

# 糖皮质激素对角膜移植术后大鼠角膜 TLR2 表达的影响

白浪 陆晓和 钟彦彦 张静 周瑾 武海军

## The effects of steroid on expression of TLR2 in rat corneas after penetrating keratoplasty

Bai Lang, Lu Xiaohu, Zhong Yanyan, Zhang Jing, Zhou Jin, Wu Haijun. Department of Ophthalmology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

**Abstract Objective** Our previous study demonstrated that toll-like receptor 2 (TLR2) can distinguish extraneous antigen and prevent the immunological response. This study was designed to detect the expression of toll-like receptor 2 (TLR2) mRNA in cornea and investigate the effect of steroid on TLR2 expression in rats cornea following allograft penetrating keratoplasty.

**Methods** The penetrating keratoplasty models were established in SPF rats with the 108 SD rats as receptors and 36 SPF Wistar rats as donors, and other 6 SPF SD rats worked as normal controls. The receptor rats were divided randomly into autograft group, allograft group and steroid group. The clarity and neovascularization of corneas of experiment rats were examined under the slit-lamp microscope and the rejection index was calculated based on Holland criteria. Corneal histopathological examination was carried out by hemotoxylin and eosin staining under the light microscope, and real time-PCR was employed for the detect of TLR2 mRNA in the corneas at the fifth, seventh and ninth day after operation. The experimental animals were obtained from the Animal Experimental Center of Southern Medical University and the procedure followed the Statement of Association for Research in Vision and Ophthalmology. **Results** The rejection occurred in 7 days after operation in allograft group, and only mild edema, opacity and neovascularization of corneas were found at different degrees in 9 days after operation in autograft group and steroid group. Severe corneal edema, a lots of inflammatory cells infiltration and new vessels in stroma were seen in allograft group, and mild inflammatory response was found in autograft group and steroid group. Normal corneal structure was exhibited in normal control group under the light microscope. The fold differences of TLR2 mRNA expression in cornea after amplification was significantly different among three groups and different time points ( $F_{\text{group}} = 39.46, P = 0.00; F_{\text{time}} = 35.38, P = 0.00; F_{\text{interaction}} = 45.66, P = 0.00$ ), and the evident enhance of TLR2 mRNA expression was revealed in allograft group compared with autograft group ( $P < 0.05$ ) and declined in steroid group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Steroid may restrain the acute allograft rejection by down-regulating the expression of TLR2 in corneas and its signals transaction. This result suggests that steroid offer a protection from rejection of cornea after penetrating keratoplasty.

**Key words** toll-like receptor; cornea; steroid; corneal transplantation; rejection

**摘要 目的** 检测大鼠角膜组织 TLR2 mRNA 的表达,研究糖皮质激素对穿透角膜移植术后角膜 TLR2 表达的影响及对术后排斥反应的作用。**方法** 实验动物分正常对照组(N)、同种自体角膜移植组(A)、同种异体角膜移植组(B)和同种异体角膜移植激素(典必殊滴眼液点术眼,每日2次)抗排斥组(C),A、B、C 3组大鼠给予穿透角膜移植术,术后裂隙灯下观察角膜透明度、新生血管并用排斥反应指数评价;分别于术后第5、7、9天取材,行组织病理学检查和实时荧光定量 PCR 检测,动态观察角膜组织中 TLR2 mRNA 的表达。**结果** 术后随时间变化角膜植片均出现不同程度的水肿、混浊、新生血管生长。B组大鼠平均在穿透角膜移植术后7d发生排斥反应并获病理学支持;A组和C组大鼠术后排斥反应指数计分未达到诊断标准。术后3组手术干预组角膜 TLR2 mRNA 的表达均增加,同种异体角膜移植组角膜 TLR2 mRNA 的表达较同种自体角膜移植组显著增加,激素抗排斥组角膜 TLR2 mRNA 表达明显降低( $P < 0.05$ )。**结论** 糖

本课题为南方医院院长基金资助(2008B017)

作者单位:510515 广州,南方医科大学南方医院眼科(白浪,博士研究生);510282 广州,南方医科大学珠江医院眼科(陆晓和、钟彦彦、张静、周瑾、武海军)

通讯作者:陆晓和 (Email: bailangsfy@126.com)

皮质激素可能通过抑制角膜 TLR2 的表达及其介导的信号转导,抑制排斥反应,对移植术起保护作用。

**关键词** TLR2; 角膜; 糖皮质激素; 角膜移植; 免疫排斥反应

**分类号** R 779.65 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)11-1011-04

TLR2 属于 Toll 样受体家族 (toll-like receptors, TLRs), 是机体天然免疫应答中识别病原微生物的重要受体<sup>[1]</sup>。本研究前期实验发现 TLR2 能识别异己 (移植抗原), 参与移植后的免疫排斥反应。本研究建立穿透角膜移植的大鼠模型, 采用实时荧光定量 PCR 技术 (real time-PCR, RT-PCR) 动态检测角膜组织中 TLR2 mRNA 的表达及活性变化, 探讨糖皮质激素对移植后角膜 TLR2 表达的影响, 明确其在角膜移植术后免疫排斥反应中的保护机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 动物** SPF 级雌性 SD 大鼠 108 只为受体, 体重 180 ~ 220 g。受体分为 3 组: A 组为同种自体移植组; B 组、C 组均为同种异体移植组。SPF 级 Wistar 鼠 36 只为供体, 另 SPF 级雌性 SD 鼠 6 只 (12 只眼) 作为正常对照。随机取一半作组织学检测, 另一半作实时荧光定量 PCR 检测。所有动物购自南方医科大学动物实验中心。实验动物的应用遵循美国 ARVO 的标准。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 典必殊滴眼液 (Tobradex) (中国 Alcon 公司); Trizol (美国 Invitrogen 公司, Cat. No. 15596-018); First Strand cDNA Synthesis Kit (美国 GeneCopia 公司); 2 × AllinOne™ Q-PCR Mix (美国 GeneCopia 公司); 引物合成 (南京金思特科技有限公司)。iQ5 Real Time PCR Detection System (美国 Bio-Rad 公司)。采用染料法 (SYBR Green I) 进行相对定量分析, 按照  $\Delta\Delta Ct$  解析法进行设计。

### 1.2 方法

**1.2.1 手术方法** 本研究参照文献 [2-4] 的方法建立同种异体穿透角膜移植的大鼠模型 (B 组、C 组): 3% 戊巴比妥钠 1.5 mL/kg 腹腔注射麻醉。术前冲眼, 散瞳, 眼结膜囊表面麻醉; 显微镜下无菌操作, 环钻钻取制作角膜植片 (直径 3.25 mm) 和植床 (直径 3.0 mm)。受体前房注入玻璃酸钠黏弹剂 (爱维); 将植片植入植床, 10-0 尼龙缝线间断缝合 8 ~ 10 针; 术毕前房内注入无菌空气泡, 形成前房。术毕 B 组结膜囊内涂 0.5% 四环素眼膏。术后每日点氯霉素滴眼液, 每日 2 次, 每次 1 滴; C 组术毕涂典必殊眼膏, 术后每日点典必殊滴眼液, 每日 2 次, 每次 1 滴。同种自体穿透角膜移植术为自体角膜移植; 环钻钻取直径 3.0 mm

植片, 旋转 180° 后间断缝合 8 ~ 10 针, 其他处理同 B 组。

**1.2.2 临床观察** 自术后第 1 天起每天行裂隙灯显微镜观察, 记录排斥反应指数 (rejection index, RI), 包括角膜透明度、水肿程度、新生血管分布以及角膜排斥发生时间。以混浊、水肿、新生血管 3 项指标进行评分<sup>[5]</sup>; 当植片的 3 个参数之和  $\geq 5$ , 或者植片混浊一项达到 3 时为免疫排斥反应发生。由 2 人同时观察计分取平均值。

**1.2.3 组织病理学检测** 分别于术后第 5、7、9 天切取角膜进行组织学检测, 标本经 4% 多聚甲醛溶液固定、脱水、常规石蜡包埋, 制备成 5  $\mu\text{m}$  厚连续切片。行苏木精-伊红染色, 光镜下观察。

**1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测** 分别于术后第 5、7、9 天取材, 液氮保存。总 RNA 的提取: 取液氮保存的大鼠角膜组织样品至冷冻的研钵中, 加入液氮研磨至细粉, 按取材时间点分组研磨, 每组分 3 份, 转移至有 1 mL Trizol 的离心管中, 采用 Trizol 一步法提取总 RNA, 行琼脂糖凝胶电泳检测, 在 Nanodrop 上测定 RNA 浓度, 以 DEPC 水做空白对照, 同时记录 RNA 浓度及其 OD260/OD280。(1) mRNA 反转录成 cDNA: 根据不同样本 RNA 浓度和终浓度计算每个样本总 RNA 的体积, 加入 250  $\mu\text{mol}$  RD 引物 1  $\mu\text{L}$ , 再加入焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理的无菌纯水至总体积 13  $\mu\text{L}$ , 65  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 min, 立即置于冰上冷却; 配制反转录反应液: 在 RNA-Primer Mix 反应管内加入 5 × 反应缓冲液 5  $\mu\text{L}$ 、25 mmol dNTP 1  $\mu\text{L}$ 、25 U/ $\mu\text{L}$  RNase 抑制剂 1  $\mu\text{L}$ 、200 U/ $\mu\text{L}$  M-MLV RTase 1  $\mu\text{L}$ 、加入 DEPC 处理的无菌纯水 4  $\mu\text{L}$  至总体积 25  $\mu\text{L}$ 。混匀, 短暂离心后 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h, 85  $^{\circ}\text{C}$  灭活处理 5 min, 最后 -20  $^{\circ}\text{C}$  保存反转录产物。(2) cDNA 样本基因表达水平的检测: 引物由南京金思特科技有限公司合成: 以  $\beta$ -actin (ACTB) 为内参照。引物序列 (5' - 3'): ACTB 上游 CCAACCGTGA AAAGATGACC, 下游 ACCAGAGGCATACAGGGACA, 长度为 98 bp; TLR2 上游 AGCGAAAATCTGATGG TTGAA, 下游 TGA CTCAAACCAAGCTTTGTAGA, 长度为 86 bp。(3) 实时荧光定量 PCR 法扩增: 将 2 × AllinOne™ Q-PCR Mix 在室温下融解, 取 10  $\mu\text{L}$  加入上下游引物 (0.4  $\mu\text{mol}$ ) 各 2  $\mu\text{L}$ , cDNA (1:10 稀释) 5  $\mu\text{L}$ , 无菌去离子水 (ddH<sub>2</sub>O) 1  $\mu\text{L}$ , 至 PCR 反应体系为 20  $\mu\text{L}$ 。混匀后加入 96 孔板中短暂离心, 采用标准

三步法程序进行 PCR 反应。扩增条件：95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 10 s, 57 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 15 s, 共 40 个循环。反应在 iQ5 (美国 Bio-Rad 公司) 实时荧光定量 PCR 仪上进行, 72 ~ 95 °C 缓慢升温, 产生 ACTB 和 TLR2 的融解曲线。重复检测 2 次。

**1.2.5 结果分析** 实时荧光定量 PCR 产物采用仪器自带的 BioRad. iQ5 软件进行分析, 观察扩增曲线和融解曲线, 以 ACTB 为内参基因, 对 cDNA 的含量进行相对定量分析, 计算样本的  $\Delta\Delta Ct$  值。

**1.3 统计学方法**

应用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计学处理。各組的数据资料经 Levene 检验方差齐。同种自体角膜移植组、同种异体角膜移植组和糖皮质激素组角膜组织中 TLR2 mRNA 表达的差异倍数比较采用两因素方差分析, 组间的多重比较采用 LSD-t 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 临床观察结果**

术后第 1 ~ 3 天, 3 组角膜均轻度水肿; 第 5 天 B 组角膜混浊, 角膜基质厚度增加, 角膜缘新生血管生长; 第 7 天 3 组角膜水肿均不同程度增加, B 组角膜基质厚度明显增加, 植床布满新生血管并长入植片, A 组和 C 组角膜缘新生血管开始生长; 术后第 9 天, B 组角膜完全混浊, 新生血管布满植片, A 组和 C 组部分角膜新生血管达植床边缘。根据 RI 计分标准, B 组大鼠均达到了排斥反应的诊断标准, 排斥反应发生平均时间为 7 d。A 组和 C 组大鼠术后 RI 计分在术后 9 d 时未达到诊断标准。

**2.2 组织病理学改变**

角膜上皮细胞层由 5 ~ 6 层细胞组成, 基质层胶原排列整齐, 无水肿, 无炎性细胞浸润。角膜移植手术组角膜植片出现不同程度的水肿、增厚, 上皮基底细胞空

泡形成, 间质结构疏松, 发生排斥反应的角膜有大量炎性细胞浸润, 基质层可见新生血管管腔。

**2.3 实时荧光定量 PCR 检测结果**

各样本扩增后 TLR2 的融解曲线见图 1。采用比较 Ct 法 ( $\Delta\Delta Ct$  法) 进行角膜 TLR2 mRNA 的定量分析。其计算公式为: (1) Target A/Target B =  $2^{-(Ct1 - Ct2)}$  =  $2^{-\Delta Ct}$ ; (2) 平均相对含量 =  $2^{-\text{平均}\Delta\Delta Ct}$ 。结果表明 3 个手术干预组 TLR2 mRNA 表达差异倍数均明显高于正常对照组, 各組间差异有统计学意义 ( $F = 39.46, P = 0.00$ ), 不同时间点比较差异有统计学意义 ( $F = 35.38, P = 0.00$ ), 且存在交互作用 ( $F = 45.66, P = 0.00$ ) (表 1)。多重比较比较结果显示: 术后 5、7、9 d 时, B 组和 C 组比较差异均有统计学意义 ( $P = 0.02; P = 0.01; P = 0.00$ ), 术后 9 d, A 组和 B 组比较差异有统计学意义 ( $P = 0.00$ ), 术后 5 d 和术后 7 d, A 组和 C 组比较差异有统计学意义 ( $P = 0.01; P = 0.01$ )、术后 9 d, A 组和 C 组比较差异无统计学意义 ( $P = 0.96$ )。

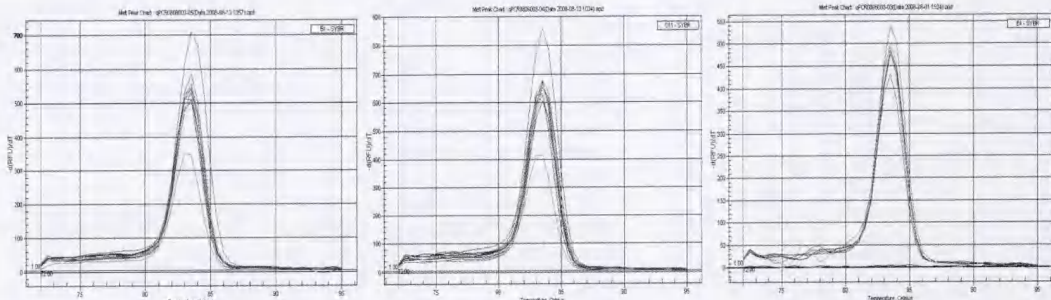
**表 1 TLR2 mRNA 在 3 组不同时间点的表达差异倍数 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )**

Table 2 The fold differences of TLR2 mRNA expression in cornea in different groups and time points after operation ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Group	Fold differences of TLR2 mRNA in post-op		
	5 d	7 d	9 d
Autograft	3.59 ± 0.62 <sup>b</sup>	5.19 ± 0.78 <sup>b</sup>	4.09 ± 0.64
Allograft	3.82 ± 0.89 <sup>b</sup>	4.79 ± 0.51 <sup>bf</sup>	15.07 ± 2.38 <sup>e</sup>
Steroid	5.70 ± 0.72 <sup>ci</sup>	3.16 ± 0.35 <sup>e</sup>	4.14 ± 0.14

$F_{\text{group}} = 39.46, P = 0.00; F_{\text{time}} = 35.38, P = 0.00; F_{\text{group}} = 45.66, P = 0.00; ^b P < 0.05, ^c P < 0.01$  vs respective steroid group,  $^e P < 0.05, ^f P < 0.01$  vs respective 9 d value;  $^i P < 0.01$  vs respective 7 d value (Two-way ANOVA, LSD-t test)

在同一手术组内 TLR2 mRNA 表达的差异倍数比较表明, 同种异体移植组和抗排斥组不同时间点差异有统计学意义 ( $t = 52.17, P = 0.00; t = 22.07, P = 0.00$ ), 同种自体移植组则与不同时间点无关 ( $t = 4.33, P = 0.07$ ); 同种异体移植组在术后 7 d 和 9 d 之间比较差异有统计学意义 ( $P = 0.00$ ), 抗排斥组 5 d 和 7 d、5 d 和 9 d、7 d 和 9 d 比较差异均有统计学意义 ( $P =$



**图 1 TLR2 在各样品扩增后融解曲线**

Fig. 1 The melt curves of TLR2 after amplification in different corneal samples

0.00;  $P = 0.01$ ;  $P = 0.04$ 。

各手术组角膜 TLR2 mRNA 表达研究表明,同种自体移植组的大鼠变化不显著,而同种异体移植组的大鼠在术后 7 d 和 9 d 时明显增加( $P = 0.00$ ),抗排斥组的大鼠显著降低,在术后 3 个时间点比较差异均有统计学意义( $P = 0.00$ ;  $P = 0.01$ ;  $P = 0.04$ ),在术后 7 d 表达最低。

### 3 讨论

糖皮质激素抗排斥反应作用已得到广泛认同。研究表明,糖皮质激素可能通过抑制多种信号传导抑制排斥反应的发生,延长移植物的存活。

作为一种天然免疫识别受体、主要表达于树突状细胞(dendritic cells, DCs)、巨噬细胞等抗原递呈细胞表面的 TLR2 具有 TLRs 共同的结构特征:即富含亮氨酸重复序列的胞外区与与 IL-1 受体相似的胞内 TLR 结构域<sup>[1,6]</sup>,可以识别来自病原微生物的病原相关分子模式(pathogen associated molecular patterns, PAMPs)<sup>[7-8]</sup>和来自宿主细胞、在机体应激或组织损伤时释放的内源性配体<sup>[9-10]</sup>。TLR2 在病原体入侵机体或炎症反应的早期即可通过其介导的信号转导途径诱导前炎症因子的释放并上调共刺激分子的表达,提供启动免疫反应所必需的特异性抗原信号和共刺激信号,从而启动获得性免疫。此外,TLR2 还可与不同的配体结合下调肿瘤坏死因子的表达,调节机体的免疫反应方向<sup>[11]</sup>。研究表明人正常角膜、角膜缘表达 TLR2 mRNA。当角膜受到病原微生物感染<sup>[12-15]</sup>,TLR2 mRNA 及其蛋白表达增加,并引起炎症前因子的生成增加,证明 TLR2 的表达与免疫监视和启动先天性的抗微生物免疫反应有关。本研究结果也证实,与正常对照组相比,3 个手术干预组均出现 TLR2 mRNA 表达增加,与 TLR2 识别内源性配体、引发创伤性炎症相符合。进一步的研究<sup>[6]</sup>发现,TLR2 可能还参与同种异体移植排斥反应。Goldstein 等<sup>[16]</sup>发现 TLR2 缺陷小鼠的同种异型皮肤移植存活时间延长。本研究进一步应用糖皮质激素抗排斥反应,并检测在给予糖皮质激素治疗的情况下角膜 TLR2 mRNA 的变化情况,发现糖皮质激素抗排斥组的大鼠角膜 TLR2 mRNA 的表达趋势和同种自体移植组、同种异体移植组完全不同,其 TLR2 mRNA 表达显著性降低。这与裂隙灯下观察到的糖皮质激素抗排斥组的大鼠角膜 RI 计分未达到诊断标准相符,提示在角膜移植过程中,供体或受体的 TLR2 识别异己抗原,释放信号促进抗原递呈细胞成熟,最终激活初始型 T 细胞,使其增生分化为效应细胞,引发移植排斥反应。糖皮质激素可能通过抑制抑制上述过程,从而阻断排斥

反应的发生。其抗排斥作用的机制有待进一步阐明。

同种异型抗原引起的移植排斥反应是一个复杂的多信号通路共同参与调控的过程,TLR2 是这一过程中的关键启动分子。研究糖皮质激素对角膜 TLR2 的表达及其信号转导的影响有助于进一步了解如何通过抑制 TLR2 识别移植抗原、抑制抗原递呈细胞的激活、阻断获得性免疫反应的产生,对明确移植后免疫排斥反应的发生机制具有重要意义,未来可能通过对 TLR2 信号通路进行干预,在早期阻断免疫排斥反应,为提高角膜移植的成功率提供新的思路。

(志谢:感谢广州南方医科大学肿瘤研究所张进华老师、广州基因复能公司洪来法老师在实验检测方面的帮助和指导。感谢广州南方医科大学生物统计学教研室安胜利老师在数据统计处理方面的帮助和指导。)

### 参考文献

- 1 Tesar BM, Goldstein DR. Toll-like receptors and their role in transplantation [J]. *Front Biosci*, 2007, 12: 4221 - 4238
- 2 白浪, 陆晓和, 周瑾, 等. CD86 在大鼠角膜移植排斥反应中表达的初步研究[J]. *第一军医大学学报*, 2004, 24(5): 533 - 535
- 3 白浪, 陆晓和, 党森涛, 等. 树突状细胞在大鼠穿透性角膜移植排斥反应中的作用[J]. *南方医科大学学报*, 2007, (1): 72 - 74
- 4 白浪, 陆晓和, 党森涛, 等. CD86 在排斥反应和前房相关免疫偏离过程中的作用[J]. *眼科研究*, 2009, (9): 751 - 754
- 5 Holland EJ. Clinical and immunohistological studies of corneal rejection in the rat penetrating keratoplasty model[J]. *Cornea*, 1991, 10: 374 - 380
- 6 Goldstein DR. Toll like receptors and acute allograft rejection[J]. *Transpl Immunol*, 2006, 17(1): 11 - 15
- 7 富宇. Toll 样受体与病原相关分子模式[J]. *上海免疫学杂志*, 2001, 21(4): 195 - 198
- 8 Schjetne KW, Thompson KM, Nilsen N, et al. Cutting edge: link between innate and adaptive immunity: Toll-like receptor 2 internalizes antigen for presentation to CD4<sup>+</sup> T cells and could be an efficient vaccine target [J]. *J Immunol*, 2003, 171: 32 - 36
- 9 Rifkin IR, Leadbetter EA, Busconi L, et al. Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease[J]. *Immunol Rev*, 2005, 204: 27 - 42
- 10 Goldstein DR. Toll-like receptors and other links between innate and acquired alloimmunity[J]. *Curr Opin Immunol*, 2004, 16(5): 538 - 544
- 11 Albrecht I, Thomas PJH, Foxwell B 2, et al. Tolerance induced via TLR2 and TLR4 in human dendritic cells: role of IRAK-1 [J]. *BMC Immunol*, 2008, 9: 69 - 83
- 12 Li Q, Kumar A, Gui JF, et al. Staphylococcus aureus lipoproteins trigger human corneal epithelial innate response through toll-like receptor-2 [J]. *Microb Pathog*, 2008, 44 (5): 426 - 434
- 13 Jin X, Qin Q, Chen W, et al. Expression of toll-like receptors in the healthy and herpes simplex virus-infected cornea [J]. *Cornea*, 2007, 26(7): 847 - 852
- 14 高建鲁, 吴欣怡. 人角膜上皮细胞 Toll 受体介导的炎性细胞因子的表达 [J]. *中华眼科杂志*, 2006, 42(7): 628 - 633
- 15 Hise AG, Daehnel K, Gillette-Ferguson I, et al. Innate immune responses to endosymbiotic Wolbachia bacteria in *Brugia malayi* and *onchocerca volvulus* are dependent on TLR2, TLR6, MyD88, and Mal, but not TLR4, TRIF, or TRAM [J]. *J Immunol*, 2007, 178(2): 1068 - 1076
- 16 Goldstein DR, Tesar BM, Akira S, et al. Critical role of the Toll-like receptor signal adaptor protein MyD88 in acute allograft rejection [J]. *J Clin Invest*, 2003, 111 (10): 1571 - 1578

(收稿:2008-12-06 修回:2009-09-20)

(本文编辑:尹卫靖)