

槲皮素对 H_2O_2 诱导人 RPE 细胞氧化应激损伤的保护作用

张佳君, 厉新新, 陈宝石, 刘丽娟

作者单位: (150001) 中国黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第一医院眼科二病房

作者简介: 张佳君, 女, 护师, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 刘丽娟, 副主任护师, 研究方向: 眼底病. 3051136639@qq.com

收稿日期: 2016-07-04 修回日期: 2016-09-28

Effects of quercetin on H_2O_2 - induced oxidative damage in human retina pigment epithelium cells

Jia-Jun Zhang, Xin-Xin Li, Bao-Shi Chen, Li-Juan Liu

the Second Ward of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Li-Juan Liu. the Second Ward of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. 3051136639@qq.com

Received: 2016-07-04 Accepted: 2016-09-28

Abstract

• **AIM:** To discuss the protective effects and possible mechanisms of quercetin in oxidative damage of human retina pigment epithelium (RPE) cells induced by H_2O_2 .

• **METHODS:** RPE cells were subculture, and they were divided into negative control group: cultured with normal culture medium; oxidative injury group: 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 treated for 12h; quercetin low dose group: 100 $\mu\text{mol/L}$ quercetin incubated for 24h then treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 for 12h; and quercetin high dose group: 100 $\mu\text{mol/L}$ quercetin incubated for 24h then treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 for 12h. Cell viability were tested by MTT colorimetric detection, apoptosis rate was detected by flow cytometry, apoptotic cell morphology was observed by Hochest33258 staining, expression of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were tested by colorimetric detection.

• **RESULTS:** Quercetin inhibited H_2O_2 - induced cell viability decreased in RPE cells, after treated with different concentrations of quercetin, RPE cells activity increased to (79.67 \pm 4.98)% and (83.00 \pm 3.60)%, which had statistical significance difference compared with oxidative damage group (48.93 \pm 3.39)% ($P < 0.05$). After treated with different concentrations of quercetin, the apoptosis rate of RPE cells decreased to (23.23 \pm 3.29)% and (16.23 \pm 1.94)%, respectively, which had statistical significance difference

compared with oxidative damage group (38.03 \pm 4.76)% ($P < 0.05$). In addition, quercetin also increased the expression of CAT, SOD, GSH-Px in RPE cells, which had statistical significance difference compared with oxidative damage group.

• **CONCLUSION:** Quercetin effectively inhibited H_2O_2 - induced RPE cells damage by improving cell antioxidant enzyme activity, which provide reliable experimental basis for the treatment of injuries in RPE cells.

• **KEYWORDS:** quercetin; human retina pigment epithelium; catalase; superoxide dismutase; glutathione peroxidase

Citation: Zhang JJ, Li XX, Chen BS, et al. Effects of quercetin on H_2O_2 -induced oxidative damage in human retina pigment epithelium cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2016;16(11):2010-2013

摘要

目的: 探讨槲皮素对 H_2O_2 诱导的人视网膜色素上皮细胞 (retina pigment epithelium, RPE) 氧化应激损伤的保护作用及可能机制。

方法: RPE 细胞传代培养, 分为阴性对照组; 以正常培养液培养; 氧化损伤组: 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 作用 12h; 槲皮素低浓度组: 100 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素孵育 24h 后, 加入 H_2O_2 作用 12h; 槲皮素高浓度组: 500 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素孵育 24h 后, 加入 H_2O_2 作用 12h。MTT 比色法检测细胞活力, 流式细胞仪检测细胞凋亡率, Hochest33258 染色观察凋亡细胞形态, 比色法检测细胞中过氧化氢酶 (catalase, CAT)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 活性。

结果: 槲皮素能明显抑制 H_2O_2 诱导的 RPE 细胞活力的下降, 用不同浓度槲皮素处理后, RPE 细胞活性分别提高到 79.67% \pm 4.98% 和 83.00% \pm 3.60%, 与氧化损伤组 (48.93% \pm 3.39%) 比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 经不同浓度槲皮素处理后, RPE 细胞凋亡率分别下降至 23.23% \pm 3.29% 和 16.23% \pm 1.94%, 与氧化损伤组 (38.03% \pm 4.76%) 比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 此外, 槲皮素还能增加细胞中 CAT、SOD、GSH-Px 活性, 与氧化损伤组比较, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

结论: 槲皮素通过改善细胞中抗氧化酶活性有效抑制了 H_2O_2 对 RPE 细胞的损伤, 从而为其用于治疗 RPE 细胞损伤提供可靠的实验依据。

关键词: 槲皮素; 视网膜色素上皮; 过氧化氢酶; 超氧化物歧化酶; 谷胱甘肽过氧化物酶

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2016.11.07

引用:张佳君,厉新新,陈宝石,等. 槲皮素对 H₂O₂ 诱导人 RPE 细胞氧化应激损伤的保护作用. 国际眼科杂志 2016; 16(11): 2010-2013

0 引言

糖尿病患者因糖代谢障碍导致全身各组织器官的血管发生病变,其中糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是最严重的并发症之一^[1]。研究表明,氧化应激与 DR 的发生密切相关。视网膜色素上皮层位于视网膜神经上皮层与脉络膜毛细血管层之间,由单层排列的 RPE 细胞构成,当收到外界各种因素刺激时,容易导致生理功能的破坏,是 DR 最早受损伤的靶组织^[2]。本实验模拟 DR 发生机制,体外建立 RPE 细胞氧化损伤模型,对比分析不同浓度的槲皮素干预 RPE 细胞后细胞活力以及相关因子表达的变化,并进一步探讨其细胞保护机制,为其用于防治 DR 提供新的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 槲皮素(美国 Sigma 公司,批号 PHR1488,分子量 302.24),人 RPE 细胞株(美国 ATCC,批号 CRL-4000),30% H₂O₂(天津基准化学试剂有限公司,批号 20131016),DMEM 培养基(Sigma 公司,批号 D0819),胎牛血清(Sigma 公司,批号 12107C),MTT 试剂盒(Sigma 公司,批号 M2128),Annexin V FITC/PI(美国 BD 公司,批号 556570),Hoechst33258 试剂盒(碧云天公司,批号 C1011),CAT、SOD、GSH-Px 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号 S0101, S0051, S0053)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 RPE 细胞培养在 100 μg/mL 链霉素及 100 U/mL 青霉素的 DMEM 培养基中,内含 15% 胎牛血清,培养箱温度为 37℃。

1.2.2 细胞分组 共分 4 组:(1)阴性对照组:以正常培养液培养;(2)氧化损伤组:100 μmol/L H₂O₂ 作用 12h;(3)槲皮素低浓度组:100 μmol/L 槲皮素孵育 24h 后,加入 H₂O₂ 作用 12h;(4)槲皮素高浓度组:500 μmol/L 槲皮素孵育 24h 后,加入 H₂O₂ 作用 12h。

1.2.3 MTT 检测细胞活力 细胞接种于 96 孔板(细胞密度 5×10⁴/L,每孔 120 μL 培养 24h 使细胞融合约 80%~90%,将原培养液吸出,向各孔细胞中加入 20 μL 终浓度为 5g/L 的 MTT 无血清培养液,培养 4h 后弃去培养液,加入 150 μL 的 DMSO 溶液,置摇床摇晃 10min 后用酶标仪测定 492nm 的光密度值。

1.2.4 流式细胞技术检测细胞凋亡 各组 RPE 细胞六孔板内培养,经过相应处理后,用 1g/L 胰酶消化后制备细胞悬液。1000r/min 离心后收集细胞,用 Annexin V-FITC 试剂盒中缓冲液悬浮细胞,调节细胞浓度为 5×10⁴/L,取上述细胞分别按试剂盒说明,加入 Annexin 和 PI,混匀后孵育 20min,于 1h 内用流式细胞仪检测细胞凋亡,以上操作均在暗室内避光进行。检测结果图共分 4 个象限,第四象限代表凋亡早期的细胞数量,细胞凋亡率=第四象限凋亡细胞/总细胞数×100%。

1.2.5 Hoechst33258 染色观察凋亡细胞形态 各组 RPE 细胞六孔板内培养,经过相应处理后,PBS 冲洗 3 次,每次 2min,用固定液固定 20min 后用 PBS 再冲洗 2 次,加入染色液暗室内固定 20min,吸掉染色液后于倒置显微镜下观察并记录细胞形态(×400)。每组 5 张不同的图片上各随

表 1 槲皮素对 RPE 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	A 值	存活率(%)
阴性对照组	0.63±0.06	96.67±4.11
氧化损伤组	0.36±0.02 ^a	48.93±3.39
槲皮素低浓度组	0.49±0.02 ^c	79.67±4.98
槲皮素高浓度组	0.55±0.03 ^c	83.00±3.60

注:^a $P<0.05$ vs 阴性对照组;^c $P<0.05$ vs 氧化损伤组。

机选取 5 个视野计数,凋亡细胞细胞核荧光较强,呈致密浓染,细胞凋亡率=凋亡细胞/总细胞数×100%。

1.2.6 SOD 和 CAT 与 GSH-Px 活性的检测 收集细胞并用 1g/L 胰酶消化,1200r/min 离心 10min,收集细胞并用 PBS 冲洗 2 次,每份样品加 30 μL 细胞裂解液,冰上孵育 20min,10000r/min 离心 10min,然后按试剂盒操作步骤测定细胞裂解液中 CAT、SOD、GSH-Px 活性。

统计学分析:采用 SPSS 13.0 统计软件对实验数据进行处理,结果以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两两比较采用 SNK- q 法(q 检验),多组间均数比较采用单因素方差分析(F 检验),以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 槲皮素对 H₂O₂ 致 RPE 细胞氧化损伤的影响 槲皮素能明显抑制 H₂O₂ 诱导的 RPE 细胞活力的下降,氧化损伤组 RPE 细胞经 H₂O₂ 处理后,细胞活性明显下降(48.93%±3.39%),用不同浓度槲皮素处理后,RPE 细胞活性分别提高到 79.67%±4.98% 和 83.00%±3.60%,与氧化损伤组比较,差异具有统计学意义($P<0.05$,表 1)。

2.2 槲皮素对氧化损伤致 RPE 细胞凋亡的抑制作用 氧化损伤组 RPE 细胞凋亡率(38.03%±4.76%)显著高于阴性对照组(2.57%±0.76%),两者比较差异有统计学意义($P<0.01$)。结果表明,H₂O₂ 可以导致 RPE 细胞凋亡的发生,经不同浓度槲皮素处理后,其凋亡率分别下降至 23.23%±3.29% 和 16.23%±1.94%,与氧化损伤组比较差异具有统计学意义($P<0.05$,图 1)。

2.3 槲皮素对 H₂O₂ 诱导 RPE 细胞凋亡的影响 Hoechst33258 核染色法显示,阴性对照组(3.00%±1.00%)未见明显凋亡染色的细胞核,氧化损伤组(41.67%±4.33%)凋亡细胞明显增多,细胞核荧光较强,呈致密浓染,给予不同浓度的槲皮素作用后凋亡细胞减少(36.67%±4.22%,18.67%±3.45%),细胞核形态改善,荧光强度逐渐减弱(图 2)。与流式细胞计数检测结果一致。

2.4 槲皮素对 RPE 细胞内 CAT 和 SOD 与 GSH-Px 活性的影响 从表 2 中可以观察到,氧化损伤组 RPE 细胞中 CAT、SOD、GSH-Px 活性明显降低,与阴性对照组比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。给予不同浓度槲皮素处理后,CAT、SOD、GSH-Px 表达量升高,槲皮素高剂量组与氧化损伤组比较,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

高血糖导致的氧化应激增强被认为是糖尿病并发视网膜病变的重要因素,大量证据表明,氧化应激损伤在视网膜疾病的发生发展过程中起着重要的作用^[3]。过量的活性氧可直接发挥细胞毒性作用损伤细胞。H₂O₂ 常作为建立体外氧化应激损伤模型的工具,分解后产生的羟基自由基可导致细胞氧化损伤,RPE 细胞对氧化应激较为敏感,我们利用 100 μmol/L H₂O₂ 建立细胞氧化损伤模型,观察槲皮素对该细胞的保护作用。

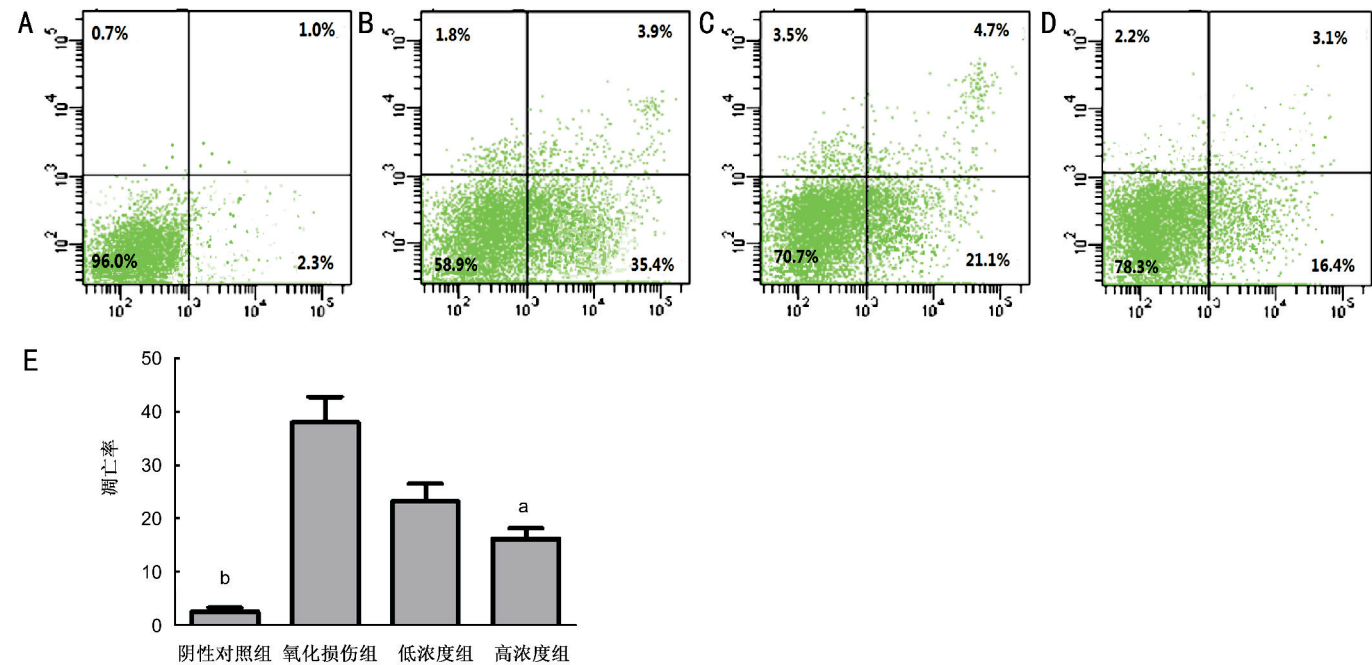


图1 流式细胞计数检测槲皮素对H₂O₂诱导RPE细胞凋亡的抑制作用 A:阴性对照组;B:氧化损伤组;C:槲皮素低浓度组;D:槲皮素高浓度组;E:槲皮素对H₂O₂诱导RPE细胞凋亡的抑制作用的柱形图(^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 氧化损伤组)。

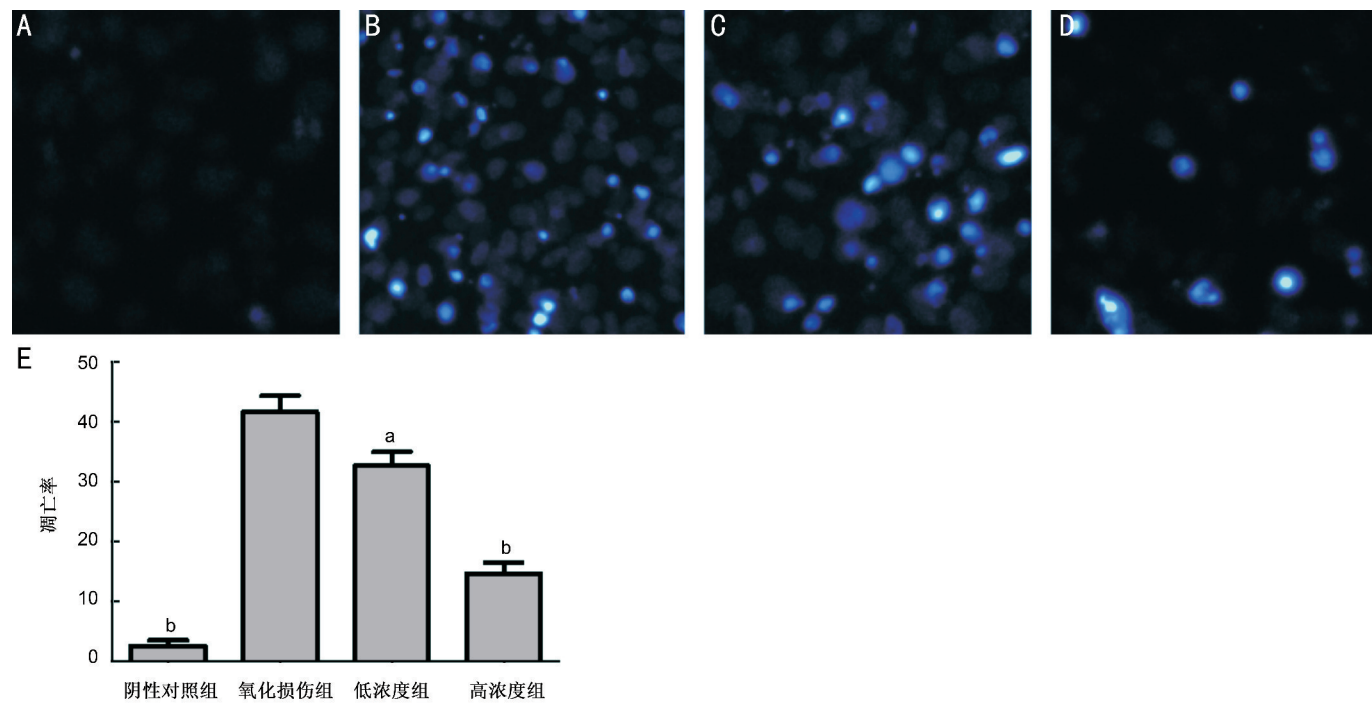


图2 槲皮素对氧化损伤致RPE细胞凋亡的抑制作用 A:阴性对照组;B:氧化损伤组;C:槲皮素低浓度组;D:槲皮素高浓度组;E:槲皮素对H₂O₂诱导RPE细胞凋亡的抑制作用的柱形图(^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 氧化损伤组)。

组别	CAT(U/mg)	SOD(U/mL)	GSH-Px(U/mL)
对照组	46.66±3.05	88.74±3.76	132.03±3.03
氧化损伤组	24.57±4.38 ^b	51.89±4.66 ^b	79.46±3.54 ^b
槲皮素低剂量组	26.89±3.29	59.06±3.44	83.03±4.37
槲皮素高剂量组	39.49±3.83 ^a	70.75±3.04 ^a	116.57±3.80 ^a

注:^aP<0.05 vs 氧化损伤组; ^bP<0.01 vs 对照组。

抗氧化剂因可延缓DR的发展而在DR的防治中得到重视。槲皮素是一种广泛存在于中草药和蔬果中的天然

黄酮类化合物,具有多种生物活性,其中包括清除自由基,下调由活性氧介导的下游信号通路^[4-5]。国内外还少见

槲皮素在眼科中的应用研究,为此该课题利用槲皮素保护 RPE 细胞缓解由 H_2O_2 所致的氧化损伤,初步探讨了槲皮素保护 RPE 细胞免受氧化损伤的效果与机制。

细胞活力检测结果显示, H_2O_2 处理的细胞活力明显降低,槲皮素能够抑制 H_2O_2 诱导的细胞损伤,而且这种药物对细胞的保护作用呈剂量依赖性;流式细胞术及 Hoechst33258 核染色法测定凋亡结果同样表明, H_2O_2 作用下 RPE 早期凋亡率明显增加,槲皮素有效抑制了 H_2O_2 诱导的凋亡反应的发生。

生理状态下,机体抗自由基损伤的酶如 SOD、GSH-Px 能有效地清除活性氧和自由基,使自由基的产生和清除处于平衡;超氧化物歧化酶(SOD)能够提供氢原子配体而使其还原生成 H_2O_2 ,进而被谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和过氧化氢酶(CAT)催化还原生成对人体无害的 H_2O 和 O_2 ,进一步降低过氧化损伤^[6-7]。用槲皮素干预后 RPE 细胞中 CAT、SOD、GSH-Px 活性较氧化损伤组显著升高,提示槲皮素可能通过提高细胞内 CAT、SOD、GSH-Px 活性发挥其较强的抗氧化作用。

综上所述,槲皮素对 H_2O_2 诱导 RPE 细胞氧化应激损伤具有剂量相关性的保护作用,其作用机制可能与槲皮素

能够有效改善抗氧化酶活性、增强自由基清除能力从而抑制氧化应激损伤有关,从而为其用于治疗 RPE 细胞损伤提供可靠的实验依据。

参考文献

- 1 薛嘉睿,郎平,吴昌凡. 氧化应激在糖尿病视网膜病发病机制中的研究进展. 中国临床药理学与治疗学 2009;14(3):356-360
- 2 凌静,栾洁. 氧化应激与糖尿病视网膜病变. 国际眼科杂志 2008;8(11):2312-2315
- 3 陈放,徐珊,吕伟红. 糖尿病大鼠视网膜氧化应激损伤及葛根素的干预作用. 眼科新进展 2012;32(1):15-19
- 4 刘红亮,胡磊,王靖凯,等. 槲皮素对 H_2O_2 损伤 PC12 细胞的保护效果与机制. 中国药理学通报 2014;30(3):373-377
- 5 刘鹃,康刚劲. 槲皮素对晶状体保护作用的研究进展. 国际眼科杂志 2015;15(1):49-51
- 6 Pehar M, Beeson G, Beeson CC, et al. Mitochondria-targeted catalase reverts the neurotoxicity of hSOD1^{G93A} astrocytes without extending the survival of ALS-linked mutant hSOD1 mice. *PLoS One* 2014;9(7):e103438
- 7 Yuhai GU, Zhen Z. Significance of the changes occurring in the levels of interleukins, SOD and MDA in rat pulmonary tissue following exposure to different altitudes and exposure times. *Exp Ther Med* 2015;10(3):915-920