

褪黑素对过氧化氢诱导晶状体上皮细胞氧化损伤的保护作用

董天睿¹, 刘平², 倪锦红¹

基金项目:国家自然科学基金(No. 30973275)

作者单位:(150001)中国黑龙江省哈尔滨市,哈尔滨医科大学附属第一医院¹ 妇科;² 眼科

作者简介:董天睿,毕业于哈尔滨医科大学,本科,护师。

通讯作者:倪锦红,毕业于哈尔滨医科大学,本科,主管护师。

bee21212@163.com

收稿日期:2015-01-15 修回日期:2015-04-17

Study of melatonin on the protective effect of hydrogen peroxide - induced oxidative damage in human lens epithelial cells

Tian-Rui Dong¹, Ping Liu², Jin-Hong Ni¹

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

¹Department of Gynecology;²Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Jin-Hong Ni. Department of Gynecology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. bee21212@163.com

Received: 2015-01-15 Accepted: 2015-04-17

Abstract

• AIM: To investigate the protective effect of melatonin against hydrogen peroxide (H_2O_2) - induced oxidative damage to human lens epithelial cells.

• METHODS: Sub-culture human lens epithelial cells preprocessed with different concentrations of melatonin for 12h and then $100 \mu\text{mol/L } H_2O_2$ for 24h. The impact of melatonin on H_2O_2 - induced lens epithelial cell viability was detected by MTT assay, rate of apoptosis was detected by flow cytometry instrument and activity of apoptosis-related factors, Caspase-3 and Caspase-9, were detected by colorimetric method.

• RESULTS: MTT assay showed that melatonin had no effect on the activity of lens epithelial cells, and the drug can inhibit the decrease of H_2O_2 - induced cell activity, as well as flow cytometry showed that melatonin can inhibit H_2O_2 - induced apoptosis. In addition, melatonin can also reduce H_2O_2 - induced Caspase-3 and Caspase-9 activity in lens epithelial cells, and their activity decreased with effect of melatonin along with extending time.

• CONCLUSION: Melatonin can obviously inhibit H_2O_2 -

induced apoptosis of human lens epithelial cells, which provide reliable experimental basis for drug on treatment of cataract.

• KEYWORDS: melatonin; human lens epithelial cells; oxidative damage

Citation: Dong TR, Liu P, Ni JH. Study of melatonin on the protective effect of hydrogen peroxide-induced oxidative damage in human lens epithelial cells. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2015; 15(5):764-766

摘要

目的:探讨褪黑素对过氧化氢诱导晶状体上皮细胞氧化损伤的保护作用。

方法:晶状体上皮细胞传代培养后,分别加入不同浓度褪黑素预处理12h后,加入 $100 \mu\text{mol/L } H_2O_2$ 继续孵育24h,MTT比色法检测褪黑素对 H_2O_2 诱导的晶状体上皮细胞活力的影响,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的活性。

结果:MTT结果显示褪黑素对晶状体上皮细胞活性无影响,该药物可以抑制过氧化氢诱导的细胞活性的下降,流式细胞计数结果显示褪黑素可以抑制过氧化氢诱导的细胞凋亡,此外,褪黑素还可以减少过氧化氢所致晶状体上皮细胞内Caspase-3及Caspase-9的活性,并且,伴随褪黑素作用时间的延长其活性呈下降趋势。

结论:褪黑素可以明显抑制过氧化氢诱导的晶状体上皮细胞的凋亡,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:褪黑素;晶状体上皮细胞;氧化损伤

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.5.05

引用:董天睿,刘平,倪锦红.褪黑素对过氧化氢诱导晶状体上皮细胞氧化损伤的保护作用.国际眼科杂志2015;15(5):764-766

0 引言

褪黑素(melatonin, MLT)化学名为N-乙酰基-5-甲氧基色胺,主要由松果体合成和分泌,产生后进入血液循环可调节睡眠,是生物体内普遍存在的一种吲哚类激素^[1]。MLT具有抗炎、抗氧化、抗癌等多种生物活性,可用于预防及治疗乳腺癌、胃癌、肺癌、皮肤癌、结肠癌、肝癌等,对肿瘤的发生具有抑制作用。MLT作为体内的天然抑瘤激素,其抗肿瘤机制可能与直接抑制肿瘤增殖、增强免疫力及抗氧化作用有关^[2]。MLT本身就是一种有效的抗氧化剂,此外,它还能提高多种抗氧化酶的活性并清除自由基,保护细胞免受氧化应激及氧自由基攻击。晶

状体上皮细胞(human lens epithelium cells, HLECs)是排列于晶状体前囊膜的单层上皮细胞,在维持晶状体内环境稳定方面起着关键作用^[3]。HLECs在代谢过程中以及各种外部因素的作用下可以不断产生自由基,自由基攻击细胞膜引起细胞骨架发生改变,胞膜脂质发生过氧化损伤,导致细胞内蛋白质变性,所以,晶状体上皮细胞发生氧化损伤,是白内障形成的一个重要原因^[4]。本实验通过配置不同浓度的 MLT 并使其作用于氧化损伤的 HLECs,借助 MTT 测定细胞活性、流式细胞计数检测其对细胞凋亡的抑制作用及细胞内 Caspase-3, Caspase-9 水平的观察来研究 MLT 对 HLECs 的保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料 MLT(Sigma 公司,纯度为 95%) ,用体积分数 0.2% DMSO(上海生物工程有限公司)溶解后分别配成相应浓度溶液,4℃避光保存待用,超净工作台(苏州安泰空气技术公司),酶标仪(上海雷勃分析仪器有限公司),CO₂培养箱(美国 Thermo Forma 公司),流式细胞仪(美国 B-D FACScan), Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(美国 BD 公司),DMEM 培养基(美国 Gibco 公司),胎牛血清(美国 Gibco 公司),Caspase-3, Caspase-9 试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.2 方法

1.2.1 HLECs 的分离和培养 HLECs 细胞系 B-3 购自于美国细胞库(ATCC)并培养于含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,内含青霉素 100×10³ U/L,链霉素 100×10³ U/L,将 HLECs 置于 37℃,含体积分数 5% CO₂培养箱内培养,每 2d 换液 1 次,细胞生长至近融合状态时,用 0.1% 胰蛋白酶消化、传代。

1.2.2 MLT 对 HLECs 活力的影响 为了检测 MLT 对 HLECs 活力是否存在潜在影响,我们先进行 MTT 活力的检测。HLECs 接种于 96 孔板(细胞密度 5×10⁴/L,每孔 120 μL)培养 24h 后,分别加入不同浓度(0, 10⁻⁸, 10⁻⁶, 10⁻⁴ mol/L) MLT,继续观察 24h, MTT 法检测细胞活力。具体方法如下:向各孔细胞中加入 20 μL MTT(5g/L),培养 4h 后弃去培养液,加入 150 μL DMSO 溶液,室温下用微量振荡器振荡 10min 后于酶标仪测定 492nm 的光密度值。HLECs 的存活率=(各组细胞光密度值/正常组细胞光密度值)×100%。

1.2.3 细胞分组 将 HLECs 分为以下 4 组:(1) 阴性对照组:以正常培养液培养。(2) H₂O₂ 模型组(氧化损伤组):除上述培养液外,加入浓度为 100 μmol/L 的 H₂O₂,制备氧化损伤模型。(3) MLT 组:10⁻⁸, 10⁻⁴ mol/L MLT 预处理细胞 12h 后,加入 100 μmol/L H₂O₂ 作用 24h。MTT 法检测细胞活力,方法同前。

1.2.4 细胞凋亡检测 各组细胞接种于六孔板,用 0.1% 胰酶消化后收集细胞制备细胞悬液,1000 r/min 离心弃上清液,在冰浴中避光进行下述操作:调节细胞浓度为 5×10⁴/L,用 Annexin V-FITC/PI 试剂盒中缓冲液悬浮细胞,分别加入 Annexin V 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 10⁻⁸, 10⁻⁴ mol/L MLT 预处理细胞 12, 24, 48h 后, H₂O₂ 作用 24h,用 0.1% 胰酶消化后, 1200 r/min 离心 12min,弃上清液,收集细胞并用 PBS 冲洗

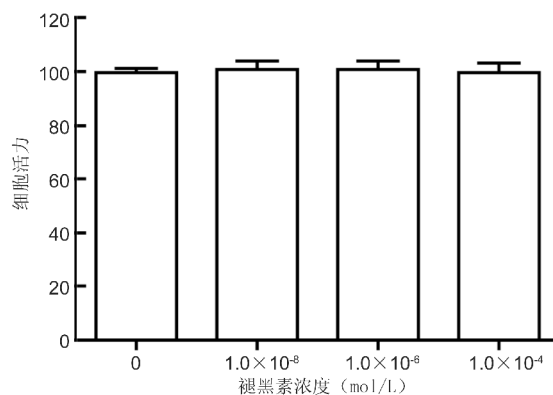


图 1 MLT 对 HLECs 活性的影响。

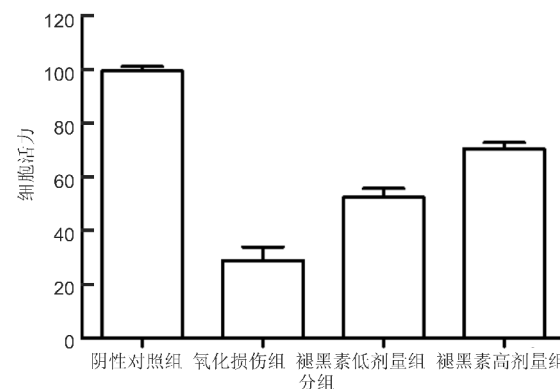


图 2 MLT 对 H₂O₂ 致 HLECs 氧化损伤细胞活性的影响。

2 次,每份样品加 30 μL 细胞裂解液,冰上孵育 20min, 10000 r/min 离心 10min,进行 Caspase 活性检测。Caspase 活性=OD_{405nm}/OD_{595nm}。

统计学分析:采用 SPSS 13.0 统计软件,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。所得实验数据均以均值±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 MLT 对 HLECs 活性的影响 通过用 MTT 法检测 MLT 对 HLECs 活性影响,我们发现实验浓度范围内的 MLT 对 HLECs 没有明显的细胞毒性,该药物可以安全作用于 HLECs。MLT 孵育 24h 后细胞活性分别为 101.00% ± 3.19%, 99.80% ± 3.27%, 99.57% ± 3.62% 与对照组(99.57% ± 1.62%)比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 1。

2.2 MLT 对 H₂O₂ 致 HLECs 氧化损伤细胞活性的影响 模型组 HLECs 经氧化损伤处理后,细胞活性明显下降(28.87% ± 4.92%),与正常组比较具有统计学差异($P < 0.01$)。用 10⁻⁸, 10⁻⁴ mol/L 的 MLT 处理后, HLECs 活性分别提高到 52.43% ± 3.82% 和 70.43% ± 2.38%,与模型组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

2.3 MLT 对氧化损伤致 HLECs 凋亡的抑制作用 HLECs 经氧化损伤处理后,细胞凋亡率明显升高,正常培养的人 HLECs 凋亡率为 0.88% ± 0.31%, 100 μmol/L H₂O₂ 作用于细胞后显示了明显的凋亡现象,细胞凋亡率达到了 39.33% ± 1.97%;然而,当预先给予 10⁻⁸, 10⁻⁴ mol/L

表1 各组 HLECs 内 Caspase-3 和 Caspase-9 活性

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

组别	Caspase-3			Caspase-9		
	12h	24h	48h	12h	24h	48h
阴性对照组	49.75±3.27	51.32±2.43	53.76±3.09	61.90±2.54	65.06±2.71	9.42±3.32
模型组	90.32±3.32 ^b	101.62±2.47 ^b	111.71±3.48 ^b	101.44±2.69 ^b	108.69±3.31 ^b	123.73±2.72
MLT 低剂量组	78.83±3.19 ^c	82.68±3.38 ^d	91.55±2.38 ^d	94.71±3.23 ^d	100.76±3.39 ^c	112.37±3.11 ^c
MLT 高剂量组	65.62±2.73 ^d	78.40±3.31 ^d	79.06±3.01 ^d	83.47±2.55 ^d	93.79±2.42 ^d	98.04±2.33 ^d

^b $P < 0.01$ vs 阴性对照组; ^c $P < 0.05$ vs 模型组; ^d $P < 0.01$ vs 模型组。

的 MLT 作用后, HLECs 凋亡率分别下降到 $30.55\% \pm 1.28\%$ 和 $23.85\% \pm 2.33\%$, 与模型组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。实验结果表明 H_2O_2 可以导致 HLECs 凋亡的发生, 经 $10^{-8}, 10^{-4} \text{ mol/L}$ MLT 处理后, 其凋亡率呈下降趋势, 见图 3。

2.4 MLT 对 H_2O_2 致 HLECs 氧化损伤 Caspase-3、Caspase-9 活性的影响 模型组 HLECs 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具有统计学意义 ($P < 0.05$)。 $10^{-8}, 10^{-4} \text{ mol/L}$ MLT 处理后, 可见 Caspase-3、Caspase-9 活性下降, 且呈时间依赖性, 与相同作用时间点的模型组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

3 讨论

氧化损伤诱导的 HLECs 的凋亡是各种类型白内障发生的主要机制, 游离基穿过细胞膜通过氧化应激反应引起细胞内蛋白质、脂质和核酸的损坏, 这些损伤均可加剧细胞的凋亡及坏死^[5]。本实验模拟 HLECs 氧化损伤模型, 体外将 MLT 作用于 HLECs, 通过结果证实该药物能够有效抑制 H_2O_2 损伤导致的 HLECs 凋亡。 H_2O_2 是一种极易透过细胞膜的强氧化剂, 通过增加细胞内 ROS 含量发挥对细胞的氧化损伤作用^[6,7]。大量的研究证实 H_2O_2 是白内障形成的一个重要致病因素。约 30% 的白内障患者的房水和晶状体中 H_2O_2 水平比正常人高 5 倍^[8]。本实验以活性氧形式之一的 H_2O_2 作用于 HLECs, 造成 HLECs 氧化损伤, 研究 MLT 对该细胞的保护作用。

MLT 抗氧化活性比胡萝卜素高 10 倍, 为经典抗氧化药物^[9,10]。本研究结果显示, 经 H_2O_2 处理的细胞活力明显降低, 但是经过 MLT 预处理的细胞其活力得到不同程度的改善, 说明 MLT 可以在一定程度上改善细胞活力, 流式细胞技术及相关凋亡因子 Caspase-3、Caspase-9 检测结果均显示经 H_2O_2 处理的细胞其凋亡率与阴性对照组相比明显升高, 而 MLT 预处理的 HLECs 凋亡率下降。说明 MLT 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和时间依赖性。

凋亡是存在于生命体内的一种基本的生物学现象, 对维持生物体内环境的稳定起着重要保护作用。Caspases 蛋白酶家族参与该机制并发挥重要作用^[8,11]。有研究证实, H_2O_2 可以使 HLECs 凋亡过程中 Caspase-3 及 Caspase-9 的表达明显增加, 本研究结果亦显示, 模型组细胞内 Caspase-3 及 Caspase-9 的活性均增加, 提示 Caspases 参与氧化损伤的病理生理过程, 是 HLECs 凋亡的重要调控因子。用 MLT 处理后 Caspase-3 及 Caspase-9 的活性显著下降, 其下降趋势与 MLT 的剂量和作用时间正相关。

综上所述, 本研究证实 MLT 在 H_2O_2 诱导的 HLECs 凋亡中发挥细胞保护作用。然而, MLT 保护 HLECs 抵抗 H_2O_2

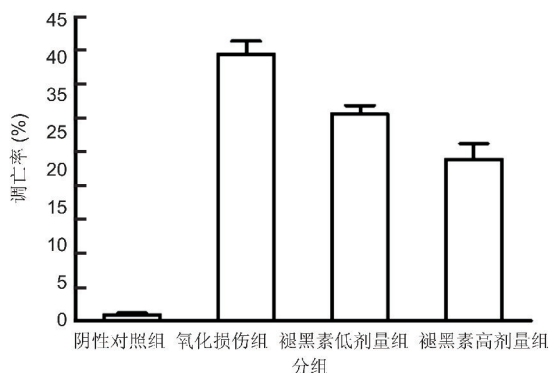


图3 MLT 对 H_2O_2 致 HLECs 凋亡的抑制作用。

诱导的氧化损伤的分子机制尚不清楚。因此, 了解细胞氧化损伤的保护机制对于预防治疗 HLECs 的丢失或死亡引起的晶状体疾病具有重要意义。

参考文献

- Lee S, Shin J, Hong Y, et al. Beneficial effects of melatonin on stroke-induced muscle atrophy in focal cerebral ischemic rats. *Lab Anim Res* 2012;28(1):47-54
- Siu AW, Maldonado M, Sanchez-Hidalgo M, et al. Protective effects of melatonin in experimental free radical-related ocular diseases. *J Pineal Res* 2006;40(2):101-109
- Tabin G, Chen M, Espandar L. Cataract surgery for the developing world. *Curr Opin Ophthalmol* 2008;19(1):55-59
- Ornek K, Karel F, Büyükbıngöl Z. May nitric oxide molecule have a role in the pathogenesis of human cataract? *Exp Eye Res* 2003;76(1):23-27
- 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
- 陶津华, 张劲松, 盛耀华. 硫酸对人晶状体上皮细胞抗紫外线损伤作用的研究. *眼科研究* 2010;28(7):632-635
- 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
- Akasaka Y, Ishikawa Y, Ono I, et al. Enhanced expression of caspase-3 in hypertrophic scars and keloid: induction of caspase-3 and apoptosis in keloid fibroblasts *in vitro*. *Lab Invest* 2000;80(3):354-357
- Tamura H, Takasaki A, Taketani T, et al. Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle. *Endocr J* 2013;60(1):1-13
- Buscemi N, Vandermeer B, Hooton N, et al. Efficacy and safety of exogenous melatonin for secondary sleep disorders and sleep disorders accompanying sleep restriction: meta-analysis. *BMJ* 2006;332(7538):385-393
- Ke Yao, Panpan Ye, Li Zhang, et al. Epigallocatechin gallate protects against oxidative stress-induced mitochondria-dependent apoptosis in human lens epithelial cells. *Mol Vis* 2008;14:217-223