

锌对半乳糖诱导的人晶状体上皮细胞凋亡的影响

贾义,张亮亮,夏欢

基金项目:国家自然科学基金(No. 21561006,21867007);贵州省科学技术基金(No. 黔科合 LH字[2016]7372)
作者单位:(550025)中国贵州省贵阳市,贵州医科大学生物与工程学院化学生物学教研室
作者简介:贾义,男,毕业于华中科技大学,博士,副教授,研究方向:生物无机化学。
通讯作者:贾义. jiayiyouxiang@163.com
收稿日期:2018-04-13 修回日期:2018-09-04

Effect of zinc on galactose-induced cell apoptosis in human lens epithelial cells

Yi Jia, Liang-Liang Zhang, Huan Xia

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 21561006, 21867007); Foundation of Science and Technology of Guizhou Province [No. LH(2016)7372]

Department of Chemical Biology, School of Biology and Engineering, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou Province, China

Correspondence to: Yi Jia. Department of Chemical Biology, School of Biology and Engineering, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou Province, China. jiayiyouxiang@163.com

Received:2018-04-13 Accepted:2018-09-04

Abstract

• **AIM:** To study the effect of zinc on galactose-induced cell apoptosis in human lens epithelial cells (HLEC).

• **METHODS:** HLEC cell line SRA01/04 cells were cultured in DMEM medium and divided into six groups: control group, galactose treatment group, zinc supplement group, zinc supplementation combined with galactose treatment group, zinc deficiency group, zinc deficiency combined with galactose treatment group. The cell viabilities were assayed by MTT, cell morphology and apoptosis were detected by fluorescence microscope and flow cytometry, respectively.

• **RESULTS:** The cell viabilities induced by galactose (0, 25, 50, 75, 100, 125mmol/L) were (100.0±5.4)%, (97.5±3.2)%, (91.3±5.3)%, (93.4±0.6)%, (86.6±1.4)% and (83.5±0.4)%, respectively. When the concentration of galactose was 100 and 125mmol/L, cell viability was significantly decreased, compared with the untreated cells ($P<0.05$). Fluorescence microscopy results showed that the cell nucleus remained uniformly stained in control group and zinc supplement group. Nuclear shrinkage, a typical apoptotic morphology, was visible in some cells in the galactose treatment group, zinc supplementation combined with galactose treatment group, zinc deficiency

group and zinc deficiency combined with galactose treatment group. The cell apoptosis in the six groups were (1.5±0.1)%, (7.1±0.2)%, (1.4±0.1)%, (4.4±0.2)%, (5.5±0.2)% and (15.8±0.3)%, respectively. The cell apoptosis were significant increased in galactose treatment group, zinc supplementation combined with galactose treatment group, zinc deficiency group and zinc deficiency combined with galactose treatment group, compared with the control group ($P<0.05$), and those of zinc supplementation combined with galactose treatment group were significant decreased, and zinc deficiency combined with galactose treatment group were increased ($P<0.05$), compared with the galactose treatment group.

• **CONCLUSION:** Zinc supplementation protects human lens epithelial cells against apoptosis induced by galactose and may have an inhibition effect on cataract formation.

• **KEYWORDS:** human lens epithelial cells; galactose; zinc; cell apoptosis

Citation: Jia Y, Zhang LL, Xia H. Effect of zinc on galactose-induced cell apoptosis in human lens epithelial cells. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2018;18(10):1774-1777

摘要

目的: 研究锌对半乳糖诱导的人晶状体上皮细胞(human lens epithelial cells, HLEC)凋亡的影响。

方法: 将培养的SRA01/04细胞系分为六组,对照组、半乳糖处理组、补锌组、补锌联合半乳糖处理组、缺锌组、缺锌联合半乳糖处理组。采用MTT法检测半乳糖对HLEC存活率的影响,荧光显微镜和流式细胞仪分别检测各实验分组细胞核形态和细胞凋亡率水平的变化。

结果: 不同浓度半乳糖(0、25、50、75、100、125mmol/L)处理HLEC细胞后,细胞存活率分别为(100.0±5.4)%、(97.5±3.2)%、(91.3±5.3)%、(93.4±0.6)%、(86.6±1.4)%和(83.5±0.4)%,与未处理细胞相比,半乳糖浓度为100、125mmol/L时,细胞存活率显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。荧光显微镜结果显示对照组和补锌组的细胞核呈现均一的染色,半乳糖处理组、补锌联合半乳糖处理组、缺锌组和缺锌联合半乳糖处理组中一些细胞的细胞核收缩,表现出典型的细胞凋亡形态。各组的细胞凋亡率分别为(1.5±0.1)%、(7.1±0.2)%、(1.4±0.1)%、(4.4±0.2)%、(5.5±0.2)%和(15.8±0.3)%。与对照组相比,半乳糖处理组、补锌联合半乳糖处理组、缺锌组和缺锌联合半乳糖处理组的细胞凋亡率显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。与半乳糖处理组相比,补锌联合半乳糖处理组的细胞凋亡率显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$),缺锌联合半乳糖处理组的细胞凋亡率则显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。

结论:补锌可以保护人晶状体上皮细胞抵抗由半乳糖引起的细胞凋亡,可能对白内障的形成有抑制作用。

关键词:人晶状体上皮细胞;半乳糖;锌;细胞凋亡

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.10.04

引用:贾义,张亮亮,夏欢. 锌对半乳糖诱导的人晶状体上皮细胞凋亡的影响. 国际眼科杂志 2018;18(10):1774-1777

0 引言

白内障已经成为大多数国家致盲和视力残疾的主要因素,也是我国老年人群致盲的首要原因^[1-4]。半乳糖性白内障的发生是由半乳糖代谢有关的酶缺陷引起,在正常浓度时,半乳糖被代谢为葡萄糖,但在较高浓度时,通过半乳糖氧化酶的作用转化为醛糖和氢过氧化物,并导致活性氧(reactive oxygen species,ROS)的产生^[5]。氧化应激被认为是白内障发生的主要因素^[6],在半乳糖性白内障小鼠模型^[7]或半乳糖处理的晶状体上皮细胞^[8]中会产生大量的ROS。铜锌超氧化物歧化酶(Cu/Zn-SOD)是一个重要的ROS清除剂,它在白内障的形成中有一定的保护作用^[9]。我们的研究表明,补锌可以通过上调Cu/Zn-SOD的蛋白表达水平和活性,保护人晶状体上皮细胞抵抗氧化损伤^[10],而晶状体上皮细胞凋亡是非先天性白内障发生的早期事件^[11-12],但锌对半乳糖诱导的人晶状体上皮细胞凋亡的影响还不是很清楚。因此本研究拟用半乳糖诱导人晶状体上皮细胞凋亡,观察锌对晶状体上皮细胞凋亡的影响,从而探讨锌在白内障发生中的预防机制。

1 材料和方法

1.1 材料 高糖DMEM培养基、N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸(HEPES)、新生小牛血清(NCS)、溴化-4,5-二甲基-2-噻唑基-2,5-二苯基氮唑(MTT,美国Gibco公司);青霉素G、硫酸链霉素、胰蛋白酶(美国Amresco公司);PI/Hoechst 33258、N,N,N,N-四-(2-吡啶基甲基)乙二胺(TPEN)、ZnSO₄、半乳糖(美国Sigma公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和加药处理 人晶状体上皮细胞HLEC细胞系SRA01/04(美国Sciencell公司)用含体积分数10%热灭活的NCS、青霉素100U/mL和链霉素100μg/mL,pH=7.4的DMEM培养基,于37℃、含体积分数5%CO₂培养箱内培养。ZnSO₄为补锌试剂,TPEN可以螯合细胞中的锌离子导致细胞锌浓度的降低,为缺锌试剂。经细胞活力检测,不同浓度的ZnSO₄对人晶状体上皮细胞的活力没有显著影响,随TPEN处理浓度的升高人晶状体上皮细胞的活力显著下降,补锌和缺锌试剂的浓度参考我们以前发表的论文,分别为50μmol/L和1μmol/L^[10],补锌、缺锌和半乳糖处理细胞的时间均为12h。之后将培养的细胞分为六组:对照组、半乳糖处理组、补锌组、补锌联合半乳糖处理组、缺锌组、缺锌联合半乳糖处理组。

1.2.2 细胞存活率检测 将细胞密度为 2×10^5 /mL的悬液接种于24孔培养板中,培养12h后换用新鲜的无血清培养基继续培养24h,用不同浓度的半乳糖(25、50、75、100、125mmol/L)处理细胞12h后测定细胞存活率。测定细胞存活率前4h,每孔加入终质量浓度为0.5mg/mL的MTT溶液,继续培养4h,然后将培养孔内的液体小心吸出,每孔加入1mL DMSO,充分溶解10min,于570nm波长处测定各孔的吸光度(A)值。细胞存活率(%) = $(A_{\text{实验组}} -$

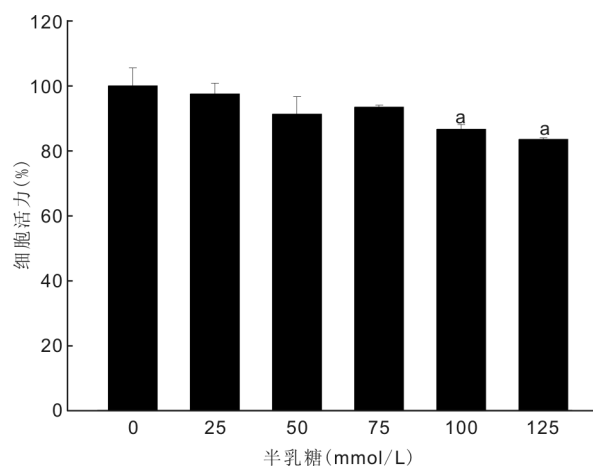


图1 不同浓度半乳糖对HLEC细胞存活率的影响^a $P < 0.05$ vs 未处理组(0mmol/L半乳糖组)。

$A_{\text{空白组}})/(A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。根据细胞存活率测定结果选择合适的药物浓度,之后按照各实验分组处理细胞。

1.2.3 荧光显微镜观察细胞核形态 按实验分组处理细胞后,吸尽培养液,加入0.5mL固定液[甲醇:冰醋酸=3:1(V/V)]固定10min,用PBS洗涤2次后加入0.5mL Hoechst 33258染色液(5μg/mL)染色30min,PBS洗涤2次后用荧光显微镜观察细胞核的形态变化。

1.2.4 细胞凋亡率检测 将细胞密度为 2×10^5 /mL的悬液接种至6孔培养板中。细胞培养至80%后,将旧的培养基丢弃,加入新鲜的无血清培养基培养24h,按照实验分组加药处理细胞12h。之后用冷PBS洗涤细胞2次,并收集细胞沉淀,然后用700mL/L乙醇在-20℃固定4h,用PBS洗涤后,悬浮于0.9mL缓冲液(含1% TritonX-100和100μL 0.5mg/mL RNase A),37℃孵育30min,调整细胞密度为 1×10^6 /mL,在100μL 50μg/mL PI染色缓冲液中室温避光反应30min,然后加入300μL PBS,立即用流式细胞仪检测细胞凋亡率,样品在1h内测试完毕。

统计学分析:采用SPSS 17.0统计学软件进行统计分析。实验数据经Shapiro-Wilk检验呈正态分布,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,经Levene检验方差齐。经单因素方差分析后,组间的多重比较采用LSD-t检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 半乳糖对人晶状体上皮细胞存活率的影响 不同浓度半乳糖(0、25、50、75、100、125mmol/L)处理HLEC细胞后,细胞存活率比较,差异有统计学意义($F = 10.192, P < 0.001$),细胞存活率分别为(100.0 ± 5.4)%、(97.5 ± 3.2)%、(91.3 ± 5.3)%、(93.4 ± 0.6)%、(86.6 ± 1.4)%和(83.5 ± 0.4)%,随着半乳糖浓度的增加,细胞存活率呈下降趋势,与未处理组相比,半乳糖浓度为100mmol/L和125mmol/L时,细胞存活率均显著下降($P = 0.014, 0.006$,图1)。后期处理细胞的半乳糖浓度为125mmol/L。

2.2 荧光显微镜观察细胞核形态变化 为了检测锌对半乳糖诱导的HLEC细胞核形态变化的影响,我们用荧光染料Hoechst 33258对处理后的细胞进行染色,荧光显微镜观察细胞核形态。结果见图2,对照组和补锌组的细胞核呈现均一的染色,半乳糖处理组、补锌联合半乳糖处理组、缺锌组和缺锌联合半乳糖处理组中一些细胞的细胞核收缩,表现出典型的细胞凋亡形态。缺锌联合半乳糖处理组

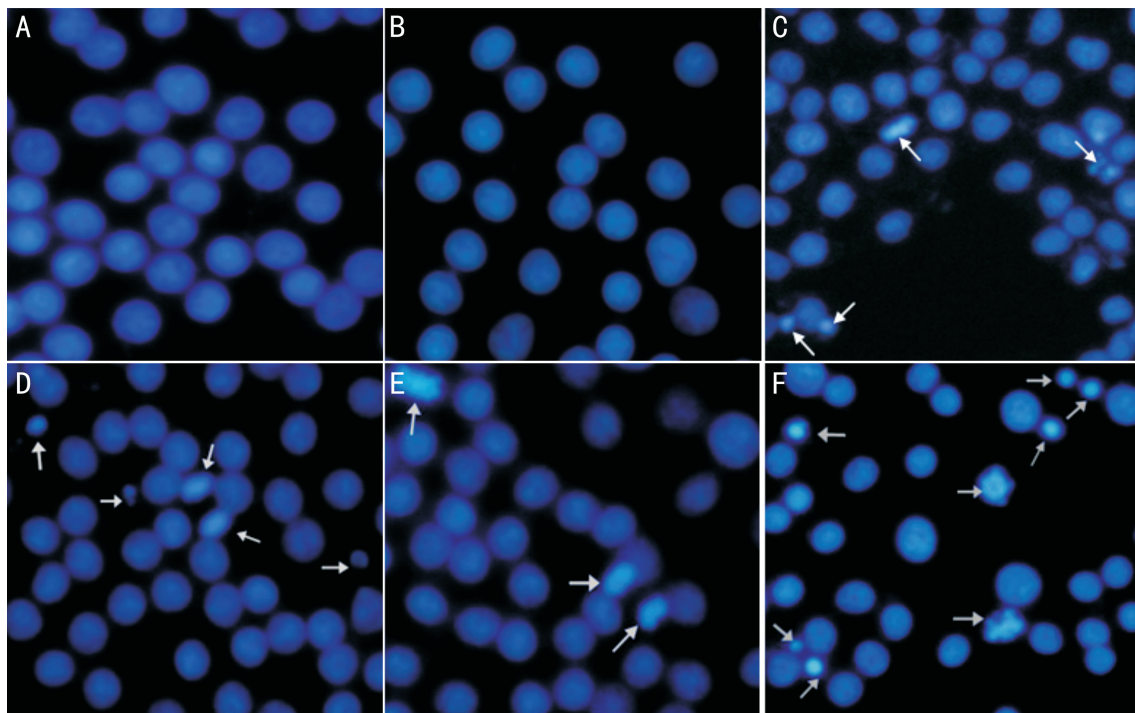


图2 各分组细胞核形态的变化(x200,箭头示凋亡细胞核) A:对照组;B:补锌组;C:缺锌组;D:半乳糖处理组;E:补锌联合半乳糖处理组;F:缺锌联合半乳糖处理组。

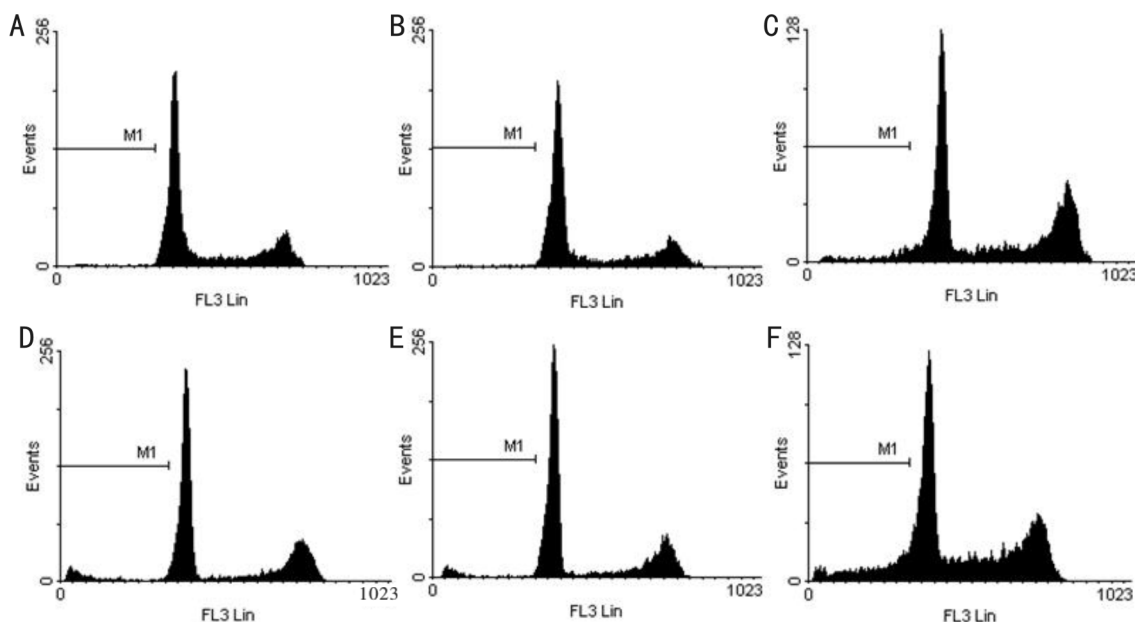


图3 各组细胞凋亡率的结果 A:对照组;B:补锌组;C:缺锌组;D:半乳糖处理组;E:补锌联合半乳糖处理组;F:缺锌联合半乳糖处理组。

表1 各组细胞凋亡率的比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	细胞凋亡率
对照组	6	1.5±0.1
半乳糖处理组	6	7.1±0.2 ^a
补锌组	6	1.4±0.1
补锌联合半乳糖处理组	6	4.4±0.2 ^{a,c}
缺锌组	6	5.5±0.2 ^a
缺锌联合半乳糖处理组	6	15.8±0.3 ^{a,c}

注:^a $P < 0.05$ vs 对照组;^c $P < 0.05$ vs 半乳糖处理组。

中的细胞表现出明显的核浓缩和碎片,且细胞凋亡明显增加。

2.3 各组细胞凋亡率的变化 各组细胞凋亡率的检测结果

果见图3、表1,经分析差异具有统计学意义($F = 2214.078, P < 0.001$)。与对照组相比,半乳糖处理组、补锌联合半乳糖处理组、缺锌组和缺锌联合半乳糖处理组的细胞凋亡率均显著增加,差异有统计学意义($P < 0.001$)。与半乳糖处理组相比,补锌联合半乳糖处理组的细胞凋亡率显著下降,差异有统计学意义($P < 0.001$),缺锌联合半乳糖处理组的细胞凋亡率则显著升高,差异有统计学意义($P < 0.001$)。

3 讨论

半乳糖性白内障小鼠模型和细胞的研究表明^[5,7-8,13-14],半乳糖会诱导大量一氧化氮和羟自由基的产生,一氧化氮可以和超氧阴离子反应生成过氧亚硝酸根,不断增强的氧化应激和硝化应激会导致脂质过氧化的产

生和总谷胱甘肽水平的变化,进一步造成氧化还原状态的失衡,从而引起白内障的发生。SOD、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶等抗氧化剂可以减缓氧化应激,在白内障的形成中有一定的抑制作用^[5,7-10,13-14]。

本研究对锌在半乳糖诱导的 HLEC 凋亡中的作用进行了研究,以 HLEC 为研究对象,利用半乳糖诱导 HLEC 凋亡,对补锌和缺锌条件下 HLEC 凋亡和细胞核形态变化进行了检测。结果发现,半乳糖处理和缺锌可以引起 HLEC 凋亡的显著增加($P < 0.05$),补锌可以显著降低由半乳糖处理引起的细胞凋亡($P < 0.05$),缺锌则可以进一步增加半乳糖诱导的细胞凋亡($P < 0.05$)。Dai 等^[8]研究发现,半乳糖处理 HLEC 后,细胞中活性氧水平、脂质过氧化水平和蛋白质羰基水平升高,且会导致线粒体膜电位下降和细胞色素 C 释放,最终导致细胞凋亡。半乳糖处理导致 HLEC 凋亡的结果和我们的结果类似。晶状体上皮细胞凋亡是非先天性白内障发生的早期事件^[11-12],补锌可以显著降低半乳糖引起的细胞凋亡,说明锌对白内障的发生有一定的预防作用。Dai 等^[15]也发现,微量元素硒对半乳糖诱导的白内障有一定的预防作用。最近研究表明,补锌可以改善老年和糖尿病小鼠的氧化应激^[16-17],且锌稳态的破坏将导致细胞功能异常^[18]。已证明缺锌与人类大多数眼部疾病有关^[19],包括白内障^[20]。我们的研究也证实补锌可以降低半乳糖引起的细胞凋亡,而缺锌会增加半乳糖诱导的细胞凋亡,说明锌稳态的异常可能对白内障的预防和形成起到一定的作用。

我们推测,锌对半乳糖诱导的 HLEC 凋亡的影响与细胞中 Cu/Zn-SOD 的蛋白表达水平和活性有关^[10],补锌可以提高 Cu/Zn-SOD 的蛋白表达水平和活性,抵抗半乳糖处理产生的活性氧对细胞的凋亡,而缺锌虽然也可以提高 Cu/Zn-SOD 的蛋白表达水平和活性,但其不足以抵抗半乳糖处理产生的活性氧对细胞的凋亡。Dai 等^[15]实验表明,半乳糖诱导的大鼠白内障的发生和晶状体中 Cu/Zn-SOD 的蛋白表达水平下降有关。而 Cu/Zn-SOD 蛋白表达水平和活性的提高对半乳糖诱导的晶状体上皮细胞凋亡的抵抗作用还需要进一步的实验验证。另外,补锌也有可能提高其他含锌酶的表达和活性,如硒蛋白 R,从而减少活性氧的产生。Manikandan 等^[13]研究表明,半乳糖处理的大鼠中 SOD 的活性升高,而 Iezhitsu 等^[14]研究则发现半乳糖处理的大鼠中 SOD 的活性下降,但脂质体镁牛磺酸盐和橙皮苷都可以将其恢复至正常活性水平,预防白内障的发生。

总之,补锌可以保护人晶状体上皮细胞抵抗由半乳糖处理引起的细胞凋亡,而缺锌会增加半乳糖诱导的细胞凋亡,说明白内障的发生可能和缺锌有关,锌对白内障的发生有一定的预防作用。

参考文献

- Verhoeven VJM, Wong KT, Buitendijk GHS, et al. Visual consequences of refractive errors in the general population. *Ophthalmology* 2015;122(1):101-109
- Chou CF, Cotch MF, Vitale S, et al. Age-related eye diseases and visual impairment among U. S. adults. *Am J Prev Med* 2013;45(1):29-35

- 娄尚,袁兆康. 我国老年性白内障流行病学的调查研究. 南昌大学学报(医学版) 2012;52(6):98-101
- Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, et al. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health Organ* 2004;82(11):844-851
- Wu DM, Lu J, Zheng YL, et al. Purple sweet potato color repairs D-galactose-induced spatial learning and memory impairment by regulating the expression of synaptic proteins. *Neurobiol Learn Mem* 2008;90(1):19-27
- Devi VG, Rooban BN, Sasikala V, et al. Isorhamnetin-3-glucoside alleviates oxidative stress and opacification in selenite cataract *in vitro*. *Toxicol In Vitro* 2010;24(6):1662-1669
- Agarwal R, Lezhitsa I. Effects of magnesium taurate on the onset and progression of D-galactose-induced experimental cataract: *In vivo* and *in vitro* evaluation. *Exp Eye Res* 2013;110:35-43
- Dai J, Liu H, Zhou J, et al. Selenoprotein R protects human lens epithelial cells against D-galactose-induced apoptosis by regulating oxidative stress and endoplasmic reticulum stress. *Int J Mol Sci* 2016;17(2):231
- Behndig A, Karlsson K, Reaume AG, et al. *In vitro* photochemical cataract in mice lacking copper-zinc superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med* 2001;31(6):738-744
- 贾义,宋萍萍,周静,等. 锌对 3-吗啡-斯得酮亚胺(SIN-1)诱导的人晶状体上皮细胞 Cu/Zn-SOD 表达及活性的影响. 眼科新进展 2017;37(1):24-27
- Long AC, Colitz CM, Bomser JA. Apoptotic and necrotic mechanisms of stress-induced human lens epithelial cell death. *Soc Exp Biol Med* 2004;229(10):1072-1080
- Li WC, Kuszak JR, Dunn K, et al. Lens epithelial cell apoptosis appears to be a common cellular basis for non-congenital cataract development in humans and animals. *J Chem Biol* 1995;130(1):169-181
- Manikandan R, Arumugam M. Anticataractogenic effect of hesperidin in galactose-induced cataractogenesis in Wistar rats. *World J Ophthalmol* 2016;6(1):1-9
- Iezhitsu I, Agarwal R, Saad SDB, et al. Mechanism of the anticataract effect of liposomal MgT in galactose-fed rats. *Mol Vis* 2016;22:734-747
- Dai J, Zhou J, Liu H, et al. Selenite and ebselen supplementation attenuates D-galactose-induced oxidative stress and increases expression of SELR and SEP15 in rat lens. *J Biol Inorg Chem* 2016;21(8):1037-1046
- Kumar SD, Vijaya M, Samy RP, et al. Zinc supplementation prevents cardiomyocyte apoptosis and congenital heart defects in embryos of diabetic mice. *Free Radic Biol Med* 2012;53(8):1595-1606
- Prasad AS, Beck FWJ, Bao B, et al. Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. *Am J Clin Nutr* 2007;85(3):837-844
- Du Y, Guo D, Wu Q, et al. Zinc chloride inhibits human lens epithelial cell migration and proliferation involved in TGF- β 1 and TNF- α signaling pathways in HLE B-3 cells. *Biol Trace Elem Res* 2014;159(1-3):425-433
- Grahn BH, Paterson PG, Gottschall-Pass KT, et al. Zinc and the eye. *J Am Coll Nutr* 2001;20(2):106-118
- Shukla N, Moitra JK, Trivedi RC. Determination of lead, zinc, potassium, calcium, copper and sodium in human cataract lenses. *Sci Total Environ* 1996;181(2):161-165