

· 博士之窗 ·

中药菊花决明散防治大鼠高危角膜移植
免疫排斥反应的研究

王 颖 马东丽 接 英 潘志强 徐 健 武宇影

摘要 目的 探讨中药菊花决明散对大鼠高危角膜移植排斥反应的抑制作用。方法 角膜缝线法诱导受体角膜新生血管,行穿透性角膜移植,建立大鼠高危角膜移植排斥反应模型。术后治疗组采用每天菊花决明散方 0.1g/2 mL 灌胃,对照组采用生理盐水 2 mL 灌胃,观察植片存活状况;应用组织病理学、免疫荧光组织化学、流式细胞仪等方法对受体局部和全身免疫状态进行检测。结果 治疗组大鼠角膜植片存活时间为 (14.50 ± 3.55) 天,明显长于生理盐水组的 (8.25 ± 0.71) 天 ($P < 0.01$);治疗组术后虹膜铺片 Fas、FasL 的表达低于对照组;术后 14 天外周血中 $CD_4^+CD_{25}^+FOXP3^+$ 阳性细胞治疗组 $[(14.81 \pm 2.58)\%]$ 高于对照组 $[(5.11 \pm 3.92)\%]$,差异有统计学意义 ($P < 0.01$);治疗组房水中 IL-2 浓度低于对照组而 IL-10 浓度高于对照组。结论 菊花决明散方对高危角膜移植排斥反应模型大鼠术后免疫排斥反应具有一定抑制作用。

关键词 高危角膜移植;免疫排斥;菊花决明散方

Effect of Juhua Jueming Powder in Preventing High-risk Corneal Transplantation Immune Rejection in Rats WANG Ying, MA Dong-li, JIE Ying, et al *Beijing Ophthalmic and Visual key laboratory, Beijing Tongren Eye Center, Beijing Tongren Hospital, Beijing (100730)*

ABSTRACT **Objective** To study the inhibitory effect of Juhua Jueming powder (JJP) on high-risk corneal transplantation immune rejection in rats. **Methods** The high-risk corneal transplantation immune rejection rat model was established by inducing corneal neoangiogenesis by suture method and the penetrating transplantation. Model rats were divided into two groups, the treated group and the control group, they were administered with JJP 0.1 g (dissolved in 2 mL water) and normal saline respectively via gastric infusion every day after transplantation. The survival status of the allograft, histopathology, local and systemic immune status in the recipients were observed using immunofluorescence histochemistry and flow cytometry. **Results** The survival time of the allograft in the treated group $(14.50 \pm 3.55 \text{ days})$ was significantly longer than that in the control group $(8.25 \pm 0.71 \text{ days}, P < 0.01)$. Levels of Fas, FasL expressions in iris were stronger, and the percentage of $CD_4^+CD_{25}^+FOXP3^+$ positive cells in peripheral blood was less $(5.11 \pm 3.92\% \text{ vs } 14.81 \pm 2.58\%)$ in the control group than those in the treated group respectively. The concentration of IL-2 was lower while that of IL-10 was higher in aqueous humor of the treated group than those of the control group, respectively. **Conclusion** JJP has certain effect for preventing high-risk corneal transplantation immune rejection in rat model.

KEYWORDS high-risk corneal transplantation; immune rejection; Juhua Jueming powder

角膜疾病是目前致盲的主要原因之一。严重的感染、外伤以及合并眼内多种疾病均可造成角膜新生血管、角膜免疫优势地位丧失,即使行穿透性角膜移植,

术后免疫排斥反应也发生的早而且严重。临床上称这种角膜移植为高危角膜移植,其术后排斥率高达 60%~65%^[1]。局部应用免疫抑制剂是目前常用的提高植片存活率的方法^[2],其不良反应明显且价格昂贵。近年来我们在临床实践基础上进行了中药抗排斥实验研究,选用元代·倪维德《原机启微》“菊花决明散”加减抑制角膜移植术后排斥反应,现将结果报告如下。

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (No.30672712)

作者单位:首都医科大学附属北京同仁医院,北京同仁眼科中心,
北京市眼科学与视觉科学重点实验室 (北京 100730)

通讯作者:马东丽, Tel:010-58265781, E-mail: mal888@163.com

材料与方 法

1 实验动物 选用 SPF 级大鼠,32 只 Lewis 大鼠作为受体,16 只 Fisher 344 大鼠作为供体。受体和供体均为雌性,8~10 周龄,160~180 g。受体大鼠右眼接受穿透性角膜移植手术。实验动物购买、饲养、手术操作及术后观察均于首都医科大学实验动物中心完成。

2 中药配制 菊花决明散由生石决明、醋鳖甲、黄芩、生白芍、赤芍、菊花等按比例配方,遵照煎药规则加水煮沸,沸腾过滤,滤液浓缩,干燥浸膏,加 95% 乙醇适量,制成颗粒剂,由北京首创大地药业有限公司(现更名为北京康仁药业有限公司)配制,用时 0.1 g 加生理盐水 2 mL。

3 实验方法

3.1 手术方法 (1)缝线法诱导受体大鼠角膜新生血管:角膜移植术前 7 天采用 Alcon 10-0 尼龙线,于受体角膜深基质层间隔 120 度间断缝合 3 针,诱导角膜新生血管^[3]。每日观察角膜新生血管生长情况并分级。选择缝线 7 天后 4 个象限新生血管均匀长入角膜中周区(新生血管达到 2 级)的大鼠作为高危受体行穿透性角膜移植术。缝线后角膜新生血管的分级:0 级:角膜无新生血管;1 级:4 个象限的新生血管超过角膜缘进入角膜周边区,长度 <1 mm;2 级:4 个象限的新生血管超过角膜缘进入角膜中周区,长度 1~2 mm;3 级:4 个象限的新生血管超过角膜缘进入角膜中央区,长度 >2 mm。(2)穿透性角膜移植手术:参照 Williams^[4]的方法行正位穿透性角膜移植术。供体全身麻醉双眼取材后过量麻醉处死。受体大鼠全身麻醉后,右眼用复方托品酰胺目水充分散瞳,爱尔卡因表面麻醉。3.0 环钻取供体角膜植片放入 Optisol 角膜保存液中备用,2.5 环钻取受体角膜,10-0 尼龙线间断缝合 8 针,行正位穿透性角膜移植术。术毕结膜下注射硫酸妥布霉素 0.1 mL,红霉素眼膏涂眼,5-0 丝线缝合眼睑,24 h 后拆除眼睑缝线。角膜植片缝线在整个观察期内保留不去除。术后出现并发症者,如前房出血,感染,虹膜前粘连或前房消失者排除在观察之列。

3.2 分组与治疗方法 将 32 只受体大鼠随机分为治疗组和对照组,每组 16 只大鼠。术后 1 周两组大鼠用 0.25% 氯霉素及复方托品酰胺目水点眼,每天 2 次;自术后第 1 天治疗组用菊花决明散方 0.1g/2 mL 灌胃每天 1 次,对照组用生理盐水 2 mL 灌胃每天 1 次,共治疗 4 周。

3.3 术后角膜植片观察 术后每日在裂隙灯显微镜下观察角膜植片的混浊、水肿和新生血管情况并

进行评分,分别记录术后每只大鼠排斥反应发生的时间即存活时间,直到排斥反应发生,之后每周观察 3 次,共 4 周。角膜植片混浊分为 0-5 级(即 0-5 分),每级记为 1 分^[5],混浊评分 ≥3 分即判定为免疫排斥反应发生。混浊评分:0 级,植片清亮,无混浊;1 级,植片上皮混浊;2 级,植片基质轻度混浊,虹膜纹理清晰可见;3 级,植片基质中度混浊,虹膜纹理模糊可见;4 级,植片基质广泛混浊,仅可见瞳孔;5 级,植片基质完全混浊,前房窥不入。

3.4 术后眼局部和全身免疫指标检测 角膜移植术后第 7、14、28 天,治疗组和对照组中分别随机处死符合观察标准的大鼠各 4 只,取其角膜、虹膜、外周血和房水,用于局部和全身免疫学检测。(1)外周血的取材:动物麻醉后,以毛细管穿刺其健侧眼眶静脉丛,EDTA 抗凝管接取流出的血液约 1 mL。血液室温下放置备用^[6],用于外周血淋巴细胞亚群的流式细胞仪检测。(2)房水的取材:动物麻醉后,用眼科弯钳将一侧眼球固定,一手持前房穿刺刀,另一手持 100 μL 毛细管一端。穿刺刀和角膜成 15 度夹角,略偏向操作者,将刀尖和毛细管一端放在角膜内下缘同一点处,此时将刀尖刺入,房水会被自动虹吸进入毛细管。将房水置于无菌 Eppendorf 管中,立即放入 -20 ℃ 冰箱冷冻保存。(3)虹膜和角膜的取材:动物深麻醉后,行左心室插管,用肝素化的磷酸盐缓冲液和 4% 的多聚甲醛固定液进行全身灌注。灌注完成后,用弯剪摘除眼球,在立体解剖显微镜下分离虹膜和角膜^[7],用于组织病理学检查。

3.5 外周血淋巴细胞样本的制备和检测 取混匀后的 100 μL EDTA 抗凝血,加入 5 μL 小鼠抗大鼠 CD₄-APC, CD₂₅-PE, FOXP3-Alexa Fluor488 荧光标记抗体(BioLegend 公司),摇匀后室温避光 20 min 后,加入 1 mL 红细胞裂解液,摇匀后室温避光 6~10 min,1 000 r/min 离心 8 min,去上清,加 1 mL PBS 洗 1 次,1 000 r/min 离心 8 min,去上清,加入 5~10 mL PBS,摇匀,上机检测,用 Cellquest 软件获取数据并分析各细胞亚群百分数。

3.6 虹膜铺片免疫荧光染色 虹膜组织放在装有预热的 20 mmol/L EDTA 的密闭管型瓶中,37 ℃ 孵育 30 min,放入 24 孔板中(Iwaki Glass, Tokyo, Japan),然后快速用含 0.1% 吐温-20 PBS 清洗 3 次,每次 10 min。用二抗来源的血清原液封闭 1 h,不用清洗。将虹膜分成 5 块组织,分别放入 5 个孔中(3 个一抗,2 个阴性对照),选择一抗为小鼠抗大鼠 Fas, FasL, 二抗为羊抗小鼠 IgG-FITC。荧光显微镜下观察细胞着

色情况并拍照,对于不同细胞因子,分别随机计数 5 个高倍视野中(×1 000)阳性细胞数目并取其均值比较其表达量。

3.7 房水中白细胞介素(IL)-2 及 IL-10 检测
分别将房水样本及标准品分别加入抗大鼠 IL-2 和 IL-10 的抗体包被的 96 孔板中,每一份样品和标准品浓度均测 3 个孔,37 ℃ 孵育 1.5 h,洗板 3 次后,每孔加入生物素化抗体,37 ℃ 孵育 1 h,洗板 3 次,每孔加入链霉素-辣根过氧化物酶溶液,37 ℃ 孵育 30 min 后,洗板 3 次,每孔加入 TMB 溶液,避光、室温放置显色 30 min 后加入终止液。分别以 450 nm 和 550 nm 波长测每孔的吸光度值,根据标准曲线计算出样品的 IL-2 和 IL-10 浓度。

4 统计学方法 采用 SPSS 13 系统处理数据,各组植片存活时间之间的差异,采用独立样本 *t* 检验进行统计学检验。

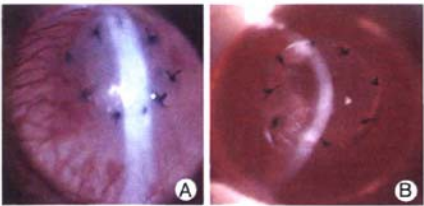
结 果

1 两组角膜植片存活时间比较 角膜植片的平均存活时间(mean survival time, MST)对照组为(8.25 ± 0.71)天,治疗组为(14.50 ± 3.55)天,两组比较差异有统计学意义(*t* = -4.89, *P* < 0.01),治疗组植片平均存活时间明显较对照组延长(表 1)。术后第 10 天,对照组角膜植片发生免疫排斥反应,植片混浊水肿伴新生血管长入(图 1A),治疗组植片清亮,轻度水肿,未见新生血管长入植片(图 1B)。

表 1 两组角膜植片存活时间比较

组别	<i>n</i>	存活时间 (天)	平均存活时间 (天, $\bar{x} \pm s$)
对照	8	8,7,9,8,9,8,9,8	8.25 ± 0.71
治疗	8	18,18,20,12,11,12,12,13	14.50 ± 3.55*

注:与对照组比较,**P* < 0.01



注:A 为对照;B 为治疗组

图 1 角膜移植术后 14 天两组植片外眼像

2 外周血 CD₄⁺CD₂₅⁺FOXP3⁺ 淋巴细胞亚群分析(表 2) 角膜移植术后,对照组外周血中 CD₄⁺CD₂₅⁺FOXP3⁺ 细胞百分数随时间逐渐减少,而治疗组

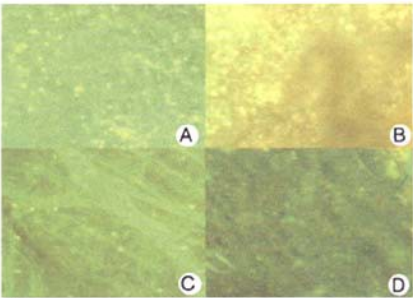
CD₄⁺CD₂₅⁺FOXP3⁺ 细胞先升高后下降;两组术后 7 天和 28 天比较差异无统计学意义(*P* > 0.05),术后 14 天比较差异有统计学意义(*P* = 0.008 < 0.01)。

表 2 两组术后 7、14 及 28 天外周血中 CD₄⁺CD₂₅⁺FOXP3⁺ 细胞比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	<i>n</i>	CD ₄ ⁺ CD ₂₅ ⁺ FOXP3 ⁺ 细胞
对照	术后 7 天	4	10.39 ± 2.54
	术后 14 天	4	5.11 ± 3.92
	术后 28 天	8	1.31 ± 1.42
治疗	术后 7 天	4	12.26 ± 0.68
	术后 14 天	4	14.81 ± 2.58*
	术后 28 天	8	2.30 ± 2.91

注:与对照组比较,**P* < 0.01

3 两组术后 14 天 Fas 和 FasL 表达 角膜移植术后第 7 天,对照组虹膜铺片可见少量 Fas 及 FasL 表达,菊花决明散方治疗组未见明显表达。术后 14 天对照组可见大量 Fas 及 FasL 表达,每高倍视野中阳性细胞数分别为 18.12 ± 2.32,26.29 ± 3.13,治疗组中仅可见少量表达,每高倍视野中阳性细胞数分别为 5.42 ± 1.21,3.15 ± 1.03(图 2)。



注:A 为对照组 Fas 表达;B 为对照组 FasL 表达;C 为治疗组 Fas 表达;D 为治疗组 FasL 表达

图 2 两组术后 14 天 Fas 和 FasL 表达

4 两组房水中 IL-2 及 IL-10 浓度比较 术后第 7 天,对照组和治疗组房水中的浓度均低于试剂盒最低检测浓度,无法测出。其余时间点治疗组房水中 IL-2 和 IL-10 浓度均明显低于对照组,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

表 3 两组术后 7、14 及 28 天房水中 IL-2 及 IL-10 浓度比较 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	<i>n</i>	IL-2	IL-10
对照	术后 7 天	4	98.76 ± 11.32	—
	术后 14 天	4	274.97 ± 25.13	260.41 ± 28.37
	术后 28 天	8	247.76 ± 21.42	80.99 ± 8.94
治疗	术后 7 天	4	—	—
	术后 14 天	4	197.42 ± 18.82*	292.70 ± 25.62*
	术后 28 天	8	211.96 ± 19.73*	48.69 ± 5.33*

注:与对照组比较,**P* < 0.05

讨 论

高危角膜移植术后应用免疫抑制剂,是治疗角膜移植免疫排斥反应的主要手段,但长期应用会导致严重并发症^[8]。因此,我们试图从中药中寻找不良反应小的全身免疫抑制剂来诱导免疫耐受,以达到植片长期存活的目的。

中医学认为:肝开窍于目,角膜为黑睛,在藏属肝。移植片局部所表现出来的结膜混合充血、角膜浸润混浊水肿以及患者出现烦躁、不安、焦虑等症状,属于肝阳上亢、肝火上炎范畴。菊花决明散方是经中医辨证并在临床实践中逐步形成的一组方剂。

本研究结果证明,术后采用菊花决明散方灌胃治疗的大鼠,角膜植片存活时间较生理盐水组明显延长,说明中药治疗可以明显延长植片存活时间。

CD₄⁺CD₂₅⁺FOXP3⁺细胞作为外周血中重要的免疫调节细胞,可以表达多种共刺激因子如 CTLA4, CD₂₈ 等,从而达到阻断免疫反应的发生,诱导受体产生前房相关免疫偏离,抑制效应细胞的活化等多种作用^[9,10]。本试验中术后不同时间治疗组 CD₄⁺CD₂₅⁺FOXP3⁺细胞均明显高于对照组,而且在术后 14 天时差异明显,说明菊花决明散方可以通过提高调节性 T 细胞,达到抑制角膜移植免疫排斥反应的作用。

Fas、FasL 作为经典细胞凋亡因子的标志主要用于检测细胞的功能和状态^[11]。Fas、FasL 可促进多种细胞因子(如 CTLA4 等)介导的免疫耐受^[12]。虹膜作为眼内重要的免疫组织,是角膜移植免疫排斥反应的重要场所。诱导虹膜内免疫细胞的凋亡可以诱导角膜植片的免疫耐受^[13,14]。角膜移植术后 14 天对照组虹膜铺片中出现大量 Fas 阳性细胞,参与免疫排斥反应,导致植片破坏。同时虹膜中也有大量 FasL 阳性细胞,因此推测角膜移植排斥反应中,FasL 随着 Fas 表达的增强而增强,FasL 阳性的细胞和 Fas 阳性的细胞结合,从而诱导免疫细胞的凋亡。而治疗组中 Fas、FasL 表达明显低于对照组,说明菊花决明散方可能通过抑制 Fas 阳性细胞的浸润,从而减轻免疫排斥反应。

多种细胞因子在角膜移植免疫排斥反应中发挥重要作用^[15]。其中由辅助性 T 淋巴细胞产生的细胞因子可分为两类:Th₁ 群和 Th₂ 群。Th₁ 细胞主要产生 IL-2 及 IFN- γ , Th₂ 细胞主要产生 IL-4、IL-6、IL-10,一些研究报道 Th₁/Th₂ 免疫平衡的偏离有利于角膜移植植片存活。本结果表明治疗组大鼠房水 IL-2 浓度在不同时间点均较对照组低,IL-10 浓度在不同时间点均较对照组高,表明菊花决明散方可以诱导局部 Th₁/Th₂ 偏离延长植片的存活。

参 考 文 献

- [1] 史伟云,谢立信. 高危角膜移植[J]. 中国实用眼科杂志, 1998, 16(12): 712-714.
Shi WY, Xie LX. High risk keratoplasty[J]. Chin J Pract Ophthalmol, 1998, 16(12): 712-714.
- [2] 潘志强,邹留河,张文华,等. 穿透性角膜移植回顾性分析[J]. 中国实用眼科杂志, 2003, 21(suppl): 99-103.
Pan ZQ, Zou LH, Zhang WH, et al. Retrospective analysis of penetrating keratoplasty[J]. Chin J Pract Ophthalmol, 2003, 21(suppl): 99-103.
- [3] Dana MR, Zhu SN, Yamada J, et al. Topical modulation of interleukin-1 activity in cornea neovascularization[J]. Cornea, 1998, 17(4): 403-409.
- [4] Williams KA, Coster DJ. Penetrating cornea transplantation in the inbred rat: a new model[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1985, 26(1):23-30.
- [5] Holland EJ, Chan CC, Wetzig RP, et al. Clinical and immuno-histologic studies of corneal rejection in the rat penetrating keratoplasty model[J]. Cornea, 1991, 10(5): 374-380.
- [6] Migita K, Ochi A. Induction of clonal anergy by oral administration of staphylococcal enterotoxin B[J]. Eur J Immunol, 1994, 24(12):2081-2086.
- [7] Paul G. Optimal methods for preparation and immunostaining of iris, ciliary body, and choroidal wholemounts[J]. Invest ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(10):3043-3048.
- [8] George AJ, Larkin DF. Corneal transplantation: the forgotten graft[J]. Am J Transplant, 2004, 4(5): 678-685.
- [9] Vincent F. Costimulation blockade in autoimmunity and transplantation[J]. J Allergy Clin Immunol, 2008, 121(2):299-306.
- [10] Shi Z, Rifas M. Importance of CD80/CD86-CD28 interactions in the recognition of target cells by CD8⁺CD122⁺ regulatory T cell[J]. Immunology, 2008, 16(1):2185-2163.
- [11] Sano Y, Osawa H, Sotozono C, et al. Cytokine expression during orthotopic corneal allograft rejection in mice[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39(10): 1953-1957.
- [12] Wilson SE, Li Q, Weng J, et al. The Fas-Fas ligand system and other modulators of apoptosis in the cornea[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996, 37(8):1582-1592.
- [13] Kim WJ, Helena MC, Mohan RR, et al. Changes in corneal morphology associated with chronic epithelial injury[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40(1):35-42.
- [14] Wang DS, Li Y. Utility of adenovirus-mediated Fas ligand and bcl-2 gene transfer to modulate rat liver allograft survival[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2006, 5(4): 505-510.
- [15] Yamagami S, Kawashima H, Endo H, et al. Cytokine profiles of aqueous humor and graft in orthotopic mouse corneal transplantation[J]. Transplantation, 1998, 66(11): 1504-1510.

(收稿:2009-07-01 修回:2009-11-18)