

8-羟基脱氧鸟苷在原发性翼状胬肉组织中的表达及意义

靳怀运, 王剑锋

作者单位: (233000) 中国安徽省蚌埠市, 蚌埠医学院第一附属医院眼科

作者简介: 靳怀运, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 白内障、眼表疾病。

通讯作者: 王剑锋, 女, 硕士, 主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 青光眼、白内障、眼表疾病、斜视。7852978@qq.com

收稿日期: 2016-11-10 修回日期: 2017-02-08

Expression and significance of 8-OHdG in primary pterygium

Huai-Yun Jin, Jian-Feng Wang

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233000, Anhui Province, China

Correspondence to: Jian - Feng Wang. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233000, Anhui Province, China. 7852978 @ qq. com

Received: 2016-11-10 Accepted: 2017-02-08

Abstract

• **AIM:** To detect oxidative DNA damage marker 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) in primary pterygium and normal conjunctival tissues, explore the role of oxidative DNA damage in the pathogenesis of pterygium.

• **METHODS:** Totally 35 primary pterygium specimens were collected during surgery and 5 normal conjunctival specimens which above the normal temporal bulbar conjunctiva were collected. The expressions of 8-OHdG in pterygium tissues were detected by immunohistochemical method and compared with the normal conjunctival tissues. The difference of 8-OHdG expression between the two groups was compared.

• **RESULTS:** There were 24 (69%) pterygium specimens positive for 8-OHdG staining, limited to the nuclei of the epithelial layer. No substantial staining was visible in the subepithelial fibrovascular layers. All normal controls were negative for 8-OHdG staining. The difference of 8-OHdG expression between the two groups was statistically significant ($P=0.007$).

• **CONCLUSION:** The increased levels of 8-OHdG in the pterygium tissues indicate that oxidative DNA damage maybe play an important role in the pathogenesis of pterygium.

• **KEYWORDS:** pterygium; 8-hydroxy-2-deoxyguanosine; oxidative DNA damage

Citation: Jin HY, Wang JF. Expression and significance of 8-

OHdG in primary pterygium. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2017; 17(3):565-567

摘要

目的: 检测 DNA 氧化损伤标志物 8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG) 在翼状胬肉和正常结膜组织中的表达, 探讨 DNA 氧化损伤在翼状胬肉发病机制中的作用。

方法: 收集在我科行翼状胬肉切除手术的原发性翼状胬肉组织标本 35 例, 并收集术眼颞上方正常球结膜标本 5 例作对照。采用免疫组织化学法检测翼状胬肉标本中 8-OHdG 的表达, 并与正常球结膜组织的标本进行对照。

结果: 在 35 例翼状胬肉组织中有 24 例呈阳性表达, 阳性表达率为 69%, 而正常结膜组织中无 8-OHdG 的表达, 其阳性表达率的差异具有显著统计学意义 ($P=0.007$)。8-OHdG 的阳性表达位于胬肉组织上皮细胞的细胞核, 呈棕黄色着色, 上皮下的纤维血管组织及正常结膜组织无表达。

结论: 在翼状胬肉组织中 8-OHdG 呈阳性表达, 而正常结膜组织中不表达, 提示 DNA 氧化损伤在翼状胬肉的发病机制中发挥重要作用。

关键词: 翼状胬肉; 8-羟基脱氧鸟苷; DNA 氧化损伤

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.3.48

引用: 靳怀运, 王剑锋. 8-羟基脱氧鸟苷在原发性翼状胬肉组织中的表达及意义. *国际眼科杂志* 2017; 17(3):565-567

0 引言

翼状胬肉是眼科门诊的常见眼表疾病之一, 表现为睑裂部球结膜和结膜下组织变性增生侵犯角膜, 因其外观类似昆虫翅膀而得名, 其确切发病机制尚不十分清楚。流行病学研究发现, 翼状胬肉的发生、发展与环境因素有非常密切的关系, 其中紫外线损伤在翼状胬肉发病过程中的重要作用已得到众多学者的认同^[1-3]。紫外线辐射可以产生大量活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS), ROS 能够损伤细胞的 DNA、蛋白质和脂质, 产生氧化应激损伤。8-羟基脱氧鸟苷 (8-hydroxy-2-deoxyguanine, 8-OHdG) 是 ROS 攻击 DNA 链上的鸟嘌呤碱基第 8 位碳原子, 使脱氧鸟苷氧化为 8-OHdG, 是目前国际上公认的一种评价 DNA 氧化损伤的重要标志物^[4]。因此检测翼状胬肉中 8-OHdG 的表达能够反映 DNA 氧化损伤与翼状胬肉发病机制的关系。本试验通过免疫组织化学的方法研究 8-OHdG 在翼状胬肉组织中的表达情况, 探讨 DNA 氧化损伤在翼状胬肉发病过程中的作用, 为寻找翼状胬肉的预防和治疗新方法提供理论依据, 完善对翼状胬肉发病机制的认识。

1 对象和方法

1.1 对象 收集 2015-10/2016-03 在我科行翼状胬肉切除手术的原发性翼状胬肉组织标本 35 例 35 眼, 年龄 40 ~

70岁,并收集术眼颞上方正常球结膜标本5例5眼作自身对照。病例纳入标准:对侧眼无翼状胬肉,眼部及周围无炎性病变,无糖尿病、葡萄膜炎、肿瘤等有可能合并有氧化损伤的疾病。术前常规局部应用抗菌素滴眼液点眼。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 鼠抗人8-OHdG单克隆抗体(艾博抗上海贸易有限公司);酶标抗小鼠/兔IgG聚合物、即用型EliVision Plus/HRP免疫组化试剂盒、DAB显色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司)。

1.2.2 免疫组织化学染色 手术切取翼状胬肉和结膜组织标本平铺于10%福尔马林中固定,常规脱水,石蜡包埋,行4 μ m厚连续切片。免疫组化采用Elivision二步法:石蜡切片脱蜡、水化,自来水冲洗,抗原修复液修复抗原,自然冷却至室温。切片上滴加30mL/L H₂O₂溶液,室温下孵育10min,消除内源性过氧化物酶活性,PBS冲洗3次,每次3min。除去PBS,每张切片上滴加1:50稀释的鼠抗人8-OHdG单克隆抗体1滴,室温下孵育1h,PBS冲洗3 \times 3min。除去PBS,切片上滴加反应增强液,室温下孵育20min,PBS冲洗3 \times 3min。除去PBS,切片上滴加酶标抗小鼠/兔IgG聚合物,室温下孵育30min,PBS冲洗3 \times 3min。除去PBS,切片上滴加新鲜配制的DAB显色试剂显色。出现棕色颗粒即终止反应,自来水冲洗终止显色,苏木素复染,PBS返蓝,切片经梯度酒精脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封固,室温下自然晾干,光学显微镜下观察。

1.2.3 结果判定 8-OHdG阳性染色定位于细胞核,呈棕黄色颗粒。显微镜下细胞核呈棕黄色颗粒即为阳性,不着色为阴性。每张切片任意选择5个高倍视野(\times 400),计数每个视野中阳性细胞所占的比例,取平均值作为该标本的阳性细胞表达率。8-OHdG表达结果分为:阴性(-):无阳性细胞;弱阳性(+):阳性细胞率小于10%;强阳性(++):阳性细胞率大于10%。

统计学分析:采用SPSS 17.0软件进行分析,计数资料以例数表示,采用Fisher确切概率法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

每张切片形态及染色良好,阳性与阴性对比明显。8-OHdG的阳性表达位于胬肉组织上皮细胞层全层,阳性细胞均匀分布,细胞核呈明显强烈的棕黄色深染,上皮下的纤维血管组织无表达(图1)。在35例翼状胬肉组织切片中有24例呈阳性表达,阳性表达率为69%(24/35)。在正常结膜组织中无8-OHdG的表达(图2),其阳性表达率为0(0/5)。在正常结膜组织和原发翼状胬肉组织中,8-OHdG表达的差异具有显著统计学意义($P = 0.007$)。

3 讨论

翼状胬肉是一种常见的眼表慢性增生性眼病,其病理改变主要是纤维组织和新生血管的增生。流行病学研究认为,本病与环境因素密切相关。大量研究证明,紫外线辐射在翼状胬肉的发病机制中发挥重要作用。紫外线辐射可导致DNA氧化损伤,可能通过诱导炎症因子、细胞生长因子等各种细胞因子的分泌及基因突变,导致凋亡抑制基因Bcl-2、突变型P53基因的增高,抑制了正常的细胞凋亡过程,造成组织细胞的过度增生,引起翼状胬肉的发生和发展^[5]。

紫外线辐射等氧化应激损伤可以产生大量的活性氧

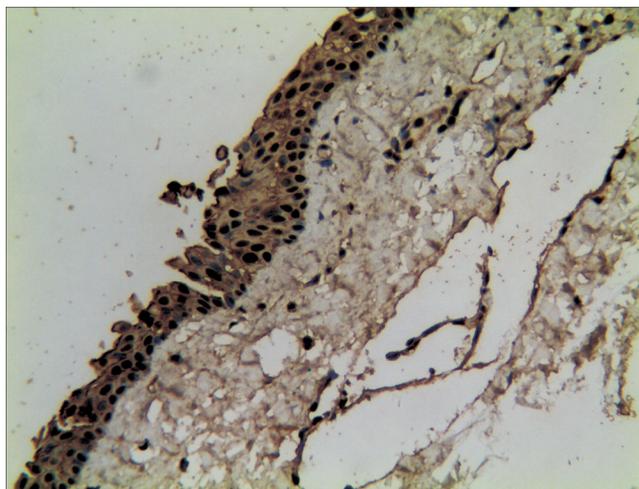


图1 翼状胬肉中8-OHdG的表达,上皮细胞核呈棕黄色阳性表达(\times 400)。

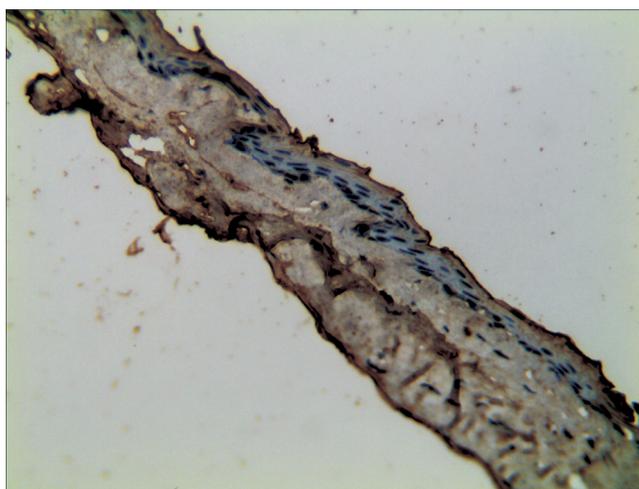


图2 正常结膜组织中8-OHdG无表达,上皮细胞核呈蓝色阴性表达(\times 400)。

自由基(ROS),包括超氧阴离子(O₂⁻)、羟自由基(-OH)和过氧化氢(H₂O₂)等,在正常生理条件下人体可及时清除多余的ROS,但在氧化应激超出机体抗氧化能力时,ROS快速释放并在体内过度蓄积,进而造成DNA的氧化损伤,从而产生大量嘌呤羟基化、嘧啶羟基化的碱基修饰产物^[6]。8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxy-deoxyguanosine, 8-OHdG)作为活性氧自由基(ROS)引起DNA氧化损伤的生物标志物,是ROS直接攻击DNA的鸟嘌呤碱基第8位碳原子,使脱氧鸟苷发生羟基化的产物。大量研究显示8-OHdG在糖尿病、癌症、心血管疾病等氧化应激相关疾病患者的血液、尿液或组织标本中表达增高,可作为疾病诊断与疗效评价的一种敏感指标。

Tsai等^[7]于2005年首次报告了在翼状胬肉组织中检测出8-OHdG阳性表达率增高。他们采用免疫组织化学染色法检测52例翼状胬肉组织和6例正常结膜组织中8-OHdG及8-羟基鸟嘌呤糖苷酶(hOGG1)的表达,结果显示:在52例翼状胬肉中8-OHdG的阳性表达率为23.1%,表达位于上皮细胞层的细胞核,而上皮下的纤维组织层不表达。hOGG1在翼状胬肉中的阳性表达率为13.5%。在正常结膜中8-OHdG和hOGG1均不表达,提示DNA氧化损伤在翼状胬肉发病机制中发挥一定作用,8-OHdG的表达增加引起抗氧化损伤物质hOGG1的表达增加。Kau等^[8]

用 ELISA 方法进一步检测 8-OHdG 在翼状胬肉组织中表达量的变化, 研究结果显示在翼状胬肉组织中 8-OHdG 的表达量是正常结膜组织中的 4.7 倍, 且表达量的增高与患者性别、年龄无关。

P53 基因作为一种肿瘤抑制基因, 其主要作用是调控细胞生长、抑制肿瘤细胞增殖。紫外线辐射可导致 p53 肿瘤抑制基因的突变, 导致细胞过度增殖。翼状胬肉组织临床表现为结膜纤维组织不断的生长、增厚, 具有肿瘤组织学特征。采用免疫组织化学法可以检测翼状胬肉中 P53 蛋白的表达。Perra 等^[9]研究了翼状胬肉中 8-OHdG 与 P53 蛋白的表达及相关性, 结果显示翼状胬肉中 8-OHdG 阳性表达率为 67.74%, P53 阳性表达率为 35.48%, 两者的阳性表达呈正相关; 8-OHdG 与 P53 在正常结膜中均不表达。此研究提示在翼状胬肉中存在 P53 基因突变, 引起胬肉组织的过度增生, P53 基因突变可能由 DNA 氧化损伤引起。也有研究发现^[10], 在翼状胬肉和正常结膜组织中的细胞增生率无明显统计学差异, 提示翼状胬肉的过度增生可能是由于细胞的凋亡减少所致。有研究发现^[11], 凋亡抑制基因 Bcl-2 在翼状胬肉的头、颈部和体部均较结膜中表达增高, 其中头部表达增高最明显, 提示翼状胬肉的生长存在细胞凋亡减少, 相对增殖能力较强, 存在过度修复。赵博等^[12]进一步研究了 Bcl-2 与 8-OHdG 在翼状胬肉中的表达关系, 证实 Bcl-2 与 8-OHdG 在翼状胬肉中呈阳性表达, 正常结膜中无表达; 进行一致性检验分析, 8-OHdG 与 Bcl-2 阳性表达具有一致性, 推测 Bcl-2 的过度表达可能与 DNA 氧化损伤有密切关系。

本研究采用免疫组织化学 Elivision 二步法, 检测并比较了在原发性翼状胬肉组织及正常结膜组织中 8-OHdG 的表达, 其主要结果为: (1) 8-OHdG 在原发性翼状胬肉组织中的阳性表达率为 69% (24/35), 而在正常结膜组织中未见表达。 (2) 8-OHdG 表达在胬状胬肉组织的上皮细胞全层, 位于上皮细胞的细胞核。本研究结果与既往研究结

果一致, 均显示 8-OHdG 在翼状胬肉组织中呈高表达。

综上所述, 认为 DNA 氧化损伤在翼状胬肉发生、发展过程中发挥重要作用。DNA 氧化损伤可能通过引起翼状胬肉基因突变, 导致肿瘤抑制基因失活和凋亡抑制基因激活, 引起胬肉组织过度增殖和凋亡减少, 促进翼状胬肉的发生与发展。

参考文献

- 1 Mauro J, Foster CS. Pterygia: Pathogenesis and the Role of Subconjunctival Bevacizumab in Treatment. *Semin Ophthalmol* 2009; 24(3):130-134
- 2 Yam JC, Kwok AK. Ultraviolet light and ocular diseases. *Int Ophthalmol* 2014; 34(2):383-400
- 3 Threlfall TJ, English DR. Sun exposure and pterygium of the eye: a dose-response curve. *Am J Ophthalmol* 1999; 128(3):280-287
- 4 汪莉君, 邵华. 8-羟基脱氧鸟苷检测方法研究进展. *中国卫生检验杂志* 2007; 17(10):1915-1916
- 5 Bradley JC, Yang W, Bradley RH, et al. The science of pterygia. *Br J Ophthalmol* 2010; 94(7):815-820
- 6 高玉楠, 杨靖, 宋沁馨, 等. 8-羟基脱氧鸟苷作为 DNA 氧化损伤标志物在疾病诊断中的应用. *药学与临床研究* 2012; 20(3):223-228
- 7 Tsai YY, Cheng YW, Lee H, et al. Oxidative DNA damage in pterygium. *Mol Vis* 2005; 11:71-75
- 8 Kau HC, Tsai CC, Lee CF, et al. Increased oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxy-guanosine, in human pterygium. *Eye* 2006; 20(7):826-831
- 9 Perra MT, Maxia C, Corbu A, et al. Oxidative stress in pterygium: relationship between p53 and 8-hydroxy deoxyguanosine. *Mol Vis* 2006; 12:1136-1142
- 10 Karukonda SR, Thompson HW, Beuerman RW, et al. Cell cycle kinetics in pterygium at three latitudes. *Br J Ophthalmol* 1995; 79(4):313-317
- 11 李娟, 廖荣丰, 王剑锋, 等. Bcl-2, CD34 在初发性翼状胬肉组织中的表达. *蚌埠医学院学报* 2013; 38(8):992-994
- 12 赵博, 吴江, 景红, 等. DNA 氧化损伤在翼状胬肉发病中的作用. *中华实验眼科杂志* 2013; 31(2):160-163