



CD86在大鼠角膜移植排斥反应中的表达及意义

目前, 穿透性角膜移植被公认为是治疗角膜盲、恢复视力的唯一有效的方法[1]。但手术后的排斥反应威胁着角膜植片的成活, 是导致手术失败的关键。该反应是一种多因素参与的复杂过程。目前认为局部的抗原提呈细胞提呈同种异体抗原, 激活T细胞, 诱发免疫反应导致植片排斥[2][3], 但其具体机制尚未完全清楚。近年研究表明: T细胞的完全活化需要2个信号, 第1个信号是T淋巴细胞表面的TCR-CD3复合物同抗原提呈细胞上的MHC-II类抗原肽复合物结合, 赋予免疫应答的特异性; 第2个信号主要由T细胞上的CD28与抗原提呈细胞上的CD80(B7-1)和CD86(B7-2)结合所提供, 这一传导途径被称为共刺激途径[4][5]。CD80和CD86被称为共刺激分子。关于CD86在大鼠角膜组织中的原位表达, 国内尚未见报道。因此, 我们采用免疫组织化学方法检测正常和移植后发生排斥反应的角膜上CD86的表达, 并以脾脏组织中CD86的表达为对照, 以了解CD86在角膜移植排斥反应中的作用和意义。

1 材料和方法

1.1 材料

SPF级雌性Wistar大鼠12只, 为供体; 雄性SD大鼠12只, 为受体。另用SPF级雌性Wistar大鼠和雄性SD大鼠各2只作正常对照。所有动物购自第一军医大学实验动物中心。免疫组化主要试剂: 一抗为小鼠抗大鼠CD86单克隆抗体, 购自深圳晶美公司。即用型SABC免疫组化试剂盒(含生物素化羊抗小鼠IgG), 购自武汉博士德公司。

1.2 手术方法

大鼠穿透性角膜移植术参照Williams等[6]方法建立大鼠同种异体角膜移植模型。10%水合氯醛4 ml/kg·b. w. 腹腔注射麻醉, 术前冲眼, 散瞳。对术眼进行表面麻醉, 显微镜下无菌操作, 作上下眼睑牵引缝线。以环钻钻取植片(直径3.25 mm)和制作植床(直径3 mm)。受体前房注入爱维粘弹剂, 然后将植片植入植床, 以10-0尼龙缝线间断缝合8针。术毕前房内注入少量平衡盐溶液, 形成前房。结膜囊内涂0.5%四环素眼膏, 使上下睑闭合。术后每日滴氯霉素眼液, 每日2次, 每次1滴。

1.3 临床观察

自术后第1天起每天行裂隙灯显微镜观察。记录移植排斥指数(rejection index, RI), 包括: 角膜透明度、水肿度、新生血管度以及角膜排斥发生时间。评分标准参照Holland法[7], 即以混浊、水肿、新生血管3项指标进行评分。当植片的3个参数之和达到5或5以上, 或植片混浊1项达到3时, 即认为免疫排斥反应发生。

1.4 免疫组织化学染色

大鼠角膜移植术后明确诊断出现排斥反应时, 按术后5 d、7~10 d以及14 d分别取材。标本经4%多聚甲醛溶液固定、脱水, 常规石蜡包埋, 制备成5 μm厚, 连续切片备用。1张行HE染色。另取2张石蜡切片脱蜡至水后, PBS振洗, 按试剂盒说明书操作。DAB显色, 苏木素复染, 脱水透明后封片, 光镜下观察。以PBS液代替一抗作空白对照。结果判定以细胞膜呈棕黄色染色为阳性细胞。

2 结果

2.1 临床观察

术后第1天,角膜轻度水肿混浊。随时间推移水肿、混浊、厚度增加,新生血管逐渐长入植片,部分角膜植片有融解征象。排斥反应发生时间为术后5~11 d,排斥反应率为100%。

2.2 组织学及病理学改变(HE染色)

对照组的正常大鼠角膜上皮细胞层由5~6层细胞组成,基质层胶原排列整齐,无水肿、混浊,无单核细胞及淋巴细胞等炎性细胞浸润。发生排斥反应的角膜组织在急性排斥期角膜植片水肿、增厚、混浊,上皮基底细胞有空泡形成,间质结构疏松,伴大量炎细胞浸润,基质层可见新生血管管腔。

正常脾脏组织被膜完整光滑,小梁清楚,脾小结内单核细胞分布均匀。发生排斥反应的脾脏组织与正常脾脏组织差别不明显。

2.3 免疫组织化学观察

正常大鼠角膜及角膜缘未见阳性细胞表达(图1)。发生排斥反应的角膜上皮层可见大量的阳性细胞表达,CD86⁺细胞聚集出现在角膜缘和角膜植片的上皮层基底部(图2)。

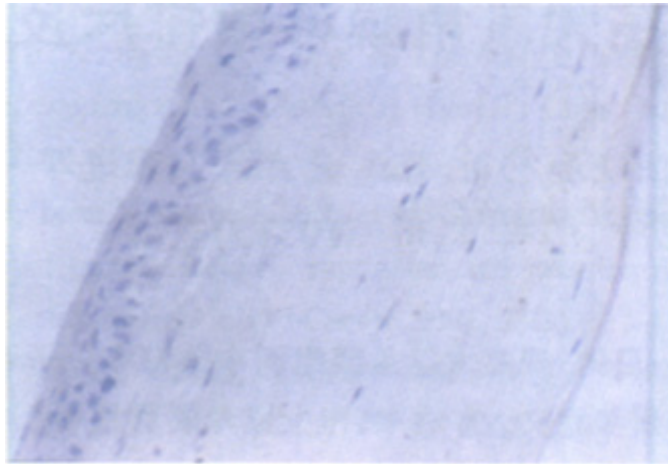


图1 正常大鼠角膜免疫组化染色无阳性细胞表达
(原放大倍数: ×400)

Fig.1 Microscopic observation of normal rat cornea showing no positive cells
(Immunohistochemical staining, original magnification: ×400)



图2 急性排斥期大鼠角膜免疫组化染色见角膜上皮层CD86阳性细胞表达 (原放大倍数: ×400)
Fig.2 Microscopic observation of the rejected rat corneal allograft showing CD86-
positive cells in the epithelium of the cornea

正常脾脏组织被膜完整光滑，小梁清楚，红髓区可见大量的阳性细胞表达；边缘区和动脉旁淋巴细胞鞘有中等程度的阳性细胞表达；白髓区CD86⁺细胞少见(图3)。发生排斥反应的脾脏组织与正常脾脏组织差别不明显。

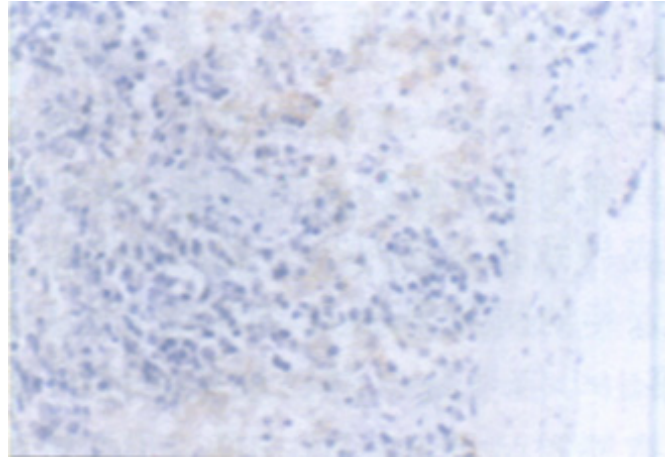


图3 正常大鼠脾脏组织免疫组化染色在红髓区可见大量CD86阳性细胞表达 (原放大倍数: $\times 400$)

Fig.3 Microscopic observation of rat spleen tissue showing numerous CD86-positive cells in the red pulp (Immunohistochemical staining, original magnification: $\times 400$)

3 讨论

目前认为共刺激途径在免疫反应中起着重要作用，共刺激分子只有在细胞上有效的表达，才可以在抗原特异性免疫应答和免疫排斥中引起T细胞亚群的成功活化。B7:CD28/CTLA-4是最重要的共刺激分子之一[4]，B7家族属于免疫球蛋白超家族，至少包括2个成员：B7-1(CD80)和B7-2(CD86)。B7分子以单体形式主要表达于单核细胞、树突状细胞和B淋巴细胞等抗原提呈细胞上。其配体为CD28/CTLA-4，表达于T细胞表面。未受抗原刺激的抗原提呈细胞中几乎不表达B7，经活化后CD80和CD86的表达显著上调。抗原提呈细胞表面CD80、CD86与T细胞上的配体CD28、CTLA-4结合，传导非抗原特异性的共刺激信号，即第二信号。缺乏共刺激信号而仅有抗原特异性信号，将导致T细胞无能甚至凋亡。正常的角膜无炎性细胞浸润，静止状态下角膜组织内的抗原提呈细胞不表达共刺激分子，所以无法检测到CD86⁺细胞。在角膜移植后，移植物表达同种异体抗原，激活抗原提呈细胞表达共刺激分子，因此在理论上应检测到CD86⁺细胞。Kuffova等[8]研究发现小鼠角膜移植后24 h植片即可检测到CD86⁺细胞，出现高峰分别在术后第2天、第6~12天和第17天，而在移植后期(术后21天后)CD86仅出现于宿主角膜基质层。但其它学者[9][10][11]仅在植片-植床区检测到少数细胞表达共刺激分子CD86或CD86，呈弱阳性表达。本研究以检测脾脏表达的阳性细胞为对照，结果与Damoiseaux等[12]的检测结果一致，说明本实验方法确实可行。CD86在正常的角膜组织上无阳性表达，在发生排斥反应的角膜上皮层有大量的阳性细胞表达，CD86⁺细胞聚集出现在角膜缘和角膜植片的上皮层基底部。本研究以术后出现排斥反应的时间分为3组：术后5 d、7~10 d以及术后14 d。检测结果表明：术后14 d角膜出现CD86⁺细胞最多。值得注意的是：(1)角膜基质层也出现阳性染色，但细胞定位欠准确，还有待于进一步研究；(2)一般认为角膜缘上皮存在成熟的Langerhans细胞，表达CD86。但本研究并未在正常角膜缘上皮检测到CD86⁺细胞。推测其原因可能与所用抗体和检测手段不同有关。

Kagaya等[11]联合使用抗CD80和抗CD86的单克隆抗体，Comer等[9]用CTLA-4抑制蛋白(CTLA4-Ig)或

表达CTLA4-Ig的腺病毒载体处理供体或受体角膜可阻断B7:CD28/CTLA-4介导的共刺激分子通路,有效延长同种异体角膜移植物的存活,这进一步证实了CD80和CD86共刺激分子在角膜移植排斥中的重要作用。因此,选择性减弱或消除抗原提呈细胞上共刺激分子的表达和活性,阻断共刺激信号,可减轻或阻断移植后排斥反应。本研究为可能的免疫治疗提供了试验依据。

参考文献:

[1] 刘海俊,钟世镇,曾静,等.自体角膜缘移植治疗兔单眼碱烧伤的实验研究[J].第一军医大学学报,2003,23(4):344-6.

Liu HJ, Zhong SZ, Zeng J, et al. Autologous limbal autograft for alkali-burned corneas in rabbit: an experimental study[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(4): 344-6.

[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,2000,20(5):313-5.

Li ZJ, Peng GH. Immunity of rejection reaction of the grafted cornea[J]. Rec Adv Ophthalmol, 2000, 20(5): 313-5.

[3] 唐娜.角膜内皮抗原及抗角膜内皮抗原抗体的提纯[J].第一军医大学学报,2002,22(1):76-8.

Tang N. Purification of corneal endothelial antigen and anti-corneal endothelial antibody[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(1): 76-8.

[4] 龚非力,主编.医学免疫学[M].北京:科学出版社,2000.6,171-9.

[5] 罗海燕,彭庶民,王永建.新鲜羊膜移植治疗眼表疾病的临床观察[J].第一军医大学学报,2003,23(5):488-9.

Luo HY, Peng SM, Wang YJ. Fresh amniotic membrane transplantation for ocular surface diseases[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(5): 488-9.

[6] Williams KA, Coster DJ. Penetrating corneal transplantation in the inbred rat: a new model[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1985, 26(1): 23-30.

[7] Holland EJ. Clinical and immunohistological studies of corneal rejection in the rat penetrating keratoplasty model[J]. Cornea, 1991,10(4): 374-81.

[8] Kuffova L, Lumsden L, Vesela V, et al. Kinetics of leukocyte and myeloid cell traffic in the murine corneal allograft response[J]. Transplantation, 2001,72(7): 1292-8.

[9] Comer RM, King WJ, Ardjomand N, et al. Effect of administration of CTLA4-Ig as protein or cDNA on corneal allograft survival[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43(4): 1095-103.

[10] Larkin DF, Calder VL, Lightman SL. Identification and characterization of cells infiltrating the graft and aqueous humour in rat corneal allograft rejection[J]. Clin Exp Immunol, 1997, 107(2): 381-91.

[11] Kagaya F, Hori J, Kamiya K, et al. Inhibition of murine corneal allograft rejection by treatment with antibodies to CD80 and CD86[J]. Exp Eye Res, 2002, 74(1): 131-9.

[12] Damoiseaux JG, Yagita H, Okumura K, et al. Costimulatory molecules CD80 and CD86 in the rat: tissue distribution and expression by antigen-presenting cells[J]. J Leukoc Biol, 1998, 64(6): 803-9.

参考文献:

[1] 刘海俊,钟世镇,曾静,等.自体角膜缘移植治疗兔单眼碱烧伤的实验研究[J].第一军医大学学报,2003,23(4):344-6.

- Liu HJ, Zhong SZ, Zeng J, et al. Autologous limbal autograft for alkali-burned corneas in rabbit: an experimental study[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(4): 344-6.
- [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, 20(5): 313-5.
Li ZJ, Peng GH. Immunity of rejection reaction of the grafted cornea[J]. Rec Adv Ophthalmol, 2000, 20(5): 313-5.
- [3] 唐娜. 角膜内皮抗原及抗角膜内皮抗原抗体的提纯[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(1): 76-8.
Tang N. Purification of corneal endothelial antigen and anti-corneal endothelial antibody[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(1): 76-8.
- [4] 龚非力, 主编. 医学免疫学[M]. 北京: 科学出版社, 2000. 6, 171-9.
- [5] 罗海燕, 彭庶民, 王永建. 新鲜羊膜移植治疗眼表疾病的临床观察[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(5): 488-9.
Luo HY, Peng SM, Wang YJ. Fresh amniotic membrane transplantation for ocular surface diseases[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(5): 488-9.
- [6] Williams KA, Coster DJ. Penetrating corneal transplantation in the inbred rat: a new model[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1985, 26(1): 23-30.
- [7] Holland EJ. Clinical and immunohistological studies of corneal rejection in the rat penetrating keratoplasty model[J]. Cornea, 1991, 10(4): 374-81.
- [8] Kuffova L, Lumsden L, Vesela V, et al. Kinetics of leukocyte and myeloid cell traffic in the murine corneal allograft response[J]. Transplantation, 2001, 72(7): 1292-8.
- [9] Comer RM, King WJ, Ardjomand N, et al. Effect of administration of CTLA4-Ig as protein or cDNA on corneal allograft survival[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43(4): 1095-103.
- [10] Larkin DF, Calder VL, Lightman SL. Identification and characterization of cells infiltrating the graft and aqueous humour in rat corneal allograft rejection[J]. Clin Exp Immunol, 1997, 107(2): 381-91.
- [11] Kagaya F, Hori J, Kamiya K, et al. Inhibition of murine corneal allograft rejection by treatment with antibodies to CD80 and CD86[J]. Exp Eye Res, 2002, 74(1): 131-9.
- [12] Damoiseaux JG, Yagita H, Okumura K, et al. Costimulatory molecules CD80 and CD86 in the rat: tissue distribution and expression by antigen-presenting cells[J]. J Leukoc Biol, 1998, 64(6): 803-9.