

结膜松弛症结膜组织及泪液中黏蛋白的表达变化

项敏泓¹, 陈星星¹, 周欢明¹, 贾元玲¹, 李青松¹, 张兴儒¹, 盛霞²

基金项目: 上海市卫生及计划生育委员会资助项目 (No. 20124108); 上海市普陀区自主创新科研基金 (No. 2013PTKW009)

作者单位: (200062) 中国上海市, 上海中医药大学附属普陀医院¹眼科; ²病理科

作者简介: 项敏泓, 女, 毕业于上海第二医科大学, 硕士, 硕士研究生导师, 副主任医师, 副主任, 研究方向: 眼表泪液学、白内障、青光眼、视网膜疾病。

通讯作者: 项敏泓. xiangminhong@sohu.com

收稿日期: 2016-12-24 修回日期: 2017-04-10

Study on the expression of mucin in conjunctival tissue and tear in eyes with conjunctivochalasis

Min-Hong Xiang¹, Xing-Xing Chen¹, Huan-Ming Zhou¹, Yuan-Ling Jia¹, Qing-Song Li¹, Xing-Ru Zhang¹, Xia Sheng²

Foundation items: Shanghai Municipal Health and Family Planning Commission Project (No. 20124108); Independent Innovation Research Foundation of Putuo District Shanghai (No. 2013PTKW009)

¹Department of Ophthalmology; ²Department of Pathology, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai Traditional Chinese Medicine University, Shanghai 200062, China

Correspondence to: Min - Hong Xiang. Department of Ophthalmology, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai Traditional Chinese Medicine University, Shanghai 200062, China. xiangminhong@sohu.com

Received: 2016-12-24 Accepted: 2017-04-10

Abstract

• **AIM:** To investigate the expression of mucin in the conjunctival tissue and tear in eyes with conjunctivochalasis (CCh).

• **METHODS:** Thirty-eight cases (38 eyes) of CCh were recruited as the CCh group and 36 cases (36 eyes) without CCh were included as the normal control group and the conjunctival tissue and tear were collected, respectively. Mucins (MUC2, MUC4, MUC5AC, MUC16) expression in conjunctival tissue were detected by immunohistochemical staining; Mucins (MUC2, MUC4, MUC5AC, MUC16) OD value in tear were determined by ELISA, the differences of which were compared between the CCh and normal control group.

• **RESULTS:** No difference in the expression of MUC2 and MUC4 in conjunctival epithelia was observed between the two groups ($P = 0.315$, $P = 0.156$). There

was significant difference in the expression of MUC5AC and MUC16 in conjunctival epithelia between the two groups ($P = 0.016$, $P < 0.01$, respectively). No significant difference in the OD value of MUC2 in tear was found between the two groups ($P = 0.651$). The OD value of MUC4 and MUC5AC in tear were significantly lower in CCh group than in the normal control group ($P < 0.01$, $P < 0.01$, respectively), so was the OD value of MUC16 ($P = 0.022$).

• **CONCLUSION:** MUC5AC and MUC16 both decreased in the conjunctiva and tear of eyes with CCh. The further study may reveal the pathogenesis of conjunctivochalasis.

• **KEYWORDS:** conjunctivochalasis; mucin; conjunctival tissue; tear

Citation: Xiang MH, Chen XX, Zhou HM, et al. Study on the expression of mucin in conjunctival tissue and tear in eyes with conjunctivochalasis. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017;17(5): 857-860

摘要

目的: 观察结膜松弛症结膜组织和泪液中黏蛋白的表达变化, 探讨结膜松弛症的发病机制。

方法: 收集结膜松弛症组 38 例 38 眼和正常对照组 36 例 36 眼的结膜组织和泪液标本, 分别行免疫组织化学染色检测结膜组织中黏蛋白 (MUC2、MUC4、MUC5AC、MUC16) 表达情况, ELISA 检测泪液中黏蛋白 (MUC2、MUC4、MUC5AC、MUC16) A 值, 结果行统计学分析, 比较两组之间的差异。

结果: 结膜松弛症组的结膜上皮细胞中 MUC2、MUC4 与正常对照组表达无统计学差异 ($P = 0.315$ 、 0.156); 结膜松弛症组的结膜上皮细胞中 MUC5AC、MUC16 阳性表达细胞较正常对照组明显减少, 差异有统计学意义 ($P = 0.016$ 、 < 0.01)。结膜松弛症组泪液中 MUC2 的 A 值与正常对照组无统计学差异 ($P = 0.651$), 结膜松弛症组中 MUC4、MUC5AC 的 A 值较正常对照组明显降低, 有显著的统计学差异 (均 $P < 0.01$), 结膜松弛症组中 MUC16 的 A 值较正常对照组下降, 差异有统计学意义 ($P = 0.022$)。
结论: 结膜松弛症患者结膜组织和泪液中 MUC5AC 和 MUC16 均下降, 对其进一步研究可能揭示结膜松弛症的发病机制。

关键词: 结膜松弛症; 黏蛋白; 结膜组织; 泪液

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2017.5.13

引用: 项敏泓, 陈星星, 周欢明, 等. 结膜松弛症结膜组织及泪液中黏蛋白的表达变化. *国际眼科杂志* 2017;17(5):857-860

0 引言

正常的眼表覆盖一层泪膜,其中水分占98.2%,蛋白质约占0.7%。泪膜稳定是维持眼表健康的基础,任何原因引起泪液成分的改变都会引起泪膜的不稳定,导致临床症状的产生。黏蛋白(Mucin, MUC)是泪膜的主体,被泪液中的水分所水化,水化的黏蛋白成凝胶样将泪膜水液层固定于其下的结膜和角膜表面,稳定泪膜。人类黏蛋白家族至少包括24种,目前已证实存在于人类的黏蛋白有MUC1~2、3A、3B、4、5AC、5B、6~21和24,眼表的黏蛋白主要由结膜杯状细胞以及角膜和结膜上皮细胞分泌^[1-2]。许多眼部疾病均可出现黏蛋白异常,其中干眼症近年日益受到高度重视,干眼症患者的眼表黏蛋白分泌减少,泪膜完整性破坏。结膜松弛症(conjunctivochalasis, CCH)属于泪液动力学异常型干眼,是由于球结膜过度松弛和(或)下睑缘张力高,造成松弛球结膜堆积在眼球与下睑缘、内、外眦部之间形成皱褶引起眼表泪液学异常^[3]。研究发现结膜松弛症患者出现泪膜稳定性下降,泪液分泌减少,泪液中羊齿状结晶减少,因此泪液中黏蛋白异常可能是导致结膜松弛症发生发展的重要原因^[4]。但是具体是何种黏蛋白出现异常未见文献报导。因此,本文就结膜松弛症患者结膜组织及泪液中的黏蛋白表达情况进行研究,以期对结膜松弛症的治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料 2015-05/2016-04 收集结膜松弛症组38例38眼,其中男13例13眼,女25例25眼,年龄63~79(平均73.5±3.9)岁。结膜松弛症组的临床分级为Ⅱ级10眼,Ⅲ级22眼,Ⅳ级6眼。正常对照组36例36眼为老年性白内障手术病例,其中男12例12眼,女24例24眼,年龄65~80(平均72.6±4.5)岁。

1.1.1 结膜松弛症组入选标准 参照 Zhang 等^[3] 提出的结膜松弛症诊断与分级标准:(1)患者有干涩、异物感、泪溢、视物模糊、视疲劳、疼痛等症状;(2)裂隙灯检查松弛结膜成皱褶堆积在下睑缘、内、外眦部之间,影响泪河,堵塞泪小点,引起结膜充血、水肿;且结膜松弛症分级≥Ⅱ级;(3)泪小点大小、位置无异常,泪道冲洗通畅;无鼻腔病变或异常;无睑缘内、外翻及倒睫;(4)经规范药物等保守治疗3mo无明显效果,经医院伦理委员会及患者知情同意自愿要求手术治疗的患者。

1.1.2 正常对照组入选标准 (1)随机选择单纯白内障超声乳化手术的病例,无眼部其他不适主诉;(2)裂隙灯检查眼表形态结构无异常,无结膜松弛症,年龄匹配;(3)经患者知情并同意签字后为正常对照组。

1.1.3 主要试剂 鼠抗 MUC2 抗体、鼠抗 MUC4 单克隆抗体、兔抗 MUC5AC 抗体、兔抗 MUC16 抗体(1:200,美国 sigma 公司),羊抗鼠二抗、羊抗兔二抗(北京中杉金桥公司)用于结膜组织免疫组织化学染色。人黏蛋白 MUC2、MUC4、MUC5AC、MUC16 的 ELISA 试剂盒(武汉基因美生物科技有限公司)用于泪液标本检测。

1.1.4 实验仪器 裂隙灯显微镜(苏州医疗器械厂),自吸式毛细玻璃管(国药集团化学试剂有限公司),Olympus BX51 双目光学显微镜,HMIAS-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统(美国 Leica 公司)。

1.2 方法

1.2.1 标本的收集

1.2.1.1 结膜标本^[5] 松弛结膜标本取自结膜松弛症患者术中切除,正常结膜标本取自单纯白内障超声乳化手术病例在白内障手术中剪取相应区域的球结膜组织。将获取的结膜组织上皮面朝上,基质面朝下,平铺于无菌滤纸上,4%中性甲醛固定,石蜡包埋。

1.2.1.2 泪液标本 10μL 的玻璃毛细管在下睑结膜囊泪阜处采用虹吸方法吸取泪液标本,尽量不接触眼表,不使用表面麻醉药物或其他化学性药物,每例患者共收集20μL 泪液吹入 Ep 管,置-70℃超低温冰箱冷冻保存。

1.2.2 检测方法及指标

1.2.2.1 结膜标本免疫组织化学染色 石蜡切片烘干后常规脱蜡,经胰酶消化、双氧水消除内源性过氧化物酶活性。滴加正常山羊血清封闭后,依次使用 MUC2、MUC4、MUC5AC、MUC16 抗体于4℃冰箱内反应过夜,二抗室温反应1h,二氨基联苯胺显色,苏木素复染、脱水、透明、封片,在高倍镜下观察染色结果。染色结果判定:细胞膜边界清晰、无特异性细胞胞质染色者为阴性(-);细胞胞质呈浅棕黄色者为弱阳性(+),细胞胞质呈棕色者为中度阳性(++),细胞胞质呈深棕色者为强阳性(+++)。分别定为0、1、2、3。每个切片随机选择4个视野,每个视野测定3次后取平均值^[6]。

1.2.2.2 泪液标本 ELISA 检测 采用双抗体夹心法测定泪液标本中人黏蛋白 MUC2、MUC4、MUC5AC、MUC16 水平。用纯化的抗体包被微孔板,制成固相抗体,往包被单抗的微孔中依次加入 MUC2、MUC4、MUC5AC、MUC16,再与 HRP 标记的 MUC2、MUC4、MUC5AC、MUC16 抗体结合,形成抗体-抗原-酶标抗体复合物,经过彻底洗涤后加底物 TMB 显色。TMB 在 HRP 酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的 MUC2、MUC4、MUC5AC、MUC16 呈正相关。用酶标仪在450nm 波长下测定吸光度(A 值)。

统计学分析:使用 SPSS 21.0 统计软件包对所有数据进行统计学处理。结膜标本黏蛋白免疫组织化学染色结果采用卡方检验,泪液黏蛋白 A 值采用独立样本检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结膜标本 MUC2、MUC4、MUC5AC、MUC16 的表达 结膜松弛症组中结膜上皮细胞 MUC2、MUC4 阳性表达细胞与正常对照组无明显差异 ($\chi^2 = 3.548, P = 0.315; \chi^2 = 5.222, P = 0.156$);结膜松弛症组中结膜上皮细胞中 MUC5AC、MUC16 阳性表达细胞较正常对照组明显减少,差异有统计学意义 ($\chi^2 = 10.284, P = 0.016; \chi^2 = 19.900, P < 0.01$),见图 1~3。

2.2 泪液中 MUC2、MUC4、MUC5AC、MUC16 的表达 结膜松弛症泪液中 MUC2 的 A 值(0.440±0.110)与正常对照组(0.427±0.107)比较差异无统计学意义 ($t = -0.455, P = 0.651$)。结膜松弛症组中 MUC4 的 A 值(0.362±0.107)、MUC5AC 的 A 值(0.334±0.097)较正常对照组(0.452±0.122、0.457±0.136)明显降低,差异有显著统计学意义 ($t = -2.929, P = 0.005; t = -3.984, P < 0.01$)。MUC16 的 A 值(0.408±0.114)较正常对照组(0.477±0.109)下降,差异有统计学意义 ($t = -2.356, P = 0.022$)。

3 讨论

结膜松弛症是老年性常见眼病, Mimura 等^[7] 对 1416 例 1~94 岁住院患者的结膜松弛症调查发现其患

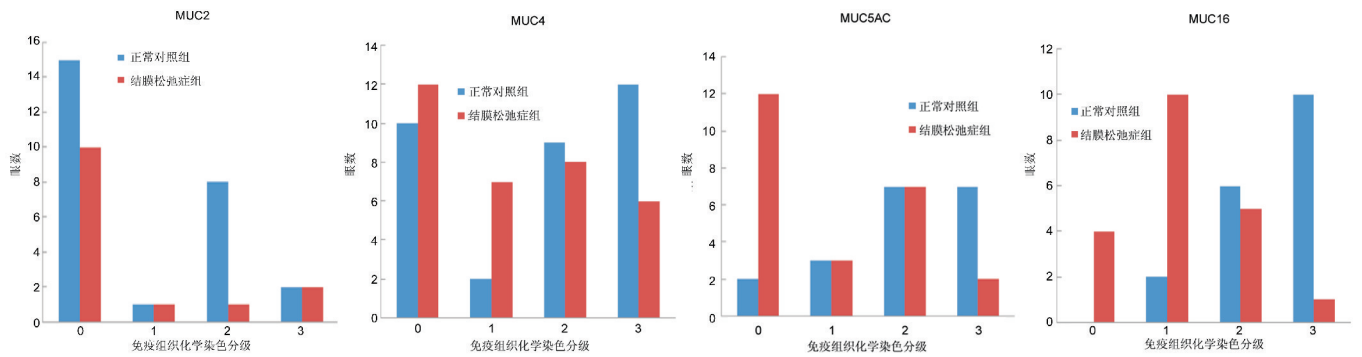


图1 黏蛋白免疫组织化学染色分级统计图。

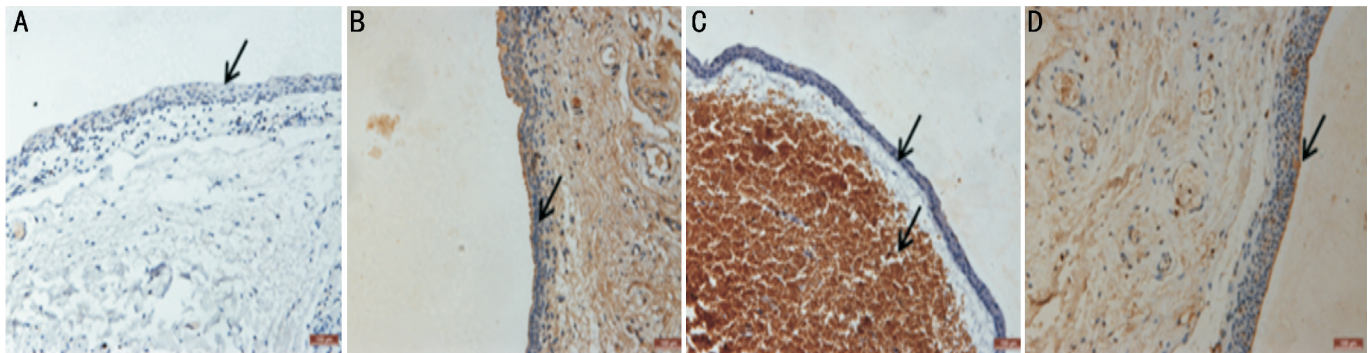


图2 结膜松弛症组黏蛋白免疫组织化学染色,结膜松弛症组中结膜上皮层明显变薄,上皮细胞排列稀疏,杯状细胞减少,观察结膜上皮细胞特异性黏蛋白染色情况(×200) A:黏蛋白 MUC2 染色,可见细胞膜边界清晰,未见特异性细胞胞质染色;B:黏蛋白 MUC4 染色,可见细胞膜边界清晰,细胞胞质呈浅棕黄色;C:黏蛋白 MUC5AC 染色,结膜上皮层显著变薄,上皮组织减少、稀疏,细胞胞质呈浅棕黄色,附见结膜下大量出血也呈现棕黄色颗粒;D:黏蛋白 MUC16 染色,可见细胞膜边界清晰,细胞胞质呈浅棕黄色。

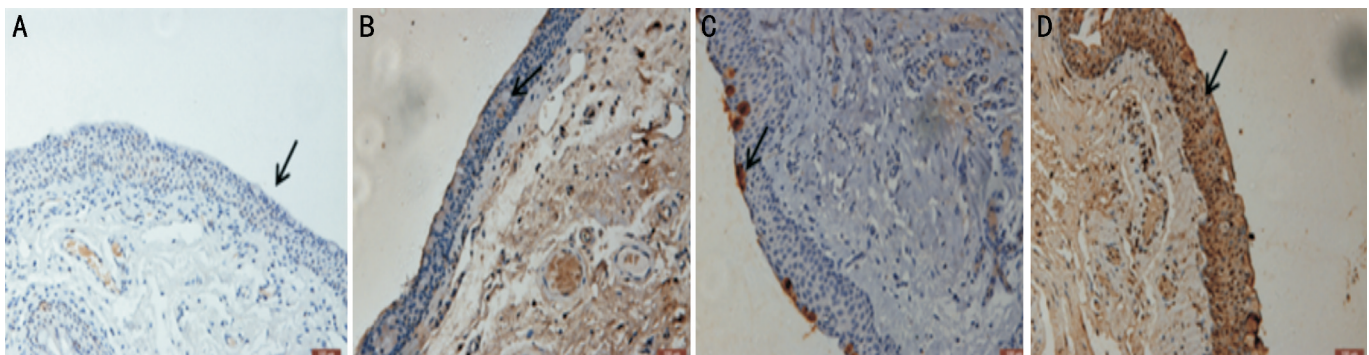


图3 正常对照组黏蛋白免疫组织化学染色,正常对照组结膜上皮层排列紧密,结构清晰,细胞层次较多,可见较多的杯状细胞分布,观察结膜上皮细胞特异性黏蛋白染色情况(×200) A:黏蛋白 MUC2 染色,可见细胞膜边界清晰,未见明显特异性细胞胞质染色;B:黏蛋白 MUC4 染色,可见细胞膜边界清晰,细胞胞质呈浅棕黄色,杯状细胞分布较多;C:黏蛋白 MUC5AC 染色,结膜上皮层细胞层次较多,固有层与上皮层结合紧密,可见杯状细胞特异性染色呈深棕色强阳性;D:黏蛋白 MUC16 染色,可见细胞膜边界清晰,细胞胞质染色呈棕色。

病率为 85.24%。傅东红等^[8]对无锡市滨湖区 50 岁及以上人群结膜松弛症流行病学调查发现患病率为 13.92%。但目前结膜松弛症的发病机制并不是很清楚。近年的研究多集中在炎症因子、基质金属蛋白酶等增加导致胶原纤维溶解,弹力纤维变性,球结膜基质和 Tenon 囊的过度降解等导致球结膜松弛,松弛结膜堆积在下睑缘、内、外眦部之间,出现一系列眼表泪液学异常^[9-10]。

黏蛋白是迄今为止发现的分子量最大且高度糖基化的糖蛋白,主要由眼表、呼吸系统、消化系统及生殖系统产生。黏蛋白是泪膜的重要组成部分,在维持眼表稳态、内在黏膜的防御功能方面具有重要作用。目前研究较多的黏蛋白分别是 MUC2、MUC4、MUC5AC、MUC16。其中

MUC2、MUC5AC 属于成胶型黏蛋白;MUC4、MUC16 属于跨膜黏蛋白。MUC5AC 是泪膜中主要的分泌黏蛋白,由结膜杯状细胞分泌。Argüeso 等^[11]发现干燥综合征患者结膜上皮表达 MUC5AC mRNA 含量明显低于正常人,泪液中含量也明显低于正常人。Floyd 等^[12]通过动物实验发现 MUC5AC 敲除的大鼠较野生型对照组的泪膜破裂时间显著下降,角膜荧光素染色评分显著上升,同时角膜透明度也出现不同程度的下降。McKenzie 等^[13]研究发现了泪液中的另一种成胶型黏蛋白 MUC2,并通过 PCR 技术在人类结膜上皮细胞中也发现 MUC2 的转录。MUC4 存在于人结膜、角膜缘和角膜组织的各层及泪液中,并呈现一定的浓度梯度。Pflugfelder 等^[14]认为 MUC4 起到维持眼表

屏障功能和稳定泪膜的作用,并促进眼表上皮的正常生长和具有抗凋亡的特性。MUC16是人类眼表发现的第3个黏蛋白,主要存在于结膜上皮层的扁平细胞中,具有抗黏附和屏障的功能,Corrales等^[15]证实结膜上皮中MUC1、MUC2、MUC4和MUC5AC的mRNA在干眼症中表达显著减低。

关于结膜松弛症中黏蛋白方面的研究国内外均较少,研究发现结膜松弛症中结膜杯状细胞减少^[16],泪液中羊齿状结晶减少提示泪液中的黏蛋白发生异常^[4]。Wang等^[17]也证实在Ⅲ级鼻侧结膜松弛症中出现杯状细胞密度减少,同时MUC5AC mRNA的表达相对下调。在本研究中发现结膜松弛症结膜上皮细胞中MUC5AC、MUC16阳性表达细胞较正常对照组明显减少($P=0.016$ 、 <0.01);而MUC2、MUC4阳性表达细胞与正常对照组无统计学差异($P>0.05$)。同时对结膜松弛症泪液的黏蛋白研究发现MUC4、MUC5AC的A值较正常对照组明显降低,差异有显著统计学意义(均 $P<0.01$),MUC16也出现下降,差异有统计学意义($P=0.022$),但MUC2较正常对照组无差异。说明结膜松弛症中黏蛋白表达无论是在结膜组织或是在泪液中均减少,特别是MUC5AC、MUC16的变化较为突出。

对于结膜松弛症松弛结膜组织和泪液中均出现黏蛋白减少的原因分析如下:(1)结膜松弛症中松弛结膜的杯状细胞减少^[17],杯状细胞数量减少导致结膜组织和泪液中的黏蛋白合成和分泌减少。(2)瞬目时,由于球结膜过度松弛,上睑缘不能正常接触到下睑缘,无法将黏蛋白正常带到眼表,从而影响黏蛋白在眼表的分布,加重泪膜的不稳定^[18]。(3)同时结膜松弛症出现泪液渗透压上升^[19],泪液渗透压升高激活一系列炎症反应,加之结膜松弛症自身表达炎症因子增加^[20],造成眼表正常微环境的破坏。出现细胞凋亡、杯状细胞减少以及黏蛋白的改变,引起泪膜不稳定,进而松弛结膜堆积,影响泪液的分泌、流动和正常分布,出现一系列临床症状和体征。

因此,结膜松弛症中黏蛋白的改变可能是其发生发展的重要原因。MUC5AC和MUC16在结膜松弛症中均下降,进一步研究可能揭示结膜松弛症的发病机制。而临床上通过增加黏蛋白的分泌、促进杯状细胞合成和分泌黏蛋白并改善结膜松弛症的眼表微环境,有利于治疗结膜松弛症,并改善患者的不适症状和体征。

参考文献

- 1 Moniaux N, Escande F, Porchet N, et al. Structural organization and classification of the human mucin genes. *Front Biosci* 2001;1(6):1192-1206
- 2 Ablamowicz AF, Nichols JJ. Ocular Surface Membrane - Associated

- Mucins. *Ocul Surf* 2016;14(3):331-341
- 3 Zhang XR, Zou HD, Li QS, et al. Comparison study of two diagnostic and grading systems for Conjunctivochalasis. *Chin Med J* 2013;126(16):3118-3123
- 4 项敏泓,张兴儒,蔡瑞霞,等. 结膜松弛症泪液功能改变的观察. *中华眼科杂志* 2009;45(6):556-557
- 5 Ward SK, Wakamatsu TH, Dogru M, et al. The role of oxidative stress and inflammation in conjunctivochalasis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(4):1994-2002
- 6 倪灿荣,马大烈,戴益民,等. 免疫组织化学实验技术及应用. 北京:化学工业出版社 2006:61
- 7 Mimura T, Yamagami S, Usui T, et al. Changes of conjunctivochalasis with age in a hospital-based study. *Am J Ophthalmol* 2009;147(1):171-177
- 8 傅东红,谢田华,朱靖,等. 无锡市滨湖区50岁及以上人群结膜松弛症流行病学调查. *中华实验眼科杂志* 2014;32(9):838-843
- 9 张兴儒,蔡瑞霞,王宝华,等. 结膜松弛症的组织病理学观察. *中华眼科杂志* 2004;40(1):37-39
- 10 Zhang XR, Xiang MH, Wu QQ, et al. The tear proteomics analysis of conjunctivochalasis. *Spektrum der Augenheilkund* 2008;22(5):288-294
- 11 Argüeso P, Balarám M, Spurr-Michaud S, et al. Decreased level of the goblet cell mucin MUC5AC in tears of patients with Sjögren syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(4):1004-1011
- 12 Floyd AM, Zhou X, Evans C, et al. Mucin deficiency causes functional and structural changes of the ocular surface. *PLoS One* 2012;7(12):e50704
- 13 McKenzie RW, Jumblatt JE, Jumblatt MM. Quantification of MUC2 and MUC5AC transcripts in human conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(3):703-708
- 14 Pflugfelder SC, Liu Z, Monroy M, et al. Detection of sialomucin complex (MUC4) in human ocular surface epithelium and tear fluid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(6):1316-1326
- 15 Corrales RM, Narayanan S, Fernández I, et al. Ocular mucin gene expression levels as biomarkers for the diagnosis of dry eye syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(11):8363-8369
- 16 Xing-Ru Zhang, Qing-Song Li, Min-Hong Xiang, et al. Analysis of tear mucin and goblet cells in patients with conjunctivochalasis. *Spektrum der Augenheilkd* 2010 24(4):206-213
- 17 Wang Y, Dogru M, Matsumoto Y, et al. The impact of nasal conjunctivochalasis on tear functions and ocular surface findings. *Am J Ophthalmol* 2007;144(6):930-937
- 18 张兴儒,李青松,项敏泓,等. 结膜松弛症泪液黏蛋白及球结膜杯状细胞的研究. *国际眼科杂志* 2009;9(5):895-899
- 19 Fodor E, Kosina-Hagyó K, Bausz M, et al. Increased tear osmolarity in patients with severe cases of conjunctivochalasis. *Curr Eye Res* 2012;37(1):80-84
- 20 项敏泓,张兴儒,张迅轶,等. 结膜松弛症泪液中细胞因子检测. *国际眼科杂志* 2010;10(9):1702-1703