

# 硫醇转移酶基因敲除小鼠模型的建立及其白内障形成机制

张 婕<sup>1</sup>, 严 宏<sup>2</sup>, Marjorie F. Lou<sup>3</sup>

引用:张婕,严宏,Marjorie F. Lou. 硫醇转移酶基因敲除小鼠模型的建立及其白内障形成机制.国际眼科杂志 2020;20(3):420-425

基金项目:国家自然科学基金青年项目(No.81300743)

作者单位:<sup>1</sup>(710038)中国陕西省西安市,空军军医大学唐都医院眼科;<sup>2</sup>(710004)中国陕西省西安市第四医院 陕西省眼科医院 西北工业大学附属西安市第四医院;<sup>3</sup>(68583)美国内布拉斯加州林肯市,内布拉斯加大学生物医学科学院

作者简介:张婕,毕业于第四军医大学,博士研究生,主治医师,讲师,中国医师协会眼科医师分会青年委员会委员,陕西省医学会眼科分会青年委员会副主任委员,陕西省医学会眼科分会白内障学组委员,西安市医学会眼科分会白内障学组委员,研究方向:白内障发病机制。

通讯作者:张婕. jessicazhangjie@hotmail.com

收稿日期:2019-06-23 修回日期:2020-02-13

## 摘要

**目的:**通过建立硫醇转移酶(TTase)基因敲除小鼠模型,观察其晶状体形态和生化方面随年龄的改变,探讨TTase在晶状体氧化还原系统中的重要作用及参与年龄相关性白内障形成的机制。

**方法:**建立TTase基因敲除小鼠模型并进行基因型鉴定。裂隙灯观察TTase基因敲除型和野生型小鼠白内障随年龄的发生情况。检测小鼠晶状体中谷胱甘肽(GSH)含量。Western blot检测晶状体中氧化产物蛋白质二硫化物(PSSG)的变化。免疫共沉淀法鉴定形成PSSG的蛋白质。观察纯化的重组人晶状体TTase(RHLT)对PSSG的脱硫醇作用。

**结果:**TTase基因敲除型小鼠和野生型小鼠白内障的发生均随年龄而增加,且主要表现为核性白内障。在TTase基因敲除型小鼠中,白内障最早从4月龄开始发生,9月龄时最为显著;野生型小鼠白内障最早从9月龄开始发生,12月龄时最为显著。两种基因型小鼠晶状体中GSH含量均随年龄增加而下降,9月龄TTase基因敲除型小鼠晶状体中GSH下降更为显著,且PSSG的表达明显高于野生型,主要表现为高分子聚合物。免疫共沉淀反应证实形成PSSG的蛋白质包含肌动蛋白(actin)和三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH),这种积聚的PSSG可被GSH还原,且与纯化的RHLT反应更有效。

**结论:**TTase基因敲除可以加速小鼠年龄相关性白内障的发生,这与晶状体中PSSG的积聚相关,且形成的PSSG可被TTase脱硫醇,证实TTase在防止年龄相关性白内障的发生中发挥重要作用。

**关键词:**硫醇转移酶;白内障;谷胱甘肽;二硫化物;肌动蛋白;三磷酸甘油醛脱氢酶

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2020.3.05

## Establishment of Thioltransferase knockout mouse model and the function of thioltransferase in cataractogenesis

Jie Zhang<sup>1</sup>, Hong Yan<sup>2</sup>, Marjorie F. Lou<sup>3</sup>

**Foundation item:** Natural Science Foundation of China (No. 81300743)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Tangdu Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China;

<sup>2</sup>Shaanxi Eye Hospital of Xi'an Fourth Hospital; Affiliated Xi'an Fourth Hospital, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China; <sup>3</sup>School of Veterinary Medical and Biomedical Sciences, University of Nebraska, Lincoln, Nebraska 68583, USA

**Correspondence to:** Jie Zhang. Department of Ophthalmology, Tangdu Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China. jessicazhangjie@hotmail.com

Received:2019-06-23 Accepted:2020-02-13

## Abstract

• **AIM:** To examine the morphological and biochemical alterations in the eyes of Thioltransferase knockout (TTase KO) mouse model as a function of age, and to explore the important function in redox homeostasis in the lens and in the age-related cataractogenesis.

• **METHODS:** TTase KO model was established in this laboratory. TTase KO and WT mice were examined and the lens opacity was classified by using a slit lamp. Each lens was homogenized in lysis buffer and processed for measurement of glutathione (GSH) level. Examination of Protein-GSH mixed disulfides (PSSG) formation in the lens by Western blot analysis. Immunoprecipitation was used to identify the proteins formed PSSG. Dethiolation of lens proteins was carried out using purified recombinant human lens TTase (RHLT).

• **RESULTS:** The slit lamp examination showed an age-dependent nuclear cataract development in both eyes of the WT and TTase KO mice. The onset of cataract was 4mo in the KO mice and 9mo in the WT mice. The GSH loss showed in both groups during aging and was prominent in the TTase KO mice after 9mo old. PSSG in the lenses of both groups showed progressive elevation, whereas the lenses of the KO group had a higher level of PSSG after 9mo. These GSH-conjugated proteins were confirmed as actin and glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) by immunoprecipitation and they could be eliminated when the homogenates were

treated with RHLT.

• **CONCLUSION:** The results showed that deletion of TTase gene in the mouse could lead to an early age-dependent cataract formation and the PSSG formation in these lenses appeared to link directly to lens opacity. The PSSG could be dethiolated by TTase. This data strengthens that TTase plays an essential role in maintaining lens clarity.

• **KEYWORDS:** thioltransferase; cataract; glutathione; PSSG; actin; GAPDH

**Citation:** Zhang J, Yan H, Lou MF. Establishment of Thioltransferase knockout mouse model and the function of thioltransferase in cataractogenesis. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2020;20(3):420-425

## 0 引言

年龄相关性白内障可由多种因素诱发,包括氧化损伤、紫外线辐射、高血糖、吸烟及遗传等。氧化损伤是最重要的发病因素。研究证实,在年龄相关性白内障的晶状体中,含巯基的抗氧化物和谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 水平急剧下降,含巯基的蛋白质广泛被氧化,形成蛋白质与 GSH 形成的二硫化物 (protein-GSH mixed disulfides, PSSG) 或蛋白质与蛋白质形成的二硫化物 (protein-protein mixed disulfides, PSSP); 细胞质和细胞膜间的大量结合蛋白转化为不可溶性蛋白; 细胞膜内大部分脂质被氧化,以上这些都是导致白内障发生的原因<sup>[1]</sup>。

硫醇转移酶 (thioltransferase, TTase) 也称为谷氧还蛋白 1 (glutaredoxin 1, Grx1), 它是巯基-二硫化物的氧化还原酶家族中一个非常重要的成员。1974 年首次在大鼠肝细胞发现<sup>[2]</sup>, 随后在大肠杆菌 *E. coli* 中发现<sup>[3]</sup>, 并且得到广泛的研究。哺乳动物中 Grx 两种最主要的同工酶, TTase (Grx1) 主要存在于细胞质中<sup>[4-5]</sup>, Grx2 存在于线粒体中<sup>[6]</sup>, Grx2 的功能尚未完全阐明。TTase 通过断裂晶状体蛋白质氧化形成的二硫键 (PSSG) 使硫醇化的蛋白质脱硫醇, 保持晶状体蛋白和膜蛋白的还原状态, 从而阻止它们交联失活, 同时可以通过调节酶活性中心的巯基来修复氧化损伤的酶, 从而防止白内障的产生<sup>[4-5]</sup>。本研究通过建立硫醇转移酶基因敲除小鼠模型, 观察其晶状体形态和生化方面随年龄的改变, 探讨 TTase 在晶状体氧化还原系统中的生理作用及在年龄相关性白内障发生发展过程中的重要性。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 主要实验试剂: REDEExtract-N-Amp Tissue PCR 试剂盒、胎牛血清、GSH 含量测定试剂盒 (美国 Sigma 公司), BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (美国 Pierce 公司), 抗 PSSG 单克隆抗体 (美国 ViroGeng 公司), 抗 GAPDH 单克隆抗体、抗 Beta-actin 单克隆抗体、山羊抗鼠 IgG2a (美国 Santa Cruz 公司), His-band 试剂盒 (美国 QIAGEN 公司), 其他试剂均为国产分析纯试剂。主要仪器设备: 裂隙灯 (美国 Zeiss 公司)、离心机 (美国 Eppendorf 公司), PCR 仪、电泳仪、电转仪、化学发光成像仪 (美国 Bio-Rad 公司), 紫外分光光度计 (美国 Beckman Coulter 公司)。

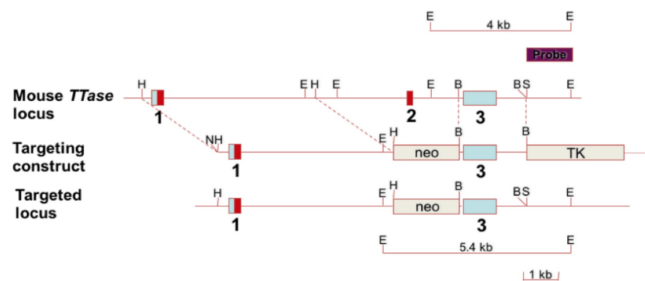


图 1 小鼠 TTase 基因敲除过程。

## 1.2 方法

**1.2.1 建立 TTase 基因敲除小鼠模型** TTase 基因敲除过程见图 1, 该过程是与南京大学-南京生物医药研究院合作完成。小鼠 TTase 基因序列包括 3 个外显子, 第 1、2 外显子为蛋白质编码区, 且第 2 外显子为 GSH 结合部位, 第 3 外显子为 3'-非编码区。从 129SV 小鼠文库中克隆出 TTase 基因组片段, 用外源性载体序列 (Neo) 替换, 敲除片段包含了第 2 个外显子和第 1、2 内含子的部分片段。打靶载体用 Not I 酶切线性化后, 转入 R1 胚胎干细胞 [来源 (129SVx129SVJ) F1], 经过筛选, 得到阳性克隆。将筛选成功的克隆细胞植入 C57BL/6 小鼠的囊胚细胞, 进行至少两代遗传, 由杂合子 (TTase<sup>+/-</sup>) [遗传背景为 (129SVx129SVJ) F1 和 C57BL/6] 小鼠交配后产杂合子、野生型和基因敲除型三种基因型小鼠, 采用 PCR 的方法对其基因型进行鉴定, 最后得到 TTase 基因敲除型小鼠 (TTase<sup>-/-</sup>)<sup>[7]</sup>。实验动物在清洁级层流动物房内进行饲养繁殖, 小鼠笼、水、食物、垫料等均经消毒处理。采用 1 只公鼠和 1 只母鼠交配繁殖后代。母鼠的孕期大约是 20d, 生育小鼠发育良好。本研究过程中动物管理符合动物保护条例, 并经伦理委员会批准。

**1.2.2 小鼠基因型鉴定** 采用 REDEExtract-N-Amp Tissue PCR 试剂盒进行小鼠基因组 DNA 抽提, 并采用 PCR 扩增的方法对所有小鼠基因型进行鉴定。

**1.2.3 裂隙灯观察小鼠晶状体混浊情况** 分别取不同年龄 (1、4、9、12、16 月龄) TTase 基因敲除型和野生型小鼠, 0.5% 托吡卡胺和 0.5% 去氧肾上腺素眼液联合散瞳, 15min 后在裂隙灯下观察每只小鼠双眼晶状体混浊程度, 并根据晶状体混浊分级系统 II (LOCSII)<sup>[8]</sup> 进行分级, 分析不同基因型小鼠随年龄增长白内障发生情况。

**1.2.4 小鼠晶状体可溶性蛋白质的提取与定量** 小鼠处死后, 立即取出眼球, 分离晶状体并称重, 置于干冰上冷冻干燥, -80℃ 保存待用。加组织裂解液于 1~2mL 匀浆器中, 将晶状体置于匀浆器中匀浆, 并置于冰上, 重复研磨使组织尽量碾碎, 裂解 30min 后, 用移液管将裂解液移至 1.5mL 离心管中, 在 4℃ 下 13000r/min 离心 10min, 离心 2 次, 取上清置于 -80℃ 保存。采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白质的总浓度。

**1.2.5 小鼠晶状体 GSH 含量的测定** 取晶状体组织匀浆液于 1.5mL 离心管中, 加等体积 20% 三醋酸纤维素 (TCA) 混合, 使终浓度为 10%, 在 4℃ 下 13000r/min 离心 10min, 离心 2 次, 取上清备用。按试剂盒说明书测定晶状体 GSH 含量。

**1.2.6 Western blot 检测小鼠晶状体 PSSG 蛋白质的表达** 将提取的晶状体组织匀浆液进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜及脱脂牛奶封闭, 之后于 4℃ 冰箱内与一

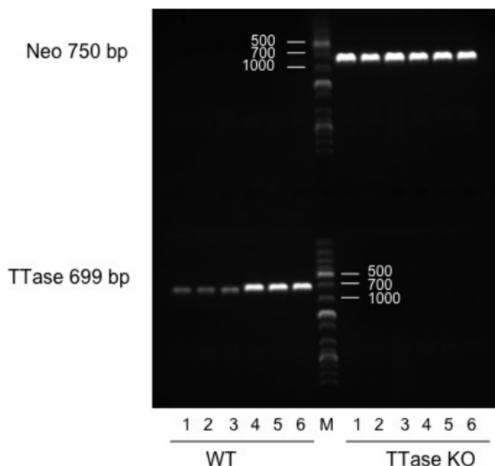


图2 小鼠基因型 PCR 鉴定结果 M:Marker;1~6:小鼠编号。WT,野生型;TTase KO;TTase 基因敲除型。

抗(1:1000 抗 PSSG 单克隆抗体)孵育过夜,室温漂洗后给予二抗(1:4000 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG2a)封闭液中孵育 1h,再次漂洗后加入配置好的显色液,于发光成像仪 Versadoc 进行化学发光及成像并进行蛋白条带的光密度扫描。

**1.2.7 免疫共沉淀法检测形成 PSSG 的蛋白质** 每管中加入 20 $\mu$ L 晶状体组织匀浆液,加入 RIPA 缓冲液至 100 $\mu$ L,加入 5 $\mu$ g 抗体(抗 Beta-actin/GAPDH 单克隆抗体),在混匀器上 4 $^{\circ}$ C 匀速旋转过夜。每管中加入 50 $\mu$ L Beta-actin/GAPDH beads,在混匀器上 4 $^{\circ}$ C 匀速旋转 2h。将免疫沉淀后的溶液于 4 $^{\circ}$ C 2500r/min 离心 10min,收集上清,加入 500 $\mu$ L RIPA 缓冲液洗涤 beads,4 $^{\circ}$ C 2500r/min 离心 10min,弃上清,共洗涤 3 次。在洗涤完毕的 beads 中加入 2 $\times$ SDS 加样缓冲液,于 100 $^{\circ}$ C 煮沸 3min 后进行 Western blot 检测(方法同前)。

**1.2.8 重组人晶状体 TTase 的分离纯化及脱硫醇作用检测** 选取转化的携有重组表达质粒 pET23a(+)的大肠杆菌单菌落于 5mL LB(Amp+)培养液中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜后,测量 600nm 下吸光度值,收集 4 OD/mL 细胞,转移至 100mL LB(Amp+)培养液中 32 $^{\circ}$ C 振荡培养,待吸光度值达 0.6 OD/mL(2~3h)加入 IPTG,42 $^{\circ}$ C 诱导 6h,4 $^{\circ}$ C 下 3000r/min 离心 30min 收获菌体。同时收取少量表达产物进行全蛋白 12% SDS-PAGE 分析。离心收集沉淀加入 5mL BugBuster 和 5 $\mu$ L Nucleas 悬浮,室温下缓慢摇匀 10min,避免气泡。4 $^{\circ}$ C 下 15000r/min 离心 30min 收集上清。上清经 His-band 纯化试剂盒进行洗脱。将重组液超滤浓缩至 2~3mL,-80 $^{\circ}$ C 保存。采用 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分析重组蛋白的纯化过程。取晶状体组织匀浆液,分别与还原型 GSH(终浓度为 5、10mmol/L)或纯化的重组人晶状体 TTase(recombinant human lens TTase, RHLT)0.1U 在 30 $^{\circ}$ C 水浴反应 30min。反应后加入 5 $\times$ SDS 加样缓冲液,于 100 $^{\circ}$ C 煮沸 3min 后进行 Western blot 检测(方法同前)。

统计学分析:本研究中所有实验均重复 3 次,实验数据使用 SPSS 19.0 进行统计学分析。计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,TTase 基因敲除型和野生型小鼠组间比较用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

表 1 两种基因型小鼠晶状体 GSH 含量 ( $\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/g}$ )

基因型	1 月龄	4 月龄	9 月龄	16 月龄
野生型	5.22 $\pm$ 0.23	5.00 $\pm$ 0.09	4.90 $\pm$ 0.24	4.22 $\pm$ 0.47
TTase 基因敲除型	5.17 $\pm$ 0.08	4.90 $\pm$ 0.13	4.26 $\pm$ 0.41	4.01 $\pm$ 0.48
<i>t</i>	2.11	2.20	2.36	2.31
<i>P</i>	0.57	0.19	0.02	0.50

## 2 结果

**2.1 小鼠基因型鉴定及生长情况** 不同基因型小鼠基因鉴定的 PCR 电泳结果见图 2,TTase 基因敲除型小鼠扩增出第一对引物(Neo),野生型小鼠扩增出第二对引物(TTase)。TTase 基因敲除型小鼠和野生型小鼠生长状况良好,目前为止最长观察 1mo 发现,两种基因型小鼠在体质量、习性及生长发育方面均非常相似。

**2.2 不同基因型小鼠白内障发生情况** 在 TTase 基因敲除型和野生型小鼠中,白内障的发生均随着年龄增加而增加,混浊类型主要为核性,见图 3。在 TTase 基因敲除型小鼠中,晶状体混浊最早从 4 月龄发生,可见晶状体核点状混浊,9 月龄晶状体核混浊明显加重;而野生型小鼠晶状体混浊最早从 9 月龄发生,12 月龄明显加重。16 月龄时两种基因型小鼠晶状体均发展为成熟期白内障。

4 月龄 TTase 基因敲除型小鼠白内障发病率为 26%(10/38 眼),野生型小鼠晶状体均透明(0/22 眼);9 月龄 TTase 基因敲除型小鼠白内障发病率增加至 78%(22/28 眼),野生型为 40%(8/20 眼);12 月龄 TTase 基因敲除型小鼠晶状体均发生混浊(18/18 眼),野生型发病率为 50%(16/32 眼);16 月龄两种基因型小鼠晶状体均出现明显混浊(TTase 基因敲除型 20/20 眼;野生型 12/12 眼)。

**2.3 不同基因型小鼠晶状体 GSH 含量变化** 观察不同年龄(1、4、9、16 月龄)TTase 基因敲除型和野生型小鼠晶状体中 GSH 含量发现,两种基因型小鼠晶状体 GSH 含量均随着年龄增加而降低,且 9 月龄 TTase 基因敲除型小鼠晶状体中 GSH 含量明显低于野生型,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1,图 4。

**2.4 不同基因型小鼠晶状体 PSSG 蛋白质的表达** 观察不同年龄(1、4、9、16 月龄)TTase 基因敲除型和野生型小鼠晶状体 PSSG 蛋白质的表达发现,两种基因型小鼠晶状体中 PSSG 蛋白质的表达均随着年龄增加而升高,且形成的 PSSG 蛋白质主要集中在分子量 37~50kDa 和 100kDa 以上。比较两种基因型小鼠晶状体 PSSG 蛋白质表达灰度值发现,4 月龄( $P < 0.05$ )和 9 月龄( $P < 0.01$ )TTase 基因敲除型小鼠晶状体中高分子 PSSG(100kDa 以上)蛋白质表达明显高于同年龄野生型小鼠(图 5)。

**2.5 免疫共沉淀法鉴定形成 PSSG 的蛋白质** Western blot 可见 PSSG 条带主要集中在分子量 37~50kDa,与骨架蛋白 Beta-actin(42kDa)和 GAPDH(37kDa)分子量相似,因此利用免疫共沉淀法检测形成 PSSG 的蛋白质。取组织裂解液分别用抗 Beta-actin 和抗 GAPDH 进行免疫沉淀反应,免疫沉淀物经 SDS-PAGE 凝胶电泳后转膜,并用抗 Beta-actin 和抗 GAPDH 抗体进行 Western blot。结果发

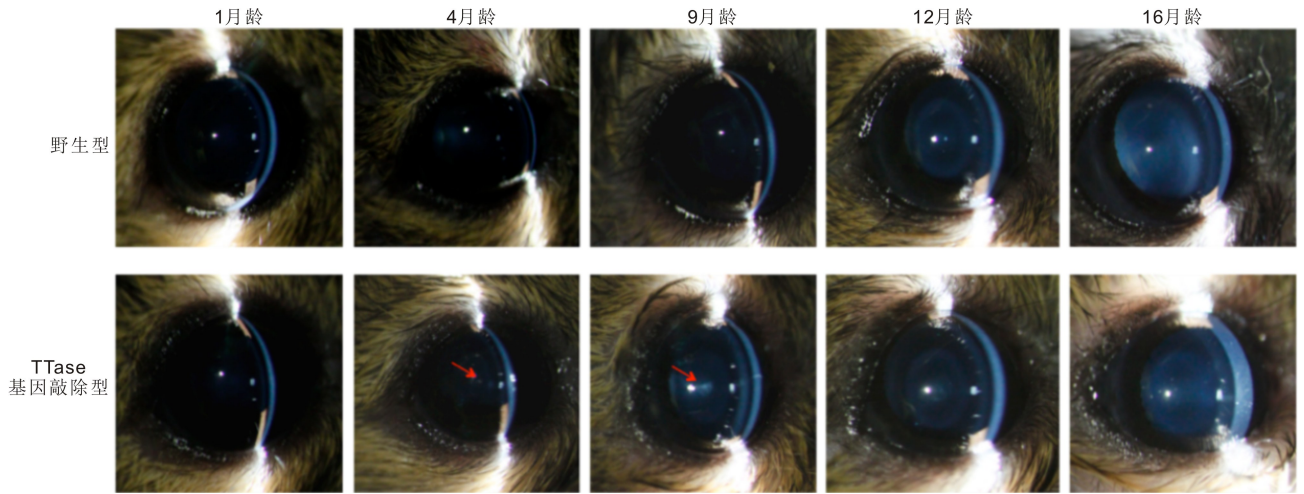


图3 裂隙灯观察不同年龄两种基因型小鼠晶状体混浊情况 1月龄 TTase 基因敲除型和野生型小鼠晶状体均透明;4月龄基因敲除型小鼠晶状体开始发生核点状混浊,而野生型小鼠晶状体仍然保持透明;9月龄基因敲除型小鼠可见核性混浊及空泡和小水裂,而野生型小鼠晶状体仅可见轻度的混浊;12~16月龄两种基因型小鼠晶状体混浊均加重,逐渐发展为成熟期白内障,包括皮质和后囊下混浊。红色箭头示小鼠晶状体核混浊部位。

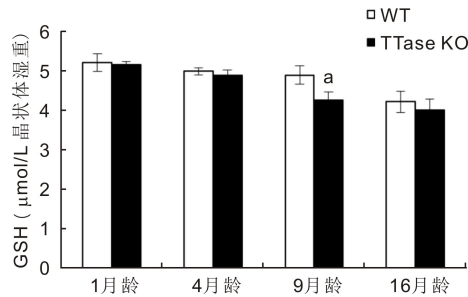


图4 不同年龄两种基因型小鼠晶状体 GSH 含量 WT:野生型;TTase KO:TTase 基因敲除型。<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 野生型。

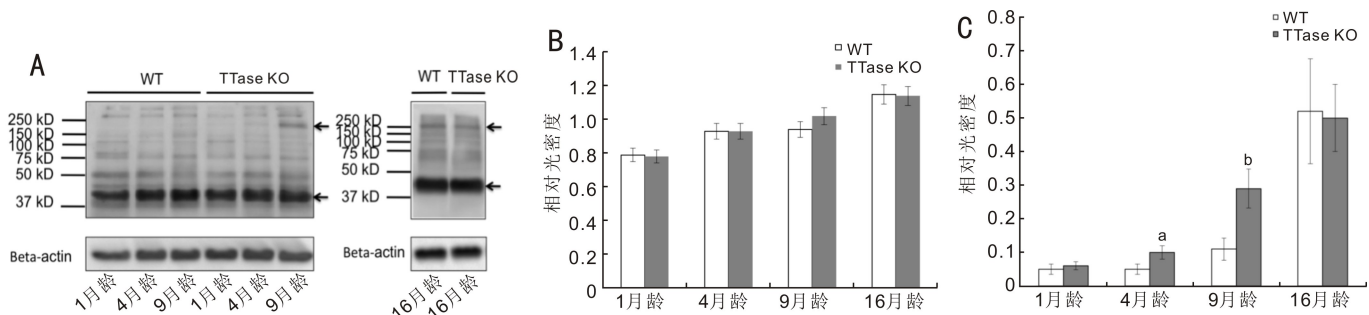


图5 Western blot 分析不同基因型小鼠晶状体 PSSG 蛋白质表达 A:Western blot 检测结果;B:不同基因型小鼠晶状体 PSSG 37~50kDa 蛋白条带光密度扫描统计图;C:不同基因型小鼠晶状体 PSSG 100kDa 以上蛋白条带光密度扫描统计图。WT:野生型;TTase KO:TTase 基因敲除型。<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 野生型。

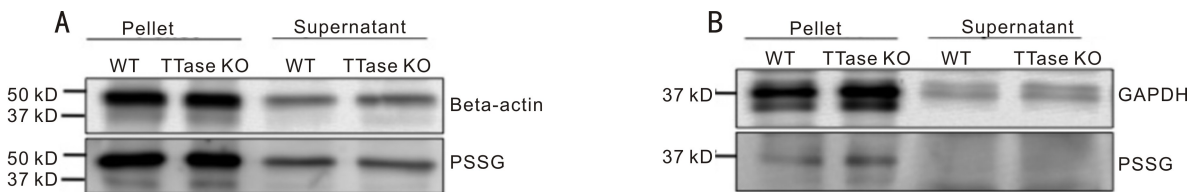


图6 免疫共沉淀法鉴定形成 PSSG 的蛋白质 A:免疫共沉淀鉴定 Beta-actin;B:免疫共沉淀鉴定 GAPDH。Pellet: 免疫沉淀物; Supernatant: 上清;WT:野生型;TTase KO:TTase 基因敲除型。

现,在免疫沉淀产物中可以检测到 Beta-actin 和 GAPDH,证实形成氧化产物 PSSG 中的蛋白质包含 Beta-actin 和 GAPDH(图6)。

2.6 重组人晶状体 TTase 的脱硫醇作用 取9月龄 TTase 基因敲除型小鼠晶状体裂解液,分别与 5、10mmol/L GSH 或同时加入纯化的 RHLT 0.1U 反应,形成的 PSSG 可被还原剂 GSH 还原,而加入纯化的 TTase 后,更多硫醇化的

PSSG 可被还原,证明 TTase 具有脱硫醇作用(图7)。

### 3 讨论

晶状体的氧化损伤是年龄相关性白内障形成的重要因素<sup>[1,9]</sup>。晶状体中有多重抗氧化屏障,其中包括 2 种主要蛋白质/酶修复系统:(1) GSH 依赖的 TTase/Grx 系统,通过切断晶状体蛋白质和 GSH 硫醇化形成的二硫化物 (PSSG) 维持晶状体的还原状态<sup>[10]</sup>;(2) NADPH 依赖的硫

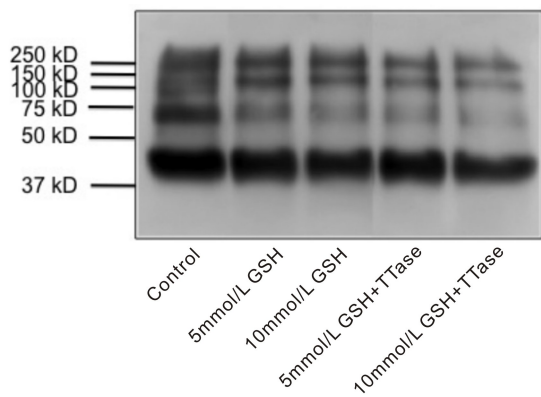


图7 Western blot 分析 TTase 的脱硫醇作用 control: TTase 基因敲除小鼠晶状体裂解液,未加入 GSH 或纯化的 TTase。

氧化蛋白(thioredoxin, Trx)系统,可以有效还原蛋白质和蛋白质之间形成的二硫键(PSSP)<sup>[11-12]</sup>。这些抗氧化系统可以独立或联合发挥作用,保持晶状体的氧化还原平衡,从而防止白内障的形成。本研究通过建立 TTase 基因敲除小鼠模型,观察其白内障的发生情况,进一步探讨 TTase 在白内障发病中的保护机制。

小鼠 TTase 基因序列包括 3 个外显子,其中 GSH 结合氨基酸位点编码于第 2 外显子,本研究通过敲除第 2 外显子建立 TTase 基因敲除小鼠模型。Western blot 检测结果显示,TTase 基因敲除型小鼠晶状体上皮细胞及其他组织如脑、心、肾均无 TTase 表达<sup>[7]</sup>。目前观察 TTase 基因敲除型小鼠在体质量、习性及生长发育方面与野生型小鼠都非常相似。两种基因型小鼠白内障的发生均呈年龄相关性,且混浊部位表现为核性混浊。TTase 基因敲除型小鼠中白内障最早从 4 月龄开始发生,9 月龄明显加重;而野生型小鼠最早从 9 月龄开始发生,12 月龄时明显加重。至 16 月龄时,两种基因型小鼠晶状体均发生明显混浊。结果提示 TTase 基因敲除可以加快年龄相关性白内障的发生。

GSH 是晶状体中重要的还原物,其可以通过一系列代谢反应和抗坏血酸不断产生<sup>[13]</sup>。GSH 的损失是发生老化和白内障形成的重要标志之一<sup>[1]</sup>。比较两种基因型小鼠晶状体 GSH 含量发现,GSH 均随年龄增加而降低,且 9 月龄 TTase 基因敲除型小鼠晶状体中 GSH 含量明显低于野生型,分析与两种基因型小鼠白内障的发生相关,9 月龄 TTase 基因敲除型小鼠白内障的发生率明显高于同年龄野生型小鼠。结果提示 TTase 基因敲除可以加速 GSH 的损失。

本课题组前期进行细胞和动物实验研究发现,TTase 等抗氧化酶在紫外线(UV)照射后表达上调,说明 TTase 在抵抗晶状体蛋白质免受紫外线等氧化损伤方面发挥重要作用<sup>[14-16]</sup>。研究发现,在年龄相关性白内障(包括核性、皮质性、混合性)患者的晶状体中,TTase 的活性明显下降<sup>[17]</sup>。TTase 的重要功能之一是通过脱硫醇作用来还原氧化损伤后的蛋白质或酶形成的 PSSG,从而修复其功能或活性。PSSG 的形成可以使蛋白质结构发生改变,且晶状体中 PSSG 的积聚可以引起蛋白质和蛋白质之间二硫键的形成和交联,最终导致白内障的发生<sup>[18]</sup>。在本研

究中两组基因型小鼠晶状体 PSSG 均随年龄增加而增加,且 9 月龄 TTase 基因敲除型小鼠晶状体中 PSSG 表达明显高于同年龄野生型小鼠,主要为高分子聚合物,分析与白内障的发生情况相关。

本研究发现,硫醇化形成 PSSG 的蛋白质之一为肌动蛋白(actin),其是一条由多肽链构成的分子量为 42kDa 的球形分子,与肌球蛋白结合构成微丝后有多种生物学功能,如构成细胞骨架、维持细胞形状;参与细胞运动、分泌等活动;参与细胞内信号的传递;参与蛋白质的合成等。大量研究表明,肌动蛋白因含有大量巯基而易被氧化损伤<sup>[19]</sup>。另一种被硫醇化的蛋白质为 GAPDH(37kDa),它在糖酵解途径中对氧化损伤最敏感。GAPDH 有 4 个亚基,每个亚基都包括 4 个巯基(-SH),其中 2 个巯基位于活性中心(Cys-149),而活性中心的氧化会导致其酶活性的丧失<sup>[20]</sup>。由于晶状体属于无氧代谢,这种代谢在晶状体中尤为重要。Xing 等<sup>[21]</sup>发现晶状体上皮细胞与低浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育后,GAPDH 可以和 GSH 被硫醇化生成 PSSG。抵抗氧化损伤引起的细胞毒性及发生永久性修饰,这种硫醇化反应也对 GAPDH 及其他酶起到保护作用<sup>[22]</sup>。本研究表明,形成硫醇化的肌动蛋白及 GAPDH 可被还原剂 GSH 还原。而加入纯化的 TTase 后,更多硫醇化的 PSSG 被还原。证实了这些条带是形成二硫化物的蛋白质,证明 TTase 通过断裂氧化形成的二硫键,使晶状体中硫醇化的蛋白质脱硫醇,阻止它们交联失活,从而使晶状体蛋白以及膜蛋白保持还原状态,防止白内障的产生。

综上所述,本研究通过建立 TTase 基因敲除小鼠模型,发现 TTase 基因敲除可以加速小鼠白内障的发生。晶状体中 PSSG 的聚积随年龄的增加而增加,且与晶状体的混浊程度相关。这种形成二硫化物的蛋白质主要是肌动蛋白和 GAPDH,且可被 GSH 联合 RHLT 还原,证实了 TTase 的脱硫醇作用。

#### 参考文献

- 1 Spector A. Oxidative stress-induced cataract: mechanism of action. *FASEB J* 1995; 9(12): 1173-1182
- 2 Askelof P, Axelsson K, Eriksson S, et al. Mechanism of action of enzymes catalyzing thiol-disulfide interchange. Thiols transferase rather than transhydrogenases. *FEBS Lett* 1974; 38: 263-267
- 3 Holmgren A. Hydrogen donor system for Escherichia coli ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73(7): 2275-2279
- 4 Lou MF. Protein-thiol mixed disulfides and thioltransferase in the lens—a review. *Advances Ocular Toxicology* 1997; 27-46
- 5 Gladyshev V, Sun CA, Liu AM, et al. Identification and characterization of a new mammalian mitochondrial glutaredoxin (thioltransferase). *J Biol Chem* 2001;276(32): 30374-30380
- 6 Lundberg M, Johansson C, Chandra J. Cloning and expression of a novel human glutaredoxin (Grx2) with mitochondrial and nuclear isoforms. *J Biol Chem* 2001;276(28): 26269-26275
- 7 Lofgren S, Fernando MR, Xing KY, et al. Effect of thioltransferase (glutaredoxin) deletion on cellular sensitivity to oxidative stress and cell proliferation in lens epithelial cells of thioltransferase knockout mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(10): 4497-4505
- 8 Chylack LT Jr, Leske MC, McCarthy D, et al. Lens opacities

- classification system II (LOCS II). *Arch Ophthalmol* 1989;107, 991-997
- 9 Lou MF. Redox regulation in the lens. *Prog Retin Eye Res* 2003;22(5): 657-682
- 10 Raghavachari N, Lou MF. Evidences for the presence of thioltransferase in the lens. *Exp Eye Res* 1996; 63(4): 433-441
- 11 Bhuyan KC, Reddy BP, Bhuyan DK. Thioredoxin genes in lens; regulation by oxidation stress. *Meth Enzymol* 2002; 374: 421-435
- 12 Yegorova S, Liu A, Lou MF. Human lens thioredoxin; molecular cloning and functional characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(8): 3263-3271
- 13 Reddy VN. Glutathione and its function in the lens-An overview. *Exp Eye Res* 1990;50(6): 771-778
- 14 Zhang J, Yan H, Löfgren S, *et al.* Ultraviolet radiation - induced cataract in mice; the effect of age and the potential biochemical mechanism. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53(11): 7276-7275
- 15 张婕. 硫醇转移酶的基因敲除及功能在白内障发病中的研究. 第四军医大学 2011
- 16 郑晓亮, 张婕, 严宏. 硫醇转移酶(TTase)对紫外线诱导氧化损伤的人晶状体上皮细胞的保护作用. *眼科新进展* 2017; 37(7): 601-604
- 17 Wei M, Xing KY, Fan YC, *et al.* Loss of repair systems in human cataractous lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; 56(1): 598-605
- 18 Sies H. In *Oxidative Stress*. London; Academic Press 1985; 243-272
- 19 Lou MF, Xu GT, Cui XL. Further studies on the dynamic changes of glutathione and protein-thiol mixed disulfides in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced cataract in rat lenses; distributions and effect of aging. *Curr Eye Res* 1995; 14(10): 951-958
- 20 Lou MF, Dickerson JE Jr, Tung WH, *et al.* Correlation of nuclear color and opalescence with protein S-thiolation in human lens. *Exp Eye Res* 1999;68(5): 547-552
- 21 Xing KY, Lou MF. Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on human lens epithelial cells and the possible mechanism for oxidative damage repair by thioltransferase. *Exp Eye Res* 2002; 74: 113-122
- 22 DalleDonne I, Milzani A, Colombo R. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated actin; assembly and polymer interactions with cross-linking proteins. *Biophys J* 1995; 69(6): 2710-2719