

# 金钗石斛提取物对晶状体上皮细胞氧化损伤防护作用

马伟凤, 徐勤

作者单位:(510405)中国广东省广州市,广州中医药大学基础医学院中西医结合

作者简介:马伟凤,女,硕士研究生。

通讯作者:徐勤,男,教授. xhqin@163.com

收稿日期:2010-03-15 修回日期:2010-03-30

## Protection of dendrobium nobile's extractive on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced lens epithelial cells damage

Wei-Feng Ma, Qin Xu

Combination of Chinese Medicine and western Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Basic Medical College, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

**Correspondence to:** Qin Xu. Combination of Chinese Medicine and western Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Basic Medical College, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China. xhqin@163.com

Received:2010-03-15 Accepted:2010-03-30

### Abstract

• **AIM:** To investigate the protection of different polarity alkaloids ( fat-soluble, water-soluble, low polar, weak polar) from dendrobium nobile on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced damage of human lens epithelial cells (HLEC).

• **METHODS:** The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and HLEC were incubated with oxidative damage model. At the same time the different polarity alkaloid were added and sustained for 24 hours. Then detection of the proliferation of HLEC was with MTT and apoptosis was detected by FCM.

• **RESULTS:** The proliferation of LEC in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group was declined. The group of fat-soluble alkaloid and water-soluble alkaloid (25μg/L) were significantly increased compared to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced group. The group of fat-soluble alkaloids could significantly reduce the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis of LEC ( $P < 0.01$ ).

• **CONCLUSION:** Fat-soluble alkaloids (12.5μg/L) extracted from dendrobium nobile can enhance the proliferation of LEC by anti-oxidation, and inhibit the apoptosis of LEC.

• **KEYWORDS:** dendrobium nobile; alkaloid; oxidative damage

Ma WF, Xu Q. Protection of dendrobium nobile's extractive on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced lens epithelial cells damage. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2010;10(4):650-652

### 摘要

**目的:**探讨中药金钗石斛提取物中4种不同极性的生物碱(脂溶性、水溶性、低极性、弱极性)对人晶状体上皮细胞(HLEC)氧化损伤防护作用的影响。

**方法:**将H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>与传代培养的HLEC共同孵育复制氧化损伤模型,同时加入不同极性的金钗石斛提取物作用24h后,用四甲基偶氮唑蓝法(MTT)检测HLEC的增殖情况,流式细胞术检测其凋亡情况,并探讨不同极性同一极性不同浓度的金钗石斛提取物对氧化损伤后细胞增殖及凋亡的影响。

**结果:**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组LEC增殖下降,金钗石斛脂溶性生物碱和水溶性生物碱高剂量组可促进氧化损伤的LEC的增殖,其中脂溶性生物碱显著增强氧化损伤的LEC的增殖( $P < 0.01$ )。脂溶性生物碱可以明显抑制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的LEC凋亡( $P < 0.01$ )。

**结论:**金钗石斛脂溶性生物碱低剂量组通过抗氧化损伤而促进LEC的增殖,抑制LEC的凋亡。

**关键词:**金钗石斛;生物碱;氧化损伤

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.04.012

马伟凤,徐勤.金钗石斛提取物对晶状体上皮细胞氧化损伤防护作用.国际眼科杂志2010;10(4):650-652

### 0 引言

白内障是全世界的首位致盲眼病,致盲率占所有致盲病因的50%<sup>[1]</sup>。尽管现代手术为白内障提供了最终治疗的有效手段,但初、中期白内障仍需寻求药物治疗以阻止或延缓其进程。现今临床上所用的内服或外用药在有效性及副作用方面存在很多不足<sup>[2]</sup>。因此毒副作用较小的中药制剂和天然提取物正在成为白内障药物研究的热点。白内障的氧化应力学说认为,白内障的发病是由于氧自由基的生成增多和清除减少,致使晶体细胞过氧化所致。以往研究提示金钗石斛中所含的部分生物碱对晶状体氧化损伤所致的白内障有抑制作用,而本实验则旨在进一步考察金钗石斛提取物中4种不同的组分及同一组分的不同浓度对由过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)所致氧化损伤的晶状体上皮细胞(HLEC)增殖及凋亡的影响,从而使其有效成分和相应的作用浓度细化。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 实验细胞HLEC(SRA01/04)中山大学眼科中心提供。中药:金钗石斛,由贵州赤水信天石斛有限公司提供,经广州中医药大学中药鉴定教研室鉴定。试剂:800mL/L乙醇、浓盐酸、乙酸乙酯、三氯甲烷、正丁醇、碘化钾、氨水、氯化钠(以上化学试剂均为分析纯级别,由广州化学试剂厂提供);胎牛血清(FBS)购自杭州四季青生物工程有限公司。300mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>系上海试剂总厂产品。DMEM培养基、乙二胺四乙酸(EDTA)、胰蛋白酶(trypsin)、四甲基偶氮唑蓝(MTr)、DMSO 1.3实验仪器均购自华美生物工程公司,分别是美国Sigma公司、美国GIBCO公司、美国Augus公司和美国Am-reseo公司产品。E-52AA旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(河南巩义市英峪予华仪器厂);BP221S电子分析天平(上海精密仪器表有限公司)CO<sub>2</sub>培养箱(美国FORMA 2111),倒置研究显微镜(日本IMT-413),全自动酶标仪(BioTek ELX 808)。

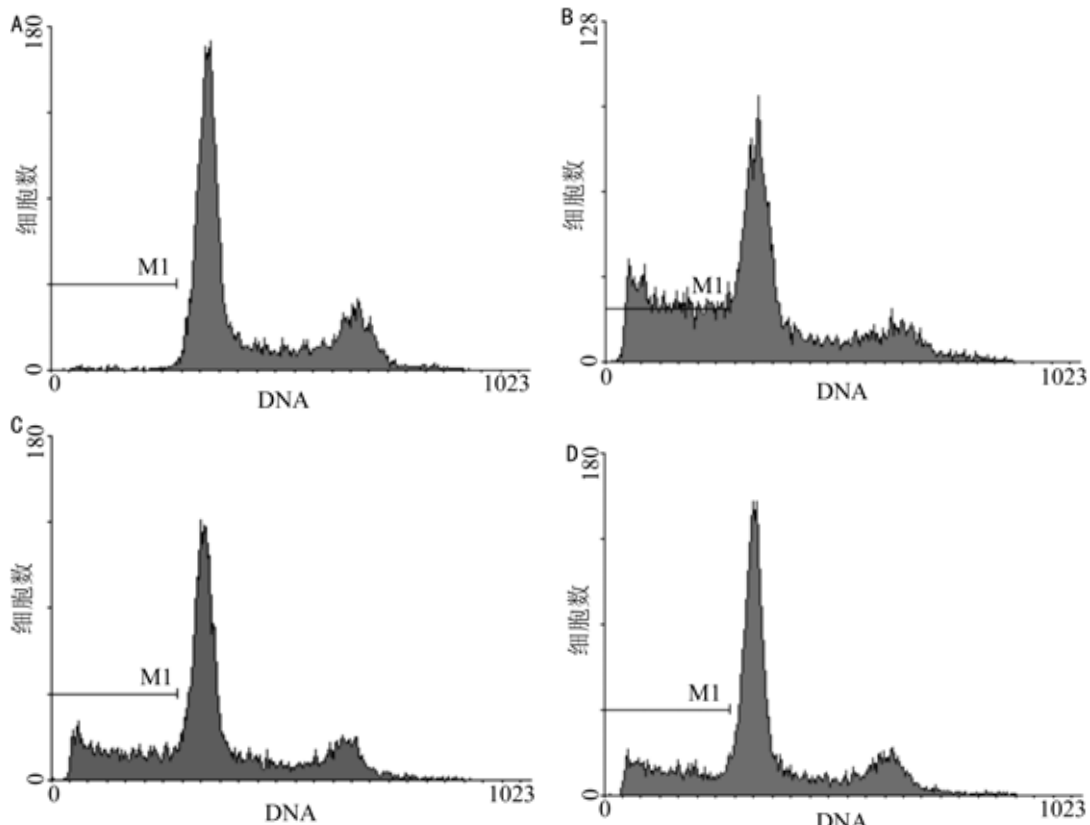


图1 脂溶性生物碱低剂量组对  $H_2O_2$  诱导的 HLEC 的凋亡率的变化 A: 正常组; B: 模型组; C: 模型组 + 100g/L 白内停滴眼液; D: 模型组 + 低浓度 (12 $\mu$ g/L) 脂溶性生物碱。

**1.2 方法** 金钗石斛洗净、烘干、粉碎,其粉未经乙醇提取、降膜浓缩、酸化、盐析、萃取后;水洗、回收可得脂溶性生物碱;酸化、氯仿萃取回收获得弱极性生物碱;将酸化后并用氯仿萃取的酸水层浓缩再碱化回收得低极性生物碱;碱化后用正丁醇萃取、饱和水洗回收获得水溶性生物碱。人晶状体上皮细胞用含 100mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养液,置于 37 $^{\circ}C$ , 50mL/L  $CO_2$  培养箱内培养,细胞形态呈多角形或梭形,3~4d 可融合。融合成片的细胞,大小较一致。细胞生长接近融合时及时传代或冻存,按 1:3~4 分瓶传代。实验分组:(1)正常组:正常 HLEC + DMEM 维持液;(2)模型组:正常组 + 500 $\mu$ mol/L  $H_2O_2$ ;(3)高浓度脂溶性生物碱组:模型组损伤晶状体上皮 + 高浓度 (25 $\mu$ g/L) 脂溶性生物碱;(4)低浓度脂溶性生物碱:模型组损伤晶状体上皮 + 低浓度 (12 $\mu$ g/L) 脂溶性生物碱;(5)高浓度的水溶性生物碱:模型组损伤晶状体上皮 + 高浓度 (25 $\mu$ g/L) 的水溶性生物碱;(6)低浓度的水溶性生物碱组:模型组损伤晶状体上皮 + 低浓度 (12 $\mu$ g/L) 的水溶性生物碱;(7)高浓度低极性生物碱组:模型组损伤晶状体上皮 + 高浓度 (25 $\mu$ g/L) 低极性生物碱;(8)低浓度低极性生物碱组:模型组损伤晶状体上皮 + 低浓度 (12 $\mu$ g/L) 低极性生物碱;(9)高浓度弱极性生物碱组:模型组损伤晶状体上皮 + 高浓度 (25 $\mu$ g/L) 弱极性生物碱;(10)低浓度弱极性生物碱组:阳性组 + 低浓度 (12 $\mu$ g/L) 弱极性生物碱。MTT 法检测不同极性生物碱对 HLEC 增殖的影响:消化并收集生长良好、呈对数生长期的 HLEC,接种于 96 孔板培养板中,细胞密度为  $8 \times 10^3$  个/mL,置于 37 $^{\circ}C$ , 50mL/L  $CO_2$  培养箱中培养 24h 后,弃去培养液,按照上述实验分组,各极性生物碱浓度分别为 25 $\mu$ g 和 12 $\mu$ g。继续培养 24h 后,弃去培养液,在各组培养板分别加入 200 $\mu$ L

的 MTT 试剂(终浓度为 0.5g/L),继续培养 4h。吸去 MTT 溶液,加入 150 $\mu$ L DMSO 溶液,振荡器轻轻振荡 10min 后,于全自动酶标仪上 490nm 波长比色测定,测定各组的吸光值,即  $D$  值。按下列公式计算抑制率。抑制率 (%) = (增殖组平均  $D$  值 - 各药物组平均  $D$  值) / 增殖组平均  $D$  值  $\times 100\%$ 。流式细胞术检测细胞凋亡:消化并收集生长良好呈对数生长的细胞,接种于 6 孔板培养板中,细胞培养同上,分组加药:正常组(正常 HLEC + DMEM 维持液);模型组(正常组 + 500 $\mu$ mol/L  $H_2O_2$ );白内停组(模型组 + 100g/L 白内停滴眼液);模型组 + 低浓度 (12 $\mu$ g/L) 脂溶性生物碱收集细胞将细胞制成单细胞悬液,进行细胞 4 $^{\circ}C$  固定过夜,每 5min 800r 离心弃上清。加入 150 $\mu$ L RnaseA 37 $^{\circ}C$  消化 30min。在加入 150 $\mu$ L PI 工作液,4 $^{\circ}C$  避光 30min,转至流式检测管,上机检测。

统计学分析:应用 SSPS 13.0 统计软件分析,数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间采用  $t$  检验或  $t'$  检验,多组间两两比较采用  $F$  检验,以  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 脂溶性生物碱低剂量组对 HLEC 凋亡的影响** 如图 1 所示,过氧化氢能够诱导细胞凋亡,白内停能够抑制 HLEC 的凋亡,脂溶性生物碱低剂量组抑制 HLEC 的作用类似于白内停。

### 2.2 不同极性不同浓度生物碱对 HLEC 增殖的影响结果

不同极性不同浓度生物碱对 HLEC 增殖的影响结果见表 1。

**2.3 中药金钗石斛对  $H_2O_2$  损伤的 HLEC 增殖的影响** 与正常组相比, $H_2O_2$  组可以引起 LEC 的  $A$  值显著下降 ( $P < 0.05$ );与  $H_2O_2$  组相比,脂溶性生物碱低剂量组的  $A$  值显著上升 ( $P < 0.05$ ),且不随脂溶性生物碱的浓度增加而增加。其他极性生物碱  $A$  虽有升高但是无显著上升 ( $P > 0.05$ )。

表1 不同极性不同浓度生物碱对 HLEC 增殖影响结果 n=6

组别	浓度(μg/L)	吸光度值(D)	抑制率(%)
正常组	-	0.555 ± 0.007 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>
模型组	-	0.261 ± 0.007 <sup>b</sup>	0.530 ± 0.013 <sup>b</sup>
脂溶性高剂量组	25	0.287 ± 0.010 <sup>b,d,f</sup>	0.483 ± 0.018 <sup>b,d,f</sup>
脂溶性低剂量组	12	0.328 ± 0.004 <sup>b,d</sup>	0.409 ± 0.007 <sup>b,d</sup>
水溶性高剂量组	25	0.280 ± 0.007 <sup>b,d,f</sup>	0.494 ± 0.013 <sup>b,d,f</sup>
水溶性低剂量组	12	0.256 ± 0.014 <sup>b</sup>	0.538 ± 0.025 <sup>b</sup>
低极性高剂量组	25	0.266 ± 0.014 <sup>b</sup>	0.520 ± 0.025 <sup>b</sup>
低极性低剂量组	12	0.255 ± 0.018 <sup>b</sup>	0.540 ± 0.032 <sup>b</sup>
弱极性高剂量组	25	0.263 ± 0.018 <sup>b,f</sup>	0.525 ± 0.033 <sup>b,f</sup>
弱极性低剂量组	12	0.272 ± 0.012 <sup>b</sup>	0.509 ± 0.021 <sup>b</sup>

<sup>b</sup>P < 0.01 vs 正常组; <sup>d</sup>P < 0.01 vs 模型组; <sup>f</sup>P < 0.01 vs 脂溶性低剂量组。

**2.4 中药金钗石斛对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 HLEC 凋亡的影响** 与正常组相比, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组可以引起 LEC 凋亡率的下降; 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组相比, 脂溶性生物碱组和白内停组凋亡率均有显著下降; 与脂溶性生物碱低剂量组相比, 白内停组的凋亡率无显著差异。

### 3 讨论

我们所用金钗石斛生物碱均是从天然药物中提取而得。相关研究表明金钗石斛具有免疫调节、抗肿瘤、抗氧化、抗白内障、延缓衰老以及抑菌、抗诱变等作用。目前已有报道金钗石斛中所含的联苳类和酚类成分具有抗氧化活性, 其所含丁香酸(syringic acid)的活性明显强于 VitC<sup>[3]</sup>。此外还有研究表明金钗石斛中提取物中的生物碱成分, 通过抗氧化损伤途径起到抗白内障的作用<sup>[4]</sup>。

白内障是当今世界的主要致盲性眼病, 其发病机制十分复杂。已有很多基础与临床研究证实氧化损伤是白内障形成的重要机制; 氧化损伤可引起晶状体蛋白质变性, 使晶状体部分或全部混浊而发生白内障。晶状体上皮细胞中含有大量抗氧化酶系统, 对于晶状体的生长、发育、损伤修复及正常结构和功能的维持非常重要。一旦此层细胞受损, 晶状体的生长就会延缓, 甚至停止, 严重者还会破坏其自身稳定性。人晶状体中自由基的产生主要有 3 个途径<sup>[5]</sup>: 首先, 长期的紫外线照射, 激活晶状体中的色氨酸生成 N-甲酰犬尿酸, 可经多途径产生氧自由基。其次, 还原性单糖发生的自氧化过程(Maillard 反应)产生自由基。第三, 晶状体正常的生化过程产生自由基。此外, 各种损伤因素间往往存在交互作用, 破坏晶状体的自身稳定性<sup>[6]</sup>, 加速白内障形成。因此, 应用抗氧化剂保护晶状体免受氧化损伤, 成为防治白内障的一大突破口。凋亡是一种由基因调控的细胞程序性死亡, 在凋亡过程中, 细胞不仅发生生化变化, 而且呈现出具有凋亡特征性的细胞形态。有核细胞凋亡的一个重要特征是 DNA 发生变化。Li 等<sup>[7-9]</sup>运用过氧化氢、钙离子透入及紫外线照射等方法进行了诱发白内障的晶状体离体实验, 首次发现在晶状体混浊前均出现上皮细胞凋亡现象, 并提出 LEC 凋亡是一切非先天性白内障发生共同的细胞学基础。

LECs 是晶状体内代谢最活跃的部位, 是晶状体抗氧化损伤的活性中心, 其功能状态对维持晶状体的透明性十分重要。LECs 凋亡后, LECs 的各种生理机能随之发生改变, 加剧了蛋白质和脂质的交联、变性、聚集, 使晶状体的有序结构进一步遭到破坏, 最终导致晶状体混浊。因此可以说, 药物是否能够促进 LECs 增殖或抑制其凋亡, 间接

反应了其是否有抗氧化损伤作用, 进而运用于白内障的防治当中。

我们采用了目前应用最广的用以检测细胞生长存活、增殖及凋亡情况的 MTT 比色法和流式细胞术, 先探明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可降低 LEC 活性, 之后在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用的同时投以不同浓度、不同组分的生物碱, 再次对其细胞生长活性进行检测。结果表明金钗石斛脂溶性生物碱低剂量组能有效地抑制过氧化氢对 LEC 的氧化损伤促进 LEC 增殖, 进而抑制 LEC 凋亡。我们证实了金钗石斛脂溶性生物碱能抑制过氧化氢对 LEC 的氧化损伤的作用, 抑制 LEC 凋亡, 结果显示金钗石斛脂溶性生物碱低剂量组细胞抑制率与模型组相比要低, 其细胞凋亡率亦低, 其 G2 百分比则较高, 为分裂期做最后准备。并提示了金钗石斛脂溶性生物碱能够抗氧化损伤的机制可能是通过加快细胞周期进程, 从而影响细胞的分裂与增殖, 从而促进 LEC 的增殖。

综上所述, 我们所发现金钗石斛脂溶性生物碱具有较强的抗氧化作用, 能够显著提高晶状体上皮细胞对抗氧化应激损伤的能力, 为金钗石斛防治白内障提供了科学依据, 开阔了其应用于临床作为白内障的治疗药物的研究前景。但对于脂溶性生物碱是如何进入眼内发挥抗氧化作用的, 其中哪些具体的有效单体起主要作用, 作用机制如何等问题还有待我们进一步探讨。

### 参考文献

- 胡静. 开创防盲治盲的新局面. 中华眼科杂志 2001;37(1):1-2
- 夏小平, 张晓, 夏海涛. 糖尿病性白内障发病的有关因素研究. 江西医药 2000;35(4):211-212
- 张雪, 续洁琨, 王乃力, 等. 金钗石斛中联苳类和酚性类成分的抗氧化活性研究中国药理学杂志 2008;43(11):829-832
- 龙艳, 魏小勇, 詹宇坚, 等. 金钗石斛提取物抗白内障的体外实验研究. 现在中药演技与实践 2008;22(2):27-30
- 刘莹. 氧化损伤与眼科疾病. 中华实用中西医杂志 2004;4(17):3501-3503
- 江励华. 中药抗 DNA 损伤作用的研究. 医药导报 2004;23(4):250-252
- 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 human and animals. *J Cell Biol* 1995;130(1):169-181
- Li WC, Kuszak JR, Wang GM. Calamycin-induced lens epithelial cell apoptosis contributes to cataract formation. *Exp Eye Res* 1995;61(1):91-98
- Li WC, Spector A. Lens epithelial cell apoptosis is an early event in the development of UVB-induced cataract. *Free Radic Biol Med* 1996;20(3):301-311