

单纯疱疹病毒性角膜炎患者外周血免疫表型的差异^①

刘祖国^{1,②} 陈家祺¹ 李绍珍¹ 曾耀英² 孙 红²

(1 中山医科大学中山眼科中心; 广州, 510080 2 暨南大学组织器官移植中心; 广州, 510632)

摘 要 应用流式细胞术(FCM)检测 36 例单纯疱疹性角膜炎(HSK)患者外周血 30 项免疫表型的变化, 并与 8 例正常人进行对照。结果显示 HSK 基质型与溃疡型 CD8、HLA-DP、HLA-DR 抗原表达阳性细胞明显高于正常人, 基质型 CD10 也高于正常人。HSK 基质型与溃疡型 CD9、CD45RA 抗原表达阳性细胞明显低于正常人, 溃疡型 HLA-ABC 也低于正常人, 其他抗原表达阳性细胞与正常人无差异; HSK 基质型 CD10、CD69、CD71 抗原表达阳性细胞显著高于 HSK 溃疡型组, 其他抗原表达阳性细胞两组无差异。此结果提示机体免疫功能紊乱及自身免疫反应可能是决定 HSK 是否发生及发生后 HSK 表现的临床类型的重要因素。HSK 基质型机体可能具有强的激活免疫细胞的能力, 而 HSK 溃疡型的机体激活免疫细胞的能力不足。

主题词 角膜炎, 疱疹性/免疫学; 免疫表型分型

中图分类号 R 772.21

单纯疱疹病毒性角膜炎(herpes simplex keratitis, HSK)是由单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)引起的角膜炎症性疾病, 目前已成为世界性的致盲眼病之一, 在我国占致盲角膜病的首位^[1]。HSK 的病因明确, 但机体感染 HSV 后是否发病及发病的临床表现类型有个体差异。因此研究表明机体的免疫功能及免疫遗传背景在 HSK 的发生、发展及复发中具有十分重要的作用^[2]。目前对 HSK 与免疫功能的关系仍未完全阐明, 在人类除了对 HSK 患者外周血 CD4、CD8 细胞^[3]及活性 T 细胞、E 玫瑰花结形成细胞和巨噬细胞移动抑制因子进行了检测外, 了解十分有限。为此我们应用流式细胞术(flow cytometry)对 HSK 的患者外周血的免疫细胞变化进行较详细的研究, 试图揭示人类免疫功能与 HSK 的关系。

1 材料与方 法

1.1 病例资料

取临床已确诊为 HSK 病例共 36 例。以溃疡为主要临床表现(包括树枝状角膜炎, 地图状角膜溃疡, 不规则形角膜溃疡及角膜穿孔)的溃疡型组 18 例(男 15 例, 女 3 例; 右眼 8 例, 左眼 10 例), 年龄 20

~59 岁。以角膜基质水肿为主要临床表现的基质型组(包括角膜基质炎、角膜内皮炎及角膜内皮葡萄膜炎)18 例(男 15 例, 女 3 例; 右眼 7 例, 左眼 9 例, 双眼者 2 例), 年龄 21 ~ 50 岁; 此组病例全部有反复发作史。在取外周血进行实验时, 两组病例均有活动性炎症表现。另取身体健康的正常人 8 例作对照, 正常组为暨南大学组织器官移植中心工作人员及暨南大学学生, 其中男 5 例, 女 3 例, 年龄 20 ~ 25 岁。3 组年龄经统计学处理无明显差异。

1.2 单克隆抗体

单克隆抗体为荧光 FITC(异硫氰酸荧光素)或 PE(藻红蛋白)标记的小鼠抗人荧光标记单克隆抗体, 共 30 种, 为以下抗原的抗体: CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD9、CD10、CD11a、CD11b、CD15、CD16、CD18、CD19、CD23、CD27、CD38、CD41、CD42、CD45、CD45RA、CD57、CD69、CD71、HLA-ABC、HLA-DR、HLA-DP、HLA-DQ、IL-IRP55、IL-IRP75, 均购自美国 BDIS(Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose)。

1.3 实验方法

1.3.1 淋巴细胞荧光抗体标记 新鲜的全血 30 μ L 与抗体 10 μ L 混合, 室温孵育 30 min。用红细胞裂解液(0.155 mol/L NH_4Cl , 0.01 mol/L KHCO_3 ,

① 广东省自然科学基金 1996 年重点项目基金资助课题; ② 第一作者, 1962 年出生, 男, 博士, 副教授

0.1 mol/L MEDTA, pH7.4) 裂解红细胞, 离心获取有核细胞, 用 PBS 洗涤后, 用 1% 多聚甲醛 PBS 固定 10 min 后用流式细胞仪分析。

1.3.2 流式细胞仪数据获取及分析 全部数据用流式细胞仪(FAC Star Plus, 美国 BD 公司)和软件 LYSYS II 进行双色荧光参数获取及分析。简述如下: 在前散射(FSC)和侧散射(SSC)的二维 Dot-plot 图中, 划出淋巴细胞区, 然后对淋巴细胞作 FITC 和 PE 的荧光强度检测, 荧光 I (FL1) 为 FITC, 滤光片为(530±10) nm 带通, 荧光 II (FL2) 为 PE, 滤光片为(575±10) nm 带通。数据分析时, 在确定每次检测阳性细胞百分率之前, 根据 Isotype 的非特异性荧光强度设定界限, 以确定双阴性、双阳性及单阳性

区。

1.4 统计方法

按《中国医学百科全书、医学统计学》统计组合软件 main-men 进行统计。采用计量资料多个样本的均数比较及两两比较, *F* 检验。

2 结果

2.1 基质型与正常组比较

HSK 基质型 CD8、CD10、HLA-DP、HLA-DR 抗原表达阳性细胞明显高于正常人, CD9、CD45RA 抗原表达阳性细胞显著低于正常人(表 1), 其他抗原表达阳性细胞与正常人无差异。

表 1 HSK 基质型与正常组抗原表达阳性细胞的百分率 ($\bar{x} \pm s$) %

	基质型组	正常组	<i>P</i>
CD8	49.2±14.3	21.9±2.4	< 0.001
CD9	6.7±4.1	16.5±7.0	< 0.001
CD10	4.7±2.4	1.5±0.9	< 0.001
CD45RA	80.1±11.6	91.8±2.8	< 0.001
HLA-DP	12.2±4.9	7.5±3.2	< 0.05
HLA-DR	28.5±11.7	11.8±2.6	< 0.001

2.2 HSK 溃疡型与正常组比较

HSK 溃疡型 CD8、HLA-DP、HLA-DR 抗原表达

阳性细胞显著高于正常人, CD9、CD45RA、HLA-ABC 抗原表达阳性细胞明显低于正常人(表 2), 其他抗原表达阳性细胞与正常人无差异。

表 2 HSK 溃疡型与正常组抗原表达阳性细胞的百分率 ($\bar{x} \pm s$) %

	溃疡型组	正常组	<i>P</i>
CD8	49.1±14.8	21.9±2.4	< 0.001
CD9	4.6±2.9	16.5±7.0	< 0.001
CD45RA	69.5±9.9	91.8±2.8	< 0.001
HLA-ABC	91.6±4.8	96.9±1.3	< 0.05
HLA-DP	13.9±5.7	7.5±3.2	< 0.05
HLA-DR	31.2±6.1	11.9±2.6	< 0.001

2.3 HSK 基质型与 HSK 溃疡型比较

HSK 基质型 CD10、CD69、CD71 抗原表达阳性

细胞显著高于 HSK 溃疡型组(表 3), 其他抗原表达阳性细胞两组无差异。

表 3 HSK 基质型与 HSK 溃疡型组抗原表达阳性细胞的百分率 ($\bar{x} \pm s$) %

	基质型组	溃疡型组	<i>P</i>
CD10	4.7±2.4	3.3±2.1	< 0.05
CD69	4.3±3.8	1.7±1.1	< 0.05
CD71	6.1±4.2	3.0±1.8	< 0.05

3 讨论

3.1 HSK 病人外周血免疫功能变化

关于 HSK 与机体免疫功能的关系, 已有较多的动物实验(主要为鼠)报告, 而对人的研究报道较少。研究表明同一病毒株在人及鼠的反应不完全相同, 因而实验结果难以解释临床上所面临的问题^[4]。为了全面了解 HSK 患者全身免疫功能的变化, 我们检测了 HSK 患者外周血 30 个免疫成分。本研究显示 HSK 患者 CD8 细胞表达在基质型组及溃疡型组均明显升高, 使 CD4/CD8 的比值下降, 与其他研究的结果基本相同。本研究还显示 CD9 细胞及 CD45RA 细胞在 HSK 基质型组及溃疡型组均降低, CD10 在基质型组升高。MHC-II 类抗原(HLA-DP、HLA-DR)在 HSK 基质型组及溃疡型组较正常组明显升高, 而 MHC-I 类抗原(HLA-ABC)在 HSK 溃疡组较正常组均降低, 在 HSK 基质型组与正常无差异。CD10、CD69 及 CD71 在 HSK 基质型组较溃疡型组明显升高。

3.2 HSK 病人外周血免疫功能变化与其发病机制的关系

3.2.1 CD8 抗原表达升高在 HSK 发病中的意义

HSK 活动期病人外周血的 CD4 细胞较正常人低或基本正常, 而 CD8 细胞明显升高, 从而导致 CD4/CD8 的比值下降。CD8 细胞可分为 T_s 及 T_c 亚群, 因而本结果有以下两种可能性: ①如 T_s 升高, 表示 HSK 活动期患者 Th 与 T_s 细胞间的平衡失调, 引起机体的免疫功能发生紊乱, 从而导致 HSK 的发生及复发; ②如为 T_c 的升高, 则说明机体在病毒感染的诱导下产生了对病毒的攻击, T_c 的升高对抗病毒是有利的, 但也可能损伤正常的角膜组织, 从而导致自身免疫反应。

3.2.2 MHC 抗原表达差异与 HSK 发病的关系

本组研究显示 HSK 溃疡型患者外周血淋巴细胞 MHC-I 类抗原表达降低, HSK 基质型与溃疡型患者 MHC-II 类抗原(HLA-DP、HLA-DR)表达均明显升高。说明 HSK 病人的免疫反应模式与正常人存在明显不同, HSK 疾病的两种类型免疫反应模式也

不完全相同。外周血淋巴细胞表面 MHC-I 类抗原表达降低是否能间接反映病毒感染的靶细胞表面 MHC-I 类抗原表达也降低尚需进一步研究。但如能反应靶细胞表面 MHC-I 类抗原表达降低, 则说明 HSK 溃疡型患者是由于清除病毒的 CTL 细胞活性下降, 导致病毒不能立即被清除, 从而使此型疾病病情迁延漫长。MHC-II 类抗原表达升高, 是由于 HSV 的诱导而产生, 患者局部角膜的免疫化学研究也显示了角膜细胞 HLA-DR 抗原异常表达, 说明自身免疫反应在 HSK 的发生及复发中具有十分重要的作用。

3.2.3 CD69 及 CD71 抗原表达差异在 HSK 临床类型中的意义 本组结果显示 HSK 基质型 CD69 (激活的 T 细胞和激活的 B 细胞及巨噬细胞均表达此分化抗原)及 CD71(增殖细胞及转铁蛋白受体表达此分化抗原)较 HSK 溃疡型高, 说明机体感染 HSV 后, HSK 基质型个体激活的 T、B 细胞及巨噬细胞的能力大于 HSK 溃疡型个体; 在 HSK 基质型个体, 激活的 T、B 细胞及巨噬细胞的增加对清除感染的病毒是有利的, 但同时也会损害机体自身组织。在 HSK 溃疡型的个体由于激活 T、B 细胞及巨噬细胞的不足, 不能立即清除感染的病毒, 导致病情迁延漫长。此结果与临床相吻合, 因而为解释临床上 HSK 所面临的问题提供了免疫学依据。

参 考 文 献

- 1 刘祖国, 陈家祺, 金 姬, 等. 单疱病毒性角膜炎手术时机的选择. 眼科新进展, 1994, 14(1): 16
- 2 Pepose J S. Herpes simplex keratitis: role of viral infection versus immune response. Surv Ophthalmol, 1991, 35(5): 345
- 3 晏晓明, 吴静安, 金凤霞. 单疱病毒性角膜炎患者外周血 T 细胞亚群的研究. 中华眼科杂志, 1991, 27(1): 8
- 4 Rinne J, Abghari S Z, Stulting R. The severity of herpes simplex viral keratitis in mice does not reflect the severity of disease in human. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1992, 33(2): 268

(1996-10-15 收稿 1997-03-04 修回)

THE CHANGE OF IMMUNE EPITOPE FROM THE PERIPHERIAL BLOOD OF PATIENTS WITH HERPES SIMPLEX KERATITIS

Liu Zuguo¹ Chen Jiaqi¹ Li Shaozhen¹ Zeng Yaoying² Sun Hong²

(1 Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510060

2 Institute of Tissue Transplantation and Immunology, Jinan University, Guangzhou, 510632)

The 30 immune epitopes expressing in patients with herpetic keratitis were investigated by flow cytometry comparing with the normal people. The results showed that the expression rate of CD8, HLA-DP, HLA-DR in patients with both stromatic and ulcer herpetic keratitis also CD10 in stromatic herpetic keratitis were higher than in normal people. And the expression rate of CD9, CD45RA in patients with both stromatic and ulcer herpetic keratitis also HLA-ABC in ulcer herpetic keratitis were lower than in normal people. The other epitopes in patients with both stromatic and ulcer herpetic keratitis had no difference with normal people. The expression rate of CD10, CD59, CD71 in patients with stromatic herpetic keratitis were higher than those in patients with ulcer herpetic keratitis. There were no difference in the other epitopes between the stromatic and the ulcer herpetic keratitis group. These results suggest that the immune disorder and autoimmunity may play an important role in the occurrence and clinical types of herpetic keratitis. The strong activating capacity for immunocyte were showed in individual with parenchymatous herpetic keratitis and the insufficient activating capacity for immunocyte were showed in individual with ulcer herpetic keratitis.

Subject headings keratitis herpetic/immunology; immunophenotyping

黄洁夫教授的“原位肝移植治疗终末期肝病的实验及临床研究” 荣获 1997 年度广东省科技进步一等奖

黄洁夫教授等人完成的“原位肝移植治疗终末期肝病的实验及临床研究”荣获 1997 年广东省科技进步一等奖,这是 1990 年以来在广东省医疗行业中获取的第一项省科技进步一等奖项目。

肝脏移植已成为常规性的外科手术。在我国,由于许多客观因素,肝移植研究进展缓慢,与先进国家相比差异逐渐拉大。如何吸收国外先进的肝移植技术,提高我国大器官移植的整体水平,已成为我国移植外科界亟待解决的课题。黄洁夫教授等人从 1988 年开始,进行了肝脏移植的实验及临床研究。在动物实验方面,开展了体外静脉转流下的原位肝移植、多器官移植、原位辅助性肝移植等技术;首次在国内研究了 UW 液保存下,供肝热缺血耐受时限及安全保存时间;为我国的供肝保存提供了有益的实验依据;对目前大鼠肝移植技术进行了改进,建立了大鼠肝移植胆汁外引流模型,并在此基础上,利用逆转录 PCR 技术检测了移植肝及胆汁中细胞因子基因表达,证明 r-干扰素 RNA 对排斥反应的诊断价值。1993 年 9 月率先在国内将体外静脉转流下的原位肝移植技术应用于临床。迄今为止,已施行 10 例肝移植,是国内近年来开展例数最多的单位,最长存活时间为 14 个月。并率先在国内开展了背驮式肝移植、减体积式肝移植、急诊肝移植;在国内首先总结了肝动脉栓塞、CMV 感染等并发症的诊断和处理经验;根据我国供肝切取特点,提出了有临床实用价值的快速多器官联合切取方法;开展了亚洲第一例肝肾联合移植。本项研究提高了我国终末期肝病的治疗水平,对促进我国肝移植的进一步开展起了积极的推动作用。

(科研处成果科)