

CTLA4-Ig 抑制兔角膜移植排斥反应的作用

石岱远¹, 王又东², 张劲松²

作者单位:¹(115200)中国辽宁省盖州市中心医院眼科;²(110032)中国辽宁省沈阳市,中国医科大学附属第四医院眼科
作者简介:石岱远,男,毕业于大连医科大学,副主任医师,主任。
通讯作者:石岱远. das991628@163. com
收稿日期:2008-10-07 修回日期:2008-12-25

• KEYWORDS: corneal transplantation; CTLA4; CD28; rabbit

Shi DY, Wang YD, Zhang JS. Inhibition effect of CTLA4-Ig on the rejection in rabbit corneal transplantation. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2009;9(2):271-273

Inhibition effect of CTLA4-Ig on the rejection in rabbit corneal transplantation

Dai-Yuan Shi¹, You-Dong Wang², Jin-Song Zhang²

¹Department of Ophthalmology, the Central Hospital, Gaizhou 115200, Liaoning Province, China; ²Department of Ophthalmology, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, Liaoning Province, China

Correspondence to: Dai-Yuan Shi. Department of Ophthalmology, the Central Hospital, Gaizhou 115200, Liaoning Province, China. das991628@163. com

Received: 2008-10-07 Accepted: 2008-12-25

Abstract

• AIM: To study the effect of CTLA4-Ig on allograft rejection after high-risk corneal transplantation by blocking CD₂₈ on the models of high-risk and non-high-risk rabbit corneal.

• METHODS: Rabbits were divided into nonvascularized group and vascularized group. Then, each group was divided into control and experimental group separately ($n = 10$). Transplantant corneas were incubated in preserving solutions for control group, contained CTLA4-Ig (10mg/L) for experimental group (4°C, 18 hours). All corneas were examined and the appearance of the graft was recorded with a slit-lamp photomicroscope after operation. Corneal grafts were examined on the 4th week and rejection happened with histology method and *in situ* hybridization method. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) on corneal graft was determined and survival days were compared between two parts.

• RESULTS: Nonvascularized group: control allografts and all experimental allografts exhibited similar frequencies of rejection. More than half of the grafts (16/30, 53%) survived during the 100-day observation period; Vascularized group: the grafts of experimental group (69 ± 34 days) had significantly longer mean survival times, compared with control group (26 ± 4 days), the expression of TNF- α was determined on corneal graft in control group *in situ* hybridization method, whereas no expression in experimental group.

• CONCLUSION: These findings demonstrate that the blockade with CTLA4-Ig has a favorable effect to restrain the rejection of high-risk corneal transplantation.

摘要

目的:建立兔角膜移植高危及非高危模型,通过阻断 CD₂₈,探讨 CTLA4-Ig 对高危角膜移植排斥反应的影响。

方法:实验分为新生血管化模型组及非新生血管化组,每组随机分成:空白对照组(空白保存液)、实验组(浸入含有 CTLA4-Ig 10mg/L 保存液 4°C 孵育 18h),每组 10 只兔。观察术后受体植片角膜混浊情况和植片病理改变,原位杂交方法检测角膜植片 TNF mRNA 的表达情况,比较植片生存时间。

结果:非新生血管化角膜移植组:对照组和实验各组的植片排斥时间或平均植片存活时间上无统计学意义,超过半数植片(16/30, 53%)存活时间超过 100d。新生血管化角膜移植组:实验组生存时间较长 69 ± 34 d, 对照组 26 ± 4 d, 原位杂交检测移植术后 4wk 或排斥反应发生时对照组角膜植片上皮基底层浸润细胞有明显的 TNF mRNA 的表达,实验组未见 TNF mRNA 表达。

结论:在兔角膜移植排斥反应中应用 CTLA4-Ig 阻断 CD₂₈,可以明显抑制兔高危角膜移植排斥反应,提高移植的存活率。

关键词:角膜移植; CTLA4; CD₂₈; 兔

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2009. 02. 016

石岱远,王又东,张劲松. CTLA4-Ig 抑制兔角膜移植排斥反应的作用. 国际眼科杂志 2009;9(2):271-273

0 引言

角膜盲人在我国约有 200 ~ 300 万,已经成为第二大致盲原因^[1],角膜移植是这部分患者复明的唯一手段。角膜移植是目前器官和组织移植成功率最高的手术,但术后的免疫排斥反应仍是手术失败的最主要原因^[2,3],尤其在血管化、角膜严重感染或大植片移植术后,免疫排斥率高达 60%^[4]。现在应用于临床一线的免疫抑制药物大多数为非特异性免疫抑制药物,并不能诱导移植特异性免疫耐受。所以,寻找稳定、有效、副作用小的特异性免疫抑制剂和联合用药方案仍是角膜移植研究的主要方向。阻断 CD₂₈/B7 共刺激通路是一个较为理想的无角膜毒性的特异性免疫抑制方案^[5]。实验证明使用 CTLA4-Ig 在啮齿类动物中可阻止 T 细胞增殖,防止排斥反应的发生^[6,7]。我们拟在兔高危及非高危角膜移植排斥反应中应用 CTLA4-Ig,探讨 CTLA4-Ig 抑制高危角膜移植排斥反应的效应,提高高危角膜移植的成功率。

1. 材料和方法

1.1 材料 新西兰大白兔 65 只,体质量 2.0 ~ 2.5 kg, 8 ~

12wk,雌雄不限,购自中国医科大学实验动物中心。成功制作非高危角膜移植受体动物模型 20 只,成功做高危角膜移植受体模型 25 只,其余 20 只兔作为供体。

1.2 方法 选择大于 3 个象限,新生血管长入距角膜中央 7mm 的 20 只兔作为高危即新生血管模型实验组^[8]。分别将新生血管化模型组及非新生血管化组随机分成:空白对照组(空白保存液)、实验组(浸入含有 CTLA4-Ig 10mg/L 保存液 4℃ 孵育 18h)。25 只兔右眼角膜 3 个象限分别间断缝合一针(5-0 丝线),跨距 5mm,深达 2/3 角膜基质层,2wk 新生血管长入角膜后拆线。其余 20 只健康新西兰白兔右眼作为供体。穿透性角膜移植在角膜缝合拆除 2~4d 之间进行,氯胺酮(50mg/kg)和氯丙嗪(10mg/kg)混合 im 全身麻醉,选择 20 只新生血管化模型组及 20 只健康兔行穿透性角膜移植术,植片与植床直径分别为 7.5mm 和 7.0mm,10-0 尼龙线间断缝合 12 针至水密状态,平衡盐溶液形成前房。对植片混浊,水肿,新生血管生长进行观察 2~3 次/wk。记录排斥指数(rejection index, RI),角膜混浊,水肿,新生血管评分合计^[9]:应用双盲法裂隙灯显微镜检查植片情况连续检测 100d(在临床医学上,移植物生存超过 100d 视为长期存活),具体评分标准如下:角膜混浊:0 分,角膜透明;1 分,角膜轻度混浊;2 分,角膜混浊加重,前房结构依然清楚;3 分,角膜明显混浊,前房结构模糊不清;4 分,角膜白色混浊,前房不入。角膜水肿:0 分,角膜无水肿;1 分,角膜基质轻度增厚;2 分,角膜基质弥漫水肿;3 分,2 分伴上皮下微小水泡;4 分,大泡性角膜病变。角膜新生血管:0 分,植片无新生血管;1 分,新生血管长入植片 1 个象限;2 分,新生血管长入植片 2 个象限;3 分,新生血管长入植片 3 个象限;4 分,新生血管长入植片 4 个象限。RI 达到或超过 6 分判定为免疫排斥反应。发生排斥反应时或移植术后 4wk 切取 1/2 角膜植片,40g/L 甲醛固定,HE 染色原位杂交判定结果。

统计学分析:所用数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采取方差分析 q 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义,所有数据均由 SPSS 11.5 软件处理。

2 结果

新西兰白兔 25 只进行角膜新生血管化模型制作,其中 20 只兔成功诱导角膜新生血管化并作为受体进行 PKP 术;另 5 只兔因发生感染或未达模型要求而被淘汰。对照组和实验各组的植片排斥时间或平均植片存活时间上无统计学意义。超过半数植片(16/30, 53%)存活时间超过 100d(图 1)。在新生血管化角膜移植组:实验组孵育于 CTLA4-Ig 10mg/L 的植片有较长的生存时间(图 2)。移植术后 4wk 或排斥反应发生时,对照组角膜植片水肿,可见新生血管长入,角膜基质中有大量的炎性细胞浸润,以单核和淋巴细胞为主,实验组未见明显的炎性细胞浸润。移植术后 4wk 或排斥反应发生时,对照组角膜植片上皮基底质层浸润细胞有明显的 TNF mRNA 的表达,CTLA4-Ig 10mg/L 实验组未见 TNF mRNA 表达。

3 讨论

在器官移植排斥反应中,诱导抗原特异性免疫应答时,T 细胞激活必须接受抗原递呈细胞(APC)递呈的双重信号^[9],即 APC 上主要组织相容性复合体(MHC)/多肽复合物与 T 细胞抗原受体(TCR)/CD₃ 复合物结合产生第一信号,还需要由抗原递呈细胞上一组黏附分子所组成的协同刺激分子-B₇ 与 T 细胞上相应的受体 CD₂₈ 相结合,产生共同刺激信号,称为第二信号,共同调节 T 淋巴细胞的

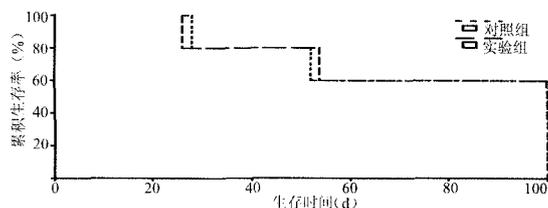


图 1 非新生血管化组

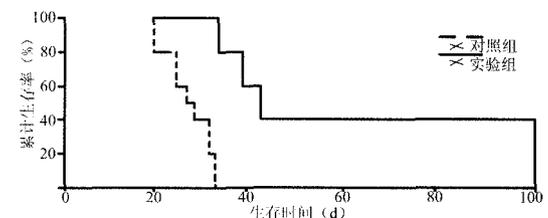


图 2 新生血管化组

增殖反应及效应功能。如果阻断 B₇ 与 CD₂₈ 相结合,抑制第二信号的产生,将导致 T 细胞的克隆失活或克隆无反应,诱导免疫耐受^[10]。CTLA4-Ig mAb 是 B₇ 的特异性阻断剂,是 Linsley 等在 1991 年采用基因重组方法构建的一种可溶性嵌合蛋白。它由人的 CTLA4 膜外部分和免疫球蛋白 CrI 链组成^[11]。CTLA4-Ig 的氨基酸序列与 CTLA-4 相同。可溶性 CTLA4-Ig 和膜结合 CD₂₈/CTLA-4 一样都能与 B₇ 分子结合,CTLA4-Ig 与 B₇ 的结合力比 CD₂₈ Ig 与 B₇ 的结合力强 20 倍。因此采用 CTLA4-Ig 与 CD₂₈ 竞争性地结合 B₇ 分子,阻断共同刺激信号的产生。抗 CD₂₈ mAb 的 Fab 片段或抗 B₇ mAb 也能阻断该信号,但它们的作用不如 CTLA4-Ig,CTLA4-Ig 是阻断 B₇-CD₂₈ 共同刺激途径地最有效制剂。CTLA4-Ig 不是在于消灭或抑制活化 T 细胞的功能,与免疫抑制剂不同。内源性 CTLA4-Ig 对 B₇ 的亲合力明显高于 CD₂₈ 的亲合力,但通常 CTLA4 受体数量明显少于 CD₂₈ 配体数量,因此当外源性 CTLA4-Ig 应用后,其可以迅速与 APC 细胞上 B₇ 结合,从而阻断 B₇/CD₂₈ 激活途径。我们在新生血管化模型中,CTLA4-Ig 治疗组角膜植片存活时间 69 ± 34 d,明显长于对照组。角膜移植术后非特异性炎症反应伴随 TNF- α 的分泌,大量的 TNF- α 可以增加角膜组织中主要组织相容性复合物(MHC)-II 类抗原的表达,提高巨噬细胞提取及递呈抗原能力,同时激活 T 淋巴细胞并促进其他细胞因子的释放,形成复杂的细胞因子网络从而加剧免疫反应发生。我们应用原位杂交法及 RT-PCR 法检测各组移植术后一定阶段的角膜植片发现在 CTLA4-Ig 治疗组未见细胞因子阳性表达,而在对照组可见 TNF- α 的表达。说明 CTLA4-Ig 治疗组降低或抑制 TNF- α 的表达,降低移植术后排斥反应,延长植片存活时间。在本实验中,可见新生血管化模型中角膜排斥反应较非新生血管化模型中角膜排斥反应易于发生。其机制有待进一步研究,但是可能由于新生血管化提高更多 B₇ 分子结合,增加 VEGF 等细胞因子大量分泌,促进排斥反应加剧,同时显现了 CTLA4-Ig 的治疗效果。临床上新生血管化角膜移植患者排斥反应高风险性也证明了这一点。反过来,也为这一类患者提供一新的治疗思路。在体内和体外实验中,CTLA4-Ig 均显示很强的免疫抑制作用。因此,阻断 CD₂₈/B₇ 共刺激通路是一个较为理想的免疫抑制方案和潜在的诱导免疫耐受方案。应用 CTLA4-Ig 来封闭 B₇ 是抑制高危角膜排斥反应的有效方法。

参考文献

- 1 赵家良. 深入开展防盲治盲是我国眼科医师的社会责任. 中华眼科杂志 2005; 41(1):3-5
- 2 Price MO, Thompson RW Jr, Price FW Jr. Risk factors for various causes of failure in initial corneal grafts. *Arch Ophthalmol* 2003; 121: 1087-1092
- 3 Hill JC. Systemic cyclosporine in high-risk keratoplasty: short-versus long-term therapy. *Ophthalmology* 1994; 101(1):128-133
- 4 史伟云, 谢立信. 重视角膜移植术后免疫排斥反应的防治. 中华眼科杂志 2006; 42(1):3-5
- 5 高华, 史伟云, 谢立信, 等. 雷帕霉素缓释片防治兔高角膜移植免疫排斥反应和新生血管增殖的研究. 中华眼科杂志 2006; 42(1):6-11
- 6 Lenschow DJ, Zeng Y, Thistlethwaite JR, et al. Long-term survival of

- xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4Ig. *Science* 1992; 257(5071):789
- 7 Pearson TC, Alexander DZ, Winn KJ, et al. Transplantation tolerance induced by CTLA4-Ig. *Transplantation* 1994; 57(12):1701
- 8 Mills RA, Jones DB, Winkler CR, et al. Topical FK-506 prevents experimental corneal allograft rejection. *Cornea* 1995; 14:157-160
- 9 Liu Y, Janeway CA Jr. Interferon γ plays a critical role in induced cell death of effect or T cell: a possible third mechanism of self-tolerance. *J Exp Med* 1990; 172(6):1735
- 10 张骄, 王义东, 张劲松. 联合阻断 CD28 和 ICOS 对兔高角膜移植排斥反应的影响. 国际眼科杂志 2007; 7(3):665-667
- 11 Hoffmann F, Zhang EP, Pohl T, et al. Inhibition of corneal allograft reaction by CTLA4-Ig. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1997; 235:535

· 病例报告 ·

单眼晶状体全脱位 1 例

刘琳, 易魁先

基金项目: 中国广东省科学技术研究基金资助项目 (No. B2006118)

作者单位: (510010) 中国广东省广州市, 广州军区广州总医院眼科
作者简介: 刘琳, 女, 毕业于中山大学中山眼科中心, 主治医师, 研究方向: 白内障、角膜病。

通讯作者: 刘琳. jiangqiangliulin@126.com

收稿日期: 2008-10-13 修回日期: 2008-12-26

刘琳, 易魁先. 单眼晶状体全脱位 1 例. 国际眼科杂志 2009; 9(2):273

0 引言

晶状体脱位的原因多为外伤或马凡氏综合征及同型胱氨酸尿症, 球形晶状体短指综合征, 而自发性单眼晶状体全脱位较为少见^[1]。我们在临床工作中遇到 1 例, 现报道如下。

1 病例报告

患者, 男, 40 岁, 2008-06-16 就诊于我院。患者右眼于 1mo 前无明显诱因下出现视力下降, 无眼红、眼痛、眼胀、头痛及复视, 曾就诊于当地医院, 诊断为右眼晶状体半脱位, 未行特殊处理。后因视力不断下降而就诊于我院。入院检查: 右眼视力为 0.05, 左眼视力为 0.5。以前双眼为轻度近视。右眼结膜无充血, 角膜透明, 房水清, 瞳孔圆, 对光反射 (+), 虹膜震颤明显, 下方前房变浅。晶状体透明, 向鼻下方脱位, 于瞳孔中心可见 10:30 晶状体赤道部。晶状体脱位处未见悬韧带, 晶状体后的玻璃体前界膜完整, 无玻璃体脱出。诊断: 右眼晶状体脱位。术中发现: 患者平躺后晶状体位置明显改变, 说明晶状体已全脱位。治疗方法: 拟行晶状体囊内摘除术。右眼球后麻醉及上直肌吊线后, 做 4:00~8:00 球结膜剪开并充分止血。做 3:00 和 9:00 巩膜瓣, 之后沿角膜缘后界稍前剪开, 长

约 10mm。左手用有齿镊下压角膜切口后唇, 右手持截囊钩拟将脱位晶状体转出切口, 但一压后唇, 晶状体自动从角膜切口绷出, 伴大量玻璃体脱出, 眼球变扁。遂立即用有齿镊向后拉前唇, 以与后唇接触而暂时关闭切口。角膜间断缝合 5 针。显微剪剪除切口处的玻璃体, 再用前段玻切头行前段玻璃体切除。吊线法植入人工晶状体。卡米可林缩瞳, 最后再次清除前房及人工晶状体前的玻璃体, 至瞳孔复圆为止。术后第 3d 视力为 0.1, 7d 后恢复到 0.2, 视力不佳可能与角膜散光及玻璃体轻度混浊有关。

2 讨论

本例患者无眼外伤史, 智力正常, 骨骼系统、心血管系统及泌尿系统均未见异常。家族中也无同类患者, 故可诊断为自发性晶状体脱位。自发性晶状体脱位多见于葡萄膜慢性炎症患者及高度近视患者, 本例患者无眼红痛病史, 仅有轻度近视, 考虑发病原因为先天晶状体悬韧带发育异常所致。以往报道晶状体全脱位的手术方法为先用针固定晶状体后再行晶状体囊内摘除术^[2], 此方法对于晶状体已脱入玻璃体腔, 有玻璃体脱出者有效。但对于玻璃体前界膜完整, 无玻璃体脱出的患者, 我们采用晶状体囊内摘出术, 即扩大角膜切口至足够大, 约 10mm 左右, 用压迫及旋转法将脱位的晶状体娩出。此方法在患者合作的情况下晶状体可顺利娩出, 且不伴有玻璃体的脱出。但如出现后段眼压高时, 如患者过于紧张, 眨眼频繁, 则在娩出晶状体的瞬间可伴随玻璃体大量脱出, 眼球迅速变软, 有可能出现暴发性脉络膜出血。此时应及时关闭角膜切口, 稳定眼内压, 之后彻底清除前房内的玻璃体^[3], 并植入吊线式人工晶状体。我们认为这是治疗晶状体全脱位且未脱入玻璃体腔的较佳方式, 也是较简单实用的一种方式。

参考文献

- 1 苏颖, 王继群, 刘平. 超声乳化术联合人工晶体植入治疗小儿晶状体半脱位. 中国实用眼科杂志 2004; 22(11):892-893
- 2 刘晓, 姜倩钰, 胡秀玲. 外伤性晶体脱位手术方法的探讨. 眼外伤职业眼病杂志 2006; 28(8):573-575
- 3 李光玲, 冯熠. 外伤性晶体脱位的手术治疗. 眼外伤职业眼病杂志 2004; 26(10):694-695