

内毒素诱导葡萄膜炎中炎症细胞凋亡与 TRAIL 表达的研究

满 辉¹, 黄旭东¹, 黄 静²

作者单位:¹(261042) 中国山东省潍坊市, 潍坊眼科医院;
²(250000) 中国山东省济南市, 济南儿童眼科医院
作者简介: 满辉, 硕士, 研究方向: 白内障、角膜病、斜视。
通讯作者: 满辉. mh-alice@163.com
收稿日期: 2012-09-07 修回日期: 2012-12-17

Expression of TNF - related apoptosis - inducing ligand system and infiltrated cells apoptosis in endotoxin - induced uveitis

Hui Man¹, Xu-Dong Huang¹, Jing Huang²

¹Weifang Eye Hospital, Weifang 261042, Shandong Province, China; ²Jinan Children's Eye Hospital, Jinan 250000, Shandong Province, China

Correspondence to: Hui Man. Weifang Eye Hospital, Weifang 261042, Shandong Province, China. mh-alice@163.com
Received: 2012-09-07 Accepted: 2012-12-17

Abstract

• AIM: To investigate the expression and function of TNF-related apoptosis - inducing ligand (TRAIL) apoptosis system on infiltrated cells in Sprague-Dawley (SD) rats with endotoxin-induced uveitis (EIU), and to study the role of TRAIL on apoptosis.

• METHODS: EIU model was established by injecting a dose of 1mg/kg endotoxin (LPS) into the footpads of SD rats. At different time points (6, 12, 18, 24, 48 hours) after endotoxin injection, clinical symptoms were observed with ophthalmoscope. The cells in the aqueous humor one eye in each rat were counted. Eyes were enucleated for histological examination at different time points. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling assay (TUNEL) method was used to assess the infiltrated cells apoptosis. The expression of TRAIL was determined by streptavidin - biotin complex (SABC) immune histochemistry. The positive stain section was analyzed by computer-based image analysis system.

• RESULTS: Intraocular inflammation appeared 6 hours after LPS injection, peaked at 18 - 24 hours, and obviously weakened at 48 hours. The cells of aqueous humor were gradually increased peaked at 24 hours. TUNEL stain indicated: a number of apoptotic infiltrated cells could be seen at the time of 6 hours to 24 hours after endotoxin injection. TRAIL was constitutively expressed on the rat iris weakly. TRAIL was expressed on the infiltrated cells. The intensity was weak in the 6

hours, 12 hours, at a peak in the 18 to 24 hours.

• CONCLUSION: Uveitis was induced in the rat eyes with injecting 1mg/kg endotoxin. The short duration of EIU may be associated with apoptosis of infiltrated cells in inflammation. The TRAIL system may be associated with the infiltrated cells apoptosis in EIU.

• KEYWORDS: endotoxin; uveitis; cell apoptosis; TNF-related apoptosis-inducing ligand

Citation: Man H, Huang XD, Huang J. Expression of TNF-related apoptosis - inducing ligand system and infiltrated cells apoptosis in endotoxin-induced uveitis. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(1):34-37

摘要

目的: 在内毒素诱导的葡萄膜炎(endotoxin induced uveitis, EIU)模型中, 观察葡萄膜炎病变中炎症细胞凋亡的发生, 研究大鼠虹膜组织中炎症细胞肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)的表达与炎症细胞凋亡的关系, 探讨 TRAIL 凋亡途径可能参与炎症细胞的凋亡。

方法: 以 1mg/kg 内毒素注射于大鼠后足垫建立 EIU 模型, 分别于注射后不同时间点观察大鼠眼内的炎症反应。吸取房水观察细胞数。摘取眼球, 行 HE (hematoxylin eosin) 染色观察大鼠虹膜组织的病理改变; TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick-end labeling) 法检测炎症细胞凋亡情况; 同时运用 SABC 法检测在内毒素诱导后的不同时间 TRAIL 在炎症细胞上的表达, 并行图像分析。

结果: 内毒素注射 6h 开始出现炎症, 以后炎症加重, 于 18 ~ 24h 达到炎症高峰, 48h 炎症明显消退。房水中的细胞数也在 24h 组达到最多。HE 染色显示: 内毒素注射后 6h, 即出现炎症细胞, 细胞数目在 24h 组最多, 多数为多形核中性粒细胞, 少数为单核细胞和淋巴细胞, 48h 组炎症细胞几乎消失。TUNEL 染色显示: 在内毒素注射后 6h 组即有炎症细胞出现阳性着色, 24h 组凋亡数达到最多。免疫组化显示: TRAIL 蛋白在大鼠的虹膜色素上皮层呈弱阳性着色; TRAIL 在炎症细胞上呈阳性着色, 24h 组在炎症细胞中的着色数量及着色强度达到最高。

结论: 以 1mg/kg 的内毒素注射于 SD 大鼠后足垫可诱导出葡萄膜炎反应, 炎症反应在 24h 组最为强烈。炎症细胞凋亡可能是 EIU 炎症迅速消退的原因之一。TRAIL 可能参与了炎症细胞的凋亡。

关键词: 内毒素; 葡萄膜炎; 细胞凋亡; TRAIL

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.01.06

引用: 满辉, 黄旭东, 黄静. 内毒素诱导葡萄膜炎中炎症细胞凋亡与 TRAIL 表达的研究. 国际眼科杂志 2013;13(1):34-37

0 引言

葡萄膜炎是常见眼病,也是主要致盲眼病之一^[1],它多发于青壮年,易反复发作。由于病因及发病机制目前尚不完全清楚,治疗颇为棘手。内毒素诱导的葡萄膜炎(endotoxin induced uveitis, EIU)是研究人类葡萄膜炎较为成熟的动物模型之一。EIU 炎症迅速消退的机制目前认为与炎症细胞凋亡有关,但凋亡途径尚不完全清楚,以往的研究大都集中在 Fas/FasL 途径。TRAIL 是新发现的肿瘤坏死因子家族成员之一。TRAIL 与其死亡受体 DR4 (TRAIL-R1)或 DR5 (TRAIL-R2) 结合后,引起许多细胞发生快速凋亡。而其诱饵受体 (Decoy Receptors) DcR1 (TRAIL-R3)和 DcR2 (TRAIL-R4) 以及可溶性受体 OPG (Osteoprotegerin)可以和 DR4 及 DR5 竞争 TRAIL,从而抑制凋亡^[2]。死亡受体及诱饵受体的存在使得 TRAIL 精确地、可选择性地诱导凋亡,成为当前肿瘤治疗研究中的热点。随着研究的深入,发现 TRAIL 及其受体同家族中的其它成员一样,在许多细胞上有表达,可诱导活化 T 细胞、中性粒细胞凋亡,推测 TRAIL 及其受体在自身免疫性疾病中可能起到不可估量的作用^[3]。

本研究通过建立 EIU 动物模型,通过光学显微镜下苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色,观察注射内毒素后大鼠虹膜组织中的炎症反应;结合末端脱氧核苷酸转移酶介导的生物素化 dUTP 缺口末端标记 (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nickend labeling, TUNEL) 技术,观察炎症细胞的凋亡情况;同时运用 SABC 法检测在注射内毒素后不同时间炎症细胞 TRAIL 表达,观察其与炎症细胞凋亡的关系,以探讨 EIU 模型中炎症迅速消退的原因,并推测人类葡萄膜炎与动物模型的差异,为人类葡萄膜炎病变的治疗提出新设想。

1 材料和方法

1.1 材料 健康清洁级 SD 大鼠 72 只 (购自解放军第八十九医院实验动物中心),8~10 周龄,体质量 180~220g,雌雄不拘。随机分为 3 组,空白对照组 7 只;实验对照组 (生理盐水注射组) 25 只;实验组 (内毒素注射组) 40 只。根据注射后时间不同分为 6,12,18,24,48h 五个亚组,实验对照组每亚组各 5 只,内毒素注射组每亚组各 8 只。主要试剂:一抗:兔抗大鼠 TRAIL 多克隆抗体;二抗:生物素化山羊抗兔 IgG (武汉博士德公司产品);SABC 试剂盒 (武汉博士德公司产品)。细胞凋亡检测试剂盒 (POD)、胰蛋白酶 (北京中山公司产品)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的制备 参照 McMenamin 等方法,采用大肠杆菌内毒素 (LPS) 制作 EIU 动物模型^[4]。内毒素溶于无菌生理盐水中,浓度为 1mg/mL,实验组每只大鼠双后足垫共注射 1mg/kg 内毒素;实验对照组注射 1mg/kg 9g/L 生理盐水;空白组不行任何处理。

1.2.2 裂隙灯观察与房水细胞计数检测 实验对照组与实验组大鼠在各个时间点进行裂隙灯观察,详细记录临床体征的改变,并摄像。空白组亦进行相应的观察。分别于内毒素注射后相应时间点麻醉大鼠,5g/L 地卡因滴眼剂局部麻醉,在解剖显微镜下用微量注射器自大鼠单眼角膜缘抽出房水后滴 1 滴于细胞计数板上,显微镜下人工计数板内 4 个角的大方格中的白细胞总数,将所得数 $\times 10 \times 1/2$ 即得每微升房水的白细胞数。每亚组取平均值进行分析。

表 1 内毒素注射后不同时间点单眼房水中白细胞计数

组别	n(眼)	白细胞数	F
注射后 6h	8	32.50 \pm 7.56	149.103
12h	8	106.88 \pm 25.49	
18h	8	178.13 \pm 22.03	
24h	8	207.50 \pm 27.12	
48h	8	15.00 \pm 5.35	

1.2.3 HE 染色观察眼内组织炎症随时间的变化 分别在各时间点处死实验组大鼠,迅速摘除一眼,中性福尔马林固定,石蜡包埋,4 μ m 连续切片,HE 染色。

1.2.4 免疫组织化学染色观察 TRAIL 表达 石蜡切片常规免疫组织化学染色。石蜡切片常规脱蜡至水,3% 过氧化氢室温孵育,抗原修复,正常山羊血清封闭,滴加适当比例稀释的一抗,4 $^{\circ}$ C 过夜,滴加生物素标记的二抗工作液,DAB 显色。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。光镜下观察免疫组织化学染色切片,抗 TRAIL 抗体染色阳性的细胞表现为胞浆程度不同,基本均匀的棕黄色粗大颗粒反应,反之为染色阴性。

1.2.5 TUNEL 染色检测不同时间凋亡细胞个数 石蜡切片常规 TUNEL 染色。石蜡切片常规脱蜡至水,胰蛋白酶 37 $^{\circ}$ C 孵育,加入转化剂-POD 孵育,DAB 显色。光镜下观察 TUNEL 切片,染色阳性的细胞表现为核为棕黄色着色,反之为染色阴性。

1.2.6 计算机图像分析 采用 CMIAS 计算机医学图像分析系统对上述各组组织切片进行分析。实验对照组和实验组每亚组及空白组取 8 张切片,每张切片在虹膜部位随机取 5 个视野 (400 倍) 做图像分析,计算 8 张切片的平均光密度,作为此组的阳性细胞的平均光密度。

统计学分析:实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经计算机 SPSS 11.5 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 裂隙灯观察和单眼房水细胞计数 实验组内毒素注射 6h 后出现炎症,以后炎症加重,表现为房水闪辉、前房纤维渗出、虹膜充血、瞳孔缩小,18~24h 炎症达高峰 (图 1)。48h 炎症反应明显减轻。实验对照组和空白组无炎症表现。房水中细胞数见表 1,实验组 18h 组和 24h 组对比无统计学差异 ($P > 0.05$),其余组两两比较均有显著统计学差异 ($P < 0.01$)。

2.2 组织学检查观察不同时间点眼内炎症变化 HE 染色切片在光镜下观察,实验对照组和空白组无炎症表现 (图 2)。实验组中不同时间点实验动物表现不同。高峰期 (LPS 注射后 24h) 时前房有纤维素渗出,前房、后房、虹膜、睫状体有大量的中性粒细胞和少量的单核细胞与淋巴细胞浸润 (图 3)。

2.3 免疫组化染色检测 TRAIL 在眼内组织以及炎症细胞中着色情况 免疫组化显示大鼠 TRAIL 弱阳性着色主要见于虹膜上皮细胞 (图 4),TRAIL 阳性染色主要见于渗出的炎症细胞 (图 5)。计算机图像分析系统测量 TRAIL 阳性细胞的平均光密度见表 2。结果显示:实验组 6h 组和 12h 组,18h 组和 24h 组对比无统计学差异 ($P > 0.05$);其余组两两比较,皆有统计学差异 ($P < 0.05$)。

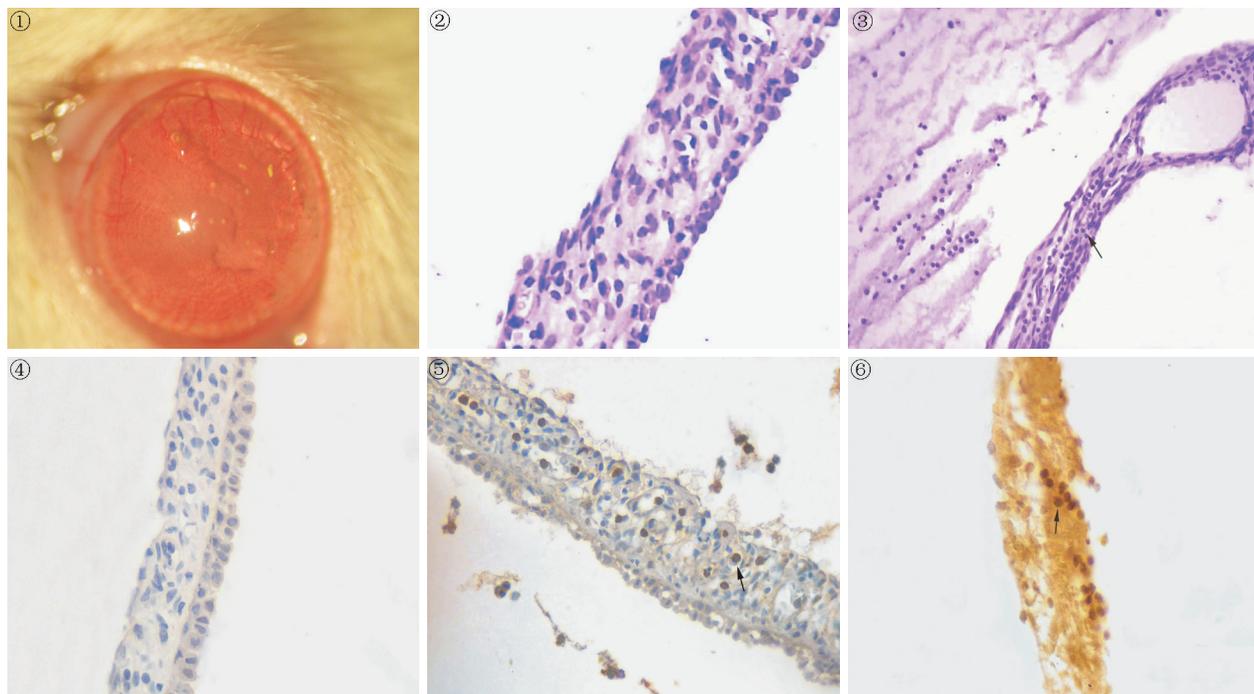


图1 内毒素注射后24h,大鼠虹膜充血,纹理模糊,瞳孔缩小。
 图2 正常大鼠虹膜组织结构清晰,无炎症浸润(HE×400)。
 图3 内毒素注射后24h,炎症细胞数目增多(↑),伴纤维渗出(HE×200)。
 图4 正常虹膜色素上皮层 TRAIL 有弱阳性表达(SABC×400)。
 图5 内毒素注射后24h,炎症细胞 TRAIL 强阳性表达(↑)(SABC×400)。
 图6 内毒素注射后24h,凋亡细胞数明显增多(↑)(SABC×400)。

表2 内毒素注射后不同时间点 TRAIL 阳性表达平均光密度值 $\bar{x} \pm s$

组别	TRAIL 阳性平均光密度值
注射后 6h	0.0592±0.0091
12h	0.0674±0.0137
18h	0.0791±0.0135
24h	0.0828±0.0093
48h	0.0436±0.0081

表3 内毒素注射后不同时间点炎症细胞凋亡个数 ($\bar{x} \pm s$, 个)

组数	细胞凋亡个数	F
注射后 6h	2.48±1.22	95.504
12h	3.85±0.75	
18h	8.98±1.25	
24h	10.78±2.12	
48h	0.33±0.28	

2.4 TUNEL 染色检测不同时间点炎症细胞的凋亡情况

TUNEL 阳性染色主要见于浸润的炎症细胞(图6)。计算机图像测量 TUNEL 阳性细胞数见表3。结果显示:实验组中两两比较,6h组与12h组,18h组与24h组对比无统计学差异($P>0.05$),余各组两两比较均有显著统计学差异($P<0.01$)。

3 讨论

葡萄膜炎多见于中青年,常因病情反复与慢性化而致盲,目前无理想的预防及治疗措施。由于人类葡萄膜炎的研究受诸多因素的限制,目前主要通过动物模型进行研究。内毒素诱导的葡萄膜炎动物模型与人类葡萄膜炎有

一些共同的病理改变^[5]。Guex-Crosier 等研究认为大鼠在注射 LPS 后眼部病理改变是:2~4h 前房开始蛋白渗出,6~10h 炎症开始浸润,同时蛋白渗出,炎症反应在24h 达到高峰,48h 炎症明显消退^[6]。主要浸润细胞是多形核中性粒细胞和少量的单核细胞及淋巴细胞。本次实验亦证实使用大肠杆菌内毒素在 SD 大鼠上成功诱导出了葡萄膜炎,其临床表现与病理改变与以往报道基本相符。

EIU 模型与人类葡萄膜炎在病程上有很大差异性,表现为 EIU 起病快,病程短,炎症消散迅速。以往认为炎症的消散多是通过巨噬细胞的吞噬作用来清除^[7]。最近有报道,炎症细胞如中性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞也可经凋亡途径发生死亡^[8]。本次实验通过 TUNEL 染色结合电镜发现,在 EIU 的早期即内毒素注射后6h 虹膜组织即发生明显的炎症反应,组织中也开始出现凋亡细胞,这似乎表明在早期发生炎症的组织较早开始了炎症的消退。随着炎症程度的加深,凋亡细胞的数目也增加,在24h 组,炎症细胞凋亡数量达到最多。EIU 虹膜组织中炎症细胞的凋亡可能是标志 EIU 开始消退的最初征象之一,这与 Smith 等实验结果基本一致^[9]。杨培增等在实验性自身免疫性葡萄膜炎视网膜膜炎研究中也发现,炎症细胞一进入眼组织即发生凋亡,认为炎症细胞在眼组织的迅速凋亡是此种炎症迅速消退的重要机制^[10]。

近来,杨培增教授研究发现,葡萄膜炎患者淋巴细胞对凋亡有很大抵抗性,造成了自身免疫性淋巴细胞长期存在,导致了葡萄膜炎的慢性化或复发,人类淋巴细胞抗凋亡能力增强与这些细胞的凋亡分子(如 Fas/FasL)表达不平衡有关^[11]。由此可见,葡萄膜炎患者体内的某些细胞对凋亡的抵抗性也许可以解释人类葡萄膜炎与 EIU 的不

同病程。

以往对于葡萄膜炎中细胞凋亡的研究都集中在 Fas/FasL 途径上,认为 Fas/FasL 系统介导的凋亡参与免疫反应过程中淋巴细胞的调控,该系统发生功能紊乱时,淋巴细胞凋亡不足或过多,将引起自身免疫性疾病。活化的淋巴细胞上 Fas 或 FasL 的表达增高时,可经 Fas/FasL 系统至凋亡途径而死亡^[12]。

TRAIL 和 TNF 家族其他成员相比,其主要特点在于^[13]TRAIL 具有广谱诱导细胞凋亡的作用,TNF 家族成员也只有 FasL 可以与之相媲美,而其他的 TNF 家族成员均具有较高的组织和细胞特异性;与 FasL 仅表达于活化 T 淋巴细胞和一些免疫禁区不同的是,TRAIL mRNA 不仅广泛表达于机体多种正常组织,特别是成人的脾、前列腺和肺等^[14]。而且一些对 FasL 有抗性的细胞却对 TRAIL 敏感。有研究表明,活化后的 T 细胞 DR4 或 DR5 表达上调,而 DcR1 和 DcR2 的表达降低,使之处于一种凋亡易感状态^[15]。Stephen 等发现 TRAIL 可通过调节其假靶受体与死亡受体的比率而影响中性粒细胞的凋亡率^[16]。由此推测 TRAIL 及其受体在抗炎中也必然占据着一席之地。

随着 Lee 等^[17]发现 TRAIL 同 FasL 一样,也广泛存在于人和鼠的眼组织中,通过免疫组化技术,研究者们发现 TRAIL 蛋白广泛地表达在眼组织中,在角膜主要在上皮、内皮细胞上表达,少量在基质中表达;在虹膜、睫状体上皮细胞中也有表达;同样在脉络膜、视网膜上都有其表达。提示 TRAIL 作为一种新的凋亡因子,在保护眼组织的功能、控制炎症细胞的入侵方面可能和 FasL 一同起到了关键作用,都可能参与了眼免疫赦免的形成。

在本次实验中,我们第一次观察了 EIU 中炎症细胞 TRAIL 表达的情况,并对 EIU 中炎症细胞凋亡的情况做了连续观察。我们发现 TRAIL 表达于正常大鼠虹膜色素上皮层。EIU 中,大多数的炎症细胞都表达 TRAIL,并且随着炎症程度的加深表达增强。同时也观察到炎症细胞凋亡在早期即发生,随着炎症程度的加深,炎症细胞的凋亡数目也随着增加,在 24h 组凋亡数目最多。凋亡变化与以往的研究大致相同。就 TRAIL 如何诱导炎症细胞凋亡的方式上来说,我们推测可能是通过以下两种途径:一是通过炎症细胞上的 DR5 同表达 TRAIL 的眼组织相接触,诱导炎症细胞的凋亡;二是通过表达 TRAIL 和 DR5 的炎症细胞的相互接触从而导致其凋亡。籍莉等^[18]在 EIU 中发现内毒素不仅活化血淋巴细胞参与炎症反应,同时还诱导血淋巴细胞发生凋亡,这样的结果是进一步加快了炎症消退。因为 Fas/FasL 也被证实在 EIU 中促进了炎症细胞的凋亡,因此我们不排除 TRAIL 和 FasL 系统可能有相互协同作用,共同为炎症的消除发挥了不可估量的作用。

细胞表面 TRAIL 受体表达的相对水平,即诱饵受体和死亡受体的相对量可能是决定一种细胞凋亡与否的标志,通过改变死亡受体和诱饵受体的表达比例有可能改变某些细胞的凋亡趋势。但是如何改变其比例,TRAIL/DR5 在人类葡萄膜炎患者中的表达尚需要进一步研究。

参考文献

- 葛坚. 眼科学. 北京:人民卫生出版社 2005; 277-278
- Li X, Han WQ, Boini KM, et al. TRAIL death receptor 4 signaling via lysosome fusion and membrane raft clustering in coronary arterial endothelial cells: evidence from ASM knockout mice. *J Mol Med* 2012; 24(10): 134-135
- Steinwede K, Henken S, Bohling J, et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) exerts therapeutic efficacy for the treatment of pneumococcal pneumonia in mice. *J Exp Med* 2012; 209(11):1937-1952
- Lennikov A, Kitaichi N, Noda K, et al. Amelioration of endotoxin-induced uveitis treated with an IκB kinase inhibitor in rats. *Mol Vis* 2012;18:2586-2597
- Akdeniz N, Esrefoglu M, Keles MS, et al. Serum interleukin-2, interleukin-6, tumour necrosis factor-α and nitric oxide levels in patients with Behcet's disease. *Ann Acad Med Singapore* 2004;33(5): 596-599
- Dedieu L, Chapey E, Balcer-Rodrigues V. Mycoplasma mycoides ssp. Mycoides biotype small colony - secreted components induce apoptotic cell death in bovine leucocytes. *Scand Immunol* 2005;62(6): 528-538
- Sawatzky DA, Willoughby DA, Colville-Nash PR, et al. The involvement of the apoptosis-modulating proteins ERK 1/2, Bcl-X1 and Bax in the resolution of acute inflammation *in vivo*. *Am J Pathol* 2006; 168(1): 33-41
- Kanda A, Noda K, Oike Y, et al. Angiopoietin-like protein 2 mediates endotoxin-induced acute inflammation in the eye. *Lab Invest* 2012;92(11):1553-1563
- Kozak Y, Omri B, Smith JR, et al. Protein kinase Czeta (PKCzeta) regulates ocular inflammation and apoptosis in endotoxin-induced uveitis (EIU): signaling molecules involved in EIU resolution by PKCzeta inhibitor and interleukin-13. *Am J Pathol* 2007;170(4):1241-1257
- Wakisaka S, Takeba Y, Mihara S, et al. Aberrant Fas ligand expression in lymphocytes in patients with Behcet's disease. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;129(2):175-180
- 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. *中华眼科杂志* 2004;(40):507-509
- Yang P, Chen L, Zhou H, et al. Resistance of lymphocytes to Fas-mediated apoptosis in Behcet's disease and Vogt-Koyanagi-Harada syndrome. *Ocul Immunol Inflamm* 2002;10: 47-52
- Graban J, Kohut A. Apoptosis in T-lymphocytes and its significance. *Cesk Fysiol* 2003;52(4): 144-152
- Neumann S, Bidon T, Branschadel M, et al. The transmembrane domains of TNF-related apoptosis-ligand (TRAIL) receptors 1 and 2 co-regulate apoptotic signaling capacity. *Plos One* 2012;7(8):e42526
- Diao Z, Shi J, Zhu J, et al. TRAIL suppresses tumor growth in mice by inducing tumor-infiltrating CD4(+) CD25(+) Treg apoptosis. *Cancer Immunol Immunother* 2012;11: 332-334
- Renshaw SA, Parmar JS, Singleton V, et al. Acceleration of human neutrophil apoptosis by TRAIL. *J Immunol* 2003;170(2): 1027-1033
- Lee HO, Herndon JM, Barreiro R, et al. TRAIL: A mechanism of tumor surveillance in an immune privileged site. *J Immunol* 2002;169(9): 4739-4744
- 籍莉, 杨培增, 林健贤, 等. 内毒素诱导的 SD 大鼠葡萄膜炎外周血淋巴细胞凋亡的研究. *眼科研究* 2002;20(2): 123-125