

驻景丸加减方含药血清对过氧化氢诱导的人 RPE 细胞上皮-间质转化的抑制作用及其机制

邵雁¹ 张元钟² 杨宁² 杭丽² 陈春明¹ 李敏¹ 徐新荣²

¹江苏省中医院溧阳分院 溧阳市中医医院眼科,溧阳 213300;²南京中医药大学附属医院 江苏省中医院眼科,南京 210029

通信作者:徐新荣,Email:xinrong_xu@aliyun.com

【摘要】 目的 研究驻景丸加减方含药血清对过氧化氢(H₂O₂)诱导的人视网膜色素上皮(ARPE)-19 细胞上皮-间质转化(EMT)的作用及其机制。方法 选取 2 月龄 SPF 级雌性 SD 大鼠 30 只,采用随机数字表法将其随机分为空白对照组和驻景丸加减方组,每组 15 只,分别给予生理盐水和驻景丸加减方连续灌胃 7 d,以制备空白血清和含药血清。采用 SD 大鼠制备驻景丸加减方含药血清。将 ARPE-19 细胞分为正常对照组,模型对照组,空白血清组,2.5%、5.0%、10.0%含药血清组,SB216763 组和 SB216763+含药血清组;其中前 2 个组均于正常培养基中培养,后 6 个组分别于空白大鼠血清培养基、相应浓度含药血清培养基、10 μmol/L GSK-3 抑制剂 SB216763 培养基以及 10 μmol/L SB216763+10.0%的含药血清培养基中培养;正常对照组常规培养,其他各组先常规培养 24 h,后加入终浓度 200 μmol/L 的 H₂O₂ 继续培养 24 h。采用细胞计数试剂盒-8 (CCK-8)法检测细胞活性;Transwell 法检测细胞迁移能力;DCFH-DA 法检测细胞内活性氧簇(ROS)含量;硫化巴比妥酸法检测细胞内丙二醛(MDA)含量;Western blot 法检测细胞中 Nrf2 通路相关蛋白核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)、血红素加氧酶 1(HO-1)、醌氧化还原酶 1(NQO-1)和 EMT 相关蛋白转化生长因子 β2(TGF-β2)、蛋白激酶 B(AKT)、糖原合成酶激酶 3β(GSK-3β)、snail 家族锌指转录因子 1(SNAIL1)、α 平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、上皮钙黏蛋白(E-cadherin)的表达。结果 空白血清组、2.5%、5.0%、10.0%组细胞存活率总体比较差异无统计学意义($F=0.163, P>0.05$)。正常对照组、模型对照组、2.5%含药血清组、5.0%含药血清组、10.0%含药血清组细胞存活率分别为(100.50±5.91)%、(60.87±4.30)%、(73.27±4.46)%、(80.73±5.67)%和(89.90±4.97)%,正常对照组、模型对照组、空白血清组、2.5%含药血清组、5.0%含药血清组和 10.0%含药血清组细胞迁移数分别为(84.67±8.33)、(222.33±13.58)、(215.67±10.02)、(174.67±10.60)、(143.67±8.02)和(107.67±6.66)个/视野,总体比较差异均有统计学意义($F=26.628, 99.289, 均 P<0.01$)。模型对照组细胞内 ROS 和 MDA 含量较正常对照组显著增加,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$);各含药血清组细胞内 ROS 和 MDA 含量均较模型对照组显著减少,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。模型对照组细胞内 SNAIL1、α-SMA、TGF-β2、p-AKT 及 p-GSK-3β 蛋白相对表达量明显多于正常对照组和各浓度含药血清组,E-cadherin 蛋白相对表达量明显少于正常对照组和各浓度含药血清组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。与正常对照组比,模型对照组细胞质 Nrf2 蛋白相对表达量降低,细胞核 Nrf2、HO-1 和 NQO-1 蛋白相对表达量升高,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);与模型对照组比,各含药血清组细胞质 Nrf2 蛋白相对表达量降低,细胞核 Nrf2、HO-1 和 NQO-1 蛋白相对表达量升高,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。与模型对照组相比,SB216763 组细胞质 Nrf2 蛋白相对表达量降低,细胞核 Nrf2 蛋白相对表达量升高,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);与 SB216763 组相比,SB216763+含药血清组细胞质 Nrf2、SNAIL1 和 α-SMA 蛋白相对表达量降低,细胞核 Nrf2 和 E-cadherin 蛋白相对表达量升高,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。结论 驻景丸加减方含药血清抑制 H₂O₂ 诱导的 ARPE-19 细胞 EMT,可能与 AKT/GSK-3β 通路的抑制及 Nrf2 信号通路的激活有关。

【关键词】 黄斑变性;氧化应激;上皮-间质转化;驻景丸加减方;视网膜色素上皮细胞

基金项目: 国家自然科学基金项目(82074177);江苏省重点研发项目(BE2018757);常州市第十七批科技计划(应用基础研究指导性)项目(CJ20209003);常州市卫生健康委青苗人才培养工程项目(CZQM2020116);常州市卫生健康委青年人才科技项目(QN202054);江苏省中医院溧阳分院院内课题项目(YN2018011)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20210907-00501



Inhibitory effect of ZhuJing pill variant formula medicated serum on H₂O₂-induced epithelial-mesenchymal transition of human RPE cells and its mechanism

Shao Yan¹, Zhang Yuanzhong², Yang Ning², Hang Li², Chen Chunming¹, Li Min¹, Xu Xinrong²

¹Department of Ophthalmology, Liyang Branch of Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Liyang Hospital of Chinese Medicine, Liyang 213300, China; ²Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

Corresponding author: Xu Xinrong, Email: xinrong_xu@aliyun.com

[Abstract] Objective To study the effect of ZhuJing pill variant formula medicated serum on hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) of human retinal pigment epithelial (ARPE-19) cells and its mechanism. **Methods** Thirty female SPF grade SD rats aged 2 months old were selected. The rats were randomized into blank control group and ZhuJing pill variant formula group according to random number table method, with 15 in each group, which were intragastrically administered with normal saline and ZhuJing pill variant formula solution for 7 days accordingly to prepare blank control serum and medicated serum. ZhuJing pill variant formula medicated serum was prepared with SD rats. ARPE-19 cells were divided into normal control group, model control group, blank serum group as well as 2.5%, 5.0% and 10.0% medicated serum groups, SB216763 group and SB216763+medicated serum group. Normal and blank control groups were cultured in normal culture medium, while the other six groups were cultured in blank rat serum medium, medicated serum medium of corresponding concentration, 10 μmol/L SB216763 medium and 10 μmol/L SB216763 + 10.0% medicated serum medium, respectively. Normal control group was routinely cultured, while the other groups were routinely cultured for 24 hours, and then added with H₂O₂ with the final concentration of 200 μmol/L for 24 hours. Cell viability was assessed by cell counting kit-8 (CCK-8) assay, and cell migration ability was detected by Transwell assay. Intracellular reactive oxygen species (ROS) level was detected by dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay, and MDA level was identified by sulfhydryl barbituric acid assay. The expression levels of Nrf2 pathway related proteins including nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), quinone oxidoreductase 1 (NQO-1) and EMT-related proteins including transforming growth factor-β2 (TGF-β2), protein kinase B (AKT), glycogen synthase kinase-3β (GSK-3β), snail family zinc finger 1 (SNAIL1), α-smooth muscle actin (α-SMA), epithelial cadherin (E-cadherin) in cells were measured by western blot assay. The use and care of animals complied with Regulations for the Administration of Affairs Concerning Experimental Animals. **Results** There was no significant difference in cell survival rate among blank serum group, 2.5%, 5.0% and 10.0% medicated serum groups ($F=0.163, P>0.05$). The cell survival rates were (100.50 ± 5.91)%, (60.87 ± 4.30)%, (73.27 ± 4.46)%, (80.73 ± 5.67)% and (89.90 ± 4.97)% in normal control group, model control group, 2.5%, 5.0% and 10.0% medicated serum groups, and the number of migrating cells was (84.67 ± 8.33), (222.33 ± 13.58), (215.67 ± 10.02), (174.67 ± 10.60), (143.67 ± 8.02) and (107.67 ± 6.66) pcs/visual field in normal control group, model control group, blank serum group, 2.5%, 5.0% and 10.0% medicated serum groups, respectively, with significant differences among the groups ($F=26.628, 99.289$; both at $P<0.01$). The contents of ROS and MDA in model control group were significantly increased in comparison with normal control group (both at $P<0.01$). The contents of ROS and MDA of 2.5%, 5.0% and 10.0% medicated serum groups were significantly decreased in comparison with model control group (all at $P<0.01$). The relative expression levels of SNAIL1, α-SMA, TGF-β2, p-AKT and p-GSK-3β proteins were significantly higher and the relative expression level of E-cadherin protein was significantly lower in model control group compared with normal control group, 2.5%, 5.0% and 10.0% medicated serum groups (all at $P<0.05$). Compared with normal control group, the relative expression level of cytoplasmic Nrf2 in model control group was decreased, while the relative expression levels of nuclear Nrf2, HO-1 and NQO-1 were increased, and the differences were statistically significant (all at $P<0.05$). Compared with model control group, the relative expression levels of cytoplasmic Nrf2 in 2.5%, 5.0% and 10.0% medicated serum groups were reduced, and the relative expression levels of nuclear Nrf2, HO-1 and NQO-1 were enhanced, and the differences were statistically significant (all at $P<0.01$). Compared with model control group, the relative expression level of cytoplasmic Nrf2 in SB216763 group was decreased, and the relative expression level of nuclear Nrf2 was increased, and the differences were statistically significant (both at $P<0.05$). Compared with SB216763 group, the relative expression levels of cytoplasmic Nrf2,

SNAIL1 and α -SMA in SB216763 + medicated serum group were decreased, and the relative expression levels of nuclear Nrf2 and E-cadherin protein were increased, and the differences were statistically significant (both at $P < 0.05$). **Conclusions** ZhuJing pill variant formula medicated serum can inhibit H_2O_2 -induced EMT in ARPE-19 cells. The mechanism may be related to the inhibition of AKT/GSK-3 β pathway and the activation of Nrf2 signaling pathway.

[Key words] Macular degeneration; Oxidative stress; Epithelial-mesenchymal transition; ZhuJing pill variant formula; Retinal pigment epithelial cells

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82074177); Key Research and Development Program of Jiangsu Province (BE2018757); The 17th Batch of Science and Technology Plan (Guiding Project of Applied Basic Research) of Changzhou (CJ20209003); Youth Talent Training Project of Changzhou Commission of Health (CZQM2020116); Youth Talent Science and Technology Project of Changzhou Commission of Health (QN202054); Hospital Project of Liyang Branch of Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine (YN2018011)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20210907-00501

视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞维持光感受器结构和功能的完整, RPE 细胞的损害是多种视网膜脉络膜疾病的重要原因, 如年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD)、增生性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 等^[1-2]。RPE 细胞可被各种生长因子和细胞因子激活, 发生上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT), 使去分化的上皮细胞移行、增生并转化为成纤维细胞^[3]。研究表明, 核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 通路和 EMT 均与 AMD 发病密切相关^[4-5]。氧化应激是 RPE 细胞功能损害的关键因素, 诱导活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 生成增加; Nrf2 通路作为人体最重要的抗氧化通路, 通过平衡氧化还原状态维持细胞存活和功能完整。ROS 能直接触发转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 介导的 EMT, TGF- β 又通过 NADPH 氧化酶 4 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4, NOX4) 进一步促进线粒体生成 ROS, 形成正反馈回路^[6]。在氧化应激状态下, Nrf2 通路和 EMT 之间会发生交互作用, Nrf2 可直接抑制 snail 家族锌指转录因子 1 (snail family zinc finger 1, SNAIL1) 表达从而抑制 EMT^[7-8]; TGF- β 1 诱导的细胞 EMT 过程中, Nrf2 通路的抗氧化作用受到抑制^[9]。驻景丸加减方是治疗肝肾亏虚内障眼病的代表方剂, 对 AMD 有一定治疗作用, 但其作用机制仍不清楚, 这制约了其在临床推广应用, 也不利于组方优化和疗效提高。本课题组前期研究显示, 驻景丸加减方可激活视网膜组织 Nrf2 通路, 上调下游靶基因血红素氧化酶 1 (hemeoxygenase-1, HO-1)、醌氧化还原酶 1 (quinone oxidoreductase 1, NQO-1) 表达, 对于性 AMD 模型小鼠视网膜有保护作

用^[10]。基于此, 本研究拟观察驻景丸加减方含药血清对过氧化氢 (hydrogen peroxide, H_2O_2) 诱导的 ARPE-19 细胞 EMT 的抑制作用, 并探讨相关信号通路, 以阐明驻景丸加减方治疗 AMD 的机制, 为其临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及细胞 2 月龄 SPF 级 Sprague Dawley (SD) 雌性大鼠 30 只, 体质量 (220 \pm 20) g, 由南通大学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK (苏) 2019-0001, 实验动物的使用遵循我国《实验动物管理条例》。ARPE-19 细胞购自美国 ATCC 公司。

1.1.2 主要试剂及仪器 驻景丸加减方颗粒剂 (菟丝子 20 g、楮实子 20 g、枸杞子 12 g、茺蔚子 15 g、车前子 12 g、木瓜 6 g、河车粉 5 g、寒水石 10 g、五味子 6 g、生三七 2 g) (江阴天江药业有限公司); 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、双抗 (美国 HyClone 公司); 糖原合成酶激酶 (glycogen synthetase kinase, GSK)-3 抑制剂 SB216763 (美国 MCE 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); ROS、丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 试剂盒; 兔抗人 SNAIL1 一抗 (3879)、兔抗人 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 一抗 (19245)、鼠抗人上皮钙黏蛋白 (epithelial cadherin, E-cadherin) 一抗 (14472)、兔抗人 TGF- β 2 一抗 (84912)、兔抗人蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 一抗 (4685)、兔抗人磷酸化 (p-) AKT 一抗 (4060)、兔抗人 GSK-3 β 一抗 (12456)、兔抗人 p-GSK-3 β 一抗 (5558)、兔抗人 Nrf2 一抗 (12721)、兔抗人 HO-1 一抗 (26416)、鼠抗人 NQO-1 一抗 (3187) (美国 Cell Signaling Technology 公司); 过

氧化物酶标记鼠抗兔 IgG 二抗(sc-2357)(英国 Abcam 公司)。Transwell 小室(美国 Corning 公司);可见分光光度计(南京建成生物工程研究所);倒置生物显微镜(德国 Leica 公司);流式细胞仪(美国 BD 公司);电泳系统、凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);酶标仪(美国 Synergy 公司)。

1.2 方法

1.2.1 含药血清的制备 将 SD 大鼠随机分为空白对照组和驻景丸加减方组,每组 15 只。根据人和动物体表面积折算的等效剂量比率表计算出驻景丸加减方大鼠给药的等效剂量为 0.9 g/kg,2 ml 生理盐水溶解药物,给予大鼠灌胃给药,空白对照组灌服等量生理盐水,每日 1 次,连续给药 7 d。末次给药后 1 h 股动脉采血,室温静置 2~4 h,于 4℃ 3 000 r/min 离心 15 min 取上清液,56℃ 水浴灭活,0.22 μm 滤网除菌后多管分装,-20℃ 保存备用。

1.2.2 细胞处理及分组 ARPE-19 细胞用含体积分数 10% FBS 和体积分数 1% 双抗的 DMEM/F 培养基于 37℃、体积分数 5% CO₂ 环境中培育。待细胞生长融合达 80% 时进行胰酶消化、传代,选取对数生长期细胞进行后续实验。将培养的细胞分为 8 个组,其中正常对照组、模型对照组细胞正常培养,空白血清组培养基中加入空白对照组大鼠血清,含药血清组培养基中分别加入 2.5%、5.0%、10.0% 的含药血清,SB216763 组培养基中加入终浓度 10 μmol/L SB216763,SB216763+含药血清组加入 10 μmol/L SB216763 和 10.0% 的含药血清。正常对照组仅常规培养,其他各组先常规培养 24 h,后加入终浓度 200 μmol/L 的 H₂O₂ 继续培养 24 h。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞活性 取对数期生长的 ARPE-19 细胞,按照 1×10⁴ 个/孔接种于 96 孔板,细胞贴壁后继续培养 24 h,根据分组分别更换空白血清、2.5% 含药血清组、5.0% 含药血清组和 10% 含药血清组含药浓度血清培养基继续培养 24 h;另取接种的细胞按照 1.2.2 部分进行分组处理。每孔中加入 0.5% CCK-8 溶液 20 μl 培养 2 h,酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光度(absorbance, A) 值,计算细胞存活率。细胞存活率(%)=(A_{给药}-A_{空白})/(A_{模型}-A_{空白})×100%。

1.2.4 Transwell 检测 ARPE-19 细胞迁移能力 取对数生长期 ARPE-19 细胞按 1.2.2 方法进行分组培养,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤细胞后加入胰酶消化,离心后制成 2×10⁵/ml 细胞悬液;将 Transwell 小室置于 24 孔板,上室加入 200 μl 细胞悬液,下室加入 800 μl 含 FBS 培养基,培养箱孵育

24 h;吸除上室培养基,转移至甲醛溶液室温固定下表面细胞 30 min,吸干上室固定液后置于结晶紫溶液中,下表面细胞室温染色 30 min, PBS 洗涤数次,晾干,倒置显微镜下观察并拍照,计算 200 倍显微镜下 5 个视野平均细胞迁移数。

1.2.5 DCFH-DA 法和硫化巴比妥酸法分别检测 ARPE-19 细胞内 ROS 和 MDA 含量 (1) ROS 含量测定 细胞接种至 96 孔板,按照试剂盒说明书配置试剂,加入 10 μmol/L DCFH-DA 于培养基,37℃ 孵育细胞 30 min,1 000×g 离心收集细胞,用 PBS 重悬,酶标仪进行检测,设置最佳激发波长为(500±15) nm,最佳发射波长为(530±20) nm。(2) MDA 含量测定 按照试剂盒说明书配置试剂,将试剂与待测样本混匀后用保鲜膜扎紧试管口,刺一小孔,95℃ 沸水浴 40 min,冷却后低速离心,取上清,用可见分光光度计 1 cm 光径,蒸馏水调零,测定 532 nm 处 A 值。

1.2.6 Western blot 法检测 ARPE-19 细胞内 Nrf2 通路相关蛋白和 EMT 相关蛋白表达 ARPE-19 细胞按 1.2.2 方法进行分组培养,收集细胞并进行常规裂解、提取蛋白,其中 Nrf2 用细胞核蛋白和细胞质蛋白抽提试剂盒分别提取蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样本于 100℃ 水浴 10 min 蛋白变性后,取 50 μl 上样,用 100 g/L 分离胶、50 g/L 浓缩胶电泳,之后转印至硝酸纤维素膜上;加入一抗(均 1:1 000 稀释)4℃ 孵育过夜, TBST 漂洗后加相应二抗(1:5 000 稀释)孵育,化学发光剂显影,凝胶成像系统获取显影图像。采用 ImageJ 软件对图像进行灰度分析,以 GAPDH 为内参,核蛋白以 Lamin B 为内参,计算各目蛋白相对表达量。实验独立重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad 8.0 软件进行统计分析。本研究中计量资料经 S-W 检验符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间不同指标总体差异比较采用单因素方差分析,多重比较采用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各浓度含药血清培养细胞存活率比较

各浓度含药血清培养细胞形态扁平且排列较规则。空白血清组、2.5% 含药血清组、5.0% 含药血清组和 10.0% 含药血清组细胞常规培养 24 h 时细胞存活率分别为(100.60±7.90)%、(101.27±8.58)%、(103.80±9.97)% 和(105.20±10.34)%,总体比较差异无统计学意义($F=0.163, P>0.05$)(图 1)。

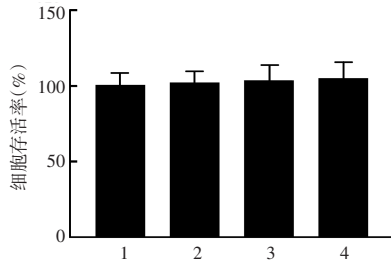


图 1 各浓度含药血清组细胞存活率比较 $F=0.163, P>0.05$ (单因素方差分析, $n=3$) 1:空白血清组;2:2.5%含药血清组;3:5.0%含药血清组;4:10.0%含药血清组

Figure 1 Comparison of cell viability among four serum groups with different drug-containing concentrations $F=0.163, P>0.05$ (One-way ANOVA, $n=3$) 1: blank serum group; 2: 2.5% medicated serum group; 3: 5.0% medicated serum group; 4: 10.0% medicated serum group

2.2 各氧化应激处理组细胞存活率比较

各组检测发现,正常对照组、模型对照组以及 2.5%、5.0%、10.0% 含药血清组细胞存活率分别为 (100.50±5.91)%、(60.87±4.30)%、(73.27±4.46)%、(80.73±5.67)%和(89.90±4.97)%,总体比较差异有统计学意义 ($F=26.628, P<0.01$)。与正常对照组相比,模型对照组细胞存活率显著降低,差异有统计学意义 ($P<0.01$);与模型对照组相比,各浓度含药血清组细胞存活率明显升高,差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$) (图 2)。

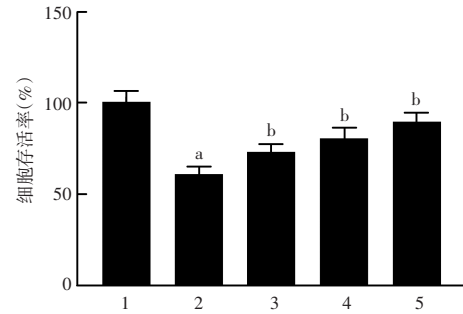


图 2 各氧化应激组细胞存活率比较 $F=26.628, P<0.01$. 与正常对照组比较, $^a P<0.01$; 与模型对照组比较, $^b P<0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n=3$) 1:正常对照组;2:模型对照组;3:2.5%含药血清组;4:5.0%含药血清组;5:10.0%含药血清组

Figure 2 Comparison of cell viability among different H_2O_2 -induced groups $F=26.628, P<0.01$ Compared with normal control group, $^a P<0.01$; compared with model control group, $^b P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test, $n=3$) 1: normal control group; 2: model control group; 3: 2.5% medicated serum group; 4: 5.0% medicated serum group; 5: 10.0% medicated serum group

2.3 各氧化应激处理组细胞迁移能力比较

正常对照组细胞呈多角形,生长规则;模型对照组和空白血清组细胞形态异常,可见大量细胞迁移和凋亡(图 3)。正常对照组、模型对照组、空白血清组及 2.5%含药血清、5.0%含药血清、10.0%含药血清组细胞迁移数分别为 (84.67±8.33)、(222.33±13.58)、

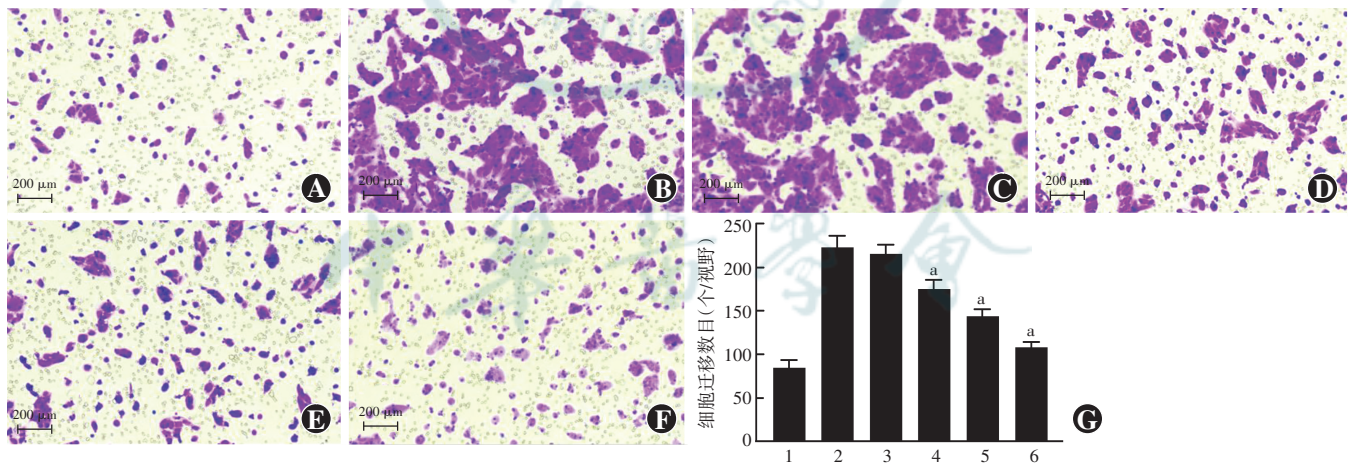


图 3 各氧化应激组细胞迁移能力(结晶紫×200,标尺=200 μm) A:正常对照组细胞迁移数量较少 B:模型对照组存在大量迁移细胞 C:空白血清组存在大量迁移细胞 D:2.5%含药血清组细胞迁移数较模型对照组减少 E:5.0%含药血清组细胞迁移数较2.5%含药血清组减少 F:10.0%含药血清组细胞迁移数较5.0%含药血清组减少 G:各氧化应激组细胞迁移数比较 $F=99.289, P<0.01$. 与模型对照组比较, $^a P<0.01$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n=3$) 1:正常对照组;2:模型对照组;3:空白血清组;4:2.5%含药血清组;5:5.0%含药血清组;6:10.0%含药血清组

Figure 3 Cell migration capacity in different H_2O_2 -induced groups (Crystal violet ×200, bar=200 μm) A: Normal control group There were few migrating ARPE-19 cells B: Model control group There were large number of migrating ARPE-19 cells C: Blank serum group There were lots of migrating ARPE-19 cells D: 2.5% medicated serum group There were fewer migrating ARPE-19 cells than model control group E: 5.0% medicated serum group There were fewer migrating ARPE-19 cells than 2.5% medicated serum group F: 10.0% medicated serum group There were fewer migrating ARPE-19 cells than 5.0% medicated serum group G: Comparison of number of migrating cells among different H_2O_2 -induced groups $F=99.289, P<0.01$. Compared with model control group, $^a P<0.01$ (One-way ANOVA, LSD- t test, $n=3$) 1: normal control group; 2: model control group; 3: blank serum group; 4: 2.5% medicated serum group; 5: 5.0% medicated serum group; 6: 10.0% medicated serum group

(215.67±10.02)、(174.67±10.60)、(143.67±8.02)和(107.67±6.66)个/视野,总体比较差异有统计学意义($F=99.289, P<0.01$)。模型对照组细胞迁移数明显多于正常对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);各含药血清组细胞迁移数量明显少于模型对照组,差异均有统计学意义($P<0.01$)。

2.4 各氧化应激处理组细胞内 ROS 和 MDA 含量比较

正常对照组、模型对照组和各浓度含药血清组细胞内 ROS 和 MDA 含量总体比较差异均有统计学意义($F=140.166, 172.866$, 均 $P<0.01$)。模型对照组细胞内 ROS 和 MDA 含量较正常对照组显著增加,各浓度含药血清组细胞内 ROS 和 MDA 含量较模型对照组显著减少,差异均有统计学意义($P<0.01$) (表 1)。

表 1 各氧化应激处理组细胞内 ROS 和 MDA 含量比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 1 Comparison of ROS and MDA contents among different H₂O₂-induced groups ($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 样本量 | ROS 含量 (荧光强度/mg 蛋白) | MDA 含量 (nmol/mg 蛋白) |
|------------|-----|------------------------------|-------------------------|
| 正常对照组 | 3 | 2 594.67±232.88 ^a | 15.73±1.47 ^a |
| 模型对照组 | 3 | 8 946.00±440.84 | 54.27±2.65 |
| 2.5%含药血清组 | 3 | 7 157.00±355.48 ^a | 45.67±1.82 ^a |
| 5.0%含药血清组 | 3 | 6 881.67±335.44 ^a | 42.03±1.72 ^a |
| 10.0%含药血清组 | 3 | 5 960.67±314.56 ^a | 37.20±1.61 ^a |
| <i>F</i> 值 | | 140.166 | 172.866 |
| <i>P</i> 值 | | <0.01 | <0.01 |

注:与模型对照组比较,^a $P<0.01$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验)
ROS:活性氧簇;MDA:丙二醛
Note:Compared with model control group,^a $P<0.01$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) ROS:reactive oxygen species;MDA:malondialdehyde

2.5 各氧化应激处理组细胞中 EMT 及氧化应激通路相关蛋白表达量比较

2.5.1 各组细胞内 EMT 相关蛋白表达比较

在各氧化应激处理组中,模型对照组 SNAIL1 和 α -SMA 蛋白条带灰度最强, E-cadherin 蛋白条带灰度最弱;10.0%含药血清组 SNAIL1 和 α -SMA 蛋白条带灰度最弱, E-cadherin 蛋白条带灰度最强(图 4)。正常对照组、模型对照组和 3 个含药血清组细胞 SNAIL1、 α -SMA 和 E-cadherin 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义($F=22.322, 44.310, 73.194$, 均 $P<0.01$)。与正常对照组比较,模型对照组 SNAIL1、 α -SMA 蛋白相对表达量显著升高, E-cadherin 蛋白相对表达量显著降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$);与模型对照组

比较,各含药血清组 SNAIL1、 α -SMA 蛋白相对表达量明显下降, E-cadherin 蛋白相对表达量明显升高,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$) (表 2)。

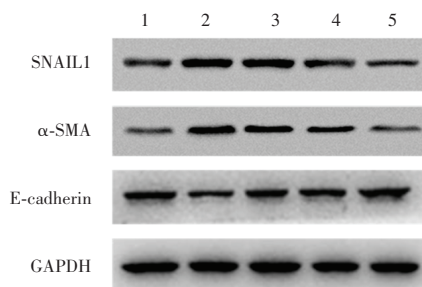


图 4 各组细胞内 SNAIL1、 α -SMA、E-cadherin 蛋白表达电泳图

1:正常对照组;2:模型对照组;3:2.5%含药血清组;4:5.0%含药血清组;5:10.0%含药血清组 SNAIL1:snail 家族锌指转录因子 1; α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白;E-cadherin:上皮钙黏蛋白;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Figure 4 Electrophoretogram of SNAIL1, α -SMA and E-cadherin proteins in five groups

1: normal control group; 2: model control group; 3: 2.5% medicated serum group; 4: 5.0% medicated serum group; 5: 10.0% medicated serum group SNAIL1: snail family zinc finger 1; α -SMA: α -smooth muscle actin; E-cadherin: epithelial cadherin; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

表 2 各组细胞内 SNAIL1、 α -SMA、E-cadherin 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 2 Comparison of relative protein expression levels of SNAIL1, α -SMA and E-cadherin among five groups ($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 样本量 | SNAIL1 | α -SMA | E-cadherin |
|------------|-----|------------------------|------------------------|------------------------|
| 正常对照组 | 3 | 0.52±0.04 ^a | 0.38±0.03 ^a | 0.85±0.04 ^a |
| 模型对照组 | 3 | 0.89±0.08 | 0.67±0.02 | 0.45±0.03 |
| 2.5%含药血清组 | 3 | 0.72±0.06 ^a | 0.58±0.04 ^a | 0.62±0.03 ^a |
| 5.0%含药血清组 | 3 | 0.59±0.06 ^a | 0.50±0.04 ^a | 0.74±0.04 ^a |
| 10.0%含药血清组 | 3 | 0.53±0.05 ^a | 0.40±0.03 ^a | 0.84±0.04 ^a |
| <i>F</i> 值 | | 22.322 | 44.310 | 73.194 |
| <i>P</i> 值 | | <0.01 | <0.01 | <0.01 |

注:与模型对照组比较,^a $P<0.01$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验)
SNAIL1:snail 家族锌指转录因子 1; α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白;
E-cadherin:上皮钙黏蛋白

Note:Compared with model control group,^a $P<0.01$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) SNAIL1:snail family zinc finger 1; α -SMA: α -smooth muscle actin;E-cadherin:epithelial cadherin

2.5.2 各组细胞内 AKT/GSK-3 β 信号通路相关蛋白表达比较

在各氧化应激处理组中,模型对照组细胞 TGF- β 2、p-AKT 和 p-GSK-3 β 蛋白条带灰度最强;10.0%含药血清组细胞 TGF- β 2、p-AKT 和 p-GSK-3 β 蛋白条带灰度最弱;各组细胞 AKT 和 GSK-3 β 蛋白条带灰度无明显差异(图 5)。正常对照组、模型对照组

和 3 个含药血清组细胞 TGF-β2、p-AKT 和 p-GSK-3β 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F = 138.390、67.645、116.825$, 均 $P < 0.01$)。与正常对照组相比,模型对照组 TGF-β2、p-AKT、p-GSK-3β 蛋白相对表达量显著升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);与模型对照组相比,各含药血清组 TGF-β2、p-AKT、p-GSK-3β 蛋白相对表达量显著降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。各组细胞 AKT、GSK-3β 蛋白相对表达量差异均无统计学意义 ($F = 1.140、0.321$, 均 $P > 0.05$)(表 3)。

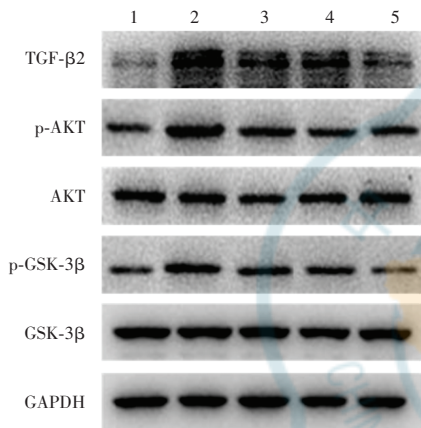


图 5 各组细胞内 TGF-β2、AKT、p-AKT、GSK-3β、p-GSK-3β 蛋白表达电泳图 1:正常对照组;2:模型对照组;3:2.5%含药血清组;4:5.0%含药血清组;5:10.0%含药血清组 TGF-β2:转化生长因子-β2;AKT:蛋白激酶 B;p-AKT:磷酸化 AKT;GSK-3β:糖原合成酶激酶 3β;p-GSK-3β:磷酸化 GSK-3β;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Figure 5 Electrophoretogram of TGF-β2, AKT, p-AKT, GSK-3β and p-GSK-3β proteins in five groups 1: normal control group; 2: model control group; 3: 2.5% medicated serum group; 4: 5.0% medicated serum group; 5: 10.0% medicated serum group TGF-β2: transforming growth factor-β2; AKT: protein kinase B; p-AKT: phosphorylated AKT; GSK-3β: glycogen synthase kinase-3β; p-GSK-3β: phosphorylated GSK-3β; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

2.5.3 各组细胞内 Nrf2 通路相关蛋白表达比较 在各氧化应激处理组中,正常对照组细胞质 Nrf2 蛋白条带灰度最强,细胞核 Nrf2、HO-1 和 NQO-1 蛋白条带灰度最弱;10.0%含药血清组细胞质 Nrf2 蛋白条带灰度最弱,细胞核 Nrf2、HO-1 和 NQO-1 蛋白条带灰度最强(图 6)。正常对照组、模型对照组和各浓度含药血清组细胞质 Nrf2、HO-1、NQO-1 和细胞核 Nrf2 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F = 64.026、35.686、209.719、73.847$, 均 $P < 0.01$)。与正常对照组相比,模型对照组细胞质中 Nrf2 蛋白相对表达量降低,

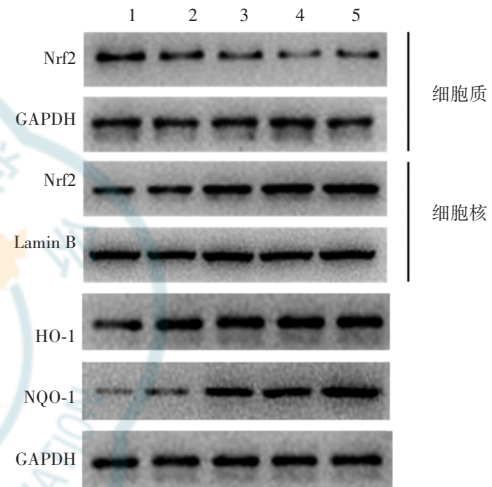


图 6 各组细胞内细胞质 Nrf2、HO-1、NQO-1 和细胞核 Nrf2 蛋白表达电泳图 1:正常对照组;2:模型对照组;3:2.5%含药血清组;4:5.0%含药血清组;5:10.0%含药血清组 Nrf2:核因子 E2 相关因子 2;HO-1:血红素氧化酶 1;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶;NQO-1:醌氧化还原酶 1

Figure 6 Electrophoretogram of cytoplasmic Nrf2, HO-1, NQO-1 and nuclear Nrf2 in five groups 1: normal control group; 2: model control group; 3: 2.5% medicated serum group; 4: 5.0% medicated serum group; 5: 10.0% medicated serum group Nrf2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2; HO-1: hemoxygenase-1; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; NQO-1: quinone oxidoreductase 1

表 3 各组细胞内 TGF-β2、AKT、p-AKT、GSK-3β、p-GSK-3β 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of relative protein expression levels of TGF-β2, AKT, p-AKT, GSK-3β and p-GSK-3β among five groups ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 样本量 | TGF-β2 | AKT | p-AKT | GSK-3β | p-GSK-3β |
|------------|-----|------------------------|-----------|------------------------|-----------|------------------------|
| 正常对照组 | 3 | 0.44±0.03 ^a | 0.97±0.07 | 0.48±0.04 ^a | 1.04±0.08 | 0.43±0.03 ^a |
| 模型对照组 | 3 | 1.23±0.07 | 0.96±0.07 | 1.07±0.07 | 1.00±0.07 | 0.90±0.04 |
| 2.5%含药血清组 | 3 | 1.04±0.04 ^a | 0.92±0.06 | 0.89±0.05 ^a | 1.01±0.09 | 0.69±0.03 ^a |
| 5.0%含药血清组 | 3 | 1.01±0.05 ^a | 0.89±0.04 | 0.67±0.05 ^a | 1.02±0.08 | 0.64±0.03 ^a |
| 10.0%含药血清组 | 3 | 0.68±0.05 ^a | 0.96±0.05 | 0.63±0.03 ^a | 0.97±0.06 | 0.44±0.03 ^a |
| F 值 | | 138.390 | 1.140 | 67.645 | 0.321 | 116.825 |
| P 值 | | <0.01 | >0.05 | <0.01 | >0.05 | <0.01 |

注:与模型对照组比较,^a $P < 0.01$ (单因素方差分析,LSD-*t*检验) TGF-β2:转化生长因子-β2;AKT:蛋白激酶 B;p-AKT:磷酸化 AKT;GSK-3β:糖原合成酶激酶 3β;p-GSK-3β:磷酸化 GSK-3β

Note: Compared with model control group ^a $P < 0.01$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) TGF-β2: transforming growth factor-β2; AKT: protein kinase B; p-AKT: phosphorylated AKT; GSK-3β: glycogen synthase kinase-3β; p-GSK-3β: phosphorylated GSK-3β

HO-1、NQO-1 蛋白以及细胞核 Nrf2 蛋白相对表达量升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);与模型对照组相比,各含药血清组细胞质 Nrf2 蛋白相对表达量明显降低,HO-1、NQO-1 蛋白以及细胞核 Nrf2 蛋白相对表达量明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)(表 4)。

2.6 各 GSK-3β 抑制剂处理组 Nrf2、SNAIL1、α-SMA 和 E-cadherin 蛋白表达比较

各 GSK-3β 抑制剂处理组中,正常对照组细胞质 Nrf2 蛋白条带灰度最强,细胞核 Nrf2 和 α-SMA 蛋白条带灰度最弱;模型对照组 SNAIL1 蛋白条带灰度最强,E-cadherin 蛋白条带灰度最弱;SB216763+含药血清组细胞质 Nrf2 蛋白条带灰度最弱,细胞核 Nrf2 蛋白条带灰度最强(图 7)。正常对照组、模型对照组、SB216763 组和 SB216763+含药血清组细胞质 Nrf2、SNAIL1、α-SMA、E-cadherin 和细胞核 Nrf2 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义($F = 46.073$ 、 10.135 、 41.450 、 95.296 、 162.906 ,均 $P < 0.01$)。与正常对照组相比,模型对照组细胞质 Nrf2 和 E-cadherin 蛋白相对表达量下降,细胞核 Nrf2、SNAIL1 和 α-SMA 蛋白相对表达量升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);与模型对照组相比,SB216763 组细胞质 Nrf2 蛋白相对表达量下降,细胞核 Nrf2 蛋白相对表达量升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);与 SB216763 组相比,SB216763+含药血清组细胞质 Nrf2、

表 4 各组细胞内 Nrf2、HO-1、NQO-1 蛋白相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)
Table 4 Comparison of relative protein expression levels of Nrf2, HO-1 and NQO-1 among five groups ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 样本量 | 细胞质 Nrf2 | 细胞核 Nrf2 | HO-1 | NQO-1 |
|------------|-----|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 正常对照组 | 3 | 0.96±0.05 ^a | 0.54±0.04 ^a | 0.82±0.04 ^a | 0.22±0.04 ^a |
| 模型对照组 | 3 | 0.81±0.06 | 0.67±0.05 | 0.94±0.04 | 0.32±0.04 |
| 2.5%含药血清组 | 3 | 0.58±0.05 ^a | 0.92±0.05 ^a | 1.08±0.05 ^a | 0.59±0.04 ^a |
| 5.0%含药血清组 | 3 | 0.46±0.05 ^a | 1.06±0.05 ^a | 1.15±0.05 ^a | 0.92±0.05 ^a |
| 10.0%含药血清组 | 3 | 0.42±0.05 ^a | 1.09±0.06 ^a | 1.18±0.05 ^a | 1.11±0.06 ^a |
| F 值 | | 64.026 | 73.847 | 35.686 | 209.719 |
| P 值 | | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |

注:与模型对照组比较,^a $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验) Nrf2:核因子 E2 相关因子 2;HO-1:血红素氧化酶 1;NQO-1:醌氧化还原酶 1

Note:Compared with model control group,^a $P < 0.05$ (One-way ANOVA,LSD-*t* test) Nrf2:nuclear factor erythroid 2-related factor 2;HO-1:hemeoxygenase-1;NQO-1:quinone oxidoreductase 1

SNAIL1 和 α-SMA 蛋白相对表达量下降,细胞核 Nrf2 和 E-cadherin 蛋白相对表达量升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表 5)。

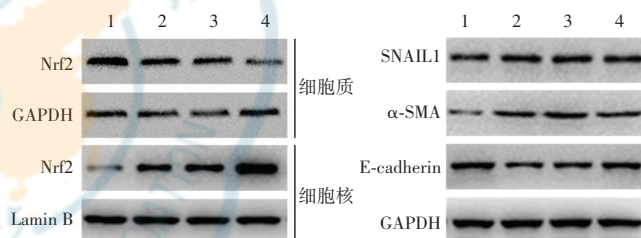


图 7 各组细胞细胞质 Nrf2、SNAIL1、α-SMA、E-cadherin 和细胞核 Nrf2 蛋白表达电泳图 1:正常对照组;2:模型对照组;3:SB216763 组;4:SB216763+含药血清组 Nrf2:核因子 E2 相关因子 2;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶;SNAIL1:snail 家族锌指转录因子 1;α-SMA:α-平滑肌肌动蛋白;E-cadherin:上皮钙黏蛋白

Figure 7 Electrophoretogram of cytoplasmic Nrf2, SNAIL1, α-SMA, E-cadherin and nuclear Nrf2 1:normal control group;2:model control group;3:SB216763 group;4:SB216763+medicated serum group Nrf2:nuclear factor erythroid 2-related factor 2;GAPDH:glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase;SNAIL1:snail family zinc finger 1;α-SMA:α-smooth muscle actin;E-cadherin:epithelial cadherin

表 5 各组细胞内 Nrf2、SNAIL1、α-SMA 和 E-cadherin 蛋白相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of relative protein expression levels of Nrf2, SNAIL1, α-SMA and E-cadherin among four groups ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 样本量 | 细胞质 Nrf2 | 细胞核 Nrf2 | SNAIL1 | α-SMA | E-cadherin |
|----------------|-----|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 正常对照组 | 3 | 1.32±0.07 | 0.34±0.04 | 0.76±0.04 | 0.34±0.03 | 1.01±0.05 |
| 模型对照组 | 3 | 1.11±0.07 ^a | 0.71±0.05 ^a | 0.91±0.05 ^a | 0.62±0.05 ^a | 0.49±0.04 ^a |
| SB216763 组 | 3 | 0.97±0.05 ^b | 0.87±0.06 ^b | 0.91±0.05 | 0.61±0.04 | 0.51±0.04 |
| SB216763+含药血清组 | 3 | 0.77±0.06 ^c | 1.24±0.06 ^c | 0.76±0.04 ^c | 0.52±0.03 ^c | 0.60±0.04 ^c |
| F 值 | | 46.073 | 162.906 | 10.135 | 41.450 | 95.296 |
| P 值 | | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型对照组比较,^b $P < 0.05$;与 SB216763 组比较,^c $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验) Nrf2:核因子 E2 相关因子 2;SNAIL1:snail 家族锌指转录因子 1;α-SMA:α-平滑肌肌动蛋白;E-cadherin:上皮钙黏蛋白

Note:Compared with normal control group,^a $P < 0.05$;compared with model control group,^b $P < 0.05$;compared with SB216763 group,^c $P < 0.05$ (One-way ANOVA,LSD-*t* test) Nrf2:nuclear factor erythroid 2-related factor 2;SNAIL1:snail family zinc finger 1;α-SMA:α-smooth muscle actin;E-cadherin:epithelial cadherin

3 讨论

氧化应激可导致 RPE 细胞结构和/或功能损害,与 AMD 发病密切相关^[11]。研究表明,激活 Nrf2 通路可启动抗氧化酶和 II 相解毒酶合成,对机体细胞起保护作用^[12]。本课题组前期的动物和细胞实验发现,激活 Nrf2 通路对氧化应激损伤 ARPE-19 细胞和干性 AMD 模型小鼠视网膜有保护作用^[13]。本研究结果显示,驻景丸加减方能促进 Nrf2 核转位,上调 HO-1 和 NQO-1 表达,并降低氧化应激损伤细胞内 ROS 和 MDA 含量,提高氧化应激损伤 ARPE-19 细胞的存活率。EMT 与 AMD 发病密切相关,在湿性 AMD 患眼中可观察到,半乳糖凝集素-1 通过上调 EMT 相关的 TGF- β /SMAD 通路,促进脉络膜新生血管形成和视网膜下纤维增生^[14];在干性 AMD 患眼和 *Cryba1* 基因敲除小鼠的视网膜组织中也出现 SNAIL1、Vimentin 高表达和 E-cadherin 低表达^[15]。氧化应激也会诱导 EMT,黄斑处于高氧环境,加上光感受器脱离膜盘的脂质氧化,会产生大量的 ROS,通过 TGF- β 触发 EMT 进程^[16]。本研究结果显示, H₂O₂ 诱导的 ARPE-19 细胞迁移能力增强, SNAIL1、 α -SMA 表达上调, E-cadherin 表达下调,表明 ARPE-19 细胞发生了 EMT;驻景丸加减方含药血清能下调氧化应激损伤细胞的 α -SMA、Vimentin 表达,上调其 E-cadherin 表达,并减弱细胞迁移能力,显示驻景丸加减方有抑制细胞 EMT 的作用。这些结果表明,驻景丸加减方可抑制 H₂O₂ 诱导的 ARPE-19 细胞 EMT,与 Nrf2 通路的激活密切相关。

RPE 是外层视网膜 TGF- β 的主要来源,多项研究表明 TGF- β 与视网膜下纤维化、EMT 密切相关^[17-18]。TGF- β 可通过多种方式被激活,如加热、紫外线辐射、酸性 pH、ROS^[19-20];活化的 TGF- β 与特定的跨膜丝氨酸/苏氨酸激酶受体结合,通过磷酸化启动典型或非典型 Smad 途径,包括 MAPK、PI3K/AKT、mTOR^[21-22]。其中,PI3K/AKT 途径的激活导致 GSK-3 β 的磷酸化和失活,从而触发 EMT^[23]。SNAIL1 作为 EMT 的关键调节因子,受上游 GSK-3 β 调节^[24]。现代药理学研究已证实,驻景丸加减方中多味中药的活性成分有抑制 EMT 的作用,如车前子苷能够抑制缺氧诱导的 EMT^[25],五味子乙素可明显抑制细胞的迁移、侵袭和 EMT^[26],枸杞多糖可抑制氧化应激诱导的 ARPE-19 细胞凋亡^[27]。在本研究中, H₂O₂ 处理的 ARPE-19 细胞中 TGF- β 2、p-AKT、p-GSK-3 β 蛋白表达升高,驻景丸加减方含药血清处理的 ARPE-19 细胞中 TGF- β 2、p-AKT 及 p-GSK-3 β 蛋白表达降低,表明驻景丸加减

方可抑制 AKT/GSK-3 β 通路的激活。

研究表明 Nrf2 通路与 AKT/GSK-3 β 通路之间存在相互作用, GSK-3 β 可通过促进 Nrf2 磷酸化、防止核转位而抑制 Nrf2 通路激活^[28], *Nrf2* 基因敲除能启动 TGF- β 1 诱导的 EMT^[29]。本研究结果显示 GSK-3 β 抑制剂能促进 Nrf2 核转位,从而激活 Nrf2 通路;而 GSK-3 β 抑制剂对细胞中 SNAIL1、 α -SMA 和 E-cadherin 表达作用不明显,这可能是 GSK-3 β 抑制剂产生的促进 Nrf2 核转位作用与其抑制 SNAIL1 累积和核转位的作用相互抵消的结果。当驻景丸加减方和 GSK-3 β 抑制剂同时干预后,细胞 SNAIL1、 α -SMA 表达较 GSK-3 β 抑制剂组下降、E-cadherin 表达升高,表明驻景丸加减方对 Nrf2 通路的激活作用明显强于 GSK-3 β 抑制剂,从而发挥对 EMT 的抑制作用。上述研究结果表明,驻景丸加减方通过激活 Nrf2 通路、抑制 AKT/GSK-3 β 通路调控 EMT;Nrf2、GSK-3 是 Nrf2 通路和 EMT 之间交互作用的重要调控因子;GSK-3 β 介导了 Nrf2 与 AKT/GSK-3 β 通路间的交互作用。

综上所述,驻景丸加减方含药血清抑制氧化应激诱导的 ARPE-19 细胞 EMT,可能与抑制 AKT/GSK-3 β 通路和激活 Nrf2 信号通路有关。相较于对单一通路的调控,通过 Nrf2 通路和 AKT/GSK-3 β 通路的交互作用进行双通路协同调控对 AMD 的防治更具积极意义。本研究结果为驻景丸加减方用于 AMD 的治疗提供了实验基础,后续将在动物模型中进一步证实其安全性和有效性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 邵雁:参与研究选题和设计、实施研究、起草文章、统计分析、论文修改;张元钟、杨宁:参与研究选题和设计、实施研究、采集数据;杭丽、陈春明:参与实施研究、采集数据、实验方案管理;李敏:分析/解释数据、统计分析;徐新荣:参与研究选题和设计、分析/解释数据、论文智力性内容修改及最终定稿

参考文献

- [1] Shu DY, Butcher E, Saint-Geniez M. EMT and EndMT: emerging roles in age-related macular degeneration [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(12): 4271 [2022-02-01]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32560057>. DOI: 10.3390/ijms21124271.
- [2] 徐月娟, 李晓华. 肿瘤坏死因子调控下 MeCP2 与增生性玻璃体视网膜病变发病的关联 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2020, 38(6): 548-552. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20191111-00491.
Xu YJ, Li XH. Association between MeCP2 and proliferative vitreoretinopathy under the regulation of tumor necrosis factor [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2020, 38(6): 548-552. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20191111-00491.
- [3] Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(2): 69-84. DOI: 10.1038/s41580-018-0080-4.
- [4] Zhao Z, Chen Y, Wang J, et al. Age-related retinopathy in NRF2-

- deficient mice[J/OL]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e19456 [2022-02-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21559389>. DOI: 10.1371/journal.pone.0019456.
- [5] Ishikawa K, Kannan R, Hinton DR. Molecular mechanisms of subretinal fibrosis in age-related macular degeneration[J]. *Exp Eye Res*, 2016, 142: 19-25. DOI: 10.1016/j.exer.2015.03.009.
- [6] Drummond GR, Sobey CG. Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease? [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2014, 25(9): 452-463. DOI: 10.1016/j.tem.2014.06.012.
- [7] Hyttinen J, Kannan R, Felszeghy S, et al. The regulation of NFE2L2 (NRF2) signalling and epithelial-to-mesenchymal transition in age-related macular degeneration pathology[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(22): 5800 [2022-02-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31752195>. DOI: 10.3390/ijms20225800.
- [8] Zhou W, Mo X, Cui W, et al. Nrf2 inhibits epithelial-mesenchymal transition by suppressing snail expression during pulmonary fibrosis[J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6: 38646 [2022-02-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27982105>. DOI: 10.1038/srep38646.
- [9] Mallano T, Palumbo-Zerr K, Zerr P, et al. Activating transcription factor 3 regulates canonical TGF β signalling in systemic sclerosis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2016, 75(3): 586-592. DOI: 10.1136/annrheumdis-2014-206214.
- [10] 柯玲玲, 周欣, 张元钟, 等. 驻景丸加减方对干性年龄相关性黄斑变性模型小鼠视网膜的保护作用[J]. *眼科新进展*, 2021, 41(9): 12-16. DOI: 10.13389/j.issn.cnki.rao.2021.0000.
Ke LL, Zhou X, Zhang YZ, et al. Protection of modified prescription of Zhujingwan on theretina of mice with dry age-related macular degeneration[J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2021, 41(9): 12-16. DOI: 10.13389/j.issn.cnki.rao.2021.0000.
- [11] Heesterbeek TJ, Lorés-Motta L, Hoyng CB, et al. Risk factors for progression of age-related macular degeneration[J]. *Ophthalmic Physiol Opt*, 2020, 40(2): 140-170. DOI: 10.1111/opo.12675.
- [12] Shaw P, Chattopadhyay A. Nrf2-ARE signaling in cellular protection: mechanism of action and the regulatory mechanisms[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(4): 3119-3130. DOI: 10.1002/jcp.29219.
- [13] Shao Y, Yu H, Yang Y, et al. A solid dispersion of quercetin shows enhanced Nrf2 activation and protective effects against oxidative injury in a mouse model of dry age-related macular degeneration[J/OL]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 1479571 [2022-02-18]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31781321>. DOI: 10.1155/2019/1479571.
- [14] Wu D, Kanda A, Liu Y, et al. Galectin-1 promotes choroidal neovascularization and subretinal fibrosis mediated via epithelial-mesenchymal transition[J]. *FASEB J*, 2019, 33(2): 2498-2513. DOI: 10.1096/fj.201801227R.
- [15] Ghosh S, Shang P, Terasaki H, et al. A role for β A3/A1-crystallin in type 2 EMT of RPE cells occurring in dry age-related macular degeneration[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59(4): AMD104-AMD113. DOI: 10.1167/iovs.18-24132.
- [16] Jobling MF, Mott JD, Finnegan MT, et al. Isoform-specific activation of latent transforming growth factor β (LTGF- β) by reactive oxygen species[J]. *Radiat Res*, 2006, 166(6): 839-848. DOI: 10.1667/RR0695.1.
- [17] Tosi GM, Orlandini M, Galvagni F. The controversial role of TGF- β in neovascular age-related macular degeneration pathogenesis[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(11): 3363 [2022-03-05]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30373226>. DOI: 10.3390/ijms19113363.
- [18] 刘帅, 金海鹰. N-乙酰半胱氨酸对 TGF- β 1 诱导的 ARPE-19 细胞向肌成纤维细胞转分化的影响[J]. *中华实验眼科杂志*, 2017, 35(10): 894-901. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.10.008.
- Liu S, Jin HY. Effect of N-acetylcysteine on the transforming growth factor β 1-induced transdifferentiation of retinal pigment epithelial cell to myofibroblast[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2017, 35(10): 894-901. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.10.008.
- [19] Hirsch L, Nazari H, Sreekumar PG, et al. TGF- β 2 secretion from RPE decreases with polarization and becomes apically oriented[J]. *Cytokine*, 2015, 71(2): 394-396. DOI: 10.1016/j.cyto.2014.11.014.
- [20] Robertson IB, Rifkin DB. Regulation of the bioavailability of TGF- β and TGF- β -related proteins[J/OL]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, 8(6): a021907 [2022-03-05]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27252363>. DOI: 10.1101/cshperspect.a021907.
- [21] Medici D, Potenta S, Kalluri R. Transforming growth factor- β 2 promotes Snail-mediated endothelial-mesenchymal transition through convergence of Smad-dependent and Smad-independent signalling[J]. *Biochem J*, 2011, 437(3): 515-520. DOI: 10.1042/BJ20101500.
- [22] Luo K. Signaling cross talk between TGF- β /Smad and other signaling pathways[J/OL]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2017, 9(1): a022137 [2022-03-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27836834>. DOI: 10.1101/cshperspect.a022137.
- [23] Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition[J/OL]. *Sci Signal*, 2014, 7(344): re8 [2022-03-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25249658>. DOI: 10.1126/scisignal.2005189.
- [24] Turini S, Bergandi L, Gazzano E, et al. Epithelial to mesenchymal transition in human mesothelial cells exposed to asbestos fibers: role of TGF- β as mediator of malignant mesothelioma development or metastasis via EMT event[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(1): 150 [2022-03-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30609805>. DOI: 10.3390/ijms20010150.
- [25] Zuo X, Li L, Sun L. Plantamajoside inhibits hypoxia-induced migration and invasion of human cervical cancer cells through the NF- κ B and PI3K/akt pathways[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2021, 41(4): 339-348. DOI: 10.1080/10799893.2020.1808679.
- [26] Li S, Wang H, Ma R, et al. Schisandrin B inhibits epithelial-mesenchymal transition and stemness of large-cell lung cancer cells and tumorigenesis in xenografts via inhibiting the NF- κ B and p38 MAPK signaling pathways[J/OL]. *Oncol Rep*, 2021, 45(6): 115 [2022-03-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33907830>. DOI: 10.3892/or.2021.8066.
- [27] Liang R, Zhao Q, Zhu Q, et al. Lycium barbarum polysaccharide protects ARPE-19 cells against H₂O₂-induced oxidative stress via the Nrf2/HO-1 pathway[J/OL]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(5): 769 [2022-03-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34490478>. DOI: 10.3892/mmr.2021.12409.
- [28] Salazar M, Rojo AI, Velasco D, et al. Glycogen synthase kinase-3 β inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(21): 14841-14851. DOI: 10.1074/jbc.M513737200.
- [29] Ryoo IG, Ha H, Kwak MK. Inhibitory role of the KEAP1-NRF2 pathway in TGF β 1-stimulated renal epithelial transition to fibroblastic cells: a modulatory effect on SMAD signaling[J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e93265 [2022-03-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24691097>. DOI: 10.1371/journal.pone.0093265.

(收稿日期:2022-03-26 修回日期:2022-09-26)

(本文编辑:张宇 骆世平)

