

表没食子儿茶素没食子酸酯抑制地塞米松体外诱发兔白内障的作用

刘湘萍¹, 何湘珍²

作者单位:¹ (421001) 中国湖南省衡阳市中心医院眼科;
² (421001) 中国湖南省衡阳市, 南华大学第二附属医院眼科

作者简介: 刘湘萍, 副主任医师, 研究方向: 白内障。

通讯作者: 何湘珍, 主任医师, 教授, 研究方向: 白内障. 70016303@qq.com

收稿日期: 2009-12-07 修回日期: 2010-02-21

Inhibitory effect of epigallocatechin gallate on cataract of rabbits induced by dexamethason

Xiang-Ping Liu¹, Xiang-Zhen He²

¹Department of Ophthalmology, Central Hospital of Hengyang, Hengyang 421001, Hunan Province, China; ² Department of Ophthalmology, Deuto-Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Correspondence to: Xiang-Zhen He. Department of Ophthalmology, Deuto-Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China. 70016303@qq.com

Received: 2009-12-07 Accepted: 2010-02-21

Abstract

• **AIM:** To observe the inhibitory effect of epigallocatechin gallate (EGCG) on apoptosis of lens epithelial cell (LEC) of rabbits dexamethason (Dex) peroxide induced.

• **METHODS:** Cultured normal rabbit lens *in vitro* were randomly divided into 3 groups: the control group (A), the group treated by Dex (10 μmol/L) (B), the group treated by Dex peroxide and EGCG (10 mmol/L) (C). The transparenance and apoptosis ratio of lens on the time points of 3, 5, 7 days were determined by image analysis and flowcytometry, as well as by terminal deoxyribonucleotide transferase-mediate dUTP nick end labeling (TUNEL) detection, the effect of EGCG on the number of dexamethason-induced rabbit LEC with apoptosis were examined, the related comparisons and statistical analyses were carried out.

• **RESULTS:** The transparenance of the group treated by Dex and EGCG in association were higher than that of the group treated by Dex and lower than that of the control group. The differences among groups were statistically significant ($P < 0.01$). There was a significant difference between the EGCG in association with tocopherol group and the Dex group ($P < 0.01$). The TUNEL method revealed that the apoptosis rate of LEC in Dex group was apparently higher than that of the control group ($P < 0.01$); There was a significant difference between the EGCG in association with tocopherol group and the Dex group ($P < 0.01$).

• **CONCLUSION:** EGCG can evidently inhibit LEC apoptosis, and prevent and delay the development of the cataract.

• **KEYWORDS:** epigallocatechin gallate; cataract; dexamethason; lens epithelial cells; apoptosis

Liu XP, He XZ. Inhibitory effect of epigallocatechin gallate on cataract of rabbits induced by dexamethason. *Int J Ophthalmol (Guji Yank e Zazhi)* 2010;10(3):443-445

摘要

目的: 观察表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG) 对抑制地塞米松 (Dex) 诱导体外培养兔晶状体上皮细胞 (LEC) 凋亡的作用。

方法: 采用体外培养正常家兔晶状体, 随机将家兔晶状体分为 3 组: 空白对照组 (A); Dex (10 μmol/L) 处理组 (B); Dex + EGCG (10 mmol/L) 实验组 (C)。分别于 3, 5, 7d 培养结束后观察各组晶状体的透明度, 并进行相关比较及统计学分析。TUNEL 法检测 EGCG 对 Dex 诱发的兔 LEC 凋亡细胞数量的影响, 并进行相关比较及统计学分析。

结果: EGCG 实验组晶状体透明性均低于空白对照组, 但高于 Dex 处理组, 差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$); Dex 处理组 LEC 凋亡率显著高于空白对照组 ($P < 0.01$); Dex 处理组与 EGCG 实验组比较, 有显著性差异 ($P < 0.01$)。

结论: EGCG 可抑制 Dex 损伤所诱导兔 LEC 凋亡, 具有明显抑制激素性白内障形成的作用。

关键词: 表没食子儿茶素没食子酸酯; 白内障; 地塞米松; 晶状体上皮细胞; 凋亡

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.03.013

刘湘萍, 何湘珍. 表没食子儿茶素没食子酸酯抑制地塞米松体外诱发兔白内障的作用. 国际眼科杂志 2010;10(3):443-445

0 引言

随着糖皮质激素的广泛应用, 激素性白内障发病率越来越高。尽管白内障手术已日臻完善, 但不可避免的手术并发症和经济问题仍十分严重。寻找有效的预防和治疗方法, 早期控制白内障, 仍然是该领域研究热点。我们通过建立兔激素性白内障离体模型, 探讨 EGCG 是否对激素性白内障有抑制作用, 为药物防治激素性白内障提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料 健康家兔, 体质量 2.5 ~ 3.0 kg, 南华大学医学实验动物中心提供, 雌雄兼用; EGCG 和 Dex (SIGMA 公司); DMEM 培养基 (Hyclone 公司); TUNEL 试剂盒 (武汉 boster 公司)。正常成年家兔 50 只, 经耳缘静脉注射空气形成栓塞致死, 立即摘取眼球于超净工作台后路法小心取出晶状体, 清除干净玻璃体, 置入含青霉素 80 万 U + 庆大霉素 8 万 U 的生理盐水 500 mL 中, 1 min 后取出置入 5 mL DMEM 低糖培养液 (含 100 mL/L 小牛血清, 100 kU/L 青霉素

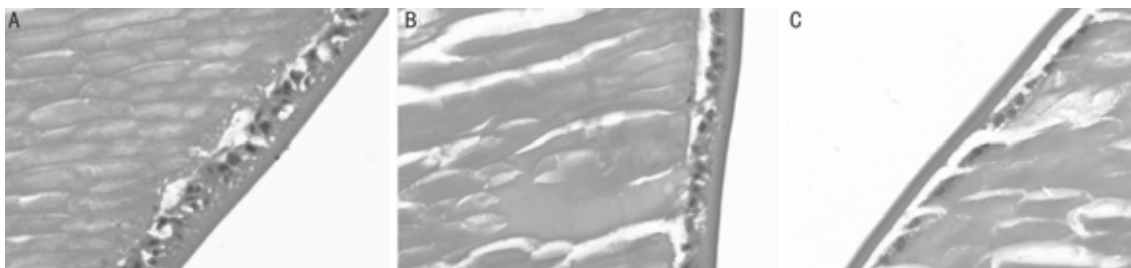


图1 培养晶状体上皮细胞(HE ×400) A:空白对照组;B:Dex 模型组;C:EGCG 组。

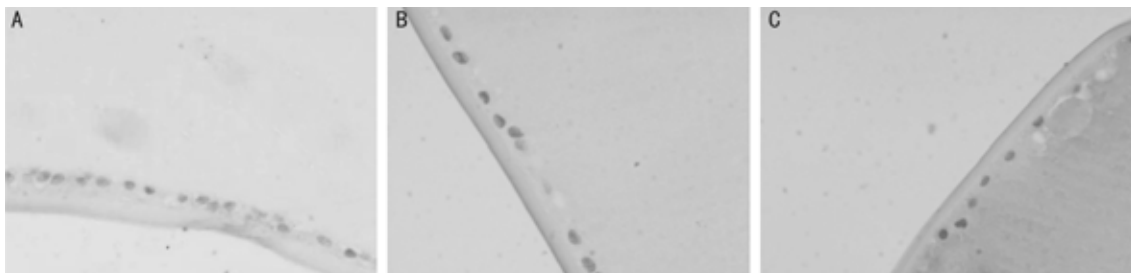


图2 培养 LEC 凋亡(TUNEL ×400) A:空白对照组;B:Dex 组;C:EGCG 组。

和 100kU/L 链霉素)的 12 孔培养板内,每孔一个晶状体,于 37℃,50mL/L CO₂ 培养箱内培养 6h,选取透明晶状体作为下一步实验对象,其中 10 只晶状体可能由于手术损伤或其他原因致其混浊而被排除,留取 90 只透明晶状体备用。

1.2 方法 对照组(A组):将筛选后的透明晶状体 30 只置于 DMEM 培养液 5mL 的 12 孔培养板内,每孔 1 个晶状体,置于 37℃,50mL/L CO₂ 培养箱内培养,每 12h 更换一次培养液以确保营养充足。处理组(B组):将筛选后的透明晶状体 30 只置于 DMEM + Dex(终浓度为 10μmol/L)培养液 5mL 的 12 孔培养板内,每孔 1 个晶状体,置于 37℃,50mL/L CO₂ 培养箱内培养,每 12h 更换一次培养液以确保营养充足。实验组(C组):用 DMEM 配置 100mmol/L EGCG 母液,将筛选后的透明晶状体 30 只置于 C 组:含 DMEM + Dex(终浓度为 10μmol/L) + EGCG(终浓度为 10mmol/L)培养液 5mL 的 12 孔培养板内,每孔 1 个晶状体,置于 37℃,50mL/L CO₂ 培养箱内培养,每 12h 更换 1 次培养液以确保营养充足。于培养结束后,将 12 孔培养板置于带有 2mm × 2mm 黑色网格的透明胶片上分析。晶状体混浊程度参照 Azuma 等的标准分为 5 级:Ⅰ级:无混浊,晶状体透明;Ⅱ级:轻度混浊,晶状体周边出现空泡;Ⅲ级:中度混浊,晶状体周边空泡向中心扩展,核出现雾状混浊;Ⅳ级:高度混浊,晶状体周边空泡扩展到核区,核雾状混浊加重;Ⅴ级:核混浊,白内障成熟。观察晶状体上皮细胞排列,晶状体纤维的六角形结构改变。采用 TUNEL 法进行原位细胞凋亡检测试剂盒中所带的样本片为阳性对照片。光镜下观察 TUNEL 染色标本,细胞核出现棕黄色颗粒沉积者为凋亡细胞,呈蓝色者为正常细胞。记录各实验组及对照组凋亡上皮细胞的发生率,并行统计学处理。上皮细胞凋亡量以细胞凋亡率计,每个标本在 400 倍光镜视野下计数 5 个视野的全部细胞数与凋亡细胞数,计算凋亡细胞所占百分比即为上皮细胞凋亡率。

统计学分析:数据采用 SPSS 12.0 统计软件进行统计学分析,晶状体混浊程度为等级分组资料用 *H* 检验,晶状体上皮细胞凋亡率用方差分析法。

2 结果

2.1 晶状体混浊 随培养时间延长,Dex 组晶状体混浊程

表 1 各组培养 10 个晶状体混浊程度

混浊程度	t/d	Ⅰ级	Ⅱ级	Ⅲ级	Ⅳ级	Ⅴ级	<i>n</i>
A 组 ^b	3	9	1	0	0	0	
B 组		0	2	5	3	0	
C 组 ^b		6	3	1	0	0	
A 组 ^b	5	7	3	0	0	0	
B 组		0	0	6	3	1	
C 组 ^b		5	4	1	0	0	
A 组 ^b	7	6	3	1	0	0	
B 组		0	0	1	6	3	
C 组 ^b		4	3	2	1	0	

^b*P* < 0.01 vs B 组。

表 2 晶状体上皮细胞凋亡率

分组	3d	5d	7d
A 组	0.19 ± 0.04 ^b	0.21 ± 0.12 ^b	0.56 ± 0.21 ^b
B 组	40.45 ± 0.30	50.60 ± 0.63	73.12 ± 0.74
C 组	3.77 ± 0.29 ^b	4.58 ± 0.37 ^b	11.74 ± 0.85 ^b

^b*P* < 0.01 vs B 组。

度逐渐加重,EGCG 组晶状体混浊程度较 Dex 组明显减轻,对照组则无明显变化(表 1)。统计学处理:Dex 组、EGCG 组和对照组晶状体混浊度比较,差异有显著统计学意义(*H* 检验:*H*_c = 31.474, *P* = 0.000)。

2.2 晶状体组织学改变 对照组兔 LEC 形态正常,晶状体上皮细胞排列规整,晶状体纤维的六角形结构清晰(图 1A);在实验 3d 期间,Dex 组部分晶状体上皮细胞呈长形或类圆形,排列紊乱,晶状体纤维崩解(图 1B);EGCG 组兔 LEC 形态接近正常,纤维水肿减轻(图 1C)。在实验 7d 期间,Dex 组除以上表现外,细胞体积缩小,胞质色深,胞核致密、浓缩,呈深紫色,赤道部皮质出现大量特征性空泡改变。

2.3 晶状体上皮细胞凋亡 培养 3d 空白对照组,细胞核呈现均一的蓝染,无明显的凋亡细胞(表 2,图 2A);Dex 组 7d 大部分细胞的核呈棕黄色着色,核固缩,染色质聚集成团,呈现强阳性改变(图 2B);EGCG 组在培养 3d 均未发现细胞核棕黄色着色,7d 见细胞核少量棕黄色着色(图 2C)。统计学结果见表 2。

3 讨论

糖皮质激素具有多方面的生理作用,它对人的水、盐、糖、蛋白质和脂肪的代谢有着重要的影响。临床作为药物广泛应用于器官移植、外伤和免疫性疾病的治疗,有一定的、甚至是显著的疗效,但也能引起一定、甚至严重的不良反应和并发症。尤其是对眼部的损害,许多医师往往认识不足而忽略了对它的重视,长时间大量全身、局部及吸入糖皮质激素可引起以晶状体后囊膜混浊为特征的激素性白内障^[1],局部应用糖皮质激素引起白内障的几率更大,因药物在局部的浓度更高^[2]。研究其发病机制对药物治疗具有重大的临床意义。目前,激素性白内障的发病机制还不明确,国内外学者对糖皮质激素诱导晶状体混浊作了广泛研究,以阐明其发病机制,可能的发病机制有氧化损伤学说、离子转运障碍学说、蛋白加和物学说、受体学说、酶功能损害学说、细胞黏附分子异常学说^[3]。长期应用糖皮质激素削弱晶状体的防御屏障,产生氧化损害,造成晶状体细胞结构损伤和功能代谢障碍。主要表现为:(1)破坏晶状体细胞膜;(2)破坏细胞内结构;(3)晶状体代谢改变。预防和药物治疗激素性白内障主要有两种途径,即减少白内障发病的危险因素和应用抗白内障药物。

茶叶的生物活性物质特别是以儿茶素为主体的茶多酚类物质正以不同的方式对人体健康产生着积极的影响,茶多酚(TP)是茶叶中多酚类物质的总称,主要由儿茶素、黄酮类、花青素、花白素和酚酸等类物质组成。在茶叶中,儿茶素(EGCG)是最重要的多酚类化合物,约占茶多酚总量的70%,其含量最高。它是2-连苯酚基苯并吡喃与没食子酸形成酯,具有酚类抗氧化剂的通用性,同时因其结构中6个酚羟基而有优于其他儿茶素的许多性质。具有抗肿瘤作用,抗氧化作用,消臭、防龋作用,抗紫外线辐射,抑菌作用。在许多研究中已发现EGCG的抗氧化作用与它的分子结构有关,存在着抗氧化活性中心,儿茶素在氧化还原过程中产生的半醌自由基的稳定性也是它们抗氧化能力强弱的原因。半醌自由基越稳定,其抗氧化能力越强。Guo等^[4]的研究发现EGCG的半醌自由基是儿茶素中最稳定的,结构中存在的没食子酸基团非常有助于半醌自由基的稳定。由于EGCG具有酯型结构,被认为更易于透过细胞膜脂进入细胞内,因而其分子扩散入细胞较快,不至于在细胞外积累。其抗氧化具体的作用机制:(1)清除自由基;(2)增加抗氧化酶的活性;(3)络合诱导氧化的金属离子;(4)体内抗氧化物再生。既往研究发现,EGCG抗氧化自由基能力是维生素C的20倍,比其它几种天然植物如迷迭香提取物、虎杖提取物抗氧化能力均强^[5],且用量少,无合成物的潜在毒副作用。EGCG多种生物活性均与其抗氧化性有关,根据其抗氧化能力,我们认为EGCG在激素性白内障的预防与治疗中也应该具有一定的作用。我们采用兔离体模型并采用Dex干预,形成白内障,Dex组培养到3d其中Ⅱ级混浊20%、Ⅲ级混浊50%、Ⅳ级混浊30%,培养到5dⅢ级混浊60%、Ⅳ级混浊30%、Ⅴ级混浊10%,培养到7dⅢ级混浊10%、Ⅳ级混浊60%、Ⅴ级混浊30%,晶状体随着培养时间延长混浊逐渐加重,而空白对照组晶状体混浊率很低,培养到3d才一个晶状体发生Ⅱ级混浊,混浊率为10%,培养到5dⅡ级混浊3例,培养到7dⅡ级混浊3例、Ⅲ级混浊1例。晶状体组织学也发生改变:3d时,Dex组部分晶状体上皮细胞呈长形或类圆形,排列紊乱,晶状体纤维崩解;EGCG处理组兔LEC形态接近正常,纤维水肿减轻。在7d时,Dex组除以上表现外,细胞体积缩小,胞质色深,胞核致密、浓缩,呈深紫色,赤道

部皮质出现大量特征性空泡性改变。EGCG组兔LEC形态接近正常,纤维水肿减轻,激素性白内障的发生和发展得到抑制。从而我们认为抗晶状体氧化损伤是EGCG抑制激素性白内障形成的一个重要机制。

激素性白内障与晶状体上皮细胞生理机能和病理改变有密切关系,目前认为晶状体上皮细胞凋亡是除先天性白内障以外的所有类型白内障形成的细胞学基础^[6]。诱发白内障的共同细胞学基础是细胞凋亡,晶状体上皮细胞是晶状体内代谢最活跃的部位,具有晶状体的生长、分化和修复等功能,并为其代谢提供能量,晶状体上皮细胞参与前囊内外离子的转运,维持囊膜内外的离子梯度,从而使晶状体纤维排列整齐、均匀。以上这些功能均有赖于晶状体上皮细胞间紧密连接、形态完整和功能正常。因此,对晶状体上皮细胞的任何损害,晶状体的生长就会受到影响,甚至停止,严重者还会破坏晶状体的自身稳定性,引起Ca²⁺渗入、半胱氨酸酶激活、细胞骨架降解、晶状体蛋白聚集、水和电解质进入,最终导致晶状体混浊^[7]。糖皮质激素削弱晶状体抗氧化的防御屏障及晶状体代谢发生改变,能量供应不足,产生氧化应激,氧化损伤是引起晶状体上皮细胞凋亡的重要诱发因素之一^[8],影响晶状体上皮细胞的代谢及生理,导致晶状体上皮细胞凋亡的发生。

TUNEL技术是目前检测细胞凋亡较常用的方法。它能很好地在组织、切片或细胞培养物中显示原位凋亡细胞,此方法优点在于其敏感性和特异性均较满意。我们采用TUNEL法检测凋亡的LEC细胞核为棕黄色染色,染色集中于核膜下呈环状或位于一侧呈新月形,有的呈均匀凝集状,有的为核碎裂状;未凋亡的LEC细胞核为蓝紫染色。我们的实验结果揭示Dex是LEC凋亡的重要诱发因素,实验结果表明Dex组与空白组同期比较,其LEC凋亡百分率有显著意义($P < 0.01$),并随时间延长和晶状体混浊逐渐加重,LEC凋亡的程度亦加重。Dex诱导LEC凋亡的具体途径目前还不十分明确。许多学者^[9]在糖皮质激素诱导鸡胚胎致白内障实验中均发现晶状体内谷胱甘肽浓度下降,脂质过氧化物浓度升高,从而促使LEC凋亡。EGCG组在培养3d未发现细胞核棕黄色着色,随着作用时间的延长细胞核少量棕黄色着色,可能由于EGCG通过清除自由基、使体内抗氧化体系再生,抑制过氧化,从而抑制细胞凋亡。

参考文献

- 1 王建伟,严宏. 激素性白内障的发病机制. 国际眼科杂志 2004;4(2):312-317
- 2 McGhee Charles NJ, Dean S, Danesh Meyer H. Locally administered ocular corticosteroids; benefits and risks. *Drug Saf* 2002;25(1):33-35
- 3 杨水平,黄秀蓉. 糖皮质激素性白内障的分子生物学机制. 国外医学眼科分册 2004;28(4):248-251
- 4 Guo Q, Zhao BL. ESR study on the structure-antioxidant activity relationship of catechins and their reprimers. *Biochem Biophys Acta* 1999;1427:13-23
- 5 何小解,易著文,田云,等. 儿茶素清除O[·]-2与·OH的能力. 中南大学学报医学版 2006;31(1):138-140
- 6 Jaklevic B, SuTT. Cell turnover: flexible coupling meets the needs of development. *Curr Biol* 2003;13(20):805-807
- 7 Kuszak WC, Dunnk JR, Wang RR, et al. Lens epithelial cell apoptosis appears to be a common cellular basis for noncongenital cataract development in humans and animals. *J Cell Biol* 1995;130:169-180
- 8 Li WC, Kuszak JR, Dunn K, et al. Lens epithelial cell apoptosis appears to be a common cellular basis for non-congenital cataract development in humans and animals. *J Cell Biol* 1995;130:181
- 9 Cai J, Yang J, Jones DP. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome. *Biochim Biophys Acta* 1998;1336(12):139-149