

· 论 著 ·

儿童激素性高眼压与外周血淋巴细胞糖皮质激素受体表达相关性研究

赵 芸, 郭妍妍*, 陈柏谕, 张 谦, 许 蕾

(内蒙古医科大学附属医院 儿科, 内蒙古 呼和浩特 010050)

摘要:目的:检测激素性高眼压患儿外周血淋巴细胞糖皮质激素受体(GR), GR α 和 GR β 的表达,研究其与儿童激素性高眼压的相关性。方法:收集20例激素性高眼压患儿(高眼压组),20例使用激素后眼压正常患儿(对照组),20例健康儿童(健康组)的外周血,提取淋巴细胞RNA,采用半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测淋巴细胞内GR α 、GR β mRNA表达水平。结果:儿童外周血淋巴细胞有GR α 、GR β mRNA表达,以GR α 为主。高眼压组的GR α mRNA半定量比值为 1.29 ± 0.14 ,与对照组 1.23 ± 0.13 及健康组 1.28 ± 0.08 相比,3组之间的表达差异无显著性意义($P > 0.05$)。高眼压组的GR β mRNA半定量比值为 1.24 ± 0.04 ,与对照组 1.22 ± 0.09 及健康组 1.19 ± 0.07 相比,3组之间的表达差异无显著性意义($P > 0.05$)。结论:未发现儿童外周血淋巴细胞糖皮质激素受体GR α 和GR β 的表达水平与激素性高眼压之间相关性。

关键词:糖皮质激素受体;激素性高眼压;外周血淋巴细胞;儿童

中图分类号: R77

文献标识码: A

文章编号: 2095-512X(2020)05-0449-05

CORRELATION OF GLUCOCORTICOID OCULAR HYPERTENSION AND EXPRESSION OF GLUCOCORTICOID RECEPTOR mRNA IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTE IN CHILDREN

ZHAO Yun, GUO Yan-yan, CHEN Bai-yu, et al.

(Department of Pediatrics, The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050 China)

Abstract: Objective: To investigate the relationship between glucocorticoid ocular hypertension and expression of glucocorticoid receptor mRNA (GR) in peripheral blood lymphocyte in children. **Methods:** Peripheral blood from 20 children with glucocorticoid ocular hypertension (ocular hypertension group), 20 children without glucocorticoid ocular hypertension after glucocorticoid treat (control group), and 20 healthy children (healthy group) was collected to detect the expression level of GR α and GR β mRNA in peripheral blood lymphocyte by semi-quantitative reverse transcriptional polymerase chain reactin (RT-PCR). **Results:** There were both GR α and GR β mRNA in peripheral blood lymphocyte, and the content of GR α is higher than GR β . GR α /actin in ocular hypertension group was 1.29 ± 0.14 , which has no significance difference among control group 1.23 ± 0.13 and healthy group 1.28 ± 0.08 . GR β /actin in ocular hypertension group was 1.24 ± 0.04 . Compared with the control group 1.22 ± 0.09 and the healthy group 1.19 ± 0.07 , there was no significant difference in the expression of GR β between the three groups ($P > 0.05$). **Conclusion:** No correlation was found between the expression of glucocorticoid receptor GR α and GR β in peripheral blood lymphocytes of children and glucocorticoid ocular hypertension.

Key words: glucocorticoid receptor; glucocorticoid ocular hypertension; peripheral blood lymphocytes; children

收稿日期: 2020-04-08; 修回日期: 2020-08-08

基金项目: 2017内蒙古自治区卫生计生科研计划项目(2017091)

作者简介: 赵芸(1981-),女,内蒙古医科大学附属医院儿科副主任医师。

通讯作者: 郭妍妍,主任医师,硕士研究生导师, E-mail: cqh69731@sohu.com 内蒙古医科大学附属医院儿科, 010050

糖皮质激素(glucocorticoid, GC)类药物具有强大的抗炎及免疫抑制作用,在儿童多个系统疾病的治疗中广泛应用。长期及大剂量用药,会引发诸多副作用,主要的眼科不良反应为眼内压增高(glucocorticoid induced ocular - hypertension, GC-OHT),若未及时控制可发展为激素性青光眼(glucocorticoid induced glaucoma, GIG)^[1]。激素性高眼压起病一般较为隐秘,且儿童的语言表达能力差,往往容易被忽视而误诊及漏诊,病情发展易造成视力损害^[2]。

GC通过与糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)结合而发挥其生理作用。糖皮质激素通过作用于小梁网细胞GR而引发高眼压。已有研究发现外周血淋巴细胞GR浓度与小梁网中的GR数量成正比,并通过检测外周血淋巴细胞中的GR的表达水平以帮助确定激素诱导的青光眼中的糖皮质激素敏感性,以筛选敏感人群^[3]。目前相关研究多为成人,尚未见儿童相关报道。

本研究拟通过检测使用糖皮质激素后出现高眼压儿童的外周血淋巴细胞糖皮质激素受体GR亚型GR α 及GR β 表达水平,探讨儿童激素性高眼压与GR α 及GR β 表达水平之间的相关性。

1 材料和方法

1.1 研究对象

1.1.1 入选对象 自2018-01~2019-01期间就诊于内蒙古医科大学附属第一医院儿科,使用糖皮质激素>2周的210例患儿,使用剂型包括口服及静脉用药,口服为强的松(初始剂量2mg/kg·d,足量4周后逐渐减量),静脉分为甲基强的松龙(①冲击治疗10~30mg/kg·d×3天,后改为口服强的松片1.5~2mg/kg·d,疗效稳定后逐渐减量;②一般治疗:2mg/kg·d×3天,后改为口服美卓乐片逐渐减量)及氢化可的松(5~10mg/kg·d×5~7天,后改为口服强的松片逐渐减量)。

用药前检测眼压均为正常,用药后常规用非接触式眼压计检测眼压。用药后第1月为每周1次,后为每月1次,随访期为1年,将所有数据记录备用。

激素性高眼压诊断标准^[4]:发生在眼部或全身使用糖皮质激素后,引起眼压升高,眼压超过2.74kPa(21mmHg)或两眼眼压差值>0.67kPa(5mmHg)。

将出现高眼压的20例患儿为实验组,随机选取20例未出现高眼压的患儿为对照组。另随机选取20例健康儿童,且近1年来未使用糖皮质激素者为

健康组。高眼压组及对照组均于入院当天采血3mL备用,健康组于晨8:00~10:00采外周血进行备用。高眼压组、对照组及健康组年龄、性别无统计学差异。此研究通过伦理委员会批准。

具体分组如下:(1)高眼压组:最高眼压高于21mmHg,其中最高30mmHg,平均左眼压:25.0mmHg,平均右眼压:24.7mmHg,男性13例,女性7例,年龄4~14岁,平均7.75±2.86岁。肾病综合征6例,急性肾炎2例,过敏性紫癜4例,视神经脊髓炎2例,难治性支原体肺炎2例,紫癜性肾炎2例,狼疮性肾炎1例,ANCA相关性血管炎1例;(2)对照组:最高眼压低于21mmHg。男性10例,女性10例,年龄4~13岁,平均7.85±2.92岁。肾病综合征6例,过敏性紫癜8例,免疫性脑炎2例,难治性支原体肺炎4例;(3)健康组:眼压正常,男性9例,女性11例,年龄4~14岁,平均7.80±2.93岁。

1.1.2 排除标准 POAG的一级亲属、高度近视、糖尿病、外伤性房角后退病人、先天性青光眼、葡萄膜炎继发青光眼等。

1.2 实验试剂及实验设备

人外周血淋巴细胞分离液(Solarbio);TRizol试剂(Invitrogen),2XPCR预混液(北京康为世纪生物科技有限公司);反转录酶(Promega M1701)和RNase抑制剂(Promega N2111);PCR仪:伯乐,2720型;核酸定量仪:GE, GeneQuant II;金属浴:狄昊, DHT200-4;

1.3 外周血GR α 及GR β mRNA检测

1.3.1 外周血淋巴细胞分离 清晨空腹抽取静脉血5mL,枸橼酸钠抗凝,以1×PBS缓冲液等倍稀释,缓慢加到淋巴细胞分离液,1500r/min离心20min,毛细吸管吸出淋巴细胞层,加生理盐水,略混匀,1500r/min离心20min,沉淀经2次洗涤后得所需淋巴细胞。

1.3.2 引物设计 使用NCBI的Primer-BLAST设计引物为:

GR α 的上游引物5'-ACCTAGTCCAGTGACCT-GCT-3', GR α 的下游引物5'-AGGTACAGA-CAGGGCCTCTT-3',扩增片段大小为91bp;

GR β 的上游引物5'-AAAAATTAACCAGT-GACTCCTGT-3', GR β 的下游引物5'-TCTGACATTCCTGCGTAGGT-3',扩增片段大小为118bp;

内参选用Actin, Actin的上游引物5'-TC-CAAATATGAGATGCGTTGTT-3', Actin的下游引物5'-GCTATCACCTCCCCTGTGTG-3',扩增片段大小为116bp。

引物由上海生工生物工程技术有限公司进行合成,合成后使用无菌水将引物配制成10 μ M。

1.3.3 总RNA的提取 使用TRIzol法提取总RNA,本次实验为每个样品(500 μ L)加入5mL预冷的TRIzol(15mL离心管中)。之后加入氯仿,离心,分层,使用预冷的异丙醇沉淀RNA,最终用总体积30~50 μ L的DEPC水溶解RNA。

1.3.4 RNA反转录 根据promega反转录酶的说明书进行RNA反转录,其中模板RNA使用0.8 μ g,RNase抑制剂使用0.5 μ L,最终获得20 μ L的cDNA。

1.3.5 PCR反应 分别使用上下游引物(10 μ M)各1 μ L,模板cDNA使用2 μ L,DEPC水1 μ L,以及2XP-CR预混液5 μ L,总体积为10 μ L。各成分混好后在PCR仪上进行片段扩增,PCR过程为:预变性95 $^{\circ}$ C 5min,变性95 $^{\circ}$ C 30s,退火55 $^{\circ}$ C 30s,延伸72 $^{\circ}$ C 30s,总延伸72 $^{\circ}$ C 5min,其中变性、退火和延伸为循环步骤,GR α 循环数设置为30,GR β 循环数设置为35,Actin循环数设置为25。将PCR产物全部上样至3%核酸胶,使用天能照胶仪拍照,使用Image J进行

PCR条带灰度值分析,得出各个条带的值。

1.4 数据分析

将GR α 和GR β 的值分别除以Actin的值,使用该比值计算每组的平均值和标准差。

1.5 统计学处理

统计软件为SPSS 22.0。计数资料以率(%)表示,组间比较采用卡方检验,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 基线资料

经卡方检验,高眼压组、对照组和健康组的性别构成差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。经单因素方差检验,实验组、对照组和健康组的年龄、体重、收缩压、舒张压差异无统计学意义($P > 0.05$)(见表1、2),具有可比性。

表1 高眼压组、对照组和健康组基线资料对比($n, \%$)

Tab.1 Comparison of baseline data among high intraocular pressure group, control group and healthy group($n, \%$)

项目	高眼压组($n=20$)	对照组($n=20$)	健康组($n=20$)	χ^2	P
性别					
男(%)	13(65%)	10(50%)	9(45%)	1.741	0.419

表2 高眼压组、对照组和健康组基线资料对比($n, \bar{x} \pm s$)

Tab.2 Comparison of baseline data among high intraocular pressure group, control group and healthy group($n, \bar{x} \pm s$)

项目	高眼压组	对照组	健康组	F	P
年龄	7.75 \pm 2.86	7.85 \pm 2.92	7.80 \pm 2.13	0.006	0.994
体重	23.50 \pm 6.15	23.62 \pm 6.98	23.97 \pm 6.31	0.028	0.972
收缩压	101.55 \pm 11.98	100.80 \pm 12.23	102.65 \pm 13.67	0.108	0.898
舒张压	66.11 \pm 12.48	65.85 \pm 10.54	69.15 \pm 10.57	0.535	0.589

2.2 RT-PCR 检测结果

儿童外周血单个核细胞RNA经RT-PCR扩增后,扩增产物于3%核酸胶上电泳,显示出约90bp条带(GR α)及120bp条带(GR β),与预期长度91bp(GR α)及118bp(GR β)一致;Actin条带约110bp,与预期116bp一致(见图1)。

2.3 各组外周血淋巴细胞GR α 、GR β mRN检测结果

儿童外周血淋巴细胞有GR α 、GR β mRNA表达,以GR α 为主。高眼压组的GR α mRNA半定量比值为1.29 \pm 0.13,与对照组1.23 \pm 0.13及健康组1.28 \pm 0.08相比,差异无显著性意义($P > 0.05$)。高眼压组的GR β mRNA半定量比值分别为1.24 \pm 0.04,与对

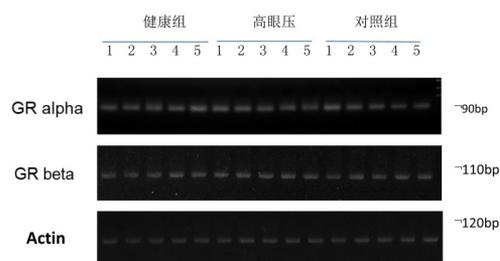


图1 外周血淋巴细胞GR α 和GR β mRNA的扩增片段电泳结果
Fig.1 Electrophoresis results of GR α and gr β mRNA in peripheral blood lymphocytes

照组1.22 \pm 0.09及健康组1.19 \pm 0.07相比,3组之间的表达差异无显著性意义($P > 0.05$)(见表3)。

表3 各组外周血 G R α 、G R β mRNA 表达的比较($n, \bar{x} \pm s$)
Tab.3 Comparison of mRNA expression of GR α and gr β in peripheral blood of each group($n, \bar{x} \pm s$)

分组	<i>n</i>	GR α /action	GR β /action
高眼压组	20	1.29 \pm 0.13	1.24 \pm 0.04
对照组	20	1.23 \pm 0.13	1.22 \pm 0.09
健康组	20	1.28 \pm 0.08	1.19 \pm 0.07
F		0.675	0.92
P		>0.05 (<i>P</i> =0.518)	>0.05(<i>P</i> =0.4)

3 讨论

糖皮质激素可通过任何给药途径(全身、滴眼、雾化等)引起眼内压升高^[5]。儿童对于糖皮质激素的用药敏感性明显高于成人,更易受到激素的影响而眼内压升高^[6]。在我们的研究中,210例患儿中有20例出现高眼压,发病率为9.5%。

在前期关于肾病综合征患儿激素性高眼压的研究中,我们未发现糖皮质激素使用的种类、累积剂量、用药方式及年龄、性别与激素性高眼压相关,提示高眼压的发生可能与个体对于激素的敏感性相关^[7]。

糖皮质激素需通过GR发挥其生物学效应。目前已发现GR经选择性剪接可产生5种亚型:GR α 、GR β 、GR γ 、GR ρ 和GR δ ^[8,9]。GR α 几乎在所有的组织和细胞中均有表达,在绝大多数细胞中的含量超过GR β 。这与我们的研究结果一致,在高眼压组、对照组及正常儿童外周血淋巴细胞中,GR α 含量高于GR β 。

糖皮质激素通过改变小梁网的功能与结构,导致房水流出阻力增加,而使眼内压升高,主要机制包括:诱导小梁网肌动蛋白张力丝重组;增加细胞外基质在小梁网的沉积,导致房水流出受阻;抑制蛋白酶和小梁网上皮细胞吞噬作用,导致小梁网基质分解减少,增加房水流出阻力^[1]。

既往认为GC诱导的OHT与病人的固有GC敏感性相关^[5],而GC敏感性与GR α 的数量相关^[10]。但结果尚不一致。在刘荣等的研究中激素性高眼压病人外周血单核细胞的GR α 的表达水平较正常眼压及对照组有显著升高,认为外周血GR α mRNA的表达水平与糖皮质激素性青光眼的发病密切相关^[11]。但在王纓^[12]等人研究发现,特发性血小板减少性紫癜对照组、激素敏感组和激素抵抗组3组之间GR α mRNA表达水平无显著性差异。这与我们

的研究结果一致,在我们的研究中,高眼压组的GR α mRNA半定量比值为1.35 \pm 0.15,与健康眼压组1.33 \pm 0.09及对照组1.25 \pm 0.14相比,差异无显著性意义(均*P*>0.05)。这就提示激素性高眼压的发生不只决定于GR α 的数量,而可能与其他因素相关。

近年来研究发现除了GR α 水平外,包括:GR α 的亚型、HSP90表达、翻译后修饰等在内的多种机制均参与激素性高眼压的发生。

3.1 GR多个翻译位点可产生多达8种不同的GR α 亚型

即GR α -a、GR α -b、GR α -c1、GR α -c2、GR α -c3、GR α -d1、GR α -d2和GR α -d3。人眼小梁网细胞优先表达GR α -c和GR α -d亚型^[13]。GR α -c亚型被认为是最具生物活性的,而gr α -d亚型则是糖皮质激素介导功能最缺乏的^[14]。GR α 各亚型具体参与激素性高眼压的发病机制还有待于进一步研究。

3.2 GR的结合活性由两方面的因素决定

GR的数量及GR的配体亲和力。Hsp90是影响GR亲和力的重要因素之一^[15]。只有Hsp90与GR的配体结合域结合后,GR才具有对GC的高亲和力。HSP90可在一定程度上决定GC作用的敏感度。

3.3 GR的激活和功能

除了受配体调节外,还受翻译后修饰,包括磷酸化、乙酰化、亚硝基化、氧化还原、遍在蛋白化以及小分子遍在蛋白样修饰、去甲基化等影响^[1]。

GR β 作为GR α 转录活性的显性负调节因子发挥作用。GR β 对GR α 的抑制作用机制迄今尚不清楚,目前认为可能包括以下几个方面:(1)通过共有DBD与GR α 竞争GRE的结合位点;(2)与GR α 形成异型二聚体;(3)通过竞争性结合转录而共激活因子AP-1使GR α 与之隔离,进而影响GR α 的转录调节作用^[16]。Zhang等^[17]的研究显示青光眼病人的小梁细胞GR β 表达水平低于正常人,使其对激素更敏感,同时还引起小梁细胞吞噬功能降低,导致房水流出阻力增加。而在刘荣等的研究中发现外周血单核细胞高眼压组、正常眼压组、对照组间GR β mRNA半定量比值无明显差异,外周血GR β mRNA与激素性青光眼的关系可能不大^[12]。在我们的研究中,高眼压组的GR β mRNA半定量比值分别为1.24 \pm 0.04,与健康眼压组1.20 \pm 0.07及对照组1.28 \pm 0.03相比,3组之间的表达差异无显著性意义(均*P*>0.05)。

分析原因除了GR β 表达水平外,GR β 亚型及炎症因子影响了其功能的表达:

(1)人类GR β 也有8种不同的亚型,这是由于有不同的翻译位点(称为:gr β -a、gr β -b、gr β -c1、gr β -c2、gr β -c3、gr β -d1、gr β -d2和gr β -d3)。这意味着根据表达的不同亚型,可能有256种不同的gr α /gr β 异二聚体受体组合^[1]。GR β 与GR α 形成异型二聚体类型有可能关系到GR β 的抑制作用;(2)炎症因子,如TNF- α 、IL-2、IL-4可上调GR,尤其是GR β 的表达水平,而影响GC的敏感性^[18,19]。

除了以上因素外,糖皮质激素受体基因多态性参与GC与GR功能的改变,NR3C1基因突变与GC抵抗相关^[20]。还有研究发现除了GR α 和GR β 外,GR-P可能提高了GC的生物活性,进而参与了激素性高眼压的发生^[21]。

综上,我们的研究未发现儿童外周血淋巴细胞糖皮质激素受体GR α 和GR β 的表达水平与激素性高眼压之间相关性。除数量外,糖皮质激素通过包括GR α 和GR β 亚型、HSP90表达、GR翻译后修饰、炎症因子、选择性剪切、基因多态性等多种机制作用于糖皮质激素受体功能而引发激素性高眼压。外周血GR α 及GR β 的表达水平对判断发生GIG的相关性仍需进一步研究。本研究不足之处在于病例数较少,可能会影响到实验结果,且未对不同种类糖皮质激素使用后出现眼内压增高分组进行比较,期望在以后的研究中可以扩大标本数量,进一步完善研究。儿童使用糖皮质激素容易引发激素性高眼压,在使用激素过程中需密切监测眼压情况。

参考文献

- [1]Dibas A, Yorio T. Glucocorticoid therapy and ocular hypertension [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016; **787**(1):57-71
- [2]Wang XQ, Duan ZX, He XG, et al. Clinical relevance of the glucocorticoid receptor gene polymorphisms in glucocorticoid-induced ocular hypertension and primary open angle glaucoma[J]. *Int J Ophthalmol*, 2015; **8**(1):169-173
- [3]Zhang X, Clark AF, Yorio T. Regulation of glucocorticoid responsiveness in glaucomatous trabecular meshwork cells by glucocorticoid receptor-beta[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005; **46**(12):4607-4616
- [4]李凤鸣. 中华眼科学[M]. 北京: 人名卫生出版社, 2006:1473
- [5]姚乃成. 激素性青光眼的研究进展. *临床眼科杂志*[J], 2007; **1**(5):470-473
- [6]Lam DS, Fan DS, Ng JS, et al. Ocular hypertensive and anti-inflammatory responses to different dosages of topical dexamethasone in children: a randomized trial. *Clin Exp Ophthalmol*. 2005; **33**:252-258
- [7]赵芸, 苏白鸽, 肖慧捷, 等. 原发肾病综合征患儿糖皮质激素治疗致眼科不良反应临床特点分析. *北京大学学报*[J], 2017; **49**(5):794-797
- [8]Delom F, Chevet E. Phosphoprotein analysis: from proteins to proteomes. *Proteome Sci*, 2006; **19**:4-15
- [9]Simic I, Maric NP, Mitic M, et al. Phosphorylation of leukocyte gluco-corticoid receptor in patients with current episode of major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2013; **40**:281-285
- [10]张虎, 欧阳钦, 温忠慧, 等. 溃疡性结肠炎肠粘膜细胞中糖皮质激素受体 α 和 β 的表达. *四川大学学报*[J], 2004; **35**(5):630-633
- [11]刘荣, 李贵刚, 毕江江. 激素性高血压病人外周血单个核细胞糖皮质激素受体 α 、 β 的表达及意义. *华中科技大学学报*[J], 2009; **38**(1):124-127
- [12]王纓, 李长刚, 石红松, 等. 糖皮质激素受体 α 和受体 β 与特发性血小板减少性紫癜糖皮质激素抵抗的关系. *中国实用儿科杂志*[J], 2007; **22**(2):124-126
- [13]Nehme A, Lobenhofer EK, Stamer WD, et al. Glucocorticoids with different chemical structures but similar glucocorticoid receptor potency regulate subsets of common and unique genes in human trabecular meshwork cells. *BMC Med Genomics*. 2009; **2**:58
- [14]Wu I, Shin SC, Cao Y, et al. Selective glucocorticoid receptor translational isoforms reveal glucocorticoid-induced apoptotic transcriptomes. *Cell Death Dis*. 2013; **4**:e453
- [15]沈璐, 易高, 张春云, 等. 热休克蛋白90和糖皮质激素受体mRNA在糖皮质激素敏感型依赖型和抵抗型哮喘中的表达及其在抵抗型哮喘发病中的作用. *河北医学*[J], 2017; **25**(6):968-971
- [16]徐佩, 王俊文, 张虹, 等. 糖皮质激素受体与激素性青光眼. *华南国防医学杂志*[J], 2012; **26**(3):292-295
- [17]Zhang X, Ognibene CM, Clark AF, et al. Dexamethasone inhibition of trabecular meshwork cell phagocytosis and its modulation by glucocorticoid receptor beta [J]. *Exp Res*, 2007; **84**(2):275-284
- [18]De Rijk RH, Schaaf M, de Kloet ER. Review: glucocorticoid receptor variants: clinical implications[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2002; **81**:103122
- [19]Oakley RH, Cidlowski JA. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2013; **132**:1033-1044
- [20]李瑞佳, 刘洁. 糖皮质激素受体基因多态性与糖皮质激素抵抗的遗传药理学研究进展. *中国新药杂志*[J], 2015; **24**(11):1246-1254
- [21]王德杰, 刘兴国, 张东. 糖皮质激素受体的研究进展. *现代生物医学进展*[J], 2010; **10**(8):1592-1594