

晶状体上皮细胞中骨连蛋白的研究

白晶 张劲松 夏泉 郭莲英

Effects of osteonectin on lens epithelial cells

Bai Jing, Zhang Jinsong, Xia Quan, Guo Lianying. Department of Ophthalmology, Affiliated Forth Hospital of China Medical University, Key Laboratory of Lens of Liaoning High School, Shenyang 110001, China

Abstract Objective Some studies demonstrated the effects of osteonectin, or secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC), on the formation and development of cataract. Our study was to compare the expression of SPARC in lens epithelium of cataract patients and normal donor and detect its expression change on human lens epithelial cell line SRA01/04 under the heat stress and hypoxigen. **Methods** Eighty patients with cataract were divided into below 50 years group, 50 - 65 years group, 65 - 80 years group and over 80 years group. The anterior capsules of lens were collected during the operation. The six normal anterior capsules were taken from the donor eyes as control. Western blot was applied to observe SPARC level in lens. Human lens epithelial cell line SRA01/04 was defrosted and cultured and assigned to control group, heat stress group and oxidative damage group. Expression of SPARC was detected by Western blot. **Results** In the tissue samples, SPARC was not expressed in control group. But in cataract groups, expression of SPARC was seen at 43 000 and presented an elevating tendency upon age. The expression of SPARC in over 80 years group reached peak in comparison with other age groups ($P < 0.01$), and that in 65 - 80 years group was significantly higher than 50 - 65 years group and < 50 years group ($P < 0.01$). In the cell samples, the control group was absent reactive for SPARC. After heat stress or oxidative damage, the SPARC level was notably increased at 43 000. **Conclusion** SPARC is overexpressed in lens epithelium of cataracts. The expression of SPARC shows an increased tendency with aging. Heat stress and oxidative damage can induce the up-regulation of SPARC. SPARC may play a role in the formation and progression of cataract.

Key words secreted protein acidic and rich in cysteine; lens epithelium cell; cataract

摘要 目的 对比骨连蛋白 (SPARC) 在不同年龄白内障及正常人晶状体中的表达, 并对人晶状体上皮细胞 (LECs) 进行热应激、氧化损伤等预处理后检测其骨连蛋白表达的变化, 以探讨其在白内障发病机制中的作用。 **方法** 将 80 例不同年龄白内障患者平均分为 4 组 (< 50 岁组, 50 ~ 65 岁组, 66 ~ 80 岁组, > 80 岁组), 于白内障超声乳化手术中环形撕囊后取晶状体的前囊膜, 对照组取 6 例角膜移植手术供体眼的晶状体前囊膜。常规蛋白印迹法检测样品中 SPARC 的含量。将永生化人 LECs SRA01/04 解冻, 传代培养。分为正常对照组、氧化损伤组、热应激处理组, 蛋白印迹法观察各组 SPARC 的表达情况。 **结果** 组织样本对照组未检出 SPARC 表达, 白内障组可见明确 SPARC 表达, 并有随着年龄增长表达增加的趋势。细胞样本正常对照组未见明确 SPARC 表达, 氧化损伤组、热应激处理组均可见 SPARC 表达上调。 **结论** 白内障患者 LECs 中 SPARC 较正常人表达增高, 且随年龄的增长表达逐渐增高。氧化损伤及热应激可使 LECs 中 SPARC 表达上调, 提示 SPARC 在白内障的发生发展中可能起一定的作用。

关键词 骨连蛋白; 晶状体上皮细胞; 白内障

分类号 R 776.101 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)02-0149-04

晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LECs) 在白

内障的发病中有重要意义, 其结构的完整、功能的正常是维持晶状体透明的关键因素。骨连蛋白又称富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白 (secreted protein acidic and rich in cysteine, SPARC) 是一种多细胞分泌的小分子蛋白^[1], 在人体内表达丰富, 有研究证明利用同源重组技术敲除 SPARC 的小鼠出生 6 个月出现成熟的白

作者单位: 110001 沈阳, 中国医科大学附属第四医院眼科 辽宁省高校晶状体重点实验室 [白晶 (在读博士, 现在大连市中心医院 116033)、张劲松]; 116011 大连医科大学生化实验室 (夏泉), 细胞实验室 (郭莲英)

通讯作者: 白晶 (Email: baijingsky@163.com)

内障^[2],表明 SPARC 在白内障发病中起一定作用。本实验对比了正常人及不同年龄组的白内障患者 LECs 中 SPARC 的差异表达,及氧化损伤、热损伤对 SPARC 表达的影响,以探讨 SPARC 在白内障发病中的作用。

1 材料与方 法

1.1 材料来源

80 例白内障晶状体前囊膜来自白内障超声乳化手术患者,6 例正常晶状体前囊膜来自角膜移植手术供眼。永生化人 LECs 系 SRA01/04 由中国医学科学院肿瘤研究所提供。

1.2 主要试剂与仪器

羊抗人 SPARC 单克隆抗体、碱性磷酸酶标记的兔抗羊二抗、β-actin 羊多克隆抗体(美国 Santa cluz 公司),DMEM 培养基(美国 Gibco 公司),胎牛血清(美国 Gibco 公司)。Thermo MμLtiskan MK3 酶标仪,CO₂ 培养箱,DYY-Ⅲ5 型稳压稳流电泳仪,JIM-X 半干式转移电泳仪,超净工作台,低温高速离心机,Kodak 1D 型凝胶自动成像分析系统,GIS-700D 型凝胶图像系统。

1.3 方 法

1.3.1 样 本 的 采 集 及 制 作

(1)组织样本 对照组角膜移植术供眼 6 例,于晶状体赤道部剪开前囊,取出囊膜。白内障组手术患者 80 例,按年龄分为 4 组(<50 岁组,50~65 岁组,66~80 岁组,>80 岁组,每组 20 例),于超声乳化手术中环行撕囊后取直径约 5 mm 的前囊,样品采集后立即放入 -80℃ 低温冰箱中保存。实验前将每组中 4 个囊膜合并成 1 例,合并后每组 5 例,共 20 例,临床类型均为皮质型。对照组与白内障组称重校正样品。

(2)细胞样本 将永生化人 LECsSRA01/04 传代培养后分为 3 组。正常对照组;氧化损伤组:细胞中加入 200 × 10⁶ mol/L H₂O₂ 作用 6 h;热应激处理组:42℃ 30 min,37℃ 恢复 2 h^[3]。

1.3.2 免疫印迹(Western blotting)法检测 SPARC 蛋白含量 将样品囊膜剪碎后加入 200 μL 裂解液 PMSF 10 μL,超声粉碎后,4℃、12 000 r/min 离心 30 min。细胞样本密度 2 × 10⁶ 个/L,加入 200 μL 裂解液 PMSF 10 μL 后离心。BCA 法定蛋白,制成蛋白样本进行 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳后采用半干转膜法将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,50 min 后将 NC 膜放入 3% BSA 封闭过夜。弃去封闭液加入 1:500 一抗孵育 1 h 后加 TBS 洗膜 3 次,加入 1:500 二抗室温孵育 1 h 后 TBS 洗膜 3 次,加 BCIP/NBT 显色剂显色。使用 GIS-700D 型凝胶图像系统扫描分析,记

录平均灰度值。实验重复 3 次。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计学软件对数据进行统计学分析。本研究同组数据服从正态分布,各组方差齐。不同年龄白内障患者 LECs 中 SPARC 的平均灰度值的比较采用单因素方差分析,各组间的两两比较采用 SNK-q 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 组织样本

对照组 43 000 处未见明确条带,实验组均可见明确的 SPARC 表达(P < 0.05),并随着年龄的增长,SPARC 表达有所增强(图 1)。实验组中,80 岁以上组较其他 3 个组 SPARC 表达均明显增高(P < 0.01),66~80 岁组较 65 岁以下 2 个组 SPARC 表达均增高(P < 0.01),50~65 岁组较 50 岁组表达有增高的趋势,但差异无统计学意义(P = 0.055)。各组的平均灰度值见表 1。

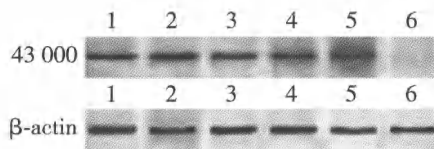


图 1 Western blot 检测不同年龄组白内障 LECs 中 SPARC 的差异表达 1:标准相对分子质量 2:>80 岁白内障组 3:66~80 岁白内障组 4:50~65 岁白内障组 5:<50 岁白内障组 6:正常人组

Fig. 1 Expression of SPARC in human LECs of patients with cataract (Western blot) 1:marker 2:over 80 years group 3:65 to 80 years group 4:50 to 65 years group 5:below 50 years group 6:normal control group

表 1 不同年龄组白内障患者 LECs 中 SPARC 的平均灰度值(x ± s)

Table 1 Mean gray scale of SPARC in LECs of cataract patient(x ± s)

Age(year)	n	SPARC/Actin
>80	25	0.730 ± 0.060 ^{ef}
66-80	25	0.580 ± 0.076 ^{ef}
50-65	25	0.423 ± 0.025
<50	25	0.330 ± 0.020
Normal lens	25	0
F		69.582
P		0.000

^e P < 0.01 vs < 50 years group, ^f P < 0.01 vs 50 - 65 years group, ⁱ P < 0.01 vs 66 - 80 years group

2.2 细胞样本

对照组 43 000 处未见明确条带,氧化损伤组、热应

激处理组均可见明确的 SPARC 表达(图 2),各组的平均灰度值见表 2。

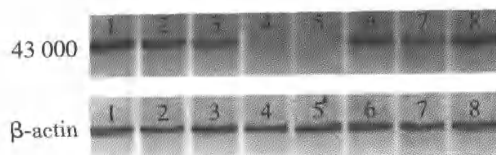


图 2 Western blot 检测氧化损伤及热应激对人 LECs 中 SPARC 表达的影响 1,8:标准相对分子质量 2,6:氧化损伤组 3,7:热应激组 4,5:正常细胞组

Fig.2 Effect of heat stress and oxidative damage on expression of SPARC in human LECs 1,8:marker 2,6 :oxidative damage group 3,7 :heat stress group 4,5:normal cell

表 2 氧化损伤及热应激后 LECs 中 SPARC 的平均灰度值($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Mean gray scale of SPARC in LECs after heat stress and oxidative damage($\bar{x} \pm s$)

Group	SPARC/Actin
Normal	0
Heat stress	1.095 ± 0.143
Oxidative damage	0.925 ± 0.053

3 讨论

SPARC 是一种多细胞分泌的小分子蛋白,最早是由 Termine 等^[4]作为一种牛和人骨组织中的非胶原组分发现并描述的。根据不同的命名依据,SPARC 又被称作相对分子质量 43 000(依据蛋白的大小)^[5],BM(基底膜)-40(根据组织来源)^[6],骨连接素(根据其骨基质具高亲和力的生化特性)。SPARC 属于细胞外基质蛋白家族,同属此族的还有凝血酶应答蛋白-1、凝血酶应答蛋白-2、骨桥蛋白、固生蛋白 C 和固生蛋白 X 等^[7-8]。Sage 等^[9]发现可增生细胞在体外可分泌这种蛋白,体内的多种细胞均可分泌 SPARC 蛋白,LECs 即有较丰富的表达。其生物学功能包括^[10]:(1)抗增生和黏附是 SPARC 的主要作用。早期研究表明 SPARC 是一种有效的细胞周期抑制剂,它能使细胞停留在 G1 期,并在细胞的形状上出现可识别的变化^[11]。SPARC 的去黏附作用主要是由于局部粘连的溶解和肌动蛋白纤维的重组造成的^[12];近年有研究显示 SPARC 抑制 DNA 的合成从而发挥抗增生和黏附作用,这一过程并不通过核定位信号系统^[13]。(2)调节细胞和细胞外基质的相互作用。SPARC 调节细胞对细胞外环境的变化作出应答,这一过程是通过影响生长因子、细胞外基质修饰酶、细胞外基质结构蛋白(如胶原蛋白 I)的表达及活动而完成的。(3)与细胞因

子结合及相互作用。SPARC 与血小板衍生生长因子(PDGF)、血管内皮生长因子(VEGF)结合并通过终止生长因子与感受器之间的相互作用降低了它们的分生潜能。SPARC 还能调节肿瘤生长因子 β (TGF- β)的活性。(4)SPARC 对发育的影响。在线虫和爪蟾的发育过程中干涉 SPARC 的活性会导致很严重的后果。(5)SPARC 与损伤愈合及血管发生。Amy 等^[14]在其论述中探讨了 SPARC 敲除小鼠的皮肤创口愈合加快的机制,认为 SPARC 对 TGF- β 活性的影响是原因之一,此外 SPARC 对促进创口愈合的 3 种因子 PDGF、bFGF、VEGF 具有抑制作用,也影响了损伤的愈合。近年来 Martinek 等^[15]发现 SPARC 具有胶原分子伴侣作用,能够促进胶原纤维形成。

Gilmour 等^[2]利用同源重组技术将鼠胚胎干细胞中的内源性 SPARC 的位点敲除,缺乏 SPARC 的鼠能够正常生长并具有繁殖能力,但出生 6 个月后出现了以白内障形成、晶状体囊膜破裂为特点的眼部病理变化,提示 SPARC 参与了白内障的发生。本实验已证实微克水平外源性的 SPARC 即能够抑制体外培养的人 LECs 的增生及黏附。LECs 在白内障的发生发展中起着至关重要的作用。结果证实在白内障患者的 LECs 中 SPARC 的表达较正常晶状体表达有明确上调,并有随着患者年龄增长表达量增高的趋势,65 岁以上患者白内障 LECs 中 SPARC 表达显著升高。且细胞组实验证实氧化损伤、热应激能够使 LECs 中 SPARC 的表达增加。氧化损伤、热应激是白内障发病的重要因素,SPARC 的高表达很可能是晶状体应对外界刺激的一种保护作用。这种蛋白的表达通过何种途径,是否涉及已知的胞内信号系统,或是利用其他未证实的信号转导通路,在白内障的发展中抑制晶状体上皮的增生、维持晶状体的透明是否存在一个域值,这些问题均有待进一步的研究。

临床上可见年龄越大的白内障患者手术后后发障的发生越少、程度越轻,我们考虑这与 SPARC 随年龄增长高表达有一定的关系。鉴于 SPARC 是 LECs 本身所表达的内源性蛋白,其对眼内其他组织的安全性较高,对预防后发障,抑制 LECs 增生、黏附有明确的效果,不失为一种良好的防治后发障的候选药物。

参考文献

- 1 Lane TF, Sage EH. The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions[J]. FASEB J, 1994, 8: 163 - 173
- 2 Gilmour DT, Lyon GJ, Carlton MB, et al. Mice deficient for the secreted glycoprotein SPARC/osteonectin/BM40 develop normally but show severe age-onset cataract formation and disruption of the lens[J]. J EMBO, 1998, 17 (7): 1860 - 1870

3 张雪岩,孔玮,贾琳琳,等. 热应激预处理对晶状体上皮细胞过氧化氢氧化损伤的保护作用[J]. 眼科新进展, 2005, 25(4): 325 - 327

4 Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, et al. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen[J]. Cell, 1981, 26: 99 - 105

5 Sage H, Johnson C, Bornstein P. Characterization of a novel serum albumin-binding glycoprotein secreted by endothelial cells in culture [J]. J Biol Chem, 1984, 259(6): 3993 - 4007

6 Mann K, Deutzmann R, Paulsson M, et al. Solubilization of protein BM-40 from a basement membrane tumor with chelating agents and evidence for its identity with Osteonectin and SPARC [J]. FEBS, 1987, 218 (2): 167 - 172

7 Sage EH. Terms of attachment; SPARC and tumorigenesis [J]. Nat Med, 1997, 3: 144 - 146

8 Yan Q, Sage EH. SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions [J]. J Histochem Cytochem, 1999, 47: 1495 - 1506

9 Sage H, Pritzl P, Bornstein P. Secretory phenotypes of endothelial cells in culture; comparison of aortic, venous, capillary, and corneal endothelium [J]. Arteriosclerosis, 1981, 1: 427 - 422

10 Helene S, Bornstein P. Unraveling mysteries of the multifunctional protein SPARC [J]. J Invest Dermatol, 2007, 127(11): 2491 - 2505

11 Funk SE, Sage EH. The Ca ++ -binding glycoprotein SPARC modulates cell cycle progression in bovine aortic endothelial cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 2648 - 2652

12 Young BA, Wang P, Goldblum SE. The counteradhesive protein SPARC regulates an endothelial paracellular pathway through protein tyrosine phosphorylation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 251: 320 - 327

13 Carmean N, Leaf EM, Dyamenahalli K, et al. The motif of SPARC that inhibits DNA synthesis is not a nuclear localization signal [J]. J Mol Kosman Biol, 2007, 371(4): 883 - 901

14 Amy D. SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury [J]. J Clin Invest, 2001, 107(9): 1049 - 1054

15 Martinek N, Shahab J, Sodek J, et al. Is SPARC an evolutionarily conserved collagen chaperone [J]? J Dent Res, 2007, 86(4): 296 - 305

(收稿: 2008-05-05 修回: 2008-12-23)

(本文编辑: 高 红)

· 病例报告 ·

甲状腺低分化鳞癌脉络膜转移一例

任明玉 赵 红 宋国祥 闫 静

患者,男,60岁,因“左眼胀痛伴头痛10个月,视力丧失3个月”入院。于10个月前无明显诱因出现左眼胀痛伴头痛,视力逐渐下降,3个月前视力丧失。既往史:8年前曾行甲状腺肿瘤切除术,组织病理学诊断为甲状腺低分化鳞癌;2年前颈部淋巴结肿大,手术清扫后经组织病理学诊断为甲状腺肿瘤颈部淋巴结转移。入院后眼科检查:右眼正常。左眼无光感,结膜混合充血,角膜轻度水肿,周边前房1/5 CT,虹膜节段性萎缩,后粘连,约4 mm,可见大量新生血管,对光反射消失,晶状体混浊,后囊表面可见大量血管,其余结构未窥清。眼压 T₂。眶压正常。入院前10个月行MRI检查,发现左眼后极部、内侧及下赤道部眼球壁大范围扁平隆起,信号强度异常, T1WI 及 T2WI 均为中信号强度。强化脂肪抑制后, T1WI 高信号, T2WI 中信号。考虑脉络膜转移癌、继发性视网膜脱离、筛窦炎(图1)。入院后眼眶CT横轴位显示眼内占位病变,位于眼球后极及下部,与眼球壁相连,边界基本清楚,内密度均匀,后部眼环增厚、

视神经约1 cm,眼眶内未见明显异常组织。组织病理学检查诊断为左眼脉络膜转移癌,考虑为低分化鳞状细胞癌,并发现左眼继发性视网膜全脱离、继发性闭角型青光眼,视神经断端未发现瘤细胞,但视神经胶质细胞增生,间质水肿。

讨论:原发性甲状腺鳞癌临床罕见,发病率仅占甲状腺恶性肿瘤的1%,多见于40岁以上的患者,老年人多见。影像及病理检查可见肿瘤大片坏死,提示肿瘤可能较早发生血行转移,但由于其病程短而临床少见。甲状腺鳞癌的转移可以是颈淋巴结转移,也可远处转移至纵隔淋巴结、肺、肝、骨等^[1]。由于眼眶和眼球内组织缺乏淋巴管,眶内软组织和葡萄膜转移性肿瘤是体内其他部位或器官的恶性肿瘤经血行扩散转移而来的比较少见。眼眶或眼球转移性肿瘤,国外报道多来自乳腺和前列腺,国内报道多来自呼吸系统和消化道^[2]。何为民等^[3]曾报道14例眼眶转移癌,其中有甲状腺癌2例。本报道中患者为老年男性,曾于8年前诊断为甲状腺低分化鳞癌,行手术治疗,2年前发现颈部淋巴结转移,再次行手术治疗。10个月前出现眼部症状,经术后组织病理学检查确诊为左眼脉络膜转移癌。

参考文献

1 Harada T, Shimaoka K, Katagiri M, et al. Rarity of squamous cell carcinoma of the thyroid: autopsy review [J]. World J Surg, 1994, 18(4): 542 - 546

2 宋国祥. 眼眶病学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 286 - 294

3 何为民, 罗清礼, 刘扬宏. 眼部转移癌 14 例临床分析 [J]. 华西医学, 2003, 18(1): 8 - 9

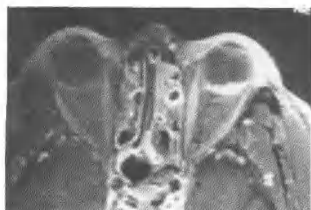


图1 手术前10个月时眼眼病变的MRI表现

变形,玻璃体密度高于对侧,视神经与球壁相连处增粗,眼球在冠状位呈葫芦状。肝、胆、脾、肾以及肺部检查未发现占位病灶。临床诊断为:左眼占位病变、绝对期青光眼、继发性视网膜脱离、双侧筛窦炎。行眼球摘除术,术中发现眼球呈明显巩膜葡萄样改变,切除

作者单位:300020 天津医科大学眼科临床学院 天津市眼科医院
眼眶病眼整形科
通讯作者:赵红 (Email: zhaohongeye@yahoo.com.cn)

(收稿: 2008-12-22)

(本文编辑: 尹卫靖)