

单纯疱疹病毒性角膜炎中细胞凋亡的作用机制研究进展

宋晓燕 综述 钟良玉 审校

Research advances in mechanism of apoptosis in herpes simplex keratitis

Song Xiaoyan, Zhong Liangyu. Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China

Abstract Herpes simplex keratitis (HSK) is a serious and worldwide blinding corneal diseases. The pathogenesis is unclear now. In recent years, studies have shown that it is closely related with apoptosis. After corneal infection, corneal epithelial cells can be induced to apoptosis, following that, the apoptosis is inhibited. Immediately after epithelial insult, corneal stroma underlying the lesion of injury undergo apoptosis to retard extension of the virus into the deeper cornea. Following this event, corneal stroma sequentially occurs change at many patterns, including turbid, necrosis, scar formation, neovascularization, corneal endothelial cell reduce and so on. This review reveals the latest advances in the mechanism of apoptosis in corneal epithelium, stroma, endothelial cells in the course of HSK.

Key words herpes simpix keratitis; cornea; cell apoptosis; mechanism

摘要 单纯疱疹病毒性角膜炎(HSK)是一种严重的世界性致盲性角膜疾病,发病机制目前尚不明确。近年来的研究表明,该病的发病机制与细胞凋亡密切相关。病毒感染角膜后,可诱导角膜上皮细胞发生凋亡,随后抑制凋亡过程。同时亦可引起浅层基质发生细胞凋亡,以防止病毒从感染的上皮细胞传染至角膜深部。而当病变累及角膜深层时,常可发生角膜基质混浊、坏死、瘢痕形成、新生血管化以及角膜内皮皱褶等。就 HSK 发病过程中角膜上皮、基质、内皮发生细胞凋亡的机制进行综述。

关键词 单纯疱疹病毒性角膜炎; 角膜; 细胞凋亡; 机制

分类号 R 772. 21 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)05-0434-03

单纯疱疹病毒性角膜炎(herpes simplex keratitis, HSK)主要是由 I 型单纯疱疹病毒(herpes simplex virus type I, HSV-I)感染引起的炎症性疾病。病毒感染后可经多种机制引发疾病,包括 HSV-I 造成结构上的破坏、免疫及炎性机制等^[1]。随着分子生物学技术的发展,细胞凋亡越来越受到人们的重视,现将近年来国内外对细胞凋亡在 HSK 中的作用机制研究进展进行综述。

1 细胞凋亡概述

细胞凋亡是 1972 年 Kerr 等^[2]首先提出的一种不同于细胞坏死的细胞死亡方式,是指细胞接受某种信号或受到某些因素刺激后为了维持内环境稳定而发生的一种主动性消亡过程,是一种细胞的自杀性死亡。细胞凋亡可由紫外线或 γ 射线、化疗药物、病毒因素等刺激信号启动,随后,凋亡信号可通过外源性通路

(死亡受体通路)和内源性通路(线粒体通路)进行传导^[3]。其特征性表现为细胞膜内陷、磷脂酰丝氨酸暴露、膜泡化、细胞核片段化、胞浆浓缩、染色质凝聚、DNA 裂解、凋亡小体形成等^[4]。

现已发现多种基因对细胞凋亡具有调控作用。通常将这些基因分为细胞生存基因和细胞死亡基因两大类。细胞生存基因又分为促进细胞增生的基因如 C-myc、C-abl、Ras 等和促进细胞存活的基因如 Bcl-2、E1B、Bcl-X 等,前者在一定条件下具有促进细胞增生、拮抗凋亡的作用,后者则通过不同方式、途径和结合形式来促进细胞的生存。细胞死亡基因包括细胞生长抑制基因如 P53、RB、DCC 等和细胞死亡促进基因如 Fas/FasL、TGF- β 、Bax、ICE 等^[5]。目前对凋亡调控基因的研究尚处于初级阶段,许多新的基因正在不断发现中,其功能和相互之间的关系将进一步证实。

2 角膜细胞凋亡的主要因素

研究表明,细胞凋亡在正常角膜代谢、一些角膜病

作者单位:310053 杭州,浙江中医药大学(宋晓燕);310006 杭州市中医院眼科(钟良玉)
通讯作者:钟良玉(E-mail:zly5066@tom.com)

的发生发展以及角膜损伤修复过程中起着重要作用。Fas-FasL 系统是细胞因子 - 受体作用介导的凋亡因子,该系统在角膜上皮损伤后的凋亡中起重要作用;细胞因子 IL-1 在角膜细胞凋亡中的作用逐渐被认识。Wilson 等^[6]将微量 IL-1 α 注入小鼠角膜基质导致细胞凋亡和角膜细胞的重新分布;骨形态生成因子 BMP-2、BMP-4 是 TGF- β 超家族的成员可在角膜中表达,调控角膜细胞的增生和凋亡;另外,锚着依赖性细胞是一种需黏附依赖于细胞表面整合素受体与基质蛋白的特异性结合而存在的细胞,细胞外基质是锚着依赖性细胞的生存条件,如果这类细胞从其黏附的基质处脱离便会激活细胞凋亡^[7]。王又冬等^[8]发现 β -1 整合素过度表达能够明显增加角膜上皮细胞对细胞外基质蛋白的黏附力,抑制角膜上皮细胞凋亡及促使 MAPK 磷酸化。Howell 等^[9]亦证实, β -1 整合素 - 基质之间的相互作用可诱导基质成纤维细胞凋亡。

3 细胞凋亡在 HSK 中的作用机制

3.1 感染后角膜上皮细胞的凋亡

病毒感染可诱导和刺激角膜细胞凋亡。Wilson 等^[10]指出角膜细胞凋亡与角膜上皮感染 HSV 有关。病毒感染细胞后可通过自身基因的表达或激活宿主细胞凋亡相关基因,启动或抑制细胞凋亡^[11]。感染早期,HSV 可编码 ICP4、ICP0、ICP27、 α ²² 及 α 47 基因,其中 ICP4 和 ICP27 是细胞复制所必需的,可能决定病毒对角膜的致病力^[12]。Sanfilippo 等^[13]发现 HSV- I 感染角膜后,ICP0 基因中 α 0 基因的表达是细胞凋亡的诱因,并认为感染细胞凋亡的发生是由单一病毒基因表达引起的。病毒的宿主遮闭蛋白(virus host shutoff protein, vhs, UL41 基因)是病毒感染时传递给细胞的包膜成分,可引发宿主 mRNA 的降解,影响角膜致病力^[14]。

另外,大量研究表明 HSV- I 感染可先诱导随后抑制角膜上皮细胞凋亡。Aubert 等^[15]发现,添加 Pancaspase 抑制剂或半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-9(cysteine aspartate-specific protease-9, caspase-9)特异性抑制剂可使 HSV- I 感染的细胞免于死亡。因而认为,HSV- I 依赖性凋亡是通过阻止线粒体细胞色素 C 的释放而抑制细胞凋亡。Miles 等^[16]亦证实 HSV- I 可诱导并随后抑制宿主角膜上皮细胞凋亡,且认为抑制细胞凋亡发生在 HSV- I 感染期间。但不同的是此凋亡反应的诱导与线粒体途径无关,因为他在实验中发现 HSV- I 感染角膜上皮细胞后通过激活 caspase-8、caspase-3,细胞角蛋白 18 卵裂,磷脂酰丝氨酸向外膜

移位诱发促凋亡反应,而此过程中既没有 caspase-9 的诱导,也没有线粒体膜电位的减少。另有报道指出,HSV- I 感染角膜上皮细胞后 1 h 内可诱导初期凋亡,随后的 4 ~ 8 h 凋亡相关基因(如 caspase-8, Fas-相关蛋白因子和 Fas 相关死亡域蛋白(fas-associated with death domain protein, FADD)的 mRNA 水平受到抑制,因而抑制细胞凋亡^[17]。

角膜上皮细胞凋亡的发生机制有待进一步探讨,大部分学者认为,早期的促凋亡反应有利于阻止炎症扩散,而随后的抑制凋亡作用可使角膜上皮细胞继续存活,从而完成宿主细胞的病毒复制。

3.2 感染后角膜基质细胞的凋亡

研究认为角膜上皮损伤后浅基质层细胞的消失是由细胞凋亡所介导的,角膜上皮损伤可引起浅层基质发生细胞凋亡^[18]。Wilson 等^[19]提出 HSK 引起的角膜基质细胞死亡是通过凋亡引起的,这种凋亡可能是生物进化过程中机体自我保护、防止病毒从感染的上皮细胞传染角膜深部的一种方式。另外,细胞凋亡可能是活性角膜细胞产生和基质重构的启动因素,研究发现早期角膜基质细胞凋亡的数量与后期角膜基质中活化的角膜细胞及成纤维细胞的数量呈正相关^[20]。

角膜上皮损伤后通过上皮细胞立即释放多种细胞因子包括 IL-1、TNF- α 、EGF、PDGF 等诱发细胞凋亡^[21]。细胞因子和受体可通过自分泌、旁分泌和邻分泌三种途径参与角膜细胞因子网络的调控体系,完成角膜上皮与基质细胞间的信号传递。目前在参与调控的细胞因子中,IL-1、Fas/FasL 倍受重视。Mohan 等^[22]在体外共同培养 IL-1 与角膜纤维母细胞过程中发现诱发细胞表达 FasL,推测角膜上皮损伤后释放的 IL-1 使 Fas 上调,随后基质细胞自分泌 FasL,进而诱发细胞凋亡。由此可见,在凋亡过程中,可溶性 FasL 的旁分泌途径与上皮细胞损伤后释放 IL-1 诱导 FasL 表达的自分泌途径可能同时存在。Heiligenhaus 等^[23]通过观察 HSV- I 感染的基质性角膜炎小鼠模型的细胞凋亡与 Fas、FasL 表达情况,证实了 Fas/FasL 系统在此过程中起诱导基质细胞凋亡的作用。张杰等^[24]在研究角膜炎症反应过程与 Fas 配体之间关系的实验中发现,角膜上皮细胞 IL-1 β 可抑制 FasL 的表达及蛋白翻译,且其浓度可影响 FasL 的启动子活性。Wilson 等^[25]报道,在角膜正常代谢、自身稳定及损伤愈合过程中,上皮组织与基质组织间存在双向调节作用。基质细胞分泌的 HGF 和 KGF 经旁分泌途径调节上皮细胞的增生、迁移和分化,而上皮组织对基质的作用则通过释放细胞因子来介导。

此外,当炎症累及深层基质时,多可出现角膜基质混浊、坏死、瘢痕形成和新生血管化等表现,其发病机制目前尚不明确,但似乎是由各种细胞因子,趋化因子和生长因子相互作用,或是炎性细胞引起,也可能是HSV- I 感染引起的局部反应。现有实验证实在炎性条件下同样存在角膜细胞凋亡现象。Vemuganti 等^[26]发现被感染的角膜组织发生坏死和细胞凋亡,并认为此细胞凋亡是由宿主细胞或炎性细胞因子诱导触发的。Ozaki 等^[27]亦发现有炎性细胞和新生血管形成的角膜以细胞凋亡方式发生退化,从而减少混浊,保持角膜透明。另有研究发现角膜损伤后,损伤角膜释放或诱导的细胞因子和趋化因子可将骨髓源性干细胞诱导到角膜基质,继而发生细胞凋亡^[28-29]。

3.3 感染后角膜内皮细胞的凋亡

HSV- I 感染引起角膜内皮炎的发病机制,目前尚不清楚。在感染 HSV- I 时,角膜内皮细胞可协同上皮细胞借 Fas/FasL 系统或通过合成和分泌 IL-1 刺激角膜基质细胞发生凋亡,阻止病变的进一步发展。而当感染引起角膜水肿、增厚,后弹力层皱褶或伴有虹膜睫状体炎时,现多认为与病毒引起的机体免疫反应有关。

4 研究细胞凋亡机制的意义

细胞凋亡既可能是机体对病毒感染的防御反应,亦可能是病毒感染导致宿主组织细胞严重损伤的重要机制。凋亡机制的基因调控、角膜细胞凋亡发生的机制和途径等均有待于进一步研究。

细胞凋亡机制在限制炎症发展和防止炎症后瘢痕形成方面起着重要的作用,研究细胞凋亡在 HSK 中的作用机制,将有助于进一步认识疾病的发生、发展及转归机制,为 HSK 的防治提供新的思路。

参考文献

- 1 钟良玉,来坚,王晓娟,等.单纯疱疹性角膜炎发病机理的现代研究[J].中国中医眼科杂志,2003,13(2):116-119
- 2 Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics[J]. Br J Cancer, 1972, 26: 239-257
- 3 Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B. Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony[J]? Biochem Biophys Res Commun, 1999, 266: 699-717
- 4 陈瑜.死亡受体及线粒体途径与激活诱导 T 细胞凋亡[J].国外医学·免疫学分册,2003,1(26):27-30
- 5 潘耀谦,于艳,高丰.细胞凋亡的常用调控基因研究近况[J].动物医学进展,2000,21(4):22-25
- 6 Wilson SE, He YG, Weng J, et al. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing[J]. Exp Eye Res, 1996, 62(4): 325-327
- 7 王康,王康孙.角膜疾病中细胞凋亡的作用机制[J].中国实用眼科

- 杂志,2000,18(9):519-521
- 8 王又冬,张劲松.β-1 整合素过表达抑制角膜上皮细胞凋亡的研究[J].眼科研究,2007,25(10):736-740
- 9 Howell SJ, Doane KJ. Type VI collagen increases cell survival and prevents anti-beta 1 integrin-mediated apoptosis[J]. Exp Cell Res, 1998, 241(1):230-241
- 10 Wilson SE, Pedroza L, Beuerman R, et al. Herpes simplex virus type-1 infection of corneal epithelial cells induce apoptosis of underlying keratocytes[J]. Exp Eye Res, 1997, 64: 775-779
- 11 宋建领,王金萍,杨斌.细胞凋亡的研究近况[J].云南畜牧兽医,2003,1:5-7
- 12 Roizman B, Knipe DM. Herpes simplex viruses and their replication. // Knipe DM, Howley PM, eds. Fields virology [M]. Philadelphia: Lippincott/Williams & Wilkins, 2001: 2399-2460
- 13 Sanfilippo CM, Blaho JA. ICPO gene expression is a herpes simplex virus type 1 apoptotic trigger[J]. J Virol, 2006, 80(14): 6810-6821
- 14 尹婕,黄振平.单纯疱疹性角膜炎的免疫发病机制[J].眼科研究,2007,25(3):233-236
- 15 Aubert M, Pomeranz LE, Blaho JA. Herpes simplex virus blocks apoptosis by precluding mitochondrial cytochrome c release independent of caspase activation in infected human epithelial cells [J]. Apoptosis, 2007, 12(1): 19-35
- 16 Miles DH, Thakur A, Cole N, et al. The induction and suppression of the apoptotic response of HSV- I in human corneal epithelial cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(2): 89-96
- 17 Miles D, Athmanathan S, Thakur A, et al. A novel apoptotic interaction between HSV- I and human corneal epithelial cells[J]. Curr Eye Res, 2003, 26: 165-174
- 18 王语诗,邓应平,熊洁,等.角膜上皮损伤方式与基质细胞凋亡的关系[J].眼科研究,2007,25(10):796
- 19 Wilson SE, He YG, Weng J, et al. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing[J]. Exp Eye Res, 1996, 62(4): 325-327
- 20 黄琼,胡燕华.细胞凋亡与角膜损伤修复[J].国外医学·眼科学分册,2001,25(3):181-185
- 21 陆勤康,盛艳,杨亚波,等.准分子激光原位角膜磨镶术后角膜细胞凋亡的研究[J].中国实用眼科杂志,2007,25(9):1041-1044
- 22 Mohan RR, Liang Q, Kim WJ. Apoptosis in the cornea: further characterization of Fas/Fasligand system [J]. Exp Eye Res, 1997, 65(4): 575-589
- 23 Heiligenhaus A, Mrzyk S, Bauer D, et al. Apoptosis in human non 2 necrotizing stromal herpes simplex keratitis [J]. Klin Monatsbl Augenheilkd, 2000, 217(3): 178-182
- 24 张杰,杨克,谭德勇,等.小鼠眼角膜上皮细胞中 IL-1β 对 Fas 配体的表达调控研究[J].科学通报,2007,16(52):1891-1895
- 25 Wilson SE, Liu JJ, Mohan RR. Stromal-epithelial interactions in the cornea[J]. Prog Retin Eye Res, 1999, 18(3): 293-309
- 26 Vemuganti GK, Reddy K, Iftekhar G, et al. Keratocyte loss in corneal infection through apoptosis: a histologic study of 59 cases [J]. BMC Ophthalmol, 2004, 4:16
- 27 Ozaki N, Ishizaki M, Ghazizadeh M, et al. Apoptosis mediates decrease in cellularity during the regression of Arthus reaction in cornea[J]. Br J Ophthalmol, 2001, 85: 613-618
- 28 Carlson EC, Drazba J, Yang X, et al. Visualization and characterization of inflammatory cell recruitment and migration through the corneal stroma in endotoxin-induced keratitis [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47: 241-248
- 29 Mohan RR, Hutcheon AE, Choi R, et al. Apoptosis, necrosis, proliferation, and myofibroblast generation in the stroma following LASIK and PRK[J]. Exp Eye Res, 2003, 76: 71-87

(收稿:2008-07-04 修回:2009-03-26)

(本文编辑:高红)