

过氧化氢诱导的氧化应激对 ARPE-19 细胞中泛素化途径的激活

闫焱 雷霞 王玲 徐国彤

Effects of hydrogen peroxide on ubiquitin and ubiquitinated proteins in ARPE-19

Yan Yan, Lei Xia, Wang Ling, Xu Guotong. Department of Ophthalmology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

Abstract Objective Oxidative stress in retinal pigment epithelial(RPE) cells is thought to be one of the risk factors in retinal diseases because of the specific anatomic and physiological characteristics of RPE cells. The purpose of this study was to investigate the change of ubiquitination induced by oxidative stress in ARPE-19 cells. **Methods** ARPE-19 cells were cultured and treated with different concentrations of hydrogen peroxide for 4 hours respectively, and the cell viability was detected by using MTT assay. The change of ubiquitin mRNA was detected by RT-PCR. MG-132, a proteasome inhibitor, was used to pretreat ARPE-19 cells and then hydrogen peroxide was used to treat the pretreated ARPE-19 cells. The expression of ubiquitinated proteins in pretreated cells was detected by Western blotting. Intracellular distribution of ubiquitinated proteins in ARPE-19 cells treated with hydrogen peroxide was detected by immunofluorescence stain assay. **Results** ARPE-19 cell viability was significantly reduced after treated by 50-300 $\mu\text{mol/L}$ hydrogen peroxide. The mRNA levels of ubiquitin A52 and ubiquitin B in ARPE-19 cells were obviously increased after treated with 50, 100, 200, 300 $\mu\text{mol/L}$ of hydrogen peroxide in comparison with control group ($P < 0.05$), but no statistically significant difference was seen in ubiquitin C expression ($P > 0.05$). Ubiquitinated proteins of 50 000-250 000 increased after the oxidative stress, but if RPE cells were preconditioned by MG-132, ubiquitinated proteins increased mainly over 75 000. Ubiquitinated protein expressions in cells increased after treating mainly in the nucleus. **Conclusion** Ubiquitination is induced in ARPE-19 cells by oxidative stress in vitro.

Key words retinal pigment epithelial cells; oxidative stress; ubiquitin-proteasome pathway; ubiquitin; hydrogen peroxide

摘要 目的 探讨 H_2O_2 诱导的氧化应激对人视网膜色素上皮(RPE)细胞系 ARPE-19 细胞中泛素及泛素化蛋白表达的影响。**方法** MTT 法建立 H_2O_2 诱导 ARPE-19 细胞模型。不同浓度 H_2O_2 作用于 ARPE-19 细胞后, RT-PCR 检测细胞内泛素基因转录水平, 细胞免疫荧光方法检测细胞内泛素化蛋白的表达。用有(或无)蛋白酶体抑制剂 MG-132 预处理后再用 H_2O_2 处理 ARPE-19, Western blot 方法检测细胞内泛素化蛋白。**结果** 氧化应激后 UBA、UBB 的转录水平明显增加($P < 0.05$), UBC 无明显变化。细胞内相对分子质量为 50 000 ~ 250 000 的泛素化蛋白均增加, MG-132 预处理后再用 H_2O_2 处理, 细胞内增加的泛素化蛋白则多集中在相对分子质量 75 000 以上。细胞内泛素化蛋白表达增加, 核内增加明显。**结论** H_2O_2 诱导的 ARPE-19 氧化应激过程激活细胞内泛素化途径。

关键词 视网膜色素上皮细胞; 氧化应激; 泛素-蛋白酶体途径; 泛素; H_2O_2

分类号 R 774 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)01-0035-05

泛素-蛋白酶体途径(ubiquitin-proteasome pathway, UPP)主要作用于细胞内一些半衰期短的调节蛋白和

结构异常、错构或受损伤的蛋白。研究显示一些氧化蛋白底物在被降解前需要结合多个泛素分子, 氧化应激会增加蛋白质底物泛素化的机会^[1-2]。本研究采用 H_2O_2 诱导人视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞系 ARPE-19 氧化应激这一体外

模型,模拟体内 RPE 细胞氧化应激环境,探讨 UPP 参与 RPE 细胞氧化应激过程的可能机制。

1 材料与方 法

1.1 细胞及主要试剂

ARPE-19(美国 ATCC 公司);DMEM/F12 培养基、优级胎牛血清、胰蛋白酶、青链霉素(美国 Gibco 公司);Ubiquitin(#3936)单克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司);Ubiquitin(ab7780)抗体(美国 ABCAM 公司);RT-PCR 试剂盒(日本 TAKARA 公司);MTT、二硫苏糖醇(DTT)、Tween-20、十二烷基硫酸钠(SDS)、牛血清白蛋白(BSA)、蛋白酶抑制剂以及蛋白电泳的标准品(美国 Sigma 公司);Triton X-100、TEMED(德国 Merck 公司);丙烯酰胺、双丙烯酰胺(美国 Fluka 公司);硝酸纤维素膜(美国 Amersham 公司);BCA 蛋白定量试剂盒、化学荧光显色剂(美国 Pierce 公司);蛋白裂解液 RIPA 和苯甲基磺酰氟(PMSF)(上海申能博彩生物科技有限公司);MG-132(ALX-260-092,瑞士 Alexis Biochemicals 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 H₂O₂作用 ARPE-19 的细胞生存活力测定 细胞生存活力测定用 MTT 法。将细胞接种在 96 孔板中,37℃,5% CO₂培养条件下用 DMEM/F12 培养基配制的不同浓度 H₂O₂溶液处理细胞,每组浓度做 4 个复孔,设正常对照组。继续培养 4 h,吸出培养液,PBS 洗 1 次,加入终质量浓度为 0.5 mg/mL 的 MTT 培养 4 h。吸出孔内培养液,每孔再加入 150 μL DMSO,在摇床上摇匀 10 min。在酶标仪上测定各孔在 570 nm 处的吸光值。

1.2.2 RNA 的提取以及泛素相关基因转录变化的检测 用不同浓度 H₂O₂处理细胞 4 h 后,收集样本。细胞裂解后按照说明书提供的方法提取细胞总的 RNA。然后进行反转录,取反转录产物(1 μL)进行 PCR 扩增。采用 primer premier 5.0 软件设计引物并到上海生物工程公司合成引物。UBA52 扩增片断大小为 73 bp。F:5'-GAGCCCAGTGACACCATTGA-3', R:5'-GCTGCTGGTCAGGTGGGATA-3'。PCR 条件为:95℃预热 5 min,94℃变性 30 s,58℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共 35 个循环。所得的 PCR 产物在 2.5%的琼脂糖凝胶上进行电泳。UBB 扩增片断大小为 91 bp。F:5'-GGGCGGTTGGCTTTGTT-3', R:5'-GACCTGTTAGCGGATAACCAGGAT-3'。PCR 条件为:95℃预热 5 min,94℃变性 30 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共 35 个循环。UBC 扩增片断大小为 134 bp。F:5'-GATTGGGTGCGGTTCTT-3', R:5'-

TGCCTTGACATTCTCGATGGT-3'。PCR 条件为:95℃预热 5 min,94℃变性 30 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共 35 个循环。18S 扩增片断大小为 86 bp。F:5'-GGCGCCCCCTCGATGCTCTTAG-3', R:5'-GCTCGGGCCTGCTTTGAACACTCT-3'。PCR 条件为:95℃预热 5 min,94℃变性 30 s,58℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共 30 个循环。电泳条带的密度通过 Quantity One 软件(Bio-Rad)进行定量分析。

1.2.3 Western blot 检测细胞内泛素化蛋白 分为 H₂O₂处理组和 MG-132 预处理后 H₂O₂处理组。H₂O₂处理组即用不同浓度 H₂O₂处理细胞 4 h。MG-132 预处理组操作如下:细胞融合达到 85%~90%时,用无血清培养基配制 20 μmol/L MG-132 溶液,处理细胞 60 min,吸出含 MG-132 培养液后,PBS 洗 1 遍,再加入不同浓度 H₂O₂溶液处理细胞 4 h。设无药物处理的空白对照组。

裂解提取蛋白,4℃下以 12 000 g 离心 30 min;采用 BCA 方法进行蛋白定量。制备 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(10%),在样品槽内分别加入蛋白电泳分子量标准品、待测的蛋白样本。接通电源,先以 80 V 恒定电压跑胶 30 min,再以 120 V 恒定电压跑胶约 2 h,将取下的 SDS-PAGE 胶体、硝酸纤维素膜定性滤纸以及纤维垫放在电泳槽转移液内转膜,通以 300 mA 恒流 2 h。将转有蛋白的硝酸纤维素膜取出浸入抗体封闭液,在摇床上室温孵育 30 min 封闭(5%牛奶封闭);将硝酸纤维素膜浸于 ubiquitin(#3936,1:1 000 稀释)的鼠抗人一抗孵育液,4℃下过夜,以 TBST 缓冲液于摇床上洗膜 15 min,共 3 次;将硝酸纤维素膜浸入含有辣根过氧化酶标记的二级抗体(羊抗鼠二抗,1:4 000 稀释)的二抗孵育液中,在室温下摇晃孵育 1 h,再以 TBST 洗膜 15 min,共 3 次。利用辣根过氧化酶显色剂的化学荧光方法使 X-感光胶片成像来检测相关蛋白的位置和含量。

1.2.4 细胞免疫荧光检测细胞内泛素的变化 细胞在盖玻片上生长融合到 85%~90%时,加入不同浓度 H₂O₂,4 h 后从 CO₂培养箱中取出;用预冷的 1×PBS 洗 1 次;4%的甲醛室温固定 20~30 min;1×PBS 洗 3 次,每次 10 min;然后用 0.25% Triton X-100 透膜 2~5 min;1×PBS 洗 3 次,每次 10 min;5% BSA 室温封闭 30 min;加 ubiquitin 一抗(ab7780,用 1% BSA 稀释)放在湿盒里,4℃过夜;1×PBS 洗 3 次,每次 10 min;然后加抗兔二抗(用 1% BSA 稀释)30 min;1×PBS 洗 3 次,每次 10 min;封片后在荧光光学显微镜下观察。

1.3 统计学方法

计量资料所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS

13.0 统计学软件对数据进行统计学处理。不同浓度的 H₂O₂ 组和对照组 ARPE-19 对细胞内 UBA52、UBB、UBC 转录水平影响的总体比较采用单因素方差分析,各浓度组与对照组间的两两比较采用 Dunnett *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 H₂O₂ 作用对 ARPE-19 细胞活性的影响

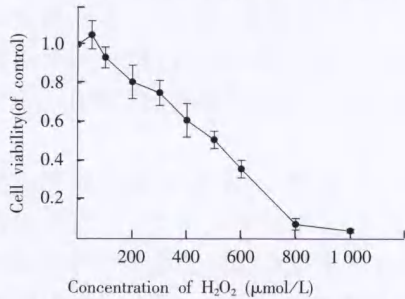


图 1 不同浓度 H₂O₂ 处理 ARPE-19 4 h 后, H₂O₂ 对细胞增生的抑制作用

Fig.1 Cell viabilities of ARPE-19 treated by different concentrations of H₂O₂ for 4 hours

不同浓度 H₂O₂ 处理 ARPE-19 细胞后, H₂O₂ 对细胞增生的抑制作用呈浓度依赖性。本实验中显示, 相对于高浓度而言, 所用 0 ~ 300 μmol/L 的浓度未明显降低细胞活力(图 1)。从图中看出 H₂O₂ 的半数致死量约为 500 μmol/L, 一般情况下多数实验中采用的药物质量浓度基本在半数致死量浓度的前 2/3, 说明实验采用的 0 ~ 300 μmol/L 浓度为非毒性浓度。

2.2 RT-PCR 检测泛素基因转录变化

各 H₂O₂ 处理组与对照组相比, UBA52 的转录水平显著增加 ($F = 52.063, P < 0.01$), 各用药组和对照组相比其转录水平明显增加 ($P = 0.004, 0.008, 0.009$,

0.004)。UBB 的转录水平与对照组相比显著增加 ($F = 125.559, P < 0.01$), 各用药组和对照组相比转录水平均明显增加 ($P = 0.003, 0.001, 0.002, 0.001$), 而 UBC 无明显变化 ($F = 1.261, P = 0.347$)(图 2)。

2.3 Western blot 检测有(或无)MG-132 预处理的 ARPE-19 经不同浓度 H₂O₂ 氧化应激后细胞内泛素化蛋白的表达

H₂O₂ 处理后, 细胞内泛素化蛋白水平在相对分子质量为 50 000 ~ 250 000 可见明显增加, 蛋白酶体抑制剂 MG-132 预处理后再给予 H₂O₂ 处理, 细胞内相对分子质量 75 000 以上的泛素化蛋白增加较明显(图 3)。

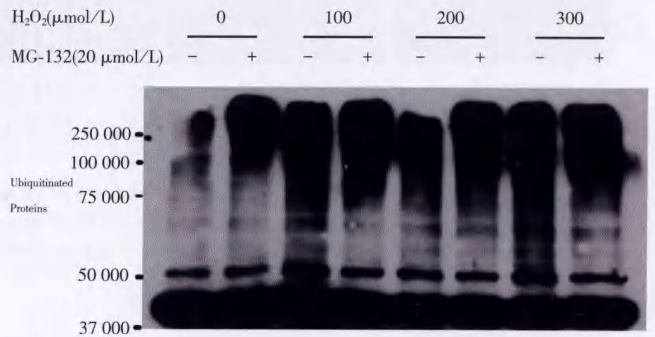


图 3 有(或无)MG-132 预处理的 ARPE-19 用不同浓度的 H₂O₂ 处理后, 细胞内泛素化蛋白的 Western blotting 电泳图

Fig.3 The Western blotting of the ubiquitinated protein expressions in ARPE-19 cells treated with different concentrations of hydrogen peroxide after with (or without) preconditioning of MG-132

2.4 不同浓度 H₂O₂ 处理细胞后泛素化蛋白的细胞免疫荧光检测

100 μmol/L H₂O₂ 作用细胞 4 h 后, 细胞内泛素化蛋白水平轻度升高, 而 300 μmol/L H₂O₂ 作用细胞后, 细胞内泛素化蛋白水平明显增加, 尤其以核内明显(图 4)。

3 讨论

UPP 是一种高效的蛋白分解途径^[1], 其过程是以共价键形式联结多个泛素(ubiquitin)分子, 形成靶蛋白多聚泛素链, 即泛素化后输送到 26S 蛋白酶体上被消化降解^[2-3]。许多疾病与 UPP 的功能下降相关, 该途径存在于眼部组织晶状体、视网膜等部位, 衰老和应激会引起此途径的变化^[4-5]。已有研究证明晶状体中存在功能性

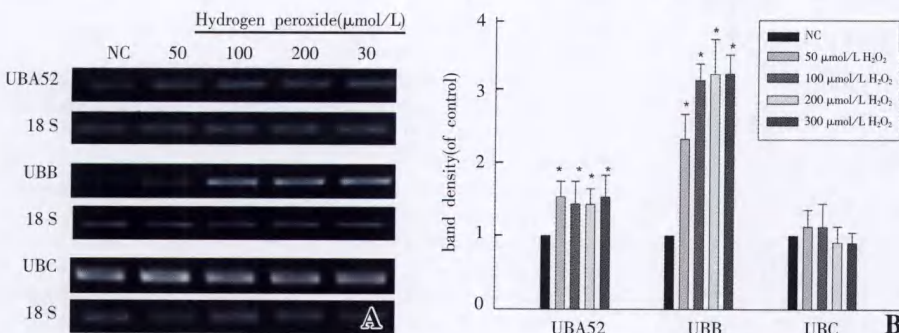


图 2 不同浓度的 H₂O₂ 处理 ARPE-19 对细胞内 UBA52、UBB、UBC 转录水平的影响

A: 扩增的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图 B: 表达趋势的统计柱状图 ($\bar{x} \pm s$) ($n = 3$); 18 S: 内参, 与对照组比较 * $P < 0.05$

Fig.2 Changes of UBA52, UBB, UBC gene transcription in ARPE-19 treated with different concentrations of hydrogen peroxide for 4 hours A: with 18S included to control for loading represent one out of three identical experiments B: indicate mean relative band intensity obtained by densitometric analysis of visualized bands from three individual experiments

UBA52: $F = 52.063, P < 0.01$; UBB: $F = 125.559, P < 0.01$; UBC: $F = 1.261, P = 0.347$; * $P < 0.05$ vs respective control group (One-way ANOVA, Dunnett *t* test)

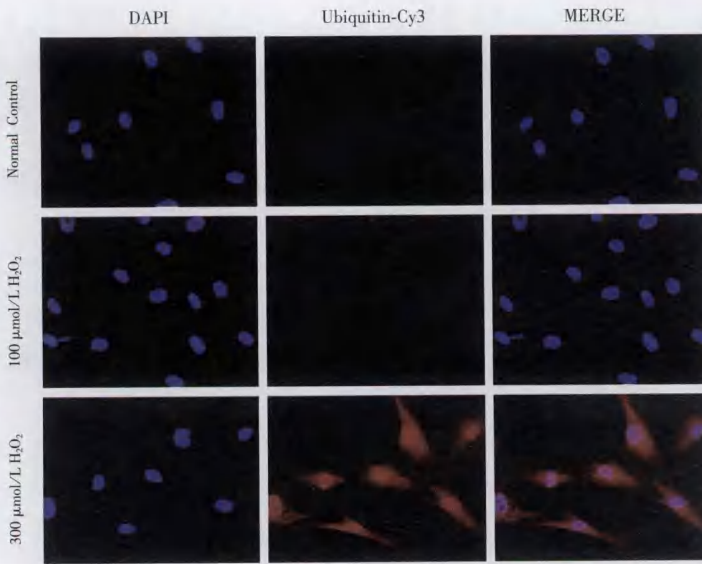


图4 ARPE-19经不同浓度的H₂O₂处理后,细胞内泛素化蛋白表达,DAPI染DNA,ubiquitin-Cy3为一抗和二抗,MERGE为DAPI和Cy3荧光的叠加(LM×200)

Fig.4 Intracellular distribution of ubiquitinated proteins in ARPE-19 treated with different concentrations of hydrogen peroxide DAPI: DNA staining Ubiquitin-Cy3: the first antibody and the second antibody MERGE: merge of immunofluorescence of DAPI and Cy3 (LM×200)

合成的化合物 MG-132 (Z-leu-leu-leu-CHO, 三肽基乙醛) 是一类醛基肽蛋白酶体抑制剂, 可以抑制蛋白酶体的糜蛋白酶 (chymotrypsin-like, ChTL) 活性, 阻止蛋白酶体对泛素化蛋白的降解^[12]。本研究选择 MG-132 对 RPE 细胞进行预处理以模拟衰老细胞。本研究结果显示在 MG-132 抑制细胞糜蛋白酶活性的情况下, 氧化应激后细胞内泛素化蛋白的表达增加多在 75 000 以上, 相对分子质量大的蛋白的降解受到明显抑制。这可以解释在衰老情况下, 蛋白酶体功能下降, 机体内相对分子质量大的蛋白降解被抑制并因此在细胞内聚集而引起一系列疾病的发生。

图 4 显示 H₂O₂ 处理后, RPE 细胞核和细胞浆内泛素化的蛋白表达都有明显增加, 核内增加明显, 表明这种程度的氧化应激对细胞核的作用是比较明显的, 细胞核内的泛素增加有利于对 ROS 的清除, 对机体起保护作用。Fernandes 等^[9] 研究证实在氧化应激后, 细胞内蛋白降解的速度加快, 所以即使泛素化水平增加, 细胞内的泛素化蛋白水平改变不明显。但是本研究所用的 H₂O₂ 浓度和处理时间不同于 Fernandes 等, 这可能是造成结果不同的原因。

综上所述, 在 ARPE-19 受到氧化应激时, 细胞内的泛素化过程被激活, 泛素的转录和表达上调。

的 UPP, UPP 功能下降导致晶状体纤维降解的障碍引起白内障^[6]。

由于 RPE 内源性泛素化水平有限^[7], RPE 的 UPP 很容易受到应激损伤而影响细胞功能, 因此 RPE 被认为是研究 UPP 蛋白水解作用的一个很好的体外模型。

H₂O₂ 溶液相对稳定, 而且可以自由透过细胞膜, 所以其作为氧化应激来源进行细胞研究优于其他氧化剂。在恒定光下照射 3~7 d 后, 兔玻璃体中 H₂O₂ 的浓度为 110 μmol/L, 比光照射前增加了 15 倍^[8]。视网膜中的 H₂O₂ 是由光感受器释放的, 其在视网膜中的浓度远高于在玻璃体中, 并直接作用于 RPE 细胞。

泛素的基因包括 UBA52、UBB 和 UBC。UBA52 与泛素-核蛋白体融合蛋白相关, UBB 和 UBC 则是一类多泛素化基因。图 2 表明 H₂O₂ 会引起 UBA52 和 UBB 转录上调, 但 UBC 无明显变化, 提示该程度的氧化应激造成特定的泛素基因激活, 这与 Fernandes 等^[9] 在视网膜血管内皮细胞氧化应激研究中的结果相似。Yang 等^[10] 研究证实不同泛素的转录水平差异与晶状体上皮细胞 (lens epithelial cell, LECs) 分化的时期相关。在 LECs 分化早期, UBA52 和 UBB 上调, 而 UBC 无变化。提示细胞内特定的泛素基因激活可能也与应激的时间和强度相关。本研究表明氧化应激会引起细胞内泛素化蛋白的水平上调。Liu 等^[11] 在糖尿病大鼠的心肌细胞和骨骼肌细胞中也发现类似结果。

参考文献

- 1 Ciechanover A. The ubiquitin proteolytic system and pathogenesis of human diseases: a novel platform for mechanism-based drug targeting [J]. Biochem Soc Trans, 2003, 31: 474 - 481
- 2 Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction [J]. Physiol Rev, 2002, 82(2): 373 - 428
- 3 Pickart CM, Eddins MJ. Ubiquitin: structure, functions, mechanisms [J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1695(123): 55 - 72
- 4 Grune T, Merker K, Sandig G, et al. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 305: 709 - 718
- 5 Wang QE, Wani MA, Chen J, et al. Cellular ubiquitination and proteasomal functions positively modulate mammalian nucleotide excision repair [J]. Mol Carcinog, 2004, 42: 53 - 64
- 6 Pereira P, Shang F, Hobbs M, et al. Lens fibers have a fully functional ubiquitin-proteasome pathway [J]. Exp Eye Res, 2003, 76: 623 - 631
- 7 Obin M, Nowell T, Taylor A. A comparison of ubiquitin-dependent proteolysis of rod outer segment proteins in reticulocyte lysate and a retinal pigment epithelial cell line [J]. Curr Eye Res, 1995, 14: 751 - 760
- 8 Taguchi H, Ogura Y, Takanashi T, et al. In vivo quantitation of peroxides in the vitreous humor by fluorophotometry [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996, 37: 1444 - 1450
- 9 Fernandes R, Ramalho J, Pereira P. Oxidative stress upregulates the ubiquitin proteasome pathway in retinal endothelial cells [J]. Mol Vis, 2006, 12: 1526 - 1535
- 10 Yang S, Wang-Su ST, Cai H, et al. Changes in three types of ubiquitin mRNA and ubiquitin-protein conjugate levels during lens development [J]. Exp Eye Res, 2002, 74(5): 595 - 604
- 11 Liu Z, Miers WR, Wei L, et al. The ubiquitin-proteasome proteolytic

pathway in heart vs skeletal muscle; effects of acute diabetes [J].
 Biochem Biophys Res Commun, 2000, 276: 1255 - 1260
 12 Kisselev AF, Goldberg AL. Proteasome inhibitors; From research tools to
 drug candidates [J]. Chem Biol, 2001, 8: 739 - 758

(收稿:2008-04-16 修回:2008-10-22)

(本文编辑:胡纯钢 刘 艳)

· 病例报告 ·

角膜后弹力层前营养不良一例

叶宇峰 张惠成 谢亚男 姚玉峰

角膜后弹力层前营养不良主要表现为角膜后弹力层前的后基质层的细小混浊。现将我们遇到的 1 例报告如下。

患者,男,35 岁。因双眼干涩、易疲劳半年余来我院就诊。患者否认既往眼病和外伤史;无角膜接触镜佩戴史、长期服药史。眼部检查:视力:右眼 0.3 (-2.00 DS = 1.0),左眼 0.2 (-2.50 DS = 1.0)。眼压:右眼 12 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa),左眼 15 mmHg。裂隙灯检查:双眼眼睑、结膜、角膜上皮未见异常。角膜前、中基质层透明,后基质层可见细小弥漫性灰白色点状、丝状、屑状混浊(图 1)。余未见异常。泪膜破裂时间(BUT):右眼 3 s、左眼 4 s。双眼角膜 A 型超声测厚:右眼 558 μm ,左眼 561 μm 。

经患者知情同意后,患者双眼行角膜共焦显微镜检查(ConfoScan2.0, Nidek, Italy)。扫描范围为 340 $\mu\text{m} \times 255 \mu\text{m}$,景深 10 μm ,侧向分辨率 1 μm ;扫描间距 4 μm ,放大倍数为 500。0.4% 盐酸奥布卡因滴眼液点眼行表面麻醉,于水浸式物镜镜头前表面加涂 Viscotirs 眼用胶。患者坐于检查台前,将下颌置于显微镜的颌托架上,缓慢前推物镜。嘱患者平视前方,使镜头与中央区角膜垂直,此时可依次观察角膜各层。当显示内皮层时,将镜头再稍向前推进,自动记录角膜各层的扫描图像。

共焦显微镜检查示双眼角膜上皮层细胞形态正常,上皮基

底层细胞呈不规则多边形,密度约 5 500/ mm^2 (图 2)。角膜前中基质层基质细胞形态及密度正常,可见上皮下神经丛及基质神经干,未见明显异常反光物质(图 3,4);后基质层可见团块状反光物,呈网状,最大可达 76 $\mu\text{m} \times 81 \mu\text{m}$ 。团块内可见较多细点状强反光物质,直径 2 ~ 5 μm (图 5),在靠近角膜后弹力层处最明显,向前逐渐减少,累及 80 ~ 100 μm 的后基质层。角膜内皮层的细胞形态正常,密度约 2 200/ mm^2 (图 6)。诊断:(1) 双眼角膜后弹力层前营养不良;(2) 双眼干眼症。

讨论:角膜后弹力层前营养不良由 Maeder 等^[1]于 1947 年首次报道,常在 30 岁后被发现。Grayson 等^[2]报道了 22 例患者,其中包括 3 个患病家系。但至今尚无基因遗传学方面的研究报道。Curran 等^[3]对 1 例患者进行观察,发现患者后基质细胞肿胀,胞浆内有较多油红染色阳性物质,推测可能为含脂褐素样物质的次级溶酶体。此病一般无症状,临床上不易被发现。

角膜共焦显微镜可以无创、活体、动态地观察角膜各层组织的结构。Holopainen 等^[4]曾报道了 2 例角膜后弹力层营养不良患者的共焦显微镜表现,发现异常物质主要在角膜后弹力层前的后基质层区,有许多细小高反光样物质在基质细胞周围或基质细胞内,但基质细胞的形态基本正常。本研究共焦显微镜图像表现为后基质层团块反光物内大量的点状强反光物质,推测团块反光物可能是肿胀的角膜基质细胞,而团块内的强反光物质是细胞胞浆内的含脂褐素样物质的次级溶酶体。这与 Curran 等^[3]报道的病理结果大致对应。产生这些物质的原因目前尚不清楚,考虑与细胞衰老、基因异常、细胞代谢异常等因素有关。

参考文献

- 1 Maeder G, Danis P. On a new form of corneal dystrophy (deep filiform dystrophy of the cornea) associated with keratoconus [J]. Ophthalmologica, 1947, 14: 246 - 248
- 2 Grayson M, Wilbrandt H. Pre-descemet dystrophy [J]. Am J Ophthalmol, 1967, 64: 276 - 282
- 3 Curran RE, Kenyon KR, Green WR. Pre-Descemet's membrane corneal dystrophy [J]. Am J Ophthalmol, 1974, 77: 711 - 716
- 4 Holopainen JM, Moilanen JA, Tervo TM. In vivo confocal microscopy of fleck dystrophy and pre-Descemet's membrane corneal dystrophy [J]. Cornea, 2003, 22: 160 - 163



图 1 角膜近后弹力层的后基质层弥漫细小灰白色的点状、丝状、屑状混浊 图 2 正常角膜上皮基底细胞,隐约可见其下的神经丛 图 3 角膜前基质细胞



图 4 角膜中基质细胞及基质神经干 图 5 角膜后基质层的团块状反光物,最大可达 76 $\mu\text{m} \times 81 \mu\text{m}$ 。团块内的高反光点状物质直径 2 ~ 5 μm 图 6 角膜内皮细胞形态正常

作者单位:310006 杭州市第一人民医院眼科(叶宇峰、张惠成);
 310000 杭州市师范大学医学院(谢亚男);310000 浙江大学附属邵逸夫
 医院眼科(姚玉峰)

通讯作者:叶宇峰 (Email: yeandxie@sohu.com)

(收稿:2008-09-18)

(本文编辑:尹卫靖)