

# 现代物理学方法与眼科研究

陈翠真

(北京市眼科研究所)

应用现代物理测试技术如顺磁共振,核磁共振,尤其是激光拉曼光谱技术,对探讨视网膜脱离和白内障成因或为临床提供快速诊断依据,具有不可忽视的作用。近年来拉曼光谱技术引人注目,国外一些研究者用这一技术研究了紫外光诱发白内障、糖尿病白内障、遗传性白内障和冷白内障眼晶状体。从而揭示了不同类型白内障拉曼光谱的异同,对今后深入探讨白内障的成因、临床诊断和筛选抗白内障药物等,具有重要的意义。

## 一、现代物理测试技术已进入眼科研究领域

当今物理、化学测试技术的发展,使人们能从分子水平来探讨机体的分子结构。最新研究表明,某些现代物理测试技术已进入眼科研究,它们对探讨常见眼病的发病机理和临床诊断起了重要作用。如顺磁共振(ESR)、核磁共振(NMR),激光拉曼散射光谱等。

白内障与活性氧的关系的研究引人注目。十年前, Borkman 等<sup>[1]</sup>用顺磁共振(ESR)技术检测了人和兔眼晶状体蛋白中色氨酸(trp)自由基的信号,他们发现随年龄增加,ESR信号减弱。正常人眼晶状体的ESR比相同年龄的核(褐色)白内障强。最近藤原久子等<sup>[2]</sup>用ESR测定了老年性白内障眼晶状体的超氧化物歧化酶(SOD)活性,他们指出,全摘的眼晶状体比去囊眼晶状体的活性高,此外,SOD活性随白内障发展而降低。全摘出的猪眼晶状体SOD活性也比去囊眼晶状体的高,他们还讨论了活性氧与白内障的关系。

近年核磁共振(NMR)显像技术,已为眼科临床提供了快速诊断依据。日本岡部等<sup>[3]</sup>通过检测视网膜脱离患者眼内视网膜下液的蛋白质浓度,可鉴别陈旧与新鲜的视网膜脱离,从而为改进治疗和手术方法提供了依据。最近日本有

人用NMR研究了半乳糖诱发小白鼠糖尿病性白内障眼晶状体内水分的变化,他们认为这一指标可鉴别诊断早期白内障(按常规检查难以发现)。此外,尚有其他方法,因篇幅所限,在此不作介绍。本文着重介绍激光拉曼光谱技术在眼科研究中的应用。

## 二、激光拉曼光谱技术在眼科研究中的应用

近年来迅速发展的激光拉曼光谱技术已进入眼科研究领域。因拉曼光谱对生物体结构是一种无损伤的分析探针,并且可从分子水平来检测完整眼晶状体或活动物眼内晶状体蛋白的亚结构和微区变化如酪氨酸(tyr)、色氨酸(trp)、巯基(SH)和二硫键(S-S)<sup>[4,5]</sup>。已知眼晶状体纤维干重的主要成分为 $\alpha$ -、 $\beta$ -和 $\gamma$ -晶状体蛋白。当白内障形成时它们发生各种变化,最主要的是蛋白质聚合物形成而引起晶状体混浊。一般认为聚合物内包括芳香族残基和半胱氨酸SH基,但其聚合物形成的详细机理不清楚。国内刚开始应用拉曼光谱技术探讨诱发动动物白内障的特征。国外一些研究者则认为,拉曼光谱技术对从分子水平探讨白内障形成和发展,几乎是无可比拟的工具。他们从基础研究到白内障诊断取得许多可喜的成果,现综述如下。

### 1. 激光拉曼光谱仪操作简介

常用  $\text{Ar}^+$  激光器发出单色光照到样品池产生拉曼散射光,用复合反光镜和大孔径的聚光透镜收集微弱的散射光,再投至双联单色仪的入口狭缝处,经分光后再投射到光电倍增管上。用直流放大器或光子计数器把微弱的信号放大,整理后输入记录仪,最后得到拉曼光谱图。

## 2. 正常眼晶状体的激光拉曼光谱

### (1) 测定方法

(a) 定位测定:将摘出的完整晶状体放在透明小杯底部,倾入培养基,激光通过杯底进入选择的晶状体小区聚焦,并收集拉曼散射光。激光光源为氩离子激光器,激发波长为 514.5 nm 和 488.0 nm,激光功率为 100—300 mW,温度为  $25^\circ\text{C}$ — $35^\circ\text{C}$ <sup>[6]</sup>。

(b) 移位测定:将完整晶状体放在石英玻璃杯内,注满缓冲液(含 5.5 mM 葡萄糖的三羟甲基氨基甲烷缓冲液),激光从底部至晶状体核中心聚焦开始测定,然后从中心向赤道每隔 0.3—0.6 mm 移动并测定各部位的拉曼光谱<sup>[7]</sup>,从而确定眼晶状体各部位的  $\alpha$ -、 $\beta$ -和  $\gamma$ -晶状体蛋白的相对浓度及其亚结构,tyr 和 trp 残基等的结构,存在部位的微环境和水分含量的变化。

### (2) 正常眼晶状体拉曼光谱的特征

正常眼晶状体的拉曼光谱是由  $\alpha$ -、 $\beta$ -和  $\gamma$ -晶状体蛋白以及它们的聚合物组成。它们的扫描范围分三个区域:400—1800  $\text{cm}^{-1}$ , 2500—2800  $\text{cm}^{-1}$  和 2800—3800  $\text{cm}^{-1}$ 。第一区域是典型的蛋白质光谱,是由多肽主链的拉曼光谱组成,它们来自各种氨基酸链;第二区域为半胱氨酸残基 SH 伸展光谱;第三区域包括晶状体蛋白质和晶状体内水的光谱<sup>[6]</sup>。

(3) 眼晶状体蛋白质成分、亚结构组分等的拉曼光谱

(a)  $\alpha$ -、 $\beta$ -和  $\gamma$ -晶状体蛋白质的相对浓度:Yu 等<sup>[4]</sup>首先测定了牛眼晶状体的  $\alpha_1$ -、 $\beta_1$ -、 $\beta_2$ -、 $\beta_3$ -、 $\gamma$ -晶状体蛋白质和白蛋白在 400—800  $\text{cm}^{-1}$  区的拉曼光谱,他们发现这些成分的苯丙氨酸/酪氨酸( $I_{624}/I_{644}$ )相对强度比值不等。故通过其比率变化可检测蛋白质成分的相对变化。

(b) 晶状体蛋白亚结构:完整晶状体和分离蛋白质的 Amide I 和 III 分别位于 1670 和 1240  $\text{cm}^{-1}$  区,这表明分离的水溶性蛋白质的肽主链未变<sup>[4]</sup>。

(c) 晶状体蛋白的 tyr 和 trp 微环境:Ozaki 等<sup>[6]</sup>指出,tyr 和 trp 微环境反应在 700—900  $\text{cm}^{-1}$  区。有人曾报道,tyr 残基的 OH 与中等强度的 H 结合,其双带比率为 1:0.8。若 OH 作为强的 H 受体,其比率为 1:0.4。另外,当 trp 残基处于埋入状态,在 880  $\text{cm}^{-1}$  区相当强;当 trp 残基处于暴露状态,在 880  $\text{cm}^{-1}$  区很弱。这些特征对白内障诊断是很有用的。

(d) SH 和 S-S:由  $I_{2579}/I_{2731}$  的强度比率可测出晶状体蛋白质中的 SH 相对含量。而在 550  $\text{cm}^{-1}$  区可检测 S-S 链的形成<sup>[4]</sup>。

(e) 晶状体水合作用和脱水作用:晶状体的水合作用和脱水作用表现在晶状体水的 OH 在 3390  $\text{cm}^{-1}$  伸展;晶状体蛋白的 CH 在 2935  $\text{cm}^{-1}$  伸展<sup>[8,9]</sup>。

(4) 眼球内晶状体和摘出晶状体的拉曼光谱

Mizuno 等<sup>[10]</sup>比较了兔眼内和摘出的兔眼晶状体的拉曼光谱,没有明显区别。他们指出,角膜、房水或其它眼组织对眼晶状体的拉曼光谱无干扰。这一结论对临床应用拉曼光谱探讨白内障形成具有重要意义。

### (5) 活动物眼晶状体拉曼光谱的测定

Yu 等<sup>[10]</sup>于 1982 年成功地测定了活兔子眼部拉曼光谱,其测量系统包括氩离子激光、显微镜、双单色器、增强 Reticon 检测器、多道光学分析器(OMA)。他们指出,实验成功在于用 Reticon 检测器,它可将信息积累,并能强化弱信号。

## 3. 眼晶状体的拉曼光谱与年龄的关系

有人比较了 28 龄(24h 为 1 龄)和 7 月龄的小白鼠眼晶状体核和皮质部的拉曼光谱,指出,随着晶状体老化,在 450—700  $\text{cm}^{-1}$ , 2500—2800  $\text{cm}^{-1}$  区的拉曼光谱有明显的变化,如随年龄增加,SH 强度下降,S-S 强度增加,这表明 7 月龄之内的眼晶状体蛋白的 SH  $\rightarrow$  S-S,但其

亚结构氨基酸成分相同<sup>[8]</sup>。Chang<sup>[11]</sup>曾检测了分离的 $\alpha$ -、 $\beta$ -和 $\gamma$ -晶状体蛋白的拉曼光谱,他认为,老化晶状体皮质部内 $\gamma$ -晶状体蛋白合成减少,而 $\alpha$ -晶状体蛋白增加。由此可见,皮质部SH(在 $2580\text{cm}^{-1}$ )减少是由于蛋白质成分改变,而不是SH氧化所致<sup>[10]</sup>。随后,Ozaki等<sup>[9]</sup>发现正常老化晶状体与trp残基的拉曼光谱( $880\text{cm}^{-1}$ )强度明显下降有关,也与S-S形成有关,tyr残基微区无改变。另外,随着晶状体老化,4月龄老鼠晶状体脱水过程非常快,然后渐慢,这表明OH相对强度变化与SH强度改变相似。因此,可认为SH迅速减少,晶状体脱水作用增加,致使S-S形成。

#### 4. 拉曼光谱技术与白内障诊断

(1) 紫外光(UV)诱发白内障眼晶状体的拉曼光谱

Thomas等<sup>[12]</sup>报道,UV诱发兔眼晶状体白内障,其OH伸展强度( $3400$ 和 $3800\text{cm}^{-1}$ )明显增加,他们还发现,trp残基强度( $759\text{cm}^{-1}$ )下降是由于trp残基在光化学反应中产生了分解产物。作者还认为,UV诱发白内障的机制是热损伤。

(2) 糖尿病白内障眼晶状体的拉曼光谱

Ozaki等<sup>[13]</sup>首次报告了诱发动物白内障眼晶状体的致病性光谱。他们比较了6月龄的对照组和7月龄的糖尿病组的光谱,发现在 $900-1700\text{cm}^{-1}$ 区,彼此相似,而在 $830-850\text{cm}^{-1}$ 区,两组有明显差异,对照组tyr双带之比为 $1:0.85(I_{833}/I_{831})$ ,糖尿病组为 $1:1$ 。他们认为引起眼晶状体混浊的主要原因是 $\alpha$ -、 $\beta$ -和 $\gamma$ -晶状体蛋白的聚合作用。随后,Mizuno等<sup>[14]</sup>报道诱发的糖尿病性白内障组有两只小白鼠有核白内障,其眼晶状体中心的水合作用远比对照组大;该组另外四只小白鼠为白内障前期,无核混浊,在赤道部有小液泡。

近年来,野沢裕子等<sup>[15]</sup>用拉曼光谱法比较了不同年龄的对照组,用链脲佐菌素(STZ)诱发的糖尿病组和STZ诱发十醛糖抑制剂(ARI)组肥晶状体内水的相对含量和酪氨酸双带的相对强度。结果表明,对照组晶状体核部水的相

对强度( $I_{3390}/I_{2935}$ )随年龄增加而逐渐减少,用STZ诱发组眼晶状体各部位水含量随核白内障发展迅速增加,STZ+ARI组则明显抑制了这种变化。因此,晶状体水的OH伸展强度( $3390\text{cm}^{-1}$ )是检测白内障形成时的水合作用的最好标志。另外晶状体核部的tyr双带的相对强度比,在混浊的糖尿病群显示了高值;无混浊的糖尿病群(投ARI组)与对照组无甚差异。

(3) 自然发糖尿病小白鼠眼晶状体的拉曼光谱

新开发的WBN/Kob系小白鼠(雄性),自出生后9个月才发糖尿病,在18个月有90%为糖尿病,自然发糖尿病半年左右,可确认眼晶状体混浊。作者用激光拉曼光谱法分析了它的发病过程,以水的相对含量( $I_{3390}/I_{2935}$ )变化表示,并与STZ诱发的急性糖尿病小白鼠眼晶状体比较。结果表明,后者的晶状体从核中心到赤道各部分含水量明显增加。与之相反,前者皮质部含水量明显增加,晶状体尚保持透明。急性糖尿病的应急反应是整个晶体混浊,而慢性糖尿病则引起皮质部混浊,晶状体核部有相当多的抵抗性。

人的糖尿病性白内障,多数也是从皮质开始混浊。因此,WBN/Kob系小白鼠的自发白内障可作为良好的动物模型。

(4) 遗传性白内障的拉曼光谱

Iriyama等<sup>[8]</sup>曾比较了对照组(ICR-Strain)和遗传性白内障(Cas-strain)组不同年龄小白鼠的拉曼光谱。结果表明,后者眼晶状体混浊时, $\alpha$ -、 $\beta$ -和 $\gamma$ -晶状体蛋白相对含量变化不大,肽主链也未改变。在对照组中,随着老化(2.5, 5和12周龄)仅在 $500-550\text{cm}^{-1}$ 区有S-S伸展,而在2.5周龄未见此变化。但随着遗传性白内障发展,接近 $840\text{cm}^{-1}$ tyr双带( $I_{833}/I_{831}$ )的强度比由 $1:0.85$ 变到 $1:1$ ,而在 $760$ 和 $880\text{cm}^{-1}$ trp带由 $1:0.83$ 变到 $1:0.65$ 。这反映了tyr残基微环境改变。Itoh等<sup>[16]</sup>报道,遗传性白内障初期,tyr残基与水中氢键结合先于聚合作用,trp则由埋入转为暴露。

Itoh等<sup>[16]</sup>还注意到在遗传性白内障初期,

眼晶状体的 SH 下降速率与对照组相比,无甚差异.待核白内障发展之后,加速了 2SH → S-S 的进程,这是由于眼晶状体老化和混浊所致.由此可见, S-S 的形成不是眼晶状体混浊之初的主要因子,但它对晶状体混浊的蛋白质聚合物起着稳定作用.已知眼晶状体混浊时,蛋白质发生聚合不伴有多肽变化. Garcia-Castineiras 等<sup>[17]</sup>曾报道该类聚合物中含有 tyr 和 trp 的降解产物,它们能从人眼晶状体蛋白水解产物中分离,但尚未用激光拉曼光谱证实.另外,在 3390 和 2935 $\text{cm}^{-1}$  区的强度比率随年龄而变,对照组出现迅速脱水,而遗传性白内障组则出现水合作用加强.因此,水的强度改变可严格检出晶状体初始期的病理改变.

#### (5) Emory 鼠白内障形成的拉曼光谱

Emory 鼠白内障是一种迟发的遗传性白内障<sup>[18]</sup>,对它的研究有利于探讨物化作用引起的眼晶状体混浊的过程.因此,它可作为老年性白内障动物模型.近年, Ozaki 等<sup>[19]</sup>报道,3—6 月龄的 Emory 鼠晶状体水的 OH 伸展强度较大,其核呈透明状,此时可视为白内障前期.6 月龄之后,其晶状体混浊,水的强度比率较对照组 (ICR-Strain 鼠)高,但两组动物随晶状体老化由 2SH → S-S 的速率相似.此外,他们还注意到,在进行性白内障晶状体中, tyr 双带 ( $I_{832}/I_{835}$ )比率(由 0.85→1)的变化,与糖尿病性白内障、Cac-strain 鼠白内障和冷白内障相似, trp 强度 ( $I_{360}/I_{760}$ )变化,经常由 0.85→0.65,这与上述不同类型的白内障相似.因此,作者认为芳香族氨基酸残基光谱改变是白内障形成的共同特征.

#### (6) 冷白内障的拉曼光谱

Mizuno 等<sup>[20]</sup>证明了 SD-strain 小白鼠眼晶状体处在 26℃ 以下,晶状体核部出现冷白内障,而拉曼光谱在 300—800 $\text{cm}^{-1}$  和 900—4000  $\text{cm}^{-1}$  区与冷白内障形成无关,即 trp 残基 ( $I_{760}/I_{860}$ )和 SH 的伸展强度 ( $I_{2579}/I_{2560}$ )与此无关.因此,当眼晶状体混浊时,SH 氧化并非必需<sup>[16]</sup>.另外,晶状体内水的 OH 强度 (3390 $\text{cm}^{-1}$ ) 也与冷白内障无关,这与遗传性白内障眼晶状体混

浊之初以脱水作用为主相区别.但 tyr 双带 ( $I_{835}/I_{832}$ )比率随晶状体所处环境温度下降而明显改变,也与上述糖尿病性和遗传性白内障晶状体 tyr 比率改变(由 1:0.85→1:1)相似.值得注意的是 tyr 强度变化几乎与冷白内障发展相平行,因此,它可作为冷白内障温度转变的指示.作者还指出,冷白内障现象随温度升高至 26℃ 以上可以完全消失.相反,遗传性白内障的发展伴有晶状体水合作用以及 SH 和 trp 残基的改变,这些均属该病因的不可逆因子.

综上所述,应用现代物理测试技术如 ESR, NMR 尤其是激光拉曼光谱技术在探讨视网膜脱离和白内障发病机理以及为临床提供快速诊断依据等方面具有不可忽视的作用.特别是拉曼光谱技术对生物体结构是一种无损伤的分析探针,它可从分子水平检测完整的眼晶状体蛋白的亚结构和微区变化,可用来诊断不同类型白内障和检测药物防治效应.因此,可以相信,应用现代物理方法将把眼科研究推向新的阶段.

- [1] R. F. Borkman et al., *Exp. Eye Res.*, 25(1977), 304.
- [2] 藤原久子·他, *あたらしい眼科*, 6(1989), 770.
- [3] 岡部仁·他, *日眼会誌*, 90(1986), 134.
- [4] N. T. Yu et al., *J. Biol. Chem.*, 250(1975), 2196.
- [5] A. Mizuno et al., *Curr. Eye Res.*, 1(1981/1982), 609.
- [6] Y. Ozaki et al., *Innov. Tech. Biol. Med.*, 5(1984), 269.
- [7] 宮崎仁志·他, *日眼会誌*, 91(1987), 437.
- [8] K. Iriyama et al., *Curr. Eye Res.*, 2(1982/1983), 489.
- [9] Y. Ozaki et al., *Biochemistry*, 22(1983), 6254.
- [10] N. T. Yu et al., *Curr. Eye Res.*, 1(1982), 615.
- [11] R. C. C. Chang, Ph. D thesis Georgia (1976), Institute of Technology Atlanta.
- [12] D. M. Thomas et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 19(1980), 904.
- [13] Y. Ozaki et al., *Chem. Lett.*, 126(1982), 887.
- [14] A. Mizuno et al., *Exp. Eye Res.*, 45(1987), 185.
- [15] 野沢裕子·他, *日眼会誌*, 92(1988), 1.
- [16] K. Itoh et al., *Biochemistry*, 22(1983), 1773.
- [17] S. Garcia-Castineiras et al., *Exp. Eye Res.*, 26(1978), 461.
- [18] J. F. R. Jr. Kuck et al., *Exp. Eye Res.*, 36(1983), 351.
- [19] Y. Ozaki et al., *Appl. Spectroscopy*, 41(1987), 597.
- [20] A. Mizuno et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 119(1984), 989.