

· 基础研究 ·

淫羊藿总黄酮含药血浆对泪腺上皮细胞凋亡模型
Caspase-3 及 Caspase-8 表达的影响

王 方 洪作权 卢书娟 胡文婧 石玉恒

摘要 **目的** 观察淫羊藿总黄酮含药血浆对雄兔泪腺上皮细胞半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 及 Caspase-8 表达的影响,探究其作用机制。**方法** 将体外培养 of 雄兔泪腺上皮细胞,随机分为淫羊藿黄酮治疗组(黄酮组)、含雄激素培养对照组(雄激素组)和空白对照组(空白组)。分别加入含淫羊藿总黄酮血浆、丙酸睾酮、空白血浆干预 48 h 后,各组加入双氧水(H_2O_2)诱导细胞凋亡。采用 Western Blot 法检测 Caspase-3、Caspase-8 的表达情况。**结果** 与空白组比较,黄酮组及雄激素组 Caspase-3、Caspase-8 蛋白表达降低($P < 0.01$),同时黄酮组较雄激素组的 Caspase-3、Caspase-8 蛋白表达降低($P < 0.01$)。**结论** 淫羊藿总黄酮含药血浆作用于泪腺上皮细胞凋亡模型可抑制 Caspase-3 及 Caspase-8 的表达。

关键词 淫羊藿总黄酮;泪腺;细胞凋亡模型;半胱氨酸蛋白酶-3;半胱氨酸蛋白酶-8

Effect of Caspase-3 and Caspase-8 in Apoptosis Model of Lacrimal Gland Epithelial Cells Influenced by Epimedium Flavonoids Drug-Containing Plasma WANG Fang, HONG Zuo-quan, LU Shu-juan, HU Wen-jing, and SHI Yu-heng Ophthalmology Department of The Second Hospital Affiliated to Guizhou University of Chinese Medicine, Guiyang(550000)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect on expression of Caspase-3 and Caspase-8 in epimedium flavonoids drug-containing plasma on apoptosis model of lacrimal gland epithelial cells, and explore the mechanism. **Methods** The lacrimal gland epithelial cells were randomly divided into the epimedium flavonoids group, the control group with androgen cultural (androgen group), and the blank group. Total flavonoids with epimedium plasma, testosterone propionate and blank plasmain were added for 48 h after intervention respectively. Then, the apoptosis model was established by H_2O_2 . Western Blot was used to detect the expression of Caspase-3 and Caspase-8 in lacrimal gland epithelial cells. **Results** Compared with the blank group, the protein expressions of Caspase-3 and Caspase-8 decreased in the epimedium flavonoids group and the androgen group ($P < 0.01$). Meanwhile, the protein expressions of Caspase-3 and Caspase-8 in the epimedium flavonoids group were lower than those in the androgen group ($P < 0.01$). **Conclusion** Epimedium flavonoids drug-containing plasma can inhibit the expression of Caspase-3 and Caspase-8 in apoptosis model of lacrimal gland epithelial cells.

KEYWORDS epimedium flavonoids; lacrimal gland; apoptosis model; Caspase-3; Caspase-8

干眼症是眼科门诊常见的疾病之一。近年来,干眼症的发病率越来越高,并且发病趋于年轻化^[1]。全球发病率为 5.5% ~ 33.7%,我国的干眼症发病率为 21% ~ 30%^[2]。一项 Meta 分析显示 17% 的中国人患有干眼症,其中超过 60 岁的人群中有 34.4% 患有

干眼症^[3]。现代药理研究表明淫羊藿具有抗炎、调节免疫等多种药理作用^[4,5],既往研究发现黄酮类物质可以治疗干眼症^[6],但淫羊藿总黄酮是否能够抑制炎症及治疗干眼症的作用机制尚不清楚。干眼症炎症是基于免疫异常的非感染性炎症^[7],细胞凋亡与免疫反应密切相关,细胞凋亡也是干眼症发病的机制之一,而 Caspase-3 与 Caspase-8 在凋亡过程中起着关键作用。因此本实验通过观察淫羊藿总黄酮含药血浆对干眼细胞凋亡模型 Caspase-3 及 Caspase-8 表达的影响,进一步探讨淫羊藿总黄酮对泪腺上皮细胞凋亡

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81660809)

作者单位:贵州中医药大学第二附属医院眼科(贵阳 550000)

通讯作者:王 方, Tel: 0851-85283146, E-mail: 82490945@qq.com

qq.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20191222. 270

的作用。

材料与方法

1 动物 1 个月龄健康无眼疾的远交系新西兰大耳雄兔 61 只,体重 2.0~2.5 kg 左右(贵州中医药大学实验动物中心提供,SPF 级,动物合格证号:2009—09。本实验动物的喂养和使用符合国家科学技术委员会发布的《实验动物管理条例》、卫生部发布的《医学实验动物管理实施细则》等有关章程。本实验通过《贵阳中医学院实验动物管理办法(试行)》伦理审核(No.2018-05)。

2 试剂及仪器 朝藿定 A(纯度 98.13%)、淫羊藿苷(纯度 99.94%)均购自成都曼思特生物公司;PVDF 膜(Millipore ISEQ00010);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(Beyotime,批号:P0010);ECL 发光液(Thermo Fisher,批号:32106);淫羊藿总黄酮提取物(自制);丙烯酰胺(Alladin,批号:A108470);亚甲基双丙烯酰胺(Alladin,批号:M104026);Tris-base(Alladin,批号:T110601);过硫酸铵(Alladin,批号:A112450);TEMED(Alladin,批号:T105496);甘氨酸(Alladin,批号:A110752);SDS(Alladin,批号:S108346);Tween-20(Solarbio,批号:T8220);Protease inhibitor cocktail(Sigma,批号:P8340)。SDS-PAGE 电泳仪及湿法转膜仪(美国 Bio-Rad 公司),脱色摇床(金坛市医疗仪器厂),Tanon5200 化学发光检测系统(美国 Tanon 公司)。

3 兔泪腺上皮细胞的原代培养 随机选取 1 只雄兔,耳缘静脉注射空气处死,术前用妥布霉素冲洗兔眼,常规无菌操作取出泪腺。无菌超净台内无菌 PBS 平衡液清洗泪腺 3 遍。置于原液中,剥离其上的血管及纤维结缔组织,原液中漂洗后将其剪碎。加入等量质量分数现配制的 2 g/L II 型胶原酶,于 37℃ 电热恒温振荡器消化 25 min,再将消化的细胞转移至 15 mL 离心管中,1 000 r/min 离心 5 min,接种于培养瓶中,反复贴壁 3 次(每次 15~20 min)纯化泪腺上皮细胞,置于 37℃、含体积分数 5%的 CO₂ 培养箱中培养。36 h 后首次半量换液,48 h 后全量换液 1 次^[8]。以后每 4 天换液 1 次。10 天后进行第一次传代。取第 3 代的兔泪腺上皮细胞用于实验。

4 含淫羊藿总黄酮血浆以及含药血浆加入量的筛选 按随机数字表法将 60 只新西兰大白兔平均分为淫羊藿总黄酮 10 倍组、淫羊藿总黄酮 5 倍组、淫羊藿总黄酮 2.5 倍组和空白组。按体表面积换算的方法算出每只兔的灌药量(单倍兔的剂量 = X mg/kg ×

70 kg × 0.07/1.5 kg = 3.27 X mg/kg, X 为成人剂量,为 26 mg/kg),空白组灌同等剂量的生理盐水。各组灌胃 1 周后,用体积分数 3%戊巴比妥 40 mg/kg 腹腔注射将兔麻醉后,心脏穿刺抽取动脉血,在盛血的离心管中加入 3.8%枸橼酸钠溶液(按 1:9 比例,1 mL 枸橼酸钠抗 9 mL 血),将血液加入一定量后颠倒混匀。离心 3 000 r/min,10 min 后,收集上清液。0.45 μm 手动负压过滤器过滤分装 -80℃ 超低温冰箱储存备用。用胰酶将长到培养皿 80%~90%的泪腺上皮细胞取出,1 000 r/min 离心,去除上清,用 DMEM/F12 配成细胞悬液(1 × 10⁵/mL)加入 96 孔板,90 μL/孔,待细胞贴壁后,加入不同浓度的含药血浆,培养 48 h 后,去除培养基,加入含有 10 μL MTT(5 mg/mL)的无血清培养基,在细胞培养箱中继续培养约 3 h。去除培养基,每孔加入 150 μL DMSO,摇晃均匀,在 570 nm 波长测定吸光度。计算各组血浆的对细胞的抑制率:抑制率 = 1 - 实验组 OD 值/对照组 OD 值。经计算选择抑制率为 50%左右的浓度,即淫羊藿总黄酮 2.5 倍组,作为干预细胞含药血浆的浓度。

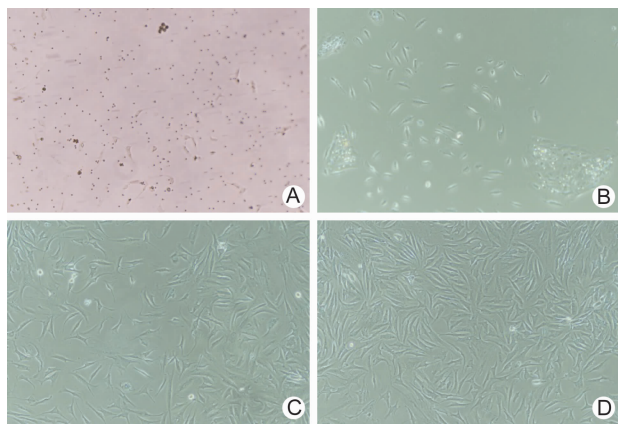
5 Western Blot 检测 Caspase-8 蛋白表达 将所培养的泪腺上皮细胞随机分为淫羊藿黄酮治疗组(简称黄酮组),含雄激素培养对照组(简称雄激素组),空白对照组(简称空白组)。细胞融合 2 天后,3 组用 15%胎牛血清的 DMEM/F12 低糖培养基分别加入含淫羊藿总黄酮血浆(干预细胞的最终浓度为 13.2 × 10⁻² mol/L)、1 × 10⁻⁶ mol/L 丙酸睾酮、空白血浆(干预细胞的浓度是 1 × 10⁻² mol/L)。干预 48 h 后,分别加入浓度为 1 × 10⁻⁴ mol/L H₂O₂ 继续培养 60 min,诱导细胞凋亡^[9]。收集细胞,六孔板中每孔加入 100 μL 预冷的裂解液,冰上裂解 30 min,4℃ 下 12 000 r/min 离心 5 min,吸取上清,即样品总蛋白,放于 -20℃ 保存。BCA 测定试剂盒测定蛋白浓度。配制浓度为 100 μg/mL SDS-PAGE 分离胶及 50 μg/mL 浓缩胶,4℃ 保存。将样品总蛋白与 5 × SDS 上样缓冲液混合至终浓度为 1 ×,于沸水中煮 5 min 使蛋白变性后上样电泳。浓缩胶层所用电压 60 V,30 min,样品进入分离胶后,改用 80 V 电压电泳 90 min。电泳后转至 PVDF 膜,移至封闭液中,室温下脱色摇床上摇动封闭 1 h。Caspase-3、Caspase-8 一抗参照说明书按 1:1 000 稀释于 4℃ 孵育过夜后用 TBST 液洗涤 3 次,每次 10 min。再将二抗用 TBST 按 1:5 000 稀释,室温孵育 2 h 后再用 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。用 Thermo ECL 进行化学发光按电化学发

光,于 Tanon 凝胶成像仪下拍照,获取图片。计算目的条带 Caspase-3、Caspase-8 与内参 β -actin 光密度值的比值作为其基因的相对含量。

6 统计学方法 使用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计处理。实验检测指标的数据资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,3 个组 Caspase-3、Caspase-8 在泪腺组织中表达的差异比较采用随机区组设计的方差分析,组间的多重比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 泪腺上皮细胞的培养(图 1) 在倒置显微镜下观察发现大部分细胞已贴壁,可见分散的单个或数个细胞呈不规则的圆形或椭圆形,胞膜清晰、晶莹透亮,可见细胞核位于中央,以后可见细胞逐渐向椭圆形变化,第 2 代细胞接种后于 48 h 后首次全量换液,见细胞全部伸展生长,后可单层融合。传代后,细胞继续生长至第 3 代。



注: A、B、C、D 分别表示原、1、2、3 代

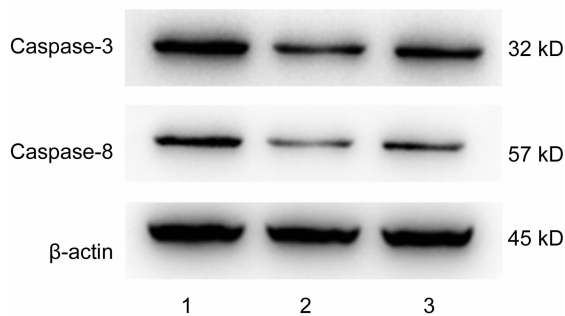
图 1 泪腺上皮细胞培养图

2 各组兔泪腺细胞中 Caspase-3、Caspase-8 表达比较(图 2、表 1) Western Blot 结果显示,与空白组比较,黄酮组及雄激素组 Caspase-3、Caspase-8 的蛋白表达降低($P < 0.01$),同时黄酮组较雄激素组的 Caspase-3、Caspase-8 表达降低($P < 0.01$)。

表 1 各组 Caspase-3、Caspase-8 蛋白表达量

组别	Caspase-3	Caspase-8
空白	3.65 ± 0.05	2.56 ± 0.02
黄酮	$2.26 \pm 0.08^* \Delta$	$1.21 \pm 0.03^* \Delta$
雄激素	$2.98 \pm 0.06^*$	$1.47 \pm 0.03^*$

注:与空白组比较, $^*P < 0.01$;与雄激素组比较, $^\Delta P < 0.01$



注: 1 为空白组; 2 为黄酮组; 3 为雄激素组

图 2 各组兔泪腺细胞中 Caspase-3、Caspase-8 蛋白表达电泳图

讨 论

干眼症常见症状有疲倦、干涩、异物感、眼痒等,严重者可引起角结膜病变,视力受损^[7]。干眼症发病机制至今未有确切的结论,但有研究显示干眼症是一种眼表慢性的自身免疫性炎症性疾病^[10],而免疫系统与细胞凋亡机制之间关系密切^[11],角膜组织上皮细胞凋亡可能通过影响免疫系统导致角膜组织上皮细胞出现干燥、变薄,引起功能减退,最终出现干眼症相关症状^[12]。

环孢素及类固醇激素可通过抑制免疫反应来治疗干眼症,但其使用后局部药物毒性所致的抑制角膜上皮再生、角膜病变、泪膜稳定性下降都是不可避免的不良反应^[13]。对症治疗中常用的人工泪液多数添加防腐剂苯扎溴铵,长期滴用会造成眼表角结膜上皮细胞的损害。此外,人工泪液所含的有效成分玻璃酸钠及羧甲基纤维素钠并非泪液固有成分,长期应用会稀释自然泪液,破坏泪膜和促进泪液释放的反射弧,引起眼部的刺激,甚至加重干眼症的症状。因此,思考一种安全有效的中医药治疗干眼症是亟待解决的问题。

中医学中,干眼是指泪液减少致白睛、黑睛干燥失泽,转动失灵,甚至黑睛混浊,自觉干涩不适的病证,属“神水将枯”、“干涩昏花症”等范畴。肝肾阴虚,致燥邪内生,伤津耗液,引发“干眼”故当代医家多从肝肾阴虚论治本病。但最新的流行病学调查中指出,中国女性患干眼症危险性远高于男性,且在 65 岁以上的人群中,这种患病无性别差异^[14]。中医学中,女性与老年人为阳虚体质,而这与患者多为女性及老年人一致。肾阳是人体阳气的根本,对各个脏腑起着温煦生化作用,因此临床上从肾阳虚论治干眼症不可忽视。淫羊藿是中医学经典的补肾阳药物,淫羊藿总黄酮是其最主要的化学成分。大量研究发现淫羊藿总黄酮具有抗

炎、调节免疫等功能^[15,16]。研究发现雄激素与黄酮类物质都是多酚类化合物,因此淫羊藿总黄酮具有拟雄激素作用^[17],且淫羊藿无明显不良反应,相关报道极少。

细胞凋亡是机体为了维持内环境稳定的一种由基因控制的细胞主动性死亡的过程,Caspases 是细胞凋亡的介导者和执行者,激活或超量表达均会引起细胞凋亡,又称凋亡蛋白酶^[18]。Caspase-3 是 Caspase 蛋白酶家族中细胞凋亡的启动者和执行者,一经活化则标志着凋亡进入不可逆阶段^[19]。正常情况下,Caspase-3 以酶原的形式存在于细胞中,凋亡程序一旦启动 Caspase-3 即被活化,激活的 Caspase-3 能使许多与细胞结构、细胞周期及 DNA 修复等相关蛋白或激酶失活,从而使细胞凋亡。Caspase-8 是多种凋亡刺激信号传递汇聚的关键节点。在细胞外途径中,死亡配体和相对应的受体结合形成死亡信号,接着再与信号传导分子相连接,形成死亡诱导信号复合物,从而使 Caspase-8 活化进而诱导细胞凋亡^[20]。由此可以看出 Caspase-3 是执行细胞凋亡的主导核心步骤,而 Caspase-8 是启动细胞凋亡的关键。

从 Western Blot 结果中发现黄酮组及雄激素组 Caspase-3、Caspase-8 的蛋白表达都较空白组显著减少,并且黄酮组对 Caspase-3、Caspase-8 的抑制作用是优于雄激素组的。以上结果表明,淫羊藿总黄酮可抑制泪腺中的 Caspase-3、Caspase-8 的表达,并与雄激素的抑制作用形成差异。淫羊藿总黄酮含药血浆很可能是通过抑制泪腺上皮细胞 Caspase-3、Caspase-8 的表达途径而达到抑制细胞凋亡的作用,这也可能是其治疗干眼症的机制之一。含雄激素培养组的 Caspase-3、Caspase-8 的表达明显高于肾虚黄酮治疗组,不难看出淫羊藿总黄酮的效果优于雄激素。但对于其以何种调控机制实现拟雄激素效应,以及拟雄激素效应后的机制如何,还需要进一步证明。

利益冲突:本实验资金由国家自然科学基金提供,无制药公司参与,不存在医药利益冲突。本课题不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Li J, Zheng K, Deng Z, et al. Prevalence and risk factors of dry eye disease among a hospital-based population in southeast China [J]. *Eye Contact Lens*, 2015, 41 (1): 44–50
- [2] 刘祖国, 王华. 关注干眼慢性疾病管理体系的建设[J]. *中华眼科杂志*, 2018, 54(2): 90–92.
- [3] Liu NN, Liu L, Li J, et al. Prevalence of and risk factors for dry eye symptom in mainland China: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Ophthalmol*, 2014, 2014: 748654.
- [4] 李艳, 于涛, 苗明三. 淫羊藿的化学、药理与临床应用分析[J]. *中医学报*, 2017, 32(4): 619–622.
- [5] 纪昕. 淫羊藿苷免疫调节作用的研究进展[J]. *河北医药*, 2016, 38(5): 753–756.
- [6] 彭俊, 欧阳云, 李文娟, 等. 密蒙花滴眼液对去势雄兔泪腺细胞炎症因子的影响[J]. *国际眼科杂志*, 2018, 18(8): 10–15.
- [7] 刘祖国主编. 干眼[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2017: 42, 82–93, 98.
- [8] 譙雁彬, 赵敏, 张新, 等. 兔泪腺上皮细胞的体外分离和培养[J]. *中华实验眼科杂志*, 2007, 25(5): 386.
- [9] 沙翔垠, 罗春云, 宋莉, 等. 雌二醇及丙酸睾酮对 H₂O₂ 诱导泪腺上皮细胞凋亡的抑制作用[J]. *中华实验眼科杂志*, 2012, 29(12): 1082–1086.
- [10] 克里木江, 柯碧莲. 干眼有病的眼表炎症机制研究进展[J]. *世界临床药物*, 2012, 33(7): 426–430
- [11] 肖小强, 陈新华. 细胞凋亡信号途径与免疫系统之间的串流[J]. *生命的化学*, 2008, 28(6): 715–718
- [12] 李娟, 金龙山, 沈贞女, 等. 细胞凋亡在干眼症发病中的作用及相关机制的研究进展[J]. *中国社区医师*, 2017, 33(28): 12–13.
- [13] 迟来婷, 曲得军. 药物的眼表损害[J]. *中国中医眼科杂志*, 2014, 24(4): 304–308.
- [14] Nelson JD, Craig JP, Akpek EK, et al. TFOS DEWS II introduction [J]. *Ocul Surf*, 2017, 15(3): 269–275.
- [15] 宋来新, 张长城, 王婷, 等. 淫羊藿总黄酮通过抑制 MAPK/NF- κ B 信号通路减轻自然衰老大鼠脑组织炎症反应[J]. *中国药理学通报*, 2017, 33(1): 84–90.
- [16] Deng Y, Long L, Wang K, et al. Icariside II, a broad-spectrum anti-cancer agent, reverses beta-amyloid-induced cognitive impairment through reducing inflammation and apoptosis in rats [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8(2): 39.
- [17] 黄秀兰, 周亚伟, 王伟. 淫羊藿黄酮类化合物药理研究进展[J]. *中成药*, 2005, 27(6): 719–721.
- [18] 张巍, 金瑛, 朱文赫, 等. 肽基脯氨酸顺反异构酶抑制剂胡桃醌对宫颈鳞癌 SiHa 细胞凋亡的作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2015, 31(3): 543–546.
- [19] 王正引, 郭明章, 陈燕. 四物汤对血虚证小鼠肝细胞凋亡相关分子 Caspase-3 及 Caspase-8 表达的影响[J]. *陕西中医药大学学报*, 2017, 40(6): 98–102.
- [20] Brasseur K, Auger P, Asselin E, et al. Parasporin-2 from a new bacillus thuringiensis 4R2 strain induces Caspases activation and apoptosis in human cancer cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0135106.

(收稿: 2018–09–11 在线: 2020–01–14)

责任编辑: 汤 静