

# 核转录因子 $\kappa$ B 相关蛋白在特发性眼眶炎性假瘤细胞中的表达变化及其意义

杨林麒 赵鹏翔 吴亚楠 张旭娟 商蕾 刘梦昱 刘骁 马建民 马雪梅

100124 北京工业大学生命科学与生物工程学院(杨林麒、赵鹏翔、吴亚楠、张旭娟、商蕾、刘梦昱、马雪梅);100730 首都医科大学附属北京同仁医院 北京同仁眼科中心 北京市眼科学与视觉科学重点实验室(刘骁、马建民)

通信作者:马建民,Email:jmma@sina.com;马雪梅,Email:xmma@bjut.edu.cn

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.09.004

**【摘要】** **背景** 特发性眼眶炎性假瘤(IOIP)是常见的眼眶疾病之一,症状严重,治疗后易复发,其发病机制尚不清楚。研究表明,核转录因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)相关蛋白参与炎症反应、免疫应答以及细胞的重要生理过程,其在 IOIP 的发生过程中是否发挥作用值得关注。**目的** 探讨 NF- $\kappa$ B 信号通路在 IOIP 发病机制中的作用。**方法** 于 2010 年 9 月至 2016 年 5 月收集在北京同仁医院眼科手术切除并经组织病理学证实的 IOIP 组织标本 24 例,制备石蜡切片,采用苏木精-伊红染色法检查 IOIP 的组织病理学特征,采用免疫组织化学法检测和定位 IOIP 细胞中 NF- $\kappa$ B 相关蛋白 NF- $\kappa$ B/p65、p-p65、p50 和  $\kappa$ B 抑制蛋白  $\alpha$ (I $\kappa$ B- $\alpha$ )的表达,采用免疫细胞化学法及 Western blot 法对免疫组织化学检测结果进行验证。**结果** IOIP 的病理组织学特征为以小淋巴细胞为主的多种炎性细胞浸润及不同程度的纤维结缔组织增生,病灶涉及泪腺时可见大量上皮样细胞。免疫组织化学法检测显示,24 例 IOIP 标本的细胞质中均可见 NF- $\kappa$ B/p65 阳性表达,其中 15 例可见细胞核中 NF- $\kappa$ B/p65 呈阳性表达,占 62.5%;22 例 IOIP 标本的细胞质中 p50 呈阳性表达,占 91.7%,其中 17 例细胞核中 p50 呈阳性表达,占 70.8%;22 例 IOIP 标本中 p-p65 呈阳性表达,占 91.7%;11 例 IOIP 标本中 I $\kappa$ B- $\alpha$  呈阳性表达,均定位于细胞质,占 45.8%。免疫细胞化学法及 Western blot 结果与免疫组织化学法检测结果一致。**结论** IOIP 发病过程中 NF- $\kappa$ B 信号通路可能被激活,NF- $\kappa$ B 信号通路可能参与 IOIP 的发病机制。

**【关键词】** 核转录因子  $\kappa$ B/代谢;眼眶炎性假瘤/病理;炎症;免疫组织化学;人;核蛋白/代谢;信号转导通路

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(81602408、81170875)

**Expression and significance of nuclear factor- $\kappa$ B-related proteins in idiopathic orbital inflammatory pseudotumor** Yang Linqi, Zhao Pengxiang, Wu Yanan, Zhang Xujuan, Shang Lei, Liu Mengyu, Liu Xiao, Ma Jianmin, Ma Xuemei

College of Life Science and Bioengineering of Beijing University of Technology, Beijing 100124, China (Yang LQ, Zhao PX, Wu YN, Zhang XJ, Shang L, Liu MY, Ma XM); Beijing Tongren Eye Center, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing Key Laboratory of Ophthalmology and Visual Science, Beijing 100730, China (Liu X, Ma JM)

Corresponding authors: Ma Jianmin, Email:jmma@sina.com; Ma Xuemei, Email:xmma@bjut.edu.cn

**【Abstract】** **Background** Idiopathic orbital inflammatory pseudotumor (IOIP) is a common orbital disease, with serious eye symptoms and relapse tendency, and its pathogenesis is still unclear. Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)-related proteins participate in many important pathophysiological process, however, whether NF- $\kappa$ B plays a role in the IOIP process is worthy of attention. **Objective** This study was to explore the roles of NF- $\kappa$ B pathway in IOIP pathogenesis. **Methods** Twenty-four IOIP specimens were collected during surgery in Beijing Tongren Hospital from September 2010 to May 2016. The histopathological characteristics of IOIP were examined by hematoxylin and eosin staining. The expression and location of NF- $\kappa$ B/p65, p-p65, p50 and inhibitor of  $\kappa$ B (I $\kappa$ B- $\alpha$ ) were detected by immunohistochemistry and verified by immunocytochemistry and Western blot assay. **Results** The histopathological features of IOIP were numerous small lymphocyte infiltration and fibrous tissue proliferation, and a lot of epithelioid cells were seen in lacrimal gland-involved specimens. NF- $\kappa$ B/p65 was positively expressed in the cytoplasm of all 24 specimens and the nucleus in 15 specimens with the expressing rate of 62.5%. p50 was expressed in the cytoplasm in

22 specimens with the expressing rate of 91.7% and in the nucleus in 17 specimens with the expressing rate of 70.8%. The positive expression of p-p65 was found in 22 specimens with the expressing rate of 91.7%, and I $\kappa$ B- $\alpha$  was expressed in the cytoplasm of 11 specimens with the expressing rate of 45.8%. These results were confirmed by immunocytochemistry and Western blot assay. **Conclusions** NF- $\kappa$ B pathway is activated during IOIP process, and NF- $\kappa$ B pathway may be involved in the pathogenesis of IOIP.

**[Key words]** Nuclear factor-kappa B/metabolism; Orbital inflammatory pseudotumor/pathology; Inflammation; Immunocytochemistry; Humans; Nuclear proteins/metabolism; Signal transduction pathway

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81602408, 81170875)

炎性假瘤是一种非瘤性炎性病变,其病理表现为结缔组织的增生及炎性细胞浸润。特发性眼眶炎性假瘤(idiopathic orbital inflammatory pseudotumor, IOIP)占眼眶疾病的 4.7%~6.3%,是仅次于甲状腺相关眼病的常见眼眶疾病<sup>[1]</sup>,主要表现为眼球突出、眼球运动障碍、眼睑肿胀、视力下降,严重者甚至可致盲<sup>[2]</sup>。治疗后较易复发,发病机制尚无确切结论,一直是眼科领域研究的重点和难点。近年来研究发现,核转录因子 $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)可与多种细胞基因启动子或增强子序列特定位点发生特异性结合,进而促进基因的转录和表达,与炎症反应、免疫应答以及细胞的增生、转化和凋亡等病理生理过程密切相关<sup>[3]</sup>。NF- $\kappa$ B 信号通路包含 NF- $\kappa$ B/Rel 家族、 $\kappa$ B 抑制蛋白(inhibitor of  $\kappa$ B, I $\kappa$ B)家族、激酶抑制剂  $\kappa$ B(kinase inhibitory kappa B, IKK)复合物,其家族成员包括 p50(NF- $\kappa$ B1)、p52(NF- $\kappa$ B2)、RelA(p65)、RelB 和 c-Rel,在多种疾病的发生和发展过程中起重要作用,但其是否参与 IOIP 的病理过程鲜见研究报道。本研究拟探讨 NF- $\kappa$ B 在 IOIP 中的作用,为 IOIP 发病机制的研究提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 IOIP 组织标本来源** 于 2010 年 9 月至 2016 年 5 月收集在北京同仁医院眼科手术中切除并经组织病理学检查证实为 IOIP 的眼眶组织标本 24 例,将各例新鲜组织标本分为 3 个部分,立即置于液氮中保存备用,然后用质量分数 10% 中性甲醛固定,石蜡包埋并连续切片,采用苏木精-伊红染色法观察组织形态变化并检测浸润炎性细胞的类型;采用组织块培养法进行细胞培养。本研究临床样本的采集经过患者知情同意,本研究通过北京同仁医院伦理委员会批准(TRECKY2013-KS-05)。

**1.1.2 主要试剂** 兔抗人 NF- $\kappa$ B/p65 一抗(sc-372)、兔抗人 p-p65 一抗(sc-101752)、兔抗人 p50 一抗(sc-114)、兔抗人 I $\kappa$ B- $\alpha$  一抗(sc-371)、兔源多克隆二抗

(PV-9001)、兔抗人 Histone H1 抗体(sc-8030)、小鼠抗人  $\beta$ -actin 抗体(sc-47778)、山羊血清、通用型二步法免疫组织化学检测试剂盒(PV-9000)、DAB 显色试剂盒、苏木素、中性树胶(北京中杉金桥生物技术有限公司);细胞质、细胞核分步提取试剂盒(北京博大泰恒生物技术有限公司);封闭液、Western blot 荧光二抗(美国基因有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 免疫组织化学法检测和定位细胞中 NF- $\kappa$ B/p65、p50、I $\kappa$ B- $\alpha$  和 p-p65 的表达** 将 IOIP 组织标本石蜡切片 70  $^{\circ}$ C 加热 30 min,二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化。用体积分数 3%  $H_2O_2$  浸泡 10 min 以消除内源性过氧化物酶活性,1.2 g 枸橼酸三钠和 0.16 g 枸橼酸溶于 400 ml 去离子水中进行抗原修复 10 min,山羊血清 37  $^{\circ}$ C 封闭 30 min,去封闭液后加用 PBS 稀释的 NF- $\kappa$ B/p65 一抗(1:300)、p50 一抗(1:300)、I $\kappa$ B- $\alpha$  一抗(1:300)、p-p65 一抗(1:100)放入湿盒中 4  $^{\circ}$ C 过夜,1 倍 PBS 清洗 3 次,每次 3 min。添加二抗试剂 1 37  $^{\circ}$ C 孵育 20 min,1 倍 PBS 清洗 3 次,每次 3 min。添加二抗试剂 2 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min,1 倍 PBS 清洗 3 次,每次 3 min。添加 DAB 溶液显色 5~10 min,去离子水清洗后用苏木素复染核,自来水冲洗返蓝,体积分数 1% 盐酸/乙醇分化数秒,置于去离子水中 10 min,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,倒置相差显微镜下观察并拍照。任意选择 10 个高倍视野( $\times 400$ ),计数每 1 000 个细胞中所占的阳性细胞数并计算阳性细胞百分比。采用双盲法根据分级标准记分:阳性细胞数 $<5\%$ 为(-),5%~25%为(+),26%~50%为(++), $>50\%$ 为(+++)。

**1.2.2 免疫细胞化学法检测细胞中 NF- $\kappa$ B/p65 和 I $\kappa$ B- $\alpha$  的表达** 分别用 75% 乙醇消毒 IOIP 组织标本 2 次,每次 1 min。灭菌 PBS 清洗 3 次,每次 1 min。用手术剪将组织剪碎成 1 mm<sup>3</sup> 左右的小块,置于含体积分数 10% 血清和质量分数 1% 双抗的 DMEM 培养基中在 37  $^{\circ}$ C、体积分数 5%  $CO_2$  培养箱中培养约 15 d。将培养的原代细胞用胰蛋白酶消化,收集离心,DMEM 培养基重悬计数,均匀铺于 6 孔板中,细胞密度为 1 $\times$

10<sup>6</sup>/孔。用预冷 4% 多聚甲醛在 4 ℃ 冰箱中固定 30 min, 1 倍 PBS 清洗 3 次, 每次 3 min。添加质量分数 0.5% Triton X-100 孵育 10 min 以增加组织通透性, 添加体积分数 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温孵育 10 min, 山羊血清 37 ℃ 封闭 30 min, 轻轻吸弃封闭液, 加入 PBS 稀释的 NF-κB/p65 一抗(1:300)和 IκB-α 一抗(1:300), 37 ℃ 孵育 2 h, 阴性对照组用 PBS 代替一抗, PBS 清洗后加兔源多克隆二抗工作液 37 ℃ 孵育 30 min, PBS 清洗后加新鲜配制的 DAB 溶液显色 5~10 min, 去离子水清洗, 苏木素复染核, 自来水冲洗返蓝, 1% 盐酸/乙醇分化数秒, 去离子水清洗, 倒置相差显微镜下观察并拍照。

**1.2.3 Western blot 法检测细胞中 NF-κB/p65 和 IκB-α 蛋白的表达** 称取 0.1 g 液氮中保存的组织, 按试剂盒说明书分步提取细胞质和细胞核蛋白, 用考马斯亮蓝 G-250 染色后测得蛋白质量浓度, 置于 -80 ℃ 冰箱中保存备用。取 30 μg 提取的蛋白与等体积的进样缓冲液混合, 95 ℃ 变性 10 min 后上样, 经 SDS-PAGE 蛋白电泳分离后于电转液中 80 V 作用 1 h 转移至 NC 膜, 添加封闭液, 37 ℃ 条件下封闭 1 h。添加 PBS 稀释的 NF-κB/p65 一抗混合液(1:1 000)、IκB-α 一抗(1:1 000)分别与内参蛋白混匀, 细胞核蛋白内参蛋白为 Histone H1, 细胞质蛋白内参蛋白为 β-actin, 4 ℃ 过夜, 1 倍 PBST(1 倍 PBS 中加入体积分数 3% Tween20)清

洗 4 次, 每次 3 min。添加相应的驴抗兔荧光标记二抗(926-32211, 1:10 000)混合液, 避光 37 ℃ 孵育 1 h, PBST 清洗 4 次, 每次 3 min。用 Odyssey 仪器扫膜。

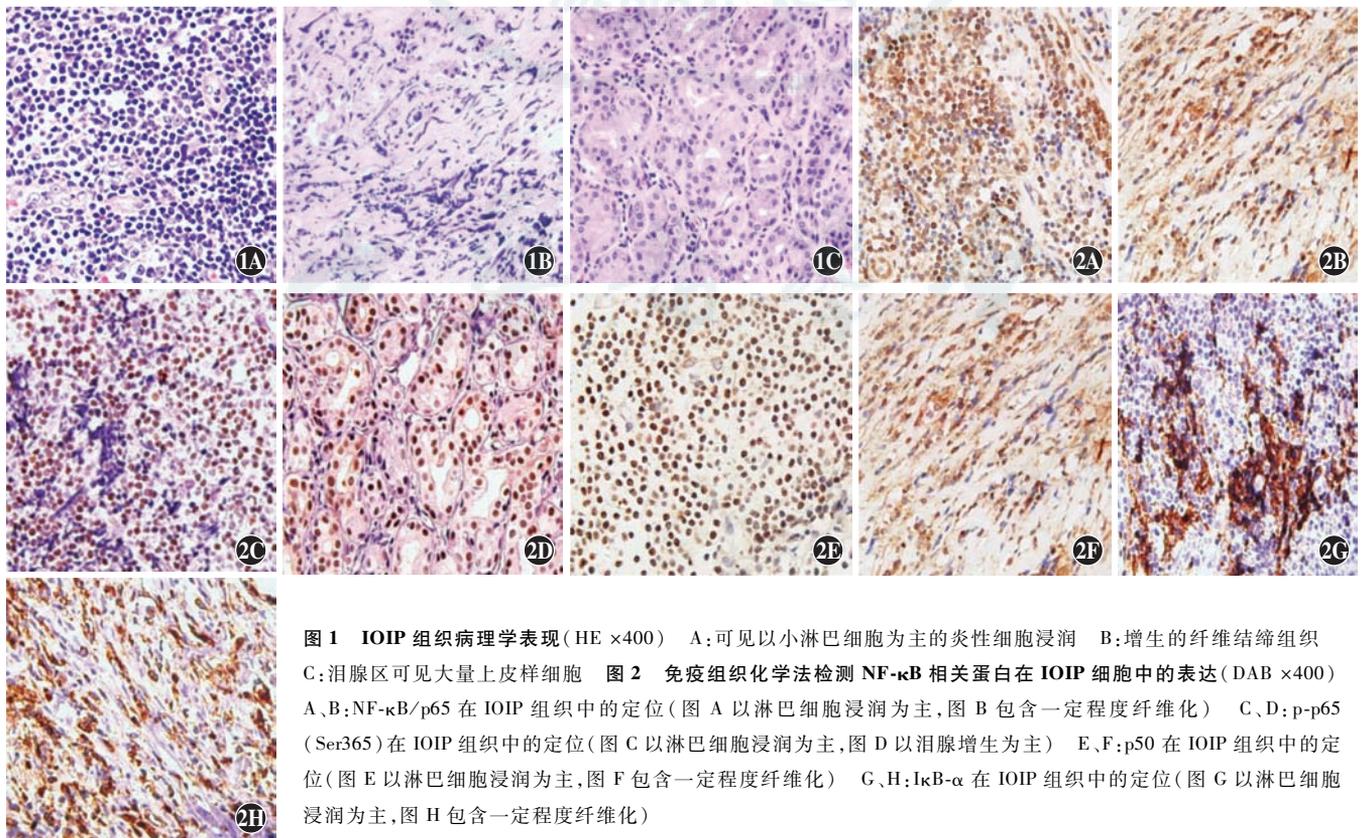
**2 结果**

**2.1 IOIP 的组织病理学表现**

IOIP 的组织病理学特征为以小淋巴细胞为主的多种炎性细胞浸润(图 1A)和不同程度的纤维结缔组织增生(图 1B), 涉及泪腺区的病灶组织可见大量的上皮样细胞(图 1C)。

**2.2 免疫组织化学法检测 IOIP 细胞中 NF-κB/p65、p50 和 IκB-α 的表达**

免疫组织化学检测显示, IOIP 细胞中 NF-κB/p65、p50、IκB-α 均呈阳性表达, 主要定位于细胞质和细胞核, 呈棕黄色或棕褐色染色; p65 主要表达于细胞核。24 例 IOIP 标本中 NF-κB/p65 均在细胞质中表达, 占 100%, 其中 15 例也可见在细胞核中表达, 占 62.5%。有 22 例标本中 p50 表达于细胞质中, 占 91.7%, 其中 17 例也可在细胞核中表达, 占 70.8%; 22 例标本中 p-p65 呈阳性表达, 占 91.7%, 主要表达于细胞核; 11 例标本中 IκB-α 呈阳性表达, 占 45.8%, 主要表达于细胞质(图 2)。NF-κB/p65、p50、IκB-α 在 IOIP 细胞中的表达强度和例数见表 1。



**图 1 IOIP 组织病理学表现(HE ×400)** A: 可见以小淋巴细胞为主的炎性细胞浸润 B: 增生的纤维结缔组织 C: 泪腺区可见大量上皮样细胞 **图 2 免疫组织化学法检测 NF-κB 相关蛋白在 IOIP 细胞中的表达(DAB ×400)** A、B: NF-κB/p65 在 IOIP 组织中的定位(图 A 以淋巴细胞浸润为主, 图 B 包含一定程度纤维化) C、D: p-p65 (Ser365) 在 IOIP 组织中的定位(图 C 以淋巴细胞浸润为主, 图 D 以泪腺增生为主) E、F: p50 在 IOIP 组织中的定位(图 E 以淋巴细胞浸润为主, 图 F 包含一定程度纤维化) G、H: IκB-α 在 IOIP 组织中的定位(图 G 以淋巴细胞浸润为主, 图 H 包含一定程度纤维化)

**表 1 NF-κB 相关蛋白在 IOIP 细胞中的表达强度和例数及阳性率**

NF-κB 相关蛋白	总例数	不同强度等级表达例数				阳性率 (%)
		-	+	++	+++	
p65	24	0	6	6	12	100.0
p-p65	24	2	14	7	1	91.7
p50	24	2	8	7	7	91.7
IκB-α	24	13	7	4	0	45.8

注: NF-κB: 核因子 κB; IOIP: 特发性眼眶炎性假瘤; IκB-α: κB 抑制蛋白 α

### 2.3 免疫细胞化学法检测 IOIP 细胞中 NF-κB/p65 和 IκB-α 的表达

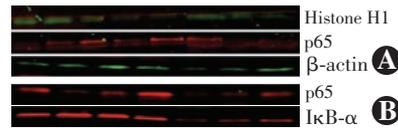
IOIP 原代培养细胞的主要类型为纤维细胞。NF-κB/p65 和 IκB-α 在 IOIP 原代培养的细胞中呈强阳性表达, 主要位于细胞质和细胞核, 均呈棕黄色染色 (图 3A ~ D); 阴性对照片细胞质和细胞核均为苏木素复染的蓝色染色 (图 3E, F)。



**图 3 NF-κB/p65、IκB-α 在 IOIP 原代培养细胞中的表达 (DAB)**  
 A: NF-κB/p65 在 IOIP 原代培养细胞的细胞质和细胞核中均呈阳性表达, 呈棕黄色染色 (×20, 标尺 = 100 μm) B: NF-κB/p65 在 IOIP 原代培养细胞的细胞质和细胞核中均呈阳性表达, 呈棕黄色染色 (×40, 标尺 = 50 μm) C: IκB-α 在 IOIP 原代培养细胞的细胞质和细胞核中均呈阳性表达, 呈棕黄色染色 (×20, 标尺 = 100 μm) D: IκB-α 在 IOIP 原代培养细胞的细胞质和细胞核中均呈阳性表达, 呈棕黄色染色 (×40, 标尺 = 50 μm) E: 阴性对照片显示 NF-κB/p65 呈阳性表达, 仅可见蓝染的细胞核 (×20, 标尺 = 100 μm) F: 阴性对照片显示 IκB-α 呈阴性表达, 仅可见蓝染的细胞核 (×40, 标尺 = 50 μm)

### 2.4 Western blot 检测 IOIP 细胞中 NF-κB/p65 和 IκB-α 蛋白的相对表达量

细胞质和细胞核内参蛋白检测显示蛋白结构完整。Western blot 检测显示 IOIP 标本细胞核中 p65 蛋白呈阳性表达, 即 p65 转入细胞核内参与转录调控。IOIP 标本的细胞质中 p65 和 IκB-α 蛋白均呈强阳性表达 (图 4), 8 个标本组织蛋白提取后考马斯亮蓝法总蛋白质量浓度检测结果见表 2。



**图 4 p65 和 IκB-α 蛋白在 IOIP 细胞中表达的 Western blot 结果** A: p65 在 IOIP 细胞核中呈阳性表达 B: p65 和 IκB-α 蛋白在 IOIP 细胞质和细胞核中均呈阳性表达 注: IκB-α: κB 抑制蛋白 α

**表 2 考马斯亮蓝法检测总蛋白样本的质量浓度**

样品编号	样品质量浓度 (g/μl)
1	5.760 3
2	8.864 9
3	6.446 2
4	8.142 9
5	11.247 5
6	11.608 5
7	10.525 5
8	7.818 0

### 3 讨论

NF-κB 二聚体在细胞处于静息状态时可与 IκB-α 结合而掩盖 NF-κB 的核定位信号, 使其以无活性的形式存在于细胞质中<sup>[4]</sup>。在促炎细胞因子、细菌、病毒等的刺激下 NF-κB 被激活, IκB-α 被 IKK 磷酸化和泛素化, 随后被蛋白酶体水解, NF-κB 二聚体释放入细胞核与靶 DNA 结合。本研究发现, p65、p50 在 IOIP 细胞质中呈强阳性表达, 部分细胞核中呈阳性表达, 说明 p65、p50 部分转入细胞核中发挥转录调节作用, 表明 NF-κB 信号通路被激活, 同时说明在 IOIP 中 NF-κB 二聚体形式可能为 p65-p50, 而 NF-κB 活化后同源二聚体明显增多, 然而该二聚体无转录激活区, 其易位于细胞核后与 NF-κB 竞争性地结合 κB 序列, 从而抑制 NF-κB 的活性, 减少炎症介质及黏附分子的表达, 故在 IOIP 中, NF-κB 二聚体 p65-65、p50-50 或许也存在。为进一步验证 p65 已转入细胞核, 本研究中任意选取 8 例 IOIP 样本组织分步提取细胞质和细胞核蛋白, 发现其细胞核蛋白中均有 p65 表达, NF-κB 活化的同时 p65 被 IKK 在 ser536 磷酸化而成为激活状态, 从而与其他转录激活子结合转录、激活靶基因<sup>[5]</sup>, 所以 p65 在 Ser536 的磷酸化为 NF-κB 信号通路激活的标志。本研究 91.7% 的 IOIP 样品中的 NF-κB 信号通路处于激活状态。IκB-α 含有核输入序列和核输出序列, 当 NF-κB 激活后在细胞核与 IκB-α 结合后将其核输回细胞质, 终止其转录活性<sup>[6]</sup>。IκB-α 又是 NF-κB 调控的靶基因, NF-κB 激活后可诱导新的 IκB-α 合成, 后者通过核输入序列进入细胞核, 使 NF-κB 与靶基因上位点解离, 并与之结合成 NF-κB-IκB 复合物, 从而进入失活状态<sup>[2]</sup>。本研究发现 IκB-α 表达于 IOIP 细胞质, 且部分转入细胞核中, 也间接证实了 NF-κB 细胞通路的激活。

本研究发现 IOIP 病理组织学特征为以小淋巴细胞为主的多种成熟细胞的浸润和不同程度的纤维结缔组织增生, 具体表现为炎性细胞浸润、眼外肌基质成分改变、血管和受累眼眶结构的变化和组织纤维化, 与以

往的研究结果相符<sup>[7]</sup>。本研究发现, NF- $\kappa$ B/p65、p50 及 I $\kappa$ B- $\alpha$  主要表达于淋巴细胞, 而上皮细胞与纤维细胞中表达较少, p65、I $\kappa$ B- $\alpha$  在培养纤维细胞的细胞质和细胞核中均呈强阳性表达。纤维化是炎症导致组织实质细胞发生坏死, 组织内细胞外基质异常增多和过度沉积的病理过程。有研究表明, NF- $\kappa$ B 与肝纤维化、肺纤维化关系密切<sup>[8-9]</sup>, 所以 IOIP 的纤维化机制可能与 NF- $\kappa$ B 通路的激活有关。

一些经典的炎症性相关疾病致病过程中 NF- $\kappa$ B 均呈过度激活状态, 大量细胞质内的 NF- $\kappa$ B 复合物进入细胞核内, 诱导相关基因的转录与表达, 如哮喘、类风湿性关节炎、炎症性肠胃病、动脉粥样硬化等<sup>[10-13]</sup>。IOIP 为一种非特异性慢性增生性炎症性疾病, 可能与 NF- $\kappa$ B 有密切的关系。另一方面, 治疗 IOIP 的主要方法是糖皮质激素的应用, 其作用机制即是阻止 NF- $\kappa$ B 的激活, 目前糖皮质激素可能是最有效的 NF- $\kappa$ B 抑制因子<sup>[14]</sup>。经典的信号通路认为糖皮质激素主要通过与其受体结合直接或间接进行基因调控而发挥作用, 在细胞核中可直接与 NF- $\kappa$ B 的活性部位 p65 亚基结合, 阻断 NF- $\kappa$ B 与 DNA 上靶位点的结合; 增加 NF- $\kappa$ B 抑制因子 I $\kappa$ B 的转录和表达, I $\kappa$ B 与 NF- $\kappa$ B 结合可使活化的 NF- $\kappa$ B 恢复到细胞质中的非活性形式, 抑制其介导的炎症基因的转录<sup>[15-16]</sup>。IOIP 的发病机制在某种程度上与 NF- $\kappa$ B 的激活相关, 尽管其具体的调节机制尚未明确。

多种疾病的发生与 NF- $\kappa$ B 的激活有关, 因此在各个环节对 NF- $\kappa$ B 的活化加以干预和阻断是治疗这些疾病的关键机制。目前, NF- $\kappa$ B 的抑制剂主要有以下几类: (1) 蛋白酶体活性抑制剂 可通过阻断 I $\kappa$ B 的降解而抑制 NF- $\kappa$ B 的激活; (2) 抗氧化剂 如花生四烯酸及自然存在的抗氧化剂, 如红酒、N-乙酰半胱氨酸等, 可以通过抑制 I $\kappa$ B- $\alpha$  的第 32、36 位磷酸化和降解及抑制 p65 磷酸化, 从而抑制 NF- $\kappa$ B 的活性; (3) IKK 活性抑制剂 如 CSH828、小白菊内酯等; (4) NF- $\kappa$ B 移位抑制剂 如 DHMEQ 和雷公藤甲素 PG490, PG490 在 NF- $\kappa$ B 与 DNA 结合后可以选择性地作用于 p65 亚基而抑制 NF- $\kappa$ B 活性<sup>[17]</sup>; (5) 免疫抑制剂 如糖皮质激素、微生物代谢产物、抗代谢物、烷化剂类等。所以, 在 IOIP 的治疗上可以选择抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路激活的药物。

由于本研究中仅用免疫组织化学、免疫细胞化学、Western blot 法检测 NF- $\kappa$ B 相关蛋白 NF- $\kappa$ B/p65、p-p65 (ser536)、p50 及 I $\kappa$ B- $\alpha$  在 IOIP 细胞中的定位和表达, NF- $\kappa$ B/p65 的细胞核阳性定位还需用经典的凝胶迟滞检测进一步验证。另外, IKK 复合物的表达情

况还有待进一步研究。

有研究认为磷脂酰肌醇-3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 及其下游分子 Akt 参与了 NF- $\kappa$ B 活性的调节, Akt 能通过磷酸化激活 IKK, 导致 I $\kappa$ B 的磷酸化、降解及其与 NF- $\kappa$ B 的分离, 被释放后的 NF- $\kappa$ B 转位到细胞核内并诱导目的基因的表达<sup>[18]</sup>, 且 Akt 介导的 p300 能显著增加乙酰转移酶的活性和 p65 的乙酰化作用及其转录激活作用<sup>[19]</sup>。所以, 研究 IOIP 中 PI3K 信号途径的活化情况可能为 IOIP 发病机制研究提供线索。

本研究表明, IOIP 标本中 NF- $\kappa$ B 信号通路可能被激活, 而进一步探究 NF- $\kappa$ B 在 IOIP 发病机制中的作用对于研究 IOIP 的发病机制和临床治疗具有指导意义。

## 参考文献

- [1] Szabo B, Szabo I, Crişan D, et al. Idiopathic orbital inflammatory pseudotumor: case report and review of the literature [J]. Rom J Morphol Embryol, 2011, 52(3): 927-930.
- [2] Yuen SJ, Rubin PA. Idiopathic orbital inflammation: distribution, clinical features, and treatment outcome [J]. Arch Ophthalmol, 2003, 121(4): 491-499. DOI: 10.1001/archoph.121.4.491.
- [3] 楼希文, 孙绍刚, 王琛. 转录因子 NF- $\kappa$ B 的核内活性调控 [J]. 细胞生物学杂志, 2009, 31(6): 741-748.
- [4] Zhang Z, Rigas B. NF-kappaB, inflammation and pancreatic carcinogenesis: NF-kappaB as a chemoprevention target (review) [J]. Int J Oncol, 2006, 29(1): 185-192.
- [5] Shiah HS, Gao W, Baker DC, et al. Inhibition of cell growth and nuclear factor-kappaB activity in pancreatic cancer cell lines by a tylophorine analogue, DCB-3503 [J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(10): 2484-2493. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0146.
- [6] Kim D, Kolch W, Cho KH. Multiple roles of the NF-kappaB signaling pathway regulated by coupled negative feedback circuits [J]. FASEB J, 2009, 23(9): 2796-2802. DOI: 10.1096/fj.09-130369.
- [7] 王蓓. 特发性眼眶炎性假瘤临床进展 [J]. 临床医药实践, 2008, 17(4): 248-251.
- [8] Luedde T, Schwabe RF. NF- $\kappa$ B in the liver—linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2011, 8(2): 108-118. DOI: 10.1038/nrgastro.2010.213.
- [9] 田莉, 王献华, 马小兵, 等. TNF- $\alpha$  介导的 NF- $\kappa$ B 信号通路在肺纤维化中的作用 [J]. 现代预防医学, 2011, 38(2): 361-363, 365. Tian L, Wang XH, Ma XB, et al. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  signaling pathway mediated by nuclear factor kappa B in pulmonary fibrosis [J]. Mod Preven Med, 2011, 38(2): 361-363, 365.
- [10] Williams RO, Paleolog E, Feldmann M. Cytokine inhibitors in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases [J]. Curr Opin Pharmacol, 2007, 7(4): 412-417. DOI: 10.1016/j.coph.2007.06.001.
- [11] Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases [J]. J Clin Invest, 2001, 107(1): 7-11. DOI: 10.1172/JCI1830.
- [12] Monaco C, Andreacos E, Kiriakidis S, et al. Canonical pathway of nuclear factor kappa B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(15): 5634-5639. DOI: 10.1073/pnas.0401060101.
- [13] Mattson MP. NF-kappaB in the survival and plasticity of neurons [J]. Neurochem Res, 2005, 30(6-7): 883-893. DOI: 10.1007/s11064-005-6961-x.
- [14] Roman-Blas JA, Jimenez SA. NF-kappaB as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2006, 14(9): 839-848. DOI: 10.1016/j.joca.2006.04.008.
- [15] Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs [J]. N Engl J Med, 2005, 353(16): 1711-1723. DOI: 10.1056/NEJMra050541.
- [16] 柳涛, 彭敏, 蔡柏嵩. 核转录因子  $\kappa$ B 和糖皮质激素受体在慢性阻塞性肺病患者稳定期的相互作用 [J]. 中国医学科学院学报, 2010, 32(2): 147-150. DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2010.02.004.

Liu T, Peng M, Cai BQ. Role of glucocorticoid receptor and nuclear factor- $\kappa$ B in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease[J]. Acta Acad Med Sin, 2010, 32 (2) : 147-150. DOI:10. 3881/j. issn. 1000-503X. 2010. 02. 004.

[17] 刘素芳. NF- $\kappa$ B 的激活及阻断策略的研究进展[J]. 国外医学生理、病理科学与临床分册, 2005, 25(3) : 264-266.

[18] Mattson MP, Camandola S. NF- $\kappa$ B in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders [J]. J Clin Invest, 2001, 107 (3) : 247-254. DOI:10. 1172/JCI1916.

[19] Han SS, Yun H, Son DJ, et al. NF- $\kappa$ B/STAT3/PI3K signaling crosstalk in iMyc E mu B lymphoma[J/OL]. Mol Cancer, 2010, 9 : 97 [2016-12-01]. https://www. ncbi. nlm. nih. gov/pmc/articles/PMC2876994/. DOI:10. 1186/1476-4598-9-97.

(收稿日期:2016-12-10)

(本文编辑:尹卫靖 张荻)

## · 病例报告 ·

### 脉络膜结核瘤一例

曾苗 陈晓 宋艳萍 洪玲 丁琴

430070 广州军区武汉总医院眼科

通信作者:曾苗, Email: zengmiao1982@163. com

DOI:10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2017. 09. 005

患者,女,25岁,因右眼视力逐渐下降5个月于2013年3月12日至广州军区武汉总医院眼科就诊。眼部检查:视力右眼数指/20 cm,不能矫正,左眼1.0;眼压右眼12 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa),左眼15 mmHg。右眼前节未见明显异常,玻璃体絮状混浊,视盘边界清,色泽正常,黄斑区附近见一直径约3 PD大小灰白色实性隆起病灶,周围环以黄白色渗出灶,可见其表面血管爬行(图1)。荧光素眼底血管造影(fundus fluorescein angiography, FFA)检查显示,右眼视盘表面荧光素渗漏,黄斑部及其颞侧视网膜见直径约3 PD的隆起灶,边界清晰,造影早期为弱荧光,随时间延长荧光逐渐增强,中晚期荧光素渗漏呈高荧光,周边见斑片状强荧光(图2)。吲哚菁绿血管造影(indocyanine green angiography ICGA)检查显示,视网膜隆起处早期表现为低荧光区,中晚期荧光素渗漏,局部呈片状强荧光(图3)。OCT检查示右眼灰白色病灶处视网膜神经上皮层高度隆起,神经上皮层间大量中高反射信号颗粒,其下信号遮挡,内节/外节(inner segment/outer segment, IS/OS)、视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)层及脉络膜毛细血管层显示不清;黄斑部视网膜隆起,神经上皮层间见数个低反射液性

暗腔及多个中高反射信号颗粒, RPE层不规则隆起(图4)。右眼B型超声检查示右眼后极部局限性实性隆起,附近视网膜浅脱离(图5)。既往史:半年前曾于外院诊断为结核性脑膜炎,行抗结核治疗,否认疫区接触史。实验室检查:结核菌素试验(PPD)阳性,结核杆菌蛋白(相对分子质量为38000)弱阳性。胸部X射线检查示双肺多发斑片状高密度影,边影模糊,心膈影正常。头颅CT检查未见明显异常。临床诊断:右眼结核性脉络膜炎;右眼脉络膜结核瘤。入院后给予硫酸链霉素注射液(山东鲁抗公司)0.75 g肌内注射,每天1次,共15 d;硫酸阿米卡星注射液(河南辅仁药业有限公司)0.2 g,静脉滴注,每天2次,共15 d;硫酸链霉素注射液0.5 g右眼球周注射,每周1次,共3次;抗结核治疗按4HRZ/2HR方案进行,同时予以口服维生素B6以减轻抗结核药物的不良反应。2个月后复查,最佳矫正视力右眼0.05,左眼1.0。眼底渗出灶较前明显缩小,FFA检查见黄斑及其颞侧有直径2.5 PD大小高荧光区(图6~9)。4个月后复查,最佳矫正视力右眼0.1,左眼1.0,眼底病灶部分机化(图10,11)。胸部X射线检查示双肺斑片状钙化影。

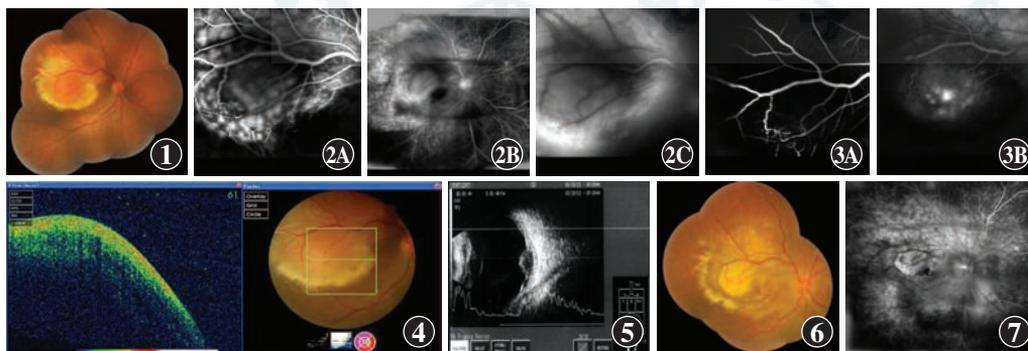


图1 右眼治疗前彩色眼底图像 视盘边界清,色淡红,黄斑及其颞侧视网膜见一直径约3 PD灰白色实性隆起病灶,其周围环以黄白色渗出灶,其上血管走行略迂曲 图2 右眼治疗前FFA表现 A:造影早期黄斑部及颞侧视网膜见3 PD大小隆起病灶,边界清晰,早期呈弱荧光 B:造影中晚期视盘表面荧光素渗漏,隆起病灶周边见斑片状强荧光 C:造影中晚期隆起病灶荧光素渗漏呈高荧光

图3 右眼治疗前ICGA表现 A:造影早期视网膜隆起处表现为低荧光 B:造影中晚期隆起病灶荧光素渗漏,局部呈片状强荧光 图4 右眼治疗前OCT图像 病灶处视网膜神经上皮层高度隆起,神经上皮层间大量中高反射信号颗粒,其下信号遮挡,IS/OS层、RPE层及脉络膜毛细血管层显示不清 图5 右眼治疗前眼部B型超声 右眼视网膜局灶性半球形隆起 图6 右眼治疗后2个月复查彩色眼底照相 黄斑及其颞侧见直径2.5 PD黄白色隆起,渗出较前明显减少 图7 右眼治疗后2个月FFA表现 视盘表面荧光素渗漏,黄斑及其颞侧有2.5 PD大小高荧光区