文章编号:1000-5404(2006)19-1955-04

论著

α晶体蛋白对视网膜神经节细胞作用的初步研究

王晓芹[1,2],王　一[1]　(第三军医大学:[1]西南医院全军眼科中心,[2]基础医学部药理学教研室,重庆 400038)

提　要: 目的　探讨α晶体蛋白对体外培养视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells,RGCs)的作用。**方法**　原代培养 RGCs,Thy1.1 免疫荧光法鉴定 RGCs 并进行纯度检测,10^{-7}、10^{-6}、10^{-5}、10^{-4}g/L α晶体蛋白加入后于 1、3、12 h、1、2 d 和 3 d 在相差倒置显微镜下观察 RGCs 形态学变化;计数突起数目和轴突长度;应用免疫荧光及激光共聚焦扫描技术观察实验组α晶体蛋白在体外培养 RGCs 上的定位并进行荧光强度半定量分析。**结果**　Thy1.1 鉴定 RGCs 纯度为 90% ~ 95%,RGCs 10^{-4}、10^{-5}g/L 组突起数目及轴突长度显著大于对照组,以10^{-4}g/L组变化最显著。免疫荧光结果显示10^{-4}g/L α晶体蛋白组 RGCs 与α晶体蛋白抗体呈阳性结合,并呈先升高后降低趋势。**结论**　α晶体蛋白能够促进 RGCs 生长,最佳浓度为 10^{-4}g/L,细胞膜上抗体结合阳性,表明α晶体蛋白可与 RGCs 膜结合,这在α晶体蛋白促进 RGCs 存活和轴突再生的反应中可能起重要作用。

关键词: 视网膜神经节细胞;α晶体蛋白;免疫荧光
中图法分类号: R774; Q51; R322.91; R329.25　　**文献标识码**: A

Effect of α-crystallin on retinal ganglial cells

WANG Xiao-qin[1,2], WANG Yi[1] ([1]Department of Ophthalmology, Southwest Hospital, [2]Department of Pharmacy, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective　To study the effect of α-crystallin on retinal ganglial cells (RGCs) and the possible mechanisms. Methods　The changes of RGCs *in vitro* stimulated by 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}, or 10^{-4}g/L α-crystallin for 1, 3, 12 h, 1, 2, 3 d were observed and identified by Thy1.1 antibody. The number and the length of outgrowing RGCs axons were calculated under microscope and compared with the control group. The effect of α-crystallin on RGCs was detected by immunofluorescence with confocal laser scanning microscope. Results　The length and number of RGCs axons in 10^{-4}, 10^{-5}g/L α-crystallin solution were more than in the control on day 1, 2, 3 after α-crystallin stimulation, most significant difference in 10^{-4}g/L group. The interaction between α-crystallin and RGCs was proven positive by immunofluorescence with confocal laser scanning microscope. It increased firstly, then reduced. It reached the maximum at 3 h after α-crystallin stimulation. Conclusion　α-crystallin enhanced the survival of RGCs and the regeneration of axons, suggesting α-crystallin might be related to the changes of RGCs membrane signal transduction pathway. The mechanism might be involved in the interaction between α-crystallin and RGCs.

Key words: retinal ganglial cells; α-crystallin; immunofluorescence

视神经的再生是视光系统研究的难点和重点,寻求视神经损伤后促进视神经再生的有效方法一直为国内外研究者广泛重视和关注[1]。视网膜内层主要由视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells,RGCs)组成,RGCs 轴突形成轴索穿出眼球组成视神经,将光刺激信息传递至大脑枕叶完成视功能,其功能重要性不言而喻。很多眼病都与视网膜神经节细胞功能障碍有关,RGCs 对损伤十分敏感,即使损伤时间很短也会造成损伤,如青光眼、糖尿病视网膜变性等[2]。2000 年以来 Fischer 等[3]发现晶状体内物质能显著促进 RGCs 的存活和轴突再生,其原因与晶状体含内源性保护物质可溶性晶状体蛋白有关。这种晶状体蛋白被证实有α、β、γ 3 种亚型,α晶状体蛋白具有分子伴侣活性,其亚单位 αA、αB 属于小分子热休克蛋白家族成员,能抑制介导细胞凋亡,在保护视网膜色素上皮细胞、光感受器细胞以及晶状体上皮细胞的损伤过程中发挥重要作用[4]。本研究通过凝胶色谱、电泳和质谱分析证实

作者简介:王晓芹(1973 -),女,山东省安丘市人,博士,讲师,主要从事视神经损伤及修复方面的研究,发表论文 10 余篇。电话:(023)65428445,E-mail: wxq2007@tom.com
通讯作者:王　一,电话:(023)68765377
收稿日期:2006-01-18;修回日期:2006-05-26

α晶状体蛋白能促进RGCs存活，但α晶体蛋白对RGCs的具体作用及机制尚不清楚。因此，本实验利用间接免疫荧光标记及激光共聚焦扫描等方法就α晶状体蛋白对RGCs的作用进行了研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器设备

DMEM/F12干粉培养基、胎牛血清、D-Hanks干粉、胰蛋白酶干粉、牛α晶体蛋白、小鼠抗大鼠Thy1.1单克隆抗体(Sigma,美国)，FITC羊抗鼠IgG二抗、兔抗大鼠α晶体蛋白单克隆抗体(Santa Cruz，美国)，TRITC羊抗兔IgG二抗(北京中山生物公司分装)，Leica QWin照相及图像分析系统、TCS NT激光共聚焦显微镜(Leica，德国)。

1.2 实验动物

采用出生2 d内的清洁级Long Evans新生鼠，体质量3～5 g，雌雄不限，购于第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心，符合国家医用动物使用标准，检证字SCXK(渝)20020003。

1.3 培养板预处理

24孔细胞培养板预先孔内放置1 cm×1 cm的盖玻片，然后滴加10%多聚赖氨酸100 μl包被孔底及盖玻片，使其均匀覆盖，静置10 min后，吸去多余的多聚赖氨酸，室温晾干备用。

1.4 RGCs的原代培养

取新生鼠2只，断头处死后头部放入75%乙醇中3～5 min。轻轻摘出眼球，置入D-Hanks液内漂洗3次。在显微镜下钝性分离出视网膜神经上皮层组织，再在D-Hanks液中漂洗3次，将组织放入0.1%胰蛋白酶液2 ml中，37 ℃孵箱中孵育30 min。加入含10%胎牛血清的DMEM/F12液终止消化，1000 r/min离心5 min后，弃上清液，加入含10%胎牛血清的DMEM/F12培养液，钝头吸管吹打使之成为细胞悬液。调整细胞密度为1×10^5～1×10^6/ cm^2。将细胞悬液分别加入24孔板中。置37 ℃恒温CO_2细胞培养箱中。

1.5 实验分组

原代培养的RGCs分为实验组和对照组，实验组培养2 d后加入牛α晶体蛋白(用DMEM/F12液作溶剂)，终浓度为10^{-7}、10^{-6}、10^{-5}、10^{-4} g/L。对照组未作任何处理。观察时相点均为加α晶体蛋白后的1、3、12 h、1、2 d和3 d。

1.6 观察指标

1.6.1 细胞形态学鉴定及轴突确定标准　观察细胞形态，判定是否为RGCs。判断标准为：①RGCs胞体发出轴突的部位常呈圆锥形(称轴丘)；②大多数RGCs上具有多个突起，最长的为轴突，其余为树突。在高倍显微镜下，如果轴丘明显，则根据第1项标准判断轴突，如果轴丘不明显，则根据第2项标准判断。

1.6.2 RGCs的Thy1.1抗体标记鉴定及纯度检测　细胞贴壁后取出预置盖玻片，4%多聚甲醛4 ℃固定20 min，采用免疫荧光法进行鼠抗Thy1.1单克隆抗体的免疫细胞化学染色：3%H_2O_2室温孵育10 min，非免疫血清室温孵育10 min，小鼠抗大鼠Thy1.1单克隆抗体(1∶50，抗体稀释液稀释)4 ℃孵育过夜(对照组不加一抗，加PBS)，PBS漂洗3 min×3次，FITC标记的羊抗鼠IgG(1∶100，PBS稀释)，37 ℃孵育30 min(避光操作)，PBS漂洗3 min×3次(避光)，分别在荧光视野和相差视野下观察。计数高倍镜下的阳性细胞数和总细胞数，计算RGCs纯度。

1.6.3 形态学变化观察　各组RGCs分别在加入α晶体蛋白后1、3、12 h、1、2、3 d于相差倒置显微镜下观察细胞形态变化(轴突长度、突起数目)。

1.6.4 α晶体蛋白对RGCs存活及轴突生长的影响及纳入标准　每组6个孔，每个孔中央为中心，取上、中、下、左、右5个有突起的离散细胞进行测量，共30个，利用Leica QWin图像分析系统计数分散的、有突起生长的RGCs轴突长度和突起数目。

1.6.5 α晶体蛋白在RGCs上定位的免疫荧光染色及共聚焦显微镜观察　取培养3 d的覆有RGCs的盖玻片，以4%多聚甲醛固定，行免疫荧光细胞化学检测。一抗为兔抗大鼠α晶体蛋白单多克隆抗体(1∶200，PBS稀释，Santa Cruz公司)，二抗为TRITC标记的羊抗兔IgG(1∶200，PBS稀释)，阴性对照设3组：以PBS代替α晶体蛋白、以PBS代替一抗、以及PBS代替二抗。正常山羊血清封闭37 ℃ 20 min，一抗4 ℃过夜或37 ℃孵育1 h；二抗37 ℃孵育30 min，各步骤间均用0.01 mol/L PBS(pH 7.2)充分漂洗，最后缓冲甘油封片，于TCS NT激光共聚焦显微镜(激发波长568 nm，发射波长590 nm)下观察并摄像，利用MIG 2000软件进行相对灰度分析。

1.7 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 11.0统计软件行t检验。

2 结果

2.1 RGCs形态学鉴定及轴突确定结果

相差显微镜下观察见原代培养的RGCs胞体有光晕，发出轴突的部位呈圆锥形，大多数细胞上具有多个突起，最长的为轴突，随着培养时间增长，有突起的细胞增多，胞体增大，突起增长增多，细胞间突起相互连接呈网络状。见图1。

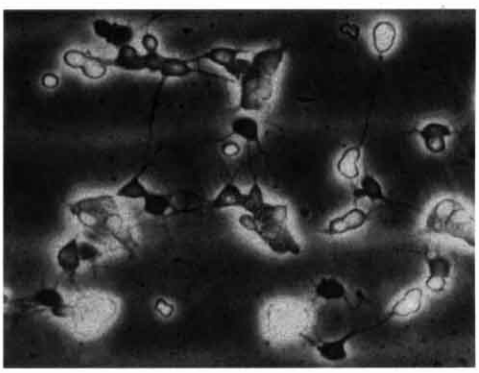


图1 原代培养的RGCs形态学观察 (相差倒置显微镜×200)

2.2 Thy1.1抗体标记鉴定及纯度检测结果

小鼠抗大鼠Thy1.1单克隆抗体标记见RGCs胞体和突起呈绿色荧光；荧光显微镜下标记阳性的RGCs与相应光镜视野中的细胞总数相除得出RGCs纯度在90%～95%。见图2。

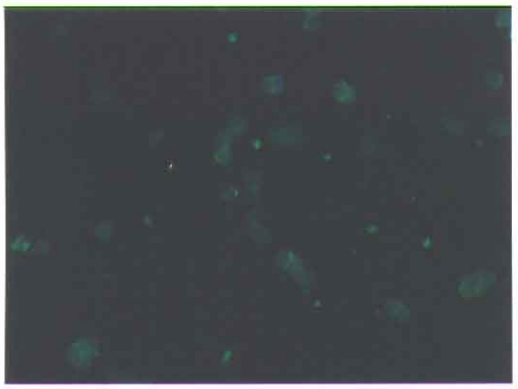


图 2　小鼠抗大鼠 Thy1.1 抗体免疫荧光鉴定 RGCs 结果
（荧光显微镜 ×200）

2.3　实验组 RGCs 加 α 晶体蛋白后形态变化观察结果

肉眼观察对照组 1、3、12 h 细胞形态无显著变化，3 d 与 1、2 d 比较有突起的细胞增多，胞体增大，突起增长增多，实验组细胞形态早期变化同对照组，2、3 d 时可见各浓度组细胞突起数目、轴突长度显著大于对照组，细胞间突起相互连接，末端可见生长锥，尤其晚期细胞生长佳，胞体进一步增大，细胞突起进一步增长并相互连接呈网络状，以上变化以 10^{-4} g/L 组最为显著。

2.4　RGCs 突起数目、轴突长度

各组 1、3 h 突起数目、轴突长度无显著变化（$P>0.05$），10^{-4}、10^{-5} g/L 实验组 1、2、3 d 突起数目及轴突长度显著高于对照组（$P<0.05$，$P<0.01$），其中 10^{-4} g/L 组 12 h 时轴突长度高于对照组（$P<0.05$）。结果见表 1、2。

表 1　各组 RGCs 突起数目（$\bar{x}\pm s$）

组别	1 h	3 h	12 h	1 d	2 d	3 d
对照组	3.4±1.1	3.7±1.3	3.9±1.5	4.4±1.5	4.6±1.6	5.6±1.8
实验组（g/L）						
10^{-7}	3.8±1.4	3.9±1.5	4.0±1.4	4.5±1.1	4.6±1.4	5.8±1.3
10^{-6}	3.8±1.4	4.0±1.7	4.0±1.5	4.6±1.3	4.7±1.5	6.0±1.8
10^{-5}	3.9±1.3	4.2±1.7	4.2±1.5	4.7±1.4[a]	5.5±1.6[a]	6.7±1.8[a]
10^{-4}	4.0±1.6	4.3±1.4	4.3±1.5	4.9±1.6[a]	5.8±1.8[b]	8.7±2.5[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较

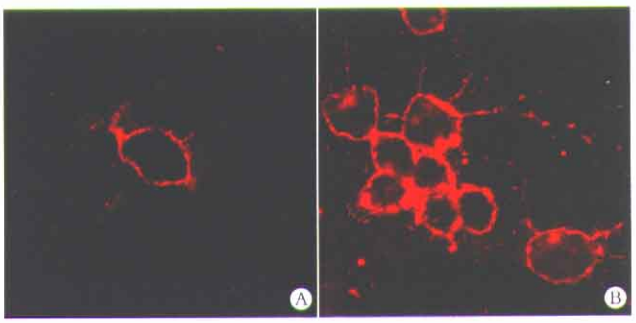
表 2　各组 RGCs 轴突长度（$l/\mu m$，$\bar{x}\pm s$）

组别	1 h	3 h	12 h	1 d	2 d	3 d
对照组	80.8±7.8	88.9±8.3	91.9±8.2	101.4±8.4	122.4±11.7	141.9±11.4
实验组（g/L）						
10^{-7}	84.1±7.7	89.0±6.6	92.4±8.0	110.2±8.2	122.5±10.2	140.7±12.1
10^{-6}	83.1±7.4	89.1±7.3	92.7±8.2	104.4±8.1	123.8±10.2	147.0±12.0
10^{-5}	82.5±7.5	90.4±8.2	93.2±8.3	106.4±8.8[a]	141.2±15.7[b]	171.1±17.5[b]
10^{-4}	81.8±7.0	92.2±9.9	96.6±8.8[a]	138.2±12.4[b]	155.5±13.3[b]	205.7±20.7[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较

2.5　α 晶体蛋白与 RGCs 相互作用的免疫荧光定位及半定量结果

实验结果提示有效作用浓度为 10^{-4} g/L，免疫荧光定位及半定量结果提示 10^{-4} g/L 组在 RGCs 细胞膜上呈高密度荧光物质沉积，呈“戒指状”，有的细胞轴突上可见少量点状荧光，并呈先升高后降低的趋势，于 1、3、12 h、1 d 时相点均见“戒指状”荧光物质，细胞完整轮廓清晰可辨。3 组阴性对照组均未见“戒指状”荧光物质（图 3），实验组与对照组相比荧光相对灰度差异显著（$P<0.05$）。



A：加入 α 晶体蛋白后 3 h；B：加入 α 晶体蛋白后 6 h

图 3　加入 α 晶体蛋白后 RGCs 免疫荧光结果
（激光共聚焦显微镜 ×1 000）

3　讨论

RGCs 是视网膜中分化最早的神经元，RGCs 经过增殖、分化逐渐发育成熟[2]。Thy1.1 抗原是啮齿类动物许多细胞表面的一种糖蛋白，在大鼠的脑和胸腺呈高浓度表达。实验显示在视网膜中，Thy1.1 抗原是 RGCs 的成熟标志，同时又是 RGCs 的特异性标志，并且出生后 1～3 d 的大鼠视网膜神经上皮层只有 RGCs 层和视网膜母细胞层[5]，这些特征使得用 Thy1.1 单克隆抗体标记 RGCs 更科学、更准确。因此，Thy1.1 单克隆抗体广泛用于 RGCs 的鉴定。本实验中抗大鼠 Thy1.1 单克隆抗体鉴定得原代培养 RGCs 纯度为 90%～95%。

建立 RGCs 体外培养和纯化模型是研究青光眼及其他视网膜疾病的基础。在此基础上我们还研究了 RGCs 体外生长的生物学特性及 α 晶体蛋白液对 RGCs 生长存活的作用，发现 α 晶体蛋白是具有促进 RGCs 生存的活性物质。这将为今后进一步研究 RGCs 的保护和死亡机制提供重要的理论依据。

α 晶体蛋白具有分子伴侣功能，其发挥生物学活性是通过改变或修饰其他蛋白质，影响或调节其他功能性蛋白质而间接发挥作用。揭示了晶状体蛋白具有分子伴娘作用之后，在体内也发现了晶状体蛋白对热应激的保护作用，其他实验还显示晶状体蛋白可抑制其他蛋白的热凝聚和保护酶的化学失活等功能[6,7]。

α 晶体蛋白与 RGCs 的相互作用免疫荧光结果提示 α 晶体蛋白和在 RGCs 上作用物的定位、分布及荧光信号强度大致相同，结合位点均在细胞膜上，呈高密度、“戒指状”分布在细胞周边，细胞轴突上可见少量点状荧光。对照组均未见“戒指状”荧光物质。提示 RGCs 膜上可能有与 α 晶体蛋白相互作用的蛋白分子存在，这个分子可能是其受体。已有实验进展表明牛和鼠 α 晶体蛋白均有相同结果，支持 RGCs 膜上存在

相关结合物的推论，而且与 α 晶体蛋白确实具有促进 RGCs 轴突生长作用相关。

应用不断成熟的共聚焦显微镜技术与现代免疫荧光学最新成就的结合，在分子水平对膜受体蛋白分子与配体分子复合物在 RGCs 膜上定位，这是目前常用的传统研究方法不可比拟的，对于单个生物分子的生物学行为具有一定的代表意义[8]。共聚焦显微镜技术使得观测结果较真实，提高了图像的准确度。而常规的观测方法单个标记分子难以显示，往往在阳性抗原上聚集多个标记分子，才有可能在光镜或共聚焦显微镜下显示；单个免疫复合物分子可以在透射或扫描电镜下显示，但又缺乏三维适时动态生理活性状态研究的能力。本实验利用激光共聚焦显微镜技术观测 α 晶体蛋白在 RGCs 膜上的定位，并且可以对荧光强度进行测量，为下一步建立受体模型和对其可能的受体原位测量奠定基础。

参考文献：

[1] MATSUKAWA T, ARAI K, KORIYAMA Y, *et al*. Axonal regeneration of fish optic nerve after injury [J]. Biol Pharm Bull, 2004, 27(4): 445-451.

[2] QING G, DUAN X, JIANG Y. Induction of heat shock protein 72 in RGCs of rat acute glaucoma model after heat stress or zinc administration [J]. Yan Ke Xue Bao, 2004,20(1): 30-33, 51.

[3] FISCHER D, HEIDUSCHKA P, THANOS S. Lens-injury-stimulated axonal regeneration throughout the optic pathway of adult rats [J]. Exp Neurol, 2001,172(2): 257-272.

[4] MADDALA R, RAO V P. Alpha-crystallin localizes to the leading edges of migrating lens epithelial cells [J]. Exp Cell Res, 2005,306(1): 203-215.

[5] 王艳华，王 一，刘 勇，等. Long Evans 大鼠视网膜神经节细胞培养与鉴定[J]. 第三军医大学学报，2004，26(5):412-415.

[6] PARCELLIER A, SCHMITT E, BRUNET M, *et al*. Small heat shock proteins HSP27 and alphaB-crystallin: cytoprotective and oncogenic functions [J]. Antioxid Redox Signal, 2005,7(3-4): 404-413.

[7] ZHANG Y, LIU X, LIU J. Recombinant human alphaA-crystallin can protect the enzymatic activity of CpUDG against thermal inactivation [J]. FEBS Lett, 2005,579(13): 2897-2900.

[8] XIN H, TANAKA H, YAMAGUCHI M, *et al*. Vanilloid receptor expressed in the sarcoplasmic reticulum of rat skeletal muscle [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 332(3): 756-762.

（编辑 王小寒）

（上接 1954 页）

月，1 例患者有轻度后抽屉试验阳性，其余患者重力抽屉试验、股四头肌收缩及后抽屉试验均为阴性。所有患者伸膝活动度正常，术后 6 个月，膝关节活动度：(伸)0°，(屈)130°。

3 讨论

膝关节外伤往往造成关节的多处损伤，PCL 胫骨止点撕脱骨折发生率较高，损伤机制与 PCL 断裂相似，由于 PCL 胫骨止点一部分在关节囊外，撕脱骨折发生后，关节囊等软组织的嵌夹常使骨块难以复位，骨折不愈合的发生率很高，容易造成 PCL 功能不全[1]，所以，在闭合复位不满意的情况下必须行手术治疗。胫骨止点骨折手术方法有关节镜下复位内固定[1]，也有后侧切开复位内固定方法，前者属微创，但由于 PCL 胫骨止点为其实质部 3～4 倍直径的蘑状附着于胫骨沟内，与后关节囊联合紧密，撕脱移位后，在关节镜下复位异常困难，往往复位不全，残留 PCL 松弛问题，对于骨块粉碎病例处理困难；后者复位及固定确切，但无法准确评估和处理关节内情况[2]，PCL 损伤常同时合并关节内其他损伤，包括半月板损伤，前交叉韧带损伤，关节内骨折等。如果不使用关节镜术，常可能对这些损伤产生漏诊、漏治。这是术后效果不佳的主要原因之一。我们将两者结合起来，通过前路常规关节镜检查，明确关节内各种损伤及后交叉韧带损伤程度，同时在关节镜下作各种合并伤的处理，根据后交叉韧带损伤情况决定手术方案，结合膝后正中有限切口确切复位牢固固定撕脱骨块，明显提高了诊断准确率和处理合理性，减少了手术创伤。半月板损伤、前交叉韧带损伤及关节内骨折，脱落的软骨碎片，一般均能在关节镜下完成手术。

关节外伤的早期功能锻炼，不但可以促进骨折的愈合，防止关节粘连，而且可以加速术后关节功能的康复。关节镜在术中的应用能够很好的对关节内结构损伤进行清理，为术后早期功能锻炼打下了基础。本组 15 例中或多或少都存在关节内其他损伤，在关节镜下完成了半月板损伤及关节软骨骨折等的处理。

关节镜内交叉韧带重建术是近年来膝关节镜外科领域发展最为迅速和受到广泛重视的手术方式之一[3]，但由于后交叉韧带修补或重建镜下操作困难，容易损伤膝后重要血管、神经，且需要昂贵的特殊器械，故不适宜在基层医院开展手术。

综上所述，本方法有以下优点：(1)能准确评估关节内创伤情况，并能同时处理关节内合并伤，有效地避免了漏诊、漏治。(2)对术后早期康复训练和判断愈后提供了客观依据。(3)避免了大创伤手术及高成本手术。因此，联合应用关节镜是诊断和治疗后交叉韧带损伤及其合并伤的较理想方法。

关键词：关节镜；后入路；后交叉韧带；撕脱骨折

中图法分类号：R684 文献标识码：B

参考文献：

[1] 赵金忠，蒋 一 点，关节镜下缝线固定治疗后交叉韧带胫骨止点撕脱骨折 [J]. 中华创伤杂志，2003，19(9)：569-570.

[2] 狄正林，徐荣明，冯建翔，等. 膝关节后侧有限切开不吸收缝线内固定治疗后交叉韧带胫骨止点骨折[J]. 中国骨与关节损伤杂志，2005，20(4)：283-284.

[3] SCHULTE K R, CHU E T, FU F H. Arthroscopic posterior cruciate ligament reconstruction [J]. Clin Sports Med, 1997, 16(1): 145-156.

（编辑 汪勤俭）