

# 茶多酚对体外培养鼠晶状体抗氧化损伤作用的研究

李 佳, 刘 丹

作者单位: (121001) 中国辽宁省锦州市, 辽宁医学院附属第一医院眼科

作者简介: 李佳, 硕士, 医师, 研究方向: 白内障发病机制和防治。  
通讯作者: 刘丹, 硕士, 教授, 主任医师, 主任, 研究方向: 白内障发病机制和防治。yankeliudan@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-11-21 修回日期: 2011-12-21

## Research of anti-oxidative damage with tea polyphenols on rat lens cultured *in vitro*

Jia Li, Dan Liu

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

**Correspondence to:** Dan Liu. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China. yankeliudan@yahoo.com.cn

Received: 2011-11-21 Accepted: 2011-12-21

### Abstract

• **AIM:** To observe tea polyphenols (TP) on the changes of the lens morphological and antioxidative system in rat of oxidative damage, and to research the protection of TP on oxidative damage to the lens.

• **METHODS:** *In vitro* oxidative damage model was established, the untreated group, oxidative damage group ( $H_2O_2$ ) and experimental groups ( $H_2O_2 + TP$ ) were set respectively. After 6, 12, 24 and 48 hours, the cloudy conditions of lens were observed in every group, and the superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) activity and malondaldehyde (MDA) content were detected of each lens.

• **RESULTS:** Untreated group's lens all maintained transparent. Along with the extension of action time, cloudy degree of the lens gradually increased obviously in oxidative damage group. The lens cloudiness in tea polyphenols group was less than that in oxidative damage groups. The differences among groups in lens opacity relative grey value were statistically significant ( $P < 0.05$ ). MDA content of lens tissue in oxidative damage group was significantly higher than that in control group ( $P < 0.05$ ), while GSH-Px and SOD decreased significantly ( $P < 0.05$ ). TP group being compared with oxidative damage group, its MDA in lens reduced ( $P < 0.05$ ), but still higher than that in control group, and GSH-Px, ATP levels increased obviously ( $P < 0.05$ ), all the differences were statistically significant.

• **CONCLUSION:** TP can improve the lens oxidation resistance to oxidative damage, reduce lipid peroxide level, thus delay the origin and development of cataract, and provide new theory basis for the clinical diagnosis and treatment of cataracts.

• **KEYWORDS:** tea polyphenols; cataract; oxidative

damage; hydrogen peroxide

Li J, Liu D. Research of anti-oxidative damage with tea polyphenols on rat lens cultured *in vitro*. *Guji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(2):215-217

### 摘要

**目的:** 观察茶多酚 (tea polyphenols, TP) 对氧化损伤鼠晶状体的形态学及抗氧化系统的变化, 研究其对晶状体氧化损伤的保护作用。

**方法:** 采用体外培养鼠晶状体的氧化损伤模型, 设置正常对照组、氧化损伤 ( $H_2O_2$ ) 组和 TP ( $H_2O_2 + TP$ ) 组, 分别于 12, 24, 48h 后观察各组晶状体的混浊情况, 并检测各组晶状体的抗氧化酶系统中的超氧化物歧化酶 (SOD) 及谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性以及脂质过氧化反应终产物丙二醛 (MDA) 的含量。

**结果:** 正常对照组晶状体均保持透明, 未见白内障形成;  $H_2O_2$  组大鼠离体晶状体随作用时间的延长, 晶状体的混浊程度逐渐明显增加; TP 组的晶状体混浊较  $H_2O_2$  组明显减轻, 白内障形成不明显。晶状体混浊相对灰度值组间比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。  $H_2O_2$  组大鼠晶状体组织中 MDA 含量较对照组明显增高 ( $P < 0.05$ ), 而 GSH-Px 和 SOD 明显下降 ( $P < 0.05$ ), TP 组与  $H_2O_2$  组相比, 其晶状体中 MDA 降低 ( $P < 0.05$ ), 但仍高于对照组, 而 GSH-Px 和 ATP 含量明显升高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

**结论:** TP 可提高氧化损伤晶状体的抗氧化能力, 降低脂质过氧化物水平, 从而延缓白内障的发生和发展, 为临床白内障的诊疗提供了新的理论基础。

**关键词:** 茶多酚; 白内障; 氧化损伤; 过氧化氢

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2012. 02. 07

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;12(2):215-217

### 0 引言

白内障是世界上最主要的致盲病因之一, 同时在我国也是位列第一位的致盲眼病。近些年来国内外学者的研究均指出眼组织内活性氧和氧自由基的增加、抗氧化防御系统力量的削弱是白内障主要成因之一, 但对晶状体氧化损伤的途径尚未完全清楚, 对白内障形成的机制尚有争议<sup>[1,2]</sup>。因此研究白内障的发病机制, 寻找能够延缓白内障发展的药物是防治白内障研究的热点。目前已有很多治疗白内障的药物在使用, 但其疗效欠佳<sup>[3]</sup>。本研究建立体外培养鼠晶状体氧化损伤的模型, 应用抗氧化剂茶多酚 (tea polyphenols, TP) 对晶状体上皮细胞进行干预, 检测晶状体中抗氧化酶系统的活性, 从而探讨 TP 对氧化损伤所致白内障的影响作用, 为氧化损伤性白内障的防治寻找新的理论依据和途径。

### 1 材料和方法

1.1 材料 健康 SD 大鼠 57 只, 雌雄各半, 体质量 200 ~

250g,由辽宁医学院实验动物中心提供。茶多酚(纯度99.9%,上海恒远生物科技有限公司),300mL/L过氧化氢溶液(南昌市东湖青山试剂助剂厂)分析纯,复方托吡卡胺滴眼液(参天制药株式会社),超氧化物歧化酶(SOD)测试盒(南京建成生物工程研究所),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测试盒(南京建成生物工程研究所),脂质过氧化反应终产物丙二醛(MDA)测试盒(南京建成生物工程研究所),眼科显微手术器械(苏州器械六厂),超净工作台(苏州净化设备厂),倒置显微镜(IX70型,日本Olympus公司),CO<sub>2</sub>细胞培养箱(Forma Scientific,3164),裂隙灯显微镜(苏州仪器六厂),扫描电镜(HITACHI,S-570),可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司,752N)。

## 1.2 方法

**1.2.1 标本的处理** 复方托吡卡胺滴眼液散瞳后于裂隙灯显微镜下检查晶状体的透明性,全部实验大鼠晶状体均透明。将大鼠颈椎脱臼处死后,钳取完整眼球,9g/L生理盐水冲洗,再用750mL/L乙醇冲洗数秒后,用含320kU/L庆大霉素的PBS溶液和含800kU/L青霉素、1000kU/L链霉素的PBS溶液各冲洗10min。在手术显微镜下从后极部剪开巩膜取出晶状体(保留部分覆盖在晶状体表面的玻璃体),放入含5kU/L青霉素、50kU/L链霉素的MEM培养基中预培养,以供实验用。

**1.2.2 实验分组** 将筛选出的114个晶状体随机分3组,其中正常对照组14个,氧化损伤(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)组和TP组各50个,每组12,24,48h随机选取4个晶状体,分组如下:(1)正常对照组:MEM培养液30mL,内含100mL/L小牛血清、5kU/L青霉素、50kU/L链霉素;(2)H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组:除对照组培养液外,另加300mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.02μL(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>最终浓度为300μmol/L);(3)TP组:除H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组各成分外,另加TP 5mL(TP浓度为0.2mg/L)。于37℃,50mL/L CO<sub>2</sub>,湿度为95%的培养箱中孵育。除对照组外,其它各组均应在第6,12,18h分别加入300mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.8μL,以调节培养液中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度达到300μmol/L。分别在加入培养液后于12,24,48h停止孵育,取标本进行检测。

**1.2.3 扫描电镜观察** 每组培养48h后各取2个晶状体,立即置入25mL/L戊二醛溶液中固定,0~4℃冰箱内保存,72h后取出,在赤道部切取1mm<sup>2</sup>柱状晶状体结构(带有囊膜)作为透射电镜的样本,用0.1mol/L磷酸盐液冲洗,1%锇酸固定2h,乙醇梯度脱水,环氧树脂渗透包埋,铀铅重金属染色,扫描电镜观察并照相。

**1.2.4 晶状体相对灰度值的观察** 分别将被检晶状体于12,24,48h在光学显微镜下观察,在24孔板下衬以白底黑色“井”状背景拍照,并观察晶状体混浊程度,将照片扫描入电脑,并用Micrografx Picture Publisher软件分析图像中黑色“井”字的每个交叉点的灰度和邻近交叉点的白色背景的灰度,两者之差即为相对灰度值。

## 1.2.5 抗氧化酶活性的测定

**1.2.5.1 晶状体谷胱甘肽过氧化物酶的测定** 分别于培养12,24,48h取出大鼠晶状体,用0~4℃ PBS充分冲洗,再用滤纸吸干后称质量,置入含5mL 0~4℃ PBS的匀浆器内,冰浴下充分研磨5min制成匀浆,低温高速离心机10000r/min离心15min,取上清液,羟胺法测定GSH-Px含量:蛋白匀浆液0.02mL,10mmol/L pH7.16磷酸盐缓冲液1.43mL,10mmol/L 2,4-二硝基氯苯(CDNB)0.05mL,50U/mL谷胱甘肽巯基(GST)0.02mL;标准管加3.11mmol/L还原型谷胱甘肽(GSH)0.02mL,于340nm处测其光密度。

**1.2.5.2 丙二醛的测定** 分别于培养12,24,48h取出大鼠晶状体,用0~4℃ PBS充分冲洗,再用滤纸吸干后称质量,以1g组织加入9mL 11.5g/L氯化钾液为标准进行匀浆。在不同试管中依次加入不同晶状体匀浆液0.2mL,80g/L十二烷基硫酸钠0.2mL,200mL/L醋酸1.5mL及8g/L硫代巴比妥酸1.5mL,用双蒸馏水调节终体积至4mL。95℃水浴加热60min。取出冷却后,加入3.5mL正丁醇与吡啶的混合液(两液体体积比为15:1),振荡后提取有机层,以四乙氧基丙烷为标准,在荧光分光光度计上测定荧光强度,激发光波长515nm,发射光波长553nm,计算MDA的量。

**1.2.5.3 晶状体超氧化物歧化酶的测定** 分别于培养12,24,48h取出大鼠晶状体,用0~4℃ PBS充分冲洗,再用滤纸吸干后称质量,用旋涡混匀器充分混匀,置37℃恒温水浴40min,将各管混匀,室温放置10min,于波长550nm处,1cm光径比色杯,蒸馏水调零,比色测各管OD值。

统计学分析:数据用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用SPSS 10.0统计软件对数据进行分析,采用单因素方差分析和多样本比较的秩和检验,以 $P < 0.05$ 作为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 电镜观察晶状体的微观组织结构** 正常对照组:晶状体上皮细胞可见相邻细胞排列紧密,皮质层纤维排列整齐,细胞间指突可见,细胞膜结构清晰完整,细胞核结构完整,核部纤维细胞间结合紧密、轮廓清晰。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组:晶状体上皮细胞溶解破坏,胞质不均匀,皮质纤维严重肿胀,指突消失或明显减少,部分细胞膜溶解破坏,近周边部位甚至细胞消失,出现空洞等现象。TP组:晶状体上皮细胞间连接接近于正常,细胞质分布均匀,但大小不等,皮质层纤维细胞结合紧密,排列较整齐,指突清晰,核部纤维分明,未见空洞等现象。

**2.2 光学显微镜下晶状体的混浊情况** 正常对照组大鼠离体晶状体随培养时间的延长,混浊程度几乎无明显的改变,于培养24h后晶状体仍透明,背景线条清晰可辨。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组大鼠离体晶状体随作用时间的延长,晶状体的混浊程度逐渐明显增加,于培养12h后光学显微镜下可见晶状体已经明显混浊,赤道部出现多量空泡,背景线条模糊不清;于培养24h后赤道部空泡向中央扩展并已达到中央部,核心出现云雾样混浊,晶状体呈现不透明状,背景线条已无法分辨;于培养48h后晶状体弥漫样白色混浊成完全不透明状;而TP组大鼠晶状体在相应时间段虽然比对照组均显混浊,但明显低于H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组。对12,24,48h的3组晶状体的照片进行计算机灰度分析并进行秩和检验,结果显示:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组与对照组、TP组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );而TP组与对照组相比,培养12h时,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),但培养24和48h差异有显著意义( $P < 0.05$ ,表1)。说明TP可以明显抑制氧化损伤大鼠晶状体混浊进展。

**2.3 晶状体组织中MDA和GSH-Px及SOD活性的变化** 各组晶状体SOD含量在12,24,48h时H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组与对照组相比均明显下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),TP组与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组相比明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),但仍低于对照组(表2)。各组晶状体GSH-Px测定,在12,24,48h H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组与对照组相比均明显下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。TP组与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组相比,在12h,差异不显著( $P > 0.05$ ),而24,48h TP组均高于H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组,差异有

表 1 不同时间各组大鼠晶状体相对灰度值的比较  $\bar{x} \pm s$

分组	12h	24h	48h
对照组	42.78 ± 3.01	42.47 ± 2.98	41.36 ± 2.74
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组	33.45 ± 2.89 <sup>a,c</sup>	18.96 ± 2.24 <sup>a,c</sup>	2.29 ± 2.01 <sup>a,c</sup>
TP组	39.95 ± 2.66	32.87 ± 2.03 <sup>e</sup>	15.79 ± 1.98 <sup>e</sup>

<sup>a</sup>P < 0.05 vs对照组; <sup>c</sup>P < 0.05 vsTP组; <sup>e</sup>P < 0.05 vs对照组。

表 2 不同时间各组晶状体 SOD 含量的变化

( $\bar{x} \pm s, U/mL, n = 12$ )

分组	12h	24h	48h
对照组	29.17 ± 1.81	28.34 ± 0.95	27.79 ± 1.46
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组	7.56 ± 0.99 <sup>a</sup>	7.25 ± 1.61 <sup>a</sup>	6.88 ± 0.76 <sup>a</sup>
TP组	19.46 ± 1.13 <sup>c</sup>	20.58 ± 0.94 <sup>c</sup>	22.13 ± 0.79 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>P < 0.05 vs对照组; <sup>c</sup>P < 0.05 vsH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组。

表 3 不同时间各组晶状体 GSH-Px 含量的变化

( $\bar{x} \pm s, kU/L, n = 12$ )

分组	12h	24h	48h
对照组	75.8 ± 9.6	74.6 ± 8.7	82.9 ± 11.2
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组	22.1 ± 10.3 <sup>a</sup>	19.8 ± 7.9 <sup>a</sup>	20.4 ± 8.8 <sup>a</sup>
TP组	23.0 ± 8.6	52.4 ± 11.2 <sup>c</sup>	63.2 ± 6.9 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>P < 0.05 vs对照组; <sup>c</sup>P < 0.05 vsH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组。

表 4 不同时间各组晶状体 MDA 含量的变化

( $\bar{x} \pm s, nmol/g, n = 12$ )

分组	12h	24h	48h
对照组	9.58 ± 1.23	8.12 ± 2.04	10.79 ± 1.65
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组	21.08 ± 1.15 <sup>a</sup>	24.49 ± 1.77 <sup>a</sup>	27.12 ± 2.43 <sup>a</sup>
TP组	15.19 ± 0.98 <sup>c</sup>	14.46 ± 2.02 <sup>c</sup>	13.71 ± 1.13 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>P < 0.05 vs对照组; <sup>c</sup>P < 0.05 vsH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组。

统计学意义(P < 0.05),但仍低于对照组(表3)。各组晶状体MDA含量在12,24,48h H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组较对照组明显增高,差异有统计学意义(P < 0.05),TP组与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组相比明显降低,差异有统计学意义(P < 0.05),但仍高于对照组(表4)。

### 3 讨论

白内障的致病因素是多元性的,其中氧化应激在多种类型白内障发病过程中发挥了重要作用<sup>[4,5]</sup>。各种致病因素均可导致抗氧化防御屏障受损,使晶状体O<sub>2</sub>·,·OH,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>等自由基产生过多或清除过少,自由基积聚,损害晶状体上皮细胞和纤维细胞,蛋白质和脂质发生过氧化、交联、聚集而形成白内障<sup>[6-8]</sup>。正常状态下晶状体抗氧化的重要防御屏障之一是抗氧化酶系统,主要是SOD,GSH-Px和脂质过氧化反应终产物MDA,通过检测各种酶的活性可评价晶状体的抗氧化水平<sup>[9,10]</sup>。本实验通过测定白内障形成早期上述三种酶的活力作为晶状体的抗氧化的生化指标,从而研究TP对晶状体氧化损伤的保护作用。

TP作为一种天然的抗氧化剂,因其含酚性羟基,故极易发生氧化、聚合、缩合等变化,具有较好的抗氧化、清除自由基的能力,抗氧化能力是维生素C,E的25~100倍,且安全、无毒、用量少。另外,TP还有增强机体免疫能力、抗肿瘤、延缓衰老等作用<sup>[11,12]</sup>。本实验采用300μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对大鼠晶状体造成氧化损伤,利用体外培养技术成功地复制了白内障体外模型,并使用TP进行干预,在透射电镜下观察晶状体上皮及纤维细胞的超微结构,可见模型组晶状体上皮细胞损伤严重,细胞器大部分破坏,而TP保

护的晶状体上皮细胞结构则基本保持正常,从超微结构改变说明TP对晶状体的保护作用<sup>[13,14]</sup>。实验形态学观察显示,培养48h后,模型组晶状体全部形成了白内障晶状体(灰白混浊),而TP组仅在晶状体赤道部出现不同程度混浊,其晶状体形态学轻度改变,说明TP有明显防止白内障形成的作用<sup>[15,16]</sup>。通过检测晶状体中的抗氧化酶活性,可以观察到H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组大鼠晶状体组织中MDA含量较对照组明显增高(P < 0.05),而GSH-Px和SOD明显下降(P < 0.05),TP组与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组相比,其晶状体中MDA降低(P < 0.05),但仍高于对照组,而GSH-Px和ATP含量明显升高,差异均有统计学意义(P < 0.05)。

本实验研究结果显示,TP通过提高机体清除氧自由基能力、减少脂质过氧化物的形成,使晶状体中MDA明显降低,且伴随SOD活力和GSH-Px明显增高,从而对晶状体上皮起到保护作用,可提高晶状体的抗氧化能力,防止或延缓白内障的形成,为临床探索防治白内障药物和研究白内障的发病机制提供了有力的实验依据。

### 参考文献

- Hu Y, Cao JJ, Liu P, et al. Protective Role of Tea Polyphenols in Combination against Radiation-induced Haematopoietic and Biochemical Alterations in Mice. *Phytother Res* 2011;25(12):1761-1769
- 白金丽,温淑湘.金钗石斛提取物抗白内障的体外实验研究. *云南中医中药杂志* 2009;30(9):57-59
- Xu JY, Wu LY, Zheng XQ, et al. Green tea polyphenols attenuating ultraviolet B-induced damage to human retinal pigment epithelial cells *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(12):6665-6669
- Park JH, Han HJ. Caveolin-1 plays important role in EGF-induced migration and proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of PI3K/Akt and ERK. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;297(4):C935-C944
- Suzen S, Buyukbingol E. Recent studies of aldose reductase enzyme inhibition for diabetic complications. *Curr Med Chem* 2003;10(15):1329-1352
- Yao J, Liu Y, Wang X, et al. UVB radiation induces human lens epithelial cell migration via NADPH oxidase-mediated generation of reactive oxygen species and up-regulation of matrix metalloproteinases. *Int J Mol Med* 2009;24(2):153-159
- Okuno T. Ultraviolet action spectrum for cell killing in a human lens epithelial cell line. *Industrial Health* 2007;45(1):137-142
- Ramana KV, Chandra D, Wills NK. Oxidative stress-induced up-regulation of the chloride channel and Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger during cataractogenesis in diabetic rats. *J Diabetes Complications* 2004;18(3):177-182
- Ahmed N. Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract* 2005;67(1):3-21
- Shibata S, Natori Y, Tomisaka K, et al. Antioxidant and anticataract effects of Chlorella on rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Nutr Sci Vitaminol(Tokyo)* 2003;49(5):334-339
- Kador PF, Inoue J, Blessing K. Anticataract activity of analogs of a sorbitol dehydrogenase inhibitor. *J Ocul Pharmacol Ther* 2004;20(4):333-344
- Yan H, Wang J, Liu B, et al. Protective effect of aspirin against dexamethasone-induced cataract in cultured rat lens. *Ophthalmic Res* 2006;38(5):303-308
- Ettl A, Daxer A, Gottinger W, et al. Inhibition of experimental diabetic cataract by topical administration of RS-verapamil hydrochloride. *Br J Ophthalmol* 2004;88(1):44-47
- Suryanarayana P, Saraswat M, Mrudula T, et al. Curcumin and turmeric delay streptozotocin-induced diabetic cataract in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(6):2092-2099
- 巢国俊,马文新,唐由之.裂隙灯图像分析系统对大鼠半乳糖性白内障的动态观察和定量分级. *中国医药导报* 2006;3(36):146-147
- Petersen A, Zetterberg M, Sjostrand J, et al. Potential protective effects of NSAIDs/ASA in oxidatively stressed human lens epithelial cells and intact mouse lenses in culture. *Ophthalmic Res* 2005;37(6):318-327