

七叶皂苷钠体外对大鼠紫外线所致晶状体上皮细胞NF- κ B表达的影响

李姗姗,鲁建华,张文芳,刘瑜

作者单位:(730030)中国甘肃省兰州市,兰州大学第二医院眼科
作者简介:李姗姗,女,住院医师,在读硕士研究生,研究方向:白内障、青光眼。

通讯作者:鲁建华,男,主任医师,硕士研究生导师,博士,研究方向:白内障、青光眼。lujianhua266@sina.com

收稿日期:2010-08-16 修回日期:2010-11-01

Intervention effect of aescinate for UV-induced cataract and its impact on NF- κ B expression of rat lens epithelial cells

Shan-Shan Li, Jian-Hua Lu, Wen-Fang Zhang, Yu Liu

Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China

Correspondence to: Jian-Hua Lu, Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China. lujianhua266@sina.com

Received:2010-08-16 Accepted:2010-11-01

Abstract

• AIM: To investigate the effect of aescinate on the expression of NF- κ B and the intervention to the rat cataract by ultraviolet(UV) rays.

• METHODS: The expression of NF- κ B was detected by immunohistochemistry in different phase (3, 12 and 24 hours) after the rat lens epithelial cells were cultivated in RPMI 1640 which were exposed to UV radiation.

• RESULTS: The expression of NF- κ B in the UV groups was significantly higher and it was positively correlated with the degree of lens opacity. Compared with the different doses of aescinate groups and the UV radiation treatment group; the expression of NF- κ B in the high dose group was lower than that of the mean, low dose and UV group ($P < 0.01$), and there was no significant difference between the low-dose treatment and UV radiation group ($P > 0.05$) and there was significant difference between the mean dose treatment and UV radiation groups ($P < 0.05$).

• CONCLUSION: UV can induce the activation of NF- κ B. Aescinate can inhibit the activation of NF- κ B expression and the occurrence of UV-induced cataract in the rat lens epithelial cells and has a dose-dependent effect.

• KEYWORDS: NF- κ B; lens epithelial cells; aescinate; ultraviolet

Li SS, Lu JH, Zhang WF, et al. Intervention effect of aescinate for UV-induced cataract and its impact on NF- κ B expression of rat lens epithelial cells. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010; 10 (12):2250-2252

摘要

目的:探讨在紫外线(ultraviolet, UV)诱导大鼠白内障形成过程中晶状体上皮细胞(lens epithelial cell, LEC)中NF- κ B的活化表达及七叶皂苷钠(aescinate)的抑制作用。

方法:大鼠晶状体离体培养,分成UV照射A组,七叶皂苷钠处理B,C,D组,用免疫组织化学方法检测紫外线照射后在RPMI 1640培养液里培养3,12和24h LEC NF- κ B的表达水平。

结果:UV照射组LEC NF- κ B表达水平随时间的延长而增强,且与晶状体混浊程度呈正相关;高剂量七叶皂苷钠处理组的NF- κ B表达水平较UV照射组、低、中剂量处理组明显减低($P < 0.01$),中剂量处理组的NF- κ B表达水平与UV照射组存在统计学差异($P < 0.05$),低剂量处理组的NF- κ B表达水平与UV照射组无统计学差异($P > 0.05$)。

结论:紫外线可诱导鼠LEC NF- κ B的活化;七叶皂苷钠可以抑制LEC NF- κ B的活化表达并存在一定的剂量依赖性。

关键词:核转录因子- κ B;晶状体上皮细胞;七叶皂苷钠;紫外线

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.12.006

李姗姗,鲁建华,张文芳,等.七叶皂苷钠体外对大鼠紫外线所致晶状体上皮细胞NF- κ B表达的影响.国际眼科杂志2010;10(12):2250-2252

0 引言

白内障是世界范围内主要的致盲原因,许多环境因素与其发病有关,其中紫外线所致白内障的现象已经在许多流行病学和实验研究中得到证实^[1]。白内障确切的发病机制尚不清楚,但是不同类型白内障共同的细胞学基础是LEC的凋亡。近年来研究表明,NF- κ B在细胞凋亡与抗凋亡作用中发挥着极其重要的作用^[2]。Alexander等^[3]用NF- κ B-虫荧光素酶转基因小鼠证实小鼠晶状体中存在NF- κ B活性,用紫外线刺激后,晶状体中NF- κ B活性明显增强;NF- κ B在白内障的发病机制中发挥着举足轻重的作用,现已跃居白内障基础研究的热点。七叶皂苷钠是一种具有抗炎、抗渗出、抗氧化、清除氧自由基强有力的药物。我们的研究的切入点:光氧化损伤是诱导NF- κ B激活的重要途径之一,近年研究发现,七叶皂苷钠能有效清除氧自由基从而有效抑制大鼠视网膜、脑组织、胰腺组织的NF- κ B活化表达^[4,5],但是国内外关于七叶皂苷钠对大鼠LEC NF- κ B表达的影响还尚未见报道,我们通过免疫组织化学法研究七叶皂苷钠体外对紫外线所致LEC NF- κ B表达的影响及抑制紫外线所致白内障发生的效果。拟解决的关键问题旨在通过初步研究紫外线所致白内障LEC中NF- κ B的活化表达,为进一步探讨白内障的发生机制提供实验依据,且明确七叶皂苷钠是否能够抑制LEC中NF- κ B的活化表达,以期通过调控LEC中NF- κ B的表达实现增强LEC抗氧化应激能力和保护LEC。

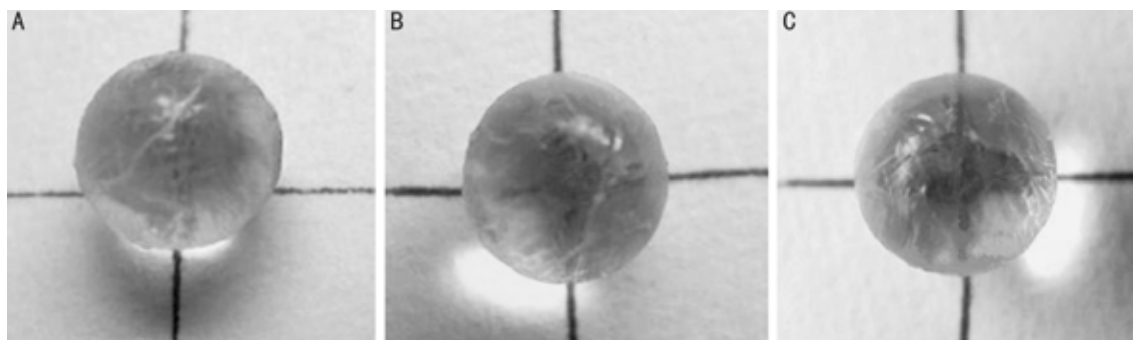


图1 大鼠晶状体 A:UV照射组,B:中剂量,C:高剂量。

表1 NF-κB 的表达率和晶状体混浊程度

分组	NF-κB 的表达率($\bar{x} \pm s, \%$)			晶状体混浊程度(“+”量) (n = 15)		
	3h	12h	24h	3h	12h	24h
A 对照组	33.7 ± 1.8	48.2 ± 6.3	71.9 ± 7.1	3	10	14
B(0.04g/L)	32.9 ± 1.8	47.5 ± 6.6	70.9 ± 8.2	3	9	14
C(0.08g/L)	31.0 ± 3.0 ^a	44.5 ± 5.6 ^a	66.6 ± 8.4 ^a	2	8	13
D(0.2g/L)	18.7 ± 3.7 ^a	30.7 ± 3.5 ^a	39.1 ± 5.8 ^a	0	3 ^c	6 ^c

^aP < 0.05 vs A, B 组; ^cP < 0.05 vs A, B, C 组。

1 材料和方法

1.1 材料 健康 SPF 级 SD 大鼠 34 只(兰州大学实验动物中心提供),雌雄兼备,体质量 180 ~ 240g,1 ~ 2 月龄。实验前双眼前节检测均正常。七叶皂苷钠粉针剂由山东绿叶制药股份有限公司提供,RPMI 1640 培养液、鼠抗人 NF-κB p65 多克隆抗体、DAB 显色试剂盒、SABC 免疫组化试剂盒、APES 由武汉博士德公司提供,免疫组化相关设备分别由甘肃省中医学院生化试验室和病理教研组提供。UV 光源选用 250W 高压泵灯(为 UV-A,UV-B 混合光源,沈阳光华灯泡厂)。

1.2 方法 健康 SPF 级 SD 大鼠 34 只,雌雄不限,纳入实验前经裂隙灯检查眼前节正常随机分组,10g/L 托吡卡胺扩瞳,3g/L 氟哌酸洗眼,颈椎脱臼致死,沿角巩膜缘全周剪开角膜,取出晶状体,置入含青霉素 80 万 U + 庆大霉素 8 万 U 的生理盐水 500mL 中,1min 后取出置入含 RPMI 1640 培养液 5mL 的 6 孔培养板内,每孔一个晶状体,于 37℃,95% 湿度,50mL/L CO₂ 培养箱内培养 8h,从其中选取 60 只透明晶状体作为下一步实验对象。UV 照射 A 组:将筛选后的透明晶状体 15 只置于含 RPMI 1640 培养液 5mL 的 6 孔培养板内,每孔 1 个晶状体,将紫外线照射组置于垂直光源下方 50cm 处,撤去培养板盖,晶状体表面上液保留约 1mm,其余培养液移走,照射 15min,之后每 5 个晶状体为 1 组,共分为 3,12,24h 3 个时限组,置于 37℃,50mL/L CO₂ 培养箱内培养。七叶皂苷钠处理组:用 RPMI 1640 培养液分别配置 0.04,0.08 和 0.2g/L(B,C,D 组)浓度的七叶皂苷钠母液,将剩余的 45 只透明晶状体,各 15 只置于含不同浓度的七叶皂苷钠母液 5mL 的 6 孔培养板内,每孔 1 个晶状体,余同 UV 照射组^[6]。将培养的各期各组晶状体用 40g/L 甲醛溶液固定,梯度乙醇脱水,常规石蜡包埋,厚度 4μm 连续切片。HE 染色光镜下观察晶状体各部病理改变,免疫组织化学染色(SABC 法)检测 NF-κB 的表达,依照使用说明:切片常规脱蜡至水,新鲜配置 30mL/L 过氧化氢,室温浸泡 5min 灭活内源性过氧化

物酶,蒸馏水冲洗,滴加正常山羊血清封闭液,室温 20min,甩去多余液体后滴加一抗(鼠抗人 NF-κB p65 多克隆抗体),37℃ 水箱孵育 20min,PBS 洗后加 SABC 试剂,再 37℃ 水箱孵育 20min,DAB 显色 20min,镜下控制反应时间,蒸馏水冲洗,苏木素轻度复染,脱水、透明、封片,光学显微镜观察拍照。阴性对照:用 PBS 代替一抗,余步骤同上。免疫组织化学染色结果:每个晶状体标本选 4 张切片,主要在细胞质和/或细胞核中表达,阳性呈棕黄色颗粒,光镜下观察并照相,分别随机计数每张切片 5 个高倍视野(DAB × 400),并记录阳性细胞率。

统计学分析:所有数据采用 SPSS 16.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,若差异有统计学意义,两组间比较用最小显著差异 LSD-t 检验,P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 晶状体混浊程度 在白色背景下设计一垂直交叉的黑色线条,将被检晶状体置于“十”字交叉的黑色线条之上,以透过晶状体所能看到的线条清晰度予以分级。“-”:线条清晰可见,为完全透明晶状体;“+”混浊:线条模糊,但轮廓尚可辨;“++”混浊:线条轮廓不清,仅中央部隐约可见;“+++”混浊:线条完全不见,晶状体全部混浊。以各组晶状体混浊度,即“+”出现量的多少行统计学处理。形态学观察结果显示,各组晶状体混浊度随损伤时间的延长而逐渐加重(图 1,表 1)。

2.2 晶状体上皮细胞 NF-κB 活化表达 UV 照射组 NF-κB 阳性活化表达率与损伤时间相关性分析显示两者呈正相关($r = 0.993, P < 0.05$),即随损伤时间的延长,NF-κB 活化表达率增高。各时段低剂量七叶皂苷钠处理组的 NF-κB 表达水平与 UV 照射组无统计学差异($P > 0.05$),各时段中剂量七叶皂苷钠处理组的 NF-κB 表达水平与 UV 照射组存在统计学差异($P < 0.05$),各时段高剂量七叶皂苷钠处理组的 NF-κB 表达水平较 UV 照射组、低、中剂量处理组有明显统计学差异($P < 0.01$,图 2,表 1)。

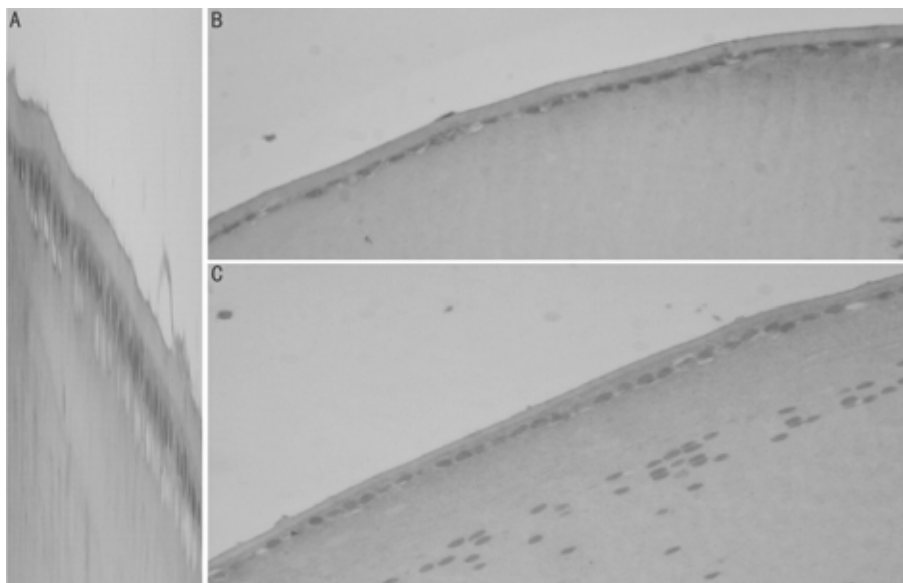


图2 大鼠晶状体(SABC×400) A:UV照射组,B:中剂量,C:高剂量NF-κB的表达。

3 讨论

白内障是世界范围内主要的致盲原因,许多环境因素与其发病有关,近年来,国外眼科学者通过研究证明在各种诱因导致的晶状体混浊前都发现了LEC的凋亡,从而推断细胞凋亡是除先天性白内障以外的所有类型白内障形成的细胞学基础,而氧化损伤是LEC凋亡的重要诱发因素之一。晶状体上皮是紫外线损害晶状体的最主要部位。紫外线诱发体外培养的LEC凋亡可能与以下因素有关:(1)紫外线对晶状体上皮细胞的光氧化损伤。紫外线到达LEC,使其产生光化学反应,产生活性氧自由基,使上皮细胞遭受氧化应力的损伤,直接损伤染色体,从而诱导凋亡。(2)光氧化产生的活性氧自由基发生氧化作用使生物膜受损,氧自由基与脂质膜的聚不饱和脂肪酸作用,引起膜内部的脂质过氧化反应致使膜通透性的改变,并导致钙泵失调,干扰了细胞内钙离子稳态,而引发细胞凋亡。可见氧化作用在紫外线照射诱发LEC凋亡过程中起着极为重要的作用。LEC凋亡后导致细胞密度降低。影响了晶状体纤维生长及生长质量,上皮细胞缺损使其下的晶状体纤维渗透压平衡失去控制,使这部分晶状体纤维的透明性和完整性受损^[7]。转录因子核因子-κB(nuclear factor-kappa B,NF-κB)是一种广泛存在并具有多向性调节作用的蛋白质分子,在细胞的信号传递和基因的诱导表达过程中起重要作用,系由两种Rel家族蛋白构成的二聚体蛋白质。当细胞未受到任何刺激时,细胞质中NF-κB的p65亚基与IκB形成三聚体化合物而处于非活化表达状态,不具有调节基因转录的能力,当细胞受到紫外线照射、细胞因子、病毒蛋白、活性氧产物等细胞外信号刺激时,蛋白激酶被激活,致使IκBαN端调节区的Ser32/36磷酸化,最后在蛋白酶小体的作用下IκB与NF-κB发生解离,获得自由的NF-κB迅速从细胞质移位到细胞核,入核的NF-κB二聚体与基因上的κB位点发生特异性结合,从而促进相关基因的转录,参与细胞的凋亡。2003年Boileau等^[2]首次提出UVAR能激活人LEC的NF-κB。NF-κB的激活可以促进晶状体上皮细胞的凋亡,参与了白内障的发生和/或进展的局部免疫/炎症反应。因此,寻找NF-κB的抑制药物,对临床治疗各种相关性疾病是十分重要的。七叶皂苷是从中药娑罗子的干燥成熟果实中提取的三萜皂苷

的钠盐,近年来研究发现其除有抗炎、抗渗出、改善微循环的药理作用外,其在抗氧化、清除氧自由基方面的作用亦尤为显著。七叶皂苷钠的结构中含有7个酚羟基,羟基能有效地捕获自由基,减轻脂质过氧化发生的程度,因此七叶皂苷钠具有较强的抗氧化自由基作用。且实验证明,七叶皂苷钠可明显增强抗氧化系统中:SOD(超氧化物歧化酶)、GSH-Px(谷胱甘肽过氧化物酶)及Na⁺-K⁺-ATP酶活性减少氧自由基对细胞的损伤^[8]。另外,HCE(其中含质量分数70%的七叶皂苷)具有抗自由基作用,提示七叶皂苷钠可能通过清除自由基来改善出血引起的损伤,加速组织的自身修复^[9]。本实验研究证实,七叶皂苷钠可有效抑制紫外线照射后晶状体上皮细胞的NF-κB活化表达,实现对晶状体上皮细胞的保护作用,从而为药物预防和治疗白内障提供了重要依据。但是七叶皂苷钠的药理作用广泛,是否还有其他途径对抗白内障的发生,有待进一步探究。

参考文献

- 1 崔蓓,付清,柳林,等.紫外线辐射致大鼠白内障模型的建立.国际眼科杂志2009;9(5):836-838
- 2 Boileau TW, Bray TM, Bomser JA. Ultraviolet radiation modulates nuclear factor kappa B activation in human lens epithelial cells. *J Biochem Mol Toxicol* 2003;17(2):108-113
- 3 Alexander G, Carlsen H, Blomhoff R. Strong *in vivo* activation of NF-kappaB in mouse lenses by classic tressors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(6):2683-2688
- 4 殷响,吴德全,王强.七叶皂苷对大鼠重症急性胰腺炎NF-κB表达的影响.肝胆胰外科杂志2008;20(6):387-389
- 5 游志鹏,姜李. NF-κB、IL-6在大鼠视网膜缺血再灌注损伤中的表达及β-七叶皂苷钠对其表达的影响.眼视光学杂志2004;6(2):106-113
- 6 胡霞敏,曾繁典.β-七叶皂苷钠在脑缺血再灌注大鼠体内药代动力学的研究.中国临床药理学与治疗学2005;10(7):828-831
- 7 Berthoud VM, Beyer EC. Oxidative stress, lens gap junctions, and cataracts. *Antioxid Redox Signal* 2009;11(2):339-353
- 8 Hu XM, Zeng FD. Protective effects of sodium beta-aescin on ischemia-reperfusion injury in rat brain. *Acta Pharmaceutica Sinica* 2004;39(6):419-423
- 9 Ojewole JA. Evaluation of the analgesic, anti-inflammatory and anti-diabetic properties of *Sclerocarya birrea* (A. Rich.) Hochst. stem-bark aqueous extract in mice and rats. *Phytother Res* 2004;18(8):601-608