

表达均增加,且SP-A的基因多态性与泌尿系感染的易感性有关<sup>[5,6]</sup>。进一步的研究发现,SP-A/D双基因敲除小鼠对泌尿系感染的易感性增加,其在发生泌尿系感染时IL-8分泌较野生型小鼠减少<sup>[3]</sup>。但其具体作用机制及SP-A亚型在其中的作用目前尚不明确。SP-A有两个亚型,SP-A1及SP-A2,关于SP-A亚型在肾脏炎症中所起的作用,目前研究的较少,值得进一步研究。

既往的研究表明,SP-A1及SP-A2在功能上有所不同,其主要区别在于调节炎性因子分泌及增强巨噬细胞吞噬中作用的差异,既往研究发现SP-A2在调节单核细胞IL-8及TNF-α分泌中的作用较SP-A1强<sup>[7]</sup>。但目前尚无分别特异性针对SP-A1及SP-A2的抗体,其针对SP-A1及SP-A2的mRNA表达水平变化就显得尤为重要<sup>[7]</sup>。LPS可激活肾小管上皮细胞NF-κB,进而诱导IL-8等多种炎性细胞因子产生。IL-8是参与机体炎症与免疫的重要细胞因子,与肾脏感染的关系密切,其在泌尿系感染起募集中性粒细胞浸润的作用。本研究发现,LPS可诱导SP-A1、SP-A2及IL-8表达上调,这与既往笔者的研究结果相符<sup>[2]</sup>。本研究中进一步发现,采用特异性siRNA下调SP-A2表达可抑制LPS诱导的肾小管上皮细胞IL-8的上调,而改变SP-A1表达则未见对LPS诱导的IL-8表达有所影响,说明在SP-A亚型中的SP-A2可能在LPS诱导肾小管上皮细胞的炎性因子表达中发挥重要作用,这可能是SP-A/D双基因敲除小鼠在泌尿系感染时IL-8分泌不足的机制之一,因LPS是革兰阴性菌细胞壁的主要成分之一,而SP-A/D双基因敲除小鼠缺乏了

SP-A2在LPS诱导IL-8中的促进调节作用,因此其在感染时IL-8分泌不足,从而对泌尿系感染的易感性增加。

综上所述,LPS可诱导HK-2细胞SP-A1及SP-A2表达增加,下调SP-A2可部分抑制LPS诱导的肾小管上皮细胞IL-8的表达,SP-A2在肾脏炎性反应中发挥重要作用。

### 参考文献

- Seaton BA, Crouch EC, McCormack FX, et al. Structural determinants of pattern recognition by lung collectins[J]. Innate Immun, 2010, 16(3):143-150.
- Jiao L, Fengqi H, Guirong W, et al. Lipopolysaccharide-induced expression of surfactant proteins A1 and A2 in human renal tubular epithelial cells[J]. J Inflamm (Lond), 2013, 10(1):2.
- 胡凤琪,袁海,王桂荣,等.表面活性蛋白A及D在小鼠尿路感染中的作用及机制[J].中华肾脏病杂志,2013,29(6):439-443.
- Gardai SJ, Xiao YQ, Dickinson M, et al. By binding SIRPα or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation[J]. Cell, 2003, 115(1):13-23.
- 胡凤琪,丁国华,梁伟,等.全反式维甲酸对肾孟肾炎大鼠表面活性蛋白-A表达的影响[J].武汉大学学报:医学版,2010,31(1):51-53.
- Jiao L, Fengqi H, Wei L, et al. Polymorphisms in the surfactant protein a gene are associated with the susceptibility to recurrent urinary tract infection in Chinese women[J]. Tohoku J Exp Med, 2010, 221(1):35-42.
- Floros J, Wang G, Mikerov AN. Genetic complexity of the human innate host defense molecules, surfactant protein A1 (SP-A1) and SP-A2--impact on function[J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2009, 19(2):125-137.

(收稿日期:2014-06-13)

(修回日期:2014-06-27)

## 叔丁基过氧化氢诱导小梁网细胞氧化应激模型的建立

杨玉霞 刘杏 黄晶晶 钟毅敏 肖辉

**摘要目的** 体外建立叔丁基过氧化氢小梁网细胞氧化应激模型。**方法** 应用tBHP刺激体外培养的小梁网细胞(iHTM)后,观察小梁网细胞形态学的改变,分别用MTT法检测氧化损伤后小梁细胞的活性,流式细胞术检测活性氧水平,Suc-LLVY-荧光底物检测糜蛋白酶样蛋白酶体的活性,流式细胞术和激光共聚焦显微镜检测小梁细胞的凋亡。**结果** 正常培养的小梁细胞呈梭形,折光性好,贴壁较牢;应用tBHP刺激后,部分细胞变圆、脱落、皱缩,小梁细胞的细胞活性明显下降,活性氧水平

基金项目:广东省医学科研基金资助项目(B2013139);广州市科技计划项目(2013Z4500019);佛山市医学类科技攻关项目(201308098)

作者单位:518000 深圳市罗湖区人民医院(杨玉霞);510060 广州,中山大学中山眼科中心、眼科学国家重点实验室(刘杏、黄晶晶、钟毅敏、肖辉)

通讯作者:刘杏,电子信箱:Liuxing@mail.sysu.edu.cn

升高, 糜蛋白酶样蛋白酶体活性降低, 细胞凋亡水平明显增加。随着刺激时间的延长, 上述改变更为明显。结论 tBHP 刺激后, 小梁网细胞出现典型的氧化应激改变, tBHP 刺激小梁网模型的建立可应用于青光眼氧化应激的研究。

**关键词** 叔丁基过氧化氢 小梁网细胞 氧化应激 模型

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.01.016

**In vitro Study on tBHP Oxidative Stress Model of Human Trabecular Meshwork Cells.** Yang Yuxia, Liu Xing, Huang Jingjing, et al.

The People's Hospital of Luohu District, Guangdong 518000, China

**Abstract Objective** To establish the oxidative stress model of immortalized human trabecular meshwork cells (iHTM) induced by tert - butyl hydroperoxide (tBHP). **Methods** iHTM were cultured and treated with tBHP (200 $\mu$ mol/L) for 1 and 2h. The 3 - (4,5 - dimethyl - thiozol - 2 - yl) - 2,5 - diphenyl - tetrazolium bromide (MTT) assay was used to analyze the cell viability. The 2',7' - Dichlorofluo - rescin - diacetate (DCFH - DA) was used to determine the reactive oxygen species (ROS) levels, and the succinyl - leucine - leucine - valine - tyrosine - aminoluciferin (Suc - LLVY) substrate was used to measure the chymotrypsin - like protease activities. Cell apoptosis was analyzed by Hoechst33258 staining and Annexin V - fluorescein isothiocyanate (FITC) / propidium iodide (PI) labeling. **Results** After tBHP treatment, the iHTM cell viability decreased obviously, while the ROS levels, chymotrypsin proteasome activity, and the cell apoptosis increased significantly. Longer duration of tBHP, the changes were more apparent. **Conclusion** The iHTM displayed typical oxidative changes after stress by tBHP. The iHTM oxidative stress model induced by tBHP was suitable for study glaucoma.

**Key words** Tert - butyl hydroperoxide; Trabecular meshwork cells; Oxidative stress; Cell model

氧化应激的概念源自人类对衰老的研究。1956年, Harman<sup>[1]</sup>将衰老和氧化联系起来, 提出了衰老的自由基学说。他认为自由基(free radical)包括O<sup>2-</sup>及其衍生物通过攻击生物高分子对组织细胞造成的损伤是导致衰老的原因, 也是导致多种疾病的重要因素。1990年, Sohal等<sup>[2]</sup>提出的氧化应激概念, 补充和发展了自由基学说, 认为机体细胞存在着氧化系统和抗氧化系统的平衡, 年轻的细胞维持着氧化和抗氧化的平衡, 但是如果氧化应激过多, 细胞则需要更多的能量来清除自由基, 而细胞可利用的能量是有限的, 当自由基超出了细胞抗氧化的能力时, 氧化应激导致的损伤便发生了。Bunin<sup>[3]</sup>研究发现青光眼患者眼内抗氧化屏障功能减退, 包括房水中抗坏血酸浓度降低, POAG 小梁组织内 GST 含量降低, 其幅度与病程相关。青光眼患者房水内总抗氧化还原电位(TRAP)较白内障患者减少64%, 且与SOD和GST过氧化物酶活性增加相关<sup>[3,4]</sup>。Izzotti等<sup>[5]</sup>认为, 氧化损伤正是原发性开角型青光眼发病机制中“青光眼链”的开始。为了进一步研究小梁细胞氧化应激损伤的机制, 笔者建立小梁细胞(imortalized human trabecular meshwork cells, iHTM)的叔丁基过氧化氢(tert - butyl hydroperoxide, tBHP)氧化刺激模型, 并观察氧化应激后小梁细胞活性、细胞活性氧、蛋白酶体复合物活性以及细胞凋亡的变化情况。

## 材料与方法

1. 试剂: 正常人小梁细胞系 iHTM 为加拿大魁北克 Labo-

ratory of Ocular Genetics and Genomics 的 Vincent Raymond 教授所赠。DMEM/F12 培养基, 胎牛血清(fetal calf serum, FCS)均购自 Gibco 公司。噻唑蓝(3, 24, 5 dimethyliazol 22, 5 diphenyl tetrazolium bromide, MTT)、Hoechst33258、tBHP 购自美国 Sigma - Aldrich 公司, 多聚甲醛购自北京化工厂, 活性氧检测试剂盒购自中国碧云天生物技术研究所, 蛋白酶体复合物检测试剂盒购自美国 Promega 公司, Annexin - V/PI 凋亡检测试剂盒购自美国 BioVision 公司。酶联免疫检测仪为美国 BioTek 公司, 激光共聚焦荧光显微镜为德国 Zeiss 公司 (LSM 510 Meta 型)。美国 BD 公司 FACSaria 型流式细胞仪和 BD FACSiva software 数据分析软件。

2. 实验分组: 阴性对照组(control)为正常培养的细胞, 不用 tBHP 进行处理。tBHP 处理 1h 组(tBHP1h): 为含 200 $\mu$ mol/L tBHP 的 DMEM 工作液培养 1h。tBHP 处理 2h 组(tBHP2h): 为含 200 $\mu$ mol/L tBHP 的 DMEM 工作液培养 2h。

3. MTT 法检测 tBHP 刺激后小梁细胞的活性: 将细胞按上述方法分别处理后, 调节细胞浓度为  $1 \times 10^5$ /ml, 取 80 $\mu$ l 加入 96 孔板中, 加入培养液至 180 $\mu$ l, 再加入 MTT 液 20 $\mu$ l, , 每一处理条件设 6 个重复孔, 同时设置调零孔(只加培养基、MTT、二甲基亚砜)。继续培养 4h 后弃去上清液, 每孔加入二甲基亚砜(DMSO)200 $\mu$ l, 充分混匀, 在酶联免疫检测仪上测定每孔的吸光度(A 值), 波长为 490nm, 以反映活细胞的数目。

4. 流式细胞术检测 tBHP 刺激后小梁细胞活性氧水平: 将 iHTM 细胞接种于 6 孔板中, 待细胞长至 80% 融合, 去除细胞培养液, 每孔加入 1ml 终浓度为 10 $\mu$ mol/L 的 DCFH - DA。将细胞置于 37℃ 细胞培养箱内孵育 20min。用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次, 充分去除未进入细胞内的 DCFH - DA。按前面所述, 加入 tBHP 工作液, 待培养 1h 和 2h 后, 收集细胞进

行流式细胞仪检测。

5. Suc - LLVY - GloTM substrate 检测 tBHP 刺激后小梁细胞糜蛋白酶样蛋白酶体复合物的活性: 将 iHTM 细胞以  $5 \times 10^4/\text{ml}$  的密度接种在 96 孔的白板中, 每孔  $200\mu\text{l}$ 。待细胞生长至 80% 融合, 使用 tBHP 对细胞进行刺激, 如前所述。使用美国 Promega 公司的 Chymotrypsin - like Cell - Based Assays 检测糜蛋白酶样蛋白酶体复合物的活性。操作步骤依试剂盒说明进行, 使用酶标仪检测荧光强度(RLU), RLU 的高低反映了糜蛋白酶样蛋白酶体活性的强弱。

6. Hoechst33258 检测 tBHP 刺激后小梁细胞的凋亡: 将细胞按上述方法分别处理后, 收集细胞, PBS 洗涤, 吸散, 用微量加样枪滴片, 风干, 甲醇固定。水洗 3min, 用 Hoechst 33258 染色 5min, 晾干, 甘油封片。共聚焦显微镜下观察。

7. 流式细胞术检测 tBHP 刺激后小梁细胞的凋亡: 将细胞

按上述方法分别处理后, 收集细胞(细胞数量  $\geq 1 \times 10^9$  个/升)。取 1ml 细胞悬液按 Annexin - V/PI 双染试剂盒操作说明进行检测。1h 内使用流式细胞检测仪进行定量检测, 并进行数据分析。

8. 统计学方法: 本研究所涉及的组间之间的比较均采用 SPSS 16.0 统计分析软件进行分析, 数据结果以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用方差分析 (one - way ANOVA) 进行组间比较。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. tBHP 刺激后小梁细胞形态学的改变: 正常培养的小梁细胞呈梭形, 折光性好, 贴壁良好; tBHP 处理 1h 后, 部分细胞变圆、脱落、皱缩; tBHP 处理 2h 后, 大部分细胞变圆、皱缩、悬浮于培养液中(图 1)。

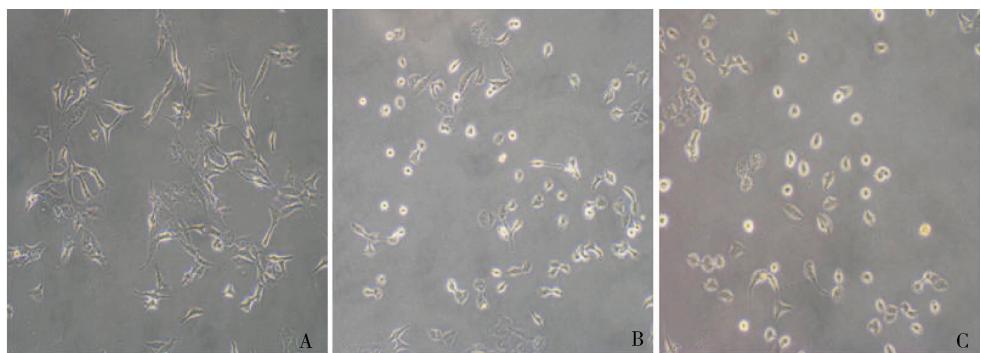


图 1 经 tBHP 处理后小梁细胞形态学改变( $\times 100$ )

2. tBHP 刺激后小梁细胞活性的改变: 设对照组细胞活性为 100%, 则 tBHP1h 组细胞活性为  $69.3\% \pm 1.5\%$ ; tBHP2h 组细胞活性为  $57.9\% \pm 2.2\%$  (表 1)。经 one - way ANOVA 分析, 3 组间细胞活性差异有统计学意义 ( $F = 602.327, P = 0.000$ )。进一步对各组间的细胞活性进行两两比较, 结果为对照组与 tBHP1h 组和 tBHP2h 组比较、tBHP1h 组与 tBHP2h 组比较, 各组间差异均有统计学意义 ( $P$  均 = 0.000)。

表 1 tBHP 刺激后小梁细胞的改变 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别       | 细胞活性<br>(%)    | 活性氧水平           | 凋亡率<br>(%)      | 蛋白酶体<br>活性 (%) |
|----------|----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| 对照组      | 100            | 1               | $3.0\% \pm 1.8$ | 100            |
| tBHP1h   | $69.3 \pm 1.5$ | $53.5 \pm 1.8$  | $28.23 \pm 3.2$ | $70.6 \pm 0.9$ |
| tBHP2h   | $57.9 \pm 2.2$ | $121.8 \pm 4.2$ | $39.2 \pm 5.9$  | $74.9 \pm 0.5$ |
| <i>F</i> | 602.3          | 528.4           | 67.8            | 783.5          |
| <i>P</i> | 0.000          | 0.000           | 0.000           | 0.000          |

3. tBHP 刺激后小梁细胞活性氧的改变: 将对照组 ROS 水平设为 1, 则 tBHP1h 组 ROS 水平为对照组的  $53.5 \pm 1.8$  倍; tBHP2h 组 ROS 水平为对照组的  $121.8 \pm 4.2$  倍(表 1)。将对照组 ROS 水平设为 1, 则

tBHP1h 组 ROS 水平为对照组的  $53.47 \pm 1.75$  倍; tBHP2h 组 ROS 水平为对照组的  $121.81 \pm 4.2$  倍; 经 one - way ANOVA 分析, 3 组间细胞 ROS 水平差异有统计学意义 ( $F = 528.366, P = 0.000$ )。进一步对各组间的 ROS 水平进行两两比较, 结果为对照组与 tBHP1h 组和 tBHP2h 组比较、tBHP1h 组与 tBHP2h 组比较,  $P$  均 = 0.000, 各组间差异均有统计学意义。

4. tBHP 刺激后小梁细胞糜蛋白酶样蛋白酶体复合物活性的改变: 将对照组小梁细胞糜蛋白酶样蛋白酶体复合物活性的荧光强度设为 100%, 则 tBHP1h 组小梁细胞糜蛋白酶样蛋白酶体复合物活性较对照组下降  $70.6\% \pm 0.9\%$ ; tBHP2h 组小梁细胞糜蛋白酶样蛋白酶体复合物活性较对照组下降  $74.9\% \pm 0.5\%$  (表 1)。将对照组小梁细胞糜蛋白酶样蛋白酶体复合物活性的荧光强度设为 100%, 则 tBHP1h 组小梁细胞糜蛋白酶样蛋白酶体复合物活性较对照组下降  $70.59\% \pm 0.88\%$ ; tBHP2h 组小梁细胞糜蛋白酶样蛋白酶体复合物活性较对照组下降  $74.93\% \pm 0.54\%$ , 对 3 组间的小梁细胞糜蛋白酶样蛋白酶体复合物活性进行 one - way ANOVA 分析, 差异有统计学

意义 ( $F = 783.469, P = 0.000$ )。进一步对各组的小梁细胞糜蛋白酶样蛋白酶体复合物活性进行两两比较,结果为对照组与 tBHP1h 组和 tBHP2h 组比较,  $P$  均 = 0.000; tBHP1h 组与 tBHP2h 比较, 差异均有统计学意义 ( $P = 0.043$ )。

#### 5. Hoechst33258 染色观察 tBHP 刺激后小梁细胞

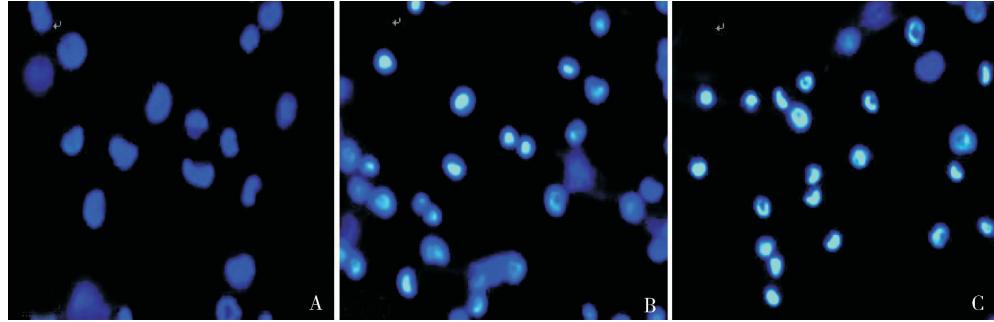


图 2 激光共聚焦荧光显微镜检测 tBHP 刺激前后小梁细胞的凋亡

6. 流式细胞术定量检测 tBHP 刺激后小梁细胞的凋亡比例:经流式细胞术定量检测,在正常对照组 iHTM 细胞中,凋亡细胞比例为  $3.0\% \pm 1.8\%$ 。tBHP 1h 组凋亡细胞比例为  $28.23\% \pm 3.20\%$ , 凋亡以晚期凋亡为主;tBHP 处理 2h 组凋亡细胞比例为  $39.2\% \pm 5.9\%$ , 且凋亡细胞以晚期凋亡和细胞坏死为主;凋亡细胞比例比对照组和 tBHP1h 组明显增加(图 3、表

1)。将 3 组间细胞凋亡比例进行 one-way ANOVA 分析,差异有统计学意义 ( $F = 67.784, P = 0.000$ )。进一步将各组间的细胞凋亡比例进行两两分析,结果分别是对照组与 tBHP1h 组和 tBHP2h 比较,  $P$  均 = 0.000; tBHP1h 组与 tBHP2h 组比较, 差异均有统计学意义 ( $P = 0.015$ )。

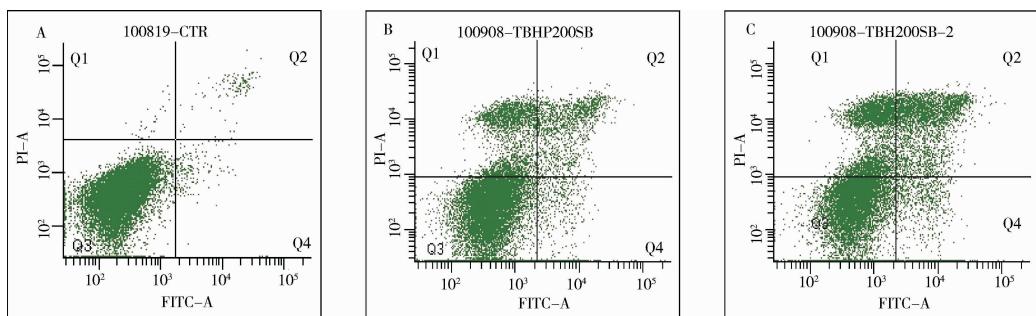


图 3 tBHP 刺激后小梁细胞凋亡的变化

## 讨 论

1. 氧化损伤对小梁细胞形态改变的影响:已有研究发现氧化应激是 POAG 疾病发生、发展的一个重要因素。Sacca 等<sup>[6]</sup> 报道氧化应激可能通过损伤小梁网, 而导致眼压升高和青光眼视神经损害的进展。在 Izzotti 等<sup>[7]</sup> 的一项病例对照研究中, 他们检测了包括了 79 名 POAG 患者和 156 名正常对照者的线粒体 DNA 损伤情况, 发现氧化损伤在青光眼患者线粒体损伤以及启动细胞凋亡和细胞丢失方面起了重要作用。Liu 等<sup>[8]</sup> 报道在小鼠的急性高眼压模型中, 眼压

升高后数小时内视网膜神经节细胞即发生氧化损伤, 说明氧化损伤在青光眼视神经病变早期即产生了影响。周琦等<sup>[9]</sup> 报道氧化损伤可以使猪小梁细胞黏附因子 ICAM - 1 下降以及 Luna 等<sup>[10]</sup> 发现氧化应激可以使小梁细胞细胞外基质增加, 基质蛋白酶含量下降。笔者发现培养的人小梁细胞经 tBHP 刺激后, 细胞变圆、收缩, 由贴壁状态变为悬浮状态, 并且随着刺激时间的延长, 细胞活性变的越来越差。

2. 氧化损伤对小梁细胞活性的影响:体外诱导小梁网细胞氧化应激可使其发生类似 POAG 的改变, 如

细胞外基质堆积、细胞溶解死亡、细胞骨架结构紊乱、脂褐素增加等,如果用抗氧化剂和降眼压药物预处理则可减轻这种改变<sup>[5]</sup>。持续的 ROS 可破坏线粒体膜电位,最终导致小梁网损伤,房水流出受阻。对 POAG 患者的研究发现,ROS 引起的小梁细胞 DNA 的损伤与眼压的升高和视野的丧失显著相关。在小梁网氧化应激过程中,持续的活性氧刺激使负调控细胞外基质(extracellular cell matrix, ECM)相关基因表达降低,从而促进了小梁网处 ECM 沉积,房水流出受阻。笔者用 tBHP 作为氧化应激的刺激源,对培养的小梁细胞进行刺激,作用 1h 后细胞活性下降 30.70% ± 1.50%,刺激 2h 后,细胞活性进一步下降(42.12% ± 2.20%),说明氧化应激损伤具有时间依赖性,随着刺激时间的延长,tBHP 对细胞造成的损伤加重。活性氧(ROS)是指化学性质活跃的含氧原子或原子团,超氧自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)、过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、羟自由基(·OH)等。活性氧是细胞信号转导必需的物质,但是过量的活性氧也会损伤线粒体、蛋白质以及核酸,对细胞造成损伤。笔者发现 tBHP 刺激小梁细胞后可使细胞的活性氧增加,刺激 1h 后增加 53.47 ± 1.75 倍,刺激 2h 后增加 121.81 ± 4.20 倍,同样随着刺激时间的延长,细胞活性氧水平增加。如前所述,小梁细胞经 tBHP 处理后可发生细胞变圆、收缩、由贴壁状态变为悬浮状态,细胞活性也显著下降,这些可能都与 ROS 的增加有关。

3. 氧化损伤对小梁细胞蛋白酶体复合物活性的影响:蛋白酶体是相对分子质量为 700kDa 的复合体,包含糜蛋白酶样、胰蛋白酶样、天冬氨酸特异性蛋白水解酶样 3 种蛋白酶活性。蛋白酶体是细胞内蛋白质降解的重要途径,也是清除细胞内变性受损蛋白质的主要工具,它的活性反映了细胞对抗损伤的能力。泛素蛋白酶体系统功能的降低可影响眼科的多种疾病如视网膜色素病变,黄斑变性,青光眼,糖尿病视网膜病变等<sup>[11]</sup>。Guo 等<sup>[12]</sup>发现在晶状体上皮细胞的增殖和分化过程均需要蛋白酶体的参与。张铁英等<sup>[13]</sup>研究发现与透明晶状体相比,白内障晶状体上皮内蛋白酶体的糜蛋白酶样、胰蛋白酶样酶活性明显降低,并认为蛋白酶体活性降低可能在老年性白内障的形成中起重要的调节作用。Zhang 等<sup>[14]</sup>报道 40 ~ 50mmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可引起体外培养的人视网膜色素上皮细胞中蛋白酶体活性的明显下降。Caballero 等<sup>[15]</sup>报道将人小梁细胞培养于 40% O<sub>2</sub> 环境中,可以引起小梁细胞蛋白酶体活性的降低。笔者使用能被

糜蛋白酶样水解酶的底物 Suc - Leu - Leu - Val - Tyr - AMC (LLVY) 来检测糜蛋白酶样蛋白酶的活性,结果表明培养的人小梁细胞经 tBHP 刺激后 1h 后,细胞糜蛋白酶样蛋白酶体的活性下降 70.59% ± 0.88%,刺激 2h 后进一步下降(74.93% ± 0.54%)。在氧化应激后,蛋白酶体复合物活性下降,一方面可能是因为蛋白酶体复合物结合了大量受氧化损伤的蛋白质,造成的蛋白酶体的转运饱和;另一方面可能是由于 tBHP 直接造成了蛋白酶体复合物的氧化损害,导致了蛋白酶体复合物功能的下降。蛋白酶体复合物功能下降,细胞内受损蛋白无法及时被降解,可以加剧氧化应激对小梁网的损伤。

4. 氧化损伤对小梁细胞凋亡的影响:凋亡不同于坏死,坏死是由损伤因子引起的被动死亡,因为坏死的细胞常常要释放出内含物,所以一般会引起炎症。而凋亡是细胞的程序化死亡过程,是能量依赖的主动的死亡过程,由凋亡通路引起,不产生炎性反应。在青光眼患者,不论视网膜还是眼前段小梁网组织都存在较高的氧化应激水平<sup>[16]</sup>。POAG 患者的小梁网组织存在着诸多形态学和生物学的异常,如细胞丢失较多,细胞骨架的改变,细胞老化现象以及亚临床炎症的表现。目前认为持续的氧化应激导致了这些改变<sup>[17]</sup>。笔者通过 tBHP 氧化刺激体外培养的小梁细胞,发现 tBHP 刺激 1h 后,凋亡细胞比例为 28.23% ± 3.23%,刺激 2h 后,凋亡细胞比例为 39.20% ± 5.91%,随着刺激时间的延长,凋亡细胞增加明显;说明小梁细胞的氧化应激加剧了细胞的凋亡,从而造成小梁网功能损伤。

笔者的研究表明,小梁细胞经 tBHP 刺激后,细胞 ROS 水平增加,细胞凋亡比例增加,细胞蛋白酶体复合物的活性降低,小梁细胞活性降低,上述改变与刺激时间相关,随着刺激时间延长,上述改变更加显著。同时笔者发现 tBHP 直接造成的细胞坏死并不多,说明 tBHP 可用于小梁细胞氧化应激损伤的模型建立,并且是一种易于诱导小梁细胞凋亡的氧化剂。

#### 参考文献

- Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry [J]. J Gerontol, 1956, 11(3):298 - 300
- Sohal RS, Allen RG. Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: a unifying hypothesis [J]. Exp Gerontol, 1990, 25(6):499 - 522
- Bunin AI. Pathogenetic factors of destructive process in trabecular tissues in primary open - angle glaucoma [J]. Vestn Oftalmol, 2000, 116(5):24 - 27

- 4 Ferreira SM, Lerner SF, Brunzini R, et al. Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma patients [J]. Am J Ophthalmol, 2004; 137(1):62-69
- 5 Izzotti A, Bagnis A, Saccà SC. The role of oxidative stress in glaucoma [J]. Mutat Res, 2006, 612(2):105-114
- 6 Sacca SC, Pascotto A, Camicione P, et al. Oxidative DNA damage in the human trabecular meshwork - clinical correlation in patients with primary open-angle glaucoma [J]. Arch Ophthalmol 2005, 123: 458-463
- 7 Izzotti A, Sacca SC, Longobardi M, et al. Mitochondrial damage in the trabecular meshwork of patients with glaucoma [J]. Arch Ophthalmol, 2010, 128(6):724-730
- 8 Liu Q, Ju WK, Crowston JG, et al. Oxidative stress is an early event in hydrostatic pressure induced retinal ganglion cell damage [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(10):4580-4589
- 9 周崎, 刘玉琴, 赵家良, 等. 氧化应激对猪眼小梁细胞内皮细胞白细胞黏附分子-1表达的影响 [J]. 中国医学科学院学报, 2007, 29(3): 394-397
- 10 Luna C, Li G, Qiu J, et al. Role of miR-29b on the regulation of the extracellular matrix in human trabecular meshwork cells under chronic oxidative stress [J]. Mol Vis, 2009, 28(15):2488-2497
- 11 Campello L, Esteve-Rudd J, Cuenca N, et al. The ubiquitin-proteasome system in retinal health and disease [J]. Mol Neurobiol, 2013, 47(2):790-810
- 12 Guo W, Shang F, Liu Q, et al. Ubiquitin-proteasome pathway function is required for lens cell proliferation and differentiation [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47(6):2569-2575
- 13 张铁英, 刘奕志, 吴明星, 等. 老年性白内障与透明晶状体上皮内蛋白酶活性的比较 [J]. 眼科学报, 2006, 22:89-92
- 14 Zhang X, Zhou J, Fernandes AF, et al. The proteasome: a target of oxidative damage in cultured human retina pigment epithelial cells [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(8):3622-3630
- 15 Caballero M, Liton PB, Epstein DL, et al. Proteasome inhibition by chronic oxidative stress in human trabecular meshwork cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 22; 308(2):346-352
- 16 Erb C, Heinke M. Oxidative stress in primary open-angle glaucoma [J]. Front Biosci (Elite Ed), 2011, 3:1524-1533
- 17 Babizhayev MA, Yegorov YE. Senescent phenotype of trabecular meshwork cells displays biomarkers in primary open-angle glaucoma [J]. Curr Mol Med, 2011, 11(7):528-552

(收稿日期:2014-06-08)

(修回日期:2014-06-27)

## EV71 及 CA16 不同检测方法敏感度及特异性比较

李 华 杨 婷 姜广菊 何晓娟 岳 磊 谢天宏 杨水芝 朱凡丽 龙润乡 杨 蓉 罗芳宇 谢忠平

**摘要 目的** 比较检测肠道病毒 71 型 (enterovirus 71, EV71) 及柯萨奇病毒 A 组 16 型 (coxsackievirus A16, CA16) 不同检测方法、不同生产厂家 (A、B、C、D、E) 荧光定量 PCR 检测试剂的敏感度及特异性。**方法** 对 EV71 及 CA16 各 10 个病毒株进行稀释, 取原倍、 $10^{-3}$  及  $10^{-6}$  3 个浓度, 分别采用实时荧光定量 PCR 法 (分别用不同厂家的检测试剂)、RT-PCR 法、ELISA 法及细胞培养 4 种方法进行检测, 每种检测连续重复 3 次, 然后将其结果进行比较分析。**结果** EV71 及 CA16 经不同方法及试剂检测后结果显示, 荧光定量 PCR 方法敏感度最高, 依次为细胞培养法、RT-PCR(VP1) 法及 ELISA 法; 细胞培养法、RT-PCR(VP1) 法及 ELISA 法的特异性较荧光定量 PCR 检测方法的特异性高, 但荧光定量 PCR 检测试剂均出现不同程度非特异的假阳性结果; 不同的荧光定量 PCR 检测试剂中, D 厂家试剂检测 EV71 和 C 厂家试剂检测 CA16 的敏感度和特异性最高。**结论** RT-PCR (VP1) 方法更适于检测 EV71 及 CA16, 如条件许可则建议联合采用细胞培养检测方法, 提高检测结果的敏感度和特异性。

**关键词** 手足口病 EV71 CA16 敏感度 特异性

**中图分类号** R446.1

**文献标识码** A

**DOI** 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.01.017

**Evaluate the Sensitivity and Specificity of Differentiating Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16.** Li Hua, Yang Ting, Jiang Guangju, et al. Institute of Medical Biology, Peking Union Medical College/Chinese Academy of Medical Science, Yunan 650118, China

**Abstract Objective** To evaluate the sensitivity and specificity of detecting EV71 and CA16 with four different methods and manufacturers (A, B, C, D, E) of the real-time PCR. **Methods** Ten EV71 strains and ten CA16 strains were diluted to three different concentrations, respectively, the original,  $10^{-3}$  and  $10^{-6}$  times, which were detected simultaneously by the real-time PCR (kits from five manu-

基金项目: 云南省重点新产品研究项目 (2012BC006)

作者单位: 650118 昆明, 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所

通讯作者: 谢忠平, 电子信箱: xzp218@126.com