文章编号:1000-5404(2007)24-2319-04

论著

分离提纯牛α晶体蛋白促大鼠RGCs生长作用的观察

王晓芹[1,2],王贵波[3],王 一[1],阴正勤[1] (第三军医大学:[1]西南医院全军眼科中心,[2]医学检验系药学院药理学教研室,[3]西南医院病理学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 观察分离提纯的牛α晶体蛋白(α-crystallin)对体外培养视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)生长的作用。**方法** 原代培养RGCs,Thy1.1免疫荧光法鉴定RGCs并进行纯度检测,不同浓度分离提纯的牛α晶体蛋白(10^{-7}、10^{-6}、10^{-5}、10^{-4} g/L)加入后,于3、12 h、1、2 d和3 d在相差显微镜下观察RGCs形态学变化;计突起数目和轴突长度并与正常对照组、鼠α晶体蛋白组(10^{-4} g/L)进行比较。**结果** 分离提纯的牛α晶体蛋白组(10^{-4} g/L和10^{-5} g/L)RGCs突起数目及轴突长度显著大于正常对照组($P<0.05$, $P<0.01$),牛α晶体蛋白10^{-4} g/L与鼠α晶体蛋白组(10^{-4} g/L)比较无明显区别($P>0.05$)。**结论** 分离提纯的牛α晶体蛋白(10^{-4} g/L)能够促进RGCs生长,与鼠α晶体蛋白(10^{-4} g/L)比较无明显区别。

关键词: 视网膜神经节细胞;α晶体蛋白;轴突
中图法分类号: R322.91;R329.24;R914 **文献标识码:** A

Effect of bovine α-crystallin on RGCs of rat *in vitro*

WANG Xiao-qin[1,2], WANG Gui-bo[3], WANG Yi[1], YIN Zheng-qin[1] ([1]Department of Ophthalmology, [3]Institute of Pathology, Southwest Hospital, [2]Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effect of bovine α-crystallin on rat RGCs *in vitro*. **Methods** Rat RGCs were cultured and then identified by Thy1.1 antibody. RGCs were treated with bovine α-crystallin at different concentration (10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} g/L) for 3 h, 12 h, 1 d, 2 d and 3 d, with the normal RGCs and RGCs treated with rat α-crystalline (10^{-4} g/L) as controls. The changes of RGCs were observed, and the number and the length of outgrowing RGCs axons were calculated under microscope. **Results** The length and number of RGCs axons treated with 10^{-4} g/L, 10^{-5} g/L bovine α-crystallin, especially 10^{-4} g/L, were more than those in normal control RGCs in the 1st, 2nd and 3rd day. The effect of 10^{-4} g/L bovine α-crystallin had no difference from that of 10^{-4} g/L rat α-crystallin. **Conclusion** Bovine α-crystallin, especially of 10^{-4} g/L, improves the survival of RGCs and the regeneration of axons, without difference with 10^{-4} g/L rat α-crystallin on effect.

Key words: RGCs; α-crystallin; axon

视神经损伤时,视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)逆行性退变及死亡是视功能不可逆性损害的主要原因,迄今仍缺乏有效的治疗手段,人们对视神经损伤机制的认识尚不完全清楚[1-3]。Fischer、Leon及Lorber分别通过离体和在体实验证明:晶状体损伤可激发"神经保护性物质"的释放,可以保护RGCs存活,促进损伤的视神经再生[4-6]。α晶体蛋白是晶状体可溶性晶体蛋白中的主要成分。本小组前期实验分离提纯了鼠α晶体蛋白,在体外实验中证实其具有显著促进RGCs存活和突起生长的生物学活性[7],并购买了纯品牛α晶体蛋白初步探讨了其可能机制[8]。但是鼠α晶体蛋白取材来源有限、难度大,而国外纯品牛α晶体蛋白成本高的缺点限制了其可能的临床应用前景。为了α晶体蛋白的来源更为经济(选取大动物如猪、牛等),以及为α晶体蛋白的最终临床应用作考虑,本实验自行分离提纯牛的α晶体蛋白,然后利用其进行干预实验,观察其对体外培养大

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(2007CB512203)及全军医学科研"十一五"计划科技攻关课题(06G072)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2007CB512203) and the Medical Research Project of the "Eleventh Five-Year Plan" of PLA (06G072)

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)68752265, E-mail:wxq2007@tom.com
通讯作者:王 一,电话:(023)68754401,E-mail:wangyieye@yahoo.com.cn

收稿日期:2007-07-11;修回日期:2007-09-21

鼠 RGCs 突起数目及轴突长度的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器设备

新鲜牛眼 2 只、DMEM/F12 干粉培养基、胎牛血清、D-Hanks 干粉、胰蛋白酶干粉、鼠抗 Thy1.1 多克隆抗体(Sigma,美国),FITC 羊抗鼠 IgG 二抗(Santa Cruz, 美国),Leica QWin 照相及图像分析系统(德国)。MB99-2 自动凝胶层析仪(上海沪西分析仪器厂),所用凝胶层析介质为 Sephacryl S-300HR(美国 Pharmacia 公司)。

1.2 视网膜神经节细胞的原代培养

1.2.1 实验动物 采用出生 2 d 内的清洁级 Long Evans 新生鼠 9 只,雌雄不限,体质量 3 ~ 5 g,购于本校大坪医院野战外科研究所实验动物中心,动检证字 SCXK(渝)20020003。

1.2.2 培养板预处理 24 孔细胞培养板孔内预先放置 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。

1.2.3 大鼠视网膜神经节细胞的原代培养 取新生鼠 3 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,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,1 000 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。调整细胞数为 10^5 ~ 10^6/cm^3。将细胞悬液分别加入 2 个 24 孔板中,置 37 ℃恒温 CO_2 细胞培养箱中。

1.3 牛 α 晶状体蛋白的分离、提纯及鉴定

1.3.1 混合可溶性晶状体蛋白的提取 取新鲜成年牛眼球 2 只,按文献[7]的方法提取混合可溶性晶状体蛋白。

1.3.2 分子排阻凝胶色谱分离可溶性 α 晶状体蛋白 按文献[7]的方法分离,只收集 α 晶状体蛋白成份(第 1 个峰)。4 ℃透析,透析液冻干得到 α 晶体蛋白干粉,-20 ℃储存备用。

1.3.3 SDS-PAGE 电泳鉴定分离的 α 晶状体蛋白质成份 常规方法进行 SDS-PAGE 电泳槽安装、样本处理、SDS-PGAE 电泳及采用考马斯亮蓝 R250 对 SDS-PAGE 凝胶染色。

1.4 Long Evans 大鼠 α 晶状体蛋白的来源

使用本课题组冻存的大鼠 α 晶体蛋白(同样方法提纯用 SDS-PAGE 与肽质谱鉴定)。

1.5 实验分组

分为牛 α 晶体蛋白组、鼠 α 晶体蛋白组和正常对照组(每组 6 个孔),在大鼠 RGCs 培养 2 d 贴壁后分别加牛 α 晶体蛋白(终浓度为 10^{-7}、10^{-6}、10^{-5}、10^{-4} g/L,用 DMEM/F12 液作溶剂)、鼠 α 晶体蛋白(根据预实验结果,终浓度定为 10^{-4} g/L,用 DMEM/F12 液作溶剂)和同量 DMEM/F12 液,观察时相点为 3、12 h、1、2 d 和 3 d,各浓度组观察孔数为 6 孔,重复 3 次。

1.6 观察指标

1.6.1 细胞形态学观察 观察细胞形态、生长情况。

1.6.2 RGCs 的 Thy1.1 抗体标记鉴定及纯度检测 参照文献[8]进行。常规免疫荧光法行 Thy1.1 单克隆抗体的免疫荧光染色,其中一抗为小鼠抗大鼠 Thy1.1 单克隆抗体,对照组不加一抗,加 PBS,二抗为 FITC 标记的羊抗鼠 IgG。计算高倍镜下的阳性细胞数和总细胞数,以及 RGCs 的纯度。

1.6.3 RGCs 生长状态观察 各组 RGCs 分别于加 α 晶体蛋白后 3、12 h、1、2、3 d 在相差显微镜下观察生长状态(轴突长度、突起数目)。每组 6 个孔,每个孔以中央为中心,随机取上、中、下、左、右 5 个有突起的离散细胞进行测量,利用 Leica QWin 图像分析系统计数分散的、有突起生长的 RGCs 轴突长度和数目。

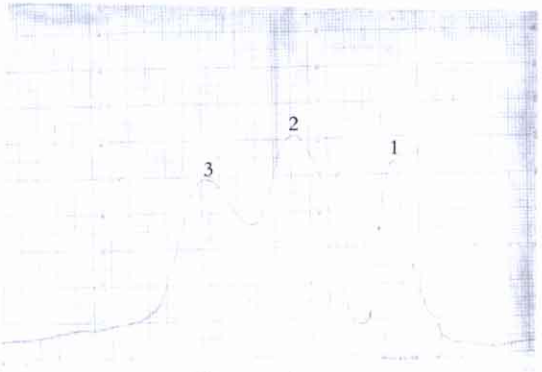
1.7 统计学分析

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

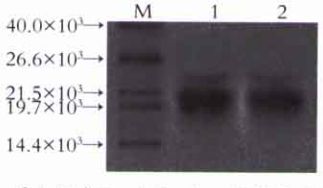
2.1 牛 α 晶状体蛋白的分离、提纯及鉴定

记录的凝胶色谱图上可见有 α、β、γ 晶体蛋白共 3 个蛋白质峰。其中,第 1 个峰(1 号)为 α 晶体蛋白,见图 1。将 α 晶体蛋白完全变性进行 SDS-PAGE 电泳考马斯亮蓝染色后,胶条上可见与文献所示的各亚基相对分子质量大小相符的条带,证明所收集的蛋白质成分是 α 晶体蛋白,见图 2。



参数:流速 18 ml/h,检测波长 280 nm,灵敏度 0.5 A,记录速度 3 cm/h。1:α 晶状体蛋白峰象(右侧第 1 个峰);2:β 晶状体蛋白峰象;3:γ 晶状体蛋白峰象

图 1 分子排阻凝胶色谱图



M:蛋白标准品;1,2:牛 α 晶状体蛋白

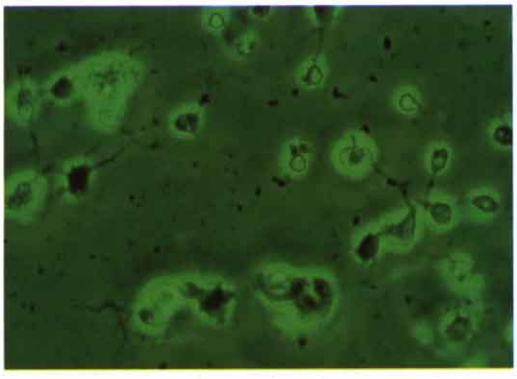
图 2 牛 α 晶状体蛋白收集品的 SDS-PAGE 电泳图

2.2 原代培养 RGCs 的 Thy1.1 抗体鉴定及纯度检测结果

结果同文献[8],RGCs 纯度为 90% ~95%。

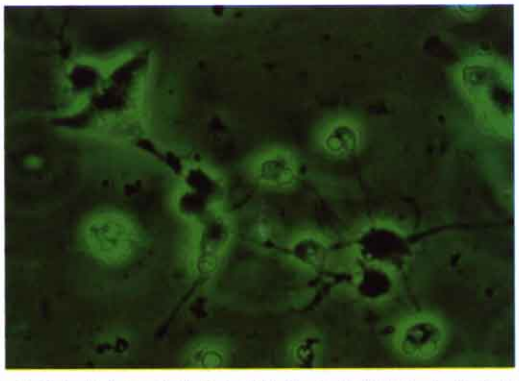
2.3　各组 RGCs 形态学变化观察结果

RGCs 贴壁生长，胞体圆型或椭圆型，有的细胞为单个，有的细胞成团，大多数细胞有多个突起，突起中最长的为轴突，发出轴突的部位呈明显圆锥形。在 RGCs 生长期内随着培养时间的延长，RGCs 胞体、突起逐渐增大、增长，有的细胞间突起相互连接呈网络状。结果见图 3、4。



RGCs 生长好，胞体较大有光晕，细胞突起清晰

图 3　牛 α 晶体蛋白组（10^{-4} g/L）的 RGCs 2 d 形态学观察（倒置显微镜 ×200）



RGCs 贴壁生长良好，胞体较大有光晕，立体感较强，细胞突起清晰

图 4　鼠 α 晶体蛋白组（10^{-4} g/L）RGCs 2 d 形态学观察（倒置显微镜 ×200）

2.4　RGCs 突起数目统计结果

在 3、12 h 和 1 d 时，各 α 晶体蛋白浓度组同正常组比 RGCs 突起数目无显著差异（$P>0.05$），2 d 时牛 α 晶体蛋白 10^{-4} g/L 浓度组及 10^{-5} g/L 浓度组突起数目显著高于正常对照组（$P<0.05$），3 d 时牛 α 晶体蛋白 10^{-4} g/L 浓度组突起数目与正常组比差异非常显著（$P<0.01$），牛 10^{-4} g/L 浓度组与鼠 α 晶体蛋白 10^{-4} g/L 浓度组细胞突起数目无显著差异（$P>0.05$）。结果见表 1。

表 1　各组 RGCs 突起数目统计结果（个，$\bar{x}\pm s$）

组别	3 h	12 h	1 d	2 d	3 d
正常对照组	3.6±1.2	4.0±1.5	4.4±1.4	4.6±1.7	5.5±1.7
鼠 α 晶体蛋白组（10^{-4} g/L）	3.9±1.1	4.2±1.4	4.7±1.4	5.6±1.3[a]	8.5±1.8[b]
牛 α 晶体蛋白组（10^{-7} g/L）	3.8±1.4	4.1±1.3	4.5±1.2	4.5±1.3[c]	5.7±1.3[d]
牛 α 晶体蛋白组（10^{-6} g/L）	3.9±1.4	4.1±1.2	4.5±1.2	4.6±1.4[c]	5.9±1.5[d]
牛 α 晶体蛋白组（10^{-5} g/L）	3.9±1.5	4.2±1.3	4.6±1.3	5.6±1.5[a]	6.6±1.6[ad]
牛 α 晶体蛋白组（10^{-4} g/L）	4.0±1.0	4.2±1.5	4.8±1.5	5.7±1.4[a]	8.6±1.9[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与正常对照组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与鼠 α 晶体蛋白组比较

2.5　各组 RGCs 轴突长度统计结果

同正常对照组比，各 α 晶体蛋白浓度组 3、12 h 细胞轴突长度差异不显著（$P>0.05$），后期差异显著，其中牛 α 晶体蛋白 10^{-4}、10^{-5} g/L 浓度组 2、3 d 时轴突长度显著高于正常对照组（$P<0.01$）；牛 α 晶体蛋白组（10^{-4} g/L）与鼠 α 晶体蛋白组（10^{-4} g/L）轴突长度无显著区别（$P>0.05$）。见表 2。

表 2　各组 RGCs 轴突长度统计结果（μm，$\bar{x}\pm s$）

组别	3 h	12 h	1 d	2 d	3 d
正常对照组	89.0±8.4	92.1±9.2	102.1±8.8	124.3±12.1	140.7±11.7
鼠 α 晶体蛋白组（10^{-4} g/L）	90.8±9.2	98.2±11.2	126.6±12.1[b]	157.4±12.3[b]	205.3±15.8[b]
牛 α 晶体蛋白组（10^{-7} g/L）	89.1±7.4	91.8±8.9	102.5±9.2[d]	126.7±11.3[d]	143.3±14.3[d]
牛 α 晶体蛋白组（10^{-6} g/L）	89.2±7.5	92.5±8.3	106.5±9.1[d]	127.5±11.2[d]	148.4±13.5[d]
牛 α 晶体蛋白组（10^{-5} g/L）	90.5±7.7	93.5±8.1	112.5±9.2[ac]	139.3±16.8[bc]	176.3±18.6[bd]
牛 α 晶体蛋白组（10^{-4} g/L）	91.1±9.7	97.7±8.1	125.4±13.5[b]	157.6±12.4[b]	203.4±16.8[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与正常对照组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与鼠 α 晶体蛋白组比较

3　讨论

本实验选择出生后 0～2 d Long Evans 大鼠为研究对象，在动物来源上保证了 RGCs 的纯化程度。另外，在视网膜中 Thy1.1 抗原是 RGCs 的特异性标记[8,9]。本实验中，Thy1.1 鉴定 RGCs 纯度为 90%～95%，为下一步实验打下了基础。

α 晶体蛋白具有复杂的生物学作用，它不仅仅是一种结构蛋白，还具有复杂的生物学功能。以往研究表明，α 晶体蛋白具有分子伴侣活性，具有保护晶状体代谢酶的失活、抑制蛋白质聚集的作用[10-12]。

本课题组前期实验证实 α 晶体蛋白具有促进 RGCs 存活和突起生长的生物学活性[7,10]。但为了观察来源更为经济的大动物（猪、牛等）的 α 晶体蛋白是否也有同样作用，并为 α 晶体蛋白的最终应用作考虑，本实验分离提纯牛 α 晶体蛋白，将其对 RGCs 的作用与课题组内冻存的已经提纯好的大鼠 α 晶体蛋白进行比较。本实验中 α 晶体蛋白的获取过程及分子量鉴定沿用了成熟的方法（凝胶色谱与 SDS-PAGE 法），均达到重复性好的效果。前期实验中，已经将获取的大鼠 α 晶体蛋白做了鉴定（作 SDS-PAGE 实验后的胶条用肽质谱方法鉴定），证实为 α 晶体蛋白，故前期实验所获取的鼠 α 晶体蛋白可用于本实验分离提纯的牛 α 晶体蛋白作阳性对照。

本实验中，给予分离提纯的牛 α 晶体蛋白后，RGCs 早期无显著变化，2 d 及 3 d 时可见部分浓度组细胞突起数目、轴突长度显著大于正常对照组，以上变化以高浓度组尤其是 10^{-4} g/L 组最为显著。在低浓度组则出现一种较好的趋势，但统计学上无显著意义，这也体现了一种量效关系。在实验组，特别是 10^{-4} g/L 浓度组后期突起数目显著高于正常对照组，牛晶体蛋

白组(10^{-4} g/L)3 d时突起数目达(8.6±1.9)个。在轴突长度的检测中也有相似的结果。从以上结果可以看出,分离提纯的牛α晶体蛋白可以显著促进培养大鼠RGCs的轴突生长,对RGCs存活具有支持作用,与鼠α晶体蛋白组(10^{-4} g/L)表现出类似结果。

RGCs的存活和轴突生长是关系到视神经损伤后能否再生修复的关键,α晶体蛋白对RGCs的促生长作用为克服视神经损伤修复这一难题的研究带来了希望,本实验证实自行分离提纯的牛α晶体蛋白具有促大鼠RGCs轴突生长及增加突起数目的作用,为下一步α晶体蛋白的临床应用奠定了基础。

参考文献:

[1] Watanabe M, Tokita Y, Yata T. Axonal regeneration of cat retinal ganglion cells is promoted by nipradilol, an anti-glaucoma drug[J]. Neuroscience, 2006, 140(2): 517-528.

[2] Hebb M O, Myers T L, Clarke D B. Enhanced expression of heat shock protein 27 is correlated with axonal regeneration in mature retinal ganglion cells[J]. Brain Res, 2006, 1073-1074: 146-150.

[3] Zurn A D, Bandtlow C E. Regeneration failure in the CNs: cellular and molecular mechanisms[J]. Adv Exp Med Biol, 2006, 557: 54-76.

[4] Leon S, Yin Y, Nguyen J, *et al*. Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve[J]. J Neurosci, 2000, 20(12): 4615-4626.

[5] Lorber B, Berry M, Logan A, *et al*. Effect of lens lesion on neurite outgrowth of retinal ganglion cells *in vitro*[J]. Mol Cell Neurosci, 2002, 21(2): 301-311.

[6] 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.

[7] 刘 康,王 一,王艳华,等. 晶状体蛋白促大鼠视网膜神经节细胞存活和突起生长的体外研究[J]. 中华创伤杂志, 2007, 23(1): 41-46.

[8] 王晓芹,王 一. α晶体蛋白对视网膜神经节细胞作用的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(19): 1955-1958.

[9] Levin L A. Retinal ganglion cells and supporting elements in culture[J]. J Glaucoma, 2005, 14(4): 305-307.

[10] Masilamoni J G, Jesudason E P, Baben B, *et al*. Molecular chaperone alpha-crystallin prevents detrimental effects of neuroinflammation[J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1762(3): 284-293.

[11] Sun Y, Bojikova-Fournier S, MacRae T H. Structural and functional roles for beta-strand 7 in the alpha-crystallin domain of p26, a polydisperse small heat shock protein from Artemia franciscana[J]. FEBS J, 2006, 273(5): 1020-1034.

[12] Yan H, Harding J J. Carnosine inhibits modifications and decreased molecular chaperone activity of lens alpha-crystallin induced by ribose and fructose 6-phosphate[J]. Mol Vis, 2006, 12: 205-214.

(编辑 薛国文)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2007)24-2322-01

苯丙胺类兴奋剂滥用者的现况调查

覃 静[1],卢金山[2],张 锐[2] ([1]广州军区武汉总医院神经内科,武汉 430070;[2]广州军区武汉疗养部二科,武汉 430074)

我们对2001年11月至2006年10月广州区武汉疗养院戒毒科、武汉市强制戒毒所及武汉铁路公安处强制戒毒所收治的1 328例苯丙胺类兴奋剂(amphetamin type stimulants, ATS)滥用者进行了流行病学普查,对武汉地区ATS滥用情况有了初步的了解,现报告如下。

1 对象与方法

调查对象1 328例,其中1 312例为公安机关在迪吧内收入强制戒毒所的ATS滥用者,16例为自愿戒毒所收治的ATS滥用者。入所时对调查对象进行初步的登记、体检,采取Bioking LLc san Diego Caqzizi U S A三合一试剂盒(MA、MDMA、Heroin)进行尿液一步法检测,前2项其中1项阳性者作为调查对象。分别对滥用者的人口学特征、ATS药丸的类型、滥用的原因、剂量、主要临床特点及合并其他药物滥用的情况进行调查,最后作出统计、分析与讨论。

作者简介:覃 静(1954-),女,湖北省石首县人,副主任医师。电话:13026187687

收稿日期:2007-01-22;修回日期:2007-03-21

2 结果

2.1 人口学特征

1 328例ATS滥用者年龄(21.8±6.8)岁,以未婚、高中以下文化程度、娱乐业、服务业及待业的青少年为主,男性774例,占58.3%,女性554例,占41.7%。

2.2 ATS制剂的形状、颜色、滥用的时间和剂量

ATS毒品制剂,每一个流行阶段毒品的来源不同,形状、颜色也不相同,多达十几种。滥用剂量:最大每次2片,最小每次1/6片,平均用量(0.51±0.12)片,102例吸麻果,用量4~30(15±4.7)片/d。滥用时间:211例为首次滥用(15.9%),滥用2~10次428例(32.2%),6个月内经常滥用326例(24.5%),6个月至1年经常滥用者268例(20.2%),1年以上者95例(7.1%)。

2.3 ATS滥用的方法、原因及合并其他药物的情况

ATS滥用的方式主要为烫吸或口服,合并海洛因依赖者主要为烫吸。滥用的原因主要有追求享受、刺激、好奇、增加聚会气氛、发泄生活中各种压力、受骗等。1 328例滥用者,其中合并滥用氯胺酮467例,占35.2%,合并滥用海洛因131例,占9.9%,合并滥用联邦泰洛其69例,占5.2%。

(下转2326页)