

·临床研究·

糖皮质激素受体在翼状胬肉中的表达及意义

戚朝秀, 王晓黎, 李奇根, 邓娟, 叶辉

(中山大学附属第三医院眼科, 广东 广州 510630)

摘要: 【目的】检测糖皮质激素受体- α 、(GR- α 、GR- β)在翼状胬肉组织中的表达,探讨其在翼状胬肉发病机制中的作用。【方法】取39例翼状胬肉组织(其中初发30例,复发9例),应用荧光定量逆转录PCR定量检测GR- α 、 β mRNA的表达,应用Western blotting技术分析相应的蛋白表达,同时通过免疫组化技术分析蛋白的细胞定位。另外,取9例正常人的球结膜作为对照。【结果】翼状胬肉及正常人的球结膜组织中均表达GR- α mRNA,不表达GR- β mRNA。其中翼状胬肉(39例)中的GR- α mRNA($\times 10^3$ 拷贝/ μ g)为 10 ± 4 ,明显高于正常人球结膜中的 2.2 ± 0.3 ($P < 0.01$),经统计检验有显著性差异。但30例初发翼状胬肉与9例复发翼状胬肉组织中的GR- α mRNA表达分别为 10 ± 4 和 10 ± 5 ,两者无统计学差异($P > 0.05$)。Western blotting分析显示GR- α 蛋白在翼状胬肉表达显著高于正常人的球结膜组织($P < 0.01$)。免疫组化显示GR- α 蛋白定位于上皮细胞核,胬肉组阳性表达率为87.2%,显著高于正常球结膜组(阳性表达率为22.2%, $P < 0.05$)。而GR- β 蛋白在两种组织中均不表达。【结论】翼状胬肉组织中GR- α mRNA及其蛋白表达明显增高,但其在翼状胬肉发生、发展中的作用机制尚待于进一步研究。

关键词: 翼状胬肉; 糖皮质激素受体- α ; 糖皮质激素受体- β

中图分类号: R776.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)05-0541-04

Expression and Significance of Glucocorticoid Receptor in Pterygium

QI Chao-xiu, WANG Xiao-li, LI Qi-gen, DENG Juan, YE Hui

(Department of Ophthalmology, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-Sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】The present study investigates whether the glucocorticoid receptor (GR) would be expressed in pterygium. 【Methods】GR- α and GR- β mRNA expression were detected by a real-time fluorescent quantitative RT-PCR. GR- α and GR- β protein expression were examined by Western blotting analysis and immunohistochemical technique from 39 patients with pterygium (30 primary pterygium and 9 recurrent pterygium). Nine normal conjunctivae were considered as control. 【Results】The expression of GR- α mRNA ($\times 10^3$ copies/ μ g) were 10 ± 4 in pterygium and 2.2 ± 0.3 in normal conjunctivae. The expression of GR- β mRNA was not detected in pterygium and in normal conjunctivae. There was no difference between the expression of GR- α mRNA in recurrent pterygium (10 ± 5) and the primary pterygium (10 ± 4 , $P > 0.05$). There was significantly difference between the expression of GR- α mRNA in pterygium and the normal conjunctivae. Western blotting analysis and immunohistochemistry further confirmed these findings for the protein transcripts of these genes. 【Conclusion】These results demonstrate, for the first time, the expression of GR- α mRNA and protein were higher in pterygium than normal conjunctivae. The role of up-regulation of GR- α mRNA expression in pterygium need more profound investigation.

Key words: pterygium; GR- α ; GR- β

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(5):541-544]

翼状胬肉是人类常见眼表疾病之一,其发病机制尚不清楚。因其生长特征及术后易复发与肿

瘤相似,故有学者认为其为一种良性肿瘤样病变。近年来,糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor,

收稿日期: 2007-01-10

基金项目: 广东省科技厅基金(2006B605125)

作者简介: 戚朝秀(1955-),女,四川乐至人,副主任医师,硕士生导师, E-mail: zssy-qcx@163.com

GR) 表达水平的测定已广泛应用于许多肿瘤的研究,并且已证实 GR 与多种肿瘤关系密切^[1-4]。但作为肿瘤样病变的翼状胬肉组织中是否存在 GR 表达尚未见报道。为此,本研究应用实时荧光定量逆转录 PCR 方法对翼状胬肉组织和正常人球结膜组织中糖皮质激素受体- α 、 β mRNA 的表达进行定量检测,同时应用 Western blotting 检测两者蛋白的表达,用免疫组化技术进行蛋白的细胞定位,以探讨其在翼状胬肉中可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 临床资料

选择 2004 年 1 月-2005 年 6 月在中山大学附属第三医院眼科门诊手术治疗的、手术后病理诊断为翼状胬肉 39 例(其中初发翼状胬肉 30 例,复发 9 例)。男性 29 例,女性 10 例;年龄 36-73 岁,平均年龄 46.5 岁。否认遗传性、哮喘病史,手术前 2 个月内未接受糖皮质激素药物治疗。9 例正常人眼球结膜作为对照,来源于角膜移植手术取材。手术取下标本分为两份,一份立即置于液氮,后于-80℃冰箱保存。另一份置于 10%福尔马林固定,于本院病理科包埋。

1.2 方法

1.2.1 实时荧光定量逆转录 PCR 同文献报道^[3,4], Primer express 2.0 软件设计引物和探针。糖皮质激素受体- α 扩增引物及荧光探针序列如下:上游引物,5'-TGAAAATGGGTTGGTGCTTCTA-3';下游引物,5'-GACAAGAATACTGGAGAT TTAGAGTCAA-3';荧光探针,5'-FAM-CCTGATGGCACTTAGCTATCAGAAGACCA CAA-TAMRA-3'。糖皮质激素受体- β 扩增引物及荧光探针序列如下:上游引物,5'-TGGCCACCCAAAAGGA-3';下游引物,5'-GAGCTCATCCCATGCTAATTATCC-3';荧光探针,5'-FAM-AACTAACATGATTTGTGTCTATGAGTGC-TAMRA-3'。引物和荧光探针由中山大学达安基因公司合成。

1.2.2 Western blotting 检测 GR- α 、GR- β 蛋白表达量 取手术后鉴定过的组织块,称量后加入细胞裂解液(50 mmol/L Tris·HCl, 1% Triton X-100, 5 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L DTT 和蛋白酶抑制剂),匀浆、超声破碎后,将组织匀浆液加热变性,高速

离心后取上清液,DC 法测量蛋白质浓度。在 Bio-Rad 垂直电泳仪中灌注质量分数 12%分离胶和质量分数 5%浓缩胶,加入不同组样本,稳压 120 V 电泳 90 min,然后在转膜仪上将凝胶上的蛋白转移到 PVDF 膜上,稳压 100 V 转移 60 min,然后用 7%脱脂牛奶封闭 60 min,分别加入兔多克隆抗人 GR- α 、GR- β 抗体(1:1 000;美国 Santa Cruz 公司 sc-1002)4 过夜,次日加入山羊抗兔 IgG 孵育 2 h, ECL 化学发光剂作用后在暗室中曝光、显影、定影、观察结果, β -actin 作为内参照。

1.2.3 免疫组化染色 采用链亲合素-生物素-过氧化物酶(LsAB)法。石蜡切片经梯度酒精脱蜡至水。0.45 mol/L H₂O₂ 避光处理 25 min 阻断内源性过氧化物酶,普通高压锅加压法修复。羊血清封闭 15 min,加 1:700 稀释的 GR- α 抗体(兔抗人多克隆抗体,美国 Santa Cruz 公司 sc-1002)37℃ 孵育 3 h, PBS 洗,再分别加 1:300 稀释的生物素化兔抗 IgG 及 1:300 稀释的链亲合素-辣根过氧化物酶复合物(北京中山公司),于 37℃ 各孵育 45 min, DAB(Sigma 公司)显色,苏木素复染,梯度酒精脱水二甲苯透明,中性树脂封片。

1.2.4 结果判定标准和统计学分析 免疫组化根据组织细胞(上皮细胞+间质炎性细胞)中阳性着色面积所占其总面积的百分比和染色强度分别记为:(-)无明显阳性反应细胞; (+)组织细胞呈棕黄色。免疫组化半定量标准每张切片随机观察 5 个高倍视野,计算出每张切片上阳性细胞百分数,阳性细胞数<10%为阴性,10%为阳性。实时荧光定量逆转录 PCR 结果用 ABI7000 software (Applied biosystem, USA)处理。率的差异显著性用 χ^2 检验进行统计学分析,实验所得数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两个样本均数间的比较采用 t 检验,两组以上样本均数间比较采用完全随机设计的单因素方差分析,以 P<0.05 为差异有显著性,所有操作均以 SPSS 11.0 for Windows 统计软件完成。P<0.05 表示有统计学差异。

2 结果

2.1 实时荧光定量逆转录 PCR

2.1.1 阳性梯度标准品定量标准曲线 不同的标准起始模板数在反应的平台期,产物量相差不成比例。将检测的临界点定在 PCR 产物进入指数增

长期的起始点(CT值处),则起始模板数与CT值成比例增长。将不同梯度定量模板数与其对应CT值关系经对数拟合作图,便得到定量标准曲线。标准品CT值与起始模板对数之间呈线性关系,相关系数分别为0.997(GR- α)、0.996(GR- β),线性关系极好,证实了用CT值进行定量的准确性。

2.1.2 翼状胬肉组织 GR- α mRNA 在翼状胬肉组织和正常人球结膜组织中均检测到 GR- α mRNA 的表达;翼状胬肉(39例)中的 GR- α mRNA ($\times 10^3$ 拷贝/ μg) 为 10 ± 4 , 正常人球结膜组表达为 2.2 ± 0.3 , 两者有显著性差异 ($t=4.96, P=0.008 < 0.01$); 但 GR- β mRNA 表达均为阴性。此外,在翼状胬肉组织中,初发性胬肉(30例)表达为 10 ± 4 , 而复发性胬肉(9例)中为 10 ± 5 , 两者之间无统计学差异($t=0.553, P=0.610 > 0.05$)。

2.2 Western blotting 检测

在翼状胬肉组织和正常人球结膜组织中均检测到 GR- α 蛋白的表达(图1),翼状胬肉初发组和复发组 GR- α 蛋白表达量分别较正常球结膜组升高至 $449\% \pm 36\%$ 和 $423\% \pm 55\%$, 差异有显著性 ($F=77.967, P=0.000 < 0.01$)。其中翼状胬肉初发组和复发组之间无显著性差异($t=2.081, P=0.173 > 0.05$)。然而,GR- β 蛋白在翼状胬肉组织和正常人球结膜组织中均未表达。

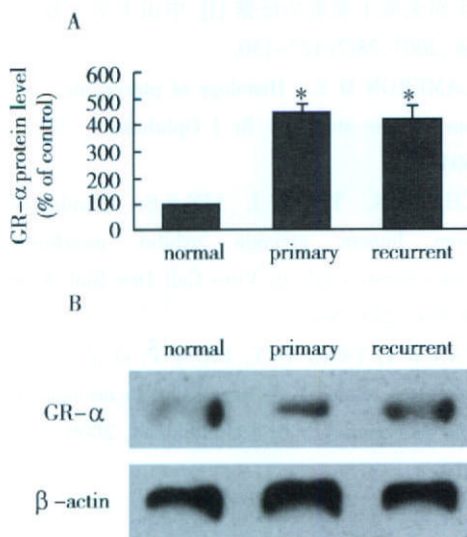


图1 三组人中 GR- α 蛋白的表达(A)及 Western blot 结果(B)

Fig.1 GR- α protein expression (A) and Western blot analysis(B) of three groups.

* $P < 0.01$ vs normal control

2.3 免疫组化

GR- α 蛋白在正常球结膜和翼状胬肉组织中均有不同程度表达,胬肉组阳性表达率 87.2%, 显著高于正常球结膜组(阳性表达率为 22.2%, $\chi^2=16.456; P < 0.05$)。棕黄色代表阳性表达。如图2所示,GR- α 蛋白表达定位于上皮细胞核。然而,GR- β 蛋白在翼状胬肉组织和正常球结膜组织中均未表达。

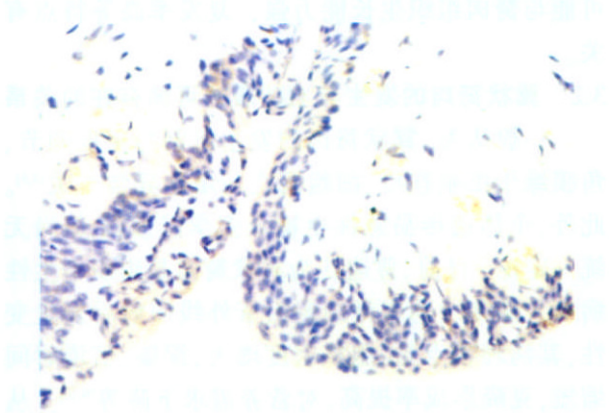


图2 免疫组化显示初发翼状胬肉组织基底膜上皮细胞核中 GR- α 蛋白表达

Fig.2 Immunohistochemical technique showing GR- α protein cytoplasm expression in pterygium ($\times 200$)

3 讨论

3.1 糖皮质激素及其受体在人眼中的作用

人眼是糖皮质激素一个重要的靶组织,如角膜、晶状体、虹膜、视网膜、脉络膜和巩膜等组织细胞中均有糖皮质激素受体表达^[9],提示糖皮质激素在人眼的功能和自身稳定中起重要作用。近年来,GR 表达水平的测定已广泛应用于许多肿瘤的研究,并且已证实 GR 与多种肿瘤关系密切。翼状胬肉在临床上表现为新生的组织不断生长、增厚,并逐渐侵入角膜,并具有复发率高、难以根治等特点。因而,翼状胬肉被学者们认为是良性肿瘤样病变,但胬肉组织中是否也与某些肿瘤病变一样存在 GR 表达,国内外文献尚未见报道。

糖皮质激素主要由肾上腺分泌,受下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴(HPA轴)的调控。糖皮质激素通过 GR 发挥效应,GR 是核受体家族的重要成员之一,同时也是一种转录调控因子,调控多种基因转录,在机体的生命活动中具有重要作用。GR 由可溶性单链多肽组成的磷蛋白,分子质量 94 ku 左右,其存在形式以 GR- α 和 GR- β 两种亚型为主

(还有 β 、 γ 亚型)。 α 亚型属于功能型,它作为一种激素依赖性转录因子,与激素结合后形成同源二聚体,再与靶基因的糖皮质激素反应元件相互作用,调节靶基因的表达,从而引起各种生物学效应。 β 亚型属于拮抗性,但其生物学功能尚不完全清楚^[9]。我们的研究从基因和蛋白水平分别证实了翼状胬肉组织中存在 GR- α 表达,而无 GR- β 表达。这就证实了功能型的 α 受体在胬肉组织中占主导作用,可能与胬肉组织生长能力强,复发率高等特点有关。

3.2 翼状胬肉的发生与 GR 表达可能存在的关系
一般认为,翼状胬肉的发生机制与免疫调节、角膜缘干细胞移行、细胞凋亡与增生异常有关^[7,8]。此外,个体遗传易感性也被众多学者强调,但尚无统一论。目前,普遍认为翼状胬肉是组织增生性病变,病变中的多种细胞因紫外线照射后发生变性,其病理特点是:胞核密度增大,深染,倍增时间缩短,克隆形成率提高,对营养需求下降等^[9,10]。从而导致其生长能力增强,环境耐受能力增加。我们通过免疫组化技术发现胬肉组织基底膜上皮细胞过度表达 GR- α ,这种表达明显高于正常球结膜对照组,这说明 GR- α 可能在胬肉组织中发挥了重要作用。Tan 等^[11]研究证实翼状胬肉组织中抗凋亡蛋白表达增加,抑凋亡蛋白减少。正是由于胬肉组织中细胞异常增生,凋亡减少导致胬肉生长能力强、术后易复发的特点。GR 与其配体结合后发挥多种生物学功能,其中它可以调节多种凋亡相关基因的表达。我们已经检测到胬肉组织中高表达 GR- α ,而这种受体一旦结合配体后可能会参与凋亡相关基因的调节,这可能会成为翼状胬肉发生发展的机制之一。至于胬肉组织中 GR- α 的表达会与哪些基因相互作用,如何调节,则成为我们今后的研究方向。

综上,我们的研究在基因和蛋白水平证实翼状胬肉组织中存在 GR- α 的高表达,但其在胬肉组织发生、发展机制中的作用有待进一步研究,GR- α 可能会成为翼状胬肉治疗的分子靶点之一。

参考文献:

[1] LEIS H, PAGE A, RAM-AREZ A, et al.

- Glucocorticoid receptor counteracts tumorigenic activity of akt in skin through interference with the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway[J]. *Mol Endocrinol*, 2004,18(2): 303-311.
- [2] BARTOLOMUCCI A, PALANSA P, PARMINANI S, et al. Chronic psychosocial stress down-regulates central cytokines mRNA [J]. *Brain Res Bull*, 2003, 62(3):173-178.
- [3] 张孝文,李鹏,李源,等.甲状腺瘤组织中糖皮质激素受体- α mRNA 的表达 [J]. *中华实验外科杂志*, 2005,16(12):420-422.
- [4] 张孝文,李鹏,李源,等.糖皮质激素受体- α mRNA 在腮腺多形性腺瘤中的定量检测 [J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2005,12(6):413.
- [5] PUJOLS L, MULLOL J, ROCA-FERRER J, et al. Expression of glucocorticoid receptor alpha- and beta-isoforms in human cells and tissues [J]. *Am J Physiol*, 2002, 283(4):1324-1331.
- [6] SOUSA A R, LANE S J, CIDLOWSKI J A, et al. Glucocorticoid resistance in asthma is associated with elevated in vivo expression of the glucocorticoid receptor beta-isoform [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2000, 105(5):943-950.
- [7] 林意玲,吴平,廖海兰,等.半边旗二萜类化合物 5F 对人翼状胬肉成纤维细胞结缔组织生长因子表达和胶原合成的影响 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2006, 27(4):369-373.
- [8] 李永平,朱哲,张文析,等.翼状胬肉纤维组织起源于间充质干细胞的证据 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2007, 28(2):127-130.
- [9] CAMERON M E. Histology of pterygium: an electron microscopic study[J]. *Br J Ophthalmol*, 1983, 67(9): 604-608.
- [10] CHEN J K, TSAI R J, LIN S S. Fibroblasts isolated from human pterygia exhibit transformed cell characteristics [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1994, 30A(4): 243-248.
- [11] TAN D T, TANG W Y, LIU Y P, et al. Apoptosis and apoptosis related gene expression in normal conjunctiva and pterygium [J]. *Br J Ophthalmol*, 2000, 84(2): 212-216.

(编辑 刘清海)