

## 茶黄素对葡萄糖诱导的人晶状体上皮细胞 一氧化氮合成的影响

牛丽<sup>1,3</sup>, 曹佩琴<sup>1,3</sup>, 刘仲华<sup>1,2,3\*</sup>

(1.国家植物功能成分利用工程技术研究中心, 湖南 长沙 410128; 2.湖南省植物功能成分利用协同创新中心, 湖南 长沙 410128; 3.湖南农业大学茶学教育部重点实验室, 湖南 长沙 410128)

**摘要:**为探明茶黄素-3,3'-双没食子酸酯(TFDG)对人晶状体上皮细胞 SRA01/04(Human lens epithelial cells, HLECs SRA01/04)的保护作用, 采用 MTT 法建立高浓度葡萄糖(HG)诱导的 HLECs 损伤模型, 同时观察 HLECs 细胞形态的变化。用不同浓度(4、8、16、64、32、64、128、256、512  $\mu\text{mol/L}$ )TFDG 处理 HLECs 损伤细胞, 采用化学比色法和硝酸还原法测定 HLECs 内一氧化氮(NO)的含量和一氧化氮合酶(NOS)的活性。结果表明:高浓度葡萄糖可以抑制人晶状体上皮细胞生长, 用于 HLECs 损伤模型诱导的最佳葡萄糖浓度为 50 mmol/L, 最佳诱导时间为 24 h; 与未经处理的模型细胞相比, 经浓度为 16~64  $\mu\text{mol/L}$  TFDG 处理的模型细胞的存活率显著提高( $P < 0.05$ ); 各个浓度的 TFDG 能极显著降低模型细胞内 NOS 的活性, 极显著减少 NO 的合成( $P < 0.01$ ), 且呈浓度依赖性。以上结果表明, TFDG 对高浓度葡萄糖诱导的 HLECs 细胞损伤具有较好的保护作用。

**关键词:**茶黄素-3,3'-双没食子酸酯; 人晶状体上皮细胞; 一氧化氮; 一氧化氮合酶; 高浓度葡萄糖

中图分类号: S571.1; R363.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2014)04-0369-04

## Effect of TFDG on synthesis of NO in human lens epithelial cells by high glucose

NIU Li<sup>1,3</sup>, CAO Pei-qin<sup>1,3</sup>, LIU Zhong-hua<sup>1,2,3\*</sup>

(1.National Research Center of Engineering Technology for Utilization of Botanical Functional Ingredients, Changsha 410128, China; 2.Hunan Co-Innovation Center for Utilization of Botanical Functional Ingredients, Changsha 410128, China; 3.Key Laboratory of Tea Science, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**Abstract:** To investigate the effect of theaflavin-3, 3'-digallate (TFDG) on human lens epithelial cells (HLECs SRA01/04), MTT method was used to establish the oxidative damage model of HLECs induced by high concentration of glucose, at the same time, the changes of cell morphology was observed. The HLECs induced by high glucose were interfered with different concentrations of TFDG (4, 8, 16, 64, 32, 64, 128, 256, 512  $\mu\text{mol/L}$ ), the NOS activity and NO level in HLECs were detected by chemical colorimetry and nitric acid reductase method respectively. It was found that HG can inhibit the growth of human lens epithelial cells. The optimal concentration of glucose and the optimal treating time are 50 mmol/L and 24 h. Compared with the model cells, survival rate of model cells treated with TFDG (16~64  $\mu\text{mol/L}$ ) increased ( $P < 0.05$ ), and the NOS activity and NO synthesis in TFDG treated model cells were extremely significantly decreased ( $P < 0.01$ ) in a dose dependent manner. In conclusion, TFDG showed good protect against damage of HLECs induced by high glucose.

**Key words:** aflavin-3, 3'-digallate; human lens epithelial cells; nitric oxide; nitric oxide synthase; high glucose

收稿日期: 2014-02-28

基金项目: 湖南省科学技术厅项目(2013FJ4231)

作者简介: 牛丽(1987—), 女, 汉族, 湖北荆门人, 硕士研究生, 主要从事茶叶的功能成分化学的研究, 260122288@qq.com; \*通信作者, larkin-liu@163.com

一氧化氮(NO)是一种极不稳定的气体分子,带有自由基,能溶于组织并且能自由地穿过细胞膜,可以引起细胞核酸亚硝酰化,破坏DNA的螺旋结构,导致细胞受损<sup>[1]</sup>。NO还可以破坏细胞的呼吸链,大量消耗三磷酸酰苷(ATP),对细胞造成毒性损伤,最终导致细胞凋亡<sup>[2-3]</sup>。一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)是诱导合成NO的关键酶,一旦被诱导,即可大量合成NO,活性可持续长达20h<sup>[4]</sup>。

茶黄素是一类多酚羟基具苯骞酚酮结构的物质,是存在于红茶中的一种金黄色色素。在红茶中含量一般为0.3%~1.5%。研究表明,茶黄素有抗氧化、防治心血管疾病、降血脂、抗癌、防癌等功效<sup>[5]</sup>。茶黄素-3,3'-双没食子酸酯(TFDG)是茶黄素4种主要的单体物质之一,具有较多的酚羟基,有较强的抗氧化活性。

随着人们生活水平的提高,糖尿病发病率迅猛增长,其并发症糖尿病性白内障(diabetic cataract, DC)也成为全球眼病致盲的主要原因。有研究表明,氧化应激是诱导糖尿病性白内障发病的主要机制之一<sup>[6-7]</sup>。本研究中,笔者采用高浓度葡萄糖对人晶状体上皮细胞(HLECs)造成氧化损伤,再用不同浓度的茶黄素单体物质TFDG进行干预,探讨TFDG对HLECs的保护作用,旨在为治疗白内障疾病提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试细胞

人晶状体上皮细胞SRA01/04(HLECs SRA01/04)购自徐州医学院。

### 1.2 主要试剂和仪器

TFDG(北京工商大学植物资源研究开发重点实验室);MEM培养基(Cyclone);胎牛血清(FBS,美国Gibco);PBS粉剂(美国Amresco公司);胰蛋白酶(美国Gibco公司);二甲基亚砜(DMSO,美国Gibco公司);NOS和NO检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);VC-50超声波细胞粉碎机(美国SONICS公司);2111型二氧化碳培养箱(美国FORMA公司)。

### 1.3 细胞的正常培养

HLECs细胞置于37℃、CO<sub>2</sub>体积分数为5%的

培养箱中培养。培养基为含10%FBS的MEM,待细胞生长至80%汇合度时用胰酶消化,按1:4的比例传代。

### 1.4 HLECs损伤模型细胞的诱导

将细胞传代后,调整细胞密度至 $2 \times 10^4$ 个/mL,接种于96孔板,正常培养24h后,弃培养液,加入葡萄糖浓度为0、10、20、30、40、50、60、70、80mmol/L的MEM培养基150μL,每个浓度设6个重复孔,继续培养24h后,每孔加入20μL的MTT溶液,孵育4h。弃培养基,加入150μL DMSO,置摇床上低速振荡10min。在酶标仪紫外波长490nm处检测吸光值,计算细胞的存活率,根据Li等<sup>[8]</sup>和Jain等<sup>[9]</sup>的研究结果确定葡萄糖造模浓度。

### 1.5 TFDG对高糖诱导的HLECs损伤的影响

HLECs细胞用96孔板培养后,根据以上确定的葡萄糖造模浓度,加入葡萄糖,培养24h,弃旧培养液,往各孔分别加入TFDG浓度为4、8、16、32、64、128、256、512μmol/L的MEM培养基150μL,每个浓度设6个重复孔,孵育24h。MTT检测细胞的活力,与正常培养细胞(CK)和未经TFDG处理的损伤模型细胞(HG Model)比较存活率。

### 1.6 HLECs内NOS活性和NO含量的测定

按照上述方法培养正常细胞、损伤模型细胞及TFDG处理的损伤模型细胞,收集细胞,制成1mL PBS悬液。将细胞悬液进行超声破碎,4000r/min离心10min。取上清,分别按NOS检测试剂盒(化学比色法)和NO检测试剂盒(硝酸还原酶法)说明书进行操作,计算出HLECs内NOS活性和NO含量。

### 1.7 数据统计与分析

用SPSS17.0进行统计分析,计量数据以“均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )”进行描述;多组间比较采用单因素ANOVA方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 构建HLECs损伤模型的葡萄糖浓度及处理时间的确定

MTT比色法检测结果(图1)显示,低浓度的葡萄

糖刺激细胞的生长,当葡萄糖浓度为30 mmol/L时,作用24 h,细胞活力最大。用50 mmol/L葡萄糖处理24 h的细胞,其存活率为67.6%,初步选择此葡萄糖浓度和处理时间为造模条件。对此条件处理的细胞进行光学显微镜观察(图2),可见细胞多呈圆形,出现大量漂浮细胞,并伴有部分细胞碎片,而正常培养细胞呈多角形或六边形,因此,确定HLECs损伤造模用葡萄糖浓度为50 mmol/L,处理时间为24 h。

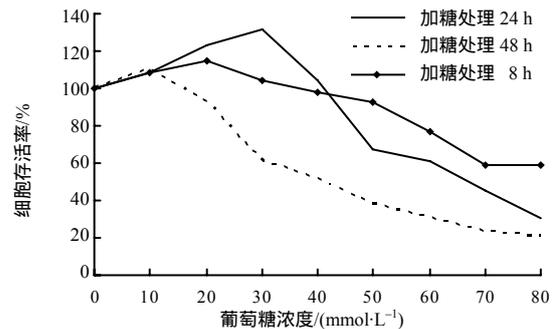


图1 葡萄糖浓度和处理时间对 HLECs 的存活率的影响  
Fig. 1 Effect of different concentration of HG and treating time on survival rate of HLECs



HG 诱导的损伤模型细胞



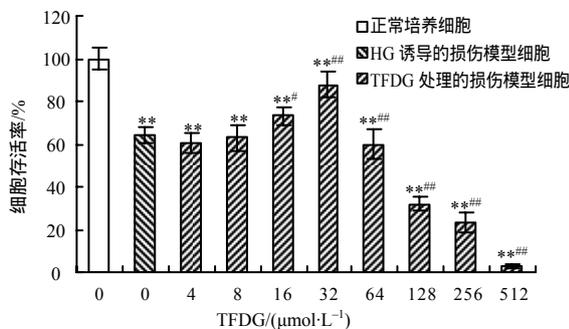
正常培养细胞

图2 倒置显微镜下细胞的形态(10×)

Fig. 2 HLEC cells under inverted microscope

2.2 不同浓度 TFDG 对 HG 诱导的 HLECs 损伤细胞的存活率的影响

HLECs损伤模型细胞经浓度为4~512 μmol/L的TFDG处理24 h后,进行MTT比色法检测的结果(图3)显示,当TFDG浓度为8~32 μmol/L时,损伤细胞存活率随浓度的升高而增加,与未用TFDG处理的模型细胞相比,存活率显著提高(P < 0.05);当TFDG浓度为64~512 μmol/L时,损伤细胞的存活率随着浓度的升高而降低;当TFDG浓度为512 μmol/L时,细胞几乎全部死亡。



“\*\*”示与正常培养细胞比较, P < 0.01; “#”、“###”分别示与未经处理的模型细胞比较, P < 0.05, P < 0.01。

图3 不同浓度 TFDG 处理下 HLEC 模型细胞的存活率(作用 24 h)

Fig. 3 Effect of different concentration of TFDG (24 h) on survival rate of model HLECs

2.3 不同浓度 TFDG 处理下 HLECs 损伤细胞内 NOS 的活性及 NO 的含量

由表1可知,正常培养的HLEC细胞中,NOS有一定的活性。与正常培养细胞相比,在高浓度葡萄糖的诱导下,损伤模型细胞NOS的活性以及NO的含量都有一定的升高。加入不同浓度的TFDG以后,损伤模型细胞内NOS的活性均显著下降,NO的含量均显著减少,其中32 μmol/L TFDG处理细胞的NOS活性及NO含量最低。

表1 不同浓度 TFDG 对 SRA01/04 细胞 NOS 活性、NO 含量的影响

组别	TFDG 浓度 / (μmol·L⁻¹)	NOS / (U·mg⁻¹)	NO / (μmol·g⁻¹)
损伤模型细胞	0	4.734±0.411	1.783±0.104
	16	(4.186±0.199)*#	(1.285±0.033)**#
	32	(3.585±0.247)###	(0.989±0.021)***#
	64	(3.812±0.247)***#	(1.175±0.071)***#
正常培养细胞	0	3.427±0.126	0.628±0.099

“\*”、“\*\*”分别示与正常培养细胞比较, P < 0.05、P < 0.01; “#”、“###”分别示与未经 TFDG 处理的损伤模型细胞比较, P < 0.05、P < 0.01。

### 3 结论与讨论

大量试验发现,脊椎动物的小梁网、睫状肌、虹膜、脉络膜、视网膜、LEC 等都有 NOS 分布<sup>[10-12]</sup>。NOS 可催化氧分子和 L-精氨酸反应生成 NO,少量 NO 可以维持机体正常的生理需求,参与调节机体一系列生理活动<sup>[12]</sup>,而大量的 NO 会对组织细胞造成剧烈的氧化损伤。近年的研究发现,NO 与眼的生理和病理有密切关系,如参与眼压的调节和眼部缺血损伤<sup>[13]</sup>、糖尿病视网膜病变的发生发展过程<sup>[14-15]</sup>等。有相关研究表明,NOS 诱发生成大量的 NO,导致糖尿病机体被氧化损伤,并参与形成白内障<sup>[16]</sup>。

本研究证实,正常 HLECs 中存在 NOS 和 NO。HLECs 细胞经高浓度葡萄糖诱导后,其细胞活力显著下降,NOS 活性与 NO 含量均上升,细胞出现明显损伤。用 32  $\mu\text{mol/L}$  TFDG 处理后,损伤细胞的活力上升幅度最大,其细胞内的 NOS 活性及 NO 含量也下降最明显,而过量的 TFDG(64~512  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理损伤细胞后,反而导致其细胞活力下降,甚至死亡。本试验结果表明,适量的 TFDG 能通过减弱 NOS 的活性,降低 NO 的合成,来对抗高浓度葡萄糖诱导的细胞损伤。

#### 参考文献:

- [1] 祁明信,黄秀榕.兔晶状体摘除和人工晶状体植入术后房水细胞因子水平和一氧化氮含量与眼内炎症反应的关系[J].中华眼科杂志,2003,39(1):41-43.
- [2] Cao M, Dong L, Chang X, et al. Effect of Mexican tea herb and pilular adina herb on conescence of gastric mucosa in experimental gastric ulcer rats[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2007, 13(2): 132-136.
- [3] Hegde K R, Varma S D. Prevention of cataract by pyruvate in experimentally diabetic mice[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2005, 269(1): 115-120.
- [4] Sharma S P. Nitric oxide and the kidney[J]. Indian J Nephrol, 2004, 14(3): 77-84.
- [5] Jiang H Y, Hang X, Yuan X Y. Anticancer activity of theaflavin diagalate and its mechanism[J]. Journal of Tea Science, 2007, 27(1): 33-38.
- [6] Howard B V, Rodriguez B L, Bennett P H, et al. Prevention conference VI: Diabetes and cardiovascular

- disease: Writing Group I. Epidemiology[J]. Circulation, 2002, 105(18): e159-164.
- [7] Jin X H, Ohgami K, Shiratori K, et al. Inhibition of nuclear factor-kappa B activation attenuates hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in human lens epithelial cells[J]. British Journal of Ophthalmology, 2007, 91(3): 369-371.
- [8] Li W C, Kuszak J R, 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]. The Journal of Cell Biology, 1995, 130(1): 169-181.
- [9] Jain A K, Lim G, Langford M, et al. Effect of high-glucose levels on protein oxidation in cultured lens cells, and in crystalline and albumin solution and its inhibition by vitamin B6 and N-acetylcysteine: Its possible relevance to cataract formation in diabetes[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2002, 33(12): 1615-1621.
- [10] 邓娟,吴德正.一氧化氮在眼科的研究进展[J].中国实用眼科杂志,1999,17(3):134-138.
- [11] 刘国军,仇宜解,说明,等.眼部一氧化氮研究的新进展[J].齐鲁医学杂志,2002,17(1):84-86.
- [12] Wilkinson Berka J L. Vasoactive factors and diabetic retinopathy: Vascular endothelia growth factor, cyclooxygenase 2 and nitric oxide[J]. Curr Pharm Des, 2004, 10(27): 3331-3348.
- [13] Kowluru R A, Chan P S. Oxidative stress and diabetic retinopathy[J]. Journal of Diabetes Research, 2007(2007): 1-12.
- [14] 宋鄂,王瑜,王秋利,等.缺氧条件下高糖及高胰岛素对 Müller 细胞 VEGF 表达的影响[J].眼科研究,2009,27(1):1-4.
- [15] Shih P H, Yeh C T, Yen G C. Anthocyanins induce the activation of phase ii enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis[J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(23): 9427-9435.
- [16] 马红宇,周之南,付波,等.一氧化氮与白内障相关性的临床研究[J].中国医师进修杂志,2006,29(27):20-21.

责任编辑:罗维

英文编辑:罗维