

补肾养血明目方含药肠吸收液对 ARPE-19 细胞氧化损伤的保护作用

陈 强, 安 娜, 庄曾渊, 梁丽娜

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(No. 81503621); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(No. ZZ0908027); 国家自然科学基金面上项目(No. 81674033)

作者单位:(100040) 中国北京市, 中国中医科学院眼科医院

作者简介:陈强, 医学博士, 副研究员, 研究方向:眼底病的基础研究。

通讯作者:梁丽娜, 医学博士, 研究员, 研究方向:眼底病的基础与临床. lianglina163@163.com

收稿日期:2017-03-06 修回日期:2017-07-05

Protective effect of Bu Shen Yang Xue Ming Mu Formula on oxidative injury in ARPE-19 cells

Qiang Chen, Na An, Zeng - Yuan Zhuang, Li - Na Liang

Foundation items: National Natural Science Foundation Youth Foundation(No. 81503621); Fundamental Research Funds for the Central Public Welfare Research Institutes (No. ZZ0908027); National Natural Science Foundation (No. 81674033)

Eye Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100040, China

Correspondence to: Li-Na Liang. Eye Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100040, China. lianglina163@163.com

Received:2017-03-06 Accepted:2017-07-05

Abstract

• **AIM:** To explore the effect of Bu Shen Yang Xue Ming Mu (BSYXMM) Formula on hydroquinone - induced oxidative stress injury in ARPE-19 cells.

• **METHODS:** The oxidative injury model of ARPE-19 cell was induced by exposure to various concentrations of hydroquinone (HQ) to determine the optimal concentration. Intestinal absorption solutions of BSYXMM Formula were prepared. Effect of intestinal absorption solutions of BSYXMM Formula on the cell viability was detected by CCK-8 assay, and the percentage of apoptotic cells was measured by TUNEL assay. The levels of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in ARPE-19 cells were detected by means of chemical colorimetry.

• **RESULTS:** It was found that ARPE-19 cell viability significantly decreased when the concentration of HQ was higher than 90 μmol/L. Compared with the model group, 1% and 2% intestinal absorption solutions in the pre-

treatment group could significantly alleviate HQ-induced injury ($P < 0.01$) and 0.5% and 5% intestinal absorption solutions in the pre-treatment group could alleviate the injury in certain degree ($P < 0.05$). While in the treatment group 1% and 2% intestinal absorption solutions could alleviate the injury to some extent ($P < 0.05$). TUNEL results showed that the apoptosis rate decreased significantly in the pre-treatment group ($P < 0.01$) and to some extent in the treatment group ($P < 0.05$) compared with the model group. It was shown that both levels of SOD and GSH-Px in pre-treatment group and treatment group were markedly higher than that of model group ($P < 0.05$), and pre-treatment group had more significant effect ($P < 0.01, P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** BSYXMM Formula could protect against HQ-induced oxidative stress injury in ARPE-19 cells, which may be related with the increasing of antioxidant enzyme in the cells.

• **KEYWORDS:** Bu Shen Yang Xue Ming Mu Formula; hydroquinone; oxidative stress; ARPE-19 cell

Citation: Chen Q, An N, Zhuang ZY, *et al.* Protective effect of Bu Shen Yang Xue Ming Mu Formula on oxidative injury in ARPE-19 cells. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2017;17(8):1433-1436

摘要

目的: 探讨补肾养血明目方含药肠吸收液对氢醌(hydroquinone, HQ)诱导的人视网膜色素上皮细胞(ARPE-19)氧化应激损伤的保护作用。

方法: 采用不同浓度 HQ 诱导体外培养 ARPE-19 细胞氧化损伤, 确定最佳造模浓度; 制备补肾养血明目方含药肠吸收液。采用 CCK-8 法检测补肾养血明目方含药肠吸收液对 ARPE-19 细胞活力的影响, TUNEL 技术观察其对细胞凋亡的保护作用, 以及化学比色法检测细胞中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)的活性。

结果: 当 HQ 浓度达到 90 μmol/L 以上时, ARPE-19 细胞活性明显降低。相较于模型组, 预防给药时, 浓度 1% 和 2% 补肾养血明目方含药肠吸收液对 HQ 损伤具有有显著保护作用(均 $P < 0.01$), 0.5% 和 5% 含药肠吸收液对 HQ 损伤有一定保护作用(均 $P < 0.05$); 治疗给药时, 1% 和 2% 含药肠吸收液对 HQ 损伤有一定保护作用(均 $P < 0.05$)。与模型组相比, 预防组的细胞凋亡率显著下降 ($P < 0.01$), 治疗组的细胞凋亡率有一定下降 ($P < 0.05$)。抗氧化酶检测结果显示与模型组相比, 预防组和治疗组均能明显提高 SOD 和 GSH-Px 含量(均 $P < 0.05$), 其中预防组的作用更为显著 ($P < 0.01, P < 0.05$)。

结论:补肾养血明目方对 HQ 诱导的 ARPE-19 细胞氧化损伤有保护作用,其作用机制可能与增加细胞内抗氧化酶的含量有关。

关键词:补肾养血明目方;氢醌;氧化应激;ARPE-19 细胞
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.8.10

引用:陈强,安娜,庄曾渊,等. 补肾养血明目方含药肠吸收液对 ARPE-19 细胞氧化损伤的保护作用. 国际眼科杂志 2017;17(8):1433-1436

0 引言

视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞来源于神经外胚叶层,具有分泌生长因子、抗氧化、参与视循环代谢、维持血-视网膜屏障和吞噬视细胞脱落外节盘膜等重要生理功能,在维持正常眼底结构和视功能方面发挥着不可替代的作用^[1]。已有研究证实,RPE 细胞损伤是年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 和视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 发生发展的重要病理机制^[2-3]。因此,保护 RPE 细胞正常生理性结构、功能和数量,抑制 RPE 细胞的损伤变性,已成为治疗 AMD、RP 等疾病的新方向。临床初步观察发现,补肾养血明目方对 AMD 及 RP 均有一定疗效。在此基础上,我们建立了氢醌 (hydroquinone, HQ) 诱导的体外培养人视网膜色素上皮细胞 (ARPE-19) 氧化损伤模型,探讨补肾养血明目方对 RPE 细胞的保护作用,从侧面阐释中医治疗视网膜变性类疾病的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 SD 大鼠,雄性,SPF 级,体质量 150~170g,购自北京大学医学部,合格证号 SCXK(京)2011-0012。饲养于中国中医科学院中药所实验动物中心,温度 (22±2)℃,湿度 50%±5%,普通饮食及饮水喂养,循环光照 (光照 12h,黑暗 12h)。ARPE-19 细胞购自于广州吉妮欧生物科技有限公司。主要试剂:HQ (Sigma-Aldrich);DMEM 高糖培养基 (HyClone);0.25% 胰蛋白酶 EDTA 消化液 (Solarbio);胎牛血清 (Gibco);CCK-8 (东仁化学科技有限公司);TUNEL 试剂盒 (Roche);SOD 检测试剂盒 (南京建成);GSH-Px 检测试剂盒 (南京建成);补肾养血明目方由中国中医科学院中药研究所制备。主要设备:CO₂ 培养箱 (德国 Heraeus 公司);组织-器官水浴系统 (上海奥尔科特生物科技有限公司);酶标分析仪 (深圳雷杜生命科学有限公司);荧光显微镜 (Olympus);紫外可见分光光度计 (英国热电 Evolution 300)。实验动物的使用和处死遵循国家科学科技委员会颁布的《实验动物管理条例》。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 ARPE-19 细胞接种于含体积分数 15% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液中,置于 37℃、体积分数为 5% CO₂ 培养箱中常规培养,细胞贴壁后,每 2d 更换一次培养液,接近融合状态时消化传代,第 4~6 代细胞用于实验。

1.2.2 补肾养血明目方含药肠吸收液的制备 正常 SD 大鼠按数字随机表法分为含药肠吸收液组和空白肠吸收液组。预先打开 ALC-M 型组织-器官水浴系统,向每个浴管中预先加入 25mL 补肾养血明目方供试液 (肠吸收液组) 或不含药物的台氏缓冲液 (空白肠吸收液组),通入

95% O₂ 和 5% CO₂ 的混合气体,37℃ 恒温。参照文献采用外翻肠囊法制备肠吸收液^[4],0.22μm 微孔滤膜过滤除菌,分装至无菌 EP 管中,-20℃ 保存备用。

1.2.3 HQ 诱导 ARPE-19 细胞氧化损伤模型 ARPE-19 细胞以 2×10⁴/mL 密度接种于 96 孔板,细胞铺满约 80% 时,换无血清培养液饥饿 24h,不同浓度 HQ (40、50、60、75、80、90、100μmol/L) 处理 24h 后测定细胞活力。

1.2.4 实验分组 细胞分为 5 组:(1) 正常对照组:以正常培养液培养;(2) 氧化损伤 (模型) 组:90μmol/L HQ 作用 24h;(3) 空白肠吸收液 (空白) 组:空白肠吸收液作用 24h 后,加入 90μmol/L HQ 作用 24h;(4) 预防给药 (预防) 组:以不同浓度含药肠吸收液 (0.1%、0.5%、1%、2%、5%) 预处理细胞 24h,加入 90μmol/L HQ 作用 24h;(5) 治疗给药 (治疗) 组:90μmol/L HQ 作用 24h 后,加入不同浓度含药肠吸收液 (0.1%、0.5%、1%、2%、5%) 处理细胞 24h。

1.2.5 CCK-8 法测定细胞活力 经上述处理细胞后,小心吸弃原培养液,PBS 缓冲液洗涤细胞一次,每孔加入 100μL DMEM 和 10μL CCK-8 试剂的混合液,培养箱内孵育 2h,酶标仪于 450nm 波长下测定各孔吸光度 (A) 值。

1.2.6 TUNEL 染色鉴定凋亡细胞 对数生长期 ARPE-19 细胞以 1×10⁶/mL 的密度接种于 35mm 培养皿内,细胞分组同上,根据细胞活力检测结果预防组及治疗组均采用 2% 的补肾养血明目方肠吸收液。各组经相应处理后吸出细胞培养液,严格按照 TUNEL 检测试剂盒说明书操作,荧光显微镜观察,计数 ARPE-19 凋亡细胞及 ARPE-19 细胞总数,计算凋亡率。凋亡率 (%) = 凋亡细胞数/同视野 ARPE-19 细胞总数×100%。

1.2.7 细胞内 SOD 和 GSH-Px 含量的测定 按照试剂盒说明书,采用比色法测定细胞内 SOD、GSH-Px 的含量。预防组及治疗组均采用 2% 的补肾养血明目方肠吸收液。

统计学分析:采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析;数据以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示;多组均数间比较采用完全随机设计的方差分析;两组间比较采用 LSD-*t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HQ 诱导 ARPE-19 细胞氧化损伤 结果显示,正常组 A 值 1.403±0.25,不同浓度 (40、50、60、75、80、90、100μmol/L) 的 HQ 溶液作用 24h 后,各组 A 值分别为 1.398±0.10、1.333±0.08、1.285±0.10、1.210±0.11、1.180±0.15、1.062±0.12、0.963±0.16,其中 90μmol/L 和 100μmol/L 组 A 值显著低于正常组,差异有统计学意义 (均 *P*<0.01)。HQ 作用 48h 后发现 100μmol/L 处理组大量细胞死亡,90μmol/L 组虽然细胞活性较差,但大多数细胞仍然存活。

2.2 补肾养血明目方对 ARPE-19 细胞的保护作用 相较于模型组,预防给药时,浓度 1% 和 2% 的含药肠吸收液对 HQ 损伤有显著保护作用 (均 *P*<0.01),0.5% 和 5% 含药肠吸收液对 HQ 损伤有一定保护作用 (均 *P*<0.05)。而治疗给药时,1% 和 2% 含药肠吸收液组对 HQ 损伤有保护作用 (均 *P*<0.05),其余浓度均无保护作用 (均 *P*>0.05,表 1)。

2.3 补肾养血明目方对 ARPE-19 细胞凋亡的影响 结果显示,正常组、模型组、空白组、预防组和治疗组的凋亡

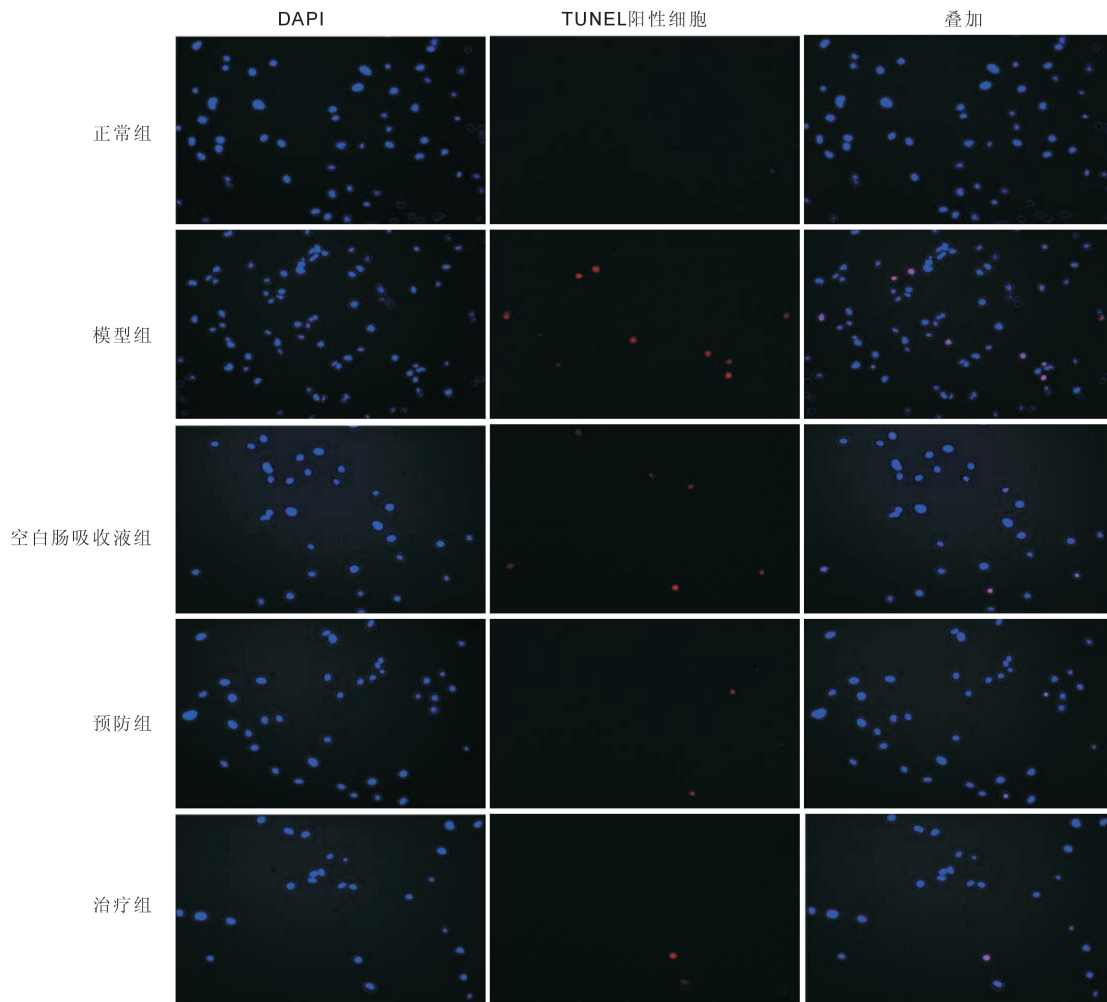


图1 荧光显微镜下各组细胞的凋亡 (×200)。

表1 含药肠吸收液对HQ氧化损伤ARPE-19细胞活性的影响

组别	浓度	A 值
正常组		1.342±0.03
模型组		1.178±0.03
预防组	0.1%	1.214±0.04
	0.5%	1.254±0.05 ^a
	1%	1.294±0.07 ^b
	2%	1.308±0.06 ^b
	5%	1.246±0.06 ^a
治疗组	0.1%	1.195±0.02
	0.5%	1.207±0.02
	1%	1.239±0.04 ^a
	2%	1.250±0.02 ^a
	5%	1.238±0.06
<i>F</i>		7.082
<i>P</i>		<0.001

注:^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 模型组。

率分别为 0.221 ± 0.47%、13.333 ± 5.16%、15.452 ± 7.03%、7.927 ± 2.09% 和 8.974 ± 3.45%。与模型组相比,预防组的细胞凋亡率显著下降 (*P*<0.01),而治疗组的细胞凋亡率有一定的下降 (*P*<0.05)。与空白组相比,预防

表2 补肾养血明目方对ARPE-19细胞内SOD、GSH-Px含量变化的影响

组别	SOD	GSH-Px
正常对照组	23.074±1.19	210.674±11.07
模型组	11.991±1.82 ^b	158.514±18.33 ^b
空白组	14.344±1.08 ^b	164.470±21.80 ^b
预防组	21.406±3.17 ^{d,f}	203.832±19.83 ^{c,e}
治疗组	17.867±4.46 ^{c,e}	192.525±13.67 ^c
<i>F</i>	9.072	5.420
<i>P</i>	0.002	0.014

注:^b*P*<0.01 vs 正常组; ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01 vs 模型组; ^e*P*<0.05, ^f*P*<0.01 vs 空白组。

组的细胞凋亡率显著下降 (*P*<0.01),治疗组则有一定的降低 (*P*<0.05,图1)。

2.4 补肾养血明目方对ARPE-19细胞内SOD、GSH-Px含量变化的影响 与正常组相比,模型组和空白组细胞中SOD和GSH-Px含量明显下降(均*P*<0.01);与模型组相比,预防组和治疗组均能明显提高SOD和GSH-Px含量(*P*<0.05),其中预防组的作用更为显著(*P*<0.01, *P*<0.05)。与空白组比较,预防组能显著提高SOD和GSH含量(*P*<0.01, *P*<0.05);治疗组能明显提高SOD含量(*P*<0.05),而对GSH-Px含量的影响,仅有升高的趋势,差异无统计学意义(*P*>0.05),见表2。

3 讨论

本研究采用 HQ 诱导建立 ARPE-19 细胞氧化损伤模型, HQ 是一种特殊的氧化剂, 不仅存在于烟雾中, 在自然界中亦广泛分布, 包括食物和大气污染物中等, 研究表明 HQ 引起的 RPE 细胞氧化应激损伤可能在 AMD 的发生和发展中起着重要作用^[5]。在前期实验中, 我们采用含 HQ 饲料喂养小鼠 3.5mo, 制备小鼠早期 AMD 模型^[6]。在本次实验中发现 90 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 HQ 溶液均使细胞活性发生显著改变, 处理 24h 后活性分别下降 24.3% 和 31.4%, 由于培养 48h 后 100 $\mu\text{mol/L}$ 组出现大量细胞死亡, 90 $\mu\text{mol/L}$ 组虽然细胞活性差, 但多数细胞仍然存活, 因此, 我们认为 90 $\mu\text{mol/L}$ 是适宜的造模浓度, 便于观察药物的干预作用。

目前, 中药复方体外药理研究方法主要有直接添加法和血清药理学法。直接添加法不能反映复方在体内吸收代谢后所产生的新成分, 同时, 一些不能被机体所吸收的成分可能会对离体实验产生影响。血清药理学法涉及血清这一复杂体系, 存在酶、补体、激肽等内源性生物活性物质, 因而会对离体系统带来较大干扰, 影响该方法的重复性及结果的准确性。近年来, 我国学者探索出了含药肠吸收液这一新型科学的体外药理研究方法, 以肠吸收液为药物载体, 模拟复方的体外吸收过程, 并制备中药复方的含药肠吸收液, 该体系能较好地反映复方进入体内的实际成分。含药肠吸收液去除了复方的非吸收成分及其它杂质, 也无含药血清的其它内源性成分的污染, 因而便于观察和追踪药物的吸收过程, 可较为清楚地认识复方中的主要有效成分, 干扰少, 结果更准确可靠^[4,7-8], 我们这次实验也发现该方法结果重复性很好。相比较治疗给药, 预防给药显示出更好的保护作用, 而且在观察的浓度范围其干预作用随着浓度增加而增强, 在 5% 含药浓度时保护作用略有下降考虑可能是由于药物浓度过高对细胞的活性有一定抑制作用。

补肾养血明目方是庄曾渊研究员多年的临床经验方, 方药组成包括枸杞子、淫羊藿、黄芪、石斛等, 其中枸杞子、淫羊藿补益肾精, 黄芪、当归益气养血, 石斛滋阴明目, 诸药合用, 共奏补肾养血明目功效。近期课题组采用含 HQ 饲料诱导小鼠早期干性 AMD 模型, 观察补肾养血明目方干预后对视网膜超微结构和 8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG) 表达的影响, 结果显示补肾养血明目方可减轻小鼠 RPE-Bruch 膜-脉络膜的损伤, 减少沉积物的形成, 抑制 8-OHdG 的表达^[9]。我们这次实验发现补肾养血明目方预防给药组及治疗给药组的凋亡率明显低于空白对照组, 在体外 RPE 氧化损伤模型上也显示出很好的保护作用。现代药理学研究显示淫羊藿苷可以明显降低糖尿病大鼠心肌胶原含量及心肌线粒体氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 水平, 高剂量淫羊藿苷明显抑制了心肌线粒体 MDA 含量, 增加了心肌线粒体 SOD 活性^[10]。沈志军等^[11]发现当归提取液能够显著升高成年人视网膜神经细胞线粒体膜电位并使其兴奋性呈波动性变化, 使细胞活性明显增加, 分别相当于对照组的 256% 和 261%。我们的结果显示预防组及治疗组细胞内 SOD 及 GSH-Px 的含量均明显高于模型组。正常情况下, RPE 细胞存在两类抗氧化系

统, 一类是酶抗氧化系统, 包括 SOD、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、GSH-Px 等; 另一类是非酶抗氧化系统, 包括维生素 C、维生素 E、谷胱甘肽等^[12-13]。SOD 可以特异性地清除氧自由基, 而 GSH-Px 可产生对抗氧化应激的作用, 增强细胞清除 ROS 的能力。抗氧化酶的表达受相应的细胞因子调控, 其中转录因子 NF-E2 相关因子 (NF-E2-related factor2, Nrf2) 是重要的调节者, 在氧化应激状态下通过与抗氧化反应原件 (antioxidant response element, ARE) 相互作用, 调节抗氧化蛋白和 II 相代谢酶的表达, 使 RPE 细胞内维持氧化还原平衡状态, 降低 RPE 细胞氧化损伤^[14-16]。

根据我们的实验结果及现代药理学研究, 我们认为补肾养血明目方对 RPE 细胞氧化应激损伤有保护作用, 其作用机制是否通过 Nrf2 途径调控抗氧化酶的表达而实现尚需进一步探讨。

参考文献

- 1 Qin S, Lu Y, Rodrigues GA. Resveratrol protects RPE cells from sodium iodate by modulating PPAR α and PPAR δ . *Exp Eye Res* 2014; 118:100-108
- 2 Bhutto I, Luttly G. Understanding age-related macular degeneration (AMD): Relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. *Mol Aspects Med* 2012;33(4):295-317
- 3 Davidson AE, Millar ID, Urquhart JE, et al. Missense mutations in a retinal pigment epithelium protein, bestrophin - 1, cause retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet* 2009;85(5):581-592
- 4 郭宇飞, 杨洪军, 王燕平, 等. 伞形科辛味中药抗血小板聚集的作用研究. *中国中医基础医学杂志* 2016;22(12):1629-1631
- 5 Pons M, Marin-Castaño ME. Cigarette smoke-related hydroquinone dysregulates MCP-1, VEGF and PEDF expression in retinal pigment epithelium *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One* 2011;6(2):e16722
- 6 安娜, 陈强, 梁丽娜, 等. 氢醌诱导小鼠年龄相关性黄斑变性模型的建立. *眼科新进展* 2016;36(7):5-8
- 7 李文宏, 潘琳娜, 徐国良, 等. 复方当归汤含药肠吸收液舒张血管平滑肌的研究. *中国实验方剂学杂志* 2012;18(11):205-208
- 8 Zhang F, Huang B, Zhao Y, et al. BNC Protects H9c2 Cardiomyoblasts from H₂O₂ - Induced Oxidative Injury through ERK1/2 Signaling Pathway. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013;2013:1-12
- 9 安娜, 庄曾渊, 梁丽娜, 等. 杞果颗粒对小鼠视网膜色素上皮细胞氧化应激损伤的影响. *中药杂志* 2017;58(3):250-254
- 10 包慧兰, 陈黎. 淫羊藿苷抗糖尿病大鼠心肌线粒体氧化应激损伤作用研究. *中国中药杂志* 2011;36(11):1503-1507
- 11 沈志军, 王津津, 李根林. 当归提取液对培养的成年人视网膜神经细胞活性的影响. *眼科* 2013;22(6):405-408
- 12 Handa JT. How does the macula protect itself from oxidative stress? *Mol Aspects Med* 2012;33(4):418-435
- 13 Plafker SM, O'Mealey GB, Szweda LI. Mechanisms for countering oxidative stress and damage in retinal pigment epithelium. *Int Rev Cell Mol Biol* 2012;298:135-177
- 14 Kinnunen K, Petrovski G, Moe MC. Molecular mechanisms of retinal pigment epithelium damage and development of age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol* 2012;90(4):299-309
- 15 Sugano E, Murayama N, Takahashi M, et al. Essential role of thioredoxin 2 in mitigating oxidative stress in retinal epithelial cells. *J Ophthalmol* 2013;2013:185825
- 16 Cano M, Thimmalappula R, Fujihara M, et al. Cigarette smoking, oxidative stress, the anti-oxidant response through Nrf2 signaling, and age-related Macular degeneration. *Vision Res* 2010;50(7):652-664