维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)05-0662-04

人参皂甙 Rg1 对氧化损伤兔晶状体上皮细胞凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 表达影响

何勇川,李平华

(重庆医科大学附属第一医院眼科,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察人参皂甙 Rg1 对实验性氧化损伤兔晶状体上皮细胞(LEC)凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 表达的影响。方法:复制兔晶状体氧化损伤模型,同时加入终浓度为 10μmol/L 的人参皂甙 Rg1 共同孵育 24h,取晶体前囊膜,采取免疫组化法,检测凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 的蛋白表达。结果:Bcl-2 和 Bax 在正常兔晶体上皮细胞中均有表达,Bcl-2 的表达远较 Bax 强;过氧化氢组 Bcl-2 的表达显著下调,Bax 表达显著上调,Bcl-2 和 Bax 比率下降;Rg1 可明显上调 Bcl-2 的表达,下调 Bax 的表达,Bcl-2/Bax 比率上升,Bcl-2 改变幅度与牛磺酸比较有显著性差异($P<0.05$)。结论:氧化损伤诱导 LEC 凋亡和 Rg1 抑制 LEC 凋亡的分子机制可能与凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 表达有关。

【关键词】人参皂甙 Rg1;氧化损伤;LEC;凋亡;Bcl-2/Bax

【中国图书分类法分类号】R776.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-04-12

The effect of ginsenoside-Rg1 on the expression of Bcl-2 and Bax in rabbit lens epithelial cell induced by oxidative injuries

He Yongchuan, et al

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

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of Rg1 on the expression of apoptosis related genes of LEC induced by experimental oxidative injuries. *Methods*: All fresh transparent lenses of rabbit except those in the control group were bathed in a culture medium with 300μmol/L hydrogen peroxide (H_2O_2) to establish cataract models in vitro. Meanwhile Rg1 were added to the culture medium and incubated for 24 hours. The anterior capsules were used in the following study. The expressions of apoptosis related genes Bcl-2 and Bax protein were studied by immunohisto chemical techniques. *Results*: Bcl-2 and Bax protein were expressed in LEC of normal rabbit lens. Expression of Bcl-2 protein was much stronger than that of Bax protein. The expression of Bcl 2 protein was down-regulated and that of Bax protein was up-regulated in H_2O_2 group when compared with the control group, so the ratio of Bcl-2/Bax was lower. Rg1 up-regulated the expression of Bcl-2, and down-regulated that of Bax protein; the ratio of Bcl-2/Bax was higher. There were significant differences in the range of ratio changes compared to that of the taurine group. *Conclusion*: Rg1 can up-regulate the expression of Bcl-2, and down-regulate that of Bax protein, to increase the ratio of Bcl-2/Bax; while the expression of Bcl-2 protein was down-regulated and that of Bax protein was up-regulated in the H_2O_2 group. The molecular mechanisms of both H_2O_2 inducing apoptosis of LEC and natural anti-oxidants restraining apoptosis of LEC may be related to the expressions of apoptosis-related gens Bcl-2 and Bax.

【Key words】Ginsenoside Rg1; Oxidative-injuries; LEC; Apoptosis; Bcl-2/Bax

白内障是当今世界上主要致盲眼病之一;其发病机制目前尚未完全阐明。至今尚无确切有效的药物治疗方法。晶状体上皮细胞(lens epithelial cell, LEC)凋亡在白内障形成早期有着重要的作用,可能是非先天性白内障形成的共同细胞学基础。有研究证实,LEC 凋亡与氧化损伤关系密切,引起细胞氧化损伤的因素可引起细胞凋亡。抗氧化剂可抑制氧化诱导的凋亡。人参皂甙 Rg1 是中药人参中提取出来的有效成分,已有研究证实人参皂甙 Rg1 是一种很强的天然抗氧化剂,Liao Yongbin 等人[1]报道人参皂甙 Rg1 可以使细胞凋亡抑制基因 Bcl-2 高表达,抑制调亡促进基因 Bax 的表达。人参皂甙 Rg1 对 H_2O_2 诱导的 LEC 凋亡是否有抑制作用,其机制

作者介绍:何勇川(1974-),男,住院医师,医学硕士,主要研究方向:白内障药物治疗。

维普资讯 http://www.cqvip.com

如何，本研究通过 H_2O_2 处理复制兔晶状体氧化损伤模型，拟从凋亡基因 Bcl-2 和 Bax 调控的角度揭示人参皂甙 Rg1 是否有抑制凋亡的作用以及其分子生物学机理。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 健康家兔 23 只，体重 1.5 ~ 2.5kg 雌雄兼用，重庆医科大学动物实验中心提供，用裂隙灯显微镜检查晶状体透明。

1.1.2 药品与试剂 DMEM/F12 美国 Hyclone 公司，30%过氧化氢 (H_2O_2) 上海光达化工试剂厂，Rg1 中国药品生物检定所，牛磺酸美国 Sigma 公司，Bcl-2 和 Bax 多克隆抗体，SP 试剂盒 博士得公司。

1.1.3 仪器 电热恒温箱北京市医疗设备厂，光学显微镜日本 OLYMPUS，解剖显微镜苏州医疗器械厂，CO_2 细胞恒温培养箱 Thermo Formu（USA），超净工作台苏州安泰空气技术有限公司，医用低温冰箱 SANYO 公司产品(日本)。

1.2 实验方法

1.2.1 取材 取家兔 23 只，空气注入兔耳缘静脉处死，摘取眼球，清除眼球周围的筋膜组织后，将眼球置入庆大霉素（800IU/ml），青霉素（1000IU/ml）生理盐水中，在 4℃冰箱中存放 30min，无菌条件下 PBS 液冲洗 3 次；在超净工作台上，自角膜缘后 3 ~ 4mm 处环行剪开眼球壁，再环行剪断晶状体悬韧带，PBS 液冲洗晶状体 3 次，置入每孔含 DMEM/F12 培养液 10ml 的 6 孔培养板中，在 5% CO_2，湿度 90%的 37℃孵箱中培养 6h 后，选取透明晶状体作为进一步实验对象。

1.2.2 实验分组及晶状体培养 将上述透明晶状体随机分为 4 组，每组 10 只晶状体，将各组晶状体分别置入含有下列试剂的无菌培养板中，5%CO_2，湿度 90% 的 37℃孵箱中培养。空白对照组，10ml DMEM/F12 培养基；H_2O_2 组，含有 300μmol/L H_2O_2 的 DMEM/F12 培养基；Rg1 组，含有 300μmol/L H_2O_2 及 10μmol/L 的 Rg1 的 DMEM/F12 培养基；牛磺酸组，含有 300μmol/L H_2O_2 及 10g/L 的牛磺酸的 DMEM/F12 培养基。每 6h 更换一次上述培养液，培养 24h。

1.2.3 免疫组织化学检测 LEC 凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 表达采用 SP 法，严格按试剂盒步骤进行。Bcl-2 和 Bax 第一抗体浓度经预实验确定为 1:100。用 10%中性甲醛固定晶状体 12h 后，进行脱水包埋切片，将标本放于经多聚赖氨酸处理的玻片上，采用 SP 法染色，DAB 显色；光镜下观察 SP 染色标本，细胞胞浆内出现棕黄色颗粒者为 Bcl-2 蛋白和 Bax 蛋白表达阳性；光镜（×400）下随机选择观察 100 个晶状体上皮细胞，以阳性细胞占细胞总数的百分比表示阳性表达的程度；0%~5%为阴性，6%~25%为弱阳性（+），26%~50%为阳性（++），51%~75%为强阳性，（+++），76%~100%（++++）。

1.2.4 统计学方法分析 采用 SPSS 版本软件对资料进行 Ridit 分析。

2 结 果

LEC 的免疫组化显示，Bcl-2 和 Bax 基因蛋白均在各自特异的细胞浆中表达，阳性细胞胞浆内见特异的棕黄色或咖啡色颗粒状着色。对照组 LEC 中 Bcl-2 和 Bax 蛋白均有表达，而 Bcl-2 表达明显强于 Bax 的表达；Bcl-2/Bax 比值处于高水平。H_2O_2 组 Bcl-2（图 1）表达明显下降，Bax（图 4）表达明显上升；Rg1 组 Bcl-2（图 3）表达明显上升，Bax（图 6）表达明显下降；而牛磺酸组 Bcl-2（图 2）表达无明显变化，Bax（图 5）表达明显下降。

以 H_2O_2 为标准组，进行 Ridit 检验，结果表明（表 1 和表 2）：H_2O_2 显著上调 Bax 的表达和下调 Bcl-2 的表达；（与空白组比较，Ridit 检验，$P<0.01$，差异均有非常显著性）；Bcl-2 和 Bax 比率下降。Rg1 可明显上调 Bcl-2 的表达，下调 Bax 的表达，（与过氧化氢组比较，$P<0.01$，差异有显著性）Bcl-2/Bax 比率上升。牛磺酸组 Bcl-2 无明显改变（与过氧化氢组比较，$P>0.05$），差异无意义。

以牛磺酸组为标准组，进行 Ridit 检验，结果表明（表 1 和表 2）：牛磺酸可以下调 Bax 的表达，而对 Bcl-2 改变不明显；Bcl-2 改变（与空白组比较，Ridit 检验，$P<0.01$，差异均有非常显著性，与 Rg1 组

表 1 4 组晶状体上皮细胞 Bcl-2 蛋白表达情况(只)

group	-	+	++	+++	++++	R1	R2
control	0	0	0	4	6	0.98**	0.948##
H_2O_2	8	0	1	1	0	0.5	0.415#
Rg1	0	0	0	5	4	0.96**	0.915##
Taurine	6	2	1	0	1	0.585*	0.5

R1: vs H_2O_2group，**$P<0.01$，*$P>0.05$；R2: VS taurine group，##$P<0.01$，#$P>0.05$.

表 2 4 组晶状体上皮细胞 Bax 蛋白表达情况(只)

group	-	+	++	+++	++++	R1	R2
control	0	0	0	4	6	0.98**	0.948##
H_2O_2	8	0	1	1	0	0.5	0.415#
Rg1	0	0	0	5	4	0.96**	0.915##
Taurine	6	2	1	0	1	0.585*	0.5

R1:vs H_2O_2group，**$P<0.01$；R2 VS taurine group，##$P>0.05$，#$P<0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com

比较，$P<0.05$，差异有显著意义）。Bax 改变与 Rgl 组比较，$P>0.05$，差异无统计学意义。

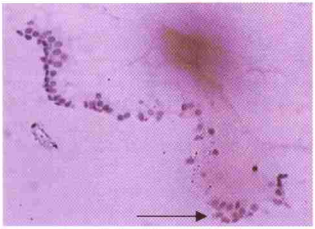


图 1 H_2O_2 组：少数 LEC 细胞浆中 Bcl-2 表达阳性，SP-DAB 法，×400

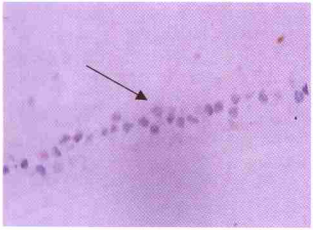


图 2 牛磺酸组：少数 LEC 细胞浆中 Bcl-2 表达阳性，SP-DAB 法，×400

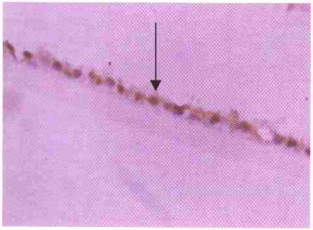


图 3 Rgl 组：绝大多数 LEC 细胞浆中 Bcl-2 表达阳性，SP-DAB 法，×400

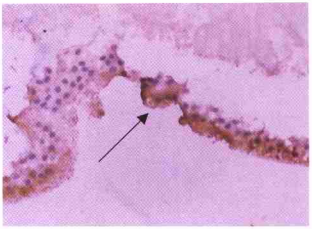


图 4 H_2O_2 组：培养 24h 晶状体大多数 LEC 细胞浆中有 Bax 蛋白表达阳性，SP-DAB 法，×400

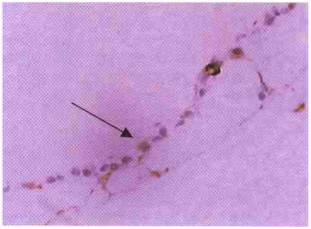


图 5 牛磺酸组：少数 LEC 细胞浆中 Bax 表达阳性，SP-DAB 法，×400

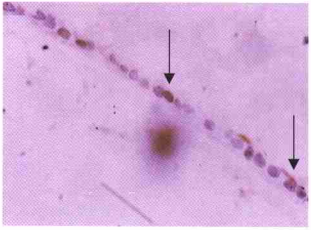


图 6 Rgl 组：少数 LEC 细胞浆中 Bax 表达阳性，SP-DAB 法，×400

3 讨 论

目前医学界认为氧化损伤是诱发白内障的主

维普资讯 http://www.cqvip.com

要因素[2]。研究发现在正常及白内障眼的晶状体及房水中均存在一定量的过氧化氢，但白内障眼的含量较正常人高[3]。氧化损伤可使 LEC 蛋白质结构改变，某些关键酶失活，DNA 断裂及脂质过氧化[4]。正常情况下晶状体中含有抗氧化物质，保护晶状体免受氧化损伤。随着对细胞凋亡与疾病关系的深入研究，人们发现氧化损伤也是诱发细胞凋亡的原因之一[5]。Li 等[6]用过氧化氢诱使鼠晶状体发生白内障，并在晶状体上皮细胞中发现凋亡细胞。而 Bcl-2 和 Bax 是与细胞凋亡关系密切的原癌基因，二者的表达比率是细胞存亡的决定因素之一。Bcl-2 是 Tsujimotoy 在 1985 年在 B 细胞淋巴瘤的研究中发现的促癌基因，能抑制细胞凋亡。这个家族中另一成员 Bax 是 Olivai 在 1993 年发现的一个抑癌基因，促进细胞凋亡。它与 Bcl-2 以二聚体的形式发挥作用。

本研究显示 Bcl-2 和 Bax 在正常兔 LEC 中均有表达，而 Bcl-2 表达明显高于 Bax;在正常情况下，晶状体可能通过 Bcl-2 高水平表达，Bax 低水平表达和 Bcl-2/Bax 的比值处于较高水平来预防各种氧化应激和其他危险因素所致的晶体上皮细胞凋亡，维持晶状体透明，防止白内障发生。本研究也显示：过氧化氢在氧化损伤诱导兔 LEC 凋亡过程中，过氧化氢激活了凋亡诱导基因 Bax 表达，下调了凋亡抑制 Bcl-2 的表达，使 Bcl-2/Bax 的比率下降，从而诱发细胞发生凋亡，使晶状体混浊，白内障发生。

Rg1是一种很强的天然抗氧化剂，Cooper[7]等报道用 A20，人参皂甙 Rg1,维生素 E 等氧化剂对氧化损伤所致的牛 RPE 细胞凋亡的保护作用。Rg1 可通过 ATP 合成，稳定线粒体跨膜电位，使线粒体细胞膜渗透性保持正常;Rg1 还可以缩短细胞内线粒体内钙通道开放时间和开放概率，抑制钙离子与细胞色素 C 外流，减少细胞凋亡。有关 Rg1 对晶体上皮细胞凋亡的作用，及凋亡基因调控机理，国内外尚未见报道。牛磺酸是一种磺基氨基酸，在人体中大量存在，具有抗氧化作用，在晶状体中牛磺酸约占蛋白水解氨基酸的 50%，有实验证实牛磺酸通过对凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 的调控来抑制过氧化氢诱发的兔晶状体上皮细胞凋亡[8]。因此本实验以牛磺酸为对比，了解 Rg1 对凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 的调控作用的大小。本研究结果发现 Rg1 加入过氧化氢作用的晶状体培养液中后，Bcl-2 表达上调，Bax 表达下调，Bcl-2/Bax 比率增加。Rg1 组 Bcl-2 蛋白表达与过氧化氢组和牛磺酸组比较均有显著性差异，而 Bcl-2 蛋白表达与牛磺酸组比较无显著性差异。我们认为，Rg1 通过加强 Bcl-2 的表达，减少 Bax 表达从而抑制氧化损伤的 LEC 凋亡的分子生物学机理，起到延缓和治疗白内障的作用，其作用强于牛磺酸，因此 Rg1 作为防止白内障的天然药物可能具有一定的应用前景。

参 考 文 献

[1] Liao Yongbin, MEIHua.Study on the effects of ginsenside on apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax genes in kidney after high energy shock wave [J].Chin J Exp Surg, 2001;18(5):259-181.

[2] Spector A .Oxidative stress—induced cataract: medchanism of action [J] .FASEB J, 1995;9:1173-1182.

[3] Bhuyan DK, Camras CB, Lakhani HK, et al .Peroxide concentration in normal and cataractous human lenses [J].Invest opthalmol Vis Sci, 1992;33:798-782.

[4] Specter A ,Wang GM. The prevention of cataract caused by oxidative stress in cultured rat lense[J]. Curr Eye Res, 1993;12:163-179.

[5] 陈凤华.细胞凋亡与白内障[J].国外医学眼科学分册，1997;21:168-172.

[6] Li WC, Jerome RK, Ken Dunn, et al.Lens epithelial cell apoptosis appears to be a common cellular basis for non-congenital cataract development in humans and animals[J].J Cell Biol , 1995;130(1):169-181.

[7] Cooper JT, Stroka DM, Brostjam C, et al.A20 block endothelial cell activation through a NF-Kappa B-dependent mechanism [J].Biol chem, 1996;27(6):18608-18610.

[8] Cheng FH, Chen CZ.An experimental research of taurine on H_2O_2-induced bovine lens epithelial cell apoptosis[J].Chin Ophthalmol, 2000;36(4):272-274.