

年龄相关性白内障晶状体前囊膜中核因子 κ B 的免疫组化研究

潘绍新¹, 范峰¹, 姚念杰¹, 赵桂秋²

作者单位:¹(235000) 中国安徽省淮北市人民医院眼科;
²(266003) 中国山东省青岛市, 青岛大学医学院附属医院眼科
作者简介:潘绍新,男,硕士,主治医师,研究方向:白内障、角膜病。

通讯作者:潘绍新. haoningpan@163.com

收稿日期:2010-08-23 修回日期:2010-10-08

Expression of nuclear factor-kappa B in epithelium of human anterior lens capsule with age-related cataract

Shao-Xin Pan¹, Feng Fan¹, Nian-Jie Yao¹, Gui-Qiu Zhao²

¹Department of Ophthalmology, Huaibei People's Hospital, Huaibei 235000, Anhui Province, China; ²Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Correspondence to: Shao-Xin Pan. Department of Ophthalmology, Huaibei People's Hospital, Huaibei 235000, Anhui Province, China. haoningpan@163.com

Received:2010-08-23 Accepted:2010-10-08

Abstract

• **AIM:** To explore the role of nuclear factor kappa B (NF- κ B) on the occurrence and development of the age-related cataract by examining the different expression of NF- κ B protein in epithelium of human anterior lens capsule.

• **METHODS:** Thirty anterior capsules with age-related cataract (case group) and 5 normal lens anterior capsules (normal control group) were collected randomly by microscope. Immunohistochemistry was used to detect the level of NF- κ B P65 protein and image analysis was adopted to perform the relative quantitative analysis on the two groups.

• **RESULTS:** There was NF- κ B protein in human lens epithelial cells according to both qualitative and quantitative analysis. Compared with normal control group, the expression of NF- κ B P65 protein significantly increased in case groups. There was significance based on independent-samples *t* test ($t=6.2109, P<0.05$).

• **CONCLUSION:** NF- κ B may be a kind of transcript factor to maintain the elementary metabolic function in lens epithelial cells. The over-expression of NF- κ B may play an important role on the occurrence and development of the age-related cataract.

• **KEYWORDS:** nuclear factor- κ B; lens epithelial cells; cataract

Pan SX, Fan F, Yao NJ, et al. Expression of nuclear factor-kappa B in epithelium of human anterior lens capsule with age-related cataract. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2010; 10(11): 2068-2070

摘要

目的:研究核因子 κ B 蛋白在正常人、年龄相关性白内障的晶状体前囊膜上皮细胞中表达的差异,探讨 NF- κ B 在年龄相关性白内障发病机制中的作用。

方法:显微镜下随机收集年龄相关性白内障前囊膜组织 30 例为病例组及透明晶状体前囊膜组织 5 例为正常对照组,采用免疫组织化学方法检测 NF- κ B P65 蛋白的表达。

结果:正常晶状体前囊膜上皮细胞胞质和胞核中可见 NF- κ B P65 蛋白阳性表达,以胞质为主;年龄相关性白内障晶状体前囊膜上皮细胞胞质和胞核染色呈阳性且以胞核为主。图像分析表明病例组 NF- κ B P65 平均吸光度值高于对照组,差异有统计学意义($t=6.2109, P<0.05$)。

结论: NF- κ B 表达水平升高与年龄相关性白内障发病密切相关,其表达异常可能参与年龄相关性白内障的发生与发展。

关键词:核因子 κ B; 晶状体上皮细胞; 白内障

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.11.008

潘绍新,范峰,姚念杰,等. 年龄相关性白内障晶状体前囊膜中核因子 κ B 的免疫组化研究. 国际眼科杂志 2010;10(11):2068-2070

0 引言

白内障是全球第一位的致盲性眼病,随着全球人口的老齡化,白内障的发病率以及患病人口总数都在不断上升,在临床上,以年龄相关性白内障最为常见。由于白内障发病机制较为复杂,目前尚不完全清楚。国内外学者普遍认为,自由基氧化损伤是年龄相关性白内障形成的重要因素之一^[1],近年来有人^[2,3]开始研究氧化敏感性核转录因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)对晶状体上皮细胞的作用,发现体外培养的兔或人的晶状体上皮细胞经过过氧化氢处理后,存在 NF- κ B 激活并由胞质转入胞核,其在多种组织细胞的应激及氧化还原反应中起重要作用。由于多数年龄相关性白内障患者前房内的过氧化氢(H₂O₂)含量明显升高^[4],故本实验拟对年龄相关性白内障与正常晶状体前囊膜上皮细胞中 NF- κ B 的表达情况进行研究,采用免疫组织化学的方法,检测 NF- κ B P65 蛋白的表达,并比较其差异,为进一步认识年龄相关性白内障发病机制提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料 随机收集 2008-10/2008-12 在青岛大学医学院附属医院眼科年龄相关性白内障手术患者 30 例 30 眼,排除眼外伤、糖尿病以及长期眼放射线接触等眼病史。男

女不限,年龄 52 ~ 73 (平均 57) 岁,白内障超声乳化手术中常规连续环形撕囊,直径约 5.5 ~ 6mm,将取下的晶状体前囊膜标本作为病例组。透明晶状体前囊膜来源于无眼病猝死尸体眼球 5 例 5 眼,男女不限,年龄 50 ~ 60 (平均 55) 岁。显微镜下同样方法留取透明晶状体前囊膜,作为正常对照组。两组年龄差别无统计学意义。所取标本予 40g/L 甲醛溶液中固定、脱水、透明、包埋并制成蜡块用于免疫组织化学。试剂:兔抗人 NF- κ B P65 多克隆抗体、SP 通用型免疫组织化学试剂盒、ZLI-9017 浓缩型 DAB 试剂盒均来自北京博奥森生物公司。

1.2 方法 免疫组织化学染色法及图像分析测定 NF- κ B P65 蛋白表达:每一标本连续切片 4 张,厚度 4 μ m,二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,蒸馏水洗 3 次,PBS 浸泡 5min;磷酸盐缓冲液微波抗原修复 15min,自然冷却 30min;30g/L H₂O₂ 去离子水室温孵育 10min,以消除内源性过氧化物酶活性;正常山羊血清封闭液室温孵育 10min,滴加 1:150 稀释的兔抗人 NF- κ B P65 多克隆抗体,4 $^{\circ}$ C 湿盒过夜,PBS 洗涤 3 次;滴加生物素标记的山羊抗兔 Ig,37 $^{\circ}$ C 孵育 15min,PBS 洗涤 3 次;滴加辣根过氧化物酶工作液,37 $^{\circ}$ C 孵育 15min,PBS 洗涤 3 次;DAB 显色,镜下控制反应时间。自来水洗涤以终止反应。充分水洗后,乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。阴性对照用 PBS 代替一抗。采用 OLYMPUS PRO150ES 及 SimpPCI 型高清晰度彩色图文报告分析系统作 NF- κ B P65 表达的半定量分析。在同一光强度,同一放大倍数下,每张切片随机选取 5 个视野,对切片上免疫组织化学阳性染色进行测定。选择阳性染色范围内每个像素的吸光度均值(平均吸光度 A 值)作为参数,NF- κ B P65 表达与 A 值成正比。

统计学分析:本文检测指标以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据采用 SPSS 11.5 统计软件进行独立样本比较 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 作为差异有统计学意义的标准。

2 结果

免疫组织化学法检测 NF- κ B P65 蛋白的表达:光镜下观察,透明晶状体和年龄相关性白内障患者晶状体前囊膜均有阳性着色,透明晶状体上皮细胞中可见有少量 NF- κ B P65 阳性表达,免疫阳性反应物呈黄色或者淡黄色颗粒,位于胞质和胞核内,以胞质为主要的,多数核未着色。年龄相关性白内障晶状体上皮细胞质内和细胞核内均可见棕黄色颗粒,在细胞核处较为明显。阴性对照未见阳性染色,仅可见被苏木素复染的蓝色细胞核(图 1 ~ 3)前囊膜下晶状体上皮细胞 NF- κ B P65 表达计算机图像分析结果(吸光度 A 值以 $\bar{x} \pm s$ 表示):透明晶状体组为 0.1658 ± 0.022 ,年龄相关性白内障组为 0.2889 ± 0.043 。年龄相关性白内障晶状体上皮细胞 NF- κ B P65 平均吸光度值高于透明晶状体上皮细胞 NF- κ B P65 平均吸光度值,差异有统计学意义($t = 6.2109, P < 0.05$)。

3 讨论

NF- κ B 广泛存在于真核生物各种细胞中,由 Rel 蛋白家族的两个亚单位组成的二聚体复合物。典型的 NF- κ B 是由 P65 和 P50 组成的异源二聚体,P65 亚单位的 c-末端含有反式活化结构域,通过与靶基因的顺式作用元件作用而促进基因的转录。正常状态下,NF- κ B 存在于细胞质中,以非活性的形式存在。当受到外界各种理化因素刺激作用后,如氧化损伤、免疫因素、炎症刺激,通过氧自由基及其它第二信使激活 NF- κ B 并从细胞质移位于细胞核中,

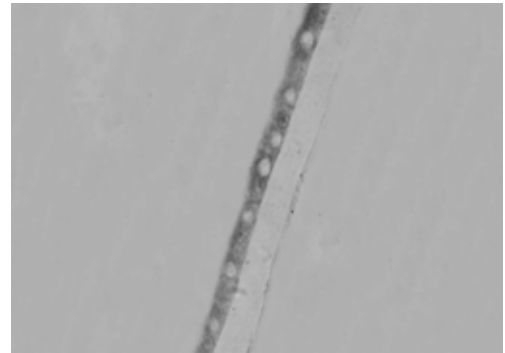


图 1 透明晶状体囊膜石蜡切片 NF- κ B P65 蛋白的表达,阳性染色位于晶状体上皮细胞胞质和胞核,以胞质为主,呈黄色颗粒 (SP-DAB $\times 400$)。

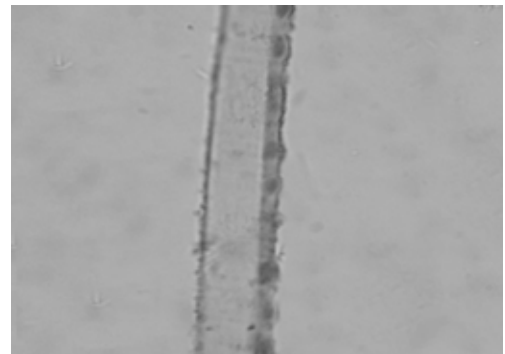


图 2 年龄相关性白内障晶状体囊膜石蜡切片 NF- κ B P65 蛋白的表达,阳性染色位于晶状体上皮细胞胞质和细胞核,以细胞核处为明显,呈棕黄色颗粒 (SP-DAB $\times 400$)。

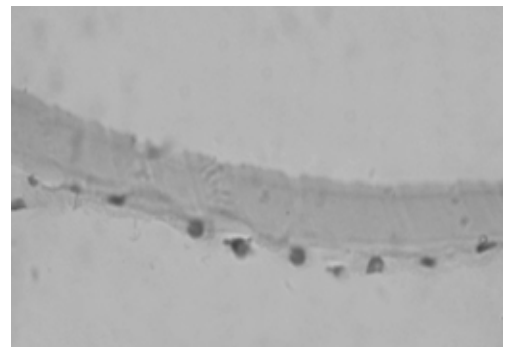


图 3 透明晶状体和年龄相关性白内障晶状体囊膜石蜡切片以 PBS 替代一抗的阴性对照,上皮细胞均未见阳性染色,仅可见复染的蓝色细胞核 (SP-DAB $\times 400$)。

诱导靶基因表达,产生各种细胞因子、细胞间黏附分子,从而发挥基因调控作用^[5-7]。年龄相关性白内障发病机制较为复杂,目前普遍认为晶状体上皮细胞受到自由基氧化损伤是其发病机制的重要因素^[1],近年来研究表明氧化敏感性核转录因子 NF- κ B 在晶状体上皮细胞的氧化损伤反应中发挥重要作用;Dudek 等^[2]通过对兔晶状体上皮细胞研究发现,H₂O₂ 介导的氧化损伤过程中,激活了 NF- κ B。Ramana 等^[8]发现在 TNF- α 和高糖环境中,人晶状体上皮细胞中 NF- κ B 也存在激活现象。Alexander 等^[9]用 NF- κ B-虫荧光素酶转基因小鼠证实小鼠晶状体中存在 NF- κ B 活性,分别用细菌 LPS, TNF- α 和紫外线刺激后,前两者晶状体中 NF- κ B 活性增强 20 ~ 40 倍,应激活后 NF- κ B 活性高峰的出现分别比其他组织迟 3 ~ 6h,可能是由于晶状体无血管的原因,但是晶状体上皮 NF- κ B 的动力学与其他组织中的相似,离体和在体研究中 NF- κ B 的活性无明显差异。

以上研究表明晶状体上皮细胞受氧化损伤、紫外线、糖代谢异常等刺激后,存在 NF- κ B 活化的现象。然而,目前国内外主要针对鼠、兔等动物通过制作动物模型和建立细胞模型而进行相关研究,很少对人类白内障进行相应的研究。

我们采用免疫组织化学^[10,11]等分子生物学方法,从蛋白水平对年龄相关性白内障患者晶状体前囊膜上皮细胞进行研究,并与正常透明晶状体进行比较。免疫组化结果显示:正常对照组和病例组晶状体前囊膜均有阳性着色,正常对照组晶状体上皮细胞中可见有少量 NF- κ B P65 阳性表达,免疫阳性反应物呈黄色或者淡黄色颗粒,位于胞质和胞核内,以胞质为主,多数核未着色。病例组晶状体前囊膜上皮细胞质内和细胞核内均可见棕黄色颗粒,在细胞核处较为明显。以上结果提示:正常透明晶状体上皮细胞内 NF- κ B P65 蛋白大多以非活性的形式存在于胞质内,细胞核内少量活性表达可能参与正常晶状体上皮细胞的各种生化活动。与正常透明晶状体比较,年龄相关性白内障晶状体前囊上皮细胞内 NF- κ B 蛋白激活增加并由胞质转入胞核,从而发挥基因转录调节作用,导致基因表达异常,可能影响晶状体上皮细胞的生物学性状改变。

总之,我们的研究结果提示 NF- κ B 表达水平升高与年龄相关性白内障发病密切相关,其表达异常可能参与年龄相关性白内障的发生与发展。但是,NF- κ B 参与年龄相关性白内障的具体机制尚需进一步研究。

参考文献

- 1 葛坚. 眼科学(八年制). 北京:人民卫生出版社 2005;214-215
- 2 Dudek EJ, Shang F, Taylor A. H₂O₂-mediated oxidative stress activates NF-kappaB in lens epithelial cells. *Free Radic Biol Med* 2001;31(5):651-658
- 3 Jin XH, Ohgami K. Inhibition of nuclear factor-kappa B activation attenuates hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in human lens epithelial cells. *Br J Ophthalmol* 2007;91(3):369-371
- 4 Spector A, GarnerWH. Hydrogen peroxide and human cataract. *Exp Eye Res* 1981;33:673
- 5 Prendes M, Zheng Y, Beg A. Regulation of developing B cell survival by Rel A-containing NF-kappa B complexes. *Immunol* 2003;171(8):3963-3969
- 6 Djavaheri-Mergny M, Amelotti M, Mathieu J, et al. NF-kappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy. *J Biol Chem* 2006;281(41):30373-30382
- 7 Vasudevan KM, Gurumurthy S, Rangnekar VM. Suppression of PTEN expression by NF-kappa B prevents apoptosis. *Mol Cell Biol* 2004;24(3):1007-1021
- 8 Ramana KV, Fried rich, Bhatanagar A, et al. Aldose reductase mediates cytotoxic signals of Hyperglycemia and TNF-alpha. In human lens epithelial cells. *FASEB J* 2003;17(2):315-317
- 9 Alexander G, Carlsen H, Blomhoff R. Strong *in vivo* activation of NF-kappaB in mouse Lens by classic stressors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(6):2683-2688
- 10 Higuchi R, Fockler C. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 1993;11(9):1026-1030
- 11 Heid CA, Stevens J, Livak KJ, et al. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996;6(10):986-994