

# CD86 在排斥反应和前房相关免疫偏离过程中的作用

白浪 陆晓和 党森涛 周瑾 张进华

## The effects of CD86 in rejection after penetrating keratoplasty and ACAID in rats

Bai Lang, Lu Xiaohe, Dang Sentao, Zhou Jin, Zhang Jinhua. Department of Ophthalmology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

**Abstract Objective** To investigate the expression of CD86, a co-stimulatory molecule, during corneal allograft rejection and anterior chamber associated immune deviation (ACAID). **Methods** Corneal transplantation was performed orthotopically from 15 Wistar donor rats to 70 SD recipients rats. The SD rats were divided into corneal transplantation group (30 rats), ACAID group (30 rats) and ACAID control group (10 rats, group I). ACAID was induced by injection of splenocytes suspension from the same Wistar donor rats into anterior chamber of the right eyes. Three female Wistar rats and 3 male SD normal rats were used as normal controls. Rejection index were determined under the slit-lamp biomicroscope at transplantation group based on the score of edema, opacity and neovascularization of graft. DTH response to alloantigen were evaluated by measuring an ear swelling height at ACAID group. The cornea of those rats was enucleated at 1, 2, 4 weeks after operation, and the expression of CD86 on the cornea whole-mounts was detected using immunohistochemistry, and spleen tissue was as positive control. **Results** The corneal grafts rejection occurred after transplantation and peaked in 7-11 days with the  $RI \geq 6$ . Cornea was clear in ACAID group during the observed period. The edema, vacuolar degeneration of cornea epithelial cells, infiltration of inflammatory cells and new blood vessel were found in graft of transplantation group, but the corneal structure was normal in ACAID group. No CD86<sup>+</sup> cell was seen in normal cornea, however, a lots of CD86<sup>+</sup> positive cells were found in corneal epithelium in allograft rejection of transplantation group. ACAID was induced successfully at two or four weeks after injection of splenocytes, and no CD86<sup>+</sup> cell was detected in corneal epithelia. The edema of ear edge was significantly mild in ACAID group compared with negative control group. **Conclusion** Expression of costimulatory molecules CD86 in cornea in situ may be related to the acute immune rejection after penetrating keratoplasty. CD86<sup>+</sup> cells are not presented on corneal epithelium of ACAID eye. This result suggests that CD86 may have no relationship with immune privilege.

**Key words** CD86; penetrating keratoplasty; allograft rejection; anterior chamber-associated immune deviation; immunohistochemistry

**摘要 目的** 检测大鼠角膜共刺激分子 CD86(B7-2)的原位表达,探讨 CD86 分子与角膜移植排斥反应和前房相关免疫偏离(ACAID)过程的关系。**方法** 制作穿透角膜移植排斥反应和同一供体前房内注射脾细胞诱导 ACAID 的大鼠模型;角膜移植组进行排斥反应指数(RI)评分;ACAID 组进行迟发型超敏反应(DTH)评价;采用免疫组织化学的方法检测 CD86 在角膜中的原位表达(以脾脏的表达为阳性对照)。**结果** 角膜移植组植片均出现不同程度的新生血管、角膜水肿、混浊、增厚;ACAID 组角膜透明,房水清,DTH 评价术后 2 周及 4 周诱导成功率 100%;免疫组织化学检测 CD86 在正常大鼠角膜组织全层无阳性表达,在移植后出现急性排斥反应的大鼠角膜上皮层中有大量阳性细胞表达,在 ACAID 诱导成功的大鼠角膜中未见阳性细胞表达。**结论** 共刺激分子 CD86 参与移植后的急性排斥反应,但可能不参与免疫赦免过程。

**关键词** CD86; 穿透角膜移植; 移植排斥反应; 前房相关免疫偏离; 免疫组织化学

**分类号** R 779.65 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)09-0751-04

本课题为广东省自然科学基金资助(032839)

作者单位:510515 广州,南方医科大学南方医院眼科(白浪,博士研究生,现在广州同和南方医院眼科 510515);510282 广州,南方医科大学珠江医院眼科(陆晓和、党森涛、周瑾);510515 广州,南方医科大学肿瘤研究所(张进华)

通讯作者:陆晓和(E-mail:bailangsfy@126.com)

眼前节具有免疫双重性,一方面,对进入的抗原产生免疫反应,如角膜移植后针对移植物产生免疫排斥(激活T细胞引起Th1占主导的免疫反应);另一方面,可在一定程度上减轻免疫炎症对视力的影响,如前房相关免疫偏离(anterior chamber associated immune deviation, ACAID)(免疫赦免状态)<sup>[1-2]</sup>。这种特殊的免疫反应能力是否与诱发免疫反应的抗原递呈细胞(antigen present cell, APC)递呈的第二信号(共刺激分子)的表达有关?本研究建立穿透角膜移植排斥反应和ACAID的大鼠模型,检测2种相反免疫状态下角膜共刺激分子CD86的原位表达,对比研究CD86的表达与角膜移植排斥反应和免疫赦免过程的关系,探讨其在决定免疫反应发展方向的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物及分组** SPF级雌性Wistar鼠15只(30只眼)为供体;清洁级雄性SD鼠70只(70只眼)为受体,体重200~250g,分为角膜移植组30只,ACAID组40只,均取右眼进行操作。ACAID组随机分为阴性对照组及ACAID术后1、2、4周组,各10只。另清洁级雌性Wistar鼠和雄性SD鼠各3只(共12只眼)作正常对照组。所有动物购自南方医科大学动物实验中心。

**1.1.2 主要试剂** 一抗为小鼠抗大鼠CD86单克隆抗体(克隆号24F,美国eBioscience公司)(一抗工作浓度为0.2mg/mL);即用型SABC免疫组织化学试剂盒(含生物素化羊抗小鼠IgG)(武汉博士德公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 穿透角膜移植术** 参照文献[3]的方法建立大鼠同种异体穿透角膜移植模型:10%水合氯醛4mL/kg腹腔注射麻醉,术前氯霉素滴眼液冲眼,散瞳,表面麻醉,显微镜下无菌操作,做上下眼睑牵引缝线,环钻钻取,制作植片(直径3.25mm)和植床(直径3mm),受体前房注入玻璃酸钠,将植片植入植床,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,球结膜下注射庆大霉素2000U,结膜囊内涂0.5%四环素眼膏,使上下睑闭合。术后每日点用氯霉素滴眼液,每日2次,每次1滴。

**1.2.2 脾细胞前房内注射诱导ACAID** 参照文献[4]的方法制备脾细胞悬液及前房接种诱导建立ACAID的大鼠模型。(1)脾细胞悬液的制备:断颈处死大鼠,浸入75%乙醇中5min,无菌条件下取出脾脏,不锈钢网碾碎,制成单细胞悬液,0.1%低渗Hank

平衡盐液(Hank balanced salt solution, HBSS)溶解红细胞,洗涤3次,记数,重悬于HBSS,制成 $5 \times 10^6$ 与角膜移植组同一供体的脾细胞悬液。(2)前房接种诱导ACAID:腹腔注射麻醉后,使用微量注射器在右眼角膜缘内1mm处行前房穿刺,将上述脾细胞悬液10 $\mu$ L接种于前房。术后每日点用氯霉素滴眼液,每日2次,每次1滴。

**1.2.3 临床观察与评价** 角膜移植组:术后每日行裂隙灯显微镜观察。观察角膜混浊、水肿及新生血管的情况并进行评分(评分标准参照文献[5]),三项评分之和为排斥反应指数(rejection index, RI),当 $RI \geq 6$ 时,即为免疫排斥反应发生,记录排斥反应发生时间。ACAID组:30只大鼠行右眼前房注射与角膜移植组同一供体脾细胞,分别于术后1、2、4周各取10只行迟发型超敏反应(delayed-type hypersensitivity, DTH)评价。前房注射术后至行DTH评价前每日行裂隙灯显微镜观察,观察项目同角膜移植组。

**1.2.4 DTH评价方法** 行DTH评价前1周预先将大鼠致敏(上述脾细胞悬液皮下多点注射),评价时将上述浓度的脾细胞悬液10 $\mu$ L注入大鼠的右耳缘;阴性对照组大鼠左耳缘注入10 $\mu$ L磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)作为对照。分别于注射前和注射后24h用游标卡尺测量双侧耳缘厚度。耳缘肿胀程度计算公式:耳缘肿胀程度=(注射后24h右耳测量值-注射前右耳测量值)-(注射后24h左耳测量值-注射前左耳测量值)。

**1.2.5 免疫组织化学染色(SABC法)** 正常对照组直接切取带角膜缘的角膜和脾脏;角膜移植组按急性排斥反应的不同时相:术后5d、7~10d以及术后2周分别切取角膜;ACAID组选择DTH评价后无DTH阳性反应的大鼠切取角膜。标本经4%多聚甲醛溶液固定、脱水、常规石蜡包埋,制成5 $\mu$ m厚的连续切片。分别行苏木精-伊红染色和CD86免疫组织化学染色。以PBS代替一抗作空白对照,光镜下观察,结果判定以细胞膜呈棕黄色染色为阳性细胞。

### 1.3 统计学方法

采用SPSS 10.0统计学软件对数据进行统计学分析。大鼠耳缘肿胀程度的测量值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各ACAID组大鼠耳缘肿胀程度的总体比较采用单因素方差分析,各组间的两两比较采用Dunnett *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 裂隙灯观察

角膜移植组:术后第 1 天,角膜轻度水肿、混浊,术后 3~5 d,水肿、混浊厚度增加,新生血管逐渐长入植片,术后 9~14 d,部分角膜植片有融解征象。角膜移植后全部大鼠在观察期(3 周)内发生了不同程度的排斥反应。RI 随时间变化的关系见图 1。在术后 7~11 d 角膜植片的 RI ≥ 6,达到排斥反应的诊断标准。排斥反应发生时间为 7~11 d。ACAID 组:术后角膜保持透明,前房清,无炎症征象。

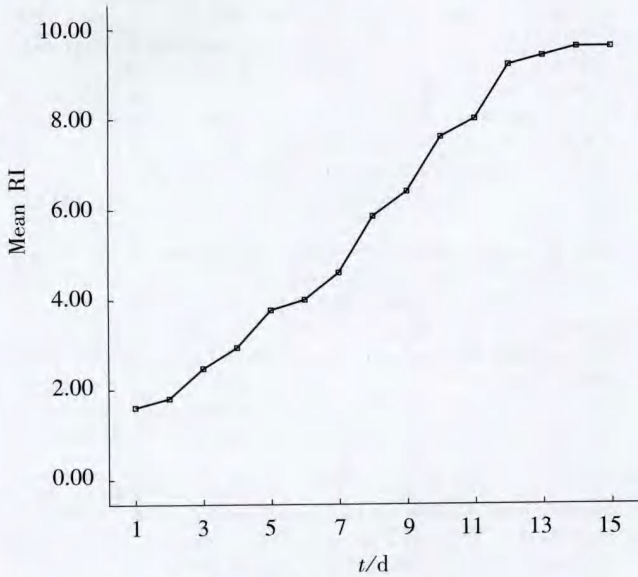


图 1 RI 随时间变化关系

Fig. 1 The relationship of rejection index and the days after operation

### 2.2 DTH 评价

ACAID 的典型特征为抗原特异性的 DTH 抑制,检测 DTH 可判断 ACAID 是否形成。阴性对照组出现耳缘充血、肿胀、压痛。ACAID 术后 1 周组部分大鼠耳缘充血、肿胀、压痛;部分大鼠耳缘无明显变化,压痛反应轻。ACAID 术后 2 周组及 ACAID 术后 4 周组大鼠无明显 DTH 反应,诱导 ACAID 成功率为 100%。各组大鼠耳缘肿胀程度的比较见表 1。

表 1 各组大鼠耳缘肿胀程度的比较(mm)

Table 1 The comparison of edema of ear edge in different groups (mm)

Group	n	Edema of ear edge
Negative control	10	1.14 ± 0.03
ACAID 1 week	10	0.69 ± 0.08 <sup>b</sup>
ACAID 2 week	10	0.46 ± 0.05 <sup>b</sup>
ACAID 4 week	10	0.46 ± 0.08 <sup>b</sup>
F		257.80
P		< 0.01

<sup>b</sup>P < 0.05 vs negative control group (One-way ANOVA, Dunnett t test)

### 2.3 苏木精-伊红染色

正常对照组角膜上皮细胞层由 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。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。角膜移植组急性排斥期角膜植片水肿、增厚、混浊,上皮基底细胞空泡形成,间质结构疏松,大量炎性细胞浸润,基质层可见新生血管管腔。ACAID 组同正常角膜组织,无炎性细胞浸润。

### 2.4 免疫组织化学染色

正常对照组大鼠角膜及角膜缘未见阳性细胞表达(图 2)。脾脏红髓区可见大量的阳性细胞表达,骨髓区阳性细胞少见(图 3)。角膜移植组排斥反应期各组大鼠角膜上皮层均可见大量的阳性细胞表达,基质层及内皮细胞层无阳性细胞(图 4)。ACAID 组大鼠角膜未见阳性细胞表达(图 5)。

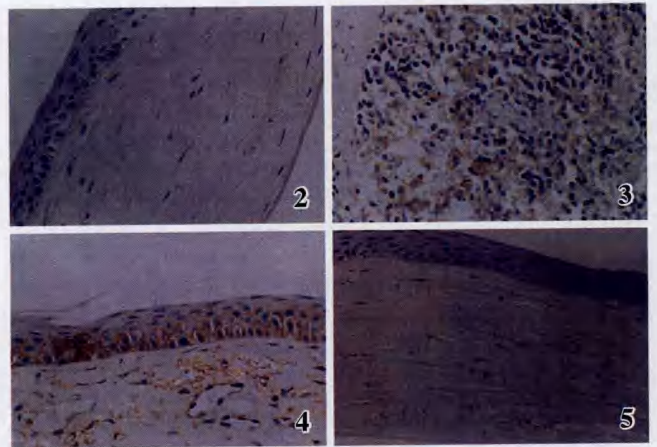


图 2 正常大鼠角膜无 CD86 阳性细胞表达(×400) 图 3 正常大鼠脾脏红髓区可见 CD86 阳性细胞表达,呈现细胞膜的棕黄色染色(×400) 图 4 角膜移植术后 2 周急性排斥期大鼠角膜上皮层和角膜基质层 CD86 阳性细胞表达,角膜基质层出现炎性细胞浸润(×400) 图 5 ACAID 组大鼠角膜无 CD86 阳性细胞表达(×400)  
**Fig. 2** No CD86 positive cell was seen in normal rat cornea under the light microscope (×400) **Fig. 3** A lots of CD86 positive cells were displayed in red pulp of rat spleen tissue, showing brown yellow staining on the cellular membrane (×400) **Fig. 4** The CD86 positive cells were exhibited in corneal epithelium stroma, and the infiltration of inflammatory cells was seen in rejected rat cornea under the light microscope (×400) **Fig. 5** No CD86 positive cell was seen in cornea of ACAID rat (×400)

### 3 讨论

CD86 属于 B7 家族,是最重要的共刺激分子之一,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 APC 上,其配体为 CD28/CTLA-4,表达于 T 细胞表面。未受抗原刺激的 APC 中几乎不表达 B7,经活化后 CD80 和 CD86 的表达显著上调。APC 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,才能诱发免疫反应。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。因此共刺激分子的表达是 APC 成熟与否的标志<sup>[6-8]</sup>。本研究结果表明:(1)正常的角膜无 CD86 表达,说明正常的角膜不存在成熟状态的 APC。(2)角膜移植排斥反应各组角膜上皮层均可见大量的 CD86 阳性细胞表达,提示植片表达移植抗原,刺激 APC 高表达共刺激分子,递呈移植抗原,介导排斥反应。(3)ACAID 组角膜未见阳性细胞表达,符合发生 ACAID 的角膜处于免疫赦免状态。

尽管角膜移植在固体组织移植中成功率最高,但术后的排斥反应仍是移植失败的主要原因。本研究为可能的免疫治疗提供了理论依据。Yoshimoto 等<sup>[9]</sup>研究提出 APC 才是选择性激活 Th1/Th2 的关键。APC 不仅为 Th 细胞提供抗原特异性信号及一系列共刺激信号,还提供免疫应答关键环节—Th1/Th2 极化的信号。因此,通过人为因素选择性减弱或消除 APC 上共刺激分子的表达及活性,阻断共刺激信号,可以减轻或阻断移植后排斥反应。Kagaya 等<sup>[10]</sup>联合使用抗 CD80 和抗 CD86 的单克隆抗体,Comer 等<sup>[11]</sup>用 CTLA-4 抑制蛋白 (CTLA4-Ig) 或表达 CTLA4-Ig 的腺病毒载体 (AdCTLA) 处理供体或受体角膜阻断 B7:CD28/CTLA-4 介导的共刺激分子通路,均有效延长同种异体角膜移植物的存活。角膜移植排斥反应是一多因素参与的复杂过程。目前认为局部的 APC 捕获并递呈抗原,在共刺激分子的作用下激活 CD4<sup>+</sup>T 细胞,促使 Th1 分化,同时分泌 IL-2、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  介导破坏性的 DTH 在急性排斥反应中起主导作用。而 ACAID 是针对进入眼前房的抗原所产生的一种抗原特异性的全身性免疫赦免现象,其典型表现是 Th1 介导的 DTH 被抑制<sup>[12]</sup>。这是机体一种主动的免疫调节,可保护局部组织逃避免疫源性炎症反应的攻击。Larkin 等<sup>[13]</sup>的研究表明,在高危眼预先诱导 ACAID 可使角膜排斥率由

100% 下降至 37.5%。因此利用 ACAID 对抗角膜移植排斥反应,特别是高危组的角膜移植,具有良好的应用前景。本研究以检测脾脏表达的阳性细胞为对照,与 Damoiseaux 等<sup>[12]</sup>的研究结果一致,证明本实验方法可行。

## 参考文献

- 1 Streilein JW. Ocular immune privilege: the eye takes a dim but practical view of immunity and inflammation [J]. *J Leukocyte Biol*, 2003, 74(2): 179 - 185
- 2 Streilein JW, Okamoto S, Hara Y, et al. Blood-borne signals that induce anterior chamber-associated immune deviation after intracameral injection of antigen [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997, 38(11): 2245 - 2254
- 3 Williams KA, Coster DJ. Penetrating corneal transplantation in the inbred rat; a new model [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1985, 26(1): 23 - 30
- 4 Yamada J, Streilein JW. Induction of anterior chamber-associated immune deviation by corneal allografts placed in the anterior chamber [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997, 38(13): 2833 - 2843
- 5 Holland EJ. Clinical and immunohistological studies of corneal rejection in the rat penetrating keratoplasty model [J]. *Cornea*, 1991, 10(5): 374 - 380
- 6 Liang J, Yamaguchi Y, Matsuda T, et al. Posttransplant infusion of donor-specific blood induces immunological unresponsiveness in rat hepatic allografts [J]. *Transplantation*, 2000, 70(9): 1363 - 1371
- 7 Hamrah P, Liu Y, Zhang Q, et al. Alterations in corneal stromal dendritic cell phenotype and distribution in inflammation [J]. *Arch Ophthalmol*, 2003, 121(8): 1132 - 1140
- 8 Hamrah P, Huq SO, Liu Y, et al. Corneal immunity is mediated by heterogeneous population of antigen-presenting cells [J]. *J Leukoc Biol*, 2003, 74(2): 172 - 178
- 9 Yoshimoto T, Albert B. Role of NK1.1 + T cells in a Th2 response and in immunoglobulin E production [J]. *Science*, 1995, 270: 1845 - 1847
- 10 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 - 139
- 11 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 - 1103
- 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 Leukocyte Biol*, 1998, 64(6): 803 - 809
- 13 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 - 391

(收稿:2008-10-04 修回:2009-06-05)

(本文编辑:尹卫靖)

读者·作者·编者

## 本刊对中英文摘要的写作要求

论著正文前附 300 字内的中文摘要,包括目的、方法、结果、结论四要素,关键词 3~8 个;英文摘要应比中文摘要详细,300 个实词左右。英文摘要的目的部分应概括写出本研究的研究背景和目的;方法部分应写明研究对象的数目、来源、分组情况及所用的研究方法和工具;结果部分应包括研究结果的主要形态学改变、染色的具体形态和具体数据。英文摘要的方法和结果部分内容的描述应用一般过去时态。英文关键词 3~8 个,应与中文关键词一致。

综述的中英文摘要不用四要素的写法,可写成指示性文摘,亦给出中英文关键词各 3~8 个;摘要用第三人称撰写,不用“本文”、“作者”等作主语。

(本刊编辑部)