

剥脱综合征白内障患者单个核细胞中 Notch2 基因及其靶蛋白表达研究

丁 琳 王慧琴 凯迪丽亚·阿力甫 买尔哈巴·米吉提 吴卫东

摘 要 **目的** 探讨信号通路重要受体基因 Notch2 及靶蛋白在剥脱综合征白内障患者、健康正常人外周血单个核细胞中的表达水平和意义。**方法** 采用实时荧光定量 PCR 法检测 Notch2 基因在 18 例剥脱综合征白内障患者外周血单个核细胞中的表达水平,同时检测对照组正常人群 18 例。运用免疫印迹法检测 Notch2 蛋白在剥脱综合征白内障患者和正常人群中的表达量。**结果** 剥脱综合征患者外周血单个核细胞中 Notch2 基因相对表达水平为 0.157 ± 0.137 , 正常人群的表达水平为 0.035 ± 0.033 , 剥脱综合征患者显著高于正常健康人群,差异有统计学意义 ($t = 3.662, P < 0.05$)。免疫印迹检测 Notch2 蛋白结果显示,剥脱综合征白内障患者蛋白表达量为 0.785 ± 0.092 , 正常人群为 0.304 ± 0.091 , 剥脱综合征患者显著高于正常人群,差异有统计学意义 ($t = 15.795, P < 0.01$)。**结论** Notch2 基因在剥脱综合征白内障患者外周血单个核细胞中的表达显著高于正常人群,其靶蛋白 Notch2 在剥脱综合征患者中的表达也高于正常人群。推测作为 Notch 信号通路重要受体基因 Notch2 异常表达正调控其靶蛋白 Notch2 参与剥脱综合征白内障的发病过程。

关键词 剥脱综合征 白内障 外周血单个核细胞 Notch2

中图分类号 R776.1

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.04.022

Expression and Significance of Notch2 and Its Target Protein in Peripheral Blood Mononuclear Cell of Patients with Exfoliation Syndrome Cataract. Ding Lin, Wang Huiqin, Kai Diliyalifu, et al. People's Hospital of Xingjiang Uygur Autonomous Region, Xinjiang 830001, China

Abstract **Objective** To investigate the expression and significance of Notch2 gene and its target protein, which in peripheral blood mononuclear cell of patients with exfoliation syndrome cataract and healthy people. **Methods** There are 18 patients with exfoliation syndrome cataract and 18 healthy people. The expressions of Notch2 was studied with real-time fluorescent quantitative PCR in the peripheral blood mononuclear cell. Western blot was used to detect the expression of Notch2 protein in the peripheral blood mononuclear cell of 18 patients with exfoliation syndrome cataract and 18 normal subjects. **Results** The expression of Notch2 in peripheral blood mononuclear cell of patients with exfoliation syndrome cataract was 0.157 ± 0.137 , significantly higher than the normal population 0.035 ± 0.033 , and the difference was statistically significant ($t = 3.662, P < 0.05$). Western blot showed that the expression of Notch2 protein in patients with exfoliation syndrome cataract were 0.785 ± 0.092 , and in normal people were 0.304 ± 0.091 . The expression of Notch2 protein in exfoliation syndrome cataract patients was higher than in normal people. And the differences was statistical significance ($t = 15.795, P < 0.01$). **Conclusion** The expression of Notch2 and its target protein in peripheral blood mononuclear cell of patients with exfoliation syndrome cataract was significantly higher than the normal people. Differential expression of Notch2 may positive regulation of Notch2 protein in the development of exfoliation syndrome eye disease.

Key words Exfoliation syndrome; Cataract; Peripheral blood mononuclear cell; Notch2

剥脱综合征(exfoliation syndrome)是一种全身性的细胞外基质疾病,与年龄相关。在眼部主要表现为无定形蛋白质碎屑沉积于晶状体前囊、基膜的其他眼

组织上,沉积物呈灰白色或蓝白色^[1-3]。可继发青光眼,加速白内障的进展,并能增加术中和术后并发症。目前剥脱综合征的发病机制尚不明确,研究表明剥脱综合征是一种多基因遗传并受多因素调控的疾病,地区高发剥脱综合征型白内障患者的病情加速进展及预后值得关注^[4-6]。因此本研究在课题组前期工作的基础上就信号通路中重要的受体基因 Notch2 及其靶蛋白表达进行检测,试探讨 Notch2 基因及其靶蛋白 Notch2 与剥脱综合征白内障发病的相关性。

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2017D01C117)

作者单位:830001 乌鲁木齐,新疆维吾尔自治区人民医院眼科(丁琳、凯迪丽亚·阿力甫、买尔哈巴·米吉提),临床医学研究中心(王慧琴、吴卫东)

通讯作者:丁琳,电子信箱:13609985600@163.com

对象与方法

1. 研究对象:选取 2016 ~ 2018 年在新疆维吾尔自治区人民医院眼科就诊或住院的剥脱综合征白内障患者 18 例,其中,男性 9 例,女性 9 例;患者年龄 45 ~ 79 (68.17 ± 10.42) 岁。选择同一时期来笔者医院体检的无相关病史的健康人群作为正常对照组,正常对照组 18 例,男女性别比为 1:1;年龄 46 ~ 80 岁 (69.11 ± 8.59) 岁。采集研究对象外周血 5 ~ 10ml。

2. 纳入、排除标准:所有患者参照 Ritch R 剥脱综合征的诊断标准;本研究获得医院医学伦理学委员会批准,所有患者或监护人均已签署知情同意书。两组人群均排除眼科手术史、恶性肿瘤、自身免疫性疾病、高血压、糖尿病、强烈红外线接触史。女性患者排除妊娠、哺乳及月经期。

3. 外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)分离:将采集的静脉血 5ml 注入盛有等量缓冲液的 EP 管中,充分混匀。将淋巴细胞分层液 3ml 加入 EP 管中,随后注入稀释抗凝血液沿管壁加至分层液上,保持两者界面清晰。室温 2000r/min 离心 20min,管内可分为 4 层。轻轻吸出乳白色的单个核细胞层,加入另一支已含有 4ml PBS 的离心管中混匀。室温下,1500r/min 离心 10min。弃上清,重复洗涤 1 次。

4. Notch2 基因表达量的检测:(1)提取总 RNA:按 MiRNeasy Mini kit 提取试剂盒(德国凯杰公司)说明书进行,收集外周血单个核细胞,然后按步骤添加试剂提取样本总 RNA。用超微量核酸蛋白测定仪(美国 Thermo 公司)测定提取物浓度及纯度, A_{260}/A_{280} 比值为 1.8 ~ 2.2,用于后续实验。(2)反转录合成 cDNA:使用 miScript II RT kit(德国凯杰公司),按反转录试剂盒说明书操作,上样于 Bio-Rad C1000 Touch PCR 仪(美国伯乐公司)。反应体系 20 μ l:5 $\times$ HiFlex Buffer 4 μ l,10 $\times$ Nucleics Mix 2 μ l,RT Enzyme Mix 2 μ l,Total RNA(浓度约 20mg/L) + RNase-Free H_2O_2 共 12 μ l。反应条件:37 $^{\circ}C$ 60min,95 $^{\circ}C$ 5min。(3)实时荧光定量 PCR 反应:应用 QuantiFast SYBR[®] Green PCR kit 试剂盒(德国凯杰公司),引物购自德国凯杰成品序列,其引物序列为专利产品。反应体系 20 μ l:2 $\times$ QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix 10 μ l,10 $\times$ miScript Primer Assay 2 μ l,10 $\times$ miScript Universal Primer 2 μ l,RNase-Free H_2O_2 5 μ l,模板 cDNA 1 μ l。反应在荧光定量 PCR 仪(Rotor Gene-Q 德国)上进行,反应条件:95 $^{\circ}C$ 15min,1 个循环;94 $^{\circ}C$

15s,55 $^{\circ}C$ 30s,70 $^{\circ}C$ 30s,40 个循环。每个样本做 3 个复孔,在相同反应条件下同时检测 Notch2 和 GAPDH 的扩增情况,程序运行结束后利用 Rotor-Gene Q Series Software 软件进行数据分析。

5. 免疫印迹法检测 Notch2 蛋白表达量:将 RIPA 裂解液加入所收集的单个核细胞团中,提取蛋白,BCA 法测定蛋白提取物浓度。12% 分离胶进行 SDS-PAGE 电泳;蛋白样本分离转印至 PVDF 膜上,5% 蛋白质干粉 TBST 封闭 1h;TBST 洗膜 10min 3 次,Notch2 一抗(美国 Abcam 公司)1:1000 室温孵育 1h;TBST 洗膜 10min 3 次,二抗 1:1000 室温孵育 1h;TBST 洗膜 10min 3 次,曝光获得灰度。

6. 统计学方法:应用 SPSS 17.0 统计学软件对数据进行统计分析。统计分析实时荧光定量 PCR 时相对定量值以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。计量资料符合正态分布以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。 t 检验进行组间比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 实时荧光定量 PCR 曲线分析:以 GAPDH 扩增作为参照,样本 Notch2 基因荧光定量扩增特异性好,扩增效率良好(图 1)。Notch2 基因在正常人群和剥脱综合征白内障患者中的表达水平分别为 0.035 ± 0.033 、 0.157 ± 0.137 ,剥脱组中 Notch2 的表达高于正常组人群,差异有统计学意义($t = 3.662$, $P = 0.002$)。

2. 免疫印迹检测 Notch2 蛋白表达:剥脱综合征白内障患者 Notch2 蛋白的相对表达量为 0.785 ± 0.092 ,正常人群 Notch2 表达量为 0.304 ± 0.091 ,剥脱组 Notch2 蛋白表达量显著高于正常组,差异有统计学意义($t = 15.795$, $P = 0.000$,图 2)。

讨 论

Notch 基因最早发现于果蝇体内,由于其基因突变可以引起果蝇出现残翅的现象因而命名。随着研究的深入发现,Notch 基因广泛表达于无脊椎动物及哺乳动物体内^[7-9]。Notch 基因属于跨膜受体蛋白家族,其受体蛋白分为胞外区、跨膜区和胞内区,结合配体并激活受体的部位是胞外区。Notch 信号的转导可直接接受临近细胞的信号,不需通过第二信使和蛋白激酶的参与来完成。信号由此转导至细胞核,激活相关转录因子的表达^[7-10]。Notch 信号通路在进化上具有高度保守性,参与多个系统的发生、发育、功能等生物学活动^[9-11]。研究表明 Notch 信号通路在胚胎发育、血管形成、血细胞形成以及肿瘤发生等的生理、

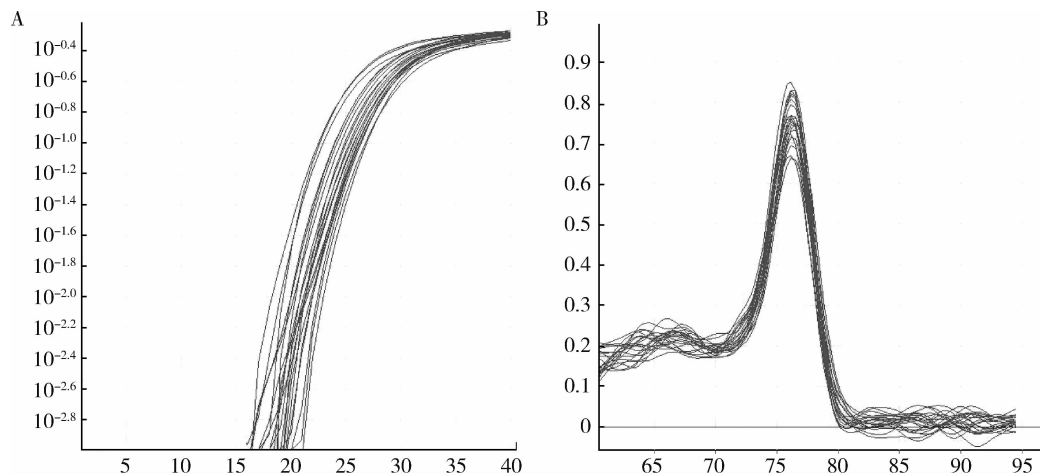


图 1 实时荧光定量 PCR 检测 Notch2 基因的扩增曲线图和溶解曲线图

A. Notch2 扩增曲线图; B. Notch2 溶解曲线图

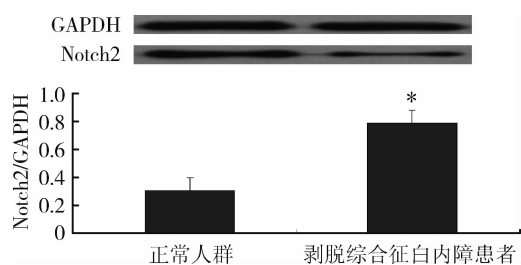


图 2 Notch2 蛋白 Western blot 法表达水平比较图

与正常人群比较, * $P < 0.01$

病理过程中发挥重要作用^[7-11]。Notch2 是 Notch 信号通路的重要受体蛋白,其与配体结合后可酶切暴露的金属酶切位点,释放出胞内 NICD。NICD 进入细胞核后与转录抑制因子 CSL/CBF1 结合活化 Hes,从而进行细胞内调控,影响细胞增殖、凋亡等过程^[12-18]。剥脱综合征是一种受多基因调控,受多因素作用的系统性疾病,其眼部病变表现为不明纤维物质在眼部组织中沉积,引起房水外流受阻,从而导致眼压增高和视神经受损,并最终发展为青光眼和白内障等疾病,严重者致盲^[1-5]。

目前研究认为剥脱综合征是由遗传、环境、年龄等多因素引起的细胞外基质代谢异常性疾病^[1]。在前期工作基础上笔者推测信号通路重要受体 Notch2 参与了眼部疾病的发生,因此本研究以 Notch2 为切入点通过进行实时荧光定量 PCR 来检测其在剥脱综合征白内障患者与正常人群外周血单个核细胞中的表达,并对其下游靶蛋白 Notch2 展开研究,以此探寻剥脱综合征白内障发生、发展可能的影响因素。

综上所述,实时荧光定量 PCR 检测结果显示,

Notch2 在剥脱组中的表达显著高于正常组,差异有统计学意义($t = 3.662, P < 0.01$),推测 Notch2 在剥脱综合征白内障患者外周血单个核细胞中的高表达可能调控了细胞异常代谢过程,从而参与了剥脱综合征的发展过程,进而加速影响白内障恶化进程。免疫印迹实验结果显示,Notch2 蛋白在剥脱组中的表达高于正常人群,差异有统计学意义($t = 15.795, P < 0.01$),受 Notch2 基因调控其靶蛋白也异常表达。参与这一系列过程可能调控了信号通路,导致细胞外基质异常分泌,从而加速病理过程。与正常人群比较,剥脱综合征白内障患者外周血单个核细胞中 Notch2 基因呈高表达,同时 Notch2 蛋白表达也明显上调,这说明二者呈正相关。由整体实验结果推测 Notch2 基因及其靶蛋白的差异表达共同作用参与了剥脱综合征白内障的发展过程。

参考文献

- 1 刘晓弟,丁琳.剥脱综合征发病机制的研究进展[J].国际眼科纵览,2016,40(6):380-383
- 2 陈玲,王宁利.囊膜剥脱综合征的研究进展[J].中华眼科杂志,2010,46(6):572-576
- 3 丁琳,王绍飞,麦迪尼亚,等.维吾尔族剥脱综合征患者与正常人角膜内皮细胞密度及六角形细胞比例的对比分析[J].中国中医眼科杂志,2014,24(2):132-134
- 4 殷燕.剥脱综合征的分子遗传学研究进展[J].中华实验眼科杂志,2015,33(8):760-763
- 5 刘晓弟,丁琳.84 例剥脱综合征临床分析[J].新疆医学,2018,48(7):735-738
- 6 杨安怀,胡焰山,李拓.白内障术后晚期人工晶状体脱位的研究进展[J].国际眼科杂志,2017,17(9):1674-1677
- 7 王晓清,袁国强,潘亚文.肿瘤 Notch 信号通路的研究进展[J].基础医学与临床,2018,38(7):1025-1028

- 8 Claudio DT, Melissa A, Lopes Pinheiro, *et al.* Notch signaling is impaired during inflammation in a Lunatic Fringe – dependent manner [J]. *Brain Behav Immunity*, 2017, 69(6): 48 – 56
- 9 Trabelsi N, Setti Boubaker N, Said R, *et al.* Notch pathway: bioinformatic analysis of related transcription factors within bladder cancer types and subtypes [J]. *IRBM*, 2018, 39(4): 261 – 267
- 10 郭乐, 胡瑞成, 朱黎明, 等. Notch 信号通路在呼吸道疾病及细胞免疫中的研究进展 [J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(5): 1109 – 1114
- 11 韩先卓, 刘畅. Notch 信号通路相关的人类骨发育疾病 [J]. *医学综述*, 2018, 24(8): 1606 – 1611
- 12 张青, 刘益飞, 张曙, 等. 跨膜受体蛋白 Notch2 在肺腺癌组织中的表达变化及意义 [J]. *山东医药*, 2018, 58(12): 82 – 84
- 13 Jerzakowski G, Lasek T, Binkiewicz – Glinska A, *et al.* NOTCH2 genetic mutation and acro – osteolysis – the Hajdu – Cheney syndrome [J]. *QJM*, 2017, 110(2): 115 – 116
- 14 Mamiko T, Sakata – Yanagimoto S, Shigeru T, *et al.* Notch2 and immune function [J]. *Curr Topics Microbiol Immunol*, 2012, 360(2): 151 – 61
- 15 Rong H, Shen H, Xu Y, *et al.* Notch signalling suppresses regulatory T – cell function in murine experimental autoimmune uveitis [J]. *Immunology*, 2016, 149(4): 447 – 459
- 16 Wang N, Chen FE, Long ZW. Mechanism of microRNA – 146a/Notch2 signaling regulating IL – 6 in graves ophthalmopathy [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(4): 1285 – 1297
- 17 Oh SJ, Ahn S, Jin YH, *et al.* Notch 1 and Notch 2 synergistically regulate the differentiation and function of invariant NKT cells [J]. *J Leukoc Biol*, 2015, 98(5): 781 – 789
- 18 张悦, 马蕾, 薛海波, 等. Notch 信号通路调控调节性 T 细胞分化与功能的研究进展 [J]. *现代免疫学*, 2018, 38(2): 162 – 165

(收稿日期: 2019 – 08 – 14)

(修回日期: 2019 – 09 – 04)

超声引导下胸神经阻滞和竖脊肌平面阻滞用于乳腺癌改良根治术后镇痛效果的比较

陈程哲 李会芳 任益锋 孙习文 洪道先 郑孝振

摘 要 目的 通过比较超声引导下胸神经Ⅱ (pectoral nerves Ⅱ, Pecs Ⅱ) 阻滞和竖脊肌平面 (erector spinae plane, ESP) 阻滞在乳腺癌改良根治术后的镇痛效果为临床选择麻醉提供依据。方法 选择笔者医院 2018 年 6 月 ~ 2019 年 6 月行单侧乳腺癌改良根治术的女性患者 90 例, 随机分为超声引导下 Pecs Ⅱ 组 (P 组)、超声引导下 ESP 组 (E 组) 和对照组 (C 组), 每组 30 例。记录 3 组患者术后不同时点数字疼痛评分 (numerical rating scales, NRS)、术中舒芬太尼用量、是否需要补救性镇痛、术后吗啡用量、不良反应及并发症发生情况。**结果** 3 组患者一般情况比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。术中舒芬太尼用量 C 组 ($33.4 \pm 3.4 \mu\text{g}$) 显著高于 P 组 ($26.1 \pm 3.1 \mu\text{g}$) 和 E 组 ($27.6 \pm 3.1 \mu\text{g}$), 差异有统计学意义 ($t = -8.742, P = 0.000; t = -6.957, P = 0.000$), P 组低于 E 组, 差异无统计学意义 ($t = -1.888, P = 0.064$)。术后 24h 补救镇痛例数 P 组 3 例显著少于 E 组 10 例和 C 组 13 例, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.812, P = 0.028; \chi^2 = 8.523, P = 0.004$), E 组少于 C 组, 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.635, P = 0.426$)。术后 24h 吗啡用量 P 组 ($0.7 \pm 1.7 \text{mg}$) 显著低于 C 组 ($2.3 \pm 2.9 \text{mg}$), 差异有统计学意义 ($t = -2.734, P = 0.008$), P 组低于 E 组 ($1.8 \pm 2.8 \text{mg}$), E 组低于 C 组, 差异均无统计学意义 ($t = -1.952, P = 0.056; t = -0.687, P = 0.495$)。术后 3、6、12、24h 的 NRS 评分 P 组分别为 0.7 ± 0.7 、 1.4 ± 0.7 、 1.6 ± 0.6 、 1.7 ± 0.6 , E 组分别为 1.2 ± 0.7 、 2.1 ± 0.7 、 2.2 ± 0.9 、 1.7 ± 0.5 , C 组分别为 1.4 ± 0.8 、 2.4 ± 0.6 、 2.4 ± 0.9 、 1.8 ± 0.4 。术后 3、6、12h 的 NRS 评分 P 组显著低于 E 组和 C 组, 差异有统计学意义 ($t = -2.833, P = 0.006; t = -3.851, P = 0.000; t = -2.876, P = 0.006; t = -3.409, P = 0.001; t = -5.581, P = 0.000; t = -4.619, P = 0.000$), 而 E 组低于 C 组, 差异无统计学意义 ($t = -0.872, P = 0.387; t = -1.617, P = 0.111; t = -0.846, P = 0.401$)。24h 的 NRS 评分 3 组比较, 差异均无统计学意义 ($t = 0.000, P = 1.000; t = -1.276, P = 0.207; t = -1.372, P = 0.175$)。术后 24h 不良反应情况比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 3 组均未出现并发症。**结论** 超声引导下 Pecs Ⅱ 阻滞较 ESP 阻滞具有更好的乳腺癌改良根治术后镇痛效果。

关键词 胸神经阻滞 竖脊肌平面阻滞 乳腺癌改良根治术 术后镇痛

中图分类号 R614.4

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.04.023

基金项目: 河南省科技发展计划项目 (192102310367); 河南省开封市科技发展计划项目 (1803012)

作者单位: 475001 开封, 河南大学第一附属医院麻醉科

通讯作者: 洪道先, 电子信箱: hdyfyhdx@126.com