

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.03.017

PDGF-A 在年龄相关性白内障晶状体上皮细胞中的表达及其临床意义*

陈爽¹ 韩清^{1△} 孙蕾¹ 刘国丹¹ 陈福来²

(1 哈尔滨医科大学附属四院 黑龙江 哈尔滨 150001; 2 哈尔滨医科大学病理教研室 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:探讨血小板源性生长因子 A(Platelet derived growth factor-A, PDGF-A)在年龄相关性白内障晶状体上皮细胞中的表达及其临床意义。**方法:**以哈尔滨医科大学附属第四医院眼科 2011 年 6 月~2012 年 1 月收治的 72 例年龄相关性白内障晶状体前囊膜作为实验组, 10 例无白内障发生的透明晶状体前囊膜作为正常对照组, 采用 SP 免疫组织化学方法分别检测两组上皮细胞中 PDGF-A 的表达, 运用图像分析软件进行量化, 并采用 SPSS11.0 软件进行统计学分析探讨其与年龄相关性白内障临床特征之间的关系。**结果:**年龄相关性白内障及透明晶状体上皮细胞中均有 PDGF-A 表达, 且在年龄相关性白内障中表达明显高于透明对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。随晶状体混浊程度加重, PDGF-A 强阳性表达率逐渐升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 另外, 不同年龄组白内障人群中 PDGF-A 表达无显著性差异($P > 0.05$)。**结论:**① PDGF-A 在年龄相关性白内障患者晶状体上皮细胞中呈高表达; ② 年龄相关性白内障患者中 PDGF-A 的表达量与晶状体的混浊程度呈正相关; ③ PDGF-A 的过度表达可能在年轻人白内障的发生中起到了重要作用。

关键词:人晶状体上皮细胞; 血小板源性生长因子 A; 年龄相关性白内障

中图分类号:R776.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)03-464-04

Expression and Clinical Significance of PDGF-A in Epithelial Cells of Age-related Cataract Lens*

CHEN Shuang¹, HAN Qing^{1△}, SUN Lei¹, LIU Guo-dan¹, CHEN Fu-lai²

(1 Department of ophthalmology, Affiliated Fourth Clinical Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China; 2 Pathological staff room of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To observe the expression and investigate the clinical significance of Platelet derived growth factor-A (PDGF-A) in epithelial cells of age-related cataract lens. **Methods:** 70 cases of age-related cataract lens and 10 cases of transparent crystal were selected as the experimental group and control group, respectively. The expression of PDGF-A in epithelial cells were detected by SP immunohistochemistry staining. The quantitative analysis was performed by professional image software and the data were analyzed with standard statistical method. **Results:** Compared with the normal transparent lens, the expression level of PDGF-A was higher in patients suffering from age related cataract. In addition, the number of positive cells went up with the level of the opacities of lens. There were significant differences in the percentage of positive cell in the anterior capsule between ARC group and control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** ① PDGF-A was highly expressed in the age-related cataract. ② The abnormal expression of PDGF-A was related to the age-related cataract. There was a positive relationship between the expression level of PDGF-A and the lens opacities classification. ③ Over expression of PDGF-A probably played an important role in the formation of ARC curling on the younger.

Key words: Human lens epithelial cells; Platelet derived growth factor-A; Age related cataract

Chinese Library Classification(CLC): R766.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)03-464-04

前言

白内障是全球主要致盲性因素之一, 白内障致盲者占盲人总数一半^[1]。年龄相关性白内障(age-related cataract, ARC)是最常见的白内障类型, 其发生率随年龄增长而增高, 随着世界范围内人口老龄化的出现, 患病率呈逐年上升趋势。白内障是多种因素共同作用的综合结果, 其表现和致病机理复杂多样, 尽管 21 世纪以来生物化学及分子生物学在飞速发展, 有关白内障的研究也日益增加, 但年龄相关性白内障的发生机制至今仍

不能完全阐明^[2], 成为全世界眼科工作者共同面临的难题。有研究认为基因表达异常与白内障的发生有密切的关系, PDGF-A 是一种由多种细胞产生分泌的活性多肽, 分子量为 28~35 KD。以往的研究表明, PDGF-A 与多种眼科疾病有关^[3], 但在晶状体的研究中甚少, 目前尚未见 PDGF-A 在人年龄相关性白内障晶状体上皮细胞中表达的报道。本研究采用免疫组织化学技术检测人晶状体上皮细胞中 PDGF-A 的表达, 以期进一步阐明年龄相关性白内障的发病机制, 为临床预防和治疗年龄相关性白内障提供更多的实验和理论依据。

* 基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(D200948)

作者简介: 陈爽(1987-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 白内障

△ 通讯作者: 韩清, 电话: 045182576577, 13804541596, E-mail: haneye@yahoo.cn

(收稿日期: 2013-04-28 接受日期: 2013-05-25)

1 材料与方法

1.1 材料来源

收集哈尔滨医科大学附属第四医院眼科 2011 年 6 月~2012 年 1 月年龄相关性白内障患者行超声乳化吸除术中连续环形撕囊的晶体前囊膜 72 例作为实验组,其中男 37 例,女 35 例,年龄 35~89 岁,术前排除其它眼部疾病及全身性疾病,将瞳孔充分散大,采用裂隙灯照相和后照法,根据晶状体混浊分类系统 II (lens opacities classification system II, LOCS II) 按晶状体混浊程度将实验组分成三组:组 1,轻度混浊,N1C1~1P1~2;组 2,中度混浊,N2C2~3P3;组 3,重度混浊,N3C4~5P4。对照组为透明晶状体前囊膜 10 例,其中男 5 例,女 5 例,年龄 16~32 岁,混浊等级 N0C0P0,取自无白内障发生的晶状体脱位眼。以上标本的采集均获得患者本人同意。

1.2 材料处理及保存

采用连续环形撕囊法取下年龄相关性白内障及正常成年人晶状体中央直径 5mm 范围内的前囊膜,生理盐水冲洗,置于 40 g/L 多聚甲醛中室温固定 24 小时,75%、85%、95%、100% 酒精各 5 min 梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,-20℃ 冰箱中保存备用。

1.3 主要试剂

兔抗人 PDGF-A 单克隆抗体(1:100 稀释),购于武汉博士德生物工程有限公司;即用型免疫组织化学超敏 Ultrasensitive TM SP 试剂盒(兔)及 DAB-0031 显色剂购于福州迈新生物技术开发有限公司。

1.4 实验方法

取组织蜡块制成 4 μ m 厚切片,捞片于 APES 浸泡并用多聚赖氨酸处理过的载玻片上,置 60℃ 烤箱 24 小时,使切片紧密粘附;取出切片二甲苯常规脱蜡,水化,蒸馏水洗 3 次,每次 2 min 至无味儿;将片子置于 0.01 mol/L, pH6.0 的柠檬酸缓冲液中 98℃ 微波修复抗原,自然冷却至室温;PBS 洗 3 次,每次 5 min;滴加适量 3% H_2O_2 -甲醇液 37℃ 孵育 5 min,去除内源性过氧化物酶;PBS 洗 3 次,每次 2 min;滴加 1:50 山羊血清封闭液,室温下 30 min,甩去多余液体,擦干组织周围多余水分;滴加 1:100 稀释的 PDGF-A 抗体 4℃ 过夜,16 小时后取出室温放置 20 min,防止组织脱片;PBS 洗 3 次,每次 5 min(用 PBS

缓冲液代替一抗作阴性对照);滴加生物素标记二抗,37℃ 孵育 30 min,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;滴加适量辣根过氧化物酶标记的链霉素卵白素工作液,覆盖组织即可,37℃ 孵育 30 min,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;DAB 显色,镜下控制反应时间,及时终止,自来水充分冲洗 3 min;苏木素复染,常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,干燥封片,放入烤箱留待显微镜下观察。

1.5 结果判定及统计学分析

1.5.1 结果判定 用 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照,PDGF-A 阳性细胞胞浆呈棕黄色或棕褐色。每张切片置于高倍显微镜下随机观察 5 个视野,记录阳性细胞率 R, $R = \frac{5 \text{ 个视野内阳性细胞总数}}{5 \text{ 个视野内细胞总数}} \times 100\%$,重复检测三遍取平均值进行计分:无阳性细胞计为 0 分;阳性细胞率 < 25% 为 1 分;25%~50% 为 2 分;50%~75% 为 3 分;> 75% 为 4 分。用专业图像分析系统分析着色程度,对实验结果计分分级,具体标准如下:细胞浆内无染色为阴性,计 0 分;细胞浆内见极少量淡黄色颗粒为判定不清,计 1 分;细胞浆内见多量淡黄色颗粒为弱阳性,计 2 分;细胞浆内见较多棕色颗粒为阳性,计 3 分;细胞浆内见大量棕褐色颗粒为强阳性,计 4 分。着色强度计分结合阳性细胞率,两者得分相加,0~2 分(-);3~4 分(+);5~6 分(++);7~8 分(+++)。

1.5.2 统计学分析 采用 SPSS11.0 软件,计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,计数资料采用秩和检验进行统计学分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

光镜下观察免疫组织化学染色片,结果显示:在透明晶状体和年龄相关性白内障晶状体两组前囊膜中可见 PDGF-A 的表达,且实验组 PDGF-A 的阳性表达率($69.52 \pm 13.46\%$)与对照组($20.47\% \pm 11.28\%$)相比,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1、图 2、图 3、图 4。年龄相关性白内障组各亚组间两两比较,强阳性表达率差异有统计学意义($P < 0.05$),且随晶体混浊程度的加重而增强。另外,年龄相关性白内障低龄组(年龄 35~62 岁,36 例)阳性表达($72.63 \pm 17.52\%$)和高龄组(年龄 62~89 岁,36 例)阳性表达($79.84 \pm 19.67\%$)比较,无显著性差异($P > 0.05$)。

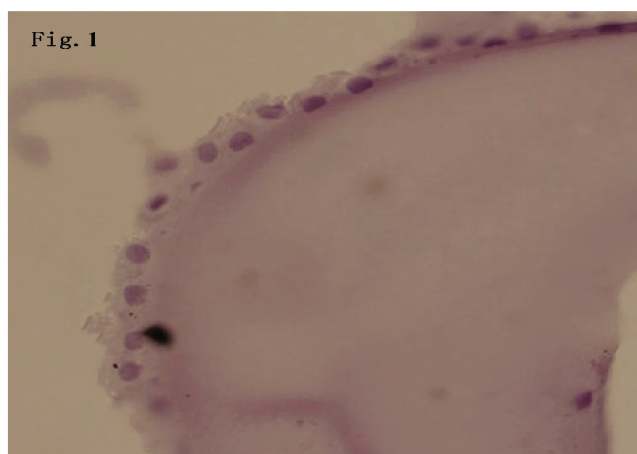


图 1 对照组晶状体上皮细胞中 PDGF-A 的表达(SP×400)

Fig.1 Expression of PDGF-A in LECs of the control group
(SP×400)

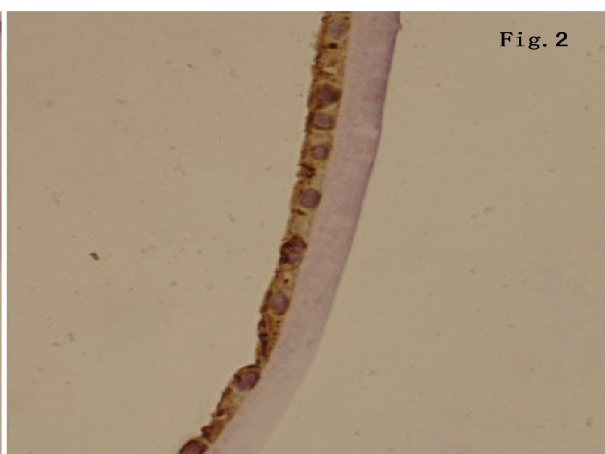


图 2 实验组 1 晶状体上皮细胞中 PDGF-A 呈弱阳性表达(SP×400)

Fig.2 Weekly positive expression of PDGF-A in LECs of ARC group 1
(SP×400)

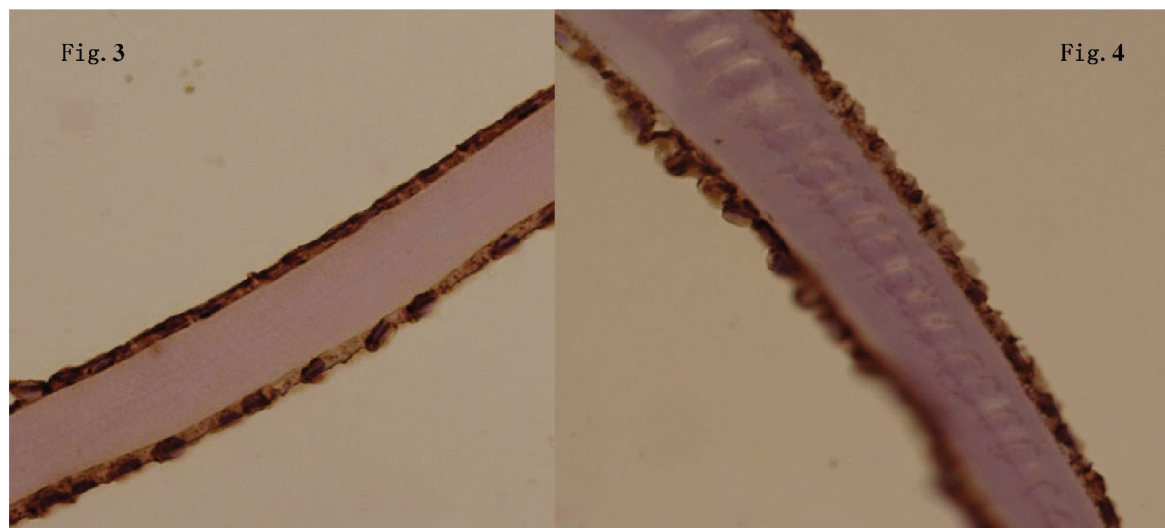


图3 实验组2 晶状体上皮细胞中 PDGF-A 呈阳性表达(SP× 400) 图4 实验组3 晶状体上皮细胞中 PDGF-A 呈强阳性表达(SP× 400)
Fig.3 Positive expression of PDGF-A in LECs of ARC group2 (SP× 400) Fig.4 Strongly positive expression of PDGF-A in LECs of ARC group3 (SP× 400)

表1 PDGF-A 的染色结果及反应强度综合比较
Table 1 Comprehensive comparison of staining results and the response intensity of PDGF-A

Groups	Case	Expression of PDGF-A in different levels			
		-	+	++	+++
ARC1	18	1	9	5	3
ARC2	32	0	5	17	10
ARC3	22	0	2	8	12
Control	10	4	6	0	0

Note: P<0.05 ARC group compared with control group; P<0.05 ARC1 group compared with ARC2;
P<0.05 ARC1 group compared with ARC3; P<0.05 ARC2 group compared with ARC3.

3 讨论

白内障即晶状体的混浊,以年龄相关性白内障最为常见,其发病机制复杂,可能是遗传、代谢、营养和环境等多种因素长期共同作用于晶状体的结果,同时过量的吸烟、饮酒、紫外线照射及糖皮质激素等药物的长期应用也与其形成有关,钙离子信号通路、Na⁺-K⁺-ATP 酶等与白内障的关系也陆续被发现^[4,5]。Ottonello S 等的动物实验结果表明氧化损伤与老年性白内障的发生密切相关^[6]。近来的研究也证实自由基引起的氧化损伤是白内障发生的共同分子生物学基础,晶状体上皮细胞 DNA 是氧化损伤最敏感的靶点,基因的改变必然引起转录和翻译的异常,导致蛋白质结构和功能的紊乱,而晶状体是富含蛋白质的组织,晶状体蛋白规则有序的排列决定了晶状体的透明性。同时,氧化损伤作用于晶状体细胞膜,使 Na⁺-K⁺-ATP 酶泵的功能发生改变,细胞膜的通透性发生变化,同时使晶状体蛋白质之间的交联增加,形成不溶性的高分子量聚合物,引起晶状体透明度的下降,最终导致白内障的形成。

Chen KC 等人通过大量研究证实血小板源性生长因子(PDGF)可以诱发晶状体上皮细胞的氧化应激^[7]。血小板源性生长因子家族由四种不同基因编码的多肽链(A、B、C、D)组成,

肽链之间通过二硫键形成五种同源或异源二聚体,分别是 PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-AB、PDGF-CC、PDGF-DD^[8]。PDGF 最初是由 Ross 等人在血凝块及全血中发现的血管形成刺激因子^[9],在组织生长、修复和再生过程中起调节作用^[10]广泛分布于血小板、内皮细胞、平滑肌细胞、单核-巨噬细胞等双倍体细胞中,是机体内较强的促细胞生长分化因子,也是重要的有丝分裂原和化学趋化剂^[11],主要通过自分泌和旁分泌的方式激活细胞膜上相应受体(PDGR)并与之结合发挥生物学效应^[12],PDGR 是单链跨膜糖蛋白,相对分子量 170~180 KD,在膜上以无活性的单体形式存在,包括 α、β 两个亚型,两者同属酪氨酸蛋白激酶受体,与配体结合后引起构象变化形成 PDGR-αα、PDGR-αβ 和 PDGR-ββ 3 种二聚体而激活,诱发细胞内结构域酪氨酸残基发生自身磷酸化等多种细胞内效应,进而介导细胞内的信号传导,调控包括靶细胞增殖在内的细胞生命活动^[13]。以往的研究提示,正常组织内 PDGF/PDGR 的表达受到严格的调控,但在肺纤维化、肾小球肾炎等多种纤维化疾病和多形性腺瘤中有过表达^[14,15]。近来的研究发现,G 蛋白耦联受体和表皮生长因子受体也可分别通过多种信号途径激活 PDGF,从而引导晶状体上皮细胞的增殖及分化^[16]。正常人房水中的 PDGF 能够调节晶状体上皮细胞的增殖、分化,影响晶体

的发育及其正常功能^[7]。当 PDGF 浓度超过正常时,将发挥有丝分裂原作用促进晶状体上皮细胞异常增殖^[1]。PDGF 亦可通过影响晶状体上皮细胞质内钙离子的浓度实现对晶状体上皮细胞的调节^[8]。此外,PDGF 还是转化生长因子 β 等的上游因子,除具有自身致纤维化作用外,尚可通过 TGF- β 的表达间接发挥重要的生物学作用。因此,PDGF 的表达及分布异常很可能导致晶状体上皮细胞的异常改变,从而导致白内障的发生。

本研究通过免疫组织化学方法观察到在年龄相关性白内障及正常人晶状体上皮细胞中均有 PDGF-A 的表达,其在年龄相关性白内障晶状体上皮细胞中的表达显著高于正常人晶状体上皮细胞,且随晶状体混浊程度的加重 PDGF-A 的表达逐渐增强,因此,PDGF-A 可能参与了年龄相关性白内障晶状体混浊的过程。另外,通过对晶状体混浊程度相同的白内障低龄组和高龄组实验数据进行比较,发现两组之间并无显著差异,推测较早发生白内障与 PDGF-A 的高表达有关,可能起到了重要的作用。当然本文的例数相对较少,PDGF-A 在年龄相关性白内障的形成过程中是否还参与了其他重要环节,有无与其相关的其他致病基因还有待于更深入的研究。

目前,尽管白内障可以通过手术获得良好的治疗效果,但随着人口老龄化问题的日益凸显,人类平均寿命的逐渐延长,即便是在发达国家,白内障的卫生保健工作也因其巨大的经济耗资而无法得到全面的实施,在发展中国家尤为严重。因此,探讨白内障的致病因素、研究白内障的发病机制、了解白内障的发生发展过程具有重要意义。本研究的结果表明:PDGF-A 的表达上调在年龄相关性白内障患者晶状体混浊过程中发挥了一定的作用,其具体机制仍有待于进一步深入研究。

参考文献(References)

- [1] 刘勇,樊保红. 老年性白内障的临床手术治疗 [J]. 中国现代药物应用, 2011, 5(2): 62-63
Liu Yong, Fan Bao-hong. Clinical operation treatment of age-related cataract[J]. Chin J Mod Drug Appl, 2011, 5(2): 62-63
- [2] Hockwin O, Kojima M, Uller-Breitenkamp U, et al. Lens and cataract research of the 20th century: a review of results, errors and misunderstandings[J]. Develop Ophthalmol, 2002, 35(1): 1-11
- [3] 邱梅园, 彭燕一. 血小板源性生长因子与眼科疾病 [J]. 医学综述, 2010, 16(19): 2924-2926
Qiu Mei-yuan, Peng Yan-yi. Platelet derived growth factor and ophthalmic diseases[J]. Medical Recapitlate, 2010, 16(19): 2924-2926
- [4] Xie Guo-li, Yan Hong, Lu Zi-fan. Inhibition of glucocorticoid-induced changes of Na⁺-K⁺-ATPase in rat lens by a glucocorticoid receptor antagonist RU486[J]. Exp Eye Res, 2010, 91(4): 544-549
- [5] Zhang-Hong, George Duncan, Wang Li-xin, et al. Arsenic trioxide initiates ER stress responses, perturbs calcium signalling and promotes apoptosis in human lens epithelial cells [J]. Exp Eye Res, 2007, 85(6): 825-835
- [6] Ottonello S, Foroni C, Carta A, et al. Oxidative stress and age-related cataract [J]. Ophthalmologica, 2000, 214(1): 78- 85
- [7] Chen KC, Zhou Y, Xing K, et al. Platelet derived growth factor (PDGF)-induced reactive oxygen species in the lens epithelial cells: the redox signaling[J]. Exp Eye Res, 2004, 7(8): 1057-1067
- [8] Fredriksson L, Li H, Eriksson U. The PDGF family: four gene products from five dimeric isoforms [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2004, 15(4): 197-204
- [9] Ross R. The biology of platelet derived growth factor [J]. Cell, 1986, 46: 155-169
- [10] Ball SG, Shuttleworth CA, Kielty CM. Platelet-derived growth factor receptors regulate mesenchymal stem cell fate: implications for neovascularization[J]. Expert Opin Biol Ther, 2010, 10(1): 57-71
- [11] 鄢飞, 鲍同柱. 血小板源性生长因子与创伤愈合[J]. 中国民康医学, 2008, 20(10): 1064-1065
Yan Fei, Bao Tong-zhu. Platelet derived growth factor and injury healing [J]. Medical Journal of Chinese People's Health, 2008, 20(10): 1064-1065
- [12] Leask A. Possible strategies for anti-fibrotic drug intervention in scleroderma[J]. J Cell Commun Signal, 2011, 5(2): 125-129
- [13] 张毅, 汤正好, 臧国庆. 血小板衍生生长因子(PDGF)与肝纤维化 [J]. 临床肝胆病杂志, 2006, 22(4): 304-306
Zhang Yi, Tang Zheng-hao, Zang Guo-qing. Platelet derived growth factor and hepatic fibrosis [J]. Journal of Clinical Hepatology, 2006, 22(4): 304-306
- [14] Trojanowska M. Role of PDGF in fibrotic diseases and systemic sclerosis[J]. Rheumatology (Oxford), 2008, 47 (5): 2-4
- [15] Miguita L, Martinez EF, De Araujo NS, et al. FGF-2, TGF-beta-1, PDGF-A and respective receptors expression in pleomorphic adenoma myoepithelial cells: an in vivo and in vitro study [J]. J Appl Oral Sci, 2010, 18(1): 83-91
- [16] Iyengar L, Patkunan athan B, McAvoy JW, et al. Growth factors involved in aqueous humour-induced lens cell proliferation [J]. Growth Factors, 2009, 27(1): 50-62
- [17] IbarakuiN, Lin LR, Reddy VN. Effects of growth factors on proliferation and differentiation in human lens epithelial cells in early subculture[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995, 36(11): 2304-2312
- [18] Ayaki M, Ishida Y, Nishimura E, et al. Lens epithelial migration between posterior capsular and intraocular lens with various finished posterior optic edge and haptic angulation [J]. Ophthalmic Res, 2003, 35(5): 262-267