

补肾养血明目方对丙烯醛致 ARPE-19 细胞氧化应激的干预作用

李 满, 梁丽娜, 庄曾渊

作者单位: (100040) 中国北京市, 中国中医科学院眼科医院
 作者简介: 李满, 博士研究生, 研究方向: 眼底病。
 通讯作者: 庄曾渊, 研究员, 研究方向: 眼底病、免疫性眼病。
 bjzhuangxy@sina.com
 收稿日期: 2015-03-06 修回日期: 2015-04-22

Effects of the prescription of reinforcing kidney, nourishing blood, improving eyesight on ARPE - 19 cells induced by acrolein

Man Li, Li-Na Liang, Zeng-Yuan Zhuang

Eye Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100040, China

Correspondence to: Zeng - Yuan Zhuang. Eye Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100040, China.
 bjzhuangxy@sina.com

Received: 2015-03-06 Accepted: 2015-04-22

Abstract

• AIM: To explore the effects of the prescription of reinforcing kidney, nourishing blood, improving eyesight on the oxidative stress model of ARPE-19 cells induced by acrolein.

• METHODS: SD rats serum containing the prescription of reinforcing kidney, nourishing blood, improving eyesight and the content of distilled water in serum were prepared. The effects of the prescription and distilled water in serum at different concentration (2.5%, 5%, 10%, 20% and 40%) on cell vitality was observed by cell counting kit (CCK-8) assay. the logarithmic phase of ARPE-19 cells were pretreated by different concentrations (1.25%, 2.5% and 5%) of the prescription serum and distilled water in serum for 24h. Then it was treated with 75μmol/L acrolein for 24h. Cell vitality was observed by CCK-8 assay. The change of cell nucleus was detected by DAPI staining .

• RESULTS: 2.5% and 5% serum had no effect on cell viability ($P>0.05$), while 10%, 20%, 40% serum could inhibit cell viability ($P<0.05$). CCK-8 results showed that 2.5% and 5% the prescription of reinforcing kidney, nourishing blood, improving eyesight serum was better than distilled water in serum ($P<0.05$).

• CONCLUSION: The prescription of reinforcing kidney, nourishing blood, improving eyesight has the protective effect on ARPE-19 cell damage induced by acrolein.

• KEYWORDS: the prescription of reinforcing kidney,

nourishing blood, improving eyesight; ARPE - 19 cell; acrolein; oxidative stress

Citation: Li M, Liang LN, Zhuang ZY. Effects of the prescription of reinforcing kidney, nourishing blood, improving eyesight on ARPE-19 cells induced by acrolein. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(5):777-780

摘要

目的: 利用丙烯醛建立 ARPE-19 细胞氧化应激模型, 观察补肾养血明目方含药血清对丙烯醛诱导 ARPE-19 细胞氧化损伤的保护作用。

方法: 制备 SD 大鼠补肾养血明目方含药血清及空白血清, 通过 CCK-8 检测不同浓度 (2.5%, 5%, 10%, 20%, 40%) 血清对细胞活性的影响, 预先加入 1.25%, 2.5%, 5% 等不同浓度的含药血清处理 24h 后, 将终浓度为 75μmol/L 的丙烯醛加入对数生长期的 ARPE-19 细胞中处理 24h, CCK-8 法检测含药血清对细胞活力的影响, DAPI 染色观察细胞核形态。

结果: CCK-8 结果显示: 低浓度 (2.5%, 5%) 血清对细胞活性影响不大 ($P>0.05$), 高浓度 (10%, 20%, 40%) 血清降低细胞活性 ($P<0.05$), 补肾养血明目方含药血清中、高剂量组细胞活性较空白血清组有统计学意义 ($P<0.05$);

结论: 补肾养血明目方对丙烯醛诱导的 ARPE-19 细胞损伤有保护作用。

关键词: 补肾养血明目方; ARPE-19 细胞; 丙烯醛; 氧化应激

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2015.5.08

引用: 李满, 梁丽娜, 庄曾渊. 补肾养血明目方对丙烯醛致 ARPE-19 细胞氧化应激的干预作用. 国际眼科杂志 2015; 15(5): 777-780

0 引言

视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelial, RPE) 位于视网膜神经上皮层与脉络膜之间, 具有吞噬感光细胞外节膜盘、营养视网膜、维持血-视网膜屏障的作用。众多研究显示氧化应激导致的视网膜色素上皮损伤在年龄相关性黄斑变性 (AMD) 发病过程中起着重要作用。补肾养血明目方是导师庄曾渊研究员临床经验的总结, 临床常用于治疗老年性黄斑变性 (干性)、视网膜色素变性等视网膜退行性疾病, 为进一步研究补肾养血明目方的作用机制, 本研究拟通过丙烯醛为诱导因素建立 ARPE-19 细胞氧化应激损伤模型, 探讨补肾养血明目方保护 RPE 细胞氧化应激损伤的作用机制, 为临床治疗视网膜色素上皮损伤的眼病提供新的研究思路。

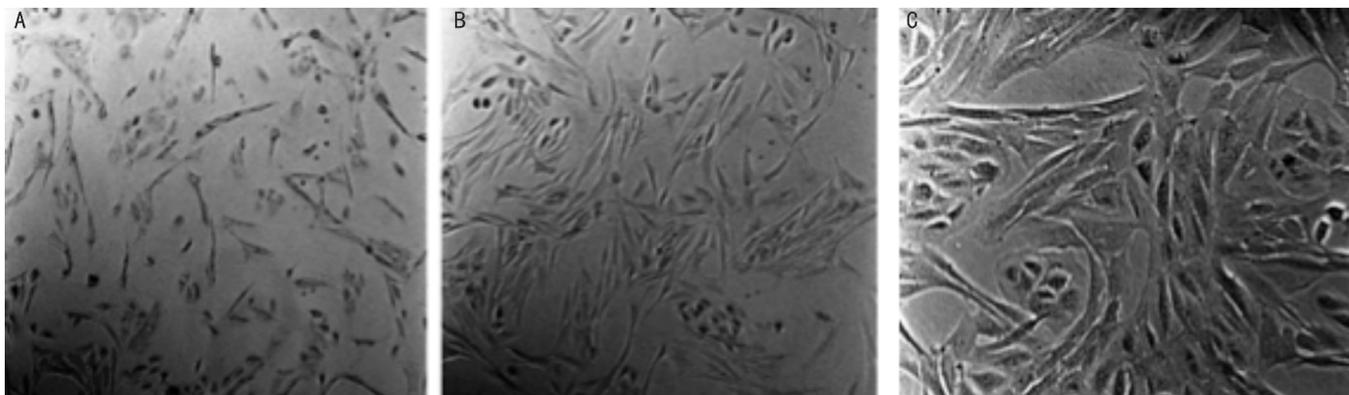


图1 ARPE-19 细胞生长情况(倒置显微镜下) A:复苏24h后(100×);B:复苏48h后(100×);C:复苏72h后(200×)。

1 材料和方法

1.1 材料 ARPE-19 细胞购自于广州吉妮欧生物科技有限公司,4代贴壁细胞,胎牛血清(GIBICO),0.25%胰酶细胞消化液(solarbio),二甲基亚砜(solarbio),MEM细胞培养液(hyclone),青链霉素混合液(solarbio),磷酸盐缓冲液(solarbio),酶标分析仪(Rayto RT-6000),荧光倒置显微镜(Olympus)。

1.2 方法

1.2.1 补肾养血明目方含药血清的制备 正常SD大鼠25只,随机分为2组,分别为补肾养血明目方含药血清组(以下简称“含药血清组”),空白血清组。含药血清组通过灌胃给药,给予含补肾养血明目方生药4.5 g/kg的水煎剂,灌胃体积均为10mL/kg,1次/d,连续给药7d。空白血清组给予等量的蒸馏水溶液。末次给药1h后,下肢肌肉注射盐酸氯胺酮注射液和盐酸赛拉嗪混合液麻醉动物,无菌条件下腹主动脉采血,静置2h,3000r/min离心15min,取上清液,56℃灭菌30min,0.22μm微孔滤膜过滤除菌,-20℃保存备用。

1.2.2 细胞培养 将ARPE-19细胞置于含有15%胎牛血清(FBS)的MEM细胞培养液,于37℃,体积分数为5%的CO₂培养箱中孵育。培养液每2~3d更换一次,待培养瓶中单层细胞长满80%后,细胞传代培养,取对数生长期的细胞,胰蛋白酶消化,细胞重悬,计数,接种于24孔及96孔板中进行实验处理。

1.2.3 血清对ARPE-19细胞活性的影响 取对数生长期细胞以 1×10^5 /mL的密度接种于96孔培养板中,待培养板中单层ARPE-19细胞长满底部约80%时,剥夺血清,弃上液,加入不含FBS的MEM培养液,12h后去MEM培养液,加不同浓度(2.5%,5%,10%,20%,40%)的空白血清及含药血清,37℃温箱培养24,48,72h后,加入CCK-8溶液10μL,37℃培养箱中继续培养4h,450nm波长处用酶标仪测定各孔吸光度值(A值)。

1.2.4 实验分组 本实验ARPE-19细胞分为模型组、空白血清组、补肾养血明目方血清组(高、中、低剂量组),另设正常组作为对照。(1)正常组:正常条件培养ARPE-19细胞;(2)模型组:加入终浓度为75μmol/L的丙烯醛溶液;(3)空白血清组:模型细胞,给予5%空白血清;(4)补肾养血明目方低剂量组:模型细胞,给予1.25%补肾养血明目方低剂量含药血清;(5)补肾养血明目方中剂量组:模型细胞,给予2.5%补肾养血明目方中剂量含药血清;(6)补肾养血明目方高剂量组:模型细胞,给予5%补肾养

血明目方高剂量含药血清。

1.2.5 补肾养血明目方对RPE细胞活力影响 取对数生长期的细胞,0.25%胰酶细胞消化液消化同前,并计数,以 1×10^5 /mL的密度接种于96孔培养板中,每孔150μL,加入含15%胎牛血清的完全MEM培养液,继续培养24h后,剥夺血清,弃上液,加入100μL MEM培养液,培养箱内继续培养12h,去MEM培养液,随机分为6组,每组6个平行标本(重复)。加入体积分数分别为1.25%,2.5%,5%的补肾养血明目方含药血清和5%的空白血清作用于细胞,以正常条件培养的细胞做为对照,24h后,弃上清,加入终浓度为75μmol/L的丙烯醛溶液100μL,继续培养24h后,每孔加入10μL CCK-8试剂,继续培养4h,于450nm波长处用酶标仪测定各孔A值。

1.2.6 DAPI染色法检测细胞形态 将ARPE-19细胞以 3×10^5 /mL的密度接种于预先放置L-多聚赖氨酸包被细胞爬片的24孔板中,按上述方法处理24h后,PBS漂洗,4%多聚甲醛室温固定25min,3% TritonX-100溶液破膜,PBS漂洗,DAPI(4',6-二咪基-2-苯基吡啶)染色5min,PBS漂洗,避光风干,抗免疫荧光衰减封片剂封片,荧光显微镜下进行观察。

统计学分析:采用SPSS17.0软件进行统计学分析,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组均数间比较采用完全随机设计的方差分析,两组间比较采用LSD-t检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞生长情况 如图1所示ARPE-19细胞复苏24h后开始贴壁生长,细胞逐渐由圆形行生长为梭形或纺锤形,48h后细胞生长开始融合。

2.2 血清对ARPE-19细胞活性的影响结果 各组血清作用24h,对细胞活力影响无统计学意义($P > 0.05$);作用48,72h仅空白血清及含药血清组低浓度组(2.5%,5%)对细胞活力影响不大($P > 0.05$),其余各组高浓度组(10%,20%,40%)均对细胞活力有影响($P < 0.05$),见表1,由此可以看出,各血清组作用24h对细胞活力影响不大。随作用时间延长,高浓度血清组对细胞活性影响明显,细胞活性降低,因此我们取血清培养24h细胞活性最高时进行实验,且空白血清在浓度为5%时细胞活性最好,因此我们将5%空白血清作为对照组。

2.3 ARPE-19细胞活性 预处理24h后,补肾养血明目方含药血清低剂量组(0.553 ± 0.03)及空白血清组(0.554 ± 0.02)A值高于模型组(0.445 ± 0.02)($P < 0.05$),有统计

表1 不同浓度血清作用 ARPE 细胞活性的影响

($\bar{x} \pm s, A$ 值)

血清浓度 (%)	n	24h			48h			72h		
		空白血清组	含药血清组	正常细胞组	空白血清组	含药血清组	正常细胞组	空白血清组	含药血清组	正常细胞组
0	6	-	-	1.607±0.06	-	-	1.867±0.09	-	-	1.805±0.08
2.5	6	1.780±0.18	1.601±0.60	-	1.806±0.08	1.715±0.07	-	1.759±0.07	1.744±0.12	-
5	6	1.795±0.29	1.833±0.44	-	1.790±0.09	1.733±0.12	-	1.795±0.11	1.750±0.16	-
10	6	1.705±0.24	1.796±0.29	-	1.623±0.01 ^a	1.631±0.13 ^a	-	1.648±0.10 ^a	1.601±0.08 ^a	-
20	6	1.652±0.21	1.622±0.13	-	1.483±0.22 ^a	1.548±0.02 ^a	-	1.600±0.06 ^a	1.553±0.07 ^a	-
40	6	1.493±0.17	1.491±0.27	-	1.485±0.09 ^a	1.370±0.08 ^a	-	1.563±0.04 ^a	1.496±0.09 ^a	-

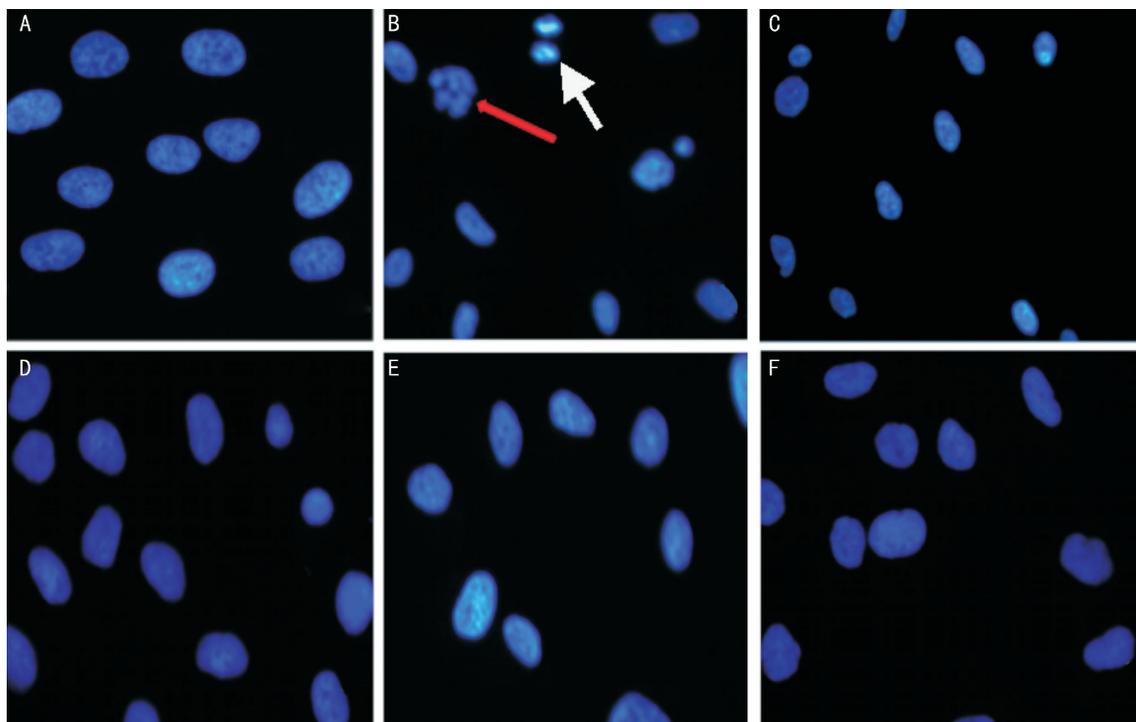
^a $P < 0.05$ vs 正常细胞组。

图2 各组 ARPE-19 细胞 DAPI 染色 A:正常组;B:模型组;C:空白血清血清组;D,E,F:补肾养血明目方含药血清低剂、中、高剂量组。

学意义,补肾养血明目方含药血清中剂量组(0.665 ± 0.04)及高剂量组(0.685 ± 0.04)高于空白血清组,有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 DAPI 染色结果 由 DAPI 染色可知正常 ARPE-19 细胞(图 2A)细胞核呈圆形或椭圆形,染色均匀,经过丙烯醛处理 24h 的,可见 ARPE-19 细胞核破裂(红色箭头),核固缩(白色箭头)(图 2B),细胞核呈不规则形(图 2C);经过含药血清预处理的 ARPE-19 细胞(图 2D~F),细胞核固缩明显减少。

3 讨论

目前 AMD 的发病机制尚不清楚,主要有氧化损伤学说、血管模式机制、炎症免疫学说及血管内皮生长因子学说,其中众多研究显示氧化应激导致的视网膜色素上皮损伤在 AMD 发病过程中起着重要作用。RPE 细胞的损伤及功能异常均可以导致 AMD 的发生,严重影响患者的生活质量,因此近年来提高 RPE 细胞抗氧化能力,维持 RPE 细胞的正常功能,成为治疗 AMD 的主要研究方向。诱导 RPE 细胞的氧化应激因素有诸多,丙烯醛^[1]、 H_2O_2 ^[2]、高糖^[3]、高氧^[4]及缺氧均可导致 RPE 氧化应激,近年来,研究者以丙烯醛及 H_2O_2 复制 ARPE-19 细胞居多,研究证

明^[5]丙烯醛浓度高于 $50 \mu\text{mol/L}$ 时即可出现 ARPE-19 细胞肿胀坏死、细胞核聚集,因此本研究运用 $75 \mu\text{mol/L}$ 丙烯醛复制 ARPE-19 细胞损伤模型,模型组可见 ARPE-19 细胞出现核碎裂,核固缩及不规则形状的细胞核,并且细胞数目明显减少,说明模型复制成功。关于丙烯醛诱导细胞凋亡的机制目前尚不明确。Kehrer 等认为丙烯醛与蛋白质巯基结合,攻击各种细胞膜引起膜脂类的过氧化分解,导致内质网结构破坏,内质网酶活力丧失,可溶性酶过漏至原生质,最终导致细胞凋亡坏死。程学美等^[6]则认为丙烯醛导致 DNA 损伤的原因主要为其羰基亲电性和较小的空间位阻,可诱发自由基效应,活泼的醛基使得它们不需经过代谢就能攻击亲核基团,如核酸和蛋白质等生物大分子物质,从而诱发 DNA 分子断裂。

补肾养血明目方由仙灵脾、当归、枸杞子等中药组成,具有补肾养血、益气明目的功效,临床在治疗干性年龄相关性黄斑变性肾精不足、气血两虚者取得较好的疗效。空白血清及含药血清毒性实验证明,高浓度的血清对 ARPE-19 细胞的生长具有抑制作用,而低浓度者对细胞的正常生长影响较小,因此我们研究选用低于 5% 的含药血清浓度进行研究,旨在减少由实验药物引起的误差,确保研究的可

靠性。当归富含有机酚类、香豆素类、多糖、氨基酸类以及一些微量元素 Zn、Mn 等^[7],其中当归多糖具有抗氧化、清除氧自由基的作用,能够减少 H₂O₂引起的细胞凋亡亦能增加细胞内活性氧的水平,并通过大鼠脑缺氧模型证明增强大脑皮质神经元的抗氧化活性,减轻氧化应激带来的损伤^[8],并且当归中的微量元素 Zn²⁺可明显增加 ARPE-19 内过氧化氢酶等抗氧化酶的含量^[9]。枸杞子水煎液中的玉米黄质^[2]通过抑制基质金属蛋白-1 的表达,减少细胞凋亡刺激细胞增殖等途径拮抗 H₂O₂所致的氧化应激损伤。此外,仙灵脾^[10]能够改善 2 型糖尿病大鼠的氧化应激水平。本研究中我们预先用补肾养血明目方含药血清增加细胞活性,减少丙烯醛引起的细胞凋亡,因此我们认为补肾养血明目方对丙烯醛诱导的 ARPE-19 细胞损伤有一定的保护作用,但由于本研究的局限性,具体的保护机制还需要进一步的研究。

参考文献

- 1 Cano M, Thimmalappula R, Fujihara M, et al. Cigarette smoking, oxidative stress, the anti-oxidant response through Nrf2 signaling, and Age-related macular degeneration. *Vision Res* 2010; 50(7): 652-664
- 2 Xu X, Hang L, Huang B, et al. Efficacy of ethanol extract of *fructus lycii* and its constituents lutein/zeaxanthin in protecting retinal

- pigment epithelium cells against oxidative stress: *in vivo* and *in vitro* models of age-related macular degeneration. *J Ophthalmol* 2013; 2013:862806
- 3 Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000;404(6779):787-790
- 4 Honda S, Hjelmeland LM, Handa JT, et al. The use of hyperoxia to induce chronic mild oxidative stress in RPE cells *in vitro*. *Mol Vis* 2000; 7:63-70
- 5 王观峰,李文立,邹秀兰,等. 硫辛酸烟酸二联体对丙烯醛损伤 ARPE-19 细胞的保护作用. *眼科新进展* 2013;33(2):106-109
- 6 程学美,邵华,单永乐,等. 甲醛及丙烯醛对人淋巴细胞 DNA 分子加合作用的研究. *中国卫生检验杂志* 2007;17(1):23-25
- 7 陈慧珍. 当归的研究进展. *海峡药学* 2008;20:83-85
- 8 Lei T, Li H, Fang Z, et al. Polysaccharides from *Angelica sinensis* alleviate neuronal cell injury caused by oxidative stress. *Neural Regen Res* 2014;9(3):260-267
- 9 Tate DJ Jr, Miceli MV, Newsome DA. Zinc protects against oxidative damage in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Free Radic Biol Med* 1999;26(5-6):704-713
- 10 张方华,姚民秀,于国华. 糖尿病大鼠血糖及氧化应激的影响. *现代生物医药进展* 2010;10(22):4238-4241

科技期刊对论文关键词的要求

关键词是论文的检索标志,是表达文献主题概念的自然语言词汇,一般是词和词组。

科技论文的关键词是从其题名、摘要和正文中选出来的。

发表的论文不标注关键词,读者就检索不到,文献数据库也不会收录;关键词选用不当,就会降低论文的被检率,甚至检索不到。

关键词包括 3 部分:1)叙词(正式主题词),经过规范化的并收入主题词表中的词或词组;2)非正式主题词(词表中的上位词+下位词+替代词);3)自由词(标引需要但主题词表中找不到的词)。

每篇论文中应列出 3~8 个关键词,其中叙词应尽可能多一些。

关键词作为论文的组成部分,置于摘要段之后。

摘自《科学技术期刊编辑教程》