

# CAIII 过氧化氢酶和过氧化物酶活性观察

尚西亮, 陈疾忤, 陈世益

(复旦大学附属华山医院运动医学科, 上海 200040)

**摘要:** 目的: 观察骨骼肌碳酸酐酶 III (carbonic anhydrase III, CAIII) 是否具有过氧化氢酶或过氧化物酶活性。方法: 提取骨骼肌可溶性蛋白, SDS-10%PAGE 分离后分别进行考马斯亮蓝染色和 Western blotting 免疫染色, 对照观察确定 CAIII 在凝胶上所处的位置; 磷酸酶活性染色鉴定提取的 CAIII 是否仍然具有酶活性; 铁染色和 DAB 显色法观察骨骼肌 CAIII 是否具有过氧化氢酶或过氧化物酶活性。结果: 骨骼肌 CAIII 与抗 CAIII 多克隆抗体有较强的特异性反应条带, 根据其位置可以在考马斯亮蓝染色图谱显示的复杂蛋白成分中鉴别出 CAIII; 酶活性染色表明提取的 CAIII 仍然具有酶活性; 铁染色法显示, 在蓝绿色的凝胶染色背景下, CAIII 相应位置未见有明显的透亮条带; DAB 显色结果发现, 在 CAIII 相应位置无明显的棕色条带。结论: CAIII 可能不具有过氧化氢酶活性, 也并非过氧化物酶同工酶, 其抵御氧化应激损伤的机理有待于进一步研究。

**关键词:** 生物医学工程学; 碳酸酐酶 III; 过氧化氢酶; 过氧化物酶; 磷酸酶

中图分类号: R373 文献标识码: A 文章编号: 1674-2850(2016)17-1748-05

## Observation of catalase and peroxidase activity in carbonic anhydrase III

SHANG Xiliang, CHEN Jiwu, CHEN Shiyi

(Department of Sports Medicine, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

**Abstract:** Objective: To observe whether carbonic anhydrase III (CAIII) in skeletal muscle has catalase or peroxidase activity. Methods: After extracting from skeletal muscle, the proteins were separated by means of SDS-10%PAGE. Kaumas blue staining and Western blotting staining were used to determine the location of CAIII on the gel. Phosphatase staining was used to identify if CAIII still had enzyme activity. Iron staining and DAB staining were used to observe whether CAIII had catalase or peroxidase activity. Results: CAIII in skeletal muscle could react immunologically with anti-CAIII polyclonal antibody. According to its location, CAIII could be identified from complex protein components on the Kaumas blue staining map. Phosphatase staining showed that CAIII still had enzyme activity. However, we did not find the corresponding CAIII strip by iron staining and DAB staining. Conclusion: CAIII may not have catalase activity, and it is also not a peroxidase isozyme. The mechanism of its resistance to oxidative damage needs to be further studied.

**Key words:** biomedical engineering; carbonic anhydrase III; catalase; peroxidase; phosphatase

## 0 引言

碳酸酐酶 (carbonic anhydrase, CA) 是一种广泛存在于不同细胞内的含锌的金属蛋白酶家族, 它能可逆性地高效催化 CO<sub>2</sub> 的水合反应。至今在哺乳动物体内已发现 13 种 CA 同工酶和 3 种 CA 相关蛋白, CAIII 是 CA 中的一员, 它是一种丰富的胞浆蛋白, 主要存在于骨骼肌、肝脏和脂肪细胞中, 分别约占骨

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金 (新教师基金) (20120071120071); 国家自然科学基金 (青年科学基金) (81301578)

作者简介: 尚西亮 (1980—), 男, 主治医师, 主要研究方向: 运动损伤修复与运动疲劳恢复

通信联系人: 陈世益, 教授, 主要研究方向: 运动损伤促进修复. E-mail: cshiyi@163.com

骨骼肌和脂肪细胞可溶性蛋白的 8%和 25%<sup>[1~2]</sup>. CAIII 具有水化酶、酯酶和磷酸酶功能,它在清除胞内 CO<sub>2</sub>、调节胞内 pH 值、维持组织酸碱平衡、能量代谢等方面均发挥重要作用<sup>[3~6]</sup>。近来研究发现,CAIII 具有抗氧化的作用,可保护细胞免于氧化应激造成的损伤,降低 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 或缺氧/复氧诱导的细胞凋亡<sup>[7~9]</sup>。基于此,推测 CAIII 可能具有过氧化氢酶或过氧化物酶活性。为阐明此问题,本研究分别对电泳分离的骨骼肌胞浆蛋白进行了铁染色和 DAB 染色,结合 Western blotting 和磷酸酶染色结果,观察了骨骼肌 CAIII 是否具有过氧化氢酶或过氧化物酶活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

预染蛋白质分子量 Marker (Fermentas 公司),硝酸纤维素 (NC) 膜 (Millipore 公司),小鼠源性抗 GAPDH 单克隆抗体 (Kang Chen 公司),羊抗小鼠 IgG-HRP (Santa Cruz 公司),兔抗大鼠 CAIII 多克隆抗体 (复旦大学神经病学研究所制备),羊抗兔 IgG-HRP (Sigma 公司),二氨基联苯胺 (DAB, Sigma 公司),BCA 蛋白定量试剂盒 (申能博彩生物科技有限公司)。考马斯亮蓝 R250、polyvinylpyrrolidone (PVP) 阻断剂、fast garnet GBC (Sigma 公司),nitrophenyl phosphate (Fluka 公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 骨骼肌蛋白的提取

剪取成年大鼠比目鱼肌,按课题组此前报道的方法提取骨骼肌可溶性蛋白<sup>[10]</sup>。简言之,用 0.01 mol/L PBS 洗净骨骼肌血污后,加入 0.3 mol/L PBS,在冰浴条件下制备匀浆。4℃、15 000 r/min 离心 15 min,取上清;然后同样条件下再次离心 10 min,取上清。采用 BCA 法测定蛋白的浓度。

#### 1.2.2 骨骼肌蛋白的考马斯亮蓝染色及免疫印迹分析

分别取两份骨骼肌蛋白 (各 10 μg) 进行 SDS-10%PAGE 分离。电泳结束后,将蛋白凝胶裁为两份,一份行考马斯亮蓝染色,一份电转移至硝酸纤维素膜 (NC 膜),丽春红染色后行 Western blotting 免疫染色,即 NC 膜用转移液脱色后浸入 5%脱脂奶粉溶液中室温封闭 2 h, PBST 洗涤后加入兔抗大鼠 CAIII 多克隆抗体 (1:1 600),室温孵育 3 h 或 4℃过夜, PBST 洗涤后加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG (1:2 000) 二抗,室温孵育 1 h, PBST 洗涤后用 DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 显色;将考马斯亮蓝染色结果和 Western blotting 免疫染色结果对照观察,确定 CAIII 在凝胶上所处的位置。

#### 1.2.3 CAIII 的磷酸酶活性分析

取 10 μg 骨骼肌蛋白行 SDS-10%PAGE 分离并转移至 NC 膜,按课题组此前报道的方法<sup>[9]</sup>进行磷酸酶活性染色分析其是否仍具有酶活性。即膜先浸在 ABS 缓冲液 (20 mmol/L NaAc、0.8%NaCl、0.02% KCl, pH=5.5) 中置摇床室温预处理 20 min,然后移置 5% PVP 阻断剂 (用 ABS 缓冲液配制) 中 4℃过夜或 25℃至少 6 h. ABS 缓冲液洗涤 5 min 后,将膜移至 20 mL 磷酸酶活性反应液 (50 mmol/L NaAc、20 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、5 mmol/L nitrophenyl phosphate、2 mmol/L fast garnet GBC, pH=5.5) 中 37℃反应 45 min 后中止, ABS 缓冲液洗涤后观察并拍照。

#### 1.2.4 铁染色法观察 CAIII 是否具有过氧化氢酶活性

分别取两份骨骼肌蛋白 (各 10 μg) 进行 SDS-10%PAGE 分离。电泳结束后,将蛋白凝胶裁为两份,一份行考马斯亮蓝染色,一份参考董泗建等<sup>[11]</sup>报道的方法行铁染色。简言之,将电泳后的凝胶用

预冷的蒸馏水冲洗3次,然后于0.03%  $H_2O_2$  中浸泡20 min. 倾去  $H_2O_2$  液,用预冷的蒸馏水冲洗3次,尽量将  $H_2O_2$  洗干净,滤纸吸干,将凝胶置于2%  $FeCl_3$ :2%  $K_3Fe(CN)_6$ =1:3 的混合液中浸泡,轻轻摇动凝胶5 min,弃去染色液,用蒸馏水清洗后拍照。染色后凝胶背景为蓝绿色,有过氧化氢酶活性的部分呈透明亮黄色。

### 1.2.5 DAB 显色法观察 CAIII 是否具有过氧化物酶活性

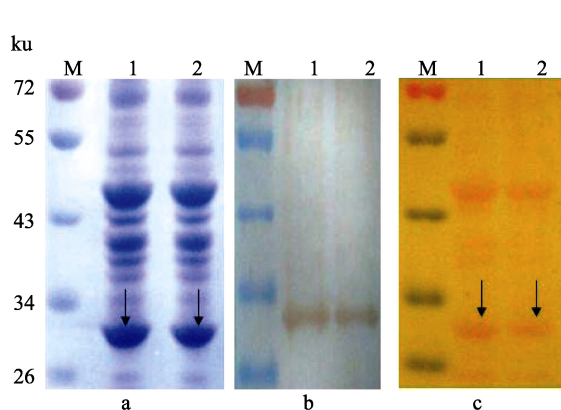
分别取两份骨骼肌蛋白(各10  $\mu g$ )进行 SDS-10%PAGE 分离。电泳结束后,将蛋白凝胶裁为两份,一份进行考马斯亮蓝染色,一份电转移至硝酸纤维素膜(NC膜),丽春红染色后行 DAB 染色,即 NC膜用转移液脱色后浸入 DAB- $H_2O_2$  中显色,显色结束后观察并拍照。

分别将铁染色和 DAB 显色结果与考马斯亮蓝染色结果进行对照观察,由于1.2.2节中已经利用 CAIII 特异性免疫反应结果在考马斯亮蓝染色的众多骨骼肌蛋白成分中甄别出 CAIII,因此,从铁染色和 DAB 显色结果可以明确 CAIII 是否具有过氧化氢酶/过氧化物酶活性。

## 2 结果

### 2.1 骨骼肌 CAIII 免疫印迹分析及磷酸酶活性染色

图1a为骨骼肌蛋白经 SDS-10%PAGE 分离后考马斯亮蓝染色图谱,图1b为骨骼肌蛋白 Western blotting 免疫染色图谱,图1c为磷酸酶活性染色图谱。图1b显示骨骼肌 CAIII 与抗 CAIII 多克隆抗体有较强的特异性反应条带,根据其位置可以在考马斯亮蓝染色图谱显示的复杂蛋白成分中鉴别出 CAIII (如图1a所示)。图1c显示骨骼肌中相对分子量约45 ku和29 ku处蛋白质均具有磷酸酶活性,结合图1b Western blotting 免疫染色结果,可见在 CAIII 所处位置有明显条带着色,说明 CAIII 具有磷酸酶活性(如图1c所示)。



注: M代表预染蛋白质分子量标准(pre-stained protein molecular weight marker),下同

图1 骨骼肌 CAIII 免疫印迹分析及磷酸酶活性染色图谱

Fig. 1 CAIII Western blotting and phosphatase activity staining

a—考马斯亮蓝染色图谱; b—Western blotting 免疫染色图谱;

c—磷酸酶活性染色图谱

a-Kaumas blue staining; b-Western blotting staining;

c-Phosphatase activity staining

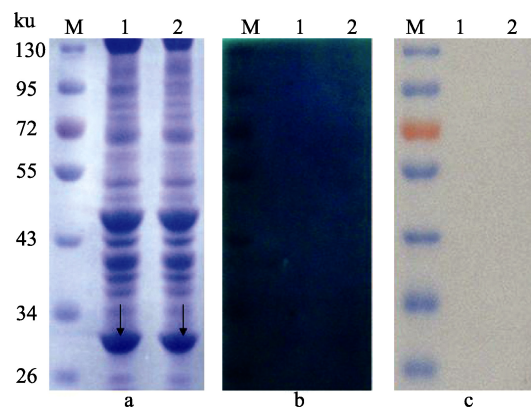


图2 骨骼肌蛋白过氧化氢酶/过氧化物酶活性染色图谱

Fig. 2 Catalase/peroxidase activity staining of skeletal muscle proteins

a—考马斯亮蓝染色图谱; b—过氧化氢酶活性染色图谱;

c—过氧化物酶活性染色图谱

a-Kaumas blue staining; b-Catalase activity staining;

c-Peroxidase activity staining

## 2.2 骨骼肌 CAIII 过氧化氢酶/过氧化物酶活性观察

图 2b 显示, 骨骼肌蛋白电泳凝胶行铁染色后, 凝胶被染成蓝绿色, 结合图 2a 考马斯亮蓝染色结果可见, 在 CAIII 相应位置无明显的透亮条带, 表明 CAIII 可能不具有过氧化氢酶活性。图 2c 为骨骼肌蛋白过氧化物酶活性染色图谱, 可见, NC 膜经 DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 染色后, 在 CAIII 相应位置无明显的棕色条带, 表明 CAIII 可能不具有过氧化物酶活性。

## 3 讨论与结论

生物体内活性氧和自由基的积累, 会导致膜脂质过氧化, 从而引起生物体代谢和功能紊乱。近来研究发现, CAIII 具有抗氧化的作用, 可保护细胞免于氧化应激造成的损伤<sup>[7-9]</sup>。如 GAILLY 等<sup>[12]</sup>研究发现, CAIII 仅在正常肾脏外皮层近端小管上皮细胞中呈低表达, 而在 CIC-5 缺陷小鼠肾脏中 CAIII 表达阳性细胞数量增加了大约 4 倍, CAIII mRNA 的表达水平达正常水平的 5~6 倍, 而 CIC-5 缺陷小鼠 (Cln5Y/-) 肾脏主要表现为较高的细胞增殖状态和氧化应激状态。此外, 作者在体外研究中还发现, 当将近端小管上皮细胞暴露于 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中时, 细胞 CAIII 表达水平明显增高, 因此作者认为 CAIII 可能在 CIC-5 缺陷小鼠肾脏避免遭受氧化应激损伤中起重要作用。RÄISÄNEN 等<sup>[8]</sup>研究发现, 转 CAIII 基因后的 NIH-3T3 细胞比未转染组细胞呈现了较低的氧化状态, 且当未转染组细胞暴露于 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中时, 其活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 含量迅速增加、凋亡细胞明显增多, 而转染组细胞 ROS 含量则无明显增加、细胞凋亡数量也明显低于未转染组。在前期研究中, 已在原核表达系统中成功表达并纯化出了具有酶活性的 CAIII 和 TAT-CAIII, 并发现 TAT-CAIII 跨膜转入胞内后降低了缺氧/复氧对细胞造成的损伤, 明显减少了细胞的凋亡, 这亦表明 CAIII 具有抗氧化的作用<sup>[9]</sup>。根据课题组的发现并结合上述文献报道 CAIII 可抵御 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 造成的细胞损伤, 推测 CAIII 可能具有过氧化氢酶或过氧化物酶活性。

铁染色法是鉴定过氧化氢酶活性的经典方法, 该方法操作简单、特异性好、灵敏度高, 最低鉴定酶量可达 0.1 ng<sup>[11]</sup>。铁染色法的基本原理是: 聚丙烯酰胺凝胶上的过氧化氢酶可将 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分解生成 H<sub>2</sub>O 和 O<sub>2</sub>, 但在无过氧化氢酶的区域, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 将 K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 还原为 K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 然后 K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 再与 FeCl<sub>3</sub> 反应生成带普鲁士蓝的亚铁化合物, 这样凝胶背景呈蓝绿色, 过氧化氢酶区域呈透亮条带, 藉此可鉴别目的蛋白是否具有过氧化氢酶活性。本研究中, 首先提取骨骼肌蛋白, 行考马斯亮蓝染色和 Western blotting 免疫染色, 利用 CAIII 特异性免疫反应结果在考马斯亮蓝染色的众多骨骼肌蛋白成分中甄别出了 CAIII (如图 1a、图 1b 所示)。然后对提取的骨骼肌蛋白行磷酸酶活性染色, 结果显示骨骼肌中有多种蛋白均具有磷酸酶活性 (如图 1c 所示), 但此前由于已经确定了 CAIII 在电泳图谱上的精确位置, 据此可以判断 CAIII 仍然具有磷酸酶活性。在此基础上, 又采用铁染色法观察了具有酶活性的 CAIII 是否具有过氧化氢酶活性, 结果显示, 在蓝绿色的凝胶染色背景下, CAIII 相应位置未见有明显的透亮条带 (如图 2b 所示), 表明 CAIII 可能不具有过氧化氢酶活性。

过氧化物酶又称过氧化酶, 其系统名称为供体: 过氧化氢氧化还原酶。它有两个底物, 一个是 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 另一个为一种氢的供体。目前临床和实验中, 多用联苯胺及其衍生物作为供体, 因为这些物质脱氢后往往会呈现颜色, 如过氧化物酶可催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 与 DAB 反应生成水和稳定的联苯胺棕色沉淀, 藉此可用来鉴定目的蛋白是否具有过氧化物酶活性。这里采用 DAB 显色法来检测 CAIII 是否具有过氧化物酶活性, 与他人直接对聚丙烯酰胺凝胶染色不同, 研究采取了在 NC 膜上对酶活性进行染色的方法, 一定程度上避免了 SDS 去垢剂对酶活性造成的影响, 克服了在凝胶中进行染色时因底物向凝胶内扩散速率较差致使酶与底物接触不充分的缺陷, 染色结果较凝胶染色清晰且便于观察和保存。结果显示, NC 膜经 DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



染色后,在 CAIII 相应位置无明显的棕色条带(如图 2c 所示),表明 CAIII 可能不具有过氧化物酶活性。

过氧化氢酶和过氧化物酶,是两种广泛存在于生物体内的氧化还原酶,它们作用的底物都有  $H_2O_2$ ,可保护细胞免于  $H_2O_2$  造成的损伤。有趣的是,CAIII 具有抗氧化的作用,可降低  $H_2O_2$  诱导的细胞凋亡,然而本研究发现,CAIII 可能不具有过氧化氢酶活性,也并非过氧化物酶同工酶,那么 CAIII 抵御  $H_2O_2$  氧化损伤的机理究竟如何呢?在骨骼肌细胞、肝细胞和脂肪细胞中含量丰富的 CAIII 到底发挥什么样的作用呢?这些问题均有待于进一步地研究与探讨。

### [参考文献] (References)

- [1] VULLO D, NISHIMORI I, SCOZZAFAVA A, et al. Carbonic anhydrase activators: activation of the human cytosolic isozyme III and membrane-associated isoform IV with amino acids and amines[J]. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, 18(15): 4303-4307.
- [2] SHANG X L, CHEN S Y, REN H M, et al. Carbonic anhydrase III: the new hope for the elimination of exercise-induced muscle fatigue[J]. *Med. Hypotheses*, 2009, 72(4): 427-429.
- [3] INNOCENTI A, SCOZZAFAVA A, PARKKILA S, et al. Investigations of the esterase, phosphatase, and sulfatase activities of the cytosolic mammalian carbonic anhydrase isoforms I, II, and XIII with 4-nitrophenyl esters as substrates[J]. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, 18(7): 2267-2271.
- [4] HUANG H, REN H M, SHANG X L, et al. Detection of the phosphatase activity of carbonic anhydrase III on a nitrocellulose membrane following 2D gel electrophoresis[J]. *Mol. Med. Rep.*, 2014, 10(4): 1887-1892.
- [5] HENRY R P. Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism[J]. *Annu. Rev. Physiol.*, 1996, 58: 523-538.
- [6] 尚西亮, 鲍苑苑, 任惠民, 等. 碳酸酐酶 III 在疾病和肌肉疲劳发生发展中的作用[J]. *生命科学*, 2011, 23 (5): 429-433. SHANG X L, BAO Y Y, REN H M, et al. Effects of CAIII on the occurrence and development of diseases and muscle fatigue[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2011, 23(5): 429-433. (in Chinese)
- [7] ZIMMERMAN U J, WANG P, ZHANG X, et al. Anti-oxidative response of carbonic anhydrase III in skeletal muscle[J]. *IUBMB Life*, 2004, 56(6): 343-347.
- [8] RÄISÄNEN S R, LEHENKARI P, TASANEN M, et al. Carbonic anhydrase III protects cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis[J]. *FASEB J.*, 1999, 13(3): 513-522.
- [9] SHANG X L, BAO Y Y, CHEN S Y, et al. Expression and purification of TAT-fused carbonic anhydrase III and its effect on C2C12 cells apoptosis induced by hypoxia/reoxygenation[J]. *Arch. Med. Sci.*, 2012, 8(4): 711-718.
- [10] 尚西亮, 陈世益, 任惠民, 等. 大强度跑台运动及低频电刺激对大鼠骨骼肌及血清 CAIII 表达的影响[J]. *中国运动医学杂志*, 2009, 28 (2): 159-163. SHANG X L, CHEN S Y, REN H M, et al. Effects of acute intense treadmill running and low-frequency electric stimulation on the expression of CAIII protein in skeletal muscles and sera of rats[J]. *Chin. J. Sports Med.*, 2009, 28(2): 159-163. (in Chinese)
- [11] 董泗建, 刘昌玲. 一种鉴定过氧化氢酶活性的铁染色法[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1996, 23 (1): 86-88. DONG S J, LIU C L. An iron staining method for determination of catalase activity[J]. *Prog. Biochem. Biophys.*, 1996, 23(1): 86-88. (in Chinese)
- [12] GAILLY P, JOURET F, MARTIN D, et al. A novel renal carbonic anhydrase type III plays a role in proximal tubule dysfunction[J]. *Kidney Int.*, 2008, 74(1): 52-61.