

引文格式:张楚,朱子诚,应充慧,展欣,刘夏薇. 葡萄膜炎并发白内障患者晶状体前囊膜中 NLRP3 炎症小体相关蛋白的表达和前囊膜超微结构改变[J]. 眼科新进展,2020,40(7):638-641. doi: 10.13389/j. cnki. rao. 2020. 0146

【应用研究】

# 葡萄膜炎并发白内障患者晶状体前囊膜中 NLRP3 炎症小体相关蛋白的表达和前囊膜超微结构改变<sup>△</sup>

张楚 朱子诚 应充慧 展欣 刘夏薇

作者简介:张楚,男,1994年6月出生,安徽合肥人,在读硕士研究生。E-mail:294109156@qq.com; ORCID:0000-0002-6661-9856  
通信作者:朱子诚,男,1968年出生,安徽阜阳人,博士,副主任医师。主要研究方向:眼外伤、眼屈光、眼底病及白内障的基础与临床研究。E-mail:zczhu123@163.com; ORCID:0000-0002-2992-1466  
收稿日期:2019-08-22  
修回日期:2019-10-15  
本文编辑:董建军  
△基金项目:安徽省自然科学基金资助(编号:1508085MH188);安徽省教育厅教学研究项目(编号:2016jyxm0546)  
作者单位:230001 安徽省合肥市,安徽医科大学附属省立医院眼科

【摘要】 目的 探究葡萄膜炎并发白内障患者晶状体前囊膜中 NLRP3 炎症小体相关蛋白的表达和前囊膜超微结构改变。方法 随机选取2018年8月至2019年6月在我院诊治的葡萄膜炎并发白内障患者17例(22眼)作为试验组;老年性白内障患者10例(18眼)作为对照组。均于白内障超声乳化手术中环形撕囊获取前囊膜。采用免疫组织化学法检测两组患者晶状体前囊膜 NLRP3 炎症小体的三个组成结构 NLRP3、Caspase-1 和接头蛋白 ASC 的蛋白表达,并对前囊膜进行电镜观察。结果 两组患者晶状体前囊膜中均有 NLRP3 炎症小体相关蛋白的表达;试验组晶状体前囊膜中 NLRP3、Caspase-1 及接头蛋白 ASC(光密度值分别为  $0.383 \pm 0.067$ 、 $0.313 \pm 0.058$ 、 $0.335 \pm 0.035$ )表达水平均明显高于对照组(光密度值分别为  $0.330 \pm 0.085$ 、 $0.271 \pm 0.039$ 、 $0.268 \pm 0.036$ )(均为  $P < 0.05$ )。试验组患者前囊膜的晶状体上皮细胞可见明显的细胞核固缩,染色质浓缩边集,细胞核膜皱褶、轻度增宽,线粒体形态基本正常、部分线粒体嵴突消失,细胞质中可见典型的凋亡小体。对照组有轻度凋亡改变。结论 NLRP3 炎症小体可能参与了葡萄膜炎并发白内障的发病过程,细胞凋亡是葡萄膜炎并发白内障的重要病理改变。  
【关键词】 葡萄膜炎;白内障;NLRP3 炎症小体;细胞凋亡  
【中图分类号】 R773

葡萄膜炎并发白内障是严重的眼科疾病,可引起视力障碍甚至致盲<sup>[1]</sup>。近年来研究发现,葡萄膜炎患者的前囊膜晶状体上皮细胞靠近前房,容易受到眼内炎症因子影响。晶状体上皮细胞是晶状体纤维与房水间的调解屏障,起到调节离子浓度和水分积聚的作用,因而其结构功能变化被认为是白内障发展的细胞基础<sup>[2]</sup>。由此推测,葡萄膜炎并发白内障患者晶状体上皮细胞可能存在结构改变。

NLRP3 炎症小体是由 Caspase-1 前体与 NLRP3 通过接头蛋白 ASC 组成。Caspase-1 前体自身活化后,促进炎症因子白细胞介素(interleukin, IL)-1 $\beta$ 、IL-18 释放,从而进一步加重炎症反应。研究发现, NLRP3 炎症小体参与一些眼科疾病,如糖尿病性视网膜病变、年龄相关性白内障、葡萄膜炎等的发病过程<sup>[3-5]</sup>。本研究探讨葡萄膜炎并发白内障患者晶状体前囊膜中 NLRP3 炎症小体相关蛋白的表达情况,以及前囊膜超微结构变化。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

#### 1.1.1 研究对象以及分组

随机选取2018年8月至2019年6月我院眼科住院部收治的葡萄膜炎并发白内障患者17例(22眼)作为试验组,老年性白内障患者10例(18眼)作为对照组。均于白内障超

声乳化手术中环形撕囊获取前囊膜。纳入标准依据2016年中华医学会制定的《葡萄膜炎并发白内障患者的诊断与治疗标准》。排除葡萄膜炎继发青光眼、葡萄膜炎合并糖尿病、葡萄膜炎合并高度近视的患者;排除受糖尿病、器官损伤以及高血压影响或受年龄、工作性质、生活环境、病情严重程度、性别以及生活习惯等因素影响的患者。上述病例均无长期眼科用药史。在手术前所有葡萄膜炎患眼炎症反应安静期均大于3个月。本研究方案获得安徽医科大学附属医院伦理委员会批准,患者均签署知情同意书。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

兔抗人 Caspase-1 抗体(巴傲得生物科技有限公司),兔抗人 NLRP3 抗体、兔抗人 ASC 抗体(北京博奥森生物技术有限公司),免疫组织化学二抗通用型 PV 6000、DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物科技有限公司),生物组织包埋机(湖北亚光公司),徕卡切片机(德国 Leica 公司),JEM1400 型透射电子显微镜(上海铸金分析仪器有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 免疫组织化学检测

将晶状体前囊膜上皮细胞组织取下后立即用石蜡包埋机进行包埋,把包埋好的标本置于液氮预冷2 min,随后置于-80℃低温冰箱保存。将石蜡切片用二甲苯脱蜡后置于酒精和蒸馏水中浸泡水化,PBS液浸泡;抗原高压修复。

切片浸入水中,倒入 EDTA 修复液后煮沸,随后修复约 2 min 后停止。冷却后滴加  $30\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}\text{H}_2\text{O}_2$ ,室温孵育 20 min,PBS 冲洗 3 遍,将切片甩干,加一抗,37℃孵育 60 min,PBS 冲 3 遍,甩干后加二抗孵育 30 min,PBS 冲 3 遍,DAB 显色。并运用图像分析软件(Image ProPlusV6.0)对 NLRP3、Caspase-1 和接头蛋白 ASC 蛋白的表达进行光密度分析。

**1.2.2 前囊膜超微结构观察** 将前囊膜放入戊二醛后于 5℃冰箱保存 24 h。使用 PBS 缓冲液漂洗后固定在  $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  四氧化锇中,固定后再次漂洗,乙醇脱水、固定后包埋,取出包埋块修整后超薄切片,片厚 70 nm,铜网捞片,铅、铀电子染色,于透射电镜下观察并摄片。

**1.3 统计学分析** 采用 SPSS 17.0 软件对数据进行分析,本研究测量指标数据呈正态分布,均采用均数±标准差表示。试验组和对照组间比较采用 *t* 检验。检验水准: $\alpha=0.05$ 。

2 结果

**2.1 两组患者晶状体前囊膜中 NLRP3 炎症小体相关蛋白的表达** 免疫组织化学检测显示,两组患者晶状体前囊膜中均有 NLRP3 炎症小体相关蛋白表达;试验组晶状体前囊膜中 NLRP3、Caspase-1 及接头蛋白 ASC 表达水平均明显高于对照组(均为  $P<0.05$ )。见图 1 至图 3 和表 1。

**2.2 两组患者前囊膜的超微结构情况** 试验组患者前囊膜的晶状体上皮细胞可见明显的细胞核固缩,染色质浓缩边集,细胞核膜皱褶、轻度增宽,线粒体形态基本正常、部分线粒体嵴突消失,细胞质中可见典型的凋亡小体。对照组有轻度凋亡改变。见图 4。

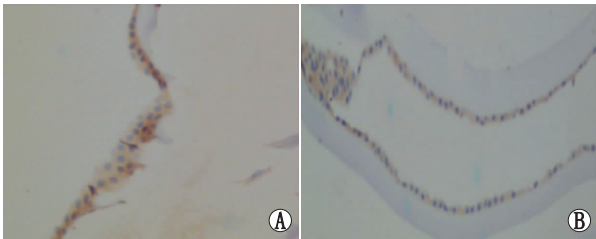


图1 NLRP3在晶状体前囊膜中的表达 A:对照组;B:试验组。放大倍数:×200

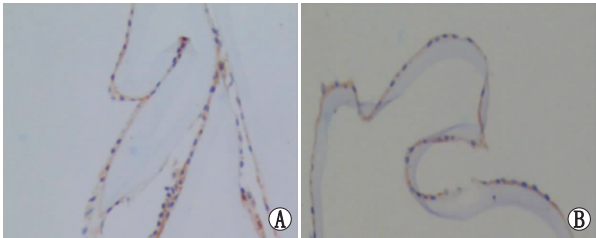


图2 Caspase-1在晶状体前囊膜中的表达 A:对照组;B:试验组。放大倍数:×200

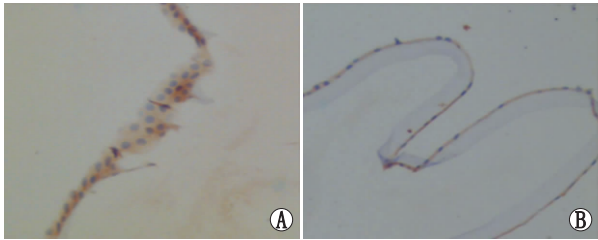


图3 接头蛋白 ASC 在晶状体前囊膜中的表达 A:对照组;B:试验组。放大倍数:×200

表1 两组患者晶状体前囊膜中 NLRP3、Caspase-1、接头蛋白 ASC 表达的光密度值

组别	光密度值		
	NLRP3	Caspase-1 蛋白	接头蛋白 ASC
试验组	0.383 ± 0.067 *	0.313 ± 0.058 *	0.335 ± 0.035 *
对照组	0.330 ± 0.085	0.271 ± 0.039	0.268 ± 0.036

注:与对照组比较,\* $P<0.05$

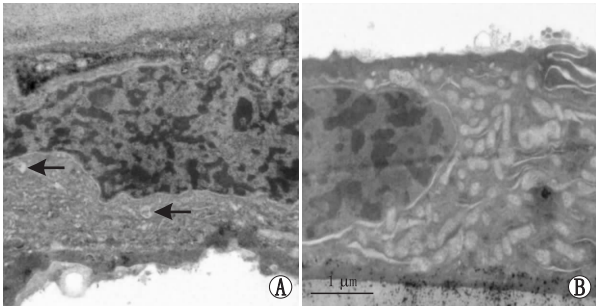


图4 电子显微镜下晶状体前囊膜超微结构 A:试验组患者前囊膜晶状体上皮细胞可见细胞凋亡改变,有典型的凋亡小体(箭头所示);B:对照组患者前囊膜晶状体上皮细胞形态多数正常,有轻度凋亡改变

3 讨论

已有研究表明,晶状体上皮细胞异常是白内障进展的基础,使用  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生氧化应激会促进上皮细胞凋亡导致白内障形成<sup>[6]</sup>。晶状体上皮细胞的氧化应激可以促使 NLRP3 介导的 IL-1 $\beta$  激活,说明 NLRP3 炎症小体可能与白内障的进展存在一定关系<sup>[7-8]</sup>。本研究结果显示,两组患者晶状体前囊膜中均有 NLRP3 炎症小体相关蛋白的表达,说明 NLRP3 炎症小体亦可能参与老年性白内障的发展。

目前,人们对葡萄膜炎的发病机制仍不明确,普遍猜测其最常见原因为自身免疫反应。已经证实葡萄膜炎发病与多种细胞因子有关,包括 IL-1、IL-6、IL-8、IL-23 等。其中 IL-1 $\beta$  最常见和最主要的来源是 NLRP3 炎症小体。研究证实,NLRP3 炎症小体与葡萄膜炎的发生有关<sup>[9]</sup>。IL-1 $\beta$  可以促进 VEGF 的产生,葡萄膜炎并发白内障患者的房水及血清中血管内皮生长因子的含量增多<sup>[10]</sup>。使用 IL-1 $\beta$  调节抗

体 XOMA052 可以有效治疗急性加重耐药型 Behcet 葡萄膜炎<sup>[11]</sup>, IL-18 与 Behcet 病的发生及疾病活动有关。在 HLA-B27 相关性葡萄膜炎患者的房水中, IL-18 含量增高, 且其与房水闪辉有关<sup>[12-13]</sup>。葡萄膜炎通过引起晶状体上皮细胞病理改变, 促进并发性白内障的进一步发展。但 NLRP3 炎症小体相关蛋白在葡萄膜炎并发白内障患者的晶状体上皮细胞是否表达尚未见文献报道。本研究结果显示, 试验组晶状体上皮细胞有 NLRP3 炎症小体相关蛋白的表达。说明 NLRP3 炎症小体与葡萄膜炎并发白内障的发病可能存在一定关系。

电镜观察可以了解细胞的超微结构改变, 以往的电镜观察发现, 晶状体上皮细胞的凋亡是白内障的发病机制之一<sup>[14-15]</sup>, 但关于葡萄膜炎并发白内障患者晶状体上皮细胞电镜观察研究较少。本研究结果显示, 电镜下, 试验组有明显的细胞凋亡变化, 说明细胞凋亡是葡萄膜炎并发白内障患者前囊膜中重要的病理改变。在细胞凋亡改变明显的试验组, NLRP3 炎症小体相关蛋白表达亦较高, 表明细胞凋亡与 NLRP3 炎症小体可能存在一定的相关性。

细胞焦亡是一种快速的炎症反应性的细胞死亡, 表现为早期细胞膜孔隙形成、细胞渗透性膨胀<sup>[16]</sup>。由于 NLRP3 在细胞焦亡与细胞凋亡中都起到重要作用<sup>[17]</sup>, 且细胞焦亡也可能是白内障发病的机制之一<sup>[18]</sup>, 因此 NLRP3 炎症小体通过细胞凋亡和细胞焦亡这两种途径来参与白内障的进展。以上研究显示, 在 NLRP3 炎症小体相关蛋白明显表达的试验组, 存在细胞焦亡改变。

## 参考文献

- [1] NUSSENBLATT R B. The natural history of uveitis[J]. *Int Ophthalmol*, 1990, 14(5-6):303-308.
- [2] LI D, LIU G Q, LU P R. High glucose: activating autophagy and affecting the biological behavior of human lens epithelial cells[J]. *Int J Ophthalmol*, 2019, 12(7):1061-1066.
- [3] DOYLE S L, CAMPBELL M, OZAKI E, SALOMON R G, MORI A, KENNA P F, et al. NLRP3 has a protective role in age-related macular degeneration through the induction of IL-18 by drusen components[J]. *Nat Med*, 2012, 18(5):791-798.
- [4] DEVI T S, LEE I, HÜTTEMANN M, KUMAR A, NANTWI K D, SINGH L P. TXNIP links innate host defense mechanisms to oxidative stress and inflammation in retinal Müller glia under chronic hyperglycemia: implications for diabetic retinopathy[J]. *Exp Diabetes Res*, 2012, 2012:1-19.
- [5] GONZÁLEZ-BENÍTEZ J F, JUÁREZ-VERDAYES M A, RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ S, CANCINO-DÍAZ M E, GARCÍA-VÁZQUEZ F, CANCINO-DÍAZ J C. The NALP3/cryopyrin-inflammasome complex is expressed in LPS-induced ocular inflammation[J]. *Mediators Inflamm*, 2008, 2008:614345.
- [6] MAO Y W, XIANG H, WANG J, KORSMEYER S, REDDAN J, LI D W. Human bcl-2 gene attenuates the ability of rabbit lens epithelial cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis through down-regulation of the alpha B-crystallin gene[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(46):43435-43445.
- [7] MARNEROS A G. NLRP3 inflammasome blockade inhibits VEGF-A-induced age-related macular degeneration[J]. *Cell Rep*, 2013, 4(5):945-958.
- [8] MARNEROS A G. Increased VEGF-A promotes multiple distinct aging diseases of the eye through shared pathomechanisms[J]. *EMBO Mol Med*, 2016, 8(3):208-231.
- [9] WAN C K, HE C, SUN L, EGWUAGU C E, LEONARD W J. Cutting edge, IL-1 receptor signaling is critical for the development of autoimmune uveitis[J]. *J Immunol*, 2016, 196(2):543-546.
- [10] PAROLI M P, TEODORI C, D'ALESSANDRO M, MARIANI P, IANNUCCI G, PAROLI M. Increased vascular endothelial growth factor levels in aqueous humor and serum of patients with quiescent uveitis[J]. *Eur J Ophthalmol*, 2007, 17(6):938-942.
- [11] GÜL A, TUGAL-TUTKUN I, DINARELLO C A, REZNIKOV L, ESEN B A, MIRZA A, et al. Interleukin-1 $\beta$ -regulating antibody XOMA 052 (gevokizumab) in the treatment of acute exacerbations of resistant uveitis of Behcet's disease: an open-label pilot study[J]. *Ann Rheum Dis*, 2012, 71(4):563-566.
- [12] MUSABAK U, PAY S, ERDEM H, SIMSEK I, PEKEL A, DINC A, et al. Serum interleukin-18 levels in patients with Behcet's disease. Is its expression associated with disease activity or clinical presentations? [J]. *Rheumatol Int*, 2006, 26(6):545-550.
- [13] ZHAO B, CHEN W, JIANG R, ZHANG R, WANG Y, WANG L, et al. Expression profile of IL-1 family cytokines in aqueous humor and sera of patients with HLA-B27 associated anterior uveitis and idiopathic anterior uveitis[J]. *Exp Eye Res*, 2015, 138:80-86.
- [14] OLTULU P, OLTULU R. The association of cataract and lens epithelial cell apoptosis in patients with pseudoexfoliation syndrome[J]. *Curr Eye Res*, 2018, 43(3):300-303.
- [15] LI G, SONG H, CHEN L, YANG W, NAN K, LU P. TUG1 promotes lens epithelial cell apoptosis by regulating miR-421/Caspase-3 axis in age-related cataract[J]. *Exp Cell Res*, 2017, 356(1):20-27.
- [16] FINK S L, COOKSON B T. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages[J]. *Cell Microbiol*, 2006, 8(11):1812-1825.
- [17] SAGULENKO V, THYGESEN S J, SESTER D P, IDRIS A, CRIDLAND J A, VAJJHALA P R, et al. AIM2 and NLRP3 inflammasomes activate both apoptotic and pyroptotic death pathways via ASC[J]. *Cell Death Differ*, 2013, 20(9):1149-1160.
- [18] JIN X, JIN H, SHI Y, GUO Y, ZHANG H. Pyroptosis, a novel mechanism implicated in cataracts[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(2):2277-2285.



**[Key words]** keratoconus; visual quality; objective scatter index; modulation transfer function cut off frequency; contrast vision