DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.03.006



论著

文章编号:1000-5404(2000)03-0216-04

# 牛磺酸对光照和暗适应条件下大鼠视杆细胞 $Gt_1$ 蛋白α亚基的影响

许红霞,糜漫天,韦 娜,郎海滨,黄国荣,余小平 (第三军医大学预防医学系营养卫生学教研室,重庆 400038)

提 要 目的:探讨牛磺酸对光照和暗适应条件下大鼠视网膜视杆细胞 $Gt_1$ 蛋白α亚基($G_{\alpha t1}$)蛋白表达的影响。方法:在幼年大鼠的饲料配方中添加牛磺酸,营养干预4周后,采用免疫组织化学染色、Western blotting技术检测大鼠视网膜 $G_{\alpha t1}$ 在光照和暗适应条件下的分布和表达。结果:光照时 $G_{\alpha t1}$ 主要表达于视杆细胞胞体及突触附近,暗适应时则以视杆外段的表达为主,且暗适应时 $G_{\alpha t1}$ 的蛋白表达量明显高于光照时。添加牛磺酸均可显著增加光照和暗适应时 $G_{\alpha t1}$ 蛋白的表达。结论:$G_{\alpha t1}$ 蛋白的分布及表达因光适应状态而异,牛磺酸能通过促进 $G_{\alpha t1}$ 表达,有利于视杆细胞光转导功能。

关键词 牛磺酸;视网膜;视杆细胞 $Gt_1$ 蛋白α亚基;暗适应;大鼠

中图法分类号 R151.41;R339.19 文献标识码 A

# Effects of taurine on expression of transducin αsubunit in retinal rods during light and dark adaptations in rats

XU Hong-xia, MI Man-tian, WEI Na, LIANG Hai-bin, HUANG Guo-rong, YU Xiao-ping (Department of Nutrition and Food Hygiene, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract** Objective: To investigate of taurine on the expression of transducin αsubunit ($G_{\alpha t1}$) in retinal rods during light and dark adaptations in rats. Methods: After the addition of taurine to the feeds of rats for 4 weeks, the localization and expression of $G_{\alpha t1}$ in retinal rods during light and dark adaptations were observed with immunohistochemistry and western blotting. Results: $G_{\alpha t1}$ was located mainly on the plasma membrane and in the vicinity of the synapses in light adaptation and in the outer segments of the rods in dark adaptation. The expression of $G_{\alpha t1}$ protein was increased after dark adaptation. The addition of taurine to the feeds of rats increased significantly the expression of $G_{\alpha t1}$ protein. Conclusion: Taurine can adjust the phototransduction of the rods through its affecting of the expression of $G_{\alpha t1}$ in the retina of rats.

**Key words** taurine; retina; rod transducin αsubunit; dark adaptation; rat

牛磺酸在视网膜中具有广泛的生理功能,它是光感受器发育和视网膜再生必需的营养因子[1],且可以保护视杆外段免受光化学损伤,与光感受器功能密切相关。近来研究发现它可能通过影响视网膜和视杆外段的 $Ca^{2+}$ 摄入而调制视杆细胞功能[2]。在视杆通路中,视杆细胞光转导蛋白 $Gt_1$ 蛋白α亚基($G_{\alpha t1}$)活性被认为是光转导的关键控制环节,本实验观察牛磺酸对光照和暗适应条件下大鼠视网膜 $G_{\alpha t1}$ 蛋白表达的影响,旨在探讨牛磺酸能否通过对 $G_{\alpha t1}$ 的影响而调制视杆通路光转导功能。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物及分组

幼年Wistar大鼠60只,雌雄各半,体重(70±10)g,随机分为3组,即正常组、缺乏组、牛磺酸组。动物自由进食和饮水,置于12 h光照/12 h黑暗的环境条件下单笼饲养。营养干预4周后,每组再随机分为光照组和暗适应组,光照组光照条件同前,暗适应组置于暗室(照度为3.0 LX),继续喂养3 d,观察各项分析指标的变化。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39900120);军队"九五"医药卫生科研基金资助项目(98Q055)

作者简介:许红霞(1970.7),女,重庆市黔江县人,硕士,讲师,主要从事营养与视功能方面的研究。电话:(023)68752291

收稿日期:1999-07-01;修回日期:2000-01-24

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

### 1.2 营养干预的饲料配方

大鼠基础饲料配方: 玉米淀粉 58.8%, 酪蛋白 18%, 蔗糖 10%, 芝麻油 5%, 纤维素 3%, 混合矿物质 4%, 混合微生素 1%, DL-蛋氨酸 0.2%, 其中混合矿物质及混合维生素采用 AOAC 配方。正常组: 在基础饲料配方的基础上, 添加 0.12% 牛磺酸。缺乏组: 在基础饲料配方的基础上, 添加正常组 1/3 剂量(0.04%)的牛磺酸。牛磺酸组: 在基础饲料配方的基础上, 添加 0.6%的牛磺酸。

### 1.3 免疫组织化学染色

4°C 预冷的 4%多聚甲醛灌注固定大鼠, 取眼球于 4%多聚甲醛后固定 4 ~ 6 h, 30%蔗糖 4°C 过夜, 冰冻切片(10 ~ 15 μm)。一抗为兔抗 $G_{αt1}$, 购自 Santa Cruz 公司。免疫组化染色采用Zymed 公司的 SPTM 试剂盒(SP9001), 二抗为羊抗兔 IgG, 染色方法参照试剂盒说明进行, 最后用 DAB 显色。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

### 1.4 组织蛋白质提取

大鼠断头处死, 取眼球, 每 0.1g 眼组织加 1ml 预冷至 0°C 的匀浆液(150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 1 mmol/L PMSF, 10 μg/ml Leupeptin, 10 μg/ml Aprotinin)匀浆, 4°C 12 000× g 离心 15 ~ 20 min, 将上清液移至另一微量离心管中, 分装后保存于 -20°C 备用。

### 1.5 Western blotting 分析

参照《分子克隆》第 2 版, 对样本进行蛋白定量后, 经 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳; 而后用电转移法转移蛋白至 PVDF 膜上, 1%BSA 封闭 4°C 过夜, 加 1∶1 000 稀释的抗 $G_{αt1}$ 37°C 孵育 1 h, 再与生物素标记的二抗及过氧化酶标记的链霉卵白素反应, 用 DAB 显色, 或用化学发光检测试剂盒(Dupont 产品)检测, 后者用图像分析系统进行分析。

## 2 结果

### 2.1 牛磺酸对大鼠视网膜 $G_{αt1}$ 蛋白分布及表达的影响

$G_{αt1}$ 免疫组织化学分析显示: 光照时, 各组 $G_{αt1}$ 的阳性染色主要出现在外核层及外网状层的外部, 而视杆外段无明显阳性染色, 牛磺酸组在视杆内段可见少量 $G_{αt1}$ 蛋白表达。表明光照时 $G_{αt1}$ 主要集中分布于视杆细胞胞体膜及突触附近的膜上。且发现, 牛磺酸组的染色明显强于正常组和缺乏组, 而缺乏组的染色最为浅淡, 见图 **1**, **2** 及表 **1**。暗适应后, 各组 $G_{αt1}$ 的阳性染色出现在视杆细胞内、外段, 外核层及外网状层外部, 其中以视杆外段染色最浓, 外核层染色最浅。表明暗适应后, $G_{αt1}$ 蛋白主要在视杆外段的胞膜及盘膜上表达, 在视杆细胞胞体膜的表达较少。类似光照时, 各组中仍以牛磺酸组的染色最强, 其次为正常组, 缺乏组染色最浅, 且此时牛磺酸组在视杆细胞各个部位均有很强的表达, 见图 **3** 及表 **1**。结果显示, 在光照和暗适应条件下添加牛磺酸均使 $G_{αt1}$ 的表达明显增加。

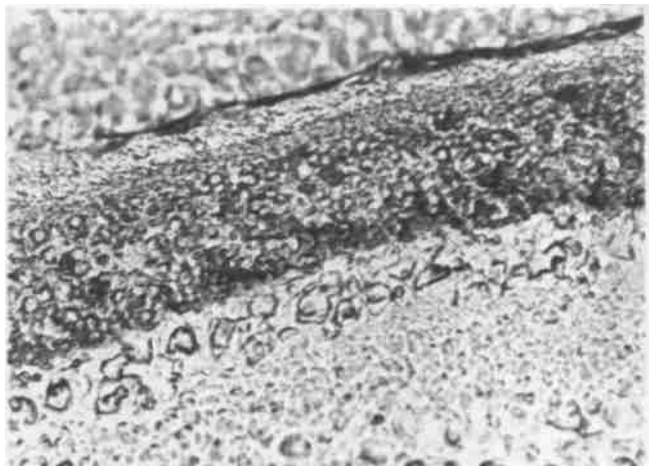


图 **1**　光照条件下正常组 $G_{αt1}$ 免疫组化染色　(× 400)

**Fig 1**　**$G_{αt1}$ immunohistochemistry of normal group inlight adaptation**　(× 400)

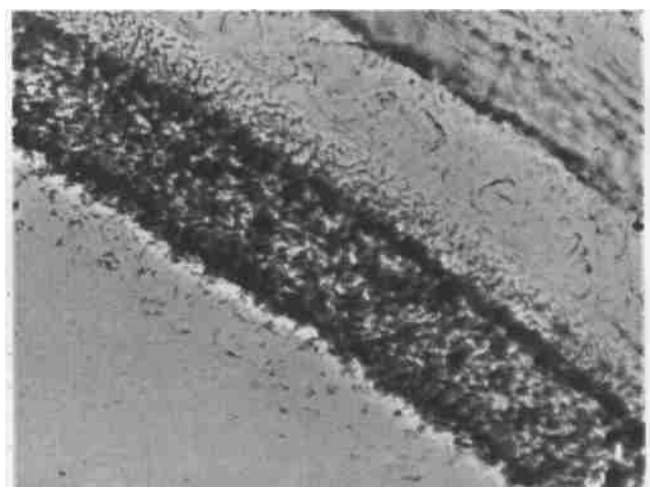


图 2　光照条件下牛磺酸组 $G_{αt1}$ 免疫组化染色　(× 400)

**Fig 2**　**$G_{αt1}$ immunohistochemistry of taurine group in light adaptation**　(× 400)

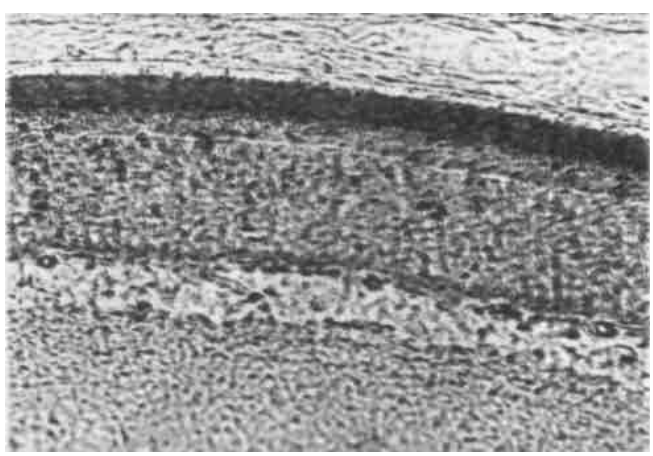


图 **3**　暗适应条件下正常组 $G_{αt1}$ 免疫组化染色　(× 200)

**Fig 3**　**$G_{αt1}$ immunohistochemistry of normal group in dark adaptation**　(× 200)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

**表1 牛磺酸对视杆细胞光转导蛋白 $G_{\alpha t1}$ 表达的影响**

**Tab 1 Effects of taurine on rod transducin α subunit**

| | | OS | IS | ONL | Outer of OPL |
|---|---|---|---|---|---|
| Light | Deficient group | - | - | + | + |
| | Normal group | - | - | ++ | ++ |
| | Taurine group | ± | + | +++ | +++ |
| Dark | Deficient group | + | + | ± | ± |
| | Normal group | ++ | + | + | + |
| | Taurine group | +++ | ++ | ++ | +++ |

+++: Intensive positivity; ++: Moderate positivity; +: Positivity; +: Low positivity; -: Negativity

2.2 牛磺酸对视杆细胞 $G_{\alpha t1}$ 蛋白表达量的影响

实验同时采用 Western blotting 技术检测了大鼠视网膜 $G_{\alpha t1}$ 的蛋白表达量，结果表明：在光照和暗适应条件下，从缺乏组、正常组到牛磺酸组，$G_{\alpha t1}$ 的蛋白表达量是逐步增多的，这与 $G_{\alpha t1}$ 的免疫组化结果相一致。Western blotting 分析还发现各组暗适应条件下 $G_{\alpha t1}$ 的蛋白表达量均明显高于光照时，见表2、图4。

**表2 $G_{\alpha t1}$ 蛋白免疫印迹分析结果**

**Tab 2 Western blotting of $G_{\alpha t1}$**

| | | $OD_{Xmax}$ | Peak Density | Average Density |
|---|---|---|---|---|
| Light | Deficient group | 0.245 | 0.07 | 0.05 |
| | Normal group | 0.575 | 0.14 | 0.12 |
| | Taurine group | 0.993 | 0.20 | 0.17 |
| Dark | Deficient group | 1.054 | 0.23 | 0.20 |
| | Normal group | 1.142 | 0.23 | 0.20 |
| | Taurine group | 1.255 | 0.25 | 0.22 |

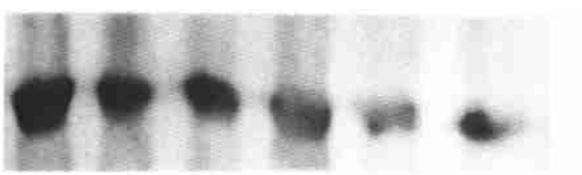



图4 $G_{\alpha t1}$ 蛋白的免疫印迹分析

Fig 4 Western blotting of $G_{\alpha t1}$

A, D: Taurine group; B, E: Normal group; C, F: Deficient group

本结果来自化学发光检测后经电泳成像凝胶分析系统（DOC gel 2000型，美国）的分析。

## 3 讨论

光感受器是产生视觉信号的第一级神经元，其主要功能是光转导功能。根据视觉的二元学说，视杆细胞在弱光时活动，超过一定照度时其功能为视锥细胞所取代。在暗中，视杆细胞光转导蛋白（$G_{t1}$ 蛋白）的α亚基与β、γ亚基聚合并结合GDP，当光量子激活视色素（Rh→Rh*）后，进一步活化 $G_{t1}$ 蛋白α亚基（$G_{\alpha t1}$），诱发其上的GDP转化为GTP，并与 $G_{t1}$ 蛋白β、γ亚基分离；$G_{\alpha t1}$ 随即激活磷酸二酯酶（PDE），从而催化cGMP水解，使cGMP门控的 $Na^+$ 通道关闭，导致视杆细胞超极化。在此过程中，$G_{\alpha t1}$ 活性被认为是光转导的关键控制环节，$G_{\alpha t1}$ 的蛋白表达量可反映视杆细胞光转导功能[3]。

本实验发现：光照时 $G_{\alpha t1}$ 主要表达于视杆细胞胞体及突触附近的膜上，长时间暗适应后以视杆外段（ROS）盘膜上的表达为主；同时，免疫印迹分析发现，光照时 $G_{\alpha t1}$ 的蛋白表达量较暗适应时低。其原因可能是：光照时视杆细胞功能受抑制，ROS盘膜上大量的视紫红质被光漂白后，不能活化 $G_{t1}$ 蛋白，ROS盘膜上大量的 $G_{t1}$ 蛋白以三聚体形式存在，而活化形式的 $G_{\alpha t1}$ 相对较少，表现为视杆外段较少 $G_{\alpha t1}$ 表达。在暗中以视杆细胞功能为主，ROS的光转导过程很活跃，$G_{t1}$ 蛋白主要以其活化形式 $G_{\alpha t1}$ 存在，表现为 $G_{\alpha t1}$ 主要在ROS表达，且 $G_{\alpha t1}$ 的蛋白表达量较光照时增多。而新近的研究还发现，光照时漂白的视紫红质也可活化部分 $G_{t1}$ 蛋白为 $G_{\alpha t1}$，这部分 $G_{t1}$ 蛋白在暗中不再具备被光量子活化的能力，从而使视敏度下降较单纯的视紫红质漂白更明显[4,5]，推测光照时和暗适应时外核层及外网状层外部表达的 $G_{\alpha t1}$ 可能正是来源于这部分 $G_{t1}$ 蛋白。

牛磺酸是视网膜中含量最丰富的游离氨基酸，其中大部分分布于光感受器细胞层。现已证实牛磺酸是光感受器发育必需的营养因子，缺乏牛磺酸会引起视网膜电图（ERG）缺陷，长期缺乏甚至会引起盘膜结构紊乱、光感受器退化，且发现牛磺酸可以保护ROS免受光化学损伤，光可以刺激牛磺酸释放，表明牛磺酸与光感受器功能密切相关。近年来大量研究发现牛磺酸对视网膜及ROS的ATP依赖的 $Ca^{2+}$ 摄入具有调节作用，而 $Ca^{2+}$ 在光感受器受到光刺激后的兴奋及复原中扮演了一个决定性的角色，它介导的是一种负反馈作用[6]：即光照使cGMP通道关闭，胞内自由 $Ca^{2+}$ 减少，从而刺激鸟甘酸环化酶（GC），使GTP生成cGMP，cGMP门控通道开放，光感受器复原。牛磺酸增加低 $Ca^{2+}$ 环境下的的ATP依赖的 $Ca^{2+}$ 的摄入，最有可能协助光感受器的复原。最新资料表明[7]，牛磺酸可能是通过开放光感受器的cGMP通道而促进ROS在低 $Ca^{2+}$ 环境下ATP依赖的 $Ca^{2+}$ 摄入，从而影响视网膜视觉信号的传导。本实验发现，牛磺酸能明显增加光照和暗适应时 $G_{\alpha t1}$ 的蛋白表达，表明牛磺酸对视杆细胞光转导功能有重要的调制作用，推测这种作用可能与牛磺酸影响cGMP通道和 $Ca^{2+}$ 摄入相关联。

## 参考文献

[1] Lima L, Obregon F, Mutus P. Taurine, glutamate and GABA modulate the outgrowth from goldfish retinal

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

explants and its concertrations are affected by the crush of the optic nerve[J]. Amino Acids, 1998, 15(3): 195—209.

[2] Militante J D, Lombandini J B. Effect of taurine in Chelerythrine inhibition if calcium uptake and ATPase activity in the rat retina[J]. Biochem Pharmacol, 1998, 55(5): 557—565.

[3] Baylor D. How photons start vision[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(2): 560—565.

[4] Matthews H R, Cornwall M C, Fain G L. Persistent activation of transducin by bleached rhodopsin in salamander rods [J]. J Gen Physiol, 1996, 108(6): 557—563.

[5] Fain G L, Matthews H R, Cornwall M C. Dark adaptation in vertebrate photoreceptors[J]. TINS, 1996, 19(11): 502—507.

[6] Calvert P D, Ho T W, Lefebvre Y W, *et al*. Onset of feedback reactions underlying vertebrate rod photoreceptor light adaptation[J]. J Gen Physiol, 1998, 111(1): 39—51.

[7] Militante J D, Lombardini J B. Pharmacological characterization of the effects of taurine on calcium uptake in the rat retina[J]. Amino Acids, 1998, 15(1—2): 99—108.

(编辑 薛国文)

文章编号: 1000-5404(2000)03-0219-01

## 经验与短篇

# 聚合酶链反应及斑点杂交技术对外耳道尖锐湿疣的病因学研究

# A study on viral etiology of condyloma acuminata in external auditory canal with GP-PCR and dot blotting hybridization

牟忠林[1], 刘兆华[2], 郭华阳[1], 姬长友[2], 周来新 (第三军医大学: [1] 医学检验系临床生物化学教研室, 重庆 400038; [2] 第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所耳鼻咽喉科, 重庆 400042)

尖锐湿疣(Condyloma acuminata, CA)由人乳头瘤病毒(Human Papillomavirus, HPV)感染引起, 尽管近年来的发病率明显升高, 但是发生于外耳道者罕见。研究外耳道 CA 的病因, 对于减少传播、控制复发具有重要意义。

## 1 临床资料

男性患者, 40 岁, 因右耳痛痒 1 月伴少量出血 1 d 入院。1 月前在街头地摊上掏耳后常感耳内痒, 自己掏挖, 轻微疼痛, 近来挖耳后少许出血。查: 右外耳道前壁见一新生物, 乳头状突起, 质软, 周围少许干血痂。否认冶游史, 无外生殖器 CA。活检: 鳞状上皮乳头状瘤。于 1994 年 9 月 29 日在局麻加强化下行"右外耳道新生物切除加植皮术", 切除瘤组织, 并凿除外耳道前上壁部分骨质后植皮。鼓膜完整, 标志清楚。病理报告为"尖锐湿疣", 1 周后出院。随访 4 年无复发, 外耳道无狭窄。

DNA 的制备: 将石蜡切片放入 0.5 ml 的 Eppendorff 管中, 二甲苯脱蜡, 95%乙醇冲洗, 真空抽干, 然后加入 100 μl 消化缓冲液(50 mmol/L Tris 1 mmol/L EDTA, 0.5%吐温 20, 蛋白酶 K 200 μg/ml, pH 8.5), 55°C 孵育 3 h, 此消化液即作为 PCR 所需样品 DNA。

按地高辛标记试剂盒说明标记寡聚核苷酸探针, 参照文献[1] 行 PCR, 参照文献[2] 行斑点杂交。

## 2 结果

鳞状上皮呈乳头状或疣状增生, 表皮脚增宽延长, 角质层增生并角化不全, 棘层和基底层明显增生肥厚, 在表皮中层或表层见有群集或灶性的凹空细胞, 真皮层毛细血管扩张及中等量慢性炎细胞浸润。取病例组织 DNA 用通用引物作 PCR 扩增, 电泳, 出现约 450 bp 条带者为阳性, 然后将扩增产物分别用地高辛配基标记的 HPV6、HPV11、HPV16 和 HPV18 型特异性寡聚核苷酸探针进行斑点杂交分型, 结果为 HPV6。

## 3 讨论

本病应与外耳道乳头状瘤鉴别。常见的外耳道乳头状瘤无感染时, 不流血性液体, 检查外耳道干燥, 肿物色棕黄而坚实, 表面干燥而无湿润感, 多发生于外耳道外段软骨部。确诊主要依赖病理组织学检查和免疫组化技术, 分型则依据 PCR、转印杂交或斑点杂交结果。我们使用的地高辛配基标记核酸探针技术克服了同位素半衰期短, 需放射性防护等缺点, 保持了较高的特异性和敏感性, 操作简便, 并且标记的探针可以反复使用。本研究斑点杂交结果与 PCR 扩增产物的电泳分析相同, 均为 HPV6 型, 与文献[3] 报道的 HPV6/11 型是尖锐湿疣的主要病原体一致。

关键词 外耳道尖锐湿疣; 聚合酶链反应; 斑点杂交
中图法分类号 R764.1 文献标识码 B

## 参考文献

[1] 郭华阳, 李文维, 谭 骏, 等. 聚合酶链反应及转印杂交对尖锐湿疣复发的病因学研究[J]. 中华皮肤科杂志, 1995, 28(3): 155—157.

[2] 蔡文琴, 王伯汀 云主编. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994. 479—582.

[3] 沈克慧, 王望梅, 际 球, 等. 尖锐湿疣新鲜组织 HPV 的聚合酶链反应与斑点杂交比较的研究[J]. 中华皮肤科杂志, 1995, 28(3): 173—174.

(编辑 汪勤俭)

作者简介: 牟忠林(1967.1), 男, 湖北省松滋市人, 博士研究生, 主治医师, 讲师, 主要从事内淋巴积水方面的研究。电话: (023)68757630

收稿日期: 1998-10-30; 修回日期: 1999-07-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net