素用量的同时维持复方龙胆泻肝胶囊的用量,仍能稳定病情,提示复方龙胆泻肝胶囊能调整机体的免疫状态,保持激素减量后病情稳定。另据文献报道,许多中药复方对机体的免疫功能具有双向调节功能,复方龙胆泻肝胶囊可能也存在双向调节功能,所以在缓解期患者体内,两种因子水平显著低于急性发作期又略高于正常对照,可能也有这方面因素的作用^[6]。

IL-10 等由 Th2 细胞分泌,参与体液免疫,可以促进中性粒细胞的活化和聚集。许多实验证据表明,IL-10 是介导 EAU 自然恢复的机制之一。体外研究发现,IL-10 能够完全抑制葡萄膜炎 Th1 细胞的功能^[6]。本实验结果表明,患者血清中 IL-10 水平显著升高,提示患者体内 Th2 已经被激活并分泌大量 IL-10,这可能与 IL-10 可抑制 Th1 细胞因子合成的功能有关,也可能与患者选择有一定的关系,因为本研究所选取的对象均为治疗后能缓解的患者。

近年来,我国葡萄膜炎专家在发病机制等方面的研究取得了不俗的成绩,其中在国际上首次发现的葡萄膜炎发生新通路——IL-23/IL-17 通路(通过 Th17 细胞介导完成),是对葡萄膜炎理论体系进一步完善^[7]。该理论体系认为,Th17 细胞在自身免疫性疾病发病中所起的作用比 Th1 细胞更为重要。有研究表明,人类 Th17 细胞的分化和增殖过程中需要 IL-23、TNF- α 等的参与^[9]。IL-23 主要由巨噬细胞(M Φ)和树突状细胞(DC)产生,不仅作用于已经分化的 Th17 细胞,维持该细胞的增殖,还可促进中晚期 Th1 细胞的进一步分化^[8,9]。因此,本研究将 IL-23 也作为一个重要的观察指标。研究结果显示,患者在急性期外周血中 IL-23 显著升高,缓解期有极大程度的下降,甚至略低于正常对照(但无统计学意义)。分析原因有:AAU 患者体内不仅存在 Th1 和 Th2 细胞的高度活化与平衡紊乱,还有 Th17 以及 M Φ 、DC 等免疫细胞的高度活化,即由活化的 Th1 分泌的 IFN- γ 等活化了 M Φ 等,导致 IL-23 和 TNF 等分泌增多,增多的 IL-23 不仅通过 Th17 细胞及其分泌的细胞因子发挥相关的免疫反应作用,还能通过诱导激活的 CD4⁺ 记忆 T 细胞产生更多的 IFN- γ 等细胞因子,如此恶性循环,使患者体内免疫平衡难以恢复,结果是病情持续、迁延。患者经糖皮质激素和复方龙胆泻肝胶囊治疗后,上述指标均明显下降,估计一方面由于糖皮质激素对 DC 具有明显的抑制作用,并能诱导巨噬细胞的凋亡,因而糖皮质激素能够使 DC 及

M Φ 分泌 IL-23 的量大大减低^[10];另一方面可能得益于复方龙胆泻肝胶囊更复杂的免疫调节作用。

将 TNF- α 、IL-10、IFN- γ 与 IL-23 进行相关性分析。查阅国内文献发现关于葡萄膜炎与 IL-23 的研究相对较少,与其他因子的相关性分析更少,因此将 TNF- α 、IL-10、IFN- γ 三项指标分别与 IL-23 进行相关分析,结果显示 TNF- α 、IL-10、IFN- γ 与 IL-23 均高度相关,说明急性前葡萄膜炎患者体内 Th1、Th2、Th17 等免疫细胞的活化程度密切相关,尤其是前两者,相关系数达到 0.9 以上,提示患者体内 Th1、Th17 细胞之间的关系更为密切。考虑到 IFN- γ 、TNF- α 主要由 Th1 细胞分泌,而以往认为葡萄膜炎主要是 Th1 细胞亚群介导的自身免疫性疾病,因此进一步将 IFN- γ 、TNF- α 进行相关性分析,结果提示 IFN- γ 、TNF- α 也成正相关。

总之,各种细胞因子在炎症反应中发挥各自的生物学活性,构成了错综复杂的网络,充当细胞、组织、内环境的信使,完成免疫炎症反应。在免疫性前葡萄膜炎患者中细胞因子网络的复杂性,也提醒临床医师在进行治疗时,需综合考虑,而不能只注重个别指标的变化。另一点值得注意的是,在炎症控制后,应尽可能减少激素使用量及维持时间,而通过选用合适的中药复方等治疗手段,可以调整机体免疫状态,降低复发率,同时减少激素治疗带来的不良反应。

参考文献

- 夏远春,曾明葵. 中医药对葡萄膜炎细胞因子作用的实验研究进展[J]. 中医药导报,2008,14(5):124-126
- 杨培增. 葡萄膜炎诊断与治疗[M]. 北京:北京人民卫生出版社,2009:386-396
- 杜红艳,杜鹏程. 人类白细胞抗原与急性前葡萄膜炎的相关性[J]. 国际眼科杂志,2009,9(1):87-88
- 王燕平,李晓玉,孙兵. Th1/Th2 极化:实验性自身免疫性葡萄膜炎[J]. 上海免疫学杂志,2001,21(6):382-384
- 唐勇华,韦丽娇,姜春晓. 西药结合中医辨证治疗急性前葡萄膜炎临床观察[J]. 广西中医药,2009,32(4):13-14
- 宋艳,詹宇坚,古继红. 葡萄膜炎与相关细胞因子的研究进展[J]. 中国中医眼科杂志,2004,14(3):180-182
- 杨培增. 我国葡萄膜炎研究进展及存在问题[J]. 眼科,2008,17(4):217-219
- 李媚,高翔,胡品津. IL-23 及其受体 IL-23R 与克罗恩病的关系[J]. 世界华人消化杂志,2008,16(4):392-398
- 赵萌,王红. 人类 Th17 细胞和自身免疫性疾病相关研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2009,25(10):963-964
- 李艳春,鲁继荣,李善玉,等. 激素治疗前后哮喘患儿血清白细胞介素 23 变化的观察[J]. 中华儿科杂志,2007,45(3):218-219

(收稿:2010-10-23)