

· 实验研究 ·

结膜下注射间充质干细胞对大鼠角膜移植物生存的影响

李斐 张琰 茹玉莎 刘会娟 赵少贞

【摘要】 背景 间充质干细胞(MSCs)已用于多种器官移植抗排斥反应的基础和临床研究。我们先前的研究表明,鼠尾静脉注射 MSCs 可延长大鼠角膜植片的存活时间,但治疗时 MSCs 的需求量较大且存在一定的全身不良反应。眼局部应用 MSCs 是否能够替代角膜移植排斥反应的全身治疗尚不清楚。目的 探讨结膜下注射骨髓 MSCs 对大鼠角膜移植排斥反应的作用。方法 从清洁级 Wistar 大鼠股骨和胫骨骨髓中分离获得 MSCs 进行培养和传代,以体外成骨细胞分化和脂肪细胞分化法进行鉴定,取第 3 代 MSCs 用于实验。将 20 只 Wistar 大鼠双眼角膜作为角膜供体植片,40 只 Lewis 大鼠右眼作为受体植床,行同种异体穿透角膜移植术。应用随机数字表法将 40 只受体大鼠分为 PBS 对照组和 MSCs 治疗组,另取 6 只正常 Lewis 大鼠作为正常对照组。MSCs 治疗组大鼠分别于角膜移植术后即刻和第 3 天结膜下注射含 2×10^6 MSCs 的 PBS 0.1 ml, PBS 对照组大鼠以同样的方法仅给予等容积 PBS。各组大鼠术后每天裂隙灯显微镜下观察角膜植片的混浊、水肿和新生血管情况,并按角膜植片排斥反应标准进行评分。于术后第 10 天分别处死 PBS 对照组和 MSCs 治疗组各 12 只大鼠,取出术眼角膜组织,采用实时荧光定量 PCR 法检测 Th1 细胞相关炎症因子 γ 干扰素(IFN- γ) mRNA 和白细胞介素-2(IL-2) mRNA 及 Th2 细胞相关炎症因子 IL-4 mRNA 和 IL-10 mRNA 在角膜中的相对表达量;采用 ELISA 法检测角膜组织中 Th2 细胞相关因子 IL-4 和 IL-10 蛋白的质量浓度。结果 培养的细胞生长良好,成骨细胞分化的细胞茜素红染色呈橘黄色,脂肪细胞分化的细胞油红 O 染色呈红色,证实为 MSCs。角膜移植术后 MSCs 治疗组角膜植片存活时间为 (11.8 ± 1.6) d,长于 PBS 对照组的 (9.6 ± 1.4) d,差异有统计学意义($P=0.004$);MSCs 治疗组大鼠角膜植片中 IFN- γ mRNA、IL-2 mRNA 的相对表达量较 PBS 对照组下降,但 2 个组间差异均无统计学意义(均 $P>0.05$),但 IL-4 mRNA 和 IL-10 mRNA 相对表达量明显高于 PBS 对照组,差异均有统计学意义(均 $P=0.00$)。正常对照组、PBS 对照组和 MSCs 治疗组大鼠角膜植片中 IL-10 蛋白质量浓度分别为 (22.74 ± 7.06) 、 (68.40 ± 12.83) 和 (215.41 ± 44.66) pg/ml,3 个组间总体比较差异有统计学意义($F=55.06, P=0.00$),且 MSCs 治疗组大鼠植片中 IL-10 蛋白质量浓度明显高于 PBS 对照组及正常对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。结论 结膜下注射 MSCs 可以延长大鼠异体穿透角膜移植术后植片的存活时间,这一作用可能是通过调节 Th1/Th2 平衡,特别是上调 Th2 细胞因子而介导的。

【关键词】 间充质干细胞移植;角膜移植;移植物存活/免疫;T 淋巴细胞; γ 干扰素;白细胞介素;Lewis 大鼠

Effect of subconjunctival injection of mesenchymal stem cells on corneal allograft survival Li Fei, Zhang Yan, Ru Yusha, Liu Huijuan, Zhao Shaozhen. Tianjin Medical University Eye Hospital & Eye Institute, Tianjin 300384, China

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

【Abstract】 **Background** Mesenchymal stem cells (MSCs) have been applied in basic and clinical researches of organ transplantation. Our previous study showed that intravenous injection of MSCs prolonged corneal allograft survival in rat. However, the effect of local administration of MSCs on corneal allograft rejection remains unclear. **Objective** The aim of this study was to investigate the effect of subconjunctival injection of MSCs on

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.05.011

基金项目:国家自然科学基金项目(81270975)

作者单位:300384 天津医科大学眼科医院 & 眼科研究所

通信作者:赵少贞, Email: zhaosz1997@sina.com

corneal allograft rejection in rat model of keratoplasty. **Methods** MSCs were isolated and cultured from femur and tibia bone marrow of clean Wistar rats, and then the cells were identified by induced differentiation of osteoblast and adipocyte. The third generation of MSCs was used in subsequent experiment. Allogenic penetrating keratoplasty was performed with the bilateral corneas of 20 Wistar rats as donor grafts and the right eyes of 40 Lewis rats as recipients. PBS 0.1 ml containing 2×10^6 MSCs and 0.1 ml PBS only was subconjunctivally injected immediately and postoperative 3 days respectively in randomized two groups, and another 6 normal Lewis rats served as the normal control group. Corneal rejection response was evaluated under the slit lamp after surgery based corneal opacity, edema and neovascularization, and the grafts were scored according to the criteria of Larkin. The corneal samples were extracted from 12 rats of the PBS control group and the MSCs group separately 10 days after surgery. The relative expressions of Th1 cytokines (interferon- γ [IFN- γ] mRNA and interleukin-2 [IL-2] mRNA) and Th2 cytokines (IL-4 mRNA and IL-10 mRNA) were detected by real-time quantitative PCR. Protein levels of IL-4 and IL-10 proteins in the corneas were assayed by ELISA. All experimental protocols involving rats were approved by the laboratory animal care and use committee of the Tianjin Medical University and treated with the ARVO statement for the use of animals in ophthalmic and vision research. **Results** The cells grew well with the orange stain for alizarin red in differentiated the osteoblasts and red stain for Oil red O in differentiated adipocytes. The survival time of corneal graft in the MSCs group was (11.8 ± 1.6) days, it was significantly longer than (9.6 ± 1.4) days in the PBS control group ($P=0.004$). The levels of IL-4 mRNA and IL-10 mRNA in the MSCs group were significantly higher than those in the PBS control group (both at $P=0.00$); while the levels of IFN- γ mRNA and IL-2 mRNA were not significantly different between the groups (both at $P>0.05$). The IL-10 protein contents were (22.74 ± 7.06) , (68.40 ± 12.83) and (215.41 ± 44.66) pg/ml in the normal control group, PBS control group and MSCs group, showing significant difference among the three groups ($F=55.06, P=0.00$) and a significant increase in the MSCs group compared with the PBS control group and the normal control group (both at $P<0.05$). **Conclusions** Subconjunctival injection of MSCs prolongs the survival time of cornea allograft in penetrating keratoplasty probably by modulating the balance between Th1 and Th2 cytokines, especially by up-regulating Th2 cytokines.

[Key words] Mesenchymal stem cell transplantation; Corneal transplantation; Graft survival/immunology; T-lymphocytes; Interferon-gamma; Interleukin; Rats, Lewis

角膜移植是许多不可逆角膜损伤及某些先天性角膜病变患者脱盲的主要治疗途径,低危角膜移植术后 5 年的存活率可达到 90%^[1],但角膜移植排斥反应仍然是影响植片长期存活及高危角膜移植失败的主要因素。近年来发现,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种多能干细胞,具有低免疫原性、多向诱导分化、促进组织修复的特性^[2],且 MSCs 诱导免疫耐受的特性已得到证实,已用于肝脏、心脏、肾脏、胰腺等多种器官移植的抗排斥反应^[3-4],取得了较理想的效果,但目前 MSCs 对角膜移植排斥作用的研究尚少。我们前期的研究证实,大鼠角膜移植术后静脉注射 MSCs 可抑制角膜移植排斥反应的发生,延长角膜植片的存活时间^[5],但静脉注射 MSCs 需要大量的细胞,而且全身应用 MSCs 产生不良反应的可能性增大。本实验拟研究局部结膜下注射 MSCs 对角膜移植排斥反应的作用,并检测角膜植片中辅助 T 细胞 1 (T helper cell 1, Th1)、Th2 细胞因子的表达,探讨 MSCs 对同种异体大鼠角膜移植排斥反应的免疫调节作用机制,为 MSCs 治疗角膜移植排斥反应探索

新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康清洁级雌性 Wistar 大鼠 20 只,体质量为 200 ~ 250 g,双眼角膜作为移植供体植片。健康清洁级雌性 Lewis 大鼠 40 只,体质量为 200 ~ 250 g,右眼作为移植受体植床。大鼠均购于北京维通利华实验动物技术有限公司。应用随机数字表法将 40 只受体大鼠随机分为 PBS 对照组和 MSCs 治疗组,另取 6 只正常 Lewis 大鼠作为正常对照组。所有实验动物的饲养、使用均经天津医科大学动物伦理委员会的批准(文件号 SYXK 2009-0001),并严格按照视觉与眼科学研究协会关于眼科与视觉研究中动物使用的管理规定执行。

1.1.2 主要试剂 Trizol 溶液、逆转录试剂盒(美国 Thermo 公司);实时 PCR 引物(北京六合华大基因科技股份有限公司);组织蛋白抽提试剂、BCA 蛋白定量试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司);ELISA 试

剂盒(美国 R&D Systems 公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠骨髓 MSCs 的培养及其诱导分化能力的鉴定

无菌条件下取出 100~120 g 的幼年雄性 Wistar 大鼠双侧股骨和胫骨,除去肌肉、筋膜组织,剪开两端骨髓腔,用 DMEM-F12 培养液反复冲洗骨髓腔以收集骨髓细胞。将骨髓细胞接种至含体积分数 10% 胎牛血清、体积分数 1% 双抗(青霉素、链霉素)和质量分数 1% 谷氨酰胺的 DMEM-F12 完全培养液的培养瓶内,在 37℃、体积分数 5% CO₂、饱和湿度的孵箱内进行培养。72 h 后首次更换培养液,去除未贴壁细胞,以后每 2~3 天换液 1 次。待原代细胞生长至 90% 融合时以 1:2 或 1:3 的比例传代,第 3 代细胞用于后续实验。取生长状态良好的第 3 代细胞进行诱导分化能力的鉴定,包括成骨细胞分化和脂肪细胞分化。

(1) 成骨细胞诱导分化能力的鉴定

将 MSCs 接种于 6 孔板中,密度为 2×10^4 /孔,24 h 后待细胞贴壁,加入成骨细胞诱导液(β -甘油磷酸钠 10 mmol/L + 地塞米松 1×10^{-8} mol/L + 抗坏血酸 50 mg/L),每 3 天换液 1 次。诱导 21 d,使用茜素红行钙化结节染色。

(2) 成脂分化能力的鉴定

将 MSCs 接种于 6 孔板中,密度为 2×10^5 /孔,待细胞达 70%~80% 融合后,加入脂肪分化诱导液(1 μ mol/L 地塞米松 + 10 μ mol/L 重组牛胰岛素 + 0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 + 200 μ mol/L 吲哚美辛),诱导 3 d 后换液,加入脂肪分化维持液(含 10 μ mol/L 重组牛胰岛素的完全培养液)培养 1 d,如此循环,诱导至第 14 天观察脂滴形成情况,行油红 O 染色,检测细胞成脂情况。

1.2.2 大鼠角膜移植模型的建立及分组

参照文献[6]的方法建立大鼠同种异体穿透角膜移植模型。大鼠腹腔内注射体积分数 10% 水合氯醛 3 ml/kg 行全身麻醉,术前充分扩瞳,对术眼行表面麻醉;手术显微镜下以直径 3.5 mm 环钻在 Wistar 大鼠角膜中央钻取角膜植片备用,再用直径 3 mm 环钻在 Lewis 大鼠右眼角膜中央钻取角膜片以制备植床,将供体角膜植片植入到植床上,以 10-0 尼龙缝线间断缝合 8 针,线结不埋藏,术毕前房内注入小气泡,形成前房。MSCs 治疗组分别于手术结束时和术后第 3 天结膜下注射含 2×10^6 MSCs 的 PBS 0.1 ml, PBS 对照组注射等容积 PBS。每次注射后,结膜囊内涂红霉素眼膏预防感染。

1.2.3 裂隙灯显微镜下观察植片的排斥情况

自术后第 1 天起,每天在裂隙灯显微镜下观察受体大鼠角膜植片,以植片混浊、水肿和新生血管作为评分的指标,参照 Larkin 等^[7]的评分标准,3 项指标评分之和即

为当日的排斥反应指数(rejection index, RI)。RI ≥ 5 或者植片混浊评分达到 3 分为免疫排斥反应发生,记录角膜植片存活时间。角膜植片感染或发生前房出血、虹膜前粘连、白内障等并发症的大鼠被剔除,并及时补充相应数量的大鼠。

1.2.4 实时定量 PCR 法检测大鼠角膜中 Th1、Th2 细胞相关因子的基因表达

于角膜移植术后第 10 天颈椎脱臼法处死大鼠,立即拆除缝线,沿角膜缘环形剪下角膜,迅速置于无 RNA 酶的 EP 管中,在液氮中快速冻结后,置于 -80℃ 冰箱冷冻保存。将 1 ml Trizol 液加入玻璃匀浆器中,每个玻璃匀浆器中放入 1 个角膜植片,提取总 RNA,并采用逆转录试剂盒逆转录合成 cDNA 模板,反应体系为 20 μ l,以 GAPDH 作为内参照进行实时 PCR 扩增。目的基因包括 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)、IL-4 和 IL-10。IFN- γ 上游引物为 5'-CACGCCCGCTCTTGGT-3',下游引物为 5'-GAGTGTGCCTTGGCAGTAACAG-3'; IL-2 上游引物为 5'-GCATGCAGCTCGCATCCT-3',下游引物为 5'-TTGAAGTGGGTGCGCTGT-3'; IL-4 上游引物为 5'-AGGGTGTTCGCAAATTTACT-3',下游引物为 5'-CCGAGAACCCAGACTTGTTTC-3'; IL-10: 上游引物为 5'-CCCTGGGAGAGAAGCTGAAGA-3',下游引物为 5'-CACTGCCTTGCTTTTATTCTCACA-3'。GAPDH 上游引物为 5'-ACAAGGCTGCCCCGACTAC-3',下游引物为 5'-ACAAGGCTGCCCCGACTAC-3'。实时 PCR 反应体系为 10.0 μ l,包括 cDNA 模板 3.0 μ l,上下游引物各 0.3 μ l,2 倍 FastStart Universal SYBR Green Master Mix 5.0 μ l;PCR 扩增条件:50℃ 孵育 2 min,95℃ 变性 10 min,然后 95℃ 变性 15 s,60℃ 退火和延伸 1 min,共 40 个循环。将目的基因相应反应的 Ct 值用内参标准化处理,得到相应的 Δ Ct 值(Δ Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{GAPDH}),再根据公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因的相对表达量。

1.2.5 ELISA 法检测大鼠角膜中细胞因子 IL-4、IL-10 蛋白变化

角膜移植术后第 10 天,每组选取 6 只大鼠,如 1.2.4 方法获取角膜组织,用组织蛋白抽提试剂盒提取角膜组织中的总蛋白。采用 ELISA 试剂盒检测角膜中 IL-4、IL-10 蛋白质量浓度(μ g/ μ l),按试剂盒说明书进行,在酶标仪上读取 450 nm 处的吸光度(A)值,并用 A₅₄₀ 值进行校正,绘制标准曲线,得到公式后计算 IL-4、IL-10 在角膜植片中的蛋白质量浓度(pg/ml)。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件(美国 IBM SPSS 公

司,美国纽约州阿蒙克市)进行统计分析,本研究测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数经 Bartlett 检验证实方差齐(均 $P > 0.05$)。MSCs 治疗组和 PBS 对照组植片平均存活时间采用 log-rank 生存曲线进行比较。采用随机分组单因素干预三水平实验设计,正常对照组、MSCs 治疗组和 PBS 对照组大鼠角膜植片中 Th1 和 Th2 细胞相关炎症因子 mRNA 及其蛋白表达的总差异比较均采用单因素方差分析,组间多重比较采用 Bonferroni 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 大鼠骨髓 MSCs 的培养及诱导分化

刚分离的原代细胞呈圆形,24 h 后可见大量贴壁细胞,呈三角形或短棒状;培养 3 ~ 5 d 后,贴壁细胞增加,呈短梭状,可见分散的细胞集落;6 ~ 7 d 集落增大,周围细胞呈放射状生长,多呈梭形。培养 9 ~ 10 d 时可见细胞集落增大、增多,彼此相连,细胞排列呈漩涡状。培养 12 d 左右贴壁细胞接近 90% 融合。体外成骨细胞分化和脂肪细胞分化诱导成功(图 1)。

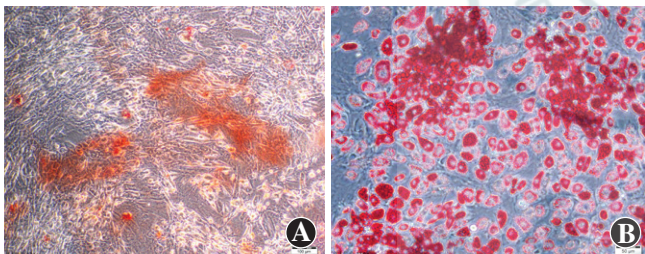


图 1 大鼠骨髓 MSCs 的诱导分化的鉴定 A: 光学显微镜下可见培养细胞向成骨细胞分化,呈橘红色染色(茜素红 $\times 100$) B: 光学显微镜下可见培养细胞向脂肪细胞分化,呈红色染色(油红 O $\times 200$)

2.2 角膜移植术后植片反应

大鼠角膜移植术后裂隙灯显微镜下观察,PBS 对照组术后 1 ~ 2 d 角膜植片轻度混浊,为手术应激所致;术后 2 ~ 4 d 角膜植片透明,轻度水肿,角膜缘新生血管开始向中央生长;术后 6 ~ 8 d 血管生长至植片周边部,植片水肿、混浊加重,瞳孔窥不清;术眼术后平均 9 ~ 10 d 时植片均发生排斥反应。MSCs 治疗组术后 1 ~ 2 d 角膜轻度混浊;术后 2 ~ 4 d 角膜植片透明,仅见角膜缘部分象限新生血管开始生长;术后 6 ~ 8 d 角膜植片轻度水肿、混浊,但较 PBS 对照组术眼透明,瞳孔和虹膜血管仍清晰可辨,新生血管未达角膜边缘;术后 9 ~ 10 d 新生血管生长至植片周边部,角膜植片水肿加重,隐约可见瞳孔;术后 11 ~ 13 d 出现排斥反应(图 2)。

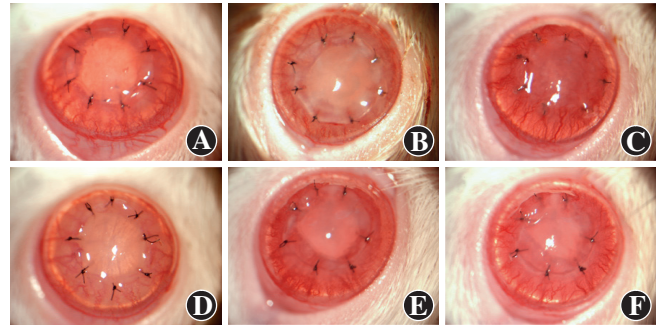


图 2 PBS 对照组和 MSCs 治疗组术后裂隙灯显微镜下植片排斥反应情况 A: PBS 对照组术后 3 d 植片透明 B: PBS 对照组术后 7 d 植片明显水肿、混浊 C: PBS 对照组术后 10 d 植片重度水肿、混浊,瞳孔不可见,可见新生血管长入 D: MSCs 治疗组术后 3 d 植片透明 E: MSCs 治疗组术后 7 d 植片混浊情况轻于同期 PBS 对照组 F: MSCs 治疗组术后 10 d 角膜明显水肿,但可窥见虹膜,可见植片周围的新生血管,但少于同期 PBS 对照组

2.3 MSCs 治疗组和 PBS 对照组大鼠角膜植片存活情况比较

Kaplan-Meier 生存分析表明,PBS 对照组大鼠术后发生植片免疫排斥反应的时间平均为 (9.6 ± 1.4) d, MSCs 治疗组为 (11.8 ± 1.6) d, MSCs 治疗组角膜移植植片存活时间显著长于 PBS 对照组,差异有统计学意义 ($P = 0.004$)。MSCs 治疗组角膜移植植片的中位存活时间延长,2 个组间角膜植片生存曲线/生存率的差异有统计学意义 ($\chi^2 = 8.352, P < 0.01$) (图 3)。

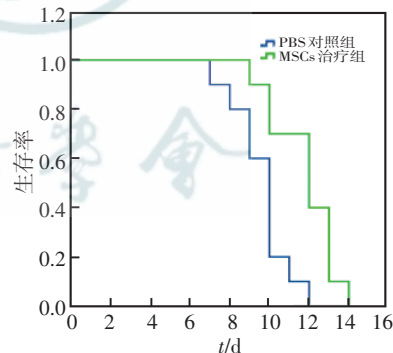


图 3 MSCs 治疗组与 PBS 对照组角膜植片生存曲线比较 MSCs 治疗组角膜植片存活时间较 PBS 对照组延长(log-rank 检验) MSCs: 间充质干细胞

2.4 各组大鼠角膜组织中 Th1、Th2 细胞相关因子 mRNA 的相对表达

术后第 10 天,PBS 对照组和 MSCs 治疗组大鼠角膜组织中 IFN- γ 、IL-2、IL-4 和 IL-10 mRNA 的相对表达量均较正常对照组显著增高,3 个组间的总体差异均有统计学意义 (IL-2: $F = 120.23, P < 0.05$; IL-4: $F = 172.60, P < 0.05$; IL-10: $F = 137.71, P < 0.05$)。MSCs 治疗组大鼠角膜植片中 IL-4 mRNA 和 IL-10 mRNA 的相对表达量均显著高于 PBS 对照组,差异均有统计学意义(均 $P = 0.00$)。MSCs 治疗组 Th1 细胞分泌因子 IFN- γ mRNA、IL-2 mRNA 的相对表达量均较 PBS 对照

组减少,但差异均无统计学意义(均 $P>0.05$) (表 1)。

表 1 3 个组大鼠角膜中各免疫炎症因子 mRNA 表达量的比较 ($\bar{x}\pm s, 2^{-\Delta\Delta Ct}$)

组别	样本量	IFN- γ mRNA [#]	IL-2 mRNA [*]	IL-4 mRNA [*]	IL-10 mRNA [*]
正常对照组	6	0.00	0.80 \pm 0.13	0.54 \pm 0.16	1.54 \pm 0.43
PBS 对照组	6	883.33 \pm 155.55	60.70 \pm 9.69 ^a	4.51 \pm 0.87 ^a	392.14 \pm 103.83 ^a
MSCs 治疗组	6	730.83 \pm 94.51	55.33 \pm 8.40 ^a	8.41 \pm 1.56 ^{ab}	880.90 \pm 181.68 ^{ab}
t/F		2.05	120.23	172.60	137.71
P		0.07	0.00	0.00	0.00

注:与各自的正常对照组比较,^a $P<0.01$;与各自的 PBS 对照组比较,^b $P<0.01$ (单因素方差分析, Bonferroni 检验) #:独立样本 t 检验; *:单因素方差分析; IFN- γ : γ 干扰素; IL: 白细胞介素; MSCs: 间充质干细胞

2.5 角膜组织中细胞因子 IL-4、IL-10 蛋白质量浓度的比较

移植术后 10 d, 正常对照组、PBS 对照组和 MSCs 治疗组角膜组织中 IL-10 蛋白质量浓度分别为 (22.74 \pm 7.06)、(68.40 \pm 12.83) 和 (215.41 \pm 44.66) pg/ml, 3 个组间总体比较差异有统计学意义 ($F=55.06, P=0.00$), 其中 MSCs 治疗组 IL-10 蛋白质量浓度明显高于 PBS 对照组及正常对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$) (图 4)。正常对照组、PBS 对照组和 MSCs 治疗组角膜组织中 IL-4 的蛋白质量浓度分别为 (11.84 \pm 0.96)、(36.18 \pm 5.24) 和 (39.14 \pm 6.69) pg/ml, 3 个组间总体比较差异有统计学意义 ($F=36.82, P=0.00$), 但 MSCs 治疗组和 PBS 对照组间差异无统计学意义 ($P=0.42$)。

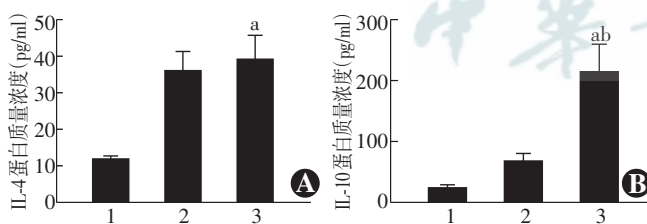


图 4 各组大鼠角膜组织中 IL-4 及 IL-10 蛋白表达量比较 A: 大鼠角膜组织中 IL-4 蛋白表达 $F=36.82, P=0.00$. 与正常对照组比较, ^a $P<0.01$ (单因素方差分析, Bonferroni 检验, $n=6$) B: 大鼠角膜组织中 IL-10 蛋白表达 $F=52.19, P=0.00$. 与正常对照组比较, ^a $P<0.01$; 与 PBS 对照组比较, ^b $P<0.05$ (单因素方差分析, Bonferroni 检验, $n=6$) 1: 正常对照组 2: PBS 对照组 3: MSCs 治疗组 IL: 白细胞介素

3 讨论

MSCs 广泛存在于全身多种组织和器官中, 呈低免疫原性, 具有自我更新和多向分化的潜能, 易于体外分离、培养和扩增^[2], 具有免疫调节作用。体外实验证实, MSCs 可以抑制多种免疫细胞的增生并调控其功

能, 如 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、自然杀伤细胞 (natural killer cells, NK)^[8-9]。此外, MSCs 还可以通过改变抗原呈递细胞的活性而干扰其分化、增生、成熟及功能, 从而间接调控免疫细胞。MSCs 主要通过靶细胞接触或分泌可溶性细胞因子而发挥免疫调节及抗炎作用^[8,10], 因此可调控同种异体免疫反应, 有效诱导免疫耐受, 并在器官移植过程中发挥移植排斥反应抑制作用, 延长移植物的存活时间^[3]。我们前期的研究证实, 大鼠角膜移植术后静脉注射供体来源的 MSCs 可以抑制 T 细胞的免疫应答, 改变 Th1/Th2 的应答平衡和上调调节性 T 细胞, 从而抑制角膜移植的排斥反应, 一定程度上延长角膜植片的存活时间。此外, 我们还应用了抗排斥药物环孢素 A (cyclosporine A, CsA) 作为对照, 证实 MSCs 联合 CsA 可降低 CsA 的使用剂量和不良反应^[5]。鉴于角膜移植用药途径的特殊性, 本实验中进一步研究 MSCs 结膜下注射对大鼠角膜移植排斥反应的影响。Yao 等^[11]报道, 分别于角膜碱烧伤动物模型建立后当天及造模后第 3 天 2 次结膜下注射含 2×10^6 MSCs 的 PBS 0.1 ml 后, 至造模后第 7 天仍可在结膜下观察到大量存活的 MSCs, 本研究根据该研究方法和结果选取等容积的 MSCs 进行结膜下注射, 结果显示结膜下注射 MSCs 可延长角膜植片的存活时间。

角膜移植具有独特的免疫赦免特性^[12], 角膜移植排斥反应的免疫机制复杂, 角膜移植术后宿主启动天然免疫反应和获得性免疫反应, 后者主要由 CD4⁺ T 淋巴细胞 (Th1、Th2 细胞) 及其分泌的细胞因子所介导^[13]。Th1 细胞主要分泌促炎因子 IFN- γ 和 IL-2, 介导细胞免疫应答, 可诱发迟发型超敏反应性炎症; Th2 细胞通过分泌 IL-4、IL-10、IL-13 等细胞因子而介导体液免疫应答, 促进 B 细胞活化并调节 Th1 细胞分泌因子的水平, 诱导免疫耐受。研究表明, Th1 和 Th2 细胞因子具有交叉调节作用, MSCs 可使免疫反应由 Th1 向 Th2 偏离, 诱导免疫耐受, 延缓排斥反应的发生^[14-15]。为了进一步探讨局部注射 MSCs 对角膜移植排斥反应的免疫调控作用, 本研究对角膜植片进行检测, 发现角膜移植术后 10 d PBS 对照组角膜植片发生排斥反应, 而 MSCs 治疗组角膜植片的炎症反应轻于 PBS 对照组提示, 局部注射 MSCs 可延缓角膜植片免疫排斥的发生。本研究还发现 MSCs 治疗组角膜植片中 Th2 相关因子, 即 IL-4 和 IL-10 mRNA 表达水平较 PBS 对照组上调, 而 Th1 相关因子, 即 IFN- γ 和 IL-2 mRNA 的相对表达量较 PBS 对照组降低, 说明局部应用 MSCs 对同种异体角膜移植免疫耐受的调控作用以上调 Th2 细胞

因子为主,使 Th1/Th2 平衡向 Th2 免疫应答偏移,而 Th1 相关因子降低不显著可能是由于 MSCs 治疗组的角膜植片也发生排斥反应,相关的炎性因子开始增加所致。另外,ELISA 结果显示,在这一时间点 MSCs 治疗组角膜植片中 IL-10 蛋白的表达量明显高于 PBS 对照组,而 IL-4 蛋白的表达量较低,且两个组间差异不明显,提示 MSCs 对 Th2 细胞因子 IL-10 的调控作用更为明显。

本研究的结果揭示了局部应用 MSCs 对大鼠角膜移植排斥反应的免疫调节作用,但其对角膜植片存活的促进作用和效果并不十分显著,其原因可能是:(1)单独应用 MSCs 在角膜移植的特殊微环境中发挥的免疫调节作用相对微弱。研究表明,MSCs 与小剂量的免疫调节剂联合应用可以发挥协同作用,能更有效地抑制移植排斥反应^[16-17],并降低大剂量免疫调节剂所带来的毒性作用和不良反应。(2)角膜移植排斥反应机制复杂,局部抑制免疫反应作用有限,并不能完全替代全身治疗,多作为全身抗排斥反应的辅助手段。(3)MSCs 发挥免疫调节作用具有时间和剂量依赖性^[3,18],MSCs 局部应用治疗角膜移植排斥反应的时间、剂量及给药方式还需进一步探讨。这更提示我们可通过 MSCs 联合小剂量的免疫抑制药物,加强 MSCs 在体内调控角膜移植免疫耐受的作用,从而延长角膜植片存活时间;或通过 *IL-10* 基因转导 MSCs 的方式验证 MSCs 参与角膜移植排斥反应的免疫调控机制。

参考文献

- [1] Kuchle M, Cursiefen C, Nguyen NX, et al. Risk factors for corneal allograft rejection: intermediate results of a prospective normal-risk keratoplasty study [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2002, 240(7):580-584. doi:10.1007/s00417-002-0496-5.
- [2] English K, Mahon BP, Wood KJ. Mesenchymal stromal cells role in tissue repair, drug discovery and immune modulation [J]. Curr Drug Deliv, 2014, 11(5):561-571. doi:10.2174/1567201810999131125222440.
- [3] Crop M, Baan C, Weimar W, et al. Potential of mesenchymal stem cells as immune therapy in solid-organ transplantation [J]. Transpl Int, 2009, 22(4):365-376. doi:10.1111/j.1432-2277.2008.00786.x.
- [4] Yi T, Song SU. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications [J]. Arch Pharm Res, 2012, 35(2):213-221. doi:10.1007/s12272-012-0202-z.
- [5] 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.
- [6] Reis A, Megahed M, Reinhard T, et al. Synergism of RAD and cyclosporin A in prevention of acute rat corneal allograft rejection [J]. Cornea, 2002, 21(1):81-84.
- [7] 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.
- [8] De Miguel MP, Fuentes-Julian S, Blazquez-Martinez A, et al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications [J]. Curr Mol Med, 2012, 12(5):574-591. doi:10.2174/156652412800619950.
- [9] Abumaree M, Al JM, Pace RA, et al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells [J]. Stem Cell Rev, 2012, 8(2):375-392. doi:10.1007/s12015-011-9312-0.
- [10] Bassi EJ, de Almeida DC, Moraes-Vieira PM, et al. Exploring the role of soluble factors associated with immune regulatory properties of mesenchymal stem cells [J]. Stem Cell Rev, 2012, 8(2):329-342. doi:10.1007/s12015-011-9311-1.
- [11] Yao L, Li ZR, Su WR, et al. Role of mesenchymal stem cells on cornea wound healing induced by acute alkali burn [J/OL]. PLoS One, 2012, 7(2):e30842 [2014-10-25]. http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0030842. doi:10.1371/journal.pone.0030842.
- [12] Niederkorn JY, Larkin DF. Immune privilege of corneal allografts [J]. Ocul Immunol Inflamm, 2010, 18(3):162-171. doi:10.3109/09273948.2010.486100.
- [13] 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.
- [14] Ge W, Jiang J, Arp J, et al. Regulatory T-cell generation and kidney allograft tolerance induced by mesenchymal stem cells associated with indoleamine 2,3-dioxygenase expression [J]. Transplantation, 2010, 90(12):1312-1320. doi:10.1097/TP.0b013e3181fed001.
- [15] Huang H, He J, Teng X, et al. Combined intrathymic and intravenous injection of mesenchymal stem cells can prolong the survival of rat cardiac allograft associated with decrease in miR-155 expression [J]. J Surg Res, 2013, 185(2):896-903. doi:10.1016/j.jss.2013.06.015.
- [16] Eggenhofer E, Renner P, Soeder Y, et al. Features of synergism between mesenchymal stem cells and immunosuppressive drugs in a murine heart transplantation model [J]. Transpl Immunol, 2011, 25(2-3):141-147. doi:10.1016/j.trim.2011.06.002.
- [17] 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.
- [18] Krampera M. Mesenchymal stromal cell 'licensing': a multistep process [J]. Leukemia, 2011, 25(9):1408-1414. doi:10.1038/leu.2011.108.

(收稿日期:2015-01-19)

(本文编辑:刘艳)

读者·作者·编者

本刊对来稿中组织病理学彩色图片及电子显微镜图片中标尺的要求

如果作者稿件中包含有组织病理图、免疫荧光染色图、免疫组织化学图、电子显微镜图片,为了反映组织标本大小的最精确尺度,请在电子版图片的左下方标注标尺。

(本刊编辑部)