

细胞粘附分子在增殖型糖尿病性 视网膜病变中的意义^①

唐仕波^②

(中山医科大学眼科研究所,广州,510060)

提 要 在国内首次报道细胞间粘附分子和血管细胞粘附分子与增殖型糖尿病性视网膜病之间的关系。结果表明,在糖尿病视网膜病变组织中,细胞间粘附分子的阳性率为90%(36/40);血管细胞粘附分子为80%(32/40)。阳性细胞主要为淋巴细胞,此外,还有纤维母细胞,视网膜色素上皮细胞及新生血管内皮细胞。细胞间粘附分子和血管细胞粘附分子在糖尿病视网膜病变组织中的表达,提示细胞与细胞间的相互作用以及免疫反应在增殖型糖尿病性视网膜病的发生发展中起重要作用。

主题词 胞间粘附分子/免疫学;细胞粘着分子/免疫学;糖尿病视网膜病/免疫学

中图分类号 R 774.12

糖尿病可以严重损害多个组织器官,眼是其中一个易损器官之一,尤其是由其引起的增殖型糖尿病性视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)是目前世界上主要的致盲眼病之一。糖尿病性视网膜病变引起的增殖性视网膜前膜是导致眼部严重并发症并最终致盲的主要病理改变。但是,糖尿病性视网膜前膜的发生机理目前尚不清楚。在诸如视网膜前膜的多细胞组织中,细胞与细胞之间的相互作用可能是控制细胞移行、识别、粘附、以及细胞分化、增殖的一个主要因素。细胞间粘附分子(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)及血管细胞粘附分子(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)被认为在上述过程中起重要作用以及参与免疫反应的启动过程^[1,2]。本研究通过免疫组化技术,应用特异性单克隆抗体来研究 ICAM-1 及 VCAM-1 与增殖型糖尿病性视网膜病变中的关系。

1 材料和方法

1.1 糖尿病性视网膜前膜的收集和处理

在本研究中,共收集了40例(30例由德国 Regensburg 大学眼科医院 Gabel 教授收集,10例为作者于本校眼科中心收集)糖尿病性视网膜前膜,分别来自40位增殖型糖尿病性视网膜病变患者。所有标本均在玻璃体视网膜显微手术中获取。标本取出后立即放入 Ringer 液在4℃冰箱中保存,保存时间不超过4h,将标本取出进行包埋,在液氮中快速冷冻,然后作6μm厚的冰冻切片,所用的玻片经0.1%多聚左旋溶解素预先处理过。切片后,放于室温下,空气中干燥4h,接着用预先冷却的丙酮固定10min,然后用透明胶袋封装,存于-40℃以下备用。各标本的一半用于免疫组化研究,余下的另一半用10%甲醛溶液固定6~24h,然后作常规苏木精-依红染色,进行常规的细胞结构和形态的分析。

1.2 检测用单克隆抗体

1.2.1 鼠抗人 ICAM-1 单克隆抗体 德国 DIANOVA 公司提供,它是一种鼠 IgG1,能

① 本文部分工作获国家教委资金资助;② 作者,1961年出生,男,医学博士,副教授

识别存在于不同细胞表面的 CD54 抗原,如单核/巨噬细胞,激活的淋巴细胞,激活的血管内皮细胞和成纤维母细胞。本抗体在工作稀释浓度是 1 : 250(Tris/HCl 溶液, pH 7.6)。

1.2.2 鼠抗人 VCAM-1 单克隆抗体 德国 DIANOVA 公司提供,也是一种鼠类 IgG1 抗体。它能特异性地识别 VCAM-1。VCAM-1 是一种 90 ku 膜糖蛋白,主要存在于激活的血管内皮细胞表面。抗 VCAM-1 抗体在工作稀释浓度是 1 : 100(Tris/HCl 溶液, pH 7.6)。

1.3 免疫组化染色

应用 APAAP(碱性磷酸酶抗碱性磷酸酶)技术进行免疫组化染色,方法是先将玻片放在 0.05 mol/L Tris/HCl(pH 7.6)溶液中复水 2~3 min,然后在玻片上滴上正常兔血清或兔 IgG,孵化 5 min,以阻断和防止非特异性或背景染色,轻轻拭干玻片(无须冲洗),将原始单克隆抗体滴于标本上,放在湿度为 100%的湿房中,在室温条件下孵化 45 min;然后用 0.05 mol/L Tris/HCl(pH 7.6)缓冲液轻轻冲洗玻片,接着在同样条件下与连接抗体(兔抗鼠 IgG)孵化 30 min,再次冲洗后,滴上 APAAP 复合物(鼠 IgG 联合碱性磷酸酶),在同上条件下孵化 30min,轻轻冲洗玻片并拭干,将 0.1%快速红染色底物(内含磷酸萘酚,4-氯-2-甲基苯和左旋咪唑)加在玻片上,孵化 20 min;轻轻冲洗玻片后,用 Mayer's 苏木精进行细胞核复染色,然后用低流量自来水漂洗 5 min;用甘油明胶封片,在光镜下观察。

新鲜人类扁桃体组织作为阳性对照,所用材料及检查方法同上。阴性对照有两种,一是用人类角膜移植后供体眼的眼后段组织(包括了巩膜、脉络膜及视网膜组织),材料及方法同上;二是被查标本,方法同上,但单克隆抗体由缓冲液代替。

1.4 结果观察与分析

为了对标本的细胞含量进行分析,在显微镜下($\times 600$),选择 3 个视野,数出每个视

野所有细胞的总数,取平均数,分为 4 级:① <10 个细胞/视野(+);② 10~30 个细胞/视野(++);③ 31~50 个细胞/视野(+++);④ >50 个/视野(++++)。为计算 ICAM-1 和 VCAM-1 的阳性染色细胞密度,同样选 3 个视野,在显微镜下($\times 600$)数出所有呈阳性和阴性反应的细胞数后,计算出阳性反应细胞所占的百分率。

2 结 果

2.1 阳性和阴性对照结果

阳性对照染色显示所有单克隆抗体均呈阳性反应。ICAM-1 和 VCAM-1 在扁桃体组织中呈高强度表达。阳性反应表现为在清晰(无色)的背景衬托下呈鲜红颜色,而细胞核则呈蓝色,阳性反应证实了所用单克隆抗体的反应性。阴性对照中未见阳性染色,说明无非特异性反应存在。

2.2 ICAM-1 和 VCAM-1 在糖尿病性视网膜前膜中的表达

在 40 例 PDR 视网膜前膜中,36 例(90%)对抗 ICAM-1 抗体呈阳性反应,32 例(80%)对抗 VCAM-1 抗体阳性。表 1 显示 31 例可以计数的 PDR 标本中,ICAM-1 和 VCAM-1 的阳性细胞率。在阳性标本中,ICAM-1 和 VCAM-1 的表达分布于整个前膜标本,明显见于细胞密度高的区域,许多标本中,它们还明显存在于标本的表面。阳性染色的细胞主要是一些小而圆的细胞(淋巴细胞),有时也会有梭形细胞(纤维母细胞)及含色素的细胞(视网膜色素上皮细胞或巨噬细胞)。在一些病例中,ICAM-1 和 VCAM-1 可以散在分布于细胞间区域。ICAM-1 和 VCAM-1 的表达强度各例有所不同,与 PDR 病变严重程度有关,但与患者的年龄及性别无关。总的来看,ICAM-1 的表达强于 VCAM-1 的表达。另外,在新生血管内皮细胞上也同样发现 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达。在血管中,VCAM-1 的表达则强于

ICAM-1 的表达。

与组织学检查结果相比较, ICAM-1 和 VCAM-1 阳性的 PDR 前膜标本中, 细胞成分和新生血管也相对较多。反之, 4 例 ICAM-1 和 VCAM-1 均呈阴性的标本几乎无细胞成分, 也无新生血管。从大体上看, 这些标本均较细小及菲薄。被检标本的细胞密度与 ICAM-1 及 VCAM-1 表达的关系见表 2。

表 1 PDR 视网膜前膜中 ICAM-1/VCAM-1 阳性细胞密度

阳性细胞率(%)	视网膜前膜标本(个)
<10	2
10~20	9
21~30	15
>30	5
合 计	31

视野倍数: ×600

表 2 PDR 视网膜前膜中的细胞密度与 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达 (例)

细胞数/视野	分 级	视网膜前膜	ICAM-1 阳性	VCAM-1 阳性
<10	+	5	2	3
10~30	++	17	16	14
31~50	+++	14	14	11
>50	+++	4	4	4

视野倍数: ×600

3 讨 论

增殖型糖尿病性视网膜病变(PDR)的发生发展是一个涉及多种因素, 包括多种生长因子、基因遗传倾向和自身免疫反应等非常复杂的过程, 其确切的发生机理目前尚未清楚。在以往的研究^[3]中, 作者已证实了糖尿病性视网膜前膜中含有多种细胞成分包括免疫细胞, 如巨噬细胞, T 辅助/诱导淋巴细胞, T 抑制/杀伤性淋巴细胞以及 B 淋巴细胞等, 提示机体的免疫系统参与了 PDR 的发生发展过程。为了阐明这些免疫细胞之间以及免疫细胞与血管内皮细胞之间的相互联系及相互作用, 我们研究了两种细胞间粘附分子(ICAM-1 和 VCAM-1)在 PDR 组织中表达情况, 结果显示, 90% 的标本表达 ICAM-1 及 80% 表达 VCAM-1, 阳性细胞主要为淋巴细胞, 以及视网膜色素上皮细胞和纤维母细胞。令人感兴趣的是, ICAM-1 和 VCAM-1 还表达在 PDR 组织中新生血管内皮细胞上。

正常情况下, ICAM-1 主要由血源细胞系统的细胞表达, 如巨噬/单核细胞, 激活 T 淋巴细胞, 扁桃体和淋巴结生发中心树突细胞等。也可表达于少数非造血细胞, 如血管内皮细胞, 胸腺上皮细胞及成纤维母细胞, 不过, 在非造血细胞中的表达很弱。VCAM-1 在正常的、处于静状态的血管内皮细胞上不表达。当组织细胞受到刺激, 尤其是受某些细胞因子, 如白细胞介素-1、 γ -干扰素, 以及 β 肿瘤坏死因子等的刺激时, 或者当它们处于激活状态时, ICAM-1 和 VCAM-1 可以很强地在不同的细胞表达出来, 比如, 未受刺激的培养视网膜色素上皮细胞和视网膜血管内皮细胞基本不表达 ICAM-1 和 VCAM-1。而当它们被上述细胞因子激活后, ICAM-1 和 VCAM-1 就会被诱导并强烈表达, 类似于组织相容抗原第二类抗原的表达情况^[4,5]。在本研究中, 在增殖型糖尿病性视网膜病变的组织中发现较高强度的 ICAM-1 和 VCAM-1 表达, 提示这些表达 ICAM-1 和 VCAM-1 的细胞处于一种被刺激或激活的状态。研究发现, 抗原提呈

细胞和淋巴细胞之间的相互作用需要细胞间粘附分子的参与才能发生免疫反应,以及此后的 T 细胞与 T 细胞及 T 细胞与 B 细胞之间的相互作用亦需要它们的参与。此外, ICAM-1 和 VCAM-1 还能为淋巴细胞准确进入免疫反应的位置提供特殊信息^[6]。

表达于血管内皮细胞上的 ICAM-1 和 VCAM-1 参与淋巴细胞与血管内皮细胞间的相互作用,并表明这些血管内皮细胞处于激活状态。它们分别与位于淋巴细胞表面的淋巴细胞功能抗原-1 和迟发抗原-4 结合,从而使淋巴细胞粘附于激活的血管内皮细胞上。这是淋巴细胞通过血管内皮细胞间隙移行进入周围组织,引起并参与免疫反应的关键步骤^[7]。ICAM-1 和 VCAM-1 的异常表达已经在一些免疫相关性病变,如肾炎,肾移植排斥反应及某些皮肤病中发现^[8~10]。因此,本研究结果显示的 ICAM-1 和 VCAM-1 在 PDR 视网膜前膜中的表达,表明免疫反应存在于 PDR 病变中,证实了免疫反应与 PDR 的关系,并揭示了在 PDR 中免疫反应发生的起始过程,为进一步阐明 PDR 的病理生理机制及发生发展过程提供了重要依据。

参 考 文 献

- 1 Dougherty GJ, Murdoch S, Hogg N. The function of human intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the generation of an immune response. *Eur J Immunol*, 1988, 18 : 35
- 2 Boyd AW, Wawryk SO, Burns GF, *et al.* Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) has a central role in cell-cell contact-mediated immune mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85 : 3095
- 3 Tang S, Scheiffarth OF, Thurau SR, *et al.* Cells of the immune system and their cytokines in epiretinal membranes and in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy (PDR). *Ophthalmic Res*, 1993, 25 : 177
- 4 Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, *et al.* Introduction by IL-1 and interferon- γ , tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adhesion molecule (ICAM-1). *J Immunol*, 1986, 137 : 245
- 5 Thornhill MH, Wellicome SM, Mahiouz DL, *et al.* TNF combines with IL 4 or interferon- γ to selectively enhance endothelial cell adhesiveness to T cells: the contribution of VCAM-1 dependent and independent binding mechanisms. *J Immunol*, 1991, 146 : 592
- 6 Altmann DM, Hogg N, Trowsdale J, *et al.* Co-transfusion of ICAM-1 and HLA-DR reconstitutes human antigen-presenting cell function in mouse L cells. *Nature (London)*, 1989, 338 : 512
- 7 Shimizu Y, Newman W, Tanaka Y, *et al.* Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunol Today*, 1992, 13 : 106
- 8 Konter U, Keller I, Kaufmann R, *et al.* Adhesion molecule mapping in human skin. *Arch Dermatol Res*, 1989, 281 : 454
- 9 Faull RJ, Russ GR. Tubular expression of intercellular adhesion molecule-1 during renal allograft rejection. *Transplantation*, 1989, 48 : 226
- 10 Seron D, Cameron JS, Haskard DO. Expression of VCAM-1 in normal and diseased kidney. *Nephrol Dial Transplant*, 1991, 6 : 917

(1995-12-21 收稿 1996-04-10 修回)

SIGNIFICANCE OF CELL ADHESION MOLECULES IN PROLIFERATIVE DIABETIC RETINOPATHY

Tang Shibo

(Eye Research Institute, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510060)

Proliferative diabetic retinopathy (PDR) is one of the main causes of blindness in the world. Although plenty of studies have been done, the pathogenesis of it remains unclear. The present study investigated the relationship of intercellular adhesion molecules, ICAM-1 and VCAM-1, with PDR by means of immunohistochemical techniques. The results showed that ICAM-1 was detected in 36 out of 40 (90%) PDR epiretinal membranes, which were obtained surgically from 40 patients with proliferative diabetic retinopathy, and VCAM-1 was found in 32 out of 40 cases (80%). The positive cells were mainly lymphocytes, vascular endothelial cells, fibroblasts, and retinal pigment epithelial cells. The expression of cell adhesion molecules, especially ICAM-1 and VCAM-1 in diabetic epiretinal membranes suggests that cell to cell interactions and immune responses may play a significant role in the development of PDR.

Subject headings cell adhesion molecules/immunology; intercellular adhesion molecule-1/immunology; diabetic retinopathy/immunology