

# MRG15 在正常及年龄相关性白内障晶状体上皮细胞中的表达

靳三全

作者单位:(454000)中国河南省焦作市,焦作煤业(集团)有限责任公司中央医院一分院

作者简介:靳三全,男,主治医师,眼科主任,研究方向:眼科临床。

通讯作者:靳三全. jinsanquan67@163.com

收稿日期:2014-11-14 修回日期:2015-02-12

## Expression and significance of MRG15 in human age-related cataract lens epithelial cells

San-Quan Jin

No. 1 Branch Hospital of the Central Hospital, Jiaozuo Coal Industry (Group) Co., Ltd., Jiaozuo 454000, Henan Province, China

**Correspondence to:**San-Quan Jin. No. 1 Branch Hospital of the Central Hospital, Jiaozuo Coal Industry (Group) Co., Ltd., Jiaozuo 454000, Henan Province, China. jinsanquan67@163.com  
Received:2014-11-14 Accepted:2015-02-12

### Abstract

• **AIM:**To study the MRG15 (death factor related gene) in age-related cataract (ARC), differential expression of normal lens epithelial cells.

• **METHODS:** Forty mature healthy female SD rats were randomly divided into study group and control group, 20 rats in each group, the study group were ovariectomized, low concentration of naphthalene long interval of administration, the establishment of perimenopausal ARC model, the control group of conventional farming. In the subtractive hybridization cloning by MRG15, and make the probe of the cDNA fragment using digoxigenin labeled. Access to the two groups of rats anterior lens capsule after slicing, and then through the differential expression *in situ* hybridization clear lens epithelial cells.

• **RESULTS:** The cloned MRG15 through BamHI, EcoRI enzyme digestion and agarose gel electrophoresis, available for 639bp long cDNA fragment. GeneBank display contrast, their homology was 99.0%. *In situ* hybridization, ARC patients and normal lens epithelial cells were observed in the expression of MRG15. Study group the percentage of positive cells compared with control group, showed a significant difference ( $P<0.05$ ). Integral index study group and the control group compared with, was significantly difference ( $P<0.05$ ).

• **CONCLUSION:** ARC, MRG15 in normal lens epithelial cells expressed ARC, and compared with the normal expression of lens epithelial cells, which may produce

inhibitory effects are associated with MRG15 transcription in human lens epithelial cells in the part of key genes, by reducing the lens epithelial cell function, make its appear aging, and the formation of cataract, clinical response to this should further study.

• **KEYWORDS:** death factor; related genes; age-related cataract; normal lens; epithelial cells; expression

**Citation:**Jin SQ. Expression and significance of MRG15 in human age-related cataract lens epithelial cells. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2015;15(3):411-413

### 摘要

**目的:**研究 MRG15(死亡因子相关基因)在年龄相关性白内障(age-related cataract,ARC)、正常晶状体上皮细胞的表达差异。

**方法:**性成熟的健康雌性 SD 大鼠 40 只,随机分为研究组、对照组,每组 20 只,研究组切除双侧卵巢、低浓度萘长间隔给药,建立围绝经期 ARC 模型;对照组常规饲养。以消减杂交改良法克隆 MRG15,并对其 cDNA 片段应用地高辛标记制作探针。获取两组大鼠晶状体前囊膜切片后,再通过原位杂交法明确晶状体上皮细胞的表达差异。

**结果:**克隆出的 MRG15 通过 BamHI 和 EcoRI 酶切以及琼脂糖电泳,可获取长为 639bp 的 cDNA 片段。GeneBank 对比显示,其同源性达到 99.0%。原位杂交显示,ARC 患者及正常晶状体上皮细胞内均可见 MRG15 表达。研究组阳性细胞百分率与对照组相较,有统计学差异( $P<0.05$ )。研究组积分指数与对照组相较,有统计学差异( $P<0.05$ )。

**结论:**MRG15 在 ARC 和正常晶状体上皮细胞中均有表达,并且 ARC 较正常晶状体上皮细胞表达增高,这可能与 MRG15 对晶状体上皮细胞中一部分关键基因的转录产生抑制效应有关,通过降低晶状体上皮细胞的功能,使其出现衰老样改变,进而形成白内障,临床应对此进行更进一步的研究。

**关键词:**死亡因子;相关基因;年龄相关性白内障;正常晶状体;上皮细胞;表达

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.3.08

**引用:**靳三全. MRG15 在正常及年龄相关性白内障晶状体上皮细胞中的表达. *国际眼科杂志* 2015;15(3):411-413

### 0 引言

年龄相关性白内障(age-related cataract,ARC)又被称为老年性白内障,主要发生于中老年人群,患者出现晶状体混浊后,形成以视物模糊等为主要症状的慢性病程性疾病<sup>[1]</sup>。目前,该病已经是致盲性眼病的主要诱因,在世界

范围内,达到半数以上的失明为 ARC 造成<sup>[2]</sup>。MRG15 与死亡因子 4 具备类似特性,不仅与生长调控有关,研究显示 MRG15 对衰老也具备调控效应,能够在人体的许多组织中出现,包括晶状体的上皮细胞组织<sup>[3]</sup>。另据文献报道,晶状体的上皮细胞是晶状体当中仅有的、具备分裂活性功能的细胞,患者白内障发生、发展均与之关系密切<sup>[4]</sup>。因此,我们通过建立大鼠 ARC 模型,研究 MRG15(死亡因子相关基因)在 ARC 和正常晶状体上皮细胞的表达差异,为进一步研究提供理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 性成熟的清洁级健康雌性 SD 大鼠 40 只,体质量 200~250g,随机分为研究组、对照组,每组 20 只,均常规饲养。主要试剂为:Superscript II 反转录酶、Klen-Taq LA 酶、La-Taq 酶、地高辛 DNA 标记检测试剂盒、质粒提取试剂盒。

## 1.2 方法

**1.2.1 造模** 研究组予双侧卵巢切除术,对照组仅予双侧腹膜切开术。术后两组均予吐温-80 和蔡混悬液(300g/L, 0.5g/kg)灌胃,每周 2 次。6wk 后两组大鼠均处死,取单眼晶状体,冻于液氮,-70℃ 环境下保存备用。造模晶状体经确认形成白内障:大鼠晶状体出现空泡、小水裂以及前囊点状混浊;光镜下,实验组晶状体组织表现出典型老年白内障早期病理改变。

**1.2.2 MRG15 克隆** 应用消减杂交改良法,提取 mRNA、反转录,制备扣除探针、杂交、目的片段 PCR 选择性扩增,克隆纯化 cDNA、酶切鉴定等步骤,获得 ARC 差异表达的 cDNA 文库。分析克隆产物序列得到目的片段,质粒载体构建并保存在 DH-5 $\alpha$  菌种内。

**1.2.3 制作切片** 晶状体囊膜组织置于恒冷箱进行切片,保证厚度 10 $\mu$ m,贴于载玻片,通过室温下 4.0% 甲醛进行固定 20min,以 PBS 冲洗,由梯度乙醇进行 2min 脱水,干燥切片封存在-70℃ 环境。

**1.2.4 探针标记** MRG15 cDNA 菌种通过摇菌扩增,以质粒提取试剂盒进行质粒提取,再通过琼脂糖电泳,将含有 cDNA 片段的胶块切下,以胶回收试剂盒进行 cDNA 回收。经紫外分光光度仪进行 cDNA 的定量,得到每克中 DNA 含量。同时加 1 $\mu$ L klenow 酶、2 $\mu$ L dNTP2 和 1 $\mu$ L 六聚体混匀,在 37℃ 环境下进行 24h 孵育。所标记的探针通过纯化在-20℃ 环境下保存。

**1.2.5 杂交和免疫检测** 将切片取出以 PBS 洗 5min,共 2 次,以甘氨酸 0.2mol/L 进行 2 次孵育切片,每次 5min。再加入 0.3% 的 Triton X-100 进行 15min 室温孵育。之后加蛋白酶 K,于 37℃ 环境下进行 30min 孵育,以甲醛进行 5min 固定,以 PBS 冲洗将乙酸酐和 TEA 加入使切片呈乙酰化。以 6 $\times$ SSC 进行 5min 洗切片,共 2 次。将切片予梯度酒精进行脱水干燥后划蜡圈。将含 50.0% 去离子甲酰胺,4 $\times$ SSC 的预杂交液添加到切片。同时配 200mL 甲酰胺湿盒液,浓度 50.0%,将其加在湿盒底部。再将切片放在湿盒中,37℃ 环境下进行 2h 孵育。将标记好探针取出加至杂交液,各组织切片均加入 25 $\mu$ L 探针杂交液,在 37℃ 环境下进行 16h 杂交。将切片取出于 SSC 中洗涤,递增温度,递减浓度,将非特异性的杂交信号洗去。待切片予缓冲液摇洗后,以碱性磷酸酶 1:500 对抗地高辛抗体进行标记,在 37℃ 环境湿盒内进行 2h 孵育。以左旋咪唑、5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸盐、硝基蓝四氮唑配置呈色液,

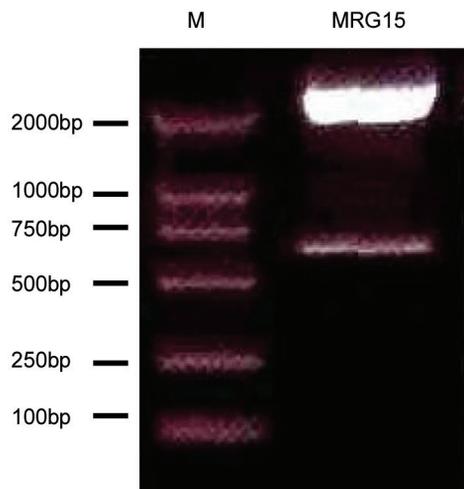


图 1 MRG15 cDNA 片段酶切鉴定。

表 1 两组阳性细胞百分率和积分指数对比

分组	n	阳性细胞百分率(%)	积分指数	$\bar{x} \pm s$
研究组	20	76.12 $\pm$ 16.25	1.91 $\pm$ 0.42	
对照组	20	55.87 $\pm$ 14.76	0.58 $\pm$ 0.04	

在室温暗室下于湿盒中进行 12~16h 呈色。再以 TE 将呈色终止,以二甲苯进行脱水透明,以中性树胶进行封片处理。

**1.2.6 对照组设置** 对照组均留一张标本,在加入杂交液情况下不加探针,给予同体积的去离子水。

**1.2.7 结果判定** 杂交完成后,以显微镜观察,对阳性颗粒数以及细胞形态进行观察。分别取两组切片,各切片计数为 100 个细胞,得到阳性细胞表达的百分率,对阳性颗粒依据颜色、数量分为阴性(-)、弱阳性(+)、阳性(++)、强阳性(+++)。以 0,1,2,3 对强度分数进行记录,得到积分指数。强度积分 $\times$ 阳性细胞的百分率=积分指数。

统计学分析:选择 SPSS 19.0 软件对数据予以统计处理,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,进行 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

克隆出的 MRG15 通过 BamHI 和 EcoRI 酶切以及琼脂糖电泳,可获取长为 639bp 的 cDNA 片段。GeneBank 对比显示,其同源性达到 99.0% (图 1)。原位杂交显示,ARC 患者及正常晶状体上皮细胞内均可见 MRG15 表达。研究组阳性细胞百分率与对照组相较,差异具有统计学意义( $t = 6.552, P < 0.05$ )。研究组积分指数与对照组相较,差异具有统计学意义( $t = 3.187, P < 0.05$ ,表 1)。

## 3 讨论

文献报道,ARC 作为多因素共存的一种致盲性眼病,其发生不仅同环境、年龄因素相关,也与基因、遗传等因素具有密切关联<sup>[4]</sup>。通过分子生物学途径对 ARC 的发生及发展进行研究,探讨相关基因的表达改变与对相关功能的影响,为目前白内障病因研究中的前沿问题<sup>[5]</sup>。

研究显示,MRG15 基因的相关功能已经得到人们的重视<sup>[5]</sup>。目前该基因家族当中,MORF4 死亡因子-4 于正常组织中呈低表达,已经被人们共识。与此同时,在给予人 HeLa 细胞转染后,呈高表达状态,出现细胞增殖的停滞等诸如此类衰老样表现。另据文献报道,染色体 1、染色体 7 等基因也是与细胞衰老关系密切的基因<sup>[6]</sup>。

文献报道<sup>[7]</sup>MRG15能够对一种转录调节因子进行编码,影响转录作用,能够同细胞生长、衰老以及死亡形成密切关系。研究显示<sup>[8]</sup>,MRG15经相关蛋白作用,可形成复合体干预细胞的转录。MRG15可形成复合体,直接使转录受到抑制,同时参与到细胞衰老的整个过程。另据研究显示,机械压力可使牙龈细胞表达呈增高改变。

MRG15是MRG基因家族的一员,该家族是在研究衰老相关基因的过程中新近被发现的,其七个成员中只有MORF4,MRG15和MRGX三个成员可以正常表达。通过对这三个成员的氨基酸序列分析发现,它们具有一些共同的结构域,包括核定位信号、MRG结构域、螺旋-环-螺旋和亮氨酸拉链等结构域,这些参与蛋白质-蛋白质相互作用的区域也是转录调节因子中经典的特征结构,而且MRG家族的成员都局限于细胞核中表达,因此推测该家族的功能可能是参与转录调节<sup>[9]</sup>。

MRG15广泛分布于人的各种组织,且在多种生物中都有较高的保守性。这种广泛分布及物种间的保守性表明,MRG15可能会在一种或多种细胞生命过程中起到重要的基础作用。MRG15蛋白的氨基酸序列与MORF4有96%的相似性,两者最大的不同是MRG15的N端有一个染色质调节结构域,可以对转录过程进行正向或反向调节。近期的研究发现,通过参与组成两个明确的核蛋白复合物MAF1和MAF2,MRG15可以作为细胞周期中关键的正向调节因子,通过激活B-myb等细胞周期中重要基因的表达来发挥作用,也为进一步研究奠定了基础。

本文结果显示,克隆出的MRG15通过BamH1和EcoR1酶切以及琼脂糖电泳,可获取长为639bp的cDNA片段。GeneBank对比显示,其同源性达到99.0%,并且原位杂交显示ARC患者及正常晶状体上皮细胞内均可见

MRG15表达。同时,研究组阳性细胞百分率与对照组相比较,呈明显差异;而研究组积分指数与对照组相比较,也呈明显差异,说明MRG15在ARC和正常晶状体上皮细胞中均有表达,并且ARC较正常晶状体上皮细胞表达增高,这可能与MRG15对晶状体上皮细胞中一部分关键基因的转录产生抑制效应有关,通过降低晶状体上皮细胞的功能,使其出现衰老样改变,进而形成白内障,临床应对此进行更进一步的研究。

#### 参考文献

- 1 段海霞,曹志星,管怀进,等. 不同类型白内障晶状体上皮细胞的组织病理学观察. 中华实验眼科杂志 2014;32(6):502-505
- 2 邢潇英,祝雪宁,喻芳,等. 年龄相关性白内障及手术对老年人优势眼的影响. 中华实验眼科杂志 2014;32(6):531-535
- 3 杨梅,苏舒,周婧,等. 年龄相关性白内障人群DNA损伤修复基因与环境因素的交互作用. 中华医学杂志 2014;94(15):1147-1151
- 4 杨斐,侯宪如,吴慧娟,等. 年龄相关性白内障合并浅前房患者白内障术后屈光状态研究. 中华眼科杂志 2014;50(2):84-88
- 5 管怀进,苏舒,蒋胜群,等. 年龄相关性白内障患者外周血淋巴细胞DNA损伤的研究. 中华实验眼科杂志 2013;31(12):1148-1151
- 6 赖伟霞,谭少健,李霞,等. 衰老标记蛋白30在不同年龄白内障患者晶状体上皮细胞中的表达变化. 中华实验眼科杂志 2014;32(6):521-524
- 7 张可可,竺向往. 晶状体蛋白的外消旋化及其在白内障发病机制中的研究进展. 中华实验眼科杂志 2014;32(6):563-567
- 8 刘兰,蔡小军,余爱华,等. 不同类型年龄相关性白内障晶状体上皮细胞衰老标记蛋白30的表达及与细胞凋亡的关系. 中华实验眼科杂志 2012;30(6):529-533
- 9 Liang Y, Wang K, Liu H. A nuclear ligand MRG15 involved in the proapoptotic activity of medicinal fungal galectin AAL (Agroclybe aegerita lectin). *Biochimica et Biophysica Acta. General Subjects* 2010;1800(4):474-480