

新型生物活性物质尾加压素 II 在人眼组织的分布

李坤鹏¹, 黄秀榕¹, 祁明信², 陈 义¹

基金项目: 中国福建省中医药重点资助项目 (No. Wzzb0601)
作者单位: ¹(350003) 中国福建省福州市, 福建中医药大学病理生理研究中心; ²(350003) 中国福建省福州市, 福建中医药大学附属第二人民医院眼科
作者简介: 李坤鹏, 男, 硕士, 研究方向: 白内障的基础与临床研究。
通讯作者: 黄秀榕, 女, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 白内障的基础与临床研究. qihuang@netease. com
收稿日期: 2011-04-22 修回日期: 2011-08-08

Distribution of new biological activity substance Urotensin-II in tissues of human eye

Kun-Peng Li¹, Xiu-Rong Huang¹, Ming-Xin Qi², Yi Chen¹

Foundation item: Fujian Provincial Key Project of Traditional Chinese Medicine, China (No. Wzzb0601)

¹Research Center of Pathophysiology, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, Fujian Province, China; ²Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, Fujian Province, China

Correspondence to: Xiu-Rong Huang. Research Center of Pathophysiology, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, Fujian Province, China. qihuang@netease. com

Received: 2011-04-22 Accepted: 2011-08-08

Abstract

• **AIM:** To study the distribution of Urotensin-II (U-II), a new biological activity substance in tissues of human eye.

• **METHODS:** The different tissues of normal fresh human eye were separated and homogenized, then the distributions of U-II were measured by radio-immunoassay.

• **RESULTS:** There were distributions of U-II in any tissues of human eye, ranging 0.807-32.958ng/g. The U-II content in optic nerve was the highest (32.958 ± 1.741ng/g), then sclera, iris, cornea, ciliary body, choroid, retina and lens in turn. The U-II content in vitreous body and aqueous humor were the lowest. The U-II content in optic nerve was 40.4 times of that in aqueous humor.

• **CONCLUSION:** U-II is distributed in tissues of human eye widely. Its effects of physiology and pathophysiology need to further study.

• **KEYWORDS:** Urotensin II; human eye; distribution

Li KP, Huang XR, Qi MX, et al. Distribution of new biological

activity substance Urotensin-II in tissues of human eye. *Guji Yanke Zazhi(Int J Ophthalmol)* 2011;11(11):1899-1901

摘要

目的: 探讨新型生物活性物质尾加压素 II (Urotensin II, U-II) 在人眼组织的分布。

方法: 将正常新鲜人眼解剖分离出各部分组织并作匀浆后, 采用放射免疫测定法检测 U-II 在人眼各组织的分布。

结果: U-II 在人眼各组织均有分布, 范围在 0.807 ~ 32.958ng/g 之间, 其中以视神经中的含量最高 (32.958 ± 1.741ng/g), 其后依次为巩膜、虹膜、角膜、睫状体、脉络膜、视网膜、晶状体、玻璃体和房水中的含量最低。视神经中 U-II 含量是房水中的 40.4 倍。

结论: U-II 广泛分布于人眼各组织, 其生理和病理生理作用有待于进一步探讨。

关键词: 尾加压素 II; 人眼; 分布

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.11.009

李坤鹏, 黄秀榕, 祁明信, 等. 新型生物活性物质尾加压素 II 在人眼组织的分布. 国际眼科杂志 2011;11(11):1899-1901

0 引言

尾加压素 II (Urotensin II, U-II) 最早是从硬骨鱼的尾部下垂体中提取的一种神经肽^[1], U-II 是一种具有多种生物学效应的新型生物活性物质, 是迄今为止发现的最强的缩血管肽, 其缩血管效应是内皮素 (endothelin, ET) 的 10 倍以上^[2]。研究发现, U-II 广泛存在于从软体动物到哺乳动物的多个系统和器官中, 其中尤以神经系统中的含量最高^[3,4]。眼球是神经和血管极为丰富的器官, 探讨 U-II 在眼组织的分布对揭示其在眼部的生理及病理效应具有重要价值。本研究采用放射免疫法检测 U-II 在人眼内各组织中的分布情况。

1 材料和方法

1.1 材料 新鲜人眼来自福建省第二人民医院眼科角膜移植手术后剩余的正常眼球组织。试剂: 人 U-II (human Urotensin II, hU-II) 放免试剂盒购自美国 Phoenix Pharm Inc。试剂盒中的抗体与 U-II (人) 的交叉反应率为 100%, 与 U-II (大鼠) 和 U-II (小鼠) 的交叉反应率分别为 3% 和 6%, 与其它多种生物活性因子的交叉反应率为 0。实验用冰醋酸为市场分析纯产品。仪器: 同光路眼科手术显微镜 (中国 LZL-16)、全自动 γ 免疫计数器 (西安 FJ2003PS)、深低温冰箱 (日本 MDF-V5410)、高速低温离心机 (上海 TGL-16G 型)、微量移液器 (法国 GILSON)、微量电子天平 (上海 FA2004)、电热式压力消毒器 (上海 YXQ. SG41)。

1.2 方法 样本制备: 取新鲜人眼球, 在手术台上角膜移

植手术开始时于同光路眼科手术显微镜下用注射器自角膜缘抽取房水待测。在角膜移植手术取完角膜后,将剩余眼球组织带到实验室,在另一台手术显微镜下用眼科显微手术器械小心分离出剩余的角膜组织以及巩膜、虹膜、睫状体、脉络膜、晶状体、玻璃体、视网膜、视神经各组织。在微量电子天平上称取一定量湿重组织后,分别将组织充分剪碎,放入装有10mL/L醋酸溶液0.5~1.5mL的玻璃匀浆器中。将匀浆器置于沸水中煮沸10min,待煮沸后的组织冷却后置于冰水中进行匀浆。将匀浆液用低温高速离心机4℃,3000g离心15min,抽取上清液放入1mL离心管中,连同房水标本置-80℃冰箱中保存待测。U-II放免试剂盒检测U-II在眼组织中的含量:用150mL蒸馏水稀释放射免疫反应(radio-immuno-assay,RIA)缓冲液,用于重溶其它试剂及稀释样品。取RIA缓冲液重溶标准肽、兔抗肽血清和样品。按实验要求制备不同浓度标准肽液。在12mm×75mm聚苯乙烯管中建立最初的RIA反应体系。用RIA缓冲液重溶¹²⁵I-肽,制得示踪液。并将其浓度调至8000~10000cpm/100μL。各管加入示踪液,涡旋混匀,4℃孵育16~24h。用RIA缓冲液重溶羊抗兔IgG血清及正常兔血清。除TC管外,每管中加入等量羊抗兔IgG血清及正常兔血清液。涡旋混匀,所有管放室温孵育90min。除TC管外,分别取RIA缓冲液加入其它各管后涡旋混匀,4℃,3000r/min离心20min,吸去上清液。用γ免疫计数仪检测沉淀物的cpm值,用微机系统自行进行结果计算。

统计学分析:应用SPSS 12.0统计软件分析。所有结果用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。相邻两组间采用*t*检验,各组间数据比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),*P*<0.05为有统计学差异。

2 结果

U-II在人眼各组织中分布的研究结果见表1。U-II在人眼各组织中均有分布,其含量从高到低依次为视神经、巩膜、虹膜、角膜、睫状体、脉络膜、视网膜、晶状体、玻璃体和房水。与眼内其它组织相比,U-II在视神经中含量最高(*P*<0.01);U-II在玻璃体和房水中含量最低(*P*<0.01);视神经中U-II含量是房水的40.4倍,是玻璃体的31.08倍。视神经、巩膜和虹膜三者间U-II含量无显著性差异(*F*=3.379,*P*>0.05);睫状体和脉络膜间U-II含量无显著性差异(*F*=12.147,*P*>0.05);玻璃体和房水中的U-II含量无显著性差异(*F*=4.622,*P*>0.05)。

3 讨论

1998年Coulouarn首次从人体中克隆出hU-II以来,相继对U-II在体内的分布有了零星的报道。1999年Ames等^[3]发现心血管组织中含有hU-II,且hU-II主要分布在中枢神经系统和内分泌组织中,并指出人体内一种孤立的G蛋白耦联受体(G-protein-coupling receptor, GPCR)—GPCR14是U-II的特异性受体。Maguire等^[5]发现hU-II受体密度在骨骼肌组织和大脑皮质较高,其次为肾皮质和左心室,而在心房和传导组织则很低。另外,Shenouda等^[6]的研究报道,U-II存于在肺和肾组织中。Coulouarn等^[4]则发现hU-II前体mRNA在肾脏、脾脏、小肠、胸腺、前列腺、脑垂体和肾上腺等组织均有表达,在胃、胰腺、卵巢和肝脏中也有微量的表达。

表1 尾加压素-II在人眼各组织的分布 (ng/g, $\bar{x} \pm s$, *n*=6)

	U-II	<i>t</i>	<i>P</i>
房水	0.807 ± 0.025		
玻璃体	1.049 ± 0.088	-2.026	0.136
晶状体	2.269 ± 0.232	-5.304	0.006
视网膜	4.381 ± 0.243	-7.137	0.002
脉络膜	7.718 ± 0.421	-5.337	0.003
睫状体	9.730 ± 1.166	-1.775	0.136
角膜	13.174 ± 0.817	-2.985	0.031
虹膜	24.531 ± 2.520	-3.988	0.010
巩膜	26.812 ± 2.376	-0.621	0.562
视神经	32.958 ± 1.741	-2.601	0.060

本文采用临床角膜移植所用正常眼球的剩余材料,用放射免疫方法检测人眼各种组织中的U-II含量。结果发现,U-II在人眼内10种组织中都有分布,其范围在0.807~32.958ng/g之间。按照U-II在人眼内的含量多少,依次为视神经、巩膜、虹膜、角膜、睫状体、脉络膜、视网膜、晶状体、玻璃体和房水。视神经和巩膜的U-II含量均显著高于其它各组织;玻璃体和房水中的U-II含量最少。视神经中U-II含量是房水的40.4倍,是玻璃体的31.08倍。

U-II和ET-1都是体内具有强烈缩血管作用的物质。已有的研究表明^[7],ET-1在眼部的分布与血管的分布明显相关,其在血管最丰富的脉络膜、睫状体和虹膜中的含量最高。但本研究结果表明,在富含血管的葡萄膜,除了虹膜的U-II含量较高外,睫状体和脉络膜的U-II含量并不高;而本研究发现U-II含量最高的视神经和巩膜的血管并不丰富,尤其是巩膜除了少量供应血管外,只是部分血管穿行的通道。因此本研究结果提示,U-II在眼部的含量与血管的分布并无明显的相关性。有研究指出^[3,8],U-II在血管组织中有其受体的大量分布,U-II本身在血管组织中的分布并不明显,这与本研究所见基本一致。这些均提示U-II可能是非血管源性的。

有关U-II在体内其它组织分布的研究表明,hU-II主要在中枢神经系统中表达^[3,4]。本研究也发现人眼视神经中U-II含量显著高于眼内其他组织。视神经主要由视网膜神经节细胞纤维汇聚而成,虽然视神经起始于视乳头,属于周围神经系统,但从胚胎和解剖上均属于中枢神经系统。U-II在视神经的高分布表明,U-II在眼部的分布可能与神经分布有关。

本研究还发现,眼内胶原成分较高的组织中U-II含量均较多。视神经几乎完全由视网膜神经节细胞发出的纤维所组成,外面被视神经鞘膜所包裹,是硬脑膜、蛛网膜和软脑膜三层脑膜延续而来的。本研究所得到的眼球标本的视神经主要为球内段,即包括视乳头和筛板部分,眶内段部分较短,一般不超过2mm,视神经的总重量在10~20mg之间。在球内段,巩膜组织外2/3层向后伸展,构成视神经鞘的硬膜,巩膜组织内1/3层横过巩膜管,作为视神经的支架,即筛板。因此本研究所用的视神经中含有一些巩膜成分,而巩膜主要是由胶原组织组成的。本研究结果显示,视神经和巩膜的U-II含量显著高于眼内多种其它组织,因此推测U-II的高分布可能与胶原组织有关。虹膜、角膜等其它含胶原较丰富的组织中U-II含量也相对较高。虽然玻璃体的有形成分中也含有较多胶原,但玻

璃体中主要成分是水,约占99%,所以其中的U-II含量较少。其它各种眼部组织中所含胶原都较少,U-II含量也不高。有研究指出^[9],U-II能浓度依赖地增加体外培养的心肌成纤维细胞外基质中I型胶原 mRNA 的表达。这说明U-II高浓度与胶原的表达强度相关,但胶原的含量高是否就能说明U-II的浓度一定高,还值得进一步研究。关于组织中U-II的来源,有研究指出^[10],U-II是一种旁分泌/自分泌的生物活性物质。本研究发现,U-II在眼部的分布与血管的分布并无明显的相关性,提示U-II是非血管源性的,是否有可能是由眼局部组织分泌的,有待进一步探讨。

目前对组织和血浆中U-II含量的检测方法以放射免疫法居多。放射免疫分析法检测U-II含量的优点是特异、敏感、精确、简单易行。但放射免疫测定仍属免疫化学反应,还有赖于抗原、抗体的生物活性,受很多因素的影响,不如其它物理或化学方法稳定性大。从目前报道的研究结果^[11,12]可见,采用放射免疫法检测,不同实验室检测U-II在正常人群血浆中的浓度尽管有差异,但大部分还都是ng/g或ng/L水平。因此,检测时只要注意控制实验条件,如微量操作的准确性、仪器设备的精确性、药品试剂的纯度等,把系统误差控制在最小的程度,结果之间仍然是有可比性的。本研究注意了对系统误差的控制,对人眼各组织的检测结果显示,U-II在人眼内的含量也为ng/g水平,同时揭示了U-II在人眼内分布的状况,因此本研究结果是可信的。

本研究结果在国内外首次揭示了U-II在眼部各组织的分布状况,它将为进一步研究U-II在眼部的生理及病理生理效应奠定了可靠的基础^[13]。

参考文献

- 1 Pearson D, Shively JE, Clark BR, et al. Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77(8):5021-5024
- 2 Luo P, Canziania G, Amesty G, et al. A molecular basis for functional

- peptide mimicry of carbohydrate antigen. *J Biol Chem* 2000;275(21):16146-16154
- 3 Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, et al. Human urotensin II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* 1999;401(6750):282-286
- 4 Coulouarn Y, Lihmann I, Jegou S, et al. Cloning of cDNA encoding the urotensin precursor in frog and human reveals intense expression of urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(26):15803-15808
- 5 Maguire JJ, Kue RE, Davenport AP. Ophren-receptor ligand human urotensin II: receptor localization in human tissues and comparison of vasoconstrictor responses with endothelin-1. *Br J Pharmacol* 2000;131(3):441-446
- 6 Shenouda A, Douglas SA, Ohlstein EH, et al. Localization of urotensin-II immunoreactivity in normal human kidneys and renal carcinoma. *J Histochem Cytochem* 2002;50(7):885-889
- 7 Chakravarth U, Douglas AJ, Bailie JR, et al. Immunoreactive endothelin distribution in ocular tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35(5):2448
- 8 Gibson A, Conyears S, Bern HA. The influence of urotensin II on calcium flux in the rat aorta. *J Pharm Pharmacol* 1988;40(12):893-895
- 9 何艳华,洪介民,郭衡山,等. 尾加压素II对培养的心脏成纤维细胞增殖和胶原基因表达的影响. *第一军医大学学报* 2004;24(5):505-508
- 10 Matsushita M, Shichiri M, Fukai N, et al. Urotensin II is an autocrine/paracrine growth factor for the porcine renal epithelial cell line, LLCPK1. *Endocrinology* 2003;144(5):1825-1831
- 11 钟萍,李志梁,吴宏超,等. 充血性心力衰竭患者血浆尾加压素II变化的临床研究. *第一军医大学学报* 2003;23(2):121-123
- 12 Balat O, Aksoy F, Kutlar I, et al. Increased plasma levels of Urotensin-II in preeclampsia eclampsia: a new mediator in pathogenesis? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005;120(1):33-38
- 13 Suguro T, Watanabe T, Kodate S, et al. Increased plasma urotensin-II levels are associated with diabetic retinopathy and carotid atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus. *Clin Sci (Lond)* 2008;115(11):327-334