

· 实验研究 ·

白细胞介素-6对糖尿病小鼠角膜缘干细胞活化的促进作用和角膜上皮愈合的加速作用

董亚慧 陈鹏 张真真 冯璐 周庆军

250000 济南, 济南大学 山东省医学科学院医学与生命科学学院(董亚慧、张真真、冯璐);

266071 青岛, 山东省医学科学院 山东省眼科研究所 山东省眼科学重点实验室(陈鹏、周庆军)

通信作者: 周庆军, Email: qjzhou2000@hotmail.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.05.008

【摘要】 背景 白细胞介素(IL)-6 既介导炎症反应过程又在损伤修复中发挥重要作用,但其具体机制及其在糖尿病角膜组织损伤修复中的作用值得探讨。目的 探讨 IL-6 在正常和糖尿病小鼠角膜缘干细胞活化和角膜上皮修复过程中的作用及其机制。方法 正常 6~8 周龄 C57BL/6 小鼠 52 只,采用随机数字表法随机分为正常对照鼠 32 只和糖尿病模型鼠 20 只,采用 50 mg/kg 链脲佐菌素连续腹腔内注射 5 d 的方法诱导建立小鼠糖尿病模型。正常对照小鼠和糖尿病模型小鼠均行角膜上皮刮除术,然后分别于刮除后即刻和 48 h 结膜下注射 IL-6 或等容量 PBS,采用荧光素染色法评价随时间延长的角膜上皮的愈合情况。体外培养小鼠角膜上皮干/祖细胞(TKE2 细胞系),采用结晶紫染色法评估不同质量浓度 IL-6 处理后细胞克隆率(CFE),并与空白对照组进行比较;采用免疫荧光检测法和 Western blot 法检测细胞和小鼠再生上皮中干细胞标志物 Δ NP63、Ki67 的表达以及关键转录因子 STAT3 磷酸化水平;采用实时荧光定量 PCR 法和 ELISA 法检测小鼠角膜再生上皮中 IL-6 的 mRNA 及蛋白水平。结果 角膜荧光素染色检查显示,正常对照小鼠和糖尿病模型小鼠 PBS 注射组与 IL-6 注射组注射后 24、48 和 72 h 残留角膜上皮缺损面积占原始缺损面积的百分比随角膜上皮损伤后时间延长均明显缩小,同时 IL-6 注射组角膜上皮缺损面积均明显小于 PBS 注射组,组间总体差异均有统计学意义(正常对照组: $F_{\text{分组}} = 19.982, P < 0.01$; $F_{\text{时间}} = 589.350, P < 0.01$; 糖尿病组: $F_{\text{分组}} = 25.411, P < 0.01$; $F_{\text{时间}} = 334.807, P < 0.01$)。空白对照组及 10、20、50、100 ng/ml IL-6 处理组 CFE 分别为 (13.23 ± 1.12)%、(15.87 ± 1.30)%、(21.69 ± 1.62)%、(25.33 ± 1.28)% 和 (18.67 ± 1.54)%,随着 IL-6 质量浓度的增加 CFE 逐渐增加,总体比较差异有统计学意义($F = 35.547, P < 0.01$)。50 ng/ml IL-6 处理 5、10、15、30 和 60 min 细胞中 Δ NP63、Ki67 和 p-STAT3 蛋白的相对表达量随着处理时间的延长均逐渐增加,各时间点细胞中 Δ NP63、Ki67 和 p-STAT3 蛋白的相对表达量均明显高于空白对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。糖尿病组和正常对照组小鼠角膜上皮刮除后 24 h 的再生上皮中 IL-6 mRNA 相对表达量分别为 0.45 ± 0.21 和 1.00 ± 0.16,糖尿病组小鼠角膜再生上皮中 IL-6 mRNA 相对表达量较正常对照组小鼠下降 56%,差异有统计学意义($t = 3.42, P = 0.03$),糖尿病小鼠角膜上皮刮除后 48 h 的再生上皮中 IL-6 蛋白质量浓度为 (257 ± 12) ng/μl,明显低于正常对照组小鼠的 (323 ± 17) ng/μl,差异有统计学意义($t = 5.60, P < 0.01$)。结论 IL-6 能够通过激活 STAT3 信号通路促进正常和糖尿病小鼠角膜缘干细胞的活化和增生,进而促进角膜上皮修复,而封闭内源性 IL-6 则会延迟小鼠角膜上皮的修复。

【关键词】 白细胞介素-6; 角膜损伤; 细胞增生/药物作用; STAT3 转录因子/代谢; 损伤修复/药物作用; 糖尿病; 角膜上皮干细胞; 近交系 C57BL 小鼠

基金项目: 山东省自然科学基金杰出青年基金项目 (JQ201518)

Effects of interleukin-6 in promoting corneal epithelial stem/progenitor cell regeneration and accelerating corneal epithelial wound healing in diabetic mouse Dong Yahui, Chen Peng, Zhang Zhenzhen, Feng Lu, Zhou Qingjun

School of Medicine and Life Sciences, University of Jinan-Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250000, China

(Dong YH, Zhang ZZ, Feng L); Shandong Provincial Key Laboratory of Ophthalmology, Shandong Eye Institute, Shandong Academy of Medical Sciences, Qingdao 266071, China (Chen P, Zhou QJ)

Corresponding author: Zhou Qingjun, Email: qjzhou2000@hotmail.com

[Abstract] Background Interleukin-6 (IL-6) is a pleiotropic cytokine involving in inflammation and wound healing. Previous report found that IL-6 increases phosphorylated STAT3 (p-STAT3) level and promotes corneal epithelial wound healing by stimulating migration. However, the essential role of IL-6 in corneal epithelial wound healing and the expression changes in diabetic mellitus remains unknown. **Objective** This study was to explore the roles of IL-6 in corneal epithelial proliferation and wound healing in both normal and diabetic mice. **Methods** Fifty-two normal C57BL/6 mice were randomized into normal control group (32 mice) and diabetic group (20 mice). Type 1 diabetic mellitus was induced by intraperitoneal injections of 50 mg/kg streptozotocin once per day for consecutive 5 days in the mice of the diabetic group. Whole corneal epithelium was scraped in all mice, and the corneal epithelial defect area was examined by fluorescein staining in 24, 48 and 72 hours after corneal epithelium removal. Recombinant mouse IL-6 or anti-IL-6 blocking antibody of 5 μ l were subconjunctivally injected according to the grouping and contrasted with PBS injection group or isotype control antibody group, respectively. TKE2 cells, a mouse corneal epithelial stem/progenitor cell line, were trypsinized and incubated in the KSM with different concentrations of IL-6 or without IL-6, and colony formation efficiency (CFE) was examined by crystal violet staining. The expressions of Δ NP63 and Ki67, specific makers of stem cells, were detected by immunofluorescence technology. The expressions of Δ NP63, Ki67 and p-STAT3 proteins were assayed in the cells by Western blot, respectively. The expression of IL-6 mRNA and protein in the regenerated corneal epithelium was detected by real time quantitative PCR and ELISA. The use and care of the mice complied with the Statement of Association for Research in Vision and Ophthalmology. **Results** The percentage of residual corneal epithelium defect area with initial defect area was gradually shrunk over time after PBS and IL-6 injection in both normal control mice and diabetic mice, and the percentage of residual corneal epithelium defect area was significantly reduced in the IL-6 injected group compared with the PBS injected group (normal control group: $F_{\text{group}} = 19.982, P < 0.01$; $F_{\text{time}} = 589.350, P < 0.01$; Diabetic group: $F_{\text{group}} = 25.411, P < 0.01$; $F_{\text{time}} = 334.807, P < 0.01$). The CFE was (13.23 \pm 1.12)%, (15.87 \pm 1.30)%, (21.69 \pm 1.62)%, (25.33 \pm 1.28)% and (18.67 \pm 1.54)% in the blank control group and 10, 20, 50, 100 ng/ml IL-6-treated groups, respectively, showing a gradual increase of CFE dependent upon IL-6 concentrations ($F = 35.547, P < 0.01$). The expressions of Δ NP63, Ki67, p-STAT3 proteins in the cells were gradually increased over time after 50 ng/ml IL-6 treated for 5, 10, 15, 30 and 60 minutes, and the relative expression level of the cytokines was significantly higher in the IL-6 cultured groups than that without IL-6 culture group (all at $P < 0.05$). The relative expression of IL-6 mRNA in the regenerated corneal epithelium was 0.45 \pm 0.21 and 1.00 \pm 0.16 in the diabetic group and normal control group, respectively, and compared with the normal control group, the expression of IL-6 mRNA reduced by 56% ($t = 3.42, P = 0.03$). The content of IL-6 protein in regenerated corneal epithelium of the diabetic group was (257 \pm 12) ng/ μ l, which was significantly lower than (323 \pm 17) ng/ μ l of the normal control group ($t = 5.60, P < 0.01$). **Conclusions** IL-6 promotes the proliferation and regeneration of corneal limbal stem cells to repair defected corneal epithelium by activating STAT3 signaling pathway in both normal and diabetic mice, while the blocking of endogenous IL-6 impairs the corneal epithelial cell activation and wound healing.

[Key words] Interleukin-6; Corneal injuries; Cell proliferation/drug effects; STAT3 transcription factor/metabolism; Wound healing/drug effects; Diabetes mellitus; Corneal epithelial stem/progenitor cells; Mice, inbred C57BL

Fund program: Shandong Provincial Nature Science Fund for Distinguished Young Scholars (JQ201518)

各种组织损伤后的修复过程均经历炎症期、增生期和重构期,各期之间既有明显的阶段性又互有重叠,若上述某个期间持续的时间延长而破坏了修复过程的自然平衡,则会导致持续性炎症、溃疡或瘢痕化,影响

组织的功能^[1]。研究组织损伤后的修复机制具有重要的临床意义,在参与组织损伤修复的各种因子中,白细胞介素(interleukin, IL)-6可以激活单核细胞和活化巨噬细胞,还能引起许多与损伤修复相关的反应^[2]。

研究发现, IL-6 在干燥综合征、角膜结膜炎、干眼和角膜感染性疾病中具有重要作用, 其可促进兔角膜上皮细胞的移行和损伤修复能力, IL-6 基因敲除小鼠则表现出皮肤损伤后修复能力及肝脏和感觉神经元轴突再生能力的减弱, 表明 IL-6 在组织损伤修复中起着重要的作用^[3-13]。作为一种能够被 IL-6 家族中多种因子激活的转录因子, STAT3 能够调节细胞的凋亡、增生、迁移以及存活等生物学行为, 角膜上皮损伤后的快速修复是通过角膜缘干细胞产生的瞬时扩增细胞来维持的, 阻断 STAT3 信号通路可以抑制细胞增生、促进干细胞分化、延迟上皮修复^[14-22]。我们前期研究发现, 糖尿病小鼠角膜上皮损伤的延迟修复与磷酸化 STAT3 (phosphorylated-STAT3, p-STAT3) 水平的降低有关^[22]。研究表明, 糖尿病患者角膜上皮损伤修复延迟与再生信号通路受损、大量糖基化终末产物积聚以及神经营养的缺乏等有关, 糖尿病患者角膜缘干细胞标志物表达下调, 角膜上皮再生过程延迟^[16-18]。我们前期研究发现, IL-6 家族来源的睫状神经营养因子 (ciliary neurotrophic factor, CNTF) 在促进角膜上皮干/祖细胞活化及角膜上皮损伤修复中起着重要作用^[22], 然而 IL-6 家族中最重要的细胞因子 IL-6 是否参与角膜上皮损伤修复仍然不明确。本研究中拟探讨 IL-6 在角膜上皮损伤修复中的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 52 只 6~8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠, 购自中国医学科学院实验动物研究所, 由山东省眼科研究所实验室动物中心饲养。采用随机数字表法将动物随机分为糖尿病小鼠 20 只和正常对照小鼠 32 只。实验过程遵循视觉与眼科学研究协会 (Association for Research in Vision and Ophthalmology, ARVO) 制定的动物使用规范。

1.1.2 主要试剂及仪器 小鼠角膜缘干/祖细胞系 (TKE2) 由厦门大学眼科研究所李炜教授馈赠; 无血清角化细胞培养液 (keratinocyte serum free medium, KSFM) (美国 Invitrogen 公司); STZ (streptozotocin) (美国 Sigma 公司); BCA 试剂盒 (深圳碧云天公司); PVDF (美国 Millipore 公司); Nucleospin RNA 试剂盒 (德国 Macherey-Nagel 公司); 逆转录试剂盒 (日本 Takara 公司); 小鼠 IL-6 ELISA 检测试剂盒 (美国 eBioscience 公司); IL-6 (406-ML/CF) (美国 R&D 公司); IL-6 中和抗体 (Ab83053) (英国 Abcam 公司); 兔抗鼠 Δ NP63 一抗 (NBP2-29467, Western blot 工作浓度

1:1 000, 免疫荧光工作浓度 1:200) (美国 Novus 公司); 绵羊抗鼠 Ki67 一抗 (AF7649, Western blot 工作浓度 1:1 000, 免疫荧光工作浓度 1:200) (美国 R&D 公司); 兔抗鼠 p-STAT3 一抗 (AP0070, Western blot 工作浓度 1:1 000, 免疫荧光工作浓度 1:200)、兔抗鼠 STAT3 一抗 (A6500, 工作浓度 1:1 000) (美国 ABclonal 公司); GAPDH 内参 (上海康成公司); 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (LK2001, 工作浓度 1:2 000) (山东三箭公司); 辣根过氧化物酶标记的驴抗绵羊 IgG 二抗 (A21060, 工作浓度 1:2 000) (美国 Abbkine 公司); Alexa Fluor 488 标记驴抗绵羊 IgG 二抗 (A11015, 工作浓度 1:200)、Alexa Fluor 594 标记驴抗兔 IgG 二抗 (A21207, 工作浓度 1:200) (美国 Life Technologies 公司); 化学发光剂 (美国 Thermo Fisher 公司); Lifescan 血糖测量仪 (美国强生公司); 电动角膜去上皮刀 (美国 Alger 公司); 裂隙灯显微镜 (BQ900, 瑞士 Haag-Streit 公司); 冷冻切片包埋剂 OCT (美国樱花公司); Eclipse TE2000-U 显微镜 (日本 Nikon 公司); 酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); ABI 7500 检测系统 (美国 Biosystems 公司)。

1.2 方法

1.2.1 糖尿病模型的建立 糖尿病小鼠用 pH 4.5 的预冷枸橼酸缓冲液溶解的链脲佐菌素行腹腔内注射, 剂量为 50 mg/kg, 连续注射 5 d, 诱导 1 型糖尿病小鼠动物模型; 正常对照组小鼠以同样方法注射等容量的枸橼酸缓冲液。于末次注射后 4 周取鼠尾静脉血, 监测血糖水平, 12 周后血糖水平高于 300 mg/dl 者视为造模成功。

1.2.2 角膜上皮损伤修复模型的建立、分组及缺损面积计算 每只小鼠均行单眼造模。正常对照及糖尿病模型小鼠全身麻醉, 以体积分数 2% 利多卡因点眼行术眼局部麻醉, 用电动刮刀刮除角膜上皮, 直径为 3 mm。分别于造模后 0、24、48 和 72 h 用质量分数 0.25% 荧光素钠 1 滴点眼, 裂隙灯显微镜照相机照相, 用 Image J 软件测定并计算角膜上皮缺损面积。将 12 只糖尿病角膜上皮损伤修复模型鼠分为 PBS 注射组和 IL-6 注射组, 根据预实验结果, IL-6 注射组分别于角膜上皮刮除后即刻和 48 h 结膜下注射 5 μ l IL-6, 剂量为 50 ng, PBS 注射组以同样方法注射等容量 PBS 缓冲液; 另将 12 只正常小鼠分为同型对照抗体注射组和 IL-6 中和抗体处理组, 根据预实验结果 IL-6 中和抗体处理组分别于角膜上皮刮除前 24 h 及刮除后即刻、24 h 结膜下注射 IL-6 中和抗体 5 μ l, 剂量为 5 μ g, 同型对照抗体组以同样的方法注射等剂量和等容量的同型

对照抗体。

1.2.3 克隆形成实验评估角膜上皮干/祖细胞增生情况 将 1 000 个 TKE2 细胞接种于六孔培养板中,分别加入 10、20、50、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ IL-6 溶液处理 7 ~ 10 d,用质量分数 4% 多聚甲醛固定,结晶紫染色法评估细胞克隆形成率 (colony forming efficiency, CFE), CFE = 每孔克隆数/接种细胞 $\times 100\%$ 。未添加 IL-6 处理的细胞为空白对照组。

1.2.4 免疫荧光染色法检测和定位眼球切片和 TKE2 细胞中 ΔNP63 、Ki67、p-STAT3 蛋白的表达 角膜上皮刮除后 48 h 取下 2 只小鼠眼球,置于冰冻切片包埋剂中速冻切片,切片厚 7 μm 。眼球切片或培养的细胞以 4% 多聚甲醛固定,质量分数 0.3% Triton X-100 透化处理,正常血清封闭。于切片和细胞中滴加相应一抗 (PBS:BSA = 1:1 配制稀释液),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,加入对应的荧光标记二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,DAPI 复染细胞核,激光扫描共焦显微镜或 Eclipse TE2000-U 显微镜下观察切片及细胞中目的蛋白的表达。

1.2.5 Western blot 法定量检测 TKE2 细胞中角膜缘干细胞标志物蛋白和 p-STAT3 的表达 将 TKE2 细胞接种至 60 mm 培养皿,培养后 24 h 将细胞分为空白对照组、IL-6 处理 5、10、15、30 和 60 min 组,分别用 50 ng/ml 的 IL-6 刺激细胞 0、5、10、15、30 和 60 min,然后应用 PBS 漂洗细胞 2 次,置于裂解缓冲液中裂解后取得总蛋白,在质量分数 10% SDS-PAGE 凝胶中电泳 2 h,电压为 110 V,转印至 PVDF 膜,以质量分数 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,分别加入 ΔNP63 、Ki67、p-STAT3 和 STAT3 一抗,室温下作用 1 h, TBST 溶液清洗 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的对应二抗,化学发光剂发光后显影,以 GAPDH 作为内参。使用 NIH Image J 软件 (Bethesda, MD) 进行条带灰度计算,目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白条带灰度值/GAPDH 表达灰度值,并计算 p-STAT3 表达量与 STAT3 表达量的比值。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 法检测正常和糖尿病小鼠角膜上皮中 IL-6 mRNA 的相对表达量 应用 Nucleospin RNA 试剂盒提取小鼠角膜上皮组织总 RNA,用逆转录试剂盒将总 RNA 逆转录成 cDNA,应用 SYBR Green 及 ABI 7500 检测系统进行定量 PCR 分析,反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 s;然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 1 min,共 2 个循环。使用序列检测系统 (Sequence Detection System, SDS) 软件进行数据分析,以 GAPDH 作为内参。IL-6 上游引物:5'-ACCCTCCCAACAGACCTGTCT-3',下游引物:5'-CAGATTGTTTCTGCAAGTGCAT-3';GAPDH 上游引物:5'-CTGCCC

AGAACATCATCCCT-3',下游引物:5'-GGTCCTCACTGTAGCCCAAGA-3'。PCR 数据采用计算 Ct 值的方法定量分析。目的基因相对表达量 = 目的基因表达量/GAPDH 基因表达量。

1.2.7 ELISA 法检测小鼠角膜上皮上清液中目的蛋白质量浓度 取同龄正常和糖尿病小鼠角膜上皮加入 300 μl 预冷 PBS,冰上电动研磨 3 min,冰上超声 20 ~ 25 次,离心半径 5.3 cm,11 000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 5 min,取上清液。使用小鼠 IL-6 ELISA 检测试剂盒,按照试剂盒说明进行定量分析,以 BCA 试剂盒测定总蛋白浓度,测定角膜上皮上清液中目的蛋白的质量浓度,使用酶标仪在 450 nm 处读取吸光度 (A)。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件 (美国 IBM 公司) 进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数经 Levene 检验方差齐。采用均衡分组多水平研究设计,IL-6 注射组与 PBS 注射组、IL-6 中和抗体注射组与同型对照抗体注射组结膜注射后不同时间点小鼠角膜上皮缺损面积变化的总体差异比较采用区组设计两因素方差分析,多重比较采用 LSD-*t* 检验;IL-6 作用后不同时间点间 CFE、细胞中 ΔNP63 和 Ki67 mRNA 及其蛋白以及 p-STAT3/STAT3 值的总体比较采用单因素方差分析,组间比较采用 Dunnett *t* 检验;正常对照小鼠与糖尿病小鼠角膜中 IL-6 mRNA 及其蛋白表达量的差异比较采用独立样本 *t* 检验。采用双尾检测法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常对照小鼠注射 IL-6 后角膜上皮修复情况比较

IL-6 注射组和 PBS 注射组角膜上皮损伤后即刻均可见全角膜荧光素染色,IL-6 注射组小鼠在注射后 24 h 角膜荧光素染色面积明显缩小,注射后 48 h 仅见角膜中央荧光素染色,注射后 72 h 角膜光滑透明,无荧光素染色。PBS 注射组小鼠在角膜荧光素染色面积均明显大于相应时间点 IL-6 注射组,PBS 注射后 72 h 仍可见角膜中央区荧光素染色 (图 1A)。PBS 注射组注射后 24、48 和 72 h 残留角膜上皮缺损面积占原始缺损面积的百分比分别为 (77.6 \pm 2.1)%、(28.7 \pm 4.0)%、(5.7 \pm 2.6)% ,IL-6 注射组分别为 (64.5 \pm 4.6)%、(14.2 \pm 3.3)%、(0.4 \pm 0.3)% ,各组在不同时间点残留角膜上皮缺损面积占原始缺损面积的百分比的总体比较差异有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 19.982, P < 0.01$; $F_{\text{时间}} = 589.350, P < 0.01$) (图 1B)。

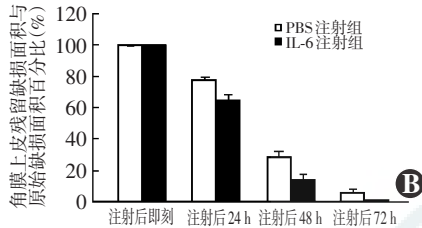
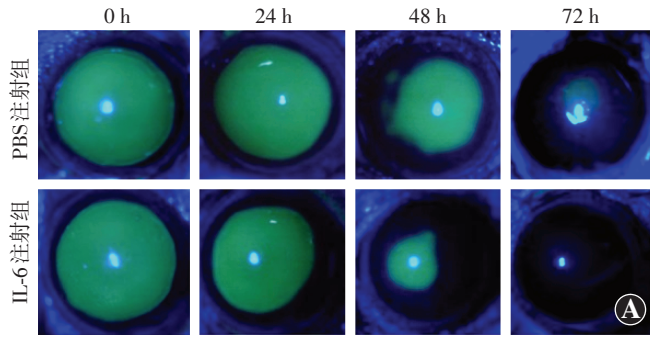


图 1 正常对照小鼠各组结膜注射后不同时间角膜上皮损伤面积变化的比较 A: 注射后不同时间点各组小鼠角膜荧光素染色面积比较, IL-6 注射组小鼠角膜上皮缺损修复快于 PBS 注射组 B: PBS 注射组与 IL-6 注射组小鼠角膜上皮缺损面积随时间变化的量化比较 $F_{\text{分组}} = 19.982, P < 0.01; F_{\text{时间}} = 589.350, P < 0.01$. 与各自时间点 PBS 注射组比较, $^a P < 0.05$ (重复测量两因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n = 3$) IL: 白细胞介素

2.2 各组小鼠角膜上皮干/祖细胞增殖情况

结晶紫染色结果显示空白对照组细胞克隆形成, 随着 IL-6 质量浓度的增加, 细胞克隆数逐渐增加, 50 ng/ml IL-6 处理组细胞克隆数最为密集。空白对照组和 10、20、50、100 ng/ml IL-6 处理组 CFE 分别为 $(13.23 \pm 1.12)\%$ 和 $(15.87 \pm 1.30)\%$ 、 $(21.69 \pm 1.62)\%$ 、 $(25.33 \pm 1.28)\%$ 、 $(18.67 \pm 1.54)\%$, 组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 35.547, P < 0.01$), 以 50 ng/ml IL-6 处理组 CFE 最高 (图 2A)。Western blot 检测结果显示, 随着 IL-6 处理时间的延长, IL-6 处理 5、10、15、30 和 60 min 细胞中 Δ NP63 的相对表达量分别为 1.41 ± 0.09 、 1.43 ± 0.18 、 1.72 ± 0.15 、 2.27 ± 0.29 和 4.84 ± 0.10 , 空白对照组为 1.00 ± 0.11 , 组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 208.07, P < 0.01$), 与空白对照组比较, IL-6 处理 5、10、15、30 和 60 min 组 Δ NP63 的相对表达量均明显升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 2B)。IL-6 处理 5、10、15、30 和 60 min 组细胞中 Ki67 相对表达量分别为 7.88 ± 0.75 、 9.71 ± 0.77 、 13.33 ± 0.88 、 13.69 ± 0.58 和 16.17 ± 1.08 , 空白对照组为 1.00 ± 0.11 , 组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 154.486, P < 0.01$), 与空白对照组比较, IL-6 处理 5、10、15、30 和 60 min 组 Ki67 的相对表达量明显升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 2C)。TKE2 细胞分组处理后培养 7 d, 免疫荧光染色结果显示, 与

空白对照组比较, 50 ng/ml IL-6 处理组 Δ NP63 和 Ki67 荧光强度显著增强, 阳性细胞数均增加 (图 2D)。角膜上皮刮除后 48 h, IL-6 处理组角膜上皮中 Δ NP63 和 Ki67 的荧光强度显著高于空白对照组, 阳性细胞数均增加 (图 2E)。

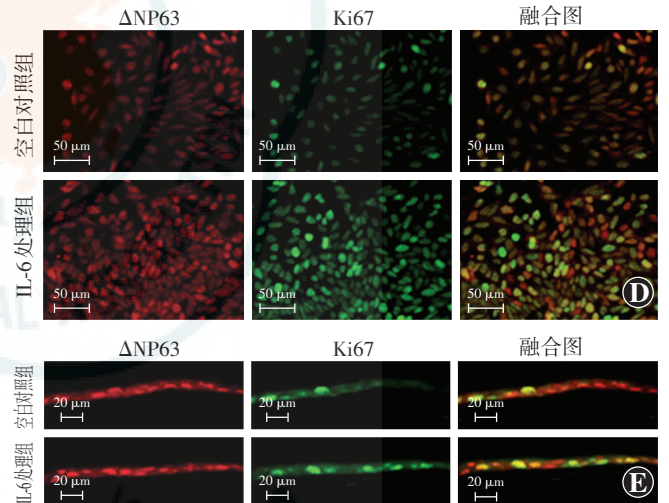
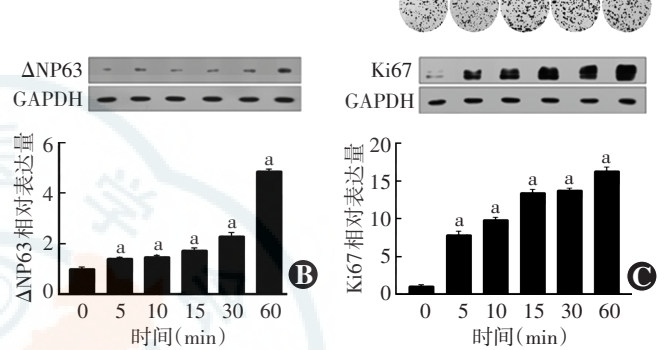
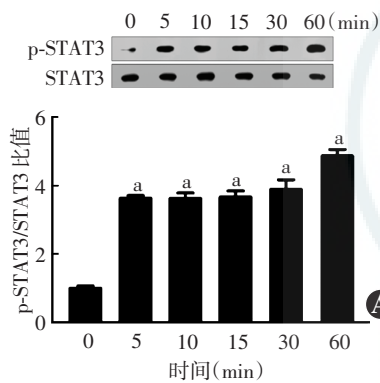


图 2 各组小鼠角膜上皮干/祖细胞增殖情况比较 A: 培养 TKE2 细胞后 7~10 d, 随着 IL-6 质量浓度的增加, CFE 逐渐增加, 50 ng/ml IL-6 处理组 CFE 达峰, 其量化比较显示组间 CFE 差异有统计学意义 $F = 35.547, P < 0.01$. 与空白对照组比较, $^a P < 0.05$ (单因素方差分析, Dunnett *t* 检验, $n = 3$) B: 50 ng/ml IL-6 处理不同时间点细胞中 Δ NP63 表达的量化比较 $F = 208.07, P < 0.01$. 与空白对照组比较, $^a P < 0.05$ (单因素方差分析, Dunnett *t* 检验, $n = 3$) C: 50 ng/ml IL-6 处理不同时间点 Ki67 表达的量化比较 $F = 154.486, P < 0.01$. 与空白对照组比较, $^a P < 0.05$ (单因素方差分析, Dunnett *t* 检验, $n = 3$) D: TKE2 细胞分组处理后培养 7 d, TKE2 细胞中角膜上皮标志物阳性表达 (标尺 = 50 μ m) TKE2 细胞中 Δ NP63 呈红色荧光, Ki67 呈绿色荧光 (FITC), 空白对照组 Δ NP63 和 Ki67 阳性细胞数量较少, IL-6 处理组 Δ NP63 和 Ki67 阳性细胞数量明显多于空白对照组 E: 角膜上皮刮除后 48 h 角膜上皮标志物的阳性表达 (标尺 = 20 μ m) Δ NP63 呈红色荧光, Ki67 呈绿色荧光 (FITC), 空白对照组 Δ NP63 和 Ki67 阳性细胞数量较少, IL-6 处理组 Δ NP63 和 Ki67 阳性细胞数量显著多于空白对照组 IL: 白细胞介素; CFE: 克隆形成率

2.3 各组 TKE2 细胞中 p-STAT3 的相对表达量变化

Western blot 结果显示,随着 IL-6 处理时间的延长, TKE2 细胞中 p-STAT3 相对表达量逐渐增强。50 ng/ml IL-6 处理后 5、10、15、30 和 60 min, TKE2 细胞中 p-STAT3/STAT3 比值分别为 3.63 ± 0.14 、 3.62 ± 0.29 、 3.67 ± 0.32 、 3.89 ± 0.50 和 4.88 ± 0.33 , 空白对照组为 1.00 ± 0.11 , 组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 52.524, P < 0.01$), IL-6 处理后各时间点 p-STAT3/STAT3 比值均明显高于对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 3A)。TKE2 细胞分组处理后培养 7 d, 免疫荧光染色显示, IL-6 处理组细胞中 p-STAT3 的荧光强度较空白对照组增强 (图 3B)。角膜上皮刮除后 48 h 角膜上皮中 p-STAT3 阳性细胞比例明显高于空白对照组 (图 3C)。



2.4 IL-6 中和抗体注射组和同型对照抗体注射组小鼠角膜上皮修复情况比较

角膜荧光素染色检查显示, IL-6 中和和抗

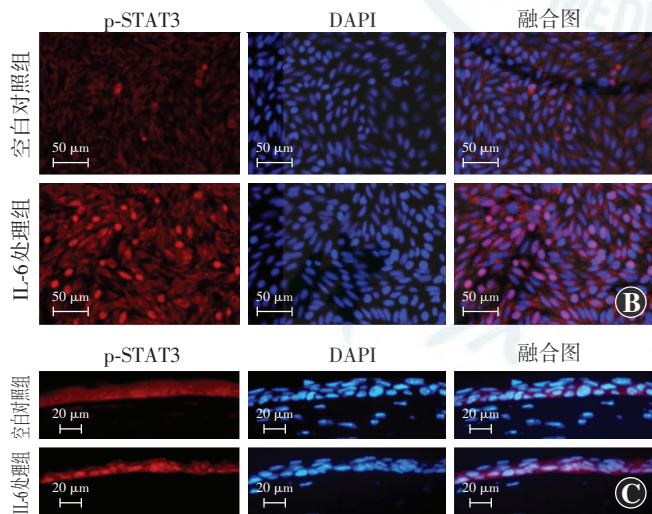


图 3 各组 TKE2 中 p-STAT3/STAT3 比值的比较 A: Western blot 检测显示随着 IL-6 处理时间延长, p-STAT3 表达条带逐渐增强, IL-6 处理不同时间点 p-STAT3/STAT3 比值的总体比较 $F = 52.524, P < 0.01$. 与空白对照组比较, $^a P < 0.01$ (单因素方差分析, Dunnett t 检验, $n = 3$) B: TKE2 细胞分组处理后培养 7 d, TKE2 细胞中 p-STAT3 的阳性表达 (标尺 = 50 μm) p-STAT3 阳性细胞呈红色荧光, 细胞核的阳性呈蓝色荧光 (DAPI), IL-6 处理组 p-STAT3 阳性细胞数量明显多于空白对照组 C: 角膜上皮刮除后 48 h 的再生上皮中 p-STAT3 的表达 (标尺 = 20 μm) IL-6 处理组 p-STAT3 阳性细胞数量明显多于空白对照组

体注射组角膜荧光素染色面积均明显大于注射后同时时间点同型对照抗体注射组 (图 4A), 同型对照抗体注射组小鼠结膜下注射后 24、48 和 72 h 角膜上皮剩余缺损面积占原始缺损面积的百分比分别为 $(75.2 \pm 3.6)\%$ 、 $(27.3 \pm 4.2)\%$ 和 $(5.6 \pm 3.3)\%$, IL-6 中和抗体注射组分别为 $(91.3 \pm 1.7)\%$ 、 $(53.7 \pm 4.2)\%$ 和 $(23.7 \pm 3.9)\%$, 2 个组小鼠结膜下注射后不同时间点角膜上皮剩余缺损面积占原始缺损面积百分比的总体比较差异有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 34.257, P < 0.01; F_{\text{时间}} = 222.085, P < 0.01$) (图 4B)。免疫荧光检测显示 IL-6 中和抗体注射组小鼠角膜上皮中 ΔNP63 及 Ki-67 染色双阳性的细胞数量明显少于同型对照抗体注射组 (图 4C)。

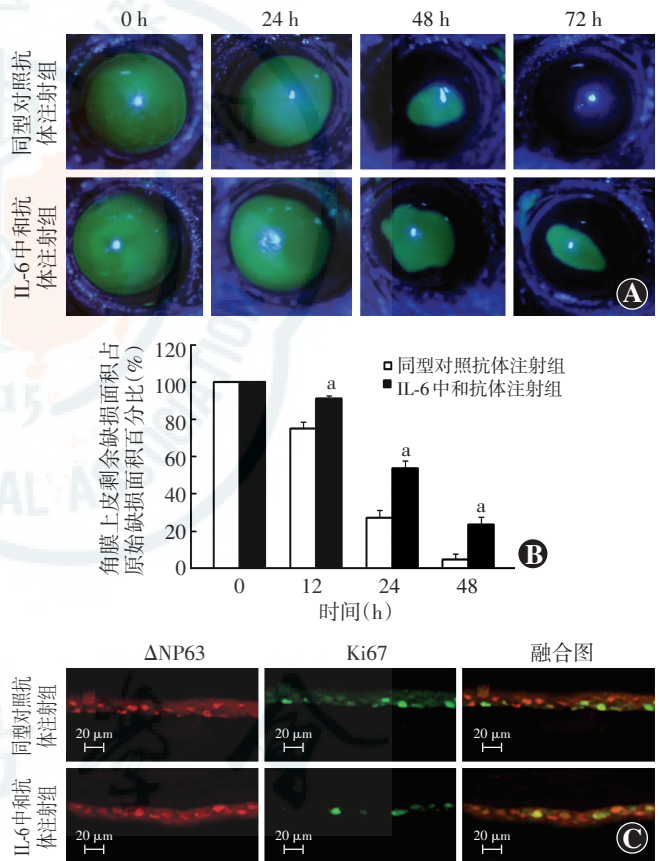


图 4 IL-6 中和抗体注射组和同型对照抗体注射组小鼠角膜上皮修复情况比较 A: 各组小鼠角膜上皮荧光素染色 角膜上皮刮除后同时时间点同型对照抗体注射组荧光素染色面积明显小于 IL-6 中和抗体注射组 B: 同型对照抗体注射组与 IL-6 中和抗体注射组各时间点角膜上皮剩余面积的量化比较 $F_{\text{分组}} = 34.257, P < 0.01; F_{\text{时间}} = 222.085, P < 0.01$. 与各自时间点同型对照抗体注射组比较, $^a P < 0.05$ (区组设计两因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 3$) C: 免疫荧光染色显示角膜上皮刮除后 48 h 再生上皮中 ΔNP63 和 Ki67 表达 (标尺 = 20 μm) ΔNP63 阳性细胞呈红色荧光, Ki67 阳性细胞呈绿色荧光 (FITC). 与同型对照抗体注射组比较, IL-6 中和抗体组角膜上皮中 ΔNP63 阳性细胞和 Ki67 阳性细胞数量均减少

2.5 正常对照组与糖尿病组小鼠角膜上皮 IL-6 mRNA 和蛋白的比较

实时荧光定量 PCR 检测显示,糖尿病小鼠和正常对照组小鼠角膜上皮刮除后 24 h 的再生上皮中 IL-6 mRNA 相对表达量分别为 0.45 ± 0.21 和 1.00 ± 0.16 , 糖尿病小鼠角膜再生上皮中 IL-6 mRNA 相对表达量较正常对照组小鼠下降了 56%, 2 个组间差异有统计学意义 ($t=3.42, P=0.03$) (图 5A), 糖尿病小鼠角膜上皮刮除后 48 h 的再生上皮中 IL-6 蛋白质量浓度分别为 $(257 \pm 12) \text{ ng}/\mu\text{l}$, 明显低于正常对照小鼠的 $(323 \pm 17) \text{ ng}/\mu\text{l}$, 差异有统计学意义 ($t=5.60, P<0.01$) (图 5B)。

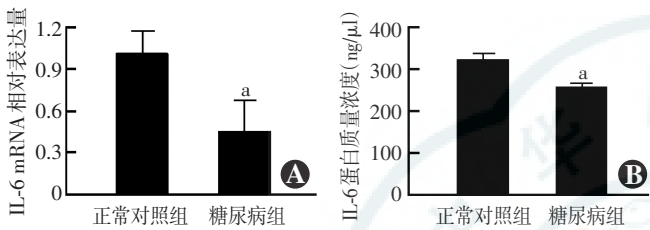


图 5 正常对照组与糖尿病小鼠角膜上皮中 IL-6 表达的量化比较
A: 糖尿病组和正常对照组小鼠角膜中 IL-6 mRNA 相对表达量比较与正常对照组比较, $^a P<0.05$ (独立样本 t 检验, $n=3$) IL-6: 白细胞介素-6 B: 糖尿病组和正常对照组小鼠角膜中 IL-6 蛋白质量浓度的比较与正常对照组比较, $^a P<0.05$ (独立样本 t 检验, $n=3$) IL: 白细胞介素

2.6 糖尿病小鼠 IL-6 注射后角膜上皮损伤修复情况

糖尿病小鼠角膜上皮刮除后 72 h, IL-6 注射组小鼠上皮荧光素染色消失, 角膜上皮光滑, PBS 注射组可见角膜中央荧光素染色阳性 (图 6A)。PBS 注射组小鼠结膜下注射 24、48 和 72 h 角膜上皮剩余缺损面积占原始缺损面积的百分比分别为 $(82.7 \pm 2.0)\%$ 、 $(67.4 \pm 6.1)\%$ 和 $(18.4 \pm 3.4)\%$, IL-6 注射组分别为 $(71.1 \pm 2.9)\%$ 、 $(52.6 \pm 4.7)\%$ 和 $(3.2 \pm 1.7)\%$, 2 个组小鼠结膜下注射后各时间点角膜上皮剩余缺损面积占原始缺损面积的百分比总体比较差异有统计学意义 ($F_{\text{分组}}=25.411, P<0.01; F_{\text{时间}}=334.807, P<0.01$), 结膜下注射后各时间点 IL-6 注射组角膜上皮剩余缺损面积占原始缺损面积的百分比明显低于 PBS 注射组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$) (图 6B)。免疫荧光检测显示, 与 PBS 注射组比较, IL-6 注射组角膜上皮刮除 48 h 后再生上皮中 ΔNP63 、Ki-67 双阳性表达的细胞数量明显增加 (图 6C), p-STAT3 表达于再生上皮的细胞核内, 其阳性细胞数量增加, 荧光强度显著增强。PBS 注射组仅在角膜上皮细胞质中检测到 p-STAT3 的弱表达 (图 6D)。

3 讨论

IL-6 是一种多效性细胞因子, 能够在组织损伤修

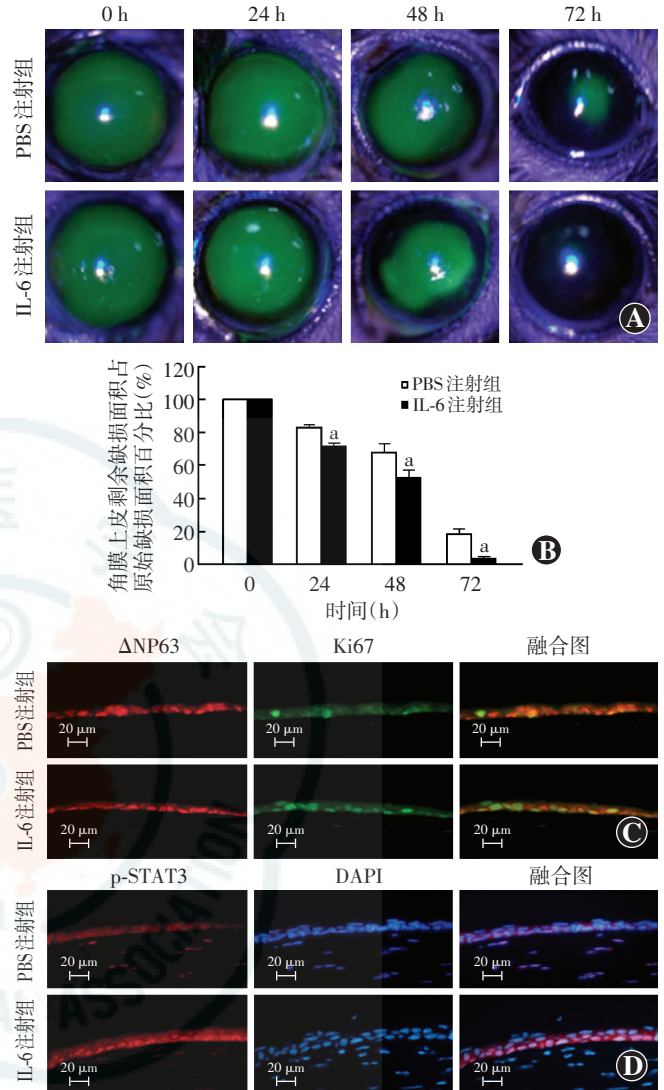


图 6 IL-6 结膜下注射对糖尿病小鼠角膜上皮损伤修复的影响 A: 糖尿病小鼠 IL-6 注射组与 PBS 注射组荧光素染色面积比较 角膜上皮刮除后 72 h, 糖尿病小鼠 IL-6 注射组各时间点角膜荧光素染色面积均小于 PBS 注射组 B: 糖尿病小鼠 PBS 注射组与 IL-6 注射组在注射后不同时间点角膜上皮剩余缺损面积占原始缺损面积的百分比的量化比较 $F_{\text{分组}}=25.411, P<0.01; F_{\text{时间}}=334.807, P<0.01$. 与各自时间点 PBS 注射组比较, $^a P<0.05$ (区组设计两因素方差分析, LSD- t 检验, $n=3$) C: 糖尿病小鼠角膜上皮刮除后 48 h 2 个组再生的角膜上皮中 ΔNP63 和 Ki67 表达 (标尺 = $20 \mu\text{m}$) 再生上皮中 ΔNP63 阳性细胞呈红色荧光, Ki67 阳性细胞呈绿色荧光 (FITC)。IL-6 注射组 ΔNP63 和 Ki67 阳性细胞数量均明显多于 PBS 注射组 D: 糖尿病小鼠角膜上皮刮除后 48 h 2 个组再生角膜上皮中 p-STAT3 的表达 (标尺 = $20 \mu\text{m}$) p-STAT3 阳性细胞呈红色荧光, 细胞核 (DAPI) 呈蓝色荧光, IL-6 注射组 p-STAT3 阳性细胞数量明显多于 PBS 注射组 IL: 白细胞介素

复中介导炎症反应, 而同时又参与组织的修复过程。关于 IL-6 在角膜相关疾病中作用的研究已经涉及感染、干眼、化学性烧伤以及术后反应等许多方面^[6,10,23-27], 研究表明, 在角膜非感染性炎症和损伤修复中, IL-6 经典信号通路参与促进角膜上皮细胞的移行, 而 IL-6 反式信号通路则可引起炎细胞渗出、STAT3

的磷酸化以及炎症相关分子的表达,进而引起角膜成纤维细胞产生更多的血管内皮生长因子和单核细胞趋化蛋白-1,促进炎症反应^[10,26-27]。在 I 型单纯疱疹病毒引起的炎症反应中,升高的 IL-6 可引起角膜神经退化,并诱导一系列炎症介质的表达^[6,25,27]。干眼患者的眼表在短暂暴露于日常干燥环境和高渗透压环境后,IL-6 等因子释放增多,可迅速引发炎症导致眼表情况恶化^[23-24]。本研究采用体内和体外实验分别对 IL-6 在组织损伤炎症和修复中的作用进行研究,证实内源性 IL-6 对于角膜上皮干/祖细胞增生和损伤修复起着关键性作用,IL-6 局部低表达抑制了角膜上皮损伤的修复,且在糖尿病小鼠角膜中 IL-6 表达明显低于正常小鼠,外源性补充 IL-6 则能促进糖尿病小鼠角膜上皮的修复。值得说明的是,IL-6 注射组的非糖尿病小鼠角膜上皮损伤的快速修复同时伴有角膜中的中性粒细胞和巨噬细胞增多。因此推测 IL-6 在角膜上皮损伤修复中可能在炎症反应和修复过程中有衔接的作用,是一种重要的介导性细胞因子。

已有研究证实,IL-6 能够通过加快角膜上皮细胞的迁移来促进角膜损伤的修复^[9-10]。本研究中通过体内和体外实验证实 IL-6 可以直接促进小鼠角膜上皮干/祖细胞系的增生,与以往关于 IL-6 的研究结论相一致,即 IL-6 作为角膜上皮和基质间相互作用的中介因子,能够增强角膜上皮干细胞标志物的表达,增加角膜缘干细胞的 CFE,并能促进关键转录因子 STAT3 的磷酸化^[28]。此外,本研究中 IL-6 中和抗体的体内实验结果也表明,内源性 IL-6 对角膜上皮干/祖细胞的活化和上皮损伤的修复都发挥着关键作用。

在糖尿病病变的研究中,角膜上皮损伤的延迟修复在人类和动物模型中均有报道,其机制与丝氨酸/苏氨酸激酶 (serine/threonine kinase, AKT)、(表皮生长因子受体、Sirt1、转化生长因子- β 、PARP (poly ADP-ribose polymerase) 和 P 物质-NK-1 受体等信号通路的异常活化相关^[29-34]。在糖尿病小鼠角膜上皮干细胞活化和损伤修复中,STAT3 信号通路的磷酸化也受到明显影响。在糖尿病小鼠中,CNTF 能够通过激活 STAT3 信号通路促进角膜上皮干/祖细胞系的活化和神经再生^[22,35]。本研究中我们进一步揭示了糖尿病角膜病变中 IL-6 同样能够促进角膜上皮干/祖细胞系的活化,提示我们 IL-6 家族的细胞因子可能在角膜上皮损伤修复过程中共用 STAT3 信号通路。此外,尽管 IL-6 注射组小鼠伴有明显炎症细胞浸润,但角膜上皮损伤的修复并未明显延迟,其具体机制需要进一步研究。

参考文献

- [1] Chin GA, Diegelmann RF, Schultz GS. Wound healing [M]. England: Taylor & Francis Group, 2005: 17-34.
- [2] Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, et al. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813 (5): 878-888. DOI: 10.1016/j.bbamer.2011.01.034.
- [3] Lee SY, Han SJ, Nam SM, et al. Analysis of tear cytokines and clinical correlations in Sjögren syndrome dry eye patients and non-Sjögren syndrome dry eye patients [J]. *Am J Ophthalmol*, 2013, 156 (2): 247-253. DOI: 10.1016/j.ajo.2013.04.003.
- [4] Yoon KC, Jeong IY, Park YG, et al. Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels in tears of patients with dry eye syndrome [J]. *Cornea*, 2007, 26(4): 431-437. DOI: 10.1097/ICO.0b013e31803dca2.
- [5] Leonardi A, Curnow SJ, Zhan H, et al. Multiple cytokines in human tear specimens in seasonal and chronic allergic eye disease and in conjunctival fibroblast cultures [J]. *Clin Exp Allergy*, 2006, 36 (6): 777-784. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2006.02499.x.
- [6] Chucair-Elliott AJ, Jinkins J, Carr MM, et al. IL-6 contributes to corneal nerve degeneration after herpes simplex virus type I infection [J]. *Am J Pathol*, 2016, 186 (10): 2665-2678. DOI: 10.1016/j.ajpath.2016.06.007.
- [7] Zhong W, Yin H, Xie L. Expression and potential role of major inflammatory cytokines in experimental keratomycosis [J]. *Mol Vis*, 2009, 15: 1303-1311.
- [8] Yamaguchi T, Calvacanti BM, Cruzat A, et al. Correlation between human tear cytokine levels and cellular corneal changes in patients with bacterial keratitis by *in vivo* confocal microscopy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55 (11): 7457-7466. DOI: 10.1167/iovs.14-15411.
- [9] Arranz-Valsero I, Soriano-Romani L, Garcia-Posadas L, et al. IL-6 as a corneal wound healing mediator in an *in vitro* scratch assay [J]. *Exp Eye Res*, 2014, 125: 183-192. DOI: 10.1016/j.exer.2014.06.012.
- [10] Ebihara N, Matsuda A, Nakamura S, et al. Role of the IL-6 classic-and trans-signaling pathways in corneal sterile inflammation and wound healing [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52 (12): 8549-8557. DOI: 10.1167/iovs.11-7956.
- [11] Gallucci RM, Simeonova PP, Matheson JM, et al. Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice [J]. *FASEB J*, 2000, 14 (15): 2525-2531. DOI: 10.1096/fj.00-0073.com.
- [12] Cressman DE, Greenbaum LE, de Angelis RA, et al. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice [J]. *Science*, 1996, 274 (5291): 1379-1383.
- [13] Zhong J, Dietzel ID, Wahle P, et al. Sensory impairments and delayed regeneration of sensory axons in interleukin-6-deficient mice [J]. *J Neurosci*, 1999, 19 (11): 4305-4313.
- [14] Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, et al. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells [J]. *Cell*, 1989, 57 (2): 201-209.
- [15] Dua HS, Azuara-Blanco A. Limbal stem cells of the corneal epithelium [J]. *Surv Ophthalmol*, 2000, 44 (5): 415-425.
- [16] Chikama T, Wakuta M, Liu Y, et al. Deviated mechanism of wound healing in diabetic corneas [J]. *Cornea*, 2007, 26 (9 Suppl 1): S75-81. DOI: 10.1097/ICO.0b013e31812f6d8e.
- [17] Misra SL, Braatvedt GD, Patel DV. Impact of diabetes mellitus on the ocular surface: a review [J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2016, 44 (4): 278-288. DOI: 10.1111/ceo.12690.
- [18] Kramerov AA, Saghizadeh M, Maguen E, et al. Persistence of reduced expression of putative stem cell markers and slow wound healing in cultured diabetic limbal epithelial cells [J]. *Mol Vis*, 2015, 21: 1357-1367.
- [19] Hirano T, Ishihara K, Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors [J]. *Oncogene*, 2000, 19 (21): 2548-2556. DOI: 10.1038/sj.onc.1203551.
- [20] Yu H, Lee H, Herrmann A, et al. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions [J]. *Nat Rev Cancer*,

- 2014, 14(11): 736-746. DOI: 10. 1038/nrc3818.
- [21] Hsueh YJ, Chen HC, Chu WK, et al. STAT3 regulates the proliferation and differentiation of rabbit limbal epithelial cells via a Δ NP63-dependent mechanism[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(7): 4685-4693. DOI: 10. 1167/iov. 10-6103.
- [22] Zhou Q, Chen P, Di G, et al. Ciliary neurotrophic factor promotes the activation of corneal epithelial stem/progenitor cells and accelerates corneal epithelial wound healing [J]. Stem Cells, 2015, 33(5): 1566-1576. DOI: 10. 1002/stem. 1942.
- [23] López-Miguel A, Tesón M, Martín-Montañez V, et al. Clinical and molecular inflammatory response in sjögren syndrome-associated dry eye patients under desiccating stress [J]. Am J Ophthalmol, 2016, 161: 133-141. DOI: 10. 1016/j. ajo. 2015. 09. 039.
- [24] Igarashi T, Fujimoto C, Suzuki H, et al. Short-time exposure of hyperosmolarity triggers interleukin-6 expression in corneal epithelial cells [J]. Cornea, 2014, 33(12): 1342-1347. DOI: 10. 1097/ICO. 0000000000000256.
- [25] Terasaka Y, Miyazaki D, Yakura K, et al. Induction of IL-6 in transcriptional networks in corneal epithelial cells after herpes simplex virus type 1 infection [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(5): 2441-2449. DOI: 10. 1167/iov. 09-4624.
- [26] Sakimoto T, Sugaya S, Ishimori A, et al. Anti-inflammatory effect of IL-6 receptor blockade in corneal alkali burn [J]. Exp Eye Res, 2012, 97(1): 98-104. DOI: 10. 1016/j. exer. 2012. 02. 015.
- [27] Biswas PS, Banerjee K, Kinchington PR, et al. Involvement of IL-6 in the paracrine production of VEGF in ocular HSV-1 infection [J]. Exp Eye Res, 2006, 82(1): 46-54. DOI: 10. 1016/j. exer. 2005. 05. 001.
- [28] Notara M, Shortt AJ, Galatowicz G, et al. IL-6 and the human limbal stem cell niche: a mediator of epithelial-stromal interaction [J]. Stem Cell Res, 2010, 5(3): 188-200. DOI: 10. 1016/j. scr. 2010. 07. 002.
- [29] Xu KP, Li Y, Ljubimov AV, et al. High glucose suppresses epidermal growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway and attenuates corneal epithelial wound healing [J]. Diabetes, 2009, 58(5): 1077-1085. DOI: 10. 2337/db08-0997.
- [30] Xu K, Yu FS. Impaired epithelial wound healing and EGFR signaling pathways in the corneas of diabetic rats [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(6): 3301-3308. DOI: 10. 1167/iov. 10-5670.
- [31] Wang Y, Zhao X, Shi D, et al. Overexpression of SIRT1 promotes high glucose-attenuated corneal epithelial wound healing via p53 regulation of the IGF1R/IGF-1R/Akt pathway [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54(5): 3806-3814. DOI: 10. 1167/iov. 13-12091.
- [32] Bettahi I, Sun H, Gao N, et al. Genome-wide transcriptional analysis of differentially expressed genes in diabetic, healing corneal epithelial cells: hyperglycemia-suppressed TGF beta3 expression contributes to the delay of epithelial wound healing in diabetic corneas [J]. Diabetes, 2014, 63(2): 715-727. DOI: 10. 2337/db13-1260.
- [33] Byun YS, Kang B, Yoo YS, et al. Poly (ADP-Ribose) polymerase inhibition improves corneal epithelial innervation and wound healing in diabetic rats [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015, 56(3): 1948-1955. DOI: 10. 1167/iov. 14-16259.
- [34] Yang L, Di G, Qi X, et al. Substance P promotes diabetic corneal epithelial wound healing through molecular mechanisms mediated via the neurokinin-1 receptor [J]. Diabetes, 2014, 63(12): 4262-4274. DOI: 10. 2337/db14-0163.
- [35] Gao N, Yan C, Lee P, et al. Dendritic cell dysfunction and diabetic sensory neuropathy in the cornea [J]. J Clin Invest, 2016, 126(5): 1998-2011. DOI: 10. 1172/JCI85097.

(收稿日期: 2016-10-22)

(本文编辑: 尹卫靖)

读者·作者·编者

眼科常用英文缩略语名词解释

- AMD: 年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration)
- ANOVA: 单因素方差分析 (one-way analysis of variance)
- BUT: 泪膜破裂时间 (breakup time of tear film)
- DR: 糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy)
- EAU: 实验性自身免疫性葡萄膜炎 (experimental autoimmune uveitis)
- EGF: 表皮生长因子 (epidermal growth factor)
- ELISA: 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay)
- ERG: 视网膜电图 (electroretinogram)
- FFA: 荧光素眼底血管造影 (fundus fluorescein angiography)
- FGF: 成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor)
- GFP: 绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein)
- IFN- γ : γ 干扰素 (interferon- γ)
- IL: 白细胞介素 (interleukin)
- IOL: 人工晶状体 (intraocular lens)
- IRBP: 光间受体视黄类物质结合蛋白 (interphotoreceptor retinoid binding protein)
- LASIK: 准分子激光原位角膜磨镶术 (laser in situ keratomileusis)
- ICGA: 吲哚菁绿血管造影 (indocyanine green angiography)
- LECs: 晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells)
- miRNA: 微小 RNA (microRNA)
- MMP: 基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase)
- mTOR: 哺乳动物类雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin)
- MTT: 四甲基偶氮唑盐 (methyl thiazolyl tetrazolium)
- NF: 核因子 (nuclear factor)
- OCT: 光学相干断层扫描 (optical coherence tomography)
- OR: 优势比 (odds ratio)
- PACG: 原发性闭角型青光眼 (primary angle-closure glaucoma)
- PCR: 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction)
- RGCs: 视网膜节细胞 (retinal ganglion cells)
- POAG: 原发性开角型青光眼 (primary open angle glaucoma)
- RPE: 视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium)
- RNV: 视网膜新生血管 (retinal neovascularization)
- RP: 视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa)
- S I t: 泪液分泌试验 (Schirmer I test)
- shRNA: 小发夹 RNA (short hairpin RNA)
- siRNA: 小干扰 RNA (small interfering RNA)
- α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin)
- TAO: 甲状腺相关眼病 (thyroid-associated ophthalmopathy)
- TGF: 转化生长因子 (transforming growth factor)
- TNF: 肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor)
- UBM: 超声生物显微镜 (ultrasound biomicroscope)
- VEGF: 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor)
- VEP: 视觉诱发电位 (visual evoked potential)

(本刊编辑部)