

# 虾青素对人视网膜色素上皮细胞氧化损伤的保护作用

庄海容<sup>1</sup>, 刘平<sup>2</sup>, 胡学政<sup>1</sup>

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30973275)

作者单位:<sup>1</sup>(570000) 中国海南省海口市, 海南省农垦总医院眼科;<sup>2</sup>(150001) 中国黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第一医院眼科

作者简介: 庄海容, 主治医师, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 胡学政, 副主任医师, 研究方向: 眼底病。bee21212@163.com

收稿日期: 2015-03-23 修回日期: 2015-06-10

## Protective effect of astaxanthin on human retinal pigment epithelial cells injured by hydrogen peroxide

Hai-Rong Zhuang<sup>1</sup>, Ping Liu<sup>2</sup>, Xue-Zheng Hu<sup>1</sup>

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 30973275)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Nongken General Hospital of Hainan, Haikou 570000, Hainan Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Xue-Zheng Hu. Department of Ophthalmology, Nongken General Hospital of Hainan, Haikou 570000, Hainan Province, China. bee21212@163.com

Received: 2015-03-23 Accepted: 2015-06-10

## Abstract

• AIM: To investigate the protective effect of astaxanthin (AST) on human retinal pigment epithelial (RPE) cells against oxidative damage induced by hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ).

• METHODS: Human RPE cells were subcultured, cell activity was detected by MTT, rate of apoptosis was detected by flow cytometry and cell ultrastructure changes were observed under transmission electron microscope.

• RESULTS: MTT results showed that cell activity elevated to ( $53.66\% \pm 3.25\%$  and  $70.43\% \pm 2.38\%$  after  $10^{-8}$  mol/L and  $10^{-4}$  mol/L AST treated. The difference had statistically significant ( $P < 0.05$ ) compared with oxidative injury group ( $38.76\% \pm 3.74\%$ ). Flow cytometry results showed that the apoptosis rate of RPE cells decreased to  $30.23\% \pm 1.91\%$  and  $12.58\% \pm 2.12\%$  in AST pretreated group, the difference was significant ( $P < 0.05$ ) compared with oxidative injury group ( $42.50\% \pm 1.94\%$ ); Electron microscopy showed that the morphology of cells gradually improved accompanied with the concentration of AST elevated.

• CONCLUSION: AST may inhibit hydrogen peroxide-induced apoptosis of RPE cells, it can provide reliable evidence for pursue effective medicine to prevent and treat retina injury.

• KEYWORDS: astaxanthin; ultraviolet; retinal pigment epithelial cells; apoptosis

Citation: Zhuang HR, Liu P, Hu XZ. Protective effect of astaxanthin on human retinal pigment epithelial cells injured by hydrogen peroxide. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(7):1148-1150

## 摘要

目的: 探讨虾青素(astaxanthin, AST)对过氧化氢(hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ )诱导人视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelial cells, RPE)氧化损伤的保护作用。

方法: 人RPE细胞系传代培养, MTT检测细胞活力, 流式细胞仪检测细胞凋亡率, 透射电镜观察超微结构变化。

结果: MTT结果显示用 $10^{-8}$  mol/L和 $10^{-4}$  mol/L AST处理后, RPE细胞活性分别提高到 $53.66\% \pm 3.25\%$ 和 $70.43\% \pm 2.38\%$ , 与氧化损伤组( $38.76\% \pm 3.74\%$ )比较, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ); 流式细胞计数结果显示, 预先给予 $10^{-8}$  mol/L和 $10^{-4}$  mol/L的AST作用后, RPE细胞凋亡率分别下降到 $30.23\% \pm 1.91\%$ 和 $12.58\% \pm 2.12\%$ , 与氧化损伤组( $42.50\% \pm 1.94\%$ )比较, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。电镜观察结果显示, 伴随AST作用浓度的增加, 细胞形态亦逐渐得到改善。

结论: AST可以抑制 $H_2O_2$ 诱导的人RPE细胞的凋亡, 从而为寻求有效的防治视网膜损伤的药物提供可靠的实验依据。

关键词: 虾青素; 紫外线; 视网膜色素上皮细胞; 凋亡

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2015.7.07

引用: 庄海容, 刘平, 胡学政. 虾青素对人视网膜色素上皮细胞氧化损伤的保护作用. 国际眼科杂志 2015;15(7):1148-1150

## 0 引言

年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)是引起我国老年人视力低下及盲的主要病因, 多发生于50岁以上人群, 发病率随年龄的增长而增高<sup>[1]</sup>。AMD的具体病因和发病机制尚不明确, 目前认为与营养、代谢、遗传、氧化应激、衰老和环境等因素有关。随着年龄增长, 人体抗氧化能力逐渐减弱, 视网膜色素上皮(retinal pigment epithelial cells, RPE)细胞位于脉络膜毛细血管层和光感受器细胞层之间, 导致其特别容易受到氧自由基的攻击, 从而引起AMD等视网膜疾病的发生<sup>[2]</sup>。虾青素(astaxanthin, AST)具有提高免疫力、抗氧化、清除自由基、抗癌、防止心血管疾病的作用, 广泛存在于海洋藻类、动物体及少数陆生植物体内, 其分子中有11个共轭双键和2个酮基, 能够清除自由基并淬灭单线态氧, 使其具有抗氧化、抗炎、抗癌、防止心血管疾病等多种生物学功能<sup>[3,4]</sup>。本文通过体外实验初步研究了AST对RPE细胞氧化损伤的保护作用, 从而为其用于防治AMD提供实验依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人 RPE 细胞 (ARPE-19 细胞株, ATCC 公司), AST (Sigma 公司, 纯度为 95%),  $H_2O_2$  (南京化学试剂有限公司), 胎牛血清, DMEM 培养基 (美国 Hyclone 公司),  $H_2O_2$  (南京化学试剂有限公司), MTT 试剂盒 (德国 Roche 公司), 酶标仪 (上海精密科学仪器有限公司), 流式细胞仪 (美国 BD 公司), Annexin V FITC/PI 凋亡试剂盒 (美国 BD 公司),  $CO_2$  培养箱 (美国 Thermo Forma 公司), 超净工作台 (苏州安泰空气技术公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 细胞培养在含 10% 胎牛血清, 100U/mL 青霉素及 100 $\mu$ g/mL 链霉素的 DMEM 培养基中, 将 RPE 细胞置于 37 $^{\circ}C$ , 体积分数 5%  $CO_2$  培养箱内培养, 细胞生长至近融合状态时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化、传代。

**1.2.2 细胞分组** 共分 4 组: (1) 对照组: 以正常培养液培养。(2) 氧化损伤组: 600 $\mu$ mol/L  $H_2O_2$  作用 12h。(3) AST 组: 加入 AST 作用 24h 之后, 加入 600 $\mu$ mol/L  $H_2O_2$  作用 12h, 依 AST 浓度不同分为 2 个亚组 ( $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L 和  $1.0 \times 10^{-8}$  mol/L)。每项试验至少重复 3 次。

**1.2.3 MTT 检测细胞活力** 细胞接种于 96 孔板 (细胞密度  $5 \times 10^4$ /L, 每孔 120 $\mu$ L) 培养 24h 使细胞同步化, 向各孔细胞中加入 20 $\mu$ L MTT (5g/L), 培养 4h 后弃去培养液, 加入 150 $\mu$ L DMSO 溶液, 室温在振荡器上彻底摇晃 10min 后用酶标仪测定 492nm 的光密度值。RPE 细胞的存活率 = (各组细胞光密度值/正常组细胞光密度值)  $\times$  100%。

**1.2.4 细胞凋亡检测** 收集对数生长期细胞并制备细胞悬液, 1 000r/min 离心弃上清液, 洗涤收集细胞, 调节细胞浓度为  $5 \times 10^6$ /L, 加入 500 $\mu$ L 的 Binding Buffer 悬浮细胞后依次加入 5 $\mu$ L 的 Annexin V FITC 和 5 $\mu$ L 的 PI 混匀, 室温下避光孵育 15min, 于 1h 内用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

**1.2.5 透射电子显微镜观察 RPE 细胞超微结构的变化** 将细胞投入到体积分数 2.5% 戊二醛溶液中进行前固定, 4 $^{\circ}C$  过夜, 1% 锇酸后固定, 醋酸铀快染, 乙醇-丙酮梯度脱水, 环氧树脂包埋, LKB 超薄切片仪切片, 醋酸铀、柠檬酸铅双重染色, 透射电镜下观察其超微结构变化。

统计学分析: 采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理, 将研究的数据进行正态分布检验和方差齐性检验后, 采用单因素方差分析, 所得实验资料均以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 AST 对  $H_2O_2$  致 RPE 细胞氧化损伤的影响** 氧化损伤组 RPE 细胞经氧化损伤处理后, 细胞活性明显下降 ( $38.76\% \pm 3.74\%$ ), 与对照组 ( $96.01\% \pm 1.77\%$ ) 比较, 差异具有统计学意义 ( $t = 13.86, P < 0.01$ )。用  $10^{-8}$  mol/L 和  $10^{-4}$  mol/L AST 处理后, RPE 细胞活性分别提高到  $53.66\% \pm 3.25\%$  和  $70.43\% \pm 2.38\%$ , 与氧化损伤组比较差异具有统计学意义 ( $t = 3.01, 7.17; P < 0.05$ ; 图 1)。

### 2.2 AST 对氧化损伤致 RPE 细胞凋亡的抑制作用

RPE 细胞经氧化损伤处理后, 细胞凋亡率明显升高, 正常培养的人 RPE 细胞凋亡率为  $1.05\% \pm 0.33\%$ , 600 $\mu$ mol/L  $H_2O_2$  作用于细胞后显示了明显的凋亡现象, 细胞凋亡率达到了  $42.50\% \pm 1.94\%$ ; 然而, 预先给予  $10^{-8}$  mol/L 和  $10^{-4}$  mol/L 的 AST 作用后, RPE 细胞凋亡率分别下降到  $30.23\% \pm 1.91\%$  和  $12.58\% \pm 2.12\%$ , 与氧化损伤组比较差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 2)。

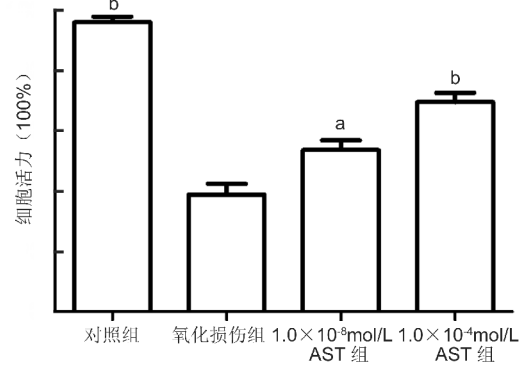


图 1 AST 对  $H_2O_2$  致 RPE 细胞氧化损伤的影响 ( $^a P < 0.05$ ,  $^b P < 0.01$  vs 氧化损伤组)。

**2.3 电镜观察结果** 空白对照组 RPE 细胞形态完整, 细胞之间紧密联接, 细胞核膜清晰、连续, 核仁呈圆形或椭圆形 (图 3A); 而 600 $\mu$ mol/L  $H_2O_2$  诱导的 RPE 细胞形态欠规则, 胞质内线粒体空泡变性, 核膜不连续, 核内染色质不均匀, 核固缩尤为明显 (图 3B); 与氧化损伤组相比较,  $1.0 \times 10^{-8}$  mol/L 和  $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L AST 处理组 RPE 细胞超微结构损害程度依次减轻, 胞核内染色质固缩情况减轻, 逐渐可看到连续的核膜结构 (图 3C, D)。

## 3 讨论

抗氧化剂 AST 是一种活性氧、自由基和活性氮的强力清除剂, 具有淬灭单线态氧的能力, AST 的保护作用机制包括抑制氧化应激导致的氧化损伤、细胞凋亡和坏死, 国内外大量研究已经证实 AST 在预防和治疗慢性退行性疾病、糖尿病、心脑血管疾病及肿瘤方面有一定作用<sup>[5,6]</sup>。在眼部 AST 同样发挥了较强的保护作用, 例如减少晶状体蛋白的氧化应激损害, 避免高血压导致的 RPE 细胞的凋亡等, 但是对于 RPE 细胞氧化损伤的保护作用鲜有报道<sup>[7]</sup>。

视网膜退行性病变是导致我国老年人视力低下的主要原因, 研究发现, 其发生与长时间的积累性氧化损伤导致的细胞凋亡有关。实验证实, 在 AMD 的早期即可出现 RPE 细胞的凋亡<sup>[8]</sup>。凋亡对促进系统的正常发育起着重要作用, 它在生命活动中可去除不需要的或异常的细胞, 以维持生物体内环境的稳定。许多视网膜疾病的发生、发展均有凋亡反应的参与, 包括 AMD 和视网膜光损伤、视网膜色素变性和糖尿病视网膜病变等<sup>[9]</sup>。

RPE 细胞参与了许多眼底疾病的发生发展, 在维护视网膜正常生理功能方面具有重要的保护作用<sup>[10]</sup>。正常情况下 RPE 细胞中含有大量抗氧化物质如超氧化物歧化酶、维生素 C、维生素 E、谷胱甘肽、过氧化氢酶等, 而且能产生相对高浓度的氧自由基, 但是随着年龄的增加, 机体自身抗氧化机制逐渐减弱, 导致上述抗氧化物质的含量及活性下降, 使衰老的 RPE 细胞容易受到氧化损伤, 引起疾病发生。 $H_2O_2$  是一种强氧化剂, 可以自由透过细胞膜, 通过增加细胞内活性氧 (ROS) 含量发挥对细胞的氧化损伤作用<sup>[11]</sup>。RPE 细胞对氧化应激损伤较为敏感, 本实验模拟 RPE 细胞氧化损伤模型, 向细胞培养液中添加 600 $\mu$ mol/L  $H_2O_2$  作用 12h, 造成 RPE 细胞氧化损伤, 研究 AST 对该细胞的保护作用。流式细胞技术检测及电镜观察细胞超微结构均显示经  $H_2O_2$  处理的细胞其凋亡率与对照组相比明显升高, 并且细胞活力检测结



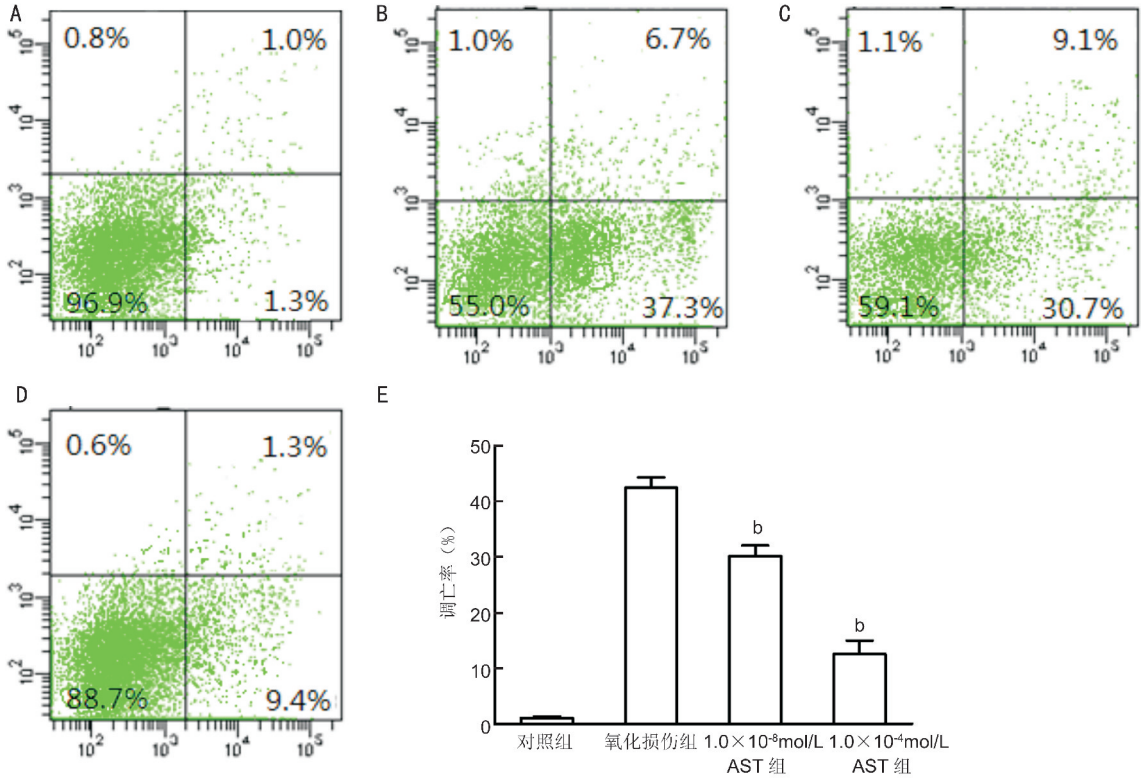


图2 AST对氧化损伤致RPE细胞凋亡的抑制作用 A:对照组;B:氧化损伤组;C: $1.0 \times 10^{-8}$  mol/L AST组;D: $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L AST组;E:各组RPE细胞凋亡率( $^b P < 0.01$  vs 氧化损伤组)。

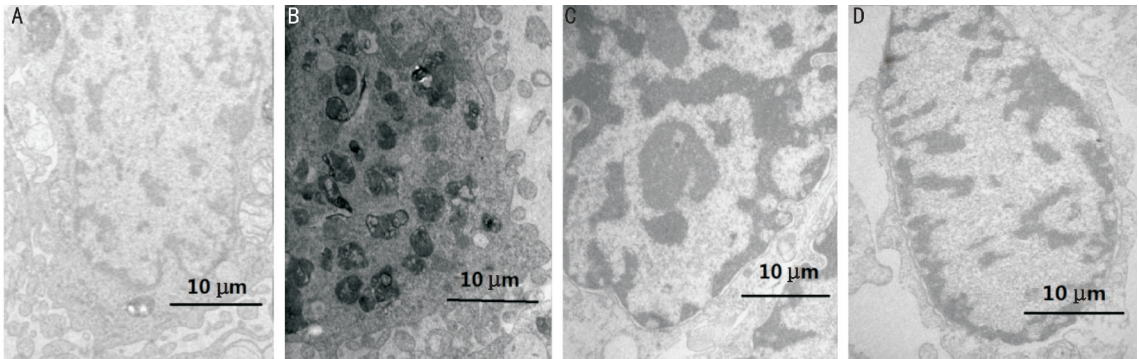


图3 透射电镜观察视网膜色素上皮细胞超微结构的改变( $\times 2000$ ) A:对照组;B:氧化损伤组;C: $1.0 \times 10^{-8}$  mol/L AST组;D: $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L AST组。

果也显示  $H_2O_2$  处理的细胞其细胞活力明显降低,细胞正常形态受到损伤,但是经过 AST 预处理的细胞其活力得到不同程度的改善,细胞形态亦逐渐改善,说明该药物在一定程度上能够抑制  $H_2O_2$  诱导的细胞损伤,而且这种药物对细胞的保护作用呈剂量依赖性。然而由于研究经费所限,我们尚未对 AST 抑制 RPE 细胞凋亡的具体机制进行研究,今后的实验中我们会继续深入探讨。

综上所述,AST 对  $H_2O_2$  诱导的 RPE 细胞的凋亡具有一定的抑制作用,抑制效应与药物浓度正相关,从而可能减少 RPE 细胞凋亡及由此引起的病理损害,为寻求有效的防治视网膜损伤药物提供可靠的实验依据。

参考文献

1 Gianniou C, Dirani A, Ferrini W, et al. Two-year outcome of an observe- and - plan regimen for neovascular age-related macular degeneration; how to alleviate the clinical burden with maintained functional results. *Eye* 2015;29(3):450-451  
 2 Han SY, Bae JH, Oh J, et al. Intravitreal ranibizumab for subfoveal choroidal neovascularization from age-related macular degeneration with combined severe diabetic retinopathy. *Diabetes Metab J* 2015;39(1):46-50

3 尹蕾,尚小玉,张泽生,等. 虾青素体外清除自由基活性的研究. *食品科技* 2010;35(4):232-235  
 4 彭亮,赵鹏,李彬,等. 虾青素的抗氧化作用及对人体健康的影响. *中国食品卫生杂志* 2011;23(4):313-315  
 5 Wang JY, Lee YJ, Chou MC, et al. Astaxanthin protects steroidogenesis from hydrogen peroxide-induced oxidative stress in mouse leydig cells. *Mar Drugs* 2015;13(3):1375-1388  
 6 曹秀明,祁小倩,王珊珊. 虾青素对活性氧所致海马神经细胞氧化损伤的保护作用. *中国海洋药物杂志* 2012;31(6):45-47  
 7 赵颖,牛膺筠,周占宇. 过氧化氢诱导人视网膜色素上皮细胞衰老及其机制探讨. *眼科新进展* 2011;31(9):804-806  
 8 闫焱,雷霞,王玲,等. 过氧化氢诱导的氧化应激对 ARPE-19 细胞中泛素化途径的激活. *眼科研究* 2009;27(1):35-37  
 9 Cort A, Ozturk N, Akpinar D, et al. Suppressive effect of astaxanthin on retinal injury induced by elevated intraocular pressure. *Regul Toxicol Pharmacol* 2010;58(1):121-130  
 10 刘敏,王雨生,赵炜,等. 缺氧诱导体外培养人视网膜色素上皮细胞凋亡. *国际眼科杂志* 2008;8(4):679-681  
 11 李钟睿,冯卓蕾,孙云端,等. 葛根素对过氧化氢诱导 ARPE-19 细胞活力损伤和凋亡的影响. *哈尔滨医科大学学报* 2014;48(6):476-479