

Eaf2 基因敲除对紫外线诱导的鼠白内障形成的影响

姜艳华, 张劲松

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81270988)
作者单位:(110005)中国辽宁省沈阳市,中国医科大学附属第四医院眼科 中国医科大学眼科医院 辽宁省晶状体学重点实验室
作者简介:姜艳华,在读博士研究生,主治医师,研究方向:白内障。

通讯作者:张劲松,教授,博士研究生导师,辽宁省医学会眼科分会主任委员,研究方向:白内障的基础与临床. cmu4h-zjs@126.com

收稿日期:2015-07-09 修回日期:2016-01-18

Effects of Eaf2 gene knockout on cataract induced by ultraviolet irradiation in mice

Yan-Hua Jiang, Jin-Song Zhang

Foundation item: the National Natural Science Foundation of China (No. 81270988)

Department of Ophthalmology, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, the Eye Hospital of China Medical University, the Key Laboratory of Lens Research of Liaoning Province, Shenyang 110005, Liaoning Province, China

Correspondence to: Jin - Song Zhang. Department of Ophthalmology, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, the Eye Hospital of China Medical University, the Key Laboratory of Lens Research of Liaoning Province, Shenyang 110005, Liaoning Province, China. cmu4h-zjs@126.com

Received:2015-07-09 Accepted:2016-01-18

Abstract

• **AIM:** To evaluate the effects of Eaf2 gene knockout on cataract in mice induced by ultraviolet irradiation.

• **METHODS:** Fifteen wild type mice were used as the control group, and 10 Eaf2 KO mice were used as the experimental group. The 14-week mice were taken as the research objects in the two groups. So the subgroups were: WT -nonUV, WT -UV, Eaf2 KO-nonUV and Eaf2 KO-UV, a total of 4 groups. Observe the lens of mice *in vivo* with slit lamp microscope, grade the lens opacity with Lens Opacities Classification System II (LOCSII). Then the mice were sacrificed by breaking the neck, the lens were removed and were observed by dark field microscopy. According to the captured images, the proportion of cataract region was analyzed using Image J software. The data of the two groups were statistically analyzed.

• **RESULTS:** The results detected by the two methods were similar. In WT-UV group and Eaf2 KO-UV group, the degree of lens opacity was significantly higher than those of WT-nonUV group and Eaf2 KO-nonUV group. The lens opacity of WT-UV group was significantly higher

than that in Eaf2 KO-UV group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** Ultraviolet radiation can lead to the formation of cataract in mice. Eaf2 protein can promote the formation of cataract in mice caused by ultraviolet.

• **KEYWORDS:** Eaf2; gene knockout; cataract; lens epithelial; ultraviolet

Citation: Jiang YH, Zhang JS. Effects of Eaf2 gene knockout on cataract induced by ultraviolet irradiation in mice. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2016;16(2):228-230

摘要

目的:分析 Eaf2 基因敲除对紫外线诱导的小鼠白内障形成的影响。

方法:将 15 只野生型(WT)小鼠作为对照组,10 只 Eaf2 基因敲除(Eaf2 KO)小鼠作为实验组。两组均取 14 周龄左右的小鼠作为研究对象。进一步分组为:WT-nonUV、WT-UV、Eaf2 KO-nonUV、Eaf2 KO-UV,共 4 组。使用裂隙灯显微镜观察小鼠白内障程度,利用晶状体混浊分类系统 II(LOCS II)对小鼠白内障进行分级。然后断颈处死小鼠,摘取晶状体进行暗视野显微镜照相,利用 Image J 软件对晶状体混浊程度进行分析,并将各测量结果进行统计学处理。

结果:裂隙灯显微镜和暗视野显微镜的结果一致:WT-UV 组及 Eaf2 KO-UV 组晶状体混浊程度明显高于 WT-nonUV 组及 Eaf2 KO-nonUV 组,其中 WT-UV 组明显高于 Eaf2 KO-UV 组,均具有统计学差异($P < 0.05$)。

结论:紫外线辐射能够导致小鼠白内障的形成,Eaf2 蛋白质具有促进紫外线所致的小鼠白内障形成的作用。

关键词:Eaf2;基因敲除;白内障;晶状体上皮细胞;紫外线
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2016.2.07

引用:姜艳华,张劲松. Eaf2 基因敲除对紫外线诱导的鼠白内障形成的影响. 国际眼科杂志 2016;16(2):228-230

0 引言

白内障是晶状体透明度降低或者颜色改变所导致的视觉障碍^[1],目前已成为世界范围内主要的致盲眼病^[2-3]。波长为 290 ~ 320nm 的中波紫外线可以穿过角膜、房水被晶状体吸收,这促进了年龄相关性白内障的形成^[4-5]。晶状体上皮细胞主要位于晶状体前囊下,在保护整个晶状体的透明度和内环境稳定上起着不可或缺的重要作用^[3]。对晶状体上皮细胞的非程序 DNA 合成进行测定,结果提示白内障是继发于晶状体上皮细胞 DNA 损伤后未修复或错误修复的结果^[6]。Eaf2 为一个潜在的肿瘤抑制因子,能够与 ELL (Elevenineteen Lysine - rich Leukemia)相互作用增强 RNA 聚合酶 II 的活性而发挥转

表1 各组小鼠晶状体混浊程度分级情况

分组	眼数	0级	1级	2级	3级	4级	5级
WT-nonUV 组	15	1	8	2	3	1	0
Eaf2 KO-nonUV 组	10	2	2	3	2	1	0
WT-UV 组	14	0	2	2	5	5	0
Eaf2KO-UV 组	10	0	1	2	4	3	0

眼

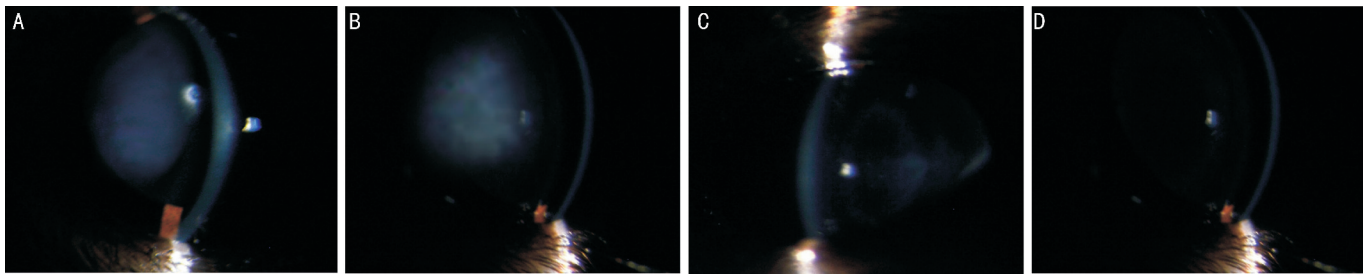


图1 裂隙灯显微镜照相结果 A:WT-UV组;B:Eaf2 KO-UV组;C:WT-nonUV组;D:Eaf2 KO-nonUV组。

录调节的作用^[7-8]。已有研究表明,Eaf2能够参与眼睛的发育,并提示Eaf2在调控晶状体发育和成熟中发挥重要功能^[9]。有研究证实,Eaf2蛋白质对紫外线诱导的晶状体上皮细胞凋亡具有促进作用^[10],我们提出疑问:Eaf2基因敲除对紫外线诱导的小鼠白内障的形成是否存在影响呢?

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 药品 复方托吡卡胺滴眼液(日本参天制药株式会社)。

1.1.2 实验动物 实验用Eaf2基因敲除小鼠和对照小鼠由中国医科大学附属第四医院眼科晶状体实验室提供,基因敲除鼠和对照鼠均由Bm12小鼠构建,按照ARVO声明饲养。

1.1.3 主要仪器 紫外线灯(Spectroline XX-15N/F, Spectronice Corporation);紫外线能量测试仪(UVX Radiometer,UVP);裂隙灯显微镜(Topcon,日本);暗视野显微镜(Olympus BX40,日本)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及饲养 将15只野生型(WT)小鼠作为对照组,10只Eaf2基因敲除(Eaf2 K.O.)小鼠作为实验组。两组均取14周龄左右的小鼠作为研究对象。按照ARVO声明饲养小鼠,定时观察小鼠精神、饮食和排便等情况。紫外线照射第3wk,WT-UV组有一只小鼠角膜混浊,无法观察晶状体混浊情况,剔除实验。因此进一步分组为:WT-UV(14眼)为A组,Eaf2 KO-UV(10眼)为B组,WT-nonUV(15眼)为C组,Eaf2 KO-nonUV(10眼)为D组,共4组。

1.2.2 紫外线辐射晶状体 紫外线照射前,裂隙灯检查所有小鼠,剔除已经患有白内障的小鼠。实验所用紫外线波长为302nm,强度为200W/cm²,将紫外透射光源用锡箔纸覆盖,只留有一个直径5mm的小孔。紫外线照射时,不对小鼠进行麻醉,直接照射。只对每只小鼠的右眼进行照射,左眼作为对照,不进行紫外线的照射。于紫外线照射前5min,对每只小鼠的右眼进行复方托吡卡胺散瞳。紫外线照射每周进行两次,每次持续100s,共照射3wk(总共1200mJ/cm²),最后一次照射48h后,裂隙灯检查小鼠晶

状体混浊程度。利用晶状体混浊分类系统II(lens opacities classification system II,LOCS II)对晶状体混浊程度进行分级:晶状体皮质完全透明为0级;少量点状混浊为1级;点状混浊扩大,瞳孔区出现少量点状混浊为2级;车轮状混浊,超过两个象限为3级;车轮状混浊扩大,瞳孔区约50%的混浊为4级;瞳孔区90%的混浊为5级。然后断颈处死小鼠摘取晶状体以进行暗视野显微镜照相,根据所拍摄的图像,利用Image J软件对白内障区域比例进行分析,白内障区域比例(cataract area ratio)=白内障区域面积/前囊膜(anterior capsules)区域面积。

统计学分析:应用SPSS 12.0统计软件进行统计学分析。采用Kruskal-Wallis秩和检验对不同组别的裂隙灯检查小鼠晶状体混浊程度分级和暗视野显微镜拍照的白内障面积比例进行分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 裂隙灯显微镜观察小鼠白内障的形成 裂隙灯显微镜观察晶状体混浊程度的小鼠眼球前节照相:A组和B组晶状体均可见明显晶状体皮质混浊,C组和D组可见少量点状晶状体皮质混浊。根据LOCS II对晶状体混浊程度进行分级,A图为4级,B图为3级,C图及D图为1级(图1)。所有样本进行秩和检验,统计结果为:WT-UV组及Eaf2 KO-UV组晶状体混浊程度明显高于WT-nonUV组及Eaf2 KO-nonUV组,其中WT-UV组明显高于Eaf2 KO-UV组,均具有统计学差异($\chi^2 = 11.31, P < 0.05$,表1)。

2.2 暗视野显微镜观察小鼠白内障的形成 暗室野显微镜观察晶状体混浊面积:图中可见A组和B组晶状体可见明显晶状体皮质混浊,C组和D组未见明显晶状体皮质混浊(图2),其中图A中白内障的面积占整个前囊膜面积比例的59.2%,B图为25.4%,C图为0%,D图为0%。WT-UV组及Eaf2 KO-UV组晶状体混浊面积明显高于WT-nonUV组及Eaf2 KO-nonUV组,其中WT-UV组明显高于Eaf2 KO-UV组,均具有统计学差异($\chi^2 = 12.84, P < 0.05$)。

3 讨论

胚鼠和成熟鼠体内均可发现Eaf2的表达^[11-12],利用基因重组和杂交技术人们构建了Eaf2基因敲除小鼠^[12],

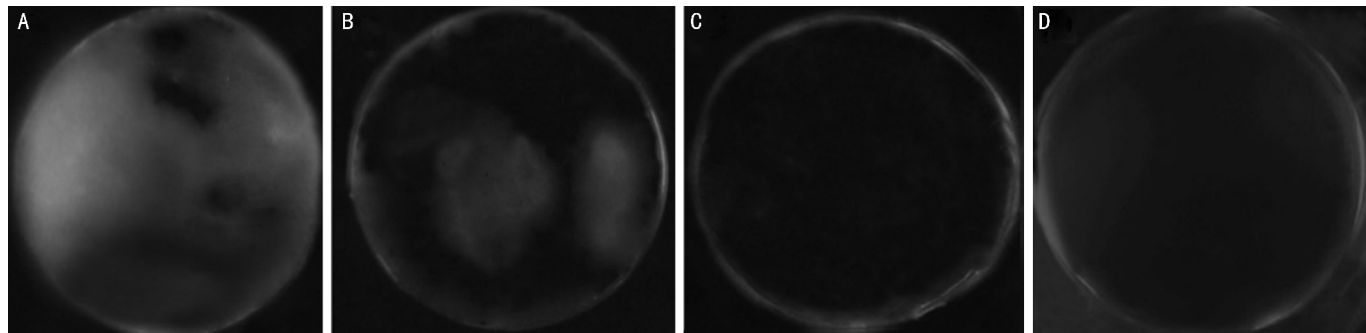


图2 暗视野显微镜照相结果 A:WT-UV组;B:Eaf2 KO-UV组;C:WT-nonUV组;D:Eaf2 KO-nonUV组。

以便于进行 Eaf2 基因调控和蛋白质功能的研究。虽然 Eaf2 被认为是一种重要的肿瘤抑制物,但研究显示在生后 4mo 内,该基因敲除小鼠和其野生型之间的生存率是没有差异的,而且直到 24mo 基因敲除鼠组内未见明显的机体异常表现。国内目前尚未有对小鼠 Eaf2 基因的研究,国外的研究主要集中在肿瘤组织的分子生物学方面的研究。虽然基因敲除小鼠在 6~12mo 没有观察到肿瘤的发生,但却出现了心肌细胞和前列腺上皮细胞的肥大和增生,这表明作为肿瘤抑制剂的 Eaf2 有调节细胞增殖和形态的功能;同时在 18~24mo 的 Eaf2 纯合子和杂合子个体出现了自然发生的肿瘤,这包括:肺腺癌、B 细胞淋巴瘤、肝癌和前列腺上皮内瘤样增生。在该模型中 Eaf2 敲除的致癌作用是缓慢的,肉眼可见的肿瘤多发生在较年长的动物个体内。因此 Eaf2 基因敲除小鼠的肿瘤发生近似于大多数人类肿瘤的形成,为这些类型肿瘤的治疗方法研究提供了动物模型基础^[12]。

自然界中的紫外线可分为波长为 200~280nm 的短波紫外线、280~320nm 的中波紫外线和 320~400nm 的长波紫外线,本实验使用波长为 302nm 的中波紫外线成功建立了紫外线诱导的小鼠白内障模型。紫外线导致晶状体上皮细胞损伤,并诱发细胞凋亡,细胞脱落、移行,使细胞密度降低,影响晶状体纤维的生长和生长质量,并导致晶状体纤维渗透压失衡,其完整性和透明性受损^[13]。白内障是各种原因造成晶状体蛋白变性致使晶状体混浊,与晶状体上皮细胞生理机能和病理改变有密切关系,目前认为晶状体上皮细胞凋亡是各种非先天性白内障形成的共同细胞学基础。我们的实验中,Eaf2 基因敲除的小鼠白内障的严重程度明显较野生组减低,其可能的作用机制是 Eaf2 蛋白对紫外线诱导的晶状体上皮细胞的凋亡具有促进作用,也有研究显示,Eaf2 很可能在某种条件下与 p53 存在相互作用,并影响 p53 的转录活性^[14]。Eaf2 蛋白也许可以提高晶状体上皮细胞对于紫外线辐射损伤的敏感度,使异常的细胞及早被发现,并通过凋亡机制将其清除,以保证晶状体的功能不被这些异常细胞所干扰。从这一角度来说,Eaf2 蛋白在维持晶状体上皮细胞“新陈代谢”方面具有积极的意义。但是过度紫外线辐射可能会导致广泛的晶状体上皮细胞凋亡进而诱发白内障的发生。紫外线诱导晶状体上皮细胞凋亡在白内障的发生、发展中起着重要作用。目前白内障的主要治疗手段仍是手术摘除+人工晶状体植入,缺乏有效的药物治疗方法。由白内障导致的视力障碍以及手术治疗所需的高额费用,给患者、家庭以及社会都带来了巨大的压力和负担。尽管前人已对白内障进行了大量的研究,但人们对白内障的发病机制仍未达成完全共识,目前晶状体上皮细胞的凋亡及 DNA 损

伤修复成为了白内障的研究热点,因此阻断晶状体上皮细胞的凋亡途径,提高晶状体上皮细胞 DNA 损伤后的修复能力,将给白内障的预防及治疗带来新的希望。从细胞凋亡角度出发,通过 Eaf2 基因敲除小鼠模型对白内障的发病机制进一步深入研究,并据此开发新的、经济有效的药物治疗方法,通过药物抑制晶状体上皮细胞凋亡而达到预防白内障的目的,将对提高患者生活质量,减轻患者精神和经济负担,促进社会医疗资源的优化和合理配置起到巨大作用。

参考文献

- 1 Wormstone IM, Collison DJ, Hansom SP, et al. A focus on the human lens *in vitro*. *Environ Toxicol Pharmacol* 2006;21(2):215-218
- 2 Moghaddam MS, Kumar PA, Reddy GB, et al. Effect of Diabecol on sugar-induced lens opacity *in vitro*: mechanism of action. *J Ethnopharmacol* 2005;97(2):397-403
- 3 张婧,陈垠杉,王思玲. 白内障动物模型的建立及评价参数的研究进展. *沈阳药科大学学报* 2008;25(8):674-678
- 4 Hayashi LC, Hayashi S, Yamaoka K, et al. Ultraviolet exposure and type of lens opacity in ophthalmic patients in Japan. *Sci Total Environ* 2003;302(123):53-62
- 5 Dong X, Lofgren S, Ayala M, et al. Maximum tolerable dose for avoidance of cataract induced by ultraviolet radiation-B for 18 to 60 week old rats. *Exp Eye Res* 2005;80(4):561-566
- 6 Li WC, Kuazak JR, Dunn K, et al. Lens epithelial cell apoptosis appears to be a common cellular basis for non-congenital cataract development in humans and animals. *J Cell Biol* 1995;130(1):169-181
- 7 Simone F, Luo RT, Polak PE, et al. ELL-associated factor 2 (EAF2), a functional homolog of EAF1 with alternative ELL binding properties. *Blood* 2003;101(6):2355-2362
- 8 Kong SE, Banks CA, Shilatifard A, et al. ELL-associated factors 1 and 2 are positive regulators of RNA polymerase II elongation factor ELL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(29):10094-10098
- 9 Maurus D, Heligon C, Burger-Schwarzler A, et al. Noncanonical Wnt-4 signaling and EAF2 are required for eye development in *Xenopus laevis*. *EMBO J* 2005;24(6):1181-1191
- 10 Li M, Wu X, Zhuang F, et al. Expression of murine ELL-associated factor 2 (Eaf2) is developmentally regulated. *Dev Dyn* 2003;228(2):273-280
- 11 Xiao F, Zhang JS, Zhao JY, et al. Regulation of Eaf2 in mouse lens cells apoptosis induced by ultraviolet radiation. *Int J Ophthalmol* 2012;5(5):571-575
- 12 Xiao W, Zhang Q, Habermacher G, et al. U19/Eaf2 knockout causes lung adenocarcinoma, B-cell lymphoma, hepatocellular carcinoma and prostatic intraepithelial neoplasia. *Oncogene* 2008;27(11):1536-1544
- 13 Berthoud VM, Beyer EC. Oxidative stress, lens gap junctions, and cataracts. *Antioxid Redox Signal* 2009;11(2):339-353
- 14 Su F, Pascal LE, Xiao W, et al. Tumor suppressor U19/EAF2 regulates thrombospondin-1 expression via p53. *Oncogene* 2010;29(3):421-431