

表没食子酸酯对高糖诱导的人晶状体上皮细胞氧化应激的影响

陈 婷, 刘 平, 王嘉翔, 单 多, 车 雯, 张丽娟

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眼科三病房

作者简介: 陈婷, 护师, 研究方向: 白内障。

通讯作者: 张丽娟, 副主任护师, 研究方向: 白内障.

zhanglijuan715@163.com

收稿日期: 2016-03-03 修回日期: 2016-05-18

Effect of epigallocatechin - 3 - gallate against oxidative stress induced by high glucose in human lens epithelium cells

Ting Chen, Ping Liu, Jia-Xiang Wang, Duo Shan, Wen Che, Li-Juan Zhang

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

The Third Ward of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Li - Juan Zhang. The Third Ward of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University. zhanglijuan715@163.com

Received: 2016-03-03 Accepted: 2016-05-18

Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of epigallocatechin - 3 - gallate (EGCG) against oxidative stress induced by high glucose in human lens epithelium (HLE) cells.

• **METHODS:** The HLE cell oxidative damage model induced by high concentration glucose was established, and was intervened with different concentrations of EGCG. Cell viability was determined by MTT assay, cell morphology was investigated by convert microscope, cells apoptosis was assayed by flow cytometry with Hoechst-PI staining. Moreover, the levels of super oxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and malondialdehyde (MDA) in supernatant were also tested after different treatment either with high concentration glucose or with different concentrations of EGCG.

• **RESULTS:** MTT results showed that HLE cells activity increased to $50.33\% \pm 3.52\%$ and $63.33\% \pm 4.63\%$ after treated with $10 \mu\text{mol/L}$ and $100 \mu\text{mol/L}$ EGCG respectively, the difference was statistically significant compared with oxidative injury group ($32.67\% \pm 3.10\%$) ($P < 0.05$); HLE cells maintained better morphology intervened with EGCG under high glucose conditions, the number of apoptotic cells reduced, SOD and GSH - Px level within HLE cells increased and MDA levels

decreased.

• **CONCLUSION:** EGCG plays its strong antioxidant effect by increasing SOD, GSH-Px content and decreasing MDA content in cells, therefore provides a reliable experimental basis for the search for effective prevention and treatment of cataract drug.

• **KEYWORDS:** epigallocatechin - 3 - gallate; high glucose; human lens epithelium cells; oxidative stress

Citation: Chen T, Liu P, Wang JX, et al. Effect of epigallocatechin-3-gallate against oxidative stress induced by high glucose in human lens epithelium cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2016;16(6):1029-1031

摘要

目的: 探讨表没食子酸酯(EGCG)对高糖诱导的人晶状体上皮细胞(human lens epithelial cells, HLEC)氧化应激的影响。

方法: 建立高糖诱导的HLEC氧化损伤模型,用不同浓度的EGCG干预,MTT检测细胞活力,倒置显微镜观察细胞形态,Hoechst-PI染色观察细胞凋亡,分光光度计检测上清液中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)及丙二醛(MDA)的含量。

结果: MTT结果显示用 $10 \mu\text{mol/L}$ EGCG和 $100 \mu\text{mol/L}$ EGCG处理后,HLEC活性分别提高到 $50.33\% \pm 3.52\%$ 和 $63.33\% \pm 4.63\%$,与氧化损伤组($32.67\% \pm 3.10\%$)比较差异具有统计学意义($P < 0.05$);EGCG干预的高糖条件下的HLEC较好地保持了细胞的形态,凋亡细胞数量减少,细胞内SOD、GSH-Px水平升高,MDA水平下降。

结论: EGCG可能通过提高细胞内SOD、GSH-Px含量,降低MDA含量发挥其较强的抗氧化作用,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: EGCG;高糖;晶状体上皮细胞;氧化应激

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2016.6.06

引用: 陈婷,刘平,王嘉翔,等.表没食子酸酯对高糖诱导的人晶状体上皮细胞氧化应激的影响.国际眼科杂志 2016;16(6):1029-1031

0 引言

糖尿病是一组由于胰岛素作用障碍和/或胰岛素分泌缺陷所致的、以高血糖为特征的代谢性疾病。长期高血糖与持续代谢紊乱可导致全身组织器官,特别是心血管、肾、眼及神经系统的功能障碍。高血糖导致晶状体纤维肿胀变性,晶状体上皮细胞凋亡,引起晶状体透明度改变,最后形成白内障^[1]。表没食子酸酯(EGCG)是从茶叶中提取的主要的儿茶素之一,具有增强抗氧化物酶活性的作用,可有效清除自由基,延缓细胞及组织衰老^[2-3]。本文通过

体外实验初步研究了 EGCG 对人晶状体上皮细胞 (human lens epithelium cells, HLEC) 氧化损伤的影响, 从而为其用于防治糖尿病性白内障提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

HLEC (美国 ATCC 公司), EGCG (美国 Sigma 公司, 纯度为 >98%), 胎牛血清、DMEM 培养基 (美国 Hyclone 公司), MTT 试剂盒 (中国上海伯奥生物制品公司), Hoechst-PI 双染试剂盒 (美国 BD 公司), 过氧化物歧化酶 (SOD)、GSH-Px (谷胱甘肽过氧化物酶) 及丙二醛 (MDA) 活力测定试剂盒 (中国南京建成生物工程研究所)。

1.2 方法

1.2.1 HLEC 的培养

HLEC 培养在内含链霉素 100 μ g/mL、青霉素 100U/mL 的 DMEM 培养基中, 胎牛血清浓度为 10%, 培养箱内 CO₂ 体积分数为 5%, 温度为 37 $^{\circ}$ C, 细胞接种密度为 5 \times 10⁵/mL。

1.2.2 细胞分组

共分 4 组: (1) 阴性对照组: 以正常培养液培养。(2) 氧化损伤组: 30mmol/L 葡萄糖溶液作用 12h。(3) EGCG 组: 加入 EGCG 作用 24h 之后, 加入 30mmol/L 葡萄糖溶液作用 12h, 依 EGCG 浓度不同分为 2 个亚组 (10 μ mol/L 和 100 μ mol/L)。

1.2.3 MTT 检测细胞活力

细胞接种于 96 孔板 (细胞密度 5 \times 10⁴/L, 每孔 120 μ L) 培养 24h 使细胞同步化, 向各孔细胞中加入 20 μ L MTT (5g/L), 培养 4h 后弃去培养液, 加入 150 μ L DMSO 溶液, 微量振荡器室温下振荡 10min 后用酶标仪测定 492nm 的光密度值。HLEC 的存活率 = (各组细胞光密度值/正常组细胞光密度值) \times 100%。

1.2.4 Hoechst-PI 染色观察细胞凋亡

细胞接种于 96 孔板中, 经相应处理后用 PBS 洗涤细胞两次, 在 150 μ L 的 Binding Buffer 中加入 2 μ L Hoechst 及 5 μ L PI 混匀, 避光、室温反应 5min 后置于荧光显微镜下观察。

1.2.5 氧化应激指标检测

相应干预后取各组细胞, 裂解后 1200g 离心 15min 取上清液, 按试剂盒说明书, 使用 721D 分光光度计测定细胞内 SOD、GSH-Px 及 MDA 含量。

统计学分析: 采用 SPSS 11.5 对实验数据进行分析 and 处理, 实验结果以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较用 *t* 检验或单因素方差分析, 以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 EGCG 对高糖致 HLEC 氧化损伤后细胞活性的影响

氧化损伤组 HLEC 经氧化损伤处理后, 细胞活性明显下降 (32.67% \pm 3.10%), 与阴性对照组 (96.07% \pm 3.32%) 比较具有显著统计学差异 (*t* = 19.08, *P* < 0.01)。用 10 μ mol/L 和 100 μ mol/L EGCG 处理后, HLEC 活性分别提高到 50.33% \pm 3.52% 和 63.33% \pm 4.63%, 两组之间比较差异无统计学意义 (*t* = 2.42, *P* > 0.05), 与氧化损伤组比较差异具有统计学意义 (*t* = 5.35, 5.98, *P* < 0.05, 图 1)。

2.2 倒置显微镜观察 HLEC 的形态学改变

正常 HLEC 贴壁生长, 呈长梭形, 胞膜完整, 细胞间界限清晰; 氧化损伤组细胞体积缩小, 呈球形改变, 出现悬浮细胞 (提示坏死细胞的出现)。经 EGCG 干预的高糖条件下 HLEC 保持了上皮细胞的形态, 较少出现细胞肿胀, EGCG 高浓度组细胞形态改善明显 (图 2)。

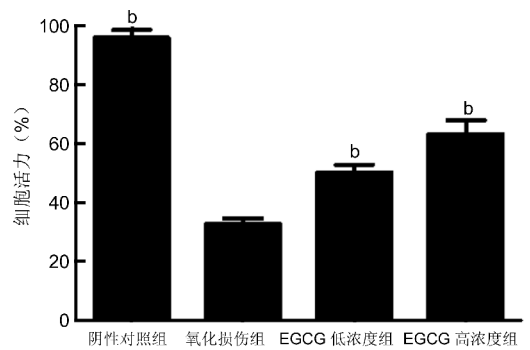


图 1 MTT 法检测 EGCG 对高糖诱导的 HLEC 细胞活力的影响 ^b*P* < 0.01 vs 氧化损伤组。

2.3 EGCG 对 HLEC 凋亡的影响

阴性对照组细胞核呈均匀致密的暗蓝色低荧光, 细胞凋亡率为 3.00% \pm 0.71%, 氧化损伤组细胞凋亡率为 35.75% \pm 3.90%, 与阴性对照组比较差异具有统计学意义 (*t* = 8.26, *P* < 0.05); 图 3 可见氧化损伤组细胞出现了亮蓝色高荧光, 说明部分细胞已经发生凋亡反应, 其中红色点状高荧光为 PI 染色阳性, 代表坏死细胞。给予不同浓度 EGCG 干预后, 凋亡及坏死细胞数逐渐减少, EGCG 低浓度组和 EGCG 高浓度组细胞凋亡率分别为 22.33% \pm 2.32% 和 6.75% \pm 1.05%, 两组之间比较差异有显著统计学意义 (*t* = 4.03, *P* < 0.01), 与氧化损伤组比较差异具有统计学意义 (*t* = 2.47, 7.26, *P* < 0.05, 图 3, 4)。

2.4 EGCG 对 HLEC 内 MDA、SOD 和 GSH-Px 含量变化的影响

从表 1 中可知, 氧化损伤组 HLEC 中 SOD 及 GSH-Px 含量与阴性对照组比较明显下降, MDA 含量明显升高, 两者比较差异具有显著统计学意义 (*t* = -59.48, *P* < 0.01), 给予 EGCG 后, 随着作用剂量的升高, MDA 含量有下降的趋势, EGCG 低、高浓度组与氧化损伤组比较差异具有显著统计学意义 (*P* < 0.01); 同时 EGCG 促进了 SOD 及 GSH-Px 含量的升高, EGCG 高剂量组与氧化损伤组比较差异具有显著统计学意义 (*F* = 1562.63, *P* < 0.01)。

3 讨论

抗氧化剂 EGCG 是一种活性氧、自由基的强力清除剂, 具有抗突变、抗炎、抗衰老、抗癌、改善肝功能的作用 [4-5]。EGCG 的保护作用机制包括抑制氧化应激导致的氧化损伤、抑制能量代谢、细胞凋亡和坏死, 保护细胞膜 [6]。有报道显示, EGCG 的抗氧化活性是 SOD 的 6 倍, 维生素 E 的 20 倍 [7]。刘湘萍等 [8] 通过体外实验初步证实了 EGCG 能够抑制地塞米松诱导的兔晶状体上皮细胞凋亡, 但是对于糖尿病性白内障的保护作用鲜有报道。

晶状体的能量来自房水中葡萄糖。糖尿病患者晶状体内葡萄糖增多, 经醛糖还原酶的作用活化, 葡萄糖转化为山梨醇。山梨醇不能透过晶状体囊膜, 在晶状体内大量积聚, 使晶状体内渗透压增加, 吸收水分, 上皮细胞及纤维肿胀变性, 导致混浊 [9]。细胞活力检测结果也显示高糖处理的细胞其活力明显降低, 细胞正常形态受到损伤, 但是经过 EGCG 预处理的细胞其活力得到不同程度的改善, 细胞形态亦逐渐改善, 并且说明该药物在一定程度上能够抑制高糖诱导的细胞损伤, 而且这种药物对细胞的保护作用呈剂量依赖性。

糖尿病引起的晶状体混浊与长时间的累积性氧化损伤导致的细胞凋亡有关, HLEC 对氧化应激较为敏感 [10]。

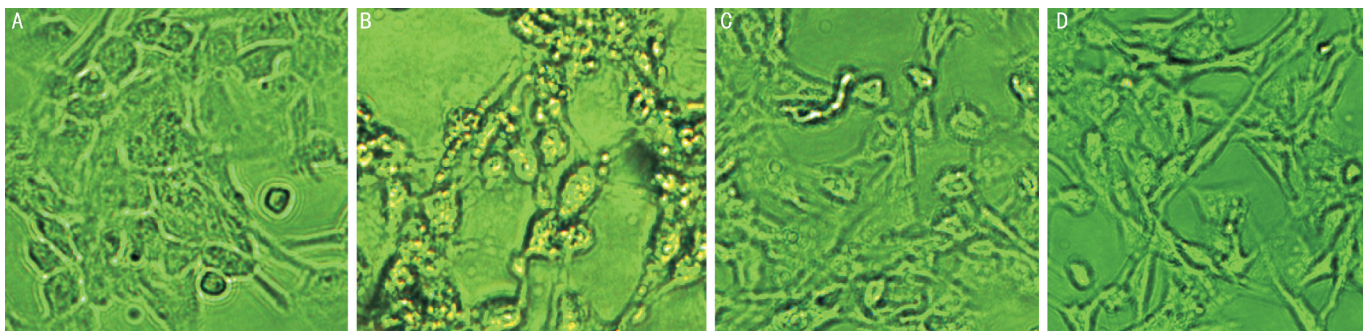


图2 各组晶状体上皮细胞的形态学改变($\times 400$) A:阴性对照组;B:氧化损伤组;C:EGCG低浓度组;D:EGCG高浓度组。

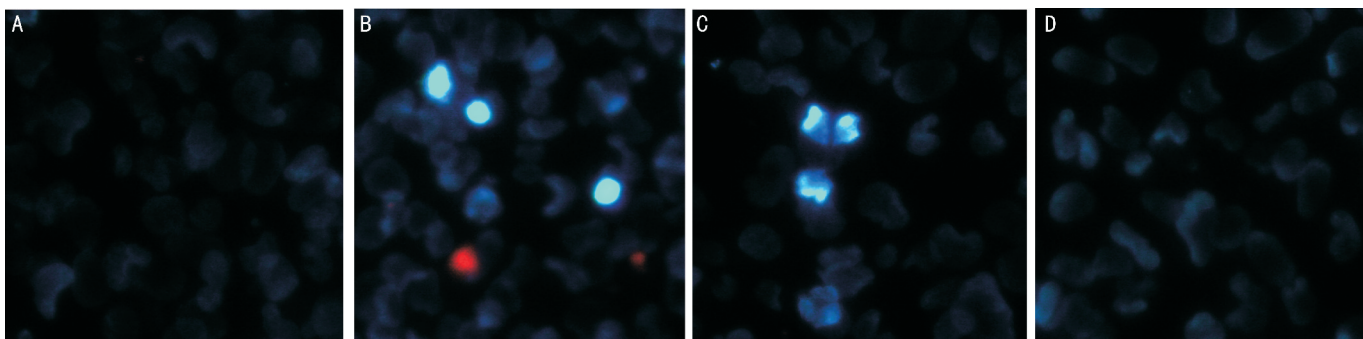


图3 Hoechst-PI染色观察细胞凋亡($\times 400$) A:阴性对照组;B:氧化损伤组;C:EGCG低浓度组;D:EGCG高浓度组。

表1 EGCG对HLEC细胞内MDA、SOD及GSH-Px含量变化的影响

组别	MDA(nmol/mL)	SOD(U/mL)	GSH-Px(U/mL)
阴性对照组	57.57 \pm 4.11	73.56 \pm 3.12	154.54 \pm 3.36
氧化损伤组	112.54 \pm 5.08 ^b	48.89 \pm 4.66 ^b	82.46 \pm 5.53 ^b
EGCG低浓度组	94.89 \pm 4.53	49.87 \pm 4.51	93.78 \pm 4.67
EGCG高浓度组	62.67 \pm 3.88 ^d	69.75 \pm 3.76 ^d	127.57 \pm 3.74 ^d

注:^b $P < 0.01$ vs 正常组;^d $P < 0.01$ vs 氧化损伤组。

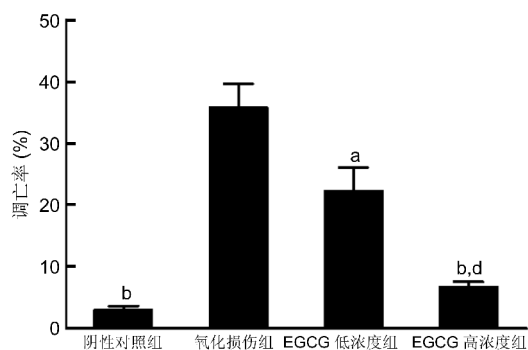


图4 EGCG对高糖诱导HLEC凋亡的抑制作用 ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 氧化损伤组; ^d $P < 0.01$ vs EGCG低浓度组。

我们利用30mmol/L葡萄糖建立细胞氧化损伤模型,观察EGCG对该细胞的保护作用。生理状态下,机体抗自由基损伤的酶如SOD、GSH-Px能有效地清除活性氧和自由基,使自由基的产生和清除处于平衡,因此清除活性氧和修复氧化损伤被认为是预防和治疗白内障行之有效的方法^[11]。本实验中,用EGCG干预后HLEC中SOD、GSH-Px活性较氧化损伤组显著升高,MDA含量显著降低,提示EGCG可能通过提高细胞内SOD、GSH-Px含量,降低细胞内MDA含量发挥其较强的抗氧化作用。

综上所述,EGCG对高糖诱导的HLEC凋亡具有一定的抑制作用,抑制效应与药物浓度正相关,从而可能减少

HLEC凋亡及由此引起的病理损害,为寻求有效的防治糖尿病性白内障药物提供可靠的实验依据。

参考文献

- Bhadada SV, Goyal RK. Effect of Aqueous Extract of Tephrosia purpurea on Cardiovascular Complications and Cataract Associated with Streptozotocin-induced Diabetes in Rats. *Indian J Pharm Sci* 2015;77(5):522-529
- 焦西英,杨浩,钱新宏,等. EGCG对过氧化氢所致神经元过氧化损伤的保护作用. *解剖学研究* 2008;30(6):401-403
- Esmaili MA. Combination of siRNA-directed gene silencing with epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reverses drug resistance in human breast cancer cells. *J Chem Biol* 2015;9(1):41-52
- 杨志辉,杨华,刘仲华. EGCG清除自由基和抑制血液脂质过氧化作用的研究. *湖南农业科学* 2009;4(5):18-20
- 李佳,刘丹. 茶多酚对体外培养鼠晶状体抗氧化损伤作用的研究. *国际眼科杂志* 2012;26(2):169-172
- Niu Y, Na L, Feng R, et al. The phytochemical, EGCG, extends lifespan by reducing liver and kidney function damage and improving age-associated inflammation and oxidative stress in healthy rats. *Aging Cell* 2013;12(6):1041-1049
- 杨志辉,杨华,刘仲华. EGCG清除自由基和抑制血液脂质过氧化作用的研究. *湖南农业科学* 2009;5(5):18-20
- 刘湘萍,何湘珍. 表没食子儿茶素没食子酸酯抑制地塞米松体外诱发兔白内障的作用. *国际眼科杂志* 2010;10(3):443-446
- Li Y, Jia Y, Zhou J, et al. Effect of methionine sulfoxide reductase B1 silencing on high-glucose-induced apoptosis of human lens epithelial cells. *Life Sci* 2013;92(3):193-201
- Mok JW, Chang DJ, Joo CK. Antiapoptotic effects of anthocyanin from the seed coat of black soybean against oxidative damage of human lens epithelial cell induced by H₂O₂. *Curr Eye Res* 2014;39(11):1090-1098
- 周红艳,郗文斌,温君琳,等. 不同时间束缚应激对大鼠血清和胃黏膜组织中SOD、MDA的影响. *实用医学杂志* 2014;30(24):3912-3915