

• 论 著 •

氯化锂在细菌性化脓性角膜炎中的调控*

陈康^{1,2}, 傅强¹, 易冰¹, 罗燕香¹, 孙世瑀¹, 张秀明^{1△}

(1. 中山大学附属中山医院检验医学中心, 广东中山 528403; 2. 南方医科大学, 广东广州 510515)

摘要:目的 探讨氯化锂(LiCl)在细菌性化脓性角膜炎中发挥的作用及其调控机制。方法 Western-blot 检测 LiCl 应用的效果后, 结膜下注射 LiCl 观察疾病进展; 实时荧光定量 PCR 检测炎症因子的表达; TUNEL 和流式细胞术检测细胞凋亡。结果 LiCl 延缓角膜炎的疾病进展; 随后实验发现 LiCl 促进抑炎因子分泌抑制促炎因子的分泌; 促进角膜浸润细胞的凋亡。结论 LiCl 通过调节炎症因子促进细胞凋亡, 抑制角膜炎症反应, 在铜绿假单胞菌角膜炎中发挥角膜保护作用。

关键词: 细菌性角膜炎; 炎症反应; 细胞凋亡

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.04.019

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)04-0478-03

The regulatory role of LiCl in microbial suppurative keratitis*

Chen Kang^{1,2}, Fu Qiang¹, Yi Bing¹, Luo Yanxiang¹, Sun Shijun¹, Zhang Xiuming^{1△}

(1. Division of Clinical Laboratory, Zhongshan Hospital of Sun Yat-sen University, Zhongshan, Guangdong 528403, China;

2. Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

Abstract: **Objective** To explore the role of LiCl in microbial suppurative keratitis. **Methods** Western-blot assay was used to detect the efficacy of LiCl. Inflammatory cytokine levels were examined using Real-time PCR. Cell apoptosis was detected by using TUNEL and flow cytometry assays. **Results** LiCl promoted corneal resistance to PA infection. Real-time PCR data showed that LiCl enhanced IL-10 expression, but suppressed TNF-expression. TUNEL and flow cytometry data showed that LiCl promoted the apoptosis of infiltrating cells. **Conclusion** LiCl promoted host resistance against microbial suppurative keratitis, via regulating inflammatory cytokine expression and cell apoptosis.

Key words: bacterial keratitis; inflammation; cell apoptosis

细菌性化脓性角膜炎是致角膜盲的主要原因之一^[1]。造成细菌性化脓性角膜炎的病原体众多, 其中铜绿假单胞菌引起的化脓性角膜炎占首位^[2]。铜绿假单胞菌(PA)是革兰阴性条件致病菌, 当角膜发生损伤时易于被感染诱发角膜炎, 其致病机制主要是大量炎症细胞和细胞因子的聚集引起过度炎症反应导致的角膜免疫病理损伤^[3]。因此, 如何抑制过度炎症引起的免疫病理损伤是治疗疾病的关键。作为一个化学分子, 氯化锂(LiCl)可参与多个生理调节过程, 如糖原的合成、基因的表达、炎症调节及细胞凋亡^[4]。研究报道 LiCl 可在内毒素诱发的炎症^[5]、Toll 样受体介导的慢性小肠炎^[6]、弗朗西斯氏菌感染^[7]中抑制炎症反应。此外, LiCl 可调节多种细胞的凋亡, 如巨噬细胞、神经细胞、淋巴细胞、上皮细胞等^[8-11]。然而, LiCl 在铜绿假单胞菌感染引起的化脓性角膜炎中的作用还未知。研究报道, LiCl 作为药物可治疗精神双向障碍^[12], 并在阿尔茨海默氏病^[13]、糖尿病^[14]中有潜在的治疗效果。然而, LiCl 可否应用于化脓性角膜炎中还有待证明。本研究发现, LiCl 通过调节细胞因子分泌和浸润细胞的凋亡, 抑制角膜局部炎症反应, 延缓角膜炎疾病进展, 在化脓性角膜炎中发挥角膜保护作用。

1 材料与与方法

1.1 角膜炎动物模型的建立及临床炎症分级 用乙醚麻醉小鼠后, 在体视显微镜 40 倍放大倍数下用 25 G 的针头在小鼠的左侧眼角膜上连续划 3 下, 每次划痕约 1 mm。用移液器滴加

入 5 L 的 1×10^8 CFU/mL 菌量于划伤角膜, 右侧眼未经任何处理作为正常对照。感染 PA 的小鼠角膜于 1、3 和 5 d 观察角膜病变情况。根据已建立的角膜疾病临床分级评分如下: 0 级, 角膜清澈或轻度浑浊, 浑浊范围部分或完全遮盖瞳孔; +1 级, 角膜轻度浑浊, 浑浊范围部分或完全遮盖眼前段; +2 级, 角膜浑浊度增高, 浑浊范围部分或完全遮盖眼前段; +3 级, 角膜高度浑浊, 浑浊范围完全遮盖眼前段; +4 级, 角膜穿孔。感染后 5 d, 裂隙灯显微镜观察并拍摄细菌感染后小鼠角膜的炎症状态, 用临床评分法确定角膜疾病的严重程度。

1.2 方法

1.2.1 Western-blot 结膜下注射 LiCl 及对照 NaCl, 收集角膜的蛋白样品, 经 SDS-PAGE 后转膜至硝酸纤维膜上, 分别孵育 5% 脱脂奶粉, 磷酸化糖原合酶激酶(P-GSK3)(1:1 000)的一抗过夜、抗兔二抗 1 h。经曝光检测目的蛋白的量。

1.2.2 Real-time PCR 用 TRIzol 法提取细胞 RNA。1 μ g RNA 转录成 cDNA, 用 SYBR Green 进行实时荧光定量 PCR 扩增。白介素 10(IL-10)、白介素 6(IL-6)、白介素 1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和 β -actin 的引物序列见表 1。

1.2.3 TUNEL 取 LiCl/NaCl 处理后的感染及未感染眼球, 4% 福尔马林固定, 石蜡包埋切片。切片经脱蜡脱水后用末端脱氧核苷酰酶试剂盒断裂 DNA 末端以标记凋亡细胞, 用核染色剂 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染细胞核, 封片后荧光显微镜下观察。

* 基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81401645); 广东省医学科研基金(B2014447); 中山市科技计划项目(2014A17C098)。

作者简介: 陈康, 女, 主管技师, 主要从事分子诊断与检验研究。 △ 通讯作者, E-mail: zxm0760@163.com。

表 1 引物列表

基因	引物序列 (5'-3')	引物上、下游
β-actin	GAT TAC TGC TCT GGC TCC TAG C	上游
	GAC TCA TCG TAC TCC TGC TTG C	下游
IL-6	CAC AAG TCC GGA GAG GAG AC	上游
	CAG AAT TGC CAT TGC ACA AC	下游
IL-1β	CGC AGC AGC ACA TCA ACA AGA GC	上游
	TGT CCT CAT CCT GGA AGG TCC ACG	下游
TNF-α	CAC AGA AAG CAT GAT CCG CGAC	上游
	TGC CAC AAG CAG GAA TGA GAA GAG	下游
IL-10	AGC TGG ACA ACA TAC TGC TAA CCG AC	上游
	CTT GAT TTC TGG GCC ATG CTT CTC TG	下游

1.2.4 流式细胞术 取 LiCl/NaCl 处理后的感染角膜(每组 5 只)胶原酶消化,筛网滤过收集单细胞悬液。细胞悬液避光孵育含 5 L 碘化丙啶(PD)的结合缓冲液,流式细胞仪上分析细胞凋亡(PI 阳性细胞数量)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件进行统计分析,所有动物实验按每组 5 只,每个实验重复 3 次,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,角膜临床评分用 M-W 统计分析方法,其他实验用非配对的 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 结膜下注射 LiCl 的效果 为了研究 LiCl 在 PA 角膜炎中的作用,结膜下注射 LiCl 或 NaCl(对照),Western-blot 显示,PA 感染小鼠角膜后,P-GSK3 的表达低于正常角膜(图 1, line2 比 line1),结膜下注射 LiCl,P-GSK3 的表达水平明显上调(图 1, line3 比 line2)。见图 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.2 LiCl 延缓角膜炎疾病进展 临床评分结果显示,在 PA 感染后 1、3、5 d,LiCl 注射组疾病的严重程度减轻,1、3、5 d 的临床评分分别为 +1、+2、+2/+3,而对照组的临床评分分别为 +2、+3、+4(图 2A)。裂隙灯照片显示,LiCl 处理组(图 2C)角膜中/重度浑浊遮盖瞳孔区;对照组(图 2B)膜溃疡穿孔。HE 染色结果显示,相对于 LiCl 处理组(2E)对照组(图 2D)角膜重度水肿,角膜增厚,并有大量的炎症细胞的浸润。临床表现结果提示 LiCl 能够延缓 PA 角膜炎的疾病进程,在 PA 角膜炎中发挥角膜保护作用。见图 2(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.3 LiCl 调节炎症因子的分泌 炎症细胞浸润和炎症因子的分泌是引起角膜过度炎症的关键因素。为了全面了解角膜的炎症反应情况,检测 LiCl 和 NaCl 处理组炎症因子的表达,结果显示,在 PA 感染后 1、5 d,LiCl 促进抑炎因子 IL-10 的表达(图 3A),并且抑制促炎因子 TNF-α 的表达(图 3D),而对促炎因子 IL-6(图 3B)和 IL-1β(图 3C)无影响。在未感染时,两组的炎症因子的分泌无差别(图 3, A-D)。见图 3(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.4 LiCl 促进角膜浸润细胞的凋亡 炎症细胞的凋亡是控制宿主过度炎症的一个重要措施。TUNEL 检测发现,PA 感染后 5 d,与对照组相比(图 4B),LiCl 处理组(图 4D)的角膜基质中有更多 TUNEL 染色为阳性的细胞(绿色荧光),且与核染色剂(紫色荧光)共定位,为凋亡细胞(图 4B 和 D 中的白色箭头所指细胞)。PA 未感染时,LiCl(图 4C)和 NaCl(图 4A)处理组中均未见 TUNEL 染色为阳性的细胞,见图 4(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。为了进一步量化 LiCl 处

理后角膜浸润细胞凋亡的情况,流式检测结果显示,PA 感染 1、5 d 后,LiCl 促进细胞的凋亡,其 PI 阳性的凋亡细胞的比例分别为 11.3%和 20.3%,而对照组凋亡细胞的比例为 5.97%和 10.6%,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 5(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

3 讨 论

LiCl 在阿尔茨海默氏病^[13]、糖尿病^[14]及精神双向障碍^[12]中有潜在的治疗作用,然而,LiCl 在铜绿假单胞菌角膜炎中的作用还未知。本研究发现,LiCl 通过调节炎症因子分泌和细胞凋亡,抑制炎症反应,发挥角膜保护作用。

据报道,LiCl 在多种疾病中可抑制炎症反应。Nahman 等^[5]报道,LiCl 通过抑制 TNF-α、IL-1β、活性氮自由基在精神双向障碍中发挥抑炎作用;Beurel 等^[15]报道 LiCl 在内毒素休克动物模型中抑制内毒素诱导的 IL-6 的产生;Wang 等^[11]报道 LiCl 通过降低促炎因子 TNF-α 和 RANTES 的表达在内毒素血症诱发的急性肾衰竭中发挥保护作用。本研究发现 LiCl 通过促进 IL-10 的表达,抑制 TNF-α 的表达在化脓性角膜炎中发挥抑炎作用。同时,组织化学染色结果显示,LiCl 处理组角膜浸润细胞明显减少。炎症因子分泌的调节和炎症细胞浸润的减少是抑制角膜过度炎症,延缓疾病进展。

炎症细胞的凋亡也是机体降低炎症反应的一个策略。研究发现,在巨噬细胞^[8]、神经细胞^[9]等中,LiCl 促进细胞凋亡;而抑制急性 T 淋巴细胞白血病细胞^[10]、肾小管上皮细胞^[11]的凋亡。这提示,LiCl 调节凋亡的作用依赖不同的细胞类型和刺激因素。TUNEL 和流式细胞术结果均显示,在铜绿假单胞菌感染时,LiCl 促进角膜浸润炎症性细胞的凋亡。

综上所述,本研究揭示了 LiCl 在细菌性化脓性角膜炎中的调节作用,为 LiCl 的临床辅助应用提供坚实的理论基础。

参考文献

- [1] 杨培增,陈家祺,葛坚,等. 眼科学基础与临床[M]. 北京:人民卫生出版社,2006.
- [2] 张文华,潘志强,王智群,等. 化脓性角膜溃疡常见致病菌的变迁[J]. 中华眼科杂志,2002,66(1):8-12.
- [3] Hazlett LD. Corneal response to Pseudomonas aeruginosa infection[J]. Prog Retin Eye Res,2004,23(1):1-30.
- [4] Machado-Vieira R,Manji HK,Zarate CA Jr. The role of lithium in the treatment of bipolar disorder: convergent evidence for neurotrophic effects as a unifying hypothesis[J]. Bipolar Disord,2009,11 (Suppl 2):92-109.
- [5] Nahman S,Belmaker RH,Azab AN. Azab Effects of lithium on lipopolysaccharide-induced inflammation in rat primary glia cells [J]. Innate Immun,2012,18(3):447-458.
- [6] Hofmann C,Dunger N,Schölmerich J, et al. Glycogen synthase kinase 3-beta: a master regulator of toll-like receptor-mediated chronic intestinal inflammation[J]. Inflamm Bowel Dis,2010,16(11):1850-1858.
- [7] Zhang P,Katz J,Michalek SM. Michalek Glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) inhibition suppresses the inflammatory response to Francisella infection and protects against tularemia in mice[J]. Mol Immunol,2009,46(4):677-687.
- [8] De Meyer I,Martinet W, Van Hove CE, et al. Inhibition of inositol monophosphatase by lithium chloride induces selective macrophage apoptosis in atherosclerotic plaques[J]. Br(下转第 481 页)

3 讨 论

引起腹泻的志贺菌(我国主要为福氏志贺菌)和致泻大肠埃希菌的研究颇为广泛和深入,从微生物学实验诊断技术、感染性腹泻发病机制、耐药菌谱及其耐药机制、新型治疗方法及预防策略等方面进行了研究^[1-7]。在临床实践中,由于患者病情错综复杂以及药物使用千差万别,细菌感染性腹泻的主要病原菌并非霍乱弧菌、志贺菌和沙门菌等经典肠道病原菌,而是因肠道菌群失调使得某些条件致病菌大量繁殖,引发腹泻。

研究者采用自动细菌鉴定系统对能与福氏志贺菌诊断血清发生凝集反应的菌株进行鉴定,结果发现,能与福氏志贺菌诊断血清发生凝集反应的病原菌不是福氏志贺菌,而是大肠埃希菌。将该细菌接种于克氏双糖斜面琼脂试管和动力-吡啶-脲酶半固体琼脂试管,结果表现为发酵葡萄糖不产气、不发酵乳糖、无动力、吡啶阳性、脲酶阴性,这就是无活性大肠埃希菌。无活性大肠埃希菌与福氏志贺菌的生物学特性很相似,部分能与福氏志贺菌诊断血清发生凝集反应。

在腹泻患者粪便中检测到无活性大肠埃希菌的文献报道很少^[8-12],很可能是大家仍在遵循传统的大便细菌学检验,只关注志贺菌、沙门菌,而忽略菌群失调后条件致病菌的检验。因此,需要高度重视容易被遗漏的无活性大肠埃希菌的检测,才能为临床治疗提供更多微生物学支持。

本次检测结果显示,无活性大肠埃希菌的耐药性较高,与相关文献报道一致^[13-14],认为致泻大肠埃希菌对临床常用抗菌药物的耐药性不断增加。在临床用药要结合药敏试验结果,选用敏感的抗菌药物,合理进行治疗。

无活性大肠埃希菌能引起腹泻,除易感人群的易感因素外,与该菌本身的致病因素有关。参考相关文献资料^[15],可以直接检测大肠埃希菌的毒力基因,为临床提供更准确的诊断依据。该菌能引起腹泻,作为大肠埃希菌的一个类型(无活性型),是否与致泻大肠埃希菌存在相同或相似的致病基因和耐药基因,生物学特性与志贺菌极为相似的无活性大肠埃希菌,它们在基因水平是否也很相近呢?尤其应关注无活性大肠埃希菌是否含有志贺菌的致病基因和耐药基因。进一步研究无活性大肠埃希菌引起腹泻的致病机制、流行病学调查、动物模型构建、耐药机制,从而为肠道感染防治提供理论依据。

参考文献

[1] 聂青和. 感染性腹泻研究最新进展[J]. 传染病信息, 2011, 24(2): 75-78.

(上接第 479 页)

J Pharmacol, 2011, 162(6): 1410-1423.

[9] Gómez-Sintes R, Lucas JJ. Lucas NFAT/Fas signaling mediates the neuronal apoptosis and motor side effects of GSK-3 inhibition in a mouse model of lithium therapy[J]. J Clin Invest, 2010, 120(7): 2432-2445.

[10] Pietruczuk K, Józwiak A, Ruckemann-Dziurdzińska K, et al. Cytoprotective effect of lithium against spontaneous and induced apoptosis of lymphoid cell line MOLT-4[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2009, 47(4): 639-646.

[11] Wang Y, Huang WC, Wang CY, et al. Inhibiting glycogen synthase kinase-3 reduces endotoxaemic acute renal failure by down-regulating inflammation and renal cell apoptosis[J]. Br J Pharmacol, 2009, 157(6): 1004-1013.

[12] Licht RW. Lithium: still a major option in the management of bipolar disorder[J]. CNS Neurosci Ther, 2012, 18(3): 219-226.

[2] Chisti MJ, Faruque AS, Khan WA, et al. Characteristics of children with Shigella encephalopathy: experience from a large urban diarrhea treatment center in Bangladesh[J]. Pediatr Infect Dis J, 2010, 29(5): 444-447.

[3] Crepin VF, Girard F, Schüller S, et al. Dissecting the role of the Tir;Nck and Tir;IRTKS/IRSp53 signalling pathways in vivo[J]. Mol Microbiol, 2010, 75(2): 308-323.

[4] Oelschlaeger TA. Mechanisms of probiotic actions-A review[J]. Int J Med Microbiol, 2010, 300(1): 57-62.

[5] Tiihonen K, Ouwehand AC, Rautonen N. Human intestinal microbiota and healthy ageing[J]. Ageing Res Rev, 2010, 9(2): 107-116.

[6] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). National, state, and local area vaccination coverage among children aged 19-35 months - United States, 2009[J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2010, 59(36): 1171-1177.

[7] Kim SJ, Han YW, Rahman MM, et al. Live attenuated Salmonella enterica serovar Typhimurium expressing swine interferon- α has antiviral activity and alleviates clinical signs induced by infection with transmissible gastroenteritis virus in piglets[J]. Vaccine, 2010, 28(31): 5031-5037.

[8] 高亚色. 检出一株双糖铁反应似志贺菌属血清学交叉的产毒性大肠埃希菌[J]. 海峡预防医学杂志, 2005, 8(5): 57-58.

[9] 高雯洁, 张建平, 沈志英, 等. 一株与福氏志贺菌 1a 交叉凝集的低活性大肠埃希菌[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(11): 2115-2116.

[10] 郭丹桂. 一株具有福氏 6 型志贺菌相同抗原的大肠埃希菌[J]. 职业与健康, 2008, 24(14): 1394-1395.

[11] 何剑锋, 叶金奶. 与福氏志贺氏菌有共同抗原的两株肠杆菌科细菌[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(5): 1168.

[12] 严卓琳. 一株三糖铁反应似志贺菌属血清学交叉的产毒型大肠埃希菌[J]. 中国医药指南, 2012, 10(14): 131-132.

[13] 周敬纲, 贾艳丽, 杨静. 腹泻综合征致泻性大肠埃希菌血清型分布及耐药性的研究[J]. 中国当代医药, 2014, 217(33): 144-146.

[14] 常海岭, 李月芳, 曾玫, 等. 儿童致泻性大肠埃希菌腹泻临床与病原分布特点[J]. 中华传染病杂志, 2015, 33(3): 137-141.

[15] 潘伟光, 李一凡, 邓启文, 等. 致婴幼儿腹泻的肠致病性大肠埃希菌血清分型和毒力基因检测[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(13): 1691-1692.

(收稿日期: 2015-09-28)

[13] Forlenza OV, de Paula VJ, Machado-Vieira R, et al. Does lithium prevent Alzheimer's disease[J]. Drugs Aging, 2012, 29(5): 335-342.

[14] Kanzariya NR, Patel RK, Patel NJ. Patel Antidiabetic and vasoprotective activity of lithium: Role of glycogen synthase kinase-3[J]. Indian J Pharmacol, 2011, 43(4): 433-436.

[15] Beurel E, Jope RS. Jope Lipopolysaccharide-induced interleukin-6 production is controlled by glycogen synthase kinase-3 and STAT3 in the brain[J]. J Neuroinflammation, 2009, 6(1): 9.

(收稿日期: 2015-11-10)

