

体外培养人角膜上皮细胞中 CD44 的表达及 IFN- γ 和雷公藤多甙对其的影响

张胜娟 闫志鹏 宋秀君 张晓融 卞小芸

Expression of CD44 in cultured human corneal epithelium and the influence of IFN- γ and Glucosida Tripterygii TOTA to it

Zhang Shengjuan, Yan Zhipeng, Song Xiujun, Zhang Xiaorong, Bian Xiaoyun. Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, China

Abstract Objective Along with the unceasing investigation of immunological rejection molecular mechanism, researchers found that adhesion molecule has a close relation to organ-graft refection. This experiment observed the expression of CD44 in normal human corneal epithelial cells and evaluated the influence of interferon- γ (IFN- γ) and Glucosida Tripterygii TOTA on expression of CD44. **Methods** Human corneal epithelial cells were isolated from 11 normal corneas of donors and cultured in SHEM culture media. The cultured cells were randomly assigned to 0, 100, 200, 500, 1 000 U/mL IFN- γ for culture for 24 hours respectively (group A, B, C, D, E) and 500 U/mL of IFN- γ was used to treat cultured cells for 48 and 72 hours (group F, G). Corneal epithelial cells were treated by 500 U/mL IFN- γ for 24 hours then followed free-drug culture for 24 hours in group H. 0.03% Glucosida Tripterygii TOTA was added to the media for 24 hours after 500 U/mL IFN- γ cultured 24 hours in group I. Flow cytometry was used to analyze the fluorescence index (FI) of CD44 in cultured human corneal epithelium cells. **Results** Cultured human corneal epithelial cells constitutively expressed certain amount of CD44 (1.944 ± 0.237) (group A), and the FI of CD44 was significantly elevated in different concentrations of IFN- γ groups and different time ($P < 0.05$) at a concentration- and time-independent manner. The FI of CD44 was 3.213 ± 0.073 in Glucosida Tripterygii TOTA group (group I), and that without Glucosida Tripterygii TOTA group (group H) was 3.618 ± 0.061 , showing a significant difference between them ($P < 0.01$). **Conclusion** IFN- γ can enhance the expression of CD44 in human corneal epithelial cells and thereby aggravate the corneal graft rejection. Glucosida Tripterygii TOTA can depress the CD44 expression.

Key words corneal epithelial cells; CD44; interferon- γ ; Glucosida Tripterygii TOTA; corneal graft rejection

摘要 目的 探讨黏附分子 CD44 在角膜上皮细胞中的表达及干扰素- γ (IFN- γ) 和雷公藤多甙对角膜上皮细胞中 CD44 表达的影响。**方法** 采用细胞培养和流式细胞技术,分别观察同一培养时间(24 h)不同 IFN- γ 含量和同一 IFN- γ 含量不同培养时间对人角膜上皮细胞 CD44 表达的影响及 0.03% 雷公藤多甙对角膜上皮细胞中 CD44 表达的影响。**结果** 体外培养的人角膜上皮细胞可基础表达一定量的 CD44 (1.944 ± 0.237), IFN- γ 可上调 CD44 的表达,其上调作用呈量和时间依赖性 ($P < 0.05$)。雷公藤多甙可以使角膜上皮中 CD44 的表达降低 ($P < 0.01$)。**结论** IFN- γ 可以使角膜上皮细胞中 CD44 的表达升高,使排斥反应加剧;雷公藤多甙可以抑制角膜上皮细胞中 CD44 的表达,从而抑制角膜移植排斥反应。

关键词 角膜上皮细胞; CD44; 干扰素- γ ; 雷公藤多甙; 角膜移植排斥

分类号 R 772 R 988.1 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)03-0188-04

黏附分子 CD44 是分布极为广泛的细胞表面糖蛋白。有研究发现角膜移植时角膜上皮层 CD44 的表达

增强^[1];干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 主要由活化的 T 细胞和自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK) 产生,有研究显示 IFN- γ 可以作为急性排斥反应的指标^[2]。另有研究认为雷公藤多甙是通过抑制 T 细胞分泌细胞因子和炎性细胞的浸润来抑制角膜排斥反应的发

作者单位:050051 石家庄,河北医科大学第三医院眼科
通讯作者:宋秀君 (Email:xiujuns2000@yahoo.com.cn)

生^[3]。本实验观察 IFN- γ 及雷公藤多甙对角膜上皮细胞 CD44 表达的影响,探讨雷公藤多甙抑制角膜移植排斥反应的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 人角膜缘环(角膜移植术取移植片后剩余部分)及外伤后摘除的眼角膜共 11 个,均来自中国河北省眼库,离体保存时间均小于 12 h。

1.1.2 主要试剂及仪器 CD44 为鼠抗人单克隆抗体(美国 Biologend 公司);SHEM 固体培养基(GIBCOBRL, 美国);重组人表皮生长因子(美国 PerproTech 公司);胎牛血清(民海生物工程有限公司);重组人干扰素- γ (上海克隆生物高技术有限公司);雷公藤多甙(湖南协力药业有限公司)。D-63450 型贺利氏(Heraeus) CO₂ 培养箱(德国);Epics-XL II 型流式细胞仪(美国);SW-CJ-1F 型净化工作台;Olympus-CK40 倒置相差显微镜(日本)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将角膜用 1:1 000 的妥布霉素消毒处理并用无 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 Hanks 平衡盐溶液冲洗后,去除结膜组织、色素膜、周围巩膜及角膜内皮,制成宽约 2 mm 的角膜缘环,将角膜缘环切成大小一致的 12 块组织,用镊子将组织块上皮细胞面朝上置于 6 孔的塑料培养板上,每孔放置 2 块组织块。在净化工作台中晾置 20~30 min 后,每组织块上滴加 1 滴胎牛血清并使血清完全覆盖组织块,然后将培养板放入 37℃,5% CO₂ 的培养箱内,24 h 后每孔滴加培养液 1 mL。48 h 后每孔加足培养液至 3 mL。每 2 d 更换 1 次培养液。至细胞长至 70% 融合时分为 A、B、C、D、E、F、G、H、I 组,分别

进行处理:(1)A、B、C、D、E 组分别加入含 0、100、200、500、1 000 U/mL IFN- γ 的培养液作用 24 h。(2)F 组、G 组加入含 500 U/mL 的 IFN- γ 的培养液分别作用 48 h、72 h。(3)H 组加入含 500 U/mL IFN- γ 的培养液作用 24 h 后,改加不含药物的培养液作用

24 h;I 组加入含 500 U/mL IFN- γ 的培养液作用 24 h 后,改加含 0.03% (300 mg/L) 雷公藤多甙的培养液作用 24 h。收集上述各组角膜上皮细胞,应用流式细胞技术观察细胞中 CD44 的表达情况。

1.2.2 流式细胞仪检测 IFN- γ 和雷公藤多甙对角膜上皮细胞 CD44 表达的影响 将处理好的细胞用流式细胞仪检测 CD44 表达的荧光强度,首先调整细胞密度为 1×10^6 /mL,随后进行细胞的 CD44 免疫荧光标记:取单细胞悬液 1×10^6 /mL,加入鼠抗人单克隆抗体工作液 0.1 mL,室温孵育 30 min,加入 PBS 液 10 mL 洗涤 1 次,弃上清,加入羊抗鼠 FITC-IgG 二抗工作液 100 μ L,避光室温孵育 30 min,加入 PBS 液 10 mL 离心同上,弃上清以除去未结合的荧光二抗,上机进行检测,并设二抗 FITC 的阴性对照。

1.3 统计学方法

应用流式细胞仪和 Expo32 ADC 进行免疫荧光数据分析,采用 SPSS 12.0 统计学软件对实验数据进行处理,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多个样本均数间的总体比较采用多因素方差分析,组间的多重比较采用最小显著差异(LSD)*t* 检验,两样本均数间的比较采用成组设计的 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

角膜上皮细胞可以基础表达一定量的 CD44,其荧光指数为 1.944 ± 0.237 。经含 0、100、200、500、1 000 U/mL IFN- γ 的培养液作用 24 h 的角膜上皮细胞表达 CD44 的量随着 IFN- γ 含量的增高而逐渐增高 ($F = 65.862, P < 0.01$),经 LSD-*t* 检验各组之间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。其平均荧光指数分别为 1.944 ± 0.237 、 2.665 ± 0.356 、 3.268 ± 0.175 、 $3.572 \pm$

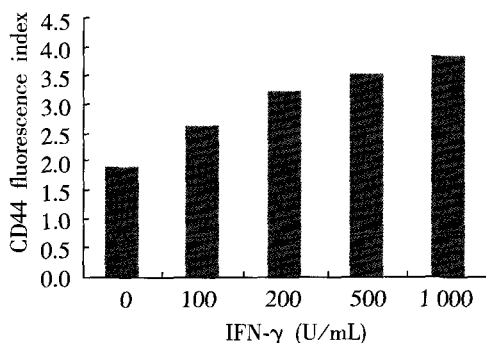


图 1 A、B、C、D、E 组角膜上皮细胞 CD44 荧光指数的变化

Fig. 1 The FI of CD44 in human corneal epithelium cells of A, B, C, D, E groups is increased gradually ($F = 65.862, P < 0.01$) (One-way ANOVA, LSD-*t* test)

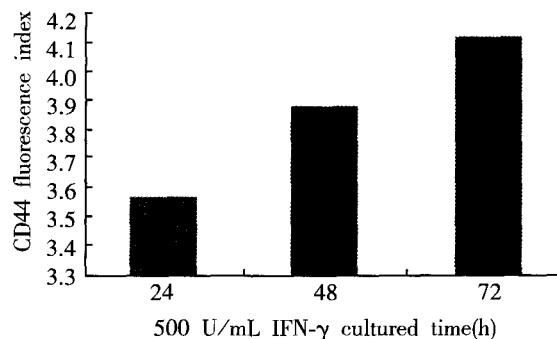


图 2 D、F、G 组角膜上皮细胞 CD44 荧光指数的变化

Fig. 2 The FI of CD44 in human corneal epithelium cells in D, F, G groups is increased gradually ($F = 20.090, P < 0.01$) (One-way ANOVA, LSD-*t* test)

0.213、 3.878 ± 0.109 (图 1)。经含 500 U/mL IFN- γ 的培养液分别作用 24、48、72 h 的角膜上皮细胞表达 CD44 的量随着时间的延长而逐渐增高 ($F = 20.090$, $P < 0.01$), 经 LSD- t 检验各组之间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。其平均荧光指数分别为 3.572 ± 0.214 、 3.893 ± 0.095 、 4.077 ± 0.059 (图 2)。

加入含 500 U/mL IFN- γ 的培养液作用 24 h 后, 改加不含药物的培养液作用 24 h, 人角膜上皮细胞 CD44 的平均荧光指数为 3.618 ± 0.061 ; 加入含 500 U/mL IFN- γ 的培养液作用 24 h 后, 改加含 0.03% (300 mg/L) 雷公藤多甙的培养液作用 24 h, 人角膜上皮细胞 CD44 的平均荧光指数为 3.213 ± 0.073 。经成组 t 检验得出两组之间比较, 差异有统计学意义 ($t = 10.455$, $P < 0.01$) (表 1)。

表 1 H 与 I 组角膜上皮细胞 CD44 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 CD44 expression in corneal epithelial cells in H and I groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	FI
H	6	3.618 ± 0.025
I	6	3.213 ± 0.030
t		10.455
P		0.01

3 讨论

CD44 是细胞黏附分子家族中的重要成员之一, 近年来研究发现 CD44 与移植排斥反应的发生发展密切相关^[4]。本研究发现体外培养的人角膜上皮细胞可以表达一定量的 CD44, 与以往研究结果相一致^[1]。

IFN- γ 主要由活化的 T 细胞和 NK 细胞产生, 它能激活中性粒细胞和 NK 细胞、巨噬细胞的杀伤活性, 使之在细胞因子的介导下, 产生排斥反应, 增加移植物主要组织相容性复合物 (major histocompatibility complex, MHC) I 类和 II 类抗原的表达^[5]。有研究显示 IFN- γ 可作为急性排斥反应的指标^[2]。近年来的研究表明, 在阻断 T 细胞活化通路、延长移植物生存时间的同时, 常伴有 IFN- γ 表达的降低^[6]。郑劲草等^[7]发现 IFN- γ 使人胰腺癌细胞 CD44 蛋白表达增加。本研究使用体外培养的角膜上皮细胞观察 IFN- γ 对 CD44 的作用。因为是体外培养, 所以不存在植片和植床之间的 T 细胞活化链, 观察到的仅为 IFN- γ 对角膜上皮细胞 CD44 表达的影响。结果发现: (1) 同一培养时间不同 IFN- γ 含量的角膜上皮细胞表达 CD44 的量随着 IFN- γ 含量的增高而逐渐增高, 各组之间差异均有统计学意义; (2) 同一 IFN- γ 含量不同培养时间的角膜

上皮细胞表达 CD44 的量随着时间的延长而逐渐增高, 各组之间差异均有统计学意义。说明 IFN- γ 可以使人角膜上皮细胞 CD44 蛋白的表达升高, 其影响呈时间及含量依赖性。

角膜移植排斥反应是由多种免疫细胞和免疫分子共同参与、受多种因素调节的复杂的免疫网络反应过程。角膜移植术后, 角膜免疫排斥反应主要由 T 淋巴细胞介导。当供体与受体角膜组织相容性白细胞抗原不符时, 即可能发生免疫排斥反应^[8]。活化的 CD4⁺ T 细胞分化为 1 型辅助性 T 细胞 (Th1) 和 2 型辅助性 T 细胞 (Th2)^[9]。Th1 细胞亚群分泌 IFN- γ 、IL-2 等细胞因子, 其介导细胞免疫反应导致角膜移植排斥反应发生^[10]。黏附分子 CD44 参与了抗原递呈细胞将供体角膜的异种抗原递呈给 Th 细胞的过程, 并参与了 T 细胞的激活、静止 T 细胞的增生^[11]和 T 细胞向靶组织的定向渗出, Th1 细胞激活后释放的 IFN- γ 等细胞因子升高, 导致角膜 MHC I 类抗原表达增加和 MHC II 类抗原的表达, 从而加剧免疫排斥反应。本实验研究发现, IFN- γ 可以使体外培养的人角膜上皮细胞 CD44 蛋白的表达升高, 其影响呈时间及含量依赖性。角膜移植排斥的 Th1 途径由 IFN- γ 和 CD44 形成一个环路, 即 CD44 激活 T 细胞, 使 T 细胞向靶组织定向渗出, 进而使 IFN- γ 释放增多, IFN- γ 的升高又可以导致 CD44 的升高, 如此形成一个类似正反馈的环路, 如果不予以阻断, 将不断加重角膜移植排斥反应, 使病情不断恶化。

雷公藤多甙包含多种成分 (二萜内酯、生物碱、三萜等), 既保留了雷公藤生药的免疫抑制作用, 又去除了许多毒性成分。有研究证明雷公藤多甙片可成功地抑制实验性角膜移植排斥反应^[12]。为避免雷公藤制剂全身应用所带来的不良反应, 邓宏伟等^[3]研制出雷公藤多甙滴眼液, 并将其应用于大鼠角膜移植排斥模型, 该研究认为雷公藤多甙是通过抑制 T 细胞介导的 IV 型超敏反应来减轻角膜移植排斥反应。本实验配制 0.03% 雷公藤多甙的滴眼液对体外培养的人角膜上皮细胞进行干预。结果发现雷公藤多甙可以使人角膜上皮细胞 CD44 蛋白的表达下降, 提示雷公藤多甙可能通过降低 CD44 蛋白的表达来减轻角膜移植免疫排斥反应。其作用机制可能为直接抑制异体植片角膜上皮细胞 CD44 的表达, 减少异体抗原的递呈, 阻断 Th1 通路从而减轻移植排斥反应。

总之, IFN- γ 可以使体外培养的角膜上皮细胞 CD44 表达升高, 加剧角膜移植排斥反应; 相反, 雷公藤多甙可以使体外培养的角膜上皮细胞中升高的 CD44

表达下降,从而减轻角膜移植排斥反应。对指导临床治疗具有重要意义。

参考文献

- Zhu SN, Nolle B, Duncker G. Expression of adhesion molecule CD44 on human corneas[J]. Br J Ophthalmol, 1997, 81: 80 - 84
- Affleck DG, Bull DA, Albanil A, et al. Interleukin-18 production following murine cardiac transplantation; Correction with histologic rejection and induction of IFN-gamma [J]. J Interf Cytok Res, 2001, 21(1): 1 - 9
- 邓宏伟, 陈建苏, 李辰, 等. 雷公藤多甙滴眼液防治大鼠角膜移植排斥反应的实验研究[J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(9): 1141 - 1143
- 尚攀峰. CD44 与移植排斥反应研究进展[J]. 国外医学·移植与血液净化分册, 2005, 3(1): 38 - 41
- Williams JG, Jurkovich GJ, Maier RV. Interferon γ : A key immunoregulatory lymphokine[J]. J Surg Res, 1993, 54(1): 79 - 83
- Newell KA, He G, Guo Z, et al. Cutting edge: blockade of the CD28/B7 costimulatory pathway inhibits intestinal allograft rejection mediated by CD + 4 but not CD + 8 T cells [J]. J Immunol, 1999, 163(5): 2358 - 2362
- 郑劲草, 许国铭, 李淑德, 等. 干扰素 γ 对人胰腺癌细胞 CD44 蛋白表达的影响[J]. 第二军医大学学报, 1998, 19(5): 473 - 474
- 刘银萍, 柳林. 细胞间黏附分子与角膜移植免疫[J]. 眼科研究, 2005, 23(5): 546 - 548
- 张晗, 黄一飞. 角膜移植的免疫学研究进展[J]. 中国实用眼科杂志, 2006, 24(4): 357 - 360
- 王玉宏, 孙兴怀, 周行涛, 等. 大鼠角膜移植术后植片内 γ 干扰素 mRNA 的表达及血清白介素 2 的变化[J]. 眼视光学杂志, 2005, 7(2): 88 - 91
- 沈峰, 郭亚军, 吴孟超. LFA-1, LFA-2, CD44 和 CD45 分子对 T 细胞的共刺激作用[J]. 第二军医大学学报, 1995, 16(3): 218 - 222
- 李志杰, 李辰. 雷公藤多甙防治角膜移植免疫排斥反应实验研究[J]. 眼科研究, 1996, 14(2): 76 - 78

(收稿: 2008-03-07 修回: 2008-10-25)

(本文编辑: 刘艳)

· 短篇论著 ·

玻璃体腔注射促红细胞生成素对大鼠视网膜结构和功能的影响

解正高 陈放 庄朝荣 马晓蓉 华欣

促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)对视网膜光损伤、视网膜缺血-再灌注损伤、高眼压视网膜神经节细胞损伤、视神经损伤诱导的神经节细胞损伤及视神经轴突再生、早期糖尿病视网膜病变视网膜神经元、血-视网膜屏障和变应性视神经脱髓鞘病变均具有保护作用。本研究将重组大鼠 EPO 注入大鼠玻璃体腔,旨在观察 EPO 对视网膜的结构和功能的影响以及是否会诱发视网膜新生血管形成。

1 材料与方法

1.1 实验动物 6 只正常雄性 SD 大鼠(中科院上海实验动物中心提供,鼠龄为 8 周,体重(200 ± 20)g,眼部检查无异常;每只大鼠的右眼用于实验。

1.2 玻璃体腔给药 采用速眠新注射液在大鼠大腿部肌肉注射麻醉(0.6 mL/kg)后,美多丽滴眼液点眼 3 次,倍诺喜滴眼液表面麻醉。角膜放置自制的前置镜,凹面填充透明质酸钠。于角膜缘后约 2.0 mm 处用 4 号针头行睫状体平坦部穿刺,避免损伤晶状体;沿穿刺口插入微量进样器针注射 5 μ L 重组大鼠 EPO(美国 Sigma 公司)400 ng;术毕涂迪可罗眼膏。

1.3 闪光视网膜电图(flash electroretinogram, FERG)检查 于注药前和注药后 3 d 分别行 FERG 检查。采用速眠新 0.6 mL/kg 大腿部肌肉注射麻醉,点倍诺喜滴眼液点眼表面麻醉,美多丽滴眼液散瞳点眼。暗适应 30 min 后,采用 Tomey EP1000(日本 Tomey 公司)分别记录 FERG 最大反应和视网膜振荡电位。刺激参数:刺激器为全视野 Ganzfeld Q400,刺激光强

2.5 cd · s/m², 采样频率 2 000 Hz, 500 μ s, 通频带 0.3 ~ 300 Hz。振荡电位:刺激频率 0.07 Hz, 循环时间 14.286 ms, 采样频率 2 000 Hz, 500 μ s, 通频带 75 ~ 300 Hz, 叠加 3 次。记录电极采用环形金属电极,放置于涂有迪可罗眼膏的角膜缘;钢针参考电极置于颞部皮下;钢针地电极置于尾部皮下。

1.4 光学显微镜检查 注射后 14 d 和 2 个月采用腹腔注射过量 1% 戊巴比妥钠各处死 2 只大鼠,于角膜 12:00 处缝线作标记,保留 12:00 角膜缘处的球结膜,去除其他部位的球结膜,迅速摘除眼球,置入 10% 中性甲醛固定液中,24 h 后沿缝线标记做经视盘的矢状切片,然后梯度乙醇脱水、石蜡包埋、切片(片厚 5 μ m)、苏木精-伊红染色,光学显微镜下观察摄像。

1.5 透射电子显微镜检查 注药后 3 d, FERG 检查后处死 2 只大鼠后迅速摘除眼球;于碎冰上去除眼前节和玻璃体并小心剥离神经视网膜固定于 2% 戊二醛磷酸盐缓冲液中固定 2 h,再用 1% 锇酸缓冲液固定 2 h;梯度乙醇脱水,环氧树脂 618 包埋;超薄切片(50 ~ 70 nm)、醋酸铀和枸橼酸铅双重染色;透射电子显微镜下观察、摄像。

1.6 统计学方法 所有计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SAS 6.12 统计学软件对数据进行统计学处理。注药前后的 FERG 变化进行配对 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验动物活体眼部观察 注药后 3 d 在手术显微镜下进行活体观察。所有手术眼角膜透明,前房无渗出,晶状体透明,晶状体后囊虽有轻微损伤,但未导致明显的晶状体混浊。玻璃体透明,无白色粉尘样结晶,眼底清晰可见,视网膜无明显水肿、出血,血管形态未见明显异常改变。

作者单位:225001 扬州,江苏省苏北人民医院 扬州大学临床医学院眼科

通讯作者:解正高 (Email: zgxie87@163.com)