

感染性眼内炎患者玻璃体液中坏死性凋亡相关蛋白 MCP-1 的检测

董 凯 韩林峰 刘静雯 吴章友 孙思勤 柯根杰

摘要 目的 探讨感染性眼内炎患者玻璃体液中坏死性凋亡相关蛋白 MCP-1 的表达及其与视力预后的关系,为预测疾病预后及进一步的眼内药物干预,保护视功能提供实验室依据。方法 收集 17 例感染性眼内炎患者的玻璃体液,检测坏死性凋亡相关蛋白单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)的表达,分析临床治疗效果。结果 实验组感染性眼内炎患者玻璃体液中 MCP-1 的浓度显著高于对照组 MCP-1 的浓度($P < 0.05$);实验组的 MCP-1 浓度与最佳矫正视力呈负相关性($P < 0.05$)。结论 感染性眼内炎患者眼内有坏死性凋亡的发生,与患者视功能损害有关,这为进一步干预坏死性凋亡,保护患者视功能提供了依据。

关键词 眼内炎;坏死性凋亡;单核细胞趋化蛋白 1

中图分类号 R 776.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)08-1133-03

感染性眼内炎是较为常见的一种眼科急症,多发生于眼科手术后和眼外伤的患者,尽管手术可以抑制炎症反应,挽救眼球,但是多数患者由于炎症的迅速播散,视细胞的死亡,导致视功能不可逆的损害,术后视功能的恢复并不理想。另一方面,近年来研究^[1]显示,坏死性凋亡也是一种基本细胞死亡形式,常常发生于组织炎症、缺血缺氧等应激环境,单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)是导致坏死性凋亡发生级联反应的关键蛋白。据此推测,在感染性眼内炎患者中,坏死性凋亡也参与了其病理过程,部分导致了视功能的损伤。所以,该研究收集了 17 例感染性眼内炎患者的玻璃体液,检测坏死性凋亡相关蛋白 MCP-1 的表达情况,探讨坏死性凋亡信号通路相关蛋白在感染性眼内炎患者病理过程中的致病作用,为预测疾病预后

及进一步的眼内药物干预,提高感染性眼内炎患者视功能恢复提供实验室依据。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集安徽医科大学附属省立医院 2013 年 1 月~2014 年 6 月收治的 17 例(17 只眼)感染性眼内炎患者作为实验组,其中男 12 例(12 只眼),女 5 例(5 只眼);年龄 29~85(54.35 ± 17.45)岁;右眼 8 只,左眼 9 只;有眼外伤病史者 10 例(10 只眼),合并有内眼手术史者 7 例(7 只眼);入院前最佳矫正视力无光感 2 只眼,光感 7 只眼,手动 6 只眼,0.08 者 1 只眼,0.4 者 1 只眼。另外收集特发性黄斑裂孔或黄斑前膜的 6 例(6 只眼)患者作为对照组,其中特发性黄斑裂孔 4 例(4 只眼),黄斑前膜患者 2 例(2 只眼),男性患者 1 例(1 只眼),女性患者 5 例(5 只眼),年龄 54~65(61.67 ± 4.08)岁。所有感染性眼内炎患者主要诊断标准包括:眼痛伴视力渐进性下降、有眼外伤或内眼手术病史;结膜充血、水肿,角膜水肿或溃疡,或伴有前房积脓,裂隙灯检查见玻璃体白色或黄白色混浊,B 超检查提示玻璃体混浊^[2-3]。患者均签署知情同意书。

1.2 治疗方案 如果患者临床表现为较为明显的前房积脓,但是不伴有明显的玻璃体混浊,则给予万古霉素前房冲洗或玻璃体腔注射;如果患者表现为明显的前房积脓,而且同时合并有明显的玻璃体腔混浊,则采用玻璃体切除联合视网膜手术,同时行万古霉素玻璃体腔灌洗和注射。以上治疗方案中万古霉素玻璃体腔注射量为 1 mg,灌注液浓度为 0.02 g/L^[3]。

1.3 标本采集 患者在行玻璃体腔穿刺注药前,将 2 ml 注射器连接 6 号针头于角膜缘后 4 mm 穿刺玻璃体腔,抽取玻璃体液(0.1~0.2 ml)待检;对于拟行玻璃体视网膜手术的患者,术前取玻璃体标本时,将玻璃体切割头回流管处连接无菌注射器,尽可能多的收集切除的混浊玻璃体,取 0.2~0.4 ml 存入-80℃冰箱待检。术后纳入研究的患者按照常规

2015-05-08 接收

基金项目:安徽省自然科学基金青年项目(编号:AHNSF1408085QH159);国家自然科学基金青年科学基金项目(编号:81400407)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院眼科,合肥 230001

作者简介:董 凯,男,主治医师,责任作者,E-mail: happysubmission@163.com

眼内炎患者治疗方案进行后续治疗,主要观察视力和眼内炎症是否得到控制^[3]。

1.4 标本检测 室温下解冻标本,采用 ELISA 法检测,步骤如下:采用 MCP-1 酶联免疫分析试剂盒(上海通蔚实业有限公司),分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。在酶标包被板上标准品准确加样 50 μ l 待测样品孔中先加样品稀释液 40 μ l,然后再加待测样品 10 μ l,轻轻晃动混匀;37 $^{\circ}$ C 温育 30 min;小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置 30 s 后弃去,如此重复 5 次;加酶:每孔加入酶标试剂 50 μ l,空白孔除外;再次温育和洗涤;每孔先加入显色剂 A、B 各 50 μ l,轻轻震荡混匀,37 $^{\circ}$ C 避光显色 15 min;每孔加终止液 50 μ l 终止反应;450 nm 波长依序测量各孔的吸光度(optical density, OD)值,通过 OD 值计算得到样本中 MCP-1 蛋白的含量。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,实验组和对照组间 MCP-1 浓度采用独立样本 t 检验,实验组中术后最佳视力与 MCP-1 浓度的相关性分析采用 Pearson 相关性分析。

2 结果

2.1 临床结果 纳入研究的 17 例感染性眼内炎患者直接行玻璃体视网膜联合手术者 12 例(12 只眼),其中硅油填充者 8 例(8 只眼),感染未得到控制而进一步行眼内容剜除术者 1 例(1 只眼);直接行前房冲洗/玻璃体腔注药术者 5 例(5 只眼),其中感染未得到控制而进一步行玻璃体视网膜手术者 3 例(3 只眼),再次手术后感染均得到控制。增菌培养阳性者 4 例(4 只眼),阳性率为 23.52%,分别是表皮葡萄球菌 2 例,草绿色链球菌 1 例,肺炎链球菌 1 例。

2.2 MCP-1 浓度 实验组感染性眼内炎患者玻璃体液中 MCP-1 的浓度为(1 867.82 $\pm$ 332.67) mg/L,对照组中 MCP-1 的浓度为(238.66 $\pm$ 30.60) mg/L,实验组浓度显著高于对照组,差异有统计学意义($t = 19.95$, $P < 0.05$)。

2.3 术后最佳矫正视力和 MCP-1 浓度的关系 所有实验组患者术后随访 3~6 个月不等,最终最佳矫正视力分布为(5 分制):无光感 1 例,1.0(光感) 2 例,2.0(眼前手动) 6 例,3.0(眼前指数) 2 例,3.9 分 1 例,4.0 分 1 例,4.3 分 1 例,4.4 分 2 例,4.7 分

1 例。术后最佳矫正视力与 MCP-1 浓度呈负相关性($r = -0.95$, $P < 0.05$)。见图 1。

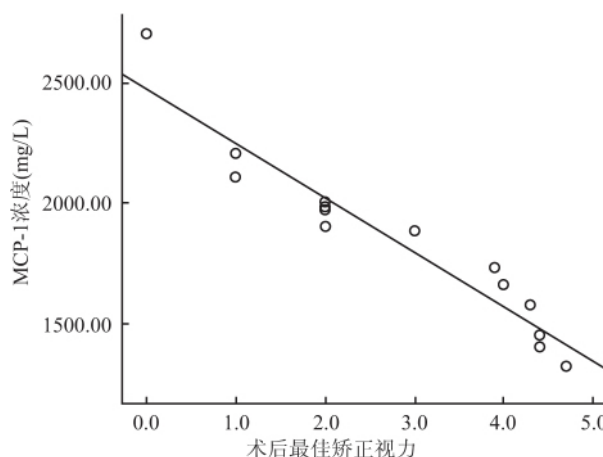


图 1 术后最佳矫正视力和 MCP-1 浓度的相关性分析

3 讨论

视细胞的死亡方式主要有凋亡、坏死和自噬性细胞死亡^[4]。坏死性凋亡是程序性细胞坏死,本课题前期研究^[5]显示在视网膜脱离中有光感受器细胞的坏死性凋亡存在,可以被坏死性凋亡特异性抑制剂 necrostatin-1 抑制^[6]。感染性眼内炎同样存在组织的缺血缺氧,所以本课题通过检测坏死性凋亡通路上重要标记蛋白 MCP-1,首次证实了在感染性眼内炎患者中同样存在有坏死性凋亡的发生,且 MCP-1 蛋白的表达与患者的最终视功能呈负相关性,实验结果对预测该类患者的预后,进一步干预坏死性凋亡,提高感染性眼内炎患者视功能的恢复具有临床指导意义。

感染性眼内炎主要的治疗方案包括前房冲洗、玻璃体腔注药和玻璃体视网膜联合手术^[7]。本研究中,如果患者仅表现为前房积脓,玻璃体腔无明显混浊或少许混浊,则行前房冲洗/玻璃体腔注药术;如果玻璃体腔混浊明显,甚至怀疑有视网膜脱离,则直接行玻璃体视网膜联合手术。本研究中采用万古霉素行前房冲洗/玻璃体腔注药术共 5 例,2 例患者的眼内感染得到控制,3 例患者炎症加重,进一步行玻璃体视网膜手术。玻璃体视网膜手术可以直接清除化脓的玻璃体和病原体,从而迅速控制炎症^[7],本研究中共有 12 例患者直接行玻璃体视网膜手术,除 1 例患者感染仍然得不到控制而行眼内容剜除外,其余患者眼内炎症得到控制,随访期间无炎症复

发。有研究者报道 66 例行玻璃体视网膜联合手术的感染性眼内炎患者,手术后眼内炎症均得到控制,在随访期间未观察到眼内炎症复发^[8]。所以,玻璃体腔注药和玻璃体视网膜联合手术可以有效地抑制感染性眼内炎。

尽管感染性眼内炎患者通过有效的治疗后,炎症得到控制,但是患者的视功能往往恢复不理想,有研究者报道 46 例感染性眼内炎患者,经过玻璃体腔注药或玻璃体视网膜联合手术后,仅有 6 例患者最终最佳矫正视力在 0.2 以上^[2],说明感染性眼内炎患者存在有视网膜组织尤其是光感受器细胞的不可逆损伤,尽管术后炎症得到控制,但是视网膜各层组织的功能未得到充分的保护,从而导致了这部分患者视功能恢复不理想。如何保护感染性眼内炎患者的视功能是目前研究的重点。

坏死性凋亡的发生与组织缺血缺氧和炎症刺激密切相关^[9]。其信号通路中受体间作用蛋白 1 (RIP1) 和受体间作用蛋白 3 (RIP3) 相互激活并且磷酸化后,导致坏死性凋亡的发生^[10]。新近的研究^[1]表明,RIP1 和 RIP3 之间可以通过 MCP-1 蛋白联系,从而通过趋化单核巨噬细胞增强细胞坏死性凋亡的发生。所以,本研究选用 MCP-1 作为检测靶蛋白,结果显示感染性眼内炎患者的玻璃体液中 MCP-1 浓度明显增加,提示眼内有坏死性凋亡的发生;MCP-1 浓度与患者最终视功能的恢复呈负相关,提示随着组织坏死增加,视功能恢复愈加不理想。

参考文献

- [1] Gautheron J, Vucur M, Reisinger F, et al. A positive feedback loop between RIP3 and JNK controls non-alcoholic steatohepatitis [J]. *EMBO Mol Med*, 2014, 6(8): 1062–74.
- [2] 胡小坤, 罗添场, 韩雅玲. 感染性眼内炎早期诊治分析 [J]. *中国实用眼科杂志*, 2013, 31(8): 1045–7.
- [3] 中华医学会眼科学分会白内障与人工晶状体学组. 我国白内障术后急性细菌性眼内炎治疗专家共识(2010 年) [J]. *中华眼科杂志*, 2010, 46(8): 764–6.
- [4] Walsh C M. Grand challenges in cell death and survival: apoptosis vs. necroptosis [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2014, 2: 3.
- [5] 董凯, 周恩亮, 朱子诚, 等. 实验性视网膜脱离后光感受器细胞的坏死性凋亡 [J]. *中华眼底病杂志*, 2014, 30(4): 378–80.
- [6] Dong K, Zhu H, Song Z, et al. Necrostatin-1 protects photoreceptors from cell death and improves functional outcome after experimental retinal detachment [J]. *Am J Pathol*, 2012, 181(5): 1634–41.
- [7] 黎晓新, 张正. 眼内炎的诊断与处理及预防 [J]. *中华眼科杂志*, 2006, 42(10): 946–50.
- [8] 刘艳, 陈松, 付妍. 玻璃体切割手术联合眼内填充治疗重症眼内炎的疗效观察 [J]. *中华眼底病杂志*, 2010, 26(5): 427–30.
- [9] Degterev A, Huang Z, Boyce M, et al. Chemical inhibitor of non-apoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury [J]. *Nat Chem Biol*, 2005, 1(2): 112–9.
- [10] Zhang D W, Shao J, Lin J, et al. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis [J]. *Science*, 2009, 325(5938): 332–6.

Vitreous levels of necroptosis related protein MCP-1 in endophthalmitis

Dong Kai, Han Linfeng, Liu Jingwen, et al

(Dept of Ophthalmology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the vitreous level of necroptosis related protein monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in endophthalmitis patients, and to provide the proof for visual prognosis and further intraocular drug intervention. **Methods** The study included 17 endophthalmitis cases from January 2013 to June 2014 and the vitreous level of MCP-1 was detected by Elisa test. **Results** The vitreous humor concentration of MCP-1 in experimental group was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$); MCP-1 concentration in experimental group was negatively correlated with the best corrected visual acuity ($P < 0.05$). **Conclusion** Necroptosis occurs in endophthalmitis, which contributes to visual impairment. The study results provide the proof for visual prognosis and further intraocular drug intervention in endophthalmitis patients.

Key words endophthalmitis; necroptosis; MCP-1