

· 临床 ·

肿瘤坏死因子与葡萄膜炎发病相关性的探讨

罗毅

(武汉市普爱医院眼科, 武汉 430000)

[摘要] 目的:探讨肿瘤坏死因子- (TNF-) 与葡萄膜炎发病的相关性。方法:采用多聚酶链反应技术检测 60 例葡萄膜炎及 60 例正常人外周血 TNF- 水平及其基因多态性。结果:观察组外周血中 TNF- 水平明显高于对照组 ($P < 0.05$); 观察组经 PCR 扩增后可见特异性 TNF- 扩增产物, TNF- 基因目的片段大小为 117 b; 对照组未见特异性 TNF- 扩增产物; 经 PCR/RFLP 分析发现两组 TNF- 基因有 3 种酶切格局, 即 TNF-308A/A 纯合子的标本不发生酶切、TNFct-308G/G 纯合子发生完全酶切; TNF-308G/A 杂合子产生部分酶切; 两组基因型频率从高到低依次为 G/G 型、G/A 型、A/A 型, 但两组比较具有明显差异 ($P < 0.05$)。结论:肿瘤坏死因子 TNF- 与葡萄膜炎的发病具有显著的相关性。

[关键词] 葡萄膜炎; 肿瘤坏死因子- ; 相关性

[中图分类号] R285.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)17-0211-03

Correlation between Tumor Necrosis Factor- and Uveitis

LUO Yi

(Ophthalmology Department, Puai Hospital, Wuhan 430000, China)

[Abstract] Objective: To investigate the correlation between tumor necrosis factor- (TNF-) and t uveitis. **Method:** The polymerase chain reaction was employed to detect 60 cases of uveitis, peripheral blood TNF- level and gene polymorphism were also determined. **Result:** TNF- in peripheral blood was significantly higher ($P < 0.05$) in observation group. After PCR amplification, TNF- gene fragment of the size of 117b was found; The control group no specific amplification products. PCR/RFLP analysis showed that Group 2 TNF- gene had three kinds of restriction patterns, i. e. TNF-308A/A homozygous without digestion, TNFct-308G/G homozygotes with completed digestion and TNF-308G/A heterozygote produces with partial digestion. Had genotype frequencies from the high to the generation were in the order of G/G type, G/A-type, A/A type. But the two groups had significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion:** TNF- and the incidence of uveitis are correlated.

[Key words] uveitis; TNF- ; correlation

葡萄膜炎(uveitis)是眼科临床常见病。据统计在我国其患病率占眼病的 5.7% ~8.2%, 至盲率达 1.1% ~9.2%, 因此葡萄膜炎的诊治在防盲治盲中占有重要地位^[1]。其发病与遗传、感染、免疫异常等相关^[2]。研究肿瘤坏死因子- (TNF-) 对某些疾病的遗传易感性及免疫调控有重要意义。笔者利用聚

合酶链反应(PCR)技术对 TNF- 与葡萄膜炎发病的相关性进行了研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料 观察组 60 例均为 2007 年 1 月至 2009 年 12 月在我院门诊或住院患者, 其中男 33 例, 女 27 例; 年龄 27 ~62 岁, 平均(41.7 ±3.6) 岁, 病程 1 ~12 个月, 平均(7.5 ±0.4) 个月; 临床分类: 前葡萄膜炎 17 例, 中间葡萄膜炎 23 例, 后葡萄膜炎 15 例, 全葡萄膜炎 5 例。患者均表现为不同程度地畏光、眼红、眼痛、流泪, 视朦检查可见不同程度睫状充

[收稿日期] 2010-09-21

[通讯作者] 罗毅, 主治医师, 主要研究方向: 眼科, Tel: 13036125700, E-mail: luoyiqqmm126.com

血、尘状、晶状体表面色素沉着、前房积脓、纤维蛋白渗出、玻璃体混浊、瞳孔缩小等。同时以同期在我院行健康体检正常者 60 例为对照组,其中男 32 例,女 28 例,年龄 25 ~66 岁,平均(40.5 ±3.7) 岁,均未见有其他自身免疫性疾病。两组研究对象性别、年龄等相比差异无统计学意义,具有可比性。

1.2 病例入选标准

1.2.1 纳入标准 观察组患者均符合《葡萄膜炎诊断与治疗》^[1] 中葡萄膜炎的诊断标准; 饮食结构相似; 各研究对象之间无血缘关系。

1.2.2 排除标准 排除严重营养不良、肝肾功能不全、甲状腺疾病、糖尿病、接受器官移植、癌症等疾病者; 排除合并有其他免疫性疾病者。

1.3 方法

1.3.1 检测血清 TNF- α 水平 于患者首次就诊时抽取空腹外周静脉血 2.0 mL, 分离血清后低温保存测定血中 TNF- α 水平。

1.3.2 DNA 提取 清晨空腹抽取外周静脉血 1.0 mL, 用 2% 的乙二胺四乙酸抗凝, 然后裂解红细胞, 白细胞沉淀用 500 μ L PCR bufer, 加蛋白醇 K_3 (10 mg \cdot μ L⁻¹), 55 $^{\circ}$ C 水浴加热 1 h, 然后在 96 $^{\circ}$ C 水浴加热 10 min 后灭活, 取 3 μ L 作为 PCR 模板。

1.3.3 检测 TNF- α 基因 PCR 体系总体积 30 μ L, 其中包括 Dntp 3 μ L, DNA 模板 5 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 2 mmol \cdot L⁻¹ 4 μ L, Taq DNA 聚合酶 2.5 U, 上、下游引物各 0.2 μ mol \cdot L⁻¹。反应条件: 先在 94 $^{\circ}$ C 水浴中预变性 10 min, 然后依次于 94 $^{\circ}$ C, 60 $^{\circ}$ C, 72 $^{\circ}$ C 水浴中加热 30 s, 30 s, 45 s, 如此共循环 30 次, 再于 72 $^{\circ}$ C 水浴中延伸 5 min。最后检测是否有特异性的扩增产物, 采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳法。

1.3.4 RFLP 分析 取 PCR 产物 25 μ L, 依次加入 1 μ L 10 U NcoI 内切酶, 3 μ L 10 \times 酶切缓冲液, 并加入双蒸馏水使总体积达 30 μ L, 再在 37 $^{\circ}$ C 下酶切 12 h 后取出酶切产物 30 μ L, 负极端加样孔中再加入 1.5% 琼脂糖凝胶, 并以溴化乙锭(EB) 为染色剂进行染色, 然后再电泳 30 min, 最后在紫外灯(波长 300 nm) 下观察带型情况。

1.4 统计学方法 采用 SPSS13.0 统计学软件, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, 计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血 TNF- α 水平比较 观察组和对照组外

周血中分别为(34.81 ±1.95), (9.38 ±1.03) ng \cdot L⁻¹, 观察组明显高于对照组($P < 0.05$)。

2.2 特异性 TNF- α 扩增产物检测 观察组经 PCR 扩增后可见特异性 TNF- α 扩增产物, TNF- α 基因目的片段大小为 117b; 对照组未见特异性 TNF- α 扩增产物。

2.3 RFLP 分析结果 经 PCR/RFLP 分析发现两组 TNF- α 基因有 3 种酶切格局, 即 TNF- α -308A/A 纯合子的标本不发生酶切、TNF- α -308G/G 纯合子发生完全酶切; TNF- α -308G/A 杂合子产生部分酶切。

2.4 两组 TNF- α 基因型频率与等位基因频率的分布情况 两组基因型频率从高到低依次为 G/G 型、G/A 型、A/A 型, 两组比较具有明显差异($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 两组 TNF- α 基因型频率与等位基因频率的分布情况 ($n = 60$)

组别	TNF 基因型频率				
	G/G	G/A	A/A	G	A
观察	38 (63.33) ¹⁾	17 (28.33) ¹⁾	5 (8.33)	0.848 5	0.151 5
对照	49 (81.67)	8 (13.33)	3 (5.00)	0.878 6	0.121 4

注: 与对照组比¹⁾ $P < 0.05$ 。

3 讨论

葡萄膜炎是常见眼病, 也是主要致盲眼病之一, TNF- α 可参与到各类葡萄膜炎的发病过程中^[3]。有学者认为, 易感试验性自身免疫性葡萄膜视网膜炎(EAU) 的发生与是否能合成 TNF- α 密切相关^[4]; 在给免疫动物皮下注射 TNF- α 后, 不仅可使 EAU 的发病率明显增加, 而且可使 EAU 的病情明显加重^[5]。还有学者发现在 EAU 动物模型的疾病高峰期外周血中 TNF- α 水平急剧上升, 在缓解期 TNF- α 水平下降, 这说明 TNF- α 与 EAU 模型的眼内炎症发生发展具有一定的相关性^[6]。动物试验表明, 在 EAU 模型大鼠的诱导期注射抗 TNF 血清, 可使眼内炎症明显减轻, 但在效应期则无此作用^[7]。动物试验证明 TNF- α 在内毒素诱导的 EIU 的病理形成过程中具有重要作用^[8]。国外学者发现在葡萄膜炎患者的血清和房水中 TNF- α 水平显著高于正常对照组, 这与本研究的结果一致。此外研究发现葡萄膜炎复发时常伴有血清 TNF- α 水平升高^[9]。TNF 基因与 HLA 位于同一区域, 位于 6 号染色体 MHC 区内的 7kb 区, TNF 与免疫调节和免疫炎症有关, 近来发现 TNF 具有遗传多态性, TNF 的基因定位于 MHC 类基因座

位内,它的第一内含子中含有单碱基点突变造成的基因多态性^[10]。由于转录起始位点下游第-308 位点的鸟嘌呤核苷酸 G 被腺嘌呤核苷酸 A 替代,使限制性内切酶 NcoI 的识别序列发生变化,致使被腺嘌呤核苷酸 A 所替代的序列不能被 NcoI 识别并切断鸟嘌呤核苷酸 G 存在的基因称为 TNF-308。由于 TNF 的重要生物学作用及其基因的特殊位置, TNF 的基因多态性与疾病的关系受到普遍的重视。目前已有不同人群 TNF- 基因型别与葡萄膜炎关联的报道,但因各家研究的对象存在种族、葡萄膜炎表型定义等方面的差异,其结果也不尽相同^[5]。本研究表明,葡萄膜组与对照组对比, TNF- 各基因型频率均有显著性差异($P < 0.05$)。

综上所述, TNF- 与葡萄膜炎的发病具有显著的相关性。

[参考文献]

- [1] 样倍增. 葡萄膜炎诊断与治疗[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 48.
- [2] 原莉莉, 郑日忠. 抗肿瘤坏死因子制剂与葡萄膜炎[J]. 国外医学·眼科学分册, 2005, 29(2), 93.
- [3] 周红颜, 杨培增, 黄祥坤, 等. HLA-B27 抗原与前葡萄膜炎的相关性及其临床意义[J]. 眼科研究, 2000, 18(3): 196.
- [4] E1-Shabrawi Y, Wegscheider B J, Weger M, et al. Polymorphisms within the tumor necrosis factor- α promoter region in patients with HLA-B27-associated uveitis: association with susceptibility and clinical manifestations[J]. Ophthalmology, 2006, 113(4): 695.
- [5] Spagnol P, Sato H, Marshall S E, et al. Association between heat shock protein 70/Hom genetic polymorphisms and uveitis in patients with sarcoidosis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(7): 3019.
- [6] Mizuk N, Meguro A, Tohrai I, et al. Association of major histocompatibility complex class I chain-related gene A and HLA-B alleles with Behcets disease in Turkey[J]. Jpn J Ophthalmol, 2007, 51(6): 431.
- [7] 陈蕾, 柳力敏. 大鼠试验性自身免疫性葡萄膜视网膜炎模型[J]. 中国免疫学杂志, 2002, 18(9): 643.
- [8] 沈降, 孙慧敏, 田恩江. 抗肿瘤坏死因子——治疗葡萄膜炎的研究现状[J]. 国外医学·眼科学分册, 2005, 29(2): 96.
- [9] 肖哲夫, 夏远春, 曾明葵. 抑阳酒连散对急性葡萄膜炎模型大鼠房水及外周血 TNF- 的影响[J]. 中医药导报, 2009, 15(3): 69.
- [10] 刘相东, 孙善会, 肖东杰, 等. 白细胞介素-1 受体拮抗剂基因型 2/2 与白塞病葡萄膜炎易感性的相关研究[J]. 山东大学学报, 2007, 45(5): 467.

[责任编辑 何伟]