

棘阿米巴角膜炎发病机制的研究进展

王萍, 朱学军

作者单位: (350001) 中国福建省福州市, 福建医科大学附属第一医院眼科

作者简介: 王萍, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 角膜病。

通讯作者: 朱学军, 女, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 中华医学会福建分会眼科学会会员, 完成了《胎儿角膜移植的临床研究》等自然科学基金课题研究, 研究方向: 角膜病. xuejun_zulia@sina. com

收稿日期: 2010-03-02 修回日期: 2010-03-26

Recent advances in the pathophysiology of acanthamoeba keratitis

Ping Wang, Xue-Jun Zhu

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Correspondence to: Xue-Jun Zhu. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China. xuejun_zulia@sina. com

Received: 2010-03-02 Accepted: 2010-03-26

Abstract

• Acanthamoeba keratitis is a sight-threatening infection, which is characterized by ring-like stromal infiltration and keratonueuritis. The pathophysiology cascade of this infection begins when the trophozoites bind to the corneal epithelium. Following processes include trophozoite-mediated cytopathic effects and the productions of several pathogenic proteases that degrade collagenous stroma. Because of the predilection of acanthamoeba for responding chemotactically to nural cell, it can produce what appears to be keratoneuritis. However the pathophysiology of acanthamoeba keratitis is still unclear, targeting pathophysiology could lead to the development of the diagnosis and treatment of this disease.

• **KEYWORDS:** acanthamoeba keratitis; pathophysiology; MIP-133; MMPs

Wang P, Zhu XJ. Recent advances in the pathophysiology of acanthamoeba keratitis. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2010; 10(5):885-887

摘要

棘阿米巴角膜炎 (acanthamoeba keratitis, AK) 是一种以环形浸润和角膜神经炎为典型临床表现的严重性眼病。它的发病机制主要包括棘阿米巴对角膜上皮的黏附, 滋养体介导的病理效应以及释放多种蛋白酶破坏角膜基质层组织。由于棘阿米巴对神经细胞的强烈趋化效应, 可引起相应的角膜神经炎。目前, AK 的发病机制尚不明确, 但随

着研究的深入可以为眼科医师提供更有效的诊断和治疗措施。

关键词: 棘阿米巴角膜炎; 发病机制; 甘露糖诱导蛋白酶; 基质金属蛋白酶

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2010. 05. 020

王萍, 朱学军. 棘阿米巴角膜炎发病机制的研究进展. *国际眼科杂志* 2010; 10(5):885-887

0 引言

棘阿米巴角膜炎 (AK) 是由棘阿米巴原虫感染引起的慢性、进行性角膜溃疡病变。1973 年, Nagington 等^[1] 和 Jones 等^[2] 报道了首例来自美国南德克萨斯州牧场主的棘阿米巴性角膜炎, 此后的 10a 仅有 10 余例的相关报道, 但自从上世纪 80 年代中后期开始, AK 患者迅速增加。经过美国疾病控制中心的统计发现, AK 的发病与角膜创伤, 接触污水, 配戴角膜接触镜有明显相关性, 其中配戴角膜接触镜是最主要的危险因素^[3]。在我国, 1992 年金秀英等^[4] 首次报道了 AK 病例。近年来随着角膜接触镜的普及, 临床病例总结资料显示, AK 发病率逐渐增高, 引起了国内眼科学者的日益重视。

1 病原学

棘阿米巴属 (Acanthamoeba) 是一类小型自由生活阿米巴, 它们广泛分布于自然界, 如土壤, 水域及空气尘埃中。它有滋养体和包囊两种时相: 通常在适宜的环境下为滋养体, 当环境条件不适宜时, 滋养体转化为球形的包囊, 包囊具有极强的抵抗能力, 并能存活多年。从形态学分类来讲, 目前发现的棘阿米巴属有 27 个种, 其中能引起眼部感染的有 8 种 (A. castellanii, A. culbertsoni, A. polyphaga, A. rhyodes, A. hatchetti, A. lugdunensis, A. quina, A. griffini) 其中最主要是 A. castellanii 和 A. polyphaga^[5]。除了形态学分类以外, 目前许多国内外学者致力于研究棘阿米巴的基因分型, 主要包括 18sDNA 测序分型和 mtDNA-RFLP 分型。利用 18sDNA 可以分为 13 个基因型, 包括 T1 ~ T12 和 T14, 其中能引起角膜感染的有 T4, T3, T6 和 T11^[6]。通过研究发现, 棘阿米巴的毒力及其药物敏感性与其特定的表型有关, 但确切的关系尚待进一步的研究。

2 发病机制

AK 的致病过程包括 2 个阶段: 第一阶段, 致病性的棘阿米巴滋养体对角膜上皮细胞进行黏附, 病变局限角膜上皮层; 第二阶段, 原虫侵入基质层, 造成广泛的胶原组织损伤, 并引起严重的炎症反应。

2.1 棘阿米巴对角膜上皮的黏附 棘阿米巴对宿主角膜上皮细胞的黏附作用有明显的特异性, 在对 11 种哺乳动物的体外黏附试验中发现, 棘阿米巴对人、猪和中国仓鼠角膜的黏附和侵袭作用最明显^[7]。一般认为, 棘阿米巴对角膜的黏附作用对于之后引发的炎症反应是至关重要的先决条件, 并且黏附程度与宿主的炎症反应程度呈正相关。所以棘阿米巴对宿主角膜的选择性也决定了 AK 在

不同宿主的特异性。

致病性棘阿米巴滋养体主要通过其细胞表面表达的一种136kDa的甘露糖结合蛋白来黏附角膜上皮细胞^[8]。甘露糖结合蛋白可以与角膜表面的甘露糖化蛋白结合,进而黏附于角膜表面。所以,角膜表面的甘露糖化蛋白水平越高,黏附的棘阿米巴的数量越多,感染的几率越大。研究发现,角膜的损伤可以导致甘露糖化蛋白表达水平的提高^[9],这也能够解释为何受损的角膜更易感染棘阿米巴。另外由于棘阿米巴包囊和滋养体均可以迅速地黏附于角膜接触镜,尤其是不清洁的镜片,所以配戴角膜接触镜不仅能够将黏附的滋养体直接运送至角膜表面,还可能由于镜片对角膜上皮组织的损伤而导致甘露糖化蛋白的表达水平升高,更加大了感染的可能性。

宿主泪液中的分泌型IgA抗体可以阻止棘阿米巴对角膜上皮的黏附作用。联合口服棘阿米巴抗原和黏膜佐剂霍乱毒素诱导免疫,可以令中华仓鼠和猪角膜完全抵御棘阿米巴的感染,原因就在于这种诱导免疫能够使宿主的泪液中表达足量的分泌型IgA抗体^[10]。也有报道称棘阿米巴可以分泌一种丝氨酸蛋白酶,它可以降低人体内分泌型IgA抗体数量,从而有利于自身的黏附作用^[11]。

2.2 棘阿米巴滋养体介导的细胞病理效应 棘阿米巴滋养体黏附宿主角膜上皮后,可以引发角膜上皮细胞发生迅速而广泛的脱落。体外实验证明,棘阿米巴滋养体可以杀灭多种目标细胞,如角膜上皮细胞、角膜内皮细胞、基质细胞、虹膜睫状体细胞等。棘阿米巴能够通过多种途径导致细胞发生病理变化,其中导致角膜上皮细胞破坏的主要的是以下三种方式:直接细胞溶解作用,细胞吞噬作用以及诱导细胞凋亡作用。滋养体直接介导的细胞裂解具有钙依赖性,Ca²⁺载体A23187可以加速这种效应,而钙通道阻滞剂可以抑制这种效应。细胞骨架也是滋养体介导细胞裂解的必要成分,因为细胞松弛素D处理可以将上述细胞病变的效应降低约98%^[12]。

近年来,甘露糖诱导蛋白酶(MIP-133)的发现是AK发病机制的重大突破。将棘阿米巴暴露于甘露糖中超过48h,会产生一种133kDa的蛋白酶即MIP-133^[13]。MIP-133属于细胞破坏的因子,它可以产生非接触性的细胞溶解作用,并能降解I型胶原纤维和IV型胶原纤维^[8]。体外实验证明,MIP-133主要通过caspase-3途径诱导角膜上皮细胞、角膜内皮细胞、虹膜睫状体细胞、视网膜色素细胞的凋亡^[14],所以棘阿米巴很可能在宿主体内也是利用这一途径破坏角膜上皮细胞。表面涂被甘露糖和棘阿米巴的角膜接触镜与单纯带有棘阿米巴的角膜接触镜相比,所导致的炎症反应更加严重,就是因为甘露糖可以诱导棘阿米巴产生更多的MIP-133,从而发挥其杀灭目标细胞的作用^[13]。在人类眼部正常菌群中,有很多细菌的胞壁都可以表达甘露糖,这有可能是棘阿米巴入侵角膜的一个重要因素。结膜棒状杆菌是眼部正常菌群中表达甘露糖最多的细菌,它已经被认为是AK的高危因素之一,因为体内与体外试验都证实它可以诱导棘阿米巴产生更多的MIP-133,加剧角膜炎的病理反应。而那些仅表达微量甚至不表达甘露糖的细菌则对AK的病理反应无明显影响^[9]。更引起学者们注意的是,只有致病性的棘阿米巴才分泌MIP-133,而非致病性的棘阿米巴不能分泌MIP-133^[8]。这些研究都表明MIP-133与AK的发病机制存在密切的联系。

2.3 棘阿米巴对角膜基质层的破坏 棘阿米巴滋养体结

合角膜上皮并使之广泛脱落后,开始入侵基质层。这一阶段棘阿米巴能够分泌多种蛋白酶,其中主要包括:金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、弹性蛋白酶、胶原裂解酶和纤溶酶原激活剂^[15]。这些蛋白酶可以引起宿主基质层的胶原纤维组织的破坏,并导致剧烈的炎症反应。关于棘阿米巴对角膜基质层的破坏,很可能是由于一种或多种蛋白酶的激活引发一系列的级联反应,最终导致棘阿米巴入侵细胞外基质和角膜基质层,从而发生慢性剧烈炎症。

AK基质层受累的典型临床表现为环形浸润。关于环形浸润的机制尚不明确,一些学者认为它是浸润炎症细胞的产物,特别是中性粒细胞及其产生的蛋白水解酶破坏角膜基质层的胶原纤维产生。已有研究表明胶原裂解酶在形成环形浸润的过程中有一定的作用^[16]。在众多蛋白酶中,只有纤溶酶原激活剂持续表达于致病性棘阿米巴,而不表达于非致病性棘阿米巴^[17]。纤溶酶原激活剂主要催化宿主的纤维蛋白酶原形成纤维蛋白酶,进而降解细胞外基质。纤溶酶系统不仅可以直接降解细胞外基质,同时还参与细胞外基质的基质金属蛋白酶(MMPs)的活化,Kucharewicz用纤溶酶原激活剂的抑制物PAI可以阻断MMPs的活化^[18]。

MMPs属于Zn²⁺依赖的以细胞外基质成分为分解底物的内肽酶,在角膜病的发生发展过程中,由角膜细胞分泌的蛋白水解酶95%以上是MMPs。在角膜发生炎症后,在生长因子、细胞因子的作用下MMPs被活化,参与组织的修复。但随着炎症的加重,大量的炎症因子可以上调MMPs的表达,过度表达的MMPs可以降解基膜的组成成分和胞外基质,包括I型和II型胶原纤维组织、纤维粘连蛋白、层粘连蛋白等^[19]。自然状态下,体内存在MMPs的天然抑制剂TIMPs,它们通过与活化的MMPs结合,抑制后者对细胞外基质的降解。MMPs/TIMPs系统可以维持和稳定细胞外基质沉积和降解的平衡,当这一调节系统失衡,组织修复能力不及破坏能力,则会导致角膜损伤。对溃疡型角膜炎模型研究发现,这些角膜组织中有多种MMPs表达增加(如MMP-2,8,9等),且含量与角膜损伤程度有密切关系,而TIMPs的表达也是增加,但增加幅度不及MMPs^[20]。Lee等^[21]研究表明,MMP-9的表达与角膜炎继发的角膜新生血管化明显相关;敲除MMP-9基因的小鼠在感染HSV-1后角膜血管化程度明显下降。这些都表明MMPs对角膜炎症的进展发挥着重要作用。最近有研究发现,棘阿米巴甘露糖诱导蛋白酶(MIP-133)可以导致人角膜上皮细胞和基质层细胞表达过量的MMPs,其中以MMP-2,3的表达增加量最为显著;若加入MIP-133抑制剂苯甲基磺酰氟(PMSF)共同培养后,MMP-2,3表达量较先前结果有明显下降^[22]。我们可以推测,棘阿米巴分泌的MIP-133在破坏角膜上皮的同时还能够激活MMPs,激活的MMPs最终导致角膜基质层的降解。目前MMPs在AK的发病机制中的作用尚不十分明确,但MMPs的激活和对角膜基质层的破坏仍值得学者们进一步的研究。

2.4 角膜神经炎 AK另外一个典型的临床表现为放射性角膜神经炎,且患者的疼痛程度与角膜组织损伤程度并不相符。在体外实验中,棘阿米巴滋养体对于神经细胞具有强烈的趋化作用,并能通过细胞裂解作用和诱导细胞凋亡来杀灭神经细胞^[23]。目前,导致AK患者眼部剧痛的病理机制尚不明确,但很可能是由于棘阿米巴浸润神经细胞后

所诱发的趋化反应以及滋养体本身产生的各种蛋白酶(包括 MIP-133)对神经细胞的损伤。

2.5 眼内炎的缺失 在黏附和损伤角膜上皮细胞,入侵基质层后,AK 的病理过程似乎停止了,因为棘阿米巴极少侵犯角膜内皮细胞及前房。但令学者困惑的是,棘阿米巴在体外实验中有足够的力量穿透基质层、后弹力层及内皮层,这说明棘阿米巴有侵入前房的可能性^[8]。接着,学者通过活体试验发现:将 106 棘阿米巴滋养体注入前房后,所有的滋养体在 15d 内全部被中性粒细胞清除,而眼内无明显病变^[24]。所以,强大的中性粒细胞是 AK 不发生眼内炎症的原因。

3 小结

AK 是一种严重的致盲性眼病,虽然诊断技术和治疗手段在不断改进,但预后仍然较差。由于单纯的抗原虫药物往往具有较强的角膜细胞毒性,不适宜眼科用药,所以通过干预发病过程中的关键步骤来达到治疗效果显得更加科学。深入研究 AK 的发病机制,特别是针对病理过程中一些关键蛋白酶的研究,有助于我们寻找有效的治疗措施。

参考文献

- 1 Nagington J, Watson PG, Playfair TJ, et al. Amoebic infection of eye. *Lancet* 1974;2(7896):1537-1540
- 2 Jones DB, Visvesvara GS, Robinson NM. Acanthamoeba polyphaga keratitis and Acanthamoeba uveitis associated with fatal meningoencephalitis. *Trans Ophthalmol Soc UK* 1975;95(2):221-232
- 3 Gray TB, Curosnis RT, Sherwan JF, et al. Acanthamoeba, bacterial and fungal contamination of contact lens storage cases. *Br J Ophthalmol* 1995;79(6):601-605
- 4 金秀英,罗时运,张文华,等. 棘阿米巴角膜炎的诊断和防治. *眼科* 1992;1(2):67-71
- 5 Schaumberg DA, Snow KK, Dana MR, et al. The epidemic of Acanthamoeba keratitis, where do we stand? *Cornea* 1998;17(1):3-10
- 6 Schroeder JM, Booton GC, Hay J, et al. Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of Acanthamoeba from humans with keratitis and sewage sludge. *Clin Microbiol* 2001;39(5):1903-1911
- 7 Niederkorn JY, Ubelaker JE, McCulley JP, et al. Susceptibility of corneas from various animal species to *in vitro* binding and invasion by Acanthamoeba castellanii. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33(8):104-112
- 8 Hurt M, Neelam S, Niederkorn J. Pathogenic Acanthamoeba spp. secrete a mannose-induced cytolytic protein that correlates with the ability to cause disease. *Infect Immun* 2003;71(11):6243-6255
- 9 Jaison PL, Cao Z, Panjwani N. Binding of Acanthamoeba to corrected

mannose-glycoproteins of corneal epithelium: effect to injury. *Curr. Eye Res* 1998 17(10):770-776

- 10 Leher HF, Alizadeh H, Taylor WM, et al. Role of mucosal IgA in the resistance to Acanthamoeba keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(13):2666-2673
- 11 Kong HH, Kim TH, Chung DI. Purification and characterization of a secretory serine proteinase of Acanthamoeba healyi isolated from GAE. *J Parasitol* 2000;86(1):12-17
- 12 Niederkorn JY, Alizadeh H, Leher H, et al. The pathogenesis of Acanthamoeba keratitis. *Microbes and Infection* 1999;1(6):437-443
- 13 Alizadeh H, Neelam S, Hurt M, et al. Role of contact lens wear, bacterial flora, and mannose-induced pathogenic protease in the pathogenesis of amoebic keratitis. *Infect Immun* 2005;73(2):1061-1068
- 14 Hurt M, Niederkorn J, Alizadeh H, et al. Effects of mannose on Acanthamoeba castellanii proliferation and cytolytic ability to corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(8):3424-3431
- 15 Khan NA, Jarroll EL, Panjwani N, et al. Proteases as markers for differentiation of pathogenic and nonpathogenic species of Acanthamoeba. *Clin Microbiol* 2000;38(8):2858-2861
- 16 He YG, Niederkorn JY, McCulley JP, et al. *In vivo* and *in vitro* collagenolytic activity of Acanthamoeba castellanii. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31(11):2235-2240
- 17 Mitra MM, Alizadeh H, Gerard RD, et al. Characterization of a plasminogen activator produced by Acanthamoeba castellanii. *Mol Biochem Parasitol* 1995;73(2):157-164
- 18 Kucharewicz I, Kowal K, Buczek W, et al. The plasmin system in airway remodeling. *Thromb Res* 2003;112(12):1-7
- 19 Parks WC. Matrix metalloproteinases in repair. *Wound Repair Regen* 1999;7(6):423-432
- 20 O'Brien TP, Li QJ, Sauerburger F, et al. The role of matrix metalloproteinases in ulcerative keratolysis associated with perioperative diclofenac use. *Ophthalmology* 2001;108(4):656-659
- 21 Lee S, Zheng M, Kim B, et al. Role of matrix metalloproteinase-9 in angiogenesis caused by ocular infection with herpes simplex virus. *Clin Invest* 2002;110(8):1105-1111
- 22 Hassan Alizadeh, Haochuan Li, Sudha Neelam, et al. Modulation of corneal and stromal matrix metalloproteinase by the mannose-induced Acanthamoeba cytolytic protein. *Experimental Eye Research* 2008;87(3):286-291
- 23 Pidherney MS, Alizadeh H, Stewart GL, et al. *In vitro* and *in vivo* tumoricidal properties of a pathogenic/free-living amoeba. *Cancer Lett* 1993;72(2):91-98
- 24 Clarke DW, Alizadeh H, Niederkorn JY. Failure of Acanthamoeba castellanii to produce intraocular infections. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(7):2472-2478