

· 实验研究 ·

叶黄素对 H₂O₂ 诱导的人视网膜 Müller 细胞氧化应激干预的作用机制

杨旭 王明臣 孙艳艳 安慧娟 李庆福 鲍玉洲

【摘要】 背景 氧化应激是年龄相关性黄斑变性(AMD)的主要因素之一。研究表明叶黄素对 AMD 有预防作用,但其抗氧化机制仍不明确。Müller 细胞是视网膜氧化应激反应的靶细胞之一,研究叶黄素对 Müller 细胞的氧化应激是否具有保护作用及其作用机制对于视网膜疾病的治疗具有重要意义。目的 研究叶黄素对视网膜 Müller 细胞核因子 E2 相关转录因子 2/抗氧化反应原件(Nrf2/ARE)信号途径的影响。方法 人 Müller 细胞株进行常规培养,将对数生长期的细胞接种于 96 孔培养板,在培养液中分别加入不同浓度(40、80、160、320、640 μmol/L)H₂O₂,绘制 Müller 细胞的凋亡曲线,取 H₂O₂ 的半数致死量,即 160 μmol/L 制备 Müller 细胞氧化应激模型。将模型细胞分为模型对照组和不同质量浓度(12.5、25.0、50.0 mg/L)叶黄素组,根据分组情况分别在培养液中加入相应质量浓度的叶黄素,用常规培养的细胞作为空白对照组。采用 MTT 比色法测定各组中 Müller 细胞增殖值(吸光度, A 值)和凋亡率;采用流式细胞仪检测各组细胞中活性氧簇(ROS)的荧光强度;采用实时荧光定量 PCR 检测细胞中 Nrf2 mRNA 和血红素加氧酶-1(HO-1) mRNA 的相对表达量;采用 Western blot 法检测各组细胞中 Nrf2 和 HO-1 蛋白的表达水平(灰度值)。结果 MTT 比色法检测显示,随着 H₂O₂ 浓度的增加,细胞增殖抑制率逐渐增加,各组间总体比较差异有统计学意义($F=43.890$, $P<0.01$)。空白对照组、模型对照组及 12.5、25.0、50.0 mg/L 叶黄素组细胞凋亡率的总体比较差异有统计学意义($F=346.770$, $P=0.000$),其中随着叶黄素质量浓度的增加,细胞凋亡率逐渐下降,组间比较差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。空白对照组、模型对照组及 12.5、25.0、50.0 mg/L 叶黄素组细胞中 ROS 含量分别为 1.92 ± 0.18 、 64.89 ± 2.86 、 52.70 ± 2.80 、 32.61 ± 4.20 和 5.68 ± 1.35 ,随着叶黄素质量浓度的增加,ROS 含量逐渐下降,组间总体比较差异有统计学意义($F=324.900$, $P=0.000$)。各质量浓度叶黄素组细胞中 Nrf2 和 HO-1 mRNA 相对表达量及细胞中 HO-1 和细胞核中 Nrf2 蛋白表达量均明显高于模型对照组,各组间总体比较差异均有统计学意义($F=236.960$ 、 242.620 、 186.830 、 263.120 , 均 $P=0.000$),随着叶黄素质量浓度的增加, Nrf2 mRNA 和 HO-1 mRNA 及其蛋白的表达量逐渐增加,组间比较差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),但各组间 Müller 细胞的细胞质中 Nrf2 蛋白表达量总体比较差异无统计学意义($F=1.790$, $P=0.210$)。结论 叶黄素通过上调 Nrf2 的表达和核转位诱导抗氧化酶的表达,从而抑制 Müller 细胞的氧化应激反应。

【关键词】 氧化应激/生理; 叶黄素/药理; Müller 细胞; 年龄相关性黄斑变性; 核因子 E2 相关转录因子 2/代谢; 血红素加氧酶-1/代谢

Molecular mechanism of lutein protecting Müller cells against oxidative stress induced by H₂O₂ Yang Xu, Wang Mingchen, Sun Yanyan, An Huijuan, Li Qingfu, Bao Yuzhou. Department of Biochemistry & Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

Corresponding author: Wang Mingchen, Email: wangmc@zzu.edu.cn

[Abstract] **Background** Oxidative stress is a main cause of age-related macular degeneration (AMD). Lutein has a preventive role for AMD, but its antioxidant mechanism remains unclear. **Objective** Present study was to investigate the effect of lutein on oxidative stress of Müller cells and its signaling pathway. **Methods** Human Müller cells (human Müller cell strain) were cultured, and the cells at logarithmic growth phase were incubated in 96 well plate overnightly. Oxidative stress cell models were established by adding 160 μmol/L H₂O₂, a

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.11.010

作者单位:450001 郑州大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室(杨旭、王明臣、安慧娟);450008 郑州,河南中医学院基础医学院(孙艳艳、李庆福);450003 郑州,河南省立眼科医院 河南省眼科研究所(鲍玉洲)

通信作者:王明臣, Email: wangmc@zzu.edu.cn

median lethal dose for Müller cells. The models were divided into the model control group and 12.5, 25.0, 50.0 mg/L lutein groups, and the different concentrations of lutein were used to culture the cells for 24 hours, respectively. The routine cultured cells served as the blank control group. Growth of the cells was assayed by MTT method (absorbancy); the reactive oxygen species (ROS) content in the cells was assayed by flow cytometry; the mRNA and protein levels of nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase-1 (HO-1) in the cells were detected by quantitative real-time PCR and Western blot, respectively. **Results** The inhibitory effects on the cells were gradually enhanced with the increase of H₂O₂ concentrations, showing a significant difference among the groups ($F = 43.890, P < 0.01$). A significant difference was found in apoptotic rate of the cells among the blank control group, model control group and 12.5, 25.0, 50.0 mg/L lutein groups ($F = 346.770, P = 0.000$), and the apoptosis rate was significant elevated with the increase of lutein dose (all at $P < 0.05$). The ROS contents in the cells were 1.92 ± 0.18 , 64.89 ± 2.86 , 52.70 ± 2.80 , 32.61 ± 4.20 and 5.68 ± 1.35 in the blank control group, model control group and 12.5, 25.0, 50.0 mg/L group, respectively, with significant difference among the groups ($F = 324.900, P = 0.000$), and the ROS content was gradually reduced as the increase of lutein dose (all at $P < 0.05$). The relative mRNA and protein expressions of Nrf2 and HO-1 were remarkably higher in the 12.5, 25.0, 50.0 mg/L lutein groups than those in the model control group ($F = 236.960, 242.620, 186.830, 263.120$, all at $P = 0.000$), and no significant difference was seen in the relative expression level of nuclear Nrf2 protein among the groups ($F = 1.790, P = 0.210$). **Conclusions** Lutein can induce the expression of antioxidant enzymes by inducing the expression of nuclear translocation of Nrf2 and consequently inhibit the oxidative stress status.

[Key words] Oxidative stress/physiology; Lutein/pharmacology; Müller cells; Macular degeneration, age-related; Nuclear factor-E2-related factor 2/metabolism; Heme oxygenase-1/metabolism

年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 是老年人常见的致盲眼病, 其作用机制为氧自由基在视网膜大量蓄积导致视网膜细胞的脂质过氧化, 引起细胞内蛋白质的表位发生变构和 DNA 损伤, 最终导致视网膜细胞凋亡^[1-4]。视网膜 Müller 细胞是脊椎动物视网膜内主要的胶质细胞, 在调节视网膜感光细胞和神经元的功能、维持血-视网膜屏障的完整性、合成并分泌多种生长因子和神经营养因子、参与维持细胞外微环境的平衡等方面发挥重要作用。氧化应激引起的视网膜功能受损是导致 AMD 等视网膜疾病发生和发展的重要机制之一。叶黄素具有很强的抗氧化作用, 能够有效地清除体内的自由基。流行病学证据表明, 叶黄素在预防 AMD 方面有较高的生物学活性^[5]。核因子 E2 相关转录因子 2/抗氧化反应原件 (nuclear factor-E2-related factor 2/antioxidant response element, Nrf2/ARE) 通路是重要的内源性抗氧化应激通路, 在抗凋亡、抗炎和神经保护等方面具有重要功能^[6], 研究叶黄素对 Müller 细胞的氧化应激是否具有保护作用及其作用与 Nrf2/ARE 通路的关系对于视网膜疾病的治疗具有重要意义。本研究探讨叶黄素对 Müller 细胞的抗氧化作用, 以期 AMD 的治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

叶黄素 (加拿大农业部食品研究中心惠赠); 人 Müller 细胞株 (郑州博兴公司); H₂O₂ (天津化学试剂厂); MTT (南京建成生物技术公司); DMEM/F12 完全培养基 (美国 Hyclon 公司); 胎牛血清、质量分数 0.05% 胰蛋白酶消化液 (美国 Gibco 公司); 青霉素钠 (国药准字: H21021677, 辽宁科泰生物基因制药股份有限公司); 硫酸链霉素 (国药准字: H13020649, 山西太原药业有限公司); 谷氨酰胺 (上海化学试剂公司); 一步式实时荧光定量 PCR 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司); Caspase-3 引物 (上海赛百盛生物科技技术有限责任公司合成); 细胞质蛋白提取试剂盒、细胞核蛋白提取试剂盒、活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒 (上海碧云天生物科技公司); 兔抗人 Nrf2 单克隆抗体 (ab31163)、兔抗人血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 单克隆抗体 (ab79854)、兔抗人 GAPDH 单克隆抗体 (ab70699)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AP) 标记羊抗兔 IgG 抗体 (ab6722) (美国 Abcam 公司); 逆转录试剂盒 (大连宝生物公司)。伯乐 680 酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); HF151UV CO₂ 培养箱 (美国 Heal Force 公司); Step One Plus 荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); FACSCanto 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 缺氧细胞模型的制备 取对数生长期的 Müller 细胞, 用含体积分数 10% 胎牛血清和青链霉素

的 DMEM/F12 培养液将细胞密度调整为 2×10^5 /ml, 接种于 96 孔培养板中, 于 37°C 、体积分数 5% CO_2 及饱和湿度条件下培养过夜, 细胞完全贴壁后换为不含血清的培养液培养 24 h。将细胞分为对照组和不同浓度 H_2O_2 (40、80、160、320、640 $\mu\text{mol/L}$) 作用组, 用 MTT 法检测各组细胞的凋亡率, 确定 H_2O_2 的半数致死量, 以制备缺氧细胞模型。

1.2.2 细胞分组 将模型细胞分为模型对照组和不同质量浓度叶黄素干预组, 模型对照组细胞仅于培养液中添加 160 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 , 叶黄素干预组加入 160 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 和相应质量浓度叶黄素 (12.5、25.0、50.0 mg/L), 另取常规培养的细胞作为空白对照组。因预实验证实质量分数 0.1% DMSO 溶媒单独使用对各项检测结果无影响, 故未列出 DMSO 溶媒对照组。各组细胞培养液加入药物后轻轻混匀, 于 5% CO_2 、 37°C 条件下培养 24 h。

1.2.3 MTT 比色法检测细胞增值和凋亡率 将各组细胞接种至 96 孔板, 细胞密度为 5×10^5 个/孔, 每孔加入质量分数 0.5% MTT 溶液 20 μl , 继续培养 4 h。终止培养后, 小心吸出每孔的细胞培养上清液, 每孔加入 150 μl DMSO, 以空白调零孔调零, 用酶标仪测定波长为 570 nm 处的吸光度 (A_{570}) 值, 并计算细胞的凋亡率。细胞凋亡率 = $(1 - \text{对照组或实验组平均 } A_{570} \text{ 值} / \text{空白组平均 } A_{570} \text{ 值}) \times 100\%$ 。

1.2.4 流式细胞技术检测细胞内 ROS 蓄积情况 细胞贴壁后, 各组加入相应浓度的 H_2O_2 和叶黄素, 培养 24 h, 收集细胞, 4°C 冷 PBS 充分洗涤, 调整细胞密度至 1×10^6 /ml。加入终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的荧光染料二氯二氢荧光素-乙酰乙酸酯 (2', 7'-Dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA) 的无血清培养液 1 ml, 于 37°C 细胞培养箱内孵育 20 min。每隔 3 ~ 5 min 颠倒混匀 1 次, 使染料和细胞充分接触。用无血清培养液洗涤细胞 3 次, 充分除去未进入细胞内的 DCFH-DA, 采用流式细胞仪检测各组细胞中 ROS 含量。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 法检测细胞内 Nrf2 和 HO-1 mRNA 的表达 Trizol 法提取总 RNA, 逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板, 用实时荧光定量 PCR 检测各组 Nrf2 mRNA 和 HO-1 mRNA 含量, 以 GAPDH 为内参。参照 GenBank 中基因序列, 采用 Primer5 软件设计引物, 所有引物序列由上海生工生物工程公司合成。Nrf2 上游引物序列为 5'-AGCCCAGCACATCCAGTCA-3'; 下游引物序列为 5'-CAAAGCATCTGATTTGGGAATG-3'。HO-1 上游引物序列为 5'-CCAGCAACAAAGTGCAAGATTC-3'; 下游引物序列为 5'-GTGTAAGGA

CCCATCGGAGAAG-3'。GAPDH 上游引物序列为 5'-GACCTGACCTGCCGTCTA-3'; 下游引物序列为 5'-TAGCCCAGGATGCCCTTGAG-3'。反应体系 20.0 μl , 包括 cDNA 模板 2.0 μl , 上下游引物各 0.4 μl , 探针 0.8 μl , Premix Ex Taq 10.0 μl , ddH₂O 6.4 μl 。每个样本设 6 个复孔。反应条件: 95°C 预变性 30 s; 95°C 反应 5 s, 60°C 反应 30 s, 共 40 个循环。用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各样本中 Nrf2 mRNA 和 HO-1 mRNA 的相对表达量。

1.2.6 Western blot 法检测细胞内 Nrf2 和 HO-1 蛋白的表达量 收集各组细胞, 按细胞核蛋白和细胞质蛋白提取试剂盒说明书操作提取细胞核蛋白和细胞质蛋白。BCA 法测定核蛋白和细胞质蛋白的含量, 取上述蛋白质提取液 15 μg , 加入等容积 2 倍上样缓冲液, 100°C 反应 3 min, 点样于质量分数 4% 分离胶和质量分数 12% 浓缩胶进行电泳, 120 V 电泳 3 h, 将蛋白质转移到 PVDF 膜上。用含质量分数 1% 牛血清白蛋白的 TBST 封闭液室温封闭 4 h, 弃去封闭液, 于 PVDF 膜上分别滴加兔抗人 Nrf2 单克隆抗体 (1:500)、兔抗人 HO-1 单克隆抗体 (1:500)、兔抗人 GAPDH 单克隆抗体 (1:300), 4°C 孵育过夜, TBST 缓冲液 200 ml 漂洗 3 次, 每次 15 min。将 PVDF 膜转入 1:3 000 稀释的 AP 标记羊抗兔 IgG 二抗中, 室温孵育 1 h。TBST 缓冲液 200 ml 漂洗 3 次, 每次 15 min, 加入显色液显色后拍照。取各蛋白条带的灰度值, 以 GAPDH 为内参照, 计算蛋白的相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计学软件进行统计分析。本研究测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 经 Levene 检验方差齐。采用均衡分组单因素干预多水平实验设计, 多个组间细胞增值、凋亡率及各组细胞中 ROS 含量、Nrf2 和 HO-1 mRNA 及其蛋白表达量的总体差异比较均采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 H_2O_2 作用后 Müller 细胞的凋亡率

分别加入 40、80、160、320、640 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 后 24 h, 各组间细胞凋亡率分别为 $(29.43 \pm 0.04)\%$ 、 $(33.82 \pm 0.05)\%$ 、 $(43.66 \pm 0.07)\%$ 、 $(61.79 \pm 0.02)\%$ 和 $(92.34 \pm 0.02)\%$, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 43.890, P < 0.01$), 与对照组相比, 不同浓度 H_2O_2 组细胞的凋亡率随浓度增加, 凋亡率逐渐增加, 160 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用时细胞接近半数致死 (图 1)。

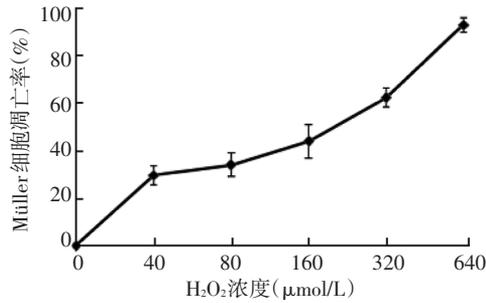


图 1 不同浓度 H₂O₂ 作用后 Müller 细胞的凋亡曲线 随 H₂O₂ 浓度的增加, Müller 细胞的凋亡率增加

2.2 叶黄素作用后模型细胞的凋亡率变化

加入 H₂O₂ 和叶黄素后 24 h, 空白对照组、模型对照组及 12.5、25.0、50.0 mg/L 叶黄素组凋亡率的总体比较差异有统计学意义 ($F = 346.770, P = 0.000$)。与空白对照组比, 模型对照组和不同质量浓度叶黄素组细胞均出现不同程度的凋亡。与模型对照组相比, 各质量浓度叶黄素组细胞凋亡率均明显下降, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 叶黄素质量浓度越高, 细胞的凋亡率越低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 1)。

表 1 各组 Müller 细胞增殖值及凋亡率的比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 样本量 | Müller 细胞增殖值 (A_{570}) | Müller 细胞凋亡率 (%) |
|----------------|-----|-----------------------------|-----------------------------|
| 空白对照组 | 6 | 0.61 ± 0.01 ^a | 0 |
| 模型对照组 | 6 | 0.38 ± 0.01 | 38.56 ± 0.01 |
| 12.5 mg/L 叶黄素组 | 6 | 0.41 ± 0.01 ^a | 34.04 ± 0.02 ^a |
| 25.0 mg/L 叶黄素组 | 6 | 0.42 ± 0.01 ^{ab} | 30.86 ± 0.02 ^{ab} |
| 50.0 mg/L 叶黄素组 | 6 | 0.46 ± 0.00 ^{abcd} | 25.81 ± 0.00 ^{abc} |
| <i>F</i> | | 589.820 | 346.770 |
| <i>P</i> | | 0.000 | 0.000 |

注: 与各自的模型对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与各自的 12.5 mg/L 叶黄素组比较, ^b $P < 0.05$; 与各自的 25.0 mg/L 叶黄素组比较, ^c $P < 0.05$ (单因素方差分析, SNK-*q* 检验)

2.3 各组细胞中 ROS 含量的变化

空白对照组、模型对照组及不同质量浓度叶黄素组 Müller 细胞中 ROS 含量明显不同, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 324.900, P = 0.000$), 其中 12.5、25.0、50.0 mg/L 叶黄素组细胞中的 ROS 含量均明显高于空白对照组, 差异均有统计学意义 ($t = -31.358, P = 0.001; t = -12.643, P = 0.006; t = -4.790, P = 0.038$); 12.5、25.0、50.0 mg/L 叶黄素组细胞中的 ROS 含量均明显低于模型对照组, 差异均有统计学意义 ($t = 5.275, 11.002, 32.408$, 均 $P = 0.000$); 且随着叶黄素质量浓度增加, ROS 含量逐渐降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$) (图 2, 表 2)。

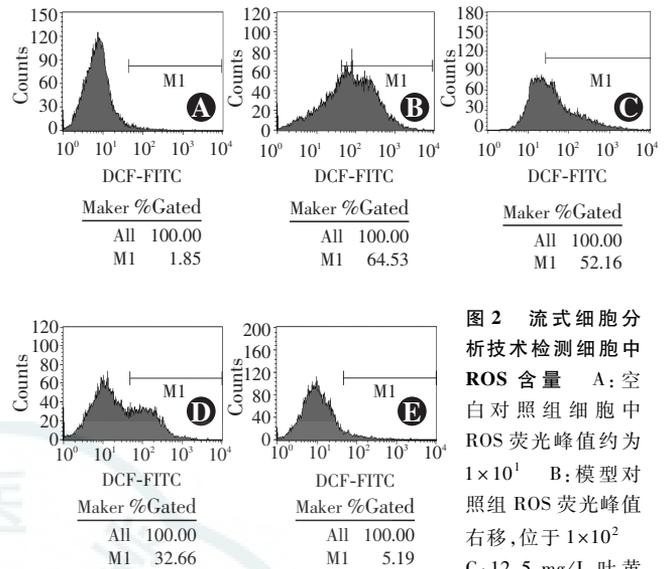


图 2 流式细胞分析技术检测细胞中 ROS 含量 A: 空白对照组细胞中 ROS 荧光峰值约为 1×10^1 B: 模型对照组 ROS 荧光峰值右移, 位于 1×10^2 C: 12.5 mg/L 叶黄素组 ROS 荧光峰值位于 $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^2$ D: 25.0 mg/L 叶黄素组 ROS 荧光峰值接近 1×10^1 E: 50.0 mg/L 叶黄素组 ROS 荧光峰值位于 1×10^1

表 2 各组 Müller 细胞中 ROS 含量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 样本量 | ROS 含量 |
|----------------|-----|-----------------------------|
| 空白对照组 | 6 | 1.92 ± 0.18 |
| 模型对照组 | 6 | 64.89 ± 2.86 ^a |
| 12.5 mg/L 叶黄素组 | 6 | 52.70 ± 2.80 ^{ab} |
| 25.0 mg/L 叶黄素组 | 6 | 32.61 ± 4.20 ^{abc} |
| 50.0 mg/L 叶黄素组 | 6 | 5.68 ± 1.35 ^{abcd} |
| <i>F</i> | | 324.900 |
| <i>P</i> | | 0.000 |

注: 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型对照组比较, ^b $P < 0.01$; 与 12.5 mg/L 叶黄素组比较, ^c $P < 0.01$; 与 25.0 mg/L 叶黄素组比较, ^d $P < 0.01$ (单因素方差分析, SNK-*q* 检验) ROS: 活性氧簇

2.4 各组 Müller 细胞内 Nrf2 mRNA 和 HO-1 mRNA 的表达

实时荧光定量 PCR 测定结果显示, 模型对照组及不同质量浓度叶黄素组细胞中 Nrf2 mRNA 的相对表达量总体比较差异有统计学意义 ($F = 236.960, P = 0.000$)。与模型对照组比较, 12.5、25.0、50.0 mg/L 叶黄素组细胞中 Nrf2 mRNA 的相对表达量均显著增加, 差异均有统计学意义 ($t = -2.940, P = 0.042; t = -6.276, P = 0.003; t = -28.864, P = 0.000$), 随着叶黄素质量浓度的增加, Nrf2 mRNA 相对表达量逐渐增加。4 个组间细胞 HO-1 mRNA 相对表达量明显不同, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 242.620, P = 0.000$), 与模型对照组比较, 各质量浓度叶黄素组细胞中 HO-1 mRNA 相对表达量均明显升高, 差异均有统计学意义 ($t = -4.000, P = 0.016; t = -12.649, P = 0.000; t = -20.041, P = 0.000$), 随叶黄素质量浓度的增加, HO-1 mRNA 逐渐增加, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 3)。

表 3 各组 Müller 细胞内 Nrf2 mRNA 及 HO-1 mRNA 的相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s, 2^{-\Delta\Delta Ct}$)

| 组别 | 样本量 | Nrf2 mRNA | HO-1 mRNA |
|----------------|-----|--------------------------|--------------------------|
| 模型对照组 | 6 | 0.21±0.02 | 0.11±0.01 |
| 12.5 mg/L 叶黄素组 | 6 | 0.24±0.02 ^a | 0.14±0.01 ^a |
| 25.0 mg/L 叶黄素组 | 6 | 0.31±0.03 ^{bc} | 0.24±0.02 ^{bc} |
| 50.0 mg/L 叶黄素组 | 6 | 0.57±0.02 ^{bcd} | 0.42±0.03 ^{bcd} |
| F | | 236.960 | 242.620 |
| P | | 0.000 | 0.000 |

注:与各自的模型对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与各自的 12.5 mg/L 叶黄素组比较,^c $P < 0.05$;与各自的 25.0 mg/L 叶黄素组比较,^d $P < 0.05$ (单因素方差分析,SNK-q 检验) Nrf2:核因子 E2 相关转录因子;HO:血红素加氧酶

2.5 各组 Müller 细胞内 Nrf2 和 HO-1 蛋白的表达

Western blot 测定显示模型对照组及不同质量浓度叶黄素组细胞中 Müller 细胞核内 Nrf2 蛋白的表达量总体比较差异有统计学意义 ($F = 263.120, P = 0.000$), 12.5、25.0、50.0 mg/L 叶黄素组细胞的核内 Nrf2 蛋白表达量较模型对照组显著增加,差异均有统计学意义 ($t = -6.238, P = 0.003; t = -10.090, P = 0.001; t = -20.058, P = 0.000$);各组细胞的细胞质中 Nrf2 蛋白表达量的总体比较差异无统计学意义 ($F = 1.790, P = 0.210$)。各组 Müller 细胞中 HO-1 蛋白表达量明显不同,总体比较差异有统计学意义 ($F = 186.830, P = 0.000$),各质量浓度叶黄素组细胞中 HO-1 表达量较模型对照组显著增加,差异均有统计学意义 ($t = -3.845, P = 0.018; t = -11.395, P = 0.000; t = -32.672, P = 0.000$) (图 3,表 4)。

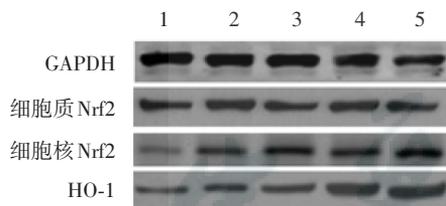


图 3 叶黄素对 Müller 细胞中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达的影响 1:空白对照组 2:模型对照组 3:12.5 mg/L 叶黄素组 4:25.0 mg/L 叶黄素组 5:50.0 mg/L 叶黄素组 Nrf2:核因子 E2 相关转录因子;HO:血红素加氧酶

表 4 各组 Müller 细胞内 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$, 灰度值)

| 组别 | 样本量 | 细胞质 Nrf2 | 细胞核 Nrf2 | HO-1 |
|----------------|-----|-----------|------------------------|------------------------|
| 空白对照组 | 15 | 0.19±0.02 | 0.08±0.01 | 0.08±0.01 |
| 模型对照组 | 15 | 0.21±0.02 | 0.23±0.02 | 0.12±0.00 |
| 12.5 mg/L 叶黄素组 | 15 | 0.18±0.02 | 0.41±0.03 ^a | 0.19±0.01 ^b |
| 25.0 mg/L 叶黄素组 | 15 | 0.22±0.02 | 0.50±0.02 ^a | 0.33±0.02 ^a |
| 50.0 mg/L 叶黄素组 | 15 | 0.23±0.02 | 0.94±0.04 ^a | 0.49±0.01 ^a |
| F | | 1.790 | 263.120 | 186.830 |
| P | | 0.210 | 0.000 | 0.000 |

注:与各自的模型对照组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$ (单因素方差分析,SNK-q 检验) Nrf2:核因子 E2 相关转录因子;HO:血红素加氧酶

3 讨论

众所周知,视网膜黄斑区的重要组成成分是叶黄素,其生理作用是改善视觉功能,清除组织中的自由基。流行病学研究表明,适量应用叶黄素可改善视力,抑制视网膜中 ROS 的集聚,阻止 AMD 的进展,且对人体无毒性作用。Seddon 等^[7]的流行病学研究发现,叶黄素与 AMD 的发病有直接关系,补充叶黄素能够降低 AMD 的发病率,改善视力^[8]。叶黄素的这些保护作用是通过抗氧化应激和抗炎作用实现的,但叶黄素在视网膜中的抗氧化作用机制仍不清楚。相关的早期研究主要集中在叶黄素对蓝光损伤视网膜的保护作用方面,目前已公认叶黄素可改善视网膜功能,但以 AMD 为代表的视网膜病变的诱因并不仅仅是光损伤等外部原因,多种因素造成的内源性和外源性自由基积聚造成的氧化应激也是最终导致视网膜疾病发生的原因。目前制作细胞的氧化应激模型主要有 2 种方式,一是通过氧自由基的累积诱发氧化应激,二是通过高糖,主要是脂多糖来诱发氧化应激,氧化应激模型的建立使得我们逐渐地探索出相关疾病的发病机制,这对我们了解疾病的发生和发展及治疗非常重要。

生理状态下线粒体会蓄积自由基,且随年龄的增长而逐渐增加。研究证明,氧化应激是视网膜多种疾病的重要发病机制,AMD 的研究亦与其有关^[9-10]。保护 Müller 细胞免受氧化损伤是治疗 AMD 的重要途径,H₂O₂诱导体外细胞是经典的氧化应激模型,可检测氧化应激的感受态以及抗氧化剂的作用。H₂O₂能够降低细胞活性,而叶黄素可减轻 H₂O₂所致的损伤。本研究结果表明,叶黄素能降低 H₂O₂诱导的细胞中的 ROS 含量,与 Murthy 等^[11]的研究结果一致。

本研究中采用外源性 H₂O₂刺激体外培养 Müller 细胞的方法来建立氧化损伤模型,观察叶黄素对 Müller 细胞氧化损伤的保护作用及机制。本研究发现,不同质量浓度的叶黄素可显著提高 H₂O₂所致的细胞存活率,提示叶黄素对氧化损伤的 Müller 细胞具有保护作用。Sachdeva 等^[12]研究发现,Nrf2/ARE 信号通路在调控人视网膜色素上皮细胞内的氧化活性方面具有重要作用。Nrf2/ARE 通路广泛存在于肝脏、肺脏、乳腺、食管等组织中,在正常组织和肿瘤组织中均发挥作用,其主要受外源性亲电子化合物和氧化应激的诱导。该内源性抗氧化应答系统调节过氧化物酶的生成,从而调控氧化损伤^[13]。正常情况下,Nrf2 蛋白与伴侣蛋白 Keap1 结合处于抑制状态,受到 ROS、亲电子物质或者上游信号通路,如丝裂原激活的蛋白激酶、

