

## · 实验研究 ·

## 褪黑素抗人晶状体上皮细胞焦亡作用及其机制

杨鑫 刘旭辉 孟佳 方梦园 张凤妍

郑州大学第一附属医院眼科, 郑州 450052

通信作者: 张凤妍, Email: zhangfengyanx@aliyun.com

**【摘要】 目的** 探讨褪黑素对过氧化氢( $H_2O_2$ )诱导的人晶状体上皮细胞(HLECs)焦亡的影响及其机制。**方法** 取传代培养的HLECs分为5个组,其中正常对照组常规培养,模型对照组于 $100\ \mu\text{mol/L}\ H_2O_2$ 条件下培养,褪黑素组、维生素E组和维生素E溶剂组分别用 $1\times 10^{-6}\ \text{mol/L}$ 褪黑素、 $100\ \mu\text{mol/L}$ 维生素E和维生素E溶剂预处理后,用 $100\ \mu\text{mol/L}\ H_2O_2$ 继续培养,收集细胞待检测。为进一步探讨褪黑素的作用机制,将细胞分为7个组,其中正常对照组常规培养;模型对照组细胞于 $100\ \mu\text{mol/L}\ H_2O_2$ 条件下培养;核转录因子E2相关因子2短双链RNA(shNrf2)阴性对照组和shNrf2组细胞分别用shNrf2阴性对照和shNrf2慢病毒转染,并于终浓度 $100\ \mu\text{mol/L}\ H_2O_2$ 条件下培养;褪黑素组细胞在终浓度 $1\times 10^{-6}\ \text{mol/L}$ 褪黑素条件下培养,然后加入终浓度 $100\ \mu\text{mol/L}\ H_2O_2$ 继续培养;褪黑素+shNrf2阴性对照组和褪黑素+shNrf2组细胞首先分别采用shNrf2阴性对照或shNrf2慢病毒转染,再于终浓度 $1\times 10^{-6}\ \text{mol/L}$ 褪黑素和终浓度 $100\ \mu\text{mol/L}\ H_2O_2$ 条件下培养,收集各组细胞。采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测各组细胞培养上清液中乳酸脱氢酶(LDH)活性,白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 和IL-18浓度;采用流式细胞术检测各组细胞中活性氧簇(ROS)的荧光强度;采用Western blot法检测各组细胞中Nrf2、NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、caspase-1 p20、GSDMD-N蛋白的表达。**结果** ELISA法检测发现,与模型对照组相比,褪黑素组和维生素E组细胞培养上清液中LDH活性及IL-1 $\beta$ 和IL-18浓度均有不同程度的下调,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ )。流式细胞仪检测发现,褪黑素组和维生素E组细胞中ROS荧光强度分别为 $13\ 040.67\pm 1\ 550.66$ 、 $12\ 593.67\pm 1\ 677.06$ ,显著低于模型对照组的 $18\ 310.33\pm 1\ 248.01$ ,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ )。Western blot结果显示,褪黑素组和维生素E组Nrf2蛋白相对表达量分别为 $4.24\pm 0.44$ 、 $3.73\pm 0.38$ ,较模型对照组的 $2.28\pm 0.34$ 明显上升(均 $P<0.05$ ),褪黑素组和维生素E组NLRP3、ASC、caspase-1 p20及GSDMD-N蛋白相对表达量较模型对照组显著下降,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ )。shNrf2组相较于shNrf2阴性对照组,褪黑素+shNrf2组相较于褪黑素+shNrf2阴性对照组,细胞培养上清液中LDH活性、IL-1 $\beta$ 和IL-18浓度均显著上升,细胞中Nrf2蛋白相对表达量明显下降,细胞中ROS荧光强度、NLRP3、ASC、caspase-1 p20及GSDMD-N焦亡相关蛋白相对表达量明显升高,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ )。**结论** 褪黑素可能通过激活Nrf2,减少NLRP3炎性体的释放,进而抑制HLECs焦亡。

**【关键词】** 人晶状体上皮细胞;褪黑素;氧化损伤;细胞焦亡;Nrf2;NLRP3炎性小体

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210516-00307

**Inhibitory effect of melatonin on pyroptosis of lens epithelium cells and its mechanism**

Yang Xin, Liu Xuhui, Meng Jia, Fang Mengyuan, Zhang Fengyan

Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Corresponding author: Zhang Fengyan, Email: zhangfengyanx@aliyun.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the inhibitory effect of melatonin on pyroptosis of lens epithelium cells (HLECs) induced by hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and its mechanism. **Methods** The cultured HLECs were divided into normal control group, model control group, melatonin group, vitamin E group, and vitamin E solvent group. Cells in melatonin group, vitamin E group and vitamin E solvent group were pre-cultured with  $1\times 10^{-6}\ \text{mol/L}$  melatonin,  $100\ \mu\text{mol/L}$  vitamin E or equal volume of vitamin E solvent, then cultured with  $100\ \mu\text{mol/L}\ H_2O_2$ , respectively, and the cells in the normal control group and model control group were cultured with normal condition or  $100\ \mu\text{mol/L}\ H_2O_2$ , respectively. The HLECs transfected with nuclear factor erythroid 2-related factor 2 short hairpin RNA (shNrf2) or shNrf2 negative control lentivirus and following with  $100\ \mu\text{mol/L}\ H_2O_2$  treatment were served as shNrf2 group and shNrf2 negative control group, respectively; and the transfected cells treated with  $1\times 10^{-6}\ \text{mol/L}$  melatonin and subsequent  $100\ \mu\text{mol/L}\ H_2O_2$  treatment were served as melatonin+shNrf2 group and melatonin+shNrf2

negative control group. The activity of lactic dehydrogenase (LDH) and the expression levels of interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-18 in the culture supernatant were detected by the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit. The concentration of reactive oxygen species (ROS) was assessed by flow cytometry. The expression level of Nrf2, NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing a C-terminal caspase recruitment domain (ASC), caspase-1 p20 and GSDMD-N proteins were evaluated by Western blot. **Results** Compared with model control group, the activity of LDH and the concentrations of IL-1 $\beta$  and IL-18 were significantly decreased in melatonin group and vitamin E group, showing statistically significant differences (all at  $P < 0.05$ ). The ROS fluorescence intensities were  $13\ 040.67 \pm 1\ 550.66$  and  $12\ 593.67 \pm 1\ 677.06$  in melatonin group and vitamin E group, respectively, which were significantly lower than  $18\ 310.33 \pm 1\ 248.01$  in model control group (both at  $P < 0.05$ ). The relative expression levels of Nrf2 protein were  $4.24 \pm 0.44$  and  $3.73 \pm 0.38$  in melatonin group and vitamin E group, respectively, which were significantly higher than  $2.28 \pm 0.34$  in model control group, and the relative expression levels of NLRP3, ASC, caspase-1 p20 and GSDMD-N in melatonin group and vitamin E group were significantly decreased than model control group (all at  $P < 0.05$ ). The relative expression level of Nrf2 protein in shNrf2 group and melatonin+shNrf2 group was significantly reduced, and the expression levels of LDH, IL-1 $\beta$ , IL-18, ROS content, NLRP3, ASC, caspase-1 p20 and GSDMD-N were significantly increased in comparison with shNrf2 negative control group and melatonin + shNrf2 negative control group, respectively (all at  $P < 0.05$ ). **Conclusions** Melatonin can inhibit the release of NLRP3 inflammasome by activating Nrf2, and has an inhibitory effect on the pyroptosis of HLECs.

**[Key words]** Epithelium cells, lens/human; Melatonin; Oxidative damage; Pyroptosis; Nrf2; NLRP3 inflammasome

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20210516-00307

白内障是老年人视力下降和致盲的首要原因,其发病机制尚不明确<sup>[1-2]</sup>。人晶状体上皮细胞(human lens epithelium cells, HLECs)位于晶状体前表面,在维持晶状体内环境稳定方面发挥重要作用。当 HLECs 处于氧化应激状态时,可产生大量活性氧簇(reactive oxygen species, ROS),诱导 HLECs 发生焦亡,进而诱发白内障<sup>[3-4]</sup>。由此可见,预防 HLECs 焦亡可以延缓白内障的发生和发展。褪黑素是由松果体合成分泌的一种吲哚类内分泌激素<sup>[5]</sup>。体外实验证实,褪黑素具有抗氧化功效,对人视网膜色素上皮细胞具有保护作用<sup>[6]</sup>。另有研究显示,褪黑素通过减少 ROS 水平使小鼠角膜上皮细胞免受氧化损伤<sup>[7]</sup>。近年来研究证实,褪黑素可通过抑制 NLRP3 炎性小体活化抑制大鼠视网膜神经元焦亡<sup>[8]</sup>。目前,尚未有褪黑素对 HLECs 焦亡作用机制的报道。本研究拟探讨褪黑素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HLECs 焦亡的抑制作用及其抗氧化机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞来源** 原代 HLECs 购自上海中乔新舟生物科技有限公司。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 内皮细胞培养基(endothelial cell medium, ECM)(上海中乔新舟生物科技有限公司); Vitamin E(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);核转录因子 E2 相关因子 2 短发夹 RNA(nuclear factor erythroid 2-related factor 2 short hairpin RNA, shNrf2)慢

病毒包装(沈阳万类生物科技有限公司);褪黑素(美国 Sigma 公司);ROS 检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)测定试剂盒(南京建成生物科技有限公司);人白细胞介素 1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒、IL-18 ELISA 试剂盒(杭州联科生物技术股份有限公司);全蛋白提取试剂盒、核蛋白和浆蛋白提取试剂盒、兔抗人 Nrf2 一抗(WL02135)、兔抗人核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族 pyrin 结构域蛋白 3(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3)一抗(WL02635)、兔抗人凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a C-terminal caspase recruitment domain, ASC)一抗(WL02462)、兔抗人 caspase-1 p20 一抗(WL02996a)、山羊抗兔 IgG-HRP 二抗(WLA023)(沈阳万类生物科技有限公司);兔抗人 GSDMD-N 一抗(ab215203)(英国 Abcam 公司);CO<sub>2</sub> 培养箱(HF-90,上海力申科学仪器有限公司);倒置相差显微镜(IX53,日本 Olympus 公司);流式细胞仪(NovoCyte,美国 ACEC 公司);酶标仪(ELX-800,美国 BioTek 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞分组及处理** HLECs 接种至 ECM 中,待细胞生长状态良好后分为 5 个组,其中正常对照组细胞正常培养基培养 48 h;模型对照组细胞在正常培养基条件下培养 24 h 后,加入 100  $\mu\text{mol/L}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 继续培养 24 h;褪黑素组细胞于终浓度  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 褪黑素

的培养基中预处理 24 h 后,加入终浓度 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  继续培养 24 h;维生素 E 组和维生素 E 溶剂组细胞于含终浓度 100  $\mu\text{mol/L}$  维生素 E 或相应体积溶剂(甲醇)培养基中预处理 24 h 后,加入终浓度 100  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  继续培养 24 h。为进一步探讨褪黑素保护 HLECs 的作用机制,用 shNrf2 慢病毒转染对数期 HLECs,然后将细胞分为 7 个组:正常对照组细胞以正常培养基培养 120 h;模型对照组细胞在正常培养基条件下培养 96 h 后,加入终浓度 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  培养 24 h;shNrf2 阴性对照组和 shNrf2 组细胞分别用 shNrf2 阴性对照和 shNrf2 慢病毒转染 24 h 后,弃去培养基上清,更换为完全培养基继续培养 72 h 后,加入终浓度 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  培养 24 h;褪黑素组细胞在正常培养基条件下培养 72 h 后,用终浓度  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 褪黑素处理 24 h,然后加入终浓度 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  继续培养 24 h;褪黑素+Nrf2 阴性对照组和褪黑素+shNrf2 组细胞分别用 shNrf2 阴性对照或 shNrf2 慢病毒转染 24 h 后,弃去培养基上清,更换为完全培养基,继续培养 48 h,再用终浓度  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 褪黑素处理 24 h,加入终浓度 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  继续培养 24 h。

**1.2.2 倒置相差显微镜观察各组细胞焦亡情况** 将细胞以  $5 \times 10^5$ /孔接种在 6 孔板中,然后参照 1.2.1 方法用不同药物处理细胞。药物处理相应时间后,倒置相差显微镜下观察细胞的焦亡情况。

**1.2.3 ELISA 法检测细胞培养上清液中 IL-1 $\beta$  及 IL-18 含量** 收集各组细胞培养上清,每组设 3 个重复,300 $\times$ g 离心 10 min 去除沉淀物,然后严格按照 IL-1 $\beta$  和 IL-18 ELISA 试剂盒说明书依次加入 100  $\mu\text{l}$  细胞培养上清液、50  $\mu\text{l}$  IL-1 $\beta$ /IL-18 抗体、室温孵育 2 h 后,每孔加入 300  $\mu\text{l}$  洗涤液洗涤;每孔依次加入 100  $\mu\text{l}$  辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素、100  $\mu\text{l}$  TMB、100  $\mu\text{l}$  终止溶液后,测定 450 nm 最大吸收波长和 570 nm 参考波长下的吸光度(A)值,校准后的 A 值为 450 nm 的测定值减去 570 nm 的测定值。分别将人 IL-1 $\beta$ 、IL-18 标准品按试剂盒说明书稀释成相应的浓度梯度,然后以标准品浓度为横坐标,校准 A 值为纵坐标绘制标准曲线。最后根据标准曲线计算各组细胞培养上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 相应的浓度。

**1.2.4 比色法检测细胞培养上清液中 LDH 活性** 收集各组细胞培养上清液,每组设置 3 个重复,600 $\times$ g 离心 10 min 去除沉淀物,参照 LDH 测定试剂盒说明书在空白孔、标准孔、测定孔、对照孔中分别加入相应工作液,混匀,室温静置 5 min,设定检测波长为 450 nm,使

用酶标仪测定 A 值。计算 LDH 活性 [ $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{L})$ ] = (样本 A 值 - 对照 A 值) / (标准品 A 值 - 空白 A 值)  $\times$  0.2 $\times$ 1 000;其中 0.2 为标准品浓度 ( $\mu\text{mol}/\text{ml}$ )。

**1.2.5 流式细胞术检测细胞中 ROS 含量** 将  $5 \times 10^5$  个细胞接种于 6 孔板中,每组设置 3 个重复,分组处理后,弃去培养基,用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 洗涤细胞 2 次。分别加入 1 ml 的 DCFH-DA 稀释液 (用培养基 1:1 000 稀释) 混匀,置于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱内孵育 20 min,每隔 5 min 颠倒混匀一次。用 PBS 洗涤细胞 3 次,充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。最后用 500  $\mu\text{l}$  PBS 重悬细胞后,流式细胞仪检测细胞中的荧光强度。

**1.2.6 Western blot 法检测细胞中 Nrf2、NLRP3、ASC、caspase-1 p20、GSDMD-N 蛋白的表达** 收集各组细胞,每组设置 3 个重复,弃去培养基,预冷 PBS 漂洗 3 次,在 6 孔板中每孔加入核蛋白和浆蛋白提取试剂盒中的抽提试剂或蛋白裂解液 (含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液),4  $^{\circ}\text{C}$  条件下离心半径 = 10 cm,12 000 r/min 离心 10 min,收集上清分别提取细胞核蛋白和总蛋白物,BCA 法测定蛋白浓度。以 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,并湿法转印至 PVDF 膜;将转印好的 PVDF 膜用质量分数 5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 h;分别加入 Nrf2 (1:500)、NLRP3 (1:500)、ASC (1:500)、caspase-1 p20 (1:500)、GSDMD-N (1:1 000) 一抗,在 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下孵育过夜;TBST 缓冲液洗膜 4 次,每次 5 min;置于 HRP 标记的山羊抗兔二抗 (1:5 000) 中 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 45 min, TBST 缓冲液洗膜 6 次,每次 5 min;ECL 化学发光液显色,用凝胶图像处理系统 (Gel-Pro-Analyzer) 软件分析目标条带的灰度值,以 Histone H3 作为核蛋白 Nrf2 内参,  $\beta$ -actin 作为 NLRP3、ASC、caspase-1 p20、GSDMD-N 内参,计算各目的蛋白的相对表达量。绘图时将正常对照组各蛋白表达量进行归一化处理,其他组的各蛋白数值为相对于正常对照组的比值。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行统计分析。计量资料经 Kolmogorov-Smirnov 检验符合正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间数据经 Levene 检验证实方差齐 (均  $P > 0.05$ )。各组间计量资料总体差异比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组细胞培养上清液中 IL-18、IL-1 $\beta$  浓度及 LDH 的活性浓度比较**

各组间 IL-18、IL-1 $\beta$  浓度及 LDH 活性总体比较, 差异均有统计学意义 ( $F = 23.44, 25.62, 22.39$ , 均  $P < 0.05$ )。与正常对照组相比, 模型对照组细胞培养上清液中 IL-18 及 IL-1 $\beta$  浓度及 LDH 的活性均显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型对照组相比, 褪黑素组和维生素 E 组 IL-18、IL-1 $\beta$  浓度及 LDH 的活性均降低, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。

### 2.3 各组细胞焦亡相关蛋白表达量比较

各组细胞中 Nrf2、NLRP3、ASC、caspase-1 p20、GSDMD-N 蛋白相对表达量总体比较差异有统计学意义 ( $F = 42.64, 54.17, 71.45, 91.26, 55.34$ , 均  $P < 0.05$ )。模型对照组细胞中 Nrf2、NLRP3、ASC、caspase-1 p20、GSDMD-N 蛋白相对表达量显著高于正常对照组, 与模型对照组相比, 褪黑素组和维生素 E 组细胞中 Nrf2 蛋白相对表达量显著升高, NLRP3、ASC、caspase-1 p20、GSDMD-N 蛋白相对表达量显著降低, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (图 2、表 2)。

### 2.4 各细胞转染组焦亡形态

正常对照组细胞大小均匀, 连接紧密, 呈长梭形, 无焦亡细胞。模型对照组及 shNrf2 阴性对照组多数细胞肿胀膨大, 有气泡状突出物状典型细胞焦亡特征。与模型对照组相比, 褪黑素组焦亡细胞数量减少, shNrf2 组细胞

表 1 各组细胞培养上清液 IL-18、IL-1 $\beta$  浓度及 LDH 活性比较 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 1 Comparison of the expression level of IL-18, IL-1 $\beta$  and LDH activity among five groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	LDH [ $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{L})$ ]	IL-1 $\beta$ (pg/ml)	IL-18 (pg/ml)
正常对照组	3	92.34 $\pm$ 13.82 <sup>a</sup>	18.37 $\pm$ 2.60 <sup>a</sup>	185.00 $\pm$ 28.31 <sup>a</sup>
模型对照组	3	340.47 $\pm$ 49.61	62.28 $\pm$ 8.73	687.18 $\pm$ 115.40
褪黑素组	3	151.99 $\pm$ 23.95 <sup>a</sup>	30.72 $\pm$ 4.96 <sup>a</sup>	313.11 $\pm$ 32.60 <sup>a</sup>
维生素 E 溶剂组	3	328.27 $\pm$ 64.14	66.06 $\pm$ 11.49	701.32 $\pm$ 129.82
维生素 E 组	3	174.78 $\pm$ 29.92 <sup>a</sup>	33.56 $\pm$ 4.01 <sup>a</sup>	352.30 $\pm$ 53.22 <sup>a</sup>
F 值		22.39	25.62	23.44
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

注: 与模型对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) LDH: 乳酸盐脱氢酶; IL: 白细胞介素

Note: Compared with model control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$  (One-way ANOVA, LSD-*t* test) LDH: lactate dehydrogenase; IL: interleukin

### 2.2 各组细胞 ROS 含量比较

正常对照组、模型对照组、褪黑素组、维生素 E 溶剂组、维生素 E 组细胞 ROS 荧光强度分别为 8 292.33 $\pm$ 653.03、18 310.33 $\pm$ 1 248.01、13 040.67 $\pm$ 1 550.66、19 546.67 $\pm$ 1 288.84、12 593.67 $\pm$ 1 677.06, 总体比较差异有统计学意义 ( $F = 35.62, P < 0.05$ )。正常对照组、褪黑素组和维生素 E 组中 ROS 荧光强度明显低于模型对照组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (图 1)。

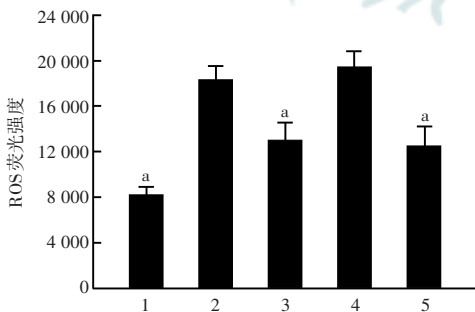


图 1 各组细胞中 ROS 荧光强度比较  $F = 35.62, P < 0.05$ 。与模型对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验,  $n = 3$ ) 1: 正常对照组; 2: 模型对照组; 3: 褪黑素组; 4: 维生素 E 溶剂组; 5: 维生素 E 组

Figure 1 Comparison of ROS level among various groups  $F = 35.62, P < 0.05$ . Compared with model control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$  (One-way ANOVA, LSD-*t* test,  $n = 3$ ) 1: normal control group; 2: model control group; 3: melatonin group; 4: vitamin E solvent group; 5: vitamin E group

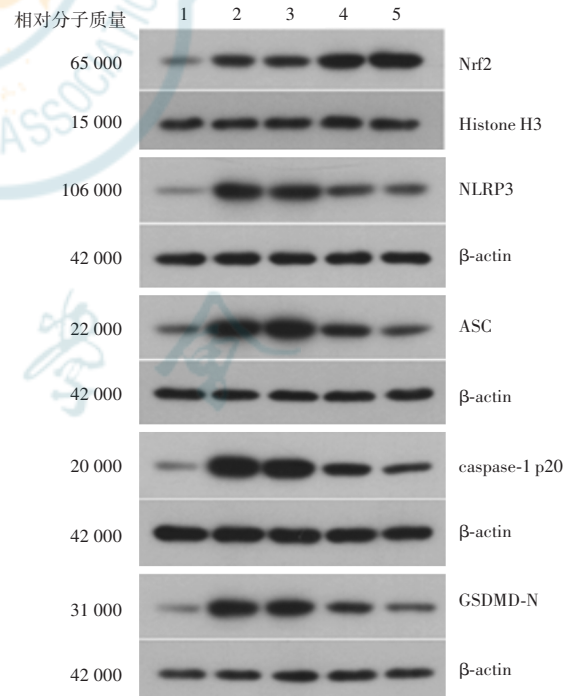


图 2 各组蛋白 Western blot 表达电泳图 1: 正常对照组; 2: 模型对照组; 3: 维生素 E 溶剂组; 4: 维生素 E 组; 5: 褪黑素组 Nrf2: 核转录因子 E2 相关因子 2; NLRP3: 核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族吡啶结构域蛋白 3; ASC: 凋亡相关斑点样蛋白

Figure 2 Electrophoretogram of different proteins by Western blot 1: normal control group; 2: model control group; 3: vitamin E solvent group; 4: vitamin E group; 5: melatonin group Nrf2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2; NLRP3: nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3; ASC: apoptosis-associated speck-like protein containing a C-terminal caspase recruitment domain

**表 2 各组细胞焦亡相关蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**  
**Table 2 Comparison of relative expression levels of pyroptosis-related protein among various groups ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	样本量	Nrf2	NLRP3	ASC	Caspase-1 p20	GSDMD-N
正常对照组	3	1.00±0.00 <sup>a</sup>	1.00±0.00 <sup>a</sup>	1.00±0.00 <sup>a</sup>	1.00±0.00 <sup>a</sup>	1.00±0.00 <sup>a</sup>
模型对照组	3	2.28±0.34	5.26±0.56	5.60±0.64	7.32±0.73	4.47±0.48
褪黑素组	3	4.24±0.44 <sup>a</sup>	2.63±0.29 <sup>a</sup>	1.67±0.27 <sup>a</sup>	2.17±0.29 <sup>a</sup>	1.66±0.21 <sup>a</sup>
维生素 E 溶剂组	3	2.20±0.37	5.17±0.58	5.57±0.58	6.84±0.72	4.37±0.50
维生素 E 组	3	3.73±0.38 <sup>a</sup>	3.82±0.40 <sup>a</sup>	3.04±0.39 <sup>a</sup>	3.74±0.40 <sup>a</sup>	2.50±0.38 <sup>a</sup>
F 值		42.64	54.17	71.45	91.26	55.34
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与模型对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验) Nrf2:核转录因子 E2 相关因子 2; NLRP3:核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族 pyrin 结构域蛋白 3;ASC:凋亡相关斑点样蛋白

Note:Compared with model control group,<sup>a</sup> $P < 0.05$ (One-way ANOVA,LSD-*t* test) Nrf2:nuclear factor erythroid 2-related factor 2;NLRP3:nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3;ASC:apoptosis-associated speck-like protein containing a C-terminal caspase recruitment domain

焦亡数量增多。褪黑素 + shNrf2 组焦亡细胞数较 shNrf2 组减少(图 3)。

**2.5 各细胞转染组培养上清液中 IL-18、IL-1β 质量浓度及 LDH 活性比较**

各组细胞培养上清液中 IL-18、IL-1β 质量浓度及 LDH 活性总体比较差异均有统计学意义( $F = 63.28、65.40、58.55$ ,均  $P < 0.05$ );与模型对照组及 shNrf2 阴性对照组比较,shNrf2 组细胞培养上清液中 IL-18、IL-1β 质量浓度及 LDH 活性升高,褪黑素 + Nrf2 阴性对照组 IL-18、IL-1β 质量浓度及 LDH 活性下降,差异有统计学意义(均  $P < 0.05$ );与褪黑素 + shNrf2 阴性对照组

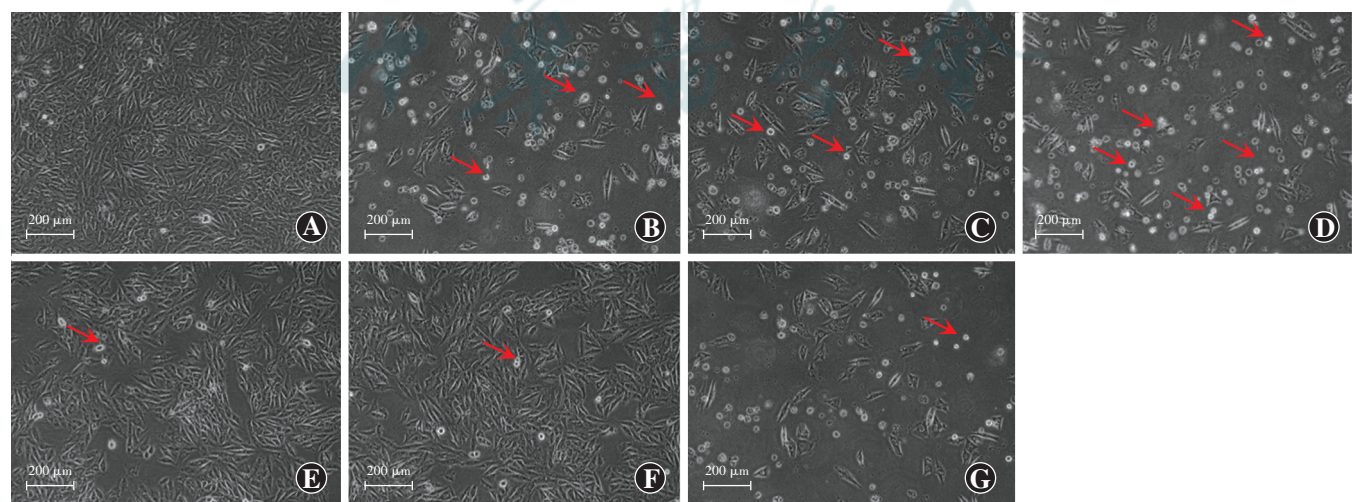
比较,褪黑素 + shNrf2 组细胞培养上清液中 IL-18、IL-1β 质量浓度及 LDH 活性均升高,差异有统计学意义(均  $P < 0.05$ )(表 3)。

**2.6 各细胞转染组 ROS 含量比较**

shNrf2 组 ROS 荧光强度为  $24\ 100.67 \pm 1\ 298.17$ ,显著高于模型对照组的  $19\ 120.00 \pm 1\ 867.73$  及 shNrf2 阴性对照组的  $19\ 077.00 \pm 2\ 031.08$ ,差异均有统计学意义( $F = 32.93$ ,均  $P < 0.05$ );褪黑素 + shNrf2 组细胞中 ROS 的荧光强度为  $17\ 651.33 \pm 1\ 850.69$ ,显著高于褪黑素 + Nrf2 阴性对照组的  $12\ 803 \pm 1\ 561.60$ ,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )(图 4)。

**2.7 各细胞转染组焦亡相关蛋白表达比较**

各细胞转染组 Nrf2、NLRP3、ASC、caspase-1 p20、GSDMD-N 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义( $F = 94.80、65.69、70.56、77.88、39.29$ ,均  $P < 0.05$ )。与模型对照组和 shNrf2 阴性对照组比较,shNrf2 组 Nrf2 蛋白相对表达量明显降低,NLRP3、ASC、caspase-1 p20、GSDMD-N 蛋白相对表达量明显升高,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ );与褪黑素 + shNrf2 阴性对照组相比,褪黑素 + shNrf2 组 NLRP3、ASC、caspase-1 p20、GSDMD-N 蛋白相对表达量显著升高,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )(图 5,表 4)。



**图 3 各细胞转染组倒置相差显微镜图 ( $\times 100$ ,标尺 = 200  $\mu\text{m}$ )** 红色箭头示焦亡细胞 A:正常对照组 B:模型对照组 C:shNrf2 阴性对照组 D:shNrf2 组 E:褪黑素组 F:褪黑素 + shNrf2 阴性对照组 G:褪黑素 + shNrf2 组

**Figure 3 Observation of cells by phase-contrast microscopy ( $\times 100$ ,bar = 200  $\mu\text{m}$ )** Red arrows indicated pyroptotic cells A:normal control group B:model control group C:shNrf2 negative control group D:shNrf2 group E:melatonin group F:melatonin+shNrf2 negative control group G:melatonin+shNrf2 group

表 3 各细胞转染组 IL-1 $\beta$ , IL-18 浓度及 LDH 活性比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Comparison of the expression level of IL-1 $\beta$ , IL-18 and LDH activity among various groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	LDH [ $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{L})$ ]	IL-1 $\beta$ (pg/ml)	IL-18 (pg/ml)
正常对照组	3	82.13 $\pm$ 13.40 <sup>a</sup>	16.19 $\pm$ 2.35 <sup>a</sup>	172.12 $\pm$ 18.19 <sup>a</sup>
模型对照组	3	317.30 $\pm$ 37.17	70.86 $\pm$ 7.40	716.78 $\pm$ 84.29
shNrf2 阴性对照组	3	321.760 $\pm$ 43.13	67.70 $\pm$ 9.37	710.40 $\pm$ 103.39
shNrf2 组	3	556.01 $\pm$ 53.36 <sup>ab</sup>	119.02 $\pm$ 11.99 <sup>ab</sup>	1339.14 $\pm$ 148.04 <sup>ab</sup>
褪黑素组	3	158.08 $\pm$ 23.06 <sup>a</sup>	35.92 $\pm$ 4.95 <sup>a</sup>	332.67 $\pm$ 59.30 <sup>a</sup>
褪黑素+shNrf2 阴性对照组	3	162.43 $\pm$ 26.95 <sup>ab</sup>	30.89 $\pm$ 3.84 <sup>ab</sup>	329.31 $\pm$ 40.18 <sup>ab</sup>
褪黑素+shNrf2 组	3	279.04 $\pm$ 29.70 <sup>c</sup>	59.03 $\pm$ 6.40 <sup>c</sup>	658.74 $\pm$ 69.07 <sup>c</sup>
F 值		58.55	65.40	63.28
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

注:与模型对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 shNrf2 阴性对照组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与褪黑素+shNrf2 阴性对照组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD- $t$  检验) LDH: 乳酸盐脱氢酶; IL: 白细胞介素; shNrf2: Nrf2 短发夹 RNA

Note: Compared with model control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; compared with shNrf2 negative control group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; compared with melatonin+shNrf2 negative control group, <sup>c</sup> $P < 0.05$  (One-way ANOVA, LSD- $t$  test) LDH: lactate dehydrogenase; IL: interleukin; shNrf2: Nrf2 short hairpin RNA

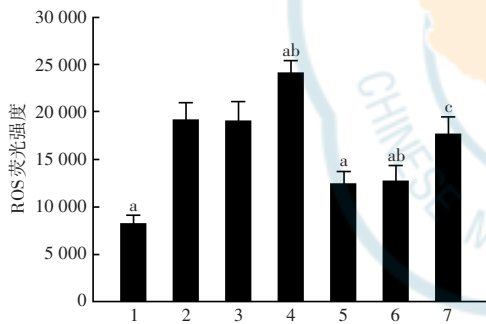


图 4 各细胞转染组 ROS 荧光强度的比较  $F = 32.93, P < 0.05$ . 与模型对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 shNrf2 阴性对照组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与褪黑素+shNrf2 阴性对照组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n = 3$ ) 1: 正常对照组; 2: 模型对照组; 3: shNrf2 阴性对照组; 4: shNrf2 组; 5: 褪黑素组; 6: 褪黑素+shNrf2 阴性对照组; 7: 褪黑素+shNrf2 组

Figure 4 Comparison of ROS fluorescence intensity among various groups  $F = 32.93, P < 0.05$ . Compared with model control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; compared with shNrf2 negative control group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; compared with melatonin + shNrf2 negative control group, <sup>c</sup> $P < 0.05$  (One-way ANOVA, LSD- $t$  test,  $n = 3$ ) 1: normal control group; 2: model control group; 3: shNrf2 negative control group; 4: shNrf2 group; 5: melatonin group; 6: melatonin+shNrf2 negative control group; 7: melatonin+shNrf2 group

### 3 讨论

多项研究表明, HLECs 的氧化损伤对年龄相关性白内障的发病起着重要的作用, 细胞内氧化代谢产物增加会对细胞产生毒性作用, 引起细胞焦亡<sup>[3-4]</sup>。有研究发现,  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的氧化应激会促进 HLECs 焦亡从而导致白内障的形成<sup>[9]</sup>。

褪黑素是经典的抗氧化药物, 对角膜炎、白内障、青光眼等眼部疾病具有一定的防治作用<sup>[10]</sup>。但其抑制 HLECs 焦亡的作用尚不明确。维生素 E 是高效的抗氧化剂和自由基清除剂, 常作为抗氧化剂的阳性对照。本研究采用  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的 HLECs 氧化损伤模型模拟白内障发病机制, 以维生素 E 为阳性对照, 系统评价褪黑素抗氧化损伤和焦亡的功效, 并研究其可能的作用机制。

ROS 是氧化还原反应的产物, 由其引起的氧化应激被认为是细胞损伤和白内障形成的主要机制。褪黑素可以降低视网膜色素上皮细胞中 ROS 含量, 缓解氧化应激引起的病理损伤<sup>[11-12]</sup>。本研究结果也显示, 与模型对照组相比, 褪黑素组和维生素 E 组细胞中 ROS 水平明显下降, 提示褪黑素能抵抗  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的 HLECs 氧化损伤, 对 HLECs 具有保护作用。

结果也显示, 与模型对照组相比, 褪黑素组和维生素 E 组细胞中 ROS 水平明显下降, 提示褪黑素能抵抗  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的 HLECs 氧化损伤, 对 HLECs 具有保护作用。

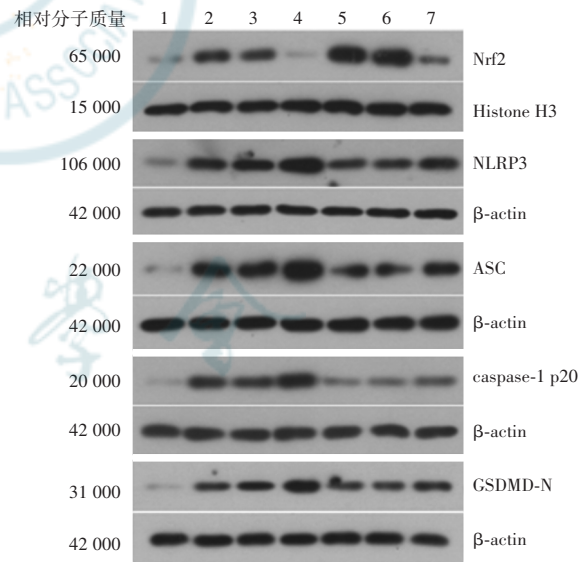


图 5 各组蛋白电泳图 1: 正常对照组; 2: 模型对照组; 3: shNrf2 阴性对照组; 4: shNrf2 组; 5: 褪黑素组; 6: 褪黑素+shNrf2 阴性对照组; 7: 褪黑素+shNrf2 组 Nrf2: 核转录因子 E2 相关因子 2; NLRP3: 核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族 pyrin 结构域蛋白 3; ASC: 凋亡相关斑点样蛋白

Figure 5 Electrophoretogram of different proteins 1: normal control group; 2: model control group; 3: shNrf2 negative control group; 4: shNrf2 group; 5: melatonin group; 6: melatonin+shNrf2 negative control group; 7: melatonin+shNrf2 group Nrf2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2; NLRP3: nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3; ASC: apoptosis-associated speck-like protein containing a C-terminal caspase recruitment domain

表 4 各细胞转染组焦亡相关蛋白相对表达量的比较( $\bar{x}\pm s$ )Table 4 Comparison of the relative expression level of pyroptosis-related proteins among different cell transfection groups ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	样本量	Nrf2	NLRP3	ASC	Caspase-1 p20	GSDMD-N
正常对照组	3	1.00±0.00 <sup>a</sup>	1.00±0.00 <sup>a</sup>	1.00±0.00 <sup>a</sup>	1.00±0.00 <sup>a</sup>	1.00±0.00 <sup>a</sup>
模型组	3	2.61±0.38	2.83±0.39	6.12±0.60	5.74±0.66	3.65±0.42
shNrf2 阴性对照组	3	2.42±0.27	3.07±0.37	6.14±0.68	5.66±0.71	3.71±0.47
shNrf2 组	3	0.72±0.09 <sup>ab</sup>	6.44±0.65 <sup>ab</sup>	8.72±0.84 <sup>ab</sup>	7.44±0.72 <sup>ab</sup>	5.02±0.52 <sup>ab</sup>
褪黑素组	3	5.52±0.53 <sup>a</sup>	2.03±0.31 <sup>a</sup>	2.64±0.33 <sup>a</sup>	1.87±0.26 <sup>a</sup>	1.99±0.31 <sup>a</sup>
褪黑素+shNrf2 阴性对照组	3	5.56±0.55 <sup>ab</sup>	1.83±0.22 <sup>ab</sup>	2.53±0.36 <sup>ab</sup>	1.88±0.19 <sup>ab</sup>	2.01±0.31 <sup>ab</sup>
褪黑素+shNrf2 组	3	1.87±0.27 <sup>c</sup>	2.93±0.34 <sup>c</sup>	4.43±0.44 <sup>c</sup>	2.60±0.31 <sup>c</sup>	2.64±0.35 <sup>c</sup>
F 值		94.80	65.69	70.56	77.88	39.29
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与模型对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与 shNrf2 阴性对照组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与褪黑素+shNrf2 阴性对照组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验) Nrf2:核转录因子 E2 相关因子 2;NLRP3:核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族 pyrin 结构域蛋白 3;ASC:凋亡相关斑点样蛋白;shNrf2:Nrf2 短发夹 RNA

Note:Compared with model control group,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;compared with shNrf2 negative control group,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;compared with melatonin+shNrf2 negative control group,<sup>c</sup> $P<0.05$ (One-way ANOVA,LSD-*t* test) Nrf2:nuclear factor erythroid 2-related factor 2;NLRP3:nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3;ASC:apoptosis-associated speck-like protein containing a C-terminal caspase recruitment domain;shNrf2:Nrf2 short hairpin RNA

细胞焦亡是一种新的细胞程序性、伴有炎症因子参与的死亡方式。Caspase-1 是介导细胞焦亡的关键蛋白,活化的 Caspase-1 切割 GSDMD,诱导细胞焦亡,使 LDH、IL-1 $\beta$ 、IL-18 分泌到胞外,加重炎症反应<sup>[13]</sup>。NLRP3 炎症小体由 Caspase-1 前体与 NLRP3 通过接头蛋白 ASC 组成<sup>[14]</sup>,参与糖尿病性视网膜病变、葡萄膜炎等眼科疾病的发病过程<sup>[15-16]</sup>,与白内障的进展也存在一定关联<sup>[17]</sup>。正常生理状态下,细胞质中的 Nrf2 与 Keap1 结合并处于相对抑制状态。当细胞发生氧化应激时,Nrf2 转移至细胞核内与抗氧化反应原件(ARE)结合,激活下游抗氧化基因的转录,发挥抗氧化功效。此外,Nrf2 可减少 NLRP3 炎症小体的激活,是抑制细胞焦亡的关键分子之一。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 会诱导细胞发生氧化应激,使 Nrf2 移位至细胞核,导致细胞核中 Nrf2 的表达应激性上调<sup>[18-19]</sup>。本研究发现,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理使细胞中 Nrf2 应激性上调,同时 NLRP3 炎症小体的释放增加。褪黑素处理进一步增加细胞核中 Nrf2 的表达,抑制 NLRP3 炎症小体的激活。氧化应激状态下沉默 Nrf2 显著促进细胞中 NLRP3 炎症小体的激活,说明 Nrf2 负调控 HLECs 细胞中 NLRP3 的表达,可能在调控细胞焦亡中发挥关键作用。

大量研究表明,褪黑素能通过激活 Nrf2 通路抑制内质网应激,缓解细胞氧化应激水平<sup>[20-21]</sup>。本研究发现用褪黑素预处理可显著上调 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导细胞核中 Nrf2 的表达,抑制 NLRP3、ASC、caspase-1 p20、GSDMD-N 蛋白表达,降低 LDH 活性,减少 IL-1 $\beta$ 、IL-18 炎症因子的释放,表明褪黑素对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导

HLECs 细胞氧化应激及焦亡具有抑制作用。为进一步验证褪黑素是否通过激活 Nrf2 参与调控 HLECs 的氧化应激及焦亡水平,本研究设计挽救实验,采用 shNrf2 慢病毒转染下调 Nrf2 表达,发现沉默 Nrf2 显著减弱了褪黑素的抗氧化及抗焦亡作用。Ma 等<sup>[21]</sup>研究也发现,褪黑素处理可逆转因 Nrf2 沉默而导致的成骨细胞死亡,提出褪黑素可通过激活 Nrf2 通路改善骨质疏松症。以上研究结果均提示,Nrf2 参与了褪黑素对氧化应激状态下抗 HLECs 焦亡作用。

本研究表明,褪黑素抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HLECs 氧化应激损伤及细胞焦亡,其作用机制可能是通过激活 Nrf2 抑制 ROS 的产生及 NLRP3 炎症小体的活化,减少 LDH 活性以及 IL-1 $\beta$ 、IL-18 炎症因子的释放,抑制 caspase-1 依赖的 HLECs 焦亡,进而发挥对 HLECs 的保护作用,为基于 HLECs 的白内障防治提供了新的思路。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在任何利益冲突

**作者贡献声明** 杨鑫:酝酿和设计实验、实施研究、采集数据、分析和解释数据、撰写文章;刘旭辉、孟佳:实施研究、采集数据、分析和解释数据;方梦园:实施研究、采集数据、数据统计分析;张凤妍:酝酿和设计实验、对文章进行指导及定稿

## 参考文献

- 李翔,张颖,黄亚琳,等. miR-125b 对晶状体上皮细胞的抗氧化应激作用及其机制[J]. 中华实验眼科杂志,2021,39(4):280-288. DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20191022-00458.
- Li X,Zhang Y,Huang YL,et al. Anti-oxidative stress effects of miR-125b on lens epithelial cells and its mechanism[J]. Chin J Exp Ophthalmol,2021,39(4):280-288. DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20191022-00458.

- [2] 王延东. 重视白内障防治药物研发,降低白内障患者致盲率[J]. 中华实验眼科杂志, 2020, 38(12): 1001-1003. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20201102-00726.  
Wang YD. Promoting the research and development of drug for cataract and reducing the blindness rate of cataract[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2020, 38(12): 1001-1003. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20201102-00726
- [3] Sun Y, Rong X, Li D, et al. Down-regulation of CRTAC1 attenuates UVB-induced pyroptosis in HLECs through inhibiting ROS production [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 532(1): 159-165. DOI: 10. 1016/j. bbr. 2020. 07. 028.
- [4] Wang Y, Zhang M, Sun Y, et al. Role of short-wavelength blue light in the formation of cataracts and the expression of caspase-1, caspase-11, Gasdermin D in rat lens epithelial cells: insights into a novel pathogenic mechanism of cataracts[J/OL]. BMC Ophthalmol, 2020, 20(1): 289 [2021-08-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32669096>. DOI: 10. 1186/s12886-020-01565-z.
- [5] Wang K, Ru J, Zhang H, et al. Melatonin enhances the therapeutic effect of plasma exosomes against cerebral ischemia-induced pyroptosis through the TLR4/NF- $\kappa$ B pathway [J/OL]. Front Neurosci, 2020, 14: 848 [2021-08-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33013286>. DOI: 10. 3389/fnins. 2020. 00848.
- [6] 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 [2021-08-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30174783>. DOI: 10. 1155/2018/9015765.
- [7] Wang B, Zuo X, Peng L, et al. Melatonin ameliorates oxidative stress-mediated injuries through induction of HO-1 and restores autophagic flux in dry eye [J/OL]. Exp Eye Res, 2021, 205: 108491 [2021-08-06]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33587908>. DOI: 10. 1016/j. exer. 2021. 108491.
- [8] Zhang Y, Huang Y, Guo L, et al. Melatonin alleviates pyroptosis of retinal neurons following acute intraocular hypertension [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2021, 20(3): 285-297. DOI: 10. 2174/1871527319666201012125149.
- [9] Jin X, Jin H, Shi Y, et al. Pyroptosis, a novel mechanism implicated in cataracts [J]. Mol Med Rep, 2018, 18(2): 2277-2285. DOI: 10. 3892/mmr. 2018. 9188.
- [10] 杨一涛, 唐罗生, 董晓光, 等. 褪黑素在眼科应用的最新进展 [J]. 眼科新进展, 2009, 29(2): 146-151. DOI: 10. 13389/j. cnki. rao. 2009. 02. 021.  
Yang YT, Tang LS, Dong XG, et al. Recent advance on application of melatonin in ophthalmology [J]. Rec Adv Ophthalmol, 2009, 29(2): 146-151. DOI: 10. 13389/j. cnki. rao. 2009. 02. 021.
- [11] Yan G, Yu L, Jiang S, et al. Melatonin antagonizes oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction in retinal pigmented epithelium cells via melatonin receptor 1 (MT1) [J]. J Toxicol Sci, 2018, 43(11): 659-669. DOI: 10. 2131/jts. 43. 659.
- [12] Blasiak J, Reiter RJ, Kaarniranta K. Melatonin in retinal physiology and pathology: the case of age-related macular degeneration [J/OL]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 6819736 [2021-09-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27688828>. DOI: 10. 1155/2016/6819736.
- [13] Fink SL, Cookson BT. Pillars article: caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages [J]. Cell Microbiol. 2006. 8: 1812-1825 [J]. J Immunol, 2019, 202(7): 1913-1926.
- [14] 陈露, 谢平, 胡仔仲. NLRP3 炎症小体在年龄相关性黄斑变性中的作用 [J]. 中华实验眼科杂志, 2022, 40(1): 73-77. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20210922-00527.  
Cheng L, Xie P, Hu ZZ. The role of NLRP3 inflammasome in age-related macular degeneration [J]. Chin J Exp Ophthalmol. 2022, 40(01): 73-77. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20210922-00527.
- [15] 张敏, 李志坚, 王亚敏. 细胞焦亡在眼部疾病中的研究进展 [J]. 眼科新进展, 2019, 39(1): 82-85. DOI: 10. 13389/j. cnki. rao. 2019. 0019.  
Zhang M, Li ZJ, Wang YM. Research progress of pyroptosis in ocular diseases [J]. Rec Adv Ophthalmol, 2019, 39(1): 82-85. DOI: 10. 13389/j. cnki. rao. 2019. 0019.
- [16] 孙梦莎, 闫泉, 孙晓东. 核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3 炎症小体在年龄相关性黄斑变性中的研究进展 [J]. 中华实验眼科杂志, 2019, 37(4): 316-320. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2019. 04. 017.  
Sun MS, Yan Q, Sun XD. Research progress of nucleotide-binding oligomerization domain like receptors 3 inflammasome in age-related macular degeneration [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2019, 37(4): 316-320. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2019. 04. 017.
- [17] 张楚, 朱子诚, 应充慧, 等. 葡萄膜炎并发白内障患者晶状体前囊膜中 NLRP3 炎症小体相关蛋白的表达和前囊膜超微结构改变 [J]. 眼科新进展, 2020, 40(7): 638-641. DOI: 10. 13389/j. cnki. rao. 2020. 0146.  
Zhang C, Zhu ZC, Ying CH, et al. Expression of NLRP3 inflammasome related protein and ultrastructure changes in lens anteriorcapsule of uveitis complicated with cataracts [J]. Rec Adv Ophthalmol, 2020, 40(7): 638-641. DOI: 10. 13389/j. cnki. rao. 2020. 0146.
- [18] Sun C, Jin W, Shi H. Oligomeric proanthocyanidins protects A549 cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress via the Nrf2-ARE pathway [J]. Int J Mol Med, 2017, 39(6): 1548-1554. DOI: 10. 3892/ijmm. 2017. 2971.
- [19] Shinjo T, Tanaka T, Okuda H, et al. Propofol induces nuclear localization of Nrf2 under conditions of oxidative stress in cardiac H9c2 cells [J/OL]. PLoS One, 2018, 13(4): e0196191 [2021-10-06]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29689082>. DOI: 10. 1371/journal.pone. 0196191.
- [20] Ariozi BI, Tasthan B, Tarakcioglu E, et al. Melatonin attenuates LPS-induced acute depressive-like behaviors and microglial NLRP3 inflammasome activation through the SIRT1/Nrf2 pathway [J/OL]. Front Immunol, 2019, 10: 1511 [2021-10-06]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31327964>. DOI: 10. 3389/fimmu. 2019. 01511.
- [21] Ma H, Wang X, Zhang W, et al. Melatonin suppresses ferroptosis induced by high glucose via activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway in type 2 diabetic osteoporosis [J/OL]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 9067610 [2021-10-06]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33343809>. DOI: 10. 1155/2020/9067610.

(收稿日期:2021-10-13 修回日期:2022-04-11)

(本文编辑:张宇 骆世平)