

· 实验研究 ·

昼夜节律颠倒对小鼠角膜上皮创伤修复的影响

何靖新¹ 林妍² 徐鹏洋³ 薛芸霞⁴ 李志杰⁴¹暨南大学第一临床医学院眼科, 广州 510632; ²暨南大学再生医学重点实验室, 广州 510632; ³暨南大学基础医学院病理生理学系, 广州 510632; ⁴暨南大学基础医学院眼科研究所, 广州 510632

通信作者: 薛芸霞, Email: xueyx@jnu.edu.cn

【摘要】 **目的** 探究昼夜节律颠倒对角膜上皮创伤修复的影响。 **方法** 选取 6~8 周龄 C57BL/6 雄性小鼠 90 只, 按照随机数字表法分为昼夜节律正常(LD)组和昼夜节律颠倒(DL)组。置于昼夜节律箱中饲养 12 d, 在小鼠角膜中央标记直径为 2 mm 的圆形区域, 用高尔夫样刀刮除标记区域上皮层, 分别使用荧光素钠、苏木精-伊红染色观察并记录角膜再上皮化过程。使用 DAPI、FITC 标记抗鼠 Ly6G 抗体和 PE 标记抗鼠 $\gamma\delta$ TCR 抗体进行免疫荧光染色, 每隔 6 h 观察角膜创伤后细胞分裂、中性粒细胞和 $\gamma\delta$ T 细胞数量的动态变化, 直至 42 h。 **结果** 角膜上皮创伤后 0、6、12、18 和 24 h LD 组角膜上皮缺损面积百分比分别为 (100.000±0.000)%、(37.677±5.243)%、(14.959±1.739)% 和 (0.000±0.000)% , DL 组角膜上皮缺损面积百分比分别为 (100.000±0.000)%、(10.967±1.065)%、(1.985±0.106)% 和 (0.000±0.000)% , 总体比较差异有统计学意义 ($F=213.718, P=0.000$)。角膜上皮创伤前, DL 组和 LD 组角膜上皮层厚度分别为 (33.983±1.074) μ m 和 (33.993±0.904) μ m, 差异无统计学意义 ($P>0.05$) ; 角膜上皮损伤后 24 h, DL 组角膜上皮厚度为 (19.473±0.856) μ m, 明显大于 LD 组 (17.485±0.718) μ m, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。苏木精-伊红染色显示, 创伤 24 h 后 2 个组小鼠角膜上皮细胞皆排列疏松、紊乱、形态不规则。LD 组角膜上皮主要为基底细胞, DL 组除了基底细胞外, 还有少量扁平细胞。角膜上皮创伤后 LD 组和 DL 组上皮分裂细胞数量、中性粒细胞数量和 $\gamma\delta$ T 细胞数量总体比较, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。 **结论** 昼夜节律颠倒可通过促进角膜上皮分裂细胞、中性粒细胞和 $\gamma\delta$ T 细胞募集高峰期提前, 进而调节角膜上皮创伤修复过程。

【关键词】 角膜; 昼夜节律颠倒; 创伤修复; 炎症反应**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (81770962、81700808)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.07.004

Wound healing of corneal epithelium in mice affected by reversed circadian rhythmsHe Jingxin¹, Lin Yan², Xu Pengyang³, Xue Yunxia⁴, Li Zhijie⁴¹Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510632, China; ²Key Laboratory for Regenerative Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, China; ³Department of Pathophysiology, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China; ⁴Institute of Ophthalmology, Medical College of Jinan University, Guangzhou 510632, China

Corresponding author: Xue Yunxia, Email: xueyx@jnu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To observe the effect of reversed circadian rhythms on wound healing of mouse corneal epithelium. **Methods** Ninety male C57BL/6 mice were divided into LD group (12 hours light/12 hours dark) and DL group (12 hours dark/12 hours light) by random number table, and then were placed in circadian rhythm box for 12 days. The circular area was scaped and marked as 2 mm diameter area in the center of the mouse's cornea with a golf-like knife. The dynamics of epithelial healing in the wound area were observed under microscope by fluorescein staining and hematoxylin-eosin staining. Besides, being marked antibodies of anti-Ly6G-FITC, anti- $\gamma\delta$ T-PE and DAPI, dynamic changes of the dividing cells, neutrophils and $\gamma\delta$ T cells were also investigated for every 6 hours until 42 hours. All mice were treated in accordance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology's Statement for the Use of Animals in Ophthalmology and Vision Research and the guidelines of the Animal Experimental Committee at Jinan University (JN-A-2002-01). **Results** In LD group, percentage of corneal epithelial defective area were (100.000±0.000)%、(37.677±5.243)%、(14.959±1.739)% and (0.000±

0.000)% after wounding 0 hour, 6, 12, 18 and 24 hours. In DL group, percentage of the corneal epithelial defective area were (100.000±0.000)% , (10.967±1.065)% , (1.985±0.106)% and (0.000±0.000)% after wounding 0 hour, 6, 12, 18 and 24 hours. The healing rate in DL group was higher than that in LD group, with a significant difference between them ($P<0.05$). As with the uninjured corneal, thickness of corneal epithelium was (33.983±1.074) μm in DL group and (33.993±0.904) μm LD group, with no statistically significant difference between them ($P>0.05$). After 24 hours, thickness of corneal epithelium in DL group was (19.473±0.856) μm , and was more than that in LD group [(17.485±0.718) μm], with a significant difference between them ($P<0.05$). Paraffin section of wounded corneal epithelium after 24 hours by hematoxylin and eosin staining showed that corneal epithelium cells arranged loosely and disorderly and were in irregular shape in both groups. The epithelium were mainly basal cells in LD group, while epithelium included basal cell and a few pinacocytes in DL group. After corneal epithelium wounded, the number of cell division, neutrophils and corneal limbus $\gamma\delta\text{T}$ cells in two groups were statistically significant difference, respectively ($P<0.05$). **Conclusions** Reversed circadian rhythms can significantly regulate the wound healing of corneal epithelium.

[Key words] Cornea; Reversed circadian rhythms; Wound healing; Inflammation

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81770962, 81700808)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.07.004

角膜位于眼球前部,呈透明横椭圆形,提供大部分屈光力。角膜必须不断更新上皮细胞层,以此维持角膜上皮的稳态,保持光滑的光学表面。角膜上皮更新通过细胞增生、迁移、分化、分层和凋亡等来实现,这一过程损伤会打破角膜上皮的动态平衡,导致角膜上皮缺损^[1]。角膜损伤修复过程包括再上皮化、细胞增生、炎症反应和细胞外基质重塑 4 个阶段。角膜上皮损伤的修复是眼球功能正常的保证,因此探究角膜损伤修复的机制异常重要。昼夜节律存在于生物体中,也存在于器官,甚至细胞中。激素分泌、新陈代谢、细胞周期和睡眠/觉醒周期受昼夜节律调控^[2]。昼夜节律的维持受外部环境的影响,其中光照/黑暗循环影响最大^[3]。角膜是视觉系统感受外界光线刺激过程中重要的屈光装置之一。视网膜昼夜节律钟是哺乳动物中发现的首个超视交叉上核昼夜节律振荡器^[4]。眼轴长度、脉络膜厚度、眼压、视盘、角膜厚度及角膜上皮层厚度变化均存在昼夜节律^[5-7]。光照节律能改变大鼠视网膜中时钟基因的表达^[8]。角膜具有生物钟功能,昼夜节律能控制角膜厚度且对角膜的正常生长发育有重要作用^[9]。角膜上皮更新有日节律性^[10]。角膜上皮损伤后,角膜缘血管发生急性炎症反应,中性粒细胞通过细胞表面整合素被损伤部位的趋化因子吸引迅速向创伤区聚集以杀灭病原体和清除坏死组织^[11]。大多数免疫细胞表达昼夜节律时钟基因,时钟基因作用包括影响细胞因子、趋化因子和溶细胞因子的合成与释放和控制免疫细胞向炎症或感染组织中迁移的速度,影响损伤组织愈合^[12]。中性粒细胞的募集和存活受昼夜节律严格控制^[13]。在不同时间点给予小鼠内毒素(脂多糖)雾化吸入,肺脏中性粒细胞聚集数量及

高峰期不同^[14]。角膜 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞对角膜损伤后修复有调节作用。 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞在上皮层聚集有助于角膜创伤修复,而在 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞缺陷小鼠模型中角膜上皮的创伤修复显著延迟^[15]。猪血中 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞存在昼夜节律且黑暗时段数量最多^[16]。昼夜节律改变,会导致免疫紊乱^[12]。基因突变或环境因素导致的昼夜节律失调会导致多种疾病^[17]。持续光照或持续黑暗会延迟角膜再上皮化并加剧炎症反应,抑制角膜修复^[18]。目前,昼夜节律颠倒对角膜创伤修复的影响鲜有报道。本研究建立昼夜节律正常(12 h light/12 h dark, LD)/昼夜节律颠倒(12 h dark/12 h dark, DL)小鼠角膜创伤修复模型,研究昼夜节律颠倒对角膜修复的影响,为角膜损伤的临床实践提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 6~8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 90 只(广东省医学实验动物中心),均无眼病。小鼠饲养于(24±2)℃ 动物房中 12 d,自由饮水、进食。本研究中均严格遵循视觉眼科学研究学会声明和暨南大学实验动物伦理委员会的有关规定(JN-A-2002-01)。

1.1.2 主要试剂及仪器 苯巴比妥钠注射液(上海碧云天生物技术有限公司);体积分数 10% Triton-X100、PBS、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)(广州斯佳生物技术有限公司);FITC 标记抗鼠 Ly6G 抗体(11-9668-82,美国 eBioscience 公司);PE 标记抗鼠 $\gamma\delta$ TCR 抗体(553178,美国 BD bioscience 公司)。高尔夫样刀(美国 Accutome 公司);SZ61 显微镜(日本 Olympus 公司);正置荧光显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物处理 按照随机数字表法分为 LD 组和 DL 组,置于可控制光照(300 lx)及黑暗时间的节律箱中,其中 LD 组节律箱光照时间为 7:00~19:00,黑暗时间为 19:00~次日 7:00;DL 组节律箱黑暗时间为 7:00~19:00,光照时间为 19:00~次日 7:00。根据 Zeitgeber Time 计时法,以光照起始时间 7:00 记为 ZT0,黑暗起始时间 19:00 记为 ZT12; Circadian Time 计时法,7:00 记为 CT7,19:00 记为 CT19。

1.2.2 角膜创伤模型建立 参照文献[19]的方法,按照 25~50 mg/kg 的剂量,大鼠腹腔内注射苯巴比妥钠后,使用直径 2 mm 的环钻标记角膜中央区域,采用高尔夫样刀机械性刮除已标记的中央区角膜上皮细胞层,避免伤及角膜基质层。使用质量分数 2% 荧光素钠滴眼液点眼显示角膜上皮缺损区域。创伤后 0 h 开始,每隔 6 h 拍照并记录角膜上皮缺损面积,直至角膜再上皮化完成。采用 Adobe Photoshop CS5 软件统计角膜上皮缺损面积。创伤后 0 h 的创伤面积为 100%,后续各时间点上皮缺损面积与 0 h 创伤面积的比值(%)为角膜创伤修复率。所有小鼠角膜上皮创伤时间均为 CT20。

1.2.3 角膜整铺片及免疫荧光染色 参照文献[20]的方法。颈椎脱臼法处死小鼠后,摘除眼球,置于体积分数 2% 甲醛溶液中固定 40 min。PBS 浸泡,手术显微镜下修剪、去除多余组织,保留完整角膜和角巩膜缘。PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。将角膜置于 200 ml 质量分数 2% BSA 中 15 min 以封闭非特异性抗原,加入 2 μ l 质量分数 10% Triton-X100,得到终体积分数 0.1% 的 Triton-X100/BSA 混合液。透膜 15 min 后,加入 4 μ l 抗小鼠 FITC 标记的 Ly6G 抗体和 4 μ l PE 标记的抗小鼠 $\gamma\delta$ TCR 抗体,混匀后 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。角膜上皮朝上置于载玻片,用手术刀片将其切成放射状 4 瓣平铺,滴加含 DAPI 的封片剂,盖玻

片,4 $^{\circ}$ C 避光保存。

1.2.4 角膜上皮层厚度测量 参照文献[20-21]的方法,颈椎脱臼法处死小鼠后,摘取左侧眼球,置于固定液 48 h。梯度乙醇脱水后,石蜡包埋,沿视神经上下方,从角膜顶点至球壁后极,平行于视神经矢状轴连续厚 5 μ m 切片,行苏木精-伊红染色(图 1)。通过正置荧光显微镜观察视神经孔、瞳孔,判断切片是否经角膜损伤区中央,测量角膜中央上皮厚度。

1.2.5 小鼠角膜中性粒细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞和分裂细胞的计算 参照文献[22]的方法,从角膜缘到角膜中央分成 5 个区,角膜中央定义为 5 区,往外依次为 4 区、3 区、2 区和 1 区(图 2A)。每组选取 4~6 个角膜。在 5 个区角膜中选取经角膜中央纵向和横向 2 条相互垂直的径线,40 倍物镜下分别选取 9 个目标视野并拍照计数,将总数作为角膜分裂细胞数目;40 倍物镜下在角膜 4 区 4 个象限上任意选取 4 个目标视野(图 2B),对视野内中性粒细胞拍照并计数,取其平均值作为中性粒细胞募集数目;40 倍物镜下在四瓣角膜的角膜缘处(1 区)任意选取 8 个视野(图 2C)拍照并计数,取其平均值作为 $\gamma\delta$ T 细胞在角膜缘募集的最终数目。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计学软件(美国 IBM 公司)进行统计分析,采用 GraphPad Prism 6.0 软件(美国 Graph-Pad 公司)进行数据处理。本研究中计量资料的数据经 W 检验证实呈正态分布,以 mean \pm SD 表示,经 Levene 检验证实组间方差齐。DL 组与 LD 组小鼠角膜上皮创伤修复率的总体差异比较采用重复测量两因素方差分析;DL 组与 LD 组角膜上皮分裂细胞、中性粒细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞数量的总体比较采用两因素方差分析;角膜上皮厚度组间比较、各个时间点小鼠角膜创伤修复率和细胞数量的两两比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

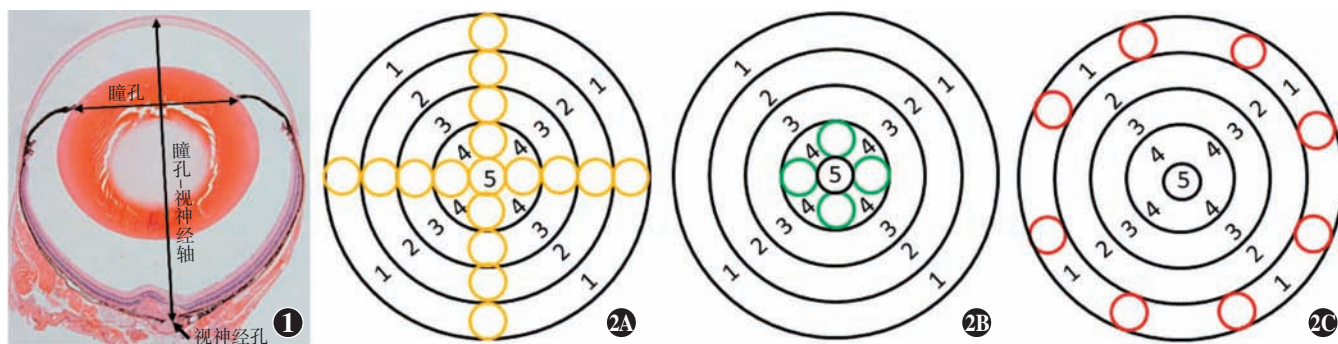


图 1 小鼠眼球组织病理学表现(HE $\times 4$) 沿平行于瞳孔-视神经轴的方向切片 图 2 角膜细胞统计示意图($\times 40$) A:角膜分裂细胞计数区域(黄圈) B:角膜中性粒细胞计数区域(绿圈) C: $\gamma\delta$ T 细胞计数区域(红圈)

2 结果

2.1 各组小鼠角膜修复率的比较

角膜上皮创伤前,DL 组和 LD 组上皮层厚度分别为 $(33.983 \pm 1.074) \mu\text{m}$ 和 $(33.993 \pm 0.904) \mu\text{m}$, 差异无统计学意义 ($t=0.014, P=0.989$)。创伤后不同时间点 LD 组和 DL 组小鼠角膜修复率总体比较, 差异均有统计学意义 ($F_{\text{组别}} = 239.226, P < 0.0001$; $F_{\text{时间}} = 6785.571, P < 0.0001$), 其中创伤后 12 h DL 组角膜修复率显著小于 LD 组, 差异有统计学意义 ($t=12.230, P < 0.0001$); 创伤后 18 h, DL 组角膜修复率显著小于 LD 组, 差异有统计学意义 ($t=17.360, P < 0.0001$) (图 3, 表 1)。2 个组小鼠角膜均在 24 h 内顺利完成再上皮化过程。

表 1 创伤后不同时间点 2 个组角膜创伤修复率比较 (mean±SD, %)

组别	样本量	角膜创伤修复率			
		创伤后 0 h	创伤后 12 h	创伤后 18 h	创伤后 24 h
LD 组	5	100.000±0.000	37.677±5.243	14.959±1.739	0.000±0.000
DL 组	5	100.000±0.000	10.967±1.065 ^a	1.985±0.106 ^a	0.000±0.000

注: $F_{\text{时间}} = 6785.571, P < 0.0001$; $F_{\text{组别}} = 239.226, P < 0.0001$; $F_{\text{交互作用}} = 148.532, P < 0.0001$ 。与 LD 组比较, ^a $P < 0.05$ (两因素重复测量方差分析, LSD- t 检验) LD: 昼夜节律正常; DL: 昼夜节律颠倒

苏木精-伊红染色结果显示, 创伤后 24 h 2 个组小鼠角膜上皮细胞皆排列疏松、紊乱、形态不规则。LD 组角膜上皮覆盖 2~3 层细胞, 主要为多角细胞和基底细胞, 细胞间隙较宽; DL 组上皮层数为 3~4 层, 除多角细胞和基底细胞外, 还有少量扁平细胞 (图 3D)。损伤后 24 h, DL 组角膜上皮厚度明显大于 LD 组, 差异有统计学意义 ($t=3.557, P=0.012$) (图 4, 表 2)。

表 2 不同时间点 LD 组和 DL 组角膜上皮层厚度比较 (mean±SD, μm)

组别	样本量	角膜上皮层厚度	
		创伤后 0 h	创伤后 24 h
LD 组	5	100.000±0.000	37.677±5.243
DL 组	5	100.000±0.000	10.967±1.065 ^a

注: 与 LD 组比较, ^a $P < 0.05$ (独立样本 t 检验) LD: 昼夜节律正常; DL: 昼夜节律颠倒

2.2 昼夜节律颠倒对角膜创伤后上皮分裂细胞的影响

创伤后不同时间点 2 个组角膜上皮分裂细胞数量总体比较, 差异均有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 28.309, P = 0.000$; $F_{\text{时间}} = 300.044, P = 0.000$), 其中 DL 组小鼠角膜上皮分裂细胞数量在创伤后 6、12、18、24 和 30 h 明显大于 DL 组, 差异均有统计学意义 ($t = 5.017, P = 0.002$; $t = 3.610, P = 0.011$; $t = 5.266, P = 0.002$; $t = 10.449, P = 0.000$; $t = 2.767, P = 0.033$); DL 组小鼠角膜上皮分裂细胞数在创伤后 36 h 明显小于 DL 组, 差异有统计学意义 ($t = 10.231, P = 0.000$); 创伤后 42 h, 2 个组上皮分裂细胞数比较, 差异无统计学意义 ($t = 0.210, P = 0.840$) (图 5, 表 3)。

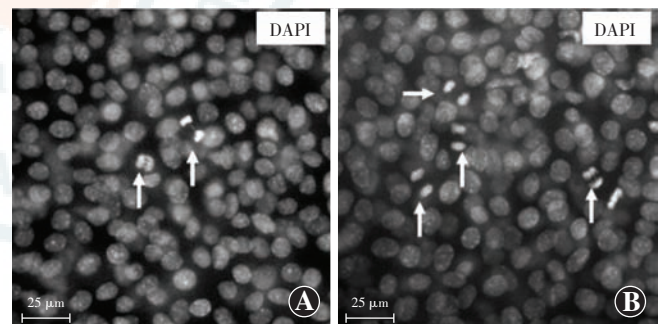


图 5 各组小鼠角膜创伤后不同时间点上皮分裂细胞的比较 (DAPI, 标尺 = 25 μm) LD 组和 DL 组角膜创伤后 18 h 角膜上皮分裂细胞染色表现 A: 昼夜节律正常组; B: 昼夜节律颠倒组

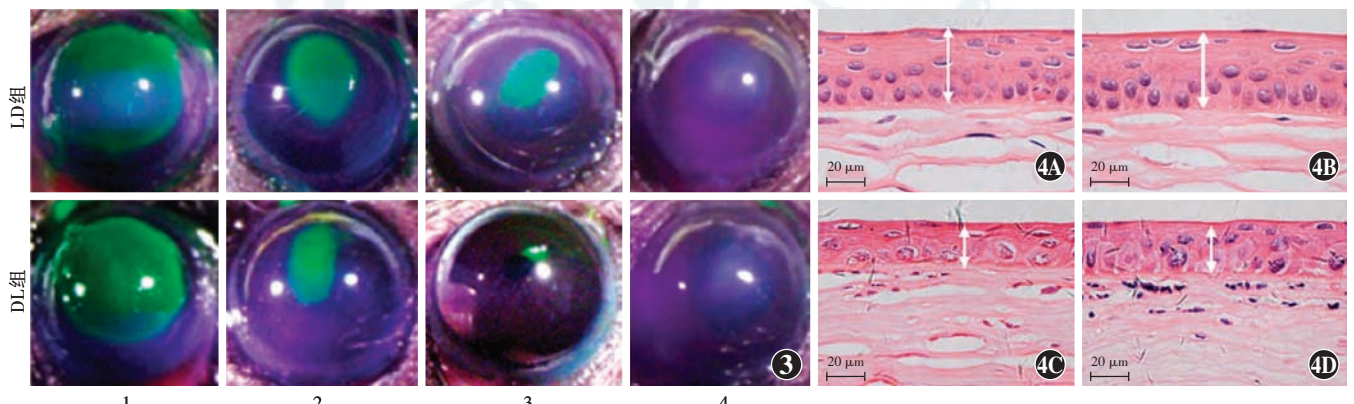


图 3 各组小鼠角膜创伤后再上皮化表现 LD 组和 DL 组小鼠创伤后各时间点角膜创面荧光素钠染色表现 1: 创伤后 0 h 2: 创伤后 12 h 3: 创伤后 18 h 4: 创伤后 24 h LD: 昼夜节律正常; DL: 昼夜节律颠倒 图 4 LD 组和 DL 组未创伤角膜及创伤后 24 h 角膜中央上皮组织学表现 (HE, 标尺 = 20 μm) 未创伤角膜上皮细胞排列规则, 角膜创伤后 24 h 上皮细胞排列紊乱 A: 未创伤 LD 组 B: 未创伤 DL 组 C: 创伤后 24 h LD 组 D: 创伤后 24 h DL 组 LD: 昼夜节律正常; DL: 昼夜节律颠倒

表 3 创伤后不同时间点 2 个组角膜上皮分裂细胞数量比较 (mean±SD, 个)

组别	样本量	不同时间点分裂细胞数量						
		6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	42 h
LD 组	5	17±7	89±9	111±11	184±15	230±14	283±12	139±16
DL 组	5	40±6 ^a	110±7 ^a	172±20 ^a	286±12 ^a	258±14 ^a	183±15 ^a	136±18

注: $F_{\text{分组}} = 28.309, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 300.044, P = 0.000; F_{\text{交互作用}} = 43.705, P = 0.000$ 。与 LD 组比较, ^a $P < 0.05$ (两因素多水平方差分析, 独立样本 t 检验) LD: 昼夜节律正常; DL: 昼夜节律颠倒

2.3 昼夜节律颠倒对角膜创伤后中性粒细胞数目的影响

创伤后不同时间点 2 个组角膜中性粒细胞数量总体比较, 差异均有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 0.494, P = 0.486; F_{\text{时间}} = 256.172, P = 0.000$), 其中 DL 组小鼠角膜中性粒细胞数量在角膜创伤后 12 h 和 18 h 明显大于 LD 组, 差异均有统计学意义 ($t = 6.505, P = 0.001; t = 11.610, P = 0.000$); DL 组小鼠角膜中性粒细胞数量在创伤后 24、30、36 和 42 h 明显小于 LD 组, 差异均有统计学意义 ($t = 4.082, P = 0.006; t = 3.326, P = 0.016; t = 4.271, P = 0.005; t = 8.273, P = 0.000$) (图 6, 表 4)。

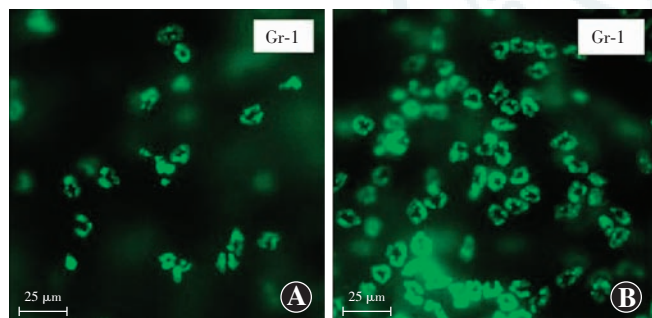


图 6 2 个组角膜创伤后中性粒细胞向角膜创伤区趋化动力学表现 (FITC, 标尺=25 μm) LD 组和 DL 组在创伤 18 h 后角膜 4 区中性粒细胞染色表现 A: 昼夜节律正常组; B: 昼夜节律颠倒组

表 4 创伤后不同时间点 2 个组角膜中性粒细胞数量比较 (mean±SD, 个)

组别	样本量	不同时间点中性粒细胞数量						
		6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	42 h
LD 组	5	0±0	18±6	54±8	150±10	125±14	75±9	48±7
DL 组	5	0±0	54±9 ^a	146±14 ^a	123±9 ^a	100±6 ^a	43±12 ^a	16±4 ^a

注: $F_{\text{分组}} = 0.494, P = 0.486; F_{\text{时间}} = 256.172, P = 0.000; F_{\text{交互作用}} = 57.395, P = 0.000$ 。与 LD 组比较, ^a $P < 0.05$ (两因素多水平方差分析, 独立样本 t 检验) LD: 昼夜节律正常; DL: 昼夜节律颠倒

2.4 昼夜节律颠倒对角膜创伤后角膜缘 γδT 细胞募集的影响

创伤后不同时间点 2 个组角膜 γδT 细胞数量比较, 差异均有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 10.736, P = 0.002; F_{\text{时间}} = 53.117, P = 0.000$), 其中 DL 组和 LD 组小鼠角膜缘 γδT 细胞数量在创伤后 6 h 和 12 h 比较, 差异均无统计学意义 ($t = 1.178, P = 0.283; t = 0.638, P = 0.547$); DL 组小鼠角膜缘 γδT 细胞数量在创伤后 18 h、24 h 明显大于 LD 组, 差异均有统计学意义 ($t = 4.990, P = 0.002; t = 3.017, P = 0.023$); DL 组和 LD 组小鼠角膜缘 γδT 细胞数量在创伤后 36 h 和 42 h 比较, 差异均无统计学意义 ($t = 0.866, P = 0.420; t = 0.950, P = 0.379$) (图 7, 表 5)。

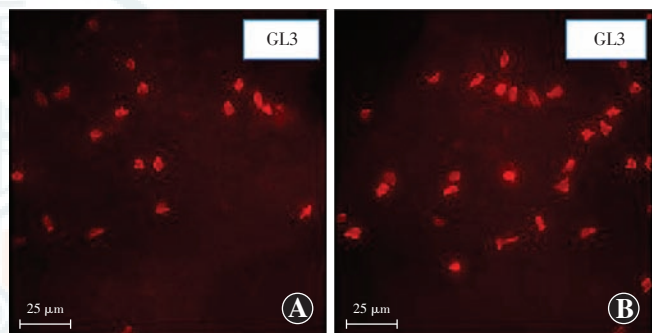


图 7 2 个组角膜创伤后 γδT 细胞在角膜缘趋化动力学表现 (PE, 标尺=25 μm) LD 组和 DL 组角膜创伤 18 h 后角膜缘 γδT 细胞染色表现 A: 昼夜节律正常; B: 昼夜节律颠倒

表 5 创伤后不同时间点 2 个组角膜 γδT 细胞数量比较 (mean±SD, 个)

组别	样本量	不同时间点 γδT 细胞数量						
		6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	42 h
LD 组	5	22±3	25±3	28±3	35±2	38±3	24±1	22±2
DL 组	5	25±3	26±2	38±3 ^a	40±2 ^a	33±2 ^a	25±2	24±3

注: $F_{\text{分组}} = 10.736, P = 0.002; F_{\text{时间}} = 53.117, P = 0.000; F_{\text{交互作用}} = 7.504, P = 0.000$ 。与 LD 组比较, ^a $P < 0.05$ (两因素多水平方差分析, 独立样本 t 检验) LD: 昼夜节律正常; DL: 昼夜节律颠倒

3 讨论

本研究中发现, 小鼠角膜创伤后 12 h 和 18 h 角膜上皮化速度加快, 创伤后 24 h 角膜上皮厚度大于昼夜节律正常组, 上皮分裂细胞数量高峰期提前 12 h; 小鼠角膜创伤后中性粒细胞和 γδT 细胞募集速度均加快, 且提前 6 h 达高峰。角膜上皮创伤后的愈合有赖于角膜再上皮化和角膜缘血管急性炎症反应。角膜上皮缺损后, 角膜缘干细胞变形并迁移到创伤区域, 增生, 分化成角膜上皮细胞^[23]。角膜上皮损伤引起边缘血管的急性炎症反应, 导致中性粒细胞向缺损区域趋化以及 γδT 细胞向角膜缘上皮层聚集^[15]。创伤后适度炎症反应可促进创伤修复, 炎症反应过度或不足对创伤

修复起阻碍作用^[24]。

哺乳动物体有丝分裂指数和 DNA 合成在许多细胞中,如舌角化细胞等,均有昼夜节律变化^[25-29]。角膜上皮细胞分裂在授光前后处于活跃状态,停止授光前后处于静息状态^[30]。本研究中发现,CT1~CT13 细胞分裂活动相对活跃,CT11 细胞分裂活动达最大值,CT13~CT1 细胞分裂活动相对静止,CT20 分裂细胞数量呈最小值。不同时间创伤角膜,上皮分裂细胞数量不同^[18]。昼夜节律颠倒状态下分裂细胞节律与正常角膜呈相反趋势。本研究中选择 CT20 作为创伤时间点,表明 DL 组角膜上皮创伤后分裂细胞增生高峰期提前到来即分速率加快。这可能是长期人为时差造成角膜上皮细胞分裂节律产生相位差,导致 DL 组小鼠角膜创伤修复速率在创伤后 12 h 和 18 h 大于昼夜节律正常组。中性粒细胞是固有免疫系统的一部分,是伤后最早被招募至损伤部位的免疫细胞^[31]。中性粒细胞的主要功能是产生抗菌肽、活性氧和蛋白酶来抵御侵入的微生物,产生介质激活细胞,调节炎症反应^[32-33]。此外, Li 等^[15,19] 研究证实 $\gamma\delta$ T 细胞通过产生白细胞介素(interleukin, IL)-17A 促进中性粒细胞的募集,并产生生长因子和 IL-22 促进角膜上皮细胞分裂增生。研究表明,中性粒细胞表达时钟基因^[34]。本研究结果显示,DL 后在 CT20 创伤角膜,角膜中性粒细胞趋化聚集加快,聚集高峰期提前到来。家猪外周血中的 $\gamma\delta$ T 细胞数量有明显昼夜节律性,具体表现为黑暗阶段的 $\gamma\delta$ T 细胞数量明显大于光照阶段^[16]。本研究中发现,DL 组角膜缘 $\gamma\delta$ T 细胞聚集高峰期早于 LD 组。小鼠外周血循环中性粒细胞总数呈昼夜节律震荡,光照开始后约 5 h(ZT5) 达峰值,光照后 13 h 出现低谷,而在小鼠骨髓、肌肉和肝脏中,中性粒细胞数量在光照后 13 h 达高峰,创伤后 15 h 出现低谷^[13]。此外,小鼠外周血中性粒细胞的吞噬作用呈昼夜节律震荡,中性粒细胞吞噬作用在 CT3~CT4 达高峰,在 CT10~CT16 呈低谷,DL 后小鼠外周血中性粒细胞噬菌作用明显下降^[35-36]。小鼠角膜缘中性粒细胞募集有节律性;不同时间创伤角膜,中性粒细胞向创伤区的迁移动力学不同^[18]。

综上所述,昼夜节律可影响上皮细胞的分裂速率和角膜再上皮化过程;影响中性粒细胞向角膜缺损区的趋化和角膜缘 $\gamma\delta$ T 细胞的聚集,对角膜上皮创伤修复有重要调节作用。昼夜节律系统是如何协调角膜创伤修复的各过程以及分子机制,仍需进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在任何利益冲突

参考文献

[1] Liu CY, Kao WW. Corneal epithelial wound healing[J]. Prog Mol Biol

Transl Sci, 2015, 134: 61-71.

- [2] Greene MW. Circadian rhythms and tumor growth[J]. Cancer Lett, 2012, 318(2): 115-123. DOI: 10.1016/j.canlet.2012.01.001.
- [3] Husse J, Eichele G, Oster H. Synchronization of the mammalian circadian timing system; light can control peripheral clocks independently of the SCN clock; alternate routes of entrainment optimize the alignment of the body's circadian clock network with external time[J]. Bioessays, 2015, 37(10): 1119-1128. DOI: 10.1002/bies.201500026.
- [4] McMahon DG, Iuvone PM, Tosini G. Circadian organization of the mammalian retina; from gene regulation to physiology and diseases[J]. Prog Retin Eye Res, 2014, 39: 58-76. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2013.12.001.
- [5] Chakraborty R, Read SA, Collins MJ. Diurnal variations in axial length, choroidal thickness, intraocular pressure, and ocular biometrics[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(8): 5121-5129. DOI: 10.1167/iovs.11-7364.
- [6] LaVail MM. Rod outer segment disk shedding in rat retina; relationship to cyclic lighting[J]. Science, 1976, 194(4269): 1071-1074.
- [7] Shen M, Wang J, Qu J, et al. Diurnal variation of ocular hysteresis, corneal thickness, and intraocular pressure[J]. Opt Vis Sci, 2008, 85(12): 1185-1192. DOI: 10.1097/OPX.0b013e31818e8abe.
- [8] 徐金华, 林琳, 王育良, 等. 光照节律改变对大鼠视网膜中 Cry2 表达的影响[J]. 中华实验眼科杂志, 2012, 30(11): 994-998. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.11.008.
- Xu JH, Lin L, Wang YL, et al. Effect of light rhythm on the expression of cryptochrome 2 in retina[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2012, 30(11): 994-998. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.11.008.
- [9] Cohen Y, Belkin M, Yehezkel O, et al. Dependency between light intensity and refractive development under light-dark cycles[J]. Exp Eye Res, 2011, 92(1): 40-46. DOI: 10.1016/j.exer.2010.10.012.
- [10] Doughty MJ. Morphometric analysis of the surface cells of rabbit corneal epithelium by scanning electron microscopy[J]. Am J Anat, 1990, 189(4): 316-328. DOI: 10.1002/aja.1001890404.
- [11] Rosales C, Lowell CA, Schnoor M, et al. Neutrophils; their role in innate and adaptive immunity 2017 [J/OL]. J Immunol Res, 2017, 2017: 9748345 [2018-09-01]. https://www.hindawi.com/journals/jir/2017/9748345/. DOI: 10.1155/2017/9748345.
- [12] Labrecque N, Cermakian N. Circadian clocks in the immune system[J]. J Biol Rhythms, 2015, 30(4): 277-290. DOI: 10.1177/0748730415577723.
- [13] Scheiermann C, Kunisaki Y, Lucas D, et al. Adrenergic nerves govern circadian leukocyte recruitment to tissues[J]. Immunity, 2012, 37(2): 290-301. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.05.021.
- [14] Gibbs J, Ince L, Matthews L, et al. An epithelial circadian clock controls pulmonary inflammation and glucocorticoid action[J]. Nat Med, 2014, 20(8): 919-926. DOI: 10.1038/nm.3599.
- [15] Li Z, Burns AR, Rumbaut RE, et al. $\gamma\delta$ T cells are necessary for platelet and neutrophil accumulation in limbal vessels and efficient epithelial repair after corneal abrasion[J]. Am J Pathol, 2007, 171(3): 838-845. DOI: 10.2353/ajpath.2007.070008.
- [16] Engert LC, Weiler U, Stefanski V, et al. Data characterizing diurnal rhythms in the number of peripheral CD8 α - and CD8 α + $\gamma\delta$ T cells in domestic pigs[J]. Data Brief, 2018, 16: 843-849. DOI: 10.1016/j.dib.2017.12.013.
- [17] Evans JA, Davidson AJ. Health consequences of circadian disruption in humans and animal models[J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2013, 119: 283-323. DOI: 10.1016/B978-0-12-396971-2.00010-5.
- [18] Xue Y, Liu P, Wang H, et al. Modulation of circadian rhythms affects corneal epithelium renewal and repair in mice[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2017, 58(3): 1865-1874. DOI: 10.1167/iovs.16-21154.
- [19] Li Z, Burns AR, Miller SB, et al. CCL20, $\gamma\delta$ T cells, and IL-22 in corneal epithelial healing[J]. FASEB J, 2011, 25(8): 2659-2668. DOI: 10.1096/fj.11-184804.
- [20] Li Z, Burns AR, Han L, et al. IL-17 and VEGF are necessary for efficient corneal nerve regeneration[J]. Am J Pathol, 2011, 178(3): 1106-1116. DOI: 10.1016/j.ajpath.2010.12.001.
- [21] Marko CK, Menon BB, Chen G, et al. Spdef null mice lack conjunctival goblet cells and provide a model of dry eye[J]. Am J Pathol, 2013, 183(1): 35-48. DOI: 10.1016/j.ajpath.2013.03.017.
- [22] Byeseda SE, Burns AR, Dieffenbaugher S, et al. ICAM-1 is necessary for epithelial recruitment of gammadelta T cells and efficient corneal

- wound healing[J]. Am J Pathol, 2009, 175 (2) : 571-579. DOI: 10.2353/ajpath.2009.090112.
- [23] West JD, Dorá NJ, Collinson JM. Evaluating alternative stem cell hypotheses for adult corneal epithelial maintenance[J]. World J Stem Cells, 2015, 7 (2) : 281-299. DOI: 10.4252/wjsc.v7.i2.281.
- [24] Karin M, Clevers H. Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration[J]. Nature, 2016, 529 (7586) : 307-315. DOI: 10.1038/nature17039.
- [25] García MN, Barbeito CG, Andrini LA, et al. Circadian rhythm of DNA synthesis and mitotic activity in tongue keratinocytes[J]. Cell Biol Int, 2001, 25 (2) : 179-183. DOI: 10.1006/cbir.2000.0585.
- [26] Scheving LE, Tsai TH, Scheving LA. Chronobiology of the intestinal tract of the mouse[J]. Am J Anat, 1983, 168 (4) : 433-465. DOI: 10.1002/aja.1001680405.
- [27] Buchi KN, Moore JG, Hrushesky WJ, et al. Circadian rhythm of cellular proliferation in the human rectal mucosa[J]. Gastroenterology, 1991, 101 (2) : 410-415.
- [28] Matsuo T, Yamaguchi S, Mitsui S, et al. Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division *in vivo* [J]. Science, 2003, 302 (5643) : 255-259. DOI: 10.1126/science.1086271.
- [29] Bjarnason GA, Jordan R. Circadian variation of cell proliferation and cell cycle protein expression in man: clinical implications[J]. Prog Cell Cycle Res, 2000, 4 : 193-206.
- [30] Burns ER, Scheving LE. Isoproterenol-induced phase shifts in circadian rhythm of mitosis in murine corneal epithelium[J]. J Cell Biol, 1973, 56 (2) : 605-608. DOI: 10.1083/jcb.56.2.605.
- [31] Soehnlein O, Lindbom L. Neutrophil-derived azurocidin alarms the immune system[J]. J Leukoc Biol, 2009, 85 (3) : 344-351. DOI: 10.1189/jlb.0808495.
- [32] Wilgus TA, Roy S, McDaniel JC. Neutrophils and wound repair: positive actions and negative reactions[J]. Adv Wound Care (New Rochelle), 2013, 2 (7) : 379-388. DOI: 10.1089/wound.2012.0383.
- [33] Weninger W, Biro M, Jain R. Leukocyte migration in the interstitial space of non-lymphoid organs[J]. Nat Rev Immunol, 2014, 14 (4) : 232-246. DOI: 10.1038/nri3641.
- [34] Haimovich B, Calvano J, Haimovich AD, et al. *In vivo* endotoxin synchronizes and suppresses clock gene expression in human peripheral blood leukocytes[J]. Crit Care Med, 2010, 38 (3) : 751-758. DOI: 10.1097/CCM.0b013e3181cd131c.
- [35] Hriscu ML. Modulatory factors of circadian phagocytic activity[J]. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1057 : 403-430. DOI: 10.1196/annals.1356.032.
- [36] Li JC, Xu F. Influences of light-dark shifting on the immune system, tumor growth and life span of rats, mice and fruit flies as well as on the counteraction of melatonin[J]. Biol Signals, 1997, 6 (2) : 77-89.

(收稿日期: 2019-02-07 修回日期: 2019-06-03)

(本文编辑: 杜娟)

· 病例报告 ·

KCNV2 基因突变导致常染色体隐性遗传 Best 病一例

王蕾 陶天畅 崇伟华 李根林

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, 北京 100730

通信作者: 李根林, Email: ligenglin@263.net

基金项目: 国家自然科学基金项目(81271046); 北京市自然科学基金项目

暨北京市教育委员会科技发展计划重点项目(KZ201510025025)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.07.005

患者男, 3 岁, 主诉发现眯眼看东西半年余, 于 2017 年 3 月 11 日来北京同仁医院就诊。患儿足月产, 否认吸氧史、家族史、外伤史及全身病史。眼部检查: 因患儿不配合查未检查视力; 眼压右眼 10.1 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa), 左眼 10.2 mmHg; 双眼睑球结膜无充血; 角膜清; 前房中深; 角膜下沉积物(-); 房水闪辉(-); 双瞳孔等大等圆, 直径约 3 mm, 直接间接对光反射(+); 双眼晶状体透明; 双眼玻璃体透明。眼底检查: 视盘界清, 色橘红, 杯盘比均为 0.3, 视网膜血管分支及走行未见明显异常。右眼黄斑区可见一大约 1 PD 的卵黄样病灶, 边界不清, 卵黄样物质部分吸收, 黄斑中心凹光反射消失, 视盘及周边部视网膜未见明显异常(图 1A); 左眼黄斑区视网膜深层有一约 1.5 PD 的卵圆形病灶, 边界清, 呈典型蛋黄样改变, 周围有晕, 视盘及周边部视网膜未见明显异常(图 1B)。相干光断层扫描(optical coherence tomography, OCT)示: 右眼黄斑区内节(inner segment, IS)/外节(outer segment, OS)萎缩性改变(图 2A); 左眼黄斑区 IS/OS 萎缩性改变, 伴脉络膜萎缩斑, 黄斑部厚度较正常略小(图 2B)。基因检测示携带复合杂合突变: 1. KCNV2 c.368T>G; p. L123R 及 2. KCNV2 c.1408G>C; p. G470R。其父携带杂合突变 2, 其母携带杂合突变 1。2 名胞姐均携带杂合突变 2(图 3), 但对其家属成员进行眼部检查时均未见异常。因患者配合度差, 未给予荧光素眼底血管造影(fundus fluorescein

angiography, FFA)、眼电图(electro-oculogram, EOG)及视网膜电图(electroretinogram, ERG)检查。临床诊断: 右眼常染色体隐性遗传 Best 病(autosomal recessive bestrophinopathy, ARB) III 期, 左眼 ARB II 期。



图 1 患者彩色眼底照片 A: 右眼 B: 左眼 图 2 患者相干光断层扫描检查图像 A: 右眼黄斑区改变 B: 左眼黄斑区改变

讨论: ARB 是一种罕见的黄斑疾病, 与 Best 卵黄样黄斑营养不良(Best vitelliform macula dystrophy, BVMD)和常染色体显性遗传玻璃体视网膜脉络膜病统称 Best (Bestrophinopathies) 病。研究发现, *BEST1* 基因突变可引起 Best 病^[1]。有关 *KCNV2*