

色素上皮衍生因子在人晶状体上皮细胞表达的意义

刘恬¹, 刘奕志², 项道满¹

基金项目: 中国广东省广州市医药卫生科技资助项目 (No. 201-102A213124)

作者单位: ¹(510623) 中国广东省广州市妇女儿童医疗中心眼科; ²(510060) 中国广东省广州市, 中山大学中山眼科中心

作者简介: 刘恬, 毕业于中山大学中山眼科中心, 博士, 主治医师, 研究方向: 白内障。

通讯作者: 刘恬. fifaspring@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-01-24 修回日期: 2011-04-21

Expression of pigment epithelium-derived factor in human lens epithelial cells and its correlated factors

Tian Liu¹, Yi-Zhi Liu², Dao-Man Xiang¹

Foundation item: Medical and Health Projects of Guangzhou City, China (No. 201102A213124)

¹Department of Ophthalmology, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou 510623, Guangdong Province, China;

²Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China

Correspondence to: Tian Liu. Department of Ophthalmology, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou 510623, Guangdong Province, China. fifaspring@yahoo.com.cn

Received: 2011-01-24 Accepted: 2011-04-21

Abstract

• **AIM:** To observe the expression of pigment epithelium-derived factor (PEDF) in human lens, and discuss the correlation between the level of PEDF in human lens epithelial cells (LEC) and some lens-related pathophysiological conditions.

• **METHODS:** Lens anterior capsules attached with LEC were collected from cataract surgeries in patients with senile and congenital cataract. Human clear lens were obtained from eye bank. PEDF expression and location were detected in above frozen sections specimens by indirect immunofluorescence with polyclonal antibodies specific to human PEDF. Anterior lens capsules with LEC were respectively pooled, and grouped as following: clear lens, slight opacity, severe opacity, young and aged. In each group, PEDF protein levels were analyzed by Western-blot, and mRNA levels were determined by RT-PCR.

• **RESULTS:** PEDF protein was present in human lens, with mainly cytoplasmic expression in LEC. We firstly revealed the down-regulation of PEDF mRNA and protein levels in LEC, with the appearance and aggravation of senile cataract ($P < 0.01$), and in aged cases as compared with young ones ($P < 0.01$).

• **CONCLUSION:** The expression level of PEDF in LEC down-regulates with lens aging, cataract formation and progression.

• **KEYWORDS:** pigment epithelium-derived factor; lens epithelial cells; cataract

Liu T, Liu YZ, Xiang DM. Expression of pigment epithelium-derived factor in human lens epithelial cells and its correlated factors. *Gujji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(6):973-975

摘要

目的: 观察色素上皮衍生因子 (PEDF) 在人晶状体内的分布, 探讨人晶状体上皮细胞 (LEC) 中 PEDF 表达水平与年龄及白内障发生发展的关系。

方法: 收集老年性和先天性白内障患者术中所取前囊膜、新鲜眼库眼透明晶状体样品, 冰冻切片标本用间接免疫荧光组织化学法检测 PEDF 蛋白在人晶状体中的分布, 前囊膜标本分别用蛋白质免疫印迹 (Western-blot) 及逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 技术检测 LEC 中 PEDF 蛋白和基因的表达水平。

结果: 人晶状体中存在 PEDF 蛋白, 主要分布于前囊下 LEC 胞浆中。按透明晶状体、轻度白内障、重度白内障及年龄分组分析, 人 LEC 内 PEDF 基因及蛋白的表达水平在晶状体由透明变混浊、混浊由轻变重的过程中呈下调趋势 ($P < 0.01$), 且随着机体的衰老显著下降 ($P < 0.01$)。

结论: 人 LEC 中 PEDF 表达随晶状体衰老和白内障发生发展显著下调。

关键词: 色素上皮衍生因子; 晶状体上皮细胞; 白内障

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.06.011

刘恬, 刘奕志, 项道满. 色素上皮衍生因子在人晶状体上皮细胞表达的意义. 国际眼科杂志 2011;11(6):973-975

0 引言

色素上皮衍生因子 (pigment epithelium-derived factor, PEDF) 是一种分布广泛的多效能多肽因子, 已在眼内多种组织中检测到。在对其它类型组织细胞的研究中发现, PEDF 在调控细胞周期、细胞寿命、细胞保护及血管抑制等方面表现了生物学活性, 但尚无研究揭示人晶状体细胞内 PEDF 的表达情况及其与晶状体生理病理特性的关系。我们观察 PEDF 在人晶状体内的表达及分布, 探讨人晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LEC) 中 PEDF 基因和蛋白的表达水平与年龄、白内障发生发展的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 老年性白内障 120 例 120 眼和先天性白内障 40 例 40 眼, 排除代谢性或继发性白内障, 排除合并糖尿病、青光眼、葡萄膜炎、眼底病变、眼外伤或内眼手术史的

患者。健康成年人(22~53岁)透明晶状体均来源于广东省眼库的供体眼球,共15例。按所研究的晶状体生理病理特征分为5组:透明晶状体组、轻度白内障组、重度白内障组、低龄组和高龄组。其中先天性白内障定义为低龄组(4月龄~4岁);老年性白内障包括高龄组40例,年龄85~102岁;轻度组40例,按LOCSⅢC<3.0,N<2.0,P<2.0,或按核硬度分级I和Ⅱ级,年龄52~75岁;重度组40例,按LOCSⅢN>4.0,或按核硬度分级为V级,年龄54~78岁。

1.2 方法 美国R&D Systems公司羊抗人PEDF多克隆抗体、FITC标记的兔抗羊IgG,Santa Cruz公司鼠抗人 β -actin,HRP标记的兔抗羊IgG和兔抗鼠IgG,Pierce公司BCA蛋白检测试剂盒,Invitrogen公司RNA提取试剂Trizol,美国Promega公司逆转录酶。

1.2.1 PEDF 表达的检测 选择先天性白内障和老年性白内障各8例,术中撕囊取直径5~5.5mm的中央区晶状体前囊(含囊下上皮);新鲜眼库眼3例,解剖显微镜下取完整晶状体。标本立即固定并行冰冻切片6~8 μ m染色。标本经正常血清封闭非特异性背景后,先后加一抗PEDF多克隆抗体和二抗FITC标记IgG,充分漂洗后用含PI荧光封片剂封片。即刻用Zeiss激光扫描共焦荧光显微镜观察结果。视网膜组织切片作为阳性对照。

1.2.2 PEDF 蛋白的检测 选择先天性白内障20例和老年性白内障80例如上术中取前囊,新鲜眼库眼8例解剖显微镜下撕取晶状体前囊。标本经细胞裂解液中研磨和超声粉碎后离心,取上清液(即为所需要的蛋白溶液)保存于-20 $^{\circ}$ C。因检测单个囊膜标本的细胞蛋白总量较少,经预试验和统计处理后按相近原则将5例手术囊膜标本合并为一个样本,2例眼库眼囊膜标本合并为一个样本。所有样品根据其所测出浓度配成相同浓度的蛋白液。按标准蛋白质免疫印迹(Western-blot)程序进行制胶、上样、电泳、蛋白质转印和显色。用 β -actin作为内参照。将X光胶片扫描,应用Labwork4.5图像分析系统,所测PEDF条带与 β -actin条带的光密度比值作为目标蛋白半定量值。

1.2.3 PEDF 基因的检测 选择先天性白内障12例和老年性白内障32例,术中取前囊(2例标本合并为一个样本),新鲜眼库眼4例取前囊。设计引物序列分别为PEDF上游:5'-TGTGCAGGCTTAGAGGGACT-3',PEDF下游:5'-GTT-CACGGGGACTTTGAAGA-3',由北京SBS Genetech Co. Ltd合成。组织样品冷冻匀浆一步法提取组织中的总RNA,按逆转录试剂盒步骤合成cDNA,常规半定量RT-PCR扩增mRNA、电泳、成像。用 β -actin作为内参照。用Bio-Rad软件分析扩增片断,计算每个样品目的基因和内参的光密度比值,所得即基因表达的相对浓度。

统计学分析:计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用SPSS 10.0软件的One-way-ANOVA比较组间差异, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 人晶状体中 PEDF 表达的检测 正常视网膜组织作为阳性对照,感光细胞层呈强表达;在正常晶状体组织, PEDF 蛋白表达存在且仅存在于前囊膜下单层晶状体上皮细胞胞内(图1);各白内障标本中,中央区前囊下 LEC 胞浆中存在不同程度的 PEDF 阳性表达(图2)。

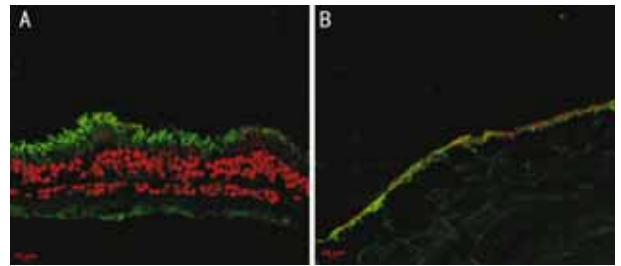


图1 正常人眼中 PEDF 蛋白的表达(间接免疫荧光 FITC-PI 双染色 $\times 200$) A:正常视网膜组织切片;B:正常人晶状体组织切片。

2.2 人晶状体中 PEDF 蛋白的表达 随着晶状体由透明变混浊及混浊程度由轻变重,LEC 中 PEDF 蛋白表达水平(相对于内参)依次分别为 0.76 ± 0.10 (透明), 0.65 ± 0.04 (轻度混浊)和 0.25 ± 0.06 (重度混浊),呈现明显下调趋势($P < 0.01$)。对比4岁以下低龄组(平均年龄 1.2 ± 0.7 岁)与85岁以上高龄组(平均年龄 91.2 ± 6.9 岁),LEC 中 PEDF 蛋白表达水平(相对于内参)分别为 0.90 ± 0.03 和 0.10 ± 0.02 ,前者远高于后者($P < 0.01$,图3)。

2.3 人晶状体中 PEDF 基因的表达 晶状体在透明、轻度混浊、重度混浊的状态下,LEC 中 PEDF mRNA 表达水平(相对于内参)依次分别为 0.58 ± 0.06 , 0.55 ± 0.05 和 0.42 ± 0.07 ,重度混浊者表现出明显的下调($P < 0.01$)。对比低龄组(平均年龄 1.1 ± 0.5 岁)与高龄组(平均年龄 90.6 ± 5.7 岁),LEC 中 PEDF mRNA 表达水平(相对于内参)分别为 0.76 ± 0.06 和 0.25 ± 0.09 ,前者远高于后者($P < 0.01$)。PEDF 在基因水平和蛋白水平的组间差异模式基本相同(图4)。

3 讨论

PEDF 是1989年Tombran Tink最先从胎儿视网膜色素上皮细胞条件培养液中分离出并由此命名。2001年Karakousis等^[1]用免疫组化及原位杂交检测发现,在人胚胎7周龄起 PEDF 就可在眼内多种细胞中合成,在成体眼内 PEDF 基因或/和蛋白广泛分布于视网膜、脉络膜、睫状体、角膜。2002年Ogata等^[2]在鼠全眼球组织切片中发现 PEDF 也存在于 LEC^[2],但在人 LEC 中的表达情况一直未得到证实。直到2005年Segev等^[3]利用cDNA微序列技术探讨人晶状体前囊下 LEC 的分子特征时,在检出的1827个基因克隆中发现了 PEDF 的存在,且其水平的变化与白内障有关。我们首先用免疫组化的方法检测出 PEDF 在人晶状体仅表达于囊膜下 LEC,而纤维和囊膜则未见。又用免疫印迹和 RT-PCR 技术证实人前囊下 LEC 中存在 PEDF 基因转录和蛋白水平的表达,提示在 LEC 中不仅表现 PEDF 功能活性,还可能合成 PEDF。在前期的研究中我们已经发现,人眼房水中 PEDF 浓度随年龄增加呈显著下降趋势,且与老年性白内障的混浊程度负相关^[4]。我们推测, PEDF 可能以旁分泌和自分泌的方式参与维持晶状体表型、延缓晶状体衰老、调节和保护 LEC 生物性状等机制。

PEDF 表达与衰老的密切关系在眼内其它部位如 RPE 细胞及体内其它组织如皮肤细胞^[5]中已经得到证实, PEDF 的水平也被显示是一些衰老相关性病变发生发展的重要指标和潜在致病因素,如 Alzheimer 病、老年性黄斑变性。PEDF 的衰退或许就是组织内环境紊乱等衰老初

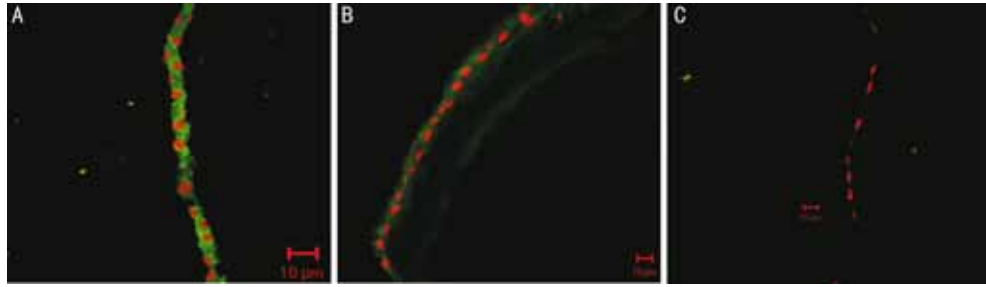


图2 白内障患者晶状体前囊膜(含囊下上皮)PEDF蛋白的表达(间接免疫荧光 FITC-PI 双染色×400) A:先天性白内障标本;B:老年性白内障标本;C:阴性对照。

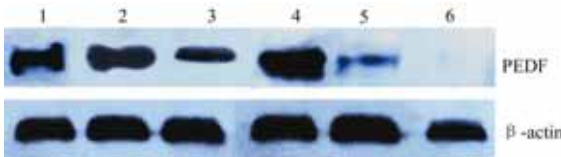


图3 人晶状体前囊下 LEC 中 PEDF 蛋白在不同生理病理状态的变化 1:透明晶状体组;2:轻度白内障组;3:重度白内障组;4:低龄组;5:高龄组;6:阴性对照。

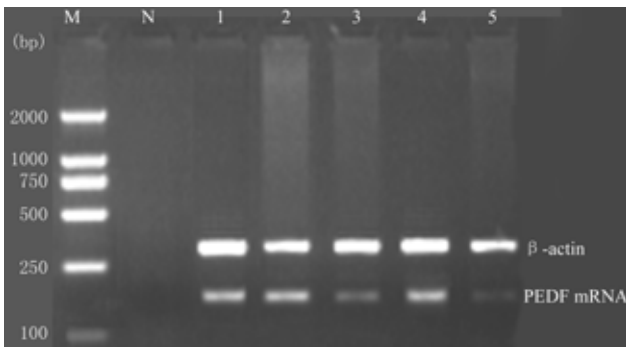


图4 人晶状体前囊下 LEC 中 PEDF mRNA 在不同生理病理状态的变化 M: Marker; N: 阴性对照; 1:透明晶状体组; 2:轻度白内障组; 3:重度白内障组; 4:低龄组; 5:高龄组。

期事件的生物学指标之一。根据衰老的细胞假说^[6], PEDF 可能是表达于多数细胞的衰老相关基因, PEDF 合成及表达水平可以反映细胞寿命或标志细胞的年轻化。年龄相关性白内障的形成被公认为是伴随着 LEC 功能性改变的晶状体衰老过程,这一过程与 LEC 基因表达的改变密切相关。我们对比年幼与衰老个体,发现了晶状体老化与 LEC 中 PEDF 的表达下调有关;在晶状体由透明变混浊及混浊由轻变重的进程中,也显示了 LEC 中 PEDF 的表达随白内障的发生发展而衰减。

根据在其它组织细胞中 PEDF 生物学特性的研究结果^[69], PEDF 是目前最强效的血管生成抑制剂之一,是 G₀ 期细胞的特征性基因,可反映细胞增殖潜能,而且在细胞周期复杂的调控网络中起负性效应; PEDF 在体内外通过旁分泌或自分泌的胞外信号的形式,以激活 NF- κ B、抑制胞内 ROS 等途径对多种组织和细胞有抗氧化、抗凋亡的

功能,是表达广泛的细胞生存/保护因子。我们推测, LEC 作为晶状体结构、代谢、功能的中心,细胞的衰老以及多种环境刺激诱导的细胞氧化损伤和凋亡是晶状体老化和白内障发生发展最主要的原因, PEDF 除了维持晶状体无血管状态,还参与调节中央区 LEC 的生物活动,如诱导并维持细胞处于生长静息状态,与其它细胞因子共同调控细胞正常的增殖、分化,也是 LEC 内防御系统的一个功能因子。

我们以人 LEC 为主要研究对象,首次显示在体内 LEC 中存在 PEDF 的合成及活性,而且其基因及蛋白的表达水平随着机体的衰老和白内障混浊程度的加重呈现显著下调。提示 PEDF 适度表达或许参与了晶状体特征性的组织结构、生长方式、细胞保护等生理机制,而 PEDF 表达下调很可能也是 LEC 衰老凋亡及白内障发生发展的重要因素或指标,这为后续的研究奠定了基础。

参考文献

- 1 Karakousis PC, John SK, Behling KC, *et al.* Localization of pigment epithelium derived factor (PEDF) in developing and adult human ocular tissues. *Mol Vis* 2001;7:154-163
- 2 Ogata N, Wada M, Otsuji T, *et al.* Expression of pigment epithelium-derived factor in normal adult rat eye and experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(4):1168-1175
- 3 Segev F, Mor O, Segev A, *et al.* Downregulation of gene expression in the aging lens: a possible contributory factor in senile cataract. *Eye (Lond)* 2005;19(1):80-85
- 4 Liu T, Liu Y, Wu M. Pigment epithelium-derived factor in cataractous aqueous humor and lens epithelial cells. *Yan Ke Xue Bao* 2006;22(1):40-46,53
- 5 Francis MK, Appel S, Meyer C, *et al.* Loss of EPC-1/PEDF expression during skin aging *in vivo*. *J Invest Dermatol* 2004;122(5):1096-1105
- 6 Tombran-Tink J, Barnstable CJ. PEDF: a multifaceted neurotrophic factor. *Nat Rev Neurosci* 2003;4(8):628-636
- 7 Pignolo RJ, Francis MK, Rotenberg MO, *et al.* Putative role for EPC-1/PEDF in the G₀ growth arrest of human diploid fibroblasts. *J Cell Physiol* 2003;195(1):12-20
- 8 Amano S, Yamagishi S, Inagaki Y, *et al.* Pigment epithelium-derived factor inhibits oxidative stress-induced apoptosis and dysfunction of cultured retinal pericytes. *Microvasc Res* 2005;69(1-2):45-55
- 9 Bhat SP. The ocular lens epithelium. *Biosci Rep* 2001;21(4):537-563