

• 论 著 •

β -catenin 在铜绿假单胞菌角膜炎中的调控研究*

傅 强, 陈 康, 黄福达, 缪丽韶, 杨山虹, 张秀明[△]
(广东省中山大学附属中山医院检验医学中心 528403)

摘 要:目的 探讨 β -catenin 在铜绿假单胞菌角膜炎中发挥的作用及其调控机制。方法 Western-blot 检测 β -catenin 慢病毒应用的效果, 临床评分观察疾病进展; Real-time 聚合酶链式反应(PCR)检测炎性因子和抗菌肽的表达; 平板细菌计数检测角膜细菌清除情况。结果 β -catenin 延缓角膜炎的疾病进展; 随后实验发现 β -catenin 抑制促炎因子的分泌, 并上调抗菌肽 CRAMP 表达, 促进细菌清除。结论 β -catenin 通过调节炎性反应并促进细菌清除, 在铜绿假单胞菌角膜炎中发挥角膜保护作用。

关键词: β -catenin; 角膜炎; 炎性反应; 细菌清除

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.22.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)22-3093-03

Study on regulatory role of β -catenin in *Pseudomonas aeruginosa* keratitis*

FU Qiang, CHEN Kang, HUANG Fuda, MIAO Lishao, YANG Shanong, ZHANG Xiuming[△]
(Laboratory Medicine Center, Affiliated Zhongshan Hospital of Sun Yat-sen University, Zhongshan, Guangdong 528403, China)

Abstract: **Objective** To explore the role of β -catenin in *Pseudomonas aeruginosa*(PA) keratitis and its regulatory mechanism. **Methods** Western-blot assay was used to detect the efficacy of β -catenin lentivirus application. The clinical score was used to observe the disease progression; the expression of inflammatory cytokines and antimicrobial peptides were examined by using real-time PCR; the corneal bacterial clearance was detected by using the plate bacterial count. **Results** β -catenin delayed the progression of keratitis; then the following experiment found that β -catenin suppressed the secretion of pro-inflammatory cytokines, up-regulated the antibacterial peptide cathelicidin-related antimicrobial peptide(CRAMP) expression and promoted the bacterial clearance. **Conclusion** β -catenin plays the corneal protective effect in PA keratitis by regulating inflammatory reactions and promoting the bacterial clearance.

Key words: β -catenin; keratitis; inflammation; bacterial clearance

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感染角膜诱发角膜炎,其致病机制是过度炎症反应和细菌侵袭导致的角膜病理损伤^[1-2]。因此,如何抑制过度炎症反应并清除角膜细菌是治疗疾病的关键。 β -catenin 是经典 Wnt 通路中核心分子,调节细胞的凋亡、增殖、肿瘤形成等,参与机体众多生理和病理过程^[3]。作为 1 个多功能分子, β -catenin 可以参与调节细菌的定植和机体的炎性反应^[4-5]。研究报道 β -catenin 可在沙门菌感染和结核分枝杆菌感染时抑制炎症反应^[4-5],并抑制细菌定植,然而其在 PA 感染中的作用尚属未知。本研究构建 PA 角膜炎的动物模型,观察 β -catenin 对该疾病的调节作用及机制。研究发现, β -catenin 通过抑制促炎因子的分泌,促进细菌清除,延缓角膜炎疾病进展,在 PA 角膜炎中发挥角膜保护作用。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 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,每次划痕长约 1 mm。用移液器滴加入 5 μ L 的 1×10^6 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、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性状态,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 β -catenin 慢病毒 β -catenin lentivirus、 β -cat-lentivirus 及对照慢病毒 control lentivirus、Ctl-lentivirus,收集角膜的蛋白样品,经十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)后转膜至硝酸纤维膜上,分别孵育 5%脱脂奶粉、 β -catenin(1:1 000)的一抗、抗兔二抗。经曝光后检测目的蛋白的量。

1.2.2 Real-time 聚合酶链式反应(PCR) 用 TRIzol 法提取细胞 RNA。1 g RNA 转录成 cDNA,用 SYBR Green 进行 Real-time PCR 扩增。白细胞介素(IL)-6、IL-1 β 、肿瘤坏死因子(TNF)- β 、巨噬细胞炎性蛋白(MIP)-2、抗菌肽(如 CRAMP、 β -defensin 1~3、mBD 1~3)和 β -actin 的引物序列,见表 1。

1.2.3 角膜活细菌平板计数 于感染后 5 d 收集 β -catenin 慢病毒注射组和对照组的小鼠角膜,用含有 0.85%(w/v)NaCl 和 0.25%牛血清清蛋白(BSA)的无菌水碾磨,10 倍系列稀释样品,涂布于 PA 分离平板,37 $^{\circ}$ C 孵箱培养过夜,每个稀释度

* **基金项目:**国家自然科学基金青年基金资助项目(81401645);广东省医学科研基金资助项目(B2014447);广东省中山市科技计划项目(2014A1FC098);广东省中山市医疗科研项目(2015J004)。

作者简介:傅强,男,主管技师,主要从事临床检验诊断方面的研究。 [△] **通讯作者,**E-mail:zxm0760@163.com。

设 3 个复板,第 2 天计数平板菌落。

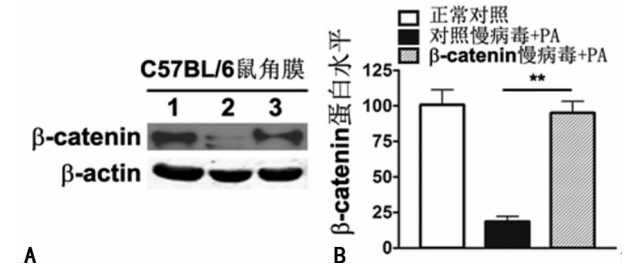
1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件进行统计分析,所有动物实验按每组 5 只,每个实验重复 3 次,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,角膜临床评分用 M-W 统计分析方法,其他实验用非配对 t 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

表 1 引物列表

基因	引物序列 (5'~3')	位置
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
MIP-2	TGT CAA TGC CTG AAG ACC CTG CC	上游
	AAC TTT TTG ACC GCC CTT GAG AGT GG	下游
mBD 1	GGC ATT CTC ACA AGT CTT GGA CGA AG	上游
	AGC TCT TAC AAC AGT TGG GCT TAT CTG G	下游
mBD 2	TCT CTG CTC TCT GCT GCT GAT ATG C	上游
	AGG ACA AAT GCC TCT GAC ACA GTA CC	下游
mBD 3	TCT TTG CAT TTC TCC TGG TGG TGC	上游
	AAC TGC CAA TCT GAC GAG TGT TGC	下游
CRAMP	AGC TAC AGG GAT GCT GTG CT	上游
	TCA CTC GGA ACC TCA GAC T	下游

2 结 果

2.1 结膜下注射慢病毒的效果 为了研究 β-catenin 在 PA 角膜炎中的调控作用,结膜下注射 β-catenin 慢病毒或对照慢病毒,Western-blot 显示,PA 感染小鼠角膜后,β-catenin 的表达低于正常角膜,结膜下注射 β-catenin 慢病毒后,β-catenin 的表达水平显著上调。见图 1。

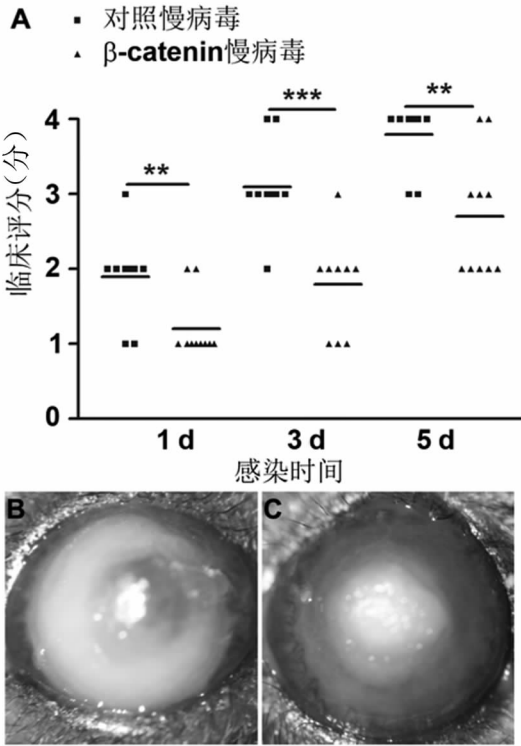


注:泳道 1 为正常对照;泳道 2 为对照慢病毒+PA;泳道 3 为 β-catenin 慢病毒+PA。图 1A 为结膜下注射 β-catenin 慢病毒的效果图;图 1B 为 β-catenin 相对于 β-actin 的灰度扫描结果。数据源于 3 次独立实验,每次实验 5 只小鼠角膜。* $P < 0.05$ 。

图 1 结膜下注射 β-catenin 慢病毒的效果

2.2 β-catenin 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,β-catenin 慢病毒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、+3,而对照组的临床评分分别为 +2、+3、+4。裂隙灯显微镜照片显示,β-catenin 慢病毒注射组角膜中/重度浑浊遮盖瞳孔区;对照组膜溃疡穿

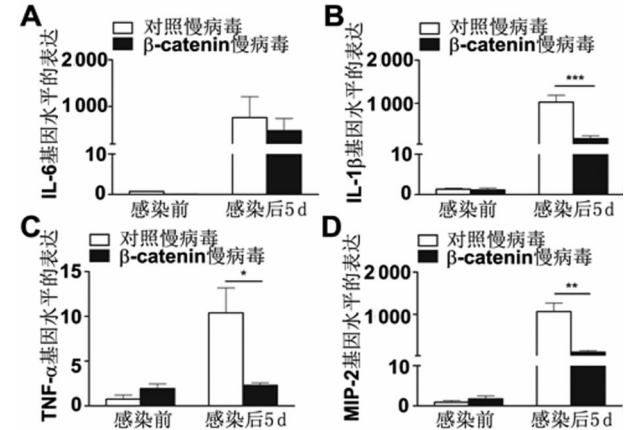
孔。临床表现结果提示 β-catenin 能够延缓 PA 角膜炎的疾病进程,在 PA 角膜炎中发挥角膜保护作用。见图 2。



注:图 2A 为临床评分显示 β-catenin 慢病毒注射组在小鼠感染后 1、3、5 d 临床评分均低于对照组 ($P < 0.05$),** $P < 0.05$,*** $P < 0.05$,横线表示中位线评分;图 2B 为对照组感染后 5 d 的小鼠角膜照片;图 2C 为 β-catenin 慢病毒注射组感染后 5 d 的小鼠角膜照片。数据源于 3 次独立实验,每次实验 5 只小鼠角膜。

图 2 β-catenin 延缓角膜炎疾病进展

2.3 β-catenin 抑制促炎因子的分泌 炎性因子的分泌是引起角膜过度炎症反应的关键因素。为全面了解角膜的炎症反应情况,笔者检测 β-catenin 慢病毒注射组和对照组促炎因子的表达。结果显示,在 PA 感染后 5 d,β-catenin 抑制促炎因子 IL-1β、TNF-α 和 MIP-2 的表达,而对 IL-6 的表达无影响。在未感染时,2 组的炎症因子分泌无差别。见图 3。

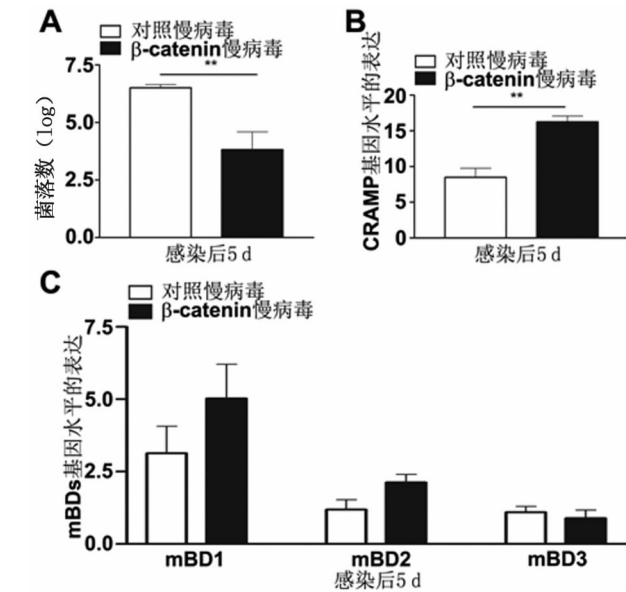


注:图 3A 为 Real-time PCR 检测 β-catenin 慢病毒注射组和对照组感染角膜炎症因子 IL-6 的表达;图 3B 为 IL-1β 的表达;图 3C 为 TNF-α 的表达;图 3D 为 MIP-2 的表达。数据源于 3 次独立实验,每次实验 5 只小鼠角膜。* $P < 0.05$; ** $P < 0.05$; *** $P < 0.05$ 。

图 3 β-catenin 抑制促炎因子的分泌

2.4 β-catenin 促进角膜细菌的清除 除了过度炎症反应,细

菌侵袭也是导致角膜炎病理损伤的主要因素。平板计数结果发现,PA 感染后 5 d,与对照组比较, β -catenin 慢病毒注射组的角膜荷菌量显著降低,提示 β -catenin 促进细菌清除。为了探讨 β -catenin 促进细菌清除的机制,笔者检测了抗菌肽的表达。实验结果发现, β -catenin 促进抗菌肽 CRAMP 的表达,而对抗菌肽 mBD 1~3 的表达无影响。见图 4。



注:图 4A 为平板细菌计数检测 β -catenin 慢病毒注射组和对照组的角膜荷菌量;图 4B 为 Real-time PCR 的方法检测抗菌肽 CRAMP 的表达;图 4C 为 mBD 1~3 的表达。数据源于 3 次独立实验,每次实验 5 只小鼠角膜。* * $P < 0.05$ 。

图 4 β -catenin 促进角膜细菌的清除效果

3 讨 论

β -catenin 是一个多功能分子,参与众多生理和病理过程,并可参与调节炎症反应和细菌的定植。研究报道,在沙门菌感染和结核分枝杆菌感染时^[4-5], β -catenin 有利于感染性疾病的恢复,然而其在 PA 感染中的作用尚未知。本研究发现, β -catenin 通过抑制促炎因子的分泌并促进角膜细菌的清除,延缓角膜炎的疾病进展,发挥角膜保护作用。

据报道,在不同疾病中, β -catenin 对机体炎症反应的调节作用不同。 β -catenin 可在沙门菌感染和结核分枝杆菌感染时抑制炎症反应^[4-5];然而,也有报道 β -catenin 可诱导多种炎症介质如一氧化氮、IL-8、环氧合酶、前列腺素 E2 的表达,促进机体炎症反应^[6-8]。本研究发现,在 PA 感染角膜时, β -catenin 通过抑制促炎因子的分泌发挥抑炎作用。

除了机体过度炎症反应,角膜细菌侵袭也是导致角膜炎病理损伤的重要因素。本研究发现, β -catenin 可促进角膜细菌的清除,抗菌肽 CRAMP 和抗菌肽 mBD 可通过降低角膜荷菌量并抑制角膜炎症反应^[9-12],延缓角膜炎疾病进展。 β -catenin 可促进抗菌肽 CRAMP 的表达,对抗菌肽 mBD 1~3 的表达无影响,提示 β -catenin 通过上调抗菌肽 CRAMP 的表达,促进角膜细菌的清除。

综上所述,本研究揭示了 β -catenin 在 PA 角膜炎中的调节

作用,为角膜炎疾病的临床辅助应用提供了坚实的理论基础。

参考文献

- [1] Hazlett LD. Corneal response to pseudomonas aeruginosa infection[J]. Prog Retin Eye Res, 2004, 23(1): 1-30.
- [2] Hazlett LD. Pathogenic mechanisms of P. aeruginosa keratitis: a review of the role of T cells, Langerhans cells, PMN, and cytokines[J]. DNA Cell Biol, 2002, 21(5/6): 383-390.
- [3] Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 1998, 14(1): 59-88.
- [4] Duan Y, Liao AP, Kuppireddi S, et al. Beta-catenin activity negatively regulates bacteria-induced inflammation [J]. Lab Invest, 2007, 87(6): 613-624.
- [5] Schaale K, Neumann J, Schneider D, et al. Wnt signaling in macrophages: augmenting and inhibiting mycobacteria-induced inflammatory responses[J]. Eur J Cell Biol, 2011, 90(6/7): 553-559.
- [6] Du Q, Park KS, Guo Z, et al. Regulation of human nitric oxide synthase 2 expression by Wnt beta-catenin signaling [J]. Cancer Res, 2006, 66(14): 7024-7031.
- [7] Masckauchán TN, Shawber CJ, Funahashi Y, et al. Wnt/ beta-catenin signaling induces proliferation, survival and interleukin-8 in human endothelial cells[J]. Angiogenesis, 2005, 8(1): 43-51.
- [8] Haertelwiesmann M, Liang YX, Fantl WJ, et al. Regulation of cyclooxygenase-2 and periostin by Wnt-3 in mouse mammary epithelial cells[J]. J Biol Chem, 2000, 275(41): 32046-32051.
- [9] Huang LC, Reins RY, Gallo RL, et al. Cathelicidin-deficient (Cnlp^{-/-}) mice show increased susceptibility to pseudomonas aeruginosa keratitis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(10): 4498-4508.
- [10] Kumar AD, Yu FS. Flagellin suppresses the inflammatory response and enhances bacterial clearance in a murine model of pseudomonas aeruginosa keratitis[J]. Infect Immun, 2008, 76(1): 89-96.
- [11] Augustin DK, Heimer SR, Tam C, et al. Role of defensins in corneal epithelial barrier function against pseudomonas aeruginosa traversal[J]. Infect Immun, 2011, 79(2): 595-605.
- [12] Wu M, McClellan SA, Barrett RP, et al. Beta-defensins 2 and 3 together promote resistance to pseudomonas aeruginosa keratitis[J]. J Immunol, 2009, 183(12): 8054-8060.

(收稿日期: 2016-04-05 修回日期: 2016-06-11)