

# 伤寒杆菌内毒素诱导的 SD 大鼠全葡萄膜炎

马翠萍<sup>1</sup>, 金浩丽<sup>2</sup>, 杨培增<sup>2</sup>, 吴善宏<sup>1</sup>, 陈雪梅<sup>1</sup>, 周红颜<sup>2</sup>

(中山医科大学 1. 附属第一医院眼科, 2. 中山眼科中心, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】用伤寒杆菌内毒素在 SD 大鼠建立葡萄膜炎模型。【方法】将 200  $\mu$ g 伤寒杆菌内毒素注射于 SD 大鼠双足底部, 观察眼部临床改变和组织学改变, 并测定房水中蛋白浓度。【结果】内毒素注射 4 h 后出现炎症, 以后炎症加重, 表现为瞳孔缩小、前房明显闪辉、细胞和渗出, 甚至出现后房积液, 于 24 h 发现房水蛋白浓度显著增高, 虹膜睫状体、视网膜以及脉络膜有大量的白细胞及一定量的单核细胞和淋巴细胞浸润。【结论】伤寒杆菌内毒素在 SD 大鼠诱导出严重的葡萄膜炎, 它可作为人类全葡萄膜炎的动物模型。

**关键词:** 沙门氏菌, 伤寒; 脂多糖类; 葡萄膜炎; 疾病模型, 动物

**中图分类号:** R773 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-257X(2001)06-0451-03

## Panuveitis induced by *Salmonella Typhimurium* Lipopolysaccharide in Sprague-Dawley Rats

MA Cui-ping<sup>1</sup>, JIN Hao-li<sup>2</sup>, YANG Pei-zeng<sup>2</sup>, WU Shan-hong<sup>1</sup>, CHEN Xue-mei<sup>1</sup>, ZHOU Hong-yan<sup>2</sup>

(1. Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital, 2. Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

**Abstract** 【Objective】To establish an uveitis model in Sprague-Dawley rats by using *Salmonella Typhimurium* Lipopolysaccharide. 【Methods】200  $\mu$ g of *Salmonella Typhimurium* Lipopolysaccharide(Lps) were injected into hind footpad of Sprague-Dawley rats. Clinical and histological examinations were performed at different times, and protein concentration in the aqueous humor was determined 24 hours after Lps injection. 【Results】The inflammation began 4 hours after Lps injection. Obvious inflammatory signs such as flare, cells and exudates in anterior chamber were observed thereafter. Severe inflammation as evidenced by hypopyon predominately in the posterior chamber was noted 24 hours after Lps injection. Much higher protein concentration in aqueous humor compared with that in control group was detected in the Lps-treated group. Histological examination revealed massive infiltration of polymorphonuclear cells and monocytes in the iris, ciliary body, retina and choroid. 【Conclusion】Uveitis with marked clinical signs is successfully induced in the Sprague-Dawley rats with injection of Lps which can act as a model for panuveitis seen in human.

**Key words:** *Salmonella typhi*; lipopolysaccharide; uveitis; disease model, animal

葡萄膜炎是一种常见的、易反复发作的致盲眼病。其病因复杂, 发病机制尚未完全明确, 目前尚无理想的预防及治疗措施。因此, 此病已成为眼科领域的一个重要课题。由于人类葡萄膜炎的研究受到诸多因素的限制(例如, 不能做病理检查), 所

以近年来人们通过动物模型进行了广泛的研究, 目前用于葡萄膜炎的动物模型主要有两种, 一种是自身免疫性葡萄膜炎<sup>[1]</sup>, 另一种则为内毒素诱导的葡萄膜炎。前一种模型在我国已有较多的研究报道, 但后一种模型的研究则为数不多。有鉴于此, 我们

收稿日期: 2001-06-01

基金项目: 广东省“千百十工程”优秀人才培养基金资助(9949); 中山医科大学“211”工程科研基金资助(98002)

作者简介: 马翠萍(1962-), 女, 回族, 广东广州人, 主治医师

用伤寒杆菌内毒素在 SD 大鼠建立了葡萄膜炎模型, 并对其临床特征、组织学、房水蛋白浓度进行了详细观察和测定。

## 1 材料与方 法

### 1.1 动物与实验

1.1.1 动物与分组 采用中山医科大学动物中心提供的二级动物 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 16 只, 雄性, 6~8 周龄, 体质量 150~180 g。将动物分为实验组(8 只), 正常对照组(8 只)。所用内毒素为伤寒杆菌内毒素 (*Salmonella Typhimurium* Lipopolysaccharide, LPS, Sigma)。

1.1.2 动物检测 参照杨培增等<sup>[2,3]</sup>的方法将内毒素溶于无菌生理盐水中, 使溶液浓度为 2 g/L, 将 50  $\mu$ L 内毒素分别注射于实验组大鼠的双后足底部, 每只鼠的注射总量为 100  $\mu$ g; 于注射前及注射后第 4、6、12、18、24 h 进行裂隙灯及眼底镜检查, 必要时用托品酰胺散瞳检查, 详细记录临床体征的改变。参照并修改 Hoekzema 等<sup>[4]</sup>的方法对临床表现进行评价与记分: 虹膜充血、前房内渗出、前房积脓、瞳孔缩小各 0~2 分, 总分为 8 分。正常对照组双后足底部仅注射 50  $\mu$ L 生理盐水。

### 1.2 病理检测

于内毒素注射后 24 h 处死实验组动物(8 只)并摘取眼球(16 只), 立即置 100 mL/L 福尔马林中固定过夜。以 8 只正常鼠的眼球(16 只)作对照, 眼球保留晶体, 经瞳孔视乳头轴作矢状切面, 行常规病理学检查。

### 1.3 房水蛋白浓度测定

于内毒素注射后 24 h 处死前, 将等量氯胺酮与氯丙嗪(各 1 mL/kg)混合后于鼠腹腔注射全身麻醉, 地卡因滴眼剂局部麻醉。在解剖显微镜下, 用 29 号针头通过透明角膜进行前房穿刺, 将每只鼠双眼的房水分别收集, 储存于 -20  $^{\circ}$ C 冰箱内, 采用考马斯亮蓝 G-250 染料法作房水蛋白定量。

## 2 结 果

### 2.1 临床观察

伤寒杆菌内毒素可在 SD 大鼠上诱发出临床可见的葡萄膜炎, 表现为注射药物后 4 h 开始出现睫状充血与虹膜血管扩张(2 分), 6 h 出现前房闭

辉与细胞(2 分)。随着时间推移, 这些表现逐渐加重, 18~24 h 出现显著炎症反应, 表现为瞳孔显著缩小(2 分), 虹膜后粘连, 前房纤维素渗出(2 分), 瞳孔膜闭, 甚至后房积脓(图 1), 玻璃体混浊, 眼底由于严重的前房和玻璃体反应而难以视及。对照组无阳性体征。

### 2.2 组织学观察

组织学检查发现: 虹膜血管扩张, 虹膜睫状体、前后房及玻璃体腔均有炎症细胞浸润, 以多形核中性粒细胞为主, 有一定的淋巴细胞、单核巨噬细胞。角膜背部大量中性粒细胞粘附, 虹膜睫状体基质增厚, 上皮细胞破坏, 失去正常结构, 瞳孔闭锁; 视网膜显著增厚, 大量多形核白细胞浸润, 累及视乳头, 一些部位可见视网膜下浆液性渗出, 脉络膜轻度受累, 表现为脉络膜水肿及炎症细胞浸润(图 2)。对照组未见任何组织学改变。

### 2.3 房水蛋白的质量浓度

正常组房水蛋白的质量浓度最高值为 4.2 g/L, 最低值 0.5 g/L, 平均值(2.3 $\pm$ 1.8) g/L; 实验组内毒素注射后 24 h 房水蛋白的质量浓度最高值为 24.4 g/L, 最低值 18.3 g/L, 平均值(21.3 $\pm$ 3.0) g/L, 二者有显著差异( $P < 0.001$ )。

## 3 讨 论

内毒素为革兰氏阴性杆菌细胞膜上的脂质多糖, 已知其可增强血管通透性, 激活补体系统和刺激血小板聚合因子的释放<sup>[5]</sup>, 引起组织炎症反应。20 世纪 80 年代初人们发现, 将其注射于动物体内可以诱发出葡萄膜炎, 以后有关此方面的研究日渐增多, 目前已成为葡萄膜炎研究领域中的一个重要研究方向。通过我们的实验, 发现伤寒杆菌内毒素能成功地在 SD 大鼠诱导出严重的全葡萄膜炎。Bhattacharjee 等<sup>[6]</sup>最早发现, 将内毒素直接注入兔子的玻璃体腔内可诱发伴房水内前列腺素水平增高的眼内炎症反应。以后不少学者又发现, 足底注射内毒素可在大鼠诱导眼前段炎症的反应。因此, 人们提出了内毒素诱导的葡萄膜炎可作为研究人类内源性前葡萄膜炎动物模型的观点<sup>[7]</sup>。另有作者发现了此模型中眼后段受累的现象, 但他们认为这是一种继发现象<sup>[8]</sup>。1996 年, Yang 等<sup>[9]</sup>利用平片技术详细地研究了内毒素诱导的葡萄膜炎模型中的受累部位, 发现早期即有炎症细胞侵入视网膜

与脉络膜,视网膜脉络膜的炎症并非继发于虹膜睫状体炎,从而提出内毒素诱导的葡萄膜炎模型可作为人类全葡萄膜炎动物模型的观点。我们用伤寒杆菌内毒素诱导出了严重的葡萄膜炎,组织学表现为视网膜中大量的炎症细胞浸润,这一结果有力支持上述观点。

以往研究发现,不同种属动物对内毒素的敏感性不同。人们已经成功地在 Lewis 大鼠、FVB/N 小鼠上诱发出葡萄膜炎,但却难在 Brown Norway、Fischer 大鼠诱发临床显著的葡萄膜炎<sup>[2]</sup>。目前,国外大多数作者采用 Lewis 大鼠作为研究对象。目前,国内尚无法得到敏感的 Lewis 大鼠,我们根据现有的条件对两种大鼠进行了研究。最初我们每只用 100~300  $\mu\text{g}$  的大肠杆菌内毒素,均未能在 SD 与 Wistar 大鼠上诱发临床可见的葡萄膜炎,而绿脓杆菌内毒素在 SD 大鼠上的诱发率仅为 3/6,且不能在 Wistar 中诱发。考虑到不同内毒素致病力的差异,我们又改用了伤寒杆菌内毒素,发现这种内毒素在 SD 大鼠可诱导出临床可见的葡萄膜炎,成功率达 100%。这为我们进行葡萄膜炎发病机制、预防和治疗的研究提供了良好而稳定的动物模型。我们用伤寒杆菌内毒素诱导的葡萄膜炎有以下特点:其发生、发展过程中的临床表现与文献报道的在 Lewis 大鼠上诱发的模型基本相符,但表现似乎更重,于 24 h 不仅发生前房积脓,还发生了严重的后房积脓;后房积脓、瞳孔闭锁及纤维素渗出的发生率几达 100%;房水蛋白浓度明显增高;组织受累广泛,虹膜、睫状体、玻璃体、视网膜、视乳头以及脉络膜均发生了严重的炎症反应,出现全葡萄膜炎的表现。

总之,SD 大鼠伤寒杆菌内毒素双足底注射能诱发全葡萄膜炎,可为研究人类全葡萄膜炎发病机

制,及其预防、治疗等提供良好的动物模型。

(本文图 1,图 2 见插页 3)

#### 参考文献:

- [1] 杨培增,李绍珍,毛文书,等. 视网膜 S 抗原在不同动物诱发的实验性自身免疫性葡萄膜炎视网膜炎[J]. 中山医科大学学报, 1993, 14(1): 7.
- [2] 杨培增, de Vos A F, Broersma L, *et al.* 内毒素诱导大鼠葡萄膜炎的组织平片和切片研究[J]. 中华眼底病杂志, 1996, 12(1): 33.
- [3] Li Q, Peng B, Whitcup S M, *et al.* Endotoxin induced uveitis in the mouse: susceptibility and genetic control[J]. *Exp Eye Res* 1995, 61(5): 629.
- [4] Hoekzema R, Murray P I, van Haren M A, *et al.* Analysis of interleukin-6 in endotoxin-induced uveitis[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991, 32(1): 88.
- [5] Okumura A, Mochizuki M. Endotoxin-induced uveitis in rats: morphological and biochemical study[J]. *Jpn J Ophthalmol* 1988, 32(4): 457.
- [6] Bhattacharjee P. Release of prostaglandin-like substances by Shigella endotoxin and its inhibition by non-steroidal anti-inflammatory compounds[J]. *Br J Pharmacol* 1975, 54(4): 489.
- [7] Rosenbaum J T, McDevitt H O, Guss R B, *et al.* Endotoxin-induced uveitis in rat as a model for human disease [J]. *Nature* 1980, 286(5733): 611.
- [8] Ruiz-Moreno J M, Thialye B, de Kozak Y. Retino-choroidal changes in endotoxin-induced uveitis in the rat [J]. *Ophthalmic Res* 1992, 24(3): 162.
- [9] Yang P, de Vos A F, Kijlstra A. Macrophages in the retina of normal Lewis rat and their dynamics after injection of lipopolysaccharide [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996, 37(1): 2708.

(编辑 刘清海)

(上接第 435 页)

- [3] Templeton N S, Brown P D. Cloning and characterization of human tumor cell interstitial collagenase [J]. *Cancer Res* 1990, 50(17): 5431.
- [4] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术 [M]. 第 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版, 1999. 61~67.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, *et al.* Molecular cloning: a laboratory manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 16~56.
- [6] Lichtinghagen R, Breitenstein K, Arndt B, *et al.* Com-

parison of matrix metalloproteinase expression in normal and cirrhotic human liver [J]. *Virchows Arch*, 1998, 432(2): 153.

- [7] Barnes W M. PCR amplification of up to 35 kb DNA with high fidelity and high yield from  $\lambda$ bacteriophage templates [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(6): 2216.

(编辑 张敏瑞)

## 晶状体上皮细胞清除预防后囊混浊 (正文见第 447 页)

Removal of Lens Epithelial Cells to Prevent Posterior Capsule Opacification (Text in page 447)

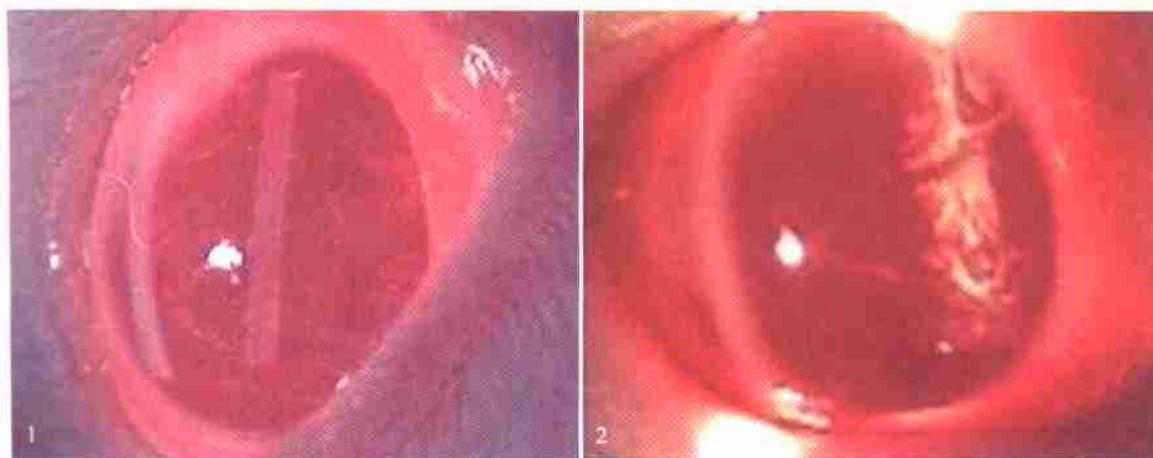


图 1 胰蛋白酶组术后 4 周裂隙灯观察

图 2 对照组术后 4 周裂隙灯观察

Fig. 1 Trypsin treated group 4 weeks after operation

The lens posterior capsules were clear, no opacification was observed

Fig. 2 Control group 4 weeks after operation

The lens posterior capsules were unclear, posterior capsule opacification was observed

## 伤寒杆菌内毒素诱导的 SD 大鼠全葡萄膜炎 (正文见第 451 页)

Panuveitis Induced by *Salmonella Typhimurium* Lipopolysaccharide in Sprague-Dawley Rats (Text in page 451)

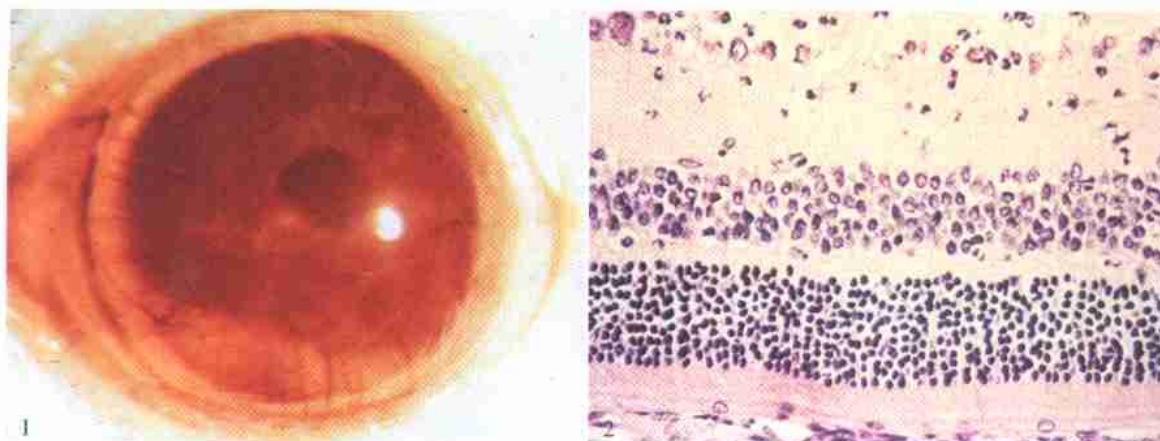


图 1 伤寒杆菌内毒素在 SD 大鼠诱导的眼前段改变

图 2 伤寒杆菌内毒素在 SD 大鼠诱导的视网膜组织学改变

Fig. 1 Changes of anterior segment induced by Lipopolysaccharide in SD rat

Fig. 2 Retinal histological changes induced by Lipopolysaccharide in SD rat