

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01056

## 叔丁醇治疗 SD 大鼠硒性白内障的疗效观察

李 静<sup>1</sup>, 薛 炼<sup>2</sup>, 张 军<sup>3</sup>, 黄才国<sup>1</sup>, 李闻捷<sup>3\*</sup>

1. 第二军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433

2. 济南军区总医院实验诊断科, 济南 250031

3. 第二军医大学长海医院中心实验室, 上海 200433

**[摘要]** 目的: 探讨叔丁醇外用滴眼液对 SD 大鼠硒性白内障模型(模拟老年性白内障)的治疗作用。方法: 建立 SD 大鼠硒性白内障模型, 并将实验大鼠右眼作为药物干预组, 左眼作为对照组; 用自行配制的叔丁醇外用滴眼液(浓度分别为 25、50、75 mmol/L)按时滴眼(1 滴/次, 3~5 次/d); 每日进行肉眼观察, 并于用药后第 5 日及第 10 日用裂隙灯显微镜观察大鼠双眼晶状体核性病变, 每日用游标卡尺(最小刻度值 0.02 mm)测量大鼠双眼晶状体核性斑块最大直径的改变。另选未建模的 SD 大鼠, 用 100 mmol/L 的叔丁醇滴眼液滴眼(1 滴/次, 3~5 次/d), 观察药物有无毒性及其他不良反应。结果: 硒性白内障大鼠用药眼晶状体核性混浊斑块直径小于对照眼( $P < 0.01$ ); 用药眼核性混浊斑块混浊程度低于对照眼; 叔丁醇滴眼液毒性低, 刺激性小。结论: 叔丁醇滴眼液对 SD 大鼠硒性白内障有一定的治疗作用。

**[关键词]** 叔丁醇; 烷基化作用; 亚硒酸钠; 白内障

**[中图分类号]** R 776.1      **[文献标志码]** A      **[文章编号]** 0258-879X(2008)09-1056-04

### Therapeutic effect of tertiary butyl alcohol eyedrops on sodium selenite-induced cataract in rats

LI Jing<sup>1</sup>, XUE Lian<sup>2</sup>, ZHANG Jun<sup>3</sup>, HUANG Cai-guo<sup>1</sup>, LI Wen-jie<sup>3\*</sup>

1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Clinical Laboratory, General Hospital of PLA, PLA Jinan Military Area Command, Jinan 250031

3. Central Laboratory, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433

**[ABSTRACT]** **Objective:** To study the therapeutic effect of tertiary butyl alcohol (TBA) eyedrops on selenite-induced rat cataract (simulating senile cataract). **Methods:** Rat cataract model was induced by sodium selenite. The right eyes of the rats were treated with 25, 50, or 75 mmol/L TBA eyedrops (1 drop/time, 3-5 times/day); the left eyes were taken as control. The eyes were observed everyday and were examined using slit lamp at the fifth and tenth day after treatment for nuclear plaques of the lens. The maximal diameter changes of the cataract plaques were detected using vernier cursor (with the minimum division value being 0.02 mm). Meanwhile, the right eyes of normal SD rats were stimulated with 100 mmol/L TBA eyedrops (1 drop/time, 3-5times/day) to investigate the toxic effect of the eyedrops and other adverse reactions. **Results:** The diameter and degree of cataract plaques of the nuclear cataract in the right eyes were less than those in the left eyes, and the opacification degree in the right eyes was slighter than that in the left eyes. The TBA eyedrops had less toxicity and stimulation to the eye. **Conclusion:** TBA eyedrops have obvious therapeutic effect on selenite cataract.

**[KEY WORDS]** tertiary butyl alcohol; alkylation; sodium selenite; cataract

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(9):1056-1059]

白内障是我国的第一位致盲疾病, 严重影响了我国人民的健康。白内障发生的关键因素是晶状体发生混浊, 影响光线经晶状体透射、汇聚到视网膜,

从而造成视物不清。老年性白内障是与年龄相关的疾病, 是老年人视力下降及致盲的主要原因, 是晶体老化过程中逐渐出现的变性混浊。随着我国人口的

**[收稿日期]** 2008-04-13      **[接受日期]** 2008-05-29

**[基金项目]** 军队“十一五”资助课题(06MB213)。Supported by the 11<sup>th</sup> Five-year Plan of PLA(06MB213)。

**[作者简介]** 李 静, 硕士生。E-mail: pretty\_jingjing@sina.com

\* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 021-25070649-8700, E-mail: LWJ\_smmu@sohu.com

老龄化趋势,其患病人数还会继续增加。国外的研究<sup>[1]</sup>资料表明,75岁以上的人群中老年性白内障患病率高达88%。氧化应激(oxidative stress)在老年性白内障的发病过程中发挥了重要作用<sup>[2-3]</sup>,其晶状体的混浊与晶体蛋白遭受翻译后修饰(PTM)密切相关<sup>[4-5]</sup>,氧化应激就是一类无处不在的PTM途径。大多数晶体蛋白含半胱氨酸巯基(-SH),对氧化应激极为敏感,易形成二硫键、蛋白去折叠、构象改变,聚集成二聚体及多聚体甚至高相对分子质量聚合物,影响晶状体的透明性。目前白内障传统的治疗方法仍为外科手术;白内停、卡林优(吡诺克辛钠滴眼液)等传统治疗白内障药物的临床应用效果不十分明显。因此,探寻老年性白内障的发生机制,寻找新型的抗白内障药物成为我们关注的重点。

叔丁醇,简称TBA,分子式 $C(CH_3)_3OH$ ,相对分子质量为74.12,根据其化学反应特性,推测其通过对晶体蛋白巯基的烷基化作用,可以封闭晶体蛋白暴露的巯基,抑制晶体蛋白之间的聚合,据此可以阻止、延缓晶状体混浊,理论上可以预防白内障的发展。为此,本研究将叔丁醇配制成外用滴眼液,观察其对硒性白内障的预防及治疗作用。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物及试剂 出生12 d的SD大鼠(由第二军医大学动物实验中心提供),体质量22~32 g,未睁眼。试剂 $Na_2SeO_3$ 为上海金山兴塔化工厂产品,用生理盐水配制成2 mmol/L;叔丁醇为上海国药集团化学试剂有限公司产品,用生理盐水分别配制成25、50、75、100 mmol/L外用滴眼液。

1.2 白内障模型的建立 对出生12 d的SD大鼠行颈背部皮下注射 $Na_2SeO_3$ <sup>[6]</sup>,0.2 ml/次,隔天注射1次,共计3次,累计剂量约210  $\mu g$ ;注射3次后(鼠龄18 d),90%以上的大鼠可发生核性白内障,同时开始用药并每日进行观察及测量。

1.3 模型动物的药物干预 将注射 $Na_2SeO_3$ 后第6日的大鼠(鼠龄18 d)进行药物干预,方法是用叔丁醇滴眼液滴模型大鼠右眼(1滴/次,3~5次/d),将左眼作为对照眼。另选一窝未造模的正常SD大鼠10只(鼠龄为1个月)进行刺激试验,目的为观察该浓度的药物对大鼠眼睛有无毒性作用(如红肿、眼周脱毛、分泌物增多等)及不良反应。方法是用100 mmol/L叔丁醇外用滴眼液滴右眼,3~5次/d,连续用药2个月。

1.4 合适药物浓度的筛选 选择3窝造模成功的SD大鼠,同窝大鼠左眼设为对照眼,右眼为用药眼,每窝分别滴浓度为25 mmol/L( $n=12$ )、50 mmol/L( $n=9$ )、75 mmol/L( $n=10$ )的叔丁醇外用滴眼液(1滴/次,3~5次/d),观察不同浓度叔丁醇滴眼液干预的有效率。

1.5 最佳浓度的药物干预 另选择5窝造模成功的SD大鼠(第18日, $n=61$ ),用上述实验所选择的最佳药物浓度(50 mmol/L,本次实验有效率最高)进行重复试验,方法同前。定期用裂隙灯显微镜观察大鼠双眼核及皮质病变、核混浊程度;并用游标尺(最小刻度值0.02 mm)贴近大鼠晶状体测量核性混浊斑块直径变化(不规则斑块取最大直径)。

1.6 统计学处理 采用SPSS 16.0软件,对晶状体核性白内障斑块直径变化比较采用同鼠左、右眼配对 $t$ 检验。

## 2 结果

2.1 硒性白内障大鼠晶状体核性混浊斑块直径及混浊程度的变化 硒性白内障大鼠右眼用药后1~3 d,大鼠双眼的晶状体核斑块直径呈逐渐增大趋势;用药3~4 d,大鼠双眼斑块直径均达峰值,部分大鼠左右眼斑块直径呈现明显差异( $P<0.01$ ,表1),小部分大鼠用药眼核斑块混浊程度明显低于对照眼(图1);此后核性斑块直径呈轻度下降趋势。3种浓度的叔丁醇滴眼液干预后都具有一定效果,主要表现为用药眼核斑块直径小于对照眼,少部分表现为核混浊程度低于对照眼(图1);50 mmol/L的叔丁醇效果较好,主要表现为有效率较高(表2)。

表1 叔丁醇滴眼液对SD大鼠核性白内障混浊斑块区最大直径的影响

Tab 1 Change of maximal diameter of nuclear cataract plaques in SD rats after TBA eyedrop treatment

( $n=34, \bar{x} \pm s, d/mm$ )

Treatment time $t/d$	Left eye (control)	Right eye (treatment)
1	1.76 $\pm$ 0.21	1.76 $\pm$ 0.21
3	1.9 $\pm$ 0.23	1.89 $\pm$ 0.23
4	2.03 $\pm$ 0.23	1.96 $\pm$ 0.24*
5	2.02 $\pm$ 0.23	1.88 $\pm$ 0.41*
7	2.0 $\pm$ 0.24	1.84 $\pm$ 0.40*
9	1.92 $\pm$ 0.24	1.76 $\pm$ 0.38*
11	1.83 $\pm$ 0.24	1.68 $\pm$ 0.38*
14	1.71 $\pm$ 0.23	1.61 $\pm$ 0.37*

\*  $P<0.01$  vs control

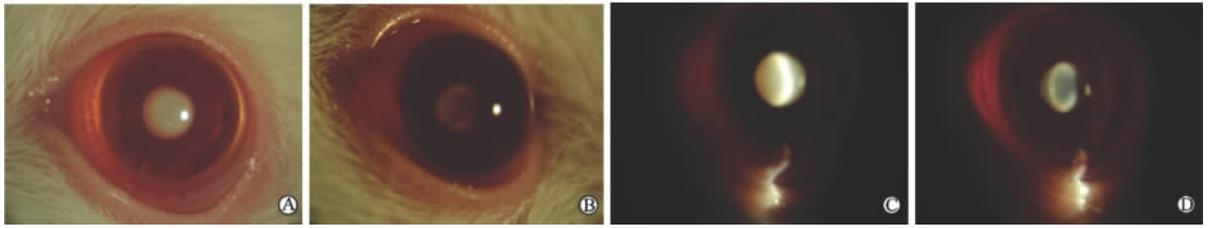


图 1 叔丁醇滴眼液对大鼠核性混浊斑块直径大小及混浊程度的影响

Fig 1 Changes of maximal diameter and degree of nuclear cataract plaques in SD rats after TBA eyedrop treatment

A: Left eye(Control); B: Right eye(Treatment); C: Left eye(Control, slit lamp); D: Right eye(Treatment, slit lamp)

表 2 3种浓度的叔丁醇滴眼液对  
硒性白内障大鼠治疗作用的有效率比较

Tab 2 Comparison of therapeutic effectiveness  
of TBA at 3 different concentrations  
on selenite-induced rat cataract

Concentration of TBA c <sub>B</sub> /(mmol · L <sup>-1</sup> )	N	Effectiveness (n)	Effective rate (%)
25	12	3	25
50	9	3	33.3
75	10	3	30
50	12	5	41.7
50	14	5	35.7
50	11	4	36.3
50	12	6	50
50	12	5	41.7
Total	92	34	36.96

TBA: Tertiary butyl alcohol

2.2 刺激试验 刺激试验持续 2 个月后,大鼠(鼠龄 1 个月)眼睛及眼周未见红肿、脱毛、分泌物增多等药物毒副作用改变及大鼠生活习性的改变。

### 3 讨论

3.1 硒性白内障的发病机制与老年性白内障 目前,硒性白内障模型被广泛应用,亚硒酸钠可在幼鼠身上快速诱发白内障,一般 3~4 d 后即可出现双侧核性白内障,并且可重复性好。其可能的机制是亚硒酸盐氧化晶状体中特别是上皮细胞中的巯基,产生各种活性氧,使晶状体上皮细胞受损,引起 Ca<sup>2+</sup>在核纤维中堆积,导致核纤维中钙蛋白酶被激活,此酶催化晶状体蛋白水解变成非水溶性蛋白而使蛋白质易于聚集<sup>[6]</sup>,导致晶状体混浊。氧化损伤是老年性白内障发生的一个重要因素<sup>[7]</sup>,近年来许多研究提示眼组织内氧自由基的增加以及抗氧化防御系统能力的削弱可能为老年性白内障的主要病因之一;其病理学基础是眼晶体蛋白发生氧化而聚集成为水不溶性蛋白。因此,硒性白内障模型可以用来模拟

老年性白内障模型<sup>[8]</sup>。

3.2 巯基保护剂对硒性白内障的抑制作用 本实验室前期还验证了一种巯基保护剂二巯苏糖醇(dithiothreitol, DTT)对晶体蛋白的保护作用<sup>[9-10]</sup>,将其配制成滴眼液单独使用即可发挥明显的抑制大鼠硒性白内障发展的作用<sup>[11]</sup>,而且有效率高于传统的临床用滴眼液(日本产卡林优、国产白内停)。DTT 是常用还原剂,可还原蛋白质分子内及分子间的二硫键,使其不受氧化,作为蛋白质巯基的保护剂,它能够抑制晶体蛋白热变性 & 非特异性聚集,有助于维持蛋白质的稳定<sup>[12-13]</sup>。其原理也是保护晶体蛋白中极易遭受氧化修饰的半胱氨酸巯基(-SH)。这种药物的优点是价格便宜,有效率高,不仅能够抑制核性白内障的发展,还减轻了伴皮质混浊程度。不利方面是 DTT 为强效还原剂,室温条件下易被氧化,不易保存;而且它有一定的生物毒性。与此同时,我们从中受到了启发,保护晶体蛋白巯基可以抵抗白内障,减轻或抑制晶状体混浊。据此,我们根据化学试剂的生物学特性,尝试用针对晶体蛋白巯基进行特异性烷基化修饰的叔丁醇作为抗晶体蛋白聚集的药物。

3.3 叔丁醇的烷基化作用对晶状体蛋白的保护作用 白内障是一种多病因的疾病<sup>[1]</sup>,通常由氧化应激、老化、晶体蛋白基因突变(在出生时即已存在)、其他系统疾病如糖尿病所引起。晶状体中蛋白含量极高,这些晶体蛋白在生物体的一生中持续存在。因此,随着时间推移,晶体蛋白会遭受诸如氧化、脱酰胺作用等翻译后修饰作用<sup>[4-5,8]</sup>,可诱导晶体蛋白分子内或分子间的交联,使蛋白构象改变、易于聚集。多数晶体蛋白含一定数量的半胱氨酸(Cys),尤其是 β 及 γ 类含量较高,Cys 含一游离的巯基,对氧化应激极为敏感<sup>[9]</sup>,易形成蛋白分子内及分子间的二硫键(-S-S-),使蛋白聚集成二聚体、四聚体,甚至

高分子量聚合物(HMW),成为水不溶性蛋白,影响晶状体的透光性。

目前白内障的主要治疗方法为外科手术,临床用的滴眼液效果不十分理想。由于我国人口的老龄化发展,尽早采取预防措施是关键。因此,探寻老年性白内障的发病机制,寻找有效、便宜的药物进行非手术治疗,并且早期预防,是抑制和延缓老年性白内障发生、发展的有效途径。

本实验尝试了用叔丁醇抗晶体蛋白聚集,它作为一种能够针对晶体蛋白巯基进行特异性烷基化修饰的化学试剂,理论上能够封闭晶体蛋白分子内或分子间的巯基,使之不易交联。通过实验验证了上述设想的可行性,叔丁醇滴眼液的确有一定的抗白内障作用。且通过叔丁醇高浓度(治疗剂量的两倍)刺激试验(每日5次滴右眼),表明它的毒性较低,具有较强的临床应用可行性。

探索烷基化试剂叔丁醇对晶体蛋白的抗氧化、抗晶体蛋白的聚集作用是本研究的目的所在。在本文所述的实验条件下,通过对同窝大鼠左、右眼对照,证实了叔丁醇具有延缓、抑制白内障斑块发展的作用,按时滴入自行配制的叔丁醇滴眼液能够使硒性白内障大鼠晶状体的核斑块体积减小,核混浊程度减轻,透光度增强。

从DTT与叔丁醇的作用比较看,DTT可以解离已发生二硫化物交联的晶体蛋白分子内或分子间的二硫键,而叔丁醇则是通过烷基化作用,封闭蛋白的巯基使蛋白之间不能形成二硫键,因此蛋白不易聚集,从原理上分析,叔丁醇具有一定的预防作用。且叔丁醇比DTT易于保存,可以置于室温环境中,经实验论证毒性较低。

总之,本研究发现叔丁醇滴眼液对硒性白内障大鼠模型有一定的缓解和治疗作用,因此,叔丁醇在白内障尤其是老年性白内障的发生发展过程中的应

用价值值得进一步研究。

## [参考文献]

- [1] Bloemendal H, de Jong W, Jaenicke R, Lubsen N H, Slingsby C, Tardieu A. Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins[J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2004, 86: 407-485.
- [2] Quillen D A. Common causes of vision loss in elderly patients [J]. *Am Fam Physician*, 1999, 60: 99-108.
- [3] Sun W R, Zhang X H, Zhang S J, Zhou Z Y. Oxidative damage and enzyme histochemistry changes in senile cataract[J]. *US Chin J Ophthalmol*, 2000, 1: 1-3.
- [4] 严宏. 翻译后修饰对 $\alpha$ -晶体蛋白分子伴侣活性的影响及白内障形成机制[J]. *国外医学:眼科学分册*, 2002, 26: 108-112.
- [5] Wilmarth P A, Tanner S, Dasari S, Nagalla S R, Riviere M A, Bafna V, et al. Age-related changes in human crystallins determined from comparative analysis of post-translational modifications in young and aged lens: does deamidation contribute to crystallin insolubility[J]? *J Proteome Res*, 2006, 5: 2554-2566.
- [6] Shearer T R, Ma H, Fukiage C, Azuma M. Selenite nuclear cataract: review of the model[J]. *Molecular Vision*, 1997, 23: 8.
- [7] Truscott R J. Age-related nuclear cataract-oxidation is the key [J]. *Exp Eye Res*, 2005, 80: 709-725.
- [8] 范莉琼, 曹阳, 岑洁, 祝肇荣. 硒性白内障模型与人老年性白内障比较研究[J]. *眼科新进展*, 2005, 25: 248-250.
- [9] 李闻捷, 张军, 黄才国. 二硫苏糖醇对晶体蛋白的保护作用及其用途: CN1895238[P]. 2007-01-17.
- [10] 彭亚军, 耿宇, 张军, 谢伯林, 李静, 李闻捷. 二硫苏糖醇对大鼠硒性白内障的抑制作用[J]. *第二军医大学学报*, 2007, 28: 1320-1323.
- [11] 李闻捷. 晶体蛋白时相性改变及对老年性白内障形成的影响[D]. 第二军医大学博士论文, 50-68, 万方数据资源系统 20050401.
- [12] Doganay S, Turkoz Y, Evereklioglu C, Er H, Bozaran M, Ozerol E. Use of caffeic acid phenethyl ester to prevent sodium-selenite-induced cataract in rat eyes[J]. *J Cataract Refract Surg*, 2002, 28: 1457-1462.
- [13] Lou M F. Redox regulation in the lens[J]. *Progr Retin Eye Res*, 2003, 22: 657-682.

[本文编辑] 邓晓群