

茶多酚对 H₂O₂ 诱导大鼠晶状体上皮细胞中 NF-κB 表达的干预作用

门保成¹, 张 姝², 刘 丹¹

基金项目: 辽宁省自然科学基金 (No. 201102130)

作者单位:¹(121001) 中国辽宁省锦州市, 辽宁医学院附属第一医院眼科;²(125001) 中国辽宁省葫芦岛市, 锦西石化医院眼科
作者简介: 门保成, 硕士, 主治医师, 研究方向: 白内障发病机制和防治。

通讯作者: 刘丹, 硕士, 主任医师, 主任, 研究方向: 白内障发病机制和防治. sea1439_cn@sina.com

收稿日期: 2012-11-21 修回日期: 2013-02-28

Intervention of tea polyphenols to NF-κB expression on H₂O₂ - induced rat lens epithelial cells

Bao-Cheng Men¹, Shu Zhang², Dan Liu¹

Foundation item: Natural Science Foundation of Liaoning Province, China (No. 201102130)

¹Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China;²Department of Ophthalmology, Shihua Hospital of Jinxi, Huludao 125001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Dan Liu, Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China. sea1439_cn@sina.com

Received: 2012-11-21 Accepted: 2013-02-28

Abstract

• AIM: To observe the influence of tea polyphenols (TP) to NF-κB expression on the H₂O₂-induced lens epithelial cells.

• METHODS: SD rats transparent crystals were cultured *in vitro* by lens technology, and placed in a certain concentration of H₂O₂ in MEM medium. The experimental cataract lens model was established. Blank control group, H₂O₂ group and tea polyphenols (0.02mg/mL, 0.2mg/mL, 2mg/mL) treatment group were set and sampled at different time points (6, 12, 24, 48 hours). NF-κB mRNA expression was detected by RT-PCR, and NF-κB protein expression was detected by Western-blot in lens epithelial cells.

• RESULTS: H₂O₂ raised the expression of NF-κB, and appeared time-dependent manner ($P < 0.01$) in lens epithelial cells; different concentrations of tea polyphenols can inhibit the expression of NF-κB in lens epithelial cells, when TP concentration was 0.2mg/mL, the inhibitory effects was statistically significant ($P < 0.05$).

• CONCLUSION: TP can inhibit the expression of NF-κB in H₂O₂-induced lens epithelial cells, when TP concentration was 0.2mg/mL, the effect is statistically significant.

• KEYWORDS: cataract; tea polyphenols; oxidative damage; NF-κB; hydrogen peroxide

Citation: Men BC, Zhang S, Liu D. Intervention of tea polyphenols to NF-κB expression on H₂O₂-induced rat lens epithelial cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(3):434-437

摘要

目的: 建立离体 H₂O₂ 诱导的大鼠白内障模型, 并观察茶多酚 (tea polyphenols, TP) 对 H₂O₂ 诱导大鼠晶状体上皮细胞中 NF-κB 表达的影响。

方法: 采用离体晶状体培养技术, 在一定浓度 H₂O₂ 的 MEM 培养液中置入透明的 SD 大鼠晶状体, 建立实验性白内障晶状体模型。设置空白对照组、H₂O₂ 组和茶多酚 (0.02g/L, 0.2g/L, 2g/L) 处理组, 分别于不同时间点 (6, 12, 24, 48h) 取样, 应用 RT-PCR 检测晶状体上皮细胞中 NF-κB mRNA 表达, Western-blot 检测晶状体上皮细胞中 NF-κB 蛋白表达。

结果: H₂O₂ 上调晶状体上皮细胞中 NF-κB 的表达, 且呈时间依赖性 ($P < 0.01$); 不同浓度的茶多酚均可抑制晶状体上皮细胞中 NF-κB 的表达, 茶多酚浓度为 0.2g/L 时抑制效果最显著 ($P < 0.05$)。

结论: 茶多酚可抑制 H₂O₂ 诱导的晶状体上皮细胞中 NF-κB 的表达, 并且在茶多酚浓度为 0.2g/L 时抑制效果最明显。

关键词: 白内障; 茶多酚; 氧化损伤; 转录因子核因子-κB; 过氧化氢

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.03.04

引用: 门保成, 张姝, 刘丹. 茶多酚对 H₂O₂ 诱导大鼠晶状体上皮细胞中 NF-κB 表达的干预作用. 国际眼科杂志 2013;13(3): 434-437

0 引言

白内障是全球第一位的致盲眼病, 其发病机制目前尚不完全清楚, 在人类白内障眼的晶状体和房水中, H₂O₂ 的浓度相对较高。在离体培养的晶状体中发现, 活性氧自由基促使晶状体出现生物化学改变, 导致晶状体内的水不溶性蛋白增加, 发生白内障^[1,2]。研究证实, 在晶状体氧化损伤后的不同时期, 晶状体上皮细胞中转录因子核因子-κB (nuclear factor Kappa B, NF-κB) 的含量发生变化, 可能与白内障的发生有关。NF-κB 是一种广泛存

在并具有多向性调节作用的蛋白质分子,在细胞的信号传递和基因的诱导表达过程中起重要作用。Dudek 等^[3]检测 H₂O₂ 介导晶状体上皮细胞氧化应力中 NF- κ B 的激活和调节,发现用 H₂O₂ 处理过的晶状体上皮细胞 NF- κ B 被强烈激活,可见活性氧参与了激活 NF- κ B,该转录因子参与氧化刺激与损伤的过程^[4]。本实验使用抗氧化剂茶多酚(tea polyphenols, TP)对 H₂O₂ 诱导的晶状体上皮细胞进行干预,研究不同浓度茶多酚对 H₂O₂ 诱导的晶状体上皮细胞中 NF- κ B 表达的影响,为氧化损伤性白内障的防治寻找新的途径和理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 实验动物:正常成年 SD 大鼠 90 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:茶多酚(纯度 99.9%,上海恒远生物科技有限公司)、兔抗鼠 NF- κ B 多克隆抗体(Lab Vision 公司)、MEM 培养液(Hyclone 公司)、小牛血清(Hyclone 公司)、Trizol 液(Invitrogen 上海);逆转录试剂盒及荧光定量 PCR 试剂盒(TaKaRa,大连)、CO₂ 细胞培养箱、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、微量移液器,其它实验室常备器皿、耗材、普通生物化学试剂均为国产优质品。

1.2 方法

1.2.1 标本的处理 将大鼠颈椎脱臼处死后立即摘除取出双眼球,无菌无损伤条件下剥离出晶状体,放入每孔盛有 5mL MEM 培养液(含 10% 小牛血清、青霉素 100×10³ 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,选取培养基蛋白含量低且完全透明的晶状体用于实验,排除手术损伤或其它原因所致晶状体混浊(共 20 只晶状体)。

1.2.2 实验分组及方案 将筛选出的晶状体随机分为 5 组:(1)空白对照组:将筛选后的透明晶状体 32 只置于加过 5mL 培养液的 12 孔培养板内,每孔 1 个晶状体,每 12h 更换 1 次培养液,以保营养充足,置于 37℃,50mL/L CO₂ 培养箱内培养。每 8 个晶状体为一组,分别于 6,12,24,48h 时停止孵育,取标本进行检测。(2)H₂O₂ 组:于对照组的培养液中加入新鲜配置的 30mL/L H₂O₂ 5.1 μ L,使其终浓度为 0.9mmol/L,每 6h 另加 30mL/L H₂O₂ 4.1 μ L 以保持浓度相对恒定,其余处理同对照组。(3)茶多酚处理组:H₂O₂ 诱导白内障模型,同时加入不同浓度茶多酚提取液(0.02g/L,0.2g/L,2g/L)。每组选取 8 个晶状体,分别于 6,12,24,48h 取标本进行检测。

1.2.3 形态学观察及分析 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 6,12,24,48h 各组被检晶状体置于“+”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,对各组晶体相对灰度值进行统计学分析。

1.2.4 RNA 提取及 RT-PCR RT-PCR 方法检测各组中 NF- κ B mRNA 表达,按常规步骤进行操作,提取晶状体上皮细胞总 RNA 然后进行总量检测,提取的 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳,观察 18S 与 28S 条带,以条带清晰且 28S 亮度约为 18S 的二倍为最佳标准,同时测量 OD 值,计算

表 1 PCR 引物

引物	序列
NF- κ B 上游	5'-TGCCGAGTGAAACCGAAAC-3'
下游	5'-TGGTGCTCAGGGATGACG-3'
β -actin 上游	5'-AAATCGTCGTGACATTAA-3'
下游	5'-CTCGTCATACTCCTGCTTG-3'

OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值,逆转录酶介导的 cDNA 的合成;PCR 反应体系:采用 PCR 反应体系来检测各目的基因的表达情况。每次操作均经过 3 次重复,将 PCR 产物采用电泳的方法进行分离,UV 凝胶成像分析系统扫描测定 PCR 产物条带的密度,以 β -actin 为内对照,引物见表 1。

1.2.5 蛋白提取及 Western-Blot 取冻存晶状体前囊膜研磨成粉末(每组每个时间点各取 5 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 pH=7.4 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 90 μ L 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,取空白对照组和 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,5% 脱脂奶粉封闭液封闭膜,然后用兔抗鼠多克隆抗体 NF- κ B 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 软件系统进行定量分析。

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,数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计方法采用单因素方差分析,大鼠离体晶状体不同时段相对灰度值采用 Dunnett-t 检验。 $P < 0.05$ 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;H₂O₂ 组大鼠离体晶状体,随着时间的延长,晶状体的混浊程度逐渐加重(图 1)。茶多酚组晶状体混浊进展较 H₂O₂ 组缓慢,在不同时间段的混浊程度均低于 H₂O₂ 组。各实验组与空白对照组相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。其中茶多酚组与 H₂O₂ 组相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$,表 2)。说明茶多酚可以抑制 H₂O₂ 诱导的大鼠晶状体混浊的进展。

2.2 RT-PCR 检测 H₂O₂ 组晶状体上皮细胞 NF- κ B mRNA 表达 H₂O₂ 上调晶状体上皮细胞中 NF- κ B mRNA 表达,0h,6h,12h,24h,48h 分别为 0.541 \pm 0.18,0.612 \pm 0.287,0.693 \pm 0.67,0.962 \pm 0.412,0.943 \pm 0.314,呈时间依赖性,在 H₂O₂ 作用 24h 时,NF- κ B 表达上调最明显(图 2)。遂选定 24h 为后续实验时间点。

2.3 不同浓度茶多酚对晶状体上皮细胞中 NF- κ B 表达的影响 取 24h 作用时间点,将空白对照组、H₂O₂ 组、茶多酚处理组(0.02g/L,0.2g/L,2g/L)依次标记为组 1~组 5,可见 H₂O₂ 上调晶状体上皮细胞中 NF- κ B mRNA 表达,茶多酚可抑制晶状体上皮细胞中 NF- κ B 的表达,RT-PCR

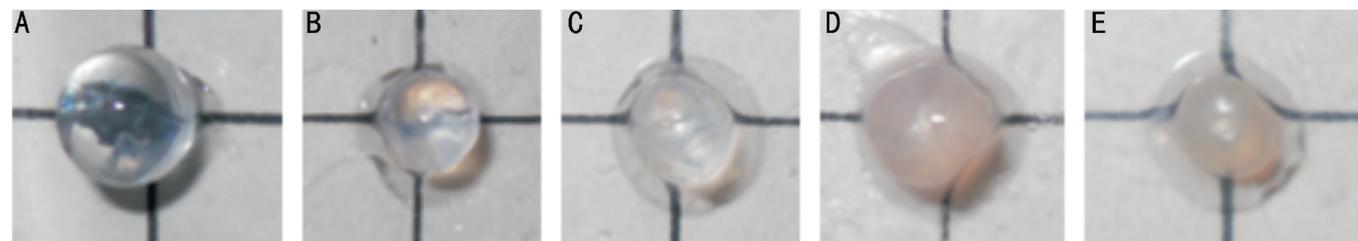


图1 H₂O₂组大鼠离体晶状体的混浊情况 A:0h;B:6h;C:12h;D:24h;E:48h。

表2 各组大鼠离体晶状体不同时段相对灰度值的比较 $\bar{x} \pm s$

分组	6h	12h	24h	48h
正常组	46.30±6.62	44.67±3.85	43.19±5.34	42.68±4.49
H ₂ O ₂ 组	35.78±6.14	26.96±5.33	18.83±7.92	13.57±4.03
TP(0.02g/L)	42.43±5.73 ^a	39.34±7.55 ^a	36.77±3.47 ^a	35.24±4.75 ^a
TP(0.2g/L)	45.19±8.75 ^a	43.58±5.76 ^a	42.31±4.29 ^a	40.82±5.35 ^a
TP(2g/L)	44.26±6.42 ^a	42.02±5.12 ^a	37.82±6.39 ^a	36.12±4.60 ^a

^aP<0.05 vs H₂O₂组。

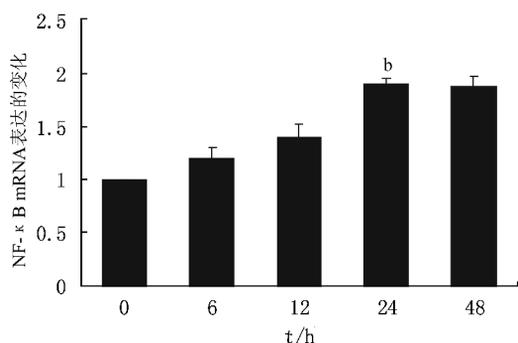


图2 RT-PCR检测H₂O₂组NF-κB mRNA表达 ^bP<0.01 vs H₂O₂作用0h。

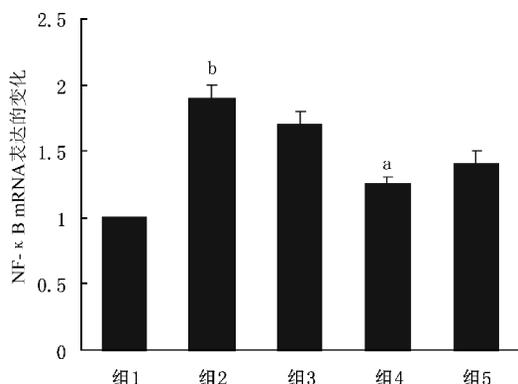


图3 RT-PCR检测NF-κB mRNA表达 ^aP<0.05 vs 组2; ^bP<0.01 vs 组1。

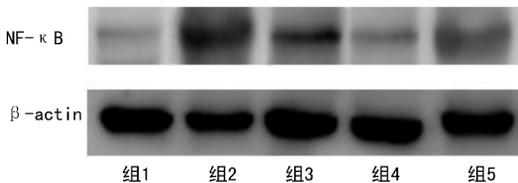


图4 Western-Blot检测NF-κB蛋白表达。

检测1~5组分别为0.522±0.214, 0.843±0.314, 0.756±0.287, 0.664±0.142, 0.692±0.203(图3)。Western-blot检测1~5组分别为0.487±0.112, 0.924±0.176, 0.731±0.214, 0.521±0.108, 0.634±0.129, 在茶多酚浓度为0.2g/L时抑制效果最显著;与组1相比,组2中NF-κB蛋白表达明显上调(P<0.01),与组2相比,组4中NF-κB蛋白表达下调最明显(P<0.05,图4)。

3 讨论

白内障的发病机制较为复杂,自由基引起晶状体的氧化损伤及生化改变越来越受到人们的重视,氧自由基在晶状体的氧化修饰过程中起重要的作用^[5],过氧化氢(H₂O₂)能够产生氧自由基,如:超氧阴离子(O₂⁻)、羟自由基(OH·)等,它们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^[6]。NF-κB首次由Sen等在1986年从B淋巴细胞核的抽提物中检测到,后有研究表明其是一种广泛存在并具有多向性调节作用的蛋白质分子,在细胞的信号传递和基因的诱导表达过程中起重要作用,活性氧参与激活NF-κB,即该转录因子参与了氧化刺激与损伤的过程;所以NF-κB在晶状体的氧化损伤及白内障的发生发展中发挥着重要作用。

茶多酚是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^[7]。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、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^[8,9]。本实验通过体外培养晶状体上皮细胞,H₂O₂诱导使其造成氧化损伤,同时使用不同浓度茶多酚进行干预。实验结果提示H₂O₂对晶状体上皮细胞中NF-κB的表达产生了上调作用,且呈时间依赖性,在H₂O₂作用24h后NF-κB的表达上调最明显。同时还提示了不同浓度的茶多酚均可抑制晶状体上皮细胞中NF-κB的表达,当茶多酚浓度为0.2g/L时抑制效果最为显著。

本实验研究结果显示,H₂O₂可诱导晶状体上皮细胞中NF-κB的表达升高,而茶多酚则可抑制晶状体上皮细胞中NF-κB的表达,进而阻止氧化应激对晶状体上皮细胞的损伤。茶多酚对维持白内障晶状体的透明可发挥重要作用。当前药物防治白内障已成研究热点,临床上已有许多治疗白内障的药物在使用,但疗效均欠佳^[10],所以本实验结果提示茶多酚具有防治氧化损伤性白内障的重要作用。这为临床防治白内障药物的研究提供了重要依据,但至于茶多酚中又有哪些主要的成分在发挥着关键性的作用,它们通过哪些途径能更好地进入眼内,并能充分地发挥抗氧化作用,这一系列的问题还有待于进一步研究和探讨。

参考文献

1 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;25(12):1761-1769
2 Singh M, Sharma H, Singh N. Hydrogen peroxide induces apoptosis in HeLa cells through mitochondrial pathway. *Mitochondrion* 2007;7(6):367-373
3 Dudek EJ, Shang F, Taylor A. H₂O₂-mediated oxidative stress activates NF-kappa B in lens epithelial cells. *Free Radic Biol Med* 2001;31(5):651-658
4 吕晓霞, 庞东渤. NF-κB 与白内障的研究进展. 眼科新进展 2007;27(6):475-478
5 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

6 Yal 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
7 朱桂勤, 李建科. 茶多酚的功能研究进展. 食品研究与开发 2005;26(1):33-35
8 Yan H, Wang J, Liu B, *et al.* Protective effect of aspirin against dexamethasone-induced cataract in cultured rat lens. *Ophthalmic Res* 2006;38(5):303-308
9 Kador PF, Inoue J, Blessing K. Anticataract activity of analogs of a sorbitol dehydrogenase inhibitor. *J Ocul Pharmacol Ther* 2004;20(4):333-344
10 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

国际眼科杂志 (IJO) 与国际眼科理事会 (ICO) 正式建立合作关系

本刊讯 《国际眼科杂志》自2000年创刊以来,得到了国际眼科理事会(ICO)的宝贵指导和大力支持。时任国际眼科理事会主席 Prof. G O H Naumann 和现任主席 Prof. Bruce E Spivey 先后应邀出任本刊总顾问。Prof. G O H Naumann 曾提议本刊开设 International Corner, 及时报道全球眼科的信息。特别是《国际眼科杂志》英文版正式创刊并被 SCI expanded 和 PubMed 及 PubMed central 收录后,引起了国际眼科理事会的高度关注。最近本刊胡秀文总编向国际眼科理事会主席 Prof. Bruce E Spivey 汇报了 International Journal of Ophthalmology(IJO) 近况,并提出与 ICO 建立实质性的友好合作关系。Prof. Bruce E Spivey 等 ICO 领导对此特别感兴趣并高度重视。从2013年初开始,IJO 每期将安排5~10页码发表 ICO 有关信息及资料,并在 IJO 网站(www.ijo.cn)开设 ICO 专栏,利用本刊网站与 Web of Science(ISI)和 PubMed 及 PubMed central 等国际重要网站相互链接的优势,作为 ICO 的辅助媒体,让 ICO 的信息传播得更快更广,同时更便于让 IJO 读者及时了解全球眼科信息。