

· 实验研究 ·

水苏碱对高糖诱导的人晶状体上皮细胞凋亡的抑制作用及机制

吴桂佳 陈曦腾 寇振宇 高楠 白小妹 毛瀚 蒋元丰 东莉洁 田芳

天津医科大学眼科医院 天津医科大学眼视光学院 天津医科大学眼科研究所 国家眼耳鼻喉疾病临床医学研究中心天津市分中心 天津市视网膜功能与疾病重点实验室,天津 300384

通信作者:田芳,Email:fangtian06@tmu.edu.cn

【摘要】 **目的** 探究水苏碱对高糖诱导的人晶状体上皮细胞(LEC)凋亡水平的影响及其机制。 **方法** 将体外培养的人 LEC 细胞系 HLE-B3 分为正常组、甘露醇组、高糖组、高糖+二甲基亚砜(DMSO)组和高糖+水苏碱组,分别采用常规培养基、55 mmol/L 甘露醇、55 mmol/L 葡萄糖、55 mmol/L 葡萄糖+25 μ mol/L DMSO 和 55 mmol/L 葡萄糖+25 μ mol/L 水苏碱处理。采用流式细胞术检测各组细胞凋亡水平;采用活性氧(ROS)检测试剂盒检测各组细胞 ROS 水平;采用线粒体超氧化物检测试剂盒检测各组细胞线粒体超氧化物含量;采用线粒体膜电位检测试剂盒检测各组细胞线粒体膜电位水平;采用 Mito-Tracker 染色观察各组细胞线粒体形态。 **结果** 正常组、甘露醇组、高糖组、高糖+DMSO 组和高糖+水苏碱组细胞凋亡率分别为(4.09 \pm 0.25)%、(4.01 \pm 0.23)%、(10.54 \pm 0.69)%、(10.72 \pm 0.34)%和(6.32 \pm 0.37)% ,总体比较差异有统计学意义($F=191.80, P<0.001$),其中高糖组和高糖+DMSO 组细胞凋亡率显著高于正常组、甘露醇组和高糖+水苏碱组,差异均有统计学意义(均 $P<0.001$)。各组细胞 ROS 平均荧光强度、线粒体超氧化物平均荧光强度、多聚体平均荧光强度、单聚体平均荧光强度、线粒体膜电位水平、线粒体平均形状因子数目、线粒体平均分支数目及平均面积总体比较差异均有统计学意义($F=112.50, 84.63, 79.20, 165.90, 73.14, 10.67, 31.65, 52.19$, 均 $P<0.05$),其中与正常组和甘露醇组相比,高糖组和高糖+DMSO 组细胞 ROS 平均荧光强度、线粒体超氧化物平均荧光强度、单聚体平均荧光强度均明显升高,多聚体平均荧光强度、线粒体膜电位水平、线粒体平均形状因子数目、线粒体平均分支数目及平均面积均明显降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);与高糖组和高糖+DMSO 组相比,高糖+水苏碱组细胞 ROS 平均荧光强度、线粒体超氧化物平均荧光强度、单聚体平均荧光强度均明显降低,多聚体平均荧光强度、线粒体膜电位水平、线粒体平均形状因子数目、线粒体平均分支数目及平均面积均明显升高,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。 **结论** 水苏碱可能通过恢复线粒体功能抑制高糖诱导的人 LEC 凋亡。

【关键词】 白内障;晶状体上皮细胞;水苏碱;高糖;线粒体;凋亡

基金项目: 国家自然科学基金(81900846);天津市视网膜功能与疾病重点实验室自主开放项目(2022tjswmm003, 2022jswmq002, 2021tjswmm002);天津市医学重点学科建设资助项目(TJYXZDXK-3-004A-2);滨海新区卫生健康委员会科技项目(2022BWKZ003);天津高等教育委员会科技发展基金(2022ZD057);天津医科大学“临床人才培养 123 攀登计划

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20240722-00204

Inhibitory effect of stachydrine on high glucose-induced apoptosis in human lens epithelial cells and its mechanism

Wu Guijia, Chen Xiteng, Kou Zhenyu, Gao Nan, Bai Xiaomei, Mao Han, Jiang Yuanfeng, Dong Lijie, Tian Fang
School of Optometry, Institute of Ophthalmology, National Clinical Research Center for Eye, Ear, Nose and Throat Diseases, Tianjin Branch, Tianjin Key Laboratory of Retinal Function and Diseases, Tianjin Medical University Eye Hospital, Tianjin 300384, China

Corresponding author: Tian Fang, Email: fangtian06@tmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effect of stachydrine on the apoptosis of human lens epithelial cells induced by high glucose and its underlying mechanism. **Methods** Cultured human lens epithelial cell line HLE-

B3 *in vitro* was divided into five groups: normal group, mannitol group, high-glucose group, high-glucose+dimethyl sulfoxide (DMSO) group, and high-glucose+stachydrine group treated with regular medium, 55 mmol/L mannitol, 55 mmol/L glucose, 55 mmol/L glucose + 25 μ mol/L DMSO, and 55 mmol/L glucose + 25 μ mol/L stachydrine, respectively. The apoptosis rate of cells in each group was detected by flow cytometry. The intracellular reactive oxygen species (ROS) level was measured using the ROS assay kit. The mitochondrial superoxide content was determined by the mitochondrial superoxide assay kit. The mitochondrial membrane potential was assessed using the mitochondrial membrane potential assay kit. The mitochondrial morphology of cells was observed by Mito-Tracker staining. **Results** The apoptosis rates of cells in the normal group, mannitol group, high-glucose group, high-glucose+DMSO group, and high-glucose+stachydrine group were $(4.09 \pm 0.25)\%$, $(4.01 \pm 0.23)\%$, $(10.54 \pm 0.69)\%$, $(10.72 \pm 0.34)\%$ and $(6.32 \pm 0.37)\%$, respectively, with a statistically significant overall difference ($F = 191.80$, $P < 0.001$). The apoptosis rates of the high-glucose group and high-glucose+DMSO group were significantly higher than those of the normal group, mannitol group and high-glucose+stachydrine group (all $P < 0.001$). There were statistically significant differences in the mean ROS fluorescence intensity, mean fluorescence intensity of mitochondrial superoxide, mean fluorescence intensity of monomers, mean fluorescence intensity of polymers, mitochondrial membrane potential, mean number of mitochondrial shape factor, mean mitochondrial branch number, and mean mitochondrial area among the five groups ($F = 112.50$, 84.63 , 79.20 , 165.90 , 73.14 , 10.67 , 31.65 , 52.19 ; all $P < 0.05$). Compared with the high-glucose group and high-glucose+DMSO group, the mean ROS fluorescence intensity, mean fluorescence intensity of mitochondrial superoxide, and mean fluorescence intensity of monomers were significantly reduced, and the mean fluorescence intensity of polymers, mitochondrial membrane potential, mean mitochondrial shape factor, mean mitochondrial branch number, and mean mitochondrial area were significantly increased in the normal group, mannitol group and the high-glucose + stachydrine group (all $P < 0.05$). **Conclusions** Stachydrine may inhibit high glucose-induced apoptosis of human lens epithelial cells by restoring mitochondrial function.

[Key words] Cataract; Lens epithelial cells; Stachydrine; High glucose; Mitochondria; Apoptosis

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81900846); Independent Open Project of Tianjin Key Laboratory of Retinal Function and Disease (2022tjswmm003, 2022jswmq002, 2021tjswmm002); Tianjin Key Medical Discipline Construction Funding (TJYXZDXK-3-004A-2); Science and Technology Project of Health Commission of Binhai New Area (2022BWKZ003); Science and Technology Development Fund of Tianjin Municipal Education Commission (2022ZD057); "123 Climbing Plan for Clinical Talent Training" of Tianjin Medical University

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20240722-00204

白内障是糖尿病患者的主要眼部并发症之一,常在早期发生,且进展迅速,其发生与高糖环境下晶状体上皮细胞(lens epithelial cell, LEC)凋亡密切相关^[1]。在糖尿病患者体内,高血糖环境可导致晶状体细胞内糖化终产物蓄积和氧化应激反应增强,进而造成晶状体细胞损伤^[2]。这种损伤包括线粒体功能异常、蛋白质糖基化、细胞内钙离子失衡等,可引起 LEC 凋亡,最终导致白内障形成^[3]。

水苏碱是一种从中华益母草中提取的水溶性生物碱,具有抗氧化、抗炎和抗肿瘤等作用^[4]。此外,与其他经典抗氧化剂相比,水苏碱具有更高的生物利用度及安全性,不仅对心血管系统有保护作用,还可抑制细胞凋亡并调节免疫反应^[5]。然而,水苏碱能否对高糖诱导的 LEC 凋亡发挥保护作用尚不清楚。因此,本研

究旨在通过体外细胞培养模型,探究水苏碱对高糖刺激的人 LEC 凋亡水平的影响及机制,以期研发糖尿病性白内障新的治疗策略提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 人 LEC 细胞系 HLE-B3 购自河南北纳生物检验检测有限公司。

1.1.2 主要试剂及仪器 水苏碱(HY-N0298,美国 MCE 公司); DMEM 培养基(L110KJ,上海源培生物科技股份有限公司); 二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)(D8370)、葡萄糖(G8150)、甘露醇(SM8120)、细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8)(CA1210,北京索莱宝科技有限公司); Annexin V-

FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (CX005S, 上海雅酶生物医药科技有限公司); 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒 (S0033S)、Mito-Tracker 线粒体绿色荧光探针 (C1048)、Hoechst 33342 (C1022, 上海碧云天生物技术股份有限公司); 线粒体超氧化物检测试剂盒 (MitoSOX Red, 40778ES50)、JC-10 线粒体膜电位检测试剂盒 [40707ES03, 翌圣生物科技(上海)股份有限公司]。荧光显微镜 (IX73, 德国 Olympus 公司); 多功能酶标仪 (Infinite 200 PRO, 瑞士 TECAN 公司); FACS Calibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和分组处理 将 HLE-B3 细胞接种至含 10% 胎牛血清和 10 g/L 青霉素链霉素的 DMEM 低葡萄糖培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养; 次日更换新鲜培养液并观察细胞生长情况, 当细胞融合度达到 80% 以上时, 按 1:3 比例进行消化传代。选取第 3 代对数生长期细胞, 制备单细胞悬液, 以备后续实验使用。将细胞分为正常组、甘露醇组、高糖组、高糖+DMSO 组和高糖+水苏碱组, 其中正常组常规培养, 不进行特殊处理; 甘露醇组使用 55 mmol/L 甘露醇处理, 以排除高糖处理对细胞渗透压的影响; 高糖组使用 55 mmol/L 葡萄糖处理; 高糖+DMSO 组在高糖条件下添加 25 μmol/L DMSO 处理用作溶剂对照; 高糖+水苏碱组在高糖条件下添加 25 μmol/L 水苏碱处理。水苏碱用 DMSO 配制成初始浓度为 10 mmol/L 储备液, 临用前用完全培养基稀释至所需浓度。高糖模型的建立参考文献 [6]。

1.2.2 CCK-8 法检测不同浓度水苏碱处理后细胞活力 取对数生长期细胞, 经消化、离心、重悬后, 取 10 μl 细胞悬液滴加到细胞计数板进行计数, 以 1×10⁴ 个/孔的密度接种于 96 孔板, 每孔加入 100 μl 细胞悬液, 待细胞贴壁后, 吸弃原培养基, 根据实验设计在每个孔中加入用完全培养基稀释的含 0、6.25、12.5、25.0、50.0、100 μmol/L 的水苏碱 100 μl, 每组设置 3 个复孔; 将 96 孔板放入细胞培养箱中孵育 24 h, 向每个孔中加入 10 μl CCK-8 溶液, 避光孵育 2 h, 采用酶标仪检测波长 450 nm 处的吸光度 (absorbance, A) 值。细胞活力值 = (实验孔 A 值 - 空白孔 A 值) / (对照孔 A 值 - 空白孔 A 值) × 100%。实验独立重复 3 次。

1.2.3 流式细胞术检测各组细胞凋亡水平 各组细胞培养 24 h 后将细胞轻柔重悬于 Annexin V 结合缓冲液中, 与 Annexin V-FITC/PI 避光孵育 15 min; 采用 FACS Calibur 流式细胞仪对样品进行检测; 采用

FlowJo v10.8.1 软件分析不同象限的细胞群比例; 左下象限细胞为正常细胞, 右下象限细胞为早期凋亡细胞, 右上象限细胞为晚期凋亡细胞; 凋亡细胞群总比例 = 右上象限凋亡细胞比例 + 右下象限凋亡细胞比例。实验独立重复 3 次。

1.2.4 ROS 检测试剂盒检测各组细胞 ROS 水平 取对数生长期细胞, 以 2×10⁴ 个/孔的密度接种于 48 孔板, 各组细胞分别培养 24 h 后用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 洗 2 次, 用不含血清的基础培养基将原液为 5 mmol/L 的 DCFH-DA 荧光探针稀释至 10 μmol/L, 每孔加入 200 μl 染色液, 37 °C 避光孵育 30 min; 弃去染色液, 预冷 PBS 洗 3 次, 倒置荧光显微镜下拍照; 采用 ImageJ_v1.53t 图像分析软件进行定量分析, 设置统一测量参数, 选择目标区域并去除背景荧光, 计算各组 ROS 平均荧光强度。DCFH-DA 阳性染色表现为细胞内绿色荧光信号。实验独立重复 3 次。

1.2.5 线粒体超氧化物检测试剂盒检测各组细胞线粒体超氧化物含量 各组细胞培养 24 h 后用 PBS 洗 2 次, 用不含血清的基础培养基将原液为 5 mmol/L 的 Mito-SOX 荧光探针按照 1:1 000 比例稀释, 使其终浓度为 5.0 μmol/L, 每孔加入 200 μl 染色液, 37 °C 避光孵育 1 h; 弃去工作液, 预冷 PBS 洗 3 次, 倒置荧光显微镜下拍照; 采用 ImageJ_v1.53t 图像分析软件进行定量分析, 设置统一测量参数, 选择目标区域并去除背景荧光, 计算各组细胞线粒体超氧化物平均荧光强度。Mito-SOX 阳性染色表现为线粒体部位出现红色荧光信号。实验独立重复 3 次。

1.2.6 线粒体膜电位检测试剂盒检测各组细胞线粒体膜电位水平 各组细胞培养 24 h 后用 PBS 洗 2 次, 用不含血清的基础培养基将原液为 3 mmol/L 的 JC-10 荧光探针按照 1:100 比例稀释, 使其终浓度为 30 μmol/L。每孔加入 200 μl JC-10 染色工作液, 充分混匀; 37 °C 避光孵育 20 min, 吸除上清, 用 JC-10 染色缓冲液洗涤 3 次; 加入 200 μl 细胞培养液, 倒置荧光显微镜下拍照; 采用 ImageJ_v1.53t 图像分析软件进行定量分析, 设置统一测量参数, 选择目标区域并去除背景荧光, 计算各组细胞单聚体和多聚体的平均荧光强度。红色荧光代表线粒体功能完好, 绿色荧光代表线粒体功能受损。线粒体膜电位水平 = 平均红色荧光强度 / 平均绿色荧光强度。实验独立重复 3 次。

1.2.7 Mito-Tracker 染色检测各组细胞线粒体形态 各组细胞培养 24 h 后用 PBS 洗 2 次, 用不含血清的基

基础培养基将原液为 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 Mito-Tracker 荧光探针稀释至终浓度为 20 nmol/L , 加入配制好的且经 37 $^{\circ}\text{C}$ 预温育的 Mito-Tracker 染色工作液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, 倒置荧光显微镜下拍照。参照文献[7], 采用 ImageJ_v1.53t 图像分析软件进行线粒体形态定量分析, 首先对原始图像进行二值化处理, 采用自适应阈值方法调整阈值参数, 捕获原始图像中线粒体信号的形态特征, 同时避免将紧密相邻但物理上分离的线粒体合并或对单个分裂线粒体产生误判; 对阈值处理后的图像执行“骨架化 2D/3D”命令, 生成线粒体骨架图; 通过“Analyze Particles”命令, 对每个线粒体的平均面积、平均形状因子数目和平均分支数目等形态学特征进行识别和量化。线粒体平均面积 = 线粒体总面积/线粒体数量。实验独立重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 9.4.1 软件进行统计分析。计量资料经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并经 Levene 检验证实方差齐。各组间 ROS 水平、线粒体超氧化物含量、线粒体膜电位水平、线粒体平均面积、线粒体平均形状因子数目和线粒体平均分支数目等总体比较采用单因素方差分析, 多重比较采用 Tukey 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度水苏碱处理后细胞活力值比较

0、6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 水苏碱处理后, 细胞活力值分别为 (100.00 \pm 0.00)%、(96.40 \pm 3.48)%、(96.18 \pm 3.39)%、(94.46 \pm 2.93)%、(84.54 \pm 7.55)%、(73.46 \pm 2.77)% , 总体比较差异有统计学意义 ($F = 17.86, P < 0.001$), 其中与 0 $\mu\text{mol/L}$ 水苏碱处理相比, 50、100 $\mu\text{mol/L}$ 水苏碱处理后细胞活力值明显下降, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$) (图 1)。为避免高浓度水苏碱对细胞产生的毒性作用, 后续实验选择 25 $\mu\text{mol/L}$ 水苏碱进行干预。

2.2 各组细胞凋亡水平比较

正常组、甘露醇组、高糖组、高糖+DMSO 组和高糖+水苏碱组细胞凋亡率分别为 (4.09 \pm 0.25)%、(4.01 \pm 0.23)%、(10.54 \pm 0.69)%、(10.72 \pm 0.34)% 和 (6.32 \pm 0.37)% , 总体比较差异有统计学意义 ($F = 191.80, P < 0.001$), 其中与正常组和甘露醇组相比, 高糖组和高糖+DMSO 组细胞凋亡率显著升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$); 与高糖组和高糖+DMSO 组相比, 高糖+水苏碱组细胞凋亡率显著降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$) (图 2)。

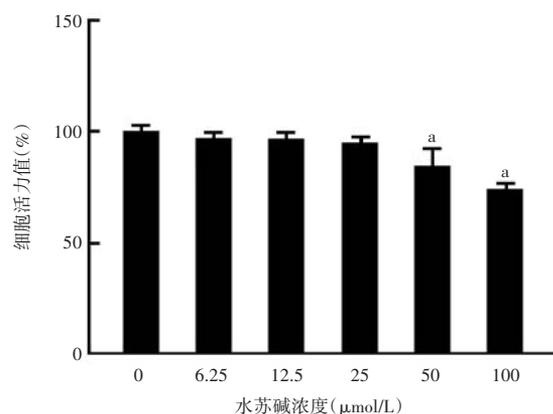


图 1 不同浓度水苏碱处理后细胞活力值比较 $F = 17.86, P < 0.001$ 。与 0 $\mu\text{mol/L}$ 水苏碱比较, $^{\text{a}}P < 0.01$ (单因素方差分析, Tukey 法; $n = 3$)

Figure 1 Comparison of cell viability after treatment with different concentrations of stachydrine $F = 17.86, P < 0.001$. Compared with 0 $\mu\text{mol/L}$ stachydrine, $^{\text{a}}P < 0.01$ (One-way ANOVA, Tukey test; $n = 3$)

2.3 各组细胞 ROS 水平比较

正常组、甘露醇组、高糖组、高糖+DMSO 组和高糖+水苏碱组细胞 ROS 平均荧光强度分别为 33.00 \pm 4.58、39.33 \pm 5.13、83.33 \pm 4.04、80.00 \pm 3.61 和 34.33 \pm 3.06, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 112.50, P < 0.001$), 其中与正常组和甘露醇组相比, 高糖组和高糖+DMSO 组 ROS 平均荧光强度显著升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$); 与高糖组和高糖+DMSO 组相比, 高糖+水苏碱组细胞 ROS 平均荧光强度显著降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$) (图 3)。

2.4 各组细胞线粒体超氧化物含量比较

正常组、甘露醇组、高糖组、高糖+DMSO 组和高糖+水苏碱组细胞线粒体超氧化物平均荧光强度分别为 42.33 \pm 4.04、38.67 \pm 3.51、79.41 \pm 3.10、77.67 \pm 4.04 和 42.33 \pm 4.51, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 84.63, P < 0.001$), 其中与正常组和甘露醇组相比, 高糖组和高糖+DMSO 组线粒体超氧化物平均荧光强度显著升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$); 与高糖组和高糖+DMSO 组相比, 高糖+水苏碱组细胞线粒体超氧化物平均荧光强度显著降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$) (图 4)。

2.5 各组细胞多聚体平均荧光强度、单聚体平均荧光强度和线粒体膜电位水平比较

正常组、甘露醇组、高糖组、高糖+DMSO 组和高糖+水苏碱组多聚体平均荧光强度、单聚体平均荧光强度和线粒体膜电位水平总体比较差异均有统计学意义 ($F = 79.20, 165.90, 73.14$, 均 $P < 0.001$), 其中与正

常组和甘露醇组相比,高糖组和高糖+DMSO 组多聚体平均荧光强度和线粒体膜电位水平均明显降低,单聚体平均荧光强度明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);与高糖组和高糖+DMSO 组相比,高糖+水苏碱组细胞多聚体平均荧光强度和线粒体膜电位水平均明显升高,单聚体平均荧光强度明显降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 5,表 1)。

2.6 各组细胞线粒体形态参数比较

正常组、甘露醇组、高糖组、高糖+DMSO 组和高

糖+水苏碱组线粒体平均形状因子数目、平均分支数目及平均面积总体比较差异均有统计学意义($F = 10.67, 31.65, 52.19$, 均 $P < 0.05$),其中与正常组和甘露醇组相比,高糖组和高糖+DMSO 组线粒体平均形状因子、平均分支数目及平均面积均显著降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);与高糖组和高糖+DMSO 组相比,高糖+水苏碱组线粒体平均形状因子数目、平均分支数目及平均面积均显著升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 6,表 2)。

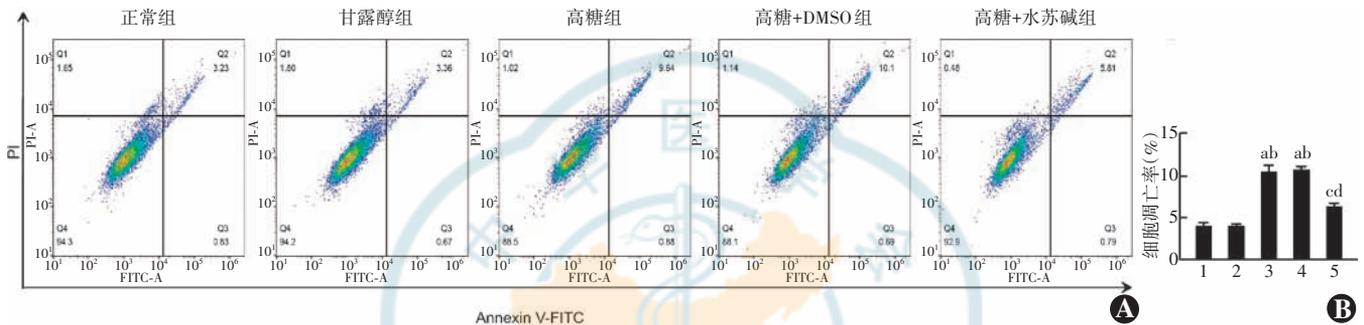


图 2 各组细胞凋亡水平比较 A: 各组细胞凋亡流式细胞图 B: 各组细胞凋亡率比较 $F = 191.80, P < 0.001$ 。与正常组比较, $^a P < 0.001$; 与甘露醇组比较, $^b P < 0.001$; 与高糖组比较, $^c P < 0.001$; 与高糖+DMSO 组比较, $^d P < 0.001$ (单因素方差分析, Tukey 法; $n = 3$) 1: 正常组; 2: 甘露醇组; 3: 高糖组; 4: 高糖+DMSO 组; 5: 高糖+水苏碱组 DMSO: 二甲基亚砜

Figure 2 Comparison of cell apoptosis among different groups A: Flow cytometry plots of apoptosis in each group B: Comparison of apoptosis rates among different groups $F = 191.80, P < 0.001$. Compared with the normal group, $^a P < 0.001$; compared with the mannitol group, $^b P < 0.001$; compared with the high glucose group, $^c P < 0.001$; compared with the high glucose+DMSO group, $^d P < 0.001$ (One-way ANOVA, Tukey test; $n = 3$) 1: normal group; 2: mannitol group; 3: high glucose group; 4: high glucose+DMSO group; 5: high glucose+stachydrine group DMSO: dimethyl sulfoxide

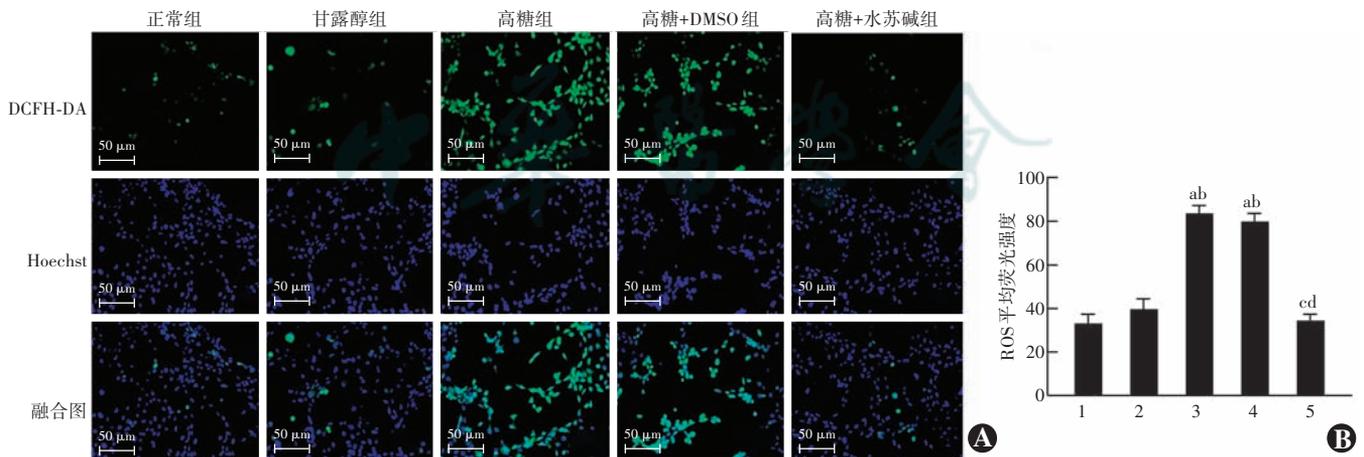


图 3 各组细胞 ROS 水平比较 A: 各组细胞 ROS 荧光染色图 (DCFH-DA $\times 200$, 标尺 = $50 \mu\text{m}$) B: 各组细胞 ROS 平均荧光强度比较 $F = 112.50, P < 0.001$ 。与正常组比较, $^a P < 0.001$; 与甘露醇组比较, $^b P < 0.001$; 与高糖组比较, $^c P < 0.001$; 与高糖+DMSO 组比较, $^d P < 0.001$ (单因素方差分析, Tukey 法; $n = 3$) 1: 正常组; 2: 甘露醇组; 3: 高糖组; 4: 高糖+DMSO 组; 5: 高糖+水苏碱组 DMSO: 二甲基亚砜; ROS: 活性氧

Figure 3 Comparison of intracellular ROS levels among different groups A: Fluorescence images of ROS staining in each group (DCFH-DA $\times 200$, scale bar = $50 \mu\text{m}$) B: Comparison of the mean ROS fluorescence intensity $F = 112.50, P < 0.001$. Compared with the normal group, $^a P < 0.001$; compared with the mannitol group, $^b P < 0.001$; compared with the high glucose group, $^c P < 0.001$; compared with the high glucose+DMSO group, $^d P < 0.001$ (One-way ANOVA, Tukey test; $n = 3$) 1: normal group; 2: mannitol group; 3: high glucose group; 4: high glucose+DMSO group; 5: high glucose+stachydrine group DMSO: dimethyl sulfoxide; ROS: reactive oxygen species

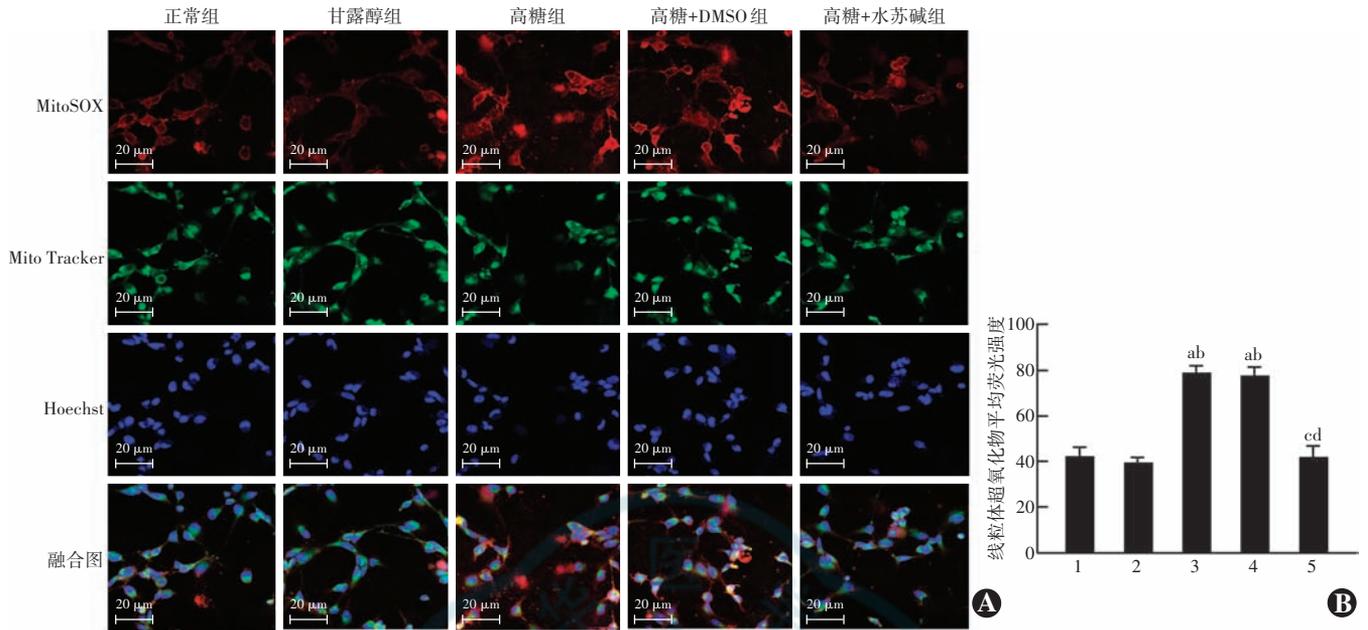


图 4 各组细胞线粒体超氧化物含量比较 A: 各组细胞线粒体超氧化物荧光染色图 (MitoSOX $\times 200$, 标尺 = $20 \mu\text{m}$) B: 各组细胞线粒体超氧化物平均荧光强度比较 $F = 84.63, P < 0.001$. 与正常组比较, ^a $P < 0.001$; 与甘露醇组比较, ^b $P < 0.001$; 与高糖组比较, ^c $P < 0.001$; 与高糖+DMSO 组比较, ^d $P < 0.001$ (单因素方差分析, Tukey 法; $n = 3$) 1: 正常组; 2: 甘露醇组; 3: 高糖组; 4: 高糖+DMSO 组; 5: 高糖+水苏碱组 DMSO: 二甲基亚砜

Figure 4 Comparison of mitochondrial superoxide levels among different groups A: Fluorescence images of mitochondrial superoxide staining in each group (MitoSOX $\times 200$, scale bar = $20 \mu\text{m}$) B: Comparison of the mean fluorescence intensity of mitochondrial superoxide $F = 84.63, P < 0.001$. Compared with the normal group, ^a $P < 0.001$; compared with the mannitol group, ^b $P < 0.001$; compared with the high glucose group, ^c $P < 0.001$; compared with the high glucose+DMSO group, ^d $P < 0.001$ (One-way ANOVA, Tukey test; $n = 3$) 1: normal group; 2: mannitol group; 3: high glucose group; 4: high glucose+DMSO group; 5: high glucose+stachydrine group DMSO: dimethyl sulfoxide

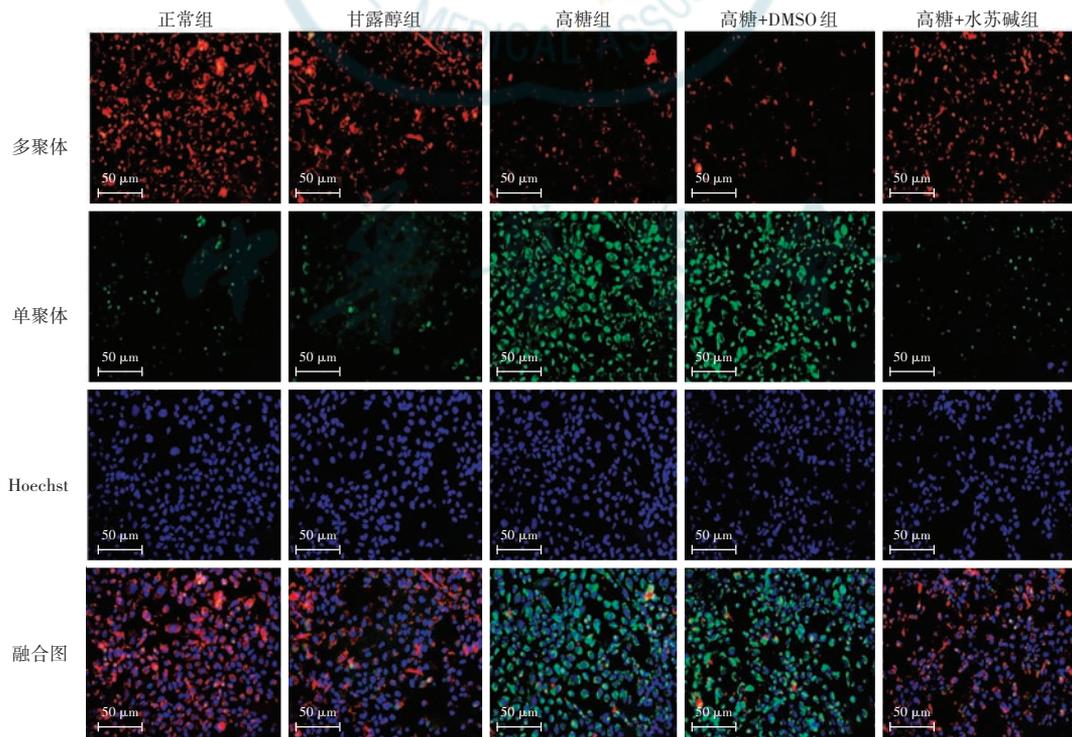


图 5 各组细胞线粒体膜电位荧光染色图 (JC-10 $\times 200$, 标尺 = $50 \mu\text{m}$) 红色荧光代表线粒体功能完好, 绿色荧光代表线粒体功能受损 DMSO: 二甲基亚砜

Figure 5 Fluorescence staining images of mitochondrial membrane potential (JC-10 $\times 200$, scale bar = $50 \mu\text{m}$) Red fluorescence indicated intact mitochondrial function, and green fluorescence indicated impaired mitochondrial function DMSO: dimethyl sulfoxide

表 1 各组细胞多聚体平均荧光强度、单聚体平均荧光强度及线粒体膜电位水平比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of the average fluorescence intensity of polymers, monomers, and the mitochondrial membrane potential levels among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	多聚体平均荧光强度	单聚体平均荧光强度	线粒体膜电位水平
正常组	3	83.20±4.14	36.26±3.92	2.31±0.34
甘露醇组	3	81.31±4.97	38.03±3.39	2.14±0.09
高糖组	3	42.91±4.10 ^{ab}	85.63±2.65 ^{ab}	0.50±0.06 ^{ab}
高糖+DMSO 组	3	46.47±2.30 ^{ab}	87.63±3.51 ^{ab}	0.53±0.05 ^{ab}
高糖+水苏碱组	3	80.40±3.74 ^{cd}	46.45±3.68 ^{cd}	1.74±0.16 ^{cd}
F 值		79.20	165.90	73.14
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常组比较,^a $P < 0.05$;与甘露醇组比较,^b $P < 0.05$;与高糖组比较,^c $P < 0.05$;与高糖+DMSO 组比较,^d $P < 0.05$ (单因素方差分析,Tukey 法) DMSO;二甲亚砜

Note: Compared with the normal group, ^a $P < 0.05$; compared with the mannitol group, ^b $P < 0.05$; compared with the high glucose group, ^c $P < 0.05$; compared with the high glucose+DMSO group, ^d $P < 0.05$ (One-way ANOVA, Tukey test) DMSO: dimethyl sulfoxide

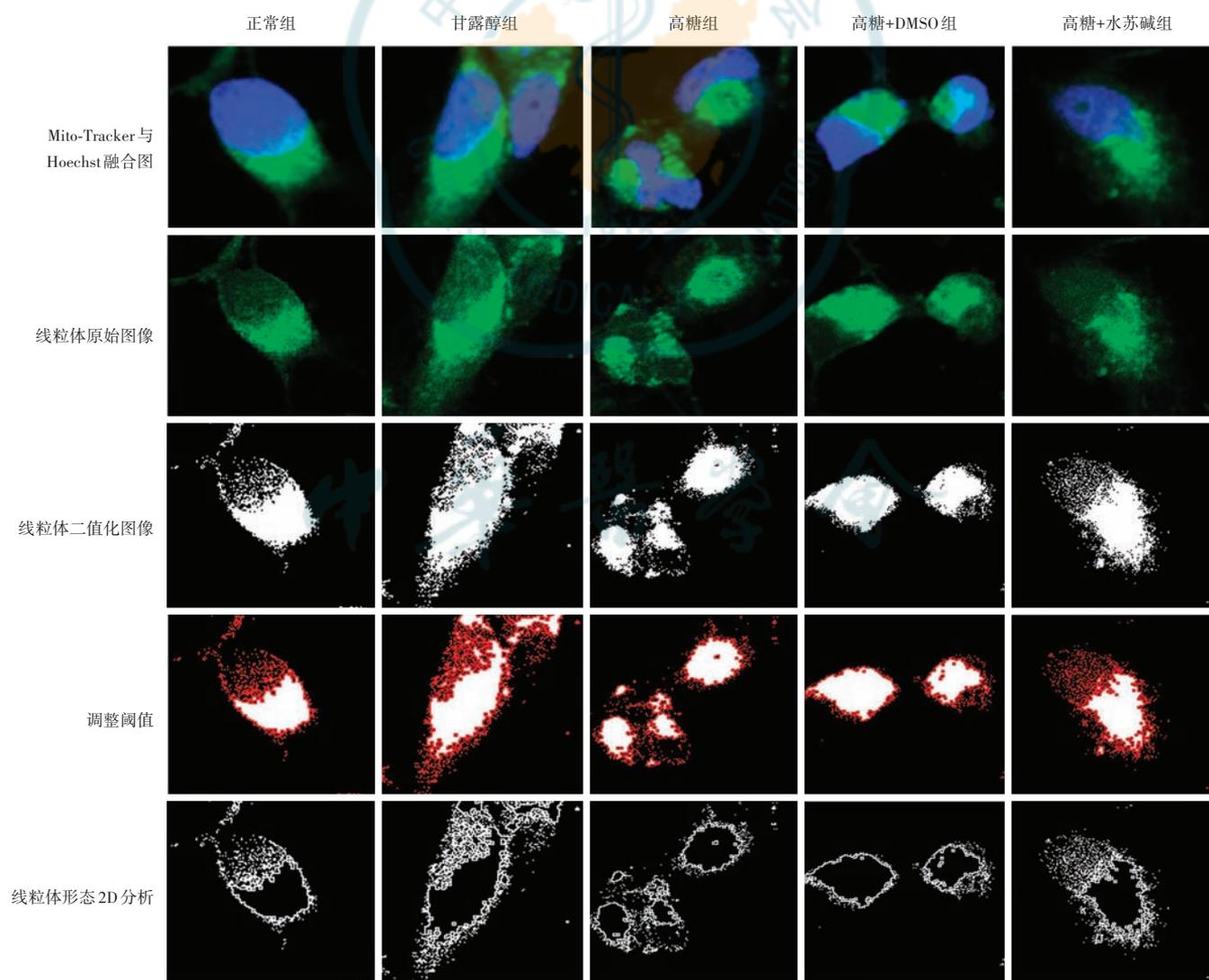


图 6 各组细胞线粒体形态分析过程示意图($\times 400$) DMSO;二甲亚砜

Figure 6 Schematic diagram of the analysis process of mitochondrial morphology in each group of cells ($\times 400$) DMSO: dimethyl sulfoxide

表 2 各组线粒体平均形状因子数目、平均分支数目及平均面积比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 2 Comparison of the average mitochondrial shape factor number, average mitochondrial branching number, and average mitochondrial area in cells among different groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	线粒体平均形状因子数目 (%)	线粒体平均分支数目 (个)	线粒体平均面积 (μm^2)
正常组	3	4.10±0.46	395.30±36.90	1 019.00±75.08
甘露醇组	3	4.27±0.45	370.00±16.52	1 032.00±70.81
高糖组	3	2.70±0.40 ^{ab}	273.30±19.50 ^{ab}	502.00±77.83 ^{ab}
高糖+DMSO 组	3	2.80±0.30 ^{ab}	250.70±13.58 ^{ab}	493.00±35.93 ^{ab}
高糖+水苏碱组	3	3.83±0.32 ^{cd}	351.30±16.26 ^{cd}	919.00±48.57 ^{cd}
F 值		10.67	31.65	52.19
P 值		0.034	<0.001	<0.001

注:与正常组比较,^a $P<0.05$;与甘露醇组比较,^b $P<0.05$;与高糖组比较,^c $P<0.05$;与高糖+DMSO 组比较,^d $P<0.05$ (单因素方差分析,Tukey 法) DMSO:二甲基亚砜

Note: Compared with the normal group, ^a $P<0.05$; compared with the mannitol group, ^b $P<0.05$; compared with the high glucose group, ^c $P<0.05$; compared with the high glucose+DMSO group, ^d $P<0.05$ (One-way ANOVA, Tukey test) DMSO: dimethyl sulfoxide

3 讨论

糖尿病是一种全球流行的慢性代谢性疾病,其特点是血糖水平的长期升高,可引发糖尿病性白内障等多种并发症^[8]。白内障是导致老年人视力丧失的主要原因之一,糖尿病患者白内障的发病率高于非糖尿病患者^[8]。LEC 是维持晶状体透明性和正常功能的重要细胞类型,其功能状况直接影响晶状体的代谢和透明性^[9]。研究表明,高糖环境可诱导 LEC 凋亡,进而导致白内障形成^[10]。因此,探寻抑制 LEC 凋亡的药物可能是预防和治疗糖尿病性白内障的有效策略。水苏碱是益母草中的一种有效成分,作为一种天然植物提取物,与其他常规抗氧化剂相比,其具有较高的生物利用度和良好的安全性,长期使用的不良反应更少^[11]。此外,已有研究证实,水苏碱除对心血管系统有一定的治疗和保护作用外,还具有抑制细胞凋亡、调节免疫反应等药理活性^[12]。然而水苏碱是否对高糖刺激的 LEC 凋亡具有调控作用尚不清楚。本研究发现,高糖刺激可引起 LEC 凋亡水平明显增加,这可能与高糖环境下 LEC 内氧化应激水平显著升高有关,因为氧化应激不仅会直接损伤细胞膜、蛋白质和 DNA,还会激活多种凋亡相关信号通路^[1]。随后,本研究检测了细胞内 ROS 水平,结果与上述推测一致。采用水苏碱干预后,高糖刺激 LEC 的 ROS 水平及凋亡水平均明显降低,这提示水苏碱可减轻高糖环境对 LEC 的氧化损伤,进而降低其凋亡水平。

有研究指出,高糖环境下 LEC 凋亡与线粒体功能异常密切相关^[13]。线粒体是细胞内的能量代谢中心,其功能异常可导致氧化应激水平和细胞凋亡增加、炎症反应增强等,进而导致晶状体透明度下降,促进白内

障的发生和发展^[14-15]。保护线粒体功能、减少氧化应激、抑制细胞凋亡已被证明可在一定程度上减缓糖尿病性白内障的进展^[16]。此外,有证据表明,水苏碱可改善线粒体膜电位,增加三磷酸腺苷的生成,减少线粒体外逸的细胞色素 C,进而抑制凋亡通路的激活^[17]。因此,本研究从线粒体功能视角阐明了水苏碱对 LEC 凋亡水平的调控机制。线粒体膜电位是维持线粒体正常功能的重要参数之一。过量的线粒体超氧化物可破坏线粒体膜的完整性,导致线粒体膜电位下降,进而促进促凋亡因子释放并损伤 DNA,最终引发或加速 LEC 凋亡过程^[18]。因此,适当的线粒体膜电位水平对于维持线粒体内外膜结构完整性和正常功能至关重要。本研究结果表明,高糖处理引起 LEC 中线粒体超氧化物含量增加以及线粒体膜电位降低,而水苏碱处理后则逆转了这种变化。此外,在线粒体功能受损时,线粒体面积减小、形状变圆、分支数目减少,这些形态学改变通常伴随能量代谢紊乱和 ROS 水平增加,最终加速细胞凋亡^[19]。因此本研究依据文献^[7,20]中记载的方法对各组经 Mito-tracker 标记的线粒体形态进行了分析,发现水苏碱处理后,线粒体平均面积、平均形状因子及平均分支数目等参数相较于高糖组和高糖+DMSO 组得到了恢复,进一步证实水苏碱可恢复高糖环境下受损的线粒体功能,降低氧化应激水平,并减少细胞凋亡。

综上所述,本研究发现,水苏碱可通过改善线粒体功能,从而有效减轻高糖环境下 LEC 的凋亡水平。本研究仍有一定的局限性,首先,本研究主要聚焦于体外细胞实验,尚未开展体内模型研究及临床试验。此外,本研究虽明确水苏碱可通过维持线粒体结构和功能的完整性,降低 LEC 凋亡水平,但尚未深入探讨其具体

信号通路。后续研究应进一步探讨水苏碱调控 LEC 存活的具体信号通路,为糖尿病性白内障的预防和治疗提供新策略。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 吴桂佳;实施研究、文章撰写;陈曦腾;实验设计、数据分析、论文审阅;寇振宇;统计分析、作图;高楠、白小妹、毛瀚、蒋元丰;数据整理;东莉洁;设计实验;田芳;研究指导、文章审阅及定稿

参考文献

[1] Hsueh YJ, Chen YN, Tsao YT, et al. The pathomechanism, antioxidant biomarkers, and treatment of oxidative stress-related eye diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 1255. DOI: 10.3390/ijms23031255.

[2] Chen L, Chen Y, Ding W, et al. Oxidative stress-induced TRPV2 expression increase is involved in diabetic cataracts and apoptosis of lens epithelial cells in a high-glucose environment[J]. *Cells*, 2022, 11(7): 1196. DOI: 10.3390/cells11071196.

[3] Xie Q, Xue L, Cao X, et al. Apoptosis of lens epithelial cells and expression of NLRP3-related proteins in patients with diabetes and cataract[J]. *Ocul Immunol Inflamm*, 2023, 31(5): 1103-1110. DOI: 10.1080/09273948.2022.2079537.

[4] Sun Y, Xia X, Yuan G, et al. Stachydrine, a bioactive equilibrist for synephrine, identified from four citrus Chinese herbs[J]. *Molecules*, 2023, 28(9): 3813. DOI: 10.3390/molecules28093813.

[5] 毛益申, 石家齐, 朱明宇. 益母草水苏碱药理作用的研究进展[J]. *微循环学杂志*, 2017, 27(1): 65-69. DOI: 10.3969/j.issn.1005-1740.2017.01.016.
Mao YS, Shi JQ, Zhu MY. Advances in the study of pharmacological action of stachydrine[J]. *Chin J Microcirculat*, 2017, 27(1): 65-69. DOI: 10.3969/j.issn.1005-1740.2017.01.016.

[6] 张奇, 马天驹, 黄杨, 等. 血红素氧合酶 1 对高糖诱导人晶状体上皮细胞的氧化应激和凋亡的影响[J]. *解放军医学院学报*, 2021, 42(4): 413-417. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5227.2021.04.011.
Zhang Q, Ma TJ, Huang Y, et al. Effect of heme oxygenase 1 (HO-1) on oxidative stress and apoptosis induced by high glucose in human lens epithelial cells[J]. *Acad J Chin PLA Med Sch*, 2021, 42(4): 413-417. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5227.2021.04.011.

[7] Valente AJ, Maddalena LA, Robb EL, et al. A simple ImageJ macro tool for analyzing mitochondrial network morphology in mammalian cell culture[J]. *Acta Histochem*, 2017, 119(3): 315-326. DOI: 10.1016/j.acthis.2017.03.001.

[8] Ang MJ, Afshari NA. Cataract and systemic disease: a review[J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2021, 49(2): 118-127. DOI: 10.1111/ceo.13892.

[9] Liu Z, Huang S, Zheng Y, et al. The lens epithelium as a major determinant in the development, maintenance, and regeneration of the crystalline lens[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2023, 92: 101112. DOI: 10.

1016/j.preteyeres.2022.101112.

[10] Tomić M, Vrabec R, Rašteggorac P, et al. Hypertension and hypercholesterolemia are associated with cataract development in patients with type 2 diabetes[J]. *High Blood Press Cardiovasc Prev*, 2021, 28(5): 475-481. DOI: 10.1007/s40292-021-00472-8.

[11] 周瑜城, 宋文明, 陈科宇, 等. 益母草生物碱的研究进展[J]. *浙江农业科学*, 2023, 64(5): 1230-1235. DOI: 10.16178/j.issn.0528-9017.20221301.

[12] 李艳, 苗明三. 益母草药理作用研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2023, 41(5): 102-106. DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2023.05.024.
Li Y, Miao MS. Research progress of pharmacological action of Yimucao (Herba Leonuri) [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2023, 41(5): 102-106. DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2023.05.024.

[13] Wang YH, Han YP, Yu HT, et al. Protocatechualdehyde prevents methylglyoxal-induced mitochondrial dysfunction and AGES-RAGE axis activation in human lens epithelial cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 738: 374-383. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.04.045.

[14] Zhang K, Di G, Li B, et al. AQP5 deficiency promotes the senescence of lens epithelial cells through mitochondrial dysfunction and AGES-RAGE axis activation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2023, 680: 184-193. DOI: 10.1016/j.bbrc.2023.09.051.

[15] Chen X, Chen Y, Li C, et al. Glutaredoxin 2 protects lens epithelial cells from epithelial-mesenchymal transition by suppressing mitochondrial oxidative stress-related upregulation of integrin-linked kinase[J]. *Exp Eye Res*, 2023, 234: 109609. DOI: 10.1016/j.exer.2023.109609.

[16] Liu S, Jin Z, Xia R, et al. Protection of human lens epithelial cells from oxidative stress damage and cell apoptosis by KGF-2 through the Akt/Nrf2/HO-1 pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 6933812. DOI: 10.1155/2022/6933812.

[17] Zeng H, Xu D, Song Y, et al. Synthesis, characterization and anti-breast cancer activities of stachydrine derivatives[J]. *Eur J Med Chem*, 2023, 259: 115679. DOI: 10.1016/j.ejmech.2023.115679.

[18] Sakamuru S, Zhao J, Attene-Ramos MS, et al. Mitochondrial membrane potential assay[J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2474: 11-19. DOI: 10.1007/978-1-0716-2213-1_2.

[19] Johnson J, Mercado-Ayon E, Mercado-Ayon Y, et al. Mitochondrial dysfunction in the development and progression of neurodegenerative diseases[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2021, 702: 108698. DOI: 10.1016/j.abb.2020.108698.

[20] Chaudhry A, Shi R, Luciani DS. A pipeline for multidimensional confocal analysis of mitochondrial morphology, function, and dynamics in pancreatic β -cells[J/OL]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2020, 318(2): E87-E101 [2025-10-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31846372/>. DOI: 10.1152/ajpendo.00457.2019.

(收稿日期:2025-09-20 修回日期:2026-01-07)

(本文编辑:施晓萌)

读者 · 作者 · 编者

本刊对来稿中计量单位的使用要求

计量单位 计量单位的使用执行 GB 3100/3101/3102-1993《国际单位制及其应用/有关量、单位和符号的一般原则/(所有部分)量和单位的有关规定,具体执行可参照中华医学会杂志社编写的《法定计量单位在医学上的应用》第3版(人民军医出版社2001年出版)。作者在撰写论文时应注意单位名称与单位符号不可混用。组合单位符号中表示相除的斜线为2条时本刊采用 ng/(kg·min) 的形式,而不用 ng/kg/min 的形式。应尽可能使用单位符号,也可以与非物理单位(如:人、次、台等)的汉字构成组合形式的单位,如:次/min。在叙述中请先列出法定计量单位数值,括号内写旧制单位数值;如果同一计量单位反复出现,可在首次出现时注明法定计量单位与旧制单位的换算系数,然后只列出法定计量单位数值。参量及其公差均需附单位,当参量与其公差的单位相同时,单位可只写1次,即加圆括号将数值组合,置共同单位符号于全部数值之后。例如:“75.4 ng/L±18.2 ng/L”可以表示为“(75.4±18.2) ng/L”。量的符号一律用斜体字,如吸光度(旧称光密度)的符号为 A。

根据国家质量监督局和卫生部联合发出的质技监局函[1998]126号文件《关于血压计量单位使用规定的补充通知》,凡是涉及人体及动物体内的压力测定,可以使用毫米汞柱(mmHg)或厘米水柱(cmH₂O)为计量单位,但首次使用时应注明 mmHg 或 cmH₂O 与 kPa 的换算系数(1 mmHg=0.133 kPa, 1 cmH₂O=0.098 kPa)。

(本刊编辑部)