

视网膜变性小鼠视网膜组织中 FasL 蛋白表达的动态变化

田洁 李根林

100730 北京,首都医科大学附属北京同仁医院 北京同仁眼科中心 北京市眼科学与视觉科学重点实验室(田洁,现在大连市友谊医院眼科)

通信作者:李根林,Email:ligenglin@263.net

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.01.004

【摘要】 **背景** 视网膜移植是治疗视网膜变性性疾病的新方法,但如何避免或减少视网膜移植后的免疫排斥反应是亟待解决的问题之一。目前的实验研究中常将正常 C57BL/6 小鼠视网膜作为供体,视网膜变性(rd)小鼠作为受体。研究表明视网膜中 Fas 配体(FasL)蛋白通过 FasL/Fas 途径诱导 Fas⁺炎症细胞凋亡,推测可能与视网膜移植后的免疫排斥反应密切相关。**目的** 探讨 FasL 蛋白在不同鼠龄 C57BL/6 小鼠和 rd 小鼠视网膜中的表达特点,揭示小鼠视网膜的免疫特性,为视网膜移植免疫排斥反应的研究提供参考依据。

方法 分别将出生后(PN)-0周(出生日)、PN-1周、PN-2周、PN-3周、PN-4周的正常 C57BL/6 小鼠和 rd 小鼠处死制备眼球冰冻切片,采用免疫荧光技术摄片,并经激光扫描共焦显微镜采集图片,用图像分析软件对各鼠龄不同品系小鼠间视网膜中 FasL 蛋白表达的荧光强度(FI)变化进行半定量分析。**结果** PN-1周 C57BL/6 小鼠视网膜发育尚不完善,FasL 蛋白在视网膜各层均呈阳性表达。PN-2、3、4周 C57BL/6 小鼠已发育成 10 层的视网膜结构,FasL 蛋白在视网膜色素上皮(RPE)、内节段(IS)、外界膜(OLM)、外丛状层(OPL)、内核层(INL)、内丛状层(IPL)及节细胞层(GCL)呈阳性表达。PN-1周 rd 小鼠视网膜结构与同龄 C57BL/6 小鼠接近,FasL 蛋白在视网膜各层均呈阳性表达。PN-2周至 PN-4周 rd 小鼠视网膜中外核层(ONL)细胞随着鼠龄增大逐渐减少,FasL 蛋白在 RPE、OPL、INL、IPL 及 GCL 呈阳性表达;PN-2、3、4周 rd 小鼠 RPE 中 FasL 蛋白表达 FI 值分别为 184.199±16.747、186.797±7.904 和 184.319±18.795,均明显高于同龄 C57BL/6 小鼠的 160.402±22.851、160.995±22.799 和 105.787±17.676,差异均有统计学意义($t = -3.360, P = 0.002; t' = -4.277, P = 0.000; t = -12.175, P = 0.000$);各周龄 rd 小鼠与 C57BL/6 小鼠间视网膜 IPL 中 FasL 蛋白表达的 FI 值差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。**结论** rd 小鼠随着鼠龄增加视网膜 ONL 细胞逐渐减少,其 RPE 内免疫赦免相关抗原 FasL 蛋白的表达强度明显高于同龄 C57BL/6 小鼠。

【关键词】 Fas 配体蛋白; 视网膜/免疫; 眼色素上皮/免疫; 凋亡; 免疫赦免; 视网膜色素变性; 近交系 C57BL 小鼠; rd 小鼠

基金项目: 国家自然科学基金项目(81271046)

Dynamic changes of FasL protein expression in retinal tissue with aging in retinal degeneration mice Tian J, Li Genlin

Beijing Tongren Eye Center, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Ophthalmology & Visual Sciences Key Lab of Beijing, Beijing 100730, China (Tian J, now Dalian Municipal Friendship Hospital)

Corresponding author: Li Genlin, Email: ligenglin@263.net

[Abstract] **Background** Retinal transplantation is a new approach to the treatment of retinal degeneration diseases, and how to avoid or reduce the immune rejection after transplantation is a problem. In experimental studies on retinal transplantation, C57BL/6 mice are often used as donors and rd mice serve as recipients. Studies showed that Fas ligand (FasL) protein induces the apoptosis of Fas⁺ inflammatory cells by FasL/Fas signal pathway, speculating that FasL protein is associated with immune rejection after transplantation. **Objective** The aim of this study was to investigate FasL protein expression change in retinas of C57BL/6 mice and rd mice with aging and reveal the immune characteristics of the mouse retinas. **Methods** The frozen sections of eyeball from C57BL/6 mice and rd mice at the age of postnatal (PN)-0 week, PN-1 week, PN-2 week, PN-3 week and PN-4 week were prepared. The expression of FasL protein in the mouse retinas was examined by immunofluorescence technique. Images were acquired by

fluorescence microscope and analyzed semi-quantitatively by software from laser scanning confocal microscope as the fluorescence intensity (FI). The results were compared among different strains of mice. **Results** The retina developed imperfectly in PN-1 week C57BL/6 mice and FasL protein was positively expressed in the whole retina. In PN-2, 3 and 4 week C57BL/6 mice, retinas finished the development with 10 layers, and retinal pigment epithelium (RPE), inner segment (IS), outer limiting membrane (OLM), outer plexiform layer (OPL), inner nuclear layer (INL), inner plexiform layer (IPL) and ganglion cell layer (GCL). Retinal structure and expression of FasL protein in the whole retina of rd mice in the PN-1 week were similar with C57BL/6 mice, however, ONL cells of rd mice were evidently decreased with aging. The RPE, OPL, INL, IPL and GCL expressed the FasL protein in PN-2, PN-3 and PN-4 week rd mice. The mean FI of FasL protein in the RPE layer was 184.199 ± 16.747 , 186.797 ± 7.904 and 184.319 ± 18.795 in rd mice of PN-2 week, PN-3 week and PN-4 week, which were significantly higher than 160.402 ± 22.851 , 160.995 ± 22.799 and 105.787 ± 17.676 in C57BL/6 mice ($t = -3.360, P = 0.002$; $t' = -4.277, P = 0.000$; $t = -12.175, P = 0.000$). There were not significant differences in the mean FI of FasL protein in IPL between C57BL/6 mice and rd mice at ages of PN-2 week, PN-3 week and PN-4 week (all at $P > 0.05$). **Conclusions** The cells of retinal ONL are gradually decreased with the development of rd mice, and FasL protein expression intensity in RPE is evidently enhanced in rd mice compared with C57BL/6 mice.

[Key words] Fas ligand protein; Retina/immunology; Pigment epithelium of eye/immunology; Apoptosis; Immune privilege; Retinitis pigmentosa; Mice, inbred, C57BL; rd mice

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81271046)

视网膜移植是近年来研究治疗视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 和年龄相关性黄斑变性等不可逆性视觉损害性眼底病的新方法之一。视网膜移植采用健康视网膜细胞替代病变视网膜细胞,并使移植的视网膜细胞与受体组织建立功能联系,从而改善患者的视功能^[1]。目前供体视网膜移植细胞的研究多集中在诱导多能干细胞、间充质干细胞、神经干细胞分化的视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium (RPE)) 细胞、人胚胎干细胞分化的 RPE 细胞等方面,各项研究均取得了一定的进展^[2-4],移植部位和方式多选择为视网膜下腔注射。与其他移植受体组织不同的是, RPE 细胞具有免疫赦免特性,其对移植物不发生排斥反应,因此在合适的条件和微环境下移植的细胞可以长期存活^[5]。研究认为这可能与它能够表达 Fas 配体 (Fas ligand, FasL) 蛋白,并可通过 FasL/Fas 途径诱导 Fas⁺ 的炎症细胞凋亡密切相关^[6]。尽管如此,移植后的整合细胞数仍大量减少,研究证实移植部位有大量的巨噬细胞和 T 细胞,提示视网膜细胞移植后局部发生了慢性免疫反应^[7]。因此视网膜移植研究中如何避免或抑制免疫排斥反应是目前亟待解决的问题之一,了解供体和受体组织与免疫排斥反应相关的各种因素的相互作用是研究的关键。一般来说,在关于视网膜移植的动物实验中多以正常 C57BL/6 小鼠作为供体,视网膜变性 (retinal degeneration, rd) 小鼠作为受体,但 2 种小鼠视网膜中 FasL 蛋白的表达及作用尚不清楚。本研究中拟比较和研究 C57BL/6 小鼠和 rd 小鼠视网膜组织中 FasL 蛋白随着小鼠生长的动态表达

变化,揭示正常和病理条件下视网膜的免疫特性,为进一步视网膜移植免疫排斥反应及相关免疫性眼病的研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 分别取 SPF 级出生后 (postnatal, PN) 当天 (PN-0 周)、1 周龄 (PN-1 周)、2 周龄 (PN-2 周)、3 周龄 (PN-3 周) 和 4 周龄 (PN-4 周) 的正常 C57BL/6 小鼠及 rd 小鼠各 8 只,雌雄不限,由首都医科大学实验动物科学部配种饲养。本研究经首都医科大学实验动物伦理委员会批准 (伦审号:2012-X-89),实验动物的使用符合《北京市实验动物管理条例》。

1.1.2 主要试剂及仪器 正常鸡血清、兔抗小鼠 FasL (N-20) 多克隆抗体 (一抗) (抗体编号:SC-834,工作浓度 1:100)、TRITC 标记鸡抗兔 IgG (二抗) (抗体编号:SC-2862,工作浓度 1:100) (美国 Santa Cruz 公司)。DML-060 型手掌型离心机 (日本 Tomy 公司); CM1900 型恒冷箱切片机、激光扫描共焦显微镜 (德国 Leica 公司);超低温冰箱 (日本 Sanyo 公司);37 °C 恒温干燥箱 (上海景迈公司);荧光显微镜 (日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 免疫荧光法行眼球标本观察 采用颈椎脱臼法处死各周龄的 C57BL/6 小鼠和 rd 小鼠,立即摘出眼球, OCT 包埋, -180 °C 液氮下骤冷, -80 °C 冰箱冻存。

用恒冷箱切片机行连续常规冰冻切片,切片厚度为 7~8 μm ,按眼球横断面切片,确保至少一张切片中包括角膜水平直径和视神经组织,吹干,4 $^{\circ}\text{C}$ 丙酮固定 10 min, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。取出待染切片,室温晾干;用 pH 值为 7.2~7.4 的 PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;室温下用正常鸡血清封闭 30 min,添加一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜;PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;添加二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温干燥箱孵育 45 min;PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;抗衰减封片剂封片。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。切片在荧光显微镜下观察,取 4 个视网膜切片,每个视网膜切片取 4 个视野,确保每个切片中观察的组织部位相同,采用 Viewfinder lite 数码照相系统摄片。于激光扫描共焦显微镜下采集图片,用 Leica Qwin 软件按照设定的平均荧光强度 (fluorescence intensity, FI) 阈值提取每个视野中的阳性目标,以图像分析系统自动计算出其平均 FI。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析。本研究中检测指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经 Levene 检验证实 PN-3 周 C57BL/6 小鼠与 rd 小鼠 RPE 内 FasL 蛋白表达强度方差齐,采用 t 检验;PN-0 周、PN-1 周、PN-2 周、PN-4 周 C57BL/6 小鼠与 rd 小鼠间内丛状层 RPE 内 FasL 蛋白表达强度以及不同鼠龄 C57BL/6 小鼠与 rd 小鼠间 (inner plexiform layer, IPL) 中 FasL 蛋白表达强度方差齐,组间的差异比较均采用独立样本 t 检验。采用双侧检测法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同鼠龄小鼠视网膜组织中 FasL 蛋白的动态表达

2.1.1 各鼠龄 C57BL/6 小鼠视网膜组织中 FasL 蛋白的表达

PN-0 周 C57BL/6 小鼠视网膜神经母细胞层尚未分化。PN-1 周 C57BL/6 小鼠视网膜外丛状层 (outer plexiform layer, OPL) 出现但层次不连续,并初步可见分化的内核层 (inner nuclear layer, INL) 和外核层 (outer nuclear layer, ONL)。PN-0 周及 PN-1 周小鼠神经视网膜可见 FasL 蛋白表达的弱荧光 (图 1A, B)。PN-2 周小鼠视网膜发育成 10 层结构,PN-3 周小鼠视网膜逐渐完善,PN-4 周小鼠视网膜已发育成熟。FasL 蛋白在 PN-2 周至 PN-4 周 C57BL/6 小鼠视网膜内节段 (inner segment, IS)、外界膜 (outer limiting membrane, OLM)、OPL、INL、IPL、节细胞层 (ganglion

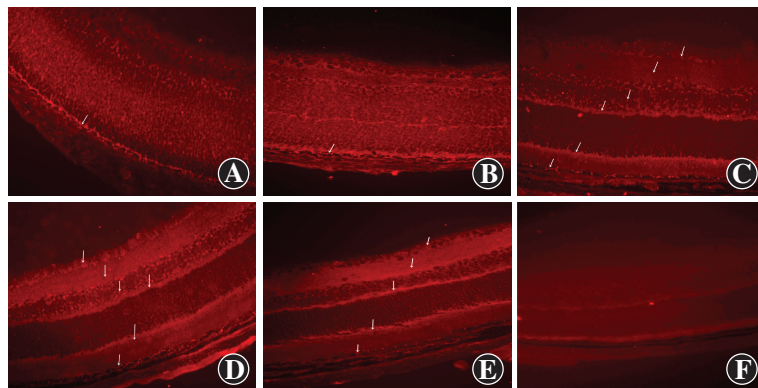


图 1 免疫荧光法检测各周龄 C57BL/6 小鼠视网膜组织中 FasL 蛋白的表达 (TRITC $\times 400$) A:PN-0 周小鼠视网膜 RPE 层 FasL 蛋白的表达呈点线状较强荧光(箭头),神经视网膜呈弱荧光 B:PN-1 周小鼠视网膜 RPE 层 FasL 蛋白的表达呈点线状较强荧光(箭头),神经视网膜呈弱荧光 C:PN-2 周小鼠视网膜 RPE 层、IS、OLM、OPL、INL、IPL 和 GCL 可见 FasL 蛋白的表达呈红色荧光(箭头) D:PN-3 周小鼠视网膜 RPE 层、IS、OLM、OPL、INL、IPL 和 GCL 可见 FasL 蛋白的表达呈红色荧光(箭头) E:PN-4 周小鼠视网膜 RPE 层、IS、OLM、OPL、INL、IPL 和 GCL 可见 FasL 蛋白的表达呈红色荧光(箭头) F:PN-2 周小鼠的阴性对照片视网膜内未发现 FasL 蛋白表达的荧光

cell layer, GCL) 的表达均呈红色荧光 (图 1C~E)。FasL 蛋白的表达在各周龄 C57BL/6 小鼠 RPE 层呈点线状较强荧光。各周龄小鼠的阴性对照片未发现 FasL 蛋白表达的红色荧光 (图 1F)。

2.1.2 不同鼠龄 rd 小鼠视网膜组织中 FasL 蛋白的动态表达

PN-0 周及 PN-1 周的 rd 小鼠视网膜结构与同周龄 C57BL/6 小鼠未见明显差别, FasL 蛋白的表达在神经视网膜呈弱荧光 (图 2A, B)。PN-2 周的 rd 小鼠视网膜 ONL 细胞层数明显减少, PN-3 周时 ONL 仅可见一层细胞,细胞排列欠连续, PN-4 周时 ONL 细胞继续减少,细胞排列不连续,部分区域感光细胞核消失, INL 细胞与 RPE 层相贴。PN-2 周至 PN-4 周, rd 小鼠视网膜 OPL、INL、IPL 和 GCL 可见 FasL 蛋白表达的红色荧光 (图 2C~E)。各周龄 rd 小鼠 RPE 层均可见 FasL 蛋白表达的点线状较强荧光。各周龄 rd 小鼠的阴性对照片视网膜未见 FasL 蛋白表达的荧光 (图 2F)。

2.2 不同品系小鼠视网膜组织内 FasL 蛋白表达的差异

2.2.1 同龄 C57BL/6 小鼠与 rd 小鼠间 RPE 层 FasL 蛋白表达强度的比较

PN-0 周和 PN-1 周 rd 小鼠视网膜 RPE 层 FasL 蛋白表达的 FI 值分别为 178.027 ± 10.467 和 180.154 ± 14.153 , 均高于相应周龄的 C57BL/6 小鼠, 差异均无统计学意义 ($t = -1.614, P = 0.117$; $t = -0.680, P = 0.501$), 而 PN-2 周、PN-3 周、PN-4 周 rd 小鼠 RPE 层 FasL 蛋白表达的 FI 值分别为 184.199 ± 16.747 、 186.797 ± 7.904 和 184.319 ± 18.795 , 均明显高于相应周龄的 C57BL/6 小鼠, 差异

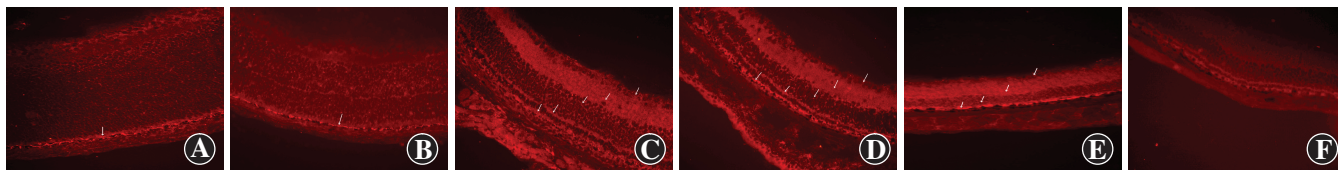


图 2 荧光显微镜下各周龄 rd 小鼠视网膜组织中 FasL 蛋白的表达 (TRITC ×400) A:PN-0 周小鼠视网膜 RPE 层 FasL 蛋白的表达呈点线状较强荧光 (箭头), 神经视网膜呈弱荧光 B:PN-1 周小鼠视网膜 RPE 层 FasL 蛋白的表达呈点线状较强荧光 (箭头), 神经视网膜呈弱荧光 C:PN-2 周小鼠 RPE 层、OPL、INL、IPL 和 GCL 可见 FasL 蛋白表达的红色荧光 (箭头) D:PN-3 周小鼠 RPE 层、OPL、INL、IPL 和 GCL 可见 FasL 蛋白表达的红色荧光 (箭头) E:PN-4 周小鼠 RPE 层、INL、IPL 和 GCL 可见 FasL 蛋白表达的红色荧光 (箭头) F:PN-2 周小鼠的阴性对照视网膜未见 FasL 蛋白表达的荧光

均有统计学意义 ($t = -3.360, P = 0.002; t' = -4.277, P = 0.000; t = -12.175, P = 0.000$) (表 1, 图 3)。

2.2.2 同龄 C57BL/6 小鼠与 rd 小鼠间视网膜 IPL 中 FasL 蛋白表达强度的比较 同龄 C57BL/6 小鼠与 rd

小鼠间视网膜 IPL 中 FasL 蛋白表达的 FI 值接近, 二者的差异均无统计学意义 ($t = 1.571, P = 0.127; t = -1.540, P = 0.134; t = -0.773, P = 0.446; t = -0.833, P = 0.411; t = 0.990, P = 0.330$) (表 2, 图 4)。

表 1 同龄 C57BL/6 小鼠与 rd 小鼠间 RPE 层 FasL 蛋白 FI 比较 ($\bar{x} \pm s$)

小鼠种系	样本量	各周龄小鼠 RPE 层 FasL 蛋白表达的 FI 值				
		PN-0 周 ^a	PN-1 周 ^a	PN-2 周 ^a	PN-3 周 ^b	PN-4 周 ^a
C57BL/6 小鼠	8	172.956 ± 6.962	176.469 ± 16.403	160.402 ± 22.851	160.995 ± 22.799	105.787 ± 17.676
rd 小鼠	8	178.027 ± 10.467	180.154 ± 14.153	184.199 ± 16.747	186.797 ± 7.904	184.319 ± 18.795
t/t' 值		-1.614	-0.680	-3.360	-4.277	-12.175
P 值		0.117	0.501	0.002	0.000	0.000

注: rd: 视网膜变性; RPE: 视网膜色素上皮; FasL: Fas 配体; PN: 出生后; FI: 荧光强度 (a: 独立样本 t 检验; b: t' 检验)

表 2 同龄 C57BL/6 小鼠与 rd 小鼠间视网膜 IPL 中 FasL 蛋白 FI 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

小鼠种系	样本量	各周龄小鼠视网膜 IPL 中 FasL 蛋白表达的 FI 值				
		PN-0 周	PN-1 周	PN-2 周	PN-3 周	PN-4 周
C57BL/6 小鼠	8	101.017 ± 14.994	111.673 ± 11.331	126.131 ± 16.631	131.680 ± 14.861	137.599 ± 17.652
rd 小鼠	8	92.199 ± 16.715	119.400 ± 16.573	131.723 ± 23.673	136.703 ± 18.988	132.009 ± 14.081
t 值		1.571	-1.540	-0.773	-0.833	0.990
P 值		0.127	0.134	0.446	0.411	0.330

注: rd: 视网膜变性; FI: 荧光强度; IPL: 内丛状层; FasL: Fas 配体; PN: 出生后 (独立样本 t 检验)

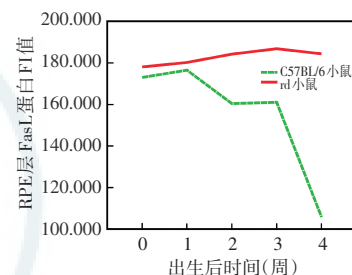


图 3 各周龄 C57BL/6 小鼠与 rd 小鼠 RPE 层 FasL 蛋白表达强度的曲线图 RPE: 视网膜色素上皮; FasL: Fas 配体; FI: 荧光强度; rd: 视网膜变性

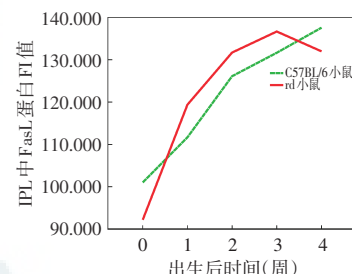


图 4 各周龄 C57BL/6 小鼠与 rd 小鼠视网膜 IPL 中 FasL 蛋白表达强度的曲线图 IPL: 内丛状层; FasL: Fas 配体; FI: 荧光强度; rd: 视网膜变性

3 讨论

3.1 FasL 蛋白的免疫特性及其意义

免疫赦免并不是涉及生物组织物理屏障的被动过程, 而是诱导细胞凋亡和免疫耐受等自然机制的主动过程。FasL 蛋白属于肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 家族成员, 而 Fas 蛋白为 TNF 受体家族成员, FasL/Fas 介导细胞凋亡^[8]。FasL 蛋白表达于眼组织, 并通过诱导 Fas⁺ 炎症细胞凋亡或抑制新生血管形成而维持眼组织的免疫赦免^[9]。Wenkel 等^[10] 在同种异体小鼠肾囊下植入新生小鼠的 RPE 和 C57BL/6gld/gld (FasL 蛋白表达缺陷) 小鼠 RPE, 前者移植后第 12

周时细胞存活良好, 而后者移植后 1 周即可见大量淋巴细胞浸润, 移植后 2 周即发生免疫排斥反应, 提示源于 RPE 的 FasL 蛋白通过 FasL/Fas 途径诱导 Fas⁺ 炎症细胞凋亡, 以保护移植物免受破坏。

3.2 视网膜组织中 FasL 蛋白表达的生理和病理特征

杨培增等^[11] 用免疫组织化学法证实正常供体人眼虹膜、睫状体、脉络膜、视网膜中均有 FasL 蛋白的表达, 但无 Fas 蛋白的表达。韦纯义等^[12] 收集经水囊或雷佛奴尔引产的人类胎儿视网膜进行免疫组织化学染色, 发现 26 周龄时视网膜各层均开始表达 FasL 蛋白, 32 周龄时可见 FasL 蛋白主要表达于视网膜 GCL 及视神经纤维层。本研究发现, PN-1 周正常 C57BL/6 小鼠

视网膜 RPE 层 FasL 蛋白强阳性表达,而神经视网膜弱阳性表达,PN-2 周至 PN-4 周 C57BL/6 小鼠视网膜 RPE 层、IS、OLM、OPL、INL、IPL 和 GCL 均有 FasL 蛋白表达。

rd 小鼠由于编码视杆细胞 cGMP-磷酸二酯酶 (phosphodiesterase, PDE) 的 β 亚单位基因突变导致 cGMP-PDE 酶活性下降,从而使 cGMP 在视杆细胞内积聚,导致视杆细胞变性^[13],而 β -PDE 基因的隐性突变则引起人类遗传性 RP^[14]。邓新国等^[15]研究发现,PN 第 7 天 rd 小鼠视网膜发育较为成熟,ONL 细胞层数为 7 层左右,第 8 天视网膜开始发生变性,第 14 天 ONL 减至 2 层,第 21 天 ONL 继续减少,接近单层,至第 35 天呈不连续单层。本研究发现,PN-1 周 rd 小鼠视网膜组织发育与正常 C57BL/6 小鼠相比未见明显异常,但 PN-2 周时视网膜 ONL 细胞层数明显减少,PN-3 周时 ONL 只剩一层细胞,PN-4 周时 ONL 呈不连续的单层,部分区域感光细胞核消失,INL 细胞与 RPE 层相贴,与邓新国等^[15]的研究基本一致。本研究还发现,PN-1 周 rd 小鼠 RPE 层 FasL 蛋白呈强阳性表达,而神经视网膜中呈弱阳性表达。PN-2 周至 PN-4 周 rd 小鼠 RPE 层、OPL、INL、IPL 和 GCL 可见 FasL 蛋白表达。

3.3 视网膜组织中 FasL 蛋白表达变化对 RP 进展的可能影响

曹永亮等^[16]用免疫组织化学法发现,SD 大鼠视网膜缺血-再灌注损伤过程中各层视网膜均可见 FasL 蛋白阳性表达的细胞。Valverde 等^[17]的研究证实,糖尿病患者神经视网膜中 FasL 蛋白的表达明显增强。本研究中发现,PN-2 周至 PN-4 周的 rd 小鼠视网膜 IPL 中 FasL 蛋白的表达强度与正常 C57BL/6 小鼠接近,推测与视网膜变性尚未累及 IPL 有关;而 PN-2 周至 PN-4 周的 rd 小鼠 RPE 层 FasL 蛋白的表达强度明显高于正常 C57BL/6 小鼠,与曹永亮等^[16]和 Valverde 等^[17]的研究结果一致,提示 rd 小鼠视网膜逐渐发生变性后,RPE 层 FasL 蛋白的表达强度较正常 C57BL/6 小鼠增高,并通过 FasL/Fas 介导 Fas⁺视网膜神经细胞凋亡,同时介导 Fas⁺炎症细胞凋亡,故在视网膜下腔进行视网膜移植时有利于减少免疫排斥反应的发生或减弱排斥反应的强度。

参考文献

[1] van Zeeburg EJ, Maaijwee KJ, Missotten TO, et al. A free retinal pigment epithelium-choroid graft in patients with exudative age-related macular degeneration; results up to 7 years [J]. *Am J Ophthalmol*, 2012, 153(1): 120-127. DOI: 10.1016/j.ajo.2011.06.007.

[2] Sun J, Mandai M, Kamao H, et al. Protective effects of human iPS-derived retinal pigmented epithelial cells in comparison with human mesenchymal stromal cells and human neural stem cells on the

degenerating retina in rd1 mice [J]. *Stem Cells*, 2015, 33(5): 1543-1553. DOI: 10.1002/stem.1960.

[3] Schwartz SD, Regillo CD, Lam BL, et al. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies [J]. *Lancet*, 2015, 385(9967): 509-516. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61376-3.

[4] 邵兵,陈迪,闵寒毅.老年性黄斑变性的细胞疗法及组织工程的研究现状与进展[J]. *中华眼底病杂志*, 2016, 32(1): 88-91. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2016.01.025.

Shao B, Chen D, Min HY. Progresses of cell-based therapy and tissue engineering in the treatment of age-related macular degeneration [J]. *Chin J Ocul Fund Dis*, 2016, 32(1): 88-91. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2016.01.025.

[5] Masli S, Vega JL. Ocular immune privilege sites [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 677: 449-458. DOI: 10.1007/978-1-60761-869-0_28.

[6] 李志杰,彭广华,李辰.细胞凋亡与眼的免疫赦免[J]. *眼科研究*, 2000, 18(2): 182-184.

Li ZJ, Peng GH, Li C. Apoptosis and ocular immune privilege [J]. *Chin Ophthalmic Res*, 2000, 18(2): 182-184.

[7] West EL, Pearson RA, Barker SE, et al. Long-term survival of photoreceptors transplanted into the adult murine neural retina requires immune modulation [J]. *Stem Cells*, 2010, 28(11): 1997-2007. DOI: 10.1002/stem.520.

[8] Lettau M, Paulsen M, Schmidt H, et al. Insights into the molecular regulation of FasL (CD178) biology [J]. *Eur J Cell Biol*, 2011, 90(6-7): 456-466. DOI: 10.1016/j.ejcb.2010.10.006.

[9] Roychoudhury J, Herndon JM, Yin J, et al. Targeting immune privilege to prevent pathogenic neovascularization [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(7): 3560-3566. DOI: 10.1167/iovs.09-3890.

[10] Wenkel H, Streilein JW. Evidence that retinal pigment epithelium functions as an immune-privileged tissue [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(11): 3467-3473.

[11] 杨培增,钟华红,周红颜,等.人眼组织中中共刺激分子、Fas/FasL 及主要组织相容性复合体 II 类分子的免疫组织化学研究 [J]. *中华眼底病杂志*, 2003, 19(2): 109-112.

Yang PZ, Zhong HH, Zhou HY, et al. Immunohistochemical studies on the expression of costimulatory molecules, Fas/FasL, and major histocompatibility complex II antigens in normal ocular tissues [J]. *Chin J Ocular Fundus Dis*, 2003, 19(2): 109-112.

[12] 韦纯义,李爱冬,羊惠君.人胎视网膜发育过程中 Fas、FasL、Bax 和 bcl-2 蛋白的表达 [J]. *中华眼底病杂志*, 2001, 17(1): 55-57.

Wei CY, Li AD, Yang HJ. Protein expression of genes related to apoptosis in retina of human fetus [J]. *Chin J Ocular Fundus Dis*, 2001, 17(1): 55-57.

[13] Bowes C, Li T, Danciger M, et al. Retinal degeneration in the rd mouse is caused by a defect in the beta subunit of rod cGMP-phosphodiesterase [J]. *Nature*, 1990, 347(6294): 677-680. DOI: 10.1038/347677a0.

[14] 韩娟娟,庞继景.视网膜变性 *Pde6b* 基因突变小鼠治疗的研究进展 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2013, 31(7): 693-696. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.07.019.

Han JJ, Pang JJ. Research progress in the treatment of retinitis pigmentosa degeneration with phosphodiesterase 6b gene mutation mouse [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2013, 31(7): 693-696. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.07.019.

[15] 邓新国,张清炯,胡世兴,等. rd 小鼠出生后 5 周内视网膜外核层细胞及其外段的光镜和电镜观察 [J]. *眼科研究*, 2006, 24(1): 30-32.

Deng XG, Zhang QJ, Hu SX, et al. Observation of light-microscopy and electro-microscopy of retinal outer nuclear layer cells during the growth duration of 5 weeks in rd mice [J]. *Chin Ophthalmic Res*, 2006, 24(1): 30-32.

[16] 曹永亮,赵岩松,张芳芹,等.骨髓间充质干细胞移植对缺血-再灌注损伤视网膜中 Fas/FasL 及 caspases-3 表达的影响 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2014, 32(1): 36-40. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.01.008.

Cao YL, Zhao YS, Zhang FQ, et al. The effect of bone marrow mesenchymal stem cells transplantation on the expressions of retinal Fas/FasL and caspase-3 after ischemic reperfusion injury [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2014, 32(1): 36-40. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.01.008.

[17] Valverde AM, Miranda S, Garcia-Ramirez M, et al. Proapoptotic and survival signaling in the neuroretina at early stages of diabetic retinopathy [J/OL]. *Mol Vis*, 2013, 19: 47-53 [2016-04-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3541044/>.

(收稿日期:2016-05-11)

(本文编辑:尹卫靖)