

1,25 二羟基维生素 D₃ 对兔角膜碱烧伤朗格罕氏细胞影响

解玉军^{1,2} 高晓唯^{2△} 李文静²

(1 石河子大学医学院 新疆 石河子 832000 2 解放军 474 医院全军眼科中心 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要 目的 研究 1,25 二羟基维生素 D₃ (骨化三醇)对兔角膜碱烧伤后角膜朗格罕氏细胞分布的影响,并初步探讨其作用机制。**方法** 在兔角膜制作碱烧伤模型,然后实验组局部和全身给予 1,25 二羟基维生素 D₃,分别在第 3、7、21 天时对正常组、实验组和对照组家兔行角膜共聚焦显微镜 HE 染色观察角膜病理改变。**结果** 正常组角膜中央在三个时间点均未检测出朗格罕氏细胞。实验组和对照组碱烧伤后 3、7 天角膜中央出现朗格罕氏细胞,对照组密度高于实验组($p < 0.05$)。碱烧伤后 21 天两组朗格罕氏细胞密度相近($p > 0.05$)。实验组炎症反应程度在第 7、21 天时轻于对照组。**结论** 1,25 二羟基维生素 D₃ 能够在兔角膜碱烧伤早期抑制朗格罕氏细胞的向心性迁移,并且能在一定程度上抑制炎症反应。

关键词 角膜碱烧伤;1,25 二羟基维生素 D₃;朗格罕氏细胞

中图分类号 Q95-3 R772.2 **文献标识码**:A **文章编号**:1673-6273(2011)05-854-03

Role of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on Langerhans cell in rabbitcorneal alkali burn

XIE Yu-jun^{1,2}, GAO Xiao-wei^{2△}, LI Wen-jing²

(1 Medical college of Shihezi University, Shihezi 832002, Xin jiang Uyghur autonomous Region, China;

2 Ophthalmic Center, NO.474 Hospital of Chinese PLA, Urumuqi 830011, Xin jiang Uyghur autonomous Region, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the role of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (calcitriol) on Langerhans cell in rabbit corneal alkali burn and preliminary study its mechanism action. **Methods:** The models of corneal alkali burn were induced in rabbit, then administer the experimental group 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in local and general way. Corneas of normal group, experimental group and control group were examined at day 3, 7 and 21, analyzed by corneal confocal microscopy and H-E staining. **Results:** None Langerhans cell was found in the corneas of normal group on all three days. Less Langerhans cells were found in the experimental group than in the control group on day 3 and 7 ($p < 0.05$). Quantity of Langerhans cells in both experiment group and control group was no difference on the day 21 ($p > 0.05$). The inflammatory reaction degree of experimental group is slighter than the control group on the day 7 and 21. **Conclusions:** 1,25-dihydroxyvitamin D₃ can suppress Langerhans cell transfer centrality and provide a way to suppress the inflammatory reaction in prophase of rabbit corneal alkali burn.

Key words: corneal alkali burn; 1,25-dihydroxyvitamin D₃; Langerhans cell

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3 R772.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)05-854-03

角膜是一种透明组织,没有血管、淋巴管,免疫学上处于“免疫赦免”的状态。角膜碱烧伤后,角膜的免疫平衡被破坏,引发细胞免疫和体液免疫的改变。其中朗格罕氏细胞(Langerhans cells,LC)作为重要的抗原提呈细胞在局部的免疫反应中起重要作用。过度的免疫反应对角膜碱烧伤后的角膜溶解和新生血管起促进作用。因此角膜碱烧伤后的免疫抑制剂的治疗手段的使用成为重要的研究方向。1,25 二羟基维生素 D₃ [1,25-dihydroxyvitamin D₃, 1,25(OH)₂D₃]是维生素 D₃ 在体内的一种活性形式,近年来不断有研究证实它具有免疫调节作用,提示可以作为免疫抑制剂用于角膜碱烧伤。

本实验旨在通过兔角膜碱烧伤模型,研究 1,25 二羟基维生素 D₃ 对兔角膜碱烧伤后角膜 LC 的分布的影响,并观察角

膜的病理改变,以对 1,25 二羟基维生素 D₃ 作用于角膜碱烧伤进行进一步的研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物和主要试剂

清洁级新西兰大白兔 40 只,体重 1800-2300g,雌性,由新疆医科大学实验动物中心提供。

1,25 二羟基维生素 D₃ (罗氏公司),由解放军 474 医院药剂科在无菌条件下用灭菌花生油溶液溶解 1,25 二羟基维生素 D₃ 配制成腹腔注射液,浓度 0.1μg/mL,滴眼液,浓度为 0.5μg/mL。

1.2 实验动物分组和兔角膜碱烧伤模型的建立

36 只新西兰大白兔随机分为正常组 6 只(12 眼),实验组 17 只(15 眼),对照组 17 只(15 眼),三组造模前均进行 5 天适应性饲养。

将外径 8mm 内径 5mm 的滤纸环浸入 1mol/L 的 NaOH 溶液中,1min 后取出。选实验组和对照组共 30 只家兔,滴 1%盐

作者简介 解玉军(1983-)男,硕士研究生,研究方向:白内障和眼表疾病治疗,电话:13565881873, E-mail:xiexujun1206@sina.com
△通讯作者 高晓唯 gaomiaowei474@sina.com
(收稿日期 2010-11-15 接受日期 2010-12-10)

酸奥比卡因于随机单眼做三次表面麻醉;用眼科镊将浸有NaOH的滤纸片贴附于角膜中央,与角膜密切接触1min后取下,立即用生理盐水冲洗角膜表面和结膜囊1min,形成角膜中央边界清楚的圆盘状白色烧伤区,依据Hughes分度法确认中度碱烧伤模型建立。

1.3 造模后用药

实验组动物建模后5小时内以 $0.5\mu\text{g/mL}$ 25-二羟基维生素 D_3 溶液和0.25%氯霉素滴眼液滴眼3次/日,腹腔注射 $0.1\mu\text{g/mL}$ 25-二羟基维生素 $\text{D}_3\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$;正常组和对照组以灭菌纯花生油和0.25%氯霉素滴眼液滴眼3次/日,腹腔注射灭菌纯花生油 $1\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。

1.4 造模后临床观察

手术显微镜分别在造模后第3、7、21d观察各组动物的角膜浑浊程度,角膜混浊程度评分标准^[1]:0分:角膜无混浊;1分:角膜轻度混浊;2分:角膜混浊较重,可见虹膜纹理;3分:角膜混浊加重,不能窥见虹膜;4分:角膜完全混浊,看不到前房。

造模后第3、7、21d采用NIDEK公司CS系列角膜共聚焦显微镜观察各组角膜改变,计算LC数量。

1.5 造模后取材

分别在造模后第3、7、21d实验组和对照组各随机处死5只,正常组随机处死2只,取完整角膜(连角膜缘),用于实验检测。

1.6 病理学检测

将兔完整角膜连角膜缘,置于4%多聚甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,切片,苏木精-伊红(HE)染色,显微镜下观察。

1.7 统计学处理

SPASS13.0统计软件,进行成组设计的两样本均数t检验和等级资料的秩合检验,以 $p<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 角膜浑浊度改变

浑浊度评分在造模后3天,实验组和对照组差异无统计学意义($p>0.20$);在造模后7天,实验组和对照组差异有统计学意义($p<0.05$);造模后21天,实验组和对照组差异明显($p<0.01$)。正常组角膜浑浊度在三个时间点均未出现角膜浑浊。在三个时间点实验组和对照组与正常组差异均有统计学意义($p<0.01$)。

2.2 病理学检查

造模后3天,对照组角膜明显水肿增厚,烧伤区域透明度明显下降,且镜下可见少量的炎性细胞浸润,角膜边缘出现毛刷样新生血管;实验组角膜也出现水肿,透明度下降和炎性细胞浸润,但是角膜边缘毛细血管的数量和长度明显低于对照组。

造模后第7天,对照组角膜明显水肿增厚,烧伤区域透明度仍较低,且镜下可见中量的炎性细胞浸润,新生血管粗大,部分长入烧伤区域;实验组角膜水肿和透明度均好于对照组,且炎性细胞数量明显少于对照组。角膜边缘毛细血管的呈毛刷状,有个别新生血管较长,但是新生血管面积明显低于对照组。

造模后第21天,对照组角膜明显水肿减轻,烧伤区域透明度好转,且镜下可见炎性细胞浸润减少,仍有少量粗大新生血管,部分新生血管开始萎缩;实验组角膜水肿较对照组减轻明显,部分烧伤区域透明度接近正常区域,炎性细胞数量明显少于对照组。角膜边缘毛细血管开始萎缩,新生血管面积明显低于对照组。

正常组角膜在三个时间点角膜均未发生浑浊,无新生血管生成和炎性细胞浸润,裂隙灯显微镜下均未出现上皮缺损。

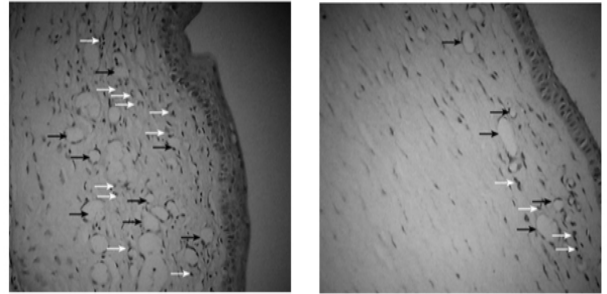


图1 对照组21天 HE染色(HE, $\times 400$)

图2 实验组21天 HE染色(HE, $\times 400$)

Fig1. H-E staining of control group on day 21(HE, $\times 400$)

Fig2. H-E staining of experiment group on day 21(HE, $\times 400$)

2.3 角膜共聚焦显微镜检查

造模后3天,对照组和实验组角膜烧伤区域前基质层和前弹力层的反光较强,提示水肿明显,在此区域发现极少量的朗格罕氏细胞浸润,但数量无明显差异。

造模后第7天,对照组角膜烧伤区域前基质层和前弹力层的反光较强,提示仍存在较严重水肿,在此区域发现少量的朗格罕氏细胞浸润。实验组角膜烧伤区域前基质层和前弹力层的反光明显弱于对照组,提示基质水肿较轻,在此区域的朗格罕氏细胞浸润数量也低于对照组。

造模后第21天,对照组角膜烧伤区域前基质层和前弹力层的仍存在反光,但是较前减弱,提示基质水肿减轻,在此区域发现中量的朗格罕氏细胞浸润。实验组角膜烧伤区域前基质层和前弹力层的反光明显弱于对照组,部分区域接近正常区域角膜,且基质细胞的形态完整,细胞核明显。提示基质细胞水肿较轻,在此区域可见少量朗格罕氏细胞浸润,数量明显低于对照组。

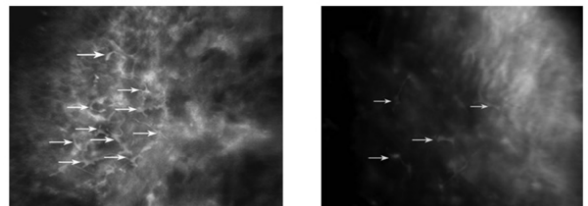


图3 对照组21天(角膜共聚焦显微镜, $\times 1000$)

图4 实验组21天(角膜共聚焦显微镜, $\times 1000$)

Fig3. The control group on day 21(Corneal Confocal Microscopy, $\times 1000$)

Fig4. The experiment group on day 21 (Corneal Confocal Microscopy, $\times 1000$)

正常组角膜在三个时间点角膜上皮层、基质层细胞形态均正常,无基质层强反光,在角膜中央均未发现朗格罕氏细胞浸润。

LC 计数变化

正常组在三个时间点均未发现 LC 细胞浸润。实验组和对照组随时间延长,中央角膜区域 LC 细胞数量增加,在造模后 3 天实验组与对照组角膜中央 LC 数量差异不明显($p>0.1$)。在造模后第 7、21 天时,对照组角膜中央 LC 数量高于实验组,差异有统计学意义($p<0.05$)。

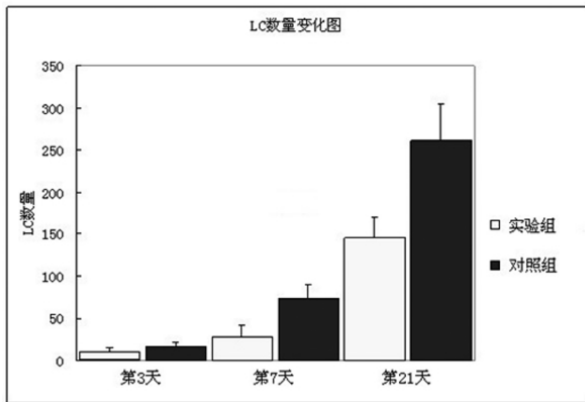


图 5 实验组与对照组三次 LC 数量结果

Fig.5 The quantity of LCS in both experiment group and control group on three days

3 讨论

维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)广泛分布于机体多种细胞,包括抗原提呈细胞和 T 细胞。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 通过 VDR 实现其免疫生物学功效。Suzuki 等^[2]通过离体培养的角膜上皮细胞证实, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 能显著降低角膜上皮细胞合成 IL-1 α 、IL-1 β 和 IL-8。而 IL-1 是诱导 LC 移行的重要因子。而且, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对角膜上皮细胞无毒性作用,这点我们在本实验中也得到证实。他们还发现^[3]采用缝线诱导的小鼠角膜新生血管, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 能抑制 LC 移行。胡雁等^[4]采用 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 全身应用抑制角膜移植后免疫排斥反应,发现 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 能显著降低外周血中 IL-1 β 、IL-2、IL-8 水平,提高 IL-10 水平,从而延长角膜植片的存活时间。

关于角膜碱烧伤的免疫学机制,目前比较肯定的是角膜碱烧伤可引起体液免疫反应和细胞免疫反应的改变,过度的免疫反应对角膜碱烧伤后的愈合过程起不利的作用,可能加重角膜血管化和溃疡的形成。LC 是来源于骨髓的树突状细胞,近来通过共聚焦显微镜和新发现的 APC 表面标记物证实,在角膜缘和角膜中央均存在一定密度的 LC,其密度为从角膜缘向角膜中央递减^[5]。在角膜碱烧伤后的免疫反应过程中 LC 起重要作用。引起 LC 迁移的机制尚不明确,可能与多种细胞因子和抗原抗体复合物相关,IL-1 可能是关键的启动因素,IL-1 的这种启动作用可能是通过 TNF- α 介导实现的^[6]。LC 有识别抗原,诱导免疫反应的作用,可诱导 T 细胞和多形核白细胞浸润。Resch 等^[7]认为 LC 在角膜无菌性炎症反应中起重要作用。已有研究证实^[8]角膜无菌性溃疡的形成与基质金属蛋白酶(MMP)

和氧自由基有密切关系,角膜碱烧伤后多形核白细胞(PMN)浸润是角膜内 MMP 和氧自由基的主要来源。

朱可建等^[9]研究证实 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 能够对树突状细胞,主要为 LC 在免疫应答开始阶段摄取抗原起重要的调节作用。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 能够诱导细胞保护性基因 A20 的表达,通过抑制蛋白 I κ B 的降解,抑制 NF- κ B 的活化从而抑制 Th-1 类细胞因子如 IL-1、IL-2 和 INF- γ 等的表达^[10]。有实验证明角膜碱烧伤后,角膜组织中炎性因子 IL-1 α 、IL-1 β 和 IL-6 表达增强^[11]。在本实验中我们发现,在角膜碱烧伤初期, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 能有效的抑制 LC 移行,而且 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 应用治疗角膜碱烧伤能减轻早期角膜碱烧伤的基质层溃疡和炎性细胞浸润,从而减轻角膜浑浊。我们推测其作用机制可能为通过抑制局部(主要为角膜上皮细胞)和全身免疫系统生成 IL-1、IL-2 和 INF- γ 从而抑制了 LC 的移行和分化,因此 LC 的抗原提呈作用受到抑制,从而减轻角膜损伤区域的炎性细胞浸润,达到减轻基质层细胞水肿和破坏的作用。

角膜碱烧伤治疗效果差,并发症多,是临床上复杂而难以治愈的眼病之一,长期困扰眼科临床医生。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 在实验动物模型中治疗角膜碱烧伤显示了良好的应用前景。当然对于 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 治疗角膜碱烧伤的具体作用机制、用药方法、用药的浓度剂量,如何避免药物副作用等问题有待进一步探讨,其远期效果还有待进一步研究。

参考文献(References)

- [1] 袁进,陈家祺,刘祖国,等.IL-1ra 治疗角膜碱烧伤的免疫学机制研究[J].眼科研究,2007,25:5-9
Yuan Jin, Chen Jia-qi, Liu Zu-guo, et al. Study of Immunology Mechanism of alkali-burned Corneas Treated with IL-1ra [J]. Chinese Ophthalmic Research, 2007, 25: 5-9
- [2] Suzuki T, Sano Y, Kinoshita S. Effects of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ on Langerhans cell migration and corneal neovascularization in mice [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(1): 154-158
- [3] Suzuki T, Sano Y, Sotozono C, et al. Regulatory effects of 1 α , 25-dihydroxy- vitamin D₃ on cytokine production by human corneal epithelial cells [J]. Current Eye Research, 2000, 20(2): 127-130
- [4] 胡雁,周善璧. 1, 25-二羟维生素 D₃ 抑制大鼠角膜移植术后免疫排斥反应[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(23): 2211-2214
Hu Yan, Zhou Shan-bi. Prevention of corneal allograft rejection by 1, 25- dihydroxyvitamin D₃ in rats [J]. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2008, 30(23): 2211-2214
- [5] Andrey Z, Joachim S, Brigitte V, Rudolf G. In vivo confocal microscopic evaluation of Langerhans cell density and distribution in the normal human corneal epithelium [J]. Arch Ophthalmol. 2005, 243: 1056-1061
- [6] Dekaris I, Zhu SN, Dana MR. TNF-alpha regulates corneal Langerhans cell migration. J Immunol, 1999, 162: 4235-4239
- [7] M.D. Resch, L. Imre, B. Tapasztó, J. Nemeth. Confocal microscopic evidence of increased Langerhans cell activity after corneal metal foreign body removal [J]. European Journal of Ophthalmology, 2008, 18(5): 703-707

(下转第 849 页)

- [3] Sun HK, Chun HI, Kye CK, et al. Microsatellite alterations in hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma[J].Cancer Genetics and Cytogenetics.2003,146:139-144
- [4] Tomoe L, Hiroshi H, Meng CX, et al. Frequent loss of heterozygosity in two distinct regions,8p23.1 and 8p22,in hepatocellular carcinoma [J].World J Gastroenterology, 2007,13:1090-1097
- [5] Matthew K.S.HO, Joyce M.F.Lee, Chris K.L.Chan, et al.Allelic alterations in Nontumorous Liver Tissues and Corresponding Hepatiocellular Carcinomas From Chinese Patients [J].Human Pathology,2003,34:699-705
- [6] Tomlinson IP, Lambros MB, Roylance RR, et al. Loss of heterozygosity analysis:practically and conceptually flawed[J].Gene Chromosomes Cancer,2002,34:349-353
- [7] 斯特罗恩(英)等著;孙开来主译.人类分子遗传学(原书第三版)[M].北京:科学出版社,2007:212-412
Tom Strachan, Andrew P. Read. Human Molecular Genetics,3rd ed [M].Bei Jing: Science Press,2007:212-412
- [8] Tomoe L, Hiroshi H. Identification of minimal regions of deletion at 8p23.1-22associated with metastasis of hepatocellular carcinoma[J]. Liver International, 2007, 27:782-790
- [9] Joon C, Nam-Gyun K, Zhe P, et al. Assessment of chromosomal losses and gains in hepatocellular carcinoma [J].Cancer Letters,2002,182:193-202
- [10] Cong WM, Zhang SH, Xian ZH, et al. Study on loss of heterozygosity and microsatellite instability in hepatocellular carcinoma [J]. Chinese Journal of pathology,2005,34:71-74
- [11] Chan KL, Joyce MFL, Guan XY, et al.High-Density Allelotyping of Chromosome 8p in Hepatiocellular Carcinoma and Clinicopathologic Correlation [J].Cancer,2002,94:3179-3185
- [12] Yutaka M, Shogo Y, Shingo T, et al. Allelic imbalances and homozygous deletion on 8p23.2 for stepwise progression of hepatocarcinoma genesis[J]. Hepatology, 2009, 49:513-522
- [13] Zhang SH, Cong WM, Xian ZH, et al. Clinicopathological significance of heterozygosity and microsatellite instability in hepatocellular carcinoma in China[J].World J Gastroenterol,2005,11:3034-3039
- [14] Cengiz Y, Patricia L, Christelle V, et al.Identification of Homozygous deletions at chromosome 16q23 in Aflatoxin B1 exposed hepatocellular carcinoma[J]. Oncogene, 2001,20:5232-5238
- [15] Wai MT, Hu L, Zhang MY, et al. Characterization of rearrangements involving 4q,13q and 16q in hepatocellular carcinoma cell lines using region-specific multiplex-FISH probes [J].Cancer Letters,2007,250:92-99
- [16] Tricia ED, Maja HO, Melissa JF, et al. Prognostic and predictive value of 16p21.1 and 16q22.1 copy number changes in human breast cancer[J]. Cancer Genetics and Cytogenetics, 2010,198(4):52-61
- [17] 邵建永,李晓明,刘宗石,等.原发性肝癌患者17号和16号染色体等位基因杂合性丢失的研究[J].中华医学杂志,1999,79(6):428-430
SHAO Jian-yong, LI Xiao-ming, LIU Zong-shi, et al. Loss of heterozygosity on chromosomes 17 and 16 in primary hepatocellular carcinomas[J]. Natl Med J China,1999,79:428-430
- [18] Salvucci M, Lemoine A, Azoulay K, et al. Frequent microsatellite instability in post-hepatitis B viral cirrhosis [J]. Oncogene, 1996,13:2681-2685

(上接第856页)

- [8] Zhang H, Li C, Baci PC.Expression of integrins and MMPs during alkaline burn induced corneal angiogenesis [J].Invest Ophthalmol VisSci,2002, 43: 955-962
- [9] 朱可建,周伟芳,郑敏. $1\alpha, 25$ -二羟维生素D₃及其类似物对单核细胞衍生的树突状细胞吞噬功能的调节作用[J].药学报, 2002, 37(2):94-97
Zhu Ke-jian, Zhou Wei-fang, Zheng Min. $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D₃ and its analogues modulate the phagocytosis of human monocyte-derived dendritic cells [J].Acta Pharmaceutica Sinica, 2002, 37(2):94-97
- [10] 章爱斌,郑树森.骨化三醇诱导锌指蛋白A20抑制下游基

因表达延长肝移植大鼠生存期[J].中华普通外科杂志, 2006, 21(6):408-410

- Zhang Ai-bin, Zheng Shu-seng. Calcitriol prolongs recipient survival by inducing expression of zinc-finger protein A20 and inhibiting down-stream genes following rat allogeneic orthotopic liver transplantation[J].Chin J Gen Surg, 2006, 21(6):408-410
- [11] 陆培荣,李龙标,张学光.小鼠角膜碱烧伤后前炎症因子、趋化因子及其受体的表达[J].眼科研究,2007,25(4):256-260.
Lu Pei-rong, Li Long-biao, Zhang Xue-guang. Expression of proinflammatory cytokine, chemokine and its receptor in mouse cornea after alkali injury [J]. Chinese Ophthalmic Research, 2007, 25(4):256-260