

· 实验研究 ·

高糖条件下糖康乐对 RPE 细胞 GSH 表达的影响

谢佩玉 张晓梅 松仓诚 藤井绩 伊藤薰 赵基恩 筱原诚

Effects of Tangkangle on production of glutathione by cultured retinal pigment epithelial cells in hyperglycemia condition

Xie Peiyu, Zhang Xiaomei, Makoto Matsukura, Isao Fujii, Kaori Ito, Zhao Ji'en, Makoto Shinohara. Eye Hospital, First Clinical College of Harbin Medical College, Harbin 150001, China

Abstract Objective Glutathione(GSH) is an important factor of anti-oxidation in retina. It has been demonstrated that exogenous GSH is a main way to maintain the GSH in retinal pigment epithelial(RPE) cells. However, less research on promoting GSH production in RPE cells using the compound derived from algae extracts was seen. Present study was to investigate the effect of Tangkangle, on GSH production in cultured rabbit RPE cells under the hyperglycemia condition. **Methods** Rabbit RPE cells were isolated by trypsin digest and cultured in DMEM/F12 medium containing 10% fetal bovine serum and identified by ABC method. The 3rd generation of cells were divided into blank control group(without glucose), high glucose(25 mmol/L, HG) group, different concentrations of Tangkangle (0.002, 0.02, 0.2, 2, 20, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + HG group and 1 mmol/L aminoethylsulfonic acid + HG group(positive control) according to the addition of high concentration of glucose and different concentrations of Tangkangle in medium. GSH production in the RPE cells was analyzed by detection of absorption of light at 405 nm. **Results** The GSH level in blank control group was 121.35 ± 5.44 , and that in hyperglycemia condition was 44.77 ± 21.22 , showing a remarkable reduction ($t = 5.72, P < 0.01$). The absorption values of RPE cells for GSH in 0.2 - 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tangkangle + HG groups and positive control group were significantly increased in comparison with HG group ($P < 0.01$) with a peak in 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tangkangle + HG group ($t = 4.63, P < 0.01$). **Conclusion** Tangkangle retrieve GSH from the reduction by HG and can protect RPE cells from oxidative damage by HG.

Key words Tangkangle; glutathione; retinal pigment epithelial cell; hyperglycemia

摘要 目的 探讨在高糖条件下糖康乐对兔视网膜色素上皮(RPE)细胞谷胱甘肽(GSH)表达的影响。**方法** 采用体外培养的兔 RPE 细胞,分成空白对照组、高糖组、糖康乐组和牛磺酸组 4 个实验组($n = 6$),在高糖条件下糖康乐组加以不同质量浓度的糖康乐,对 RPE 细胞的 GSH 含量进行测定。**结果** RPE 细胞的 GSH 含量在高糖作用后明显降低($t = 5.72, P < 0.01$),糖康乐在质量浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时可显著抑制 GSH 含量的降低($t = 4.63, P < 0.01$),在 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时其作用优于阳性对照组的牛磺酸($t = 4.74, P < 0.01$)。**结论** 一定质量浓度的糖康乐可以抑制高糖所导致的 RPE 细胞 GSH 含量的降低。

关键词 糖康乐; 谷胱甘肽; 视网膜色素上皮细胞; 高糖

分类号 R 774 R 988.1 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)02-0141-03

氧化损伤是视网膜感光细胞常见的损伤形式,如高糖、缺氧等过程都可能造成感光细胞的过度氧化^[1]。视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞通过合成谷胱甘肽(glutathione, GSH)来清

除自由基以保证感光细胞的正常功能^[2]。GSH 是视网膜对抗氧化损伤不可缺少的因子^[3],在氧化损伤时,GSH 被大量消耗^[4]。通过外源性 GSH 或其前体氨基酸来促进 GSH 合成的方法已被证实是维持 RPE 细胞内 GSH 含量较为有效的方法^[5],但应用海洋生物活性成分促进 GSH 表达的文献报道较少。我们研究从海藻萃取物中获得的化合物糖康乐在高糖条件下对 RPE 细胞 GSH 表达的影响,探讨其在抗氧化损伤方面的作用。

作者单位:150001 哈尔滨医科大学附属第一临床医学院眼科医院(谢佩玉、张晓梅);860-0082 日本国熊本市崇城大学药学部药物治疗实验室(松仓诚、藤井绩、伊藤薰);869-5461 日本国熊本县芦北发育性残疾人治疗机构(赵基恩、筱原诚)

通讯作者:张晓梅(E-mail:zhangxm66@tom.com)

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 主要试剂与仪器 含有 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM/F12 培养液(Gibco 公司),每 100 mL 的培养液中含有 88 mL 的 DMEM/F12 培养液、10 mL 的 FBS (BioTech 公司),2 mL 的青霉素(10 000 U/mL)、链霉素(10 000 μg/mL)(Gibco 公司)。GSH 试剂盒(Glutathione Assay kit)(日本 Cayman Chemical Company)。MTP-800 分光光度计(CORONA ELECTRIC,日本)。

1.1.2 海藻提取物 糖康乐由日本国芦北发育性残疾人治疗机构、芦北药园生产并无偿提供,其主要成分 是海藻。将海藻通过应用氯仿、乙酸乙酯和 n-丁酰乙 醇的提取,在硅胶和 LH-20 葡聚糖凝胶层析仪上的分 离,经过大孔吸收树脂的提纯以及硫酸的磺化作用后, 再配以鹿角、灵芝、枸杞子、大豆粉和山芋粉制成。

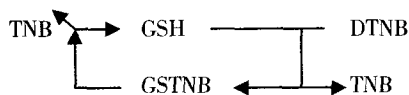
1.2 方 法

1.2.1 RPE 细胞的培养及鉴定 将有色兔麻醉处 死,摘取眼球,D-Hanks 液冲洗数遍,4 ℃ 冰箱内用含有 庆大霉素的生理盐水浸泡 30 min,显微镜下除去眼前 节及视网膜,应用酶消化法,在眼杯中加入 25% 胰蛋 白酶,37 ℃ 水浴消化 30 min,用 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM/F12 培养液终止消化,将眼杯内细胞反复吹打 制成细胞悬液。应用 ABC 法进行细胞鉴定。细胞培 养在 37 ℃、5% CO₂ 孵箱内,每 2~3 d 换液 1 次,每 7~ 8 d 传代 1 次,传代时应用 0.25% 的胰蛋白酶。采用胰 蛋白酶消化法原代培养兔视网膜 RPE 细胞,第 3 代细 胞与原代细胞具有相似的细胞形态,ABC 法鉴定 95% 以上为阳性细胞,进一步传代,细胞逐渐失去原有形 态,本实验采用第 3 代细胞作为实验细胞。

1.2.2 实验分组 应用第 3 代兔 RPE 细胞,将细胞以 2.0 × 10⁵ cells/well 的密度接种于 24 孔平板中培养 72 h 后,将 24 孔随机分成 4 个组:空白对照组、高糖组 (25 mmol/L)(HG 组)、糖康乐组和牛磺酸组。糖康乐 组的质量浓度分别为 0.002、0.02、0.2、2、20、200 μg/mL, 牛磺酸组的浓度为 1 mmol/L。将培养液换成不含 FBS 的 DMEM/F12 培养液,继续培养 72 h,测量上清培养液 中 GSH 的含量。每组实验测量 3 次以上,取其平均值。

1.3 GSH 分析测定体系

应用 GSH 试剂盒和 MTP-800 分光光度计,于 405 nm 处测定吸光度。试剂盒遵循的方程式如下:



1.4 统计学方法

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计学 软件进行处理。空白对照组和高糖培养组 RPE 细胞 中 GSH 含量的比较采用独立样本 *t* 检验,不同质量浓 度的糖康乐作用于高浓度葡萄糖下 RPE 细胞后 GSH 含量的比较采用方差分析,各质量浓度组与高糖组 GSH 含量的多重比较采用 LSD *t* 检验。*P* < 0.05 为差 异有统计学意义。

2 结 果

2.1 高浓度葡萄糖对 RPE 细胞 GSH 含量的影响

应用 25 mmol/L 的高浓度葡萄糖作用后,RPE 细 胞 GSH 含量明显降低,与空白组比较差异有统计学意 义(*P* < 0.01)(表 1)。

表 1 高浓度葡萄糖对 RPE 细胞 GSH 表达的影响($\bar{x} \pm s, nU/mL$)
Table 1 GSH level in RPE cells with or without hyperglycemia($\bar{x} \pm s, nU/mL$)

Group	n	GSH
Blank control	6	121.35 ± 5.44
Hyperglucose	6	44.77 ± 21.22
<i>t</i>		8.570
<i>P</i>		< 0.01

(Student's *t* test)

2.2 糖康乐对高浓度葡萄糖下 RPE 细胞 GSH 含量 的影响

在应用 25 mmol/L 的高浓度葡萄糖作用后,牛磺 酸可以抑制 GSH 的含量的降低,与高糖组比较差异有 统计学意义(*P* < 0.01)。糖康乐在一定质量浓度下, 可以明显抑制 GSH 的含量的降低,与高糖组相比较差 异有统计学意义(*P* < 0.01),在质量浓度为 2 μg/mL 时 对 GSH 的含量降低的抑制作用优于牛磺酸(*P* < 0.01)(表 2)。

表 2 不同药物对高浓度葡萄糖条件下 RPE 细胞 GSH 的 含量(A 值)的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 GSH level(A value) in cultured RPE cells under the different concentrations of Tangkangle($\bar{x} \pm s$)

Group	n	A value
HG	6	8.71 ± 0.62
0.002T + HG	6	8.92 ± 0.68
0.02T + HG	6	9.01 ± 0.31
0.20T + HG	6	9.84 ± 0.49 ^c
2.00T + HG	6	10.10 ± 0.39 ^{cd}
20.00T + HG	6	9.96 ± 0.25 ^c
200.00T + HG	6	9.16 ± 0.17
AA + HG	6	9.99 ± 0.25 ^c
<i>F</i>		24.191
<i>P</i>		0.000

^c*P* < 0.01 vs HG group, ^d*P* < 0.01 vs AA + HG group (ANOVA, LSD *t* test) HG: hyperglucose T: Tangkangle AA: aminoethylsulfonic acid

3 讨论

本实验成功地建立了体外培养兔 RPE 细胞的模型,排除体内因素的影响。本实验选用的葡萄糖浓度为 25 mmol/L。体外培养时 25 ~ 30 mmol/L 的葡萄糖水平可近似地等同于糖尿病时体内的葡萄糖水平^[6]。本实验采用牛磺酸作为阳性对照。体外实验证明,糖尿病早期视网膜中牛磺酸含量下降,补充牛磺酸后,视网膜电图可基本恢复正常^[7]。牛磺酸在光适应动物中,可削弱外界因素对细胞的氧化损伤作用^[8]。

RPE 细胞是视网膜内对抗氧化损伤的重要细胞^[9-10]。RPE 细胞对高糖^[11-12]、高氧局部压力、强烈的光刺激和临近光感受器外节段中高浓度的不饱和脂肪酸所造成的损伤比较敏感^[13],当遭受氧化攻击时,RPE 细胞会首先通过产生 GSH 和 SOD 等物质有效地消除氧自由基,防止视网膜细胞遭受破坏^[14]。

GSH 是大量存在于 RPE 细胞中的三肽物质^[15],它可以在 GSH 依赖性过氧化物酶催化的反应中,通过减灭过氧化物来对抗氧化损伤^[16],并且可以消除脂质过氧化反应中产生的乙醛毒性以及由抗坏血酸盐和维生素 E 依赖性的代谢反应而产生的自由基的毒性^[17]。RPE 细胞中的 GSH 可以通过从氨基酸前体合成和将氧化型谷胱甘肽还原等途径不断得到补充,但是在过度的氧化应激时,氧化型谷胱甘肽还原的过程受到限制,此时细胞内 GSH 含量的维持就取决于细胞内 GSH 的合成^[18]。

近年来,人们对海洋有机体内生物活性成分的兴趣日益增加。糖康乐是从海藻萃取物中获得的化合物,其促进 RPE 细胞内 GSH 表达的作用与海藻内富含的海藻多糖类化合物密切相关。海藻多糖是一类多组分的混合物,由不同的单糖基通过糖苷键(一般为 C1,3-键和 C1,4-键)相连而成,是海藻细胞间和细胞内所含有的高分子碳水化合物,它可以调节细胞的生长和衰老,抵抗光辐射,清除超氧化阴离子,抑制氧自由基对不饱和脂肪酸的氧化作用^[19],促进机体对谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的生物合成,从而增强机体的抗氧化损伤能力^[20]。但其具体对抗氧化损伤的机制比较复杂,尚需进一步研究。

参考文献

- 1 廖宇洁. 氧化应激与糖尿病视网膜病变[J]. 眼科研究, 2007, 25(9): 710-713
- 2 Beatty S, Koh H, Phil M, et al. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration[J]. *Surv Ophthalmol*, 2000, 45: 115-134

- 3 Saena M, Singhal SS, Awasthi YC. A specific and rapid method for the determination of glutathione and its application in ocular tissues[J]. *Exp Eye Res*, 1992, 55: 461-468
- 4 Winkler BS, Giblin FJ. Glutathione oxidation in retina: Effects on biochemical and electrical activities [J]. *Exp Eye Res*, 1983, 36: 287-297
- 5 Wefers H, Sies H. Hepatic low-level chemiluminescence during redox-cycling of menadione and the menadione-glutathione conjugate: Relation to glutathione and NAD(P)H; quinone reductase (DT-diaphorase) activity[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1983, 224: 568-578
- 6 Du Y, Miller CM, Kern TS. Hyperglycemia increases mitochondrial superoxide in retina and retinal cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2003, 35(11): 1491-1499
- 7 Franconi F, Dileo MA, Bennardini F, et al. Is taurine beneficial in reducing risk factors for diabetes mellitus[J]? *Neurochem Res*, 2004, 29(1): 143-145
- 8 Chen WQ, Jin H, Nguyen M, et al. Role of taurine in regulation of intracellular calcium level and neuroprotective function in cultured neurons[J]. *Neuro Sci Res*, 2001, 66(4): 612-619
- 9 谢佩玉, 张晓梅, 松仓诚, 等. 高糖条件下糖康乐对视网膜色素上皮细胞超氧化物歧化酶表达的影响[J]. *国际眼科杂志*, 2007, 6: 1584-1586
- 10 Bok D. Retinal photoreceptor-pigment epithelium interactions. Friedenwald lecture[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1985, 26: 1659-1694
- 11 穆华, 张晓梅. 色素上皮衍生因子与眼部新生血管[J]. *国际眼科杂志*, 2006, 6(4): 882-884
- 12 徐海峰, 王宜强, 王瑶, 等. 高糖对人视网膜色素上皮细胞 Na₂K₂ATP 酶表达的影响[J]. *眼科研究*, 2007, 25(2): 113-116
- 13 Young RW. Pathophysiology of age-related macular degeneration [J]. *Surv Ophthalmol*, 1987, 31: 291-306
- 14 Shamsi FA, Chaudhry IA, Boulton ME, et al. L-carnitine protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative damage[J]. *Curr Eye Res*, 2007, 32(6): 575-584
- 15 Meister A. Glutathione. // Arias IM, Jakoby WB, Popper H, et al. *The Liver: Biology and Pathobiology* [M]. 2nd ed. New York: Raven Press, 1985: 401-417
- 16 Wefers H, Sies H. Antioxidant effects of ascorbate and glutathione in microsomal lipid peroxidation are dependent on vitamin E. // Poli G, Cheeseman KH, Diangani MU. *Advances in Biosciences: Free Radicals in the Pathogenesis of Liver Injury* [M]. Oxford: Pergamon Press, 1989: 309-316
- 17 Sternberg P, Jr, Davidson PC, Jones DP, et al. Protection of retinal pigment epithelium from oxidative injury by glutathione and precursors [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1993, 34: 3661-3668
- 18 Davidson PC, Sternberg P, Jr, Jones DP, et al. Synthesis and transport of glutathione by cultured human retinal pigment epithelial cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35: 2843-2849
- 19 Itoh H, Noda H, Amano H, et al. Antitumor activity and immunological properties of marine algal polysaccharides, especially fucoidan, prepared from *Sargassum thunbergii* of phaeophyceae [J]. *Anticancer Res*, 1993, 13(6): 2045-2052
- 20 Kim IT, Park HJ, Nam JH, et al. In-vitro and in-vivo anti-inflammatory and antinociceptive effects of the methanol extract of the roots of *Morinda officinalis* [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2005, 57(5): 607-615

(收稿:2008-03-27 修回:2008-10-23)

(本文编辑:胡纯钢 刘 艳)