

SCD-1、LYSC 在干眼症病人结膜上皮细胞及泪液中表达及意义

陈旭¹, 申颖²

(1. 内蒙古医科大学, 内蒙古 呼和浩特 010059; 2. 内蒙古医科大学附属医院 近视眼激光治疗中心)

摘要: **目的:** 探究干眼症(DES)病人结膜上皮细胞及泪液中硬脂酰辅酶 A 去饱和酶-1(SCD-1)、溶菌酶 C (LYSC)的表达及意义。 **方法:** 随机抽取在医院干眼门诊就诊的 DES 病人 55 例(DES 组)及非妊娠健康人群 50 例(对照组), 利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术检测两组研究对象结膜上皮细胞及泪液中 SCD-1 水平, 利用微量快速比浊法测定 LYSC 含量, 比较 DES 组及对对照组结膜上皮细胞及泪液中 SCD-1、LYSC 水平, DES 组治疗前后 SCD-1、LYSC 水平及各项临床指标的变化, 利用 Pearson 分析 DES 病人结膜上皮组织及泪液中 SCD-1、LYSC 水平与各项临床指标变化的相关性。 **结果:** DES 组病人结膜上皮细胞、泪液中 SCD-1、LYSC 水平与对照组相比均显著降低($P < 0.05$); 与治疗前相比, DES 组病人治疗后结膜上皮细胞及泪液中 SCD-1、LYSC 水平升高 ($P < 0.05$), BUT 延长, SIT 值增加, CFS 评分降低 ($P < 0.05$); Pearson 结果显示, 结膜上皮组织及泪液中所含 SCD-1、LYSC 水平与 BUT、SIT 结果呈正相关 ($P < 0.05$), 与 CFS 评分呈负相关 ($P < 0.05$)。 **结论:** DES 病人结膜上皮细胞和泪液中 SCD-1、LYSC 水平均低于健康对照组, 治疗后 SCD-1、LYSC 水平均高于治疗前, 提示 SCD-1、LYSC 水平变化可能与泪液中的脂质存在某种关系, 参与 DES 症状的发生、发展。

关键词: 硬脂酰辅酶 A 去饱和酶-1; 溶菌酶 C; 干眼症; 结膜上皮细胞; 泪液

中图分类号: R77

文献标识码: A

文章编号: 2095-512X(2020)04-0444-05

EXPRESSIONS AND SIGNIFICANCE OF SCD-1 AND LYSC IN CONJUNCTIVAL EPITHELIAL CELLS AND TEARS OF PATIENTS WITH DRY EYE SYNDROME

CHEN Xu, SHEN Ying

(Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059 China)

Abstract: Objective: To investigate the expression and significance of stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1) and lysozyme C (LYSC) in conjunctival epithelial cells and tears of patients with dry eye disease (DES). **Methods:** 55 cases of DES patients (DES group) and 50 Non-pregnant healthy people (control group) treated in dry eye outpatient department of affiliated hospital of Inner Mongolia Medical University were selected to detect conjunctiva in two groups using real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) technology. The levels of SCD-1 in epithelial cells and tears were determined by the rapid turbidimetry method. The levels of SCD-1 and LYSC in conjunctival epithelial cells and tears in the DES group and the control group were compared. The levels of SCD-1 and LYSC in the DES group before and after treatment; Pearson was used to analyzed the correlation between SCD-1 and LYSC levels in conjunctival epithelial tissue and tear fluid and changes in various clinical indicators in patients with DES. **Results:** The levels of SCD-1 and LYSC in conjunctival epithelial cells and tears were significantly lower in the DES group than in the control group ($P < 0.05$); Levels of SCD-1 and LYSC in conjunctival epithelial cells and tears increased in the DES group as compared to pre-treatment ($P < 0.05$), BUT extended, SIT value increases, the CFS score lower ($P < 0.05$); Pearson, according to the results of conjunctival epithelial tissue and tears of SCD-1, LYSC

收稿日期: 2020-04-11; 修回日期: 2020-07-21

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金面上项目(2019MS08142)

作者简介: 陈旭(1993-), 女, 内蒙古医科大学 2018 级在读硕士研究生。

通讯作者: 申颖, 主任医师, E-mail: 2438413496@qq.com 内蒙古医科大学附属医院近视眼激光治疗中心, 010050

level and regress, SIT positively correlated ($P < 0.05$), negatively correlated with CFS score ($P < 0.05$). **Conclusion:** Levels of SCD-1 and LYSC in conjunctival epithelial cells and tears of DES patients were lower than those of healthy control group, Both SCD-1 and LYSC levels were higher after treatment than before, which is suggested that the changes of SCD-1 and LY-SC levels may be related to the lipid in tear, and may be participate in the occurrence and development of DES symptoms.

Key words: stearyl-CoA desaturase-1; lysozyme C; dry eye syndrome; conjunctival epithelial cells; tears

干眼症(dry eye syndrome, DES)是一种常见的眼科疾病,由于任何原因造成眼泪质量、动力学异常改变,最终导致泪膜不稳定、眼表损害,临床上DES病人主要表现为眼睛干涩、易疲劳、有灼烧感或异物感、瘙痒、畏光、眼红、视疲劳等^[1]。中国DES患病率约为21%~30%,经流行病学统计数据发现,DES发病病人受性别、年龄等因素的影响,研究发现女性病人多于男性病人,老年病人多于青年病人。DES发病原因众多,临床表现各异,发病机制较为复杂^[2]。硬脂酰辅酶去饱和酶-1(stearoyl-CoA desaturase-1, SCD-1)是一种限速酶,其反应的主要产物油酸是人脂肪组织三酰基甘油的主要脂肪酸,与肥胖症和代谢综合征有关^[3]。有学者研究发现,SCD-1敲除后小鼠表现出睑板腺异常^[4]。溶菌酶C(lysozyme C, LYSC)是所有生物体不同组织中的多种溶菌酶之一,是细胞中的关键免疫蛋白,具有稳定的结构和较强的抑菌活性^[5,6]。Piera等^[7]研究表明DES病人泪液中LYSC水平明显低于正常人。关于SCD-1、LYSC与DES的相关研究在国内鲜有报道,因此本研究通过测定SCD-1、LYSC在DES病人的结膜上皮细胞以及所分泌泪液中的表达水平,以探究其在DES病人结膜上皮细胞以及泪液中的表达关系及其特殊意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

随机抽取在医院干眼门诊就诊的DES病人55例为DES组,其中男性21例,女性34例,年龄13~60岁,平均年龄 38.52 ± 7.36 岁;同时选取于我院进行体检且眼科检查无异常的非妊娠健康人群50例作对照组,其中男性20例,女性30例,年龄15~60岁,平均年龄 38.26 ± 7.10 岁。DES病人纳入标准均符合《干眼症临床诊断与治疗》中的诊断标准^[8]。排除标准^[9]:(1)近期眼部有炎症反应症状;(2)眼部曾做过手术或有眼角膜移植史;(3)近期一周使用过滴眼液;(4)合并免疫系统疾病。两组研究对象年

龄、性别差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 样本采集与检测 对照组在首次入院检查时采集样本,DES组病人分别在治疗前后采集样本。结膜上皮细胞采集:用干净刀片轻刮研究对象上睑结膜,放入冻存管中,置于 -20°C 冷冻冰箱保存,待测。泪液样本采集:将0.9%生理盐水注射液 $60\ \mu\text{L}$ 滴入研究对象结膜囊内,让泪液与生理盐水混合充分后,分别收集左、右眼所分泌的泪液并置于离心管中,混匀后放入 -20°C 冷冻冰箱保存待测。

1.2.2 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测SCD-1水平 利用qRT-PCR技术检测SCD-1水平。用Trizol试剂盒(货号:RP2401,北京百泰克生物技术有限公司)提取总RNA。利用紫外分光光度计(UV-8000,上海精密仪表)检测RNA纯度。反转录试剂盒(货号:KL266,上海康朗生物科技有限公司)、PCR扩增试剂盒(货号:ZY-14806,上海泽叶生物科技有限公司)均严格按照说明书操作步骤执行,以GAPDH为内参基因。实验循环参数:提前预热至 95°C ,预变性30min;取出并降温至 90°C ,变性5s;迅速降温至 58°C ,退火20s;使温度保持在 60°C ,延伸45s,共40个循环。引物序列由生工生物工程公司合成,SCD-1上游引物:5'-AGATA-CACTCTGGTGCTCAACGC-3',下游引物:5'-CAG-GATGTTCTCCCCGAGATTGA-3';GAPDH上游引物:5'-GACTCCGCTAACATCAAATG-3',下游引物:5'-GAGGGAGTTGTCATATTTCTC-3'。用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算SCD-1相对表达量。

1.2.3 微量快速比浊法测定LYSC含量 利用微量快速比浊法测定LYSC含量^[10]。LYSC测试盒、染色菌液制备、LYSC标准液制备及标准曲线绘制,均按照说明书操作步骤进行。LYSC测试盒(JN1255-BRE)购自北京百奥莱博科技有限公司,标准溶菌酶干粉(LM100406-10)购自上海联迈生物科技有限公司,酶标仪(RT-6000)购自上海信裕生物科技有限公司。

1.3 临床指标检测

(1)泪膜破裂时间(break-up time, BUT)检测: 在所有研究对象下睑结膜囊内涂抹 20 g/L 的荧光素钠溶液 1μL,嘱受试者闭眼使荧光素钠溶液均匀的涂抹于角膜表层,通过裂隙灯在钴蓝光照射下仔细观察角膜,嘱观察对象瞬目后保持不动,观察在泪膜上产生的首个破裂点计为泪膜破裂时间。破膜时间<10 s 则呈阳性结果,重复实验 3 次取其平均值;(2)基础泪液分泌试验(schirmer I test, SIT): 轻拨开受试者下眼睑,避免刺激其流泪,嘱受试者眼球上翻保持不动,在下眼睑中外 1/3 结膜囊内轻放入泪液分泌试纸,闭眼 5 min 后读取试纸湿润长度,结果以长度不足 5 mm 为干眼;(3)角膜荧光素染色(cornea fluorescein staining, CFS): 在研究对象的结膜囊内滴入 20 g/L 的荧光素钠溶液 1μL,用 0.9%生理盐水冲洗后,通过裂隙灯在钴蓝光照射下仔细观察角膜,以瞳孔中心为中点,将角膜划分为 4 个象限,根据染色情况对角膜破损程度进行评分

(无染色记 0 分,离散点状染色记 1 分,密集点状染色记 2 分,片状染色记 3 分),共计 0~12 分。给予已确诊的 DES 病人 0.1%玻璃酸钠滴眼液(德国 URSAPHARM 公司,进口药品注册证号 H20150150) 1 滴/次,5~6 次/天,2 周后复查。

1.4 统计学处理

将所得数据用 SPSS19.0 统计学软件进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差表示,两组间比较采用 t 检验的统计学方法,以 P< 0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 将 DES 组和对照组治疗前,在结膜上皮细胞及泪液中所含 SCD-1、LYSC 的水平进行比较

DES 组病人结膜上皮细胞及泪液中所含 SCD-1、LYSC 的水平均低于对照组,差异有统计学意义 (P<0.05)(见表 1)。

表 1 DES 组与对照组(治疗前)在结膜上皮细胞及泪液中 SCD-1、LYSC 水平比较(̄x ± s, n)

Tab.1 Comparison of SCD-1 and LYSC levels in conjunctival epithelial cells and tears between des group and control group (before treatment)(̄x ± s, n)

Table with 6 columns: 组别, n, 结膜上皮细胞 (SCD-1, LYSC(mg/mL)), 泪液 (SCD-1, LYSC(mg/mL)). Rows include DES 组, 对照组, t, and P values.

2.2 对 DES 组病人治疗前后结膜上皮细胞及泪液中 SCD-1、LYSC 水平比较

SCD-1、LYSC 水平均高于治疗前,差异有统计学意义 (P< 0.05)(见表 2)。

DES 组病人经治疗后结膜上皮细胞及泪液中

表 2 DES 组病人治疗前后结膜上皮细胞及泪液中 SCD-1、LYSC 水平比较(̄x ± s)

Tab.2 Comparison of SCD-1 and LYSC levels in conjunctival epithelial cells and tears before and after treatment in DES group(̄x ± s)

Table with 6 columns: 组别, n, 结膜上皮细胞 (SCD-1, LYSC(mg/mL)), 泪液 (SCD-1, LYSC(mg/mL)). Rows include 治疗前, 治疗后, F, and P values.

2.2 DES 组病人治疗前后临床指标变化

DES 组病人经治疗后与治疗前相比, BUT 延

长, SIT 值增加, CFS 评分降低, 差异有统计学意义 (P<0.05)(见表 3)。

表3 DES组病人治疗前后临床指标变化($\bar{x} \pm s$)
Tab.3 Changes of clinical indexes in DES group before and after treatment($\bar{x} \pm s$)

组别	n	BUT(s)	SIT(mm)	CFS评分
治疗前	55	5.10 ± 1.26	4.68 ± 1.22	3.86 ± 1.05
治疗后	55	8.57 ± 3.42	5.24 ± 1.49	3.46 ± 1.02
t	-	7.061	2.157	2.026
P	-	0.000	0.033	0.045

2.3 DES组病人SCD-1、LYSC水平与临床指标的相关性分析

DES组病人结膜上皮组织、泪液中所含SCD-

1、LYSC的水平与BUT、SIT均呈正相关($P < 0.05$), 与CFS评分均呈负相关($P < 0.05$)(见表4)。

表4 DES组病人结膜上皮组织中SCD-1、LYSC水平与临床指标的相关性

Tab.4 Correlation between SCD-1、LYSC levels in conjunctival epithelium and clinical indexes in DES group

指标	SCD-1		LYSC	
	r	P	r	P
BUT	0.435	0.000	0.406	0.000
SIT	0.472	0.000	0.398	0.000
CFS评分	-0.487	0.000	-0.426	0.000

3 讨论

DES可引起病人眼睛红肿、充血,严重时会造成角结膜病变,影响视力。目前研究认为,DES核心机制是由泪液高渗透压和泪膜不稳定引起的^[11]。泪液量减少是泪液渗透压增高的主要原因^[12],由于炎性介质破坏泪腺组织及潜在可逆的流动性神经分泌被阻断,导致泪液量减少^[13]。炎症因子进入泪液,引起眼脸上皮细胞损坏,导致泪膜不稳定,促使泪液渗透压进一步升高,形成恶性循环。

SCD-1是一种含铁的同素酶,可催化饱和脂肪酸向单不饱和脂肪酸转化,在脂肪酸合成和代谢中起关键作用^[14]。Tan等^[15]研究发现,miR-199a-3p可能促进脂肪细胞增殖,通过下调SCD和改变脂质形成过程中的脂肪酸组来抑制脂肪细胞分化。SCD-1也是癌症的潜在药物靶标^[16],在癌细胞中,SCD-1的活性上调利于癌细胞增殖。Angelucci等^[17]研究发现,在与成纤维细胞共培养的肿瘤细胞中,膜流动性调节SCD-1表达上调,确立其在肿瘤细胞固有运动和驱动肿瘤细胞运动中的重要作用。泪液主要由脂质、蛋白质、无机盐和粘液组成^[18]。泪液蛋白在保护眼部表面免受外部伤害方面起重要作用^[19],还能调节眼部伤口愈合,有助于维持泪液膜的稳定^[20]。Inaba等^[4]通过对SCD-1缺陷型(SCD-1 KO)小鼠泪液和眼组织的分析研究发现,SCD-1 KO小鼠泪腺脂质代谢基因表达降低,并且

缺乏SCD-1会引起与脂质代谢基因表达相关的泪液量和粘蛋白水平代偿性增加,为治疗干眼症提供新策略。眼泪的产生与人类代谢综合症之间存在某种联系^[21,22]。本研究结果显示,DES病人结膜上皮细胞和泪液中SCD-1水平低于正常对照组,治疗后SCD-1水平高于治疗前,提示SCD-1可能与泪液中的脂质含量存在某种关系,参与DES作用。

溶菌酶(LYS)是一种碱性蛋白酶,广泛存在于动植物各个组织及分泌物中^[23]。在目前已知的6种LYS类型中,LYSC是研究最为广泛、深入的类型^[24]。LYSC是由主泪腺腺泡分泌的具有抗炎、抑菌、抗氧化等特性的多功能链多肽^[25]。陈彦等探究2型糖尿病合并干眼症病人LYS、表皮生长因子(EGF)和乳铁蛋白(LF)的水平变化,结果显示经玻璃酸钠滴眼液治疗后,病人泪液中LYS、EGF和LF水平均显著升高。有学者报道,LYS主要由嗜中性粒细胞分泌,当眼结膜受到炎症因子作用时,嗜中性粒细胞活性增加,刺激LYS分泌,使其水平升高,可作为指示机体防御功能的指标。本研究结果显示,DES病人结膜上皮细胞和泪液中LYSC水平低于正常对照组,治疗后LYSC水平高于治疗前,提示LYSC水平变化与DES的发生、发展有关。

本研究对DES病人治疗前后的临床指标进行比较,结果显示,与治疗前相比,治疗后BUT延长,SIT值增加,CFS评分降低。泪液中的蛋白质不仅起消毒杀菌作用,还提供脂质载体,稳定泪膜形态,

保护滋养角膜及角膜上皮细胞。推测 DES 病人可能经长期炎症因子或者免疫因子侵蚀,眼表皮的免疫微环境稳态被破坏,临床症状加重,可以通过滴注人工泪液的方式减缓 DES 病症。利用 Pearson 分析 DES 患者结膜上皮组织及泪液中 SCD-1、LYSC 水平与临床指标的相关性,结果显示结膜上皮组织及泪液中 SCD-1、LYSC 水平 SCD-1、LYSC 水平与 BUT、SIT 均呈正相关,与 CFS 评分均呈负相关,提示 SCD-1、LYSC 可作为评价 DES 病人病情好坏的指标。

4 结论

本研究发现,DES 病人结膜上皮细胞和泪液中 SCD-1、LYSC 水平均低于健康对照组。经治疗后,SCD-1、LYSC 水平均高于治疗前,且 BUT 延长,SIT 值增加,CFS 评分降低,提示 SCD-1、LYSC 水平变化可能与泪液中的脂质存在某种关系,参与 DES 症状的发生、发展,具体的作用机制有待进一步研究。

参考文献

- [1]唐颖,田甜,葛红岩.干眼症发病机制与发病因素的研究进展[J].医学综述,2019;25(11):2196-2201
- [2]曾永宜.TNF- α 和TSLP在干眼症患者结膜上皮细胞和泪液中的表达水平及意义[J].临床眼科杂志,2016;24(6):496-498
- [3]Mauvoisin D, Mounier C. Hormonal and nutritional regulation of SCD1 gene expression[J]. Biochimie, 2011;93(1):78-86
- [4]Inaba T, Tanaka Y, Tamaki S, et al. Compensatory increases in tear volume and mucin levels associated with meibomian gland dysfunction caused by stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency[J]. Sci Rep, 2018;8(3358):1-8
- [5]何乐,翟少伟,冯建军,等.日本鳎嗜水气单胞菌的分离鉴定与免疫相关基因变化的研究[J].集美大学学报(自然版),2019;24(4):249-257
- [6]江利红,牟旆,魏锐利,等.甲状腺相关眼病患者泪液中溶菌酶C与乳铁蛋白的表达[J].中华医学杂志,2015;95(10):749-752
- [7]Versura P, Bavelloni A, Grillini M, et al. Diagnostic performance of a tear protein panel in early dry eye[J]. Mol Vis, 2013;19(6):1247-1257
- [8]刘祖国.干眼的临床诊断与治疗亟待规范化和精细化[J].中华眼科杂志,2017;53(9):641-644
- [9]赵亚东,徐夏冰,张少波,等.肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素1 β (IL-1 β)在干眼症患者结膜上皮细胞和泪液中的表达及意义[J].现代生物医学进展,2017;17(34):6713-6716
- [10]熊辉.泪液中溶菌酶与转化生长因子 β 2在干眼症患者中检测方法及其意义研究[J].临床医学,2016;36(03):15-17
- [11]晋秀明,章悦.关注干眼的系统治疗方法[J].中华实验眼科杂志,2019;37(3):218-223
- [12]林超,柯大观.免疫抑制剂在干眼治疗应用中的进展[J].中华眼视光学与视觉科学杂志,2018;20(6):380-384
- [13]牟芑玥,褚晨晨,赵少贞.过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 在治疗干眼中的作用[J].国际眼科纵览,2018;42(6):371-375
- [14]Kamal S, Saleem A, Rehman S, et al. Protein engineering: Regulatory perspectives of stearoyl CoA desaturase[J]. Int J Biol Macromol, 2018;1(114):692-699
- [15]Tan Z, Du J, Shen L, et al. miR-199a-3p affects adipocytes differentiation and fatty acid composition through targeting SCD1[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017;492(1):82-88
- [16]杨君,张彩凤,秦瑞英,等.SCD-1在宫颈癌中的表达及其表达下调对宫颈癌细胞增殖和凋亡的影响[J].中国病理生理杂志,2013;29(11):1972-1977
- [17]Angelucci C, Alessio DA, Iacopino F, et al. Pivotal role of human stearoyl-CoA desaturases (SCD1 and 5) in breast cancer progression: oleic acid-based effect of SCD1 on cell migration and a novel pro-cell survival role for SCD5[J]. Oncotarget, 2018;9(36):24364-24380
- [18]Azkargorta M, Soria J, Acera A, et al. Human tear proteomics and peptidomics in ophthalmology: Toward the translation of proteomic biomarkers into clinical practice[J]. J Proteomics, 2016;150(1):359-367
- [19]Turck N, Dor M, Eperon S, et al. Exploration of human tear proteome[J]. Acta Ophthalmologica Scandinavica, 2016;94(S256):1755-1756
- [20]Gao Y, Zhou J, Sun XF. The effect of tear film function on the activity of primary pterygium[J]. Ophthalmology in China, 2015;24(1):44-46
- [21]魏茜敏,邹文进.视频显示终端使用时间及睡眠时间对干眼患者泪液代谢的影响[J].广东医学,2016;37(5):744-746
- [22]宁玉贤,赵少贞.伴长时间视频终端干眼儿童睑板腺及泪膜脂质层的特点[J].中华实验眼科杂志,2019;37(3):201-205
- [23]Ashley Y. Cellular microbiology: Lysozyme protects bacteria from β -lactams[J]. Nat Rev Microbiol, 2018;16(4):183-184
- [24]Wu T, Huang J, Jiang Y, et al. Formation of hydrogels based on chitosan/alginate for the delivery of lysozyme and their anti bacterial activity[J]. Food Chem, 2018;240(1):361-369
- [25]Glasgow BJ, Abduragimov AR. Interaction of Ceramides and Tear Lipocalin[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2018;1863(4):399-408