

交感性眼炎眼组织中共刺激分子表达的变化

钟华红¹, 杨培增², 唐松¹, 应方微¹

作者单位:¹(518040)中国广东省深圳市,暨南大学医学院附属深圳眼科医院;²(400016)中国重庆市,重庆医科大学第一附属医院眼科

作者简介:钟华红,女,博士,主治医师,研究方向:葡萄膜炎及小儿眼科。

通讯作者:钟华红. hh_zhong@hotmail. com

收稿日期:2010-10-15 修回日期:2010-11-25

Immunohistochemical study of costimulatory molecules in sympathetic ophthalmia

Hua-Hong Zhong¹, Pei-Zeng Yang², Song Tang¹, Fang-Wei Ying¹

¹Shenzhen Eye Hospital, School of Medicine, Jinan University, Shenzhen 518040, Guangdong Province, China;² Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Correspondence to: Hua-Hong Zhong. Shenzhen Eye Hospital, School of Medicine, Jinan University, Shenzhen 518040, Guangdong Province, China. hh_zhong@hotmail. com

Received:2010-10-15 Accepted:2010-11-25

Abstract

• AIM: To examine the specimens of iris, ciliary body and retina from patients with sympathetic ophthalmia for the expression of costimulatory molecule CD28, CTLA-4 and its ligands B7-1(CD80) and B7-2(CD86).

• METHODS: The paraffin-embedded sections of sympathetic ophthalmia were obtained based on the specimens of 4 patients with sympathetic ophthalmia and 2 healthy persons, and analyzed by immunohistochemical method with polyclonal antibody probes for B7-1, B7-2, CD28 and CTLA-4 molecules.

• RESULTS: The specimens of normal iris and ciliary body showed B7-2 expression. B7-1 was found in the normal choroids. B7, CD28 and CTLA-4 molecules did not express in the normal retina. However, in the sympathetic ophthalmia, the iris and ciliary body showed B7-1, B7-2, CD28 and CTLA-4 molecules expression. Approximately 100% of retina pigment epithelium cells expressed B7-1 and B7-2 molecules, but not CD28 or CTLA-4 molecules. In the specimens of retina, there was low expression of B7-1, B7-2, CD28 and CTLA-4 molecules.

• CONCLUSION: The results of this study indicate that the interaction between B7 and CD28, CTLA-4 may contribute to the sustained immune activation in the uvea of the patients with sympathetic ophthalmia.

• KEYWORDS: sympathetic ophthalmia; uveitis; immunohistochemical method; costimulatory molecule

Zhong HH, Yang PZ, Tang S, et al. Immunohistochemical study of costimulatory molecules in sympathetic ophthalmia. *Guji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(1):46-48

摘要

目的:探讨交感性眼炎眼组织(虹膜睫状体、脉络膜、视网膜)中共刺激分子 B7-1, B7-2, CD28 和 CTLA-4 的表达意义。

方法:交感性眼炎眼球石蜡标本 4 例,行常规石蜡切片,免疫组织化学方法探讨交感性眼炎各部分眼组织中上述分子的表达,并与正常人眼组织中各分子的表达进行比较。

结果:正常人眼组织虹膜睫状体中有 B7-2 分子,无 B7-1, CTLA-4 和 CD28 分子;脉络膜中有 B7-1 分子,但无 B7-2, CTLA-4 和 CD28 分子;视网膜内无 B7-1, B7-2, CTLA-4 和 CD28 分子。而交感性眼炎的虹膜睫状体和脉络膜中均有 B7-1, B7-2, CTLA-4 和 CD28 分子,视网膜的色素上皮细胞有 B7-1 和 B7-2 分子表达,而无 CD28 和 CTLA-4 分子表达,视网膜内可见少量 B7-1, B7-2, CTLA-4 和 CD28 分子表达。

结论:眼组织中 B7 与 CD28 和 CTLA-4 分子之间的相互作用与交感性眼炎患者葡萄膜处于持续免疫激活状态密切相关。

关键词:交感性眼炎;葡萄膜炎;免疫组织化学方法;共刺激分子

DOI:10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2011. 01. 016

钟华红,杨培增,唐松,等. 交感性眼炎眼组织中共刺激分子表达的变化. 国际眼科杂志 2011;11(1):46-48

0 引言

交感性眼炎(sympathetic ophthalmia, SO)是指穿通性外伤眼或眼内手术眼(诱发眼),在经过一段时间的非化脓性肉芽肿性全葡萄膜炎后,另一眼(交感眼)也发生同样性质的全葡萄膜炎。目前,SO 发病的具体机制尚不完全清楚。近年来国内外大量实验研究认为,此病发生的机制可能为:抑制性或细胞毒性 T 细胞对视网膜感光细胞、视网膜色素上皮(RPE)细胞和脉络膜黑色素细胞所共有的表面抗原发生的迟发型超敏反应。其中,T 淋巴细胞的激活是其发病的基础。业已证明,T 细胞的激活需要 2 个信号,共刺激信号在其中起较重要的作用。目前已发现多种共刺激分子对,其中以 B7: CD28/CTLA-4 共刺激途径最为重要。基于上述研究,我们用免疫组织化学的方法探讨了共刺激分子 B7: CD28/CTLA-4 在正常人和 SO 眼组织中的表达,以期从共刺激途径来初步探讨 SO 的发病机制。

1 材料和方法

1.1 材料 正常供体人眼球 2 例均来自深圳市眼科医院眼库,捐献者生前志愿将器官捐献用于器官移植,死亡后 16~24h 内将眼球摘除行角膜移植,将角膜移植术后眼球 24h 内固定,制成石蜡标本,病理组织学检查排除眼部疾病。SO 眼球石蜡标本 4 例,病理组织学检查证实为 SO。所用一抗分别为兔抗人 B7-1 多克隆抗体(Santa Cruz, USA)、

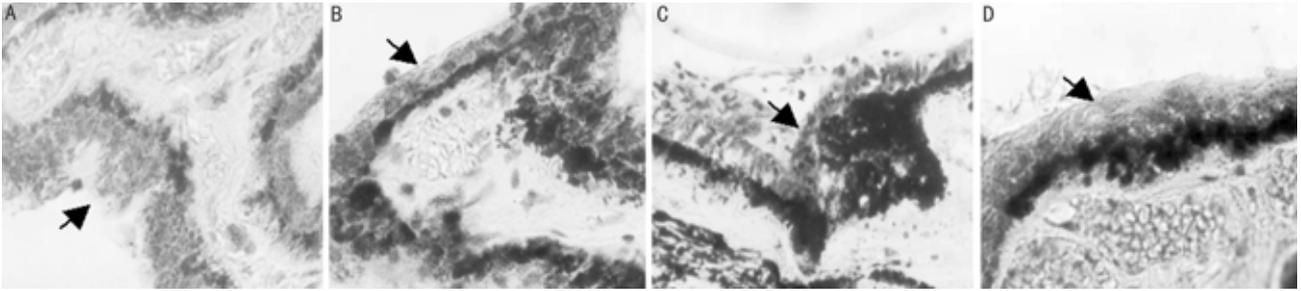


图1 交感性眼炎虹膜睫状体中共刺激分子阳性表达(SABC×400) A: B7-1; B: B7-2; C: CTLA-4; D: CD28。

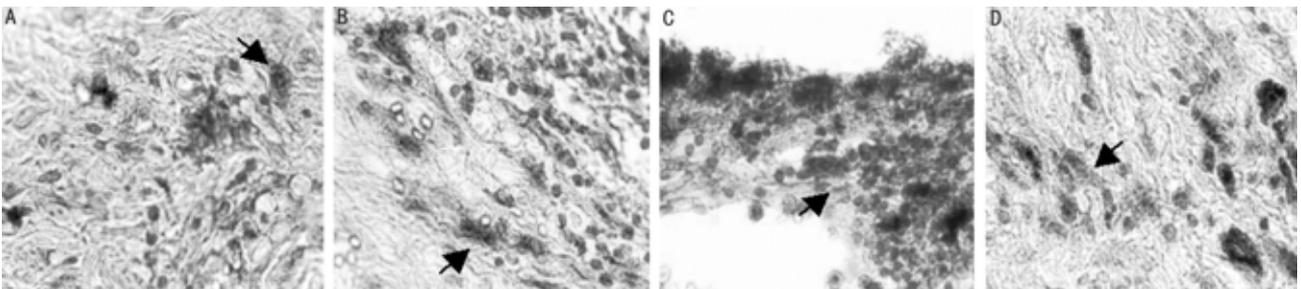


表2 交感性眼炎脉络膜中共刺激分子阳性表达(SABC×400) A: B7-1; B: B7-2; C: CTLA-4; D: CD28。

表1 眼组织中共刺激分子的阳性表达

	虹膜睫状体				脉络膜		视网膜	
	正常基质部	正常上皮细胞层	SO 基质部	SO 上皮细胞层	正常	SO	正常	SO
B7-1	0	0	6 ± 2 ^b	36 ± 5 ^b	5 ± 1	10 ± 5 ^a	0	4 ± 3 ^a
B7-2	6 ± 2	36 ± 8	7 ± 4	32 ± 7	0	9 ± 4 ^b	0	7 ± 4 ^b
CTLA-4	0	0	10 ± 6 ^a	41 ± 10 ^b	0	5 ± 3 ^a	0	4 ± 3 ^a
CD28	0	0	3 ± 1 ^b	35 ± 8 ^b	0	3 ± 2	0	2 ± 1

^aP < 0.05, ^bP < 0.01 vs 正常组。

兔抗人 B7-2 多克隆抗体(Santa Cruz, USA)、兔抗人 CD28 多克隆抗体(Santa Cruz, USA)、兔抗人 CTLA-4 多克隆抗体(Santa Cruz, USA),二抗为生物素标记山羊抗兔 IgG(H+L)(DAKO, Denmark),所用其他试剂为卵白素-生物素-过氧化物酶复合物(DAKO, Denmark)、AEC 复合物(迈新)、正常山羊血清。

1.2 方法 用标准的 ABC 技术在眼组织切片上进行免疫组织化学染色,其中一抗稀释度为 1:100,同时以 PBS 代替一抗作阴性对照。主要步骤如下:将组织与含 10mL/L H₂O₂ 的 PBS 一起孵育,以消除内源性过氧化酶的活性,再与正常山羊血清共育,以降低背景着色,然后与一抗一起孵育,4℃ 过夜,依次与二抗、卵白素-生物素-过氧化物酶复合物在室温下孵育 1h,最后用 AEC 复合物显色,苏木素复染,稍干燥,滴加水溶性封片剂后加盖玻片。于高倍物镜下计算包含在 0.5mm × 0.5mm 记数大方格内的细胞数,每张切片于眼组织各部位随机选择 3 个代表性视野计数,取平均值乘以 4 即得该组织细胞数(个/mm²)。

2 结果

2.1 虹膜睫状体 正常人虹膜睫状体基质部可见少量散在 B7-2 阳性细胞,圆形或类圆形,胞质着色,100% 无色素睫状上皮细胞为 B7-2 阳性,胞质着色。未见 B7-1, CD28 和 CTLA-4 阳性细胞。SO 虹膜睫状体基质中可见 B7-1 和 B7-2 阳性细胞,呈类圆形;几乎所有的无色素睫状上皮细胞 B7-1 和 B7-2 染色阳性,色素上皮层细胞由于有大量色素掩盖,仅见红色点状染色。不同的标本中 CTLA-4 和 CD28 阳性细胞的表达量不同,3 例 SO 虹膜睫状体部 CTLA-4 阳性细胞较 CD28 阳性细胞稍多,但无明显差异,其中睫状体色素上皮层和无色素上皮层 CTLA-4 阳性,

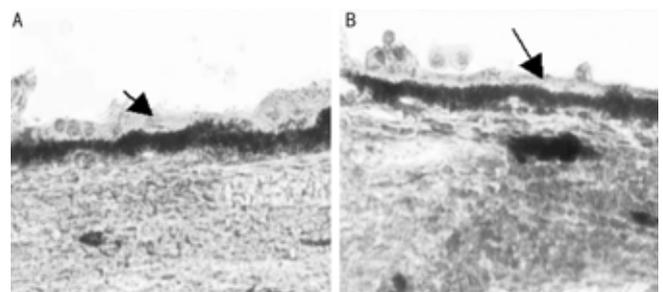


图3 交感性眼炎视网膜色素上皮层中共刺激分子阳性表达(SABC×400) A: B7-1; B: B7-2。

CD28 呈弱阳性。1 例 SO 虹膜睫状体部 CD28 阳性细胞表达量高于 CTLA-4 阳性细胞,亦无明显差异,无色素睫状上皮细胞 CD28 染色强阳性,基质部也有较多表达,细胞呈类圆形或不规则形(图 1,表 1)。

2.2 脉络膜 正常人脉络膜组织中可见散在 B7-1 阳性细胞,细胞形态大小不一,多呈长梭形或椭圆形,胞质着色,有些阳性细胞被脉络膜中色素所覆盖。脉络膜中无 B7-2, CD28 和 CTLA-4 阳性细胞。SO 脉络膜中 B7-1, B7-2 和 CTLA-4 阳性细胞较正常组显著增多,有 CD28 阳性细胞,但与正常组无显著性差异,多为长椭圆形或梭形,有的细胞被脉络膜中色素所覆盖。3 例标本中 CTLA-4 阳性细胞较 CD28 阳性细胞稍多,但无明显差异;1 例标本中 CD28 阳性细胞较 CTLA-4 阳性细胞稍多,亦无明显差异,这些细胞多呈圆形或类圆形(图 2,表 1)。

2.3 视网膜 正常人视网膜中未见 B7-1, B7-2, CD28 和 CTLA-4 阳性细胞。SO 视网膜色素上皮细胞层 B7-1 和 B7-2 阳性(图 3)。3 例 SO 视网膜内可见 B7-1, B7-2 和 CTLA-4

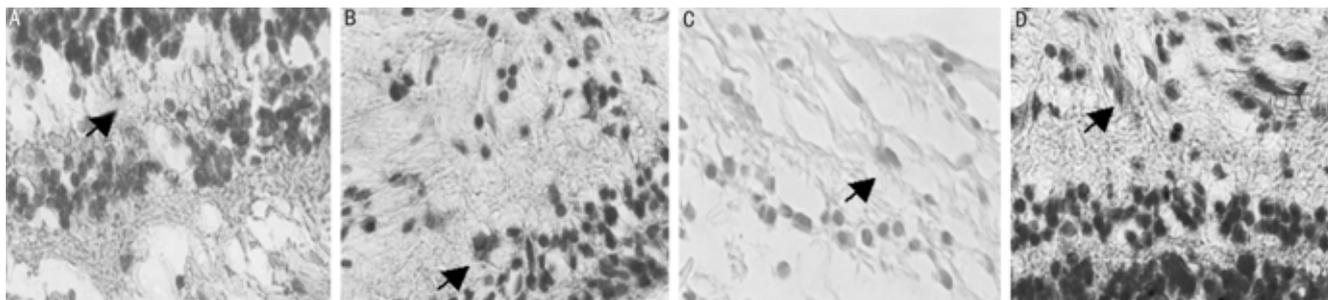


图4 交感性眼炎视网膜中共刺激分子阳性表达(SABC ×400) A: B7-1; B: B7-2; C: CTLA-4; D: CD28。

阳性细胞, 偶见少量 CD28 阳性细胞。1 例标本中 CD28 阳性细胞稍多(图4, 表1)。

3 讨论

我们发现, SO 虹膜睫状体、脉络膜、视网膜中 B7-1, B7-2, CD28 和 CTLA-4 阳性细胞表达量较正常人显著增多。T 淋巴细胞的激活不仅需要 T 细胞受体(TCR)与抗原提呈细胞(APC)表面的 MHC-II 类抗原肽复合物的结合来传递活化信号, 还需要共刺激信号, 即 T 细胞表面的共刺激分子与 APC 表面的共刺激分子配体相互结合而产生的信号^[1,2]。我们推测 SO 眼组织中共刺激分子对 B7: CD28/CTLA-4 的异常表达, 可能是 SO 发生的一个重要原因。B7 分子以单体形式表达于 APC 表面, 未受抗原刺激的 APC 中几乎不表达 B7, 经活化后 B7-1 和 B7-2 的表达显著上调^[3,4], SO 眼组织中 B7 的表达增高, 可能在激活 T 细胞导致免疫反应的发生中起了重要作用。B7 分子的配体为 CD28 和 CTLA-4, 二者主要在 T 细胞上表达, CD28 表达于静止及活化的 T 细胞表面, CTLA-4 只表达于活化的 T 细胞。SO 中有 CD28 和 CTLA-4 阳性细胞, 说明眼组织中出现了大量活化增殖的淋巴细胞, 这些细胞的激活可能是 SO 发病的基础。SO 中, 近 100% 无色素睫状上皮细胞均表达 B7-1 和 B7-2, 提示无色素睫状上皮细胞可能具有抗原提呈的作用。在 SO 发生时, 原先隐蔽的抗原暴露, 眼组织的微循环也发生改变, 此时, 无色素睫状上皮细胞被激活, 表达 B7 分子。另外, 无色素睫状上皮细胞还表达 CD28 和 CTLA-4, 说明无色素睫状上皮细胞间可能通过共刺激分子对 B7: CD28/CTLA-4 之间的相互作用, 而导致局部自身免疫炎症的发生。但其具体发生方式及机制仍有待于进一步深入研究。

我们发现, 正常人视网膜中无 B7-1 和 B7-2 阳性细胞, 而 SO 的 RPE 细胞 B7-1 和 B7-2 阳性, 说明在 SO 发生的过程中, RPE 细胞可能参与了抗原提呈。RPE 在某些情况下(如 IFN- γ 刺激下)可表达 MHC-II 类分子和共刺激分子 ICAM-1 和 VCAM-1, 因此 RPE 可能具有抗原提呈功能, 我们的结论与这些研究的结论相一致。SO 发生时, 眼内的多种细胞可以分泌细胞因子(如: IFN- γ 和 TGF- β 等), RPE 细胞在这些细胞因子及其他物质作用下被激活, 表达大量的 MHC-II 类分子和共刺激分子^[5]。此时, RPE 细胞通过 MHC-II 类分子和 T 细胞表面的 TCR 受体复合物之间的相互作用以及 RPE 细胞表面的共刺激分子

与 T 细胞表面配体的连接, 最终可导致 T 淋巴细胞的活化。我们发现, CTLA-4 和 CD28 的表达有较大差异。当 B7 与 CD28 结合后, 可促进 T 细胞增殖和产生大量的细胞因子, 并可使细胞表面细胞因子受体的表达增多, 而 CTLA-4 与 B7 结合后, 可使 T 细胞的反应能力下降, 阻止 T 细胞的增殖、活化^[6,7]。在 T 细胞开始激活时, CTLA-4 与 B7 分子的亲和力高于 CD28, B7: CTLA-4 的作用占优势, 则可阻止 T 细胞反应的起始; 但当激活的 APC 表面表达高水平的 B7 分子时, B7: CD28 的作用占优势, 则可促进 T 细胞的增殖、分化和分泌细胞因子^[3,8]。本研究说明, 取标本时患者临床病程可能不同, CTLA-4 分子表达多的患者炎症正向好的方面转化, 而 CD28 分子表达多时情况正相反。总之, 我们的研究显示, SO 眼组织中有大量共刺激分子 B7-1, B7-2, CD28 和 CTLA-4 的表达, 共刺激信号在诱导 T 淋巴细胞的激活和巨噬细胞的功能和活性中起了重要作用, 这些分子之间的相互作用可能使 SO 患者葡萄膜处于持续免疫激活状态, 从而导致 SO 炎症的发生和迁延不愈。

参考文献

- Collins M, Ling V, Carreno BM. The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biol* 2005;6(6):223
- Sansom D, Manzotti C, Zheng Y. What's the difference between CD80 and CD86. *Trends in Immunology* 2003;24(6):313
- Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2002;20:29
- Bhatia S, Edidin M, Almo SC, et al. Different cell surface oligomeric states of B7-1 and B7-2: Implications for signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(43):15569-15574
- 钟华红, 杨培增, 周红颜, 等. γ -干扰素对人眼组织共刺激分子及 Fas/FasL 分子表达的影响. *中华眼底病杂志* 2006;22(2):117-119
- Brunner MC, Hoff H, Burmester GR. Multiple functions for CD28 and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 during different phases of T cell responses: implications for arthritis and autoimmune diseases. *Arthritis Res Ther* 2004;6(1):45-54
- Steiner K, Moosig F, Csernok E, et al. Chimeric costimulatory molecules that selectively act through CD28 or CTLA-4 on human cells. *Clin Exp Immunol* 2001;126(1):143-150
- Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* 2001;1(3):220-228