文章编号:1000-5404(2006)08-0801-03

论著

大鼠青光眼慢性高眼压视网膜组织的二维凝胶电泳分析

崔 馨[1],贺翔鸽[1],许建涛[1],马建洲[1],熊仁平[2] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]眼科,[2]第七研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要:目的 应用二维凝胶电泳对SD大鼠青光眼慢性高眼压视网膜组织的蛋白进行初步分析。**方法** 分离大鼠青光眼慢性高眼压视网膜组织,以对侧眼视网膜组织为对照,经样本初处理后,进行二维凝胶电泳和凝胶银染色,然后分析电泳图谱,观察蛋白的分离效果,对比、分析其表达蛋白质点的差异,寻找SD大鼠视网膜中与慢性高眼压相关的蛋白质。**结果** 用化学裂解法结合超声波粉碎,可以裂解视网膜神经组织,使其大部分蛋白质得到溶解,成功建立对大鼠青光眼慢性高眼压眼及对照眼视网膜组织进行样本处理、二维凝胶电泳的基本方法和条件,得到两组视网膜组织的二维凝胶电泳图谱。各组织蛋白在小胶上均能显示120~290个左右的斑点。两组视网膜组织的凝胶图谱呈现出9个斑点的差异。**结论** 二维凝胶电泳可以有效分离、显示视网膜特异表达蛋白质。通过双向电泳,我们发现SD大鼠视网膜蛋白质表达与对照眼相比有质和量的差异。

关键词: 二维凝胶电泳;大鼠;高眼压;视网膜
中图法分类号: R322.91;R446.19;R775.02 **文献标识码:** A

Studies on retinal proteome of chronic high intraocular pressure of SD rats by two-dimensional gel electrophoresis

CUI Xin[1], HE Xiang-ge[1], XU Jian-tao[1], MA Jian-zhou[1], XIONG Ren-ping[2] ([1]Department of Ophthalmology, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 7, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To apply two-dimensional (2D) gel electrophoresis to resolve specifically expressed proteins related to glaucoma in the retina of SD rats. Methods Glaucoma was induced in the left eye of 45 Sprague-Dawley rats by repeated argon laser photocoagulation of the trabecular meshwork. The right eye served as the control. Retinas were isolated from glaucomatous and control eyes 35 days after photocoagulation. Proteins, prepared from the retinas of glaucomatous and control eyes, were separated by using two-dimensional electrophoresis and then analyzed by 2D electrophoresis imaging analyzer. Results 2D gel electrophoresis was established for the retinal proteome analysis. Retinal neural tissue was lysed by using chemical lysis solution and ultrasonic. Using carrier ampholyte to set up pH gradient as first dimension and casting vertical 12% SDS-acylamide-bis slab as second dimension, the major retinal proteins showed maps of proteome on 2D gel clearly. There were 120 – 290 spots with good distribution on the gels. The number of most different spots was 9. Retinal proteome of glaucomatous and control eyes had different expression patterns. Conclusion 2D gel electrophoresis is effective to separate specifically expressed retinal proteins. The expressed proteins in the glaucomatous retina are different in quality and quantity from that in the control eyes.

Key words: 2D gel electrophoresis; rat; high intraocular pressure; retina

青光眼是目前全世界第二位双眼致盲性眼病,是1组以特征性视神经萎缩和视野缺损为共同特征的疾病,病理性眼压升高是其主要危险因素之一。随着人类基因组草图的完成,相关研究的重点已转移到基因表达产物蛋白质功能的研究;生命活动的真正执行者

作者简介:崔 馨(1979-),女,山东省莱芜市人,博士研究生,医师,主要从事青光眼及角膜疾病方面的研究。电话:(023)68757341

收稿日期:2006-02-17;修回日期:2006-03-27

是蛋白质，因此蛋白质组的研究已成为后基因组计划的主战场，这也是研究疾病发生机制的重要途径[1]。研究 SD 大鼠在慢性高眼压影响下视网膜蛋白质组表达的差异，是揭示其发生机制的一个途经。

在本研究中，我们对大鼠青光眼慢性高眼压视网膜及对侧眼视网膜组织进行二维电泳分析，获得凝胶图谱，并且希望寻找到两组视网膜组织的差异蛋白质，为青光眼的防治研究工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 45 只 Sprague-Dawley 大鼠，雌雄不拘，体质量 200 ~ 250 g，由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供。

1.1.2 试剂及仪器 一向等电聚焦所用的固定 pH 梯度胶条、再水化液、覆盖液、等电聚焦电泳仪及其配套装置、试剂盒均为 Pharmacia 公司产品。二向聚丙烯酰胺凝胶电泳使用的所有试剂均购自 Sigma 或 Pharmacia 公司。聚丙烯酰胺凝胶电泳使用 Bio Rad 相应电泳装置。

1.1.3 动物模型的建立 实验前检查角膜透亮，晶体无混浊，在 1% 戊巴比妥钠全麻下(40 ml/kg)眼压计测量眼压在 10 ~24 mmHg 间，为保证实验组与对照组遗传背景的一致性，将每只大鼠的左眼设为实验眼，右眼设为对照眼。

麻醉满意后，将大鼠俯卧位固定于手术台上，左眼结膜囊内 0.4% 倍诺喜眼液 2 次，眼表面麻醉，在光学手术显微镜下，532 二极管激光行右眼角膜缘小梁网和角膜缘颞侧及颞上、颞下 3 条巩膜浅层静脉血管光凝，激光方法及部位见图 1[2]。

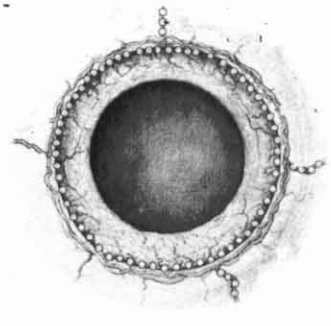


图 1 激光部位模式图

1.2 方法

1.2.1 取材及视网膜蛋白质的提取 在建模后 35 d 时摘除 SD 大鼠眼球，参照李大疆等[3]的方法，取上清液冰冻干燥。

1.2.2 蛋白浓度测定 考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(Pharmacia)测定样本液蛋白浓度，并据此浓度确定二维电泳的上样量。

1.2.3 双向凝胶电泳 第一向 pH 梯度水平板等电聚焦(IEF)：(1)取尿素 11g 溶于 30% 凝胶储存液(36.5∶1)3 ml，加双蒸水至 18 ml 待用；(2)按(1)溶液：两性电解质混合液(pH 3.5/10∶pH 5/7 =4∶1)：去污剂溶液(0.3 g CHAPS、100 μl NP-40 溶于 900 μl ddH_2O) =18∶1∶1 比例将上述溶液混匀，每 6 ml 加 150 μl 的 100 g/L $(NH_4)_2S_2O_8$ 和 10 μl TEMED。用自制的模具，在 Pharmacia 产 Gelbond 硝酸纤维膜的亲水面上，制成 15 cm × 5 cm × 1 mm 凝胶；(3)将附有凝胶的硝酸纤维膜放在 Pharmacia 产多功能电泳系统 Multiphor 的陶瓷冷却板上，连接 Poly-science 循环水浴系统，使温度保持在 10 ~ 20 ℃。将 6 mm × 3 mm × 1 mm 上样滤纸片置于凝胶表面，每片滤纸横向间隔约 4 mm，各按 20 μl (4 mg 蛋白质溶于 20 μl 上样缓冲液)(上样缓冲液：0.1 g DTT、0.4 g CHAPS、5.4 gurea、500 μl Ampholyte3.5/10 溶于 6 ml ddH_2O)上样。电泳电压在 2 h 内持续升至 1 500 V，电流保持低于 5 mA，1 500 V 电泳 6 h。电泳完毕后，取电泳胶片在 100 g/L 三氯乙酸中固定 10 min 后，用双蒸水反复漂洗，使凝胶呈中性为止。将凝胶干燥后一致切成 1 cm 宽的凝胶条用于第二向电泳。

第二向 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)：取 1 mm 厚度边条，制得 1 mm × 16 cm × 20 cm (16 cm 高的 12% 分离胶和 2 cm 高的 4% 浓缩胶)凝胶，将 1 cm 宽等电聚焦后的凝胶条放在浓缩胶上端，硝酸纤维膜贴附于玻璃上，使胶条与浓缩胶相贴。在 Bio-Rad 产 Protein 2-DCell 垂直电泳仪中以 200 V 电泳 5.5 h，使溴酚蓝前缘距玻璃板边缘 0.5 cm。

1.2.4 银染 方法参见文献[4]。

1.2.5 图像分析 用德国产 KONTRONIBAS2.0 全自动图像分析系统(包括 JVCky-F30B2-CCD 彩色图像输入仪)扫描凝胶，测量部分点的平均光密度。

1.3 统计学方法

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 眼压范围

实验前左眼眼压(17.1 ± 3.7) mmHg，右眼眼压(17.0 ± 3.4) mmHg，双眼眼压无明显差异；实验后右眼眼压均值升高，具体见表 1。使用 Tonopen 眼压测量装置来进行眼压测量。

表 1 激光术后不同时期对照眼、实验眼眼压测量值 (mmHg，$\bar{x} \pm s$)

组别	实验前眼压	实验后不同时期眼内压				
		3 d	7 d	35 d	60 d	90 d
对照眼	17.1 ± 3.7	17.1 ± 3.2	16.2 ± 3.3	17.1 ± 3.2	17.4 ± 4.8	16.2 ± 3.7
实验眼	17.0 ± 3.4	22.6 ± 5.1[a]	24.5 ± 5.1[a]	28.3 ± 4.2[a]	24.9 ± 4.9[a]	21.8 ± 3.8[a]

a：$P < 0.05$，与对照眼比较

2.2 成功建立双向电泳分析视网膜蛋白质的方法

由蛋白质多肽点可知，所使用的 2-DE 方法是有效的。通

过对比 2 组视网膜的 2-DE 凝胶扫描图可以看出,绝大部分点的重复性较好。分离得到 120 ~ 290 个蛋白质多肽点,基本上达到目前利用两载体制备的 pH 梯度胶的分辨神经组织的能力。

2.3　高眼压模型建立后 35 d 视网膜蛋白质组表达差异

找到两组视网膜差异表达的蛋白质 9 个,主要分布在 $4.5 \times 10^3 \sim 6.8 \times 10^3$。经用全自动图像分析系统扫描凝胶,测量出部分点的平均光密度(表 2)。点的平均光密度高,意味着这一蛋白质多肽的表达量高。

表 2　差异蛋白质点平均光密度值($\times 10^{-2}$)

蛋白质点	1	2	3	4	5	6	7	8	9
实验眼	1.16	2.89	0.66	1.75	8.14	3.99	1.52	5.33	0.46
对照眼	0.35	4.57	4.86	3.16	16.43	0.25	4.60	7.89	3.71

3　讨论

青光眼导致视功能损害的病理基础是视网膜神经节细胞(retina ganglion cell, RGC)进行性死亡和视神经纤维丢失,RGC 的死亡常导致视功能发生不可逆性损害。近年来对其病因的认识获得了突破性进展[5],不妨设想,在青光眼的发生发展过程中,视网膜由于慢性高眼压的刺激,必然存在着相关基因的差异性表达,即基因表达谱发生改变,一部分基因开放,另外一部分基因关闭,或者出现开放基因表达水平的变化。这些基因的表达产物(即蛋白)具有明显的生物学效应,将导致生理平衡的失调和病理性改变,作为生理功能的直接执行者,在机体生理、病理状态下都起着举足轻重的作用。如果能寻找和发现慢性高眼压下导致视网膜损害的未知基因产物的功能和病理条件下的作用,将有助于从分子水平理解青光眼视网膜视神经损害的机制,为青光眼的治疗和预防提供有意义的依据。

二维电泳的意义不仅仅在于使蛋白分开,通过比较生理及病理状态下蛋白质分布图谱,可以筛选出蛋白质关键分子,或者提供药物作用的靶蛋白质分子,发现在信号传递中起重要作用的蛋白质分子,也可比较不同组织、细胞蛋白质的异同从而寻找特异蛋白和保守蛋白[6]。

本研究采用两性载体制备的 pH 梯度胶 IEF 作为第一向、SDS-PAGE(浓缩胶 + 分离胶)作为第二向,虽然分离蛋白质点不是很多,仅 120 ~ 290 个点,但蛋白质点之间分离得比较清楚,两张胶重复性较好,得到了 9 个明显的差异点,因而可以认为本方法对于分离大鼠视网膜蛋白质是有效的。目前,IPG 胶条从宽幅到窄幅 pH 梯度都有供应,我们选用 pH 3 ~ 10 的宽幅 17cm 的 IPG 胶条目的在于可以对样本组织中蛋白质的整体分布作一个快速、大致的了解;在此基础上,还可以就我们感兴趣区域的蛋白及下一步的研究目的,使用窄幅 IPG 胶条来进行更细致的分析。

对眼组织的基因研究,特别是对序列表达标签(ESTs)的研究至今已经比较成熟,但对这些基因所表达的蛋白进行蛋白质组的研究还非常有限,对疾病或组织的全部蛋白质进行分析研究更是少见[7]。本实验成功建立了对大鼠高眼压及对照眼视网膜组织进行样本处理、二维凝胶电泳的基本方法和条件,优化了其二维电泳的流程,如样本处理、加样量、等电聚焦时间、银染过程的确定,为更进一步的研究奠定了基础。对于在实验中寻找到的 9 个差异蛋白质点,我们将对其进行蛋白质的质谱分析,确定其类型及属性,并分析其在青光眼高眼压这一病理过程中可能起到的作用,以期为青光眼的防治及新的有效药物靶点的寻找提供坚实的理论依据。

参考文献:

[1] DOHERTY M K, BEYNON R J. Protein turnover on the scale of the proteome[J]. Expert Rev Proteomics, 2006, 3(1): 97 - 110.

[2] LEVKOVITCH-VERBIN H, QUIGLEY H A, MARTIN K R, *et al*. Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43(2): 402 - 410.

[3] 李大疆, 张清炯, 肖学珊. 应用双向电泳对 rds 和 C3B 鼠视网膜蛋白质组的初步研究[J]. 眼科新进展, 2001, 21(3): 153 - 156.

[4] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992: 886.

[5] FREZZOTTI R, RENIERI A, FREZZOTTI P. Adult-onset primary glaucoma and molecular genetics: a review[J]. Eur J Ophthalmol, 2004, 14(3): 220 - 225.

[6] DOWSEY A W, DUNN M J, YANG G Z. The role of bioinformatics in two-dimensional gel electrophoresis[J]. Proteomics, 2003, 3(8): 1567 - 1596.

[7] STEELY H T, Jr., CLARK A F. The use of proteomics in ophthalmic research[J]. Pharmacogenomics, 2000, 1(3): 267 - 280.

(编辑　张大春)