

蛋白酶体 5 亚单位过表达对氧化环境下人晶状体上皮细胞的影响

张铁英, 柳夏林, 吴明星, 刘奕志

(眼科学国家重点实验室//中山大学中山眼科中心, 广东 广州 510060)

摘要: 【目的】探讨蛋白酶体 5 亚单位(PSMB5)基因过表达对氧化条件下晶状体上皮细胞的影响。【方法】构建重组质粒 pcDNA3.1- PSMB5 并将其转染入人晶状体上皮细胞株 SRA01/04 中, 形成稳定表达, 同时设 pcDNA3.1 空载体为对照组。RT- PCR 法及 Western blot 法分别检测 PSMB5 基因及蛋白的表达情况。H₂O₂ 分别作用 PSMB5 转染细胞及空载体转染细胞, MTT 法检测细胞增殖能力的变化。【结果】转染后用 G418 筛选 3 周后, 获得 PSMB5 转染及空载体转染的 G418 抗性的细胞克隆。转染 PSMB5 基因的细胞 PSMB5 mRNA 表达强度明显增高, 而空载体转染细胞与未转染细胞无显著差异; 转染 PSMB5 基因的细胞的 PSMB5 蛋白表达也显著高于空载体转染细胞。低浓度 H₂O₂ 作用后, 转染 PSMB5 基因的细胞增殖能力高于空载体转染细胞。【结论】低浓度氧化环境下蛋白酶体 5 亚单位 PSMB5 过表达能对晶状体上皮细胞具有保护作用。

关键词: 过表达; 蛋白酶体; PSMB5; 晶状体; 增殖

中图分类号: R77

文献标识码: A

文章编号: 1672- 3554(2007)06- 0617- 05

Influence of Proteasome 5 Subunit (PSMB5) to Human Lens Epithelial Cells under Oxidative Environment

ZHANG Tie- ying, LIU Xia- lin, WU Ming- xing, LIU Yi- zhi

(State Key Laboratory of Ophthalmology//Zhongshan Ophthalmic Center, SUN Yat- sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract: 【Objective】To explore the influence of proteasome subunit 5 (PSMB5) gene overexpression in human lens epithelial cells under the oxidative condition. 【Methods】The recombinant plasmid pcDNA3.1- PSMB5 was constructed and transfected into human lens epithelial cell line SRA01/04 to form stable transfection, and empty pcDNA3.1 was also transfected into lens epithelial cells at the same time as control. RT- PCR and Western blot analysis were performed to detect the PSMB5 gene and protein expression. Cell viability assay was performed using 3- [4,5dimethylthiazol- 2- yl]- 2,5- diphenyltetrazolium bromide substrate (MTT) after the above cells were treated by H₂O₂. 【Results】The G- 418- resistant cell clones, which had been transfected with PSMB5 or empty vector were obtained by screening continually with G- 418 for 3 w after transfection. There was stronger expression of PSMB5 mRNA in the cells transfected with PSMB5 gene than in those transfected with empty vector or non- transfected cells; the expression of PSMB5 protein was also significantly upregulated in PSMB5 transfected cells than in empty vector transfected cells. Cell viability of PSMB5 transfected cells was statistically higher than that of empty- transfected cells under the low H₂O₂ concentration. 【Conclusion】Overexpression of the proteasome 5 catalytic subunit can play protective role to human lens epithelial cells under the low oxidative environment.

Key words: overexpression; proteasome; PSMB5; lens; viability

[J SUN Yat- sen Univ(Med Sci), 2007, 28(6):617- 621]

白内障是全球最主要的致盲眼病, 其发病机理仍不清楚。目前普遍认为氧化损伤是年龄相关

性白内障形成中的重要因素, 并且在体内、外实验中得到证实。氧自由基使晶状体内的蛋白质受到

收稿日期: 2007-02-28

基金项目: "985" 二期建设重点研究项目(3030902084010); 广州市科技计划项目(2002Z3- E0141)

作者简介: 张铁英(1976-), 女, 四川南充人, 博士, 现在广州花都区人民医院眼科, E- mail: rosezhang1976@163.com; 刘奕志, 通讯作者, 教授, E- mail: liuyz@yahoo.com.cn

损伤, 这些异常蛋白质蓄积会导致细胞的功能异常。蛋白酶体作为细胞内蛋白质降解的主要途径之一, 能够有效地清除晶状体内异常的蛋白质, 维持晶状体的透明性^[1]。位于蛋白酶体核心部分 20S 的 5 亚单位 (β 5 subunit of proteasome, PSMB5) 具有糜蛋白酶样酶活性, 是蛋白酶体所具有的三大主要的酶活性之一^[2]。蛋白酶系统是细胞内蛋白质降解的重要途径之一, 而 PSMB5 在降解蛋白质过程中发挥重要的蛋白水解酶的作用。已有研究证实, 在年龄相关性白内障等疾病中, 蛋白酶体的蛋白水解酶功能均不同程度降低^[3]。氧自由基, 特别是 H_2O_2 能明显抑制蛋白酶体的活性^[4], 最近的研究表明氧化损伤对蛋白酶体亚单位的表达有抑制作用^[5]。我们用基因转染技术将含有 PSMB5 基因的真核表达载体转入人晶状体上皮细胞系 SRA01/04 内, 建立稳定高表达 PSMB5 蛋白的晶状体上皮细胞, 并用 H_2O_2 进行处理, 分析 PSMB5 蛋白对晶状体上皮细胞的影响, 为年龄相关性白内障的发病机制及防治方法提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

人晶状体上皮细胞株 SRA01/04、大肠杆菌菌株 DH5 及真核表达载体 pcDNA-3.1 由本实验室保存; 新生牛血清及 DMEM 培养基 (Gibco 公司); 引物合成 (北京赛百盛公司); Trizol 试剂 (美国 Invitrogen 公司), 全自动测序由 Invitrogen 公司完成; 限制性内切酶 EcoR、Hind 及 T_4 连接酶 (TaKaRa 公司); 牛小肠碱性磷酸酶 (BCIP, 上海生物工程服务有限公司); RT-PCR 试剂 (TOYOBO 公司); 质粒提取试剂盒及脂质体 SuperFect (QIAGEN)。

1.2 PSMB5 真核表达载体的构建

根据 GeneBank 的 PSMB5 基因序列设计上下游引物, 在其两端分别加入 Hind 及 EcoR 的酶切位点序列。F: 5'-GCGAAGCTTATGGCGCTTGCCAGCGTGT-3', R: 5'-AGAGAATTCTCAGGGGTAGAGCCACTAT-3'。从人晶状体上皮细胞株 SRA01/04 中提取总 RNA, RT-PCR 扩增目的 DNA 片段, 凝胶回收目的片段。Hind 及 EcoR 双酶切质粒 pcDNA3.1 (+) 和回收的目的 DNA 片段, T_4 连接酶进行连接, 构建重组质粒, 进行筛选

和鉴定。

1.3 重组质粒 PSMB5- pcDNA3.1 的转染及筛选

15% 新生牛血清的 DMEM 培养液培养人晶状体上皮细胞株 SRA01/04, 使细胞处于对数生长期。取适当数量的细胞接种于 6 孔板中, 当细胞生长融合至 60%~70%, 将 5 μ g 纯化的质粒 DNA 溶于 50 μ L 无血清的 DMEM, 加入 30 μ L 转染试剂混匀, 室温下孵育。PBS 洗细胞 3 次, 加入转染混合液。37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 条件下培养 3 h, 弃去转染混合液, 加入 2 mL 含 15% 血清的 DMEM 培养液继续培养。转染 48 h 后, 培养液中加入终浓度为 700 μ g/mL 的 G418 进行筛选, 3~4 个星期后选取阳性细胞继续培养。

1.4 RT-PCR 检测 PSMB5 的表达

稳定转染的细胞吸去培养液后, 用冰预冷的 PBS 洗 3 次, 加入 1 mL Trizol, 氯仿、异丙醇提取 RNA, 测定浓度。逆转录反应: 5 \times RT 缓冲液 4 μ L, dNTP 混合物 2 μ L, RNA 酶抑制剂 1 μ L, OligodT 1 μ L, RNA 2 μ L, 逆转录酶 1 μ L, 加 DEPC 处理水至总体积 20 μ L。反应混合物于 30 $^{\circ}$ C 水浴中孵育 10 min, 42 $^{\circ}$ C 水浴孵育 20 min, 99 $^{\circ}$ C 灭活逆转录酶 5 min, -20 $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增: 引物稀释至浓度为 10 pmol/ μ L。反应体系为: 10 \times PCR 缓冲液 5 μ L, dNTP 5 μ L, $MgSO_4$ 3 μ L, 上下游引物各 1 μ L (或 β -actin 上下游引物各 1 μ L), cDNA 1 μ L, DNA 多聚酶 1 μ L, 加高压灭菌的去离子水至总体积 50 μ L。PCR 循环过程: 预变性 94 $^{\circ}$ C 4 min, 变性 94 $^{\circ}$ C 30 s, 复性 57 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 68 $^{\circ}$ C 50 s, 35 个循环, 终末延伸 68 $^{\circ}$ C 10 min。 β -actin 作为内参。取 3 μ L 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 凝胶图像分析仪处理。

1.5 Western Blot 法检测蛋白酶体亚单位的表达

稳定转染的晶状体上皮细胞, 用冷 PBS 洗 3 次, 加入 100 μ L 细胞裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟), 冰上放置 30 min, 用刮器刮取, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min ($r=8.3$ cm) 离心 20 min (Eppendorf 5415R), 收集上清, 测定提取的总蛋白浓度, -20 $^{\circ}$ C 保存。制备的蛋白样品进行 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电转膜法将蛋白转到硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后, 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 三羟甲基氨基甲烷缓冲液冲洗后加入辣根过氧化物酶标记的特异性二抗室温孵育 1 h, 加底物显色。

1.6 MTT 法检测细胞增殖能力

将细胞以适当密度接种于 96 孔板中, 37℃, 5%CO₂ 培养 24 h。弃去培养液, 每组细胞加不含酚红和血清的不同浓度的 H₂O₂ 180 μL 处理, 每组浓度做 5 个复孔, 并设正常对照组。5%CO₂ 培养 4 h。加 MTT (5 mg/mL): 每孔 20 μL, 继续培养 4 h。吸除孔内培养液, 每孔加入 150 μL DMSO, 震荡 5~10 min。在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度。

1.7 统计学分析

各组数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 11.5 软件, 采用 ANOVA 检验统计结果, 取 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 PSMB5 的 PCR 结果

目的基因 PSMB5 扩增后于 10 g/L 琼脂糖电泳, 根据所设计的 PSMB5 基因的 PCR 引物可知目的基因大小约为 792 bp, 电泳后获得的片段与预计相符(图 1)。

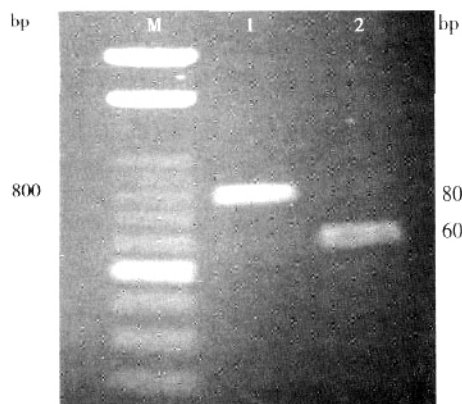


图 1 PCR 扩增结果

Fig.1 PCR amplification result

1: PSMB5 cDNA; 2: β -actin; M: marker

2.2 重组质粒的鉴定结果

以重组质粒为模板 PCR 扩增, 琼脂糖电泳可见一约 792 bp 条带。重组质粒经 EcoR 和 Hind III 双酶切后电泳, 可见一约 792 bp 条带, 与预计相符(图 2)。

2.3 pcDNA3.1-PSMB5 基因测序结果

重组质粒 pcDNA3.1-PSMB5 由 Invitrogen 公司进行基因测序, 结果显示, 各连接位点正确, 表达框架与已知相符。

2.4 半定量 RT-PCR 结果

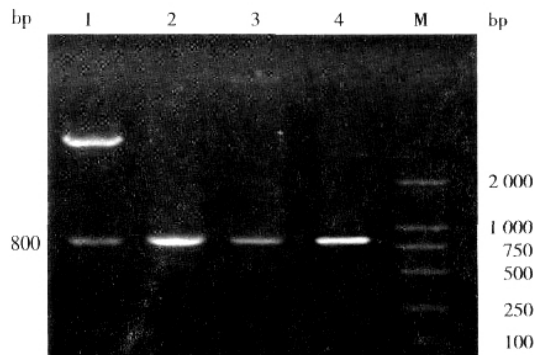


图 2 重组质粒 pcDNA3.1-PSMB5 的鉴定

Fig.2 Identification of recombinant plasmid pcDNA3.1-PSMB5

1: restriction enzyme analysis of recombinant plasmid; 2: PSMB5 cDNA; 3: restriction enzyme digest PSMB5 cDNA; 4: PCR identification of recombinant plasmid; M: marker

分别提取为未转染组、空载体 pcDNA3.1 组及 PSMB5 转染组细胞的总 RNA, 做 RT-PCR, 结果如图 3。转染组 PSMB5 基因的 mRNA 明显高于其他组(图 3)。

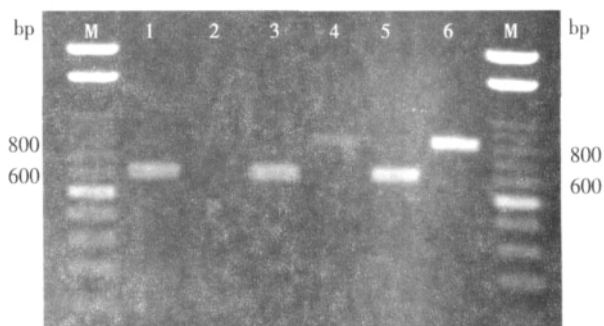


图 3 转染后 PSMB5 mRNA 表达水平

Fig.3 PSMB5 mRNA level after transfection

1, 3, 5: β -actin of non-transfected, pcDNA3.1-transfected, pcDNA3.1-PSMB5 transfected cells; 2, 4, 6: PSMB5 cDNA of non-transfected, pcDNA3.1-transfected, pcDNA3.1-PSMB5 transfected cells; M: marker

2.5 Western blot 检测蛋白表达结果

分别提取空载体转染细胞及 PSMB5 转染细胞的蛋白, Western blot 检测 PSMB5 蛋白表达情况, 结果如图 4。PSMB5 转染细胞的蛋白酶体 PSMB5 亚单位蛋白表达明显高于空载体转染组。

2.6 H₂O₂ 对细胞增殖的影响

H₂O₂ 处理 4 h 后, PSMB5 转染组及空转染组增殖受到抑制, 而空转染组比 PSMB5 转染组降低更为明显, 统计学具有显著性差异。

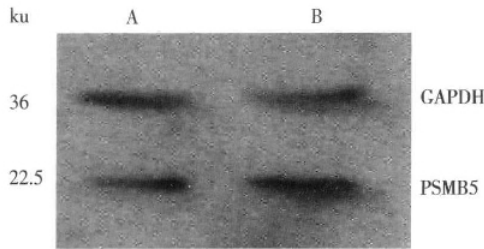


图 4 Western 检测转染细胞 PSMB5 蛋白表达

Fig.4 PSMB5 protein expression detected by Western blot analysis

A: pcDNA3.1-transfected cells; B: PSMB5-transfected cells

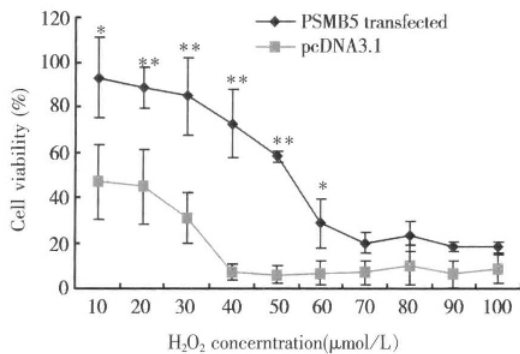


图 5 不同浓度 H₂O₂ 处理后细胞生长抑制曲线

Fig.5 The inhibitory line treated by different H₂O₂ concentration

Compared between two groups, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Data were shown with $\bar{x} \pm s$

3 讨论

蛋白酶体系统是由泛素、蛋白酶体以及介导泛素和蛋白酶体相互作用的酶类组成, 主要具有糜蛋白酶样、胰蛋白酶样、天冬氨酸特异性蛋白水解酶样三种蛋白酶活性, 是细胞内蛋白降解的重要途径之一^[6]。近年来的研究表明, 泛素-蛋白酶体途径参与介导细胞活动过程, 如: 细胞周期的进展、转录、凋亡、细胞生长、机体的发育等^[7], 而在年龄相关性疾病、癌症、代谢性疾病以及炎症免疫过程中, 泛素蛋白酶体途径起着重要作用^[8,9]。

蛋白酶体 5 亚单位 PSMB5 位于蛋白酶体的核心部分, 具有糜蛋白酶活性, 是蛋白酶体的主要酶活性之一。PSMB5 在蛋白酶体的组装、成熟以及发挥蛋白水解功能中都起主导作用。研究结果提示, PSMB5 亚单位通过其糜蛋白酶样酶活性降解异常氧化的蛋白质, 防止这类蛋白质在晶状体内蓄积, 从而对维持晶状体透明性发挥重要作用。

近年来的研究普遍认为氧化损伤是导致年龄相关性白内障发生的首要危险因素, 各种原因和途径引起的氧自由基产生过多或清除减少, 均可导致氧自由基在晶状体内蓄积。研究证实, 晶状体混浊之前就已经有氧自由基造成的损伤, 任何促使自由基产生增加的因素都能引起白内障形成。晶状体的上皮及晶状体纤维内都广泛存在着泛素-蛋白酶体系统^[10], 能够有效地减少氧自由基造成的损伤, 对晶状体具有保护作用, 因此蛋白酶体对维持晶状体的透明性发挥着重要的作用, 而蛋白酶体功能损伤与白内障形成密切相关。有研究表明人晶状体内蛋白酶体的三种酶活性随年龄增加都逐渐减低^[11], 而在白内障晶状体内蛋白酶体三种酶的活性较正常晶体内的蛋白酶体活性均明显降低^[12], 白内障晶体的混浊程度也与蛋白酶体酶活性降低的程度明显相关。在氧化环境下, 晶状体上皮细胞内蛋白酶体的活性明显受到抑制。由此我们推测, 氧自由基造成的损伤抑制了蛋白酶体的保护功能, 从而导致了白内障的形成, 如果人为提高晶状体内蛋白酶体的功能, 就可以增强晶状体防御氧化损伤的能力, 从而延缓白内障的形成。

本研究构建了含有蛋白酶体 PSMB5 亚单位的重组真核表达质粒 pcDNA3.1-PSMB5, 并将其转染人晶状体上皮细胞系 SRA01/04 后, 获得 G418 抗性细胞克隆, 并采用 RT-PCR 及 Western blot 两种方法检测证实我们成功的使人晶状体上皮细胞系 SRA01/04 过表达 PSMB5 分子。本实验还检测了在 H₂O₂ 处理的氧化环境下晶状体上皮细胞增殖能力的变化。研究结果提示, 转染的晶状体上皮细胞和空载体转染的晶状体上皮细胞两组细胞的增殖能力逐渐下降, 但是空载体转染细胞增殖能力受抑制程度更为明显。这表明 PSMB5 具有一定的抗氧化能力, 对晶状体上皮细胞有保护作用。

本实验在体外成功模拟了晶状体上皮细胞中蛋白酶体 PSMB5 过表达, 使蛋白酶体功能维持较高水平的状态, 为研究氧化环境下蛋白酶体对晶状体上皮细胞的影响及其作用机制提供了良好的体外模型, 并为深入研究蛋白酶体在年龄相关性白内障形成过程中的作用机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] ZETTERBERG M, PETERSEN A, SJOSTRAND J, et al. Proteasome activity in human lens nuclei and

- correlation with age, gender and severity of cataract[J]. *Curr Eye Res*, 2003, 27(1):45- 53.
- [2] ORLOWSKI M, WILK S. Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complexes [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 383(1):1- 16.
- [3] JENNER P. Oxidative stress in Parkinson s diseases[J]. *Ann Neurol*, 2003, 53 (Suppl 3):S26- 38.
- [4] REINHECKEL T, SITTE N, ULLRICH O, et al. Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress [J]. *Biochem J*, 1998, 335 (Pt 3): 637- 642.
- [5] HOSLER M R, WANG-SU S T, WAGNER B J. Targeted disruption of specific steps of the ubiquitin- proteasome pathway by oxidation in lens epithelial cells [J]. *Int J Biochem Cell Bid*, 2003, 35(5):685- 697.
- [6] NANDI D, TAHILIANI P, KUMAR A, et al. The ubiquitin- proteasome system [J]. *J Biosci*, 2006, 31(1): 137- 155.
- [7] LIU Q, SHANG F, GUO W, et al. Regulation of the ubiquitin proteasome pathway in human lens epithelial cells during the cell cycle [J]. *Exp Eye Res*, 2004, 78 (2):197- 205.
- [8] QURESHI N, VOGEL S N, VAN WAY C 3rd, et al. The proteasome: a central regulator of inflammation and macrophage function [J]. *Immunol Res*, 2005, 31 (3): 243- 260.
- [9] 杨艳艳, 牛朝诗. 泛素蛋白酶体系统与帕金森病 [J]. *中华神经医学杂志*, 2006, 5(9): 962- 965.
- [10] PEREIRA P, SHANG F, HOBBS M, et al. Lens fibers have a fully functional ubiquitin- proteasome pathway [J]. *Exp Eye Res*, 2003, 76(5):623- 631.
- [11] VITERI G, CARRARD G, BIRLOUEZ- ARAGON I, et al. Age- dependent protein modifications and declining proteasome activity in the human lens [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 427(2):197- 203.
- [12] ANDERSSON M, SJOSTRAND J, KADSSON J O. Differential inhibition of three peptidase activities of the proteasome in human lens epithelium by heat and oxidation [J]. *Exp Eye Res*, 1999, 69(1):129- 138.

(编辑 刘清海)

(上接第 606 页 from page 606)

- [5] CHENG L Y L, YUEN A C Y, CHOW P H. Electrophoretic study of modification of sperm plasma membrane by ventral prostate secretion in golden hamsters [J]. 1995, 35(1): 13- 20.
- [6] AUMULLER G, RENNEBERG H, SCHIEMANN P J, et al. The role of apocine released proteins in the post- testicular regulation of human sperm function [J]. *Adv Exp Med Bid*, 1997, 424:193- 219.
- [7] YING Y, CHOW P H, O W S. Effects of male accessory sex glands on deoxyribonucleic acid synthesis in the first cell cycle of golden hamster embryos [J]. *Bid Reprod*, 1998, 58(3): 659- 663.
- [8] 彭蔚, 余敏斌, 吴开力, 等. 正常人眼小梁组织的二维凝胶电泳及质谱分析. [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2006, 27(6):672- 676.
- [9] NEUER A, SPANDORFER S D, GIRALDO P, et al. Heat shock protein expression during gametogenesis and embryogenesis [J]. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 1999, 7(1- 2): 10- 16.
- [10] EDWARDS J L, HANSEN P J. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two- cell embryos and compromises function of maturing oocytes [J]. *Bid Reprod*, 1996, 55(2):341- 346
- [11] FORREST G L, GONZALEZ B. Carbonyl reductase [J]. *Chem Biol Interact*, 2000, 129(1- 2): 21- 40.
- [12] ISHIKURA S, USAMI N, KITAHARA K, et al. Enzymatic characteristics and subcellular distribution of a short- chain dehydrogenase/reductase family protein, P26h, in hamster testis and epididymis [J]. *Biochemistry*, 2001, 40(1):214- 224.
- [13] MONTFORT L, FRENETTE G, SULLIVAN R. Sperm- zona pellucida interaction involves a carbonyl reductase activity in hamster [J]. *Mol Reprod Dev*, 2002, 61(1): 113- 119.
- [14] BERUBE B, SULLIVAN R. Inhibition of in vivo fertilization by active immunization of male hamsters against a 26- kDa sperm glycoprotein [J]. *Bid Reprod*, 1994, 51(6):1255- 1263.
- [15] LEGARE C, BERUBE B, LEFIEVRE L, et al. Hamster sperm antigen P26h is a phosphatidylinositol- anchored protein [J]. *Mol Reprod Dev*, 1999, 52(2):225- 233.

(编辑 徐杰)