doi:10.11659/jjssx.02E020117

·基础研究·

结肠黏膜 Trx 的表达与肠易激综合征发病机制的相关性研究

张春燕[1],黄学飞[1],李丛勇[1],孙 刚[2],杨云生[2] (1.解放军总医院第六医学中心干部消化科,北京 100048;2.解放军总医院第一医学中心消化病中心,北京 100853)

[摘 要] **目的** 观察硫氧还蛋白(Trx)在腹泻型肠易激综合征(IBS-D)和便秘型肠易激综合征(IBS-C)患者结肠黏膜中的表达情况,探讨肠易激综合征(IBS)的发病机制。**方法** 选择 2017 年 1 月至 2019 年 4 月解放军总医院消化门诊收治的 IBS-D、IBS-C 患者各 16 例,分别设为 IBS-D 组和 IBS-C 组,另选择健康志愿者 16 例作为对照组,活检留取盲肠及乙状结肠黏膜组织,应用免疫组织化学染色分析。Western blot 和荧光定量 PCR 法检测 Trx 及 Trx mRNA 表达情况。**结果** 免疫组织化学染色显示,在正常结肠腺上皮细胞、隐窝上皮细胞、上皮基底膜和固有层间质细胞均可见 Trx 阳性表达。Western blot 显示,Trx 在 IBS-D 组和 IBS-C 组盲肠及乙状结肠的表达均明显高于对照组($P<0.05$)。荧光定量 PCR 结果提示,与对照组比较,Trx mRNA 在 IBS-D 组和 IBS-C 组盲肠黏膜的表达明显下调($P<0.05$),在 IBS-D 组和 IBS-C 组乙状结肠黏膜的表达明显上调($P<0.01$)。**结论** IBS 发病机制可能与 Trx 相关的氧化应激、能量代谢异常及免疫稳态失衡相关。

[关键词] 肠易激综合征;硫氧还蛋白;氧化应激;免疫稳态;代谢;腹泻型;便秘型
[中图分类号] R446.8 [文献标识码] A [收稿日期] 2020-02-26

Correlation between Trx expression in colonic mucosa and pathogenesis of irritable bowel syndrome

ZHANG Chun-yan[1], HUANG Xue-fei[1], LI Cong-yong[1], SUN Gang[2], YANG Yun-sheng[2] (1. Department of Geriatric Gastroenterology, Sixth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100048, China; 2. Department of Gastroenterology, First Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of thioredoxin (Trx) in the colonic mucosa of patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (IBS-D) and constipation-predominant irritable bowel syndrome (IBS-C), and to explore the pathogenesis of irritable bowel syndrome (IBS). **Methods** From January 2017 to April 2019, 16 patients with IBS-D and 16 patients with IBS-C in the gastroenterology department of PLA General Hospital were selected as the IBS-D group and the IBS-C group respectively, and 16 healthy volunteers were selected as the control group. The mucosal tissues of cecum and sigmoid colon were collected by biospy and analyzed by immunohistochemical staining, and the expression levels of Trx and Trx mRNA were observed by Western blot and fluorescence quantitative PCR. **Results** Immunohistochemical staining revealed positive Trx expression in normal colonic glandular epithelial cells, crypt epithelial cells, epithelial basement membrane, and stromal cells of lamina propria. Western blot showed that the expression levels of Trx in the cecum and sigmoid colon of the IBS-D group and the IBS-C group were significantly higher than those of the control group ($P<0.05$). According to the fluorescence quantitative PCR results, compared with the control group, Trx mRNA expression levels in the cecal mucosa of the IBS-D group and the IBS-C group were significantly down-regulated ($P<0.05$), while the expression levels of Trx mRNA in the sigmoid colon mucosa of the IBS-D group and the IBS-C group were significantly up-regulated ($P<0.01$). **Conclusion** The pathogenesis of IBS may be associated with Trx-related oxidative stress, abnormal energy metabolism, and immune homeostasis imbalance.

Keywords: irritable bowel syndrome; thioredoxin; oxidative stress; immune homeostasis; metabolism; diarrhea type; constipation type

肠易激综合征(irritable bowel syndrome,IBS)是一种功能性肠病,存在内脏高敏反应,表现为反复发作的腹痛、与排便相关或伴随的排便习惯异常。典型的排便习惯异常可表现为便秘、腹泻、便秘与腹泻交替出现,同时可有腹胀/腹部膨胀等症状。IBS 是消化科常见的疾病之一,其发病机制目前尚不明确。本研究小组在前期工作中应用蛋白组学方法,通过双向凝胶电泳及质谱分析技术对腹泻型 IBS(diarrhea-predominant IBS,IBS-D)患者和正常人结肠黏膜蛋白进行对比发现,硫氧还蛋白(thioredoxin,Trx)在 IBS-D 患者结肠中表达异常[1]。Trx 是一个广泛分布的小分子氧化还原蛋白(104 个氨基酸、分子量为 12 kDa)[2],与硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin reductase,TrxR)、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate,NADPH)和硫氧还蛋白过氧化物酶(thioredoxin peroxidase,TrxP)构成控制细胞还原、氧化状态、细胞增殖及生存的广泛表达的氧化还原 Trx 系

[基金项目] 国家自然科学基金(30570822)
[通信作者] 杨云生,E-mail:sunny301ddc@126.com

统[3]。Trx 系统也是最重要的硫醇还原系统,其通过二硫化物还原酶活性作用减轻细胞内氧化应激,保护细胞正常生理功能[4]。Trx 主要分为 Trx1 和 Trx2,Trx1 位于细胞浆,在一些生理及应激情况下转位于细胞核中,而 Trx2 仅位于线粒体中[5]。Trx 的氧化还原活性依赖于高度保守的活性位点 CGPC(Cys-Gly-Pro-Cys),2 个半胱氨酸经过可逆的氧化过程,将自身的巯基转化为二硫键,同时将还原力传给含有二硫键的底物。无活性的氧化态 Trx 则被 TrxR 在还原因子 NADPH 的作用下还原。Trx 具有许多功能,包括活性氧(reactive oxygen species,ROS)清除、促进细胞凋亡、DNA 合成和硫化氢信号传导[6]。Trx 与人类许多疾病的发病有关,如肿瘤、获得性免疫缺陷综合征、自身免疫性疾病、神经退行性病变、脑缺血、心血管系统疾病等[7-8]。为进一步探讨 Trx 在 IBS 发病中的作用,本研究应用免疫组织化学、Western blot 和荧光定量 PCR 法进一步验证 Trx 在 IBS-D 中的表达情况,并同时将其在便秘型 IBS(constipation-predominant IBS,IBS-C)结肠黏膜中的表达情况作为对比,为探讨 IBS 的发病机制提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选择 2017 年 1 月至 2019 年 4 月解放军总医院消化门诊收治的 32 例 IBS 患者,根据文献方法钳取 IBS 患者的盲肠、乙状结肠黏膜组织[1]。按照罗马Ⅲ诊断标准均诊断为 IBS[1],其中 IBS-C 患者 16 例设为 IBS-C 组,男女各 8 例,年龄 37 ~ 48 岁,平均(42.3 ± 5.2)岁;IBS-D 患者 16 例设为 IBS-D 组,男女各 8 例,年龄 38 ~ 44 岁,平均(40.5 ± 3.2)岁;选择健康志愿者 16 例设为对照组,男女各 8 例,年龄 39 ~ 48 岁,平均(43.8 ± 3.5)岁。本研究经解放军总医院伦理委员会批准,纳入研究的对象均知情同意。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色分析 石蜡切片制片:各部位标本以 10% 甲醛固定,石蜡包埋,4 μm 厚连续切片。SP 免疫组织化学染色:加入一抗小鼠抗人 Trx(效价 1∶1 500,中国台湾 Abnova 公司)置于湿盒中 4 ℃冰箱过夜,然后加入二抗 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG(北京中杉金桥公司)37 ℃孵育 60 min;应用苏木素复染 1 min,脱水,二甲苯透明,中性树胶封片;光镜下观察结果。用 PBS 代替一抗做对照实验,结果为阴性。

1.2.2 Western blot 检测蛋白表达 依据文献[1]的方法提取蛋白,取 20 μg 所提取的蛋白经过 15% 的分离胶分离,上样量 20 μg;一抗小鼠抗人 Trx(效价 1∶500,中国台湾 Abnova 公司),室温孵育 1 h;二抗 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG(1∶2 000)室温孵育 60 min。用 ECL 显色试剂对膜进行显色,结果分析以 β-actin 蛋白表达作为参照,应用 BioRad 公司提供的 Quantity-One 分析软件进行图像分析。测定目的显影条带和内参照 β-actin(稀释度 1∶2 000)的灰度值,结果以比值(样本灰度值/内参照灰度值)表示。

1.2.3 荧光定量 PCR 检测 Trx mRNA 的表达 将分离的组织悬液 200 μL 加入 1 mL TRIzol,提取 RNA;按照逆转录试剂盒说明将 RNA 反转成 cDNA。根据基因总长进行引物设计,Trx 引物序列,上游引物:5′-GCCTTTCTTTCATTCCCTC-3′,下游引物:5′-TTCACCCACCTTTTGTCC-3′;GAPDH 引物序列,上游引物:5′-TTGTCAGCAATGCATCCTGCAC-3′,下游引物:5′-ACAGCTTTCCAGAGGGGCCATC-3′,引物由上海英俊生物有限公司合成。RT-PCR 扩增反应体系如下:上下游引物各 0.25 μL,灭菌注射用水 7.5 μL,RT-PCR Mix 10 μL,cDNA 2 μL,反应总体系 20 μL。反应条件:预变性 95 ℃ 5 min;变性 95 ℃ 30 s,退火 55 ℃ 30 s,延伸 72 ℃ 30 s;60 ℃ 30 s(收集溶解曲线),反应 40 个循环。扩增产物用实时定量 PCR 仪 Bio-rad IQ5 软件进行分析。

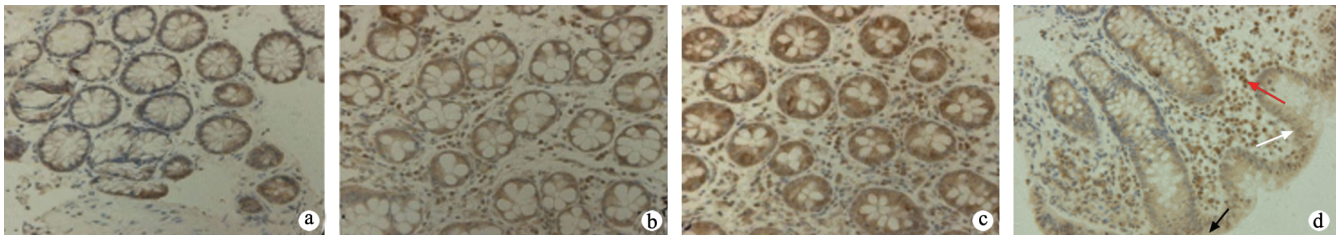
1.3 统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析,所得数据服从正态分布且方差齐性,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,多组之间的比较采用单因素方差分析并利用 *Tukey* 检验进行组内比较,数据不服从正态分布则采用 *Wilcoxon* 双样本检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义,$P<0.01$ 为差异有极显著性统计学意义。

2 结果

2.1 Trx 的免疫组织化学表达

Trx 在对照组结肠腺上皮细胞胞浆、胞核均有阳性表达,以胞浆表达为主,固有层少许间质细胞核为阳性,显示为浅棕色颗粒(图 1a)。Trx 在 IBS-D 组及 IBS-C 组结肠黏膜腔面上皮细胞胞浆、腺上皮细胞胞浆及胞核均有较强阳性表达,显示为深棕色或棕褐色颗粒(图 1b ~ c)。Trx 在 IBS 结肠黏膜上皮细胞、腔面上皮细胞胞浆及胞核、隐窝上皮细胞胞浆可见强阳性表达,在上皮基底膜、固有层间质细胞亦可见阳性表达。与对照组相比,IBS 结肠黏膜有较多的腺上皮细胞及固有层间质淋巴细胞胞核呈现强阳性(图 1d)。

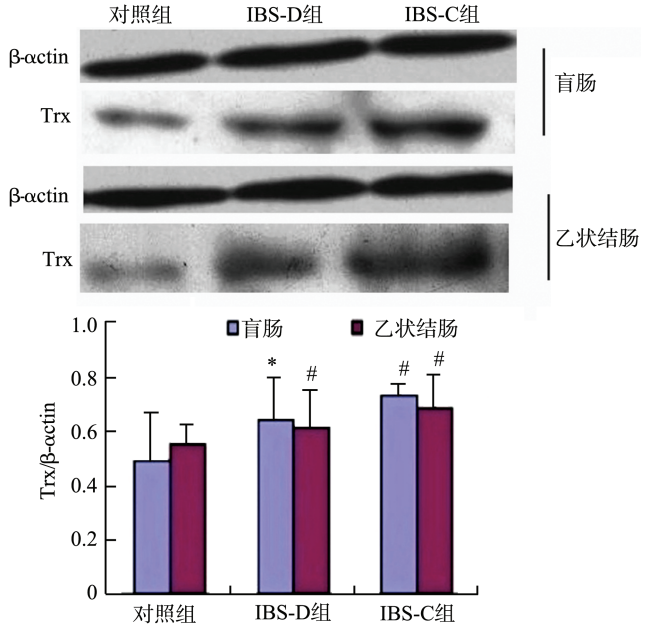


a:对照组结肠黏膜 Trx 的表达(SP ×200);b:IBS-D 组结肠黏膜 Trx 的表达(SP ×200);c:IBS-C 组结肠黏膜 Trx 的表达(SP ×200);d:IBS 患者结肠黏膜 Trx 的表达(SP ×400),结肠黏膜上皮细胞胞核可见阳性染色(黑色箭头所示),上皮基底膜呈阳性(白色箭头所示)、固有层间质细胞胞浆、胞核呈阳性(红色箭头所示)

图 1 结肠黏膜的免疫组织化学表达

2.2 Western blot 检测 Trx 在结肠黏膜的表达

Trx 在 IBS-D 组乙状结肠、IBS-C 组盲肠及乙状结肠表达高于对照组,差异有极显著性统计学意义($P<0.01$),Trx 在 IBS-D 组盲肠的表达高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),Trx 在对照组的盲肠及乙状结肠的表达未见明显差异($P>0.05$),见图 2。

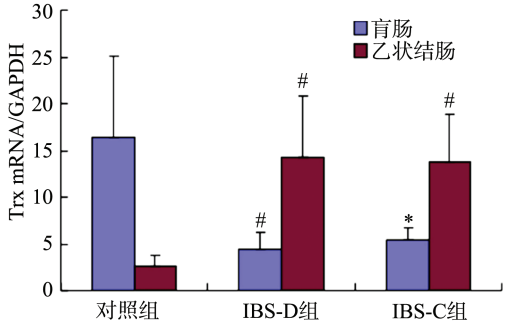


*:与对照组比较,$P<0.05$;#:与对照组比较,$P<0.01$

图 2 Western blot 检测 Trx 在结肠黏膜的表达

2.3 荧光定量 PCR 检测 Trx mRNA 的相对表达量

与对照组比较,Trx mRNA 在 IBS-D 组盲肠的表达明显下调,差异有极显著性统计学意义($P<0.01$),在 IBS-C 组盲肠表达也下调,差异有统计学意义($P<0.05$);与对照组比较,Trx mRNA 在 IBS-D 组和 IBS-C 组乙状结肠表达均明显上调,差异有极显著性统计学意义($P<0.01$),见图 3。



*:与对照组比较,$P<0.05$;#:与对照组比较,$P<0.01$

图 3 荧光定量 PCR 检测 Trx mRNA 在结肠黏膜的表达

3 讨论

Trx 是作为应答外界压力而产生细胞反应的重要调节因子,参与各种氧化还原相关的细胞生理过程,如衰老、基因表达、细胞生长、细胞凋亡、信号转导以及免疫应答等[9-11]。肠是人体最大的免疫器官,黏膜固有层包含最大的 T 细胞区域,与其他组织相比,肠黏膜含较多的 Trx,Trx 促进肠上皮细胞生长发育,也与肠道的免疫应答有关。Sido 等[12]发现结肠不同部位的 T 细胞存在 Trx 的表达差异,肠黏膜固有层 T 细胞 Trx 高表达,而外周血 T 细胞 Trx 低表达,推测与体外肠黏膜固有层 T 细胞比外周血 T 淋巴细胞产生的 IL-2、IL-10多有关。Trx mRNA 的诱导性表达能被几种转录因子所调节,预先已被刺激的外周血 T 细胞比初次经受刺激的外周血 T 细胞对重组 Trx1 的反应更强,说明 Trx 有炎症放大的作用。重组 Trx 能在体外减少人单核细胞巨噬细胞游走抑制因子(macrophage migration inhibitory factor,MIF)的产生,应激情况下 Trx 从细胞质转位于细胞核中[5,13]。本研究通过免疫组织化学研究发现,对照组结肠黏膜 Trx 表达主要集中在结肠黏膜腺上皮细胞胞浆,而 IBS 结肠黏膜腺上皮细胞浆、细胞核及固有层间质细胞胞核 Trx 染色均较明显,提示 IBS 可能存在氧化应激等情况,促使 Trx 从细胞浆转位到胞核并表达增加。有学者认为 Trx 的核转位可促进某些炎性基因的表达[14]。一项关于细颗粒物质对人支气管上皮细胞影响的研究提示,Trx 在细胞核中的核转位和积累在 $PM_{2.5}$ 诱导的核因子(nuclear factor kappa B,NF-κB)活化和促炎反应中起重要作用,阻断

Trx 核转位并抑制 NF-κB 的 DNA 结合活性可减轻炎症细胞因子分泌[15]。但阻断 Trx 核转位是否能通过减少 IBS 结肠黏膜炎症因子分泌而缓解症状还需进一步研究证明。

有研究证实,IBS 患者存在的内脏超敏反应与结肠黏膜肥大细胞分泌组胺、类胰蛋白酶、前列腺素 E2 等炎症介质增加有关[13]。Trx 是调节肥大细胞及过敏性炎症 IgE 信号的关键信号分子,Trx 能影响肥大细胞分泌类胰蛋白酶,而类胰蛋白酶反过来又能影响 Trx 的表达,两者相互作用[16]。另外,IBS 的内脏超敏反应还与硫化氢有关。有研究发现,IBS 患者结肠有较高浓度的硫化氢和/或产生硫化氢的硫酸盐还原菌,而 Trx 可调节硫化氢水平,通过调节硫化氢信号传导,影响结肠多种生理过程[17-18]。可见,Trx 通过多种机制影响 IBS 内脏超敏反应发生。

硫氧还蛋白互作蛋白(thioredoxin-interacting protein,TXNIP)是 Trx 的内源性抑制蛋白,通过共价结合 Trx,抑制 Trx 活性,清除活性氧并干扰 Trx 与其他信号分子的结合[19]。TXNIP 也是一种代谢调控蛋白,是葡萄糖稳态的调节器,调节细胞的葡萄糖摄取,能与 Trx 结合而影响其正常生理功能发挥[20]。本研究小组在前期工作中发现,IBS 结肠黏膜存在糖酵解酶(醛缩酶及烯醇化酶)表达异常及能量代谢异常[1,9]。有研究发现,因缺氧而被转录激活的醛缩酶及烯醇化酶是缺氧诱导因子 1α(hypoxia-inducible factor 1α,HIF-1α)的靶标蛋白[18,21],在氧含量正常或缺氧情况下,Trx-1 表达增加可刺激 HIF-1α 活性并提高 HIF-1α 蛋白水平[10],HIF 上调这些糖酵解酶,HIF-1α 的激活也可抑制 ROS,反之亦然[21]。IBS 结肠黏膜代谢异常 Trx 如何通过激活 HIF-1α 途径诱导还需要进一步研究证实,Trx/TXNIP 在 IBS 发病中的作用机制也需要进一步研究。

Trx mRNA 的表达与蛋白水平表达一致,说明 IBS 患者结肠黏膜 Trx 在转录水平即发生变化,IBS 结肠黏膜 Trx 表达增加,也提示黏膜保护因子增加,Trx 水平与疾病活动性相关。本研究提示,IBS 发病涉及氧化应激、免疫稳态失衡和代谢等异常。Trx 在 IBS 发病中如何影响肠道免疫活性,存在哪些免疫因子的异常,通过怎样的信号传导通路介导,均需进一步实验研究。另外,本研究因样本量有限,进一步的大样本、多次重复实验非常必要。

[参考文献]

[1] Zhang CY, Yao X, Sun G, et al. Close association between abnormal expressed enzymes of energy metabolism and diarrhea-predominant irritable bowel syndrome[J]. Chin Med J (Engl), 2019, 132(2): 135-144. doi: 10.1097/CM9.0000000000000003.

[2] Balsera M, Buchanan BB. Evolution of the thioredoxin system as a step enabling adaptation tooxidative stress[J]. Free Radic Biol Med, 2019, 140(8): 28-35. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.003.

[3] Shao Y, Qi X, Xu X, et al. TGP attenuates endoplasmic reticulum stress and regulates the expression of thioredoxin-interacting protein in the kidneys of diabetic rats[J]. Biosci Trends, 2017, 10(6): 489-495. doi: 10.5582/bst.2016.01188.

[4] 刘 楠,黄 荣,李晓晶. 硫氧还蛋白生物学功能与人类疾病的关系[J]. 当代医学,2019,25(17):189-192. doi:10.3969/j.issn.1009-4393.2019.17.083.

[5] Zhao L, Li W, Zhou Y, et al. The overexpression and nuclear translocation of Trx-1 during hypoxia confers on HepG2 cells resistance to DDP, and GL-V9 reverses the resistance by suppressing the Trx-1/Ref-1 axis [J]. Free Radic Biol Med, 2015, 82: 29-41. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.01.014.

[6] Kruithof PD, Lunev S, Aguilar Lozano SP, et al. Unraveling the role of thiosulfate sulfurtransferase in metabolic diseases[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020, 1866(6): 165716. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165716.

[7] Li YY, Xiang Y, Zhang S, et al. Thioredoxin-2 protects against oxygen-glucose deprivation/ reperfusion injury by inbibiting autophagy and apoptosis in H9c2 cardiomyocytes[J]. Am J Transl Res, 2017, 9(3): 1471-1482.

[8] Eriksson J, Gidlöf A, Eriksson M, et al. Thioredoxin a novel biomarker of post-injury sepsis[J]. Free Radic Biol Med, 2017, 104: 138-143. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.016.

[9] 张春燕,欧阳晶,孙 刚,等. 异丁酰辅酶 A 脱氢酶在便秘型肠易激综合征结肠黏膜的表达[J]. 转化医学杂志,2020,9(1):26-28. doi:10.3969/j.issn.2095-3097.2020.01.007.

[10] Espinosa B, Arnér ESJ. Thioredoxin-related protein of 14kDa as a modulator of redox signalingpathways[J]. Br J Pharmacol, 2019, 176(4): 544-553. doi: 10.1111/bph.14479.

[11] 罗 诚,戴爱国,蒋永亮. 硫氧还蛋白-1 与衰老的研究进展[J]. 临床与病理杂志,2016,36(4):492-494. doi:10.3978/j.issn.2095-6959.2016.04.028.

[12] Sido B, Giese T, Autschbach F, et al. Potential role of thioredoxin in immune responses in intestinal lamina propria T lymphocytes[J]. Eur J Immunol, 2005, 35(2): 408-417. doi: 10.1002/eji.200424500.

[13] Grabauskas G, Wu X, Gao J, et al. Prostaglandin E_2, produced by mast cells in colon tissues from patients with irritable bowel syndrome, contributes to visceral hypersensitivity in mice[J]. Gastroenterology, 2020, 158(8): 2195-2207. doi: 10.1053/j.gastro.2020.02.022.

[14] 吴应涛,谭华清,唐湘宇. 硫氧还蛋白与心血管疾病的研究进展[J]. 中国循证心血管医学杂志,2017,9(5):634-635.

[15] Zhu Z, ChenX, Sun J, et al. Inhibition of nuclear thioredoxin aggregation attenuates $PM_{2.5}$-induced NF-κB activation and pro-inflammatory responses[J]. Free Radic Biol Med, 2019, 130: 206-214. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.438.

doi:10.11659/jjssx.05E020006

·基础研究·

Pax6 和 Wnt7a 在小鼠角膜中的表达分析

高 杰,穆 尧,向 松,丁 玲,胡 蓉,李 红,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** 观察 Pax6 和 Wnt7a 在小鼠角膜中的表达及分布情况,探讨 Pax6 和 Wnt7a 在角膜中的关系。**方法** 对小鼠与人、家兔、恒河猴的 Pax6 和 Wnt7a 氨基酸序列同源性进行生物信息学分析;石蜡切片法观察小鼠眼球壁的形态结构;免疫组织化学技术和流式细胞术分别检测 Pax6 和 Wnt7a 在小鼠角膜中的分布和表达。**结果** 小鼠和人、家兔、恒河猴的 Pax6 和 Wnt7a 蛋白氨基酸序列同源性都超过 90%,其中小鼠和人的同源性最高。HE 染色显示了正常小鼠的眼球壁结构。Pax6 的免疫阳性表达在小鼠角膜全层的细胞质和细胞膜上,阳性表达率约为 77.84%;Wnt7a 的免疫阳性主要表达在小鼠角膜全层的细胞膜上,阳性表达率约为 63.51%。**结论** Pax6 和 Wnt7a 均在小鼠角膜中高表达,可能参与角膜的形成。

[关键词] Pax6;Wnt7a;角膜;小鼠;石蜡切片法;免疫组织化学技术;流式细胞术

[中图分类号] R329.2 [文献标识码] A [收稿日期] 2020-05-06

Expression analysis of Pax6 and Wnt7a in mouse cornea

GAO Jie, MU Yao, XIANG Song, DING Ling, HU Rong, LI Hong, SU Min (Department of Histology and Embryology, Guizhou Medical University, Guiyang Guizhou 550004, China)

Abstract: Objective To observe the expression and distribution of Pax6 and Wnt7a in mouse cornea, and explore the relationship between Pax6 and Wnt7a in the cornea. **Methods** The bioinformatic analysis were conducted on the amino acid sequence homology of Pax6 and Wnt7a from mouse, human, rabbit and macaca mulatta. The paraffin section method was used to observe the morphological structure of the eyeball wall of the mouse. The immunohistochemistry and the flow cytometry were used to detect the distribution and expression of Pax6 and Wnt7a in the mouse cornea respectively. **Results** The amino acid sequence homology of Pax6 and Wnt7a proteins among mouse, human, rabbit and macaca mulatta were more than 90%, and the homology between mouse and human was the highest. HE staining results showed the normal structure of eyeball wall in mice. The immunopositive of Pax6 was expressed on the cytoplasm and cell membrane of the entire layer of the mouse cornea, and the positive expression rate was about 77.84%. The immunopositive of Wnt7a was mainly expressed on the cell membrane of the entire layer of the mouse cornea, and the positive expression rate was about 63.51%. **Conclusion** Both Pax6 and Wnt7a are highly expressed in mouse cornea, which may be involved in the corneal formation.

Keywords: Pax6; Wnt7a; cornea; mouse; paraffin sectioning; immunohistochemistry; flow cytometry

[基金项目] 贵州省科学技术项目(黔科合基础[2020]1Y408);贵州省科技厅学术新苗培养项目(黔科合平台人才[2018]5779-21);贵州省教育厅青年科技人才成长项目(黔教合 KY 字[2018]201);贵州省科学技术基金项目(黔科合 J 字[2012]2037 号)

[通信作者] 苏 敏,E-mail:summ30@163.com

[16] Santosh Martin S, Rabelo Melo F, Pejle G. The absence of tryptase Mcpt6 causes elevated cellular stress in response to modulation of the histone acetylation status in mast cells[J]. Cells, 2019, 8(10): 1190 - 1204. doi:10.3390/cells8101190.

[17] Smith NW, Shorten PR, Altermann EH, et al. Hydrogen cross-feeders of the human gastrointestinal tract[J]. Gut Microbes, 2019, 10(3): 270 - 288. doi:10.1080/19490976.2018.1546522.

[18] Libiad M, Motl N, Akey DL, et al. Thiosulfate sulfurtransferase-like domain-containing 1 protein interacts with thioredoxin[J]. J Biol Chem, 2018, 293(8): 2675 - 2686. doi:10.1074/jbc.RA117.000826.

[19] 扶 涛,张学云,骆 严. 硫氧还蛋白互作蛋白研究进展[J]. 生命的化学,2019,39(3):438 - 445. doi:10.13488/j.smhx.20180134.

[20] 刘 琪,杨 杰,Sattar H,等. 硫氧还蛋白在心肌疾病及其能量代谢中的作用[J]. 黑龙江畜牧兽医,2017(17):85 - 88. doi:10.13881/j.cnki.hljxmsy.2017.1521.

[21] Wang H, Zhao L, Zhu LT, et al. Wogonin reverses hypoxia resistance of human colon cancer HCT116 cells via downregulation of HIF-1α and glycolysis, by inhibiting PI3K/Akt signaling pathway[J]. Mol Carcinog, 2014, 53(Suppl 1): E107 - E108. doi:10.1002/mc.22052.

(编辑:魏 源)