

2.5~12 年,均未发生后发性白内障。本研究中,超声乳化白内障摘出+人工晶状体植入+后囊膜撕囊组后发性白内障的发生率较高,为 51.06%,可能与人工晶状体与前后囊膜未紧贴,晶状体上皮细胞移行至玻璃体前界膜有关。

1983 年 Parks^[11] 首先提出,在白内障手术中同时行后囊连续环形撕囊以及前部玻璃体切割术可防止后发性白内障的发生。术中行后囊连续环形撕囊以及前部玻璃体切割术,其目的是进一步解除晶状体上皮细胞移行的支架。其缺点是术中操作较多,术后炎症反应较重,而且破坏了玻璃体前界膜的完整性,可能增加视网膜脱离以及黄斑水肿的危险。王政等^[12] 报道 22 例行超声乳化白内障摘出+后囊膜连续环形撕囊+前部玻璃体切割术,后发性白内障的发生率是 13.64%,比单纯的超声乳化白内障摘出+后囊膜连续环形撕囊的 71.19% 明显降低。黄瑾等^[13] 亦报道后囊环形撕囊联合前部玻璃体切割术可有效地预防儿童后发性白内障的发生。本研究中,超声乳化白内障摘出+后囊膜撕囊+前段玻璃体切割术共 51 眼,后发性白内障的发生率为 19.61%,与单纯后囊膜撕囊组比较明显降低 ($P=0.001$)。

此外,由于儿童的组织反应性高、血-眼屏障尚未发育完善等原因,先天性白内障手术后炎症反应高。炎症反应可导致虹膜后粘连,瞳孔区渗出膜形成,继而引起继发性青光眼,人工晶状体移位夹持,均可能影响患者的视力发育^[14]。因而熟练掌握手术技巧,操作中避免对眼内组织尤其是虹膜组织的干扰,术后足够的抗炎治疗,是减少 PCO 的有效方法。联合前段玻璃体切割者,手术时间以及术中操作比较繁琐,术后反应比较重,术后更应注意抗炎治疗。

对于后发性白内障的治疗,有主张用玻璃体切割器行后发性白内障切除^[15]。而 YAG 激光后囊膜切开具有操作简便、损伤小、安全性高等特点,但需要患者的配合。若术中配合不佳,易损伤角膜内皮或人工晶状体,术后部分患者由于后囊及细胞碎片的播散,可导

致一过性的高眼压以及炎症反应。本研究中,34 眼后发性白内障,29 眼行 YAG 激光后囊膜切开,效果明显。另 5 眼由于配合欠佳,改为手术后囊膜切开。

在本研究中,对于先天性白内障手术,超声乳化白内障摘出术+人工晶状体植入+后囊膜撕囊+前段玻璃体切割术比超声乳化白内障摘出术+人工晶状体植入+后囊膜撕囊术能更好地减少后发性白内障的发生率。

参考文献

- 1 Foster A, Gilbert C. Epidemiology of childhood blindness[J]. Eye, 1992, 6: 173
- 2 Lu Q Zhang Y, Sun B, et al. A population-based study of visual impairment among pre-school children in Beijing: The Beijing study of visual impairment in children[J]. Am J Ophthalmol, 2009 Feb 9. [Epub ahead of print]
- 3 BenEzra D, Cohen E. Posterior capsulectomy in pediatric cataract surgery: the necessity of a choice[J]. Ophthalmology, 1997, 104(12): 2168-2174
- 4 来坚,姚克,孙朝晖,等. 儿童白内障人工晶状体植入临床观察[J]. 中国实用眼科杂志, 2005, 23(2): 127-129
- 5 杨建华. 儿童白内障摘除联合人工晶状体植入和后囊撕除术的临床观察[J]. 眼视光学杂志, 2008, 10(3): 231-232
- 6 Luo Y, Lu Y, Lu G. Primary posterior capsulorhexis with anterior vitrectomy in preventing posterior capsule opacification in pediatric cataract microsurgery[J]. Microsurgery, 2008, 28(2): 113-116
- 7 李钦兹,崔瑞. 学龄前儿童白内障切除联合前段玻璃体切除术[J]. 眼科研究, 1999, 17(4): 308-309
- 8 Chee KY, Lam GC. Management of congenital cataract in children younger than 1 year using a 25-gauge vitrectomy system[J]. J Cataract Refract Surg, 2009, 35(4): 720-724
- 9 Onol M, Ozdek S, Aktas Z. Long-term results of pars plana lensectomy with double-capsule-supported intraocular lens implantation in children[J]. Can J Ophthalmol, 2008, 43(6): 673-677
- 10 Gimbel HV. Posterior continuous curvilinear capsulorhexis and optic capture of the intraocular lens to prevent secondary opacification in pediatric cataract surgery[J]. J Cataract Refract Surg, 1997, 23(5): 652-656
- 11 Parks MM. Posterior lens capsulectomy during primary cataract surgery in children[J]. Ophthalmology, 1983, 90(3): 344-345
- 12 王政,沈爱祥,许志娟. 儿童先天性白内障不同手术方式的临床效果观察[J]. 眼外伤职业眼病杂志, 2008, 30(6): 477-479
- 13 黄瑾,谢莉娜,王林农. 预防儿童后发性白内障 3 种不同术式的临床探讨[J]. 眼科新进展, 2005, 25(1): 57-59
- 14 谢立信,董晓光,曹警,等. 儿童先天性白内障摘除和人工晶状体植入[J]. 中华眼科杂志, 1990, 26(2): 133-134
- 15 Xie L, Huang Y. Pars plana capsulectomy and vitrectomy for posterior capsular opacification in pseudophakic children[J]. J Pediatr Ophthalmol Strabism, 2008, 45(6): 362-365

(收稿:2009-01-22 修回:2009-03-24)

(本文编辑:刘艳)

· 短篇论著 ·

人促甲状腺激素受体基因真核表达质粒的构建

康莉 黑砚 肖利华

甲状腺相关眼病(thyroid-associated ophthalmopathy, TAO)

作者单位:100039 北京,武警总医院眼眶病研究所
通讯作者:康莉(E-mail:kangli95@163.com)

是一种与自身免疫性甲状腺疾病密切相关,且累及眼眶组织的慢性器官特异性自身免疫性疾病。目前普遍认为人促甲状腺激素受体(thyroid stimulating hormone receptor, TSHR)是 TAO 发

病的最主要自身抗原。通过人 TSHR 构建合适的 TAO 动物模型有助于 TAO 的深入研究。但存在于甲状腺细胞膜的人 TSHR 蛋白量较少,且结构不稳定,因此有必要对其进行分子克隆,为构建 TAO 动物模型及进一步研究其发病机制和防治措施奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 人甲状腺总 RNA(美国 BD 公司);pGEM-T 载体、M-MLV 反转录酶、定点突变试剂盒(美国 Promega 公司);pcDNA3.1(+)载体(军事医学科学院生化及分子生物学实验室惠赠);Probest DNA 聚合酶、EcoR I 和 Xba I 限制性内切酶(大连 Takara 公司);T4 DNA 快速连接试剂盒(北京 NEB 公司);人 TSHR 特异性引物和定点突变诱变引物由上海英骏生物技术公司合成。

1.2 方法 用 RT-PCR 的方法从人甲状腺总 RNA 中扩增 TSHR 基因,扩增产物连接至 pGEM-T 载体得到 pGEM-T/TSHR 重组质粒,序列分析发现其中插入的基因在第 154 bp 处存在 1 个点突变(C→A),相应密码子编码的氨基酸由脯氨酸(Pro)变成了苏氨酸(Thr),为错义突变,使用定点突变试剂盒使之突变成与公布序列完全一致的序列。将突变成功的 pGEM-T/TSHR 质粒与 pcDNA3.1(+)质粒分别行 EcoR I 和 Xba I 双酶切,产物纯化回收后用 T4 DNA 快速连接酶完成连接反应,得到 pcDNA3.1(+)/TSHR 重组质粒,用琼脂糖凝胶电泳、PCR 扩增和双酶切的方法进行鉴定。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增产物的鉴定 人甲状腺总 RNA 经 RT-PCR 扩增后,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测显示(图 1),在 DNA 标准物的 2 500 bp 条带处出现略小于 2 500 bp 的特异性扩增条带,这与 人 TSHR 的大小相符合。

2.2 定点突变后重组质粒 pGEM-T/TSHR 的核苷酸序列的测定 突变后重组质粒 pGEM-T/TSHR 中插入基因与 Genbank 中公布的人 TSHR mRNA 完整的肽编码区序列完全一致,证实了所获得人 TSHR 基因的正确性。

2.3 重组质粒 pcDNA3.1(+)/TSHR 的鉴定 重组质粒 pcDNA3.1(+)/TSHR 为 7 700 bp 左右的单一条带;经 EcoR I 和 Xba I 双酶切后得到 5 400 bp 和 2 300 bp 2 个条带;重组质粒 PCR 结果为 2 300 bp 左右的单一条带(图 2)。

以上结果基本说明人 TSHR 与 pcDNA3.1(+)正确重组。

3 讨论

近年来对 TAO 认识日益深入,但有关病因、发病机制以及防治措施等方面的研究仍少有进展,其原因之一就是缺少合适



图 2 重组质粒 pcDNA3.1(+)/TSHR 的鉴定 1:1 000 bp DNA 标准物 2:pcDNA3.1(+)空载体 3:pcDNA3.1(+)/TSHR 重组质粒 4:pcDNA3.1(+)/TSHR 重组质粒用 EcoR I 和 Xba I 双酶切 5:pcDNA3.1(+)/TSHR 重组质粒 PCR 6:1 000 bp DNA 标准物

的动物模型。近年来人们探索了多种 TAO 动物模型的构建方法,包括 TSHR 核酸免疫、TSHR 和 G2s 基因联合免疫、免疫细胞转导免疫、激活的 T 细胞转导免疫、表达 TSHR 的 M12 细胞免疫以及 TSHR 转染的腺病毒免疫等。这些方法都需要应用人 TSHR,因此构建重组人 TSHR 质粒非常重要。人 TSHR 主要存在于甲状腺滤泡细胞膜,也存在于其他组织中。无论从 mRNA 水平还是从蛋白质水平都可以在 TAO 患者球后组织中检测到全长 TSHR 的表达,而正常对照组表达极弱。目前普遍认为眼眶组织中存在的 TSHR 是诱导 TAO 自身免疫反应的交叉抗原,在 TAO 的发生发展过程中起关键作用。

在实验中,我们所扩增的人 TSHR 存在 1 个错义突变(C52→A52),这一突变在 TAO 中的意义尚存在争论。Bahn 等^[1]发现在 2 个严重的 TAO 病例中存在该点突变,认为此突变可能是 Graves 病的病理因素。Cuddihy 等^[2]将此突变与致 Graves 病的其他危险因素相结合分析,结果提示此突变是 Graves 病独立的致病因素。但也有学者认为该点突变并不会引起甲状腺功能的异常。Watson 等^[3]对伴或不伴 TAO 的 Graves 病以及自身免疫性甲状腺功能减退患者和健康对照者研究发现,各组之间人 TSHR 基因该点突变的发生率差异无统计学意义,说明该位点的多型性与 TAO 发病无关。Kaczur 等^[4]的研究亦发现该位点的多型性与 Graves 病无关。而由于本研究中所用的 RNA 提取自 65 例 18~61 岁猝死者的正常甲状腺,因此本研究结果支持后一种观点。

以上结果表明,本实验中 人 TSHR 真核重组表达质粒的构建成功,这为我们下阶段直接免疫实验小鼠建立 TAO 动物模型以及进行其他相关的实验,奠定了理论和实验基础。

参考文献

1 Bahn RS, Dutton CM, Heufelder AE, et al. A genomic point mutation in the extracellular domain of the thyrotropin receptor in patients with Graves' ophthalmopathy [J]. J Clin Endocrinol Metab, 1994, 78 (2) : 256 - 260
2 Cuddihy RM, Schaid DS, Bahn RS. Multivariate analysis of HLA loci in conjunction with a thyrotropin receptor codon 52 polymorphism in conferring risk of Graves' disease [J]. Thyroid, 1996, 6(4) : 261 - 265
3 Watson PF, French A, Pickerill AP, et al. Lack of association between a polymorphism in the coding region of the thyrotropin receptor gene and Graves' disease [J]. J Clin Endocrinol Metab, 1995, 80(3) : 1032 - 1035
4 Kaczur V, Szalai C, Falus A, et al. Polymorphism of the 52 triplet gene (nucleotide 253) of the TSH receptor in Basedow-Graves patients and in healthy controls [J]. Orv Hetil, 1997, 138(25) : 1625 - 1628

(收稿:2009-01-20 修回:2009-04-01)

(本文编辑:尹卫靖)