

羊毛甾醇合酶及羊毛甾醇在大鼠角膜、晶状体和视网膜组织中的分布

康丽华 沈心悦 杨梅 张国伟 张俊芳 秦柏 杨铃 胡楠 管怀进

226001 南通大学附属医院眼科 南通大学眼科研究所

通信作者:管怀进,Email:guanhuajey@126.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.03.003

【摘要】 背景 已有研究证实与羊毛甾醇结构相似的三萜类化合物对于全身多种疾病具有治疗作用,近年来发现羊毛甾醇合酶(LSS)及羊毛甾醇对白内障具有治疗作用,但羊毛甾醇及其抑制剂与其他眼病的关系尚不清楚。了解羊毛甾醇在眼组织中的分布有助于阐明其与眼病的关系。目的 研究正常大鼠角膜、晶状体和视网膜中 LSS 及羊毛甾醇的表达及分布,为相关眼科疾病的靶向治疗提供依据。方法 取 SPF 级雄性 SD 大鼠 15 只,采用戊巴比妥钠过量麻醉法处死实验大鼠,立即摘取眼球,分别采用 Western blot 和逆转录(RT)-PCR 法检测大鼠角膜、晶状体和视网膜组织中 LSS 蛋白及其 mRNA 的表达情况;采用免疫荧光化学法对 LSS 在角膜、晶状体和视网膜组织中的表达进行定位;采用液相色谱-质谱联用仪(LC-MS)检测羊毛甾醇在正常大鼠角膜、晶状体和视网膜组织中的含量。结果 Western blot 法检测显示,大鼠视网膜中无 LSS 蛋白表达,LSS 蛋白在晶状体组织的相对表达量为 0.43 ± 0.05 ,明显高于角膜组织中的 0.25 ± 0.03 ,差异有统计学意义($t = -5.35, P < 0.01$)。RT-PCR 结果显示,正常大鼠视网膜中无 LSS mRNA 表达,大鼠角膜和晶状体组织中 LSS mRNA 的相对表达量为 0.51 ± 0.04 ,明显高于角膜组织中的 0.29 ± 0.02 ,差异有统计学意义($t = -8.34, P < 0.01$)。免疫荧光化学法结果表明,LSS 主要表达于角膜上皮、基质和内皮层角膜细胞的细胞质以及晶状体上皮细胞和浅皮质层细胞,而视网膜组织中未检测到 LSS 表达,且视网膜中 LSS 与 NeuN 标记的神经元及谷氨酰胺合成酶(GS)标记的 Müller 细胞无共表达。LC-MS 检测显示,正常大鼠视网膜中未检测到羊毛甾醇,大鼠晶状体中含羊毛甾醇为 $(24.37 \pm 2.91) \text{ ng/mg}$,明显高于角膜组织中的 $(5.31 \pm 0.58) \text{ ng/mg}$,差异有统计学意义($t = -11.13, P < 0.01$)。结论 LSS 及羊毛甾醇分布于大鼠角膜各层组织以及晶状体组织中,在视网膜各层组织中均无 LSS 表达。

【关键词】 羊毛甾醇/代谢;羊毛甾醇合酶;角膜;晶状体;视网膜;白内障;SD 大鼠

基金项目: 国家自然科学基金项目(81070718、81470616、81500706)

Distribution of lanosterol synthase and lanosterol in cornea, lens and retina tissue of rats Kang Lihua, Shen Xinyue, Yang Mei, Zhang Guowei, Zhang Junfang, Qin Bai, Yang Ling, Hu Nan, Guan Huaijin
Eye Institute, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China
Corresponding author: Guan Huaijin, Email: guanhuajey@126.com

【Abstract】 **Background** Researches showed that triterpenoids, with a similar structure to lanosterol, has therapeutical effect on many systemic diseases, and lanosterol was determined to have a therapeutical effect on cataract recently. However, how the lanosterol plays effects on other eye diseases is still unelucidated. Understanding the distribution of lanosterol in ocular tissue is helpful for us to elucidate the relationship of lanosterol with eye diseases. **Objective** This study attempted to investigate the distribution of lanosterol synthase (LSS) and lanosterol in cornea, lens and retina tissue of rats and offer a basis for the targeting treatment of eye diseases. **Methods** Fifteen SPF male SD rats were sacrificed by excessive anesthesia to obtain the eyeballs. The relative expressions of LSS protein and gene in the cornea, lens and retina tissue of the rats were detected by Western blot and reverse transcription (RT)-PCR, respectively. Immunofluorescence staining technology was used to locate the distribution of LSS in cornea, lens and retina tissue. The contents of lanosterol in the cornea, lens and retina tissue were analyzed by liquid chromatograph mass spectrometer (LC-MS). **Results** No LSS protein and mRNA was expressed in the retinal tissue in normal rats. The mean relative expression of LSS protein in the lens and cornea was 0.43 ± 0.05 and 0.25 ± 0.03 , respectively, showing a significant difference between them ($t = -5.35, P < 0.01$). The relative expression of LSS mRNA was 0.51 ± 0.04 and 0.29 ± 0.02 in the lens and cornea, respectively, with a stronger expression in the lens in comparison with the cornea ($t = -8.34, P < 0.01$). Immunofluorescence staining showed that LSS primarily located in corneal epithelial layer, stromal layer and endothelial layer as well as lens epithelial cells and shallow cortex layer and hardly expressed in retina, and no co-expression of LSS with the neuron marked by NeuN and the Müller cell

marked by glutamine synthetase (GS) in retinal tissue. LC-MS analysis revealed that the contents of lanosterol in lens and cornea was (24.37 ± 2.91) ng/mg and (5.31 ± 0.58) ng/mg, respectively, with a significant difference between them ($t = -11.13, P < 0.01$). **Conclusions** LSS and lanosterol extensively distribute in cornea and lens of normal rats, but not in retina tissue. These results offer new strategies for the target treatment of relevant eye diseases.

[Key words] Lanosterol/metabolism; Lanosterol synthase; Cornea; Lens, crystalline; Retina; Cataract; Rat, SD

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81070718, 81470616, 81500706)

羊毛甾醇合酶 (lanosterol synthase, LSS) 又称环氧角鲨烯环化酶, 在生物界普遍存在, 参与动物、植物的多项生理活动, 对调节机体代谢具有重要作用^[1]。LSS 催化 2,3-单环氧角鲨烯形成羊毛甾醇, 进一步形成的胆固醇参与细胞膜的构成及胆汁酸、维生素 D 及甾体激素的合成, 同时 LSS 还具有催化 2,3;22,23-二环氧角鲨烯的环化进而调节脂类代谢的生理功能^[2]。最近的研究发现, LSS 可能与白内障的发生有关, 犬玻璃体腔注射羊毛甾醇后能解聚晶状体蛋白质而逆转晶状体的混浊^[3]。曾有一项关于大鼠遗传性白内障的基因研究发现, LSS 基因可能是引起遗传性白内障的主要致病基因^[4], 也有研究发现 LSS 抑制剂可导致小鼠和犬的晶状体混浊^[5], 这些研究都证实了羊毛甾醇在晶状体疾病的发生和发展中发挥细胞保护作用, 但是其在眼科领域中的研究目前仅局限于白内障, 尚未发现其与角膜、视网膜疾病关系的研究报道。本研究拟探讨 LSS 及羊毛甾醇在大鼠角膜、晶状体和视网膜中的表达及分布, 为进一步研究其与眼科疾病的关系提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 成年 SPF 级雄性 SD 大鼠 15 只, 体质量 220 ~ 250 g, 购自南通大学实验动物中心。实验用大鼠均在无特定病原级标准环境下用标准饲料喂养。对实验动物行常规眼部检查, 证实其外眼和眼底均正常。实验过程中大鼠的使用和饲养均遵循 ARVO 声明。

1.1.2 主要试剂及仪器 Trizol 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司); 逆转录试剂盒 (加拿大 Fermentas 公司); 引物 (上海英骏生物工程公司); 神经元核 (neuronal nuclei, NeuN) 鼠抗单克隆抗体 (MAB377, 美国 Millipore 公司); LSS 兔抗鼠多克隆抗体 (ab80364, 英国 Abcam 公司); 谷氨酰胺合成酶 (glutamine synthetase, GS) 鼠抗单克隆抗体 (sc-376767)、GAPDH 兔抗鼠多克隆抗体 (sc-25778)、辣根过氧化物酶 (horse radish peroxidase, HRP) 标记的羊抗兔二抗 (sc-2054)

(美国 Santa Cruz 公司); ECL 化学发光液 (以色列 Bioind 公司); Cy3 标记的驴抗鼠二抗 (715-165-150)、FITC 标记的驴抗兔荧光二抗 (711-095-152) (美国 Jackson ImmunoResearch 公司); BCA 蛋白定量试剂盒 (北京盖宁金诺生物公司)。荧光显微镜 (德国 Leica 公司); 液相色谱-质谱联用仪 (liquid chromatograph-mass spectrometer, LC-MS) (美国 Waters 公司); SpeedVac 真空离心浓缩系统 (美国 Thermo Electron 公司)。

1.2 方法

1.2.1 Western blot 法检测 LSS 在大鼠角膜、晶状体和视网膜组织中的表达 戊巴比妥钠静脉注射过量麻醉法处死 3 只大鼠, 快速摘除眼球, 解剖显微镜下分离角膜、晶状体和视网膜, 按照每 0.1 g 组织加入 1 ml 组织裂解液的体系, 在各组织中加入相应体积的组织裂解液, 超声粉碎法提取组织蛋白。应用 BCA 蛋白定量检测试剂盒将组织总蛋白定量为 40 μ g, 将上述提取的各组织蛋白与上样缓冲液均匀加热后置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。用质量分数 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 1.5 h, 电压为 120 V; 转 PVDF 膜 2 h, 电流为 350 mA, 将 PVDF 膜用质量分数 5% 脱脂奶粉封闭后加入 LSS 兔多克隆抗体 (1 : 800) 和 GAPDH 兔多克隆抗体 (1 : 1000), 分别 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗 5 min, 共 3 次, 加入 HRP 标记的羊抗兔二抗 (1 : 10 000), 室温孵育 2 h; TBST 洗 5 min, 共 3 次; ECL 化学发光法显影, 洗胶片, 晾干, 应用 Image J 图像分析软件测定吸光度 (A) 值, 以 GAPDH 为内参, 待测组织中 LSS 蛋白的表达量为目的条带 A 值/内参照 GAPDH A 值。

1.2.2 RT-PCR 法测定大鼠角膜、晶状体和视网膜组织中 LSS mRNA 的相对表达 戊巴比妥钠过量麻醉法处死大鼠 3 只, 快速摘除眼球, 解剖显微镜下分离角膜、晶状体和视网膜, 匀浆后用 Trizol 分别提取总 RNA, 用 RT 试剂盒进行逆转录反应, 合成的 cDNA 进行 PCR 循环。LSS (Gene ID: 81681) 上游引物: 5'-TGAGATGTGGCTGCTTCCTG-3', 下游引物: 5'-AGGCTGGTACTGTGGAAACG-3'; 内参照 GAPDH 上游引物: 5'-ACAGCCGCATCTTCTTGTG-3', 下游引物: 5'-GGCCTGACTGTGCCGTTGAATTT-3', 进行 RT-

PCR 检测。PCR 反应体系为 25.00 μl :cDNA 0.50 μl , 上下游引物各 1.00 μl , dNTP 1.00 μl , PCR 缓冲液 2.50 μl , Taq 酶 0.25 μl , ddH₂O 18.75 μl 。PCR 扩增条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 50 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,共 28 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 7 min。取 PCR 产物进行凝胶电泳,应用 Image J 图像分析软件对产物条带 A 值进行分析,结果以 GAPDH 标准化。

1.2.3 免疫荧光化学法检测 LSS 在大鼠角膜、晶状体和视网膜组织中的表达 戊巴比妥钠麻醉 3 只大鼠,用质量分数 4% 多聚甲醛经心脏灌注,摘取眼球,混合固定液固定 30 min,4% 多聚甲醛后固定过夜,分离角膜、晶状体和视网膜,梯度蔗糖(先用质量分数 20% 蔗糖溶液,后用 30% 蔗糖溶液)脱水,冰冻切片,进行免疫荧光化学法检测。冰冻切片清洗后滴加体积分数 10% 驴血清封闭,室温孵育 2 h,滴加兔抗鼠 LSS 多克隆抗体(ab80364)(1:50)和 NeuN 鼠单克隆抗体(1:200)或 GS 鼠单克隆抗体(1:200),湿盒 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜后 PBS 洗 5 min,共 3 次,滴加 FITC 标记驴抗兔或 Cy3 标记的驴抗鼠荧光二抗(1:200)孵育 2 h,DAPI 染核 15 min,洗涤封片后荧光显微镜下观察组织中 LSS 的表达。

1.2.4 LC-MS 检测羊毛甾醇在角膜、晶状体和视网膜组织中的含量 戊巴比妥钠过量麻醉法处死 3 只大鼠,快速摘除眼球,解剖显微镜下分离角膜、晶状体和视网膜,在 600 μl 冰氯仿/甲醇(体积比 1:2)中匀浆器匀浆,匀浆后再依次加入 300 μl 氯仿和 450 μl KCl,离心半径 8 cm,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 14 000 r/min 离心 5 min,将下层有机相转移至新 EP 管,水相用 300 μl 氯仿再次提取 2 遍。收集所有有机相,Speedvac 真空抽干,干燥后的脂质提取物重新悬浮于 100 ml 甲醇中,涡流搅拌 5 min,用 80 W 超声处理 15 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 12 000 r/min 离心 5 min,然后将上清液转移到新的离心管,共离心处理 3 次。采用 UPLC/Quattro 仪器和 Thermo Hypersil Gold 吸附柱进行超高效液相色谱分析。以体积分数 60% 甲醇为流动相,流速为 0.2 ml/min,样品化合物进样 5 μl 。质谱通过大气压化学电离源(atmospheric pressure chemical ionization, APCI),反应条件:锥孔电压 20 V,源温度为 120 $^{\circ}\text{C}$,APCI 探头温度为 400 $^{\circ}\text{C}$,洗脱剂和锥孔气流流速分别为 700 L/h 和 5 L/h。上述 LC-MS 分析化合物采用的是多反应检测扫描模式。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件(Statistical Package for Social Sciences, Inc, Chicago, Illinois, USA)进行统计分析。本研究中检测指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检

验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数经 Levene 检验证实方差齐。大鼠角膜组织与晶状体中 LSS 蛋白及其 mRNA 相对表达量以及 2 种组织中羊毛甾醇含量的差异比较均采用独立样本 *t* 检验。采用双尾检测法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠角膜、晶状体和视网膜组织中 LSS 蛋白的表达

Western blot 法检测均可见大鼠角膜、晶状体组织中 LSS 蛋白的表达条带,而视网膜组织中未检测到 LSS 表达条带。角膜组织中和晶状体中 LSS 蛋白的相对表达量分别为 0.25 ± 0.03 和 0.43 ± 0.05 ,晶状体中 LSS 蛋白的相对表达量明显高于角膜组织,差异有统计学意义($t = -5.35, P < 0.01$)(图 1)。

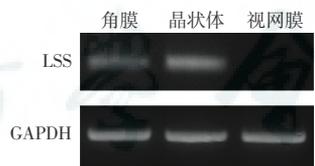


LSS:羊毛甾醇合成酶;GAPDH:磷酸甘油酸脱氢酶

图 1 Western blot 法检测 LSS 在大鼠角膜、晶状体和视网膜中的表达 大鼠视网膜中未见 LSS 蛋白表达条带,晶状体中 LSS 的表达条带强于角膜组织中的表达

2.2 大鼠角膜、晶状体和视网膜组织中 LSS mRNA 的表达

RT-PCR 法检测结果显示,大鼠角膜和晶状体组织中均有 LSS mRNA 的表达,而视网膜中未检测到 LSS mRNA 的表达。大鼠角膜和晶状体组织中 LSS 的 mRNA 的相对表达量分别为 0.29 ± 0.02 和 0.51 ± 0.04 ,晶状体组织中 LSS mRNA 的相对表达量明显高于角膜组织,差异有统计学意义($t = -8.34, P < 0.01$)(图 2)。



LSS:羊毛甾醇合成酶;GAPDH:磷酸甘油酸脱氢酶

图 2 RT-PCR 法检测大鼠角膜、晶状体和视网膜组织中 LSS mRNA 表达 大鼠视网膜中未见 LSS mRNA 表达条带,晶状体中 LSS mRNA 表达条带强于角膜组织中的表达

2.3 LSS 在大鼠角膜、晶状体和视网膜组织中的表达和定位

免疫荧光化学法检测结果显示,LSS 主要表达于角膜上皮、基质和内皮层角膜细胞的细胞质(图 3);在晶状体中,LSS 主要表达在晶状体上皮和皮质,而在晶状体核和囊膜中无表达(图 4);LSS 在视网膜组织无阳性表达。LSS 与神经元特异性标志物 NeuN 以及 Müller 细胞特异性标志物 GS 间没有共定位表达,即 LSS 在视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC)和 Müller 细胞中无表达(图 5)。

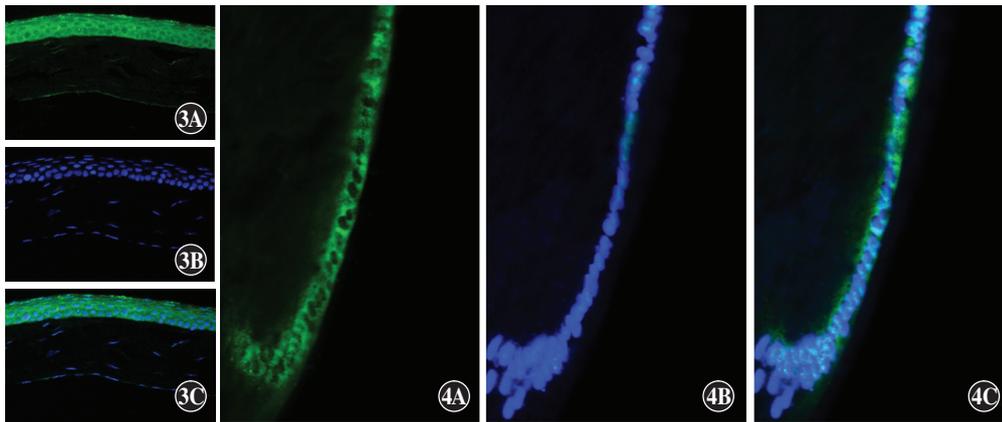
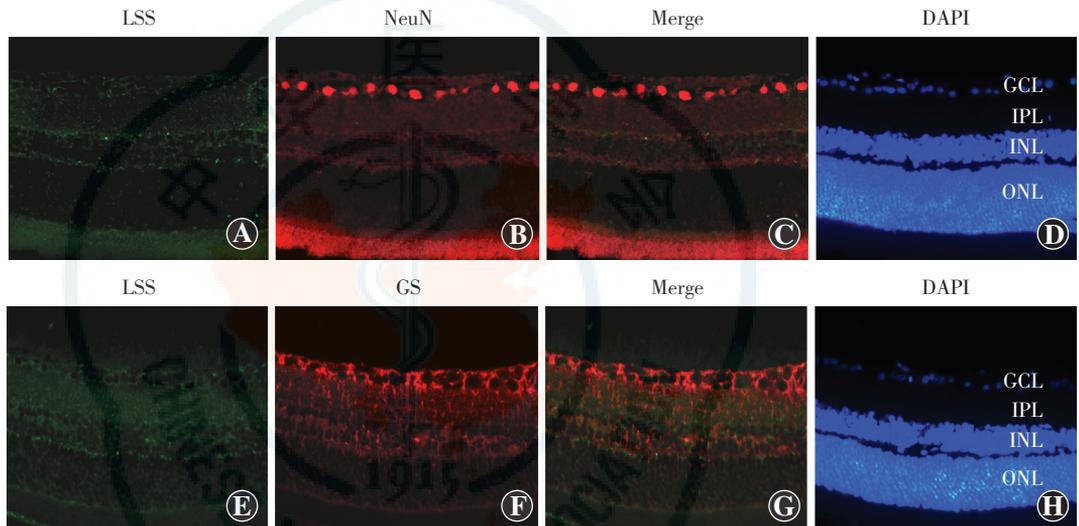


图 3 免疫荧光染色法检测 LSS 蛋白在大鼠角膜组织中的表达
 A:大鼠角膜各层细胞质中 LSS 的表达呈绿色荧光 (FITC ×200)
 B:角膜各层组织中细胞核呈蓝色荧光 (DAPI ×200) C:图 A 和图 B 的融合图 (×200) **图 4 免疫荧光染色法检测 LSS 蛋白在大鼠晶状体组织中的表达**
 A:LSS 蛋白在晶状体上皮和皮质细胞中呈绿色荧光,而在晶状体核和囊膜中未见表达 (FITC ×200) B:晶状体赤道部上皮和皮质细胞中细胞核呈蓝色荧光 (DAPI ×200) C:图 A 和图 B 的融合图 (×200)

图 5 免疫荧光染色法检测 LSS 蛋白在大鼠视网膜组织中的表达
 A、E:LSS 蛋白在大鼠视网膜神经节细胞层、内核层可见微量表达,呈绿色荧光 (FITC ×200) B:神经节细胞层可见 NeuN 呈阳性表达,呈红色荧光 (Cy3 ×200) C: Merge 显示 LSS 与 NeuN 标记的神经节细胞不存在共定位 (×200) D、H:大鼠视网膜组织中细胞核呈蓝色荧光 (DAPI ×200) F: Müller 细胞中可见 GS 阳性表达,呈红色荧光 (Cy3 ×200) G: Merge 显示 LSS 与 GS 标记的 Müller 细胞不存在共定位 (×200) LSS:羊毛甾醇合酶;GCL:神经节细胞层;IPL:内丛状层;INL:内核层;ONL:外层



2.4 羊毛甾醇在大鼠角膜、晶状体和视网膜组织中的含量测定

LC-MS 法检测结果显示,大鼠角膜、晶状体组织中存在羊毛甾醇,而视网膜中未检测到羊毛甾醇。大鼠角膜组织中羊毛甾醇的相对含量为(5.31±0.58)ng/mg,晶状体中为(24.37±2.91)ng/mg,与角膜组织比较,晶状体中的羊毛甾醇含量明显较高,差异有统计学意义 ($t = -11.13, P < 0.01$) (图 6)。

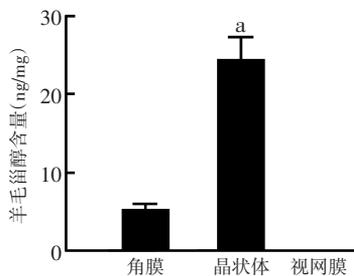


图 6 LC-MS 法检测的大鼠角膜、晶状体和视网膜组织中羊毛甾醇含量的比较
 与角膜组织中羊毛甾醇含量相比, $^a P < 0.01$ (独立样本 t 检验, $n = 3$)

3 讨论

研究表明, LSS 参与多种疾病的发生和发展,如高脂血症和肿瘤等, LSS 抑制剂能够抑制胆固醇的合成,

减少其在细胞内的堆积,从而发挥血脂代谢的作用,防止高脂血症的发生^[6],并影响肿瘤细胞的黏附和迁移^[7],抑制前列腺肿瘤新生血管的发生^[8]; LSS 能够调节激素受体表达,影响人类乳腺癌细胞的增生和生长活力^[9-10]。在高脂血症中, LSS 是除他汀类药物外的降血脂药作用的靶点,可能减少他汀类药物产生的不良反应^[11]。另外,有实验表明 LSS 还可以保护间歇缺氧所致的肝细胞损伤,可能通过调节细胞中三酰甘油水平参与阻塞性睡眠呼吸暂停的发生^[12]。

研究证实, LSS 在人体多种疾病的发生和发展中发挥抑制作用,目前, LSS 在角膜中的分布及其意义的研究鲜见报道。于昕航等^[13]曾用人参皂苷治愈单纯疱疹病毒性角膜炎,而人参皂甙是一种与羊毛甾醇结构相似的三萜类化合物。钟文等^[14]及杨艳等^[15]也研究发现,人参皂苷 Rg3 抑制角膜新生血管的生长。研究表明,另一种羊毛甾醇结构类似物 2-氨基-3,12-二氧代齐墩果烷-1,9-二烯-28-酸-甲酯可以降低 α -平滑肌肌动蛋白、胶原和纤维连接蛋白的产生,进而抑制角膜成纤维细胞向成纤维细胞的分化^[16],因此推测羊毛

甾醇可能存在于角膜组织中。本研究结果显示, LSS 及羊毛甾醇主要表达于角膜上皮细胞中, 提示 LSS 及羊毛甾醇可能对维持角膜及眼表健康发挥重要作用, 也可能参与角膜上皮细胞的再生, 在角膜上皮损伤修复中发挥重要作用。

中山眼科中心、四川大学以及美国加州大学圣地亚哥分校组成的联合研究团队曾分析了 2 个遗传性白内障家系的 DNA 序列, 发现 LSS 的 2 个突变位点 (W581R 和 G588S), 证实 LSS 可能与人类白内障的发生有关, 且发现犬玻璃体腔注射羊毛甾醇后能够解聚晶状体蛋白质, 逆转晶状体混浊^[3]。Shumiya 大鼠 (Shumiya cataract rat, SCR) 是具有遗传性白内障特点的品系, 通过对 SCR 基因的定位克隆, 发现其 20 号染色体上的 LSS 可能是白内障发生的致病基因^[4], 还有报道显示 LSS 抑制剂可导致小鼠和犬发生晶状体混浊^[5], 其机制可能与细胞膜产物减少、纤维细胞生长受限有关^[17]。本研究结果显示, LSS 及羊毛甾醇多表达在晶状体上皮细胞和浅层皮质中, 这一结果与之前国内外研究者的研究结果一致^[3-4], 提示 LSS 及羊毛甾醇可能影响晶状体上皮细胞的增生、迁移和凋亡, 进而在不同类型白内障的发生和发展过程中发挥不同的作用。

除此之外, 已有研究报道人参皂苷 Rg3、人参总皂苷等参与人晶状体上皮细胞生长、抗氧化的调节, 降低过氧化物歧化酶的含量, 提示其有强的抗氧化能力, 可预防白内障的发生^[18-19]。Asha 等^[20]研究证实, 羽扇豆醇可降低晶状体中超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶等抗氧化酶的活性, 抑制丙二醛和活性氧的生成, 进而阻止亚硒酸钠引起的大鼠白内障。

LSS 与视网膜相关的研究报道较少, 但已有研究发现, 在视网膜血管阻塞和年龄相关性黄斑变性等患者中, 人参皂苷 Rg1 可明显增强视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞的抗凋亡能力^[21-22]。Lee 等^[23-24]研究发现, 一种三萜类化合物熊果酸能降低 RPE 细胞中核转录因子 κ B 的活性, 减轻光辐射引起的 RPE 细胞 DNA 的氧化损伤。Cano 等^[25]研究发现, 三萜类化合物 CDDO-Im 可对抗吸烟引起的 RPE 细胞炎症反应和氧化损伤。人参茎叶总皂甙、人参皂苷 Rg1 及 Rg3、人参三醇组皂苷、人参皂苷 Rb1 对 RPE 细胞的增生均有直接抑制作用^[21, 25-27], 提示人参皂苷有望成为预防增生性玻璃体视网膜病变的有效药物。研究发现, 人参皂苷 Rh2 和 Rg3 能显著下调血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和细胞间黏附分子的表达, 抑制视网膜血管内皮细胞的增生和迁移, 进而预防糖尿病视网膜

病变的发生^[28-29]。Maeng 等^[30]研究发现, 人参皂苷 Rk1 可明显抑制视网膜血管内皮细胞的通透性, 减少糖尿病小鼠视网膜血管的渗漏。姚红娥等^[31]研究发现, 人参皂苷 Re、Rg1 和 Rb1 可抑制大鼠视网膜 Müller 细胞的增生。此外, 也有学者研究表明人参皂苷 Rg1 可有效降低视网膜氧化应激程度, 改善大鼠视神经损伤后神经元的凋亡^[32-34]。本研究对 LSS 及羊毛甾醇在视网膜中的表达进行研究, 未发现 NeuN 与 GS 的共表达, 这些结果提示 LSS 及羊毛甾醇在正常大鼠视网膜中可能不表达或仅有微量表达, 与其他研究发现的多种三萜类羊毛甾醇类似物在视网膜视神经损伤中均发挥保护作用的结果不符^[31-34], 推测 LSS 及羊毛甾醇可能在视网膜疾病中也能发挥一定的保护作用, 但其具体作用还需进一步研究。

综上所述, 本研究中通过观察大鼠角膜、晶状体、视网膜中 LSS 和羊毛甾醇的表达及分布, 发现 LSS 及羊毛甾醇在正常大鼠的角膜和晶状体组织中均有表达, 而在视网膜组织中无表达, 提示 LSS 及羊毛甾醇可能与某些角膜疾病或晶状体疾病的预防、发生或转归有关。我们拟选择不同的眼部疾病模型进一步进行相关研究, 进而揭示羊毛甾醇与角膜、晶状体和视网膜疾病的关系及其机制。

参考文献

- [1] 秦玉芝, 赵小英, 邓克勤, 等. 甾醇生物合成中的关键酶——环角鲨烯环化酶的分子生物学研究[J]. 生命科学研究, 2007, 11(1): 10-15.
Qin YZ, Zhao XY, Deng KQ, et al. Development on the molecular biology of oxidosqualene cyclase-the key enzyme in sterols biosynthesis[J]. Life Sci Res, 2007, 11(1): 10-15.
- [2] Huff MW, Telford DE. Lord of the rings-the mechanism for oxidosqualene: lanosterol cyclase becomes crystal clear[J]. Trends Pharmacol Sci, 2005, 26(7): 335-340. DOI:10.1016/j.tips.2005.05.004.
- [3] Zhao L, Chen XJ, Zhu J, et al. Lanosterol reverses protein aggregation in cataracts[J]. Nature, 2015, 523(7562): 607-611. DOI: 10.1038/nature14650.
- [4] Mori M, Li G, Abe I, et al. Lanosterol synthase mutations cause cholesterol deficiency-associated cataracts in the Shumiya cataract rat[J]. J Clin Invest, 2006, 116(2): 395-404. DOI:10.1172/JCI20797.
- [5] Pyrah IT, Kalinowski A, Jackson D, et al. Toxicologic lesions associated with two related inhibitors of oxidosqualene cyclase in the dog and mouse[J]. Toxicol Pathol, 2001, 29(2): 174-179. DOI: 10.1080/019262301317052440.
- [6] Dang H, Liu Y, Pang W, et al. Suppression of 2, 3-oxidosqualene cyclase by high fat diet contributes to liver X receptor-alpha-mediated improvement of hepatic lipid profile[J]. J Biol Chem, 2009, 284(10): 6218-6226. DOI:10.1074/jbc.M803702200.
- [7] Murai T. Cholesterol lowering: role in cancer prevention and treatment[J]. Biol Chem, 2015, 396(1): 1-11. DOI:10.1515/hsz-2014-0194.
- [8] Solomon KR, Pelton K, Boucher K, et al. Ezetimibe is an inhibitor of tumor angiogenesis[J]. Am J Pathol, 2009, 174(3): 1017-1026. DOI:10.2353/ajpath.2009.080551.
- [9] Grinter SZ, Liang Y, Huang SY, et al. An inverse docking approach for identifying new potential anti-cancer targets[J]. J Mol Graph Model, 2011, 29(6): 795-799. DOI:10.1016/j.jmgl.2011.01.002.
- [10] Liang Y, Besch-Williford C, Aebi JD, et al. Cholesterol biosynthesis inhibitors as potent novel anti-cancer agents: suppression of hormone-

- dependent breast cancer by the oxidosqualene cyclase inhibitor RO 48-8071 [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, 146 (1) : 51-62. DOI: 10.1007/s10549-014-2996-5.
- [11] Morand OH, Aebi JD, Dehmlow H, et al. Ro 48-8071, a new 2,3-oxidosqualene: lanosterol cyclase inhibitor lowering plasma cholesterol in hamsters, squirrel monkeys, and minipigs; comparison to simvastatin [J]. *J Lipid Res*, 1997, 38 (2) : 373-390.
- [12] Zhen YQ, Wu YM, Sang YH, et al. 2,3-Oxidosqualene cyclase protects liver cells from the injury of intermittent hypoxia by regulating lipid metabolism [J]. *Sleep Breath*, 2015, 19 (4) : 1475-1481. DOI: 10.1007/s11325-015-1167-1.
- [13] 于昕航, 王淑霞, 谢兰, 等. 人皂甙治疗单疱病毒性角膜炎临床观察 [J]. *吉林医学情报*, 1992, (1) : 20-22.
- [14] 钟文, 戴功, 李国锋, 等. 人皂甙 Rg3 抑制角膜新生血管生长的实验研究 [J]. *中华眼外伤职业眼病杂志*, 2010, 32 (4) : 261-264. Zhong W, Dai G, Li GF, et al. Suppression effects of ginsenoside Rg3 on rat corneal neovascularization [J]. *Chin J Ocul Traumatol Occupat Eye Dis*, 2010, 32 (4) : 261-264.
- [15] 杨艳, 张明昌. 人皂甙 Rg3 在大鼠角膜新生血管中的作用研究 [J]. *眼科研究*, 2007, 25 (8) : 580-583. Yang Y, Zhang MC. Effect of ginsenoside Rg3 on cautery-induced rat corneal neovascularization [J]. *Chin Ophthalmol Res*, 2007, 25 (8) : 580-583.
- [16] Kuriyan AE, Lehmann GM, Kulkarni AA, et al. Electrophilic PPARgamma ligands inhibit corneal fibroblast to myofibroblast differentiation *in vitro*; a potentially novel therapy for corneal scarring [J]. *Exp Eye Res*, 2012, 94 (1) : 136-145. DOI: 10.1016/j.exer.2011.11.018.
- [17] Trapani L, Segatto M, Ascenzi P, et al. Potential role of nonstatin cholesterol lowering agents [J]. *IUBMB Life*, 2011, 63 (11) : 964-971. DOI: 10.1002/iub.522.
- [18] 赵颖, 刘丹. 人皂甙 Rg3 对人晶状体上皮细胞生长的抑制作用 [J]. *国际眼科杂志*, 2011, 11 (1) : 25-27. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.01.009. Zhao Y, Liu D. Effects of ginsenoside Rg3 on proliferation of cultured human lens epithelial cells [J]. *Int J Ophthalmol*, 2011, 11 (1) : 25-27. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.01.009.
- [19] 杨宁, 王丽. 人皂甙对 H₂O₂ 诱导的大鼠白内障的抑制作用相关实验研究 [J]. *黑龙江医药科学*, 2013, 36 (1) : 51-52.
- [20] Asha R, Gayathri Devi V, Abraham A. Lupeol, a pentacyclic triterpenoid isolated from *Vernonia cinerea* attenuate selenite induced cataract formation in Sprague Dawley rat pups [J]. *Chem Biol Interact*, 2016, 245 : 20-29. DOI: 10.1016/j.cbi.2015.12.002.
- [21] 鹿庆, 马丽萍, 王津津, 等. 人皂甙 Rg1、Rb1 和维生素 E 对氧化损伤的牛视网膜色素上皮细胞 bcl-2 表达的影响 [J]. *中华眼底病杂志*, 2000, 16 (2) : 122.
- [22] Li KR, Zhang ZQ, Yao J, et al. Ginsenoside Rg-1 protects retinal pigment epithelium (RPE) cells from cobalt chloride (CoCl₂) and hypoxia assaults [J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8 (12) : e84171 [2016-09-12]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0084171>. DOI: 10.1371/journal.pone.0084171.
- [23] Lee YH, Kumar NC, Glickman RD. Modulation of photochemical damage in normal and malignant cells by naturally occurring compounds [J]. *Photochem Photobiol*, 2012, 88 (6) : 1385-1395. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2012.01156.x.
- [24] Lee YH, Wang E, Kumar N, et al. Ursolic acid differentially modulates apoptosis in skin melanoma and retinal pigment epithelial cells exposed to UV-VIS broadband radiation [J]. *Apoptosis*, 2014, 19 (5) : 816-828. DOI: 10.1007/s10495-013-0962-z.
- [25] Cano M, Thimmalappala R, Fujihara M, et al. Cigarette smoking, oxidative stress, the anti-oxidant response through Nrf2 signaling, and age-related macular degeneration [J]. *Vision Res*, 2010, 50 (7) : 652-664. DOI: 10.1016/j.visres.2009.08.018.
- [26] 李晓华, 王作书, 王瑞卿, 等. 人皂甙组皂甙对人视网膜色素上皮细胞增生和 DNA 合成的抑制作用 [J]. *中国实验诊断学*, 2011, 15 (8) : 1303-1305. DOI: 10.3969/j.issn.1007-4287.2011.08.025. Li XH, Wang ZS, Wang RQ, et al. The inhibition on RPE cell proliferation and DNA synthesis by PTS [J]. *Chin J Lab Diag*, 2011, 15 (8) : 1303-1305. DOI: 10.3969/j.issn.1007-4287.2011.08.025.
- [27] 王作书, 李晓华, 明月. 人皂甙 Rb1 对人视网膜色素上皮细胞 DNA 合成的抑制作用 [J]. *中国实验诊断学*, 2012, 16 (9) : 1553-1555.
- [28] 杨成明, 刘伟, 赵燕颖, 等. 人皂甙 Rb1 抑制缺氧条件下人视网膜血管内皮细胞增殖及整合素 αvβ3 表达的研究 [J]. *中国老年学杂志*, 2008, 28 (6) : 557-559.
- [29] 曹亮, 宋愈, 吴莹, 等. 人皂甙 Rg3 对正常和缺氧条件下人视网膜血管内皮细胞的作用 [J]. *中华眼底病杂志*, 2013, 29 (2) : 183-187. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2013.02.015. Cao L, Song Y, Wu Y, et al. The effect of ginsenoside Rg3 on human retinal capillary endothelial cells cultured in normal and hypoxia condition [J]. *Chin J Ocul Fund Dis*, 2013, 29 (2) : 183-187. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2013.02.015.
- [30] Maeng YS, Maharjan S, Kim JH, et al. Rk1, a ginsenoside, is a new blocker of vascular leakage acting through actin structure remodeling [J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8 (7) : e68659 [2016-06-12]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0068659>. DOI: 10.1371/journal.pone.0068659.
- [31] 姚红娥, 张梅, 徐杪, 等. 人皂甙提取物对大鼠视网膜 Müller 细胞的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2014, 25 (5) : 1025-1028. Yao HE, Zhang M, Xu M, et al. Study the effect of ginsenoside extractions on rat retinal Müller cell [J]. *Lishizhen Med Mat Med Res*, 2014, 25 (5) : 1025-1028.
- [32] 方庆, 陆卫华, 赵智刚, 等. 人皂甙 Rg1 对大鼠视网膜神经节细胞的保护作用 [J]. *实用医学杂志*, 2011, 27 (9) : 1548-1550. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2011.09.011.
- [33] 郭小东, 胡楚璇, 刘洁, 等. 球周注射人皂甙 Rg1 对大鼠视神经钳夹损伤影响的临床病理观察 [J]. *中国实用眼科杂志*, 2013, 31 (11) : 1482-1487. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1006-4443.2013.11.030. Guo XD, Hu CX, Liu J, et al. The clinicopathological observation of ginsenoside Rg1 periocular injection on rat optic nerve damage [J]. *Chin J Pract Ophthalmol*, 2013, 31 (11) : 1482-1487. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1006-4443.2013.11.030.
- [34] 曹妍群, 黄凯, 罗特坚. 人皂甙 Rg1 对视网膜氧化应激损伤的保护作用 [J]. *神经解剖学杂志*, 2015, 31 (4) : 515-519. Cao YQ, Huang K, Luo TJ. The protective effect of Ginsenoside on the oxidative stress injury of rats' retina [J]. *Chin J Neuroanat*, 2015, 31 (4) : 515-519.

(收稿日期: 2016-10-20)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)

· 病例报告 ·

康柏西普联合光动力疗法治疗视网膜血管瘤样增生随访一例

毛剑波 褚梦琪 沈丽君 陈亦棋 吕喆

325000 温州医科大学附属眼视光医院杭州院区

通信作者: 沈丽君, Email: slj@mail.eye.ac.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.03.004

基金项目: 国家科技重大专项(2014ZX09303301); 浙江省医学重点学科建设计划项目(2016CXXK2); 浙江省医药卫生平台项目(2016RCB012)

患者, 女, 59 岁, 于 2014 年 9 月 15 日因右眼视力下降 1 年余于温州医科大学附属眼视光医院就诊。2014 年 6 月于杭州

市第二人民医院行黄斑区光凝治疗, 原因不详。否认全身其他病史。眼科检查: 右眼最佳矫正视力 (best corrected visual