

白杨素对小鼠实验性自身免疫性葡萄膜炎的抑制作用及其机制

孟祥达 颜华

【摘要】 背景 白杨素具有广泛的生物学活性,其抗炎作用已在多种炎性疾病动物模型中得到证实,但其对实验性自身免疫性葡萄膜炎(EAU)的抗炎作用及其机制尚未完全明确。目的 探讨白杨素对小鼠 EAU 的治疗作用及其机制。方法 选择 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 30 只,按随机数字表法随机分为模型对照组和白杨素组。用光间受体视黄类物质结合蛋白₁₋₂₀(IRBP₁₋₂₀)/完全弗氏佐剂(CFA)注射法建立 C57BL/6J 小鼠 EAU 模型,白杨素组小鼠自免疫前 3 d 至免疫后 21 d 按 25 mg/kg 的剂量每日给予白杨素灌胃,模型对照组小鼠同法给予空白溶媒灌胃。每日间接检眼镜下观察眼底,免疫后 21 d 参照 Caspi 的标准对 EAU 小鼠进行视网膜炎症评分和组织病理学评分;采用 TUNEL 法检测小鼠视网膜细胞的凋亡情况;Western blot 法检测小鼠视网膜中炎症因子 γ 干扰素(IFN- γ)、白细胞介素-17A(IL-17A)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及信号传导与转录激活子 1(STAT1)、STAT3、p-STAT1、p-STAT3 的相对表达量。结果 模型对照组和白杨素组小鼠视网膜炎症评分分别为 1.58 ± 0.92 和 0.50 ± 0.45 ,差异有统计学意义($t = 2.600, P = 0.026$);白杨素组小鼠视网膜组织病理学评分明显低于模型对照组(0.58 ± 0.38 与 1.83 ± 0.75),差异有统计学意义($t = 3.638, P = 0.005$)。模型对照组小鼠玻璃体及视网膜血管周围可见大量炎性细胞浸润,可见视网膜血管炎症,视网膜组织有肉芽肿性病变,而白杨素组玻璃体腔未见明显炎性细胞浸润,视网膜形态大致正常。TUNEL 染色结果显示,白杨素组小鼠视网膜凋亡细胞数较模型对照组明显减少。Western blot 法检测表明,白杨素组小鼠视网膜中炎症因子 IFN- γ 、IL-17A、IL-6、TNF- α 蛋白的相对表达量明显低于模型对照组,差异均有统计学意义($t = 7.802, P = 0.001; t = 14.906, P = 0.000; t = 10.241, P = 0.001; t = 3.304, P = 0.030$)。白杨素组小鼠视网膜中 STAT1、STAT3、p-STAT1、p-STAT3 蛋白的相对表达量明显低于模型对照组,差异均有统计学意义($t = 8.965, P = 0.001; t = 8.358, P = 0.001; t = 4.864, P = 0.031; t = 4.730, P = 0.009$)。结论 白杨素能够缓解 EAU 小鼠模型的视网膜炎症反应,具有抗眼内炎症作用,其作用机制可能与抑制 STAT 途径的激活有关。

【关键词】 类黄酮/药理学;免疫抑制剂/药理学;自身免疫性疾病;葡萄膜炎/免疫;动物模型;信号传导与转录激活子;T 淋巴系细胞/药物作用

Attenuating effect of chrysin on experimental autoimmune uveitis and its mechanism Meng Xiangda, Yan Hua. Department of Ophthalmology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China
Corresponding author: Yan Hua, Email: phuyan2000@163.com

【Abstract】 **Background** Chrysin has many biological activities, and its anti-inflammatory effect has been confirmed. However, whether it can treat experimental autoimmune uveitis (EAU) is still not elucidated. **Objective** This study was to investigate the therapeutic effect of chrysin on EAU and explore the potential mechanism. **Methods** EAU animal models were established in 30 SPF C57BL/6J mice by the subcutaneous injection and ball pad injection of interphotoreceptor retinoid binding protein₁₋₂₀(IRBP₁₋₂₀)/complete Freund adjuvant (CFA), and then the models were randomized into the model control group and chrysin-treated group. Chrysin solution dissolved by 10 μ l dimethyl sulfoxide (DMSO)+140 μ l PBS was administrated by gavaging in the mice with the dose 25 mg/kg from 3 days before immunization through 21 days everyday in the chrysin group, and equal volume of solvent was used in the same way in the model control group. Retinas were examined by indirect ophthalmoscope once per day, and

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.07.002

基金项目:国家自然科学基金重大项目(91442124);国家自然科学基金面上项目(81371038)

作者单位:300052 天津医科大学总医院眼科

通信作者:颜华,Email:phuyan2000@163.com

inflammation and pathological scores of retina were performed based on the criteria of Caspi on the 21st day after injection. The apoptosis of retinal cells was assayed by TUNEL staining, and the relative expressions of pro-inflammatory cytokines interferon- γ (IFN- γ), interleukin-17A (IL-17A), IL-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) and signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1), STAT3, p-STAT1, p-STAT3 in mouse retinas were detected by Western blot. **Results** Compared with the model control group, the inflammation scores and pathological scores of retinal inflammation were significantly reduced in the chrysin group (inflammation scores: 0.50 ± 0.45 vs 1.58 ± 0.92 , $t = 2.600$, $P = 0.026$; pathologic scores: 0.58 ± 0.38 vs 1.83 ± 0.75 , $t = 3.638$, $P = 0.005$). The infiltration of a large number of inflammatory cells, retinal vasculitis and granulomatous lesions were found in mouse retinas in the model control group, however, the morphology of mouse retinas in the chrysin group was normal based on hematoxylin-eosin staining. The number of apoptotic cells was remarkable lessened in the chrysin group compared with the model control group under the fluorescence microscope. Western blot assay resolved that significantly down-regulation in the expressions of IFN- γ , IL-17A, IL-6 and TNF- α was seen in the chrysin group in comparison with the model control group ($t = 7.802$, $P = 0.001$; $t = 14.906$, $P = 0.000$; $t = 10.241$, $P = 0.001$; $t = 3.304$, $P = 0.030$), and the relative expression levels of STAT1, STAT3, p-STAT1 and p-STAT3 were considerably lower in the chrysin group than those in the model control group ($t = 8.965$, $P = 0.001$; $t = 8.358$, $P = 0.001$; $t = 4.864$, $P = 0.031$; $t = 4.730$, $P = 0.009$). **Conclusions** Chrysin or chrysin-like flavonoids ameliorate intraocular inflammatory symptoms in EAU mice by inhibiting the activity of STAT signal pathway.

[Key words] Flavonoids/pharmacology; Immunosuppressive agents/pharmacology; Autoimmune diseases; Uveitis/immunology; Disease models, animal; Signal transducer and activator of transcription; T-lymphocytes/drug effects

葡萄膜炎是一种严重威胁视力的复杂眼病, 20 ~ 59 岁人群的发病率较高^[1]。根据病因可将葡萄膜炎分为感染性葡萄膜炎和非感染性葡萄膜炎两大类。目前, 睫状肌麻痹剂和糖皮质激素的应用是治疗非感染性葡萄膜炎的主要手段。研究表明, 运用免疫抑制剂及一些生物制剂, 如环孢素 A、环磷酰胺和英夫利昔单抗等, 对非感染性葡萄膜炎疗效较好^[2-6], 但免疫抑制剂作为非生物制剂, 特异性差, 且具有较明显的全身不良反应^[7], 因此寻求不良反应小、疗效确切且稳定的药物成为目前葡萄膜炎研究的热点。白杨素即 5, 7-二羟基黄酮, 是一种天然黄酮类化合物, 广泛存在于蜂蜜、蜂胶及多种植物中^[8], 生物学作用广泛, 包括抗肿瘤、抗炎、抗过敏及抗氧化应激等^[9], 其中抗炎作用在多种炎症疾病动物模型中得到验证, 且尚未发现其毒性的报道^[10-14]。实验性自身免疫性葡萄膜炎 (experimental autoimmune uveitis, EAU) 是一种经典的眼部自身免疫性疾病的动物模型, 白杨素对其是否有抗炎作用目前鲜见报道。本研究探讨白杨素对 EAU 的治疗作用及其机制, 为临床治疗葡萄膜炎提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 光间受体视黄类物质结合蛋白₁₋₂₀ (interphotoreceptor retinoid binding protein₁₋₂₀, IRBP₁₋₂₀)

(纯度 > 95%) (上海生工生物工程有限公司); 结核分枝杆菌 H37RA (美国 Difco 公司); 百日咳毒素干粉 (美国 List Laboratory 公司); 完全弗氏佐剂 (complete Freund adjuvant, CFA) (美国 Sigma 公司); 白杨素 (纯度 > 99%) (美国 Acros Organics 公司); 兔抗人白细胞介素 (interleukin, IL)-17A 抗体 (ab79056, 1:1 000)、兔抗小鼠 IL-6 抗体 (ab83339, 1:1 000)、小鼠抗人信号传导与转录激活子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 抗体 (ab119352, 1:5 000) (英国 Abcam 公司); 小鼠抗大鼠 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 抗体 (GTX74863, 1:500)、兔抗大鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 抗体 (GTX74120, 1:1 000) (美国 GeneTex 公司); 兔抗人 STAT1 抗体 (#9172S, 1:1 000)、兔抗人 p-STAT1 抗体 (#7649S, 1:250)、小鼠抗小鼠 p-STAT3 抗体 (#4113S, 1:2 000) (美国 CST 公司); 小鼠抗人 β -actin 抗体 (TA-09, 1:1 000) (北京中杉金桥生物技术有限公司); 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 二抗 (E030120-02)、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 二抗 (E030110-02) (美国 EarthOx 公司); TUNEL 凋亡检测试剂盒 (德国 Roche 公司)。

1.1.2 实验动物 6 ~ 8 周龄雌性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 30 只, 体质量 15 ~ 20 g, 购自中国军事医学科学院实验动物研究所。小鼠饲养于标准化动物房, 标准颗粒饲料喂养, 自由饮水摄食, 室温为 (22 \pm 2) $^{\circ}$ C, 相对

湿度为 40% ~ 60%。适应性饲养 2 ~ 7 d 后用于实验。本实验严格遵循天津医科大学实验动物管理伦理委员会相关规定,实验动物的喂养和使用符合实验动物伦理道德规范。

1.2 方法

1.2.1 小鼠 EAU 模型的建立 用 PBS 将 IRBP₁₋₂₀ 稀释至 1.5 g/L,然后将稀释液与等容积溶解 1.5 g/L 结核分枝杆菌 H37RA 的 CFA 混合,用注射器乳化至油包水状态,制备抗原乳剂,以上操作在低温、避光、无菌条件下进行。选择每只小鼠任意一侧后足掌垫、尾根两侧及后臀部皮下注射乳化的 IRBP₁₋₂₀ 共 300 μ g,同时腹腔内注射 1 μ g 百日咳菌液以增强免疫效果。免疫当天记作实验第 0 天。采用随机数字表法将小鼠分为模型对照组和白杨素组,每组 15 只。

1.2.2 白杨素对小鼠 EAU 模型的干预 白杨素以 10 μ l 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) + 140 μ l PBS 溶解。自免疫前 3 d 对白杨素组小鼠进行灌胃给药,每日 1 次,剂量为 25 mg/kg,直至免疫后第 21 天。模型对照组小鼠以空白溶媒灌胃,方法同白杨素组。

1.2.3 小鼠 EAU 模型视网膜炎症评分 自免疫后第 12 天每日观察 2 个组小鼠眼底情况。用复方托吡卡胺滴眼液点眼充分扩瞳,使用双目间接检眼镜辅以 +90D 前置镜在暗室内检查。于免疫后第 21 天对小鼠眼底损伤进行视网膜炎症评分,参照 Caspi 对小鼠 EAU 的眼底评分标准^[15]:0 分:未发现明显眼底改变;0.5 分:可见周边部视网膜 1 ~ 2 个小的病灶,有轻微血管炎或玻璃体炎;1 分:小的局部病灶 < 5 个,1 个线性病理损害,有轻度血管炎;2 分:脉络膜视网膜病理损害 > 5 个,有或无渗出,血管变粗,管壁增厚,线性病理损害 < 5 个;3 分:可见大片融合的病理损害,有视网膜下新生血管、视网膜出血及视盘水肿;4 分:大面积视网膜脱离,可见视网膜萎缩灶。

1.2.4 小鼠 EAU 模型的组织病理学评分 于免疫后第 21 天过量麻醉法处死小鼠 5 只,摘除左侧眼球,用质量分数 10% 甲醛 + 质量分数 5% 冰乙酸溶液固定,然后脱水、透明、浸蜡、冷却并包埋成石蜡块,用石蜡切片机连续 5 μ m 厚切片,常规苏木精-伊红染色,光学显微镜下观察并拍照。参照 Caspi 的评分标准对小鼠视网膜损伤进行组织病理学评分^[15]:0 分:未发现视网膜有明显的组织病理学改变;0.5 分:视网膜有轻度炎性细胞浸润,无组织结构损伤;1 分:可见视网膜炎性细胞浸润、视网膜皱褶和局部视网膜脱离,脉络膜和视网膜内见少量小肉芽肿,出现血管周围炎;2 分:可见视网膜中度炎性细胞浸润、视网膜皱褶、视网膜脱离和

局部光感受器细胞层结构紊乱、炎性细胞浸润,有小到中等大小的肉芽肿形成,出现血管周围炎和血管炎;3 分:视网膜中度到重度炎性细胞浸润,有广泛的视网膜皱褶伴脱离,中度光感受器细胞层结构紊乱、炎性细胞浸润,可见中等大小的肉芽肿,出现视网膜下新生血管;4 分:视网膜重度炎性细胞浸润,可见弥漫的视网膜脱离伴随浆液性渗出和视网膜下出血、广泛的光感受器细胞破坏、大的肉芽肿性病灶及视网膜下新生血管形成。

1.2.5 TUNEL 法检测小鼠视网膜细胞凋亡 于免疫后第 21 天过量麻醉法处死小鼠 5 只,摘取左侧眼球,立即浸于液氮中冷冻 10 ~ 15 s,包埋后冷冻于 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱,15 min 后取出,冰冻切片机 5 μ m 厚连续切片,复温后固定,TUNEL 反应混合液室温孵育 1 h, PBS 洗涤,用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染核 1 min,然后用防荧光淬灭的封片剂封片,激光扫描共焦显微镜下观察并拍照。

1.2.6 Western blot 法检测视网膜中炎症因子的相对表达量 于免疫后第 21 天过量麻醉法处死小鼠 5 只,摘除双侧眼球,显微镜下沿角巩膜缘剪去角膜,去除晶状体和玻璃体,分离视网膜组织,用裂解液提取视网膜组织总蛋白,双辛丁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法测定蛋白质量浓度,根据蛋白质量浓度调整上样,然后电泳、转膜,添加相应一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBS-T 洗后用相应二抗常温孵育 1 h,采用电化学发光试剂盒显像。应用 Image J 分析软件测定灰度值,以 β -actin 为内参。目的蛋白相对表达量 = 目的炎症因子蛋白灰度值 / β -actin 灰度值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 进行统计分析。本研究计量指标的数据资料经 Kolmogorov-Smirnov 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用完全随机分组单因素干预两水平实验设计,模型对照组与白杨素组间小鼠视网膜炎症评分、组织病理学评分和炎性细胞因子表达量的差异比较采用独立样本 *t* 检验。采用双尾检测法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠视网膜炎症评分比较

实验中未发现模型鼠脱毛或非正常死亡等不良反应。免疫后第 12 天,模型对照组小鼠周边部视网膜开始出现点状炎性渗出,随着免疫后时间的延长,点状渗出逐渐增多,并逐渐融合成线性病理损害;免疫后第

21 天,小鼠视网膜出现多处渗出性病灶,血管迂曲,血管周围可见白色渗出。模型对照组和白杨素组小鼠视网膜炎症评分分别为 1.58 ± 0.92 和 0.50 ± 0.45 ,与模型对照组小鼠相比,白杨素组小鼠起病晚,免疫后第 21 天,视网膜渗出较轻,未发现明显的血管炎表现,视网膜炎症评分显著降低,差异有统计学意义 ($t = 2.600, P = 0.026$) (图 1)。

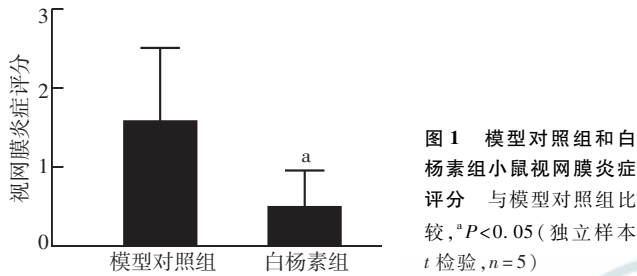


图 1 模型对照组和白杨素组小鼠视网膜炎症评分与模型对照组比较, $^a P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n = 5$)

2.2 各组小鼠视网膜组织病理学表现

苏木精-伊红染色结果显示,模型对照组小鼠玻璃体腔内可见大量炎性细胞浸润,视网膜血管炎症反应严重,视网膜组织有肉芽肿性病变(图 2A);白杨素组玻璃体腔未见明显炎性细胞浸润,视网膜各层结构清晰,排列整齐,形态大致正常(图 2B)。模型对照组和白杨素组小鼠视网膜组织病理学评分分别为 1.83 ± 0.75 和 0.58 ± 0.38 ,与模型对照组相比,白杨素组小鼠视网膜组织病理学评分显著降低,差异有统计学意义 ($t = 3.638, P = 0.005$) (图 3)。

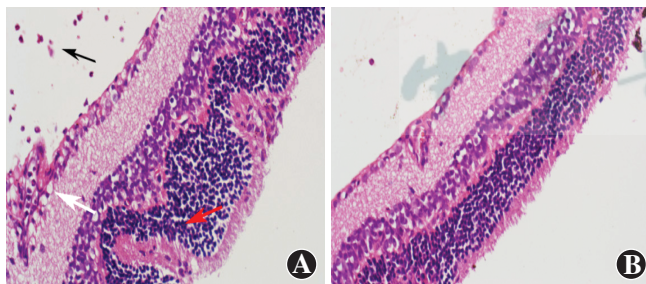


图 2 模型对照组和白杨素组小鼠视网膜的组织病理学检查 (HE $\times 200$) A:模型对照组小鼠玻璃体内大量炎性细胞浸润(黑色箭头),血管周围炎性细胞浸润,视网膜组织结构紊乱,出现血管炎(白色箭头)及肉芽肿样病灶(红色箭头) B:白杨素组小鼠视网膜各层结构清晰,玻璃体腔未见明显炎性细胞浸润

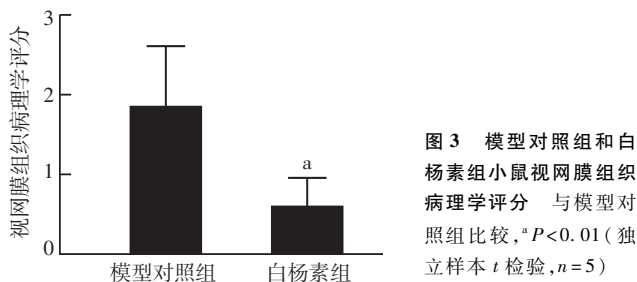


图 3 模型对照组和白杨素组小鼠视网膜组织病理学评分与模型对照组比较, $^a P < 0.01$ (独立样本 t 检验, $n = 5$)

2.3 各组小鼠视网膜细胞凋亡情况

TUNEL 染色结果显示,凋亡细胞的细胞核对 TUNEL 反应混合液呈红色荧光,同时对 DAPI 染色呈蓝色荧光,TUNEL 与 DAPI 双染后细胞核呈紫色荧光。模型对照组小鼠视网膜中呈紫色荧光着色的凋亡细胞数较多(图 4A),而白杨素组小鼠的视网膜凋亡细胞数较少(图 4B)。

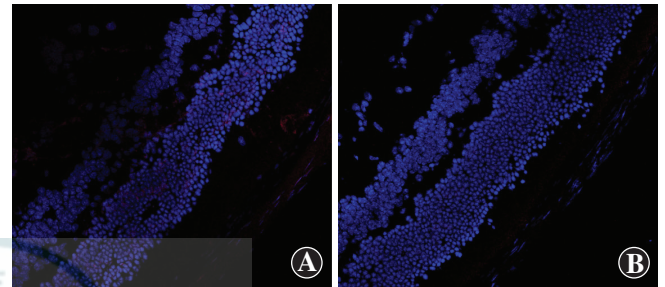


图 4 模型对照组和白杨素组小鼠视网膜细胞凋亡表现 (TUNEL/DAPI $\times 200$) A:模型对照组小鼠可见大量视网膜细胞凋亡,凋亡细胞呈紫色荧光 B:白杨素组小鼠凋亡的视网膜细胞数较少

2.4 各组小鼠视网膜中炎性细胞因子的相对表达量

Western blot 法检测结果显示,白杨素组小鼠视网膜中促炎因子 IFN- γ 、IL-17A、IL-6 和 TNF- α 蛋白的相对表达量分别为 2.60 ± 0.16 、 0.58 ± 0.03 、 0.40 ± 0.01 和 1.98 ± 0.17 ,明显低于模型对照组的 3.99 ± 0.66 、 1.12 ± 0.06 、 0.51 ± 0.02 和 2.70 ± 0.34 ,差异均有统计学意义 ($t = 7.802, P = 0.001$; $t = 14.906, P = 0.000$; $t = 10.241, P = 0.001$; $t = 3.304, P = 0.030$) (图 5);白杨素组小鼠视网膜中 STAT1、p-STAT1、STAT3 和 p-STAT3 蛋白的相对表达量分别为 0.34 ± 0.05 、 0.31 ± 0.01 、 0.27 ± 0.03 和 0.37 ± 0.05 ,明显低于模型对照组的

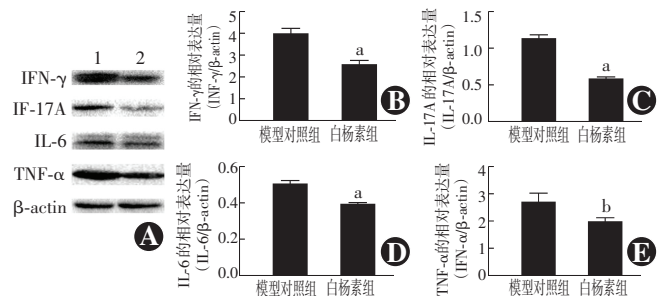


图 5 模型对照组和白杨素组小鼠视网膜中 IFN- γ 、IL-17A、IL-6 和 TNF- α 的相对表达量 A:模型对照组及白杨素组小鼠视网膜中 IFN- γ 、IL-17A、IL-6、TNF- α 蛋白表达的 Western blot 法检测电泳图 1:模型对照组 2:白杨素组 B:2 个组小鼠视网膜中 IFN- γ 蛋白的相对表达量比较 C:2 个组小鼠视网膜中 IL-17A 蛋白的相对表达量比较 D:2 个组小鼠视网膜中 IL-6 蛋白的相对表达量比较 E:2 个组小鼠视网膜中 TNF- α 蛋白的相对表达量比较 与各自的模型对照组比较, $^a P < 0.01$, $^b P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n = 5$) IFN- γ : γ 干扰素;IL:白细胞介素;TNF:肿瘤坏死因子

0.65±0.03、0.39±0.03、0.55±0.05 和 0.73±0.12, 差异均有统计学意义 ($t=8.965, P=0.001; t=4.864, P=0.031; t=8.358, P=0.001; t=4.730, P=0.009$) (图 6)。

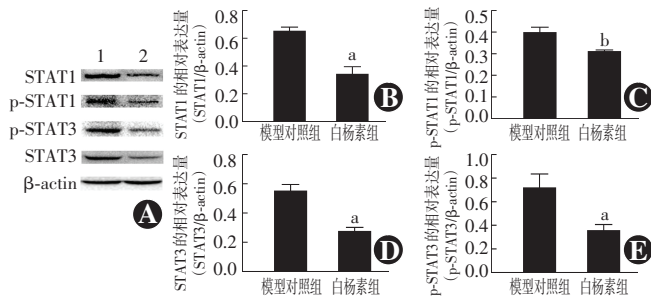


图 6 模型对照组和白杨素组小鼠视网膜中 STAT1、p-STAT1、STAT3 和 p-STAT3 的相对表达量 A: 模型对照组及白杨素组小鼠视网膜中 STAT1、p-STAT1、STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达的 Western blot 法检测电泳图 1: 模型对照组 2: 白杨素组 B: 2 个组小鼠视网膜中 STAT1 蛋白的相对表达量比较 C: 2 个组小鼠视网膜中 p-STAT1 蛋白的相对表达量比较 D: 2 个组小鼠视网膜中 STAT3 蛋白的相对表达量比较 E: 2 个组小鼠视网膜中 p-STAT3 蛋白的相对表达量比较 与各自的模型对照组比较, $^a P < 0.01, ^b P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n=5$) STAT: 信号传导与转录激活子

3 讨论

IRBP/CFA 诱导的小鼠 EAU 模型是研究人类葡萄膜炎的经典动物模型, 为人类葡萄膜炎临床特点、组织病理学表现、病理机制及治疗手段的研究提供了有用的工具。早期对于 EAU 动物模型的研究发现, Th1 细胞亚群是 EAU 的主要效应 T 淋巴细胞, 而随后的研究则逐渐揭示 Th17 细胞亚群在 EAU 发病中的重要作用, 二者作为主要效应 T 细胞, 在 EAU 的发病过程中发挥重要作用^[16-17]。Th1 细胞是由原始 T 细胞在 IFN- γ 、IL-12 的作用下分化而来的一类辅助 T 淋巴细胞亚群, Th17 细胞是在 IL-6 和转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 的共同作用下由原始 T 细胞分化而来的一类辅助 T 淋巴细胞亚群。Th1 细胞分泌 IFN- γ , 而 Th17 细胞分泌 IL-17, 二者能够募集单核巨噬细胞到达炎症反应发生部位, 引起组织损伤。IFN- γ 是 JAK/STAT 信号转导通路的激活因子, 能够通过激活 JAK1、JAK2, 募集 STAT1, 并促进 STAT1 发生 Y⁷⁰¹ 位点的磷酸化, 形成 p-STAT1^[18]。STAT1 的磷酸化促进 STAT 二聚体的形成, STAT1 途径被激活, 诱导 STAT1 途径依赖的 Th1 细胞分化特异性转录因子 T-bet 上调, 促进原始 T 细胞向 Th1 细胞分化^[19]。另外, STAT1 途径的激活可促进细胞凋亡, 激活免疫系统, 促进 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等炎症因子的释放, 诱发炎症反应。除 IFN- γ 外, IL-6、TNF- α 也是 STAT1 途径重要的激活因子。原始 T 细胞向 Th17

细胞的分化主要依赖于 IL-6 等细胞因子激活 STAT3 途径, 促进 STAT3 磷酸化形成 p-STAT3, 诱导激活视黄醛相关的孤儿受体 γ t (retinal orphan receptor gamma t, ROR- γ t)^[20]。ROR- γ t 是 Th17 细胞发育所必需的一类转录因子, 在 ROR- γ t 的作用下, 原始 T 细胞向 Th17 细胞分化, 分泌 IL-17, 募集炎症细胞至免疫损伤部位。

黄酮类化合物白杨素具有广泛的生物学活性^[9]。研究表明, 白杨素对某些炎症性疾病有治疗作用, 然而其抗炎机制尚未明确, 且白杨素对 EAU 的作用尚不清楚, 仍需进一步研究。本研究通过建立 IRBP/CFA 诱导的小鼠 EAU 模型并每日给予白杨素灌胃治疗, 发现服用白杨素的小鼠视网膜炎症评分降低, 玻璃体及视网膜的炎性细胞浸润减轻, 说明白杨素能保护视网膜的组织结构免受炎症细胞的破坏, 提示白杨素对 EAU 有治疗作用。研究表明, 白杨素能够通过促进细胞凋亡而抑制肿瘤细胞生长^[21], 为了明确白杨素抑制 EAU 小鼠视网膜炎性细胞浸润的作用是否通过促进炎症细胞凋亡所致, 本研究利用 TUNEL 法对小鼠视网膜细胞凋亡情况进行评估, 结果表明白杨素并不能促进 EAU 小鼠视网膜细胞的凋亡, 提示其对 EAU 的治疗作用并非是通过促进炎症细胞凋亡途径而实现的。为了进一步明确白杨素对 EAU 的作用机制, 本研究中对小鼠视网膜中 Th1 细胞及 Th17 细胞分泌相应炎症因子及转录因子的表达量进行检测, 结果表明白杨素能够抑制 JAK-STAT 途径激活因子 IFN- γ 、IL-6、TNF- α 的表达, 抑制 STAT1、STAT3 的磷酸化, 从而抑制效应 T 细胞 Th1、Th17 细胞分泌 IFN- γ 和 IL-17A。Th1 细胞分泌的以 IFN- γ 为代表的细胞因子和 Th17 细胞分泌的以 IL-17 为代表的细胞因子在 EAU 小鼠模型中显著升高, 且其升高程度与疾病的严重程度相关, 以往研究显示, EAU 经治疗后 IFN- γ 和 IL-17 显著下降^[22], 与本研究结果一致, 表明白杨素对 EAU 的治疗有效。

综上所述, 白杨素对小鼠的 EAU 有良好的治疗效果, 其作用机制可能与抑制 STAT 途径的激活有关。

参考文献

- [1] Chang JH, Wakefield D. Uveitis: a global perspective [J]. Ocul Immunol Inflamm, 2002, 10(4): 263-279.
- [2] Cervantes-Castañeda RA, Gonzalez-Gonzalez LA, Cordero-Coma M, et al. Combined therapy of cyclosporine A and mycophenolate mofetil for the treatment of birdshot retinochoroidopathy: a 12-month follow-up [J]. Br J Ophthalmol, 2013, 97(5): 637-643. doi: 10.1136/bjophthalmol-2012-302123.
- [3] Davatchi F, Sadeghi Abdollahi B, Shams H, et al. Combination of pulse cyclophosphamide and azathioprine in ocular manifestations of Behcet's disease: longitudinal study of up to 10 years [J]. Int J Rheum Dis, 2014, 17(4): 444-452. doi: 10.1111/1756-185X.12248.
- [4] Al-Rayes H, Al-Swailem R, Al-Balawi M, et al. Safety and efficacy of

- infiximab therapy in active behcet's uveitis; an open-label trial [J]. *Rheumatol Int*, 2008, 29(1): 53-57. doi:10.1007/s00296-008-0606-8.
- [5] Niccoli L, Nannini C, Benucci M, et al. Long-term efficacy of infiximab in refractory posterior uveitis of Behcet's disease: a 24-month follow-up study [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2007, 46(7): 1161-1164. doi:10.1093/rheumatology/kem101.
- [6] Sobrin L, Kim EC, Christen W, et al. Infiximab therapy for the treatment of refractory ocular inflammatory disease [J]. *Arch Ophthalmol*, 2007, 125(7): 895-900. doi:10.1001/archoph.125.7.895.
- [7] Wakefield D. Does cyclophosphamide still have a role in the treatment of severe inflammatory eye disease? [J]. *Ocul Immunol Inflamm*, 2014, 22(4): 306-310. doi:10.3109/09273948.2013.854395.
- [8] Lv PC, Cai TT, Qian Y, et al. Synthesis, biological evaluation of chrysin derivatives as potential immunosuppressive agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2011, 46(1): 393-398. doi:10.1016/j.ejmech.2010.10.034.
- [9] Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer [J]. *Pharmacol Rev*, 2000, 52(4): 673-751.
- [10] Shin EK, Kwon HS, Kim YH, et al. Chrysin, a natural flavone, improves murine inflammatory bowel diseases [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 381(4): 502-507. doi:10.1016/j.bbrc.2009.02.071.
- [11] Dou W, Zhang J, Zhang E, et al. Chrysin ameliorates chemically induced colitis in the mouse through modulation of a PXR/NF- κ B signaling pathway [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2013, 345(3): 473-482. doi:10.1124/jpet.112.201863.
- [12] Du Q, Gu X, Cai J, et al. Chrysin attenuates allergic airway inflammation by modulating the transcription factors T-bet and GATA-3 in mice [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(1): 100-104. doi:10.3892/mmr.2012.893.
- [13] Bae Y, Lee S, Kim SH. Chrysin suppresses mast cell-mediated allergic inflammation: involvement of calcium, caspase-1 and nuclear factor- κ B [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2011, 254(1): 56-64. doi:10.1016/j.taap.2011.04.008.
- [14] Xiao J, Zhai H, Yao Y, et al. Chrysin attenuates experimental autoimmune neuritis by suppressing immuno-inflammatory responses [J]. *Neuroscience*, 2014, 262: 156-164. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.01.004.
- [15] Agarwal RK, Silver PB, Caspi RR. Rodent models of experimental autoimmune uveitis [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 900: 443-469. doi:10.1007/978-1-60761-720-4_22.
- [16] Su SB, Grajewski RS, Luger D, et al. Altered chemokine profile associated with exacerbated autoimmune pathology under conditions of genetic interferon-gamma deficiency [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48(10): 4616-4625. doi:10.1167/iovs.07-0233.
- [17] Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages [J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(11): 1123-1132. doi:10.1038/nri1254.
- [18] Gambin A, Charzynska A, Ellert-Miklaszewska A, et al. Computational models of the JAK1/2-STAT1 signaling [J/OL]. *JAKSTAT*, 2013, 2(3): e24672 [2015-03-09]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3772111/>. doi:10.4161/jkst.24672.
- [19] Weinmann AS. Regulatory mechanisms that control T-follicular helper and T-helper 1 cell flexibility [J]. *Immunol Cell Biol*, 2014, 92(1): 34-39. doi:10.1038/icb.2013.49.
- [20] Li P, Spolski R, Liao W, et al. Complex interactions of transcription factors in mediating cytokine biology in T cells [J]. *Immunol Rev*, 2014, 261(1): 141-156. doi:10.1111/imr.12199.
- [21] Pal-Bhadra M, Ramaiah MJ, Reddy TL, et al. Plant HDAC inhibitor chrysin arrest cell growth and induce p21WAF1 by altering chromatin of STAT response element in A375 cells [J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 180 [2015-02-10]. <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/12/180>. doi:10.1186/1471-2407-12-180.
- [22] Wang RX, Yu CR, Mahdi RM, et al. Novel IL27p28/IL12p40 cytokine suppressed experimental autoimmune uveitis by inhibiting autoreactive Th1/Th17 cells and promoting expansion of regulatory T cells [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(43): 36012-36021. doi:10.1074/jbc.M112.390625.

(收稿日期:2015-04-18)

(本文编辑:尹卫靖 杜娟)

· 病例报告 ·

双眼泪道痿合并双侧先天性骨性鼻泪管发育异常一例

张诚玥 于刚 张燕 白雪晴 崔燕辉 胡曼 李程

患儿,男,3岁,出生后双眼流泪伴有黏液脓性分泌物,同时双眼内眦部皮肤表面分别可见1个小孔,间断有黏液自小孔处溢出(图1)。患儿曾于外院就诊并行泪道探通术2次,术后上述症状未消失。眼部检查:患儿双眼内眦部偏内下方分别存在直径约1mm的圆孔,周围可见少量黄色沉着物。压迫双眼泪囊区可见黏液脓性分泌物自上、下泪小点

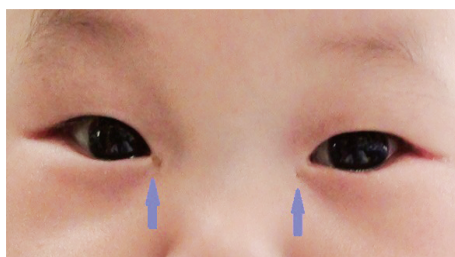


图1 患儿双眼内眦偏内下方分别可见1个小孔(箭头)

返出。泪道冲洗检查显示患儿双眼泪道阻塞,同时可见少量冲洗液自患儿双眼内眦部的小圆孔返流。分别自上泪小点及皮肤痿口处注入造影剂后行CT泪囊造影,未明确显示泪道痿的走行及其与皮肤面相对应的另一端开口位置。CT影像显示双侧骨性鼻泪管中段明显狭窄,在下段骨性鼻泪管出现骨性闭锁(图2~4)。患儿其他眼部检查未见明显异常,无类似病变家族史,无鼻炎、鼻窦炎等病史,无系统性疾病病史,无外伤史,除2次泪道探通手术外无其他颜面部及眼部手术史。患儿在全身麻醉下接受了双侧经鼻鼻腔泪囊吻合手术。1年后随访时双眼溢泪伴黏液脓性分泌物等症状消失,双侧泪道痿皮肤开口处未见黏液返流。

讨论:先天性泪道痿是一种少见的先天性泪道发育异常,

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.07.003

基金项目:北京市优秀人才培养项目(青年骨干个人)(2014000021469G241)

作者单位:100045 北京,首都医科大学附属北京儿童医院眼科 儿科学国家重点学科

通信作者:于刚,Email:ykyg0202@vip.163.com