

RCS 大鼠视网膜色素变性过程中视网膜免疫微环境的改变

唐环宇 卢紫阳 何军材 郜原 阴正勤

400038 重庆,陆军军医大学西南医院 全军眼科中心 视觉损伤与修复重庆市重点实验室

通信作者:郜原,Email:yuang@tmmu.edu.cn;阴正勤,Email:qinzyin@aliyun.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.11.005

【摘要】 目的 研究在英国皇家外科学院(RCS)大鼠视网膜色素变性(RP)发展过程中,介导细胞免疫的 T 淋巴细胞和自然杀伤(NK)细胞及其分泌的细胞因子 γ 干扰素(IFN- γ)的变化。方法 选取出生后 20 日龄(P20)、P40、P60 RCS- rdy^{-}/P^{+} 大鼠(简称 RCS 大鼠)和相应日龄 RCS- rdy^{+}/P^{+} 大鼠(简称对照大鼠)各 12 只,细胞因子液相悬浮芯片检测大鼠视网膜匀浆中多种炎症细胞因子的质量浓度。实时荧光定量聚合酶链反应(real-time PCR)检测各日龄大鼠视网膜中白细胞介素-2(IL-2)、C-C 趋化因子配体 2(CCL2)、CXC 趋化因子配体 9(CXCL9)、CXCL10 和 IFN- γ mRNA 的表达水平;免疫组织化学技术检测大鼠视网膜中 T 淋巴细胞(CD4 $^{+}$ 、CD8 $^{+}$)和 NK 细胞(CD161 $^{+}$)的分布;流式细胞术检测大鼠视网膜中 T 淋巴细胞(CD4 $^{+}$ 、CD8 $^{+}$)和 NK 细胞(CD161 $^{+}$)的比例,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测大鼠视网膜组织匀浆中 IFN- γ 的质量浓度。结果 RCS 组大鼠视网膜中淋巴细胞相关细胞因子和趋化因子 mRNA 表达水平均表现出随日龄增加而表达上调的趋势,P60 RCS 大鼠视网膜中 IL-2、CCL2、CXCL9、CXCL10、CXCL11 和 IFN- γ mRNA 表达水平均较 P20 RCS 大鼠和对照组大鼠表达水平明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。P60 RCS 大鼠视网膜中 CD4、CD8、CD161 细胞阳性率分别为(9.09 \pm 0.89)%、(18.77 \pm 0.38)%和(9.41 \pm 0.38)%。P60 RCS 大鼠视网膜中 IFN- γ 阳性细胞比例为(8.29 \pm 0.27)% ,较对照大鼠的(0.28 \pm 0.02)% 显著升高,差异有统计学意义($t = 29.03, P = 0.00$)。P60 RCS 大鼠视网膜中 CD4 $^{+}$ 、CD8 $^{+}$ 和 CD161 $^{+}$ 淋巴细胞主要分布在内层视网膜,且 IFN- γ 阳性标记与淋巴细胞表面标记呈共定位。不同日龄 RCS 大鼠和对照大鼠视网膜中 IFN- γ 质量浓度比较,差异均有统计学意义($F_{\text{组别}} = 16.49, P < 0.01; F_{\text{时间}} = 21.05, P < 0.01$),其中 P60 RCS 大鼠视网膜中 IFN- γ 质量浓度较 P20 RCS 大鼠、P40 RCS 大鼠和对照组大鼠明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 RCS 大鼠 RP 改变了视网膜内相对免疫豁免的微环境,视网膜中淋巴细胞趋化因子和细胞因子表达水平逐渐升高,并在病变后期引起淋巴细胞的浸润和激活,导致 IFN- γ 在视网膜中浓度显著升高,表明细胞免疫参与其病理机制。

【关键词】 视网膜变性疾病; 淋巴细胞; γ 干扰素

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2013CB967002); 重庆市基础科学与前沿技术研究(重点)项目(cstc2017jcyjBX0058)

Changes of the immune-microenvironment in retinal degeneration process of RCS rat Tang Huanyu, Lu Ziyang, He Juncai, Gao Yuan, Yin Zhengqin

Department of Ophthalmology, Key Laboratory of Visual Damage and Regeneration & Restoration of Chongqing, Southwest Hospital, Army Medical University, Chongqing 400038, China

Corresponding authors: Gao Yuan, Email: yuang@tmmu.edu.cn; Yin Zhengqin, Email: qinzyin@aliyun.com

【Abstract】 Objective To explore the immune-microenvironment of the retinas at different stages of retinal degeneration in Royal College of Surgeon (RCS) rats. **Methods** RCS- rdy^{-}/P^{+} (RCS) rats at early stage (P20), middle stage (P40) and late stage (P60) were involved, 12 rats at each post-natal day, RCS- rdy^{+}/P^{+} rats served as control. Relative concentrations of rat cytokines in rat retina homogenate were detected by using Bio-Plex Suspension Array System. Relative expressions of interleukin-2 (IL-2), C-C motif ligand 2 (CCL2), chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (CXCL9), CXCL10, CXCL11 and interferon- γ (IFN- γ) mRNA in rat retina were analyzed by real-time PCR. Expressions of IFN- γ and immune cells surface marker CD4, CD8 and CD161 in the retinas were detected by immunohistochemical staining. Percentage of IFN- γ positive T lymphocytes and natural killer (NK) cells in rat retina were analyzed by flow cytometry. The concentrations of IFN- γ in rat retina homogenate were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The use and care of the animals complied with Regulations for the Administration of Affairs Concerning Experimental Animals by State Science and Technology Commission. **Results** Lymphocytes related cytokines and chemokines mRNA expression levels in the RCS rat retinas showed increase trends with the extension of time. The expression levels of IL-2, CCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11 and IFN- γ mRNA in P60

RCS rat retinas were significantly increased than those in the P20 RCS rat retinas and the control rat retinas (all at $P < 0.05$). The positive rates of CD4, CD8 and CD161 cells in the retinas of P60 RCS rats was $(9.09 \pm 0.89)\%$, $(18.77 \pm 0.38)\%$ and $(9.41 \pm 0.38)\%$, respectively. The proportion of IFN- γ positive cells in the retinas of P60 RCS rats was $(8.29 \pm 0.27)\%$, which was significantly higher than that of the control rats $([0.28 \pm 0.02]\%)$, with a significant difference between them ($t = 29.03, P = 0.00$). CD4 $^+$, CD8 $^+$ and CD161 $^+$ lymphocytes were mainly distributed in the retinas of P60 RCS rats, and the expressions of IFN- γ were co-located with lymphocyte surface markers. There were significant differences in the concentrations of IFN- γ in the retinas of RCS rats and control rats at different day ages ($F_{\text{group}} = 16.49, P < 0.01$; $F_{\text{time}} = 21.05, P < 0.01$), the concentration of IFN- γ in retinas of P60 RCS rats was significantly higher than that of P20 RCS rats, P40 RCS rats and control rats, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.05$).

Conclusions Along with the process of retinal degeneration, immune privilege balance in the retinas is disrupted, the expressions of lymphocytes related chemokines and cytokines are elevated. Lymphocytes infiltration and activation are appeared in the retina highly activated at the late stage of RP, leading to the significant up-regulation of inflammatory cytokine IFN- γ in microenvironment, which indicates that lymphocytes mediated immune response may take part in retinal degeneration.

[Key words] Retinal degeneration disease; Lymphocytes; Interferon- γ

Fund program: National Basic Research Program of China (973 Program) (2013CB967002); Chongqing Research Program of Basic Research and Frontier Technology (cstc2017jcyjBX0058)

在视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 的病理过程中, 炎症和自身免疫反应具有极其重要的作用^[1]。研究表明视网膜变性疾病的发生与血-视网膜屏障的破坏和免疫细胞的激活密切相关^[2-4], 以往此类疾病的免疫学研究主要关注视网膜固有免疫细胞——小胶质细胞, 本研究团队也通过大量动物实验证明小胶质细胞的激活可促进视网膜变性疾病的发展^[5-7]。目前, 关于眼内淋巴细胞的研究多集中于前房和葡萄膜^[8-9], 淋巴细胞在 RP 病理过程中的具体作用鲜见报道, 视网膜中淋巴细胞与外源性治疗细胞的关系仍处于干细胞转化医学研究的真空地带。英国皇家外科学院 (Royal College of Surgeon, RCS) 大鼠是 RP 模型大鼠, 其遗传性受体酪氨酸激酶基因突变导致视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞吞噬感光细胞外节膜盘功能障碍, 膜盘残余小体滞留于基底部细胞原浆中并向细胞外排出, 特征表现为色素上皮层和 Bruchs 膜之间形成玻璃膜疣^[10-11]。玻璃膜疣中大量自身抗原、氧化蛋白、模式识别受体等可活化抗原递呈细胞和补体系统, 诱发视网膜中免疫细胞对感光细胞的攻击, 促进视网膜变性疾病的发展^[11-12]。其中, 淋巴细胞作为机体获得性免疫的主要介导者, 能识别抗原递呈细胞表面的眼自身抗原而被激活, 受到趋化作用聚集于微环境中并引起一系列的免疫应答, 破坏视网膜组织^[13]。本研究中通过检测 RCS 大鼠视网膜微环境在变性不同阶段淋巴细胞相关细胞因子和趋化因子, 以及淋巴细胞在变性视网膜组织中的分布和比例, 探讨视网膜变性疾病与淋巴细胞的相互关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 出生后 20 日龄 (P20)、P40 和 P60 的变性早、中、晚期 RCS-rdy $^-$ -P $^+$ 大鼠 (RCS 大鼠) 以及相应日龄的 RCS-rdy $^+$ -P $^+$ 大鼠 (对照大鼠) 各 18 只 (陆军军医大学实验动物中心提供), 分笼饲养于 20 °C 恒温室内, 自动控制光照 12 h。实验动物的使用和喂养遵循国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》。

1.1.2 主要试剂及仪器 Bio-Plex 大鼠炎症因子试剂盒 (美国 Bio-Rad 公司); RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒 (北京康为世纪有限公司); 小鼠抗大鼠 CD4 单克隆抗体 (OX-35)、小鼠抗大鼠 CD8a 单克隆抗体 (OX-8)、小鼠抗大鼠 CD161a 单克隆抗体 (10/78)、Alexa Fluor[®] 647 偶联小鼠抗大鼠 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 抗体 (DB-1) (美国 BD Bioscience 公司); Alexa Fluor 488 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗 (A32723)、大鼠 IFN- γ ELISA 试剂盒 (美国 Thermofisher 公司); PE 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗 (550589, 美国 BD 公司); RNA 提取试剂 Trizol、Prime Script[™] RT reagent Kit 逆转录试剂盒、荧光染料 SYBR Premix Ex Taq (日本 Takara 公司)。Bio-Plex 悬液微珠芯片平台、CFX96 荧光实时定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); LSM800 激光扫描共焦显微镜 (德国 ZEISS 公司); FACSCanto[™] 流式细胞仪 (美国 BD 公司); Varioskan Flash 全波长多功能酶标仪 (美国 Thermofisher 公司)。

1.2 方法

1.2.1 液相悬浮芯片检测大鼠视网膜中细胞因子质量浓度 取 P60 RCS 和相应日龄对照大鼠各 3 只, 腹腔内注射质量分数 3% 戊巴比妥钠 50 mg/kg, 深度麻醉后断颈处死大鼠, 摘取眼球, 分离并剪碎视网膜, 置于含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 冰上吹打裂解 20 min, 4 °C 条件下 12 000 \times g 离心 10 min, 收集各组视

网膜组织匀浆蛋白样本,BCA 法测定样本蛋白质量浓度。根据 Bio-Plex 大鼠炎症因子试剂盒说明,各组样本按照 50 μg 等质量上样,并用 RIPA 裂解液补足体积至 50 μl,依次孵育微珠、抗体和 PE 标记链霉亲和素后送入已校正的 Bio-Plex 机器中读值。根据标准品得到的荧光检测值,使用多参数模式对标准曲线进行拟合,得到标准曲线及其方程,再将样本检测的原始荧光检测值代入标准曲线公式,计算样品质量浓度。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 法检测细胞因子及趋化因子基因表达 取 P20、P40、P60 RCS 大鼠和相应日龄对照大鼠各 6 只,按照 1.2.1 步骤处死大鼠后摘取眼球,分离并剪碎新鲜视网膜组织,分组置于含 1 ml Trizol 的无菌离心管内,氯仿抽提组织 mRNA,每组制备 3 份 mRNA 样本。按照 Prime Script™ RT reagent Kit 逆转录试剂盒说明书逆转录合成各组 cDNA,用特异性引物(表 1)进行实时荧光定量聚合酶链反应(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)检测白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)、CC 类趋化因子配体 2(C-C motif ligand 2, CCL2)、CXC 趋化因子配体 2[chemokine (C-X-C motif) ligand 9, CXCL9]、CXCL10 和 IFN-γ mRNA 的表达。Real-time PCR 扩增达到荧光阈值时的循环次数记作 Ct 值, $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{GAPDH}}$, 各基因相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示, $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct_{\text{RCS组}} - \Delta Ct_{\text{对照组}})}$ 。

表 1 各目的基因上下游引物序列

基因	引物序列(5'-3')
CCL2	正义链:GGACCAGAACCAAGTGAGATCAGA
	反义链:AGCTTCAGATTATGGGTCAAGTTCAC
CXCL9	正义链:TCCACTACAAATCCCTCAAAGACCT
	反义链:GCAGGTTTGATCTCCGTTCTTCAG
CXCL10	正义链:GAAGCACCATGAACCCAAAGT
	反义链:CAACATGCGGACAGGATAGA
CXCL11	正义链:GGCCACAACGGTTCCAGGCTT
	反义链:GCTTGGATGTGGGTCCAGGC
IL-2	正义链:GCTTTCACCTTGAAGACGCTGGAA
	反义链:AAATTCGACCACAGTTGCTGGCTC
IFN-γ	正义链:AACAACCCACAGATCCAGCACAA
	反义链:CCAGAATGAGCACCAGACTCCTTT
GAPDH	正义链:GAGACAGCCGCATCTTCTTG
	反义链:TGACTGTGCCGTTGAACCTG

注:CCL:CC 类趋化因子配体;CXCL:CXC 趋化因子配体;IL:白细胞介素;IFN-γ:γ 干扰素;GAPDH:磷酸甘油醛脱氢酶

1.2.3 流式细胞术检测视网膜中淋巴细胞比例 取 P60 RCS 大鼠和对照大鼠各 3 只,按照 1.2.1 的步骤麻醉并处死各组大鼠,摘取大鼠眼球并分离视网膜,置于 RPMI 培养基,巴氏吸管轻柔吹打成细胞悬液,

30 μm 滤器过滤去除消化不完全的细胞团块^[14],细胞悬液以 300×g 离心 10 min,重悬于含质量分数 2% FBS 的 PBS 缓冲液备用。2 个组样本分别以小鼠抗大鼠 CD4 单克隆抗体(1:200)、小鼠抗大鼠 CD8a 单克隆抗体(1:200)、小鼠抗大鼠 CD161a 单克隆抗体(1:200) 4℃ 避光孵育 30 min,经固定破膜处理后以 APC 偶联小鼠抗大鼠 IFN-γ 单克隆抗体(1:100) 4℃ 避光孵育 30 min,PBS 漂洗后再以 Alexa Fluor 488 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗(1:500)和 PE 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗(1:500) 4℃ 避光孵育 30 min,PBS 漂洗重悬后 FACSCanto™ 流式细胞仪上机检测。FlowJo 软件分析流式细胞学数据,并分别统计活细胞中 CD4、CD8 和 CD161 淋巴细胞阳性率以及表面标记阳性细胞中 IFN-γ 的表达水平。

1.2.4 免疫荧光染色检测视网膜中淋巴细胞分布 取 P60 RCS 大鼠和对照大鼠各 3 只按照 1.2.1 步骤麻醉并处死各组大鼠,摘取眼球并立即置于质量分数 4% 多聚甲醛溶液中室温固定 1.5 h,于显微镜下去除眼前节,质量分数 30% 蔗糖溶液 4℃ 过夜脱水后 OCT 包埋剂包埋,经视网膜后极部和锯齿缘行 10 μm 厚连续切片,切片保存于 -20℃ 备用。选取各组形态结构完整冰冻切片,0.01 mol/L PBS 漂洗 3 遍后用质量分数 0.1% Triton X-100 溶液室温破膜 15 min,再以 5% 山羊血清室温封闭 1 h。小鼠抗大鼠 CD4 单克隆抗体(1:400)、小鼠抗大鼠 CD8a 单克隆抗体(1:400)、小鼠抗大鼠 CD161a 单克隆抗体(1:400)和 Alexa Fluor® 647 偶联小鼠抗大鼠 IFN-γ 单克隆抗体(1:200)以 0.01 mol/L PBS 稀释后 4℃ 孵育组织切片过夜。样本经 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 遍后用 Alexa Fluor 488 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗(1:1000)室温孵育 2 h,DAPI 室温孵育 10 min,PBS 漂洗 3 遍后以抗荧光淬灭封片剂封片,LSM 800 激光扫描共焦显微镜下观察并拍照。DAPI 染色细胞核用以区分视网膜层次,CD4、CD8 和 CD161 分别标记视网膜组织中辅助性 T 淋巴细胞、细胞毒性 T 淋巴细胞和自然杀伤细胞(natural killer cells,NK 细胞),并共定位分析以上细胞 IFN-γ 表达情况判断其是否为激活状态。

1.2.5 酶联免疫吸附试验测定大鼠视网膜中 IFN-γ 质量浓度 取 P20、P40 和 P60 RCS 大鼠和对照大鼠各 3 只,按照 1.2.1 步骤麻醉并处死各组大鼠,提取各组视网膜组织匀浆蛋白样本,按照说明书以 50 μg 总蛋白上样量进行 ELISA 检测。梯度稀释标准品(0 ~ 2000 pg/ml),标准品和样品均设 2 个复孔,每孔 50 μl(样品稀释液补足体积)上样,室温孵育 2 h 后去除孔板

中标准品和样品,继续室温下孵育辣根过氧化物酶标记链霉亲和素(HRP-streptavidin)1 h,弃去孵育试剂后每孔加入 100 μl TMB 底物显色 10 min,随后迅速加入 100 μl 终止液终止反应,并立即用酶标仪检测(检测波长:450 nm,参考波长:620 nm)。根据不同浓度标准品的吸光度(A)值绘制标准曲线,再利用样品的 A 值计算其细胞因子蛋白质量浓度。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行分析。各组量化指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经 Levene 检验证实方差齐性。RCS 大鼠和对照大鼠视网膜中多种细胞因子质量浓度的比较及 IFN-γ 阳性细胞比例比较均采用独立样本 t 检验,RCS 组和对照组不同日龄 RCS 大鼠视网膜中趋化因子和淋巴细胞相关细胞因子 mRNA 表达水平以及 IFN-γ 质量浓度比较均采用两因素方差分析,多重比较采用

Tukey 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 变性晚期 RCS 大鼠视网膜免疫微环境中炎症因子质量浓度变化

视网膜液相悬浮芯片检测结果显示,多种细胞因子中白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)质量浓度最高,达(2 675.14±901.47) pg/ml,IFN-γ 次之,为(109.93±13.62) pg/ml;变化最显著的细胞因子除粒细胞/巨噬细胞(小胶质细胞)相关细胞因子粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)和 IL-1α 外,淋巴细胞相关细胞因子 IL-2 和 IFN-γ 在 RCS 大鼠视网膜中较对照大鼠也有明显升高,2 个组间比较差异均有统计学意义(均 P<0.05)(表 2)。

表 2 RCS 大鼠和对照大鼠视网膜中多种细胞因子质量浓度比较($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

组别	样本量	G-CSF	M-CSF	IL-1α	IL-2	IFN-γ	MIP-3a	IL-1b	IL-7
对照大鼠	3	0.69±0.27	2.13±0.28	7.32±2.33	979.72±213.83	42.09±6.27	0.93±0.03	10.23±1.57	6.92±0.56
RCS 大鼠	3	2.65±0.81	6.12±1.26	20.64±3.85	2 675.14±901.47	109.93±13.62	1.96±0.23	18.99±1.97	12.14±1.49
t 值		4.00	5.33	5.13	3.17	7.84	7.64	6.01	5.69
P 值		0.02	0.01	0.01	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00

组别	样本量	MIP-1a	MCP-1	IL-4	GM-CSF	IL-17	IL-5	CCL-5	VEGF
对照大鼠	3	1.67±0.17	23.45±1.83	3.8 ±0.4	9.98±1.16	6.87±0.35	42.60±2.61	11.6±1.14	20.58±4.64
RCS 大鼠	3	2.89±0.65	38.55±6.94	6.15±0.36	15.63±1.94	9.17±0.83	56.59±5.13	7.35±1.10	6.71±1.97
t 值		3.12	3.65	7.53	4.33	4.42	4.21	4.64	4.76
P 值		0.04	0.02	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

注:RCS:英国皇家外科学院;G-CSF:粒细胞集落刺激因子;M-CSF:单核细胞集落刺激因子;IL:白细胞介素;IFN-γ:γ 干扰素;MIP:巨噬细胞炎症蛋白;MCP:单核细胞趋化蛋白;GM-CSF:粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子;CCL:CC 类趋化因子配体;VEGF:血管内皮生长因子(独立样本 t 检验)

2.2 各组不同日龄大鼠视网膜中淋巴细胞趋化因子和细胞因子 mRNA 表达水平变化

RCS 组和对照组不同日龄大鼠视网膜中 IL-2、CCL2、CXCL9、CXCL10、CXCL11 和 IFN-γ mRNA 表达水平的比较,差异均有统计学意义(IL-2: $F_{组别} = 7.18, P = 0.02; F_{时间} = 9.15, P < 0.01$ 。CCL2: $F_{组别} = 131.70, P < 0.01; F_{时间} = 33.45, P < 0.01$ 。CXCL9: $F_{组别} = 10.80, P < 0.01; F_{时间} = 72.04, P < 0.01$ 。CXCL10: $F_{组别} = 214.83, P < 0.01; F_{时间} = 173.06, P < 0.01$ 。CXCL11: $F_{组别} = 10.22, P < 0.01; F_{时间} = 2.39, P = 0.13$ 。IFN-γ: $F_{组别} = 257.32, P < 0.01; F_{时间} = 238.89, P < 0.01$ 。)。RCS 组大鼠视网膜中淋巴细胞相关细胞因子和趋化因子 mRNA 表达水平均表现出随日龄的增加而表达上调的趋势,在变性晚期(P60)表达水平显著升高,P60

RCS 大鼠视网膜中 RCS 大鼠视网膜中 IL-2、CCL2、CXCL9、CXCL10、CXCL11 和 IFN-γ mRNA 表达水平均较 P20 RCS 大鼠表达水平明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。P20 RCS 大鼠视网膜中 IFN-γ mRNA 的表达水平高于同日龄对照组,P40 RCS 大鼠视网膜中 CCL2 和 CXCL10 的表达水平高于同日龄对照组,P60 RCS 大鼠视网膜中 IL-2、CCL2、CXCL9、CXCL10、CXCL11 和 IFN-γ mRNA 表达水平高于同日龄对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表 3)。

2.3 RCS 大鼠变性晚期视网膜中淋巴细胞及其相关细胞因子表达变化

视网膜流式细胞学结果显示,对照组大鼠视网膜中几乎未见淋巴细胞浸润,而 P60 RCS 大鼠视网膜中

CD4 阳性细胞率为(9.09±0.89)%, CD8 阳性细胞率为(18.77±0.38)%, CD161 阳性细胞率为(9.41±0.38)%;其中表达 IFN- γ 的 CD4⁺ 细胞比例为(69.73±4.74)%, 表达 IFN- γ 的 CD8⁺ 细胞比例为(41.77±2.57)%, 表达 IFN- γ 的 CD161⁺ 细胞比例为(78.13±2.35)%, 证明视网膜膜中 IFN- γ 表达水平的上调来自于浸润的淋巴细胞。P60 RCS 大鼠视网膜膜中 IFN- γ 阳性细胞比例为(8.29±0.27)%, 较对照大鼠的(0.28±0.02)% 显著升高, 差异有统计学意义($t=29.03, P=0.00$) (图 1)。

表 3 RCS 组和对照组不同年龄 RCS 大鼠视网膜膜中趋化因子和淋巴细胞相关细胞因子 mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	不同年龄 IL-2 mRNA			不同年龄 CCL2 mRNA		
		P20	P40	P60	P20	P40	P60
对照组	3	1.00±0.20	1.41±0.26	1.31±0.22	1.00±0.29	0.66±0.10	1.05±0.12
RCS 组	3	1.16±0.20	1.49±0.11	1.89±0.27 ^{ac}	3.22±0.33	12.02±2.05 ^{ac}	24.64±5.20 ^{abc}

组别	样本量	不同年龄 CXCL9 mRNA			不同年龄 CXCL10 mRNA		
		P20	P40	P60	P20	P40	P60
对照组	3	1.00±0.09	1.63±0.17 ^a	1.44±0.10 ^a	1.00±0.11	1.65±0.14	2.57±0.16 ^a
RCS 组	3	0.76±0.19	1.33±0.28 ^a	2.82±0.19 ^{abc}	1.07±0.21	4.47±0.91 ^{ac}	12.15±1.12 ^{abc}

组别	样本量	不同年龄 CXCL11 mRNA			不同年龄 IFN- γ mRNA		
		P20	P40	P60	P20	P40	P60
对照组	3	1.00±0.10	0.97±0.10	0.89±0.07	1.00±0.11	2.59±0.25 ^a	3.25±0.22 ^a
RCS 组	3	0.96±0.17	1.13±0.21	1.42±0.13 ^{ac}	2.68±0.50 ^c	3.29±0.64	15.66±1.33 ^{abc}

注: IL-2: $F_{组别}=7.18, P=0.02; F_{时间}=9.15, P<0.01$. CCL2: $F_{组别}=131.70, P<0.01; F_{时间}=33.45, P<0.01$. CXCL9: $F_{组别}=10.80, P<0.01; F_{时间}=72.04, P<0.01$. CXCL10: $F_{组别}=214.83, P<0.01; F_{时间}=173.06, P<0.01$. CXCL11: $F_{组别}=10.22, P<0.01; F_{时间}=2.39, P=0.13$. IFN- γ : $F_{组别}=257.32, P<0.01; F_{时间}=238.89, P<0.01$. 与组内 P20 比较, ^a $P<0.05$; 与组内 P40 比较, ^b $P<0.05$; 与同日龄对照组比较, ^c $P<0.05$ (两因素方差分析, Tukey 法检验) RCS: 英国皇家外科学院; IL: 白细胞介素; CCL: CC 类趋化因子配体; CXCL: CXC 趋化因子配体; IFN- γ : γ 干扰素

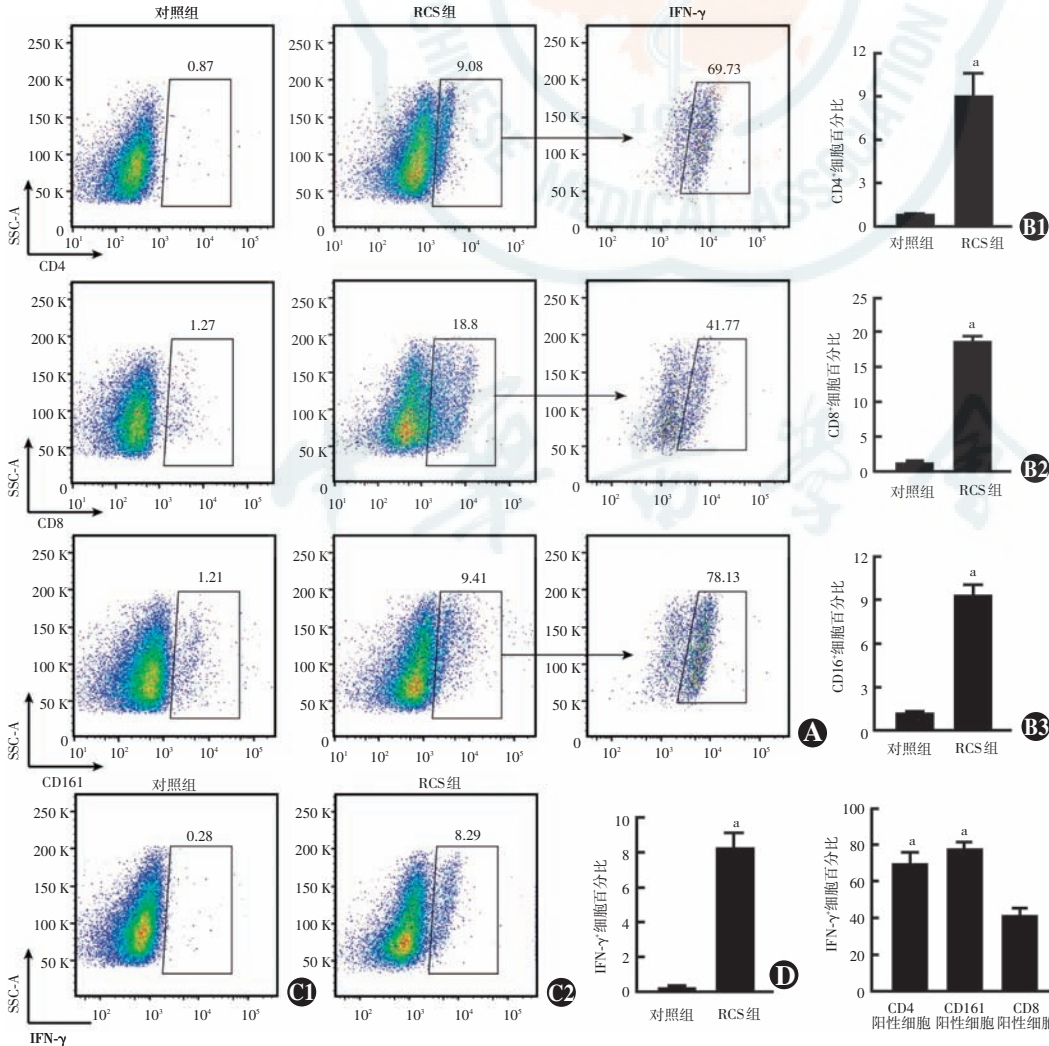


图 1 RCS 大鼠变性晚期视网膜膜中淋巴细胞检测 分别以 CD4、CD8 和 CD161 标记辅助性 T 淋巴细胞、细胞毒性 T 淋巴细胞和 NK 细胞, 并破膜标记细胞内细胞因子 IFN- γ A: 左侧 3 个流式散点图示对照组视网膜膜细胞, 中间及右侧 6 个流式散点图示 RCS 组视网膜膜细胞及表面标记阳性细胞 IFN- γ 表达百分比, 图中数字为门内阳性细胞所占百分比 (各组平均值) B1 ~ B3: RCS 组和对照组大鼠 CD4⁺、CD8⁺ 和 CD161⁺ 淋巴细胞所占百分比比较 与对照组比较, ^a $P<0.05$ (独立样本 t 检验, $n=3$) C1、C2: 对照组和 RCS 组视网膜膜中 IFN- γ 细胞阳性率, 图中数字为门内阳性细胞所占百分比 (各组平均值) D: RCS 和对照组视网膜膜中 IFN- γ 细胞阳性率比较 与对照组比较, ^a $P<0.05$ (独立样本 t 检验, $n=3$) E: RCS 组视网膜膜中各群淋巴细胞 IFN- γ 阳性率比较 与 CD8⁺ 细胞比较, ^a $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n=3$) 注: RCS: 英国皇家外科学院; IFN- γ : γ 干扰素

2.4 RCS 大鼠变性晚期视网膜中淋巴细胞的分布

视网膜免疫组织化学结果显示, P60 RCS 大鼠视网膜中 CD4⁺、CD8⁺ 和 CD161⁺ 淋巴细胞主要分布在内

层视网膜, 且 IFN- γ 阳性标记与淋巴细胞表面标记呈共定位(图 2)。P60 对照大鼠视网膜中未检测到以上 3 种淋巴细胞。

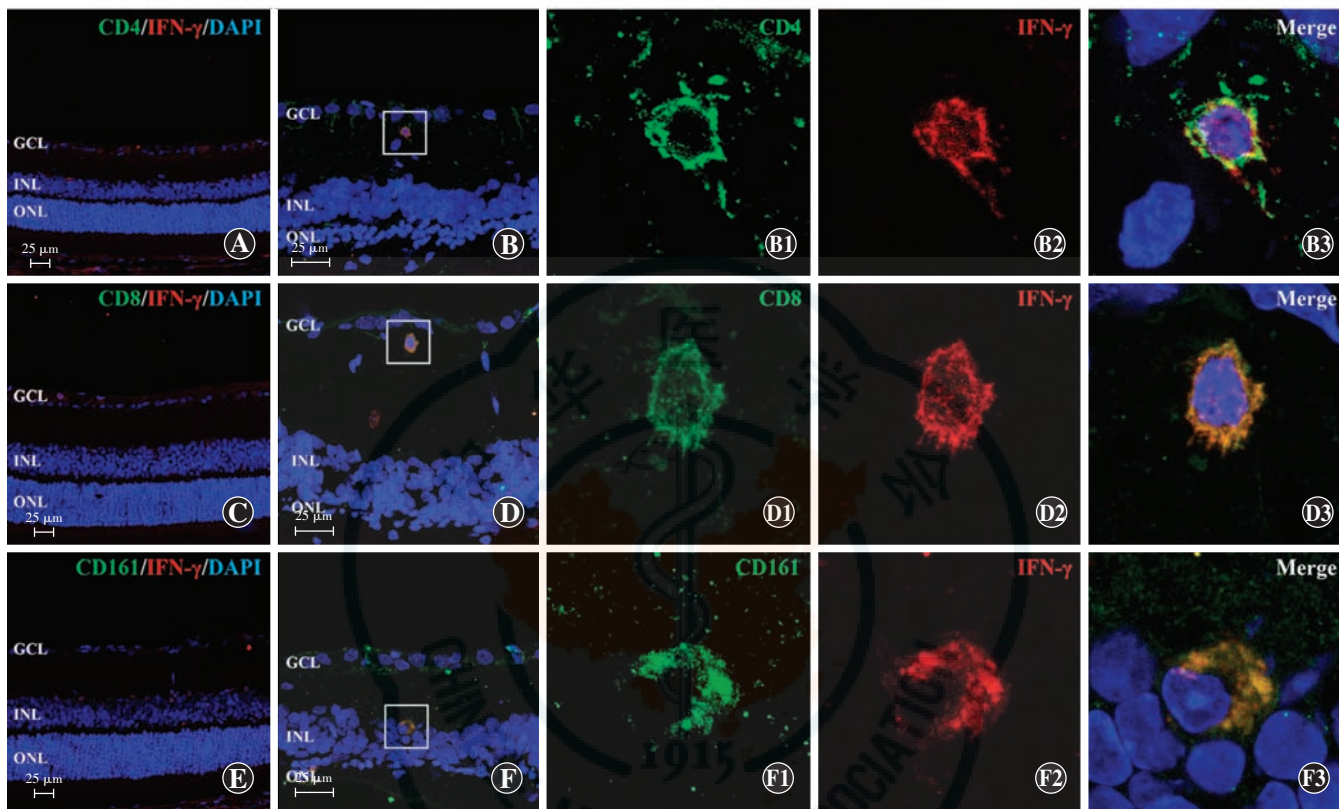


图 2 RCS 大鼠变性晚期视网膜冰冻切片免疫荧光染色 (Alexa Fluor 488, DAPI, 标尺 = 25 μ m) 分别以小鼠抗大鼠 CD4、CD8 和 CD161 单克隆抗体标记辅助性 T 淋巴细胞、细胞毒性 T 淋巴细胞和 NK 细胞 (绿色), 并双标细胞因子 IFN- γ (红色), 细胞核以 DAPI (蓝色) 染色标记, 白色框示视网膜中典型淋巴细胞形态 A、C、E: 对照大鼠 B、D、F: RCS 大鼠 注: GCL: 节细胞层; INL: 内核层; ONL: 外核层

2.5 RCS 大鼠视网膜组织中 IFN- γ 质量浓度的变化

ELISA 定量检测结果显示, 不同日龄 RCS 大鼠和对照大鼠视网膜中 IFN- γ 质量浓度比较, 差异均有统计学意义 ($F_{\text{组别}} = 16.49, P < 0.01; F_{\text{时间}} = 21.05, P < 0.01$)。RCS 大鼠和对照大鼠视网膜中 IFN- γ 质量浓度均表现出随日龄增加而升高的趋势, 其中对照组 P60 大鼠视网膜中 IFN- γ 质量浓度高于 P20 大鼠 ($P = 0.02$), P60 RCS 大鼠视网膜中 IFN- γ 质量浓度较 P20 RCS 大鼠、P40 RCS 大鼠和对照组大鼠明显升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 4)。

3 讨论

视网膜微环境的稳定是维持视网膜细胞正常功能的必要条件, 早期对于视网膜免疫微环境的研究主要聚焦于小胶质细胞^[15], 淋巴细胞及其相关细胞因子在视网膜变性疾病中的作用并未受到重视。本研究中发现 RCS 大鼠视网膜中淋巴细胞趋化因子 CCL2、CXCL9、

表 4 不同日龄 RCS 大鼠和对照大鼠视网膜中 IFN- γ 质量浓度比较 ($\bar{x} \pm s, \text{pg/ml}$)

组别	样本量	不同日龄大鼠视网膜中 IFN- γ 质量浓度		
		P20	P40	P60
对照组	3	262.10 \pm 27.40	335.02 \pm 30.26	362.65 \pm 20.14 ^a
RCS 组	3	278.06 \pm 40.76	342.36 \pm 79.30	530.26 \pm 80.34 ^{abc}

注: $F_{\text{组别}} = 16.49, P < 0.01; F_{\text{时间}} = 21.05, P < 0.01$ 。与组内 P20 比较, ^a $P < 0.05$; 与组内 P40 比较, ^b $P < 0.05$; 与同日龄对照组比较, ^c $P < 0.05$ (两因素方差分析, Tukey 法检验) RCS: 英国皇家外科学院; IFN- γ : γ 干扰素

CXCL10 和 CXCL11 可随 RP 的发展而表达上调, 并引起视网膜中 T 淋巴细胞和 NK 细胞的浸润, 证实 RP 改变了视网膜内相对免疫豁免的平衡状态, 引起小胶质细胞的激活; 首次阐述 RCS 大鼠视网膜中淋巴细胞和 IFN- γ 的关系, 证明 CD4⁺ T 淋巴细胞和 CD161⁺ NK 细胞是视网膜中 IFN- γ 的主要来源, 淋巴细胞的浸润导致视网膜中 IFN- γ 的质量浓度随 RP 发展逐渐升高。更重要的是, 本研究表明细胞免疫的参与使 RCS 大鼠

视网膜免疫微环境发生了更加复杂的变化,为深入研究视网膜变性的免疫学机制提供了新的启示。

本研究创新性借助悬液微珠芯片平台,发现在 RCS 大鼠 RP 的过程中除小胶质细胞的激活外,IL-2、IFN- γ 、IL-7 和 IL-4 等淋巴细胞相关细胞因子的表达也显著上调,提示淋巴细胞的浸润和获得性免疫反应的激活。其中 IL-2 是促进 T 淋巴细胞成熟和分化,维持 NK 细胞增生的重要细胞因子,在免疫应答和调节中处于极其关键的位置,并且 IL-2 可以促进视网膜中 T 淋巴细胞与视网膜微血管的结合^[16-18];而 IFN- γ 主要由激活的 T 淋巴细胞和 NK 细胞产生,能通过上调细胞表面主要组织抗原提高其免疫原性,继而特异性激活淋巴细胞,引发自身免疫反应或免疫排斥反应,并且 IFN- γ 还可通过活化补体或极化小胶质细胞参与视网膜变性疾病^[19-20]。本研究中发现,伴随 RP 的进程,RCS 大鼠视网膜中不但有 IL-2 和 IFN- γ mRNA 的表达上调,CCL2、CXCL9、CXCL10 和 CXCL11 等淋巴细胞趋化因子的表达水平也逐渐升高,表达差异在变性晚期(P60)尤其显著。其中 CCL2 在视网膜中主要由活化的小胶质细胞分泌^[21],与 AMD 等视网膜变性疾病有密切关系^[22],并且对 T 淋巴细胞,尤其是活化的记忆性 T 淋巴细胞有较强的趋化效应。CXC 趋化因子家族中 3 个重要成员 CXCL9、CXCL10 和 CXCL11,由 IFN- γ 诱导免疫细胞产生和分泌^[23],同样对 T 淋巴细胞和 NK 细胞有很强的趋化作用^[24-25],这也从另一方面说明 IFN- γ 对于淋巴细胞的功能发挥有非常重要的意义。本研究率先从细胞水平、蛋白水平和 mRNA 水平对视网膜中淋巴细胞与 IFN- γ 的关系进行研究,发现 RCS 大鼠变性晚期视网膜中淋巴细胞的浸润伴随 IFN- γ 表达的上调,使视网膜免疫微环境发生了显著变化。

研究表明,RP 可被视为一种神经系统炎症,免疫豁免平衡的改变不但引起原位小胶质细胞的激活和血-视网膜屏障的破坏,还引起外源性巨噬细胞和淋巴细胞在视网膜的浸润,进一步改变视网膜的免疫微环境^[26]。近 60% 的 RP 患者可检测到其外周血淋巴细胞的激活^[27-28],脉络膜视网膜病变患者的玻璃体中也存在自身免疫性 CD4⁺ 和 CD8⁺ 淋巴细胞的活化和浸润,并且大量分泌 IFN- γ ^[29],与本研究在 RCS 大鼠中的研究结果一致。

目前,对于大部分视网膜变性疾病尚无明确有效的治疗方法,细胞替代疗法为视网膜变性疾病受累患者的视力恢复带来了一线曙光^[30-31]。研究人员成功利用间充质干细胞、胚胎干细胞、视网膜祖细胞和多能

干细胞等诱导出表型和功能与视网膜特定细胞相似的治疗细胞^[32-34],在动物实验和临床试验中短期疗效较好^[35-36],但长期观察发现干细胞来源的眼治疗细胞在视网膜微环境中的生存并不理想^[2,33,37]。细胞替代疗法关键在于宿主对同种异基因治疗细胞的免疫排斥反应^[38-39],而变性视网膜微环境中的淋巴细胞是特异性免疫排斥反应的主要效应细胞,应引起干细胞转化医学研究的重视。同时,视网膜中随淋巴细胞浸润而表达上调的 IFN- γ 可以增强干细胞来源的眼治疗细胞的免疫原性,激活淋巴细胞对治疗细胞的识别和攻击,威胁外源性治疗细胞的长期存活和功能,严重影响细胞替代治疗的效果。我们在后期的研究将进一步探究这些淋巴细胞的来源和激活的机制,以及在自身免疫应答和特异性排斥反应中发挥的具体作用,为调控视网膜免疫微环境、改善外源性治疗细胞的长期存活和功能提供免疫学理论基础;基于眼内液或外周血检测,我们希望建立系统评估视网膜变性患者眼内免疫微环境的手段,这对于指导干细胞临床研究和治疗将有重要意义。

综上所述,本研究结果显示 RCS 大鼠 RP 改变了视网膜内相对免疫豁免的微环境,视网膜中淋巴细胞趋化因子和细胞因子表达水平逐渐升高,并在病变后期引起淋巴细胞的浸润和激活,导致 IFN- γ 在视网膜中表达量显著增加,表明细胞免疫的参与是其病理机制之一。本研究结果对于深入认识视网膜免疫微环境内各种免疫细胞和细胞因子在视网膜变性疾病中的作用具有重要意义,也为今后细胞替代治疗、基因治疗、药物治疗致盲眼病提供了免疫学参考。

参考文献

- [1] Kyger M, Worley A, Adamus G. Autoimmune responses against photoreceptor antigens during retinal degeneration and their role in macrophage recruitment into retinas of RCS rats[J]. *J Neuroimmunol*, 2013, 254(1-2): 91-100. DOI:10.1016/j.jneuroim.2012.10.007.
- [2] Grindle CF, Marshall J. Ageing changes in Bruch's membrane and their functional implications[J]. *Trans Ophthalmol Soc U K*, 1978, 98(1): 172-175.
- [3] Penfold PL, Killingsworth MC, Sarks SH. Senile macular degeneration: the involvement of immunocompetent cells[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 1985, 223(2): 69-76.
- [4] Cherepanoff S, McMenamin P, Gillies MC, et al. Bruch's membrane and choroidal macrophages in early and advanced age-related macular degeneration[J]. *Br J Ophthalmol*, 2010, 94(7): 918-925. DOI:10.1136/bjo.2009.165563.
- [5] Wu N, Wang YH, Zhao HS, et al. alpha-Crystallin downregulates the expression of TNF-alpha and iNOS by activated rat retinal microglia *in vitro* and *in vivo*[J]. *Ophthalmic Res*, 2009, 42(1): 21-28. DOI:10.1159/000219681.
- [6] Qu L, Gao L, Xu H, et al. Combined transplantation of human mesenchymal stem cells and human retinal progenitor cells into the

- subretinal space of RCS rats [J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1) : 199 [2018-09-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5428026/>. DOI:10.1038/s41598-017-00241-5.
- [7] Li Z, Zeng Y, Chen X, et al. Neural stem cells transplanted to the subretinal space of rd1 mice delay retinal degeneration by suppressing microglia activation [J]. *Cytherapy*, 2016, 18 (6) : 771-784. DOI:10.1016/j.jcyt.2016.03.001.
- [8] Paunicka K, Chen PW, Niederkorn JY. Role of IFN- γ in the establishment of anterior chamber-associated immune deviation (ACAID)-induced CD8⁺ T regulatory cells [J]. *J Leukoc Biol*, 2012, 91 (3) : 475-483. DOI:10.1189/jlb.0311173.
- [9] Horai R, Zárate-Bladés CR, Dillenburg-Pilla P, et al. Microbiota-dependent activation of an autoreactive T cell receptor provokes autoimmunity in an immunologically privileged site [J]. *Immunity*, 2015, 43 (2) : 343-353. DOI:10.1016/j.immuni.2015.07.014.
- [10] Glenn JV, Mahaffy H, Wu K, et al. Advanced glycation end product (AGE) accumulation on Bruch's membrane: links to age-related RPE dysfunction [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50 (1) : 441-451. DOI:10.1167/iovs.08-1724.
- [11] Crabb JW. The proteomics of drusen [J/OL]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2014, 4 (7) : a017194 [2018-09-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC42799364/>. DOI: 10.1101/cshperspect.a017194.
- [12] Hageman GS, Luthert PJ, Victor CNH, et al. An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2001, 20 (6) : 705-732.
- [13] Boldison J, Chu CJ, Copland DA, et al. Tissue-resident exhausted effector memory CD8⁺ T cells accumulate in the retina during chronic experimental autoimmune uveoretinitis [J]. *J Immunol*, 2014, 192 (10) : 4541-4550. DOI:10.4049/jimmunol.1301390.
- [14] Noailles A, Maneu V, Campello L, et al. Persistent inflammatory state after photoreceptor loss in an animal model of retinal degeneration [J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6 : 33356 [2018-09-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5022039/>. DOI: 10.1038/srep33356.
- [15] Madeira MH, Boia R, Santos PF, et al. Contribution of microglia-mediated neuroinflammation to retinal degenerative diseases [J/OL]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015 : 673090 [2018-08-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4385698/>. DOI:10.1155/2015/673090.
- [16] Liao W, Lin JX, Leonard WJ. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation [J]. *Curr Opin Immunol*, 2011, 23 (5) : 598-604. DOI: 10.1016/j.coi.2011.08.003.
- [17] Khaziri N, Mohammadi M, Aliyari Z, et al. Cord blood mononuclear cells have a potential to produce nk cells using il2rg cytokines [J]. *Adv Pharm Bull*, 2016, 6 (1) : 5-8. DOI:10.15171/apb.2016.01.
- [18] Hill TA, Stanford MR, Graham EM, et al. A new method for studying the selective adherence of blood lymphocytes to the microvasculature of human retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997, 38 (12) : 2608-2618.
- [19] Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses [J]. *Adv Immunol*, 2007, 96 : 41-101. DOI:10.1016/S0065-2776(07)96002-2.
- [20] Jiang K, Cao S, Cui JZ, et al. Immuno-modulatory effect of IFN-gamma in AMD and its role as a possible target for therapy [J]. *J Clin Exp Ophthalmol*, 2013, Suppl 2 : 0071-0076. DOI:10.4172/2155-9570-S2-007.
- [21] Carr MW, Roth SJ, Luther E, et al. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91 (9) : 3652-3656.
- [22] Rutar M, Valter K, Natoli R, et al. Synthesis and propagation of complement C3 by microglia/monocytes in the aging retina [J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9 (4) : e93343 [2018-09-06]. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0093343>. DOI: 10.1371/journal.pone.0093343.
- [23] Luster AD, Unkles JC, Ravetch JV. Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins [J]. *Nature*, 1985, 315 (6021) : 672-676.
- [24] Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, et al. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking [J]. *J Immunol*, 2002, 168 (7) : 3195-3204.
- [25] Maghazachi AA, Skalhogg BS, Rolstad B, et al. Interferon-inducible protein-10 and lymphotactin induce the chemotaxis and mobilization of intracellular calcium in natural killer cells through pertussis toxin-insensitive and-insensitive heterotrimeric G-proteins [J]. *FASEB J*, 1997, 11 (10) : 765-774.
- [26] Buschini E, Piras A, Nuzzi R, et al. Age related macular degeneration and drusen: neuroinflammation in the retina [J]. *Prog Neurobiol*, 2011, 95 (1) : 14-25. DOI:10.1016/j.pneurobio.2011.05.011.
- [27] McMurtrey JJ, MOM T. A review of the immunologic findings observed in retinitis pigmentosa [J/OL]. *Surv Ophthalmol*, 2018, pii: S0039-6257 (17) 30267-9 [2018-09-10]. [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039-6257\(17\)30267-9](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039-6257(17)30267-9). DOI: 10.1016/j.survophthal.2018.03.002.
- [28] Williams LL, Shannon BT, Leguire LE. Immune alterations associated with T lymphocyte activation and regulation in retinitis pigmentosa patients [J]. *Clin Immunol Immunopathol*, 1988, 49 (3) : 380-389.
- [29] Kuiper JJ, Rothova A, Schellekens PA, et al. Detection of choroid- and retina-antigen reactive CD8 (+) and CD4 (+) T lymphocytes in the vitreous fluid of patients with birdshot chorioretinopathy [J]. *Hum Immunol*, 2014, 75 (6) : 570-577. DOI:10.1016/j.humimm.2014.02.012.
- [30] Bi YY, Feng DF, Pan DC. Stem/progenitor cells: a potential source of retina-specific cells for retinal repair [J]. *Neurosci Res*, 2009, 65 (3) : 215-221. DOI:10.1016/j.neures.2009.07.008.
- [31] Lamba DA, Gust J, Reh TA. Transplantation of human embryonic stem cell-derived photoreceptors restores some visual function in Crx-deficient mice [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4 (1) : 73-79. DOI:10.1016/j.stem.2008.10.015.
- [32] Ng TK, Fortino VR, Pelaez D, et al. Progress of mesenchymal stem cell therapy for neural and retinal diseases [J]. *World J Stem Cells*, 2014, 6 (2) : 111-119. DOI:10.4252/wjsc.v6.i2.111.
- [33] Luo J, Baranov P, Patel S, et al. Human retinal progenitor cell transplantation preserves vision [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289 (10) : 6362-6371. DOI:10.1074/jbc.M113.513713.
- [34] Takahashi M. Retinal cell therapy using iPS cells [J]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*, 2016, 120 (3) : 210-225.
- [35] Algere PV. Clinical possibilities in retinal pigment epithelial transplantations [J/OL]. *Acta Ophthalmol Scand*, 1997, 75 (1) : 1 [2018-08-03]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-0420.1997.tb00239.x>.
- [36] Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G, et al. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report [J]. *Lancet*, 2012, 379 (9817) : 713-720. DOI:10.1016/S0140-6736(12)60028-2.
- [37] Lai CC, Gouras P, Doi K, et al. Local immunosuppression prolongs survival of RPE xenografts labeled by retroviral gene transfer [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41 (10) : 3134-3141.
- [38] Algere PV, Gouras P, Dalfgård KE. Long-term outcome of RPE allografts in non-immunosuppressed patients with AMD [J]. *Eur J Ophthalmol*, 1999, 9 (3) : 217-230.
- [39] Binder S, Stanzel BV, Krebs I, et al. Transplantation of the RPE in AMD [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2007, 26 (5) : 516-554. DOI:10.1016/j.preteyeres.2007.02.002.

(收稿日期:2018-09-15)

(本文编辑:刘艳)