

· 实验研究 ·

二十二碳六烯酸对人视网膜色素上皮细胞中血红素氧合酶-1 表达的诱导作用

刘越峰 罗卫民 张勇 钟晓东

442000 湖北省十堰市,湖北医药学院附属十堰市太和医院眼科中心(刘越峰、张勇、钟晓东),心胸外科(罗卫民)

通信作者:罗卫民,Email:weiminluo120@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.08.002

【摘要】 背景 氧化应激是年龄相关性黄斑变性发生的重要机制。研究表明,二十二碳六烯酸(DHA)在视网膜光感受细胞的发育中发挥重要作用,并可上调血红素氧合酶 1(HO-1)的表达,从而发挥抗氧化效应,但 DHA 是否能影响人视网膜色素上皮(RPE)细胞表达 HO-1 尚未阐明。目的 观察 DHA 对体外培养的 RPE 中 HO-1 表达的影响及其分子机制。方法 对人 RPE 细胞系 ARPE-19 进行培养,分别用 30、50、100 和 120 $\mu\text{mol/L}$ DHA 作用 4~24 h,以不含 DHA 培养的细胞作为对照组。采用乳酸脱氢酶(LDH)法检测 DHA 对细胞的毒性;分别采用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 法检测各组细胞中 HO-1 mRNA 及其蛋白的相对表达;采用比色法分析各组细胞中 HO-1 酶活性变化情况;采用荧光探针 H_2DCFDA 检测细胞中活性氧簇(ROS)的相对比例,并采用免疫荧光技术检测各组培养细胞中核转录因子-E2 相关因子 2(Nrf2)的核转位情况;分别采用 ROS 抑制剂 N-乙酰半胱氨酸(NAC)干预法和 Nrf2 小干扰 RNA(siRNA)转染法作用于培养的细胞,采用 Western blot 法检测细胞中 Nrf2 蛋白的表达,并观察其对细胞中 HO-1 蛋白表达量的影响。结果 0、30、50、100 和 120 $\mu\text{mol/L}$ DHA 作用于 ARPE-19 细胞后 24 h,培养上清液中 LDH 漏出率的总体比较差异有统计学意义($F=8.14, P<0.05$),其中 120 $\mu\text{mol/L}$ DHA 作用后细胞中 LDH 漏出率明显高于 0、30、50、100 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。不同浓度 DHA 作用 ARPE-19 细胞后 8 h,HO-1 mRNA 及其蛋白的相对表达量以及 HO-1 的酶活性总体比较差异均有统计学意义($F=16.24, P<0.05$; $F=11.34, P<0.05$; $F=11.81, P<0.05$),其中 30、50、100 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组细胞中 HO-1 mRNA 及其蛋白的相对表达量以及 HO-1 的酶活性均明显高于 0 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。不同浓度 DHA 作用 ARPE-19 细胞后 4 h 细胞内 ROS 相对荧光强度、细胞核 Nrf2 阳性细胞比例的总体比较差异均有统计学意义($F=11.08, P<0.05$; $F=16.42, P<0.05$),其中 30、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组细胞中 ROS 相对荧光强度、细胞核 Nrf2 阳性细胞比例均明显高于 0 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。100 $\mu\text{mol/L}$ DHA 处理条件下,NAC 预处理后细胞中 HO-1 蛋白的相对表达量和细胞核 Nrf2 阳性细胞比例均明显低于单纯 100 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组,Nrf2 siRNA 转染组细胞中 HO-1 的相对表达量和细胞核 Nrf2 阳性细胞比例均明显低于空白 siRNA 转染组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。结论 低于 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 DHA 可能通过 ROS/Nrf2 途径诱导 RPE 细胞表达 HO-1,从而发挥对细胞的保护作用。

【关键词】 抗氧化剂/药理; 细胞保护/药物作用; 氧化应激; 眼色素上皮/药物作用; 血红素氧合酶-1; 核转录因子-E2 相关因子 2/代谢; 活性氧簇/代谢; 二十二碳六烯酸

基金项目:十堰市科学技术研究与开发计划项目(14Y40)

Induction of docosahexaenoic acid to expression of heme oxygenase-1 in retinal pigment epithelial cells Liu

Yuefeng, Luo Weimin, Zhang Yong, Zhong Xiaodong

Department of Ophthalmology (Liu YF, Zhang Y, Zhong XD), Department of Cardiothoracic Surgery (Luo WM), Shiyan Taihe Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China

Corresponding author: Luo Weimin, Email: weiminluo120@163.com

【Abstract】 Background Oxidative stress is an important pathogenesis of age-related macular degeneration. Recent evidences indicate that docosahexaenoic acid (DHA) plays an important role during the development of retinal photoreceptor cells and protect the cells against oxidative stress by inducing the expression of heme oxygenase-1 (HO-1). However, whether DHA can induce the expression of HO-1 in human retinal pigment epithelium (RPE) cells is unelucidated. Objective This study was to investigate the effect of DHA on the expression of HO-1 in RPE cells and its molecular mechanism. Methods Human RPE cell line ARPE-19 was cultured *in vitro* and treated with 30, 50, 100 and 120 $\mu\text{mol/L}$ DHA for 4 to 24 hours, respectively, and the cells were cultured without DHA as the control group. The cytotoxicity of DHA was detected by lactate dehydrogenase (LDH), and the expression of HO-1 mRNA and protein were detected by real-time PCR and Western blot assay, respectively. The enzymatic activity of HO-1 was

detected by colorimetry. The reactive oxygen species (ROS) proportion in the cells was detected using fluorescence probe H_2 DCFDA, and immunofluorescence technology was adopted to detect the nuclear translocation of nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2). The expression of Nrf2 protein in the cells was detected by Western blot after intervention of ROS inhibitor N-acetylcysteine (NAC) and transfection of Nrf2 small interfering RNA (siRNA).

Results The LDH leakage rate was significantly different after 0, 3, 50, 100 and 120 $\mu\text{mol/L}$ DHA treated the cells for 24 hours ($F=8.14, P<0.05$), and the LDH leakage rate in the 120 $\mu\text{mol/L}$ DHA group was significantly higher than that of 0, 30, 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$ DHA group (all at $P<0.05$). The relative expression levels of HO-1 mRNA and HO-1 protein or HO-1 enzymatic activity in the cells were significantly different among different concentrations of DHA group in 8 hours after treatment ($F=16.24, P<0.05$; $F=11.34, P<0.05$; $F=11.81, P<0.05$), and the expressions of these factors were considerably higher in the 30, 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$ DHA group than those in the 0 $\mu\text{mol/L}$ DHA group (all at $P<0.05$). The ROS relative fluorescence intensity and nuclear Nrf2 positive cells proportion were statistically significant among different concentrations of DHA groups ($F=11.08, P<0.05$; $F=16.42, P<0.05$), and the ROS relative fluorescence intensity and nuclear Nrf2 positive cells proportion were evidently higher in the 30, 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$ DHA group than those in the 0 $\mu\text{mol/L}$ DHA group (all at $P<0.05$). The relative expression levels of HO-1 protein and the proportion of nuclear Nrf2 positive cells were significantly lower in the NAC pretreated 100 $\mu\text{mol/L}$ DHA group than those in the 100 $\mu\text{mol/L}$ DHA group. In addition, the HO-1 relative expression level and the positive cells proportion of nuclear Nrf2 were significantly lower in the of Nrf2 siRNA transfection group than those in the blank siRNA transfection group (both at $P<0.05$).

Conclusions DHA with concentration below 100 $\mu\text{mol/L}$ can protect RPE cells from oxidative stress by inducing the expression of HO-1 in the cells via ROS/Nrf2 pathway.

[Key words] Antioxidants/pharmacology; Cytoprotection/drug effects; Oxidative stress; Pigment epithelium of eye/drug effects; Heme oxygenase-1; Nuclear factor-E2-related factor 2/metabolism; Reactive oxygen species/metabolism; Docosahexaenoic acid

Fund program: Scientific and Technological Projects of Shiyuan City (14Y40)

年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 是一种随年龄增长出现的双侧、进行性视网膜黄斑部退行性病变, 常发生于 45 岁以上人群, 是常见的不可逆性致盲眼病之一^[1-2]。目前, AMD 的病因和发病机制仍不完全明了, 遗传、营养、中毒、慢性光损害、自身免疫反应等因素均与 AMD 的发病有关^[3]。研究表明, 氧化应激在 AMD 的发病过程中发挥重要作用。由于黄斑部解剖学与组织学的特殊性, 视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞对氧化应激非常敏感, 持续暴露于光照之下形成积累的光氧化效应, 即 RPE 细胞吞噬光感受器外节盘膜后细胞内可产生大量活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS)。此外, 随着年龄的增长, RPE 细胞清除 ROS 的能力有所降低。因此, 改善 RPE 细胞的氧化应激状态有利于延缓 AMD 的进展^[4-5]。临床研究也显示, 给予抗氧化剂治疗后可有效降低 AMD 患者 RPE 细胞的氧化应激水平, 减轻临床症状^[6-7]。二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA) 是一种不饱和脂肪酸, 具有抗氧化作用, 对中枢神经系统以及视网膜光感受细胞的发育和功能具有重要作用, 并能在一定程度上改善细胞的氧化应激状态, 其机制可能与上调多种抗氧化应激蛋白, 如血红素氧合酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 的表达有关^[8]。本研究旨在探讨 DHA 对人 RPE 细胞表达 HO-1 的影响, 从而为其临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 人 RPE 细胞株 人 RPE 细胞株 ARPE-19 细胞购自美国 ATCC 公司。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM 培养基、无内毒素胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (美国 Gibco 公司); DHA、 β -actin 多克隆抗体、ROS 抑制剂 N-乙酰半胱氨酸 (N-acetyl-cysteine, NAC)、荧光探针 H_2 DCFDA (美国 Sigma-Aldrich 公司); CytoTox 96[®] 非放射性细胞毒性分析试剂盒 (美国 Promega 公司); 鼠抗人 HO-1 多克隆抗体 (sc-136960)、辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗 (sc-2354)、鼠抗人核转录因子-E2 相关因子 2 (nuclear factor-E2-related factor 2, Nrf2) 多克隆抗体 (sc-365949) (美国 Santa Cruz 公司); Cy3 标记的羊抗鼠多克隆抗体 (ab97035) (美国 Abcam 公司); Nrf2 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) (广州市锐博生物科技有限公司); siRNA 转染试剂盒 (德国 Qiagen 公司); HO-1 活性分析试剂盒 (上海 GenMed 公司); 细胞蛋白提取试剂盒、Bradford 蛋白浓度测定试剂盒 (美国 Pierce 公司)。5810R 型高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); Infinite F200 型荧光分光光度计 (瑞士 Tecan 公司); Nikon C2 Plus 型激光扫描共焦显微镜 (日本尼康株式会社)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 ARPE-19 细胞用含体积分数 10% FBS 的 DMEM (含 2 mmol/L L-谷氨酰胺和 100 μg/ml 青霉素和链霉素) 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 的恒温培养箱中培养。待细胞生长至密度为 80% 时用胰酶消化并接种至 6 孔板中, 改用含 1% FBS 的 DMEM 培养基培养 24 h。于不同培养孔的培养液中分别加入 30、50、100 和 120 μmol/L DHA 作用 4 ~ 24 h, 以未添加 DHA 培养液培养的细胞作为对照组, 在 100 μmol/L DHA 处理前给予 10 mmol/L NAC 预处理 1 h 作为 100 μmol/L DHA+NAC 组。

1.2.2 Nrf2 siRNA 细胞转染 取胰酶消化的 ARPE-19 细胞接种至直径为 6 cm 的培养皿, 细胞约 5×10^5 , 更换为无血清培养基培养 18 ~ 24 h, 按照 siRNA 转染试剂盒的步骤进行 siRNA 转染, 即 100 nmol/L Nrf2 siRNA 与转染试剂混合后加入细胞培养基中孵育 4 h, 无菌 PBS 漂洗细胞; 更换为完全培养基进行后续实验, 以不加 siRNA 或加入空白 siRNA 分别作为空白对照组和对照 siRNA 转染组。

1.2.3 乳酸脱氢酶法检测 DHA 对细胞的毒性 ARPE-19 细胞按照 1×10^4 /孔的密度接种至 96 孔板中, 每孔中培养基为 100 μl。按照 1.2.1 方法处理各浓度 DHA 组细胞, 于培养后 24 h 收集培养液上清, 采用 CytoTox 96[®] 非放射性细胞毒性分析试剂盒检测乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 的质量浓度, 并计算 LDH 的漏出率。LDH 漏出率 (%) = 实验组 LDH 质量浓度/细胞 LDH 最大释放量 $\times 100\%$ 。每组设 3 个复孔, 重复测量 3 次。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 法检测细胞中 HO-1 mRNA 的相对表达量 按照 1.2.1 方法收集不同浓度 DHA 处理细胞, 采用 Trizol 法提取细胞总 RNA, 取 3 μg RNA 进行逆转录, 将获得的 cDNA 进行实时定量 PCR 检测。HO-1 上游引物为 5'-GCAGAGAATGCTGAGTTCATG-3', 下游引物为 5'-CACATCTATGTGGCCCTGGAGGAGG-3'; GAPDH 上游引物为 5'-GCCTCAAGATCATCAGCAATGC-3', 下游引物为 5'-CCITCCACGATACCAAAGTTGTCAT-3'。扩增条件: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 15 s, 58 °C 退火 1 min, 共 40 个循环。以 GAPDH 为内参照, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组细胞中 HO-1 的相对表达量。

1.2.5 Western blot 法检测 HO-1 蛋白的相对表达量 收集不同浓度 DHA 处理、NAC 预处理及 Nrf2 siRNA 转染细胞, 用 4 °C 无菌 PBS 漂洗 1 次, 加入含蛋白酶抑制剂的 Cocktails 裂解细胞。按照细胞蛋白提取试剂盒的说明提取细胞质和细胞核蛋白并采用 Bradford

法测定蛋白质量浓度。取 20 μg 蛋白用于聚丙烯酰胺琼脂糖凝胶电泳, 将蛋白转印至硝酸纤维素膜上, 用体积分数 5% 牛血清白蛋白室温封闭 2 h, 分别加入 HO-1 和 β-actin 抗体 4 °C 孵育 12 h, 加入相应二抗室温孵育 2 h, ECL 显影、拍照, 采用 Image J 软件分析其灰度值, 以 GAPDH 为内参照, 计算目的蛋白的相对表达量。

1.2.6 HO-1 酶活性测定 按照 1.2.5 方法收集各组细胞, 离心半径 11 cm, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入 1.5 ml GENMED 清洗液 A 重悬细胞漂洗 1 次。离心后弃上清, 于沉淀的细胞中加入 1.5 ml 裂解液 B, 充分混匀, 400 W 超声 3 ~ 5 s 裂解细胞。按照 HO-1 活性分析试剂盒操作步骤设置背景管和样品管, 依次加入 340 μl 缓冲液 C、20 μl 反应液 D 和 20 μl 底物, 充分混匀, 37 °C 避光孵育 1 h, 加入 400 μl 终止液终止反应。离心并吸取 100 μl 绿色相, 于 464 nm 和 530 nm 波长处获得其吸光度 (A) 值, 计算 HO-1 的活性, 以每毫克蛋白中每小时生成的胆绿素浓度表示。

1.2.7 ROS 含量测定 分别于 0、30、40 和 100 μmol/L DHA 处理后 4 h 收集细胞, 加入分子探针染液 H₂DCFDA (终浓度为 5 μmol/L), 37 °C 避光孵育 30 min。PBS 充分洗涤, 荧光分光光度计测量细胞内荧光强度, 激发波长为 485 nm, 发射波长为 530 nm。相对荧光强度值 = 处理组荧光强度/对照组荧光强度 $\times 100\%$ 。

1.2.8 免疫荧光法观察 ARPE-19 细胞 Nrf2 核转位 取胰酶消化的 ARPE-19 细胞接种至含有载玻片的 24 孔板中培养 24 h, 参照 1.2.1 方法处理各组细胞, 用质量分数 3.5% 多聚甲醛室温固定 15 min, 甲醇通透 10 min, 无菌 PBS 洗涤后滴加体积分数 1% 山羊血清, 室温封闭 30 min; PBS 洗涤 3 次, 添加抗 Nrf2 抗体, 室温孵育 2 h; PBS 洗涤, 加入 Cy3 标记的羊抗鼠二抗孵育 1 h; 激光扫描共焦显微镜下观察并拍照, 并采用 Image Pro Plus 软件对 Nrf2 核转位细胞进行计数。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 *F* 检验呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素干预多水平实验设计, 不同浓度 DHA 处理组间 LDH 漏出率、HO-1 mRNA 和蛋白相对表达量、ROS 表达量、细胞核 Nrf2 阳性细胞比例比较采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。采用双侧检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 培养的 ARPE-19 细胞形态及不同浓度 DHA 组

LDH 漏出率

ARPE-19 细胞在 DMEM 培养基中贴壁生长,细胞未融合时呈卵圆形、多角形或短梭形,细胞质中可见色素颗粒。细胞生长至融合状态时呈近似六角形和铺路石样排列,多次传代后细胞形态无明显变化(图 1)。0、30、50、100 和 120 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组细胞上清培养液中 LDH 漏出率分别为 $(8.18 \pm 0.32)\%$ 、 $(8.42 \pm 0.68)\%$ 、 $(7.35 \pm 1.03)\%$ 、 $(9.25 \pm 0.86)\%$ 和 $(12.36 \pm 0.72)\%$,不同浓度 DHA 作用后 LDH 漏出率的总体比较差异有统计学意义($F=8.14, P<0.05$);其中 120 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组 LDH 漏出率明显高于 0、30、50、100 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)(图 2)。因此后续实验中剔除 120 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组。

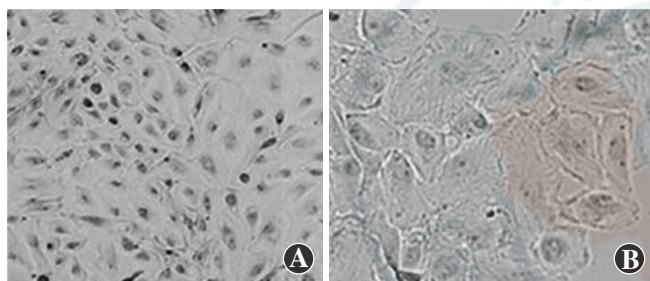


图 1 培养的 ARPE-19 细胞形态 A:原代培养的细胞呈卵圆形、多角形或短梭形,细胞质中可见色素($\times 200$) B:传代的细胞近似六角形,排列紧密($\times 400$)

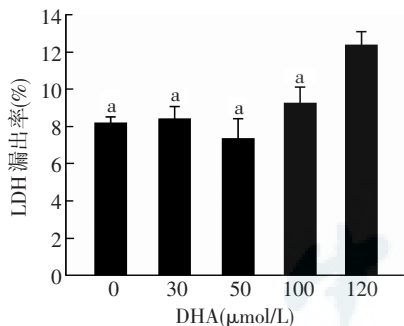


图 2 不同浓度 DHA 作用后培养上清液中 LDH 漏出率比较 $F=8.14, P<0.05$. 与 120 $\mu\text{mol/L}$ DHA 作用后值比较, $^a P<0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n=3$) LDH:乳酸脱氢酶;DHA:二十二碳六烯酸

2.2 不同浓度 DHA 作用后细胞中 HO-1 mRNA 相对表达量

实时荧光定量 PCR 结果显示,30、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ DHA 作用后 8 h,ARPE-19 细胞中 HO-1 mRNA 的相对表达量分别为 1.61 ± 0.22 、 2.42 ± 0.14 和 2.90 ± 0.21 ,总体比较差异有统计学意义($F=16.24, P<0.05$);其中 30、50、100 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组细胞中 HO-1 mRNA 的相对表达量明显高于 0 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组,差异均有统计学意义($P=0.041, 0.024, 0.000$)(图 3A),100 $\mu\text{mol/L}$ DHA 作用于 ARPE-19 细胞后 4、8、26 和 24 h 细胞中 HO-1 mRNA 相对表达量分别为 1.64 ± 0.14 、 2.91 ± 0.22 、

3.10 ± 0.11 、 2.52 ± 0.27 和 1.33 ± 0.25 ,总体比较差异有统计学意义($F=20.83, P<0.05$);与未处理组比较,处理后 4、8、12、16 h 细胞中 HO-1 mRNA 相对表达量均明显升高,差异均有统计学意义($P=0.038, 0.000, 0.000, 0.018$)(图 3B)。

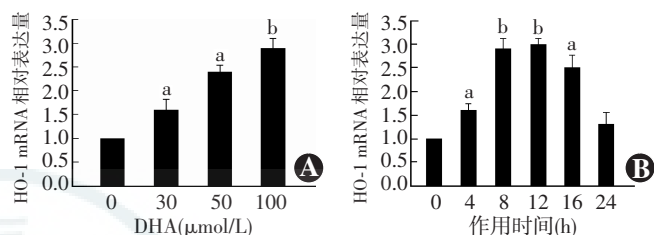


图 3 各组细胞中 HO-1 mRNA 相对表达量的比较 A:不同浓度 DHA 作用 ARPE-19 细胞后 8 h HO-1 mRNA 相对表达量的比较 $F=16.24, P<0.05$. 与 0 $\mu\text{mol/L}$ DHA 作用组比较, $^a P<0.05, ^b P<0.01$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n=3$) B:100 $\mu\text{mol/L}$ DHA 作用 ARPE-19 细胞后不同时间点细胞中 HO-1 mRNA 相对表达量的比较 $F=20.83, P<0.05$. 与 0 h 比较, $^a P<0.05, ^b P<0.01$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n=3$) HO:血红素氧合酶;DHA:二十二碳六烯酸

2.3 不同浓度 DHA 作用后 ARPE-19 细胞中 HO-1 蛋白表达及活性变化

Western blot 结果显示,HO-1 蛋白的相对表达量随 DHA 浓度的升高而增加,不同 DHA 浓度组 HO-1 蛋白的相对表达量总体比较差异有统计学意义($F=11.34, P<0.05$)(图 4)。0、30、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组细胞中 HO-1 的酶活性值分别为 (0.37 ± 0.04) 、 (0.56 ± 0.07) 、 (0.98 ± 0.12) 和 (1.26 ± 0.05) mmol/(mg·h),总体比较差异有统计学意义($F=11.81, P<0.05$);与 0 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组比较,30、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组细胞中 HO-1 酶活性均明显增加,差异均有统计学意义($P=0.027, 0.019, 0.000$)(图 5)。

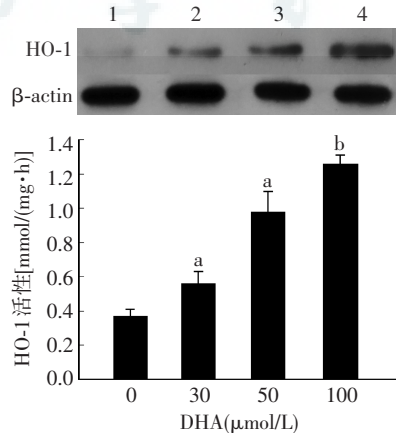


图 4 Western blot 法检测不同浓度 DHA 组细胞中 HO-1 蛋白的相对表达量 HO-1 蛋白的相对表达量随 DHA 浓度的升高而增加 1:0 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组 2:30 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组 3:50 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组 4:100 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组 HO:血红素氧合酶;DHA:二十二碳六烯酸

图 5 不同浓度 DHA 作用 8 h 后细胞中 HO-1 酶活性量化比较 $F=11.81, P<0.05$. 与 0 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组比较, $^a P<0.05, ^b P<0.01$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n=3$) HO:血红素氧合酶;DHA:二十二碳六烯酸

2.4 不同浓度 DHA 作用后 ARPE-19 细胞中 ROS 荧光强度变化

0、30、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组 ARPE-19 细胞内 ROS 相对荧光强度分别为 $(12.52 \pm 1.07)\%$ 、 $(19.47 \pm 3.21)\%$ 、 $(32.41 \pm 1.82)\%$ 和 $(44.58 \pm 2.52)\%$ ，总体比较差异有统计学意义 ($F = 11.08, P < 0.05$)，30、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ DHA 作用后细胞内 ROS 相对荧光强度明显高于 0 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组，差异均有统计学意义 ($P = 0.021, 0.014, 0.000$) (图 6)。

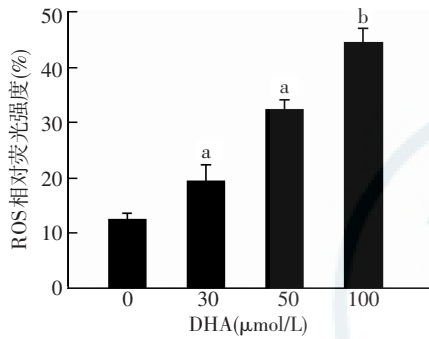


图 6 不同浓度 DHA 作用后 ARPE-19 细胞中 ROS 的相对荧光强度比较 $F = 11.08, P < 0.05$ 。与 0 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n = 3$) ROS: 活性氧簇; DHA: 二十二碳六烯酸

2.5 NAC 预处理和 Nrf2 siRNA 转染对 ARPE-19 细胞中 HO-1 蛋白表达的影响

0 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组细胞仅表达极微量的 HO-1 蛋白,随着 DHA 浓度的增加,细胞中 HO-1 蛋白的表达条带逐渐增强。100 $\mu\text{mol/L}$ DHA+NAC 组细胞中 HO-1 表达条带明显弱于 100 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组 (图 7A)。0、30、50、100 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组及 100 $\mu\text{mol/L}$ DHA+NAC 组细胞中 HO-1 蛋白的相对表达量分别为 0.01 ± 0.06 、 0.24 ± 0.07 、 0.78 ± 0.05 、 0.89 ± 0.02 和 0.21 ± 0.06 , 组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 7.38, P < 0.05$), 其中 30、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ DHA 作用后细胞中 HO-1 蛋白相对表达量明显高于 0 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组, 差异均有统计学意义 ($P = 0.035, 0.007, 0.000$)。100 $\mu\text{mol/L}$ DHA+NAC 组细胞中 HO-1 蛋白相对表达量明显低于 100 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组, 差异有统计学意义 ($P = 0.030$) (图 7B)。不同浓度 DHA 组及 Nrf2 siRNA 转染组间 HO-1 蛋白相对表达量总体比较差异有统计学意义 ($F = 14.82, P < 0.05$), 其中 30、50、100 $\mu\text{mol/L}$ DHA 作用后细胞中 HO-1 蛋白相对表达量均明显高于 0 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组, 差异均有统计学意义 ($P = 0.044, 0.028, 0.000$), 100 $\mu\text{mol/L}$ DHA+Nrf2 siRNA 转染组细胞中 HO-1 蛋白相对表达量明显低于 100 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组, 差异有统计学意义 ($P = 0.014$) (图 8)。

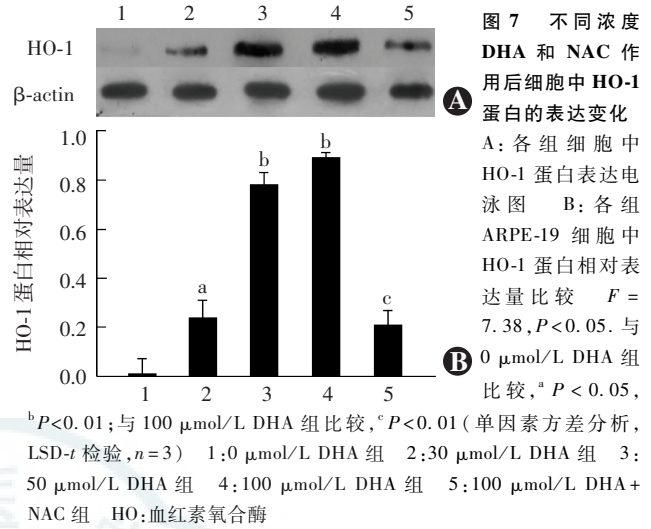


图 7 不同浓度 DHA 和 NAC 作用后细胞中 HO-1 蛋白的表达变化 A: 各组细胞中 HO-1 蛋白表达电泳图 B: 各组 ARPE-19 细胞中 HO-1 蛋白相对表达量比较 $F = 7.38, P < 0.05$ 。与 0 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与 100 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组比较, ^c $P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n = 3$)

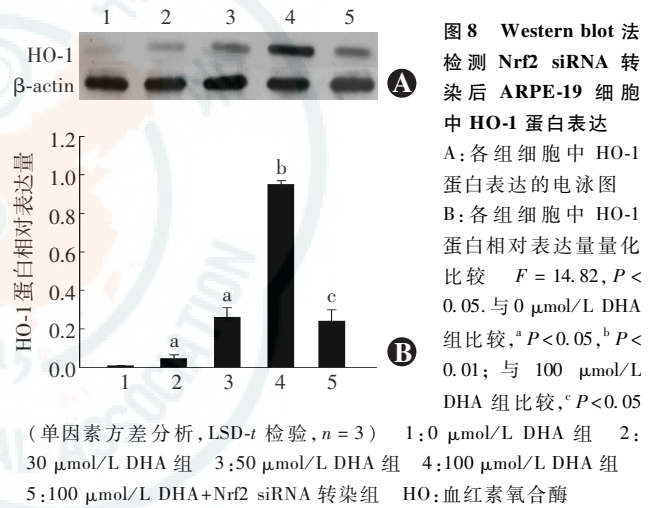


图 8 Western blot 法检测 Nrf2 siRNA 转染后 ARPE-19 细胞中 HO-1 蛋白表达 A: 各组细胞中 HO-1 蛋白表达的电泳图 B: 各组细胞中 HO-1 蛋白相对表达量量化比较 $F = 14.82, P < 0.05$ 。与 0 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与 100 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组比较, ^c $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n = 3$)

2.6 不同浓度 DHA 和 NAC 作用后 ARPE-19 细胞中 Nrf2 核转位情况

0 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组 Nrf2 主要位于 ARPE-19 细胞的细胞质, 细胞核 Nrf2 阳性细胞比例为 $(4.6 \pm 1.1)\%$ 。30、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组细胞核 Nrf2 阳性细胞比例分别为 $(13.5 \pm 1.6)\%$ 、 $(24.3 \pm 2.5)\%$ 和 $(36.5 \pm 1.7)\%$, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 16.42, P < 0.05$); 其中 30、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组细胞核中 Nrf2 阳性细胞比例明显低于 0 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组, 差异均有统计学意义 ($P = 0.022, 0.032, 0.002$), 100 $\mu\text{mol/L}$ DHA+NAC 组细胞核 Nrf2 阳性细胞比例为 $(8.2 \pm 1.3)\%$, 明显低于 100 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组, 差异有统计学意义 ($P = 0.014$) (图 9)。空白对照组、对照 siRNA 转染组细胞中 HO-1 蛋白的表达较强, Nrf2 siRNA 转染组细胞中 HO-1 蛋白的表达明显减弱 (图 10A)。空白对照组、对照 siRNA 转染组和 Nrf2 siRNA 转染组细胞中 Nrf2 蛋白的相对表达量分别为 0.66 ± 0.10 、 0.75 ± 0.14 和

0.15±0.06, 总体比较差异有统计学意义 ($F=10.17$, $P<0.05$), Nrf2 siRNA 转染组细胞中 Nrf2 蛋白的相

对表达量明显低于空白对照组和对照 siRNA 组, 差异均有统计学意义 ($P=0.012, 0.008$) (图 10B)。

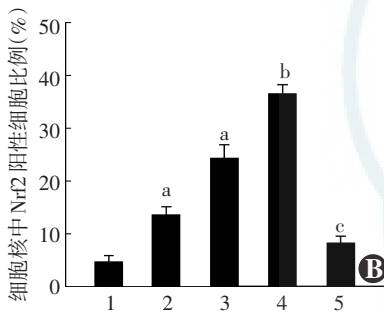
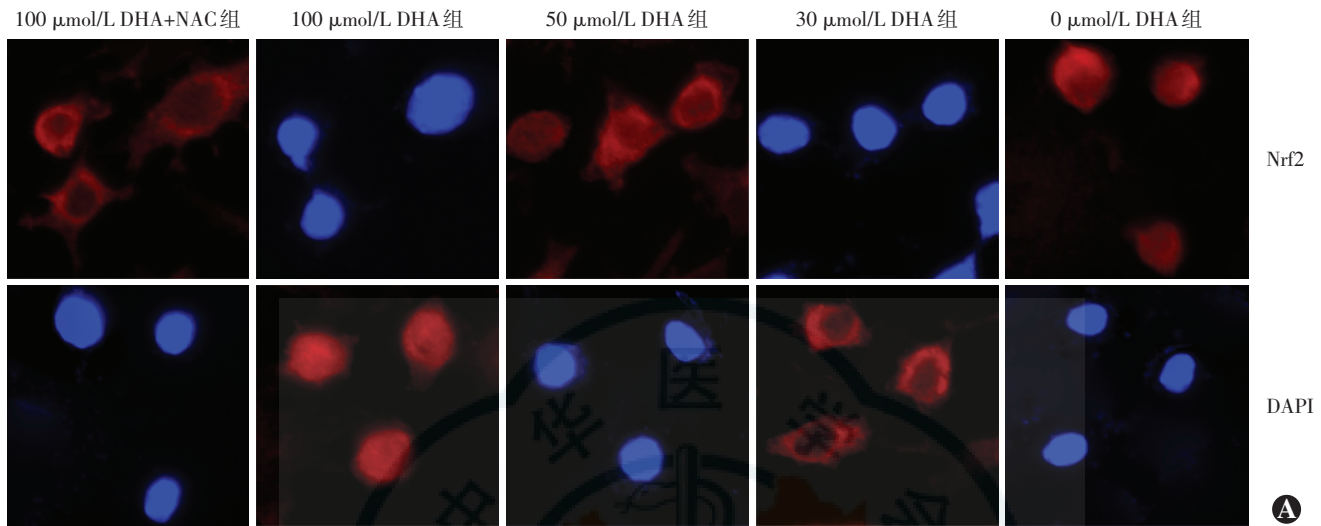


图 9 ROS 抑制剂 NAC 作用后 ARPE-19 细胞中 Nrf2 核转位情况 A: 各组细胞中 Nrf2 核转位免疫荧光图 (Cy3, ×100) B: 各组细胞中 Nrf2 核转位情况量化比较 $F=16.42, P<0.05$. 与 0 μmol/L DHA 组比较, $^a P<0.05$, $^b P<0.01$; 与 100 μmol/L DHA 组比较, $^c P<0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n=3$) 1: 0 μmol/L DHA 组 2: 30 μmol/L DHA 组 3: 50 μmol/L DHA 组 4: 100 μmol/L DHA 组 5: 100 μmol/L DHA+NAC 组 DHA: 二十二碳六烯酸; NAC: N-乙酰半胱氨酸; Nrf: 核转录因子-E2 相关因子

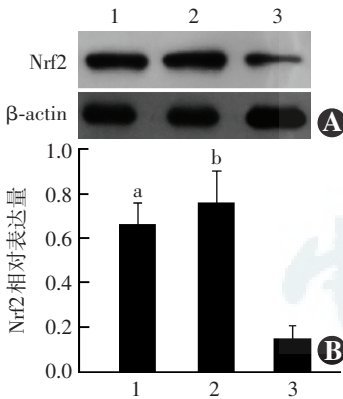


图 10 不同质粒转染组细胞中 Nrf2 蛋白表达变化 A: 空白对照组、对照 siRNA 转染组和 Nrf2 siRNA 转染组细胞中 Nrf2 蛋白表达强度 B: 各组细胞中 Nrf2 蛋白相对表达量的量化比较 $F=10.17, P<0.05$. 与 Nrf2 siRNA 转染组比较, $^a P<0.05$, $^b P<0.01$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n=3$) 1: 空白对照组 2: 对照 siRNA 转染组 3: Nrf2 siRNA 转染组 Nrf: 核转录因子-E2 相关因子

3 讨论

HO 是血红素降解为等分子 CO、Fe²⁺ 和胆绿素的限速酶。HO 有 3 种同工酶, 即 HO-1、HO-2 和 HO-3, 其中 HO-1 为诱导型。在氧化应激、感染、糖尿病和视网膜病变等多种病理生理状态下 HO-1 的表达上调^[9]。HO-1 可通过其产物 CO、胆红素和 Fe²⁺ 而发挥细胞保护作用, 降低肿瘤坏死因子 α 的促凋亡毒性^[10], 维持血管内皮细胞的生理功能, 减轻炎症和氧化应激损伤^[11]。有研究表明, 采用外源性药物诱导

HO-1 的表达可减轻光感受器细胞的凋亡^[12-13]。DHA 是人体内不饱和程度最高的脂肪酸之一, 可影响膜蛋白活性、信号转导及受体的功能。研究表明, DHA 可降低 RPE 细胞的氧化应激水平, 并能抑制因蛋白折叠错误所致的自噬^[8]。同时, DHA 也能促进高糖条件下视网膜细胞的增生, 并能抑制白细胞介素-6 的分泌, 从而减轻炎症反应^[14], 此外 DHA 可有效延缓视网膜色素变性病程的进展^[15]。DHA 可有效改善光损伤所致的视网膜氧化应激反应, 抑制核因子-κB 的激活, 并能上调内源性抗氧化蛋白的表达^[16-18]。以上结果表明 DHA 可通过多种机制发挥对视网膜细胞的保护作用。为了进一步观察 DHA 是否能影响 RPE 细胞中 HO-1 的表达, 本研究用不同浓度的 DHA 作用于体外培养的人 RPE 细胞 ARPE-19, 发现 30 μmol/L DHA 即可诱导 HO-1 mRNA 和蛋白的表达, 同时上调其酶活性。基于 HO-1 对细胞的保护效应, 推测 DHA 可能通过上调 HO-1 的表达而减轻 RPE 细胞的氧化应激水平。

在氧化应激或炎症条件下, 细胞内 NADPH 氧化酶被激活, 进而通过一系列电子传递过程诱导 ROS 产

生。适量的 ROS 也是细胞内重要的信号分子,但 ROS 的过度产生可引起细胞大分子,如蛋白质、DNA 的氧化损伤。有研究显示,HO-1 表达与 ROS 有关^[19]。本研究也发现,DHA 可明显诱导 ARPE-19 细胞产生 ROS,而经 ROS 抑制剂 NAC 处理细胞后,HO-1 蛋白表达显著减少,这表明 HO-1 的表达受 ROS 的调控。

Nrf2 是一种重要的氧化应激转录保护因子。生理条件下 Nrf2 存在于细胞质中,并与抑制蛋白 Keap1 相结合。当细胞受到各种外源性刺激时,Keap1 经泛素化降解并与 Nrf2 分离。Nrf2 随后转移至细胞核内与基因 5' 非编码区的抗氧化应激反应性元件相结合而启动相关基因的转录^[20]。本研究中也发现,DHA 处理 ARPE-19 细胞后,细胞质中的 Nrf2 转移至细胞核内,参与 HO-1 表达的调控。此外,通过采用 ROS 清除剂 NAC 处理细胞后,Nrf2 的核转位受到明显抑制,表明 Nrf2 的激活与 ROS 有关。同时,采用 Nrf2 siRNA 转染细胞后发现 HO-1 的表达显著减少,表明 HO-1 的表达受 ROS/Nrf2 的调控。

总之,本研究证实 DHA 可激活 RPE 细胞中 ROS/Nrf2 信号通路,并诱导 HO-1 的表达。HO-1 蛋白表达水平以及酶活性的上调可能通过多种机制发挥对 RPE 细胞的保护作用。在随后的研究中,我们将对 HO-1 保护 RPE 细胞的机制进行更深入的研究,以进一步明确 DHA 在 AMD 诊疗中的应用价值。

参考文献

- [1] French DD, Margo CE. Age-related macular degeneration, anti-vascular endothelial growth factor agents, and short-term mortality: a postmarketing medication safety and surveillance study [J]. *Retina*, 2011, 31(6): 1036-1042. DOI: 10.1097/IAE.0b013e31821dc66f.
- [2] Seddon JM, Reynolds R, Maller J, et al. Prediction model for prevalence and incidence of advanced age-related macular degeneration based on genetic, demographic, and environmental variables [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(5): 2044-2053. DOI: 10.1167/iovs.08-3064.
- [3] Hemminki K, Försti A, Li X, et al. Familial risks of age-related macular degeneration [J]. *Am J Ophthalmol*, 2011, 151(3): 561-562. DOI: 10.1016/j.ajo.2010.11.004.
- [4] Parmeggiani F, Sorrentino FS, Romano MR, et al. Mechanism of inflammation in age-related macular degeneration: an up-to-date on genetic landmarks [J/OL]. *Mediators Inflamm*, 2013, 2013: 435607 [2015-09-20]. <http://www.hindawi.com/journals/mi/2013/435607>. DOI: 10.1155/2013/435607.
- [5] 黄大蕊, 王桂云. 视网膜色素上皮细胞的损伤因素与治疗进展 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2014, 32(1): 88-93. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.01.018.
Huang DR, Wang GY. The causative factors and treatment of RPE cell-related eye diseases [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2014, 32(1): 88-93. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.01.018.
- [6] Voloboueva LA, Liu J, Suh JH, et al. (R)-alpha-lipoic acid protects retinal pigment epithelial cells from oxidative damage [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(11): 4302-4310. DOI: 10.1167/iovs.04-1098.
- [7] Jia L, Liu Z, Sun L, et al. Acrolein, a toxicant in cigarette smoke, causes oxidative damage and mitochondrial dysfunction in RPE cells: protection by (R)-alpha-lipoic acid [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48(1): 339-348. DOI: 10.1167/iovs.06-0248.
- [8] Johansson I, Monsen VT, Pettersen K, et al. The marine n-3 PUFA DHA evokes cytoprotection against oxidative stress and protein misfolding by inducing autophagy and NFE2L2 in human retinal pigment epithelial cells [J]. *Autophagy*, 2015, 11(9): 1636-1651. DOI: 10.1080/15548627.2015.1061170.
- [9] Paine A, Eiz-Vesper B, Blasczyk R, et al. Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential [J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80(12): 1895-1903. DOI: 10.1016/j.bcp.2010.07.014.
- [10] Morse D, Pischke SE, Zhou Z, et al. Suppression of inflammatory cytokine production by carbon monoxide involves the JNK pathway and AP-1 [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(39): 36993-36998. DOI: 10.1074/jbc.M302942200.
- [11] Florczyk U, Jazwa A, Maleszewska M, et al. Nrf2 regulates angiogenesis: effect on endothelial cells, bone marrow-derived proangiogenic cells and hind limb ischemia [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(11): 1693-1708. DOI: 10.1089/ars.2013.5219.
- [12] Li Z, Dong X, Liu H, et al. Astaxanthin protects ARPE-19 cells from oxidative stress via upregulation of Nrf2-regulated phase II enzymes through activation of PI3K/Akt [J]. *Mol Vis*, 2013, 19: 1656-1666.
- [13] Hanus J, Kolkin A, Chimienti J, et al. 4-Acetoxyphenol prevents RPE oxidative stress-induced necrosis by functioning as an NRF2 stabilizer [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56(9): 5048-5059. DOI: 10.1167/iovs.15-16401.
- [14] 于海宁, 蔡鹏飞, 沈生荣, 等. 长链多不饱和脂肪酸对高糖环境下视网膜细胞生长的影响及其机理研究 [J]. *浙江工业大学学报*, 2014, 43(3): 338-343. DOI: 10.3969/j.issn.1006-4303.2014.03.023.
Yu HN, Cai PF, Shen SR, et al. Effects of long chain polyunsaturated fatty acid on the growth of retinal cells in high glucose environment and their mechanisms [J]. *J Zhejiang Univ Tech*, 2014, 43(3): 338-343. DOI: 10.3969/j.issn.1006-4303.2014.03.023.
- [15] 艾明, 孙明, 杨芳, 等. 二十二碳六烯酸抑制大鼠视网膜光感受器细胞凋亡 [J]. *武汉大学学报: 医学版*, 2012, 33(6): 800-804.
Ai M, Sun M, Yang F, et al. Inhibiting effect of docosahexaenoic acid on apoptosis of photoreceptor cells of rats [J]. *Med J Wuhan Univ*, 2012, 33(6): 800-804.
- [16] Ramchani-Ben Othman K, Cercy C, Amri M, et al. Dietary supplement enriched in antioxidants and omega-3 protects from progressive light-induced retinal degeneration [J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0128395 [2015-12-20]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0128395>. DOI: 10.1371/journal.pone.0128395.
- [17] Johansson I, Monsen VT, Pettersen K, et al. The marine n-3 PUFA DHA evokes cytoprotection against oxidative stress and protein misfolding by inducing autophagy and NFE2L2 in human retinal pigment epithelial cells [J]. *Autophagy*, 2015, 11(9): 1636-1651. DOI: 10.1080/15548627.2015.1061170.
- [18] Fang IM, Yang CH, Yang CM. Docosahexaenoic acid reduces linoleic acid induced monocyte chemoattractant protein-1 expression via PPARγ and nuclear factor-κB pathway in retinal pigment epithelial cells [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2014, 58(10): 2053-2065. DOI: 10.1002/mnfr.201400196.
- [19] Wei S, Wang Y, Chai Q, et al. Potential crosstalk of Ca²⁺-ROS-dependent mechanism involved in apoptosis of Kasumi-1 cells mediated by heme oxygenase-1 small interfering RNA [J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(6): 2373-2384. DOI: 10.3892/ijo.2014.2661.
- [20] Chen N, Wu L, Yuan H, et al. ROS/autophagy/Nrf2 pathway mediated low-dose radiation induced radio-resistance in human lung adenocarcinoma A549 cell [J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11(7): 833-844. DOI: 10.7150/ijbs.10564.

(收稿日期: 2016-03-05)

(本文编辑: 尹卫靖 张宇)