

Pax6 在翼状胬肉上皮鳞状化生中的异常表达

Down-Regulation of Pax6 in Pterygial Epithelium

董诺 李程 李炜 吴护平 陈文生 瞿杨洛娃 刘祖国

厦门大学附属厦门眼科中心, 厦门大学眼科研究所, 厦门 361005

Nuo Dong, Cheng Li, Wei Li, Huping Wu, Wensheng Chen, Yangluowa Qu, Zuguo Liu

Eye Institute and affiliated Xiamen Eye Center of Xiamen University, Xiamen 361005, China

目的: 观察翼状胬肉上皮细胞中 Pax6 的表达情况。

方法: 应用免疫组织化学染色法检测 15 例翼状胬肉上皮细胞 Pax6、K10、K19 以及 MUC5AC 的表达, 并与正常结膜对比。

结果: 在正常结膜上皮, K19 全层表达, Pax6 在全层细胞核内表达, K10 染色阴性, MUC5AC 阳性细胞在上皮表皮层呈单个或簇状散在分布; 而翼状胬肉组织 Pax6、K19 和 MUC5AC 表达下降甚至阴性表达, 且比较差异有统计学意义, 而 K10 在上皮的部分表层细胞中阳性表达。

结论: Pax6 基因在翼状胬肉上皮细胞表达下调, 提示其上皮细胞发生鳞状上皮化生。《眼科学报》2010; 25: 41-44.

关键词: 翼状胬肉; Pax6; 鳞状化生; 上皮细胞; 免疫组织化学技术

Purpose: To evaluate the expression of Pax6 in pterygia epithelium.

Methods: Fifteen patients (15 eyes) with pterygium who underwent simple excision were enrolled in this study. Pax6, K10, K19 and MUC5AC immunostaining were performed in pterygia tissue and normal conjunctiva.

Results: A decline or absence of Pax6 expression and K19 keratin and MUC5AC but increased of K10 expression with epidermal differentiation was observed in pterygia epithelium, in comparison with the normal conjunctival tissue.

Conclusion: These results indicate that down-regulation of Pax6 is associated with abnormal differentiation of the epithelial cells in pterygium. *Eye Science* 2010; 25: 41-44.

Key words: Pterygium; Pax6; Squamous metaplasia; Epithelial cells; Immunohistochemistry

Pax6 是控制从低等线虫以至人类的多细胞动物眼球发育的关键基因, Pax6 基因突变可导致严重的眼球发育异常^[1-2]。近年来, 已经有大量的研究探讨了 Pax6 在视网膜及晶体发育中的作用, 但是鲜有 Pax6 在眼表面上皮细

胞中异常表达的研究报道。本研究应用免疫组织化学方法检测翼状胬肉中 Pax6 的表达情况, 并用 MUC5AC、K10 和 K19 来检测翼状胬肉的眼表上皮分化, 现将结果报道如下。

资料与方法

一、临床资料

非随机性回顾性收集 2007 年 11 月至 2008 年 2 月在厦门眼科中心就诊的初发翼状胬肉患者

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30872809); 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(No. 2006AA02A131)

通讯作者: 刘祖国, E-mail: zuguol@yahoo.com

15例(15只眼),其中男3例(3只眼),女12例(12只眼)。年龄34~56岁,年龄(46±7)岁,右眼5只,左眼10只。眼科检查排除慢性泪囊炎、沙眼、睑缘炎、过敏性结膜炎及其它眼表病的病例,所有病例无长期眼科用药史。初发标准:结膜及结膜下纤维组织增生肥厚,呈三角形侵入角膜,既往未行翼状胬肉手术切除。所有翼状胬肉患者均由同一人行翼状胬肉切除术。具体方法如下:常规消毒,爱尔卡因表面麻醉,于翼状胬肉结膜下注射适量的2%利多卡因,显微镜下用剪刀分离翼状胬肉与周围正常结膜及下方巩膜后剪除,并清除变性的结膜下组织后,必要时巩膜烧灼止血,随后沿0.5 mm的透明角膜区作一浅层划切将胬肉头部包括在内做角膜浅层剥离,于上方球结膜取一块包括角膜缘上皮组织在内的游离球结膜组织植片,拖至原胬肉植床处展平,与角膜缘相对应。对位间断缝合植片,固定于浅层巩膜。术毕结膜囊涂妥布霉素地塞米松眼膏,包扎术眼。术后3 d每晨换药包眼,随后开放点眼(予妥布霉素地塞米松滴眼液滴术眼),每日4次,妥布霉素眼膏涂眼,每晚1次。术后1个月停药。术后随访3个月。对照组4例为正常结膜,取自猝死尸眼(厦门眼科中心眼库),遵循赫尔辛基宣言。在翼状胬肉头部前覆盖整个创面,角膜表面渐恢复透明,结膜移植片平坦。

二、免疫组织化学染色法

1. 主要试剂与仪器:鼠抗人单克隆抗体 Pax6(美国 Santa Cruz 公司),鼠抗人单克隆抗体 K10及 K19(美国 Dako 公司),鼠抗人单克隆抗体 MUC5AC(美国 Abcam 公司),DAPI(美国 Burlingame 公司),FITC 标记的山羊抗鼠 IgG 二抗(美国 Sigma 公司),OCT 包埋剂(美国 SAKURA 公司产品,型号 OCT4583)。Leica CM1850 冰冻切片(德国 Leica 公司),Nikon TE2000 倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司)。

2. 免疫组织化学染色法:组织切片用4%多聚甲醛固定15 min,0.3%过氧化氢甲醇溶液30 min,以灭活内源性过氧化物酶的活性,PBS洗涤3次,每次5 min;加入血清稀释液稀释的第一抗体(Pax6 工作浓度1:200),4℃冰箱内孵育过夜,吸去抗体,PBS洗涤3次,每次15 min;滴加血清稀释液稀释的生物素标记兔抗鼠二抗(工作浓度1:100),室温孵育1 h;吸去二抗,PBS洗涤3次,每次5 min;加入亲和素-生物素-过氧化物酶复合物

(Avidin-biotin-peroxidase complex, ABC),孵育30 min,PBS洗涤3次,每次5 min;二氨基联苯胺(Diaminobenzidine, DAB)溶液显色50 s,终止反应;梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片;盖玻片,置光镜下观察结果,照相。阴性对照以 PBS 代替一抗。

3. 免疫荧光组织化学染色法:新鲜正常结膜及翼状胬肉标本取下后立即用 OCT 包埋,液氮预冷1 min,置-80℃低温冰箱保存。将低温保存的标本作连续冰冻切片,片厚6 μm。超薄组织切片用4%多聚甲醛固定15 min,PBS加2%小牛血清去除非特异性染色,加第一抗体(K10、K19 工作浓度1:200, Muc5AC 工作浓度1:50)置于4℃孵育过夜,PBS洗涤3次,每次5 min,加荧光素标记的第二抗体(工作浓度1:50),37℃孵育1 h,PBS洗涤3次,每次5 min。加封片剂后盖玻片,置荧光显微镜观察结果,照相。

三、图像分析

采用 Nikon TE2000 倒置荧光显微镜和尼康 NIS 专业图像分析软件采集系统对四组翼状胬肉切片进行拍摄,免疫荧光组织化学染色的每张切片在荧光显微镜下300倍随机选取5个视野,免疫组织化学染色的每张切片在光镜下400倍随机选取5个视野,运用图像分析软件(Image Pro Plus V6.0)对其进行分析,测量阳性结果的吸光度值(A值),取平均值。

四、统计学处理

使用 SPSS 13.0 软件处理数据。以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验。

结 果

一、免疫组织化学检查结果

1. Pax6 在翼状胬肉的表达情况及图像分析吸光度值:免疫染色显示正常结膜全层上皮细胞大量表达 Pax6 蛋白(图 1A),而翼状胬肉上皮细胞 Pax6 表达明显减少,其中基底层上皮细胞 Pax6 丢失最明显(图 1B)。Pax6 在正常结膜阳性表达的吸光度为(3 2140±5 698),而在翼状胬肉的吸光度为(4 590±3 668),两组吸光度比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

2. 翼状胬肉上皮细胞表型改变及图像分析吸光度值:K10 在正常结膜上皮不表达(图 1C),在翼状胬肉大部分上皮表层呈阳性表达(图 1D)。角

蛋白 K19 均匀分布在全部正常结膜上皮层 (图 1E), 在翼状胬肉上皮表达减弱, 部分上皮完全无表达 (图 1F), 提示翼状胬肉上皮有异常分化。K10 在正常结膜上皮阳性表达的吸光度值为 0, 而在翼状胬肉的吸光度为 $(8\ 113 \pm 1\ 848)$ 。K19 在正常结膜阳性表达的吸光度值为 $(25\ 792 \pm 14\ 261)$, 而在翼状胬肉的吸光度值为 $(8\ 346 \pm 6\ 954)$, 两组吸光度比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3. 翼状胬肉上皮主要黏蛋白表达情况及图像分析吸光度值: 在正常结膜 MUC5AC 单个或簇状散在分布于上皮表皮层 (图 1G), 而在翼状胬肉上皮 MUC5AC 表达显著减弱, 大部分上皮完全无表达 (图 1H)。MUC5AC 在正常结膜阳性表达的吸光度为 $(7\ 050 \pm 2\ 812)$, 而在翼状胬肉的吸光度为 (696 ± 910) 。两组之间的 MUC5AC 吸光度比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

讨 论

翼状胬肉是表现为呈三角形增厚的球结膜组织病变的常见眼表疾病, 其头部侵袭生长至角膜, 体部位于睑裂区的一侧, 大多生长在鼻侧。尽管目前有强有力的证据表明翼状胬肉的发生、发展和日光中紫外线有密切的关系^[3-4], 但是迄今为止关于翼状胬肉的确切病因及具体发病机制仍未完全解释清楚。近来的研究发现翼状胬肉患者的眼表功能有异常^[5], 提示我们翼状胬肉眼表功能的改变在翼状胬肉的发生机制中可能具有一定作用。在本研究中, 我们发现翼状胬肉 Pax6 基因表达下降与其鳞状上皮化生的眼表表现有关。

鳞状上皮化生被认为是由分泌型非角化复层柱状上皮化生为非分泌型角化鳞状上皮的病理过程^[6-7]。它也是多种严重眼表疾病如, 干燥综合征, Stevens-Johnson 综合征, 眼类天疱疮, 热/化学伤和维生素 A 缺乏综合征等出现干眼症状的标志^[6, 8]。Chan 等^[5]检查翼状胬肉的眼表改变, 发现 50 例患者翼状胬肉表面结膜出现鳞状上皮化生。但是该研究应用印迹细胞学方法, 仅局限于眼表浅层细胞的变化, 不能显示上皮全层细胞的改变。角质蛋白 K19 是一种细胞骨架蛋白, 是正常结膜上皮的重要组成蛋白, 常作为正常结膜上皮细胞的标志物^[9]。K10 作为角化上皮的终末分化标志物, K10 在正常结膜上皮不表达^[10]。MUC5AC 由杯状细胞分泌, 是构成泪膜黏液层的最主要成份, 被认为对

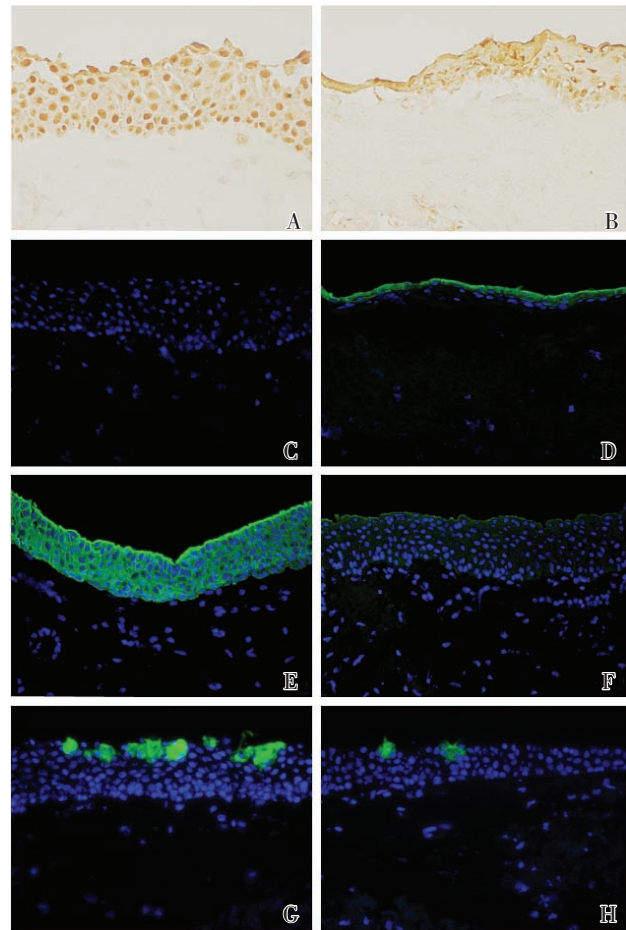


图 1 Pax6、K10、K19 和 MUC5AC 在正常结膜及翼状胬肉上皮细胞中的表达情况 Pax6 在正常结膜上皮细胞核内表达 (A, $\times 400$), 在翼状胬肉上皮细胞核内表达显著下降 (B, $\times 400$); K10 在正常结膜上皮无表达, 蓝色荧光为 DAPI 核染 (C, $\times 300$), 在翼状胬肉上皮可见表层阳性表达 (D, $\times 300$); K19 均匀分布在全部结膜上皮层 (E, $\times 300$), 在翼状胬肉上皮, K19 表达明显减弱 (F, $\times 300$); MUC5AC 单个或簇状散在分布于正常结膜上皮表皮层 (G, $\times 300$), 而在翼状胬肉上皮层 MUC5AC 表达下降 (H, $\times 300$)

于促进泪膜在眼表的分布, 维持泪膜的稳定性起至关重要的作用^[11]。在本研究中, 应用组织化学检查翼状胬肉上皮, 发现翼状胬肉上皮中 K19 和 MUC5AC 表达明显下降, 而 K10 则在上皮阳性表达增多, 进一步证明了翼状胬肉上皮出现鳞状上皮化生 (图 1C-H)。

Pax6 是胚眼发育的主导基因, 在眼球发育过程中, Pax6 表达于大部分眼组织各种上皮细胞类型, 包括神经外胚层起源的视网膜神经上皮和色素上皮层, 虹膜, 睫状体, 以及晶体和角膜上皮细胞。出生以后眼部的 Pax6 表达逐渐局限于角结膜、晶体

的上皮细胞、虹膜及视网膜的无长突细胞,而皮肤上皮不表达^[1-2]。Pax6 基因突变可导致严重的眼球发育异常,纯合子 Pax6 基因突变鼠无眼球发育,杂合突变在鼠可导致小眼球综合征,在人类可导致先天性无虹膜、Peter's 异常及常染色体显性遗传性角膜炎等^[12],其中先天性无虹膜患者会发生角膜上皮干细胞缺乏。Collinson 等^[13]通过对 Pax6 (+)/(-) 转基因鼠的研究发现,Pax6 的正常表达也是角膜发育过程中维持角膜上皮生长及角膜上皮细胞移行所必需的。在先前的实验研究中,我们已经证实了 Pax6 基因维持眼表面角膜上皮正常表型发挥着重要的调控作用,以及 Pax6 基因表达下降或沉默参与严重眼表疾病鳞状上皮化生的发生发展^[14]。在随后的研究中,我们发现 Pax6 在睑裂斑的结膜上皮表达明显下降,并参与其上皮的异常分化^[15]。本研究应用免疫组化观察 Pax6 在翼状胬肉的表达情况,发现其在上皮层表达明显下降。Liang 等^[16]研究尿道上皮鳞状上皮化生时,提出鳞状上皮化生的可能发病机制:在终末分化细胞水平转分化;去分化和再分化;具有多向潜能的干细胞某些情况下选择性扩增不同的干细胞,以及出现由其他类型的干细胞的扩增及替代。本研究中 Pax6 在翼状胬肉上皮基底层阴性表达,提示翼状胬肉眼表鳞状上皮化生的发生发展可能是在祖细胞水平。以上结果提示,类似于角结膜组织,Pax6 基因在维持眼表面结膜上皮正常表型发挥着重要的调控作用,以及 Pax6 基因表达下降或沉默可能参与翼状胬肉鳞状上皮化生的发生发展。

综上所述,本研究首次发现翼状胬肉形成后伴随 Pax6 基因表达下降,合并眼表上皮鳞状化生。通过基因治疗技术将 Pax6 基因重新导入异常分化的翼状胬肉上皮或应用分化的抑制剂可能是治疗翼状胬肉的一种新手段。

参考文献

1. Quiring R, Walldorf U, Kloter U, et al. Homology of the eyeless gene of *Drosophila* to the Small eye gene in mice and Aniridia in humans [J]. *Science*, 1994, 265 (5173): 785-789.
2. Koroma BM, Yang JM, Sundin OH. The Pax-6 homeobox gene is expressed throughout the corneal and conjunctival epithelia [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997, 38 (1): 108-120.
3. Taylor HR, West S, Muñoz B, et al. The long-term effects of visible light on the eye [J]. *Arch Ophthalmol*, 1993, 111 (3): 99-104.
4. Moran DJ, Hollows FC. Pterygium and ultraviolet radiation: a positive correlation [J]. *Br J Ophthalmol*, 1984, 68 (5): 343-346.
5. Chan CM, Liu YP, Tan DT. Ocular surface changes in pterygium [J]. *Cornea*, 2002, 21 (1): 38-42.
6. Tseng SC. Staging of conjunctival squamous metaplasia by impression cytology [J]. *Ophthalmology*, 1985, 92 (6): 728-733.
7. Rivas L, Oroza MA, Perez-Esteban A, et al. Morphological changes in ocular surface in dry eyes and other disorders by impression cytology [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 1992, 230 (4): 329-334.
8. Beitch I. The induction of keratinization in the corneal epithelium. A comparison of the "dry" and vitamin A-deficient eyes [J]. *Invest Ophthalmol*, 1970, 9 (11): 827-843.
9. Elder MJ, Hiscott P, Dart JK. Intermediate filament expression by normal and diseased human corneal epithelium [J]. *Hum Pathol*, 1997, 28 (12): 1348-1354.
10. Pitz S, Moll R. Intermediate-filament expression in ocular tissue [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2002, 21 (2): 241-262.
11. McKenzie RW, Jumblatt JE, Jumblatt MM. Quantification of MUC2 and MUC5AC transcripts in human conjunctiva [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41 (3): 703-708.
12. Callaerts P, Halder G, Gehring WJ. PAX-6 in development and evolution [J]. *Annu Rev Neurosci*, 1997, 20: 483-532.
13. Collinson JM, Chanas SA, Hill RE, et al. Corneal development, limbal stem cell function, and corneal epithelial cell migration in the Pax6 (+/-) mouse [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45 (4): 1101-1108.
14. Li W, Chen YT, Hayashida Y, et al. Down-regulation of Pax6 is associated with abnormal differentiation of corneal epithelial cells in severe ocular surface diseases [J]. *J Pathol*, 2008, 214 (1): 114-122.
15. Dong N, Li W, Lin H, et al. Abnormal epithelial differentiation and tear film alteration in pinguecula [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50 (6): 2710-2715.
16. Liang FX, Bosland MC, Huang H, et al. Cellular basis of urothelial squamous metaplasia: roles of lineage heterogeneity and cell replacement [J]. *J Cell Biol*, 2005, 171 (5): 835-844.

(收稿日期:2010-04-18 编辑:林燕薇)