

TGF- β_1 基因在高危角膜移植术后对移植排斥反应的作用

周炼红 朱祥祥 邢怡桥 谭锦泉 王 炯

Effects of TGF- β_1 gene on transplanting rejection in high-risk keratoplasty

Zhou Lianhong, Zhu Xiangxiang, Xing Yiqiao, Tan Jinquan, Wang Jiong. Department of Ophthalmology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Abstract Objective Present study was to investigate the expression of TGF- β_1 gene transferred by recombinated adeno-associated virus (rAAV) in the implant tablets after high-risk keratoplasty of rats and the effects of TGF- β_1 gene on transplant rejection. **Methods** Corneal neovascularization models were created by putting the filter paper with 1% NaCl solution in the central cornea for 20 seconds in 40 Sprague-Dawley (SD) rats. The penetrating corneal transplantation was performed in the model rats with 20 Wistar rats as donors and models as receptors. The right eyes of 20 model rats received the grafts cultured in DMEM/F12 medium with rAAV-TGF- β_1 in experimental group, and another right eyes of 20 model rats received the grafts cultured in only DMEM/F12 medium as control group. After the operation, survival of grafts was examined under the slit lamp once a day at the first week and after there at two-day interval. The grafts rejection was scored according to Plskova criteria. Expression of TGF- β_1 in graft was detected in different time points by immunohistochemistry and Western-blotting in 1 week, 2, 4 and 8 weeks after the operation. The use of the animals followed the Standard of Statement of ARVO. **Results** The mean graft rejection time was (17.60 \pm 2.31) days in experimental group and (9.27 \pm 1.50) days in control group, showing a statistically significant difference between them ($t = 6.76, P < 0.01$). The degree of vascularizing and the turbidity of graft in treatment group was significantly lower than that the control group with the statistically significant difference between them ($P < 0.01$). TGF- β_1 showed a weak expression only in corneal epithelium in the initial week and positive expression in whole layer of cornea from 2 weeks through 4 weeks in experimental group. After 2-4 weeks, TGF- β_1 expression in graft was stronger in experimental group compared with control group. In the first week after operation, no significant difference in TGF- β_1 expression between two groups ($t = 0.46, P > 0.05$). However, the TGF- β_1 content in grafts was significantly higher in experimental group than control group from 2 through 8 weeks after operation ($P < 0.05$). **Conclusion** The rAAV-TGF- β_1 can reduce high-risk corneal transplant rejection.

Key words adeno-associated virus; transforming growth factor; high-risk corneal transplantation

摘要 目的 研究高危角膜移植术后,重组腺相关病毒(rAAV)携带的 TGF- β_1 基因(rAAV-TGF- β_1)在角膜中的表达及对免疫排斥反应的影响。**方法** 用碱烧伤的方法建立受体角膜新生血管(CNV)化模型。20只 Wistar 大鼠角膜为供体,40只 SD 大鼠为受体进行大鼠穿透角膜移植。治疗组术前将 20 只供体植片置于含 rAAV-TGF- β_1 的 DMEM/F12 混合培养液中常温培养 30 min,对照组术前将 20 只供体植片置于 DMEM/F12 培养液中常温培养 30 min,术后裂隙灯下观察植片排斥反应及存活情况。免疫组织化学染色观察 2 组术后 1、2、4 周 TGF- β_1 在角膜中的表达。Western blot 检测 2 组术后 1、2、4、8 周 TGF- β_1 的表达量。**结果** 治疗组角膜平均存活时间为 (17.60 \pm 2.31) d, 对照组为 (9.27 \pm 1.50) d, 治疗组角膜植片混浊及血管化程度明显低于对照组 ($P < 0.01$)。免疫组织化学染色显示治疗组术后 1 周 TGF- β_1 在角膜上皮呈弱阳性表达,术后 2~4 周角膜上皮及内皮细胞层呈阳性表达并高于对照组。对照组术后 1~4 周 TGF- β_1 在角膜上皮及基底膜呈弱阳性表达。Western blot 检测显示术后 1 周 2 组角膜 TGF- β_1 含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 术后 2、4、8 周治疗组角膜 TGF- β_1 的表达较对照组增高 ($P > 0.05$)。**结论** rAAV-TGF- β_1 能减轻高危角膜移植的排斥反应。

关键词 腺相关病毒; 转化生长因子; 高危角膜移植

分类号 R 779.65 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)09-0737-06

生,树突状细胞分化的成熟和影响白介素(interleukin, IL)IL-1、IL-2、IFN- γ 等细胞因子发挥其免疫抑制功能^[1-3]。因此,TGF- β_1 在抗移植排斥反应中是一个非常重要的细胞因子。重组腺相关病毒(recombinated adeno-associated virus, rAAV)载体是目前动物病毒中最小的单链DNA病毒,无包被,自然缺陷,无致病源性,具有高效、安全、长期有效表达的优点^[4-5],是目前较理想的病毒基因载体。本研究将rAAV作为载体携带TGF- β_1 基因转染到供体角膜组织,利用TGF- β_1 的生物学活性减轻高危角膜移植术后的免疫排斥反应,并探讨其作用机制。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康清洁级SD大鼠40只及Wistar大鼠20只,雌雄兼用,体重120~150g,鼠龄8~12周(武汉大学人民医院实验动物中心提供)。20只Wistar大鼠为供体,40只SD大鼠为受体。所有受体右眼接受角膜移植手术,供体双眼取材后过量麻醉处死。动物的饲养及使用均遵循美国视觉及眼科学会(ARVO)制定的科研动物使用规范进行。

1.1.2 主要试剂 小鼠抗大鼠TGF- β_1 单克隆抗体(北京博奥森公司);免疫组织化学试剂盒(武汉博士德公司);10%水合氯醛200mL,1mol/L NaOH 20mL、DMEM培养基、胎牛血清(美国Gibco公司)。Western blot试剂盒、其他细胞培养及病毒包装试剂(上海星汉生物公司)。

1.2 方法

1.2.1 rAAV-TGF- β_1 的包装、纯化及滴度测定 根据已公布的人TGF- β_1 成熟肽基因序列设计两端引物,TGF- β_1 基因上游引物为5'-GCCGAATTCATGCCGCCCTCGGGGCTGC-3',下游引物为5'-GCCGTCGACTCAGCTGCACTTGCAGGAG-3',PCR扩增回收目的基因片段,内切酶分别酶切回收目的基因片段与pSNAV2.0-EGFP质粒,将回收产物连接、转化。pSNAV2.0-TGF- β_1 -EGFP质粒转染到BHK-21细胞,24h后用800mg/L G418选择培养,在辅助病毒HSV1-RC感染后培养48h收获病毒颗粒。氯仿处理-聚乙二醇/氯化钠沉淀-氯仿抽提法粗纯化病毒,肝素柱层析法精纯化病毒。地高辛标记的CMV探针点杂交法检测病毒物理滴度为 0.125×10^{15} $\mu\text{g/L}$,DMEM/F12稀释为病毒滴度 10^{13} $\mu\text{g/L}$ 的溶液,-80℃冰箱保存备用。

1.2.2 角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV)化模型的制作^[6] 10%水合氯醛3mL/100g腹

腔麻醉联合丁卡因滴眼液表面麻醉SD大鼠,将浸有1mol/L NaOH碱液的3mm直径滤纸片贴于SD大鼠右眼角膜中央烧灼20s,100mL生理盐水冲洗结膜囊及角膜。每日用裂隙灯显微镜观察角膜、结膜及前房情况,直至出现CNV。随机选取3个以上象限角膜有新生血管且新生血管达到角膜中央的SD大鼠40只右眼用于实验。

1.2.3 动物分组、穿透角膜移植术及取材 CNV化SD大鼠模型40只作为角膜移植受体,Wistar大鼠20只(40只眼)作为供体,抽签法随机分为2组(每组Wistar大鼠10只,SD大鼠20只)。治疗组:术前将供体植片(20只眼)置于含 1×10^{10} $\mu\text{g/L}$ (病毒基因组数/mL)rAAV-TGF- β_1 的DMEM/F12(1:1)混合培养液中常温孵育30min。对照组:术前将供体植片(20只眼)置于DMEM/F12培养液中常温孵育30min。2组分别进行穿透角膜移植。常规方法进行手术参照文献[7],供体Wistar大鼠术前15min美多丽滴眼液散瞳,10%水合氯醛350mg/kg腹腔注射。供体角膜钻取3.5mm直径植片。SD大鼠作为受体散瞳麻醉方法同上,右眼行穿透角膜移植术,用直径3.25mm环钻钻除中央角膜,将植片置于植床,10-0尼龙线间断缝合8针至前房密闭。术后每日0.3%氧氟沙星滴眼液点眼,每日2次,持续1周。分别于术后1、2、4、8周随机处死5只动物摘取术眼,将术眼角膜缘取下完整角膜植片,一半用4%多聚甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,切片备用。另一半角膜液氮保存备用。

1.2.4 术后植片排斥反应及存活情况观察 受体自术后第1天起在裂隙灯显微镜下观察术眼角膜水肿、混浊及新生血管情况,1周后隔日观察。并依据Plskova等^[8]的评分标准分别进行评分,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2时即认为排斥反应发生。

1.2.5 免疫组织化学染色观察 将术后1、2、4周实验组和对照组的切片固定于有明胶的载玻片上,SABC法进行免疫组织化学染色。一抗为小鼠抗大鼠TGF- β_1 单克隆抗体(1:300),二抗为生物素化羊抗小鼠IgG,DAB显色。PBS代替一抗、二抗作为阴性对照。染色后常规脱水,苏木素复染,中性树脂封片后光镜下观察。组织内出现棕黄色、棕褐色颗粒为阳性。每只眼球的切片随机抽取5张,每张切片选择5个视野($\times 400$ 倍),测定其阳性染色平均灰度值,利用MIAS医学图像分析软件进行分析。

1.2.6 Western blot检测 2组术后角膜TGF- β_1 的含量将实验组和对照组术后1、2、4、8周液氮保存的角膜

分别提取总蛋白后测定蛋白含量(用 BCA 试剂盒测定提取的蛋白含量)。参照 Western blot 检测试剂盒操作方法进行, SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白并电转移至硝酸纤维素膜上, 用转移槽转印蛋白质, 将转印后的蛋白质进行可逆染色, 抗体耦联物进行免疫检测, 用发光底物显影(底物显色试剂盒显色), 照相, 实验重复 5 次。图像处理系统对条带进行灰度测定。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计学分析。实验组和对照组大鼠角膜植片存活时间、RI、TGF- β_1 灰度值均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不同时间点 2 组间所测指标的比较采用独立样本的 *t* 检验。 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 角膜形态学观察结果

术后 2 ~ 3 d, 2 组角膜植片出现一过性混浊、水肿, 考虑为手术创伤刺激所致, 对照组混浊、水肿持续存在, 治疗组 4 ~ 5 d 恢复透明。对照组术后 1 周出现

混合充血、角膜后沉着物及上皮和内皮层排斥线、房水闪烁、虹膜血管可见, 植片中度混浊及基质层水肿, 4 ~ 7 d 有新生血管长入植片周边, 部分植片混浊程度 2 级, 植床细小新生血管长入植片(图 1), RI 为 5.40 ± 1.36 ; 术后 2 周植片弥漫性基质层水肿、增厚, 植片混浊程度 1 级, 植床较粗大新生血管长入植片边缘(图 2), RI 为 7.10 ± 2.13 ; 术后 4 周植片溶解坏死, 混浊程度 2 级, 植床可见粗大新生血管(图 3); 术后 8 周植片瘢痕化、混浊, 新生血管长入(图 4), 治疗组术后 1 周植片上皮层水肿, 角膜上皮层出现排斥线, 轻度混浊, 细小新生血管开始长入植床(图 5), RI 为 2.07 ± 1.09 ; 术后 2 周植片水肿较前加重、中度混浊, 9 ~ 10 d 出现新生血管, 但实验组较对照组血管稀疏, 生长速度较慢, 较粗大新生血管长入植床边缘(图 6), RI 为 3.75 ± 1.73 ; 术后 4 周大部分新生血管萎缩, 水肿消失, 植片透明(图 7)。术后 8 周仍有 2 只植片保持透明(图 8)。对照组和治疗组均在术后 7 d 左右出现排斥反应, 发生率为 100%, 术后 14 d 左右 RI 接近峰值。对照组角膜植片平均存活时间为 (9.27 ± 1.50) d, 治

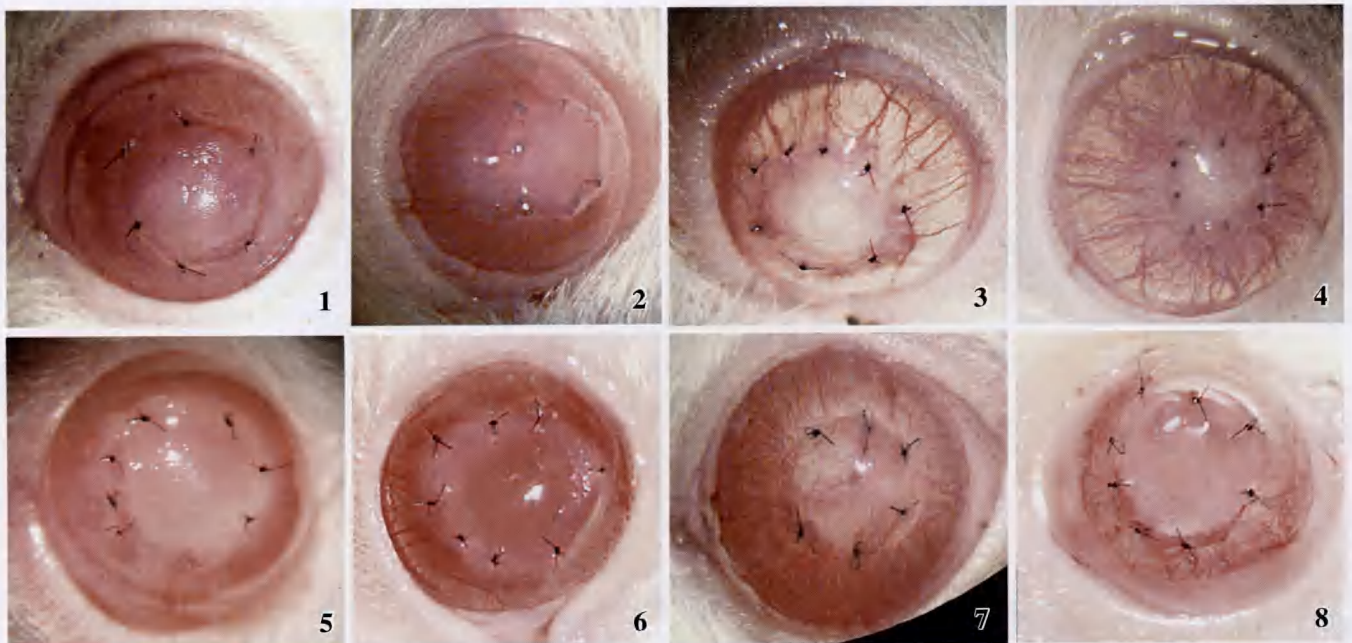


图 1 对照组术后 1 周植片混浊程度 2 级, 植床细小新生血管长入植片边缘 **图 2** 对照组术后 2 周植片混浊程度 1 级, 植床较粗大新生血管长入植片边缘 **图 3** 对照组术后 4 周植片溶解坏死, 混浊程度 2 级, 植床可见粗大新生血管 **图 4** 对照组术后 8 周植片瘢痕化, 混浊程度 2 级, 新生血管长入植片中央 **图 5** 治疗组术后 1 周植片混浊程度 1 级, 细小新生血管开始长入植床 **图 6** 治疗组术后 2 周植片混浊程度 1 级, 较粗大新生血管长入植床边缘 **图 7** 治疗组术后 4 周植片转为透明, 植床粗大新生血管长入 **图 8** 治疗组术后 8 周仍有植片保持透明

Fig. 1 The grade 2 of graft opacification was displayed, and thin new blood vessels on the grafts were seen in control group in 1 week after operation **Fig. 2** Thicker new blood vessels were exhibited in the margin of graft, and the opacification of graft showed grade 1 in control group in two weeks after operation **Fig. 3** The grafts dissolved and necrosed, and thicker neovascularization was seen on graft with the grade 2 of opacification in control group in four weeks after operation **Fig. 4** The scarring of graft was presented, and neovascularization ingrowed in the center of graft in control group in 8 weeks after operation **Fig. 5** The grade 1 of graft opacification and thin new blood vessels were seen in experimental group in 1 weeks after operation **Fig. 6** The thicker new blood vessels were seen in the edge of bed, and graft pacification was grade 2 in experimental group in 2 weeks after operation **Fig. 7** The graft was transparent and thick neovascularization ingrowed in bed in experimental group in four weeks after operation **Fig. 8** The grafts remained transparent in experimental group in eight weeks after operation

疗组为(17.60 ± 2.31) d,较对照组明显延长,差异有统计学意义($t=6.76, P<0.01$)。术后2周对照组角膜植片混浊、水肿、新生血管以及 RI 均明显较实验组高($P<0.01$)(表1)。

表1 术后2周治疗组及对照组角膜植片 RI 的比较($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of graft rejection index(RI) between experimental group and control group in two weeks after operation ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Opacity	Edema	Vascularization	RI
rAAV-TGF-β ₁	15	1.15 ± 0.31	1.23 ± 0.40	1.37 ± 0.50	3.75 ± 1.73
Control	15	2.33 ± 0.65	2.40 ± 0.80	2.07 ± 0.56	7.10 ± 2.13
t		6.35	5.07	3.61	4.73
P		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

(Student's t test)

2.2 免疫组织化学观察术后 TGF-β₁ 在角膜组织中的表达

对照组术后1周角膜上皮及基底膜呈弱阳性表达,基质层和内皮细胞层未见明显表达,基质层炎性细胞浸润(图9);术后2周角膜上皮表达较1周时减弱,基质层炎性细胞较前有所增加,其他各层未见明显表达(图10);术后4周在角膜上皮呈低表达,仍可见炎性细胞浸润(图11);治疗组术后1周角膜上皮有极少量表达,可见大量炎性细胞浸润(图12),与相同时间

点对对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$);术后2周角膜内皮表达较高,角膜上皮也可见阳性表达,炎性细胞浸润较前减少(图13),较相同时间点对照组内皮细胞表达高($P<0.05$);术后4周角膜上皮、内皮细胞较高表达,基质层少量表达,未见明显炎性细胞浸润(图14);对照组 TGF-β₁ 表达在术后1、2、4周未见明显变化。实验组术后2周时表达开始增强,4周时稍下降但仍维持在较高水平,实验组术后2周、4周表达较对照组高($P<0.05$)(表2)。

表2 术后不同时期2组角膜植片 TGF-β₁ 平均灰度值的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Expression of TGF-β₁ in corneal grafts of two groups at different periods after transplantation($\bar{x} \pm s$)

Group	TGF-β ₁ scale in different time		
	1 week	2 weeks	4 weeks
rAAV-TGF-β ₁	60.22 ± 13.34	119.38 ± 10.32	108.85 ± 8.90
Control	56.70 ± 8.93	62.08 ± 10.85	54.01 ± 8.99
t	0.46	8.56	9.70
P	>0.05	<0.01	<0.01

(Student's t test)

2.3 Western blot 检测2组不同时间角膜植片内 TGF-β₁ 的含量

术后1周治疗组和对照组角膜 TGF-β₁ 含量均较

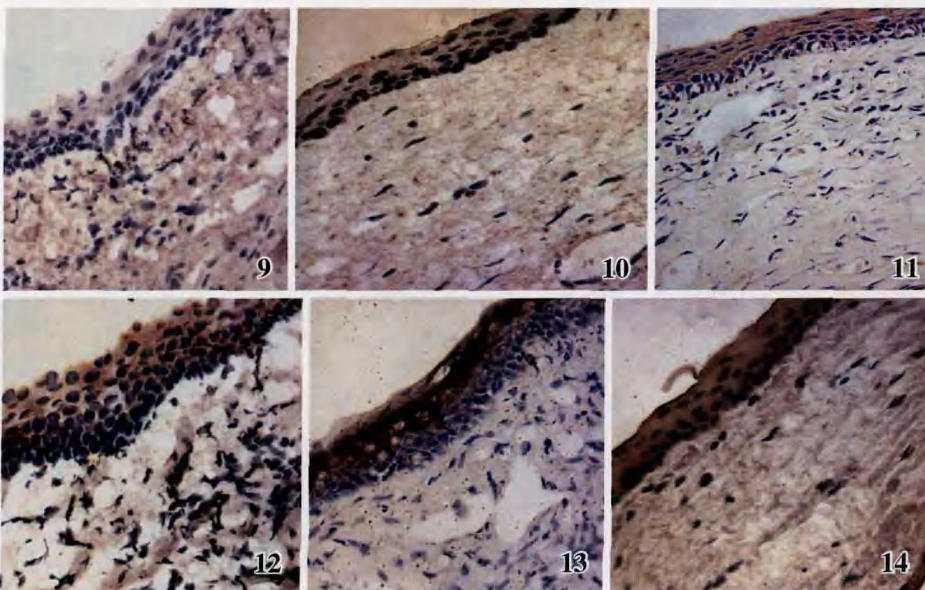


图9 对照组术后1周角膜上皮及基底膜 TGF-β₁ 呈弱阳性表达,可见大量炎性细胞浸润(DAB × 200) 图10 对照组术后2周角膜上皮层 TGF-β₁ 表达较1周时减弱,基质层炎性细胞较前有所增加(DAB × 200) 图11 对照组术后4周角膜上皮中 TGF-β₁ 呈低表达,仍可见炎性细胞浸润(DAB × 200) 图12 治疗组术后1周角膜上皮 TGF-β₁ 有极少量表达,可见大量炎性细胞浸润(DAB × 200) 图13 治疗组术后2周角膜内皮 TGF-β₁ 表达较高,角膜上皮也可见阳性表达,炎性细胞浸润较前减少(DAB × 200) 图14 治疗组术后4周角膜上皮、内皮细胞较高表达,基质层少量表达,未见明显炎性细胞浸润(DAB × 200)

Fig. 9 In 1 week after operation, TGF-β₁ was weakly expressed in corneal epithelium and basement membrane, and a large number of inflammatory cells were seen in control group(DAB × 200) Fig. 10 In 2 weeks after operation, expression of TGF-β₁ in corneal epithelium was weaker than 1 week, and the inflammatory cells in stromal layer increased in control group(DAB × 200) Fig. 11 A few of TGF-β₁ positive cells were seen in corneal epithelium, and the inflammatory cell infiltration was still visible 4 weeks later in control group(DAB × 200) Fig. 12 In 1 week after operation, TGF-β₁ was weakly expressed in corneal epithelium, and a large number of inflammatory cells were seen in experimental group(DAB × 200) Fig. 13 The expression of TGF-β₁ in corneal epithelium and endothelium enhanced, and the inflammatory cells decreased than 1 week in experimental group in 2 weeks after operation(DAB × 200) Fig. 14 After 4 weeks, TGF-β₁ was strongly expressed in corneal epithelial cells and endothelial cells and weakly expressed in stroma cells. No obvious inflammatory cell infiltration was seen in experimental group 4 weeks later(DAB × 200)

低,差异无统计学意义($P > 0.05$),术后 2、4、8 周治疗组角膜 TGF- β_1 含量明显高于对照组,2 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)(图 15,表 3)。治疗组术后 2 周角膜 TGF- β_1 含量较同组其他时间点高,可见治疗组 TGF- β_1 的表达早期具有一段时间的增强趋势,在急性排斥反应期表达最高,随后稍下降。结果表明,TGF- β_1 可显著抑制大鼠高危角膜移植术后免疫排斥反应,延长角膜植片存活时间。

表 3 TGF- β_1 蛋白各组表达水平($\bar{x} \pm s$)

Table 3 TGF- β_1 protein expression levels in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	TGF- β_1 protein in different time			
	1 week	2 weeks	4 weeks	8 weeks
rAAV-TGF- β_1	0.883 \pm 0.210	4.675 \pm 0.783	3.321 \pm 0.456	3.098 \pm 0.650
Control	1.000 \pm 0.234	1.511 \pm 0.343	1.368 \pm 0.132	1.407 \pm 0.442
t	0.83	8.27	5.50	4.81
P	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01

(Student's t test)

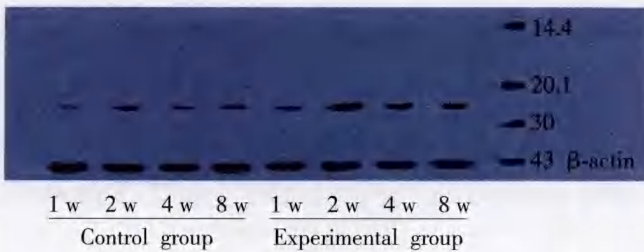


图 15 术后 TGF- β_1 在角膜中的表达形式为相对分子质量为 25 000,对照组角膜 1、2、4、8 周可见较弱条带,治疗组角膜术后 1 周可见 1 条较弱条带,2、4、8 周可见条带明显较其他条带色深(Western blot 分析)

Fig. 15 Western blot analysis showed the weaker band of TGF- β_1 expression in 1 week, 2 weeks, 4 weeks and 8 weeks in control group. In experimental group, the band of TGF- β_1 expression was gradually increased from 1 week through 8 weeks(Western blot analysis)

3 讨论

高危角膜移植术后移植排斥反应的发生率为 60% ~ 90%,虽然术后糖皮质激素、环孢素、FK-506 等免疫抑制剂用于抗排斥反应,但角膜移植的远期效果仍然欠佳^[9]。角膜移植排斥反应是一种多因素参与的复杂过程,在角膜移植术后诱导免疫耐受和前房相关免疫偏离(anterior chamber-associated immune deviation, ACAID)及房水中的免疫抑制性细胞因子对于延长植片的存活时间有着十分重要作用。TGF- β_1 是存在于角膜、前房和全身各组织器官的多肽类生长因子,具有强大的免疫抑制作用,能通过抑制 T 淋巴细胞的活化及功能、干扰 DC 细胞的分化成熟、诱导免疫抑制性细胞因子等途径发挥其抗移植排斥反应的作

用^[10],是前房中主要的免疫抑制性因子^[11],角膜移植后当房水中 TGF- β_1 、IL-10、IL-4 等细胞因子缺乏或丧失,而 IL-2、IL-12、IFN- γ 等上调时发生排斥反应^[12]。在正常水平 TGF- β_1 存在的情况下,虹膜和睫状体的树突状细胞获得诱导 ACAID 的潜能,抑制 IFN- γ 活化的巨噬细胞的功能,在前房炎症时 TGF- β_1 水平下降,免疫赦免被破坏,巨噬细胞被激活,一氧化氮等炎症因子增加。在急性炎症过程中房水 TGF- β_1 水平急剧下降,炎症高峰后角膜、虹膜和睫状体代偿性产生 TGF- β_1 。本研究对照组角膜术后 2 周 TGF- β_1 表达较同组其他时间点稍高可能与此作用有关。有研究证实 TGF- β_1 能增强角膜移植片的耐受性,延长其存活时间^[13],因此认为在角膜移植后提高眼局部 TGF- β_1 的水平是有利的。

基因治疗为高危角膜移植后排斥反应的治疗提供了新思路。Sen 等^[14]通过基因枪、阳离子聚合物、脂质体及腺病毒等作为基因治疗载体,但无法避免转染效率低、目的基因表达时间短、可诱导机体免疫反应以及野生型病毒感染等缺点。rAAV 为非致病性单链 DNA 微小病毒,它是动物病毒中最小的一种真核病毒,可感染分裂细胞和非分裂细胞,并定点整合到 19 号染色体。重组 rAAV 具有高效转导、稳定长期表达、无致病源性等优点,是基因治疗的理想载体。由于其有以上优点,因此已被广泛应用于基因治疗的研究中,在某些疾病如血友病 B 已经取得了较好的效果。rAAV 宿主范围广,AAV 不仅可感染分裂期细胞,对非分裂期细胞(如神经元、肌细胞、造血干细胞等)也较敏感。我们在以往的研究中采用不同的用药途径,将 rAAV 携带的报告基因转染到结膜下组织、角膜及视网膜组织中并且持续、稳定地表达^[15-16]。本研究的免疫组织化学结果说明 rAAV-TGF- β_1 能成功的转染到角膜各层,尤其是角膜内皮细胞。而对照组植片术后各时间点均未见明显 TGF- β_1 内皮表达,说明在无病毒转染的情况下大鼠角膜内皮细胞较少表达 TGF- β_1 。Western blot 结果显示治疗组植片术后 2 周时 TGF- β_1 表达量最高,随后有所下降。可能的原因为 rAAV-TGF- β_1 基因在转染早期进入宿主细胞核内的为游离、无活性单链核苷酸,必须在宿主 DNA 合成酶的作用下合成第 2 条链变成双链核苷酸游离体时,才能激活目的基因的表达。这个过程在不同宿主细胞及转染环境可以是数日、数周甚至是数月。另外可能由于炎症反应时角膜组织细胞的分裂增生增强而使其表达量增加,随后炎症的消退,角膜组织细胞分裂增生减弱伴随 TGF- β_1 达到稳定表达水平。本实验至观察结束实验

组仍有 2 只植片保持透明,可能为高表达的 TGF-β₁ 成功诱导了大鼠的免疫耐受,或是大鼠的个体差异免疫缺陷等因素导致了植片的透明存活。本研究还发现治疗性 TGF-β₁ 基因的表达高峰与植片排斥反应高峰相重叠,可能是血管化的角膜更易使外周炎性细胞和细胞因子进入,导致排斥反应发生更早、更剧烈,其次 TGF-β₁ 也是较强的巨噬细胞趋化因子,高浓度 TGF-β₁ 的存在也促进了巨噬细胞向角膜的侵入,由于巨噬细胞可分泌多种炎性细胞因子如 IL-1、肿瘤坏死因子等,又能作为抗原递呈细胞激活免疫反应,这些因素可引起强烈的炎症反应并造成对植片的破坏,这也可能是角膜移植排斥反应未能被完全有效抑制的原因之一。

本研究采用 rAAV 介导的 TGF-β₁ 在角膜植片中的转染和表达,使眼局部 TGF-β₁ 含量增加诱导 ACAID 从而抑制高危角膜移植反应。研究表明重组 rAAV 介导的 TGF-β₁ 在角膜组织能高效、稳定、长期地表达,并显著抑制了大鼠高危角膜移植排斥反应,延长了植片的存活时间。对于 TGF-β₁ 抑制高危角膜移植免疫排斥反应的具体机制,本课题将从细胞和分子水平进一步研究。

参考文献

1 Govinden R, Bhoola KD. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta [J]. *Pharmacol Ther*, 2003, 98 (2): 257 - 265
 2 Hutchinson IV. The role of transforming growth factor-beta in transplant rejection [J]. *Exp Opin Invest Drug*, 2000, 9(5): 1021 - 1027
 3 King WJ, Comer RM, Hudde T, et al. Cytokine and chemokine expression kinetics after corneal transplantation [J]. *Transplantation*, 2000, 70 (8):

1225 - 1233
 4 Rudich SM, Zhou S, Srivastava R. Dose response to a single intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus-erythropoietin in monkeys [J]. *J Surg Res*, 2000, 90: 102 - 108
 5 Schirmer JM, Miyagi N, Rao VP, et al. Recombinant adeno-associated virus vector for gene transfer to the transplanted rat heart [J]. *Transpl Int*, 2007, 20(6): 550 - 557
 6 赵敏, 陈家祺, 杨培增. 鼠角膜碱烧伤的免疫学研究 [J]. *中华眼科杂志*, 2000, 36(1): 40 - 42
 7 Williams KA, Coster DJ. Penetrating corneal transplantation in the inbred rat: a new mode [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1985, 26(1): 23 - 30
 8 Plskova J, Kuffova L, Holan V, et al. Evaluation of corneal graft rejection in a mouse model [J]. *Br J Ophthalmol*, 2002, 86(1): 108 - 113
 9 费文雷, 陈家祺, 庞志清, 等. FK-506 纳米粒对大鼠角膜移植的影响 [J]. *眼科研究*, 2006, 24(2): 49 - 52
 10 Hodge GL, Hodge SJ, Nairn J, et al. Poststorage leuko-depleted plasma inhibits T-cell proliferation and Th1 response in vitro: characterization of TGFbeta-1 as an important immunomodulatory component in stored blood [J]. *Transplantation*, 2005, 80(1): 95 - 101
 11 Thakur VS, Shankar B, Chatterjee S, et al. Role of tumor-derived transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in site-dependent tumorigenicity of murine ascitic lymphosarcoma [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2005, 54(9): 837 - 847
 12 杨洋, 周善璧. 转化生长因子 β₁ 在角膜移植术后的免疫抑制作用 [J]. *国际眼科杂志*, 2006, 6(4): 851 - 853
 13 Dekaris I, Gabric N, Mazuran R, et al. Profile of cytokines in aqueous humor from corneal graft recipients [J]. *Croat Med J*, 2001, 42 (6): 650 - 656
 14 Sen L, Hong YS, Luo H, et al. Efficacy, and adverse effects of adenovirus vs. liposome-mediated gene therapy in cardiac allografts [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 281(3): H 1433 - 1441
 15 周炼红, 胡燕华, 汪道文. 重组腺相关病毒经不同途径转染鼠眼球组织 [J]. *眼科新进展*, 2004, 24(3): 182 - 184
 16 周炼红, 邢怡桥, 汪道文. 重组腺相关病毒介导的报告基因在角膜内皮细胞中的表达 [J]. *眼科研究*, 2006, 24: 169 - 173

(收稿: 2009-01-12 修回: 2009-07-27)

(本文编辑: 尹卫靖)

读者 · 作者 · 编者

本刊对前言的写作要求

前言主要回答“为什么研究”这个问题,简明扼要地介绍论文的研究背景即相关领域的研究历史与现状(此处应列出引用的参考文献),研究目的、范围和方法等;前言一般 200 字左右。勿将知识性、常识性的叙述写入前言。

论文中对“结果”和“讨论”部分的要求

结果是论文最重要的部分。结果应尊重事实,得出的各种数据应有统计学处理;能用简要文字讲清楚的内容不用图表;图和表应有自明性;各种数据应严谨准确,具有可靠性和重现性。

讨论是整篇文章的最后总结,主要回答“研究出什么”的问题。讨论的内容:由研究结果所揭示的原理及其普遍性;研究中有无发现例外或本论文尚难以解释和解决的问题;与先前已发表过的(他人或自己)研究工作的异同,引用他人成果要有出处,列出参考文献;本论文在理论上与实用上的价值;对进一步深入研究本课题的建议。

(本刊编辑部)