

## 翼状胬肉中 IL-6、TNF-α 基因的表达

石凡军<sup>1</sup> 张胜权<sup>2</sup> 孙功勋<sup>1</sup> 张 雷<sup>1</sup>

(1. 芜湖市眼科医院 眼科,安徽 芜湖 241000; 2. 安徽医科大学 生物化学教研室,安徽 合肥 230001)

**【摘要】**目的: 探讨翼状胬肉中 IL-6、TNF-α 基因表达与正常球结膜组织的差异。方法: 收集手术中切除的翼状胬肉及正常球结膜组织。Trizol 法提取组织总 RNA, 逆转录出 cDNA, PCR 扩增 IL-6、TNF-α 及管家基因 β-Actin, PCR 扩增产物经电泳及图像分析比较这两个基因的表达差异。同时制备组织匀浆蛋白定量标准化后, ELISA 法测定组织中两个细胞因子的水平。结果: RT-PCR 对 22 例正常球结膜组织及 28 例翼状胬肉的结果经琼脂糖电泳及 Image-pro Express 软件分析, 结果显示翼状胬肉组织中的 IL-6、TNF-α mRNA 表达水平显著高于正常球结膜组织( $P < 0.01$ )。ELISA 分析结果经蛋白含量校正后的结果表明翼状胬肉组织中的 IL-6、TNF-α 蛋白质表达水平显著高于正常球结膜组织( $P < 0.01$ )。结论: 翼状胬肉 IL-6、TNF-α 基因表达较正常球结膜组织显著增加。IL-6、TNF-α 可能是翼状胬肉发病的重要环节之一。

**【关键词】**白细胞介素 6; 肿瘤坏死因子 α; 翼状胬肉

**【中图分类号】**R 779.6 **【文献标识码】**A

**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2015.04.005

## IL-6 and TNF-α gene expression in pterygium

SHI Fanjun ZHANG Shengquan SUN Gongxun ZHANG Lei

Department of Ophthalmology, Wuhu Ophthalmologic Hospital, Wuhu 241000, China

**【Abstract】Objective:** To investigate the expression variation of the interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF-α) in pterygium and normal ocular conjunctiva. **Methods:** The surgically removed pterygium and normal ocular conjunctiva were obtained, and total RNA was extracted by Trizol reagent. After reverse transcription of cDNA and amplification of IL-6 and TNF-α as well as housekeeping genes beta-actin with polymerase chain reaction (PCR), the PCR products were subjected to electrophoretic analysis on the difference of the two genes. ELISA was performed to determine the messenger ribonucleic acid (mRNA) expression and protein secretion. **Results:** The mRNA expression and protein secretion of IL-6 and TNF-α were significantly increased in pterygium as compared with the tissues from normal ocular conjunctiva ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Significantly up-regulated expression of IL-6 and TNF-α were found in pterygium, suggesting that the two cytokines may be one of the vital roles in pathogenesis of this disorder.

**【Key words】** interleukin-6; tumor necrosis factor; pterygium

翼状胬肉是一种常见眼病,其发病机理历来有许多争论。近年来,随着免疫遗传学、免疫组织化学、电镜及单克隆抗体技术的迅速发展,人们对此病的认识不断提高。目前很多学者认为翼状胬肉的发生与免疫因素有关<sup>[1]</sup>。

TNF-α 由细菌脂多糖活化的单核-巨噬细胞产生,可引起肿瘤组织出血坏死,也称恶病质素。TNF-α 的毒性较大,易引起血管阻塞。IL-6 和 TNF-α 是一组重要的细胞因子,并且同属细胞因子网络中的核心成员<sup>[2]</sup>。病理学研究表明,翼状胬肉组织

中有大量的新生血管、纤维母细胞和弹性纤维及胶原纤维增生,并可见大量的淋巴细胞、浆细胞浸润和肥大细胞反应<sup>[3-4]</sup>,这些研究都表明在翼状胬肉发病机理中免疫因素的存在。

本研究主要从 IL-6、TNF-α 等细胞因子入手,RT-PCR 方法分析翼状胬肉组织细胞 mRNA 水平,采用 ELISA 等方法分析 IL-6、TNF-α 的蛋白质水平表达含量,以此推断炎症因子在翼状胬肉中发挥的致病作用,探讨这些炎性细胞因子在翼状胬肉疾病中发挥的生物学活性和致病作用。

收稿日期: 2014-11-28

作者简介: 石凡军(1984-),男,住院医师,硕士。(电话) 18119888051 (电子信箱) stone4491@163.com;

张 雷,男,副主任医师。(电子信箱) whsyky@163.com 通讯作者。

1 材料与方法

1.1 材料 眼科手术中切除的 28 例患者翼状胬肉组织及 22 例正常球结膜组织,迅速置液氮中保存。正常球结膜组织取自于同一患者手术眼下方。

1.2 方法

1.2.1 组织总 RNA 提取 称取 5 mg 组织,加入 1 mL TRIZOL 试剂,匀浆器匀浆,10 000 g 离心 10 min,取上清液。按 TRIZOL 说明书提取总 RNA。

1.2.2 cDNA 第一链合成 总 RNA 经紫外比色定量后,取 1 μg RNA,按逆转录试剂盒操作说明合成 cDNA 第一链。

1.2.3 PCR 扩增 IL-6、TNF-α 及 β-actin 根据 GeneBank 提供的基因序列,使用 Primer Express 软件设计特异性 PCR 引物: TNF-α 上游: 5'-CAGAGG-GAAGAGTTCCTCCAG-3', 下游: 5'-CCTTGGTCTGG-TAGGAGACG-3', 产物长度 325 bp; IL-6 上游: 5'-CACCGGAACGAAAGAGAAG-3', 下游: 5'-TCT-GAGGTGCCCATGCTACAT-3', 产物长度 710 bp; β-Actin 上游引物: 5'-GTTGCGTTACACCCTTCTTGA-CA-3', 下游引物: 5'-GGCTGCCTCCACCCACTCC-3', 产物长度 525 bp。PCR 扩增体系是分别加入 5 μL cDNA 模板、10 × 缓冲体系 2.5 μL, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.5 μL, 2 mmol/L dNTP 2.5 μL, 上游引物 1.0 μL, 下游引物 1.0 μL, DNA 聚合酶 1.0 μL, 去离子水补至 20 μL。充分混匀,置 PCR 仪上扩增。

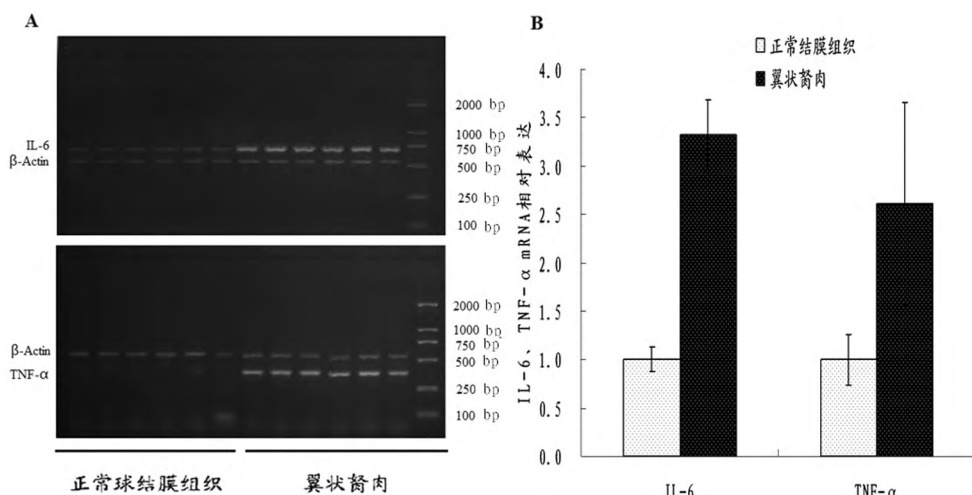
PCR 扩增条件是: 预变性 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 52℃ 1 min, 72℃ 1 min, TNF-α 32 个循环, IL-6 30 个循环及 β-actin 28 个循环; 最后 72℃ 10 min。扩增结束后琼脂糖电泳拍照分析。

1.2.4 ELISA 分析胬肉中 IL-6、TNF-α 含量 取约 5 mg 组织加入组织裂解液,匀浆器匀浆,10 000 g 离心 10 min。BCA 法蛋白定量后调整各样本蛋白质浓度一致。ELISA 试剂盒分析 IL-6、TNF-α 含量,具体按试剂盒说明书操作。

1.2.5 统计分析 各组数值均采用  $\bar{x} \pm s$  描述, SPSS 10.0 统计软件作相应统计分析。两组之间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 分析 IL-6、TNF-α mRNA 表达 通过 RT-PCR 对 22 例正常球结膜组织及 28 例翼状胬肉组织经琼脂糖电泳分析,结果显示翼状胬肉组织中的 IL-6、TNF-α mRNA 表达水平显著高于正常球结膜组织(图 1A, 部分样本的电泳结果)。进一步的 Express 软件分析数据经统计学分析表明翼状胬肉组织中的 IL-6 表达水平显著高于正常球结膜组织 (*P* < 0.001 *t* = 28.69, 见表 1 及图 1B); 翼状胬肉组织中的 TNF-α mRNA 表达水平显著高于正常球结膜组织 (*P* < 0.001 *t* = 7.00, 见表 1 及图 1B)。



A: 部分样本 PCR 产物的电泳结果; B: mRNA 相对表达结果的图像分析结果(正常 *n* = 22, 对照 *n* = 28, *P* < 0.01)

图 1 IL-6 及 TNF-α RT-PCR 分析结果

2.2 ELISA 分析 IL-6、TNF-α 蛋白质表达 ELISA 分析结果经蛋白含量校正后的结果如图 2 及表 2。经统计学分析表明翼状胬肉组织中的 IL-6 蛋白质表达水平显著高于正常球结膜组织 (*P* < 0.001 *t* =

8.16); 翼状胬肉组织中的 TNF-α 蛋白质表达水平显著高于正常球结膜组织 (*P* < 0.001 *t* = 7.67)。

表1 IL-6、TNF-α mRNA 的相对表达量

组织类型	mRNA 相对表达量( $\bar{x} \pm s$ )	
	IL-6/ $\beta$ -actin	TNF- $\alpha$ / $\beta$ -actin
正常结膜组织 (n = 22)	1.00 $\pm$ 0.13	1.00 $\pm$ 0.26
翼状胬肉组织 (n = 28)	3.33 $\pm$ 0.36	2.61 $\pm$ 1.05

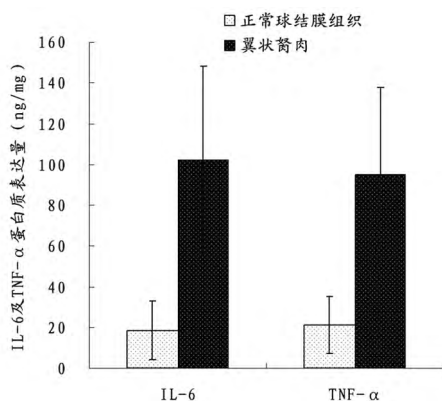


图2 IL-6 及 TNF-α 的 ELISA 分析

表2 IL-6 及 TNF-α 蛋白质表达量(ng/mg 蛋白)

组织类型	蛋白质表达量( $\bar{x} \pm s$ )	
	IL-6/ $\beta$ -actin	TNF- $\alpha$ / $\beta$ -actin
正常结膜组织 (n = 22)	18.38 $\pm$ 14.49	21.24 $\pm$ 14.20
翼状胬肉组织 (n = 28)	102.37 $\pm$ 45.82	94.85 $\pm$ 43.18

### 3 讨论

翼状胬肉是一种常见眼病,其发病机理历来有许多争论。目前很多学者认为翼状胬肉的发生与免疫因素有关。研究发现在翼状胬肉组织中有肥大细胞及 IgG、IgE 存在<sup>[3-4]</sup>。Hill 等发现在胬肉组织中存在淋巴细胞,提示IV型变态反应也可能参与其中。细胞因子作为重要的炎症因子在翼状胬肉发病中的地位日益受到人们的关注<sup>[3-4]</sup>。TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-15、IL-18 是一组来源于淋巴细胞、单核巨噬细胞的细胞因子,它们不仅一起构成炎性介质,而且还可以

促进纤维母细胞的增殖<sup>[5]</sup>。而翼状胬肉的主要成分为大量增生的成纤维细胞,并由其导致相应的病变<sup>[5]</sup>。我们的研究发现胬肉组织中的 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达显著高于正常球结膜组织,进一步证实了这两个炎症因子在翼状胬肉组织中表达失控,而这两个炎症因子均有直接或间接的诱导炎症细胞浸润及促进细胞增殖等作用,提示这两个炎症因子在翼状胬肉的发病中可能发挥重要的作用。本研究的结果与近年来国内程钰<sup>[6]</sup>及张俊华<sup>[7]</sup>的研究结果相符,并得到了王宏等<sup>[8]</sup>研究结果的支持。

我们的研究仅仅对这两个细胞因子在翼状胬肉的表达进行了分析,还需要进一步对这两个炎症因子在翼状胬肉中的来源、翼状胬肉组织中细胞增殖及诱导炎症细胞浸润的机制等进行深入探讨。

### 【参考文献】

- [1] Todani A, Melki S. Pterygium: current concepts in pathogenesis and treatment [J]. Int Ophthalmol Clin 2009; 49 (1): 21-30.
- [2] Taylor P, Feldmann M. Anti-TNF biologic agents: still the therapy of choice for rheumatoid arthritis [J]. Nat Rev Rheumatol 2009; 5 (10): 578-582.
- [3] Garg P. Pathogenesis of pterygium: role of Eph receptors and ligand ephrins [J]. Can J Ophthalmol 2009; 44 (2): 138-140.
- [4] Detorakis E T, Zaravinos A, Spandidos D A. Growth factor expression in ophthalmic pterygia and normal conjunctiva [J]. Int J Mol Med 2010; 25 (4): 513-516.
- [5] Chui J, Di Girolamo N, Wakefield D et al. The pathogenesis of pterygium: current concepts and their therapeutic implications [J]. Ocul Surf 2008; 6 (1): 24-43.
- [6] 程钰, 高伟, 朱海峰. 复发型翼状胬肉 IL-6 与 TNF- $\alpha$  的表达研究 [J]. 延安大学学报: 医学科学版 2012; 10 (2): 1-3.
- [7] 张俊华, 张国安, 金威尔, 等. 翼状胬肉 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的异常分泌及其意义 [J]. 眼科新进展 1999; 19 (1): 15-17.
- [8] 王宏, 张月梅, 黎小军, 等. 自体角膜缘干细胞及羊膜对翼状胬肉 TNF- $\alpha$ 、IL-6 表达的影响 [J]. 中国中医眼科杂志 2009; 19 (1): 9-11.