

番茄红素对紫外线诱导人晶状体上皮细胞氧化损伤的保护作用

孙敬文, 郝静

作者单位: (150060) 中国黑龙江省哈尔滨市, 中航工业哈尔滨242 医院眼科
作者简介: 孙敬文, 硕士, 主治医师, 研究方向: 晶状体病。
通讯作者: 孙敬文. 3051136639@qq.com
收稿日期: 2016-01-17 修回日期: 2016-04-13

Protective effect of lycopene for oxidative damage in human lens epithelial cells induced by UV

Jing-Wen Sun, Jing Hao

Department of Ophthalmology, China Aviation Industry 242 Hospital of Harbin, Harbin 150060, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Jing-Wen Sun. Department of Ophthalmology, China Aviation Industry 242 Hospital of Harbin, Harbin 150060, Heilongjiang Province, China. 3051136639@qq.com
Received: 2016-01-17 Accepted: 2016-04-13

Abstract

• **AIM:** To investigate the protective effect and possible mechanisms of lycopene for oxidative damage induced by ultraviolet in cultured human lens epithelial cells (HLEC).

• **METHODS:** HLEC was subcultured and divided into negative control group, oxidative injury group, lycopene low dose group and lycopene high dose group. Cell viability was assayed by MTT colorimetric. Cell morphological changes were detected by electron microscope. Reactive oxygen species (ROS) levels were detected with DCFH-DA fluorescent probe. Content of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH) and malondialdehyde (MDA) in supernatants were detected by spectrophotometer.

• **RESULTS:** Lycopene could obviously inhibited UV-induced decline in cell activity, reduce UV-induced ROS generation within HLEC, cause SOD, GSH-Px levels increased and MDA levels decreased.

• **CONCLUSION:** Lycopene plays its strong antioxidant role in increasing the intracellular SOD and GSH-Px content levels and decreasing MDA levels, which provide reliable experimental basis for prevent and treatment of cataracts.

• **KEYWORDS:** lycopene; ultraviolet; human lens epithelial cell; oxidative damage

Citation: Sun JW, Hao J. Protective effect of lycopene for oxidative damage in human lens epithelial cells induced by UV. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2016;16(5):826-828

摘要

目的: 探讨番茄红素对紫外线诱导的人晶状体上皮细胞 (human lens epithelial cells, HLEC) 氧化损伤的保护作用及可能机制。

方法: HLEC 传代培养, 分为阴性对照组、氧化损伤组、番茄红素低剂量组和番茄红素高剂量组, MTT 比色法检测细胞存活率, 电子显微镜观察细胞形态学改变, DCFH-DA 荧光探针检测胞内 ROS 变化, 分光光度计检测上清液中超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH) 活性及丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 的含量。

结果: 番茄红素能明显抑制紫外线诱导的细胞活性的下降, 减少紫外线所致 HLEC 内 ROS 的生成, 引起 HLEC 内 SOD 和 GSH-Px 水平的升高及 MDA 水平的下降。

结论: 番茄红素通过提高细胞内 SOD 和 GSH-Px 含量, 降低细胞内 MDA 含量, 发挥其较强的抗氧化作用, 从而为其用于白内障防治提供可靠的实验依据。

关键词: 番茄红素; 紫外线; 晶状体上皮细胞; 氧化损伤
DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2016.5.08

引用: 孙敬文, 郝静. 番茄红素对紫外线诱导人晶状体上皮细胞氧化损伤的保护作用. *国际眼科杂志* 2016;16(5):826-828

0 引言

白内障是导致我国老年人致盲的首要因素, 多种因素能够引起晶状体蛋白质变性而形成白内障, 其中氧自由基损伤是首位危险因素^[1]。研究结果证实, 在晶状体发生混浊之前, 就已经出现了晶状体组织及细胞的氧化损伤^[2]。本实验模拟白内障的发生机制, 体外建立紫外线诱导的人晶状体上皮细胞 (human lens epithelial cells, HLEC) 氧化损伤模型, 分析不同浓度的番茄红素干预 HLEC 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, 为用于防治白内障提供新的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 人 HLEC (ATCC 公司), 番茄红素 (Sigma 公司, 纯度为 95%), DMEM 培养基, 胎牛血清 (美国 Hyclone 公司), MTT 试剂盒 (德国 Roche 公司), DCFH-DA 试剂盒 (美国 BD 公司), 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH) 及丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 活力测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所), 酶标仪 (上海精密科学仪器有限公司), CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Forma 公司), 超净工作台 (苏州安泰空气技术公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞培养在含 10% 胎牛血清, 100U/mL 青霉素及 100μg/mL 链霉素的 DMEM 培养基中, 将 HLEC

表1 番茄红素对 HLEC 内 MDA 和 SOD 及 GSH-Px 含量的影响 $\bar{x} \pm s$

组别	MDA (nmol/mL)	SOD (U/mL)	GSH-Px (U/mL)
阴性对照组	55.32±2.43	67.62±3.44	153.37±4.05
氧化损伤组	83.53±3.56 ^b	41.28±4.84 ^b	102.28±4.52 ^b
低浓度番茄红素组	80.67±3.75	51.84±3.40	114.18±3.62
高浓度番茄红素组	57.28±4.32 ^d	69.76±3.30 ^d	147.74±4.47 ^d

注:^b $P < 0.01$ vs 阴性对照组;^d $P < 0.01$ vs 氧化损伤组。

置于 37℃, 体积分数 5% CO₂ 培养箱内培养, 细胞生长至近融合状态时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化、传代。

1.2.2 细胞分组 共分 4 组: (1) 阴性对照组; (2) 氧化损伤组; (3) 低浓度番茄红素组: 1×10^{-6} mol/L 番茄红素孵育 24h; (4) 高浓度番茄红素组: 1×10^{-4} mol/L 番茄红素孵育 24h。将氧化损伤组及番茄红素组 HLEC 垂直放置于紫外线光源下方, 撤去培养板盖, 照射强度为 30mJ/cm², 照射 30min; 将阴性对照组置于同室同条件无紫外线照射下 30min, 然后进行相关因子检测。电子显微镜观察细胞形态学改变。

1.2.3 MTT 检测细胞活力 细胞接种于 96 孔板 (细胞密度 5×10^4 /L, 每孔 120μL 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 20μL 终浓度为 5g/L MTT 无血清培养液, 培养 4h 后弃去培养液, 加入 150μL 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 荧光显微镜检测细胞内 ROS 表达 HLEC 接种于 96 孔板内, 用含 10μmol/L DCFH-DA 探针的培养液在 37℃ 细胞培养箱内孵育 20min, 平衡盐溶液冲洗 2 次后置于荧光显微镜下检测细胞内荧光强度。

1.2.5 氧化应激指标检测 相应干预后取各组细胞, 裂解后 1200g 离心 15min 取上清液, 按试剂盒说明书, 使用 721D 分光光度计测定细胞内 SOD 和 GSH-Px 及 MDA 含量。

统计学分析: 采用 SPSS 11.5 对实验数据进行分析, 实验结果以均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较用单因素方差分析, 进一步两组间比较采用 SNK-*q* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 番茄红素对 HLEC 活性的影响 氧化损伤组 HLEC 经氧化损伤处理后, 细胞活性明显下降 ($41.40\% \pm 4.54\%$), 与阴性对照组 ($99.40\% \pm 3.43\%$) 比较差异具有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。用不同浓度番茄红素处理后, HLEC 活性分别提高到 $55.34\% \pm 4.01\%$ 和 $75.23\% \pm 3.97\%$, 与氧化损伤组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1)。

2.2 不同处理因素下 HLEC 的形态学改变 正常 HLEC 呈长梭形, 贴壁生长, 胞膜完整, 细胞间界限清晰, 氧化损伤组细胞体积缩小, 呈圆形改变, 细胞间可见丝线样物质相连, 出现悬浮细胞 (提示坏死细胞的出现)。给予不同浓度的番茄红素处理后, 细胞形态逐渐得到改善 (图 2)。

2.3 番茄红素对 HLEC 内 ROS 含量变化的影响 采用 DCFH-DA 荧光探针检测胞内 ROS 变化情况, 氧化损伤组与阴性对照组相比, DCF 荧光信号明显增强, 不同浓度番茄红素干预后, 荧光信号强度逐渐减弱 (图 3)。

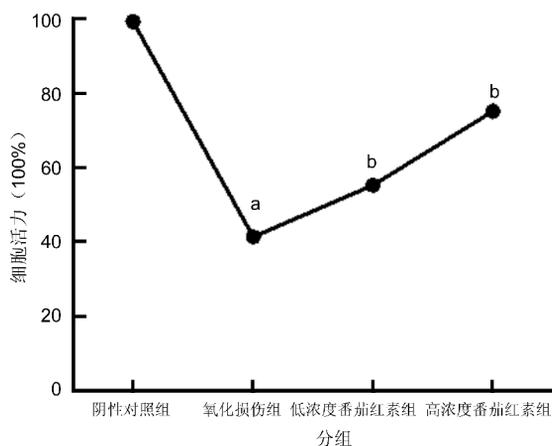


图1 番茄红素对 HLEC 活性的影响 ^a $P < 0.05$ vs 阴性对照组; ^b $P < 0.01$ vs 氧化损伤组。

2.4 番茄红素对 HLEC 内 MDA 和 SOD 及 GSH-Px 含量的影响 从表 1 中可知, 氧化损伤组 HLEC 中 MDA 含量为 83.53 ± 3.56 nmol/mL, 与阴性对照组 (55.32 ± 2.43 nmol/mL) 比明显升高, SOD (41.28 ± 4.84 U/mL) 及 GSH-Px (102.28 ± 4.52 U/mL) 含量明显下降。给予番茄红素后, 随着作用剂量的升高, MDA 含量有下降的趋势, 番茄红素高剂量组 (57.28 ± 4.32 nmol/mL) 与氧化损伤组比较差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$); 同时番茄红素促进了 SOD (69.76 ± 3.30 U/mL) 及 GSH-Px (147.74 ± 4.47 U/mL) 含量的升高, 番茄红素高剂量组与氧化损伤组比较差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。

3 讨论

已有研究证实, 氧化损伤在白内障的发生、发展中起着重要的作用^[3-4]。多种原因可引起晶状体内自由基的生成, 如自由基的生成率大于其清除率, 体内活性氧类物质蓄积, 便会引起晶状体蛋白质和脂质过氧化, HLEC 受损, 长时间的积累性氧化损伤导致细胞凋亡^[5-6]。生理状态下, 机体抗自由基损伤的酶如 SOD 和 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。因此, 清除活性氧和修复氧化损伤被认为是预防和治疗白内障行之有效的方法^[7-8]。

番茄红素广泛存在于红色水果与蔬菜中, 抗氧化剂是一种重要的不含氧的类胡萝卜素, 其中尤以番茄中的含量最高。有报道显示, 其清除单线态氧的能力是 β -胡萝卜素的 2 倍, 维生素 E 的 100 倍^[9-10]。番茄红素分子中含有开链不饱和双键的长链结构, 具有淬灭单线态氧、清除自由基的能力^[11]。国内外大量研究已经证实, 番茄红素在预防胸腺癌和前列腺癌、抗动脉粥样硬化、抗老化、保护皮肤、预防和治疗神经系统退行性疾病、抗炎方面有一定作用^[12]。但是对于 HLEC 氧化损伤的保护作用鲜有报道。

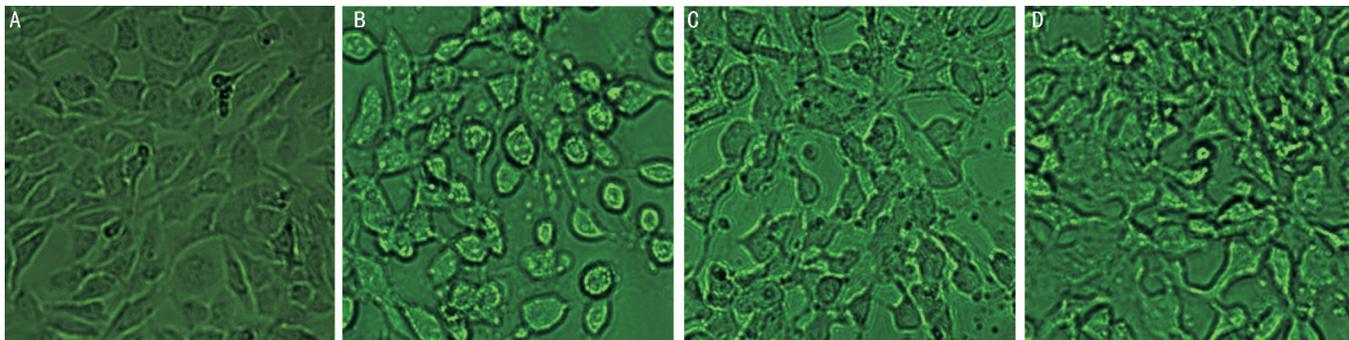


图2 不同处理因素下晶状体上皮细胞的形态学改变(×100) A:阴性对照组;B:氧化损伤组;C:低浓度番茄红素组;D:高浓度番茄红素组。

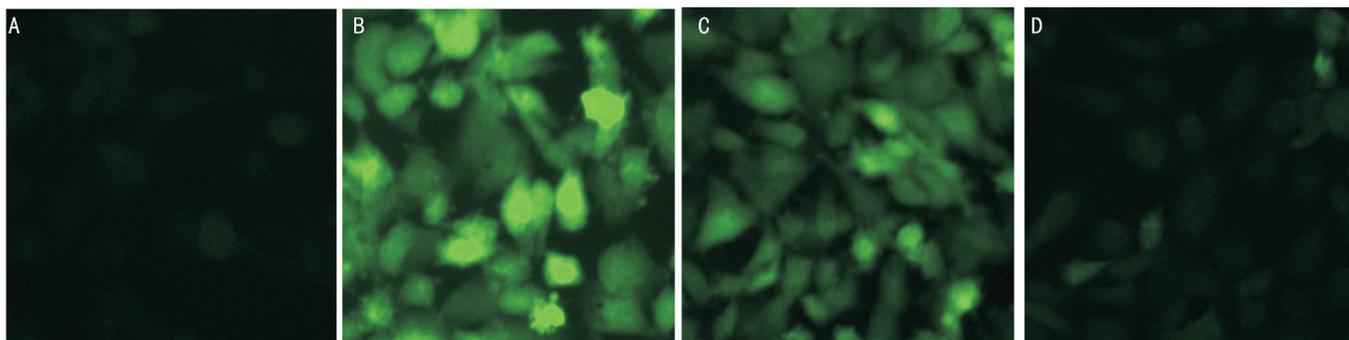


图3 番茄红素对 HLEC 内 ROS 含量变化的影响(×100) A:阴性对照组;B:氧化损伤组;C:低浓度番茄红素组;D:高浓度番茄红素组。

HLEC 对氧化应激损伤较为敏感,我们以传代培养的 HLEC 为研究对象,利用紫外线建立细胞氧化损伤模型,观察番茄红素对该细胞的保护作用。MTT 检测结果显示番茄红素能够抑制氧化损伤致 HLEC 活力的下降,其保护作用呈剂量依赖性;此外,番茄红素还能够有效抑制细胞内 ROS 的生成;ROS 和 MDA 是氧化应激的主要产物,其水平的高低反映了细胞受自由基损伤和攻击的程度。用番茄红素干预后,HLEC 中 SOD 和 GSH-Px 活性较氧化损伤组显著升高,MDA 含量显著降低,提示番茄红素可能通过提高细胞内 SOD 和 GSH-Px 含量,降低细胞内 MDA 含量发挥其较强的抗氧化作用。

本研究结果提示,番茄红素在白内障防治方面的运用潜力,对紫外线诱导的 HLEC 的氧化损伤具有一定的抑制作用,抑制效应与药物浓度正相关,希望通过对白内障发病机制更深入的研究,为白内障的临床防治提供新的实验证据。

参考文献

- 1 李佳,刘丹. 茶多酚对体外培养鼠晶状体抗氧化损伤作用的研究. 国际眼科杂志 2012;26(2):169-172
- 2 马奕萍,马萍,姜海瑞. N-乙酰半胱氨酸预防亚硒酸钠诱导大鼠白内障的研究. 现代药物与临床 2014;29(7):717-719
- 3 Yanshole LV, Cherepanov IV, Snytnikova OA, et al. Cataract specific posttranslational modifications and changes in the composition of urea-

- soluble protein fraction from the rat lens. *Mol Vis* 2013;19(4):2196-2208
- 4 Miric DJ, Kusic BB, Zoric LD. Xanthine oxidase and lens oxidative stress markers in diabetic and senile cataract patients. *J Diabetes Complications* 2012;8(11):1059-1060
- 5 Libongdi T, Costag lioal G, Della Corte M, et al. Cataract risk factors: blood level of antioxidative vitamins, reduced glutathione and malondialdehyde in cataractous patients. *Metab Padiatral Ophthalmol* 1991;14(2):31-34
- 6 胡建章. 自由基与白内障的关系研究进展. 国外医学:眼科学分册 2003;27(1):45-49
- 7 周红艳,郗文斌,温君琳,等. 不同时间束缚应激对大鼠血清和胃黏膜组织中 SOD、MDA 的影响. 实用医学杂志 2014;30(24):3912-3915
- 8 洪亚琼,鄢鸿,孟欣欣,等. 低剂量辐射联合阿霉素对荷乳腺癌裸鼠肾脏组 SOD、GSH-Px 和 MDA 的影响. 中国老年学杂志 2014;34(24):6987-6989
- 9 刘重斌,王瑞,潘慧斌,等. 番茄红素对帕金森模型小鼠氧化应激损伤及神经行为的影响. 中国应用生理学杂志 2013;29(4):380-383
- 10 陈文豪,陈浩,赵达君,等. 番茄红素对血管内皮细胞氧化应激损伤的作用及机制研究. 现代生物医学进展 2014;14(11):2037-2039
- 11 张建武,闵冬雨,周云,等. 番茄红素对 H₂O₂ 致乳鼠心肌细胞氧化应激损伤的保护作用. 中国实验方剂学杂志 2014;20(12):160-163
- 12 戴鸣翔,张荣庆,李聪叶,等. 番茄红素对大鼠乳鼠心肌细胞缺氧复氧的保护作用及其机制. 现代生物医学进展 2011;11(6):1106