

ICOS 共刺激通路参与角膜移植免疫排斥反应的研究

袁 伟 陆晓和 宫玉波 周 瑾 杨旭冉 汤明芳

The role of ICOS co-stimulatory passageway on corneal transplantation rejection

Yuan Wei, Lu Xiaohe, Gong Yubo, Zhou Jin, Yang Xuran, Tang Mingfang. Department of Ophthalmology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, China

Abstract Objective Researches demonstrated that inducible co-stimulator (ICOS)-mediated co-stimulatory passageway plays a critical role during multi-organ transplantation rejection. However, its influence on corneal graft rejection is unclear. Present study was to investigate the expression of ICOS protein and ICOS mRNA in rejected rat corneal allografts and the expression of CD3⁺ ICOS⁺ T/CD3⁺ T in rejected rat peripheral blood and explore the relationship between ICOS co-stimulator passageway and immune rejection. **Methods** Corneal allograft transplantation was performed orthotopically from 10 Wistar rats to 20 SD rats (Wistar→SD). Corneal samples were collected on day 7, 14 postoperatively. Immunohistochemistry was used to detect the expression and distribution of ICOS protein in corneal grafts. RT-PCR was used for the detection of expression of ICOS mRNA. The expression of CD3⁺ ICOS⁺ T/CD3⁺ T in peripheral blood of SD rats was evaluated using flow cytometry. Ten healthy eyes from 5 normal SD rats were as control group. **Results** The grafts rejection occurred in postoperative day 14, showing the thickness increase of corneal grafts and infiltration of inflammatory cells. ICOS protein and ICOS mRNA were not detected in normal rat cornea but were expressed on graft tissue from 7 days through 14 days after transplantation and peaked on the 14th day after operation. Compared with the normal rats, CD3⁺ ICOS⁺ T/CD3⁺ T expression in peripheral blood was elevated on the 7th and 14th days after transplantation with the highest level on the 14th day. **Conclusion** The ICOS mRNA and ICOS protein are overexpressed in graft tissue during the allograft rejection. ICOS co-stimulatory passageway may be associated to the acute immune rejection after penetrating keratoplasty.

Key words cornea transplantation; rejection; inducible co-stimulator

摘要 目的 研究可诱导共刺激分子(ICOS)共刺激通路与角膜移植急性免疫排斥反应的关系。**方法** 建立大鼠同种异体穿透角膜移植模型,分别于术后7d、14d取植片进行病理学观察,采用RT-PCR法检测植片组织 ICOS mRNA 的表达情况,免疫组织化学法检测植片组织淋巴细胞 ICOS 蛋白水平;同时采用流式细胞术检测外周血 CD3⁺ ICOS⁺ T/CD3⁺ T 的表达情况。均以正常大鼠作为正常对照。**结果** 正常大鼠角膜组织未检测到 ICOS 蛋白及 ICOS mRNA 的表达,移植术后植片组织可以检测到 ICOS 蛋白及 ICOS mRNA 的表达,且术后 14 d 高于术后 7 d ($P=0.000$);与正常大鼠外周血 CD3⁺ ICOS⁺ T/CD3⁺ T 的表达相比术后表达皆升高(方差齐性, $P=0.156$),且术后 14 d 外周血 CD3⁺ ICOS⁺ T/CD3⁺ T 的表达高于术后 7 d 的表达 ($P=0.000$)。**结论** 共刺激分子 ICOS 与角膜移植急性免疫排斥反应密切相关。

关键词 角膜移植; 排斥反应; 可诱导共刺激分子

分类号 R 772 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)04-0275-04

研究认为角膜移植免疫排斥反应主要是 T 细胞介导的迟发型超敏反应,是多种免疫细胞和分子共同

参与、相互调节的复杂过程。T 细胞活化需要两个信号的参与,即 MHC-抗原肽信号和共刺激信号。如缺乏共刺激分子提供的共刺激信号,T 细胞则不能活化而处于无能状态。在 T 细胞活化的不同阶段,多种共刺激分子发挥着重要的调节作用。其中可诱导共刺激分子(inducible co-stimulator, ICOS)是新近发现的一种重要的共刺激分子^[1]。以 ICOS 介导的共刺激通路在多

本课题为广东省自然科学基金资助(04020438)

作者单位:510280 广州,南方医科大学珠江医院眼科[袁伟(研究生,现在济南军区青岛第一疗养院,青岛 266070)、陆晓和、宫玉波、周瑾、汤明芳;730000 兰州,武警甘肃总队医院检验科(杨旭冉)]

通讯作者:陆晓和 (Email:banana1619@163.com)

种器官移植免疫排斥中发挥重要作用^[2-4]。我们通过建立大鼠同种异体穿透角膜移植模型,研究 ICOS 共刺激通路与角膜移植急性免疫排斥反应的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 健康清洁级 Wistar 大鼠 10 只为供体,SD 大鼠 20 只为受体,另取 5 只健康清洁级 SD 大鼠(10 只眼)作为正常对照。雌雄兼用,体重 200 ~ 250 g,鼠龄 2 ~ 3 个月。南方医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂及药物 羊抗大鼠 ICOS 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);RT-PCR 试剂盒、Trizol 试剂盒(南京凯基生物公司);FITC 标记的抗大鼠 CD3 mAb 及匹配的同型对照(美国 Biolegend 公司);PE 标记的抗大鼠 ICOS mAb 及匹配的同型对照(英国 Serotec 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的制作 术前 20 min 以 0.5% 托品酰胺滴眼液散瞳,腹腔注射 3% 戊巴比妥钠溶液 1.5 mL/kg 麻醉。术前消毒,常规无菌操作,参照 William 等^[1]的方法在手术显微镜下进行。首先于供体角膜中央区钻取直径为 3.5 mm 植片,置于 Healon 中备用。在受体大鼠右眼行穿透角膜移植术。做上下眼睑牵引线,用直径 3.0 mm 环钻钻取中央区角膜,将植片置于植床,以 10-0 尼龙丝线间断缝合 8 针,线结暴露不包埋。手术做部分改进,以黏弹剂 Healon 代替平衡盐溶液,维持前房。术毕散瞳,结膜下注射庆大霉素 2 000 U,结膜囊涂四环素眼膏,缝合睑缘。24 h 后拆除睑缘缝线观察角膜植片情况。角膜缝线在整个观察期内不拆除。

1.2.2 术后观察 术后第 1 d 开始在裂隙灯显微镜下进行临床观察,参照 Larkin 等^[5]的评分标准,记录每日排斥反应指数(rejection index, RI),当 RI > 5 或植片混浊一项达到 3 时,即认为排斥反应发生。

1.2.3 术后取材 移植组及正常对照组大鼠分别于术后 7 d、14 d 随机取 10 只大鼠,麻醉后心脏采血行流式细胞术检测;处死大鼠,取角膜分别行苏木精-伊红染色、免疫组织化学及 RT-PCR 检测。

1.2.4 苏木精-伊红染色 将角膜植片于 10% 甲醛溶液中固定,常规石蜡包埋,4 μm 厚连续切片,常规行苏木精-伊红染色,光学显微镜下观察。

1.2.5 免疫组织化学染色 取植片置于 4% 多聚甲醛溶液固定、脱水,常规石蜡包埋,行免疫组织化学染色。以试剂盒中未染色的已知阳性对照片与被测标本同

时染色作阳性对照,以 PBS 取代一抗作阴性对照,两种标记物均以细胞膜呈棕黄色染色者为阳性细胞。

1.2.6 RT-PCR 检测 ICOS mRNA 取完整植片,采用 Trizol 法提取总 RNA,紫外分光光度计测定大鼠角膜 RNA 浓度,利用提取大鼠角膜 RNA 行逆转录为 cDNA。引物设计合成:ICOS 上游引物为 5'-CCCTACTTCTCGTGCCTCTT-3',下游引物为 5'-GTGTTTCCGCTTCCCTTG-3',扩增片段长度为 215 bp;内参照:G₃ PDH 上游引物为 5'-TATCGGACGCCTGGTTAC-3',下游引物为 5'-TTCCATTCTCAGCCTTG-3',扩增片段长度为 159 bp。RT-PCR 反应条件:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 40 s,58 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 40 s,30 个循环,72 °C 再延伸 5 min。扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,利用凝胶成像分析系统观察电泳结果及图像分析,计算待测基因与 G₃ PDH 灰度值的比值并比较。

1.2.7 流式细胞术检测外周血 CD3⁺ICOS⁺T/CD3⁺T 将移植术后不同时间点大鼠麻醉后,心脏采血 1.0 mL,并放入 EDTA 抗凝管中,正常 SD 大鼠作为对照。检测方法:取 100 μL EDTA 抗凝大鼠全血,加入 10 μL FITC 标记的抗大鼠 CD3 单克隆抗体及 10 μL PE 标记的抗大鼠 ICOS 单克隆抗体,室温反应 20 min;加红细胞裂解液 2 mL 充分裂解;用含 1% BSA 的 PBS 洗 2 次,上机检测。并用 CellQuest 软件分析结果。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件对数据进行统计学处理。两组间比较用独立样本 *t* 检验;3 组以上均数比较应用单因素方差分析,样本均数间的多重比较采用 LSD-*t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 术后裂隙灯观察

角膜移植术后 1 d,可见角膜轻度水肿和混浊,随时间推移角膜植片水肿、混浊逐渐加重,厚度逐渐增加;术后 3 d,部分角膜缘可见新生血管开始向角膜生长;术后 5 d 起,排斥反应的各项观测指标出现明显变化;术后 7 d 时,所有移植大鼠 RI 均 < 5,且植片混浊一项均未达到 3;至 14 d 时大鼠均已发生排斥反应。

2.2 苏木精-伊红染色及病理学观察

苏木精-伊红染色结果显示:正常大鼠角膜上皮细胞层由 5 ~ 6 层细胞构成,上皮结构完整;基质层胶原排列整齐。角膜组织无水肿、增厚及混浊,无单核细胞及淋巴细胞等炎性细胞浸润。术后 7 d 角膜植片厚度增加,角膜基质出现水肿增厚,纤维排列紊乱,可见炎性

细胞浸润;术后 14 d 植片厚度增加明显,角膜基质水肿增厚显著,纤维排列紊乱,大量炎性细胞浸润,在移植床和移植片交接处尤为明显。

2.3 免疫组织化学染色

正常大鼠角膜组织各层均未见 ICOS 阳性淋巴细胞;术后 7 d 植片上皮层、基质层出现 ICOS 阳性淋巴细胞,主要集中在角膜前基质层;术后 14 d 角膜植片基质层可见大量 ICOS 阳性淋巴细胞,较 7 d 时明显增多,阳性细胞主要集中在移植床和移植片交接处,角膜前基质 ICOS 阳性淋巴细胞较后基质层更为多见(图 1,2)。

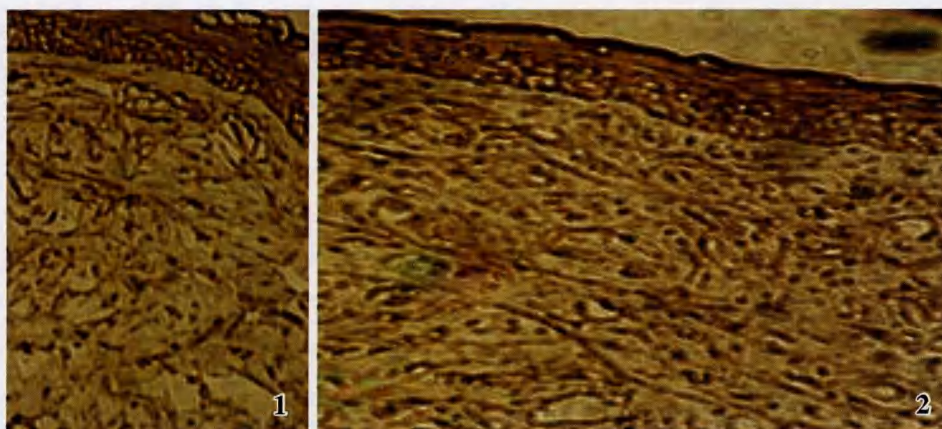


图 1 移植术后 7 d 植片组织可见 ICOS 蛋白表达(SABC ×200) 图 2 移植术后 14 d 植片组织 ICOS 蛋白表达明显高于术后 7 d(SABC ×200)
Fig.1 ICOS protein is expressed on the cell membrane in epithelial and stroma layers of cornea on the 7th day after corneal transplantation, showing the brown staining(SABC ×200) Fig.2 The ICOS protein positive cells are obviously increased on graft tissue on the 14th day after corneal transplantation(SABC ×200)

2.4 RT-PCR 检测

正常大鼠角膜组织未检测到 ICOS mRNA 的表达;植片 ICOS 的 PCR 产物凝胶电泳条带灰度比值术后 7 d 为 1.168 ± 0.190 , 术后 14 d 为 1.525 ± 0.139 。术后 14 d 与术后 7 d 相比,差异有统计学意义($t = -4.812, P = 0.000$)(图 3)。

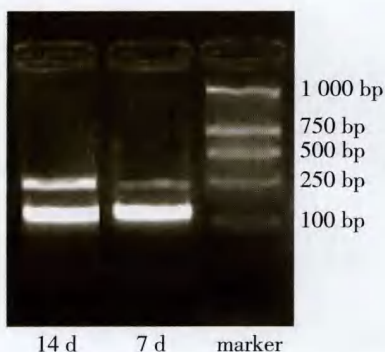


图 3 移植术后 7 d、14 d 植片 ICOS mRNA 的表达

Fig.3 The expression of ICOS mRNA on the 7th day and 14th day after transplantation

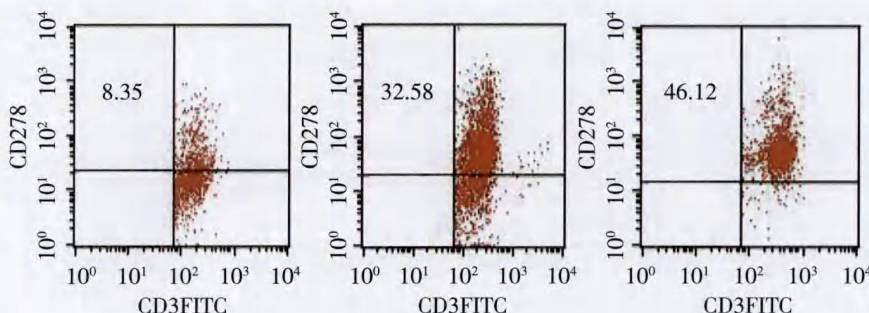


图 4 正常大鼠移植术后 7 d、14 d 外周血 CD3⁺ICOS⁺T/CD3⁺T 的表达

Fig.4 Positive rate of CD3⁺ICOS⁺T/CD3⁺T in peripheral blood of normal rats, transplanting 7-day rats and transplanting 14-day rats

2.5 流式细胞术检测

正常大鼠外周血 CD3⁺ICOS⁺T/CD3⁺T 表达为 $(7.354 \pm 1.114)\%$, 术后 7 d 为 $(31.521 \pm 1.995)\%$, 术后 14 d 为 $(45.602 \pm 2.034)\%$ ($F = 2067.263, P = 0.000$)。与正常大鼠相比,术后 7 d、14 d 外周血 CD3⁺ICOS⁺T/CD3⁺T 表达均升高,且 14 d 时较 7 d 时升高更加明显,差异均有统计学意义($P < 0.05$)(图 4)。

3 讨论

近年来对 T 淋巴细胞活化的研究表明,T 细胞要发挥效应除了特异性抗原信号作用于 T 细胞受体外,还需要抗原递呈细胞递呈的共刺激信号激

活。阻断其共刺激信号可诱导 T 细胞凋亡或者呈现无能状态。在诱导 T 细胞活化的共刺激分子中,研究最广泛的共刺激信号是 B7/CD28 分子^[5]。

ICOS 是 Hutloff 等^[6]在激活的人外周血 T 细胞中首次认定的。基于 ICOS 与 CD28 结构相似、基因位点相近,而且为 T 细胞活化提供共刺激信号,故将其化归为 CD28 家族。ICOS 具有较强的共刺激效应,与 CD28 组成型表达在静止 T 细胞表面不同,其只表达于活化的 T 细胞上^[7-8],说明 ICOS 不能活化 T 细胞而产生初次免疫应答但能够维持 T 细胞的免疫力。目前研究发现 ICOS 对 Th 细胞分化有重要影响,Th1 和 Th2 细胞都受到 ICOS 的调节^[8-11];ICOS 还可以刺激 T 细胞增生并分泌细胞因子,尤其是 IL-10 及 IL-4、IL-5、IFN- γ 、TNF- α 和 GM-CSF 的分泌^[11-12];此外 ICOS 还能够促进 T/B 细胞协同,影响抗体类型转换,与其他

共刺激途径相互作用^[13-14]。许多研究证实阻断共刺激信号诱导 T 细胞进入低反应状态或者引起凋亡,是促进抗原特异性器官移植耐受的有效方法^[15]。目前国内外很多学者已经将 ICOS/ICOSL 应用于移植排斥的防治研究当中,诸多研究提示其与心脏移植、肝脏移植等多种器官移植免疫排斥反应有关。

本研究发现:正常大鼠角膜组织未检测出 ICOS mRNA 表达,也未检测到 ICOS 阳性淋巴细胞,这与正常大鼠角膜组织各层均无淋巴细胞浸润的特征相符;移植术后植片可检测到 ICOS 蛋白及 mRNA 的表达,ICOS 阳性淋巴细胞主要集中于植片基质层,尤以植片与植床交接处明显,且术后 14 d 植片 ICOS 蛋白及 mRNA 的表达高于术后 7 d;正常大鼠外周血 CD3⁺ ICOS⁺ T/CD3⁺ T 的表达为(7.354 ± 1.114)%,移植术后 7 d、14 d 大鼠 CD3⁺ ICOS⁺ T/CD3⁺ T 表达均升高,14 d 时升高尤为明显。结合术后裂隙灯观察结果,术后 7 d 大鼠均发生排斥反应,而术后 14 d 大鼠均已发生角膜移植急性免疫排斥反应,ICOS 蛋白及 mRNA 表达结果及外周血流式细胞术结果提示共刺激分子 ICOS 与角膜移植免疫排斥反应关系密切。

参考文献

- 1 Williams KA, Coster DJ. Penetrating corneal transplantation in the inbred rat: a new model [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1985, 26(1): 23 - 30
- 2 Guo L, Li XK, Funeshima N, et al. Prolonged survival in rat liver transplantation with mouse monoclonal antibody against an inducible costimulator (ICOS) [J]. Transplantation, 2002, 73(7): 1027 - 1032
- 3 Salama AD, Yuan X, Nayer A, et al. Interaction between ICOS-B7RP1 and B7-CD28 costimulatory pathways in alloimmune responses in vivo [J]. Am J Transplant, 2003, 3(4): 390 - 395
- 4 Guo L, Li XK, Enosawa S, et al. Significant enhancement by anti-ICOS

- antibody of suboptimal tacrolimus immunosuppression in rat liver transplantation [J]. Liver Transplant, 2004, 10(6): 743 - 747
- 5 Larkin DFP, Calder VL, Lightman SL. Identification and characterization of cells infiltrating the graft and aqueous humor in rat corneal allograft rejection [J]. Clin Exp Immunol, 1997, 107: 381 - 391
- 6 Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, et al. ICOS is an inducible T-cell costimulator structurally and functionally related to CD28 [J]. Nature, 1999, 397(6716): 263 - 266
- 7 Sperling AI, Bluestone JA. ICOS costimulation: It's not just for TH2 cells anymore [J]. Nat Immunol, 2001, 2(7): 573 - 574
- 8 Mages HW, Hutloff A, Heuck C, et al. Molecular cloning and characterization of murine ICOS and identification of B7h as ICOS ligand [J]. Eur J Immunol, 2000, 30(4): 1040 - 1047
- 9 Rulifson IC, Sperling AI, Fields PE, et al. CD28 costimulation promotes the production of Th2 cytokines [J]. J Immunol, 1997, 158(2): 658 - 665
- 10 Rottman JB, Smith T, Tonra JR, et al. The costimulatory molecule ICOS plays an important role in the immunopathogenesis of EAE [J]. Nat Immunol, 2001, 2(7): 605 - 611
- 11 Witsch EJ, Peiser M, Hutloff A, et al. ICOS and CD28 reversely regulate IL-10 on re-activation of human effector T cells with mature dendritic cells [J]. Eur J Immunol, 2002, 32(9): 2680 - 2686
- 12 Kopf M, Coyle AJ, Schmitz N, et al. Inducible costimulator protein (ICOS) controls T helper cell subset polarization after virus and parasite infection [J]. J Exp Med, 2000, 192(1): 53 - 61
- 13 Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, et al. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS [J]. Nature, 1999, 402(6763): 827 - 832
- 14 Ozkaynak E, Gao W, Shemmeri N, et al. Importance of ICOS-B7RP-1 costimulation in acute and chronic allograft rejection [J]. Nat Immunol, 2001, 2(7): 591 - 596
- 15 Li W, Lu L, Wang Z, et al. Costimulation blockade promotes the apoptotic death of graft-infiltrating T cells and prolongs survival of hepatic allografts from FLT3L-treated donors [J]. Transplantation, 2001, 72(8): 1423 - 1432

(收稿:2008-06-21 修回:2008-10-22)

(本文编辑:刘艳)

读者·作者·编者

英文参考文献著录的注意事项

按照我国出版物中的文后参考文献的著录规则,英文的参考文献主要涉及主要责任者、题名、版本、出版项(出版地、出版者、出版日期)、期刊名称、出版年、卷(期)和页码等信息。

1 主要责任者的著录方法

1.1 个人著者采用姓在前用全称,名在后用缩写的著录形式。一般来说,国外作者在发表文章时常采用名前姓后的形式,所以在著录参考文献时应注意交换原文中作者姓名的书写顺序。

1.2 姓名中若表示“小”或“几世”时,应将其放置于姓名最后,并用逗号隔开,如 Day FW, Jr.

1.3 西方人姓名中的 von, van, de, la 为姓的组成部分,当其移至前面时,首字母大小写均可,如 von Hindenberg P.

1.4 如姓名中出现复姓时,著录格式为夫姓-妇姓在前均用全称,名在后用缩写的形式。

1.5 著作方式相同的责任者不超过 3 人时,可全部照录。责任者超过 3 人时,只著录前 3 位责任者,其后加“et al”字样。

1.6 集体责任者,可直接按照著录来源著录,每个词的首字母大写。

(本刊编辑部)