

白细胞介素-10 修饰的未成熟树突状细胞对角膜移植术后的影响

邱 姣,周军格

作者单位:(430010)中国湖北省武汉市,长江航运总医院眼科
作者简介:邱姣,毕业于辽宁医学院,硕士,住院医师,研究方向:
眼表疾病。

通讯作者:邱姣.95356043@qq.com

收稿日期:2013-06-29 修回日期:2013-09-10

Effects of IL-10 modified immature dendritic cells after corneal transplantation

Jiao Qiu, Jun-Ge Zhou

Department of Ophthalmology, Central Hospital of the Yangtze River Shipping, Wuhan 430010, Hubei Province, China

Correspondence to: Jiao Qiu. Department of Ophthalmology, Central Hospital of the Yangtze River Shipping, Wuhan 430010, Hubei Province, China. 95356043@qq.com

Received:2013-06-29 Accepted:2013-09-10

Abstract

• **AIM:** To observe the effect of IL-10 modified immature dendritic cells (imDC) for providing theoretical and practical basis for anti-rejection of corneal transplantation.

• **METHODS:** Eighteen Wistar rats were used as donors and 36 SD rats were used as recipients. The recipient was injected by tail with donor IL-10-treated imDC or with untreated imDC. The rats were randomly assigned to three groups, 12 in control group received no pretreatment, 12 in imDC group were injected with imDC (2×10^6) 3d before surgery, and 12 in IL-10-imDC group were injected with IL-10-imDC (2×10^6) 3d before surgery. The survival time of corneal allografts in three groups were observed. The expression of NF- κ B was detected by histopathological examination 14d postoperative.

• **RESULTS:** The mean survival time was merely 10.17 \pm 2.16d, 19.83 \pm 2.25d and 27.57 \pm 1.72d respectively in control, imDC and IL-10-imDC groups. There was significant difference among three groups ($P < 0.01$). Corneas in groups B and C had fewer infiltrating cells, corneal thickness almost normal, and stroma arrangement in order, the center of the grafts showed no inflammatory cellular infiltration. NF- κ B cells strongly expressed in control group ($P < 0.05$), and there was no significant difference between groups B and C ($P > 0.05$).

• **CONCLUSION:** IL-10 can restrain DC from mature.

Derivatives from donor imDC can markedly prolong the survival time of corneal allografts. NF- κ B may play a potential role in the development of corneal graft rejection.

• **KEYWORDS:** IL-10; dendritic cells; keratoplasty; immunologic tolerance

Citation: Qiu J, Zhou JG. Effects of IL-10 modified immature dendritic cells after corneal transplantation. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(10):1978-1981

摘要

目的:研究白细胞介素-10(IL-10)修饰的未成熟树突状细胞(imature dendritic cells, imDC)对大鼠同种异体角膜移植术后免疫耐受的影响。

方法:用培养的供体来源的 imDC 及 IL-10-imDC 预处理受体,建立 Wistar-SD 大鼠穿透性角膜移植模型。供体 Wistar 大鼠 18 只;受体 SD 大鼠 36 只,受体鼠随机分为 3 组,每组均为 12 只。A 组(对照组);受体鼠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 imDC,细胞数为 2×10^6 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 imDC,细胞数为 2×10^6 个。观察术后各组受体角膜植片的存活时间;术后第 14d 各组随机抽取 4 只鼠取术眼角膜行组织病理学检查及免疫组化法检测 NF- κ B 的表达。

结果:三组植片存活时间分别为 10.17 \pm 2.16, 19.83 \pm 2.25, 27.57 \pm 1.72d;三组组间比较,差异均有显著性($P < 0.01$)。A 组角膜植片显著水肿、增厚,出现大量的淋巴细胞和单核细胞浸润,角膜基质排列紊乱。B, C 两组植片炎症细胞浸润均显著减少,角膜厚度及结构基本正常。NF- κ B 在 A 组即对照组中呈高表达($P < 0.05$), B, C 组间比较无显著性差异($P > 0.05$)。

结论:IL-10 可有效抑制树突状细胞(dendritic cells, DC)成熟。摄取供体的 imDC 能显著延长角膜植片的存活时间。IL-10-imDC 可抑制 NF- κ B 的表达水平,从而抑制角膜排斥反应的发生。

关键词:白细胞介素-10;树突状细胞;角膜移植;免疫耐受

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.10.09

引用:邱姣,周军格.白细胞介素-10 修饰的未成熟树突状细胞对角膜移植术后的影响.国际眼科杂志 2013;13(10):1978-1981

0 引言

角膜移植是目前成功率最高的组织移植手术,而免疫排斥反应仍是该手术失败的主要原因。随着移植学实验及临床实践的发展,如何诱导角膜移植的免疫耐受,使受者在保持正常免疫应答能力的情况下诱导供体特异性免疫耐受从而获得更长期的植片存活一直是研究的热点。树突状细胞(dendritic cells, DC)是目前已知的功能最强的专职抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC), DC的功能主要与其成熟状态有关。成熟树突状细胞(mature dendritic cells, mDC)可捕获和加工提呈外来抗原,激活初始型 T 细胞启动免疫反应;未成熟树突状细胞(immature dendritic cells, imDC)能够诱导免疫耐受,防止移植排斥反应的发生^[1]。体外研究发现,经白细胞介素-10(IL-10)预处理后的 imDC 能降低效应性 T 细胞的反应能力,可用于抑制炎症免疫反应和 T 细胞介导的免疫反应^[2]。本实验通过获取所需的 imDC,继而采用这些细胞预处理受体,观察角膜移植后植片的存活情况,探讨经 IL-10 修饰的 imDC 对大鼠角膜移植术后免疫耐受的影响作用。

1 材料和方法

1.1 材料 健康雌性 Wistar 大鼠(供体)18 只,质量 200~250g,购自中国医科大学实验动物中心。成年健康雄性 SD 大鼠(受体)36 只,质量 200~250g,购自辽宁医学院实验动物中心。RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司);胎牛血清(杭州四季青生物试剂公司);细胞因子 rrGM-CSF, rrIL-4, rrIL-10(英国 PeproTech 公司);OX62-FITC/CD86-PE(Serotec 公司);NF- κ B 试剂盒(武汉艾美捷科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 DC 及 IL-10 修饰的 DC 的制备 DC 及 IL-10 修饰的 DC 制备参考 Hermans 等方案取 Wistar 大鼠 1 只颈动脉处死,750mL/L 的乙醇中浸泡 5min。无菌手术取出股骨和胫骨,用磷酸盐缓冲液(PBS)反复冲洗出骨髓,将骨髓细胞的骨髓冲洗液经 100 目铜网过滤后收入离心管中,3000r/min 离心 20min,弃上清;沉淀细胞用无血清 RPMI 1640 培养液重悬,将细胞悬液贴壁缓慢加入盛有等体积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。取中间层至离心管内,加 PBS,2000r/min 离心 10min,弃上清。重复上述过程 2 次,取初步纯化的单个核细胞,重悬于无血清 RPMI 1640 培养液中调整细胞浓度至 1×10^{10} 个/mL,接种于 6 孔培养板,置于 37℃、50mL/L CO₂ 培养箱中培养 2h,取出后用 37℃ 预温的 RPMI 1640 培养液洗去非黏附细胞,然后于贴壁细胞中加入含细胞因子 rrGM-CSF(10 μ g/L)、rrIL-4(10 μ g/L)的培养液中常规培养,每 3d 更换含上述细胞因子的新鲜培养液。培养期间每日在相差倒置显微镜下观察细胞形态。培养至第 6d,细胞贴壁生长并呈现短毛刺状时即为 DC 诱导成功。收集部分细胞,与 20 μ g/L 浓度的 IL-10 共同孵育 48h 即为 IL-10 修饰的 DC。流式细胞仪检测 DC 表面 OX62 和 CD86 分子的表达,IL-10 修饰的 DC 表面标志性抗原 OX62 高表达(88.9%),CD86 低表达(12.6%),符合 imDC 的表型。

1.2.2 实验分组及角膜移植动物模型的建立 受体 SD 大鼠 36 只,随机分为 3 组,每组均为 12 只。A 组(对照组):受体鼠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 imDC,细胞数为 2×10^6 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 imDC,细胞数为 2×10^6 个。参照 Williams 等^[3]的方法建立大鼠穿透性角膜移植(PKP)模型:于术前 15min 起滴 5g/L 复方托吡卡胺滴眼液充分散瞳,庆大霉素 2000U 冲洗结膜囊。常规消毒铺巾,在手术显微镜下首先于供体鼠角膜中央区钻取直径为 3.5mm 植片,备用。然后对受体鼠右眼行穿透性角膜移植术,植床 3.0mm,10-0 Alcon 尼龙线间断缝合 8 针,线结不埋藏。术前房内注入消毒小气泡,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 阿托品滴眼液每日 3 次滴眼 7d,不拆除角膜缝线。术后第 1d 起在裂隙灯显微镜下对受体鼠移植角膜进行观察。排斥反应发生之前,每日 1 次;排斥反应发生后每周 2~3 次。参照 Larkin 等^[4]的评分标准对角膜植片混浊、水肿、新生血管三项指标进行评分。三项评分之和为当日排斥反应指数(rejection index, RI),当 $RI \geq 5$ 或植片混浊一项达到 3 时,即认为排斥反应发生。

1.2.3 HE 染色及免疫组织化学检测 于术后第 14d 各组随机抽出 4 只大鼠术眼取材,全眼球摘除,10% 甲醛固定,常规石蜡包埋,5 μ m 切片,1 张石蜡切片行常规 HE 染色,光学显微镜下观察其病理学变化。其余每组各取 3 张石蜡切片行免疫组织化学的检测,以 PBS 液代替一抗作阴性对照。每张切片随机取 4 个视野(每个视野面积为 0.2mm \times 0.2mm)做图像分析,计算平均光密度。

统计学分析:采用 SPSS 17.0 软件包进行数据处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间差异采用单因素方差分析(one way-ANOVA),进而采用 LSD-*t* 法检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 角膜植片裂隙灯显微镜观察结果 PKP 术后第 1wk 内由于炎症反应各组角膜均出现一过性水肿、混浊,1wk 后各组角膜开始呈现不同免疫排斥情况(表 1):A 组混浊、水肿、新生血管及 RI 这 4 项指标均明显高于 B、C 两组($P < 0.01$);B、C 组间比较差异无显著性($P > 0.05$)。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($P < 0.01$)。

2.2 病理学及免疫组织化学检测

2.2.1 病理学检查 A 组角膜植片显著水肿、增厚,出现大量的淋巴细胞和单核细胞浸润,角膜基质排列紊乱(图 1A);B、C 两组植片炎性细胞浸润均显著减少,角膜厚度及结构基本正常(图 1B、C)。

2.2.2 NF- κ B 在角膜植片中的表达 A 组角膜植片的上皮层基底部分出现大量聚集的 NF- κ B 阳性细胞(图 2A);而 B、C 两组角膜植片的上皮层亦存在 NF- κ B 阳性表达,但他们的表达强度较 A 组均明显减少(图 2B、C)。NF- κ B 的平均光密度 A 组(0.560 ± 0.91)明显高于其他两组,与

表1 三组大鼠角膜移植术后植片的评分以及平均存活时间 $\bar{x} \pm s$

组别	混浊度	水肿	新生血管	排斥指数	排斥发生时间(d)
A组	3.50±0.53 ^b	1.58±0.51 ^b	1.75±0.62 ^b	5.17±1.03 ^b	10.17±2.16 ^b
B组	0.92±0.66	0.75±0.45	0.42±0.79	1.88±0.90	19.83±2.25 ^d
C组	0.83±0.57	0.75±0.46	0.45±0.46	1.83±0.64	27.57±1.72

^b $P < 0.01$ vs B,C组; ^d $P < 0.01$ vs C组。

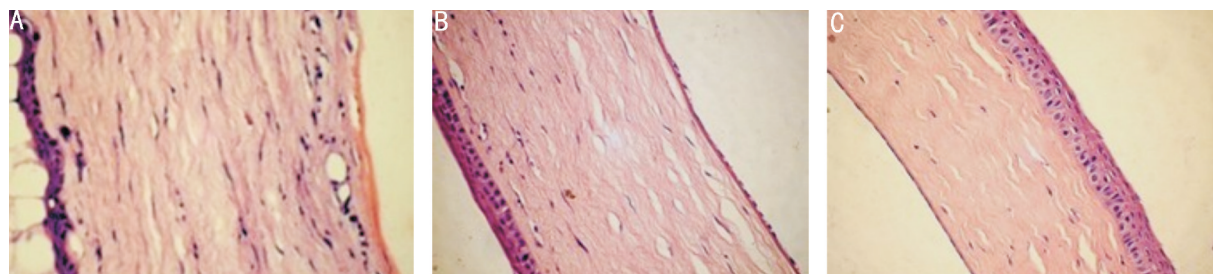


图1 三组移植术后角膜病理学检查(×200) A:A组;B:B组;C:C组。

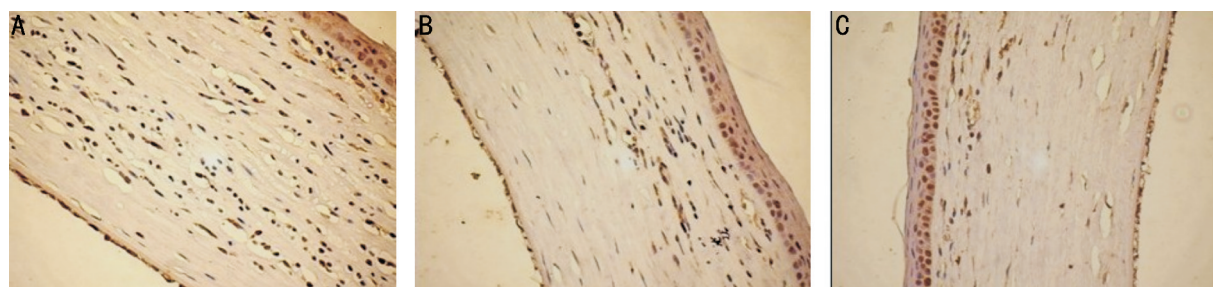


图2 三组移植术后免疫组织化学检测在角膜植片中NF-κB的表达(×200) A:A组;B:B组;C:C组。

其他两组相比较差异均有统计学意义($P < 0.05$);B组(0.212±0.06),C组(0.192±0.03)两组比较差异无显著性($P > 0.05$)。

3 讨论

目前,移植学界普遍认为解决异体移植排斥反应的关键在于诱导受体对供体器官产生免疫耐受,即受体免疫系统对供体器官产生特异性免疫无反应性^[5]。DC是由美国ROCKFELLE大学Steinman等^[6]于1973年在分离小鼠脾细胞中被发现并报道的,因其在成熟状态时伸出树突状伪足而得名。随着DC在免疫反应中的作用机制逐步被阐明,人们发现DC是抗原提呈过程的中心环节,在免疫耐受的诱导中起着重要的作用。DC的作用取决于其成熟状态,近年来已有动物实验证实,输注imDC在一定程度上可延长移植物的存活时间^[7]。因为imDC表面缺乏协同刺激因子即T细胞活化的第二信号使T细胞特异性无应答,但在摄取抗原或受到某些炎性细胞因子(如TNF-α)、细菌成分(如LPS)的刺激后,细胞表型会迅速改变为成熟状态,从而失去耐受原作用,诱发免疫应答反应^[8],故单独应用imDC的效果不甚满意。因此,使DC稳定地保持不成熟状态是诱导移植免疫耐受的关键。有研究证实,imDC分泌IL-10在免疫耐受中起重要作用^[9]。

IL-10是一种可以抑制同种移植免疫反应的细胞因子。研究发现,IL-10可以降低单核细胞的抗原递呈能力、下调MHCII表达,阻止抗原特异T细胞的增殖,由此减弱或消除T、B细胞介导的免疫应答,导致T细胞无能。另外,通过特异性的抑制T细胞IL-2的分泌,IL-10可抑

制T细胞的增殖^[10]。此外IL-10还能直接作用于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。这些特性可以看出作为一种潜在的免疫增殖反应和炎症反应的负性调节因子,IL-10在抵抗外界刺激因子对DC刺激的同时可使DC稳定地维持在不成熟状态。而且目前没有发现IL-10对健康受试者存在严重毒副作用。因此,在本实验中我们应用IL-10处理DC,抑制DC成熟,促使在受体内的供体DC维持于不成熟状态,导致T细胞的低应答或无应答,从而使移植植物存活时间进一步延长。核因子-κB(NF-κB)是一种细胞内普遍存在的重要的转录因子,它可高效诱导多种细胞因子、免疫识别受体和急性期反应蛋白编码基因的表达,进而影响机体的炎症反应^[11]。

本实验中我们应用IL-10修饰供体imDC后输注给受体的预处理方法,在成功建立大鼠同种异体角膜移植模型的基础上,观察角膜移植后受体植片存活和排斥反应情况,同时检测术眼角膜NF-κB的表达。结果显示,与对照组比较,实验组角膜植片存活时间明显延长,术后14d角膜植片混浊、水肿、新生血管及RI均显著降低。对照组角膜植片呈大量炎细胞浸润,植片显著水肿,角膜基质排列紊乱;而实验组角膜植片炎细胞显著减少,角膜结构基本正常。NF-κB在对照组呈显著高表达,而实验组的表达水平显著降低。IL-10-imDC组角膜植片存活时间最长,炎症反应最轻,NF-κB表达水平最低。用IL-10修饰供体来源的imDC输注给受体,可能抑制了共刺激通路^[12],使受体处于一种低应答状态,抑制了植片的炎细胞浸润和

NF- κ B 的表达,降低受体对移植物的排斥,从而延长了角膜植片的存活时间。IL-10 可在一定程度上维持 DC 的未成熟状态,进一步延长角膜植片存活时间。但我们也发现,供体来源的 IL-10-imDC 虽然延长了移植物的存活时间,但在一定时间后仍会发生排斥反应。其原因可能是随着 imDC 的逐步成熟,其诱导耐受的作用逐步减弱,并不能完全保护供者的移植物免于受者 T 细胞的攻击。其次,也可能是多种免疫细胞参与免疫活动,如树突状细胞、调节性 T 细胞、自然杀伤 T 细胞等,它们在诱导免疫耐受中均可抑制角膜移植术后排斥反应,而并非只依赖于单一的耐受机制。因此,如何进一步增强角膜移植术后的免疫耐受从而更有效地延长角膜植片的存活时间,仍有待学者们深入探讨。

参考文献

- 1 韩波,胡燕华. CTLA4 Ig 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
- 2 Lgyarto BZ, Jenison MC. Langerhans cells suppress contact hypersensitive response via cognate CD4 interaction and langerhans cell-derived IL-10. *J Immunol* 2009;183(8):5085-5093
- 3 Williams KA, Coster DJ. Penetrating corneal transplantation in the inbred rat: a new model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985;26(1):23-30

- 4 Larkin DFP, 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
- 5 Waldmann H. Transplantation tolerance where do we stand. *Nat Med* 1999;5:1245-1248
- 6 Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in perithelial lymphoid organs of mice I Morphology quantitation tissue distribution. *J Exp Med* 1973;137(5):1142-1162
- 7 Raimondi G, Thomson AW. Dendritic cells, tolerance and therapy of organ allograft rejection. *Contrib Nephrol* 2005;146:105-120
- 8 Liu E, Law HK, Lau YL. Tolerance associated with cord blood transplantation may depend on the state of host dendritic cells. *Br J Hematology* 2004;126:517-526
- 9 Lgyarto BZ, Jenison MC. Langerhans cells suppress contact hypersensitivity responses via cognate CD4 interaction and langerhans cell-derived IL-10. *J Immunol* 2009;183(8):5085-5093
- 10 Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003;3(2):133-136
- 11 刁玉梅,李兵. 细胞与角膜移植免疫耐受. 国际眼科杂志 2010;10(9):1716-1718
- 12 Klebe S, Coster DJ, Williams KA. Rejection and acceptance of corneal allografts. *Curr Opin Organ Transplant* 2009;14(1):4-9

热烈祝贺《国际眼科杂志》中、英文版两刊被 DOAJ 收录

本刊讯: 国际眼科杂志英文版——International Journal of Ophthalmology 和国际眼科杂志中文版——International Eye Science 分别于 2013-04-24 和 2013-05-06 率先被全球最具影响力的开放存取期刊数据库——DOAJ(directory of open access journals)收录。

DOAJ 是目前最权威、认知度最高的开放存取期刊目录。2003-02,在 OSI(The Open Society Institute)支持下,瑞典隆德大学图书馆与 SPARC(The Scholarly Publishing and Academic Resources Coalition)联合创建了 DOAJ。DOAJ 由隆德大学图书馆负责维护,旨在覆盖所有学科、所有语种的高质量的开放存取期刊,以现代信息组织理论为基础,对开放存取期刊进行组织,提高其透明度、可用性和利用率,为科研工作者提供一站式服务,从而推动开放存取运动更快发展,促进全球范围内的学术交流和研究。该目录收录的期刊均为学术性、研究性期刊,且都经过同行评议、或者有编辑做质量控制,具有免费、全文、自由获取、高质量等特点,对学术研究有很高的参考价值。

(本刊编辑部)