

不同年龄白内障患者晶状体特异性表达基因检测及分析

王昕华 李若溪

【摘要】目的 研究晶状体上皮细胞特异表达的基因 LEP503 在不同年龄白内障患者以及正常人晶状体中表达情况,探讨白内障的发生机制。**方法** 收集白内障患者晶状体前囊膜 50 例(白内障低龄组和高龄组)、无白内障发生的晶状体前囊膜 50 例(正常对照低龄组和高龄组)。通过 RT-PCR 和 Western-Blotting 技术检测各组 LEP503 基因和蛋白表达情况,凝胶成像分析系统比较各组之间 LEP503 表达的差异。利用 SPSS13.0 软件包, *t* 检验和线性回归进行统计学分析。**结果** RT-PCR 和凝胶成像分析结果显示:白内障组 LEP503 基因表达明显比正常对照组高 ($P < 0.01$); 其中白内障高龄组 LEP503 基因表达明显比低龄组高 ($P < 0.01$); Western-Blotting 结果显示:白内障患者 LEP503 蛋白表达量明显比正常人高,且年龄越大 LEP503 蛋白表达越强。**结论** ① LEP503 基因在白内障患者中有表达且比正常人高; ②白内障患者 LEP503 基因的表达量与患者年龄之间呈线性关系; ③ LEP503 基因与晶状体上皮细胞增殖没有直接关系; ④ LEP503 基因可能参与了老年人白内障和青年人白内障不同发病机制过程。

【关键词】 晶状体上皮细胞; 白内障; LEP503; 基因表达

中图分类号: R776.1

文献标识码: B

文章编号: 1671-8194 (2009) 15-0025-03

Detection and Analysis of Gene which Specifically Expressed in Lens in Different Age Cataract

WANG Xin-hua, LI Ruo-xi

(Department of Ophthalmology, The Fourth People's Hospital of Shenyang, Shenyang 110031, China)

[Abstract] Objective To investigate the mechanism of cataract by studying on the expression of LEP503 gene, which is specifically expressed in lens epithelial cells, in different ages of cataract patients and normal persons. **Methods** Anterior capsular membranes of 50 lenses from cataract patients were collected to be cataract group (youth group and senile group). Anterior capsular membranes of 50 lenses without cataract were collected to be control group (youth group and senile group). The expression of LEP503 gene and protein were detected by RT-PCR and Western-Blotting, and Gel Imaging Assay system compared the difference of LEP503 expression between cataract group and control group. Data was analyzed by T test and linear regression statistically with SPSS13.0. **Results** RT-PCR showed the expression level of LEP503 in cataract group was higher than that of control group. There was significant difference between cataract patients and normal persons $P < 0.01$, and between cataract patients in youth group and senile group as well. Western Blotting showed the protein expression level of LEP503 was more notable in cataract group than in control group, and the level increasing in cataract group with ages. **Conclusion** ①Cataract patients express LEP503 and the expression level is higher than that of normal persons. ②There is a linear relationship between the expressing level of LEP503 and cataract age. ③There is no direct relationship between the expression of LEP503 and the proliferation of lens epithelial cells. ④LEP503 may play different roles in the pathogenesis of senile and youth cataract.

[Key words] Lens epithelium; Cataract; LEP503; Gene express

晶状体上皮细胞基因的适度表达对于维持晶状体的生物学功能起着重要作用^[1]——控制着它们在正常或异常如白内障等情况下的行为活动。晶状体上皮细胞表达很多基因,但绝大多数基因不会限制在晶状体中。近年来研究表明^[2],晶状体上皮细胞特异性基因表达可能在其生长、分化或细胞损伤修复这些特殊过程起了关键的作用。

1995 至 2001 年, Wen 等^[2-4]从大鼠的晶状体上皮细胞中克隆出一种新的基因,将其命名为 LEP503。实验显示, LEP503 在正常人晶状体上皮细胞中特异性表达,并通过实验分析 LEP503 基因可能与分化有关。

为进一步研究 LEP503 在白内障患者中是否表达,是否有规律性及是否与增殖有关,对不同年龄的白内障患者的晶状体前囊膜 LEP503 基因表达情况进行了分析。

1 材料和方法

1.1 材料

收集 2008 年不同年龄白内障患者超声乳化术中取下的晶状体前囊膜;同时收集无白内障发生的眼球摘除患者及尸体眼的晶状体前囊膜。

标本选取:从白内障患者标本中选取 50 个,设为白内障组,其中白内障低龄组 25 个和白内障高龄组 25 个;从无白内障正常标本中选取 50 个,设为正常对照组,其中正常低龄组 25 个和正常高龄组 25 个(四

组标本均男女混合,比例为 1:1,以排除性别差异影响)。以 β -actin 做为内参基因。从白内障组和正常对照组中分别选取 10 个标本进一步做蛋白测定。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR

通过 RNA 提取,紫外分光光度计测浓度,逆转录反应、PCR 反应扩增特异片段,琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像分析系统进行密度分析。结果采用 SPSS13.0 软件包、单因素设计定量资料的 *t* 检验和线性回归统计分析。

1.2.2 Western-Blotting

通过蛋白质提取,SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,Western-Blotting 印迹分析。

2 结果

2.1 RT-PCR 电泳结果

2.1.1 正常对照组的电泳结果显示

所有标本都有 LEP503 表达,但 LEP503 无论在低龄组还是高龄组

表达都很弱,说明LEP503在正常人群中低水平表达。

2.1.2 白内障组电泳结果显示

所有标本都有LEP503表达,LEP503表达量较正常对照组要高,且白内障高龄组表达明显高于白内障低龄组。

2.2 凝胶成像分析系统密度分析结果

根据IOD密度值和Marker含量换算出样品的DNA含量,然后计算出LEP503/ β -actin的比值进行标准化。

2.2.1 SPSS12.0软件包t检验分析各组之间LEP503基因表达的差异

结果显示,正常对照组LEP503基因表达与白内障组比较有显著性差异($P < 0.01$),说明LEP503基因在白内障患者中表达比正常人高。另外,白内障低龄组和高龄组LEP503表达有显著性差异($P < 0.01$),而正常人低龄组和高龄组之间LEP503表达无显著性差异($P=0.75$),说明LEP503与老年性白内障的发生密切相关。同时利用线性回归分析LEP503表达是否与年龄相关,结果显示白内障组LEP503与年龄呈明显线性关系($P < 0.01$)。说明LEP503在白内障患者中的表达是随着年龄增加而逐渐增强的。

2.3 Western-Blotting结果

LEP503蛋白由61个氨基酸组成,相对分子质量为 6.9×10^3 。Western-Blotting分析结果显示正常对照组和白内障组晶状体前囊膜都有LEP503蛋白不同程度表达。其中正常对照组蛋白表达量较弱,且与年龄增长无明显关联;而白内障组蛋白表达量较强,且年龄越大表达越强。

3 讨论

白内障是世界上居首位的致盲性眼病,20世纪末以来有关晶状体和白内障的基础研究日益增加,然而白内障的发病机制至今仍未明确^[5]。因此,考察白内障的致病因素,探讨白内障的发病机制具有十分重要的作用。各种病因所形成的白内障往往贯穿在不同年龄段白内障患者中,以中老年人发生白内障最为常见。近年来的研究表明,基因表达异常与白内障的发生有着密切的关系。基因的异常必然造成晶状体内各种蛋白的转录和翻译发生变化,继而导致其结构和功能的改变,最终形成白内障。由于导致晶状体混浊的环节很多,所以白内障的致病基因也很多,但绝大多数基因不仅仅在晶状体中表达,在体内其他组织器官中也有表达。因此,寻找晶状体中特异性表达的基因对研究白内障的发生发展过程,探索白内障的预防和治疗途径至关重要。

1995年,Wen等^[2]从大鼠的晶状体上皮细胞中克隆出一种新的基因,并将其命名为LEP503,实验显示LEP503 mRNA只在晶状体前表面的上皮细胞中特异性表达,在晶状体纤维和眼内及体内其他组织中均不表达。Wen等^[2]对正常人和培养的晶状体上皮细胞系进行了分析检测,说明了LEP503的特异性表达,然而白内障患者是否也表达这一基因还未阐明。通过RT-PCR和Western-Blotting技术对正常人和白内障患者的晶状体前囊膜LEP503基因和蛋白进行了检测分析,结果显示所有标本都有LEP503的表达,但白内障患者表达较正常人高($P < 0.01$),从而丰富了LEP503基因在晶状体上皮细胞中特异性表达这一理论,即无论是正常人还是白内障患者,晶状体上皮细胞都有LEP503基因的特异性表达。另外,眼外伤等外界因素刺激也可能是造成LEP503在正常对照组中低水平表达的因素之一。

2000年,Wen等^[3]采用Northern印迹杂交对不同出生天数的新生大鼠晶状体前囊膜的LEP503基因表达情况进行了分析,实验发现LEP503蛋白存在于大鼠晶状体前表面的LECs以及赤道部已分化的晶状体纤维细胞中,这些都说明它与晶状体上皮细胞分化有关。然而

它是否与增殖也有关呢?因此,检测了不同年龄白内障患者晶状体前囊膜LEP503基因和蛋白表达情况。众所周知,年轻人的晶状体上皮细胞增殖能力远远大于老年人,这也是为什么年轻人后发障的发生率近100%,而老年人只是50%左右的原因。如果LEP503与晶状体上皮细胞的增殖有关,那么,随着年龄的增长其表达必然逐渐减弱。然而,意外的是RT-PCR结果显示LEP503表达并没有逐渐减弱,相反随着年龄的增长其表达逐渐增强,白内障高龄组与低龄组表达有明显差异($P < 0.01$),而正常人不同年龄段的LEP503表达并无显著差异($P=0.75$);线性回归分析结果白内障组LEP503表达量与年龄之间呈明显线性关系,而正常对照组LEP503表达量与年龄之间无线性关系。同时Western-Blotting结果也证实这一结论。LEP503表达量是随着白内障患者年龄增加而增高的,这说明LEP503与晶状体上皮细胞的增殖没有直接关系。2000年,Wen等^[3]提出,根据LEP503蛋白的氨基酸序列,理论上它可能是一种具有转录功能的DNA结合蛋白,应当存在细胞核中。然而有趣的是,他们检测出LEP503蛋白绝大部分在细胞质内,而非在细胞核内,这说明LEP503与细胞的转录可能没有关系。细胞增殖必然伴随大量的转录和翻译,实验结果即LEP503与细胞的增殖没有直接关系从另一个角度也证实了Wen等^[3]的LEP503蛋白可能不具有转录功能这一结论。除此,LEP503基因在白内障高龄组和低龄组表达的明显差异,可能是LEP503参与了老年人白内障和青年人白内障不同的发病机制过程。

引发老年性白内障的因素很多,目前很多研究认为老年性白内障的发生与氧自由基损伤密切相关,除此细胞缝隙连接蛋白异常、MIP、MP19等基因表达异常、晶状体蛋白异常、细胞凋亡^[6]等也与其相关。

LEP503基因及其表达的蛋白可能参与了上述的某个或某些过程,它可能在老年人白内障发生过程中起了推进作用,而在儿童和青年人白内障发生过程中因其表达量较老年人少,其作用并不明显,致使老年人白内障发生率明显高于青年人。另外,正如癌基因与抑癌基因的关系一样,在白内障患者中可能存在着某个与LEP503相抗衡的基因,由于其在青年患者中表达增高,从而抑制了LEP503的表达。有关LEP503到底参与了白内障发生的哪些环节,LEP503蛋白功能如何,以及是否存在某些与其密切关联的基因,有待于进一步研究。

目前,与白内障发生有关的许多致病基因还不清楚,但随着人类基因组计划的完成,分子克隆技术日新月异,所有白内障致病基因都将得到定位与克隆。同时伴着蛋白质组时代的来临与发展,届时将会揭示尚未为人们所认识的在晶状体内表达的重要功能蛋白,充分揭示白内障的致病机制,由此可寻找发病途径中的一个共同环节,试图探索一条全新的治疗途径。

参考文献

- [1] 才娜,张劲松,刘芙蓉,等.抗免疫晶状体上皮细胞单克隆抗体的制备及特异性研究[J].眼科新进展,2000,20(6): 9-11.
- [2] Wen Y,Li GW,Chen P,et al. Lens epithelial cell mRNA. 1. Cloning and sequencing of a messenger RNA with a basic motif/leucine-rich domain specifically expressed in rat lens epithelial cells[J]. *Exper Eye Res*,1995,60(6): 675-682.
- [3] Wen Y,Sachs G,Athmann C. A novel lens epithelium gene,LEP503,is highly conserved in different vertebrate species and is developmentally regulated in postnatal rat lens[J]. *Exper Eye Res*,2000,70(2): 159-168.
- [4] Wen Y,Ibaraki N,Reddy VN,et al. Functional analysis of the promoter and chromosomal localization for human LEP503,a novel lens

epithelium gene[J]. Gene,2001,269(1): 61-71.

[5] Hockwin O,Kojima M, uller-Breitenkamp U,et al. Lens and cataract research of the 20th century: a review of results,errors and misund-

erstandings[J]. Develop Ophthalmol,2002,35(1): 1-11.

[6] 牛嗣云,高福祿,李秀华,等.细胞增殖与凋亡在胎儿晶状体发育中的意义[J].眼科新进展,2001,21(1): 11-12.

系统性红斑狼疮合并结核病临床分析

梁国飞 谭毅刚 梁国添 李宇

【摘要】目的 探讨系统性红斑狼疮合并结核病患者的临床特点。**方法** 回顾分析 24 例系统性红斑狼疮合并结核病患者的临床表现、X 线和实验室检查及诊治情况。**结果** 24 例患者临床表现主要为不规则高热 (占 66.7%)、双肺病灶广泛、5 个肺野以上者 15 例 (占 62.5%)、PPD 皮试阳性者 4 例 (占 16.7%)、抗酸杆菌阳性率为 15 例 (占 62.5%)、合并肺外结核为 18 例 (占 75%)、药物性肝损害 5 例 (占 20.8%)、病死率 8.33%。**结论** 系统性红斑狼疮合并结核病患者的临床症状明显,肺外结核发生率高,肺部病灶广泛,PPD 皮试阳性率低,抗酸杆菌阳性率较高,病死率较高,两病均应尽早确诊和治疗。

【关键词】 红斑狼疮, 系统性; 结核; 诊断; 治疗

中图分类号 R593.24 1; R52

文献标识码: B

文章编号: 1671-8194 (2009) 15-0027-03

Clinic Analysis of Tuberculosis Complicated with Systemic Lupus Erythematosus

LIANG Guo-fei, TAN Yi-gang, LIANG Guo-tian, LI Yu

(Guangzhou Chest Hospital, Guangzhou 510095, China)

[Abstract] Objective To study clinic characteristic of tuberculosis complicated with systemic lupus erythematosus. **Methods** Retrospective analysis of 24 cases were performed and the clinic manifestations included X-ray, laboratory examination results, diagnosis and treatment conditions. **Results** 66.7% (n=24) had irregular hyperpyrexia, 62.5% showed with chest X-ray diplopulmonary lesion extensive and over 5 lung fields damaged, 16.7% had PPD test being positive, 62.5% had acid-fast being positive, 75% had tuberculosis besides inpulmonary fields, 20.8% had drug-induce dliver damage, and 8.33% died. **Conclusion** Complicated with systemic lupus erythematosus, the TB patients have multiple clinic symptoms and their X-ray results show extensive damages. These patients have lower PPD positive rate, high positive rate of acid-fast bacillus, and the TB may exist out side the lung. Thus, the fatality rate is high. We should seek for an early diagnosis and treatment for these patients.

[Key words] Systemic lupus erythematosus; Tuberculosis; Diagnosis; Treatment

系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 是一种累及多脏器、原因未明的自身免疫性疾病,因患者免疫系统本身存在的功能紊乱或低下,且临床上常需应用激素和免疫抑制剂以控制 SLE 患者的疾病活动,近年来 SLE 预后显著改善,但激素和免疫抑制剂的使用,使患者的特异和非特异免疫功能均下降,易于继发病毒、细菌、真菌和卡氏肺孢子虫等感染。其中,结核杆菌是常见的病原菌之一^[1]。在服用激素的情况下,SLE 患者结核杆菌感染的临床表现、特点和病程均与免疫力正常的情况下有所不同。临床表现多不典型,不易与狼疮本身活动相鉴别,临床上常导致误诊。为了探讨 SLE 患者合并发生结核病的临床特征,本文对广州市胸科医院 2003 年 2 月至 2006 年 9 月共收治的资料较完整的 24 例 SLE 合并结核病患者进行分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 诊断标准

1.1.1 SLE 的诊断

所有病例诊断依据均符合 1982 年美国风湿病协会制定的 SLE 诊断标准^[2]。

1.1.2 结核病诊断

肺结核:其依据符合肺结核诊断和治疗指南标准^[3],通过查痰液找到抗酸杆菌且行菌型鉴定排除非结核分枝杆菌和(或)胸部 X 线符合活动性肺结核表现而诊断为肺结核。菌阴患者通过霉菌、普通菌培养或革兰染色等进行病原体检查已排除真菌和其他细菌感染。并发结

核性胸膜炎、肺外结核如结核性脑膜炎、淋巴结核、关节结核、盆腔结核、喉结核、脾结核等均在浆膜腔积液或分泌物中找到抗酸杆菌或取组织病理活检或经抗结核治疗有效等证实。

1.2 一般情况

本文 24 例均为 SLE 合并结核病患者,其中男性 5 例,女性 19 例;年龄 16~71 岁,平均 43 岁。SLE 病程在 12 个月以下的 5 例,其中病程在 1 个月内的 3 例,最短的仅 5d;病程在 12~60 个月的 16 例;60 个月的以上 3 例,最长的达 25 年。使用免疫抑制剂治疗的时间在 1 个月内的 5 例,其中包括在本院确诊 SLE 后才开始治疗的 2 例,其余的使用免疫抑制剂治疗时间在 7~36 个月,免疫抑制剂使用距结核病发病平均时间为 31.2 个月。SLE 处于活动期的 21 例,非活动期 3 例。

24 例患者中肺结核占 22 例(包括 6 例血行播散型肺结核、16 例继发型肺结核),肠结核、腹腔结核、泌尿生殖结核等多发性结核 1 例,腰椎结核 1 例。肺结核患者中有 16 例还合并其他多个器官或部位结核,其中,有 8 例结核性胸膜炎,5 例结核性脑膜炎,1 例盆腔结核,1 例喉结核,1 例脾结核,3 例浅表或深部淋巴结,1 例腕关节结核。结核病病程在 4~38 个月。

1.3 治疗方案

患者入院后根据病情先给予初治规则方案抗结核治疗(为 2~3HRZE/4~6HR 方案)(H:异烟肼;R:利福平;Z:吡嗪酰胺;E: