

钙蛋白酶抑制剂 E-64d 对高钙诱导的白内障的保护作用

杨 义,鲁建华,张文芳,张冬梅

作者单位:(730000)中国甘肃省兰州市,兰州大学第二医院 甘肃省眼科临床医学中心
作者简介:杨义,女,毕业于兰州大学,硕士,主治医师,研究方向:眼底病。
通讯作者:鲁建华,男,毕业于兰州大学,博士,副教授,主任医师,研究方向:白内障。lujianhua266@sina.com
收稿日期:2014-12-30 修回日期:2015-05-19

Protective effect of E-64d on calcium-induced cataract

Yi Yang, Jian-Hua Lu, Wen-Fang Zhang, Dong-Mei Zhang

The Second Hospital of Lanzhou University, Gansu Province Ophthalmology Medical Center, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Correspondence to: Jian-Hua Lu. The Second Hospital of Lanzhou University, Gansu Province Ophthalmology Medical Center, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. lujianhua266@sina.com
Received: 2014-12-30 Accepted: 2015-05-19

Abstract

• **AIM:** To investigate the protective effect of E-64d on calcium-induced cataract and its possible mechanism.

• **METHODS:** Sixteen paired rabbit lens were randomly divide into two groups, the lens of any pair of one was as experimental group, the other for the control group. Experimental group contained concentration of 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40mmol/L CaCl_2 1640 culture medium, the control group contained 1640 culture medium, the situation was observed by turbidity after 36h. Twenty-four paired rabbits lens were randomly divided into two groups, the lens of any pair of one was as experimental group, the other for the control group. Experimental group contained CaCl_2 (5 ~ 30mmol/L) + E-64d of 1640 culture medium and control group contained CaCl_2 (5 ~ 30mmol/L) of 1640 culture medium. Lens transparency and relative gray values were detected, Atomic absorption spectrophotometer was used to detect lens calcium (Ca^{2+}) content. The data were analyzed with SPSS 13.0 statistical software. Measurement data were expressed $\bar{x} \pm s$ and the differences of two groups were compared by paired-samples *t* test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

• **RESULTS:** Transparent lens opacity occurred in medium containing CaCl_2 , and with the Ca^{2+} concentration increased, degree of lens opacity was also improved. When Ca^{2+} concentration $> 30\text{mmol/L}$, black cross line below the lens was hardly seen through in culture

medium, and lens cortex was almost completely cloudy. Lens opacity incubated with 1640 medium containing E-64d was declined compared with controls. There were significant difference of relative gray scale between experimental group and control group ($t = 3.820$, $P = 0.001 < 0.01$). However, experimental group and control group had no significant effect on Ca^{2+} uptake by lens ($t = 2.144$, $P = 0.055 > 0.05$).

• **CONCLUSION:** The high levels of extralenticular calcium can induced cataract. E-64d, an inhibitor of calpain, can inhibit calcium-induced lens opacity. However, E-64d has no significant effect on Ca^{2+} uptake by lens. Its inhibitory effect on lens opacification may be due to a direct action on the activity of calpain. Moreover, maybe it can inhibit degeneration of crystallin or apoptosis and necrosis of epithelial cell by other approaches to delay the occurrence of cataract.

• **KEYWORDS:** calpain; E-64d; cataract; calcium

Citation: Yang Y, Lu JH, Zhang WF, *et al.* Protective effect of E-64d on calcium-induced cataract. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(6):972-975

摘要

目的:探讨钙蛋白酶抑制剂 E-64d 对高钙诱导的白内障的保护作用及其作用机制。

方法:取健康清洁级兔的 16 对离体透明晶状体,将一对晶状体的任意一只为实验组,另一只为对照组,实验组为含浓度依次为 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40mmol/L CaCl_2 的 1640 培养液,对照组含 1640 培养液,观察培养 36h 后晶状体的混浊情况。取健康清洁级兔的 24 对离体透明晶状体,将一对晶状体的任意一只为实验组,另一只为对照组,实验组为含有 CaCl_2 (5 ~ 30mmol/L) + E-64d 的 1640 培养液,对照组为含 CaCl_2 (5 ~ 30mmol/L) 的 1640 培养液,检测两组晶状体的透明度及相对灰度值,用原子吸收分光光度计检测两组晶状体的钙离子 (Ca^{2+}) 含量。采用 SPSS 11.9 统计学软件进行统计学分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用配对 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果:透明晶状体在含有氯化钙的培养液而发生混浊,且随着钙离子浓度的升高,晶状体的混浊程度也提高,当培养液中钙离子浓度为 30mmol/L 以上时,培养液中的晶状体下方的黑色十字线几乎不能透见,晶状体皮质几乎完全混浊;含有钙蛋白酶抑制剂 E-64d 的实验组晶状体的混浊程度较对照组明显减轻,实验组与对照组晶状体灰度值比较,差异有显著统计学意义 ($t = 3.820$, $P = 0.001 < 0.01$),但实验组与对照组晶状体钙离子含量比较,差异无统计学意义 ($t = 2.144$, $P = 0.055 > 0.05$)。

结论:晶状体外的高钙环境可以诱导晶状体混浊;钙蛋白酶抑制剂 E-64d 不能抑制晶状体对细胞外钙离子的摄

入;钙蛋白酶抑制剂 E-64d 对高钙诱导的晶状体混浊有保护作用,它可能是直接抑制了钙蛋白酶的活性,进而通过其他途径抑制晶状体蛋白变性或者上皮细胞凋亡及坏死,延缓白内障的发生。

关键词:钙蛋白酶;E-64d;白内障;钙离子

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.6.08

引用:杨义,鲁建华,张文芳,等.钙蛋白酶抑制剂 E-64d 对高钙诱导的白内障的保护作用.国际眼科杂志 2015;15(6):972-975

0 引言

白内障的病因及发病机制比较复杂,迄今对白内障的发病机制尚未完全达成共识,众学者们分别从不同的侧面来诠释了它的发病机制,提出了各种不同学说。近年来许多学者在对人晶状体的研究中发现钙蛋白酶 II 的表达占主导地位,几乎所有类型的白内障的晶状体中钙离子浓度均高于正常者,故认为各种原因引起的钙离子浓度的升高可激活钙蛋白酶,使晶状体内的晶体蛋白、细胞骨架蛋白和膜蛋白等多种蛋白发生水解,从而导致白内障的形成。本实验体外构建高钙诱导白内障动物实验模型,通过观察钙蛋白酶抑制剂 E-64d 对高钙诱导的白内障的保护作用,进一步探讨白内障发生的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康成年清洁级兔子 41 只,雌雄不限,裂隙灯下检查见双眼角膜透明,双眼瞳孔等大等圆,光反射灵敏,双眼前房清 Ty(-),双眼晶状体透明。

1.1.2 主要试剂 E-64d 1mg (德国 MERCK 公司),无水乙醇(北京中联化工试剂厂),氯化钙(CaCl₂北京化工厂),1640 培养基(上海世泽生物科技有限公司),钙标准应用液(100mg/L),氢氧化钾溶液(2g/L),硼氢化钾溶液(8g/L),硝酸(优级纯),过氧化氢(30%,甘肃省中医学中心实验室提供)。

1.1.3 主要仪器设备 裂隙灯显微镜(苏州医疗器械厂),医用超净工作台(苏州净化设备公司生产),CO₂细胞培养箱(Heraeus),SpectraAA220 原子吸收分光光度计,微波消解仪(ETHOS D 型,意大利),数码照相机(日本 Nikon),电子分析天平(Sartorius BS400S,北京赛利多斯有限公司),磁力加热搅拌器(79-1,江苏大地自动化仪器厂),电热恒温鼓风干燥箱(DHG-9245)。

1.2 方法

1.2.1 离体晶状体的培养 清洁级兔空气栓塞处死后立即摘除眼球^[1],无菌条件下洗净血迹,小心剔除肌肉筋膜等软组织,用 1:1000 庆大霉素生理盐水反复冲洗干净后置于超净工作台中,在超净工作台中行无菌操作,由后极部剪开巩膜,小心取出晶状体(注意勿使器械碰伤晶状体,不刻意去除覆盖在晶状体表面的玻璃体),将晶状体放入含 5 万 U/L 青霉素和 5 万 U/L 链霉素的 1640 培养液 24 孔培养板中,每孔放置 1 枚晶状体,后极向下,在 37℃,5% CO₂细胞培养箱中培养 8h,弃去混浊的晶状体 1 只(可能由于手术损伤或其他原因导致的混浊),包括与之配对的那个晶状体也弃去,留取透明晶状体作为下一步的实验对象备用(40 对共 80 个)。

1.2.2 高钙诱导的白内障模型的建立 在超净工作台中,无菌操作下取上述备用成对透明晶状体(共 16 对 32 个),

将一对晶状体的任意一只为实验组,另一只为对照组,分别放置于无菌的 24 孔培养板内,每孔一个晶状体,后极向下,实验组含 1640 培养液+浓度依次为 5,10,15,20,25,30,35,40mmol/L CaCl₂,对照组含 1640 培养液,然后将 24 孔培养板放置于 37℃,5% CO₂培养箱中培养 36h,观察晶状体的混浊情况,并用数码相机对其进行拍照。

1.2.3 钙蛋白酶抑制剂 E-64d 对白内障的保护作用 在超净工作台中,无菌操作下取上述备用成对透明晶状体(24 对 48 只),将一对晶状体的任意一只为实验组,另一只为对照组,实验组含 1640 培养液+浓度依次为 5,10,15,20,25,30mmol/L CaCl₂+100μL E-64d(1mg/mL 溶于乙醇),对照组含 1640 培养液+浓度依次为 5,10,15,20,25,30mmol/L CaCl₂,将各组晶状体放入含以上试剂的无菌 24 孔培养板中,每孔一个,后极向下,然后将 24 孔培养板放置于 37℃,5% CO₂培养箱中培养,观察 36h 后晶状体的混浊情况,并用数码相机对其进行拍照。

1.2.4 晶状体混浊度的检测 在白色背景下设计一行间距均为 0.6mm 且相互垂直交叉的线条,将被检晶状体置于“+”字交叉的黑色线条上,同一地点、同光源、同高度、由同一人、用同一数码相机拍照,将所拍的照片输入电脑,用 Adobe Photoshop 6.0 图像分析软件对背景黑色线条的灰度进行定量分析,并进行 SPSS 19.0 软件包进行统计学分析。

1.2.5 晶状体中钙离子含量的测定^[2] 将各组晶状体用双蒸水反复冲洗干净(避开晶状体表面残留钙离子的干扰),放置烤箱内 80℃,6h 烘干,置入干净的消解罐中,加入 7mL 硝酸,1mL 过氧化氢,盖好安全阀后,将消解罐放入微波消解仪中消解。消解程序 10min 升至 200℃,200℃ 保持 20min 消解结束完全冷却后,将消解罐中的液体移入 25mL 容量瓶中,用双蒸水定容,同时做标准空白。设定好仪器最佳条件负高压:320V;钙元素分线波长 422.7nm;灯电流 3.0mA;狭缝 0.5nm;进样方式:手动;校正模式:浓度;测量模式:PROMT;标样精密密度:1.0%;样品精密密度 1.0%;测量时间:8.0s;预读数延迟 6s;火焰类型:空气/乙炔;空气流量:13.50L/min;乙炔气流量:1.71L/min;燃烧头高度:0mm。在试样参数画面输入以下参数:试样质量(g 或 mL)、稀释体积(mL),并选择结果的浓度单位,逐步将炉温升至所需温度,稳定后测量。连续用标准系列零管进样,等读数稳定后,转入标准系列测量,绘制标准曲线。在转入试样测定之前,再进入空白值测量状态,用试样空白消化液进样,让仪器取其均值作为扣除的空白值。随后即可依次测定试样。测定完毕后,选择“打印报告”即可将测定结果自动打印。

统计学分析:本实验所得的数据均输入 SPSS 19.0 软件包进行统计学分析,统计方法采用配对样本 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高钙诱导的白内障模型的建立结果 对照组:兔晶状体在离体培养条件下保持了其透明度,培养 36h 后,晶状体下方的黑色十字线均清晰可见,晶状体的透明度无明显改变。实验组:兔晶状体在含有不同氯化钙(CaCl₂)的 1640 培养液中培养了 36h 后,随着 1640 培养液中钙离子浓度的升高,离体兔晶状体下方的黑色十字线由赤道部向中央开始变得模糊,且模糊的范围逐渐扩大,当 1640 培养液中钙离子为 30mmol/L 以上,晶状体下方的黑色十字线

几乎不能透见,晶状体皮质几乎完全混浊(图1)。

2.2 钙蛋白酶抑制剂 E-64d 对白内障的保护作用分析

2.2.1 形态学观察 对照组:培养36h后,随着1640培养液中钙离子浓度的升高,离体兔晶状体下方的黑色十字线由赤道部向中央开始变得模糊,且模糊的范围逐渐扩大,直至几乎完全不能透见,兔晶状体的混浊程度逐渐加重,直至完全混浊。实验组:培养36h后,随着1640培养液中钙离子浓度的升高,离体晶状体下方的黑色十字线也由赤道部向中央开始变得模糊,晶状体的混浊程度逐渐加重,但是与1640培养液中同浓度钙离子的对照组相比,晶状体下方的黑色十字线相对清晰,晶状体的混浊程度与同浓度钙离子的对照组相比明显降低(图2)。

2.2.2 实验组与对照组晶状体培养36h后照片灰度值的比较 对照组:培养液中无钙蛋白酶抑制剂 E-64d,余成分均同实验组。实验组(91.4721±13.7959)与对照组(101.1850±17.1689)晶状体下方的黑色十字线的灰度值差异有统计学意义($t=3.820, P=0.01$),钙蛋白酶抑制剂 E-64d 对高钙诱导的晶状体混浊有保护作用。

2.3 实验组与对照组晶状体培养36h后晶状体内钙离子含量的测定 对照组培养液中无钙蛋白酶抑制剂 E-64d,余成分均同实验组。实验组与对照组中晶状体内钙离子的含量分别为:0.56683±0.32948,0.63375±0.41457mg/L,两者无明显的统计学差异($t=2.144, P=0.055>0.05$),两组中晶状体内钙离子的含量无明显不同,钙蛋白酶抑制剂 E-64d 对于晶状体钙离子的摄入没有明显的抑制作用。

3 讨论

3.1 Ca^{2+} 与高钙诱导的白内障模型的建立 正常晶状体的钙含量比前房水含量低0.1%~1%,维持在较低水平^[3],主要通过细胞膜上的离子通道进入细胞,再被细胞膜上的泵排出细胞。国内外多数学者认为钙在维持晶状体透明性方面有重要作用,当 Ca^{2+} 在晶状体代谢过程中发生异常改变时,可导致晶状体混浊而发生白内障。我国学者刘晓莉等^[4]发现白内障晶状体 Ca^{2+} 含量明显高于正常,钙离子在晶状体内的分布为上皮细胞>核>皮质。在体外培养的晶状体中,也有报道发现晶状体的混浊与 Ca^{2+} 浓度的升高直接有关^[5]。目前又有许多研究均证实,高 Ca^{2+} 可以诱发白内障的产生。晶状体外环境中 Ca^{2+} 浓度的改变可引起晶状体上皮细胞膜的通透性变化,高 Ca^{2+} 可以抑制 Na^+-K^+-ATP 酶的活性,激活钙蛋白酶,被激活的钙蛋白酶使晶体蛋白降解,失去部分肽链片段,蛋白空间结构发生改变,巯基暴露,进而交联成高分子聚合物,从而导致白内障。近年来的大量实验研究还表明,细胞中 Ca^{2+} 浓度能调节细胞的凋亡^[6],而晶状体上皮细胞的凋亡与白内障的形成有关这一结论已被大多学者所接受。高 Ca^{2+} 诱导白内障的发生机制还可能有:高 Ca^{2+} 使晶状体cAMP和cGMP的含量减少,抑制晶状体对氨基酸的摄取能力,蛋白质合成下降;高 Ca^{2+} 引起晶状体蛋白之间交联,形成大分子蛋白质,使晶状体投射光发生散射。晶状体中的钙浓度与钠浓度密切相关,几乎所有高钠晶状体中的钙浓度均增加,反之则不然,有些高钙晶状体中钠浓度却保持正常。这说明晶状体细胞膜对钠的通透性取决于其周围环境的钙浓度,而不是晶状体内钙浓度。在本实验中,我们逐渐提高培养液中钙离子的浓度,构建细胞外的高钙环境,将

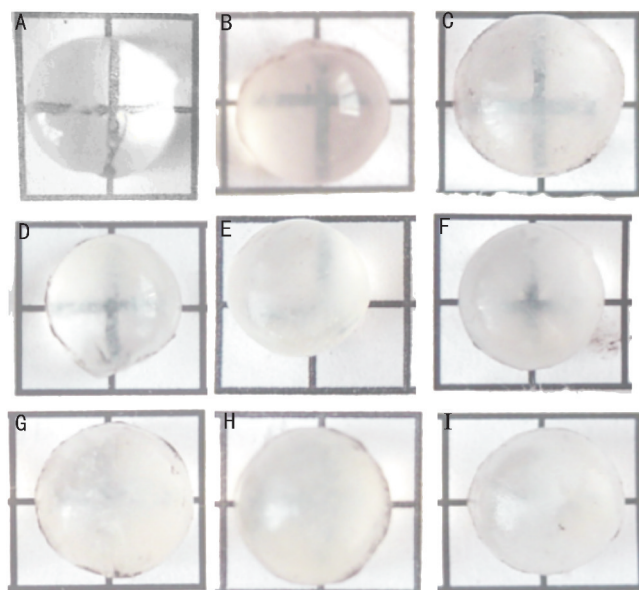


图1 高钙诱导的白内障模型的建立(培养36h后) A:1640培养液;B:1640培养液+5mmol/L $CaCl_2$;C:1640培养液+10mmol/L $CaCl_2$;D:1640培养液+15mmol/L $CaCl_2$;E:1640培养液+20mmol/L $CaCl_2$;F:1640培养液+25mmol/L $CaCl_2$;G:1640培养液+30mmol/L $CaCl_2$;H:1640培养液+35mmol/L $CaCl_2$;I:1640培养液+40mmol/L $CaCl_2$ 。

透明的离体晶状体放置其中培养,发现透明晶状体在高钙的条件下很快发生了混浊,成功地建立了白内障的模型,并且在实验中我们还观察到随着细胞外钙离子浓度的升高,离体晶状体的混浊程度也逐渐提高。这与目前的许多研究结果一致:高钙(Ca^{2+})可以诱发白内障的产生。

3.2 钙蛋白酶抑制剂与白内障 越来越多的研究指出:各种原因引起的钙离子浓度的升高可激活钙蛋白酶,使晶状体内的晶状体蛋白、细胞骨架蛋白和膜蛋白等多种蛋白质发生水解,从而导致白内障形成。钙蛋白酶的抑制剂可不同程度地抑制蛋白的水解作用,从而延缓晶状体混浊,可为白内障的药物预防和治疗提供新的方法^[7]。Biswas等^[8]研究指出SJA6017作为抑制剂作用于高钙诱导的晶状体,可较有效抑制高钙诱发的离体猪晶状体混浊,其作用机制可能是通过直接抑制晶状体上皮细胞内钙蛋白酶的表达,从而抑制了白内障的形成。徐雯等^[9]也研究指出PD15060作为抑制剂作用于过氧化氢诱导的晶状体,可较有效抑制过氧化氢诱发的离体大鼠晶状体混浊,其作用机制可能是通过抑制晶状体上皮细胞内钙蛋白酶的表达,从而抑制钙蛋白酶对晶状体蛋白的水解作用及钙蛋白酶激活Caspase-3的细胞凋亡途径,最终延缓白内障的形成。

钙蛋白酶抑制剂 E-64d 是一种不可逆性肽类抑制剂,与其它钙蛋白酶抑制剂相比,它最大的优势是可以迅速透过细胞膜,在细胞膜中被酯酶迅速水解而形成二级产物 E-64c,后者对钙蛋白酶的抑制活性是前者的100倍。这一类抑制剂的共同特点是具有环氧琥珀酰基团,对半胱氨酸蛋白酶具有高特异性,可与钙蛋白酶活性部位的半胱氨酸巯基形成共价结合,抑制其水解能力。虽然已有研究证实 E-64d 对神经元有较好的抗蛋白水解作用,但目前在国内还没有应用于眼科研究的报道。

本实验从形态学上观察到钙蛋白酶抑制剂 E-64d 可有效地抑制高钙诱导的离体兔晶状体混浊,同时我们还用

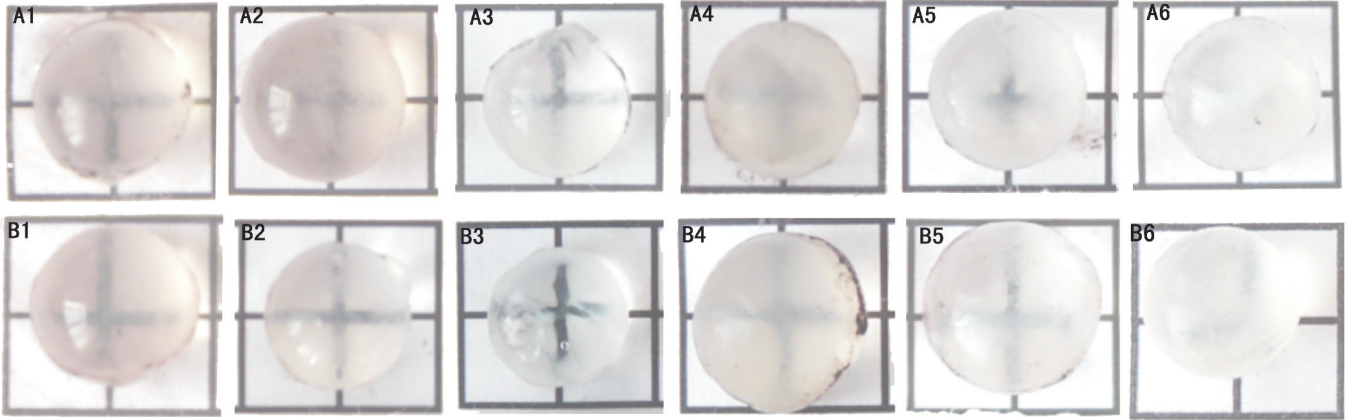


图2 钙蛋白酶抑制剂 E-64d 对白内障的保护作用(培养 36h 后) A₁:对照组 1(1640+5mmol/L CaCl₂);B₁:实验组 1(1640+5mmol/L CaCl₂+E-64d);A₂:对照组 2(1640+10 mmol/L CaCl₂);B₂:实验组 2(1640+10mmol/L CaCl₂+E-64d);A₃:对照组 3(1640+15mmol/L CaCl₂);B₃:实验组 3(1640+15mmol/L CaCl₂+E-64d);A₄:对照组 4(1640+20mmol/L CaCl₂);B₄:实验组 4(1640+20mmol/L CaCl₂+E-64d);A₅:对照组 5(1640+25mmol/L CaCl₂);B₅:实验组 5(1640+25mmol/L CaCl₂+E-64d);A₆:对照组 6(1640+30mmol/L CaCl₂);B₆:实验组 6(1640+30mmol/L CaCl₂+E-64d)。

原子吸收分光光度计分别测量同等条件下有钙蛋白酶抑制剂 E-64d 保护实验组的晶状体和无钙蛋白酶抑制剂 E-64d 保护的对照组晶状体中钙离子的含量,结果发现实验组与对照组中晶状体内钙离子的含量无明显的统计学意义,钙蛋白酶抑制剂 E-64d 对于晶状体钙离子的摄入没有明显的抑制作用,推测钙蛋白酶抑制剂 E-64d 抑制高钙诱导的晶状体的混浊不是抑制了晶状体对细胞外钙离子的摄入,而可能是直接抑制了钙蛋白酶的活性,进而减轻了晶状体上皮细胞的凋亡及坏死、晶状体蛋白的水解,最终延缓了白内障的发生。

目前对钙蛋白酶的研究尚处于起步阶段,主要限于用实验研究某些疾病的发病机制等方面,同临床应用尚有一定的距离,但是鉴于钙蛋白酶在白内障发病机制中的作用,钙蛋白酶抑制剂无疑会为今后的眼科临床实践提供一个可行的选择靶点。在本实验中我们也证实了钙蛋白酶抑制剂 E-64d 对高钙诱导的白内障有一定的保护作用,但是同目前许多学者对大多数钙蛋白酶抑制剂的研究一样,仍然主要是实验室的研究结果,钙蛋白酶抑制剂 E-64d 如何应用于临床,有待我们进一步研究。

参考文献

1 董东生,陆爱丽,刘莹,等.体外培养大鼠白内障模型晶状体的早期

生化改变.中华眼科杂志 2000;36(5):344-347
2 王久庆.钙含量测定原理及过程分析.中国氯碱 2010;8(2):28-29
3 Lee HY, Morton JD, Sanderson J, et al. The involvement of calpains in opacification induced by Ca²⁺ overload in ovine lens culture. *Vet Ophthalmol* 2008;11(6):347-355
4 刘晓莉,方谦逊.晶状体钙-钙调节蛋白的研究.国外医学眼科学分册 1995;19(3):223
5 Nagai N, Ito Y, Takeuchi N, et al. Comparison of the mechanisms of cataract development involving difference in Ca²⁺ regulation in lenses among three hereditary cataract model rats. *Biol Pharm Bull* 2008;31(11):1990-1995
6 Rhodes JD, Russell SL, Lillingworth CD, et al. Regional difference in store-operated Ca²⁺ entry in the epithelium of the intact human lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(9):4330-4336
7 De Maria A, Shi Y, Kumar NM, et al. Calpain expression and activity during lens fiber cell differentiation. *J Biol Chem* 2009;284(20):13542-13550
8 Biswas S, Harris F, Singh J, et al. The *in vitro* retardation of porcine cataractogenesis by the calpain inhibitor, SJA6017. *Mol Cell Biochem* 2004;261(1-2):169-173
9 徐雯,姚克,王凯军,等.钙蛋白酶抑制剂 PD150606 对鼠氧化性白内障的预防作用.中华眼科杂志 2003;39(7):400-405