

原花青素对紫外线诱导晶状体上皮细胞氧化损伤保护作用的研究

于攀, 王欣玲, 阎启昌

基金项目: 中国辽宁省自然科学基金资助项目 (No. 20092101); 中国辽宁省教育厅重点实验室基金资助项目 (No. 2009S111, LS2010177)
作者单位: (110005) 中国辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第四医院眼科 中国医科大学眼科医院 辽宁省晶状体重点实验室
作者简介: 于攀, 硕士, 研究方向: 白内障。
通讯作者: 阎启昌, 教授, 主任医师, 教研室副主任, 眼科学博士, 研究方向: 白内障. Cmu4h-yqc@126. com
收稿日期: 2010-06-12 **修回日期:** 2010-06-30

Study on protection of procyanidins against UV-induced oxidative damage of lens epithelial cells

Pan Yu, Xin-Ling Wang, Qi-Chang Yan

Foundation items: Liaoning Province Natural Science Foundation of China (No. 20092101); Key Laboratory Foundation of Liaoning Provincial Department of Education, China (No. 2009S111, LS2010177) Department of Ophthalmology, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Eye Hospital of China Medical University, the Key Laboratory of Lens of Liaoning Province, Shenyang 110005, Liaoning Province, China

Correspondence to: Qi-Chang Yan. Department of Ophthalmology, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Eye Hospital of China Medical University, the Key Laboratory of Lens of Liaoning Province, Shenyang 110005, Liaoning Province, China. Cmu4h-yqc@126. com

Received: 2010-06-12 Accepted: 2010-06-30

Abstract

• **AIM:** To determine the protection of procyanidins (PC) against UVB-induced oxidative damage of lens epithelial cells (LECs) with alkaline single cell gel electrophoresis, in order to provide an experimental foundation for cataract clinical treatment.

• **METHODS:** LECs lines of generation 4 were divided randomly into 5 groups. As untreated group: normal cultured LECs; control group: LECs + UVB; three treated groups: PC treated groups: LECs + PC + UVB; taurine (TAU) treated groups: LECs + TAU + UVB; VC treated groups: LECs + VC + UVB. All groups of antioxidants were divided into 3 groups according to the final concentration from low to high (0.05, 0.1, 0.2mg/mL). Each treated group was treated by antioxidants 2 hours before irradiated under UVB, respectively, then conventional cultivation. The LECs of treated groups and control group were all irradiated at UVB-dose 15mJ/cm². All of LECs in every group were collected after treatment an hour respectively and analyzed with alkaline single cell gel electrophoresis.

• **RESULTS:** The differences of tail length, percentage of tail DNA and tail moment between PC treated groups and control group were statistically significant ($P < 0.01$). The differences of percentage of tail DNA, tail moment in each PC treated group and untreated group were not significant ($P > 0.05$). The results of PC treated groups were significantly smaller than those of TAU treated groups and VC treated groups, The differences of tail length, percent-age of tail DNA and tail moment in various antioxidant treated groups were statistically significant ($P < 0.01$).

• **CONCLUSION:** Exogenous PC has protective effect to UVB-induced LECs DNA damage. The protective effect of PC is obviously stronger than those of TAU and VC, and in a certain range of concentration, the protective effect of PC has the positive relationship of dose-effect.

• **KEYWORDS:** procyanidins; ultraviolet rays; lens epithelial cells; DNA damage

Yu P, Wang XL, Yan QC. Study on protection of procyanidins against UV-induced oxidative damage of lens epithelial cells. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(8):1477-1480

摘要

目的: 研究原花青素 (procyanidins, PC) 对紫外线诱导的人晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LECs) DNA 氧化损伤的保护作用。

方法: 采用照射剂量为 15mJ/cm² 的中波紫外线 (UVB) 分别照射用 0 (对照组), 0.05, 0.1, 0.2mg/mL 的 PC, 牛磺酸 (TAU), 维生素 C (VC) 预处理的 LECs, 未处理组未给予紫外线和任何抗氧化剂处理, 用单细胞凝胶电泳法 (SCGE) 检测分析各 PC 组 LECs DNA 单链断裂的程度, 并与其他各组的检测结果相比较。

结果: 各 PC 组的尾长、尾部 DNA 百分比、尾力矩在数值上均明显小于对照组, 且与对照组相比, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。各 PC 实验组的尾部 DNA 百分比、尾力矩与未处理组相比差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。相同浓度下, PC, TAU 和 VC 组的各检测指标数值逐渐增大。

结论: 外源性 PC 对 UVB 照射诱导损伤的人 LECs DNA 有保护作用。PC 的保护作用明显强于 TAU 和 VC, 并且在一定浓度范围内随着浓度的增加其抗氧化作用逐渐增强。

关键词: 原花青素; 紫外线; 晶状体上皮细胞; DNA 损伤

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.08.008

于攀, 王欣玲, 阎启昌. 原花青素对紫外线诱导晶状体上皮细胞氧化损伤保护作用的研究. *国际眼科杂志* 2010;10(8):1477-1480

0 引言

原花青素 (procyanidins, PC) 是植物中广泛存在的天然抗氧化物质, 具有很强的抗氧化活性, 能够清除自由基

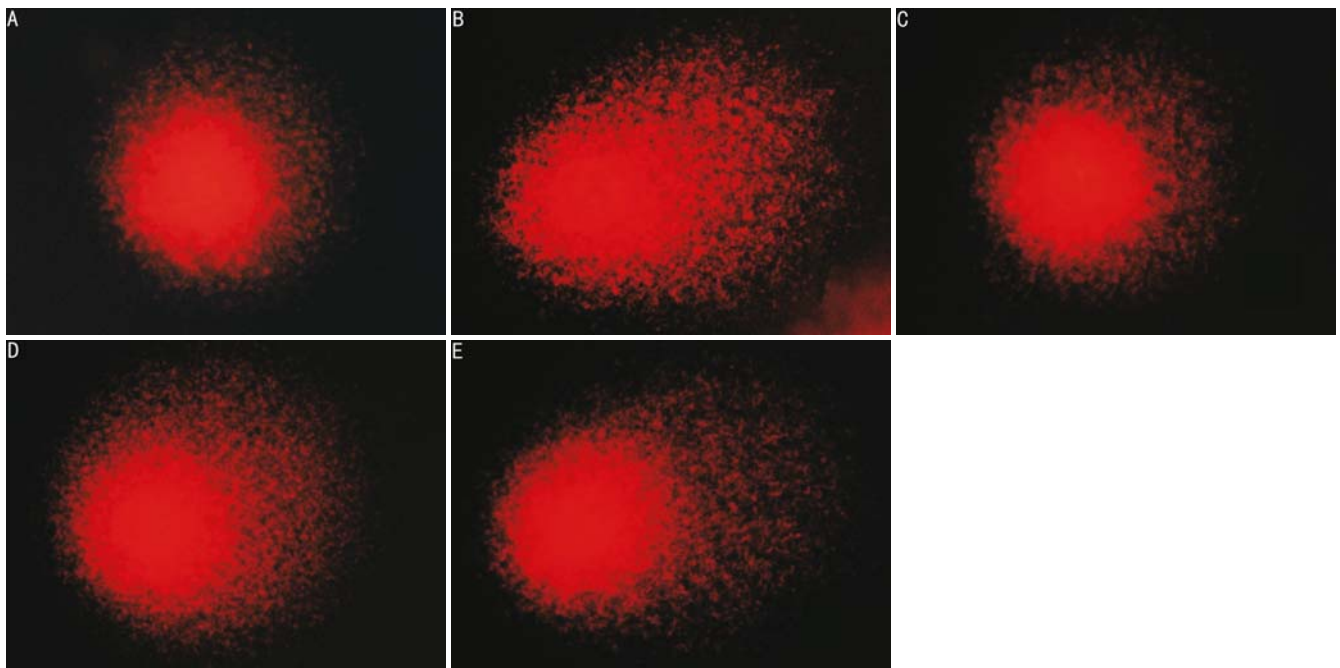


图1 倒置荧光显微镜下细胞形态学观察 A:未处理组;B:对照组;C:PC组;D:TAU组;E:VC组。

以及抑制脂质过氧化反应,是低毒高效热门的抗氧化剂。自从氧化损伤被认为是一个包括白内障在内的多种年龄相关疾病的共同启动因子,用化学方法延缓白内障的发生、发展就显得非常有价值^[1]。紫外线可诱发白内障已得到广泛的流行病学证实^[2,3]。晶状体上皮细胞(lens epithelial cells, LECs)是晶状体代谢最活跃的部位,可能是白内障发生的最初位置^[2],而DNA是LECs受紫外线损伤最薄弱的靶子之一^[4],因此,寻求高效的抗氧化剂拮抗紫外线对LECs DNA的损伤将成为预防白内障的重要手段之一。在到达眼部的紫外线中,UVB被认为生物损伤性最强,可以独立致眼部白内障^[5]。我们采用UVB复制的人LECs损伤模型,采用单细胞凝胶电泳法(single cell gel electrophoresis, SCGE)研究原花青素对紫外线所致LECs DNA氧化损伤的直接保护作用,以期为白内障的临床药物治疗提供新的途径。

1 材料和方法

1.1 材料 细胞:人晶状体上皮细胞系SRA01/04(购自中国科学院肿瘤研究所)。主要试剂和仪器:MEM培养液、胰蛋白酶、非必需氨基酸、胎牛血清(美国Hyclone公司)、双抗(青霉素、链霉素)、正常熔点琼脂糖凝胶、低熔点琼脂糖凝胶(美国sigma公司)、溴化乙锭(Ethidium bromide, EB)、PC、牛磺酸、VC(成都生物制剂公司)、Olympus倒置荧光显微镜(日本Olympus公司BX51型)、UVB段紫外灯(美国SP公司xx-15N/F型)、电泳仪(Tanon公司HE-120型)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 使用含100g/L胎牛血清、非必需氨基酸、50g/L双抗的MEM完全培养液,在37℃,50mL/L CO₂,90%湿度的孵箱中人LECs单层贴壁生长。

1.2.2 细胞分组及抗氧化剂处理 将LECs传代培养取第4代细胞随机分为5组。未处理组:正常培养的LECs;对照组:正常培养的LECs + UVB;实验组:PC组:LECs + PC + UVB;TAU组:LECs + TAU + UVB;VC组:LECs + VC + UVB。各抗氧化剂组按终浓度从低到高(0.05, 0.1, 0.2mg/mL)再分为3个亚实验组。各实验组于UVB照射前2h加药,常规培养。

1.2.3 紫外线照射 紫外灯照射强度为1.5mW/cm²(每次使用前都预先经紫外线仪器测量,避免由于衰减造成的强度不一致),照射时间为10s,即采用的照射剂量为15mJ/cm²。取对数生长期的细胞置于暗室中紫外光源下10cm处,照射前将培养液弃去,用PBS轻柔冲洗2次,照射时打开培养皿。照射后加入完全培养液,培养箱内继续培养1h,收集细胞,消化后制备单细胞悬液(稀释成约2 × 10⁴/mL),用于检测DNA。

1.2.4 碱性SCGE检测 100μL 8g/L正常熔点琼脂糖凝胶溶解后滴加在经多聚赖氨酸预处理的载玻片上,用盖玻片使胶均匀展开,在酒精灯上略过火,使正常熔点琼脂糖完全凝固于载玻片上,即第1层胶。再次滴加与第一次相同的正常熔点琼脂糖,盖玻片使胶均匀展开后4℃下固化10min,为第二层胶。取混有新鲜制备细胞悬液的低熔点琼脂糖(按1:3混合)100μL加到第2层胶上,立即盖上盖玻片,4℃固化10min,即第3层胶。轻轻揭去盖玻片待裂解,将凝胶载玻片浸没于新配置的裂解液中(pH = 10)裂解2h,除去细胞质。从裂解液中取出载玻片,用蒸馏水浸泡5min后移入水平电泳槽,4℃冰箱内避光解旋20min(1mmol/L Na₂EDTA, 300mmol/L NaOH, pH = 13)。电压25V,4℃冰箱内避光条件下电泳15min。然后用PBS漂洗2次,每次5min。用5μg/mL的EB避光染色10min(每张2~3滴),染色后放入避光的密闭湿盒内,24h内进行图像分析。染色后的凝胶板,置于倒置荧光显微镜下可清晰的观察到核DNA和迁移的DNA。每个处理组随机保存200个细胞,用单细胞凝胶电泳分析软件TriTek CometScore进行图像分析,计量每个细胞的尾长、尾部DNA百分比和尾力矩。每一实验条件至少重复1次。

统计学分析:数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 16.0统计学软件进行随机样本的单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态学观察 实验中观察到细胞分布适中,DNA较均匀,清楚地反映了细胞的损伤情况。各处理组细胞呈不同程度的彗星图像,头尾分明(图1)。未处理组LECs

分组	例数(n)	尾长(μm)	尾部 DNA(%)	尾力矩
未处理组	200	31.26 ± 5.70	0.0019 ± 0.0002	0.0006 ± 0.0001
对照组	200	256.80 ± 34.86	18.56 ± 3.06	33.81 ± 5.82
PC 组(mg/mL)				
0.05	200	107.44 ± 6.33	0.19 ± 0.013	0.205 ± 0.018
0.1	200	90.14 ± 6.41	0.064 ± 0.007	0.0586 ± 0.008
0.2	200	68.36 ± 5.42	0.0067 ± 0.0009	0.005 ± 0.0006
TAU 组(mg/mL)				
0.05	200	198.24 ± 38.24	8.74 ± 0.99	12.27 ± 2.20
0.1	200	194.84 ± 27.41	5.57 ± 0.85	8.93 ± 0.99
0.2	200	159.56 ± 29.64	2.94 ± 0.64	5.51 ± 1.00
VC 组(mg/mL)				
0.05	200	237.24 ± 28.24	14.17 ± 3.00	26.37 ± 2.45
0.1	200	214.16 ± 46.11	10.62 ± 3.12	18.26 ± 2.40
0.2	200	327.42 ± 39.99	19.12 ± 3.82	38.60 ± 3.59

呈圆形基本无拖尾、保持较完整的拟核状态(图 1A);对照组 LECs 从胞核中溢出的单链 DNA 片段最多,表现为尾部长度最长、荧光强度最强(图 1B);相同浓度时,PC 组、TAU 组和 VC 组 LECs 尾长逐渐增加,尾部荧光强度逐渐增大(图 1C-E)。

2.2 各处理组尾长、尾部 DNA 百分比和尾力矩比较 各 PC 组尾长与对照组和未处理组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$);各抗氧化剂组间比较,差异均具有统计学意义($P < 0.01$);0.1mg/mL TAU 组尾长与 0.05mg/mL TAU 组比较,差异无统计学意义。各 PC 组尾部 DNA 百分比与对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$);与未处理组比较,差异均无统计学意义;0.2mg/mL VC 组的尾部 DNA 百分比与对照组比较,差异无统计学意义。各抗氧化剂组间尾长、尾部 DNA 百分比、尾力矩比较,差异均具有统计学意义($P < 0.01$);相同浓度时,各检测指标从 PC 到 VC 逐渐增加,且在一定浓度范围内,均有随其浓度的增加,尾长、尾部 DNA 百分比、尾力矩逐渐减小。各 PC 组尾力矩与对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$);与未处理组比较,差异均无统计学意义(表 1)。

3 讨论

UVB 是紫外线中最具生物学意义的一种,Boettner 和 Wolter 的研究表明晶状体可吸收绝大部分到达眼部的 UVB。本实验选择 UVB 段紫外灯,有针对性的复制 LECs 的氧化损伤模型,进一步证实了 UVB 对 LECs 的氧化损伤作用。

原花青素是一种有着特殊分子结构的生物类黄酮,是目前国际上公认的清除人体内自由基最有效的天然抗氧化剂,广泛分布在葡萄、银杏等多种植物中。其抗氧化能力是 VE 的 50 倍,VC 的 20 倍^[6]。在抗肿瘤^[7]、抗衰老^[8]及对其它药物的协同作用^[9]等方面有很好的效果。本实验结果提示各 PC 组的尾部 DNA 百分比、尾力矩与未处理组比较,差异均无统计学意义($P < 0.01$),表明其对 LECs 具有较强的保护作用。以往已有实验证实 PC 在白内障方面的应用,Durukan 等^[10]在用亚硒酸钠致大鼠白内障模型的研究中,发现 PC 能有效的抑制白内障的发生。Jourdain 等^[11]用可可豆提取物 PC 作用于糖尿病性白内障

的大鼠,亦发现其具有良好的抗糖尿病鼠白内障发生的效果。本实验将 PC 应用于 UVB 致损伤的人 LECs 上,明确了在体外培养条件下 PC 对 LECs 的保护作用,以及对白内障的预防作用。在以往的研究中,牛磺酸和 VC 对 LECs 氧化损伤的保护作用均已得到明确证实^[12,13],我们将 PC 对人 LECs 的保护作用与牛磺酸和 VC 作对比,三者的差异具有统计学意义,表明其抗氧化作用强度不同。从数值上看,各 PC 组的细胞损伤情况均明显小于同剂量组的另两种抗氧化剂,明确证实了 PC 对于 LECs 的保护作用明显强于牛磺酸和 VC。并且实验发现 PC 的抗氧化作用呈现浓度依赖的量效关系,即在一定范围内随浓度的增加,PC 对于 LECs 的保护作用逐渐增强。SCGE 实验成功与否的最关键步骤就在于铺胶,有时轻柔操作尚无法避免脱胶,针对这一问题,本实验在铺胶方法上作了一些改良,与以往不同,本实验增加了经多聚赖氨酸预处理和正常熔点琼脂糖凝胶铺胶过火两个步骤,事实证明该改良方法确实减少了脱胶问题的出现,又未对实验结果产生明显影响,明显提高了实验的成功率,希望对完善和改进该实验步骤会有一定帮助作用。

本研究结果显示 PC 对于紫外线导致的晶状体上皮细胞氧化损伤的保护作用明显强于牛磺酸和 VC。目前国内外已经逐步将 PC 抗炎、抗氧化、调节免疫等相关作用应用于眼科的研究中,并初步证实其在葡萄膜炎^[14]、保护角膜基质细胞^[15]和视网膜神经血管疾病^[16,17]等方面的应用。已有临床证实 PC 眼用剂型对于干眼症的确切治疗作用^[18],这也让我们看到了 PC 的巨大研究价值和发展潜力。但对于 PC 如何进入眼内发挥抗氧化作用,哪些有效成分起主要作用及有效质量浓度等问题还有待进一步探讨。希望通过更深入的研究,在不久的将来能为白内障的临床治疗提供一种有效的药物。

参考文献

- 1 Thiagarajan G, Chandani S, Sundari CS, *et al.* Antioxidant properties of green and black tea and their potential ability to retard the progression of eye lens cataract. *Exp Eye Res* 2001;72:393-401
- 2 Shui YB, Sasaki H, Pan JH, *et al.* Morphological observation on cell death and phagocytosis induced by ultraviolet irradiation in a cultured human lens epithelial cell line. *Exp Eye Res* 2000;71:609-618

- 3 Yao J, Liu Y, Wang X, *et al.* UVB radiation induces human lens epithelial cell migration via NADPH oxidase-mediated generation of reactive oxygen species and up-regulation of matrix metalloproteinases. *Int J Mol Med* 2009; 24(2):153-159
- 4 Unal M, Güven M, Batar B, *et al.* Polymorphisms of DNA repair genes XPD and XRCC1 and risk of cataract development. *Exp Eye Res* 2007;85(3):328-334
- 5 Kawada H, Kojima M, Kimura T, *et al.* Effect of 5-S-GAD on UV-B-induced cataracts in rats. *Jpn J Ophthalmol* 2009;53(5):531-535
- 6 Bagchi D, Bagchi M, Stohs S, *et al.* Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds. *Ann N Y Acad Sci* 2002;957:260-270
- 7 Zhang XY, Li WG, Wu YJ, *et al.* Proanthocyanidin from grape seeds potentiate anti-tumor activity of doxorubicin via immunomodulatory mechanism. *Int Immunopharmacol* 2005;5(7-8):1247-1257
- 8 Sangeetha P, Balu M, Panneerselvam C, *et al.* Age associated changes in erythrocyte membrane surface charge: Modulatory role of grape seed proanthocyanidins. *Exp Gerontol* 2005;40(10):820-828
- 9 Faria A, Mateus N, de Freitas V, *et al.* Modulation of MPP+ uptake by procyanidins in Caco-2 cells; involvement of oxidation/reduction reaction. *FEBS Lett* 2006;580(1):155-160
- 10 Durukan AH, Evereklioglu C, Hurmeric V, *et al.* Ingestion of IH636 grape seed proanthocyanidin extract to prevent selenite-induced oxidative stress in experimental cataract. *J Cataract Refract Surg* 2006;32(6):1041-1045
- 11 Jourdain C, Tenca G, Deguercy A, *et al.* *In vitro* effects of polyphenols vom cocoa and beta-sitosterol on the growth of human prostate cancer and normal cells. *Eur J Cancer Prev* 2006;15(4):353-361
- 12 Chen F, Chen C. An experimental research of taurine on H₂O₂-induced bovine lens epithelial cell apoptosis. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 2000;36(4):272-274
- 13 Murano N, Ishizaki M, Sato S, *et al.* Corneal endothelial cell damage by free radicals associated with ultrasound oscillation. *Arch Ophthalmol* 2008;126(6):816-821
- 14 Ohgami K, Ilieva I, Shiratori K, *et al.* Anti-inflammatory effects of aronia extract on rat endotoxin-induced uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(1):275-281
- 15 Robert AM, Robert L, Renard G. Effect of procyanidolic oligomers on corneal collagen fibrillogenesis. *J Fr Ophthalmol* 2005;28(10):1017-1025
- 16 Li M, Ma YB, Gao HQ, *et al.* A novel approach of proteomics to study the mechanism of action of grape seed proanthocyanidin extracts on diabetic retinopathy in rats. *Chin Med J (Engl)* 2008;121(24):2544-2552
- 17 Zhang B, Osborne NN. Oxidative-induced retinal degeneration is attenuated by epigallocatechin gallate. *Brain Res* 2006;1124(1):176-187
- 18 Sun Y, Yuan HP, Zhou XR. The clinical application of procyanidins eyedrops and the protective effects on the dry eye syndrom. *Habin Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2009;43(3):268-274

《国际眼科杂志》约稿信

尊敬的眼科主任/教授/医师:

《国际眼科杂志》是在国际眼科理事会(ICO)指导下,由中华医学会西安分会主办的一种国际性中英文混合版眼科专业学术期刊。本刊已被荷兰《医学文摘》、美国《化学文摘》、波兰《哥白尼索引》及世界卫生组织《全球医学索引》等国内外知名数据库收录。本刊面向各级眼科医师,刊登各类有关眼科基础研究和临床研究方面的论文。主要栏目:英文论著、实验论著、临床论著、专题报告、文献综述、调查研究、教学研究、临床研究、临床报告、短篇报道、病例报告、眼科护理、防盲治盲、中医及中西医结合等。本刊于2008年改为月刊,发表周期更短,期刊容量更大。为满意广大作者需求,我们实行快速审稿、快速定稿和快速发表的“三快”原则,并奉行急作者之所急,想作者之所想及一切为了作者,为了作者一切的行动指南,为广大作者提供尊贵、优质和快捷的服务。我们非常感谢您和您的同事们多年来对本刊的大力支持并希望继续得到您们更多的宝贵支持!

欢迎指导、欢迎投稿、欢迎引用本刊文献!

《国际眼科杂志》编辑部
2010-07-20