

间充质干细胞联合低剂量环孢素 A 对角膜移植排斥的抑制作用

贾喆 李斐 吕瑛 曾孝宇 路晓晓 赵少贞

300384 天津医科大学眼科医院

通信作者:赵少贞, Email: zhaosz1997@sina.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.11.004

【摘要】目的 探讨静脉注射间充质干细胞(MSCs)联合肌内注射低剂量环孢素 A(CsA)对大鼠角膜移植免疫排斥的作用。**方法** 制作大鼠异体角膜移植动物模型,采用随机数字表法将 36 只模型大鼠随机分为 MSCs 组、CsA 组和 MSCs+CsA 组,每组 12 只,每组中 6 只用于症状观察,6 只用于免疫因子检测。术后第 3 天开始裂隙灯显微镜下观察并记录角膜植片血管化程度、水肿程度及混浊程度评分。术后 18 d,采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法测定脾脏辅助性 T 细胞(Th)1 及 Th2 细胞因子的表达。**结果** MSCs+CsA 组植片存活时间为(21.3±3.9)d,明显长于 MSCs 组的(14.8±2.4)d 和 CsA 组的(16.0±1.1)d,差异均有统计学意义($P=0.003, 0.004$)。术后 18 d, MSCs 组、CsA 治疗组和 MSCs+CsA 组植片的角膜混浊程度评分分别为 3.17±0.17、3.00±0.00 和 2.17±0.17,角膜新生血管评分分别为 2.67±0.21、2.33±0.21 和 1.83±0.21,总体比较差异均有统计学意义($F=15.500, P<0.01; F=4.524, P=0.029$),其中 MSCs+CsA 组角膜混浊程度及新生血管评分较 MSCs 组和 CsA 组低,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。MSCs 组、CsA 组和 MSCs+CsA 组白细胞介素(IL)-2、IL-4、IL-10、 γ 干扰素(IFN- γ)质量浓度比较,差异均有统计学意义($F=15.000, 12.810, 10.720, 17.960$, 均 $P<0.01$)。与 MSCs 组和 CsA 组相比, MSCs+CsA 组大鼠脾脏淋巴细胞中 Th1 亚群细胞因子 IFN- γ 及 IL-2 质量浓度明显降低, Th2 亚群细胞因子 IL-4、IL-10 质量浓度明显升高,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。**结论** MSCs 联合 CsA 治疗可以通过上调 Th2 亚群细胞因子的表达和抑制 Th1 亚群细胞因子的表达而显著延长高危角膜移植植片的存活时间。

【关键词】 间充质干细胞; 免疫抑制剂; 角膜移植; 排斥反应

基金项目: 国家自然科学基金项目(81770890、81600705); 天津市自然科学基金项目(16JQNJC12500)

Synergism of mesenchymal stem cells and low-dose cyclosporine A on corneal allograft rejection Jia Zhe, Li

Fei, Lyu Ying, Zeng Xiaoyu, Lu Xiaoxiao, Zhao Shaozhen

Tianjin Medical University Eye Hospital, Tianjin 300384, China

Corresponding author: Zhao Shaozhen, Email: zhaosz1997@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of mesenchymal stem cells (MSCs) combined with low-dose cyclosporin A (CsA) on corneal transplantation rejection and its mechanism. **Methods** A fully allogeneic rat cornea transplant model (Wistar rats to Lewis rats) was created. Thirty-six model rats were divided into MSCs group, CsA group and MSCs+CsA group randomly by using the random number table method, with 12 rats for each group. In each group, six rats were used for the evaluation of symptom observation and six for the assay of immune factor. Three days after corneal transplantation, slit lamp microscope was used to observe and record the vascularization, edema and opacity scores of corneal graft. After 18 days, spleen T helper cell(Th)1 and Th2 cytokines were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The use and care of the animals complied with Regulations for the Administration of Affair Concerning Experimental Animals by State Science and Technology Commission. This study protocol was approved by Ethic Committee of Tianjin Medical University Eye Hospital (No. TMUaMEC2017028).

Results The survival time of corneal grafts in MSCs+CsA group was prolonged in comparison with the MSCs group and CsA group, with significant differences between them ([21.3±3.9] days vs. (14.8±2.4) days; [21.3±3.9] days vs. [16.0±1.1] days) ($P=0.003, 0.004$). Eighteen days after corneal transplantation, corneal opacity scores were 3.17±0.17, 3.00±0.00 and 2.17±0.17, corneal neovascularization scores were 2.67±0.21, 2.33±0.21 and 1.83±0.21, respectively in the MSCs group, CsA group and MSCs+CsA group, showing significant differences among the three groups ($F=15.500, P<0.01; F=4.524, P=0.029$). The corneal opacity scores and corneal neovascularization scores in the MSCs+CsA group were significantly lower than those in the MSCs group and CsA group (all at $P<0.05$). Interleukin(IL)-2, IL-4, IL-10, and interferon- γ (IFN- γ) concentrations were all significantly different among the MSCs group, CsA group and MSCs+CsA group ($F=15.000, 12.810, 10.720, 17.960$, all at $P<$

0.01)。Compared with the MSCs group and CsA group, Th1 subsets cytokines IFN- γ and IL-2 concentrations in the MSCs+CsA group were significantly lower, and Th2 subsets cytokines IL-4 and IL-10 concentrations were significantly increased in the MSCs + CsA group in comparison with the MSCs group and CsA group (all at $P < 0.05$).

Conclusions The combination of MSCs with low-dose CsA can effectively ameliorate immunological rejection by the modulation of the balance of Th1/Th2.

[Key words] Mesenchymal stem cells; Immunosuppressant; Corneal transplantation; Rejection

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81770890, 81600705); Tianjin Municipal Natural Science Foundation (16JQNJC12500)

穿透角膜移植术 (penetrating keratoplasty, PKP) 是临床上常用的手术方法, 是许多导致角膜盲疾病唯一治疗方法。角膜具有免疫赦免机制, 相较其他器官移植排斥反应发生率低, 但角膜植片的 5 年存活率却与心脏、肾脏、肝脏等实体器官移植相近, 约有 50% 的患者会发生排斥反应, 导致手术失败^[1]。在存在眼表炎症或角膜血管化等的高危移植排斥患者中, 排斥反应发生率高达 70% 以上^[2]。目前中国供体角膜来源缺乏, 且多次移植会增加排斥反应的发生率, 目前抑制角膜移植排斥的药物治疗效果尚不理想。局部加全身糖皮质激素和/或免疫抑制剂应用是角膜移植术后预防排斥反应的金标准, 但对于高危角膜移植却收效甚微, 且糖皮质激素及免疫抑制剂长期使用可能导致多种并发症。间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 对多种免疫细胞增生和功能具有调节作用。前期研究发现, 大鼠尾静脉注射 MSCs 可有效延长角膜植片存活时间^[3]。本研究在此基础上观察 MSCs 联合不同浓度环孢素 A (cyclosporin A, CsA) 对大鼠角膜移植排斥模型植片存活的影响, 探讨其对角膜组织移植排斥反应发生和转归的作用, 为角膜移植排斥反应的临床治疗提供新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 选用清洁级雄性成年 Wistar 大鼠 (供体) 和 Lewis 大鼠 (受体) 各 36 只 (北京维通利华实验动物技术有限公司), 体质量为 (200±10) g。术前检查大鼠屈光间质均清晰, 眼底无病变。采用随机数字表法将 36 只造模成功的角膜移植排斥模型大鼠随机分为 MSCs 组、CsA 组和 MSCs+CsA 组, 每组 12 只。每组中 6 只大鼠用于症状观察, 6 只用于免疫因子检测。大鼠饲养于天津医科大学, 饲养环境符合医学实验动物环境设施要求。选择左眼为手术眼, 以保证大鼠日常生活无障碍。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》。本研究方案经天津医科大学眼科医院伦理委员会审批 (批文号: TMUaMEC2017028)。

1.1.2 主要试剂及仪器 CsA 注射液 (瑞士诺华制药有限公司); 白细胞介素 (interleukin, IL)-2、IL-4、IL-10 和 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (美国 Sigma 公司)。裂隙灯显微镜照相系统 (深圳康华科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 高危角膜移植免疫排斥动物模型的建立 建立以 Wistar 大鼠为供体, Lewis 大鼠为受体的角膜移植排斥模型。排斥反应模型大鼠称体质量后按照 3 ml/kg 的剂量使用 100 g/L 水合氯醛溶液进行腹腔内注射诱导全身麻醉, 麻醉后左眼扩瞳并行穿透角膜移植术。角膜正中钻取直径 3.5 mm 植片。植床直径为 3.0 mm, 10-0 缝线间断缝合 8 针, 前房自然形成, 缝线裸露不包埋。结膜囊内涂氧氟沙星眼膏。手术由同一医师完成。

1.2.2 实验动物的分组处理 参照文献[3]的方法培养 MSCs, 将 Wistar 大鼠骨髓来源的 MSCs 消化离心, 充分震荡, 制成浓度为 5×10^6 /ml PBS 的混悬液。MSCs 组模型大鼠分别于角膜移植术后即刻、1 d、2 d 行尾静脉注射 MSCs, 每天 1 ml。

CsA 的用量和用法参照文献[4]的描述。在前期实验中行药物浓度筛选, 进一步确定药物最适浓度。将 CsA 溶于 PBS, 充分震荡, 稀释至 2 mg/ml。CsA 组模型大鼠分别于角膜移植术后即刻及术后 1、2、3、4、5、6、7、8、9 d 肌肉注射 CsA 溶液, 每日剂量为 0.2 ml, 共 10 d。

MSCs 联合 CsA 治疗组模型大鼠分别于角膜移植术后即刻、1 d、2 d 尾静脉注射 MSCs, 每天 1 ml, 同时分别于术后即刻及术后 1、2、3、4、5、6、7、8、9 d 肌肉注射 CsA 溶液, 每天 0.2 ml, 共 10 d。

1.2.3 裂隙灯显微镜下观察角膜植片情况 术后第 3 天起各组分别取 6 只模型大鼠, 裂隙灯显微镜下观察术眼角膜, 每隔 2 天观察 1 次, 术后 3 周开始每周观察 2 次至术后 100 d。发生排斥反应者终止观察。

参照 Larkin 分级^[5]对植片的混浊程度、水肿以及血管化程度进行评分。混浊程度: 植片完全透明为 0

分;轻度混浊为 1 分;中度混浊为 2 分;虹膜血管窥不清,但瞳孔轮廓可见为 3 分;瞳孔轮廓看不清为 4 分。植片水肿:植片无水肿为 0 分;植片中度水肿为 1 分;伴有植片增厚的显著水肿为 2 分。新生血管化:植片无新生血管为 0 分;任何象限新生血管伸入达到植片半径的 25% 为 1 分;新生血管伸入达到植片半径的 50% 为 2 分;新生血管伸入到植片半径的 75% 为 3 分;新生血管伸入到植片中央为 4 分。

移植排斥定义为术后植片中等或严重混浊、水肿以及血管化,即混浊程度评分 ≥ 3 分,总评分 ≥ 5 分。剔除发生手术并发症大鼠,包括白内障、严重前房积脓或术后第 2 天前房仍不能形成者。

1.2.4 ELISA 法测定 Th1 和 Th2 亚群细胞因子蛋白表达水平 术后 18 d,过量麻醉法处死各组大鼠,置体积分数 75% 乙醇中浸泡 20 min,在无菌操作台取出脾脏,行 PBS 灌注冲洗。以淋巴细胞提取液分离淋巴细胞,并于 ConA 刺激下孵育 72 h,收集上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书的步骤测定上清液中 IFN- γ 、IL-2、IL-4 以及 IL-10 水平。将抗大鼠 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10 单克隆抗体分别包被于酶标板上,加入生物素化的抗大鼠 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10,形成免疫复合物,用辣根过氧化物酶标记的 Streptavidin 与生物素结合,加入底物工作液显蓝色,最后加终止液硫酸。测定波长为 450 nm 处的吸光度(A)值,通过绘制标准曲线求出标本中各细胞因子质量浓度。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 软件进行统计分析,各组植片平均存活时间比较采用 Kaplan-Meier 的单因素分析时序检验。本研究中各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,Levene 方差齐性检验证实方差齐。MSCs 组、CsA 组和 MSCs+CsA 组间角膜植片存活时间及术后 18 d 角膜植片混浊程度评分、角膜新生血管评分比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Bonferroni 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组角膜植片存活时间

MSCs 组、CsA 组和 MSCs + CsA 组角膜植片存活时间分别为 (14.8 \pm 2.4)、(16.0 \pm 1.1) 和

(21.3 \pm 3.9)d (图 1)。MSCs+CsA 组角膜植片存活时间较 MSCs 组和 CsA 组明显延长,差异均有统计学意义 (P = 0.003、0.004)。CsA 组角膜植片存活时间较 MSCs 组稍延长,但差异无统计学意义 (P = 0.582)。

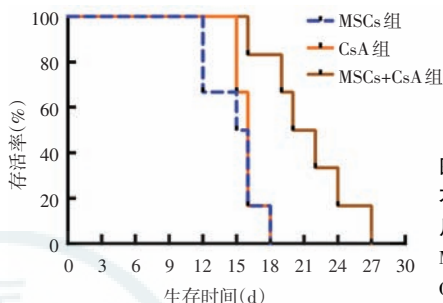


图 1 角膜移植术后不同时间各组角膜植片的存活率 注: MSCs:间充质干细胞; CsA:环孢素 A

2.2 各组角膜植片角膜混浊度及血管化程度评分比较

在排斥反应发生高峰期,即术后 18 d, MSCs 组和 CsA 组较 MSCs+CsA 组植片水肿、混浊及血管化程度更为严重(图 2)。术后 18 d, MSCs 组、CsA 组和 MSCs+CsA 组植片的角膜混浊程度评分分别为 3.17 \pm 0.17、3.00 \pm 0.00 和 2.17 \pm 0.17,总体比较差异有统计学意义 (F = 15.500, P < 0.01),其中 MSCs+CsA 组较 MSCs 组和 CsA 组角膜混浊程度评分降低,差异均有统计学意义 (均 P < 0.05)。术后 18 d, MSCs 组、CsA 组和 MSCs+CsA 组角膜新生血管评分分别为 2.67 \pm 0.21、2.33 \pm 0.21 和 1.83 \pm 0.21,总体比较差异有统计学意义 (F = 4.524, P = 0.029),其中 MSCs+CsA 组较 MSCs 组和 CsA 组新生血管评分低,差异均有统计学意义 (均 P < 0.05) (图 3)。

2.3 各组 Th1 和 Th2 亚群细胞因子表达比较

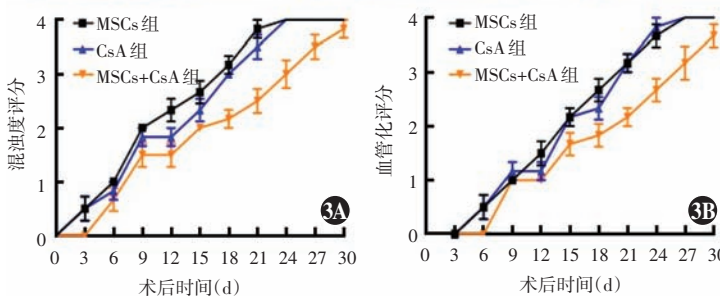
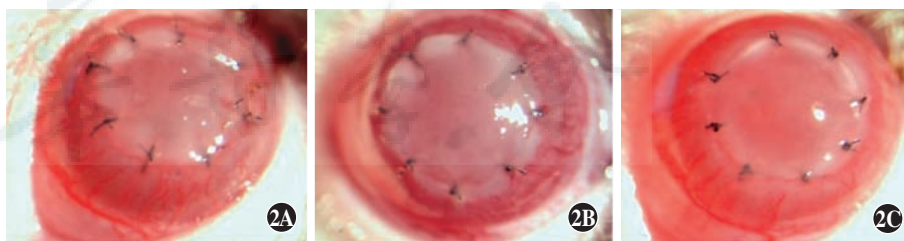


图 2 裂隙灯显微镜下各组角膜植片情况 术后 18 d, MSCs 组及 CsA 组较 MSCs+CsA 组植片水肿、混浊及血管化程度更为严重 A: MSCs 组 B: CsA 组

图 3 各组角膜混浊度及血管化程度评分 MSCs+CsA 组大鼠角膜混浊及新生血管发生时间较 MSCs 组及 CsA 组延迟,同时间点角膜混浊程度及血管化程度降低 A: 各组角膜混浊度评分比较 B: 各组角膜血管化评分比较 注: MSCs: 间充质干细胞; CsA: 环孢素 A

MSCs 组、CsA 组和 MSCs+CsA 组 IL-2 质量浓度分别为 (875.18 ± 42.33)、(848.95 ± 32.60) 和 (766.43 ± 31.76) pg/ml, IL-4 质量浓度分别为 (56.2 ± 4.43)、(55.11 ± 2.88) 和 (65.38 ± 4.09) pg/ml, IL-10 质量浓度分别为 (195.4 ± 14.38)、(204.97 ± 18.08) 和 (244.18 ± 24.25) pg/ml, IFN-γ 质量浓度分别为 (525.75 ± 166.09)、(396.37 ± 84.89) 和 (149.01 ± 43.84) pg/ml, 3 个组间 IL-2、IL-4、IL-10、IFN-γ 质量浓度总体比较差异均有统计学意义 ($F = 15.000, P < 0.01$; $F = 12.810, P = 0.006$; $F = 10.720, P = 0.001$; $F = 17.960, P < 0.01$)。与 MSCs 组和 CsA 组比较, MSCs+CsA 组大鼠脾脏淋巴细胞中 Th1 亚群细胞因子 IFN-γ 和 IL-2 质量浓度明显降低, Th2 亚群细胞因子 IL-4 和 IL-10 质量浓度明显升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 4)。

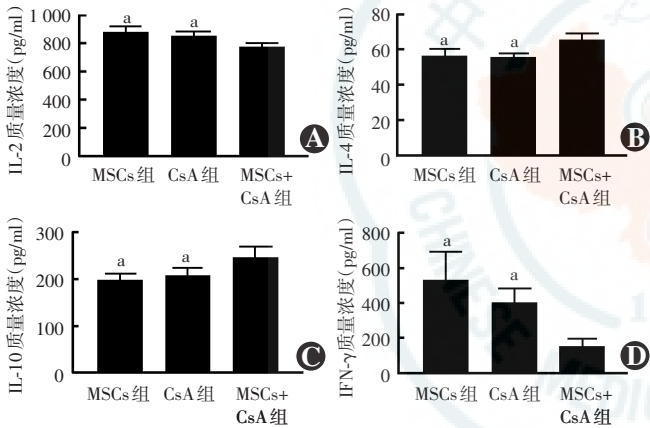


图 4 各组 Th1 亚群及 Th2 亚群细胞因子质量浓度的比较 A: 各组 IL-2 质量浓度比较 $F = 15.000, P < 0.01$ 。与 MSCs+CsA 组比较, $^a P < 0.05$ B: 各组 IL-4 质量浓度比较 $F = 12.810, P = 0.006$ 。与 MSCs+CsA 组比较, $^a P < 0.05$ C: 各组 IL-10 质量浓度比较 $F = 10.720, P = 0.001$ 。与 MSCs+CsA 组比较, $^a P < 0.05$ D: 各组 IFN-γ 质量浓度比较 $F = 17.96, P < 0.01$ 。与 MSCs+CsA 组比较, $^a P < 0.05$ (单因素方差分析, Bonferroni 检验, $n = 6$) 注: MSCs: 间充质干细胞; CsA: 环孢素 A; IL: 白细胞介素; IFN-γ: γ 干扰素

3 讨论

角膜移植术后排斥反应的发生是导致手术失败的主要原因, 局部联合全身糖皮质激素和/或免疫抑制剂的应用是角膜移植术后用药的金标准。CsA 是目前临床上公认的防治器官和组织移植术后免疫排斥反应的经典基础用药^[6]。CsA 属于钙调神经素抑制剂, 进入细胞质后在钙离子的协同下与环孢素 (cyclophilin, CyP) 构成 CyP-CsA 复合物。CsA-CyP 复合物与 CNA 和 CNB 结合构成异源性三聚体, 再与钙离子和 CaM8 形成具有抑制中枢神经作用的五聚体, 后者通过抑制活化 T 细胞的核因子 (nuclear factor of activated T cells, NF-AT) 的去磷酸化抑制其向细胞核的转位并促

使其从细胞核上脱落, 从而抑制由 NF-AT 所引发的细胞因子转录过程, 阻止细胞编码因子 IL-2、IFN-γ 等的产生及其受体基因的诱导, 抑制细胞表面活化分子 CD25、CD69 的表达, 阻断 T 细胞的活化, 从而抑制细胞免疫和体液免疫, 最终发挥抑制机体免疫排斥作用。CsA 主要作用于细胞周期 G1 期, 其靶细胞为 Th 细胞和细胞毒性 T 细胞, 而以 Treg 为代表的 T 抑制细胞因其为钙离子非依赖性, 故不受 CsA 的影响。在前期研究中我们发现, 不同剂量的 CsA 肌肉注射可以有效延长植片生存时间, 抑制术后排斥反应的发生, 其抗排斥作用呈剂量依赖性^[4], 但是 CsA 长时间高剂量应用具有系统毒性作用且有机会感染的风险, 使得 CsA 的使用剂量受到限制。

MSCs 是来源于发育早期中胚层和外胚层的一类多能成体干细胞, 近年来其免疫调控作用倍受关注^[7-9]。目前, MSCs 已广泛用于多种器官和组织移植的基础实验以及临床试验研究^[10-12], 如肾脏移植、心脏移植、肝脏移植、胰岛移植、皮肤组织移植和角膜移植等, 证明 MSCs 具有改善植片微环境、抑制免疫应答、减轻炎症反应、延长植片存活时间的作用。目前的研究认为, MSCs 发挥免疫抑制作用的机制主要包括细胞间接触、分泌抑制性因子和/或诱导调节性 T 细胞形成。研究表明, MSCs 可以抑制 Th1 细胞因子, 上调 Th2 细胞水平, 同时增强抑制类细胞 Treg 细胞的表达。我们的前期实验也证明, MSCs 是一种温和而有效的免疫抑制剂, 大鼠尾静脉注射 MSCs 可有效延长角膜植片存活时间, 其作用机制主要为抑制 T 细胞增生, 改变 Th1/Th2 平衡, 诱导免疫耐受^[10], 但 MSCs 免疫调控作用效能较低也是临床应用亟待解决的关键问题。尾静脉注射 MSCs 的归巢问题一直倍受关注, 但尚未有定论。有研究发现, MSCs 可以定位并迁移至损伤靶器官, 通过细胞间接触发挥作用, 但大部分研究倾向于认为 MSCs 通过旁分泌的作用发挥免疫调控作用, 经细胞本身自然死亡过程代谢出体外^[13]。尽管 MSCs 治疗已用于多项器官移植排斥的实验中, 部分已通过 IV 期临床试验, 但干细胞的复制潜能使得其在用于临床治疗前需要大量实验进行佐证。

Calne^[14] 提出器官移植术后, 不同类型免疫抑制剂发挥总体抑制作用前具有相互促进表达的作用, 此理论是临床联合应用抗排斥药物的理论基础。鉴于 MSCs 与 CsA 抗排斥作用机制不完全相同, 本研究中将 MSCs 与低剂量 CsA 联合应用, 以在降低 CsA 使用剂量的基础上发挥二者的联合作用, 达到延长角膜植片存活时间的目的。关于二者联合作用的效果, 既往

研究结果报道不一。Zhang 等^[15]发现在肾脏移植模型中单独应用 MSCs 治疗或者 MSCs 与 CsA 联合应用均会引起 IL-1 β 、TNF- γ 和转化生长因子- β 1 等炎性因子表达的下调,从而抑制排斥反应,但联合治疗组各炎性因子下调的程度不如单用 CsA 治疗组。Inoue 等^[16]在同种异体心脏移植的大鼠模型中发现 MSCs 和低剂量 CsA 联合应用时, CsA 的治疗作用被逆转。Sbano 等^[17]研究发现,在皮肤移植模型中, MSCs 和 CsA 联合使用时具有协同作用,可以有效延长皮肤植片的存活时间,且皮肤植片的存活率高于单用免疫抑制剂治疗者。Hajkova 等^[18]也证实, MSCs 与 CsA 联合应用可以通过上调 IL-10 分泌水平,促进皮肤植片的存活。在气管移植动物实验中发现, CsA 与 MSCs 联合应用可以通过抑制淋巴细胞浸润,促进气管黏膜上皮化表达,提高机体对植片的耐受^[19]。Kim 等^[20]在胰腺移植排斥模型的研究中同样也表明, MSCs 联合低剂量 CsA 可以上调 Treg 细胞表达,改善移植胰腺的存活环境,延长植片存活时间。Cejka 等^[21]研究表明, CsA 与 MSCs 治疗角膜碱烧伤模型具有联合作用,可以有效减少新生血管及瘢痕的形成。本实验结果显示,术后 MSCs 和 CsA 联合使用与单用 MSCs 或单用 CsA 治疗相比,植片的存活时间明显延长,二者的联合使用可以推迟角膜新生血管形成时间,有效维持角膜透明程度,减轻角膜植片的水肿程度。分析联合作用的机制与上调 Th2 亚群细胞因子的表达和抑制 Th1 亚群细胞因子有关,具体机制尚需进一步研究。

综上所述,本研究结果表明 MSCs 与低剂量 CsA 联合应用具有免疫抑制剂的互补效果,对于大鼠高危角膜移植排斥模型,可以发挥不同种类免疫抑制剂联合应用的加和效果,为进一步临床研究提供了可供选择的治疗方案。

参考文献

- [1] Treacy O, O'Flynn L, Ryan AE, et al. Mesenchymal stem cell therapy promotes corneal allograft survival in rats by local and systemic immunomodulation[J]. *Am J Transplant*, 2014, 14(9): 2023-2036. DOI:10.1111/ajt.12828.
- [2] Figueiredo GS, Jones MN, Krishna Y, et al. Transplant rejection following endothelial keratoplasty and penetrating keratoplasty in the United Kingdom: incidence and survival[J]. *Am J Ophthalmol*, 2015, 160(3): 416-421. DOI:10.1016/j.ajo.2015.06.012.
- [3] 张晓敏, 焦春娜, 贾喆, 等. 间充质干细胞对大鼠角膜移植排斥反应的观察[J]. *中华眼科杂志*, 2012, 48(8): 733-738. DOI:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2012.08.013.
Zhang XM, Jiao CN, Jia Z, et al. Investigation of the role of mesenchymal stem cells on keratoplasty rejection[J]. *Chin J Ophthalmol*, 2012, 48(8): 733-738. DOI:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2012.08.013.
- [4] 焦春娜, 张晓敏, 赵少贞. 肌注不同剂量环孢霉素 A 抑制大鼠角膜移植的免疫排斥反应[J]. *天津医科大学学报*, 2010, 16(2): 208-210, 231. DOI:10.3969/j.issn.1006-8147.2010.02.008.
Jiao CN, Zhang XM, Zhao SZ. Experimental studies of cyclosporine A in different doses on the prevention of penetrating keratoplasty rejection in a rat model[J]. *J Tianjin Med Univ*, 2010, 16(2): 208-210, 231. DOI:10.3969/j.issn.1006-8147.2010.02.008.
- [5] Larkin DF, Calder VL, Lightman SL. Identification and characterization of cells infiltrating the graft and aqueous humour in rat corneal allograft rejection[J]. *Clin Exp Immunol*, 1997, 107(2): 381-391.
- [6] Colombo D, Ammirati E. Cyclosporine in transplantation—a history of converging timelines[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2011, 25(4): 493-504.
- [7] Wang LT, Ting CH, Yen ML, et al. Human mesenchymal stem cells (MSCs) for treatment towards immune- and inflammation-mediated diseases: review of current clinical trials[J/OL]. *J Biomed Sci*, 2016, 23(1): 76 [2018-07-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5095977/>. DOI:10.1186/s12929-016-0289-5.
- [8] 韦春玲, 胡竹林. 骨髓间充质干细胞在眼科应用的研究进展[J]. *中华实验眼科杂志*, 2012, 30(1): 83-85. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.01.021.
Wei CL, Hu ZL. Research progress in bone marrow mesenchymal stem cell in ophthalmology[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2012, 30(1): 83-85. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.01.021.
- [9] 高铁理, 刘红玲, 傅少颖. 骨髓间充质干细胞在角膜、视网膜及视神经疾病中的研究进展[J]. *中华实验眼科杂志*, 2012, 30(6): 563-565. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.06.020.
Gao YK, Liu HL, Fu SY. Research progress in the application of bone marrow stem cell in ophthalmology[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2012, 30(6): 563-565. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.06.020.
- [10] Jia Z, Jiao C, Zhao S, et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat corneal allograft rejection model[J]. *Exp Eye Res*, 2012, 102: 44-49. DOI:10.1016/j.exer.2012.06.008.
- [11] Schweizer R, Gorantla VS, Plock JA. Promise and promise of mesenchymal stem cell-based therapies in clinical vascularized composite allotransplantation[J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2015, 20(6): 608-614. DOI:10.1097/MOT.0000000000000247.
- [12] Murphy N, Lynch K, Lohan P, et al. Mesenchymal stem cell therapy to promote corneal allograft survival: current status and pathway to clinical translation[J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2016, 21(6): 559-567. DOI:10.1097/MOT.0000000000000360.
- [13] Lai RC, Yeo RW, Lim SK. Mesenchymal stem cell exosomes[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 40: 82-88. DOI:10.1016/j.semedb.2015.03.001.
- [14] Calne R. WOFIE hypothesis: some thoughts on an approach toward allograft tolerance[J/OL]. *Transplant Proc*, 1996, 28(3): 1152 [2018-07-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8658605?dopt=Abstract>.
- [15] Zhang W, Qin C, Zhou ZM. Mesenchymal stem cells modulate immune responses combined with cyclosporine in a rat renal transplantation model[J]. *Transplant Proc*, 2007, 39(10): 3404-3408. DOI:10.1016/j.transproceed.2007.06.092.
- [16] Inoue S, Popp FC, Koehl GE, et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat organ transplant model[J]. *Transplantation*, 2006, 81(11): 1589-1595. DOI:10.1097/01.tp.0000209919.90630.7b.
- [17] Sbano P, Cuccia A, Mazzanti B, et al. Use of donor bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of skin allograft rejection in a preclinical rat model[J]. *Arch Dermatol Res*, 2008, 300(3): 115-124. DOI:10.1007/s00403-007-0827-9.
- [18] Hajkova M, Javorkova E, Zajicova A, et al. A local application of mesenchymal stem cells and cyclosporine A attenuates immune response by a switch in macrophage phenotype[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2017, 11(5): 1456-1465. DOI:10.1002/term.2044.
- [19] Kim H. Influence of mesenchymal stem cells on cryopreserved tracheal allografts in rabbits[J]. *Korean J Thorac Cardiovasc Surg*, 2013, 46(5): 328-339. DOI:10.5090/kjtes.2013.46.5.328.
- [20] Kim YH, Wee YM, Choi MY, et al. Interleukin (IL)-10 induced by CD11b(+) cells and IL-10-activated regulatory T cells play a role in immune modulation of mesenchymal stem cells in rat islet allografts[J]. *Mol Med*, 2011, 17(7-8): 697-708. DOI:10.2119/molmed.2010.00098.
- [21] Cejka C, Hajkova J, Trosan P, et al. Transfer of mesenchymal stem cells and cyclosporine A on alkali-injured rabbit cornea using nanofiber scaffolds strongly reduces corneal neovascularization and scar formation[J]. *Histol Histopathol*, 2016, 31(9): 969-980. DOI:10.14670/HH-11-724.

(收稿日期:2018-07-15)

(本文编辑:刘艳)