

## · 研究论文 ·

# 花青素对晶状体上皮细胞氧化应激损伤和 上皮间充质转化的抑制作用

周婉祎<sup>1</sup>, 赵一秀<sup>1</sup>, 安娜<sup>2</sup>, 白云龙<sup>1</sup>, 张妍<sup>1\*</sup>, 杨宝峰<sup>1</sup>

(哈尔滨医科大学 1. 药学院, 省部共建国家重点实验室培育基地, 心血管药物研究教育部重点实验室,  
2. 黑龙江省医学科学院, 黑龙江 哈尔滨 150081)

**摘要:** 花青素 (anthocyanin) 是广泛存在于植物中的一种水溶性黄酮类色素。研究表明花青素对视力具有一定的保护作用, 但其对于白内障是否具有治疗作用及机制尚不明确。本研究分别采用过氧化氢 (hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 及转化生长因子- $\beta_2$  (transforming growth factor  $\beta_2$ , TGF- $\beta_2$ ) 处理人晶状体上皮细胞 (human lens epithelial cells, HLECs), 诱导氧化应激损伤及上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT), 以构建年龄相关性白内障 (age-related cataract, ARC) 及后囊膜浑浊型白内障 (posterior capsule opacification, PCO) 细胞模型, 并检测花青素对 HLECs 氧化应激损伤及 EMT 标志物的影响。结果表明, 花青素有较好的抗氧化应激损伤作用, 能明显保护细胞活力, 增加细胞内 SOD、GSSG、GSH-Px 及  $\alpha$ -晶状体蛋白水平, 降低细胞内 MDA、ROS 及 Ca<sup>2+</sup>水平; 同时, 花青素显著抑制后囊膜浑浊型白内障发生发展的病理进程, 能明显抑制 TGF- $\beta_2$  诱导的 HLECs 增殖、迁移, 降低 EMT 标志物 COL1A1、COL1A2、COL3、COL4、Fn、 $\alpha$ -SMA 的 mRNA 表达水平。综上, 花青素能保护 HLECs 细胞对抗 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的自由基损伤及由 TGF- $\beta_2$  诱导的 EMT, 对 ARC 及 PCO 具有一定的预防和治疗作用。

**关键词:** 花青素; 白内障; 氧化应激; 上皮间充质转化; 细胞增殖

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 04-0538-08

## Inhibitory effects of anthocyanin on oxidative stress injury and epithelial-mesenchymal transition of human lens epithelial cells

ZHOU Wan-yi<sup>1</sup>, ZHAO Yi-xiu<sup>1</sup>, AN Na<sup>2</sup>, BAI Yun-long<sup>1</sup>, ZHANG Yan<sup>1\*</sup>, YANG Bao-feng<sup>1</sup>

(1. State-Province Key Laboratories of Biomedicine-Pharmaceutics of China, Key Laboratory of Cardiovascular Medicine Research, Ministry of Education, College of Pharmacy, 2. Heilongjiang Medical Academy, Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

**Abstract:** Anthocyanin is a water-soluble flavonoid pigment which is widely found in plants. Studies showed that anthocyanin had protective effect on vision. However, whether anthocyanin has therapeutic effect on cataract remain unclear. In this study, we established the age-related and posterior capsule opacification cataract cell models through inducing oxidative damage of human lens epithelial cells (HLECs) by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and inducing epithelial-mesenchymal transition (EMT) by transforming growth factor  $\beta_2$  (TGF- $\beta_2$ ). The preventative effects of anthocyanin on markers of oxidative damage and EMT were determined by respective assay kits and PCR analysis. Anthocyanin was beneficial to reduce oxidative stress of HLECs, protecting cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

收稿日期: 2017-10-15; 修回日期: 2017-12-06.

基金项目: 中央引导地方科技发展专项资助项目 (ZY16A07).

\*通讯作者 Tel: 86-451-86671354, E-mail: zhangyan@ems.hrbmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-1004

induced damage and increasing  $\alpha$ -crystallin expression. The potential mechanisms might be that anthocyanin increased the activities of SOD and GSH-Px, which contributes to reduce cellular ROS and MDA level. Besides, anthocyanin inhibited  $\text{Ca}^{2+}$  overload, which contributes to protection of cell from apoptosis. Meanwhile, anthocyanin had inhibitory effect on EMT, slowed down cell proliferation, migration caused by TGF- $\beta_2$  through decreasing mRNA expression levels of EMT markers including *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3*, *COL4*, *Fn* and  $\alpha$ -SMA. The results suggest that anthocyanin could protect HLECs from oxidative damage induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$  and cell proliferation, migration and EMT induced by TGF- $\beta_2$ , which indicated that anthocyanin may have protective and therapeutic effects on age-related cataract and posterior capsule opacification.

**Key words:** anthocyanin; cataract; oxidative stress; epithelial-mesenchymal transition; cell proliferation

白内障是指由于各种原因如老化、局部营养障碍、免疫与代谢异常、外伤、中毒、辐射等引起晶状体代谢紊乱,使晶状体蛋白变性而发生浑浊,最终导致视力下降甚至丧失的疾病,严重影响患者的日常生活及生存质量。随着我国人口老龄化的加剧,白内障已成为最主要的致盲眼病之一。目前,治疗白内障的最主要方式是进行晶状体置换术,即取出浑浊的晶状体,植入人工晶体。但我国人口众多,许多经济相对落后地区的患者无法承担昂贵的手术及治疗费用,因此研究与开发一种具有预防与治疗白内障作用的药物刻不容缓<sup>[1]</sup>。

晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LECs) 是位于晶状体前表面的功能性细胞,可表达多种结构性及功能性蛋白,参与维持晶状体的透明性及屈光性,对晶状体的生长、分化、损伤和修复均具有重要作用<sup>[2]</sup>。研究表明,年龄相关性白内障 (age-related cataract, ARC) 的发生发展与晶状体长期处于氧化应激状态密切相关。氧化应激可激活 LECs 中相关信号通路,使细胞内 DNA 损伤、蛋白结构改变,影响细胞生理功能,诱导 LECs 发生凋亡而无法供给晶状体代谢所需的营养物质,最终导致晶状体浑浊<sup>[3]</sup>。此外,在对浑浊的晶状体进行摘除、并植入人工晶体的过程中,极易引起晶状体后囊膜浑浊 (posterior capsular opacification, PCO),也称为后发性白内障。目前研究认为,LECs 发生增殖、迁移、上皮间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)、胶原沉积及纤维组织形成是后发性白内障形成的主要原因。因此,有效地减轻 LECs 氧化应激损伤及 EMT 等病理过程,可成为延缓白内障发生及发展的重要途径<sup>[4,5]</sup>。

花青素 (anthocyanin) 属于黄酮类化合物,广泛分布于有色植物中。目前已发现的花青素约有 27 种,其特征结构为 2-苯基色原烯母核,其中以矢车菊素-3-O-葡萄糖苷最为常见<sup>[6]</sup>。花青素具有抗氧化、抗炎、抑菌和抗肿瘤等多种药理活性,对心脏及肝脏等器

官的功能具有明显的保护作用<sup>[7,8]</sup>。研究表明,花青素对视力也具有一定的保护作用,但其对于白内障的作用及机制尚不明确。因此,本研究分别采用过氧化氢 (hydrogen peroxide,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 及转化生长因子  $\beta_2$  (transforming growth factor  $\beta_2$ , TGF- $\beta_2$ ) 处理人晶状体上皮细胞 (human lens epithelial cells, HLECs),以诱导 HLECs 发生氧化应激损伤及 EMT,建立 ARC 及 PCO 细胞模型,并初步探讨 anthocyanin 对于白内障是否具有治疗作用及其初步机制。

## 材料与方法

**细胞培养** HLECs 由哈尔滨医科大学附属第二医院惠赠,培养于哈尔滨医科大学科技园院士工作站细胞培养室。HLECs 接种于含有 15% 胎牛血清、1% 青链霉素的 DMEM 低糖培养基中,于 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  环境中培养。待细胞融合至 80% 后,用胰蛋白酶进行消化、传代,分瓶培养后用于后续实验。

**药物配制** 花青素 (含矢车菊素-3-O-葡萄糖苷高于 25%) 由大兴安岭林格贝有机食品有限公司提供,溶于无菌 PBS 中,配置成母液 ( $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 4 °C 保存; TGF- $\beta_2$  溶于无菌的 PBS 中,配置母液 ( $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), -20 °C 保存;  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶于无菌 PBS 中,配置成母液 ( $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 4 °C 保存; 取 3.974 g NaCl、0.201 g KCl、1.1915 g HEPES、0.10165 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  溶于 50 mL ddH $_2\text{O}$  中,配制成台式母液,4 °C 保存。

**细胞分组** 将培养的 HLECs 细胞分为 2 大组,即  $\text{H}_2\text{O}_2$  组及 TGF- $\beta_2$  组。 $\text{H}_2\text{O}_2$  组中,将细胞分为空白对照组 (control)、模型组 (model)、阳性药吡诺克辛 (pirenoxine) 滴眼液组、花青素低、中、高剂量组 (1、10、100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。其中,阳性药组细胞预孵育 0.5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  吡诺克辛滴眼液 12 h,花青素低、中、高剂量组分别预孵育 1、10、100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  花青素溶液 24 h。TGF- $\beta_2$  组中,将细胞分为空白对照组 (control)、模型

组 (model)、花青素低、中、高剂量组 (1、10、100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。其中,花青素低、中、高剂量组分别预孵育 1、10、100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  花青素 12 h。

**细胞活力及细胞内氧化应激水平检测** HLECs 细胞以 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  处理 3 h 或 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  TGF- $\beta_2$  处理 12 h 后,使用 MTT 法检测各组细胞活力,采用相关试剂盒 (碧云天生物技术研究所) 检测细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、脂质过氧化物丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathion peroxidase, GSH-px)、氧化型谷胱甘肽 (oxidized glutathione, GSSG) 水平。

**Fluo-3/AM 荧光探针检测细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  水平** 在避光条件下将处理好的 HLECs 细胞装载 Fluo-3/AM 荧光探针,并给予 55  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  KCl 诱导细胞内钙超载,荧光显微镜检测各组细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  水平。

**Western blot 检测  $\alpha$ -晶状体蛋白的表达** HLECs 细胞以 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  处理 3 h 后,提取细胞总蛋白并测定蛋白浓度后,将蛋白行 SDS-PAGE 电泳。孵育一抗  $\alpha$ -晶状体蛋白 ( $\alpha$ -crystallin, 1 : 1000) 抗体过夜及二抗 (anti-rabbit, 1 : 10 000) 后,odyssey 软件检测并分析各组细胞  $\alpha$ -crystallin 表达水平。

**划痕实验检测细胞迁移率** HLECs 细胞以 10  $\mu\text{L}$  枪头在六孔板中央制作划痕,并给予 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  TGF- $\beta_2$  处理 (control 组除外),Image Pro Plus 软件分别检测加入 TGF- $\beta_2$  处理 0、12、24 h 后的细胞迁移距离。

**RT-PCR 检测 EMT 标志物的表达** HLECs 细胞以 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  TGF- $\beta_2$  处理 12 h 后,使用 Trizol 试剂盒提取 RNA, RewerTra Ace qPCR RT kit 试剂盒对 RNA 逆转录。利用 SYBR Green PCR Master 试剂盒进行 Real-Time PCR 反应。检测各组样品中 EMT 标志物 I 型胶原 (collagen I alpha 1 chain, COL1A1; collagen I alpha 2 chain, COL1A2)、III 型胶原 (collagen III, COL3)、IV 型胶原 (collagen IV, COL4)、纤连蛋白 (fibronectin, Fn)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) 的表达水平。引物序列见表 1,结果以 GAPDH 为内参,统计以  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  值比较 mRNA 表达水平。

**统计学处理** 各组数据采用方差分析及  $t$  检验进行统计,各给药组数据与同期对照组数据分别进行显著性检验。 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$  分别表示差异显著性级别。

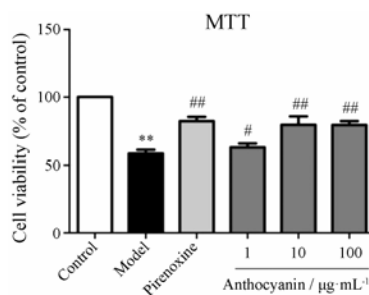
**Table 1** The primer sequence of real time-PCR. COL1A1: Collagen I alpha 1 chain; COL1A2: Collagen I alpha 2 chain; COL3: Collagen III; COL4: Collagen IV; Fn: Fibronectin;  $\alpha$ -SMA:  $\alpha$ -Smooth muscle actin

Primer	F or R	Sequence (5'-3')
COL1A1	F	5'-TCTAGACATGTTTCAGCTTTGTGGAC-3'
	R	5'-TCTGTACGCAGGTGATTGGTG-3'
COL1A2	F	5'-ACTGGCGAAACCTGTATCCG-3'
	R	5'-ACCGATGTCCAAGGTGCAA-3'
COL3	F	5'-GGTCTCAGTGGAGAACGTGG-3'
	R	5'-TCTGTCCACCAGTGTTCG-3'
COL4	F	5'-TGCTTGTGTCCAGCTGAAAT-3'
	R	5'-ACAGGAGGAAAGGCAACCAC-3'
$\alpha$ -SMA	F	5'-GACAATGGCTCTGGGCTCTGTAA-3'
	R	5'-CTGTGCTTCGTACCCACGTA-3'
Fn	F	5'-CAGGATCACTTACGGAGAAACAG-3'
	R	5'-GCCAGTGACAGCATAACAGTG-3'

**结果**

**1 花青素对 HLEC 氧化应激损伤的保护作用**

**1.1 花青素对氧化应激损伤后 HLECs 细胞活力的影响**  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理后, model 组细胞活力降低至 control 组的  $58.5\% \pm 7.5\%$  ( $P < 0.01$ ); 而 1、10 和 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  花青素预处理组细胞活力分别升高至 control 组的  $63.0\% \pm 8.0\%$ 、 $79.6\% \pm 17.7\%$ 、 $79.5\% \pm 8.0\%$ , 与 model 组相比有统计学差异 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。该结果说明,花青素对氧化应激损伤后的 HLEC 细胞活力具有一定的保护作用 (图 1)。



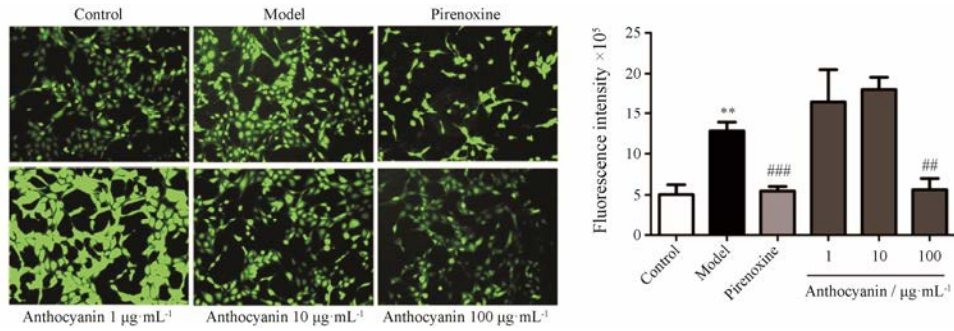
**Figure 1** Anthocyanin protected HLECs from damaging by  $\text{H}_2\text{O}_2$ .  $n = 8$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$  vs control; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs model

**1.2 花青素对氧化应激损伤后 HLECs 细胞中活性氧水平的影响**

$\text{H}_2\text{O}_2$  处理后, model 组 ROS 含量升高至  $(12.8 \pm 2.4) \times 10^5$ , 显著高于 control 组  $(5.1 \pm 2.7) \times 10^5$  ( $P < 0.01$ ); 而 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  花青素组细胞中 ROS 荧光强度降低至  $(5.6 \pm 3.1) \times 10^5$ , 显著低于 model 组 ( $P < 0.01$ , 图 2)。

**1.3 花青素对氧化应激损伤后 HLECs 细胞中氧化应激因子水平的影响**

$\text{H}_2\text{O}_2$  处理后, model 组细胞中



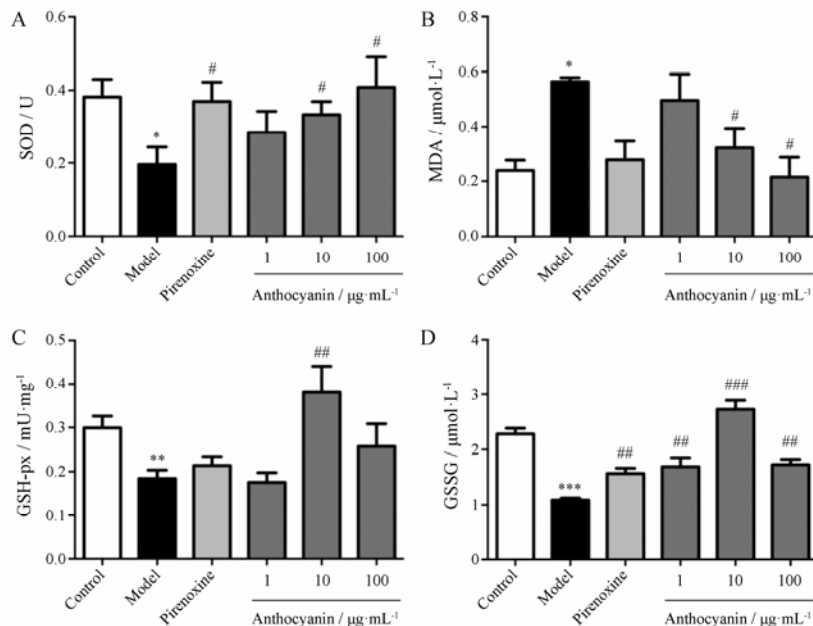
**Figure 2** Anthocyanin reversed the increase of reactive oxygen species (ROS) in HLECs induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reagent. The photographs were taken under a fluorescence microscope (20 ×).  $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$  vs control; ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  vs model

SOD 活力降低至  $0.20 \pm 0.12$  U, 显著低于 control 组 ( $P < 0.05$ ); 花青素预处理后, 10 及  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  组 SOD 活力升高至  $0.33 \pm 0.09$ 、 $0.41 \pm 0.20$  U, 显著高于 model 组 ( $P < 0.05$ , 图 3A)。Model 组细胞中 MDA 含量升高至  $0.57 \pm 0.03 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 显著高于 control 组 ( $P < 0.05$ ); 花青素预处理后, 10 及  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  组 MDA 含量降低至  $0.25 \pm 0.16$ 、 $0.22 \pm 0.16 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 显著低于 model 组 ( $P < 0.05$ , 图 3B)。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组细胞中 GSH-px 活性降低至  $0.18 \pm 0.05 \text{mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ , 显著低于 control 组 ( $P < 0.01$ ); 花青素预处理后,  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  组 GSH-px 活性升高至  $0.38 \pm 0.15 \text{mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ , 显著高于 model 组 ( $P < 0.01$ , 图 3C)。Model 组 GSSG 含量降低至  $1.09 \pm 0.09 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 显著低于 control 组 ( $P < 0.001$ ); 1、10 和  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  花青素预处理后, 细胞中 GSSG 含量升

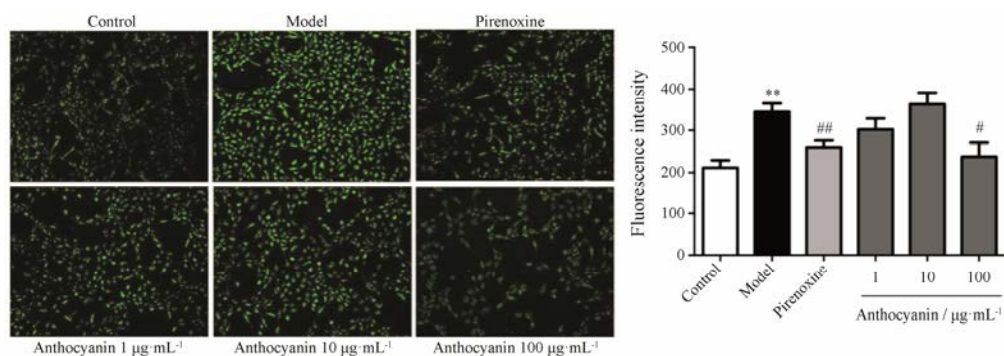
高至  $1.69 \pm 0.44$ 、 $2.73 \pm 0.43$ 、 $1.73 \pm 0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 显著高于 model 组 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ , 图 3D); 以上结果说明, 花青素能明显降低 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后 HLECs 细胞内氧化应激水平, 对 HLECs 氧化应激损伤具有一定的保护作用。

**1.4 花青素对氧化应激损伤后 HLECs 细胞中 Ca<sup>2+</sup> 水平的影响** 结果显示, model 组细胞中 Ca<sup>2+</sup> 荧光强度显著升高 ( $P < 0.01$ );  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  花青素组细胞中降低 Ca<sup>2+</sup> 荧光强度, 显著低于 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组 ( $P < 0.05$ , 图 4)。该结果说明, 花青素对细胞内 Ca<sup>2+</sup> 超载具有一定的抑制作用。

**1.5 花青素对 HLECs 氧化应激损伤后细胞中  $\alpha$ -crystallin 表达水平的影响** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后, 细胞中  $\alpha$ -crystallin 的表达量显著降低至 control 组的  $68\% \pm 26\%$

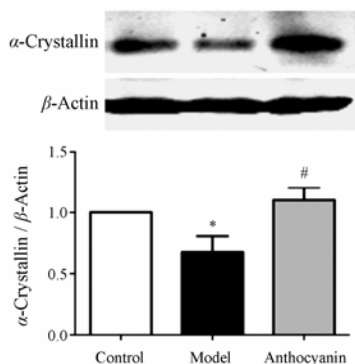


**Figure 3** Anthocyanin increased anti-oxidative capacity of HLECs. Anthocyanin reversed the decrease of SOD activity (A), the increase of MDA content (B), the decrease of GSH-px activity (C), the decrease of GSSG content (D) in HLECs induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.  $n=6-8$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  vs model. MDA: Malondialdehyde; SOD: Superoxide dismutase; GSH-px: Glutathion peroxidase; GSSG: Oxidized glutathione



**Figure 4** Anthocyanin inhibited Ca<sup>2+</sup> overload. Ca<sup>2+</sup> content measured by fluorescence microscope (20 ×). n=5,  $\bar{x} \pm s$ . \*\*P<0.01 vs control; #P<0.05, ##P<0.01 vs model

(P<0.05); 花青素预处理后, 细胞中 α-crystallin 的表达量升高至 control 组的 1.10 ± 0.20 倍, 显著高于 model 组 (P<0.05, 图 5)。该结果说明, 花青素可显著增加 α-crystallin 含量, 改善晶状体功能。



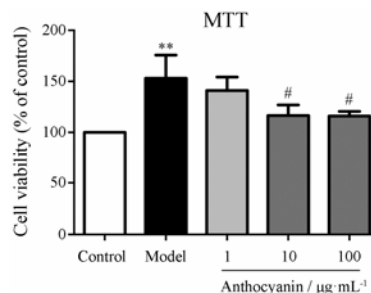
**Figure 5** Anthocyanin reversed the decreased expression of α-crystallin induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in HLECs. n=4,  $\bar{x} \pm s$ . \*P<0.05 vs control; #P<0.05 vs model

## 2 花青素对 HLECs 上皮间充质转化的抑制作用

**2.1 花青素对 TGF-β<sub>2</sub> 诱导 HLECs 细胞增殖的影响**  
TGF-β<sub>2</sub> 处理后, 细胞活力显著升高至 control 组的 139.0% ± 54.2% (P<0.01), 10 及 100 μg·mL<sup>-1</sup> 花青素预处理组细胞活力降低至 control 组的 116.5% ± 31.5%、115.7% ± 13.7%, 显著低于 model 组 (P<0.05, 图 6)。该结果说明, 花青素对 TGF-β<sub>2</sub> 诱导的 HLECs 细胞增殖有显著的抑制作用。

**2.2 花青素对 TGF-β<sub>2</sub> 诱导 HLECs 细胞迁移的影响**  
TGF-β<sub>2</sub> 处理后 0、12、24 h 时的迁移情况如图 7 所示。给予 TGF-β<sub>2</sub> 12 h 后, model 组细胞迁移距离为 375.0 ± 31.9 pixels, 显著大于 control 组 133.4 ± 25.3 pixels (P<0.001), 花青素预处理后细胞迁移的距离分别为 133.7 ± 36.7、190.3 ± 25.4、140.7 ± 9.4 pixels, 显著小于 model 组 (P<0.01, P<0.001); 给予 TGF-β<sub>2</sub> 24 h 后, model 组细胞迁移距离为 308.1 ± 156.4 pixels,

显著大于 control 组 105.5 ± 45.9 pixels (P<0.001, n=3), 花青素预处理后细胞迁移的距离分别为 109.4 ± 46.6、161.7 ± 82.0、120.0 ± 62.3 pixels, 显著小于 model 组 (P<0.01, P<0.001)。该结果说明, 花青素对 TGF-β<sub>2</sub> 诱导的 HLECs 迁移具有显著的抑制作用。



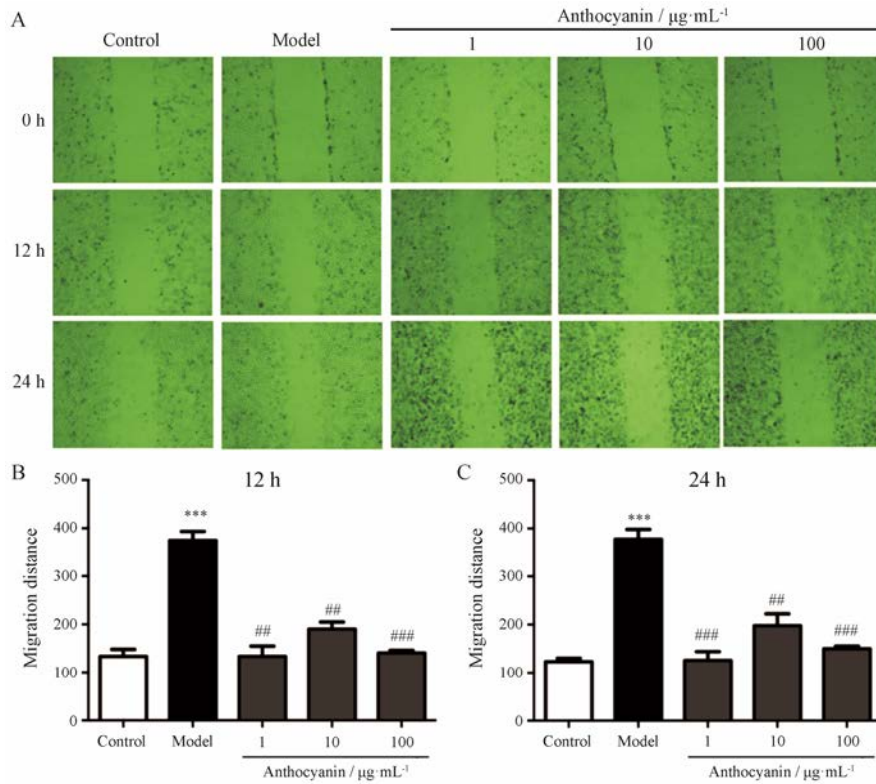
**Figure 6** Anthocyanin reversed the proliferation of HLECs induced by TGF-β<sub>2</sub>. n=8,  $\bar{x} \pm s$ . \*\*P<0.01 vs control; #P<0.05 vs model

## 2.3 花青素对 TGF-β<sub>2</sub> 诱导 HLECs 细胞 EMT 的影响

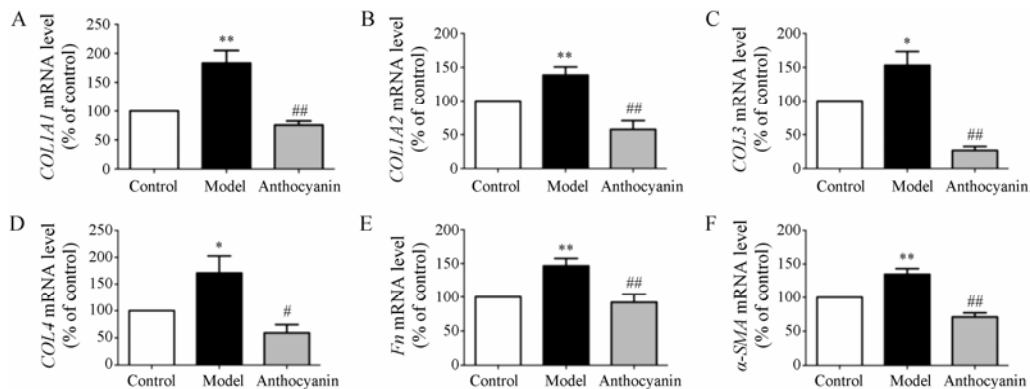
TGF-β<sub>2</sub> 处理后, EMT 标志物 COL1A1、COL1A2、COL3、COL4、α-SMA、Fn 的 mRNA 表达水平分别显著升高至 control 组的 183% ± 49%、138% ± 30%、153% ± 41%、171% ± 71%、135% ± 17%、147% ± 25% (P<0.05, P<0.01); 花青素预处理后, 细胞中 COL1A1、COL1A2、COL3、COL4、α-SMA、Fn 含量分别降低至 control 组的 76% ± 16%、58% ± 32%、27% ± 12%、59% ± 34%、71% ± 12%、92% ± 26%, 显著低于 model 组 (P<0.05, P<0.01, 图 8)。该结果说明花青素对 TGF-β<sub>2</sub> 诱导 HLECs 细胞 EMT 具有显著的抑制作用。

## 讨论

LECs 是位于晶状体前囊膜下的单层立方上皮细胞, 代谢较活跃, 具有生长、分化及应激刺激反应的能力<sup>[9]</sup>。LECs 对晶状体具有营养、代谢及损伤修复作用, 是维持晶状体透明性的最重要的防线, 任何原因



**Figure 7** Anthocyanin prevents HLECs from migrating induced by TGF- $\beta_2$ . A: Representative images showed that anthocyanin reversed the migration of HLECs induced by TGF- $\beta_2$ . The photographs were taken under a (10 $\times$ ) microscope. B, C: Statistic graphs of migration distance of cells.  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$ . \*\*\* $P<0.001$  vs control; ## $P<0.01$ , ### $P<0.001$  vs model



**Figure 8** Anthocyanin reversed the increase of epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers induced by TGF- $\beta_2$  in HLECs.  $n=4-6$ ,  $\bar{x}\pm s$ . \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs control; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$  vs model. COL1A1, Collagen I alpha 1 chain; COL1A2, Collagen I alpha 2 chain; COL3, Collagen III; COL4, Collagen IV; Fn, Fibronectin;  $\alpha$ -SMA,  $\alpha$ -Smooth muscle actin

(如衰老、营养代谢异常、中毒变性、外伤等)破坏 LECs 的正常结构和功能, 都可能导致不同类型的晶状体混浊。研究证实, ARC 的发生发展即与 LECs 长期处于氧化应激状态密切相关<sup>[10]</sup>。由于晶状体内无血管供给, 易遭受自由基攻击, 使氧化应激水平升高。虽然正常人的晶状体及房水中存在一定数量的自由基, 如正常人房水中  $H_2O_2$  浓度约为  $20\sim 30\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 然而, 白内障患者的房水中  $H_2O_2$  浓度可高达  $660\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 为正常人的 30 倍<sup>[11]</sup>。晶状体长期处于氧化

应激状态时, 可引起 LECs 膜通透性改变, 细胞内的蛋白质漏出, 房水成分发生改变, 导致细胞内环境改变, 稳定性下降; 引起细胞内蛋白质变性, 不溶性蛋白质增多, 导致透明的晶状体发生浑浊, 影响视力<sup>[12, 13]</sup>。因此, 氧化应激诱导并促进了白内障发生、发展过程的恶性循环。可见,  $H_2O_2$  诱导的 LECs 氧化应激损伤是 ARC 发生发展的起始途径, 减少 LECs 氧化应激损伤是抑制 ARC 发生发展的重要途径<sup>[14]</sup>。而 PCO 是白内障囊外摘除联合人工晶状体植入术后最常见的并

发病,严重影响白内障术后的视力恢复,导致视力严重下降甚至失明<sup>[15,16]</sup>。研究表明,术后残留的 LECs 在晶状体后囊发生增殖、移行、EMT,形成新的晶体物质或纤维化而引起后囊皱缩是导致晶状体浑浊的主要原因<sup>[17]</sup>。目前,PCO 的药物防治研究尚未取得突破性进展,而防治的重点应集中于如何抑制残留的 LECs 发生增殖、迁移、EMT 及纤维化<sup>[18]</sup>。

目前,治疗白内障的最有效方法是手术,但是早期应用药物进行预防与初步治疗也十分必要。有效的抗白内障药物能推迟手术时间,延缓白内障的发展。目前,临床上常用的抗白内障药物包括:非甾体类抗炎药、牛磺酸、醛糖还原酶抑制剂、谷胱甘肽及一些中药制剂等。本研究所采用的阳性对照药吡诺克辛即为醛糖还原酶抑制剂,研究表明吡诺克辛能保护 HLECs 预防氧化应激损伤。花青素属于黄酮类化合物,被誉为继水、蛋白质、脂肪、碳水化合物、维生素、矿物质之后的第七大人体必需营养素,极具开发和利用前景。蓝莓花青素以其提取率高、结构较稳定等特点,在食品、药品和保健品领域均有广泛应用<sup>[19]</sup>。而矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷作为蓝莓花青素的主要成分之一,其生物活性的研究备受关注。目前已有研究表明,矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷在多种慢性疾病如动脉粥样硬化、糖尿病、癌症等的防治中发挥重要作用,其保护眼睛健康、预防视力受损的活性也有报道,包括对视疲劳、屈光不正、眼表疾病、青光眼及视网膜损伤中的治疗作用<sup>[20,21]</sup>。也有研究报道,花青素可通过降低机体血糖、血脂水平延缓糖尿病性白内障的发生、发展,但其对于 ARC 和 PCO 是否具有治疗作用及作用机制尚不明确<sup>[22,23]</sup>。本研究分别以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及 TGF-β<sub>2</sub> 处理 HLECs,诱导细胞氧化应激损伤及 EMT,建立 ARC 及 PCO 细胞模型,探讨花青素对白内障的治疗作用及其作用机制。本研究结果显示,花青素能有效减轻氧化应激损伤,保护 HLECs 活力。进一步研究发现,花青素能显著降低 HLEC 内 ROS、MDA 水平,且该作用可能是由于花青素显著升高 HLECs 内 SOD 和 GSH-Px 活性,增加细胞内超氧阴离子等氧自由基向 H<sub>2</sub>O 的转化而降低细胞内 ROS 及 MDA 水平;花青素有效抑制细胞内 Ca<sup>2+</sup>超载,进一步抑制由氧化应激诱导的 HELC 凋亡;同时,花青素能够显著增加氧化应激损伤后细胞内 α-crystallin 的表达水平,α-crystallin 是存在于 LECs 中的最重要的功能性蛋白,具有分子伴侣功能。当细胞处于应激和病理状态时,α-crystallin 能有效组织细胞的程序性死亡和蛋白质变性聚集,从而有效增强应激状态下晶状体中

各种功能蛋白的稳定性,在增强细胞的抗氧化能力、减少细胞凋亡、维持晶状体透明性方面发挥重要作用<sup>[24]</sup>。此外,花青素能显著降低由 TGF-β<sub>2</sub> 处理后的 HLECs 细胞活力、细胞迁移距离及 EMT 标志物 COL1A1、COL1A2、COL3、COL4、Fn、α-SMA 的 mRNA 表达水平,有效抑制 TGF-β<sub>2</sub> 诱导的 HLECs 增殖、迁移、EMT 及纤维化生,进而延缓 PCO 发生、发展的病理进程(图 9)。

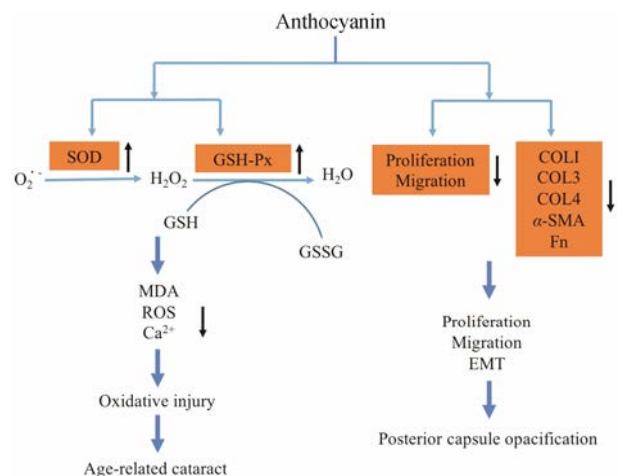


Figure 9 Pharmacological effect and mechanisms of anthocyanin

综上所述,花青素可明显提高氧化应激状态下 LEC 抗氧化能力及晶状体蛋白表达水平,有效保护 LECs 及晶状体功能;同时,花青素能明显抑制由 TGF-β<sub>2</sub> 诱导的 LECs 异常增殖、迁移、EMT 及纤维化生,延缓后囊膜浑浊的病理进程。因此,花青素对于晶状体功能的保护作用,有望应用于 ARC 及 PCO 的预防和治疗中。

References

- [1] Resnikoff S, Pascolini D, Mariotti SP, et al. Global magnitude of visual impairment caused by uncorrected refractive errors in 2004 [J]. Bull World Health Organ, 2008, 86: 63–70.
- [2] Michael R, Bron A. The ageing lens and cataract: a model of normal and pathological ageing [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2011, 366: 1278–1292.
- [3] Hawse JR, Padgaonkar VA, Leverenz VR, et al. The role of metallothionein IIa in defending lens epithelial cells against cadmium and TBHP induced oxidative stress [J]. Mol Vis, 2011, 12: 342–349.
- [4] Gilmour DT, Lyon GJ, Carlton MB, et al. Mice deficient for the secreted glycoprotein SPARC/osteonectin/BM40 develop normally but show severe age-onset cataract formation and disruption of the lens [J]. EMBO J, 1998, 17: 1860–1870.

- [5] Hawse JR, Hejtmancik JF, Horwitz J, et al. Identification and functional clustering of global gene expression differences between age-related cataract and clear human lenses and aged human lenses [J]. *Exp Eye Res*, 2004, 79: 935–940.
- [6] Lee YK, Lee WS, Kim GS, et al. Anthocyanins are novel AMPK $\alpha$ 1 stimulators that suppress tumor growth by inhibiting mTOR phosphorylation [J]. *Oncol Rep*, 2010, 24: 1471–1477.
- [7] Han KH, Sekikawa M, Shimada K, et al. Anthocyanin-rich purple potato flake extract has antioxidant capacity and improves antioxidant potential in rats [J]. *Br J Nutr*, 2006, 96: 1125–1133.
- [8] Matsumoto H, Nakamura Y, Iida H, et al. Comparative assessment of distribution of blackcurrant anthocyanins in rabbit and rat ocular tissues [J]. *Exp Eye Res*, 2006, 83: 348–356.
- [9] Zhang W, Hawse J, Huang Q, et al. Decreased expression of ribosomal proteins in human age-related cataract [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43: 198–204.
- [10] Martens E, Stevens I, Janssens V, et al. Genomic organization chromosomal localization tissue distribution and developmental regulation of the PR61/B0 regulatory subunits of protein phosphatase 2A in mice [J]. *J Mol Biol*, 2004, 336: 971–986.
- [11] Hejtmancik JF, Kantorow M. Molecular genetics of age-related cataract [J]. *Exp Eye Res*, 2004, 79: 3–9.
- [12] Du YX, Guo DD, Wu QX, et al. Zinc chloride inhibits human lens epithelial cell migration and proliferation involved in TGF- $\beta$ <sub>1</sub> and TNF- $\alpha$  signaling pathways in HLEB-3 cells [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2014, 159: 425–433.
- [13] Ou Y, Yuan ZJ, Li KP, et al. Phycocyanin may suppress D-galactose-induced human lens epithelial cell apoptosis through mitochondrial and unfolded protein response pathways [J]. *Toxicol Lett*, 2012, 215: 25–30.
- [14] Xie L, Santhoshkumar P, Reneker LW, et al. Histone deacetylase inhibitors trichostatin A and vorinostat inhibit TGF- $\beta$ <sub>2</sub>-induced lens epithelial-to-mesenchymal cell transition [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55: 4731–4740.
- [15] Wertheimer C, Siedlecki J, Kook D, et al. EGFR inhibitor gefitinib attenuates posterior capsule opacification *in vitro* and in the *ex vivo* human capsular bag model [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2015, 253: 409–417.
- [16] Wertheimer C, Liegl R, Kernt M, et al. EGF receptor inhibitor erlotinib as a potential pharmacological prophylaxis for posterior capsule opacification [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2013, 251: 1529–1540.
- [17] Wang Z, Wang D, Li Y, et al. Protective effects of verapamil against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in human lens epithelial cells [J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2014, 22: 553–557.
- [18] Sharma P, Panwar M. Trypan blue injection into the capsular bag during phacoemulsification: initial postoperative posterior capsule opacification results [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2013, 39: 699–704.
- [19] Jing Y, Yumin X, Khaoustov V, et al. Identification of components of grape powder with anti-apoptotic effects [J]. *Toxicol Ind Health*, 2011, 27: 19–28.
- [20] Yao JY, Li ZJ. Research progress in blueberry anthocyanin in eye disease [J]. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)*, 2016, 16: 2234–2236.
- [21] Jin GR, Hong H, Jin GY, et al. Anthocyanidin inhibits immunoglobulin E-mediated allergic response in mast cells [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2012, 47: 34–38.
- [22] Miyake S, Takahashi N, Sasaki M, et al. Vision preservation during retinal inflammation by anthocyanin-rich bilberry extract: cellular and molecular mechanism [J]. *Lab Invest*, 2012, 92: 102–109.
- [23] Chung MY, Park HJ, Manautou JE, et al. Green tea extract protects against nonalcoholic steatohepatitis in *ob/ob* mice by decreasing oxidative and nitrate stress responses induced by proinflammatory enzymes [J]. *J Nutr Biochem*, 2012, 23: 361–367.
- [24] Andley UP, Song Z, Wawrousek EF, et al. Differential protective effect of  $\alpha$ A- and  $\alpha$ B-crystallin in lens epithelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 36823–36831.