

DOI:10.16781/j.0258-879x.2018.05.0547

· 短篇论著 ·

富氢水对体外培养甲状腺相关眼病患者眼眶成纤维细胞氧化应激的影响

陈欣欣, 蔡季平, 程金伟, 周晓晴, 沈亚, 李坚, 魏锐利*
海军军医大学(第二军医大学)长征医院眼科, 上海 200003

[摘要] **目的** 探讨富氢水对甲状腺相关眼病(TAO)的抗氧化应激作用。**方法** 取TAO患者眼眶脂肪结缔组织的眼眶成纤维细胞进行体外培养,用不同浓度的过氧化氢(H_2O_2)处理细胞18 h后,用CCK-8法检测细胞增殖能力以确定合适的 H_2O_2 浓度。将细胞分为4组:空白组(正常培养)、 H_2O_2 组(H_2O_2 处理18 h)、富氢水+ H_2O_2 组(富氢水处理72 h的同时用 H_2O_2 处理18 h)、地塞米松+ H_2O_2 组(1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松处理72 h的同时用 H_2O_2 处理18 h)。用流式细胞术检测各组细胞活性氧(ROS)荧光强度,用ELISA检测细胞培养液中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的含量。**结果** TAO患者眼眶成纤维细胞体外培养成功。 H_2O_2 浓度越高对TAO患者眼眶成纤维细胞增殖能力的抑制效果越明显,本实验最终选取的 H_2O_2 浓度为100 $\mu\text{mol/L}$ 。培养TAO患者眼眶成纤维细胞72 h后,空白组、 H_2O_2 组、富氢水+ H_2O_2 组、地塞米松+ H_2O_2 组细胞培养液中MDA、SOD、GSH-Px的含量和细胞ROS荧光强度分别为(1.63±0.29)、(5.06±0.24)、(3.94±0.29)、(2.34±0.24) nmol/mL, (10.51±0.32)、(2.41±0.23)、(5.58±0.29)、(7.98±0.15) U/mL, (107.79±1.06)、(21.07±0.92)、(49.19±6.75)、(76.33±4.70) U/mL和18 275.82±521.05、92 524.81±2 097.01、54 460.87±572.64、35 961.37±540.61,统计分析发现富氢水和地塞米松均可抑制 H_2O_2 处理后眼眶成纤维细胞的氧化应激(P 均<0.01),且地塞米松的抑制效果较富氢水更明显(P 均<0.01)。**结论** 氢分子可能通过抗氧化应激对TAO发挥治疗作用。

[关键词] 甲状腺相关眼病;眼眶成纤维细胞;富氢水;氧化性应激;地塞米松

[中图分类号] R 581.11; R 774.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2018)05-0547-05

Effect of hydrogen-rich water on oxidative stress of *in vitro* orbital fibroblasts of patients with thyroid associated ophthalmopathy

CHEN Xin-xin, CAI Ji-ping, CHENG Jin-wei, ZHOU Xiao-qing, SHEN Ya, LI Jian, WEI Rui-li*

Department of Ophthalmology, Changzheng Hospital, Navy Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To explore the anti-oxidation stress effect of hydrogen-rich water (HW) on thyroid associated ophthalmopathy (TAO). **Methods** The orbital fibroblasts were derived from orbital adipose connective tissue of TAO patients and cultured *in vitro*. The cells were treated with different concentrations of hydrogen peroxide (H_2O_2) for 18 h, and the proliferation ability was detected by CCK-8 method to determine the appropriate H_2O_2 concentration. The cells were divided into four groups: blank group (normal culture), H_2O_2 group (treating cells with H_2O_2 for 18 h), HW+ H_2O_2 group (culturing cells using culture media containing HW for 72 h in combination with H_2O_2 for 18 h), dexamethasone+ H_2O_2 group (treating cells using dexamethasone 1 $\mu\text{mol/L}$ for 72 h in combination with H_2O_2 for 18 h). After culturing for 72 h in each group, the fluorescence intensity of reactive oxygen species (ROS) was measured by flow cytometry, and the contents of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were detected by ELISA. **Results** We successfully cultured orbital fibroblasts derived from orbital adipose connective tissues of TAO patients. The higher concentration of H_2O_2 , the greater inhibition effect on the proliferation ability of the orbital fibroblasts from TAO patients, and we finally chose 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 . After 72 h of cell culture, the contents of MDA, SOD, and GSH-Px and the fluorescence intensity of ROS were (1.63±0.29), (5.06±0.24), (3.94±0.29), and (2.34±0.24) nmol/mL, (10.51±0.32), (2.41±0.23), (5.58±0.29), and (7.98±0.15) U/mL, (107.79±1.06), (21.07±0.92), (49.19±6.75), and (76.33±4.70) U/mL

[收稿日期] 2018-03-09 **[接受日期]** 2018-04-25

[作者简介] 陈欣欣, 硕士生, 住院医师. E-mail: 13127893672@163.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81885921, E-mail: ruiwei@126.com

and $18\ 275.82 \pm 521.05$, $92\ 524.81 \pm 2\ 097.01$, $54\ 460.87 \pm 572.64$, and $35\ 961.37 \pm 540.61$ in the blank, H_2O_2 , HW + H_2O_2 and dexamethasone + H_2O_2 groups, respectively. Statistic analysis results showed that both HW and dexamethasone could significantly inhibit oxidative stress induced by H_2O_2 in orbital fibroblasts (all $P < 0.01$), and the inhibitory effects of dexamethasone were significantly more obvious than those of HW (all $P < 0.01$). **Conclusion** HW may be a treatment option for TAO through anti-oxidant stress.

[Key words] thyroid associated ophthalmopathy; orbital fibroblasts; hydrogen-rich water; oxidative stress; dexamethasone

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2018, 39(5): 547-551]

甲状腺相关眼病 (thyroid associated ophthalmopathy, TAO) 是一种自身免疫性疾病, 发病机制尚未完全明了, 目前发现氧化应激参与了 TAO 的发病过程, 试验性的抗氧化剂对治疗轻、中度 TAO 取得了比较理想的效果。Ohsawa 等^[1] 在 2007 年研究发现氢分子具有选择性抗氧化作用, 其可以通过选择性地中和羟自由基 ($\cdot OH$) 和过氧亚硝基阴离子 (peroxynitrite anion, $ONOO^-$) 治疗氧化损伤相关疾病, 有效保护细胞功能。富氢水作为抗氧化剂的一种, 因几乎无毒副作用, 近年来广受关注, 研究发现其可以通过抗氧化、抗凋亡、抗炎作用有效治疗氧化应激导致的器官损伤^[2]。本研究用富氢水处理体外培养的 TAO 患者眼眶成纤维细胞, 探讨其对 TAO 的抗氧化应激作用。

1 材料和方法

1.1 标本与来源 选择 2016 年 3 月至 2016 年 6 月于我院行眼眶减压术的 TAO 患者, 共 4 例 4 只眼, 男性 3 例、女性 1 例, 年龄为 36~68 岁, 均符合 TAO 的 Bartly 和 Gorman 诊断标准^[3]且排除其他自身免疫性疾病, 术中取眼眶脂肪结缔组织标本。以上操作均经海军军医大学 (第二军医大学) 长征医院医学伦理委员会审批, 取得患者及家属知情同意并签署知情同意书。

1.2 试剂与仪器 过氧化氢 (H_2O_2) 购自国药集团化学试剂有限公司, 小鼠抗人波形蛋白 (vimentin) 单克隆抗体、细胞角蛋白 19 (cytokeratin 19, CK19) 单克隆抗体、结蛋白 (desmin) 单克隆抗体、S-100 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司, 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 检测试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 活性氧 (reactive

oxygen species, ROS) 检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, 人透明质酸检测试剂盒购自上海信裕生物科技有限公司。

酶标分析仪 (北京普朗新技术有限公司), 流式细胞仪 (美国 BD 公司), CO_2 恒温培养箱 (美国 Thermo Forma 公司), 细胞培养耗材 (美国 Trueline 公司), 显微镜 (上海蔡康光学仪器有限公司), 离心机 (上海卢湘仪离心机仪器有限公司), 镁棒 (Premium FDR, 日本 FriendEar 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 眼眶成纤维细胞的培养 保持无菌状态从手术台上将标本转移至含青霉素/链霉素双抗的 PBS (双抗: PBS=1:50, 体积比; 青霉素和链霉素原始浓度分别为 1×10^4 U/mL 和 10 g/L) 的离心管中, 将离心管置入 $0^\circ C$ 冰水混合物中快速转运 (1 h 内) 至细胞培养室。采用组织块培养法培养细胞并传代, 第 4~9 代细胞用于实验。采用形态学以及用免疫组织化学法检测细胞波形蛋白、CK19、S-100、结蛋白的表达鉴定细胞。

1.3.2 CCK-8 实验 取对数生长期的眼眶成纤维细胞用胰蛋白酶消化, 于显微镜下计数并制成 5×10^4 /mL 的细胞悬液。以每孔 100 μL 接种至 96 孔板, 每组设 3 复孔, 以 100 μL 培养液作为空白对照, $37^\circ C$ 培养过夜, 分别在加入不同浓度的 H_2O_2 (0、100、200、300、400、500、550、600 $\mu mol/L$) 后 0、18 h, 按体积比 1:10 混合 CCK-8 试剂和无血清培养液, 以每孔 100 μL 加入待测孔中, 在 $37^\circ C$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 1 h 后, 用酶标分析仪检测 450 nm 波长处的光密度 (D) 值。根据该实验结果选择合适浓度的 H_2O_2 开展后续实验。

1.3.3 富氢水的制备 使用镁棒制备富氢水。镁棒的长度为 14.5 cm、直径为 1.8 cm。将镁棒放入密封的聚乙烯对苯二甲酸乙二醇酯瓶 (碳酸饮料瓶级) 内, 镁棒被 600 mL 的超轻水 (deuterium

depleted water, DDW) 完全浸透至少 2 h, 2 h 后产生副产物——氢氧化镁沉淀, 后者会在镁棒表面呈膜样或颗粒样附着而不污染富氢水。

1.3.4 实验分组 将 TAO 患者眼眶成纤维细胞分为 4 组。空白组: 正常培养。氧化损伤模型组 (H_2O_2 组): 正常培养细胞 6 h 后加入 H_2O_2 处理 18 h, 之后去除 H_2O_2 正常培养, 每 12 h 换液 1 次。富氢水+氧化损伤模型组 (HW+ H_2O_2 组): 用加入富氢水的培养液预处理细胞 6 h 后, 加入 H_2O_2 处理细胞 18 h 后去除 H_2O_2 , 每 12 h 更换富氢水培养液 1 次。其中富氢水培养液的制备方法为: 用 100 mL 富氢水溶解 1.04 g 固体培养基、0.2 g 碳酸氢钠。地塞米松+氧化损伤模型组 (DEX+ H_2O_2 组): 用加入 1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松^[4]的培养液预处理细胞 6 h 后, 加入 H_2O_2 处理 18 h 后去除 H_2O_2 , 每 12 h 更换含地塞米松培养液 1 次。

1.3.5 流式细胞术检测细胞 ROS 荧光强度 TAO 患者眼眶成纤维细胞用含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素双抗混合液的 DMEM-F12 培养液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养。显微镜下观察细胞为贴壁细胞, 锥虫蓝染色活细胞率达 95% 以上。取对数生长期的细胞用胰蛋白酶消化后以 5×10^5 /孔的密度接种于 6 孔板。细胞贴壁生长 24 h 后吸弃原培养液, 各组细胞均在处理 72 h 后用胰蛋白酶消化, 收集细胞用流式细胞仪检测, 设激发波长为 480 nm、发射波长为 525 nm, ROS 阳性的细胞有较强的绿色荧光。

1.3.6 ELISA 检测细胞培养液中 MDA、SOD、GSH-Px 的含量 取对数生长期的细胞用胰蛋白酶消化, 于显微镜下计数并制成 5×10^4 /mL 的细胞悬液。以每孔 100 μL 接种至 96 孔板, 每组设 3 个复孔, 以 100 μL 培养液作为空白对照, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。根据分组处理细胞 72 h 后, 分别采用 MDA

检测试剂盒、SOD 检测试剂盒和 GSH-Px 检测试剂盒检测各组细胞培养液中 MDA、SOD 和 GSH-Px 的含量。

1.4 统计学处理 使用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。服从正态分布的计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组比较采用 t 检验。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 眼眶成纤维细胞的体外培养及鉴定 本实验选择的 4 例 TAO 患者 4 只眼的眼眶脂肪结缔组织, 1 例眼眶脂肪组织未见细胞爬出, 可能与术中所取的组织量过少有关。原代培养 3 d 后, 显微镜下见培养皿内有细长梭形的细胞爬出 (图 1A)。继续培养可见突起从细胞周围长出, 细胞贴壁牢固。约 10 d 后见细胞密集, 开始相互融合, 细胞形态良好依然为细长梭形, 各细胞间可见颗粒状黑色或透明的分泌物 (图 1B), 符合成纤维细胞典型的形态学特征及贴壁的生长方式。选取对数生长期的第 3 代细胞, 对其进行波形蛋白、CK19、结蛋白、S-100 免疫组织化学染色, 发现只有波形蛋白染色呈阳性, 细胞质被染成棕色、细胞核未染色 (图 2A), 其余均为阴性 (图 2B~2D)。传代后继续培养, 细胞形态无明显改变, 平均每周传代 1 次。

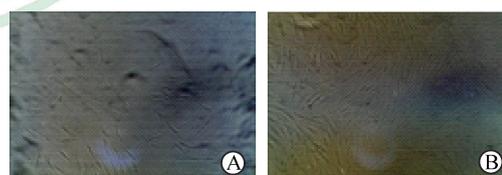


图 1 TAO 患者眼眶成纤维细胞的体外培养

A: 细胞培养的第 3 天, 少量细胞爬出, 呈细长梭形贴壁生长; B: 细胞培养的第 10 天, 细胞逐渐增多, 密集平铺于培养皿底部且逐渐融合。TAO: 甲状腺相关眼病。Original magnification: $\times 100$

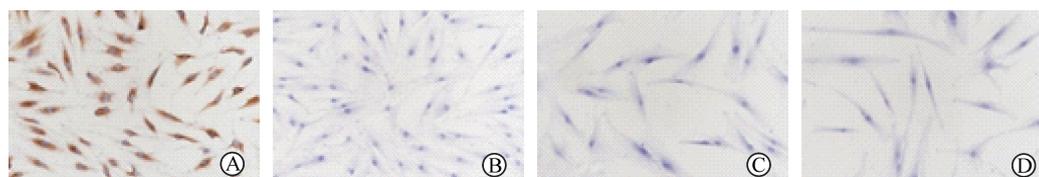


图 2 体外培养 TAO 患者眼眶成纤维细胞的免疫组织化学染色鉴定

A: 波形蛋白染色呈阳性, 细胞质被染成棕色, 细胞核未染色; B: 细胞角蛋白 19 阴性; C: 结蛋白阴性; D: S-100 阴性。TAO: 甲状腺相关眼病。Original magnification: $\times 100$

2.2 不同浓度 H₂O₂ 对眼眶成纤维细胞增殖能力的影响 见图 3, 100、200、300、400、500、550、600 μmol/L 的 H₂O₂ 刺激 TAO 患者眼眶成纤维细胞 18 h 后, 450 nm 波长处测定的 D 值随 H₂O₂ 浓度增加逐渐下降, 表明 H₂O₂ 对眼眶成纤维细胞增殖的抑制率随浓度升高逐渐增大, 且在 H₂O₂ 浓度为 100~400 μmol/L 时抑制率呈快速增长, 浓度为 400~600 μmol/L 时抑制率增长缓慢。100 μmol/L 的 H₂O₂ 对 TAO 患者眼眶成纤维细胞的抑制率为 27.79%, 该浓度已对细胞造成损伤; 200 μmol/L 的 H₂O₂ 对细胞的抑制率已达 49.41%, 对细胞损伤明显, 不利于后续眼眶成纤维细胞的培养, 故选择 100 μmol/L 的 H₂O₂ 进行后续实验。

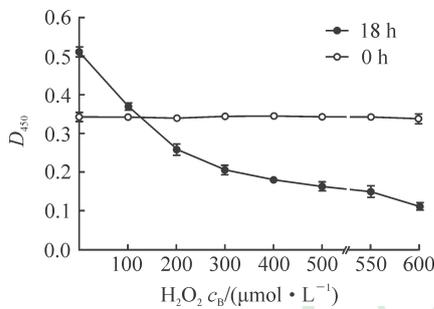


图 3 H₂O₂ 对 TAO 患者眼眶成纤维细胞增殖的抑制效果
TAO: 甲状腺相关眼病; H₂O₂: 过氧化氢. n=3, $\bar{x} \pm s$

2.3 富氢水及地塞米松对氧化损伤 TAO 患者眼眶成纤维细胞氧化应激的影响 检测各组眼眶成纤维细胞培养 72 h 后细胞培养液中 MDA、SOD、GSH-Px 的含量以及细胞的 ROS 荧光强度, 与空白组比较, H₂O₂ 组细胞培养液中 MDA 含量和细

胞 ROS 荧光强度均增加, 细胞培养液中 SOD 和 GSH-Px 含量均降低 (P 均 < 0.01)。与 H₂O₂ 组相比, 富氢水和地塞米松均可降低氧化损伤后眼眶成纤维细胞培养液中 MDA 含量和细胞中 ROS 的荧光强度, 增加 SOD 和 GSH-Px 的含量 (P 均 < 0.01), 其中地塞米松的作用效果较富氢水更加明显, 且两组间各氧化应激指标的比较差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01)。见表 1。

3 讨论

自 20 世纪 80 年代 Wilson 等^[5]首次发现 TAO 患者体内自由基堆积、抗氧化酶活性降低, 氧化应激与 TAO 的关系开始得到研究者的关注, 越来越多的证据表明氧化应激产物 ROS 参与了 TAO 的病理过程^[6-7]。研究发现 TAO 患者眼眶成纤维细胞对氧化应激的反应比正常人更敏感, 其可能是因为 TAO 患者眼眶中抗氧化酶谱以及 GSH 减少甚至耗竭所致^[8]。可见氧化应激与 TAO 的发病关系密切。目前抗氧化剂富氢水在眼部疾病中的研究较多, 涵盖了角膜、葡萄膜、晶状体、视网膜、视神经等多种相关眼部疾病, 如 Yang 等^[9]于 2013 年发现富氢水可通过抗氧化应激预防亚硝酸盐致幼鼠白内障; Yokota 等^[10]研究发现氧化和硝化过程在青光视网膜神经退行性疾病的发病机制中有重要作用, 同时发现氢可抑制大鼠视网膜细胞线粒体膜电位的缺失和视网膜细胞的凋亡, 降低视网膜细胞中酪氨酸硝化水平, 抑制氧化应激损伤, 对减缓青光视网膜神经退行性改变有重要作用。

表 1 富氢水及地塞米松对 TAO 患者氧化损伤眼眶成纤维细胞氧化应激的影响

组别	MDA c _B /(nmol · mL ⁻¹)	SOD z _B /(U · mL ⁻¹)	GSH-Px z _B /(U · mL ⁻¹)	ROS 荧光强度
空白组	1.63 ± 0.29	10.51 ± 0.32	107.79 ± 1.06	18 275.82 ± 521.05
H ₂ O ₂ 组	5.06 ± 0.24**	2.41 ± 0.23**	21.07 ± 0.92**	92 524.81 ± 2 097.01**
HW+H ₂ O ₂ 组	3.94 ± 0.29 ^{△△}	5.58 ± 0.29 ^{△△}	49.19 ± 6.75 ^{△△}	54 460.87 ± 572.64 ^{△△}
DEX+H ₂ O ₂ 组	2.34 ± 0.24 ^{△△△△}	7.98 ± 0.15 ^{△△△△}	76.33 ± 4.70 ^{△△△△}	35 961.37 ± 540.61 ^{△△△△}
F 值	101.725	538.210	237.464	2 292.554
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

TAO: 甲状腺相关眼病; H₂O₂: 过氧化氢; HW: 富氢水; DEX: 地塞米松; MDA: 丙二醛; SOD: 超氧化物歧化酶; GSH-Px: 谷胱甘肽过氧化物酶; ROS: 活性氧. **P < 0.01 与空白组比较; ^{△△}P < 0.01 与 H₂O₂ 组比较; ^{△△△△}P < 0.01 与 HW+H₂O₂ 组比较

眼眶成纤维细胞是 TAO 发病的主要靶细胞和效应细胞, 是近年来 TAO 相关研究的经典细胞模型。本实验通过体外培养 TAO 患者的眼眶脂肪结

缔组织成纤维细胞, 并给予 H₂O₂ 刺激模拟细胞外源性氧化应激反应。给予富氢水处理氧化损伤细胞, 发现富氢水可降低氧化损伤细胞培养液中

MDA的含量和细胞ROS的荧光强度、提高细胞培养液中SOD和GSH-PX的含量。虽然其作用不如地塞米松明显,但考虑糖皮质激素有较多的不良反应及其使用限制性,富氢水不失为TAO治疗的一种有效手段。

目前富氢水的临床应用存在两大难点,一是通过何种途径使富氢水到达靶器官后能够发挥期望的治疗作用,二是因氢气难溶于水,富氢水中的氢气易挥发使其浓度降低,因此对富氢水中含氢量的控制较难。有研究表明,富氢水的保存与储存容器无关,与容器中的氢气是否全满、是否震荡或搅拌及氢气储存时间有关^[11]。本实验采用的富氢水是将镁棒置于600 mL的DDW中并完全浸透8 h制取,在实验操作时贯彻富氢水制取完成即刻使用的原则,并在培养细胞时每12 h换培养液时更换富氢水,以尽可能保证富氢水中较高的氢浓度。但这一方法无法在临床大规模使用,因此后续实验将继续探索富氢水的临床应用及其治疗效果。

[参 考 文 献]

- [1] OHSAWA I, ISHIKAWA M, TAKAHASHI K, WATANABE M, NISHIMAKI K, YAMAGATA K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals[J]. *Nat Med*, 2007, 13: 688-694.
- [2] 李波,吕国义,于泳浩,谢克亮,王国林. 富氢生理盐水治疗相关疾病机制研究进展[J]. *天津医药*, 2016, 44: 250-252.
- [3] BARTLEY G B, GORMAN C A. Diagnostic criteria for Graves' ophthalmopathy[J]. *Am J Ophthalmol*, 1995, 119: 792-795.
- [4] 何为民,罗清礼,曾继红. 地塞米松对甲状腺相关眼病眼眶成纤维细胞ICAM-1表达的影响[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2007, 38: 113-115.
- [5] WILSON R, CHOPRA M, BRADLEY H, McKILLOP J H, SMITH W E, THOMSON J A. Free radicals and Graves' disease: the effects of therapy[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1989, 30: 429-433.
- [6] ADEMOĞLU E, ÖZBEY N, ERBİL Y, TANRIKULU S, BARBAROS U, YANIK B T, et al. Determination of oxidative stress in thyroid tissue and plasma of patients with Graves' disease[J]. *Eur J Intern Med*, 2006, 17: 545-550.
- [7] ERDAMAR H, DEMIRCI H, YAMAN H, ERBİL M K, YAKAR T, SANCAK B, et al. The effect of hypothyroidism, hyperthyroidism, and their treatment on parameters of oxidative stress and antioxidant status[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2008, 46: 1004-1010.
- [8] TSAI C C, WU S B, CHENG C Y, KAO S C, KAU H C, LEE S M, et al. Increased response to oxidative stress challenge in Graves' ophthalmopathy orbital fibroblasts[J]. *Mol Vis*, 2011, 17: 2782-2788.
- [9] YANG C X, YAN H, DING T B. Hydrogen saline prevents selenite-induced cataract in rats[J]. *Mol Vis*, 2013, 19: 1684-1693.
- [10] YOKOTA T, KAMIMURA N, IGARASHI T, TAKAHASHI H, OHTA S, OHARAZAWA H. Protective effect of molecular hydrogen against oxidative stress caused by peroxynitrite derived from nitric oxide in rat retina[J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2015, 43: 568-577.
- [11] 秦秀军,安全,张伟,李建国,李炜宾,李幼忱,等. 富氢水制备及保存方法的初步研究[J]. *癌变·畸变·突变*, 2013, 25: 457-460.

[本文编辑] 杨亚红