

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00934

## 视神经慢性损伤相关差异表达 cDNA 文库的鉴定与分析

吕立权,楼美清,董艳,蔡如珏,胡国汉,骆纯,侯立军,卢亦成\*

第二军医大学长征医院神经外科,上海市神经外科研究所,上海 200003

**[摘要]** 目的:对构建的猫视神经慢性损伤相关差异表达 cDNA 文库进行初步克隆、鉴定和分析。方法:用氯化钙转化法转化大肠杆菌进行 cDNA 文库扩增和蓝白斑筛选,每个文库随机挑取 300 个白色克隆用菌落 PCR 进行鉴定。对阳性克隆菌落进行 DNA 测序以获得差异表达基因片段序列。将测序所得的序列通过互联网用 Blast 程序查找日本国家 DNA 数据库进行同源性分析。用实时定量 PCR 验证差异克隆。结果:PCR 鉴定获得 1 000 个阳性菌落,测序获得 674 个 EST 片段,序列长度在 200~800 bp 之间。同源性分析结果提示 4 周正向文库得到 14 个同源基因,4 周反向文库得到 20 个同源基因,8 周正向文库得到 23 个同源基因,8 周反向文库得到 19 个同源基因。这些基因可归类于能量代谢、物质转运、信号转导、基因转录、细胞损伤与修复、MHC 分子等。实时定量 PCR 检测的 4 个克隆证实是差异表达序列。结论:本研究构建的视神经慢性损伤相关差异表达 cDNA 文库为进一步鉴定和研究慢性视神经损伤相关基因提供了实验基础。

**[关键词]** 慢性视神经损伤;cDNA 文库;基因表达

**[中图分类号]** R 774.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)08-0934-06

### Identification and analysis of subtracted cDNA library of differentially expressed genes associated with chronic optic nerve injury

LÜ Li-quan, LOU Mei-qing, DONG Yan, CAI Ru-jue, HU Guo-han, LUO Chun, HOU Li-jun, LU Yi-cheng\*

Department of Neurosurgery, Changzheng Hospital, Shanghai Institute of Neurosurgery, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

**[ABSTRACT]** **Objective:** To clone, identify and analyze subtractive cDNA libraries of differentially expressed genes associated with chronic optic nerve compression in cats. **Methods:** The constructed cDNA libraries were amplified by *E. coli* transformation with calcium chloride and were subjected to blue and white screening. Three hundred positive bacterial clones were randomly chosen from each library and were identified by colony PCR. The positive clones were sequenced to screen for the differentially expressed genes. The identified sequences were then analyzed for homology using Blast program against the DNA database bank of Japanese through internet. Real-time PCR was performed to verify the expression of the 4 differential clones. **Results:** One thousand positive clones were identified by PCR and 674 ESTs were obtained by sequencing, with length ranging from 200 to 800bp. Results from Blast analysis revealed 14, 20, 23 and 19 homolog genes in 4-w forward, 4-w reverse, 8-w forward and 8-w reverse subtractive libraries, respectively. These genes fell into several functional groups, such as energy and metabolism, ion transport, gene transcription, signal transduction, cellular injury and repair, and MHC molecules. Result of real-time PCR verified that the 4 clones were differentially expressed. **Conclusion:** The constructed subtractive cDNA libraries lay an experimental basis for further identification and study of the differentially expressed genes related to chronic optic nerve injury.

**[KEY WORDS]** chronic optic nerve injury;cDNA library;gene expression

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(8):934-939]

累及视路的占位病变对视神经或视交叉造成的慢性压迫损伤是神经外科和眼科的常见疾病,主要见于垂体腺瘤、颅咽管瘤、鞍结节脑膜瘤、蝶骨嵴内侧脑膜瘤和眶内肿瘤等。不断增大的瘤体直接压迫

视神经或视交叉,导致视力或视野的逐步丧失。虽然早期切除占位病变后,患者的视力视野可有不同程度的恢复,但是仍有不少患者的视觉功能得不到良好恢复,严重影响了患者的生活质量。为了深入

**[收稿日期]** 2008-01-08 **[接受日期]** 2008-06-14

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30271333). Supported by National Natural Science Foundation of China(30271333).

**[作者简介]** 吕立权,博士,讲师、主治医师. E-mail:lvliquan@yahoo.com.cn

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-63610109-73361, E-mail:lycheng@sh163.com

研究慢性视神经损伤的机制, 探索有效的神经保护措施和促进视神经再生的方法, 我们实验室采用球囊植入法成功地建立了慢性视神经压迫损伤模型<sup>[1]</sup>。在前期研究中, 我们利用抑制消减杂交 (suppression subtractive hybridization, SSH) 技术成功构建了视神经慢性受压后差异表达基因文库, 分别得到视神经受压后 4 周和 8 周的正反相文库<sup>[2]</sup>。本实验利用分子生物学技术结合生物信息学技术对文库进行了初步克隆、鉴定和分析, 旨在为进一步阐明慢性视神经损伤的分子机制创造条件。

## 1 材料和方法

1.1 消减 cDNA 文库的构建 取成年健康家猫 15 只, 雌雄不限, 体质量 2.5~3.5 kg。随机平均分为 3 组, 即正常组、压迫 4 周组和压迫 8 周组。采用球囊植入法制作猫慢性视神经损伤模型<sup>[1]</sup>, 利用抑制消减杂交技术构建视神经慢性损伤相关差异表达基因消减 cDNA 文库<sup>[3-4]</sup>, 分别得到视神经受压后 4 周和 8 周的正反相文库<sup>[2]</sup>。

1.2 消减 cDNA 文库的扩增及鉴定 取前期研究中构建好的消减 cDNA 文库中的连接质粒 10  $\mu$ l 与感受态细菌 DH5 $\alpha$  混匀, 用氯化钙法将质粒导入大肠杆菌。取 150  $\mu$ l 细菌培养液均匀涂布于含 X-gal/IPTG 的氨苄西林琼脂培养板上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。待菌落显色完全, 随机挑取 50 个白色菌落接种到 LB/Amp 液体培养基中, 250 次/min 摇菌 8 h; 重复上述操作, 再次转化感受态细胞, 随机挑取 50 个白色菌落, 直至每个库得到 300 个菌落为止。各取 1  $\mu$ l 菌液用巢式引物进行 PCR 扩增, 产物用 2% 琼脂糖/EB 凝胶电泳进行鉴定。

1.3 DNA 测序 将含有差异表达插入片段的菌液解冻, 取 100  $\mu$ l 加入到 1.2 ml LB/Amp 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C 摇菌 8 h, 送测序公司用 3700 测序仪测序。

1.4 EST 同源性分析 将测序所得的序列通过互联网用 Blastn2.2 程序查找日本国家 DNA 数据库 (DNA Data Bank of Japan, DDBJ) 进行同源性分析。通过 PubMed 和 KEGG 数据库对同源基因进行初步分类和分析。

1.5 实时定量 PCR 验证阳性克隆 从差减文库中选取 4 个阳性克隆用实时定量 PCR 进行验证。以 G3PDH 为内参照, 根据目的基因序列用 Primer 5 设计引物并合成。按照 SYBR ExScript RT-PCR 试剂盒 (TaKaRa 公司) 说明书进行实时定量 PCR 反应, 实验结果利用软件 Rotor-Gene 6.0 以及 Excel 7.0 进行数据分析处理。

## 2 结果

2.1 文库鉴定结果 对 4 个文库共 1 200 个白斑细菌进行 PCR 扩增, 电泳结果显示共得到 1 000 个目的片段, 经 PCR 扩增得到的目的片段相对分子质量分布在 200~800 bp 范围内, 与文献<sup>[5]</sup>报道结果一致 (图 1)。

图 1 消减文库 PCR 扩增结果

Fig 1 PCR results of subtractive libraries

A: PCR results of 4-w forward subtractive libraries; B: PCR results of 4-w reverse subtractive libraries; C: PCR results of 8-w forward subtractive libraries; D: PCR results of 8-w reverse subtractive libraries

2.2 测序和序列同源性分析结果 共对 769 个克隆进行了测序, 得到 674 个 EST 片段, 序列长度在 200~800 bp 之间。根据 Blast 查询结果, 以  $E \leq 10^{-4}$  为判定标准, 得到: 4 周正向文库 14 个同源基因, 4 周反向文库 20 个同源基因, 8 周正向文库 23 个同源基因, 8 周反向文库 19 个同源基因。这些基因可归类于能量代谢、物质转运、信号转导、基因转录、损伤与修复、MHC 分子等 (表 1~4)。

2.3 实时定量 PCR 验证结果 从差减文库中选择了 4 个阳性克隆, B2、C238、D41、D211, 用实时定量 PCR 进行验证。根据这 4 个阳性克隆序列和内参基因 G3PDH 设计了引物 (表 5)。

实时定量 PCR 结果表明克隆 B2 和 D41 在受压 4 周组表达下调, 在受压 8 周组表达上调, 克隆 C238 在

受压4周组和8周组表达均下调,克隆D211在受压4周组和8周组表达均上调,与SSH结果相符(表6)。

表1 4周正向差减文库序列同源性分析结果

Tab 1 Result of homology analysis of 4-w forward subtracted ESTs

Categorization	Clone number	Homologous gene	Accession number
Energy and metabolism	A17	Squalene epoxidase	D78130
	A43	16S ribosomal RNA	AY011183
	A52	Tyrosine aminotransferase	AF163863
	A55	PTS gene for 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase	AB042297
Cytoskeleton	A45	Muscle actin	AF483014
Stress	A33	Alpha-crystallin-related protein	AB047592
Substance transport	A10	Solute carrier family 2	AJ715983
Nutrition factor	A56	Survival of motor neuron	AF503618
Immunity molecule	A6	BAT1 homolog	AF075691
	A41	CD80	AY007703
Miscellaneous	A13	HMGIC fusion partner-like 2	AY309920
	A19	LINE-1 element ORF2	AB012223
	A26	AT2 gene	AJ566903
	A61	PKP4	AC005042

表2 8周正向差减文库序列同源性分析结果

Tab 2 Result of homology analysis of 8-w forward subtracted ESTs

Categorization	Clone number	Homologous gene	Accession number
Energy and metabolism	D7	Urocanase domain containing 1	BC033269
	D31	NADH dehydrogenase subunit 5	U20753
	D37	ATPase 6	U20753
	D41	NADH4	AY634402
	D47	Cytb gene for cytochrome b	AB194815
	D50	Cytochrome c oxidase subunit I	U20753
	D65	NADH dehydrogenase subunit 3	U20753
	D63	16S ribosomal RNA	U20753
	D72	Hydroxysteroid (17-β) dehydrogenase 3	AY341031
	D85	UDP-glucuronosyltransferase mRNA	AF039138
	D94	LIPA gene	X75491
	D155	Indolethylamine N-methyltransferase	AF128847
	D254	Apolipoprotein D	J02611
	Cell injury	D211	Calpain-like protease
Signal transduction	D187	Titin	X90569
	D296	Phospholipase D2	AF033850
Cytoskeleton	D45	Beta-actin	X00351
Nucleus encoding protein	D83	Sumiko	AF026274
Nutrition factor	D33	Survival of motor neuron	AF503618
Transcription factor	D148	Zinc finger protein 281	BC060820
	D306	Elf-1 related protein	AF000670
	D46	LINE-1 element ORF2	AB012223
Miscellaneous	D53	BPAG1-like gene	AF293449

表 3 4 周反向差减文库序列同源性分析结果

Tab 3 Result of homology analysis of 4-w reverse subtracted ESTs

Categorization	Clone number	Homologous gene	Accession number
Energy and metabolism	B2	Cytochrome c oxidase subunit I	AY672098
	B74	ATPase 6	U20753
	B65	NADH dehydrogenase subunit 4	AY634402
	B77	TrpB gene	AJ749797
	B129	NADH dehydrogenase subunit 2	AY634390
	B166	12S ribosomal RNA gene	AY012149
	B223	GMDS gene for GDP-mannose 4,6-dehydratase	AL033517
	Substance transport	B127	Oxysterol binding protein 2
B318		Melanophilin gene	AJ920047
Receptor	B56	Interleukin 22 receptor, alpha 2	AY779023
Signal transduction	B30	Sorting nexin 5	BC093980
	B73	Agouti signaling protein	AY237394
	B92	Inositol polyphosphate 4-phosphatase type II -alpha	U96922.1
Injury and repair	B58	Methionine sulfoxide reductase	AY958432
Cell cycle	B158	p27Kip1 gene	AB083336
Miscellaneous	B15	PRP39 pre-mRNA processing factor 39 homolog	BC051886
	B27	Tubby like protein 1	AF105711
	B85	LKP serotype 4 pilin	U19761
	B138	FLJ31810 clone RP11-301H18	AL592206
	B144	FLJ32721 fis	AK057283

表 4 8 周反向差减文库序列同源性分析结果

Tab 4 Result of homology analysis of 8-w reverse subtracted ESTs

Categorization	Clone number	Homologous gene	Accession number
Metabolism	C7	Squalene epoxidase	D78130
Signal transduction	C190	Mixed lineage kinase-related kinase MRK-alpha	AF480461
Gene transcription	C23	REV3-like, catalytic subunit of DNA polymerase zeta (REV3L)	AY684169
Injury and repair	C49	Nitric oxide synthase 1 (neuronal)	AY445095
	C60	Alpha-crystallin-related protein	AB047592
	C128	Heat shock cognate (hsc70)	L77146
	C198	RAD18 homolog (RAD18)	AY961989
	Substance transport	C17	Solute carrier family 2
C41		Sec61 alpha 2 subunit	BC026179
C68		Monocarboxylate transporter 2 (MCT2)	U62316
C88		Vacuolar H <sup>+</sup> ATPase d2 subunit (ATP6V0D2)	AY079172
C238		Potassium-dependent Na/Ca exchanger NCKX3 (SLC24A3)	AF288087
MHC molecule	C57	MHC class I DLA-53 gene	U55029
Cell proliferation	C113	Growth hormone receptor (GHR) gene	AY928727
Miscellaneous	C9	Trypsinogen	AB182970
	C43	mRNA for KIAA1012 protein	AB023229
	C72	hSSH-1B	AB072357
	C56	A stretch regulated skeletal muscle protein	AJ290944
	C80	PTH-responsive osteosarcoma B1 protein	AF095771

表 5 目的基因和内参基因的引物序列

Tab 5 Primer sequences of the target and reference genes analyzed by PCR

Clone	Primer sequence(5'-3')	PCR product size(bp)
B2	5'-TAA TTG GAG GGT TCG GAA ACT G-3' 5'-GAG TAG AAA GGA TGG AGG GAG GA-3'	113
C238	5'-ACC TTG GGA ACC GCA GAA-3' 5'-GAG CAG TGA TTG GCA GCA AC-3'	82
D41	5'-ACG AGG CAA ATA CAC ACA CCA C-3' 5'-GGG TTA AGT GAT AGG AGG AGA AGG-3'	109
D211	5'-GCC CTT GAC ATG TGA AAA AGA T-3' 5'-ACC GAT TAG CAG AAT CTG AAG G-3'	104
G3PDH	5'-ATT CCA CCC ACG GCA AA-3' 5'-ACT CCA CAA CAT ACT CAG CAC CA-3'	144

表 6 实时定量 PCR 中各产物的相对浓度

Tab 6 Relative concentrations of the real-time PCR products

Group	B2/G3PDH	C238/G3PDH	D41/G3PDH	D211/G3PDH
Control	2.420 86×10 <sup>-5</sup>	2.991 82×10 <sup>-5</sup>	2.420 86×10 <sup>-5</sup>	3.425 75×10 <sup>-6</sup>
4-w compression	1.775 15×10 <sup>-5</sup>	1.061 61×10 <sup>-5</sup>	1.775 15×10 <sup>-5</sup>	4.524 90×10 <sup>-6</sup>
8-w compression	2.673 61×10 <sup>-5</sup>	1.609 91×10 <sup>-5</sup>	2.673 61×10 <sup>-5</sup>	6.037 18×10 <sup>-6</sup>

### 3 讨论

我们前期的研究显示视神经慢性受压后视神经损伤、神经元变性和视觉功能障碍是逐渐进展的过程,在此过程中伴随着细胞形态和功能的改变<sup>[1]</sup>。但是有关基因和分子水平的变化尚不清楚,国内外至今尚无慢性视神经受压损伤相关分子机制的研究报道。我们推测慢性视神经损伤同其他中枢神经系统病变一样伴随着一系列基因表达的改变,这种改变既是损伤的结果,又是损伤进展的原因。因此,阐明视神经慢性损伤过程中基因表达变化的规律,进而探索这些基因之间的相互关系及在病变进展中的作用,不仅有助于认识慢性视神经损伤的分子机制,也将为慢性视神经损伤的有效干预和治疗提供有价值的线索。

在前期研究中,我们利用 SSH 技术成功地构建了视神经慢性受压后 4 周和 8 周双向差异表达 cDNA 文库。在本实验中我们对文库进行克隆、大量测序和同源性分析,获得了数十条慢性视神经损伤相关的差异表达基因,并利用生物信息学方法对这些基因进行了初步分析和功能归类。

3.1 慢性视神经损伤和能量代谢障碍 本实验得到与能量和代谢相关的同源基因共 18 个,在这些基因中有一类属于线粒体基因,包括 ND2-ND5、细胞色素 b 亚基(cytochrome b, Cytb)、细胞色素 C 亚单位 I (cytochrome c oxidize subunit I, COX I)、ATP 酶 6(ATPase 6)、16 S RNA 和 12 S RNA。结

果表明在视神经受压后 4 周线粒体基因表达大部分下降,而在受压后 8 周大部分表达上调。这种表达改变的确切原因还不清楚,但肯定与线粒体功能改变或细胞对能量的需求有关,推测在受压后 4 周,视神经轴索和细胞以变性为主,大量线粒体受损,线粒体基因表达下调。而在受压后 8 周,视神经内的大量胶质细胞出现增生激活,对能量的需求增加,线粒体基因表达也随之上调,以增加对细胞的能量供应<sup>[6]</sup>。我们的病理研究结果显示神经纤维和胶质细胞内线粒体在视神经损伤早期就发生变性,与线粒体基因表达下调一致,线粒体损伤将导致细胞能量供应不足,触发一系列的病理生理过程,尤其是离子泵不能充分运转,钠离子内流导致细胞水肿,钙离子内流导致细胞坏死或凋亡。

3.2 细胞损伤与修复 根据生物信息学分析的结果,视神经受压后不同时间有关应激、物质转运和各种酶的表达改变,这些基因许多与细胞损伤与修复有关。Alpha 晶状体球蛋白相关蛋白(alpha-crystallin-related protein)属于小热休克蛋白(small heat shock proteins, sHSPs)家族成员,在细胞内具有非常重要的功能,其核心功能是维持细胞蛋白质组的稳定性,对抗各种内外应激<sup>[7]</sup>。体外研究显示视神经星形细胞在受到静水压后 sHSPs 表达上调,可能参与保持神经丝的完整<sup>[8]</sup>。Alpha 晶状体球蛋白相关蛋白在视神经损伤后 4 周表达上调,反映了细胞内源性的保护作用,而在损伤后 8 周表达下降,表明细胞内源性保护作用是比较短暂的,因此给予

外源性的 sHSPs 以强化这种内源性保护作用可能为慢性视神经损伤提供一种有效的神经保护措施。

Calpain-like protease 是 calpain 的同源分子, 同属于 calpain 家族。Calpain 是一种钙离子依赖的蛋白酶。在体外 calpain 能够裂解超过 100 种蛋白分子, 在体内它们的生理功能也多种多样<sup>[9]</sup>。研究证实 calpain 在视神经高表达。小鼠视神经伸展性损伤后数分钟至数小时轴索内 calpain 一过性激活, 4 d 后再次发现 calpain 介导的蛋白水解, 提示 calpain 早期激活促进轴索内结构的持续损伤, 而延迟的激活可能与轴索降解有关<sup>[10]</sup>。视神经挫伤后给予 calpain 抑制剂能够促进视神经结构的完整, 显著增加轴索和髓鞘完好的纤维数量, 减轻轴索的水肿<sup>[11]</sup>。视神经压迫损伤后 calpain 样蛋白酶表达上调, 可能也参与了细胞骨架丢失、轴索降解和胶质细胞死亡等病理过程。Calpain 抑制剂能否延缓慢性视神经损伤的病理过程、改善预后值得进一步研究。

钠/钙交换子 (Na/Ca exchange) 在神经细胞的钙离子稳定中发挥关键作用。我们克隆的是 NCKX3 同源分子, 在脑组织有广泛的表达<sup>[12]</sup>。视神经损伤后 NCKX3 表达下调, 提示在视神经受压过程中, 除了可能存在的兴奋性氨基酸毒性导致的钙离子内流外, 钙泵出细胞外减少也会进一步加重神经细胞的钙超载, 诱导细胞坏死或凋亡。

**3.3 信号转导分子** 我们的研究结果显示视神经受压后多种与信号转导有关的基因表达发生变化, 其中功能研究比较透彻的是磷脂酶 D2 (phospholipase D2, PLD2)。磷脂酶 D 分为 PLD1 和 PLD2, 目前确定是一种受细胞受体调节的参与信号转导的酶, 控制多种生物学功能, 包括细胞分泌、细胞吞噬、肌动蛋白运动和膜的转运等。哺乳动物 PLD 催化膜磷脂的主要成分卵磷脂 (phosphatidylcholine, PC) 水解成为磷脂酸 (phosphatidic acid, PA) 和胆碱。PLD 被细胞表面受体激活的过程与磷脂酶 C (PLC) 和 PI3K (phosphoinositide 3-kinase) 激活的过程类似, 催化特定的脂质产生第二信使。PLD 的活性产物是 PA, 在许多情况下 PA 具有两个主要的功能: 一个是募集蛋白, 另一个是调节酶的活性, 包括蛋白激酶和脂质激酶。PA 可以激活 PIPK (phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase) 产生 PIP2 (phosphatidylinositol [4, 5] biphosphate), 而 PIP2 自身又能调节 PLD 的活性。因此 PLD 激活将导致一个正反馈的信号放大<sup>[13]</sup>。PLD2 在慢性视神经损伤后表达上调, 可能与多种细胞受体激活有

关, 其病理意义有待进一步研究。

总之, 我们对慢性视神经损伤相关差异表达 cDNA 文库进行的初步克隆和分析显示, 包括能量与代谢、内源性保护因子、损伤修复因子、信号转导分子和基因转录因子等在内的许多基因表达发生了变化, 今后利用基因芯片技术、基因转染技术和 RNA 干扰技术等新的研究手段对这些差异基因进行深入研究, 了解其病理意义, 有可能为阐明慢性视神经损伤的分子机制提供重要信息。

## [参考文献]

- [1] 吕立权, 朱爱红, 楼美清, 蔡如珏, 董艳, 卢亦成. 猫慢性视神经损伤模型的建立及病理学的动态变化[J]. 中华医学杂志, 2006, 86: 2177-2181.
- [2] 吕立权, 楼美清, 董艳, 蔡如珏, 胡国汉, 骆纯, 等. 猫视神经慢性损伤相关差异表达基因消减 cDNA 文库的构建[J]. 第二军医大学学报, 2008, 29: 550-554.
- [3] Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 6025-6030.
- [4] Zuber J, Tchernitsa O I, Hinzmann B, Schmitz A C, Grips M, Hellriegel M, et al. A genome-wide survey of RAS transformation targets[J]. Nat Genet, 2000, 24: 144-152.
- [5] 王顺启, 冯占宁, 刘国红, 王广良, 程华, 王同顺, 等. 应用抑制性消减杂交技术构建人肝癌组织特异表达 cDNA 文库[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2005, 38: 115-118.
- [6] Cottee L J, Daniel C, Loh W S, Harrison B M, Burke W. Remyelination and recovery of conduction in cat optic nerve after demyelination by pressure[J]. Exp Neurol, 2003, 184: 865-877.
- [7] Sun Y, MacRae T H. Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function[J]. Cell Mol Life Sci, 2005, 62: 2460-2476.
- [8] Salvador-Silva M, Ricard C S, Agapova O A, Yang P, Hernandez M R. Expression of small heat shock proteins and intermediate filaments in the human optic nerve head astrocytes exposed to elevated hydrostatic pressure *in vitro* [J]. J Neurosci Res, 2001, 66: 59-73.
- [9] Goll D E, Thompson V F, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system[J]. Physiol Rev, 2003, 83: 731-801.
- [10] Saatman K E, Abai B, Grosvenor A, Vorwerk C K, Smith D H, Meaney D F. Traumatic axonal injury results in biphasic calpain activation and retrograde transport impairment in mice [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2003, 23: 34-42.
- [11] Araújo Couto L, Sampaio Narciso M, Hokoc J N, Blanco Martinez A M. Calpain inhibitor 2 prevents axonal degeneration of opossum optic nerve fibers[J]. J Neurosci Res, 2004, 77: 410-419.
- [12] Lytton J, Li X F, Dong H, Kraev A. K<sup>+</sup>-dependent Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchangers in the brain[J]. Ann N Y Acad Sci, 2002, 976: 382-393.
- [13] Cockcroft S. Signalling roles of mammalian phospholipase D1 and D2[J]. Cell Mol Life Sci, 2001, 58: 1674-1687.

[本文编辑] 尹茶