

· 实验研究 ·

CCR7 基因修饰未成熟树突状细胞诱导大鼠高危角膜移植免疫耐受

周琨 高晓唯 蔡岩 李文静 胡裕坤 田丽丽 付燕

【摘要】 背景 角膜移植术后免疫排斥反应是手术失败的主要原因,尤其是高危角膜移植。延长高危角膜移植术植片的存活时间是目前亟待解决的问题。目的 研究趋化因子受体 7 (CCR7) 基因重组腺病毒 (Ad) 体外转染供体骨髓来源的未成熟树突状细胞 (imDCs) 对大鼠高危角膜移植免疫排斥反应的影响,并探讨其可能的机制。方法 取 1 只雄性 Wistar 供体大鼠股骨骨髓分离和培养骨髓源 imDCs,用携带大鼠 CCR7 基因的重组 Ad 转染 imDCs,收集 1×10^7 个 imDCs 重悬于 500 μ l 含体积分数 1% 胎牛血清的 PBS 中。将 60 只受体 SD 大鼠以角膜碱烧伤法建立高危角膜移植模型,并用 30 只 Wistar 大鼠角膜作为供体进行同种异体角膜移植。采用随机数字表法将 SD 大鼠分为 PBS 组、未修饰 imDCs 组、imDCs+Ad 空载体组和 imDCs+Ad-CCR7 组,每组 15 只,按照分组不同分别于术前 7 d 和术后 3 d 经尾静脉注射相应溶液。术后每日裂隙灯显微镜下观察角膜植片存活情况,术后 14 d 每组任意处死 6 只大鼠,取角膜植片行常规组织病理学检查,采用逆转录 PCR (RT-PCR) 法检测辅助性 T 细胞 1 (Th1) 型细胞因子白细胞介素-2 (IL-2)、 γ 干扰素 (IFN- γ) 和 Th2 型细胞因子 IL-4、IL-10 的 mRNA 表达水平。结果 PBS 组、未修饰 imDCs 组、imDCs+Ad 空载体组和 imDCs+Ad-CCR7 组角膜植片的平均存活时间分别为 (10.44 \pm 1.88)、(16.00 \pm 2.18)、(15.11 \pm 2.03) 和 (23.67 \pm 2.83) d, 4 个组间总体比较差异有统计学意义 ($F=53.005, P=0.000$); 与 PBS 组比较,未修饰 imDCs 组、imDCs+Ad 空载体组和 imDCs+Ad-CCR7 组角膜植片的平均存活时间均明显延长,差异均有统计学意义 ($t=5.220, 4.385, 12.423$, 均 $P=0.000$); imDCs+Ad-CCR7 组植片的平均存活时间较未修饰 imDCs 组和 imDCs+Ad 空载体组均明显延长,差异均有统计学意义 ($t=7.204, 8.039$, 均 $P=0.000$)。RT-PCR 结果显示,与 PBS 组相比,未修饰 imDCs 组、imDCs+Ad 空载体组、imDCs+Ad-CCR7 组大鼠 IFN- γ mRNA 和 IL-2 mRNA 相对表达量均明显降低,而 IL-4 mRNA 和 IL-10 mRNA 相对表达量均明显升高,差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$); 与未修饰 imDCs 组和 imDCs+Ad 空载体组比较,imDCs+Ad-CCR7 组 IFN- γ mRNA 和 IL-2 mRNA 相对表达量明显降低,而 IL-4 mRNA 和 IL-10 mRNA 相对表达量明显升高,差异均有统计学意义 (均 $P=0.000$)。结论 尾静脉注射 CCR7 基因修饰的 imDCs 可以明显延长大鼠高危角膜移植术后角膜植片的存活时间,抑制角膜移植免疫排斥反应,可能与 CCR7 基因修饰的 imDCs 诱导的 Th1/Th2 功能偏移有关。

【关键词】 角膜移植; 植片存活/免疫; 免疫耐受; 辅助 T 淋巴细胞/免疫; 树突状细胞/免疫; 受体, 趋化因子受体 7/代谢

Induction of CCR7 gene modified immature dendritic cells to immune tolerance in rats high-risk corneal allograft Zhou Kun, Gao Xiaowei, Cai Yan, Li Wenjing, Hu Yukun, Tian Lili, Fu Yan. Ophthalmic Center, No. 474 Hospital of Chinese PLA, Urumqi 830013, China

Corresponding author: Gao Xiaowei, Email: gxwgaowx@263.net

[Abstract] **Background** Graft rejection is a primary cause of corneal transplantation failure, especially in high-risk keratoplasty. How to extend the survival time of graft is a problem to be solved. **Objective** This study was to investigate the influence of immune tolerance on high-risk rat keratoplasty induced by donor bone marrow-derived immature dendritic cells (imDCs) transfected by chemokine receptor 7 (CCR7) recombinant adenovirus (Ad). **Methods** Bone marrow-derived imDCs were isolated and cultured from femur marrow of one male Wistar

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.10.008

基金项目:全军医学科研“十二五”课题计划项目 (CWS11J239)

作者单位:830013 乌鲁木齐,解放军第四七四医院 全军眼科中心 [周琨 (现在郑州市第二人民医院眼科)、高晓唯、蔡岩、李文静、胡裕坤、田丽丽]; 071000 保定市第一中心医院东院眼科 (付燕)

通信作者:高晓唯, Email: gxwgaowx@263.net

donor rat. The cells were transfected using recombinant Ad vector with rat *CCR7* gene and resuspended in 500 μ l PBS containing 1% fetal bovine serum with the cells 1×10^7 . High-risk corneal transplantation models were established using monolateral corneal alkali-burn method in 60 SD rat recipients, and then allograft keratoplasty was performed with the 30 Wistar rats as donors. The models were randomized into the PBS group, imDCs group, imDCs with blank Ad vector group and imDCs with Ad-CCR7 group following the corresponding solution injection via caudal vein on preoperative day 7 and postoperative day 3 respectively. The survival time of graft was evaluated under the slit lamp microscope once per day. On the 14th day after operation, corneal sections were prepared from 6 eyes of each group for the pathological examination, and the relative expression levels of T helper cell 1 (Th1)-related factors, interleukin-2 (IL-2) mRNA and interferon- γ (IFN- γ) mRNA, as well as Th2-related factors, IL-4 mRNA and IL-10 mRNA, were detected by reverse transcription PCR (RT-PCR). The use and care of animals complied with the ARVO statement

Results The mean survival time of grafts was (10.44 \pm 1.88), (16.00 \pm 2.18), (15.11 \pm 2.03) and (23.67 \pm 2.83) days in the PBS group, imDCs group, imDCs with blank Ad group and imDCs with Ad-CCR7 group, respectively, with a significant difference among the 4 groups ($F=53.005, P=0.000$). Compared with the PBS group, the mean survival time of grafts was considerably extended in the imDCs group, imDCs with blank Ad group and imDCs with Ad-CCR7 group ($t=5.220, 4.385, 12.423$, all at $P=0.000$), and a remarkable prolongation of graft survival duration was seen in the imDCs with Ad-CCR7 group in comparison with the imDCs group and the imDCs with blank Ad group ($t=7.204, 8.039$, both at $P=0.000$). The relative expression levels of IFN- γ mRNA and IL-2 mRNA in the grafts were significantly lower, but the relative expression levels of IL-4 mRNA and IL-10 mRNA were significantly higher in the imDCs group, imDCs with blank Ad group and the imDCs with Ad-CCR7 group than those in the PBS group (all at $P<0.05$). Compared with the imDCs group and the imDCs with blank Ad group, the relative expression levels of IFN- γ mRNA and IL-2 mRNA in the grafts were remarkably declined, but the relative expression levels of IL-4 mRNA and IL-10 mRNA were remarkably elevated in the imDCs with Ad-CCR7 group (all at $P=0.000$). **Conclusions** Application of imDCs transfected with CCR7 recombinant Ad via vena caudalis can prolong the survival time of grafts after keratoplasty of SD rats probably by affecting the balance of Th1/Th2 cytokines.

[Key words] Corneal transplantation; Graft survival/immunology; Immune tolerance; T-lymphocytes, helper/immunology; Dendritic cells/immunology; Receptors, Chemokine receptor 7/metabolism

角膜移植术是角膜盲患者复明的主要手段,角膜无血管的特点使其处于相对的免疫赦免状态,使角膜移植术的成功率明显高于其他器官移植术,但排斥反应仍是穿透角膜移植术失败的首要原因^[1],因此如何延长高危角膜移植术植片的存活时间已成为亟待解决的问题。目前,对高危角膜移植排斥反应发生机制的研究主要集中在细胞分子、免疫和基因水平^[2-3]。辅助性 T 细胞(T helper cells, Th)的激活是启动细胞免疫应答的起点,根据其分泌细胞因子的不同分为 Th1 和 Th2 两个亚群,二者之间的动态平衡对免疫耐受的诱导和维持发挥重要作用^[4-5]。Th1 型细胞因子与急性排斥反应有关,而 Th2 型细胞因子与移植后的免疫耐受有关^[6]。趋化因子受体 7(chemokine receptor 7, CCR7)在趋化树突状细胞(dendritic cells, DCs)从外周组织迁移到次级淋巴器官中起关键作用,只有在 CCR7 快速表达并与趋化因子结合之后,捕获抗原的 DCs 才能迁移至淋巴系统,从而刺激免疫应答^[7-8]。有研究表明,通过诱导细胞迁移并进入淋巴器官,CCR7 有助于免疫耐受的发生^[9],但 CCR7 通过何种途径诱导免疫耐受目前尚不清楚。本研究拟在 CCR7 基

因修饰的未成熟树突状细胞(imature dendritic cells, imDCs)诱导高危角膜移植免疫耐受的基础上,进一步研究其与 Th1 和 Th2 细胞的相互关系,探讨 CCR7 基因修饰的 imDCs 在免疫耐受中的具体作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 60 只健康清洁级雄性 SD 大鼠作为受体,30 只健康清洁级雄性 Wistar 大鼠作为供体,鼠龄 6~8 周,体质量 180~220 g,购于新疆医科大学实验动物中心。所有实验动物的喂养和实验过程符合 ARVO 声明。

1.1.2 主要试剂 重组大鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(recombinant rat granulocyte-macrophage colony stimulating factor, rrGM-CSF)、重组大鼠白细胞介素-4(recombinant rat interleukin-4, rrIL-4)(美国 Peprotech 公司);RPMI-1640 培养液、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(美国 Gibco 公司);腺病毒-趋化因子受体 7-增强型绿色荧光蛋白(adenovirus-chemokine receptor 7-enhanced green fluorescence protein, Ad-

CCR7-EGFP) 溶液 (滴度为 3.6×10^{10} PFU/ml)、Ad-EGFP 溶液 (滴度为 1.95×10^{11} PFU/ml) (广州赛业生物科技有限公司); PCR 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠骨髓源 imDCs 的培养 取 Wistar 大鼠 1 只, 颈椎脱臼法处死后在体积分数 75% 乙醇中浸泡 5 min; 无菌条件下取出双侧股骨和胫骨, 清除骨周围肌肉及结缔组织, PBS 冲洗; 剪去骨两端, 用 PBS 反复冲洗骨髓腔直至变白, 收集冲洗液于 50 ml 注射器中; 将骨髓悬液按 2:1 比例缓慢加入含有大鼠淋巴细胞分离液的离心管内, 离心半径 13 cm, 2 000 r/min 离心 30 min; 小心吸取中间白膜层至另一含有 PBS 的离心管内, 轻轻吹打混匀, 1 500 r/min 离心 10 min; 弃上清, PBS 重复洗涤 1 遍; 用含体积分数 15% FBS 的 RPMI-1640 培养液调整细胞密度至 2×10^9 /ml, 接种于 6 孔培养板中, 于 37 °C、95% 湿度、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养 3 h; 轻轻吸弃上清, 重新加入含 15% FBS 的 RPMI-1640 培养液, 每孔 3 ml, 加入 rrGM-CSF (终质量浓度为 20 mg/L) 及 rrIL-4 (终质量浓度为 10 mg/L), 于 37 °C、95% 湿度、5% CO₂ 培养箱中培养, 隔日半量换液, 并加入相应量的细胞因子, 细胞培养 6 d 即为 imDCs。

1.2.2 携带大鼠 CCR7 基因的重组 Ad 转染 imDCs 采用文献 [10] 中的离心法增强 Ad 对 imDCs 的转染。收集 1×10^7 个 imDCs, 重悬于 500 μ l 含 1% FBS 的 PBS 中, 并与 500 μ l 含 100 感染复数 (multiplicity of infection, MOI) Ad 及 1% FBS 的 PBS 混合。将上述混合液于 37 °C 条件下 2 000 \times g 离心孵育 2 h, imDCs 用 PBS 洗涤 2 遍, 重悬于含 15% FBS 的 RPMI-1640 培养液中继续培养, 加入终质量浓度 20 mg/L rrGM-CSF 及 10 mg/L rrIL-4, 转染后 48 h 收集 imDCs。

1.2.3 大鼠高危角膜移植模型的建立 受体 SD 大鼠全身麻醉后吸去结膜囊内的泪液, 将直径 3.0 mm 的圆形滤纸浸于 1 mol/L NaOH 溶液中 20 s, 贴敷于角膜中央 35 s, 然后用生理盐水冲洗角膜及结膜囊 2 min, 复方托吡卡胺滴眼液点眼, 涂氧氟沙星眼膏。造模后用复方托吡卡胺滴眼液点眼, 每日 3 ~ 4 次; 待角膜 4 个象限的新生血管均长至角膜中央时视为造模成功。

1.2.4 实验动物分组 采用随机数字表法将模型鼠分为 4 个组, 每组 15 只。PBS 组大鼠尾静脉注射 PBS 0.1 ml, 未修饰 imDCs 组大鼠尾静脉注射供体源 imDCs, imDCs+Ad 空载体组大鼠尾静脉注射空载体修饰的供体源 imDCs, imDCs+Ad-CCR7 组大鼠尾静脉注射 CCR7 基因修饰的供体源 imDCs, 各组大鼠均于角

膜移植术前 7 d 及术后 3 d 进行注射, 注射的细胞悬浮于 0.1 ml PBS 中, 注射细胞量均为 1×10^7 /只。各组分别任意取 3 只眼行组织病理学观察, 取 3 只眼角膜组织行荧光定量 PCR 检测, 每组各取 9 只大鼠观察角膜植片存活时间。

1.2.5 大鼠同种异体角膜移植术 参照 Williams 等 [11] 的方法行大鼠同种异体穿透角膜移植术。SD 大鼠模型眼术前用复方托吡卡胺滴眼液点眼以充分扩瞳, 过量麻醉法处死 Wistar 大鼠后立即摘除眼球, 用直径 3.5 mm 角膜环钻钻取供体角膜植片后置于无菌培养皿中备用; SD 大鼠全身麻醉, 用盐酸丙美卡因滴眼液点眼 2 次行表面麻醉, 常规消毒铺巾, 用直径 3.0 mm 角膜环钻制作角膜植床, 用 10-0 尼龙缝线于植片与植床间断缝合 8 针, 水密形成前房, 线结调整至瞳孔远侧, 不包埋, 至取材时拆线, 术后用氯霉素及复方托吡卡胺滴眼液点眼, 每日 2 次, 每晚涂氧氟沙星眼膏 1 次, 连续 1 周。

1.2.6 术后角膜植片的排斥反应观察及评分 自术后第 1 天起每日在裂隙灯显微镜下观察受体大鼠角膜植片, 参照 Larkin 等 [12] 的评分标准, 以角膜混浊、水肿和新生血管作为综合指标, 由 2 人同时观察并评分, 记录角膜植片的平均存活时间和排斥反应指数 (rejection index, RI), 3 项指标的评分之和为当日的 RI, 当 RI \geq 5 分或植片混浊达到 3 级 (3 分) 时视为发生排斥反应。手术因素造成的感染、前房出血、前房消失或术后 5 d 内发生严重的角膜植片水肿、混浊及白内障者均予以剔除, 不纳入分析, 并及时补充实验动物。

1.2.7 角膜植片的组织病理学观察 术后 14 d, 各组任意处死 3 只大鼠, 立即摘除术眼, 取完整的角膜植片, 置于质量分数 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 逐级脱水, 置换, 浸蜡, 石蜡包埋后切片, 行常规苏木精-伊红染色。

1.2.8 逆转录 PCR 法检测角膜植片中 γ 干扰素、白细胞介素-2、白细胞介素-4 及白细胞介素-10 mRNA 的表达 角膜移植术后 14 d, 每组各处死 3 只大鼠, 立即取角膜植片, 液氮速冻后置于 -80 °C 冰箱内保存备用。角膜组织总 RNA 的提取: 将角膜放入 1.5 ml Ep 管中, Trizol 法提取总 RNA, 用紫外分光光度计测定波长为 280 nm 和 260 nm 处的吸光度 (A) 值, 以 A_{260}/A_{280} 值判定 RNA 纯度。参照逆转录试剂盒说明书逆转录合成 cDNA, 反应体系为 20 μ l。根据 GenBank 碱基序列设计引物 (表 1), 由上海 Invitrogen 公司合成。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 退火 [温度因引物而不同: β -actin 55 °C、 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ)

60 ℃、白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2) 55 ℃、IL-4 54.2 ℃、IL-10 62 ℃]30 s,72 ℃延伸 30 s,共 35~40 个循环;4 ℃保存。以 β-actin 作为标准化内参照,扩增产物在 20 g/L 琼脂糖凝胶中电泳,用图像分析系统测定各电泳条带的积分光密度值 (integral optical density, IOD),以同时扩增的 β-actin 作为标准内参照,以目的因子 mRNA 与内参基因 β-actin mRNA IOD 比值作为各因子 mRNA 的相对表达量。

表 1 各细胞因子基因引物序列

| 基因 | 引物序列 | 产物长度 (bp) | 循环次数 |
|---------|--------------------------------|-----------|------|
| β-actin | F:5' AGAGGAAATCGTGCCTGAC 3' | 100 | 35 |
| | R:5' TTCTCCAGGGAGGAAGAGGAT 3' | | |
| IFN-γ | F:5'-TTCGAGGTGAACAACCACAG-3' | 101 | 38 |
| | R:5'-CCTTTTCCGCTTCTTAGGCT-3' | | |
| IL-2 | F:5'-GCGCACCCACTTCAAGCCCT-3' | 340 | 36 |
| | R:5'-CCACCACAGTTGCTGGCTCA-3' | | |
| IL-4 | F:5'-GAACCAGGTCACAGAAAAAGG-3' | 313 | 40 |
| | R:5'-CTGCAAGTATTTCCCTCGTAGG-3' | | |
| IL-10 | F:5'-CTTTCACCTGCCCTCATCC-3' | 265 | 36 |
| | R:5'-ACAAACAATACGCCATTTCCC-3' | | |

注:IFN-γ:γ 干扰素;IL:白细胞介素

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件(美国 IBM 公司)进行统计分析。本研究测量指标的数据资料经 Shapira-Wilk 检验证实符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数经 Levene 检验证实方差齐。采用完全随机分组单因素干预 4 水平实验设计,PBS 组、未修饰 imDCs 组、imDCs+Ad 空载体组和 imDCs+Ad-CCR7 组间植片生存时间、植片中 Th1 细胞因子和 Th2 细胞因子基因的总差异比较均采用单因素方差分析,多重比较均采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠角膜植片存活时间比较

PBS 组、未修饰 imDCs 组、imDCs+Ad 空载体组和 imDCs+Ad-CCR7 组大鼠角膜植片平均存活时间分别为 (10.44 ± 1.88)、(16.00 ± 2.18)、(15.11 ± 2.03) 和 (23.67 ± 2.83)d,4 个组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 53.005, P = 0.000$);与 PBS 组相比,未修饰 imDCs 组、imDCs+Ad 空载体组、imDCs+Ad-CCR7 组角膜植片的平均存活时间均明显延长,差异均有统计学意义 ($t = 5.220, 4.385, 12.423$, 均 $P = 0.000$);imDCs+Ad-CCR7 组角膜植片的平均存活时间较未修饰 imDCs 组和 imDCs+Ad 空载体组均明显延长,差异均有统计学

意义 ($t = 7.204, 8.039$, 均 $P = 0.000$);未修饰 imDCs 组与 imDCs+Ad 空载体组间相比,角膜植片平均存活时间的差异无统计学意义 ($t = 0.835, P = 0.410$)。

2.2 各组大鼠角膜植片裂隙灯显微镜下观察及病理学表现

大鼠角膜移植术后 14 d, PBS 组角膜植片显著水肿,角膜上皮细胞层明显增厚,角膜基质层板层纤维结构排列紊乱,可见大量炎性细胞浸润及粗大的新生血管;未修饰 imDCs 组大鼠角膜植片中度水肿,角膜上皮细胞层增厚,角膜基质层板层纤维结构排列轻度紊乱,有炎性细胞浸润,可见少量细小新生血管;imDCs+Ad 空载体组大鼠角膜植片水肿较未修饰 imDCs 组严重,角膜上皮细胞层增厚,有少量新生血管形成,角膜基质层板层纤维结构排列紊乱程度及炎性细胞浸润程度较未修饰 imDCs 组严重;imDCs+Ad-CCR7 组大鼠角膜植片轻度水肿,角膜上皮细胞接近正常,角膜基质层板层纤维排列整齐,仅有少量炎性细胞浸润,新生血管少见(图 1,2)。

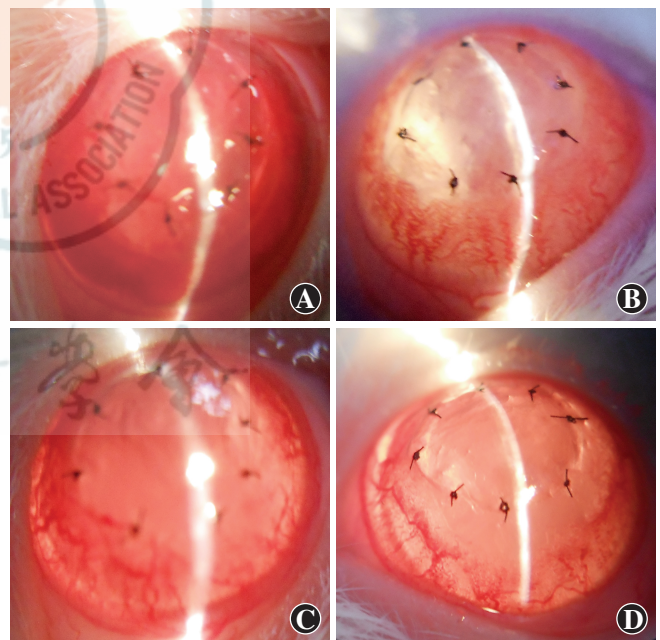


图 1 角膜移植术后 14 d 各组大鼠角膜植片裂隙灯显微镜下观察 A: PBS 组可见角膜炎症反应明显,角膜水肿、混浊,新生血管长入植片 B: 未修饰 imDCs 组角膜炎症反应较轻,中度混浊,有细小新生血管,但未长入植片 C: imDCs+Ad 空载体组角膜炎症反应较轻,植片中度水肿、混浊,可见植床上细小新生血管 D: imDCs+Ad-CCR7 组大鼠角膜透明,虹膜纹理清晰可见

2.3 各组大鼠角膜植片中 IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-10 mRNA 的相对表达

逆转录 PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR) 结果显示,PBS 组、未修饰 imDCs 组、imDCs+Ad 空载体组和 imDCs+Ad-CCR7 组间 IFN-γ、IL-2、IL-4 和 IL-1

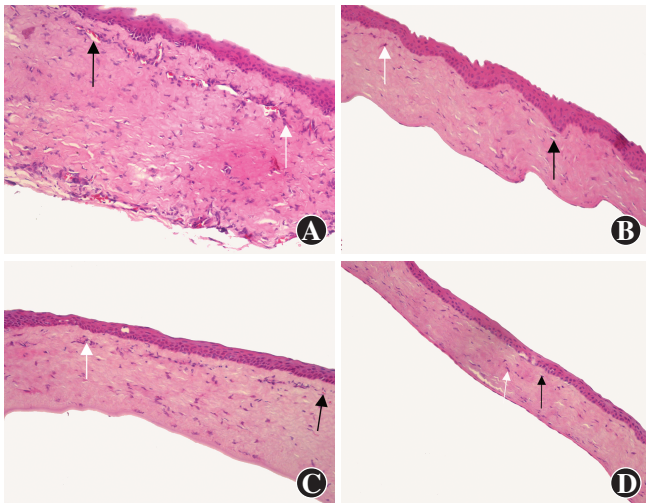


图2 角膜移植术后 14 d 各组角膜植片组织病理学观察(HE ×200) A:PBS 组角膜植片显著增厚,角膜基质层纤维排列紊乱,可见大量炎性细胞(白箭头)及粗大的新生血管(黑箭头) B:未修饰 imDCs 组大鼠植片中度水肿,角膜基质层纤维结构轻度紊乱,可见炎性细胞浸润(白箭头)及少量细小新生血管(黑箭头) C:imDCs+Ad 空载体组植片较未修饰 imDCs 组水肿严重,基质层纤维结构紊乱及炎性细胞浸润程度较未修饰 imDCs 组严重(白箭头),有少量新生血管(黑箭头) D:imDCs+Ad-CCR7 组植片轻度水肿,基质层板层纤维排列整齐,仅有少量炎性细胞浸润(白箭头)和新生血管(黑箭头)

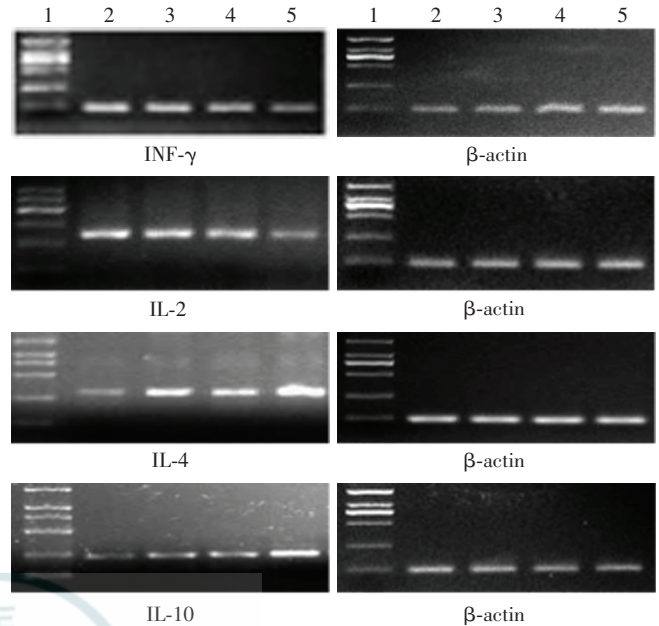


图3 角膜移植术后 14 d 各组角膜植片 IFN- γ 、IL-2、IL-4 和 IL-10 mRNA 扩增产物凝胶电泳图 1:PCR Marker 2:PBS 组角膜植片 3:未修饰 imDCs 组角膜植片 4:imDCs+Ad 空载体组角膜植片 5: imDCs+Ad-CCR7 组角膜植片 IFN- γ : γ 干扰素;IL:白细胞介素

mRNA 相对表达量的总体比较差异均有统计学意义 ($F=66.265, 161.561, 70.872, 117.436$, 均 $P=0.000$)。与 PBS 组相比,未修饰 imDCs 组 IFN- γ mRNA 和 IL-2 mRNA 相对表达量明显降低,IL-4 mRNA 和 IL-10 mRNA 相对表达量明显升高,差异均有统计学意义 ($t=-7.931, -2.315, 6.066, 2.826$, 均 $P<0.05$);imDCs+Ad 空载体组 IFN- γ mRNA 和 IL-2 mRNA 相对表达量明显降低,IL-4 mRNA 和 IL-10 mRNA 相对表达量明显升高,差异均有统计学意义 ($t=-7.812, -2.738, 6.083, 3.167$, 均 $P<0.05$);imDCs+Ad-CCR7 组 IFN- γ mRNA 和 IL-2 mRNA 相对表达量明显降低,IL-4 mRNA 和 IL-10 mRNA 相对表达量明显升高,差异均有统计学意义 ($t=-14.048, -19.498, 14.487, 17.058$, 均 $P=0.000$)。与未修饰 imDCs 组相比,imDCs+Ad-CCR7 组 IFN- γ mRNA 和 IL-2 mRNA 相对表达量明显降低,IL-4 mRNA 和 IL-10 mRNA 相对表达量明显升高,差异均有统计学意义 ($t=-6.117, -17.183, 8.421, 14.232$, 均 $P=0.000$)。与 imDCs+Ad 空载体组相比,imDCs+Ad-CCR7 组 IFN- γ mRNA 和 IL-2 mRNA 相对表达量明显降低,IL-4 mRNA 和 IL-10 mRNA 相对表达量明显升高,差异均有统计学意义 ($t=-6.236, -16.760, 8.404, 13.891$, 均 $P=0.000$)。未修饰 imDCs 组和 imDCs+Ad 空载体组间 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10 mRNA 相对表达量的比较,差异均无统计学意义 ($t=-0.119, 0.423, -0.017, -0.341$, 均 $P>0.05$) (图 3,表 2)。

表 2 术后 14 d 各组大鼠角膜植片中 IFN- γ 、IL-2、IL-4 及 IL-10 mRNA 相对表达量的比较 ($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 样本量 | IFN- γ mRNA | IL-2 mRNA | IL-4 mRNA | IL-10 mRNA |
|-----------------|-----|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| PBS 组 | 3 | 1.43±0.08 | 1.29±0.03 | 1.25±0.16 | 2.22±0.27 |
| 未修饰 imDCs 组 | 3 | 0.93±0.07 ^a | 1.16±0.07 ^a | 2.36±0.32 ^a | 3.11±0.22 ^a |
| imDCs+Ad 空载体组 | 3 | 0.94±0.06 ^a | 1.14±0.09 ^a | 2.37±0.22 ^a | 3.22±0.35 ^a |
| imDCs+Ad-CCR7 组 | 3 | 0.54±0.10 ^{bcd} | 0.22±0.07 ^{bcd} | 3.91±0.15 ^{bcd} | 7.61±0.59 ^{bcd} |
| <i>F</i> | | 66.265 | 161.561 | 70.872 | 117.436 |
| <i>P</i> | | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

注:与各自的 PBS 组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$;与各自的未修饰 imDCs 组比较,^c $P<0.01$;与各自的 imDCs+Ad 空载体组比较,^d $P<0.01$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验) IFN- γ : γ 干扰素;IL:白细胞介素;imDCs:未成熟树突状细胞;Ad:腺病毒;CCR:趋化因子受体

3 讨论

各种原因所致的角膜混浊是眼科常见的致盲眼病,角膜移植术是有效的复明手段,但穿透角膜移植术后排斥反应的发生率为 10% ~ 30%,在高危患者中排斥反应的发生率为 60% 以上,角膜移植术后免疫排斥反应的预防和治疗已成为眼科领域一个重要的研究课题^[1]。目前,临床上延长高危角膜移植植片存活时间的主要手段是使用免疫抑制剂,其疗效确切,但缺乏特异性,无法避免不良反应的发生,且停用后常再次发生免疫排斥反应,因此,诱导受体对移植物特异性免疫耐受才是解决高危角膜移植植片存活的根本方法^[13-15]。

CCR7 主要在未成熟 T 细胞、未成熟 B 细胞及 imDCs 等免疫细胞表面表达,在 DCs 迁移过程中表达

逐渐增多^[16],其通过与 CC 类趋化因子配体 21 (CC chemokine ligand 21, CCL21) 和 CCL19 结合,在趋化 DCs 从外周组织迁移至次级淋巴器官中起关键作用^[17-18]。DCs 是一类重要的专职抗原递呈细胞,对于诱导机体初始免疫应答尤为重要。不同成熟阶段的 DCs 具有不同的功能,imDCs 缺乏共刺激分子,不能提供 T 淋巴细胞活化必需的第二信号,往往导致 T 淋巴细胞无能或凋亡,诱导免疫耐受^[19-21];而成熟 DCs 表达高水平主要组织相容性复合体-II 类分子和协同刺激分子,能活化初始型 T 淋巴细胞,从而刺激免疫应答。DCs 摄取并处理周围环境中的抗原性物质,迁移至淋巴系统将抗原递呈给 T 淋巴细胞,从而发挥免疫学效应。研究发现,imDCs 中未检测到 CCR7 的表达,而成熟 DCs 细胞膜上 CCR7 表达上调^[18]。

本研究中根据 CCR7 及 imDCs 的生物学特性,将含 CCR7 基因的 Ad 转染修饰 imDCs,诱导 imDCs 表达 CCR7 蛋白,使其具有迁移特性,有规律地向淋巴结归巢,诱导机体对移植角膜产生特异性的免疫耐受而维持正常的免疫功能。

自 Th1/Th2 模式被提出至今,细胞因子与移植免疫反应的关系一直是移植领域的研究热点。根据分泌细胞因子种类的不同,Th 可分为 Th1 和 Th2 两个亚群。Th1 型细胞因子主要包括 IFN- γ 、IL-2、IL-12、IL-15 和肿瘤坏死因子- α/β ,其参与移植物抗原特异性的细胞毒性 T 细胞的活化、增生和功能性分化,诱导迟发型超敏反应,启动或加速移植排斥反应^[22-24];Th2 型细胞因子主要包括 IL-4、IL-6 和 IL-10,其可抑制 Th1 细胞分化及其细胞因子的表达,促进免疫耐受^[25-26]。Th1 和 Th2 两个亚群的动态平衡对诱导和维持免疫耐受具有重要作用^[4-5]。本研究中采用 RT-PCR 法检测角膜植片中的 Th1 型细胞因子 IFN- γ 、IL-2 和 Th2 型细胞因子 IL-4、IL-10 mRNA 表达的差异,探讨 CCR7 基因修饰的 imDCs 是否影响 Th1/Th2 型细胞因子的平衡,从而调节免疫耐受。本研究结果表明,与 PBS 组相比,未修饰 imDCs 组、imDCs+Ad 空载体组和 imDCs+Ad-CCR7 组角膜植片的平均存活时间均明显延长,其中 imDCs+Ad-CCR7 组植片存活时间最长,与未修饰 imDCs 组和 imDCs+Ad 空载体组比较差异均有统计学意义,说明 CCR7 基因修饰的 imDCs 诱导免疫耐受的能力增强,将其通过静脉输注给受体,可使其处于免疫低应答状态,延缓受体对移植物的免疫排斥,从而明显延长移植物的存活时间;imDCs 组与 imDCs+Ad 空载体组相比差异无统计学意义,表明 imDCs 转染空载体后,诱导免疫耐受的能力并未提高。通过对植片

内 Th1 和 Th2 型细胞因子的检测发现,与 PBS 组、未修饰 imDCs 组和 imDCs+Ad 空载体组相比,imDCs+Ad-CCR7 组 Th1 型细胞因子 IFN- γ 、IL-2 的表达明显降低,Th2 型细胞因子 IL-4、IL-10 的表达明显升高,提示 CCR7 基因修饰的 imDCs 可能通过影响在急性排斥反应中 Th1/Th2 型细胞因子的平衡,诱导 Th0 向 Th2 偏移,选择性激活 Th2 亚群,从而诱导免疫耐受。

本研究发现经 CCR7 基因修饰的 imDCs 虽然延长了角膜植片的存活时间,但是最终仍发生了免疫排斥,原因可能是随着 CCR7 基因修饰的 imDCs 在体内逐渐成熟,诱导免疫耐受的作用减弱。本课题组将在后续实验中深入研究,以期进一步延长植片的存活时间。

参考文献

- [1] 李凤鸣. 中华眼科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:1338-1339.
- [2] 闫峰,石尧,蔡莉. 小鼠角膜移植排斥反应中植片内细胞因子表达水平的变化[J]. 中华实验眼科杂志,2012,30(10):869-872. doi:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.10.002.
- [3] Klebe S, Sykes PJ, Coster DJ, et al. Prolongation of sheep corneal allograft survival by ex vivo transfer of the gene encoding interleukin-10 [J]. Transplantation, 2001, 71(9): 1214-1220.
- [4] Li L, Boussiotis V. Control and regulation of peripheral tolerance in allergic inflammatory disease: therapeutic consequences [J]. Chem Immunol Allergy, 2008, 94: 178-188. doi:10.1159/000155086.
- [5] Torres PF, Kijlstra A. The role of cytokines in corneal immunopathology [J]. Ocul Immunol Inflamm, 2001, 9(1): 9-24.
- [6] Zhang XG, Lü Y, Wang B, et al. Cytokine production during the inhibition of acute vascular rejection in a concordant hamster-to-rat cardiac xenotransplantation model [J]. Chin Med J (Engl), 2007, 120(2): 145-149.
- [7] Marsland BJ, Bättig P, Bauer M, et al. CCL19 and CCL21 induce a potent proinflammatory differentiation program in licensed dendritic cells [J]. Immunity, 2005, 22(4): 493-505.
- [8] Kohout TA, Nicholas SL, Perry SJ, et al. Differential desensitization, receptor phosphorylation, beta-arrestin recruitment, and ERK1/2 activation by the two endogenous ligands for the CC chemokine receptor 7 [J]. J Biol Chem, 2004, 279(22): 23214-23222. doi:10.1074/jbc.M402125200.
- [9] Yanagawa Y, Onoe K. CCL19 induces rapid dendritic extension of murine dendritic cells [J]. Blood, 2002, 100(6): 1948-1956.
- [10] Nishimura N, Nishioka Y, Shinohara T, et al. Novel centrifugal method for simple and highly efficient adenovirus-mediated green fluorescence protein gene transduction into human monocyte-derived dendritic cells [J]. J Immunol Methods, 2001, 253(1-2): 113-124. doi:10.1016/S0022-1759(01)00360-X.
- [11] Williams KA, Coster DJ. Penetrating corneal transplantation in the inbred rat: a new model [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1985, 26(1): 23-30.
- [12] 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. doi:10.1111/i.1365-2249.1997.279-cel171.x.
- [13] 奚瑾,潘志强,接英,等. CD4+CD25+调节性 T 细胞参与大鼠角膜移植免疫耐受的研究 [J]. 中华眼科杂志, 2007, 43(12): 1114-1118.
- [14] 陈志峰,王哲. 角膜新生血管生成抑制剂的研究进展 [J]. 眼科研究, 2003, 21(2): 206-208.
- [15] 张晗,肖鹤,王大江,等. 拮抗 CD4 小分子化合物 I2 抗小鼠角膜移植排斥机制的初步研究 [J]. 中华眼科杂志, 2010, 46(1): 51-55. doi:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2010.01.012.
- [16] Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cells subsets: function, generation, and maintenance [J]. Annu Rev Immunol, 2004, 22: 745-763. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702.
- [17] Randolph GJ, Angeli V, Swartz MA. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels [J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(8): 617-628. doi:10.1038/nri1670.

- [18] Pan MR, Hou MF, Chang HC, et al. Cyclooxygenase-2 up-regulates CCR7 via EP2/EP4 receptor signaling pathways to enhance lymphatic invasion of breast cancer cells [J]. J Biol Chem, 2008, 283 (17) : 11155-11163. doi:10.1074/jbc.M710038200.
- [19] Cools N, Ponsaerts P, Tendeloo VFI, et al. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells [J]. J Leukoc Biol, 2007, 82 (6) : 1365-1374. doi: 10.1189/jlb.0307166.
- [20] Ueno H, Klechevsky E, Morita R, et al. Dendritic cell subsets in health and disease [J]. Immunol Rev, 2007, 219 : 118-142. doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00551.x.
- [21] Yang DF, Qiu WH, Zhu HF, et al. CTLA4-Ig-modified dendritic cells inhibit lymphocyte-mediated alloimmune responses and prolong the islet graft survival in mice [J]. Transpl Immunol, 2008, 19 (3-4) : 197-201. doi:10.1016/j.trim.2008.05.005.
- [22] King WJ, Corner RM, Hudde T, et al. Cytokine and chemokine expression kinetics after corneal transplantation [J]. Transplantation, 2000, 70 (8) : 1225-1233.
- [23] Skurkovich S, Kasparov A, Narbut N, et al. Treatment of corneal transplant rejection in humans with anti-interferon-gamma antibodies [J]. Am J Ophthalmol, 2002, 133 (6) : 829-830.
- [24] Cunnusamy K, Chen PW, Niederkorn JY. Paradigm shifts in the role of CD4⁺ T cells in keratoplasty [J]. Discov Med, 2010, 10 (54) : 452-461.
- [25] Pirenne J, Kitade H, Kawai M, et al. Regulatory cells, TH1/TH2 unbalance, and antibody-induced chronic rejection in operational tolerance induced by donor-specific blood transfusion [J]. Transplantation, 2005, 79 (3) : S25-S27.
- [26] Maier P, Heizmann U, Bohringer D, et al. Distinct cytokine pattern in aqueous humor during immune reactions following penetrating keratoplasty [J]. Mol Vis, 2010, 16 : 53-60.

(收稿日期:2015-04-28)

(本文编辑:刘艳 张宇)

· 病例报告 ·

慢性 CSC 合并 PCV 一例诊疗结果及其分析

陈中山 宋艳萍

患者,女,56岁,2014年12月10日因左眼视力下降及视物变形3d就诊。患者自诉10年前左眼曾因相似症状诊断为中心性浆液性脉络膜视网膜病变(central serous chorioretinopathy, CSC),无其他全身及眼病史。眼科检查:右眼最佳矫正视力(best corrected visual acuity, BCVA)1.0,左眼0.1,指测眼压正常,双眼眼前节裂隙灯生物显微镜检查未发现异常;彩色眼底照相、荧光素眼底血管造影(fundus fluorescein angiography, FFA)、吲哚菁绿血管造影(indocyanine green angiography, ICGA)检查均可见视网膜后极部荧光遮蔽,黄斑颞上方息肉状高荧光,OCT检查可见视网膜色素上皮明显隆起,呈反射暗区(图1)。右眼黄斑区未见异常,颞上血管弓外点状荧光素渗漏,晚期渗漏点扩大,此处OCT扫描显示神经上皮下低反射暗区(图2)。根据患者的临床特征、眼底表现和影像学检查结果,诊断:左眼息肉样脉络膜血管病变(polypoidal choroidal vasculopathy, PCV);双眼慢性CSC。针对左眼的PCV,可选择抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)治疗、光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)、抗VEGF联合PDT、保守治疗4种治疗方案。患者选择保守治疗,给予卵磷脂络合碘片口服,每次2片,每日3次。随访过程中患者左眼视力继续下降,治疗后2周时为手动/眼前,治疗后3周复查玻璃体腔积血未见明显吸收,于2015年1月6日行雷珠单抗玻璃体腔注射(0.5 mg/0.05 ml),注射后1个月后患者视力无改善。于2015年2月10日行玻璃体切割术,清除玻璃体积血,术中未行气体或硅油填充,术后第2天视力为0.02。术后1个月复诊,BCVA为0.08,眼底检查结果见图3。随后每月玻璃体腔注射雷珠单抗1次,连续3个月,末次注射时间为2015年5月12日,末次随访时间为2015年6月9日,BCVA为0.1,OCT显示视网膜色素上皮下降起度下降(图4)。

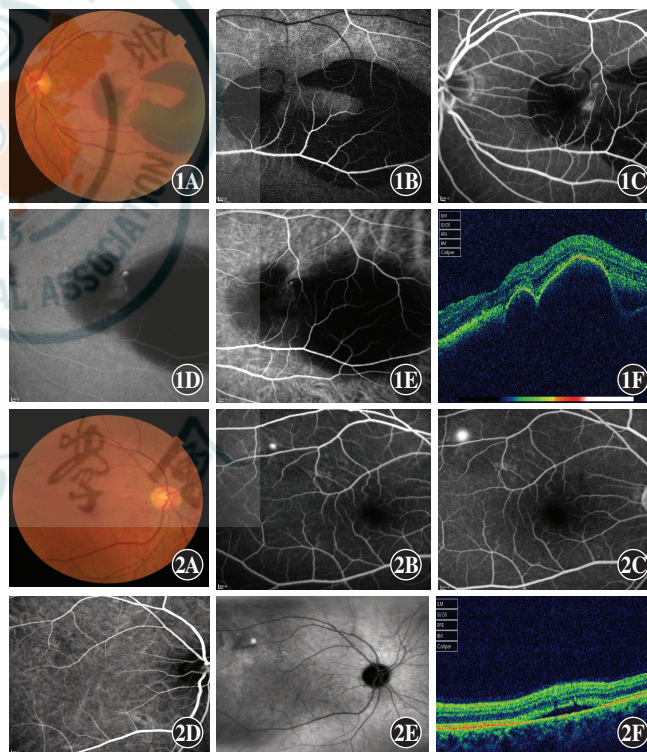


图1 患者就诊时左眼检查结果 A:彩色眼底照相可见后极部大片状视网膜下出血 B:FFA检查可见视网膜后极部遮蔽荧光 C:FFA晚期可见后极部点片状高荧光 D:ICGA早期可见后极部片状荧光遮蔽,颞上方有点状高荧光 E:ICGA晚期可见颞上方息肉状高荧光 F:OCT可见视网膜色素上皮隆起,呈反射暗区 图2 患者就诊时右眼检查结果 A:右眼彩色眼底照相可见黄斑区视网膜正常 B:FFA早期可见后极部上方点状高荧光 C:FFA晚期可见点状高荧光面积扩大 D:ICGA早期可见后极部上方片状脉络膜血管高荧光区 E:ICGA晚期可见后极部上方点状高荧光 F:OCT可见视网膜神经上皮与视网膜色素上皮脱离,呈反射暗区

讨论:本例是一曾经有类似病变发作的患者,其左眼PCV是否与曾患慢性CSC有关?对于没有明显息肉状病灶或脉络

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.10.009

作者单位:430070 武汉,广州军区武汉总医院 全军眼科中心

通信作者:陈中山,Email:czs1112@163.com