doi:10.11659/jjssx.06E025012

·基础研究·

Pax6和Wnt7a表达对小鼠角膜碱烧伤的影响

高 杰,文邦红,邹星星,张祥令,胡 蓉,苏 敏 (贵州医科大学组织学与胚胎学教研室,贵州 贵阳 550004)

[摘 要] **目的** 研究Pax6和Wnt7a在碱烧伤小鼠角膜中的表达,探讨Pax6和Wnt7a是否参与了角膜的损伤修复。**方法** 选取40只健康雌性昆明小鼠,随机分为对照组和实验组,每组20只。实验组小鼠右眼建立角膜碱烧伤模型,左眼不做任何处理。对照组小鼠不做碱烧伤。1个月后,取小鼠角膜组织,HE染色观察角膜的形态学变化;免疫荧光染色及流式细胞术检测角膜组织中p63、Pax6和Wnt7a的表达。**结果** 肉眼观察到碱烧伤模型小鼠角膜混浊,HE染色观察可见角膜内有杯状细胞和毛细血管增生。实验组小鼠角膜厚度较对照组显著增加($P<0.05$)。与正常小鼠的角膜相比,碱烧伤小鼠角膜Pax6阳性表达率降低($P<0.05$),而Wnt7a阳性表达率升高($P<0.05$)。**结论** Pax6及Wnt7a在碱烧后小鼠的角膜中表达量发生改变,提示可能参与了角膜的损伤修复。

[关键词] 碱烧伤;小鼠角膜;Pax6;Wnt7a
[中图分类号] R329.2 [文献标志码] A [收稿日期] 2025-06-04

Effect of Pax6 and Wnt7a expression in mouse cornea with alkali burn

GAO Jie, WEN Bang-hong, ZOU Xing-xing, ZHANG Xiang-ling, HU Rong , SU Min (Department of Histology and Embryology, Guizhou Medical University , Guiyang Guizhou 550004, China)

Abstract: Objective To explore the expression of Pax6 and Wnt7a in alkali-burned cornea of mice, and thus discuss whether Pax6 and Wnt7a are involved in the repair of corneal damage. **Methods** Totally 40 healthy female Kunming mice were randomly divided into the control group and the experimental group, with 20 mice in each group. The alkali burn model was established in the right eye of mice in the experimental group, and the left eye was not treated. The control group was not intervened by alkali burn. One month later, corneal tissues of mice were taken and the morphological changes of the cornea were observed by HE staining. The expressions of p63, Pax6 and Wnt7a in corneal tissues were detected by immunofluorescence staining and flow cytometry. **Results** Corneal opacity was observed with the naked eye in the alkali-burned mice. HE staining revealed goblet cells and capillary hyperplasia within the cornea. The corneal thickness of the mice in the experimental group was significantly increased than that in the control group ($P<0.05$). Compared with the corneas of normal mice, the positive expression rate of Pax6 in the corneas of alkali-burned mice decreased ($P<0.05$), while the positive expression rate of Wnt7a increased ($P<0.05$). **Conclusion** The expression levels of Pax6 and Wnt7a changed in the corneas of mice after alkali burn, suggesting that they might be involved in the repair of corneal damage.

Keywords: alkali burn; mice cornea; Pax6; Wnt7a

眼球壁的最外层为角膜,为透明的圆盘状结构,正常的角膜组织中不含血管和淋巴管,营养由房水和角膜缘的血管以渗透方式供应。外界环境(如外伤、感染、化学试剂、物理刺激等)因素可能导致角膜的正常结构遭到破坏,严重时影响外观和视力[1]。角膜化学烧伤是临床上常见的严重眼外伤之一,主要由眼部接触NaOH、KOH、氨水等碱性物质所致,可引发角膜上皮缺损、角膜穿孔及眼球粘连等严重创伤[2],此类创伤愈合过程中易形成角膜瘢痕和新生血管,从而造成永久性失明。目前研究多集中在药物对角膜碱烧伤的效果上,对于引起的角膜碱烧伤的分子机制研究较少,因此,本研究主要对角膜损伤修复中的分子表达变化进行观察研究。

配对盒基因6(paired box gene 6,Pax6)对于眼球结构形成和正常发育具有非常重要的作用[3-4]。研究发现在胚胎发育过程中Pax6基因突变可能导致角膜混浊、先天性无虹膜、Peters异常、黄斑发育不良、视网膜母细胞瘤等[5]。Pax6主要表达于眼球各组织中,包括视泡、视盘、晶状体、睫状体、角膜上皮以及视网膜色素上皮等[6-7]。其可维持角膜上皮的细胞分化,在治疗角膜上皮损伤中有重要作用[8]。Wnt7a是Wnt信号家族成员中的一种分泌糖蛋白,广泛存在于生物体内,对细胞的增殖和分化具有重要的作用,经典Wnt通路激活后,联合其他一些因子可影响下游目的基因的表达,从而影响细胞增殖和分化[9-10]。研究表明,Wnt7a

[基金项目] 贵州省科技厅项目(黔科合基础-ZK[2022]一般344);贵州省高等学校重点实验室(黔教技[2023]016号)

[通信作者] 苏 敏,E-mail:summ30@163.com

主要在胎盘、肾脏、睾丸、子宫和成人脑等组织中表达,在胚胎生长、组织再生、干细胞分化以及癌症中都起到了关键性的作用,并负责维持基质中其他Wnt基因的表达[11-12]。

目前国外有研究在体外无滋养细胞的条件下成功扩增了角膜缘干细胞,发现Wnt7a通过Pax6控制了角膜上皮的分化,证实Wnt7a和Pax6在角膜谱系专向分化中起重要作用[13]。我们前期也在正常角膜中观察到Wnt7a和Pax6的表达[14],但其在碱烧伤角膜中是否发挥作用,目前还不清楚。因此,本研究通过建立小鼠角膜碱烧伤模型,运用免疫荧光染色、流式细胞术等技术检测Pax6及Wnt7a在碱烧伤造成的角膜损伤中的表达变化,以期为转基因治疗眼表疾病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

健康清洁级雌性昆明小鼠,体质量10~20 g,周龄4~6周,由贵州医科大学实验动物中心提供,动物使用许可证号:SYXK(黔)2018-001。甲醛-乙醇-冰醋酸(alcohol-formalin-acetic acid,AFA)固定液配置:20%甲醛40 mL+95%乙醇60 mL+冰醋酸5 mL。兔抗Pax6多克隆抗体(稀释浓度1∶200)、兔抗Wnt7a单克隆抗体(稀释浓度1∶300)、别藻青蛋白(allophycocyanin,APC)山羊抗兔荧光二抗(稀释浓度1∶500)购自Abcam;Cy3荧光山羊抗兔二抗(稀释浓度1∶300)购自碧云天公司。引物设计与合成由上海生工完成。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制作 将40只昆明小鼠随机分为对照组和实验组,每组20只。对照组小鼠双眼不做任何处理,常规饲养。实验组小鼠右眼造模,左眼不处理。碱烧伤造模步骤:小鼠腹膜注射1%戊巴比妥钠溶液0.2 mL/20 g进行麻醉,然后使用盐酸利多卡因对小鼠右眼进行表面麻醉,使用阿托品滴眼扩瞳1 min,1 mol/L NaOH滤纸片碱灼伤右眼30 s;之后生理盐水冲洗,妥布霉素滴眼液1滴清洗。以后每天滴4次氧氟沙星滴眼液,持续3 d,之后每日3次,持续1周,1个月后取材做相关检测。

1.2.2 HE染色观察小鼠眼球壁的形态变化 10%的水合氯醛麻醉处理小鼠,摘取眼球,投入垫有脱脂棉的AFA固定液固定,间隔6 h换等量AFA固定液固定,眼球后壁开窗,共固定18 h。常规乙醇梯度脱水,氯仿透明,石蜡包埋制作眼球切片,厚度7 μm,常规HE染色,化蜡-染色-上行-二甲苯透明,封片后正置荧光显微镜下观察并采集图片。

1.2.3 免疫荧光染色 将眼球组织切片常规化蜡后,用柠檬酸蒸煮10 min,PBS洗涤3次。加入山羊血清工作液封闭30 min。去掉山羊血清,不洗,直接加入一抗(p63、Pax6或Wnt7a)4 ℃过夜。隔天取出,PBS洗涤3次,加入荧光二抗37 ℃水浴2 h。PBS洗涤3次,加入DAPI染核15 min,PBS洗涤3次,荧光淬灭剂封片后正置荧光显微镜下观察并采集图片。

1.2.4 流式细胞术检测 取小鼠的眼球,小心除去周围的结缔组织,从角膜与巩膜交界的地方分离角膜组织。用眼科剪尽可能地剪碎角膜组织,加入4%甲醛固定40 min,2%BSA重悬组织细胞,调整组织细胞量约1×10^6个/管,加入一抗(Pax6或Wnt7a),混匀冰上孵育45 min,PBS洗2遍,去掉一抗,2%BSA 100 μL重悬后,加入APC山羊抗兔荧光二抗避光冰上孵育30 min,去除二抗,PBS重悬,混匀后上机检测。

1.3 统计学分析

采用SPSS 19.0统计软件处理分析,计数资料用率(%)表示,组间比较采用t检验,$P<0.05$为差异有统计学意义。

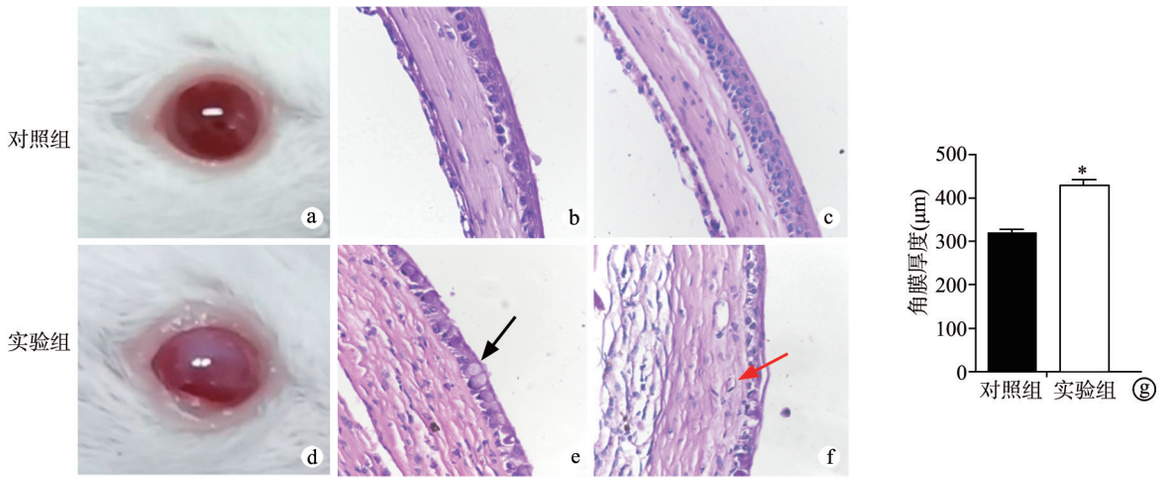
2 结果

2.1 小鼠角膜的形态学观察

造模1个月后,对照组小鼠的眼睛透明,折光性好;而实验组小鼠的右眼角膜混浊,透光性不好(图1)。HE染色发现:对照组小鼠的角膜形态结构完整,各层排列整齐,无炎症细胞增生及毛细血管生成,其中角膜上皮为未角化的复层扁平上皮,基底面平坦,游离面平整光滑;而实验组小鼠角膜上皮明显缺损,由5~6层细胞缩减为2~3层细胞,出现角膜结膜化,杯状细胞增生,前后界膜消失,角膜基质变厚,有新生毛细血管生成(图1)。与对照组比较,实验组小鼠角膜厚度增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 免疫荧光染色结果

免疫荧光结果显示:p63主要表达于角膜上皮基底层细胞内,与对照组比较,实验组小鼠角膜中p63表达明显减少,见图2。对照组小鼠角膜上皮全层细胞均有Pax6和Wnt7a阳性表达;实验组小鼠角膜上皮因角膜结膜化出现大量的杯状细胞,顶部胞质中充满空泡状黏原颗粒,Pax6和Wnt7a主要表达于杯状细胞的胞膜上,见图3。



a~c:对照组小鼠眼球及角膜结构(HE染色×200);d~f:实验组小鼠眼球及角膜结构(HE染色×400,黑色箭头示杯状细胞,红色箭头示毛细血管);g:角膜厚度定量统计 *:与对照组比较,$P<0.05$

图1 小鼠角膜的形态学观察

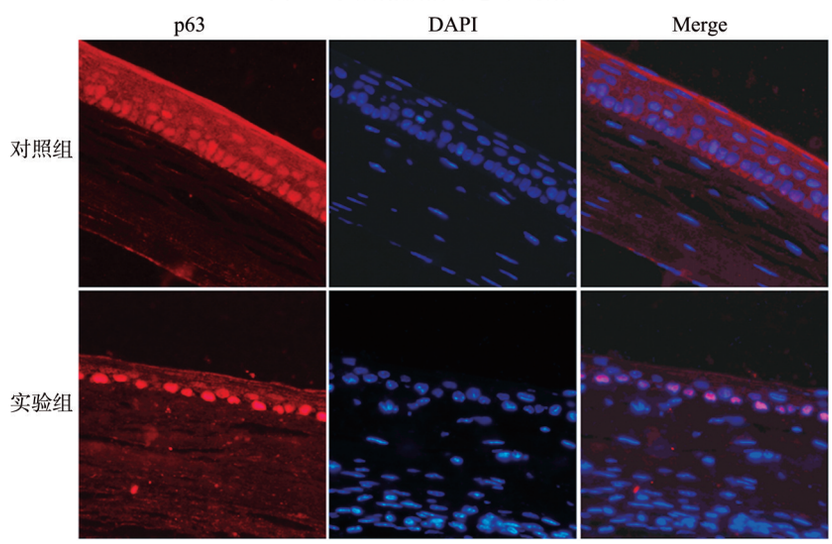


图2 免疫荧光检测p63在小鼠角膜中的表达(×400)

2.3 流式细胞术检测结果

流式细胞术结果显示:与对照组比较,实验组小鼠角膜组织Pax6阳性表达率降低,Wnt7a阳性表达率升高,差异均有统计学意义($P<0.01$),见图4。

3 讨论

在建立角膜碱烧伤模型过程中,小鼠眼组织较小,且眼组织结构特殊,采用NaOH滴注浸润方式更容易建立角膜碱烧伤模型[15-16]。由于角膜上皮有丰富的游离神经末梢,感觉敏锐,经常出现小鼠抓挠眼部而造成细菌感染,导致小鼠死亡;为解决该问题,本研究在滴注浸润NaOH前及建立模型后多次用盐酸利多卡因进行眼局部麻醉,并长时间持续滴加妥布霉素抗感染,结果小鼠存活率高,造模结果良好。

角膜为眼球前部的透明薄膜,向前突出,由前向后依次为角膜上皮、前界膜、角膜基质、后界膜及角膜内皮。正常角膜上皮由5~6层排列整齐的细胞组成,表层细胞有许多短小的微绒毛,基底面平坦,基底层细胞再生功能强[17-18]。睑结膜为眼睑内层结构,由上皮和固有层形成,上皮夹有少量杯状细胞,在经NaOH化学碱烧伤后,角膜上皮和结膜上皮会缺损,再生过程中会出现角膜结膜化的现象[19],因此肉眼观察角膜上皮会出现灰白色混浊,透明度下降,角膜上皮也会出现少量结膜上皮才有的杯状细胞。角膜基质由粗细一致的胶原纤维平行排列成层,夹有少量成纤维细胞,经碱烧伤处理后,前界膜会永久性缺损,而角膜基质可能发生免疫炎症反应及水肿,同时促血管生成因子增加,抑制血管生成因子减少,导致新生血管生成,角膜基质结构改变,胶原原纤维排列紊乱,使角膜基质变厚,从而影响后界膜的排列[20]。

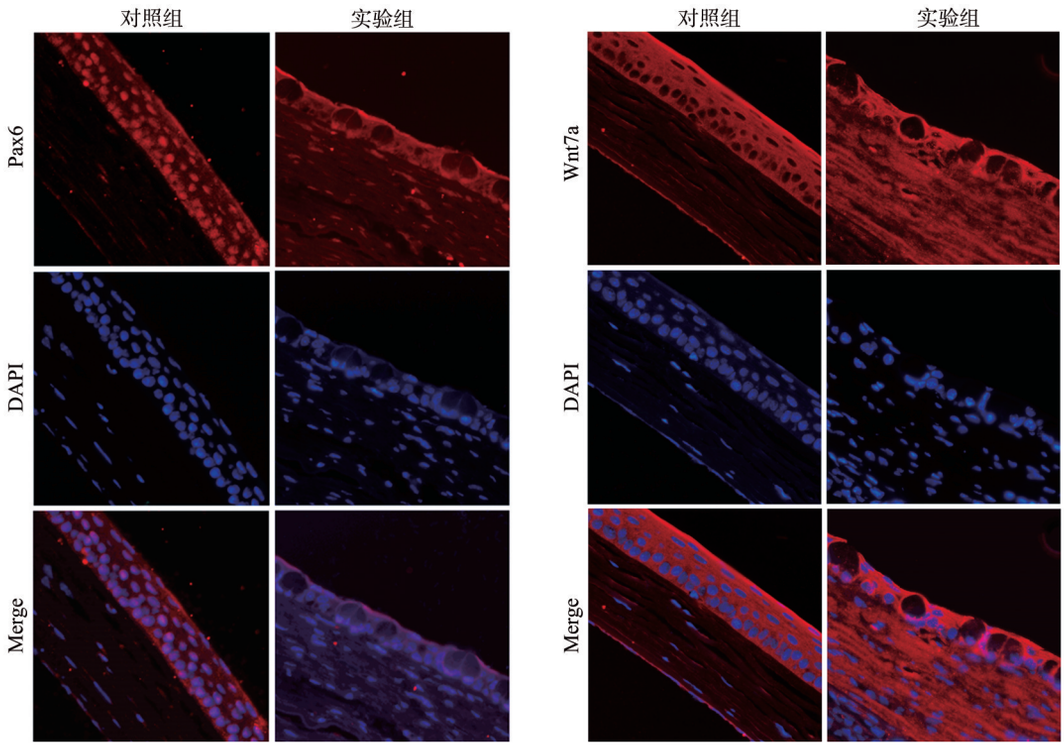
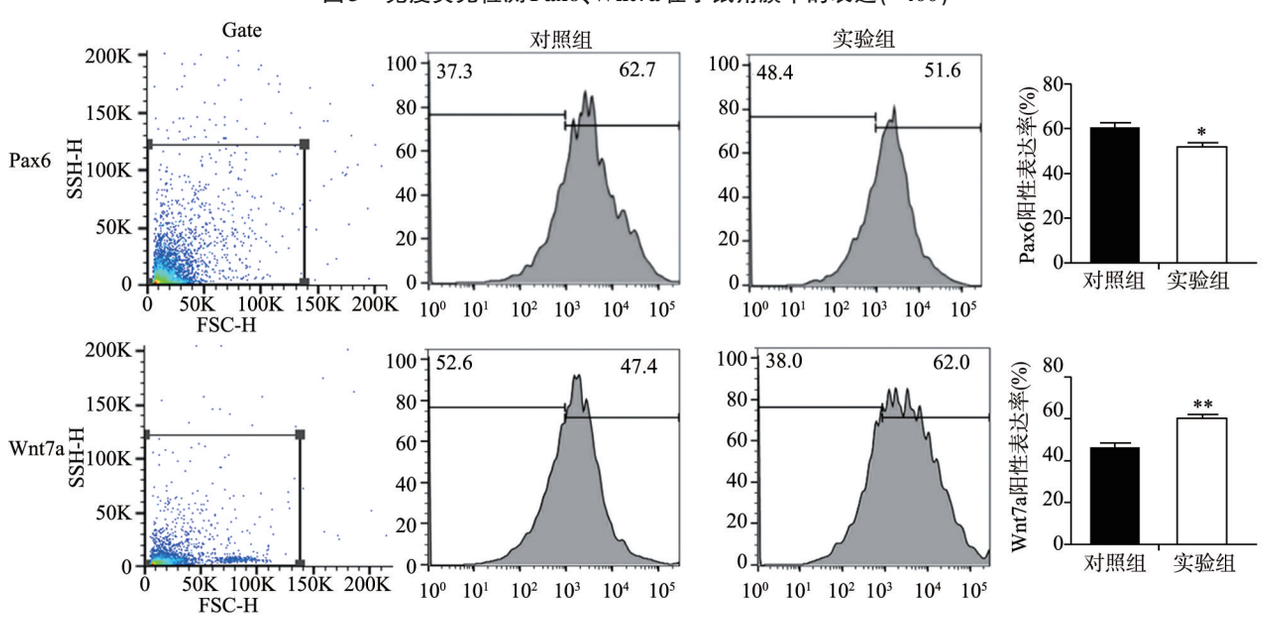


图3　免疫荧光检测Pax6、Wnt7a在小鼠角膜中的表达(×400)



*:与对照组比较,$P<0.05$;**:与对照组比较,$P<0.01$

图4　流式细胞仪检测Pax6和Wnt7a阳性表达率

转录因子p63是肿瘤抑制蛋白p53家族成员之一,与p53表现出高度的同源性,可在角膜缘基底部特异性表达。Yoshida等[21]研究表明,p63高表达的细胞具有向复层上皮分化的潜能;体外研究表明,p63可用于角膜上皮前体细胞的鉴定,其表达可影响人角膜上皮前体细胞在羊膜上的存活[22]。Dua等[23]和Hernandez等[24]研究发现,一些具有增生能力的干细胞可表达p63。本研究免疫荧光结果显示,碱烧伤后的小鼠角膜上皮基底层细胞中p63表达减少,提示角膜基底层的细胞增殖能力减弱,无法修复碱烧伤的角膜上皮,导致角膜上皮缺损。

Pax6在眼正常发育和各种眼科疾病中有重要作用,主要表达于角膜上皮、视网膜及睫状体等,Pax6表达降低后会导致角膜混浊、先天性无虹膜等疾病[5]。有研究表明,Pax6基因有维持角膜上皮细胞增殖的能力,在治疗角膜上皮损伤中有重要作用[8]。Wnt7a为

Wnt信号家族的成员之一,Wnt信号转导通路是调控细胞生长、发育和分化的重要途径,可以调控Pax6的表达,对维持角膜缘干细胞特性有重要意义[13]。因此,在本研究中,经免疫荧光染色定位,确定了Pax6和Wnt7a在正常和碱烧伤角膜上皮均有阳性表达;通过流式细胞术检测发现,碱烧伤小鼠角膜组织的Pax6阳性表达减少,Wnt7a阳性表达增加。在碱烧伤的小鼠角膜中,角膜正常结构遭到破坏,细胞增殖能力减弱,致使碱烧伤角膜中Pax6表达相对正常角膜降低,从而进一步破坏角膜上皮的修复。而Wnt7a表达上调,推测其原因是碱损伤激活了Wnt信号通路,调控了新生血管形成,结果提示Wnt7a参与角膜的损伤修复。

综上所述,角膜上皮的持续更新需要基底层细胞增殖分化完成,在基底层形成新的细胞可阻止角膜结膜化。在碱烧伤角膜的治疗中可通过激活或增加Pax6的表达来影响角膜的损伤修复能力,同时可通过抑制Wnt信号通路减少新生血管的生成。这为转基因治疗角膜疾病提供了科学依据。

[参考文献]

[1] Kamil S, Mohan RR. Corneal stromal wound healing: major regulators and therapeutic targets [J]. Ocul Surf, 2021, 19: 290-306. doi: 10.1016/j.jtos.2020.10.006.

[2] Gong D, Wu N, Chen H, et al. Phytic acid-loaded polyvinyl alcohol hydrogel promotes wound healing of injured corneal epithelium through inhibiting ferroptosis[J]. Redox Biol, 2024, 76: 103354. doi: 10.1016/j.redox.2024.103354.

[3] Moustardas P, Abbasi M, Javidjam D, et al. Duloxetine enhances PAX6 expression and suppresses innate immune responses in murine LPS-induced corneal inflammation[J]. Ocul Surf, 2024, 34: 225-234. doi: 10.1016/j.jtos.2024.08.008.

[4] Hever AM, Williamson KA, van Heyningen V. Developmental malformations of the eye: the role of PAX6, SOX2 and OTX2 [J]. Clin Genet, 2006, 69(6): 459-470. doi: 10.1111/j.1399-0004.2006.00619.x.

[5] Chalepakis G, Stoykova A, Wijnholds J, et al. Pax: gene regulators in the developing nervous system[J]. J Neurobiol, 1993, 24(10): 1367-1384. doi: 10.1002/neu.480241009.

[6] 李志清,黄 悦,孙慧敏. PAX6基因在眼发育中的调控作用[J]. 国际眼科杂志, 2013, 13(4): 685-687. doi: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.04.12.

[7] Manuel M, Tan KB, Kozic Z, et al. Pax6 limits the competence of developing cerebral cortical cells to respond to inductive intercellular signals[J]. PLoS Biol, 2022, 20(9): e3001563. doi: 10.1371/journal.pbio.3001563.

[8] 刘卫华,刘漪沦,刘海荣,等. Pax6基因转染对脂肪来源间充质干细胞的诱导分化研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2014, 28(8): 1004-1008. doi: 10.7507/1002-1892.20140221.

[9] Piers TM, Fang K, Namboori SC, et al. WNT7A-positive dendritic cytonemes control synaptogenesis in cortical neurons[J]. Development, 2024, 151(23): dev202868. doi: 10.1242/dev.202868.

[10] 耿志鑫,李 炜,刘祖国. Wnt信号传导通路在眼部发育及眼科疾病中的研究进展[J]. 中华眼视光学与视觉科学杂志, 2013, 15(9): 572-576. doi: 10.3760/cma.j.issn.1674-845X.2013.09.017.

[11] Hirata T, Zheng Q, Chen Z, et al. Wnt7A is a putative prognostic and chemosensitivity marker in human malignant pleural mesothelioma [J]. Oncol Rep, 2015, 33(4): 2052-2060. doi: 10.3892/or.2015.3771.

[12] Lin JB, Sene A, Wiley LA, et al. WNT7A/B promote choroidal neovascularization [J]. Exp Eye Res, 2018, 174: 107-112. doi: 10.1016/j.exer.2018.05.033.

[13] Ouyang H, Xue Y, Lin Y, et al. WNT7A and PAX6 define corneal epithelium homeostasis and pathogenesis [J]. Nature, 2014, 511(7509): 358-361. doi: 10.1038/nature13465.

[14] 高 杰,穆 尧,向 松,等. Pax6和Wnt7a在小鼠角膜中的表达分析[J]. 局解手术学杂志, 2020, 29(9): 689-692. doi: 10.11659/jjssx.05E020006.

[15] 顾宏卫,胡 楠. 大鼠角膜碱烧伤模型制备方法的研究[J]. 国际眼科杂志, 2013, 13(6): 1093-1095. doi: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.06.08.

[16] Huang Y, Lin L, Yang Y, et al. Effect of tauroursodeoxycholic acid on inflammation after ocular alkali burn[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(19): 11717. doi: 10.3390/ijms231911717.

[17] 王宇静,杨燕宁. 人角膜上皮细胞体外培养的研究进展[J]. 眼科新进展, 2017, 37(4): 384-387. doi: 10.13389/j.cnki.rao.2017.0098.

[18] 李 睿,崔红平. 常见眼部疾病干细胞治疗进展[J]. 眼科新进展, 2011, 31(7): 688-691. doi: 10.13389/j.cnki.rao.2011.07.012.

[19] 李学东. 角膜结膜化学烧伤的非手术治疗[J]. 眼科研究, 2004(1): 80-82. doi: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2004.01.024

[20] 郑晓汾,冯克孝,李 冰,等. 兔角膜碱烧伤后不同时期的组织病理学变化[J]. 国际眼科杂志, 2005(3): 449-450. doi: 10.3969/j.issn.1672-5123.2005.03.007.

[21] Yoshida S, Yasuda M, Miyashita H, et al. Generation of stratified squamous epithelial progenitor cells from mouse induced pluripotent stem cells[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e28856. doi: 10.1371/journal.pone.0028856.

[22] Ma DH, Lai JY, Yu ST, et al. Up-regulation of heat shock protein 70-1 (Hsp70-1) in human limbo-corneal epithelial cells cultivated on amniotic membrane: a proteomic study[J]. J Cell Physiol, 2012, 227(5): 2030-2039. doi: 10.1002/jcp.22932.

[23] Dua HS, Joseph A, Shanmuganathan VA, et al. Stem cell differentiation and the effects of deficiency[J]. Eye (Lond), 2003, 17(8): 877-885. doi: 10.1038/sj.eye.6700573.

[24] Hernandez Galindo EE, Theiss C, Steuhl KP, et al. Expression of Delta Np63 in response to phorbol ester in human limbal epithelial cells expanded on intact human amniotic membrane [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(7): 2959-2965. doi: 10.1167/iovs.02-0776.

(编辑:杨 颖)