

IL-10 修饰的树突状细胞在大鼠角膜移植中的作用

苏海英,刁玉梅,李 兵

基金项目: 中国辽宁省教育厅重点实验室资助项目(No. IS2010103)

作者单位:(121001) 中国辽宁省锦州市, 辽宁医学院附属第一医院眼科

作者简介: 苏海英, 在读硕士研究生, 研究方向: 角膜移植、角膜及眼表疾病。

通讯作者: 李兵, 博士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 角膜移植、角膜及眼表疾病。jzslibingv@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-12-29 修回日期: 2011-02-24

Effects of IL-10 modified dendritic cells in rat corneal transplantation

Hai-Ying Su, Yu-Mei Diao, Bing Li

Foundation item: Key Laboratories Project of Liaoning Province Education Department, China(No. IS2010103)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Bing Li. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China. jzslibingv@yahoo.com.cn

Received: 2010-12-29 Accepted: 2011-02-24

Abstract

• AIM: To study the effect of donor IL-10 modified dendritic cells (DC) for providing theoretical and practical basis for anti-rejection of corneal transplantation.

• METHODS: Wistar rats were used as donors, and SD rats were used as recipients. The recipient was injected by tail vein with donor IL-10-treated DC or with untreated DC. Keratoplasty was performed after three days and the survival time of corneal allografts was observed. Animals were randomly assigned to the following three groups: (A) control, (B) DC, (C) IL-10-DC.

• RESULTS: The mean survival time in the control group was merely 10.1 ± 1.7 days, but in the pretreated groups was 17.8 ± 1.8 days and 26.4 ± 1.6 days respectively which was statistically prolonged compared with the control groups ($P < 0.01$), and comparison within the two pretreated groups was significantly different ($P < 0.01$).

• CONCLUSION: It is indicated that pretreatment with donor immature DC could markedly prolong the survival time of corneal allografts. And IL-10-modified DC can further extend the rat corneal allografts.

• KEYWORDS: IL-10; dendritic cells; keratoplasty

Su HY, Diao YM, Li B. Effects of IL-10 modified dendritic cells in rat corneal transplantation. *Guoji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(4):588-590

摘要

目的: 探讨 IL-10 修饰的供体树突状细胞(dendritic cells, DC)在大鼠角膜移植中的作用。

方法: 建立 Wistar-SD 大鼠穿透性角膜移植动物模型, Wistar 大鼠为供体, SD 大鼠为受体。受体大鼠 42 只随机分为 3 组, 每组 14 只。A 组为对照组, 受体不经任何预处理, 即行角膜移植术; B 组角膜移植前 3d, 每只受体鼠经尾静脉注射供体的未成熟 DC, 细胞数为 2×10^7 个; C 组角膜移植前 3d, 每只受体鼠经尾静脉注射经 IL-10 修饰的供体未成熟 DC, 细胞数为 2×10^7 个。

结果: 以混浊、水肿和新生血管 3 项指标作为临床评估标准, 观察各组角膜植片的存活时间。角膜植片的存活时间 3 组分别为: 10.1 ± 1.7 , 17.8 ± 1.8 , 26.4 ± 1.6 d。各干预组与对照组比较差异均有显著性 ($P < 0.01$)。B、C 组间比较差异有显著性 ($P < 0.01$)。

结论: 摄取供体抗原的不成熟 DC 能显著延长角膜植片的存活时间; IL-10 修饰的 DC 可进一步延长角膜植片的存活时间。

关键词: IL-10; 树突状细胞; 角膜移植

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.04.007

苏海英, 刁玉梅, 李兵. IL-10 修饰的树突状细胞在大鼠角膜移植中的作用. 国际眼科杂志 2011;11(4):588-590

0 引言

角膜移植仍然是目前治疗各种严重角膜疾病的最终途径, 而免疫排斥反应是造成植片衰竭导致移植失败的主要原因^[1]。如何避免排斥反应的发生, 是角膜移植研究中需要解决的关键问题。随着移植学实验及临床实践的发展, 角膜移植排斥的防治已经融入了新观念, 在保持受体正常免疫应答能力的情况下诱导供体特异性免疫耐受能获得更长期的植片存活^[2]。未成熟树突状细胞(dendritic cells, DC)在诱导免疫耐受、防治移植排斥反应中发挥着重要作用^[3]。IL-10 是一个多效性细胞因子, 具有广泛的生物学作用, 体外研究发现, 经 IL-10 预处理的 DC 可以诱发放效性 T 细胞反应能力的下降, 同时淋巴细胞对于成熟 DC 的反应性显著降低, 阻止单核巨噬细胞活化和抗原提呈细胞的功能, 因此可以抑制炎症免疫反应和 T 细胞介导的免疫反应^[4], 这对于减轻免疫排斥反应有重要的意义。我们采用 IL-10 修饰的供体未成熟 DC 预处理受体, 观察植片的存活情况, 探讨 IL-10 修饰的供体 DC 对角膜移植免疫耐受的诱导效果。

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年雄性 SD 大鼠 42 只为受体, 体质量 200 ~ 250g, 购自辽宁医学院动物中心; 雌性 Wistar 大鼠 21 只为供体, 体质量 200 ~ 250g, 购自中国医科大学动物中心。RPMI 1640(Gibco 公司), 用于干粉按常规配制; 新生小牛血清(杭州四季青生物试剂公司), 细胞因子 rrGM-CSF, rrIL-4 和 rrIL-10(Perprotech 公司); OX62-FITC, CD86-PE

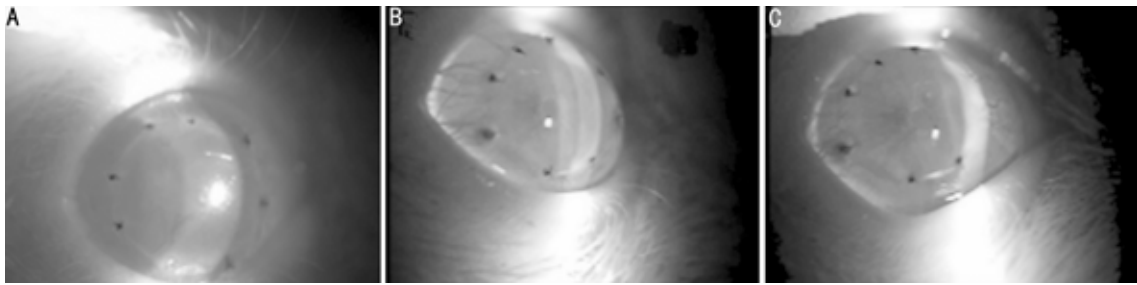


图1 大鼠角膜植片状况 A:A组;B:B组;C:C组。

(Serotec 公司)。DC 及 IL-10 修饰 DC 的制备参照 Hermans 等方案将 Wistar 大鼠 1 只脱颈致死,体积分数为 750mL/L 乙醇浸泡 5 ~ 10min。无菌手术取出股骨和胫骨,用磷酸盐缓冲溶液(PBS)反复冲洗出骨髓细胞,收入离心管中,3000r/min 离心 20min,弃上清,沉淀细胞用 PBS 重悬,混匀,缓慢加至已有淋巴细胞分离液的离心管内,形成界面。中间为单核细胞层,下层为红骨髓,取界面细胞即单个核细胞层至离心管内,加 PBS,以 1500r/min 离心 5min,弃上清。重复上述过程 2 次,然后用 RPMI 1640 调整细胞浓度至 1×10^6 个/L。接种细胞于 6 孔培养板中,置于 37℃ 50mL/L CO₂ 培养箱中培养 2h。取出后用 37℃ 预温的 RPMI 1640 轻轻洗去非黏附细胞,然后在贴壁细胞中加入含细胞因子 rrIL-4 (10μg/L), rrGM-CSF (10μg/L) 的培养基常规培养,每 3d 更换含上述细胞因子的新鲜培养基。培养至第 6d,当细胞呈贴壁生长并呈现短毛刺状树突状时即为诱导成功。收获一部分 DC 细胞,与 20μg/L 浓度的 IL-10 共同孵育 48h,即为 IL-10 修饰 DC。流式细胞仪(FACS)检测 DC 表面分子 OX62 和 CD86 的表达。将收获的 DC 用 FACS 标记液 PBA (PBS + 10g/L BSA + 0.2g/L 叠氮钠)调整细胞密度为 1×10^9 /L 加入离心管,每管 100μL,未直接标记荧光素的抗 OX62 mAb 100μL,4℃,30min 后用 PBA 洗细胞 2 次,加入 FITC 标记羊抗鼠 IgG 荧光二抗,每管 100μL,悬浮细胞。二抗标记终浓度为 5mg/L。4℃ 暗处标记 45min,PBA 洗 2 次,细胞悬浮于含 10g/L 多聚甲醛的 PBA 中通过 FACS 检测,对照组用同类无关一抗代替 OX62 mAb,其余步骤相同。以 CD86-PE mAb 替代 OX62-FITC 通过 FACS 检测细胞表型。IL-10 修饰的 DC 组表面标志抗原 OX62 高表达(89.2%),CD86 低表达(11.6%)。

1.2 方法 受体 SD 大鼠 42 只,随机分为 3 组,每组均为 14 只。A 组:为对照组,受体不经任何预处理,即行角膜移植术;B 组:角膜移植前 3d,每只受体鼠经尾静脉注射供体的未成熟 DC,细胞数为 2×10^7 个;C 组:角膜移植前 3d,每只受体鼠经尾静脉注射用 IL-10 修饰的供体未成熟 DC,细胞数为 2×10^7 个。参照 Williams 等方法建立大鼠穿透性角膜移植模型:于术前 15min 起滴复方托吡卡胺滴眼液,充分散瞳。庆大霉素 2000U 冲洗结膜囊,腹腔内注射 100g/L 水合氯醛注射液 30 ~ 40mg/kg 全身麻醉。常规消毒铺巾,在手术显微镜下对受体鼠右眼行穿透性角膜移植术,植片直径 3.5mm,植床 3.0mm,10-0 尼龙线间断缝合 8 针,线结不埋藏。术毕前房内注入小气泡,形成前房。涂红霉素眼膏,睑缘缝合。术后第 1d 拆除睑缘缝线,2.5g/L 氯霉素滴眼液、10g/L 阿托品滴眼液滴眼,3 次/d,共 10d。自术后第 1d 起受体鼠每日在裂隙灯下进行临床观测,以混浊、水肿和新生血管 3 项指标进行评分,参照 Larkin 等的评分标准,植片混浊 0 ~ 4 级:0 级为完全透明;1 级为透明度轻度丢失;2 级为透明度中度丢失,虹膜血管

表 1 各组大鼠角膜植片参数比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	混浊	水肿	新生血管	排斥指数
A	2.83 ± 0.67 ^b	1.48 ± 0.51 ^b	1.53 ± 0.46 ^b	5.84 ± 1.13 ^b
B	0.61 ± 0.53	0.43 ± 0.53	0.49 ± 0.5	1.53 ± 1.11
C	0.59 ± 0.52	0.45 ± 0.51	0.47 ± 0.51	1.51 ± 1.23

^b P < 0.01 vs B, C 组。

可见;3 级为虹膜血管窥不清,但瞳孔轮廓可见;4 级为瞳孔轮廓不清。植片水肿 0 ~ 2 级:0 级为无水肿;1 级为中度水肿;2 级为伴有植片增厚的显著水肿。植片新生血管 0 ~ 4 级:0 级为无新生血管;1 级为新生血管在任何象限伸入达到植片半径的 25%;2 级为新生血管达到植片半径的 50%;3 级为新生血管达到植片半径的 75%;4 级为新生血管达到植片的中央。3 项评分之和为当日排斥反应指数(rejection index, RI),当 RI ≥ 5 时,或植片混浊一项达到 3 时视为排斥反应发生。术后 5d 内有严重前房出血、虹膜广泛前粘连、伤口裂开、晶状体混浊、植片感染者剔除并补充例数。排斥以后每周观察 2 ~ 3 次,于术后第 14d 各组随机抽出 4 只大鼠术眼取材,全眼球摘除,100g/L 甲醛固定,常规石蜡包埋,5μm 切片,HE 染色镜检。

统计学分析:应用统计分析软件 SPSS 16.0 进行数据处理,角膜植片生存时间和排斥指数的组间比较采用单因素方差分析和进一步的 LSD-t 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 角膜移植片存活时间 A 组 10.1 ± 1.7d, B 组 17.8 ± 1.8d, C 组 26.4 ± 1.6d。术后 14d, A 组角膜植片均发生排斥,而 B, C 两组角膜植片仍保持透明(图 1)。B, C 两组植片存活时间与 A 组比较显著延长(P < 0.01); B, C 组间比较,差异有显著性(P < 0.01)。表明不成熟 DC 能显著延长角膜植片的存活时间;IL-10 可维持 DC 的不成熟性,进一步延长了角膜植片的存活时间。

2.2 角膜植片病理变化 A 组角膜植片切口周围出现大量的淋巴细胞和单核细胞浸润,植片显著水肿、增厚,可见大量炎性细胞,角膜基质排列紊乱。B, C 两组植片切口周围有少量的炎性细胞,但植片中央部几乎未见炎性细胞浸润,角膜厚度及结构基本正常,基质排列较规则(图 2)。大鼠各组角膜植片术后 14d, A 组混浊、水肿、新生血管及 RI 4 项指标均明显高于 B, C 两组; B, C 组与 A 组之间比较差异有显著性(P < 0.01); B, C 组间比较差异无显著性(P > 0.05, 表 1)。

3 讨论

DC 是目前已知的功能最强的专职抗原提呈细胞(antigen presenting cells, APC),是机体免疫反应的始动体^[5],成熟 DC 可以激活初始型 T 细胞启动免疫反应,未成熟的自体 DC 或供体 DC 可作为诱导移植免疫耐受的启动子,通过致敏受体的 T 细胞诱导免疫耐受,从而使移植

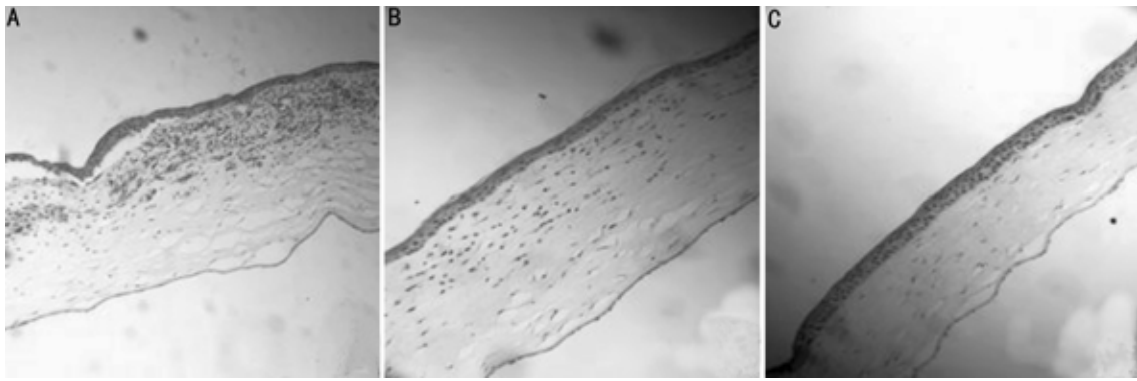


图2 大鼠角膜组织病理变化(HE×200) A:A组;B:B组;C:C组。

物的存活时间延长^[6]。近年来应用供体未成熟 DC 输入受体诱导免疫耐受引起了广泛的关注^[7]。目前已有动物实验证实,未成熟 DC 的输注能在一定程度上延长移植物的存活时间^[8],在大鼠的同种异体心脏、肝脏、胰岛、小肠、肾脏和皮肤等移植模型中,未成熟 DC 诱导免疫耐受均得到证实。但单独应用未成熟 DC 的效果尚不能令人满意,其主要原因是:未成熟 DC 由于表面缺乏协同刺激因子即 T 细胞活化的第二信号而引起 T 细胞特异性无应答,但在摄取抗原后,或受到某些炎性细胞因子(如 TNF- α)或某些细菌成分(如 LPS)的刺激后,细胞表型迅速发生变化,进入成熟状态,失去耐受原作用进而诱发免疫应答反应^[9]。因此,如何使 DC 稳定地保持不成熟状态是诱导免疫耐受的关键。而有关 IL-10 的研究为解决这个难题提供了新的思路。IL-10 最初是由 Mosman 等于 1989 年发现的一种由 Th2 细胞分泌的细胞因子,体外研究发现,它能抑制 Th1 细胞亚群细胞因子 IFN- γ , IL-2, TNF- α 等的合成,抑制 ICAM-1 和 B7 的表达,阻止单核巨噬细胞活化和 APC 的功能。并由此减弱或消除 T 和 B 细胞介导的免疫应答,导致 T 细胞无能。IL-10 能直接作用于 T 细胞上的 CD28 协同刺激受体,阻断 CD28 酪氨酸磷酸化过程和 CD28 分子介导的信号传导通路,诱导 T 细胞耐受。此外,IL-10 通过特异地抑制 T 细胞 IL-12 的分泌而抑制 T 细胞的增殖^[10],而 IL-12 是特异性细胞免疫应答中的基本介质^[11]。IL-10 的这些生物学活性显示其为一种潜在的免疫增殖反应和炎症反应的负性调节因子,可抵抗外界刺激因子对 DC 的刺激作用,使 DC 稳定地维持在不成熟状态。

在应用供体未成熟 DC 作为耐受原诱导受体免疫耐受时,若将 IL-10 修饰 DC,通过下调 DC 表面 MHC II 类分子和 B7 分子的表达,可能会促使在受体内的供体 DC 维持于不成熟状态,不成熟状态的 DC 可导致 T 细胞的低应答或无应答,从而诱导受体特异性 T 细胞发生克隆删除和/或克隆无能,使移植物存活时间进一步延长。我们在成功建立大鼠同种异体角膜移植模型的基础上,应用 IL-10 修饰供体 DC 后输注给受体的预处理方法,观察受体植片存活和排斥反应情况。在角膜移植过程中,DC 和巨噬细胞是主要的 APC^[12],它们摄取供体抗原肽并与自身 MHC 分子结合后形成 MHC II-CD3 肽复合物,迁移至引流淋巴结和脾脏,在炎性因子刺激下 DC 高水平表达 CD80, CD86 和 CD40 等协同刺激分子,分别与 T 细胞的 CD28 和 CD40 配体结合,启动第二信号,激活抗原特异性的 T 细胞。激活的 T 细胞循环至眼部并分泌各种细胞因子,吸引大量 CD4⁺ T 细胞和巨噬细胞聚集,从而引起免疫排斥反应^[13]。IL-10 可将受体内的供体 DC 维持于不成熟状态,这种 IL-10-DC 低表达协同刺激分子,经尾静脉注射后,能

够竞争性地抑制第二信号 CD28 与 CD80, CD86 的结合,继而下调或终止 T 细胞的反应,明显延长角膜移植片的存活时间。实验结果提示:经 IL-10 修饰的 DC 输注组与 A, B 组比较,角膜植片存活时间明显延长,说明用 IL-10 修饰供体 DC 输注给受体,能使受体处于一种低应答状态,在这种应答状态下进行角膜移植,延缓了宿主对移植物的排斥,从而延长了角膜植片的存活时间。然而,供体来源的 IL-10-DC 虽然延长了移植物的存活时间,但到了一定的时间仍将发生排斥。其原因可能因为随着未成熟 DC 的逐步成熟,其诱导耐受的作用逐步减弱。而且,未成熟 DC 在诱导免疫耐受的同时,并不能完全保护供者的移植物免于受者 T 细胞的攻击。因为受者体内的 APC 可通过直接和间接识别途径向受者 T 细胞呈递同种异型抗原,使受者 T 细胞活化、增殖,进而攻击供者移植物导致排斥的发生;另外,耐受的形成往往有多种耐受机制参与,并不完全依赖于某种单一的耐受机制,这可能也是原因之一。

参考文献

- 1 余洪华,陆晓和. CD28/CTLA4-B7 协同刺激分子与角膜移植免疫. 眼科新进展 2005;25(5):476-478
- 2 Chong EM, Dana MR. Graft failure IV. Immunologic mechanisms of corneal transplant rejection. *Int Ophthalmol* 2008;28(3):209-222
- 3 韩波,胡燕华. CTLA4Ig 基因修饰的树突状细胞抑制角膜移植排斥反应的机制研究. 眼科研究 2007;25(5):347-350
- 4 Gong N, Pleyer U, Volk HD, et al. Effects of local and systemic viral interleukin-10 gene transfer on corneal allograft survival. *Gene Ther* 2007;14(6):484-490
- 5 Steinman RM. Dendritic cells: understanding immunogenicity. *Eur J Immunol* 2007;37(Suppl 1):S53-60
- 6 Raimondi G, Thomson AW. Dendritic cells, tolerance and therapy of organ allograft rejection. *Contrib Nephrol* 2005;146:105-120
- 7 Chen W. The role of plasmacytoid dendritic cells in immunity and tolerance. *Curr Opin Organ Transplant* 2005;10(4):181-185
- 8 Ferguson TA, Kazama H. Signals from dying cells: tolerance induction by the dendritic cell. *Immunol Res* 2005;32(1-3):99-108
- 9 Liu E, Law HK, Lau YL. Tolerance associated with cord blood transplantation may depend on the state of host dendritic cells. *Br J Haematol* 2004;126(4):517-526
- 10 Ye Z, Huang H, Hao S, et al. IL-10 has a distinct immunoregulatory effect on naive and active T cell subsets. *J Interferon Cytokine Res* 2007;27(12):1031-1038
- 11 Rosenberg B, Juckett DA, Aylsworth CF, et al. Protein from intestinal *Eimeria* protozoan stimulates IL-12 release from dendritic cells, exhibits antitumor properties *in vivo* and is correlated with low intestinal tumorigenicity. *Int J Cancer* 2005;114(5):756-765
- 12 Forrester JV, Xu H, Kuffov L, et al. Dendritic cell physiology and function in the eye. *Immunol Rev* 2010;234(1):282-304
- 13 Klebe S, Coster DJ, Williams KA. Rejection and acceptance of corneal allografts. *Curr Opin Organ Transplant* 2009;14(6):4-9