

# $\alpha$ -晶状体蛋白对脂多糖诱导的视神经星形胶质细胞增生、活化及分泌功能的抑制作用

刘霄 邵维阳 古贤梁 王一

400038 重庆,第三军医大学西南医院 全军眼科中心 视觉损伤与再生修复重点实验室

通信作者:王一,Email:wangyieye@aliyun.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.12.007

**【摘要】背景** 视神经损伤后星形胶质细胞的活化和增生引起的局部胶质瘢痕形成是神经细胞轴突难以再生的主要原因之一。研究表明, $\alpha$ -晶状体蛋白能促进视网膜神经节细胞(RGCs)轴突的再生,且部分再生的轴突能够穿过胶质瘢痕区,故推测 $\alpha$ -晶状体蛋白可能抑制胶质瘢痕的形成,从而对视神经发挥保护作用。

**目的** 探讨 $\alpha$ -晶状体蛋白对视神经星形胶质细胞的活化及其分泌功能的影响。**方法** 分离 SPF 级 3~5 日龄 Long Evans 大鼠的视神经组织,体外培养和纯化视神经星形胶质细胞,采用免疫荧光技术检测细胞中胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的表达以鉴定培养的细胞。将培养的细胞分为 3 个组,正常对照组细胞用常规细胞培养液进行培养,脂多糖(LPS)刺激组在培养液中添加 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS, $\alpha$ -晶状体蛋白干预组在培养液中添加 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS 和  $1 \times 10^{-4}$  g/L  $\alpha$ -晶状体蛋白,各组细胞均继续培养 24 h。采用细胞计数试剂盒 8(CCK-8)法检测各组视神经星形胶质细胞的增生情况(A 值);采用细胞免疫荧光法和 Western blot 法测定各组细胞中 GFAP 蛋白的表达;采用 ELISA 法检测各组细胞培养上清液中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )质量浓度的变化。**结果** 培养 3~4 代的细胞大小均匀,GFAP 阳性细胞达 95% 以上。正常对照组、LPS 刺激组和 $\alpha$ -晶状体蛋白干预组细胞的 A 值分别为  $1.335 \pm 0.070$ 、 $1.643 \pm 0.069$  和  $1.390 \pm 0.004$ ,LPS 刺激组 A 值明显高于正常对照组和 $\alpha$ -晶状体蛋白干预组,差异均有统计学意义( $t=3.315, 3.681$ ,均  $P<0.05$ )。免疫荧光检测结果显示,LPS 刺激组星形胶质细胞中的 GFAP 荧光明显强于正常对照组和 $\alpha$ -晶状体蛋白干预组,且细胞胞体较正常对照组和 $\alpha$ -晶状体蛋白干预组增大。Western blot 法检测结果显示,LPS 刺激组 GFAP 蛋白的相对表达量为  $0.851 \pm 0.076$ ,高于正常对照组的  $0.786 \pm 0.091$  和 $\alpha$ -晶状体蛋白干预组的  $0.569 \pm 0.049$ ,其中 $\alpha$ -晶状体蛋白干预组细胞中 GFAP 蛋白的相对表达量较 LPS 刺激组明显下降,差异有统计学意义( $t=3.115$ ,  $P<0.01$ )。LPS 刺激组 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  质量浓度明显高于正常对照组和 $\alpha$ -晶状体蛋白干预组,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ )。**结论**  $\alpha$ -晶状体蛋白能抑制 LPS 诱导的视神经星形胶质细胞的增生、活化和炎症因子的释放。

**【关键词】**  $\alpha$ -晶状体蛋白/代谢;星形胶质细胞;视神经;神经再生;细胞培养;增生;炎症细胞因子;Long-Evans 大鼠

**基金项目:**国家自然科学基金面上项目(81270996)

**Inhibitory effects of  $\alpha$ -crystallin on optic nerve astrocytes proliferation, activation and secretion stimulated by lipopolysaccharide** Liu Xiao, Shao Weiyang, Gu Xianliang, Wang Yi

Department of Ophthalmology, Key Laboratory of Visual Damage and Regeneration & Restoration of Chongqing, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Corresponding author: Wang Yi, Email: wangyieye@aliyun.com

**[Abstract] Background** Glial scarring induced by the activation and proliferation of astrocytes after optical nerve damage is one of causes of neural axons difficult to regeneration. Researches showed that  $\alpha$ -crystallin can promote the regeneration and pass through scarring zone of retinal ganglion cells (RGCs) axons, and we speculate  $\alpha$ -crystallin protect optical nerve tissue against scarring process. **Objective** This study was to investigate the influence of  $\alpha$ -crystallin for the activation and secretion of inflammatory factors of astrocytes. **Methods** Optical nerve tissue was isolated from 3-5 day-old SPF Long Evans rats to culture and purify astrocytes. The cells were

identified by detecting the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) with immunofluorescence technique. The cells were cultured with regular culture medium in the normal control group, and 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  lipopolysaccharides (LPS) was added in the LPS group, while 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS and  $1 \times 10^{-4}$  g/L  $\alpha$ -crystallin were added in the  $\alpha$ -crystallin group, and the cells were consecutively cultured for 24 hours. The proliferation (absorbance,  $A$ ) of the cells was assayed by cell counting kit-8 (CCK-8). The expression of GFAP in the cells was detected by immunofluorescence technique and quantitated by Western blot. The contents in the cell supernatants of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) were detected by ELISA. **Results** The morphology and size were well-proportioned in 3-4 generation of cells with the GFAP positive rate over 95%. The  $A$  values were  $1.335 \pm 0.070$ ,  $1.643 \pm 0.069$  and  $1.390 \pm 0.004$  in the normal control group, LPS group and  $\alpha$ -crystallin group, and the  $A$  values in the LPS group were significantly higher than those in the normal control group and  $\alpha$ -crystallin group ( $t = 3.315$ ,  $3.681$ , both at  $P < 0.05$ ). Immunofluorescence examination showed that the fluorescence intensity was evidently enhanced in the LPS group compared with the normal control group and  $\alpha$ -crystallin group and presented the largest cell bodies in the LPS group. The relative expressions of GFAP in the cells were  $0.851 \pm 0.076$  in the LPS group, which were higher than those in the normal control group and  $\alpha$ -crystallin group ( $0.786 \pm 0.091$ ,  $0.569 \pm 0.049$ ). Compared between the LPS group and  $\alpha$ -crystallin group, there is a significant difference between the two groups ( $t = 3.115$ ,  $P < 0.01$ ). In addition, compared with the LPS group, the contents of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the suspensions were significantly reduced in the normal control group and  $\alpha$ -crystallin group (all at  $P < 0.05$ ). **Conclusions**  $\alpha$ -Crystallin protein can inhibit the activation and secretion of optic nerve astrocytes stimulated by LPS.

**[Key words]** Alpha-crystallins/metabolism; Astrocytes; Optic nerve; Nerve regeneration; Cell culture; Proliferation; Proinflammatory cytokines; Rats, Long-Evans

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81270996)

视神经属于中枢神经系统,损伤后难以再生,其原因主要有视神经损伤后视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)的继发性凋亡和视神经损伤区以星形胶质细胞增生为主的胶质瘢痕形成及其产生的抑制性微环境阻碍再生的视神经通过损伤区,其中胶质瘢痕的形成是抑制 RGCs 轴突再生和延伸的关键因素。胶质瘢痕主要由活化的小胶质细胞、少突胶质细胞、前体细胞和星形胶质细胞构成,其中星形胶质细胞约占 80%<sup>[1]</sup>。视神经损伤可激活部分星形胶质细胞,一方面引起胶质纤维的大量增生,形成瘢痕;另一方面活化的星形胶质细胞自身产生肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 和白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 等炎性因子,加重 RGCs 的损伤<sup>[2-3]</sup>。马成霞等<sup>[4]</sup>研究发现,大鼠视神经损伤合并晶状体刺伤时,晶状体损伤可诱导 Müller 细胞活化,进而促进视神经损伤后 RGCs 的存活。我们前期的研究发现,加入外源性  $\alpha$ -晶状体蛋白能促进 RGCs 的存活和轴突的再生<sup>[5-6]</sup>,推测  $\alpha$ -晶状体蛋白除了作用于 RGCs 外,对视神经星形胶质细胞也有一定的抑制作用,从而促进再生轴突的生长和延伸。为了证实这种推测,本研究中用脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)对分离培养的视神经星形胶质细胞进行活化,研究  $\alpha$ -晶状体蛋白对 LPS 诱导的视神经星形胶质细胞的活化、增生、分泌功能的调节作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** SPF 级 3~5 日龄 Long Evans 大鼠(第三军医大学动物中心)。

**1.1.2 主要试剂及仪器**  $\alpha$ -晶状体蛋白(C4163, 美国 Sigma 公司)。细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8)(日本 Dojind 公司); DMEM/F12 培养基、胰蛋白酶、青链霉素双抗、质量分数 0.25% 胰蛋白酶(美国 HyClone 公司); 胎牛血清(广州 TBD 公司); LPS (Escherichia coli, 0111:B4, 美国 Sigma 公司); TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  ELISA 试剂盒(深圳欣博盛公司); 兔抗鼠胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)抗体(Ab48050, 英国 Abcam 公司); RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒(P0011)(上海碧云天生物技术公司)。SHEL-LAB2300 细胞培养箱(美国 BD 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 视神经星形胶质细胞的培养及免疫荧光法鉴定** 过量麻醉法处死大鼠, 无菌条件下分离大鼠视神经, 胰蛋白酶消化 30 min 后用含体积分数 15% 胎牛血清的完全培养基终止消化, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 3 d, 贴壁后半换液, 随后每 2 天更换培养基, 直到细胞铺满整个培养瓶后放入 37  $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 摇床中纯化 18 h。弃培养液, 用无菌 PBS 洗 3 遍后传至新的培养瓶中继续培养, 将传 3~4 代的细胞接种于

载玻片上,待细胞融合达到约 70% 时用质量分数 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 漂洗 5 min, 共 3 次, 用体积分数 0.5% Triton x-100 破膜 15 min, PBS 漂洗 5 min, 共 3 次, 质量分数 3% BSA 室温封闭 1 h, 加入兔抗鼠 GFAP 一抗(1:500)4 ℃ 过夜孵育, PBS 漂洗 5 min, 共 3 次, 加入羊抗兔 FICT 抗体(1:300)室温孵育 1 h, PBS 漂洗 5 min, 共 3 次, DAPI(1:1 000)染色 10 min, PBS 漂洗 5 min, 共 3 次, 甘油封片, 荧光显微镜下观察并拍照。任意选取 5 个视野, 计算平均 GFAP 阳性细胞比例。

**1.2.2 细胞分组培养** 将处于对数生长期的视神经星形胶质细胞分为正常对照组(常规培养液培养)、LPS 刺激组(常规培养液中添加 LPS 5 μg/ml)和 α-晶状体蛋白干预组(常规培养液中添加 LPS 5 μg/ml 和 α-晶状体蛋白 1×10<sup>-4</sup> g/L)分别培养 24 h。

**1.2.3 CCK-8 法检测细胞增殖抑制率** 将处于对数生长期的视神经星形胶质细胞接种于 96 孔板内, 每孔 100 μl, 含细胞 6.8×10<sup>3</sup> ~ 7.2×10<sup>3</sup> 个。按上述分组培养 24 h 后每孔加入 10 μl CCK-8 溶液作用 3 h, 采用酶联免疫检测仪测量各孔波长 450 nm 处的吸光度(A)值。

**1.2.4 Western blot 法检测细胞中 GFAP 蛋白的表达**

收集 3 个组的培养细胞(6 孔板, 每组 2 孔), 离心半径 3.5 cm, 4 ℃ 条件下 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清。加入组织蛋白提取液, 重悬并冰上孵育 40 min。4 ℃ 条件下 8 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, BCA 法测定总蛋白质量浓度。以每泳道 30 μg 总蛋白量, 用质量分数 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 100 V 恒压电泳 60 min, 将蛋白转至 PVDF 膜上, 用质量分数 5% 脱脂奶粉(含体积分数 0.05% Tween 20 的 TBST 稀释液)室温封闭 2 h, TBST 洗涤 10 min, 共 3 次。用 GFAP 抗体(1:1 000)孵育, 4 ℃ 孵育过夜, 以 GAPDH 作为内参。TBST 漂洗 10 min, 共 4 次。用辣根过氧化物酶标记的 IgG 抗体(1:500)37 ℃ 下孵育 2 h, TBST 漂洗后用 Western blot 荧光剂显影。以同一泳道的 GAPDH 为内参, 计算目的蛋白与内参的比值, 常规培养的细胞作为正常对照组, 实验重复 3 次。

**1.2.5 ELISA 法检测视神经星形胶质细胞上清液中 TNF-α、IL-1β 蛋白的质量浓度** 收集各组培养细胞的上清液, 按说明书将标准品等比稀释, 依次加入酶标孔, 同时将 3 个组样品(每组样品 4 个复孔)加入酶标孔, 37 ℃ 孵育 90 min, 洗涤液清洗 5 次后每孔依次加入 100 μl 生物素化抗体, 37 ℃ 孵育 60 min, 洗涤 5 次后加入 100 μl 浓缩酶结合物, 37 ℃ 孵育 30 min, 洗涤 5 次, 每孔加入 100 μl 显色底物, 37 ℃ 孵育 15 min 后直接加入 100 μl 终止液, 用酶标仪在波长 450 nm 处检测各组

A 值, 根据标准品绘制标准曲线, 得到相应的直线回归方程, 计算各组上清液中 TNF-α 和 IL-1β 的质量浓度。

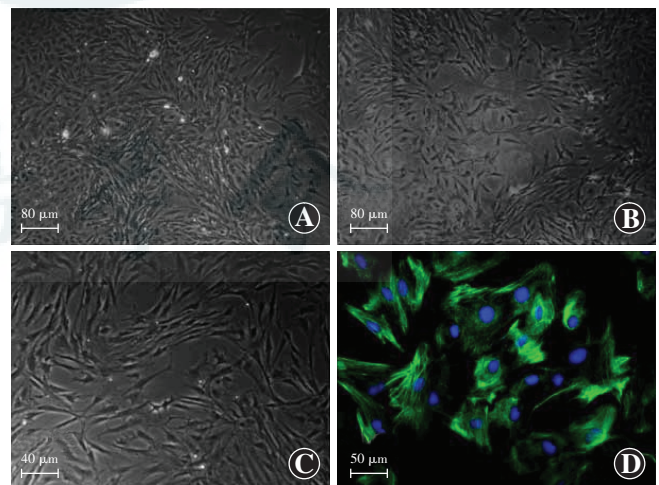
### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 W 检验证实呈正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 正常对照组、LPS 刺激组、α-晶状体蛋白干预组间星形胶质细胞增殖值(A 值)、细胞中 GFAP 蛋白相对表达量、细胞培养上清液中 TNF-α 和 IL-1β 质量浓度的总体差异比较均采用单因素方差分析, 组间两两比较均采用 LSD-t 检验。采用双尾检测法, P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 培养细胞的形态和鉴定

组织块培养 36 h 后开始贴壁, 培养后 48 ~ 72 h 细胞从贴壁的组织块中爬出, 培养后 7 ~ 8 d 细胞长满培养瓶并开始分层, 小胶质细胞和少突胶质细胞位于上层, 星形胶质细胞位于最下层, 细胞形态不一致, 相互交错(图 1A), 振荡纯化后去除小胶质细胞、少突胶质细胞和少量残留神经细胞, 收集贴壁细胞并开始传代, 此时与培养前期比较细胞形态较规则, 大小较一致(图 1B)。传至 6 代的细胞色素颗粒增多, 细胞衰老。传至 3 ~ 4 代的 GFAP 阳性细胞骨架形态为丝状纤维样(图 1C), 细胞质中呈绿色荧光(图 1D), GFAP 阳性细胞达 95% 以上。



**图 1 原代培养视神经星形胶质细胞的形态和 GFAP 免疫荧光鉴定**  
A: 原代细胞培养后 10 d 细胞分层, 多种胶质细胞混合, 大小形态不一(标尺=80 μm) B: 第 1 代细胞摇床振荡纯化 18 h 后分布均一, 形状较一致(标尺=80 μm) C: 第 3 代细胞大小均匀, 有 2~3 个突起, 呈星形(标尺=40 μm) D: 第 3~4 代细胞细胞质为 GFAP 阳性反应, 呈绿色荧光(FICT), 细胞核呈蓝色荧光(DAPI)(标尺=50 μm)

### 2.2 各组视神经星形胶质细胞增殖值的比较

正常对照组、LPS 刺激组和  $\alpha$ -晶状体蛋白干预组细胞的增殖值(A 值)分别为  $1.335 \pm 0.070$ 、 $1.643 \pm 0.069$  和  $1.390 \pm 0.004$ , 各组间总体比较差异有统计学意义( $F=8.385, P=0.018$ ), 其中 LPS 刺激组 A 值明显高于正常对照组, 差异有统计学意义( $t=3.135, P=0.035$ );  $\alpha$ -晶状体蛋白干预组 A 值明显低于 LPS 刺激组, 差异有统计学意义( $t=3.681, P=0.021$ )(图 2)。

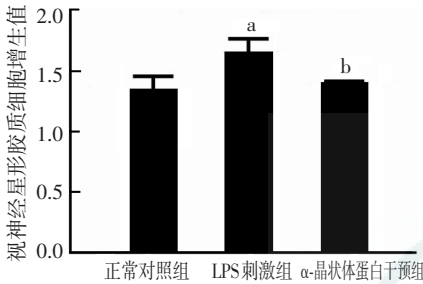


图 2 LPS 和  $\alpha$ -晶状体蛋白干预后各组视神经星形胶质细胞增殖值的比较 与正常对照组比较,  $^a P < 0.05$ ; 与 LPS 刺激组比较,  $^b P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n=3$ ) LPS: 脂多糖

### 2.3 各组视神经星形胶质细胞中 GFAP 蛋白的相对表达

正常对照组视神经星形胶质细胞形态规则, 可见细胞质中的细胞骨架对 GFAP 呈较弱的阳性反应, 为红色荧光; LPS 刺激组星形胶质细胞的胞体较正常对照组增大, GFAP 呈强荧光, 细胞骨架更致密, 相邻的细胞间相互交错重叠;  $\alpha$ -晶状体蛋白干预组细胞骨架回缩, GFAP 荧光强度减弱, 相对表达量减少, 细胞体较 LPS 刺激组缩小(图 3)。

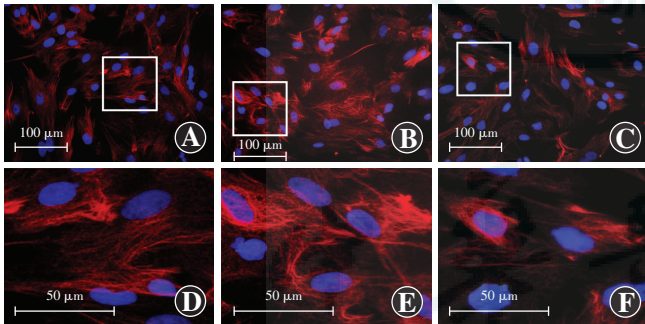


图 3 LPS 和  $\alpha$ -晶状体蛋白干预后各组视神经星形胶质细胞中 GFAP 的表达 A: 正常对照组细胞中 GFAP 表达较弱, 荧光染色均匀(标尺 =  $100 \mu\text{m}$ ) B: LPS 刺激组 GFAP 荧光强度明显增强, 相互重叠(标尺 =  $100 \mu\text{m}$ ) C:  $\alpha$ -晶状体蛋白干预组 GFAP 荧光强度较 LPS 刺激组明显减弱, 细胞体缩小(标尺 =  $100 \mu\text{m}$ ) D: A 图内矩形区域的局部放大图(标尺 =  $50 \mu\text{m}$ ) E: B 图内矩形区域的局部放大图(标尺 =  $50 \mu\text{m}$ ) F: C 图内矩形区域的局部放大图(标尺 =  $50 \mu\text{m}$ )

Western blot 法检测结果显示, 与正常对照组比较, LPS 刺激后 GFAP 的表达条带明显增强,  $\alpha$ -晶状体蛋白干预组 GFAP 的表达条带明显减弱。正常对照组、LPS 刺激组和  $\alpha$ -晶状体蛋白干预组 GFAP 蛋白相对表达量分别为  $0.786 \pm 0.091$ 、 $0.851 \pm 0.076$  和  $0.569 \pm 0.049$ , 组间总体比较差异有统计学意义( $F=3.960$ ,

$P=0.033$ ), 其中  $\alpha$ -晶状体蛋白干预组细胞中 GFAP 蛋白相对表达量较 LPS 刺激组明显下降, 差异有统计学意义( $t=3.115, P < 0.01$ )(图 4)。

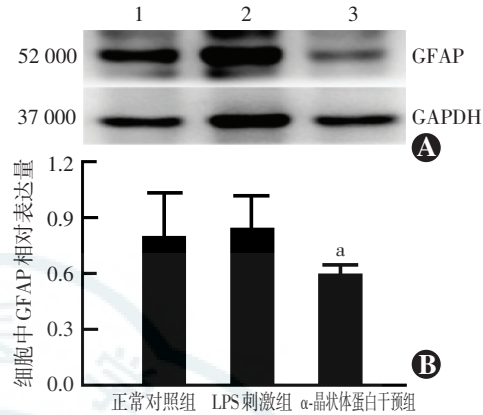


图 4 LPS 和  $\alpha$ -晶状体蛋白干预后各组视神经星形胶质细胞中 GFAP 蛋白相对表达量的比较 A: 各组细胞中 GFAP 蛋白表达的 Western blot 电泳图 1: 正常对照组 2: LPS 刺激组 3:  $\alpha$ -晶状体蛋白干预组 B: 各组细胞中 GFAP 蛋白相对表达量的量化比较  $F=3.960, P=0.033$ . 与 LPS 刺激组比较,  $^a P < 0.01$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n=2$ ) GFAP: 胶质纤维酸性蛋白; GAPDH: 磷酸甘油醛脱氢酶; LPS: 脂多糖

正常对照组、LPS 刺激组和  $\alpha$ -晶状体蛋白干预组细胞上清液中 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  质量浓度的比较

### 2.4 各组视神经星形胶质细胞上清液中 TNF- $\alpha$ 和 IL-1 $\beta$ 质量浓度的比较

正常对照组、LPS 刺激组和  $\alpha$ -晶状体蛋白干预组细胞上清液中 TNF- $\alpha$  质量浓度和 IL-1 $\beta$  质量浓度总体比较差异均有统计学意义(TNF- $\alpha$ :  $F=7.270, P < 0.05$ ; IL-1 $\beta$ :  $F=87.460, P < 0.01$ ), 其中 LPS 刺激组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  质量浓度均明显高于正常对照组和  $\alpha$ -晶状体蛋白干预组, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )(表 1)。

表 1 LPS 和  $\alpha$ -晶状体蛋白干预后各组视神经星形胶质细胞上清液中 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  质量浓度的比较 ( $\bar{x} \pm s, \text{ng/L}$ )

组别	样本量	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$
正常对照组	4	$33.96 \pm 6.94$	$60.96 \pm 7.97$
LPS 刺激组	4	$47.05 \pm 3.96^a$	$84.44 \pm 6.41^a$
$\alpha$ -晶状体蛋白干预组	4	$38.33 \pm 2.22^b$	$54.53 \pm 8.69^b$
F 值		7.270	87.460
P 值		$< 0.05$	$< 0.01$

注: 与正常对照组比较,  $^a P < 0.05$ ; 与 LPS 刺激组比较,  $^b P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验) TNF: 肿瘤坏死因子; IL: 白细胞介素; LPS: 脂多糖

### 3 讨论

作为神经系统主要的细胞成分, 星形胶质细胞具有促进神经细胞的存活和分化、调节神经系统血流量及维持渗透压等生物学作用, 并与阿尔茨海默病、帕金森病等神经系统退行性疾病的发生和发展有关<sup>[7-9]</sup>。当处于细胞应激和中枢神经系统感染的状态下, 激活

的星形胶质细胞可分泌重要的细胞因子,如 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 等,其所形成的化学屏障能够引起自身和神经细胞的状态发生改变,导致炎症、神经退行性变和神经细胞的凋亡;同时大量的胶质细胞聚集,形成胶质瘢痕这一物理屏障,阻止再生的视神经穿过损伤区,从而抑制视神经的再生和修复<sup>[10-11]</sup>,因此如何抑制视神经损伤后星形胶质细胞的活化及增生是视神经再生研究领域亟待解决的课题。

晶状体蛋白分为 3 类,其首先在晶状体中进行分离,而后发现其作为热休克蛋白的一种存在于多个器官中,对组织细胞起保护作用<sup>[12]</sup>。研究证实, $\alpha$ -晶状体蛋白能在一定程度上抵抗紫外线所引起的白内障,对糖尿病患者的视网膜神经细胞也有一定的保护作用<sup>[13-14]</sup>。LPS 是革兰阴性菌外膜的主要组成成分,能够激活星形胶质细胞,可能与 LPS 被模式识别受体 Toll 样受体 4 所识别,导致核因子- $\kappa$ B 激活和炎性细胞因子释放有关<sup>[15-17]</sup>。GFAP 是星形胶质细胞反应性增生的标志,在活化的星形胶质细胞中大量存在<sup>[18-19]</sup>,增生的 GFAP 阳性星形胶质细胞能促进星形胶质细胞的有丝分裂,使大量星形胶质细胞进入增生状态,促进胶质瘢痕的形成。本研究结果显示, $\alpha$ -晶状体蛋白能够抑制星形胶质细胞活化后 GFAP 的表达,说明  $\alpha$ -晶状体蛋白能在一定程度上抑制视神经星形胶质细胞的增生和活化,而 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  除了能够引起神经元的死亡外,还是促发炎症反应的重要物质,能够进一步刺激星形胶质细胞产生更多的炎性因子,活化炎症信号通路,加重炎症反应,引起视神经细胞的损伤<sup>[20]</sup>。本研究结果还显示, $\alpha$ -晶状体蛋白能够抑制 LPS 诱导的视神经星形胶质细胞的增生、活化和炎性因子的释放,从而对视神经发挥保护作用。因此探寻多种联合方法抑制神经组织的胶质化,同时护 RGCs 的生长,促进神经突触的再生是未来治疗视神经损伤性疾病的发展趋势。

## 参考文献

- Burda JE, Sofroniew MV. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease [J]. *Neuron*, 2014, 81 (2) : 229-248. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.12.034.
- Hamby ME, Sofroniew MV. Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders [J]. *Neurotherapeutics*, 2010, 7 (4) : 494-506. DOI: 10.1016/j.nurt.2010.07.003.
- Fischer D. Stimulating axonal regeneration of mature retinal ganglion cells and overcoming inhibitory signaling [J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 349 (1) : 79-85. DOI: 10.1007/s00441-011-1302-7.
- 马成霞, 吕勇, 吕建, 等. 晶状体损伤对视神经损伤后 RGCs 的保护作用及其机制 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2014, 32 (2) : 143-148. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.02.009.
- Ma CX, Lyu Y, Lyu J, et al. Protective effect of cataractogenic lens injury on RGCs in optic nerve axotomy eye *in vivo* and its mechanism [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2014, 32 (2) : 143-148. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.02.009.
- Wang Y, Wang Y, Wang D, et al. *In vitro* study of the effects of lens extract on rat retinal neuron survival and neurite outgrowth [J]. *Ophthalmic Res*, 2009, 42 (1) : 29-35. DOI: 10.1159/000219682.
- Ying X, Zhang J, Wang Y, et al. Alpha-crystallin protected axons from optic nerve degeneration after crushing in rats [J]. *J Mol Neurosci*, 2008, 35 (3) : 253-258. DOI: 10.1007/s12031-007-9010-1.
- Oberheim NA, Goldman SA, Nedergaard M. Heterogeneity of astrocytic form and function [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 814 : 23-45. DOI: 10.1007/978-1-61779-452-0\_3.
- Guillamón-Vivancos T, Gómez-Pinedo U, Matías-Guiu J. Astrocytes in neurodegenerative diseases (I): function and molecular description [J]. *Neurologia*, 2015, 30 (2) : 119-129. DOI: 10.1016/j.nrl.2012.12.007.
- Hamby ME, Sofroniew MV. Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders [J]. *Neurotherapeutics*, 2010, 7 (4) : 494-506. DOI: 10.1016/j.nurt.2010.07.003.
- García DM, Koke JR. Astrocytes as gate-keepers in optic nerve regeneration—a mini-review [J]. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2009, 152 (2) : 135-138. DOI: 10.1016/j.cbpa.2008.09.026.
- Ben HL, Carrillo-de SMA, Ceyzériat K, et al. Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases [J/OL]. *Front Cell Neurosci*, 2015, 9 : 278 [2016-03-17]. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2015.00278/full>. DOI: 10.3389/fncel.2015.00278.
- Piri N, Kwong JM, Gu L, et al. Heat shock proteins in the retina: focus on HSP70 and alpha crystallin in ganglion cell survival [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2016, 52 : 22-46. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2016.03.001.
- Saraswathy S, Nguyen AM, Rao NA. The role of TLR4 in photoreceptor  $\alpha$  crystallin upregulation during early experimental autoimmune uveitis [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51 (7) : 3680-3686. DOI: 10.1167/iovs.09-4575.
- Losiewicz MK, Fort PE. Diabetes impairs the neuroprotective properties of retinal alpha-crystallins [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52 (9) : 5034-5042. DOI: 10.1167/iovs.10-6931.
- Adhikari AS, Singh BN, Rao KS, et al.  $\alpha$ B-crystallin, a small heat shock protein, modulates NF- $\kappa$ B activity in a phosphorylation-dependent manner and protects muscle myoblasts from TNF- $\alpha$  induced cytotoxicity [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813 (8) : 1532-1542. DOI: 10.1016/j.bbamer.2011.04.009.
- Bian Y, Zhao X, Li M, et al. Various roles of astrocytes during recovery from repeated exposure to different doses of lipopolysaccharide [J]. *Behav Brain Res*, 2013, 253 : 253-261. DOI: 10.1016/j.bbr.2013.07.028.
- Gupta S, Goswami P, Biswas J, et al. 6-Hydroxydopamine and lipopolysaccharides induced DNA damage in astrocytes: involvement of nitric oxide and mitochondria [J]. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2015, 778 : 22-36. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2014.12.007.
- Sullivan SM. GFAP variants in health and disease: stars of the brain and gut [J]. *J Neurochem*, 2014, 130 (6) : 729-732. DOI: 10.1111/jnc.12754.
- Hol EM, Pekny M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, 32 : 121-130. DOI: 10.1016/j.ccb.2015.02.004.
- Renner NA, Sansing HA, Inglis FM, et al. Transient acidification and subsequent proinflammatory cytokine stimulation of astrocytes induce distinct activation phenotypes [J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228 (6) : 1284-1294. DOI: 10.1002/jcp.24283.

(收稿日期:2016-08-10)

(本文编辑:尹卫靖 刘艳)