

## · 实验研究 ·

# 基于 iTRAQ 的不同眼轴长度核性白内障患者晶状体差异表达蛋白分析

周海燕<sup>1</sup> 严宏<sup>2</sup> 严唯佳<sup>3</sup> 王新川<sup>4</sup>

<sup>1</sup>陕西省人民医院眼科 西安交通大学医学院第三附属医院眼科 710068; <sup>2</sup>空军军医大学唐都医院眼科 710038; <sup>3</sup>英国谢菲尔德大学医学院 S102TN; <sup>4</sup>空军军医大学基础医学院, 西安 710038

严宏现在西安市第四医院 陕西省眼科医院 710004

通信作者: 严宏, Email: yhongb@fmmu.edu.cn

**【摘要】** 目的 筛选和鉴定与眼轴相关的核性白内障晶状体核的相关差异蛋白质。方法 收集 2016 年 1 月至 2017 年 12 月西宁以东地区行白内障囊外摘出术的 III ~ IV 级核性白内障患者 48 例 48 眼的晶状体核, 根据年龄和眼轴长度分为长眼轴高龄组、长眼轴低龄组、正常眼轴高龄组、正常眼轴低龄组、短眼轴高龄组和短眼轴低龄组, 每组 8 例, 同时取自角膜移植供体的 7 个透明晶状体核作为正常对照组。每组提取晶状体水溶性、水不溶尿素溶性、水不溶尿素不溶性蛋白后合并进行相对和绝对定量同位素标记 (iTRAQ) 技术的质谱检测, 并进行差异蛋白质筛选。另收集 20 例拟行白内障囊外摘出术的白内障患者 20 个晶状体核分为长眼轴低龄组、正常眼轴低龄组、长眼轴高龄组和正常眼轴高龄组, 利用 Western blot 法对质谱检测中有意义的差异表达蛋白质进行验证。结果 通过重复 2 次 iTRAQ 技术共鉴定出 80 个蛋白, 控制年龄因素后, 分析得出 6 种蛋白质与轴性近视相关的核性白内障密切相关, 其中山梨醇脱氢酶在长眼轴组中上调,  $\beta$ B2-晶状体蛋白在长眼轴组中表达下调。长眼轴低龄组山梨醇脱氢酶蛋白的相对表达量为  $1.204 \pm 0.142$ , 明显高于正常眼轴低龄组的  $0.711 \pm 0.072$ , 长眼轴高龄组山梨醇脱氢酶蛋白的相对表达量为  $1.092 \pm 0.334$ , 明显高于正常眼轴高龄组的  $0.617 \pm 0.089$ , 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。结论 山梨醇脱氢酶在长眼轴核性白内障患者晶状体核中含量高于短眼轴患者, 其可能作为眼轴相关性核性白内障潜在的研究靶蛋白。

**【关键词】** 眼轴长度; 晶状体; 核性白内障; 同位素标记; 蛋白质组学

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (81370997、81600720); 陕西省自然科学基金青年基金项目 (2017JQ8012)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.12.004

## Study on iTRAQ-based differential expression protein analysis in nuclear cataract lens with different axial length

Zhou Haiyan<sup>1</sup>, Yan Hong<sup>2</sup>, Yan Weijia<sup>3</sup>, Wang Xinchuan<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Third Affiliated Hospital of the School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710068, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Tangdu Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710004, China; <sup>3</sup>Medical School, The University of Sheffield, Western Bank, Sheffield S102TN, UK; <sup>4</sup>Basic Medical School, Air Force Medical University, Xi'an 710038, China

Yan Hong is working at Xi'an No. 4 Hospital, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710004, China

Corresponding author: Yan Hong, Email: yhongb@fmmu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To identify and verify differentially expressed proteins in lens of nuclear cataract eyes with different axial lengths. **Methods** Forty-eight nuclear cataract patients with the hardness grade III to IV were enrolled from January 2016 to December 2017 in the east area of Xining city. The lens nucleus was obtained during extracapsular cataract extraction (ECCE) surgery. The samples were divided into six groups according to age and axial length, with 8 samples in each group. Seven normal transparent human lens nuclei were obtained from donors during corneal transplantation surgery and served as normal control. Water-soluble, water-insoluble and water-insoluble-urea-soluble protein fractions were extracted separately and merged to analyze by using 8-plex isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) labeling combined with 2D-LC/MS/MS. The data were processed with ProteinPilot software. Two technical replicates of iTRAQ analyses were carried out. Up-regulated and down-regulated proteins were

selected in two replicates as candidate biomarkers. Twenty lens nuclei from 20 nuclear cataract patients were divided into long axis young age group, normal axis young age group, long axis old age group and normal axis old age group. Western blot was used to confirm the most different proteins. This study protocol was approved by the Ethics Committee of TangDu Hospital of Air Force Medical University (TDLL2015046). Written consent was obtained from each participant. **Results** Eighty proteins were identified. Six proteins were selected as differentially-expressed proteins. Sorbitol dehydrogenase (SDH) was elevated whereas beta-crystallin B2 (CRYBB2) was decreased in the long axis groups. The relative expression of SDH protein in the long axis low age group was  $1.204 \pm 0.142$ , which was significantly higher than  $0.711 \pm 0.072$  in the normal axis low age group, the relative expression level of SDH in the long axis old age group was  $1.092 \pm 0.334$ , which was significantly higher than  $0.617 \pm 0.089$  in the normal axis old age group, the difference was statistically significant (all at  $P < 0.05$ ). **Conclusions** The expression levels of SDH in the nuclear cataract were elevated with long axial length. SDH may be involved in the pathogenesis of axial myopia-associated nuclear cataract.

[Key words] Axial lengths, eye; Human lens, crystalline; Nuclear cataract; Isotope labeling; Proteomics

**Fund program:** Natural Science Foundation of China (81370997, 81600720); Shaanxi Nature Science Foundation Project (2017JQ8012)

DOI:10.3760/ema.j.issn.2095-0160.2019.12.004

白内障是全球首位致盲眼病,其中核性白内障的发病率较高,对视力损害较早且严重。随着白内障患者年轻化,白内障和近视的相关性逐渐引起人们的重视。60岁前近视的人较正视和远视的人更易患白内障,而高度近视患者多较早并发核性白内障<sup>[1]</sup>。核性白内障的形成是多因素综合作用的结果。晶状体的透明性主要由其结构蛋白的性质决定,晶状体蛋白质在白内障发生过程中常进行翻译后修饰,同时伴随酶的改变。蛋白质组学研究有利于更深刻、更全面地认识白内障发病的关键环节<sup>[2-3]</sup>。相对和绝对定量同位素标记(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)技术已被广泛应用于差异蛋白质组学的研究<sup>[4]</sup>。本研究中利用 iTRAQ 技术鉴定不同眼轴人晶状体差异表达蛋白质,为进一步研究近视相关核性白内障发生机制提供新证据和思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 临床标本** 选择 2016 年 1 月至 2017 年 12 月在西宁市以东的平安县、循化县、民和县、乐都县、兰州市等海拔低于 2 000 m 地区拟行白内障囊外摘出术的汉族及回族 LOCS 11 分级为 III ~ IV 级的核性白内障患者作为研究对象。另收集 7 个来自角膜移植供体的透明晶状体核。排除标准:眼外伤、青光眼、角膜病、视网膜脱离及全身有与眼部相关的疾病。本研究经空军军医大学唐都医院医学伦理委员会批准(批文号:TDLL2015046),所有患者均签署知情同意书。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)、AMICON ULTRA SERU 3k 除盐柱、

Tris-HCl 缓冲液(pH 7.3)、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、碘乙酰胺(iodoacetamide)、苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)、吲哚乙酸(indoleacetic acid, IAA)、尿素(美国 Amresco 公司); dissolution buffer 液、iTRAQ 试剂盒(美国 Applied Biosystem 公司); Bradford 蛋白浓度测定试剂盒(美国 Bio-Rad 公司); 三氟乙酸(高相液相色谱纯)、乙腈(高相液相色谱纯)(德国 Merck 公司); 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、胰蛋白酶(美国 Sigma 公司); C18 脱盐小柱(Sep-Pak Vac, 50 mg)(美国 Waters 公司); 抗山梨醇脱氢酶试剂盒、二抗(美国 Abcam 公司)。5417R 型高速冷冻型离心机、Concentrator plus 真空离心浓缩仪、5415D 微量高速离心机(德国 Eppendorf 公司); LC-20AD 高效液相色谱仪、AY120 微量电子天平(日本 Shimadzu 公司); Q-STARXL 质谱仪(美国 Applied Biosystem 公司); XBridge C18 强阳离子交换色谱柱(美国 Waters 公司); ZORBAX 300SB-C18 反相色谱柱(美国 Microm 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 实验分组及晶状体核收集** 采用 A 型超声测量患者眼轴长度,根据年龄和眼轴长度将 48 例患者分为长眼轴高龄组、长眼轴低龄组、正常眼轴高龄组、正常眼轴低龄组、短眼轴高龄组和短眼轴低龄组,每组 8 例。眼轴长度分组:眼轴长度  $\geq 26$  mm 为长眼轴组;  $23 \text{ mm} \leq$  眼轴长度  $< 26 \text{ mm}$  为正常眼轴组;眼轴长度  $< 23 \text{ mm}$  为短眼轴组;年龄分组:年龄  $\geq 75$  岁为高龄组;年龄  $\leq 60$  岁为低龄组。同时将取自角膜移植供体的 7 个透明晶状体核作为正常对照组(表 1)。另收集 20 例拟行白内障囊外摘出术核性白内障患者的 20 个晶

状体核进行 western blot 验证,分为长眼轴低龄组、正常眼轴低龄组、长眼轴高龄组和正常眼轴高龄组,年龄分别为(59.0±3.0)、(55.8±3.5)、(78.4±1.9)和(79.3±3.5)岁,眼轴长度分别为(29.1±1.4)、(23.1±0.3)、(28.8±1.2)和(23.0±0.6)mm。白内障囊外摘出术中撕囊后行水分离,充分分离皮质与核,观察晶状体核可以转动后转入前房,将其从角巩膜隧道口娩出。利用直径 3 mm 的环钻钻取晶状体核中央区,并快速置入液氮中快速冻结。

表 1 各组样本年龄和眼轴长度比较 (mean±SD)

组别	样本量	年龄(岁)	眼轴长度(mm)
长眼轴高龄组	8	79.8±1.9	28.7±1.5
长眼轴低龄组	8	58.0±4.0	28.5±1.4
正常眼轴高龄组	8	80.3±4.5	23.1±0.4
正常眼轴低龄组	8	56.9±4.2	23.0±0.3
短眼轴高龄组	8	75.1±2.5	19.9±0.5
短眼轴低龄组	8	57.6±5.3	20.7±0.6
正常对照组	7	34.7±4.2	23.5±0.6

**1.2.2 蛋白质提取及质谱鉴定** 晶状体标本经 PBS 冲洗后称质量;按照分组将其研磨成粉末状,放入 EP 管中,冰上混旋 45 min;加入 A 溶液(pH 7.3 的 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液、5 mmol/L DTT、1 mmol/L PMSF、1 mmol/L IAA),样品与提取液体积比为 1:9。4℃条件下 10 000×g 离心 15 min,取上清。沉淀用 A 溶液共清洗 4 次,收集上清,为水溶性蛋白;EP 管中的沉淀加入 B 溶液(pH 7.3 的 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液,7 mmol/L 尿素、5 mmol/L DTT),4℃条件下 10 000×g 离心 15 min。沉淀用 B 溶液共清洗 4 次,收集上清,为水不溶性蛋白;最后的沉淀加入 C 溶液(pH 7.9 的 0.5 mmol/L Tris-HCl 缓冲液),4℃条件下 10 000×g 离心 15 min。沉淀用 C 溶液共清洗 4 次,收集上清,为水不溶、尿素不溶蛋白;每组将 3 种蛋白质混合,100 mg 分装,洗去蛋白中的盐分,采用 Bradford 法进行蛋白质定量。AMICON ULTRA SERU 3k 除盐小柱进行蛋白除盐,用 iTRAQ 试剂中的 dissolution buffer SDS-PAGE 电泳检测、FASP 酶解和肽段分析。各组样品分别取约 100 μg,按照试剂盒说明书对长眼轴高龄组、长眼轴低龄组、正常眼轴高龄组、正常眼轴低龄组、短眼轴高龄组、短眼轴低龄组和正常对照组标本分别标记 114、115、116、117、118、119 和 121 报告基因,各管标记试剂中加入 50 μl 异丙醇混匀,分别加入各管样品中,室温反应 1 h,之后各加入 3 倍体积水,使标记试剂分解。将标记后的肽段分组混合,进行 SCX 预分级。每份样

品采用高效液相色谱系统进行分离,再用 Q-STAR XL MS/MS 系统进行质谱鉴定。

**1.2.3 Western blot 验证差异蛋白质表达** 将研磨器放入-80℃冰箱中过夜;从液氮中取出晶状体样品,置于冰上,用 1 倍 PBS 冲洗,称质量;按照分组将样品放入研磨器中研磨成粉末状,并转移至 EP 管中,冰上混旋 45 min;参照 1.2.2 方法对蛋白质进行提取;按照 Bradford 法进行蛋白定量。配置 0.75 mm 质量分数 10%分离胶和 0.75 mm 质量分数 5%浓缩胶,各组取蛋白样品 80 μg,经上样缓冲液处理后,每孔上样 20 μl,电泳条件,90 V 电泳约 20 min,分离胶恒压 120 V 电泳 90 min;湿法转硝酸纤维素膜;将膜浸没在封闭液[含质量分数 5%脱脂奶粉 Tris 盐吐温缓冲液(Tris buffered saline Tween, TBST)]中 37℃轻摇 1 h;用 Western blot 封闭液 I(质量分数 4%BSA 的 TBST 溶液)稀释一抗,4℃孵育过夜, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;用辣根过氧化物酶结合的二抗(1:1 000)37℃孵育 2 h,再用 TBST 洗膜 4 次,每次 15 min,于 Bio-Rad 发光成像仪显色,凝胶成像分析系统显影。以 α-tubulin 为内参,计算目的蛋白相对表达量。

**1.2.4 数据分析** 所得数据结果进入 Protein Pilot 4.5(美国 ABI 公司)检索,搜索限定:Sapiens:Human; Enzyme:trypsin。采用 iTRAQ 标记样品赖氨酸和氨基端。有效蛋白鉴定的条件是 2 条肽段被鉴定,其中至少 1 条肽段置信度大于 95%;蛋白定量的有效性为只有 2 条 95%置信度且有定量信息的肽段同时被鉴定,而且这些肽段的定量信息中的 E7(相对标准偏差)<2。组间差异>1.2 或<0.8 即被认为该蛋白质表达存在差异。实验重复 2 次,选择重复出现且表达趋势一致的蛋白质作为差异蛋白。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件(美国 IBM 公司)进行统计分析。本研究中定量资料数据经 W 检验呈正态分布,以 mean±SD 表示。各组间均数经 Levene 检验呈方差齐性。长眼轴低龄组、正常眼轴低龄组、长眼轴高龄组和短眼轴高龄组山梨醇脱氢酶蛋白相对表达量比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD-t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 蛋白质鉴定

通过重复 2 次 iTRAQ 技术,筛选出符合蛋白质鉴定条件的蛋白质共 80 个(表 2)。在控制年龄的因素下,分析与眼轴相关的差异蛋白质。经过筛选发现与眼

轴相关的差异蛋白共 6 种,分别是  $\gamma$ -烯醇酶、丙酮酸激酶同工酶 M1/M2、山梨醇脱氢酶、缝隙连接蛋白 3、 $\beta$ B2-晶状体蛋白(beta-crystallin B2,CRYBB2)和 T-复合物多

肽 1,其中山梨醇脱氢酶在同一年龄段长眼轴组中含量高,短眼轴组中含量低,而 CRYBB2 在同一年龄段长眼轴组中含量低,在短眼轴组中含量高(图 1,表 3)。

表 2 iTRAQ 技术鉴定的蛋白质

序号	蛋白质名称	序号	蛋白质名称
1	Protein epsilon(蛋白质 E)	41	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A(肽酰脯氨酰顺反异构酶 A)
2	Acylamino-acid-releasing enzyme(酰基氨基酸释放酶)	42	Peroxiredoxin-1(过氧化物还原酶 1)
3	ADP-ribosylation factor 3(ADP 核糖基化因子 3)	43	Peroxiredoxin-2(过氧化物还原酶 2)
4	Alpha-crystallin A chain(晶状体蛋白 a 链)	44	Phakinin(晶状体蛋白)
5	Alpha-crystallin B chain(晶状体蛋白 b 链)	45	Phosphoglycerate kinase 1(磷酸甘油酸激酶 1)
6	Ankyrin-2(锚蛋白-2)	46	Phosphoglycerate mutase 1(磷酸甘油酸变位酶 1)
7	Beta-crystallin A2( $\beta$ -晶状体蛋白 A2)	47	Plectin(网蛋白)
8	Beta-crystallin A3( $\beta$ -晶状体蛋白 A3)	48	Protein DJ-1(蛋白质 DJ-1)
9	Beta-crystallin A4( $\beta$ -晶状体蛋白 A4)	49	Pterin-4-alpha-carbinolaminedehydratase(蝶呤-4-甲氨基乙醇胺脱水酶)
10	Beta-crystallin B1( $\beta$ -晶状体蛋白 B1)	50	Pyruvate kinaseisozymes M1/M2(丙酮酸激酶同工酶 M1/M2)
11	Beta-crystallin B2( $\beta$ -晶状体蛋白 B2)	51	Quinoneoxidoreductase(醌氧化还原酶)
12	Beta-crystallin B3( $\beta$ -晶状体蛋白 B3)	52	Quinoneoxidoreductase PIG3(醌氧化还原酶 PIG3)
13	Beta-crystallin S( $\beta$ -晶状体蛋白 S)	53	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 3(ras 相关 C3 肉毒毒素底物 3)
14	Betaine—homocysteine S-methyltransferase 1(甜菜碱同型半胱氨酸甲基转移酶 1)	54	V-type proton ATPase catalytic subunit A(V 型质子 ATP 酶催化亚基 A)
15	Bisphosphoglycerate mutase(二磷酸甘油酸变位酶)	55	Retinal dehydrogenase 1(视网膜脱氢酶 1)
16	Brain acid soluble protein 1(脑酸溶蛋白 1)	56	Serpin B6(丝氨酸蛋白酶抑制剂 B6)
17	Carbonylreductase [NADPH] 1(羧基还原酶 1)	57	Sorbitol dehydrogenase(山梨醇脱氢酶)
18	Coactosin-like protein(毛茛蛋白)	58	Spectrin alpha chain,non-erythrocytic 1(血影蛋白 $\alpha$ 链,非红细胞 1)
19	Cytidine deaminase(胞苷脱氨酶)	59	Spectrin beta chain,non-erythrocytic 1(血影蛋白 $\beta$ 链,非红细胞 1)
20	Fatty acid-binding protein, epidermal(脂肪酸结合蛋白,表皮)	60	T-complex protein 1 subunit beta(T-复合体蛋白 1 亚单位 $\beta$ )
21	Ferritin light chain(铁蛋白轻链)	61	T-complex protein 1 subunit delta(T-复合体蛋白 1 亚单位 $\delta$ )
22	Filamin-A(细丝蛋白 A)	62	T-complex protein 1 subunit eta(T-复合体蛋白 1 亚单位 $\eta$ )
23	Filensin(晶状体丝蛋白)	63	Titin(肌联蛋白)
24	Fructose-bisphosphate aldolase A(果糖-二磷酸醛缩酶 A)	64	Transketolase(转酮醇酶)
25	Galectin-1(半乳糖凝集素 1)	65	Tubulin-specific chaperone A(微管伴侣蛋白 A)
26	Gamma-crystallin B( $\gamma$ -晶状体蛋白 B)	66	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolaseisozyme L1(泛素羧基末端水解酶同工酶 1)
27	Gamma-crystallin C( $\gamma$ -晶状体蛋白 C)	67	Elongation factor 2(肽链延伸因子 2)
28	Gamma-crystallin D( $\gamma$ -晶状体蛋白 D)	68	Methylmalonyl-CoA mutase,mitochondrial(甲基丙二酰辅酶 a 突变酶,线粒体)
29	Gamma-enolase( $\gamma$ -烯醇酶)	69	Syntaxin-6(突触融合蛋白-6)
30	Gap junction alpha-3 protein(间隙连接蛋白-3)	70	Hemoglobin subunit beta(血红蛋白 $\beta$ 亚基)
31	Gap junction alpha-8 protein(间隙连接蛋白-8)	71	Vacuolar protein sorting-associated protein 35(空泡蛋白-相关蛋白 35)
32	Glutathionesynthetase(谷胱甘肽合成酶)	72	Vimentin(波形蛋白)
33	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(甘油醛-3-磷酸脱氢酶)	73	Ubiquitin-40S ribosomal protein(泛素-40S 核糖体蛋白)
34	Glycogenphosphorylase, brain form(糖原磷酸化酶,脑源)	74	Ubiquitin-60S ribosomal protein(泛素-60S 核糖体蛋白)
35	Heat shock protein HSP 90-alpha(热休克蛋白 90- $\alpha$ )	75	Uncharacterized protein(无特征蛋白质)
36	Keratin, type I cytoskeletal 10(角质-I 型,细胞骨架蛋白 10)	76	Unconventional myosin-Ib(非常规肌浆球蛋白-1b)
37	Keratin, type I cytoskeletal 9(角质-I 型,细胞骨架蛋白 9)	77	Unconventional myosin-Ih(非常规肌浆球蛋白-1h)
38	Keratin, type II cytoskeletal 1(角质-III 型,细胞骨架蛋白 1)	78	Voltage-gated potassium channel subunit beta-2(电压门控钾通道 $\beta$ -2)
39	L-lactate dehydrogenase A chain(L-乳酸脱氢酶 A 链)	79	Zinc finger FYVE domain-containing protein 26(含锌指状 FYVE 结构域蛋白 26)
40	NADP-dependent malic enzyme(NADP 依耐型苹果酸脱氢酶)	80	Tubulin alpha-4A chain(微管蛋白 $\alpha$ -4A 链)

注:重复 2 次 iTRAQ 技术测量并经 Protein Pilot 4.5 数据库检索;iTRAQ:相对和绝对定量同位素标记

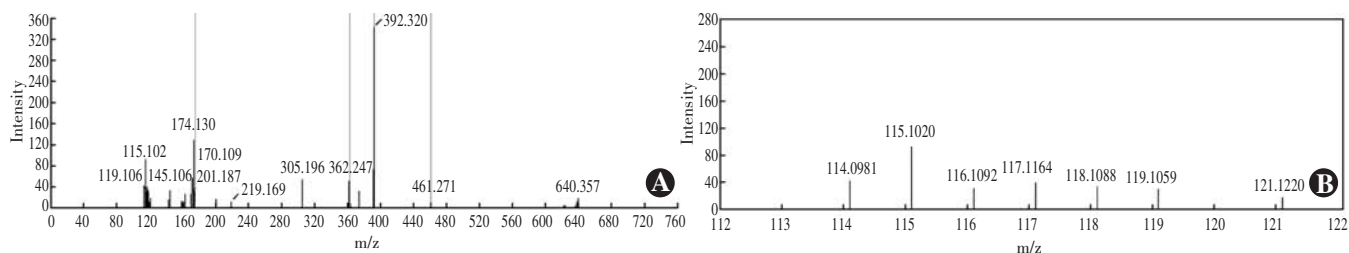


图 1 iTRAQ 法鉴定和定量山梨醇脱氢酶 A: 标本一级质谱图 山梨醇脱氢酶离子峰质核比为 175 B: 山梨醇脱氢酶离子峰二级质谱图 114、115、116、117、118、119 和 121 离子峰分别为长眼轴高龄组、长眼轴低龄组、正常眼轴高龄组、正常眼轴低龄组、短眼轴高龄组、短眼轴低龄组和正常对照组山梨醇脱氢酶的报告基团

表 3 各组较正常眼轴低龄组差异蛋白质倍数

序号	蛋白质名称	各组较正常眼轴低龄组变化倍数							
		115:117	P 值	116:117	P 值	118:117	P 值	119:117	P 值
1	CRYBB2	1.35	<0.001	1.66	<0.001	1.79	0.001	1.32	<0.001
2	缝隙连接蛋白-3	1.34	<0.001	1.29	0.003	1.47	0.002	1.21	0.002
3	T-复合体蛋白 1 亚单位 β	1.59	0.003	1.27	<0.001	1.24	<0.001	1.41	0.004
4	γ-烯醇酶	0.76	0.018	0.35	<0.001	0.38	0.004	0.59	0.003
5	丙酮酸激酶同工酶 M1/M2	0.34	0.021	0.72	0.003	0.69	<0.001	0.80	0.003
6	山梨醇脱氢酶	0.75	0.002	0.43	0.003	0.79	0.003	0.59	0.005

注: 115、116、117、118、119 分别为长眼轴低龄组、正常眼轴高龄组、正常眼轴低龄组、短眼轴高龄组和短眼轴低龄组山梨醇脱氢酶的报告基团 CRYBB2:βB2-晶状体蛋白

### 2.2 Western blot 法验证差异蛋白

长眼轴低龄组、长眼轴高龄组、正常眼轴低龄和正常眼轴高龄组山梨醇脱氢酶蛋白的相对表达量为  $1.204 \pm 0.142$ 、 $1.092 \pm 0.334$ 、 $0.711 \pm 0.072$  和  $0.617 \pm 0.089$ ，组间总体比较差异有统计学意义 ( $F = 14.90$ ,  $P = 0.01$ )，其中长眼轴低龄组明显高于正常眼轴低龄组，长眼轴高龄组山梨醇脱氢酶相对表达量明显高于正常眼轴高龄组，差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (图 2)。

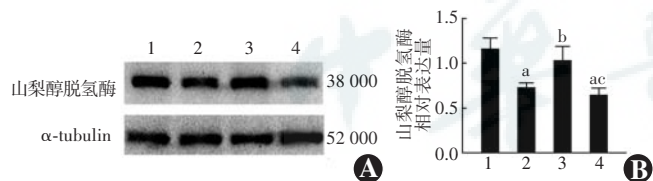


图 2 Western blot 法检测各组晶状体核山梨醇脱氢酶蛋白的表达

A: 各组山梨醇脱氢酶蛋白表达电泳图 B: 各组山梨醇脱氢酶蛋白相对表达量化比较  $F = 14.90$ ,  $P = 0.01$ 。与长眼轴低龄组比较,  $^a P < 0.05$ ; 与正常眼轴低龄组比较,  $^b P < 0.05$ ; 与长眼轴高龄组比较,  $^c P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n = 3$ ) 1: 长眼轴低龄组 2: 正常眼轴低龄组 3: 长眼轴高龄组 4: 正常眼轴高龄组

### 3 讨论

人晶状体混浊是进行性老化的表现, 是晶状体氧化损伤反应的累积。动物模型无法模拟人白内障病理生理过程, 且动物晶状体结构和蛋白组成与人晶状体差别较大, 故本研究中直接以人晶状体为研究对象, 通

过复明工程, 在 2 000 多例患者中筛选出 48 枚晶状体用于研究。Kubo 等<sup>[5]</sup>研究发现, 有轴性近视的年轻患者较老年患者更早发展为核性白内障并较早施行白内障手术, 推测眼轴延长和高度近视是核性白内障发展的重要危险因素, 但其发病机制仍不十分清楚, 可能由于延长的玻璃体腔降低了晶状体背面代谢物或营养物质的扩散, 从而抑制了氧化防御系统。研究认为, 高度近视玻璃体脱水液化现象发生较早, 范围较广, 并随近视屈光度数增长而加剧, 液化的玻璃体将视网膜表面氧运送到玻璃体腔内, 改变了眼内正常氧浓度梯度, 使晶状体暴露在高氧环境下, 诱发核性白内障<sup>[6-7]</sup>。因此, 近视和长眼轴可能会加重玻璃体液化和核性白内障的形成。氧化损伤造成晶状体蛋白和脂质的改变, 且玻璃体液化增加了形成核性白内障的风险<sup>[8]</sup>。施健等<sup>[9]</sup>利用双向电泳联合质谱分析比较了病理性近视并发白内障和正常晶状体之间的差异蛋白质组学变化, 病理性近视并发白内障患者晶状体中 αA-、αB-晶状体蛋白含量明显减少, 推测病理性近视并发核性白内障的形成可能主要与晶状体中 α-晶状体蛋白含量降低以及 CRYBB2 成分异常增多有关; β-晶状体蛋白还可能发生多种翻译后修饰改变, 导致结构和功能改变, 进而引起核性白内障。

晶状体蛋白质分水溶性和水不溶性蛋白质, 后者又分为水不溶性尿素溶性, 水溶性尿素不溶性蛋白。以往蛋白质研究只对相关蛋白质逐个分析, 忽略了蛋白质之间的相互关系。故本研究中提取水溶性、水不溶尿素溶性、水不溶尿素不溶性蛋白并进行混合研究。晶状体组织结构非常精细, 其形态和蛋白组成随着年龄的不同而变化。为确保纳入研究部分均为晶状体核部, 本研究选用直径 3 mm 的环钻环取晶状体核。

iTRAQ 标记法检测敏感、识别率准确、变异小、重复率高, 已广泛应用于差异蛋白质组学的研究<sup>[4, 10-11]</sup>。

