

## · 实验研究 ·

# 过氧化氢处理体外培养小鼠晶状体上清液的蛋白组学分析

李果<sup>1</sup> 陈颖<sup>2</sup> 严宏<sup>3</sup> 周希媛<sup>1</sup>

<sup>1</sup>重庆医科大学附属第二医院眼科 眼科学重庆市重点实验室 400010; <sup>2</sup>重庆医科大学附属第一医院眼科 400016; <sup>3</sup>西安市人民医院(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 710004

陈颖现在在西安市人民医院(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 710004

通信作者:周希媛, Email:zhouxiyuan2002@aliyun.com

**【摘要】 目的** 研究过氧化氢处理体外培养小鼠晶状体蛋白渗漏情况,并对其进行鉴定和生物信息分析。**方法** 分离 42 只健康成年雄性 C57BL/6J 小鼠双眼完整晶状体,任意合并 28 个晶状体作为一个样本,共 3 个样本。体外培养小鼠晶状体,以含 2 mmol/L 过氧化氢培养液进行培养,构建体外白内障模型。以空白培养液作为对照组。收集培养 24 h 上清液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。采用液相质谱联用对上清液蛋白质进行结构鉴定并采用无标记定量质谱法定量分析高丰度蛋白。采用 METASCAPE 数据库对鉴定的蛋白进行生物信息分析。采用多重微珠免疫分析系统测定上清液中细胞因子的含量。**结果** 过氧化氢处理 24 h,所有晶状体均混浊且囊膜完整。上清液中总蛋白质量浓度为  $(3.73 \pm 0.59) \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。聚丙烯酰胺凝胶电泳分析结果显示,蛋白条带主要位于相对分子质量 35 000 以下。质谱分析共鉴定出 675 种蛋白,其中包括 16 种晶状体蛋白,占总蛋白丰度的  $(86.1 \pm 0.8)\%$ ;蛋白涉及的生物学过程主要包括细胞-细胞黏附、细胞转化、氧化还原、抑制细胞凋亡和蛋白质转运;涉及的分子功能主要包括水解酶活性、氧化还原酶活性、催化活性、翻译起始因子活性和 GTPase 活性;亚细胞定位主要为细胞质、外泌体、细胞核、质膜和胞外间隙。基于抗体的多重微珠免疫分析结果显示,体外培养上清液中可定量检测到 9 种细胞因子,包括在眼内液高表达的单核细胞趋化蛋白-1 和转化生长因子- $\beta_2$ 。**结论** 过氧化氢处理体外培养的晶状体存在蛋白质渗漏,这些渗漏蛋白可能对眼内其他组织的代谢、功能产生影响。

**【关键词】** 白内障;晶状体;上清液;蛋白组学;细胞因子

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(81873674)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200730-00546

## Proteomics analysis of mouse lens supernatant treated with hydrogen peroxide *in vitro*

Li Guo<sup>1</sup>, Chen Ying<sup>2</sup>, Yan Hong<sup>3</sup>, Zhou Xiyuan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing Key Laboratory of Ophthalmology, Chongqing 400010, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; <sup>3</sup>Xi'an People's Hospital (Xi'an Fourth Hospital), Shaanxi Eye Hospital, Affiliated Xi'an Fourth Hospital, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710004, China

Chen Ying is working at Xi'an People's Hospital (Xi'an Fourth Hospital)

Corresponding author: Zhou Xiyuan, Email: zhouxiyuan2002@aliyun.com

**【Abstract】 Objective** To study the protein leakage of mouse lens treated with hydrogen peroxide *in vitro*, and to identify and carry out bioinformatics analysis of the leaked proteins. **Methods** Intact binocular lenses of 42 healthy male C57BL/6J mice were enucleated following sacrifice, and 28 lenses were arbitrarily combined as one sample, with 3 samples in total. Mouse lenses were cultured with medium containing 2 mmol/L hydrogen peroxide for 24 hours to establish a cataract model *in vitro*. Blank medium M-199 was taken as control sample. Supernatant was subjected to polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The structure of the supernatant proteins was identified by

liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, and the high-abundant proteins were quantitatively analyzed by label-free quantitative mass spectrometry. The biological information of the identified proteins was analyzed by METASCAPE database. Content of cytokines in the supernatant was determined using the multiplex bead immunoassay system. This study protocol was approved by an Ethics Committee of The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University (No. 2019-173), and the use and care of experimental animals complied with the ARVO statement. **Results** After 24-hour culturing, the lenses became turbid, and the capsules were intact. The protein concentration in the supernatant was  $(3.73 \pm 0.59) \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . PAGE analysis of the supernatant protein profile revealed that protein bands were below 35 000. A total of 675 proteins were identified with mass spectrometry. Sixteen crystallin proteins accounted for  $(86.1 \pm 0.8) \%$  of the total protein abundance; the biological processes those proteins participated in mainly included cell-cell adhesion, cell transformation, oxidation-reduction, inhibition of apoptosis, and protein translocation; the molecular functions of those proteins mainly involved the activity of hydrolase, oxidoreductase, catalysis, translation initiation factor, and GTPase; the subcellular localization of proteins were mainly in cytoplasm, extracellular exosome, the nucleus, the plasma membrane, and the intercellular space. The results of an antibody-based multiplex bead immunoassay presented 9 cytokines in the supernatant, which included monocyte chemoattractant protein-1 and transforming growth factor- $\beta_2$  highly expressed in intraocular fluid. **Conclusions** There are protein leakages in lens treated with hydrogen peroxide *in vitro*, and it may have influences on metabolism and/or functions of other intraocular tissues.

[Key words] Cataract; Lens; Supernatant; Proteomics; Cytokines

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81873674)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200730-00546

晶状体是由晶状体囊和晶状体纤维构成的双凸透镜状透明无血管组织。晶状体囊为一层透明的薄膜,其控制着营养物质进入及代谢产物排出。当晶状体内的蛋白发生变性和凝聚,晶状体就逐渐变混浊,形成白内障。晶状体混浊主要与氧化应激损伤有关。已有的研究表明,在白内障形成过程中晶状体内蛋白可能通过晶状体囊膜渗漏到房水或者玻璃体液中<sup>[1]</sup>,但是对这些渗漏蛋白质的具体成分还缺乏全面的了解。为了明确白内障晶状体渗漏蛋白质的成分,预测其对眼内其他组织可能的影响,本研究采用基于无标记液相色谱-串联质谱的定量蛋白质组学方法和多重微珠免疫分析系统分析过氧化氢诱导体外培养小鼠晶状体上清液中的蛋白质组成及其生物信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 健康 8~10 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 42 只,体质量 16~23 g,购自重庆医科大学动物实验中心[动物合格证编号:SYXK(渝)2018-0003]。将这些小鼠置于  $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、60%湿度下,进行 12 h/12 h 的光暗循环。本实验均遵循 ARVO 声明。本研究方案经重庆医科大学附属第一医院伦理委员会批准(批文号:2019-173)。

**1.1.2 主要试剂及仪器** M-199 培养基(美国 Gibco 公司);体积分数 3% 过氧化氢溶液(美国 Sigma 公

司);BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Pierce 公司);Bio-Plex Pro 试剂盒 III(美国 Bio-Rad 公司);Milliplex Map TGF- $\beta$ -3 Plex 试剂盒、Ziptip C18 柱(美国 Millipore 公司);Nano-RPLC 液相色谱仪、Q Exactive Plus 质谱仪、酶标仪、CO<sub>2</sub> 培养箱、超净工作台(美国 Thermo Fisher 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 晶状体培养及白内障模型建立** 取 42 只小鼠以颈椎脱臼法处死,立即摘除双眼眼球,无菌条件下洗净血迹,剔除肌肉筋膜。浸没在 M-199 培养基中,解剖显微镜下于后极部剪开巩膜,取出晶状体,操作过程中避免损伤晶状体囊膜。首先将分离的晶状体放入 M-199 培养基中,在体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中预培养 8 h;借助网格图鉴别后丢弃混浊的晶状体并补充相应数量晶状体;任意选取 28 个晶状体合并作为一个样本,共 3 个样本;将各样本转移到 24 孔板中,加入含有 2 mmol/L 过氧化氢的 M-199 培养基 400  $\mu\text{l}$  中培养晶状体 24 h;丢弃培养基,更换为正常 M-199 培养基 400  $\mu\text{l}$  继续培养 24 h;在解剖显微镜下仔细观察每个晶状体,评估囊膜的完整性;使用网格图再次检查晶状体透明度。收集晶状体混浊且囊膜完整无破损的培养孔上清液,1 000 $\times g$  离心 5 min,收集上清液于  $-70^\circ\text{C}$  条件下保存备用。以正常 M-199 培养基作为空白对照组。实验步骤重复 3 次。

**1.2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定样本中蛋白质量分**

布 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定培养上清液中蛋白含量;取含 15  $\mu\text{g}$  蛋白上清液上样进行十二酰基磺胺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(质量分数 10% 凝胶)电泳。在 80 V 恒压下电泳 60 min, 然后 120 V 电泳至结束。采用胶体考马斯亮蓝染色试剂盒对凝胶进行染色并拍照。

**1.2.3 无标记定量分析法鉴定蛋白质** 取上清液样品,采用 BCA 法测定蛋白质质量浓度。添加丙酮沉淀蛋白质,-20  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜;4  $^{\circ}\text{C}$  条件下 12 000 $\times g$  离心 10 min 后收集沉淀,用预冷混合液( $V_{\text{乙醇}}:V_{\text{丙酮}}:V_{\text{乙酸}}=50:50:0.1$ )洗涤沉淀 2 次,在 12 000 $\times g$ 、4  $^{\circ}\text{C}$  条件下离心 15 min,收集沉淀,用 6 mol/L 盐酸胍、300 mmol/L 四乙基溴化铵溶解沉淀物。取 100  $\mu\text{g}$  蛋白质沉淀,加入碳酸氢铵稀释的胰蛋白酶,37  $^{\circ}\text{C}$  条件下培养过夜;收集肽段并离心浓缩干燥;应用 Ziptip C18 柱除去肽段中的盐。用上样缓冲液( $V_{\text{乙醇}}:V_{\text{水}}:V_{\text{甲酸}}=2:98:0.1$ )溶解样品并进行液相串联质谱分析。采用 Nano-RPLCEasy-nLC 1000 系统进行液相色谱分析,使用 Q Exactive Plus 纳米电喷雾电离质谱仪对肽样品进行质谱分析。以数据依赖模式运行质谱仪,一级质谱扫描范围为 350~1 600  $m/z$ 。在 70 000 的分辨率下检测完整的肽,然后以 17 500 的分辨率选择肽进行二级质谱分析。

使用 MaxQuant 计算蛋白质组学平台 1.5.8.3 版(www.maxquant.org)及其内置的 Andromeda 肽和蛋白质识别搜索引擎进行质谱数据分析,采用无标记定量(label-free quantification, LFQ)和基于强度的绝对定量(iBAQ)算法进行蛋白定量。在 Swissprot Mus musculus 数据库中使用标准设置(肽质量公差为 $\pm 20$  ppm,片段相对分子质量公差为 $\pm 0.5$ )比对质谱数据。肽鉴定错误发现率(false discovery rate, FDR)设置为 0.01,蛋白质鉴定 FDR 设为 0.05,氨基酸残基 $\geq 7$ 个。定量分析中只包括属于蛋白质的“unique plus razor peptides”。使用 METASCAPE 数据库对鉴定的蛋白进行 GO 分析(<http://metascape.org/gp/index.html/main/step1>)。对鉴定的高丰度蛋白进行生物信息检索,根据相关的生物学过程、分子功能和亚细胞定位对它们进行分类。

**1.2.4 多重系统分析白内障晶状体上清培养液中细胞因子质量浓度** 使用 Bio Plex Magpix 多重阅读器分析白内障晶状体上清培养液中细胞因子质量浓度,利用该系统可同时检测和定量单个 25~50  $\mu\text{l}$  样品中的多种低丰度细胞因子。使用多重磁珠免疫分析系统对细胞因子进行量化分析。检测细胞因子包

括白细胞介素(interleukin, IL)-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-12(p40)、IL-12(p70)、IL-13、IL-17A、嗜酸性粒细胞趋化因子、粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)、干扰素(interferon, IFN)- $\gamma$ 、趋化因子配体 1(chemokine C-X-C motif ligand 1, CXCL1)、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、调节激活正常 T 细胞表达和分泌细胞因子(regulate the expression and secretion of cytokines in activated normal T cells, RANTES)、巨噬细胞炎性蛋白(macrophage inflammatory protein, MIP)1 $\alpha$ 、MIP1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$ 、转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- $\beta_1$ 、TGF- $\beta_2$  和 TGF- $\beta_3$ 。所有分析程序均按照说明书进行:用荧光标记的磁性微球与特异性捕获抗体偶联,并与待测样品混合;加入生物素化检测抗体和链霉亲和素-R-藻红蛋白。应用 Luminex-Magpix 系统对混合物进行分析,利用该仪器的 2 种激光分别识别微球类型和量化结合抗原的数量。同时在每个测试板上平行测试标准浓度,生成标准曲线,根据标准曲线计算样本中各细胞因子浓度。

## 2 结果

### 2.1 晶状体白内障模型建立

2 mmol/L 过氧化氢处理后 24 h 晶状体全部变混浊,在显微镜下观察可见 3 个样本中晶状体囊膜均完整(图 1)。

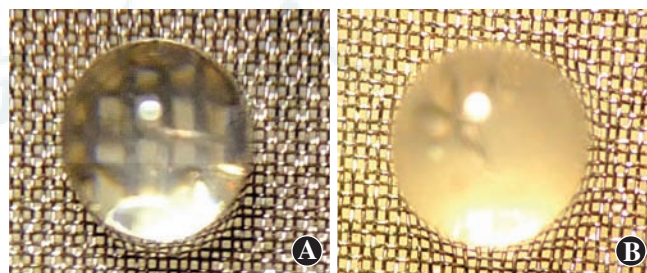


图 1 小鼠晶状体的显微镜下图像( $\times 15$ ) A:刚从眼球中取出的晶状体透明且囊膜无破损 B:过氧化氢处理后的晶状体混浊且囊膜无破损

Figure 1 Microscopic images of mouse lens ( $\times 15$ ) A: Clear and undamaged lens just removed from eyeball B: Turbid and undamaged lens at 24 hours after hydrogen peroxide treatment *in vitro*

### 2.2 白内障模型培养上清液蛋白图谱分析

3 个样本的平均蛋白质量浓度为(3.73  $\pm$  0.59)  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。胶体考马斯亮蓝染色显示样本中蛋白条带主要位于相对分子质量 35 000 以下(图 2)。



### 2.3 体外白内障模型培养上清液中蛋白鉴定及生物信息学分析

共发现 3 909 个已鉴定的肽与 3 713 个独特的肽序列相对应,从而鉴定出 675 种蛋白。发现共 521 种蛋白同时存在于 3 个样本中,82 种蛋白同时存在于其中 2 个样本中,72 种蛋白只存在于其中 1 个样本中(图 3)。本研究发现的大多数高丰度蛋白为晶状体蛋白,占有所有蛋白的(86.1±0.8)%。

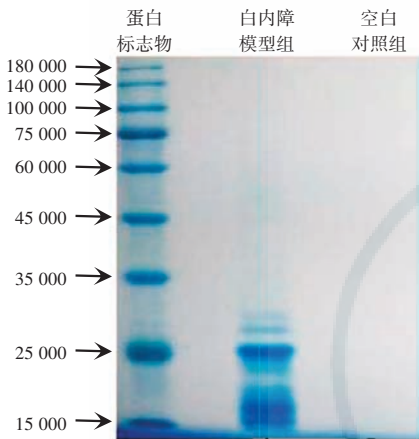


图 2 晶状体培养上清液聚丙烯酰胺凝胶电泳图(考马斯亮蓝染色) 过氧化氢处理 24 h,晶状体培养上清液中出现大量蛋白,蛋白条带主要位于相对分子质量 35 000 以下

Figure 2 Polyacrylamide gel electrophoretogram of lens supernatant culture medium (coomassie brilliant blue staining) After 24-hour hydrogen peroxide treatment, a large number of proteins appeared in the supernatant of lens culture, and the protein bands were mainly below 35 000

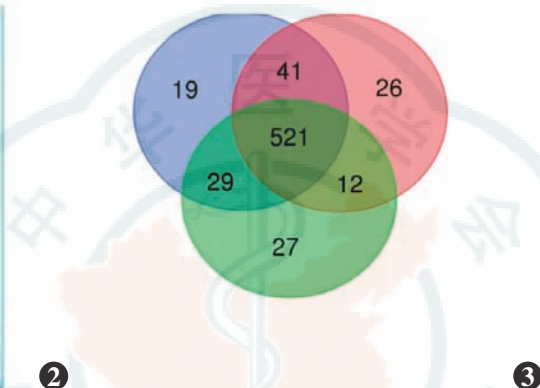


图 3 3 个样本鉴定蛋白的异同分析

Figure 3 The Venn diagram showing unique and common proteins among the three samples

基于生物学过程的分类显示,47 种蛋白参与细胞-细胞黏附过程,占 6.53%;44 种蛋白与细胞转化相关,占 6.11%;43 种蛋白与氧化还原有关,占 5.97%;40 种蛋白与抑制细胞凋亡有关,占 5.56%;36 种蛋白与蛋白质转运有关,占 5%;33 种蛋白与凋亡过程有关,占 4.58%;32 种蛋白与细胞黏附有关,占 4.44%;31 种蛋白与代谢过程有关,占 4.31%;30 种蛋白与蛋白质酶解有关,占 4.17%;29 种蛋白与蛋白质折叠有关,占 4.03%(图 4A);其余蛋白与翻译启动、mRNA 的合成以及核小体的组装等生物过程有关。基于分子功能的分类显示,258 种蛋白具有蛋白质结合功能,占 35.83%;136 种蛋白具有多聚 RNA 结合功能,占 18.89%;128 种蛋白具有核苷酸结合功能,占 17.78%;79 种蛋白具有与钙黏蛋白结合参与细胞间黏附功能,占 10.97%;70 种蛋白具有水解酶活性,占 10.56%;66 种蛋白具有 RNA 结合功能,占 9.17%;40 种蛋白具有氧化还原酶活性,占 5.56%;33 种蛋白具有催化活性,占 4.58%;27 种蛋白具有翻译起始因子活性,占 3.75%;26 种蛋白具有 GTPase 活性,占 3.61%(图 4B);其余蛋白具有肌动蛋白结合、酶结合以及蛋白激酶结合等分子功能。根据亚细胞定位对蛋白进行分类发现,492 种蛋白分布在细胞质,占 68.33%;391 种蛋白分布在外泌体,占 54.31%;331 种蛋白分布在细胞核,占 45.97%;175 种蛋白分布在质膜,占 24.31%;97 种蛋白分布在胞外间隙,占 13.47%(图 4C)。

### 2.4 体外白内障模型培养上清液中不同细胞因子质量浓度

采用基于抗体的多重微珠免疫分析方法检测低丰度细胞因子,共检测 26 种细胞因子,其中 9 种细胞因子均达检测限(表 1),17 种细胞因子在 3 个样本中均未被检测到。对照组未检测到细胞因子。

基于生物学过程的分类显示,47 种蛋白参与细胞-细胞黏附过程,占 6.53%;44 种蛋白与细胞转化相关,占 6.11%;43 种蛋白与氧化还原有关,占 5.97%;40 种蛋白与抑制细胞凋亡有关,占 5.56%;36 种蛋白与蛋白质转运有关,占 5%;33 种蛋白与凋亡过程有关,占 4.58%;32 种蛋白与细胞黏附有关,占 4.44%;31 种蛋白与代谢过程有关,占 4.31%;30 种蛋白与蛋

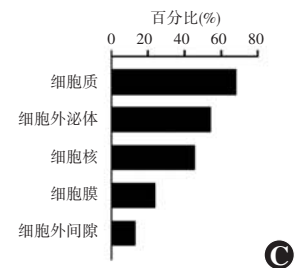
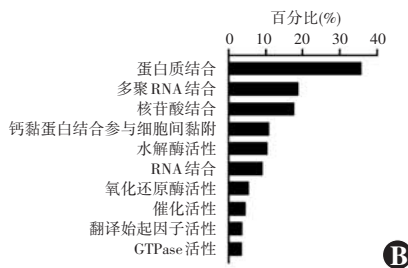
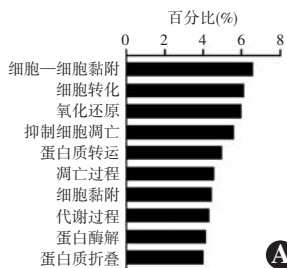


图 4 体外白内障模型培养上清液中蛋白生物信息学分析 A:蛋白主要参与的生物学过程 B:蛋白主要参与的分子功能 C:蛋白的主要亚细胞定位

Figure 4 Bioinformatics analysis of protein in culture supernatant of extracorporeal cataract model A: main biological processes proteins participated in B: main molecular functions proteins involved C: main subcellular localization of proteins

表 1 体外白内障模型培养上清液中各细胞因子质量浓度  
Table 1 Cytokine levels in culture supernatant of extracorporeal cataract model

细胞因子	可检测到样本/ 全部检测样本 (n/n)	细胞因子质量浓度 (mean±SD, pg/ml)
MCP-1	3/3	585.38±192.70
CXCL1	3/3	67.21± 9.30
TGF-β <sub>2</sub>	3/3	58.16± 7.88
G-CSF	3/3	32.39± 6.83
IL-6	3/3	13.65± 4.66
RANTES	3/3	11.85± 3.86
GM-CSF	1/3	4.13
TNF-α	3/3	3.67± 0.28
MIP 1α	3/3	2.32± 0.89

注: MCP: 单核细胞趋化蛋白; CXCL: 趋化因子配体; TGF: 转化生长因子; G-CSF: 粒细胞集落刺激因子; IL: 白细胞介素; RANTES: 调节激活正常 T 细胞表达和分泌细胞因子; GM-CSF: 粒细胞巨噬细胞集落刺激因子; TNF: 肿瘤坏死因子; MIP: 巨噬细胞炎症蛋白

Note: MCP: monocyte chemoattractant protein; CXCL: chemokine C-X-C motif ligand; TGF: transforming growth factor; G-CSF: granulocyte colony stimulating factor; IL: interleukin; RANTES: regulate the expression and secretion of cytokines in activated normal T cells; GM-CSF: granulocyte macrophage colony stimulating factor; TNF: tumor necrosis factor; MIP: macrophage inflammatory protein

### 3 讨论

本研究采用晶状体体外培养的方式,以过氧化氢诱导形成白内障模型。目前,以过氧化氢诱导体外培养的晶状体形成白内障的方法已十分成熟<sup>[2]</sup>。不同的研究采用了不同浓度(0.2、0.5、1、2 mmol/L)的过氧化氢诱导体外培养的晶状体形成白内障模型。本实验研究使用少量(400 μl)的培养基培养数量众多的(28个)晶状体,故采用了常用浓度中的高限 2 mmol/L 过氧化氢培养晶状体。

本研究通过液相质谱联用技术鉴定出完整白内障晶状体体外过氧化氢处理后培养上清液中 675 种蛋白,其中相对分子质量 35 000 以下的晶状体蛋白占总蛋白丰度的(86.1±0.8)%。晶状体蛋白是晶状体内的主要成分,包括 α-、β-和 γ-晶状体蛋白 3 类,在维持晶状体纤维细胞的结构、折射率以及光学特性中发挥重要作用。已有研究在白内障患者房水中检测到一些晶状体蛋白,包括 β-晶状体蛋白 S、β-晶状体蛋白 B2、γ-晶状体蛋白 D 等<sup>[3-4]</sup>。在白内障患眼的玻璃体液中证实存在晶状体蛋白<sup>[5]</sup>。本研究证实白内障晶状体在体外培养的环境中同样渗漏以晶状体蛋白为主的蛋白质,同时本结果显示有更多种类的晶状体蛋白能从白内障晶状体中漏出。

目前,大量的研究报道了晶状体蛋白的生物学活

性<sup>[6-7]</sup>。有研究显示,大鼠视网膜缺血-再灌注损伤后,视网膜中 α-、β-和 γ-晶状体蛋白转录表达增加<sup>[8]</sup>。在视网膜光损伤、糖尿病视网膜病变和年龄相关性黄斑变性等视网膜疾病中也发现视网膜中晶状体蛋白质表达水平升高<sup>[9-10]</sup>。在应激条件下,α-晶状体蛋白能够通过抑制非晶状体组织中的 caspases 从而抑制细胞凋亡<sup>[11]</sup>。此外,由 α-晶状体蛋白衍生的小分子肽在包裹具有伴侣功能的活性部位时具有类似抗聚集和抗凋亡特性<sup>[12]</sup>。β-晶状体蛋白 B2 在应激条件下可促进视网膜色素上皮细胞的增生并提高细胞活力<sup>[13]</sup>。给予青光眼实验动物模型玻璃体腔内注射 β-晶状体蛋白 B2 可以减少视网膜神经节细胞丢失,缓解视网膜神经纤维层的减少并保护视神经<sup>[14]</sup>。此外,β-和 γ-晶状体蛋白能促进视网膜轴突再生<sup>[15-16]</sup>。基于以上研究,推测白内障患者晶状体蛋白会从晶状体渗漏到前房和玻璃体腔,保护除晶状体以外的眼组织免受应激性损伤,促进受损神经元的修复。

此外,本研究还检测到其他 659 种蛋白质,其中生物学过程中占比第三的一组蛋白能通过氧化还原酶的分子功能介导还原反应,从而抑制降低体内氧化应激程度。这些结果提示,白内障晶状体可能是眼内具有抗氧化、细胞保护作用的蛋白质储存库。在白内障患者体内,这些蛋白质不断地从晶状体中漏出,其可能对其他组织有一定的作用,仍需进一步研究。

临床研究显示,白内障手术后糖尿病黄斑水肿(diabetic macular edema, DME)和玻璃体后脱离(posterior vitreous detachment, PVD)相关的视网膜脱离风险增加<sup>[17-18]</sup>,但其确切的机制尚不明确。已有研究表明,氧化应激是 DME 和 PVD 相关视网膜脱离的重要因素<sup>[19]</sup>。推测白内障手术后,晶状体不再继续渗漏抗氧化和保护细胞的蛋白质,导致玻璃体及视网膜氧化应激加剧,从而增加 DME 和视网膜脱离的发生风险。

但是,当大量晶状体蛋白渗漏到前房和玻璃体腔时,也可能诱发葡萄膜炎。例如,过熟期白内障的晶状体皮质液化后形成的大量晶状体蛋白漏出到晶状体囊膜外;白内障手术残留的皮质也会诱发单核细胞浸润并吞噬处理这些蛋白质,形成晶状体源性葡萄膜炎<sup>[20]</sup>。

另外,根据亚细胞定位对蛋白质进行分类,发现高达 54.31%的蛋白质是通过外泌体分泌的。外泌体为脂质双层结构,其结构与脂质体类似,使得蛋白质大分子更容易透过晶状体囊膜<sup>[21-22]</sup>。

本研究结果显示,体外白内障模型上清培养液中

可检测到 MCP-1 和 TGF- $\beta_2$  等细胞因子。TGF- $\beta_2$  在眼内作用明确,其属于 TGF- $\beta$  超家族的成员,具有调节细胞生长、分化以及凋亡等功能;同时它作为一种房水免疫抑制因子,在眼的免疫调控机制中起到非常重要的作用。这 2 种细胞因子在白内障患者的房水和玻璃体液中处于较高水平<sup>[23-24]</sup>,表明白内障晶状体是眼内液中部分细胞因子的来源之一。

本研究证实体外培养的白内障晶状体能向外渗漏晶状体蛋白、其他具有抗氧化功能的蛋白质以及一些活性细胞因子,推测白内障晶状体可能通过向外渗漏蛋白质,从而影响眼内其他组织的功能。然而,究竟人眼内是否能够观察到这种影响,以及这种影响最终表现为保护或是损伤作用,仍需要进一步研究。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**志谢** 感谢重庆医科大学附属第一医院眼科实验室 眼科学重庆市重点实验室提供的实验平台及设备

## 参考文献

- [1] Shen Y, Dong LF, Zhou RM, et al. Role of long non-coding RNA MIAT in proliferation, apoptosis and migration of lens epithelial cells: a clinical and *in vitro* study [J]. J Cell Mol Med, 2016, 20 (3) : 537-548. DOI:10.1111/jcmm.12755.
- [2] Hernebring M, Adelöf J, Wiseman J, et al. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cataract as a model of age-related cataract: lessons learned from overexpressing the proteasome activator PA28 $\alpha$ B in mouse eye lens[J/OL]. Exp Eye Res, 2021, 203 : 108395 [2021-03-25]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33310056>. DOI:10.1016/j.exer.2020.108395.
- [3] Bennett KL, Funk M, Tschernutter M, et al. Proteomic analysis of human cataract aqueous humour: comparison of one-dimensional gel LCMS with two-dimensional LCMS of unlabelled and iTRAQ<sup>®</sup>-labelled specimens [J]. J Proteomics, 2011, 74 (2) : 151-166. DOI:10.1016/j.jprot.2010.10.002.
- [4] Escoffier P, Paris L, Bodaghi B, et al. Pooling aqueous humor samples: bias in 2D-LC-MS/MS strategy? [J]. J Proteome Res, 2010, 9 (2) : 789-797. DOI:10.1021/pr9006602.
- [5] Jay NL, Gillies M. Proteomic analysis of ophthalmic disease [J]. Clin Exp Ophthalmol, 2012, 40 (7) : 755-763. DOI:10.1111/j.1442-9071.2012.02788.x.
- [6] Zhang K, Zhu X, Lu Y. The proteome of cataract markers: focus on crystallins [J]. Adv Clin Chem, 2018, 86 : 179-210. DOI:10.1016/bs.acc.2018.05.005.
- [7] Selivanova OM, Galzitskaya OV. Structural and functional peculiarities of  $\alpha$ -crystallin [J/OL]. Biology (Basel), 2020, 9 (4) : 85 [2021-02-11]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32340218>. DOI:10.3390/biology9040085.
- [8] Yoshimura N, Kikuchi T, Kuroiwa S, et al. Differential temporal and spatial expression of immediate early genes in retinal neurons after ischemia-reperfusion injury [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44 (5) : 2211-2220. DOI:10.1167/iovs.02-0704.
- [9] Kumar PA, Haseeb A, Suryanarayana P, et al. Elevated expression of alphaA-and alphaB-crystallins in streptozotocin-induced diabetic rat [J]. Arch Biochem Biophys, 2005, 444 (2) : 77-83. DOI:10.1016/j.abb.2005.09.021.
- [10] Johnson PT, Brown MN, Pulliam BC, et al. Synaptic pathology, altered gene expression, and degeneration in photoreceptors impacted by drusen [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46 (12) : 4788-4795. DOI:10.1167/iovs.05-0767.
- [11] Hamann S, Métrailler S, Schorderet DF, et al. Analysis of the cytoprotective role of  $\alpha$ -crystallins in cell survival and implication of the  $\alpha$ A-crystallin C-terminal extension domain in preventing Bax-induced apoptosis [J/OL]. PLoS One, 2013, 8 (2) : e55372 [2021-01-19]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23383327>. DOI:10.1371/journal.pone.0055372.
- [12] Raju M, Santhoshkumar P, Krishna Sharma K. Alpha-crystallin-derived peptides as therapeutic chaperones [J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1860 (1 Pt B) : 246-251. DOI:10.1016/j.bbagen.2015.06.010.
- [13] Böhm MR, Melkonyan H, Oellers P, et al. Effects of crystallin- $\beta$ -b2 on stressed RPE *in vitro* and *in vivo* [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2013, 251 (1) : 63-79. DOI:10.1007/s00417-012-2157-7.
- [14] Anders F, Teister J, Liu A, et al. Intravitreal injection of  $\beta$ -crystallin B2 improves retinal ganglion cell survival in an experimental animal model of glaucoma [J/OL]. PLoS One, 2017, 12 (4) : e0175451 [2021-01-19]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28384305>. DOI:10.1371/journal.pone.0175451.
- [15] Fischer D, Hauk TG, Müller A, et al. Crystallins of the beta/gamma-superfamily mimic the effects of lens injury and promote axon regeneration [J]. Mol Cell Neurosci, 2008, 37 (3) : 471-479. DOI:10.1016/j.mcn.2007.11.002.
- [16] Böhm MR, Prokosch V, Brückner M, et al.  $\beta$ 2-crystallin promotes axonal regeneration in the injured optic nerve in adult rats [J]. Cell Transplant, 2015, 24 (9) : 1829-1844. DOI:10.3727/096368914X684583.
- [17] Denniston AK, Chakravarthy U, Zhu H, et al. The UK Diabetic Retinopathy Electronic Medical Record (UK DR EMR) Users Group, Report 2: real-world data for the impact of cataract surgery on diabetic macular oedema [J]. Br J Ophthalmol, 2017, 101 (12) : 1673-1678. DOI:10.1136/bjophthalmol-2016-309838.
- [18] Hilford D, Hilford M, Mathew A, et al. Posterior vitreous detachment following cataract surgery [J]. Eye (Lond), 2009, 23 (6) : 1388-1392. DOI:10.1038/eye.2008.273.
- [19] Nuzzi R, Marchese A, Gulino GR, et al. Influence of posterior vitreous detachment and type of intraocular lens on lipid peroxidation in the human vitreous [J]. Mol Vis, 2015, 21 : 1106-1112.
- [20] Nche EN, Amer R. Lens-induced uveitis: an update [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2020, 258 (7) : 1359-1365. DOI:10.1007/s00417-019-04598-3.
- [21] Boyle DL, Carman P, Takemoto L. Translocation of macromolecules into whole rat lenses in culture [J]. Mol Vis, 2002, 8 : 226-234.
- [22] Bang C, Thum T. Exosomes: new players in cell-cell communication [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2012, 44 (11) : 2060-2064. DOI:10.1016/j.biocel.2012.08.007.
- [23] Chen Y, Zhang Y, Sun K, et al. Higher TGF- $\beta$ 2 level in the aqueous humor of the second eye versus the first eye in the course of sequential cataract surgery [J]. Ocul Immunol Inflamm, 2020, 28 (3) : 439-445. DOI:10.1080/09273948.2019.1578888.
- [24] Takahashi H, Nomura Y, Tan X, et al. Effects of posterior vitreous detachment on aqueous humour levels of VEGF and inflammatory cytokines [J]. Br J Ophthalmol, 2015, 99 (8) : 1065-1069. DOI:10.1136/bjophthalmol-2014-306051.

(收稿日期:2020-07-30 修回日期:2021-03-26)

(本文编辑:张宇)