

ZnSO₄ 对紫外线诱导的大鼠晶状体氧化损伤的保护作用

季阳, 刘丹

作者单位:(121001) 中国辽宁省锦州市, 辽宁医学院附属第一医院眼科

作者简介: 季阳, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 白内障。

通讯作者: 刘丹, 女, 主任医师, 教授, 主任, 硕士研究生导师, 研究方向: 白内障的基础与临床研究. yankeliudan@ yahoo. com. cn

收稿日期: 2011-06-03 修回日期: 2011-08-09

Protective effect of ZnSO₄ on ultraviolet-induced oxidative damage of rat lens

Yang Ji, Dan Liu

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Dan Liu. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China. yankeliudan@ yahoo. com. cn

Received: 2011-06-03 Accepted: 2011-08-09

Abstract

• **AIM:** To investigate the protective effect of ZnSO₄ on ultraviolet-induced oxidative damage of rat lens.

• **METHODS:** Rat lens were randomly divided into 3 groups: negative control group (normal group), positive control group (UV radiation group) and experimental group (treated by UV radiation and ZnSO₄). After cultured, the turbid level of lens was observed; the contents of glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD) in tissue as well as the expression changes of heat shock protein 70 (HSP70) in rat lens epithelial cells were determined.

• **RESULTS:** The turbid level of lens in experimental group was lower than that in positive control group at the same time, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The expression of HSP70 in experimental group significantly increased after UV radiation, there was significant difference compared with that in positive control group ($P < 0.05$). The contents of GSH-Px and SOD in positive control group were much lower than that in negative control group, the differences were statistically significant ($P < 0.05$), while the contents of GSH-Px and SOD in experimental group were significantly higher than that in positive control group, the differences were statistically significant ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** ZnSO₄ can induce HSP70 expression in rat lens epithelial cells, which may play a vital role in lens oxidative damage protection.

• **KEYWORDS:** ZnSO₄; heat shock protein 70; lens epithelial cells; ultraviolet

Ji Y, Liu D. Protective effect of ZnSO₄ on ultraviolet-induced oxidative damage of rat lens. *Guji Yanke Zazhi(Int J Ophthalmol)* 2011;11(10):1704-1706

摘要

目的:探讨 ZnSO₄对紫外线诱导的大鼠晶状体氧化损伤的保护作用。

方法:离体培养大鼠晶状体,随机分为三组:(1)阴性对照组(正常组);(2)阳性对照组(紫外线照射);(3)实验组(紫外线照射+ZnSO₄)。观察晶状体的混浊程度,晶状体组织中 GSH-Px 和 SOD 的含量,晶状体上皮细胞中 HSP70 表达的变化。

结果:实验组晶状体混浊程度较同时段阳性对照组轻,差异有统计学意义($P < 0.05$)。紫外线照射后,晶状体上皮细胞中 HSP70 的表达明显增加,实验组晶状体上皮细胞中 HSP70 的表达较同时段的阳性对照组显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。阳性对照组中 GSH-Px 和 SOD 含量显著低于同时段阴性对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);实验组中 GSH-Px 和 SOD 含量明显高于同时段阴性对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

结论:在晶状体中,ZnSO₄可诱导 HSP70 的表达进而对晶状体的氧化损伤起到保护作用。

关键词: ZnSO₄; HSP70; 晶状体上皮细胞; 紫外线

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2011. 10. 005

季阳, 刘丹. ZnSO₄对紫外线诱导的大鼠晶状体氧化损伤的保护作用. 国际眼科杂志 2011;11(10):1704-1706

0 引言

白内障是全球第1位致盲眼病,随着全球人口的不断增加,白内障的患病人口总数在不断上升。尽管现代手术为白内障的治疗提供了最终治疗的有效手段,可以提高患者的视力,但手术的风险、严重的并发症以及由此而引起的经济问题仍不能忽视。白内障仍需寻求药物治疗以阻止和延缓其进展^[1]。白内障的致病因素有很多,其中紫外线辐射是主要的致病因素之一。大量的研究已经证明,HSP70在紫外线和氧化损伤所致白内障的晶状体上皮细胞中处于高表达的水平,在晶状体上皮细胞的凋亡和晶状体蛋白变性等方面具有积极的保护作用^[2]。锌是人体必需的微量元素之一,国内外关于锌对HSP70影响的研究开展较多,但锌对晶状体上皮细胞中HSP70表达的影响还需进一步讨论。本实验通过观察ZnSO₄对紫外线诱导的大鼠晶状体上皮细胞中HSP70, GSH-Px和SOD含量的影响,研究ZnSO₄对晶状体氧化损伤的保护作用,为白内障的防治提供了新的研究方向。

1 材料和方法

1.1 材料 健康SD大鼠72只,200~250g,雌雄不限(辽宁医学院实验动物中心),实验前双眼前节检查均正常。

表 1 各组晶状体培养不同时间段相对灰度值的比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组	3h	6h	12h	24h
阴性对照组	40.04 ± 1.01	40.27 ± 1.43	39.65 ± 1.05	42.84 ± 2.07
阳性对照组	17.92 ± 0.78 ^a	13.80 ± 0.74 ^a	7.88 ± 0.48 ^a	2.92 ± 0.45 ^a
实验组	35.26 ± 0.84 ^c	23.54 ± 0.44 ^c	18.92 ± 0.72 ^c	13.85 ± 0.12 ^c

^a $P < 0.05$ vs 阴性对照组; ^c $P < 0.05$ vs 阳性对照组。

表 2 各组晶状体中 GSH-Px 和 SOD 的含量 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组	SOD				GSH-Px			
	3h	6h	12h	24h	3h	6h	12h	24h
阴性对照组	23.89 ± 0.32	22.99 ± 0.57	24.23 ± 0.34	23.65 ± 0.39	7.28 ± 0.17	7.52 ± 0.34	6.66 ± 0.34	7.23 ± 0.17
阳性对照组	12.69 ± 0.27 ^a	10.76 ± 0.14 ^a	6.03 ± 0.12 ^a	4.80 ± 0.17 ^a	4.36 ± 0.29 ^a	3.51 ± 0.21 ^a	1.41 ± 0.85 ^a	0.84 ± 0.07 ^a
实验组	15.62 ± 0.33 ^c	13.41 ± 0.26 ^c	8.16 ± 0.24 ^c	6.42 ± 0.29 ^c	5.51 ± 0.19 ^c	5.26 ± 0.30 ^c	3.45 ± 0.31 ^c	1.56 ± 0.09 ^c

^a $P < 0.05$ vs 阴性对照组; ^c $P < 0.05$ vs 阳性对照组。

GSH-Px 和 SOD 试剂盒(南京建成生物制品有限公司),硫酸锌($ZnSO_4$), MEM 培养液,胎牛血清,鼠抗兔 HSP70 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司),UV 光源选用 250W 高压汞灯(UV-A, UV-B 混合光源), CO_2 培养箱,超净工作台等。

1.2 方法

1.2.1 离体晶状体的培养 将 SD 大鼠颈椎脱臼法处死,摘除眼球,把眼球浸泡在 750mL/L 乙醇中,然后用抗生素液(320kU/L 庆大霉素的 PBS 溶液)浸泡 10min。超净工作台上置于含二抗(100kU/L 青霉素,0.1g/L 链霉素)的 PBS 溶液中,从眼球后壁剪开巩膜,钝性离断晶状体悬韧带,将晶状体取出,剔除晶状体周围的残留组织,放入每孔盛有 1mL MEM 培养液(含 100mL/L 胎牛血清,100kU/L 青霉素,0.1g/L 链霉素)的 24 孔培养板中,置于 37℃,95% 湿度,50mL/L CO_2 培养箱中,培养 8h 后,取出透明的晶状体用于实验。

1.2.2 实验分组 将用于实验的晶状体随机分为 3 组:(1)阴性对照组(48 只晶状体),加含 100mL/L 胎牛血清的 MEM 培养液;(2)阳性对照组(48 只晶状体),加含 100mL/L 胎牛血清的 MEM 培养液;(3)实验组(48 只晶状体),加含 100mL/L 胎牛血清,1mmol/L $ZnSO_4$ 的 MEM 培养液。将阳性对照组和实验组的晶状体置于紫外线垂直光源下方 50cm 处,撤去培养板盖,晶状体表面液体保留 1mm,其余液体移走,照射 30min;将阴性对照组置于同室同条件无紫外线照射下 30min。然后将晶状体放入培养箱中继续培养,分别于 3,6,12,24h 各取出 12 只进行实验。

1.2.3 晶状体混浊程度的观察 在白色背景下画一宽 1mm,间距 5mm 的垂直交叉的黑色线条,将被检晶状体置于“+”字交叉的黑色线条背景之上照相,用 Adobe Photoshop 10.0 软件分析图像中每个交叉点的平均灰度值和邻近交叉点的白色背景的平均灰度值,两者之差即为相对灰度值,对各组晶状体相对灰度值进行统计学分析。

1.2.4 晶状体中 GSH-Px 和 SOD 含量的检测 取晶状体组织称重,用冷生理盐水制成 100mL/L 组织匀浆,4℃ 3 000r/min,离心 15min,取上清液,测定 GSH-Px 和 SOD 含量,检测方法和所用试剂均按南京建成生物工程研究所生产的试剂盒进行。

1.2.5 免疫印迹法检测晶状体上皮细胞中 HSP70 的表达 将晶状体中加入裂解液,匀浆,冰上裂解 30min,4℃

12 000r/min,离心 30min,吸取上清液。用 BCA 法测定上清液中蛋白质的含量。制备样本,进行凝胶电泳,结束后将蛋白质转至 PVDF 膜上,取出 PVDF 膜,用洗膜液洗 1 次后置于封闭液中,放在摇床上缓慢摇 1h。倒掉封闭液,用洗膜液清洗一次,加入稀释的一抗(1:500),在摇床上缓慢摇 2h。取出 PVDF 膜,用洗膜液洗膜 10min × 3 次,倒掉洗膜液后加入稀释的二抗(1:500),在摇床上缓慢摇 1h,取出 PVDF 膜,用洗膜液洗膜 10min × 3 次,倒掉洗膜液后,ECL 显色将条带放入拍摄设备内照相,对图像进行分析,记录平均灰度值。

统计学分析:使用 SPSS 17.0 软件包对数据进行统计分析,数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 描述,采用析因设计的方差分析、单因素方差分析对各组资料进行统计学分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 晶状体混浊程度 阴性对照组大鼠晶状体混浊程度无明显变化,保持透明;阳性对照组大鼠晶状体随着培养时间的延长,晶状体混浊程度逐渐加重;实验组大鼠晶状体比同时段阳性对照组大鼠晶状体混浊程度轻。各组晶状体相对灰度值分析结果见表 1,阳性对照组与同时段阴性对照组比差异有统计学意义($P < 0.05$),实验组与同时段阳性对照组比差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 晶状体中 GSH-Px 和 SOD 的含量 阳性对照组中 GSH-Px 和 SOD 含量显著低于同时段阴性对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);实验组中 GSH-Px 和 SOD 含量明显高于同时段阳性对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$,表 2)。

2.3 晶状体上皮细胞中 HSP70 的表达 阴性对照组中 HSP70 表达无明显变化;阳性对照组中晶状体上皮细胞中 HSP70 表达明显增加,在 6h 时达到高峰,以后逐渐减少;实验组中 HSP70 表达比同时段阳性对照组多(图 1)。实验组与同时段阴性对照组比差异有显著性意义($P < 0.05$),实验组与同时段阳性对照组比差异有显著性意义($P < 0.05$,表 3)。

3 讨论

紫外线引起白内障的发生已在许多流行病学调查和实验研究中得到证实^[3]。长期的紫外线照射可作用于紫外线的敏感成分,产生活性氧自由基,透明晶状体本身存在的防御系统虽然有足够的保护能力,但当积累的效应超过一个临界值时,平衡遭到破坏,晶状体发生损伤导致白

表3 各组晶状体培养不同时间时 HSP70 表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组	3h	6h	12h	24h
阴性对照组	0.0772 ± 0.0211	0.0836 ± 0.0379	0.0808 ± 0.0245	0.0913 ± 0.2450
阳性对照组	0.3226 ± 0.1183 ^a	0.4636 ± 0.0582 ^a	0.2544 ± 0.0683 ^a	0.1046 ± 0.0407 ^a
实验组	0.6079 ± 0.1259 ^c	1.3100 ± 0.3367 ^c	0.8699 ± 0.1832 ^c	0.5049 ± 0.0958 ^c

^a $P < 0.05$ vs 阴性对照组; ^c $P < 0.05$ vs 阳性对照组。

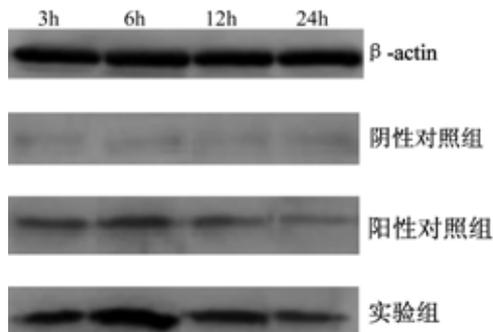


图1 培养不同时间各组晶状体上皮细胞中 HSP70 的表达。

内障^[4]。热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)最初的发现是细胞在物理刺激下产生的一种应激蛋白,随后的大量研究发现,HSPs 是一切生物体在多种应激状态下(如高温、重金属、缺氧、乙醇、病毒感染等)合成增加的一种在进化上高度保守的细胞应激蛋白^[5]。HSPs 按其分子量可分为 HSP90 家族(分子量约 83 ~ 110kU)、HSP70 家族(分子量约 66 ~ 78kU)、HSP60 家族及相对小分子量 smHSP 家族(分子量约 12 ~ 43kU)^[6]。HSP70 是热休克蛋白家族中研究较为广泛的一种,它们广泛参与机体和细胞的各种活动,具有多种生物学功能,包括参与免疫反应、抗氧化功能、提高细胞的应激耐受性、参与细胞骨架的形成和修复等,在细胞的信息传递、生长、分化中具有重要的调控作用,保护并促进机体和细胞从各种刺激所造成的损伤中自身修复^[7]。晶状体蛋白表达与结构的异常与白内障的形成有着密切的关系。晶状体中可以表达多种 HSPs,它们对于维持晶状体的透明与结构的稳定起着关键性的作用^[8]。Bagchi 等^[9,10]通过研究发现 HSP40 和 HSP70 表达在胚胎鸡和成年鸡的晶状体全层,其随后的研究证实人眼中 HSP40 和 HSP70 只见于晶状体上皮细胞和前皮质纤维,并随着年龄的增大而下降,推测其下降可能与年龄相关性白内障的发病有关。Yao 等^[11]实验研究证实,在外伤性白内障的大鼠晶状体中 HSP70 的表达明显高于对照组,推测 HSP70 对外伤性晶状体蛋白的变性起到保护作用。锌为机体生长发育所必需的微量元素之一,是多种代谢酶类的辅助成分。此外有研究表明,锌还以各种锌蛋白的结构方式参与基因复制、转录及蛋白合成的调控^[12]。锌对 HSPs 的诱导是通过改变热休克基因转录因子的结构,使其直接活化,并促使其与热休克成分(heat shock element, HSE)结合,启动 HSPs 基因的转录活化,促进 HSPs 的大量

合成。原春辉等^[13]研究证实,外源性应用恰当剂量的 ZnSO₄能增加胰腺组织 HSP70 的含量,对移植胰腺再灌注损伤起到保护作用。

在紫外线氧化损伤存在的条件下,实验组加入 ZnSO₄后大鼠晶状体的透明度及 GSH-Px 和 SOD 的含量明显高于同时段阳性对照组,实验组中 HSP70 的表达明显高于同时段阳性对照组,说明 ZnSO₄可诱导大鼠晶状体上皮细胞中 HSP70 的表达,实现了其对晶状体的保护作用,延缓了晶状体的氧化损伤,但是 ZnSO₄的给药方式及给药浓度尚需进一步讨论。

参考文献

- 1 Babizhayev MA, Deyev AL, Yermakova VN, et al. Lipidperoxidation and cataracts; N-acetylcarnosine as a therapeutic tool to manage age-related cataracts in human and in canine eyes. *Drugs RD* 2004;5(3):125-139
- 2 刘瑜,鲁建华,张文芳,等. 谷氨酰胺体外对大鼠晶状体上皮细胞 HSP70 和 NF-κB 表达的影响. *国际眼科杂志* 2010;10(9):1662-1664
- 3 崔蓓,付清,柳林,等. 紫外线辐射致大鼠白内障模型的建立. *国际眼科杂志* 2009;9(5):836-838
- 4 Okuno T. Ultraviolet action spectrum for cell killing in a human lens epithelial cell line. *Industrial Health* 2007;45(1):137-142
- 5 周星利,亢泽峰,李凌,等. 热休克蛋白与白内障发生的研究进展. *国际眼科杂志* 2008;8(4):788-790
- 6 仝佳,王胜军,肖寿华. 热休克蛋白及其在眼部疾病中作用的研究进展. *国际眼科杂志* 2006;6(1):152-157
- 7 蔡方刚,吴捷,詹腾辉,等. 热休克蛋白 HSP70 在自体静脉移植中表达的动态变化. *中国现代医学杂志* 2010;20(2):214-216
- 8 马颖,邵彦. 热处理对 STZ 诱导糖尿病性白内障大鼠晶状体上皮细胞生物学特性的影响. *眼科新进展* 2007;27(10):754-757
- 9 Bagchi M, Katar M, Maisel H. A heat shock transcription factor like protein in the nuclear matrix compartment of the tissue cultured mammalian lens epithelial cell. *J Cell Biochem* 2001;80(3):382-387
- 10 Bagchi M, Katar M, Maisel H. Heat shock proteins of adult and embryonic human ocular lenses. *J Cell Biochem* 2002;84(2):278-284
- 11 Yao K, Rao H, Tang X, et al. Expression of Hsp70 and Hsp27 in lens epithelial cells in contused eye of rat modulated by thermotolerance or quercetin. *Mol Vis* 2006;12:445-450
- 12 Satoh M, Shimoda Y, Akatsu T, et al. Elevated circulating levels of heat shock protein 70 are related to systemic inflammatory reaction through monocyte toll signal in patients with heart failure after acute myocardial infarction. *Eur J Heart Failure* 2006;8(8):810-815
- 13 原春辉,修典荣,李丽君,等. 硫酸锌对大鼠移植胰腺再灌注损伤的保护作用. *中国普通外科杂志* 2008;17(11):1093-1096