

# 蜕皮甾酮和异补骨脂素在 HLEC 中抗氧化损伤的信号转导机制

张可丽<sup>1</sup>, 黄秀榕<sup>2</sup>, 祁明信<sup>3</sup>, 郭娜<sup>2</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(334000)中国江西省上饶市,江西医学院上饶分院病理教研室;<sup>2</sup>(350003)中国福建省福州市,福建中医药大学病理生理研究中心;<sup>3</sup>(350003)中国福建省福州市,福建中医药大学附属第二人民医院眼科

作者简介:张可丽,硕士,助教,研究方向:白内障。

通讯作者:黄秀榕,教授,研究方向:白内障。qihuang@netease.com

收稿日期:2012-07-17 修回日期:2012-10-11

## Mechanisms of signal transduction of isopsoralen and ecdysterone anti-oxidative damage on HLEC

Ke-Li Zhang<sup>1</sup>, Xiu-Rong Huang<sup>2</sup>, Ming-Xin Qi<sup>3</sup>, Na Guo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, Shangrao Branch of Jiangxi Medical College, Shangrao 334000, Jiangxi Province, China; <sup>2</sup>Research Center of Pathophysiology, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, Fujian Province, China; <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, Fujian Province, China

**Correspondence to:** Xiu-Rong Huang. Research Center of Pathophysiology, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, Fujian Province, China. qihuang@netease.com  
Received: 2012-07-17 Accepted: 2012-10-11

## Abstract

• **AIM:** To investigate the relative mechanisms of signal transduction of isopsoralen (ISR) and ecdysterone (ECR) on phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (p-ERK) expression in human lens epithelial cells (HLEC), which will provide a view in better understanding the mechanisms of aged cataract, and provide the experiment bases for the prophylaxis and treatment of aged cataract.

• **METHODS:** Human lens epithelial cells (HLECs) were cultured and sub-cultured *in vitro*. The cultured HLECs were exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 300 μmol/L over a time course of several hours, with and without pretreatment with β-Estradiol (E<sub>2</sub>), ECR, ISR. The HLECs were used for following experiments. The changes of the expression levels of ERK phosphorylation in HLECs which exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, with pretreatment with certain concentration of ECR and ISR, were analyzed by flow cytometer (FCM), the signal transduction mechanism of ECR and ISR on antioxidative damage was studied.

• **RESULTS:** The expression levels of ERK phosphorylation were examined in normal HLECs by FCM, and peaked at 6 hour. The p-ERK levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group gradually decreased with a prolongation of treatment time. There were significant differences as compared with control group respectively ( $P < 0.01$ ). The p-ERK levels of E<sub>2</sub> group gradually increased with a prolongation of treatment time, showed significant increase from 6 hour when compared with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group respectively ( $P < 0.01$ ), and peaked at 6 hour. The p-ERK levels of ECR group showed significant increase from 3 hour when compared with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group respectively ( $P < 0.01$ ), and peaked at 12 hour. The p-ERK levels of ISR group showed significant increase from 1 hour when compared with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group respectively ( $P < 0.01$ ), and peaked at 1 hour.

• **CONCLUSION:** The resistance against oxidant-induced injury by E<sub>2</sub>, ECR and ISR in HLECs might relate to ERK/MAPK signaling pathway.

• **KEYWORDS:** human lens epithelial cell; estrogen receptor; isopsoralen; ecdysterone; signal transduction

**Citation:** Zhang KL, Huang XR, Qi MX, *et al.* Mechanisms of signal transduction of isopsoralen and ecdysterone anti-oxidative damage on HLEC. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(11): 2072-2074

## 摘要

**目的:** 研究异补骨脂素 (Isopsoralen, ISR) 和蜕皮甾酮 (Ecdysterone, ECR) 对经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理的 HLEC 内磷酸化 ERK (p-ERK) 的表达, 从而探讨雌二醇 (β-Estradiol, E<sub>2</sub>), ECR 和 ISR 是否通过启动或干预 ERK/MAPK 信号转导途径来发挥抗氧化损伤作用, 以揭示 E<sub>2</sub> 和 ECR 及 ISR 抗氧化损伤的信号转导机制。

**方法:** 本研究采用 ECR 和 ISR 与人晶状体上皮细胞 (HLEC) 共同孵育, 以 E<sub>2</sub> 作为阳性对照, 再用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 HLEC 造成氧化损伤后, 采用流式细胞术 (flow cytometer, FCM) 检测不同时间段的 p-ERK 蛋白表达。

**结果:** 正常 HLEC 内存在 p-ERK 表达; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组 p-ERK 表达量随着时间的延长而减少; E<sub>2</sub> 和 ECR 与 ISR 各组 p-ERK 表达量分别在 1, 6, 12h 达到高峰。

**结论:** E<sub>2</sub> 和 ECR 与 ISR 的抗氧化损伤作用可能是与 ERK/MAPK 信号通路有关。

**关键词:** 人晶状体上皮细胞; 雌激素受体; 异补骨脂素; 蜕皮甾酮; 信号转导

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.11.08

**引用:** 张可丽, 黄秀榕, 祁明信, 等. 蜕皮甾酮和异补骨脂素在

HLEC 抗氧化损伤的信号转导机制. 国际眼科杂志 2012; 12 (11):2072-2074

## 0 引言

近年来的流行病学调查研究和实验研究结果<sup>[1-8]</sup>从不同角度表明,老年性白内障与雌激素间存在一定的相关性。而近年的实验研究表明,很多富含植物雌激素的中药,如补骨脂、牛膝、葛根、淫羊藿、黑升麻、虎杖等具有类雌激素活性<sup>[9-13]</sup>,异补骨脂素为中药补骨脂的有效单体,蜕皮甾酮为中药牛膝的有效单体,补骨脂和牛膝均归肾经,且均有补肾之功。肾属水,肝属木,水可生木,即肾可生肝,而肝开窍于目。本实验研究异补骨脂素和蜕皮甾酮对经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理的人晶状体上皮细胞 (HLEC) 内 p-ERK 表达的影响,探讨其对老年性白内障防治的细胞信号转导机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 流式细胞仪(美国 B-D FACScan),二氧化碳培养箱(美国 FORMA 2111),倒置相差显微镜(日本 Olympus IMT-413),超净工作台(江苏 SW-CJ-IF),微量移液器(法国 GILSON),冰箱(青岛 BCD-268),超低温冰箱(日本 MDF-V5410)。雌二醇粉末( $\beta$ -Estradiol, E<sub>2</sub>, 美国 Sigma 公司),蜕皮甾酮粉末和异补骨脂素粉末(中国药品生物制品检定所),胰蛋白酶(Trypsin, 美国 Gibco 公司),乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA, 美国 Augus 公司); DMEM 培养基干粉(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 美国 Gibco 公司),牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA, 美国 Amresco 公司),新生牛血清(Newborn Calf Serum, NCS, 奥地利 PAA 公司),Hepes(美国 Amresco 公司),Triton X-100 和 NP40(美国 Sigma 公司),Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) 小鼠单克隆抗体为 Cell Signaling 公司产品, FITC 标记的羊抗鼠抗体(北京中山生物技术有限公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 HLEC 培养** 取出冻存细胞的冻存管立即放入 37℃ 水中,将溶解的细胞悬液用 10 倍体积以上的培养液进行稀释,离心,除上清,反复洗涤 3 次。以  $5 \times 10^5$  个/mL 接种于培养瓶中, 37℃, 50mL/L CO<sub>2</sub> 培养箱培养。待细胞生长融合后进行传代培养。

**1.2.2 分组与给药** 对照组: LEC+含 10% NCS 的 DMEM 培养液; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组: 对照组 +  $3 \times 10^{-4}$  mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; E<sub>2</sub> 组: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组 +  $10^{-8}$  mol/L E<sub>2</sub>; ISR 组: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组 +  $10^{-6}$  mol/L ISR; ECR 组: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组 +  $10^{-7}$  mol/L ECR。

**1.2.3 FCM 检测经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理的 HLEC 中 p-ERK 蛋白的表达** 按实验分组,取对数期生长的细胞,常规消化,收集,细胞密度为  $(1 \sim 2) \times 10^6$  个/mL, PBS 洗涤 1 次,每组设 7 个平行样本(其中一个为阴性对照);用 -20℃ 预冷的 100% 甲醇 -20℃ 固定 20min; PBS 洗涤 2 次,用 4℃ 预冷的核分离液(含 5g/L BSA, 25mmol/L Hepes 和 0.6% NP-40 的 PBS 溶液)室温处理 10min,用反应缓冲液(含 10g/L BSA 和 0.05% TritonX-100 的 PBS 溶液)洗涤 2 遍;加入含有 1g/L BSA 及 10mL/L NCS 的 PBS 50 $\mu$ L,混匀后室温中放置 30min;反应缓冲液洗涤 2 遍,分别加入 1:100 稀释(稀释液为 0.01mol/L 的磷酸钠缓冲液, pH=7.6)的 p-ERK 抗体, 4℃ 反应过夜(阴性对照组以 PBS 代替一抗,其它步骤同前,以便试机、调零),然后用反应

缓冲液洗涤 2 遍;加入 1:50 稀释(稀释液为 0.01mol/L 的磷酸钠缓冲液, pH=7.6)的 FITC 标记的二抗,置冰上避光放置 30min;反应缓冲液洗涤 2 遍,加入 1mL PBS 悬浮细胞,上机做流式细胞分析,检测 p-ERK 蛋白阳性率。

统计学分析:数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理,多组比较用 one-way ANOVA 方法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

FCM 检测结果见表 1,正常 HLEC 内存在 p-ERK 的表达; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用于 HLEC 1h 以后, HLEC 内 p-ERK 的表达随作用时间延长呈逐渐下降趋势,与空白组比较有非常显著性差异( $P < 0.01$ ); E<sub>2</sub> 作用于 HLEC 以后, HLEC 内 p-ERK 的表达随作用时间延长呈逐渐升高, 3h 以后各时段 p-ERK 表达量与同时段 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组比较有非常显著性的差异( $P < 0.01$ ),且在 6h 时 p-ERK 的表达量最高; ECR 作用于 HLEC 3h 以后,各时段 p-ERK 表达量较同时段 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组显著升高( $P < 0.01$ ),且在 12h 时 p-ERK 的表达量最高; ISR 作用于 HLEC 1h 以后,各时段 p-ERK 表达量较同时段 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组显著升高( $P < 0.01$ ),且在 1h 时 p-ERK 的表达量最高。

## 3 讨论

细胞信号转导与通讯在晶状体上皮细胞(lens epithelial cell, LEC)正常的功能与代谢中起重要作用。细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinase, ERK)是一类具有丝氨酸和酪氨酸双重磷酸化能力的蛋白激酶,主要有 ERK1 和 ERK2 两种亚型。它们被特异性的上游信号分子丝裂活化的蛋白激酶的激酶磷酸化而呈活化状态,活化的 ERK1/2 进入细胞核内,进而活化一系列转录因子,促进细胞增殖和分化。

至今国内外对 LEC 的信号转导已有不少研究报道:在丝裂原蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族中,人、牛、大鼠 LEC 的 ERK1/2 的蛋白含量和活性水平均是含量最高的<sup>[14]</sup>;也有报道 HLEC 经紫外线诱导凋亡时 ERK1/2 表达增强<sup>[15]</sup>;调控 ERK 的磷酸化水平可抑制兔 LEC 的增殖<sup>[16]</sup>。

国外已有报道用 Western-blot 检测到正常 HLEC 上存在磷酸化 ERK 表达,研究发现在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理的 LEC 中,雌二醇可诱导 ERK1/2 磷酸化,从而活化 ERK/MAPK 信号通路<sup>[17]</sup>。

本研究采用 FCM 检测 HLEC 上的 p-ERK 表达,结果表明:正常 HLEC 上存在 p-ERK 表达, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能活化 HLEC 上 ERK/MAPK 信号通路,与国内外学者的报道结果一致。

而大量研究表明,氧化损伤是诱发老年性白内障形成的一个重要因素,如各种原因和途径导致的晶状体氧自由基产生过多或清除过少,均可引起 LEC 和纤维组织的损伤而导致老年性白内障的发生。氧化应激与细胞凋亡密切相关, Lennon 等<sup>[18]</sup>首先发现低浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可诱导 HL-60 细胞发生凋亡,而当 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度继续升高时,便可导致大量的细胞坏死。研究发现, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 或 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 等外源性活性氧均可诱导培养的乳鼠心肌细胞凋亡<sup>[19]</sup>。近来最新的观点认为活性氧物质(ROS)可以作为信号分子介导细胞凋亡信号转导,引发细胞凋亡<sup>[20]</sup>。故激活 ERK/MAPK 信号通路促进细胞增殖和分化,从而可达到对抗氧化损伤和凋亡的效应。

表1 FCM检测不同时段 E<sub>2</sub>和 ECR与 ISR对经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理的 HLEC中 p-ERK的表达 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

时间 (h)	分组				
	对照组	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组	E <sub>2</sub> 组	ECR组	ISR组
0.5	21.483±3.425	29.885±0.951 <sup>b</sup>	13.267±0.187 <sup>d</sup>	14.635±1.303 <sup>d</sup>	24.000±1.746 <sup>d</sup>
1	24.317±0.679	19.450±1.932 <sup>b</sup>	15.945±1.625 <sup>d</sup>	17.917±0.450 <sup>a</sup>	38.017±0.771 <sup>d</sup>
3	28.033±5.000	16.007±1.029 <sup>b</sup>	18.457±1.277	24.177±0.704 <sup>d</sup>	32.182±1.634 <sup>d</sup>
6	33.062±0.945	15.567±1.001 <sup>b</sup>	21.692±0.178 <sup>d</sup>	28.320±2.173 <sup>d</sup>	30.082±0.407 <sup>d</sup>
12	34.217±0.649	11.717±0.741 <sup>b</sup>	20.500±0.369 <sup>d</sup>	29.267±0.631 <sup>d</sup>	26.150±0.373 <sup>d</sup>
24	14.617±1.023	9.900±0.322 <sup>b</sup>	18.467±0.961 <sup>d</sup>	15.133±0.819 <sup>d</sup>	11.027±0.380 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P<0.05 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组; <sup>b</sup>P<0.01 vs 对照组; <sup>d</sup>P<0.01 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组。

本研究结果表明, E<sub>2</sub>和 ECR与 ISR在不同的时间点 ERK1/2磷酸化各有一高峰,与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组在同一时间点比较有显著性差异,提示这三种药物的抗氧化损伤的作用可能与 ERK/MAPK信号通路有关,且 ERK1/2磷酸化的最佳时间点各不相同,这可能与这三种药物各自对 HLEC的抗氧化损伤效应不同<sup>[21,22]</sup>。本课题组已报道了异补骨脂素对 HLEC上的 ER $\alpha$ 和 ER $\beta$ 具有上调作用<sup>[23]</sup>,故可推测 ECR和 ISR可能通过 HLEC上的 ER途径激活 ERK/MAPK信号通路,从而发挥其抗氧化损伤的效应。该结果为开发防治老年性白内障的有效药物提供了信号转导机制方面的实验依据。

参考文献

1 Tsai SY, Hsu WM, Cheng CY, et al. Epidemiologic study of age-related cataracts among an elderly Chinese population in Shih-Pai, Taiwan. *Ophthalmology* 2003;110(6):1089-1095  
 2 Aina FO, Smeeth L, Hubbard R, et al. Hormone replacement therapy and cataract: a population-based case-control study. *Eye* 2006;20(4):417-422  
 3 Delcourt C, Cristol JP, Tessier F, et al. Risk factors for cortical, nuclear, and posterior subcapsular cataracts: the POLA Study. *Am J Epidemiol* 2000;151(5):497-504  
 4 Benitez del Castillo JM, del Rio T, Garcia SJ. Effects of estrogen use on lens transmittance in postmenopausal women. *Ophthalmology* 1997;104(6):970-973  
 5 Dolatowska E. The evaluation of estradiol and FSH serum levels in menopausal women with primary cataract. *Klin Oczna* 2002;104(5-6):357-361  
 6 Bigsby RM, Cardenas H, Caperell-Grant A, et al. Protective effects of estrogen in a rat model of age-related cataracts. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96(16):9328-9332  
 7 Paganini-Hill A, Clark LJ. Eye problems in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* 2000;60(2):167-172  
 8 Zhang JJ, Jacob TJ, Hardy SP, et al. Tamoxifen blocks chloride channels. a possible mechanism for cataract formation. *J Clin Invest* 1994;94(4):1690-1697  
 9 赵丕文,王大伟,牛建昭,等.红花等10种中药的植物雌激素活性研究. *中国中药杂志* 2007;32(5):436-439

10 赵丕文,王大伟,王玲巧,等.用小鼠子宫增重法筛选淫羊藿等10种中药雌激素样作用的实验研究. *北京中医药大学学报* 2006;29(10):686-689  
 11 张彩宁,张晓哲,肖红斌,等.提取方法对4种中药雌激素活性的影响. *精细化工* 2005;22(12):903  
 12 刘兆平,杨陟华,于波,等.黑升麻的雌激素活性及其对人类乳腺癌细胞 MCF-7 细胞雌激素受体水平的影响. *卫生研究* 2001;30(2):77-80  
 13 张彩宁,王煦漫,张晓哲,等.中药虎杖雌激素活性组分的分离及活性测试. *世界科学技术—中医药现代化* 2007;9(2):58-64  
 14 Li WC, Liu JP, Wang J, et al. Expression and Activity of the Signaling Molecules for Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in Human, Bovine, and Rat Lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(12):5277-5286  
 15 熊炜,唐罗生,贾松柏.人晶状体上皮细胞凋亡时细胞外信号调节激酶表达的变化. *中国现代医学杂志* 2007;17(17):2120-2122  
 16 黄文勇,曾骏文,刘奕志.儿茶素通过 ERK 抑制兔晶状体上皮细胞增殖. *眼科研究* 2005;23(5):501-503  
 17 Moor AN, Flynn JM, Gottipati S. 17 $\beta$ -estradiol stimulates MAPK signaling pathway in human lens epithelial cell cultures preventing collapse of mitochondrial membrane potential during acute oxidative stress. *Mitochondrion* 2005;5(4):235-247  
 18 Lennon SV, Martin SJ, Cotter TG. Dose dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif* 1991;24(2):203-214  
 19 Cook S, Sugden PH, Clerk A. Regulation of bcl-2 family proteins during development and in response to oxidative stress in cardiomyocytes: association with changes in mitochondrial membrane potential. *Circ Res* 1999;85(10):940-949  
 20 Carmody RJ, Cotter TG. Signaling apoptosis: a radical approach. *Redox Rep* 2001;6(2):77-90  
 21 冯春燕,黄秀榕,祁明信,等.蜕皮甾酮对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导氧化损伤的人晶状体上皮细胞核因子  $\kappa$ B p65 表达的影响. *中国中西医结合杂志* 2012;32(1):76-79  
 22 冯春燕,黄秀榕,祁明信,等.异补骨脂素对氧化损伤的人晶状体上皮细胞的防护作用及其机制. *中华眼科杂志* 2011;47(4):353-355  
 23 黄秀榕,祁明信,张可丽,等.异补骨脂素对人晶状体上皮细胞雌激素受体表达的上调作用. *中国病理生理杂志* 2010;26(9):1844-1848