

引文格式:彭红娟,黎宗汉,郑彪,方林彬,柯毅.兔眼小梁切除术后滤过泡组织 Fas mRNA 的表达[J].眼科新进展,2016,36(2):118-120. doi:10.13389/j.cnki.rao.2016.0032

【实验研究】

兔眼小梁切除术后滤过泡组织 Fas mRNA 的表达[△]

彭红娟 黎宗汉 郑彪 方林彬 柯毅

Expression of Fas mRNA of filtration bleb after trabeculectomy in rabbit

PENG Hong-Juan, Li Zong-Han, ZHENG Biao, FANG Lin-Bin, KE Yi

【Key words】 glaucoma; trabeculectomy; filtration bleb; Fas mRNA; rabbit

【Abstract】 **Objective** To study the expression of Fas mRNA in filtration bleb after trabeculectomy in rabbits. **Methods** Forty-eight New Zealand rabbits were fed singly, in which 40 cases were randomly chosen to perform the trabeculectomy in the right eye, then the rabbits were sub-divided into 1-day group, 7-day group, 14-day group, 20-day group and 28-day group based on the postoperative time, 8 cases in each group. Another 8 rabbits received no any operation as the normal control group. At 1 day, 7 days, 14 days, 20 days, 28 days after trabeculectomy, the filtration bleb tissues of operated groups were harvested respectively. The conjunctiva tissues of control group were also harvested at 28 days. The expression level of Fas mRNA was detected by Real Time RT-PCR. **Results** The relative expression of Fas mRNA at 1 day, 7 days, 14 days after operation were 1.33 ± 0.35 , 1.41 ± 0.28 , 1.38 ± 0.25 , respectively, compared with the normal control group (1.42 ± 0.34) the difference was not significant ($P > 0.05$). The relative expression of Fas mRNA at 20 days after operation was 0.90 ± 0.18 , which was lower than that in the normal control group ($P < 0.05$), and decreased to 0.78 ± 0.09 at 28 days after operation. **Conclusion** In the procession of filtering bleb tissue healing, the expression of Fas mRNA decrease at 20 days and 28 days, 14 days after operation, which may be emerged as a promising target for treating postoperative scar of trabeculectomy.

【关键词】 青光眼;小梁切除术;滤过泡;Fas mRNA;兔

【摘要】 **目的** 对小梁切除术后滤过泡组织 Fas mRNA 的表达进行初步研究。**方法** 新西兰白兔 48 只单独笼养,随机选取 40 只兔右眼行小梁切除术,使上方结膜形成滤过泡,按术后时间又分为 1 d、7 d、14 d、20 d、28 d 共 5 个亚组,每组 8 只兔。另外 8 只兔的右眼未进行手术为正常对照组。在行小梁切除术后 1 d、7 d、14 d、20 d、28 d,切下滤过手术区组织,同时于 28 d 时切除正常对照组相应部位的结膜组织。实时荧光定量 PCR 检测各组标本的 Fas mRNA 表达情况。**结果** 兔眼小梁切除术后 1 d、7 d、14 d 三个亚组 Fas mRNA 的相对表达量分别为 1.33 ± 0.35 、 1.41 ± 0.28 、 1.38 ± 0.25 ,与正常对照组的表达量 1.42 ± 0.34 相比差异无统计学意义($P > 0.05$),术后 20 d Fas mRNA 相对表达量为 0.90 ± 0.18 ,较对照组明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),28 d 时进一步下降至 0.78 ± 0.09 ($P < 0.05$)。**结论** 在兔眼结膜滤过泡组织愈合过程中,术后 20 d 及 28 d 凋亡主要基因 Fas mRNA 表达量明显减少,可能为减少青光眼小梁切除术后瘢痕化寻找到一个新的突破口。

作者简介:彭红娟,女,1981 年 1 月出生,广东兴宁人,硕士,主治医师。研究方向:青光眼。联系电话:13652874353; E-mail: 490858384@qq.com

About PENG Hong-Juan: Female, born in January, 1981. Master degree, attending doctor. Tel: 13652874353; E-mail: 490858384@qq.com

收稿日期:2015-04-19

修回日期:2015-11-02

本文编辑:盛丽娜

△基金项目:广东省湛江市科技计划项目(编号:20120602)

作者单位:524001 广东省湛江市,广东医学院附属医院眼科

通讯作者:方林彬, E-mail: fanglinbin1@163.com

Received date: Apr 19, 2015

Accepted date: Nov 2, 2015

Foundation item: Science and Technology Plan Program of Zhanjiang of Guangdong Province (No:20120602)

From the Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001, Guangdong Province, China

Responsible author: FANG Lin-Bin, E-mail: fanglinbin1@163.com

组织,同时于 28 d 时切除正常对照组相应部位的结膜组织。实时荧光定量 PCR 检测各组标本的 Fas mRNA 表达情况。**结果** 兔眼小梁切除术后 1 d、7 d、14 d 三个亚组 Fas mRNA 的相对表达量分别为 1.33 ± 0.35 、 1.41 ± 0.28 、 1.38 ± 0.25 ,与正常对照组的表达量 1.42 ± 0.34 相比差异无统计学意义($P > 0.05$),术后 20 d Fas mRNA 相对表达量为 0.90 ± 0.18 ,较对照组明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),28 d 时进一步下降至 0.78 ± 0.09 ($P < 0.05$)。**结论** 在兔眼结膜滤过泡组织愈合过程中,术后 20 d 及 28 d 凋亡主要基因 Fas mRNA 表达量明显减少,可能为减少青光眼小梁切除术后瘢痕化寻找到一个新的突破口。

青光眼是全球首位不可逆致盲性眼病,也是严重影响我国人民身心健康的主要疾病之一。青光眼的治疗是世界防盲治盲的重点工作之一。虽然近年来在青光眼的治疗领域上各种新技术不断出现,但小梁切除术仍然是最主要的治疗方式,只是随着术后时间的推移,其远期手术成功率并不理想,术后 2 a 的手术失败率达 15%~25%^[1,2]。小梁切除术失败的主要原因是滤过泡瘢痕化。如何调控滤过泡瘢痕化是目前青光眼研究的热点之一,这首先需要对滤过泡瘢痕化机制有更深入的理解,进一步探讨其机制是眼科工作者的当务之急。滤过泡瘢痕化的机制尚不清楚,一般认为可能主要与凋亡受阻、结膜成纤维细胞过度增生

等有关。但目前国内外对凋亡的主要影响因子 Fas 的表达及意义了解甚少,所以本研究拟对 Fas 在小梁切除术后滤过泡组织的表达进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 动物模型的制备及标本的取材

1.1.1 实验动物及分组 新西兰雄性白兔(广东双林生物制药有限公司)48 只,体质量 2.5~3.5 kg,单独笼养,经普通饲料(苜蓿草粉)适应性喂养 20 d 后,随机选取 8 只不进行手术者为正常对照组,另外 40 只均右眼行小梁切除术为小梁切除术组,按术后不同时间又分为 1 d、7 d、14 d、20 d 和 28 d 共 5 个亚

组,每组 8 只。

1.1.2 动物模型的制备 右眼造模。实验动物按 50 mg · kg⁻¹氯胺酮和 15 mg · kg⁻¹甲苯噻嗪的剂量行腹腔注射全身麻醉;10 g · L⁻¹利多卡因结膜下麻醉;做以穹隆为基底的结膜瓣,以角巩膜缘为基底 3 mm × 3 mm 巩膜瓣,切除 1.5 mm × 1.0 mm 小梁组织,切除周边虹膜,用 10-0 尼龙线缝合巩膜瓣 2 针,并用 10-0 尼龙线连续缝合结膜瓣,使结膜上方形成一个滤过泡,并恢复前房。裂隙灯显微镜观察术后 1 d、7 d、14 d、20 d、28 d 滤过泡情况。

1.1.3 取材 在行小梁切除术后 1 d、7 d、14 d、20 d 和 28 d 常规消毒铺巾,完整摘除右眼眼球每个时间点均为 8 只兔眼,同时正常对照组兔喂养 28 d 后,完整摘除右眼眼球以备提取 RNA 用。

1.2 实时荧光定量 PCR 检测 Fas mRNA 的表达 摘除后的眼球切下上方带结膜、筋膜、巩膜及角膜缘的滤过手术区组织,分离得到手术区域滤过道的眼组织,包括结膜、Tenon 囊和巩膜,迅速保存在 -80 ℃ 冰箱,以备 RNA 的提取。取得的眼组织均经过同质加工处理,去核糖核酸酶(RNase)处理,提取 RNA,检测浓度和纯度后,进行 RAN 电泳检测,三条带完整者即认为总 RNA 抽提比较完整。应用 SYBR[®] Prime-Script RT-PCR Kit II 试剂盒[Perfect Real Time, 宝生物工程(大连)有限公司]在 PCR 扩增仪(Mastecycle gradient 型,Eppendorf,德国)进行逆转录合成 cDNA 第一链,目的基因 Fas mRNA 引物序列:上游为 5'-GGGGCTGAGAAGATACAAA-3',下游为 5'-GAG-GAAGTCGGTGATGGTT-3';内参基因 18 S rRNA 引物序列,上游为 5'-CCTGGATACCGCAGCTAGGA-3',下游为 5'-GCGGCGCAATACGAATGCCC-3'。实时荧光定量 PCR 反应条件:预变性 95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s,60 ℃ 20 s,40 个循环;退火 65 ℃ 15 s。

1.3 结果计算方法 数据用 LightCycler480 实时荧光定量 PCR 系统(Roche,瑞士)分析。采用目前较

为常用的 2^{-ΔΔCt} 方法来进行相对定量,在该公式中,ΔΔCt = Ct 实验组 - Ct 对照组,其中 Ct 实验组及 Ct 对照组计算方式均为 Ct_{Fas mRNA} - Ct_{18 S rRNA},Ct 值是每个反应管内的荧光信号强度到达设定的域值时所经历的循环数,由电脑根据扩增曲线自动分析计算出。2^{-ΔΔCt} 表示的是实验组目的基因的表达相对于对照组的变化倍数。

1.4 统计学方法 所得数据应用 SPSS 17.0 统计软件分析,实验结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本均数的比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),多个样本均数的两两比较采用 SNK 法。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 滤过泡的观察 小梁切除术后 1 d、7 d,结膜明显充血,滤过泡轻微隆起、弥散;术后 14 d 结膜稍微充血,滤过泡轻微隆起、弥散,可见微小囊状腔隙;术后 20 d 滤过泡相对局限,部分形成包裹,部分区域有瘢痕形成;术后 28 d 结膜下广泛粘连,在巩膜表面呈多血管外观,滤过泡瘢痕形成。

2.2 RNA 电泳结果和熔解曲线 内参基因和目的基因 Fas 的 PCR 扩增后的熔解曲线,其熔点峰分别位于 93.7 ℃ 和 92.1 ℃,峰形窄而尖,无杂峰(图 1-图 4)。总 RNA 电泳条带完整(图 5),说明 RNA 提取完整。综合上述两者证实 PCR 扩增的特异性良好,Ct 值的可信度强。

2.3 各组 Fas mRNA 相对表达量 兔眼小梁切除术后 1 d、7 d、14 d Fas mRNA 相对表达量分别为 1.33 ± 0.35、1.41 ± 0.28、1.38 ± 0.25,与正常对照组的 1.42 ± 0.34 相比差异无统计学意义(P > 0.05),术后 20 d Fas mRNA 相对表达量为 0.90 ± 0.18,较正常对照组表达量下降,差异有统计学意义(P < 0.05),28 d 时进一步下降至 0.78 ± 0.09,与正常对照组、20 d 组相比差异均有统计学意义(均为 P < 0.05)。

图1 Fas 扩增曲线。图2 Fas 熔解曲线。图3 内参基因 18 S rRNA 扩增曲线。图4 内参基因 18 S rRNA 熔解曲线

3 讨论

小梁切除术失败的主要原因是滤过泡瘢痕化,瘢痕形成的机制一般认为除了与成纤维细胞大量增生有关外,还与凋亡抑制、细胞外基质中胶原合成与降解失衡、部分细胞因子大量产生有关,三者的密切关系构成了病理性瘢痕形成的生物学基础^[3,4]。细胞凋亡的调节可能是瘢痕形成的重要机理^[5],创伤修复的整个过程均有凋亡机制参与,特别是上皮细

胞、成纤维细胞增殖与凋亡之间的平衡决定着创面修复的结局^[5-6]。创面修复过程中形成病理性瘢痕重要的原因是上皮细胞与成纤维细胞数量增多,凋亡不足。病理性瘢痕形成过程中多种凋亡基因的表达出现异常^[7],而 Fas 基因是激活细胞凋亡的最主要的基因之一。Fas 又称 CD95,属于肿瘤坏死因子受体超家族成员,是一种跨膜蛋白,是由 325 个氨基酸组成的受体分子。Fas 与配体 Fas 分子交联结合,激活 Fas 相关的死亡结构域(fas-associated death do-

图5 RNA电泳图。1~6分别代表正常对照组及小梁切除术后1 d、7 d、14 d、20 d、28 d组,M为Marker,由下至上片段大小依次为100 bp、250 bp、500 bp、750 bp、1000 bp、2000 bp

main, FADD), FADD通过其死亡效应域(death effector domain, DED)与Caspase-8酶原结合并相互作用,驱使Caspase-8酶原自身活化。随后活化的Caspase-8又激活下游的Caspase-3及其他Caspases家族,引起凋亡。Fas广泛表达于成纤维细胞和淋巴细胞等细胞表面,对其的研究已成为目前生命科学领域研究的热点之一^[8-9]。Fas在很多疾病的发病过程中以及正常免疫反应中都有重要的起始和调控作用,Fas途径作为细胞凋亡激活途径,其表达水平的变化会导致一系列病理改变^[10-11]。

在我们的研究中发现,正常兔结膜表达Fas mRNA,这与CHEN等^[12]用免疫组织化学染色方法得出的Fas在正常结膜组织有表达的结果相一致。手术后1 d、7 d、14 d滤过泡组织Fas mRNA相对表达量分别为 1.33 ± 0.35 、 1.41 ± 0.28 、 1.38 ± 0.25 ,与正常对照组的 1.42 ± 0.34 无明显差异,这可能与手术时间短、兔结膜滤过泡处于术后创伤修复过程中的凝块形成期、增殖期、肉芽形成期,而在这三期滤过泡还未形成胶原性瘢痕,细胞凋亡与增殖处于平衡之中有关。但在切口创伤愈合修复过程中,20 d后肉芽组织胶原形成,肉芽组织逐渐转为胶原瘢痕,这与在我们的研究中术后20 d、28 d,滤过泡组织Fas mRNA表达量分别为 0.90 ± 0.18 、 0.78 ± 0.09 ,与对照组相比表达量明显减少的结果是相符合的。Fas表达量的减少导致滤过泡组织成纤维细胞及上皮细胞凋亡不足,细胞增生过多;过多的成纤维细胞合成成熟性胶原纤维;同时,过多的成纤维细胞逐渐转换为纤维细胞,毛细血管退化,从而导致滤过泡的瘢痕化。

滤过泡瘢痕化是小梁切除术失败的主要原因,为了解决滤过泡瘢痕化的问题,人们通过使用抗代

谢药物、基因治疗、激光微创治疗、生物合成材料等方法,但均未得到满意效果。临床常用的抗代谢药物及抗细胞增殖药物如丝裂霉素C、5-氟尿嘧啶等在手术中的应用大大提高了手术的成功率,但是由于使用此类药物导致的如滤过泡渗漏、角膜损害、黄斑水肿、眼内感染等并发症的发生率也相应增加,对患者本来已经损伤的视功能造成了新的威胁,再次手术疗效欠佳,且明显增加了患者心理及经济负担,所以寻找一种更加安全、特异、有效的抗瘢痕化方法是研究人员仍需解决的重要问题。而我们的研究发现,在兔结膜滤过泡组织愈合过程中,术后20 d及28 d凋亡主要基因Fas mRNA表达量明显减少,可能为减少青光眼小梁切除术后瘢痕化寻找到一个新的突破口。本研究为寻找一种更加安全、特异、有效的抗瘢痕化方法提供新思路。

参考文献

- [1] FOSTER PJ, BUHRMANN R, QUIGLEY HA, JOHNSON GJ. The definition and classification of glaucoma in prevalence surveys[J]. *Br J Ophthalmol*, 2002, 86(2): 238-242.
- [2] CACKETT P, VALLANCE J, COBB C, DEVLIN H, SIMPSON A, SANDERS R. South-trabeculectomy survey[J]. *Eye (Lond)*, 2007, 21(1): 46-51.
- [3] ZHANG GY, LI X, CHEN XL, LI ZJ, YU Q, JIANG LF, et al. Contribution of epidermal stem cells to hypertrophic scars pathogenesis[J]. *Med Hypotheses*, 2009, 73(3): 332-333.
- [4] DE FELICE B, GARBI C, SANTORIELLO M, SANTILLO A, WILSON RR. Differential apoptosis markers in human keloids and hypertrophic scars fibroblasts[J]. *Mol Cell Biochem*, 2009, 327(1): 191-201.
- [5] DESMOULIERE A, REDARD M, DARBU L, GABBIANI G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar[J]. *Am J Pathol*, 1995, 146(1): 56-66.
- [6] EDWARDS M, JONES D. Programmed cell death in human acute cutaneous wounds[J]. *J Cutan Pathol*, 2001, 28(3): 151-155.
- [7] NASSIRI M, WOOLERY-LLOYD H, RAMOS S, JACOB SE, GUGIC D, VICIANA A, et al. Gene expression profiling reveals alteration of caspase 6 and 14 transcripts in normal skin of keloid-prone patients[J]. *Arch Dermatol Res*, 2009, 301(2): 183-188.
- [8] WANG JA, LI CL, FAN YQ, HE H, SUN Y. Allograftic bone marrow-derived mesenchymal stem cells transplanted into heart infarcted model of rabbit to renovate infarcted heart[J]. *Zhejiang Univ Sci*, 2004, 5(10): 1279-1285.
- [9] PAK HN, QAYYUM M, KIM DT, HAMABE A, MIYAUCHI Y, LILL MC, et al. Mesenchymal stem cell injection induces cardiac nerve sprouting and increased tenascin expression in a swine model of myocardial infarction[J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2003, 14(8): 841-848.
- [10] KMI HS, PARK CK. Retinal ganglion cell death is delayed by activation of retinal intrinsic cell survival program[J]. *Brain Res*, 2005, 1057(1-2): 17-28.
- [11] NIU YJ, ZHAO YS, GAO YX. Therapeutic effect of bFGF on retina ischemia-reperfusion injury[J]. *Chin Med J*, 2004, 117(2): 252-257.
- [12] CHEN SY, JIANG Y, WANG Z, LI Y. Conjunctival Fas-FasL expression in chronic Stevens-Johnson syndrome[J]. *Zhonghua Yanke Zazhi*, 2014, 50(9): 691-694.