

· 实验研究 ·

秦皮乙素对氧化损伤 ARPE-19 细胞的保护作用及其机制

张英俊¹ 白鸽² 何向东³ 张东蕾³ 何伟⁴¹沈阳眼产业技术研究院 110163; ²辽宁中医药大学, 沈阳 110847; ³辽宁何氏医学院, 沈阳 110163; ⁴沈阳何氏眼科医院 110034

通信作者: 张东蕾, Email: zhangdonglei@huh.edu.cn; 何伟, Email: hewei@huh.edu.cn

【摘要】 目的 研究秦皮乙素对叔丁基过氧化氢(t-BHP)诱导的人视网膜色素上皮细胞系 ARPE-19 细胞氧化损伤的影响及其机制。**方法** 将传代 ARPE-19 细胞贴壁培养后分为空白对照组、模型对照组、20 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组、40 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组、80 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组和 100 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组,空白对照组细胞采用正常培养液培养,模型对照组使用 900 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP 单独作用细胞 4 h,后 4 个组分别使用 900 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP+不同浓度的秦皮乙素共同作用细胞 4 h。采用 MTS 法检测细胞存活率;采用荧光染色分析法检测细胞内活性氧簇(ROS)活性;采用试剂盒检测超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性,以及丙二醛(MDA)含量。**结果** 空白对照组、模型对照组、20 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组、40 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组、80 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组和 100 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组细胞存活率分别为(100.00 $\pm$ 1.58)%、(49.19 $\pm$ 1.06)%、(76.82 $\pm$ 3.48)%、(103.90 $\pm$ 1.60)%、(111.70 $\pm$ 3.36)%和(113.40 $\pm$ 3.08)%,组间总体比较差异有统计学意义($F=95.44, P<0.01$),其中与空白对照组比较,模型对照组细胞存活率明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型对照组比较,各浓度秦皮乙素组细胞存活率明显升高,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。各组 ROS 荧光强度相对值、MDA 水平、SOD 活力值、CAT 活力值、GSH-Px 活力值总体比较差异均有统计学意义($F=575.20, 40.61, 1802.00, 41.62, 38.31$, 均 $P<0.01$),其中与模型对照组比较,各浓度秦皮乙素组 ROS 荧光强度相对值、MDA 水平明显降低,SOD 活性、CAT 活性和 GSH-Px 活性明显升高,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。**结论** 秦皮乙素通过上调细胞内抗氧化酶类活性或抗氧化蛋白的表达对氧化损伤的 ARPE-19 细胞起到保护作用。

【关键词】 秦皮乙素;人视网膜色素上皮细胞;氧化损伤;抗氧化酶**基金项目:** 辽宁省自然科学基金项目(2017054450);辽宁省科学技术计划项目(2019JH2/10300011)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200224-00101

Protective effect and mechanism of esculetin on oxidative damaged ARPE-19 cellsZhang Yingjun¹, Bai Ge², He Xiangdong³, Zhang Donglei³, He Wei⁴¹Shenyang Industrial Technology Institute of Ophthalmology, Shenyang 110163, China; ²Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China; ³He University, Shenyang 110163, China; ⁴He Eye Hospital of He University, Shenyang 110034, China

Corresponding authors: Zhang Donglei, Email: zhangdonglei@huh.edu.cn; He Wei, Email: hewei@huh.edu.cn

[Abstract] Objective To study the protective effect and the mechanism of esculetin on oxidative-stressed human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19) induced by tert-butyl hydroperoxide (t-BHP). **Methods** The ARPE-19 cells were divided into blank control group, model control group, 20 $\mu\text{mol/L}$ esculetin group, 40 $\mu\text{mol/L}$ esculetin group, 80 $\mu\text{mol/L}$ esculetin group and 100 $\mu\text{mol/L}$ esculetin group. The cells in the blank control group were normally cultured. The cells in the model control group were treated with 900 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP for 4 hours. The rest four groups were treated with 900 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP+different molar concentrations of esculetin respectively for 4 hours. The cell viability of the each group was detected by MTS method. The activity of reactive oxygen species (ROS) was detected by fluorescence staining, and the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) as well as the levels of malondialdehyde (MDA) of the cells from each group were measured with each corresponding assay kit, respectively. **Results** The relative viabilities of the cells in the blank control group, model control group, 20 $\mu\text{mol/L}$ esculetin group, 40 $\mu\text{mol/L}$ esculetin group, 80 $\mu\text{mol/L}$ esculetin group and

100 $\mu\text{mol/L}$ esculetin group were (100.00 $\pm$ 1.58)%, (49.19 $\pm$ 1.06)%, (76.82 $\pm$ 3.48)%, (103.90 $\pm$ 1.60)%, (111.70 $\pm$ 3.36)% and (113.40 $\pm$ 3.08)%, respectively. There was a significant difference among the groups ($F=95.44, P<0.01$). Compared with the blank control group, the viability of the cells in the model control group was decreased significantly ($P<0.01$). Compared with the model control group, the cell viabilities in different concentrations of esculetin groups were increased significantly (all at $P<0.01$). There were significant differences between the groups in the relative value of ROS fluorescence intensity, MDA level, SOD activity, CAT activity and GSH-Px activity ($F=575.20, 40.61, 1802.00, 41.62, 38.31$; all at $P<0.01$). Compared with the model control group, the levels of ROS and MDA were decreased significantly, while the activities of SOD, CAT and GSH-Px were increased significantly in different concentrations of esculetin-treated groups (all at $P<0.01$). **Conclusions** Esculetin can protect the oxidative damaged ARPE-19 cells by up-regulating the expression of antioxidant enzymes or antioxidant proteins.

[Key words] Esculetin; Retinal pigment epithelial cells; Oxidative damage; Antioxidant enzymes

Fund program: Natural Science Foundation of Liaoning (2017054450); Liaoning Provincial Science and Technology Project (2019JH2/10300011)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200224-00101

视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)层位于视网膜神经上皮层和脉络膜之间,为紧密排列、不可再生的单细胞片层,具有抗氧化、分泌营养物质、构成血-视网膜屏障、吞噬和参与视循环等生理作用,对维持视网膜的正常功能起到重要作用^[1-2]。RPE 细胞中高表达抗氧化酶和非酶物质,含有抗氧化剂色素、类胡萝卜素等,用于抵御光氧化等生理作用中的氧化损伤,维持氧化还原平衡^[3-4]。一旦 RPE 细胞中的氧化和抗氧化平衡失调, RPE 细胞功能将受损,会导致如年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD),以及参与糖尿病、青光眼等相关的视网膜病变^[5-6],其中 AMD 是典型的导致老年人视力不可逆性损伤的眼底退行性疾病之一。在预防治疗 AMD 药物的研究中,利用抗氧化药物保护 RPE 细胞免受氧化损伤是可行的方法之一^[7]。秦皮是用于眼病治疗的传统中药,在众多中医典籍中,将其用于治疗目赤肿痛、目生翳膜、眼赤烂等症^[8],并且在《中国药典》(2015 版)中收录秦皮具有明目功效。秦皮乙素是秦皮中的主要有效成分之一,研究证明,秦皮乙素具有抗氧化、抗炎、抑制血管平滑肌、保肝、抗菌、抗肿瘤等作用^[9]。关于秦皮乙素抗氧化研究报道较多^[10-12],但其对于人 RPE 细胞的抗氧化作用尚未见报道。本研究探讨秦皮乙素对 ARPE-19 细胞氧化损伤的影响及其机制,为秦皮乙素在视网膜细胞损伤相关眼科疾病领域的开发利用,尤其是 AMD 的预防和治疗提供一定的实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

ARPE-19 细胞(美国 ATCC 细胞库);DMEM 高糖

培养基、胎牛血清、磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)(以色列 BI 公司);胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);青链霉素混合液(美国 Life Technologies 公司);秦皮乙素(246573)、叔丁基过氧化氢(tert-butyl hydroperoxide, t-BHP)(美国 Sigma 公司);MTS 细胞活性检测试剂盒(G3582, 美国 Promega 公司);Western 及 IP 细胞裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(P0012S)、活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒、总超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性检测试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(S0131)、过氧化氢酶(catalase, CAT)检测试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)检测试剂盒(S0056)(上海碧云天生物技术有限公司)。酶标仪 Gen 5 软件(美国 BioTek 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 ARPE-19 细胞采用含有体积分数 10%胎牛血清、100 U/ml(商品单位)青霉素和 100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素的 DMEM 高糖培养基在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 培养箱中培养。细胞复苏 24 h 后换液,待细胞融合至约 80%,采用质量分数 0.25%胰蛋白酶消化,传代。采用 3~7 代状态良好的细胞进行实验。

1.2.2 细胞分组处理 将传代后 RPE 细胞按照 2×10^5 个/ml 接种于加有 10 ml 培养液的直径 10 cm 培养皿中,24 h 细胞贴壁后,分为空白对照组、模型对照组、20 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组、40 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组、80 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组、100 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组,空白对照组不做任何处理,模型对照组使用 900 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP 单独作用细胞 4 h,后 4 个组分别使用 900 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP+不同浓度秦皮乙素共同作用细胞 4 h。用刮刀收集细胞,进行细胞内 ROS、MDA、SOD、

CAT、GSH-Px 酶活性或含量检测。

1.2.3 蛋白收集及浓度检测 将收集的细胞沉淀,每个样品加入 100 μl Western 及 IP 细胞裂解液,混合充分后,于冰浴内孵育 30 min,每隔 5 min 吹打数次。裂解完成后,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,12 000 $\times g$ 离心 15 min,取上清于 EP 管中。将上清稀释 10 倍后,取 20 μl 加入 96 孔板中,每个样品设 3 个复孔。按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒配制标准品,取 20 μl 加入 96 孔板中,每个样品设 3 个复孔。样品和标准品每孔加入 200 μl BCA 蛋白工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。用酶标仪在波长 562 nm 处测得的吸光度 (A) 值绘制出标准品浓度曲线,并计算出样品蛋白的浓度。

1.2.4 MTS 法检测细胞存活率 将处于对数生长期的细胞以 2×10^5 个/ml 细胞密度接种于 96 孔板中,每孔 100 μl ,细胞培养箱中培养 24 h 贴壁后进行如下实验:(1) 秦皮乙素对细胞增生活力的影响 每孔换液加入含有 0、0.01、0.10、1.00、10.00、100.00 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素的培养液 100 μl ,继续培养 24 h;(2) t-BHP 造模浓度摸索实验 每孔换液加入 100 μl 含有 0、200、400、600、800、900、1 000 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP 的培养液,继续培养 4 h;(3) 秦皮乙素抗 t-BHP 氧化损伤实验 每孔换液加入 100 μl 培养液、含有 900 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP 的培养液、含有 900 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP+秦皮乙素 (20、40、80、100 $\mu\text{mol/L}$) 的培养液,继续培养 4 h。设 5 个复孔。每个浓度接种时以上各处理组分别设置无细胞空白组,用于检测试剂本底 A 值。以上各实验孵育结束后,每孔加入 20 μl MTS,孵育 4 h 后用酶标仪在 492 nm 处检测 A 值^[13]。细胞存活率 = $(A_{\text{处理组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$

1.2.5 荧光染色分析法检测细胞内 ROS 活性 将 1.2.2 中收集的细胞转移到离心管内,离心半径 15.6 cm,1 000 r/min 离心 3 min 收集细胞。同样的离心条件,用 5 ml PBS 洗涤 2 次,细胞计数,收集细胞沉淀于离心管内,用无血清培养液将荧光染料 DCFH-DA 稀释为 10 $\mu\text{mol/L}$,并用此稀释液调节细胞密度至 2×10^6 /ml,将细胞与 DCFH-DA 稀释液充分混匀,铺于 96 孔荧光酶标板中,每孔 100 μl ,按细胞分组每组设置 5 个复孔,于细胞培养箱内避光孵育 30 min,3~5 min 颠倒混匀 1 次,使细胞与探针充分接触。孵育完成后,用荧光酶标仪检测在激发光 488 nm、发射光 525 nm 处的荧光强度,对测得的荧光强度进行统计分析^[14]。

1.2.6 TBA 显色法检测细胞内 MDA 含量 按照 MDA 试剂盒的操作说明制备 MDA 标准品、质量分数 0.37% TBA 储存液和 MDA 检测工作液。PBS 组作为

空白对照组,将待测样品、不同浓度标准品、PBS 与 MDA 检测工作液按照 1:2 比例混合。混匀后,水浴锅内 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 15 min。冷却至室温后,1 000 $\times g$ 离心 10 min,取上清。在 96 孔板内,每孔加入 200 μl 上清,每组 3 个复孔,用酶标仪检测波长 532 nm 处的 A 值。根据标准品与 A 值绘制出 MDA 标准曲线,根据标准曲线计算出样品中 MDA 含量后,再根据各样品的总蛋白含量计算出单位质量蛋白所含 MDA 含量^[15]。

1.2.7 WST-8 法检测细胞内 SOD 活性 按照 SOD 活性检测试剂盒 (WST-8 法) 的操作说明,根据细胞分组每组设 3 个复孔,每孔 200 μl 制备 WST-8/酶工作液、反应启动工作液。待测样品组及空白对照组 1 按照反应启动液、样品、WST-8/酶工作液 20 μl :20 μl :160 μl 比例混合,先将样品、WST-8/酶工作液混合并加入 96 孔板中,每孔 180 μl ;空白对照组 2 按照 WST-8/酶工作液、SOD 检测缓冲液 160 μl :40 μl 比例混合并加入到 96 孔板中,每孔 200 μl 。除空白对照组 2 外,用排枪在每组各孔中迅速加入 20 μl 启动液,充分混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。用酶标仪检测波长 450 nm 处 A 值,根据说明书提供公式计算,抑制百分率 = $(A_{\text{空白对照1}} - A_{\text{样品}}) / (A_{\text{空白对照1}} - A_{\text{空白对照2}}) \times 100\%$,SOD 酶活力单位 = 抑制百分率 / $(1 - \text{抑制百分率})$ Units,最终以蛋白浓度和稀释倍数换算为 U/mg^[16]。

1.2.8 CAT 显色法检测细胞内 CAT 活性 按照 CAT 检测试剂盒的操作说明,酶标仪 240 nm 处测定过氧化氢实际浓度,过氧化氢浓度 (mmol/L) = $22.94 \times A_{240}$,并配制 5 mmol/L 过氧化氢溶液制备 CAT 标准曲线,配制 250 mmol/L 过氧化氢溶液和显色工作液。混合各反应试剂,25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min 后测定 A_{520} 值。样品中 CAT 活力 = 消耗的 CAT $\times$ 稀释倍数 / (反应分钟数 $\times$ 样品体积 $\times$ 蛋白浓度),单位为 U/mg 蛋白^[17]。

1.2.9 有机过氧化物法检测细胞内 GSH-Px 活性 按照 GSH-Px 检测试剂盒的操作说明制备还原型辅酶 II 溶液、GSH 溶液、过氧化物试剂,按照细胞分组每组设 3 个复孔,每孔 200 μl ,根据说明书的反应体系,依次加入检测缓冲液、待测样品和 GPx 检测工作液,加入 15 mmol/L 过氧化物试剂溶液 4 μl 后,振荡器震荡 96 孔板,混匀,预先设定酶标仪检测温度为 25 $^{\circ}\text{C}$,在 340 nm 处自动每隔 2 min 测定 1 次 A 值,连续测定 10 min。根据酶标仪检测结果,取由 2 个连续时间点计算出的线性较好的 A_{340}/min ,用于计算细胞内 GSH-Px 活力。GSH-Px 活力 = $[A_{340}/\text{min}(\text{样品}) - A_{340}/\text{min}(\text{空白})] / 0.00622$;样品中 GSH-Px 酶活性 = 检测体系中 GSH-Px 酶活力 $\times$ 稀释倍数/样品中蛋白浓度,单位为 U/mg 蛋白^[18]。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8 统计学软件进行统计分析,本研究中计量资料的数据经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示。采用 Brown-Forsythe 检验和 Bartlett 检验检测各组数据方差齐性,多个组间不同检测指标的总差异比较时,方差齐者采用单因素方差分析,方差不齐者则采用 Brown-Forsythe 和 Welch ANOVA 法分析,各组间的多重比较采用 Dunnett-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各处理组的细胞存活率比较

0、0.01、0.10、1.00、10.00、100.00 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素作用于细胞后 24 h 细胞存活率分别为 (100.00 $\pm$ 1.03)%、(104.70 $\pm$ 2.00)%、(105.7 $\pm$ 2.36)%、(104.6 $\pm$ 1.65)%、(100.3 $\pm$ 0.74)% 和 (97.03 $\pm$ 0.87)%,各浓度组间细胞存活率比较差异无统计学意义 ($F = 1.18$, $P = 0.35$) (图 1A)。0、200、400、600、800、900、1 000 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP 组细胞存活率分别为 (100.00 $\pm$ 2.37)%、(98.71 $\pm$ 2.58)%、(92.72 $\pm$ 1.23)%、(89.74 $\pm$ 1.21)%、(79.30 $\pm$ 2.61)%、(50.74 $\pm$ 0.82)% 和 (40.30 $\pm$ 1.60)%,各组间细胞存活率总体比较差异有统计学意义 ($F = 158.10$, $P < 0.01$),其中与空白对照组比较,900 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP 组细胞的存活率明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.01$) (图 1B),900 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP 对细胞造成约 50% 的损伤,作为后续实验氧化损伤模型的造模浓度。空白对照组、模型对照组、20 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组、40 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组、80 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组和 100 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组细胞存活率分别为 (100.00 $\pm$ 1.58)%、(49.19 $\pm$ 1.06)%、(76.82 $\pm$ 3.48)%、(103.90 $\pm$ 1.60)%、(111.70 $\pm$ 3.36)% 和 (113.40 $\pm$ 3.08)%,组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 95.44$, $P < 0.01$),其中与空白对照组比较,模型对照组细胞存活率明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.01$);与模型对照组比较,各浓度秦皮乙素组细胞存活率明显升高,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$) (图 1C)。

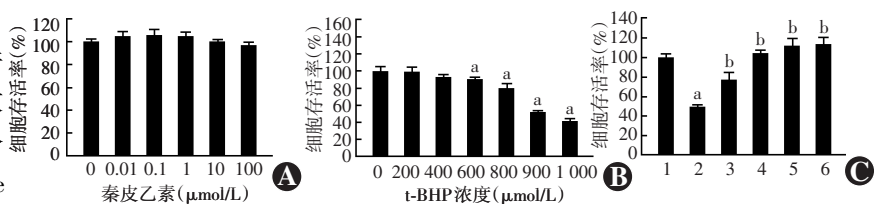


图 1 各处理组的细胞存活率比较 A:不同浓度秦皮乙素作用于细胞 24 h 细胞存活率比较 B:不同浓度 t-BHP 作用于细胞 4 h 细胞存活率比较 C:与空白对照组比较, $^a P < 0.01$ C: t-BHP+秦皮乙素同时作用于细胞 4 h 细胞的存活率比较 与空白对照组比较, $^a P < 0.01$,与模型对照组比较, $^b P < 0.01$ 1:空白对照组;2:模型对照组;3:20 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组;4:40 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组;5:80 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组;6:100 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组 (单因素方差分析, Dunnett-*t* 检验, $n = 5$)

Figure 1 Comparison of the cell viabilities among different treatment groups

A: Comparison of the cell viabilities after treated with different concentrations of esculetin treatment for 24 hours B: Comparison of the cell viabilities after treated with different concentrations of t-BHP treatment for 4 hours Compared with the blank control group, $^a P < 0.01$ C: Comparison of the cell viabilities after treated with different concentrations of esculetin+t-BHP treatment for 4 hours Compared with the blank control group, $^a P < 0.01$; compared with the model control group, $^b P < 0.01$ 1: blank control group; 2: model control group; 3: 20 $\mu\text{mol/L}$ esculetin group; 4: 40 $\mu\text{mol/L}$ esculetin group; 5: 80 $\mu\text{mol/L}$ esculetin group; 6: 100 $\mu\text{mol/L}$ esculetin group (One-way ANOVA, Dunnett-*t* test, $n = 5$)

2.2 各处理组的细胞形态比较

空白对照组细胞呈梭形,扁平贴壁状,细胞形态正常;模型对照组细胞呈现损伤状态,与空白对照组比较,细胞肿胀变圆,立体折光性变强;与模型对照组比较,20 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组和 40 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组梭形细胞逐渐增多,细胞逐渐恢复扁平,80 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组细胞基本恢复梭形扁平贴壁状态,100 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组细胞状态与空白对照组细胞类似 (图 2)。

2.3 各处理组细胞内 ROS 相对水平比较

空白对照组、模型对照组、20 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组、40 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组、80 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组和

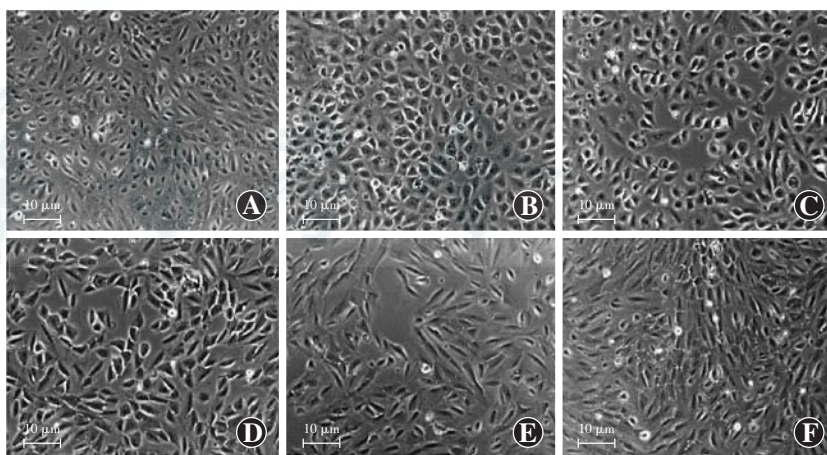


图 2 不同浓度秦皮乙素与 t-BHP 同时作用后细胞形态变化 (标尺 = 10 μm , $\times 100$) t-BHP 作用后细胞肿胀变圆,立体折光性变强;随着秦皮乙素浓度的升高,细胞形态逐渐恢复,100 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组细胞状态与空白对照组细胞类似 A:空白对照组 B:模型对照组 C:20 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组 D:40 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组 E:80 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组 F:100 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组

Figure 2 Morphological changes of the cells treated with different concentrations of esculetin+t-BHP (bar = 10 μm , $\times 100$) After t-BHP treatment, the cells turned to swelled and rounded, and the stereo refraction of the cells became stronger; with the increase of esculetin concentration, the cell morphology was gradually recovered, and the morphology of the cells in the 100 $\mu\text{mol/L}$ esculetin group were similar to that of the blank control group A: blank control group B: model control group C: 20 $\mu\text{mol/L}$ esculetin group D: 40 $\mu\text{mol/L}$ esculetin group E: 80 $\mu\text{mol/L}$ esculetin group F: 100 $\mu\text{mol/L}$ esculetin group

100 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组 ROS 水平分别为 $(100.00 \pm 0.38)\%$ 、 $(151.33 \pm 0.34)\%$ 、 $(139.82 \pm 1.26)\%$ 、 $(136.88 \pm 0.59)\%$ 、 $(132.98 \pm 0.31)\%$ 和 $(121.29 \pm 1.01)\%$, 总体比较差异有统计学意义 ($F=575.20, P<0.01$), 其中模型对照组 ROS 水平较空白对照组明显升高, 各浓度秦皮乙素组 ROS 水平较模型对照组明显降低, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.01$) (图 3)。

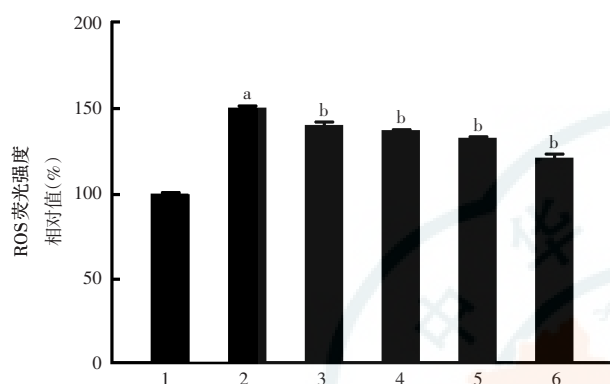


图 3 不同浓度秦皮乙素与 t-BHP 同时作用时细胞内 ROS 荧光强度比较 与空白对照组比较, $^a P<0.01$; 与模型对照组比较, $^b P<0.01$ 1: 空白对照组; 2: 模型对照组; 3: 20 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组; 4: 40 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组; 5: 80 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组; 6: 100 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组 (单因素方差分析, Dunnett- t 检验, $n=3$) ROS: 活性氧簇

Figure 3 Comparison of the ROS fluorescence values of the cells cultured by different concentrations of esculetin and t-BHP Compared with the blank control group, $^a P<0.01$; compared with the model control group, $^b P<0.01$ 1: blank control group; 2: model control group; 3: 20 $\mu\text{mol/L}$ esculetin group; 4: 40 $\mu\text{mol/L}$ esculetin group; 5: 80 $\mu\text{mol/L}$ esculetin group; 6: 100 $\mu\text{mol/L}$ esculetin group (One-way ANOVA, Dunnett- t test, $n=3$) ROS: reactive oxygen species

2.4 各处理组细胞内 MDA 水平比较

空白对照组、模型对照组、20 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组、40 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组、80 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组和 100 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组 MDA 水平分别为 (2.57 ± 0.25) 、 (5.82 ± 0.26) 、 (2.66 ± 0.26) 、 (2.24 ± 0.16) 、 (0.76 ± 0.10) 和 (0.18 ± 0.04) $\mu\text{mol/mg}$, 总体比较差异有统计学意义 ($F=40.61, P<0.01$), 其中模型对照组 MDA 水平较空白对照组明显升高, 各浓度秦皮乙素组 MDA 水平较模型对照组明显降低, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.01$) (图 4A)。

2.5 各处理组细胞内 SOD 活力比较

空白对照组、模型对照组、20 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组、40 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组、80 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组和 100 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组 SOD 活力水平分别为 (5.55 ± 0.14) 、 (4.40 ± 0.12) 、 (9.14 ± 0.25) 、 (14.89 ± 0.22) 、 (16.36 ± 0.22) 和 (30.83 ± 0.35) U/mg, 总体比较差异有统计学意义 ($F=1802.00, P<0.01$), 其中模型对照组 SOD 活力较空白对照组明显降低, 各浓度秦皮乙素组 SOD 活力较模型对照组明显升高, 差异均有统计学

意义 (均 $P<0.01$) (图 4B)。

2.6 各处理组细胞内 CAT 活力比较

空白对照组、模型对照组、20 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组、40 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组、80 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组和 100 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组 CAT 活力水平分别为 (0.84 ± 0.11) 、 (0.02 ± 0.00) 、 (0.13 ± 0.04) 、 (0.68 ± 0.08) 、 (0.74 ± 0.05) 和 (1.14 ± 0.06) U/g, 总体比较差异有统计学意义 ($F=41.62, P<0.01$), 其中模型对照组 CAT 活力较空白对照组明显降低, 各浓度秦皮乙素组 CAT 活力较模型对照组明显升高, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.01$) (图 4C)。

2.7 各处理组细胞内 GSH-Px 活力比较

空白对照组、模型对照组、20 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组、40 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组、80 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组和 100 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组 GSH-Px 活力水平分别为 (52.25 ± 3.10) 、 (12.41 ± 0.84) 、 (30.73 ± 2.28) 、 (30.85 ± 2.07) 、 (30.96 ± 1.53) 和 (31.96 ± 1.68) U/g, 总体比较差异有统计学意义 ($F=38.31, P<0.01$), 其中模型对照组 GSH-Px 活力较空白对照组明显降低, 各浓度秦皮乙素组 GSH-Px 活力较模型对照组明显升高, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.01$) (图 4D)。

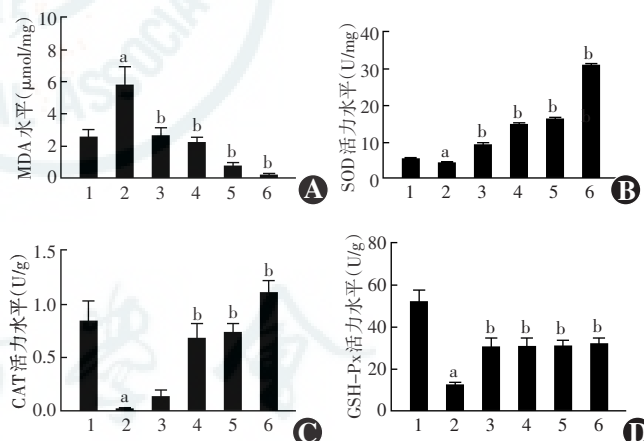


图 4 各组细胞内 MDA 水平、SOD 活力、CAT 活力、GSH-Px 活力比较 与空白对照组比较, $^a P<0.01$; 与模型对照组比较, $^b P<0.01$ 1: 空白对照组; 2: 模型对照组; 3: 20 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组; 4: 40 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组; 5: 80 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组; 6: 100 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素组 (单因素方差分析, Dunnett- t 检验, $n=3$) A: 各组 MDA 水平比较 B: 各组 SOD 活力比较 C: 各组 CAT 活力比较 D: 各组 GSH-Px 活力比较 MDA: 丙二醛; SOD: 超氧化物歧化酶; CAT: 过氧化氢酶; GSH-Px: 谷胱甘肽过氧化物酶

Figure 4 Comparison of the MDA levels, SOD activities, CAT activities, GSH-Px activities among different groups Compared with the blank control group, $^a P<0.01$; compared with the model control group, $^b P<0.01$ 1: blank control group; 2: model control group; 3: 20 $\mu\text{mol/L}$ esculetin group; 4: 40 $\mu\text{mol/L}$ esculetin group; 5: 80 $\mu\text{mol/L}$ esculetin group; 6: 100 $\mu\text{mol/L}$ esculetin group (One-way ANOVA, Dunnett- t test, $n=3$) A: Comparison of the MDA levels B: Comparison of the SOD activities C: Comparison of the CAT activities D: Comparison of the GSH-Px activities MDA: malondialdehyde; SOD: superoxide dismutase; CAT: catalase; GSH-Px: glutathione peroxidase

3 讨论

AMD 以 RPE 层变薄、萎缩、渗漏为早期病理改变,进而导致无法逆转的光感受器细胞损伤。在 RPE 层发生病理改变的过程中,氧化损伤起到关键作用,过多的 ROS 造成脂质氧化并沉积于黄斑,导致 AMD 病理进展^[19]。对 AMD 治疗手段的研究已经成为热点,方法包括抗炎、抗氧化、神经保护及诱导干细胞分化为 RPE 细胞及光感受器细胞等。临床上服用抗氧化剂和臭氧自血疗法均对 AMD 患者的视力有明显改善作用^[20]。褪黑素、槲皮素、叶黄素等抗氧化剂已经成为抗 AMD 药物研发的方向之一^[21-23]。

本研究结果发现,0.01~100.00 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素作用于 ARPE-19 细胞 24 h 对细胞活力无明显影响;900 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP 单独作用 ARPE-19 细胞 4 h 造成约 50% 的细胞存活率下降;然而 t-BHP 联合 20~100 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮乙素同时作用 4 h 后细胞存活率明显提高,氧化损伤明显减轻。本实验结果表明,在 ARPE-19 细胞氧化损伤前给药秦皮乙素和损伤的同时给药秦皮乙素均具有显著的抗细胞氧化作用,具体体现在能够显著清除 ROS、减少过氧化脂质 MDA 的产生,并且能够显著提高细胞内分解过氧化氢的 CAT 酶活性、能清除超氧自由基的 SOD 酶活性以及能解除过氧化物毒性并促进过氧化氢分解的 GSH-Px 酶活性。在其他疾病模型的研究报道中,秦皮乙素具有清除 DPPH 自由基、羟自由基和 ROS 的作用^[10,24],其抗氧化作用与调节 Nrf-2 信号通路而影响 NQO1 的表达有关^[11],而对 Nrf-2 的调节作用可通过直接结合 KEAP1 实现^[25]。研究表明,秦皮乙素可抑制 Fenton 反应中的氧化还原平衡相关的铁离子反应,进而抑制 ROS 的产生,其总抗氧化能力约为维生素 E 的 3 倍^[26]。

细胞内抗氧化系统可分为内源性和外源性抗氧化物质。内源性抗氧化剂包括抗氧化酶类(如 SOD、CAT、GSH-Px)和非酶类,外源性抗氧化剂包括一些食物获得性的物质,如酚类、黄酮、维生素等^[27]。SOD、CAT 和 GSH-Px 是在生物体内起到调节氧化还原平衡的重要抗氧化酶^[28-29]。秦皮乙素为外源性香豆素类抗氧化剂^[30]。本研究表明,秦皮乙素抑制 ROS 产生,并且在细胞内促进内源性抗氧化酶的表达,进一步清除 ROS,减少细胞的氧化损伤。秦皮乙素可从多个方面发挥抗氧化作用。同时本研究发现秦皮乙素对氧化损伤后的 ARPE-19 细胞不具有保护作用。此外,本研究发现秦皮乙素先于 t-BHP 给药后加 t-BHP 与秦皮乙

素和 t-BHP 同时给药显示出相似的抗氧化损伤作用。以上结果表明,秦皮乙素的抗氧化作用可能依赖于细胞自身的相关活性分子,一旦细胞自身的抗氧化系统失衡,秦皮乙素将不能发挥其抗氧化作用。正如其他研究模型所报道的,秦皮乙素的作用可能与影响体内最重要的抗氧化转录因子 Nrf2 有关,但在 ARPE-19 细胞中仍需要进一步研究验证。

本研究发现秦皮乙素对氧化损伤的 ARPE-19 细胞具有保护作用,通过清除 ROS、减少 MDA,促进抗氧化酶 SOD、CAT 及 GSH-Px 的活性发挥其抗氧化作用。近年来,在眼科相关的模型中,有文献报道了在脂多糖处理的 ARPE-19 细胞模型中,秦皮乙素减少了模型细胞的凋亡和坏死,降低了白细胞介素 1 β (interleukin-1 β)、IL-6 和 IL-12 的 mRNA 水平^[31]。在泪腺摘除的兔干眼动物模型中,秦皮乙素通过调节炎症相关因子 IL-1 α 、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α 的表达发挥抗炎作用,从而减轻干眼症状^[32]。本研究结果表明,秦皮乙素对视网膜色素上皮细胞也能发挥抗氧化作用,保护氧化损伤的 ARPE-19 细胞,为将来秦皮乙素在视网膜氧化损伤相关眼病,尤其是 AMD 的治疗应用前景提供了一定的实验依据。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张季,徐海峰,董晓光. ARMS2 在人视网膜色素上皮细胞中的表达[J]. 中华实验眼科杂志,2012,30(4):339-340. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.04.013.
- [2] 王珊珊,汪枫桦. 间充质干细胞治疗年龄相关性黄斑变性研究现状及其局限性[J]. 中华实验眼科杂志,2019,37(11):926-931. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.11.014.
Wang SS, Wang FH. The research status and the limitations of mesenchymal stem cell-based therapies in age-related macular degeneration[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2019, 37(11):926-931. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.11.014.
- [3] Guymer RH, Rosenfeld PJ, Curcio CA, et al. Incomplete retinal pigment epithelial and outer retinal atrophy in age-related macular degeneration: classification of atrophy meeting report 4[J]. Ophthalmology, 2020, 127(3):394-409. DOI:10.1016/j.ophtha.2019.09.035.
- [4] 张珂凡,曲秀霞,范国平. 干细胞治疗视网膜退行性疾病[J]. 中华实验眼科杂志,2018,36(11):871-877. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.11.011.
Zhang KF, Qu XX, Fan GP. Research progress of stem cells in the treatment of retinal degenerative diseases[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2018, 36(11):871-877. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.11.011.
- [5] Handa JT. How does the macula protect itself from oxidative stress? [J]. Mol Aspects Med, 2012, 33(4):418-435. DOI:10.1016/j.mam.2012.03.006.
- [6] 陈海霞,张璐. 年龄相关性黄斑变性氧化应激相关性研究进展[J]. 国际眼科杂志,2017,17(4):652-654. DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.4.15.
Chen HX, Zhang L. Research advance in the correlation between age

- related macular degeneration and oxidative stress [J]. *Int Eye Sci*, 2017, 17(4): 652–654. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2017.4.15.
- [7] Uğurlu N, Aşık MD, Yülek F, et al. Oxidative stress and anti-oxidative defence in patients with age-related macular degeneration [J]. *Curr Eye Res*, 2013, 38(4): 497–502. DOI: 10.3109/02713683.2013.774023.
- [8] 马芬俞. 秦皮在眼科中的临床应用 [J]. *山西中医学院学报*, 2011, 12(6): 24–25. DOI: 10.3969/j.issn.1671-0258.2011.06.01.
- [9] Liang C, Ju W, Pei S, et al. Pharmacological activities and synthesis of esculetin and its derivatives; a mini-review [J/OL]. *Molecules*, 2017, 22(3): 387 [2020-02-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28257115/>. DOI: 10.3390/molecules22030387.
- [10] Lin HC, Tsai SH, Chen CS, et al. Structure-activity relationship of coumarin derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities [J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 75(6): 1416–1425. DOI: 10.1016/j.bcp.2007.11.023.
- [11] Han MH, Park C, Lee DS, et al. Cytoprotective effects of esculetin against oxidative stress are associated with the upregulation of Nrf2-mediated NQO1 expression via the activation of the ERK pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39(2): 380–386. DOI: 10.3892/ijmm.2016.2834.
- [12] Sen Z, Weida W, Jie M, et al. Coumarin glycosides from *Hydrangea paniculata* slow down the progression of diabetic nephropathy by targeting Nrf2 anti-oxidation and smad2/3-mediated profibrosis [J]. *Phytomedicine*, 2019, 57: 385–395. DOI: 10.1016/j.phymed.2018.12.045.
- [13] Ben Mimouna S, Le Charpentier T, Lebon S, et al. Involvement of the synapse-specific zinc transporter ZnT3 in cadmium-induced hippocampal neurotoxicity [J/OL]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(9): 15872–15884 [2020-02-21]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30714133/>. DOI: 10.1002/jcp.28245.
- [14] Liu MX, Jin L, Sun SJ, et al. Metabolic reprogramming by PCK1 promotes TCA cataplerosis, oxidative stress and apoptosis in liver cancer cells and suppresses hepatocellular carcinoma [J/OL]. *Oncogene*, 2018, 37(12): 1637–1653 [2020-02-21]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5860930/>. DOI: 10.1038/s41388-017-0070-6.
- [15] Xiao X, Jiang Y, Liang W, et al. miR-212-5p attenuates ferroptotic neuronal death after traumatic brain injury by targeting Ptgs2 [J/OL]. *Mol Brain*, 2019, 12(1): 78 [2020-02-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6749650/>. DOI: 10.1186/s13041-019-0501-0.
- [16] Lu MC, Zhao J, Liu YT, et al. CUPY192018, a potent inhibitor of the Keap1-Nrf2 protein-protein interaction, alleviates renal inflammation in mice by restricting oxidative stress and NF- κ B activation [J/OL]. *Redox Biol*, 2019, 26: 101266 [2020-02-21]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6614503/>. DOI: 10.1016/j.redox.2019.101266.
- [17] Huang MZ, Yang YJ, Liu XW, et al. Aspirin eugenol ester reduces H₂O₂-induced oxidative stress of HUVECs via mitochondria-lysosome axis [J/OL]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 8098135 [2020-02-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6754946/>. DOI: 10.1155/2019/8098135.
- [18] Zhu Z, Li R, Fan X, et al. Resveratrol improves boar sperm quality via 5'AMP-activated protein kinase activation during cryopreservation [J/OL]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 5921503 [2020-02-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6746164/>. DOI: 10.1155/2019/5921503.
- [19] Handa JT, Cano M, Wang L, et al. Lipids, oxidized lipids, oxidation-specific epitopes, and age-related macular degeneration [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2017, 1862(4): 430–440. DOI: 10.1016/j.bbalip.2016.07.013.
- [20] 薛璐, 万光明. 萎缩型老年性黄斑变性的治疗研究进展 [J]. *中华眼底病杂志*, 2019, 35(1): 94–98. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2019.01.023.
- Xue R, Wan GM. Progress in the treatment of atrophic age-related macular degeneration [J]. *Chin J Ocul Fundus Dis*, 2019, 35(1): 94–98. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2019.01.023.
- [21] Chang CC, Huang TY, Chen HY, et al. Protective effect of melatonin against oxidative stress-induced apoptosis and enhanced autophagy in human retinal pigment epithelium cells [J/OL]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 9015765 [2020-02-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6098907/>. DOI: 10.1155/2018/9015765.
- [22] 徐新荣, 于海涛, 李敏, 等. 槲皮素磷脂复合物固体分散体增强对氧化损伤小鼠视网膜的保护作用 [J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(4): 775–778. DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2018.04.001.
- Xu XR, Yu HT, Li M, et al. Quercetin-phospholipid solid dispersion enhances protective effects on oxidative damage retina in mice [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2018, 36(4): 775–778. DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2018.04.001.
- [23] 刘娟, 姜永华. 叶黄素对眼科疾病防治作用的研究进展 [J]. *中国实用眼科杂志*, 2011, 29(7): 660–662. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1006-4443.2011.07.005.
- [24] Kim SH, Kang KA, Zhang R, et al. Protective effect of esculetin against oxidative stress-induced cell damage via scavenging reactive oxygen species [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2008, 29(11): 1319–1326. DOI: 10.1111/j.1745-7254.2008.00878.x.
- [25] Arora R, Sawney S, Saini V, et al. Esculetin induces antiproliferative and apoptotic response in pancreatic cancer cells by directly binding to KEAP1 [J/OL]. *Mol Cancer*, 2016, 15(1): 64 [2020-02-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5069780/>. DOI: 10.1186/s12943-016-0550-2.
- [26] Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, et al. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease [J]. *Arch Toxicol*, 2016, 90(1): 1–37. DOI: 10.1007/s00204-015-1579-5.
- [27] He L, He T, Farrar S, et al. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(2): 532–553. DOI: 10.1159/000485089.
- [28] Wang Y, Branicky R, Noë A, et al. Superoxide dismutases; dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling [J]. *J Cell Biol*, 2018, 217(6): 1915–1928. DOI: 10.1083/jcb.201708007.
- [29] Lismont C, Revenco I, Franssen M. Peroxisomal hydrogen peroxide metabolism and signaling in health and disease [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(15): 3673 [2020-02-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6695606/>. DOI: 10.3390/ijms20153673.
- [30] Vianna DR, Bubols G, Meirelles G, et al. Evaluation of the antioxidant capacity of synthesized coumarins [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(6): 7260–7270 [2020-02-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3397524/>. DOI: 10.3390/ijms13067260.
- [31] Ozal SA, Turkecul K, Gurlu V, et al. Esculetin protects human retinal pigment epithelial cells from lipopolysaccharide-induced inflammation and cell death [J/OL]. *Curr Eye Res*, 2018, 43(9): 1169–1176 [2020-02-21]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29806490/>. DOI: 10.1080/02713683.2018.1481517.
- [32] Jiang D, Liu X, Hu J. Topical administration of esculetin as a potential therapy for experimental dry eye syndrome [J/OL]. *Eye (Lond)*, 2017, 31(12): 1724–1732 [2020-02-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5733282/>. DOI: 10.1038/eye.2017.117.

(收稿日期: 2020-02-24 修回日期: 2020-11-10)

(本文编辑: 刘艳 施晓萌)