

# 重组人促红细胞生成素对大鼠视网膜神经节细胞的影响

王 辉<sup>1,2</sup>, 刘哲丽<sup>1</sup>

基金项目:辽宁省博士科研启动基金资助项目(No. 20101107)  
作者单位:<sup>1</sup>(110001)中国辽宁省沈阳市,中国医科大学附属第一医院眼科;<sup>2</sup>(110031)中国辽宁省沈阳市第四人民医院眼科  
作者简介:王辉,毕业于中国医科大学,博士,副主任医师,研究方向:眼底病、神经眼科。

通讯作者:王辉. huihuihome@126.com

收稿日期:2012-07-17 修回日期:2012-11-13

## Effect of recombinant human erythropoietin on rat retinal ganglion cells

Hui Wang<sup>1,2</sup>, Zhe-Li Liu<sup>1</sup>

**Foundation item:** Doctoral Scientific Research Foundation of Liaoning Province, China (No. 20101107)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China;

<sup>2</sup>Department of Ophthalmology, the Fourth People's Hospital of Shenyang, Shenyang 110031, Liaoning Province, China

**Correspondence to:** Hui Wang. Department of Ophthalmology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. huihuihome@126.com

Received:2012-07-17 Accepted:2012-11-13

## Abstract

• **AIM:** To observe the influence of recombinant human erythropoietin (rhEPO) on cultured retinal ganglion cells (RGCs) survival and axonal regeneration of rats, detect the expression of growth associated protein 43 (GAP-43), and to investigate the possible effective mechanism.

• **METHODS:** RGCs were cultured in DMEM (control group) or DMEM containing rhEPO (rhEPO group) for 72 hours. Cell morphology and axonal growth were observed under phase-contrast microscope. The length of the longest processes of RGCs were measured and compared between two groups. The GAP-43 expression was detected by Western blot and the gray value scales of GAP-43 were measured by imaging analysis system. All results were compared using *t* test.

• **RESULTS:** The RGCs were observed to extend processes under microscope after culturing for 72 hours. The cells in rhEPO group were bigger and the processes were longer compared to the control group ( $P < 0.05$ ). The expression of GAP-43 *in vitro* was detected by Western blot. The expression of GAP-43 in rhEPO group was higher than that in control group ( $P < 0.05$ ).

• **CONCLUSION:** rhEPO can promote the axonal growth of cultured RGCs *in vitro*. rhEPO can also increase the expression of GAP-43 in cultured RGCs, which may result in the promotion of rhEPO on the axonal growth of RGCs.

• **KEYWORDS:** recombinant human erythropoietin; optic nerve injury; retinal ganglion cell; growth associated protein

**Citation:** Wang H, Liu ZL. Effect of recombinant human erythropoietin on rat retinal ganglion cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(12):2264-2267

## 摘要

**目的:**观察重组人促红细胞生成素(recombinant human erythropoietin, rhEPO)对体外培养的大鼠视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)存活及其轴突生长的影响,检测作为神经再生标志的生长相关蛋白43(growth associated protein 43, GAP-43)的表达情况,并探讨rhEPO对RGCs可能的作用机制。

**方法:**RGCs分为实验组(rhEPO组)和对照组(DMEM组)行体外培养,倒置显微镜下观察细胞和轴突生长情况,培养72h测量细胞最长突起长度进行比较,行GAP-43的Western-blot检测,图像分析系统对两组标本进行灰度值测量。

**结果:**培养72h的RGCs倒置显微镜下观察,形成典型的细胞突起,rhEPO组的细胞比对照组胞体更大,突起更长( $P < 0.05$ )。培养72h的RGCs行GAP-43 Western-blot检测,DMEM组GAP-43呈阳性表达,rhEPO组呈强阳性表达,两组差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**结论:**rhEPO能够促进体外培养的RGCs轴突生长,能够上调体外培养的RGCs的GAP-43蛋白表达水平,可能是其能够促进RGCs轴突生长的原因。

**关键词:**重组人促红细胞生成素;视神经损伤;视网膜神经节细胞;生长相关蛋白

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2012.12.05

**引用:**王辉,刘哲丽.重组人促红细胞生成素对大鼠视网膜神经节细胞的影响.国际眼科杂志2012;12(12):2264-2267

## 0 引言

促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是分子量约为30~39kD的糖蛋白,是调节红细胞生成的造血细胞因子,既往被认为只能作用于红系前体细胞<sup>[1]</sup>,1985年被成功克隆后,重组人促红细胞生成素(rhEPO)获得成功,现已在临床上广泛应用于贫血的治疗。然而近年来许多研究表明,在神经系统内,神经元、胶质细胞和内皮细胞

都能产生和表达 EPO 和 EPOR, EPO 被发现能保护神经系统,改善神经功能。视神经是由视网膜神经节细胞(RGCs)的轴突组成,RGCs 的进行性死亡是视神经损伤时导致视功能不可逆性损害的主要原因<sup>[2]</sup>,如果能够研制出促进 RGCs 存活和其轴突再生的药物,就会为视神经损伤后的保护性治疗提供一种有力工具。RGCs 体外培养是研究视神经损伤与修复的重要手段,研究 RGCs 的发育、生长及其影响因素对于探讨视神经损伤后 RGCs 的保护具有重要意义。本研究拟观察 rhEPO 对体外培养的大鼠 RGCs 存活及轴突生长的影响,检测作为神经再生标志的生长相关蛋白 43(GAP-43)的表达水平,并探讨其可能的作用机制,以期为进一步揭示 EPO 的视神经保护作用机制提供基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 出生 1~3d 的 Wistar 大鼠 20 只,清洁级,雌雄不限,由中国医科大学实验动物中心提供。DMEM 培养基(Sigma 公司,美国),胎牛血清(Sigma 公司,美国),5-溴-2'-脱氧尿嘧啶(Sigma 公司,美国),透明质酸酶(Sigma,美国),胰蛋白酶(Sigma,美国),多聚赖氨酸(武汉博士德公司),rhEPO 注射液:规格 10000U/mL(沈阳三生制药),小鼠抗大鼠 Thy1.1 单克隆抗体(Chemicon,美国),兔抗大鼠 GAP-43 单克隆抗体(武汉博士德公司),DAB 显色试剂盒与 SABC 免疫组化染色试剂盒(武汉博士德公司),组织裂解液、BCA 法蛋白定量试剂盒、Tris-甘氨酸电泳缓冲液、6×SDS 凝胶加样缓冲液及 PVDF 膜(武汉博士德公司)。转移电泳仪(北京六一仪器厂),稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂),CBS-8000 凝胶扫描成像系统(上海第三分析仪器厂),Image-Pro Plus 图像分析系统(美国)。

## 1.2 方法

**1.2.1 RGCs 的接种和分组培养与鉴定** 参照钟一声等报道的方法进行实验<sup>[3]</sup>。将出生 1~3d 的 Wistar 大鼠浸入 750mL/L 乙醇中溺死并消毒,放置于培养皿中,摘取眼球,用含有 100U/mL 青霉素和 100μg/mL 链霉素的 D-Hanks 液漂洗 3 次。在显微镜下,沿角巩膜缘剪除角膜,用镊子去除晶状体及玻璃体,分离视网膜神经上皮层,使用钝头吸管将其移入离心管中。依次收集所有视网膜,D-Hanks 液漂洗 3 次,加入终浓度为 1.25g/L 胰蛋白酶和 2g/L 透明质酸酶,37℃ 消化 30min。加入含 100mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养液终止消化,1000r/min 离心 5min,弃去上清液,加入 DMEM 培养液,钝头吸管吹打成单细胞悬液,行细胞计数,加入培养液,调整活细胞密度为  $1 \times 10^6$ /mL,接种于 24 孔培养板中。将接种后的细胞分为实验组(rhEPO 组)和对照组(DMEM 组)。对照组只加入 DMEM 培养液,实验组在 DMEM 培养液中加入终浓度为 0.6U/mL rhEPO。将所有 RGCs 置于 50mL/L CO<sub>2</sub> 培养箱内,37℃ 恒温培养。24h 加入 20μg/mL 的 5-溴-2'-脱氧尿嘧啶抑制非神经细胞生长,继续培养 48h 观察结果。每组随机选取 5 个孔进行 RGCs 的特异性标记抗体——Thy1.1 的免疫细胞化学检测,鉴定 RGCs 细胞及其纯度。培养重复进行 5 次。

**1.2.2 RGCs 的形态学观察** 每天于倒置显微镜下观察活细胞形态,直至 72h 终止培养。分别以两组培养板中央为中心,分别在其上、下、左、右、中五个方向随机选取 5 个显微镜扫描视野框(×400),采集镜下图像,用图像分析系统测量 RGCs 的最长突起长度,每一视野内随机选取 3 个细胞进行测量,结果取均值进行比较。实验重复进行 5 次。

**1.2.3 RGCs 的 GAP-43 Western-blot 检测** 每次实验 rhEPO 组和 DMEM 组均各取 15 个孔的 RGCs 合并后进行 GAP-43 Western-blot 检测,实验重复进行 5 次。将培养 72h 的细胞置冰浴 2mL 匀浆器中,加组织裂解液 600μL,反复匀浆 30min,4℃ 离心 14 000g×15min,将上清移入 Eppendorf 管中,即为总蛋白,用于实验。将 BCA 法蛋白定量试剂盒中的 A 液和 B 液按 50:1 的体积比混合配制 BCA 工作液。将试剂盒中的标准蛋白(0.5mg/mL)按 0,1,2,4,8,12,16,20μL 分别加入到 96 孔板中,配制蛋白标准品。各孔加入 200μL BCA 工作液,混匀,4℃ 放置 30min。室温下用酶标仪测定各孔在 570nm 波长的吸光值(A)得出标准曲线,得出各组蛋白的浓度。进行 SDS-PAGE 电泳。分别取各组蛋白加 6×SDS 凝胶加样缓冲液,混匀后置 100℃ 沸水中煮沸 5~10min,短暂离心,上样,每泳道加入各样品的蛋白总量均为相同(200μg),进行电泳后,取下凝胶在电转液中平衡 15min 后,与 PVDF 膜在半干转印仪中 5mA/cm<sup>2</sup> 恒流转膜约 1h,电压 13~15V。TBST 洗膜 3 次,封闭,加用 TBST 封闭液 1:500 稀释的一抗(兔抗大鼠 GAP-43 单克隆抗体)至保鲜袋,室温振荡孵育 2h 后,4℃ 孵育过夜;TBST 洗膜 3 次;加入 1:1000 稀释的二抗工作液,37℃ 振荡 1h;TBST 振荡洗膜 3 次。将化学发光试剂盒中的 A 液和 B 液等体积混合,均匀地铺在 PVDF 膜上,用凝胶成像系统显影。以 Scion 凝胶分析软件测量每个目的条带的蛋白表达灰度值。

统计学分析:数据结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组数值比较使用 SPSS 11.0 统计软件,进行 *t* 检验, $P < 0.05$  为有统计学差异。

## 2 结果

**2.1 培养 RGCs 的鉴定结果** 应用小鼠抗大鼠 Thy1.1 单克隆抗体对培养 72h 的细胞行免疫细胞化学染色,进行 RGCs 鉴定。显示棕黄色染色的细胞为 RGCs。分别在每个标本的上、下、左、右、中五个方向随机选取 5 个显微镜下视野进行细胞计数,表明 RGCs 纯度达到 90% 以上。

**2.2 培养 RGCs 的形态学观察** 倒置显微镜下观察,经消化所获得的细胞在培养板内 4~6h 开始贴壁,24h 后细胞基本完全贴壁,呈单层排列,部分细胞聚集成团,细胞呈圆形或椭圆形,核圆且相对透明,少数细胞膜上伸出短而小的突起,48h 后细胞体积较前增大,伸出突起细胞增多;72h 细胞胞体继续增大,突起变长,形成典型的细胞突起,细胞间突起相互连接(图 1)。rhEPO 组的细胞胞体更大,突起更长(图 2)。使用图像分析系统对两组 RGCs 的最长突起长度进行测量和比较,rhEPO 组明显长于 DMEM 组(表 1),差异有统计学意义( $t = 24.498, P < 0.05$ )。

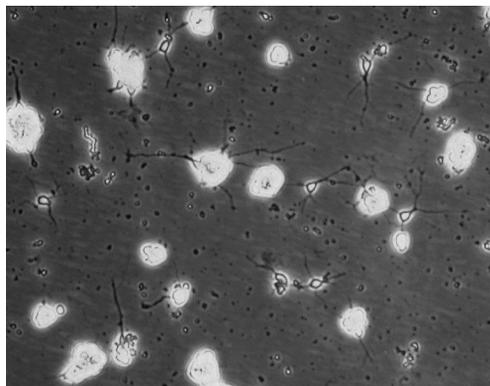


图1 DMEM组培养3d的RGCs(x400)。

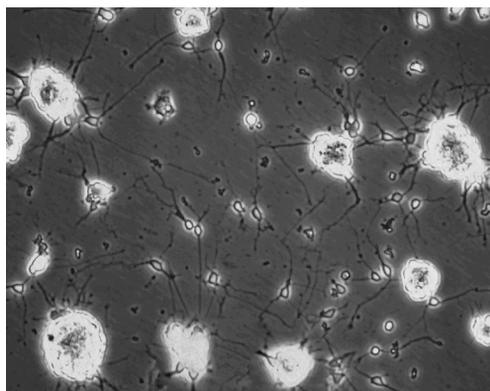


图2 rhEPO组培养3d的RGCs(x400)。

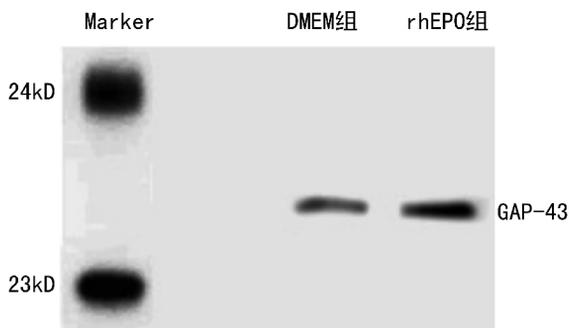


图3 培养3d的RGCs GAP-43 Western-blot检测。

表1 两组培养72h的RGCs最长突起长度比较( $\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$ )

分组	细胞数	RGCs最长突起长度
rhEPO组	75	75.50±5.13
DMEM组	75	54.92±5.16

表2 两组培养72h的RGCs表达GAP-43的灰度值比较( $\bar{x} \pm s$ )

分组	标本数	灰度值
rhEPO组	5	178.87±2.83
DMEM组	5	158.42±4.27

**2.3 培养RGCs的GAP-43蛋白表达水平** 培养72h的RGCs行GAP-43 Western-blot检测,DMEM组GAP-43呈阳性表达,rhEPO组表达水平明显上升,呈强阳性表达(图3)。图像分析系统对两组标本的目的条带进行灰度值测量,显示rhEPO组GAP-43蛋白表达明显高于DMEM组(表2),两组差异有统计学意义( $t=8.933, P<0.05$ )。

### 3 讨论

许多眼病都与RGCs的功能障碍有关,如青光眼、视

神经挫伤、视网膜变性、糖尿病性视网膜病变、视网膜中央动脉阻塞等,RGCs的进行性死亡是这些疾病发展到最后的必经之路,常导致视功能不可逆性损害。如何能够促进和诱发损伤的RGCs修复和再生,从而使视神经功能恢复是目前研究的热点。近年来的研究表明,EPO促进神经系统生长发育的能力并不亚于其促进红系前体细胞生长发育的作用<sup>[4]</sup>。EPO基因以组织特异性的方式表达,主要受缺氧诱导因子1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)的调节,缺氧可以诱导EPO和EPOR表达增加,提示EPO在中枢神经系统可能作为一种神经营养因子和神经保护因子,特别是在神经损伤的情况下,如缺氧、缺血或大脑出血等<sup>[5]</sup>。视神经作为中枢神经系统的一部分,在其发生损伤时,也可能有EPO的神经保护作用参与。Dreixler等<sup>[2]</sup>在成年大鼠视网膜缺血再灌注损伤动物模型中发现,急性视网膜缺血可诱导大鼠视网膜中EPO及其受体表达明显增高。这些均提示我们,EPO作为一种已经在临床其他领域使用的耐受性良好的药物,由于其具有神经保护作用,有可能作为神经保护药物在眼科领域应用。

神经受损后修复再生的首要条件是神经元的存活,神经保护治疗的一个主要目标就是阻止神经元凋亡<sup>[6]</sup>。正常生理条件下,EPO具有促使神经元增生、肥大、树突增多、功能增强、分化良好等一系列营养作用<sup>[7]</sup>。RGCs作为一种神经元细胞,我们推测EPO对其生长发育也可能有类似的影响。Weishaupt等<sup>[8]</sup>使用单核细胞直接细胞毒性染色法对培养的RGCs进行计数,发现rhEPO可明显增加被剥夺了神经营养因子的RGCs的存活数量。在低于0.6U/mL的浓度时,rhEPO对RGCs的保护作用有明显的剂量依赖关系,超过0.6U/mL的浓度后RGCs的存活数量不再增加,但是随着浓度的增加并未发现rhEPO对RGCs有毒性作用。该实验不仅证实了rhEPO有促进RGCs存活的作用,这种作用是不依赖于任何一种神经营养因子的,而且从侧面说明了rhEPO应用的安全性。在本研究中,我们利用了0.6U/mL这个浓度,但我们更深入的研究了在此浓度下rhEPO对RGCs的最长突起生长的影响,为以后进一步研究rhEPO对视神经损伤后的轴突再生的影响提供基础。我们的研究表明,培养液中加入0.6U/mL rhEPO能够促进体外培养的RGCs及其轴突的生长,在培养72h的细胞已经出现比较明显的作用,rhEPO能使RGCs的突起生长得更长。

GAP-43是一种在神经生长、发育和塑性过程中起着重要作用的跨膜蛋白。在神经元的发育过程中,GAP-43的表达较高,但随着神经发育的完成,大多数神经元上的GAP-43都大幅度下降。在成年的视网膜上,GAP-43 mRNA在内丛状层的固有层表达。在缺血的大鼠脑组织中可以见到增高的GAP-43的表达<sup>[9]</sup>。因此,在损伤的中枢神经系统修复过程中,高的GAP-43表达可能起着重要的作用。GAP-43作为一种神经元特异性蛋白,其基因表达仅限于神经系统<sup>[10]</sup>,周围神经和中枢神经损伤后,GAP-43的表达增加,GAP-43可作为神经再生的标志<sup>[11]</sup>。在我们的研究中,加入rhEPO培养的RGCs能够

产生更多量的 GAP-43 蛋白,从而进一步证实了 rhEPO 对 RGCs 不仅有保护作用,更主要的是具有促进 RGCs 生长发育的作用。

在本研究中,我们证实了 rhEPO 具有促进体外培养的 RGCs 及其轴突生长的作用,这种作用是不依赖于任何一种神经营养因子的,同时 rhEPO 能够上调培养的 RGCs 产生 GAP-43 蛋白,由此我们推测, rhEPO 促进 RGCs 及其轴突生长的作用也可能通过 GAP-43 的产生来实现,但是两者之间连接的作用机制尚不明确,为我们进一步在视神经损伤修复方面的研究提供基础。

#### 参考文献

- 1 Jelkmann W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev* 1992;72:449-489
- 2 Dreixler JC, Hagevik S, Hemmert JW, et al. Involvement of erythropoietin in retinal ischemic preconditioning. *Anesthesiology* 2009; 110(4):774-780
- 3 袁容娣,贺翔鸽,叶剑,等. 睫状神经营养因子对培养大鼠视网膜神经节细胞的影响. *中华眼底病杂志* 2002;18(4):283-285
- 4 Alnaeeli M, Wang L, Piknova B, et al. Erythropoietin in brain development and beyond. *Anat Res Int* 2012;2012:953264

- 5 Zhang Y, Xiong Y, Mahmood A, et al. Therapeutic effects of erythropoietin on histological and functional outcomes following traumatic brain injury in rats are independent of hematocrit. *Brain Res* 2009;1294:153-164
- 6 李耀宇,游思维,苏国辉,等. 视神经损伤后节细胞的保护和神经修复的研究进展. *中华眼科杂志* 2004;40(2):141-144
- 7 Grasso G, Sfacteria A, Meli F, et al. Neuroprotection by erythropoietin administration after experimental traumatic brain injury. *Brain Res* 2007;1182:99-105
- 8 Weishaupt JH, Rohde G, Polking E, et al. Effect of erythropoietin axotomy - induced apoptosis in rat tetalinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sic* 2004;45(5):1514-1535
- 9 Patkar S, Tate R, Modo M, et al. Conditionally immortalised neural stem cells promote functional recovery and brain plasticity after transient focal cerebral ischaemia in mice. *Stem Cell Res* 2012;8(1):14-25
- 10 John BD. Molecular Mechanisms, Biological Actions, and Neuropharmacology of the Growth - Associated Protein GAP - 43. *Curr Neuropharmacol* 2006;4(4):293-304
- 11 Perrone-Bizzozero NI, Sower AC, Bird ED, et al. Levels of the growth - associated protein GAP - 43 are selectively increased in association cortices in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(24):14182-14187

## 好消息—《国际眼科杂志》英文版被 PubMed 和 PubMed Central 收录

本刊讯 《国际眼科杂志》英文版 International Journal of Ophthalmology 于 2011-01 申请 PMC,经过极为严格的科学评审和技术评审,于 2011-12-02 通过评审并于 2012-05-03 被 PubMed 和 PMC 正式收录。这是《国际眼科杂志》英文版继 2010-09 被 SCI Expanded 收录后又被另一国际权威数据库收录,这对本刊英文版的发展具有重大意义。

PubMed 和 PubMed Central(PMC)是美国国立医学图书馆(NLM)国家生物技术信息中心(NCBI)开发和维的生物医学与生命科学期刊文献免费数据库。PubMed 是一种免费的搜索引擎,提供生物医学方面的论文搜寻及摘要,但不包括期刊论文的全文,其数据库来源为 Medline。PMC 是由 NLM 下属的 NCBI 创立的开放存取(OA)的生物医学和生命科学全文数据库,并在全球范围内免费提供使用。PubMed 和 PMC 的关系:两者都是 NLM 建立的数据库,其中 PubMed 是一个基于互联网的文献检索系统,它收录了几千种生物医学和生命科学期刊的目次和文摘,该数据库提供与 PMC 全文的链接以及与数千种期刊网站的链接。而 PMC 是免费生物医学和生命科学电子期刊全文数据库,目前收录 400 余种期刊,数量还在不断增加。PMC 所有论文在 PubMed 中都有相应的记录。

IJO 编辑部