

· 实验研究 ·

腺苷激酶小干扰 RNA 修饰的角膜内皮细胞诱导调节性 T 细胞的增生和分泌

张万红¹ 焦惠英¹ 阮燕飞¹ 刘元真²¹天津市泰达医院眼科 300457; ²南阳市中心医院眼科 473000

通信作者:张万红, Email: yanbowang12@126.com

【摘要】 目的 探讨腺苷激酶(ADK)小干扰 RNA(siRNA)修饰的角膜内皮细胞诱导调节性 T 细胞(Treg)增生和分泌的作用。方法 取第 3~5 代人角膜内皮细胞,实验分为转染组和未转染组,转染组采用 Lipofectamine[®] 3000 将 FAM-ADK siRNA 转染进入角膜内皮细胞,采用高效液相色谱法检测各组中腺苷的质量浓度。实验分为对照组[转染对照 siRNA]、雷帕霉素组(转染对照 siRNA 后培养液中加入 10 ng/ml 雷帕霉素)和 ADK siRNA 组(转染 ADK siRNA 后培养液中加入 10 ng/ml 雷帕霉素),采用 TUNEL 染色检测细胞凋亡比例;采用流式细胞术检测内皮细胞表面细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)和 E-选择素的表达。实验分为单独培养组(单纯淋巴细胞培养)、共培养组(淋巴细胞与角膜内皮细胞共培养)和 ADK siRNA 组(淋巴细胞与 ADK siRNA 转染的角膜内皮细胞共培养),流式细胞术检测各组 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞的比例;ELISA 法检测各组上清液中白细胞介素-10(IL-10)和转化生长因子-β(TGF-β)的质量浓度。结果 流式细胞术检测结果显示,95.1%的角膜内皮细胞表达 siRNA,转染组上清液中腺苷的质量浓度为(38.020±6.658)ng/ml,较对照组的(1.663±0.581)ng/ml 明显升高,差异有统计学意义($t=5.437, P=0.006$)。TUNEL 染色结果显示,雷帕霉素组角膜内皮细胞平均凋亡率较对照组明显升高,ADK siRNA 组角膜内皮细胞平均凋亡率较雷帕霉素组明显降低,差异均有统计学意义($t=3.763, P=0.020; t=4.405, P=0.012$)。流式细胞术检测结果显示,ADK siRNA 组 ICAM-1、VCAM-1 和 E-选择素的平均荧光强度分别为 4.060±1.179、3.600±1.234 和 5.223±1.734,明显弱于对照组的 11.600±2.427、11.030±2.291 和 24.270±4.332,差异均有统计学意义($t=2.794, P=0.049; t=2.857, P=0.046; t=4.081, P=0.015$)。单独培养组、共培养组和 ADK siRNA 组淋巴细胞中 Treg 细胞比例总体比较,差异有统计学意义($F=12.890, P=0.007$),其中 ADK siRNA 组淋巴细胞中 Treg 细胞的比例较共培养组明显升高,差异有统计学意义($t=3.650, P=0.022$)。ELISA 检测结果显示,单独培养组、共培养组和 ADK siRNA 组淋巴细胞上清液中 IL-10 和 TGF-β 的质量浓度总体比较,差异均有统计学意义($F=20.960, P=0.003; F=27.320, P=0.001$),其中 ADK siRNA 组淋巴细胞上清液中 IL-10 和 TGF-β 的质量浓度均较共培养组明显升高,差异均有统计学意义($t=4.492, P=0.011; t=5.280, P=0.006$)。结论 ADK siRNA 修饰的角膜内皮细胞能够诱导 Treg 细胞增生及分泌 IL-10 和 TGF-β,为角膜移植的免疫耐受诱导提供了新的选择。

【关键词】 腺苷激酶;角膜移植;内皮细胞;调节性 T 细胞

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.05.004

Effect of adenosine kinase small interfering RNA modified corneal endothelial cells on the proliferation and secretion of regulatory T cellsZhang Wanhong¹, Jiao Huiying¹, Ruan Yanfei¹, Liu Yuanzhen²¹Department of Ophthalmology, Tianjing Taida Hospital, Tianjing 300457, China; ²Department of Ophthalmology, Nanyang City Center Hospital, Nanyang 473000, China

Corresponding author: Zhang Wanhong, Email: yanbowang12@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the role of adenosine kinase (ADK) small interfering RNA (siRNA) modified corneal endothelial cells on the proliferation and secretion of regulatory T cells (Treg cells). **Methods** The experiment was divided into transfected group and non-transfected group, FAM-ADK siRNA was transfected into corneal endothelial cells with Lipofectamine 3000 in transfected group, and the average mass concentration of adenosine was detected by high performance liquid chromatography in both groups. The experiment was divided into control group (transfected with control siRNA), rapamycin group (added 10 ng/ml rapamycin to culture supernatant after transfected with control siRNA) and ADK siRNA group (added 10 ng/ml rapamycin to culture supernatant after transfected with ADK siRNA). TUNEL staining was used to detect the proportion of apoptosis. Flow cytometry was used to detect the expressions of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and E-selectin in corneal endothelial cells. The cells were divided into single cultured group (lymphocytes were cultured separately), co-culture group (lymphocytes were co-cultured with corneal endothelial cells) and ADK siRNA group (lymphocytes were co-cultured with ADK siRNA transfected corneal endothelial cells), and the proportion of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg cells was detected by flow cytometry, and the content of interleukin-10 (IL-10) and transforming growth factor-β (TGF-β) in the supernatant was detected by ELISA in the three groups.

The access and use of clinical specimens was approved by Ethic Committee of Tianjing Taida Hospital (TD201705140901). **Results** Flow cytometry showed that 95.1% of the endothelial cells expressed siRNA. The average mass concentration of adenosine in the supernatant of the transfection group was significantly higher than that in the control group ($[38.020 \pm 6.658]$ ng/ml vs. $[1.663 \pm 0.581]$ ng/ml) ($t = 5.437, P = 0.006$). TUNEL staining showed that the average apoptotic cell proportion of corneal endothelial cells in the rapamycin group was significantly higher than that in the control group, and the average apoptotic cell proportion of corneal endothelial cells in the ADK siRNA group was significantly lower than that in the rapamycin group, with significant differences between them ($t = 3.763, P = 0.020; t = 4.405, P = 0.012$). Flow cytometry showed that the average fluorescence intensities of ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in the ADK siRNA group was weaker than that in the control group (4.060 ± 1.179 vs. $11.600 \pm 2.427, 3.600 \pm 1.234$ vs. $11.030 \pm 2.291, 5.223 \pm 1.734$ vs. 24.270 ± 4.332), with significant differences between them ($t = 2.794, P = 0.049; t = 2.857, P = 0.046; t = 4.081, P = 0.015$). The proportions of Treg cells in the single cultured group, co-culture group and ADK siRNA group was significantly different ($F = 12.890, P = 0.007$), and the proportion of Treg cells in the ADK siRNA group was significantly lower than that in the co-culture group ($t = 3.650, P = 0.022$). ELISA assay showed that, the contents of IL-10 and TGF- β in the supernatant in the single cultured group, co-culture group and ADK siRNA group were significantly different ($F = 20.960, P = 0.003; F = 27.320, P = 0.001$), and the content of IL-10 and TGF- β in the supernatant in the ADK siRNA group was significantly higher than that in the co-culture group, respectively ($t = 4.492, P = 0.011; t = 5.280, P = 0.006$).

Conclusions ADK siRNA modified corneal endothelial cells can induce Treg cells to proliferate and secrete IL-10 and TGF- β , which provides a new method for induction of corneal allograft immune tolerance.

[Key words] Adenosine kinase; Corneal transplantation; Endothelial cells; Regulatory T cells
DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.05.004

角膜移植是角膜盲患者复明的主要手段,免疫排斥反应和血管新生是引起角膜移植失败的主要原因。目前临床上多采用糖皮质激素或者免疫抑制剂诱导移植角膜的免疫耐受,具有较好的治疗效果^[1]。然而这些免疫抑制剂会不同程度地损伤移植角膜的内皮细胞,长期使用还容易引起感染^[2]。因此寻找新的诱导免疫耐受的方法对于角膜移植具有十分重要的意义^[3]。研究表明,腺苷能够诱导局部组织的免疫耐受,并在缺血-再灌注损伤中发挥着保护移植器官的作用^[4-5]。然而,腺苷在体半衰期极短,如何长时间维持腺苷的释放至关重要。腺苷激酶(adenosine kinase, ADK)是控制细胞中腺苷浓度的一种关键酶,抑制 ADK 能保护组织和细胞抵御外界损伤,此外 ADK 抑制的细胞还能持续释放腺苷进入局部组织^[6]。本研究中将 ADK 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 转染进入角膜内皮细胞,并进一步研究其诱导免疫耐受的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人角膜内皮细胞(美国 ATCC 公司);胎牛血清、RPMI1640 基础培养基、DMEM 基础培养基、胰蛋白酶(美国 HyClone 公司);人淋巴细胞分离液(天津 TBD 生物公司);白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)和转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)的 ELISA 试剂盒(深圳欣博盛生物科技公司);TUNEL 凋亡试剂盒(美国罗氏生物公司);CD4-PE、CD25-APC、Foxp3-FITC、细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)-PE、血管细胞黏附分子-1

(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)-APC 和 E-选择素-FITC 抗体(美国 BD 公司);雷帕霉素(美国 Sigma 公司)。ADK siRNA 由上海吉玛公司设计合成。

1.2 方法

1.2.1 角膜内皮细胞的培养及 ADK siRNA 转染 采用第 3~5 代处于对数生长期的角膜内皮细胞。采用含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养内皮细胞;待内皮细胞铺满培养孔 70% 时,使用质量分数 0.25% 胰蛋白酶进行细胞传代。实验分为转染组和未转染组。转染组 FAM 荧光标记 ADK siRNA 的转染采用 Lipofectamine[®] 3000,转染后 6 h,更换新鲜的内皮细胞培养基。继续培养 24 h,收集细胞,流式细胞术检测转染效率,检测荧光阳性细胞的比例,实验均重复 3 次,取平均值。采用高效液相色谱法检测各组中腺苷的质量浓度。

1.2.2 TUNEL 染色法检测细胞凋亡率 实验分为对照组(转染对照 siRNA)、雷帕霉素组(转染对照 siRNA 后培养上清中加入 10 ng/ml 雷帕霉素)和 ADK siRNA 组(转染 ADK siRNA 后培养上清中加入 10 ng/ml 雷帕霉素)。雷帕霉素刺激 48 h 后,弃上清,加入质量分数 4% 多聚甲醛固定, PBS 清洗后,加入含质量分数 0.1% Triton X-100 的 PBS,冰浴孵育 2 min, PBS 清洗 3 次,加入 50 μ l TUNEL 检测液, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 60 min, PBS 清洗 3 次,加入 DAPI 染色 5 min, PBS 清洗 3 次,封片,100 倍荧光显微镜下观察绿色荧光细胞的比例,实验均重复 3 次,取平均值。

1.2.3 流式细胞术检测内皮细胞促炎分子的表达 实验分为对照组(转染对照 siRNA)和 ADK siRNA 组(转染 ADK siRNA 后培养上清中加入 10 ng/ml 雷帕霉

素)。ADK siRNA 转染后 48 h, 弃上清, 胰蛋白酶消化, 离心半径 20 cm, 1 000 r/min 离心 5 min, 之后加入小鼠抗人 ICAM-1、VCAM-1 和 E-选择素的流式细胞术抗体(实验浓度严格按照说明书), 室温下孵育 20 min, 离心后弃上清, 流式细胞术检测平均荧光强度。实验均重复 3 次, 取平均值。

1.2.4 淋巴细胞和内皮细胞共培养及流式细胞技术检测 Treg 细胞比例 采用梯度离心法分离健康志愿者外周血中的淋巴细胞(临床标本的获取和使用经天津市泰达医院伦理委员会批准, 批准号: TD201705140901), 将其加入提前培养有 5×10^4 个内皮细胞的培养孔中。实验分为单独培养组(单纯的淋巴细胞置于含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中培养)、共培养组(淋巴细胞与内皮细胞置于含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中共培养)和 ADK siRNA 组(淋巴细胞与 ADK siRNA 转染的内皮细胞置于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中共培养), 分别培养 48 h, 收集淋巴细胞, 加入 CD4-PE 和 CD25-APC 抗体, 室温下孵育 15 min, PBS 清洗 3 次, 破膜后加入 Foxp3-FITC 抗体, 室温下孵育 15 min, PBS 清洗 3 次, 流式细胞仪上检测 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg), 实验均重复 3 次, 取平均值。

1.2.5 ELISA 法检测细胞因子含量 实验分组同 1.2.4, 共培养后 48 h, 收集淋巴细胞, 置于培养板中继续培养 48 h, 之后收集上清, ELISA 法检测上清中 IL-10 和 TGF- β 的含量, 操作严格按照试剂盒的说明书进行。实验均重复 3 次, 取平均值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析。本研究中计量资料的数据经 Kolmogorov-Smirnov 检验证实呈正态分布, 以 mean \pm SD 表示, 经 Levene 检验证实方差齐。转染组与未转染组上清中腺苷的质量浓度比较, 以及对照组与 ADK siRNA 组 ICAM-1、VCAM-1 和 E-选择素的平均荧光强度均采用独立样本 *t* 检验; 对照组、雷帕霉素组和 ADK siRNA 组角膜内皮细胞平均凋亡细胞比例比较, 单独培养组、共培养组和 ADK siRNA 组淋巴细胞中 Treg 细胞的比例比较, 以及淋巴细胞上清液中 IL-10 和 TGF- β 质量浓度比较均采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ADK siRNA 转染进入角膜内皮细胞

流式细胞术检测结果显示, 95.1% 的细胞表达 FAM

标记荧光, 表明 ADK siRNA 成功转染进入角膜内皮细胞; 转染组上清中腺苷质量浓度为 (38.020 ± 6.658) ng/ml, 明显高于未转染组的 (1.663 ± 0.581) ng/ml, 差异有统计学意义 ($t = 5.437, P = 0.006$) (图 1)。

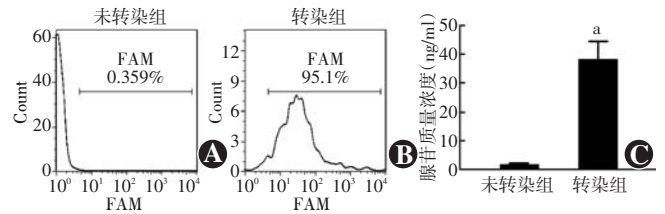


图 1 ADK siRNA 转染进入角膜内皮细胞 A: 流式细胞术检测未转染组 FAM 标记荧光 B: 流式细胞术检测转染组 FAM 标记荧光 C: 2 个组上清液中腺苷的质量浓度比较 与未转染组比较, $^a P < 0.05$ (独立样本 *t* 检验, $n = 3$)

2.2 各组角膜内皮细胞凋亡比例比较

TUNEL 染色结果显示, 对照组、雷帕霉素组和 ADK siRNA 组角膜内皮细胞平均凋亡细胞比例分别为 0.247 ± 0.0376 、 0.480 ± 0.0493 和 0.190 ± 0.0436 , 差异有统计学意义 ($F = 12.340, P = 0.008$), 其中雷帕霉素组角膜内皮细胞平均凋亡率较对照组明显升高, ADK siRNA 组角膜内皮细胞平均凋亡率较雷帕霉素组明显降低, 差异均有统计学意义 ($t = 3.763, P = 0.020; t = 4.405, P = 0.012$) (图 2)。

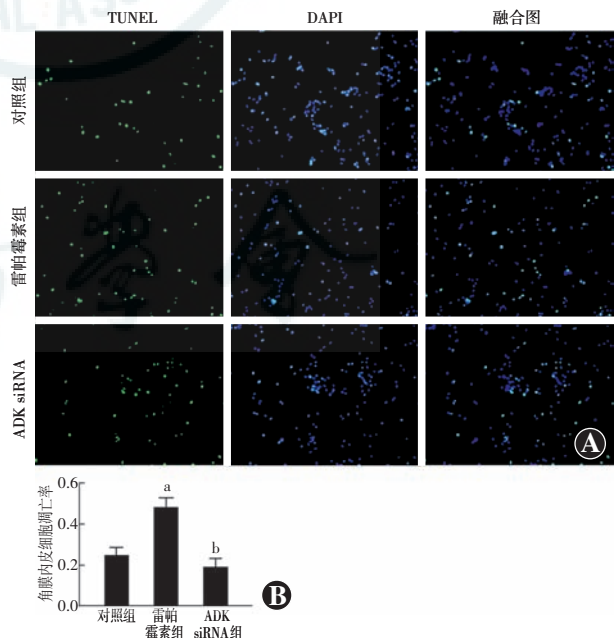


图 2 各组角膜内皮细胞凋亡情况比较 ADK siRNA 抑制雷帕霉素引起的角膜内皮细胞凋亡 A: TUNEL 染色结果 B: 各组角膜内皮细胞凋亡率的量化比较 与对照组比较, $^a P < 0.05$; 与雷帕霉素组比较, $^b P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n = 3$) 注: ADK: 腺苷激酶; siRNA: 小干扰 RNA

2.3 各组角膜内皮细胞表面促炎分子的表达比较

流式细胞术检测结果显示,对照组 ICAM-1、VCAM-1 和 E-选择素的平均荧光强度分别为 11.600±2.427、11.030±2.291 和 24.270±4.332, ADK siRNA 组分别为 4.060±1.179、3.600±1.234 和 5.223±1.734, ADK siRNA 组 ICAM-1、VCAM-1 和 E-选择素的平均荧光强度明显弱于对照组,差异均有统计学意义 ($t=2.794, P=0.049; t=2.857, P=0.046; t=4.081, P=0.015$) (图 3)。

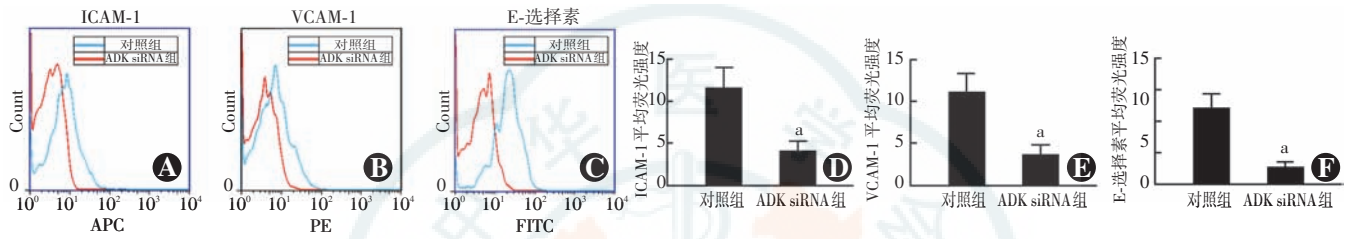


图 3 各组角膜内皮细胞表面促炎分子 ICAM-1、VCAM-1 和 E-选择素的表达比较 ADK siRNA 可以降低角膜内皮细胞表面 ICAM-1、VCAM-1 和 E-选择素的表达 A:ICAM-1 的流式细胞术检测结果 B:VCAM-1 的流式细胞术检测结果 C:E-选择素的流式细胞术检测结果 D:各组角膜内皮细胞表面 ICAM-1 表达的量化比较 E:各组角膜内皮细胞表面 VCAM-1 表达的量化比较 F:各组角膜内皮细胞表面 E-选择素表达的量化比较 与对照组比较, $aP<0.05$ (独立样本 t 检验, $n=3$) 注:ICAM: 细胞间黏附分子; VCAM: 血管细胞黏附分子; ADK: 腺苷激酶; siRNA: 小干扰 RNA

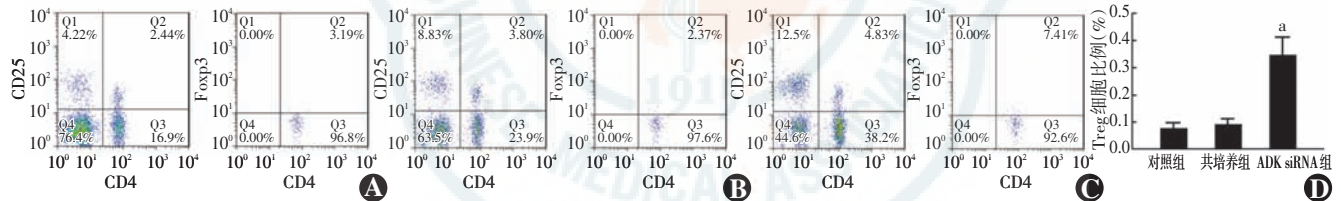


图 4 各组淋巴细胞中 Treg 细胞的比例比较 A:单独培养组流式细胞术检测结果 B:共培养组流式细胞术检测结果 C:ADK siRNA 组流式细胞术检测结果 D:各组淋巴细胞中 Treg 细胞比例的量化比较,与共培养组比较, $aP<0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n=3$) 注:Treg: 调节性 T 细胞; ADK:腺苷激酶; siRNA: 小干扰 RNA

2.5 各组细胞培养上清液中 IL-10 和 TGF-β 质量浓度比较

ELISA 的结果显示,单独培养组、共培养组和 ADK siRNA 组淋巴细胞培养上清液中 IL-10 的质量浓度分别为 (0.154±0.020)、(0.186±0.026) 和 (0.534±0.051) ng/ml, TGF-β 的质量浓度分别为 (2.833±0.788)、(3.700±1.044) 和 (17.800±2.458) ng/ml, 总体比较差异均有统计学意义 ($F=20.960, P=0.003; F=27.320, P=0.001$), 其中 ADK siRNA 组淋巴细胞上清液中 IL-10 和 TGF-β 的质量浓度均较共培养组明显升高, 差异均有统计学意义 ($t=4.492, P=0.011; t=5.280, P=0.006$); 单独培养组淋巴细胞上清液中 IL-10 和 TGF-β 的质量浓度与共培养组比较, 差异均无统计学意义 ($t=0.707, P=0.518; t=0.662, P=0.544$) (图 5)。

2.4 各组内皮细胞 Treg 细胞比例比较

流式细胞术检测结果显示,单独培养组、共培养组和 ADK siRNA 组淋巴细胞中 Treg 细胞的比例分别为 0.075±0.022、0.090±0.023 和 0.347±0.066, 总体比较差异有统计学意义 ($F=12.890, t=0.007$), 其中 ADK siRNA 组淋巴细胞中 Treg 细胞的比例较共培养组明显升高, 差异有统计学意义 ($t=3.650, P=0.022$); 单独培养组淋巴细胞中 Treg 细胞的比例与共培养组比较, 差异无统计学意义 ($t=0.474, P=0.660$) (图 4)。

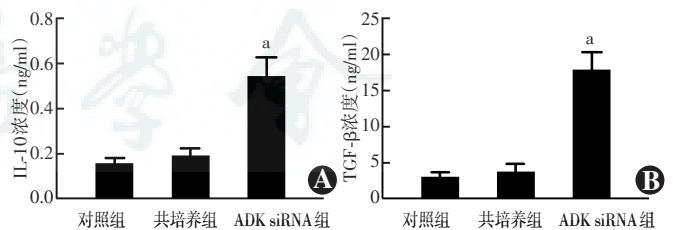


图 5 各组细胞培养上清液中 IL-10 和 TGF-β 质量浓度的比较 A: 各组上清液中 IL-10 质量浓度的比较 B: 各组上清液中 TGF-β 质量浓度的比较 与共培养组比较, $aP<0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n=3$) 注:IL: 白细胞介素; ADK: 腺苷激酶; siRNA: 小干扰 RNA; TGF: 转化生长因子

3 讨论

免疫排斥反应是引起角膜移植失败的主要原因,临床上主要采用免疫抑制剂局部治疗,然而不良反应很大,常引起各种并发症^[7]。雷帕霉素是近几年临床应用较多的免疫抑制剂,然而研究发现其能够诱导角膜内皮

细胞发生凋亡并抑制其增生、迁移,长期应用将会引起感染,甚至致盲等^[8-9]。间充质干细胞治疗是近几年兴起的一种诱导移植角膜免疫耐受的方法,但是其在发挥免疫耐受作用的同时,还可能分泌促血管生成因子,具有潜在的诱导血管新生作用^[10-12]。基因转染进入内皮细胞能够精准靶向治疗,减少不良反应的发生。本研究中以 ADK 为靶点,一方面可以帮助角膜内皮细胞抵御免疫抑制剂或者免疫细胞的损伤;另一方面还能促进角膜内皮细胞不断释放腺苷,促进 Treg 细胞增生,诱导移植角膜局部的免疫耐受,最终促进移植角膜的长期存活和正常功能的发挥。

角膜内皮细胞表面表达 ICAM-1、VCAM-1 和 E-选择素 3 种促炎分子,在移植免疫排斥中发挥重要的功能。第 3~5 代处于对数生长期的角膜内皮细胞生长状态佳,细胞表面蛋白表达稳定,因此本研究中选择第 3~5 代内皮细胞进行实验。缺氧或脂多糖等能够诱导 ICAM-1、VCAM-1 和 E-选择素表达增加,进一步促进局部炎症反应^[13]。ICAM-1、VCAM-1 和 E-选择素还能以分子或者外泌体的形式从内皮细胞脱落,诱导巨噬细胞向促炎型细胞转换,加重炎症反应的损伤^[14]。因此,抑制内皮细胞促炎分子的表达对于角膜移植的成功具有重要意义。本研究中发现,ADK siRNA 能够通过直接抑制 ICAM-1、VCAM-1 和 E-选择素的表达,减少内皮细胞引起的同种异体免疫排斥反应。

Treg 细胞在诱导移植免疫耐受中发挥着重要的作用,IL-10 和 TGF- β 等免疫抑制分子在这个过程中发挥着关键作用^[15]。近年研究发现,Treg 细胞移植或者通过各种途径促进 Treg 细胞比例升高能够显著诱导同种异体移植物的免疫耐受^[16-18]。在角膜移植后,Treg 细胞移植可以有效诱导免疫耐受^[19]。本研究中发现,ADK siRNA 修饰的角膜内皮细胞能够显著促进 Treg 细胞的增生及其分泌免疫抑制分子,进而诱导角膜移植局部免疫耐受。

综上所述,本研究中发现 ADK siRNA 能够通过促进 Treg 细胞的增生和分泌,诱导角膜移植物的免疫耐受以保护角膜内皮细胞。本研究为角膜移植免疫排斥反应的治疗提供了新的选择。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Gain P, Jullienne R, He Z, et al. Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking[J]. JAMA Ophthalmol, 2016, 134(2): 167-173. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2015.4776.
- [2] Amouzegar A, Chauhan SK, Dana R. Alloimmunity and tolerance in corneal transplantation[J]. J Immunol, 2016, 196(10): 3983-3991. DOI: 10.4049/jimmunol.1600251.
- [3] Fredholm BB. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue

- damage and repair[J]. Cell Death Differ, 2007, 14(7): 1315-1323. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402132.
- [4] 艾李倩玉, 黄娟娟, 陈琛, 等. 缺氧诱导下人微血管内皮细胞的活化与腺苷水平的关系[J]. 中华实验眼科杂志, 2017, 35(1): 26-31. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.01.006.
- Ai LQ, Huang CJ, Chen C, et al. Relationship of human microvascular endothelial cell activation and adenosine level under the hypoxia[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2017, 35(1): 26-31. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.01.006.
- [5] Kashfi S, Ghaedi K, Baharvand H, et al. A1 adenosine receptor activation modulates central nervous system development and repair[J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(10): 8128-8139. DOI: 10.1007/s12035-016-0292-6.
- [6] Stauffer C, Lindner M, Dionisi-Vici C, et al. Adenosine kinase deficiency: expanding the clinical spectrum and evaluating therapeutic options[J]. J Inher Metab Dis, 2016, 39(2): 273-283. DOI: 10.1007/s10545-015-9904-y.
- [7] Inomata T, Mashghi A, Di ZA, et al. Kinetics of angiogenic responses in corneal transplantation[J]. Cornea, 2017, 36(4): 491-496. DOI: 10.1097/ICO.0000000000001127.
- [8] Bruns CJ, Koehl GE, Guba M, et al. Rapamycin-induced endothelial cell death and tumor vessel thrombosis potentiate cytotoxic therapy against pancreatic cancer[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(6): 2109-2119.
- [9] 叶盛, 张怀勤, 林以诺, 等. 雷帕霉素对血管内皮细胞凋亡及增殖、迁移、成血管能力的影响[J]. 实用医学杂志, 2011, 27(10): 1735-1736. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2011.10.009.
- [10] 罗丹, 赵敏. 角膜移植免疫排斥反应细胞疗法的研究进展[J]. 中华实验眼科杂志, 2017, 35(9): 848-851. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.09.016.
- Luo D, Zhao M. Recent advances of cellular therapy for corneal graft rejection[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2017, 35(9): 848-851. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.09.016.
- [11] Zhao L, Liu X, Zhang Y, et al. Enhanced cell survival and paracrine effects of mesenchymal stem cells overexpressing hepatocyte growth factor promote cardioprotection in myocardial infarction[J]. Exp Cell Res, 2016, 344(1): 30-39. DOI: 10.1016/j.yexcr.2016.03.024.
- [12] Liang X, Zhang L, Wang S, et al. Exosomes secreted by mesenchymal stem cells promote endothelial cell angiogenesis by transferring miR-125a[J]. J Cell Sci, 2016, 129(11): 2182-2189. DOI: 10.1242/jcs.170373.
- [13] Steimbrenner H, Bilgic E, Pinto A, et al. Selenium pretreatment for mitigation of ischemia/reperfusion injury in cardiovascular surgery: influence on acute organ damage and inflammatory response[J]. Inflammation, 2016, 39(4): 1363-1376. DOI: 10.1007/s10753-016-0368-5.
- [14] Lee HM, Choi EJ, Kim JH, et al. A membranous form of ICAM-1 on exosomes efficiently blocks leukocyte adhesion to activated endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 397(2): 251-256. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.05.094.
- [15] Unutmaz D, Pulendran B. The gut feeling of Treg cells: IL-10 is the silver lining during colitis[J]. Nat Immunol, 2009, 10(11): 1141-1143. DOI: 10.1038/nri1109-1141.
- [16] Zhang L, Bertucci AM, Ramsey-Goldman R, et al. Regulatory T cell (Treg) subsets return in patients with refractory lupus following stem cell transplantation, and TGF-beta-producing CD8+ Treg cells are associated with immunological remission of lupus[J]. J Immunol, 2009, 183(10): 6346-6358. DOI: 10.4049/jimmunol.0901773.
- [17] 张莲, 宋继科, 唐凯, 等. Treg 细胞在实验性自身免疫性葡萄膜炎发病过程中的动态变化[J]. 中华实验眼科杂志, 2016, 34(8): 684-690. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.08.003.
- Zhang L, Song JK, Tang K, et al. The dynamic changes of regulatory T cells in the pathogenesis of experimental autoimmune uveitis[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2016, 34(8): 684-690. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.08.003.
- [18] Zhang C, Shan J, Lu J, et al. Rapamycin in combination with donor-specific CD4+CD25+ Treg cells amplified *in vitro* might be realize the immune tolerance in clinical organ transplantation[J]. Cell Immunol, 2010, 264(2): 111-113. DOI: 10.1016/j.cellimm.2010.05.014.
- [19] Jin Y, Chauhan SK, Saban DR, et al. Role of CCR7 in facilitating direct allosensitization and regulatory T-cell function in high-risk corneal transplantation[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(2): 816-821. DOI: 10.1167/iovs.09-3952.

(收稿日期: 2018-09-17 修回日期: 2019-03-28)

(本文编辑: 刘艳)