

白内障与晶状体的离子转运

杨毅 陈晓明 冷麟

(复旦大学生化系,上海)

提 要

本文介绍了晶状体的结构与功能,并着重介绍了与白内障有密切关系的离子转运的研究概况。大多数学者认为,白内障晶状体的离子泵 Na^+ , K^+ -ATPase 和 Ca^{2+} -ATPase 活力下降,也有人认为 Na^+ , K^+ -ATPase 的活力没有变化。

关键词 白内障,晶状体, Na^+ , K^+ -ATPase, Ca^{2+} -ATPase, 离子转运

白内障是眼科常见疾病,也是致盲的主要原因之一。其病理变化主要表现为晶状体的混浊。因此,对白内障的研究主要集中于研究晶状体的生理生化变化。这些研究结果对于白内障的形成机理已有所阐明。

晶状体内蛋白质含量非常高。例如,人的晶状体其蛋白质约占湿重 30%;小鼠晶状体的内部即核区,蛋白质浓度可达 65—70%。尽管有这样高的蛋白质浓度,晶状体仍然是透明的。但随着年龄增长或白内障发生,蛋白质结构发生变化,晶状体内积累了水不溶性蛋白质,改变了晶状体的折射率,使光线发生散射,造成晶状体混浊^[1]。

晶状体的细胞学结构^[2]

成熟晶状体的结构非常独特。它由成千上万的纤维细胞组成,它们通过低电阻间隙联结(low-resistance gap junction)或细胞-细胞融合(cell-to-cell fusions)的方式直接传递信息。晶状体表面为一层上皮细胞,其外还有一层囊膜,接近赤道部位,上皮细胞开始伸长,分化成这个组织的主要成分——纤维细胞。正在分化的纤维细胞仍有一些细胞器,随着纤维细胞的成熟,细胞核及其 DNA 和 RNA 逐渐丢失。晶状体的大部分细胞是成熟的纤维细胞,

只有在晶状体前囊下有一层上皮细胞。除了这一部分活跃代谢的组织外,晶状体内受损伤的生物大分子不能被替代,代谢循环不起作用。这些特点有些与红细胞类似。与红细胞不同的是,红细胞寿命短,而晶状体纤维细胞一旦形成,在全部生命过程中就一直存在于晶状体内。这样,晶状体内部就必须依靠其外部组织来保持平衡和代谢有毒化合物。这种结构,使得晶状体组织的很大一部分容易受到损伤,因为它没有明显的修复机制。

晶状体的生理功能

晶状体的基本功能是把光线汇聚在视网膜上,这就要求晶状体是一个透明组织。同时还依赖于下面几个物理性质:(1)晶状体内没有血管和神经;(2)大多数纤维细胞没有细胞器;(3)细胞间隙比光的波长小;(4)晶状体细胞内高浓度蛋白质一般不聚集形成可与光的波长相比拟的颗粒。这些性质其中的(3)和(4)容易发生变化,这些变化可引起白内障。

细胞间隙的变化,可由细胞体积改变或细胞的局部性质变化所引起。细胞体积的稳定以及晶状体内任何细胞的完整性都依赖于合胞体(Syncytium)中的所有细胞的转运特性,以此来维持电解质的渗透平衡。这些细胞的相互依

赖意味着晶状体的局部区域可以具有不同的转运特性。这种转运的定域化对晶状体保持透明性是很重要的。细胞核和线粒体只出现在表面细胞内显然对晶状体的透明性也是有利的,因为主动运输中的蛋白质需要这些细胞器来合成和维持^[2]。

渗透平衡对晶状体保持透明性和生活力至为重要。晶状体的渗透平衡主要也是通过离子泵来维持的。晶状体具有典型的 Na^+ , K^+ -ATPase, 它通过产生电位而排出 Na^+ 保存 K^+ ^[2]。Neville 等提出晶状体内至少有两种不同的对乌本苷敏感的 ATPase^[2]。Shuzo Iwata 等人的研究表明,晶状体膜上还存在对乌本苷不敏感的 Ca^{2+} -ATPase 和 Mg^{2+} -ATPase^[3]。已确定 Ca^{2+} -ATPase 就是“钙泵”,对维持晶状体的钙离子梯度有重要作用。对晶状体内 Mg^{2+} -ATPase 的研究很少,但关于它在晶状体内的生理作用也有报道^[4]。

晶状体的离子转运与白内障

对各种白内障的研究表明,晶状体的早期病理变化都伴随着细胞内 Na^+ 和 Ca^{2+} 浓度的增加以及 K^+ 的浓度减小。根据这一现象,很多学者开展了对晶状体的离子泵—— Na^+ , K^+ -ATPase 和 Ca^{2+} -ATPase 的研究。

1. 对 Na^+ , K^+ -ATPase 的研究

关于白内障晶状体 Na^+ , K^+ -ATPase 的研究有一些相互冲突的结论^[5]。Friedburg(1973)报道了老年性白内障的上皮细胞 Na^+ , K^+ -ATPase 的活力升高;而 Gupta 和 Harley(1975), Nordmann 和 Klethi(1976)等报道这种酶活力下降;Auricchio 等报道,与早期皮质白内障和核白内障比较,严重混浊的人晶状体其 Na^+ , K^+ -ATPase 活力下降;Pasino 和 Maraini(1982), Paterson(1983)等的研究表明,人类白内障晶状体的 Na^+ 水平与 Na^+ , K^+ -ATPase 的活力没有相关性。他们指出,白内障晶状体上的离子泵具有正常的功能。一种可能的假设是,导致阳离子不平衡的基本原因是晶状体细胞膜的通透性发生改变。

为什么上述研究结论不一致?可能的原因有许多。其中,考察的晶状体数目多少,获得晶状体的方法不同以及随后的处理方法不同都会影响实验数据。Kobatashi 等^[6]对正常人和白内障病人晶状体的各个部分的 Na^+ , K^+ -ATPase 进行了研究,发现随着年龄的增长,晶状体各部分——囊膜-上皮、皮质、核的 Na^+ , K^+ -ATPase 活力,只有核区的酶活力发生很大变化,其活力下降。随着白内障患病程度不同, Na^+ , K^+ -ATPase 的活力变化也不同。在患病程度较轻的白内障中,皮质和核的酶活力显著下降,而上皮层的酶活力则没有明显变化。在较严重的白内障中,晶状体各个部位的 Na^+ , K^+ -ATPase 活力都下降到最低程度。因此,他们认为, Na^+ , K^+ -ATPase 与白内障病理学是有关系的。

在一些白内障病人中,发现房水和晶状体中出现不正常的高浓度 H_2O_2 。很多用体外培养晶状体的实验表明, H_2O_2 能抑制 K^+ 内流。Garner 等^[7,8]对 H_2O_2 修饰的 Na^+ , K^+ -ATPase 进行了研究。没经过 H_2O_2 处理的晶状体, K^+ 内流依赖于细胞外的 K^+ 和 Na^+ , 而经 H_2O_2 处理后,胞外的 Na^+ 不再影响依赖于 Na^+ , K^+ -ATPase 的 K^+ 内流。一般认为, H_2O_2 能导致 Na^+ , K^+ -ATPase 解偶联。 Na^+ , K^+ -ATPase 仍能水解 ATP, 但离子的转运受到抑制。因此,即使检测到的 Na^+ , K^+ -ATPase 酶活力正常,也不能排除离子运输受到抑制的可能性。

Mizuno 等^[9]和 Sen 等^[10]以及他们以前的工作,研究了晶状体的 Na^+ , K^+ -ATPase 与细胞膜脂类的关系。发现 Na^+ , K^+ -ATPase 活力依赖于膜脂类的流动性。纤维细胞膜的脂类组成的较小变化,可以很大程度地改变 Na^+ , K^+ -ATPase 反应的活化能,因而会影响晶状体维持正常渗透调节的能力和代谢产物的运输活动,从而影响晶状体的透明性。实验发现,随着年龄的增长,老年性白内障形成后,或在用降血脂药曲帕拉醇(triparanol)喂养动物所诱导的实验性白内障中,细胞膜脂类都有很大变化。同时也发现, Na^+ , K^+ -ATPase 的活力降低。用

其它试剂,例如氯奎(chloroquine)、chlorpheniramine 和 iprindole 诱导的白内障也有上述同样的结果。这些试剂都属于两亲(amphiphilic)类药物,它们都具有干扰溶酶体功能和干扰多种组织内极性脂类降解的能力。这表明,高度分化的纤维细胞仍有一定的代谢脂类和改变其膜上脂类组成的能力。因此,由于膜脂变化对 Na^+ , K^+ -ATPase 活力的影响,可能是白内障形成机制中的一个重要方面。

2. 对 Ca^{2+} -ATPase 的研究^[3,11-13]

正常晶状体内外环境的 Ca^{2+} 浓度梯度为 1:100—1000。并很多哺乳动物的晶状体内的 Ca^{2+} 水平比房水和玻璃体内都要低。晶状体上存在着 Ca^{2+} -ATPase。晶状体内低水平的 Ca^{2+} 必须由 Ca^{2+} -ATPase 这个依赖能量的离子泵来维持。在实验性动物白内障和人类老年性白内障等白内障晶状体中,都发现有不正常的 Ca^{2+} 离子积累。

Iwata^[11] 推测,引起晶状体内高浓度钙离子的主要原因有:

(1) 晶状体膜的屏障作用失调;(2) 钙泵的作用失调;(3) 晶状体蛋白质对钙离子亲和力增高。

Iwata 及其同事们的研究发现,钙调蛋白(Calmodulin)是 Ca^{2+} -ATPase 的激活剂。钙调蛋白存在于晶状体的可溶性成分中,它可结合四个 Ca^{2+} 而受激活,这种受到激活的钙调蛋白再激活功能蛋白,例如晶状体 Ca^{2+} -ATPase。进一步实验表明,钙调蛋白的拮抗物能抑制 Ca^{2+} -ATPase。萘磺酰胺类(naphthalenesulfonamides)化合物是钙调蛋白的拮抗物。各个拮抗物对 Ca^{2+} -ATPase 的抑制程度不同。用抑制程度不同的拮抗物体外实验,检测晶状体的混浊程度,发现晶状体的混浊程度与 Ca^{2+} -ATPase 受抑制的程度是相关的。这些实验表明, Ca^{2+} -ATPase 失调导致了 Ca^{2+} 积累,从而诱发了蛋白质变性,因而导致晶状体混浊。

Iwata 等还发现,晶状体内 Ca^{2+} 激活的 Ca^{2+} -ATPase 其最适浓度范围是有限的。例如,小鼠晶状体内, Ca^{2+} 激活的 Ca^{2+} -ATPase

最适浓度为 10^{-6} mol/L, 大于 10^{-5} mol/L 的 Ca^{2+} 浓度就会抑制该酶的活力。这可能是由于晶状体内存在着钙结合蛋白,例如, α -晶体蛋白(α -crystallin)。 α -晶体蛋白可能与钙离子结合而改变游离的 Ca^{2+} 浓度。Spector 和 Rothschild 报道,过量的 Ca^{2+} 与 α -晶体蛋白结合会加速晶状体蛋白质聚集形成 HMW (High Molecular Weight) 产物^[11,12]。

Hightower 等^[13]发现,高浓度的 Ca^{2+} 对 Na^+ , K^+ -ATPase 有抑制作用。钙离子和该酶相互作用的性质还不清楚。但钙离子不是同 ATP 形成复合物而减小底物的有效浓度来起抑制作用的。钙离子首先要与膜结合,才能抑制酶的活性,而且抑制是不可逆的。因此,他们认为,当晶状体内钙离子浓度增高到一定程度时,就抑制了 Ca^{2+} -ATPase 的离子泵活力,这样就使越来越多的 Ca^{2+} 积累到晶状体内。随着 Ca^{2+} 与晶状体膜的结合,它抑制了 Na^+ , K^+ -ATPase 的活力,又造成 Na^+ 和 K^+ 的转运不平衡。这些变化以及其它的生理生化变化,使晶状体正常功能进一步恶化,从而导致晶状体混浊,白内障发生。

小 结

白内障的发生都伴随着晶状体的 Ca^{2+} 、 Na^+ 内流和 K^+ 外流。大多数学者都认为,这个现象是由 Na^+ , K^+ -ATPase 和 Ca^{2+} -ATPase 的活力下降所引起的。对 Na^+ , K^+ -ATPase 失活的主要原因有几种可能的解释。其一是, Na^+ , K^+ -ATPase 的活性需要-SH 基团,白内障的晶状体内还原型谷胱甘肽减少,其代谢产物 H_2O_2 是强氧化剂, Na^+ , K^+ -ATPase 很容易被氧化失活^[7,9]。二是,晶状体的脂类组成变化会使 Na^+ , K^+ -ATPase 失去活力^[9]。三是,高浓度的 Ca^{2+} 能抑制 Na^+ , K^+ -ATPase 的活力^[13]。 Ca^{2+} -ATPase 的活力也能被高浓度的 Ca^{2+} 所抑制。细胞内阳离子的不正常变化,破坏了细胞内外的电解质渗透平衡,导致晶状体纤维吸水肿胀,这不仅改变了晶状体的折射率,而且诱导形成 HMW 蛋白质以及其它恶化状态,使晶状体混

(下转第29页)

BAS 联结起来,组成各种测定与观察方法。

(5) 操作简便,节省试剂, BAS 的所有方法都不需要特殊设备,观察结果也可视不同实验室的条件进行。BAS 中的多种试剂,像生物素化第二抗体,酶标亲合素和 ABC 等,即可高度稀释,又都是通用试剂。

3. BAS 技术的应用

BAS 技术的建立虽时间不算太长,但发展迅速,应用广泛。就目前来看,几乎覆盖了整个医学和生物学的各个学科,包括:

(1) 用于对抗原、抗体、酶和受体的分离纯化,据报道,除利用抗生物素和抗亲合素抗体制成相应的免疫吸附剂,分别纯化亲合素和生物素之外。生物素与生物胞素-琼脂糖珠吸附剂已有产品出售。其他像卵黄结合生物素蛋白,抗生蛋白链菌素、胰岛素受体等的纯化均取得良好效果。

(2) 抗原、抗体、受体和激素等定性、定量或定位测定

对于上述几种物质的定性或定位,主要用于免疫病理、组织化学及微生物学等方面的实验。定量测定则对于抗体、部分抗原或受体的含量。最近也有关于脑垂体激素、肾上腺皮质激素的测定,以及单克隆抗体筛选的报道。

(3) 生物素化 DNA 探针的应用

目前,生物素化 DNA 探针已初步地用于微生物学的临床实验诊断和流行病学调查。Yoshiho^[4] 先后建立了微量板法和硝酸纤维膜法,利用生物素化 DNA 探针及 β -半乳糖酶标记亲合素系统,定量测定乙肝病毒 DNA 的含

量,方法简便快速,仅 2 小时可报结果,其灵敏度也和 P^{32} 标记 DNA 探针法近似,二者均可测出 1—5pg 的 DNA。另外, Sethabutr 等^[5] 用生物素化的 17 kb *EcoRI* 探针,与对应的 52 株菌作菌落原位杂交,具有特异反应,而同 16 株非 *EcoRI* 菌都不起反应。

(4) BAS 技术的其它应用

除上述的应用以外,它还有多方面的应用。Della^[6] 用生物素化蛋白作为 Wester blots 的分子量标准。也有人介绍了生物素化瘤细胞,通过亲合素作桥,以促进杂交瘤细胞的生产。

参 考 文 献

- 1 Chaiet L *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 1964; 1061
- 2 De-Lange R. J. *J Biol Chem*, 1970; 245: 907
- 3 Chairt L *et al.* *Antimicrob Ag Chemother*, 1963; 3: 28
- 4 Edward A *et al.* *J Biochem Biophys Methods*, 1986; 13: 103
- 5 Meslar H W *et al.* *J Biol Chem*, 1978; 253: 6979
- 6 Bonnard C *et al.* *Immunolabelling for electron microscopy*. Amsterdam: Elsevier Scientific publishers, 1984: 95
- 7 Bodanszky M, Fagan D. *J Amer Chem Soc*, 1977; 99: 235
- 8 Reisfel A *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1987; 142(2): 519
- 9 Sigma: *Immunochemicals, catalog*, 1988: 107
- 10 William A *et al.* *J Histochem*, 1988; 36: 145
- 11 Geohagam N D *et al.* *J Histochem Cytochem*, 1977; 25 (11): 1187
- 12 Ashorn R *et al.* *Comp Biochem Physiol (B)*, 1985; 92 (1): 123
- 13 Yoshiho Nagata *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1986; 868(1): 45
- 14 Yoshiho Nagata *et al.* *FEBS*, 1985; 183(2): 379
- 15 Sethabutr O *et al.* *Lancet*, 1985; 1095
- 16 Della P D *et al.* *Anal Biochem*, 1986; 152(2): 329

[本文于1988年11月7日收到]

(上接第32页)

浊而形成白内障。关于白内障形成的详细机理和过程还有待进一步研究。对晶状体内离子转运及其失调机理的深入探讨,将有助于对白内障全部生化机理的阐明。

参 考 文 献

- 1 Spector A. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1984; 25: 130
- 2 Mathias R T *et al.* *Am J Physiol*, 1985; 249: 181
- 3 Iwata S *et al.* *Curr Eye Res*, 1984; 3(5): 717
- 4 Lin Leng, Yi Yang *et al.* *Invest Ophthalmol Vis Sci*,

1989; 30(3): 194

- 5 Paterson C A *et al.* *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1983; 24: 1534
- 6 Kobatashi S *et al.* *Curr Eye Res*, 1982/1983; 2(5): 327
- 7 Garner M H *et al.* *J Bio Chem*, 1984; 259(12): 7712
- 8 Garner M H *et al.* *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986; 27: 103
- 9 Mizuno G R *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1981; 644: 1
- 10 Sen P C *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1982; 693: 34
- 11 Iwata S: *Curr Eye Res*, 1985; 4(3): 299
- 12 Iimuro A *et al.* *Ophthalmic Res*, 1987; 19: 95
- 13 Hightower K R *et al.* *Curr Eye Res*, 1982/1983; 2(4): 239

[本文于1988年6月30日收到]