

HIF-1 α 和 Pax6 在翼状胬肉中的表达及其意义

阴秀霞^{1,2}, 康前雁¹

作者单位:¹(710061)中国陕西省西安市,西安交通大学第一附属医院眼科;²(710004)中国陕西省西安市第四医院眼科
作者简介:阴秀霞,在读硕士研究生,研究方向:眼表疾病及泪道疾病。

通讯作者:康前雁,医学博士,博士研究生导师,教授,主任医师,研究方向:眼表疾病、青光眼及眼底病. kangqy@mail.xjtu.edu.cn

收稿日期:2014-05-16 修回日期:2014-10-27

Expression and significance of HIF-1 α and Pax6 in pterygium

Xiu-Xia Yin^{1,2}, Qian-Yan Kang¹

¹ Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China;

² Department of Ophthalmology, Xi'an No. 4 Hospital, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Qian-Yan Kang. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. kangqy@mail.xjtu.edu.cn

Received:2014-05-16 Accepted:2014-10-27

Abstract

• **AIM:** To study the expression of hypoxia-inducible factor (HIF) and Pax6 in pterygium and investigate the relationship between expression of HIF and Pax6 in pterygium.

• **METHODS:** Thirty-five patients with pterygium who underwent simple excision and 10 cases of normal conjunctival tissues were enrolled in this study. Immunofluorescence was performed in pterygia tissue and normal conjunctiva, detecting the expression of HIF-1 α and Pax6.

• **RESULTS:** The positive expression rate of HIF-1 α was 66% (23/35) and 10% (1/10) in pterygia tissue and normal conjunctiva, respectively. The difference of expression between pterygia tissue and normal conjunctiva was statistically significant ($P < 0.05$). Expression of Pax6 was full-thickness nuclear in normal conjunctiva; however, expression of Pax6 decreased and even was negative in pterygium. The difference of expression in two groups was statistically significant ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** HIF-1 α is highly expressed in pterygium, suggesting that it may be involved in the occurrence and development of pterygium. Pax6 gene downregulated in pterygium epithelial cells, suggesting that epithelial cells are squamous metaplasia.

• **KEYWORDS:** hypoxia-inducible factor; Pax6; pterygium

Citation: Yin XX, Kang QY. Expression and significance of HIF-1 α and Pax6 in pterygium. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(11):1956-1958

摘要

目的:检测缺氧诱导因子(HIF-1 α)和干细胞标志物(Pax6)在患者翼状胬肉组织中的表达,比较其与正常结膜组织中的变化,以探讨HIF-1 α 和Pax6的表达与翼状胬肉之间的关系。

方法:选取35例翼状胬肉患者切除的翼状胬肉组织为实验组,同时选取10例正常人结膜组织为对照组,使用常规免疫组织荧光染色法对HIF-1 α 和Pax6的表达进行检测并与染色进行对照。

结果:实验组35例组织中HIF-1 α 的阳性表达率为66%(23/35),正常对照组10例组织中HIF-1 α 的阳性表达率仅为10%(1/10),HIF-1 α 表达在正常球结膜与翼状胬肉两组间的表达有统计学差异($P < 0.05$)。正常人球结膜Pax6在组织各层细胞核内表达,而Pax6在翼状胬肉组织中表达下降甚至未见表达,两组比较有统计学差异($P < 0.05$)。

结论:HIF-1 α 在翼状胬肉中高表达,提示它可能参与了翼状胬肉的病理过程;Pax6基因在翼状胬肉上皮细胞中表达下调,提示翼状胬肉上皮细胞病理过程属于鳞状上皮化生类型。

关键词:缺氧诱导因子;Pax6;翼状胬肉

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.11.11

引用:阴秀霞,康前雁. HIF-1 α 和Pax6在翼状胬肉中的表达及其意义. 国际眼科杂志 2014;14(11):1956-1958

0 引言

翼状胬肉是眼科最常见的眼表疾病之一,临床表现为结膜下增生的血管和纤维结缔组织侵及角膜。组织病理学研究结果显示,翼状胬肉改变是结膜下组织内胶原纤维和弹力纤维的变性^[1]。因为翼状胬肉有很高的复发率,并且在生长过程中伴随发育的异常以及富有侵袭性^[2],所以近来有人认为翼状胬肉的形成是多因素参与的复杂病理过程。为了解翼状胬肉组织上皮细胞以及间质内纤维血管的病理学发生机制,我们采用免疫组织化学方法对35例原发翼状胬肉组织中的HIF-1 α 和Pax6的表达情况进行观察,并与正常结膜组织进行比较,以揭示HIF-1 α 和Pax6在翼状胬肉发生中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 标本取自西安交通大学医学院附属广仁医院、西安市第四医院眼科 2010-10-20/2012-1-20 的门诊

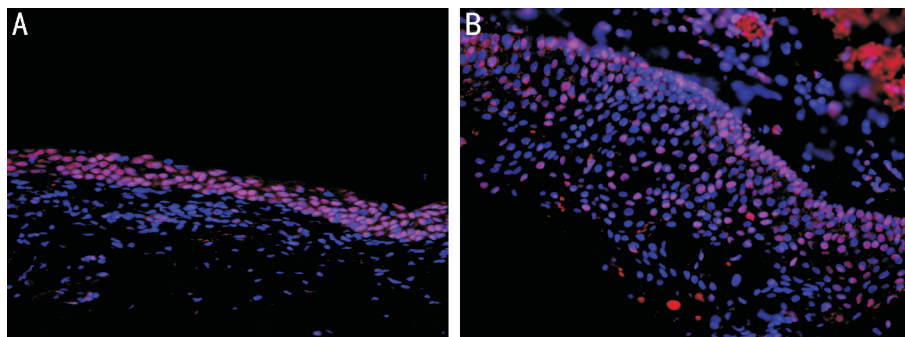


图1 各组组织 HIF-1 α 染色 ($\times 400$, 红色为 HIF-1 α 的阳性表达, 蓝色为 DAPI 标记的细胞核) A: 正常人球结膜; B: 翼状胬肉组织。

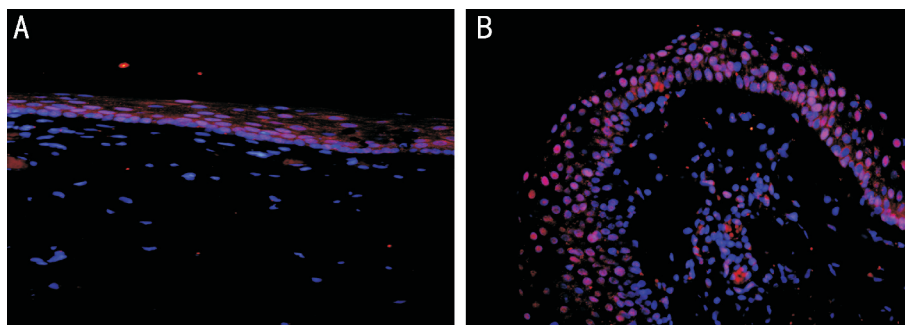


图2 Pax6 在正常人球结膜和翼状胬肉组织中上皮细胞核内表达 ($\times 400$, 红色为 Pax6 阳性表达, 蓝色为 DAPI 标记的细胞核) A: 正常人球结膜; B: 翼状胬肉组织。

患者, 实施手术切除后的组织标本, 其中正常结膜组织 10 例 10 眼, 取自治疗性白内障手术的角巩膜缘球结膜; 翼状胬肉组织 35 例 35 眼, 男:女=9:26。

1.2 方法 所有组织标本经 100mL/L 福尔马林溶液固定后, 石蜡包埋、切片。采用免疫组织化学法对石蜡切片行免疫荧光法染色, 抗体分别为 HIF-1 α (兔抗人多克隆抗体, Santa Cruz, 1:100) 和 Pax6 (兔抗大鼠多克隆抗体, Santa Cruz, 1:200)。切片常规脱蜡, 柠檬酸高压修复, PBS 洗涤 3 \times 5min; 30mL/L 过氧化氢封闭内源性过氧化物 10min, PBS 洗涤 3 \times 5min; 山羊血清封闭 30min, 滴加稀释的一抗工作液, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜; PBS 洗涤 3 \times 5min, 滴加荧光素标记的二抗 (中杉金桥, 1:200), 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h, PBS 洗涤 3 \times 5min, 加封片剂后盖玻片, 置荧光显微镜观察结果, 照相。图像分析采用 Nikon TE2000 倒置荧光显微镜和尼康 NIS 专业图像分析软件采集系统对两组正常人球结膜和翼状胬肉切片进行拍摄, 免疫荧光组织化学染色的每张切片在荧光显微镜下 $\times 300$ 倍随机选取 5 个视野, 运用图像分析软件 (Image ProPlus V6.0) 对其进行分析, 测量阳性结果荧光强度的 COD 值, 取平均值。

统计学分析: 使用 SPSS 13.0 软件处理数据, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 χ^2 检验与单因素方差分析进行组间比较, $P < 0.05$ 表示具有统计学差异。

2 结果

2.1 HIF-1 α 在正常人球结膜和翼状胬肉组织中的表达

正常人球结膜组中几乎见不到 HIF-1 α 的阳性染色, 而在翼状胬肉中可见 HIF-1 α 的阳性染色 (图 1)。35 例翼状胬肉中 HIF-1 α 的阳性表达率为 66%, 10 例正常人结膜组织中 HIF-1 α 的阳性表达率为 10% (表 1)。 χ^2 检验结果显示, 两组中 HIF-1 α 表达阳性率具有统计学差异 ($\chi^2 = 9.700, P = 0.02 < 0.05$)。

表 1 两组 HIF-1 α 表达阳性率的比较

分组	HIF 阳性	HIF 阴性	合计	阳性率 (%)
正常结膜组	1	9	10	10
翼状胬肉组	23	12	35	66
合计	24	21	45	53

2.2 Pax6 在正常人球结膜和翼状胬肉组织中上皮细胞核内表达

正常结膜 Pax6 在全层细胞核内表达; 而翼状胬肉组织 Pax6 表达下降甚至未见表达; 正常结膜组 Pax6 的 COD 值为 0.0601 ± 0.0037 , 翼状胬肉组为 0.0343 ± 0.0093 , 单因素方差分析显示两组间具有统计学差异 ($P < 0.05$, 图 2)。

3 讨论

翼状胬肉是眼科临床较为常见的眼表疾病之一, 裂隙灯下表现为类三角形增厚的球结膜组织病变, 其头部以侵袭性生长方式跨越角巩缘进入角膜, 体部位于睑裂区的一侧或两侧, 大多数生长于鼻侧。增生的组织肥厚, 血管扩张逐渐向角膜中央生长, 使角膜曲率变平可引起角膜散光而导致视力下降^[3]。若进入瞳孔区将会严重影响视力, 尤其是复发型翼状胬肉则给患者造成美容缺陷和视力损害^[4,5]。翼状胬肉的病理过程十分复杂, 迄今为止, 对其确切的发病机制还未能完全研究阐明, 各种研究及学说之间仍然存在着不同观点^[6-8], 多数学者认为, 一些细胞因子及其受体异常表达可能参与了翼状胬肉的发生与发展。近年来一些学者认为翼状胬肉的形成是多因素参与的复杂病理过程^[9]。

HIF 是哺乳动物和人体细胞内缺氧状态下产生的一种转录因子, 其靶基因与细胞凋亡、能量代谢和血管增生等关系密切, 在机体细胞的低氧适应性反应中起着重要作用。乏氧细胞可生存于低氧微环境但不增殖, 处于休眠状

态,这与 HIF 对细胞周期的调节有关,HIF 能延缓细胞进入 S 期,而停滞于 G 期。在翼状胬肉的起始阶段,因某种机制引起球结膜组织缺氧或伴随着翼状胬肉的不生长发展、体积增大,血液供应相对不足而发生了缺血缺氧组织坏死,从而诱导 HIF 过度表达^[10]。本研究结果显示,35 例翼状胬肉中 HIF-1 α 的阳性表达率为 66% (23/35),而 10 例正常人球结膜组织中 HIF-1 α 的阳性表达率仅为 10% (1/10),HIF-1 α 在翼状胬肉组织中的表达明显高于正常球结膜组织,差异具有统计学意义($P<0.05$),验证了国外研究部分结果。据此推论,HIF 在翼状胬肉组织中的高表达可能是翼状胬肉发生、发展过程中诸多因素之一。

近来的研究提示,眼表功能的改变在翼状胬肉的发生机制中可能具有一定作用,Pax6 是胚眼发育的主导基因,对维持眼表面角膜上皮正常表型发挥重要调控作用,Pax6 基因突变可引起眼球发育严重异常,然而 Pax6 在眼表面上皮细胞中的异常表达研究甚少^[11],董诺等^[12]研究首次发现翼状胬肉形成后伴随 Pax6 基因表达下降,合并眼表上皮鳞状化生。本研究发现,正常人球结膜 Pax6 在全层细胞核内表达,而翼状胬肉组织 Pax6 表达下降甚至未见表达,且比较具有统计学差异($P<0.05$)。提示翼状胬肉中 Pax6 表达下降与其鳞状上皮化生有关。翼状胬肉发展到一定程度治疗以手术为主,近年来国内外采用翼状胬肉切除联合角膜缘干细胞移植术,取得了显著疗效^[13-15],但仍有一定复发率。目前应有分子生物学技术对翼状胬肉的发表机制进行深入研究^[16],可能对临床实践中应用基因疗法治疗翼状胬肉提供一些科学依据。

参考文献

1 Lee DY, Cho HJ, Kim JT, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and inducible nitric oxide synthase in pterygia. *Cornea* 2001;20(7):738
2 Taylor HR. Risk factors for pterygium. *Ophthalmology* 2013;120(2):441

3 Mahar PS, Manzar N. Pterygium recurrence related to its size and corneal involvement. *J Coll Physicians Surg Pak* 2013;23(2):120-123
4 Girolamo ND, Minas T, Wakefield CD. Active matrix metalloproteinase (MMP-7) in human pterygia: potential role in angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(8):1963-1968
5 Kheirkhah A, Hashemi H, Adelpour M, et al. Randomized trial of pterygium surgery with mitomycin C application using conjunctival autograft versus conjunctival-limbal autograft. *Ophthalmology* 2012;119(2):227-232
6 张莉薇,席兴华.翼状胬肉发病机制的分子生物学研究进展.国际眼科杂志 2006;6(6):1404-1406
7 Bautista-de Lucio VM, López-Espinosa NL, Robles-Contreras A, et al. Overexpression of peroxiredoxin 2 in pterygium. A proteomic approach. *Exp Eye Res* 2013;110:70-75
8 Sebastia R, Ventura MP, Solari HP, et al. Immunohistochemical detection of Hsp90 and Ki-67 in pterygium. *Diagn Pathol* 2013;8:32
9 李海燕,刘克兰,袁志刚,等.翼状胬肉中 Ki-67 和 VEGF 的表达.中国实用眼科杂志 2006;24(9):946-948
10 李明渊,唐仁泓. HIF-1 与 VEGF 在翼状胬肉中的表达及意义.眼科研究 2009;27(3):214-217
11 Xu K, Tao T, Jie J, et al. Increased importin 13 activity is associated with the pathogenesis of pterygium. *Mol Vis* 2013;19(3):604-613
12 董诺,李程,李炜,等. Pax6 在翼状胬肉上皮鳞状化生中的异常表达.眼科学报 2010;25(1):44-47
13 Al Fayed MF. Limbal-conjunctival vs conjunctival autograft transplant for recurrent pterygia: a prospective randomized controlled trial. *JAMA Ophthalmol* 2013;131(1):11-16
14 Yu CM, Liang WL, Huang YY, et al. Comparison of clinical efficacy of three surgical methods in the treatment of pterygium. *Yan Ke Xue Bao* 2011;26(4):193-196
15 Sadiq MN, Arif AS, Jaffar S, et al. Use of supero-temporal free conjunctivo-limbal autograft in the surgical management of pterygium: our technique and results. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 2009;21(4):121-124
16 王丽波,李海,巫宇舟,等. VEGF、CD34、Ki-67 和 p21 在翼状胬肉中的表达及意义.国际眼科杂志 2014;14(7):1197-1201