

兔棘阿米巴角膜炎模型血清抗体效价分析

王月华¹, 郑文彧², 赵丽薇¹, 冯宪敏^{1*}, 李瑶¹, 鞠晓红¹

【提要】 10 只健康新西兰白兔随机分为实验组 ($n=8$) 和阴性对照组 ($n=2$)。实验组兔左眼为实验眼, 右眼为空白对照眼。实验组采用氢化可的松点眼 3 d 后行角膜基质内注入赫氏棘阿米巴滋养体和包囊悬液 ($1 \times 10^6/ml$) 0.2 ml。对照组兔角膜基质内注射等量生理盐水。于注射后每天记录兔眼角膜病变情况, 刮取角膜组织进行病原学检测。于感染后不同时间采血和摘取角膜进行抗体效价检测和病理学检查。经角膜刮片镜检和角膜病理切片 HE 染色观察证实, 实验眼感染棘阿米巴, 并出现棘阿米巴角膜炎典型表现和病理改变。血清抗体效价随感染时间的延长而升高, 于感染后第 28 天达峰值 (A_{450} 值为 2.2358), 而后逐渐下降, 并维持稳定, 直到处死仍高于阴性对照组。阴性对照组血清抗体效价无明显变化。

【关键词】 棘阿米巴角膜炎; 动物模型; 抗体

中图分类号: R531.19

文献标识码: B

Dynamic Changes of Serum Antibody Titer in a Rabbit Model of *Acanthamoeba Keratitis*

WANG Yue-hua¹, ZHENG Wen-yu², ZHAO Li-wei¹, FENG Xian-min^{1*}, LI Yao¹, JU Xiao-hong¹

(1 *Jilin Medical College, Jilin 132013, China*; 2 *Jilin Central Hospital, Jilin 132013, China*)

【Abstract】 Ten healthy New Zealand white rabbits were randomly divided into two groups named as experiment group ($n=8$) and normal control group ($n=2$). Left eyes were for experiment, right eyes served as control. New Zealand rabbits were each injected by subconjunctival route with hydrocortisone for three days, and then *Acanthamoeba keratitis* was induced by intrastromal injection of live *Acanthamoeba healyi* trophozoites and cysts. Eyes in control group were injected with equivalent volume of physiological saline. Corneal lesions of rabbits were recorded every day after injection, etiological diagnosis was carried out by corneal scraping. Blood samples were examined for serum antibody titer by ELISA. Corneas were removed for pathological examination. Corneal scraping and corneal histopathologic examination proved that experiment eyes were infected by *Acanthamoeba*, and appeared typical manifestations and pathological changes of *Acanthamoeba keratitis*. Serum antibody titer raised continuously with infection time and reached the highest level (A_{450} value=2.2358) on the 28th days post-infection, then began to decline and remained higher level than the control until the rabbits were sacrificed. In control group, no significant change in antibody titer had taken place.

【Key words】 *Acanthamoeba keratitis*; Animal model; Antibody

Supported by a grant from Jilin Provincial Education Department (No. 2014373) and the National Natural Science Foundation of China (No. 81301450)

* Corresponding author, E-mail: fengxianmin28@163.com

棘阿米巴角膜炎 (*Acanthamoeba keratitis*) 是一种严重威胁视力的感染性眼病, 配戴角膜接触镜、接触污染的水源、角膜轻度擦伤以及机体抵抗力降低是其主要诱因^[1-3]。棘阿米巴角膜炎的病原体棘阿米巴原虫广泛分布于自然环境中, 包括滋养体和包囊两个发育阶段, 包囊抵抗能力强, 一旦成囊治疗困

难。自从1973年Jones等^[4]报道首例棘阿米巴角膜炎病例以来, 直到20世纪80年代中期该病仍为一种罕见的寄生虫病。但随着角膜接触镜的广泛使用和艾滋病患者的急速增多, 棘阿米巴角膜炎的感染率呈急速上升趋势, 引起广泛关注。张文华等^[5]对北京眼科研究所5年间化脓性角膜溃疡病例分析发现, 其中2.4%为棘阿米巴性角膜溃疡。目前, 对棘阿米巴的研究主要集中在形态与基因分型、模型构建方法、体外药物杀伤实验以及致病机制的初步研究, 而对血清抗体效价的研究较为少见。因此, 本研究通过兔棘阿米巴角膜炎模型的构建, 对感染兔的血清抗体效价进行了动态分析。

基金项目: 吉林省教育厅课题 (No. 2014373); 国家自然科学基金 (No. 81301450)

作者单位: 1 吉林医药学院, 吉林 132013;

2 吉林市中心医院, 吉林 132013

* 通讯作者, E-mail: fengxianmin28@163.com

1 材料与方法

1.1 棘阿米巴原虫培养 赫氏棘阿米巴 (*Acanthamoeba healyi*) 标准菌株由延边大学病原教研室惠赠。将赫氏棘阿米巴纯培养于蛋白胨-酵母-葡萄糖培养 (PYG) 中, 取对数生长期滋养体, 离心, 生理盐水洗3次, 调整原虫浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ (含90%以上的滋养体)。用台盼蓝染色检测原虫活力, 活力 $>90\%$ 用于实验。

1.2 主要试剂和仪器 辣根过氧化物酶标记的兔抗免IgG (批号为bs-0295G-HRP) 购自北京碧云天科技生物技术有限公司。酶联免疫检测仪 (Bio-Rad 680) 为美国BIO-RAD公司产品。

1.3 兔棘阿米巴角膜炎模型的建立 采用角膜基质内注射法建立兔棘阿米巴角膜炎模型^[6]。健康新西兰白兔10只, 体重2.0~2.5 kg, 由吉林大学白求恩医学院动物实验中心提供。10只兔随机分为实验组 ($n=8$) 和阴性对照组 ($n=2$)。实验组兔左眼为实验眼, 右眼为空白对照眼。实验前每兔左眼先用0.5%氯化考的松滴眼液点眼, 每天3~4次, 共3 d。实验开始后, 停用激素。将白兔固定, 经氯胺酮肌肉注射全麻后, 左眼再经0.5%可卡因点眼局麻, 用1 ml无菌注射器向8只兔角膜基质内分别注射纯化培养的棘阿米巴原虫生理盐水混悬液0.2 ml。另2只兔角膜基质内注射等量生理盐水作为对照。于注射原虫后12 h开始, 每天观察兔眼角膜病变情况, 直到处死 (注射后42 d)。

1.4 棘阿米巴感染检测

1.4.1 10%氢氧化钾 (KOH) 湿封片镜检 在兔角膜注射棘阿米巴原虫悬液后3、7、14和28 d分别作角膜刮片, 即刮取角膜较深层病变组织涂于滴加10% KOH的载玻片上, 于光学显微镜下查找滋养体或包裹。

1.4.2 病理组织标本制备 于感染前和感染后1、7、14和28 d各取1只兔, 心脏采血处死, 剥离眼角膜, 经10%甲醛固定后制作石蜡切片, 厚度为3 μm , 苏木精-伊红 (HE) 染色。观察兔角膜组织的病理改变。

1.5 ELISA法检测血清抗体效价 感染后1、7、14、21、28、35和42 d在耳缘静脉或动脉取血, 制备血清, 采用间接酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测兔血清中抗棘阿米巴原虫的抗体效价。将自制的棘阿米巴原虫粗抗原 (浓度为1.632 mg/ml) 稀释至10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 每孔加入100 μl 包被96孔酶标板, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。次日用0.05 mol/L PBS-吐温20 (PBST, pH 7.4) 洗液洗涤3次, 每次5 min; 每孔加入3%脱脂奶粉100 μl , 封闭1 h, PBST洗涤后, 加入稀释的兔血清 (1:4 000、1:8 000、1:16 000、1:32 000), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h, PBST洗涤。加入1:5 000稀释的兔抗免HRP-IgG, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育0.5 h, PBST洗涤。以3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 为底物显色10 min, 4 mol/L硫酸终止反应, 于酶联免疫检测仪上测定吸光度 (A_{450} 值)。

2 结果

2.1 兔棘阿米巴角膜炎的病理变化 8只新西兰白兔实验眼均形成角膜基质炎, 对照眼正常。感染后1~3 d, 实验眼角膜出现轻度混浊, 眼睑、睑结膜充血水肿, 分泌物较多。感染后5~10 d, 实验眼角膜混浊程度加重, 角膜基质浸润日益明显, 眼球、睑结膜水肿减轻, 而充血加重, 分泌物增多, 少量新生血管开始自角膜缘向溃疡病灶内生; 其中2眼出现前房积脓甚至穿孔。感染后14~28 d, 实验眼角膜血管翳逐渐形成, 并开始形成角膜瘢痕组

织, 角膜混浊病灶逐渐局限, 分泌物逐渐减少 (图1)。



A: 健康兔角膜; B: 感染后1 d, 弥漫性角膜点状水肿、混浊; C: 感染后10 d, 角膜基质环形浸润伴角膜溃疡; D: 感染后14 d, 角膜基质环形浸润伴角膜缘新生血管; E: 感染后28 d, 角膜新生血管变细, 并向角膜中央区侵入, 溃疡灶局限缩小。

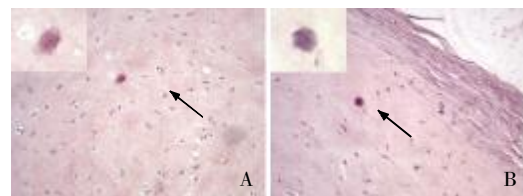
图1 兔实验眼角膜的病变

2.2 KOH湿封片镜检 兔角膜感染棘阿米巴原虫后3~28 d, 经10%氢氧化钾湿封片检查, 所有实验眼均检出滋养体或包裹; 对照眼阴性。



图2 氢氧化钾湿片检获的包裹和滋养体

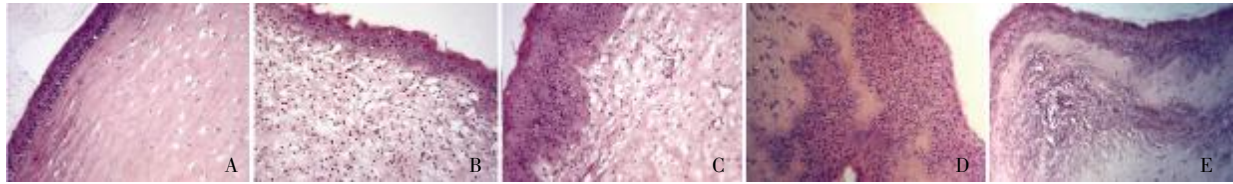
2.3 兔眼角膜组织病理学改变 光镜下观察HE染色标本, 在实验眼病变角膜基质层中可见棘阿米巴包裹和滋养体 (图3)。感染后1~3 d, 实验眼角膜水肿增厚, 边缘上皮细胞排列不整齐, 基质结构疏松, 胶原纤维肿胀, 排列紊乱, 可见大量中性粒细胞、单核巨噬细胞和嗜酸粒细胞等炎症细胞浸润; 感染后5~10 d, 实验眼角膜上皮复层鳞状上皮细胞排列紊乱, 薄厚不一; 角膜水肿减轻, 病灶区基质层纤维出现区域性溶解坏死, 大量毛细血管形成, 周围可见少量成纤维细胞和大量中性粒细胞、嗜酸粒细胞浸润。感染后11~21 d, 上皮可见细胞核深染的淋巴细胞浸润, 角膜基质层纤维排列紊乱, 大量纤维结缔组织增生, 使角膜感染区明显增厚。感染后28 d, 实验眼角膜上皮层已基本修复完整, 基底层细胞增生、增高呈柱状, 纤维排列不规则, 瘢痕形成。对照眼结构完好, 未见炎症细胞浸润和其他病理改变 (图4)。



A: 滋养体; B: 包裹。

图3 兔角膜中的棘阿米巴 (HE, $\times 100$)

2.4 血清抗体水平变化 兔感染棘阿米巴原虫后1 d, 血清抗体的吸光度值为0.4226, 此后抗体水平逐渐增高, 感染后3 d升高明显, 感染后28 d达到峰值, 感染后3、7、14和28 d的 A_{450} 值分别为0.4695、0.7154、1.1108和2.2358, 然后缓慢下降, 直至处死 (42 d) A_{450} 值为1.6782, 仍明显高于阴性对照组; 阴性



A: 健康角膜组织; B: 感染后 1 d, 可见上皮损伤, 基质排列紊乱, 周围有炎症细胞浸润; C: 感染后 7 d, 可见角膜不规则增厚和区域性溶解坏死, 大量新生血管生成; D: 感染后 14 d, 可见角膜上皮增生, 淋巴细胞浸润; E: 感染后 28 d, 可见角膜基质内纤维组织增生, 角膜上皮修复。

图4 实验兔眼角膜的组织病理学变化 (HE, ×100)

对照组兔血清抗体水平无明显变化 (图5)。

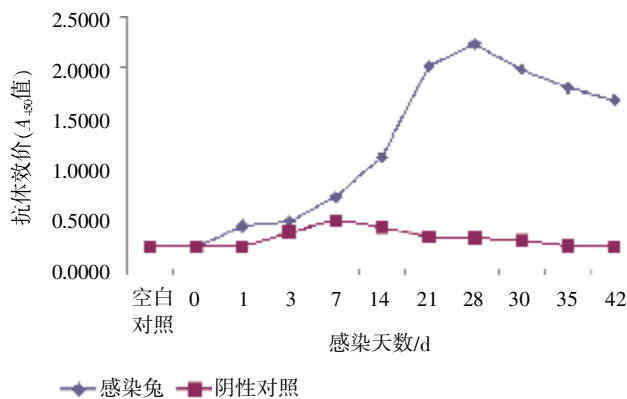


图5 兔棘阿米巴角膜炎模型血清抗体效价的变化

3 讨论

目前, 采用角膜接触镜诱导法、划伤感染法、降低免疫力感染法和角膜基质内注射法等方法构建棘阿米巴角膜炎动物模型^[69]。其中角膜基质内注射法的感染率最高^[7], 故本研究通过激素点眼方式降低局部免疫力, 而后行角膜基质内注入棘阿米巴原虫滋养体和包囊悬液。激素点眼可减少因多次基质内注射激素对角膜的损伤, 降低炎症反应和细菌感染的几率, 以及外源性损伤对模型构建的影响。该方法具有技术简便、易于操作和成功率高的特点。50%以上的人群血清中可检测到抗阿米巴原虫抗体^[9,10], 然而, 棘阿米巴角膜炎患者血清中是否存在抗棘阿米巴的特异性抗体鲜见报道, 故本研究在成功构建感染模型的基础上, 对其血清抗体效价进行了动态分析。

本研究结果显示, 实验组兔随着感染时间的延长血清抗体水平不断升高, 于感染后第28天到达峰值, 而后逐渐下降, 直至处死 (42 d) 抗体水平仍高于阴性对照组; 阴性对照组兔血清抗体水平无明显变化, 仅在基质注射生理盐水后 7 d 略有升高, 这可能与机体受外界刺激后产生的一过性非特异性应激反应有关。当角膜发生棘阿米巴原虫感染后, 一方面侵入机体的棘阿米巴机械性破坏角膜组织, 被巨噬细胞吞噬, 激活补体, 释放大细胞因子, 致使炎症细胞浸润。在吞噬清除坏死组织的同时, 白细胞释放多种酶, 如溶菌酶、髓过氧化物酶、碱性磷酸酶和酸性水解酶等分解胶原和蛋白质, 加重组织的损伤^[11], 角膜组织溶解坏死, 角膜上皮排列紊乱。另一方面, 当角膜感染棘阿米巴原虫后, 刺激机体产生相应的抗体, 此时血清内出现抗体且效价水平随感染时间的延长呈逐渐上升趋势。抗原与抗体结合后可进一步激活补体, 加重炎症反应和免疫反

应。尤其后期淋巴细胞浸润可能与抗体水平快速升高有一定的相关性。抗体效价的动态变化符合初次免疫应答规律, 随着抗体水平的升高, 机体抗棘阿米巴原虫感染的的能力随之增强, 提示获得性免疫应答有效建立, 并有效对抗棘阿米巴感染, 此与棘阿米巴角膜炎病理切片呈现出由炎症坏死到肉芽组织增生修复的变化相吻合。本实验的研究结果与2001年 Alizadeh 等^[12]发表在 *cornea* 杂志上的观点相符, 即, 虽然几乎 50% 以上的健康人血清中存在抗棘阿米巴原虫的抗体, 但棘阿米巴角膜炎患者的血清抗体 IgG 明显高于健康人^[12]。本研究发现, 角膜感染后 1 d 至 42 d 血清抗体水平始终高于阴性对照组。提示棘阿米巴原虫感染后血清中会出现特异性的抗棘阿米巴抗体, 这种抗体在棘阿米巴角膜炎的发生、发展、预后及抵抗再感染中的作用仍需要进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Radford CF, Minassian DC, Dart JK. *Acanthamoeba* keratitis in England and Wales; incidence, outcome, and risk factors[J]. Br J Ophthalmol, 2002, 86(5): 536-542.
- [2] 郑荣领, 蒋伟新, 金秀英. 接触镜相关性棘阿米巴性角膜炎防治研究进展[J]. 眼科新进展, 2001, 21(3): 210-212.
- [3] Alizadeh H, Neelam S, Niederkorn JY. Role of activated macrophages in *Acanthamoeba* keratitis[J]. J Parasitol, 2007, 93(5): 1114-1120.
- [4] Jones DB, Visvesvara GS, Robinson NM. *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis[J]. Trans Ophthalmol Soc UK, 1975, 95(2): 221-232.
- [5] 张文华, 潘志强, 王智群, 等. 化脓性角膜溃疡常见致病菌的变迁[J]. 中华眼科杂志, 2002, 38(1): 8-12.
- [6] 邓新国, 郭雪, 庞广仁, 等. 家兔棘阿米巴角膜炎动物模型的建立[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1999, 17(5):308-310.
- [7] Ren MY, Wu XY. Evaluation of three different methods to establish animal models of *Acanthamoeba* keratitis[J]. Yonsei Med J, 2010, 51(1): 121-127.
- [8] 朱学军, 林秀丽, 胡建章, 等. 角膜表面镜片术建立兔棘阿米巴角膜炎模型[J]. 眼科新进展, 2010, 5(30): 418-421.
- [9] Niederkorn JY. The role of the innate and adaptive immune responses in *Acanthamoeba* keratitis [J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2002, 50(1): 53-59.
- [10] Leher HF, Alizadeh H, Taylor WM, et al. Role of mucosal IgA in the resistance to *Acanthamoeba* keratitis[J]. Investig Ophthalmol Vis Sci, 1998, 13(39): 2666-2673.
- [11] Tzanetou K, Miltakakis D, Droutsas D, et al. *Acanthamoeba* keratitis and contact lens disinfecting solutions[J]. Ophthalmologica, 2006, 220(4): 238-241.
- [12] Alizadeh H, Apte S, El-Agha MS, et al. Tear IgA and serum IgG antibodies against *Acanthamoeba* in patients with *Acanthamoeba* keratitis[J]. Cornea, 2001, 20(6): 622-627.

(收稿日期: 2013-12-20 编辑: 杨频)