

ResolvinE1 对高危角膜移植免疫排斥反应的抑制作用

王菡 罗丹 李婷 赵敏

400016 重庆医科大学附属第一医院眼科 重庆市眼科研究所 眼科学重庆市重点实验室

通信作者:赵敏,Email:minzhao2002@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.03.005

【摘要】 背景 以往防治角膜移植术后排斥反应的药物存在诱发局部或全身不良反应的风险,研究表明 resolvinE1 (RvE1) 能够调节辅助性 T 细胞 1 (Th1) 型免疫反应,但其对高危角膜移植术后的植片排斥反应有无抑制作用尚不清楚。目的 观察高危角膜移植动物模型局部应用 RvE1 对植片免疫排斥反应的抑制作用。方法 以 BALB/c 小鼠为受体,C57BL/6 小鼠为供体行角膜移植术。采用随机数字表法将 90 只 BALB/c 小鼠随机分成异体角膜移植组、异体角膜移植+RvE1 组和自体角膜移植组,每组各 30 只。BALB/c 小鼠右眼先用缝线法刺激 2 周以建立高危角膜移植眼模型,然后行穿透角膜移植术。异体角膜移植组和异体角膜移植+RvE1 组小鼠右眼行异体角膜移植,自体角膜移植组小鼠将右眼角膜植片旋转 180° 后缝合于植床上。异体角膜移植组及自体角膜移植组小鼠术后每日用生理盐水 10 μ l 结膜下注射 1 次,异体角膜移植+RvE1 组小鼠术后同法注射终质量浓度为 0.1 μ g/ μ l 的 RvE1 10 μ l,连续 7 d。术后裂隙灯显微镜下观察小鼠角膜植片反应并对其排斥反应进行评分。术后 21 d 处死各组小鼠各 20 只,收集小鼠术眼角膜、眼球和术眼侧颈部淋巴结,采用苏木精-伊红染色法观察各组小鼠角膜植片的组织病理学变化;采用免疫组织化学法检测术眼角膜中 CD4 及 γ 干扰素 (IFN- γ) 的表达;采用流式细胞术检测术眼侧颈部淋巴结淋巴细胞中 Th1 细胞 (CD3⁺CD8a⁻IFN- γ ⁺) 比例;采用荧光定量 PCR 法检测 Th1 细胞相关因子白细胞介素-2 (IL-2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IFN- γ 及 T-bet mRNA 的相对表达水平。结果 异体角膜移植+RvE1 组小鼠角膜植片存活时间为 (28.5 \pm 1.7) d,明显长于异体角膜移植组的 (14.0 \pm 1.6) d,差异有统计学意义 ($t=4.14, P<0.001$),自体角膜移植组小鼠植片在术后 50 d 存活率为 100%。苏木精-伊红染色显示,异体角膜移植+RvE1 组和自体角膜移植组小鼠角膜植片水肿及炎性细胞浸润程度均轻于异体角膜移植组。免疫组织化学法检测显示,各组角膜全层均有 CD4 表达,而 IFN- γ 主要表达于角膜上皮层,异体角膜移植组小鼠角膜组织中 CD4 和 IFN- γ 阳性细胞数均明显多于异体角膜移植+RvE1 组和自体角膜移植组。流式细胞术检测显示,异体角膜移植+RvE1 组和自体角膜移植组小鼠淋巴细胞中 Th1 细胞比例分别为 (1.07 \pm 0.25)% 和 (0.85 \pm 0.12)%,明显低于异体角膜移植组的 (1.56 \pm 0.20)%,差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$)。荧光定量 PCR 检测显示,异体角膜移植组小鼠角膜中 IL-2、TNF- α 、IFN- γ 及 T-bet mRNA 的相对表达量明显高于异体角膜移植+RvE1 组和自体角膜移植组,差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$)。结论 RvE1 可抑制小鼠高危角膜移植排斥反应,作用机制可能与其下调角膜植片和淋巴细胞中 Th1 细胞及相关细胞因子的表达有关。

【关键词】 角膜/免疫; 角膜移植/免疫; 植片排斥反应; 十二碳戊烯酸/拟似物 & 衍生物; ResolvinE1; 辅助性 T 细胞 1; 细胞因子; 动物模型; 近交系 BALB/c 小鼠; 近交系 C57BL/6 小鼠

基金项目:国家自然科学基金项目 (81170822、81201771)

Experimental study on inhibiting graft rejection following high-risk cornea transplantation by resolvinE1 in mice Wang Han, Luo Dan, Li Ting, Zhao Min

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing Key Lab of Ophthalmology, Chongqing Eye Institute, Chongqing 400016, China

Corresponding author: Zhao Min, Email: minzhao2002@163.com

【Abstract】 **Background** The conventional drugs for preventing and treating graft rejection have the risks of inducing adverse responses. Researches showed that resolvinE1 (RvE1) can regulate Th1 cell-mediated immunoreaction. However, whether RvE1 has an inhibit effect on high-risk corneal graft is unclear now. **Objective** This study was to investigate the effects of RvE1 on immune rejection in high-risk corneal grafting mouse models.

Methods SPF BALB/c mice were used as recipients, C57BL/6 mice were as donors. Ninety BALB/c mice were divided into corneal allograft group, corneal allograft+RvE1 group and corneal autograft group according to random number table. High-risk corneal graft models were established by corneal suturing for 14 days and followed by penetrating keratoplasty in recipients. Allograft keratoplasty was performed on the right eyes in the mice of corneal

allograft group and corneal allograft+RvE1 group, and self-corneal graft rotated 180° was transplanted on the right eyes in the mice of autograft group. Normal saline solution of 10 μ l was subconjunctivally injected after surgery once per day for 7 days in the corneal allograft group and corneal autograft group, and 10 μ l RvE1 (1 μ g) was used in the same way in the corneal allograft+RvE1 group. The recipient eyes were examined for potential rejection signals with slit lamp microscope and calculated the mean survival time and rejection index (RI). The histopathology was examined 21 days after modeling by hematoxylin and eosin staining. The expressions of CD4 and interferon- γ (IFN- γ) in the corneas were detected by immunohistochemistry. Th1 cell (CD3⁺CD8a⁻IFN- γ ⁺) percentage in draining lymph nodes were measured by flow cytometry. The mRNA expression levels of interleukin-2 (IL-2), tumor necrosis factor- α (TNF- α), IFN- γ and T-bet were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** The mean survival time of grafts was (28.5 \pm 1.7) days in the corneal allograft group, and that in the corneal allograft+RvE1 group was (14.0 \pm 1.6) days, showing a significant difference between them ($t=4.14, P<0.001$), while the survival rate was 100% at 50 days after modeling in the corneal autograft group. Corneal edema and inflammatory cell infiltration were slight in the corneal allograft+RvE1 group and corneal autograft group compared with corneal allograft group. CD4 was positively expressed in corneal tissue, and IFN- γ was expressed in corneal epithelium. The CD4⁺ and IFN- γ ⁺ cell number was decreased in the corneal allograft+RvE1 group and corneal autograft group compared with corneal allograft group under the fluorescence microscope. The percentages of Th1 cells in lymph cells of corneal allograft +RvE1 group and corneal autograft group were (1.07 \pm 0.25)%, (0.85 \pm 0.12)%, respectively, which were significantly lower than (1.56 \pm 0.20)% in the corneal allograft group (both at $P<0.05$). The expressions of IL-2, TNF- α , IFN- γ and T-bet mRNA in the corneal tissue in the corneal allograft group were higher than those in the corneal allograft+RvE1 group and corneal autograft group (all at $P<0.05$). **Conclusions** RvE1 inhibits graft rejection in high-risk allograft mouse models probably by down-regulating the Th1 cell percentage in lymph cells and the expression of inflammation-related cytokines in corneal grafts.

[Key words] Cornea/immunology; Corneal transplantation/immunology; Graft rejection; Eicosapentaenoic acid/analogues & derivatives; ResolvinE1; T helper cell 1; Cytokines; Disease models, animal; Mice, inbred BALB/c; Mice, inbred C57BL/6

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81170822, 81201771)

角膜病是世界上主要的致盲眼病之一,目前治疗角膜盲的主要方法是角膜移植术。尽管角膜缺乏血管及淋巴管而具有免疫赦免特性,但高危角膜移植患者存在角膜新生血管增加及炎症细胞浸润,因此术后免疫排斥反应的发生率仍较高。研究表明,CD4⁺T 淋巴细胞激活是诱发角膜移植排斥反应的主要因素^[1]。CD4⁺T 细胞在不同的细胞因子诱导下主要分化为 4 个亚群且表达不同的转录因子,分别为 Th1 (T-bet)、Th2 (GATA-3)、Th17 (ROR γ t) 和 Treg (FoxP3)^[2],其中 Th1 型细胞主要产生白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2)、 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等促炎性细胞因子,诱发局部炎症反应,在介导免疫排斥反应中发挥重要作用^[3]。ResolvinE1 (RvE1) 是 ω 3-二十碳五烯酸 (ω 3-eicosapentaenoic acid, ω 3-EPA) 多不饱和脂肪酸的 E 类衍生物,可通过抑制 CD4⁺T 细胞的浸润而减少相关炎性因子的分泌,以发挥免疫调节作用^[4],但 RvE1 是否能够减少高危角膜移植眼发生免疫排斥反应的风险尚不清楚。本研究中将 RvE1 应用于小鼠高危角膜移植模型,探讨 RvE1 对小鼠高危角膜移植眼发生免疫排斥反应的作用及其机制,为高危角膜移植术后免疫排斥反应的预防和治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

90 只 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠作为受体,30 只雄性 C57BL/6 小鼠为供体,体质量为 (16 \pm 4)g,鼠龄 4 ~ 6 周,由重庆医科大学动物实验中心提供及 SPF 级适应性饲养 50 d。所有小鼠术前经裂隙灯显微镜检查眼部未见异常,采用随机数字表法将小鼠分为异体角膜移植组、异体角膜移植+RvE1 组和自体角膜移植组,每组 30 只。异体角膜移植组及自体角膜移植组小鼠术后结膜下注射生理盐水 10 μ l,每天 1 次,连续 7 d;异体角膜移植+RvE1 组小鼠术后结膜下注射等容积生理盐水稀释的 RvE1 (加拿大 TRC 公司),每天 1 次,连续 7 d,终质量浓度为 0.1 μ g/ μ l。实验动物的饲养和使用符合国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》。

1.2 方法

1.2.1 小鼠高危角膜移植模型的建立 BALB/c 受体小鼠右眼为术眼,用 11-0 缝线于术眼上方角膜基质上缝 3 个线结,2 周后拆除缝线,行穿透角膜移植术 (penetrating keratoplasty, PKP),异体角膜移植+RvE1 组用眼科环钻取雄性 C57BL/6 小鼠双眼中央全层角膜,直径为 2 mm,并用过量麻醉法处死。受体小鼠用

质量分数 4% 水合氯醛 (10 ml/kg) 腹腔内注射麻醉, 术前 15 min 用盐酸奥布卡因滴眼液点眼行眼表麻醉, 用复方托吡卡胺滴眼液点眼充分扩瞳后, 将角膜植片移植于受体角膜植床上, 植床直径为 1.5 mm, 用 11-0 缝线 (日本 MANY 公司) 间断缝合 8~9 针, 线结暴露不包埋, 术后前房注入黏弹剂。自体角膜移植组小鼠将自身角膜植片旋转 180° 后缝合于植床上。术毕术眼结膜囊内涂左氧氟沙星眼膏。术后 5 d 内若小鼠出现前房感染、出血、虹膜嵌顿等并发症或死亡者均剔除, 重新造模进行补充。

1.2.2 裂隙灯显微镜下观察各组小鼠角膜情况 自术后第 2 天起每日裂隙灯显微镜下观察小鼠角膜情况, 参考 Sonoda 等^[5] 的评分标准进行评分, 以角膜混浊、水肿及新生血管 3 项评分之和作为排斥反应指数 (rejection index, RI), 植片混浊 1 项达到 3 分或者 RI ≥ 5 时视为排斥反应发生。记录角膜存活时间, 持续观察 50 d。

1.2.3 各组小鼠角膜组织病理学检查 术后 21 d 任意处死各组小鼠各 4 只, 获取术眼完整眼球置于质量分数 4% 多聚甲醛中固定过夜, 经乙醇脱水、二甲苯透明后常规石蜡包埋, 4 μm 厚切片, 苏木精-伊红染色, 光学显微镜下观察角膜组织。

1.2.4 免疫组织化学染色检测术眼 CD4 和 IFN-γ 的表达 各组取术后 21 d 小鼠 4 只, 术眼眼球固定和切片方法同 1.2.3, 将眼球组织切片置于有明胶的载玻片上, 采用体积分数 3% H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶, 山羊血清封闭, 分别滴加兔抗小鼠 CD4 抗体 (抗体编号: ab183685, 工作浓度: 1:1 000, 英国 Abcam 公司) 及兔抗小鼠 IFN-γ 抗体 (抗体编号: SC-8308, 工作浓度: 1:50, 美国 Santa Cruz 公司), 4 °C 过夜, 阴性对照片用 PBS 代替一抗。洗涤后加辣根过氧化物酶标记的抗兔 IgG (抗体编号: PV9001, 北京中杉金桥生物技术有限公司), DAB 显色, 苏木素复染, 光学显微镜下观察, 以细胞质中出现黄色或棕黄色染色为 CD4 或 IFN-γ 表达阳性。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 检测角膜中 IL-2、TNF-α、T-bet 和 IFN-γ mRNA 的表达 将小鼠完整角膜 (含角膜缘) 超声粉碎, 采用 Trizol (美国 Life 公司) 法提取总 RNA, 逆转录为 cDNA, 用 10 μl 反应体系进行扩增 [Takara 宝生物工程 (大连) 有限公司]: 95 °C 反应 30 s, 95 °C 反应 15 s, 60 °C 反应 45 s, 共 40 个循环。引物由重庆生工公司合成。GAPDH 上游引物: 5'-AGAAGGTGGTGAAGCAGGCATC-3', 下游引物: 5'-CGAAGGTGGAAGAGTGGGAGTTG-3'; IL-2 上游引物: 5'-GGAACCTGAACTCCCCAGG-3', 下游引物: 5'-

AATCCAGAACATGCCGCAGA-3'; TNF-α 上游引物: 5'-CTTGTTCCTCTCTTTTGCTTA-3', 下游引物: 5'-CTTTATTTCTCTCAATGACCCGTAG-3'; T-bet 上游引物: 5'-TCAACCAGCACCAGACAGAG-3', 下游引物: 5'-CCACATCCACAAACATCCTG-3'; IFN-γ 上游引物: 5'-AGTTCTGGGCTTCTCCTCCT-3', 下游引物: 5'-GGCTTTCATGACTGTGCCG-3'。以 GAPDH 为内参, 采用 2^{-ΔΔCt} 法计算靶基因的相对表达量。

1.2.6 流式细胞术检测术眼侧颈部淋巴结中 Th1 细胞比例 术后 21 d, 取各组 6 只小鼠术眼侧颈部淋巴结, 研磨过滤后计数, 每组样本接种于 24 孔培养板, 加入 PMA 和 ionomycin (美国 Sigma 公司) 在 37 °C、体积分数 5% CO₂ 条件下刺激 1 h, 加入布雷菲德菌素 A (brefeldin A, BFA) (美国 MedChem Express 公司) 再次孵育 4 h, 洗涤后转入流式管并将细胞分为两部分, 每管加入抗鼠 CD3-APC 和抗鼠 CD8a-FITC (美国 eBioscience 公司) 混匀, 4 °C 避光孵育 30 min, 洗涤后加入破膜剂 30 min, 再次洗涤, 加入抗鼠 IFN-γ-PE (美国 eBioscience 公司) 混匀, 避光孵育 30 min, 洗涤并重悬细胞后上机检测。通过 FACS Calibur 和 FlowJo 7.3 软件进行分析, 计算术侧颈部淋巴结中 Th1 细胞 (CD3⁺CD8a⁻IFN-γ⁺) 在淋巴结 CD3 细胞中所占比例。

1.3 统计学方法

采用 SAS 9.2 统计学软件 (美国 SAS 公司) 进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 W 检验呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间数据资料经 Levene 检验方差齐 (均 $P > 0.05$)。采用完全随机分组单因素干预三水平研究设计, 异体角膜移植组与异体角膜移植+RvE1 组间植片生存时间的差异比较采用独立样本 *t* 检验; 异体角膜移植组、异体角膜移植+RvE1 组和自体角膜移植组间术眼侧颈部淋巴结中 Th1 细胞比例及角膜植片中 IL-2、TNF-α、T-bet 及 IFN-γ mRNA 相对表达量的总体差异比较均采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK-*q* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。角膜植片生存曲线采用 Kaplan-Meier 法。

2 结果

2.1 各组小鼠术后植片的一般情况

术后 21 d, 角膜移植术眼植片均发生排斥反应, 植片明显混浊且水肿增厚, 大量新生血管长入 (图 1A)。异体角膜移植+RvE1 组小鼠角膜植片水肿及混浊程度较异体角膜移植组明显减轻, 新生血管明显减少 (图 1B)。自体角膜移植组小鼠角膜植片新生血管少, 角膜呈轻度混浊水肿, 观察期内未发生明显排斥反应 (图 1C)。

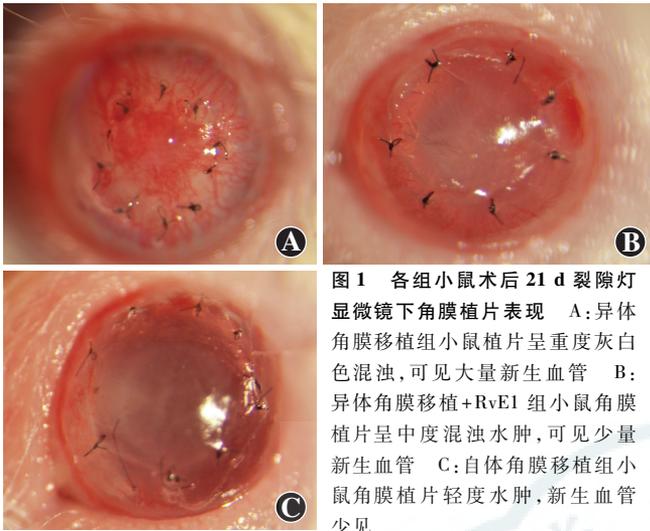


图 1 各组小鼠术后 21 d 裂隙灯显微镜下角膜植片表现 A: 异体角膜移植组小鼠植片呈重度灰白色混浊, 可见大量新生血管 B: 异体角膜移植+RvE1 组小鼠角膜植片呈中度混浊水肿, 可见少量新生血管 C: 自体角膜移植组小鼠角膜植片轻度水肿, 新生血管少见

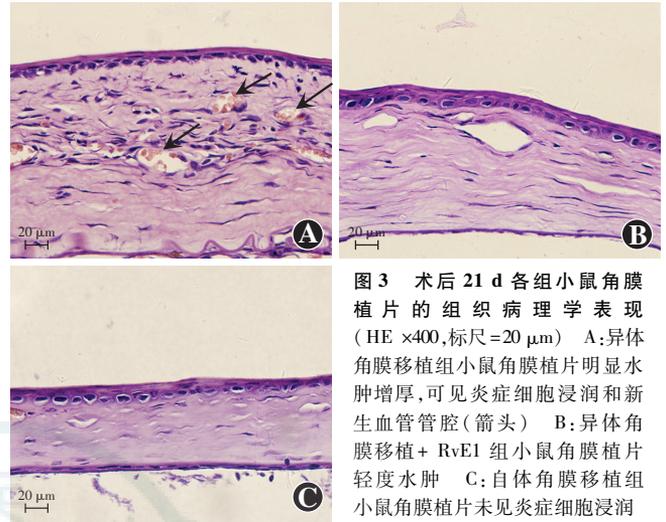


图 3 术后 21 d 各组小鼠角膜植片的组织病理学表现 (HE ×400, 标尺=20 μm) A: 异体角膜移植组小鼠角膜植片明显水肿增厚, 可见炎症细胞浸润和新生血管管腔(箭头) B: 异体角膜移植+RvE1 组小鼠角膜植片轻度水肿 C: 自体角膜移植组小鼠角膜植片未见炎症细胞浸润

2.2 各组植片的存活时间及生存曲线

异体角膜移植+RvE1 组小鼠角膜植片存活时间为(28.5±1.7)d, 明显长于异体角膜移植组的(14.0±1.6)d, 差异有统计学意义($t=4.14, P<0.001$), 2 个组植片生存率为 50% 的时间分别为 14 d 和 28 d, 自体角膜移植组观察期间内植片无明显排斥反应, 观察 50 d 植片存活率为 100% (图 2)。

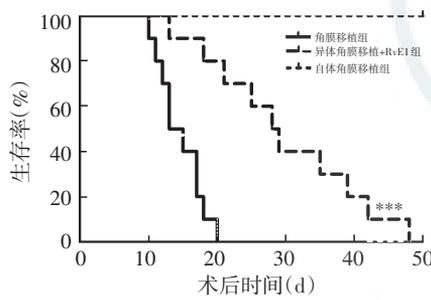


图 2 各组大鼠角膜植片生存曲线 异体角膜移植组和异体角膜移植+RvE1 组术后角膜植片生存率为 50% 的时间分别为术后 14 d 和 28 d, 自体角膜移植组小鼠至术后 50 d 植片生存率为 100% (n=10)

2.3 各组大鼠角膜植片的组织病理学表现

术后 21 d, 异体角膜移植组小鼠角膜植片明显水肿增厚, 大量炎症细胞浸润, 胶原纤维排列紊乱, 可见大量新生血管形成; 异体角膜移植+RvE1 组小鼠角膜植片增厚程度明显轻于异体角膜移植组, 此外与异体角膜移植组比较, 植片胶原纤维排列较规则, 炎症细胞浸润及新生血管均减少; 自体角膜移植组角膜植片未见明显水肿, 胶原纤维排列规则, 未见明显的炎症细胞浸润(图 3)。

2.4 各组小鼠角膜组织中 CD4 及 IFN-γ 的表达情况

术后 21 d, 免疫组织化学染色显示, 异体角膜移植组小鼠角膜全层中均可见 CD4 呈强阳性表达, 阳性反应细胞数明显多于异体角膜移植+RvE1 组和自体角膜移植组, 自体角膜移植组 CD4 阳性反应数最少, 反应强度最弱。异体角膜移植组小鼠 IFN-γ 主要表达于

上皮细胞及部分基质细胞, 异体角膜移植+RvE1 组 IFN-γ 在角膜中的表达弱于异体角膜移植组, 主要集中在角膜上皮层, 自体角膜移植组 IFN-γ 的表达最弱, 可见上皮层中少量散在阳性细胞(图 4)。

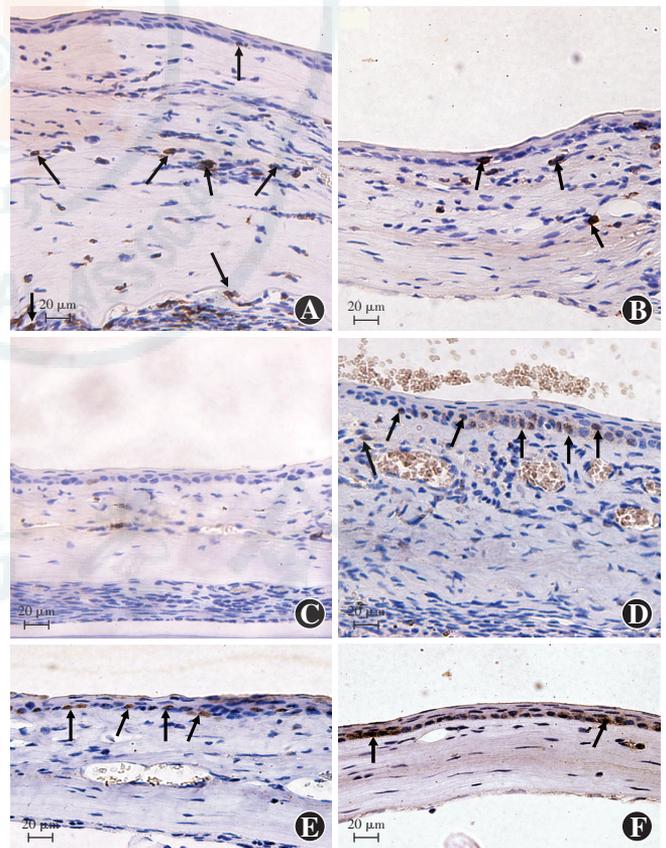


图 4 免疫组织化学法检测各组角膜植片中 CD4 和 IFN-γ 的表达 (DAB ×400, 标尺=20 μm) A: 异体角膜移植组小鼠角膜全层可见大量 CD4 阳性细胞, 呈棕色染色(箭头) B: 异体角膜移植+RvE1 组小鼠角膜组织中 CD4 阳性细胞较异体角膜移植组减少(箭头) C: 自体角膜移植组小鼠角膜组织中少有 CD4 阳性细胞 D: 异体角膜移植组小鼠角膜中可见大量 IFN-γ 阳性反应细胞(箭头) E: 异体角膜移植+RvE1 组小鼠角膜组织中 IFN-γ 阳性反应细胞较异体角膜移植组减少(箭头) F: 自体角膜移植组小鼠角膜组织中可见少量 IFN-γ 阳性反应细胞(箭头)

2.5 各组小鼠术眼侧颈部淋巴结中 Th1 细胞比例

角膜移植术后 21 d, 异体角膜移植组、异体角膜移植+ RvE1 组和自体角膜移植组小鼠术眼侧颈部淋巴结中 Th1 细胞 (CD3⁺CD8a⁻IFN- γ ⁺) 在淋巴结 CD3 细胞中所占比例分别为 (1.56 \pm 0.20)%、(1.07 \pm 0.25)% 和 (0.85 \pm 0.12)%, 3 个组间总体比较差异有统计学意义 ($F=13.60, P=0.00$)。与异体角膜移植组相比, 异体角膜移植+ RvE1 组和自体角膜移植组小鼠颈部淋巴结中 Th1 细胞比例明显降低, 其中自体角膜移植组小鼠颈部淋巴结中 Th1 细胞 (IFN- γ ⁺ 细胞) 比例明显低于异体角膜移植组和异体角膜移植+ RvE1 组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$) (图 5)。

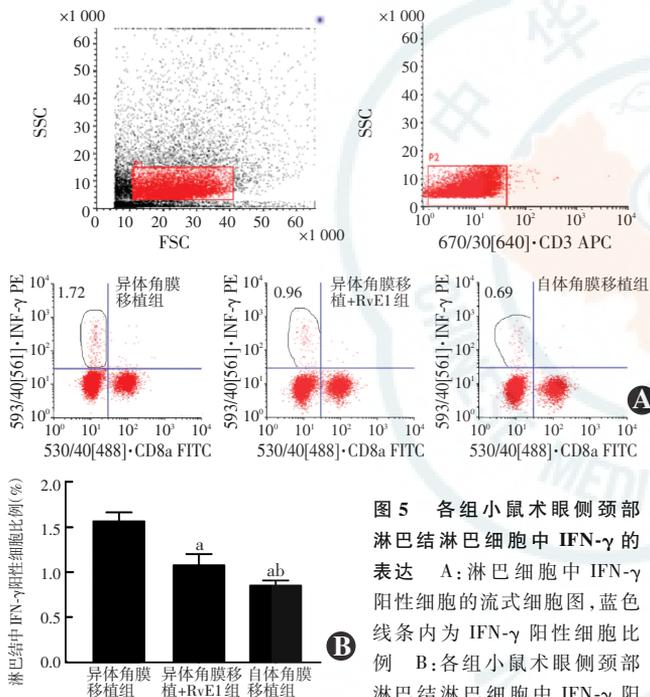


图 5 各组小鼠术眼侧颈部淋巴结淋巴细胞中 IFN- γ 的表达 A: 淋巴细胞中 IFN- γ 阳性细胞的流式细胞图, 蓝色线条内为 IFN- γ 阳性细胞比例 B: 各组小鼠术眼侧颈部淋巴结淋巴细胞中 IFN- γ 阳性细胞比例的量化比较 $F=13.60, P=0.00$ 。与异体角膜移植组比较, ^a $P<0.05$; 与异体角膜移植+ RvE1 组比较, ^b $P<0.05$ (单因素方差分析, SNK- q 检验, $n=6$) RvE1: resolvinE1; IFN: 干扰素

2.6 各组小鼠角膜植片中 IL-2、TNF- α 、T-bet 和 IFN- γ mRNA 的表达

术后 21 d, 异体角膜移植组、异体角膜移植+ RvE1 组和自体角膜移植组小鼠角膜植片中 IL-2 mRNA 表达水平的总体比较差异有统计学意义 ($F=5.55, P=0.01$), 其中异体角膜移植+ RvE1 组植片中 IL-2 mRNA 表达水平明显低于异体角膜移植组, 差异有统计学意义 ($P<0.01$), 自体角膜移植组小鼠角膜植片中 IL-2 mRNA 表达水平低于异体角膜移植组, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$); 异体角膜移植组、异体角膜移植+ RvE1 组和自体角膜移植组小鼠角膜植片中 TNF- α mRNA 水平的总体比较差异有统计学意义 ($F=9.52,$

$P<0.01$), 异体角膜移植+ RvE1 组和自体角膜移植组小鼠角膜植片中 TNF- α mRNA 水平均明显低于异体角膜移植组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.01$); 异体角膜移植+ RvE1 组和自体角膜移植组中 IFN- γ mRNA 表达水平均低于异体角膜移植组, 差异有统计学意义 ($F=21.75, P<0.01$), 其中, 异体角膜移植+ RvE1 组降低最为明显; 异体角膜移植组、异体角膜移植+ RvE1 组和自体角膜移植组小鼠角膜植片中 Th1 细胞的特征性表达因子 T-bet mRNA 的表达水平总体比较差异有统计学意义 ($F=9.72, P=0.01$), 异体角膜移植组小鼠角膜植片中 T-bet mRNA 的表达水平明显高于异体角膜移植+ RvE1 组和自体角膜移植组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$), 异体角膜移植+ RvE1 组与自体角膜移植组间小鼠角膜植片中 IL-2、TNF- α 、T-bet 和 IFN- γ mRNA 的比较差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$) (表 1)。

表 1 术后 21 d 各组角膜植片中 IL-2、TNF- α 、IFN- γ 和 T-bet mRNA 相对表达量的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	IL-2 mRNA	TNF- α mRNA	IFN- γ mRNA	T-bet mRNA
异体角膜移植组	6	1.10 \pm 0.54	1.01 \pm 0.19	1.00 \pm 0.11	1.02 \pm 0.22
异体角膜移植+RvE1 组	6	0.53 \pm 0.13 ^a	0.51 \pm 0.23 ^a	0.20 \pm 0.16 ^a	0.42 \pm 0.06 ^a
自体角膜移植组	6	0.73 \pm 0.12 ^a	0.32 \pm 0.06 ^a	0.40 \pm 0.20 ^a	0.42 \pm 0.23 ^a
F 值		5.55	9.52	21.75	9.72
P 值		0.01	0.00	0.00	0.01

注: 与各自的异体角膜移植组比较, ^a $P<0.01$ (单因素方差分析, SNK- q 检验) IL: 白细胞介素; TNF: 肿瘤坏死因子; IFN: 干扰素; RvE1: resolvinE1

3 讨论

高危角膜移植患者由于角膜新生血管的生长而破坏了角膜正常的微环境和角膜免疫赦免的解剖基础, 导致术后排斥反应的发生率明显升高^[6]。传统抗移植排斥反应的药物对肝功能和肾功能有一定的毒性作用, 部分药物眼部长期间局部使用有引起青光眼、白内障等并发症的风险, 如肾上腺皮质激素、环孢素等。因此, 近年来研发高效、低毒的抗免疫排斥反应药物是研究的热点之一。

Rv 是近年来发现的一种具有较强抗炎作用的多不饱和脂肪酸衍生物^[7], 根据其前体结构及合成途径的不同, 可分为 RvD、RvE 及阿司匹林触发的 AT-RvD, 其中 RvE1 在眼科的应用研究较多, 已有文献报道 RvE1 可作为一种新型的高效低毒抗炎药物用于干眼的治疗, 可抑制 CD4⁺T 细胞及相关炎症因子, 对结膜杯状细胞发挥保护作用, 恢复泪液分泌率^[8-9]。Rajasagi 等^[10]用 RvE1 对单纯疱疹性角膜炎模型进行

治疗,发现 RvE1 可减少角膜中 CD4⁺T 细胞及中性粒细胞的浸润,降低 IFN- γ 、IL-6 等促炎性细胞因子的分泌,减轻角膜炎症反应。Torricelli 等^[11]研究发现,兔屈光性角膜切削术后局部应用 RvE1 可减少组织中成纤维细胞的增生,减轻术后角膜混浊程度。Levy 等^[12]则发现,应用 RvE1 可有效减轻小鼠肾移植术后移植物的炎症反应,并提高移植物的存活率。上述研究均证实了 RvE1 能够通过抑制炎症因子的分泌而延长移植器官的生存时间,但其是否可以抑制角膜移植术后免疫排斥反应,目前尚缺乏相关文献报道,故本研究利用目前国际上通用的小鼠角膜移植模型进行了相关研究。本研究中发现,RvE1 结膜下注射可有效抑制角膜植片的排斥反应,延长植片存活时间。植片存活期内成纤维细胞的增生可导致胶原纤维排列紊乱,加速植片的免疫排斥反应。本研究通过常规组织病理学检查显示,RvE1 可有效减轻角膜植片水肿及炎症细胞浸润,维持角膜正常的板层结构,减轻了角膜移植免疫排斥反应。

角膜移植免疫排斥的发生过程复杂,与免疫炎症反应相关的多种细胞因子及炎症介质介导的炎症反应密切相关。在间接抗原识别途径中,CD4⁺T 淋巴细胞识别外源性主要组织相容性抗原复合物 (major histocompatibility complex, MHC) 并进而活化和分泌相关细胞因子,激活 CD8⁺T 细胞和 B 淋巴细胞,引发免疫应答,导致移植排斥反应。研究表明,CD4 单克隆抗体对角膜移植模型植片排斥反应的预防作用好于 CD8 抗体,使用药物抑制角膜移植术后 CD4 细胞的表达可使植片存活率明显增高^[13],故认为 CD4⁺T 淋巴细胞是介导角膜移植免疫排斥反应主要的细胞群体。本研究中通过免疫组织化学法检测发现,RvE1 可减轻角膜植片中 CD4⁺T 细胞的浸润程度,提示局部应用 RvE1 可抑制排斥反应的发生。CD4⁺T 细胞在不同细胞因子的诱导下可分化为 Th1、Th2、Th17 和 Treg 4 种亚型,其中 Th1 细胞表达特征性转录因子 T-bet,主要分泌 IL-2、TNF- α 、IFN- γ 等相关细胞因子,介导细胞免疫及局部炎症反应,从而促进角膜免疫排斥反应。研究表明,Th1 细胞在同种异体角膜移植排斥反应中发挥关键作用^[14],高危角膜移植术后 Th1 细胞在颈部淋巴结中产生并经新生血管、淋巴管引流至眼部,分泌相关细胞因子,诱发炎症反应,引起移植排斥反应^[15]。在 Th1 细胞分泌的多种细胞因子中,IFN- γ 是强有力的促炎性细胞因子,可上调 MHC I 类和 II 类因子的表达,导致趋化因子表达及白细胞浸润,介导组织炎症反应,在急性炎症反应及免疫排斥反应中发挥重要作用^[16]。

本研究中观察到,异体角膜移植组小鼠颈部淋巴结中 Th1 相关细胞的比例明显高于自体角膜移植组,而异体角膜移植+RvE1 组小鼠颈部淋巴结中 Th1 细胞比例明显降低。本研究中还显示,异体角膜移植组中小鼠角膜上皮及基质中 IFN- γ 呈高表达,而异体角膜移植+RvE1 组角膜上皮及基质中 IFN- γ 表达明显减少,自体角膜移植组小鼠角膜中 IFN- γ 表达量最低,说明局部应用 RvE1 能够抑制 Th1 细胞在淋巴结的流出,进而减少 IFN- γ 在角膜组织中的表达。有学者对小鼠角膜移植排斥反应中植片内细胞因子的表达水平进行检测,发现 TNF- α 是角膜移植术后局部参与调控的主要因子^[17]。本研究中发现,异体角膜移植组小鼠中 Th1 细胞相关细胞因子 IL-2、TNF- α 及 IFN- γ mRNA 的表达水平均明显高于自体角膜移植组,异体角膜移植+RvE1 组角膜中相关因子的表达水平明显低于异体角膜移植组,表明 RvE1 可通过下调 Th1 相关细胞因子的表达水平而抑制角膜植片的免疫排斥反应。

T-bet 是 Th1 细胞特征性转录因子,参与机体的免疫调控过程,在 Th1 细胞的分化中发挥决定性的作用。T-bet 基因敲除的小鼠其 Th1 细胞型免疫应答明显缺陷,且 IFN- γ 的分泌严重减少^[18]。本研究结果表明,角膜组织中 T-bet mRNA 的表达变化趋势与 IFN- γ 大致相同,从转录因子水平进一步验证了 Th1 细胞与角膜移植术后排斥反应的严重程度有关。RvE1 干预后角膜中 T-bet 表达下调,角膜移植排斥反应减轻,从而抑制 Th1 细胞的分化,导致 Th1 细胞分泌 IFN- γ 等促炎性细胞因子减少,这可能是 RvE1 抑制角膜免疫排斥反应的机制之一。

在角膜移植术后减轻排斥反应并达到免疫耐受状态是器官移植的终极目标。本研究结果证明,RvE1 可减少角膜移植术后 CD4 细胞及炎症细胞的浸润,对 Th1 细胞分化有潜在影响,并减少 Th1 细胞及其相关细胞因子,从而减轻角膜移植术后排斥反应的发生,这些结果提示 RvE1 是抑制角膜免疫排斥反应的新型药物,但其具体的作用机制仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Price MO, Thompson RW Jr, Price FW Jr. Risk factors for various causes of failure in initial corneal grafts [J]. Arch Ophthalmol, 2003, 121(8): 1087-1092. DOI:10.1001/archoph.121.8.1087.
- [2] Hegde S, Beauregard C, Mayhew E, et al. CD4 (+) T-cell-mediated mechanisms of corneal allograft rejection; role of Fas-induced apoptosis [J]. Transplantation, 2005, 79(1): 23-31.
- [3] King WJ, Comer RM, Hudde T, et al. Cytokine and chemokine expression kinetics after corneal transplantation [J]. Transplantation, 2000, 70(8): 1225-1233.
- [4] Lee JE, Sun Y, Gjorstrup P, et al. Inhibition of corneal inflammation by the resolvin E1 [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015, 56(4): 2728-2736. DOI:10.1167/iovs.14-15982.

- [5] Sonoda Y, Streilein JW. Impaired cell-mediated immunity in mice bearing healthy orthotopic corneal allografts [J]. J Immunol, 1993, 150(5): 1727-1734.
- [6] 侯培莉, 陆燕, 黄振平. 角膜新生血管与微环境研究进展 [J]. 中华实验眼科杂志, 2016, 34(2): 184-188. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2016. 02. 019.
Hou PL, Lu Y, Huang ZP. Research progress in corneal neovascularization and microenvironment [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2016, 34(2): 184-188. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2016. 02. 019.
- [7] Schwab JM, Chiang N, Arita M, et al. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes [J]. Nature, 2007, 447(7146): 869-874. DOI: 10. 1038/nature05877.
- [8] Cortina MS, Bazan HE. Docosahexaenoic acid, protectins and dry eye [J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2011, 14(2): 132-137. DOI: 10. 1097/MCO. 0b013e328342bb1a.
- [9] Li N, He J, Schwartz CE, et al. Resolvin E1 improves tear production and decreases inflammation in a dry eye mouse model [J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2010, 26(5): 431-439. DOI: 10. 1089/jop. 2010. 0019.
- [10] Rajasagi NK, Reddy PB, Suryawanshi A, et al. Controlling herpes simplex virus-induced ocular inflammatory lesions with the lipid-derived mediator resolvin E1 [J]. J Immunol, 2011, 186(3): 1735-1746. DOI: 10. 4049/jimmunol. 1003456.
- [11] Torricelli AA, Santhanam A, Agrawal V, et al. Resolvin E1 analog RX-10045 0. 1% reduces corneal stromal haze in rabbits when applied topically after PRK [J]. Mol Vis, 2014, 20: 1710-1716.
- [12] Levy BD, Zhang QY, Bonnans C, et al. The endogenous pro-resolving mediators lipoxin A4 and resolvin E1 preserve organ function in allograft rejection [J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2011, 84(1-2): 43-50. DOI: 10. 1016/j. plefa. 2010. 09. 002.
- [13] 王大江, 黄一飞, 郭惠玲, 等. 以 CD4 为靶点的小分子化合物 J2 对转基因角膜移植小鼠淋巴细胞的影响 [J]. 眼科研究, 2010, 28(8): 750-754. DOI: 10. 3969/j. issn. 1003-0808. 2010. 08. 017.
Wang DJ, Huang YF, Guo HL, et al. Effects of a micromolecular compound target to CD4-J2 on lymphocytes of mouse after corneal allograft [J]. Chin Ophthal Res, 2010, 28(8): 750-754. DOI: 10. 3969/j. issn. 1003-0808. 2010. 08. 017.
- [14] Cunnusamy K, Chen PW, Niederkorn JY. Paradigm shifts in the role of CD4⁺ T cells in keratoplasty [J]. Discov Med, 2010, 10(54): 452-461.
- [15] Yamagami S, Dana MR, Tsuru T. Draining lymph nodes play an essential role in alloimmunity generated in response to high-risk corneal transplantation [J]. Cornea, 2002, 21(4): 405-409.
- [16] Evaristo C, Alegre ML. IFN- γ : the Dr. Jekyll and Mr. Hyde of immunology? [J]. Am J Transplant, 2013, 13(12): 3057-3058. DOI: 10. 1111/ajt. 12468.
- [17] 闫峰, 石尧, 蔡莉. 小鼠角膜移植排斥反应中植片内细胞因子表达水平的变化 [J]. 中华实验眼科杂志, 2012, 30(10): 869-872. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2012. 10. 002.
Yan F, Shi Y, Cai L. Expression of cytokine in mouse graft of corneal allograft rejection [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2012, 30(10): 869-872. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2012. 10. 002.
- [18] Szabo SJ, Sullivan BM, Stemmann C, et al. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN- γ production in CD4 and CD8 T cells [J]. Science, 2002, 295(5553): 338-342. DOI: 10. 1126/science. 1065543.

(收稿日期: 2016-11-05)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)

· 病例报告 ·

未规范治疗的湿性年龄相关性黄斑变性病情转归一例

万文萃 金学民

450052 郑州大学第一附属医院眼科 郑州大学眼底病研究所(万文萃); 450003 郑州, 河南省立眼科医院 河南省眼科研究所(金学民)

通信作者: 万文萃, Email: wanwencui82@126.com

DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2017. 03. 006

患者, 女, 50 岁, 因右眼视力下降 1 周伴闪光感就诊于郑州大学第一附属医院。患者既往身体健康, 无全身病史及家族遗传病史。眼科检查: 右眼最佳矫正视力 (best corrected visual acuity, BCVA) 为 0. 1, 左眼 0. 8。右眼彩色眼底照相见黄斑区视网膜前出血 (图 1A), OCT 检查见视网膜神经上皮层水肿, 神经上皮层下团块状高反射信号, 视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 层缺损 (图 1B)。初步诊断: 右眼年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD)。患者未接受雷珠单抗右眼玻璃体腔注射的治疗方案, 故进行临床观察。初次就诊后 1 个月患眼 BCVA 为 0. 05, 彩色眼底照相见黄斑区出血面积增加 (图 2A), OCT 检查见视网膜神经上皮层水肿、隆起, 神经上皮层下团块状高反射信号, RPE 层缺损 (图 2B)。患眼给予雷珠单抗 0. 5 mg (0. 5 ml) 玻璃体腔注射治疗。注射后 2 周复查, 可见患眼黄斑区积血较治疗前减少 (图 3A), OCT 检查见 RPE 层隆起 (图 3B)。患者接受第 2 次雷珠单抗 0. 5 mg (0. 5 ml) 右眼玻璃体腔注射。注射后

2 周复查患眼 BCVA 提高至 0. 2, 右眼彩色眼底照相可见黄斑区积血明显减少 (图 4A), OCT 检查见黄斑区视网膜结构清晰

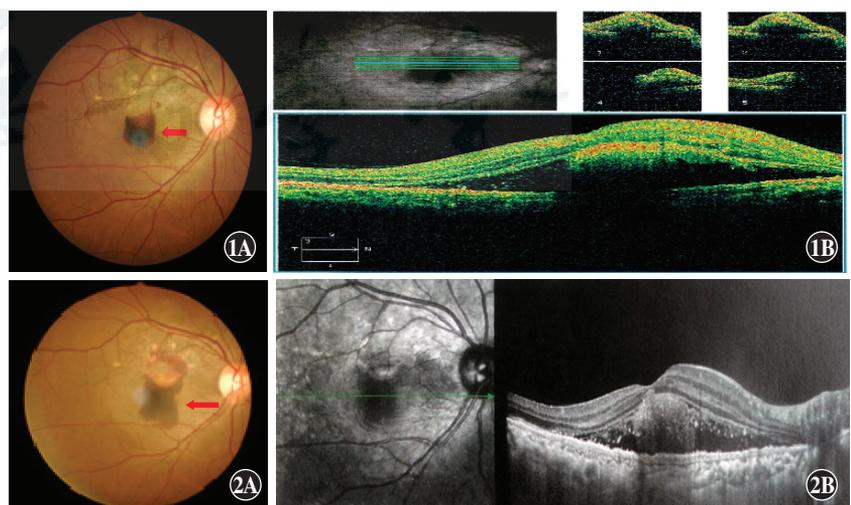


图 1 患者就诊时右眼眼底表现 A: 彩色眼底照相可见黄斑区视网膜前出血 (箭头) B: OCT 检查可见黄斑区视网膜神经上皮层水肿, 神经上皮层下团块状高反射信号, RPE 层缺损 图 2 患者就诊后 1 个月右眼眼底表现 A: 彩色眼底照相可见黄斑区出血面积较就诊时增加 (箭头) B: OCT 检查可见黄斑区视网膜神经上皮层水肿, 神经上皮层下团块状高反射信号, RPE 层缺损