小鼠眼角膜上皮细胞中IL-1 β 对Fas配体的表达调控研究

张 杰 杨 克 谭德勇 曾军英 Alan Fine

(云南大学生命科学学院生物化学与分子生物学实验室, 昆明 650091. The Pulmonary Center and the Department of Biochemistry, Boston University School of Medicine, Boston, MA 02118. E-mail: jzhang007@gmail.com)

摘要 Fas 配体(Fas Ligand, FasL)在多种不同的上皮细胞中均见表达, 在炎症反应中诱导 Fas 阳性免疫细胞凋亡以保护组织. 为了研究眼角膜炎症反应过程与 Fas 配体之间的关系, 本研究检测了在眼角膜上皮细胞中 IL-1 β 对 FasL 的表达翻译水平以及细胞毒性的影响, 明确了在眼角膜上皮细胞中 IL-1 β 抑制 FasL 的表达以及蛋白翻译, FasL 的启动子活性受到 IL-1 β 作用浓度的影响, 两者呈相关性表现, 发现 IL-1 β 阻断由 FasL 诱导 Fas 阳性细胞对于眼角膜上皮细胞的细胞毒性作用. 这些结果表明, 眼角膜上皮细胞 FasL 受 IL-1 β 的调控.

关键词 FasL 角膜 IL-1 β 启动子 小鼠

Fas配体(Fas Ligand, FasL)是一个分子量为 40 kD 的 型跨膜蛋白, 隶属于TNF配体家族^[1-3]. 当T细胞受体与其配体结合后, 被激活的T细胞中FasL被诱导表达, 发挥其免疫调控作用^[4-6]. 但是, 在某些非淋巴细胞中FasL是组成型表达的, 如小肠中的Paneth细胞、角膜细胞, 睾丸中的Sertoli细胞, 气管中的Clara细胞等^[1,7-11]. FasL存在诱导型表达和组成型表达两种表达模式, 这意味着在淋巴细胞和非淋巴细胞中存在着不同的FasL基因表达调控机制. 在免疫系统中, FasL激活信号直接介导T细胞依赖的细胞毒作用和自身反应淋巴细胞的消除^[12,13]. 通过消除非淋巴细胞部位(如眼睛和睾丸)浸润的Fas⁺白细胞, 内皮细胞分泌的FasL维持所谓的“免疫耐受”^[14-16]. “免疫耐受”是指在感染和组织移植中, 组织可以耐受免疫介导的各种损伤效应. Fas表达缺陷(*lpr*)小鼠中的Fas表达缺陷以及FasL缺陷(*gld*)小鼠中由于基因点突变导致的FasL功能缺失都与淋巴结病、狼疮类自身免疫病以及淋巴细胞不受调控地迁移至器官的发生有关^[17-21]. 例如, 与野生型小鼠相比, *gld*小鼠的眼部病毒感染将导致更加广泛的和更具破坏性的炎症细胞浸润^[14]. 研究表明, *gld*小鼠的眼和睾丸中不具有免疫耐受^[2]. 研究也表明, 在角膜移植中, 移植的角膜细胞中FasL诱导浸润性宿主免疫细胞凋亡, 从而提高角膜异体移植存活^[22-24]. 研究显示, FasL表达调控可能对角

膜异体移植的结果具有重要影响. 许多研究也证实, 炎症细胞因子, 如IL-6, IL-1, INF- γ 和TNF- α 可能调节在星形胶质神经细胞、 β -细胞和视网膜色素内皮细胞中Fas和FasL的表达^[25-27]. 为研究一个有效的炎症细胞因子IL-1 β 对角膜细胞中FasL表达的影响, 本文对小鼠角膜内皮细胞中FasL的产物、基因表达、启动子活性和细胞毒性进行研究, 发现IL-1 β 可以下调角膜内皮细胞中FasL的产生, 转录和细胞毒性.

1 材料和方法

() 细胞培养. 角膜内皮细胞系(C3H3)是一个SV40 感染导致的无限增殖细胞系, 由 Bruce Ksander 博士(The Scheppens Eye Research Institute, Boston)惠赠. C3H3 细胞用含 2 mmol/L L-谷氨酰胺、青霉素、15% FBS 和链霉素的 RPMI 1640 培养基在 100%湿度和 5% CO₂ 的条件下 37 °C 单层培养.

() FasL 的检测. 当 C3H3 长满 100 mm 培养皿后, 向培养皿中添加刺激物. 在实验过程中先分别更换含有和不含有 IL-1 β 的新鲜培养基, 37 °C 孵育 16 h 后用 PBS 洗涤细胞, 然后用含 50 mmol/L Tris-HCl, 1% Nonidet P-40, 0.25% 去氧胆酸钠, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF, 1 μ g/mL 胰蛋白酶抑制剂, 1 μ g/mL 亮氨酸和 1 μ g/mL 胃蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液裂解细胞. 裂解产物-70 °C 保存.

FasL的检测是在96孔微量滴定板上用小鼠抗小鼠FasL单抗(Pharmagen)、大鼠抗小鼠FasL多抗(Amershamer)、生物素标记的羊抗大鼠IgG抗体、抗生物素蛋白链菌素碱性磷酸酶(Promega)和磷酸酶底物(Sigma)进行。其中,重组鼠FasL(Amershamer)被用作检测标准。滴定板使用Bio-Kinetics reader model EL312 (Bio-Tek Instruments, Inc)在405 nm时进行读数。

() RT-PCR. 用RNeasy试剂盒(Qiagen)从角膜内皮细胞(C3H3 cell)抽提得到的总RNA,用总RNA为模板,利用Reverse Transcription System (Promega)进行反转录。用Taq DNA聚合酶和小鼠FasL引物(5'-CTTAGCTTCTCTGGAGCAGTCAGCGTCAGAG-3', 3'-CCTTCTTCTTTAGAGGGGTCAGTGGCGGCA-5')或特异的 β -actin引物(Promega)对FasL和 β -actin cDNA进行PCR扩增,并用2%琼脂糖胶电泳检测。获得的FasL PCR产物用酶切图谱鉴定。

() FLP-荧光素酶质粒的构建。通过将5'端长度各异的FasL基因导入到pGL3B载体(Promega)的Kpn-Hind酶切位点,获得荧光素酶质粒。其中质粒pGL3B-618含有由基因组步移法测得的全长启动子,并被作为PCR的反应模板以得到更短的启动子片段: -308~+71的片段及-246~+71的片段。将这些PCR产物片段克隆进pGL3B载体,分别得到了质粒pGL3B-308和pGL3B-246。

() 瞬时转染。用LipofectamineTM试剂(Gibco)进行转染和荧光素酶的测定。简言之,将细胞以 2.5×10^5 个/孔的细胞密度接种到6孔板(Costar)中,37℃培养过夜。然后将细胞用含有2 μ g荧光素酶质粒、1 μ g β -半乳糖苷酶报告质粒和10 μ g LipofectamineTM及10% FBS的DMEM培养基进行孵育。5 h后分别用含有和不含有IL-1 β 的新鲜培养基更换培养基,孵育24 h后提取细胞总蛋白。蛋白上清中荧光素酶的活性通过液体闪烁计数器测定。参照Zhang等人^[28]进行 β -半乳糖苷酶活性测定,以标准化转染效率。

() 细胞毒性的测定。参照Matsui等人^[29]的方法,以Fas⁺细胞和Fas⁻细胞(Jurket细胞系)为靶细胞进行角膜内皮细胞的毒性测定。Na₂CrO₄放射性标记的靶细胞(2×10^4)分别与用IL-1 β 处理或未处理6 h的C3H3混合,孵育5 h后收集培养上清,然后使用 γ 计数器计数释放到培养上清中的放射性物质。无毒性培养的细胞的测定值作为背景控制。以在含有0.5% Nonidet P-40的细胞培养中释放的放射性物质的测量则作为总细胞死亡的参照。毒性 = (样品的测量值-背

景的测量值)/(释放的总放射性物质的测量值-背景的测量值)。所有的实验都设置副本并重复3次。

() 统计学分析。所有的数据都以平均数 $\pm$ 标准差表示。对照组和IL-1 β 处理组FasL产生、荧光素酶活性和毒性效应差异进行 t 测验。

() 启动子分析。使用软件OMIGA 2.0进行启动子分析。

2 结果

2.1 IL-1 β 下调角膜内皮细胞中FasL的表达和蛋白翻译水平

为了检测IL-1 β 对小鼠角膜内皮细胞FasL表达和翻译水平的影响,C3H3细胞用小鼠重组IL-1 β 孵育16 h,裂解细胞,用酶联免疫吸附法(ELISA)检测FasL蛋白产物。如图1所示,FasL蛋白的翻译水平随IL-1 β 浓度的升高而受到抑制,呈剂量-效应方式。如用2 ng/mL IL-1 β 处理后,C3H3的FasL蛋白产物减少了63%。为了检测FasL在角膜内皮细胞中的表达,分别提取实验组(IL-1 β 处理)和对照组C3H3细胞中的总RNA进行逆转录,用FasL的特异引物进行PCR扩增,扩增获得的产物(321 bp)用限制性酶切图谱法证实为FasL(结果未显示)。如图2所示,IL-1 β 处理组的FasL mRNA表达水平降低(以 β -actin为对照组、处理组为内参),这与IL-1 β 对FasL蛋白产生的效应一致。

2.2 IL-1 β 抑制FasL启动子的荧光素酶活性

为进一步研究IL-1 β 对FasL启动子活性的调控,

图1 角膜内皮细胞中IL-1 β 对FasL蛋白产生的抑制
C3H3细胞用1或2 ng/mL IL-1 β 处理,IL-1 β 降低了FasL的产生。所有的实验都设置副本并重复3次

图 2 角膜内皮细胞中 FasL 基因表达的 RT-PCR 分析
由 C3H3 细胞 mRNA 反转录得到的 FasL cDNA 使用特异的 FasL 引物进行 PCR 扩增. PCR 产物 2% 琼脂糖电泳, 溴化乙锭染色. FasL 条带的预期大小是 321 bp. β -actin 为内对应参照. 1, DNA Marker; 2, 对照; 3, 2.5 ng/mL IL-1 β 处理; 4, 12.5 ng/mL IL-1 β 处理

将 FasL 基因启动子片段 -618~+71, -308~+71 和 -246~+71 克隆进 PGL3B 载体, 并转染 C3H3 细胞. 然后分别检测 IL-1 β 处理组和未处理组瞬时转染细胞的荧光素酶活性. 从图 3 可以看出, 在 C3H3 细胞中 FasL 启动子(PGL3B-308)荧光素酶的活性被 IL-1 β 以剂量依赖方式抑制. 这种抑制结果在用了一个更长序列的 FasL 启动子(700 bp, -618~+71)转染的 C3H3 细胞中也可以观察到(表 1). 用 12.5 ng/mL IL-1 β 处理 24 h 后, 转染细胞的荧光素酶活性下降了 48%, 然而在用更短序列(-246~+70)的 FasL 启动子转染的细胞中, 荧光素酶活性显著下降. 后者和我们先前研究所显示的顺式元件 TCCT 位于 -301~-298 区域的结论一致. 综合上述, 这些结果显示, FasL 基因的启动子活性可被 IL-1 β 下调, 并且 IL-1 β 应答元件可能位于 FasL 启动子的 -308~-246 区域. 通过软件分析, 在 FasL 启动子的 -308~-246 区域发现了一个 IGF 特定位点和

其他位点(图 4). 因此, 需开展进一步的实验证实这些元件的确切位点.

表 1 C3H3 细胞中 IL-1 β 对 FasL 启动子区抑制作用结果

	对照	IL-1 β (12.5 ng/mL)	抑制(%)
PGL3B	35.4 $\pm$ 5.1 ^{a)}	32.6 $\pm$ 4.2	7.9
PGL3B-246	47.1 $\pm$ 4.2	41.5 $\pm$ 7.1	11.9
PGL3B-308	198.0 $\pm$ 25.5	114.2 $\pm$ 14.7	42.4 ^{b)}
PGL3B-618	222.4 $\pm$ 24.1	105.8 $\pm$ 21.2	52.4 ^{b)}

a) 荧光酶活性/ β -半乳糖苷酶活性; b) $P < 0.05$

图 3 角膜内皮细胞中 IL-1 β 对 FasL 启动子活性的抑制
C3H3 细胞转染 308 bp 的启动子片段, 分别用 0.25, 2.5 和 12.5 ng/mL IL-1 β 处理 24 h 后, 收获细胞并进行荧光素酶活性的检测. 数据通过对比 β -半乳糖苷酶活性进行标准化处理, 并以相对一个参照启动子的比例进行表示

2.3 IL-1 β 对 FasL 依赖毒性的影响

为检测 IL-1 β 是否选择性抑制 FasL 的细胞毒性, 用角膜内皮细胞去诱导 Fas⁺ 靶细胞的凋亡, 而 Fas⁻ 作为对照. 用 IL-1 β 处理或不处理角膜内皮细胞系(C3H3)后, 分别与 Fas⁺ 和 Fas⁻ 靶细胞共孵育 5 h. 如图 5 所示, C3H3 细胞诱导 Fas⁺ 靶细胞的凋亡, 但对 Fas⁻ 细胞无效. 此外, 如果用 5 ng/mL IL-1 β 预处理, C3H3 细胞对 Fas⁺ 细胞毒效应下降 90%(图 4), 这些数据表明, IL-1 β 可阻断 FasL 在角膜内皮细胞中的细胞毒功能.

图 4 FasL 启动子(-308~-246)分析结果

图5 角膜内皮细胞中 FasL 的细胞毒性效应。

C3H3 细胞用 5 ng/mL IL-1 β 预处理()或不处理(对照,)后, 与 Fas⁺ 细胞(LF+)或 Fas⁻ 细胞(LF-)共孵育。孵育 5 h 后, 收集培养上清, 然后使用计数器计数释放到培养上清中的放射性物质。所有的实验都设置副本并重复 3 次

3 讨论

本研究报道了在角膜内皮细胞中炎症因子 IL-1 β 调控小鼠 FasL 的翻译、表达、启动子活性和毒性功能。通过 ELISA 测定蛋白和 RT-PCR 检测 mRNA 表达水平, 发现 IL-1 β 可以下调角膜内皮细胞中 FasL 的翻译和基因表达。此外, 启动子荧光素酶活性测定表明, 当细胞用 IL-1 处理后, FasL 启动子的活性被抑制; IL-1 β 的应答元件可能位于 -308~246 区域。最后, 细胞毒性测定证明了 IL-1 阻断角膜内皮细胞中 FasL 依赖的细胞毒性。Fas 和 FasL 在免疫系统中介导凋亡已被研究得较为清楚。在免疫系统中, 它们通过诱导凋亡来下调包括 T 细胞介导的细胞毒性在内的免疫反应。然而, 在非淋巴组织, 如眼和小肠, 表达的 FasL 通过消除浸润的 Fas⁺ 白细胞来维持组织的完整性 [30]。许多研究证实, 内皮细胞来源的 FasL 可能调节炎症。例如, *gld* 小鼠在诸如小肠、雌性生殖道和肺等内皮组织中聚集淋巴细胞, 这些组织都含有能长期与外环境抗原接触的黏膜表面 [9,20,21]。Gochuico 等人 [21] 也报道了当小鼠由卵清蛋白导致气管过敏时, 其气管内皮中的 FasL mRNA 和蛋白的表达下调。此外, 十分引人注目的是, 在 *gld* 小鼠中, 炎症细胞浸润了黏膜下层及上呼吸道和下呼吸道的周围组织 [9,21]。很多研究显示, 在眼的角膜上皮细胞和内皮细胞中 FasL 是组成型表达的 [22,24,28], 并且可能在控制眼组织炎症细胞的浸润中起到关键作用。与此类似, Stuart 等人 [22] 证实, 异体移植后, 野生型而不是 *gld* 小鼠的角膜移植物能

够存活。免受免疫介导的组织排异被认为是由 FasL(移植物组成型表达)诱导浸润的 Fas⁺ 宿主效应 T 细胞凋亡造成的 [22~24]。大量的研究已经证实, IL-1 是一个有效的前炎症因子, 它积极地参与炎症过程, 包括免疫细胞的聚集和其他炎症因子的诱导产生, 如 IL-8, TNF- α , IL-6 和前列腺素 E2 [31]。已证实, 在眼中, 角膜内皮细胞和上皮细胞, 而不是角膜成纤维细胞, 能够在离体培养时产生 IL-1 α mRNA 和蛋白, 而 IL-1 α 蛋白在体内也是可测的 [32]。IL-1 对 FasL 表达的调控在不同的组织和眼中是有争论的。一方面, Choi 等人 [25] 报道, 用 IL-1 处理星形胶质细胞可以上调 FasL 的表达。同样, 在 IL-1 处理的角膜成纤维细胞也观察到了相同的现象 [33]。此外, IL-1 α 与 IFN- γ 共同作用可以诱导小鼠 L929 成纤维细胞的凋亡, 并使其产生 N₂O [34]。另一方面, 本研究结果显示, 在离体情况下 IL-1 β 下调 FasL 的表达及其细胞毒性功能。然而, 在角膜间质成纤维细胞中看不到 IL-1 导致的细胞死亡 [33,35]。我们推测, 角膜内皮细胞来源的 FasL 阻止免疫细胞的聚集。炎症状态的产生可能涉及 FasL 表达情况改变相对炎症细胞聚集速度的平衡关系。

总之, 目前的研究表明, IL-1 β 抑制角膜内皮细胞 FasL 的翻译和表达。这些细胞中 FasL 启动子的活性被 IL-1 β 以剂量依赖的方式降低。最后, 我们发现, IL-1 β 也会阻断角膜内皮细胞来源的 FasL 对 Fas⁺ 靶细胞的细胞毒性效应。需要进一步的实验来验证角膜中 FasL 的表达与角膜炎症的发展及发病机理的关系。

参 考 文 献

- Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science*, 1995, 267: 1449—1456[DOI]
- Watanabe-Fukunaga R, Brannan C I, Itoh N, et al. The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol*, 1992, 148: 1274—1279
- Suda T, Takahashi T, Golstein P, et al. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*, 1993, 75: 1169—1178[DOI]
- Ramsdell F, Seaman M S, Miller R E, et al. Differential ability of Th1 and Th2 T cells to express Fas ligand and to undergo activation-induced cell death. *Int Immunol*, 1994, 6: 1545—1553[DOI]
- Tanaka M, Suda T, Takahashi T, et al. Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J*, 1995, 14: 1129—1135
- Brunner T, Kasibhatla S, Pinkoski M J, et al. Expression of Fas ligand in activated T cells is regulated by c-Myc. *J Biol Chem*, 2000, 275: 9767—9772[DOI]
- Sayama K, Yonehara S, Watanabe Y, et al. Expression of Fas an-

- tigen on keratinocytes *in vivo* and induction of apoptosis in cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 1994, 103: 330—334
- 8 de Panfilis G, Semenza D, Lavazza A, et al. Keratinocytes constitutively express the CD95 ligand molecule on the plasma membrane: An *in situ* immunoelectron microscopy study on ultracryosections of normal human skin. *Br J Dermatol*, 2002, 147: 7—12[DOI]
- 9 Fine A, Anderson N L, Rothstein T L, et al. Fas expression in pulmonary alveolar type cells. *Am J Physiol*, 1997, 273: L64—L71
- 10 Zhang J, Miranda K, Ma B Y, et al. Molecular characterization of the mouse Fas ligand promoter in airway epithelial cells. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1490: 291—301
- 11 French L E, Tschopp J. Constitutive Fas ligand expression in several non-lymphoid mouse tissues: Implications for immune-protection and cell turnover. *Behring Inst Mitt*, 1996, 97: 156—160
- 12 Hanabuchi S, Koyanagi M, Kawasaki A, et al. Fas and its ligand in a general mechanism of T-cell-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 4930—4934[DOI]
- 13 Alderson M R, Tough T W, Davis-Smith T, et al. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J Exp Med*, 1995, 181: 71—77[DOI]
- 14 Griffith T S, Brunner T, Fletcher S M, et al. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*, 1995, 270: 1189—1192[DOI]
- 15 Griffith T S, Yu X, Herndon J M, et al. CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. *Immunity*, 1996, 5: 7—16[DOI]
- 16 Bellgrau D, Gold D, Selawry H, et al. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature*, 1995, 377: 630—632[DOI]
- 17 Lynch D H, Watson M L, Alderson M R, et al. The mouse Fas-ligand gene is mutated in *gld* mice and is part of a TNF family gene cluster. *Immunity*, 1994, 1: 131—136[DOI]
- 18 Reap E A, Leslie D, Abrahams M, et al. Apoptosis abnormalities of splenic lymphocytes in autoimmune *lpr* and *gld* mice. *J Immunol*, 1995, 154: 936—943
- 19 Nagata S, Suda T. Fas and Fas ligand: *lpr* and *gld* mutations. *Immunol Today*, 1995, 16: 39—43[DOI]
- 20 Hahne M, Peitsch M C, Irmeler M, et al. Characterization of the non-functional Fas ligand of *gld* mice. *Int Immunol*, 1995, 7: 1381—1386[DOI]
- 21 Gochuico B R, Miranda K M, Hessel E M, et al. Airway epithelial Fas ligand expression: Potential role in modulating bronchial inflammation. *Am J Physiol*, 1998, 274: L444—L449
- 22 Stuart P M, Griffith T S, Usui N, et al. CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis is necessary for corneal allograft survival. *J Clin Invest*, 1997, 99: 396—402
- 23 Williams K A, Standfield S D, Smith J R, et al. Corneal graft rejection occurs despite Fas ligand expression and apoptosis of infiltrating cells. *Br J Ophthalmol*, 2005, 89: 632—638[DOI]
- 24 Stuart P M, Yin X, Plambeck S, et al. The role of Fas ligand as an effector molecule in corneal graft rejection. *Eur J Immunol*, 2005, 35: 2591—2597[DOI]
- 25 Choi C, Park J Y, Lee J, et al. Fas ligand and Fas are expressed constitutively in human astrocytes and the expression increases with IL-1, IL-6, TNF-alpha, or IFN-gamma. *J Immunol*, 1999, 162: 1889—1895
- 26 Liu B, Ma J, Wei H, et al. Influence of IL-1 beta and TNF-alpha on Fas expression of human retinal pigment epithelial cells *in vitro*. *Eye Sci*, 2004, 20: 39—41
- 27 Augstein P, Heinke P, Salzsieder E, et al. Fas ligand down-regulates cytokine-induced Fas receptor expression on insulinoma (NIT-1), but not islet cells, from autoimmune nonobese diabetic mice. *Endocrinology*, 2004, 145: 2747—2752[DOI]
- 28 Zhang J, Ma B Y, Fine A. Characterization of a novel *cis*-element that regulation fas ligand expression in corneal endothelial cell. *J Biol Chem*, 1999, 274: 26537—26542[DOI]
- 29 Matsui K, Omura S, Cui H, et al. Proteasome regulation of Fas ligand cytotoxicity. *Eur J Immunol*, 1997, 27: 2269—2278[DOI]
- 30 Ferguson T A, Green D R, Griffith T S. Cell death and immune privilege. *Int Rev Immunol*, 2002, 21: 153—172[DOI]
- 31 Dinarello C A. Role of interleukin-1 in infectious diseases. *Immunol Rev*, 1992, 127: 119—146[DOI]
- 32 Dana M R, Qian Y, Hamrah P. Twenty-five-year panorama of corneal immunology: Emerging concepts in the immunopathogenesis of microbial keratitis, peripheral ulcerative keratitis, and corneal transplant rejection. *Cornea*, 2000, 19: 625—643[DOI]
- 33 Mohan R R, Liang Q, Kim W J, et al. Apoptosis in the cornea: Further characterization of Fas/Fas ligand system. *Exp Eye Res*, 1997, 65: 575—589[DOI]
- 34 Friedlander R M, Gagliardini V, Rotello R J, et al. Functional role of interleukin 1 beta (IL-1 beta) in IL-1 beta-converting enzyme-mediated apoptosis. *J Exp Med*, 1996, 184: 717—724[DOI]
- 35 Wilson S E, He Y G, Weng J, et al. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: Hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. *Exp Eye Res*, 1996, 62: 325—327[DOI]