

# 叔丁基对苯二酚对高糖环境下大鼠视网膜 Müller 细胞的抗氧化应激作用及其机制

何薇<sup>1</sup> 田敏<sup>2</sup> 余曦<sup>3</sup> 曹阳<sup>2</sup> 郑文丽<sup>4</sup> 吕红彬<sup>2</sup>

<sup>1</sup>成都市温江区人民医院眼科 611130; <sup>2</sup>西南医科大学附属医院眼科, 泸州 646099; <sup>3</sup>泸州市第二人民医院眼科 646100; <sup>4</sup>攀枝花学院附属医院眼科医院 617000

通信作者: 吕红彬, Email: oculistlvhongbin@163.com

**【摘要】目的** 研究叔丁基对苯二酚(tBHQ)对高糖环境下 SD 大鼠视网膜 Müller 细胞氧化应激的影响及其机制。**方法** 体外培养 SD 大鼠视网膜 Müller 细胞。将实验分为正常对照组、高糖组 and tBHQ 干预组, 采用 Western blot 法和实时荧光定量 PCR 测定各组 Müller 细胞核因子-E2 相关因子(Nrf2)、血红素氧化酶 1(HO-1)、缺氧诱导因子 1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )和血管内皮生长因子(VEGF)蛋白及其 mRNA 的相对表达量。**结果** 体外培养 Müller 细胞的细胞体扁平不规则, 细胞核呈卵圆形, 细胞质丰富, 相邻细胞交织形成网状; Western blot 法检测结果显示, 正常对照组、高糖组和 tBHQ 干预组 Müller 细胞中 Nrf2、HO-1、HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 的蛋白相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义( $F=73.831, 148.618, 152.269, 91.217$ , 均  $P<0.001$ ); 其中高糖组 Nrf2、HO-1、HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 蛋白相对表达量分别是  $0.17\pm 0.02, 0.47\pm 0.02, 0.67\pm 0.07$  和  $0.60\pm 0.05$ , 较正常对照组的  $0.06\pm 0.01, 0.19\pm 0.03, 0.06\pm 0.00$  和  $0.07\pm 0.02$  明显增加, 差异均有统计学意义( $t=4.114, 9.275, 16.479, 13.353$ , 均  $P<0.001$ ); tBHQ 干预组 Nrf2、HO-1 蛋白表达量分别为  $0.40\pm 0.06, 0.72\pm 0.05$ , 较高糖组增加, 差异均有统计学意义( $t=7.847, 7.947$ , 均  $P<0.001$ ); tBHQ 干预组 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 蛋白表达量分别为  $0.18\pm 0.04, 0.26\pm 0.07$ , 较高糖组降低, 但较正常对照组增加, 差异均有统计学意义( $t=13.215, 8.444$ , 均  $P=0.000$ )。实时荧光定量 PCR 测定结果显示, 正常对照组、高糖组和 tBHQ 干预组 Müller 细胞中 Nrf2、HO-1、HIF-1 $\alpha$  和 VEGF mRNA 相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义( $F=340.317, 1582.911, 488.852, 185.699$ , 均  $P<0.001$ ); 其中高糖组 Nrf2、HO-1、HIF-1 $\alpha$  和 VEGF mRNA 相对表达量分别是  $1.53\pm 0.06, 1.50\pm 0.04, 2.56\pm 0.09$  和  $3.04\pm 0.19$ , 较正常对照组的  $1.07\pm 0.07, 0.95\pm 0.05, 0.99\pm 0.02$  和  $1.09\pm 0.08$  明显增加, 差异均有统计学意义( $t=7.292, 15.014, 30.550, 18.573$ , 均  $P<0.001$ ); tBHQ 干预组 Nrf2、HO-1 mRNA 相对表达量分别为  $2.68\pm 0.09, 2.94\pm 0.05$ , 较高糖组增加, 差异均有统计学意义( $t=18.046, 39.458$ , 均  $P<0.001$ ); tBHQ 干预组 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF mRNA 相对表达量分别为  $1.48\pm 0.05, 1.6\pm 0.08$ , 较高糖组降低, 但较正常对照组增加, 差异均有统计学意义( $t=21.036, 13.739$ , 均  $P<0.001$ )。**结论** tBHQ 通过激活抗氧化应激 Nrf2/ARE 信号通路, 对高糖环境下 Müller 细胞损伤起保护作用。

**【关键词】** 糖尿病视网膜病变; Müller 细胞; 叔丁基对苯二酚; 氧化应激; 保护机制

**基金项目:** 四川省科技支撑计划项目 (2015SZ0086)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2020.01.004

## Antioxidative effect and mechanism of tert-butyl hydroquinone on rat retinal Müller cells under high glucose condition

He Wei<sup>1</sup>, Tian Min<sup>2</sup>, Yu Xi<sup>3</sup>, Cao Yang<sup>2</sup>, Zheng Wenli<sup>4</sup>, Lyu Hongbin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, the People's Hospital of Chengdu Wenjiang District, Chengdu 611130, China;

<sup>2</sup>Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646099, China;

<sup>3</sup>Department of Ophthalmology, The Second People's Hospital of Luzhou; <sup>4</sup>The Affiliated Hospital Eye Hospital of Panzhihua College, Panzhihua 617000, China

Corresponding author: Lyu Hongbin, Email: oculistlvhongbin@163.com

**【Abstract】Objective** To explore the impact of tertiary butyl hydroquinone (tBHQ) on Müller cells in SD rats retina under high glucose condition, and discuss the mechanism of tBHQ. **Methods** The Müller cells of SD rats were cultured *in vitro* and the experiment was divided into normal control group, high glucose group and tBHQ intervention group. Western blot and quantitative real time PCR were used to determine the expression of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), hemeoxygenase-1 (HO-1), hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and vascular endothelial growth factor (VEGF) protein and mRNA in each group. **Results** Müller cells cultured *in vitro* were flat with irregularly sharp. The nucleus was oval, while the cytoplasm was abundant. Adjacent cells were interwoven to a network. Western blot assay showed the overall expression of Nrf2, HO-1, HIF-1 $\alpha$ , and VEGF in Müller cells of normal control group, high glucose group, and tBHQ intervention group were significantly different ( $F=$

73.831, 148.618, 152.269, 91.217, all at  $P < 0.001$ ); Among them, the relative expressions of Nrf2, HO-1, HIF-1 $\alpha$  and VEGF proteins in the high glucose group were  $0.17 \pm 0.02$ ,  $0.47 \pm 0.02$ ,  $0.67 \pm 0.07$ , and  $0.6 \pm 0.05$ , which were increased in comparison with  $0.06 \pm 0.01$ ,  $0.19 \pm 0.03$ ,  $0.06 \pm 0.00$  and  $0.07 \pm 0.02$  in the normal control group, with statistically significant differences ( $t = 4.114, 9.275, 16.479, 13.353$ , all at  $P < 0.001$ ); the relative expressions of Nrf2 and HO-1 proteins in the tBHQ intervention group were  $0.40 \pm 0.06$  and  $0.72 \pm 0.05$ , which were increased by comparison with those in the higher glucose group, with statistically significant differences ( $t = 7.847, 7.947$ , both at  $P < 0.001$ ); the relative expressions of HIF-1 $\alpha$  and VEGF proteins in the tBHQ intervention group were  $0.18 \pm 0.04$ ,  $0.26 \pm 0.07$ , which were decreased in comparison with those in the higher glucose group, but were increased in comparison with those in normal control group, with statistically significant differences ( $t = 13.215, 8.444$ , both at  $P < 0.001$ ). Quantitative real time PCR showed that the relative mRNA expressions of Nrf2, HO-1, HIF-1 $\alpha$ , and VEGF in Müller cells of normal control group, high glucose group, and tBHQ intervention group were significantly different ( $F = 340.317, 1582.911, 488.852, 185.699$ , all at  $P < 0.001$ ); the relative mRNA expressions of Nrf2, HO-1, HIF-1 $\alpha$ , and VEGF proteins in the high-glucose group were  $1.53 \pm 0.06$ ,  $1.50 \pm 0.04$ ,  $2.56 \pm 0.09$ , and  $3.04 \pm 0.19$ , which were increased in comparison with  $1.07 \pm 0.07$ ,  $0.95 \pm 0.05$ ,  $0.99 \pm 0.02$ , and  $1.09 \pm 0.08$  in the normal control group, with statistically significant differences ( $t = 7.292, 15.014, 30.550, 18.573$ , all at  $P < 0.001$ ); The relative mRNA expressions of Nrf2 and HO-1 proteins in the tBHQ intervention group were  $2.68 \pm 0.09$  and  $2.94 \pm 0.05$ , which were increased in comparison with those in the high-glucose group, with statistically significant differences ( $t = 18.046, 39.458$ , both at  $P < 0.001$ ); The relative mRNA expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF protein in the tBHQ intervention group were  $1.48 \pm 0.05$  and  $1.6 \pm 0.08$ , which were decreased by comparison with those in the higher glucose group were increased in comparison with those in normal control group, with statistically significant differences ( $t = 21.036, 13.739$ , both at  $P < 0.001$ ). **Conclusions** tBHQ protects Müller cells from damage in high glucose condition by activating anti-oxidative stress signaling pathway of Nrf2/ARE.

**[Key words]** Diabetic retinopathy; Müller cells; Tertiary butyl hydroquinone; Oxidative stress; Protective mechanism

**Fund Program:** Sichuan Science and Technology Support Program (2015SZ0086)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2020.01.004

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是全球工作年龄人群首位的致盲眼病,其发病机制目前尚不明确。氧化应激作为 DR 的发病机制之一,是目前研究的热点<sup>[1]</sup>。长期高血糖及缺氧可增强氧化应激,诱导血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、缺氧诱导因子 1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )等细胞因子的表达,引起视网膜新生血管形成、血管渗漏以及无灌注区形成,导致视网膜组织损伤<sup>[2-3]</sup>。Müller 细胞作为支持视网膜神经元的神经胶质细胞,在 DR 中参与 VEGF 产生并诱导慢性炎症、新生血管形成和血管渗漏,以及视网膜纤维化<sup>[1]</sup>。核因子 NF-E2 相关因子(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)在受到亲电子试剂或活性氧刺激时与抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)相互作用调节编码抗氧化蛋白如血红素氧化酶 1(hemeoxygenase-1, HO-1)而达到抗氧化应激作用,是重要的内源性抗氧化应激通路<sup>[4-5]</sup>。叔丁基对苯二酚(tertiary butyl hydroquinone, tBHQ)是 Nrf2/ARE 信号通路的强效诱导剂,可能通过激活 Nrf2/ARE 信号通路,减轻视网膜氧化应激损伤,减少视网膜血管增生,抑制视网膜细胞凋亡,但其具体机制仍不明确<sup>[6]</sup>。本研究拟观察 tBHQ 对高糖环境下 SD 大鼠视网膜 Müller 细胞 Nrf2、HO-1、HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 表达的影响,

探讨 tBHQ 对高糖环境下 Müller 细胞的保护机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂及仪器

SD 大鼠 Müller 细胞(上海 Procell 公司)。tBHQ (美国 MedChemExpress 公司); DMEM 培养基(美国 HyClone 公司);胎牛血清(杭州天杭生物科技有限公司); DAPI 染液(武汉阿斯本生物技术有限公司);细胞计数试剂盒-8(cell counting kit -8, CCK-8)(上海碧云天生物技术有限公司); Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(天津三箭生物技术有限公司); SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、RIPA 总蛋白裂解液、兔抗大鼠谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)单克隆抗体(1:150, ab64613)、FITC 标记的山羊抗小鼠(1:50, AS-1112)、山羊抗兔 IgG 多抗(1:10 000, AS1107)(武汉阿斯本生物技术有限公司);兔抗人 HO-1 抗体(1:2 000, AF5393)(美国 Affbiotech 公司);兔抗人 Nrf2 抗体(1:1 000, ab31163)、兔抗人 HIF-1 $\alpha$ (1:1 000, ab2185)、兔抗人 VEGF 抗体(1:2 000, ab46154)、兔抗人 GAPDH(ab37168)(英国 Abcam 公司); PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser、SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup>(日本 TaKaRa 公司)。CO<sub>2</sub> 恒温培养箱(SCO6WE, 美国 SHELLAB 公司);倒置显

显微镜(IX51,日本 OLYMPUS 公司);电泳仪(DYY-6C,北京六一仪器厂);台式离心机(TGL-16c,上海安亭科学仪器厂);荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织荧光法鉴定 Müller 细胞 预先在 6 孔板中置入灭菌盖玻片,待细胞贴壁融合后取出,PBS 清洗,质量分数 4%多聚甲醛固定 30 min,体积分数 3%过氧化氢溶液避光孵育 20 min,以消除内源性过氧化物酶活性,加入用质量分数 5%牛血清白蛋白封闭溶液按 1:150 的比例稀释兔抗大鼠 GS 单克隆抗体,4 °C 孵育过夜,滴加按 1:50 比例稀释的 FITC 标记山羊抗小鼠二抗,孵育 50 min;滴加 100 μl DAPI 荧光染液,孵育 5 min 后 PBS 清洗,免疫荧光显微镜采集图像,绿色荧光为阳性染色。

1.2.2 体外培养 Müller 细胞及实验分组 将 Müller 细胞用含体积分数 10%胎牛血清低糖型 DMEM 完全培养基于体积分数 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 的培养箱中培养,每 2~3 天换液 1 次,每 5~7 天传代 1 次。取 2~4 代细胞,采用 CCK-8 法筛选最佳高糖浓度及最佳 tBHQ 干预浓度。将细胞分为正常对照组(5.5 mmol/L DMEM)、高糖组(45 mmol/L DMEM)和 tBHQ 干预组(45 mmol/L DMEM+20 μmol/L tBHQ)。

1.2.3 Western blot 法测定各组细胞相关因子的蛋白表达 各组细胞经细胞总蛋白提取试剂裂解 3~5 min,4 °C 条件下离心力为 13 000×g,离心 5 min,收集上清液,用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒测定样品蛋白浓度;根据样品浓度确定上样量,保证每个样品总蛋白上样量均为 40 μg;在蛋白样品中加入适量 5 倍蛋白上样缓冲液,沸水浴 5 min,制胶和上样后按浓缩胶 80 V、分离胶 120 V 进行恒压电泳,300 mA 恒流转膜,转膜时间根据目的蛋白相对分子质量进行调整。结束后加入封闭液封闭 1 h,去除封闭液,分别加入兔抗人 Nrf2 抗体、HO-1 抗体、HIF-1α 抗体及 VEGF 抗体,4 °C 孵育过夜,TBST 洗去未结合抗体,加入 HRP 标记山羊抗兔 IgG 多抗,室温孵育 30 min,加入 ECL 混合溶液,暗室曝光、显影。以 GAPDH 为内参,计算各目的条带的相对表达量。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测各组细胞相关因子 mRNA 的表达 各组 Müller 细胞洗净培养基后加入 1 ml Trizol 溶液制成细胞悬液,加入 250 μl 三氯甲烷,充分混匀,冰上静置 5 min,4 °C 条件下,10 000×g 离心 10 min,吸取上清 500 μl 于 1.5 ml EP 管中,加入等体积的 4 °C 预冷异丙醇混匀,-20 °C 条件下静置 15 min;离心弃上清液后加入 1 ml 4 °C 条件下预冷的体积分数 75%乙醇清洗 RNA 沉淀,离心后弃上清液加入 10 μl

无 RNA 酶水充分溶解 RNA。将收集的 RNA 采用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 逆转录成 cDNA,以 cDNA 为模板实时荧光定量 PCR 法扩增目的基因 *Nrf2*、*HO-1*、*HIF-1α* 和 *VEGF*。反应条件:95 °C 预变性 1 min;95 °C 变性 15 s,58 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 45 s,共 40 次循环。以 GAPDH 作为内参。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 计算各目的蛋白相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 逆转录 PCR 引物序列  
Table 1 Primer sequences of reverse transcription PCR

引物名称	引物序列	产物长度(bp)
GAPDH	F: 5'-CGCTAACATCAATGGGGTG-3'	201
	R: 5'-TTGCTGACAATCTTGAGGGAG-3'	
HO-1	F: 5'-GTGACAGAAGAGGCTAAGACCG-3'	290
	R: 5'-GGCCAACACTGCAATTTACATGG-3'	
Nrf2	F: 5'-CAACTGGATGAAGAGACCGGAG-3'	294
	R: 5'-TATGCTGCTTAAATCAGTCATGGC-3'	
HIF-1α	F: 5'-AAGCCCAGAGTCACTGGGACT-3'	118
	R: 5'-GTACTCACTGGGACTGTTAGGCTC-3'	
VEGF	F: 5'-ATCTTCAAGCCGTCCTGTGTG-3'	120
	R: 5'-AGGTTTGATCCGCATGATCTG-3'	

注:GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶;HO:血红素氧化酶;Nrf2:核因子-E2 相关因子;HIF:缺氧诱导因子;VEGF:血管内皮生长因子

Note: GAPDH: glyceraldehyde -3- phosphate dehydrogenase; HO: hemeoxygenase;Nrf2:nuclear factor erythroid 2-related factor 2;HIF:hypoxia inducible factor;VEGF:vascular endothelial growth factor

1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计学软件进行统计分析。各组细胞的 Nrf2、HO-1、HIF-1α 及 VEGF 蛋白和 mRNA 相对表达量资料经 K-S 检验,符合正态分布,以 mean ± SD 表示,各组间相关细胞因子总体比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

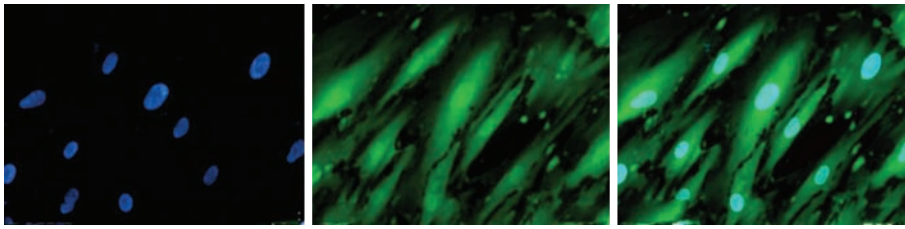
2.1 Müller 细胞鉴定

GS 在视网膜 Müller 细胞中特异表达,GS 在细胞质和胞核都表达(图 1)。鉴定表明,所用细胞为 SD 大鼠 Müller 胶质细胞,细胞纯度为 95%以上。

2.2 各组 Müller 细胞的形态学表现

正常对照组 Müller 细胞贴壁良好,形态基本一致,细胞体扁平不规则,向四周形成突起,细胞核呈卵圆形,细胞质丰富,相邻细胞交织形成网状。高糖组 Müller 细胞细胞活力降低,细胞密度及生长状态较正常对照组明显降低,tBHQ 干预组 Müller 细胞生长状态明显好于高糖组(图 2)。





**图 1 Müller 细胞的鉴定**( $\times 200$ , FITC) GS 在细胞质和细胞核均表达, 呈绿色荧光  
**Figure 1 Identification of Müller cells**( $\times 200$ , FITC) GS was expressed in both cytoplasm and nucleus, and green fluorescence was shown by immunofluorescence staining



**图 2 倒置相差显微镜下各组 Müller 细胞的形态学表现**( $\times 40$ ) A: 正常对照组 Müller 细胞贴壁良好 B: 高糖组 Müller 细胞贴壁不良, 细胞形态不规则 C: tBHQ 干预组 Müller 细胞形态较高糖组规则  
**Figure 2 Morphology of Müller cells in each group under an inverted microscope**( $\times 40$ ) A: Müller cells adhered well in the normal control group B: Müller cells adhered poorly and irregularly in high glucose group C: Müller cell morphology in tBHQ intervention group was more regularly than that in high glucose group

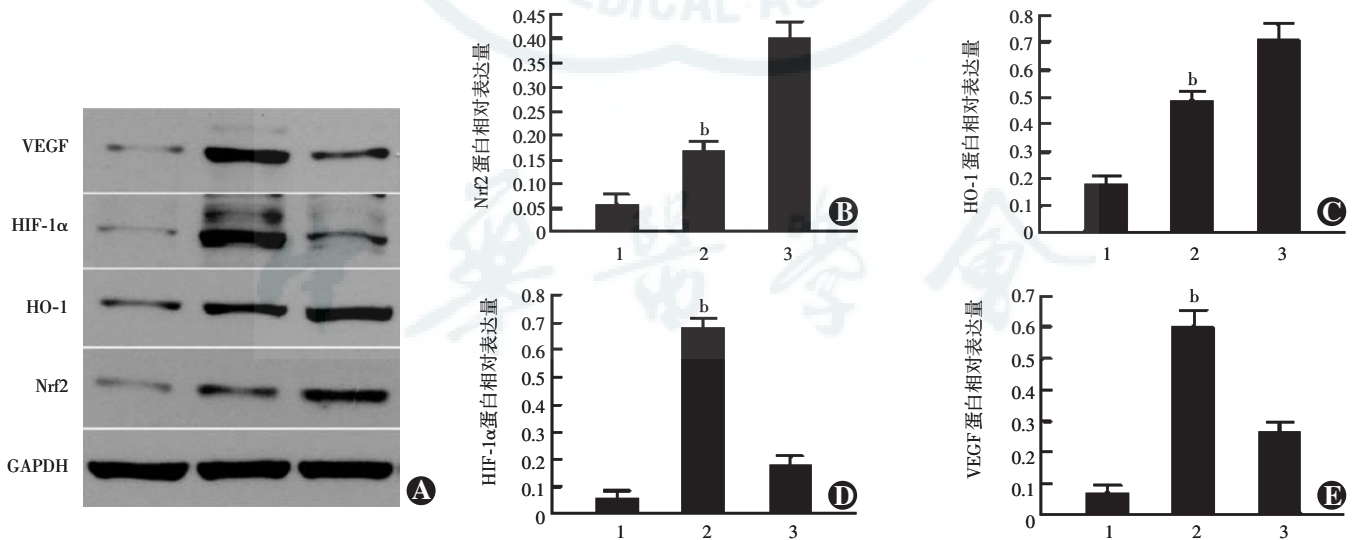
**2.3 各组 Müller 细胞中相关细胞因子蛋白表达的比较**

Westernblot 法检测结果显示, 正常对照组、高糖组和 tBHQ 干预组 Müller 细胞中 Nrf2、HO-1、HIF-1 $\alpha$  和

较正常对照组增加, 差异均有统计学意义( $t = 13.215$ 、 $8.444$ , 均  $P < 0.001$ ) (图 3)。

**2.4 各组 Müller 细胞中相关细胞因子 mRNA 相对表达量比较**

VEGF 蛋白相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义 ( $F = 73.831$ 、 $148.618$ 、 $152.269$ 、 $91.217$ , 均  $P < 0.001$ ); 其中高糖组 Nrf2、HO-1、HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 蛋白相对表达量分别是  $0.17 \pm 0.02$ 、 $0.47 \pm 0.02$ 、 $0.67 \pm 0.07$  和  $0.6 \pm 0.05$ , 较正常对照组的  $0.06 \pm 0.01$ 、 $0.19 \pm 0.03$ 、 $0.06 \pm 0.00$  和  $0.07 \pm 0.02$  明显增加, 差异均有统计学意义 ( $t = 4.114$ 、 $9.275$ 、 $16.479$ 、 $13.353$ , 均  $P < 0.001$ ); tBHQ 干预组 Nrf2、HO-1 蛋白表达量分别为  $0.4 \pm 0.06$ 、 $0.72 \pm 0.05$ , 较高糖组增加, 差异均有统计学意义 ( $t = 7.847$ 、 $7.947$ , 均  $P < 0.001$ ); tBHQ 干预组 HIF-1 $\alpha$  及 VEGF 蛋白表达量分别为  $0.18 \pm 0.04$ 、 $0.26 \pm 0.07$ , 较高糖组降低, 但



**图 3 A:** 各组相关细胞因子蛋白表达电泳图 **B:** 各组 Nrf2 蛋白相对表达量比较 **C:** 各组 HO-1 蛋白相对表达量比较 **D:** 各组 HIF-1 $\alpha$  相对表达量比较 **E:** 各组 VEGF 蛋白相对表达量比较  $F = 73.831, 148.618, 152.269, 91.217$ , 均  $P < 0.001$  与正常对照组比较,  $^a P < 0.001$ ; 与 tBHQ 干预组比较,  $^b P < 0.001$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n = 3$ ) 1. 正常对照组 2. 高糖组 3. 高糖+tBHQ 组 Nrf2: 核因子 NF-E2 相关因子, HO: 血红素氧化酶; HIF: 缺氧诱导因子; VEGF: 血管内皮生长因子  
**Figure 3 Comparison of the relative expression levels of Nrf2, HO-1, HIF-1 $\alpha$  and VEGF proteins in each group** A: Electrophoregram of related cytokines in each group B: comparison of the relative expression of Nrf2 C: comparison of the relative expression of HO-1 D: comparison of the relative expression of HIF-1 $\alpha$  E: comparison of the relative expression of VEGF  $F = 73.831, 148.618, 152.269, 91.217$ , all at  $P < 0.001$  Compared with the normal control group,  $^a P < 0.001$ ; Compared with tBHQ intervention group,  $^b P < 0.001$  (ANOVA, LSD- $t$  test,  $n = 3$ ) 1: normal control group 2: high glucose group 3: tBHQ intervention group Nrf2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2; HO: hemoxygenase; HIF: hypoxia inducible factor; VEGF: vascular endothelial growth factor

实时荧光定量 PCR 检测显示,正常对照组、高糖组和 tBHQ 干预组 Müller 细胞中 Nrf2、HO-1、HIF-1 $\alpha$  和 VEGF mRNA 相对表达量总体比较,差异均有统计学意义 ( $F = 340.317, 1582.911, 488.852, 185.699$ , 均  $P < 0.001$ );其中高糖组 Nrf2、HO-1、HIF-1 $\alpha$  和 VEGF mRNA 相对表达量分别是  $1.53 \pm 0.06, 1.50 \pm 0.04, 2.56 \pm 0.09$  和  $3.04 \pm 0.19$  较正常对照组的  $1.07 \pm 0.07, 0.95 \pm 0.05, 0.99 \pm 0.02$  和  $1.09 \pm 0.08$  明显增加,差异均有统计学意义 ( $t = 7.292, 15.014, 30.550, 18.573$ , 均  $P < 0.001$ );tBHQ 干预组 Nrf2、HO-1 蛋白 mRNA 相对表达量分别为  $2.68 \pm 0.09, 2.94 \pm 0.05$  较高糖组增加,差异均有统计学意义 ( $t = 18.046, 39.458$ , 均  $P < 0.001$ );tBHQ 干预组 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF mRNA 相对表达量分别为  $1.48 \pm 0.05, 1.6 \pm 0.08$ , 较高糖组降低,但较正常对照组增加,差异均有统计学意义 ( $t = 21.036, 13.739$ , 均  $P = 0.000$ ) (图 4)。

### 3 讨论

DR 的高致盲率使越来越多的人特别是 DR 患

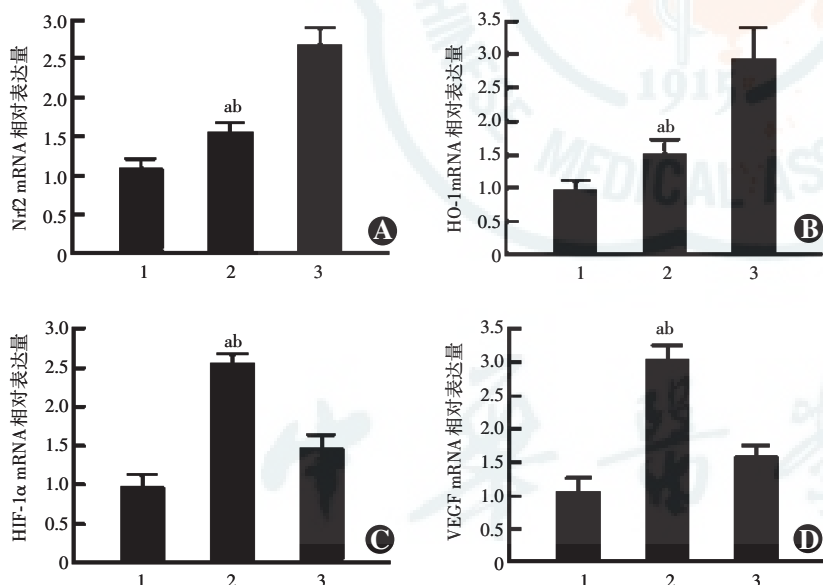


图 4 各组 Nrf2、HO-1、HIF-1 $\alpha$  及 VEGF mRNA 相对表达量的比较 A: 各组 Nrf2 相对表达量比较 B: 各组 HO-1 相对表达量比较 C: 各组 HIF-1 $\alpha$  相对表达量比较 D: 各组 VEGF 相对表达量比较  $F = 340.317, 1582.911, 488.852, 185.699$ , 均  $P < 0.001$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n = 3$ ) 与正常对照组比较,  $^a P < 0.001$ ; 与 tBHQ 干预组比较,  $^b P < 0.001$  Nrf2: 核因子 NF-E2 相关因子; HO: 血红素氧化酶; HIF: 缺氧诱导因子; VEGF: 血管内皮生长因子

Figure 4 Comparison of the relative expression of Nrf2, HO-1, HIF-1 $\alpha$  and VEGF mRNA in each group A: comparison of the relative expression of Nrf2 B: comparison of the relative expression of HO-1 C: comparison of the relative expression of HIF-1 $\alpha$  D: comparison of the relative expression of VEGF  $F = 340.317, 1582.911, 488.852, 185.699$ , all at  $P < 0.001$  (ANOVA, LSD- $t$  test,  $n = 3$ ) Compared with the normal control group,  $^a P < 0.001$ ; Compared with tBHQ intervention group,  $^b P < 0.001$  Nrf2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2; HO: hemeoxygenase; HIF: hypoxia inducible factor; VEGF: vascular endothelial growth factor

者意识到 DR 治疗的重要性<sup>[7]</sup>。细胞具有高度发达的内源性抗氧化防御系统,用来抵消许多疾病中产生的氧化应激<sup>[8]</sup>。tBHQ 在体内通过增加 Nrf2 蛋白的稳定性,继而激活内源性 Nrf2/ARE 信号通路,促进其介导的下游目标基因 HO-1 等的转录激活,在机体细胞组织病理受损时发挥保护作用。

DR 是糖尿病的微血管病变,同时也是神经退行性病变作用的结果<sup>[9-10]</sup>。研究表明,DR 患者在视网膜新生血管形成之前,Müller 细胞的功能已降低<sup>[11]</sup>。Müller 细胞贯穿从内界膜至外界膜的整个视网膜,对视网膜中的神经细胞起支持和营养作用,还直接参与调节视网膜的微环境,与神经元有双向信号传递;其细胞体位于内核层的内中间区,突起贯穿从内界膜至外界膜的整个视网膜,包绕着视网膜中视锥视杆细胞、双极细胞及神经节细胞的大部分神经元,特化的足板参与形成血-视网膜屏障,这种形态关系与神经元和血-视网膜屏障之间的多种功能性相互作用相对应<sup>[12]</sup>。在 DR 的发展过程中,氧化应激可引起 Müller 细胞的功能障碍和结构异常<sup>[13]</sup>。长期高血糖导致相对或绝对缺氧,诱导了神经元分泌信号,刺激 Müller 细胞表达成 VEGF 及其他介质,导致新生血管的形成和视网膜纤维化<sup>[14]</sup>。本研究中选用 Müller 细胞作为研究对象,能更好地体现在 DR 早期视网膜功能的损伤,为早期诊断 DR 提供理论依据。

生理状态下,Nrf2 与 Keap1 大量结合并在细胞质中被 26S 蛋白酶快速降解;在高糖环境下氧化应激被激活,Keap1 与 Nrf2 解耦联使得 Nrf2 转移入细胞核内,与 ARE 结合,启动下游抗氧化蛋白基因的转录,提高细胞抗氧化能力<sup>[15]</sup>。HO-1 通过与 ARE 相互作用调节编码抗氧化蛋白。作为应激诱导和氧化还原敏感蛋白,HO-1 发挥间接抗氧化功能<sup>[16-17]</sup>。tBHQ 作为 Nrf2/ARE 通路下游靶基因的强效诱导剂,能够诱导 Nrf2 基因的表达,进而上调 HO-1 基因的表达,编码抗氧化蛋白,达到抗氧化应激作用。本研究表明高糖环境刺激 Nrf2 和 HO-1 表达增加,而 tBHQ 干预后二者表达量进一步增加,可能与 Nrf2 解耦联并核内移,诱导下游抗氧化蛋白表达有关。

HIF-1 $\alpha$  是机体适应氧浓度变化的

主要调节因子,在正常情况下,无活性的 HIF-1- $\alpha$  由羟化酶激活后与肿瘤抑制基因蛋白 (protein von Hippel-Lindau, pVHL) 结合,导致 HIF-1- $\alpha$  泛素化,进而被脯氨酰羟化酶 (prolyl hydroxylase, PHD) 羟基化而降解。然而,在缺氧条件下,HIF-1- $\alpha$  不能被 pVHL 识别,因此其泛素化被阻断并转移至细胞核内。该信号通路的启动是由 HIF-1 $\alpha$ -HIF-1 $\beta$  复合体与某种辅助因子的相互作用完成的,随后与 HREs 复合体结合,导致如 VEGF 基因等各种目标基因转录的激活,导致 VEGF 生成的增加<sup>[18]</sup>。在 DM 早期,视网膜 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达便开始增加,并呈时间依赖性,而 HIF-1 $\alpha$  可通过诱导 VEGF 等因子参与 DR 早期视网膜缺血缺氧的继发损害。tBHQ 激活 Nrf2/ARE 通路诱导 HO-1 产生而提高细胞的抗氧化能力,能有效降低细胞中氧自由基的产生,进而下调 HIF-1 $\alpha$  的表达,导致 VEGF 产生减少,对高糖环境下细胞起保护作用<sup>[19]</sup>。本研究结果表明,在高糖环境下 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 表达明显增加,而 tBHQ 诱导的 Nrf2 和 HO-1 表达,使 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 的表达减少,表明 tBHQ 可以抑制高糖条件下 SD 大鼠视网膜 Müller 细胞中 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 的产生达到抗氧化应激作用。因此,抑制 VEGF 和 HIF-1 $\alpha$  过度产生应该能够预防或减缓 DR 的发生或进展。

研究发现, tBHQ 可通过 Nrf2/HO-1/VEGF 和 Nrf2/Bcl-2 途径,促进 DM 大鼠视网膜组织中 Nrf2、HO-1、Bcl-2 的表达,降低 VEGF、BAX 的表达,对视网膜组织有抗氧化应激损伤、减少细胞凋亡、抑制视网膜血管增生等作用,进而对糖尿病模型大鼠视网膜起保护作用<sup>[20-23]</sup>。tBHQ 的抗氧化应激作用在本次体外研究中进一步得到证实。

综上所述, tBHQ 通过激活抗氧化应激 Nrf2/ARE 信号通路,对高糖环境下 Müller 细胞损伤起保护作用, tBHQ 的抗氧化应激作用有望成为治疗 DR 新的手段。

利益冲突 所有作者均声明不存在任何利益冲突

## 参考文献

- [1] Sorrentino FS, Allkabs M, Salsini G, et al. The importance of glial cells in the homeostasis of the retinal microenvironment and their pivotal role in the course of diabetic retinopathy [J]. *Life Sci*, 2016, 162 : 54–59. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.08.001.
- [2] Kowluru RA, Chan PS. Oxidative stress and diabetic retinopathy [J]. *Exp Diabetes Res*, 2007, 2007 : 43603 [2018-03-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17641741>. DOI: 10.1155/2007/43603.
- [3] Tarr JM, Kaul K, Chopra M, et al. Pathophysiology of diabetic retinopathy [J/OL]. *ISRN Ophthalmol*, 2013, 2013 : 343560 [2018-03-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24563789>. DOI: 10.1155/2013/343560.
- [4] de Nicola GM, Karreth FA, Humpton TJ, et al. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis [J]. *Nature*, 2011, 475 (7354) : 106–109. DOI: 10.1038/nature10189.
- [5] Zhong Q, Mishra M, Kowluru RA. Transcription factor Nrf2-mediated antioxidant defense system in the development of diabetic retinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54 (6) : 3941–3948. DOI: 10.1167/iovs.13-11598.
- [6] Liu XY, Li CY, Bu H, et al. The neuroprotective potential of phase II enzyme inducer on motor neuron survival in traumatic spinal cord injury *in vitro* [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2008, 28 (5) : 769–779. DOI: 10.1007/s10571-007-9219-0.
- [7] Jeong IK, King GL. New perspectives on diabetic vascular complications: the loss of endogenous protective factors induced by hyperglycemia [J]. *Diabetes Metab J*, 2011, 35 (1) : 8–11. DOI: 10.4093/dmj.2011.35.1.8.
- [8] He M, Siow RC, Sugden D, et al. Induction of HO-1 and redox signaling in endothelial cells by advanced glycation end products: a role for Nrf2 in vascular protection in diabetes [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2011, 21 (4) : 277–285. DOI: 10.1016/j.numecd.2009.12.008.
- [9] Wong TY, Cheung CM, Larsen M, et al. Diabetic retinopathy [J]. *Nature reviews. Disease primers*, 2016, 2 : 16012–16017.
- [10] Han N, Yu L, Song Z, et al. Agmatine protects Müller cells from high-concentration glucose-induced cell damage via N-methyl-D-aspartic acid receptor inhibition [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12 (1) : 1098–1106. DOI: 10.3892/mmr.2015.3540.
- [11] Liu H, Gu WZ, et al. Evaluate the Müller cells' role in retinal neovascularization [J]. *Chin J Pract Ophthalmol*, 2009, 27 (9).
- [12] 黎晓新, 白玉婧. 重视 Müller 细胞在糖尿病视网膜病变中作用的基础研究 [J]. *中华眼科杂志*, 2015, 51 (5) : 321–322. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2015.05.001.
- [13] Li XX, Bai YJ. To attach importance of basic research in Müller cell of diabetic retinopathy [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2015, 51 (5) : 321–322. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2015.05.001.
- [14] Devi TS, Lee I, Hüttemann M, et al. TXNIP links innate host defense mechanisms to oxidative stress and inflammation in retinal Müller glia under chronic hyperglycemia: implications for diabetic retinopathy [J/OL]. *Exp Diabetes Res*, 2012, 2012 : 438238 [2018-04-05]. <https://www.hindawi.com/journals/jdr/2012/438238/>. DOI: 10.1155/2012/438238.
- [15] Rodrigues M, Xin X, Jee K, et al. VEGF secreted by hypoxic Müller cells induces MMP-2 expression and activity in endothelial cells to promote retinal neovascularization in proliferative diabetic retinopathy [J]. *Diabetes*, 2013, 62 (11) : 3863–3873. DOI: 10.2337/db13-0014.
- [16] Dinkova-Kostova AT, Wang XJ. Induction of the Keap1/Nrf2/ARE pathway by oxidizable diphenols [J]. *Chem Bio Int*, 2011, 192 (1–2) : 101–106. DOI: 10.1016/j.cbi.2010.09.010.
- [17] Fan J, Xu G, Jiang T, et al. Pharmacologic induction of heme oxygenase-1 plays a protective role in diabetic retinopathy in rats [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53 (10) : 6541–6556. DOI: 10.1167/iovs.11-9241.
- [18] Ren J, Fan C, Chen N, et al. Resveratrol pretreatment attenuates cerebral ischemic injury by upregulating expression of transcription factor Nrf2 and HO-1 in rats [J]. *Neurochem Res*, 2011, 36 (12) : 2352–2362. DOI: 10.1007/s11064-011-0561-8.
- [19] Behl T, Kotwani A. Exploring the various aspects of the pathological role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in diabetic retinopathy [J]. *Pharmacol Res*, 2015, 99 : 137–148. DOI: 10.1016/j.phrs.2015.05.013.
- [20] Fan J, Xu G, Jiang T, et al. Pharmacologic induction of heme oxygenase-1 plays a protective role in diabetic retinopathy in rats [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53 (10) : 6541–6556. DOI: 10.1167/iovs.11-9241.
- [21] 张思远, 田敏, 李晶艳, 等. tBHQ 对 2 型糖尿病大鼠视网膜 HO-1、VEGF 表达及胰岛功能作用的研究 [J]. *中华眼科杂志*, 2016, 52 (5) : 373–381. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2016.05.012.
- [22] Zhang SY, Tian M, Li JY, et al. Influence of tert-butylhydroquinone on the islets function and expression of HO-1 and VEGF in retina of type 2 diabetic rats [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2016, 52 (5) : 373–381. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2016.05.012.
- [23] 韩佩晏, 张思远, 李晶艳, 等. 叔丁基对苯二酚对 2 型糖尿病大鼠视网膜细胞的保护作用及其机制 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2016, 34 (6) : 496–502. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.06.004.



Han PY, Zhang SY, Li JY, et al. Protecting effects and mechanism of tert-butyl hydroquinone on retinal cells in type 2 diabetic rats[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2016, 34(6): 496-502. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2016. 06. 004.

[22] 田敏, 张思远, 韩佩晏, 等. 叔丁基对苯二酚激活 Nrf2 信号通路增强对 2 型糖尿病大鼠视网膜的保护作用[J]. 眼科新进展, 2017, 37(3): 220-224. DOI: 10. 13389/j. cnki. rao. 2017. 0056.

Tian M, Zhang SY, Han PY, et al. tBHQ activates Nrf2 signaling pathways to enhance retinal protection in type 2 diabetic rats[J]. Rec Adv Ophthalmol, 2017, 37(3): 220-224. DOI: 10. 13389/j. cnki. rao. 2017. 0056.

[23] 李晶艳, 田敏, 张思远, 等. 叔丁基对苯二酚对 2 型糖尿病大鼠视网膜核因子 E2 相关因子、血红素氧合酶 1 表达的影响[J]. 中华眼底

病杂志, 2015, 31(6): 581-585. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1005-1015. 2015. 06. 017.

Li JY, Tian M, Zhang SY, et al. The influence of tert-butyl hydroquinone on retinal nuclear factor E2-related factor 2 and heme oxygenase-1 in type 2 diabetic rats[J]. Chin J Ocul Fund Dis, 2015, 31(6): 581-585. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1005-1015. 2015. 06. 017.

(收稿日期: 2018-12-09 修回日期: 2019-11-15)

(本文编辑: 杜娟)

读者 · 作者 · 编者

## 欢迎订阅《中华实验眼科杂志》

《中华实验眼科杂志》为中国科技论文统计源期刊和中国中文核心期刊、中国科学引文数据库(CSCD)核心期刊,月刊,80面,每月10日出版,每期定价16元,邮发代号:36-13,国内外公开发售,欢迎到各地邮局订阅或直接与本刊编辑部联系订购。联系电话:0371-87160872。

## 本刊投稿方式

初次投稿作者请按照下列步骤投稿:登陆中华医学会网站(<http://www.cma.org.cn>)→点击页面右上角的“注册”→选项注册账号→返回首页→点击页面右下方的“申请成为杂志作者”成为本刊作者进行投稿。投稿时请使用 Word 格式(.doc 文件类型),投稿后请注意自留原稿,并保留论文相关的原始资料,以备稿件修改补充所用。投稿后请从“业务中心”下载“中华医学会系列杂志论文投送介绍信及授权书(中文版)”,填写有关项目并请每位作者亲笔签字,加盖单位公章后寄 2 份至本刊编辑部,其中作者签名顺序和作者单位署名名称应与投稿时文章中署录的相一致,如有变更应由每位作者同意并请通信作者告知编辑部。投稿请注意:(1)在非公开刊物发表的稿件、学术会议交流的文章、已用非中文文字期刊发表的文稿不属于一稿两投,但投稿时应向编辑部说明,非中文文字期刊已发表的文稿须征得首次发表期刊的同意。(2)作者须告知与该研究有关的利益冲突,如该研究被某机构资金资助的声明或与审稿人的利益关系。(3)如涉及保密问题,需附有关部门审查同意发表的证明。

## 本刊对中英文摘要的要求

论著或综述文稿正文请撰写中英文摘要。原创性论著文稿要求为结构式摘要,包括背景(Background)、目的(Objective)、方法(Methods)、结果(Results)和结论(Conclusions) 5 个要素,摘要应能够回答以下问题:(1)为什么进行这项研究。(2)主要用什么方法进行的研究。(3)获得什么主要结果。(4)通过研究得出什么结论等。其中背景部分请概括本课题所涉及的研究内容及亟待解决的问题。目的部分为本课题对上述提出问题设立的目标。方法部分应提供研究对象、样本量、分组情况、各组的干预情况、与研究相适应的观察或检测指标,获得结局指标的手段和设备等。临床研究请说明是前瞻性研究、回顾性研究还是观察性研究。结果部分请客观描述研究的主要发现,包括主要的形态学检查表现、相关的关键性或主要的量化资料以及相应的统计学比较结果,须写明统计学量值及其概率值。结论部分请提出与本研究论据直接相关的、必然的推论,避免得出过度推测性、评价性和扩大化的结论。摘要请用第三人称客观表述,不列图表,不引用文献,不加评论和解释。英文摘要应与中文摘要内容相对应,但为了对外交流的需要,可以略详细。英文摘要应包括论文标题(正体)及全部作者姓名(汉语拼音,姓在前,首字母大写,名在后,首字母大写,双字连写。如:Yin Xiaohui)、标准化的单位名称、城市名称(汉语拼音)、邮政编码及国家名称(全部为斜体)。请在另起一行处提供通信作者姓名的汉语拼音和 Email 地址,如 *Corresponding author: Yin Xiaohui, Email: xiaohuih@126.com*。专家述评或综述类文稿请撰写指示性中英文摘要,摘要内容应包含研究涉及的概念、研究的目的、综述资料的来源、复习的文献量、研究的新发现或应用领域、综合的结果和结论及其意义等必要的信息。

研究论文为前瞻性研究者应在中英文摘要结束处提供临床试验注册号,以“临床试验注册(Trial registration)”为标题,提供注册机构名称和注册号。前瞻性临床研究的论著摘要应注明遵循 CONSORT 声明(Consolidated Standards of Reporting Trials)(<http://www.consort-standart.org/home>)。

(本刊编辑部)