维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)02-0190-03

茶多酚抗晶状体上皮细胞凋亡的体外研究及机制

周 晞,李平华

(重庆医科大学附属第一医院眼科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨抗氧化剂茶多酚对氧化损伤所诱发的晶状体上皮细胞凋亡的抑制作用和相关机制。方法:分离培养兔晶状体上皮细胞,茶多酚处理 24～72h 后,采用透射电镜、流式细胞术、凋亡细胞 DNA 片断分析检测茶多酚抗晶状体上皮细胞凋亡的作用,并用 Western－blot 检测凋亡相关蛋白 bcl－2、Bax、caspase－3 蛋白表达变化,揭示茶多酚抑制晶状体上皮细胞凋亡的相关机制。结果:氧化损伤型晶状体上皮细胞生理盐水处理组中,凋亡细胞增多,G_1 期细胞升高,DNA 片断分析呈现典型的凋亡细胞特征性“梯状条带”;茶多酚处理组中,凋亡细胞明显减少,G_1 期细胞降低,未出现特征性“梯状条带”,凋亡相关蛋白 bcl－2 增多、Bax 降低、caspase－3 蛋白减少。结论:抗氧化剂茶多酚可抑制 H_2O_2 氧化损伤所诱导的兔晶状体上皮细胞凋亡并减轻或延缓白内障形成,其机制与 bcl－2、Bax 及细胞凋亡过程中最重要的终末执行酶 caspase－3 蛋白表达变化密切相关。

【关键词】茶多酚;晶状体上皮细胞;氧化损伤;凋亡;机制

【中国图书分类法分类号】R776;R914.4;R340.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-01-18

The study of green tea polyphenols inhibiting apoptosis of lens epithelial cell in vitro and relevant mechanism

ZHOU Xi, et al

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

【Abstract】*Objective*: To investigate the inhibitory effect of Green Tea Polyphenols (GTP) on H_2O_2-induced lens epithelial cell apoptosis and relevant mechanism. *Methods*: Separated and cultivated lens epithelial cell, disposed that with GTP, then detected the inhibitory effect of GTP by electron transmission microscopy, flow cytometry and DNA fragmentation assay. The bcl－2, Bax and caspase－3 protein expression were measured with Western-blot in various groups. *Results*: The apoptosis cells and G_1 phase cells increased in the group treated with sodium chloride solution, and the DNA "ladder" was found. In the group treated with GTP, the apoptosis cells and G_1 phase cells decreased, and no DNA "ladder". The apoptosis protein bcl－2 increased, however, the Bax and caspase－3 protein decreased. *Conclusion*: The GTP can protect lens epithelial cells from the oxidative injury and restrain the apoptosis rate of lens epithelial cells and the mechanism was nearly correlated with bcl－2, Bax and caspase－3 protein.

【Key words】Green Tea Polyphenols; Lens epithelial cell; Oxidative injury; Apoptosis; Mechanism

白内障是致盲的首要眼病,在大多数的非洲和亚洲国家,白内障至少占盲人的一半。据我国调查的结果,白内障也是我国引起失明的最主要的病因。白内障与晶状体上皮细胞生理机能和病理改变有密切关系,目前认为晶状体上皮细胞凋亡是除先天性白内障以外的所有类型白内障形成的细胞学基础[1]。本研究使用强抗氧化剂茶多酚,从体外细胞水平,研究茶多酚抑制晶状体上皮细胞凋亡的可行性及相应机制,探讨凋亡相关蛋白 bcl－2、Bax、caspase－3 蛋白表达差异,为白内障的防治提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验对象 健康四周龄 SD 大鼠 30 只,雌雄不限,由本校实验动物中心提供。

1.1.2 仪器 CO_2 2300 型 Sheldon Manufacturing(美国);苏州净化设备厂超净工作台;EPICSXL Beckman Coulter 流式细胞仪;美国 Bio-Rad 公司数字化凝胶成像分析仪;Quantity-One version3 分析软件;日本 Hitachi－600 型透射式电子显微镜。

作者介绍:周 晞(1968-),男,硕士,讲师
主要研究方向:白内障。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1.3 试剂 美国 Gibco 公司的 DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶；bcl－2、Bax、caspase 单克隆抗体和 Western blot 检测试剂盒购自博士德公司。茶多酚由重庆中医药研究所提供，粉剂，200μg/ml。

1.2 试验方法

1.2.1 晶状体上皮细胞分离与培养 SD 大鼠处死后，分离晶状体，术中取环形撕裂前囊膜，放入 DMEM 培养液（含青霉素 100 U/ml，链霉素 100 U/ml）中，在超净工作台中将组织块取出，PBS 漂洗两次，用眼科剪将其剪成约 1mm×1mm 若干小组织块，均匀种植在细胞培养瓶底，盖紧瓶盖后倒置于 37℃，CO_2 培养箱中，3~4h 后翻转培养瓶。培养 48h 后，可见细胞增生，3～5 天后细胞增殖较快，并向周围蔓延；培养至两周时，细胞呈单层融合，融合的细胞呈多边形，大小均匀，胞质透明，呈现晶状体上皮细胞的典型形态。细胞长满后，用 0.25%胰蛋白酶消化液消化，按 1∶2 传代，取第 3 代以后细胞用于实验。

1.2.2 实验分组 H_2O_2＋生理盐水组；H_2O_2 终浓度为 300μmol/L；H_2O_2＋茶多酚处理组；H_2O_2 终浓度为 300μmol/L、茶多酚处理组为浓度 0.02%，24～72h 后检测指标。

1.2.3 电镜观察凋亡细胞形态学变化 试验分为两组，一组用 H_2O_2＋茶多酚处理晶状体上皮细胞，一组用 H_2O_2＋生理盐水处理，72h 后，收获细胞，PBS 洗涤，4℃冷戊二醛固定 2h 后，浸泡于 PBS 中，交本校电子显微镜室检测。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡 试验分为两组，一组用 H_2O_2＋茶多酚处理晶状体上皮细胞，一组用 H_2O_2＋生理盐水处理，72h 后，收获细胞 2×10^6 个，75%冷乙醇固定，RNase 消化，碘化丙啶（PI）室温染色 30min，经 Beckman Coulter 流式细胞仪检测细胞周期相分布和细胞凋亡情况。

1.2.5 DNA 片断分析 参照 Herrmann 等[4]的方法，将不同时限 H_2O_2＋茶多酚处理的晶状体上皮细胞（或 H_2O_2＋生理盐水处理）组分别收集到 1.5mL 离心管中，加入 500μl 细胞裂解液（10mmol/L Tris、10mmol/L EDTA、75 mmol/L NaCl、0.5% SDS、150μg/ml 蛋白酶 K），置于 37℃水浴过夜至混合物变清亮；用酚氯仿异戊醇（25∶24∶1）抽提液提取 DNA，离心弃上清，TE 缓冲液溶解，2%琼脂糖凝胶电泳，记录结果。

1.2.6 Western blot 检测 bcl－2、Bax、caspase－3 蛋白表达 收集 H_2O_2＋茶多酚处理的晶状体上皮细胞 2×10^6 个（或 H_2O_2＋生理盐水处理的晶状体上皮细胞），提蛋白，通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白样本和分子量标准，将蛋白样本转移至 PVDF 膜上，蛋白封闭液 37℃封闭 PVDF 膜 1h，PBST 洗涤，分别加 bcl－2、Bax、caspase－3 一抗（1∶300）37℃孵育 4h，PBST 振荡洗涤 2 次，加二抗（1∶200）37℃孵育 20min，PBST 洗涤 4 次，5min/次，DAB 室温显色，显影，记录结果。

1.2.7 统计分析 采用 SAS 统计软件包进行 t 检验。

2 结 果

2.1 电镜观察凋亡细胞形态学变化

在氧化损伤型晶状体上皮细胞的生理盐水处理组中，可见到较多凋亡细胞形成，其形态为细胞体积缩小、细胞表面纤毛丧失、细胞质固缩，核碎裂，可见凋亡小体形成（图 1）。而茶多酚处理组仅见少量凋亡细胞形成。

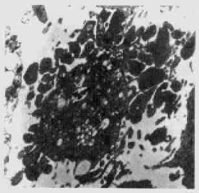
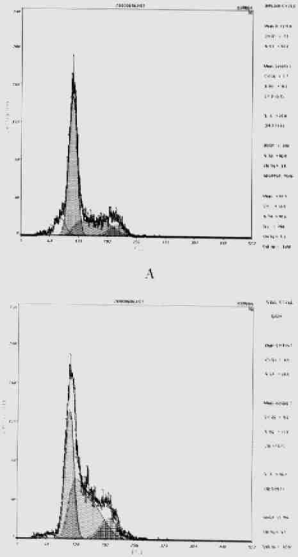


图 1 电镜观察晶状体上皮凋亡形态 6000×

2.2 流式细胞术检测细胞凋亡

在氧化损伤型晶状体上皮细胞的生理盐水处理组中，可见到细胞周期中 G_1 期细胞为 62.9%、凋亡峰出现，达 10.0%（图 2a）；经茶多酚处理后，G_1 期细胞下降为 38.8%，几乎未见凋亡峰（图 2b）。



A

B

图 2 流式细胞仪检测各组晶状体上皮周期分布

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.3 DNA 片断分析

在氧化损伤型晶状体上皮细胞的生理盐水处理组中,24、48、72h 后,晶状体上皮细胞 DNA 琼脂糖凝胶电泳可见凋亡细胞典型的梯状条带;而茶多酚处理组未出现此变化,仅呈现正常细胞 DNA 条带(图 3)。



图 3 晶状体上皮细胞 DNA 片断分析

从左到右依次为茶多酚处理组,生理盐水 24、48、72h 处理组

2.4 Western blot 检测 bcl-2、Bax、caspase-3 蛋白表达

用茶多酚处理氧化损伤型晶状体上皮细胞后,与生理盐水处理组相比较,bcl-2 表达升高,Bax 明显降低,caspase-3 降低。将各目的条带与内参 actin 的光密度比较后,定量分析可得 bcl-2 表达升高了 31.6%,Bax 明显降低了 26.4%,caspase-3 降低了 23.5%(图 4)。

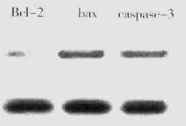


图 4a 氧化损伤型晶状体上皮细胞后生理盐水处理组

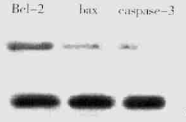


图 4b 氧化损伤型晶状体上皮细胞茶多酚处理组

3 讨 论

研究证实,晶状体上皮细胞凋亡是除先天性白内障以外的所有类型白内障形成的细胞学基础[1],而氧化损伤又是细胞凋亡的重要原因之一。晶状体上皮细胞的凋亡是由于人体内氧化反应产生的自由基作用于眼球的晶状体所致。因此具有抗氧化作用的物质可以阻止体内产生自由基的氧化反应的发生,抑制晶状体上皮细胞凋亡而延缓或抑制白内障的发生。

茶多酚是从茶叶中提取,其富含黄烷醇类的多种儿茶素。茶多酚具有很强的抗氧化作用,其抗氧化能力是人工合成抗氧化剂 BHT、BHA 的 4~6 倍,是 VE 的 6~7 倍,VC 的 5~10 倍,且用量少:0.01~0.03%即可起作用,而无合成物的潜在毒副作用。茶多酚的抗氧化作用和对疾病的预防作用越来越受到关注,人们对茶多酚及其单体和异构体在不同体系清除各种自由基进行了研究,发现没食子酸酯的存在大大加强了茶多酚的抗氧化反应活性,在 C 环上的双键对增加抗氧化反应活性也起重要作用,茶多酚各成分之间具有抗氧化协同作用,异构体中(+)构型的抗氧化活性高于(-)构型。茶多酚清除自由基的活性位点主要在没食子酸酯对位酚羟基处,也有在吡喃环的酚羟基处。在苯并吡喃环和苯酚环之间的大 p 键是茶多酚抗氧化的结构基础。

细胞周期与细胞凋亡有一定的相关性。不同的药物诱导不同内型细胞凋亡时,细胞脱离细胞周期进入凋亡程序的时期不同。我们采用流式细胞术对细胞周期的研究表明,茶多酚可使晶状体上皮细胞周期发生明显变化,可阻滞细胞进入 G_1 期而减少凋亡的发生。经茶多酚处理的晶状体上皮细胞,细胞凋亡的凋亡速度和凋亡率明显低于生理盐水处理组。琼脂糖凝胶电泳"梯状"条带,是凋亡细胞的重要生化特征[3]。在生理盐水处理组中的 24、48、72h 各时限均呈现了典型的"梯状"电泳条带,而茶多酚处理组呈现正常电泳图,而非"梯状"条带,这与不同处理组组晶状体上皮细胞凋亡细胞量相吻合。

Mao YW[4]等试验结果显示,bcl-2 能调节兔晶状体上皮细胞表达,通过下调 β-晶状体蛋白基因,bcl-2 可减弱由 H_2O_2 诱导的兔晶状体上皮细胞对凋亡的抵抗力。bcl-2 与 Bax 以二聚体的形式发挥作用,bcl-2/Bax 的比率决定着细胞凋亡与否,高水平的 bcl-2 表明存在大量的 bcl-2/Bax 杂合体,从而能维持细胞的活性;而高水平的 Bax 表明存在更多的 Bax 同源二聚体,故能诱发细胞凋亡。在我们的试验中,茶多酚处理后可见 (下转第 203 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

胃上皮 Bcl-2 表达峰值在 E11～13 天，峰值时间在 DAB 峰值之前，且 E14 天 Bcl-2 表达降低时，DAB达峰值，表明 Bcl-2 可能参与了抑制胃上皮细胞凋亡。Bax 表达峰值在 E14 天，与 DAB 峰值时间一致，表明 Bax 可能起着促进胃上皮细胞凋亡的作用。本实验结果还显示：Bax/ Bcl-2 值在 E14、15 天达峰值（分别为 1.273 与 1.463，$P<0.01$），与 DAB 峰值一致。

P53 蛋白可通过激活凋亡基因 Bax 的表达，进而与 Bcl-2 形成异二聚体，抵消 Bcl-2 的抑制凋亡作用，促进细胞凋亡，与生长发育有关，但大量文献也表明并非所有细胞凋亡均须 p53 调控，Jene 等[6]即发现 P53 的转录活性在胚胎的不同组织和不同发育阶段有着不同变化。野生型 P53 蛋白在细胞内含量低，半衰期短，免疫组化法很难检测到，而突变的 P53 蛋白含量高，半衰期长，可用免疫组化法检测。本实验中，P53 高水平表达于 E11 天～13 天的胃上皮细胞，E15 天明显降低，其峰值时间与 DAB 峰值时间不一致，与 Bcl-2 峰值时间一致，但与 Bax 表达峰值时间不一致，提示 P53 可能与调控胃上皮细胞凋亡关系不密切。

器官发育是与遗传和进化紧密相关的三大生物学难题之一。现代分子生物学对发育的研究，证实了遗传控制发育的本质可归结为在发育不同时期基因的选择表达及其控制。本研究通过对凋亡关键调控阶段、凋亡相关蛋白表达的鉴定，将有助于阐明细胞凋亡的机制并为进一步揭示胃发育机理及先天性畸形的预防提供有价值的资料。

参 考 文 献

[1] Jaklevic B, Su TT. Cell turnover: flexible coupling meets the needs of development [J]. Curr Biol., 2003;13(20):805-807.

[2] Kylarova D, Vrchovecky J, Holinka M, et al. The occurrence of c-myc, P53 and bcl-2 family proteins in the early phase of development of duodenal epithelium [J]. Biomed Pap Med FacUniv Palacky Olomouc Czech Repub, 2004;148(2):229-232.

[3] Ladas SD, Kitsanta P, Triantafyllou K, et al. Cell turnover of serrated adenomas[J]. J Pathol, 2005.

[4] Hall PA, Coates RT, Ansari B, et al. Regulation of cell number in the mammalian Gastrointestinal tract: the importance of apoptosis [J]. Cell Science, 1994;107(12): 3569-3577.

[5] Helen R, Russell. Murine Ovarian Development Is Not Affected by Inactivation of the Bcl-2 Family Member Diva [J]. Molecular and Cellular Biology, 2002;22(19):6866-6870.

[6] Jene Frenkel, Saegusa M, Uegaki k, et al. Accentuated apoptosis in normally developing p53 knockout mouse embryos following genotoxic stress[J]. Oncogene, 1999;18:2901-2907.

[7] Korsmeyer SJ. Bcl-2 gene family and the regulation of programmed cell death [J]. Cancer Res, 1999;59:1693-1700.

（上接第 192 页） bcl-2表达升高，而 Bax 表达明显下降，bcl-2/Bax 的比率上升，阻止了凋亡的发生，也进一步从基因水平证明了茶多酚具有抗氧化而阻止凋亡发生的作用。Caspase-3[5]在 caspase 家族中属于凋亡效应亚类的 caspase 蛋白酶，执行剪切细胞结构蛋白的作用，直接使细胞发生凋亡，是细胞凋亡过程中最重要的终末执行酶。在 H_2O_2 造的氧化损伤细胞模型中，caspase-3 的表达是升高的，而经茶多酚处理后，其表达明显下降，这与 Wang[6]等的研究结果相一致。

本试验中，我们利用强抗氧化剂茶多酚成功阻止了 H_2O_2的氧化作用，延缓了兔晶状体上皮细胞的凋亡，并从 bcl-2、Bax、caspase-3 基因水平进行了探讨，为阻止或延缓白内障的发生提供了新的思路。

参 考 文 献

[1] Li WC, Kuszak JR, Dunn K, 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.

[2] Herrmanm M, Lorenz HM, Voll R, et al. A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments [J]. Nucleic Acid Res, 1994; 22(24): 5506-5507.

[3] Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation[J]. Nature, 1980; 284:555-556.

[4] Mao YW, Xiang H, Wang J, et al. Human Bcl-2 gene alterrates the ability if rabbit lens epithelial cells against H_2O_2-induced apoptosis through down-regulation if the alpha β crytalline gene [J]. J Biol Chem, 2001;276:43435-43445.

[5] Thornberry NA, Larebnik Y. caspase enemines within[J]. Science, 1998;281:1312-1316.

[6] Wang G, Ding WP, Wang WP, et al. Expression of Bcl-2 and bax in apoptosis of nerve cell after human contusion and laceration of brain[J]. Zhongguo linchuang kanfu, 2002, 6:1137-1138.