

实验性自身免疫性葡萄膜炎眼球中自然杀伤细胞的致炎作用及其机制

李墨涵 鲍宁 刘东伟 陶黎明 蒋正轩

230601 合肥,安徽医科大学第二附属医院眼科

通信作者:陶黎明,Email:lmtao9@163.com;蒋正轩,Email:jzx1287@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.09.007

【摘要】 **背景** 实验性自身免疫性葡萄膜炎(EAU)是葡萄膜炎常见的动物模型,自然杀伤(NK)细胞是一种强烈的致炎细胞,但其在 EAU 中的作用及其机制仍有待研究。**目的** 探讨 EAU 模型大鼠不同发病阶段视网膜组织中 NK 细胞的定位和分布及其机制。**方法** 将 36 只 SPF 级 Lewis 大鼠应用随机数字表法随机分成对照组和造模后第 6、9、12、16、21 天组,每组各 6 只。造模后第 6、9、12、16、21 天组大鼠采用光感受器间维生素 A 类结合蛋白(IRBP)联合 5 mg/ml 结核杆菌和完全福氏佐剂(CFA)乳化液双后足垫皮下注射,然后腹腔内注射 400 ng 百日咳毒素免疫大鼠建立 EAU 大鼠模型。对照组大鼠双后足垫皮下注射生理盐水与等容量 CFA 乳化液,然后腹腔内注射 400 ng 百日咳毒素。造模后每天用裂隙灯显微镜观察大鼠眼前段炎症反应过程,根据 Caspi 方法进行眼部炎症症状评分。分别于造模后第 6、9、12、16、21 天摘取各组大鼠眼球,采用苏木精-伊红染色法检测各组大鼠视网膜炎症反应和组织结构形态学改变;采用免疫荧光双标法检测大鼠视网膜中 NK 细胞的分布及浸润情况。另取 25 只 Lewis 大鼠应用随机数字表法随机分为造模后第 0、3、6、9 和 12 天组,每组 5 只大鼠,电动匀浆机破裂组织并匀浆为眼内液,采用实时荧光定量 PCR 法检测大鼠眼内液中 NK 细胞趋化因子 CXCL10 mRNA 和 CXCL12 mRNA 的表达。**结果** 对照组大鼠眼前节未发现炎症反应。造模后第 6 天组大鼠虹膜血管扩张,随着造模后时间延长虹膜血管扩张明显,前房逐渐出现渗出或积脓,造模后第 12 天炎症反应达峰。视网膜组织病理学检查显示,对照组大鼠视网膜组织结构排列整齐,各 EAU 模型组大鼠造模后随时间延长均出现不同程度的视网膜结构排列紊乱,外核层细胞分离,层间组织松散,视细胞水肿且有炎性细胞浸润,以造模后第 12 天组最为严重。免疫荧光双标记显示对照组仅见蓝色标记的细胞核,视网膜各层细胞排列规则;造模后第 6 天组开始可见大鼠视网膜内层大量 NK 细胞浸润,呈红色荧光,随时间延长逐渐增加,造模后第 9 天组 NK 细胞浸润达峰。造模后第 9 天组大鼠视网膜中 CXCL10 mRNA 相对表达量为 34.298 ± 16.689 ,明显高于造模后第 3、6、12 天组的 1.390 ± 0.660 、 3.359 ± 2.581 和 4.711 ± 1.387 ,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);各组大鼠视网膜中 CXCL12 mRNA 相对表达量的总体比较差异无统计学意义($F = 2.851, P > 0.05$)。**结论** EAU 大鼠发病早期视网膜中 NK 细胞浸润,其严重程度和视网膜中 CXCL10 的表达动态与 EAU 炎症发展过程相吻合,提示 NK 细胞在 EAU 的早期炎症过程中发挥重要作用,CXCL10 是 NK 细胞的主要趋化因子。

【关键词】 自然杀伤细胞/免疫;葡萄膜炎/免疫;视黄醇结合蛋白类/免疫;自身免疫性疾病/病理;炎症;趋化因子;动物模型;大鼠

基金项目: 国家自然科学基金项目(81300755)

Inflammation-causing effects and mechanism of natural killer cells in experimental autoimmune uveitis rats

Li Mohan, Bao Ning, Liu Dongwei, Tao Liming, Jiang Zhengxuan

Department of Ophthalmology, the Second Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601, China

Corresponding author: Tao Liming, Email: lmtao9@163.com; Jiang Zhengxuan, Email: jzx1287@163.com

【Abstract】 **Background** Experimental autoimmune uveitis (EAU) is a common animal model of uveitis. Natural killer (NK) cells have been confirmed to be a type of strong inflammation-causing cells, but its role in EAU is still studying. **Objective** This study was designed to explore the role and mechanism of NK cells in the pathogenesis of EAU. **Methods** Thirty-six SPF Lewis rats were randomly divided into experimental control group and EAU 6-, 9-, 12-, 16-, and 21-day groups (6 rats for each group). Rats in EAU group received subcutaneous injection interphotoreceptor retinoid binding protein (IRBP) combining 5 mg/ml tubercle bacillus with complete Freund's adjuvant (CFA) emulsion in foot pads, and then 400 ng pertussis toxin was intraperitoneally injected to

establish EAU models in the EAU 6-, 9-, 12-, 16-, and 21-day group, and normal saline solution combined with CFA and 400 ng pertussis toxin was used in the same way in the experimental control group. The inflammatory response was observed by slit lamp daily after modeling and scored based on Caspi criteria. The eyeballs were extracted in 6, 9, 12, 16 and 21 days after modeling for retinal histopathological examination. Immunofluorescent double-staining was employed to detect and locate the expression of NK cells in the retina. In addition, 25 model rats were divided into EAU 0-, 3-, 6-, 9- and 12-day groups, with 5 rats for each group, and eyeballs were extracted to prepare tissue homogenate. The expression of CXCL10 mRNA, and CXCL12 mRNA NK cell chemokines, in the tissue homogenate was assayed by real-time quantitative PCR. The use and care of the rats followed Regulations for the Administration of Affair Concerning Experimental Animal by State Science and Technology Commission. **Results** No inflammatory sign in ocular anterior segment of the rats was seen in the experimental control group. The expansion of rat iris vessels was found in the EAU 6-day group, and exudes and hypopyon of the anterior chamber occurred in the EAU 9-day group and the inflammation peaked in the EAU 12-day group. The rat retinal structure was normal in the experimental control group, and the arrangement disorder of retinal structure, the cell separation in outer nuclear layer and damage of photoreceptors were found under the optical microscope in different degree in various EAU groups, with the most serious change in the EAU 12-day group. Immunofluorescent double staining showed normally arranged nucleus in the experimental control group, and a lot of NK infiltration was seen in the EAU 6-day group and peaked in the EAU 9-day group. The expression level of CXCL10 mRNA in the EAU 9-day group was 34.298 ± 16.689 , which was significantly higher than that in the EAU 3-, 6- and 12-day group, respectively ($1.390 \pm 0.660, 3.359 \pm 2.581, 4.711 \pm 1.387$) (all at $P < 0.01$). No significant differences were found in the relative expression of CXCL12 mRNA among different EAU groups ($F = 2.851, P > 0.05$). **Conclusions** Retinal NK cell infiltration occurs in the early stage of EAU, and the severity of NK cell infiltration is consistent with the inflammatory process and CXCL10 expression, suggesting NK cells play an important role in the early stage of EAU, and CXCL10 is an important chemokine of NK cells in EAU rats.

[Key words] Killer cells, natural/immunology; Uveitis/immunology; Retinol-binding proteins/immunology; Autoimmune diseases/pathology; Inflammation; Chemokines; Disease models, animal; Rats

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81300755)

葡萄膜炎常累及葡萄膜、视网膜、视网膜血管及玻璃体,严重损害视功能。葡萄膜炎病因复杂,其发病机制仍不清楚。目前认为,细菌、病毒等多种病原体的感染以及自身免疫紊乱、遗传等多种因素参与葡萄膜炎的发病^[1],临床上以自身免疫紊乱因素引起者较常见,如自身免疫性葡萄膜炎的常见类型有 Fuchs 虹膜睫状体炎、人类白细胞相关抗原 B27 (human leukocyte antigen B27, HLA-B27) 相关葡萄膜炎、Vogt-Koyanagi-Harada 综合征、Behçet 病、交感性眼炎等^[2]。由于葡萄膜炎的主要患病人群为拥有劳动能力的中青年,因而造成较为严重的社会经济负担。目前,关于葡萄膜炎的特异性免疫疗法研究已取得一定成果^[3],但在针对 T 细胞免疫系统的治疗方面不能有效防止病变的复发。有报道称自然杀伤(nature killer, NK)细胞在复发性葡萄膜炎中对病毒感染发挥抑制作用,从而避免慢性炎症的发生,但同时因为 NK 细胞缺乏抑制性受体,可能无法识别自身主要组织相容性复合体,故可引起自身免疫性疾病,因此关于 NK 细胞在葡萄膜炎中的作用逐渐受到关注^[4],但二者的关系尚未完全阐明。本研究拟检测实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveitis, EAU)大鼠模型不同

发病阶段视网膜组织中炎症细胞的分布及 NK 细胞的组织浸润情况,探索 NK 细胞在葡萄膜炎疾病中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康 SPF 级雄性 Lewis 大鼠 61 只,体质量(200 ± 20)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,在 SPF 条件下适应性饲养 1 周,实验期间各组大鼠均自由饮水和进食。实验动物的喂养及使用遵循国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》。各组大鼠造模前均经裂隙灯显微镜检查,以排除其他眼病。

1.1.2 主要试剂及耗材 光感受器间维生素 A 类结合蛋白(interphotoreceptor retinoid binding protein, IRBP) 1169-1191 (PTARSVGAADGSSW EGVGVVPDV) 由上海生工集团合成;含有 5 mg/ml 结核杆菌的完全弗氏佐剂(complete Freund adjuvant, CFA)、百日咳毒素(美国 Sigma 公司);小鼠抗大鼠 CD161 一抗(ab175313)、兔抗大鼠 CD3 一抗(ab5690)、蛋白酶 K (英国 Abcam 公司);驴抗兔绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP) 标记 IgG 二抗(A24221)、驴

抗小鼠红色荧光蛋白 (red fluorescence protein, RFP) 标记 IgG 二抗 (A24411) (美国 Abbkine 公司); DAPI 试剂盒 (瑞士 Roche 公司); 微量 RNA 提取试剂盒 (美国 Omega 公司); 荧光定量染料、SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒 (日本 Takara 公司); DNA 逆转录试剂盒 (美国 Thermo 公司)。三通阀、螺口注射器 (美国 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 EAU 模型的建立

将大鼠分为对照组和模型组, 参照文献 [5] 的步骤将 IRBP 与含有 5 mg/ml 结核杆菌的 CFA 等体积混合并充分乳化 2 h, 注入大鼠双侧后足垫皮下, 于注射后 24 h 经大鼠腹腔内注射 400 ng 百日咳毒素, 建立大鼠 EAU 模型。对照大鼠双侧后足垫皮下注射生理盐水与等容量 CFA 充分乳化溶液, 并用与 EAU 模型组大鼠相同的方式注射等容量百日咳毒素。

1.2.2 裂隙灯显微镜下观察眼前节炎症反应

于造模后第 1 天开始每天用裂隙灯显微镜观察并记录大鼠眼前节炎症情况, 并根据炎症反应严重程度参照 Caspi 分级标准进行评分 [6]。0 分: 眼前段无炎症反应, 视网膜红光反射正常; 0.5 分: 虹膜血管轻度扩张、充血; 1 分: 虹膜血管中度充血, 瞳孔缩小; 2 分: 前房轻度混浊, 红光反射减弱; 3 分: 前房中度混浊, 但仍可见瞳孔, 眼底红光反射暗淡; 4 分: 前房重度混浊, 可见前房有积脓, 出现瞳孔膜闭, 视网膜红光反射消失, 眼球突出。

1.2.3 视网膜组织病理学检查

采用随机数字表法将 36 只 Lewis 大鼠随机分为对照组及造模后第 6、9、12、16、21 天组, 每组各 6 只。按照分组在相应时间点处死各组大鼠, 立即摘取眼球 (保留球后视神经 4 mm), 参照文献 [7] 的方法置于 FAA 固定液 (体积分数 70% 乙醇 90 ml + 冰醋酸 5 ml + 体积分数 40% 甲醛 5 ml) 内固定 2 h, 由角膜缘向眼球内注入少量固定液, 然后再置于固定液内固定 24 h。将眼球按子午线方向切开, 使用自动石蜡包埋机包埋, 行 4 μ m 厚切片, 常规苏木精-伊红染色, 光学显微镜下观察大鼠视网膜组织结构。

1.2.4 视网膜免疫荧光双染法检测视网膜中 NK 细胞浸润情况

将包埋好的眼球标本连续 3 μ m 厚石蜡切片, 蜡带水浴锅中展平, 防脱载玻片捞片, 90 $^{\circ}$ C 烘片 15 min, 二甲苯常规脱蜡, 梯度乙醇水化, 切片移入 0.01 mol/L、pH 6.0 的枸橼酸盐中修复抗原 10 ~ 15 min, 水浴冷却, PBS 洗涤 2 次, 每次 3 min, 质量分数 5% 牛血清蛋白 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h。加入小鼠抗大鼠 CD161 一抗 (1:50) 和兔抗大鼠 CD3 一抗 (1:50), 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜, 用 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。滴加驴抗兔

GFP 标记 IgG 二抗 (1:100) 和 RFP 驴抗小鼠 IgG 二抗 (1:100), 避光条件下 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min, 用 PBS 洗涤 2 次, 每次 5 min。滴加 DAPI, 避光条件下 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 擦干组织切片周边液体, 滴加抗荧光淬灭封片剂封片, Leica 激光扫描共焦显微镜下观察。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 法检测眼球中 NK 细胞趋化因子 CXCL10 mRNA 和 CXCL12 mRNA 的表达

上下游引物由上海生工集团合成, 引物序列见表 1。另取 25 只 Lewis 大鼠应用随机数字表法随机分为造模后第 0、3、6、9、12 天组, 每组 5 只大鼠。取大鼠双侧眼球置于 2 ml EP 管中, 用电动匀浆机破裂组织并匀浆, 用 mRNA 试剂盒提取总 mRNA, 按照试剂盒的实验步骤得到每管 30 μ l 总 mRNA。用 Nanodrop2000 测出质量浓度, 并计算出 1 μ g 相应体积的总 mRNA。吸出 1 μ l 随机引物、DEPC 水与 1 μ g 相应体积的 mRNA 充分混匀至 12 μ l 体系中, 先放入 65 $^{\circ}$ C 的 PCR 仪中 5 min, 然后立刻置于冰上 2 min, 依次加入 4 μ l 5 倍反应缓冲液、1 μ l RiboLock RNase 抑制剂、2 μ l dNTP 混合液、1 μ l RevertAid, 至 20 μ l 体系中进行逆转录。反应条件: 42 $^{\circ}$ C 作用 60 min, 70 $^{\circ}$ C 作用 5 min, 40 $^{\circ}$ C 作用 10 min, 得到 cDNA。按照 SYBR Premix Ex Taq II 定量 PCR 试剂盒的操作步骤, 将 1.0 μ l cDNA、7.0 μ l DEPC 水与 0.4 μ l ROX 配制体系与 10.0 μ l 混合液、1.6 μ l CXCL10 和 CXCL12 引物混合的体系按照配比加倍, 配制实时荧光 PCR 反应体系 20.0 μ l。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 共 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 预变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 95 $^{\circ}$ C 延伸 15 s (熔解曲线)。以 GAPDH 为内参, 应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各趋化因子 mRNA 的相对表达量。

表 1 PCR 引物序列

引物名称	上游引物序列 (5'-3')	下游引物序列 (5'-3')
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	TGCTGAAGACGCCAGTGGA
CXCL10	GGCCATCAAGAATTTACTGAAAGCATCTGTGTGGTCCATCCTTGAA	
CXCL12	AAGGTCGTGGTCTGCTGG	AAGCTTCTCCAGGTACTCC

注: CXCL: 趋化因子

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行统计分析。本研究测定指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用完全随机分组单因素干预多水平研究设计, 造模后第 3 天组、造模后第 6 天组、造模后第 9 天组和造模后第 12 天组间大鼠眼球中

CXCL10 mRNA 和 CXCL12 mRNA 相对表达量的总体差异比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。采用双尾检测法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠眼前节炎症反应程度的比较

对照组大鼠眼部虹膜血管形态正常,虹膜纹理清晰,未见炎症反应,视网膜红光反射正常;造模后第 6 天模型组大鼠虹膜表面血管迂曲扩张;造模后第 9 天大鼠虹膜血管中度扩张、充血;造模后第 12 天虹膜血管形态扭曲最为严重,前房重度混浊,可见前房积脓和瞳孔膜闭,视网膜红光反射消失;造模后第 16 天前房轻度混浊,前房积脓消失,隐约可见视网膜红光反射;造模后第 21 天虹膜血管轻度扩张,炎症反应明显轻于造模后早期,符合 EAU 大鼠眼部炎症过程的规律(图 1)。按照评分标准,EAU 模型成功率为 100%。造模后不同时间 EAU 大鼠的炎症评分变化趋势见图 2。

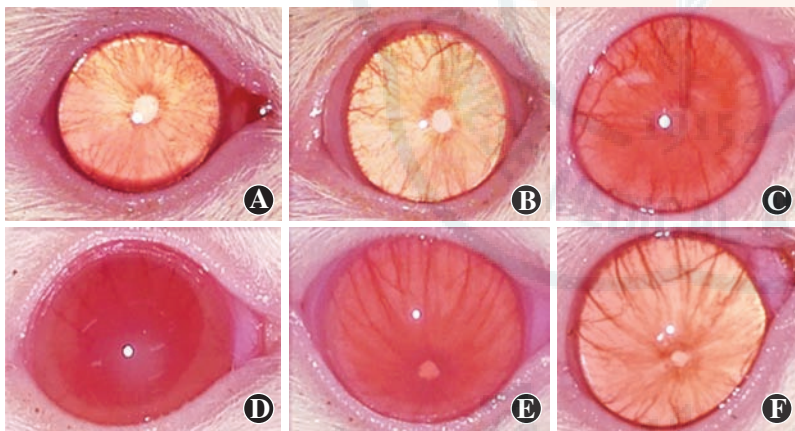


图 1 大鼠造模后眼前节炎症反应表现 A:正常对照组大鼠虹膜血管形态未见异常 B:大鼠造模后第 6 天可见虹膜血管扩张,轻度充血 C:大鼠造模后第 9 天虹膜血管中度扩张充血,瞳孔区可见大量渗出物 D:大鼠造模后第 12 天可见前房积脓和瞳孔膜闭 E:大鼠造模后第 16 天前房轻度混浊,但积脓消失 F:大鼠造模后第 21 天可见虹膜血管轻度扩张,房水清

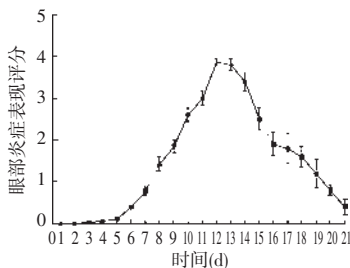


图 2 造模后不同时间点大鼠眼前节炎症表现评分曲线 随造模后时间的延长,大鼠眼前节炎症表现评分呈现先上升后下降的趋势

2.2 各组大鼠视网膜组织病理学表现

对照组大鼠视网膜组织结构排列整齐,各层组织分界清晰;造模后第 6 天组大鼠各层视网膜细胞肿胀,

外核层细胞分离;造模后第 9 天组大鼠视网膜明显肿胀,光感受器细胞层层间组织疏松、细胞水肿且有炎症细胞浸润,内核层肿胀明显;造模后第 12 天组大鼠视网膜结构排列紊乱、松散,内核层与外核层可见新生血管长入;造模后第 16 天组大鼠视网膜结构逐渐修复,视网膜神经节细胞层与内丛状层间出现大量新生血管,光感受器细胞层消失;造模后第 21 天组大鼠新生血管减少,外核层细胞结构疏松,与光感受器细胞层界限模糊(图 3)。

2.3 各组大鼠视网膜中 NK 细胞和 T 细胞的荧光表达

对照组大鼠视网膜通过蓝色荧光标记的细胞核染色显示各层组织分界清楚;造模后第 6 天组大鼠可见视网膜内层有大量红色荧光标记的 NK 细胞;造模后第 9 天组可见视网膜内丛状层至内核层的 NK 细胞浸润;造模后第 12 天组大鼠视网膜结构疏松,NK 细胞明显减少;造模后第 16 天组视网膜结构较造模后第 12 天组整齐、规则,NK 细胞罕见,但视网膜中开始出现绿色荧光标记的 T 细胞浸润;造模后第 21 天组大鼠视网膜中未发现 NK 细胞,但全层视网膜均可见 T 细胞(图 4)。

2.4 各组大鼠眼内液中 CXCL10 mRNA 和 CXCL12 mRNA 的表达

造模后随着时间延长,大鼠眼内液中 CXCL10 mRNA 和 CXCL12 mRNA 相对表达量均呈现先上升后下降的趋势,CXCL10 mRNA 和 CXCL12 mRNA 的相对表达量均以造模后第 9 天达峰,造模后第 9 天组大鼠眼球中 CXCL10 mRNA 相对表达量明显高于造模后第 3、6、12 天组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。各组间大鼠眼球中 CXCL12 mRNA 相对表达量的总体比较差异无统计学意义($F = 2.851, P > 0.05$)(表 2)。

表 2 各组大鼠眼内液中 CXCL10 mRNA 和 CXCL12 mRNA 相对表达量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	CXCL10 mRNA	CXCL12 mRNA
造模后第 3 天组	5	1.390 ± 0.660 ^a	1.377 ± 0.320
造模后第 6 天组	5	3.359 ± 2.581 ^a	1.625 ± 0.843
造模后第 9 天组	5	34.298 ± 16.689	2.727 ± 1.149
造模后第 12 天组	5	4.711 ± 1.387 ^a	1.707 ± 0.596
F 值		16.997	2.851
P 值		0.000	0.700

注:与各自的造模后第 9 天组比较,^a $P < 0.01$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验) CXCL:趋化因子

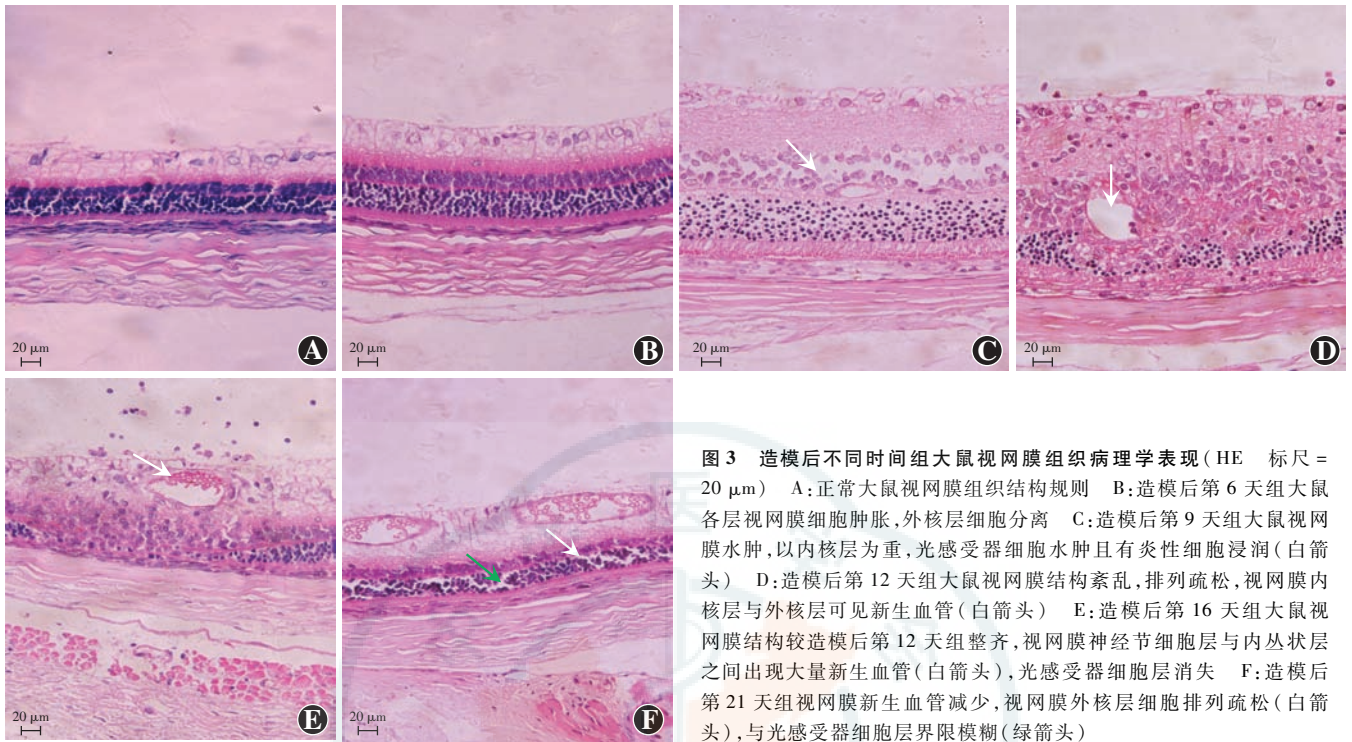


图3 造模后不同时间组大鼠视网膜组织病理学表现(HE 标尺 = 20 μm) A:正常大鼠视网膜组织结构规则 B:造模后第6天组大鼠各层视网膜细胞肿胀,外核层细胞分离 C:造模后第9天组大鼠视网膜水肿,以内核层为重,光感受器细胞水肿且有炎性细胞浸润(白箭头) D:造模后第12天组大鼠视网膜结构紊乱,排列疏松,视网膜内核层与外核层可见新生血管(白箭头) E:造模后第16天组大鼠视网膜结构较造模后第12天组整齐,视网膜神经节细胞层与内丛状层之间出现大量新生血管(白箭头),光感受器细胞层消失 F:造模后第21天组视网膜新生血管减少,视网膜外核层细胞排列疏松(白箭头),与光感受器细胞层界限模糊(绿箭头)

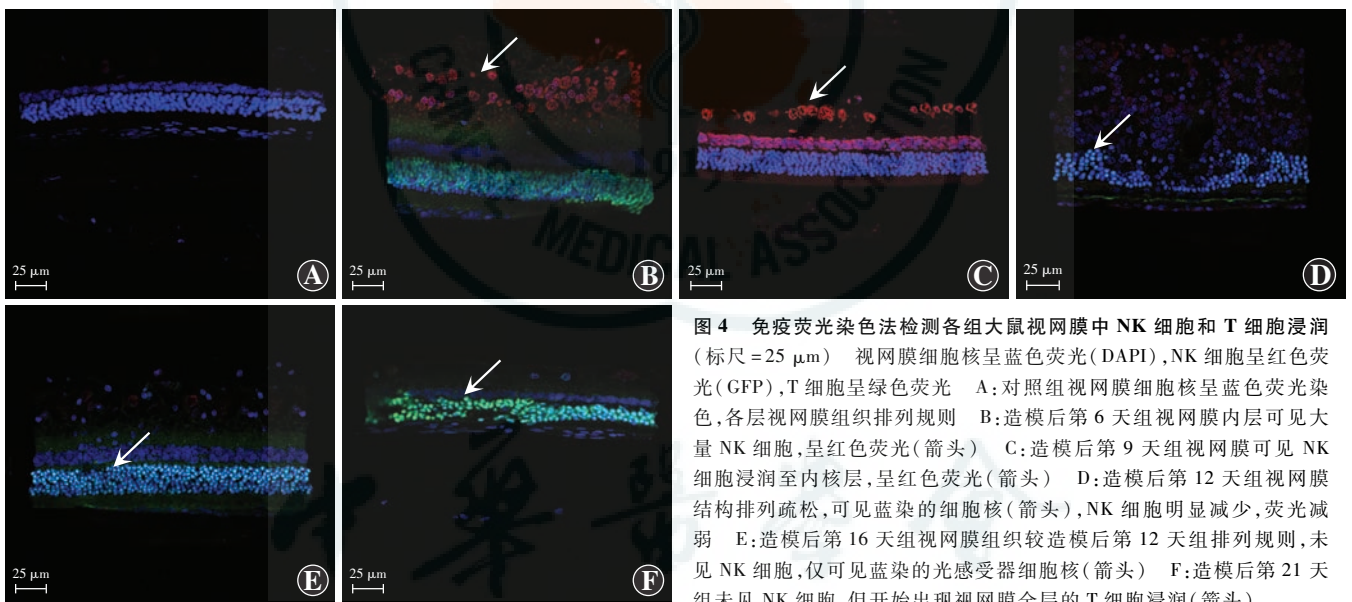


图4 免疫荧光染色法检测各组大鼠视网膜中NK细胞和T细胞浸润(标尺 = 25 μm) 视网膜细胞核呈蓝色荧光(DAPI),NK细胞呈红色荧光(GFP),T细胞呈绿色荧光 A:对照组视网膜细胞核呈蓝色荧光染色,各层视网膜组织排列规则 B:造模后第6天组视网膜内层可见大量NK细胞,呈红色荧光(箭头) C:造模后第9天组视网膜可见NK细胞浸润至内核层,呈红色荧光(箭头) D:造模后第12天组视网膜结构排列疏松,可见蓝染的细胞核(箭头),NK细胞明显减少,荧光减弱 E:造模后第16天组视网膜组织较造模后第12天组排列规则,未见NK细胞,仅可见蓝染的光感受器细胞核(箭头) F:造模后第21天组未见NK细胞,但开始出现视网膜全层的T细胞浸润(箭头)

3 讨论

葡萄膜炎是中国常见的致盲眼病之一,免疫因素在其发病过程中发挥重要作用。研究表明,Th1细胞和Th17细胞在葡萄膜炎中发挥促炎作用,一方面Th1细胞分泌的标志性细胞因子 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)与Th17细胞分泌的致炎因子IL-17不仅发挥致炎作用,而且激活其他免疫细胞,导致炎症反应^[8];另一方面,这些免疫细胞通过旁分泌和自分泌引起级联放大效应,从而进一步加剧炎症反应度^[9]。然而,各种免疫细胞反应的起始因素目前并不完全清楚。机

体接受外界抗原免疫初期最先启动天然免疫,继而引起特异性免疫细胞产生锁链式效应,天然免疫可能通过细胞因子的产生快速启动特异性免疫。因此,研究非特异性免疫细胞在葡萄膜炎中的作用就显得尤为重要。最新的研究表明,异源反应性NK细胞可以抑制骨髓移植后主要由Th1细胞和Th2细胞引起的排斥反应,NK细胞注入动物体内后Th1/Th2比例明显下调,表明NK细胞在某些因素下发挥调控特异性炎症反应的作用^[10-12]。因此,研究NK细胞在葡萄膜炎早期中的作用可能明确葡萄膜炎发生的始动因素。

本研究采用IRBP对Lewis大鼠进行免疫,观察大

鼠眼前节炎症程度,同时动态监测 NK 细胞在大鼠视网膜组织中的表达情况,发现大鼠免疫后第 6 天虹膜和视网膜组织均发生炎症反应,视网膜组织中有 NK 细胞浸润,且免疫后第 9 天炎症反应程度达峰,视网膜中 NK 细胞浸润最严重,至免疫后第 12 天大鼠虹膜、前房和视网膜炎症反应减轻,免疫后第 21 天大鼠眼部炎症轻微,视网膜中 NK 细胞消失,提示 EAU 大鼠视网膜中 NK 细胞浸润高峰期的出现早于 EAU 炎症的高峰期,推测 NK 细胞可能在 EAU 炎症早期发挥作用。

研究表明,在炎症反应的早期 NK 细胞到达炎症部位,受炎症组织中趋化因子的调控。CXCL9、CXCL10、CXCL11 和 CXCL12 是 NK 细胞常见的趋化因子^[13],其中关于 CXCL10 和 CXCL12 的研究十分广泛。本研究检测结果表明,CXCL10 mRNA 在眼内液中的表达量在大鼠免疫后第 9 天达到高峰,显著高于其他时间点,而大鼠眼内液中 CXCL10 mRNA 相对表达量与 NK 浸润的动态变化完全一致,表明 CXCL10 在 EAU 中可能发挥 NK 细胞的趋化作用。既往研究表明,视网膜血管内皮细胞可分泌多种趋化因子,包括 CXCL8、CXCL10 和 CXCL11 等,导致 NK 细胞、T 细胞和单核细胞等进入眼内,触发一系列炎症反应^[14],但本研究中的 CXCL10 是否由视网膜血管内皮细胞所释放仍有待进一步研究证实。

Giannice 等^[15]研究表明,IRBP 诱导的 EAU 炎症高峰期在动物免疫后第 12 天,与本研究的结果基本一致。效应 T 细胞在 EAU 的炎症过程中发挥重要作用,且与炎症程度完全一致。在 EAU 过程中,NK 细胞发挥的免疫效应早于效应 T 细胞。由此可推测,一方面,NK 细胞可能通过某些细胞因子启动 T 细胞的致炎效应;另一方面,NK 细胞可能通过分泌某些细胞因子发挥致炎作用。研究还显示,活化的 NK 细胞可以分泌 IFN- γ ,引起 IL-12 的上升,进而诱导 Th0 细胞向 Th1 细胞分化,导致炎症反应的发生^[16]。NK 细胞自身会释放穿孔素、可溶性 NK 细胞毒因子、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 和 TNF- β 等 T 淋巴细胞致炎因子,导致细胞或组织受损^[17],因此,NK 细胞究竟分泌何种细胞因子而导致后期炎症的加剧还需要进一步探讨。

本研究表明,NK 细胞在 EAU 早期发挥重要作用,可能参与调控效应性 T 细胞的活化。本研究进一步证实 CXCL10 是 EAU 中 NK 细胞的主要趋化因子之一,该结果可为葡萄膜炎的抗炎治疗提供新的途径。

参考文献

[1] Mesquida M, Molins B, Llorenç V, et al. Current and future treatments

for Behçet's uveitis; road to remission[J]. *Int Ophthalmol*, 2014, 34(2): 365-381. DOI: 10. 1007/s10792-013-9788-5.

- [2] Gül A. Pathogenesis of Behçet's disease: autoinflammatory features and beyond[J]. *Semin Immunopathol*, 2015, 37(4): 413-418. DOI: 10. 1007/s00281-015-0502-8.
- [3] Schleinitz N, Vély F, Harlé JR, et al. Natural killer cells in human autoimmune diseases[J]. *Immunology*, 2010, 131(4): 451-458. DOI: 10. 1111/j. 1365-2567. 2010. 03360. x.
- [4] Ahn JK, Park YG, Park SW, et al. Combined low dose cyclosporine and prednisone down-regulate natural killer cell-like effector functions of CD8^{bright}CD56⁺ T cells in patients with active Behçet uveitis[J]. *Ocul Immunol Inflamm*, 2006, 14(5): 267-275. DOI: 10. 1080/09273940600966616.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 李光达,张晓敏,袁立飞,等. 雷帕霉素对大鼠实验性自身免疫性葡萄膜炎的治疗作用[J]. *中华实验眼科杂志*, 2011, 29(11): 973-977. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2011. 11. 004.
- Li GD, Zhang XM, Yuan LF, et al. Therapeutic effects of rapamycin on experimental autoimmune uveoretinitis[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2011, 29(11): 973-977. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2011. 11. 004.
- [8] Zhou ZY, Chen SL, Shen N, et al. Cytokines and Behçet's disease[J]. *Autoimmun Rev*, 2012, 11(10): 699-704. DOI: 10. 1016/j. autrev. 2011. 12. 005.
- [9] Parajuli P, Anand R, Mandalaparty C, et al. Preferential expression of functional IL-17R in glioma stem cells; potential role in self-renewal[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(5): 6121-6135. DOI: 10. 18632/oncotarget. 6847.
- [10] Imamura M, Tsutsumi Y, Miura Y, et al. Immune reconstitution and tolerance after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Hematology*, 2003, 8(1): 19-26. DOI: 10. 1080/1024533031000072045.
- [11] 赵圣亚,毕宏生. 稳定性自然杀伤性 T 细胞调节自身免疫性疾病作用机制的研究进展[J]. *中华实验眼科杂志*, 2013, 31(12): 1183-1186. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2013. 12. 019.
- Zhao SY, Bi HS. The mechanism of invariant natural killer T cells in regulating autoimmune diseases[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2013, 31(12): 1183-1186. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2013. 12. 019.
- [12] 刘正峰,崔彦,毕宏生. 先天性获得性免疫在葡萄膜炎发生中病理机制的研究进展[J]. *中华实验眼科杂志*, 2013, 31(5): 505-509. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2013. 05. 022.
- Liu ZF, Cui Y, Bi HS. The pathological mechanism of innate and adaptive immunity in the development of uveitis[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2013, 31(5): 505-509. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2013. 05. 022.
- [13] Cheng HC, Zhuo HL, Shao CY, et al. Effect of alloreactive NK cells on the proportion of Th1/Th2 cell subset in bone marrow transplanted mice[J]. *Lett Biotechnol*, 2014, 25(5): 672-675. DOI: 10. 3969/j. issn. 1009-0002. 2014. 05. 017.
- [14] Belleis P, Barbeiro DF, Rizzo LV, et al. Transcriptional changes in the expression of chemokines related to natural killer and T-regulatory cells in patients with deep infiltrative endometriosis[J]. *Fertil Steril*, 2013, 99(7): 1987-1993. DOI: 10. 1016/j. fertnstert. 2013. 02. 038.
- [15] Giannice R, Erreni M, Allavena P, et al. Chemokines mRNA expression in relation to the macrophage migration inhibitory factor (MIF) mRNA and vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression in the microenvironment of endometrial cancer tissue and normal endometrium: a pilot study[J]. *Cytokine*, 2013, 64(2): 509-515. DOI: 10. 1016/j. cyto. 2013. 07. 024.
- [16] 李剑冰,徐国兴. 葡萄膜炎及其模型中相关细胞因子的研究进展[J]. *国际眼科杂志*, 2015, (7): 1172-1175. DOI: 10. 3980/j. issn. 1672-5123. 2015. 7. 14.
- Li JB, Xu GX. Relative cytokines in uveitis and experimental uveitis[J]. *Int Eye Sci*, 2015, 15(7): 1172-1175. DOI: 10. 3980/j. issn. 1672-5123. 2015. 7. 14.
- [17] Arjona A, Sarkar DK. Circadian oscillations of clock genes, cytolytic factors, and cytokines in rat NK cells[J]. *J Immunol*, 2005, 174(12): 7618-7624.

(收稿日期:2016-11-11)

(本文编辑:尹卫靖)