

# ICAM-1 在大鼠晶状体上皮细胞中表达的实验研究

王晓辉<sup>1</sup>, 潘永明<sup>2</sup>, 徐国兴<sup>1</sup>

**基金项目:**中国福建省卫生厅青年科研基金资助项目(No. 2005-2-37)

**作者单位:**<sup>1</sup>(350005)中国福建省福州市,福建医科大学附属第一医院眼科;<sup>2</sup>(341000)中国江西省赣州市人民医院眼科

**作者简介:**王晓辉, 硕士, 主治医师, 曾获得福建省卫生厅青年科研基金及福建医科大学苗圃科研基金资助各1项, 研究方向: 白内障。

**通讯作者:**王晓辉. wxhfyk@163. com

**收稿日期:**2011-07-25 **修回日期:**2011-08-29

## Experimental study of intercellular adhesion molecule-1 expression in the lens epithelium cells

Xiao-Hui Wang<sup>1</sup>, Yong-Ming Pan<sup>2</sup>, Guo-Xing Xu<sup>1</sup>

**Foundation item:** Youth Research Foundation of Health Department of Fujian Province, China (No. 2005-2-37)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Jiangxi Ganzhou Hospital, Ganzhou 341000, Jiangxi Province, China

**Correspondence to:** Xiao-Hui Wang. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China. wxhfyk@163. com

Received: 2011-07-25 Accepted: 2011-08-29

## Abstract

• **AIM:** To evaluate the role of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the pathogenesis of diabetic cataract, and to investigate the effects of transforming growth factor $\beta$ -1 (TGF- $\beta$ <sub>1</sub>) on the expression of ICAM-1 in the lens epithelium cells.

• **METHODS:** Totally 120 SD rats were randomly divided into two groups: normal control group and diabetic cataract group. Diabetic model was built in diabetic cataract group. Immunohistochemical streptavidin-peroxidases (SP) method was used to observe changes of the expression of ICAM-1 in the lens epithelium cells in two groups. RT-PCR method was used to detect the effects of TGF- $\beta$ <sub>1</sub> and TGF- $\beta$ <sub>1</sub> antibody on the expression of ICAM-1 in the cultured human lens epithelium cells.

• **RESULTS:** The expression of ICAM-1 in the lens epithelium cells was significantly higher in diabetic cataract group than that in normal control group, and increasing with the development of disease ( $P < 0.01$ ). The expression of ICAM-1 in the lens epithelium cells was significantly increased in TGF- $\beta$ <sub>1</sub> cultured group, which had statistical significance compared with normal serum cultured group ( $P < 0.05$ ). The expression of ICAM-1 was

significantly inhibited in TGF- $\beta$ <sub>1</sub> antibody cultured group, which had statistical significance compared with TGF- $\beta$ <sub>1</sub> cultured group ( $P < 0.05$ ).

• **CONCLUSION:** TGF- $\beta$ <sub>1</sub> could induce the expression of ICAM-1 in the lens epithelium cells, and played an important role in the occurrence of diabetic cataract through promoting attachment and proliferation of lens epithelium cells.

• **KEYWORDS:** intercellular adhesion molecule-1; transforming growth factor $\beta$ -1; diabetic cataracts; lens epithelium cells

Wang XH, Pan YM, Xu GX. Experimental study of intercellular adhesion molecule-1 expression in the lens epithelium cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(10):1700-1703

## 摘要

**目的:**研究细胞间黏附分子-1(ICAM-1)在糖尿病性白内障发病机制中的作用及转化生长因子 $\beta$ -1(TGF- $\beta$ <sub>1</sub>)对晶状体上皮细胞ICAM-1表达的影响。

**方法:**SD大鼠120只随机分为对照组和糖尿病性白内障组。在糖尿病性白内障组中,建立糖尿病模型,免疫组织化学SP法观察两组晶状体上皮细胞中ICAM-1表达变化;RT-PCR法检测TGF- $\beta$ <sub>1</sub>和TGF- $\beta$ <sub>1</sub>中和抗体对体外培养的人晶状体上皮细胞ICAM-1 mRNA表达的影响。

**结果:**在糖尿病性白内障组大鼠晶状体上皮细胞ICAM-1的表达明显增高,且随着病程发展呈进行性增强,与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。TGF- $\beta$ <sub>1</sub>培养组的人晶状体上皮细胞的ICAM-1的表达则显著增强,与正常血清培养组比较差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。在TGF- $\beta$ <sub>1</sub>抗体培养组中,ICAM-1的表达明显受到抑制,与TGF- $\beta$ <sub>1</sub>培养组比较,差别具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**结论:**TGF- $\beta$ <sub>1</sub>可以促进晶状体上皮细胞ICAM-1的表达;ICAM-1通过促进晶状体上皮细胞的黏附、增殖而在糖尿病性白内障的发生中发挥重要作用。

**关键词:**细胞间黏附分子-1;转化生长因子 $\beta$ -1;糖尿病性白内障;晶状体上皮细胞

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2011.10.004

王晓辉,潘永明,徐国兴. ICAM-1在大鼠晶状体上皮细胞中表达的实验研究. 国际眼科杂志 2011;11(10):1700-1703

## 0 引言

研究表明,TGF- $\beta$ <sub>1</sub>可促进晶状体上皮细胞发生增殖,形成斑片样多层结构甚至纤维化从而在糖尿病性白内障发生过程中起重要作用<sup>[1]</sup>,但其具体作用机制不明。黏附分子是一类介导细胞间或细胞与细胞外基质间黏附作用的膜表面糖蛋白,它们在胚胎的发育分化、正常组织结构

的维持等多种生理病理过程中具有重要作用。晶状体上皮细胞能表达多种细胞黏附分子,如 ICAM-1 和 CD44 等<sup>[2]</sup>。我们设想,TGF- $\beta_1$  促进晶状体上皮细胞表达 ICAM-1,通过 ICAM-1 介导细胞与细胞间、细胞与细胞外基质间的黏附,诱导晶状体上皮细胞发生斑片样多层生长,导致糖尿病性白内障的发生。因此我们制作链脲佐菌素(streptozotocin,STZ)大鼠糖尿病性白内障模型,检测晶状体上皮细胞中 ICAM-1 的表达规律,并应用 TGF- $\beta_1$  和 TGF- $\beta_1$  中和抗体对体外培养的人晶状体上皮细胞进行干预,研究 ICAM-1 在糖尿病性白内障发生中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

选取 SD 大鼠 120 只(福建医科大学实验动物中心,许可证号:2002-0006),体质量  $200 \pm 20$ g,雄性。人晶状体上皮细胞取自于外伤导致脱位的健康儿童(年龄在 5~12 岁)晶状体 12 只,体外培养的第 3 代人晶状体上皮细胞经标准的鉴定人晶状体上皮细胞的方法<sup>[3]</sup>进行鉴定(免疫组织化学 SP 法),发现其 100% 阳性表达人细胞角蛋白-18,证实体外培养的第 3 代细胞为人晶状体上皮细胞(图 1)。链脲佐菌素(Sigma 公司),小鼠抗大鼠 ICAM-1 抗体(武汉博士德公司),SP 免疫组织化学超敏试剂盒、DAB 显色试剂盒(福州迈新生物公司)。DMEM/F12 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司)。RNA 抽提试剂盒、Taq DNA 多聚酶(美国 Fermentas 公司)。PCR 引物(美国 Fermentas 公司)序列:ICAM-1:上游:5'-CAGAGGTTGAACCCACACT-3',下游:5'-CATTGGAGTCTGCTGGGAA T-3',扩增 cDNA 片断长度为 486bp; GAPDH:上游:5'-GAGTCAACGGATTGGTCGT-3',下游:5'-TTGATTTGGAGGGATCTCG-3',扩增 cDNA 片断长度为 238bp。人 TGF- $\beta_1$  抗体(美国 Pepro Tech 公司)。PCR Marker(纽英伦生物技术有限公司)。OLMPUS 数码相机(C3040-ABU)、OLMPUS 光学显微镜(BH-2)、one touch II 血糖测定仪、石蜡切片机(LKB-Nova 5 型)、OLYMPUS 荧光倒置式相差显微镜、9700 型 PCR 扩增仪、Bio-Rad 酶联免疫检测仪、紫外分析仪(UV-2000)、生物电泳图像分析系统、JY3000+ 型电泳仪。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 建立糖尿病动物模型

SD 大鼠 120 只随机分为两组,正常对照组和糖尿病性白内障组,每组 60 只。大鼠禁食 12h 后,糖尿病性白内障组一次性 ip 20g/L STZ 溶液(pH=4.5,0.1mol/L 柠檬酸缓冲液配制),70mg/kg,3d 后采尾静脉血测血糖浓度,血糖浓度在 16.7mmol/L 以下者则不视为糖尿病大鼠。正常组仅给予 ip 0.1mol/L 柠檬酸缓冲液(pH4.5)。

#### 1.2.2 血糖检测

从 ip STZ 开始,用裂隙灯检查晶状体变化(每周 1 次),并监测血糖(每两周 1 次)。分别于实验开始后 2,4 及 8wk 糖尿病性白内障组和正常组大鼠各取 20 只(40 眼),测血糖,称体质量。

#### 1.2.3 免疫组织化学染色 SP 法检测 ICAM-1 表达

摘取眼球,立即用 100mL/L 中性福尔马林液固定,制成 0.4 $\mu$ m 厚的石蜡切片。免疫组织化学实验步骤按 SP 超敏试剂盒免疫组织化学染色步骤进行。光镜下随机选择观察 50 个晶状体上皮细胞,用 ICAM-1 表达阳性细胞数占细胞总数的百分比来表示阳性表达率。

#### 1.2.4 RT-PCR 检测 TGF- $\beta_1$ 和 TGF- $\beta_1$ 抗体对体外培养的人晶状体上皮细胞 ICAM-1 基因表达的影响

取人晶状体

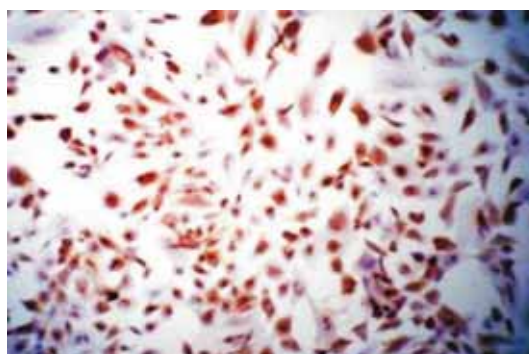


图 1 体外培养第 3 代人晶状体上皮细胞角蛋白-18 染色(SP  $\times$  400)。

表 1 对照组与糖尿病性白内障组的大鼠血糖变化

组别	$(\bar{x} \pm s, \text{mmol/L})$		
	2wk	4wk	8wk
对照组	6.65 $\pm$ 0.41	6.81 $\pm$ 0.63	6.79 $\pm$ 0.65
糖尿病性白内障组	26.37 $\pm$ 2.01	27.03 $\pm$ 1.90	26.87 $\pm$ 2.17

12 只,分为 3 组:(1)正常血清培养组(4 只):用含 150mL/L 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基培养,作用 48h;(2)TGF- $\beta_1$  组(4 只):用含 200IU/mL TGF- $\beta_1$ ,150mL/L 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基培养,作用 48h;(3)TGF- $\beta_1$  抗体组(4 只):用含 200IU/mL TGF- $\beta_1$  抗体,150mL/L 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基培养,作用 48h。应用 RT-PCR(两步法)对 3 组分别检测:(1)Trizol 法抽提总 RNA:用 Trizol 一步法提取组织总 RNA,-80 $^{\circ}$ C 冻存备用,仅用少量样品作紫外扫描分析和琼脂糖电泳分析。(2)半定量 RT-PCR:按逆转录 RT 实验步骤(cDNA 的制备)进行。先把总 RNA 4~5 $\mu$ L,Oligo(dT)<sub>18</sub> primer 1 $\mu$ L,DEPC 处理水 7 $\mu$ L 孵育、冷却、离心 70 $^{\circ}$ C  $\times$  5min;再用 5  $\times$  reaction buffer 4 $\mu$ L,RNA 酶抑制剂(20U/ $\mu$ L) 1 $\mu$ L,10mmol/L dNTP 混合物 2 $\mu$ L,M-MuIV 逆转录酶(200U/ $\mu$ L) 1 $\mu$ L 稍离心、37 $^{\circ}$ C  $\times$  5min 孵育;以上产物 42 $^{\circ}$ C  $\times$  60min 孵育,70 $^{\circ}$ C  $\times$  10min 中止反应;然后 cDNA 产物于-20 $^{\circ}$ C 保存。(3)PCR 产物电泳:PCR 产物以 15g/L 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统进行灰度扫描,记录 ICAM-1 及 GAPDH 的吸光度(A)值,计算 ICAM-1/GAPDH 的值。

统计学分析:所有统计学处理在 SPSS 12.0 软件上运行,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。免疫组织化学染色检测结果采用两因素的方差分析,RT-PCR 检测结果采用 one-way ANOVA 分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血糖

糖尿病性白内障组大鼠血糖在 STZ 注射后第 3d~8wk 末均保持较高的水平,各时间点比较无统计学差异( $F = 0.575, P < 0.05$ );而正常组大鼠的血糖值一直保持在正常值范围,各时间点比较无统计学差异( $F = 0.462, P < 0.05$ ,表 1)。

### 2.2 裂隙灯下大鼠晶状体变化

正常组大鼠晶状体始终保持透明,糖尿病性白内障组大鼠在第 2wk 末晶状体可见空泡出现,第 4wk 末可见晶状体周边部出现乳白色混浊,到第 8wk 末混浊程度增加、范围扩大(图 2)。

### 2.3 大鼠晶状体上皮细胞 ICAM-1 的表达

光镜下正常对照组晶状体上皮细胞呈规则的单层排列,而在糖性白内障组中,晶状体上皮细胞则形成复层结构,细胞形态类似

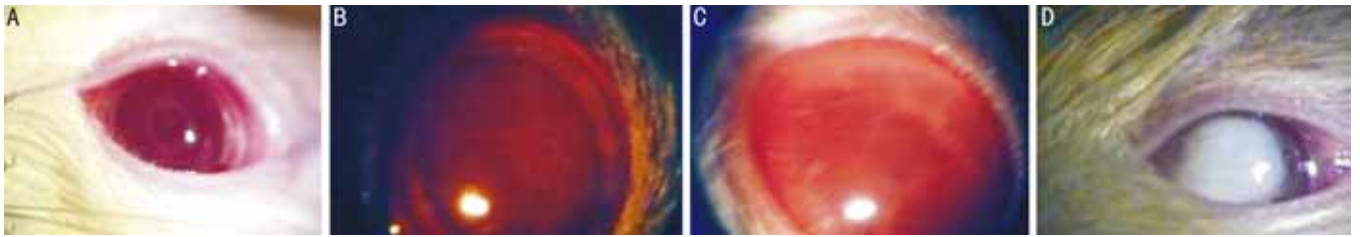


图2 裂隙灯下大鼠晶状体变化 A: 对照组; B: 2wk 末糖尿病性白内障组; C: 4wk 末糖尿病性白内障组; D: 8wk 末糖尿病性白内障组。

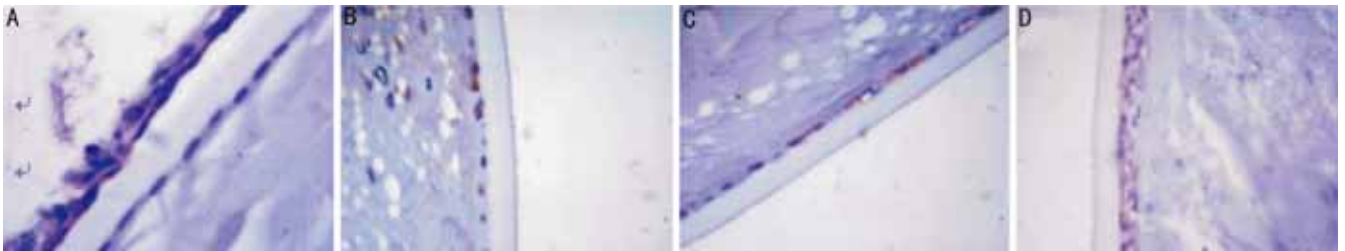


图3 大鼠晶状体上皮细胞 ICAM-1 的表达 (SP × 400) A: 对照组; B: 2wk 末糖尿病性白内障组; C: 4wk 末糖尿病性白内障组; D: 8wk 末糖尿病性白内障组。

梭形细胞或成纤维细胞。正常组晶状体上皮细胞中未见 ICAM-1 表达;糖尿病性白内障组中晶状体上皮细胞膜可见棕黄色颗粒,表明 ICAM-1 表达明显(图3)。两组间的差异均有统计学意义( $t_{2wk} = 27.214, t_{4wk} = 60.542, t_{8wk} = 70.259, P < 0.01$ );在3个时间组中,糖尿病性白内障组的 ICAM-1 表达逐渐增多( $F = 98.235, P < 0.01$ );SNK-*q* 法两两比较,各组间有统计学差异( $P < 0.05$ );而正常对照组无明显变化( $F = 0.254, P > 0.05$ ,表2,图4)。

#### 2.4 TGF- $\beta_1$ 和 TGF- $\beta_2$ 抗体对体外培养的人晶状体上皮细胞 ICAM-1 基因表达的影响

**2.4.1 RNA 抽提和纯化结果** 紫外分光光度计测抽提的总 RNA 的浓度和纯度,  $OD_{260nm}/OD_{280nm}$  在 1.7 ~ 2.1 之间,表明抽提的总 RNA 无污染,纯度高。琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 质量,可见 28S 和 18S 两个清晰条带,28S/18S 比值约为 2:1,表明抽提的 RNA 比较完整(图5)。

**2.4.2 体外培养的人晶状体上皮细胞 ICAM-1 基因的表达** 正常血清培养组中,人晶状体上皮细胞 ICAM-1 有微弱的表达( $0.931 \pm 0.002$ ),而在 TGF- $\beta_1$  组中,ICAM-1 的表达明显增强( $1.009 \pm 0.013$ ),与正常血清培养组比较,其差异具有统计学意义( $t = 9.553, P < 0.01$ )。TGF- $\beta_1$  抗体组中,ICAM-1 的表达明显受到抑制( $0.925 \pm 0.011$ ),与 TGF- $\beta_1$  组比较,差异具有统计学意义( $t = 10.288, P < 0.01$ ,图6)。

### 3 讨论

晶状体前、后囊膜下混浊是糖尿病性白内障典型的病理特征<sup>[4]</sup>。研究发现,晶状体发生前、后囊膜下型白内障时,晶状体上皮细胞形成斑片样多层生长,甚至呈成纤维细胞样改变<sup>[5]</sup>。本实验中,光镜下正常对照组晶状体上皮细胞呈规则的单层排列,而在糖性白内障组中,晶状体上皮细胞则增殖形成复层结构,细胞形态类似梭形细胞或成纤维细胞,与前、后囊膜下型白内障的病理特征相吻合。糖尿病性白内障的发病机制较为复杂。而近年来研究表明,发生糖尿病性白内障的晶状体上皮细胞 TGF- $\beta_1$  的表达明显增加,TGF- $\beta_1$  诱导晶状体上皮细胞增殖形成多层样生长、促进晶状体前后囊膜纤维化从而在糖尿病性白内

表2 对照组与糖尿病性白内障组的大鼠晶状体上皮细胞中 ICAM-1 的表达 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	2wk	4wk	8wk
对照组	4.31 ± 0.56	4.25 ± 0.68	4.36 ± 0.86
糖尿病性白内障组	58.86 ± 8.43	70.87 ± 4.71	87.80 ± 4.99

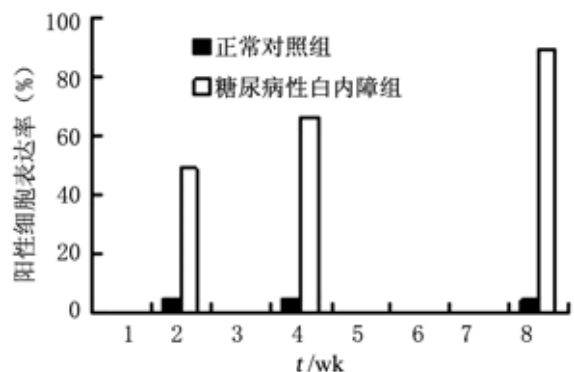


图4 ICAM-1 在 STZ-糖尿病大鼠晶状体上皮细胞中的表达。

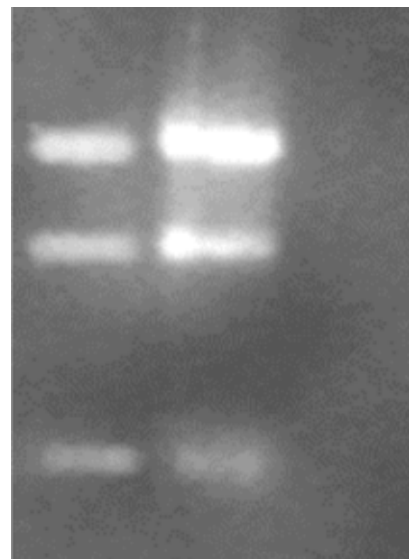


图5 总 RNA 的凝胶电泳图。

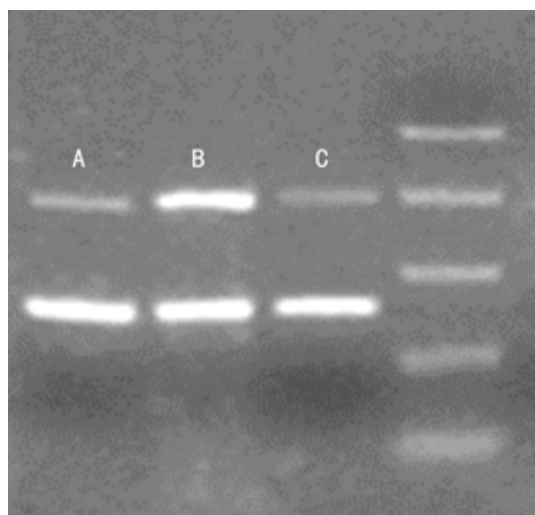


图6 ICAM-1 mRNA 的表达 A: 正常血清培养组; B: TGF- $\beta_1$  组; C: TGF- $\beta_1$  抗体组。

障发生过程中起重要作用<sup>[1]</sup>。研究发现, TGF- $\beta_1$  可以促进大鼠晶体上皮细胞发生增殖和排列异常<sup>[6]</sup>, 但 TGF- $\beta_1$  的这种作用的具体机制仍不十分明确。

ICAM-1 是目前研究最为广泛和深入的细胞黏附分子之一。近年来, 它在眼科疾病中的作用受到广泛关注。ICAM-1 属免疫球蛋白基因超家族 (IgSF) 成员, 克隆号 CD54<sup>[7]</sup>, 由 19 号染色体基因编码, 具有 5 个细胞外串联的单链免疫球蛋白样结构域和 1 个胞质尾样结构域, 分子量 80 ~ 110kD<sup>[8,9]</sup>, 是体内重要的免疫活性分子, 通过介导细胞与细胞间, 细胞与细胞外基质间的黏附作用, 在组织分化、免疫识别、炎症反应、损伤修复、肿瘤浸润等一系列生理及病理过程中发挥重要作用。Nishi 等<sup>[2]</sup> 研究表明, 白内障摘除术中即取的和培养的人晶体上皮细胞都表达 ICAM-1 等细胞黏附分子, 使晶体上皮细胞得以黏附在其下方的囊膜上, 加入 ICAM-1 的单克隆抗体则可以明显抑制晶体上皮细胞在细胞外基质上的增殖和移位。本实验研究结果表明, 正常组大鼠晶体上皮细胞中不表达 ICAM-1, 而糖尿病性白内障组大鼠晶体上皮细胞中, ICAM-1 的表达明显增加, 且随着白内障病程的发展, ICAM-1 的表达呈进行性增加, 可以看出 ICAM-1 在糖尿病性白内障发生中具有重要的作用。结合 Nishi 等的研究可以看出, ICAM-1 具有促进晶体上皮细胞在细胞外基质上生长、移行和增强晶体上皮细胞与细胞外基质相黏附的作用, 因此我们推测 ICAM-1 是通过影响晶体上皮细胞的增殖、移行及黏附状态而促进糖尿病性白内障的形成。

Schierano 等<sup>[10]</sup> 发现, TGF- $\beta_1$  可上调培养的齿龈成纤

维细胞的 ICAM-1 表达。郝思国等<sup>[11]</sup> 则发现 TGF- $\beta_1$  能够上调造血祖细胞的 ICAM-1 的表达, 这表明 TGF- $\beta_1$  可以促进 ICAM-1 的表达。在实验中, 我们通过应用 TGF- $\beta_1$  及 TGF- $\beta_1$  抗体对体外培养的人晶状体上皮细胞进行体外干预, 检测晶状体上皮细胞中 ICAM-1 的表达情况, 结果表明, 正常血清培养组中, 人晶状体上皮细胞 ICAM-1 有微弱的表达, 而在 TGF- $\beta_1$  作用下, ICAM-1 的表达明显增强, 而应用 TGF- $\beta_1$  中和抗体可以明显抑制 TGF- $\beta_1$  引起的 ICAM-1 表达, 从而证实了 TGF- $\beta_1$  对晶状体上皮细胞 ICAM-1 的表达具有诱导、增强作用。我们认为, 在糖尿病性白内障的发生、发展过程中, TGF- $\beta_1$  诱导 ICAM-1 的表达增强, 通过 ICAM-1 介导细胞与细胞间、细胞与细胞外基质间的黏附, 诱导细胞发生斑块状聚集和梭形变化, 形成前、后囊膜下型白内障特征性的病理改变, 导致糖尿病性白内障的形成。通过实验, 我们进一步阐明 ICAM-1 在晶状体上皮细胞中表达的调节规律, 为进一步应用特异性、TGF- $\beta_1$  下游的中和抗体, 如 ICAM-1 等细胞黏附因子中和抗体, 进行干预研究提供理论基础, 有助于进一步阐明糖尿病性白内障的发病机制。

#### 参考文献

- 1 徐国兴, 胡建章, 郑为东, 等. 基质金属蛋白酶 2 和金属蛋白酶 2 组织抑制因子及转化生长因子  $\beta_1$  在糖尿病性白内障患者晶状体上皮细胞的表达及意义. 中华眼科杂志 2003; 39(7): 411-414
- 2 Nishi O, Nishi K, Akaishi T, et al. Detection of cell adhesion molecules in lens epithelial cells of human cataracts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38(3): 579-585
- 3 Lang RA. Which factors stimulate lens fiber cell differentiation *in vivo*? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40(13): 3075-3078
- 4 李凤鸣. 眼科全书. 北京: 人民卫生出版社. 1996: 1563-1565
- 5 Font RL, Brownstein S. A light and electron microscopic study of anterior subcapsular cataracts. *Am J Ophthalmol* 1974; 78(6): 972-984
- 6 Liu J, Hales AM, Chamberlain CG, et al. Induction of cataract-like changes in rat lens epithelial explants by transforming growth factor beta. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35(2): 388-401
- 7 Rothlein R, Dustin ML, Marlin L, et al. A human intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J Immunol* 1986; 137(4): 1270
- 8 Vainer B. Role of cell adhesion molecules in inflammatory bowel diseases. *Scand J Gastroenterol* 1997; 32(5): 401-410
- 9 Santos-Perez JL, Diez-Ruiz A, Luna-Casado L, et al. T-cell activation expression of adhesion molecules and response to ethanol in alcoholic cirrhosis. *Immunol Lett* 1996; 50(3): 179-184
- 10 Schierano G, Bellone G, Manzella C, et al. *In vitro* effect of transforming growth factor-beta on adhesion molecule expression by human gingival fibroblasts cultured in the presence of a titanium abutment. *J Periodontol* 2001; 72(12): 1658-1665
- 11 郝思国, 孙关林, 邹维礼, 等. TGF- $\beta_1$  对脐血体外扩增中造血祖细胞生物学特性影响. 中国实验血液学杂志 2004; 12(1): 20-28