

人翼状胬肉组织 HMG-CoA 还原酶和 LDL 受体基因的表达

喻 谦¹, 柳 林², 王永志³

作者单位:¹(610050)中国四川省成都市,成都医学院第一附属医院眼科;²(200433)中国上海市,上海第二军医大学第一附属医院眼科;³(200433)中国上海市,上海第二军医大学微生物教研室
作者简介:喻谦,男,硕士,研究方向:眼表病的基础和临床。
通讯作者:柳林,男,博士研究生导师,教授,主任医师,研究方向:眼屈光系统和视网膜。linliu@sh163.net
收稿日期:2008-09-27 修回日期:2008-12-31

Expression of low-density lipoprotein receptors and hydroxy methylglutaryl-coenzyme A-reductase in human pterygium

Qian Yu¹, Lin Liu², Yong-Zhi Wang³

¹Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Chengdu Medical College, Chengdu 610050, Sichuan Province, China; ²Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; ³Staff Room of Microorganism, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Correspondence to: Lin Liu. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China. linliu@sh163.net
Received:2008-09-27 Accepted:2008-12-31

Abstract

• **AIM:** To quantitatively detect gene expression level of low-density lipoprotein receptors (LDL-R) and hydroxy methylglutaryl-coenzyme A-reductase (HMG-CoA-R) in human primary pterygium, recurrent pterygium and conjunctiva.

• **METHODS:** Primary pterygium, recurrent pterygium and normal conjunctiva samples were obtained from 30 eyes at the time of surgery during February 2007 to February 2008. Quantitative real-time PCR was used to analyze the content of HMG-CoA-R and LDL-R gene in pterygium and normal tissue.

• **RESULTS:** QRT-PCR revealed a statistically significant increase of LDL-R mRNA levels: 4.1 fold in primary pterygia and 2.7 fold in recurrent pterygium, compared with the control normal conjunctiva. The differences had statistical significance ($P < 0.05$). Also the mRNA levels of HMG-CoA-R were increased significantly in both primary and recurrent pterygia by 4.2 fold and 3.6 fold respectively, compared with normal conjunctiva, with statistical significance ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** This study indicates that pterygium have an altered metabolism of cholesterol namely increased LDL-R and HMG-CoA-R mRNAs, which is characteristic of tumorlike tissues. Both genes may play important roles in the pathogenesis of pterygium.

• **KEYWORDS:** pterygium; low-density lipoprotein receptors; hydroxy methylglutaryl coenzyme A-reductase; QRT-PCR; gene expression

Yu Q, Liu L, Wang YZ. Expression of low-density lipoprotein receptors and hydroxy methylglutaryl-coenzyme A-reductase in human pterygium. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2009;9(2):284-285

摘要

目的:研究 LDL-R 基因和 HMG-CoA-R 基因在翼状胬肉组织中的表达。

方法:随机选取原发性和复发性翼状胬肉组织各 10 例,正常结膜组织 10 眼。实时荧光定量 PCR 技术分析结膜中 HMG-CoA-R 和 LDL-R 的相对 mRNA 含量。

结果:原发性和复发性翼状胬肉中的 HMG-CoA-R 及 LDL-R 的 mRNA 水平均明显高于正常球结膜组织,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

结论:HMG-CoA-R 和 LDL-R 基因可能参与翼状胬肉的发病过程。

关键词:翼状胬肉;低密度脂蛋白受体;羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶;实时荧光定量逆转录聚合酶链反应;基因表达
DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2009.02.021

喻谦,柳林,王永志.人翼状胬肉组织 HMG-CoA 还原酶和 LDL 受体基因的表达.国际眼科杂志 2009;9(2):284-285

0 引言

翼状胬肉是常见的眼表疾病,局部球结膜纤维血管组织呈三角形增生并侵犯角膜,其发生发展是多因素协同作用的结果,确切机制至今尚不清楚。研究其发生、发展的机制对预防和治疗这一疾病具有重要的临床意义。目前越来越多的证据表明翼状胬肉是良性肿瘤样组织,细胞高速增长导致胆固醇代谢调节紊乱。我们定量检测在胆固醇代谢中 LDL-R 和 HMG-CoA-R 基因,了解在翼状胬肉中表达的情况。

1 材料和方法

1.1 材料 2007-02/2008-02 我院手术的原发性翼状胬肉 10 例,复发性翼状胬肉 10 例。年龄 55~70(平均 63)岁,男 12 例,女 8 例,均为单眼发病。排除其它角、结膜的疾病,术前检查血脂、肝肾功均正常。正常结膜组织 10 例取自视网膜脱离手术中,所有对照组标本均无感染的征象。根据 HMG-CoA-R 和 LDL-R 的 mRNA 基因序列,用 Primer Premier 5.0 引物设计软件设计 2 对引物(表 1)。

1.2 方法 在无菌条件下获得手术中翼状胬肉及正常球结膜组织,取材后迅速放入液氮中,按照 Invitrogen 公司 Total RNA Isolation System 方法提取总 RNA,紫外分光光度仪测定其纯度和含量,10g/L 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。为了消除基因组 DNA 的污染,将总 RNA 用 RNase-

free DNase I (TaKaRa) 处理, 20 μ L 的体系包括总 RNA 1 μ g, 10 \times buffer 2 μ L, RNase-free DNase I 4 U 和 RNA 酶抑制剂 8 U, 37 $^{\circ}$ C 25min 去除 DNA, 75 $^{\circ}$ C 10min 使酶失活。LDL-R, HMG-CoA-R 和内参的引物序列均根据 cDNA 编码区设计。总 RNA 500 ng 利用 M-MLV 反转录酶和随机 primer (Takara 公司) 合成第一链 cDNA。 β -actin, LDL-R 和 HMG-CoA-R 的 PCR 产物 10g/L 琼脂糖凝胶电泳后, 切胶回收 (EZNA Gel Extraction Kit), 用于标准品的制备。测得 A 260, 计算各标准品 cDNA 浓度, 稀释缓冲液等梯度稀释标准品, 共设置 10 个浓度梯度: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} 。从中选取 4 个梯度作为标准曲线。Real-time PCR 根据 Quanti Tect SYBR Green PCR 试剂盒 (Bio-Rad) 手册进行。反应混合液 20 μ L 体系: SYBR Green mixture 10 μ L, 上游 Primer (10 μ mol/L) 和下游 Primer (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, 模板 2.0 μ L 以及 ddH₂O 7 μ L。基因扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 变性 60s, 60 $^{\circ}$ C 退火 45s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45s, 共 40 个循环。每次 PCR 扩增都要采用没有模板的阴性对照。通过顺序检测系统观察各扩增曲线、融解曲线, 标准曲线的线性回归系数 R 值, 统计软件自动进行样本的 mRNA 拷贝数的计算。以 β -actin 的拷贝数对 LDL-R 和 HMG-CoA-R 进行标化处理。

统计学分析: 所有数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用两样本均数 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

原发性和复发性翼状胬肉中 HMG-CoA-R 基因和 LDL-R 基因明显高于正常球结膜, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 2), 但原发性和复发性翼状胬肉中两种基因和复发性翼状胬肉差别无统计学意义。

3 讨论

以往的研究发现翼状胬肉具有良性肿瘤样的组织特性, 这包括过度无序生长、轻度发育不良、原位癌和局部浸润性。*P*₅₃ 基因是引起人类肿瘤发生的最常见的突变基因, *P*₅₃ 基因突变在翼状胬肉发病中的作用, 已得到多数学者的认可。Dushku 等^[1] 发现翼状胬肉上皮比正常结膜上皮高表达 *P*₅₃ 基因, 认为翼状胬肉可分为突变型 *P*₅₃ 阴性和阳性两种类型, 阳性者可以发展为角膜缘肿瘤, 但未从蛋白水平证实。在翼状胬肉和角膜缘肿瘤中还发现致癌的人类乳头状瘤病毒 (HPV)^[2], 特别是 16 和 18 型, 它能干扰 *P*₅₃ 依赖的细胞凋亡途径, 并和紫外线一起作用, 成为潜在的致癌危险。最近又在翼状胬肉中发现一种具有强烈的促进有丝分裂的因子, 即肝磷脂结合的表皮生长因子 (HP-EGF)^[3], 并被证实紫外线照射翼状胬肉可导致该因子表达明显增高。翼状胬肉成纤维细胞呈现可以传代的生长变异特性, 即杂合子丢失, 微卫星不稳定性 (MSI)。原来在肿瘤细胞和癌前期病变的细胞中发生的杂合性丢失和微卫星不稳定性却在翼状胬肉组织中检测到。因而 Spandidos 等^[4] 认为翼状胬肉组织细胞一定发生了转化, 具有与肿瘤相似的分子生物学特性, 可将翼状胬肉称为良性肿瘤性病变。以往的研究在良性肿瘤中均可以发现胆固醇合成和代谢的改变。在正常的细胞中, 胆固醇的

表 1 PCR 引物及产物大小

基因	引物	大小 (bp)
β actin-F	5'-AGGGGCCGGACTCGTCATACT-3'	202
β actin-R	5'-GGCGGCACCACCATGTACCT-3'	
HMG-CoA-R-F	5'-TACCATCTCAGGGGTACGTC'-3	246
HMG-CoA-R-R	5'-CAAGCCTAGAGACATAATCATC'-3	
LDL-R-F	5'-CAATGTCTCACCAAGCTCTG'-3	258
LDL-R-R	5'-TCTGTCTCGAGGGGTACCTG'-3	

表 2 翼状胬肉 HMG-CoA-R 和 LDL-R mRNA 的表达

分组	($\times 10^3$, $n = 10$, $\bar{x} \pm s$)	
	HMG-CoA-R/actin	LDL-R/actin
原发性	20.1 \pm 9.0 ^a	1.90 \pm 0.85 ^a
复发性	19.9 \pm 9.3 ^a	1.20 \pm 0.18 ^a
正常	5.4 \pm 2.0	0.46 \pm 0.20

^a $P < 0.05$ vs 正常组

分布有严格的划分, 胆固醇是构成细胞膜的重要脂质。其来源有两种途径: (1) 在关键限速酶 HMG-CoA-R 下, 由 3-甲(基)-3,5-二羟(基)戊酸合成乙酰辅酶 A, 再完成内源性胆固醇生物合成; (2) 外源性的, 通过结合细胞膜上丰富的 LDL 受体, 完成胆固醇的细胞内吞噬作用^[5]。细胞有丝分裂活动加剧, 导致细胞对于外源性和内源性胆固醇的需求增加, 在许多肿瘤中, 如白血病、胃癌的癌细胞中已经发现 LDL-R, HMG-CoA-R 在 mRNA 水平的增高^[6,7]。

我们发现, 原发性和复发性翼状胬肉中 LDL-R 和 HMG-CoA-R 在 mRNA 水平均较正常结膜高表达。LDL-R 调控细胞内吞噬结合胆固醇的低密度脂蛋白, HMG-CoA-R 作为限速酶, 两者互相制约调控胆固醇代谢, 这两者的高表达表明纤维细胞和伴随的血管内皮细胞对胆固醇需求的增加, 胆固醇代谢调节紊乱, 因此, 我们推测翼状胬肉组织是具有良性肿瘤样组织特性, LDL-R 和 HMG-CoA-R 基因可能参与翼状胬肉发病的过程。

参考文献

- Dushku N, Reid TW. *P*₅₃ expression in altered limbal basal cells of pingueculae, pterygia, and limbal tumors. *Curr Eye Res* 1997;16(12): 1179-1192
- Gallagher MJ, Giannoudis A, Herrington CS, et al. Human papillomavirus in pterygium. *Br J Ophthalmol* 2001;85:782-784
- Nolan TM, DiGirolamo N, Sachdev NH, et al. The role of ultraviolet irradiation and heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the pathogenesis of pterygium. *Am J Pathol* 2003;162:567-574
- Spandidos DA, Sourvinos G, Kiaris H, et al. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in human pterygia. *Br J Ophthalmol* 1997;81(6):493-496
- Clayton PT. Disorders of cholesterol biosynthesis. *Arch Dis Child* 1998;78(6):185-189
- 李白云, 李继昌, 陈健, 等. 胃癌、食管癌患者血清和组织中 LDL 及胆固醇含量的测定. *郑州大学学报* 1993;28(2):137
- 刘德文, 张悦红, 王鹤皋, 等. LDL-C, HDL-C, LPO 及 LDH 同工酶水平的研究. *山西医学院学报* 1989;20(2):65