

- 7 陆再英, 钟南山. 内科学[M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 778 - 779
- 8 Stamatelopoulos KS, Armeni E, Georgiopoulos G, *et al.* Recently postmenopausal women have the same prevalence of subclinical carotid atherosclerosis as age and traditional risk factor matched men [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 221: 508 - 513
- 9 Rundek T, Arif H, Boden - Albala B, *et al.* Carotid plaque, a sub-clinical precursor of vascular events: the Northern Manhattan Study [J]. *Neurology*, 2008, 70: 1200 - 1207
- 10 Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, *et al.* Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima - media thickness: a systematic review and meta - analysis [J]. *Circulation*, 2007, 115: 459 - 467
- 11 Karason K, Wikstrand J, Sjostrom L, *et al.* Weight loss and progression of early atherosclerosis in the carotid artery: a four - year controlled study of obese subjects [J]. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1999, 23: 948 - 956
- 12 Singh AS, Atam V, Patel ML, *et al.* Carotid intima media thickness as a reflection of generalized atherosclerosis is related to body mass index in ischemic stroke patients [J]. *N Am J Med Sci*, 2013, 5: 228 - 234
- 13 De Michele M, Panico S, Iannuzzi A, *et al.* Association of obesity and central fat distribution with carotid artery wall thickening in middle - aged women [J]. *Stroke*, 2002, 33: 2923 - 2928
- 14 Takami R, Takeda N, Hayashi M, *et al.* Body fatness and fat distribution as predictors of metabolic abnormalities and early carotid atherosclerosis [J]. *Diabetes Care*, 2001, 24: 1248 - 1252
- 15 Hassinen M, Lakka TA, Komulainen P, *et al.* Association of waist and hip circumference with 12 - year progression of carotid intima - media thickness in elderly women [J]. *Int J Obes (Lond)*, 2007, 31: 1406 - 1411
- (收稿日期: 2013 - 11 - 14)
(修回日期: 2013 - 11 - 25)

石决明提取液对晶状体抗氧化能力的影响

崔丽金 徐国兴

摘 要 **目的** 研究石决明提取液对人晶状体抗氧化能力的影响。**方法** 采用双氧水干预体外培养人晶状体上皮细胞造成氧化损伤模型, 同时加入不同浓度的石决明提取液, 应用对照实验研究, 分成空白对照组、阳性对照组即双氧水组 and 不同浓度的石决明干预组, 于 1、3、5 天用 CCK - 8 检测各组人晶状体上皮细胞增殖能力, 3 天后用化学比色法检测 SOD、GSH 和 MDA 的水平。**结果** 不同时间点时各实验组间 HLECs 增殖能力存在变化, 各组间比较差异具有统计学意义 (1 天时, $F = 23922.421$, $P < 0.01$; 3 天时, $F = 120605.864$, $P < 0.01$; 5 天时, $F = 150939.452$, $P < 0.01$)。H₂O₂ 使细胞的增殖能力降低, 石决明提取液使其提高, 且在一定的时间和浓度范围内具有依赖性, 其中以第 3 天时 0.1% 组最佳。双氧水组损伤后, 人晶状体上皮细胞中 SOD、GSH 水平降低而 MDA 含量增高, 石决明组提高了氧化损伤的人晶状体上皮细胞的抗氧化水平, 减少脂质过氧化物的升高程度, 差异具有统计学意义 (SOD: $F = 983.042$, $P < 0.01$; GSH: $F = 444.446$, $P < 0.01$; MDA: $F = 830.523$, $P < 0.01$)。**结论** 石决明提取液可提高人晶状体的抗氧化能力。

关键词 石决明 氧化损伤 超氧化物歧化酶 还原型谷胱甘肽 丙二醛

[中图分类号] R737 [文献标识码] A

Effect of Extract of Concha Haliotidis on Anti-oxidative Ability of Human Lens Epithelial Cells in Vitro. Cui Lijin, Xu Guoxing. *Fujian Institute of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fujian 350005, China*

Abstract Objective To study the antioxidation effect of water extract of concha haliotidis on human lens epithelial cells cultured in vitro. **Methods** Cultured human lens epithelial cells in vitro were divided into control group, the positive control group (hydrogen peroxide group) and the treated group. Oxidative damage model was established by culturing human lens epithelial cells with hydrogen peroxide. The human lens epithelial cells in the blank control group were cultured with H₂O₂. The human lens epithelial cells in the positive control group were cultured with hydrogen peroxide. The human lens epithelial cells in the treated group were cultured with hydrogen peroxide and different concentrations of concha haliotidis extractive. On the first, the third and the fifth day, the proliferation of cultured human lens epithelial cells were detected with CCK - 8. On the third day the level of SOD, GSH and MDA were detected with chemical colorimetric.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81070715); 福建省创新平台基金资助项目 (2010Y2003)

作者单位: 350001 福州, 福建医科大学附属第一医院、福建省眼科研究所

通讯作者: 徐国兴, 教授, 博士生导师, 电子信箱: zjfmuxg@pub5.fz.fj.com

Results The proliferation of HLECs varied at different time points. The different among groups was statistical significance (1 day, $F = 23922.421, P < 0.01$; 3 day, $F = 120605.864, P < 0.01$; 5 day, $F = 150939.452, P < 0.01$). H_2O_2 reduced the proliferation of HLECs, while concha halitidis extractive promoted its vitality, at certain range of time and concentrations with a manner of time dependent manner and concentration dependent. The best manner was 0.1% at the third day. After adding H_2O_2 , the SOD and GSH level of HLECs reduced but the MDA increased. Concha halitidis improved oxidation resistance and decread the lipid peroxidation in oxidative damaged HLECs. The difference between had a statistical significance (SOD: $F = 983.042, P < 0.01$; GSH: $F = 444.446, P < 0.01$; MDA: $F = 830.523, P < 0.01$). **Conclusion** The concha halitidis extractive can significantly improve the anti-oxidation function in human lens epithelial cells.

Key words Concha halitidis extractive; Oxidative damage; Superoxide dismutase (SOD); Glutathione (GSH); Malondialdehyde (MDA)

白内障是中国乃至全世界的首位致盲眼病,氧化损伤在白内障的发生、发展中起重要作用。石决明性味咸而微寒,入肝、肺、肾三经,为清肝明目、平肝潜阳之药,可用治目赤翳障、青盲雀目、怕光羞明、视物昏花等各种虚实眼科疾患^[1]。石决明自古以来即为清肝明目、退翳除障之药,已有石决明的复方制剂用于防治白内障的实验室研究^[2,3]。本研究通过体外培养氧化损伤的人晶体上皮细胞探讨其抗氧化损伤的作用。

材料与方法

1. 材料:(1)实验细胞:人晶状体上皮细胞(human lens epithelial cells, HLECs SRA01/04)(上海复蒙基因生物技术有限公司)。(2)石决明中药水提取液:福建医科大学眼科研究院提供。(3)试剂:DMEM/HIGH GLUCOSE (1×)、胎牛血清(美国 Hyclone 公司);0.25% 胰蛋白酶-0.02% EDTA (美国 Gibco 公司);3% H_2O_2 (南昌白云药业有限公司);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测试盒、还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)测试盒和丙二醛(malondialdehyde, MDA)测试盒和 Bradford 蛋白质定量试剂(自南京建成生物工程研究所);CCK-8、PMSF (100mmol/L)、Western 及 IP 细胞裂解液(碧云天生物技术研究)。 (4)仪器: BIO-RAD 550 型酶标仪(美国), 722G 可见分光光度计, DT5-3 型台式低速自动平衡离心机(北京), 台式高速冷冻离心机(德国), AIR-TECH BCM-1000A 型生物洁净工作台(苏州), THERMO FORMA 311 型水套式 CO_2 培养箱(美国), OLYMPUS 1×70 荧光倒置相差显微镜(日本), 数显恒温水浴锅, SHE-Ⅲ型循环真空泵。

2. 方法:(1)实验分组:人晶体上皮细胞(HLECs)加入含 10% 胎牛血清的 DMEM-HG 培养基中,置于 37℃、100% 湿度和 5% CO_2 的培养箱中培养。细胞生长至接近瓶底约 80% 时及时冻存或传代,按 1:3~1:4 传代。实验分组:①空白对照组:HLECs+DMEM 维持液;②阳性对照组:HLECs+DMEM 维持液+0.15mmol/L H_2O_2 ;③石决明实验组:HLECs+DMEM 维持液+0.15mmol/L H_2O_2 +不同浓度的石决明提取液(分别为 0.001%、0.01%、0.1%、0.3%)。(2)CCK-8 法检测不同浓度石决明提取物对 HLECs 增殖能力的影响:消化

并收集生长状态良好、呈对数生长期的 HLECs,接种于 96 孔培养板中,细胞密度为 8×10^4 个/毫升,置于 37℃、100% 湿度和 5% CO_2 的培养箱中培养 1 天,弃去培养液,按照上述实验分组,需 H_2O_2 干预的组别用 H_2O_2 干预 3h,同时加不同浓度的石决明与细胞共培养 1、3 和 5 天后除去旧的培养液,各组培养板分别加入 10μl CCK-8 和 90μl 培养基的混合液,置于培养箱中继续孵育 1h 后于全自动酶标仪上 450nm 波长比色测定,测定各组的吸光值,即 OD 值。细胞活力(%)=(实验组平均 OD 值-空白组平均 OD 值)/(正常组平均 OD 值-空白组平均 OD 值)×100%。(3)检测石决明提取物对 HLECs 中 SOD、GSH、MDA 水平的影响:消化并收集生长状态良好、呈对数生长期的 HLECs,接种于 6 孔培养板中,细胞培养及实验分组同上。按实验分组加 H_2O_2 干预 3h,同时加浓度为 0.1% 的石决明提取液与细胞共培养 5 天后除去旧的培养液,各组各自消化 4℃ 低温离心,加入 300μl 冷的生理盐水,在冰浴中匀浆 3min 左右,按说明书的要求用分光光度计检测匀浆液中 SOD 活力、GSH 和 MDA 含量。

3. 统计学方法:应用 SPSS 17.0 统计软件分析,用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,单因素方差分析进行样本均数间的多重比较,组间两两比较采用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 不同浓度及时间点石决明提取液对 HLECs 增殖能力的影响:据不同时间点各实验组 HLECs 活力存在变化,且各组间比较差异具有统计学意义(1 天时, $F = 23922.421, P < 0.01$; 3 天时, $F = 120605.864, P < 0.01$; 5 天时, $F = 150939.452, P < 0.01$)。从而得出图 1,可见 H_2O_2 使细胞的活力降低,石决明提取液对 H_2O_2 引起的晶状体上皮细胞氧化损伤具有保护作用,提高其活力,且在一定的时间和浓度范围内具有浓度依赖性。当石决明提取液浓度升高到 0.1%,作用时间维持达到 3 天时,细胞的活力达到最高。

2. 石决明提取液对 HLECs 中 SOD、GSH、MDA 水平的影响:应用化学比色法检测空白对照组、阳性对照组和 0.1% 石决明实验组 HLECs 中 SOD、GSH、MDA 水平显示,SOD、GSH 在空白对照组中最高,阳

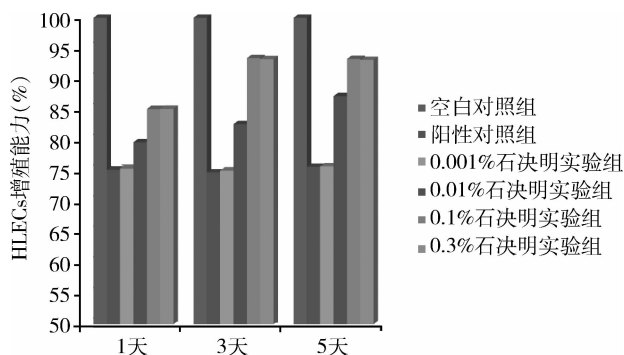


图1 不同浓度及时间点石决明提取液对 HLECs 活力的影响

性对照组中的活力最低,3组间的差异具有统计学意义($P < 0.01$)。MDA在阳性对照组中的含量最高,0.1%石决明实验组次之,空白对照组最低,3组间差异具有统计学意义($P < 0.01$,表1)。

表1 石决明提取液对氧化损伤的 HLECs 中 SOD 活力、GSH 和 MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	SOD 活力 (U/mg)	GSH 含量 (mg/g)	MDA 含量 (nmol/mg)
空白对照组	212.14 ± 2.09	25.37 ± 0.74	10.89 ± 0.40
阳性对照组	158.05 ± 2.12	15.05 ± 0.61	18.11 ± 0.27
石决明实验组	188.64 ± 3.02	21.05 ± 0.73	14.16 ± 0.39

组间 SOD 活力、GSH 含量、MDA 含量比较, $P < 0.01$

讨 论

氧自由基损伤是老年性白内障首位危险因素,晶状体内自由基主要是超氧阴离子自由基、羟自由基、 H_2O_2 ,其中羟自由基损害最严重,但超氧阴离子自由基、羟自由基半衰期短,而 H_2O_2 相对较稳定,且可以从一处转移到另一处,在 SOD、过渡金属(Fe^{2+} 、 Cu^{+})存在下发生歧化。本实验应用 H_2O_2 与人晶状体上皮细胞共培养造成体外培养晶状体上皮细胞氧化损伤模型^[4,5]。各种理化因素均可通过不同途径导致晶状体自由基产生,如自由基产生过多或清除障碍,均可导致自由基聚积。自由基最先损害的靶目标是晶状体上皮细胞,其次是晶状体纤维。晶状体上皮细胞是抗氧化损伤的活性中心,通过两个途径发挥抗氧化的作用。第1个途径是以还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)、抗坏血酸和维生素 E 等抗氧化剂为代表的清除自由基机制^[6]。GSH是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸组成的三肽,分子中半胱氨酸的巯基是该化合物的主要功能基团,巯基具有还原性,作为体内重要还原剂保护蛋白质或酶分子中的巯基免遭氧化,

使蛋白质或酶处于活性状态。在哺乳动物体内,晶状体是富含 GSH 的组织之一。抗氧化酶系是晶状体另一个抗氧化屏障,主要是谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和 SOD。生理状态下晶状体中氧化和抗氧化二者处于动态平衡,但当机体氧化物质产生过多或清除这些物质的能力下降时,晶状体将受到损伤,表现在 GSH、SOD 含量大幅度下降^[7]。

实验中从 CCK-8 检测各实验分组不同时间点细胞增殖情况的统计数据得出的图 1 可见: H_2O_2 使细胞的增殖能力降低,石决明提取液对 H_2O_2 引起的晶状体上皮细胞氧化损伤具有保护作用,提高其增殖能力,恢复细胞活力,且在一定的时间和浓度范围内具有浓度依赖性。当石决明提取液浓度升高到 0.1%,作用时间维持达到 3 天时,细胞的增殖能力最高,活力达最佳。

本实验研究结果显示相对于空白对照组,阳性对照组中晶状体上皮细胞内的 SOD 活力和 GSH 含量降低,提示其抗氧化系统活力减弱,说明 H_2O_2 对晶状体上皮细胞具有氧化损伤作用,石决明组使晶状体上皮细胞中降低的 SOD 活力和 GSH 含量有所回升,说明石决明对氧化损伤的晶状体上皮细胞中抗氧化系统有保护作用,这与石决明对白内障大鼠晶体中 SOD、GSH 及 GSH-PX 的影响结果相一致^[8]。相较于空白对照组,阳性对照组中晶状体上皮细胞中 MDA 明显增多,提示 H_2O_2 使晶体上皮细胞受到氧化损伤,使晶体细胞内脂质过氧化产物堆积,石决明组中氧化损伤的晶体细胞内 MDA 增多有所减轻,降低的 SOD 活力和 GSH 含量有所回升,说明石决明可能是通过保护晶状体细胞内的抗氧化系统,促进上皮细胞清除自由基,从而减轻细胞的氧化损伤,使 MDA 增多有所减少,减轻脂质过氧化产物对细胞膜及蛋白质等的攻击,使晶状体上皮细胞避免氧化损伤,从而可能具有潜在的抗氧化作用。据相关的石决明炮制工艺的研究提示,石决明提取液的主要成分为多种离子,包括 Ca、Fe、Zn、Cu、Mn 等^[9]。有研究表明 Fe、Mn、Zn 等离子在不同时间点对蚯蚓体内外的抗氧化酶有不同程度的激活或抑制作用^[10]。石决明提取液可能是通过其内的离子对酶的活性产生激活,从而在一定程度上保护细胞免受氧化损伤,提高其活力。

参考文献

- 1 温暖荣. 石决明散在眼科应用举隅[J]. 中西医结合眼科志, 1997, 15(1): 59

- 2 徐国兴,林媛,王婷婷,等.石决明药理研究及眼科应用进展[J]. 国际眼科杂志,2009,9(12):2389-2390
- 3 刘静霞,张晓冬,吕瑞民,等.决明退障丸对亚硒酸钠性白内障大鼠脂质过氧化的影响[J].中国中医药科技,2005,12(3):143-145
- 4 Gajjar D, Patel D, Alapure B, *et al.* Rapid action of oestradiol against hydrogen peroxide induced oxidative stress in cataractous lens epithelium: an in vitro study[J]. *Eye (Lond)*, 2009, 23(6):1456-1463
- 5 Löfgren S, Fernando MR, Xing KY, *et al.* Effect of thioltransferase (glutaredoxin) deletion on cellular sensitivity to oxidative stress and cell proliferation in lens epithelial cells of thioltransferase knockout mouse [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(10):4497-4505
- 6 Reddan JR, Giblin FJ, Kadry R, *et al.* Protection from oxidative insult in glutathione depleted lens epithelial cells[J]. *Exp Eye Res*, 1999, (68):117-127
- 7 张伟,陈翠真.牛磺酸对亚硒酸钠性白内障抑制作用的实验研究[J].中华眼科杂志,1998,34:208-210
- 8 祁磊,林媛,徐国兴,等.石决明对大鼠白内障晶状体中 SOD 和 GSH 及 GSH-PX 的影响[J].国际眼科杂志,2011,12(11):2085-2087
- 9 王文凯,彭小平.石决明炮制研究[J].中成药,2004,26(5):377-379
- 10 Naqai N, Ito Y, Takeuchi N. Correlation between hyper-sensitivity to hydro-gen peroxide and low defense against Ca^{2+} influx in cataractogenic lens of ihara cataract rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34(7):1005-1010
- (收稿日期:2013-11-02)
(修回日期:2013-11-11)

siRNA 沉默 PACE4 基因对乳腺癌 MCF-7 细胞生物学行为的作用

王菲菲 王 林 潘继红

摘 要 **目的** 研究 siRNA 沉默 PACE4 基因对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、迁移以及细胞周期的影响。**方法** 利用人工合成的 siRNA 特异性抑制 PACE4 在乳腺癌 MCF-7 细胞中的表达,瞬时转染 24h 和 36h 后分别利用 real-time PCR 和 Western blot 的方法检测沉默效率;MTT、细胞划痕和流式细胞术等方法测定干扰 PACE4 表达后对细胞的增殖、迁移和细胞周期的影响。**结果** 转染特异性 siRNA-PACE4 后,与对照组相比,在 36h 时,mRNA 水平和蛋白水平抑制效果最明显($P < 0.01$, $P < 0.05$);MCF-7 细胞的生长受到抑制($P < 0.05$),且细胞的迁移力($P < 0.05$)也明显下降,但是对细胞周期的影响不明显。**结论** PACE4 在乳腺癌细胞的异常增殖和迁移中发挥一定作用,为进一步探讨乳腺癌的发病机制奠定了基础。

关键词 siRNA 枯草杆菌样蛋白原转化酶 4 人乳腺癌 MCF-7 细胞 生物学行为

[中图分类号] R737 [文献标识码] A

Effect of Silience of PACE4 Gene by siRNA on the Biological Behavior of Breast Cancer MCF-7 Cells. Wang Feifei, Wang Lin, Pan Jihong. Shandong Medicinal and Biotechnology Center, Key laboratory for Biotech-Drugs Ministry of Health, Key Laboratory for Rare & Uncommon Diseases of Shandong Province, Shandong Academy of Medical Sciences; College of Medical and Life Sciences, Jinan University & Shandong Academy of Medical Sciences, Shandong 250062, China

Abstract Objective To investigate the effects of siRNA on the proliferation, migration and cell cycle of PACE4 in breast cancer MCF-7 cells. **Methods** We used the synthetic siRNA to inhibit the expression of PACE4 specifically by transient transfection in the breast cancer MCF-7 cells and detected at 24h and 36h respectively by real-time PCR and Western blot to confirm the silencing efficiency. MTT method was used to determine cell proliferation. Wound healing was performed to test cell migration and flow cytometry was used to test cell cycle. **Results** After the siRNA for PACE4 was transfected into MCF-7 cells, the inhibitory effect reached most obvious at 36h both in the levels of mRNA and proteins compared with controls. The proliferation was reduced obviously ($P < 0.05$), as well as the migration ($P < 0.05$), but for cell cycle the effect was not obvious. **Conclusion** Application of siRNA to silence PACE4 can de-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81102275);山东省自然科学基金资助项目(ZR2011CQ028);山东省科技发展计划项目(2012GSF12115)

作者单位:250062 济南,山东省医学科学院、山东省医药生物技术研究中心(王菲菲、王林、潘继红);济南大学 山东省医学科学院医学与生命科学学院(王菲菲)

通讯作者:潘继红,电子信箱:pjh933@sohu.com