文章编号:1000-5404(2013)20-2195-04

论著

三氮脒减轻内毒素诱导性小鼠葡萄膜炎的研究

邱一果,杨红霞,杨培增,雷 博 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院眼科,眼科学重庆市重点实验室,重庆市眼科研究所)

[摘要] **目的** 探讨三氮脒(diminazene aceturate,DIZE)是否能减轻内毒素诱导性小鼠葡萄膜炎。**方法** 连续给予一般情况良好、体质量16~20 g的雌性BALB/c小鼠腹腔内注射DIZE(60 mg/kg)2 d后,将125 ng脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)注射入小鼠玻璃体内建立内毒素诱导性葡萄膜炎模型。分别于注射LPS后12、24 h观察小鼠眼前房炎症情况并进行临床评分。第24小时摘除眼球,石蜡切片HE染色观察小鼠眼部形态学变化。用Real-time PCR检测小鼠眼内炎症细胞因子表达。**结果** 在注射LPS 12 h后DIZE对眼前房炎症出现明显的保护作用。24 h时DIZE+LPS组的临床评分[(1.75±0.96)分]明显低于生理盐水+LPS组[(4.00±1.22)分]($P<0.01$);HE染色结果显示DIZE+LPS组小鼠玻璃体内渗出的炎症细胞数明显少于生理盐水+LPS组,但各组小鼠视网膜结构和层次无明显改变。DIZE+LPS组的小鼠眼内细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、TNF-α、单核细胞趋化蛋白(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、IL-6的mRNA水平明显低于生理盐水+LPS组($P<0.01$)。**结论** DIZE在LPS引起的内毒素诱导性小鼠葡萄膜炎的眼部炎症中起保护作用,有望成为一种治疗葡萄膜炎的新药。

[关键词] 三氮脒;小鼠;内毒素诱导性葡萄膜炎;细胞因子;炎症
[中图法分类号] R-332;R773.905;R978.6 [文献标志码] A

Diminazene aceturate ameliorates endotoxin-induced uveitis in mice

Qiu Yiguo, Yang Hongxia, Yang Peizeng, Lei Bo (Department of Ophthalmology, Chongqing Key Laboratory of Ophthalmology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing Eye Institute, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate whether diminazene aceturate (DIZE) protects mice from endotoxin-induced uveitis (EIU). **Methods** Female BALB/c mice received intraperitoneal injection of DIZE (60 mg/kg) for 2 d prior to intravitreous injection of lipopolysaccharides (LPS, 125 ng). The anterior segments of the mice were examined and clinical scores were determined at 12 and 24 h after LPS injection. Morphology change was evaluated with a light microscope at 24 hours after LPS injection. The mRNA levels of inflammatory cytokines in the eyes were measured by real-time PCR. **Results** At the 24th hour, the clinical score of mice treated with DIZE (1.75±0.96) was significantly lower than that of the saline-injected controls (4.00±1.22, $P<0.01$). Histological examination showed the total infiltrating inflammatory cells remarkably reduced in DIZE-treated eyes. The mRNA levels of ICAM-1, TNF-α, MCP-1, and IL-6 were significantly reduced in DIZE-treated eyes($P<0.01$). **Conclusion** DIZE protects retinal structure and reduces infiltrating inflammatory cells in LPS-induced EIU mouse model. These results support that DIZE may provide a novel therapeutic strategy for uveitis.

[**Key words**] diminazene aceturate; mouse; endotoxin-induced uveitis; cytokine; inflammation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30973251, 81271033). Corresponding author: Lei Bo, E-mail:bolei99@126.com

葡萄膜炎是一类严重危害患者视力的常见眼病,是世界范围内致盲的主要眼科疾病之一[1]。葡萄膜炎的病因有多种,创伤、感染、自身免疫性疾病等均可导致葡萄膜炎[2]。葡萄膜炎可以以独立的眼部炎症为表现,也可表现为全身免疫疾病的一部分,例如强直性脊柱炎、Behcet's病和Reiter's病等[3]。其炎症表现可涉及眼前段和眼后段。目前,治疗葡萄膜炎的主要药物包括:糖皮质激素、非甾体类抗炎药(non-steroid anti-inflammatory drugs,NSAIDs)和免疫抑制剂[4]。这些药物虽然有一定的疗效,但可能引起严重的副作用,

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30973251,81271033)
[通信作者] 雷 博, E-mail:bolei99@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130929.1018.001.html(2013-09-29)

比如免疫力低下、物质代谢和水盐代谢紊乱以及诱发或加重感染等。长期使用糖皮质激素类药物,还可能诱发白内障、青光眼等眼部疾病[5]。因此,寻找治疗葡萄膜炎的新方法便成为研究的热点。

内毒素诱导性葡萄膜炎(endotoxin-induced uveitis, EIU)是一种经典的模拟人类急性葡萄膜炎的模型。通过单次全身或局部注射革兰阴性细菌的外膜成分即内毒素(lipopolysaccharides, LPS)即可在动物中成功诱导[6]。EIU的炎症在注射LPS诱导后24 h达到高峰,炎症表现和病理过程与人类急性葡萄膜炎非常相似。其炎症可涉及眼前节和后节。炎症对前房的影响主要以血-房水屏障的破坏和白细胞渗出为特征。多种炎性细胞因子,如单核细胞趋化蛋白(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和白介素-6(IL-6)在葡萄膜炎的炎症病理过程的发展中起到了主要作用[7-9]。然而EIU对眼后节的影响主要以血-视网膜屏障损坏和表达细胞间黏附分子(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)[10]、白细胞黏附于视网膜血管内皮细胞并且渗出到玻璃体腔内为特征[11]。

三氮脒(diminazene aceturate,DIZE)又名贝尼尔、血虫净,是一种相对分子质量较小的抗原虫药。主要用于治疗锥虫病[12]。新近研究表明DIZE在肺动脉高压的疾病过程以及缺血性脑卒中疾病模型中可以通过针对全身肾素-血管紧张素系统发挥保护性作用[13-14]。我们前期观察发现DIZE可以减轻内毒素诱导性葡萄膜炎的前房炎症。因此,本研究探索DIZE可否通过抑制炎症相关因子干预葡萄膜炎的病理变化过程,从而抑制葡萄膜炎病理过程的发展。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

6~8周龄雌性BALB/c小鼠28只,体质量16~20 g,购自美国Jackson Laboratories。小鼠饲养环境为室温22~25℃,光照为12~12 h明暗循环,给予足够的食物和水。将小鼠用完全随机分组法分成4组($n=7$)。①DIZE+LPS组:连续2 d给予小鼠腹腔注射DIZE 60 mg/kg,第2天注射DIZE 30 min后,行玻璃体内注射LPS 125 ng(1 μL)诱导炎症;②生理盐水+LPS组:连续2 d给予小鼠60 mg/kg生理盐水腹腔注射,于第2天注射30 min后,行玻璃体内注射LPS 125 ng;③正常对照组:不做任何处理;④DIZE组:连续2 d给予小鼠腹腔注射DIZE 60 m/kg。

1.2 主要试剂及仪器

三氮脒(diminazene aceturate, DIZE)购自美国Santa Cruz Biotechnology公司;LPS购自美国Sigma-Aldrich公司;Trizol Reagent购自美国Invitrogen公司;反转录试剂盒PrimeScript® RT reagent Kit购自大连宝生物公司。Real-time PCR反应所需all-in-one qPCR Mix试剂盒以及小鼠特异性炎症因子引物ICAM-1、MCP-1、TNF-α、IL-6、内参引物GAPDH均购自广州GeneCopoeia Inc.公司。实时荧光定量PCR仪Bio-Rad C-1000 Thermal Cycler(美国Bio-Rad Laboratories公司)。

1.3 前房炎症观察及临床评分

分别于LPS注射后12、24 h在裂隙灯下对小鼠眼前房炎症情况进行观察。同时,2名独立的观察者根据EIU小鼠模型前房炎症临床评分标准[7],对其前房炎症的严重程度进行临床评分。将2名独立观察者进行的每项评分平均后所得数据纳入统计。

1.4 石蜡切片及HE染色

注射LPS 24 h后,用4%多聚甲醛进行心脏灌注,收集眼球标本,去除角膜后固定于4%多聚甲醛4 ℃过夜。梯度酒精脱水,石蜡包埋切片,切片沿角膜-视神经轴方向进行,切片厚度4 μm。经常规脱蜡和酒精水化后,苏木精染色5 min,水洗10 min,盐酸酒精分色5 s,水洗10 min,伊红2 min,酒精脱水、二甲苯透明后中性树脂封片。

1.5 炎症因子的mRNA表达水平的检测

在注射LPS第24小时收集小鼠全眼球,用Trizol试剂提取组织总RNA。采用PrimeScript® RT reagent Kit将RNA反转录成cDNA,进行PCR反应。所使用引物的特异性均由广州GeneCopoeia Inc.公司验证。小鼠ICAM-1:Primer ID(Mm-QRP-20301),MCP-1:Primer ID(Mm-QRP-20287),TNF-α:Primer ID(Mm-QRP-20147),IL-6:Primer ID(Mm-QRP-20026),内参引物GAPDH:Primer ID(Mm-QRP-20043)。采用实时荧光定量PCR仪进行荧光定量检测,$\Delta Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{GAPDH}$;$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{实验组} - \Delta Ct_{正常对照组}$;扩增倍数$= 2^{-\Delta\Delta Ct}$。引物序列见表1。

表1 Real-time PCR检测小鼠炎症因子引物序列

炎症因子	上游引物	下游引物
ICAM-1	5′-AGATGACCTGCAGACGGAAG-3′	5′-GGCTGAGGGTAAATGCTGTC-3′
MCP-1	5′-CCCCACTCACCTGCTGCTACT-3′	5′-GGCATCACAGTCCGAGTCACA-3′
TNF-α	5′-AGGCGCCACATCTCCCTCCA-3′	5′-CGGTGTGGGTGAGGAGCACG-3′
IL-6	5′-TCGGCAAACCTAGTGCGTTA-3′	5′-CCAAGAAACCATCTGGCTAGG-3′
GAPDH	5′-ATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC-3′	5′-TTACTCCTTGGAAG-3′

1.6 统计学分析

用GraphPad Prism 5软件进行统计及数据处理,数据均以$\bar{x} \pm s$表示。实验数据用ANOVA方法分析并辅以Bonferroni校正。

2 结果

2.1 LPS注射后24 h裂隙灯下小鼠前房炎症情况及临床评分

DIZE+LPS组和生理盐水+LPS组的小鼠前房均可见到明显的炎症表现,如虹膜充血、前房渗出、前房积脓等。在正常对照组以及DIZE组无任何炎症表现。LPS注射后12 h,生理盐水+LPS组比DIZE+LPS组出现更严重的虹膜充血,前房渗出物也较多。第24小时,生理盐水+LPS组的炎症反应加重,除虹膜充血加重和前房渗出增多外,某些小鼠甚至出现前房积脓(图1)。根据小鼠EIU临床评分准则进行临床评分,结果提示前房炎症可在LPS注射后12 h被检测到,在24 h时达到高峰,之后逐渐下降。第24小时时,DIZE+LPS组的临床评分[(1.75±0.96)分]明显低于生理盐水+LPS组[(4.00±1.22)分]($P<0.01$)。

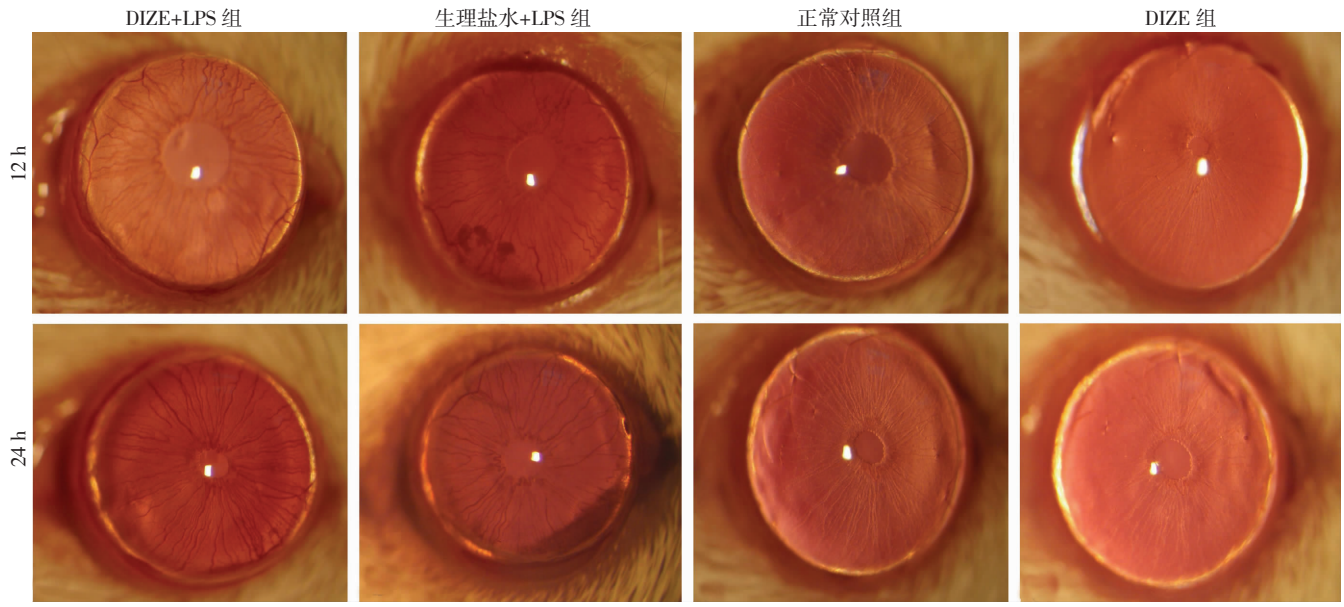
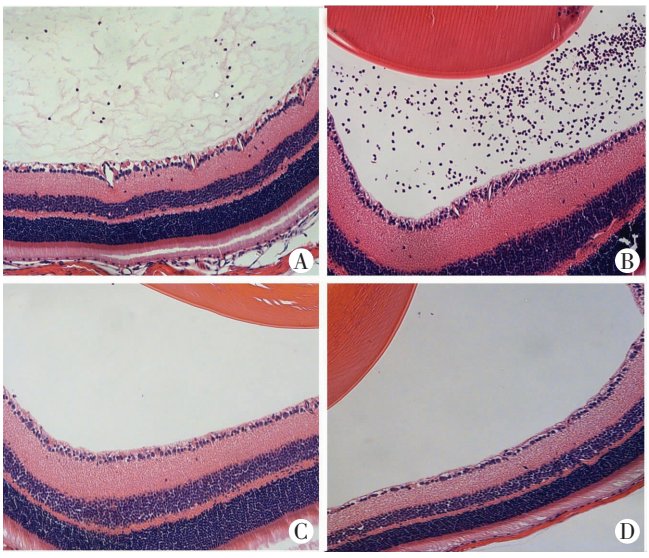


图 1　LPS 注射后各组小鼠前房炎症裂隙灯观察结果

2.2　LPS 注射后 24 h 小鼠玻璃体内炎症细胞及视网膜组织形态学变化

在注射 LPS 后 24 h，石蜡切片 HE 染色组织形态学观察可见生理盐水 + LPS 组小鼠玻璃体腔内大量炎症细胞渗出（图 2）。而 DIZE + LPS 组小鼠玻璃体内渗出的炎症细胞相比生理盐水 + LPS 组明显减少。但即便是炎症发展的高峰，生理盐水 + LPS 组和 DIZE + LPS 组小鼠的视网膜结构及层次正常，未见任何破坏。

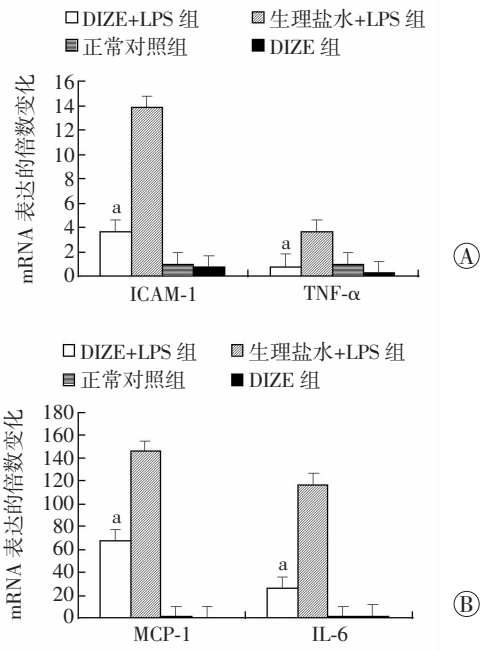


A：DIZE + LPS 组；B：生理盐水 + LPS 组；C：正常对照组；D：DIZE 组

图 2　LPS 注射后 24 h 各组小鼠玻璃体腔炎症细胞渗出形态学变化　（HE ×200）

2.3　LPS 注射后 24 h 小鼠眼部炎症因子 mRNA 表达水平的变化

与生理盐水 + LPS 组相比，DIZE + LPS 组小鼠的炎症因子 mRNA 表达水平明显降低（$P<0.01$）。见图 3。



A：ICAM-1、TNF-α 的表达；B：MCP-1、IL-6 的表达　a：$P<0.01$，与生理盐水 + LPS 组比较

图 3　LPS 注射后 24 h 各组小鼠小鼠眼部炎症因子 mRNA 水平表达变化　（$n=4, \bar{x} \pm s$）

3　讨论

我们的研究结果表明，DIZE 能使 EIU 小鼠前房炎症减轻。同时，玻璃体内的炎症细胞渗出有所减少，眼部炎症细胞因子的 mRNA 表达水平也显著降低，从而在内毒素诱导性葡萄膜炎的病理过程中发挥了保护性作用。这些炎症因子在炎症过程的起始和发展中起到重要的作用。比如 MCP-1、TNF-α、IL-6 在启动炎症和

其进展中发挥关键作用,而 ICAM-1 则是促进眼后节的炎性细胞渗出和迁移至关重要的因素。我们的研究结果也显示在 EIU 模型中,上述炎性细胞因子的mRNA表达水平升高,而给予 DIZE 处理后可以明显降低上述炎症因子的表达,这可能是 DIZE 减轻葡萄膜炎炎症的一种途径,然而 DIZE 抑制炎症的更进一步的机制还未完全阐明。近年来,有研究表明 DIZE 和一种名为 XNT 的化合物有着高度相似的分子结构。而 XNT 已经被证实能够发挥提高血管紧张素转换酶 2(angiotensin conversion enzyme 2, ACE2)活性的作用。提示 DIZE 也有可能通过提高 ACE2 的活性的作用达到抑炎作用,这一观点在最近得到支持[15]。并且有研究显示在肺动脉高压以及缺血性脑卒中模型的研究中,DIZE 的确可以通过调节全身肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)系统的保护性轴发挥对机体的保护性作用[13-14]。

血管紧张素Ⅱ(Ang Ⅱ)是 RAS 系统主要的调节因子,在血管紧张素转换酶(angiotensin conversion enzyme, ACE)的作用下生成,并主要通过其受体血管紧张素Ⅱ 1 型受体(AT1R)和血管紧张素Ⅱ2 型受体(AT2R)发挥主要的生理作用[16]。此外,越来越多的研究证实 Ang Ⅱ主要通过 ACE/Ang Ⅱ/AT1R 这条 RAS 系统损害性轴发挥一系列生物学功能,比如新生血管生成、血管重塑、增殖以及促进炎症反应等[17]。对炎症反应来说,Ang Ⅱ是炎症过程的关键性因素。Ang Ⅱ可以通过刺激机体产生特异性的炎症因子和趋化因子,使炎症细胞在组织周围渗出和聚集。同时,Ang Ⅱ自身还可以诱导炎症细胞的增殖和分化[18]。

然而最近发现的 RAS 系统的新成员 ACE2 可能通过 RAS 系统的另一条包含血管紧张素(Ang)1~7 及其受体 Mas-R 的保护性轴,抵消损害性轴的机体损伤性反应。RAS 系统的这条 ACE2/Ang(1~7)/Mas-R 保护性信号轴可以调节机体产生多种机体保护性反应,比如抗炎症、抗增殖、抗氧化损伤等。因此,本研究结果所显示的炎症因子表达降低,可能是因为 DIZE 提高 ACE2 的活性,从而通过活化 ACE2/Ang(1~7)/Mas-R 这条保护性轴抵消了 Ang Ⅱ通过损害性轴起到的促炎作用。

葡萄膜炎有易复发的特性,其机制尚不完全清楚,但反复发作,如果得不到合理有效的治疗,炎症可能趋于慢性化,并可产生一些严重的并发症和后遗症,甚至致盲。此外,长期、反复用药,还会带来一些严重的毒副作用。因此寻求新的有效的治疗药物,已成为亟待解决的问题。我们的研究结果发现 DIZE 在 EIU 模型的典型病理过程中能够发挥保护性作用,控制炎症的病理发展。或许能够在一定程度上减少致盲的可能。我们的进一步研究将证实 DIZE 是否通过提高 ACE2 活性起到抵消 Ang Ⅱ所引起的促炎作用。从而证实 DIZE 是否可以成为一种治疗葡萄膜炎的新药。

参考文献:

[1] Reeves S W, Sloan F A, Lee P P, *et al*. Uveitis in the elderly: epidemiological data from the National Long-term Care Survey Medicare Cohort[J]. Ophthalmology, 2006, 113(2): 307. e1.

[2] Read R W. Uveitis: advances in understanding of pathogenesis and treatment[J]. Curr Rheumatol Rep, 2006, 8(4): 260-266.

[3] Munoz-Fernandez S, Martin-Mola E. Uveitis[J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2006, 20(3): 487-505.

[4] Servat J J, Mears K A, Black E H, *et al*. Biological agents for the treatment of uveitis[J]. Expert Opin Biol Ther, 2012, 12(3): 311-328.

[5] Gomes-Bittencourt M, Sepah Y J, Do D V, *et al*. New treatment options for noninfectious uveitis[J]. Dev Ophthalmol, 2012, 51: 134-161.

[6] Rosenbaum J T, Rosenzweig H L, Smith J R, *et al*. Uveitis secondary to bacterial products[J]. Ophthalmic Res, 2008, 40(3/4): 165-168.

[7] Hoekzema R, Murray P I, van-Haren M A, *et al*. Analysis of interleukin-6 in endotoxin-induced uveitis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1991, 32(1): 88-95.

[8] Koizumi K, Poulaki V, Doehmen S, *et al*. Contribution of TNF-alpha to leukocyte adhesion, vascular leakage, and apoptotic cell death in endotoxin-induced uveitis *in vivo*[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(5): 2184-2191.

[9] Tuaillon N, Shen D F, Berger R B, *et al*. MCP-1 expression in endotoxin-induced uveitis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43(5): 1493-1498.

[10] Becker M D, Garman K, Whitcup S M, *et al*. Inhibition of leukocyte sticking and infiltration, but not rolling, by antibodies to ICAM-1 and LFA-1 in murine endotoxin-induced uveitis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42(11): 2563-2566.

[11] Miyamoto K, Ogura Y, Hamada M, *et al*. *In vivo* quantification of leukocyte behavior in the retina during endotoxin-induced uveitis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996, 37(13): 2708-2715.

[12] Peregrine A S, Mamman M. Pharmacology of diminazene: a review[J]. Acta Trop, 1993, 54(3/4): 185-203.

[13] Ferreira A J, Shenoy V, Yamazato Y, *et al*. Evidence for angiotensin-converting enzyme 2 as a therapeutic target for the prevention of pulmonary hypertension[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 179(11): 1048-1054.

[14] Mecca A P, Regenhardt R W, O'Connor T E, *et al*. Cerebroprotection by angiotensin-(1-7) in endothelin-1-induced ischaemic stroke[J]. Exp Physiol, 2011, 96(10): 1084-1096.

[15] Gjymishka A, Kulemina L V, Shenoy V, *et al*. Diminazene aceturate is an ACE2 activator and a novel antihypertensive drug[J]. FASEB J, 2010, 24: 1032-1033.

[16] de-Gasparo M, Catt K J, Inagami T, *et al*. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors[J]. Pharmacol Rev, 2000, 52(3): 415-472.

[17] Marchesi C, Paradis P, Schiffrin E L. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation[J]. Trends Pharmacol Sci, 2008, 29(7): 367-374.

[18] Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, *et al*. Inflammation and angiotensin II[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2003, 35(6): 881-900.

(**收稿**:2013-04-09;**修回**:2013-05-29)

(编辑 张 维)