

Myocilin 蛋白对青光眼小梁网细胞 FN 表达和黏附能力的抑制作用

黄一鸿, 吴瑜瑜

基金项目:福建省自然科学基金资助项目(No. 2016J01525)
作者单位:(362000) 中国福建省泉州市, 福建医科大学附属第二医院眼科
作者简介:黄一鸿, 毕业于福建医科大学, 硕士, 住院医师, 研究方向: 青光眼。
通讯作者:吴瑜瑜, 毕业于福建医科大学, 主任医师, 教授, 研究方向: 青光眼。wyeyedoctor@qq.com
收稿日期:2017-08-26 **修回日期:**2018-01-30

Inhibitory effect of myocilin on fibronectin expression and adhesion in trabecular meshwork cells of glaucoma

Yi-Hong Huang, Yu-Yu Wu

Foundation item: Fujian Natural Science Foundation (No. 2016J01525)
Department of Ophthalmology, Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 362000, Fujian Province, China
Correspondence to: Yu-Yu Wu. Department of Ophthalmology, Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 362000, Fujian Province, China. wyeyedoctor@qq.com
Received: 2017-08-26 Accepted: 2018-01-30

Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of myocilin on the expression of fibronectin (FN) and the adhesion function in trabecular meshwork cells of primary open angle glaucoma (POAG) *in vitro*.
• **METHODS:** The concentration of recombinant myocilin protein was 0 (control group), 0.5, 1, 1.5, 2 and 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The expression of FN in the cells and the cell culture medium were detected by Western blot and ELISA. The effect of myocilin protein on the adhesion of cultured POAG trabecular meshwork cells was detected by CCK-8 method.
• **RESULTS:** Western blot showed that the ratio of FN/ β -actin was 34.8 ± 0.6 , 33.4 ± 1.0 , 28.9 ± 0.8 , 21.6 ± 0.9 , 15.9 ± 1.1 and 11.9 ± 0.8 ; that of 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group was not significantly different compared with that of control group ($P=0.092$); that of 1.0, 1.5, 2 and 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group were significantly different compared with that of the control group ($F=346.131$, $P<0.05$). The concentration of FN in the cell culture medium was 0.4654 ± 0.0039 , 0.4596 ± 0.0032 , 0.4216 ± 0.0037 , 0.4214 ± 0.0039 , 0.4043 ± 0.0039 , $0.3806 \pm 0.0071 \mu\text{g}/\text{mL}$ by ELISA; difference between that of

0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group and that of control group was not statistically significant ($P=0.120$); the difference between of 1, 1.5, 2, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group and the control group were statistically significant ($F=176.054$, $P<0.05$). The mean values of the absorbance values of each group were 1.9814 ± 0.1624 , 1.8848 ± 0.0267 , 1.4895 ± 0.0916 , 1.4120 ± 0.1087 , 1.3392 ± 0.1391 , 1.0310 ± 0.0639 through CCK-8 method; that of 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group was not significantly different compared with that of control group ($P=0.300$); the difference between of 1, 1.5, 2, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group and the control group were statistically significant ($F=177.818$, $P<0.05$).

• **CONCLUSION:** Myocilin protein can inhibit the fibronectin expression in POAG trabecular meshwork cells, showing a dose dependent manner. Myocilin protein can reduce the adhesion of POAG trabecular meshwork cells.

• **KEYWORDS:** cell culture; myocilin; primary open angle glaucoma; expression; adhesion

Citation: Huang YH, Wu YY. Inhibitory effect of myocilin on fibronectin expression and adhesion in trabecular meshwork cells of glaucoma. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018;18(3):418-422

摘要

目的: 分析不同浓度重组 myocilin 蛋白对体外培养的原发性开角型青光眼(primary open angle glaucoma, POAG)患者小梁网细胞纤维连接蛋白(fibronectin, FN)表达及对黏附功能的影响。

方法: 体外培养 POAG 患者小梁网细胞, 分别加入含重组 myocilin 蛋白终浓度为 0 (对照组)、0.5、1、1.5、2、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的无血清培养基, 运用 Western blot、ELISA 法分别检测小梁网细胞内和细胞培养液中 FN 的表达水平; 并运用 CCK-8 法检测 myocilin 蛋白对 POAG 小梁网细胞黏附的影响。

结果: Western blot 检测结果: FN/ β -actin 比值分别为 34.8 ± 0.6 、 33.4 ± 1.0 、 28.9 ± 0.8 、 21.6 ± 0.9 、 15.9 ± 1.1 、 11.9 ± 0.8 ; 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组与对照组相比, 差异无统计学意义($P=0.092$); 1.0、1.5、2、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组与对照组比较, 差异有统计学意义($F=346.131$, $P<0.05$)。ELISA 法检测各组细胞培养液中 FN 浓度为: 0.4654 ± 0.0039 、 0.4596 ± 0.0032 、 0.4216 ± 0.0037 、 0.4214 ± 0.0039 、 0.4043 ± 0.0039 、 $0.3806 \pm 0.0071 \mu\text{g}/\text{mL}$; 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组与对照组相比, 差异无统计学意义($P=0.120$); 1.0、1.5、2、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组与对照组比较, 差异有统计学意义($F=176.054$, $P<0.05$)。运用 CCK-8 法检测各组细胞吸光度均值分别为 $1.9814 \pm$

0.1624、1.8848±0.0267、1.4895±0.0916、1.4120±0.1087、1.3392±0.1391、1.0310±0.0639;0.5μg/mL组与对照组相比,差异无统计学意义($P=0.300$);1、1.5、2、2.5μg/mL组与对照组相比,差异有统计学意义($F=177.818, P<0.05$)。

结论:Myocilin蛋白能抑制POAG小梁网细胞FN的表达,并呈现一定的剂量依赖性;myocilin蛋白可降低POAG小梁网细胞的黏附能力。

关键词:细胞培养;myocilin蛋白;原发性开角型青光眼;表达;黏附

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.3.04

引用:黄一鸿,吴瑜瑜. Myocilin蛋白对青光眼小梁网细胞FN表达和黏附能力的抑制作用. 国际眼科杂志 2018; 18(3): 418-422

0 引言

青光眼是目前第二大致盲眼病,原发性开角型青光眼(primary open angle glaucoma, POAG)是其重要的临床类型之一,其分子遗传学研究一直备受关注。病理性眼压增高是青光眼的主要危险因素,目前绝大多数学者认为房水的生成和流出之间的动态平衡是维持眼内压正常的关键因素,小梁网细胞具有滤过、吞噬、收缩等功能,其数量、活性及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)等异常均可影响房水排出,最终影响眼压。小梁网细胞的形态和功能以及代谢水平对维持正常的房水流出系统具有极其重要的意义。因此,小梁网细胞成为研究POAG发病机制的主要靶细胞,本课题将研究有关细胞外基质对小梁网细胞的作用,在探讨POAG发病机制和临床治疗方面提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 体外培养的小梁组织块取自福建医科大学附属第二医院眼科青光眼专家确诊的行小梁切除术的3例POAG患者。取带小梁网组织的巩膜内板层组织块进行细胞培养,符合人体细胞实验的伦理学标准,经过医院伦理委员会批准,并征得患者同意。患者年龄分别为42、57、51岁,无高血压、糖尿病、传染性和遗传性疾病。

1.1.2 主要试剂及仪器 试剂:羊抗鼠IgG-HRP、羊抗兔IgG-HRP、ECL增强型化学发光底物检测试剂盒(Pierce, USA),总蛋白提取试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒(上海欣基生物),内参β-actin(Santa Cruz, USA),PVDF膜(Millipore),重组myocilin蛋白(Abnova),预染蛋白Marker(Fermentas),人FN Elisa试剂盒(上海西塘生物),Cell Counting Kit-8(CCK-8试剂盒,碧云天),胎牛血清、DMEM/F₁₂培养基、青/链霉素双抗、2.5g/L胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液PBS(Hyclone),鼠抗波形蛋白抗体、纤维连接蛋白抗体、兔抗层黏连蛋白抗体、兔抗第Ⅷ因子抗原、兔抗神经元烯醇化酶抗体、免疫组化染色试剂盒、DAB酶物显色试剂盒(Boster)。仪器:微量加样器(Eppendorf, Germany),倒置显微镜(Olympus, Japan),Mini-PROTEAN垂直电泳和转膜系统、高速离心机(Bio-Rad, USA),水平脱色摇床(New Brunswick USA),CO₂培养箱(New

Brunswick Scientific),超净工作台(苏州净化设备厂)、酶联免疫检测仪(Tecan)。

1.2 方法

1.2.1 细胞鉴定 在无菌条件下,将从小梁切除术中取得的带小梁网的巩膜内板层组织块接种于一次性塑料培养瓶壁上,在光镜下确认组织块内皮面并将小梁网面贴壁。将培养瓶放入CO₂培养箱,细胞长至培养瓶底面积约80%融合后用2.5g/L胰蛋白酶消化传代。取传3代近融合的POAG小梁网细胞以4×10⁵个/mL接种于预置盖玻片的6孔平板中,培养至细胞接近融合,取出盖玻片,PBS充分漂洗后,用4%多聚甲醛固定30min,PBS漂洗3次,每次3min,可立即进行下一步的检测。取出制作好的小梁网细胞爬片,进行纤维连接蛋白(fibronectin, FN)、层黏连蛋白(laminin, LN)、波形蛋白(VN)和神经元烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE)染色,具体步骤按试剂盒说明书进行,并用显微镜进行观察和摄片。

1.2.2 蛋白印迹(Western blot)法、酶联免疫吸附测定(ELISA)检测小梁网细胞FN的表达

1.2.2.1 实验分组 取传至第3代的POAG小梁网细胞,调整细胞密度6×10⁴个/mL左右,接种于6孔板中,待细胞长至瓶底80%融合后,饥饿培养24h,随机分为6组,分别加入重组myocilin蛋白终浓度为0(对照组)、0.5、1、1.5、2、2.5μg/mL的培养液(不含血清),均培养24h,使细胞同步化,然后进行Western blot法、ELISA法检测FN的表达。

1.2.2.2 Western blot测定myocilin蛋白对小梁网细胞FN表达的影响 采用总蛋白提取试剂盒进行6个样品总蛋白的提取,然后采用BCA蛋白定量试剂盒进行定量。具体步骤:取样品60μg,进行SDS-PAGE凝胶电泳,将蛋白质电转至PVDF膜,5%脱脂牛奶封闭1h,分别加入FN抗体(1:800)和鼠抗人β-actin抗体(1:2000),再依次加入羊抗兔IgG-HRP(1:5000)和羊抗鼠IgG(1:5000),ECL显色,扫描图像。结果分析采用Bandscan 5.0软件分析条带的光密度值,目的蛋白相对表达量=目的蛋白(光密度值)/内参β-actin(光密度值)。

1.2.2.3 ELISA测定myocilin蛋白对小梁网细胞上清液FN的表达 按ELISA试剂盒操作步骤操作,将稀释后的6个待测样品(每孔设有3个复孔)与FN标准品加入包被有FN抗体的96孔板,37℃孵育40min,洗板并加入第一抗体工作液37℃孵育20min,再次洗板并加酶标抗体工作液37℃孵育10min,再洗板且加底物工作液,37℃避光孵育20min,加入终止液,蓝色变成黄色,30min内在波长为450nm的酶标仪上读数。结果分析运用ELISA数据处理软件处理,进行绘图并计算细胞上清液FN的浓度。

1.2.3 测定myocilin蛋白对POAG小梁网细胞黏附的影响

1.2.3.1 实验分组 参考Wentz-Hunter等^[1]实验方法,分别用0(对照组)、0.5、1、1.5、2、2.5μg/mL的重组myocilin蛋白(用DMEM培养基稀释)包被96孔板(设置三个复孔),4℃过夜后PBS轻轻漂洗3次,加入0.1%BSA溶液37℃封闭2h,DMEM培养液漂洗3次,备用。

1.2.3.2 实验方法 取传3代POAG小梁网细胞,饥饿24h使细胞同步化,吸去培养基,经2.5g/L胰酶消化后,

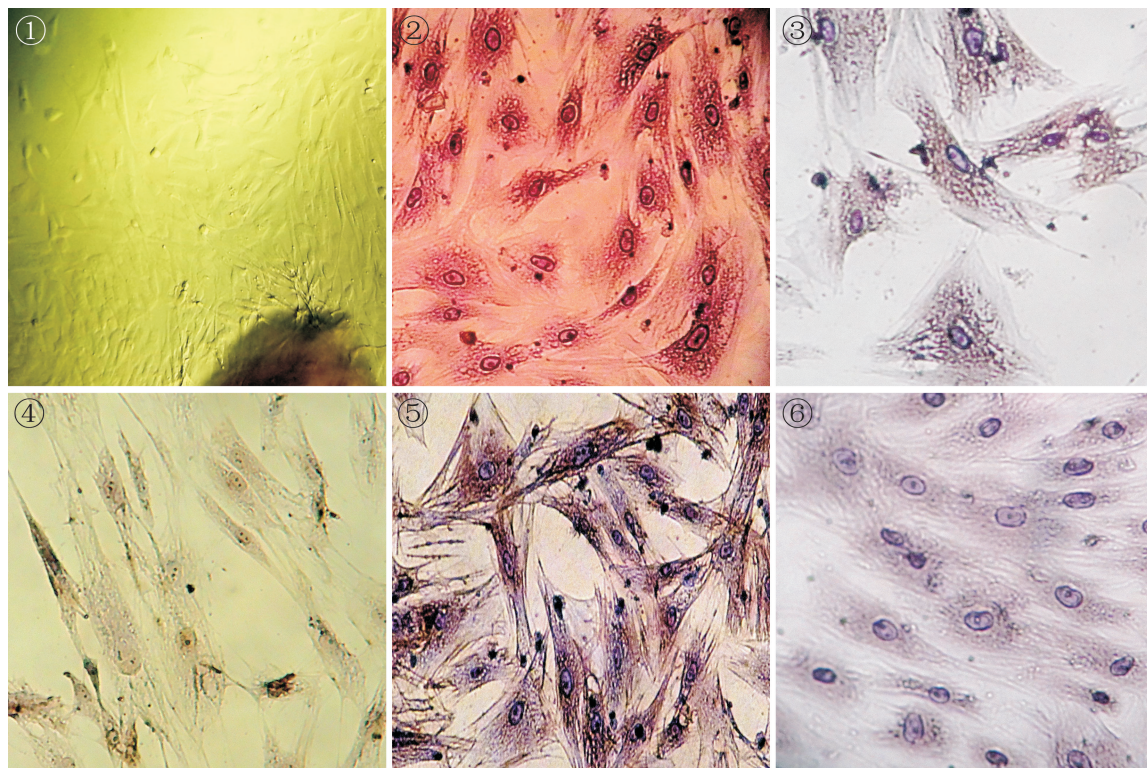


图1 小梁网细胞周边爬出(x400)。图2 FN染色(免疫细胞化学法x400)。图3 LN染色(免疫细胞化学法x400)。图4 VN染色(免疫细胞化学法x400)。图5 NSE染色(免疫细胞化学法x400)。图6 F8因子染色阴性(免疫细胞化学法x400)。

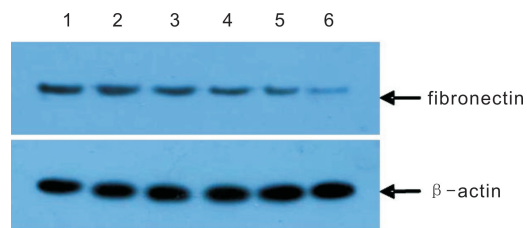


图7 Western blot 检测 myocilin 蛋白对 POAG 小梁网细胞 FN 表达的影响 数字 1~6 分别对应 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 μg/mL 重组 myocilin 蛋白。

用无血清培养液制备成浓度为 4×10^5 个/mL 的单细胞悬液,接种细胞悬液 100 μL 到上述包被的 96 孔板上,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 1h 后,吸去培养液,PBS 轻轻冲洗 3 次,去除未贴壁的细胞,每孔加入 20 μL CCK-8 试剂,继续培养 2h 后。在酶标仪 450nm 波长处测吸光度(OD 值)。OD 值与活细胞数呈正相关。以上实验重复 3 次。

统计学分析:所有数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)形式表示,采用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析,进行 Levene 方差齐性检验,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞培养和鉴定结果 组织块接种 7d,细胞开始从组织块边缘向外长出,逐渐增多,呈现外疏内密样(图 1);小梁网细胞免疫细胞化学 SP 法结果示:传代培养第 3 代 POAG 小梁网细胞 FN 染色阳性,表现为胞浆呈棕黄色,颗

表 1 myocilin 蛋白对 POAG 小梁网细胞 FN 表达的影响 $\bar{x} \pm s$

组别(重组 myocilin 蛋白终浓度)	FN/β-actin 灰度比值	<i>P</i>
0 μg/mL(对照组)	34.8 ± 0.6	
0.5 μg/mL	33.4 ± 1.0	0.092
1.0 μg/mL	28.9 ± 0.8	<0.01
1.5 μg/mL	21.6 ± 0.9	<0.01
2.0 μg/mL	15.9 ± 1.1	<0.01
2.5 μg/mL	11.9 ± 0.8	<0.01

注:*P* 值为不同浓度重组 myocilin 蛋白组与对照组比较。

粒状,有些彼此相连呈网状(图 2);层黏连蛋白(LN)染色阳性,表现为胞浆呈红色,颗粒状(图 3);波形蛋白(VN)染色阳性示:细胞内广泛分布棕黄色颗粒(图 4);神经元特异性烯醇化酶(NSE)是一种胞浆内蛋白,在阳性细胞表现为弥漫性胞浆染色,传代培养第 3 代 POAG 小梁网细胞 NSE 染色阳性,表现为胞浆呈红色,颗粒状遍及整个细胞(图 5);第Ⅷ因子相关抗原染色示:细胞胞浆不着色,仅细胞核被苏木素染成蓝色(图 6)。

2.2 myocilin 蛋白对小梁网细胞内 FN 表达的影响

Western blot 结果分析:图片经光密度图像扫描仪(HP)扫描,采用 Bandscan 5.0 软件分析条带的光密度值,测定值主要与条带中心密度和条带周边背景色有关(图 7)。重组 myocilin 蛋白终浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 μg/mL 的各实验组 FN/β-actin 比值分别为 33.4 ± 1.0、28.9 ± 0.8、21.6 ± 0.9、15.9 ± 1.1、11.9 ± 0.8。随着重组 myocilin 蛋白浓度的增高,各实验组 FN/β-actin 比值呈现下降趋势(表 1)。且对于 FN/β-actin 灰度比值,0.5 μg/mL 组与对照组(34.8 ± 0.6)相比,差异无统计学意义

表2 不同浓度 FN 标准品的 OD 值 $\bar{x} \pm s$

FN 标准品浓度	OD
1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	2.9218 \pm 0.0030
0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.7511 \pm 0.0014
0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.9941 \pm 0.0056
0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.6745 \pm 0.0066
0.0625 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.4503 \pm 0.0010

表3 不同浓度 myocilin 蛋白对小梁网细胞上清液中 FN 表达的影响 $\bar{x} \pm s$

组别(重组 myocilin 蛋白终浓度)	OD	FN 浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)	<i>P</i>
0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (对照组)	1.5629 \pm 0.0103	0.4654 \pm 0.0039	
0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.5478 \pm 0.0083	0.4596 \pm 0.0032	0.120
1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.4478 \pm 0.0098	0.4216 \pm 0.0037	<0.01
1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.4474 \pm 0.0104	0.4214 \pm 0.0039	<0.01
2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.4024 \pm 0.0103	0.4043 \pm 0.0039	<0.01
2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.3420 \pm 0.0157	0.3806 \pm 0.0071	<0.01

注:*P* 值为不同浓度重组 myocilin 蛋白组与对照组比较。

(*P*=0.09);1.0、1.5、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组与对照组比较,差异有统计学意义(*F*=346.131,*P*<0.01)。结果可见高浓度的 myocilin 蛋白可明显抑制 POAG 小梁网细胞 FN 蛋白的表达。

2.3 小梁网细胞上清液中 FN 的表达 采用 ELISA 法检测出不同浓度 FN 标准品的 OD 值(表2),并绘制标准曲线,求出标准曲线 $Y=0.3407+2.6263X$ (*X*:FN 浓度,*Y*:OD 值)。在一定范围内,随着重组 myocilin 蛋白浓度的增加,POAG 小梁网细胞 FN 表达明显降低(表3)。结果经 SPSS11.5 统计软件处理,采用单因素方差分析:myocilin 蛋白终浓度为 1.0、1.5、2.0、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组与对照组吸光度平均值比较,差异具有统计学意义(*P*<0.05);通过标准曲线计算出各组 FN 表达量为 0.4654 \pm 0.0039、0.4596 \pm 0.0032、0.4216 \pm 0.0037、0.4214 \pm 0.0039、0.4043 \pm 0.0039、0.3806 \pm 0.0071 $\mu\text{g}/\text{mL}$;0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组与对照组相比,差异无统计学意义(*P*=0.12);1.0、1.5、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组与对照组比较,差异有统计学意义(*F*=176.054,*P*<0.01)。结果显示高浓度的 myocilin 蛋白能够抑制小梁网细胞分泌 FN。

2.4 myocilin 蛋白对 POAG 小梁网细胞黏附的影响

不同浓度的 myocilin 蛋白作用于 POAG 小梁网细胞 24h 后,小梁网细胞的黏附能力明显被抑制并显示出剂量-效应关系。当 myocilin 蛋白为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,抑制黏附能力弱,与对照组相比,差异无统计学意义(*P*=0.30);当 myocilin 蛋白为 1、1.5、2、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 等浓度,抑制小梁网细胞黏附作用逐渐增强,且与对照组相比,差异有统计学意义(*F*=176.054,*P*<0.01),见表4。

3 讨论

青光眼是一类以进行性视网膜神经节细胞凋亡以及视野缺损为特征的不可逆性视神经退行性病变,病理性眼压的升高是其常见的临床表现。POAG 是青光眼的一种,病情缓慢进展,早期症状很不明显而难以发现,往往到了造成一定不可逆视力损害后才被重视。POAG 的病理性眼

表4 myocilin 蛋白对小梁网细胞黏附的影响 $\bar{x} \pm s$

组别(重组 myocilin 蛋白终浓度)	OD	<i>P</i>
0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (对照组)	1.9814 \pm 0.1624	
0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.8848 \pm 0.0267	0.300
1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.4895 \pm 0.0916	<0.01
1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.4120 \pm 0.1087	<0.01
2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.3392 \pm 0.1391	<0.01
2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.0310 \pm 0.0639	<0.01

注:*P* 值为不同浓度重组 myocilin 蛋白组与对照组比较。

压升高主要是由于小梁房水循环通路的阻力增加造成的^[2]。本实验主要通过研究 myocilin 蛋白对 POAG 小梁网细胞 FN 的影响,继而探讨小梁房水循环通路在 POAG 发病中的作用。

临管区域的小梁网组织及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)结构异常是房水循环通路上产生阻力的主要原因。房水流出阻力的稳态被正常小梁网细胞伸展功能的变化以及临管区域小梁网窗孔样结构的变形所调节。有研究表明,ECM 的弹性纤维(即小梁网的窗孔样结构)与 IV 型胶原纤维和 FN 有关^[3]。FN 在临管区域小梁网条索的核心中被发现。FN 在 ECM 中扮演着许多重要作用,包括提供细胞生长、分化、收缩性、基因表达、生长因子信号等细胞结构支架以及信号转导途径^[4]。MYOC 基因编码的 myocilin 蛋白在小梁网细胞的异常聚集影响房水外流途径的内稳定,从而增加房水外流阻力,引起高眼压。myocilin 蛋白的过度表达对小梁网细胞在肌动蛋白形成、细胞黏附以及细胞凋亡的敏感性方面有广泛的作用。

本实验表明,myocilin 蛋白抑制小梁网细胞 FN 的表达和黏附能力,这种抑制作用在一定浓度范围(1~2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)内表现为浓度依赖性。研究表明,myocilin 蛋白在细胞-基质中扮演着重要作用。小梁网细胞 myocilin 蛋白的过度表达使细胞黏附功能丢失,导致蛋白激酶的增强以及 Rho 蛋白激酶的抑制^[5],进而引起小梁网细胞骨架蛋白结构的改变,造成肌动蛋白纤维应力和黏着斑的丢失,从而降低细胞对 ECM 的黏附。Peters 等^[6]在对皮肤成纤维细胞的研究表明,当外源性的 myocilin 蛋白加入 FN 基质中,细胞表现为黏附能力下降,结果表明 myocilin 蛋白能够影响细胞-基质间的交流。该研究还发现,myocilin 蛋白与 FN 的肝素结合区域(Hep II)结合干扰信号通路,进而调节黏着斑的合成。结合之前研究显示:FN 的肝素结合区域(Hep II)激活蛋白激酶 C(PKC)^[7]和 Rho 调节的信号通路^[8]装配黏着斑。黏着斑蛋白和桩蛋白是黏附斑的主要成分,而 myocilin 蛋白能够影响上述两种蛋白的合成。Filla 等^[9]研究 myocilin 蛋白能够与人小梁网细胞 ECM 的 FN 肝素结合区域(Hep II)相互作用,可以调节小梁网细胞与细胞外基质的黏附,从而对小梁网的阻力产生影响。

FN 通过引导细胞外基质之间和细胞与细胞外基质的相互作用提供结构支撑和信号传导发挥生物学功能^[10]。Gagen 等^[11]研究发现,FN 的许多生物活性被整合素信号通路所调节,FN 表达的增加能够通过整合素信号通路改变肌动蛋白细胞骨架,与青光眼的致病机制有关系。

Faralli 等阐述了 FN 与整合素的作用:小梁网通过整合素 $\alpha 5\beta 1$ 与 FN 的 RGD 结合区域结合形成少量的肌动蛋白应力纤维^[3];对于单个细胞而言,通过 $\alpha 4\beta 1$ 整合素与肝素结合区域(Hep II)结合诱导与 $\alpha 5\beta 1$ 整合素信号传递,如此可以增强肌动蛋白应力纤维和黏着斑的形成;这种共信号传递也能够促进基质金属蛋白酶(MMPs)的基因转录水平的表达导致 ECM 溶解变少,而 ECM 的伸展以及衰竭是受控于小梁网细胞 FN 肝素结合区域(Hep II)暴露的途径之一。这与我们的前期研究结果一致^[12],即 FN 能够促进 POAG 小梁网细胞整合素 $\alpha 5\beta 1$ 表达,进而增强细胞黏附能力。因此,小梁网细胞整合素信号通路常常需要其他类型受体和细胞基质蛋白与整合素共同指导激活^[13],而且小梁网细胞内整合素之间的相互作用能够激活整合素信号通路,参与细胞生物功能。

综上所述,根据本实验条件下得出的结果以及本课题组既往的研究,我们推测 myocilin 蛋白在 POAG 的致病机制中发挥着如下作用:myocilin 蛋白通过抑制 FN 的表达,影响着整合素信号通路的传导,干扰肌动蛋白应力纤维和黏着斑的形成,从而影响小梁网细胞的黏附能力,影响房水外流阻力,引起高眼压。然而,myocilin 蛋白在 POAG 致病机制的作用还未清楚,需要更多进一步的研究。

参考文献

- 1 Wentz-Hunter K, Shen X, Okazaki K, et al. Overexpression of myocilin in cultured human trabecular meshwork cells. *Exp Cell Res* 2004; 297(1):39-48
- 2 An L, Ji J. The progress of aqueous humor outflow pathway in open-angle glaucoma. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 2011; 47(10):953-956
- 3 Keller KE, Acott TS. The Juxtacanalicular region of ocular trabecular meshwork: A tissue with a unique extracellular matrix and specialized

function. *Ocul Biol* 2013; 1(1):3

- 4 Faralli JA, Schwinn MK, Gonzalez JM Jr, et al. Functional properties of fibronectin in the trabecular meshwork. *Exp Eye Res* 2009; 88(4):689-693
- 5 Shen X, Koga T, Park BC, et al. Rho GTPase and cAMP/protein kinase A signaling mediates myocilin-induced alterations in cultured human trabecular meshwork cells. *J Biol Chem* 2008; 283(1):603-612
- 6 Peters DM, Herbert K, Biddick B, et al. Myocilin binding to Hep II domain of fibronectin inhibits cell spreading and incorporation of paxillin into focal adhesions. *Exp Cell Res* 2005; 303(2):218-228
- 7 Woods A, Couchman JR. Protein kinase C involvement in focal adhesion formation. *J Cell Sci* 1992; 101(Pt2):277-290
- 8 Saoncella S, Echtermeyer F, Denhez F, et al. Syndecan-4 signals cooperatively with integrins in a Rho-dependent manner in the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(6):2805-2810
- 9 Filla MS, Liu X, Nguyen TD, et al. *In vitro* localization of TIGR/MYOC in trabecular meshwork extracellular matrix and binding to fibronectin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43(1):151-161
- 10 Medina-Ortiz WE, Belmares R, Neubauer S, et al. Cellular fibronectin expression in human trabecular meshwork and induction by transforming growth factor- $\beta 2$. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54(10):6779-6788
- 11 Gagen D, Faralli JA, Filla MS, et al. The role of integrins in the trabecular meshwork. *J Ocul Pharmacol Ther* 2014; 30(2-3):110-120
- 12 胡艳, 吴瑜瑜. 纤维连接蛋白对原发性开角型青光眼小梁网细胞整合素 $\alpha 4\beta 1$ 表达的影响. *河北医药* 2015; 37(7):1060-1061
- 13 Muller EJ, Williamson L, Kolly C, et al. Outside-in signaling through integrins and cadherins; a central mechanism to control epidermal growth and differentiation? *J Invest Dermatol* 2008; 128(3):501-516