

NF κ Bp65、NOS2 在维生素 A 缺乏干眼模型兔角膜中的表达及意义

刘 超 耿 燕

Expression and significance of NF κ Bp65 and NOS2 in cornea of experimental xerophthalmia rabbits

Liu Chao, Geng Yan. Department of Ophthalmology, Qingdao Central Hospital, Qingdao 266042, China

Abstract Objective Xerophthalmia is common and frequently-occurring in clinic, and its cause is comprehensive. This paper aimed to detect the expression and alteration of NF κ Bp65 and inducible nitric oxide synthase (NOS2) in cornea with experimental xerophthalmia and investigate the pathogenesis of xerophthalmia. **Methods** Experimental xerophthalmia model was induced in 6 rabbits by raising with casein-base vitamin A-deficient diet for six months and the criteria of xerophthalmia was identified based on Schirmer I test, tear film break-up time (BUT) and fluorescence score of cornea. Six control rabbits were fed with normal forage and matched environment. Corneas were removed from the rabbit models and normal controls after six months for HE stain and immunohistochemistry to detect the expressions of NF κ Bp65 and NOS2 in cornea. **Results** The fluorescence stain showed the corneal ulceration with the score >1 in model rabbits, and the values of Schirmer I and BUT were significantly decreased ($6.17 \text{ mm} \pm 1.75 \text{ mm}$, $5.83 \text{ s} \pm 1.95 \text{ s}$, respectively) in comparison with normal rabbits ($30.08 \text{ mm} \pm 6.65 \text{ mm}$, $29.75 \text{ s} \pm 5.66 \text{ s}$) ($t = 12.05, 13.84, P < 0.01$). The expression of NF κ Bp65 and NOS2 in the models ($34.75 \pm 9.49, 21.17 \pm 5.44$ respectively) was prominently higher than that in the normal controls ($4.33 \pm 2.64, 2.25 \pm 1.76$) ($t = 4.38, 4.68, P < 0.01$). NF κ Bp65 was expressed mainly inside of cell and that of NOS2 was outside of cell. **Conclusion** The immunological inflammation may be one of the most important mechanisms leading to the destruction of cornea with xerophthalmia, and overexpression of NF κ Bp65 and NOS2 plays a role during the process of xerophthalmia.

Key words xerophthalmia; NF κ Bp65; NOS2; vitamin A deficiency

摘要 目的 检测 NF κ Bp65、NOS2 在维生素 A 缺乏干眼模型兔角膜中的表达和改变,探讨干眼的发病机制。 **方法** 实验组 6 只兔以维生素 A 完全缺乏饲料喂养 6 个月制作维生素 A 缺乏干眼兔模型,正常对照组 6 只兔喂养正常饲料,采用免疫组织化学 SP 方法,对模型兔和对照兔角膜组织中 NF κ Bp65、NOS2 的表达进行检测。 **结果** 与正常对照组相比,实验组维生素 A 缺乏干眼模型兔角膜组织中 NF κ Bp65、NOS2 的表达明显增多 ($P < 0.01$),NF κ Bp65 在细胞中表达明显,NOS2 在间质中表达明显。 **结论** 维生素 A 缺乏兔角膜组织中的免疫炎症反应可能是导致干眼的主要病理过程,NF κ Bp65、NOS2 在此过程中起重要作用。

关键词 干眼; NF κ Bp65; NOS2; 维生素 A 缺乏

分类号 R 772 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)01-0019-04

干眼是多种原因所致泪液质和量及动力学的异常,从而导致泪膜不稳定和/或眼表的异常,并伴有眼部不适症状的一类疾病。其致病原因很多,由环境诱发因素、个人习惯等引起的轻度干眼仅出现较轻的体征,而无明显的眼表损伤;但眼表化学伤、热烧伤、

干燥综合征(Sjögren's syndrome, SS)等原因导致的干眼发病机制较复杂,最终导致包括眼表、泪腺及相关神经回路的泪腺功能单位运作失常,泪液动力学改变而出现严重的干眼^[1]。近年来研究表明基于免疫的炎症反应是各种类型干眼发病的共同机制^[2],角膜等眼表面的炎症可导致眼表上皮细胞损伤及凋亡^[3-4],泪液中水样液及黏液的成分改变,维生素 A 缺乏可能是导致炎症反应发生的重要因素^[5],而 NF κ Bp65、NOS2

作者单位:266042 青岛市中心医院眼科

通讯作者:刘超 (Email: babyliuchao@126.com)

是参与此过程的重要因子^[6-7]。我们制作维生素 A 缺乏的干眼兔模型,对其角膜组织标本进行 NFκBp65、NOS2 的检测和研究,旨在探讨干眼组织破坏的发生机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物及分组 健康 1 个月龄新西兰白兔 12 只(青岛市实验动物中心提供),雌雄兼用,体重 (0.5 ± 0.2)kg,采用抽签法将实验动物随机分为实验组和正常对照组,每组 6 只。

1.1.2 主要试剂 NFκBp65 多克隆抗体、亲和纯化兔 NOS2 多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司);SP 试剂盒、DAB 显色剂(北京中杉金桥生物技术有限公司);干酪素(上海伯奥生物科技有限公司)。

1.2 方 法

1.2.1 动物模型的建立 维生素 A 缺乏组以干酪素为主的维生素 A 完全缺乏饲料喂养 6 个月,饲料配方参照文献[8]。正常对照组喂含维生素 A 1 200 μg/kg 的正常饲料。

1.2.2 诊断标准 两组动物均由同一人检查,每次检查的时间、地点、照明亮度、湿度及温度相同。以 Schirmer I 试验 < 10 mm、泪膜破裂时间 (tear film break-up time, BUT) < 10 s、角膜荧光素染色评分 > 1 作为干眼的诊断标准^[9]。

1.2.3 标本取材及处理 两组兔均以空气栓塞法处死后取双眼角膜组织,4% 多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,4 μm 连续切片,行苏木精 - 伊红染色。

1.2.4 NFκBp65、NOS2 检测方法 采用免疫组织化学 SP 法,取石蜡切片常规脱蜡、水化,3% H₂O₂ 室温孵育 20 min 以消除内源性过氧化物酶活性,蒸馏水冲洗 5 min × 3 次;置于 0.01 mol/L 柠檬酸缓冲液中进行微波抗原修复,温度保持在 92 ~ 98 °C,持续 5 min,室温自然冷却,PBS 冲洗 5 min × 3 次;正常血清封闭非特异性抗原,37 °C 孵育 20 min,倾去血清,滴加 1:100 稀释的 NFκBp65,37 °C 孵育 2 h,PBS 冲洗 5 min × 3 次,滴加生物素化二抗,37 °C 孵育 20 min,PBS 冲洗 5 min × 3 次,滴加三抗(工作液),37 °C 孵育 30 min,PBS 冲洗 5 min × 3 次;DAB 显色,苏木素复染,系列乙醇脱水、透明,中性树胶封片。阳性对照采用乳腺癌石蜡切片,阴性对照采用 PBS 液代替一抗。NOS2 抗体检测方法同上,稀释度为 1:100。在 400 倍放大下以 16 D 目镜测微网(每个网格面积为 0.102 4 mm²)计数阳性细胞数,每个切片随机统计 10 个网格,取平均值为阳

性细胞密度。

1.3 统计学方法

计量资料所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计学软件对数据进行统计学处理。两样本均数间的比较均采用独立样本的 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

维生素 A 缺乏模型兔喂养 6 个月后,体重较对照组轻,体型较小,毛发粗糙,活动度差。未进行维生素 A 含量的测定。

2.1 两组兔角膜 Schirmer I 试验、BUT 结果比较

3 个月开始实验兔出现角膜干燥,荧光素染色可见点状着色,并随时间的延长逐渐加重,6 个月时荧光素染色见散在点状溃疡,评分均 > 1。正常对照组兔眼未见上述表现。Schirmer I 试验结果示实验组均 < 10 mm,正常对照组均 > 20 mm,两组比较差异有统计学意义 (*P* < 0.01);BUT 结果示实验组均 < 10 s,正常对照组均 > 20 s,两组比较差异有统计学意义 (*P* < 0.01)(表 1)。

表 1 模型兔和正常兔角膜 Schirmer I 试验、BUT 结果比较($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of Schirmer I test, BUT between normal and model rabbits ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	Schirmer I test (mm)	BUT (s)
Normal rabbit	12	30.08 ± 6.65	29.75 ± 5.66
Model rabbit	12	6.17 ± 1.75	5.83 ± 1.95
<i>t</i>		12.05	13.84
<i>P</i>		< 0.01	< 0.01

(Student's *t* test)

2.2 形态学改变

正常对照组兔角膜结构完整(图 1)。与正常对照组相比,维生素 A 缺乏干眼模型兔角膜上皮细胞层次增加,排列紊乱,细胞形态不规则;翼状细胞及基底细胞变得扁而小,细胞核小而染色深(图 2)。

2.3 NFκBp65 的阳性表达

NFκBp65 在角膜细胞胞核和胞浆表达明显,呈棕褐色,以胞核为主,弥漫或颗粒状分布,阳性着色细胞主要为角膜上皮细胞,间质内有少量不连续表达(图 3);对照组极少表达。实验组和对照组角膜阳性细胞密度差异有统计学意义 (*P* < 0.01)(表 2)。

2.4 NOS2 的阳性表达

NOS2 主要在角膜的间质中表达,连续的弥漫性分布,呈棕褐色;阳性着色细胞较 NFκBp65 少,以角膜的炎症细胞为主,胞浆着色明显(图 4);对照组表达微弱。实验组和对照组角膜的阳性细胞密度差异有统计

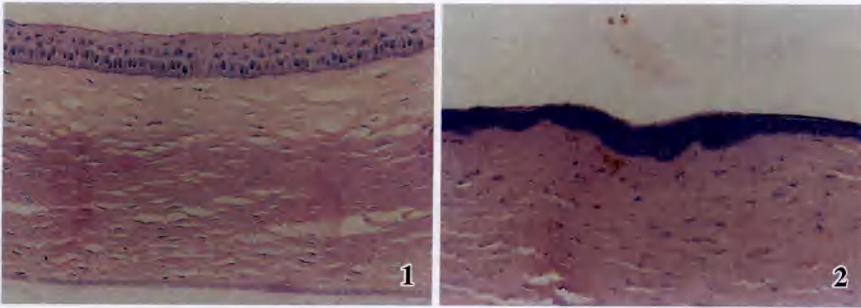


图 1 正常兔角膜结构完整,无阳性染色(HE × 200) 图 2 维生素 A 缺乏干眼模型兔角膜结构紊乱(HE × 200)

Fig. 1 Integrated structure is showed without positive stain in normal cornea(HE × 200) Fig. 2 Corneal structure is disordered in vitamin A deficient rabbits (HE × 200)

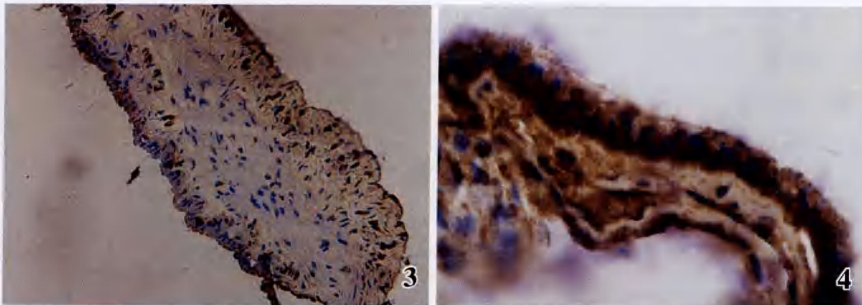


图 3 维生素 A 缺乏兔角膜组织中 NFκBp65 的表达,呈棕褐色(SP × 200) 图 4 维生素 A 缺乏兔角膜组织(上皮层和基质层)中 NOS2 的表达,呈棕褐色(SP × 400)

Fig. 3 NFκBp65 is positively expressed in cornea of model rabbits, showing dark brown stain(SP × 200) Fig. 4 NOS2 is expressed in the corneal epithelium and stroma of model rabbits, presenting the dark brown stain(SP × 400)

学意义($P < 0.01$) (表 2)。

表 2 NFκBp65 和 NOS2 在正常兔和模型兔角膜组织的阳性细胞密度比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Positive cell density of NFκBp65 and NOS2 expression in cornea of normal and model rabbits($\bar{x} \pm s$)

Group	n	NFκBp65	NOS2
Normal rabbit	12	4.33 ± 2.64	2.25 ± 1.76
Model rabbit	12	34.75 ± 9.49	21.17 ± 5.44
t		4.38	4.68
P		<0.01	<0.01

(Student's t test)

3 讨论

Schirmer I 试验主要检查泪液分泌的量, BUT 是检查泪膜稳定性的简单及常用的指标, 两者是诊断干眼症的重要指标, 在本实验中造模后 Schirmer I 试验值和泪膜破裂时间均明显减少。鉴于目前没有兔干眼时泪液分泌和稳定性的诊断标准, 采用自身比较的 t 检验, 结果差异有统计学意义。

维生素 A 又名视黄醇 (retinol), 其体内代谢后的衍生物为视黄醛、视黄酸, 视黄酸通过与核受体结合后调控基因的转录表达, 调节眼的发育和眼表上皮的正

常分化。维生素 A 参与合成角膜糖蛋白, 刺激葡萄糖和氨基葡聚糖渗入角膜上皮; 诱导基质层纤维母细胞 cDNA 合成增加; 参与角膜的能量代谢; 诱导角膜内皮细胞表面表皮生长因子受体表达增加^[10-11]。维生素 A 缺乏时角膜上皮不能正常生长与分化, 鳞状角化细胞比例增加, 周密性下降。角膜基底层增生变厚, 细胞分裂加快, 合成张力原纤维和桥粒增加, 使表面层细胞变扁, 变为无核的角化细胞, 由被角质原纤维所填充的角质透明质构成。基底细胞一旦发角质化, 实际上就是终止它的分化, 标志着角膜上皮的衰老和死亡^[12]。角膜上皮对维生素 A 缺乏有一定阈值, 维生素 A 稍低于此值即可使角膜跃入角化状态。

NFκBp65 是核转录因子-kappa B (nuclear factor-kappa B, NFκB) 的一个亚基。近来研究发现在多种类型细胞中的基因启动子存在着 NFκB 的结合位点, NOS2 启动子启动子和增强子区就是其中之一^[13]。NFκB 是 Rel 蛋白家族成员, 并广泛存在于真核细胞胞浆中的一种重要的核转录因子, 在静息细胞中, NFκB 的 p65 亚基与其抑制蛋白 IκB 结合形成 IκB-NFκBp50/p65 三聚体复合物, 覆盖了 p50 亚基的核定位信号, 处于无活性状态, 存在于胞浆中^[14]。只有当胞外刺激通过一个或多个信号传导途径激活蛋白激酶致 IκB 磷酸化并与 NFκB 解离后, p50 亚基的核定位信号才被暴露出来, NFκB 才被活化进入细胞核, 与核内基因启动子上的 κB 位点 (GGGACTTCC) 特异性结合, 发挥其基因转录调控作用, 参与多种生理、病理的基因调节^[15]。NFκBp65 的检测可间接反应 NFκB 的活化和表达。

NOS2 即诱导型一氧化氮 (nitric oxide, NO) 合成酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS), 是重要的促炎介质, 但在正常生理情况下不表达或低水平表达, 当受到炎症、免疫因子和细菌内外毒素等刺激时经基因转录翻译后生成大量 NO, 且持续时间长, NOS 的表达调控中最重要的是转录水平的调节, NFκB 的活化是诱导 NOS2 基因表达的关键环节。NO 是一种胞间信使分子, 可介导许多生物学现象。在炎症反应中, NO 可直接介导细胞毒作用, NO 对金属蛋白有高亲和性,

NO 对金属蛋白有高亲和性,

其损伤机制有:(1)NO与线粒体呼吸链或DNA合成酶的含铁部分结合,导致亚硝基化,从而抑制线粒体合成酶I和II电子传递,抑制乌头酸酶、核糖核酸还原酶和DNA限速酶活性。(2)NO对嘌呤和嘧啶碱基有脱氨基作用,导致DNA突变断裂,直接损伤DNA。(3)NO与超氧化物结合形成过氧亚硝酸盐,自发释放·OH而损伤靶细胞。(4)NO可引起3-磷酸甘油醛脱氢酶核糖基化,封闭糖酵解过程而阻断ATP产生^[16]。Kontinen等^[17]用Griess法测量发现干眼患者NOS2常与肿瘤坏死因子一起在角膜上皮细胞中表达,过剩的NO发挥其自由基性质的细胞毒作用可导致炎症损害、细胞凋亡。

本研究结果表明,维生素A缺乏干眼兔角膜组织较正常对照组其组织病理结构有明显异常,同时NFκBp65、NOS2的表达明显高于对照组。推测维生素A缺乏时,可能通过NFκB的活化,诱导NOS2基因的表达,产生大量NO,过量的NO将发挥其自由基性质的细胞毒作用,参与干眼的发生和发展。

参考文献

- 1 盛敬杰. 干眼的研究进展[J]. 同济大学学报(医学版), 2008, 4: 1-5
- 2 张梅. 干眼症的的眼表改变及发病机制的研究进展[J]. 中国眼耳鼻喉科杂志, 2002, 2: 252-256
- 3 马轶群, 王传富, 王青. 维生素A缺乏干眼症兔泪腺凋亡及相关基因表达的研究[J]. 眼科新进展, 2003, 23: 406-408
- 4 刘超, 王传富. NFκBp65、NOS2在去势雄兔角膜、结膜、泪腺的表达及意义[J]. 眼科研究, 2006, 24: 81-82

- 5 Sullivan DA, Wickham LA, Rocha EM, et al. Androgens and dry eye in Sjögren's syndrome[J]. Ann NY Acad Sci, 1999, 22: 312-324
- 6 Azuma M, Motegi K, Aota K, et al. Role of cytokines in the destruction of acinar structure in Sjögren's syndrome salivary glands[J]. Lab Invest, 1997, 77: 269-272
- 7 Jabs DA, Gerard HC, Wei Y, et al. Inflammatory mediators in autoimmune lacrimal gland disease in MRL/Mpj mice[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45: 2293-2298
- 8 李述信, 孟广政, 于建国, 译. AOAC分析方法手册[M]. 北京: 中国光学学会光谱委员会, 1986: 619-622
- 9 张梅, 陈家祺, 刘祖国. 干眼症检查的进展[J]. 眼科研究, 2001, 19: 184-187
- 10 Hatchell DL, Sommer A. Detection of ocular surface abnormalities in experimental vitamin A deficiency[J]. Arch Ophthalmol, 1984, 102: 1389-1393
- 11 Ubles JL, MacRae SM. Vitamin A is present as retinol in the tears of humans and rabbits[J]. Curr Eye Res, 1984, 3: 815-822
- 12 Twining SS, Hatchell DL, Hyndiuk RA, et al. Acid proteases and histologic correlations in experimental ulceration in vitamin A deficient rabbit corneas[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1985, 26: 31-44
- 13 金伯泉. 细胞和分子免疫学[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 2001: 197-198
- 14 Ganster RW, Taylor BS, Shao LF, et al. Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF-κB[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 8638-8643
- 15 Baldwin AS. IL-18 and IL-12 signal through the NF-kappa B pathway to induce NK-1R expression on T cells[J]. Immunology, 1996, 86: 649-681
- 16 Driss Z, Robin RH, Darlene AD. Lacrimal gland innervation is not altered with the onset and progression of disease in a murine model of Sjögren's syndrome[J]. Clin Immunol Immunopathol, 1998, 89(2): 126-133
- 17 Kontinen YT, Plattls LA, Tuminen S, et al. Role of nitric oxide in Sjogrenps syndrome[J]. Arthritis Rheum, 1997, 40: 875-879

(收稿:2008-03-03 修回:2008-11-20)

(本文编辑:胡纯钢 刘艳)

《医药与保健》征稿启事

《医药与保健》创办于1993年,是教育部主管、西安交通大学主办的国家级医药卫生期刊,系中国核心期刊(遴选),中国万方数据库全文收录期刊,国内刊号:CN61-1246/R,国际刊号:ISSN1004-8650,邮发代号:52-207。

本刊主要刊登临床、医药科研、护理、检验、医院管理、预防及保健等方面的优秀稿件,欢迎医药卫生系统、全国高等医药院校、医疗单位和海外的作者踊跃投稿。

一、投稿范围:

医学及药学的临床、科研、教学、管理等领域内的新成果、新理论、新技术、新方法、新经验,能及时反映国内外学科新进展的学术性论文。

二、征文要求:

1. 文章要求字数在2500字左右,文章用A4字打印或直接发电子邮件。
2. 请按标准格式顺序:标题;作者(单位、邮编);摘要(150字左右);关键词;正文;(文后)参考文献。
3. 来稿应具有先进性(创新、首次报道)、科学性(设计合理、数据可靠和统计方法正确)、实用性(对于研究、临床或其他方面有较大指导意义),论点明确、资料可靠、数字准确、文字精炼,图表尽量简化;文稿应表达准确,重点突出,文字简练。

三、联系方式:

投稿地址:北京市丰台区马家堡东路2号409室《医药与保健》编辑部(100068)

电话:010-83441099/67534765 传真:010-67538381 联系人:张文智编辑 投稿邮箱:yiyaozazhi@yahoo.com.cn

在线投稿:<http://www.bimtdoctor.com/pages/qk/tjqk/sendarticle.aspx?id=57>(投稿请写上详细的通讯地址和联系方式,以便编辑部及时与您联系)