

## · 实验研究 ·

# 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

张莲 宋继科 唐凯 郑凤鸣 郭俊国 毕宏生

250014 济南, 山东中医药大学 [张莲 (2013 级眼科学硕士研究生)、宋继科、唐凯]; 530000 南宁, 广西中医药大学 (郑凤鸣); 250002 济南, 山东中医药大学眼科研究所 (郭俊国、毕宏生)

通信作者: 毕宏生, Email: hongshengbi@126.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.08.003

**【摘要】** 背景 研究表明, 调节性 T 细胞 (Treg) 是一类负向调控免疫应答的 T 细胞亚群, 在维持免疫稳态和免疫耐受方面发挥重要作用。自身免疫性葡萄膜炎是一种免疫性眼病, Treg 细胞在自身免疫性葡萄膜炎发生和发展过程中的调控作用尚不完全清楚。目的 观察 Treg 细胞在实验性自身免疫性葡萄膜炎 (EAU) 大鼠发病过程中的动态变化。方法 选取 84 只 6~8 周龄 SPF 级 Lewis 大鼠, 采用随机数字表法随机分为模型组和对照组。模型组于大鼠双后足垫、腹部双侧及背部皮下注射光感受器间维生素 A 类结合蛋白 (IRBP)<sub>1177-1191</sub>、结核菌素 (TB)、完全弗氏佐剂 (CFA) 和 PBS 混合乳化剂共 300  $\mu$ l, 对照组大鼠以同样方法皮下注射等容量不含 IRBP 的 TB 与 CFA 乳化剂。分别于造模后第 9、13、18、23、28、35、48 天观察模型组和对照组大鼠的眼部炎症症状并根据严重程度进行炎症评分。于造模后上述时间点分别处死模型组及对照组大鼠各 6 只, 采用常规组织病理学方法观察各组大鼠眼部虹膜、睫状体和视网膜组织形态变化; 分离大鼠脾脏淋巴细胞, 采用流式细胞术检测大鼠脾脏悬液中 Treg 细胞特异性标志物 Foxp3 标记细胞比例; 采用实时荧光定量 PCR 法检测大鼠脾脏淋巴细胞中 Foxp3 mRNA 相对表达量变化。结果 免疫后第 8 天模型组大鼠虹膜血管扩张充血, 开始出现眼部炎症表现, 免疫后第 13 天虹膜血管明显扩张, 前房可见渗出和积脓, 瞳孔区有膜样渗出, 炎症评分最高, 为 (3.75 $\pm$ 0.42) 分, 之后眼部炎症反应逐渐减轻, 至免疫后第 23 天炎症反应接近消失, 造模后第 7、11、13、15、17、19、21 天模型鼠眼炎症反应评分总体比较差异有统计学意义 ( $F=81.709$ ,  $P<0.001$ )。对照组大鼠眼部检查正常。组织病理学观察发现, 模型组大鼠虹膜、睫状体、视网膜等组织有中性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞浸润, 组织结构排列疏松, 以免疫后第 13 天最为明显, 此后逐渐减轻, 至免疫后第 23 天虹膜、睫状体和视网膜组织结构接近正常, 炎性细胞浸润消失。流式细胞术检测发现, 免疫后第 13、18、23、28、35、48 天模型组大鼠脾脏 Foxp3 标记细胞比例分别为 (5.50 $\pm$ 0.64)%、(13.36 $\pm$ 0.98)%、(10.34 $\pm$ 0.79)%、(9.58 $\pm$ 1.02)%、(6.73 $\pm$ 0.81)% 和 (5.58 $\pm$ 0.47)%、明显高于对照组的 (2.80 $\pm$ 0.38)%、(3.36 $\pm$ 0.53)%、(3.65 $\pm$ 0.57)%、(3.37 $\pm$ 0.43)%、(3.33 $\pm$ 0.50)% 和 (3.13 $\pm$ 0.61)%、差异均有统计学意义 ( $t=-6.272$ 、 $-15.556$ 、 $-11.910$ 、 $-9.753$ 、 $-6.154$ 、 $-5.491$ , 均  $P<0.01$ )。模型组和对照组造模后各时间点大鼠脾脏淋巴细胞中 Foxp3 mRNA 的相对表达量变化与 Foxp3 标记细胞比例变化趋势基本一致。结论 EAU 大鼠葡萄膜炎的发病及转归与 Treg 细胞数量和功能变化密切相关。

**【关键词】** 实验性自身免疫性葡萄膜炎/免疫; 调节性 T 淋巴细胞/免疫; 淋巴细胞活性; 近交系 Lew 大鼠; 动物模型; 叉头转录因子/免疫; 脾脏/免疫

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (81373826、81403438); 山东省医药卫生科技发展计划项目 (2013WS0251)

**The dynamic changes of regulatory T cells in the pathogenesis of experimental autoimmune uveitis** Zhang Lian, Song Jike, Tang Kai, Zheng Fengming, Guo Junguo, Bi Hongsheng

Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China (Zhang L, Song JK, Tang K); Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530000, China (Zheng FM); Eye Institute of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250002, China (Guo JG, Bi HS)

Corresponding author: Bi Hongsheng, Email: hongshengbi@126.com

**【Abstract】** **Background** Studies show that regulatory T cells (Treg) are a kind of T cell subsets to negatively regulate immune response, and play an important role in maintaining immune homeostasis and immune tolerance. Autoimmune uveitis is an autoimmune disease, the regulation of Treg cells in pathogenesis and progression of autoimmune uveitis is not fully unelucidated. **Objective** This study was to observe the dynamic changes of Treg in experimental autoimmune uveitis (EAU) rats and explore the role of Treg cells in the pathological process of EAU

rats. **Methods** Eighty four 6–8 week-old SPF Lewis rats were randomly divided into model group and control group. The mixed emulsifier of interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP)<sub>1177-1191</sub>, tuberculin (TB), complete Freund adjuvant (CFA) and PBS (300 μl) was subcutaneously injected in double rear foot pad, abdominal side and back, and only equal amount of TB, CFA and PBS emulsifier was used in the same way in the control group. Ocular inflammation symptoms was examined at 9, 13, 18, 23, 28, 35 and 48 days after modeling and scored based on the severity of the inflammatory. Six rats of each group were sacrificed in above time points respectively for the histopathological examination of iris, ciliary body and retinas by haematoxylin-eosin staining. The lymphocytes were isolated and cultured from rat spleens, and the proportion of Foxp3-labelled cells, a specific marker of Treg cells, was assayed by flow cytometry. The relative expression level of Foxp3 mRNA in the lymphocytes detected by using real-time quantitative PCR (RT-PCR). The use and care of the rats complied with the ARVO Statement. **Results** Eye inflammatory response appeared at 8 days after immunization, showing vasodilation and hyperemia of rat iris in the model group, and the response peaked at 13 days, with exudation and hypopyon in the anterior chamber. The highest inflammatory scores were  $3.75 \pm 0.42$  at day 13, and the ocular inflammation reaction was gradually relieved after that and disappeared at 23 days after immunity. A significant difference in ocular inflammatory scores of model rats was found among different time points ( $F = 81.709, P < 0.001$ ); while no inflammatory symptom was observed in the control group. Histopathology examination showed obvious infiltration of inflammatory cells in the iris, ciliary body and retinas in model rats, including neutrophils, lymphocytes and mononuclear cells. The proportion of Foxp3-labelled cells in spleen lymphocytes was  $(5.50 \pm 0.64)\%$ ,  $(13.36 \pm 0.98)\%$ ,  $(10.34 \pm 0.79)\%$ ,  $(9.58 \pm 1.02)\%$ ,  $(6.73 \pm 0.81)\%$  and  $(5.58 \pm 0.47)\%$  in the model group on day 13, 18, 23, 28, 35, 48 respectively, with statistically significant differences in comparison with  $(2.80 \pm 0.38)\%$ ,  $(3.36 \pm 0.53)\%$ ,  $(3.65 \pm 0.57)\%$ ,  $(3.37 \pm 0.43)\%$ ,  $(3.33 \pm 0.50)\%$  and  $(3.13 \pm 0.61)\%$  in the control group ( $t = -6.272, -15.556, -11.910, -9.753, -6.154, -5.491$ , all at  $P < 0.01$ ). The change trend of Foxp3 mRNA expression was consistent to the dynamic change of the proportion of Foxp3-labelled cells. **Conclusions** The pathogenesis and development is closely associated with the dynamic changes of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg cells in EAU rats.

[**Key words**] Uveitis, autoimmune, experimental/immunology; T-lymphocytes, regulatory/immunology; Lymphocyte activation; Rats, inbred Lew; Disease models, animal; Forkhead transcription factors/immunology; Spleen/immunology

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81373826, 81403438); Health & Medicine Research and Development Program of Shandong Province (2013WS0251)

自身免疫性葡萄膜炎是临床上常见的致盲眼病,常反复发作,迁延不愈。对自身免疫性葡萄膜炎的研究受到病源和伦理等因素的限制,因此体外建立内源性致病动物模型——实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveitis, EAU)成为相关研究的主要工具。EAU 是一种器官特异性疾病,是通过视网膜抗原进行免疫诱导,通过 CD4<sup>+</sup> T 细胞介导的自身免疫性疾病<sup>[1]</sup>。EAU 与人类葡萄膜炎自然病程的主要区别在于发病后存在明显的自发缓解现象,这是眼组织限制过强免疫应答的一种自我保护过程,是机体的一种负向免疫调控,但其机制尚未阐明。研究表明,机体的免疫调节主要与调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)的作用密切相关<sup>[2-3]</sup>。Treg 细胞是一类负向调控免疫应答的 T 细胞亚群,在维持免疫稳态和免疫耐受方面发挥重要作用<sup>[4-5]</sup>。Foxp3 是 Treg 细胞的特异标志物,对 Treg 细胞的发生和发育发挥控制作用,剔除 Foxp3 基因的小鼠可因产生大量慢性炎症因子而导致致死性炎症疾病的发生<sup>[6]</sup>。研究表明, Treg 细胞功能和数量的改变是诱发自身免疫性葡萄膜炎发生的重要机制之一<sup>[7]</sup>。为了进一步明确 EAU 大鼠模

型中 Treg 细胞的动态表达变化对疾病发生、发展及转归的影响,本研究中拟观察 EAU 大鼠模型的眼部炎症、Treg 细胞及其特异性转录因子 Foxp3 的动态变化,为葡萄膜炎的临床治疗提供分子生物学基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物及分组** 6~8 周龄雌性 SPF 级 Lewis 大鼠(常州卡文斯实验动物有限公司),按随机数字表法将 88 只 Lewis 大鼠分为模型组和对照组,每组各 42 只。实验动物的饲养和使用遵循 ARVO 关于眼科研究动物实验的要求。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 感光细胞间维生素 A 类结合蛋白(interphotoreceptor retinoid binding protein, IRBP)<sub>1177-1191</sub>(上海生工生物工程股份有限公司);结核杆菌(tubercle bacillus, TB)(美国 Difco 公司);完全弗氏佐剂(complete freund adjuvant, CFA)(美国 Sigma 公司);FITC-CD4、APC-CD25、PE-Foxp3 抗人荧光标记抗体(美国 eBioscience 公司);固定破膜试剂盒(美国 BD 公司);逆转录试剂盒(美国罗氏公司)。Genesis-D 动物

眼部照相机(日本 Kowa 公司);K5600 超微量分光光度计(北京凯奥科技发展有限公司);石蜡切片机(德国 SLEE 公司);FACSverse 流式细胞仪(美国 BD 公司);LightCycler480II 型实时荧光定量 PCR 仪(美国罗氏公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 EAU 大鼠模型的制备及分组处理** 参照文献[8]的方法建立 EAU 大鼠模型,造模前大鼠腹腔内注射体积分数 10% 水合氯醛溶液(0.5 ml/100 g)进行麻醉,将 200  $\mu$ g IRBP<sub>1177-1191</sub>、200  $\mu$ g TB、300  $\mu$ l CFA、300  $\mu$ l PBS 充分混合的乳化剂行大鼠双后足垫、腹部双侧及背部皮下注射,每只 300  $\mu$ l。对照组大鼠于上述部位注射不含 IRBP 充分混合的乳化剂。

**1.2.2 大鼠眼部炎症反应评分** 免疫后每日用 Genesis-D 照相机观察 EAU 发病情况,参照文献[9]的标准对炎症反应进行评分:0 分为无炎症;1 分为虹膜血管扩张充血,瞳孔缩小;2 分为前房轻度混浊;3 分为前房中度混浊,但仍可见瞳孔;4 分为前房重度混浊或积脓,瞳孔膜闭,眼球前突。

**1.2.3 眼球组织的常规组织病理学检查** 分别于免疫后第 9、13、18、23、28、35、48 天于大鼠腹腔内注射过量 10% 水合氯醛麻醉处死大鼠,每个时间点处死 6 只,用弯镊、剪刀摘取眼球,立即放在质量分数 4% 多聚甲醛溶液中固定 48 h,常规石蜡包埋,将包埋好的眼球固定在切片机上,调整角度使平行于视神经矢状轴的平面与刀刃尽量在同一平面上,进行 5  $\mu$ m 厚连续切片,行苏木精-伊红染色。光学显微镜下观察大鼠虹膜、睫状体、视网膜的组织形态。

**1.2.4 流式细胞术检测各组大鼠脾脏中 Treg 细胞** 无菌条件下摘取大鼠脾脏,置于含有 1640 培养液的培养皿中备用。将分离的大鼠脾脏置于有 200 目滤网的培养皿中,加入 3 ml 1640 细胞培养液,研磨,收集细胞悬液并依次通过棉花毛柱和尼龙毛柱,将过滤后的液体收集到 50 ml 离心管中,离心半径 8.2 cm,2 000 r/min 离心 5 min,得到抗原特异性 T 细胞,用 PBS 清洗后再用 3 ml 1640 细胞培养液重悬细胞,轻轻注入含有 3 ml 大鼠淋巴细胞分离液的 Ficoll 管,1 700 r/min 离心 30 min,离心后吸取中间细胞层,即为分离纯化的单细胞悬液。取约含  $1 \times 10^6$  个细胞的悬液,CD4 单染组和 CD4 CD25 双染组各加入 FITC 标记的 CD4 抗体 1  $\mu$ l,CD25 单染组和 CD4 CD25 双染组各加入 APC 标记的 CD25 抗体 1  $\mu$ l,4  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,加入 2 ml PBS,500  $\times$ g 离心 6 min 洗涤细胞,加入 1 ml 固定破膜剂,4  $^{\circ}$ C 避光 40 ~ 50 min,用 Perm/Wash 缓冲液洗涤细胞 2 次,加入特异性胞内因子抗体(PE-Foxp3)或同型对照抗体,4  $^{\circ}$ C 避

光孵育 40 ~ 50 min,用 Perm/Wash 缓冲液洗涤细胞 2 次,重悬上机检测。实验均重复 3 次。

**1.2.5 实时荧光定量 PCR 法检测大鼠脾脏中 Foxp3 mRNA 的表达** 取上述部分单细胞悬液,离心去上清,加入 1 ml Tripure,反复吹打裂解后提取总 RNA。按照说明书中的步骤用逆转录试剂盒逆转录成 cDNA。引物的设计使用 Premier 5.0 软件,引物序列见表 1。应用 LightCycler480 II PCR 仪以  $\beta$ -actin 为内参进行扩增,反应条件:95  $^{\circ}$ C 预变性 10 min;95  $^{\circ}$ C 变性 10 s,60  $^{\circ}$ C 退火 10 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 20 s,循环 45 次;熔解曲线:95  $^{\circ}$ C 5 s,65  $^{\circ}$ C 1 min,95  $^{\circ}$ C 持续至结束;45  $^{\circ}$ C 10 s,冷却机器。实验均重复 3 次,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 Foxp3 mRNA 的相对表达量。

表 1 目的基因的引物序列

目的基因	引物序列	退火温度( $^{\circ}$ C)
Foxp3	F:5'-GGGGCCACACCTCCTCTTCTTC-3'	67
	R:5'-GGGGCCACACCTCCTCTTCTTC-3'	
$\beta$ -actin	F:5'-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3'	62
	R:5'-CCCATACCCACCATCACACC-3'	

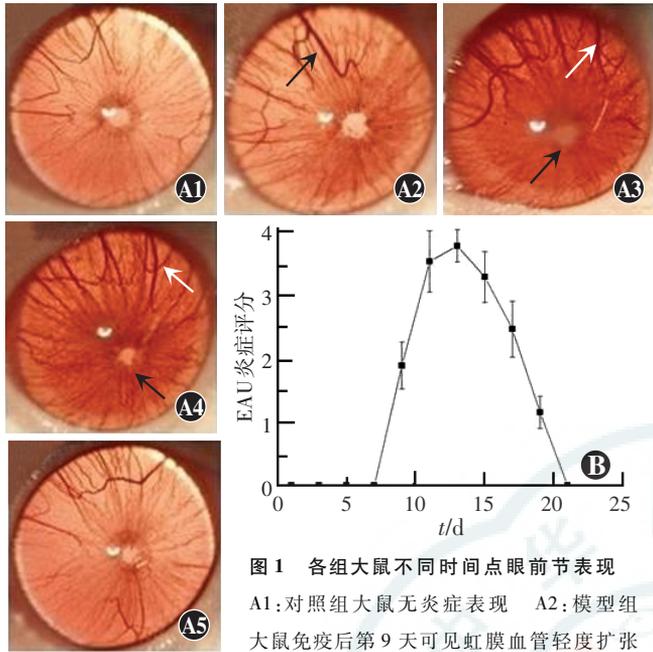
## 1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析。本研究中测试指标的数据资料经 W 检验呈正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间均数经 Levene 检验方差齐。模型组大鼠免疫后不同时间点炎症评分比较采用单因素方差分析,对照组与模型组大鼠脾脏中 Foxp3 细胞比例和脾脏 Foxp3 mRNA 相对表达量的差异比较均采用两因素方差分析,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 两组大鼠眼部炎症表现

模型组大鼠免疫后第 8 天,大鼠眼部出现虹膜血管轻度扩张充血。免疫后第 11 ~ 13 天大鼠虹膜充血逐渐加重,房水混浊,可见积脓,瞳孔区有膜状渗出,其后眼部炎症反应逐渐缓解,至免疫后第 23 天眼部炎症完全消退(图 1)。免疫后第 13 天模型鼠眼部炎症反应最重,炎症评分最高,其后炎症反应逐渐减轻,至免疫后第 21 天炎症反应消失,免疫后第 7、11、13、15、17、19、21 天模型鼠眼炎症反应评分总体比较差异有统计学意义( $F = 81.709, P < 0.001$ )(表 2)。对照组大鼠眼部检查均正常。依据上述模型组大鼠的眼部炎症变化可将 EAU 大鼠的病程分为初发期(8 ~ 10 d)、高峰期(11 ~ 13 d)、缓解期(14 ~ 19 d)和恢复期(20 d 后)。



**图 1** 各组大鼠不同时间点眼前节表现 A1: 对照组大鼠无炎症表现 A2: 模型组大鼠免疫后第 9 天可见虹膜血管轻度扩张充血(箭头) A3: 模型组大鼠免疫后第 13 天可见虹膜血管重度扩张充血(白箭头), 前房积脓, 瞳孔膜闭(黑箭头) A4: 模型组大鼠免疫后第 18 天可见虹膜血管中度扩张充血(白箭头), 前房中度混浊, 瞳孔缩小(黑箭头) A5: 模型组大鼠免疫后第 23 天炎症反应消失 B: 模型组大鼠免疫后不同时间点眼部炎症反应评分的动态变化 EAU: 实验性自身免疫性葡萄膜炎

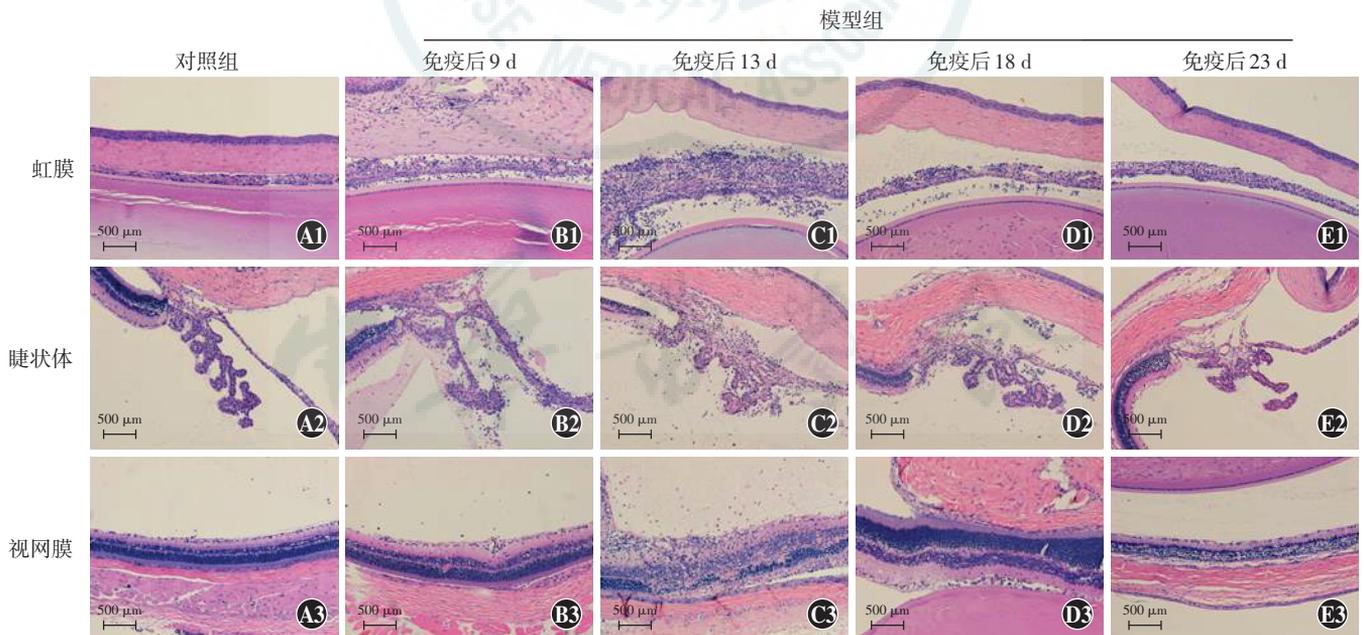
**表 2** 免疫后不同时间点模型组大鼠眼部炎症评分的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

时间	样本量	炎症评分
免疫后第 7 天	6	0
免疫后第 9 天	6	1.92 ± 0.38
免疫后第 11 天	6	3.58 ± 0.49 <sup>a</sup>
免疫后第 13 天	6	3.75 ± 0.42 <sup>ab</sup>
免疫后第 15 天	6	3.33 ± 0.41 <sup>abc</sup>
免疫后第 17 天	6	2.50 ± 0.45 <sup>abcd</sup>
免疫后第 19 天	6	1.17 ± 0.26 <sup>abcde</sup>
免疫后第 21 天	6	0
F		81.709
P		<0.001

注: 与免疫后第 9 天比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与免疫后第 11 天比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与免疫后第 13 天比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与免疫后第 15 天比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$ ; 与免疫后第 17 天比较, <sup>e</sup> $P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验)

**2.2 各组大鼠球壁组织病理学表现**

光学显微镜下可见, 模型组大鼠免疫后第 9 天, 虹膜、睫状体、视网膜等部位可见少量炎性细胞浸润, 免疫后第 13 天, 模型组大鼠虹膜、睫状体和视网膜组织内均可见大量淋巴细胞、中性粒细胞及单核细胞浸润, 虹膜和视网膜结构疏松; 免疫后第 18 天, 模型组大鼠虹膜、睫状体和视网膜内炎性细胞浸润减少, 虹膜和视网膜结构接近正常; 免疫后第 23 天, 模型组大鼠虹膜和视网膜组织中炎性细胞浸润消失, 虹膜、视网膜结构正常; 对照组大鼠的虹膜、睫状体、视网膜等组织中未见炎性细胞浸润, 虹膜及视网膜组织结构排列整齐(图 2)。



**图 2** 对照组大鼠和模型组大鼠免疫后不同时间点组织病理学观察(HE ×200, 标尺=500 μm) A1: 对照组大鼠虹膜组织结构正常, 无炎性细胞浸润 A2: 对照组大鼠睫状体组织结构正常 A3: 对照组大鼠视网膜结构排列整齐, 无炎性细胞浸润 B1: 模型组大鼠免疫后第 9 天虹膜组织中可见少量炎性细胞浸润 B2: 模型组大鼠免疫后第 9 天睫状体组织中可见少量炎性细胞浸润 B3: 模型组大鼠视网膜组织中可见少量炎性细胞浸润 C1: 模型组大鼠免疫后第 13 天虹膜组织结构紊乱, 可见大量炎性细胞浸润 C2: 模型组大鼠免疫后第 13 天睫状体组织结构排列疏松, 结构紊乱, 可见淋巴细胞、中性粒细胞和单核细胞浸润 C3: 模型组大鼠免疫后第 13 天视网膜结构排列异常, 大量炎性细胞浸润 D1: 模型组大鼠免疫后第 18 天虹膜组织中炎性细胞减少 D2: 模型组大鼠免疫后第 18 天睫状体组织中炎性细胞浸润减少, 组织结构接近正常 D3: 模型组大鼠免疫后第 18 天视网膜中炎性细胞减少 E1: 模型组大鼠免疫后第 23 天虹膜组织形态接近正常, 未见炎性细胞浸润 E2: 模型组大鼠免疫后第 23 天睫状体组织排列接近正常 E3: 模型组大鼠免疫后第 23 天视网膜结构接近正常, 无炎性细胞浸润

### 2.3 两组大鼠脾脏 Treg 细胞比例比较

流式细胞计数检测显示,对照组大鼠脾脏组织中 Foxp3 标记细胞占 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞比例为 11.76%,模型组大鼠脾脏悬液中 Foxp3 标记细胞比例增加,模型组大鼠免疫后第 18 天 Foxp3 标记细胞比例达高峰,此后随着造模时间的延长, Foxp3 标记细胞比例逐渐下降(图 3)。

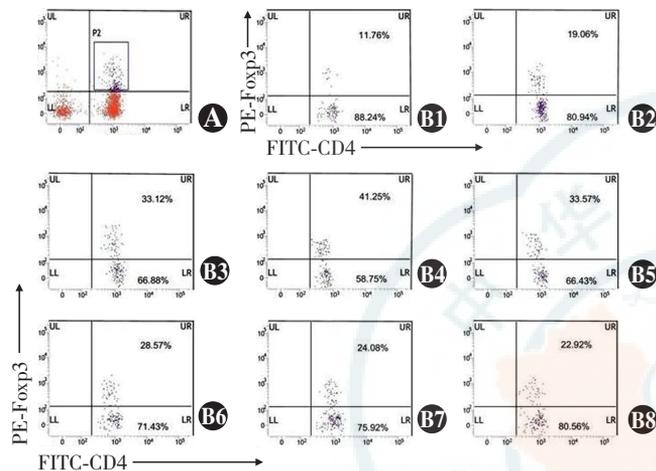


图 3 对照组大鼠和模型组大鼠免疫后不同时间点脾脏组织中 Foxp3 标记细胞(Treg 细胞)比例的流式细胞检测 A: CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞流式检测设门图片 B1: 对照组大鼠脾脏组织中 Foxp3 标记细胞比例为 11.76% B2: 模型组大鼠免疫后第 9 天 Foxp3 标记细胞比例为 19.06% B3: 模型组大鼠免疫后第 13 天 Foxp3 标记细胞比例为 33.12% B4: 模型组大鼠免疫后第 18 天 Foxp3 标记细胞比例为 41.25% B5: 模型组大鼠免疫后第 23 天 Foxp3 标记细胞比例为 33.57% B6: 模型组大鼠免疫后第 28 天 Foxp3 标记细胞比例为 28.57% B7: 模型组大鼠免疫后第 35 天 Foxp3 标记细胞比例为 24.08% B8: 模型组大鼠免疫后第 48 天 Foxp3 标记细胞比例为 22.92%

对照组大鼠与模型组大鼠造模后不同时间点脾脏中 Foxp3 标记细胞占 CD4<sup>+</sup> T 细胞比例的总体比较,差异有统计学意义 ( $F_{\text{分组}} = 310.408, P = 0.002; F_{\text{时间}} = 51.849, P = 0.000$ ),其中模型组大鼠在免疫后第 13、18、23、28、35、48 天脾脏中 Foxp3 标记细胞比例均明显高于对照组,差异均有统计学意义 ( $t = -6.272, -15.556, -11.910, -9.753, -6.154, -5.491$ , 均  $P < 0.01$ );模型组大鼠于造模后第 13 天脾脏中 Foxp3 标记细胞比例开始增加,造模后第 18 天数值达高峰,与造模后第 9 天值比较差异有统计学意义(均  $P < 0.05$ ),此后逐渐下降,造模后第 48 天大鼠脾脏中 Foxp3 标记细胞比例仍稍高于造模后第 9 天,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )(表 3)。

### 2.4 两组大鼠脾脏中 Foxp3 mRNA 相对表达量的比较

各组大鼠脾脏中 Foxp3 mRNA 相对表达量总体比较差异有统计学意义 ( $F_{\text{分组}} = 945.755, P = 0.000$ ),模型组大鼠在免疫后不同时间点脾脏中 Foxp3 mRNA 的相对表达水平随免疫后时间发生动态变化,总体比较差异有统计学意义 ( $F_{\text{时间}} = 67.869, P = 0.000$ )。模型组大鼠在免疫后第 18、23、28、35、48 天脾脏中 Foxp3 mRNA 相对表达量明显高于对照组,差异均有统计学意义 ( $t = -17.486, -19.431, -15.824, -8.184, -6.434$ , 均  $P < 0.01$ )。模型组大鼠于造模后第 18 天脾脏中 Foxp3 mRNA 相对表达量开始增加,造模后第 23 天达高峰,与造模后第 9 天值比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),此后逐渐下降,造模后第 48 天大鼠脾脏中 Foxp3 mRNA 相对表达量仍稍高于造模后第 9 天,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )(表 4)。

表 3 对照组和模型组大鼠脾脏 Foxp3 标记细胞占 CD4<sup>+</sup> T 细胞比例的比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	样本量	免疫后不同时间点脾脏 Treg 细胞比例						
		9 d	13 d	18 d	23 d	28 d	35 d	48 d
对照组	42	2.96±0.21	2.80±0.38	3.36±0.53	3.65±0.57	3.37±0.43	3.33±0.50	3.13±0.61
模型组	42	3.20±0.80	5.50±0.64 <sup>ab</sup>	13.36±0.98 <sup>ac</sup>	10.34±0.79 <sup>ac</sup>	9.58±1.02 <sup>ac</sup>	6.73±0.81 <sup>ab</sup>	5.58±0.47 <sup>ab</sup>

注:  $F_{\text{分组}} = 310.408, P = 0.002; F_{\text{时间}} = 51.849, P = 0.000$ 。与各自的对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组内 9 d 值比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ , <sup>c</sup> $P < 0.01$ (两因素方差分析, LSD-t 检验)

表 4 对照组和模型组大鼠脾脏中 Foxp3 mRNA 相对表达水平的比较

组别	样本量	免疫后不同时间点脾脏中 Foxp3 mRNA 表达水平 ( $\bar{x} \pm s$ )						
		9 d	13 d	18 d	23 d	28 d	35 d	48 d
对照组	42	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	42	0.89±0.05	1.55±0.22	4.0±0.30 <sup>ab</sup>	4.29±0.29 <sup>ab</sup>	3.49±0.28 <sup>ab</sup>	2.49±0.32 <sup>ac</sup>	2.06±0.31 <sup>ac</sup>

注:  $F_{\text{分组}} = 945.755, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 67.869, P = 0.000$ 。与各自对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组内 9 d 值比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$ , <sup>c</sup> $P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD-t 检验)

### 3 讨论

本研究中通过 IRBP<sub>1177-1191</sub> 乳糜液免疫 Lewis 大鼠,成功诱导大鼠 EAU 动物模型,发现大鼠于免疫后第 8 天开始出现眼部炎症表现,第 13 天眼部炎症反应最重,然后逐步缓解,至第 23 天炎症反应基本消退,故 IRBP<sub>1177-1191</sub> 诱导出的 EAU 大鼠呈现急性、单相葡萄膜炎的病理过程。

Treg 细胞是主要的负向调控免疫 T 淋巴细胞<sup>[10]</sup>,由日本学者 Sakaguchi 在 1995 年首次报道,是部分高表达 IL-2 受体  $\alpha$  链

(CD25)分子的 CD4<sup>+</sup> T 细胞<sup>[11]</sup>,在维持自身免疫耐受中有着不可替代的作用,其细胞表面标志物是 Foxp3<sup>[12]</sup>。研究表明,多种疾病的进展过程中均伴有 Treg 细胞数量和功能的改变<sup>[13-17]</sup>。Chen 等<sup>[18]</sup>研究表明,Vogt-小柳原田综合征患者存在 Treg 细胞数量的减少或其功能损害,表明人类葡萄膜炎易反复发作及迁延不愈与 Treg 细胞数量的减少或免疫负向调控作用的减弱有密切关系。本研究中通过流式细胞技术检测发现,EAU 大鼠脾脏 Treg 细胞比例高于对照组,且在免疫后第 18 天(缓解期)达到高峰,至免疫后第 48 天(恢复期)仍维持在较高水平,且 Treg 细胞特异性转录因子 Foxp3 mRNA 的相对表达量动态变化趋势与流式细胞术检测结果一致,验证了 EAU 大鼠病程变化过程中 Treg 细胞的变化规律。本研究结果与 Sun 等<sup>[19]</sup>报道的 IRBP<sub>161-180</sub> 诱导的 B10R III 小鼠 Treg 细胞比例达到峰值的时间不同,且本研究中发现造模后第 48 天 EAU 大鼠脾脏中 Treg 细胞比例虽有明显的下降趋势,但仍高于对照组,造成这些研究结果差异的原因可能与 2 个研究中所采用的鼠类品种、免疫所用的抗原肽段或免疫后所选的检测时间点等不同有关。Ke 等<sup>[20]</sup>研究发现,Lewis 大鼠复发性 EAU 模型中 Treg 细胞的抑制功能弱于单相 EAU 模型,且将单相 EAU 模型鼠 Treg 细胞过继转移给复发性 EAU 模型可使其转化为单相 EAU,说明 Treg 细胞在葡萄膜炎发生和发展中的作用可能是相关领域进一步研究的热点,Treg 细胞检测可作为葡萄膜炎病情监测的重要指标。

综上所述,本研究成功诱导出单相 EAU 大鼠模型,结合模型鼠眼部炎症表现和组织病理学结果证实了 EAU 大鼠的病理变化过程。本研究中发现,EAU 模型鼠脾脏中 Treg 细胞比例在眼部炎症的高峰期明显升高,并在炎症缓解期达到高峰,至炎症恢复期依然保持在较高水平,证实 Treg 细胞在 EAU 模型中可发挥免疫调节作用,使 EAU 呈现出自愈倾向,EAU 模型鼠脾脏中 Treg 细胞比例的变化规律可为临床上葡萄膜炎的个体化治疗及疗效评价提供依据。但葡萄膜炎中 Treg 细胞负向调控免疫反应的确切分子机制及如何调控 Treg 细胞靶点以提高 Treg 水平,从而更好地发挥其抑制炎症、维持免疫耐受作用等,仍需进一步研究加以证实。

## 参考文献

[1] Wacker WB, Lipton MM. Experimental allergic uveitis; homologous retina as uveitogenic antigen[J]. *Nature*, 1965, 206(981): 253-254.  
[2] Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(1): 7-13.

DOI:10.1038/ni.1818.  
[3] Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, et al. Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease[J]. *Immunol Rev*, 2006, 212: 8-27. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2006.00427.x.  
[4] Miyara M, Gorochoff G, Ehrenstein M, et al. Human FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in systemic autoimmune diseases [J]. *Autoimmun Rev*, 2011, 10(12): 744-755. DOI: 10.1016/j.autrev.2011.05.004.  
[5] Alunno A, Carubbi F, Bistoni O, et al. T regulatory and T helper 17 cells in primary Sjögren's syndrome: facts and perspectives [J/OL]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015: 243723 [2015-12-11]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4427804/>. DOI: 10.1155/2015/243723.  
[6] Muranski P, Boni A, Antony PA, et al. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma [J]. *Blood*, 2008, 112(2): 362-373. DOI: 10.1182/blood-2007-11-120998.  
[7] Ruggieri S, Frassanito MA, Dammacco R, et al. Treg lymphocytes in autoimmune uveitis [J]. *Ocul Immunol Inflamm*, 2012, 20(4): 255-261. DOI: 10.3109/09273948.2012.681830.  
[8] Cui Y, Shao H, Sun D, et al. Regulation of interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP)-specific Th1 and Th17 cells in anterior chamber-associated immune deviation (ACAID) [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(12): 5811-5817. DOI: 10.1167/iovs.09-3389.  
[9] Shao H, Shi H, Kaplan HJ, et al. Chronic recurrent autoimmune uveitis with progressive photoreceptor damage induced in rats by transfer of IRBP-specific T cells [J]. *J Neuroimmunol*, 2005, 163(1-2): 102-109. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2005.03.004.  
[10] Osmola-Mańkowska, Teresiak-Mikołajczak, Dańczak-Pazdrowska, et al. The role of dendritic cells and regulatory T cells in the pathogenesis of morphea [J]. *Cent Eur J Immunol*, 2015, 40(1): 103-108. DOI: 10.5114/ceji.2015.50841.  
[11] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases [J]. *J Immunol*, 1995, 155(3): 1151-1164.  
[12] 唐凯. T 细胞对自身免疫性葡萄膜炎调节作用的研究进展 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2014, 32(7): 664-668. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.07.020.  
Tang K. Regulatory effect of T cells on the development of autoimmune uveitis [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2014, 32(7): 664-668. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.07.020.  
[13] Vigiuetta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, et al. Loss of functional suppression by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in patients with multiple sclerosis [J]. *J Exp Med*, 2004, 199(7): 971-979. DOI: 10.1084/jem.20031579.  
[14] Lawson CA, Brown AK, Bejarano V, et al. Early rheumatoid arthritis is associated with a deficit in the CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> high regulatory T cell population in peripheral blood [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2006, 45(10): 1210-1217. DOI: 10.1093/rheumatology/kei089.  
[15] Wang X, Wang L, Mo Q, et al. Changes of Th17/Treg cell and related cytokines in pancreatic cancer patients [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(5): 5702-5708.  
[16] Han YM, Sheng YY, Xu F, et al. Imbalance of T-helper 17 and regulatory T cells in patients with alopecia areata [J]. *J Dermatol*, 2015, 42(10): 981-988. DOI: 10.1111/1346-8138.12978.  
[17] Gao Y, Tang J, Chen W, et al. Inflammation negatively regulates Foxp3 and regulatory T-cell function via DBC1 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(25): E3246-3254. DOI: 10.1073/pnas.1421463112.  
[18] Chen L, Yang P, Zhou H, et al. Diminished frequency and function of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> regulatory T cells associated with active uveitis in Vogt-

Koyanagi-Harada syndrome [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(8): 3475-3482. DOI:10.1167/iovs.08-1793.

[19] Sun M, Yang P, Du L, et al. Increased regulatory T cells in spleen during experimental autoimmune uveoretinitis [J]. Ocul Immunol Inflamm, 2010, 18(1): 38-43. DOI:10.3109/09273940903414525.

[20] Ke Y, Jiang G, Sun D, et al. Ocular regulatory T cells distinguish

monophasic from recurrent autoimmune uveitis [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(9): 3999-4007. DOI:10.1167/iovs.07-1468.

(收稿日期:2016-03-11)

(本文编辑:尹卫靖 张宇)

· 临床经验 ·

# 微创玻璃体手术联合雷珠单抗治疗息肉样脉络膜血管病变合并玻璃体出血和出血性视网膜脱离

于滨 冉莉莉 张晶 李君

266071 青岛,山东省眼科研究所 青岛眼科医院

通信作者:于滨, Email: maryyu721@sina.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.08.004

息肉样脉络膜血管病变 (polypoidal choroidal vasculopathy, PCV) 是一组以视网膜下橘红色结节样病灶和/或呈异常分支的脉络膜血管网及其末梢息肉状扩张为特征的疾病<sup>[1]</sup>, 严重者可伴有玻璃体积血和出血性视网膜脱离, 导致视力丧失。目前常用的治疗 PCV 的方法有抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 药物的玻璃体腔注射和光动力疗法 (photodynamic therapy, PDT), 但伴有玻璃体积血和出血性视网膜脱离的 PCV 病变单纯应用抗 VEGF 药物玻璃体腔注射效果不佳, 且因眼底无法窥见而不能实施 PDT 治疗。采用玻璃体切割联合视网膜下积血清除术可有效清除玻璃体腔和视网膜下的积血, 但术后并发症多, 视力恢复不理想, 且常需行硅油填充术, 而抗 VEGF 药物玻璃体腔注射可抑制眼内新生血管的生长, 减轻病灶区的渗出和水肿。故本研究中应用玻璃体切割术联合雷珠单抗玻璃体腔注射法对伴有玻璃体积血和出血性视网膜脱离的 PCV 患者进行治疗, 并评价其疗效。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 本研究为干预性试验研究。纳入 2012 年 12 月至 2015 年 11 月在青岛眼科医院诊治的 PCV 合并玻璃体出血和出血性视网膜脱离患者 12 例 12 眼。患者的诊断标准为行吲哚青绿血管造影 (indocyanine green angiography, ICGA) 发现息肉样血管瘤样扩张和/或异常分支血管网, 直接或间接检眼镜行眼底检查发现眼底有橘红色结节样病灶及 OCT 显示视网膜色素上皮层出现高而窄的“手指样”突起和双层征者。12 例患者中男 8 例, 女 4 例; 年龄 51~82 岁, 平均 (69.25±8.72) 岁; 初诊时病程为 0.5~2.5 个月, 平均 (1.30±0.55) 个月。

**1.2 方法** 术眼前行常规 B 型超声检查。12 例患者因玻璃体出血无法窥见眼底, 除 1 例患者对侧眼已发生萎缩外, 同时对其他 11 例患者的对侧眼行常规眼底照相、荧光素眼底血管造影 (fluorescein fundus angiography, FFA)、ICGA 和 OCT 检

查, 以协助患眼的病因诊断。患者术前 1 周停用抗凝血药物。患者治疗前均签署手术知情同意书, 患眼的治疗均由同一位具有丰富玻璃体视网膜手术经验的医师完成。

所有患眼均行 25G 标准玻璃体切割术, 术中尽可能清除玻璃体积血, 经睫状体扁平部注入雷珠单抗注射液 (瑞士诺华制药有限公司) 0.5 mg/0.05 ml, 术毕巩膜切口不予缝合。术眼中均未探查视网膜裂孔, 未行视网膜切开术及玻璃体腔内惰性气体或硅油填充。患者术后无体位限制, 静脉滴注氨甲环酸 3 d, 应用抗生素及糖皮质激素滴眼液点眼, 口服活血化瘀药物促进视网膜下积血吸收; 术眼玻璃体腔注射雷珠单抗每月 1 次, 共注射 3 次。分别于术后 1 周、2 周和 1 个月进行随访, 之后每月随访 1 次。患者共随访 6~18 个月, 平均 (13.2±2.8) 个月, 定期行眼底照相、OCT、FFA 以及 ICGA 检查。

## 2 结果

12 眼中术后均未发生前房及玻璃体出血, 视网膜脱离无复发。玻璃体腔注射雷珠单抗每月 1 次, 共 3 次, 视网膜下出血逐渐吸收, 视网膜脱离复位, 所有患者均未再次行玻璃体切割术。末次随访时, 12 眼中最佳矫正视力 (best corrected visual acuity, BCVA) 0.01~0.10 者 6 眼, 0.12~0.20 者 4 眼, 0.25~0.30 者 2 眼, 视力均较术前提高。其中 1 例患者术前视力为光感, 于发病后 24 d 行 0.5 mg 雷珠单抗玻璃体腔注射联合玻璃体切割术, 术中可见 3/4 象限视网膜高度隆起, 视网膜下暗红色出血, 黄斑区受累 (图 1A), 术后第 1 天 BCVA 为 0.02。术后行 0.5 mg 雷珠单抗玻璃体腔注射每月 1 次, 视网膜下出血逐渐吸收, 视网膜平复。术后 2 个月, 视网膜下出血逐渐吸收, 视网膜仍未解剖学复位 (图 1B), 视力恢复至 0.12, 术后 6 个月视网膜完全平复, 呈斑驳外观, 黄斑中心凹颞侧见盘状黄白色瘢痕 (图 1C), 视力为 0.3。术后随访期间 OCT 检查显示, 随着时间的推移, 黄斑区视网膜下低反射暗区面积逐渐缩小, 至术后 6 个月时, 黄斑中心凹显现 (图 2)。