

引文格式:邹秀兰,王观峰,皮荣标,李文立,俞永珍,邹玉平. Bax、Bcl-2 在丙烯醛诱导的 ARPE-19 细胞凋亡中的作用[J]. 眼科新进展,2014,34(7):633-636. doi:10.13389/j.cnki.rao.2014.0173

【实验研究】

# Bax、Bcl-2 在丙烯醛诱导的 ARPE-19 细胞凋亡中的作用<sup>△</sup>

邹秀兰 王观峰 皮荣标 李文立 俞永珍 邹玉平

**作者简介:**邹秀兰,女,1967年10月出生,江西人,副主任医师兼科副主任。联系电话:15323363967; E-mail:xlzou2003@yahoo.com.cn

**作者简介:**王观峰,男,1988年2月出生,江西人,住院医师。联系电话:13711090644; E-mail:306841512@qq.com

**About ZOU Xiu-Lan:** Female, born in October, 1967. Tel: 15323363967; E-mail: xlzou2003@yahoo.com.cn

**About WANG Guan-Feng:** Male, born in February, 1988. Tel: 13711090644; E-mail: 306841512@qq.com

**收稿日期:**2014-02-27  
**修回日期:**2014-04-10  
**本文编辑:**董建军

**△基金项目:**广东省科技计划项目(编号:20120314)

**作者单位:**510010 广东省广州市,广州军区广州总医院眼科(邹秀兰,俞永珍,邹玉平);510150 广东省广州市,广州医科大学附属第三医院眼科(王观峰);510006 广东省广州市,中山大学药学院药理学和毒理学研究室(皮荣标);510300 广东省广州市,广东省疾病预防控制中心(李文立)

**通讯作者:**邹玉平, E-mail: xlzou2003@yahoo.com.cn

**Received date:** Feb 27, 2014  
**Accepted date:** Apr 10, 2014

**Foundation item:** Guangdong Province Science and Technology Project (No: 20120314)

From the Department of Ophthalmology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command (ZOU Xiu-Lan, YU Yong-Zhen, ZOU Yu-Ping), Guangzhou 510010, Guangdong Province, China; Department of Ophthalmology, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University (WANG Guan-Feng), Guangzhou 510150, Guangdong Province, China; Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-Sen University (PI Rong-Biao), Guangzhou 510006, Guangdong Province, China; Disease Prevention and Control Center of Guangdong Province (LI Wen-Li), Guangzhou 510300, Guangdong Province, China

**Responsible author:** ZOU Yu-Ping, E-mail: xlzou2003@yahoo.com.cn

## Roles of Bax and Bcl-2 in ARPE-19 cell apoptosis induced by acrolein

ZOU Xiu-Lan, WANG Guan-Feng, PI Rong-Biao, LI Wen-Li, YU Yong-Zhen, ZOU Yu-Ping

**[Key words]** acrolein; ARPE-19 cell; cell apoptosis; Bax; Bcl-2

**[Abstract] Objective** To observe the roles of Bax and Bcl-2 in ARPE-19 cells apoptosis induced by acrolein. **Methods** The ARPE-19 cells were cultured in medium, containing volumn fraction 10% fetal bovine serum, 2.48 g · L<sup>-1</sup> sodium bicarbonate, 100 U · mL<sup>-1</sup> penicillin and 100 μg · mL<sup>-1</sup> streptomycin, in the 37 °C incubator with volumn fraction 5% CO<sub>2</sub>. The cells were treated with acrolein (0 μmol · L<sup>-1</sup>, 50 μmol · L<sup>-1</sup> and 100 μmol · L<sup>-1</sup>) for 24 hours, then the apoptotic cells was detected by flow cytometry, and the expression of Bcl-2 and Bax protein were detected by Western blot.

**Results** Early apoptosis cell rate was 2.97% in blank control group, 4.67% in 50 μmol · L<sup>-1</sup> acrolein group and 50.07% in 100 μmol · L<sup>-1</sup> acrolein group. Late apoptotic cell rate were 1.66%, 24.24%, 6.77% in blank control group, 50 μmol · L<sup>-1</sup> acrolein group and 100 μmol · L<sup>-1</sup> acrolein group, respectively. The ratio expression of Bax/Bcl-2 was 0.293 9, 1.389 2, 1.496 1 in blank control group, 50 μmol · L<sup>-1</sup> acrolein group and 100 μmol · L<sup>-1</sup> acrolein group, respectively. **Conclusion** The apoptosis of ARPE-19 cells are induced by the up-expression of Bax and down-expression of Bcl-2 activated by acrolein.

**[Rec Adv Ophthalmol, 2014, 34(7): 633-636]**

**[关键词]** 丙烯醛; ARPE-19 细胞; 细胞凋亡; Bax; Bcl-2;

**[摘要]** **目的** 观察 Bax、Bcl-2 蛋白在丙烯醛诱导的体外培养 ARPE-19 细胞凋亡中的作用。**方法** 将培养的 ARPE-19 细胞置于含有体积分数 10% 胎牛血清的完全培养基中,于 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育;用不同浓度(50 μmol · L<sup>-1</sup>、100 μmol · L<sup>-1</sup>) 丙烯醛处理对数期培养的 ARPE-19 细胞 24 h,设不加药的空白对照组,用流式细胞仪检测丙烯醛诱导 ARPE-19 细胞的凋亡情况,Western blot 检测 ARPE-19 细胞中 Bax、Bcl-2 蛋白的表达情况。**结果** 流式细胞仪显示,早期在空白对照组中细胞凋亡率为 2.97%,50 μmol · L<sup>-1</sup> 丙烯醛处理组中为 4.67%,100 μmol · L<sup>-1</sup> 丙烯醛处理组中为 50.07%;晚期凋亡细胞在空白对照组中细胞凋亡率为 1.66%,50 μmol · L<sup>-1</sup> 丙烯醛处理组中为 24.24%,100 μmol · L<sup>-1</sup> 丙烯醛处理组中为 6.77%。Western blot 显示空白对照组的 Bax/Bcl-2 蛋白表达的比值为 0.293 9,50 μmol · L<sup>-1</sup> 丙烯醛处理组的 Bax/Bcl-2 蛋白表达的比值为 1.389 2,100 μmol · L<sup>-1</sup> 丙烯醛处理组的 Bax/Bcl-2 蛋白表达的比值为 1.496 1。**结论** 丙烯醛可以通过激活凋亡蛋白 Bax 及抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达来导致 ARPE-19 细胞凋亡。

**[眼科新进展,2014,34(7): 633-636]**

我们和其他研究人员前期研究发现,丙烯醛可以导致人视网膜色素上皮(human retinal pigment epithelial-19, ARPE-19)细胞数量明显减少、肿胀、坏死或染色体聚集、胞浆收缩、胞膜出芽等,目前的研究尚不能证明是何种路径介导这一损伤过程<sup>[1-7]</sup>。近期国内外研究发现丙烯醛可以激活大量活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)、活性氧自由基,促进氧自由基反应干扰细胞内的氧化磷酸化过程,损伤生物膜系统、氨基酸、DNA、RNA 等;氧自由基反应作为信号分子参与了凋亡基因的表达与凋亡蛋白的激活<sup>[8-12]</sup>。本研究在前期研

究的基础上,拟通过丙烯醛诱导 ARPE-19 细胞的凋亡模型,初步探讨 Bax、Bcl-2 蛋白在该细胞凋亡中的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 材料与仪器** ARPE-19 细胞株、丙烯醛由中山大学药学院提供;胰蛋白酶购自美国 Sigma 公司,改良 Eagle 培养基 DMEM 和胎牛血清购自美国 Gibco 公司;ECL 化学发光试剂盒购自美国 PIERCE 公司,丙烯酰胺 (Acrylamide) 购自美国 B. M. 公司;四甲基乙二胺购自美国 B. M. 公司,POVEF 膜购自美国 BIO-RAD 公司;X 光片购自日本 KODAK 公司;其他仪器包括倒置相差显微镜 (Leica, 德国)、流式细胞仪 (Beckman Coulter, 美国)、Eppendorf 恒温振荡仪 (Eppendorf 公司, 美国)、MiniSpin 台式离心机 (Eppendorf 公司, 美国)、450 型全波长多功能酶标仪 (Eppendorf 公司, 美国)、Tanon 凝胶成像系统 (TANON 公司, 中国上海)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 实验分组** 丙烯醛使用前要立即溶解到无血清的 DMEM-F12 培养液中。待培养板中的单层 ARPE-19 细胞长满底部约 70% 时,用不含血清的培养液继续培养 24 h 后 (即按血清饥饿法),将培养细胞分为:空白对照组,不加任何药物;不同浓度丙烯醛处理组,培养细胞中加入丙烯醛 (终浓度为  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 处理 24 h。

**1.2.2 流式细胞仪检测凋亡细胞** 无菌超净台内进行 ARPE-19 细胞的培养及 6 孔板的铺板。将 ARPE-19 细胞以含体积分数 10% 胎牛血清的完全培养基重悬,调整细胞密度为  $10^9 \text{ L}^{-1}$ , 3 mL 接种于 6 孔细胞培养板。第 3 天吸去原液,每孔再给予 3 mL 无血清 DMEM-F12 培养基。第 4 天每孔吸去原液,每孔再按上述实验分组给予不同浓度的药物处理。待药物丙烯醛作用 24 h 后,将细胞培养板中各组的培养基分别转移到位于冰上的 15 mL 锥形管内,用 PBS 溶液进行重悬,  $0.5 \text{ mL } 2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Trpsin (不含 EDTA) 消化细胞;收集各组培养板上的细胞,并用预冷的 PBS 缓冲液重悬,维持细胞密度在  $10^9 \text{ L}^{-1}$  左右;每组离心管内取 0.5 mL 细胞重悬液,加入 1.25  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC, 18 ~ 24  $^{\circ}\text{C}$  室温避光反应 15 min,室温下  $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min,用 0.5 mL 预冷缓冲液轻轻重悬细胞,加入 10  $\mu\text{L}$  Propidium Iodide;立即将样品放入冰盒内保存,并送往检测中心进行检测。

**1.2.3 Western blot 检测 Bax、Bcl-2 蛋白的表达** 按照说明书中的程序和方法检测 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达情况。

**1.3 统计学方法** 实验数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素多组间方差分析和组间  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学

意义。

## 2 结果

**2.1 细胞凋亡情况** 正常细胞在空白对照组中所占比例 94.80%,  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  丙烯醛处理组中为 60.98%,  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  丙烯醛处理组中为 42.58%;与正常对照组相比,  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  丙烯醛处理组中的正常细胞数明显下降 ( $P = 0.0001$ )。早期空白对照组中细胞凋亡率为 2.97%,  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  丙烯醛处理组中为 4.67%,  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  丙烯醛处理组中为 50.07%;与空白对照组相比,  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  丙烯醛处理组中的早期凋亡细胞数明显上升 ( $P = 0.001$ )。晚期空白对照组中细胞凋亡率为 1.66%,  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  丙烯醛处理组中为 24.24%,  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  丙烯醛处理组中为 6.77%;与空白对照组相比,  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  丙烯醛处理组中的晚期凋亡细胞数明显上升 ( $P = 0.0001$ )。总凋亡率在空白对照组中为 4.63%,  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  丙烯醛处理组中为 28.91%,  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  丙烯醛处理组中为 56.84%;与空白对照组相比,  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  丙烯醛处理组中的总凋亡细胞数明显上升 ( $P = 0.0001$ ), 见图 1。

**Figure 1** Apoptotic cells detected by flow cytometry. A: Blank control group; B:  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  acrolein group for 24 hours; C:  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  acrolein group for 24 hours 流式细胞仪检测凋亡细胞情况。A: 空白对照组中 ARPE-19 凋亡细胞; B:  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  丙烯醛作用 24 h 后 ARPE-19 凋亡细胞; C:  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  丙烯醛作用 24 h 后 ARPE-19 凋亡细胞

**2.2 Western blot 检测 ARPE-19 细胞 Bax、Bcl-2 表达情况** 利用人源性多克隆抗体检测 Bax 与 Bcl-2 蛋白在 ARPE-19 细胞中的表达情况,结果如图 2 所示;空白对照组的 Bax/Bcl-2 蛋白表达的比值为 0.2939,  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  丙烯醛处理组的 Bax/Bcl-2 蛋白表达的比值为 1.3892,  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  丙烯醛处理组的 Bax/Bcl-2 蛋白表达的比值为 1.4961。与空白对照组相比,  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  丙烯醛处理组的 Bax/Bcl-2 蛋白表达显著升高。

## 3 讨论

在丙烯醛诱导 ARPE-19 细胞凋亡的研究中,国外学者就发现有大量 ROS、氧自由基、一氧化氮 (nitrogen monoxide, NO) 等形成。我们在早期研究中已证实  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  丙烯醛可以导致 ARPE-19 细胞的大量损伤,其可能与以下因素有关: (1) ROS 的增高可以降低细胞内抗氧化剂的量导致细胞凋亡形态学特征的出现,使用内源性或外源性抗氧化剂可以

**Figure 2** Expression of Bax and Bcl-2 protein detected by Western blot in each group Western blot 检测各组 Bax、Bcl-2 蛋白表达情况

阻断细胞的凋亡过程,且细胞内 ROS 水平与细胞的凋亡水平成正相关。(2)在体内,氧自由基为含有很强活性的化学物质,能够损伤细胞内的蛋白质、核酸、脂肪等。基础研究表明,氧自由基反应是诸多生命化学反应的一个基本组成部分,同时也作为信号因子作用于凋亡信号通路来介导凋亡蛋白与凋亡基因的表达,从而影响细胞的代谢和细胞内环境。(3)作为氧自由基之一的 NO 就是一种神经传导信号因子。一氧化氮合酶(induce nitric oxide synthase, iNOS)的活化在 NO 诱导缺氧细胞发生凋亡上起着关键作用。在此病理过程中,iNOS 的活化促进 NO 的生成及 NO 与  $O_2 \cdot$  相互结合生成  $ONOO^-$ 。据此有学者认为 NO 和  $ONOO^-$  可能是触发细胞凋亡的关键因子。(4)许多可以诱导细胞凋亡的其他理化因素同样也可以导致氧化应激的产生,如金属化合物、电离辐射和紫外线等<sup>[13-16]</sup>。

在后续实验中,我们发现随着丙烯醛浓度的升高,ARPE-19 细胞的损伤增加,总凋亡细胞数也随之增高。我们认为作为真核生物细胞内氧化磷酸化和 ATP 合成,不仅为细胞提供能量,还参与了细胞分化、信息传递和凋亡等多种生命过程,且在调控细胞生长或转导、扩大细胞凋亡信号过程起到决定作用。作为细胞凋亡的内源性途径的上游,线粒体与半胱氨酸蛋白水解酶、下游的效应器之间连接。多种理化刺激因子均可以激活此凋亡途径。国外学者研究均发现丙烯醛可以介导线粒体跨膜电位的破坏,而后者已被公认是细胞凋亡级联反应发生的先兆之一。线粒体跨膜电位的破坏,也可以被看成是线粒体膜固有特性(如通透性等)的改变,继而使得线粒体内的多种氧自由基和其他活性物质进入细胞质内,导致“瀑布”样的凋亡过程<sup>[17-19]</sup>。我们的研究实验组  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  丙烯醛即可造成 Bax/Bcl-2 蛋白表达比值的显著提高,据此我们认为丙烯醛可能通过作用于多种理化因子,激活和上调 Bcl-2 族基因 Bax/Bak 凋亡蛋白的表达,影响甚至于逆转线粒体跨膜电位,导致细胞色素 C 的异常分泌。而后者可以激活细胞质内的凋亡蛋白酶激活因子、脱氧三磷酸腺苷等 caspase 前体激活物。这些前体激活物可以激活凋亡通路下游的 caspases-3 及 caspases-7,最

终使细胞产生凋亡。另外,丙烯醛也可以干扰转录因子 NF- $\kappa$ B 的生成,后者可以调节如抗凋亡 Bcl-2 家族、cLAP 等抗凋亡基因的表达。我们考虑这种改变可能是由于相关凋亡蛋白的改变介导的线粒体“内源性”细胞凋亡。实验中我们还发现随着丙烯醛浓度提高,Bax/Bcl-2 蛋白表达比值也进一步升高,但差异无统计学意义。这可能与  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  丙烯醛已经激活了“瀑布”样的细胞凋亡过程,而  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  丙烯醛在此基础上又引发了多种导致细胞死亡或凋亡信号通路有关。本研究目前仅从蛋白水平说明丙烯醛通过 Bax/Bcl-2 线粒体凋亡途径导致 ARPE-19 细胞损伤,为进一步探寻丙烯醛诱导 ARPE-19 细胞损伤的机理今后拟从基因水平及凋亡信号调节路径等进行深入研究。

## 参考文献

- 1 王观峰,李文立,邹秀兰,邹玉平,皮荣标,姚敏. 硫辛酸烟酸二联体对丙烯醛损伤 ARPE-19 细胞的保护作用[J]. 眼科新进展, 2013, 33(2):106-109.
- 2 Pons M, Marin-castano ME. Nicotine increases the VEGF/PEDF ratio in retinal pigment epithelium: a possible mechanism for CNV in passive smokers with AMD[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(6):3824-3853.
- 3 Rabuka D, Rush JS, deHart GW, Wu P, Bertozzi CR. Site-specific chemical protein conjugation using genetically encoded aldehyde tags[J]. *Nat Protoc*, 2012, 7(6):1052-1067.
- 4 Perez JM, Arenas FA, Pradenas GA, Sandoval JM, Vasquez CC. *Escherichia coli* YqhD exhibits aldehyde reductase activity and protects from the harmful effect of lipid peroxidation-derived aldehydes[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(12):7346-7353.
- 5 Cassee FR, Groten JP, Feron VJ. Changes in the nasal epithelium of rats exposed by inhalation to mixtures of formaldehyde, acetaldehyde, and acrolein[J]. *Fundam Appl Toxicol*, 1996, 29(2):208-218.
- 6 Cassee FR, de Burbure CY, Rambali B, Vleeming W, van de Kuil A, van Steeg H, et al. Subchronic inhalation of mixtures of cigarette smoke constituents in Xpa-/-p53 +/- knock-out mice: a comparison of intermittent with semi-continuous exposure to acetaldehyde, formaldehyde, and acrolein[J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46(2):527-536.
- 7 Espinosa-Heidmann DG, Suner IJ, Catanuto P, Hernandez EP, Marin-Castano ME, Cousins SW. Cigarette smoke-related oxidants and the development of sub-RPE deposits in an experimental animal model of dry AMD[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(2):729-737.
- 8 Zhang SY, Villalta PW, Wang MY, Hecht SS. Detection and quantitation of acrolein-derived 1, N2-propanodeoxyguanosine adducts in human lung by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry[J]. *Chem Res Toxicol*, 2007, 20(6):565-571.
- 9 Pawlowski AJ, Munter T, Klika KD, Kronberg L. Reaction of acrolein with 2'-deoxyadenosine and 9-ethyladenine-Formation of cyclic adducts[J]. *Biorgan Chem*, 2006, 34(1):39-48.
- 10 Liu Z, Sun L, Zhu L, Jia X, Li X, Jia H, et al. Hydroxytyrosol protects retinal pigment epithelial cells from acrolein-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction[J]. *J Neurochem*, 2007, 103(6):2690-2700.
- 11 Sheu SJ, Liu NC, Chen JL. Resveratrol protects human retinal pigment epithelial cells from acrolein-induced damage[J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2010, 26(3):231-236.
- 12 Feng Z, Liu Z, Li X, Jia H, Sun L, Tian C, et al.  $\alpha$ -Tocopherol is an effective Phase II enzyme inducer; protective effects on acrolein-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human retinal pigment epithelial cells[J]. *Nutr Biochem*, 2010, 21(12):1222-1231.

引文格式: 刘晓文, 付汛安. 硫氧还蛋白 TXN 对视神经轴突损伤的保护作用[J]. 眼科新进展, 2014, 34(7): 636-639.  
doi: 10. 13389/j. cnki. rao. 2014. 0174

【实验研究】

# 硫氧还蛋白 TXN 对视神经轴突损伤的保护作用

刘晓文 付汛安

## Protective effects of thioredoxin on optic nerve axon damage

LIU Xiao-Wen, FU Xun-An

【Key words】 thioredoxin; axon formation; axon protection; optic nerve

【Abstract】 **Objective** To investigate the protective effects of thioredoxin (TXN) on optic nerve (ON) crushed in rats, and provide effective treatment for the prevention of optic nerve injury. **Methods** The traumatic optic nerve model in rats were established, the normal rats acted as a control group. Respectively at 1 week, 2 weeks, 4 weeks after ON injury, the retina mRNA and protein from two groups were extracted. By RT-PCR and Western blot, the expression of TXN was detected. After stimulating RGC-5 with trichostatin A, the ratio and lengths of cell axons were counted and the expression of TXN was detected. Treating with DMSO acted as a control group. Under stimulation of TNF- $\alpha$ , the thioredoxin protein in RGC-5 cells were over-expressed and axon formation of RGC-5 cells were observed. **Results** Compared with the normal rats, TXN mRNA and protein levels were significantly decreased in ON crush model rats. At 1 week after injury, TXN expression decreased by 32%, while at 2 weeks and 4 weeks after injury, TXN expression was down by 55% and 70%, respectively, which indicated that the level of TXN decreased more with the extension of injury time. When RGC-5 cells were induced by TSA for 24 hours, (65  $\pm$  5)% of the cells could produce axon, whereas the control group did not detect the axon. TXN expression also increased after treating with TSA. After stimulation with TNF- $\alpha$ , the proportion of axon dropped to (30  $\pm$  4)%, axon length decreased from (100  $\pm$  6)  $\mu$ m to (74  $\pm$  6)  $\mu$ m, but over-expression of TXN in RGC-5 cells, the proportion could recover to (52  $\pm$  7)% and the axon length could recover to (92  $\pm$  8)  $\mu$ m. **Conclusion** After ON injury, TXN expression is significantly decreased. In the axon formation process, the expression of TXN increases significantly. Over-expression of TXN can inhibit axonal injury induced by external stimuli. These results indicate that TXN is involved in axon formation and can effectively protect the axons from injury.

[Rec Adv Ophthalmol, 2014, 34(7): 636-639]

【关键词】 硫氧还蛋白; 轴突形成; 轴突保护; 视神经

【摘要】 **目的** 研究硫氧还蛋白(thioredoxin, TXN)在视神经轴突保护中的作用, 为视神经损伤提供有效的治疗方案。 **方法** 制作大鼠视神经夹伤模型, 以正常大鼠作为正常对照组。按夹伤后处死时间不同, 选取伤后1周、2周、4周三个时间点, 提取实验组和正常对照组中大鼠视网膜的mRNA和蛋白, 通过RT-PCR和Western blot实验方法检测TXN表达情况; 用曲古抑菌素A(TSA)刺激RGC-5细胞, 观察在TSA刺激后, RGC-5细胞的轴突形成情况, 并检测TXN表达量的变化。构建TXN的真核表达质粒, 转染进RGC-5细胞, 在TNF- $\alpha$ 刺激条件下, 观察RGC-5细胞的轴突形成情况以及轴突长度的改变。 **结果** 与正常大鼠比较, 视神经夹伤模型大鼠中TXN的mRNA以及蛋白水平明显下降。在伤后1周, TXN mRNA表达量仅下降了32%, 而在伤后2

- Macallister SL, Martin-Brisac N, Lau V, Yang K, O'Brien PJ. Acrolein and chloroacetaldehyde: An examination of the cell and cell-free biomarkers of toxicity [J]. *Chem Biol Interact*, 2013, 202(1-3): 259-266.
- Borchers MT, Wessenlcamper SC, Deshmukh H, Beckman E, Medvedovic M, Sartor M, et al. The role of cells in the regulation of acrolein-induced pulmonary inflammation and epithelial-cell pathology [J]. *Res Rep Health Eff Inst*, 2009, 146(1): 5-29.
- Lambert C, McCue J, Portas M, Ouyang Y, Li J, Rosano TG, et al. Acrolein in cigarette smoke inhibits T-cell responses [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 116(4): 916-922.
- Swystun LL, Mukherjee S, Levine M, Liaw PC. The chemotherapy metabolite acrolein upregulates thrombin generation and impairs the protein C anticoagulant pathway in animal-based and

- cell-based models [J]. *J Thromb Haemost*, 2011, 9(4): 767-775.
- Yang ES, Woo SM, Choi KS, Kwon TK. Acrolein sensitizes human renal cancer Caki cells to TRAIL-induced apoptosis via ROS-mediated up-regulation of death receptor-5 (DR5) and down-regulation of Bcl-2 [J]. *Exp Cell Res*, 2011, 317(18): 2592-2601.
- Ozer H, Yenicesu G, Arici S, Cetin M, Tuncer E, Cetin A. Immunohistochemistry with apoptotic-antiapoptotic proteins (p53, p21, bax, bcl-2), c-kit, telomerase, and metallothionein as a diagnostic aid in benign, borderline, and malignant serous and mucinous ovarian tumors [J]. *Diagn Pathol*, 2012, 7(1): 124.
- Zhai D, Jin C, Huang Z, Satterthwait AC, Reed JC. Differential regulation of Bax and Bak by anti-apoptotic Bcl-2 family proteins Bcl-B and Mcl-1 [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(15): 9580-9586.