

# SD大鼠同种异体结膜移植的免疫组织化学<sup>①</sup>

郑永欣<sup>②</sup> 刘金陵 陈家祺 杨培增

(中山医科大学中山眼科中心眼科医院; 广州, 510060)

**摘要** 用免疫组织化学方法观察 SD大鼠同种异体结膜移植术后结膜植片的临床和局部免疫情况。结果显示: 实验组动物结膜移植片的 CD3、CD4、CD8、MΦ、BC在术后第1天与术后4周出现2个峰值, DC在术后4周也明显升高, 至12周时以上各指标恢复到正常结膜水平。第1天的结果应为同种异体结膜移植术后发生的创伤性反应所致。第4周的结果揭示受体动物受异体抗原刺激后, 有发生免疫排斥反应的可能性。12周后各指标恢复正常, 说明机体通过某种机制抑制了免疫排斥反应的发生。

**关键词** 结膜; 器官移植; 移植, 同种 免疫学

**中图分类号** R 779.64

从1985年以来, 我国开始开展同种异体结膜手术, 但有关其免疫排斥反应的探讨甚少。作者使用免疫组织化学方法观察 SD大鼠同种异体结膜移植术后植片的免疫变化, 为进一步开展人体同种异体结膜移植研究提供理论根据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物

二级标准化 SD大鼠 15只, 体重 0.18~0.22 kg, 雌雄兼用。新西兰兔子 2只。

### 1.2 主要试剂

所用单克隆抗体是小鼠抗大鼠免疫球蛋白, 由荷兰 Holland Biotechnology Bv 提供, 包括抗 CD3、抗 CD4、抗 CD8、抗巨噬细胞抗体、抗树突细胞抗体、抗 B淋巴细胞抗体。第二抗体是辣根过氧化物酶标记的大鼠抗小鼠免疫球蛋白, 由上海生物研究所提供。

### 1.3 器械和仪器

眼科手术显微镜, 冰冻切片机, 低温冰箱 (-20℃), 双目显微镜和摄影系统及其它(包括手术器械、实验器皿和免疫组织化学常用的试剂等)。

### 1.4 结膜移植手术

取 15只 SD大鼠随机分为 3组, A组为阴性对照组(自体结膜移植组), 在 10点~2点靠角膜缘作 4 mm×5 mm 的结膜植片后左右眼对调用 10-0 进

口单股尼龙线间断缝合 6针。B组为实验组(同种异体结膜移植组), 用同组 SD大鼠行异体结膜植片移植, 操作同上。C组为阳性对照组(异种结膜移植组), 用兔子双眼结膜移植到 SD鼠的双眼。所有 SD大鼠于术毕用四环素眼药膏涂眼, 术后第1天开始用 0.23% 新霉素地塞米松滴眼剂滴术眼, 每天 4次, 晚上使用四环素可的松眼药膏涂术眼, 连续 4周。每天用裂隙灯观察, 并于术后 1天、1周、2周、4周、12周行外观和裂隙灯照相, 并在缝合口附近取结膜行免疫组织化学检查。先取 1只 SD大鼠的球结膜作免疫组织化学检查, 以作正常参考值。

### 1.5 动物结膜的免疫组织化学检查方法

取新鲜标本制 6μm 厚的冰冻切片室温下干燥 1 h, 用新鲜丙酮固定 10 min; 室温干燥 1 h 后用缓冲液 (pH 7.3) 洗 2 min; 去除缓冲液加第 1 抗体(小鼠抗大鼠单克隆抗体)后置 4℃ 冰箱 12 h; 用缓冲液洗净后加第 2 抗体(辣根过氧化物酶标记的大鼠抗小鼠的免疫球蛋白 G) 30 min; 用缓冲液洗净第 2 抗体后浸于 DAB 液 (3,3-二氨基联苯胺) 15 min; 用缓冲液冲洗玻片 5 min 后加 0.5% CuSO<sub>4</sub> 5 min; 水洗 5 min 后加苏木精染色 2 min 再水洗 5 min; 干燥后盖玻片, 显微镜下观察结果。

### 1.6 数据统计方法

用每个高倍镜 (40×5) 视野的阳性细胞个数为参数。所有数据采用 SPSS4.0 软件包统计, 使用单

① 广东省科委自然科学基金资助课题; ② 第一作者, 1962年出生, 男, 硕士, 讲师

向方差分析,对方差不齐者先用以 10 为底的对数转换,对两次转换仍方差不齐者使用秩和检验,植片存活率的比较使用卡方分析 ( $\alpha = 0.05$ )

## 2 结 果

### 2.1 动物手术后临床检查结果

A 组动物手术后结膜红肿时间平均为 7 d,无结膜下出血,10 d 后伤口愈合,植片无糜烂、收缩和睑球粘连现象。B 组动物手术后结膜红肿时间平均为 14 d,20% 术后第 1 天开始结膜下出血,持续

10 d,术后 24 d 有 1 眼结膜植片溶解脱落,占 5%。存活的结膜植片在观察期 12 周内无糜烂、收缩、增厚和睑球粘连现象。C 组动物手术后持续结膜充血水肿和结膜下出血,30% 植片在术后 2 周内溶解脱落,其余植片在 4 周内全部溶解。12 周时仍存活的动物全部睑球粘连。

### 2.2 免疫组织化学结果

B 组动物第 1 天、第 1 周和第 4 周结膜植片周围的 CD<sub>3</sub>、CD<sub>4</sub>、CD<sub>8</sub>、M $\Phi$ 、BC 比阴性对照组明显增高。12 周时以上各项指标恢复至正常结膜的水平 (表 1,表 2)。

表 1 SD 大鼠不同结膜移植术后第 1 天、第 1 周各项指标的变化 ( $\bar{x} \pm s$ ) (个)

	术后第 1 天			术后第 1 周		
	A 组 (n= 10)	B 组 <sup>1)</sup> (n= 10)	C 组 (n= 9)	A 组 (n= 10)	B 组 (n= 10)	C 组 (n= 9)
CD <sub>3</sub>	3.8 $\pm$ 1.5	9.2 $\pm$ 1.5	50.3 $\pm$ 20.7	4.7 $\pm$ 1.8	6.5 $\pm$ 2.1	56.0 $\pm$ 16.9
CD <sub>4</sub>	2.0 $\pm$ 0.9	5.9 $\pm$ 1.3	32.0 $\pm$ 21.5	2.0 $\pm$ 0.7	5.3 $\pm$ 1.2	31.8 $\pm$ 14.3
CD <sub>8</sub>	2.9 $\pm$ 1.2	6.9 $\pm$ 3.3	23.8 $\pm$ 10.3	2.7 $\pm$ 1.7	4.5 $\pm$ 1.6	46.6 $\pm$ 21.5
M $\Phi$	3.4 $\pm$ 1.3	6.6 $\pm$ 1.8	31.2 $\pm$ 10.9	3.0 $\pm$ 1.1	4.3 $\pm$ 1.5	32.8 $\pm$ 18.7
DC	2.4 $\pm$ 1.2	6.5 $\pm$ 2.8	23.7 $\pm$ 13.3	2.6 $\pm$ 1.6	4.7 $\pm$ 2.0	33.2 $\pm$ 17.0
BC	3.7 $\pm$ 2.2	10.9 $\pm$ 2.2	73.9 $\pm$ 24.8	3.6 $\pm$ 1.7	9.7 $\pm$ 2.0	38.2 $\pm$ 13.2

1) B 组与 C 组、B 组与 A 组的各项指标在术后第 1 天的均数差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )

表 2 SD 大鼠不同结膜移植术后第 4 周、第 12 周各项指标的变化 ( $\bar{x} \pm s$ ) (个)

	术后第 4 周		术后第 12 周		正常 SD 结膜 (n= 1)
	A 组 (n= 10)	B 组 <sup>1)</sup> (n= 10)	A 组 (n= 10)	B 组 <sup>2)</sup> (n= 10)	
CD <sub>3</sub>	6.1 $\pm$ 3.1	7.1 $\pm$ 5.3	4.1 $\pm$ 1.9	3.8 $\pm$ 2.4	3.5
CD <sub>4</sub>	2.9 $\pm$ 1.8	4.7 $\pm$ 2.6	2.1 $\pm$ 1.1	1.6 $\pm$ 0.5	2.0
CD <sub>8</sub>	3.1 $\pm$ 1.9	6.1 $\pm$ 3.8	1.7 $\pm$ 1.4	2.0 $\pm$ 1.2	1.5
M $\Phi$	3.5 $\pm$ 2.7	5.7 $\pm$ 7.0	1.8 $\pm$ 1.3	2.2 $\pm$ 0.9	2.0
DC	3.1 $\pm$ 2.4	5.9 $\pm$ 6.4	1.6 $\pm$ 1.2	2.7 $\pm$ 1.8	1.5
BC	5.7 $\pm$ 2.9	9.0 $\pm$ 3.4	3.5 $\pm$ 2.7	4.1 $\pm$ 1.6	1.5

1) B 组与 A 组的各项指标在术后 4 周的均数差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 2) B 组、A 组和正常结膜之间的各项指标在术后 12 周的均数差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )

## 3 讨 论

### 3.1 SD 大鼠同种异体结膜移植的临床观察

同种异体结膜组 (B 组) SD 大鼠术后结膜充血水肿时间明显延长,且部分出现结膜下出血,说明手术后的炎症反应较剧烈;但 14 d 后炎症反应基本消失,95% 的移植片术后 12 周未发现糜烂、溶解、收缩和睑球粘连。而异种结膜移植组 (C 组) 的移植片在

术后 4 周内全部溶解脱落。提示同种异体种结膜能在受体动物身上较好地存活。作者已于人体开展同种异体结膜移植术 32 例,所得的临床结果与 SD 大鼠的结果相似。

### 3.2 SD 大鼠同种异体结膜移植的免疫组织化学变化

同其它器官移植一样,同种异体结膜移植术后的免疫排斥反应仍是手术成功的关键。肾脏移植、骨髓移植和角膜移植等已为免疫排斥积累丰富的临床

及免疫学资料,认为细胞免疫在排斥反应中占主导地位,其次是体液免疫<sup>[1]</sup>。免疫组织化学研究方法是利用抗原抗体结合的高度特异性,它们所形成的复合物再与底物结合,通过对复合物的特异染色而在局部组织标记出特异性抗原<sup>[2]</sup>。本研究用免疫组织化学的方法发现 B组动物第 1天和第 4周结膜植片周围的 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、MΦ、BC 比阴性对照组明显增高,DC 在第 4周的增多更明显。但各项指标远不如异种结膜移植的高,说明同种异体结膜移植后所引起的免疫反应较异种移植为弱。术后第 1天的免疫组化结果结合临床检查结果,提示受体动物手术创伤后发生剧烈的创伤性反应,这与 Weise<sup>[3]</sup>的实验结果相似。至术后 4周时这些细胞再次明显增多,加上 DC 也明显升高,说明可能发生了抗原提呈现象,CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>活化,提示有排斥反应发生的危险,这符合宿主抗移植反应的急性排斥类型,它是细胞免疫介导的迟发型变态反应(DTH)<sup>[4]</sup>。B细胞的增多提示体液免疫也可能参与同种异体结膜移植的免疫反应。12周时,以上各项指标恢复至正常结膜的水平,可能是受体鼠通过某种机制抑制了免疫反应,从而使受体对供体结膜植片发生免疫耐受,至于机体是如何发挥这一免疫抑制作用目前尚不清楚,有待进一步研究。

### 3.3 对人体的临床意义

眼外伤(特别是化学伤与热烧伤)首先受害部位是眼睑和结膜,往往造成严重的眼球粘连,不但对眼球的功能和外观造成严重损害,而且妨碍其他复明性手术(如角膜移植术和白内障摘除术等)的进行。人体自身结膜来源极有限,而结膜的替代物(如唇粘膜等),无论是解剖还是生理功能都不同于结膜,移植术后不能恢复结膜的特有功能<sup>[5]</sup>。对需基础麻醉或气管内麻醉下手术的小孩,因切取唇粘膜使口腔创面出血会有阻塞气管窒息的危险而不能使用自体

唇粘膜移植术。以往作者陆续报告同种异体结膜移植<sup>[6,7]</sup>,但未对免疫排斥反应作深入的探讨。本文综合 SD大鼠同种异体结膜移植的临床和免疫组织化学实验结果,提示同种异体结膜移植存在宿主对植片免疫排斥的危险,但绝大多数移植片仍能在受体眼存活生长,手术后的创伤性反应较剧烈。这将开拓一条结膜囊成形材料的新路,为眼烧伤后严重睑球粘连的病人带来福音,也为进一步探讨抗眼组织移植排斥反应治疗提供有用的信息。

### 参 考 文 献

- 1 丁桂凤,马大龙,邓鸿业.医学免疫学纲要.北京:北京医科大学和中国协和医科大学联合出版社,1992.323~324
- 2 杨景山.医学细胞化学与细胞生物技术.北京:北京医科大学和中国协和医科大学联合出版社,1994.98-100
- 3 Weise RA, Mannis MJ, Vastine DW, *et al.* Conjunctival transplantation. Autolog Homolog Arch Ophthalmol, 1985, 103(11): 1736
- 4 钱玉昆.临床免疫学.北京:北京医科大学和中国协和医科大学联合出版社.1994.79-80
- 5 伍杏娟,郭培恒,袁菊芳.唇粘膜移植在眼窝再造的应用.实用眼科杂志,1990,8(10): 612
- 6 张久荣,李太乾,孙德生,等.同种异体结膜移植实验及临床研究.眼科通讯,1986,5(10): 12
- 7 康宛夏,李光玲,彭群,等.早期结膜移植治疗重症眼部烧伤.眼外伤职业病杂志,1991,13(9): 18

(1996-03-04收稿 1996-09-16修回)

(下转第 23页)

## LOCALIZATION AND DISTRIBUTION OF TH-IR NEURONS IN HAMSTER RETINA

Liao Bagen    Li Haibiao

(Department of Histology and Embrology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

The localization and distribution of TH<sup>+</sup> R neurons in hamster retina was studied with immunohistochemistry ABC method. The results showed that 84.6% TH<sup>+</sup> R cells were amacrine cells (AC) or interplexiform cells (IPC). 15.4% TH<sup>+</sup> R neurons were displaced amacrine cells and/or ganglion cells (RGC). The processes of TH<sup>+</sup> R cells ramified most heavily in sublamina 1 of innerplexiform layer (IPL). TH<sup>+</sup> R cells were distributed throughout the central and periphery of the retina. The density of TH<sup>+</sup> R cells was calculated to be  $22.4 \pm 1.5$  cells per  $\text{mm}^2$ . The highest density ( $29.1 \pm 3.2$  cell/ $\text{mm}^2$ ) of TH<sup>+</sup> R cells occurred in superior-temporal retina. The majority of TH<sup>+</sup> R AC exhibited a satellite appearance. The TH<sup>+</sup> R cells in GCL were medium to small sized. The diameter of these neurons ranged from 7-16  $\mu\text{m}$ . And their processes ascended to sublamina 1 of IPL. The double label study of fluorescence retrograde tracing combined with TH indirect immunofluorescence histochemical method showed that some TH<sup>+</sup> R neurons in the GCL of hamster retina were RGC. The number of TH<sup>+</sup> R RGC was estimated to be  $55 \pm 7$ , representing 45% of the total number of TH<sup>+</sup> R neurons in GCL.

**Subject headings**    retinal ganglion cell/cytology; tyrosine 3-monoxygenase

(上接第 18 页)

## IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF HOMOLOGOUS CONJUNCTIVAL TRANSPLANTATION IN SD RATS

Zheng Yongxin    Liu Jinling    Chen Jiaqi    Yang Peizeng

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

Immunohistochemical studies were carried out to study the immunological changes in the conjunctival graft in SD rats after homologous conjunctival transplantation. Two peaks of CD<sub>3</sub>, CD<sub>4</sub>, CD<sub>8</sub> positive cells, macrophages and B cells were observed in the conjunctiva one day and four weeks after conjunctival transplantation. A large number of dendritic cells were also noted four weeks after the transplantation. All of these cells returned to normal levels 12 weeks after the transplantation. The results suggest that homologous conjunctival graft is tolerated by the recipient rats although possible immunological rejection may occur.

**Subject headings**    conjunctiva; organ transplantation; transplantation, homologous/immunology