

## · 实验研究 ·

# p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 在兔外伤性增生性玻璃体视网膜病变发生和发展中的抑制作用

袁志刚 由彩云 韩金栋 李海燕 颜华

300052 天津医科大学总医院眼科[袁志刚(现在山西省眼科医院玻璃体视网膜病科)、由彩云、韩金栋、颜华];030002 太原,山西省眼科医院病理科(李海燕)

通信作者:颜华,Email:phuayan2000@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.05.008

**【摘要】背景** p21 是一种细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂,能阻止细胞从 G<sub>1</sub> 期进入 S 期,抑制细胞增生,研究认为内源性 p21 表达的动态变化可能与细胞增生性病变有关。外伤性增生性玻璃体视网膜病变(PVR)是眼部增生性反应相关性疾病,了解 PVR 过程中 p21 表达的动态变化可能为 PVR 的靶向治疗提供依据。

**目的** 检测 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 在兔外伤性 PVR 中的动态变化,探讨其在外伤性 PVR 发病机制中的作用。**方法** 选取青紫兔 54 只,采用随机数字表法将实验兔随机分为正常对照组(6 只)和造模后 7、14、21 和 28 d 组(每组 12 只),每只兔任意选取一眼作为实验眼。各模型组兔眼玻璃体腔注射人富含血小板血浆(PRP)0.4 ml,同时于鼻上方角巩膜缘后 5 mm 处行巩膜外冷冻约 5 s,以建立外伤性 PVR 模型。各组兔眼行眼部 B 型超声检查以评估建模情况。分别于造模后 7、14、21 和 28 d 以过量麻醉法处死实验兔并制备实验眼视网膜组织切片,采用苏木精-伊红染色法检测兔眼视网膜的形态表现,分别采用免疫组织化学染色、Western blot 及逆转录 PCR(RT-PCR)法检测兔眼视网膜中 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白及其 mRNA 的相对表达。**结果** 正常对照组兔眼眼前后节均正常,模型组兔造模后 1~7 d 兔眼玻璃体中增生条索逐渐变粗,可见视网膜皱褶,造模后 14 d 兔眼出现牵引性视网膜脱离,造模后 28 d 兔眼漏斗状视网膜脱离。视网膜病理组织学检查显示,造模后 7 d 兔眼视网膜表面有增生膜和炎性细胞聚集,造模后 28 d 可见视网膜呈花瓣形固定皱褶,视网膜结构紊乱。免疫组织化学染色显示,p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白在正常对照组兔眼视网膜神经节细胞层及内核层的细胞核内呈强阳性表达,造模后 7、14、21 和 28 d 表达强度减弱,以造模后 14 d 表达量最低。Western blot 结果显示,正常对照组和造模后 7、14、21 和 28 d 组兔眼视网膜中 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白相对表达量分别为 0.74±0.08、0.60±0.05、0.56±0.03、0.74±0.02 和 0.65±0.04,组间总体比较差异有统计学意义( $F=20.55, P=0.00$ ),造模后 7 d 和 14 d 的表达量均明显低于正常对照组和造模后 21 d 和 28 d 组,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ )。RT-PCR 结果显示,正常对照组和造模后 7、14、21 和 28 d 组兔眼视网膜中 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> mRNA 的相对表达量分别为 0.65±0.09、0.57±0.05、0.45±0.04、0.46±0.02 和 0.47±0.04,总体比较差异有统计学意义( $F=18.06, P=0.00$ ),造模后 14、21 和 28 d P21<sup>WAF1/CIP1</sup> mRNA 的相对表达量均明显低于正常对照组和造模后 7 d 组,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ )。**结论** p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 在外伤性 PVR 兔眼视网膜中的动态表达变化与 PVR 的病程发展过程相吻合,p21 可能参与外伤性 PVR 发生和发展的病理过程,p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 表达量的下降与细胞增生的动态变化过程一致,可能促进了 PVR 的进展。

**【关键词】** 细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 p21/分析;增生性玻璃体视网膜病变;视网膜脱离/并发症;眼外伤;动物模型;兔

**基金项目:** 天津市应用基础与前沿技术研究计划重点项目(12JCYBJC33900)

**Suppressing effect of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> on traumatic proliferative vitreoretinopathy in rabbits** Yuan Zhigang, You Caiyun, Han Jindong, Li Haiyan, Yan Hua

Department of Ophthalmology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China (Yuan ZG [now Department of Retinal Disease, Shanxi Eye Hospital], You CY, Han JD, Yan H); Department of Pathology, Shanxi Eye Hospital, Taiyuan 030002, China (Li HY)

Corresponding author: Yan Hua, Email: phuayan2000@163.com

**【Abstract】Background** p21 is a cyclin-dependent kinase inhibitor, and it can prevent cells from going through the G<sub>1</sub>/S phase checkpoint and inhibit cell proliferation. Studies determined that the expression level of

p21<sup>WAF1/CIP1</sup> is associated with proliferative diseases. Traumatic proliferative vitreoretinopathy (PVR) is a proliferative response of eye. Understanding the relationship of dynamic expression levels of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> in PVR is of significance for the prevention and management of PVR. **Objective** This study was to investigate the expression of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> during the course of experimental traumatic PVR in rabbits. **Methods** Fifty-four pigmented rabbits were randomized into the normal control group and different experimental groups, and one lateral eye of each rabbit served as experimental eye. PVR models were established by intravitreal injection of human platelet-rich plasma (PRP) (0.4 ml) combined with cryotherapy for 5 seconds, and vitreous and retinas were examined with B type sonography. The rabbits were sacrificed in 7, 14, 21 and 28 days after operation, and histopathological examination of the retinas was performed by haematoxylin and eosin stain. The expression levels of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> protein and gene were detected by immunohistochemistry, Western blot and reverse transcription-PCR (RT-PCR). The use and care of the rabbits complied with Statement of ARVO. **Results** B type sonography showed that the retinal morphology was normal in the normal control group. However, the proliferative membrane was gradually thickened 1 to 7 days after operation. Retinal folds of rabbits were seen in 7 days, and tractional retinal detachment was found in 14 days and 28 days after operation. The histopathological examination of the retinas showed epiretinal membrane and infiltration of inflammatory cells 7 days and fixed ruffle 28 days after operation. The p21<sup>WAF1/CIP1</sup> was strongly expressed in the cell nucleus of retinal ganglion cell layer (GCL) and inner nuclear layer (INL) in the normal control group, and the expression was gradually weakened after modeling, with the weakest expression in the retinas in 14 days after modeling. The relative expression levels of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> protein was 0.74±0.08, 0.60±0.05, 0.56±0.03, 0.74±0.02 and 0.65±0.04 in the normal control group, postoperative 7-day group, postoperative 14-day group, postoperative 21-day group and postoperative 28-day group, respectively, showing a significant difference among the groups ( $F = 20.55, P = 0.00$ ), and the expression levels of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> protein were significantly lower in the postoperative 7-day group and postoperative 14-day group than those of the normal control group, postoperative 21-day group and postoperative 28-day group (all at  $P < 0.05$ ). The relative expression levels of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> mRNA was 0.65±0.09, 0.57±0.05, 0.45±0.04, 0.46±0.02 and 0.47±0.04 in the normal control group, postoperative 7-day group, postoperative 14-day group, postoperative 21-day group and postoperative 28-day group, respectively, with a significant difference among the groups ( $F = 18.06, P = 0.00$ ), and the expression levels were significantly lower in the postoperative 14-day group, postoperative 21-day group and postoperative 28-day group than those of the normal control group and postoperative 7-day group (all at  $P < 0.05$ ). **Conclusions** The dynamic expression of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> in the retinas is consistent with the progression of traumatic PVR, and the reduce tendency of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression is similar to cell proliferation change, indicating that reduce of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression in the retinas may promote the development of traumatic PVR.

**[Key words]** Cyclin-dependent kinase inhibitor p21/analysis; Vitreoretinopathy, proliferative/etiology; Retinal detachment/complications; Ocular trauma; Disease model, animal; Rabbits

**Fund program:** Tianjin Application Basic and Frontier Technology Research Plan Key Project (12JCYBJC33900)

外伤引起的增生性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 是开放性眼外伤的严重并发症, 是眼内损伤的过度修复过程, 损伤修复时多种增生细胞在视网膜表面聚集, 引起增生性玻璃体视网膜病变<sup>[1]</sup>, 可导致牵拉性视网膜脱离<sup>[2]</sup>, 最终致眼球萎缩<sup>[3-4]</sup>。目前, PVR 的发病机制仍不十分清楚, 研究抑制 PVR 的方法和途径对 PVR 的防治具有重要的临床意义。研究表明, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 是一种细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂, 可与细胞周期蛋白依赖性激酶、细胞周期蛋白和增生细胞核抗原组成复合体, 阻止细胞从 G<sub>1</sub> 期进入 S 期, 引起细胞周期停止, 抑制细胞增生<sup>[5]</sup>, 但 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 在 PVR 的形成过程中是否能够发挥抑制细胞增生作用尚不清楚。本研究检测

p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白在外伤性 PVR 模型兔视网膜组织中的表达, 探讨 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 在外伤性 PVR 发生和发展中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 成年青紫兰兔 54 只 (由天津医科大学动物中心提供), 体质量 1.5 ~ 2.5 kg, 雌雄不限, 应用随机数字表法将实验兔随机分成对照组 (6 只) 和造模后 7、14、21 和 28 d 组 (每组 12 只), 各造模组兔均任意选取一眼作为实验眼。实验动物的使用和喂养遵循 ARVO 声明。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 鼠抗兔 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 多克隆抗体 (AP021, 1:100, 上海碧云天生物技术公司); 鼠抗兔

p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 抗体(一抗)(SC-6246, 1:200, 美国 Santa Cruz 公司);辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG(二抗)超敏即用型二步法(非生物素)检测试剂盒(1:2000)、DAB 染色试剂盒(北京中杉生物技术公司);Trizol 液(上海生物工程技术有限公司)。自动脱水机、石蜡切片机(德国 Leica 公司);光学显微镜(日本 Olympus 公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 外伤性 PVR 动物模型的建立

采用质量分数 3.2% 枸橼酸钠离心管收集健康体检者静脉血 25 ml, 离心半径 7.2 cm, 1500 r/min 离心 10 min, 获得含  $4 \times 10^8$  ml 血小板的血浆共 10 ml, 即富含血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)。实验兔肌肉注射盐酸赛拉嗪注射液行全身麻醉, 剂量为 0.4 ml/kg, 并用质量分数 0.4% 盐酸奥布卡因滴眼液点眼 3 次行表面麻醉, 开睑器开睑, 暴露颞上方巩膜, 于角膜缘后 3.5 mm 依次切开球结膜及巩膜, 切口长度约为 6 mm, 剪除脱出的玻璃体约 0.5 ml, 用 7-0 可吸收缝线间断缝合巩膜及球结膜切口, 玻璃体腔注射 PRP 0.4 ml, 同时于鼻上方角巩膜缘后 5 mm 处行巩膜外冷冻约 5 s。分别于术后 1、3、7、14、21 和 28 d 点复方托吡卡胺滴眼液充分扩瞳, 采用间接检眼镜及 B 型超声检查眼后节改变。

### 1.2.2 免疫组织化学染色检测兔视网膜中 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白的表达

(1) 实验眼组织的病理组织学检查 分别于术后 7、14、21 和 28 d 用过量麻醉法处死实验兔, 摘出眼球, 用质量分数 4% 多聚甲醛固定 24 h, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 浸蜡和石蜡包埋后切片, 贴于经多聚赖氨酸处理的载玻片上, 同时正常对照组兔以相同的方法处理作为对照。每组兔 2 只眼任意取 2 张切片, 行常规苏木精-伊红染色, 光学显微镜下观察视网膜的炎症反应和形态学变化。(2) 免疫组织化学检测 将制备好的眼球常规二甲苯脱蜡, 用体积分数 3% 过氧化氢灭活内源性酶, 热修复抗原, 滴加一抗, 4℃ 孵育过夜, 用 PBS 代替一抗作为阴性对照; 滴加二抗工作液, 37℃ 孵育 30 min, DAB 显色 3~5 min, 自来水冲洗后苏木素复染, 脱水, 透明, 中性树胶封片, 光学显微镜下观察眼组织中 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白的表达。每组 6 只眼任意选取 6 张切片, 每张切片任意取 5 个视野, 采用 Image-Pro Plus 6.0 彩色图像分析系统进行分析。细胞核呈棕黄色或棕褐色染色者为 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白表达阳性, 用平均吸光度(A)值表示。

### 1.2.3 Western blot 法检测视网膜中 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白的表达

按照 1.2.3 的方法处死实验兔和正常对照兔, 于碎冰上去除兔眼眼前节组织和玻璃体, 剥取视网膜, 置入液氮中备用。将预冷的组织细胞裂解液按

1:6 的比例与视网膜标本混合, 4℃ 下充分匀浆。静置 1 h, 用高速冷冻离心机 12 000 r/min 离心 20 min, 将上清液与蛋白上样缓冲液(5 倍上样缓冲液、20 倍还原剂)充分混合, 100℃ 煮沸 5 min。用 Bradford 法定量测定蛋白, 每个泳道上样 25 μg, 用质量分数 10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 然后以半干法用 DYY-III40C 型电泳槽将凝胶上蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)上。用质量分数 0.5% 脱脂奶粉封闭膜, 室温放置 1.5 h, 加入鼠抗兔 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 抗体, 4℃ 摇床过夜。次日室温下用山羊抗小鼠 IgG/辣根过氧化物酶后孵育 1 h, 适量 ECL 发光剂与膜反应 3 min, 压片曝光 3 min。胶片扫描后采用 Quantity One 软件(美国 Bio-Rad 公司)计算不同条带的灰度值(吸光强度×面积), 以 β-actin 作为内参照, 目的蛋白的相对表达量=(条带灰度值/内参条带灰度值)×100%。

### 1.2.4 逆转录 PCR 法测定视网膜中 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> mRNA 的表达

采用 1.2.4 的方法获取视网膜标本, Trizol 液提取兔视网膜组织标本的总 RNA。采用紫外分光光度计测定波长为 260 nm 和 280 nm 处的吸光度(A)值, 计算出总 RNA 样本浓度。按说明书的步骤和方法合成 cDNA。引物由上海生物工程技术有限公司合成: p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 上游引物为 5'-GAACCATGTTGGGAGTGT-3', 下游引物为 5'-ACTGCTTATTGGTCTTGTG-3', 目的基因长度为 321 bp; β-actin 上游引物为 5'-AGTCGTTGGAGCGAGCAT-3', 下游引物为 5'-GTTTATAGCACTCTACGGTAC-3', 目的片断长度为 121 bp。p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 的扩增程序: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 58.5℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 35 个循环, 72℃ 再延伸 10 min。所得产物在琼脂糖凝胶中电泳分离, 采用凝胶成像分析系统测量 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 及 β-actin 扩增条带的产物含量(条带灰度值=强度×面积)及目的基因的相对表达量[(目的基因条带灰度值/内参基因条带灰度值)×100%]。

## 1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 W 检验符合正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用完全随机分组单因素干预多水平实验设计, 各组数据方差经 Levene 检验符合方差齐性。正常对照组及造模后 7 d 组、14 d 组、21 d 组和 28 d 组间兔眼视网膜中 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白及其 mRNA 相对表达量的差异比较均采用单因素方差分析, 组间的多重比较 LSD-t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 兔 PVR 模型眼的表现

造模后所有兔均健康成活,模型眼结膜及角膜上皮完整,术后未发生感染,无白内障形成。造模后 1 d,兔眼球结膜高度水肿,可见前房渗出,玻璃体呈灰白色混浊;造模后 3 d,兔眼前房形成渗出膜,玻璃体混浊加重,可见灰白色的玻璃体条索;造模后 7 d,兔眼前房渗出物较少,玻璃体混浊开始减轻,但玻璃体中增生条索逐渐变粗及增长,自伤口方向向后极部延伸,并牵拉视盘及髓线,可见髓线处视网膜皱褶。B 型超声检查显示,模型眼可见玻璃体混浊及增生条索(图 1A)。造模后 14 d,兔眼前节炎症反应再次加重,其中 3 只眼出现花瓣样虹膜后粘连,玻璃体内增生的牵拉膜增厚,出现牵引性视网膜脱离。造模后 28 d,兔眼发生广泛的或漏斗状视网膜脱离,B 型超声检查示视网膜脱离(图 1B)。

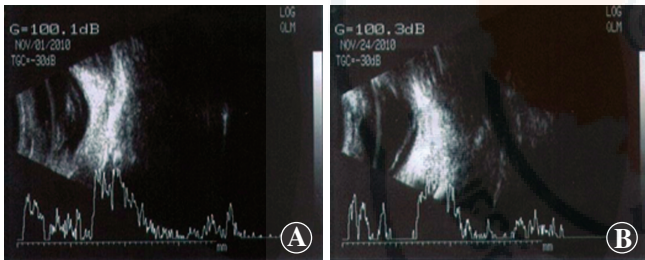


图 1 兔 PVR 模型眼的 B 型超声检查表现 A:造模后 7 d 可见兔眼玻璃体混浊及增生 B:造模后 14 d 可见兔眼视网膜脱离

### 2.2 兔 PVR 模型眼组织病理学表现

正常对照组兔眼视网膜结构正常,层次清晰,排列规则(图 2A),造模后 7 d,可见模型眼视网膜表面炎性渗出及细胞聚集(图 2B),造模后 28 d 模型眼视网膜脱离,形成花瓣样固定皱褶,视网膜结构紊乱(图 2C)。

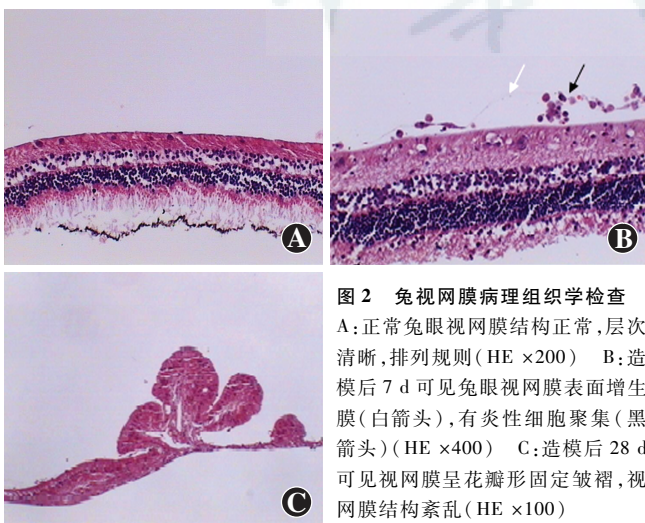


图 2 兔视网膜病理组织学检查 A:正常兔眼视网膜结构正常,层次清晰,排列规则(HE ×200) B:造模后 7 d 可见兔眼视网膜表面增生膜(白箭头),有炎性细胞聚集(黑箭头)(HE ×400) C:造模后 28 d 可见视网膜呈花瓣形固定皱褶,视网膜结构紊乱(HE ×100)

### 2.3 各组兔眼视网膜中 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白的表达

PVR 兔视网膜中可见 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白呈阳性表达,主要表达于视网膜神经节细胞层(ganglion cell layer, GCL)和内核层(inner nuclear layer, INL)细胞的细胞核,可见正常对照组兔眼视网膜中 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白染色最强,造模后各时间点兔眼视网膜中 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白均减弱(图 3)。正常对照组兔眼及造模后 7、14、21 和 28 d 兔眼视网膜中 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白表达量(平均 A 值)分别为 57.70 ± 4.21、54.28 ± 3.43、37.26 ± 4.33、41.10 ± 3.31 和 43.08 ± 4.74,总体比较差异有统计学意义( $F = 38.175, P = 0.000$ ),造模后 14 d 其表达量最低,与造模后 14、21 和 28 d 兔眼比较差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )(图 4)。

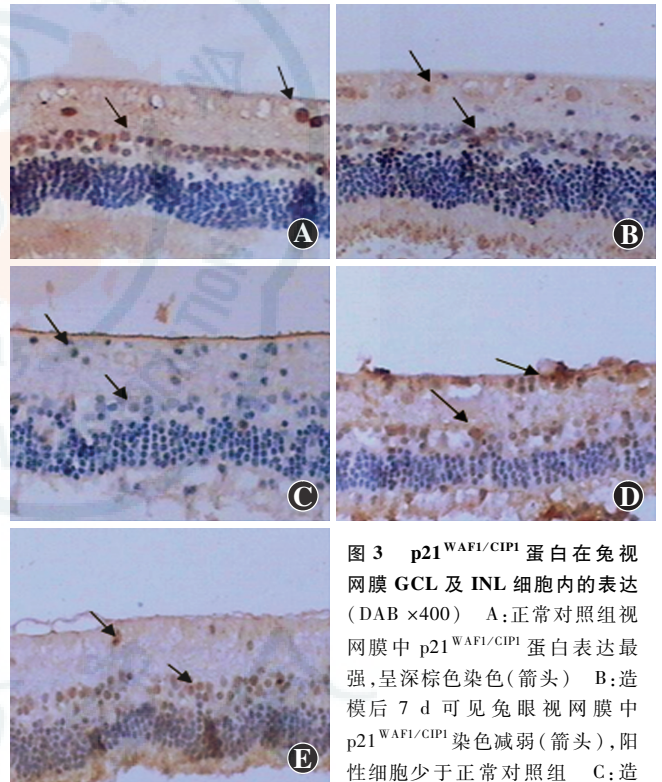


图 3 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白在兔视网膜 GCL 及 INL 细胞内的表达(DAB ×400) A:正常对照组视网膜中 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白表达最强,呈深棕色染色(箭头) B:造模后 7 d 可见兔眼视网膜中 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 染色减弱(箭头),阳性细胞少于正常对照组 C:造模后 14 d 兔眼视网膜中 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白表达最弱,呈淡棕色染色(箭头) D:造模后 21 d 兔眼视网膜中 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 呈棕色染色(箭头) E:造模后 28 d 兔眼视网膜中 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 阳性反应强于造模后 14 d,但弱于正常对照组(箭头)

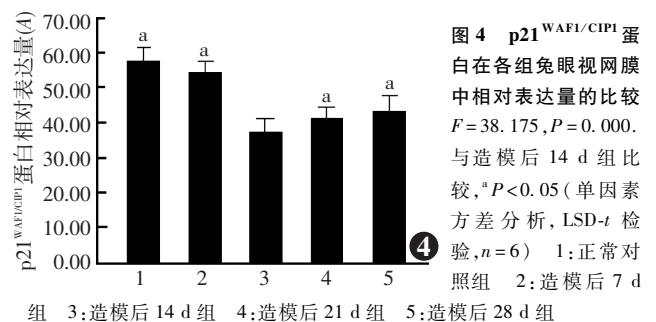


图 4 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白在各组兔眼视网膜中相对表达量的比较  $F = 38.175, P = 0.000$ . 与造模后 14 d 组比较,  $^*P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验,  $n = 6$ ) 1:正常对照组 2:造模后 7 d 组 3:造模后 14 d 组 4:造模后 21 d 组 5:造模后 28 d 组

### 2.4 各组 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白的相对表达量比较

Western blot 法检测结果显示,正常对照组兔视网膜中 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白的表达条带最强,造模后 7 d、14 d 表达强度减弱,此后逐渐增强。正常对照组及造模后 7、14、21 和 28 d 组兔视网膜中 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白的相对表达量分别为 0.74±0.08、0.60±0.05、0.56±0.03、0.74±0.02 和 0.65±0.04,组间总体比较差异有统计学意义 ( $F=20.55, P=0.00$ ),造模后 7 d 和 14 d p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白的相对表达量明显低于正常对照组及造模后 21 d 组和 28 d 组,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ ) (图 5)。

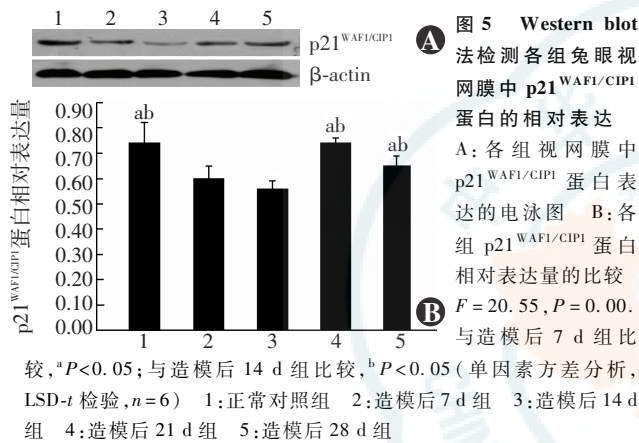


图 5 Western blot 法检测各组兔视网膜中 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白的相对表达量 A: 各组兔视网膜中 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白表达的电泳图 B: 各组 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白相对表达量的比较  $F=20.55, P=0.00$ .

### 2.5 各组兔视网膜中 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> mRNA 相对表达量的比较

正常对照组兔视网膜中 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白的表达条带最强,造模后表达强度减弱,其中造模后 14 d 表达强度最弱。正常对照组和造模后 7、14、21 和 28 d 组 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> mRNA 的相对表达量分别为 0.65±0.09、0.57±0.05、0.45±0.04、0.46±0.02 和 0.47±0.04,总体比较差异有统计学意义 ( $F=18.06, P=0.00$ ),造模后 14、21 和 28 d 组 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> mRNA 的相对表达量均明显低于正常对照组和造模后 7 d 组,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ ) (图 6)。

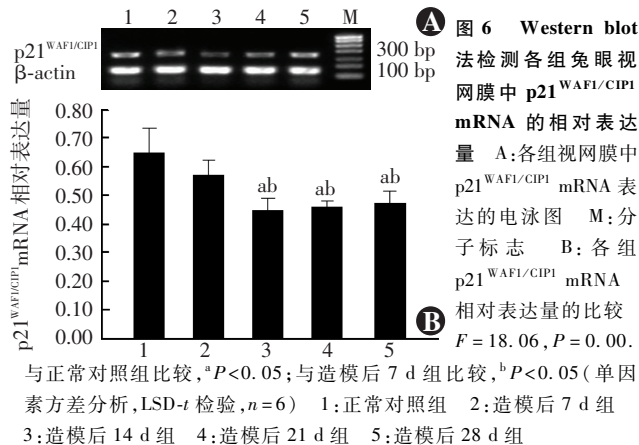


图 6 Western blot 法检测各组兔视网膜中 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> mRNA 的相对表达量 A: 各组兔视网膜中 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> mRNA 表达的电泳图 M: 分子标志 B: 各组 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> mRNA 相对表达量的比较  $F=18.06, P=0.00$ .

### 3 讨论

本研究中采用人 PRP 玻璃体腔注射联合巩膜外冷冻法成功建立兔外伤性 PVR 模型。人 PRP 含有大量的生长因子<sup>[6-7]</sup>,注射给动物后可产生强烈的免疫排斥反应,在各种生长因子及炎症因子的共同作用下刺激视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞、纤维母细胞、神经胶质细胞等增生并移行至视网膜表面,形成增生膜,从而导致 PVR;同时巩膜冷冻引起了血-视网膜屏障的破坏,因此可提高 PVR 造模的成功率。以往多用引入外源性细胞成分的方法建立 PVR 模型<sup>[8]</sup>,其病理过程与外伤性 PVR 的自然病程不十分吻合。本研究中的模型由于未引入外源性细胞,能够更好地模拟外伤性 PVR 的自然发病过程,造模过程操作简单,成模率高。本研究中兔眼造模后 28 d 眼 B 型超声检查显示模型眼视网膜脱离,病理组织学检查可见视网膜脱离增生形成的花节样结构,表明本实验的造模方法可成功建立外伤性 PVR 模型。

p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 是由 Harper 等<sup>[9]</sup>在 1993 年发现的细胞周期负性调节基因,可广泛抑制 Cyclin-CDK 复合物,影响 Rb 蛋白的磷酸化,阻断转录因子 E2F 的释放,使细胞周期停滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期<sup>[10-11]</sup>。p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 还可以抑制增生细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 与 DNA 聚合酶 δ 结合<sup>[12]</sup>,DNA 复制受到抑制,细胞增生减缓<sup>[13]</sup>,因此 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 在组织内的低表达可导致以细胞增生为特征的疾病。Faria 等<sup>[14]</sup>在研究抑癌基因 p53、p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 及 p27<sup>KIP1</sup> 在星形细胞瘤中表达水平时发现,随着肿瘤细胞恶性程度的增高,p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 呈低表达的趋势。赵成等<sup>[15]</sup>对视网膜母细胞瘤中 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 表达的研究中发现,p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 在视网膜母细胞瘤中的表达明显低于正常视网膜。以上研究表明,p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 低表达可能是肿瘤细胞等异常增生性疾病的发病机制之一。本研究中发现,p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白可在外伤性 PVR 兔模型眼 GCL 和 INL 细胞内表达,且其表达量随发病时间的延长明显减少,在 RPE 细胞内也观察到了同样的趋势。然而,由于在制作组织切片过程中视网膜神经上皮层脱离严重,未能观察到 RPE。

开放性眼外伤导致的眼组织损伤激发了一系列有序和复杂的细胞及细胞间质的生理病理反应,以促进新生组织的生成和损伤组织的修复<sup>[16-17]</sup>。组织修复的发展过程分为炎症期、增生期和瘢痕期,各期均有不同因素的参与和调节<sup>[18-19]</sup>。研究表明,眼外伤后 7 d

内为炎症期,主要为血-视网膜屏障的破坏及炎性介质的释放,临床表现为玻璃体混浊;眼外伤后 7~14 d 为增生期,表现为玻璃体腔尘状棕色 RPE 细胞的释放,灰色细胞团的增生及视网膜增生膜的形成,眼外伤后 14 d 行玻璃体手术时可见典型 PVR 改变<sup>[20]</sup>;眼外伤 14 d 后为瘢痕塑形期,细胞增生达到相当程度,纤维组织开始形成,瘢痕增生膜的收缩导致牵拉性视网膜脱离。本研究在 PVR 兔眼中发现,与正常对照组比较,造模后 7 d 兔眼 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 蛋白及其 mRNA 在视网膜中的表达量即明显下降,造模后第 14 天表达量最低,21 d 及 28 d 较前有所回升,这一动态变化与外伤性 PVR 的自然病程较吻合,提示 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 参与该病的发生和发展并在细胞的增生中发挥重要作用,可作为外伤性 PVR 治疗的潜在靶点。

### 参考文献

- [1] Boscher C, Ducourneau Y, Adelman RA, et al. Retinal progenitor cells contingents in the adult human eye with retinal injury: a specific differentiation potential according to the localization? [J]. *Exp Eye Res*, 2012, 105: 79-80. DOI: 10.1016/j.exer.2012.09.013.
- [2] Rouberol F, Denis P, Romanet JP, et al. Comparative study of 50 early- or late-onset retinal detachments after open or closed globe injury [J]. *Retina*, 2011, 31(6): 1143-1149. DOI: 10.1097/IAE.0b013e31819c22e.
- [3] Iandiev I, Bringmann A, Wiedemann P. Proliferative vitreoretinopathy-pathogenesis and therapy [J]. *Klin Monbl Augenheilkd*, 2010, 227(3): 168-174. DOI: 10.1055/s-0029-1245300.
- [4] Khan MA, Brady CJ, Kaiser RS. Clinical management of proliferative vitreoretinopathy: an update [J]. *Retina*, 2015, 35(2): 165-175. DOI: 10.1097/IAE.0000000000000447.
- [5] Jung YS, Qian Y, Chen X. Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity [J]. *Cell Signal*, 2010, 22(7): 1003-1012. DOI: 10.1016/j.cellsig.2010.01.013.
- [6] Takikawa M, Nakamura S, Nakamura S, et al. Enhancement of vascularization and granulation tissue formation by growth factors in human platelet-rich plasma-containing fragmin/protamine microparticles [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2011, 97(2): 373-380. DOI: 10.1002/jbm.b.31824.
- [7] Figueroa MS, Govetto A, Arriba-Palomero P. Short-term results of platelet-rich plasma as adjuvant to 23-G vitrectomy in the treatment of high myopic macular holes [J/OL]. *Eur J Ophthalmol*, 2015, 22: 10 [2015-12-08]. <http://www.eur-j-ophthalmol.com/article/fe9cd163-0a03-4479-ae52-3c63318b1429>. DOI: 10.5301/ejo.5000729.
- [8] Fastenberg DM, Diddie KR, Sorgente N, et al. A coroparison of different cellular inocular in an experimental model of massive periretinal proliferation [J]. *Am J Ophthalmol*, 1982, 93(5): 559-572.
- [9] Harper JW, Adami GR, Wei N, et al. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases [J]. *Cell*, 1993, 75(4): 805-816.
- [10] Zhang Z, Wang Z, Liu X, et al. Up-regulation of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> by small activating RNA inhibits the in vitro and in vivo growth of pancreatic cancer cells [J]. *Tumori*, 2012, 98(6): 804-811. DOI: 10.1700/1217.13507.
- [11] Kosaka M, Kang MR, Yang G, et al. Targeted p21<sup>WAF1/CIP1</sup> activation by RNAi inhibits hepatocellular carcinoma cells [J]. *Nucleic Acid Ther*, 2012, 22(5): 335-343. DOI: 10.1089/nat.2012.0354.
- [12] Jeffery DC, Kakusho N, You Z, et al. CDC28 phosphorylates Cdc1p and regulates the association of chromatin assembly factor I with chromatin [J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(1): 74-85. DOI: 10.4161/15384101.2014.973745.
- [13] Esteve-Puig R, Gil R, González-Sánchez E, et al. A mouse model uncovers LKB1 as an UVB-induced DNA damage sensor mediating CDKN1A (p21<sup>WAF1/CIP1</sup>) degradation [J/OL]. *PLoS Genet*, 2014, 10(10): e1004721 [2015-12-09]. <http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1004721>. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004721.
- [14] Faria MH, Patrocínio RM, Moraes Filho MO, et al. Immunoeexpression of tumor suppressor genes p53, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and p27 KIP1 in human astrocytic tumors [J]. *Arq Neuropsiquiatr*, 2007, 65(4B): 1114-1122.
- [15] 赵成, 游志鹏. p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 在视网膜母细胞瘤中的表达及意义 [J]. *眼科研究*, 2009, 27(10): 903-905. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2009.10.018.
- [16] 赵成, 游志鹏. p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 在视网膜母细胞瘤中的表达及意义 [J]. *眼科研究*, 2009, 27(10): 903-905. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2009.10.018.
- [17] Feng K, Wang CG, Hu YT, et al. Clinical features and prognosis of eyeball rupture: eye injury vitrectomy study [J]. *Clin Exper Ophthalmol*, 2015, 43(7): 629-636. DOI: 10.1111/ceo.12534.
- [18] Morescalchi F, Duse S, Gambicorti E, et al. Proliferative vitreoretinopathy after eye injuries: an overexpression of growth factors and cytokines leading to a retinal keloid [J/OL]. *Mediators Inflamm*, 2013, 269787 [2016-01-12]. <http://www.hindawi.com/journals/mi/2013/269787>. DOI: 10.1155/2013/269787.
- [19] 张琼, 陈松, 王昀, 等. 玻璃体视网膜手术治疗外伤性视网膜脱离合并增生性玻璃体视网膜病变的临床观察 [J]. *临床眼科杂志*, 2014, 22(2): 109-112. DOI: 10.3969/j.issn.1006-8422.2014.02.004.
- [20] 张琼, 陈松, 王昀, 等. 玻璃体视网膜手术治疗外伤性视网膜脱离合并增生性玻璃体视网膜病变的临床观察 [J]. *临床眼科杂志*, 2014, 22(2): 109-112. DOI: 10.3969/j.issn.1006-8422.2014.02.004.
- [21] Feng K, Hu Y, Wang C, et al. Risk factors, anatomical, and visual outcomes of injured eyes with proliferative vitreoretinopathy: eye injury vitrectomy study [J]. *Retina*, 2013, 33(8): 1512-1518. DOI: 10.1097/IAE.0b013e3182852469.
- [22] 马志中. 我国眼外伤近五年研究进展 [J]. *中华眼科杂志*, 2010, 46(10): 911-914. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2010.10.008.
- [23] Ma ZZ. Eye injuries in China: a five-year update [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2010, 46(10): 911-914. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2010.10.008.

(收稿日期: 2016-01-25)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)