

枸杞多糖对蓝光损伤的视网膜色素上皮细胞的保护作用

董卫红, 杜秀娟, 郭大东, 窦冉, 解孝锋, 毕宏生

基金项目: 山东省自然科学基金 (No. ZR2009CM135)

作者单位: (250002) 中国山东省济南市, 山东中医药大学附属眼科医院 山东中医药大学眼科研究所 山东省高校中西医结合眼病防治技术重点实验室

作者简介: 董卫红, 硕士, 主任医师, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 毕宏生, 博士, 主任医师, 研究方向: 眼底病、白内障、屈光。hongshengbi@163.com

收稿日期: 2013-08-20 修回日期: 2013-11-18

Protective effects of lycium barbarum polysaccharide on damaged hRPE cells induced by blue light irradiation

Wei-Hong Dong, Xiu-Juan Du, Da-Dong Guo, Ran Dou, Xiao-Feng Xie, Hong-Sheng Bi

Foundation item: Natural Science Foundation of Shandong (No. ZR2009CM135)

Affiliated Eye Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Eye Institute of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Therapy of Ocular Diseases in Universities of Shandong, Jinan 250002, Shandong Province, China

Correspondence to: Hong-Sheng Bi. Affiliated Eye Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Eye Institute of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Therapy of Ocular Diseases in Universities of Shandong, Jinan 250002, Shandong Province, China. hongshengbi@163.com

Received: 2013-08-20 Accepted: 2013-11-18

Abstract

• AIM: To establish the model of age-related macular degeneration through blue light burning human retinal pigment epithelium (hRPE) cells *in vitro* and to investigate the possible mechanism of lycium barbarum polysaccharide (LBP) protecting the hRPE cells from blue light irradiation-induced damage.

• METHODS: hRPE cells were cultured in Dulbecco's modified eagle's medium with high glucose and were pretreated with different concentrations (0.01mg/mL, 0.1mg/mL and 1mg/mL, respectively) of LBP solution, respectively. Further, hRPE cells were irradiated with different intensities (2000 ± 500 LUX) of blue light (wave length 470-520nm) for 12h and the cellular morphology was observed by inverted phase contrast microscopy for every sample. Using flow cytometry, the alterations in the levels of reactive oxygen species, mitochondrial

membrane potential and apoptosis were determined, respectively.

• RESULTS: The level of reactive oxygen species in hRPE cells in blue-light treatment group was the highest, whereas the level in control group was the lowest. The fluorescent level of reactive oxygen species among different concentrations of LBP-treatment groups had specifically significant differences compared with that in blue light irradiation group ($P < 0.05$). The amounts of apoptotic cells in different concentrations of LBP-treatment groups were specifically significant differences compared with that in blue light irradiation group ($P < 0.05$); There were no apparent significant difference between 1mg/mL LBP-treatment group and normal control group ($P > 0.05$).

• CONCLUSION: LBP can efficiently inhibit apoptosis induced by blue light irradiation in hRPE cells and 1mg/mL of LBP has the strongest protective ability in blue light irradiation-induced damage in hRPE cells. The possible mechanism may attribute to the protective effect of LBP in inhibiting the overgeneration of reactive oxygen species and apoptosis in hRPE cells.

• KEYWORDS: lycium barbarum polysaccharide; retinal pigment epithelium cell; mitochondrion; reactive oxygen species; apoptosis

Citation: Dong WH, Du XJ, Guo DD, *et al.* Protective effects of lycium barbarum polysaccharide on damaged hRPE cells induced by blue light irradiation. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013; 13 (12): 2381-2384

摘要

目的: 研究不同浓度的枸杞多糖对蓝光诱导损伤的体外培养人视网膜色素上皮 (human retinal pigment epithelium, hRPE) 细胞的保护作用。

方法: 通过蓝光诱导建立 hRPE 细胞光损伤模型, 分别用不同浓度的枸杞多糖 (分别为 0.01, 0.1, 1mg/mL) 对体外培养的 hRPE 细胞进行干预, 通过流式细胞仪检测各实验组的细胞线粒体活性氧和凋亡率。实验组分为正常对照组、光照损伤组以及不同浓度枸杞多糖 (0.01, 0.1, 1mg/mL) 干预组。

结果: 线粒体活性氧检测: 正常对照组荧光强度最小; 蓝光损伤组荧光强度最大, 不同浓度枸杞多糖处理组荧光强度与蓝光损伤组强度相比, 荧光强度差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Annexin V-FITC/PI 凋亡检测显示不同浓度枸杞多糖干预组凋亡细胞数量与蓝光损伤组凋亡细胞相比差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 1mg/mL 枸杞多糖干预组凋亡细胞数量与对照组凋亡数量相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

结论:枸杞多糖能抑制蓝光诱导损伤的 hRPE 细胞的凋亡,1mg/mL 枸杞多糖抑制蓝光诱导的 hRPE 细胞凋亡的作用更强,其作用机制可能与抑制细胞线粒体产生活性氧有关。

关键词:枸杞多糖;视网膜色素上皮细胞;线粒体;活性氧;凋亡

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.12.05

引用:董卫红,杜秀娟,郭大东,等.枸杞多糖对蓝光损伤的视网膜色素上皮细胞的保护作用.国际眼科杂志 2013;13(12):2381-2384

0 引言

年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)是西方国家老年人致盲的首要原因,在我国 AMD 发病率也在不断上升,是当今老年人不可逆性视力损害的主要原因之一。视网膜光损伤的病理过程与年龄相关性黄斑变性有许多相似之处,对其深入的研究可以为这些疾病的发病机制、治疗提供良好的依据^[1]。中药枸杞在临床上被应用于 AMD 的治疗^[2,3],其应用依据是枸杞中的枸杞多糖(Lycium barbarum polysaccharide, LBP)具有增加免疫功能、抗氧化和延缓衰老等功能^[4-6]。但对人视网膜色素上皮细胞(human retinal pigment epithelium, hRPE)的作用未见报道,本实验通过蓝光诱导建立 hRPE 细胞光损伤模型,选用不同浓度的枸杞多糖对蓝光损伤的 hRPE 细胞进行干预,探讨枸杞多糖对光损伤的 hRPE 细胞的作用和可能的机制,为临床枸杞多糖治疗 AMD 提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料 将冻存的 ARPE-19 细胞株(上海瑞齐生物有限公司)复苏,复苏好的 hRPE 细胞置于含 10% 热灭活胎牛血清(FBS,杭州四季青生物工程有限公司)的 DMEM 高糖培养液(美国 Gibco 公司)的培养瓶中,于 37℃,50mL/L 二氧化碳的培养箱中培养,约 2~3d 换一次液,取对数生长期的细胞用于实验;配制含 0.01,0.1,1mg/mL 枸杞多糖(西安奥泽生物科技有限公司)的 DMEM 高糖培养液待用;CCK-8 试剂盒(贝博公司);胰蛋白酶冻干粉(含 EDTA)(美国 Sigma 公司);Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒(晶美生物公司);线粒体膜电位测定试剂盒(碧云天生物公司);线粒体活性氧测定试剂盒(贝博公司);流式细胞仪(美国 Accuri C6 公司);K5600 超微量紫外分光光度计(北京凯奥科技发展有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 建立 hRPE 细胞的蓝光损伤模型 参照蔡善君等^[7,8]建模方法,体外培养 hRPE 细胞,待细胞铺满或近铺满瓶底时,进行蓝光照射。光照条件:35W 白色冷光灯通过蓝色滤光片,波长范围 470~520nm,光照强度 2000±500LUX,光照时间为 12h。光照在培养箱内密闭进行,无自然光干扰,光照时温度变化在 36.5℃~37.5℃ 之间。光照器放在有自动调温功能的培养箱中,排除温度升高引起细胞光热损伤的可能。

1.2.2 实验分组 A 组为正常 hRPE 细胞 6 例,无光照损伤;B 组 6 例,蓝光诱导损伤,未加枸杞多糖干预;C~E 组各 6 例,各组在蓝光诱导损伤前 30min 分别加入 0.01,0.1,1mg/mL 的枸杞多糖,然后进行蓝光照射,光照持续 12h。各组均于光照终止后继续培养 24h,然后进行相关

实验。

1.2.3 倒置相差显微镜观察各组细胞形态变化 各组细胞经不同浓度枸杞多糖处理并蓝光照射 12h 后,显微镜下观察各组细胞形态。

1.2.4 检测线粒体活性氧 按照 1:1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA,使终浓度为 10μmol/L。光照 12h 后细胞继续培养 24h,然后消化、离心收集细胞(离心 800rpm,6min),并用 PBS(PH7.4)洗 2 次,离心收集细胞并调节细胞浓度为 1×10⁶~2×10⁷个/mL,重悬于稀释好的 DCFH-DA 中,于 37℃ 二氧化碳培养箱孵育 20min,每隔 3~5min 颠倒混匀,使探针和细胞充分接触。用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次,以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA,空白组直接用活性氧阳性对照。所有样品用流式细胞仪进行检测。

1.2.5 Annexin V-FITC/PI 检测细胞凋亡率 离心收集悬浮细胞,微量离心机转速 1000rpm,离心时间 5min,弃培养基,用冷 PBS 洗涤细胞两次。PBS 洗涤细胞结束后 1000rpm 离心收集细胞,弃上清,沉淀细胞用 400μL 1×Binding Buffer 悬浮,并调整细胞浓度至 1×10⁶个/mL。在细胞悬浮液中加入 5μL Annexin V-FITC,轻轻混匀后于 2℃~8℃ 避光条件下孵育 15min。加入 10μL PI 后轻轻混匀于 2℃~8℃ 避光条件下孵育 5min。在 1h 内用流式细胞仪进行检测。

统计学分析:采用统计软件 SPSS 16.0 进行分析处理,实验所得数据用卡方检验进行处理,单因素方差分析,双侧检验,检验水准 α=0.05。

2 结果

2.1 hRPE 蓝光损伤模型 倒置显微镜下可见一些 hRPE 细胞体积缩小,变圆,折光性改变,细胞周围见透亮圈。细胞核缩小,分裂为多个或出现核边聚。培养液中出现圆形悬浮细胞及细胞碎片。

2.2 各实验组倒置相差显微镜下所见情况 A 组:细胞呈梭形或多边形,单层贴壁生长,细胞边界清楚。B 组:一些细胞体积缩小,变圆,折光性改变,细胞周围见透亮圈;细胞核缩小,分裂为多个或出现核边聚;培养液中出现圆形悬浮细胞及细胞碎片。C~E 组:少许细胞积缩小,变圆,折光性改变,培养液中未出现圆形悬浮细胞及细胞碎片(图 1)。

2.3 线粒体活性氧的检测结果 各组不同时间平均荧光强度见表 1,2。表 1 各组数据选用单因素方差分析, F=23.125, P=0.000。D, E 组分别含 0.1mg/mL 及 1mg/mL 枸杞多糖组与 B 组不含枸杞多糖组比较,差异有统计学意义(P<0.01); C 组与 B 组比较,差异无统计学意义(P>0.05); B 组与 A 组比较,差异有统计学意义(P<0.01)。表 2 各组数据选用单因素方差分析, F=19.125, P=0.000。C, D, E 组分别含 0.01, 0.1, 1mg/mL 枸杞多糖组与 B 组不含枸杞多糖组比较,差异有统计学意义(P<0.01); B 组与 A 组比较,差异有统计学意义(P<0.01)。

2.4 活性氧水平统计学分析 B 组与 A 组比较如图 2, 差异有统计学意义(图 2A, B, P<0.01); B 组与 D, E 组比较(图 2C, D), 差异有统计学意义(P<0.05), B 组与 C 组比较(图 2B, C) 差异无统计学意义(P>0.05)。

2.5 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡的检测结果如下

2.5.1 Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡结果 图 3 示分为 4 个象限,即 4 个细胞亚群,UL 代表机械损伤的细胞

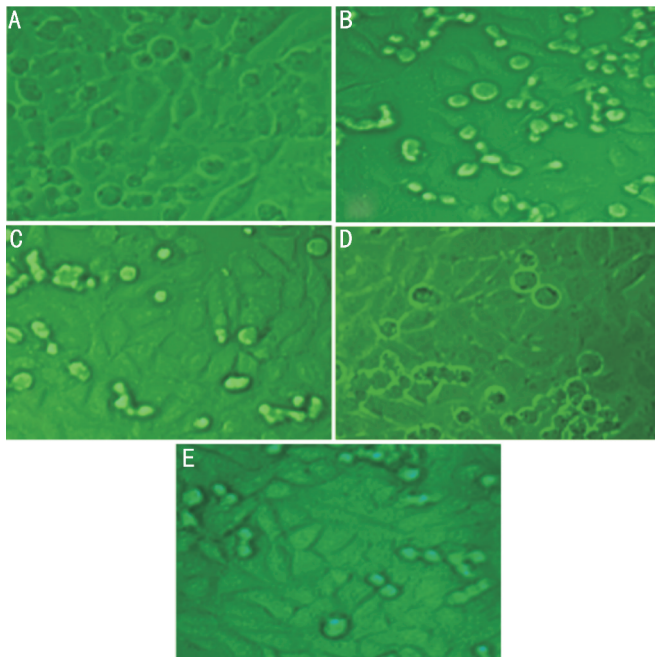


图1 枸杞多糖对蓝光损伤的视网膜上皮细胞保护作用的显微镜观察(×200) A:正常对照组,RPE细胞生长状态良好;B:蓝光损伤组,出现大量悬浮细胞;C:0.01mg/mL枸杞多糖处理组,较多悬浮细胞;D:0.1mg/mL枸杞多糖处理组,悬浮细胞数量减少;E:1mg/mL枸杞多糖处理组,少量悬浮细胞。

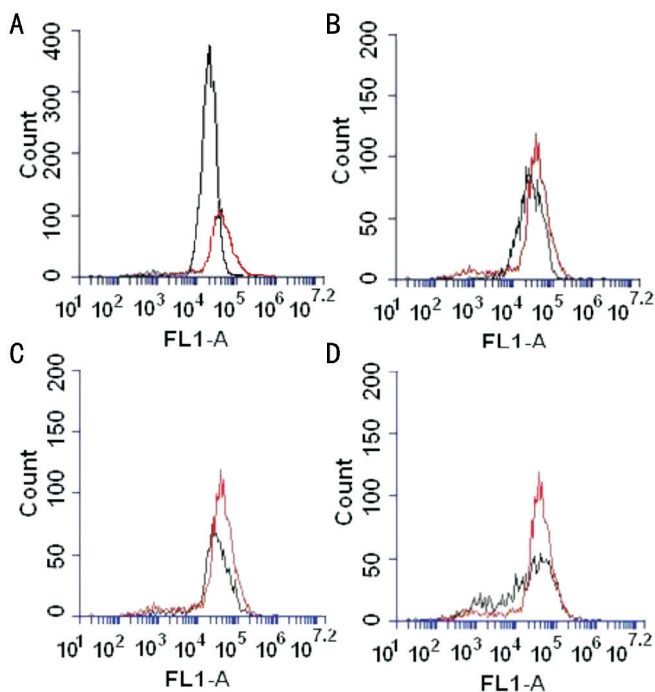


图2 枸杞多糖对蓝光损伤的视网膜色素上皮细胞细胞线粒体活性氧表达水平的影响 A:蓝光损伤组与正常对照组比较;B:蓝光损伤组与0.01mg/mL LBP组比较;C:蓝光损伤组与0.1mg/mL LBP组比较;D:蓝光损伤组与1mg/mL LBP组比较。图中红色线代表蓝光损伤组。

表1 光照后细胞培养24h线粒体活性氧荧光强度检测结果 $\bar{x} \pm s$

分组	n	线粒体活性氧荧光值
正常对照组(A组)	6	11.60±2.07
蓝光损伤组(B组)	6	73.68±3.85
蓝光损伤+0.01mg/mL LBP组(C组)	6	70.80±2.86
蓝光损伤+0.1mg/mL LBP组(D组)	6	50.00±3.64
蓝光损伤+1mg/mL LBP组(E组)	6	37.08±2.44

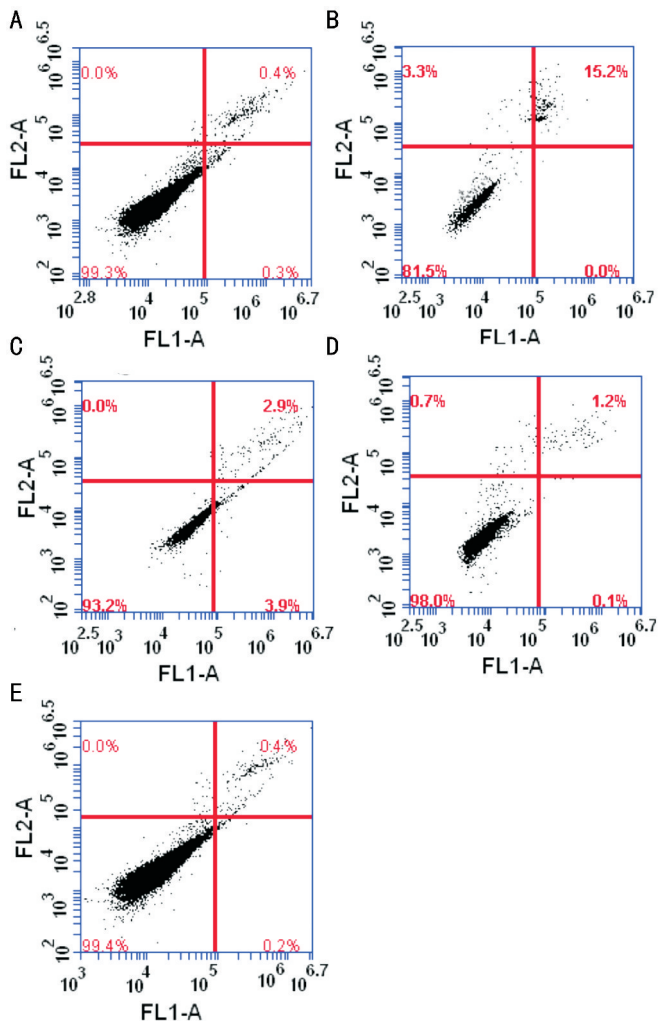


图3 枸杞多糖对蓝光损伤的视网膜色素上皮细胞细胞凋亡保护的流式细胞仪检测 A:正常对照组;B:蓝光损伤组;C:0.01mg/mL LBP处理组;D:0.1mg/mL LBP处理组;E:1mg/mL LBP处理组。

表2 光照后细胞培养48h线粒体活性氧荧光强度检测结果 $\bar{x} \pm s$

分组	n	线粒体活性氧荧光值
正常对照组(A组)	6	19.32±2.45
蓝光损伤组(B组)	6	97.54±4.13
蓝光损伤+0.01mg/mL LBP组(C组)	6	84.376±3.68
蓝光损伤+0.1mg/mL LBP组(D组)	6	65.97±3.15
蓝光损伤+1mg/mL LBP组(E组)	6	43.85±2.97

表3 Annexin V-FITC/PI检测光照24h后细胞凋亡结果

分组	UL	LL	LR	UR	UR+LR
A组	0.38	99.98	0.06	0.56	0.62±0.37
B组	3.04	77.58	2.44	16.72	19.16±4.49
C组	1.34	94.28	1.98	2.70	3.68±2.29
D组	0.92	99.30	0.18	1.14	1.32±0.68
E组	0.06	98.90	0.16	0.80	0.96±0.71

(Annexin-/PI+); LL代表正常活细胞(Annexin-/PI-); LR代表早期凋亡细胞(Annexin+/PI-); UR代表晚期凋亡细胞(Annexin+/PI+); UR+LR的值作为凋亡细胞总数。

2.5.2 Annexin V-FITC/PI细胞凋亡的检测结果 Annexin V-FITC/PI细胞凋亡的检测结果见表3。表3中数据选用单因素方差分析, $F=19.725, P=0.000$ 。C,D,E组分别为

含0.01, 0.1, 1mg/mL枸杞多糖组与B组不含枸杞多糖光照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。E组与A组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

蓝光对视网膜影响的最终结果就是作用于细胞线粒体,通过凋亡和坏死两种方式,引起RPE细胞死亡^[7-9]。而线粒体跨膜电位($\Delta\psi$)的破坏,被认为是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的事件之一;线粒体为细胞内产生活性氧簇(ROS)的主要场所,过高水平的ROS将触发细胞凋亡系统,引起细胞凋亡^[10,11]。因此,通过检测细胞凋亡率和线粒体活性氧水平的变化,观察细胞凋亡早期的信号到最终的细胞凋亡率^[12,13],我们就能了解细胞的损伤情况。

我们在凋亡实验检测中发现:空白对照组凋亡的细胞数量最少,单纯蓝光损伤组凋亡的细胞数量最多。0.01, 0.1, 1mg/mL三组枸杞多糖组凋亡细胞的数量与单纯蓝光损伤组差别有统计学意义,说明枸杞多糖能抑制RPE细胞的凋亡。1, 0.1mg/mL两组枸杞多糖组凋亡细胞的数量与空白对照组差别无统计学意义,而0.01mg/mL枸杞多糖组凋亡细胞的数量与单纯蓝光损伤组差别有统计学意义,说明枸杞多糖浓度越高对抑制细胞凋亡的作用越明显。

线粒体活性氧与细胞凋亡密切相关。有研究发现,枸杞多糖可通过线粒体途径抑制Hela细胞增殖从而诱导细胞凋亡的发生^[14]。我们对实验中不同处理组的线粒体活性氧检测结果表明:空白对照组平均荧光强度最小,单纯蓝光损伤组最大;1, 0.1mg/mL两组枸杞多糖组平均荧光强度与单纯蓝光损伤组差别有统计学意义;而0.01mg/mL枸杞多糖组平均荧光强度与单纯蓝光损伤组差别无统计学意义,线粒体活性氧的表达水平与相应的细胞凋亡数量相吻合,从而证实了凋亡细胞检测的准确性,同时也初步证实了枸杞多糖抑制RPE细胞凋亡的作用机制可能与其降低线粒体活性氧的水平、抑制细胞凋亡相关。

本实验证实了枸杞多糖能抑制蓝光照射对hRPE细胞造成的损伤,但AMD的发病机制十分复杂,不仅仅是RPE的损伤,体外培养RPE的细胞病理变化与活体的AMD中RPE的细胞病理变化有较大差异;中药在机体内的作用与体外实验作用亦有不同之处。因此,本实验仅证实了枸杞多糖能抑制蓝光照射对体外培养的hRPE细胞的损伤作用,尚不能说明枸杞多糖对AMD有治疗作用。AMD在发病的自然过程中,枸杞多糖能否起到实验中的

保护作用及其作用机制尚待进一步研究。Van der Burght等^[15]研究表明,蓝光诱导损伤的RPE细胞可以改变基因的转录,可能通过细胞凋亡和免疫反应起作用。枸杞多糖对RPE细胞是否涉及免疫调节的相关因子尚待进一步研究。

参考文献

- 1 Jang YP, Matsuda H, Itagaki Y, et al. Characterization of peroxy A2E and furan A2E photo oxidation products and detection in human and mouse retinal pigment epithelial cell lipofuscin. *J Biol Chem* 2005;280(44):39732-39739
- 2 曾自明, 彭清华, 李波, 等. 滋阴活血法治疗早期老年黄斑变性临床观察. *湖南中医学院学报* 2002;22(1):35
- 3 周丽群. 中西医结合治疗老年性黄斑盘状变性. *中西医结合眼科杂志* 1992; 10(4):219-220
- 4 蒋万志, 张洪泉. 枸杞多糖在免疫和抗衰老方面的研究进展. *中国野生植物资源* 2010; 29(2):5-7
- 5 李红光, 高银娟, 韩喜莉. 枸杞多糖在UVB辐射人角质形成细胞氧化损伤中的保护作用. *中国医学工程* 2011;19(12):60-61
- 6 张志远, 刘志宏, 安晓丹, 等. 硫酸铍致人胚肺成纤维细胞氧化损伤及枸杞多糖的抗氧化效应. *工业卫生与职业病* 2012;38(2):77-80
- 7 蔡善君, 严密, 毛咏秋, 等. 蓝光致人视网膜色素上皮细胞凋亡与线粒体膜电位和细胞色素C的关系. *中华眼科杂志* 2006;42(12):1095-1102
- 8 蔡善军, 严密, 张军军, 等. 蓝光对人视网膜色素上皮细胞线粒体膜电位及细胞色素C的影响. *四川大学学报(医学版)*2005;36(1):57-59
- 9 Yang JH, Basiager SF, Gross RL. Blue light-induced generation of reactive oxygen species in photoreceptor ellipsoids requires mitochondrial electronic transport. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(12):1312-1319
- 10 马修彬, 陈松. 蓝光对视网膜色素上皮细胞的损伤机制. *国际眼科纵览* 2007;31(6):415-419
- 11 Seagle BL, Rezai KA, Kobori Y, et al. Melanin photoprotection in the human retinal pigment epithelium and its correlation with light-induced cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102(25):8978-8983
- 12 Thompson CL, Bowes Rickman C, Shaw SJ, et al. Expression of the blue light receptor cryptochrome in the human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(10):4515-4521
- 13 Prosperini A, Juan-García A, Font G, et al. Reactive oxygen species involvement in apoptosis and mitochondrial damage in Caco-2 cells induced by enniatins A, A1, B and B1. *Toxicol Lett* 2013;222(1):36-44
- 14 Zhu CP, Zhang SH. Lycium barbarum polysaccharide inhibits the proliferation of HeLa cells by inducing apoptosis. *J Sci Food Agric* 2012 Epub ahead of print
- 15 Van der Burght BW, Hansen M, Olsen J, et al. Early changes in gene expression induced by blue light irradiation of A2E-laden retinal pigment epithelial cells. *Acta Ophthalmol* 2013;91(7):e537-545