

芸香苷通过 PI3K/AKT 信号通路抑制 H₂O₂ 诱导人晶状体上皮细胞凋亡

郭彬, 周艳峰

摘要 目的 探讨 PI3K/AKT 信号通路是否参与芸香苷对过氧化氢(H₂O₂)诱导人晶状体上皮细胞(HLEC)凋亡的抑制作用。方法 将培养的 HLEC 分为 4 组:空白对照组、H₂O₂ 组、芸香苷组、LY294002 组;采用 MTT 法测细胞存活率,Western blot 法检测 p-AKT 及 AKT 的表达,Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测各组细胞凋亡率。结果 H₂O₂ 可诱导 HLEC 发生凋亡,与 H₂O₂ 组相比,芸香苷组不仅使 AKT 的磷酸化水平显著升高,还降低了细胞凋亡率($P < 0.01$);在 LY294002 干预组,PI3K/AKT 信号通路的特异性阻断剂 LY294002 明显抑制了芸香苷组中各项指标的变化,差异有统计学意义($P < 0.01$),但与 H₂O₂ 组比较,差异无统计学意义。结论 芸香苷抑制 H₂O₂ 诱导的 HLEC 凋亡可能与 PI3K/AKT 信号通路有关。

关键词 芸香苷;人晶状体上皮细胞;PI3K/AKT 信号通路;H₂O₂

中图分类号 R 776.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)08-1107-04

白内障是当今世界范围致盲率最高的眼病。一般认为,自由基引起的晶状体上皮细胞氧化损伤及凋亡是白内障发生的主要因素^[1]。在大量关于抑制 H₂O₂ 诱导细胞凋亡的文献中,无论使用白藜芦醇、黄芪苷还是芸香苷干预,磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphoinositide-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB) 信号通路都参与其抗凋亡机制^[2-3]。但 PI3K/AKT 信号通路是否参与芸香苷对 HLEC 的抗凋亡作用,其作用机制尚未见相关报道。芸香苷又被称为维生素 P,是天然黄酮类化合物。目前研究^[4-6]表明,芸香苷拥有抗病毒、抗炎、抗高血压、抗氧化等功能。早在 1994 年,Grinberg et al^[7]报道芸香苷可保护血红蛋白免受百草枯(paraquat, PQ)诱导的氧化作用。该研究初步探讨芸香苷对晶状体上皮细胞(lens epithelial cells, LEC)的保护作用与 PI3K/AKT 信号通路的关系,为芸香苷在白内障

障早期防治中提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 人晶状体上皮细胞(human lens epithelial cells, HLEC)(上海复蒙基因生物科技有限公司);30% H₂O₂(上海中试化工总公司);Rutin(纯度 >98%,南京泽郎医药科技有限公司);0.25% 胰蛋白酶、LY294004、RIPA 裂解液、PMSF、ECL 显色液(海门市碧云天生物技术研究所);DMEM 培养液、胎牛血清(美国 GIBCO BRL 公司); β -actin、p-AKT、AKT 抗体(美国 Santa Cruz 公司);辣根酶标记山羊抗小鼠/兔(北京中山金桥生物技术有限公司);Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物有限公司)

1.2 细胞的复苏与培养 将冻存的 HLEC 立即放入 37 °C 水中快速摇晃,直至冻存液完全融化,接种于含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养,隔日观察换液;待贴壁细胞长至融合时,用胰蛋白酶消化,按 1:3 比例传代,取对数生长期细胞进行实验。

1.3 实验分组 实验分为 4 组,对照组: HLEC + DMEM 培养液;H₂O₂ 组:正常组 + H₂O₂(终浓度 200 μ mol/L);芸香苷组: H₂O₂ 组 + 芸香苷(终浓度 100 μ mol/L);LY294002 组: LY294002(终浓度 14 μ mol/L) + 芸香苷(100 μ mol/L) + H₂O₂(200 μ mol/L)。芸香苷、H₂O₂ 的浓度是从前期研究结果中筛选出来的最佳浓度。

1.4 MTT 测细胞生存率 取 2 块 96 孔板,接种以 5×10^3 细胞/孔的对数生长期细胞,每孔加 100 μ l 的培养基,在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h 后,其中 1 块 96 孔板加入 200 μ mol/L H₂O₂ 后放入细胞培养箱中分别培养 12、24、48 h(设计的空白对照组除外);另 1 块板除空白组外,加入 100 μ mol/L 芸香苷后分别培养 30 min、1、2、4 h 后,加入 200 μ mol/L H₂O₂ 再培养 24 h。将加完药的两板取出,每孔分别加入 5 g/L MTT 20 μ l 继续孵育 4 h 后取出弃上清液,每孔加入 150 μ l 的 DMSO,常温震荡 10 min 后,用酶标仪测定 490 nm 波长下的吸光度(absorbance),

2015-03-13 接收

基金项目:安徽省卫生厅中医药科研计划课题(编号:2012zy50)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院眼科,合肥 230022

作者简介:郭彬,女,硕士研究生;

周艳峰,女,副主任医师,副教授,硕士生导师,责任作者,

E-mail: Lizzhou@163.com

A) 值。每板实验重复 2 次。

1.5 Annexin V-FITC 和 PI 双染流式细胞仪 (FCM) 检测细胞凋亡率 H_2O_2 组为用 $200 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理细胞 24 h; 芸香苷组为用 $100 \mu\text{mol/L}$ 芸香苷预处理细胞 1 h 后加入 $200 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 24 h; LY294002 组为 $14 \mu\text{mol/L}$ LY294002 预处理细胞 30 min 后, 加入 $100 \mu\text{mol/L}$ 芸香苷处理 1 h, 最后加入 $200 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 孵育 24 h。细胞接种于 6 孔板, 按要求给予不同的因素处理后, 弃去培养液, 每孔加入 0.25% 胰酶(不含 EDTA) $500 \mu\text{l}$, 37°C 消化 3 min 后吹打成单细胞悬液并收集 $4\ 000 \text{ r/min}$ 离心 3 min, 弃上清液。冷 PBS 洗涤细胞后离心弃上清液, 加入 $500 \mu\text{l}$ IX AnnexinV 结合液吹打结合悬浮细胞后, 分别加入 $5 \mu\text{l}$ Annexin V-FITC 和 $5 \mu\text{l}$ PI 染色, 轻轻摇匀后放置 4°C 避光保存 15 min。每个样本计数不低于 10 000 个细胞, 采用荧光强度值并以 Multicycle 软件处理结果, 计算凋亡率。

1.6 Western blot 法检测 p-AKT 的表达 各组细胞经实验处理后, 使用冰冷的 PBS 洗涤细胞 2 次, 每孔按 1:100 的比例加入 RIPA 裂解液与 PMSF 的混合液, 4°C 裂解 15 min, 细胞裂解物 $12\ 000 \text{ r/min}$ 离心 10 min, 取上清液, 调整样品的蛋白量按照 1:5 的比例加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 水浴煮沸 5 min。将样品电泳分离的蛋白转移到 PVDF 膜上 (130 mA 恒定电流转移 3 h), 室温下用还有 5% 脱脂奶粉 (PBS 溶解) 封闭 PVDF 膜 1 h。随后加入一抗 (1:300) 4°C 孵育过夜。PBS 洗脱 3 次, 加入相应的二抗 (1:10 000) 孵育 2 h, 漂洗 3 次。将 PVDF 膜用发光试剂染 1 min, 暗室中曝光到 X 线片上。Image J 软件进行灰度分析。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA)。

2 结果

2.1 H_2O_2 处理时间的选择 根据前期实验结果, 此次选择 $200 \mu\text{mol/L}$ 为 H_2O_2 的实验浓度, 分别处理 HLEC 12、24、48、72 h 后, MTT 测其对细胞生存率的影响。细胞生存率随着时间的增加呈下降趋势, 与正常组相比, 差异有统计意义 ($P < 0.01$)。而 24 h 值最接近细胞生存半数抑制率 (50% inhibition rate, IC_{50})。因此在实验中, 选择 24 h 为 H_2O_2 处理细胞的时间。

2.2 芸香苷预处理时间选择 根据前期实验结果,

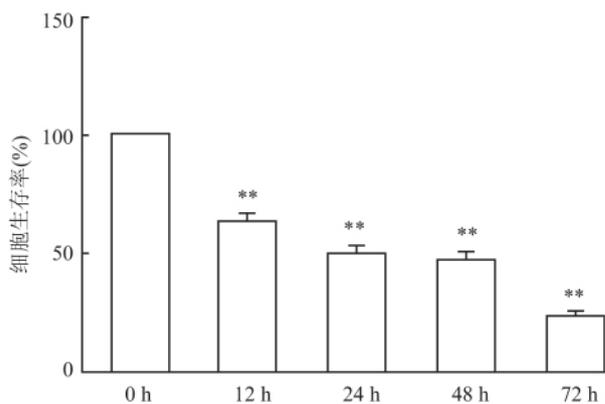


图 1 $200 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 在不同处理时间上对细胞生存率的影响
与对照组 (0 h) 比较: ** $P < 0.01$

此次选择 $100 \mu\text{mol/L}$ 为芸香苷的实验浓度, 分别预处理细胞 30 min、1 h、2 h、4 h。MTT 测其对细胞生存率的影响。各组细胞生存率较空白对照组相比, 有所下降 ($P < 0.01$), 但各组之间的细胞生存率差异无统计学意义, 且在 1 h 时为最高 ($78.73 \pm 8.74\%$), 随后, 细胞生存率逐渐降低。因此选择 1 h 为芸香苷预处理的最佳时间, 见图 2。

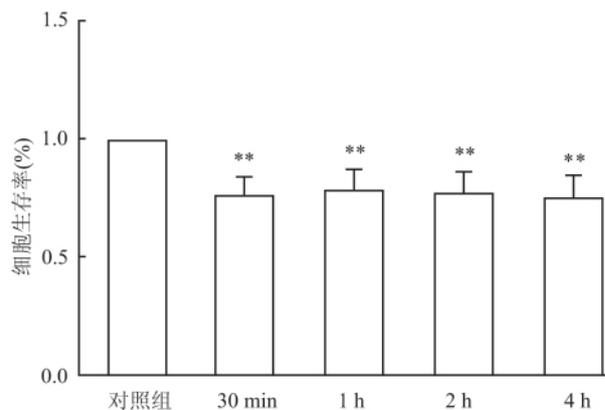


图 2 $200 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 环境中芸香苷不同预处理时间
对细胞生存率的影响
与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.3 流式细胞仪测各组细胞凋亡率 H_2O_2 组的细胞凋亡率最高。加入芸香苷预处理后, 细胞凋亡率较 H_2O_2 组明显降低 ($P < 0.01$), 与对照组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); LY294002 抑制芸香苷的保护作用, 使细胞凋亡率再次升高 ($P < 0.01$), 与 H_2O_2 组相比, 差异无统计学意义, 见图 3。

2.4 Western blot 测各组 p-AKT 的表达 与对照组相比, H_2O_2 组及 LY294002 组的 p-AKT 相对表达量下降 ($P < 0.01$), 芸香苷组 p-AKT 的相对表达量升高 ($P < 0.01$); 与芸香苷组相比, 加入抑制剂 LY294002 后 p-AKT 的灰度值由 ($39.77 \pm 5.85\%$)

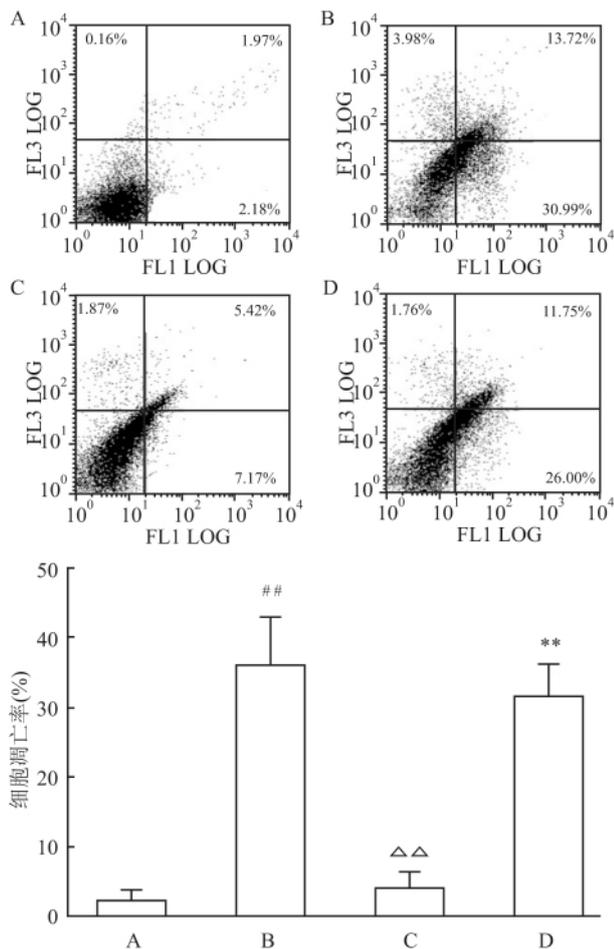


图3 各组 HLEC 凋亡率比较

A: 对照组; B: H₂O₂ 组; C: 芸香苷组; D: LY294002 组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与芸香苷组比较: ## $P < 0.01$; 与 LY294002 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

降到 $(17.64 \pm 4.55)\%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$) 而与 H₂O₂ 组比较差异无统计学意义; 总的 AKT 相对表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 见图 4。

3 讨论

LEC 是存在于前囊下、赤道弓部及赤道部的单层立方上皮细胞, 具有分化、增殖功能, 在维持晶状体透明性及稳定性中起重要作用。一旦 LEC 受到辐射、药物、外伤等慢性损伤时, 可产生大量的活性氧, 后者通过损害线粒体及能量代谢, 使抗凋亡基因表达受阻, 最终导致细胞凋亡。活性氧破坏正常的 LEC 功能, 引起晶状体浑浊, 导致白内障的发生^[1]。

H₂O₂ 属于活性氧一员, 是最常见的氧化剂。相关文献^[8]报道, 老年性白内障患者房水中 H₂O₂ 含量高于正常人 2 倍。因此本实验采用 H₂O₂ 作为体外细胞氧化损伤模型。H₂O₂ 浓度已从前期实验结果中筛选出来, 选取 0~72 h 为 H₂O₂ 处理时间, MTT

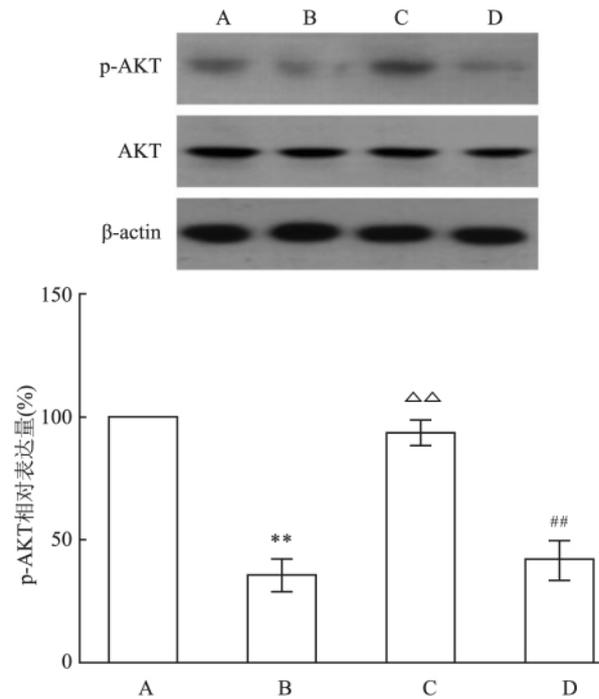


图4 Western blot 法检测各组处理因素作用 HLEC 后 p-AKT 蛋白表达水平

A: 对照组; B: H₂O₂ 组; C: 芸香苷组; D: LY294002 组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与芸香苷组比较: ## $P < 0.01$; 与 H₂O₂ 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

测其存活率。结果显示细胞生存率随着时间的增加而下降, 在 24 h 时, 其生存率 50.95% 最接近细胞 IC₅₀, 最终选择 24 h 为本实验 H₂O₂ 处理时间。

芸香苷可从荞麦花、红茶、苹果、芸香叶等植物中提取出来, 清除氧自由基、减少脂质过氧化物的生成, 发挥抗氧化作用^[9-10]。前期实验^[11]已证实芸香苷对 H₂O₂ 诱导的 HLEC 凋亡有保护作用, 且其浓度也从前期实验结果中筛选出来。笔者选取 30 min~4 h 为其预处理时间, MTT 测其存活率。结果显示, 芸香苷在预处理 1 h 时, 细胞存活率最高, 随后细胞生存率与时间呈负相关, 因此最终选择 1 h 为本实验芸香苷预处理时间。

PI3K 是参与细胞内信号转导的重要信号分子之一。AKT(又名蛋白激酶 B, PKB) 是原癌基因 C-AKT 的表达产物。PI3K 可调控 AKT 的激活, 磷酸化的 AKT 进一步激活或者抑制下游靶蛋白, 参与细胞增殖、迁移、存活及新陈代谢等多种生理活动^[12]。因其具有抗凋亡作用, 在临床疾病机制中越来越备受关注。Wang et al^[13]研究表明, PI3K/AKT 信号通路与肿瘤细胞的增殖有关; 研究^[14]表明 PI3K/AKT 信号通路参与 LEC 的增殖、迁移, 与后发障的形成有关。而特异性抑制剂 LY294002 可阻断 PI3K/

AKT 途径活化 抑制其抗凋亡作用。

本实验首次在体外 H_2O_2 诱导 HLEC 凋亡模型中加入抗氧化剂芸香苷, 试图探讨 PI3K/AKT 信号通路在芸香苷抑制 H_2O_2 诱导的 HLEC 凋亡中的作用。流式细胞术及 Western blot 结果显示, 与对照组相比, H_2O_2 能引起细胞凋亡, 降低 p-AKT 的相对表达量; 芸香苷能逆转 H_2O_2 引起的氧化损伤, 同时 p-AKT 高表达, 但在芸香苷处理细胞之前加入 PI3K/AKT 信号通路阻断剂 LY294002 后, AKT 磷酸化被抑制, 细胞凋亡率再次升高, 且与 H_2O_2 组无明显差异。

参考文献

- [1] 吴箫漪, 栾洁. 白内障与氧化损伤[J]. 现代医学, 2010, 38(3): 306-10.
- [2] Sui X Q, Xu Z M, Xie M B, et al. Resveratrol inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis in endothelial cells *via* the activation of PI3K/AKT by miR-126[J]. *J Atheroscler Thromb* 2014, 21(2): 108-18.
- [3] Xu M C, Shi H M, Wang H, et al. Salidroside protects against hydrogen peroxide-induced injury in HUVECs *via* the regulation of REDD1 and mTOR activation[J]. *Mol Med Rep* 2013, 8(1): 147-53.
- [4] Aruna R, Geetha A, Suguna P. Rutin modulates ASC expression in NLRP3 inflammasome: a study in alcohol and cerulein-induced rat model of pancreatitis[J]. *Mol Cell Biochem* 2014, 396(1-2): 269-80.
- [5] Gong G, Qin Y, Huang W, et al. Rutin inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis through regulating reactive oxygen species mediated mitochondrial dysfunction pathway in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Eur J Pharmacol* 2010, 628(1-3): 27-35.
- [6] Na J Y, Kim S, Song K, et al. Rutin alleviates prion peptide-induced cell death through inhibiting apoptotic pathway activation in dopaminergic neuronal cells[J]. *Cell Mol Neurobiol* 2014, 34(7): 1071-9.
- [7] Grinberg L N, Rachmilewitz E A, Newmark H. Protective effects of rutin against hemoglobin oxidation[J]. *Biochem Pharmacol* 1994, 48(4): 643-9.
- [8] 翁景宁, 刘秀珍, 林增云, 等. 超氧化物歧化酶、脂质过氧化物与老年性白内障的关系[J]. 实用眼科杂志, 1994(12): 26-7.
- [9] 李玉山. 芦丁的资源、药理及主要剂型研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 2013, 35(3): 13-6.
- [10] 张丽, 张丽娜, 张世栋, 等. 槲皮素和芦丁对星形神经胶质细胞氧化损伤及脂质过氧化的抑制作用[J]. 西北师范大学学报, 2008, 44(4): 96-9.
- [11] 喻亚梅, 周艳峰. 芸香苷对人晶体上皮细胞氧化损伤和凋亡保护作用的初步研究[J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48(4): 379-82.
- [12] Zhang T, Liang X, Shi L, et al. Estrogen Receptor and PI3K/AKT Signaling Pathway involvement in S(-) equol-induced activation of Nrf2/ARE in endothelial cells[J]. *PLoS One* 2013, 8(11): e79075.
- [13] Wang P, Phan T, Gordon D, et al. Arctigenin in combination with quercetin synergistically enhances the anti-proliferative effect in prostate cancer cells[J]. *Mol Nutr Food Res* 2015, 59(2): 250-61.
- [14] Liegl R, Wertheimer C, Kernt M, et al. Attenuation of human lens epithelial cell spreading, migration and contraction *via* downregulation of the PI3K/akt pathway[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2014, 252(2): 285-92.

Rutin inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis through PI3K/AKT signaling pathway in human lens epithelial cells

Guo Bin, Zhou Yanfeng

(Dept of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To explore whether PI3K/AKT signaling pathway participates in the inhibiting effect of Rutin on H_2O_2 -induced apoptosis in human lens epithelial cells (HLEC). **Methods** HLEC were divided into four groups: control group, H_2O_2 group, rutin group, LY294002 group. Cell survival rates were determined by a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay; cell apoptosis rates were monitored by flow cytometry with Annexin V-FITC and propidium iodide (PI) staining. Western blot was used to measure the expression levels of AKT and p-AKT. **Results** H_2O_2 induced HLEC apoptosis. Compared with H_2O_2 group, rutin group not only increased the expression level of p-AKT, but also reduced cell apoptosis rate ($P < 0.01$). In LY294002 group, LY294002, an inhibitor of PI3K/AKT signaling pathway, could significantly block the change of these indexes produced by rutin group ($P < 0.01$), but no significant change compared with H_2O_2 group. **Conclusion** Rutin inhibits H_2O_2 -induced cell apoptosis and may be associated with PI3K/AKT signaling pathway.

Key words rutin; human lens epithelial cells; PI3K/AKT signaling pathway; hydrogen peroxide; cell apoptosis