

大鼠泪液缺乏型干眼症眼表组织中 IL-6 和 TNF- α 的表达

李 森, 张 林

作者单位: (710061) 中国陕西省西安市, 西安交通大学第一附属医院眼科

作者简介: 李森, 女, 在读硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 角膜病。

通讯作者: 张林, 副主任, 副主任医师, 硕士研究生导师, 副教授, 研究方向: 角膜病. Linzhanga@hotmail. com

收稿日期: 2010-05-12 修回日期: 2010-06-07

IL-6 and TNF- α expression in the ocular surface of aqueous tear deficiency dry eye-type rat

Miao Li, Lin Zhang

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Lin Zhang, Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. Linzhanga@hotmail. com

Received: 2010-05-12 Accepted: 2010-06-07

Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of inflammatory cytokines interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor α (TNF- α) in aqueous tear deficiency dry eye disease in rat.

• **METHODS:** Forty-eight SD rats were randomly divided into experimental group and control group. In experimental group, lacrimal gland was removed for dry eye model, but the rats were without treatment in the control group. One day before the experiment and after 1 week, 2, 4 weeks tear secretion respectively after the experiment, tear film break-up time and corneal staining was done under a microscope camera crack. After 4 weeks, the rats died of spinal cord transaction. IL-6, TNF- α in the conjunctive and corneal tissues was detected by immunohistochemistry.

• **RESULTS:** Wet filter paper length of Schirmer I and tear film break-up time were shorter in the experimental group than that in the normal group ($P < 0.01$), IL-6, TNF- α expression was more strongly expressed in the experimental group than in the control group. The difference was statistically significant ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** Cytokines plays an important role in the pathogenesis and inflammation of aqueous tear deficiency dry eye.

• **KEYWORDS:** dry eye syndrom; aqueous tear deficiency;

interleukin-6; tumor necrosis factor

Li M, Zhang L. IL-6 and TNF- α expression in the ocular surface of aqueous tear deficiency dry eye-type rat. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2010; 10(7): 1281-1283

摘要

目的: 探讨白介素 6 (interleukin-6, IL-6) 和肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor α , TNF- α) 在泪液缺乏型干眼症发病机制中的作用。

方法: SD 大鼠 48 只随机分成实验组和对照组两组, 实验组通过摘除泪腺的方法制作干眼模型, 对照组不做处理, 分别于实验前 1d 及实验后 1, 2, 4wk 检测泪液的分泌、泪膜破裂时间及观察角膜荧光素染色, 术后 4wk 将动物脊髓离断致死, 用免疫组织化学方法检测结膜及角膜组织中 IL-6 和 TNF- α 的表达。

结果: 实验组大鼠 Schirmer I 滤纸湿长较正常组缩短 ($P < 0.01$), 泪膜破裂时间较正常组缩短 ($P < 0.01$); IL-6 和 TNF- α 在两组均有表达, 在实验组表达较强, 对照组表达较弱, 两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

结论: IL-6 和 TNF- α 在泪液缺乏型干眼的发病机制中起着重要的作用, 泪液缺乏型干眼的发病机制与炎症有关。

关键词: 干眼症; 泪液缺乏型; 白介素 6; 肿瘤坏死因子

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.07.013

李森, 张林. 大鼠泪液缺乏型干眼症眼表组织中 IL-6 和 TNF- α 的表达. 国际眼科杂志 2010; 10(7): 1281-1283

0 引言

干眼症 (dry eye syndrom, DES) 又称角结膜干燥症 (keratoconjunctivitis sicca, KCS) 为任何原因所致泪液质和量及动力学的异常, 从而导致泪膜不稳定和/或眼表面的异常, 并伴有眼部不适, 引起眼表病变为特征的多种病症的总称^[1,3]。临床表现主要有眼干涩感、异物感、烧灼感、眼红、眼痒、畏光、视疲劳、视力模糊及视力波动等。干眼症是目前最为常见的眼表疾病之一, 病因繁多, 病理过程复杂。随着社会信息化的发展, 电脑的普及应用及社会人口的老龄化, 干眼症的发病率有逐年上升的趋势。据文献报道在过去的几年中干眼症成倍地增加。所以干眼症已成为一个不容忽视的公共卫生问题, 受到越来越多的关注。研究发现, 机制尚无定论。关于细胞因子与干眼的关系是干眼症研究的一个热点之一。研究发现, 在干燥性角结膜炎患者的结膜和泪液中炎症因子的表达明显增高。

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年 SD 大鼠 55 只, 体质量 180 ~ 200g, 雌

雄各半,购自西安交通大学医学院实验动物中心,饲养条件:清洁、通风、温度:14℃~24℃,湿度60%~77%,混合饲料喂养。实验前裂隙灯检查外眼无病变48只纳入实验,随机分为2组,每组24只,第1组摘除主泪腺,第2组为对照组,不做处理。

1.2 方法 100g/L水合氯醛3mL/kg ip全身麻醉,剪除左眼颞侧及耳后长毛,暴露皮面,消毒铺巾,左耳下方约1cm处沿皮纹做横行切口1.0cm,暴露皮下见一微黄色圆形腺体(眶外泪腺),分离周边包膜将其完整摘除,生理盐水冲洗局部,4-0丝线皮针间断缝合皮肤切口。左眼外侧1cm处做纵行切口1cm,暴露皮下见一白色质硬膜,切开见下方一三角形腺体(眶内泪腺),将其完整摘除。生理盐水冲洗,4-0丝线皮针间断缝合,切口局部碘伏消毒,表面涂红霉素眼膏预防感染。手术前1d和术后1,2,4wk分别在裂隙灯下观察并记录大鼠眼表形态、行泪液分泌量(Schirmer I test, S I t)、泪膜破裂时间(break-up time, BUT)、角膜上皮荧光素染色检测。4wk后将大鼠脊髓离断处死取左眼角膜和结膜组织,行眼表组织病理学检查,免疫组化方法检测角膜和结膜组织中的IL-6和TNF-α的表达。

1.2.1 Schirmer 试验 检查前将Schirmer试验用滤纸修剪成2.5mm×35mm大小,将滤纸一端折弯5mm,置于下睑内侧1/3结膜囊内,其余部分悬垂于皮肤表面,闭眼,5min后测量滤纸被润湿的长度(不包括反折)。

1.2.2 泪膜破裂时间测定 在下睑结膜囊内涂抹20g/L荧光素钠,使眼睑闭合荧光素均匀分布于角膜表面,固定其上下睑使角膜充分暴露,从最后一次瞬目开始计时,通过裂隙灯钴蓝光观察,记录泪膜上出现的第1个破裂点的时间,取3次观察的时间平均值并记录。

1.2.3 荧光素染色 玻璃棒蘸荧光素涂抹于下睑结膜,荧光素可渗透至细胞间隙,裂隙灯下观察,染色阳性提示角膜上皮细胞层的完整性破坏。角膜荧光素钠染色评分标准参照文献将角膜分为4个象限,染色程度分为0~3级,规定无染色为0分,有染色分为轻、中、重3级,1分为染色<5个点,3分为出现块状染色或丝状物,2分介于两者之间,共分为0~12分(表1)。

1.2.4 病理学检查 取结膜及角膜标本于40g/L甲醛中固定,各级酒精脱水,石蜡包埋,切片,予常规HE染色,光学显微镜检查。

1.2.5 IL-6和TNF-α的表达 取大鼠角膜和结膜组织,40g/L多聚甲醛固定常规石蜡包埋,切片5μm,常规脱蜡至水。30mL/L过氧化氢室温孵育10~15min(消除内源性过氧化物酶的活性)。蒸馏水洗3次,抗原修复水煮法98℃~99℃20min。用10g/L BSA(小牛血清白蛋白)封闭,室温10~15min,倾去血清。滴加一抗,4℃过夜,PBS冲洗5min,3遍。滴加生物素标记的二抗,37℃60min。PBS冲洗5min,3遍。滴加SP复合物,37℃30~40min。PBS冲洗5min,3遍。PBS 4mL,10mL/L盐酸酒精分化,脱水、透明、封固。镜下观察结果,阳性部位为棕黄色。每次染色均同步设阴性和阳性对照(阳性对照为乳癌组织;阴性对照采用PBS代替一抗)。

统计学分析:数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本均数比较用t检验,采用SPSS 13.0软件进行数据的统计学分析,以P<0.05为差异有统计学意义。

表1 干眼的评分标准

	S I t 试验(mm/5min)	BUT(s)	荧光染色(分)
正常	≥10	≥10	0
轻度异常	7~9	7~9	1~4
中度异常	4~6	4~6	5~8
重度异常	0~3	0~3	9~12

表2 大鼠摘除主泪腺前后各项指标的变化

	$\bar{x} \pm s$			
	术前	术后1wk	术后2wk	术后4wk
S I t 试验(mm/5min)	15.3±2.5	11.9±4.0	7.6±2.7 ^b	3.6±1.2 ^b
BUT(s)	15.7±2.2	13.4±1.3	7.4±1.0 ^b	6.9±2.2 ^b
荧光素染色(分)	0	2.7±1.5 ^b	4.4±1.6 ^b	6.5±1.8 ^b

^bP<0.01 vs术前。

2 结果

2.1 眼表及指标的变化 摘除主泪腺1wk后,大鼠睑缘轻度红肿,结膜轻度充血,4wk后大鼠泪河浅,泪液量少,角膜外观干燥无光泽,或溃疡形成。术后S I t试验试纸湿长呈下降趋势,术后2wk与术前的比较有显著性差异;荧光素染色自术后2wk开始较术前积分明显升高(P<0.01),至术后4wk更为明显稳定(表2),说明干眼模型制作成功。

2.2 病理学检查 角膜浅层鳞状上皮层增生,细胞弥漫性肿胀,排列较紊乱,可见表层细胞缺失,形态不规则,形状扁平,细胞核小而扁平,基质层增生变厚,细胞成分增多,细胞核小而染色深,一些表层及浅表上皮细胞不规则、卷曲样剥脱,深层上皮细胞结构不清,可见上皮浅层溃疡形成以及炎症细胞浸润。

2.3 IL-6和TNF-α的表达 阳性反应物呈棕黄色,主要表达于胞质。在实验组角膜每1000个细胞阳性表达数IL-6为258±21,TNF-α为279±24;结膜每1000个细胞阳性表达数IL-6为360±15,TNF-α为260±15。对照组大鼠角膜和结膜中可见部分IL-6和TNF-α阳性表达于胞质,角膜每1000个细胞阳性表达数IL-6为79±25,TNF-α为55.18±29;结膜每1000个细胞阳性表达数IL-6为83±26,TNF-α为64±36。实验组与对照组进行比较角膜结膜上皮中IL-6,TNF-α表达明显增加,经统计学分析差异有统计学意义(P<0.05)。

3 讨论

多数细胞活化后,可产生多种多样的参与炎症、免疫、细胞生长、凋亡、分化和创伤修复的低分子量蛋白,这些蛋白被称为细胞因子。在干眼症发病机制中起到重要作用的细胞因子中,TNF-α和IL-6的作用显得尤为突出,它们同属细胞因子网络中的核心成员,IL-6是一种调节炎症反应的细胞因子,是B细胞和T细胞功能的重要调节因子,可刺激造血细胞的生长和分化。但IL-6并不单独发挥作用,常与IL-1和TNF发生交互性协同作用,在SS,唾液和血清中IL-6含量增高。TNF-α主要由巨噬细胞产生,具有广泛的生物活性,可以改变多重靶细胞的功能,TNF-α是细胞黏附和趋化的主要介质,主要负责炎症期间细胞迁移的调控,免疫病理结果显示干眼患者结膜上皮多种炎性细胞因子增高,而IL-6是最有价值的,TNF-α为IL-6的强诱导剂。我们通过单纯摘除大鼠主泪腺,得到稳定的大鼠干眼模型,推测可能与炎症因子对副泪腺、结

膜杯状细胞及睑板腺的浸润,影响其正常分泌有关。在干眼的构成比中,水液缺乏型干眼所占比例较高,张梅等^[4]报道 115 例干眼患者的临床特点,水液缺乏型干眼占 48.7%,蒸发过强型干眼占 34.8%,混合型干眼占 3.9%。在以往的实验中,关于蒸发过强型干眼与细胞因子的研究较多,而泪液生成不足型干眼研究相对较少。基于此,我们以摘除大鼠主泪腺制造泪液缺乏型干眼模型,模拟泪液缺乏型干眼的特点,并在此基础上对摘除主泪腺大鼠泪液分泌,泪膜稳定性及眼表组织病理学进行观察,检测了干眼大鼠角结膜组织中的 IL-6 和 TNF- α ,发现在泪液缺乏型干眼动物模型的角结膜组织中 IL-6 和 TNF- α 在对照组较实验组显著增高,经统计学处理有显著性差异,推测由泪腺摘除引起的水液缺乏型干眼不单纯由泪液的分泌异常引起,也与这两种细胞因子的增加及免疫反应介导的炎症有关。但是由于本实验的局限性对两种因子在干眼病

损过程中是如何发挥作用未进行深入的研究,因此,进一步研究如何对细胞因子的分泌进行有效的调控对水液缺乏型干眼的预防、治疗及防止复发具有重要的意义^[5]。

参考文献

- 1 Susi B, Luana P, Patrizia C, et al. Development of a simple dry eye model in the albino rabbit and evaluation of some tear substitutes. *Ophthalmic Res* 1999;31(2):229-235
- 2 Tishler M, Yaron I, Shirazi I, et al. Increased salivary interleukin-6 levels in patients with Sjogren syndrome. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 2004;108:125-127
- 3 Pflugfelder SC. Antiinflammatory therapy for dry eye. *Am J Ophthalmol* 2004;137:337-342
- 4 张梅,陈家祺,刘祖国,等.干眼患者 115 例的临床特点分析. *中华眼科杂志* 2003;39(1):5-9
- 5 李凤鸣. *眼科全书*. 北京:人民卫生出版社 1996:211

· 病例报告 ·

旁中心凹毛细血管扩张 1 例

李金颖

作者单位:(157000)中国黑龙江省牡丹江市,牡丹江医学院附属红旗医院门诊眼病中心

作者简介:李金颖,女,硕士,副主任医师,副教授。

通讯作者:李金颖, lijying@sogou.com

收稿日期:2010-03-10 修回日期:2010-04-26

李金颖.旁中心凹毛细血管扩张 1 例. *国际眼科杂志* 2010;10(7):1283

1 病例报告

患者,男,39岁,因左眼视物模糊 3mo 于 2008-08 来我院就诊。既往史:无糖尿病、高血压。血压、肝、肾功能、血脂、空腹血糖、血常规及尿常规均正常。眼科检查:右眼 1.0,左眼 0.5(不能矫正),眼压右 18mmHg,左 19mmHg(1mmHg=0.133kPa),双眼前节正常,玻璃体无混浊,右眼底未见异常,左眼黄斑中心凹光反射无,中心凹颞侧视网膜增厚,并见数个出血点及微血管瘤,双眼余视网膜及血管未见异常。左眼视网膜荧光血管造影(FFA)显示:视网膜动、静脉充盈时间正常,早期黄斑拱环颞侧视网膜毛细血管扩张,并出现 7~8 个高荧光点,随时间延长扩大增强,晚期中心凹颞侧荧光渗漏面积达 1PD 大小,拱环颞侧结构破坏。光学相干断层扫描(optical coherence tomography, OCT)显示:未见脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)。诊断:左眼特发性旁中心凹毛细血管扩张(1型)。告之患者定期复查 FFA, OCT。

2 讨论

旁中心凹毛细血管扩张(idiopathic parafoveal telan-

giectasis)是一种视网膜血管疾病,特征性地表现为 1 眼或双眼中心凹毛细血管功能不全。继发性于糖尿病、视网膜静脉阻塞的旁中心凹毛细血管扩张临床上常见。而特发性旁中心凹毛细血管扩张则无全身病或眼底的其他表现,临床少见,根据临床征象分 3 种类型,1 型为单眼旁中心凹毛细血管扩张,30% 合并糖耐量异常;2 型为双眼旁中心凹毛细血管扩张,60% 合并糖耐量异常;3 型为双眼闭塞中心凹毛细血管扩张或合并中枢神经系统闭塞性血管炎^[1]。典型眼底表现:黄斑中心凹光反射迟钝,以中心凹颞侧视网膜增厚为显著特征;眼底 FFA 显示有黄斑拱环颞侧毛细血管扩张及渗漏,部分拱环破坏。本病例符合上述特点,无其他引起视网膜微血管瘤的眼底病及全身病,故诊断特发性旁中心凹毛细血管扩张 1 型。此病病因不明,国内曾有报道此病脉络膜血管造影显示病变区脉络膜毛细血管灌注不良,中、大血管过度充盈。推测这种情况的出现可能是脉络膜局部炎症后毛细血管闭塞或某种因素(如吸烟)导致黄斑区脉络膜小血管痉挛所致。黄斑区视网膜的营养在很大程度上依赖于脉络膜的毛细血管,脉络膜血循环灌注不良,造成周围视网膜慢性缺血、缺氧,诱发视网膜毛细血管代偿性扩张及微血管瘤形成^[2]。此病患者首次就诊视力通常轻度降低,数年后发生 CNV 可能性是 5%,因此如果视力突然丧失,应考虑 CNV 的可能,热激光凝对旁中心凹毛细血管扩张无效,但对 CNV 可能有用,所以本病例未予激光治疗,告之定期随诊。

参考文献

- 1 Allen C, Ho Gary C, Brown J, et al. Color Atlas & Synopsis of Clinical Ophthalmology Wills Eye Hospital. *McGraw-Hill Companies* 2003:110-111
- 2 杨红,汪周陵,王志涛.双眼特发性黄斑旁中心凹毛细血管扩张症视网膜脉络膜血管造影. *国际眼科杂志* 2006;6(1):242-244