

# 红景天苷对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的人晶状体上皮细胞氧化应激损伤的保护作用

刘礼婷, 郑文韬, 刘平, 张丽娟

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No. 30973275)  
作者单位: (150001) 中国黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第一医院眼科  
作者简介: 刘礼婷, 毕业于哈尔滨医科大学, 本科, 护师, 研究方向: 白内障。  
通讯作者: 张丽娟, 毕业于吉林大学, 本科, 副主任护师, 研究方向: 白内障. 3051136639@qq.com  
收稿日期: 2017-04-05 修回日期: 2017-08-23

## The protection of salidroside on oxidative stress induced in human lens epithelium cells

Li - Ting Liu, Wen - Tao Zheng, Ping Liu, Li - Juan Zhang

**Foundation item:** The National Natural Science Foundation (No. 30973275)

Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

**Correspondence to:** Li - Juan Zhang. Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. 3051136639@qq.com

Received: 2017-04-05 Accepted: 2017-08-23

### Abstract

• **AIM:** To explore the effect of different concentrations of salidroside on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative stress damage in human lens epithelium cells (HLEC).

• **METHODS:** HLEC were cultured and divided into negative control group: cultured in normal cultivation; oxidative damage group: treated with 100 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 12h; Salidroside low concentration group: 10 μmol/L salidroside treated for 24h and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated for 12h; Salidroside high concentration group: 100 μmol/L salidroside treated for 24h and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated for 12h. MTT method was applied to observe the effect of salidroside on HLEC survival rate. Morphological change of each group were observed and recorded under inverted microscope. DCFH - DA fluorescent probe was applied to detect intracellular ROS changes; content of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH - Px) in supernatants were detected by pectrophotometer.

• **RESULTS:** Salidroside obviously inhibited H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - induced HLEC vitality decline, inhibited ROS generation in cells, causing SOD, GSH - Px levels increased and MDA levels decreased.

• **CONCLUSION:** Salidroside inhibited H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced HLEC

injury by decreasing the intracellular MDA content levels and increasing SOD, GSH - Px content levels, which conclude that salidroside may have a certain role in the treatment of HLEC damage.

• **KEYWORDS:** salidroside; hydrogen peroxide; human lens epithelium cell; protect

**Citation:** Liu LT, Zheng WT, Liu P, *et al.* The protection of salidroside on oxidative stress induced in human lens epithelium cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017;17(10):1834-1836

### 摘要

**目的:** 探讨不同浓度红景天苷对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的人晶状体上皮细胞 (human lens epithelium cells, HLEC) 氧化损伤的影响。

**方法:** HLEC 传代培养, 分为 4 组: 对照组: 以正常培养液培养; 氧化损伤组: 100 μmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 12h; 红景天苷低浓度组: 10 μmol/L 红景天苷预处理 24h 后, 加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 12h; 红景天苷高浓度组: 100 μmol/L 红景天苷预处理 24h 后, 加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 12h。应用 MTT 法观察红景天苷对 HLEC 细胞活力的影响; 倒置显微镜下观察并记录各组细胞形态变化; DCFH - DA 荧光探针检测胞内 ROS 含量的变化; 分光光度计检测细胞内超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH - Px) 及丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 的含量。

**结果:** 红景天苷能明显抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HLEC 细胞活力下降, 抑制细胞内 ROS 生成, 引起 HLEC 内 SOD、GSH - Px 水平的升高及 MDA 水平的下降。

**结论:** 红景天苷通过降低细胞内 MDA 产生, 提高细胞内 SOD、GSH - Px 含量抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HLEC 损伤, 提示红景天苷可能在 HLEC 损伤的治疗中具有保护作用。

**关键词:** 红景天苷; 过氧化氢; 晶状体上皮细胞; 保护

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2017.10.07

**引用:** 刘礼婷, 郑文韬, 刘平, 等. 红景天苷对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的人晶状体上皮细胞氧化应激损伤的保护作用. 国际眼科杂志 2017;17(10):1834-1836

### 0 引言

活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 介导的氧化应激损伤在人晶状体上皮细胞 (human lens epithelium cells, HLEC) 凋亡的病理过程中发挥重要作用, 是引起晶状体上皮细胞损伤及组织结构与功能异常的重要原因<sup>[1]</sup>。氧化应激情况下, ROS 在 HLEC 内过量聚集, 造成细胞结构及功能受损, 引起 HLEC 凋亡。研究表明, 白内障的发生与 HLEC 的氧化损伤及凋亡关系密切<sup>[2]</sup>。因此, 寻找有效的抗氧化作用强的药物以减轻氧化应激引起的 HLEC 损伤

表1 红景天苷对 HLEC 内 MDA、SOD 及 GSH-Px 含量变化的影响

组别	MDA (nmol/mL)	SOD (U/mL)	GSH-Px (U/mL)	$\bar{x} \pm s$
对照组	56.80±3.12	72.07±3.98	154.37±4.47	
氧化损伤组	89.06±3.43 <sup>a</sup>	44.28±4.78 <sup>a</sup>	102.31±4.21 <sup>a</sup>	
红景天苷低剂量组	84.54±3.77 <sup>e</sup>	55.84±3.45	123.18±3.56 <sup>e</sup>	
红景天苷高剂量组	61.20±4.33 <sup>e</sup>	66.76±3.6 <sup>e</sup>	144.74±4.73 <sup>e</sup>	
F	35.72	7.90	44.56	
P	<0.05	<0.05	<0.05	

注:<sup>a</sup> $P<0.05$  vs 对照组;<sup>e</sup> $P<0.05$  vs 氧化损伤组。

具有重要的临床意义。红景天苷 (salidroside) 是青藏高原特有植物红景天 (rhodiola) 的主要活性成分, 研究表明红景天苷具有抗老化、抗炎、抗疲劳、抗抑郁、免疫调节及抗微波辐射等作用<sup>[3]</sup>。目前国内外关于红景天苷对 HLEC 保护作用的研究并不多。祝凤梅等<sup>[4]</sup>应用  $H_2O_2$  诱导 HLEC 建立氧化应激损伤模型, 发现红景天苷通过抑制 Bax、Caspase-3 表达发挥保护作用。本研究以 HLEC 为研究对象, 观察不同浓度红景天苷对  $H_2O_2$  诱导的 HLEC 损伤的影响, 并探讨相关机制, 进一步验证红景天苷对 HLEC 的保护作用, 希望为白内障的治疗提供新的实验依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 红景天苷 (美国 Sigma 公司, 纯度 >97%), HLEC (中国科学院上海细胞库), DMEM 培养基、胰蛋白酶 (上海碧云天公司), 噻唑蓝 (MTT) 试剂盒 (上海伯奥生物制品公司), DCFH-DA 活性氧检测试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司), 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 及丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 将 HLEC 置于 37℃、体积分数 50mL/L  $CO_2$  培养箱内培养, 待细胞在含 10% 胎牛血清, 100U/mL 青霉素及 100μg/mL 链霉素的 DMEM 培养液中生长至近融合状态时, 使用 0.1% 胰蛋白酶消化、传代。收集对数生长期细胞分为 4 组: (1) 对照组: 以正常培养液培养; (2) 氧化损伤组: 100μmol/L  $H_2O_2$  作用 12h; (3) 红景天苷低浓度组: 10μmol/L 红景天苷预处理 24h 后, 加入  $H_2O_2$  作用 12h; (4) 红景天苷高浓度组: 100μmol/L 红景天苷预处理 24h 后, 加入  $H_2O_2$  作用 12h。倒置显微镜下观察并记录各组细胞形态变化。

**1.2.3 MTT 法检测细胞活力** 细胞接种于 96 孔板中, 每孔 200μL 细胞悬液, 接种密度为  $5 \times 10^4$ /mL。培养 24h, 待药物作用结束后向各孔中加入 20μL MTT 溶液 (5g/L), 4h 后弃去培养基, 加入 DMSO 溶液 200μL/孔, 室温下振荡 20min 后用全自动酶标仪测定 ( $\lambda = 570nm$ ) 各孔的吸光度 (A) 值。每组设立三个复孔。细胞活力 =  $(A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。

**1.2.4 细胞内 ROS 含量的检测** 利用氧敏感荧光探针  $H_2DCFDA$  检测细胞内 ROS 含量。HLEC 细胞接种于 96 孔板, 待药物作用结束后, 用含 10μmol/L DCFH-DA 探针的培养液在细胞培养箱内孵育 20min, 于 1h 内用流式细胞仪检测 ROS 含量, 以上操作均在暗室内避光进行。

**1.2.5 氧化应激检测** 收集细胞并用 0.1% 胰蛋白酶消化, 1200r/min 离心 10min, 收集细胞并用 PBS 缓冲液洗涤

2 次, 加入 30μL 细胞裂解液后冰上孵育 20min, 10 000r/min 离心 10min, 按试剂盒说明书操作, 使用分光光度计测定细胞内 SOD、GSH-Px 及 MDA 的含量。

**统计学分析:** 采用 SPSS11.5 统计软件对实验数据进行分析。计量资料以均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用 one-way ANOVA, 两组间比较采用 Student's *t* 检验。  $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 不同浓度红景天苷对 HLEC 细胞活力的影响** 氧化损伤组 HLEC 细胞经 100μmol/L  $H_2O_2$  处理后, 细胞活力明显下降 ( $47.64\% \pm 2.36\%$ ), 与对照组 ( $99.33\% \pm 2.54\%$ ) 比较差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ )。用不同浓度红景天苷预处理后, 随着红景天苷浓度升高细胞活力逐渐提高 ( $69.53\% \pm 2.83\%$  和  $87.54\% \pm 2.58\%$ ), 与氧化损伤组细胞活力比较差异均具有统计学意义 ( $P<0.05$ )。

**2.2 不同浓度红景天苷对 HLEC 细胞形态的影响** 倒置显微镜下观察, 对照组细胞贴壁良好, 自然伸展呈长梭形, 胞质透亮, 细胞间界限清晰, 胞膜完整, 生长状态良好。氧化损伤组细胞体积明显缩小, 呈圆形, 细胞间可见丝线样物质相连。给予不同浓度的红景天苷预处理, 随着红景天苷浓度升高细胞形态逐渐得到改善, 见图 1。

**2.3 红景天苷对 HLEC 细胞内 ROS 含量的影响** 采用 DCFH-DA 荧光探针检测胞内 ROS 含量变化情况, 氧化损伤组与对照组相比, DCF 荧光信号明显增强。给予不同浓度的红景天苷预处理, 随着红景天苷浓度升高荧光信号强度逐渐减弱, 见图 2。

**2.4 红景天苷对 HLEC 细胞内 MDA 和 SOD 及 GSH-Px 含量变化的影响** 与对照组比较, 氧化损伤组细胞内 MDA 含量明显升高, SOD 及 GSH-Px 含量明显下降, 差异均具有统计学意义 ( $P<0.05$ )。给予红景天苷预处理, 随着红景天苷浓度升高, MDA 含量有下降的趋势, 红景天苷低、高剂量组与氧化损伤组比较差异均具有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 同时红景天苷能够促进 SOD 及 GSH-Px 产生, 红景天苷高剂量组与氧化损伤组比较二者差异均具有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 见表 1。

## 3 讨论

机体抵抗氧自由基损伤的主要方式依赖于抗氧化系统。正常生理情况下, HLEC 内氧化代谢产物的生成与消除是平衡的, 但是在氧化应激情况下, 细胞内 ROS 清除能力明显下降, 自由基代谢产物会在 HLEC 内过量聚集, 引起细胞毒性导致白内障的发生<sup>[5-6]</sup>。因此, 抑制 HLEC 内 ROS 的生成、增强细胞抗氧化能力、抑制 HLEC 凋亡对白内障的防治具有非常重要的临床意义。 $H_2O_2$  是引起 ROS 氧化应激主要的危险因子之一, 当 ROS 的生成超过 HLEC 的抗氧化能力时, 可导致明显的氧化损伤并触发 HLEC 的

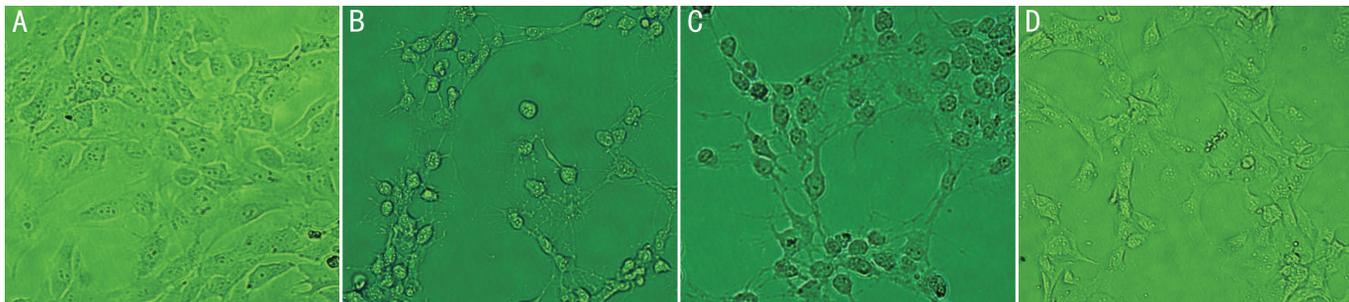


图1 不同浓度红景天苷对 HLEC 细胞形态的影响 (×300) A: 对照组; B: 氧化损伤组; C: 红景天苷低剂量组; D: 红景天苷高剂量组。

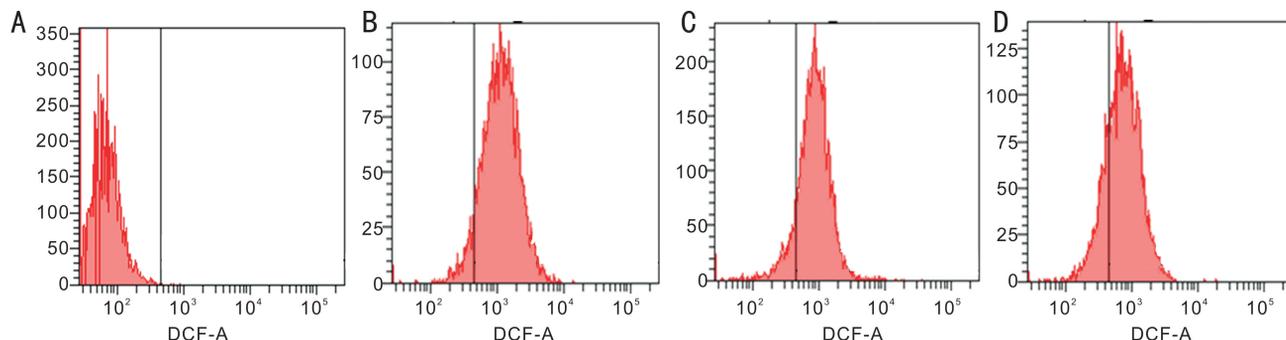


图2 红景天苷对 HLEC 细胞内 ROS 含量变化的影响 A: 对照组; B: 氧化损伤组; C: 红景天苷低剂量组; D: 红景天苷高剂量组。

凋亡<sup>[7-9]</sup>。HLEC 对氧化应激损伤较为敏感,本研究以传代培养的 HLEC 为研究对象,利用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 建立细胞氧化损伤模型,观察红景天苷对该细胞的保护作用。我们的研究结果显示,100 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 12h 细胞内 ROS 含量明显升高,说明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可以诱导 HLEC 发生氧化损伤。因此,寻找抑制 HLEC 内 ROS 过量产生和蓄积的药物是防治白内障发生的有效途径之一。

生理状态下,机体抗自由基损伤的酶如 SOD、GSH-Px 能有效地清除 ROS 和自由基,使自由基的产生和清除处于平衡<sup>[10-12]</sup>。我国传统的中草药具有分布广泛、价格低廉、对机体毒副作用小等优点,现在传统的中药治疗已成为治疗各类疾病的一个重要途径,并逐渐成为国内外学者关注的热点<sup>[13]</sup>。红景天苷抗氧化能力的研究已见报道<sup>[14-15]</sup>,但是关于红景天苷对眼部组织具有保护作用的研究鲜有报道。Shi 等<sup>[16]</sup>的研究显示,红景天苷能够有效抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HLEC 的氧化损伤和凋亡,其保护机制为增强了 CAT 及 Mn-SOD 活性。我们的研究结果发现红景天苷干预处理后,HLEC 内 SOD、GSH-Px 活性较氧化损伤组显著升高,MDA 含量显著降低,提示红景天苷可能通过提高细胞内 SOD、GSH-Px 含量,降低细胞内 MDA 含量发挥其较强的抗氧化作用,这与以往的研究结果相似。

本研究在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 HLEC 细胞模型上证实了红景天苷的抗氧化损伤作用,而且该药物的细胞保护作用呈量效相关性,其作用机制可能与调节抗氧化物酶表达有关,但仍有待于进一步探讨,希望为白内障的治疗提供新的实验依据。

#### 参考文献

- Mok JW, Chang DJ, Joo CK. Antiapoptotic effects of anthocyanin from the seed coat of black soybean against oxidative damage of human lens epithelial cell induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Curr Eye Res* 2014; 39 (11): 1090-1098
- Li Y, Liu YZ, Shi JM, et al. Alpha lipoic acid protects lens from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cataract by inhibiting apoptosis of lens epithelial cells and inducing activation of anti-oxidative enzymes. *Asian Pac J Trop Med* 2013;6(7): 548-551
- 高瑾,罗伟,王钦,等. 红景天苷对宫颈癌 Siha 细胞增殖及 IMP3 表

- 达的影响. *重庆医学* 2016;45(27):3849-3851
- 祝凤梅,郑广璞,郑艳,等. 红景天苷对人晶状体上皮细胞氧化损伤保护作用的研究. *中华眼科杂志* 2015;51(2):130-135
- 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;12(2):215-217
- Remø SC, Hevrøy EM, Olsvik PA, et al. Dietary histidine requirement to reduce the risk and severity of cataracts is higher than the requirement for growth in Atlantic salmon smolts, independently of the dietary lipid source. *Br J Nutr* 2014;111(10):1759-1772
- Varma SD, Kovtun S, Hegde KR. Role of ultraviolet irradiation and oxidative stress in cataract formation—medical prevention by nutritional antioxidants and metabolic agonists. *Eye Contact Lens* 2011; 37(4): 233-245
- Ma T, Chen T, Li P, et al. Heme oxygenase-1 (HO-1) protects human lens epithelial cells (SRA01/04) against hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-induced oxidative stress and apoptosis. *Exp Eye Res* 2016;146:318-329
- Yao K, Wu W, Yu Y, et al. Effect of superposed electromagnetic noise on DNA damage of lens epithelial cells induced by microwave radiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(5):2009-2015
- Xu F, Wang L, Ju X, et al. Transepithelial Transport of YWHDHNPQIR and Its Metabolic Fate with Cytoprotection against Oxidative Stress in Human Intestinal Caco-2 Cells. *J Agric Food Chem* 2017;65(10):2056-2065
- Wan J, Deng L, Zhang C, et al. Chikusetsu saponin V attenuates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in human neuroblastoma SH-SY5Y cells through Sirt1/PGC-1α/Mn-SOD signaling pathways. *Can J Physiol Pharmacol* 2016;94(9):919-928
- Xu Y, Wang S, Miao Q, et al. Protective Role of Hinokitiol Against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Injury in Human Corneal Epithelium. *Curr Eye Res* 2017; 42(1):47-53
- 吴稚冰,马胜林. β-榄香烯抗肿瘤作用的研究进展. *中华中医药学刊* 2011;10(29):2255-2258
- 周丽萍,李馨唐,唐超园. 红景天苷对间充质干细胞缺氧损伤后增殖及抗氧化能力影响的初步研究. *浙江中医药大学学报* 2016;40(9):643-645
- 范桂强,齐善厚,庞红霞,等. 红景天提取物与红景天苷体外抗氧化作用研究. *中国药房* 2016;27(13):1797-1799
- Shi K, Wang X, Zhu J, et al. Salidroside protects retinal endothelial cells against hydrogen peroxide-induced injury via modulating oxidative status and apoptosis. *Biosci Biotechnol Biochem* 2015;79(9):1406-1413