

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00591

转化生长因子 β 及其受体基因在翼状胬肉中的表达

Expression of transforming growth factor- β and its receptors in pterygium tissues

沈 炜¹, 仲 明^{1*}, 满晓波², 张 媛¹, 邱秀华², 付 清¹

1. 第二军医大学长海医院眼科, 上海 200433

2. 第二军医大学东方肝胆外科医院, 上海 200438

[关键词] 转化生长因子 β ; 转化生长因子 β 受体; 翼状胬肉; 实时荧光定量 PCR; 基因表达

[中图分类号] R 777.33 [文献标志码] B [文章编号] 0258-879X(2009)05-0591-02

翼状胬肉是眼科的常见病、多发病之一, 至今对其病变本质及发病机制仍有争议, 尚未取得一致的结论, 临床上也缺少根治的理想疗法。研究其病变本质及寻找有效的防治措施, 是目前急需解决的课题之一。翼状胬肉的组织病理学特征表现为大量增殖的成纤维细胞, 并由其导致相应的病变。

近年来的研究表明, 细胞因子在炎症反应及成纤维细胞增殖方面起着重要的作用^[1]。转化生长因子(TGF) β 是一类能够调节细胞生长和分化的多肽, 已有报道 TGF β 可能参与了翼状胬肉病变的病理过程^[2], 但其具体机制尚不明确。我们利用实时荧光定量 RT-PCR 法对 TGF β 1 和 TGF β 2 及其受体在翼状胬肉组织中的表达进行了检测, 探讨其在翼状胬肉病变发生、发展过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 研究对象 选择我院眼科门诊的初发型翼状胬肉患者 30 例(30 只眼)。所有患者均无其他角、结膜疾患, 确诊后均行翼状胬肉切除+结膜瓣转移术, 留取翼状胬肉标本, 同时将近患眼角膜上缘上方的切缘中的正常球结膜组织(2 mm \times 5 mm)作为自身对照。

1.2 标本制备 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, 采用 RNA 抽提试剂盒 TRIzol Reagent(Invitrogen 公司)提取总 RNA, 紫外分光光度仪测定纯度和含量, 1% 甲醛变性凝胶电泳检测其完整性。

1.3 引物设计 按照标准荧光定量 PCR 引物设计原则, TaqMan 荧光探针选择 FAM 作为荧光报告基团, TAMRA 作为淬灭基团。针对人 TGF β 1 和 TGF β 2 及其 I 型受体和 II 型受体及内参照 18S rRNA 序列设计 PCR 引物和 TaqMan 探针。合成引物序列如表 1 所示。

表 1 引物序列

引物名称	序列(5'→3')
TGF β 1-F	AAC TAC TGC TTC AGC TCC AC
TGF β 1-R	TGT GTC CAG GCT CCA AAT GTA
TGF β 1-TM	FAM CAG AAG TTG GCA TGG TAG CCC TTG GG
TGF β 2-F	ATG TGC AGG ATA ATT GCT GCC
TGF β 2-R	TGG TGT TGT ACA GGC TGA GG
TGF β 2-TM	FAM TGT TGT GTG TCT GAA CTC CAC AGA T
TGF β R I -F	ACC TTC TGA TCC ATC CGT T
TGF β R I -R	CGC AAA GCT GTC AGC CTA G
TGF β R I -TM	FAM CAG AGC TGT GAG GCC TTG AGA GTG
TGF β R II -F	CCC TAC TCT GTC TGT GGA TGA
TGF β R II -R	GAC GTC ATT TCC CAG AGT AC
TGF β R II -TM	FAM CAG GTG GGA ACA GCG AGA TAC ATG G
18S-F	GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT
18S-R	CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG
18S-F-TM	FAM ATG GGG ATC GGG GAT TGC AAT

1.4 定量 PCR 反应 取总 RNA 5 μ g, 用反转录酶 Superscript II 反转录成 cDNA, 反应体系及操作按说明书进行。以翼状胬肉及正常球结膜组织 cDNA 为模板, 分别加入 TGF β 1、TGF β 2 引物及 TGF β I 型和 II 型受体引物, 并加入对应的 TaqMan 探针进行定量 PCR 反应, 每个反应各做 3 个复孔。反应在 96 孔 PCR 板中进行。反应体系为 50 μ l: 10 \times PCR 缓冲液 5 μ l, MgCl₂ 1.5 mmol/L, 上游和下游引物 0.1 μ mol/L, TaqMan 探针 0.1 μ mol/L, Taq 酶 5 U。设定在每个循环的变性期结束后, 程序自动记录上一循环最后 10% 时间的平均荧光值, 以表示上一循环结束时 PCR 产物的量。荧光种类选择 FAM-490, 程序按照设定的激发和发射光谱选择滤镜组, 分别为 490 nm 和 530 nm。

1.5 定量 PCR 的分析 反应完成后, 得到含所有标本的记录点曲线, 选择 PCR 基线扣除(PCR baseline substrated)模

[收稿日期] 2008-04-12 [接受日期] 2008-10-09

[基金项目] 上海市卫生局科研基金(044097). Supported by Fund of Science Committee of Health Department of Shanghai Municipal Government(044097).

[作者简介] 沈 炜, 硕士, 讲师. E-mail: sw4572@yahoo. com. cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81873556, E-mail: zhongming119@yahoo. com. cn

式进行数据分析和修正。调整基线循环(baseline cycles)和计算阈值(threshold value)后,得出 Ct 值(threshold cycle)。TGFβ 和 18S rRNA 的初始模板量的比值为 $2^{Ct_{18S}-Ct_{TGF\beta}}$,代表翼状胬肉及正常球结膜组织中 TGFβ 基因相对 18S rRNA 的表达水平。TGFβ 受体和 18S rRNA 的初始模板量的比值为 $2^{Ct_{18S}-Ct_{T\beta R}}$,代表翼状胬肉及正常球结膜组织中 TGFβ 受体基因相对 18S rRNA 的表达水平。Ct 值取中位数。

1.6 统计学处理 采用 Excel 进行数据处理和统计学分析。每份标本平行测定 3 个孔,求其平均值,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 翼状胬肉及正常球结膜组织中抽提的 RNA 的鉴定

1%甲醛变性凝胶电泳鉴定 18S 与 28S 条带清晰, RNA 无明显降解。紫外分光光度仪检测 D_{260}/D_{280} 比值均为 1.8~2.0,表明抽提的 RNA 纯度较高,能用于本实验研究。

2.2 TGFβ1 和 TGFβ2 的表达 TGFβ1 在正常球结膜和胬肉组织中平均表达水平分别为 $(4.26 \pm 1.45) \times 10^{-7}$ 和 $(10.67 \pm 7.47) \times 10^{-7}$, TGFβ2 在正常结膜和胬肉组织中表达水平分别为 $(1.08 \pm 0.68) \times 10^{-10}$ 和 $(8.23 \pm 6.63) \times 10^{-11}$ 。TGFβ1 在胬肉组织中表达水平比正常球结膜中表达水平升高 (2.94 ± 2.81) 倍,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。TGFβ2 在胬肉组织中表达水平比正常球结膜中表达水平升高 (7.5 ± 1.4) 倍,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。TGFβ1 在正常球结膜和胬肉组织中表达水平均远高于相应组织中的 TGFβ2 表达,但是 TGFβ2 在胬肉组织中表达水平升高变化幅度高于 TGFβ1 ($P < 0.01$)。

2.3 TGFβ I 型受体和 TGFβ II 型受体的表达 研究结果表明 TGFβ I 型受体在正常球结膜和胬肉组织中平均表达水平分别为 0.003015 ± 0.0036 和 0.000379 ± 0.000281 , TGFβ II 型受体在正常球结膜和胬肉组织中表达水平分别为 $(5.33 \pm 5.05) \times 10^{-5}$ 和 $(1.002 \pm 0.904) \times 10^{-5}$ 。TGFβ I 型受体和 TGFβ II 型受体在胬肉组织中表达水平比正常球结膜中表达水平明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。TGFβ I 型受体在正常球结膜和胬肉组织中表达水平均高于相应组织中的 TGFβ II 型受体表达 ($P < 0.01$)。

3 讨论

翼状胬肉是眼科的常见病和多发病,一般认为它的发生

与长期受到风沙、烟尘、尘埃、日光(紫外线辐射)、花粉等过度刺激有关,也可能与结膜慢性炎症有关,是多种因素参与的复杂病理过程。TGFβ 是重要的多功能调节因子之一,已有研究表明原发性翼状胬肉组织切片中 TGFβ1 呈强阳性表达,培养的正常结膜成纤维细胞可受到外源性 TGFβ 轻度抑制,而培养的翼状胬肉成纤维细胞却受到外源性 TGFβ 促增殖作用并呈剂量依赖性^[3]。这表明 TGFβ 在翼状胬肉组织的异常增殖中可能起着重要作用,但是尚未见针对 TGFβ1 和 TGFβ2 以及其受体 TGFβ I 型和 II 型受体基因表达的完整系统的研究,其确切的正负调控机制和信号转导通路尚需进一步研究证实。

我们的研究表明胬肉组织中 TGFβ1 和 TGFβ2 的表达水平均高于正常球结膜组织。TGFβ1 在正常球结膜和胬肉组织中表达水平均高于相应组织中的 TGFβ2 表达,但是 TGFβ2 在胬肉组织中表达水平升高变化幅度高于 TGFβ1,提示 TGFβ 在翼状胬肉病变发生发展中可能起着重要的作用,而 TGFβ2 在翼状胬肉病变的发展中可能起着调控的作用。我们的研究结果还提示在翼状胬肉病变中 TGFβ I 型受体和 TGFβ II 型受体表达水平均明显降低,可能影响到 TGFβ 的下游信号转导过程^[4],使得 TGFβ 的分泌增加,改变其对靶细胞的调控作用,促使翼状胬肉病变的发生和发展。

[参考文献]

[1] Di Girolamo N, Wakefield D, Coroneo M T. UVB-mediated induction of cytokines and growth factors in pterygium epithelial cells involves cell surface receptors and intracellular signaling [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47: 2430-2437.
 [2] Kria L, Ohira A, Amemiya T. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor, platelet derived growth factor, transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha in the pterygium [J]. Acta Histochem, 1996, 98: 195-201.
 [3] Lee S B, Li D Q, Tan D T, Meller D C, Tseng S C. Suppression of TGF-beta signaling in both normal conjunctival fibroblasts and pterygial body fibroblasts by amniotic membrane [J]. Curr Eye Res, 2000, 20: 325-334.
 [4] ten Dijke P, Hill C S. New insights into TGF-beta-Smad signaling [J]. Trends Biochem Sci, 2004, 29: 265-273.

[本文编辑] 孙岩