

来氟米特活性代谢物 A771726 对大鼠角膜移植排斥反应的影响

郝念 张明昌 边芳

Effects of active metabolite of leflunomide A771726 on rat corneal allograft rejection

Hao Nian, Zhang Mingchang, Bian Fang. Department of Ophthalmology, Union Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

Abstract Objective Allograft rejection is the leading cause of corneal graft failure, so immunosuppressive agents are still in search for prevention of corneal transplantation rejection. Present study was designed to explore the inhibitory effects of A771726 eye drops, an active metabolite of leflunomide, on corneal allograft rejection. **Methods** The penetrating corneal transplantation model was established from 24 donor SD rats to 60 receptor Wistar rats. Wistar rats were randomly divided into group A, B, C and D. The model rats from group A were as blank control group, and the model rats from group B, C and D were topically treated with different concentrations of A771726 (0.5%, 1.0% and 2.0%, respectively). The normal salt solution was topically used in the autograft model rats from group E. The response of cornea graft was clinically examined regularly under the slit-lamp microscope. The graft survival time and rejection index (RI) were recorded and compared among different groups. IFN- γ and ICAM-1 expressions in corneal graft were detected by immunohistochemistry. **Results** The average graft survival time was (9.38 \pm 2.26) d in group A, (10.13 \pm 2.41) d in group B, (17.57 \pm 1.72) d in group C, (17.50 \pm 2.14) d in group D and over 28 d in group E, indicating a longer survival time in group C and D compared with group A and group B ($P < 0.01$). However, no statistically significant difference in graft survival time between group C and group D ($P > 0.05$). IFN- γ and ICAM-1 in corneal grafts were overexpressed in group A and B on the 10th day after operation, and expressions of IFN- γ and ICAM-1 in group C and D were increased obviously on the 20th day after operation. **Conclusion** Topical application A771726 could effectively suppress allograft rejection in rat models.

Key words A771726; leflunomide; keratoplasty; graft rejection

摘要 目的 探讨来氟米特活性代谢物 A771726 对大鼠角膜移植排斥反应的抑制作用。**方法** 建立 SD-Wistar 大鼠同种异体穿透角膜移植模型, 随机分组。A 组为空白对照组; B、C、D 组分别为 0.5%、1.0% 及 2.0% A771726 滴眼液组; E 组为 Wistar 大鼠自体移植对照组。术后比较各组角膜植片排斥指数 (RI) 及植片存活时间, 并对植片进行组织学及免疫组织化学染色观察。**结果** A 组角膜植片存活时间为 (9.38 \pm 2.26) d, B 组 (10.13 \pm 2.41) d, C 组 (17.57 \pm 1.72) d, D 组 (17.50 \pm 2.14) d, E 组 (>28.00) d。A 组、B 组分别与 C 组、D 组植片存活时间差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。移植术后 10 d, A 组、B 组角膜植片发生排斥反应, 植片高表达 IFN- γ 及 ICAM-1; 术后 20 d, C 组、D 组植片发生排斥反应, 植片 IFN- γ 及 ICAM-1 表达增高。**结论** 局部应用 A771726 滴眼液能有效抑制角膜移植排斥反应。

关键词 A771726; 来氟米特; 角膜移植; 免疫排斥

分类号 R 779.65 R 988.1 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)02-0100-05

新型免疫抑制剂来氟米特 (leflunomide) 因其独特的免疫抑制作用, 已被美国食品药品监督管理局批准用于

类风湿性关节炎等自身免疫性疾病的临床治疗^[1]。研究还发现该药在心脏、肾脏等多种器官移植中显示出强大的抗免疫排斥效应^[2-3]。来氟米特活性代谢物 A771726 为水溶性物质, 且分子量小。我们尝试将其配制不同质量浓度的滴眼液, 应用于大鼠角膜移植

模型,观察 A771726 滴眼液对大鼠角膜移植排斥反应的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 滴眼液的配制 取相应计量的 A771726 (批号:060103,美国欣凯公司上海代表处提供),溶解于磷酸盐缓冲液(PBS),配制成浓度分别为 0.5%、1.0% 和 2.0% 的 A771726 滴眼液,调节 pH 值至 6.8~7.2,微孔滤膜过滤除菌。

1.1.2 实验动物及分组 24 只 SD 大鼠为供体,60 只 Wistar 大鼠为受体,另 6 只 Wistar 大鼠为自体移植供体(华中科技大学同济医学院实验动物中心提供)。所有大鼠均为雌性,体重 180 g 左右,裂隙灯检查无异常。受体 Wistar 大鼠按随机数字表法平均分为 A、B、C、D、E 组,各 12 只。A 组生理盐水滴眼作为空白对照,B、C、D 组分别滴用 0.5%、1.0%、2.0% A771726 滴眼液,E 组 Wistar 大鼠自体角膜移植术后滴用生理盐水。

1.2 方 法

1.2.1 手术方法 供体大鼠处死后分别剪取双眼中央直径 3.25 mm 角膜作为植片。受体大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛(3 mL/kg)麻醉,以左眼为术眼,消毒铺巾,0.25% 丁卡因滴眼液表面麻醉,复方托吡酰胺滴眼液散瞳。去除受体大鼠眼中央直径 3.0 mm 角膜作为植床,用 10-0 尼龙线间断缝合 8 针,将供体角膜植片固定于植床上,线结不埋藏,术毕,四环素眼膏涂眼。术后根据不同分组用相应的滴眼液,每日 4 次。

1.2.2 裂隙灯显微镜观察 术后每 2 日裂隙灯显微镜观察植片水肿、混浊、植床新生血管等指标。参考 Larkin 等^[4] 制定的标准,记录移植排斥指数(rejection index, RI)(0~12 分),当 $RI \geq 6$ 时,为角膜排斥反应发生。记录各组角膜排斥反应发生的时间,共观察 28 d。观察期内若发生前房出血、感染、缝线松脱及前房消失等手术并发症者,则不归入观察统计之列。

1.2.3 角膜植片组织学观察 术后 10 d、20 d 分别处死各组大鼠 2 只,摘取术眼球固定于 10% 甲醛液中,角膜植片经常规固定脱水、石蜡包埋切片、苏木精-伊红染色封片后光镜下观察。

1.2.4 角膜植片 IFN- γ 及 ICAM-1 免疫组织化学染色观察 将上述 1.2.3 步骤中常规固定脱水,石蜡包埋

的切片固定于有明胶的载玻片上,滴加小鼠抗大鼠 IFN- γ 及 ICAM-1 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司)作为一抗,阴性对照组用 PBS 代替一抗,4℃ 过夜孵育后用 PBS 冲洗,滴加生物素标记的二抗孵育 30 min 后 PBS 液冲洗,加入二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染,封片后光镜下观察。

1.3 统计学方法

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 统计软件对数据进行统计学处理。对不同组的大鼠角膜植片存活时间和角膜植片 RI 的总体比较采用单因素方差分析,组间的多重比较采用 SNK- q 检验,并绘制生存曲线。 $P < 0.05$ 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

移植术后 3 d 各组角膜植片轻度水肿,角膜缘火焰状细小新生血管长入,A 组角膜植片水肿加重,随之出现混浊,大量树枝状新生血管形成,发生排斥反应;B 组在 2 周内角膜水肿混浊,新生血管长入,发生排斥反应;C 组、D 组角膜新生血管发展相对缓慢,血管分布稀疏,角膜轻度水肿混浊,术后 10 d 角膜植片较透明,随后角膜新生血管继续生长,混浊加重,观察期内发生排斥反应;E 组术后角膜一过性水肿后吸收消退,由于缝线刺激,有少量新生血管长入角膜植片,观察期内未发生排斥反应(图 1,2)。

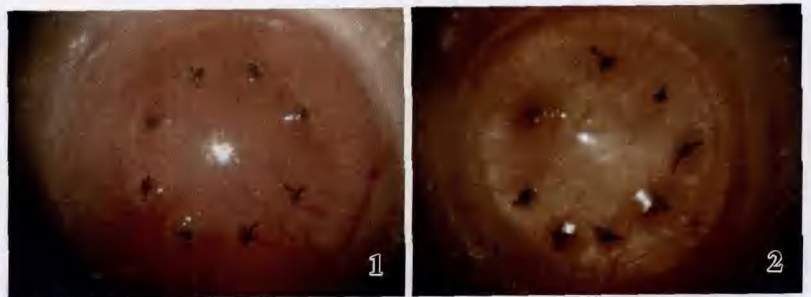


图 1 术后 10 d A 组角膜植片水肿混浊,植床大量新生血管长入植片中 图 2 术后 10 d D 组角膜植片透明,有少许新生血管长入

Fig. 1 The corneal graft of group A showed edema, and the new blood vessel could be seen in the periphery of cornea on postoperative day 10 under the slit-lamp Fig. 2 Corneal graft of group D showed transparent with less blood vessel on postoperative day 10 under the slit-lamp

2.2 角膜植片存活时间及生存曲线

5 个组大鼠角膜植片存活时间总体差异有统计学意义($F = 133.85, P = 0.000$),A 组与 C 组、D 组植片存活时间差异均有统计学意义($q = 11.78, 12.09, P < 0.01$),B 组与 C 组、D 组植片存活时间差异均有统计学意义($q = 10.71, 10.98, P < 0.01$),而 A 组和 B 组、C

组和D组植片存活时间比较差异均无统计学意义($q = 1.12, 0.10, P > 0.05$)(表1,图3)。

表1 大鼠角膜植片存活时间($\bar{x} \pm s, d$)
Table 1 Allograft survival time of corneal graft rejection in rats of different groups($\bar{x} \pm s, d$)

Group	n	Survival time	Mean time
A	8	6,7,8,9,10,11,12,12	9.38 ± 2.26
B	8	7,8,9,9,10,11,13,14	10.13 ± 2.41
C	7	15,16,17,18,18,19,20	17.57 ± 1.72 ^{ef}
D	8	15,15,16,17,18,19,19,21	17.50 ± 2.14 ^{ef}
E	9	>28	>28
F			133.850
P			0.000

^e $P < 0.01$ vs group A; ^f $P < 0.01$ vs group B (One-way ANOVA, SNK-q test)

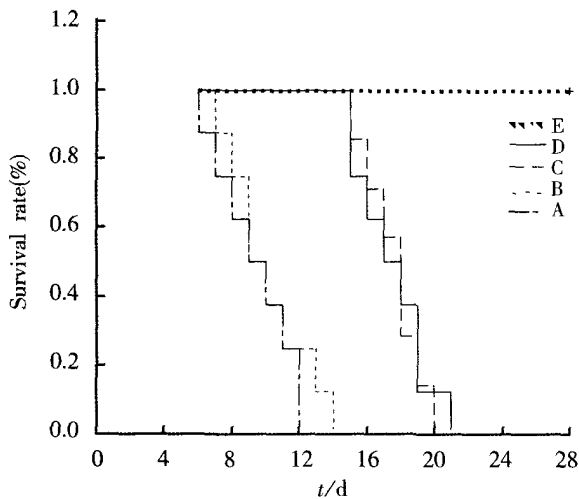


图3 5个组大鼠角膜植片生存曲线
Fig. 3 Corneal graft survival curve in group A, B, C, D, E

2.3 各组角膜植片 RI 比较

各组角膜植片 RI 在角膜移植术后 6、12、18、24 d 4 个时间点总体差异均有统计学意义 ($F = 35.76、128.77、216.25、154.93, P = 0.000$), 术后各时间点 C 组、D 组植片 RI 均明显低于 A 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), C 组、D 组植片 RI 均明显低于 B 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), A 组和 B 组、C 组和 D 组植片 RI 比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 2)。不同时间 RI 变化曲线见图 4。

2.4 角膜植片组织学观察

移植术后 10 d, A 组、B 组角膜植片明显增厚, 角膜基质水肿, 胶原纤维排列紊乱, 可见大量炎性细胞浸润, 以单核细胞及淋巴细胞浸润为主, 大量新生血管长入。C、D、E 组植片未见明显增厚, 胶原纤维排列较规

则, 未见明显炎性细胞浸润等排斥反应改变。术后 20 d, C 组、D 组植片均有炎性细胞浸润, 新生血管长入, 发生排斥反应。自体移植 E 组植片在观察期内未见炎性细胞浸润等排斥反应改变 (图 5, 6)。

表2 大鼠角膜植片排斥指数比较($\bar{x} \pm s$)
Table 2 RI at different time after keratoplasty operation($\bar{x} \pm s$)

Group	RI at different time after keratoplasty			
	6 d	12 d	18 d	24 d
A	4.41 ± 0.31	8.02 ± 1.04	10.96 ± 1.13	11.81 ± 0.97
B	4.26 ± 0.42	8.38 ± 0.87	10.43 ± 0.92	11.78 ± 1.21
C	3.13 ± 0.29 ^{ef}	3.45 ± 0.64 ^{ef}	6.47 ± 0.58 ^{ef}	10.37 ± 1.16 ^{ef}
D	2.98 ± 0.33 ^{eh}	3.25 ± 0.49 ^{eh}	5.94 ± 0.47 ^{eh}	9.65 ± 0.89 ^{eh}
E	3.17 ± 0.25	2.45 ± 0.34	1.93 ± 0.18	2.29 ± 0.23
F	35.760	128.770	216.250	154.930
P	0.000	0.000	0.000	0.000

^e $P < 0.01$ vs respective group A; ^f $P < 0.01$ vs respective group B; ^h $P < 0.05$ vs respective group C (One-way ANOVA, SNK-q test)

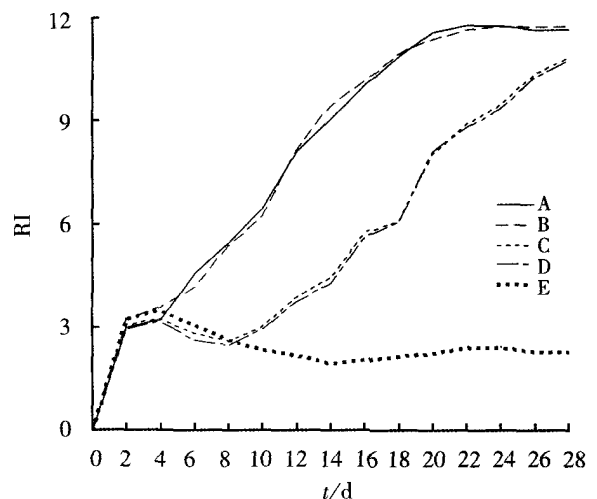


图4 5个组大鼠角膜植片不同时间 RI 的变化曲线
Fig. 4 Corneal graft RI curve of group A, B, C, D, E

2.5 角膜植片 IFN-γ 及 ICAM-1 免疫组织化学染色观察

移植术后 10 d, A 组、B 组植片可见 IFN-γ 及 ICAM-1 大量表达, 主要表达角膜上皮基底部和基质层以及浸润的炎症细胞表面; C 组、D 组植片 IFN-γ 及 ICAM-1 主要在基质层少量表达。术后 20 d, C 组、D 组植片 IFN-γ 及 ICAM-1 表达明显增强。自体移植 E 组植片在观察期内未见有明显表达 (图 7 ~ 10)。

3 讨论

目前常用的糖皮质激素和环孢素 A 等免疫抑制剂以非特异性抑制 T 淋巴细胞克隆增生为靶点, 抑制

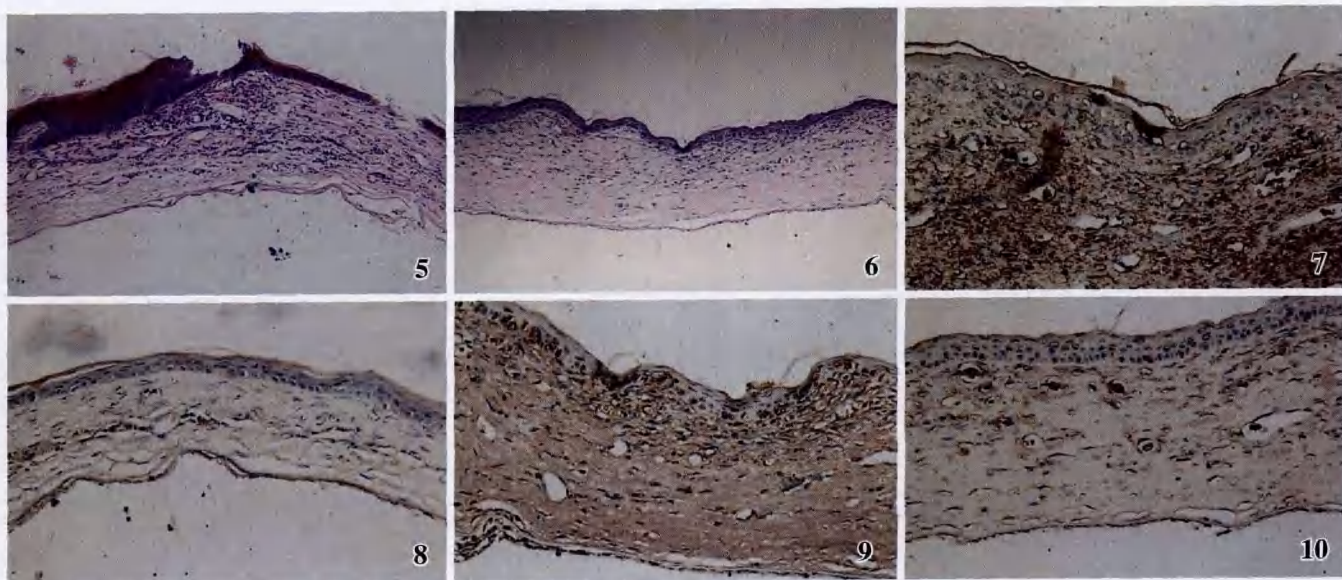


图 5 术后 10 d A 组角膜植片增厚,胶原纤维排列紊乱,大量炎性细胞浸润及新生血管形成(HE $\times 200$) 图 6 术后 10 d D 组角膜植片胶原纤维排列较整齐,少量炎性细胞浸润,新生血管少见(HE $\times 200$) 图 7 术后 10 d A 组角膜植片上皮基底部和基质层以及浸润的炎性细胞表面大量表达 IFN- γ ($\times 400$) 图 8 术后 10 d D 组角膜植片表达 IFN- γ 较轻微($\times 400$) 图 9 术后 10 d A 组角膜植片基质层、浸润的炎性细胞以及新生血管内皮表面大量表达 ICAM-1($\times 400$) 图 10 术后 10 d D 组角膜植片表达 ICAM-1 较轻微($\times 400$)

Fig. 5 Considerable corneal neovascularization and inflammatory cells infiltration were seen in group A on postoperative day 10(HE $\times 200$) Fig. 6 Only a little inflammatory cells and neovascularization in the cornea in group D on postoperative day 10(HE $\times 200$) Fig. 7 IFN- γ in corneal stroma and inflammatory cells were overexpressed in group A on postoperative day 10($\times 400$) Fig. 8 Expression of IFN- γ in corneal graft was less in group D on postoperative day 10($\times 400$) Fig. 9 ICAM-1 in corneal stroma, inflammatory cells and neovascularization were found in group A on postoperative day 10($\times 400$) Fig. 10 Expression of ICAM-1 in corneal graft was less in group D on postoperative day 10($\times 400$)

作用相对局限,有报道高危角膜移植术后全身和局部应用常规免疫抑制剂,仍有 49% 的排斥反应无法逆转^[5],且长期全身应用可能抑制免疫系统,增加罹患感染和肿瘤的危险^[6-7]。由于上述免疫抑制剂为疏水性药物,滴眼液剂型配制较复杂和不稳定,眼表穿透性差,生物利用度低,限制其在眼表应用^[8]。因此开发高效、低毒、价廉的眼表免疫抑制滴眼液具有重要的临床意义。

来氟米特,商品名为爱若华,临床上已用于类风湿性关节炎等自身免疫性疾病治疗,近年的动物实验研究证实来氟米特对多种器官移植急慢性排斥反应均有强效的抑制作用^[2-3]。来氟米特在体内转化为水溶的活性代谢物丙二酸次氮酰胺(A771726),发挥免疫抑制作用。我们将 A771726 配制成不同浓度滴眼液应用于同种异体角膜移植大鼠,观察该滴眼液对角膜移植排斥反应的疗效,探讨其作用机制。结果表明,1.0%、2.0% A771726 滴眼组大鼠角膜植片水肿、混浊、炎性细胞浸润、新生血管等反应均明显较空白对照组轻,RI 低于空白对照组,植片存活时间明显长于空白对照组。IFN- γ 是由受抗原刺激的辅助 T 淋巴细胞(Th)产生的 Th₁ 类细胞因子,一般认为 IFN- γ 等 Th₁ 类细胞因子介导细胞免疫并因此造成器官移植排斥反应

的发生。而黏附分子 ICAM-1 作为重要的共刺激分子,不仅促进白细胞和内皮细胞间的相互作用,引起移植器官的白细胞浸润,还介导 T 淋巴细胞和抗原递呈细胞间的黏附结合,从而激活 T 淋巴细胞分化成效应性 T 细胞,引起移植物的排斥反应。因此我们选择检测 IFN- γ 和 ICAM-1 作为角膜免疫排斥反应发生的指标。在角膜移植术后 10 d,未发生排斥反应的 1.0%、2.0% A771726 滴眼液组植片中 IFN- γ 、ICAM-1 表达明显少于已发生排斥反应的空白对照组和 0.5% A771726 滴眼液组。上述形态学观察显示局部应用 1.0% 和 2.0% A771726 能有效地抑制角膜移植排斥反应,延长植片存活。

A771726 的免疫抑制药理显示,该药能抑制细胞酪氨酸激酶活性,阻断由酪氨酸激酶耦联受体介导的信号转导途径。在免疫应答过程中抗原递呈细胞成熟迁移,T 细胞识别 MHC-抗原肽复合与协同刺激分子,T 细胞克隆增生的多个环节中涉及酪氨酸激酶受体介导的信号转导,因此该药从信号转导途径阻止早期特异性和非特异性 T 淋巴细胞活化增生^[9-10]。A771726 另一药理作用是有效抑制线粒体二氢乳清酸脱氢酶(DHODH)活性,阻断细胞嘧啶从头合成途径,抑制淋巴细胞内 DNA 和 RNA 的合成代谢,干扰激活的淋巴

细胞大量克隆增生^[9-11]。以往的糖皮质激素、环孢素 A 可非特异性地抑制激活的 T 细胞克隆增生,而 A771726 在免疫应答的抗原感应识别、淋巴细胞增殖活化等多个环节发生抑制作用,具有多重免疫抑制作用,是一种极具潜力的眼表免疫抑制剂。

由于手术创伤、局部炎症及缝线等刺激,角膜移植术后植片往往伴随有新生血管长入,资料统计显示角膜新生血管是角膜移植失败的首要危险因素^[12]。新生血管破坏角膜的免疫赦免状态,使受体的淋巴细胞进入供体角膜,接触角膜植片中的抗原,引发排斥反应。既往我们在对 A771726 局部滴眼液的研究中发现 A771726 能抑制角膜新生血管生长^[13]。因此, A771726 有可能通过阻止角膜新生血管生长而间接抑制免疫排斥反应的发生。

眼表局部应用来氟米特活性代谢物 A771726 将大大减轻全身用药的不良反应,同时在眼表能保持较高的浓度,有利于该药物发挥疗效。本实验为防治角膜移植排斥反应提供一种新剂型,对其他免疫相关眼病以及器官移植术后的局部用药亦有借鉴作用,具有较好的临床开发和应用前景。

参考文献

1 Kaltwasser JP, Nash P, Gladman D, et al. Efficacy and safety of leflunomide in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis: a multinational, double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial [J]. Arthritis Rheum, 2004, 50(6): 1939 - 1950

2 Hardinger KL, Wang CD, Schnitzler MA, et al. Prospective, pilot, open-label, short-term study of conversion to leflunomide reverses chronic renal allograft dysfunction [J]. Am J Transplant, 2002, 2(9): 867 - 871
3 Williams JW, Mital D, Chong A, et al. Experiences with leflunomide in solid organ transplantation [J]. Transplantation, 2002, 73(3): 358 - 366
4 Larkin DF, Calder VL, Lightman SL. Identification and characterization of cells infiltrating the graft and aqueous humour in rat corneal allograft rejection [J]. Clin Exp Immunol, 1997, 107(2): 381 - 391
5 Naacke HG, Borderie VM, Bourcier T, et al. Outcome of corneal transplantation rejection [J]. Cornea, 2001, 20(4): 350 - 353
6 Algros MP, Angonin R, Delbosq B, et al. Danger of systemic cyclosporine for corneal graft [J]. Cornea, 2002, 21(6): 613 - 614
7 Sloper CM, Powell RJ, Dua HS. Tacrolimus (FK506) in the management of high-risk corneal and limbal grafts [J]. Ophthalmology, 2001, 108(10): 1838 - 1844
8 Cosar CB, Laibson PR, Cohen EJ, et al. Topical cyclosporine in pediatric keratoplasty [J]. Eye Contact Lens, 2003, 29(2): 103 - 107
9 Kirsch BM, Zeyda M, Stuhlmeier K, et al. The active metabolite of leflunomide, A771726, interferes with dendritic cell function [J]. Arthritis Res Ther, 2005, 7(3): 694 - 703
10 Urushibara M, Takayanagi H, Koga T, et al. The antirheumatic drug leflunomide inhibits osteoclastogenesis by interfering with receptor activator of NF-kappa B ligand-stimulated induction of nuclear factor of activated T cells [J]. Arthritis Rheum, 2004, 50(3): 794 - 804
11 Fox RL, Herrmann ML, Franqou CG, et al. Mechanism of action for leflunomide in rheumatoid arthritis [J]. Clin Immunol, 1999, 93(3): 198 - 208
12 Weisbrod DJ, Sit M, Naor J, et al. Outcomes of repeat penetrating keratoplasty and risk factors for graft failure [J]. Cornea, 2003, 22(5): 429 - 434
13 郝念, 张明昌. 来氟米特活性代谢物 A771726 抑制角膜新生血管的实验研究 [J]. 眼科研究, 2008, 26(3): 191 - 195

(收稿:2008-06-10 修回:2009-01-08)

(本文编辑:高红)

2009 年国家继续医学教育项目 眼科影像学眼肿瘤和眼眶病学习班通知

眼科影像是眼科重要的检查方法,近年来发展迅速,使眼病诊断和治疗有了突破性的进展。为普及提高这一技术,由天津市眼科医院、浙江大学医学院附属第二医院,于 2009 年 4 月 6~10 日在杭州市举办全国性眼科影像学眼肿瘤和眼眶病学习班,旨在提高眼科影像在眼内病、眼肿瘤、眼眶病诊断和治疗中的应用。学习班由我国眼科影像和眼眶病著名专家宋国祥、孙丰源、唐东润等教授任教。学习内容包括眼科 10、20、50 MHz 超声诊断、X 线、CT、磁共振成像、介入影像等新技术以及眼内病、眼眶病的临床诊断和治疗。特别是授课专家将多年的临床经验、体会、病案实例进行讲解,为临床工作解决实际问题;为眼科临床、放射和超声诊断医生提供一个学习融会贯通的理论与实践平台。教学方法包括讲座、读片和示教(或录像)。学习班结束将授予国家继续教育(一类)10 学分。组委会统一安排食宿,费用自理。

学 费:600 元 资料费:200 元

联系人:天津市华苑产业区鑫茂科技园 C2 座三层 D 单元(300384) 天津迈达医学科技有限公司 韩钰莹

电 话:022-83713889、13702067907

传 真:022-83713880 Email:market@meda.com.cn

天津市眼科医院
浙江大学医学院附属第二医院
天津迈达医学科技有限公司协办