

引文格式: 赖伟霞, 梁皓, 谭少健, 李霞, 邹文进, 蒋林志. 钙调素在正常人及不同年龄白内障患者晶状体上皮细胞中的表达[J]. 眼科新进展, 2014, 34 (1): 10-12. doi: 10. 13389/j. cnki. rao. 2014. 0003

【实验研究】

钙调素在正常人及不同年龄白内障患者晶状体上皮细胞中的表达[△]

赖伟霞 梁皓 谭少健 李霞 邹文进 蒋林志

作者简介: 赖伟霞, 女, 1990年3月出生, 广西陆川人, 硕士。联系电话: 0771-5356507; E-mail: niunonv@aliyun.com

About LAI Wei-Xia: Female, born in March, 1990. Master degree. Tel: +86-771-5356507; E-mail: niunonv@aliyun.com

收稿日期: 2013-09-16

修回日期: 2013-11-07

本文编辑: 方红玲

△基金项目: 国家自然科学基金资助(编号: 81360146); 广西自然科学基金资助(编号: 桂科攻 1140003A-29)

作者单位: 530021 广西壮族自治区南宁市, 广西医科大学第一附属医院眼科

通讯作者: 梁皓, E-mail: 13617712201@163.com

Received date: Sep 16, 2013

Accepted date: Nov 7, 2013

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No: 81360146); Guangxi Natural Science Foundation (No: 1140003A-29)

From the Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Responsible author: LIANG Hao, E-mail: 13617712201@163.com

Expression of calmodulin in lens epithelial cells of normal and cataract patients with different age

LAI Wei-Xia, LIANG Hao, TAN Shao-Jian, LI Xia, ZOU Wen-Jin, JIANG Lin-Zhi

【Key words】 calmodulin; cataract; lens epithelial cell; immunofluorescence

【Abstract】 **Objective** To investigate and compare the expression of calmodulin (CaM) in lens epithelial cells (LEC) of normal and cataract patients with different age, and explore the relationship between CaM and cataract, its age related. **Methods** Twelve normal anterior capsule membranes of lens (18-28 years old) obtained from corneal transplantation donor. And the anterior capsules of cataract from children group (1-18 years old), young group (>18-45 years old), middle-aged group (>45-60 years old) and elderly group (more than 60 years old) were obtained in circular capsulorhexis of cataract surgery. Indirect immunofluorescence method was used to detect the expression of CaM in LEC. IPP 6.0 was used to calculate the average fluorescent values of CaM, and SPSS 16.0 was used in statistical analysis. **Results** CaM expressed in human LEC, and its expression mainly in the cytoplasm, cell nucleus also had a small amount of expression. Compared with the same age group, expression of CaM in youth cataract group (0.507 ± 0.288) was higher than normal group (0.297 ± 0.007), there was statistical difference ($F=17.448, P=0.021$). While in the different age cataract groups, the expression among children group (0.624 ± 0.207), youth group (0.507 ± 0.288), middle-aged group (0.704 ± 0.168), elderly group (0.561 ± 0.288) were no significant difference (all $P>0.05$). **Conclusion** The expression of CaM in human LEC is related with the development of cataract, which may be a damaged marker of lens, but CaM expression in cataract LEC has no age difference.

【Rec Adv Ophthalmol, 2014, 34 (1): 10-12】

【关键词】 钙调素; 白内障; 晶状体上皮细胞; 免疫荧光

【摘要】 目的 检测钙调素 (calmodulin, CaM) 在正常人及不同年龄白内障患者晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LEC) 中的表达情况, 探讨 CaM 与白内障发生发展的关系及其表达在白内障患者中是否有年龄相关性。方法 收集 18~28 岁角膜移植患者的正常晶状体前囊膜 12 例, 1~18 岁 (儿童组)、>18~45 岁 (青年组)、>45~60 岁 (中年组)、>60 岁 (老年组) 白内障患者手术中环形撕除的晶状体前囊膜各 12 例, 经固定、脱水、包埋、切片处理, 间接免疫荧光方法检测 CaM 的表达量, 拍照, IPP 6.0 计算 CaM 的荧光值, SPSS 16.0 进行统计学分析。结果 CaM 在 LEC 中有表达, 且主要表达在细胞浆, 细胞核也有少量表达。同年龄组相比, 青年组白内障患者 LEC 中 CaM 的表达量 (0.507 ± 0.288) 高于正常组 (0.297 ± 0.007), 差异有统计学意义 ($F=17.448, P=0.021$); 儿童组 (0.624 ± 0.207)、青年组 (0.507 ± 0.288)、中年组 (0.704 ± 0.168)、老年组 (0.561 ± 0.288) 白内障患者间 LEC 中 CaM 的表达比较, 差异均无统计学意义 (均为 $P>0.05$)。结论 CaM 在人 LEC 的表达与白内障的发生发展相关, 可能是晶状体损伤白内障发生的一个标志, CaM 在白内障 LEC 中表达无年龄相关性。

【眼科新进展, 2014, 34 (1): 10-12】

钙调素 (calmodulin, CaM) 作为钙的受体, 是真核生物中分布最广、功能最多的钙受体蛋白, Ca^{2+} -CaM 系统是晶状体中维持钙离子稳态的一个重要系统^[1-2]。CaM 以 Ca^{2+} -CaM 的活性形式参与体内

Ca^{2+} 的调节, 同时参与眼部 Ca^{2+} 的调节, 与白内障的发生有一定的联系。本实验应用组织切片免疫荧光方法检测同年龄正常人、白内障患者以及不同年龄白内障患者晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells,

LEC)中CaM的表达情况,并进行比较,探讨CaM与白内障发生发展的关系及在白内障患者中其表达是否有年龄相关性,为白内障发病机制研究提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料来源 透明晶状体前囊膜 12 例(正常组),来自于2011年9月至2012年12月广西医科大学第一附属医院眼科角膜移植术供体,其中男8例、女4例,年龄 $18 \sim 28$ (22.3 ± 2.1)岁;白内障晶状体前囊膜的收集来自于同时期行白内障手术者,其中1~18岁白内障患者(儿童组)的晶状体前囊膜12例,男6例、女6例,年龄(6.3 ± 3.1)岁; $>18 \sim 45$ 岁(青年组)12例,男7例、女5例,年龄(38.6 ± 2.2)岁; $>45 \sim 60$ 岁(中年组)12例,男6例、女6例,年龄(52.6 ± 5.5)岁; >60 岁(老年组)12例,男5例、女7例,年龄(67.6 ± 6.2)岁。各组白内障患者间年龄差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$),性别差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)。所有标本的取得都经患者及其家属同意,并经过医院伦理委员会鉴定。

1.2 主要试剂及仪器 CaM兔抗多克隆抗体(sc-5537)购自于美国 Santa Cruz Biotechnology 公司。FITC 标记羊抗兔 IgG (BA1110)、即用型正常山羊封闭血清(AR0009)购自于武汉 Boster 公司。荧光显微镜(日本 OLYMPUS BX53)。

1.3 组织固定石蜡切片法 收集角膜移植术供体前囊膜及白内障手术环形撕囊所获前囊膜,立即置于 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 中性多聚甲醛固定,室温存放 $12 \sim 24$ h;梯度酒精脱水,二甲苯透明,每缸15 min; 55°C 浸蜡3 h,包埋;切片,厚度 $3 \mu\text{m}$, 55°C 烤箱烤片4 h,置

于切片盒室温保存。

1.4 免疫荧光实验方法 将保存的石蜡切片烤片10 min,三缸二甲苯脱蜡,每缸10 min,梯度酒精水化,每缸5 min,磷酸盐缓冲液(PBS)洗片3遍 $\times 3$ min,pH 6.0的 $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸缓冲液(CBS)高压修复10 min,待其冷却,PBS洗片3遍 $\times 3$ min,正常山羊封闭血清 37°C 封闭45 min,甩去血清,免洗,加一抗(CaM兔抗多克隆抗体,1:200稀释), 4°C 孵育过夜,第2天复温30 min,PBS洗片3遍 $\times 3$ min,加荧光二抗(FITC标记羊抗兔IgG,1:100稀释)避光 37°C 孵育30 min,避光PBS洗片3遍 $\times 3$ min,甩干,用甘油-PBS封片。在暗室条件下立即用荧光显微镜观察拍照,每个组织随机选6个 $\times 400$ 视野观察并拍照,1 h内操作完毕。

1.5 荧光分析方法 用IPP 6.0分析所拍荧光图片,每个组织取6张 $\times 400$ 图片,具体操作方法严格按IPP 6.0官方操作指南,按面积计算CaM的荧光强度。

1.6 统计学方法 采用SPSS 16.0对所有CaM的荧光强度值进行统计与分析,采用两样本 t 检验分析正常组和青年组白内障之间CaM的荧光强度值,采用one-way ANOVA分析不同年龄组白内障患者LEC的CaM的免疫荧光强度值的差异,组间差异用SNK法检验。所有数据均数采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CaM的表达情况 CaM表达于正常人及白内障患者的LEC中,主要表达在细胞核,细胞浆也有少量表达,囊膜吸附少量荧光。各组表达情况见图1。

Figure 1 Immunofluorescence figure of CaM in human LEC from normal and different aged cataract groups. A: Normal group; B: Children group; C: Youth group; D: Middle-aged group; E: Senile group 正常及不同年龄组白内障患者LEC中CaM的免疫荧光图,图中绿色荧光(FITC)即为CaM表达。A:正常组;B:儿童组;C:青年组;D:中年组;E:老年组

2.2 同一年龄段的正常人和白内障患者之间及不同年龄组白内障患者之间的比较 青年组CaM的表达量为 0.507 ± 0.288 ,高于正常组的 0.297 ± 0.007 ,差异有统计学意义($F = 17.448, P = 0.021$)。而儿童组(0.624 ± 0.207)、青年组(0.507 ± 0.288)、中年组(0.704 ± 0.168)、老年组(0.561 ± 0.288)白内障患者间CaM的表达比较,差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)。

3 讨论

众所周知,白内障的形成与晶状体内的 Ca^{2+} 紊乱密切相关^[3,4]。晶状体内的低钙浓度是晶状体透明的生理基础,其维持主要依赖钙-ATP酶的活性调节完成,而CaM是细胞膜上钙-ATP酶的重要调节蛋白^[2]。因此,CaM在LEC中表达量的增加及降低与白内障的发生发展可能存在一定的联系,且其是否

存在年龄相关性,与老年性白内障关系如何,值得我们进一步探讨,为白内障发病机制的研究提供一定的实验数据。

CaM 是 1964 年美籍华人张槐耀在研究细胞内 cAMP 浓度变化时发现,我国学者于 1987 年徐州会议定名为 CaM^[5]。CaM 是真核细胞中普遍存在的钙受体蛋白,涉及多种信号途径,在细胞增殖周期的调控及维持细胞内钙离子稳态中处于中心地位^[6]。目前研究发现 CaM 主要在调节环核苷酸、细胞内钙离子浓度、糖原的合成、神经递质的合成和释放、受精、有丝分裂和微管解聚等方面发挥生理功能^[7],但其在晶状体中的生理功能研究较少。

刘晓莉等^[8]使用激活磷酸脂酶法测定正常人及白内障患者中 CaM 含量的研究发现,正常人及白内障患者晶状体 CaM 含量:上皮 > 皮质 > 核,与正常牛晶状体分布一致,白内障晶状体皮质、核 CaM 的含量高于正常人,但两者 LEC 中 CaM 含量无统计学差别。张明志等^[9]对兔晶状体中 CaM 的定位研究表明,从 LEC 到核内纤维状细胞 CaM 的含量逐渐增加,在上皮细胞内,CaM 主要分布于线粒体、微丝和细胞核中,其他部位散在分布,CaM 在高钙时可能直接参与蛋白质的聚合,引起晶状体混浊。王晓贞等^[1]对大鼠晶状体的研究表明,CaM 的相对活性随着大鼠年龄增长而下降,牺牲白内障中 CaM 的相对活性高于同龄正常晶状体。各学者研究表明,CaM 与白内障的发生有一定联系,但目前在正常人与白内障 LEC 中的定量研究及其表达是否有年龄相关性的研究较少。

本实验研究结果表明,白内障患者 LEC 内 CaM 的表达量较同龄正常人高,可能机制是透明晶状体在受到氧化损伤等多种原因时,Ca²⁺-ATP 酶受到抑制,细胞膜对钙离子通透性增加,钙离子内流增多,Ca²⁺-CaM 系统激活,CaM 表达量增加以刺激细胞内 cAMP 的含量增高,通过蛋白激酶使 Ca²⁺-ATP 酶磷酸化,Ca²⁺-ATP 酶活性升高,从而将晶状体细胞内钙离子排出细胞,避免细胞进一步遭受氧化损

伤^[10-12]。这与刘晓莉^[8]、王晓贞等^[1]的研究结果相符,CaM 的表达与钙离子呈正相关,且白内障患者的表达较正常人高。王晓贞等^[1]研究发现在大鼠晶状体中 CaM 的相对活性随着大鼠年龄增长而下降,但我们对白内障患者分不同年龄段进一步研究,结果表明不同年龄组白内障患者 LEC 内 CaM 的表达无明显差异。这可能与研究种属及实验方法不同有关。

总之,白内障患者 LEC 中 CaM 表达量明显高于正常人,说明该蛋白的改变与白内障的发生发展有一定联系,可能为晶状体损伤的一个标志,但在白内障患者 LEC 中 CaM 的表达未见明显年龄相关性。

参考文献

- 1 王晓贞,刘奕志,顾雄飞. 钙调蛋白在大鼠晶状体生长发育和白内障形成中作用的研究[J]. 眼科研究,2004,24(3):236-239.
- 2 Wu Q, Guo D, Bi H, Wang D, Du Y. UVB irradiation-induced dysregulation of plasma membrane calcium ATPase1 and intracellular calcium homeostasis in human lens epithelial cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 382(1-2):263-272.
- 3 陈莺. 白内障发病机制及预防治疗的研究进展[J]. 眼科新进展, 2005, 25(2):190-193.
- 4 Andjelić S, Zupančić G, Hawlina M. The preparations used to study calcium in lens epithelial cells and its role in cataract formation[J]. *J Clin Exp Ophthalmol*, 2011, S1:2.
- 5 顾永清. 钙调素的生理功能[J]. 生物学通报, 1994, 29(10):12-14.
- 6 刘建英. 钙调素与细胞周期[J]. 国外医学生理病理科学与临床分册, 1998, 18(4):322-324.
- 7 Sanderson JJ, Marcantonio J, Duncan G. A human lens model of cortical cataract: Ca²⁺-induced protein loss, vimentin cleavage and opacification[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 44(8):2255-2261.
- 8 刘晓莉, 方谦逊, 严密, 吴兆锋. 正常和老年性白内障晶体的钙调节[J]. 眼科研究, 1996, 14(1):13-15.
- 9 张明志, 张光毅, 赵皓, 董红艳, 陈世超, 赵强, 等. 兔晶状体中钙调素的定位研究[J]. 徐州医学院学报, 1990, 10(2):143-145.
- 10 Galvan A, Louis CF. Calcium regulation by lens plasma membrane vesicles[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1988, 264(2):472-481.
- 11 Bizac JC, Klethi J, Mandel P. Modulation of adenylate cyclase activity in bovine lens epithelial cells[J]. *Ophthalmic Res*, 1989, 21(3):167-174.
- 12 Louis CF, Mickelson JR, Tumquist J, Hur KC, Johnson R. Regulation of lens cyclic nucleotide metabolism by Ca²⁺ plus calmodulin[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1987, 28(5):806-814.