

探索白细胞介素-1 受体拮抗剂对大鼠角膜移植术后 Treg 的影响*

李 兰,曹 倩[△],李 勇,李云川,邹 莹,龙俊君,刘浩文,何柳余

(昆明市第一人民医院眼科,云南昆明 650000)

[摘要] **目的** 探讨大鼠角膜移植术后玻璃体腔内注射白细胞介素-1 受体拮抗剂(IL-1ra)对白细胞介素-1 β (IL-1 β)、调节性 T 淋巴细胞(Treg)及排斥反应的影响。**方法** 取心脏死亡供体 SD 大鼠角膜分别在 24 只受体 SD 大鼠内进行穿透性角膜移植术,将受体大鼠分为磷酸缓冲盐溶液(PBS)组与 IL-1ra 组,术毕分别于玻璃体腔注射 PBS 或 IL-1ra 1 IU。术后 1、3、5 周,观察并记录角膜排斥反应指数(RI),取全血、淋巴结检测 IL-1 β 水平与 Treg 数量。**结果** 术后 1、3、5 周,两组全血、淋巴结 IL-1 β 水平逐渐降低,Treg 数量均逐渐升高,组内不同时间点两两比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。术后 1、3、5 周,IL-1ra 组全血、淋巴结中 IL-1 β 水平较 PBS 组明显下降($P < 0.05$);IL-1ra 组全血、淋巴结中 Treg 数量较 PBS 组升高,其中术后 3、5 周全血 Treg 数量两组间差异有统计学意义($P < 0.05$),术后 1、3、5 周淋巴结中 Treg 数量两组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。术后 3、5 周,IL-1ra 组 RI 明显低于 PBS 组($P < 0.05$)。**结论** 大鼠角膜移植术后玻璃体腔注射 IL-1ra 可减轻炎症反应,升高全血、淋巴结中 Treg 数量,减少排斥反应。

[关键词] 白细胞介素-1 受体拮抗剂;角膜移植;排斥反应;调节性 T 淋巴细胞;Sprague Dawley 大鼠

[中图分类号] R779.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)06-0927-05

Exploring the effect of interleukin-1 receptor antagonist on Treg after corneal transplantation in rats*

LI Lan, CAO Qian[△], LI Yong, LI Yunchuan, ZOU Ying, LONG Junjun, LIU Haowen, HE Liuyu
(Department of Ophthalmology, the First Hospital of Kunming, Yunnan, Kunming 650000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of vitreous cavity injection of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) on interleukin-1 β (IL-1 β), regulatory T lymphocytes (Treg) and transplant rejection after corneal transplantation. **Methods** The cornea of cardiac death donor SD rat were transplanted on 24 recipient SD rats, the receptor rats were divided into the phosphate buffer saline (PBS) group and the IL-1ra group, 1 IU of PBS injection or IL-1ra were injected into vitreous cavity after surgery, 1, 3, and 5 weeks after surgery, the corneal rejection index (RI) was observed and recorded, and the whole blood and lymph nodes were collected to detect the level of IL-1 β and the number of Treg. **Results** The IL-1 β level in the whole blood and lymph nodes of the two groups were gradually decreased at the time of 1, 3 and 5 weeks after surgery, and the number of Treg were gradually increased, the differences in pairwise comparisons at different time point were statistically significant ($P < 0.05$). 1, 3, and 5 weeks after operation, IL-1 β levels in the whole blood and the lymph nodes in the IL-1ra group were significantly lower than those in the PBS group ($P < 0.05$). The number of Treg in the whole blood and the lymph nodes in the IL-1ra group were higher than that in the PBS group. Among them, the number of Treg in whole blood was significantly different between the two groups at 3 and 5 weeks after surgery ($P < 0.05$), and the number of Tregs in lymph nodes was significantly different between the two groups at 1, 3, and 5 weeks after surgery ($P < 0.05$). The RI of the IL-1ra group was significantly lower than that of the PBS group at 3, 5 weeks after surgery ($P < 0.05$). **Conclusion** Intravitreal injection of IL-1ra after corneal transplantation in rats can reduce inflammatory response, increase the number of Treg in whole blood, lymph nodes, and reduce rejection.

[Key words] interleukin-1 receptor antagonists; corneal transplantation; rejection; regulatory T lymphocytes; Sprague Dawley mice

角膜移植术是目前角膜盲患者复明的唯一方式^[1],即使在局部和全身免疫抑制治疗的前提下,患者的角膜移植术失败率仍可能超过 50%^[2]。介导角膜移植术排斥反应的细胞和分子机制还不十分清楚。大量研究提示,炎性因子介导的炎性反应是角膜移植术排斥反应发生的基础,其中白细胞介素-1 β (interleukin-1 β ,IL-1 β)是关键因子^[3-4]。CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 淋巴细胞(regulatory T cells,Treg)为参与眼前房相关免疫偏离的重要细胞^[5],近年来成为研究热点。目前研究表明炎性微环境下多聚泛素化作用可导致 Foxp3 蛋白降解,Treg 免疫抑制功能受损^[6]。为了解角膜移植术后白细胞介素-1 受体拮抗剂(interleukin-1 receptor antagonist,IL-1ra,美国 Selleck 公司)对 IL-1 β 、Treg 及排斥反应的影响,本文建立心脏死亡供体(donation after cardiac death,DCD)大鼠角膜移植术模型后,受体 SD 大鼠玻璃体腔注射 IL-1ra,观察角膜移植术情况并检测 SD 大鼠全血、淋巴结中 IL-1 β 、Treg 水平,旨在为角膜移植术排斥反应的防治提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

SD 大鼠,体重 220~250 g,8~10 周龄,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,饲料由江苏美迪森生物医药有限公司提供,清洁级适应性饲养 1 周后进行实验。实验程序经过昆明市第一人民医院医学伦理委员会动物实验伦理审查批准通过(批准号:YLS2020-119)。

1.2 方法

1.2.1 供体准备

取 12 只 SD 大鼠,使用 5 mL 注射器抽取 5 mL 空气于大鼠左侧肋骨角偏左上方心脏方向处进针,回抽见血液确定穿刺部位位于心腔,注射 5 mL 空气处死大鼠,建立心脏死亡模型。5%~10%聚维酮碘消毒右眼结膜囊 5 min,生理盐水冲洗结膜囊。沿角膜缘 360°剪下全层角膜供体,4.25 mm 环钻制作角膜植片置于 Optisol 保护液中备用。

1.2.2 受体准备

共 24 只 SD 大鼠,采用硬币法分为磷酸盐缓冲液(PBS)组与 IL-1ra 组,各 12 只。采用 10%水合氯醛按照 3 mL/kg 行大鼠腹腔麻醉后以盐酸奥布卡因滴眼液滴右眼,4.0 mm 环钻制作好植床。

1.2.3 角膜移植术

取 DCD 大鼠角膜植片,分别在受体大鼠内行穿透性角膜移植术,将供体角膜植片置于受体植床上,

使用 12-0 国产显微缝线进行间断缝合 8 针,线节不埋藏,前房内注入空气约 0.1 mL 形成前房。术毕,按照实验分组,PBS 组玻璃体腔注射 PBS 1 IU,IL-1ra 组玻璃体膜注射 IL-1ra 1 IU,结膜囊内点妥布霉素眼膏,6-0 缝线缝合眼睑中部防止术后大鼠抓挠眼部引起感染,术后 24 h 剪开眼睑缝线,点妥布霉素眼膏,1 次/天,连续使用 1 周。

1.2.4 观察指标

(1)角膜移植术排斥反应情况评分:术后用体视镜每周观察并拍照记录术眼角膜水肿、角膜混浊、新生血管情况,由同一医生进行角膜移植术排斥反应评分,3 项评分之和为排斥指数(rejection index,RI),当 RI \geq 6,确定为排斥^[7]。(2)分别于术后 1、3、5 周处死每组大鼠各 4 只,取外周血、淋巴结,ELISA 法检测 IL-1 β 表达水平,流式细胞术检测 Treg 数量。

1.3 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件对数据进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,术后同组各时间点比较采用重复测量方差分析,同一时间点组间比较采用两独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠全血和淋巴结中 IL-1 β 水平比较

术后 1、3、5 周,两组全血、淋巴结 IL-1 β 水平逐渐降低,Treg 数量均逐渐升高,组内不同时间点两两比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。术后 1、3、5 周,IL-1ra 组大鼠全血、淋巴结中 IL-1 β 水平均明显低于 PBS 组大鼠,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1、2。

表 1 大鼠角膜移植术后全血 IL-1 β 水平比较($\bar{x} \pm s$,pg/mL)

时间	PBS 组 (n=4)	IL-1ra 组 (n=4)	<i>t</i>	<i>P</i>
术后 1 周	42.454 \pm 4.035	18.540 \pm 2.973	5.412	0.032 5
术后 3 周	27.248 \pm 3.877 ^a	4.705 \pm 1.501 ^a	7.195	0.018 8
术后 5 周	16.330 \pm 2.943 ^{ab}	3.136 \pm 2.851 ^{ab}	18.040	0.003 1
<i>F</i>	20.55	23.52		
<i>P</i>	0.030 9	0.038 1		

^a: $P < 0.05$,与同组术后 1 周比较,^b: $P < 0.05$,与同组术后 3 周比较。

表 2 大鼠角膜移植术后淋巴结中 IL-1 β 水平比较($\bar{x} \pm s$,pg/mL)

时间	PBS 组 (n=4)	IL-1ra 组 (n=4)	<i>t</i>	<i>P</i>
术后 1 周	57.173 \pm 7.022	16.374 \pm 3.478	6.193	0.025 1
术后 3 周	36.353 \pm 4.465 ^a	13.844 \pm 4.673 ^a	17.680	0.003 2

续表 2 大鼠角膜移植术后淋巴结中 IL-1 β 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

时间	PBS 组 (n=4)	IL-1ra 组 (n=4)	t	P
术后 5 周	28.839 \pm 3.978 ^{ab}	5.583 \pm 1.524 ^{ab}	7.703	0.016 4
F	17.41	97.25		
P	0.049 3	0.005 4		

^a: P<0.05, 与同组术后 1 周比较; ^b: P<0.05, 与同组术后 3 周比较。

2.2 大鼠全血和淋巴结 Treg 数量比较

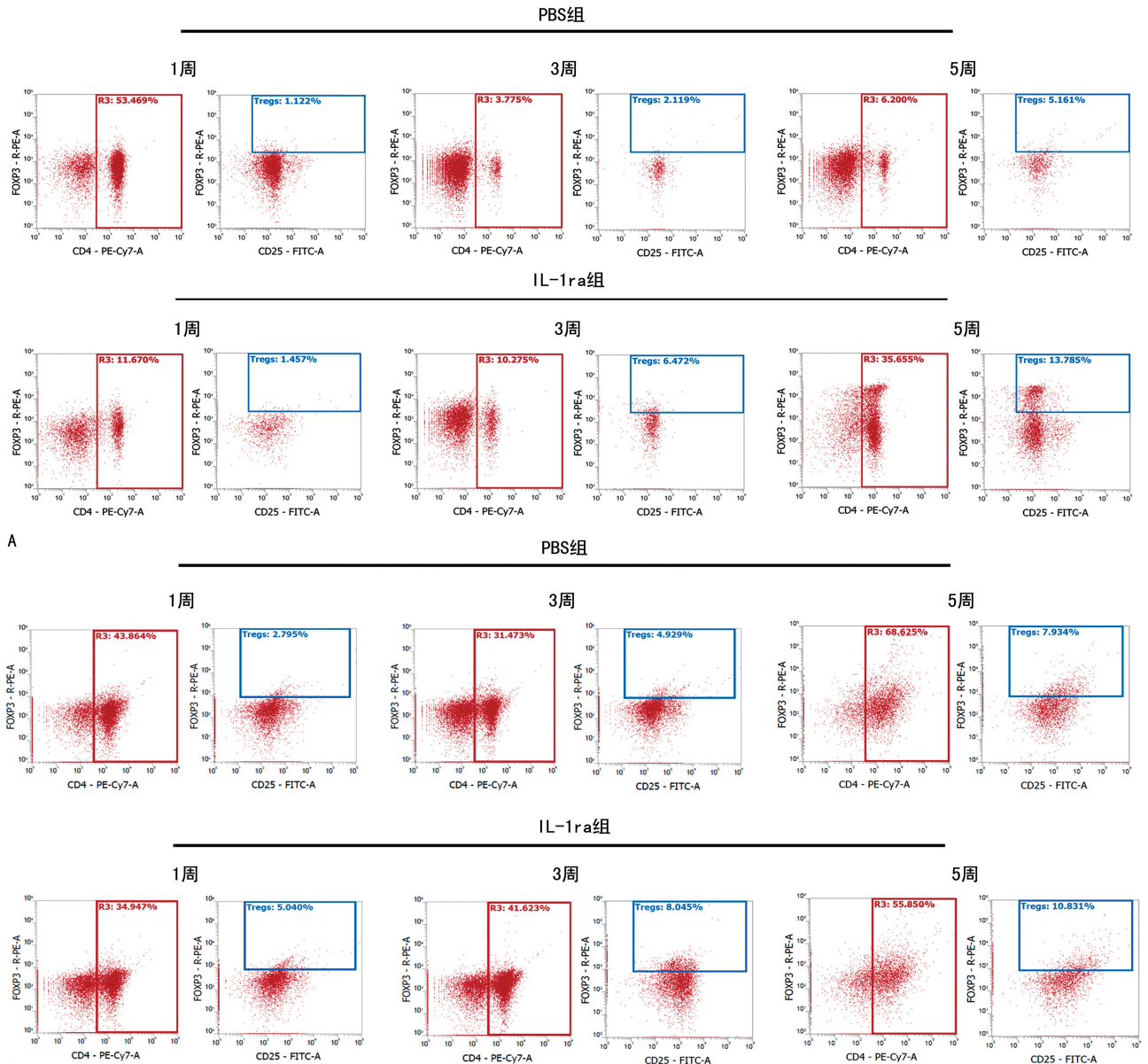
术后 1、3、5 周, 两组全血、淋巴结 Treg 数量逐渐升高, 组内不同时间点两两比较差异有统计学意义 (P<0.05)。见表 3、4。术后 1 周 PBS 组全血 Treg 数量与 IL-1ra 组比较, 差异无统计学意义 (P =

0.090), 见表 3, 图 1A。术后 3、5 周, IL-1ra 组全血 Treg 数量高于 PBS 组, 差异有统计学意义 (P<0.05)。术后 1、3、5 周, IL-1ra 组淋巴结 Treg 数量均高于 PBS 组, 差异有统计学意义 (P<0.05), 见表 4, 图 1B。

表 3 大鼠角膜移植术后全血 Treg 数量比较 ($\bar{x} \pm s$, %)

时间	PBS 组(n=4)	IL-1ra 组(n=4)	t	P
术后 1 周	1.167 \pm 0.046	1.483 \pm 0.035	1.740	0.090 0
术后 3 周	2.225 \pm 0.091 ^a	6.560 \pm 0.079 ^a	474.600	<0.000 1
术后 5 周	5.135 \pm 0.091 ^{ab}	9.538 \pm 0.490 ^{ab}	14.420	0.004 8
F	1 043.000	388.400		
P	0.000 7	0.002 4		

^a: P<0.05, 与同组术后 1 周比较; ^b: P<0.05, 与同组术后 3 周比较。



A: 全血; B: 淋巴结。

图 1 流式细胞术检测 Tregs 表达情况

表 4 大鼠角膜移植术后淋巴结 Tregs 数量比较($\bar{x} \pm s, \%$)

时间	PBS(n=4)	IL-1ra 组(n=4)	t	P
术后 1 周	2.780±0.562	3.899±0.239	3.986	0.018 4
术后 3 周	4.289±0.036 ^a	6.417±0.105 ^a	11.680	0.007 2
术后 5 周	7.399±0.304 ^{ab}	10.363±0.089 ^{ab}	16.010	0.003 9
F	77.520	1 187.000		
P	0.005 9	<0.000 1		

^a: $P < 0.05$, 与同组术后 1 周比较; ^b: $P < 0.05$, 与同组术后 3 周比较。

2.3 角膜移植术排斥情况评分比较

术后 1、3、5 周, 两组 RI 逐渐增加; 术后 1 周, IL-1ra 组与 PBS 组大鼠 RI 比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.337 5$); 术后 3、5 周, IL-1ra 组大鼠 RI 均低于 PBS 组大鼠, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2、表 5。

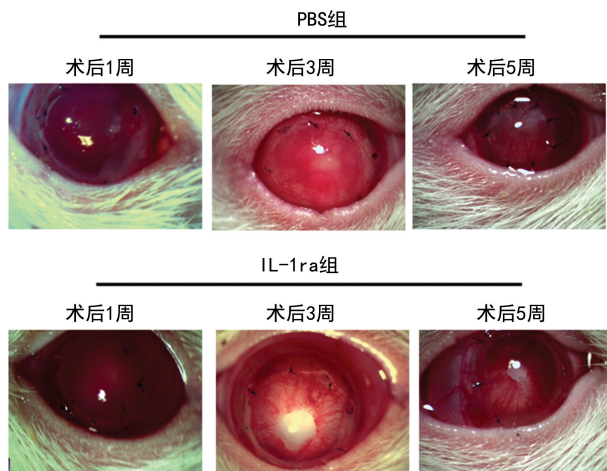


图 2 体视显微镜观察移植角膜移植术排斥反应情况(6.5×)

表 5 大鼠角膜移植术后 RI 比较($\bar{x} \pm s$)

时间	PBS 组(n=4)	IL-1ra 组(n=4)	t	P
术后 1 周	2.800±0.980	1.833±0.898	1.089	0.337 5
术后 3 周	4.833±1.462	3.500±0.957	2.697	0.042 9
术后 5 周	5.833±0.898	4.167±0.900	2.988	0.030 5
F	12.350	7.647		
P	0.005 9	0.013 1		

3 讨 论

角膜移植术后角膜植片的透明性主要通过 3 种方法来维持:(1)抑制角膜异体免疫应答;(2)诱导免疫耐受;(3)清除存在于移植物-宿主处的可溶性细胞因子和膜结合蛋白或阻断免疫效应物^[8-9]。近年来,研究者致力于通过增加外源性 Treg 的数量来抑制角膜移植术后排斥反应,延长角膜植片的存活时

间。研究表明,角膜移植术后的微环境是一种炎性环境,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)中和性抗体及天冬氨酸特异性胱氨酸蛋白酶-8(caspase-8)抑制剂可有效延缓角膜移植术排斥反应的发生,开拓了角膜移植术免疫排斥防治的新思路^[10-11]。本实验在 DCD 大鼠角膜移植术毕于受体大鼠玻璃体腔内注射 IL-1ra,并检测到术后全血及淋巴结中 Treg 数量增加。

眼前节免疫赦免机制在角膜移植术后受到破坏,有大量炎性细胞浸润于角膜植片及房水中。以往的实验研究也发现,角膜移植术后眼前房内有大量巨噬细胞聚集,并可见巨噬细胞黏附于角膜内皮^[11]。巨噬细胞可产生 TNF、IL-6 等多种炎性细胞因子,是角膜移植术后早期浸润的炎性细胞,这表明角膜移植术术后的微环境是一种炎性环境。本实验中发现 PBS 组角膜移植术术后全血、淋巴结中 IL-1 β 水平较 IL-1ra 组明显升高;IL-1ra 组术后 1、3、5 周全血和淋巴结中 IL-1 β 水平均明显下降,且术后 5 周 IL-1 β 水平降至最低,表明 IL-1ra 可明显抑制大鼠角膜移植术后前房内炎症反应。

Treg 在免疫稳态的建立与维持中起重要作用,不仅对 T 淋巴细胞具有抑制增殖、促进凋亡的作用,而且可以负向调控 B 淋巴细胞、自然杀伤细胞(NK 细胞)、自然杀伤 T 淋巴细胞(NKT 细胞)等多种免疫细胞的生物功能^[12-13],是参与眼前房相关免疫偏离的重要细胞类型之一^[14]。有研究表明,IL-1 β 刺激下 Treg 减少,增加了角膜移植术术后排斥反应发生的概率^[15-16]。本研究中,流式细胞术检测术后 1、3、5 周 IL-1ra 组全血、淋巴结中 Treg 数量均升高,且术后 5 周升至最高,而全血检测到 IL-1 β 水平逐渐降低,在术后 5 周时降至最低,说明 IL-1ra 抑制了炎症因子的表达,促进了 Treg 增殖。角膜移植术后排斥反应评分表明,随着时间延长 RI 增加,但 IL-1ra 组 RI 在术后 3 周开始较 PBS 组明显降低。

综上所述,大鼠角膜移植术术后玻璃体腔注射 IL-1ra 可降低全血、淋巴结中 IL-1 β 水平,增加全血、淋巴结中 Treg 数量,减轻术后排斥反应。但 IL-1ra 具体是通过何种通路作用于 Treg,抑制角膜移植术后排斥反应的发生,仍需要进一步实验研究。

参考文献

- [1] 郭雨欣,洪晶.角膜移植手术后病毒感染的研究进展[J].中华眼科杂志,2019,55(9):713-716.
- [2] HOS D, MATTHAEI M, BOCK F, et al. Im-

- immune reactions after modern lamellar (DALK, DSAEK, DMEK) versus conventional penetrating corneal transplantation[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2019, 73:100768.
- [3] 王昕. IL-1 β 通过调控 Th17 细胞促进角膜移植免疫排斥反应[D]. 青岛:青岛大学, 2018.
- [4] DUGGLEBY R, DANBY R D, MADRINGAL J A, et al. Clinical grade regulatory CD4⁺ T cells (Tregs): Moving toward cellular-based immunomodulatory therapies [J]. *Front Immunol*, 2018, 9:252.
- [5] 边江, 王婷, 史伟云, 等. 调节性 T 细胞在角膜移植排斥反应中的研究进展[J]. *国际眼科杂志*, 2019, 19(1):51-55.
- [6] CHANDRA A, GOLDMAN N, VAHEDI G. Foxp3 re-distributes its heavy lifting[J]. *Immunity*, 2020, 53(5):895-897.
- [7] 李娟, 罗阿丽, 秦莉. NF- κ B 抑制剂吡咯二硫氨基甲酸酯 (PDTC) 对角膜移植大鼠角膜组织的影响[J]. *眼科新进展*, 2019, 39(4):316-320.
- [8] SUBBANNAYYA Y, PINTO S M, MOHANTY V, et al. What makes cornea immunologically unique and privileged? Mechanistic clues from a high-resolution proteomic landscape of the human cornea[J]. *OMICS*, 2020, 24(3):129-139.
- [9] DAVIS M J, TSANG T M, QIU Y, et al. Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection [J]. *mBio*, 2013, 4(3):e00264.
- [10] MANNON R B. Macrophages; contributors to allograft dysfunction, repair, or innocent bystanders? [J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2012, 17(1):20-25.
- [11] LAPP T, ZAHER S S, HAAS C T, et al. Identification of therapeutic targets of inflammatory monocyte recruitment to modulate the allogeneic injury to donor cornea[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56:7250-7259.
- [12] KAILASHIYA V, SINGH U, RANA R, et al. Regulatory T cells and their association with serum markers and symptoms in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis [J]. *Immunol Invest*, 2019, 48(1):64-78.
- [13] PEDROS C, DUGUET F, SAOUDI A, et al. Disrupted regulatory T cell homeostasis in inflammatory bowel diseases [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(3):974-995.
- [14] KAILASHIYA V, SINGH U, RANA R, et al. Regulatory T cells and their association with serum markers and symptoms in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis [J]. *Immunol Invest*, 2019, 48(1):64-78.
- [15] NEELAM S, MELLON J, WILKERSON A, et al. Induction of contrasuppressor cells and loss of immune privilege produced by corneal nerve ablation[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59(11):4738-4747.
- [16] 李琳. 角膜移植免疫排斥微环境对调节性 T 细胞功能的影响及机制研究[D]. 济南:济南大学, 2019.

(收稿日期:2020-12-18 修回日期:2021-01-12)