

引文格式: 苏亚茹, 白浪, 汤明芳, 于健, 刘晶, 孙宇飞, 等. 敲除 TLR2 基因对同种异体小鼠角膜移植排斥反应的影响[J]. 眼科新进展, 2016, 36(11): 1006-1010. doi: 10.13389/j.cnki.rao.2016.0269

【实验研究】

敲除 TLR2 基因对同种异体小鼠角膜移植排斥反应的影响[△]

苏亚茹 白浪 汤明芳 于健 刘晶 孙宇飞 孟婷

Variation of immune response after allogeneic corneal transplantation in TLR2 knock-out mice

SU Ya-Ru, BAI Lang, TANG Ming-Fang, YU Jian, LIU Jing, SUN Yu-Fei, MENG Ting

【Key words】 toll-like receptor 2; gene knock-out; Myd88; corneal transplantation; immune rejection; CD4⁺ T cell; IFN- γ

【Abstract】 **Objective** To explore whether toll-like receptor 2 (TLR2) knock-out can attenuate immune rejection after allogeneic corneal transplantation. **Methods** BALB/c mice were used as donors, 30 C57BL/6 mice and 30 TLR2 knock-out mouse were chosen as receptors to establish allograft corneal transplantation models, which were grouped as the wide type (WT) mouse group and knock-out (KO) mouse group. Another 19 C57BL/6 mice were performed isograft corneal transplantation and were termed as isograft (ISO) group. Nine normal mice of wild-type C57BL/6 (WT control) or TLR2 knock-out (KO control) were respectively involved as negative controls. The edema and transparency were observed twice per week under slit lamp microscope after surgery and the rejection times were recorded according to Sonoda's criteria. At 14 days after transplantation, the frequencies of CD4⁺ T cells in ipsilateral cervical draining lymph nodes were analyzed by flow cytometry, and the expression of IFN- γ , TLR2 and MyD88 were detected by immunohistochemical staining and qPCR. **Results** The median survival time (MST) in KO group was (35.0 \pm 3.8) days, while in WT group was (21.0 \pm 1.5) days, there was significant difference between WT and KO group ($P < 0.05$). Lymphoid CD4⁺ T cells percentage of WT group was significantly higher than that of WT control group ($P < 0.05$). There was no statistical difference between ISO and WT control group, as well as KO and KO control group (all $P > 0.05$). Immunohistochemistry staining revealed that IFN- γ and MyD88 expressed almost alike in ISO and KO group, but there was a significant decreasing in ISO and KO group compared with WT group. No TLR2 could be detected in KO group, while expressed weakly in ISO group, and increased in WT group. The mRNA expression of IFN- γ and MyD88 in ISO and KO group were nearly the same (all $P > 0.05$), but there was a marked decrease in ISO and KO group while compared with WT group ($P < 0.05$). The MyD88 mRNA expression level in KO group was much higher than that in ISO group ($P < 0.05$), and both of them were lower than that in WT group (all $P < 0.05$). **Conclusion** TLR2 knock-out may attenuate immune rejection after allogeneic corneal transplantation.

作者简介: 苏亚茹, 女, 1991年5月出生, 广东佛山人, 硕士研究生。研究方向: 角膜移植免疫。联系电话: 15622138590; E-mail: xha_000@163.com; ORCID: 0000-0001-8327-3140

About SU Ya-Ru: Female, born in May, 1991. Master degree. Tel: 15622138590; E-mail: xha_000@163.com; ORCID: 0000-0001-8327-3140

收稿日期: 2016-07-01
修回日期: 2016-08-30
本文编辑: 付中静

△ 基金项目: 国家自然科学基金资助(编号: 81170887); 南方医科大学南方医院横向课题匹配基金资助(编号: G201202)

作者单位: 510000 广东省广州市, 南方医科大学南方医院眼科
通讯作者: 白浪, E-mail: bailangsfy@126.com; ORCID: 0000-0001-6953-4498

Received date: Jul 1, 2016
Accepted date: Aug 30, 2016
Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No: 81170887); Horizontal Topic Matching Funds of Nanfang Hospital of Southern Medical University (No: G201202)
From the Department of Ophthalmology, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China
Responsible author: BAI Lang, E-mail: bailangsfy@126.com; ORCID: 0000-0001-6953-4498

【中图分类号】 R772.2

【关键词】 Toll 样受体 2; 基因敲除; MyD88; 角膜移植; 免疫排斥; CD4⁺ T 细胞; 干扰素- γ

【摘要】 **目的** 探讨敲除 Toll 样受体 2 (toll-like receptor 2, TLR2) 基因后是否抑制同种异体小鼠角膜排斥反应的发生。 **方法** 以 BALB/c 为供体, 各取 30 只 C57BL/6 和同背景 TLR2 基因敲除鼠为受体行右眼角膜移植术, 设为野生组 (WT) 和基因敲除组 (KO); 取 19 只 C57BL/6 行右眼自体角膜移植术, 为自体组 (ISO); 各取 9 只 C57BL/6 和 TLR2 基因敲除鼠分别设为野生对照组 (WT control) 和基因敲除对照组 (KO control)。术后每周两次观察植片并记录免疫排斥的发生时间; 术后 14 d, 收集术眼同侧颈部淋巴结, 行流式细胞术分析 CD4⁺ T 细胞百分比; 收集术眼角膜, 行免疫组织化学染色和实时荧光定量 PCR 检测角膜干扰素 (interferon, IFN)- γ 、TLR2 和 MyD88 的表达。 **结果** WT 组和 KO 组小鼠角膜移植术后中位生存时间 KO 组 (35.0 \pm 3.8) d 长于 WT 组 (21.0 \pm 1.5) d ($P < 0.05$)。流式细胞术分析显示, WT 组同侧颈部淋巴结 CD4⁺ T 细胞百分比比较 WT control 组明显增高 ($P < 0.05$), 而 ISO 和 KO 组相对于其对应的 control 组 (WT/KO control) 差异均无统计学意义 (均为 $P > 0.05$); 免疫组织化学结果显示, ISO 和 KO 组间角膜 IFN- γ 和 MyD88 分子表达无差异, 但两者均低于 WT 组。KO 组角膜几乎不表达 TLR2 分子, ISO 组有微量表达, WT 组表达明显增高; PCR 检测显示, ISO 和 KO 组角膜 IFN- γ 和 TLR2 mRNA 相对表达量差异均无统计学意义 (均为 $P > 0.05$), 但两者均低于 WT 组 (均为 $P < 0.05$); KO 组角膜 MyD88 mRNA 相对表达量比 ISO 组高 ($P < 0.05$), 但两者均低于 WT 组 (均为 $P < 0.05$)。 **结论** 敲除 TLR2 基因可以一定程度抑制同种异体小鼠角膜排斥反应的发生。

角膜移植术是成功率最高的器官移植手术,但术后免疫排斥反应的发生仍是导致角膜移植术后植片无法存活的主要原因^[1]。研究认为角膜移植排斥反应是以 CD4⁺T 细胞介导为主导的 Th1 型免疫反应^[2]。Toll 样受体 2 (toll-like receptor 2, TLR2) 是天然免疫与获得性免疫的桥梁^[3], 阻断 TLR2 信号通路可以抑制多种器官移植排斥反应的发生^[4]。在角膜移植中, TLR2 及其下游信号蛋白髓样分化因子 (myeloid differentiation protein 88, MyD88) 的表达增高可以促进排斥反应的发生^[5-6]。我们前期研究发现给大鼠球结膜注射 TLR2 单克隆抗体可以延长角膜植片的生存时间, 提示抑制 TLR2/MyD88 信号通路可能降低角膜排斥反应的发生^[7-8]。为了进一步证实这一现象, 本研究利用 TLR2 基因敲除小鼠, 建立同种异体小鼠角膜移植模型, 观察分析术后角膜排斥反应的发生情况, 检测 CD4⁺T 细胞百分比和 Th1 细胞因子干扰素 (interferon, IFN)- γ 的表达变化, 进一步探讨敲除 TLR2 基因对角膜移植免疫反应的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 30 g·L⁻¹ 戊巴比妥钠注射液、复方托吡卡胺滴眼液、FITC 标记抗小鼠 CD3 及 PE 标记抗小鼠 CD4 (Ebioscience, 美国), 兔抗小鼠 IFN- γ 、TLR2、MyD88 一抗 (Proteintech、Thermo、Proteintech, 美国), 二抗选用山羊来源抗体 (DaKo 公司, 丹麦), RNA 提取试剂盒 (OMEGA 公司, 美国), 逆转录试剂盒、qPCR 试剂盒 (TaKaRa 公司, 日本), 引物由南京金思特科技公司合成。

1.2 实验动物与分组 TLR2 基因敲除小鼠 (C57BL 种系鼠, 购于南京大学—南京生物医药研究院)、C57BL/6 小鼠及 BALB/c 小鼠, 6~8 周龄, SPF 级, 均由南方医科大学实验动物中心提供及饲养。动物的饲养和使用均遵循视觉和眼科学研究学会原则中关于科研动物的使用规范。以 BALB/c 小鼠为供体, 各取 30 只 C57BL/6 小鼠和 TLR2 基因敲除鼠为受体, 供体角膜均来自 BALB/c 小鼠, 右眼行角膜移植手术, 分别设为野生 (WT) 组和基因敲除 (KO) 组。取 19 只 C57BL/6 小鼠, 右眼行同种自体角膜移植手术, 设为自体 (ISO) 组。各取 9 只 C57BL/6 小鼠和 TLR2 基因敲除鼠不做手术处理, 作为野生对照组 (WT control) 和基因敲除对照组 (KO control)。

1.3 穿透性角膜移植术

1.3.1 手术方法 采用改进的角膜移植术, 经腹腔麻醉后, 术前冲眼、散瞳、表面麻醉。显微镜下, 环钻钻取, 制作植片 (直径 2.0 mm) 和植床 (直径 1.5 mm), 11-0 尼龙线间断缝合 8~10 针, 无菌空气泡形成前房, 术后仅用氧氟沙星眼膏涂眼 (日本参天制药公司产品), 活结缝合眼睑。术后单笼饲养 3 d, 眼睑缝线自行脱落, 7 d 拆除角膜缝线。手

术均由同一人完成。术中发生前房出血、术后虹膜粘连及白内障者均视为手术失败, 不纳入实验并及时补充样本。

1.3.2 角膜移植术后免疫排斥反应观察 流式检测术眼同侧颈部淋巴结 CD4⁺T 细胞比例, 用以反映术眼角膜移植排斥反应情况。术后 72 h 开始, 每周观察 2 次, 由同一术者用裂隙灯显微镜观察, 并记录角膜移植片的透明度情况, 观察时间持续 8 周。按以下标准评分^[9]: 0 分: 角膜植片透明; 1 分: 轻微上皮混浊; 2 分: 轻度基质混浊, 瞳孔缘及虹膜血管可见; 3 分: 中度基质混浊仅见部分瞳孔缘; 4 分: 深度基质层混浊仅可见前房; 5 分: 基质层完全混浊前房不可见。据此标准可对移植排斥反应的程度进行量化评价: 2 周及 2 周前, 角膜评分 ≥ 3 分视为排斥反应发生; 2 周后, 角膜评分 ≥ 2 分视为排斥反应发生。

1.4 流式细胞术检测 术后 14 d 每组随机处死 6 只小鼠, 取术眼同侧颈部淋巴结, 制成单细胞悬液。取 6×10^5 个细胞悬于 100 μ L PBS, 加入 FITC 和 PE 标记的各种单克隆抗体, 避光孵育 30 min; 离心弃上清, 加入 1 mL PBS 清洗细胞 3 次, 然后将细胞重悬于 0.5 mL PBS 避光放置, 流式细胞仪检测, Flowjo 软件分析。

1.5 免疫组织化学检查 术后 14 d 每组随机处死 3 只小鼠, 取术眼眼球经 40 g·L⁻¹ 多聚甲醛液固定、脱水、石蜡包埋, 制备成 5 mm 厚连续切片。一抗选用兔来源的抗小鼠 IFN- γ 、TLR2 和 MyD88 抗体, 二抗采用山羊来源的抗小鼠抗体, 常规链霉菌抗生素蛋白-过氧化物酶连结三步法, 热修复抗原、DAB 显色、封片后显微镜下观察并拍照。所有样本均以 PBS 代替一抗作为阴性对照, 将已知的阳性片设为阳性对照, 细胞质或细胞核呈棕黄色为阳性染色细胞。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测 术后 14 d 每组随机处死 6 只小鼠, 取术眼角膜, 置于 1.5 mL 离心管中, 按照 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA, 以 DEPC 水为空白对照, 同时记录 RNA 浓度和吸光度比值 A₂₆₀/A。用 TaKaRa 逆转录试剂盒行逆转录反应合成 cDNA。以 GAPDH 为内参, 各引物基因序列: GAPDH 上游: 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3', 下游: 5'-TG TAG ACC ATGTAGTTGAGGTC A-3'; INF- γ 上游: 5'-CGAATCGCACCTGATCACTAAC-3', 下游: 5'-GCTG-GATCTGTGGGTTGTTCA-3'; TLR2 上游: 5'-GCAAAC-GCTGTTCTGCTCGCTCAG-3', 下游: 5'-AGGCGTCTC-CCTCTATTGTATT-3'; Myd88 上游: 5'-CAGAAGAAT-GGAAGAGTCAG-3', 下游: 5'-CAGATATGCAGGGAG-TCACC-3'。参照 TaKaRa 公司的说明配置反应液进行 PCR 反应。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 34 s, 共 40 个循环。

1.7 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计学软件分析

数据,各指标均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,WT 组与 KO 组间角膜平均排斥时间比较采用两独立样本 t 检验;WT、ISO 和 WT control 三组间淋巴结 $CD4^+$ T 细胞数量百分比差异及比较采用单因素方差分析,组间比较采用 LSD- t 检验;KO 组和 KO control 组间淋巴结 $CD4^+$ T 细胞数量百分比差异采用两独立样本 t 检验;各组角膜组织中 IFN- γ 、TLR2 和 Myd88 mRNA 表达差异及比较采用单因素方差分析,组间比较采用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠角膜植片排斥反应结果

ISO 组术后因炎症反应出现一过性角膜植片水肿混浊;术后 7 d 部分缝线处有新生血管伸入,拆除角膜缝线后,角膜新生

血管逐渐消退;术后 14 d 眼前节无炎症反应,无充血,裂隙灯显微镜下观察 8 周,角膜移植片仍透明。WT 组术后因炎症反应出现一过性角膜植片水肿混浊;术后 7 d 角膜植片出现混浊,瞳孔不可见,拆除角膜缝线后,水肿混浊继续加重;术后 14 d 多例角膜植片出现水肿、混浊,完全不透明(图 1A);术后角膜的中位生存时间(median survival time, MST)为 (21.0 ± 1.5) d,1 例角膜长期生存。KO 组术后因炎症反应出现一过性角膜植片水肿混浊;术后 7 d 拆除缝线后,植床和植片新生血管逐渐消退;术后 14 d 植片透明,无充血(图 1A);术后约 35 d,多例角膜植片又出现水肿、混浊,并逐渐加重;角膜 MST 为 (35.0 ± 3.8) d,3 例角膜长期生存。WT 组与 KO 组 MST 比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

图 1 小鼠角膜移植后排斥反应结果。A:术后 14 d 小鼠角膜植片生存情况;B:术后 14 d 术眼同侧颈部淋巴结 $CD4^+$ T 细胞比例,WT 组与 WT control 组比较,* $P < 0.05$;WT 组与 ISO 组比较,# $P < 0.05$

2.2 同侧颈部淋巴结 $CD4^+$ T 细胞流式检测分析

各组淋巴结中 $CD4^+$ T 细胞的流式细胞术分析见图 1B。WT 组同侧颈部淋巴结 $CD4^+$ T 细胞百分比较 WT control 组、ISO 组均显著增高(均为 $P < 0.05$),而 ISO 组与 WT control 组相比差异无统计学意义($P > 0.05$);KO 组与 KO control 组相比差异也无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 小鼠角膜 IFN- γ 的表达

免疫组织化学结果显示,在 ISO、WT 和 KO 三组间,ISO 组和 KO 组小鼠角膜 IFN- γ 分子均有微量表达,但两组间无明显差异,而 WT 组小鼠角膜 IFN- γ 分子表达明显增高(图 2)。PCR 结果显示,在 ISO、WT 和 KO 三组间,KO 组和 ISO 组间小鼠角膜 IFN- γ mRNA 表达差异均无

统计学意义(均为 $P > 0.05$),且两组均明显低于 WT 组(均为 $P < 0.05$,图 3)。

2.4 小鼠角膜 TLR2 和 Myd88 的表达

PCR 结果显示,在 ISO、WT 和 KO 三组间,KO 组和 ISO 组间小鼠角膜 TLR2 mRNA 表达差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$),且两组均明显低于 WT 组(均为 $P < 0.05$);KO 组小鼠角膜 MyD88 mRNA 表达略高于 ISO 组($P < 0.05$),且 KO 组和 ISO 组小鼠角膜 MyD88 mRNA 表达均明显低于 WT 组(均为 $P < 0.05$,图 4)。免疫组织化学结果显示,在 ISO、WT 和 KO 三组间,KO 组小鼠角膜几乎不表达 TLR2 分子,ISO 组有微量表达,WT 组小鼠角膜 TLR2 分子表达明显增高(图 5);KO 组和 ISO 组小鼠角膜 MyD88 分

图 2 术后 14 d 小鼠角膜 IFN- γ 分子的表达($\times 400$)

子均有微量表达,但两组间无明显差异,WT组小鼠角膜 MyD88 分子表达明显增高(图6)。

图3 术后14 d小鼠角膜 IFN- γ mRNA 的相对表达量。ISO组和KO组分别与WT组比较,* $P < 0.05$

图4 术后14 d小鼠角膜内 TLR2 和 MyD88 mRNA 相对表达量。ISO组和KO组分别与WT组比较,TLR2 和 MyD88 mRNA 差异显著,* $P < 0.05$;KO组与ISO组比较,MyD88 mRNA 差异显著,# $P < 0.05$

图5 术后14 d小鼠角膜内 TLR2 分子的表达($\times 400$)

图6 术后14 d小鼠角膜内 MyD88 分子的表达($\times 400$)

3 讨论

TLRs 被认为是连接天然免疫和获得性免疫的重要桥梁,其中 TLR2 是 TLR 家族中识别抗原种类最多、分布范围最广的分子^[3]。研究认为,移植排斥反应中 TLR2 可能由树突状细胞或受损细胞产生的内源性配体激活,通过下游 MyD88 分子传递信号,促使树突状细胞成熟和多种细胞因子分泌,从而激活 T 细胞,介导移植排斥反应发生^[10]。大量研究表明,TLR2/MyD88 信号通路与器官移植排斥反应的发生密切相关,抑制 TLR2 信号通路可以减少皮肤、肾、心脏等器官移植排斥反应的发生^[4,11-12]。在角膜移植中,WU 等^[5]、BAI 等^[6]先后通过大鼠同种异体角膜移植模型,证实了 TLR2 和 MyD88 出现异常增

加的时间(术后第9天)与角膜排斥反应的时间(术后第9天)相吻合,提示 TLR2 和 MyD88 的增加可能促进角膜排斥反应的发生。进一步给大鼠球结膜注射 TLR2 单克隆抗体延长了移植角膜的生存时间^[7-8],提示抑制 TLR2/MyD88 信号通路可以抑制大鼠角膜排斥反应的发生。

角膜移植术后免疫排斥反应是以 CD4⁺ T 细胞介导为主的 Th1 型免疫反应^[2]。IFN- γ 是 Th1 型细胞因子,其表达增高在 Th1 型免疫反应中起决定作用^[13]。为了进一步证实抑制 TLR2 信号可以减少角膜排斥反应发生这一现象,我们采用 C57BL 种系为背景的 TLR2 基因敲除鼠和同背景的 C57BL/6 小鼠为受体,BALB/c 小鼠为供体,建立同种异体角膜移植模型。并采用 C57BL/6 小鼠建立同种自体角膜移

植模型,用以排除手术操作对实验结果的影响。参照 DOHLMAN 等^[14]和 ZHU 等^[15]的方法,于术后 14 d 收集各组术眼同侧颈部淋巴结和术眼角膜,通过分析同侧颈部淋巴结 CD4⁺T 细胞比例及角膜 IFN- γ 表达反映术眼的免疫状态。本研究结果显示,与野生型小鼠角膜植片相比,TLR2 基因敲除小鼠角膜植片的生存时间明显延长。当野生型小鼠接受同种异体角膜移植后,同侧颈部淋巴结内 CD4⁺T 细胞百分比为 35%,这与 ZHU 等^[16]的研究结果(36%)相近,且明显高于野生型对照小鼠;而 TLR2 基因敲除小鼠接受同种异体角膜移植后,同侧颈部淋巴结内 CD4⁺T 细胞百分比仅为 18.7%,与基因敲除对照小鼠比较差异无统计学意义。可见同种异体角膜移植术后,敲除 TLR2 基因可以抑制 CD4⁺T 细胞的激活。另外,本研究还发现野生型小鼠接受同种异体角膜移植后,角膜局部 IFN- γ 表达明显增高,这与 KING 等^[17]研究一致;而 TLR2 基因敲除小鼠接受同种异体角膜移植后,角膜局部 IFN- γ 分子表达明显低于同种异体角膜移植后的野生型小鼠。以上结果显示,敲除 TLR2 基因可能抑制了同种异体角膜移植术后的免疫排斥反应,同样的现象在皮肤移植中也有报道^[18]。

与前期研究一样^[8],我们还发现野生型小鼠接受同种异体角膜移植后,TLR2 与 MyD88 分子表达增高。但当 TLR2 基因敲除小鼠接受同种异体角膜移植后,TLR2 分子的表达无增高,但其下游分子 MyD88 的表达却少量增高。这与 LIU 等^[19]的理论相符合:除 TLR2 分子以外,TLR4、5、11 分子都可以激活 MyD88 分子传递下游信号。因此,我们猜想在同种异体角膜移植中,敲除 TLR2 基因后,MyD88 表达增高可能是由于激活了其他 TLRs 分子。激活的 TLRs 可以通过共同的下游信号分子 MyD88 传递下游信号诱导了免疫排斥反应发生。这也解释了在本研究中,TLR2 基因敲除小鼠角膜植片最终发生了排斥反应,敲除 TLR2 基因不能完全阻断同种异体角膜移植排斥反应的发生。这提示同种异体角膜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,其具体作用机制仍有待进一步研究。

参考文献

[1] 白浪,陆晓和,周瑾,党森涛,张进华. CD86 在大鼠角膜移植排

斥反应中的表达及意义[J]. 第一军医大学学报,2004,24(5):533-535.
 [2] 李志杰,彭广华. 角膜移植排斥反应的免疫学[J]. 眼科新进展,2000,22(5):313-315.
 [3] TESAR BM, GOLDSTEIN DR. Toll-like receptors and their role in transplantation[J]. *Front Biosci*,2007,12:4221-4238.
 [4] GOLDSTEIN DR, PALMER SM. Role of toll-like receptor-driven innate immunity in thoracic organ transplantation[J]. *J Heart Lung Transpl*.2005,24(11):1721-1729.
 [5] WU W, YU S, FENG S, YANG JZ, LU XH. Effect of the TLR2/MyD88/NF- κ B axis on corneal allograft rejection after penetrating keratoplasty[J]. *J Recept Signal Tr*,2014,36(1):45-52.
 [6] BAI L, LU XH, SUN FY, ZHONG YY, YU J, TANG MF, et al. Blockade of toll-like receptor 2 expression and membrane translocation in rat corneal epithelial cells by glucocorticoid (TobraDex) after penetrating keratoplasty [J]. *Cornea*,2011,30(11):1253-1259.
 [7] 白浪,郑艳华,梁伟怡. TLR2 单克隆抗体对大鼠角膜移植术后植片存活的保护作用[J]. 中华实验眼科杂志,2015,33(10):887-891.
 [8] 郑艳华,白浪,梁伟怡,于健,杨娟,谭青. TLR2/MyD88 信号系统在大鼠角膜移植术后排斥反应中的作用[J]. 眼科新进展,2015,35(6):506-510.
 [9] SONODA Y, STREILEIN JW. Orthotopic corneal transplantation in mice--evidence that the immunogenetic rules of rejection do not apply[J]. *Transplantation*,1992,54(4):694-704.
 [10] GOLDSTEIN DR. Toll like receptors and acute allograft rejection[J]. *Transpl Immunol*,2006,17(1):11-15.
 [11] WANG S, SCHMADERER C, KISS E, SCHMIDT C, BONROUHI M, PORUBSKY S, et al. Recipient Toll-like receptors contribute to chronic graft dysfunction by both MyD88- and TRIF-dependent signaling[J]. *Dis Model Mech*,2010,3(1-2):92-103.
 [12] 胡守军. 联合 TLR2mab 和 TLR4mab 对同种心脏移植免疫排斥反应的影响[D]. 苏州大学,2012.
 [13] HIRAHARA K, NAKAYAMA T. CD4⁺T-cell subsets in inflammatory diseases; beyond the Th1/Th2 paradigm[J]. *Int Immunol*,2016,28(4):163-171.
 [14] DOHLMAN TH, OMOTO M, HUA J, STEVENSON W, LEE SM, CHAUHAN SK, et al. VEGF-trap aflibercept significantly improves long-term graft survival in high-risk corneal transplantation[J]. *Transplantation*,2015,99(4):678-686.
 [15] ZHU S, DEKARIS I, DUNCKER G, DANA MR. Early expression of proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha after corneal transplantation[J]. *J Interferon Cytokine Res*,1999,19(6):661-669.
 [16] ZHU J, LIU Y, PI Y, LIANG JIA, WANG LQ, HUANG YF. Systemic application of sphingosine 1-phosphate receptor 1 immunomodulator inhibits corneal allograft rejection in mice[J]. *Acta Ophthalmol*,2014,92(1):e12-e21.
 [17] KING WJ, COMER RM, HUDDLE T, LARKIN DF, GEORGE AJ. Cytokine and chemokine expression kinetics after corneal transplantation [J]. *Transplantation*,2000,70(8):1225-1233.
 [18] GOLDSTEIN DR, TESAR BM, AKIRA S, LAKKIS FG. Critical role of the Toll-like receptor signal adaptor protein MyD88 in acute allograft rejection [J]. *J Clin Invest*,2003,111(10):1571-1578.
 [19] LIU G, WU Y, GONG S, ZHAO Y. Toll-like receptors and graft rejection[J]. *Transpl Immunol*,2006,16(1):25-31.