

衰老标记蛋白-30 在人晶状体上皮细胞中的表达及意义[△]

胡美霞 罗国容 周素芳 莫发荣 谢小薰 梁皓

Expression and significance of senescence marker protein-30 in human lens epithelial cells

HU Mei-Xia, LUO Guo-Rong, ZHOU Su-Fang, MO Fa-Rong, XIE Xiao-Xun, LIANG Hao

[Key words] senescence marker protein-30; lens epithelial cells; cataract

[Abstract] Objective To study the expression of senescence marker protein-30 (SMP-30) in human lens epithelial cells and explore its possible role and clinical significance in the emergence and development of cataract. **Methods** Four normal liver, two normal kidney samples and 57 human anterior lens capsule were used for detection. Immunohistochemical method was used to detect the expression of SMP-30 in lens epithelial cells. The results associated with clinical data were analyzed statistically. **Results** The expression of SMP-30 in transparense lens epithelial cells was higher than that in cataract lens epithelial cells ($P < 0.05$). And it had no correlation with sex and age. **Conclusion** The reduction of SMP-30 expression in lens epithelial cells may result in the emergence of cataract.

[Rec Adv Ophthalmol 2008; 28(1): 13-15]

[中图分类号] R776.1 **[文献标识码]** A

[文章编号] 1003-5141(2008)01-0013-03

[关键词] 衰老标记蛋白-30; 晶状体上皮细胞; 白内障

[摘要] 目的 研究人晶状体上皮细胞中衰老标记蛋白-30 (senescence marker protein-30, SMP-30) 的表达, 探讨其在白内障发生发展中的作用及临床意义。方法 制备 57 例人晶状体前囊膜、4 例正常人肝组织和 2 例正常人肾组织的石蜡切片。采用免疫组织化学 SP 法检测 SMP-30 在晶状体上皮细胞中的表达, 并结合临床资料进行统计分析。结果 实验发现 SMP-30 在白内障晶状体上皮细胞的表达较透明晶状体弱 ($P < 0.05$), 其在晶状体上皮细胞的表达与性别、年龄未见相关性。结论 SMP-30 在晶状体上皮细胞表达的减少可能导致白内障的发生。

[眼科新进展 2008; 28(1): 13-15]

白内障是多因素综合作用的结果, 目前尚无确切的发生机制^[1]。衰老标记蛋白-30 (senescence marker protein-30, SMP-30), 也称为 regucalcin, 是 1992 年发现的一种新型钙结合蛋白质, 在细胞内信号转导途径中起调节作用。目前已证实, SMP-30 在人肝细胞、肾近曲小管上皮细胞有较强表达, 且其含量随年龄增加而减少, 无性别差异^[2]。目前有关其在白内障发生机制中的研究报道较少。我们选用各种白内障和透明晶状体前囊膜, 检测其上皮细胞中 SMP-30 的表达, 为研究白内障的

发病机制提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 选取 2006 年 8 月至 2007 年 6 月广西医科大学第一附属医院眼科行白内障囊外摘出术的患眼, 术中连续环形撕取晶状体前囊膜, 直径 4~5 mm, 前囊膜取下后置于无菌的生理盐水中洗去黏弹剂及黏附的皮质, 放入中性甲醛溶液固定, 备用。透明晶状体取自角膜移植供体眼, 取整个晶状体放入中性甲醛溶液固定, 备用。

作者简介: 胡美霞, 女, 1979 年 9 月出生, 湖南双峰人, 在读硕士研究生。联系电话: 0771-5356507; E-mail: summerhmx@sohu.com

About HU Mei-Xia: Female, born in September, 1979. Master degree. Tel: +86-771-5356507; E-mail: summerhmx@sohu.com

收稿日期: 2007-08-29

修回日期: 2007-10-17

本文编辑: 董建军

△基金项目: 广西自然科学基金资助(编号: 桂科自 0339047)

作者单位: 530021 广西壮族自治区南宁市, 广西医科大学第一附属医院眼科(胡美霞, 梁皓); 广西医科大学组胚教研室(罗国容, 周素芳, 莫发荣, 谢小薰)
通讯作者: 梁皓, E-mail: lianghao505@yahoo.com.cn

Received date: Aug 29, 2007

Accepted date: Oct 17, 2007

Foundation item: Natural Science Foundation of Guangxi (No.: 0339047)

From the Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University (HU Mei-Xia, LIANG Hao); Department of Histology and Embryology, Guangxi Medical University (LUO Guo-Rong, ZHOU Su-Fang, MO Fa-Rong, XIE Xiao-Xun), Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Responsible author: LIANG Hao, E-mail: lianghao505@yahoo.com.cn

1.1.2 抗体来源 由广西医科大学组胚教研室提供。制备及检测过程如下:参照周素芳等^[3]报道的方法重组表达出含 SMP-30 羧基端 165 个氨基酸多肽的麦芽糖融合蛋白 (MBP-SMP-30), 由武汉三鹰生物技术有限公司按常规多克隆抗体制备方法制备兔抗 MBP-SMP-30 多克隆抗体。多克隆抗体经 ELISA 法检测, 效价达 1×10^{-6} ; 经 Western blot 鉴定, 在 MBP-SMP-30 蛋白所在位置有明显阳性反应。

1.1.3 试剂来源 免疫组织化学 SP 试剂盒, DAB 显色试剂盒和苏木素复染液均购自福建迈新生物技术公司, 其余化学试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 石蜡切片制备 前囊膜标本较薄, 各浓度酒精脱水时间缩短为 15 min, 其余步骤按常规方法制成 $6 \mu\text{m}$ 厚的石蜡切片, 晶状体标本按常规脱水浸蜡制成 $6 \mu\text{m}$ 厚的石蜡切片。

1.2.2 免疫组织化学染色 石蜡切片脱蜡水化后按免疫组织化学 SP 法进行染色。抗原修复条件为: $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸钠缓冲液中 95°C 微波修复 15 min。抗 MBP-SMP-30 多克隆抗体稀释度为 1:150, 4°C 孵育过夜。按 SP 试剂盒说明依次加入试剂及一抗; DAB 染色、苏木素复染、常规脱水、透明、封片。以正常肝、肾组织作阳性对照, PBS 液取代一抗作阴性对照。

1.2.3 染色结果的判断 病理图像分析仪取图并进行阳性细胞计数以及阳性反应强度的灰度值测定 (灰度值是指半透明介质透光程度的指标, 可分为 0~258 个等级; 等级越小, 阳性反应越强)。参考邢传平等^[4]报道的方法进行半定量分析。

1.3 统计学处理 正常组与白内障组比较采用 χ^2 检验, 检验水准为 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 晶状体上皮细胞的形态学观察 正常晶状体上皮细胞核呈椭圆形或圆形单层排列 (图 1), 老年性白内障晶状体前囊膜被染成均一的浅蓝色, 上皮细胞形态不一, 呈扁平状或低柱状 (图 2)。



Figure 1 Normal lens epithelial cells are oval or round and array in a single line (SP, $\times 400$) 正常晶状体上皮细胞核呈椭圆形或圆形单层排列 (SP, $\times 400$)

2.2 SMP-30 在晶状体上皮细胞的表达 SMP-30 阳性反应呈棕黄色, 主要存在于晶状体上皮细胞胞浆, 多数细胞核也表达。SMP-30 在 35 例白内障晶状体上皮细胞中表达强阳性 (++) 4 例, 阳性 (+) 20 例, 弱阳性 (+) 5 例, 阳性率为 82.9%; 22 例透明晶状体中表达为强阳性 (++) 10 例, 阳性 (+) 9 例, 弱阳性 (+) 2 例, 阳性率为 95.5%。SMP-30 在正常组与白内障组间阳性细胞表达率差异有统计学意义 ($P < 0.05$), SMP-30 在正常组表达较白内障组强。SMP-30 在同一晶状体中只表达于最外层晶状体上皮细胞, 内层的带状晶状体细胞均未见表达 (图 3)。SMP-30 在晶状体上皮细胞的表达与年龄、性别的关系见表 1, 差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05)。

2.3 SMP-30 在正常肝、肾组织中的表达 4 例正常肝组织和 2 例正常肾组织均可见阳性反应。在肝组织, SMP-30 阳性反应颗粒主要见于肝细胞胞浆, 胞核少见, 胞膜无表达, 结缔组织、血管未见阳性反应物; 在肾组织主要见于肾小管上皮细胞胞浆, 其余部位未见阳性反应。

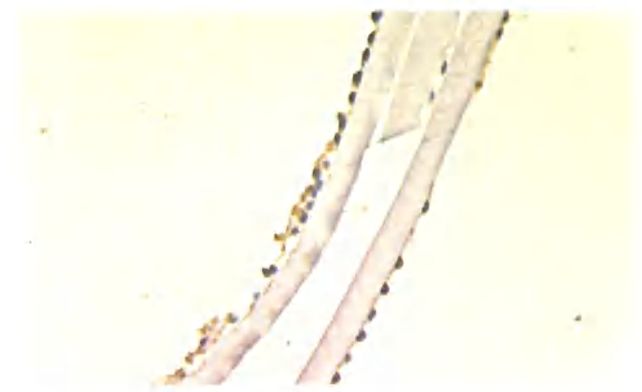


Figure 2 Lens anterior capsule of age related cataract were stained light blue, the morphologies of lens epithelial cells are not the same, they are flat or low pillar form (SP, $\times 400$) 老年性白内障晶状体前囊膜被染成均一的浅蓝色, 上皮细胞形态不一, 呈扁平状或低柱状 (SP, $\times 400$)

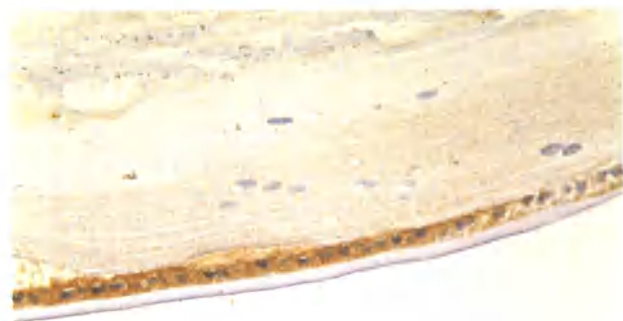


Figure 3 SMP-30 is only expressed in lens epithelial cells, the girdle-shaped lens cells don't express (SP, $\times 400$) SMP-30 只表达于最外层晶状体上皮细胞, 内层的带状晶状体细胞均未见表达 (SP, $\times 400$)

表1 SMP-30 在各项临床指标中的表达情况
Table 1 Expression of SMP-30 in different clinical indexes

		n	Expression level of SMP-30			
			-	+	++	+++
Sexuality	Male	32	3	5	17	7
	Female	25	4	2	12	7
Age(years)	≤50	27	2	3	12	10
	≥50	30	5	4	17	4

3 讨论

SMP-30/regucalcin 为一种钙结合蛋白质,但该蛋白和以往报道的钙结合蛋白的结构不同,它没有一般钙结合蛋白结构中所具有的 EF 模序(helix loop helix motif),表明 SMP-30/regucalcin 代表了一种新型的钙结合蛋白质^[5]。它在体内作为钙信号转导蛋白,调节体内细胞的增生及多种代谢过程。在其功能的研究上发现 SMP-30 的蛋白质含量与组织成熟、老化及细胞增生有关。它具有调节活化钙泵、GTP 酶,抑制 DNA、RNA 及蛋白质的合成,抑制细胞增生、凋亡,以及抗氧化等功能^[6]。动物实验证明 SMP-30 作为一种有机磷酸酯与糖酵解的磷酸戊糖途径和维生素 C 的合成密切相关,其表达随年龄增加而减少是由于氧化应激所致^[7]。

本实验用免疫组织化学方法测定了 SMP-30 在透明晶状体与白内障晶状体上皮细胞的表达情况,发现 SMP-30 在白内障晶状体上皮细胞的表达较透明晶状体弱,说明白内障的发生伴随有晶状体上皮细胞 SMP-30 含量的减少。白内障的发生可能与

SMP-30 含量的减少或活性的下降引起晶状体钙离子失衡、抗氧化功能下降以及维生素 C 的合成不足有关。这与陈莺^[8]的报道一致。而在正常晶状体 SMP-30 仅表达于外层晶状体上皮细胞,内层老化的带状晶状体细胞均未见表达。间接说明了 SMP-30 的年龄相关性,此次实验未得出 SMP-30 的表达随年龄增加而减少的结论,可能与样本含量不够大有关。至于 SMP-30 在维持晶状体正常生理功能中所起的作用以及具体作用机制有待进一步研究。

参考文献

- 1 徐国兴,胡建章,林 鸿,周琳英,王婷婷,郑学栋,等. 年龄相关性白内障晶状体上皮细胞的超微结构研究[J]. 国际眼科杂志 2004;4(4):631-632.
- 2 Shimokawa N, Yamaguchi M. Molecular cloning and sequencing of the cDNA coding for a calcium-binding protein regucalcin from rat liver[J]. *FEBS Lett* 1993;327(3):251-255.
- 3 周素芳,谢小薰,蓝 玲,赵飞兰,黎 鹏,范 蓉,等. 肝癌相关抗原 SMP30 羧基端基因的构建、表达及血清学分析[J]. 中国免疫学杂志 2004;20(12):821-824.
- 4 邢传平,刘 斌,董 亮. 免疫组织化学标记结果的判断方法[J]. 中华病理学杂志 2001;30(4):318.
- 5 Fujita T, Shirasawa T, Maruyama N. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones encoding mouse senescence marker protein-30(SMP30)[J]. *Biochim Biophys Acta* 1996;1308(1):49-57.
- 6 周素芳,罗国容. 衰老标记蛋白-30 及其研究进展[J]. 科学技术与工程 2004;4(8):725-731.
- 7 Kondo Y, Inai Y, Sato Y, Handa S. Senescence marker protein 30 function as gluconolactonase in L-ascorbic acid biosynthesis, and its knockout mice are prone to scurvy[J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(15):5723-5728.
- 8 陈 莺. 白内障发病机制及预防治疗的研究进展[J]. 眼科新进展 *Yanke Xinjinzhan* 2005;25(2):190-193.

(上接第 12 页)

不同的免疫抑制剂可以通过不同途径影响移植细胞因子的表达。在我们的研究中,IL-1ra 治疗组较生理盐水对照组和 CsA 治疗组,IL-1 β mRNA 及其蛋白的表达明显减弱,差异有显著统计学意义($P < 0.01$);CsA 组表达较生理盐水组表达病理学观察减弱,经统计学分析,差异无统计学意义($P > 0.05$)。说明 IL-1ra 可以通过抑制高危角膜移植 IL-1 β 的表达发挥作用,而 CsA 对高危角膜移植 IL-1 β 的表达影响较小。IL-1 β mRNA 及其蛋白表达的同步性再一次说明 IL-1ra 可以结合于靶细胞膜上的特异性受体,改变靶细胞中编码相应蛋白质 mRNA 的表达。即 IL-1ra 在 mRNA 水平影响高危角膜移植细胞因子的表达,降低炎症细胞浸润,抑制免疫排斥反应。这有助于进一步揭示移植免疫机理。作为天然免疫抑制剂,IL-1ra 体内副作用小,对该免疫抑制剂的不断深入研究将为临床进一步提高角膜移植成功率开辟更广阔的前景。

参考文献

- 1 Coster DJ. Mechanisms of corneal graft failure the erosion of corneal privilege[J]. *Eye* 1989;3(2):151-153.
- 2 Arend WP, Joslin FG, Massoni RJ. Effects of immune complexes on production by human monocytes of interleukin 1 or an interleukin 1 inhibitor[J]. *Immunology* 1985;134(6):3868-3875.
- 3 Ben-Ezra D, Hemo I, Maftzir G. In vivo antigenic activity of interleukins[J]. *Arch Ophthalmol* 1994;108(5):573-576.
- 4 Caimeliet P, Collen D. Molecular analysis of blood vessel formation and disease[J]. *Am J Physiol* 1997;237(5):2091-2104.
- 5 袁 进,陈家祺,刘祖国,王智崇,周世有. IL-1 基因修饰角膜内皮细胞及其表达[J]. 眼科新进展 *Yanke Xinjinzhan* 2006;26(1):2-6.
- 6 廖 琼,刘 翔. IL-1 受体拮抗剂防治大鼠角膜移植排斥反应的实验研究[J]. 眼科新进展 *Yanke Xinjinzhan* 2004;24(5):364-365.
- 7 郭金华,查家华,陈国苍. IL-1ra 对大鼠角膜移植免疫排斥反应的抑制作用[J]. 眼科研究 2001;19(3):195-197.
- 8 Hannum CH, Wilcox CJ, Arend WP, Joslin FG, Dripps DJ, Heimdal PL, et al. Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor[J]. *Nature* 1990;343(6256):336-340.