

角膜炎模型大鼠白细胞介素10及环氧酶2的表达

陆霞¹, 潘旭斌¹, 谢玉涛², 季秋娣³(无锡市第四人民医院, ¹眼科, ²手术室, ³皮肤科, 江苏省无锡市 214062)

文章亮点:

- 1 以往的研究中, 大部分学者均将重点放在角膜炎的临床治疗上, 但其主要的发病机制尚不清楚。通过制作角膜炎大鼠模型来研究白细胞介素10及环氧酶2的表达情况对发病的影响, 降低了临床研究的危险性。
- 2 结果显示白细胞介素10在角膜炎病变后期有表达, 推测其可能参与角膜炎后期的组织损伤修复; 环氧酶2的表达位于角膜炎组织, 是角膜炎病变的敏感炎症因子。

关键词:

实验动物模型; 基因病毒载体及相关因子动物模型; 角膜炎; 白细胞介素10; 环氧酶2

主题词:

角膜炎; 白细胞介素10; 环氧酶2; 组织工程

摘要

背景: 研究白细胞介素10、环氧酶2与模型大鼠角膜炎发生发展的关系, 对角膜炎的治疗有重大意义。

目的: 检测白细胞介素10及环氧酶2在大鼠模型角膜炎中的表达情况, 分析白细胞介素10、环氧酶2与模型大鼠角膜炎发生发展的关系。

方法: 随机选取26只健康大鼠, 不限雌雄, 大鼠左眼选为实验组, 采用角膜表面镜片法建立角膜炎感染模型; 右眼作为正常对照组。建模后第1, 3, 7及14天摘取角膜组织, 观察大鼠左右眼角膜组织病理学变化, 并采用免疫组织化学及反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)法, 检测白细胞介素10及环氧酶2在不同程度角膜炎的角膜组织中的表达情况。

结果与结论: ①组织病理学观察显示角膜炎病灶有严重组织坏死及中性粒细胞浸润, PAS染色结果显示菌丝主要存在于角膜基质层。②白细胞介素10在对照组大鼠角膜中基本不表达, 感染角膜炎后, 白细胞介素10的表达先上升后下降, 各时间点有显著性差异($P < 0.01$)。③环氧酶2在对照组大鼠角膜中基本不表达, 感染角膜炎后, 环氧酶2的表达逐渐升高, 第14天降低, 各时间点有显著性差异($P < 0.01$)。PAS染色及病变组织培养实验证明建立大鼠模型角膜炎成功。结果显示白细胞介素10在角膜炎病变后期有表达, 推测其可能参与角膜炎后期的组织损伤修复; 环氧酶2的表达位于角膜炎组织, 是角膜炎病变的敏感炎症因子。

陆霞, 潘旭斌, 谢玉涛, 季秋娣. 角膜炎模型大鼠白细胞介素10及环氧酶2的表达[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(49):8015-8020.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.49.025

Expression of interleukin-10 and cyclooxygenase 2 in keratitis rat models

Lu Xia¹, Pan Xu-bin¹, Xie Yu-tao², Ji Qiu-di³ (¹Department of Ophthalmology, ²Operating Room, ³Department of Dermatology, the Fourth People's Hospital of Wuxi, Wuxi 214062, Jiangsu Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Investigating the relationship between interleukin-10, cyclooxygenase-2 expression levels and the occurrence and development of keratitis is of great significance for the treatment of keratitis.

OBJECTIVE: To detect the expression of interleukin-10 and cyclooxygenase 2 in keratitis rat models and analyze the relationship between interleukin-10, cyclooxygenase-2 expression and the occurrence and development of keratitis in rats.

METHODS: Twenty-six healthy rats of either gender were randomly selected to establish keratitis rat models. The left eyes of rats were chosen as experimental group to establish keratitis models using epikeratophakia. The right eyes of rats were set as control group. At the 1st, 3rd, 7th and 14th days after modeling, the pathological changes of rat corneal tissue were observed in both eyes. The expression of interleukin-10 and cyclooxygenase 2 in the corneal tissue with different degrees of keratitis was determined using immunohistochemistry and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS AND CONCLUSION: Histopathological observation showed that there were severe tissue necrosis and neutrophil infiltration in keratitis foci. PAS staining showed that the mycelium was mainly present in the corneal stroma. In the control group, the expression of interleukin-10 was hardly detected in rat cornea. After keratitis infection, the expression of interleukin 10 increased at first and then decreased, and there was significant difference between different time points ($P < 0.01$). In the control group, the expression of cyclooxygenase-2 was hardly detected in rat cornea. After keratitis infection, the expression of cyclooxygenase 2 was increased gradually and then decreased at the 14th day. There was significant difference between different time points ($P <$

陆霞, 女, 1966年生, 安徽省淮南市人, 汉族, 2001年南京医科大学毕业, 主管护师, 主要从事眼科相关工作。

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2015)49-08015-06

稿件接受:2015-09-23

http://www.crter.org

Lu Xia, Nurse-in-charge, Department of Ophthalmology, the Fourth People's Hospital of Wuxi, Wuxi 214062, Jiangsu Province, China

Accepted: 2015-09-23

0.01). PAS staining and pathologic tissue culture experiment suggest that rat models of keratitis were successfully established. These results show that the expression of interleukin-10 appeared in the late period of keratitis lesions, which indicate that interleukin-10 may be involved in the tissue damage repair in the late period of keratitis. The expression of cyclooxygenase-2 locates in the keratitis tissue and cyclooxygenase-2 is a sensitive inflammatory cytokine of keratitis.

Subject headings: Keratitis; Interleukin-10; Cyclooxygenase-2; Tissue Engineering

Lu X, Pan XB, Xie YT, Ji QD. Expression of interleukin-10 and cyclooxygenase 2 in keratitis rat models. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(49):8015-8020.

0 引言 Introduction

角膜炎近年来在国内的发病率逐渐上升, 由多种因素导致, 例如角膜接触镜佩戴人数增多、抗生素的广泛使用等^[1-3]。目前, 针对其发病的机制尚未明确, 缺乏有效的药物及治疗手段, 导致此病在早期没有得到有效的治疗, 后期影响患者的视功能, 严重者致盲。白细胞介素10是抗炎因子, 具有免疫抑制活性^[4-5], 其通过抑制趋化因子和促炎因子的合成及巨噬细胞活性, 终止炎症反应^[6-8]。环氧酶2是存在于真菌角膜炎中的一类炎症因子, 催化前列腺素的合成^[9], 环氧酶2参与眼组织的发育及眼部肿瘤的发生。文献报道关于自身免疫性脑骨髓炎, 通过给予环氧酶2抑制剂能够提高白细胞介素10的表达, 且白细胞介素10水平上升与病情好转有相关性^[10-11]。因此, 研究白细胞介素10、环氧酶2与模型大鼠角膜炎发生、发展的关系, 对角膜炎的治疗有重大意义。文章通过建立角膜炎大鼠模型, 观察角膜炎的发生、发展观察, 采用免疫组织化学及反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)法, 检测白细胞介素10及环氧酶2在不同程度角膜炎的角膜组织中的表达情况。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 造模动物及材料 实验于2014年3月至2015年6月在江苏省无锡市第四人民医院实验室完成。

实验动物: 选取26只健康清洁级大鼠, 雌雄不限, 体质量240-260 g, 通过裂隙灯检查大鼠双眼角膜正常, 来自解放军第三军医大学第三附属医院动物室。维持12 h光照/黑暗昼夜节律(光照20: 00-8: 00, 黑暗8: 00-20: 00), 室温(22±2) °C, 给予标准自由进食, 按照国家健康协会制定的实验动物指南处理所有动物。

1.2 造模方法

1.2.1 建立角膜炎大鼠模型 制备角膜接触镜, 置于体积分数75%的乙醇中浸泡消毒备用。选取大鼠左眼为实验组, 建立角膜炎感染模型。在眼科显微镜下, 用无菌原道刮除左眼角膜中央的上皮组织, 随后将角膜表面刮痕, 在角膜表面涂抹角膜炎感染菌落, 最后覆盖角膜接触镜, 缝合眼睑。右眼为正常对照组。

1.2.2 造模成功的检测标准 造模完成之后拆线发现感染情况较好, 组织刮取物行菌落培养证实大鼠真菌性角膜炎, 说明造模成功。眼睑拆线后, 刮去少许角膜组织, 涂片观察, 并培养, 每天裂隙灯观察角膜病变情况并拍照。

角膜炎大鼠模型制备实验用试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
角膜炎感染菌株	中国科学院微生物研究所提供
外科 5-0 四线	上海眼科耗材中心
0.05% 安尔碘洗液	上海利康消毒高科技有限公司
兔抗鼠白细胞介素 10 多克隆抗体(稀释度为 1 : 100-500)、兔抗鼠环氧酶 2 多克隆抗体(稀释度为 1 : 100-500)、辣根酶标记的羊抗兔 IgG(稀释度为 1 : 200-500)、SP 试剂盒	北京博奥森生物技术有限公司
Histostain Plus	
DAB 染色试剂盒	北京中杉金桥生物技术有限公司
正电荷防脱载玻片	江苏世泰实验器材有限公司
Trizol 试剂	上海英潍捷基贸易有限公司
氯仿分析纯	烟台三和化学试剂有限公司
异丙醇分析纯	天津市广成化学试剂有限公司
无水乙醇	南京化学试剂有限公司
PrimeScript RT-PCR Kit 试剂盒(50 次量)	日本宝生物试剂公司
Tip 枪头	美国爱思进试剂公司
琼脂糖	西班牙 BIOWEST 公司
微量移液器	德国艾本德
电泳仪 DYY-6C 型	北京六一仪器厂
UVP 凝胶成像系统	美国 VILBER LOURM
DU800 核酸蛋白分析仪	美国贝克曼
普通 PCR 仪 AB2720 型	美国 Appliedbiosystems
涡旋混合仪 VX-200 型	美国 LABNET
离心机 3K30 型	德国 Sigma
超低温冰箱	日本 SANYO
-20 °C 冰箱 SCD-2166XZ 型	青岛海尔
电子天平	德国赛多利斯科学仪器(北京)有限公司

1.2.3 组织病理学检测 建模后第1, 3, 7及14天分别随机选取5只大鼠, 无菌条件下摘取其角膜组织, 将角膜组织分为2份, 一份制备病理学免疫组织化学观察, 另一份置于无菌的EP管内, -80 °C冰箱保存, RT-PCR备用。

角膜组织于固定液固定24 h后, 进行乙醇梯度脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片, 厚度2 μm, 用于染色及免疫组织化学观察, 并烘干。

1.2.4 RT-PCR 目的基因序列片段来自Genebank, 引物由上海英潍捷基贸易有限公司合成, 序列见表1。

表1 PCR引物序列及RT-PCR产物长度

Table 1 PCR primer sequences and RT-PCR product length

基因名称	引物序列	产物长度
白细胞介素10	上游 TGC CTT CAG TCA AGT GAA GAC	346 bp
	下游 AAA CTC ATT CAT GGC CTT GTA	
环氧酶2	上游 CCA TGT CAA AAC CGT GGT GAA TG	374 bp
	下游 ATG GGA GTT GGG CAG TCA TCA G	

称取50 mg角膜组织置于灭菌的EP管中, 加入500 μ L TRIZOL, 静置5 min, 充分裂解; 置于冰上将角膜组织研磨至浆状, 离心, 提取RNA, -80°C 冰箱保存。使用分光光度计检测RNA在260 nm、280 nm的吸光度, 计算RNA的纯度(A_{260}/A_{280})及浓度(g/L)= $A_{260}\times 40\times$ 稀释倍数/1 000。

反转录反应体系, 反应条件 65°C 水浴、5 min, 后置于 4°C 。见表2, 3。

表2 反转录反应体系1

Table 2 Reverse transcription reaction system 1

试剂	试剂量
dNTP Mixture (10 mmol/L each)	1 μ L
Random 6 mers (20 μ mol/L)	1 μ L
RNase Free d H ₂ O	7 μ L
样品 RNA 量	1 μ L
合计	10 μ L

表3 反转录反应体系2

Table 3 Reverse transcription reaction system 2

试剂	试剂量
Prime Script RTase (for 2 step)	0.5 μ L
RNase Inhibitor	0.5 μ L
RNase Free d H ₂ O	5 μ L
5'Prime Script Buffer	4 μ L
合计	10 μ L

反应体系如下, 反转录条件: 42°C , 30 min; 95°C , 5 min; 4°C 。

PCR反应体系, 将表4中的PCR反应液加入到表3反转录结束的PCR反应中, 混匀。

表4 PCR反应体系

Table 4 PCR reaction system

试剂	试剂量
10xPCR Buffer	1 μ L
上述反转录反应液	2 μ L
dNTP Mixture (10 mmol/L each)	0.8 μ L
上游引物	1 μ L
下游引物	1 μ L
TakaRa Ex Taq HS (5U/ μ L)	0.2 μ L
RNase Free d H ₂ O	12 μ L
合计	20 μ L

PCR反应条件: 94°C , 3 min; 95°C , 30 s; 55°C (白细胞介素10引物), 55°C (环氧酶2引物), 30 s; 72°C , 40 s; 共38个循环(白细胞介素10引物), 35个循环(环氧酶2引物) 72°C , 10 min。

DNA电泳及分析, 利用凝胶成像系统拍照, Quantity One定量分析软件分析, 检测目的基因的相对吸光度, 得到白细胞介素10及环氧酶2的相对表达量。

1.3 主要观察指标 ①大鼠模型角膜炎感染情况。②病变组织培养及染色观察结果。③组织病理学观察结果。④RT-PCR结果。

1.4 统计学分析 本次研究的统计分析软件是SPSS 22.0, 结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 t 值检验组内和组间的差异, 用 χ^2 检验计数资料间的差异, 当 $P < 0.05$ 时认为有差异显著性意义。

2 结果 Results

2.1 造模成功动物数量及过程 实验选取大鼠26只, 实验过程无脱失, 全部进入结果分析。

2.2 模型创新性/材料、方法的改进 以往大部分研究在造模时一般都是将大鼠的两只眼睛都进行感染, 在与其他大鼠作为对照, 但是本次研究为自体对照, 将同一只大鼠的一只眼睛感染造模, 另一只眼睛作为对照, 增加了数据的可信度。

2.3 模型稳定性 本次研究之前, 作者翻阅了众多相关的研究资料, 资料中显示角膜炎大鼠模型具有较高的稳定性, 且使用其进行角膜炎的相关实验均取得了较好的成果, 因此本次研究也使用了这种模型。

2.4 大鼠模型角膜炎感染情况 建模后, 大鼠状况良好, 接种感染24 h后, 拆除缝合线, 去除角膜接触镜, 露出角膜病灶组织。术后第1天, 大鼠角膜出现水肿, 表面粗糙不光滑; 第3天, 大鼠角膜水肿, 表明粗糙, 周围组织充血, 溃疡出现; 第7天, 大鼠角膜水肿加重, 溃疡程度加重, 分泌物较多, 表面凹凸不平; 第14天, 大鼠角膜溃疡大部分消退, 中央区浑浊(图1)。

2.5 病变组织培养及染色观察结果 建模1 d后, 取角膜组织进行涂片镜检, 并培养。结果显示, 未能分离培养出细菌, 分离培养出真菌, 菌落呈棉花状白色, 显微镜下观察菌丝呈短棒状或者链状(图2)。

2.6 组织病理学观察结果

2.6.1 PAS染色观察 显微镜下观察病变角膜组织, 角膜炎溃疡灶存在紫红染色, 主要存在于角膜基质层(图3)。

2.6.2 苏木精-伊红染色观察 建模后1d, 大鼠角膜出现水肿, 基质内有中性粒细胞浸润; 第3天, 中性粒细胞浸润增多; 第7天, 炎症达到高峰, 溃疡坏死区增大, 中性粒细胞明显浸润; 第14天, 上皮修复, 基质水肿消退, 中性粒细胞浸润减少(图4)。

2.6.3 免疫组织化学观察 结果显示, 白细胞介素10和环

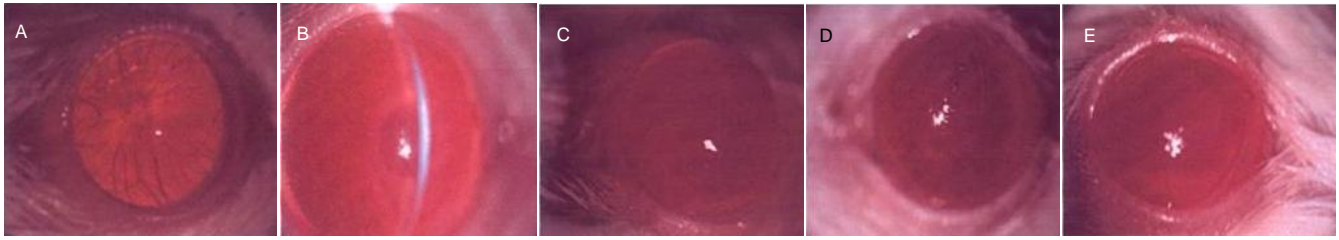


图 1 观察大鼠模型角膜炎感染情况
Figure 1 Observation of the keratitis infection of rat models
图注: 图 A 为正常角膜; B-E 分别为术后第 1, 3, 7, 14 天角膜。

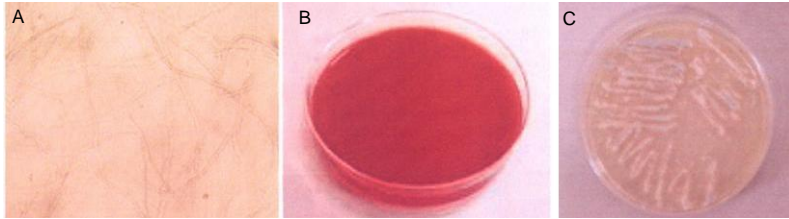


图 2 观察角膜炎感染菌株
Figure 2 Keratitis infection strains
图注: A 为涂片观察(x400); B 为病变组织细菌培养; C 为病变组织真菌培养。

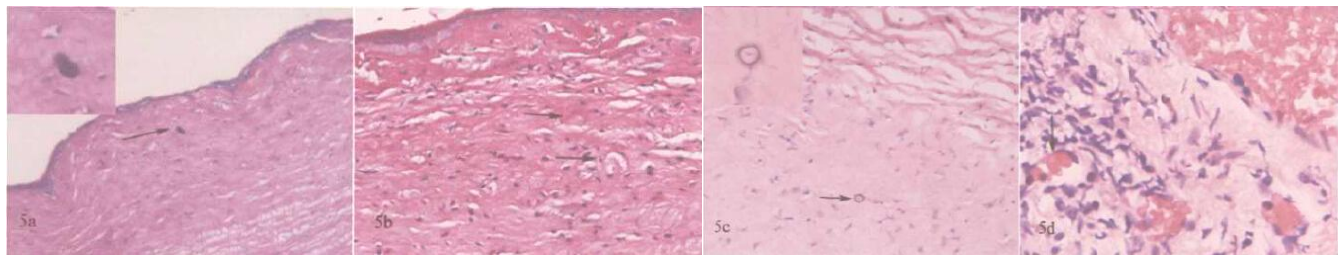


图 3 观察角膜组织 PAS 染色(x400)
Figure 3 Observation of PAS-stained corneal tissue (x400)
图注: 角膜炎溃疡灶存在紫红色染色(箭头指溃疡灶), 主要存在于角膜基质层。

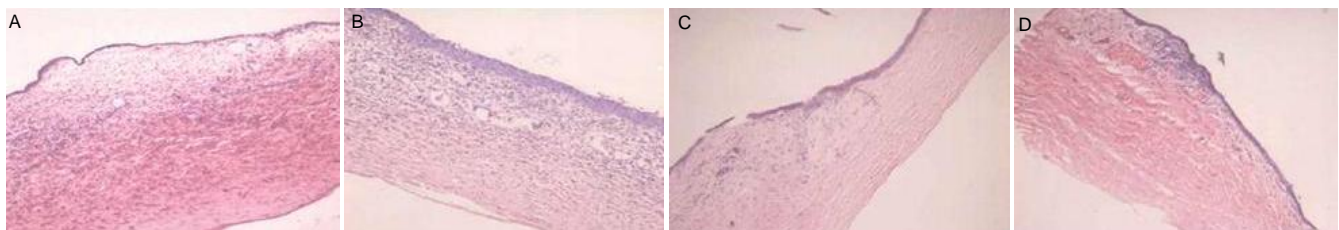


图 4 观察角膜组织苏木精-伊红染色(x400)
Figure 4 Observation of the hematoxylin-eosin-stained corneal tissue (x400)
图注: 图 A 为建模后 1 d 大鼠角膜出现水肿; B 为建模后 3 d 中性粒细胞浸润增多; C 为建模后 7 d 炎症达到高峰; D 为建模后 14 d 基质水肿消退。

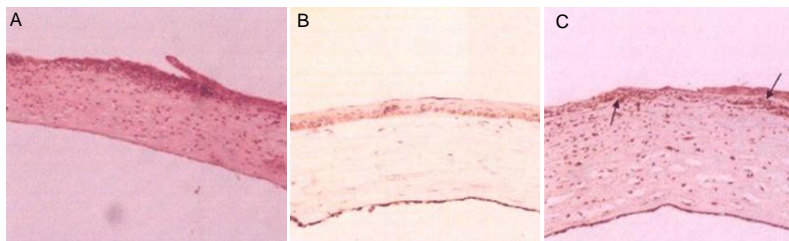


图 5 免疫组织化学观察角膜组织白细胞介素 10 的表达(x400)
Figure 5 Expression of interleukin 10 in corneal tissue observed by immunohistochemistry (x400)
图注: 图 A 为感染后 1 d(苏木精-伊红染色); B 为感染后 1 d, 白细胞介素 10 在对照组大鼠中的表达; C 为感染后 1 d, 白细胞介素 10 在角膜炎大鼠中的表达。

环氧酶2在对照组基本不表达, 白细胞介素10主要位于基质内, 感染后第1天开始表达(图5), 到第3天表达量逐渐显著上升, 第7天表达量下降, 第14天仍有表达, 各时间点差异有显著性意义($P < 0.01$), 见表5, 6; 环氧酶2主要位于基质中, 感染后第1天开始表达, 第3天到第7天表达量逐渐显著上升, 第7天达到最大值, 第14天表达量下降, 各时间点有显著性差异($P < 0.01$), 见表7, 8, 见图5。

2.7 RT-PCR结果 提取角膜组织总RNA(图6), 28S比18S为2:1, 说明RNA较完整, 检测 A_{260}/A_{280} 的比值为1.9, 浓度为1 g/L。

2.7.1 白细胞介素10在角膜组织中的表达 选用 β -actin基因为内参基因, β -actin基因PCR产物大小为317 bp, 以验证PCR系统无问题。

如图7结果显示, 白细胞介素10在对照组中不表达,

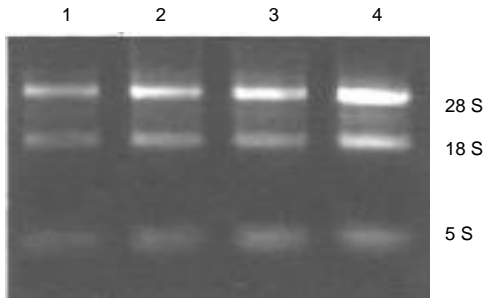


图 6 角膜总 RNA 完整性鉴定

Figure 6 Identification of total RNA integrity in corneal tissue
图注: 28 S 比 18 S 为 2 : 1, 说明 RNA 较完整。

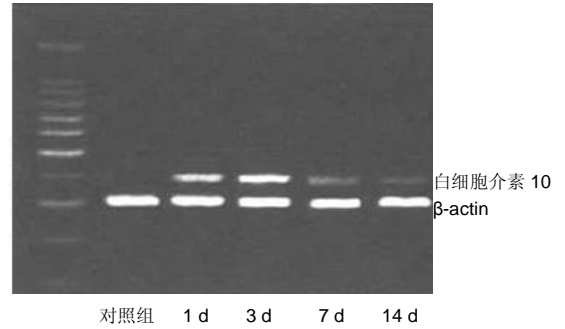


图 7 RT-PCR 法检测白细胞介素 10 在不同时间点角膜组织中 mRNA 的表达

Figure 7 mRNA expression of interleukin-10 in corneal tissue at different time points detected by RT-PCR
图注: 白细胞介素 10 在对照组中不表达, 感染后 1 d 开始表达, 到第 3 天表达量最大, 第 7 天表达量下降, 第 14 天仍有表达。

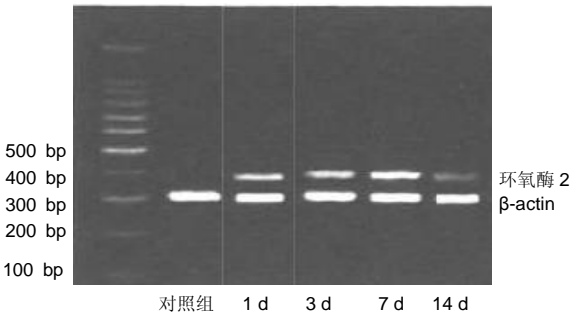


图 8 RT-PCR 法检测白细胞介素 10 在不同时间点角膜组织中 mRNA 的表达

Figure 8 mRNA expression of interleukin-10 in corneal tissue at different time points detected by RT-PCR
图注: 环氧酶 2 在对照组中不表达, 感染后 1 d 开始表达, 第 7 天达

表 5 对照组和角膜炎感染组白细胞介素 10 的平均吸光度测定 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 5 Average absorbance of interleukin 10 in corneal tissue of rats in experimental and control groups

组别	平均相对表达量
对照组	0.037 7±0.001 9
感染后第 1 天	0.242 4±0.003 1
感染后第 3 天	0.682 4±0.001 9
感染后第 7 天	0.663 4±0.003 5
感染后第 14 天	0.136 2±0.004 5

表注: 各时间点比较差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。

表 6 白细胞介素 10 的 5 个样本间 q 检验

Table 6 q tests between five samples

组间比较	两组平均数之差	组数	q	P
对照组与感染后 1 d	0.208 5	3	138.943 1	< 0.01
对照组与感染后 3 d	0.664 1	5	442.472 3	< 0.01
对照组与感染后 7 d	0.635 2	4	423.356 8	< 0.01
对照组与感染后 14 d	0.098 5	2	65.608 3	< 0.01
感染后 1 d 与感染后 3 d	0.454 0	3	303.532 9	< 0.01
感染后 1 d 与感染后 7 d	0.426 8	2	284.413 8	< 0.01
感染后 1 d 与感染后 14 d	0.110 9	2	73.334 6	< 0.01
感染后 3 d 与感染后 7 d	0.028 5	2	19.116 2	< 0.01
感染后 3 d 与感染后 14 d	0.565 2	4	376.865 1	< 0.01
感染后 7 d 与感染后 14 d	0.536 9	3	357.746 5	< 0.01

表 8 环氧酶 2 的 5 个样本间 q 检验

Table 8 q tests between five samples

组间比较	两组平均数之差	组数	q	P
对照组与感染后 1 d	0.134 3	3	92.480 9	< 0.01
对照组与感染后 3 d	0.380 8	4	262.098 0	< 0.01
对照组与感染后 7 d	0.751 3	5	517.108 6	< 0.01
对照组与感染后 14 d	0.200 7	3	138.239 6	< 0.01
感染后 1 d 与感染后 3 d	0.246 2	3	169.617 1	< 0.01
感染后 1 d 与感染后 7 d	0.616 9	4	424.627 8	< 0.01
感染后 1 d 与感染后 14 d	0.066 4	2	45.757 8	< 0.01
感染后 3 d 与感染后 7 d	0.370 5	2	255.010 6	< 0.01
感染后 3 d 与感染后 14 d	0.179 8	2	123.858 3	< 0.01
感染后 7 d 与感染后 14 d	0.550 5	3	378.869 3	< 0.01

表 7 对照组和角膜炎感染组环氧酶 2 的平均吸光度测定 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 7 Average absorbance of cyclooxygenase-2 in corneal tissue of rats in experimental and control groups

组别	平均相对表达量
对照组	0.100 2±0.002 5
感染后第 1 天	0.243 5±0.003 3
感染后第 3 天	0.481 1±0.004 2
感染后第 7 天	0.851 7±0.003 5
感染后第 14 天	0.301 3±0.002 4

感染后 1 天开始表达, 到第 3 天表达量逐渐显著上升至最大, 第 7 天表达量下降, 第 14 天仍有表达, 各时间点差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。

2.7.2 环氧酶 2 在角膜组织中的表达 如图 8 结果显示, 环氧酶 2 在对照组中不表达, 感染后 1 天开始表达, 第 3 天到第 7 天表达量逐渐显著上升, 第 7 天达到最大值, 第 14 天表达量下降, 各时间点差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。

3 讨论 Discussion

3.1 造模方法创新及稳定性 以往大部分研究在造模时一般都是将大鼠的两只眼睛都进行感染, 在与其他大鼠作为对照, 但是本次研究将一只大鼠的两只眼睛作为对照,

一只眼睛感染造模, 另一只眼睛作为对照, 增加了数据的可信度。在本次研究之前, 作者翻阅了众多相关的研究资料, 资料中显示角膜炎大鼠模型具有较高的稳定性, 且使用其进行角膜炎的相关实验均取得了较好的成果, 因此本次研究也使用了这种模型。

3.2 白细胞介素10及环氧酶2在角膜炎角膜组织中的表达
天然免疫系统在角膜炎的发病过程中有着重要作用, 主要包括淋巴细胞、粒细胞等^[12-14]。这些免疫细胞受细胞因子、趋化因子等调控, 在组织中产生化脓作用^[15], 免疫系统的反应能力决定机体的抗感染能力。目前, 缺乏有效的药物及治疗手段, 严重影响患者的视功能。本研究通过大鼠模型, 了解角膜炎的发病情况, 探讨其发病机制。

本研究中, 选取白细胞介素10作为检测基因, 因为白细胞介素10是免疫系统中的复调控因子, 能够抑制单核细胞的吞噬及中性粒细胞的呼吸氧爆发作用。结果显示, 白细胞介素10参与整个病变过程, 白细胞介素10在对照组中不表达, 感染后1d开始表达, 到第3天表达量逐渐显著上升至最大, 同时病理学表明角膜组织严重破坏, 角膜炎后期表达量下降, 炎症消退, 推测白细胞介素10可能抑制保护因子的分泌, 减弱炎症因子的吞噬, 参与角膜炎后期的组织损伤修复。环氧酶2是一类炎症因子, 催化前列腺素的合成。环氧酶2在生理或静息状态的组织中几乎不表达。环氧酶2参与眼组织的发育、眼部炎症及肿瘤的发生。本实验结果显示, 环氧酶2在对照组中不表达, 感染后1天开始表达, 第3天到第7天表达量逐渐显著上升, 第7天达到最大值, 同时病变达到最高, 角膜组织溃疡严重, 中性粒细胞明显浸润, 第14天表达量下降, 炎症消退。认为环氧酶2参与角膜炎的发生和发展过程, 与炎症病变有相关性, 是角膜炎病变的敏感炎症因子。

综上所述, 采用多种分子生物学技术, 验证白细胞介素10及环氧酶2在不同程度角膜炎的角膜组织中的表达, 进一步说明白细胞介素10及环氧酶2可能参与角膜炎的发生和发展过程, 推测白细胞介素10可能参与角膜炎后期的组织损伤修复, 环氧酶2是角膜炎病变的敏感炎症因子。

作者贡献: 设计、实施、评估为本文作者, 均受过专业培训。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验动物在戊巴妥钠麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

学术术语: 角膜炎分类? 角膜炎分为溃疡性角膜炎(角膜溃疡), 非溃疡性角膜炎(深层角膜炎)两类。因角膜外伤、细菌及病毒侵入角膜引起的炎症, 患眼有异物感, 刺痛甚至烧灼感。球结膜表面混合性充血, 伴有怕光、流泪、视力障碍和分泌物增加等症状。角膜表面浸润有溃疡形成。溃疡性角膜炎绝大部分为外来因素所致, 即感染性致病因子由外侵入角膜上皮细胞层而发生的炎症。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] 李洪霞,张宏波,王宜强.T 和 B 细胞缺陷对真菌性角膜炎发病过程的影响[J].国际眼科杂志,2012,12(12):2247-2252.
- [2] 苏晶,崔红平.烟曲霉菌性角膜炎大鼠角膜IL-6和IL-10的表达[J].眼科研究,2008,26(8):579-582.
- [3] 王晓雪.IL-L与IL-10在大鼠真菌性角膜炎固有免疫阶段角膜上皮组织中的表达[D].青岛:青岛大学,2012.
- [4] 苏晶.大鼠烟曲霉菌性角膜炎动物模型的建立及其免疫病理的研究[D].上海:同济大学医学院,2006.
- [5] 刘筱楠.CXCL1在大鼠烟曲霉菌角膜炎早期的表达[D].青岛:青岛大学,2012.
- [6] Sellers RS, Silverman L, Khan KN. Cyclooxygenase-2 expression in the cornea of dogs with keratitis.Vet Pathol. 2004; 41(2):116-121.
- [7] Li N, Che CY, Hu LT, et al.Effects of COX-2 inhibitor NS-398 on IL-10 expression in rat fungal keratitis.Int J Ophthalmol. 2011; 4(2):165-169.
- [8] 张明昌,王勇.角膜碱烧伤中白介素-1与核转录因子κB表达的相关性研究[J].眼科研究,2007,25(1):33-36.
- [9] 梁丽娜,庄曾渊.带状疱疹病毒性角膜内皮炎合并瞳孔损害 2 例[J].中国中医眼科杂志,2013,2(1):30-31.
- [10] 夏丽坤,张劲松,陈晓隆,等.HSV-1上调白细胞介素-18 mRNA在小鼠角膜组织中表达的研究[J].眼科研究,2005,23(4):393-396.
- [11] 夏丽坤,高殿文,濮伟,等.白细胞介素10对小鼠单纯疱疹性角膜基质炎作用的实验研究[J].中华眼科杂志,2003,39(10):592-596.
- [12] 林秀丽.兔棘阿米巴性角膜炎IL-1β和MCP-1的表达[D].福州:福建医科大学,2010.
- [13] 曾宗圣,韩晓丽,胡建章,等.白细胞介素-17和维甲酸相关核孤儿受体γt在小鼠真菌性角膜炎中的表达[J].中华实验眼科杂志,2013,31(7):653-658.
- [14] Hazlett LD, Jiang X, McClellan SA.IL-10 function, regulation, and in bacterial keratitis.J Ocul Pharmacol Ther.2014;30(5):373-380.
- [15] Biswas PS, Banerjee K, Kim B,et al. Role of inflammatory cytokine-induced cyclooxygenase 2 in the ocular immunopathologic disease herpetic stromal keratitis. J Virol.2005;79(16):10589-10600.