

· 葡萄膜炎研究 ·

视网膜 S 抗原的制备和提纯方法的改进

原莉莉 郑曰忠 林锦镛

【关键词】 葡萄膜炎/免疫学； 视网膜/免疫学，抗原/分离和提纯； 疾病模型，动物；
免疫学试验； 动物实验替代试验

中图分类号：R773 R446.49

实验性自身免疫性葡萄膜炎(EAU)是由 CD₄⁺T 淋巴细胞介导的器官特异性炎症,可由多种视网膜蛋白诱发,主要有视网膜可溶性抗原(S-Ag)、光感受器间维生素 A 类结合蛋白(IRBP)和视紫红质等,其中以 S 抗原诱发的葡萄膜炎更具有临床意义^[1]。由于 S 抗原所致葡萄膜炎的活性与其纯度呈正相关,所以 S 抗原的纯化尤为重要。我们将 Al-Mahdawi 等^[2]的方法进行改进简化,获得了较高纯度的牛视网膜 S 抗原,并免疫 Lewis 大鼠成功地复制出 EAU 模型。现将结果报告如下。

1 材料和方法

冰浴下暗室解剖新鲜牛眼,沿角膜缘环形切开眼球,挤出晶状体和玻璃体,用毛笔刷轻取视网膜组织,置于玻璃匀浆器内,加入适量冰冷的低张缓冲液(2.5 mmol/L Tris-HCl, pH 值 7.9),冰浴充分研磨,制成 5% 视网膜匀浆。4℃ 下以离心半径 2 cm、15 000 r/m 离心 60 min,取上清液,磁力搅拌下逐滴加入等体积的饱和硫酸铵溶液(pH 值 7.2)沉淀过夜。4℃ 下以离心半径 2 cm、4 000 r/m 离心 30 min。适量三蒸水溶解沉淀;选用 Sephadex G100 凝胶 40 ml 常规装柱(2.6 cm×16.0 cm),磷酸盐缓冲液(PBS)充分平衡,加样,待样品自然流完,PBS 洗脱(流速 1 ml/min),紫外监测仪(波长 280 nm)监测蛋白洗脱峰,收集经电泳证实含 S 抗原的 A 峰洗脱液。然后用二乙氨基-葡聚糖凝胶(DEAE-sephadex) A50 凝胶 25 ml 装柱(1.2 cm×10 cm),用 5 体积初始洗脱液平衡,加样,0~0.3 mol/L NaCl 梯度洗脱(流速 0.5 ml/min),紫外监测仪检测,收集经电泳证实为 S 抗原的 B 峰洗脱液。应用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳(Tris-甘氨酸, pH 值 8.0),考马斯亮蓝染色,计算蛋白分子量。收集 S 抗原的洗脱液,移入透析袋,用聚乙二醇-6000 浓缩,用 Bradford 法^[3]测定总蛋白浓度,计算 S 抗原含量。调整 S 抗原浓度为 1 mg/ml, -20℃ 冻存备用。

应用 6~8 周龄的雌性 Lewis 大鼠 14 只(160~180 g,北京维通利华实验动物有限公司提供)观测视网膜 S 抗原的活性。取新制备的牛视网膜 S 抗原(1 mg/ml)与完全福佐剂(含卡介苗 2.5 mg/ml)按 1:1 体积比充分乳化,取 200 μl(含 S 抗原 100 μg)注射于 10 只 Lewis 大鼠(实验组)双后足垫,同时腹腔

注射百日咳杆菌原液(10¹⁰个/ml)100 μl;免疫后第 7 天尾静脉追加 S 抗原 50 μl(含 S 抗原 50 μg)。另 4 只大鼠为对照组,用 PBS 注射免疫 Lewis 大鼠。免疫后每日用裂隙灯显微镜和检眼镜观察眼部改变,第 21 天处死动物,取眼球用福尔马林溶液固定,常规病理切片,苏木素-伊红染色,光学显微镜观察。

2 结果

视网膜匀浆内含有十多种蛋白,硫酸铵盐析后可除去大部分杂蛋白,使 S 抗原比例增加。经分子筛和离子交换两步层析洗脱,使 S 抗原在洗脱液浓度为 0.09~0.17 mol/L 时被洗脱,分离效果较好。经 SDS-PAGE 电泳发现经两步层析后,显示为单一蛋白条带,相对分子质量约为 53×10³。经 Bradford 法^[3]定量测定视网膜匀浆的蛋白含量约为 5.0 mg/ml,其中 S 抗原占 5%~7%。

实验组所有大鼠在免疫后第 9~12 天出现 EAU 改变,表现为结膜充血,角膜水肿,房水絮状混浊,虹膜血管扩张,玻璃体尘埃状混浊。眼底可见视网膜水肿,沿血管分布的点片状出血,其中 1 只眼出现渗出性视网膜脱离。组织学表现为全葡萄膜炎病理改变,如前房纤维渗出,玻璃体腔大量炎性细胞聚集,视网膜水肿增厚,视网膜下大量蛋白渗出液,炎性细胞聚集,视网膜血管炎症,光感受器细胞排列紊乱、断裂或消失。对照组大鼠无一发病。

3 讨论

葡萄膜炎是临床上常见的一组慢性复发性致盲眼病,其发病可能与眼部自身抗原引起的自身免疫反应有关^[4]。EAU 与人类内因性葡萄膜炎的病理特征相似,是研究葡萄膜炎发病机制及治疗葡萄膜炎的常用模型;EAU 可由多种视网膜抗原诱发,但由 S 抗原诱发的更为典型,更有临床意义。自从 1977 年 Wacker 等^[5]首次用硫酸铵沉淀, Sephadex G150 凝胶过滤及离子交换层析成功地分离纯化牛视网膜 S 抗原以来,许多学者进行了深入研究,不断改进和简化提纯方法,获得了牛、兔、猪或猴的 S 抗原,并在不同动物中成功地诱发了 EAU。

目前, S 抗原的提纯方法主要集中于硫酸铵盐析、分子筛及离子交换层析、高效液相色谱法、亲和层析以及等电聚焦制备电泳等,这些方法均具有提纯周期较长,样品易失活,或因技术要求高,成本高而不利于推广及大批量生产。我们对上述方法做了一些改进,选用 Sephadex G100 可同时进行除盐和分子

筛层析,简单省时,具有样品回收率高,单一缓冲液洗脱,无需再生等特点。DEAE-Sephadex A50 分离效果好,交换容量大,重复性强,再生简便,有利于 S 抗原的大批量提取。整个提取过程可在 3 天内完成,有利于保持其生物活性。我们提取的 S 抗原相对分子质量为 53×10^3 ,在视网膜总蛋白中占 5%~7%,与国内外报道相似^[1]。

我们的实验方法可快速高效地制备较高纯度的牛视网膜 S 抗原,并保持有强烈的致 EAU 活性,用 S 抗原诱导 Lewis 大鼠 EAU 模型发病率高,重复性好,临床表现及组织学改变与人类内源性葡萄膜炎相似,这为进一步研究葡萄膜炎的发病机制和治疗提供了重要工具。

4 参考文献

- 1 De Smet MD, Yamamoto JH, Mochizuki M. Cellular immune responses of patients with uveitis to retinal antigens and their fragments. *Am J Ophthalmol*, 1990,110: 135-142.
- 2 Al-Mahdawi S, Forrester JV, Lee WR. A simplified method for the isolation of highly purified bovine retinal S-antigen. *J Neuroimmunol*, 1987,14:99-108.
- 3 陈建苏,李志杰,李辰.快速高效分离纯化牛视网膜 S 抗原. *眼科研究*,1998,16:96-98.
- 4 杨培增,李绍珍,潘苏华.视网膜 S 抗原的提纯及其致葡萄膜炎活性. *中华眼科杂志*,1990,26: 8-10.
- 5 Wacker WB, Donoso LA, Kalsow CM, et al. Experimental allergic uveitis: isolation, characterization, and localization of a soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina. *J Immunol*, 1977,119:1949-1958.

(收稿日期:2005-02-21)

(本文编辑:朱敏)

· 消息 ·

《视网膜色素上皮基础理论与临床》一书出版

由美国南加州大学医学院 Doheny 眼科研究所何世坤教授、北京大学人民医院眼科赵明威教授、北京协和医院眼科陈有信教授合作主编、中国科学院出版基金资助的《视网膜色素上皮基础理论与临床》一书已由中国科学院科学出版社出版。

该书详细介绍了与视网膜色素上皮(RPE)相关的基础理论及临床诊疗进展。其中,基础理论包括 RPE 的生理学、组织胚胎学、解剖学、细胞生物学、分子生物学、药理学、毒理学等;临床诊疗进展包括 RPE 的临床检查及 RPE 相关疾病的发病机制和诊治特点。涉及的疾病包括与 RPE 有关的肿瘤、炎症、变性、物理损伤、增生性玻璃体视网膜病变、老年性黄斑变性等。此外,还专门介绍了 RPE 移植、基因治疗在 RPE 相关眼底病中的最新应用进展。为方便广大研究人员进行此方面研究,本书还特别介绍了与 RPE 有关的实验研究方法。本书适合眼底病专科医师、眼科研究人员、研究生阅读;对于相关的细胞生物学及分子生物学等领域的基础研究人员也有一定参考价值。

读者可到当地新华书店购买或向科学出版社邮购,联系地址:北京东黄城根北街 16 号,邮政编码:100717。购书热线:010-64000246,64034558,64017892。

《黄斑部疾病显微手术学》一书即将出版

由中山大学中山眼科中心唐仕波教授主编,德国、美国及广州、北京、上海、西安等地玻璃体视网膜疾病研究领域著名专家教授参编的《黄斑部疾病显微手术学》一书,将于 2005 年 12 月由人民卫生出版社正式出版发行。

该书分上、中、下三篇,共计 60 余万字,插图 500 多幅。该书系统论述了黄斑部疾病的临床检查、诊断、治疗及相关基础研究领域的最新进展,重点介绍了黄斑部疾病手术治疗的适应证、手术方法及相关并发症的处理;汇集了众多国内外黄斑部疾病相关研究的临床经验与研究成果,尤其是展示了不少我国自己的具体临床资料,图文并茂,均弥足珍贵。是国内该领域出版发行的首部专著,适合眼底病以及相关专业的临床医生、科研人员、研究生阅读。相信该书将以高水平的学术价值和印刷质量,为推动我国黄斑部疾病显微手术的开展以及相关领域的学术研究水平的提高发挥重要作用。

读者可在当地新华书店购买或向人民卫生出版社邮购,联系电话:010-67616688 转 216 或 010-67605754;广州购书电话:020-87330485。