

老年核性及皮质性白内障晶状体上皮细胞中 bFGF 及 α -SMA 的表达

朱洪燕 蔡小军 李青春

Expression of basic fibroblast growth factor and alpha smooth muscle actin in human lens epithelia cells of age-related nuclear cataract and cortical cataract

ZHU Hong-Yan, CAI Xiao-Jun, LI Qing-Chun

[Key words] lens epithelial cells; basic fibroblast growth factor; alpha smooth muscle actin; cataract

[Abstract] Objective To compare the expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) and alpha smooth muscle actin (α -SMA) in human lens epithelial cells (LEC) of senile nuclear cataract with cortical cataract, and investigate their effects in the development of age-related cataract. **Methods** According to diagnostic criteria of age-related nuclear cataract and cortical cataract, patients were divided into two groups, 36 eyes in each group (proportion of male and female was 1:1). The anterior lens capsules obtained from cataractous phacoemulsification were spread out on glass slide. bFGF and α -SMA expression in each group were detected by immunohistochemistry (sp assay), respectively, and positive cells were counted, using chi square test to comparison the two groups. **Results** bFGF and α -SMA staining were strong and diffusely distributed in all peripheral LEC. Toward the center of the epithelium, labeling became undetectable in most cells. Positive cells of bFGF expression in the LEC of nuclear cataract were stronger than that of cortical cataract (the average positive cell rates were 61.33% and 2.13%), with statistically significant difference ($\chi^2 = 14.06, P < 0.01$); Positive cells of α -SMA expression in the LEC of nuclear cataract, were also stronger than that of cortical cataract (the average positive cell rates were 32.21% and 5.04%), with statistic significance ($\chi^2 = 4.43, P < 0.05$). **Conclusion** There are more LEC of senile nuclear cataract group at the proliferative and differentiative phase than that of senile cortical cataract group.

[Rec Adv Ophthalmol 2008; 28(1):33-36]

[中图分类号] R776.1 **[文献标识码]** A

[文章编号] 1003-5141(2008)01-0033-04

[关键词] 晶状体上皮细胞;碱性成纤维细胞生长因子;平滑肌肌动蛋白;白内障

[摘要] **目的** 比较老年核性及皮质性白内障晶状体上皮细胞 (lens epithelia cells, LEC) 中碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 及 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 的表达, 探讨其在老年性白内障发展中的作用。 **方法** 按照老年核性与皮质性白内障诊断标准将患者分为 2 组, 每组 36 眼 (男女比例 1:1), 于白内障超声乳化术中截取其前囊膜 (含 LEC), 用免疫组织化学的方法检测出每组 LEC 中 bFGF 及 α -SMA 的表达, 对阳性细胞进行计数, 2 组间卡方检验作统计学分析。 **结果** 晶状体囊膜下上皮细胞中 bFGF 和 α -SMA 的阳性表达主要分布在囊膜周边部, 越近中央区, 其表达越弱; 老年核性白内障组 LEC 中 bFGF 的表达水平显著高于皮质性白内障组 (平均阳性细胞率分别为 61.33% 和 2.13%), 差异有显著统计学意义 ($\chi^2 = 14.06, P < 0.01$); 老年核性白内障组 LEC α -SMA 的表达水平亦高于皮质性白内障组 (平均阳性细胞率分别为 32.21% 和 5.04%), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.43, P < 0.05$)。 **结论** 老年核性白内障较皮质性白内障有更多的 LEC 以增生和分化为主。

[眼科新进展 2008; 28(1):33-36]

研究发现, 老年皮质性白内障与核性白内障晶状体上皮细胞 (lens epithelia cells, LEC) 增生状态不同,

核性白内障 LEC 增生能力较强, 皮质性白内障 LEC 以凋亡状态为主^[1]。碱性成纤维细胞生长因子 (basic fi-

作者简介: 朱洪燕, 女, 1981 年 12 月出生, 湖北红安人。在读硕士研究生。联系电话: 13607118244; E-mail: zhuhongyan0015@163.com

About ZHU Hong-Yan: Female, born in December, 1981. Master degree. Tel: 13607118244; E-mail: zhuhongyan0015@163.com

收稿日期: 2007-04-11

修回日期: 2007-06-18

本文编辑: 盛丽娜

作者单位: 430071 湖北省武汉市, 武汉大学中南医院眼科
通讯作者: 蔡小军, E-mail: caiyang@public.wh.hb.cn

Received date: Apr 11, 2007

Accepted date: Jun 18, 2007

From the Department of Ophthalmology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Responsible author: CAI Xiao-Jun, E-mail: caiyang@public.wh.hb.cn

broblast growth factor, bFGF) 为强效促细胞增生因子,能够促进 LEC 的增生、移行和分化^[2-3]。 α -平滑肌肌动蛋白(alpha smooth muscle actin, α -SMA)是成纤维母细胞的标志性蛋白,在 LEC 向纤维细胞转化的过程中其表达的量明显增加^[4]。本研究用免疫组织化学的方法检测 bFGF 及 α -SMA 在 2 种类型老年性白内障,即老年核性白内障及皮质性白内障 LEC 中不同的表达,探讨其发病机制,为临床预防老年性白内障的发生提供新的思路。

1 材料与方 法

1.1 材料 收集 2006 年 3 月至 9 月在我院眼科行白内障超声乳化术的老年皮质性及核性白内障患者各 36 眼(每组男女各 18 眼),排除过熟期、成熟期、代谢性及并发性白内障,核性白内障组年龄为 60~80 岁,平均年龄(68.67±6.03)岁;皮质性白内障组年龄为 60~80 岁,平均年龄(68.69±5.39)岁,2 组年龄差异无统计学意义(非参统计, $P=0.843$),均不伴其他眼病及全身疾病。术中环形撕囊,截取晶状体前囊(含囊下上皮)中央部 5~7 mm 立即铺于多聚赖氨酸处理的玻片上,细胞面朝上。

1.2 试剂及方法 α -SMA 鼠抗人单克隆抗体原液(1:160 稀释,武汉博士德生物工程有限公司)、bFGF 兔抗人多克隆抗体工作液(福州迈新生物技术有限公司)、抗体稀释液、生物素化 IgG、SP 试剂盒及 DAB 显色剂(福州迈新生物技术有限公司)。将取得的新鲜囊膜滴加冷甲醇 1~2 滴固定 10 min, PBS 液洗 3 次,滴加过氧化物酶阻断剂,室温下孵育 10 min; PBS 液洗 3 次,滴加正常山羊血清封闭液(即用型),作用 15 min;滴加一抗 1 滴,4℃ 过夜孵育,次日 PBS 液洗 3 次,滴加生物素标记的二抗,室温孵育 15 min, PBS 液洗 3 次; AEC 显色试剂盒显色,显微镜下观察着色,终止显色,苏木素复染,中性树胶封片。对照组以 PBS 代替一抗。 α -SMA 阳性表达为细胞胞质内散在棕黄色颗粒, bFGF 阳性表达为细胞胞膜出现明显的棕黄色颗粒,胞质内亦散在棕黄色颗粒。每张玻片随机观察 5 个视野,并记算阳性细胞率。阳性细胞率 = 5 个视野内阳性细胞总数 / 5 个视野内细胞总数 × 100%。阳性细胞率 < 1% 为表达阴性(-); 1%~25% 为弱阳性(+); 26%~50% 为阳性(++); > 50% 为强阳性(+++)。

1.3 统计学分析 结果用 SPSS 13.0 软件分析系统,两组间比较用卡方检验, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

通过直接平铺囊膜的方法可清楚地观察到从囊膜中央到边缘的细胞阳性表达情况,边缘区 bFGF 和 α -SMA 阳性表达的细胞较多,有的标本中央区几乎无表达。

bFGF 在老年核性白内障晶状体前囊膜中呈强阳

性表达(图 1),平均阳性细胞率为 61.33%,在皮质性白内障中呈弱阳性表达(图 2),平均阳性细胞率为 2.13%, 2 组比较差异有显著统计学意义($\chi^2 = 14.06$, $P < 0.01$)。

α -SMA 在老年核性白内障晶状体前囊膜中呈阳性表达(图 3),平均阳性细胞率为 32.21%,在皮质性白内障呈弱阳性表达(图 4),平均阳性细胞率为 5.04%, 2 组比较差异有统计学意义($\chi^2 = 4.43$, $P < 0.05$)。



Figure 1 bFGF staining were strong in LEC of age-related nuclear cataract(SP, $\times 400$) 老年核性白内障 LEC bFGF 呈强阳性表达,免疫组织化学 SP 法染色($\times 400$)



Figure 2 bFGF staining were weak and diffusely distributed in LEC of age-related cortical cataract(SP, $\times 400$) 老年皮质性白内障 LEC bFGF 呈弱阳性表达,免疫组织化学 SP 法染色($\times 400$)



Figure 3 α -SMA staining were strong and diffusely distributed in LEC of age-related nuclear cataract(SP, $\times 400$) 老年核性白内障 LEC α -SMA 呈阳性表达,免疫组织化学 SP 法染色($\times 400$)



Figure 4 α -SMA staining were weak and diffusely distributed in LEC of age-related cortical cataract (SP, $\times 400$) 老年皮质性白内障 LEC α -SMA 呈弱阳性表达,免疫组织化学 SP 法染色($\times 400$)

3 讨论

老年性白内障的发病机制较复杂,在不合并任何并发症的情况下白内障可有皮质性、核性和囊下性混浊3种主要的病理改变,但归根结底是 LEC 的增生、分化和凋亡发生异常。晶状体本身为一无血供器官,其增生、分化和凋亡是由 LEC 分泌的细胞外基质和细胞因子来调控的^[5]。LEC 根据其生物学功能存在一定的空间分布,分为中央部(前极部)、赤道部和介于二者之间的中间部。赤道部的上皮细胞具有很强的增生分化能力,其不断增生形成新的晶状体细胞,并分化为晶状体的纤维层状结构,维持光学区的透明性。

眼科界公认,在老年性白内障中,除一些相关疾病如糖尿病、高血压、高脂血症能促进白内障的进程外,紫外线所导致的氧化损伤机制是晶状体新陈代谢能力下降最终发展成老年性白内障的主要病因。正常生理条件下,机体内存在抗氧化系统,可不断清除自由基。随着年龄的增长,人体逐渐衰老,机体清除自由基能力下降,生物体内自由基堆积,可攻击生物膜、蛋白质、核酸,造成氧化性损伤,因此白内障的病程发展在老年人群中是个必然趋势。在晶状体的代谢过程中,为了维持细胞的继续生长和分化,LEC 通过自分泌和旁分泌的形式分泌一些细胞因子或调整这些细胞因子的 mRNA,以弥补因氧化应激引起的晶状体损伤,在这些细胞因子中 bFGF 的作用较受关注。Chang 等^[6]通过研究质子流辐射后的正常人 LEC 发现, bFGF 基因的表达增加为 LEC 损伤修复的机制之一。Rungger 等^[7]研究发现 LEC 表达肌动蛋白增加可能为细胞修复过程,在正常的无混浊晶状体中 LEC 就有少量的平滑肌肌动蛋白的表达,这种表达没有年龄的差异; Marcantonio 等^[8]亦发现,损伤越强, LEC 表达的平滑肌肌动蛋白量越大。根据本次实验,我们发现老年核性白内障 LEC bFGF 和 α -SMA 的表达都高于皮质性白内障,因此可以说明老年核性白内障的 LEC 在应对氧化应激损伤时的修复

功能更强。

bFGF 为强效促细胞增生因子,通过与其特异性受体结合,引起各种细胞周期调控因子表达改变,促使 G_0 、 G_1 期细胞越过限制点进入增生状态。Wormstone 等^[9]通过体外培养正常的人 LEC 发现它能够通过自分泌 bFGF 而维持上皮细胞的长期生存及生长(达 1 a 以上),而不需要依赖其他刺激因子的作用。晶状体纤维细胞膜主要内在蛋白 MIP 是晶状体纤维的特殊通道蛋白,在维持晶状体的透明性中起到重要的作用。Golestaneh 等^[10]研究发现, bFGF 能显著上调 MIP 的表达,并推测 bFGF 促进 LEC 的增殖分化功能与 MIP 的表达密切相关, MIP 的表达异常可以引起晶状体的混浊。

α -SMA 是细胞骨架蛋白,是横越在真核细胞质内的一种纤维状蛋白质, LEC 分化成纤维细胞过程中,细胞由锥形变成带形,并逐渐伸长、脱核,这有赖于细胞骨架的作用。 α -SMA 作为纤维母细胞重要的骨架蛋白,一直被认为是纤维母细胞的标志性蛋白,在白内障的病理研究中,也被看作是 LEC 向纤维细胞过渡的标记性蛋白,当细胞发生纤维化时,其表达量明显增加^[8]。

本实验在术中截取的囊膜位于晶状体的中央区,其边缘部为晶状体赤道部与中央部的过渡区,越近边缘其上皮细胞的增生分化活性越强。我们通过直接平铺囊膜的方法可清楚地观察到从囊膜中央到边缘的细胞阳性表达情况,边缘区 bFGF 和 α -SMA 阳性表达的细胞较多,有的标本中央区几乎无表达,这与 Ueda 等^[11]发现的 bFGF 在 LEC 中的极性分布的实验结果一致,也更说明了越近赤道部, LEC 增生活性越强。本实验发现在老年核性白内障中 bFGF 和 α -SMA 的阳性表达均较皮质性白内障高,其差异有统计学意义。bFGF 为强效促细胞增生因子,可反映细胞的增生分化能力,而 α -SMA 为上皮细胞向肌成纤维细胞转化的标志性蛋白,是晶状体对氧化应激损伤所产生的一种代偿性反应,可反映 LEC 向纤维细胞转化的能力^[3,12],因此老年核性白内障 LEC 较皮质性白内障 LEC 处于增生分化状态的细胞多。

我们曾比较了老年核性白内障与皮质性白内障 LEC 中增生细胞核抗原的表达,结果表明:老年核性白内障 LEC 中增生细胞核抗原的表达高于老年皮质性白内障,说明老年核性白内障 LEC 的增生较强,而老年皮质性白内障 LEC 改变以凋亡为主。我国学者柳夏林等^[13]通过探讨 LEC 密度的改变与不同类型老年性白内障的关系发现核性白内障的 LEC 密度高于同年龄组其他类型白内障(包括皮质性白内障)及对照组透明 LEC 的密度,这一结果与 Harocopos 等^[14,15]统计结果基本一致,这也更说明了老年核性白内障的发生与 LEC 的异常增生有关。

综上所述,我们推测高表达 bFGF 及 α -SMA 的老年核性白内障 LEC 在接受损伤应激后仍有继续增

生和分化的能力,使得晶状体纤维层状结构继续增厚、密度增加,晶状体纤维的有序排列才能维持晶状体的透明性^[16],但此种晶状体纤维排列紊乱,失去正常极性,发生核性混浊;相反,老年皮质性白内障的 LEC 在接受损伤应激后更容易发生凋亡和坏死,残存的上皮细胞不足以维持正常的代谢环境,纤维细胞破裂形成碎片即细颗粒状物质,纤维变性分解形成圆形子体即 morgagnian 子体,形成白色皮质混浊。

另外,我们发现,处于核性混浊的白内障其囊膜在截取过程中更容易一些,而且较容易获得完整的囊膜。有学者推测,老年核性白内障术后发生后囊膜混浊的几率高于皮质性白内障,但尚未见有确切报道。我们知道,白内障囊外摘出术后残留的赤道部上皮细胞的增生分化能力是最强的,根据后囊膜混浊的细胞学理论以及结合我们对核性白内障和皮质性白内障 LEC 的研究可以作出此推测,因此,我们还需要进一步的实验研究和临床追踪。

参考文献

- 1 蔡小军,杨桂芳.转化生长因子 $\beta 2$ 及其 II 型受体在老年人核性皮质性白内障晶状体上皮细胞中的表达[J].中华老年医学杂志 2004;23(10):742-743.
- 2 Kok A, Lovicu FJ, Chamberlain CG, McAvoy JW. Influence of platelet-derived growth factor on lens epithelial cell proliferation and differentiation[J]. *Growth Factors* 2002; 20(1):27-34.
- 3 Robinson ML. An essential role for FGF receptor signaling in lens development[J]. *Semin Cell Dev Biol* 2006;17(6):726-740.
- 4 Garcia CM, Kwon GP, Beebe DC. Alpha-Smooth muscle actin is constitutively expressed in the lens epithelial cells of several species[J]. *Exp Eye Res* 2006;83(4):999-1001.
- 5 包睿,柳林.细胞因子与晶状体上皮细胞增殖[J].国际眼科杂志 2004;4(2):125-128.
- 6 Chang PY, Bjornstad KA, Chang E. Particle irradiation induces FGF2 expression in normal human lens cells[J]. *Radiat Res* 2000;154(5):477-484.
- 7 Rungger-Brändle E, Conti A, Leuenberger PM, Rungger D. Expression of alpha smooth muscle actin in lens epithelia from human donors and cataract patients[J]. *Exp Eye Res* 2005;81(5):539-550.
- 8 Marcantonio JM, Syam PP, Liu CS. Epithelial transdifferentiation and cataract in the human lens[J]. *Exp Eye Res* 2003;77(3):339-346.
- 9 Wormstone IM, Del RK, McMahon G. FGF: an autocrine regulator of human lens cell growth independent of added stimuli[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(8):1690.
- 10 Golestaneh N, Fan JG, Fariss RN, Lo WK, Zelenka PS, Chepelinsky AB. Lens major intrinsic protein (MIP)/aquaporin expression in rat lens epithelia explants requires fibroblast growth factor-induced ERK and JNK signaling[J]. *J Biol Chem* 2004;279(30):31813-31822.
- 11 Ueda Y, Chambertain CG, Satoh K, McAvoy JW. Inhibition of FGF-induced alpha A-crystallin promoter activity in lens epithelial explants by TGF beta[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(7):1833-1839.
- 12 Symonds JG, Lovicu FJ, Chamberlain CG. Posterior capsule opacification-like changes in rat lens explants cultured with TGF beta and FGF: effects of cell coverage and regional differences[J]. *Exp Eye Res* 2006;82(4):693-699.
- 13 柳夏林,刘奕志,刘欣华,郑湖玲.老年性白内障的不同类型与晶状体上皮细胞密度的改变[J].中山医科大学学报 2002;23(1):50-52.
- 14 Harocopos GJ, Alvares KM, Allan EK. Human age-related cataract and lens epithelial cell death[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(13):2696.
- 15 Li WC, Kuszak JR, Dunn K. Lens epithelial cell apoptosis appears to be a common cellular basis for non-congenital cataract development in humans and animals[J]. *J Cell Biol* 1995;130(1):169-181.
- 16 Stump RJ, Lovicu FJ, Ang SL, Pandey SK, McAvoy JW. Lithium stabilizes the polarized lens epithelial phenotype and inhibits proliferation, migration, and epithelial mesenchymal transition[J]. *J Pathol* 2006;210(2):249-257.

《眼科新进展》杂志 2008 年征订启事

《眼科新进展》杂志是由新乡医学院主办的眼科学高级学术刊物,创刊于 1980 年,大 16 开,80 页,国内外公开发行。1999 年加入国家科技部《万方数据系统科技期刊群》和《中国学术期刊(光盘版)》,1997 年被上海医科大学图书馆选定为医学类核心期刊,2000 年被美国《化学文摘》收录,2001 年被俄罗斯《文摘杂志》收录,2002 年入选中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),2005 年获河南省优秀科技期刊奖。国际标准连续出版物号为:ISSN 1003-5141,国内统一刊号:CN 41-1105/R,邮发代号:36-42。

本刊辟有名家讲坛(述评)(Editorial)、实验研究(Experi-

mental study)、应用研究(Applied study)、文献综述(Review article)、临床报告(Clinical report)、病例报告(Case report)、消息(News)、读者来信(Letters)等栏目。本刊读者对象主要是眼科学临床、科研和教学工作者,欢迎国内外眼科医学工作者踊跃投稿和订阅。国内每期定价 8.00 元,全年定价 96.00 元。国外每期定价 5 美元,全年 60 美元。如错过邮局订阅,可直接汇款到我刊编辑部。联系地址:河南省新乡市金穗大道新乡医学院《眼科新进展》编辑部,邮编:453003。电话:0373-3029404;传真:0373-3029404-2;E-mail: ykxjz@xxmu.edu.cn, ykxjz@163.com