

外源性 IL-10 转染大鼠 DC 细胞对角膜移植术后房水中细胞因子的影响

赵丽颖¹, 张 姝², 田丽华³, 李 兵⁴

基金项目:辽宁省教育厅重点实验室项目(No. LS2010103)

作者单位:¹(121000)中国辽宁省锦州市,辽宁医学院;
²(125000)中国辽宁省葫芦岛市,锦西石化医院眼科;
³(274300)中国山东省单县中心医院;⁴(121000)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:赵丽颖,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,女,博士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:角膜移植、角膜及眼表疾病。jzslibingy@163.com

收稿日期:2012-05-10 修回日期:2013-07-17

The effect of DC cells transfected with exogenous IL-10 on cytokines in rats aqueous humor after penetrating keratoplasty

Li-Ying Zhao¹, Shu Zhang², Li-Hua Tian³, Bing Li⁴

Foundation item: Key Laboratories Project of Liaoning Province Education Department (No. LS2010103)

¹Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China; ²Department of Ophthalmology, Jinxi Petrochemical Hospital, Huludao 125000, Liaoning Province, China; ³Department of Ophthalmology, Central Hospital of Shanxian, Shanxian County 274300, Shandong Province, China; ⁴Department of Ophthalmology, the First Hospital Affiliated to Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China

Correspondence to: Bing Li. Department of Ophthalmology, the First Hospital Affiliated to Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China. jzslibingy@163.com

Received: 2012-05-10 Accepted: 2013-07-17

Abstract

• AIM: To study the effect of exogenous IL-10 transfection to dendritic cells (DC) of rat on expression of IL-4 and IFN- γ in aqueous humor after corneal transplantation.

• METHODS: Cells of 8-DC, GFP-DC and IL-10-GFP-DC were prepared. Totally 55 SD rats were randomly selected 6 (6 eyes), as a negative control group, the rest were randomly divided into 4 groups: positive control group, injected of 1mL PBS by receptor tail vein 3 days before surgery, and 8-DC group, GFP-DC group, IL-10-GFP-DC group, respectively, injected of 1mL cell suspension (8-DC, GFP-DC and IL-10-GFP-DC) have been prepared by receptor tail vein 3 days before surgery. Wistar rats as donor, keratoplasty was performed. The rats corneal graft status was examined after operation, and ELISA method was used to detect the expression of IL-4, IFN- γ in aqueous humor at the

fourteenth day after operation.

• RESULTS: The survival time of corneal graft in group IL-10-GFP-DC was significantly prolonged. Expression of IL-4 in group IL-10-GFP-DC cytokines was higher than that in other groups, while the expression of IFN- γ was lower than other groups, the difference was statistically significant.

• CONCLUSION: Exogenous IL-10 gene transfection to immature dendritic cells could inhibit corneal allograft rejection, and induce the formation of immune tolerance. The disturbance over the expression of cytokines IL-4, IFN- γ in aqueous humor is one of the mechanisms for the induction of immune tolerance in corneal transplantation.

• KEYWORDS: IL-10; keratoplasty; cytokines; rat

Citation: Zhao LY, Zhang S, Tian LH, et al. The effect of DC cells transfected with exogenous IL-10 on cytokines in rats aqueous humor after penetrating keratoplasty. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(8):1533-1536

摘要

目的:探讨外源性 IL-10 转染大鼠树突状细胞(dendritic cell, DC)对角膜移植术大鼠房水中细胞因子 IL-4 和 IFN- γ 表达的影响。

方法:制备细胞 8-DC, GFP-DC 及 IL-10-GFP-DC。55 只 SD 受体大鼠,随机抽取 6 只 6 眼,作为阴性对照组,其余随机分成 4 组:阳性对照组(术前 3d 受体大鼠尾静脉注射 1mL PBS)、8-DC 组、GFP-DC 组、IL-10-GFP-DC 组,分别于术前 3d 受体大鼠尾静脉注射 1mL 已制备的细胞悬液(8-DC, GFP-DC, IL-10-GFP-DC)。以 Wistar 大鼠为供体建立角膜移植实验模型。术后观察各组大鼠的角膜植片状态,并于术后第 14d 采用 ELISA 方法检测大鼠房水中 IL-4 和 IFN- γ 因子的表达。

结果:IL-10-GFP-DC 组角膜植片的存活时间显著延长。IL-10-GFP-DC 组细胞因子 IL-4 表达较其他各组高,而 IFN- γ 的表达较其他各组低,差异具有统计学意义。

结论:外源性 IL-10 基因转染的未成熟树突状细胞能抑制角膜移植排斥反应,诱导免疫耐受的形成。其中干扰大鼠房水中细胞因子 IL-4 和 IFN- γ 的表达是诱导角膜移植免疫耐受的机制之一。

关键词:白细胞介素-10;角膜移植术;细胞因子;大鼠

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.08.05

引用:赵丽颖,张姝,田丽华,等.外源性 IL-10 转染大鼠 DC 细胞对角膜移植术后房水中细胞因子的影响.国际眼科杂志 2013;13(8):1533-1536

0 引言

角膜移植是治疗顽固性角膜病变的重要手段,而且是目前最成功的器官移植术。但角膜移植术后发生的排斥反应至今仍是手术失败的主要原因^[1]。树突状细胞(dendritic cell, DC)是由美国学者 Steinman 于 1973 年发现的,是目前所知的、功能最强的抗原呈提细胞,其最大的特点是能够显著刺激初始 T 细胞(naive T cells)增殖,是机体适应性 T 细胞免疫应答的始动者,在适应性 T 细胞免疫应答的诱导中具有独特的地位^[2]。若预先去除移植物中的 DC 或用未成熟 DC 处理,均可延长同种移植物的存活时间^[3]。本实验室前期的研究已证实,利用腺病毒将外源性 IL-10 基因转染到大鼠骨髓来源的 DC 后,能够维持 DC 的未成熟状态,抑制异体 T 淋巴细胞的增殖^[4]。在本研究中,我们应用大鼠角膜移植动物模型,以探讨外源性 IL-10 基因修饰的未成熟 DC 对角膜移植术后房水中细胞因子表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选用 28 只健康 Wistar 大鼠作为供体,8~12 周龄,体质量 200~250g,雌雄不限,购自中国医科大学实验动物中心;55 只健康 Sprague Dawley (SD) 大鼠作为受体,8~12 周龄,体质量 200~250g,雌雄不限,购自辽宁医学院实验动物中心。两组大鼠分别于术前 1wk 自实验动物中心取至本实验室,单笼单只喂养,自由饮食,隔日更换垫料。

1.1.2 主要试剂 IL-10 基因过表达的腺病毒载体(IL-10-GFP Adenovirus)及荧光蛋白基因的腺病毒空载体(GFP-Adenovirus),上海吉凯基因化学技术有限公司;大鼠淋巴细胞分离液,天津 TBD sciencis;重组大鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)及重组大鼠白细胞介素 4(IL-4),PeproTech 公司;IL-4 ELISA 试剂盒及 IFN- γ ELISA 试剂盒,USA。

1.2 方法

1.2.1 大鼠树突细胞原代培养与体外修饰 用淋巴细胞分离液密度梯度法提取 Wistar 大鼠骨髓单个核细胞,用 RPMI-1640 培养液重悬,在 37 $^{\circ}$ C, 50mL/L CO₂ 孵箱中培养 2h 后,利用黏附分离法去除不贴壁的 T 淋巴细胞,加入细胞因子 GM-CSF 10ng/mL, IL-4 5ng/mL,隔天半量换液,培养至第 6d,收集悬浮细胞,即为 6-DC。将收集的 6d 的 DC 细胞分三组:第一组,将 6-DC 在无病毒的 10% 完全培养基中继续培养 48h,收集细胞,即为 8-DC;第二组,将 6-DC 在含有 GFP-Adenovirus 重组腺病毒的 10% 完全培养基中培养转染 48h,收集细胞,即为 GFP-DC;第三组,将 6-DC 在含有 IL-10-GFP-Adenovirus 重组腺病毒的 10% 完全培养基中培养转染 48h,收集细胞,即为 IL-10-GFP-DC。分别将收集的 8-DC, GFP-DC, IL-10-GFP-DC 用 PBS 洗涤 2 次,调整细胞悬液浓度为 2 \times 10⁶/mL,备用。

1.2.2 实验分组 55 只 SD 大鼠,随机抽取 6 只 6 眼,作为阴性对照组,大鼠未做任何处理;其余为受体大鼠,随机分成 4 组,具体分组如下:阳性对照组,术前 3d 受体大鼠尾静脉注射 1mL PBS;8-DC 组、GFP-DC 组和 IL-10-GFP-DC 组,分别于术前 3d 受体大鼠尾静脉注射 1mL 已制备的相应细胞悬液(8-DC, GFP-DC 及 IL-10-GFP-DC)。角膜移植术后第 14d 各组分别取大鼠 6 只,取房

水、进行 ELISA 方法检测,其余大鼠用于观察角膜植片的存活率。

1.2.3 建立大鼠穿透性角膜移植模型 术前 30min 术眼滴复方托吡卡胺眼液 3 次,充分散瞳;腹腔注射 10% 水合氯醛 0.4mL/100g 全身麻醉;于受体右眼进行穿透性角膜移植手术,植片直径 3.5mm,植床 3.0mm,10-0 Alcon 尼龙线间断缝合 8 针,线结不埋藏,前房注入小气泡,建立前房。术毕结膜囊内涂红霉素眼膏,缝合眼睑;每只动物仅右眼手术,以保证动物觅食正常。术后 24h 拆除眼睑缝线观察,氯霉素滴眼液和复方托吡卡胺滴眼液每日 3 次点术眼,共 10d。角膜缝线不拆除。

1.2.4 角膜植片的临床观察 自术后第 1d 起每日在裂隙灯下进行观察,以混浊、水肿和新生血管 3 项指标进行评分,参照 Larkin 等^[5]评分标准,3 项评分之和为当日排斥反应指数(rejection index, RI),当 RI \geq 5 时,或者植片混浊一项达到 3 时视为排斥反应发生,记录角膜植片存活时间。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、植片感染等并发症者剔除,并补充例数。

1.2.5 酶联免疫吸附测定法检测大鼠房水中细胞因子 全身麻醉后无菌术下从角膜缘穿刺大鼠前房,用毛细吸管吸取房水,置于 0.5mL Eppendorf 管中,-80 $^{\circ}$ C 密封保存。测定前从 4 $^{\circ}$ C 取出 IL-4 ELISA 试剂盒/IFN- γ 试剂盒,开启前室温平衡 30min。从 -80 $^{\circ}$ C 取出房水,室温融化,用 PBS 稀释 5 倍,备用。严格按照说明书操作。终止反应后,即以空白孔调零,450nm 波长依序测量各孔的吸光度 OD 值,测定在加入终止液后 15min 内进行。根据标准浓度及对应的 OD 值计算出标准曲线的回归方程,再根据样品的 OD 值在回归方程上计算出对应的样品浓度。

统计学分析:应用统计分析软件 SPSS 17.0 进行数据处理,所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用单因素方差分析及独立样本 *t* 检验,比较角膜植片生存时间及排斥指数;绘制 KaplanMeier (K-M) 生存曲线描述植片生存过程;应用直线回归,分析 ELISA 数据,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 角膜植片的存活情况 阳性对照组、GFP-DC 组、8-DC 组及 IL-10-GFP-DC 组的角膜植片存活时间分别为 10.86 \pm 0.60, 19.50 \pm 0.89, 19.67 \pm 1.37, 25.50 \pm 0.76d。其中 IL-10-GFP-DC 组与阳性对照组、GFP-DC 组及 8-DC 组比较,角膜植片的存活时间延长,差异具有统计学意义(均为 $P<0.01$)。各组大鼠角膜植片存活时间见表 1,角膜植片生存曲线见图 1。第 14d 裂隙灯下观察大鼠术眼角膜植片的状态,四组角膜植片的混浊、水肿、新生血管及排斥指数 Larkin 等^[5]评分,各组差异具有统计学意义(均为 $P<0.01$)。各组角膜植片第 14d 的 Larkin 评分见表 2。

2.2 大鼠房水中细胞因子变化 利用 Excel 软件求得细胞因子 IL-4 和 IFN- γ 标准曲线的直线回归方程,并绘制以细胞因子含量为纵坐标,OD 值为横坐标的标准曲线图(图 2,3)。同样方法计算样品孔矫正 OD 值,代入方程求得样品细胞因子 IL-4 和 IFN- γ 的含量,各组测量结果均独立重复 3 次(图 4,5)。五组房水中 IL-4 和 IFN- γ

表1 各组角膜植片存活时间

分组	n(眼)	存活时间(d)	$\bar{x} \pm s$
阳性对照组	7	9,11,10,8,13,12,9	10.86 ± 0.60
GFP-DC组	6	21,18,23,17,19,19	19.50 ± 0.89 ^b
8-DC组	6	20,19,22,18,20,18	19.67 ± 1.37 ^b
IL-10-GFP-DC组	6	23,24,27,25,28,26	25.50 ± 0.76 ^{b,d,f}

注:^b $P < 0.01$ vs 阳性对照组;^d $P < 0.01$ vs GFP-DC组;^f $P < 0.01$ vs 8-DC组。

表2 术后第14d 各组排斥反应比较

分组	混浊	水肿	新生血管	RI	$\bar{x} \pm s$
阳性对照组	2.857 ± 0.900	1.429 ± 0.535	2.286 ± 0.488	6.571 ± 1.272	
GFP-DC组	1.167 ± 0.408 ^b	0.833 ± 0.752	1.500 ± 0.547 ^b	3.500 ± 0.837 ^b	
8-DC组	1.203 ± 0.324 ^b	0.799 ± 0.721	1.473 ± 0.511 ^b	3.759 ± 0.213 ^b	
IL-10-GFP-DC组	0.547 ± 0.500 ^b	0.548 ± 0.500 ^b	1.000 ± 0.632 ^b	1.833 ± 0.753 ^{a,b,c}	

注:^a $P < 0.05$ vs GFP-DC组;^b $P < 0.01$ vs 阳性对照组;^c $P < 0.05$ vs 8-DC组。

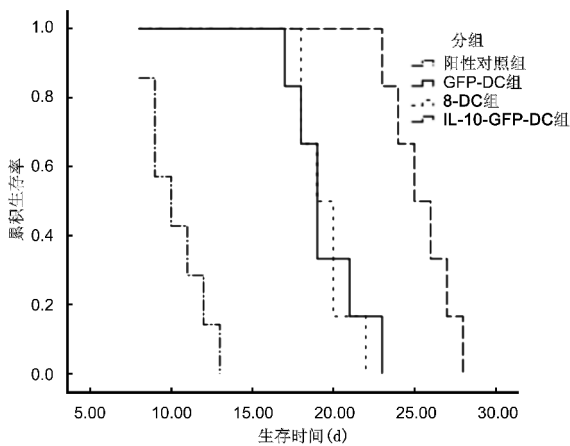


图1 各组角膜植片生存曲线。

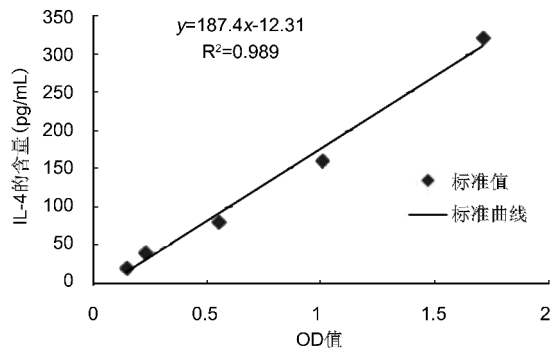


图2 IL-4的ELISA标准曲线图。

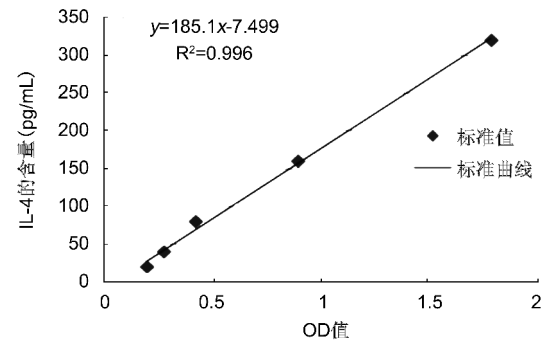


图3 IFN-γ的ELISA标准曲线图。

的表达组间比较差异具有统计学意义($P < 0.01$)。其中,阴性对照组大鼠(正常大鼠)房水中亦有IL-4和IFN-γ的表达。IL-10-GFP-DC组IL-4表达较阳性对照组、

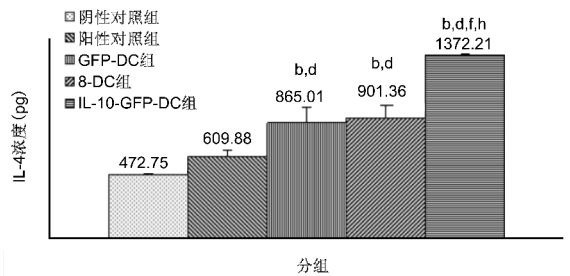


图4 各组房水中IL-4细胞因子的表达 注:^b $P < 0.01$ vs 阴性对照组;^d $P < 0.01$ vs 阳性对照组;^f $P < 0.01$ vs GFP-DC组;^h $P < 0.01$ vs 8-DC组。

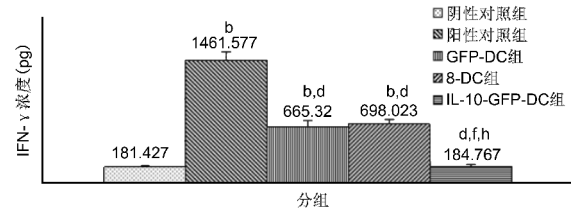


图5 各组房水中IFN-γ细胞因子的表达 注:^b $P < 0.01$ vs 阴性对照组;^d $P < 0.01$ vs 阳性对照组;^f $P < 0.01$ vs GFP-DC组;^h $P < 0.01$ vs 8-DC组。

GFP-DC组及8-DC组显著增强,差异具有统计学意义(均为 $P < 0.01$)。IL-10-GFP-DC组IFN-γ表达较阳性对照组、GFP-DC组及8-DC组低,差异具有统计学意义(均为 $P < 0.01$)。

3 讨论

众多研究表明,角膜移植排斥反应是以细胞免疫为主、多种因素共同参与的复杂过程。在抗原信号、共刺激信号及促生长因子等因素的作用下,抗原特异性T淋巴细胞活化、增殖,从而启动排斥反应的效应环节。目前观点认为,Th细胞及其细胞因子在移植免疫中起十分重要的作用,Th1/Th2细胞因子的动态平衡与移植后免疫反应密切相关,Th1细胞因子分泌增加可致排斥反应,当Th1/Th2向Th2偏移,易发生免疫耐受反应^[6,7]。

IL-10称为细胞因子合成抑制因子(cytokine synthesis inhibitory factor,CSIF),最初被认为是由Th2细胞合成及分泌的细胞因子^[8,9]。然而,目前广泛认为IL-10不限于某些特定的T细胞亚群,而是产生于几乎所有的白细胞^[10]。体内IL-10主要来源包括辅助性T细胞、单核细

胞、巨噬细胞和树突状细胞。但在某些环境下,无数的免疫效应细胞类型都能产生 IL-10,如 B 细胞、细胞毒性 T 细胞、NK 细胞、肥大细胞、粒细胞(中性粒细胞和嗜酸性粒细胞)等^[11]。此外,非免疫效应的类型,如上皮细胞和角质形成细胞,在出现感染或组织损伤以及肿瘤形成时也能够产生 IL-10。在体外,IL-10 降低单核细胞 MHC II 类抗原和 ICAM-1 (CD54),B7-1 及 B7-2(CD86)等协同刺激分子的表达,降低单核细胞的黏附能力,降低 APC 抗原提呈作用^[12-15],并抑制巨噬细胞的功能及 Th1 型细胞的免疫反应,使其相关的细胞因子,如 IL-2 和 IFN- γ 等分泌减少,发挥免疫抑制作用,诱导调节性 T 细胞介导的免疫耐受的形成^[16,17]。由此可见,IL-10 的抑制特性使得其在诱导器官免疫耐受中的作用凸显出来。

本实验室前期的研究利用腺病毒将外源性 IL-10 基因转染到大鼠骨髓来源的 DC 后,经绿色荧光蛋白测试转染率高达 90% 以上,流式细胞仪检测结果显示,转染后的 DC 特异性成熟标志 CD83 及 DC 表面共刺激分子 CD86 呈低表达,同时通过 Western-Blot 方法检测到 IL-10 蛋白的高表达,在淋巴细胞增殖反应中 IL-10 基因转染后的 DC 刺激同种异体 T 淋巴细胞增殖水平较低,提示转染 IL-10 基因后的 DC 具备了未成熟 DC 诱导的免疫无能及免疫低反应性。即证实将外源性 IL-10 基因导入 DC 细胞,能维持 DC 的不成熟状态^[4],进而抑制异体 T 淋巴细胞增殖。

本研究采用穿透性角膜移植术前,经鼠尾静脉给予 IL-10 基因修饰的大鼠 DC 处理。结果显示,IL-10-GFP-DC 组植片的存活率明显高于其他各组,说明应用转染了 IL-10 的 DC 诱导免疫耐受更有优势。术后 14d 采用酶联免疫吸附测定法对大鼠房水中细胞因子进行了检测。检测结果表明,IL-10 基因修饰后的大鼠 DC 对角膜移植术后房水中的细胞因子有调节作用。上调房水中由 Th2 细胞分泌的细胞因子 IL-4 的表达,抑制房水中由 Th1 细胞分泌的细胞因子 IFN- γ 的表达,推测外源性 IL-10 转染大鼠 DC 细胞通过干扰大鼠房水中细胞因子的表达而抑制角膜移植术后排斥反应的发生,诱导免疫耐受的产生。

参考文献

- 1 Pleyer U, Schlickeiser S. The taming of the shrew? The immunology of corneal transplantation. *Acta Ophthalmol* 2009;87(5):488-497
- 2 van Spriël AB, de Jong EC. Dendritic cell science: more than 40 years of history. *J Leukoc Biol* 2013;93(1):33-38
- 3 Xin H, Yang W, Wang Q, et al. Immune tolerance of skin allograft transplantation induced by immature dendritic cells of a third party

- 4 田丽华,李雪,刁玉梅,等. IL-10 基因修饰的大鼠树突状细胞表型分析及生物学特性的研究. *免疫学杂志* 2012;28(3):227-230
- 5 Larkin DF, Calder VL, Lightman SL. Identification and characterization of cells infiltrating the graft and aqueous humour in rat corneal allograft rejection. *Clin Exp Immunol* 1997;107(2):381-391
- 6 Chen Y, Chen J, Liu Z, et al. Relationship between TH1/TH2 cytokines and immune tolerance in liver transplantation in rats. *Transplant Proc* 2008;40(8):2691-2695
- 7 Liao W, Zeng F, Kang K, et al. Lipoxin A4 Attenuates Acute Rejection Via Shifting Th1/Th2 Cytokine Balance in Rat Liver Transplantation. *Transplant Proc* 2013;[Epub ahead of print]
- 8 Niederhorn JY. Mechanisms of corneal graft rejection; the sixth annual thygeson lecture, presented at the Ocular Microbiology and Immunology Group meeting, October 21, 2000. *Cornea* 2001;20(7):675-679
- 9 Mosmann TR, Schumacher JH, Fiorentino DF, et al. Isolation of monoclonal antibodies specific for IL-4, IL-5, IL-6, and a new Th2-specific cytokine (IL-10), cytokine synthesis inhibitory factor, by using a solid phase radioimmunoabsorbent assay. *J Immunol* 1990;145(9):2938-2945
- 10 Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 2010;10(3):170-181
- 11 Feng L, Tang WW, Chang JC, et al. Molecular cloning of rat cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) cDNA and expression in spleen and macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;192(2):452-458
- 12 Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol* 2012;32(1):23-63
- 13 Hirayama S, Sato M, Loisel-Meyer S, et al. Lentivirus IL-10 Gene Therapy Down-Regulates IL-17 and Attenuates Mouse Orthotopic Lung Allograft Rejection. *Am J Transplant* 2013;13(6):1586-1593
- 14 Mandegary A, Azmandian J, Soleymani S, et al. Effect of donor tumor necrosis factor- α and interleukin-10 genotypes on delayed graft function and acute rejection in kidney transplantation. *Iran J Kidney Dis* 2013;7(2):135-141
- 15 Sana G, Lombard C, Vosters O, et al. Adult human hepatocytes promote CD4+ T cell hyporesponsiveness via interleukin-10 producing allogeneic dendritic cells. *Cell Transplant* 2013;[Epub ahead of print]
- 16 Liu Z, Fan H, Jiang S. CD4(+) T-cell subsets in transplantation. *Immunol Rev* 2013;252(1):183-191
- 17 O'Garra A, Vieira PL, Vieira P, et al. IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. *J Clin Invest* 2004;114(10):1372-1378