

# Livin 在后发性白内障动物模型中的表达

刘淑君<sup>1,2</sup>, 赵桂秋<sup>1</sup>, 李元彬<sup>2</sup>, 蔺雪静<sup>2</sup>, 王文亭<sup>3</sup>, 张振华<sup>1</sup>

基金项目: 山东省烟台市科学技术发展计划项目 (No. 2010148-24)

作者单位:<sup>1</sup>(266021) 中国山东省青岛市, 青岛大学医学院附属医院眼科; <sup>2</sup>(264000) 中国山东省烟台市, 青岛大学医学院附属医院烟台毓璜顶医院<sup>2</sup>眼科; <sup>3</sup>中心实验室

作者简介: 刘淑君, 在读博士研究生, 主治医师, 研究方向: 角膜病、白内障。

通讯作者: 赵桂秋, 博士, 博士研究生导师, 主任医师, 研究方向: 角膜病、白内障。zhaoguiqiu@163.net

收稿日期: 2013-08-01 修回日期: 2013-11-11

## Expression of Livin in animal model of posterior capsule opacification

Shu-Jun Liu<sup>1,2</sup>, Gui-Qiu Zhao<sup>1</sup>, Yuan-Bin Li<sup>2</sup>, Xue-Jing Man<sup>2</sup>, Wen-Ting Wang<sup>3</sup>, Zhen-Hua Zhang<sup>1</sup>

Foundation item: Science and Technology Development Project of Yantai, Shandong Province (No. 2010148-24)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266021, Shandong Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology; <sup>3</sup>Central Laboratory, Yantai Yuhuangding Hospital, Qingdao University Medical College, Yantai 264000, Shandong Province, China

Correspondence to: Gui-Qiu Zhao. Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266021, Shandong Province, China. zhaoguiqiu@163.net

Received: 2013-08-01 Accepted: 2013-11-11

## Abstract

• AIM: To establish animal models of posterior capsule opacification (PCO) in New Zealand white rabbits and detect the expression of the Livin in PCO tissue.

• METHODS: Thirty healthy adult New Zealand white rabbits were randomly divided into experimental group and control group. Ultrasonic phacoemulsifications were performed in the 25 experiment rabbits under intramuscular injection anesthesia. The rabbits' eyes were examined by slit lamp microscope to observe the development of PCO after surgery and at 3d, 7d, 14d and 28d. The 5 rabbits in control group were executed to take the posterior capsule of right eyes. Reverse transcription polymerase (RT-PCR) and western-blotting were performed to detect the expression of Livin in PCO at different time points postoperatively.

• RESULTS: Both RT-PCR and western-blotting method indicated that different levels of expression of Livin could be detected in the tissue of PCO in group B, C, D, E except control group and group A that instantly after surgery. The two methods indicated that Livin reached the peak in group C and decreased in group D, lower in group E and in group B reached the bottom.

• CONCLUSION: The expression of Livin can be detected in the tissue of PCO in a certain similar time. The study indicated that Livin correlates with the pathogenesis of PCO. It may provide a novel tool for the investigation of gene therapy for PCO.

• KEYWORDS: posterior capsule opacification; Livin regulatory gene; New Zealand white rabbits

Citation: Liu SJ, Zhao GQ, Li YB, et al. Expression of Livin in animal model of posterior capsule opacification. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(12):2373-2376

## 摘要

目的: 建立新西兰大白兔后发性白内障 (posterior capsule opacification, PCO) 动物模型, 检测凋亡抑制因子 Livin 在 PCO 中的表达, 从而探讨 Livin 在 PCO 形成过程中的作用。

方法: 选用健康新西兰大白兔 30 只, 随机分为实验组 (25 只), 分为 A, B, C, D, E 组, 对照组 (5 只), 实验组行右眼晶状体皮质吸出, 分别于术后即刻; 3, 7, 14, 28d (每个时间点 5 只) 对术眼行裂隙灯显微镜检查, 并处死动物获取术眼晶状体后囊膜, 对照组直接处死动物获取右眼后囊膜, 采用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 和 Western-blotting 方法检测 Livin 在正常对照组及术后不同时间点 PCO 中的表达。

结果: RT-PCR 和 Western-blotting 在正常对照组及术后即刻 A 组均未检测到 Livin 的表达, 实验组 B, C, D, E 术后不同时间段的 PCO 组织中均可检测到不同程度 Livin 的表达, 其中 RT-PCR 和 Western-blotting 均显示术后 C 组 Livin 表达较为明显, D 组表达开始下降, 但至 E 组仍有表达, B 组表达最低。

结论: Livin 的表达在 PCO 的形成过程中具有相应的时相性, 为进一步探索 PCO 的基因治疗提供了理论依据。

关键词: 后发性白内障; 凋亡抑制因子 Livin; 新西兰大白兔

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.12.03

引用: 刘淑君, 赵桂秋, 李元彬, 等. Livin 在后发性白内障动物模型中的表达. 国际眼科杂志 2013;13(12):2373-2376

## 0 引言

后发性白内障 (posterior capsule opacification, PCO) 是白内障囊外摘除和晶状体超声乳化术后形成的晶状体后囊膜混浊,是影响白内障术后视力的最常见并发症,其术后 3a 的发病率可达 30% ~ 50%,儿童甚至可达 100%<sup>[1]</sup>,组织病理学已证实 PCO 的形成与白内障术后残留的晶状体上皮细胞增殖、向后囊移行及化生有密切关系。但 PCO 的发病机制仍未完全阐明,目前尚无防治后囊膜混浊发生的有效方法。因此,从分子生物学角度探讨 PCO 的发病机制成为近年来预防 PCO 发生的主要研究方向。Livin 是近年来发现的一种新的凋亡抑制因子,能够抑制细胞的凋亡,促使细胞增殖。Livin 蛋白 N 端包含 1 个 BIR 结构,C 段包含 1 个 RING 结构域<sup>[2]</sup>,这两个特殊结构起到抑制凋亡的作用。研究表明在人类的多种肿瘤中均发现有 Livin 基因的表达<sup>[3,4]</sup>,近年来研究发现在视网膜母细胞瘤中有 Livin 基因的表达<sup>[5]</sup>,但在关于白内障术后残留的晶状体上皮细胞增殖导致的 PCO 中是否有表达,目前国内外尚未见报道。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物及分组** 健康成年清洁级新西兰大白兔 30 只(山东省农科院研究所提供),体质量 2 ~ 2.5kg,雌雄各半,裂隙灯显微镜下检查,无眼前节病变。实验动物及实验条件均符合国家科学技术委员会的《实验动物管理条件》。随机分为实验组和对照组,右眼为实验眼,左眼不做处理,其中 25 只作为实验组,根据不同时间点分为 A, B, C, D, E 5 组,每组 5 只 ( $n=5$ ),另 5 只作为正常对照组。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 眼科手术显微镜(苏州六六视觉科技股份有限公司)、眼科手术器械(苏州医疗器械厂)、裂隙灯显微镜照相设备(苏州六六视觉科技股份有限公司)、超声乳化仪(美国 Alcon 公司)、紫外线图像成像系统(柯达 UV-2000)、爱尔凯因滴眼液(美国 Alcon 公司)、复方托吡卡胺滴眼液(广州白云山制药股份有限公司)、妥布霉素地塞米松眼膏(美国 Alcon 公司)、阿托品眼膏(上海通用药业)、平衡盐溶液(BSS,美国 Alcon 公司)、透明质酸钠凝胶(其胜,山东博士伦福瑞达)、10-0 尼龙线(美国 Alcon 公司)、二抗羊抗鼠(中山金桥)、浓缩型 DAB 显色试剂盒(上海晶美有限公司)、TRIZOL (TaKaRa)、RNA PCR Kit (AMV Ver 3.0 美国 Promega 公司)、TaqDNA 聚合酶(日本 TaKaRa 公司)、PCR 仪(美国 PE 公司); Kodak2000 凝胶成像系统(美国柯达公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 实验动物模型制作** 术前用复方托吡卡胺滴眼液充分散瞳,盐酸氯胺酮按 80mg/kg 肌肉注射麻醉。实验组行超声乳化白内障吸除术,由同一位操作熟练术者完成。透明角膜切口,连续环形撕前囊膜,水分离,注吸器吸出所有晶状体皮质,水封切口,术毕给予复方妥布霉素地塞米松眼膏涂眼<sup>[6,7]</sup>。

**1.2.2 实验取材** 实验组分别于术后即刻;3, 7, 14, 28d 静脉空气栓塞处死动物,获取实验组右眼晶状体后囊膜;并取对照组右眼正常晶状体后囊膜,所有标本均放入 1.5mL Eppendorf 管中,液氮保存。

**1.2.3 RT-PCR 检测晶状体后囊膜 Livin 基因的表达** 在 Gene Bank 中查出基因序列,以 GAPDH 序列作为内参

照,以 Vector NTI 6.0 软件(美国 Infor Max 公司)设计 Livin 及 GAPDH 的引物(由上海生工合成),引物序列如下: Livin 引物序列:上游引物 5'-GTGAGGTGCTTCTTCTGCTAC-3',下游引物 5'-GTCCACACGGCACAAAGA-3',扩增产物长度 400bp; GAPDH 引物序列: GAPDH: AAGTGGATGTTGTCGCCATC, GAPDHR: AGTGGATTCCA CCACGTACT,扩增产物长度 218bp。以上引物使用时以无菌去离子水配成 6 $\mu$ mol/mL。将获取的晶状体后囊膜标本从液氮中取出,采用 Trizol 一步法提取总 RNA,分别取 4 $\mu$ L RNA 样品,加 196 $\mu$ L 超纯水稀释,用紫外分光光度计测定出 A260 和 A280 比值(OD 值),测得 RNA OD 值 1.8 ~ 2.0。反应体系总体积为 25 $\mu$ L,模板 RNA 0.5 $\mu$ g, Oligo(dT)引物 1 $\mu$ L, 10 $\times$ dNTP 2 $\mu$ L, AMV 逆转录酶 1 $\mu$ L, 缓冲液 2.5 $\mu$ L, Mgcl 25 $\mu$ L, Taq DNA Polymerase 0.2 $\mu$ L, 核酸酶抑制剂 0.5mmol/L, 加灭菌三蒸水至总体积 25 $\mu$ L, 50 $^{\circ}$ C 30min 进行逆转录,94 $^{\circ}$ C 3min 预变性,然后 94 $^{\circ}$ C 30s 变性,58 $^{\circ}$ C 45s 退火(Livin)/52 $^{\circ}$ C 45s 退火(GAPDH),72 $^{\circ}$ C 1min 延伸, Livin 为 28 个循环, GAPDH 共 26 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min, PCR 扩增样本以加样缓冲液(含质量浓度 2.5g/L 溴酚蓝, 2.5g/L 二甲苯青, 400g/L 蔗糖溶液)稀释后加于含溴化乙锭的葡萄糖凝胶加样孔中,在 20g/L 琼脂糖凝胶上电泳,电压 100V, 30min。凝胶用数字图像分析仪并进行半定量分析。

**1.2.4 Western-blotting 检测晶状体后囊膜 Livin 蛋白表达** 取实验组术后晶状体后囊膜和对照组正常晶状体后囊膜,加入适量裂解 Buffer。10000g 离心 10min 后取上清,加入 5 $\times$ 上样缓冲液,煮 10min,然后将上述提取的蛋白用 12% SDS-PAGE 分离并转移到 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉室温封闭 1h,加入一抗鼠抗兔(1:200 稀释在封闭液中),4 $^{\circ}$ C 孵育膜过夜, TBST 洗膜 3 次后,按 1:3000 稀释浓度分别加入二抗, HRP-标记抗鼠 IgG 孵育 1h,洗涤 3 次后, ECL 显色。暗室曝光显影,结果经自动电泳凝胶成像分析仪进行灰度值测定。兔 Livin 约 41kD, 兔 GAPDH 约 36kD。

统计学分析:本实验统计数据采用 SPSS 13.0 软件进行分析。Livin 表达的组间比较采用 Dunnett-*t* 检验,  $P < 0.01$  为差异有显著统计学意义。

## 2 结果

**2.1 裂隙灯显微镜下观察** 术后即刻 5 只兔眼未见明显晶状体皮质残留;术后 3d, 3 只兔眼可见轻度前房炎症反应,后囊开始出现轻度混浊,中央区透明,术后 7d, 5 只兔眼中央角膜透明,前房无明显炎症反应,均发生后囊膜皱褶混浊,累及中央区;术后 14d, 5 只兔眼均出现后囊膜皱褶,混浊明显;术后 28d, 5 只兔眼后囊混浊厚重粗糙,其中 3 只兔眼整个残留囊袋均被混浊的晶状体物质填充,形成显著地 PCO(图 1)。

**2.2 RT-PCR 检测 Livin 基因的表达** 本实验所提取的 mRNA,经紫外分光光度计检测,OD 值 1.8 ~ 2.0,证明提所取的 mRNA 较高的纯度。新西兰大白兔 Livin 基因的 PCR 产物长度为 400bp, GAPDH 的 PCR 产物的长度为 218bp。正常对照组及实验 A 组晶状体后囊膜中未见 Livin 基因表达,而在 B, C, D, E 组均可见 Livin 基因的表达(图 2),各组 Livin mRNA 的平均相对表达量见表 1。DUNNETT 检验:设定  $P = 0.01$ , B, C, D, E 组与对照组相比较;  $F = 39.86$ ,  $P < 0.0001$ ,表明差异有显著统计学意义,



图1 裂隙灯显微镜下观察晶状体后囊膜混浊情况 A: 术后即刻; B: 术后 3d; C: 术后 7d; D: 术后 14d; E: 术后 28d。

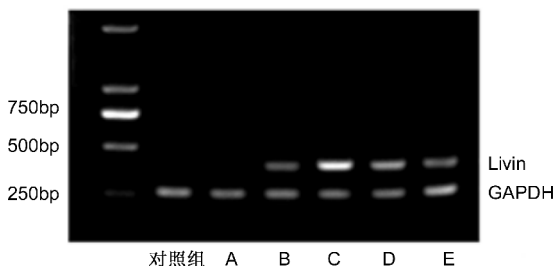


图2 对照组与 A, B, C, D, E 组 RT-PCR 检测 Livin 基因的表达。

表1 Livin mRNA 的平均相对表达量

组别	n	相对表达量	$\bar{x} \pm s$
对照组	5	0	
A 组	5	0	
B 组	5	0.641±0.009	
C 组	5	2.474±0.041	
D 组	5	1.458±0.057	
E 组	5	1.168±0.015	

与 A 组比较  $P < 0.0001$ , 表明差异有显著统计学意义, C 组和 D 组比较,  $P = 0.0096$ , 表明差异具有显著统计学意义, D 组和 E 组比较  $P = 0.152$ , 无显著统计学差异, 余组之间两两比较  $P$  值均小于 0.01, 表明差异具有显著统计学意义。

**2.3 Western-blotting 检测 Livin 蛋白的表达** 采用 Western-blotting 检测 Livin 蛋白的表达, 结果显示, 在对照组及实验 A 组晶状体后囊膜中均未检测到 Livin 蛋白的表达。而在其他实验各组中均检测到 Livin 蛋白的表达, 其中术后 3d, B 组检测到微弱的 Livin 蛋白的表达。7d 后, C 组表达量最多, D 组表达开始下降, 28d 后 E 组仍可检测到 Livin 蛋白的表达, 且表达量较 B 组明显(图 3), 各组 Livin 蛋白的平均相对表达量见表 2。DUNNETT 检验: 设定  $P = 0.01$ , B, C, D, E 组与对照组相比较:  $F = 48.17$ ,  $P < 0.0001$ , 表明差异有显著统计学意义, 与 A 组比较  $P < 0.0001$ , 表明差异具有显著统计学意义, C 组和 D 组比较,  $P = 0.0035$ , 表明差异具有显著统计学意义, D 组和 E 组比较  $P = 0.257$ , 无显著统计学差异, 余组之间两两比较  $P$  值均小于 0.01, 表明差异具有显著统计学意义。

### 3 讨论

PCO 是白内障囊外摘除和晶状体超声乳化术后形成的晶状体后囊膜混浊, 是影响白内障术后视力远期效果的常见并发症, 组织病理学已证实残留的前囊膜或赤道部晶状体上皮细胞增殖、向后囊移行并化生是后发性白内障发生的主要原因, 多种生长因子及细胞外基质参与了 PCO 的形成, 抑制晶状体上皮细胞的增殖将有助于控制 PCO 的发生<sup>[8-11]</sup>。近年来, 白内障手术方式的改进、术中尽可

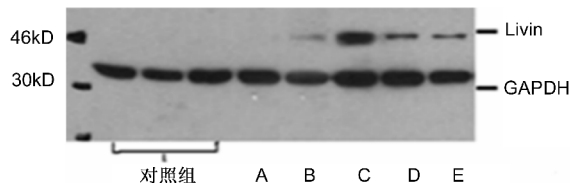


图3 对照组与 A, B, C, D, E 组 Western-blotting 检测 Livin 蛋白的表达量。

表2 Livin 蛋白的平均相对表达量

组别	n	相对表达量	$\bar{x} \pm s$
对照组	5	0	
A 组	5	0	
B 组	5	0.157±0.003	
C 组	5	0.606±0.006	
D 组	5	0.237±0.007	
E 组	5	0.210±0.002	

能清除晶状体皮质及上皮细胞、人工晶状体材料和设计的改良减少了部分 PCO 的发生, 但尚无从根本上解决后囊膜混浊的有效措施。目前基因治疗在多种疾病的防治方面取得了较大的进展, 逐步显示出其优越性和较为令人满意的效果。已有一些关于 PCO 的基因治疗的动物试验研究取得了一定发展的报道<sup>[12]</sup>, 因此研究 PCO 形成的分子生物学机制是目前基因治疗的前提。

Livin 是于 2000 年发现的一种凋亡抑制因子<sup>[2]</sup>。研究发现 Livin 存在于胚胎组织中, 在胎儿发育过程中高表达于多种组织, 可能与生长发育有关。Livin 作为一种凋亡抑制因子, 拥有与其他凋亡抑制因子家族一致的功能。Livin 不仅可以通过直接作用于 caspase-3 及 caspase-7, 还可通过干扰 caspase-9 的合成从而抑制细胞凋亡, 导致细胞增殖<sup>[2]</sup>, 在多种恶性肿瘤组织中呈高表达<sup>[3,4]</sup>。近年来研究发现在视网膜母细胞瘤、视网膜新生血管中均有 Livin 基因的表达, 但尚未见关于白内障术后残存晶状体上皮细胞增殖中是否有表达的研究。

本研究通过建立新西兰大白兔 PCO 动物模型, 检测不同时间点凋亡抑制因子 Livin 在 PCO 形成过程中的表达。发现术后即刻; 3, 7, 14, 28d 不同时间点晶状体后囊膜中 Livin 的表达都不一样。术后 3d Livin 呈低表达, 此时为 PCO 形成的初始阶段, 术后 7d PCO 较为明显, Livin 表达至高峰期, 14d 开始表达逐渐下降, 但至 28d 仍可检测到 Livin 的表达, 表明 Livin 表达与 PCO 的形成具有一定关系。

近年来研究表明, PCO 的主要病理改变为晶状体上皮细胞的转分化<sup>[13]</sup>。晶状体上皮细胞转分化是指其由上皮样细胞转变为肌纤维样细胞的过程, 又称之为上皮-间充质转化, 转化的肌纤维样细胞内表达  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋

白( $\alpha$ -SMA)。也已有人开始通过研究  $\alpha$ -SMA 的表达量来衡量 PCO 的治疗效果<sup>[14]</sup>。研究表明正常的晶状体上皮细胞中几乎无  $\alpha$ -SMA 表达<sup>[15]</sup>,因此  $\alpha$ -SMA 的表达成为晶状体上皮细胞转分化的标志。SD 大鼠在行晶状体囊外摘除术后即刻通过 Western-blotting 检测几乎检测不到  $\alpha$ -SMA,而在术后 3d 即检测到有表达,7d 达到高峰,其后表达逐渐下降,这与我们检测到的 Livin 表达曲线基本一致。由此可推论 Livin 的形成与 PCO 的发展可能具有相关性,而且二者都在术后 7d 时达到峰值,提示术后 7d 是 PCO 防治重要时期。

本研究通过动物模型实验表明凋亡抑制因子 Livin 在白内障术后 PCO 形成中具有一定的时相性,但 Livin 在后发性白内障形成中是否有决定性的作用还有待通过 RNA 干扰或基因封闭等方法进一步证实。

#### 参考文献

- 1 Wilhelmus KR, Emery JM. Posterior capsule opacification following phacoemulsification. *Ophthalmic Surg* 1980;11(4):264-267
- 2 Kasof GM, Gomes BC. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem* 2001;276(5):3238-3246
- 3 Chen L, Ren GS, Li F, et al. Expression of livin and vascular endothelial growth factor in different clinical stages of human esophageal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008;14(37):5749-5754
- 4 Liu P, Wang TS, You SH, et al. Expression of livin in gastric cancer and effect of silencing of the livin gene on apoptosis in gastric cancer cells. *Chin J Oncol* 2007;29(8):570-574
- 5 Zhang M, Shan BE, Yuan NF, et al. Effect of topotecan on retinocytoma cell apoptosis and expression of Livin and PTEN. *Chin Med*

*J* 2013;126(2):340-344

- 6 Chung HS, Lim SJ, Kim HB. Effect of mitomycin-C on posterior capsule opacification in rabbit eyes. *J Cataract Refract Surg* 2000;26(10):1537-1542
- 7 Haus CM, Galand AL. Mitomycin against posterior capsular opacification; an experimental study in rabbits. *Br J Ophthalmol* 1996;80(12):1087-1091
- 8 Eldred JA, Hodgkinson LM, Rawes IJ, et al. MMP-2 activity is critical for TGF- $\beta$ 2 induced matrix contraction implications for fibrosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(7):4085-4098
- 9 Yeger H, Perbal B. The CCN family of genes; a perspective on CCN biology and therapeutic. *J Cell Commun Signal* 2007;1(3-4):159-164
- 10 Soundararajan P, Fawcett JP, Rafuse VF, et al. Guidance of postural motoneurons requires MAPK/ERK signaling downstream of fibroblast growth factor receptor1. *J Neurosci* 2010;30(19):6595-6606
- 11 Iyengar L, Patkunanathan B, McAvoy JW, et al. Growth factors involved in aqueous humour-induced lens cell proliferation. *Growth Factors* 2009;27(1):50-62
- 12 杨晋, 卢奕. 白内障术后后囊膜混浊的基因治疗进展. *眼科新进展* 2007;27(5):393-395
- 13 Lovicu FJ, Schulz MW, Hales AM, et al. TGF $\beta$  induces morphological and molecular change similar to human anterior subcapsular cataract. *Br J Ophthalmol* 2002;86(2):220-226
- 14 Yadav UC, Lghani-Hosseinebad F, van Kuijk FJ, et al. Prevention of posterior capsular opacification through aldose reductase inhibition. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(2):752-759
- 15 朱洪燕, 蔡小军, 李青春. 老年核性及皮质性白内障晶状体上皮细胞中 bFGF 及  $\alpha$ -SMA 的表达. *眼科新进展* 2008;28(1):33-36