维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)01-0029-04

TGF-β1 对大鼠角膜移植后 IL-6,IL-8 的影响

杨 洋,周善璧

(重庆医科大学附属第一医院眼科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨转化生长因子 β1(TGF-β1)与大鼠穿透性角膜移植术后外周血中 IL-6、IL-8 含量的关系。方法:建立大鼠穿透性角膜移植模型,于术后 1 周、2 周、3 周、4 周 4 个时间点用 ELISA 法检测大鼠外周血中 IL-6、IL-8 含量的变化。结果:实验组各时间点 IL-6、IL-8 的表达较实验对照组和空白对照组均明显下降($P<0.01$)。结论:TGF-β1 通过抑制大鼠穿透性移植术后外周血中 IL-6、IL-8 的表达来发挥免疫抑制作用。

【关键词】穿透性角膜移植;IL;转化生长因子 β1

【中国图书分类法分类号】R772 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-08-29

Effects of TGF-β1 on the expressions of interleukin-6 and interleukin-8 in the rat corneal allografts

YANG Yang, et al

(*Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the relationship between TGF-β1 and the contents of IL-6 and IL-8 in peripheral blood after the penetrating keratoplasty in rat. *Methods*: Rat model of penetrating keratoplasty was established. ELISA assay was used to detect the contents of IL-6 and IL-8 in the peripheral blood at the first week, second week, third week, and fourth week postoperatively. *Results*: Compare with the control groups and self groups, the expression level of IL-6 and IL-8 in all experimental groups markedly decreased at different periods postoperatively ($P<0.01$). *Conclusion*: TGF-β1 can inhibit the expression of IL-6 and IL-8 in peripheral blood after penetrating keratoplasty to achieve the immune inhibition

【Key words】 Penetrating keratoplasty; Interleukin(IL); TGF-beta1

角膜病是致盲的主要眼病之一,角膜移植是治疗角膜盲的唯一有效方法。角膜移植术后免疫排斥反应是角膜移植失败的主要原因[1],如何有效地抑制或减弱移植排斥反应是提高移植成功率、延长植片存活时间的根本问题,也是多年来国内外学者不断努力探讨的领域。TGF-β1 是一类具有多种生物活性的细胞因子,参与调节细胞生长、分化等多种功能,是免疫系统的主要抑制性分子。IL-6 和 IL-8 可促进 T 淋巴细胞的激活、增殖及分化,在角膜移植中起到非常重要的作用。本研究通过建立大鼠穿透性角膜移植模型,探讨 IL-6 和 IL-8 与 TGF-β1 及角膜移植免疫排斥发生的关系,为临床上应用 TGF-β1 防治角膜移植免疫排斥提供实验依据。

作者介绍:杨 洋(1982-),男,硕士,
主要研究方向:眼表面疾病和角膜病的研究工作。

通讯作者:周善璧,男,主任医师,E-mail: zhoushanbi@yahoo.com.cn。

基金项目:重庆市卫生局资助项目(05-2-182)。

1 材料与方法

1.1 实验动物

供体采用健康雌性 Wistar 大鼠 20 只,受体采用健康雌性 SD 大鼠 60 只,体重 200~250g,鼠龄 2~3 个月,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 实验动物分组

本实验共分 3 组:实验组、实验对照组各 20 只大鼠,行同种异体角膜移植;空白对照组 20 只,行自体移植。

1.3 试剂

无菌条件下,将 1μg TGF(购自美国 R&D 公司)融于 20ml 生理盐水中,充分混合,配成 50ng/ml 的眼液[2,3],4℃冰箱保存备用。ELISA 试剂盒购自武汉博士德公司。

1.4 手术方法

维普资讯 http://www.cqvip.com

参照 Williams 和 Coster[4]方法，供体提供双眼角膜，受体均选择右眼手术。供体、受体均于术前以 10%水合氯醛 3ml/kg 腹腔内注射麻醉加眼局部 0.4%倍乐喜表面麻醉。受体眼在麻醉后局部点 1%阿托品眼液 3 次致瞳孔扩大约 4~5mm。常规消毒，在手术显微镜下，严格无菌操作。首先于供体 Wistar 大鼠角膜钻取直径为 3.5mm 植片(弯维纳斯剪协助取材)，置于培养皿中，用粘弹剂透明质酸钠(爱维)保护角膜植片备用，于受体 SD 大鼠右眼用直径 3.25mm 环钻钻取中央区角膜制作植床(弯维纳斯剪协助制作植床)，将植片置于植床，以 10/0 无损伤缝合线作间断缝合 8 针，线头不埋。自体移植组用 3.5mm 环钻钻取植片后将其旋转大约 270° 后原位缝合，以 10/0 无损伤缝合线作间断缝合 8 针，线头不埋。术毕，于前房内注入空气泡，结膜下注射庆大霉素 0.1ml，结膜囊内涂红霉素眼膏。5/0 丝线缝合睑缘 1 针，并于术后第 1d 拆除。保留 10/0 线不拆直至取材。

1.5 术后用药及临床观察

术后实验组滴用 TGF-β1 眼液和氯霉素眼液，实验对照及空白对照组均只用氯霉素滴眼液滴入结膜囊，3 次/天，1、2 滴/次，直至取材。自术后第 1 天开始起在显微镜下进行临床观察，隔日 1 次，于显微镜下检查角膜移植片透明度及新生血管生长情况，并进行分级。参照 Larkin[5]等制定的评分标准，包括植片新生血管，水肿，混浊 3 项指标，计算排斥反应指数(RI)，当 RI≥5 时，即认为排斥反应发生。

1.6 取材

在术后 1 周、2 周、3 周、4 周 4 个时间点，分别处死 3 组各 5 只大鼠，用断头法取大鼠外周静脉血约 1ml，水浴 0.5h 后，离心 1 000r×5min，提取上清液 4℃冰箱保存，待所有标本取完后，统一行 ELISA 检测。

1.7 ELISA 检测

使用 ELISA 法检测外周血中 IL-6、IL-8 含量，在待测孔中每孔加入 50μl 待测样品(血清)，酶标板加盖，37℃反应 120min 后洗板，每孔依次加入抗体工作液 0.1ml，ABC 工作液 0.1ml，TMB 显色液 0.1ml，TMB 终止液 0.1ml，均在 37℃条件下进行反应，用全自动酶标仪在 450nm 测定样品浓度。

1.8 统计学处理

数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，采用成组设计两样本均数的 t 检验，所有数据均应用医学统计软件 SPSS13.0 处理。$P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 排除动物

所有大鼠中，有 2 只发生麻醉意外死亡，4 只发生术后前房出血，2 只发生严重的虹膜前粘连，1 只发生感染，以上大鼠均被剔除实验，并及时补充实验动物。观察满 2 个月。

表 1 实验各组大鼠角膜植片存活时间(d，$\bar{x} \pm s$)

组别	动物眼数	角膜植片存活时间(d)
实验组	20	19.3±1.4
实验对照组	20	13.7±2.6▲
空白对照组	20	22.3±2.3▲

注：▲表示 $P<0.01$；TGF-β1 实验组动物的角膜植片存活时间较实验对照组有明显延长($P<0.01$)。

2.2 排斥反应发生时间

1 周没有发现排斥反应，按 7 天计入统计，其它组处死的大鼠，未发生排斥反应的按处死时间计入统计。

2.3 角膜植片存活时间

实验组角膜植片存活时间比实验对照组明显延长，差别有统计学意义($P<0.01$)，由此可见，TGF-β1 能明显抑制大鼠角膜移植免疫排斥反应，延长角膜植片存活时间(见表 1)。

2.4 IL-6、IL-8 的表达

正常大鼠外周血中存在一定量的 IL-6、IL-8，在炎症、免疫反应等条件下有多种细胞表达，发挥免疫调节作用。实验组术后外周血中 IL-6 及 IL-8 含量，与实验对照组及空白对照组相比，均明显下



图 1 实验组第 2 周角膜



图 2 空白对照组第 2 周角膜



图 3 对照组第 2 周角膜

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 各组大鼠角膜移植术后外周血中 IL-6 含量（pg/ml，$\bar{x} \pm s$）

组别	术后 1 周	术后 2 周	术后 3 周	术后 4 周
实验组	20.63 ± 0.86	28.65 ± 0.50	22.91 ± 0.33	18.56 ± 0.44
实验对照组	27.89 ± 1.03▲	51.81 ± 1.99▲	44.25 ± 1.20▲	33.22 ± 1.52▲
空白对照组	23.44 ± 1.33▲	38.16 ± 0.26▲	30.84 ± 0.49▲	23.89 ± 0.22▲

注：▲表示 $P<0.01$；从表中，我们可以看到实验组 IL-6 的表达在不同时间点，较实验对照组和空白对照组，均受到明显抑制，$P<0.01$；对照组的表达在 2 周时间段达到高峰，而后逐渐下调。

表 3 各组大鼠角膜移植术后外周血中 IL-8 含量（pg/ml，$\bar{x} \pm s$）

组别	术后 1 周	术后 2 周	术后 3 周	术后 4 周
实验组	18.53 ± 0.49	34.65 ± 0.73	25.21 ± 0.45	20.16 ± 0.59
实验对照组	23.01 ± 0.62▲	54.29 ± 0.88▲	37.17 ± 0.35▲	23.58 ± 0.70▲
空白对照组	23.34 ± 0.57▲	48.67 ± 0.44▲	34.38 ± 0.54▲	21.91 ± 0.65▲

注：▲表示 $P<0.01$；实验组 IL-8 的表达在不同时间点，较实验对照组和空白对照组，均受到明显抑制，$P<0.01$；对照组的表达在 2 周时间段达到高峰，而后逐渐下调。

调，差异有统计学意义（$P<0.01$）。各组在术后 2 周时，IL-6、IL-8 的表达为最高，而后逐渐下调。对照组 IL-6、IL-8 的表达，在不同时间段较自体移植组均有所增高，差异有统计学意义（$P<0.05$）（见表 2，3）。

3 讨 论

TGF-β 是一大类多功能细胞生长增殖调节蛋白，由 Todaro 等于 1978 年首次发现。目前已经证实 TGF-β1 是一种强效免疫抑制因子，功能比 CsA 还要强大，可抑制内皮细胞，T、B 淋巴细胞以及胚胎成纤维细胞的增殖。由于正常体细胞都有 TGF-β 家族的膜结合受体，因此 TGF-β1 广泛参与免疫系统细胞之间的相互作用，影响胸腺细胞、NK 细胞的增殖分化，干扰 B 细胞各种免疫球蛋白的产生和转换，并通过直接、间接影响 IL-1、IL-2、IFN-γ 而起到免疫抑制作用[6]。体外实验已经证明，它作为一种自动分泌的负性信号，具有抑制多种 IL 和其他细胞因子产生的正性信号而抑制淋巴细胞增殖功能[7,8]。

IL-6 是由多种细胞产生的具有多种生物效应的细胞因子，参与了机体多个系统的生理及病理反应过程，如造血过程、肿瘤免疫应答等，特别是器官移植领域。IL-6 在机体内与相应的受体结合而产生生物效应，由于受体分布相当广泛，没有严格的靶细胞特异性，因而表现出的生物学活性也千差万别，主要包括：促进 T、B 细胞的激活、增殖和分化，并可促进 T 细胞产生 IL-2 及使 IL-2R 表达增强等。由此可见，IL-6 不仅直接促进了 T、B 淋巴细胞的激活、增殖及分化，同时也促进了其它淋巴因子的分泌。

IL-8 是一种能激活嗜中性粒细胞的趋化性细胞因子，是一种具有内源性白细胞趋化性和活化性作用的碱基－肝素结合性蛋白质，可介导多形核中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞等向炎性部位聚集。移植物排斥时特征性的细胞浸润主要有单核细胞、巨噬细胞和 T 淋巴细胞，所有这些细胞均可分泌 IL-8。IL-8 的生物学活性主要有：（1）趋化和激活中性粒细胞，这种效应无种族特异性。（2）趋化嗜碱性粒细胞，并刺激其释放组胺，与速发型超敏反应有关。此外，还可趋化部分静止的 CD_4^+ 或 CD_8^+T 细胞，以及趋化 IL-2 活化等。（3）IL-8 是角化细胞的复合促有丝分裂原，也是黑色素瘤细胞的自分泌生长因子[9,10]。

目前已有大量临床及实验资料证实在移植物排斥反应中，患者机体有异常的 IL-6 或 IL-8 表达水平升高。Fodor 等[11]在研究中发现用 ELISA 方法检测 PKP 术后及发生结膜炎后的泪液中的 IL-6 和 IL-8 含量，发现它们均出现明显的释放增加，提示 IL-6、IL-8 可作为术后早期炎症的的一项重要指标。Mathur 等[12]的研究表明，在肺移植出现排斥反应之后，IL-6、IL-8 等细胞因子的表达可明显提高，提

维普资讯 http://www.cqvip.com

高的程度与排斥反应的发生时间和程度相关联。而 Ohta 等[13]在研究中发现 IL-6 能对抗 TGF-β 的作用，当 TGF-β 高水平的时候，T 细胞的激活受到了抑制，而当 IL-6 高水平表达时，丧失了对 T 细胞激活的抑制功能。而 Ventura 等[14]的研究也表明，通过药物抑制 IL-6 及 IL-8 的表达，能显著的提高角膜植片的存活时间。

然而，TGF-β1 也有它作用的两面性。它也是一种重要的致纤维形成因子，在伤口愈合和组织修复中具有重要作用，能刺激成纤维细胞合成胶原和其他细胞外基质并抑制胶原蛋白的降解，增加血管化，导致慢性排斥反应的发生和移植物长期功能的丧失。有研究表明，在出现新生血管的角膜中均能找到 TGF-β1[15,16]。

本实验中，通过建立大鼠穿透性角膜移植模型，将 TGF-β1 眼液运用于术后大鼠，因为大鼠泪液分泌少，提取不易，故选择检测移植术后外周血中 IL-6 和 IL-8 含量的变化，分析 TGF-β1 对大鼠角膜移植术后免疫排斥反应的作用。实验结果显示：实验组动物的角膜植片存活时间较实验对照组有明显延长；在不同时间点，实验组外周血中的 IL-6 和 IL-8 的表达均明显低于同一时间点的实验对照组和空白对照组；IL-6 和 IL-8 可作为反应角膜移植排斥反应发生的重要指标，它们的高水平表达可提示免疫排斥的发生，而 TGF-β1 可通过抑制它们的表达，发挥免疫抑制剂的作用。在实验中未观察到局部用 TGF-β1 眼液显著的毒副作用。目前，关于 TGF-β1 抑制 IL-6、IL-8 的作用机制，尚不清楚，考虑可能是 TGF-β 抑制了 T 细胞的 DNA 的合成，从而间接的抑制了这 2 种白介素的作用[12]。关于 TGF-β1 的免疫抑制作用，目前已经得到证实，但其具体作用机制，尚有待进一步的深入研究和完善。本次实验进一步研究了 TGF-β1 的免疫抑制的作用机制，为其在临床中的运用提供理论基础和实验依据。

参 考 文 献

[1] Jonas JB, Rank RM, Budde WM. Immunologic graft reactions after allogenic penetrating keratoplasty[J]. Am J Ophthalmol, 2002; 133(4): 437-443.

[2] Strobl H, Knapp W. TGF-beta1 regulation of dendretic cell[J]. Microbes Infect, 1999; 1(15): 1 283-1 290.

[3] Totth A, Sebestyen A, Bama G, et al. TGF-beta1 induces caspase-dependent but death-receptor independent apoptosis in lymphoid cells[J]. Anticancer Res, 2001; 21(2): 1 207-1 212.

[4] Williams KA, Coster DJ. Penetrating corneal transplantation in the inbred rat: a new model[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1985; 26(1): 23-30.

[5] Larkin DF, Calder VL, Lightman SL. Indentification and characterization of cells infiltrating the graft and aqueous humour in rat allograft rejection[J]. Clin Exp Immunol, 1997; 107(2): 381-391.

[6] Brand T, Schneider MD. The TGF beta superfamily in myocardium: ligands, receptors, transduction, and function[J]. J Mol Cell Cardiol, 1995; 27(1): 5-18.

[7] Hahm KB, Im YH, ks TW, et al. Loss of transforming growth factor beta signalling in the intestine contributes to tissue injury in inflammatory bowel disease[J]. Gut, 2001; 49(2): 190-198.

[8] Thakur VS, Shankar B, Chatterjee S, et al. Role of tumor-derived transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in site-dependent tumorigenicity of murine ascitic lymphosarcoma[J]. Cancer Immunol Immunother, 2005; 54(9): 837-847.

[9] Whire MV, Yoshimura T. Neutrolphil activatant/activation protein (NAP-1) causes human basophil histamine release[J]. Immunol Lett, 1989; 22(2): 151-154.

[10] Gura T. Chemokines take center stage in inflammatory ills[J]. Science, 1996; 272(5264): 954-956.

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

[12] Mathur A, Baz M, Stapkes ED, et al. Cytokine profile after lung transplantation: correlation with allograft injury[J]. Ann Thorac Surg, 2006; 81(5): 1 844-1 849.

[13] Ohta K, Yamagami S, Taylor AW, et al. IL-6 Antagonizes TGF-beta and abolishes Immune privilege in eyes with endotoxin-Induced uveitis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000; 41(9): 2 591-2 599.

[14] Ventura AC, Bohnke M. Pentoxifylline influences the autocrine function of organ cultured donor corneas and enhances endothelial cell surviva[J]. Br J Ophthalmol, 2001; 85(9): 1 110-1 114.

[15] Spriewald BM, Ensminger SM, BiUing JS, et al. Increased expression of transforming growth factor-beta and eosinophil infiltration is associated with the development of transplant arteriosclerosis in long-term surviving cardiac allografts[J]. Transpla-ntation, 2003; 76(7): 1 105-1 111.

[16] Cursiefen C, Rummelt C, Kuchle M. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor, transforming growth factor alpha, and transforming growth factor beta1 in human corneas with neovascularization[J]. Cornea, 2000; 19(4): 526-533.

(责任编辑：冉明会)