

糖皮质激素对葡萄膜炎患者外周血 Th1 和 Th2 细胞因子的影响

郑曰忠 时冀川

Effects of corticosteroids on Th1/Th2 cytokines in peripheral blood mononuclear cells in the patients with uveitis

Zheng Yuezong, Shi Jichuan. Clinical Ophthalmic College of Tianjin Medical University, Tianjin Eye Hospital, Tianjin 300020, China

Abstract Objective The aim of present study was to investigate the effects of corticosteroids on Th1/Th2 cytokines level in cultured supernatant of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in the patients with uveitis. **Methods** The levels of Th1 cytokines (IFN- γ , IL-2) and Th2 cytokines (IL-4, IL-10) in PBMC supernatant of 65 cases with uveitis and 30 healthy subjects (control group) were detected by enzyme linked immunosorbent assay before and after treatment of corticosteroids. **Results** The levels of IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 in supernatants of PBMC as well as IFN- γ /IL-4 and IFN- γ /IL-10 ratios were significantly different among pre-, post-treatment and control groups ($F = 13.643 - 87.307, P = 0.000; F = 19.824/12.388, P = 0.000$). After treatment, the levels of IFN- γ and IL-2 were decreased significantly ($t = 16.937/21.211, P = 0.000$), but that of IL-10 was increased ($t = 4.213, P = 0.000$), and the IL-4 level was insignificantly changed ($t = 1.453, P = 0.151$) in comparison with before treatment. The difference in IFN- γ and IL-10 were significant in different types of uveitis ($F = 5.561/9.985, P = 0.00$). After treatment, the difference of IL-2, IL-4, IL-10 and IFN- γ /IL-10 ratio were significant ($F = 3.860 - 11.759, P < 0.05$), and the difference of the IFN- γ and the IFN- γ /IL-4 ratio were not significant among the different types of uveitis ($F = 0.037/0.324, P > 0.05$). No obvious difference in IL-4 level between anterior uveitis and Vogt-Koyanagi-Harada disease before and after treatment ($t = 0.338/1.291, P = 0.738/0.212$), and the difference in other cytokines were significant ($t = 2.162 - 18.280, P < 0.05$). There was insignificant difference in IL-4 and IL-10 between pre- and post-treatment in Behcet patients ($t = 0.717/1.385, P > 0.05$), but significant difference was found in other cytokines ($t = 4.528 - 11.298, P < 0.001$). IFN- γ and IL-2 or IL-4 and IL-10 level showed a positive correlation before and after treatment ($r = 0.68/0.55, r = 0.90/0.86, P = 0.000$). **Conclusion** The Th1 cytokines polarization plays an important role in acute uveitis. The balance of Th1/Th2 is participated in the pathogenesis of uveitis.

Key words uveitis; Th1/Th2 cytokine; corticosteroids

摘要 目的 探讨糖皮质激素治疗前后葡萄膜炎患者外周血单核细胞(PBMC)培养上清液 Th1/Th2 细胞因子的变化。**方法** 应用酶联免疫吸附试验检测治疗前后葡萄膜炎患者 PBMC 上清液干扰素(IFN- γ)、白介素(IL)-2、IL-4 和 IL-10 水平的变化,30 例健康人作为正常对照。**结果** 急性葡萄膜炎患者 PBMC 上清液 IFN- γ 、IL-2、IL-4 和 IL-10 水平与 IFN- γ /IL-4、IFN- γ /IL-10 比值明显高于恢复期患者和正常对照者($P = 0.000$)。糖皮质激素治疗后,IFN- γ 和 IL-2 水平、IFN- γ /IL-4 和 IFN- γ /IL-10 比值降低($P = 0.000$),IL-10 水平升高($P = 0.000$)。治疗前不同类型葡萄膜炎组仅 IFN- γ 和 IL-10 水平差异有统计学意义($P < 0.01$),治疗后 IL-2、IL-4、IL-10 和 IFN- γ /IL-10 比值差异有统计学意义($P < 0.05$)。治疗前后葡萄膜炎和 Vogt-小柳原田病患者除 IL-4 外,其余细胞因子及比值差异均有统计学意义($P < 0.05$);Behcet 病患者除 IL-4 和 IL-10 外,其余细胞因子及比值差异均有统计学意义($P < 0.01$)。治疗前后葡萄膜炎患者 IFN- γ 与 IL-2 水平间及 IL-4 与 IL-10 水平间呈正相关($P = 0.000$)。**结论** 急性葡萄膜炎患者 PBMC 中 Th1 细胞因子显著升高并占优势,表明 Th1/Th2 细胞因子不平衡性与葡萄膜炎的发病有关。

关键词 葡萄膜炎; Th1/Th2 细胞因子; 糖皮质激素

分类号 R 773.9 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)03-0234-04

细胞因子处于动态平衡状态。当这种平衡失调时,可导致细胞因子网络紊乱,从而影响细胞免疫和体液免疫功能^[1-4]。近年来研究发现 Th1/Th2 细胞因子的偏移与葡萄膜炎的发生发展有关^[1-3]。为进一步探讨 Th1/Th2 细胞因子在葡萄膜炎发生中的作用,我们应用酶联免疫吸附试验检测葡萄膜炎患者外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)培养上清液中 Th1/Th2 细胞因子水平,观察经糖皮质激素治疗后这两类细胞因子的变化情况。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2004 年 12 月~2008 年 1 月间在我院治疗的各种急性葡萄膜炎患者 65 例,诊断和分类标准参照国际葡萄膜炎研究组织分类标准^[5]。男 43 例,女 22 例;年龄 16~65 岁,平均(30.9±9.65)岁。其中急性前葡萄膜炎 31 例,Vogt-小柳原田病 20 例,Behcet 病 14 例。同期收集健康体检者 30 例做为正常对照,其中男 18 例,女 12 例;年龄 18~62 岁,平均(32.1±10.83)岁;所有对照者既往身体健康,近未服用过抗生素、糖皮质激素或其他免疫抑制剂。两组人群的性别和平均年龄比较差异均无统计学意义($\chi^2 = 0.338, t = 0.581, P > 0.05$)。急性前葡萄膜炎患者给以局部滴用糖皮质激素、非甾体抗炎剂和散瞳剂治疗,Vogt-小柳原田病和 Behcet 病全身给予糖皮质激素(1 mg/kg)治疗,依据病情减量。

1.2 方法

分别在葡萄膜炎患者急性发作期(首诊时)和治疗 1~2 个月后(恢复期)抽取肘静脉血 5 mL,置于肝素抗凝管中,常规分离 PBMC,Hanks 液洗 3 次,用含 10%

小牛血清的 1640 培养液调整细胞密度为 2×10^6 /mL,加植物血凝素诱导细胞增生,置 5% CO₂ 孵箱中 37 °C 培养 48 h,收集上清液置于 -20 °C 保存待测。应用双抗体夹心法酶联免疫吸附试验检测上清液中干扰素(interferon, IFN)- γ 、白细胞介素(interleukins, IL)-2、IL-4 和 IL-10。试剂盒购自美国 RD 公司,按照说明书进行操作,根据标准品绘制标准曲线,依据标准曲线计算出各细胞因子的质量浓度。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计学软件对数据进行统计学分析。受试者 PBMC 上清液中各细胞因子的质量浓度以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组细胞因子水平的总体比较采用单因素方差分析,组间的两两比较采用 SNK-*q* 检验。各细胞因子水平间的相关关系应用 Pearson 相关分析法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组人群 PBMC 上清液中细胞因子水平

急性期葡萄膜炎患者 PBMC 上清液中 IFN- γ 、IL-2、IL-4 和 IL-10 水平均明显高于治疗后恢复期患者和正常对照者($F = 13.643 \sim 87.307, P = 0.000$); IFN- γ /IL-4 和 IFN- γ /IL-10 比值也明显高于恢复期患者和正常对照者($F = 19.824/12.388, P = 0.000$)。经糖皮质激素治疗后,IFN- γ 和 IL-2 水平较治疗前明显降低($q = 16.937/21.211, P = 0.000$),IL-10 水平上升($q = 4.213, P = 0.000$),IL-4 水平无明显变化($q = 1.453, P = 0.151$)。IFN- γ /IL-4 和 IFN- γ /IL-10 比值较急性期下降($q = 5.504/4.314, P = 0.000$),与对照组比较差异无统计学意义($q = 1.746/1.046, P = 0.084/0.298$)(表 1)。

表 1 葡萄膜炎患者和正常对照组人群细胞因子水平及比值($\bar{x} \pm s, \text{ng/L}$)
Table 1 The serum cytokines level and ratio between the uveitis patients and controls($\bar{x} \pm s, \text{ng/L}$)

Group	n	IFN- γ	IL-2	IL-4	IL-10	IFN- γ /IL-4	IFN- γ /IL-10
Pre-treatment	65	108.5 ± 35.8	88.3 ± 18.2	59.4 ± 17.9	49.1 ± 22.7	2.05 ± 1.18	2.93 ± 2.46
Post-treatment	65	70.8 ± 24.0 ^e	54.9 ± 16.7 ^e	62.2 ± 18.4	55.7 ± 22.1 ^e	1.19 ± 0.44 ^e	1.51 ± 1.01 ^e
Control	30	49.8 ± 18.4 ^f	45.7 ± 16.8 ^f	39.0 ± 18.5	31.3 ± 14.6 ^f	1.34 ± 0.21 ^f	1.71 ± 0.41 ^f
F		51.540	87.307	17.731	13.643	19.824	12.388
P		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

^e $P < 0.01$ vs respective pre-treatment value, ^f $P < 0.01$ vs respective post-treatment value(One-way ANOVA, SNK-*q* test)

2.2 不同类型葡萄膜炎患者治疗前后细胞因子分析

比较不同类型葡萄膜炎患者的细胞因子及比值,发现治疗前不同类型葡萄膜炎患者的 IFN- γ 和 IL-10

水平差异有统计学意义($F = 5.561/9.985, P = 0.006/0.000$),其余细胞因子及比值差异无统计学意义($F = 0.543 \sim 3.078, P > 0.05$)。治疗后不同类型葡萄

膜炎患者的 IL-2、IL-4、IL-10 和 IFN- γ /IL-10 比值差异有统计学意义 ($F = 3.860 \sim 11.759, P < 0.05$), IFN- γ 和 IFN- γ /IL-4 比值差异无统计学意义 ($F = 0.037/0.324, P > 0.05$) (表 2)。前葡萄膜炎患者和 Vogt-小柳原田病患者在治疗前后 IL-4 差异无统计学意义

($q = 0.338/1.291, P = 0.738/0.212$), 其余细胞因子及比值差异均有统计学意义 ($q = 2.162 \sim 18.280, P < 0.05$); Behcet 病患者 IL-4 和 IL-10 差异无统计学意义 ($q = 0.717/1.385, P > 0.05$), 其余细胞因子及比值差异均有统计学意义 ($t = 4.528 \sim 11.298, P = 0.000$)。

表 2 不同类型葡萄膜炎患者治疗前后细胞因子水平 ($\bar{x} \pm s, \text{ng/L}$)
Table 2 The serum cytokine level and ratio between the different types of uveitis patients ($\bar{x} \pm s, \text{ng/L}$)

Cytokine	Anterior uveitis		VKH		Behcet's disease	
	Pre-treated	Post-treated	Pre-treated	Post-treated	Pre-treated	Post-treated
IFN- γ	94.2 \pm 34.30	68.7 \pm 25.50 ^b	124.5 \pm 37.50	71.0 \pm 25.50 ^b	117.1 \pm 24.30	75.0 \pm 19.10 ^c
IL-2	87.7 \pm 17.60	48.1 \pm 11.70 ^b	91.5 \pm 19.00	62.5 \pm 20.50 ^b	85.0 \pm 19.10	59.3 \pm 14.90 ^c
IL-4	55.2 \pm 19.10	55.8 \pm 18.40	63.0 \pm 15.90	68.5 \pm 17.30	63.6 \pm 16.90	67.1 \pm 16.40
IL-10	37.7 \pm 22.50	43.9 \pm 19.90 ^b	56.5 \pm 17.90	64.0 \pm 17.60 ^b	63.1 \pm 16.00	70.0 \pm 19.20
IFN- γ /IL-4	2.04 \pm 1.50	1.30 \pm 0.56 ^b	2.10 \pm 0.86	1.04 \pm 0.28 ^b	1.99 \pm 0.75	1.14 \pm 0.23 ^c
IFN- γ /IL-10	3.69 \pm 3.27	1.92 \pm 1.29 ^b	2.43 \pm 1.15	1.15 \pm 0.50 ^b	1.99 \pm 0.75	1.11 \pm 0.32 ^c

^b $P < 0.05, ^c P < 0.01$ vs respective pre-treated value (ANOVA, SNK- q test)

VKH; Vogt-Koyanagi-Harada disease

2.3 各种细胞因子相关性分析

治疗前后葡萄膜炎患者 IFN- γ 与 IL-2 水平呈正相关 ($r = 0.68/0.55, P = 0.000$), IL-4 与 IL-10 水平呈正相关 ($r = 0.90/0.86, P = 0.000$)。未发现治疗前后葡萄膜炎患者的视力变化与各细胞因子之间的相关性 (图 1)。

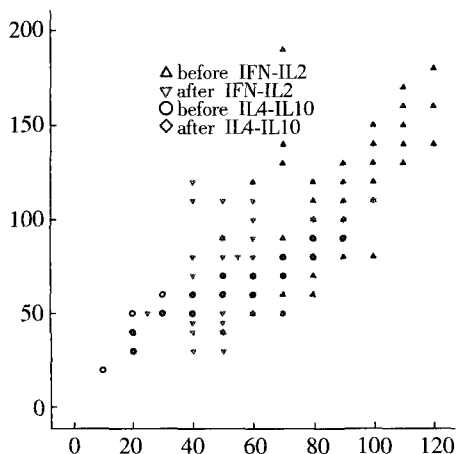


图 1 治疗前后葡萄膜炎患者血清细胞因子相关关系散点图

Fig. 1 The scatter plots of serum cytokines between the uveitis patients before and after treatment

3 讨论

葡萄膜炎是自身免疫性炎性疾病, 病因和发病机制尚不清楚, 研究表明, Th 细胞在其发病中具有重要作用。Th1 细胞主要分泌 IL-2、IFN- γ 、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- α 和 IL-12, 谓之 Th1 类细胞因子, 主要介导细胞免疫和迟发型超敏反应, 与器官

特异性自身免疫病、慢性迁延性炎症和急性排斥反应有关。Th2 细胞分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 和 IL-13, 谓之 Th2 类细胞因子, 具有促进抗体产生, 参与体液免疫反应和 I 型超敏反应^[1-4]。正常情况下, Th1 和 Th2 细胞分泌的细胞因子之间处于动态平衡状态, Th1 或 Th2 的偏移或极化可导致细胞因子紊乱, 从而影响细胞免疫和体液免疫功能。研究揭示 Th1/Th2 的偏移与葡萄膜炎的发生、发展和转归有关, 其中以 Th1 细胞因子占优势, Th2 细胞出现于炎症恢复期, 可能与葡萄膜炎的恢复有关^[6-7]。Ilhan 等^[8]发现急性期 Behcet 病患者外周血 Th1 细胞数目 (CD26⁺) 明显高于非活动期患者和正常对照者, 而 Th2 细胞 (CD30⁺) 则与正常对照者差异无统计学意义, 表明 Behcet 病的发生与 Th1 反应优势有关。Murphy 等^[9]发现中间葡萄膜炎患者外周血中表达 TNF- α 的 CD69⁺ T 细胞明显升高, PBMC 上清液中 IL-2/IL-5 和 IFN- γ /IL-5 比值明显升高, 表明 Th1/Th2 偏移与中间葡萄膜炎的发病有关。Ooi 等^[10]发现急性葡萄膜炎患者房水中 IFN- γ 明显升高, IL-5 下降; 经糖皮质激素治疗后 IL-10 升高。本文研究显示, 急性期患者 IFN- γ 和 IL-2 水平显著高于恢复期患者和正常对照者, Th1/Th2 比值升高, 表明葡萄膜炎患者外周血 Th1/Th2 淋巴细胞失衡并向 Th1 方向漂移, 经糖皮质激素治疗后 Th1/Th2 比值接近正常水平。

检测葡萄膜炎患者外周血 PBMC 上清液中 Th1/Th2 细胞因子水平的变化不仅有助于认识葡萄膜炎发生的免疫学机制, 而且可通过人为地调整 Th1/Th2 平

衡设计相应的治疗方案。糖皮质激素和一些免疫抑制剂可抑制 IL-12 和 IFN- γ 的分泌,促进 IL-4、IL-10 的分泌,使 Th1/Th2 平衡偏向 Th2 应答;IL-10 也可抑制 IL-12 和 IFN- γ 的产生。应用拮抗 IL-2、TNF- α 、IFN- γ 的制剂或应用 IL-10、IL-4 细胞因子,可缓解炎症反应^[11]。Tamer 等^[12]应用环孢素、抗 TNF 抗体和 IL-10 联合治疗实验性葡萄膜炎,结果治疗组大鼠玻璃体内 IL-1 和 TNF 明显下降。Frassanito 等^[13]发现急性葡萄膜炎患者中表达 IFN- γ 的 T 细胞比例可达 41.5%,经糖皮质激素联合环孢素治疗 6 个月后 T 细胞数量明显下降(19.7%),血清 IL-12 水平也随之明显下降。Ahn 等^[14]发现急性 Behcet 病患者外周血中产生 IFN- γ 的 CD56⁺ T 细胞明显增多,血清 IFN- γ 升高,经糖皮质激素联合环孢素治疗后,CD56⁺ T 细胞明显下降,IL-4 和 IL-10 明显升高。Plskova 等^[15]发现葡萄膜炎患者经 IFN- α 治疗后,表达 T 细胞活化的 CD62L 下降,表达 IL-10 的 T 细胞增加。本研究结果显示,葡萄膜炎患者 PBMC 中 IFN- γ 和 IL-2 水平明显下降,IL-4 和 IL-10 水平较治疗前上升;表明糖皮质激素可抑制 Th1 细胞因子的分泌,促进炎症恢复。

由于缺乏特异性 Th1/Th2 细胞表面标志物,长期以来一直是通过测定细胞因子来间接评价 Th1/Th2 细胞的平衡性。由于细胞因子的相互作用,影响因素较多,仅从细胞因子水平分析 Th1/Th2 的功能有一定局限性。如果从单个细胞水平测定 Th1 或 Th2 细胞因子的细胞数目及其比值,可精确反映体内 Th1/Th2 平衡性,这类检查方法较为繁杂,仪器较昂贵,如流式细胞仪或荧光激活细胞分类器。因此我们通过测定 PBMC 培养上清液中各种细胞因子水平,以此来评价葡萄膜炎患者治疗前后的 Th1/Th2 细胞平衡状态。

综上所述,急性葡萄膜炎患者 PBMC 培养上清液中 Th1 细胞因子明显升高,Th1/Th2 比值升高。应用糖皮质激素等药物治疗后 Th1 细胞因子下降,Th1/Th2 比值降低,提示 Th1/Th2 细胞因子的不平衡性与

葡萄膜炎的发病有关。

参考文献

- 1 Imai Y, Ohno S. Helper T cell subsets in uveitis [J]. *Int Ophthalmol Clin*, 2002, 42: 25 - 32
- 2 Vallochi AL, Commodaro AG, Schwartzman JG, et al. The role of cytokines in the regulation of ocular autoimmune inflammation [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2007, 18: 135 - 141
- 3 Crane IJ, Forrester JV. Th1 and Th2 lymphocytes in autoimmune disease [J]. *Crit Rev Immunol*, 2005, 25: 75 - 102
- 4 徐晓芳, 吕嘉华. 对自身免疫性葡萄膜炎大鼠调节性 T 淋巴细胞变化的观察 [J]. *眼科研究*, 2008, 26: 841 - 844
- 5 Jabs DA, Nussenblatt RB, Rosenbaum JT. Standardization of uveitis nomenclature for reporting clinical data [J]. *Am J Ophthalmol*, 2005, 140: 509 - 516
- 6 Ahn JK, Yu HG, Chung H, et al. Intraocular cytokine environment in active Behcet uveitis [J]. *Am J Ophthalmol*, 2006, 142: 429 - 434
- 7 Trinh L, Brignole-Baudouin F, Pauly A, et al. Th1 and Th2-related chemokine and chemokine receptor expression on the ocular surface in endotoxin-induced uveitis [J]. *Mol Vis*, 2008, 14: 2428 - 2434
- 8 Ilhan F, Demir T, Turkuoglu P, et al. Th1 polarization of the immune response in uveitis in Behcet disease [J]. *Canada J Ophthalmol*, 2008, 43: 105 - 108
- 9 Murphy CC, Duncan L, Forrester JV, et al. Systemic CD4⁺ T cell phenotype and activation status in intermediate uveitis [J]. *Br J Ophthalmol*, 2004, 88: 412 - 416
- 10 Ooi KG, Galatowicz G, Towler HMA, et al. Multiplex cytokine detection versus ELISA for aqueous humor: IL-5, IL-10, and IFN profiles in uveitis [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47: 272 - 277
- 11 Imrie FR, Dick AD. Biologics in the treatment of uveitis [J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 2007, 18: 481 - 486
- 12 Tamer D, Ahmet G, Mehmet B, et al. The effect of infliximab, cyclosporine A and recombinant IL-10 on vitreous cytokine levels in experimental autoimmune uveitis [J]. *Indian J Ophthalmol*, 2006, 54: 241 - 245
- 13 Frassanito MA, Dammacco R, Fusaro T, et al. Combined cyclosporin-A/prednisone therapy of patients with active uveitis suppresses IFN production and the function of dendritic cells [J]. *Clin Exp Immunol*, 2003, 133: 233 - 239
- 14 Ahn JK, Seo JM, Yu J, et al. Down-regulation of IFN-producing CD56⁺ T cells after combined low-dose cyclosporine/prednisone treatment in patients with Behcet uveitis [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46: 2458 - 2464
- 15 Plskova J, Greiner K, Muckersie E, et al. Interferon- α : a key factor in autoimmune disease [J]? *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47: 3946 - 3950

(收稿:2008-06-23 修回:2008-12-26)

(本文编辑:尹卫靖)

· 临床经验 ·

自制泪道探针探通治疗新生儿泪囊炎的疗效观察

杜 诚 朱志忠

新生儿泪囊炎多数由先天性鼻泪管阻塞引起,可表现为慢性或急性炎症,患儿在出生后不久即可出现持续性泪溢和限分泌物增多,压迫泪囊区可见从下或上泪小点溢出黏液脓性分泌

作者单位:314001 嘉兴市中医医院眼科(杜诚);200437 上海和平眼科医院(朱志忠)

通讯作者:杜诚(Email: zjjxducheng@163.com)