

正常与患白内障大鼠晶状体中脬溶性 蛋白质性质的研究

商 福* 张家萍 张昌颖

(北京医科大学生生化教研室, 北京 100083)

摘要 本文研究了正常及三种类型白内障大鼠晶状体中脬溶性蛋白质的含量及性质的变化, 发现在每种类型白内障晶状体中, 水溶性蛋白质均减少, 水不溶性蛋白质则都相对增加。经 Sephadex G-200 柱层析及 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳发现, 晶状体中脬溶性蛋白质主要是由二硫键交联而成的高分子聚合物。经巯基乙醇还原后, 绝大部分高分子聚合物可分解成低分子量蛋白质, 其分子量与水溶性的 γ 晶体蛋白相同。这提示晶状体中脬溶性蛋白质的主要成分很可能是以二硫键交联而成的 γ 晶体蛋白聚合物。此结果与本实验室所得白内障晶状体水溶性蛋白质的变化相吻合。

关键词: 白内障; 脬溶性蛋白质; 二硫键

晶状体中的蛋白质浓度特别高, 在人的晶状体中的蛋白质含量高达35%; 有些动物晶状体中的蛋白质含量更高。根据其溶解性, 晶状体中的蛋白质可分为水溶性及水不溶性两部分, 后者又进一步分为脬溶性及脬不溶性的。现有资料表明, 在人的多种类型白内障及实验动物白内障晶状体中, 水溶性蛋白质减少, 而水不溶性蛋白质增多^[1-4]许多学者认为: 晶状体中水不溶性蛋白质的形成是导致白内障的主要原因。多年来, 人们对晶状体中脬溶性蛋白质的来源和形成机理进行了广泛研究, 但由于所用方法及实验动物不同所得结果也不尽一致^[5-9]。本文以亚硒酸钠, 平阳霉素及半乳糖诱发的大鼠白内障为模型, 对每种白内障晶状体中脬溶性蛋白质的含量及性质变化以及其来源和形成机理进行了研究。

材 料 与 方 法

一、动物 北京医科大学实验动物部提供的 Wistar 大鼠。

二、试剂 实验中所用亚硒酸钠是北京化工厂生产 (cp), 平阳霉素是天津河北制药厂生产, 半乳糖是上海试剂二厂产品, Sephadex G-200 为 Pharmacia 公司产品, 三羟甲基氨基

* 现在北京市眼科研究所工作

收稿日期: 1990-05-10, 修回日期: 1990-07-10

甲烷是 Fluka 公司产品, 其它试剂均为国产分析纯级。

三、白内障模型的诱发方法 见作者前文^[10]。实验中所用白内障晶状体均系完全混浊的。

四、晶状体水分含量的测定 取正常及白内障晶状体在湿润滤纸上吸去表面附着的房水, 将4个晶状体一起放入恒重的小烧杯中即刻称重, 然后于105℃烘干至恒重再称其重量, 烘干前后重量之差即为晶状体水分含量。

五、晶状体中不同溶解性蛋白质的分离 按 Broekhuysse 等人的方法^[11]进行。蛋白质含量按 Bradford 的方法^[12]测定。

六、尿溶性蛋白质 Sephadex G-200 柱层析 将 Sephadex G-200 (细型) 用蒸馏水溶胀后用洗脱液 (pH8.0 含 7mol/L 尿素及 3mmol/L 巯基乙醇的 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液) 平衡 24 h; 真空抽气后装入 2.6×60cm 层析柱中并冲洗过夜。将 3mL 蛋白质溶液加到柱顶端后用洗脱液洗脱, 其速度为 10mL/h, 每管收集 5mL, 并用紫外线检测仪记录洗脱曲线。以上操作均在室温中进行。

七、SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 参照 Weber 等人的方法^[13]进行。取二份尿溶性蛋白质溶液, 一份加等体积不含巯基乙醇的样品处理液 (pH8.0 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液, 内含 2% SDS 及 25% 蔗糖), 另一份加入等体积含 2% 巯基乙醇的样品处理液, 在 100℃ 加热 10 min, 冷却后一同进行电泳。所用分子量标准为磷酸化酶 b(94kD), 牛血清清蛋白 (67kD), 卵清蛋白 (43kD), 碳酸酐酶 (30kD), 胰蛋白酶抑制物 (20kD), 及乳清蛋白 (14kD)。

结 果

一、晶状体中水分含量的变化

晶状体中水分含量列于 Table 1。从表中数据可以看出, 三种类型白内障晶状体中水分含量均高于正常晶状体中的, 其中用半乳糖诱发的增加幅度最大, 平阳霉素诱发的次之, 亚硒酸钠诱发的最小。

Table 1 Water content in rat lenses of normal and different cataracts

Kind of cataracts		age of rat (day)	water content (mg/100 mg lens)
cataract induced	normal	25	64.06±1.41 (5)
by selenite	cataract	25	68.22±3.41 (5) *
cataract induced	normal	20	68.16±4.84 (5)
by pingyangmycin	cataract	20	74.38±1.91 (5) *
cataract induced	normal	37	58.31±2.45 (5)
by galactose	cataract	37	84.49±3.31 (5) **

Figures in Parenthesis represent the number of experiments

* p<0.01, ** p<0.001 vs normal

二、晶状体中水溶性及脲溶性蛋白质含量及其在总蛋白质中的百分比

三种类型白内障晶状体中的水溶性蛋白质含量均较正常晶状体中的减少,其中以平阳霉素及半乳糖诱发的更为明显。从以晶状体湿重为单位计算出结果来看,脲溶性蛋白质含量变化不尽相同,亚硒酸钠诱发的有所增多,而平阳霉素及半乳糖诱发的却有所减少(见 Table 2)。然而,若以其在晶状体总蛋白质中的百分比来看,水溶性及脲溶性蛋白质含量的变化在三种白内障晶状体中是相似的,即水溶性蛋白质均大幅度减少,脲溶性蛋白质都成倍增加。详细结果见 Table 3。这说明三种类型白内障晶状体中蛋白质含量的变化趋势是相似的,但在程度上则有差别。

Table 2 Content of proteins of different solubilities in rat lenses of normal and different cataracts

Kind of lenses	water soluble protein (mg/100 mg wet lens)	urea soluble protein (mg/100 mg wet lens)
normal	34.79 ± 5.34 (12)	3.68 ± 0.50 (12)
cataract induced by selenite	29.40 ± 4.03 (6)**	6.56 ± 2.80 (6)**
cataract induced by pingyangmycin	14.96 ± 0.94 (4)***	3.06 ± 0.15 (4)*
cataract induced by galactose	9.50 ± 0.81 (4)***	2.67 ± 0.35 (4)**

Figures in the parenthesis represent the number of experiments

* represents $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs normal

Table 3 Percentage of proteins of different solubilities in rat lenses of normal and different cataracts

Kind of lenses	water soluble protein	urea soluble protein
normal	87.63 ± 3.42 (12)	9.34 ± 1.32 (12)
cataract induced by selenite	77.45 ± 6.67 (6) *	17.27 ± 2.24 (6) **
cataract induced by pingyangmycin	78.30 ± 1.49 (4) *	16.02 ± 1.20 (4) **
cataract induced by galactose	71.46 ± 2.78 (4) **	20.08 ± 2.29 (4) **

Figures in the parenthesis represent the number of experiments

* represents $p < 0.01$ and ** $p < 0.001$ vs normal

三、晶状体脲溶性蛋白质的性质及其在白内障形成过程中的变化

晶状体中脲溶性蛋白质经 Sephadex G-200 柱层析,绝大部分在外水体积中被洗脱出来,这说明脲溶性蛋白质的分子量很大,超过了 Sephadex G-200 的排阻极限而不被柱保留。在正常晶状体中,脲溶性蛋白质还有部分为低分子量的,在洗脱体积为 200mL 左右时被洗脱出

来，而在亚硒酸钠诱发白内障晶状体中，脲溶性蛋白质全部为大分子聚合物。在平阳霉素及半乳糖诱发白内障晶状体中，脲溶性蛋白质的层析图谱与正常的相似（见 Fig.1、Fig.2 及 Fig.3）。

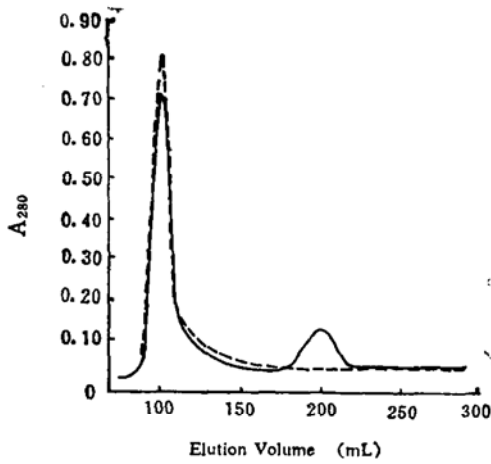


Fig.1 Gel filtration chromatography (Sephadex G-200, fine) of urea soluble proteins from normal lenses (—) and sodium selenite induced cataractous lenses (---)

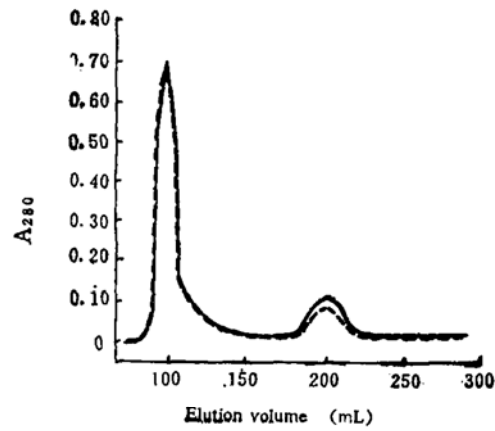


Fig.2 Gel filtration chromatography (Sephadex G-200, fine) of urea soluble proteins from normal lenses (—) and pingyangmycin induced cataractous lenses (---)

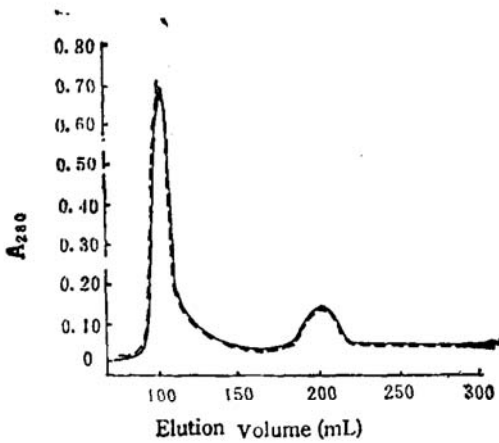


Fig.3 Gel filtration chromatography (Sephadex G-200, fine) of urea soluble proteins from normal lenses (—) and galactose induced cataractous lenses (---)

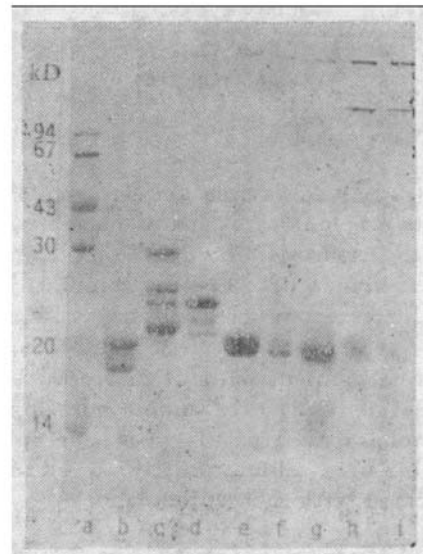


Fig.4 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of urea soluble proteins of normal and cataractous lenses induced by sodium selenite. (a) standards, (b) α -crystallin, (c) β H-crystallin, (d) β H-crystallin, (e) γ -crystallin, (f) urea soluble proteins of normal lens treated with mercaptoethanol, (g) urea soluble proteins of cataractous lens treated with mercaptoethanol, (h) urea soluble proteins of normal lens without mercaptoethanol treatment, (i) urea soluble proteins of cataractous lens without mercaptoethanol treatment

四、脲溶性蛋白质的形成方式

经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 未经巯基乙醇还原的脲溶性蛋白质主要分为三部分, 一部分不能进入浓缩胶, 一部分虽能进入浓缩胶但不能进入分离胶, 还有一部分能进入浓缩胶也能进入分离胶。三种类型白内障晶状体中的脲溶性蛋白质不能进入浓缩胶和分离胶的部分所占比例均较正常晶状体中为大。但经巯基乙醇还原后, 绝大部分脲溶性蛋白质可进入分离胶, 其中大部分分子量为 20kD 左右, 还有一部分分子量介于 20kD 至 30kD 之间。与此同时, 将水溶性 α 、 β H、 β L 及 γ 晶体蛋白与脲溶性蛋白质一起进行电泳, 发现脲溶性蛋白质经巯基乙醇还原后, 大部分的分子量与 γ 晶体蛋白相同。见 Fig.4、Fig.5 及 Fig.6。这提示脲溶性蛋白质主要是由 γ 晶体蛋白交联而成的高分子聚合物。

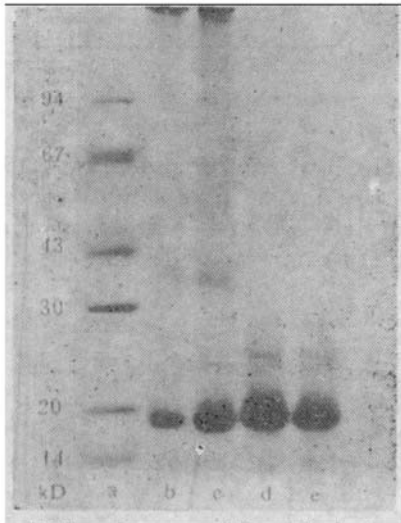


Fig.5 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of urea soluble proteins of normal and cataractous lenses induced by pingyangmycin. (a) standards, (b) urea soluble proteins of cataractous lens without mercaptoethanol treatment, (c) urea soluble proteins of normal lens without mercaptoethanol treatment, (d) urea soluble proteins of cataractous lens treated with mercaptoethanol, (e) urea soluble proteins of normal lens treated with mercaptoethanol

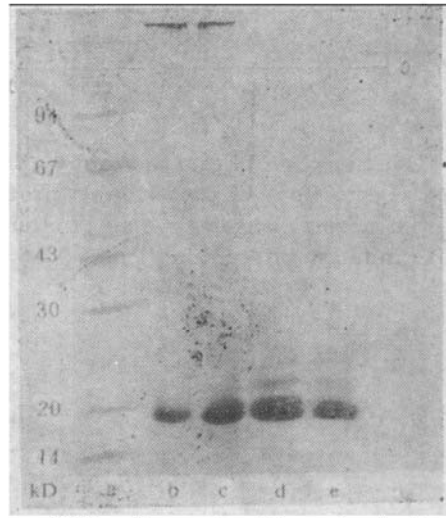


Fig.6 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of urea soluble proteins of normal and cataractous lenses induced by galactose. (a) standards, (b) urea soluble proteins of cataractous lens without mercaptoethanol treatment, (c) urea soluble proteins of normal lens without mercaptoethanol treatment, (d) urea soluble proteins of cataractous lens treated with mercaptoethanol, (e) urea soluble proteins of normal lens treated with mercaptoethanol

讨 论

晶状体内水分增多可能是白内障成因之一或其结果。晶状体内水不溶性蛋白质增多是白内障形成的重要原因之一。多年来, 许多学者对白内障晶状体内水不溶性蛋白质增多的原因进行了广泛研究, 但所得结果不尽一致。本文用亚硒酸钠, 平阳霉素及半乳糖诱发大鼠产生白内障, 研究其晶状体中水溶性及脲溶性蛋白质含量的变化, 以及脲溶性蛋白质的性质, 从中探索脲溶性蛋白质的来源和形成机理。本实验结果证明: 三种白内障晶状体中水分含量均有所增加, 但增加的幅度差异较大。考虑到单位重量晶状体中的蛋白质含量因晶状体中水分含量不同而不一致, 在测定晶状体中不同溶解性蛋白质含量时既从晶状体湿重计算, 也从晶

状体蛋白质总量计算。如从晶状体湿重计算,三种类型白内障晶状体水溶性蛋白质均大幅度减少,但尿溶性蛋白质含量的变化趋势有所不同。但从蛋白质总量计算,三种类型白内障晶状体中水溶性蛋白质都大量减少,同时尿溶性蛋白质成倍增加。这说明在三种白内障形成过程中,晶状体中水溶性蛋白质都会通过某种方式转变成尿溶性的。那么晶状体中水溶性蛋白质是怎样转变成尿溶性的呢?经 SephadexG-200 柱层析及 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳发现:尿溶性蛋白质主要是高分子聚合物,二硫键参与其形成过程。这与尿溶性蛋白质含有较多的二硫键和较少的巯基相吻合^[14]。经巯基乙醇还原后,尿溶性蛋白质都分解成低分子量的,其中大部分的分子量为 20kD 左右,与 γ 晶体蛋白相同。这说明尿溶性蛋白质的主要部分很可能是由 γ 晶体蛋白通过二硫键交联而成。此结果与本实验室所得的这三种白内障晶状体水溶性蛋白质的变化相一致。他们发现每种类型白内障晶状体中水溶性蛋白质均减少,尤以 γ 晶体蛋白最为突出^[4,15]。氨基酸的组成分析表明, γ 晶体蛋白较其它晶体蛋白含有较多的巯基^[16]。当晶状体的抗氧化机能下降时, γ 晶体蛋白最易被氧化而交联成高分子聚合物,这些高分子聚合物达到一定浓度后即会导致白内障。一般认为:不同类型白内障的起因不同。然而,本实验结果表明:各种类型白内障形成的最终机制均是通过氧化使晶体蛋白以二硫键交联而成高分子聚合物,导致晶状体的光散射作用增加而使其呈混浊状态。

参 考 文 献

- [1] Francois J, et al. *Amer J Ophthalmol*, 1957, 44:347—356
- [2] Francois J, et al. *Exp Eye Res*, 1965, 4:312—318
- [3] Charlton JM, et al. *Exp Eye Res*, 1968, 7:47—55
- [4] 张家祥, 等. 生物化学杂志, 1985, 1(5.6):15—22
- [5] Mehta PD, et al. *Amer J Ophthalmol*, 1967, 63:967—972
- [6] Zigman S, et al. *Biochim Biophys Acta*, 1968, 154:423—425
- [7] Lerman S, et al. *Exp Eye Res*, 1968, 7:444—448
- [8] Harding JJ. *Exp Eye Res*, 1969, 8:147—156
- [9] Mehta PD, et al. *Ophthal Res*, 1970, 1:10—20
- [10] 商福, 等. 生物化学杂志, 1991, 7(2): 237—241
- [11] Broekhuysse RM, et al. *Exp Eye Res*, 1974, 19:297—302
- [12] Brandford MM. *Anal Biochem*, 1976, 72:248—254
- [13] Weber K, et al. *J Biol Chem*, 1969, 244:4406—4412
- [14] 商福, 等. 北京医科大学博士论文, 1988, p47
- [15] 张 渊, 等. 生物化学杂志, 1987, 3(4):307—312
- [16] Bjork I. *Exp Eye Res*, 1964, 3:254—261

A Study of Urea Soluble Proteins of Normal and Different Cataract Lenses

Shang, Fu Zhang, Jia-ping Chang, Chang-ying

(Biochemistry Department of Beijing Medical University, Beijing 100083)

Abstract Cataracts were induced by subcutaneous injection of sodium selenite and pingyangmycin and also by abdominal injection of galactose followed by supplement of this sugar in drinking water respectively. Decrease of water contents in all these three kinds of cataractous lenses at different levels were observed. Decrease of water soluble proteins and increase of urea soluble proteins in all these three kinds of cataractous lenses were also observed. Sephadex-G-200 gel filtration chromatography and SDS-PAGE showed that the urea soluble proteins of lenses were mainly composed of disulfide crosslinked high molecular weight protein aggregates, which were segregated into proteins of smaller molecules after treatment with mercaptoethanol. As the molecular weight of most smaller protein was about 20 000 which corresponded to that of γ -crystallin, it might be assumed that γ -crystallin was most likely the main component of the protein aggregates. This result was also in agreement with the previous findings reported in this laboratory, the amount of γ -crystallin in the soluble protein decreased mainly in these cataractous lenses.

Key words, Cataract, Urea soluble protein, Disulfide