

内毒素诱导的大鼠葡萄膜炎细胞凋亡的研究

张 玮 卢 弘 华 文 李学东

Endotoxin-induced cell apoptosis in rats uveitis

Zhang Wei, Lu Hong, Hua Wen, Li Xuedong. Department of Ophthalmology, Beijing Chaoyang Hospital, Capital University of Medical Science, Beijing 100020, China

Abstract Objective Researches showed that the cellular apoptosis is an important mechanism of regression of endotoxin-induced uveitis (EIU), and the apoptosis is associated with the expression of Fas antigen (Fas) and Fas ligand (FasL). Our study was to observe the cellular apoptosis of uvea and retina in endotoxin-induced uveitis model and the relevance of Fas/FasL with the cell apoptosis. **Methods** The models of severe endotoxin-induced uveitis were induced in rats by the intraperitoneal and plantar injection of cholera vibrio lipopolysaccharide (LPS) + phosphate buffer saline (PBS) + complete Freund's adjuvant (CFA) in 25 Wistar rats, and PBS injection was used as control in 5 rats. The clinical manifestation of eyes was observed under the slit-lamp and ophthalmoscope at a two-hour interval and scored based on the Hoekzema's criteria. The rats were sacrificed at 6, 12, 18, 24 and 48 hours after injection of endotoxin respectively for the histological examinations. Cellular apoptosis was evaluated by TUNEL assay and expressions of Fas and FasL in uvea and retina was detected by immunohistochemistry. **Results** The corneal edema, anterior chamber exudation and iris edema were found at 10 hours after injection in model group and the inflammation score was gradually increased with lapse of time, and no inflammatory reaction was found in PBS injection group. Infiltration of neutrophils, monocytes and lymphocytes into the uvea and retina was noted by routine histological examination. A lots of TUNEL positive cells were seen in the uvea and retina at various time points in EIU model group compared with control group ($P < 0.01$). Many apoptotic cells were exhibited mainly in the iris and ciliary body with the peak value at 18 hour after LPS injection. Positive staining for Fas protein was not found in normal group, but Fas was expressed in the cells of uvea and retina in model group rather than control group and showed a gradually increasing tendency from 6 to 18 hour after injection of endotoxin. The FasL expression level in model group after LPS injection was significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$) at different time. There was a remarkably positive correlation between TUNEL positive cells and Fas ($r_1 = 0.923, P < 0.01$) or FasL ($r_2 = 0.807, P < 0.01$) in endotoxin-injected eyes. **Conclusion** Apoptosis of infiltrating cells exists in uvea and retina of endotoxin-induced-uveitis rats, which may contribute to the rapid resolution of inflammation. The inflammation regression may be associated with over expression of Fas and FasL in endotoxin uveitis.

Key words endotoxin; uveitis; apoptosis; Fas; FasL

摘要 目的 探讨大鼠内毒素诱导的葡萄膜炎(EIU)中葡萄膜和视网膜组织浸润细胞的凋亡,及 Fas-FasL 的表达与细胞凋亡的相关性。**方法** 注射霍乱弧菌内毒素诱发大鼠 EIU 模型,内毒素注射后 6、12、18、24、48 h 进行临床观察评分并行组织病理学检查。应用 TUNEL 法检测葡萄膜和视网膜中的凋亡细胞,免疫组织化学法检测 Fas 和 FasL 在葡萄膜和视网膜中的表达和变化。**结果** 实验组大鼠均发生了 EIU;葡萄膜和视网膜组织浸润细胞中可见 TUNEL 染色阳性凋亡细胞,18 h 达高峰,以虹膜和睫状体最为明显,凋亡阳性细胞数与正常对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$);实验各组中均可见 Fas 表达,实验各组中 FasL 表达显著增强,与正常对照组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。Fas 和 FasL 的表达与凋亡之间呈正相关($r = 0.923, 0.807, P < 0.01$)。**结论** EIU 中葡萄膜和视网膜的浸润细胞存在凋亡现象,凋亡参与了炎症的迅速消退,Fas 和 FasL 的高表达可能与内毒素诱导的葡萄膜炎眼组织的细胞凋亡有关。

关键词 内毒素; 葡萄膜炎; 凋亡; Fas; FasL

分类号 R 773 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)05-0374-06

葡萄膜炎是一种常见的致盲性眼病,多见于中青年,治疗棘手,发病机制尚不明确^[1-2]。内毒素诱导的葡萄膜炎(endotoxin-induced uveitis, EIU)是常用的研究人内源性全葡萄膜炎理想的动物模型^[3],炎性细胞迅速凋亡是其迅速消退的重要机制。在凋亡的调节机制中,Fas 和 FasL 是诱导细胞凋亡的主要蛋白,为探讨与 Fas 和 FasL 表达有关的细胞凋亡是否在 EIU 中发生并参与了 EIU 中眼内葡萄膜和视网膜组织炎症的吸收和消退,本研究采用霍乱弧菌内毒素诱导的大鼠葡萄膜炎模型,检测 EIU 动物模型眼内葡萄膜和视网膜组织中浸润细胞的凋亡情况以及 EIU 动物模型眼内 Fas 与 FasL 的表达,寻求治疗葡萄膜炎及预防复发的新途径。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物及分组 雄性 Wistar 大鼠 30 只(购于北京维通利华实验动物有限公司),体重约 200 g,健康无眼病。应用随机数字表法分为正常对照组 5 只和实验组 25 只,实验组依据内毒素注射后处死的各个时间点随机分为 5 个亚组,每个亚组各 5 只。

1.1.2 主要试剂 霍乱弧菌(小川血清型)内毒素(LPS)冻干粉,完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)、灭活百日咳杆菌溶液(兰州生物制品所提供);TUNEL 试剂盒、链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(streptavidin-biotin complex, SABC)免疫组织化学试剂盒(武汉博士德生物工程公司);兔抗人和鼠 Fas 及抗鼠 FasL 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);SPTM 试剂盒(美国 Zymed 公司);DAB 显色试剂盒(北京中山生物技术有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型的制作 参照文献[4]的方法制作 EIU 动物模型。将内毒素溶于无菌生理盐水中,使溶液质量浓度为 16 g/L。配制两组注射液:一组配方为 13 μ L 稀释液 + 500 μ L PBS + 500 μ L CFA;另一组为 13 μ L 稀释液 + 400 μ L PBS + 5 μ L 百日咳杆菌。实验组每只大鼠双后足垫注射 LPS 注射液第 1 组配方 0.4 mL,腹腔注射第 2 组配方每只 0.15 mL;对照组每只大鼠双后足垫和腹腔注射相同剂量的磷酸平衡盐水缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)。分别在注射后 6、12、18、24、48 h 处死大鼠,进行观察。

1.2.2 临床观察与评分 注射内毒素前后每隔 2 h 检查 1 次,各组在各个时间点处死前进行裂隙灯和检眼镜检查,必要时复方托品酰胺散瞳检查,详细记录临

床体征的改变并拍照。炎症分级参考 Hoekzema 等^[5]的评分标准:虹膜充血 0~2 分,前房内渗出 0~2 分,前房积脓 0~2 分,瞳孔缩小 0~2 分,总分为 8 分。

1.2.3 组织病理学检查 各时间点处死大鼠后,用 4 g/L 戊巴比妥钠(60 mg/kg)腹腔注射麻醉、开胸,于大鼠左心室内注射 10^6 U/L 肝素 0.3 mL 经心脏灌流以抗凝血。先用 200 mL 生理盐水快速灌注,充分排出血管床中的血液,然后用预冷的 5% 甲醛固定液 100 mL 灌流。待固定液缓慢注射完毕后,迅速摘除眼球立即置于 5% 甲醛溶液中固定 24 h。固定后组织进行石蜡包埋,经瞳孔-视盘轴作矢状切面,行常规苏木精-伊红染色,显微镜下观察。将正常对照组鼠眼及内毒素注射后各亚组鼠眼石蜡切片染色,显微镜下观察。

1.2.4 原位凋亡的检测 上述石蜡切片采用 TUNEL 试剂盒进行原位凋亡细胞检测。具体方法如下:石蜡切片脱蜡至水,在室温下置于 3% H_2O_2 液中 10 min;以 TBS 1:100 新鲜稀释蛋白酶 K,37 $^{\circ}C$ 下消化 5 min,每张切片内取末端脱氧核糖核酸转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT)和 GIG-d-UTP 各 1 μ L 加入 18 μ L 标记液和缓冲液,4 $^{\circ}C$ 过夜,37 $^{\circ}C$ 标记 2 h;加封闭液 50 μ L,室温 30 min,37 $^{\circ}C$ 湿盒孵育 2 h;生物素抗地高辛抗体 50 μ L,37 $^{\circ}C$ 湿盒反应 30 min,加入 SABC 反应 30 min;DAB (R-氨基联苯胺)显色 5~20 min,苏木素轻度复染,脱水,透明,封片。阳性对照在滴加反应液前,经 1 g/L DNaseI 溶液中室温孵育 15 min;阴性对照以 PBS 代替 TdT。凋亡细胞形态标准:核固缩或核碎裂贴边,出现核周空泡。阳性标记:凋亡细胞的细胞核呈棕色或棕褐色,非凋亡细胞和对照组切片苏木素复染呈蓝色。同时符合上述形态学和阳性标记的两种标准,判定为凋亡染色阳性细胞。

1.2.5 免疫组织化学染色 上述石蜡切片采用 SABC 法进行检测。具体方法如下:石蜡切片常规脱蜡至水;3% H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶 10 min,漂洗;高温高压热修复抗原,漂洗;正常山羊血清室温孵育 15 min;加一抗(Fas 1:100, FasL 1:50),湿盒内 4 $^{\circ}C$ 过夜,漂洗;加二抗,湿盒 37 $^{\circ}C$ 孵育 15 min,漂洗;加辣根酶标记链酶卵白素,湿盒 37 $^{\circ}C$ 孵育 15 min,漂洗;DAB 显色,自来水冲洗;苏木素复染,盐酸乙醇分化,烘干,二甲苯透明树脂封片。Fas 阳性标本取自乙肝患者, FasL 阳性标本取自小鼠胸腺,以 PBS 代替一抗作阴性对照。Fas 和 FasL 阳性表达为细胞膜或细胞浆呈黄色或棕黄色染色,细丝状,分布不均匀,细胞核淡染,呈浅灰蓝色。

1.2.6 图像分析 正常对照组和实验各组均取 20 张切片(每个标本取不连续的 2 张切片),高倍镜下($\times 400$)以神经节细胞层为观察框,每张切片随机选取 4 个等长距离($400\ \mu\text{m}$)并且细胞比较集中,无坏死、钙化和炎症的不重复视野,输入医学图像分析系统,计算视野中 $400\ \mu\text{m}$ 长的视网膜各层 TUNEL 阳性细胞数。在 Fas 和 FasL 反应切片上,测定 $400\ \mu\text{m}$ 长的视网膜神经节细胞层和内核层细胞阳性细胞数,取其均数作为该切片的阳性细胞数,分析视网膜组织中细胞凋亡及 Fas 和 FasL 表达情况,取平均值并进行统计学分析。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计学软件进行统计学处理。所有测试数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。不同时间组内毒素注射后各时间点大鼠临床评分、内毒素注射后不同时间鼠 TUNEL、Fas、FasL 阳性细胞数表达的比较采用单因素方差分析,组间的多重比较采用 SNK-*q* 检验,Fas、FasL 表达的相关性及 Fas、FasL 表达与凋亡间的相关性采用 Pearson 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 观察与评分

对照组大鼠无炎症表现。实验组大鼠内毒素注射后眼部出现一系列炎症反应,其症状与葡萄膜炎一致。4 h 时可见虹膜血管扩张瘀血。10 h 时角膜水肿、前房混浊、Tyndall 征(+),有少量渗出,血管仍充血,虹膜水肿加重、范围扩大,瞳孔缩小。18 h 时反应至最重,虹膜高度水肿,血管扩张充血严重,虹膜后粘连,可见渗出、前房絮状物漂浮, Tyndall 征(++);瞳孔显著缩小并呈不规则形,中央被纤维素样渗出膜遮盖,周围有脓性物;玻璃体混浊,眼底由于严重的前房和玻璃体反应而难以窥及(图 1)。24 h 时上述症状减轻。各时间点大鼠临床评分见表 1。实验组中 5 个亚组(6、12、18、24、48 h)的临床评分与对照组相比差异均有统计学意义($P < 0.05$)。12、18、24、48 h 的临床评分与前期实验组相比差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 组织病理学检查

LPS 注射后 18 h 有全葡萄膜炎的病理改变,虹膜血管扩张,虹膜睫状体基质增厚,上皮细胞破坏,失去正常结构,瞳孔闭锁;前房、后房有纤维素渗出,前房、后房、玻璃体、虹膜、睫状体、视网膜及脉络膜有大量的

表 1 内毒素注射后各时间点大鼠临床评分($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Clinical score of inflammation in different time points after LPS injection($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Inflammatory score
Normal	5	0.30 \pm 0.20
Model 6 h	5	1.80 \pm 0.46 ^b
Model 12 h	5	3.00 \pm 0.50 ^{bc}
Model 18 h	5	6.20 \pm 0.52 ^{bd}
Model 24 h	5	4.70 \pm 0.89 ^{bk}
Model 48 h	5	4.40 \pm 0.24 ^{bn}

^b $P < 0.05$ vs normal group, ^c $P < 0.05$ vs model 6 h group, ^d $P < 0.05$ vs model 12 h group, ^k $P < 0.05$ vs model 18 h group, ⁿ $P < 0.05$ vs model 24 h group (One-way ANOVA, SNK-*q* test)

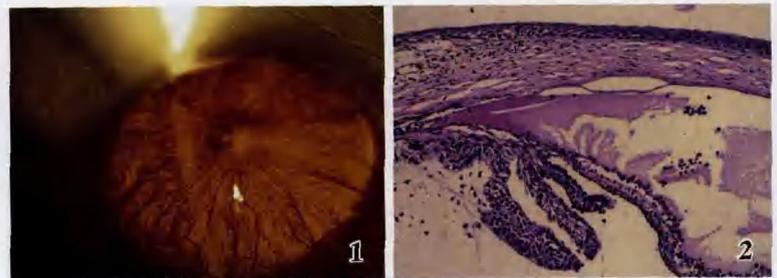


图 1 霍乱弧菌内毒素注射 18 h 后 Wistar 大鼠眼裂隙灯显微镜下可见前房积血、渗出,瞳孔缩小,虹膜高度水肿,血管重度扩张充血 **图 2** LPS 诱导的 Wistar 大鼠 EIU 模型有全葡萄膜炎的组织病理学改变,显示炎症急性期前房和玻璃体内有大量炎性细胞渗出、浸润,葡萄膜和视网膜增厚并有炎性细胞浸润(HE $\times 200$)
Fig. 1 In the eye injected of LPS for 18 hours, the hemorrhage, cells and exudates of anterior chamber are seen. In anterior chamber, mydriasis became smaller, serious hyperemia of iris, severe iris vessel engorgement are exhibited under the slit lamp microscope **Fig. 2** There are marked inflammatory cell infiltration in anterior chamber and vitreous, and obvious exudation and thickening of retina are also found in panuveitis model eye under the light microscopy (HE $\times 200$)

中性粒细胞及少量的单核细胞和淋巴细胞浸润,视网膜增厚,可见炎性细胞浸润,一些部位可见视网膜下浆液性渗出,脉络膜受累,表现为脉络膜水肿及炎性细胞浸润(图 2)。对照组无炎症表现。

2.3 TUNEL 检测凋亡细胞

正常对照组大鼠眼组织中未发现凋亡细胞。实验组大鼠在虹膜、睫状体、脉络膜、视网膜各层中均可见不同程度的 TUNEL 阳性凋亡细胞,但以虹膜和睫状体最为明显(图 3,4),凋亡细胞主要集中于炎症反应的严重部位。正常对照组及实验组 6、12、18、24、48 h 视网膜中 TUNEL 阳性细胞数见表 2。实验各观察组视网膜中凋亡阳性细胞数与正常对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$),实验各观察组间视网膜中凋亡阳性细胞数差异有统计学意义($F = 229.35, P = 0.000, P < 0.05$)。

表 2 内毒素注射后不同时间鼠 TUNEL、Fas、FasL 阳性细胞数的表达 ($\bar{x} \pm s$, 个/400 μm)

Table 2 Positive cells expression of TUNEL, Fas and FasL at different time points after LPS injection ($\bar{x} \pm s$, cells/400 μm)

Group	n	TUNEL	Fas	FasL
Normal	5	0.20 \pm 0.45	0.00	13.60 \pm 1.82
Model 6 h	5	3.00 \pm 0.71 ^b	21.00 \pm 1.58	33.40 \pm 2.07 ^b
Model 12 h	5	19.60 \pm 2.07 ^{be}	51.40 \pm 2.07 ^e	39.60 \pm 1.14 ^{bc}
Model 18 h	5	23.80 \pm 1.92 ^{bh}	83.00 \pm 1.58 ^h	92.00 \pm 1.58 ^{hh}
Model 24 h	5	13.40 \pm 1.14 ^{bk}	61.60 \pm 1.82 ^k	70.60 \pm 2.07 ^{bk}
Model 48 h	5	6.20 \pm 1.30 ^{bn}	40.40 \pm 2.07 ⁿ	51.00 \pm 1.58 ^{bn}

^b $P < 0.05$ vs respective normal group, ^e $P < 0.05$ vs respective model 6 h group, ^h $P < 0.05$ vs respective model 12 h group, ^k $P < 0.05$ vs model 18 h group, ⁿ $P < 0.05$ vs respective model 24 h group (One-way ANOVA, SNK-q test)

2.4 免疫组织化学检测 Fas 和 FasL 的表达

Fas 和 FasL 的表达呈棕黄色, 主要分布于胞浆, 两

者在视网膜的表达呈正相关 ($r = 0.955, P < 0.01$)。正常对照组大鼠眼组织中未见 Fas 表达, 各实验组大鼠在虹膜、睫状体、脉络膜、视网膜中均可见不同程度的 Fas 表达, 但以虹膜和睫状体最为明显 (图 5, 6)。正常对照组大鼠虹膜、睫状体、脉络膜、视网膜中可见 FasL 弱表达, 各实验组大鼠虹膜、睫状体、脉络膜、视网膜中 FasL 表达显著增强, 以虹膜和睫状体最为明显 (图 7, 8)。视网膜中 Fas 和 FasL 的表达以神经纤维层、神经节细胞层和内核层的表达为著, 正常对照组及实验组 6、12、18、24、48 h 视网膜中 Fas 和 FasL 阳性细胞数见表 2。实验各观察组视网膜中 Fas 和 FasL 阳性细胞数与正常对照组相比, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。Fas 和 FasL 表达与凋亡均具有较好的相关性 ($r = 0.923, 0.807, P < 0.01$)。

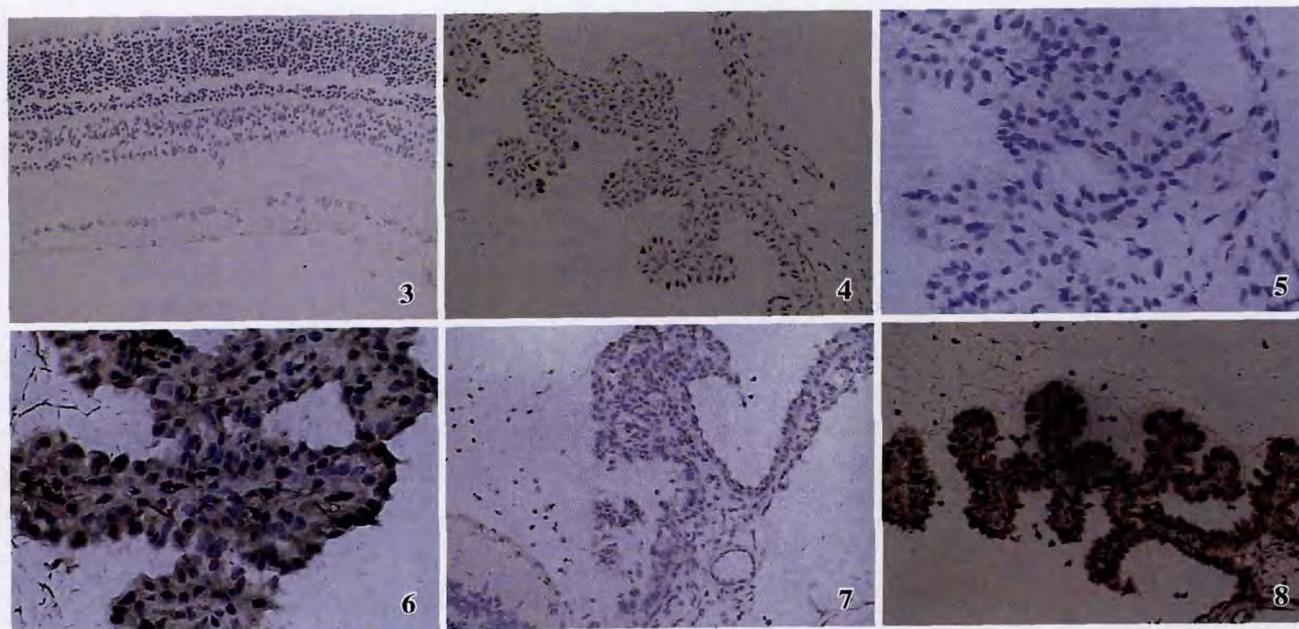


图 3 正常对照组大鼠视网膜组织 TUNEL 染色, 未见凋亡细胞 (DAB \times 200) 图 4 内毒素注射 18 h 后 Wistar 大鼠虹膜睫状体组织 TUNEL 染色, 可见较多凋亡细胞 (DAB \times 200) 图 5 正常对照组大鼠虹膜睫状体组织 Fas 免疫组织化学染色, 未见阳性细胞 (DAB \times 400) 图 6 内毒素注射 18 h 后大鼠虹膜睫状体组织 Fas 免疫组织化学染色可见阳性细胞明显增多 (DAB \times 400) 图 7 正常对照组大鼠虹膜睫状体组织 FasL 免疫组织化学染色可见低表达 (DAB \times 200) 图 8 内毒素注射 18 h 后大鼠虹膜睫状体组织 FasL 免疫组织化学染色, 阳性细胞明显增多 (DAB \times 200)

Fig. 3 No positive apoptotic cell was found after TUNEL staining in retinal tissue in normal Wistar rats (DAB \times 200) Fig. 4 In the section of iris and ciliary body in LPS injection for 18 hours, a number of positive apoptotic cells in iris and ciliary body were found in experimental group (DAB \times 200) Fig. 5 No positive staining for Fas was found in iris and ciliary body of rats (DAB \times 400) Fig. 6 In 18 hours after LPS injection, a number of positive cells for Fas were found in iris and ciliary body of rats (DAB \times 400) Fig. 7 The intensity of positive staining for FasL was weak in iris and ciliary body of normal Wistar rat (DAB \times 400) Fig. 8 In 18 hours after LPS injection, a number of positive cells for FasL were found in rat's iris and ciliary body (DAB \times 200)

3 讨论

葡萄膜炎是一类由多种原因引起的葡萄膜的炎症, 多见于中青年, 为常见的眼科疾病, 常因严重并发

症和后遗症而致盲, 目前尚无理想的预防及治疗措施。EIU 与人葡萄膜炎有一些共同的病理改变, 是比较成熟的人葡萄膜炎的动物模型, 临床表现以眼前节炎症为主, 易于观察, 此种模型已成为研究人葡萄膜炎的发

病机制、预防和治疗的重要工具。本实验亦证明在 Wistar 大鼠上用 LPS 成功地诱发出全葡萄膜炎,组织受累广泛,虹膜、睫状体、玻璃体、视网膜、视盘以及脉络膜均发生了严重的炎症反应,出现全葡萄膜炎的表现。从本研究结果来看,炎症使前后节均原发受累,且随着病程的延长,后节组织损伤加重,各种因素最后均会影响到视网膜,这也可能是该病危害较大的缘故。所以,本研究由 EIU 模型是成功的,这为我们进行葡萄膜炎发病机制、预防和治疗的研究提供了良好而稳定的动物模型。

EIU 虽然与人类葡萄膜炎在临床表现和病理改变上存在某些相似之处,但与人葡萄膜炎仍存在许多差异,其中最重要的不同表现在病程和炎症的复发上,人葡萄膜炎种类繁多,病程长,易慢性化且易复发,很多患者由于炎症反复发作,病情难以控制而导致眼组织结构破坏和功能的丧失。而 EIU 起病快,病程短,炎症消散迅速,不易复发,具有自限性,二者差异的原因目前尚不清楚,揭示两者间差异的原因及探讨炎症复发和慢性化的机制对于人葡萄膜炎的控制及避免盲目的发生有重要意义。杨培增等^[6]对 EIU 和光感受器间维生素 A 类结合蛋白诱导的葡萄膜炎研究中发现,虹膜睫状体、视网膜、脉络膜上出现炎症反应的同时,也出现炎性细胞的凋亡。凋亡细胞的分布与炎症病变部位相一致,病变反应越严重的部位凋亡细胞越多,推测此炎症之所以病程短、炎症消退迅速,可能与浸润的炎性细胞在眼组织的迅速凋亡有关。Smith 等^[7]应用 TUNEL 法检测 EIU 模型中浸润的炎性细胞时,发现在炎症早期即发生了凋亡,TUNEL 阳性的细胞在炎症的整个过程都可以见到,并且与炎症的严重程度相一致,TUNEL 阳性的细胞主要是单核细胞,TUNEL 阴性的细胞主要是嗜中性粒细胞,因而单核细胞在渗出部位很快死亡,嗜中性粒细胞却保留下来,认为凋亡机制促进了炎症的消散。Ohta 等^[8]发现某些急性前葡萄膜炎患者房水中炎性细胞有凋亡的发生。Nakamura 等^[9]发现 Behcet 病患者外周血淋巴细胞凋亡不足,T 淋巴细胞对凋亡有很大的抵抗性。籍莉等^[10]研究发现特发性前葡萄膜炎、Behcet 病、小柳-原田综合征患者外周血淋巴细胞凋亡出现异常,这有可能与它们的炎症迁延,易复发有关。既往的研究^[7,10-11]发现 EIU 在虹膜和睫状体均有大量细胞凋亡的现象发生,本实验中也发现在虹膜和睫状体上有比视网膜更多的凋亡细胞存在,但报道 EIU 视网膜中细胞凋亡的文献较少,因此我们重点观察了 EIU 对眼后节的影响,检测了视网膜中细胞凋亡的发生,也进一步证明了 EIU 不仅仅是

前部葡萄膜炎,也对眼后节造成一定的影响。本研究发现,EIU 过程中有很多细胞发生凋亡,眼组织中浸润细胞的凋亡可能是标志 EIU 开始消退的最初征象之一。在 EIU 早期虹膜和睫状体即发生严重的炎症,这些组织中出现大量凋亡细胞,表明在早期发生炎症的组织中较早开始了炎症的消退,正是由于这些浸润细胞的凋亡才使得炎症迅速消退。

细胞凋亡,是由于内外环境的变化或死亡信号的触发,多细胞有机体为调控机体发育,维护内环境稳定,由一系列相关基因控制的细胞自主有序的主动性死亡过程。它对于胚胎的发生、机体正常的生长发育、某些疾病的发生、细胞恶变以及免疫监督、免疫防御系统功能的维持等方面都具有重要意义^[12]。细胞凋亡是一些重要的眼病中细胞死亡的途径。本实验采用 TUNEL 法定量检测凋亡细胞,直观地证明了霍乱弧菌内毒素诱导的葡萄膜炎中存在凋亡。实验结果表明,正常对照组大鼠视网膜中基本未见 TUNEL 阳性细胞,内毒素注射后 6 h 即开始出现少量 TUNEL 阳性细胞,随着炎症的发展凋亡的细胞逐渐增多,18 h 时达高峰,24 h 时可见减少。凋亡细胞的分布与炎症病变部位相一致,病变反应越严重的部位凋亡细胞越多。以上研究表明 EIU 早期即存在着浸润细胞的凋亡,凋亡参与了 EIU 的病理改变,炎症高峰期即出现了炎症消退的迹象,EIU 中浸润细胞凋亡的发生可能是导致炎性细胞减少及消除炎症的一个重要因素。而人葡萄膜炎(Behcet 病和 VKH 综合征)患者的自身反应性淋巴细胞对凋亡有相当高的抵抗性,从而导致这些细胞在体内长期存活,是造成人葡萄膜炎慢性化及复发的重要原因^[15-16]。

启动凋亡的一条最具特征性的途径为以 Fas/FasL 系统为代表的死亡受体信号转导途径。Fas-FasL 系统不仅参与细胞凋亡过程,而且参与免疫系统的细胞毒作用、免疫反应的自身稳定调控及机体组织细胞的自身稳定和生理平衡^[13-14]。在免疫反应中 Fas、FasL 交联作用能够诱导激活的 T 淋巴细胞凋亡。FasL 与 Fas 在结构上互补结合可向细胞内传导死亡信号,诱导表达 Fas 的靶细胞发生程序性死亡,FasL 被认为是主要的凋亡促进基因。最近研究发现,在动物模型中浸润至眼内的细胞均可表达 Fas 和 FasL 蛋白,并且这些细胞很快发生凋亡,但在人葡萄膜炎中淋巴细胞对凋亡表现出极大的抵抗性,对此抵抗性进一步研究发现,这些细胞的 Fas 和 FasL 蛋白表达不平衡,不能有效地通过 Fas 和 FasL 的相互作用诱导凋亡这一机制来清除这些自身免疫性细胞,这些研究表明 Fas、FasL 系统的

异常表达或功能紊乱可能是造成细胞对凋亡抵抗性增加和人类葡萄膜炎复发或慢性化的一个重要机制,如何调节 Fas、FasL 的平衡可能对控制顽固性葡萄膜炎有重要的意义^[15-16]。陈玲等^[17]通过定量分析 Fas、FasL mRNA 的表达,发现 VKH 综合征患者外周血淋巴细胞的 Fas、FasL mRNA 表达均显著高于正常对照组,表明患者体内有大量活化的自身免疫性淋巴细胞,可能与炎症反应反复发作、慢性化有关。Nakamura 等^[18]对 18 例 Behcet 病患者研究发现,在疾病活动期患者血浆中游离 Fas 明显增加,且 T 细胞对凋亡有很大抵抗性,认为 Behcet 病与 T 细胞的活化状态、细胞凋亡有关。据此推测,Fas、FasL 表达或功能异常导致活化的 Fas⁺T 细胞不能有效地通过 Fas、FasL 介导的凋亡途径来清除,可能是 Behcet 病中活化的 T 细胞不能被有效清除而长期存在的一个主要原因,也可能是 Behcet 病患者葡萄膜炎持续、慢性化和复发的一个重要机制。

本研究应用免疫组织化学法检测到内毒素注射后大鼠眼组织切片中 Fas 和 FasL 表达较正常对照组表达明显增加,以虹膜和睫状体最为明显。Fas、FasL 与凋亡间具有一定的相关性,Fas 表达与凋亡的相关性最强。其表达规律为内毒素注射后 6 h Fas、FasL 开始表达,18 h 达高峰,24 h 后逐渐减少,48 h 仍维持高表达。由此可见,在时间上 Fas 和 FasL 表达的高峰与凋亡高峰重叠;在位置上 Fas 和 FasL 高表达的部位也是凋亡发生的主要部位。表明 Fas 和 FasL 在内毒素注射后大鼠眼组织中大量异常表达,表达 FasL 的细胞通过分泌或旁分泌方式使 FasL 与 Fas 结合,从而触发了 Fas 阳性细胞凋亡。

总之,本研究结果证实了凋亡在 EIU 中所起的重要作用,浸润细胞的凋亡可能在控制炎症中起着重要的作用,并发现 Fas 和 FasL 的过表达诱导了眼组织中浸润细胞的凋亡,推测 Fas、FasL 抗原的表达异常及由此所造成的细胞凋亡等方面的紊乱可能在人葡萄膜炎的发生、慢性化及复发过程中起着重要作用。对葡萄膜视网膜中炎性细胞凋亡的诱导及相关因素的研究,如何重建正常的凋亡平衡将可能为人葡萄膜炎的治疗及预防复发提供一种新的策略。

参考文献

- 1 Nussenblatt RB. Proctor lecture: experimental autoimmune uveitis [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1991, 32: 3131 - 3141
- 2 Wacker WB. Proctor lecture: experimental allergic uveitis [J]. Invest

- Ophthalmol Vis Sci, 1991, 32: 3119 - 3128
- 3 Yang P, de Vos AF, Kijlstra A. Macrophages I the retinal of normal Lewis rat and their dynamics after injection of lipopolysaccharide [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996, 37(1): 2708
- 4 卢弘. 霍乱弧菌内毒素诱导大鼠葡萄膜炎的组织切片研究 [J]. 眼科新进展, 2002, 22(6): 384 - 387
- 5 Hoekzema R, Murray PI, van Hareu MA, et al. Analysis of interlenkin-6 in endoxin induced uveitis [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1991, 32(1): 88 - 95
- 6 Yang PZ, Herzberg NH, Zhou HY, et al. Apoptosis of infiltrating cells in experimental autoimmune uveoretinitis [J]. Chin Med J, 2000, 113: 643 - 646
- 7 Smith JR, Hart PH, Standfield SD, et al. Apoptosis is a prominent feature of acute anterior uveitis in the Fischer 344 rat [J]. Br J Ophthalmol, 2000, 84: 205 - 211
- 8 Ohta K, Norose K, Wang XC, et al. Apoptosis-related fas antigen on memory T cells in aqueous humor of uveitis patients [J]. Curr Eye Res, 1996, 15(3): 299
- 9 籍莉, 杨培增, 周红艳, 等. Fas/FasL 抗原在 Behcet 患者外周血 T 淋巴细胞的表达 [J]. 眼科新进展, 2000, 20(16): 388
- 10 Yang P, Smith JR, Damodar KS, et al. () Visualization of cell death in vivo during murine endotoxin-induced uveitis [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44: 1993 - 1997
- 11 Li B, Yang P, Chu L, et al. T-bet expression in the iris and spleen parallels disease expression during endotoxin-induced uveitis [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2007, 245: 407 - 413
- 12 Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease [J]. Science, 1995, 267: 1456
- 13 Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. A cell 2 killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor [J]. J Exp Med, 1989, 169: 1747 - 1756
- 14 Suda T, Takahashi T, Golstein P, et al. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family [J]. Cell, 1993, 75: 1169 - 1178
- 15 Yang PZ, Ji L, Zhou HY, et al. Disturbed expression of Fas/FasL on CD4⁺ and CD8⁺ T cells in Behcet's disease, Vogt-Koyanagi-Harada syndrome and idiopathic anterior uveitis [J]. Ocul Immunol Inflammation, 2001, 9: 185 - 191
- 16 Yang PZ, Chen L, Zhou HY, et al. Resistance of lymphocytes to Fas-mediated apoptosis in Behcet's disease and Vogt-Koyanagi-Harada syndrome [J]. Ocul Immunol Inflammation, 2002, 10: 47 - 52
- 17 陈玲, 杨培增, 周红颜, 等. 伏格特-小柳-原田综合征患者外周血淋巴细胞 Fas 和 FasL mRNA 的表达 [J]. 中华眼科杂志, 2004, 40: 507 - 509
- 18 Nakamura S, Sugita M, Matoba H, et al. Insufficient expression of Fas antigen on helper T cells in Behcet's disease [J]. Br J Ophthalmol, 1996, 80: 174 - 176

(收稿: 2008-07-24 修回: 2009-03-18)

(本文编辑: 王莉红)