维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)04-0387-05

原花青素抗晶状体氧化损伤的实验研究

张俊鸽,李平华

(重庆医科大学附属第一医院眼科,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察原花青素(Procyanidins,PC)对氧化损伤晶状体的形态学及抗氧化系统的影响。方法:将正常兔晶状体分为 4 组:Feton 模型组(氧化损伤组)、维生素 C 组(100mg/L)、维生素 E 组(100mg/L)、PC 组(50mg/L、100mg/L、200mg/L)。体外培养 24h 后,观察晶状体混浊情况,分析晶状体的相对灰度值,光镜下观察组织形态学变化。检测各组晶状体可溶性蛋白(slo-Prot)含量,抗氧化酶系统中的超氧化物歧化酶(SOD)活性以及脂质过氧化反应终产物丙二醛(MDA)的含量。结果:各组晶状体有不同程度混浊,Feton 组和 VC 组较其它组相对灰度值减小 ($P<0.05$),PC 组晶状体组织结构较其它组损伤轻。和其它组相比,PC 组 slo-Prot 含量增加,SOD 活性增高,MDA 的含量降低($P<0.01$)。结论:PC 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,减小晶状体损伤程度。

【关键词】原花青素;抗氧化;自由基;晶状体;保护

【中国图书分类法分类号】R776.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-09-26

The experimental study on the prevention of cataract with procyanidins

ZHANG Junge, et al

(*Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To evaluate the effect of procyanidins in protecting lens against oxidative stress. *Methods*: Rabbit's lenses cultured in vitro were divided into 4 groups: Feton model group(oxidative stress group), groups treated with 100mg/L vitamin C, 100mg/L vitamin E, and with PC(50mg/L、100mg/L、200mg/L). After 24 hours of incubation, alteration of opacity was observed by photography and picture analysis; the histomorphology of lenses were examined under light microscope. The levels of slo-Prot, SOD, and MDA were tested. *Results*: The transparency of all lenses were different. The relative gray scale in Feton model and vitamin C group were lower than that in other groups($P<0.05$). Compared with other groups , the oxidative damage of lenses in PC group was light, but slo-Prot levels and SOD activities increased, while MDA level decreased significantly ($P<0.01$). *Conclusion*: PC can protect lens against oxidative stress and inhibit lipid peroxidation activity.

【Key words】Procyanidins; Antioxidant activity; Free radical; Lens; Protection

白内障是世界首位致盲原因,氧化损伤是年龄相关性白内障发生的关键环节。原花青素(Procyanidins,PC)是植物中广泛存在的天然抗氧化物质,具有很强的抗氧化活性,能够清除自由基以及抑制脂质过氧化反应。许多学者就 PC 对肝、脑组织、心血管系统的保护作用分别做了大量研究,而就 PC 对晶状体上皮细胞的抗氧化保护作用还未见报道。有鉴于此,本文通过 PC 对晶状体氧化损伤的干预进行研究,并探讨 PC 对晶状体上皮细胞的保护作用,从而为临床上对白内障的药物防治提供新的思路。

作者简介:张俊鸽(1978-),女,硕士生,
主要研究方向:白内障、青光眼。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康大白兔 24 只,体重 2.0~2.5kg,雌雄兼用,由重庆医科大学动物实验中心提供。

1.1.2 主要试剂 原花青素低聚体系天津尖峰天然产物研究开发有限公司提供,维生素 C、维生素 E 系美国 Sigma 公司产品,30% H_2O_2、$FeCl_3$ 由重庆医科大学生化教研室提供,DMEM 培养基(高糖)购自 Invit 产地,考马斯亮兰蛋白、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。

1.1.3 主要仪器设备 超净工作台,CO_2 培养箱,倒置显微镜,匀浆器,低温高速离心机,可见光分光光度计。

1.2 方法

1.2.1 晶状体体外培养及实验分组 将 24 只健康成年兔子

维普资讯 http://www.cqvip.com

随机分成 4 组，实验前行裂隙灯检查，排除先天性白内障及其他异常。气栓处死动物，低温下快速摘除各组兔子眼球，用含 500U/ml 青霉素冰生理盐水漂洗后，仔细从后路剖开眼球除去球壁和玻璃体，剥离悬韧带，取出晶状体，用含 500U/ml 青霉素、0.5mg/ml 链霉素 PBS 液漂洗 5min 后，置于下列不同条件已装有灭菌培养液的消毒六孔培养板中：

①Feton 模型组(氧化损伤组)：DMEM 培养液 10ml(含青霉素 100U/ml，链霉素 0.1mg/ml)，另加 30% H_2O_2 0.2ml，FeCl$_2$ 2mg。

②维生素 C 组：除 Feton 模型组各成分外，另加维生素 C(终浓度为 100mg/L)。

③维生素 E 组：除 Feton 模型组各成分外，另加维生素 E(终浓度为 100mg/L)。

④PC 组：除 Feton 模型组各成分外，另加 PC 低聚体(终浓度分别为 50mg/L、100mg/L、200mg/L)。

在温度 37℃，湿度 95%，5% 的 CO_2 培养箱中培养 24h。

1.2.2 形态学观察　培养 24h 后，大体观察晶状体混浊情况，在 6 孔板下衬以白色底黑色"十"状背景拍照。用图片编辑器 Image Pro Plus 5.0 软件包分析图象灰度，做线上的灰度值分析(每张图片大于 6 个分析点)，同时做四个象限内的灰度值分析(每张图片大于 6 个分析点)，两者平均值之差即为相对灰度值。

光镜标本的制作：观察晶状体囊膜、晶状体上皮细胞形态和组织结构及晶状体纤维的变化。

1.2.3 sol-Prot、SOD 及 MDA 的检测　将各组晶状体从培养液中用圆匙取出，在 0.9% 生理盐水内漂洗后，试纸擦干，称重、放入盛有冰生理盐水的玻璃匀浆器内，冰浴下匀浆 6~8min，低温离心机下 3000r/min 离心 15min，取上清液，-70℃ 保存，两周内测定各晶状体的水溶性晶体蛋白(sol-Prot)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)含量。

1.2.4 统计学分析　本实验所得数据均为正态分布，用($\bar{x}\pm s$)表示。对多个样本方差齐性检验后进行单因素方差分析，用 SNK(student-Newman-Keuls)法(q 检验)进行各组平均值之间的多重比较，作出统计结论。

2 结　果

2.1 晶状体混浊情况

培养 24h 后各组 8 只晶状体中，Feton 模型组中全部弥漫样白色混浊呈不透明状，如图 1 所示；维生素 C、维生素 E 组周边部出现空泡，核心呈现云雾样混浊；PC 各浓度组与其它组相比，晶状体表面普遍呈浅红棕色(低聚 PC 外观呈红棕色粉末状)，可见赤道部出现少量空泡，皮质轻度混浊，有些呈不同程度混浊，图 2 所示(PC200mg/L 组)。图 3 为正常晶状体透明情况，以示参照。图像分析各组晶状体相对灰度值如表 1。

2.2 光镜下各组晶状体组织的细胞形态学观察

HE 染色晶状体标本，细胞浆成粉红色，胞核为紫蓝色。

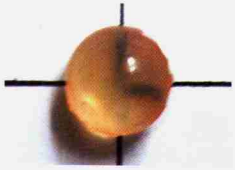


图 1　Feton 模型组弥漫样白色混浊，呈不透明状

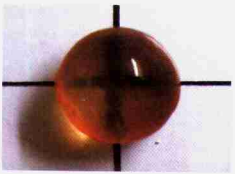


图 2　PC200mg/L 组晶状体表面　呈红棕色，皮质轻度混浊

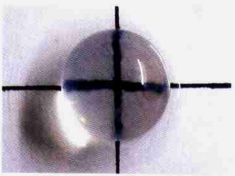


图 3　正常晶状体透明情况

表 1　各组晶状体相对灰度值($\bar{x}\pm s$, n=6)

组别	相对灰度值
Feton 模型组	14.35192 ± 3.44733*
维生素 C 组	17.19186 ± 2.79341*
维生素 E 组	20.05985 ± 3.19755
PC50mg/L 组	20.68129 ± 2.10571
PC100mg/L 组	19.47931 ± 2.95187
PC200mg/L 组	18.80849 ± 3.56477

注：* 与 VE、PC 组相比相对灰度值减小(P<0.05)

维普资讯 http://www.cqvip.com

Feton 模型组与维生素 C 组显示，晶状体前囊膜普遍增厚、囊膜下为一层无形态物质，晶状体上皮细胞(lens epithelial cells,LECs)增殖，排列紊乱，细胞间隙不均匀，细胞体积变大，胞核多形。晶状体纤维板层结构紊乱，纤维间较多囊泡及水裂，囊泡自囊膜下逐渐融合扩大成空泡向深层扩展。维生素 E 组相对前两组损伤减轻。PC 组表现出损伤明显减轻，晶状体前囊膜连续光滑，无增厚，LECs 基底部与顶部分别与晶状体前囊膜和晶状体纤维板层紧密连接，LECs 线状排列，核形态一致，晶状体纤维板层间排列紧密而规整，无空化及水裂。见图 4~9。

2.3 组织化学变化

Sol-Prot、SOD 及 MDA 测定结果见表 2。



图 4 Feton 模型组：晶状体前囊膜增厚，LECs 细胞体积变大，胞核多形，晶状体纤维板层结构排列紊乱纤维间较多囊泡及水裂。HE×40



图 5 维生素 C 组：晶状体前囊膜增厚，LECs 基底部与前囊膜广泛剥离，LECs 排列疏松，层次紊乱。晶状体纤维间偶有空泡形成。HE×40



图 6 维生素 E 组：晶状体前囊膜完整连续，囊膜下有囊泡，LECs 排列较疏松，细胞体积变大，晶状体纤维间有囊泡形成。HE×40

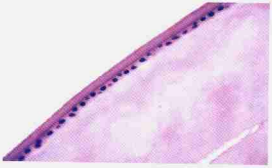


图 7 PC50mg/L 组：晶状体前囊膜连续光滑，LECs 与前囊膜晶状体纤维板层紧密连接，LECs 排列较整齐，晶状体纤维板层排列紧密而规整。HE×40

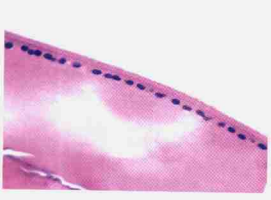


图 8 PC100mg/L 组：晶状体前囊膜连续光滑，LECs 线状排列，核形态一致，晶状体纤维板层排列紧密而规整。HE×40



图 9 PC200mg/L 组：晶状体前囊膜连续光滑，LECs 线状排列，核呈长杆状，晶状体纤维板层排列紧密而规整。HE×40

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 培养 24h 后各组晶状体 Sol-Prot、SOD 及 MDA 测定结果($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	Sol-Prot(mg/ml)	SOD(U/mgprot)	MDA(nmol/mgprot)
Feton 模型组	3.260 ± 1.277	32.008 ± 3.510	3.126 ± 0.678
维生素 C 组	4.276 ± 1.401	36.459 ± 3.558	2.489 ± 0.700
维生素 E 组	6.163 ± 1.766#	43.493 ± 4.283☆	2.182 ± 0.526#
PC50mg/L 组	13.443 ± 2.105*	49.115 ± 4.573☆△	0.951 ± 0.491*
PC100mg/L 组	12.059 ± 2.092*	60.786 ± 2.581*▲	0.867 ± 0.419*
PC200mg/L 组	13.333 ± 2.088*	61.117 ± 4.033*▲	0.907 ± 0.468*

注：*与 Feton 组、VC、VE 组相比差异非常显著($P<0.01$)；☆与 Feton 组、VC 组相比差异非常显著($P<0.01$)；□与 Feton 组差异显著($P<0.05$)；△与 VE 组间有明显性差异($P<0.05$)；▲与 50mg/L 组间差异非常显著($P<0.01$)

3 讨 论

年龄相关性白内障目前的治疗以手术摘除并人工晶状体植入为主，药物的防治作用仍面临挑战，迄今尚无有效的预防及治疗白内障的药物。近年来，对一些抗氧化药物治疗年龄相关性白内障的研究取得了一定进展。白内障形成的早期，晶状体纤维将经历水肿等一系列形态学变化，但并非代表晶状体蛋白变性，这种病理过程是可逆的。此时若应用抗氧化药物，可以逆转晶状体水肿状态，从而发挥治疗白内障作用。

PC 是植物王国中广泛存在的一大类多酚类化合物的总称，起初统归于缩合鞣质或黄烷醇类，随着分离鉴定技术的提高和对此类物质的深入研究与深刻认识，现已成为独树一帜的一大类物质并称之为原花青素，主要分布在葡萄、银杏、大黄、山楂、小连翘等多种植物中。近些年人们对 PC 进行了生物、药理活性的研究，发现 PC 是一种很强的抗氧化剂，在抗肿瘤[1]、保护心血管[2]及对其它药物的协同作用[3]等方面有很好的效果。

PC 按聚合度大小，分为低聚体和高聚体，低聚 PC 具更强的抗氧化性[4]，本实验中所用 PC 为 PC 低聚体。PC 之所以表现很强的抗氧化作用，由于 B 环上具有相邻二酚羟基广泛的电子非定域化，使得相应的氧化形式另外获得稳定状态。另外，在其高分子结构中，几个与 O 原子邻位的二羟酚基使得 PC 充分与金属离子(Fe(III)，Cu(II)，Al(III))及蛋白结合，络合作用的贡献在于阻止了催化自由基反应的金属离子的活性，这是 PC 具有营养和生物学价值的主要特征[5,6]。在本实验中我们证实了这一点：将 PC 加入配好的 Feton 模型培养液后，很快有黑色沉淀物质产生，考虑是 PC 与催化 Feton 反应的 Fe^{3+} 发生络和反应，从而减少以后反应中·OH 产生。

维生素 C 是还原性抗氧化剂，它能积极清除自由基和单线态氧，转化为过氧化离子，起到抗氧化作用。维生素 E 是脂溶性抗氧化剂，能够保护生物膜的结构与功能，能捕捉自由基而自身形成生育酚自由基，生育酚自由基又可进一步与自由基反应生成非自由基产物—生育醌。本实验采用经典的 Feton 反应产生·OH[7]，造成晶状体氧化损伤模型，观察 PC 对晶状体的保护作用，并与维生素 C、维生素 E 二种抗氧化剂进行对比研究。

形态学观察显示，培养 24h 后，大体观各组晶状体混浊情况差别不是很明显。光镜下观察 HE 标本，Feton 模型组和 VC 组前囊膜、LECs 及晶状体纤维均受到严重破坏，VE 组也受到不同程度的损伤，而 PC 组则表现出很好的保护作用。生物膜和亚细胞器是脂质过氧化作用损伤的主要部位。膜的脂质过氧化，膜中不饱和脂肪酸受到破坏，使膜的流动性下降和膜的通透性增加，正常不能通过的物质(如 Ca^{2+})的通过量增加，随后必将导致细胞代谢、功能和结构的改变。呈现出如 Feton 模型组和 VC、VE 组不同程度的囊膜增厚，LECs 退行和增生改变，细胞肿胀，细胞间隙增大，晶状体纤维排列紊乱，出现囊泡和水裂等。PC 低聚体具有很强的细胞膜保护作用[2]，能使红细胞膜中脂肪酸的构成变为高水平的不饱和脂肪酸，可节约体内脂溶性维生素 E，减少淋巴细胞 DNA 的氧化损伤[8]，能抑制氧自由基损伤后的胸腺细胞程序性死亡及降低线粒体跨膜电位[9]。本实验发现，在 PC 作用下，晶状体前囊膜连续光滑，LECs 线状排列，核形态一致，晶状体纤维板层间排列紧密而规整，无空化及水裂。结果，PC 在 50mg/L 时，就表现出明显的保护晶状体作用。

晶状体上皮细胞是抗氧化损伤的活性中心，通过两个途径发挥抗氧化作用。第一个途径是以还原型谷胱甘肽(GSH)、抗坏血酸和维生素 E 等抗氧化剂为代表的清除自由基机制。晶状体另一个抗氧化屏障是抗氧化酶系统，主要是过氧化氢酶(CAT)、超氧化物岐化酶(SOD)等。老年性白内障患者晶状体和血清中 SOD 水平明显低于老年非白内障患者，且两者活力下降同步。本研究从晶状体 SOD 检测结果看，PC 组 SOD 水平明显高于 Feton 模型组、VC、VE 组，

维普资讯 http://www.cqvip.com

且存在浓度反应关系，PC100、200mg/L 组比PC50mg/L 组表现出更强的保护作用。晶状体的水溶性蛋白是晶状体的结构蛋白，与晶状体的透明性和屈光度有关。在白内障形成过程中，晶状体中水溶性蛋白含量降低。在本研究中 PC 组水溶性蛋白含量明显高于 Feton 模型组、VC、VE 组，表明 PC 可以保护晶状体蛋白免受氧化损伤，从而维持晶状体的透明性。

丙二醛(MDA)是自由基攻击生物膜多不饱和脂肪酸而引发的脂质过氧化反应的终产物的，其含量可反映机体氧化损伤的程度。Lu[9]等研究的 PC 能抑制肝线粒体脂质过氧化反应、保护肝线粒体 SOD 活性及降低 MDA 的含量。本研究中 MDA 含量测定结果显示，PC 组中 MDA 含量明显低于其它实验组，表明 PC 对脂质过氧化反应具有抑制作用。

本研究显示，PC 能有效保护实验晶状体的氧化损伤，预防白内障形成。目前尚未见 PC 有毒副作用的报道，但其化学结构与效能间的关系以及在人体中的应用还需进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] Packer L,Rimbach G, Virgili F.Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (Pinus maritima) bark,pycnogenol[J].Free Radic Biol Med,1999;27(5-6):704-724.

[2] Zhu QY,Holt RR, Lazarus SA,et al.Inhibitory effects of cocoa flavanols and procyanidin oligomers on free radical-induced erythrocyte hemolysis[J].Exp Biol Med (Maywood),2002;227(5):321-329.

[3] Faria A,Mateus N,de Freitas V,et al.Modulation of MPP+ uptake by procyanidins in Caco-2 cells:involvement of oxidation/reduction reactions[J].FEBS Lett,2006;580(1):155-160.

[4] Faria A,Calhau C,de Freitas V,et al.Procyanidins as antioxidants and tumor cell growth modulators[J].J Agric Food Chem,2006;54(6):2392-2397.

[5] Rice-Evans CA,Miller NJ,Paganga G.Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids[J].Free Radic Biol Med,1996;20(7):933-956.

[6] Rosch D,Bergmann M,Knorr D,et al.Structure-antioxidant efficiency relationships of phenolic compounds and their contribution to the antioxidant activity of sea buckthorn juice[J].J Agric Food Chem,2003;51(15):4233-4239.

[7] 陈 瑗,周 玫,主编.自由基与衰老[M].第 2 版,北京：人民卫生出版社,2004.15-17.

[8] Simonetti P,Ciappellano S,Gardana C,et al.Procyanidins from Vitis vinifera seeds:in vivo effects on oxidative stress[J].J Agric Food Chem,2002;50(21):6217-6221.

[9] Lu Y,Zhao WZ,Chang Z,et al.Procyanidins from grape seeds protect against phorbol ester-induced oxidative cellular and genotoxic damage[J].Acta Pharmacol Sin,2004;25(8):1083-1089.

(上接第 386 页)

多的细胞越过了 G_1/S 限制点进入分裂增殖期；② CO_2 处理组 CDK4 和 Cyclin D_1 蛋白的表达显著增高，提示经 CO_2 人工气腹处理后，CDK4 和 Cyclin D_1 活性增高。表明在 CO_2 人工气腹条件下，宫颈癌 Caski 细胞增殖分裂加快与细胞增殖分裂的内源性调控途径中增殖信号的表达增强有关。

(通讯地址：重庆医科大学附属第一医院妇产科姚珍薇转王华斌，邮编 400016)

参 考 文 献

[1] Lecuru F, Agostini A, Camatte S,et al. Impact of pneumoperitoneum on visceral metastasis rate and survival. Results in two ovarian cancer models in rats[J].BJOG,2001;108(7): 733-737.

[2] 丁志杰，单吉贤，都姝妍. 直肠癌远端直肠系膜内 DNA 含量的检测及其临床意义[J]. 中国医科大学学报,2004;33(5):432-434.

[3] Volz J,Koster S,Spacek Z,et al.Characteristic alterations of the peritoneum after carbon dioxide pneumoperitoneum[J]. Surg Endosc,1999;13(6):611-614.

[4] Wildbrett P,Oh A,Naundorf D,et al.Impact of laparocopic gases on peritoneal microenvironment and essential parameters of cell functions[J].Surg Endosc,2003;17:78-82.

[5] Smidt VJ,Singh DM,Hurteau JA,et al.Effect of carbon dioxide on human ovarian carcinoma cell growth[J].American Journal of Obstetrics and Gynecology,2001;185(6):1314-1317.

[6] Jacobi C A,Wenger F,Sabat R,et al.The impact of laparoscopy with carbon dioxide versus helium on immunologic function and tumor growth in a rat model[J].Dig Surg,1998;15:110-116.

[7] Dong Y,Sui L,Sugimoto K,et al.Cyclin D1-CDK4 complex a possible critical factor for cell proliferation and prognosis in laryngeal squamous cell carcinomas[J].Int J Cancer,2001;95:209-215.

[8] 张国徽，姬宏宇，张 辉，等.Cyclin D_1 和 CDK4 在子宫颈上皮内瘤样变和宫颈鳞癌中的表达及意义[J].实用医学杂志,2005;21(7):671-672.

[9] Bae DS,Cho SB,Kim YJ.Aberrant expression of cyclin D1 is associated with poor prognosis in early stage cervical cancer of the uterus[J].Gynecol Oncol,2001;81(3):341-347.