

# 荧光染色法在实验性异种角膜移植术后免疫诊断中的应用

刘先宁<sup>1</sup>, 武鹏安<sup>2</sup>, 吴洁<sup>3</sup>, 程燕<sup>3</sup>, 潘士印<sup>1</sup>, 肖湘华<sup>1</sup>, 艾婷婷<sup>1</sup>, 安娜<sup>1</sup>, 王伟<sup>2</sup>, 朱秀萍<sup>1</sup>

基金项目: 陕西省科技统筹创新工程计划项目 (No. 2012KTCQ03-11)

作者单位:<sup>1</sup>(710002) 中国陕西省西安市第一医院 陕西省眼科研究所; <sup>2</sup>(710002) 中国陕西省西安市第一医院 病理科;

<sup>3</sup>(710002) 中国陕西省西安市第一医院 西安市眼科医院

作者简介: 刘先宁, 本科, 研究员, 主任检验师, 研究方向: 角膜组织工程及角膜眼表疾病的实验室诊断。

通讯作者: 刘先宁. lxn65@sina.com

收稿日期: 2013-06-08 修回日期: 2013-10-15

## Application of paraffin embedding slice fluorescent staining method in the experimental xenogenic corneal transplantation immune diagnosis

Xian-Ning Liu<sup>1</sup>, Peng-An Wu<sup>2</sup>, Jie Wu<sup>3</sup>, Yan Cheng<sup>3</sup>, Shi-Yin Pan<sup>1</sup>, Xiang-Hua Xiao<sup>1</sup>, Ting-Ting Ai<sup>1</sup>, Na An<sup>1</sup>, Wei Wang<sup>2</sup>, Xiu-Ping Zhu<sup>1</sup>

**Foundation item:** Science and Technology Overall Innovation Project of Shaanxi Province (No. 2012KTCQ03-11)

<sup>1</sup>Xi'an No. 1 Hospital, Shaanxi Ophthalmology Institute, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China; <sup>2</sup>Department of Pathology, Xi'an No. 1 Hospital, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China; <sup>3</sup>Xi'an No. 1 Hospital, Eye Hospital of Xi'an, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China

**Correspondence to:** Xian-Ning Liu. Shaanxi Ophthalmology Institute, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China. lxn65@sina.com

Received: 2013-06-08 Accepted: 2013-10-15

## Abstract

• **AIM:** Using monoclonal antibodies indirectly immunofluorescence to detect the changes of CD4 and CD8 T lymphocytes in the different time points in corneal tissue after corneal transplantation.

• **METHODS:** Normal rabbit cornea, axillary lymph node tissue were taken. Get corneal tissue at one week, two weeks after ostrich - rabbit heterogeneous corneal transplantation, fixed by formaldehyde, conventional paraffin embedding sectioning dewaxing after water, gastric enzyme digestion method for antigen repair, use mouse anti rabbit CD4, CD8 monoclonal antibody and fluorescent tagging sheep anti mouse IgG for immunohistochemical assay, and observe the expression of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in the cornea tissue in fluorescence microscope.

• **RESULTS:** The expression of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T cells in the

cornea tissue was negative one week after the ostrich - rabbit heterologous cornea transplantation, CD4 T lymphocytes showed strong positive expression after the second week, CD8 was negative.

• **CONCLUSION:** Indirect immunofluorescence method can be used for determination of related antigen expression in local corneal tissue after heterologous corneal transplantation, and it can lay the foundation for the studies of heterogeneous cornea transplantation rejection mechanism and postoperative drug screening.

• **KEYWORDS:** heterologous cornea transplantation; rejection; paraffin embedding organizations; indirect immunofluorescence staining; CD4 and CD8 T lymphocytes

**Citation:** Liu XN, Wu PA, Wu J, et al. Application of paraffin embedding slice fluorescent staining method in the experimental xenogenic corneal transplantation immune diagnosis. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(11):2182-2184

## 摘要

**目的:** 采用单克隆抗体间接免疫荧光法测定异种角膜移植术后不同时间点角膜组织中 CD4, CD8 T 淋巴细胞的变化。

**方法:** 取正常兔角膜、腋窝淋巴结组织; 鸵鸟-兔异种角膜移植术后 1, 2wk 角膜组织, 经甲醛固定, 常规石蜡包埋切片脱蜡复水, 胃酶消化法进行抗原修复, 用鼠抗兔 CD4, CD8 单克隆抗体及荧光标记的羊抗鼠 IgG 进行免疫组化测定, 荧光显微镜下观察角膜组织中 CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的表达。

**结果:** 鸵鸟-兔异种角膜移植后 1wk 角膜组织中 CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的表达为阴性, 2wk 时 T 淋巴细胞 CD4 呈强阳性表达, CD8 呈阴性表达。

**结论:** 采用间接免疫荧光法测定动物异种角膜移植术后不同时间点局部角膜组织中 CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的表达, 为异种角膜移植排斥反应机制研究及术后药物筛选奠定实验基础。

**关键词:** 异种角膜移植; 排斥反应; 石蜡包埋组织; 间接免疫荧光染色; CD4, CD8 T 淋巴细胞

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.11.05

**引用:** 刘先宁, 武鹏安, 吴洁, 等. 荧光染色法在实验性异种角膜移植术后免疫诊断中的应用. *国际眼科杂志* 2013; 13(11): 2182-2184

## 0 引言

各种原因引起的角膜盲是主要致盲性眼病之一, 治疗方式以同种异体角膜移植为主, 苦于人角膜材料来源

匮乏,制约着该手术的开展。近年来,随着组织工程技术的发展,国内外众多学者采用去细胞异种角膜材料进行角膜移植的实验研究。我所选取鸵鸟角膜进行脱细胞处理,前期系列研究表明该材料在体内、体外的生物相容性好,支持角膜上皮细胞、基质细胞生长<sup>[1,2]</sup>。同种角膜移植术后最大的问题是免疫排斥反应,异种角膜材料虽然来源广泛,但术后炎症反应和免疫排斥反应较为严重,仍是造成移植失败的主要原因<sup>[3]</sup>。因此,异种角膜移植术后,如何检测局部组织免疫反应并及时对症处理,对提高移植成功率意义十分重大。本研究取正常兔角膜、腋窝淋巴结组织;鸵鸟-兔异种角膜移植术后1,2wk,经甲醛固定、石蜡包埋的角膜组织建立间接免疫荧光测定法检测组织中 CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞的表达,为异种角膜移植术后免疫排除反应机制等相关研究奠定基础。现报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

健康清洁级新西兰兔角膜、腋窝淋巴结组织;鸵鸟-兔角膜板层移植术后1,2wk时取下角膜组织的固定、石蜡包埋切片的制作均由西安市第一医院病理科协助完成。主要试剂:鼠抗兔 CD4 单克隆抗体(美国 Thermo 公司产品),工作浓度 1:100 ~ 1:50,鼠抗兔 CD8 单克隆抗体(美国 SANTA CRUZ 公司产品),工作浓度 1:50, FITC 标记的羊抗鼠 IgG(武汉博士德公司产品),工作浓度 1:50。胃蛋白酶试剂盒、PH 7.4 PBS 缓冲液(福建迈新生物技术开发有限公司)。主要仪器 OLYMPUS BX41 荧光显微镜(日本产),WP700TL23-K5 型格兰仕微波炉(中国产)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 石蜡切片的制作

取正常兔角膜、腋窝淋巴结组织;鸵鸟-兔角膜板层移植术后1,2wk时取下的角膜组织用 100g/L 甲醛固定、乙醇脱水、二甲苯透明,62℃ ~ 64℃ 石蜡浸泡包埋,制成厚度 4μm 的切片,贴敷到用多聚赖氨酸处理的载玻片上。

#### 1.2.2 抗原修复

组织制片后,经干烤箱 60℃ 烤 30min,二甲苯脱蜡,乙醇梯度脱水后, pH 7.4 PBS 缓冲液冲洗,4g/L 胃蛋白酶消化 10min。PBS 缓冲液洗涤 3 次,3min/次。

#### 1.2.3 抗原封闭

给经过抗原修复并洗涤后的标本,加 100g/L 羊血清 37℃ 孵育 30min,甩去血清。

#### 1.2.4 单克隆抗体免疫荧光染色及结果观察

在经上述处理后的标本上分别加 1:50 稀释的鼠抗兔 CD4, CD8 单克隆抗体,37℃ 孵育 1h, PBS 洗涤 3 次,3min/次;在标本中滴加 1:50 稀释的 FITC 标记的羊抗鼠 IgG,避光条件下,37℃ 孵育 1h, PBS 洗涤 3 次,3min/次,用蒸馏水漂洗 1 次,加 500g/L 无荧光缓冲甘油封片。荧光显微镜下观察并照相。

## 2 结果

### 2.1 对照组检测结果

正常兔角膜组织中 T 淋巴细胞 CD4, CD8 为阴性表达(图 1)。正常兔腋窝淋巴结组织中 T 淋巴细胞 CD4, CD8 出现阳性表达细胞(图 2)。

### 2.2 异种角膜移植组检测结果

鸵鸟-兔移植后 1wk 角膜组织中 T 淋巴细胞 CD4, CD8 呈阴性表达(图 3)。2wk 时 T 淋巴细胞 CD4 阳性, CD8 为阴性(图 4)。

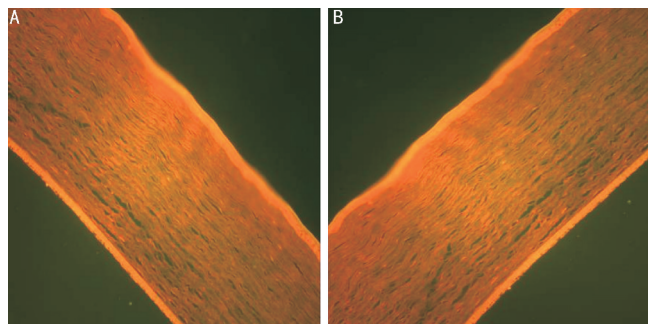


图 1 正常兔角膜组织(×200) A:CD4 阴性;B:CD8 阴性。

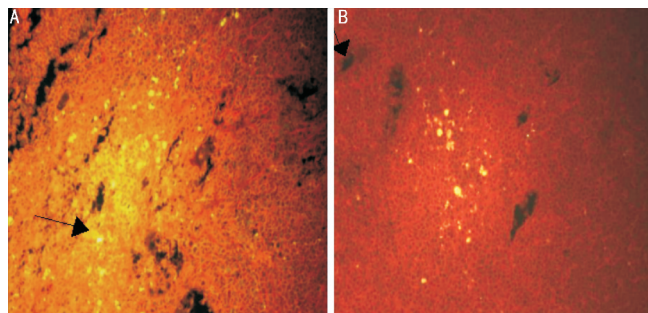


图 2 正常兔腋窝淋巴结组织(×200) A:CD4 阳性;B:CD8 阳性。

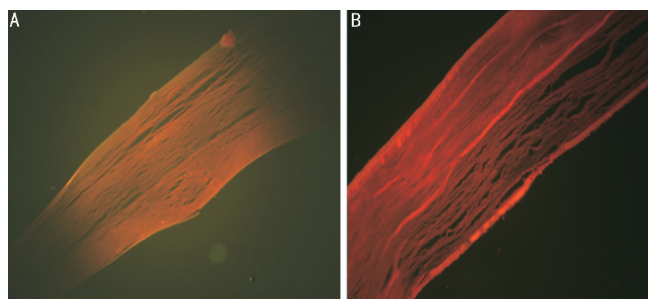


图 3 鸵鸟-兔移植后 1wk 角膜组织(×100) A:CD4 阴性;B:CD8 阴性。

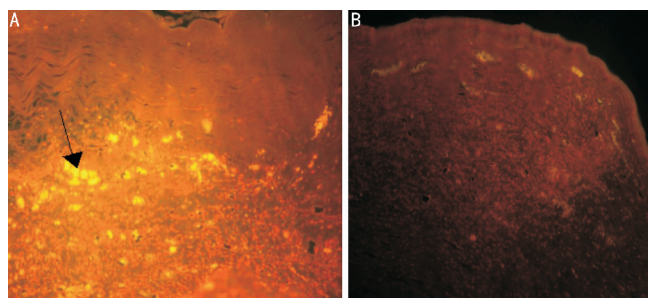


图 4 鸵鸟-兔移植后 2wk 角膜组织(×200) A:CD4 阳性;B:CD8 阴性。

## 3 讨论

随着异种去细胞角膜材料学的研究进展,研究者在思考这样一个问题,异种角膜材料移植后出现免疫排斥反应的机制是什么?是否等同于同种异体角膜移植?免疫排斥反应出现的时机?采用何种药物进行治疗、药物使用时间及方式?诸多问题,都需要我们进行进一步的实验研究。

要解决上述问题,必须进行大量的动物实验,并针对出现的免疫反应建立相应的组织学检测手段。关于异种角膜基质免疫原性测定,目前文献报道<sup>[4]</sup>大多采用流式细胞术动态测定受体动物外周血中相关 T 细胞(主要是

CD4、CD8T细胞)的改变。我们通过大量动物实验认为,在异种角膜移植术后,角膜局部组织免疫学测定意义更大。推测其原因:(1)角膜解剖结构特殊,位于眼球的前部,无血管及淋巴管,处于相对的免疫“赦免”区;(2)异种角膜材料通过一系列脱细胞处理步骤,去掉上皮细胞、内皮细胞及基质细胞,极大降低其抗原性,并且相对全身而言,异种去细胞角膜材料体积小、重量轻,植入后对血液及全身免疫状态的影响会相对较小,而局部组织中淋巴细胞的变化能够较准确地指示和反应移植后角膜免疫反应状态。

甲醛固定后石蜡包埋组织标本是目前常用的标本保存方法,具有室温保存而不需要特殊设备、保存时间久等特点。保存标本可满足不同时间点相同或不同的抗原检测。尤其适合收集的科研及临床标本的处理保存,为多种免疫学研究提供必要的条件。

免疫组织化学技术目前应用较广的是免疫酶法,它的原理是采用辣根过氧化物酶标记抗体通过使可溶性显色底物反应,指示某种特异性抗原的空间位置表达<sup>[5]</sup>。但这种方法有以下缺陷:(1)由于显色底物的扩散和沉淀易出现假阳性;(2)由于辣根过氧化物酶和底物的反应容易饱和,使得半定量分析不准确<sup>[6]</sup>。

基于此,通过查阅资料<sup>[7]</sup>,进行实验,我们确立胃蛋白酶消化法修复石蜡包埋组织标本制作过程中因甲醛固定等而封闭的抗原,建立间接免疫荧光定位染色法,抗原抗体结合后通过与荧光素标记的二抗作用后直接显色,定位定量更准确可靠,灵敏度更高。克服了免疫酶法易出现假阳性的缺点。

采用该方法对健康兔正常角膜组织检测结果为阴性,正常兔腋窝淋巴结组织检测结果为阳性,与正常组织理论相符合,说明该方法具有科学性和特异性。对鸵鸟-

兔板层移植后1,2wk取下的角膜组织进行检测,其结果,1wk时未见CD4,CD8<sup>+</sup>T细胞。2wk时在供受体基质交界面附近有较多的CD4<sup>+</sup>T细胞,未见CD8<sup>+</sup>T细胞。初步证明移植1wk尚未出现免疫排斥反应,2wk时已出现免疫排斥反应,与我们观察动物临床表现具有很好的相关性,与人同种异体角膜移植排斥反应机制极其相似<sup>[8]</sup>。

另外,在移植后2wk的HE染色组织切片中我们发现移植交界面处有大量的中性粒细胞,提示异种角膜移植机制的复杂性,推测基质金属蛋白酶(MMP-2等)表达可能会增加,下一步,我们亦可采用该法进行研究。总之,该方法将为异种角膜移植排斥反应机制研究及抗排斥药物的应用研究奠定坚实的实验基础。

#### 参考文献

- 1 刘先宁,朱秀萍,银勇,等.以干燥脱水法保存的异种角膜基质为载体构建人工生物角膜上皮组织.国际眼科杂志 2008;8(11):2214-2216
- 2 刘先宁,朱秀萍,吴洁,等.干燥脱水法保存鸵鸟拖细胞角膜基质载体材料的细胞毒性.中国组织工程研究 2013;17(33):5995-6000
- 3 吴连胜,陈建苏,徐锦堂,等.异种全厚板层角膜移植术后局部应用高渗葡萄糖的研究.眼外伤职业眼病杂志 2008;30(1):5-8
- 4 赵莺,柳林,刘银平.沙利度胺对鸵鸟-兔异种角膜板层移植术后免疫排斥反应的影响.眼科研究 2005;23(5):469-472
- 5 Leong TY, Cooper K, Leong AS. Immunohistology - past, present, and future. *Adv Anat Pathol* 2010;17(6):404-418
- 6 Hashiguchi A, Hashimoto Y, Suzuki H, et al. Using immunofluorescent digital slide technology to quantify protein expression in archival paraffin-embedded tissue sections. *Pathol Int* 2010;60(11):720-725
- 7 林旭初,金岩,惠延年.脱细胞猪角膜表面基底成分的检测.中国组织工程研究 2012;15(20):4682-4684
- 8 黄小勇,刘翔,谭小玲.角膜移植排斥反应的基础研究进展.眼视光学杂志 2007;9(1):62-65