

# 白藜芦醇对紫外线诱导人晶状体上皮细胞氧化损伤的保护作用

陈雪芳<sup>1</sup>, 刘忠鑫<sup>1</sup>, 陈炳荣<sup>1</sup>, 刘平<sup>2</sup>, 郑轶<sup>2</sup>

**基金项目:**国家自然科学基金(No. 30973275); 黑龙江省青年科学基金(No. QC2011C131)

**作者单位:**<sup>1</sup>(572000) 中国海南省三亚市人民医院眼科;  
<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:**陈雪芳, 女, 主治医师, 研究方向: 角膜病、白内障。

**通讯作者:**郑轶, 博士, 副主任医师, 研究方向: 白内障。

cao770717@163.com

收稿日期: 2013-03-14 修回日期: 2013-05-10

## The protective effect of resveratrol on human lens epithelial cells against ultraviolet-induced apoptosis

Xue-Fang Chen<sup>1</sup>, Zhong-Xin Liu<sup>1</sup>, Bing-Rong Chen<sup>1</sup>, Ping Liu<sup>2</sup>, Yi Zheng<sup>2</sup>

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (No. 30973275); Heilongjiang Province Youth Science Foundation, China (No. QC2011C131)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, People's Hospital of Sanya, Sanya 572000, Hainan Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

**Correspondence to:** Yi Zheng. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. cao770717@163.com

Received: 2013-03-14 Accepted: 2013-05-10

## Abstract

• **AIM:** To investigate the protective effect of resveratrol on human lens epithelial cells against ultraviolet-induced apoptosis.

• **METHODS:** Subcultured human lens epithelial cell line, ultraviolet induced cell apoptosis, 20 μmol/L resveratrol pretreated cell, the indicators change was observed: rate of apoptosis was detected by flow cytometry and apoptosis-related factors of caspases-3 and caspase-9 were detected by colorimetric detection, ultrastructure changes were observed under transmission electron microscope.

• **RESULTS:** Flow cytometry instrument testing found that resveratrol can suppress the apoptosis induced by ultraviolet irradiation, caspases-3 and caspase-9 content in positive control group were significantly higher than that of the negative control group at the same time period, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ); caspases-3 and caspase-9 content in experimental

group were lower than that in the positive control group at the same time, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). In addition, the damage of human lens epithelial cells was alleviated with the incubation time of resveratrol elongated.

• **CONCLUSION:** Resveratrol may inhibit ultraviolet-induced apoptosis of human lens epithelial cells, it has preventive function against radioactive cataract, and it can provide reliable evidence for pursuing effective medicine to prevent and treat cataract.

• **KEYWORDS:** resveratrol; ultraviolet light; human lens epithelial cells; apoptosis

**Citation:** Chen XF, Liu ZX, Chen BR, *et al.* The protective effect of resveratrol on human lens epithelial cells against ultraviolet-induced apoptosis. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(6):1073-1076

## 摘要

**目的:**探讨白藜芦醇对紫外线诱导人晶状体上皮细胞氧化损伤的保护作用。

**方法:**人晶状体上皮细胞系传代培养, 紫外线诱导细胞发生凋亡, 20 μmol/L 白藜芦醇预处理细胞后, 观察各项指标改变: 流式细胞仪检测细胞凋亡率, 比色法检测凋亡相关因子 caspase-3 及 caspase-9 的表达, 透射电镜观察超微结构变化。

**结果:**流式细胞仪检测发现, 白藜芦醇可以抑制紫外线照射诱导的细胞凋亡, 阳性对照组中 caspase-3 及 caspase-9 含量显著高于同时段阴性对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 实验组中 caspase-3 及 caspase-9 含量均低于同时段阳性对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。此外, 伴随白藜芦醇作用时间的延长, 透射电镜下人晶状体上皮细胞损伤的程度减轻。

**结论:**白藜芦醇可以抑制紫外线诱导的晶状体上皮细胞的凋亡, 对放射性白内障具有预防作用, 从而为寻求有效的防治白内障药物提供可靠的实验依据。

**关键词:**白藜芦醇; 紫外线; 晶状体上皮细胞; 凋亡

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.06.03

**引用:**陈雪芳, 刘忠鑫, 陈炳荣, 等. 白藜芦醇对紫外线诱导人晶状体上皮细胞氧化损伤的保护作用. 国际眼科杂志 2013;13(6):1073-1076

## 0 引言

白内障形成的病因很多, 其中, 紫外线辐射是主要因素。白内障的有效治疗方法是手术治疗, 但是由于术中及术后的风险性、并发症以及由此而引起的经济问题, 很多人仍在为白内障寻求有效的药物治疗以阻止和延缓其

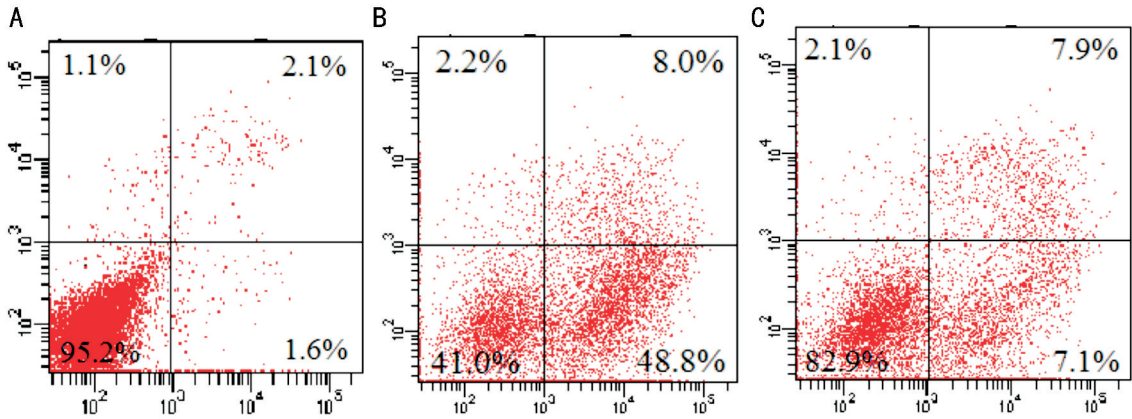


图1 白藜芦醇对氧化损伤致 HLEC 凋亡的抑制作用 A: 阴性对照组; B: 氧化损伤组; C: 20 $\mu$ mol/L 白藜芦醇组。

进展。因此,针对白内障的发病机制而研发的抗白内障药物研究正日渐成为当前国内外研究的热点。白藜芦醇(Resveratrol, RES),化学名为(E)-5-[2-(4-羟苯基)-乙烯基]-1,3-苯二酚;3,4',5-三羟基芪(3,4',5-trihydrolystil-bene),分子式为(C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>),是一种非黄酮类多酚化合物,已有研究发现它具有强大的抗氧化和清除自由基能力<sup>[1-3]</sup>。本实验通过体外制备紫外线诱导人晶状体上皮细胞(human lens epithelial cells, HLEC)损伤模型,进一步研究 RES 对晶状体氧化损伤的保护作用,从而为氧化损伤性白内障提供了新的研究方向。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

白藜芦醇(Sigma 公司,纯度为 95%),用 2mL/L DMSO(上海生物工程有限公司)溶解后配制成 20 $\mu$ mol/L 溶液 4 $^{\circ}$ C 保存待用,胎牛血清,DMEM 培养基干粉(美国 Gibco 公司),caspase-3, caspase-9 试剂盒(南京建成生物工程研究所),Annexin V FITC/PI(美国 BD 公司),流式细胞仪(美国 BD FACScan),紫外线交联仪(美国 SP 公司),超净工作台(苏州安泰空气技术公司),CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 ThermoForma 公司)。

### 1.2 方法

每项实验方法至少重复 3 次。

#### 1.2.1 人晶状体上皮细胞的培养

使用 DMEM 培养基和 200mL/L 胎牛血清,内含青霉素 100U/mL、链霉素 100 $\mu$ g/mL,将 HLEC 置于 37 $^{\circ}$ C,体积分数 50mL/L CO<sub>2</sub> 培养箱内培养,每 2d 换液 1 次,细胞生长至近融合状态时,用 1g/L 胰蛋白酶消化、传代。

#### 1.2.2 细胞分组

人晶状体上皮细胞接种于 96 孔培养板后,采用完全随机设计分组法分为以下 3 组:(1)阴性对照组:以正常培养液培养。(2)阳性对照组(即氧化损伤组):以正常培养液培养。(3)白藜芦醇组:20 $\mu$ mol/L 白藜芦醇预处理细胞 1h+正常培养液培养。将阳性对照组及白藜芦醇组的晶状体上皮细胞置于紫外线垂直光源下方 70cm 处,撤去培养板盖,照射 30min;将阴性对照组置于同室同条件无紫外线照射下 30min,然后将晶状体放入培养箱中继续培养,分别于 6, 12, 24h 后进行相应检测。

#### 1.2.3 紫外线照射方法

紫外灯光谱范围 315~365nm,强度为 0.8mW/cm<sup>2</sup>,取对数生长期的细胞,照射前将培养液吸净,用 PBS 冲洗 2 次,置于紫外光源下 50cm 处,打开培养皿盖,照射时间为 0.5h,将阴性对照组置于同室同条件无紫外线照射下照射 0.5h。

#### 1.2.4 细胞凋亡检测

各组晶状体上皮细胞接种于六孔

板,经过相应处理后,用 1g/L 胰酶消化并收集细胞,制备细胞悬液。1000r/min 离心弃上清液,洗涤收集细胞,在冰浴中避光进行下述操作:用 Annexin V-FITC 试剂盒中 binding buffer 悬浮细胞,调节细胞浓度为 5 $\times$ 10<sup>4</sup>/L,取上述细胞分别按试剂盒说明,加入 Annexin 和 PI,混匀后孵育 20min,于 1h 内用流式细胞仪检测细胞凋亡。

#### 1.2.5 caspase 活性检测

20 $\mu$ mol/L 白藜芦醇预处理细胞 1h 后,置于紫外线照射下分别照射 6, 12 和 24h。用 1g/L 胰酶消化后,1000r/min 离心 10min,弃上清液,收集细胞 PBS 洗 2 次,每份样品加 30 $\mu$ L 细胞裂解液,冰上孵育 20min,10000r/min 离心 10min,进行 caspase 活性检测。按下式求得 caspase 活性 = OD<sub>405nm</sub>/OD<sub>595nm</sub>。检测方法和所用试剂均按南京建成生物工程研究所生产的试剂盒进行。

#### 1.2.6 透射电子显微镜观察晶状体超微结构的变化

将细胞投入到体积分数 25mL/L 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 超薄切片机制片,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并照相记录发生细胞凋亡的情况。

统计学分析:采用统计软件包 SPSS 13.0 统计,所得实验资料均以均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示,采用方差分析,P<0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 白藜芦醇对氧化损伤致 HLEC 凋亡的抑制作用

阳性对照组 HLEC 凋亡率显著高于阴性对照组,实验结果表明紫外线可以导致晶状体上皮细胞凋亡的发生。经 20 $\mu$ mol/L 白藜芦醇处理后,其凋亡率呈下降趋势(图 1)。

### 2.2 白藜芦醇对紫外线致晶状体上皮细胞氧化损伤 caspase-3 及 caspase-9 活性的影响

阳性对照组晶状体上皮细胞内 caspase-3, caspase-9 活性明显增加,与相同作用时间点的阴性对照组比较差异极具显著意义(P<0.01)。经 20 $\mu$ mol/L 白藜芦醇处理后,可见 caspase-3, caspase-9 表达量下降(表 1)。

### 2.3 电镜观察结果

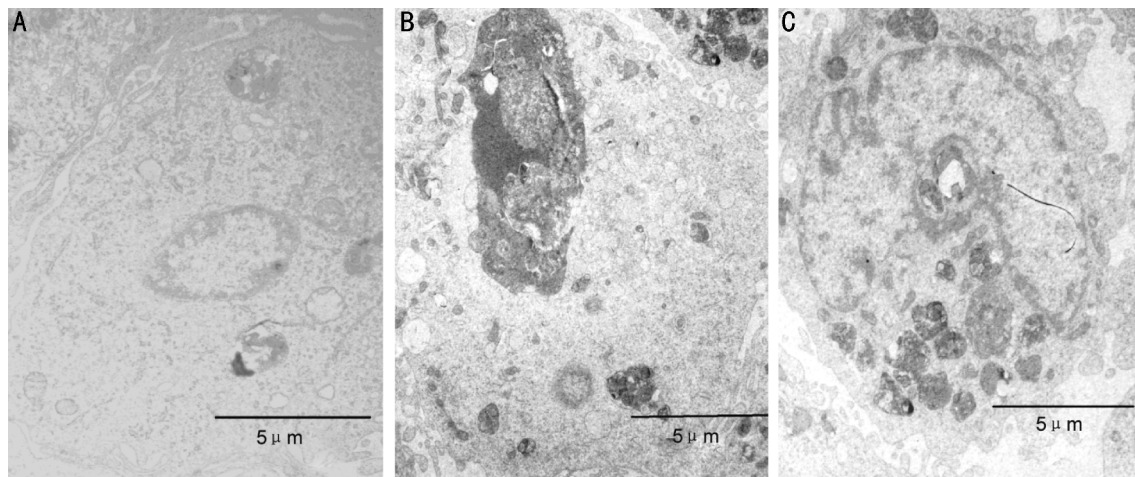
空白对照组晶状体上皮细胞胞膜结构清晰,细胞排列致密,可见细胞之间紧密联接,细胞内核仁清晰呈圆形或椭圆形,核膜连续(图 2A);而紫外线诱导的晶状体上皮细胞形态欠规则,细胞间指状突起减少,晶状体上皮细胞间隙变大,染色质不均匀,胞质内线粒体空泡变性,核固缩尤为明显(图 2B);与氧化损伤组相比较,20 $\mu$ mol/L 白藜芦醇处理组晶状体上皮细胞超微结构损害程度减轻(图 2C)。



表1 各组人晶状体上皮细胞内 caspase-3 及 caspase-9 含量

( $\bar{x} \pm s$ , U/mL)

组别	caspase-3			caspase-9		
	6h	12h	24h	6h	12h	24h
阴性对照组	67.35±1.28	62.83±1.04	62.00±1.51	96.51±1.89	93.37±1.83	97.23±1.83
阳性对照组	114.00±2.31 <sup>b</sup>	126.55±3.00 <sup>b</sup>	115.38±2.95 <sup>b</sup>	136.80±3.41 <sup>b</sup>	156.95±2.95 <sup>b</sup>	108.70±3.91 <sup>b</sup>
白藜芦醇组	89.87±2.41 <sup>c</sup>	91.49±2.57 <sup>d</sup>	109.60±1.45 <sup>d</sup>	98.07±3.54 <sup>c</sup>	111.00±3.26 <sup>d</sup>	122.60±1.66 <sup>d</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 阴性对照组, <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 阳性对照组。图2 透射电镜观察晶状体上皮细胞超微结构的改变( $\times 30000$ ) A:阴性对照组;B:阳性对照组;C:20 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇组。

### 3 讨论

白内障的诱发因素很多,紫外线辐射是重要原因之一<sup>[4-6]</sup>。紫外线辐射所致白内障的发生机制尚不十分清楚,有研究认为紫外线对晶状体的损伤主要与氧化损伤有关,而氧化损伤是凋亡的重要诱发因素之一<sup>[7-9]</sup>。当紫外线照射晶状体时,可使其发生光化学反应,光解上皮细胞并产生大量的氧自由基(例如 $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{O}_2\cdot^-$ ),这些氧自由基很容易诱发细胞凋亡<sup>[10]</sup>。本研究结果显示,正常 HLEC 给予紫外线照射后,细胞凋亡率明显上升,说明氧化损伤可以诱导细胞凋亡的发生,而给予白藜芦醇处理后,凋亡得到了抑制,且呈浓度依赖性。进而证实该药物可以在一定程度上抑制紫外线诱导的细胞凋亡。

凋亡是各种非先天性白内障形成的共同细胞学基础<sup>[11]</sup>,紫外线照射后可引起晶状体上皮细胞内相关基因的差异表达,从而引起细胞一系列变化,最终导致白内障的发生<sup>[12]</sup>。此外,氧自由基会损伤线粒体膜,引起线粒体膜内外一系列的生化改变,包括释放细胞色素 C,活化 caspase 蛋白酶家族,从而启动线粒体信号通路诱导细胞凋亡。而 caspase-3 和 caspase-9 是细胞凋亡的必经之路<sup>[13,14]</sup>。本实验结果显示,紫外线照射后,晶状体上皮细胞内 caspase-3 及 caspase-9 的活性明显增强,并且随紫外线照射时间的延长而逐渐增加。因此,提示紫外线通过 caspases 途径参与氧化损伤的病理生理过程,诱导并促进了晶状体上皮细胞的凋亡。

氧自由基还会损伤细胞膜及细胞器,导致细胞结构损伤<sup>[15]</sup>。图 2A 可见正常晶状体上皮细胞形态规则,细胞排列致密,细胞膜结构清晰,染色质均匀。而紫外线诱导的晶状体上皮细胞形态欠规则,上皮细胞间隙变大,染色质不均匀,出现核固缩(图 2B)。白藜芦醇处理组与紫外线

损伤组比较,可见细胞损伤程度减轻(图 2C),从而进一步验证了白藜芦醇对紫外线照射引起的人晶状体上皮细胞凋亡的防护作用。

本研究发现,紫外线照射可导致晶状体上皮细胞大量凋亡,而预先加入白藜芦醇培养后,可明显抑制晶状体上皮细胞内凋亡因子的产生,改善细胞形态,而且这种药物对细胞的保护作用呈剂量及时间依赖性。

综上所述,本研究证实白藜芦醇对紫外线诱导的晶状体上皮细胞的凋亡具有一定的抑制作用。并从细胞凋亡角度出发,初步探讨了其可能存在的机制,为白藜芦醇防治此类疾病提供了部分理论和实验基础。希望通过对白内障发病机制更深入的研究,通过药物抑制凋亡,为白内障的临床治疗提供一种新的有效的药物。

#### 参考文献

- Soufi FG, Mohammad-Nejad D, Ahmadi H. Resveratrol improves diabetic retinopathy possibly through oxidative stress nuclear factor  $\kappa\text{B}$  apoptosis pathway. *Pharmacol Rep* 2012;64(6):1505-1514
- King RE, Kent KD, Bomser JA. Resveratrol reduces oxidation and proliferation of human retinal pigment epithelial cells via extracellular signal-regulated kinase inhibition. *Chem Biol Interact* 2005; 151(2):143-149
- Jang JH, Surh YJ. Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Mutat Res* 2001; 496(1-2):181-190
- Hu CC, Liao JH, Hsu KY, et al. Role of pirenixine in the effects of catalin on *in vitro* ultraviolet induced lens protein turbidity and selenite induced cataractogenesis *in vivo*. *Mol Vis* 2011;17:1862-1870
- Mansour AM, Ghabra M. Cataractogenesis after Repeat Laser *in situ* Keratomileusis. *Case Rep Ophthalmol* 2012;3(2):262-265
- Kronschläger M, Galichanin K, Ekström J, et al. Protective effect of the thioltransferase gene on *in vivo* UVR-300 nm induced cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;25;53(1):248-252

7 Cotter MA, Thomas J, Cassidy P, et al. N-acetylcysteine protects melanocytes against oxidative stress/damage and delays onset of ultraviolet-induced melanoma in mice. *Clin Cancer Res* 2007;13(19):5952-5958

8 Jia Z, Song Z, Zhao Y, et al. Grape seed proanthocyanidin extract protectknknknks human lens epithelial cells from oxidative stress via reducing NF- $\kappa$ B and MAPK protein expression. *Molecular Vis* 2011;17:210-217

9 Jun HO, Kim DH, Lee SW, et al. Clusterin protects H9c2 cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis via Akt/GSK-3 $\beta$  signaling pathway. *Exp Mol Med* 2011;43(1):53-61

10 胡建章. 自由基与白内障的关系研究进展. 国外医学:眼科学分册 2003;27(1):45-49

11 Zhang L, Yan Q, Liu JP, et al. Apoptosis: its functions and control in the ocular lens. *Curr Mol Med* 2010;10(9):864-875

12 Tang X, Yao K, Zhang L, et al. Honokiol inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in human lens epithelial cells via inhibition of the mitogen-activated protein kinase and Akt pathways. *Eur J Pharmacol* 2011;650(1):72-78

13 贾松柏,石晶明,陈翮,等. UV对HLEC凋亡的诱导. 中国现代医学杂志 2012;22(21):23-25

14 Wolf BB, Green DR. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 1999;274(29):20049-20052

15 Ryter SW, Choi AM. Regulation of autophagy in oxygen-dependent cellular stress. *Curr Pharm Des* 2013;19(15):2747-2756

## 科技论文中三线表的要求

三线表是科技期刊常用的表格形式。通常有三条线,即顶线、底线和栏目线(特殊情况可添加辅助线)组成。

三线表是由表序、表题、栏目、表身及表注组成的有机联系的统一体,每一组成部分都在表述表格的内容中发挥作用。表序即表格的序号。表序按表格在文中出现的先后顺序进行编排。表题指表格的名称。表题应能反映表的主题,简明扼要,起到画龙点睛的作用。每个表格必须有表序和表题,排在顶线之上,通常为左对齐,按表格在正文中出现先后为序。

**1 表格内容** 表中主语是指所要说明的事物分组、类型、时间、地点等多为文字,谓语是指所要说明事物的指标,如例数、百分数、平均数、构成比等多为数字,主、谓语应连贯为一句完整、通顺的句子。根据阅读习惯主语列在表的左侧,为竖标目,谓语列在表的右侧,即为横标目。有的作者不注意主、谓语的位置设计,将谓语置于左,主语置于其右,使栏目设计颠倒,表中数据横向排列,这种主、谓语位置和数据排列的错误,既使读表费力,又使本来可比性较强的资料不便比较,读者难以从中找出变化规律。因此,应按照同类数据纵排的原则安排主、谓语的位置。

**2 关于表身** 三线表内底线以上,栏目线以下部分为表身。书写表身注意以下:(1)表身内的数字一般不带单位,百分数也不带百分号(%),应把单位符号和百分号等归并在栏目或表格的右上角。(2)表身中同一栏的数据应以小数点或(±)对齐,原则上表格内的有效位数保持一致。(3)表身中无数字的栏,根据规定:空白代表为未测定或无此项,而“-”或“…”代表未发现,而“0”则代表实测结果为零。

**3 表注** 注释是对内容的补充说明,如表题、标目或某个数据需注释时,可在其右上角加注释符号,并在表下用相同的符号加注相应的文字。对表需作附加说明者,可在表下加“注:……”句末不用标点。表内的注释符号与表下的标注对应,不能单独存在。

(本刊编辑部)