

α B-晶体蛋白对急性高眼压大鼠视网膜神经节细胞轴突再生作用的研究

王瑞红¹, 吴志鸿¹, 侯世科², 樊毫军², 王立华¹

基金项目: 中国博士后科学基金(No. 20080430444)

作者单位:¹(100039) 中国北京市, 武警总医院眼科;²(300300) 中国天津市, 武装后勤学院附属医院

作者简介: 王瑞红, 硕士, 医师, 研究方向: 青光眼。

通讯作者: 吴志鸿, 博士, 主任医师, 主任, 研究方向: 青光眼。

fswuzhihong@sina.com

收稿日期: 2013-01-16 修回日期: 2013-05-27

Effects of α B - crystallin on axon regeneration of rats retinal ganglion cells following acute ocular hypertension

Rui-Hong Wang¹, Zhi-Hong Wu¹, Shi-Ke Hou², Hao-Jun Fan², Li-Hua Wang¹

Foundation item: Postdoctoral Science Foundation of China (No. 20080430444)

¹Department of Ophthalmology, General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China; ² the Affiliated Hospital of Logistical College of CAPF, Tianjin 300300, China

Correspondence to: Zhi-Hong Wu. Department of Ophthalmology, General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China. fswuzhihong@sina.com

Received: 2013-01-16 Accepted: 2013-05-27

Abstract

• AIM: To study the effects of α B-crystallin on the α B-crystallin content in retina, growth associated protein-43 (GAP-43) expression of retinal ganglion cells (RGCs), amplitude of electroretinogram (ERG) b-wave, and to investigate the promotive effect of α B-crystallin on axonal regeneration of RGCs after acute ocular hypertension(AOH).

• METHODS: One hundred and twenty male Sprague-Dawley (SD) rats (220±10g) were randomly divided into four groups (thirty in each group). α B group, (AOH following intravitreal injection of α B crystallin group, n=30). S group, (AOH following intravitreal injection of normal saline solution group, n=30). P group, (AOH following vitreous puncture group, n=30). H group, (AOH group, n=30). Western blot was assayed α B-crystallin content 7 and 14 days after model; Immunohistochemistry was observed GAP-43 expression 7, 14 and 21 days after model established; Amplitude of ERG b-wave was tested retinal function before and 1 month after model.

• RESULTS: The α B content in retina of α B group was higher 7 days after model established, fewer 14 days after model ($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.001$, $P=0.000$). But the α B content in retina of α B group was more serious compared with other groups at the same time points ($P=0.019$, $P=0.016$); The GAP-43 expression of RGCs in α B group was highest 7 days after model established, started to decrease 14 days after model established, which was fewest 21 days after model established ($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$). But the GAP-43 expression of RGCs in α B group was significantly higher than in other groups at each time point ($P=0.002$, $P=0.011$, $P=0.009$); The amplitude of ERG b-wave was lower 1 month after model ($P=0.014$, $P=0.004$, $P=0.003$, $P=0.006$). There were no statistical differences among groups on amplitude of ERG b-wave before model established ($P=0.993$). The amplitude of ERG b-wave in α B group was higher than others 1 month after model ($P=0.002$).

• CONCLUSION: Exogenous α B-crystallin could improve α B-crystallin expression of retinas; α B-crystallin contributed to the increase of GAP-43 expression of RGCs and RGCs axonal regeneration; α B-crystallin could promote the recovery of retinal function and was non-toxic on retinas of rat.

• KEYWORDS: α B-crystallin; acute ocular hypertension; retinal ganglion cell; growth associated protein-43; electroretinogram

Citation: Wang RH, Wu ZH, Hou SK, et al. Effects of α B-crystallin on axon regeneration of rats retinal ganglion cells following acute ocular hypertension. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2013; 13(6):1081-1086

摘要

目的: 研究 α B-晶体蛋白对大鼠急性高眼压后视网膜组织中 α B-晶体蛋白含量, 视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 中生长相关蛋白-43 (growth associated protein-43, GAP-43) 表达和全视野视网膜电图 (full-field ERG, F-ERG) 的 b 波振幅差异, 探讨 α B-晶体蛋白对急性高眼压后 RGCs 轴突再生的影响。

方法: 采用随机分组设计的实验研究。本实验选择 120 只健康、无眼疾 SD 大鼠, 随机分为以下 4 组: α B 晶体蛋白组 (α B) 30 只, 生理盐水组 (S) 30 只, 假手术组 (P) 30 只, 急性高眼压组 (H) 30 只, 均以右眼为实验眼, 分别于术后 7d 和 14d 各取 5 只术眼的视网膜, 行 Western-blot 法, 观察急性高眼压后视网膜中 α B-晶体蛋白的表达; 术后 7, 14, 21d 各取 5 只术眼的视网膜, 行免疫组织化学

法,观察急性高眼压后 RGCs 的 GAP-43 表达;术前和术后 1mo 时应用全视野 ERG 的 b 波振幅变化测定视网膜功能。组间数据比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA),组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。

结果:αB 组视网膜中 αB-晶体蛋白的表达于术后 7d 较高,14d 时表达减弱 ($P=0.000$),但同一时间点明显高于其他三组 ($P=0.006, P=0.024, P=0.007; P=0.006, P=0.008, P=0.010$);αB 组 RGCs 的 GAP-43 表达于术后 7d 达高峰,14d 时表达减弱,21d 时仍有少量表达 ($P=0.000$),但各时间点明显高于其他三组 ($P=0.001, P=0.002, P=0.001; P=0.015, P=0.002, P=0.006; P=0.005, P=0.003, P=0.005$);ERG-b 波振幅于术后 1mo 较低 ($P=0.014, P=0.004, P=0.003, P=0.006$),其中术前各组 ERG-b 波振幅无明显差异 ($P=0.993$),术后 1mo 时 αB 组 ERG-b 波振幅明显高于其他三组 ($P=0.000, P=0.004, P=0.002$)。

结论:外源性 αB-晶体蛋白能够提高视网膜 αB-晶体蛋白的表达;αB-晶体蛋白通过促进 RGCs 中 GAP-43 的表达,从而促进 RGCs 的轴突再生;αB-晶体蛋白可促进视网膜功能的恢复,对大鼠视网膜无毒性作用。

关键词:αB-晶体蛋白;急性高眼压;视网膜神经节细胞;GAP-43;ERG

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.06.05

引用:王瑞红,吴志鸿,侯世科,等. αB-晶体蛋白对急性高眼压大鼠视网膜神经节细胞轴突再生作用的研究. 国际眼科杂志 2013;13(6):1081-1086

0 引言

青光眼作为全世界的主要不可逆致盲性眼病之一^[1],其主要特征是以组成视神经的视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 轴突慢性、进行性凋亡^[2],进而导致视野渐进性丢失,甚至全盲。研究认为,高眼压 (intraocular pressure, IOP) 是青光眼的主要致病因素,通过长期压迫视神经导致 RGCs 凋亡^[3],但是人们发现通过降低眼压进行的治疗,并不能显著地阻止青光眼的进展,主要原因就是 RGCs 的继发性凋亡。αB-晶体蛋白作为生物活性蛋白,具有防止蛋白积聚,保持细胞骨架的流动性^[4],可以抑制和抵抗应激而导致的细胞凋亡^[5],能够促进视网膜感光细胞 (retina photoreceptor cell, RPC) 的存活^[6],但是对 RGCs 的作用尚未见报道。GAP-43 的表达和变化对神经元轴突再生有着直接影响,是众多轴突再生的分子标记物^[7]。全视野视网膜电流图 (full-field ERG, F-ERG) 能够较早地反映药物干预对视网膜的影响,可以用来检测药物的安全性或毒性^[8]。本实验通过建立大鼠急性高眼压模型,通过 Western-blot 法测定视网膜 αB-晶体蛋白,免疫组化法观察 RGCs 的 GAP-43 表达,全视野 ERG 检测视网膜功能。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性、健康、无眼疾 SD 大鼠 120 只,3 月龄,购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,体质量 220 ± 10 g。饲养于北京武警总医院中心实验室,编号后随机分成 4 组:αB 晶状体蛋白组 (αB) 30 只,生理盐水组 (S) 30 只,假手术组 (P) 30 只,急性高眼压组

(H) 30 只。

1.1.2 主要试剂及溶液 αB-晶体蛋白干粉、SDS 上样缓冲液、SDS-甘氨酸电泳缓冲液、Tween-20、TEMED、Tris (美国 Sigma 公司);羊抗小鼠 αB-晶体蛋白 IgG、羊抗兔 β-Actin、兔抗羊二抗 (美国 Santa Cruz 公司);兔抗大鼠 GAP-43 IgG (北京博奥森生物公司);小鼠抗兔即用型 IgG、DAB、抗原修复液 (武汉博士得生物公司)。显影液、定影液 (北京尚柏生物公司)。

1.1.3 主要设备 Möller 手术显微镜 (德国 MEDI-THERM 公司);冰冻切片机 (德国 Leica);视觉电生理 (德国 ROLAND CONSULT 公司);普通光学显微镜,倒置显微镜 (日本 Olympus 公司);磁力搅拌器 (荣华);台式冷冻离心机 (湘仪);电泳仪、转膜仪 (J-MAX);摇床、旋涡混合器 (其林贝尔);眼科显微手术器械 (天诚华泰医疗设备有限公司);精密电子天平 (上海精科天平);各型号移液器 (德国 Eppendorf 公司);-80℃ 超低温冰箱 (北京天寒集团);4℃ 冰箱 (青岛海尔集团)。

1.2 方法

1.2.1 急性高眼压模型^[9] 所有实验动物实验前均用诺氟沙星滴眼液冲洗结膜囊,10% 水合氯醛 (剂量 0.4mL/100g) 腹腔注射麻醉成功后,右眼滴复方托品酰胺和眼科表麻药各 1 滴,10min 后显微镜下从大鼠角膜缘 3:00 位将连有生理盐水输液器的 33G 针头刺入前房,勿伤及虹膜和晶状体,打开输液调节器,液体高度为 156cm (产生 15.22kPa,相当于 120mmHg 的眼内压),当莫菲氏管中无液体滴注、球结膜苍白、虹膜迅速变白、视网膜苍白水肿时说明急性高眼压模型已成功。持续灌注 60min,间断滴诺氟沙星滴眼液以预防感染并保持角膜干燥。拔除针头后,可见球结膜及虹膜立刻恢复正常颜色,涂抹红霉素眼膏。

1.2.2 玻璃体内注射 玻璃体内注射在急性高眼压模型建立后即刻进行。在显微镜下与眼球呈 45°,刺入玻璃体腔选取颞上方距角膜缘后 1.0mm 进针。其中 αB 组大鼠右眼注射 1×10^{-5} g/L 的 αB-晶体蛋白溶液 5μL, S 组大鼠右眼玻璃体腔注入生理盐水 5μL, P 组大鼠右眼玻璃体腔穿刺成功后即拔出注射器。拔针后盖玻片轻压角膜,显微镜下观察确认玻璃体腔无出血、无晶状体及虹膜损伤者纳入实验。术后用诺氟沙星滴眼液点右眼,之后红霉素眼膏涂右眼。

1.2.3 视网膜组织取材 术后 7d 和 14d,每组各取 5 只大鼠的术眼视网膜组织,用于 Western-blot 法检测视网膜 αB-晶体蛋白含量;术后 7,14,21d 共 3 个时间点各取 5 只大鼠的术眼视网膜制作冰冻切片,进行免疫组织化学检查;各取 5 只大鼠分别在术前和术后 1mo 进行全视野 ERG 检查。术前用 10% 水合氯醛腹腔麻醉,先用眼科弯剪取出眼球,将视杯固定、脱水后用 OCT 包埋,后置于 -80℃ 冰箱中保存,收集各个时间点的视网膜组织后,统一制作厚度为 8μm 的冰冻切片,进行免疫组织化学检查测定视网膜的蛋白含量。

1.2.4 Western-bolt 法测定视网膜 αB-晶体蛋白含量 以 10mg 加入 200μL 蛋白裂解液,4℃, 12000r/min 离心 10min。然后测定上清的蛋白含量,将样品稀释至相同总蛋白含量,加适当体积样品到 96 孔板的样品孔中,再加用于稀释标准品的溶液到 20μL,各孔加入 200μL BCA 工作液,37℃ 放置 30min 读取吸光度 (A) 值,根据标准曲线

计算总蛋白浓度。SDS-PAGE 电泳后将胶放入 100mL 阴极 buffer, 平衡 15min; 用尺子测量作胶的大小, 剪同样大小的一片 PVDF 膜, 用 100% 甲醇浸泡 15s, 然后与滤纸一起放入转膜缓冲液中, 至完全浸透, 完成转膜后, 将膜与胶及滤纸分离, 将膜放入 TBS-T 中 5min, 用镊子取出置于 TBST 配制的 5% 脱脂奶粉室温放置 1h。将膜与一抗一起孵育, 4℃ 过夜 (一抗 1:100 稀释液), TBS-T 洗 3 次, 每次 5min; 将稀释后的二抗与膜共同孵育 2~3h (二抗 1:3000 稀释液), TBS-T 洗 3 次, 每次 5min, 使用 ECL 化学发光显色液 (SUNBIO), 当显色到达需要时用水洗膜以终止反应。将显色后的膜, 用 LabWorks 软件对图像进行灰度分析。

1.2.5 冰冻切片的免疫组织化学检测 低温保存的实验动物组织, 用 OCT 包埋, 在 Leica 恒温冰冻切片机上制备 8 μ m 厚的冰冻切片。在室温下用丙酮固定冰冻切片上的组织抗原, 固定 10min 后, PBS 冲洗 1 次, 然后将冰冻切片置于湿盒内, 滴加 3% H₂O₂ 室温 10min, 蒸馏水漂洗 3 次, 每次 2min, 滴加兔抗大鼠 GAP-43 IgG (1:100 稀释), 并用 PBS 代替一抗为阴性对照。4℃ 过夜, 用 PBS 漂洗 3 次, 每次 2min。再滴加小鼠抗兔即用型 IgG 37℃ 孵育 30min, PBS 漂洗 3 次, 每次 2min。滴加新鲜配制 DAB 显色液, 显微镜下观察 5~10min, 在显色最佳时用蒸馏水冲洗, 终止显色。苏木素复染细胞核, 然后水洗, 蓝化、脱水、中性树脂封片。统计 RGCs 中 GAP-43 的表达 ($\times 400$)。

1.2.6 全视野视网膜电流图检查 暗红光下, 把暗适应大鼠置于恒温固定台上, 点盐酸奥布因滴眼液 1 滴, 约 5min, 然后将 5% 甲基纤维素敷于大鼠右眼, 把金箔环状角膜电极作为记录电极, 直径约 3mm; 参考电极及接地电极均为不锈钢针, 分别置于两眼连线中点皮下和尾部皮下。以上电极间阻抗始终保持范围为 $< 5k\Omega$ 。

统计学分析: 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS17.0 统计软件包分析处理, 组间数据的比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA); 组间进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠视网膜 α B-晶体蛋白含量 术后 7d 时各组 α B-晶体蛋白含量较 14d 时明显增高, 差别有统计学意义 ($F = 171.790, P = 0.000; F = 34.441, P = 0.000; F = 28.160, P = 0.001; F = 34.972, P = 0.000$)。术后 7d 时, α B, S, P 和 H 组 α B-晶体蛋白含量分别为: $0.516 \pm 0.377, 0.403 \pm 0.068, 0.427 \pm 0.067, 0.407 \pm 0.047$, α B 组分别与 S, P, H 组进行两两比较, 差别有统计学意义 ($P = 0.006, P = 0.024, P = 0.007$); 术后 14d 时, α B, S, P 和 H 组 α B-晶体蛋白含量分别为: $0.230 \pm 0.006, 0.154 \pm 0.067, 0.163 \pm 0.080, 0.192 \pm 0.087$, α B 组分别与 S, P 和 H 组进行两两比较, 差别有统计学意义 ($P = 0.006, P = 0.008, P = 0.010$; 图 1)。

2.2 各组大鼠 RGCs 的 GAP-43 表达 各组 7d 时 GAP-43 表达最高, 14d 时表达降低, 21d 时仍有少量表达, 差别有统计学意义 ($F = 128.347, P = 0.000; F = 25.477, P = 0.000; F = 19.266, P = 0.000; F = 18.366, P = 0.000$)。术后 7d 时, α B, S, P 和 H 组 RGCs 的 GAP-43 表达结果分别为: $27.800 \pm 1.483, 19.600 \pm 3.050, 20.000 \pm 4.183, 19.400 \pm$

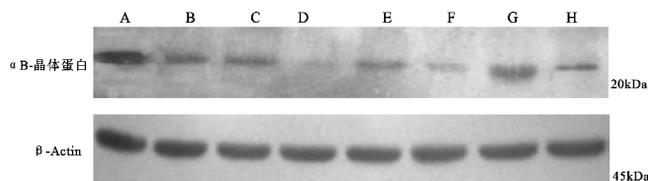


图 1 大鼠术后 7d 和 14d 时视网膜中 α B-晶体蛋白表达 A, B: α B 组术后 7d, 14d; C, D: S 组术后 17d, 14d; E, F: P 组术后 7d, 14d; G, H: H 组术后 7d, 14d。

3.975, 其中 α B 组分别与 S, P, H 组进行两两比较, 差别有统计学意义 ($P = 0.001, P = 0.002, P = 0.001$); 术后 14d 时 α B, S, P 和 H 组 RGCs 的 GAP-43 表达结果分别为: $17.600 \pm 1.140, 13.800 \pm 2.387, 12.600 \pm 2.702, 13.200 \pm 2.280$, α B 组分别与 S, P, H 组进行两两比较, 差别有统计学意义 ($P = 0.015, P = 0.002, P = 0.006$); 21d 时 α B, S, P, H 组 RGCs 的 GAP-43 表达结果分别为: $12.000 \pm 2.000, 8.800 \pm 1.483, 8.600 \pm 1.140, 8.800 \pm 1.483$, α B 组分别与 S, P, H 组进行两两比较, 差别有统计学意义 ($P = 0.005, P = 0.003, P = 0.005$; 图 2~4)。

2.3 全视野 ERG 检测视网膜功能结果 α B, S, P 和 H 组术前全视野 ERG-b 波振幅分别为: $124.680 \pm 45.049, 125.800 \pm 53.481, 132.200 \pm 48.319, 131.620 \pm 57.929$, 各组 ERG-b 波振幅组间比较, 差别无统计学意义 ($F = 0.029, P = 0.993$); 术后 1mo 时 α B, S, P 和 H 组 ERG-b 波振幅分别为: $57.800 \pm 15.287, 29.720 \pm 6.129, 37.600 \pm 7.266, 34.540 \pm 6.872$, α B 组分别与 S, P, H 组进行两两比较, 差别有统计学意义 ($P = 0.000, P = 0.004, P = 0.002$)。可见术后 1mo 较术前 b 波振幅降低, 术后 1mo 时 α B 组比其他三组 b 波振幅高 (图 5, 6)。

3 讨论

3.1 α B-晶体蛋白与 RGCs 的存活和轴突再生 研究已经明确, RGCs 凋亡是青光眼视神经损害的最终结局, 防止、延缓或逆转 RGCs 凋亡是青光眼治疗的最终目标。在这一认识下, 视神经保护的概念和实践被提上日程。然而至今研究尚未发现可以有效促进 RGCs 存活和再生的药物。Mansour-Robaey 等^[10] 研究发现, 眼前节损伤可促进 RGCs 的存活和轴突再生。2000 年时 Fischer 等^[11] 研究认为: 促进 RGCs 存活和轴突再生的原因是损伤后的晶状体释放的“神经保护性物质”所起的作用。晶体蛋白隶属于小分子量热休克蛋白家族, 包括 α, β, γ 三种, 其中 α 晶体蛋白含有 α A 和 α B。通过在体外培养 RGCs 和视神经钳夹伤视神经后的大鼠玻璃体内注射可溶性的晶体蛋白, 认为可溶性晶体蛋白是晶状体来源的神经保护物质, 其中 α 晶体蛋白对 RGCs 的存活和轴突的再生有显著的促进作用, 还可以通过抑制小胶质细胞活化起到保护 RGCs 的作用^[12]。Fisher 等^[13] 在视神经横断同时损伤晶状体, 发现 RGCs 的再生轴突可通过损伤区, 经过视交叉, 到达上丘, 并能与上丘形成功能性突触联系。另外, 分别将损伤或未损伤的晶状体与 RGCs 进行共培养, 发现前者较后者对促进 RGCs 存活和突触生长具有显著作用^[14]。由此认为晶状体来源的某“神经保护性物质”, 不但可以帮助 RGCs 渡过危险时期, 而且能够促进视神经再生。Chiu 等^[15] 在高眼压模型中, 通过 Western-blot 法和免疫组化法也证实晶体蛋白在存活的 RGCs 中含量提高。可见, 晶体蛋白可以促进 RGCs 的存活和轴突再生。

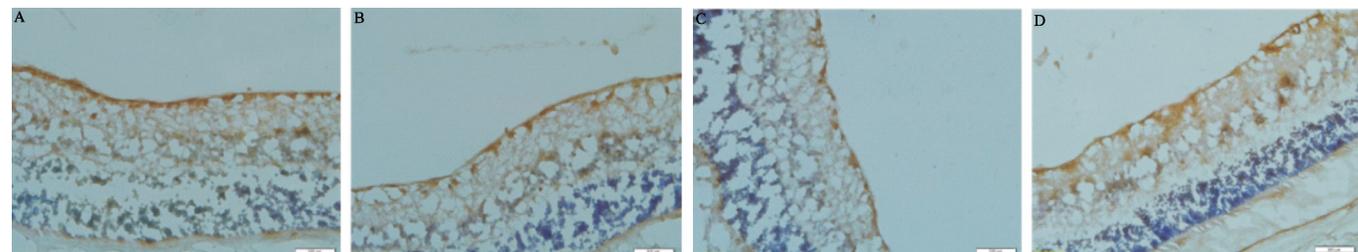


图2 术后7d时各组大鼠RGCs中GAP-43的表达(SABC法×400) A:αB组;B:S组;C:P组;D:H组。

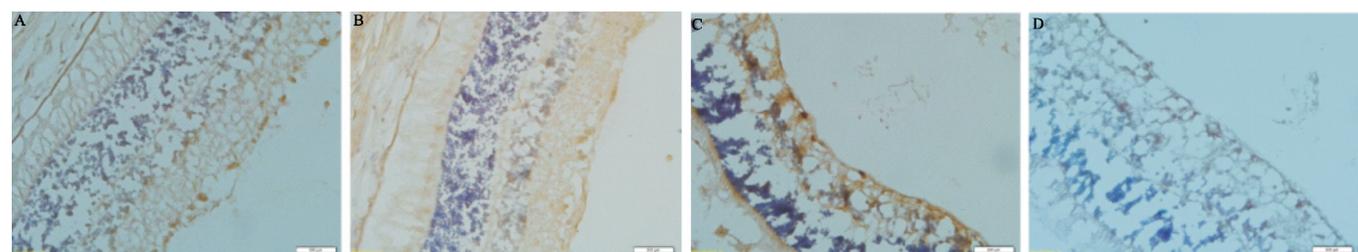


图3 光镜下14d时各组大鼠RGCs中GAP-43的表达(SABC法×400) A:αB组;B:S组;C:P组;D:H组。

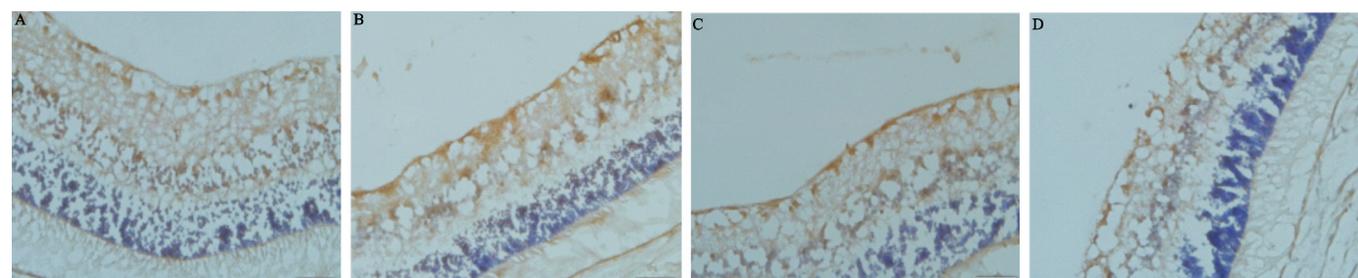


图4 光镜下21d时各组大鼠RGCs中GAP-43的表达(SABC法×400) A:αB组;B:S组;C:P组;D:H组。

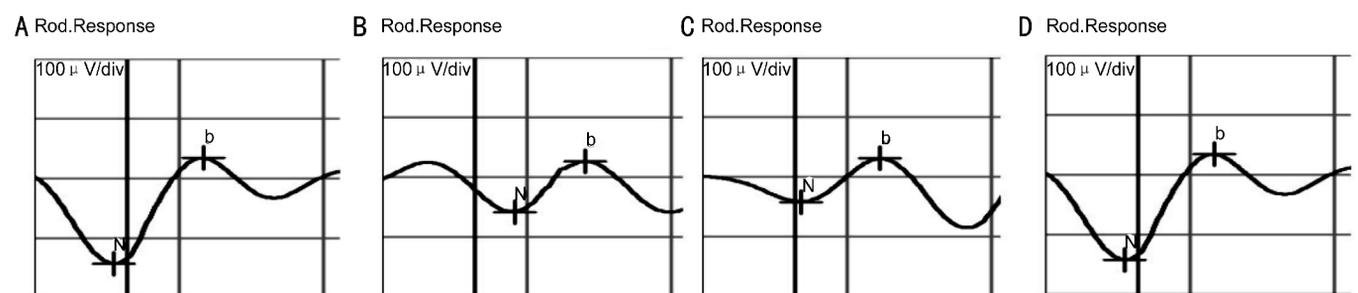


图5 各组术前全视野ERG的b波振幅(μV) A:αB组;B:S组;C:P组;D:H组。

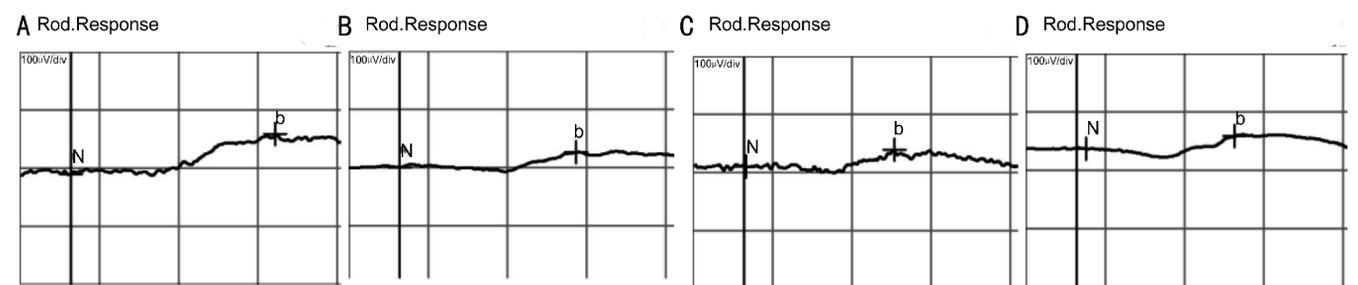


图6 各组术后1mo全视野ERG的b波振幅(μV) A:αB组;B:S组;C:P组;D:H组。

国内外研究认为,晶体蛋白表达增强提示了细胞对环境和代谢应激反应的结果,主要是因为αA和αB通过抵抗应激,发挥抑制细胞凋亡作用,从而促进细胞存活^[16]。刘康等^[17]通过分子排阻凝胶色谱法证实,α和βH-晶体蛋白有明显的保护体外培养的RGCs存活和促进RGCs突触生长的作用,并且α-晶状体蛋白的促进作用效应明显强于βH-晶状体蛋白,同时也证实γ-晶状体蛋白对RGCs突触生长无明显作用,反而对RGCs的存活具有抑制作用。Ying等^[18]在视神经损伤模型中采用银染色法证实,

玻璃腔注射α晶体蛋白组大鼠术后2wk的RGCs轴突密度高于对照组,差异具有显著性统计学意义;术后4wk轴突密度呈下降趋势,但仍高于对照组,差异具有统计学意义,因而推测α-晶体蛋白对视神经损伤后的轴突具有保护作用。但未表明到底是αA还是αB起主要作用。进一步研究发现,αB-晶体蛋白在受损的视网膜中含量提高,如眼内炎、光损伤、视神经损伤、视网膜脱离、缺血性视神经病变、糖尿病视网膜病变、视网膜缺血再灌注损伤等多种病变^[19]。αB-晶体蛋白具有防止蛋白积聚,保持细

胞骨架的流动性^[4],而且可以抵抗和停止应激细胞的凋亡^[5],促进视网膜感光细胞的存活^[6],并且保护视神经。当视网膜细胞受到各种应激后,组织中的 α B-晶体蛋白从基因水平到蛋白表达都会发生提高,对视网膜具有保护作用。王蕊^[20]通过对视神经损伤模型行逆行荧光金标记法和 VEP 检查证实:在应激条件下, α B-晶体蛋白可以促进大鼠视神经损伤的修复。

3.2 视网膜 α B-晶体蛋白表达 α B-晶体蛋白可抵抗应激,保护视神经,那么外源性 α B-晶体蛋白是否可以影响视网膜中 α B-晶体蛋白的表达? Munemasa 等^[19]发现,视神经损伤后 7d 时存活的 RGCs 中 α B-晶体蛋白含量最高,14d 时 RGCs 中 α B-晶体蛋白含量下降,认为 α B-晶体蛋白的表达变化与此期 RGCs 的存活率有关。

本实验采用 Western-blot 法测定各组实验动物视网膜 α B-晶体蛋白含量,结果显示各组视网膜中 α B-晶体蛋白的表达于术后 7d 较高,14d 时表达减弱,说明 α B-晶体蛋白在急性高血压后引起 α B-晶体蛋白在较短时间内表达迅速增高,之后下降。可能与 α B-晶体蛋白发挥抵抗应激作用有关。但在同一时间点 α B 组蛋白含量较其他三组提高,差别有统计学意义。其中 7d 时 α B 组与其他三组相比提高约 50%;14d 时 α B 组比其他三组提高近 3 倍。说明,外源性 α B-晶体蛋白能够有效提高 α B-晶体蛋白在视网膜中的表达,但是 α B-晶体蛋白是通过什么机制在视网膜中发挥作用呢?王兴利等通过原代培养 RGCs,对 α 晶体蛋白在 RGCs 的分子机制研究认为外源性的 α 晶状体蛋白通过与 RGCs 细胞膜特异性结合而发挥相应的生物学功能^[21]。

3.3 GAP-43 与 RGCs 的轴突再生 GAP-43 是神经轴突生长锥膜蛋白的主要成分,分子量 43kDa。在哺乳动物中枢神经系统早期发育过程(即大量的轴突生长及突触形成)中,GAP-43 的合成水平较高且随轴浆运输至轴突,通过磷酸化引导轴突生长和调控新连接的形成而影响轴突的生长能力。当周围神经受损后,轴突的延长和重建能够被重新诱导,GAP-43 起初位于胞体,随着轴突的延长而逐渐趋向于突起,最后集中在生长锥。眼部研究发现,GAP-43 在正常成年的 RGCs 中几乎无表达,其免疫反应活性主要局限于 IPL^[22]。若敲除视觉系统发育中小鼠的 GAP-43 基因,小鼠的视觉系统将会出现缺陷^[21]。视神经损伤启动 RGCs 的一系列传到信号,可导致 GAP-43 表达上调促进轴突再生^[23]。

李双等^[22]通过大鼠视神经损伤模型证实,晶状体损伤可促进 RGCs 的轴突再生表达 GAP-43。本实验通过免疫组化法发现,各组术后 7d 时 GAP-43 表达最高,14d 时表达减弱,21d 时仍有少量表达。这说明短时间内急性高血压后 RGCs 能通过某些蛋白上调 GAP-43 的表达。7d 时 α B 组较其它三组提高约一倍;14d 时 α B 组较其它三组提高约一倍;术后 21d 时 α B 组较其它三组提高约一倍。说明 α B-晶体蛋白可以促进 RGCs 的 GAP-43 明显增多,间接提示 α B-晶体蛋白能够促进急性高血压后 RGCs 的

轴突再生。进一步研究发现, α 晶体蛋白促进 RGCs 轴突再生是通过抑制 RhoA(轴突再生抑制性物质的关键位点)的激活,阻碍髓鞘抑制物质的信号传导,防止生长锥的萎缩^[24]。本实验 α B-晶体蛋白可能通过上调 GAP-43 表达,进而启动 RGCs 细胞内的一系列信号传导,促进 RGCs 轴突的生长。同时,RGCs 中 GAP-43 的表达变化与视网膜中 α B-晶体蛋白变化具有时间相关性,即两者的表达高峰都在术后 7d,14d 时表达均减弱。Piri 等^[7]采用原位杂交的逆行荧光金法证实,高血压后大鼠视网膜中的 α B-晶体蛋白主要在 GCL 的 RGCs 中。因而推测, α B-晶体蛋白可能是通过结合在 RGCs 胞膜,启动细胞内的信号传导,进而促进 RGCs 中 GAP-43 的表达,最终促进 RGCs 的轴突再生。

3.4 ERG 与视网膜毒性 全视野 ERG 作为短暂的闪光刺激诱发的视网膜综合电位反应,能够从视网膜细胞水平来评价视网膜功能,主要由一个负相的 a 波和一个正相的 b 波组成,叠加在 b 波上的一组小波为 Ops 波。其中 b 波代表视网膜内层细胞功能^[24],能间接反映 RGCs 活性,而且可以代表视网膜功能的状态,反映药物的视网膜毒性^[8]。

本实验研究发现:术前的 b 波振幅组间比较差异无统计学意义,说明大鼠视网膜功能状态基本一致。术后 1mo 各组大鼠全视野 ERG 的 b 波振幅较术前均降低,说明急性高血压使视网膜的功能受损,但是 α B 组 b 波振幅相比其他三组提高约 60%,甚至 100%,提示 α B-晶体蛋白能够促进受损后 RGCs 活性的恢复,从而促进急性高血压后视网膜功能的恢复,可见 α B-晶体蛋白对视网膜功能具有保护作用,无毒性作用。国外研究认为在应激条件下, α B-晶体蛋白可通过调整视网膜中血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growthfactor, VEGF)蛋白表达,促进视网膜新生血管的生成^[25,26]。因而推测说明 α B-晶体蛋白对视网膜功能的保护作用,可能是其通过某些机制促进视网膜血管生成形成,从而促进视网膜功能的恢复。

总之,本实验通过大鼠急性高血压模型,发现 α B-晶体蛋白可上调 GAP-43 在 RGCs 中的表达,为进一步探讨青光眼 RGCs 轴突再生机制开辟了良好的开端,但是 α B-晶体蛋白促进 RGCs 轴突再生的详细作用机制尚不清楚, α B-晶体蛋白是否也参与了 RGCs 内其它信号传导通路,这些有待进一步研究。

参考文献

- 1 Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol* 2006;90(3):262-267
- 2 Kingman S. Glaucoma is second leading cause of blindness globally. *Bull World Health Organ* 2004;82(11):887-888
- 3 Kwon YH, Fingert JH, Kuehn MH, et al. Primary open-angle glaucoma. *N Engl J Med* 2009;360:1113-1124
- 4 Andley UP. Crystallins in the eye: function and pathology. *Prog Retin Eye Res* 2007;26(1):78-98
- 5 Goplen D, Bougnaud S, Rajcevic U, et al. α B-crystallin is elevated in highly infiltrative apoptosis resistant glioblastoma cells. *Am J Pathol* 2010;177(4):1618-1628

6 Sreekumar PG. , Kannan R, Kitamura M, *et al.* α B Crystallin Is apically secreted within exosomes by polarized human retinal pigment epithelium and provides neuroprotection to adjacent cells. *PLoS One* 2010;5(10):1-13

7 Piri N, Song M, Kwong JM, *et al.* Modulation of alpha and beta crystallin expression in rat retinas with ocular hypertension - induced ganglion cell degeneration. *Brain Res* 2007;1141:1-9

8 Rosolen S, Kolomiets B, Varela O, *et al.* Retinal electrophysiology for toxicology studies: applications and limits of ERG in animals and *ex vivo* recordings. *Exp Toxicol Pathol* 2008;60(1):17-32

9 Tosi J, Wang NK, Zhao J, *et al.* Rapid and noninvasive imaging of retinal ganglion cells in live mouse models of glaucoma. *Mol Imaging Biol* 2010;12(4):386-393

10 Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang YC, *et al.* Effect of ocular injury and administration of brain derived neurotrophic factors on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(5):1632-1636

11 Fischer D, Pavlidis M, Thanos S, *et al.* Cataractogenic lens injury prevents traumatic ganglion cell death and promotes axonal regeneration both *in vivo* and in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(12):3943-3954

12 张莉,张晨星, 王一. 玻璃体注射 α -晶体蛋白对视神经损伤后视网膜神经节细胞的保护作用. *中华创伤杂志* 2007;23(5):368-372

13 Fisher D, Heiduschka P, Thanos S, *et al.* Lens-injury-stimulated axonal regeneration throughout the optic pathway of adult rats. *Exp Neurol* 2001;172(2):257-272

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

15 Chiu K, Zhou Y, Yeung SC, *et al.* Up-Regulation of crystallins is

Involved in the neuroprotective effect of wolfberry on survival of retinal ganglion cells in rat ocular hypertension model. *J Cell Biochem* 2010;110(2):311-320

16 Morozov V, Wawrousek EF. Caspase-dependent secondary lens fiber cell disintegration in α A/- α B - crystallin double - knockout mice. *Development* 2006;133(5):813-821

17 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. *中华创伤杂志* 2007;23:41-46

18 Ying X, Zhang J, Wang Y, *et al.* Alpha-crystallin protected axons from optic nerve degeneration after crushing in rats. *J Mol Neurosci* 2008;35(3):253-258

19 Munemasa Y, Kwong JKM, Caprioli J, *et al.* The role of α A- and α B-crystallins in the survival of retinal ganglion cells after optic nerve axotomy. *IOVS* 2009;50(8):3869-3875

20 王蕊. 重组人 α B-晶体蛋白对大鼠视神经损伤修复作用的研究. 第三军医大学博士学位论文 2011

21 Zhu Q, Julien JP. A key role for GAP - 43 in the retinotectal topographic organization. *Exp Neurol* 1999;155(2):228-242

22 李双,姜发纲. 晶状体损伤对视神经钳夹伤大鼠视网膜节细胞存活和轴突再生的影响. *眼科新进展* 2010;30(3):226-229

23 Amy T, McCurley, Gloria V, *et al.* Timecourse analysis of gene expression patterns in zebrafish eye During optic nerve regeneration. *Exp Neurosci* 2010;4:17-33

24 Zhang C, Lei B, Lam TT, *et al.* Neuroprotection of photoreceptors by minocycline in light-induced retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(8):2753-2759

25 Kerr BA, Byzova TV. α B-crystallin: a novel VEGF chaperone. *Blood* 2010;115(16):3181-3183

26 Kase S, He S, Sonoda S, *et al.* α B - crystallin regulation of angiogenesis by modulation of VEGF. *Blood* 2010;115(16):3398-3406