

N-乙酰半胱氨酸对紫外线损伤大鼠晶状体水通道蛋白-1的影响

孙 慧, 刘 丹

作者单位: (121001) 中国辽宁省锦州市, 辽宁医学院附属第一医院眼科

作者简介: 孙慧, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 白内障的基础与临床研究。

通讯作者: 刘丹, 女, 主任医师, 教授, 主任, 硕士研究生导师, 研究方向: 白内障的基础与临床研究. yankeliudan@yahoo. com. cn

收稿日期: 2011-08-23 修回日期: 2011-10-20

Expression of aquaporin protein-1 on rat lens after ultraviolet radiation injury and the effects of N-acetylcysteine on it

Hui Sun, Dan Liu

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China
Correspondence to: Dan Liu. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China. yankeliudan@yahoo. com. cn

Received: 2011-08-23 Accepted: 2011-10-20

Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of N-acetylcysteine (NAC) on the rat lens expression of aquaporin protein-1 (AQP-1) during ultraviolet (UV) radiation injury.

• **METHODS:** Transparent lens of healthy clean grade SD rats were randomly divided into 3 groups, the model group was exposed with UV ray, the drug group added in 300 μmol/L NAC besides the UV radiation, the control group did not take above measures. Respectively they were cultivated 3, 12 and 24 hours to observe the degree of lens opacification and the lens hydration degree; Western blotting was used to observe the levels of AQP-1 expression.

• **RESULTS:** The control group had high expression of AQP-1; the model group low expression of AQP-1; compared with model group, the drug group had high expression of AQP-1. By statistical analysis, between the model group and the control group, the expression of AQP-1 had significant difference ($P < 0.01$); between the model group and the drug group, the expression of AQP-1 also had significant difference (at 3 hours, $P < 0.05$; while at 12, 24 hours, $P < 0.01$).

• **CONCLUSION:** UV ray can reduce the expression of AQP-1 and lead to cataract, while NAC can protect cells from UV damage to ease cataract incidence by improving

the expression of AQP-1.

• **KEYWORDS:** aquaporin protein-1; N-acetylcysteine; cataract

Sun H, Liu D. Expression of aquaporin protein-1 on rat lens after ultraviolet radiation injury and the effects of N-acetylcysteine on it. *Gujji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(12):2088-2090

摘要

目的: 观察 N-乙酰-L-半胱氨酸 (N-acetylcysteine, NAC) 对紫外线 (ultraviolet, UV) 损伤的大鼠晶状体水通道蛋白-1 (aquaporin protein-1, AQP-1) 表达的影响。

方法: 将健康清洁级 SD 大鼠的离体透明晶状体随机分为 3 组, 模型组用 UV 照射, 药物组除照射外另加入 NAC, 对照组均不采取以上处理。分别培养 3, 12, 24h 后观察大鼠晶状体的混浊程度和水化程度; Western-blot 法观察 AQP-1 的表达情况。

结果: 对照组晶状体高水平表达 AQP-1; 模型组晶状体低表达 AQP-1; 药物组较模型组表达较高 AQP-1。经统计学分析, 模型组与对照组之间 AQP-1 的表达有显著性差异 ($P < 0.01$), 模型组和药物组之间 AQP-1 的表达有显著性差异 (3h 时 $P < 0.05$, 12 和 24h 时 $P < 0.01$)。

结论: UV 照射能降低 AQP-1 的表达, 导致白内障, 而 NAC 能通过提高 AQP-1 的表达保护细胞免受 UV 损伤, 从而延缓白内障的发生。

关键词: 水通道蛋白-1; N-乙酰半胱氨酸; 白内障

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.12.009

孙慧, 刘丹. N-乙酰半胱氨酸对紫外线损伤大鼠晶状体水通道蛋白-1 的影响. 国际眼科杂志 2011;11(12):2088-2090

0 引言

白内障是严重的致盲性眼病之一, 其发病机制也较为复杂, 而氧化损伤是目前公认的发病机制之一。氧化损伤能通过自由基、膜蛋白及脂质过氧化等, 影响细胞膜上一些离子通道的正常运转, 破坏其正常功能, 其中水通道蛋白 (aquaporin proteins, AQP) 的破坏导致晶状体内部不能维持脱水状态及透明性, 从而导致白内障的发生。本实验应用 Western-blot 方法通过 N-乙酰-L-半胱氨酸 (NAC) 作用于被紫外线 (ultraviolet, UV) 氧化破坏的晶状体, 研究其对细胞的保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料 成年健康 SD 大鼠 48 只 (雌雄不拘), 清洁级 (SPF), 体质量在 180 ~ 220g, 由辽宁医学院实验动物中心提供。MEM 培养基, 赛莫非而生物化学制品 (北京) 有限公司; 兔抗鼠 AQP-1, 北京中杉金桥生物技术有限公司;

CO₂培养箱(日本 SANYO);美国 APQC 超净工作台;250W 高压汞灯(UV-A,UV-B 混合光源,沈阳华光照明电器有限公司);N-乙酰-L-半胱氨酸(武汉麦可欣科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 晶状体的培养 大鼠脱颈椎处死后,直视下以眼科剪摘取双眼球,乙醇消毒后,PBS 缓冲液冲洗数次,在超净台上由后极部剪开巩膜,去尽玻璃体,仔细分离虹膜和悬韧带,完整取出晶状体,用圈匙捞起放入含 MEM 液(含 100mL/L 小牛血清、100U/mL 青霉素、0.1g/L 链霉素)的消毒培养板中,在 37℃,50mL/L CO₂ 培养箱中预孵 6h 后用于实验。

1.2.2 实验分组 将培养 6h 的大鼠晶状体分为三组:对照组、模型组和药物组。同一组内避免一只大鼠的两个晶状体同时存在,药物组加 300μmol/L NAC 孵育 2h 后,和模型组置于近 UV 源(250W 高压汞灯)正下方 50cm 处,撤去培养皿盖板,晶状体上液保留 1mm,照射 30min 后,送回培养箱继续培养,同时对对照组置于同室同条件下无 UV 辐射处。于 3,12,24h 取出后分别测定晶状体的含水量和 AQP-1 的表达情况。

1.2.3 晶状体混浊程度的观察 在白色背景下设计一垂直交叉的黑色线条,将被检晶状体置于十字交叉的黑色线条之上,观察透过晶状体所能看到的线条清晰度。

1.2.4 晶状体含水量测定 将各组不同时间的晶状体 6 眼,用滤纸拭干,称湿质量,然后放入干烤箱内 24h,称干质量。两者之差值比晶状体湿重的比值即为晶状体的水化程度。

1.2.5 Western-blot 检测 取培养后的晶状体,每组 2 眼标本,重复三次,冷 PBS 洗两遍,加入预冷的裂解液剪碎后匀浆,并进行细胞超声粉碎,4℃ 下静置 1h,低温 12000g 离心 30min 后取上清,蛋白浓度的测定采用 Lowry 法。取等量样品用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白。将分离后的蛋白电转移至 PVDF 膜上,依次封闭、加一抗、二抗,显色、终止反应等,将蛋白印迹显影图扫描,全自动图象分析系统处理并分析硝酸纤维膜上的蛋白条带的光密度值。

统计学分析:所有数据计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学处理,进行方差齐性检验,符合正态分布,组间及组内不同时间点比较采用单因素方差分析,若差异有统计学意义,两组间比较用最小显著差 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 晶状体混浊程度 对照组大鼠离体晶状体在培养的 24h 内仍保持透明,透过晶状体的背景线清晰度高;模型组大鼠离体晶状体,随作用时间延长,晶状体的混浊程度逐渐加重。培养 3h 后,晶状体的背景线较清晰,培养 12h 后透过晶状体的背景线已经比较模糊,但可辨认十字交叉;24h 时透过晶状体的背景线基本消失,晶状体不透明呈现白色混浊。药物组晶状体改变与模型组相似,但混浊程度明显减轻。

2.2 晶状体水含量的变化 对照组培养 24h 过程中水化程度无明显改变;模型组随时间延长,水化程度逐渐增加;药物组的水化程度随时间已有增加趋势,但较模型组明显减轻(表 1)。

表 1 各组晶状体培养不同时间后晶状体的水化程度比

分组	$(\bar{x} \pm s, \%)$		
	3h	12h	24h
对照组	54.05 ± 2.27	54.81 ± 1.54	55.40 ± 1.33
模型组	56.04 ± 1.60 ^b	60.02 ± 2.27 ^b	66.45 ± 1.86
药物组	54.71 ± 1.96	57.06 ± 2.79 ^a	60.31 ± 1.29 ^d

^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^a $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 模型组。

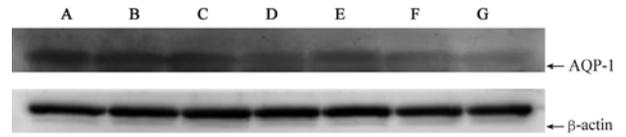


图 1 各组大鼠晶状体中 AQP-1 的表达 A:对照组;B:药物组 3h;C:药物组 12h;D:药物组 24h;E:模型组 3h;F:模型组 12h;G:模型组 24h。

2.3 各组大鼠晶状体中 AQP-1 的表达 根据文献[1],选取 24h 时正常组与模型组比较,在对照组中 AQP-1 表达量较高,而模型组中的表达量要下降许多(图 1),两组相比有明显差异($P < 0.01$)。药物组 AQP-1 的表达特点与模型组相似,都随时间延长表达量降低,但较模型组含量高(3h 时 $P < 0.05$;12 和 24h 时 $P < 0.01$)。

3 讨论

白内障是老年人群中的常见病和多发病,大量实验研究和流行病学调查显示,UV 是导致晶状体混浊的一个重要因素^[2]。长期慢性 UV 辐射导致视力减退,视物模糊,晶状体局部代谢障碍、蛋白变性,晶状体纤维间出现狭长裂隙及空泡,继之纤维肿胀,体积改变,晶状体混浊。UV 通过直接激活某些光敏分子、损伤 DNA,并间接诱发自由基、脂质过氧化反应等途径产生一系列的生物学效应。曾有文献指出 H₂O₂ 是介导光氧化损伤的主要机制^[3],如光氧化产生 H₂O₂、O₂[·] 和 ·OH 等,能升高细胞氧化水平,继而通过氧化应激对细胞各个部分产生损害。

晶状体上皮细胞是整个晶状体代谢最活跃的部位,氧化损伤首先发生于晶状体上皮细胞,主要表现为对细胞膜及膜性结构的损伤,AQPs 作为一种膜蛋白,成为其作用的靶蛋白。AQP-1 是目前为止发现的分布最广的一种 AQPs,但在晶状体只分布在晶状体上皮细胞中,是调节细胞间隙渗透压的水选择性通道^[4],能感受渗透压变化,调节晶状体液体的平衡,正常情况下维持晶状体的脱水状态,保持晶状体的透明性。单层的上皮细胞还含有大量的保护晶状体免受氧化损伤的酶系统,承担着晶状体的生长、分化和损伤修复的任务,在维持整个晶状体的透明性和内环境稳定上起着重要的作用。

Hithtower 等^[5]发现 UVB 能剂量依赖性地影响细胞内信号传递的 Ca²⁺ 水平,并且能快速降低抗氧化剂谷胱甘肽的含量。虽然 AQP-1 对 Ca²⁺ 水平变化不敏感^[6],但谷胱甘肽含量的变化却能够通过影响氧化还原水平间接影响 AQP-1 表达。UVB 还能氧化晶状体蛋白的巯基,使蛋白和质膜之间以二硫键的形式交联^[7],破坏膜结构,影响膜蛋白如 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-ATP 酶等作用的发挥,并与离子通道中的色氨酸残基(主要是活性中心附近的色氨酸残基)反应,使其光降解,破坏其维持离子平衡的能力。

本实验中观察到,晶状体在UV损伤后随时间延长出现晶状体混浊含水量增加,同时伴随着AQP-1的减少,而应用NAC组的AQP-1表达较模型组则较高一些,且晶状体不论是混浊程度还是含水量均较模型组好转,可见AQP-1在白内障的发生、发展过程中起着重要作用,因此认为NAC能通过提高AQP-1的表达保护晶状体细胞,减轻白内障的发生。通过已有的研究和本次实验结果,我们推测NAC作为一种抗氧化剂可能是通过以下几个途径的作用保护细胞免于损伤的:(1)它作为谷胱甘肽合成的前体,能够提供还原性巯基,在细胞受到氧化损伤时首先被氧化,从而保护AQP-1的第189位氨基酸残基(-SH)不被氧化,同时也就阻止了氧化后蛋白质的进一步聚合和交叉链的形成^[1]。(2)氧化损伤的情况下,晶状体内氧化物质产生过多或抗氧化系统损失减少^[8],不能有效保护如前所述的包括Na⁺-K⁺-ATP酶及AQP-1在内的各种膜蛋白免于损伤,导致离子平衡紊乱,AQP-1作为渗透压感受器不能有效感受渗透压变化,导致水转运障碍,晶状体脱水状态不能维持,而NAC的存在恰恰弥补了这些抗氧化物质的不足,减少了后继反应的发生。还有报道其还原型巯基能参与氧化应激基因表达的调控^[9],也从更根本上抑制氧化应激的作用。通过本实验可以认为,NAC作为一种抗氧化剂,对细胞的保护作用还是比较明显的,但是其对细胞保护作用的具体机制还有待更深入的研究。

参考文献

- 1 张虹,张金玲.水通道蛋白在大鼠氧化性白内障晶状体上的表达.华中科技大学学报 2007;36(3):374-376
- 2 唐建,刘谊.紫外线对晶状体上皮细胞损伤的研究进展.眼视光学杂志 2003;5(3):187-189
- 3 Andlley UP, Clark BA. The effects of near-UV radiation on human lens beta-crystallins: protein structural changes and the production of O₂⁻ and H₂O₂. *Photochem Photobiol* 1989;50(1):97-105
- 4 Iandiev I, Pannicke T, Reichenbach A, et al. Diabetes alters the localization of glial aquaporins in rat retina. *Neurosci Lett* 2007;421(2):132-136
- 5 Hightower KR, Duncan G, Dawson A, et al. Ultraviolet irradiation (UVB) interrupts calcium cell signaling in lens epithelial cells. *Photochem Photobiol* 1999;69(5):595-598
- 6 Varadaraj K, Kumari S, Shiels A, et al. Regulation of aquaporin water permeability in the lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(4):1393-1402
- 7 Wu K, Kojima M, Shui YB, et al. In vitro UVB effect on lens protein solutions. *Ophthalmic Res* 1997;29(2):75-82
- 8 Palanisamy P, Varatharaju C, Utharasamy SK. Evaluation of oxidative stress, enzymatic and non-enzymatic antioxidants and metabolic thyroid hormone status in patients with diabetes mellitus. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews* 2009;3(3):160-165
- 9 Pasquale P, Daniele M, Raffaella R, et al. Nitroxyl affords thiol-sensitive myocardial protective effects akin to early preconditioning. *Free Rad Biol Med* 2003;34(1):33-43