

参与了眼表损害的过程,尚难以断定炎症在干眼发生中的具体作用机制。在本研究中,HLA-DR 在轻度和重度干眼结膜上皮细胞中的不同表达可能反映了疾病的进展过程,即炎症逐渐波及到越来越广的结膜区域,程度也越来越深。

此外,在我们的研究中,重度组干眼患者 SS 和 Non-SS 组的 HLA-DR 显示出不同的表达率,SS 组有更高的表达,这与以前的研究相一致^[8]。两种疾病具有不同的原因:SS 是一组包括泪腺和唾液腺的功能改变为特征的自身免疫疾病,而 Non-SS 是由于慢性眼表局部的刺激造成,并不伴有系统性自身免疫性炎症。以往的研究以全身外分泌腺出现淋巴细胞浸润区分 SS 和 Non-SS^[10]。Bonafede 等^[11]认为 SS 中外分泌腺淋巴细胞是出现在唾液腺和泪腺功能障碍的晚期。邵玉红等^[12]发现 SS 患者球结膜有显著的免疫细胞异常。综合以上的观点,我们认为眼局部免疫炎症是干眼发生的共同病理基础,而系统性自身免疫可能加重了眼局部炎症。

研究表明,T 细胞激活的经典途径除了需要抗原刺激外,还需第二信号的参与,第二信号的传递主要由共刺激分子完成。CD28 与 B7 的交联介导最强的共刺激信号,二者的结合调控着 T 细胞的活化、增生与分化,在 T 细胞活化过程中起主导作用^[13]。但是在本实验中包括 SS 和 Non-SS 的重度干眼患者中并未发现 B7 分子的高表达,其表达与正常对照组比较差异无统计学意义。Tsubota 等^[14]报道结膜上皮细胞可能作为非专职抗原递呈细胞在炎症过程中起到了抗原递呈的作用。因此,HLA-DR 的高表达并不一定是专职的前炎症信号传递途径所引起,其表达增高是眼表局部炎症的原因还是炎症发展的结果尚未得知。

综上所述,HLA-DR 在不同程度干眼患者结膜上皮中的表达情况反映了疾病的进展。结膜上皮细胞可

能作为非专职抗原递呈细胞而引起 T 细胞激活。

参考文献

- 1 Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop. The definition and classification of dry eye disease: report of the definition and classification [J]. *The Ocular Surface*, 2007, 5(2): 75 - 92
- 2 刘祖国. 干眼症的发病机制[J]. *眼科*, 2005, 14(5): 342 - 345
- 3 Zoukhri D. Effect of inflammation on lacrimal gland function[J]. *Exp Eye Res*, 2006, 82: 885 - 898
- 4 Stern ME, Beuerman RW, Fox RI, et al. The pathology of dry eye: the interaction between the ocular surface and lacrimal glands[J]. *Cornea*, 1998, 17(6): 584 - 589
- 5 Schiffman RM, Christianson MD, Jacobsen G, et al. Reliability and validity of the ocular surface disease index[J]. *Arch Ophthalmol*, 2000, 118(5): 615 - 621
- 6 Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, et al. Preliminary criteria for the classification of Sjögren's syndrome. Results of a prospective concerted action supported by the European Community[J]. *Arthritis Rheum*, 1993, 36(3): 340 - 347
- 7 Pisella PJ, Brignole F, Debbasch C, et al. Flow cytometric analysis of conjunctival epithelium in ocular rosacea and keratoconjunctivitis sicca[J]. *Ophthalmology*, 2000, 107(10): 1841 - 1849
- 8 Brignole F, Pisella PJ, Goldschild M, et al. Flow cytometric analysis of inflammatory markers in conjunctival epithelial cells of patients with dry eyes[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(6): 1356 - 1363
- 9 Gilbard JP, Farris RL, Santamaria J. Osmolarity of tear microvolumes in keratoconjunctivitis sicca[J]. *Arch Ophthalmol*, 1978, 96(4): 677 - 681
- 10 Hikichi T, Yoshida A, Tsubota K. Lymphocytic infiltration of the conjunctiva and the salivary gland in sjögren's syndrome[J]. *Arch Ophthalmol*, 1993, 111(1): 21 - 22
- 11 Bonafede RP, Downey DC, Bennett RM. An association of fibromyalgia with primary Sjögren's syndrome: a prospective study of 72 patients[J]. *J Rheumatol*, 1995, 22(1): 133 - 136
- 12 邵玉红, 宋慧玲, 张汗承. 正常人与患者球结膜免疫细胞的研究[J]. *眼科研究*, 2003, 21(5): 521 - 523
- 13 Hathcock KS, Laszlo G, Dickler HB, et al. Identification of an alternative CTLA-4 ligand costimulatory for T cell activation[J]. *Science*, 1993, 262(5135): 905 - 907
- 14 Tsubota K, Fukagawa K, Fujihara T, et al. Regulation of human leukocyte antigen expression in human conjunctival epithelium[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40(1): 28 - 34

(收稿:2008-04-12 修回:2008-10-22)

(本文编辑:胡纯钢 刘艳)

· 短篇论著 ·

SELDI 技术筛选年龄相关性黄斑变性血清标志蛋白的初步研究

杨 柳 李 岱 黄时洲 林少春 吴开力

本研究从年龄相关性黄斑变性(age-related macular

degeneration, AMD)患者血清蛋白质组学层面,利用蛋白质芯片技术筛选出与 AMD 相关的特异性蛋白,以期为临床早期筛查、监测 AMD 疾病疗效及观察研究提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2006 年 8 月~10 月广州中山眼科中心

黄斑疾病专科门诊初诊为湿性 AMD 的患者 7 例(7 眼)。其中

degneration, AMD)患者血清蛋白质组学层面,利用蛋白质芯片

技术筛选出与 AMD 相关的特异性蛋白,以期为临床早期筛查、

监测 AMD 疾病疗效及观察研究提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2006 年 8 月~10 月广州中山眼科中心

黄斑疾病专科门诊初诊为湿性 AMD 的患者 7 例(7 眼)。其中

本课题为国家自然科学基金(30572002)、广东省自然科学基金(06021307)、湖北省卫生厅青年科技人才基金(QJX2008-37)资助
作者单位:510060 广州,中山大学中山眼科中心[杨柳(现在首都医科大学附属北京天坛医院眼科 100050)、黄时洲、林少春、吴开力]; 437100 咸宁,湖北省咸宁学院(李岱)
通讯作者:吴开力(E-mail:wukaili@mail.sysu.edu.cn)

男 5 例,女 2 例;平均年龄 64.8 岁;视力:指数/眼前 ~0.4。入选标准参考文献[1]。入选者均经直接检眼镜、眼底照相、荧光素眼底血管造影(FFA)及吲哚青绿血管造影(ICGA)等检查确诊为湿性 AMD。入选患者均无高血压、糖尿病及心血管疾病等全身疾病,否认吸烟及饮酒史,1 年内无特殊用药史。正常对照组为体检证实眼底无异常的老年健康者,共 7 例(7 眼)。其中男 2 例,女 5 例;平均年龄 60 岁;视力均 >1.0。

1.2 方法 所有受试者清晨空腹采集静脉血 4 mL,4 h 内常温下以 2 000 r/min 离心 20 min,分离血清,-80 °C 保存。

1.3 蛋白质芯片检测 IMAC30 和 CM10 蛋白芯片检测参考文献[2]。

1.4 统计学方法 采用 Ciphergen proteinchip 3.02 分析软件对数据进行统计处理,AMD 组和对照组间蛋白峰的差异比较采用独立样本的 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

采用 Biomarker Wizard 软件对所有蛋白质谱进行标准化,分析 AMD 患者与正常对照组血清中蛋白质峰数目和相对强度。结果显示,绝大多数蛋白质峰数目和强度在 AMD 患者和正常对照组血清中基本相同,但两组 IMAC30 蛋白芯片中 8 108.75 和 8 912.71 两个蛋白质峰(质/荷比峰, *M/Z*)表达平均值的比较差异有统计学意义(*P* < 0.05)。两组 CM10 蛋白芯片中 8 909.79 蛋白质峰表达平均值的比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。这 3 个蛋白质峰在 AMD 患者血清中均高于正常对照组(图 1,表 1)。

表 1 AMD 组与正常对照组血清差异蛋白峰统计分析($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IMAC30 蛋白芯片		CM10 蛋白芯片
		8 108.75	8 912.71	8 909.79
AMD	7	24.75 ± 8.90	28.03 ± 12.28	6.55 ± 7.84
正常	7	9.11 ± 2.56	11.98 ± 3.41	1.27 ± 0.48
<i>t</i>		-1.577	0.824	0.421
<i>P</i>		0.003	0.004	0.046

3 讨论

任何疾病在出现病理变化之前,组织细胞内的蛋白质成分和数量都会发生相应的改变,因此从理论上讲,通过对蛋白质的动态观察可以筛选出对疾病早期诊断的指标,其前提是要找到该病的特殊标志分子。蛋白质芯片技术因其灵敏度高、精确度高和高通量等特点,近年来成为蛋白质组学研究中的新方法。

目前,针对 AMD 视网膜病灶组织的蛋白质研究已有报道,如能通过对 AMD 患者血液样本的分析检测出相关的特异性蛋白,那么对 AMD 发生的早期筛查和病情进展的监测将成为可能。本研究采用蛋白质生物芯片表面增强激光解析电离飞行时间质谱(surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, SELDI-TOFMS)技术,同时为了增加差异蛋白捕获的数量及为差异蛋白的理化性质提供有价值的信息,特选用 2 种表面化学修饰不同的蛋白质芯片。IMAC30 芯片即金属离子螯合芯片,可捕获磷酸化蛋白或与金属结合的蛋白,而 CM10 芯片(弱阳离子交换芯片)主要捕获高等电点的亲水蛋白。用此两种蛋白质芯片对受试者血清进行检测,AMD 组中 3 个蛋白 *M/Z* 与健康对照组相比明显增加,因此我们认为这 3 个差异蛋白质峰有可能作为湿性 AMD 诊断的监测指标。由于本研究受试者的筛选非常严格,故样本量偏小,对于该实验的深入研究正在进行。差异蛋白质组学方法有可能成为临床早期筛查及监测 AMD 疾病的新方法。

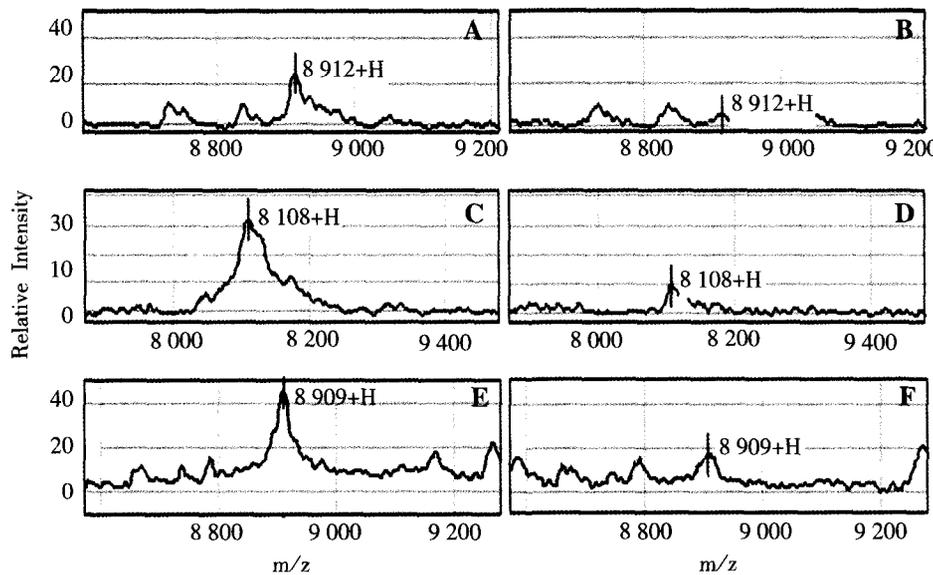


图 1 AMD 和正常对照组血清的 SELDI 蛋白图谱 A、C、E:AMD 患者 B、D、F:正常对照组 A、B、C 和 D 为 IMAC30 蛋白芯片差异蛋白峰,AMD 患者血清中 8 912.71 和 8 108.75 峰高表达;E 和 F 为 CM10 蛋白芯片差异蛋白峰,AMD 患者血清中 8 909.79 峰较对照组增强

水蛋白。用此两种蛋白质芯片对受试者血清进行检测,AMD 组中 3 个蛋白 *M/Z* 与健康对照组相比明显增加,因此我们认为这 3 个差异蛋白质峰有可能作为湿性 AMD 诊断的监测指标。由于本研究受试者的筛选非常严格,故样本量偏小,对于该实验的深入研究正在进行。差异蛋白质组学方法有可能成为临床早期筛查及监测 AMD 疾病的新方法。

参考文献

- 中华医学会眼科学会眼底病学组.老年黄斑变性临床诊断标准[S].眼底病,1987,2(4):封3
- 杨玉霞,肖雪媛,吴开力,等.用蛋白质芯片技术筛选视网膜母细胞瘤患者血清中标志蛋白[J].眼科学报,2007,23(3):136-142

(收稿:2008-10-05 修回:2008-10-28)

(本文编辑:尹卫靖)