文章编号:1000-5404(2008)23-2211-04

论著

1,25-二羟维生素 D_3抑制大鼠角膜移植术后免疫排斥反应

胡　雁,周善璧　　(重庆医科大学附属第一医院眼科,重庆 400016)

摘　要: 目的　研究 1,25-二羟维生素 D_3对角膜移植术后免疫排斥反应的影响。**方法**　以 45 只 SD 大鼠为受体,15 只 Wistar 大鼠为供体建立穿透性角膜移植模型。受体 SD 大鼠随机分成实验组、实验对照组和对照组,每组 15 只。实验组及实验对照组行同种异体角膜移植,对照组行自体角膜移植。术后 0 ~ 13 d 实验组腹腔注射 1,25-二羟维生素 D_3 1.0 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$,对照组和实验对照组注射灭菌花生油 2 ml/d;术后观察植片存活情况,并于术后 14、21、30 d 每组随机处死 5 只大鼠行植片病理学检查和 ELISA 检测外周血 IL-1β、IL-2、IL-8、IL-10。**结果**　对照组角膜植片存活时间为(21.7 ± 6.8) d,实验对照组为 (11.2 ± 2.5) d,实验组为 (19.3 ± 5.2) d,3 组比较统计学差异非常显著 ($P < 0.01$);病理学检查示实验组淋巴细胞浸润和新生血管均较实验对照组少;实验组外周血中 IL-1β、IL-2、IL-8 含量与实验对照组相比下降, IL-10 含量增高,统计学差异非常显著 ($P < 0.01$)。**结论**　1,25-二羟维生素 D_3能在角膜移植后有效的保护植片,抑制排斥反应,延长植片存活时间。

关键词: 1,25-二羟维生素 D_3;角膜移植;白介素
中图法分类号: R392.4; R772.2; R977.24　　**文献标识码**: A

Prevention of corneal allograft rejection by 1, 25-dihydroxyvitamin D_3 in rats

HU Yan, ZHOU Shan-bi (Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective　To investigate the effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D_3 in the prevention of corneal allograft rejection. Methods　Forty-five SD rats (only right eyes) were used as recipients, and 15 Wistar rats (double eyes) were used as donors. SD rats were randomly divided into 3 groups: the autograft control group, the allograft control group (receiving peanut oil as placebo), and the allograft group were treated with 1, 25-dihydroxyvitamin D_3 (1.0 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$, 3 times/d for 13 d, *i. p.*). Drugs were injected intraperitoneally for 14 d after transplantation. Routine antibiotic eye drops were used. Grafts were observed by operating microscopy everyday after transplantation. Five SD rats in each group were killed respectively at the 14, 21, and 30 d postoperatively. Neovascularization and inflammation were evaluated with HE staining. ELISA was used to detect the contents of IL-1β, IL-2, IL-8, and IL-10 in the peripheral blood. Results　The mean survival time (MST) of the graft was (21.7 ± 6.8) d in the autograft control group, (11.2 ± 2.5) d in the allograft control group, and (19.3 ± 5.2) d in the allograft group. There was statistically significance between the latter 2 groups ($P < 0.01$). The allograft group had less neovascularization and inflammation than the allograft control group; the blood levels of IL-1β, IL-2, and IL-8 were markedly lower in the former than in the latter group, but IL-10 were significantly higher ($P < 0.01$). Conclusion　1, 25-dihydroxyvitamin D_3 can prolong the survival time of corneal grafts by inhibiting the immune rejection of corneal transplantation.

Key words: 1, 25-dihydroxyvitamin D_3; corneal transplantation; interleukin

角膜是一种透明组织,没有血管、淋巴管,免疫学上处于相对的"赦免状态",因此角膜移植是目前成功率最高的组织移植手术,然而免疫排斥反应仍是该手术失败的首要原因。传统免疫抑制治疗一直存在比较明显的副作用[1],因此开发新的安全有效的免疫抑制剂或治疗手段是目前的重要研究方向。1,25-二羟维生素 D_3[1,25-dihydroxyvitamin D_3, 1,25-$(OH)_2D_3$] 是维生素 D_3的活性形式,近年来不断有研究证实其具有调节免疫功能的作用,提示可以作为免疫抑制剂用于器官移植。

作者简介:胡　雁,女,重庆市人,硕士,医师,主要从事眼表面疾病方面的研究。E-mail: judiehu@yahoo.com.cn
通信作者:周善璧,E-mail: zhoushanbi@yahoo.com.cn
收稿日期:2008-02-27;**修回日期**:2008-04-23

本实验旨在通过大鼠穿透性角膜移植模型,研究1,25-二羟维生素 D_3 对穿透性角膜移植术后角膜存活情况、植片病理学变化、细胞因子的影响,以对1,25-二羟维生素 D_3 的免疫抑制作用作进一步研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物和主要试剂

清洁级SD大鼠(受体)45只,Wistar大鼠(供体)15只,体质量200~250 g,鼠龄2~3个月,雌性,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1,25-二羟维生素 D_3(瑞士罗氏有限公司)参照章爱斌等[2]的方法,由重庆医科大学附属第一医院药剂科在无菌条件下,用灭菌花生油溶解1,25-二羟维生素 D_3 配制成腹腔注射液,浓度0.1 μg/ml;IL-1β、IL-2、IL-8、IL-10 ELISA试剂盒由武汉博士德公司提供。

1.2 大鼠穿透性角膜移植模型的建立

手术方法参照Williams等[3]的方法。供体提供双眼角膜,受体选择右眼手术。术前10%水合氯醛3 ml/kg腹腔注射麻醉联合局部0.4%倍诺喜点眼表面麻醉。受体眼在麻醉后局部点1%阿托品眼液和0.25%托品酰胺眼液充分散瞳。异体角膜移植首先于供体角膜钻取直径为3.5 mm植片,置于培养皿中并用玻璃酸钠注射液保护植片,备用;然后于受体大鼠右眼,用直径为3.25 mm的环钻钻取中央区角膜,将植片置于植床,用10-0无损伤缝合线作间断缝合8针。自体角膜移植钻取直径为3.25 mm植片再将其旋转约180°后原位缝合,以10-0无损伤缝合线作间断缝合8针。线结均暴露不包埋,术后不拆线。术毕,结膜囊内涂金霉素眼膏。

1.3 动物分组及术后用药

45只受体SD大鼠随机分成实验组、实验对照组和对照组,每组15只。实验组及实验对照组取Wistar大鼠为供体,行同种异体角膜移植。对照组行自体角膜移植。3组均于术前7 d起喂饲低钙饲料(钙含量0.47%,质量体积比)[4],实验组至术后14 d,其他组至术日起开始喂饲普通饲料。

手术后1周内各组均0.25 %氯霉素滴眼液点术眼,3次/d,实验组术后0~13 d腹腔注射1,25-二羟维生素D3 1.0 μg·kg^{-1}·d^{-1},对照组和实验对照组术后0~13 d腹腔注射灭菌花生油2 ml/d。

1.4 术后临床观察

参照Larkin等[5]评分标准。0分:植片完全透明、无水肿、无新生血管;1分:植片透明度轻度丢失、轻度水肿,新生血管在任何象限伸入达到植片半径的25%;2分:植片透明度中度丢失,虹膜血管可见、中度水肿,新生血管达到植片半径的50%;3分:植片虹膜血管窥不清,但瞳孔轮廓可见,伴有植片增厚的显著水肿,新生血管达到植片半径的75%;4分:植片瞳孔轮廓不清、大泡性角膜病变,新生血管达到植片中央。

以水肿、混浊和新生血管3项指标进行评分,3项评分之和为当日排斥反应指数(rejection index,RI),当RI≥6分或植片混浊一项达到3分时,即认为排斥反应发生。由于手术因素造成感染、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、混浊及破坏,不列为统计范围,并及时补充实验动物。自术后第1天起在显微镜下观察,1次/d。

1.5 术后取材

分别于术后14、21、30 d 3个时间点,每组随机处死5只大鼠,取其外周血(经腹主动脉)和完整角膜(连角膜缘),用于实验检测。

1.6 病理学检查

将大鼠完整角膜(连角膜缘),置于4%多聚甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,切片,苏木精-伊红(HE)染色,显微镜下观察。

1.7 细胞因子的测定

分别采用大鼠酶联免疫吸附实验(ELISA)检测试剂盒测定血清中IL-1β、IL-2、IL-8、IL-10的含量。严格按照试剂盒说明操作:将血清样品和标准品分别加入抗大鼠IL-1β、IL-2、IL-8、IL-10的抗体包被的96孔板中,37 ℃反应90或120 min;洗板,每孔加入生物素抗大鼠IL-1β、IL-2、IL-8、IL-10抗体工作液,于37 ℃反应60 min;洗板,每孔加入酶标抗体工作液37 ℃反应30或60 min;洗板,每孔加入TMB显色液37 ℃避光反应10~20 min,加入终止液;设置好参数,用全自动酶标仪在450 nm或492 nm测定样品浓度。

1.8 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SAS 8.2统计软件,进行成组设计两样本均数的 t 检验、完全随机设计的多个样本均数的方差检验、秩和检验。

2 结果

2.1 角膜植片存活情况

所有实验大鼠中,1只发生麻醉意外死亡,1只术后发生广泛虹膜前粘连,3只术后发生感染,以上大鼠均被剔除,并及时补充实验动物。观察30 d。

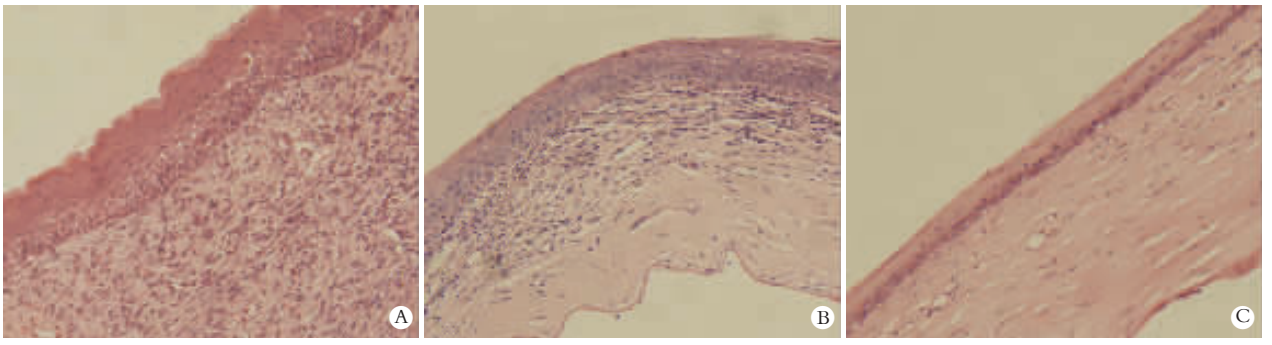
对照组在观察期内角膜植片均保持透明,存活时间为(21.7±6.8)d;实验对照组角膜植片术后6~16 d出现免疫排斥反应,存活时间为(11.2±2.5) d;实验组术后9~27 d出现免疫排斥反应,存活时间为(19.3±5.2) d(计算存活时间时,各组到时间点处死的大鼠如没有发生排斥反应,植片存活时间仍按照处死时间计算)。实验组角膜植片存活时间较实验对照组明显延长($P<0.01$)。

2.2 病理学检查

术后14 d,实验对照组角膜明显水肿增厚,基质板层结构丧失,大量炎症细胞浸润,新生血管形成;实验组可见角膜水肿增厚较对照组轻,炎症细胞浸润和新生血管较少;对照组角膜无水肿,基质排列整齐,散在炎症细胞浸润,小的新生血管形成(图1)。

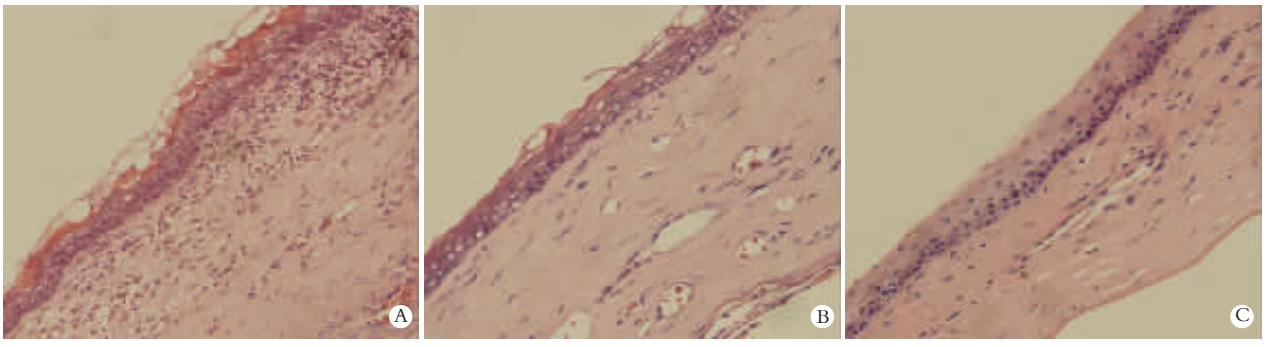
术后21 d,实验对照组角膜基质中仍有大量的淋巴细胞浸润,大量新生血管明显充血;实验组可见炎症细胞及新生血管相对较少;对照组炎症细胞减轻,新生血管逐渐萎缩(图2)。

术后30 d,实验对照组基质变薄,部分新生血管萎缩,斑痕形成,细胞浸润及基质水肿减轻;实验组基质较对照组厚,炎症细胞及新生血管较前减轻;对照组新生血管大部分已萎缩(图3)。



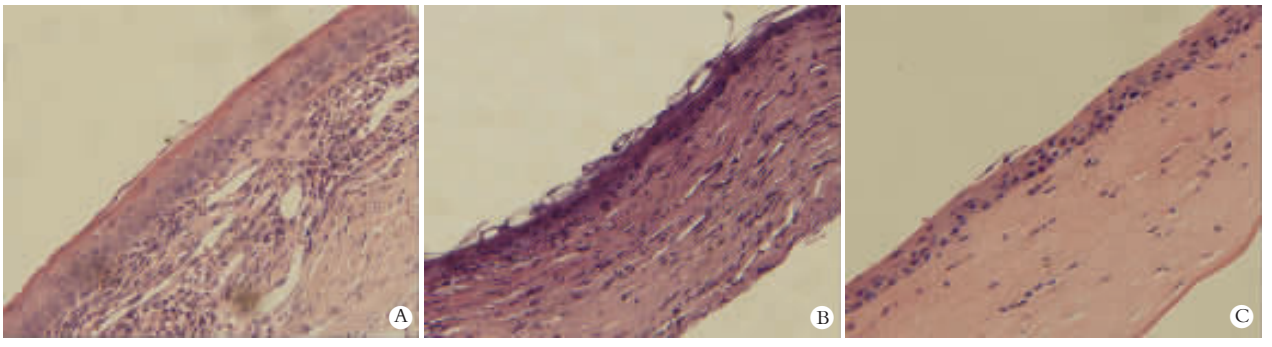
A：实验对照组；B：实验组；C：对照组

图 1　术后 14 d 角膜病理学观察　（HE×200）



A：实验对照组；B：实验组；C：对照组

图 2　术后 21 d 角膜病理学观察　（HE×200）



A：实验对照组；B：实验组；C：对照组

图 3　术后 30 d 角膜病理学观察　（HE×200）

表 1　各组大鼠角膜移植术后外周血中 IL-1β、IL-2、IL-8、IL-10 含量（pg/ml，$\bar{x} \pm s$）

组别	IL-1β			IL-2			IL-8			IL-10		
	术后 14 d	术后 21 d	术后 30 d	术后 14 d	术后 21 d	术后 30 d	术后 14 d	术后 21 d	术后 30 d	术后 14 d	术后 21 d	术后 30 d
对照组	22.62±0.46	17.70±0.68	12.96±0.46	30.49±0.41	24.81±0.49	17.63±0.41	36.39±0.42	25.77±0.49	18.67±0.36	14.71±0.40	21.78±0.33	27.85±0.34
实验对照组	46.72±0.43	33.75±0.44	25.55±0.38	51.75±0.46	41.54±0.40	28.87±0.46	55.52±0.45	44.74±0.36	31.75±0.35	11.52±0.40	14.74±0.29	18.67±0.35
实验组	31.65±0.53	23.54±0.43	18.56±0.39	40.73±0.65	31.75±0.64	21.65±0.44	46.77±0.40	34.52±0.34	25.50±0.39	19.71±0.37	30.80±0.33	39.68±0.42

$P<0.01$，相同时间点 3 组间比较

2.3　外周血中细胞因子含量变化

各组在术后 14 d 时 IL-1β、IL-2、IL-8 表达为最高，而后逐渐下调。其中实验组术后各个时间点外周血中 IL-1β、IL-2、IL-8 含量与实验对照组相比均明显下降，差异有统计学意义（$P<0.01$）。而实验组和实验对照组 IL-1β、IL-2、IL-8 的表达，在不同时间段较对照组均有所增高，差异有统计学意义（$P<0.01$）。

IL-10 含量变化趋势与之相反：各组在术后 14 d 时 IL-10 表达为最低，而后逐渐上调。实验组术后各个时间点外周血中 IL-10 含量明显高于实验对照组和对照组，差异有统计学意义（$P<0.01$）。实验对照组 IL-10 的表达，在不同时间段均较实验组和对照组低，差异有统计学意义（$P<0.01$），见表 1。

3　讨论

1，25-二羟维生素 D_3 通过与维生素 D 受体（vitamin D receptor，VDR）相互作用来实现大部分生物效应。VDR 广泛分布于人体多种细胞，包括抗原呈递细胞和 T 细胞。目前已有研究证实 1，25-二羟维生素 D_3

可有效预防如心脏、肾脏等大器官移植排斥反应,延长移植物的生存期,并与传统免疫抑制剂发挥正协同作用,减轻或避免传统免疫抑制治疗后常见的感染、骨质疏松、肾毒性等毒副作用[1]。Suzuki 等[6]用缝线法诱导小鼠角膜新生血管,发现 1,25-二羟维生素 D_3 可抑制朗罕细胞的移行。1,25-二羟维生素 D_3 对体外培养的人角膜上皮细胞产生的 IL-1α,IL-1β,IL-8 也都有明显的抑制作用。

本实验通过建立大鼠穿透性角膜移植模型显示:同种异体大鼠角膜移植术后,应用 1,25-二羟维生素 D_3 可显著延长角膜植片存活时间;临床观察与病理学检查均证实 1,25-二羟维生素 D_3 能够有效的保护植片,明显抑制大鼠角膜移植排斥反应的发生。

关于角膜移植排斥反应的机制,目前比较肯定的是 T 淋巴细胞介导的细胞免疫起主要作用。而自从发现激活的 T 细胞有 VDR 的表达后,1,25-二羟维生素 D_3 对 T 细胞的调节作用开始被证实,其中 $CD4^+$ T 细胞是其作用的直接靶点,这也是角膜移植排斥反应中的核心作用细胞。$CD4^+$ T 细胞在功能上可分为 2 个子集:Thl 和 Th2;Th1 细胞分泌 IL-1、IL-2、IL-8、IFN-γ、TNF-β 等细胞因子,介导细胞免疫,诱导免疫排斥,可以促使急性排斥反应发生,导致移植物损伤;Th2 细胞分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 等细胞因子,介导体液免疫,诱导免疫耐受,可以调低排斥反应,保护移植物功能;Th1 细胞和 Th2 细胞互相拮抗。移植后受体内 Thl/Th2 类细胞因子的偏移是急性排斥反应发生的重要机制。

因此,本实验选取了分属 Th1 类(IL-1β、IL-2、IL-8)和 Th2 类(IL-10)的细胞因子来进行检测。它们各自在角膜移植排斥反应中也都承担着重要的作用:IL-1(主要生物学效应由 IL-1β 介导)能促进 T 细胞和 B 细胞增殖,增强 NK 细胞的杀伤作用,诱导朗罕细胞迁移,也是早期新生血管关键介导因子;IL-2 又称 T 细胞生长因子,T 细胞活化后表达的第一个基因就是 IL-2 基因,研究提示抑制 IL-2 表达,能够抑制免疫排斥反应的发生,提高移植物存活时间[7];IL-8 是中性粒细胞特异的趋化因子,还可诱发新生血管,有研究表明穿透性角膜移植术后 IL-8 的含量明显提高,而通过药物抑制 IL-8 表达,能显著的提高角膜植片存活时间[8,9];IL-10 主要由 Th2 细胞分泌,能影响抗原呈递细胞的功能和 DCs 的成熟,抑制 Th1 细胞分泌的细胞因子,抑制 T 细胞介导的免疫反应,有重要的负反馈作用,并可能与免疫赦免的建立有关[10]。

正常大鼠外周血中存在一定量 IL-1β、IL-2、IL-8、IL-10,在炎症、免疫反应等条件下,含量有不同的变化,其中 IL-1β、IL-2、IL-8 表达增多,IL-10 表达减少。本实验显示不同时间段里实验组中 IL-1β、IL-2、IL-8 的表达较实验对照组均明显降低,说明这些细胞因子的表达受到 1,25-二羟维生素 D_3 的抑制;而不同时间段里实验组外周血中的 IL-10 含量均明显高于对照组和实验对照组含量,提示 1,25-二羟维生素 D_3 可通过引起大鼠角膜穿透性移植术后 IL-10 的高表达,抑制 T 细胞介导的免疫反应。由此可见 1,25-二羟维生素 D_3 在大鼠角膜移植术后能够抑制 Th1 细胞分泌的细胞因子(IL-1β、IL-2、IL-8),显著提高 Th2 细胞分泌的 IL-10,从而提示 1,25-二羟维生素 D_3 能通过调控 Th1/Th2 免疫偏移,在角膜移植后有效的保护植片,抑制免疫排斥反应,延长角膜植片存活时间。

角膜移植后的免疫排斥问题是一个长期困扰眼科医师的难题,1,25-二羟维生素 D_3 在抑制角膜移植术后免疫排斥反应中显示了良好的应用前景。当然,对于其最佳应用浓度、剂量,长期应用,与其他免疫抑制剂的联合应用及其如何避免血钙升高等副作用仍需进一步研究。

参考文献:

[1] Gregori S, Casorati M, Amuchastegui S, *et al*. Regulatory T cells induced by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance [J]. J Immunol, 2001, 167(4): 1945 - 1953.

[2] 章爱斌, 郑树森. 骨化三醇诱导锌指蛋白 A20 抑制下游基因表达延长肝移植大鼠生存期[J]. 中华普通外科杂志, 2006, 21(6): 408 - 410.

[3] Williams K A, Coster D J. Penetrating corneal transplantation in the inbred rat: a new model [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1985, 26 (1): 23 - 30.

[4] 郭成浩, 张 辉, 金 毅, 等. 不同血钙水平大鼠动物模型的建立[J]. 动物学杂志, 1999, 34(2): 14 - 16.

[5] Larkin D F, Calder V L, Lightman S L. 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] Suzuki T, Sano Y, Kinoshita S. Effects of 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 on Langerhans cell migration and corneal neovascularization in mice [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41 (1): 154 - 158.

[7] Smith J M, Stablein D, Singh A, *et al*. Decreased risk of renal allograft thrombosis associated with interleukin-2 receptor antagonists: a report of the NAPRTCS [J]. Am J Transplant, 2006, 6(3): 585 - 588.

[8] Fodor M, Facsko A, Rajnavolgyi E, *et al*. Enhanced release of IL-6 and IL-8 into tears in various anterior segment eye diseases [J]. Ophthalmic Res, 2006, 38(4): 182 - 188.

[9] Ventura A C, Bohnke M. Pentoxifylline influences the autocrine function of organ cultured donor corneas and enhances endothelial cell survival [J]. Br J Ophthalmol, 2001, 85(9): 1110 - 1114.

[10] Dhodapkar M V, Steinman R M, Krasovsky J, *et al*. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells [J]. J Exp Med, 2001, 193(2): 233 - 238.

(编辑 吴培红)