

CD86在大鼠角膜移植排斥反应中的表达及意义

白浪¹, 陆晓和¹, 周瑾¹, 党森涛¹, 张进华²(¹第一军医大学珠江医院眼科, 广东 广州 510282; ²第一军医大学肿瘤研究所, 广东 广州 510515)

摘要:目的 观察大鼠角膜组织中共刺激分子 CD86(B7-2)的原位表达,以了解共刺激分子在大鼠角膜移植排斥反应中的作用和意义。方法 制作大鼠角膜移植模型,观察角膜透明度、新生血管。采用免疫组化法检测 CD86 在角膜、脾脏组织中的表达。结果 术后角膜植片均出现不同程度的新生血管,角膜水肿、混浊,基质增厚。CD86 在正常的角膜组织中无阳性表达;在移植后出现急性排斥反应的角膜上皮层中有大量阳性细胞表达。在脾脏的阳性细胞表达与文献报道的一致。结论 共刺激分子 CD86 在移植后发生排斥的角膜组织中的阳性表达,可能与免疫排斥反应有关。

关键词:共刺激分子;CD86 (B7-2);角膜;移植排斥反应;免疫组织化学

中图分类号:Q571;Q461 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2004)05-0533-03

Immunohistochemical study of *in situ* CD86 expression in rejected rat corneal graft after penetrating keratoplasty

BAI Lang¹, LU Xiao-he¹, ZHOU Jin¹, DANG Sen-tao¹, ZHANG Jin-hua²

¹Department of Ophthalmology, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China;

²Institute of Cancer Research, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To investigate the expression of CD86 co-stimulatory molecules in rejected rat corneal graft *in situ* after penetrating keratoplasty. **Methods** Rat models of orthotopic corneal transplantation were established, and after the occurrence of graft rejection, immunohistochemical staining was performed on the corneal whole-mounts and the spleen tissue of the recipient rats. **Results** CD86⁺ cells were detected in the epithelium of the corneal graft during allograft rejection but not in normal cornea. **Conclusion** *In situ* expression of costimulatory molecules in the corneal allograft may be related to the acute immune rejection after penetrating keratoplasty.

Key words: co-stimulatory molecule; CD86 (B7-2); cornea; allograft rejection; immunohistochemistry

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。近年的研究表明: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

收稿日期:2003-11-03

基金项目:广东省自然科学基金(032839)

Supported by Natural Science Foundation of Guangdong Province (032839)

作者简介:白浪(1968-),女,1993年毕业于第一军医大学,现为在读硕士研究生,主治医师,电话:020-61641888-87325

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)。

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 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

(Immunohistochemical staining, original magnification: ×400)

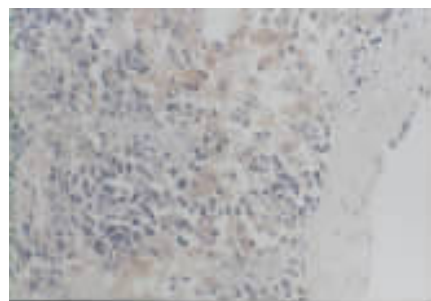


图 3 正常大鼠脾脏组织免疫组化染色在红髓区可见大量 CD86 阳性细胞表达(原放大倍数:×400)

Fig.3 Microscopic observation of rat spleen tissue showing numerous CD86-positive cells in the red pulp

(Immunohistochemical staining, original magnification: ×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^[9-11]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

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.