

小鼠单纯疱疹性角膜基质炎复发过程中 *Tim-3* 在角膜组织中的表达

夏丽坤¹, 杨颀¹, 高红², 周晶¹

(1. 中国医科大学附属盛京医院眼科, 辽宁 沈阳 110004; 2. 卫生部小儿先天畸形重点实验室)

[摘要] 目的:通过检测小鼠单纯疱疹性角膜基质炎(HSK)复发过程中T细胞免疫球蛋白黏蛋白分子3(*Tim-3*) mRNA在角膜组织的表达水平,探讨*Tim-3*的表达与HSK复发之间的关系。方法:建立复发性HSK的BALB/c小鼠模型,用紫外线B照射鼠的角膜诱导HSK复发;分别于紫外线照射前、照射后第3、7、10、14、21及28 d,采用RT-PCR方法检测全长的膜型*Tim-3*(f*Tim-3*)和可溶型*Tim-3*(s*Tim-3*)在角膜组织中的表达水平;裂隙灯显微镜下检查角膜基质炎程度。结果:处于病毒潜伏感染期的小鼠经紫外线照射诱导角膜基质炎复发后,角膜基质混浊于紫外线照射后的7~14 d达到高峰;s*Tim-3*于3~14 d高表达,f*Tim-3*于14~28 d高表达。结论:s*Tim-3*的高表达与角膜基质炎的复发和发展有关,f*Tim-3*可能有助于角膜基质炎的恢复。

[关键词] 角膜炎;单纯疱疹病毒;T细胞免疫球蛋白黏蛋白分子3;免疫病理

[中图分类号] R772.2 [文献标识码] A [文章编号] 0258-4646(2007)04-0404-03

Expression of *Tim-3* mRNA in the cornea of mice with recurrent herpetic stromal keratitis

XIA Li-kun¹, YANG Yang¹, GAO Hong², ZHOU Jing¹

(1. Department of Ophthalmology, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China; 2. Key Laboratory of Congenital Malformation of Ministry of Health, Shengjing Hospital)

[Abstract] Objective: To investigate the expression of T cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule-3 (*Tim-3*) mRNA in the cornea of mice with recurrent herpetic stromal keratitis (HSK), and to explore the relationship between *Tim-3* mRNA and recurrent HSK. Methods: The mouse model of HSK was established in BALB/c mice, and recurrent HSK was induced by ultraviolet-B irradiation. The expressions of full-length membrane-anchored form of *Tim-3* (f*Tim-3*) and soluble *Tim-3* (s*Tim-3*) mRNA were detected by reverse transcription chain polymerase reaction before and 3, 7, 10, 14, 21, and 28 after the irradiation. The degree of keratitis was observed with the slit lamp. Results: After the ultraviolet-B irradiation, the corneal stromal opacification reached the peak on days 7 to 14 in mice in the incubation period, and s*Tim-3* and f*Tim-3* were highly expressed on days 3 to 14 and days 14 to 28, respectively. Conclusion: The high expression of s*Tim-3* in the cornea is correlated with the recurrence and development of HSK, and f*Tim-3* may contribute to the rehabilitation of HSK.

[Key words] keratitis; herpes simplex virus; *Tim-3*; immunopathology

T细胞免疫球蛋白黏蛋白分子3(T cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule-3, *Tim-3*)是近年来新发现的一种T细胞表面分子,它选择性表达在小鼠活化的Th1细胞表面,Th1细胞通过mRNA选择剪接而表达全长的膜型*Tim-3*(f*Tim-3*)和可溶型*Tim-3*(s*Tim-3*),在Th1细胞介导的免疫应答和巨噬细胞的活化中起重要作用^[1,2]。单纯疱疹性角膜基质炎(herpetic stromal keratitis, HSK)是单纯疱疹病毒I型(herpes simplex virus type 1, HSV-1)感染小鼠角膜引起的一种由CD4⁺ Th1细胞介导的免疫病理性疾病^[3,4],为了研究*Tim-3*在HSK复发中是否起作用,本实验检测了BALB/c小鼠HSK复发过程中,*Tim-3* mRNA在角膜组织的表达水平,并探讨*Tim-3*的表达与HSK复发之间的关

系。

1 材料与方法

1.1 复发性HSK的BALB/c鼠模型的建立^[3,5]

1.1.1 病毒和细胞:病毒为HSV-1 Mckrae毒株,使用前滴度为 2.2×10^9 空斑单位/ml(PFU/ml)。生产和检测病毒的细胞为非洲绿猴肾细胞(VERO)。培养VERO细胞的营养液为含5%胎牛血清、青霉素、链霉素的DMEM(美国Gibco公司提供)。

1.1.2 鼠和角膜感染的程序:选用4~6周,体质量18~21 g的雌性BALB/c鼠(本院动物实验室提供)140只作为实验对象。采用随机数表方法将其分为2组,每组70只。实验组角膜接种HSV-1,对照组角膜不接种病毒。显微镜下将实验鼠的右眼角膜上皮层交叉划伤呈“井”字形后,将5 μl含有 1×10^6 PFU病毒的DMEM点于角膜表面,造成原发性角膜感染,同时向鼠的腹腔内注射人抗病毒血清1 ml(美国Chemicon公司产品)。对照组鼠的右眼角膜划伤后

[基金项目] 辽宁省教育厅科学研究计划资助项目(2004D163)

[作者简介] 夏丽坤(1965-),女,副教授,博士。

E-mail: xialk@cmu2h.com

滴 5 μ l 不含病毒的 DMEM。3 d 后用 VERO 细胞检测右眼角膜表面的泪液膜内有无病毒复制,并于接种后 3,7 d 时,在裂隙灯显微镜下检查角膜情况。除外无树枝状、地图状角膜炎或泪液膜内未检测出病毒的鼠,余鼠继续饲养 6 周。7 周时随机抽取实验组 10 只小鼠,取接种侧角膜表面泪液膜及三叉神经节检测病毒,证实潜伏感染已建立。

1.1.3 紫外线 B 光照射鼠的角膜和病毒的激活、HSK 的复发:紫外线 B 光光源为 TW20 Chromato-Vu transilluminator(美国 UVP 公司产品),其光波波长为 302 nm。每只鼠的右眼接受 170 mJ/cm² 紫外线 B 光的照射。于紫外线照射角膜的当天及照射后的 7 d 里,每天用蘸有 DMEM 的棉签擦拭右角膜 1 次,并将擦拭液用 VERO 细胞培养,检测单纯疱疹病毒,判定病毒是否被激活及 HSK 复发。

1.2 复发性 HSK 的临床观察

紫外线照射角膜后的第 1~10、14、21 及 28 d,每天 1 次用裂隙灯显微镜检查角膜改变。评估角膜基质炎的标准^[3,5,6](0~4 分):0 分,角膜基质清晰透明;1 分,角膜基质稍混浊;2 分,角膜基质中度混浊,可透见后部虹膜特征;3 分,角膜基质重度混浊,但仍可判断瞳孔缘的位置;4 分,角膜基质完全混浊,失去后部特征。

1.3 复发性 HSK 的组织病理学检查

紫外线照射角膜后的第 28 d,取鼠右眼球,用 10%甲醛固定,石蜡包埋,常规 HE 染色。

1.4 半定量 RT-PCR 方法检测 *Tim-3* mRNA 的表达

分别于紫外线照射前(0 d),照射后第 3、7、10、14、21 及 28 d,取 6 只实验组鼠的角膜和 6 只对照组鼠的角膜,提取总 RNA,逆转录为 cDNA,然后进行 PCR 扩增。 β -actin 序列:上游 5'-TGT ATG CCT CTG GTC GTA CCA C-3',下游 5'-ACA GAG TAC TTG CTG TCA GGA G-3',770 bp;*Tim-3* 序列:上游 5'-TCCCTACACAGAGCTGTC-3',下游 5'-CA-GAAATGAAGGCGAGCC-3',932 bp 或 680 bp。PCR 反应体系 25 μ l,包含模板 3 μ l,2.5 mmol/L dNTP 2 μ l,Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ l)0.2 μ l,10 \times PCR 反应缓冲液 2.5 μ l, β -actin 上、下游引物各 0.5 μ l,*Tim-3* 上、下游引物各 0.6 μ l,双蒸水 15.1 μ l,在 PCR 扩增仪上扩增 35 个循环,94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min 后,94 $^{\circ}$ C 45 s,52 $^{\circ}$ C 60 s,72 $^{\circ}$ C 90 s,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。扩增产物电泳,凝胶成像分析系统拍照并分析,所得数值代表 *Tim-3* 和 β -actin mRNA 的绝对表达量,以二者的比值代表 *Tim-3* mRNA 的相对表

达量。

1.5 统计学方法

Tim-3 mRNA 的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 临床疾病

BALB/c 鼠的角膜接种 HSV-1 后第 3 d 的角膜表面泪液膜中检测出 HSV-1 复制,所有鼠均患急性上皮性角膜炎。角膜接种 HSV-1 后第 7 周时,抽样 10 只小鼠检测 HSV-1,结果为角膜表面泪液膜内阴性,而三叉神经节内阳性,证实小鼠处于病毒潜伏感染状态。处于病毒潜伏感染期的鼠和对照组的鼠接受了相同剂量的紫外线照射后,对照组鼠仅表现为轻微的角膜水肿,很快恢复正常,泪液膜内未检测到病毒。在实验组的 58 只鼠中,有 50 只鼠的泪液膜内检测到病毒复制,即 HSK 的复发率为 86.2% (50/58);复发性角膜感染主要表现为角膜基质炎,裂隙灯显微镜下可见角膜基质混浊:角膜基质混浊于紫外线照射后第 3 d 开始出现,14 d 时角膜基质混浊达到高峰,14 d 后角膜基质混浊逐渐下降,处于恢复期(图 1)。组织学检查可见角膜上皮层完整,基质水肿,基质层内有大量的炎性细胞浸润,主要为淋巴细胞、巨噬细胞及中性粒细胞。

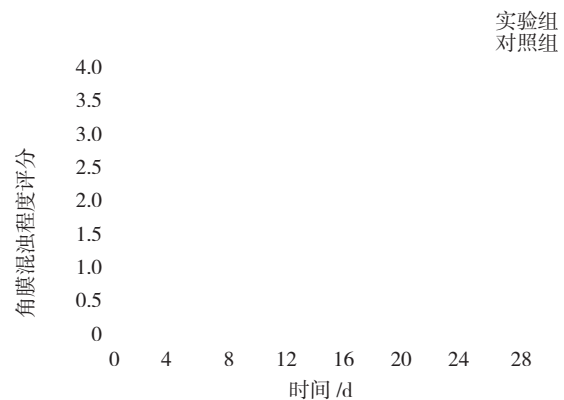


图 1 紫外线照射后不同时间的平均角膜混浊程度

Fig.1 Average corneal stromal opacification after UV-B irradiation

2.2 *Tim-3* mRNA 在小鼠 HSK 复发过程中的表达

处于病毒潜伏感染期的小鼠(实验组)在接受紫外线照射之前,角膜组织中有微量 *sTim-3* mRNA 表达,无 *fTim-3* mRNA 表达,经紫外线照射后 *sTim-3* 表达迅速增加,在照射后第 3~14 d 高表达,与照射前相比, $P < 0.01$,21 d 时恢复至照射前的水平与照射前相比, $P > 0.05$;而 *fTim-3* 于紫外线照射后第 7

d 开始表达,于照射后第 14~28 d 呈高表达与照射前相比, $P < 0.01$,而此时 *sTim-3* 表达已经明显下调(图 2)。对照组小鼠于紫外线照射前后,角膜组织中均未检测到 *sTim-3* 和 *fTim-3* mRNA 的表达。



图 2 紫外线照射后不同时间 *Tim-3* mRNA 在角膜组织中的表达水平

Fig. 2 Expression of *Tim-3* mRNA in the cornea after UV-B irradiation

3 讨论

3.1 *Tim-3* 与免疫调节机制

CD4⁺ T 细胞根据其分泌细胞因子的不同分为两种亚型:T 辅助细胞 I 型(Th1)和 T 辅助细胞 II 型(Th2)。Th1 分泌细胞因子干扰素 γ 、IL-2,主要介导细胞免疫反应和引起迟发性超敏反应;过度激活 Th1 反应会引起器官特异性自身免疫性疾病。*Tim-3* 选择性表达于小鼠活化的 Th1 细胞表面,表现为 *fTim-3* 和 *sTim-3*。*fTim-3* 由胞膜外的 IgV 区、黏蛋白区、跨膜区及胞质区组成;*sTim-3* 缺少黏蛋白区及跨膜区,仅含 IgV 区和胞质区。*Tim-3* 的配体(*Tim-3L*)主要表达于 CD4⁺ T 细胞,*Tim-3L* 在静息的 CD4⁺ Th1 细胞中表达上调,而当 Th1 细胞活化时 *Tim-3L* 表达下调。*Tim-3* 与 *Tim-3L* 相互作用产生负性调节信号,抑制 Th1 细胞增殖,下调 Th1 型免疫应答^[1,2]。目前的研究显示 *Tim-3* 在 Th1 细胞介导的自身免疫性疾病及肿瘤免疫耐受中发挥着重要作用^[7]。在实验性自身免疫性脑脊髓炎研究中发现:*Tim-3* 的表达与效应性 Th1 细胞的活化密切相关;在肿瘤免疫耐受研究中发现:*fTim-3* 的表达水平同瘤重之间呈正相关,*sTim-3* 的表达水平同瘤重之间呈负相关,提示 *fTim-3* 的大量表达可能是诱导肿瘤免疫耐受、促进肿瘤生长的重要因素之一^[8]。

3.2 *Tim-3* 在小鼠 HSK 复发过程中的表达特征

近年来细胞免疫反应在 HSK 发病机制中的作用受到人们的广泛重视。目前公认 HSK 是一种由单纯疱疹病毒及病毒抗原引起的 T 淋巴细胞介导的免疫病理性疾病,CD4⁺ T 细胞是介导 HSK 免疫病理反应的主要炎性细胞^[3,4]。CD4⁺ T 细胞介导的 HSK 免疫反应主要是一种迟发性超敏反应,角膜损伤程度最终取决于迟发性超敏反应程度^[3-6]。在 HSK 复发过程中,Th1 型细胞因子如干扰素 γ 在 HSK 角膜组织中表达明显增多,与 HSK 疾病程度密切相关^[5,6]。

我们采用 HSK 复发感染模型检测了 BALB/c 小鼠角膜组织中 *Tim-3* mRNA 表达的特征。结果显示:在 HSK 复发早期 *sTim-3* 表达迅速增加,在角膜基质混浊发生、发展过程中高表达,在角膜基质混浊达到高峰以后表达迅速下调;而 *fTim-3* 在 HSK 复发早期无表达,在角膜基质混浊达到高峰时开始高表达,高表达持续整个恢复期。因此,目前的数据表明 *sTim-3* 的高表达与角膜基质炎的复发和发展有关,*fTim-3* 可能有助于角膜基质炎的恢复。

参考文献:

- [1] 王毓琴,杨培增. T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子 3 与免疫调节的研究进展[J]. 国际免疫学杂志, 2006, 29(2): 107-111.
- [2] MEYERS JH, SABATOS CA, CHAKRAVARTI S, et al. The *TIM* gene family regulates autoimmune and allergic diseases[J]. *Tren Mole Med*, 2005, 11(8): 362-369.
- [3] 夏丽坤,舒红,高殿文. 鼠 T 淋巴细胞亚群对复发性单纯疱疹病毒性基质性角膜炎的免疫介导作用[J]. 中华眼科杂志, 2000, 36(1): 27-31.
- [4] BANERJEE K, BISWAS PS, ROUSE BT. Elucidating the protective and pathologic T cell species in the virus-induced corneal immunoinflammatory condition herpetic stromal keratitis [J]. *J Leukoc Biol*, 2005, 77(1): 24-32.
- [5] 夏丽坤,张劲松,陈晓隆,等. 细胞因子在鼠复发性单纯疱疹性角膜基质炎的角膜组织中的表达 [J]. 中华眼科杂志, 2005, 41(5): 403-408.
- [6] KEADLE TL, USUI N, LAYCOCK KA, et al. Cytokine expression in murine corneas during recurrent herpetic stromal keratitis [J]. *Ocul Immunol Inflamm*, 2001, 9(3): 193-205.
- [7] SIMMONS WJ, KONERU M, MOHINDRU M, et al. *Tim-3*+T-bet+ tumor-specific Th1 cells colocalize with and inhibit development and growth of murine neoplasms [J]. *J Immunol*, 2005, 174(30): 1405-1415.
- [8] 朱汉刚,冯作化,耿辉,等. 肿瘤组织中 *Tim-3* 表达的特征及其在肿瘤免疫耐受中的作用 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2005, 21(4): 403-406.

[收稿日期] 2007-03-15