· 实验研究 ·

雷珠单抗对脉络膜新生血管模型大鼠视网膜氧化应激的抑制作用及其机制

杨延振　庄宪丽　李树杰　张莹　杨家干　李路路
滕州市中心人民医院眼科，滕州 277500
通信作者：李路路，Email：liangzhuomengy@163.com

【摘要】 **目的**　研究雷珠单抗对脉络膜新生血管（CNV）模型大鼠视网膜氧化应激的作用及其机制。**方法**　选取 10 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只，按照随机数字表法随机分为正常对照组、模型对照组、雷珠单抗组、转录因子核因子 E2 相关因子 2（Nrf2）抑制剂（ML385）组、雷珠单抗+ML385 组，每组 12 只。除正常对照组外，其余各组以氪激光诱导 CNV 模型。雷珠单抗组、ML385 组和雷珠单抗+ML385 组分别玻璃体腔内注射 1 μl 雷珠单抗、ML385、雷珠单抗+ML385，模型对照组、正常对照组分别给予玻璃体腔内注射等体积生理盐水。脉络膜铺片法检测 CNV 面积；苏木精-伊红染色观察视网膜病理学变化；实时荧光定量 PCR 及 Western blot 检测视网膜组织中 Nrf2、超氧化物歧化酶（SOD）、醌氧化还原酶（NQO1）mRNA 及蛋白表达水平。**结果**　模型对照组、ML385 组和雷珠单抗+ML385 组 CNV 面积分别为（23.01±1.52）×10^3、（30.23±2.01）×10^3 和（18.56±1.85）×10^3 μm^2，明显高于雷珠单抗组的（12.35±1.22）×10^3 μm^2，雷珠单抗+ML385 组 CNV 面积小于模型对照组和 ML385 组，ML385 组 CNV 面积大于模型对照组，差异均有统计学意义（均 $P<0.001$）。苏木精-伊红染色结果显示，雷珠单抗组 RPE-脉络膜-巩膜复合体结构损害程度较模型对照组轻；雷珠单抗+ML385 组 RPE-脉络膜-巩膜复合体结构损害程度较雷珠单抗组重，但较模型对照组轻；ML385 组 RPE-脉络膜-巩膜复合体结构损害较模型对照组严重。雷珠单抗组 Nrf2、SOD 和 NQO1 mRNA 及蛋白相对表达量均低于正常对照组，但高于模型对照组、ML385 组和雷珠单抗+ML385 组，且雷珠单抗+ML385 组 Nrf2、SOD 和 NQO1 mRNA 及蛋白相对表达量高于模型对照组和 ML385 组，差异均有统计学意义（均 $P<0.05$）。**结论**　雷珠单抗可抑制氪激光诱导的 CNV 生长，减轻 RPE 氧化应激损伤，其机制与 Nrf2/ARE 通路的激活有关。

【关键词】 雷珠单抗；黄斑变性；视网膜；氧化应激
基金项目： 山东省医药卫生科技发展计划项目（2018WSA05655）
DOI：10.3760/cma.j.cn115989-20210930-00543

Inhibitory effect of ranibizumab on retinal oxidative stress in a rat model of choroidal neovascularization and its mechanism

Yang Yanzhen, Zhuang Xianli, Li Shujie, Zhang Ying, Yang Jiagan, Li Lulu
Department of Ophthalmology, Tengzhou Central People's Hospital, Tengzhou 277500, China
Corresponding author: Li Lulu, Email: liangzhuomengy@163.com

[**Abstract**] **Objective**　To study the effect of ranibizumab on retinal oxidative stress in a rat model of choroidal neovascularization (CNV) and its mechanism. **Methods**　Sixty SPF male SD rats aged 10 weeks were randomly divided into normal control group, model control group, ranibizumab group, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) inhibitor (ML385) group, ranibizumab+ML385 group, with 12 rats in each group according to a random number table. Except for the normal control group, the CNV model was established in the other four groups via krypton laser induction. According to grouping, the ranibizumab group, ML385 group and ranibizumab+ML385 group were intravitreally injected with 1 μl of ranibizumab, ML385 and ranibizumab+ML385, respectively. Model control group and normal control group received an intravitreal injection of normal saline of equal volume. The CNV area was measured through choroidal wholemounts. Pathological change of the retina was observed by hematoxylin and eosin staining. Expressions of Nrf2, superoxide dismutase (SOD) and quinone oxidoreductase 1 (NQO1) were detected using Western blot and real-time PCR. The use and care of animals complied with laboratory animal welfare guidelines. The study protocol was approved by the Laboratory Animal Welfare and Ethics Committee of Tengzhou

中華醫學會雜誌社 Chinese Medical Association Publishing House 版权所有 违者必究

Central People's Hospital (No. JN. No20210214S1200430[121]). **Results** CNV areas of the model control group, ML385 group and ranibizumab + ML385 group were $(23.01 \pm 1.52) \times 10^3$, $(30.23 \pm 2.01) \times 10^3$ and $(18.56 \pm 1.85) \times 10^3$ μm^2, respectively, which were significantly higher than $(12.35 \pm 1.22) \times 10^3$ μm^2 of ranibizumab group (all at $P<0.001$). The CNV area of ranibizumab+ML385 group was smaller than that of model control group and ML385 group, and the CNV area of ML385 group was larger than that of model control group, showing statistically significant differences (all at $P<0.001$). Hematoxylin and eosin staining showed that the structural damage of the retinal pigment epithelium-choroid-sclera complex was slighter in ranibizumab group than model control group, severer in ranibizumab+ML385 group than ranibizumab group but slighter than model control group, severer in ML385 group than model control group. The mRNA and protein expressions of Nrf2, SOD and NQO1 of ranibizumab group were lower than those of normal control group but higher than those of model control group, ML385 group and ranibizumab+ML385 group, and the differences were statistically significant (all at $P<0.05$). The mRNA and protein expressions of Nrf2, SOD and NQO1 were higher in ranibizumab+ML385 group than model control group and ML385 group, showing statistically significant differences (all at $P<0.05$). **Conclusions** Ranibizumab can inhibit the growth of CNV induced by krypton laser and reduce RPE damage caused by retinal oxidative stress. The mechanism is related to the activation of Nrf2/ARE pathway.

[**Key words**] Ranibizumab; Macular degeneration; Retina; Oxidative stress

Fund program: Medical and Health Science and Technology Development Program of Shandong Province (2018WSA05655)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210930-00543

年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)是一种多发于老年人群的进行性视力损害性疾病,根据其病理表现不同可分为湿性 AMD 和干性 AMD,其中湿性 AMD 预后较差,是眼科防治的研究重点[1-2]。近年来研究发现,湿性 AMD 的病变可能与脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)及视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)氧化应激反应有关[3-4]。雷珠单抗为抗血管内皮生长因子药物,可有效抑制血管生成,已被美国食品药物管理局批准用于湿性 AMD 的治疗[5]。近年来,De Cillà 等[6]研究发现,阿柏西普/雷珠单抗以剂量和时间依赖性方式增加 RPE 细胞一氧化氮的释放,并可通过刺激人脐血管内皮细胞释放旁分泌物,在生理和过氧化调节下使 RPE 细胞免受过氧化损伤,因此推测雷珠单抗对湿性 AMD 的治疗作用可能也与抗氧化应激有关。转录因子 NF-E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)/抗氧化反应元件(antioxidant responsive element, ARE)通路在细胞抗氧化应激中发挥重要的作用,且被证实参与湿性 AMD 的发生[7-8]。目前雷珠单抗的抗氧化应激机制尚待明确,关于雷珠单抗是否可通过 Nrf2/ARE 通路影响湿性 AMD 的病理变化仍需进一步探索。本研究拟通过氪激光诱导 CNV 模型,以雷珠单抗及 Nrf2 抑制剂 ML385 进行干预,探讨雷珠单抗对湿性 AMD 大鼠视网膜氧化应激的作用及其机制。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物　10 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只,体质量 200~240 g,购自河南省实验动物中心,许可证号 SCXK(豫)2017-0001。大鼠于室温(22±1)℃,相对湿度 50%~70%,光线充足(12 h 白昼/12 h 黑夜)的环境中饲养,自由饮水进食。实验动物的饲养与使用均遵循实验动物福利管理原则,本研究方案经滕州市中心人民医院实验动物管理和使用委员会审批(批文号:JN. No20210214S1200430[121])。

1.1.2　主要试剂及仪器　雷珠单抗注射液(瑞士 Novartis Pharma Stein AG 公司,注册证号:S20170003, 10 mg/ml);质量分数 0.5% 托吡卡胺滴眼液(无锡济民可信山禾药业股份有限公司,国药准字 H32021199, 6 ml:15 mg);盐酸奥布卡因滴眼液(日本参天制药株式会社,国药准字 J20100128, 20 ml:80 mg);羧甲基纤维素钠滴眼液(爱尔兰 Allergan Pharmaceuticals 公司,注册证号 H20140945, 0.4 ml:2 mg);Nrf2 抑制剂 ML385(M00240,北京百奥莱博科技有限公司,纯度 99.55%);FITC-D(I0201,厦门生光生物科技有限公司);实时荧光定量 PCR 试剂盒(EY00P590,上海一研生物科技有限公司);兔抗大鼠 Nrf2 多克隆抗体(ab137550)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)多克隆抗体(ab141496)、醌氧化还原酶(quinone oxidoreductase 1, NQO1)多克隆抗体(ab80588)、辣根

中華醫學會雜誌社 Chinese Medical Association Publishing House 版权所有 违者必究

过氧化物酶标记的 IgG 二抗(ab172780)(美国 Abcam 公司);TUNEL 染液(西安东澳生物科技有限公司)。3550UV 酶标仪、7500 实时荧光定量 PCR 仪、电泳仪、CheniDoc XRS 化学发光成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司);M500 荧光显微镜(赛默飞世尔科技中国有限公司);Novua 2000 氪激光机(美国 Coherent 公司)。

1.2　方法

1.2.1　大鼠 CNV 模型的建立及分组处理　取 60 只大鼠适应性饲养 1 周,称重编号后以随机数字表法分为正常对照组、模型对照组、雷珠单抗组、ML385 组和雷珠单抗+ML385 组,每组 12 只,除正常对照组外均参照文献[9]以氪激光建立 CNV 模型。建模方法如下:质量分数 2%戊巴比妥钠腹腔内注射麻醉,固定大鼠头部,以右侧眼为实验眼,0.5%托吡卡胺滴眼液点眼扩瞳,结膜囊内滴用盐酸奥布卡因滴眼液、质量分数 1%羧甲基纤维素钠滴眼液,眼前放置 53 D 接触镜,以波长 659 nm 的氪激光在距视盘 2 个瞳距处的视网膜大血管间光凝 20 个点,注意避开血管,光斑直径 50 μm,曝光时间 0.05 s,光斑能量输出功率 360 mW,以光凝后有小气泡产生为有效光凝点,剔除光凝后有视网膜、脉络膜或玻璃体出血者,重新造模补齐。建模后 24 h,雷珠单抗组、ML385 组和雷珠单抗+ML385 组分别给予玻璃体腔内注射 1 μl 雷珠单抗、0.1 mg/μl ML385、雷珠单抗+ML385;正常对照组和模型对照组分别注射生理盐水 1 μl。玻璃体内注射方法:2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,常规冲洗结膜囊、扩瞳,奥布卡因滴眼液点眼行眼球表面麻醉,取 1 ml 微量注射器于右眼颞下角膜缘 0.5 mm 处做穿刺口,向玻璃体中缓慢注入药物。

1.2.2　脉络膜铺片法检测大鼠 CNV 面积　分组处理后 2 周,各组任选 6 只大鼠以 2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后仰卧位固定,剖开胸腔,暴露心脏,用 20 ml FITC-D 乳酸林格液(内含 FITC-D 100 mg,明胶 2 g)缓慢灌流心脏,以大鼠四肢及尾部有肌肉颤动为灌流成功。灌注结束后处死大鼠,迅速摘取实验眼眼球,以质量分数 4%多聚甲醛溶液避光固定 1 h 后,手术显微镜下沿角膜缘剪开眼球,去除角膜、晶状体、玻璃体等,小心揭除视网膜神经上皮层,获得 RPE-脉络膜-巩膜复合标本,RPE 面朝下置于载玻片上,明胶封片,于荧光显微镜下观察并拍照,ImageJ 图像软件分析 CNV 面积。

1.2.3　苏木精-伊红染色观察大鼠眼球组织病理变化　取各组剩余 6 只大鼠过量麻醉处死,剖取实验眼眼球,分成 2 份,1 份以 4%多聚甲醛预固定 24 h,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,于角膜至视盘间做矢状位切片,切片厚度 4 μm,常规苏木精-伊红染色,光学显微镜下观察 RPE 及脉络膜病理变化。另 1 份作为后续实验组织来源。

1.2.4　实时荧光定量 PCR 检测大鼠 RPE-脉络膜-巩膜复合体 Nrf2、SOD、NQO1 mRNA 相对表达量　取各组 6 只眼球于冰上分离 RPE-脉络膜-巩膜复合体,取部分组织以 Trizol 法提取总 RNA,测定 RNA 纯度及含量,逆转录获得 cDNA,进行实时荧光定量 PCR 实验,根据 PCR 试剂盒说明书设定反应体系,反应条件:95 ℃预变性 2 min;94 ℃变性 15 s,60 ℃退火 35 s,72 ℃延伸 50 s,重复 40 个循环。以 β-actin 为管家基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算各目的基因的相对表达量,每个样本重复测量 3 次,取平均值。各基因引物序列见表 1。

表 1　基因引物序列
Table 1　Primer sequences of genes

基因	引物序列	产物长度(bp)
Nrf2	正向:5′-TTGACGTACCGGTACCATTGT-3′	21
	反向:5′-ACTAAGTTGTAGCTCCAGATA-3′	21
SOD	正向:5′-CGTATGCATGCTCTGAGACTTG-3′	22
	反向:5′-GTGCCTGTAGTGCTGAGCTATC-3′	22
NQO1	正向:5′-ACTGTGCTGACATTACTGC-3′	19
	反向:5′-ATGCGAAGTGTAGCTGTTC-3′	19
β-actin	正向:5′-ATGCTGTGCTGTAAGCACTGTG-3′	22
	反向:5′-GGATGCTCACTTCATGTGCTAC-3′	22

注:Nrf2:转录因子 NF-E2 相关因子 2;SOD:超氧化物歧化酶;NQO1:醌氧化还原酶;β-actin:β-肌动蛋白

Note: Nrf2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2; SOD: superoxide dismutase; NQO1: quinone oxidoreductase 1

1.2.5　Western blot 法检测大鼠 RPE-脉络膜-巩膜复合体 Nrf2、SOD、NQO1 蛋白相对表达量　取 1.2.4 部分收集的 RPE-脉络膜-巩膜复合体于液氮中研磨,经细胞裂解液裂解后 BCA 法测定蛋白总量,十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,恒压转印 40 min,5%脱脂奶粉室温摇床封闭 2 h,加入 Nrf2、SOD、NQO1 一抗溶液(稀释度 1∶2 000),4 ℃摇床孵育过夜,TBST 漂洗,加入相应二抗溶液(稀释度 1∶500),室温反应 1 h,暗室中曝光、显影、定影。凝胶成像系统扫描并进行灰度值分析,以目的蛋白灰度值与 β-actin 灰度值比值表示各蛋白相对表达量。

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 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示。各组大鼠检测指标总体差异比较采用单因素方差

中华医学会杂志社 Chinese Medical Association Publishing House 版权所有 违者必究

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　各组大鼠 CNV 面积比较

荧光显微镜下可见脉络膜铺片中血管填充为绿色，正常对照组微循环毛细血管清晰，形态完整，无 CNV；模型对照组有明显的光凝痕迹，中央可见绿色新生 CNV 团块；雷珠单抗组 CNV 团块较小，周围可见微循环毛细血管；ML385 组 CNV 团块较模型对照组大，边界模糊，无法分辨血管结构；雷珠单抗+ML385 组 CNV 团块较模型对照组小，但周围血管结构模糊（图 1）。

模型对照组、雷珠单抗组、ML385 组、雷珠单抗+ML385 组 CNV 面积总体比较，差异具有统计学意义（$F=120.769$，$P<0.001$）；与模型对照组比较，雷珠单抗组和雷珠单抗+ML385 组的 CNV 面积缩小，ML385 组面积增加，差异均有统计学意义（均 $P<0.001$）；与雷珠单抗组比较，ML385 组和雷珠单抗+ML385 组 CNV 面积增加，差异均有统计学意义（均 $P<0.001$）；与 ML385 组比较，雷珠单抗+ML385 组 CNV 面积缩小，差异有统计学意义（$P<0.001$）（表 2）。

表 2　各组 CNV 面积比较（$\bar{x}\pm s$，$\times10^3$ μm^2）
Table 2　Comparison of CNV area among four groups（$\bar{x}\pm s$，$\times10^3$ μm^2）

组别	样本量	CNV 面积
模型对照组	6	23.01±1.52
雷珠单抗组	6	12.35±1.22[a]
ML385 组	6	30.23±2.01[ab]
雷珠单抗+ML385 组	6	18.56±1.85[abc]
F 值		120.769
P 值		<0.001

注：与模型对照组比较，[a]$P<0.001$；与雷珠单抗组比较，[b]$P<0.001$；与 ML385 组比较，[c]$P<0.001$（单因素方差分析，LSD-*t* 检验）　CNV：脉络膜新生血管

Note: Compared with model control group, [a]$P<0.001$; compared with ranibizumab group, [b]$P<0.001$; compared with ML385 group, [c]$P<0.001$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test)　CNV: choroidal neovascularization

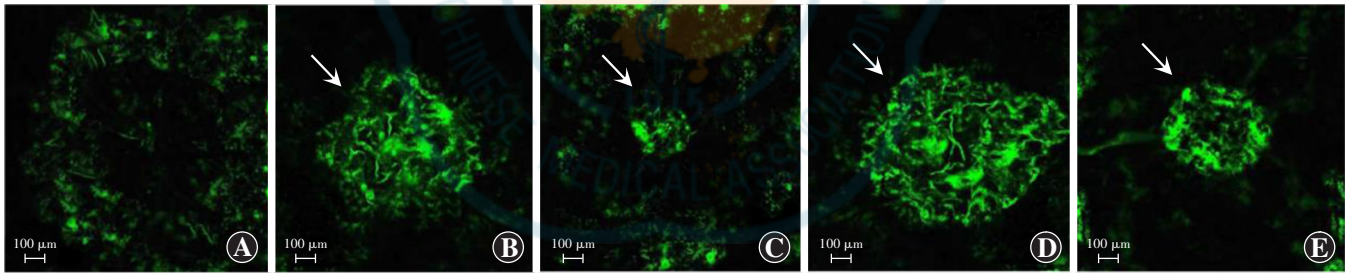

图 1　脉络膜血管铺片荧光显微镜观察图像（FITC-D ×400，标尺=100 μm）　A：正常对照组毛细血管清晰，形态完整　B：模型对照组可见新生 CNV 团块（箭头）　C：雷珠单抗组 CNV 团块（箭头）较模型对照组小　D：ML385 组 CNV 团块（箭头）较模型对照组更大　E：雷珠单抗+ML385 组 CNV 团块（箭头）较模型对照组小，周围血管结构模糊

Figure 1　Microscopic observation of choroidal wholemounts（FITC-D ×400, bar=100 μm）　A: In normal control group, the capillaries were clear and intact　B: In model control group, the new CNV mass (arrow) was observed　C: In ranibizumab group, the CNV mass (arrow) was smaller compared with model control group　D: In ML385 group, the CNV mass (arrow) was larger compared with model control group　E: In ranibizumab+ML385 group, the CNV mass (arrow) was smaller compared with model control group, and the peripheral vascular structure was blurry

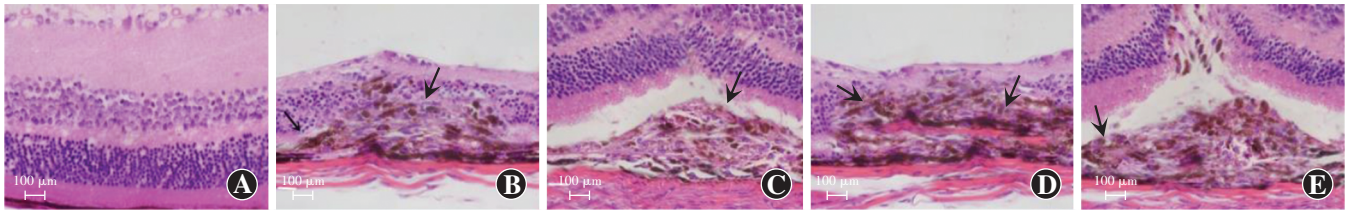

图 2　各组大鼠眼球组织病理学变化（HE ×400，标尺=100 μm）　A：正常对照组 RPE-脉络膜-巩膜复合体结构清晰、完整　B：模型对照组 RPE-脉络膜-巩膜复合体分层不明显，异常增生细胞突破脉络膜血管网基底膜　C：雷珠单抗组复合体结构损伤较模型对照组轻　D：ML385 组复合体损伤程度较模型对照组更重　E：雷珠单抗+ML385 组损伤程度较模型对照组轻

Figure 2　Pathological changes of rat retina（HE ×400, bar=100 μm）　A: In normal control group, the structure of the RPE-choroid-sclera complex was clear and complete　B: In model control group, the layers of the complex were not obvious, and the abnormal proliferative cells broke through the basement membrane of choroidal vascular network　C: In ranibizumab group, the structural damage of the complex was slighter compared with model control group　D: In ML385 group, the structural damage of the complex was severer compared with model control group　E: In ranibizumab+ML385 group, the structural damage of the complex was slighter compared with model control group

中華醫學會雜誌社 Chinese Medical Association Publishing House 版权所有 违者必究

2.2　各组大鼠眼球组织病理染色

正常对照组 RPE-脉络膜-巩膜复合体结构清晰、完整；模型对照组复合体分层不明显，Bruch 膜结构破坏，内外核层组织结构紊乱，异常增生细胞突破脉络膜血管网基底膜；雷珠单抗组复合体结构损伤较模型对照组轻；雷珠单抗+ML385 组复合体损伤程度较雷珠单抗组重但较模型对照组轻；ML385 组复合体损伤程度较模型对照组更严重（图 2）。

2.3　各组大鼠 RPE-脉络膜-巩膜复合体 Nrf2、SOD 和 NQO1 mRNA 相对表达量比较

各组 Nrf2、SOD、NQO1 mRNA 相对表达量总体比较，差异均有统计学意义（F=71.912、66.065、61.223，均 P<0.001）。其中，与正常对照组比较，模型对照组、雷珠单抗组、ML385 组、雷珠单抗+ML385 组 Nrf2、SOD 和 NQO1 mRNA 相对表达量均降低，差异均有统计学意义（均 P<0.05）；与模型对照组比较，雷珠单抗组和雷珠单抗+ML385 组 Nrf2、SOD 和 NQO1 mRNA 相对表达量增加，ML385 组相对表达量降低，差异均有统计学意义（均 P<0.05）；与雷珠单抗组比较，ML385 组、雷珠单抗+ML385 组 Nrf2、SOD 和 NQO1 mRNA 相对表达量降低，差异均有统计学意义（均 P<0.05）；与 ML385 组比较，雷珠单抗+ML385 组 Nrf2、SOD 和 NQO1 mRNA 相对表达量增加，差异均有统计学意义（均 P<0.05）（表 3）。

表 3　各组 Nrf2、SOD 和 NQO1 mRNA 相对表达量比较（$\bar{x}\pm s$）
Table 3　Comparison of relative expressions of Nrf2, SOD and NQO1 mRNA among five groups（$\bar{x}\pm s$）

组别	样本量	Nrf2	SOD	NQO1
正常对照组	6	1.35±0.14	1.48±0.15	1.60±0.18
模型对照组	6	0.62±0.07[a]	0.68±0.08[a]	0.70±0.12[a]
雷珠单抗组	6	0.95±0.10[ab]	1.02±0.12[ab]	1.21±0.15[ab]
ML385 组	6	0.53±0.06[abc]	0.55±0.08[abc]	0.48±0.10[abc]
雷珠单抗+ML385 组	6	0.74±0.08[abcd]	0.83±0.10[abcd]	1.02±0.12[abcd]
F 值		71.912	66.065	61.223
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

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；与雷珠单抗组比较，[c]P<0.05；与 ML385 组比较，[d]P<0.05（单因素方差分析，LSD-t 检验）　Nrf2：转录因子 NF-E2 相关因子 2；SOD：超氧化物歧化酶；NQO1：醌氧化还原酶

Note: Compared with normal control group, [a]P<0.05; compared with model control group, [b]P<0.05; compared with ranibizumab group, [c]P<0.05; compared with ML385 group, [d]P<0.05 (One-way ANOVA, LSD-t test)　Nrf2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2; SOD: superoxide dismutase; NQO1: quinone oxidoreductase 1

2.4　各组大鼠 RPE-脉络膜-巩膜复合体 Nrf2、SOD 和 NQO1 蛋白相对表达量比较

各组 Nrf2、SOD 和 NQO1 蛋白相对表达量总体比较，差异均有统计学意义（F=96.559、90.271、68.244，均 P<0.001）。其中，与正常对照组比较，模型对照组、雷珠单抗组、ML385 组和雷珠单抗+ML385 组 Nrf2、SOD 和 NQO1 蛋白相对表达量均降低，差异均有统计学意义（均 P<0.05）；与模型对照组比较，雷珠单抗组与雷珠单抗+ML385 组 Nrf2、SOD 和 NQO1 蛋白相对表达量增加，ML385 组各蛋白相对表达量降低，差异均有统计学意义（均 P<0.05）；与雷珠单抗组比较，ML385 组和雷珠单抗+ML385 组 Nrf2、SOD 和 NQO1 蛋白相对表达量降低，差异均有统计学意义（均 P<0.05）；与 ML385 组比较，雷珠单抗+ML385 组 Nrf2、SOD 和 NQO1 蛋白相对表达量增加，差异均有统计学意义（均 P<0.05）（图 3，表 4）。

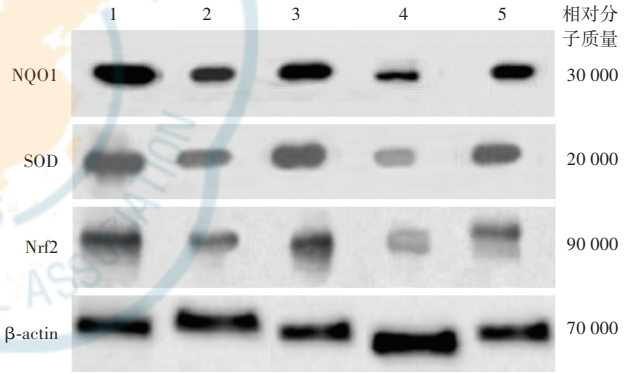

图 3　各组大鼠 RPE-脉络膜-巩膜复合体 Nrf2、SOD 和 NQO1 蛋白 Western blot 电泳图　正常对照组各蛋白电泳条带灰度明显强于其他组，雷珠单抗组各蛋白电泳条带灰度明显强于模型对照组和 ML385 组　1：正常对照组；2：模型对照组；3：雷珠单抗组；4：ML385 组；5：雷珠单抗+ML385 组　Nrf2：转录因子 NF-E2 相关因子 2；SOD：超氧化物歧化酶；NQO1：醌氧化还原酶

Figure 3　Electrophoregram of Nrf2, SOD and NQO1 proteins in rat RPE-choroid-sclera complex by Western blot　The grayscale of protein bands was significantly higher in normal control group than the other four groups, and the grayscale of protein bands in ranibizumab group was significantly higher than that in model control group and ML385 group　1: normal control group; 2: model control group; 3: ranibizumab group; 4: ML385 group; 5: ranibizumab + ML385 group　Nrf2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2; SOD: superoxide dismutase; NQO1: quinone oxidoreductase 1

3　讨论

AMD 是一种多发于老年人群的致盲眼病，可导致中央视力丧失，严重影响患者生活质量[10]。湿性 AMD 以伴有视网膜血管异常生长为病理特点，占 AMD 人群的10%～15%，但有超过90%的患者视力丧

中華醫學會雜誌社 Chinese Medical Association Publishing House 版权所有 违者必究

表 4　各组 Nrf2、SOD 和 NQO1 蛋白相对表达量比较($\bar{x}\pm s$)
Table 4　Comparison of relative expressions of Nrf2, SOD and NQO1 proteins among five groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	Nrf2	SOD	NQO1
正常对照组	6	0.82±0.08	0.75±0.08	0.91±0.10
模型对照组	6	0.33±0.05[a]	0.32±0.05[a]	0.45±0.06[a]
雷珠单抗组	6	0.69±0.06[ab]	0.63±0.05[ab]	0.77±0.08[ab]
ML385 组	6	0.25±0.04[abc]	0.20±0.04[abc]	0.32±0.05[abc]
雷珠单抗+ML385 组	6	0.52±0.06[abcd]	0.50±0.06[abcd]	0.56±0.05[abcd]
F 值		96.559	90.271	68.244
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注：与正常对照组比较，[a]$P<0.05$；与模型对照组比较，[b]$P<0.05$；与雷珠单抗组比较，[c]$P<0.05$；与 ML385 组比较，[d]$P<0.05$（单因素方差分析，LSD-t 检验）　Nrf2：转录因子 NF-E2 相关因子 2；SOD：超氧化物歧化酶；NQO1：醌氧化还原酶

Note: Compared with normal control group, [a]$P<0.05$; compared with model control group, [b]$P<0.05$; compared with ranibizumab group, [c]$P<0.05$; compared with ML385 group, [d]$P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD-t test)　Nrf2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2; SOD: superoxide dismutase; NQO1: quinone oxidoreductase 1

失[11-12]。CNV 是湿性 AMD 的主要病理特点，也是导致视力丧失的主要原因，因此抑制 CNV 的生成对延缓 AMD 的发展有重要作用。利用激光直接机械损伤能较快地诱发大鼠 CNV，且有定量、重复性好和易于观察的优势，在湿性 AMD 的研究中应用较广[13]。本研究结果显示，雷珠单抗组的 CNV 面积小于模型对照组；苏木精-伊红染色结果显示，雷珠单抗组 RPE-脉络膜-巩膜复合体结构损害较模型对照组轻，证实了雷珠单抗对 CNV 病理变化的抑制作用。

视网膜黄斑部含有的光感受器细胞和色素具有高耗氧量、对光辐射敏感等特点，极易因氧化应激损伤而导致 AMD 的发生[14-15]，因此抑制氧化应激在 AMD 的治疗中亦有重要作用。Nrf2/ARE 是机体抗氧化应激反应的核心通路，正常情况下 Nrf2 与细胞质中的 Kelch 样环氧氯丙烷相关的蛋白 1 结合维持氧化应激系统平衡[16-17]。当机体受氧化应激刺激时，Nrf2 与 Kelch 样环氧氯丙烷相关的蛋白 1 解离转移入核，并与 ARE 启动子结合，启动下游 SOD、NQO1 等抗氧化基因的表达，发挥抗氧化应激作用[18]。Zhao 等[19]及 Hartman 等[20]研究认为，湿性 AMD 的发生与 RPE 氧化应激损伤有关，Nrf2/ARE 在其中起重要作用。本研究结果显示，雷珠单抗组 Nrf2、SOD、NQO1 mRNA 与蛋白相对表达量低于正常对照组，但高于模型对照组、ML385 组、雷珠单抗+ML385 组，且雷珠单抗+ML385 组各 mRNA 与蛋白相对表达量均高于模型对照组和 ML385 组，说明雷珠单能提高 Nrf2、SOD、NQO1 mRNA 及与蛋白的表达，减轻氧化应激反应；此外雷珠单抗+ML385 组 CNV 面积和 RPE-脉络膜-巩膜复合体结构损害程度小于模型对照组和 ML385 组，而 ML385 组 CNV 面积和 RPE-脉络膜-巩膜复合体结构损害大于模型对照组，说明雷珠单抗能通过激活 Nrf2/ARE 通路，抑制氧化应激损伤，保护视网膜细胞，抑制湿性 AMD 病变。Hwang 等[21]对视网膜静脉阻塞合并黄斑水肿患者行玻璃体内注射雷珠单抗，结果显示治疗后患者的抗氧化蛋白基因表达及氧化应激和促炎细胞因子减少，证实雷珠单抗能减轻全身氧化应激反应，与本研究结果一致。

综上所述，本研究结果表明雷珠单抗能抑制氪激光诱导 CNV 生长，减轻视网膜氧化应激损伤，其机制与 Nrf2/ARE 通路的激活有关。氧化应激是湿性 AMD 发展的重要环节，本研究证实了雷珠单抗能通过抗氧化应激作用改善湿性 AMD 的病理改变，对于湿性 AMD 的病理研究及临床治疗有一定的参考意义。本研究不足之处在于，雷珠单抗可能通过多种机制发挥对湿性 AMD 的治疗作用，Nrf2/ARE 通路仅是其中的一个环节，在后续研究中需对其他发病机制进行进一步的研究。

利益冲突　所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明　杨延振：酝酿和设计实验、实施研究、采集数据及分析数据；庄宪丽：实施研究、采集和分析数据；李树杰、张莹：起草并审阅文章；杨家干、李路路：统计分析、审阅文章并最终定稿

参考文献

[1] Thomas CJ, Mirza RG, Gill MK. Age-related macular degeneration[J]. Med Clin North Am, 2021, 105(3): 473-491. DOI: 10.1016/j.mcna.2021.01.003.

[2] Cabral de Guimaraes TA, Daich Varela M, Georgiou M, et al. Treatments for dry age-related macular degeneration: therapeutic avenues, clinical trials and future directions[J]. Br J Ophthalmol, 2022, 106(3): 297-304. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2020-318452.

[3] Jabbarpoor Bonyadi MH, Yaseri M, Nikkhah H, et al. Comparison of ARMS2/LOC387715 A69S and CFH Y402H risk effect in wet-type age-related macular degeneration: a meta-analysis[J]. Int Ophthalmol, 2019, 39(4): 949-956. DOI: 10.1007/s10792-018-0853-y.

[4] Lazzarini R, Nicolai M, Lucarini G, et al. Oxidative stress in retinal pigment epithelium impairs stem cells: a vicious cycle in age-related macular degeneration[J]. Mol Cell Biochem, 2022, 477(1): 67-77. DOI: 10.1007/s11010-021-04258-3.

[5] Ng D, Fung N, Yip F, et al. Ranibizumab for myopic choroidal neovascularization[J]. Expert Opin Biol Ther, 2020, 20(12): 1385-1393. DOI: 10.1080/14712598.2021.1830969.

[6] De Cillà S, Farruggio S, Cocomazzi G, et al. Aflibercept and ranibizumab modulate retinal pigment epithelial cells function by acting on their cross talk with vascular endothelial cells[J]. Cell Physiol Biochem, 2020, 54(2): 161-179. DOI: 10.33594/000000212.

[7] You L, Peng H, Liu J, et al. Catalpol Protects ARPE-19 cells against oxidative stress via activation of the Keap1/Nrf2/ARE pathway

中華醫學會雜誌社 Chinese Medical Association Publishing House 版权所有 违者必究

[J/OL]. Cells, 2021, 10(10): 2635[2022-04-16]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34685615. DOI: 10.3390/cells10102635.

[8] Cai ZY, Fu MD, Liu K, et al. Therapeutic effect of Keap1-Nrf2-ARE pathway-related drugs on age-related eye diseases through anti-oxidative stress[J]. Int J Ophthalmol, 2021, 14(8): 1260-1273. DOI: 10.18240/ijo.2021.08.19.

[9] 李瑾,郝玉华,赵欣. 实验性脉络膜新生血管动物模型的研究[J]. 河北医科大学学报, 2010, 31(4): 419-422. DOI: 10.3969/j.issn.1007-3205.2010.04.019.
Li J, Hao YH, Zhao X. Study of experimental CNV model[J]. J Hebei Med Univ, 2010, 31(4): 419-422. DOI: 10.3969/j.issn.1007-3205.2010.04.019.

[10] Supuran CT. Agents for the prevention and treatment of age-related macular degeneration and macular edema: a literature and patent review[J]. Expert Opin Ther Pat, 2019, 29(10): 761-767. DOI: 10.1080/13543776.2019.1671353.

[11] Joo JH, Kim H, Shin JH, et al. Aqueous humor cytokine levels through microarray analysis and a sub-analysis based on optical coherence tomography in wet age-related macular degeneration patients[J/OL]. BMC Ophthalmol, 2021, 21(1): 399[2022-04-20]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34794403. DOI: 10.1186/s12886-021-02152-6.

[12] Dugel PU, Koh A, Ogura Y, et al. HAWK and HARRIER: phase 3, multicenter, randomized, double-masked trials of brolucizumab for neovascular age-related macular degeneration[J]. Ophthalmology, 2020, 127(1): 72-84. DOI: 10.1016/j.ophtha.2019.04.017.

[13] 聂闯,罗灵,张卯年. 年龄相关性黄斑变性的动物模型[J]. 解放军医学院学报, 2015, (3): 294-298. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5227.2015.03.026.
Nie C, Luo L, Zhang MN. Animal models in research on age-related macular degeneration[J]. Acad J Chin Pla Med School, 2015, (3): 294-298. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5227.2015.03.026.

[14] Deng Y, Qiao L, Du M, et al. Age-related macular degeneration: epidemiology, genetics, pathophysiology, diagnosis, and targeted therapy[J]. Genes Dis, 2022, 9(1): 62-79. DOI: 10.1016/j.gendis.2021.02.009.

[15] Zou M, Ke Q, Nie Q, et al. Inhibition of cGAS-STING by JQ1 alleviates oxidative stress-induced retina inflammation and degeneration[J]. Cell Death Differ, 2022, 29(9): 1816-1833. DOI: 10.1038/s41418-022-00967-4.

[16] Tu W, Wang H, Li S, et al. The Anti-inflammatory and anti-oxidant mechanisms of the Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway in chronic diseases[J]. Aging Dis, 2019, 10(3): 637-651. DOI: 10.14336/AD.2018.0513.

[17] Zgorzynska E, Dziedzic B, Walczewska A. An overview of the Nrf2/ARE pathway and its role in neurodegenerative diseases[J/OL]. Int J Mol Sci, 2021, 22(17): 9592[2022-05-18]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34502501. DOI: 10.3390/ijms22179592.

[18] Chu SF, Zhang Z, Zhou X, et al. Ginsenoside Rg1 protects against ischemic/reperfusion-induced neuronal injury through miR-144/Nrf2/ARE pathway[J]. Acta Pharmacol Sin, 2019, 40(1): 13-25. DOI: 10.1038/s41401-018-0154-z.

[19] Zhao X, Gao M, Liang J, et al. SLC7A11 reduces laser-induced choroidal neovascularization by inhibiting RPE ferroptosis and VEGF production[J/OL]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 639851[2022-05-22]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33681224. DOI: 10.3389/fcell.2021.639851.

[20] Hartman GD, Lambert-Cheatham NA, Kelley MR, et al. Inhibition of APE1/Ref-1 for neovascular eye diseases: from biology to therapy[J/OL]. Int J Mol Sci, 2021, 22(19): 10729[2022-05-22]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34638620. DOI: 10.3390/ijms221910279.

[21] Hwang DK, Chang YL, Lin TC, et al. Changes in the systemic expression of sirtuin-1 and oxidative stress after intravitreal anti-vascular endothelial growth factor in patients with retinal vein occlusion[J/OL]. Biomolecules, 2020, 10(10): 1414[2022-05-26]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33036304. DOI: 10.3390/biom10101414.

(收稿日期:2022-07-05　修回日期:2022-12-08)

(本文编辑:张宇)

读者 · 作者 · 编者

本刊对医学研究中知情同意和医学伦理学描述的要求

根据国际医学期刊编辑委员会提供的“生物医学期刊投稿统一要求”的表述,本刊对作者撰写稿件时关于“知情同意”和“医学伦理学”的描述提出如下要求:

(1)知情同意　在未事先获得知情同意的情况下,患者有隐私不被侵犯的权力。患者的身份信息,包括姓名、来源、住院号等均不应该以文字、图片或家系信息的方式在出版物上公开,除非这些信息对于本研究是必需的,如需在出版物上显示,应征得患者(或者父母、监护人)签署的书面同意书。

发表的文章中应该省略不必要的患者个人信息,但难以做到完全匿名时(如在照片中掩盖患者的眼部,不足以保护患者的隐私权),应提供知情同意的信息。如果用改变患者的身份特征(如遗传家系等)以保护患者隐私权的方法,作者应该确保这些改变不影响研究的科学性,并且编辑应在文中对此予以说明。

(2)医学伦理学　以人体为实验对象的研究,作者应该提及试验步骤是否符合相应的负责机构、国家委员会或 1975 年赫尔辛基宣言(2005 年修订)的医学伦理学标准。如果研究过程对是否符合赫尔辛基宣言有疑问或存在一定的问题,作者应当做出客观说明并解释研究的合理性,提交已通过审查机构的批准情况。以动物为实验对象的研究,作者应当说明是否遵循当地的相关机构、学会(国内或国外)及国家实验动物保护和使用指南。

(本刊编辑部)

中華醫學會雜誌社 Chinese Medical Association Publishing House 版权所有 违者必究