

茶多酚对紫外线诱导大鼠晶状体上皮细胞中 Caveolin-1 表达的影响

修鑫鑫, 刘丹

作者单位:(121001)中国辽宁省锦州市,辽宁医学院附属第一医院眼科

作者简介:修鑫鑫,硕士,研究方向:白内障发病机制和防治。

通讯作者:刘丹,硕士,教授,主任医师,主任,研究方向:白内障发病机制和防治. yankeliudan@yahoo.com.cn

收稿日期:2011-08-12 修回日期:2011-09-13

Influence and significance of tea polyphenols on Caveolin-1 expression in UV-induced lens epithelial cells of rats

Xin-Xin Xiu, Dan Liu

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Dan Liu. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China. yankeliudan@yahoo.com.cn

Received:2011-08-12 Accepted:2011-09-13

Abstract

• **AIM:** To observe the influence of tea polyphenols (TP) on the Caveolin-1 (CAV-1) expression in ultraviolet (UV)-induced lens epithelial cells of rats.

• **METHODS:** The experimental cataract model was established, and the untreated group, ultraviolet radiation group and experimental group (ultraviolet radiation + TP group) were set. The experimental group by tea polyphenols concentration was divided into four subgroups, namely 0.02, 0.2, 2 and 20mg/L group respectively, with sampling 6, 12, 24, 48 hours after culture respectively. The expressions of CAV-1 were detected by the S-P immunohistochemical method and Western blot method in lens epithelial cells.

• **RESULTS:** The differences of Caveolin-1 expression for the experimental group and control group compared to the UV group were statistically significant ($P < 0.05$). At different times, the lens epithelial cells positive expression for the experimental group was significantly higher than the UV group, the degree of lens opacity for the experimental group was significantly lower than the UV group. When TP was 0.02mg/L, the difference of Caveolin-1 expression between the experimental group and the control group was not statistically significant ($P > 0.05$); the difference between the rest of the experimental

group and the control group was statistically significant ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** Tea polyphenols can inhibit the expression of Caveolin-1 decreased in UV-induced lens epithelial cells. When tea polyphenols concentration is 0.02mg/L, the effect is the best.

• **KEYWORDS:** tea polyphenols; ultraviolet radiation; lens epithelial cells; Caveolin-1

Xiu XX, Liu D. Influence and significance of tea polyphenols on Caveolin-1 expression in UV-induced lens epithelial cells of rats. *Gujing Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(11):1886-1889

摘要

目的:观察茶多酚(tea polyphenols, TP)对紫外线诱导的大鼠晶状体上皮细胞中 Caveolin-1 表达的影响。

方法:采用离体晶状体培养技术,通过紫外线照射氧化损伤法,建立实验性白内障晶状体模型,设置空白对照组、紫外线照射组和实验组(即紫外线照射+TP组),实验组按 TP 的浓度分为 4 个亚组,即 0.02、0.2、2 和 20mg/L,分别于 6、12、24 和 48h 取样,运用免疫组织化学法染色计数晶状体上皮细胞中 Caveolin-1 阳性细胞,并运用 Western-blot 免疫印迹分析晶状体上皮细胞中 Caveolin-1 表达量的变化。**结果:**不同时段各组晶状体上皮细胞 Caveolin-1 阳性表达率和表达量的比较,各实验组与紫外线对照组相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$),不同时段实验组晶状体上皮细胞阳性表达明显高于紫外线照射组,实验组的晶状体混浊程度明显低于紫外线照射组。0.02mg/L TP 实验组与空白对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$);其余实验组与空白对照组相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**TP 可以抑制紫外线诱导的晶状体上皮细胞 Caveolin-1 表达的减少,其中 0.02mg/L TP 对 Caveolin-1 的作用最强。

关键词:茶多酚;紫外线;晶状体上皮细胞;小窝蛋白-1

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2011.11.005

修鑫鑫,刘丹.茶多酚对紫外线诱导大鼠晶状体上皮细胞中 Caveolin-1 表达的影响.国际眼科杂志 2011;11(11):1886-1889

0 引言

紫外线辐射与白内障的形成关系密切,但紫外线辐射导致白内障的发病机制目前仍众说纷纭。多数学者认为紫外线对晶状体的损伤机制多与氧化作用有关,氧化损伤是白内障形成的一个重要因素,也是紫外线辐射致晶状体混浊的主要机制^[1]。小窝(Caveolae)是脂筏中最重要的

一种类型,小窝蛋白(Caveolin)是 Caveolae 特异性标志蛋白^[2,3],在晶状体上皮细胞遭受氧化应激时保护细胞免遭氧化损伤等方面发挥关键作用^[4]。本实验使用强氧化剂茶多酚(tea polyphenols, TP)对紫外线诱导的晶状体上皮细胞进行干预,检测晶状体上皮细胞中 Caveolin-1 表达的变化,研究不同浓度 TP 对紫外线诱导的晶状体上皮细胞中 Caveolin-1 表达的影响,探讨 TP 抗氧化损伤作用,为氧化损伤性白内障的防治寻找新的理论依据和途径。

1 材料和方法

1.1 材料 正常成年 SD 大鼠 96 只,体质量 200 ~ 250g,雌雄兼用,健康无眼疾(购自辽宁医学院实验动物中心)。主要试剂和仪器:TP(纯度 99.9%,上海恒远生物科技有限公司)、兔抗鼠 Caveolin-1 多克隆抗体(Lab Vision 公司)、MEM 培养液(Hyclone 公司)、小牛血清(Hyclone 公司)、SP 免疫组织化学试剂盒、DAB 显色试剂盒、UV 光源(为 UV-A、UV-B 混合光源)、CO₂ 培养箱、超净工作台、倒置显微镜(日本 Olympus 公司,IX70 型)、图像分析系统、水平电泳仪、GelDoc1000 凝胶成像系统。

1.2 方法 将大鼠颈椎脱臼处死后立即摘除双眼球,无菌无损伤条件下剥离晶状体,放入每孔盛有 10mL MEM 培养液(含 100mL/L 小牛血清、青霉素 10⁵ U/L、链霉素 0.1g/L)的 12 孔培养板内,置 37℃,95% 湿度、50mL/L CO₂ 孵箱中培养 8h(取透明晶状体用于实验,以排除手术损伤或其它原因所致晶状体混浊的可能性)。将筛选出的晶状体随机分 6 组:空白对照组、紫外线照射组和实验组,实验组按 TP 的浓度分为 4 个亚组,分别为:0.02,0.2,2 和 20mg/L。每组每个时间点随机选取 4 个晶状体,放入已经加过培养液的 12 孔板中,每孔一个晶状体。各实验组于紫外线照射前 2h 加药,常规培养。紫外线照射组和实验组,参照 Dovrat 等^[5]与 Zigman 等^[6]法将晶状体置于垂直光源下方 50cm 处,撤去培养板盖,晶状体表面上液保留约 1mm,其余培养液移走照射 30min,空白对照组置于同室同条件下无 UV 辐射处,再将 6 组标本同时放入培养箱中培养,分别在加入培养液后于 6,12,24 和 48h 时,停止孵育,取标本进行检测。

1.2.1 形态学观察 在白色背景下设置一宽 1mm,间距 10mm 的垂直交叉的黑色线条,将孵育 6,12,24 和 48h 的各组晶状体置于“+”字交叉的黑色线条背景之上照相,并观察晶状体混浊程度,将照片导入电脑,用 Adobe Photoshop 软件分析图像中每个交叉点的灰度和邻近交叉点的白色背景灰度,两者之差即为相对灰度值,对各组晶状体相对灰度值进行统计学分析。

1.2.2 免疫组织化学检查 用免疫组织化学法检测晶状体上皮细胞中 Caveolin-1 的表达情况,步骤按 SP 试剂盒说明操作,光学显微镜观察。阳性表达为细胞膜和/或细胞质有呈棕黄色的颗粒。每组不同时间点每个晶状体标本选 3 张切片,400 倍光学显微镜下,每张切片随机观察 5 个视野,并记录阳性细胞率。阳性细胞率 = 5 个视野内阳性细胞总数 / 5 个视野内细胞总数 × 100%。阳性细胞率 0% 为表达阴性(-);1% ~ 25% 为弱阳性(+);26% ~ 50% 为阳性(++);>50% 为强阳性(+++)。

1.2.3 Western-blot 免疫印迹法 取冻存晶状体前囊膜研磨成粉末(每组每个时间点各取 3 只)放入管中,加入

0.2mL 预冷的含抑制剂的蛋白质抽提试剂(含 0.1mol/L 磷酸缓冲液 pH7.4 和 0.1mol/L NaCl),匀浆,将匀浆液转移至离心管中,在 4℃,13000r/min 下离心 20min。样品制备:取 90μL 晶状体匀浆的上清液与等体积的加样缓冲液混匀,100℃ 加热 15min,-80℃ 贮存。样品制备后用 Bio-Rad DC 蛋白质检测法蛋白定量,然后加入上样缓冲液煮沸 10min,12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,取空白对照组、紫外线照射组、4 个实验组各 1 个样本,每孔槽内确保可加样品的蛋白总量相等,以蛋白质低相对分子质量 Marker 作为参照。正常对照组样本可多次加样以作标准参考。电泳完毕后蛋白转移至硝酸纤维素滤膜,50g/L 脱脂奶粉封闭液封闭膜,然后用兔抗鼠多克隆抗体 Caveolin-1 作用过夜,PBS 液洗脱后,与羊抗鼠 IgG-过氧化物酶二抗结合,洗膜,ECL 显影成像。显影后将所得蛋白质条带用 Quantity-one 软件进行定量分析。

统计学分析:采用 SPSS 17.0 统计学软件包对数据进行统计分析,统计方法采用秩和检验和单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 晶状体的混浊情况 空白对照组大鼠离体晶状体在培养的 48h 内均保持透明,透过晶状体的背景线清晰度高,紫外线照射组大鼠离体晶状体,随紫外线作用时间的延长,晶状体的混浊程度逐渐加重。不同浓度 TP 实验组晶状体混浊进展较 UV 组缓慢,在不同时间段的混浊程度均低于紫外线组。对 6,12,24 和 48h 的 6 组晶状体的照片进行计算机灰度分析并 Kruskal-Wallis 法进行秩和检验,其中 0.02 和 0.2mg/L TP 实验组与空白对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$);其余实验组与空白对照组相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。各实验组与紫外线照射组相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$,表 1)。说明 TP 可以抑制紫外线诱导的大鼠晶状体混浊进展,其中以浓度为 0.02 和 0.2mg/L 的 TP 作用较强。

2.2 晶状体上皮细胞 Caveolin-1 表达的结果 Caveolin-1 阳性表达于细胞膜和/或细胞质中。空白对照组中晶状体上皮细胞在 48h 内 Caveolin-1 阳性细胞数无显著性改变;紫外线照射组中的晶状体上皮细胞早期明显出现 Caveolin-1 表达减少,随着作用时间的延长,阳性细胞数也明显减少。各实验组中 Caveolin-1 阳性细胞数均比同时时间段的紫外线照射组多。对每个时间段各组之间晶状体上皮细胞 Caveolin-1 阳性表达率进行单因素方差分析,其中 0.02mg/L TP 实验组与空白对照组相比,差异无显著性($P > 0.05$);其余各实验组与空白对照组相比,差异均有显著性意义($P < 0.05$)。各实验组与紫外线照射组相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$,表 2)。说明 TP 可以抑制紫外线诱导大鼠晶状体上皮细胞中 Caveolin-1 表达的减少,其中以 0.02mg/L TP 的作用最强。

2.3 晶状体上皮细胞 Caveolin-1 量的变化 对不同时间段各组晶状体 Western-Blot 所得条带的灰度值进行单因素方差分析,不同时间段各实验组与紫外线照射组间相比,差异均有显著性意义($P < 0.05$)。12h 时,0.02mg/L TP 实验组与空白对照组相比,差异无显著性($P > 0.05$),而其余各时间段各实验组与空白对照组相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$),说明 12h 时,0.02mg/L TP 对晶状体上皮细胞中 Caveolin-1 作用最强(图 1)。

表1 各组大鼠离体晶状体不同时段相对灰度值的比较

分组	$\bar{x} \pm s$			
	6h	12h	24h	48h
正常	46.30 ± 6.72	42.68 ± 4.45	44.19 ± 5.34	43.67 ± 3.89
UV	34.78 ± 7.14	24.96 ± 5.03	17.83 ± 7.92	3.07 ± 4.13
紫外线照射 + TP 组				
0.02mg/L	47.17 ± 8.95	44.58 ± 6.76	41.21 ± 4.19	40.32 ± 5.46
0.2mg/L	44.29 ± 7.42	41.60 ± 5.12	37.92 ± 6.39	34.62 ± 4.60
2mg/L	40.53 ± 5.73	36.84 ± 7.55	29.57 ± 6.47	22.24 ± 4.95
20mg/L	38.27 ± 6.45	33.74 ± 5.18	23.83 ± 4.56	16.41 ± 3.82

表2 不同时段各组晶状体上皮细胞 Caveolin-1 阳性细胞数的变化

分组	$\bar{x} \pm s$			
	6h	12h	24h	48h
正常	76.81 ± 6.79	78.92 ± 5.58	71.53 ± 3.26	69.12 ± 5.67
UV	27.14 ± 4.36	22.92 ± 3.04	19.32 ± 3.37	0.00
紫外线照射 + TP 组				
0.02mg/L	73.30 ± 7.97	78.83 ± 7.72	67.36 ± 6.12	61.10 ± 2.83
0.2mg/L	62.19 ± 5.68	58.47 ± 8.13	53.12 ± 4.45	50.83 ± 2.56
2mg/L	51.92 ± 5.89	48.21 ± 2.95	42.21 ± 2.53	22.78 ± 3.50
20mg/L	43.60 ± 3.71	41.84 ± 2.87	36.58 ± 1.28	16.07 ± 3.74

表3 不同时间段各组大鼠晶状体 Caveolin-1 表达量的变化

分组	$\bar{x} \pm s$			
	6h	12h	24h	48h
正常	1.00	1.00	1.00	1.00
UV	0.884 ± 0.17	0.711 ± 0.09	0.617 ± 0.21	0.566 ± 0.16
紫外线照射 + TP 组				
0.02mg/L	0.985 ± 0.22	0.981 ± 0.16	0.961 ± 0.19	0.940 ± 0.25
0.2mg/L	0.959 ± 0.14	0.947 ± 0.23	0.922 ± 0.26	0.912 ± 0.15
2mg/L	0.911 ± 0.25	0.878 ± 0.15	0.804 ± 0.14	0.778 ± 0.21
20mg/L	0.864 ± 0.18	0.733 ± 0.11	0.752 ± 0.13	0.732 ± 0.18



图1 培养12h时TP对Caveolin-1表达量的影响 A:空白对照组;B:UV组;C:0.02mg/L TP;D:0.2mg/L TP;E:2mg/L TP;F:20mg/L TP。

3 讨论

研究表明,紫外线通过光氧化作用,可以诱导体内产生过量的活性氧自由基,首先攻击晶状体脂膜产生脂质过氧化反应,这是晶状体产生白内障的启动机制^[7]。脂筏是脂质双层内含有特殊脂质的蛋白质微区,具有参与胞吞胞饮、信号转导、运输胆固醇等重要功能^[8]。小窝是脂筏中最主要的一种类型,以 Caveolin 为特异性标志蛋白,存在于不同的细胞中,在许多物种晶状体上皮细胞中表达丰富^[9],具有调控晶状体上皮细胞及皮质纤维细胞质膜上的胆固醇分布^[10]、参与细胞膜物质转运^[11]、细胞间信号转导^[12]等作用,特别是在晶状体上皮细胞遭受氧化应激时,保护细胞免遭氧化损伤等方面发挥关键作用^[13,14]。

近年来,有关晶状体中 Caveolin 的研究逐步受到重视,邓亚玲等^[15]研究发现紫外线照射对鼠晶状体上皮细胞产生影响,并导致细胞 Caveolin-1 表达量减少,Caveolin-1 的减少在氧化性白内障的发生中有一定作用,Caveolin-1 在晶状体上皮细胞膜上的表达减少,推测

Caveolin-1 对维持白内障晶状体透明具有保护意义。

TP 作为一种天然的抗氧化剂,是从绿茶中提取的儿茶素类、黄酮类、酚酸类和花色素类化合物的总称。因其含酚性羟基,故极易发生氧化、聚合、缩合等变化,具有较好的抗氧化、清除自由基的能力,抗氧化能力是维生素 C 和 E 的 25 ~ 100 倍,且安全、无毒、用量少,另外,TP 还有增强机体免疫能力、抗肿瘤、延缓衰老等作用^[16-18]。本实验通过体外培养晶状体上皮细胞,使用不同深度 TP 进行干预,实验结果提示不同时段各组晶状体上皮细胞 Caveolin-1 阳性表达率和表达量的比较中,各实验组与紫外线对照组相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$),实验组晶状体上皮细胞阳性表达明显高于紫外线照射组,实验组的晶状体混浊程度也明显低于紫外线照射组,说明 TP 对紫外线诱导的晶状体上皮细胞 Caveolin-1 有较强的保护作用。其中 0.02mg/L TP 实验组与空白对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$);其余实验组与空白对照组相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$),表明 0.02mg/L TP 对 Caveolin-1 的保护作用最强。

本实验研究结果显示,TP 可通过抑制晶状体上皮细胞中 Caveolin-1 表达的减少来阻止氧化应激对晶状体上皮细胞的损伤,TP 对紫外线诱导的晶状体上皮细胞中 Caveolin-1 的表达具有保护作用,从而维持白内障晶状体的透明。本实验结果提示,TP 具有防治氧化损伤性白内

障的重要意义。但对于 TP 通过哪些途径进入眼内、如何发挥抗氧化作用、哪些有效成分起主要作用等问题,还有待进一步研究和探讨。

参考文献

- 1 Okuno T. Ultraviolet action spectrum for cell killing in a human lens epithelial cell line. *Industrial Health* 2007;45(1):137-142
- 2 Park JH, Han HJ. Caveolin-1 plays important role in EGF-induced migration and proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of PL3K/Akt and ERK. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;297(4):C935-C944
- 3 Krajewska WM, Maslowska I. Caveolins: structure and function in signal transduction. *Cell Mol Biol Lett* 2004;9(2):195-220
- 4 张志勇,姚克. 小窝及其在眼科中的研究进展. *国际眼科纵览* 2006;30(4):269-273
- 5 Dovrat A, Weinreb O. Recovery of lens optics and epithelial enzymes after ultraviolet A radiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:2417-2424
- 6 Zigman S, McDaniel T, Schultz JB, et al. Damage to cultured lens epithelial cells of squirrels and rabbits by UV-A (99.9%) plus UV-B (0.1%) radiation and alpha tocopherol protection. *Mol Cell Biochem* 1995;143(6):35246
- 7 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
- 8 Frank PG, Woodman SE, Park DD, et al. Caveolin, caveolae and endothelial cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(7):1161-1168
- 9 Zhang Z, Yao K, Jin C. Apoptosis of lens epithelial cells induced by high concentration of glucose is associated with a decrease in caveolin-1 levels. *Mol Vis* 2009;15(6):2008-2017
- 10 Rujoi M, Jin J, Borchman D, et al. Isolation and lipid characterization of cholesterol-enriched fractions in cortical and nuclear human lens fibers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(8):1634-1642
- 11 Lo WK, Zhou CJ, Reddan J. Identification of caveolae and their signature proteins caveolin 1 and 2 in the lens. *Exp Eye Res* 2004;79(4):487-498
- 12 Sexton PS, Neely AR, Cenedella RJ. Distribution of caveolin-1 in bovine lens and redistribution in cultured bovine lens epithelial cells upon confluence. *Exp Eye Res* 2004;78(12):75-82
- 13 Lin D, Takemoto DJ. Oxidative activation of protein kinase C gamma Through the Cl domain. Effects on gap junctions. *J Biol Chem* 2005;280(1):13682-13693
- 14 Berthoud VM, Beyer EC. Oxidative stress, lens gap junctions, and cataracts. *Antioxid Redox Signal* 2009;11(2):339-353
- 15 邓亚玲,鲁建华,张文芳. 小窝蛋白-1 mRNA 在紫外线诱导的大鼠白内障的晶状体中的表达及意义. *眼外伤职业眼病杂志* 2009;31(7):481-484
- 16 Hu Y, Cao JJ, Liu P, et al. Protective role of tea polyphenols in combination against radiation-induced haematopoietic and biochemical alterations in mice. *Phytother Res* 2011 [Epub ahead of print]
- 17 毕宏生,解孝锋,吴建峰,等. 茶多酚对高糖条件下大鼠晶状体上皮细胞线粒体活性氧的影响. *国际眼科杂志* 2008;8(12):2427-2430
- 18 Xu JY, Wu LY, Zheng XQ, et al. Green tea polyphenols attenuating ultraviolet B-induced damage to human retinal pigment epithelial cells *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(12):6665-6670