

· 实验研究 ·

莱菔硫烷对过氧化氢诱导牛眼小梁细胞氧化应激损伤的保护作用

刘玉震 王强

256603 山东省滨州市,滨州医学院附属医院眼科

通信作者:王强,Email:bywq001@126.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.06.009

【摘要】 背景 研究表明小梁网组织的氧化应激损伤是开角型青光眼的基本病理过程之一,莱菔硫烷(SFN)可通过激活 Nrf2/ARE 通路发挥其抗氧化应激作用,但其是否可对氧化应激损伤的小梁细胞发挥作用目前尚不清楚。目的 探讨 SFN 对 H₂O₂诱导的牛眼小梁细胞氧化应激损伤的防护作用。方法 采用组织块培养法对新鲜摘取的黑牛眼球小梁组织进行小梁细胞原代培养,将第 3 代牛小梁细胞以 1×10³/孔的细胞密度接种于 96 孔板中培养 24 h 后将细胞分为 4 个组,空白对照组加入 100 μl 无血清培养基,H₂O₂组细胞在空白对照组的基础上加入 100 μl 终浓度为 100 μmol/L H₂O₂建立细胞氧化应激损伤模型,SFN 组在培养液中加入 100 μl 终浓度为 10 μmol/L SFN,而 SFN+H₂O₂组在 SFN 组的基础上加入 100 μmol/L H₂O₂,细胞培养后 6 h 采用 CCK-8 法检测各组牛眼小梁细胞活力,采用 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率。结果 传至第 3 代的细胞呈梭形,形状和大小较均一,细胞质丰富,可见色素颗粒,核仁大。H₂O₂组和 SFN+H₂O₂组相对细胞活力分别为空白对照组的(67.00±1.27)% 和(80.00±6.25)% ,其中 SFN+H₂O₂组相对细胞活力低于空白对照组和 SFN 组,但明显高于 H₂O₂组,差异均有统计学意义(均 P<0.01)。空白对照组、H₂O₂组、SFN 组和 SFN+H₂O₂组细胞凋亡率分别为(11.33±0.77)%、(32.31±1.03)%、(10.44±0.68)% 和(17.68±0.21)% ,各组间总体比较差异均有统计学意义(F=539.96,P<0.01),其中 SFN+H₂O₂组细胞凋亡率明显低于 H₂O₂组但高于空白对照组和 SFN 组,差异均有统计学意义(均 P<0.01)。结论 SFN 可以增强 H₂O₂诱导的牛眼小梁细胞的抗氧化应激能力,减轻氧化应激对牛眼小梁细胞的损伤。

【关键词】 异硫氰酸酯; 硫氰酸酯/药理; 细胞培养; 过氧化氢/毒性; 氧化应激/药物作用; 小梁细胞/药物作用; 凋亡; 动物, 牛; 莱菔硫烷

基金项目: 山东省科学技术发展计划项目(2012YD18117)

Protection of sulforaphane against hydrogen peroxide-induced bovine trabecular meshwork cell apoptosis

Liu Yuzhen, Wang Qiang

Department of Ophthalmology, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256603, China

Corresponding author: Wang Qiang, Email: bywq001@126.com

[Abstract] **Background** Evidences indicated that oxidative stress damage is an essential pathological process in primary open angle glaucoma. Sulforaphane (SFN) can play an antioxidative stress role to many tissues and cells by activating Nrf2/ARE single pathway. However, whether SFN has a protective role to oxidative stress induced damage of trabecular meshwork cells is still unclear. **Objective** This study was to investigate the antioxidant effect of SFN against H₂O₂-induced oxidative damage in bovine trabecular meshwork cells. **Methods** Trabecular cells were isolated from fresh black bovine eyeballs and primarily cultured and passaged. The third generation of cells were incubated to 96-well dish at a density of 1×10³/well for 24 hours and divided into 4 groups. The cells were incubated using 100 μl serum-free medium in the blank control group. Oxidative damage models were established by adding 100 μmol/L H₂O₂(100 μl) in medium in the H₂O₂ group. The cells were cultured with the medium containing 10 μmol/L SFN (100 μl) in the SFN group, and 100 μl H₂O₂ at the final concentration of 100 μmol/L was added in the SFN-treated

cell medium in the SFN+H₂O₂ group. The cell vitality in various groups was assayed by using cell counting kit-8 (CCK-8). The apoptosis rate of the cells was detected by Annexin V-FITC/PI double-staining with flow cytometry.

Results Cultured cells showed a spindle shape with uniform size, abundant cytoplasm, numerous pigmented particles and big nucleolus. The relative cell vitality reduced to (67.00±1.27)% and (80.00±6.25)% in the H₂O₂ group and SFN+H₂O₂ group in comparison with 100% in the blank control group, and the cell vitality in the SFN+H₂O₂ group was lower than that in the SFN group but higher than that in the H₂O₂ group (both at $P<0.01$). The mean apoptosis rate was (11.33±0.77)%, (32.31±1.03)%, (10.44±0.68)% and (17.68±0.21)% in the blank control group, H₂O₂ group, SFN group and SFN+H₂O₂ group, respectively, showing a significant difference among the groups ($F=539.96$, $P<0.01$), and the apoptosis rate in the SFN+H₂O₂ group was significantly lower than that in the H₂O₂ group but higher than that in the blank control group and SFN group (all at $P<0.01$). **Conclusions** SFN can improve the antioxidative stress ability of trabecular meshwork cells and alleviate the damage induced by oxidative stress.

[Key words] Isothiocyanates; Thiocyanates/pharmacology; Cells, cultured; Hydrogen peroxide/toxicity; Oxidative stress/drug effects; Trabecular meshwork cells/drug effects; Apoptosis; Animals, cattle; Sulforaphane

Fund program: The Plan of Science and Technology Development of Shandong Province (2012YD18117)

青光眼的发病是由于小梁网和 Schlemm 管的结构或功能变化导致阻力增加, 房水排出通路异常而引起眼压升高, 进而造成视功能损害的进展性视神经疾病^[1]。青光眼的病理机制尚不十分明确, 近期的研究表明氧化应激在青光眼的发生和发展过程中发挥作用, 故保护青光眼患者视神经功能的抗氧化应激药物的研发也是研究的热点^[2-5]。传统的观点认为小梁组织仅仅是房水排出通路中的被动的滤过组织, 但目前的研究发现小梁组织结构复杂, 由多种细胞构成, 可从分子水平调节房水循环通路的功能, 且小梁细胞在调节房水流速方面发挥重要作用^[1], 任何导致小梁细胞功能减退的因素均可引起眼压升高。研究证实, 小梁细胞的氧化应激损伤是原发性开角型青光眼的重要病理过程之一, 与年龄相关性小梁细胞变性、小梁细胞功能障碍及数量减少有关^[6]。因此研究小梁细胞抗氧化应激机制以及抗氧化应激药物可为青光眼的治疗提供新的途径。莱菔硫烷(sulforaphane, SFN)是一种植物提取成分, 可通过激活核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)/抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)通路发挥其抗氧化应激作用, 目前证实其对肺巨噬细胞、鼠肝脏细胞、视网膜色素上皮细胞、视神经节细胞具有保护作用^[7-10], 但其是否能够保护小梁细胞免受氧化应激性损伤尚不清楚。本研究中探讨 SFN 对 H₂O₂诱导牛眼小梁细胞氧化应激损伤的干预作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验标本来源 收集屠宰场新鲜摘取的 2~3

岁黑牛眼球, 立刻放入预冷的含庆大霉素的 PBS 中, 迅速转移至实验室。

1.1.2 主要试剂及仪器 胎牛血清、DMEM 培养基、胰酶(美国 Hyclone 公司); 链霉素、青霉素(山东鲁抗医药公司); 细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8) (日本 Dojindo Laboratories 公司); H₂O₂、PBS(武汉博士德生物工程有限公司); SFN(美国 Cayman Chemical 公司); Annexin-V-FITC、PI 染色试剂(上海碧云天生物技术研究所)。酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)。

1.2 方法

1.2.1 牛眼小梁细胞的原代培养与鉴定 参照本实验室既往的实验方法^[11], 在体式显微镜下用眼科显微剪和显微镊撕取小梁组织, 放置在预先加入 2 ml 胎牛血清的直径 5 cm 培养皿中, 在体积分数 5% CO₂、37℃、饱和湿度细胞培养箱中培养, 待组织块贴壁时, 于培养皿中加入 7~8 ml 含体积分数 20% 胎牛血清、100 μg/ml 链霉素和 100 U/ml(商品单位)青霉素的 DMEM 培养基继续培养。所有的实验步骤在牛眼摘除 8 h 内完成。牛小梁细胞培养至 80%~90% 融合时进行传代培养, 用含质量分数分数 0.04% EDTA 的胰酶消化细胞, 选取第 3 代的小梁细胞进行后续实验。

1.2.2 CCK-8 法检测各组牛眼小梁细胞的活力 第 3 代培养的牛眼小梁细胞经胰酶消化后制成单细胞悬液, 以 1×10^3 /孔的细胞密度接种于 96 孔板中培养 24 h, 待细胞贴壁后弃去原培养基, PBS 漂洗 3 次。将细胞均衡分为 5 个组, 分别加入 200 μl 含终末质量浓

度为 0、10、20、30、40 $\mu\text{mol/L}$ SFN 与细胞培养基混合液, 每组设 5 个重复孔, 分别于培养后 6、12 和 24 h 向每孔中加入 100 μl 含 CCK-8 的细胞培养基, 37 ℃孵育 30 min, 设置酶标仪激发光为 488 nm, 测定波长为 522 nm 处的吸光度 (A) 值, 计算细胞活力, 筛选最适 SFN 作用浓度。细胞活力 (%) = 实验组 A 值 / 空白对照组 A 值 × 100%。

1.2.3 氧化应激损伤模型的建立 将第 3 代培养的牛眼小梁细胞以 $1 \times 10^4/\text{孔}$ 的密度接种于 6 孔板中, 培养过夜, 待细胞贴壁后弃去培养基, 分别加入含终浓度为 0、100、200 和 300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 的培养液, 分别于培养后 0、6、12 和 24 h 倒置显微镜下观察小梁细胞的形态学改变。选择建立牛眼小梁细胞氧化应激损伤模型的最适 H_2O_2 浓度及作用时间。

1.2.4 CCK-8 法检测 SFN 对氧化应激下牛眼小梁细胞增生的影响 取第 3 代培养的牛眼小梁细胞以 $1 \times 10^3/\text{孔}$ 的密度接种于 96 孔板中, 贴壁培养 24 h 后, 弃去原培养基, PBS 清洗去除残余的培养基以及未贴壁的细胞。将细胞分为 4 个组, 空白对照组加入 100 μl 无血清培养基; 模型对照组在空白对照组的基础上加入 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 ; SFN 组在培养液中加入 100 μl 10 $\mu\text{mol/L}$ SFN 与培养基的混合液, 至终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$; SFN + H_2O_2 组在 SFN 组的基础上加入 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 ; 各组细胞均培养 6 h, 然后加入 100 μl 含 CCK-8 的细胞培养基, 37 ℃孵育 30 min, 设置酶标仪激发光为 488 nm, 测定波长为 522 nm 处的 A 值, 计算细胞活力。

1.2.5 流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率 取第 3 代牛眼小梁细胞以 $1 \times 10^4/\text{孔}$ 的密度接种于 6 孔板中, 参照 1.2.4 方法处理各组细胞。将各组细胞消化下来转移到流式管中, 分别给予 Annexin-FITC 染色以及 PI 染色, 用流式细胞仪检测细胞的凋亡情况, 将 Annexin V(+)PI(-) 与 Annexin(+)PI(+) 者为凋亡细胞。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计分析。本研究中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, 组间均数经 Bartlett 检验证实方差齐。采用均衡分组多水平实验设计, 不同浓度 SFN 或 H_2O_2 作用不同时间细胞活力的总体差异比较均采用两因素方差分析; 空白对照组、 H_2O_2 组、SFN 组和 SFN+ H_2O_2 组间细胞活力和细胞凋亡率的总体差异比较采用单因素方差分析, 多重比较均采用 Bonferroni 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 培养细胞的形态学鉴定

倒置显微镜下显示, 培养后 5~7 d 的细胞开始从组织块周围爬出, 呈圆形、三角形或梭形, 相邻细胞的突起彼此相连呈桥状, 细胞轮廓清; 培养后约 2 周, 组织块周围的细胞形成单细胞层(图 1A)。靠近角巩膜区的第 3 代小梁细胞以成纤维样细胞为主, 葡萄膜区的小梁细胞以上皮样细胞为主。上皮样细胞排列紧密, 呈扁平、宽大的多角形, 细胞核圆, 位于细胞中央。第 3 代小梁细胞形状较均一, 细胞质丰富, 细胞器明显, 细胞中可见色素颗粒, 核仁大(图 1B)。

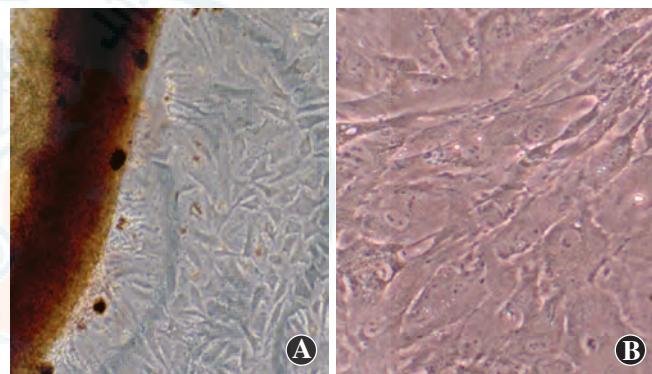


图 1 牛眼小梁细胞的原代培养及形态学鉴定($\times 100$) A: 原代培养的牛眼小梁细胞从小梁组织块周围爬出, 形态多样, 排列紧密
B: 第 3 代牛眼小梁细胞大小均一, 细胞质丰富

2.2 不同浓度 SFN 作用不同时间后牛眼小梁细胞活力的变化

随着 SFN 浓度的升高以及干预时间的延长, 小梁细胞的活力呈下降趋势, 不同浓度 SFN 作用 6、12、24 h 细胞活力的总体比较差异均有统计学意义($F_{\text{分组}} = 40.81, P < 0.01$; $F_{\text{时间}} = 50.23, P < 0.05$), 10 $\mu\text{mol/L}$ SFN 组与空白对照组小梁细胞活力比较差异无统计学意义($P = 0.26$), 20、30、40 $\mu\text{mol/L}$ SFN 组细胞活力均明显低于空白对照组, 随着 SFN 浓度升高, 小梁细胞活力均明显低于其相邻的低浓度组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。SFN 作用后 12 h 及 24 h, 10、20、30、40 $\mu\text{mol/L}$ SFN 组细胞活力均明显低于空白对照组, 随着 SFN 浓度升高, 小梁细胞活力均明显低于其相邻的低浓度组, 差异均有统计学意义(10 $\mu\text{mol/L}$ SFN 组: $P < 0.05$; 20、30、40 $\mu\text{mol/L}$ SFN 组: 均 $P < 0.01$)。10、20、30、40 $\mu\text{mol/L}$ SFN 组作用后 12 h 和 24 h 细胞活力均明显低于作用后 6 h, 差异均有统计学意义(12 h: 均 $P < 0.05$; 24 h: 均 $P < 0.01$)(表 1)。

表1 不同浓度SFN干预不同时间后牛眼小梁细胞活力($\bar{x}\pm s$,%)

组别	样本量	不同干预时间下细胞活力		
		6 h	12 h	24 h
空白对照组	15	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
10 μmol/L SFN组	15	97.38±0.82	85.62±5.45 ^{ac}	72.71±3.51 ^{abc}
20 μmol/L SFN组	15	87.43±1.53 ^c	64.16±2.48 ^{acd}	55.68±4.27 ^{abcd}
30 μmol/L SFN组	15	74.39±4.39 ^{cd}	58.75±2.17 ^{acd}	42.57±1.44 ^{abcd}
40 μmol/L SFN组	15	66.92±10.98 ^{cd}	46.98±1.69 ^{acd}	39.32±2.93 ^{abcd}
F		407.95	788.67	1131.04
P		<0.01	<0.01	<0.01

注: $F_{\text{分组}}=40.81$, $P<0.01$; $F_{\text{时间}}=50.23$, $P<0.05$ 。与各自组内6 h值比较,^a $P<0.05$;与各自组内12 h值比较,^b $P<0.01$;与各自时间点空白对照组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ (两因素方差分析,Bonferroni检验)

SFN: 莱菔硫烷

2.3 不同浓度及不同作用时间下H₂O₂对牛眼小梁细胞形态的影响

200 μmol/L和300 μmol/L H₂O₂作用后随着时间延长贴壁细胞逐渐减少,细胞体积缩小,形态不规则;细胞膜表面粗糙,可见碎片样结构;细胞核形态不一,核质比增大,可见细胞核碎裂;且随着H₂O₂干预时间的延长,这种形态学损害加重,此外细胞培养基中可见大量悬浮细胞及细胞碎片。100 μmol/L H₂O₂作用后不同时间贴壁细胞形态与空白对照组均无明显差异(图2)。

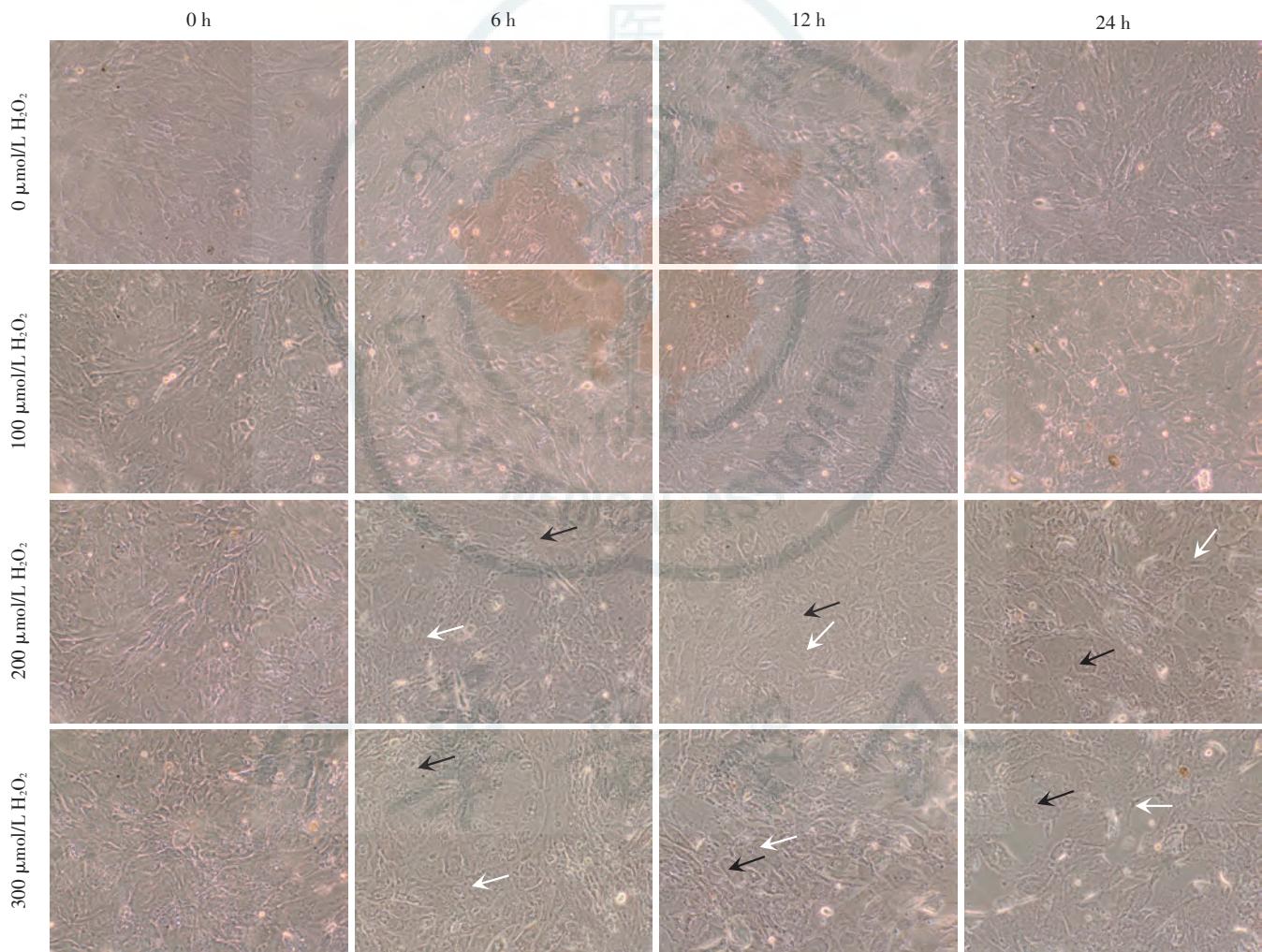


图2 不同浓度H₂O₂作用不同时间牛眼小梁细胞形态的改变(×100) 200 μmol/L和300 μmol/L H₂O₂作用后细胞数量减少,可见细胞碎片(白箭)及细胞核碎裂(黑箭),并随作用时间的延长表现逐渐加重;100 μmol/L H₂O₂作用后各时间点细胞形态及数量均接近空白对照组

2.4 各组小梁细胞活力及细胞凋亡率的比较

空白对照组细胞活力设为100.00±0.00,H₂O₂组、SFN组和SFN+H₂O₂组细胞活力分别为(67.00±1.27)%、(93.00±1.73)%和(80.00±6.25)%,各组总体比较差异有统计学意义($F=58.50$, $P<0.01$);其中H₂O₂组细胞活力明显低于空白对照组和SFN组,

SFN+H₂O₂组细胞活力低于空白对照组和SFN组,但明显高于H₂O₂组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)(图3)。

空白对照组、H₂O₂组、SFN组和SFN+H₂O₂组细胞凋亡率分别为(11.33±0.77)%、(32.31±1.03)%、(10.44±0.68)%和(17.68±0.21)%,各组总体比较差

异均有统计学意义($F=539.96, P<0.01$)， H_2O_2 组细胞凋亡率明显低于空白对照组，差异有统计学意义($P<0.01$)；SFN+ H_2O_2 组细胞凋亡率明显低于 H_2O_2 组，但高于SFN组，差异均有统计学意义(均 $P<0.01$) (图4)。

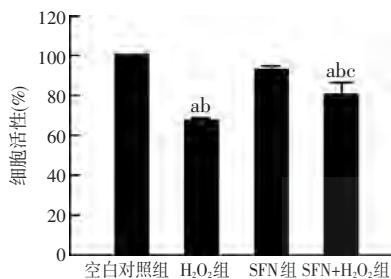


图3 各组牛眼小梁细胞活力比较 $F = 58.50, P < 0.01$ 。与空白对照组比较,^a $P < 0.05$; 与 SFN 组比较,^b $P < 0.05$; 与 H_2O_2 组比较,^c $P < 0.05$ (单因素方差分析, Bonferroni 检验, $n=3$)

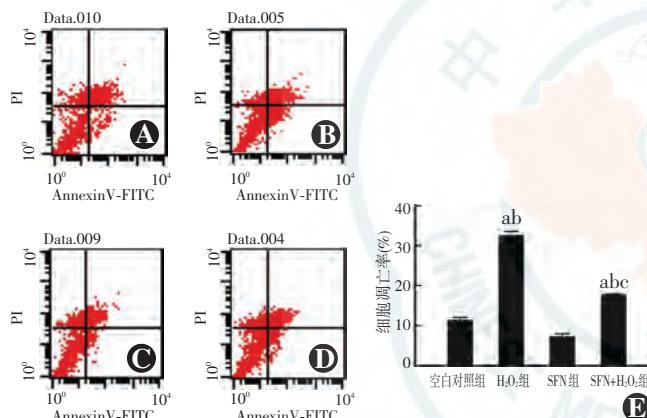


图4 流式细胞仪检测各组细胞凋亡率 A: 空白对照组细胞凋亡率流式细胞图 B: H_2O_2 组细胞凋亡率流式细胞图 C: SFN 组细胞凋亡率流式细胞图 D: SFN+ H_2O_2 组细胞凋亡率流式细胞图 E: 各组细胞凋亡率比较 $F = 539.96, P < 0.01$ 。与空白对照组比较,^a $P < 0.01$; 与 SFN 组比较,^b $P < 0.01$; 与 H_2O_2 组比较,^c $P < 0.01$ (单因素方差分析, Bonferroni 检验, $n=3$)

3 讨论

越来越多的研究证实，氧化应激在青光眼的病理机制中扮演了重要的角色^[2]。在青光眼患者房水及小梁组织中氧化物质，如脂质过氧化物等的含量较同年龄组正常者升高^[12]。正常情况下，机体内存在内源性的抗氧化系统，包括超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶、维生素C和维生素E等一些小分子物质等。体内氧化物质与抗氧化物质处于动态平衡；当活力氧自由基产生量超过细胞的自身抗氧化能力时就会造成氧化应激损伤，进而导致疾病的发生^[13-14]。青光眼患者，特别是原发性开角型青光眼患者眼压升高与小梁网处滤过阻力增加有关。青光眼患者发生小梁细胞数量减少、细胞外基质的增生、细胞骨架的改变、小梁细胞过早衰老以及一些亚临床炎症表

现等形态和功能学的改变。有研究表明，小梁细胞氧化损伤的DNA水平与青光眼患者的眼压升高和视野损害的程度呈正相关，小梁组织的氧化应激损伤会加剧青光眼的进展^[12]。体外实验研究发现，氧化应激状态下小梁细胞产生一些类青光眼的形态学改变，如细胞外基质的沉积、细胞凋亡、细胞骨架的重构、过早衰老以及炎性因子的释放等；然而应用抗氧化药物、拟前列腺素类药物、碳酸酐酶抑制剂预处理后这些形态学改变明显减轻^[1,15]。因此，小梁网细胞氧化应激损伤与青光眼，尤其是原发性开角型青光眼密切相关。

SFN 又称为莱菔硫烷，为异硫代氰酸盐衍生物，易溶于水，广泛存在于西兰花、花椰菜和甘蓝等十字花科蔬菜之中。研究证实具有抗癌、抗炎和抗氧化作用^[15-17]。生理条件下，SFN 与 Keap1 及 Nrf2 结合，通过泛素化途径降解 Nrf2^[18-20]。在氧化应激下 SFN 可使 Keap1 蛋白与 Nrf2 解离，提高 Nrf2 稳定性并促进其向细胞核内转移；Nrf2 与 ARE 结合，诱导内源性抗氧化酶系的合成，从而发挥抗氧化作用^[21-26]。

由于牛眼小梁组织来源丰富，其对体外培养的条件要求较低，而且有报道发现体外培养的牛眼小梁细胞与人眼小梁细胞相似^[27]，本研究中选用牛眼小梁组织进行原代培养。培养的小梁细胞形态特征与文献报道相一致^[28-29]，证实所培养细胞为小梁细胞。由于不同细胞对 SFN 的敏感性不同^[7]，本研究中利用梯度浓度 SFN 干预牛眼小梁细胞发现 SFN 对小梁细胞生存活力的影响呈剂量依赖性和时间依赖性，仅 $10 \mu\text{mol/L}$ 干预细胞 6 h 的小梁细胞活力与空白对照组相比差异无统计学意义，其余浓度及时间点，均可见随着 SFN 浓度的升高以及干预时间的延长，小梁细胞的活力下降越明显。SFN 通过梯度浓度 H_2O_2 干预牛眼小梁细胞发现， $200 \mu\text{mol/L}$ 和 $300 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 明显降低了牛眼小梁细胞的细胞活力，而 $100 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 干预牛眼小梁细胞后，细胞形态变化不大，且细胞活力下降约 40%，细胞凋亡率比空白对照组增长了约 20%。本研究中采用 $100 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 干预 6 h 建立牛眼小梁细胞氧化应激的模型。本研究中结果证实，SFN 能显著抑制 H_2O_2 诱导引起的小梁细胞凋亡，并保护小梁细胞免受氧化应激损伤的影响。

综上所述，SFN 可增强小梁细胞的抗氧化应激能力，维持小梁细胞的正常形态与功能，保证房水流通道的顺畅，从而减轻 H_2O_2 诱导的牛眼小梁细胞的氧化应激损伤。SFN 有望成为预防和治疗青光眼的新型药物，然而 SFN 诱导小梁细胞氧化作用增强的分子机制还有待于进一步的实验研究来证明和解释。

参考文献

- [1] Babizhayev MA. Biomarkers and special features of oxidative stress in the anterior segment of the eye linked to lens cataract and the trabecular meshwork injury in primary open-angle glaucoma: challenges of dual combination therapy with N-acetylcarnosine lubricant eye drops and oral formulation of nonhydrolyzed carnosine [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2012, 26(1) : 86–117. DOI:10.1111/j.1472-8206.2011.00969.x.
- [2] Saccà SC, Izzotti A, Rossi P, et al. Glaucomatous outflow pathway and oxidative stress [J]. *Exp Eye Res*, 2007, 84(3) : 389–399. DOI:10.1016/j.exer.2006.10.008.
- [3] Ishaq M, Evans MD, Ostrikov KK. Atmospheric pressure gas plasma-induced colorectal cancer cell death is mediated by Nox2-ASK1 apoptosis pathways and oxidative stress is mitigated by Srx-Nrf2 antioxidant system [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(12) : 2827–2837. DOI:10.1016/j.bbamer.2014.08.011.
- [4] Li J, Shen F, Guan C, et al. Activation of Nrf2 protects against triptolide-induced hepatotoxicity [J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(7) : e100685 [2015-10-23]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4079517/>. DOI:10.1371/journal.pone.0100685.
- [5] Jiang WD, Liu Y, Hu K, et al. Copper exposure induces oxidative injury, disturbs the antioxidant system and changes the Nrf2/ARE (CuZnSOD) signaling in the fish brain: protective effects of myoinositol [J]. *Aquat Toxicol*, 2014, 155 : 301–313. DOI:10.1016/j.aquatox.2014.07.003.
- [6] Izzotti A, Bagnis A, Saccà SC. The role of oxidative stress in glaucoma [J]. *Mutat Res*, 2007, 612(2) : 105–114.
- [7] La Marca M, Beffy P, Della CC, et al. Structural influence of isothiocyanates on expression of cytochrome P450, phase II enzymes, and activation of Nrf2 in primary rat hepatocytes [J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(8) : 2822–2830. DOI:10.1016/j.fct.2012.05.044.
- [8] Koskela A, Reinisalo M, Hyttinen JM, et al. Pinosylvin-mediated protection against oxidative stress in human retinal pigment epithelial cells [J]. *Mol Vis*, 2014, 20 : 760–769.
- [9] Himori N, Yamamoto K, Maruyama K, et al. Critical role of Nrf2 in oxidative stress-induced retinal ganglion cell death [J]. *J Neurochem*, 2013, 127(5) : 669–680. DOI:10.1111/jnc.12325.
- [10] Park CH, Kim JW. Effect of advanced glycation end products on oxidative stress and senescence of trabecular meshwork cells [J]. *Korean J Ophthalmol*, 2012, 26(2) : 123–131. DOI:10.3341/kjo.2012.26.2.123.
- [11] Wang Q, Wei H, Fan Z, et al. Effect of norfloxacin and clonidine on human trabecular meshwork cells *in vitro* [J]. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*, 1994, 232(9) : 566–571.
- [12] Yan DB, Trope GE, Ethier CR, et al. Effects of hydrogen peroxide-induced oxidative damage on outflow facility and washout in pig eyes [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1991, 32(9) : 2515–2520.
- [13] Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants [J]. *Exp Physiol*, 1997, 82(2) : 291–295.
- [14] Babizhayev MA. Analysis of lipid peroxidation and electron microscopic survey of maturation stages during human cataractogenesis: pharmacokinetic assay of Can-C N-acetylcarnosine prodrug lubricant eye drops for cataract prevention [J]. *Drugs R D*, 2005, 6(6) : 345–369.
- [15] 曾晓丽, 刘晓菊, 包海荣, 等. 萝卜硫素对慢性阻塞性肺疾病患者巨噬细胞Toll样受体4/髓样分化因子88信号通路的影响 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2014, 37(4) : 250–254. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2014.04.004.
- Zeng XL, Liu XJ, Bao HR, et al. Effects of sulforaphane on Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88 pathway of monocyte-derived macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Chin J Tuberc Respir Dis*, 2014, 37(4) : 250–254. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2014.04.004.
- [16] 黄静红, 李德如, 阎国富. 萝卜硫素对中波紫外线损伤HaCaT细胞的保护作用的研究 [J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2009, 8(6) : 338–341. DOI:10.3969/j.issn.1672-0709.2009.06.003.
- Huang JH, Li DR, Yan GF. Photo-protection of sulforaphane on HaCaT cell from ultraviolet radiation B induced damage [J]. *Chin J Dermatol Integ Trad W Med*, 2009, 8(6) : 338–341. DOI:10.3969/j.issn.1672-0709.2009.06.003.
- [17] 贾侃, 贺云冲, 洪姣, 等. 西兰花提取物萝卜硫素抑制肺癌细胞的生长和侵袭 [J]. 中国保健营养 (中旬刊), 2014, (7) : 4589–4590.
- Jia K, Jia YC, Hong J, et al. Sulforaphane derived from broccoli inhibit proliferation and invasion of lung cancer A549 cells *in vitro* [J]. *China Halth Care & nutrition*, 2014, (7) : 4589–4590.
- [18] Sola A, Wen TC, Hamrick SE, et al. Potential for protection and repair following injury to the developing brain: a role for erythropoietin? [J]. *Pediatr Res*, 2005, 57(5 Pt 2) : 110R–117R. DOI:10.1203/01.PDR.0000159571.50758.39.
- [19] Zhang F, Signore AP, Zhou Z, et al. Erythropoietin protects CA1 neurons against global cerebral ischemia in rat: potential signaling mechanisms [J]. *J Neurosci Res*, 2006, 83(7) : 1241–1251. DOI:10.1002/jnr.20816.
- [20] Wang Y, Zhang ZG, Rhodes K, et al. Post-ischemic treatment with erythropoietin or carbamylated erythropoietin reduces infarction and improves neurological outcome in a rat model of focal cerebral ischemia [J]. *Br J Pharmacol*, 2007, 151(8) : 1377–1384. DOI:10.1038/sj.bjp.0707285.
- [21] Hayashi T, Abe K, Itoyama Y. Reduction of ischemic damage by application of vascular endothelial growth factor in rat brain after transient ischemia [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1998, 18(8) : 887–895. DOI:10.1097/00004647-199808000-00009.
- [22] Jaquet K, Krause K, Tawakol-Khadai M, et al. Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential [J]. *Microvasc Res*, 2002, 64(2) : 326–333.
- [23] Marti HH, Bernaudin M, Petit E, et al. Neuroprotection and angiogenesis: dual role of erythropoietin in brain ischemia [J]. *News Physiol Sci*, 2000, 15 : 225–229.
- [24] Ribatti D, Presta M, Vacca A, et al. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization *in vivo* [J]. *Blood*, 1999, 93(8) : 2627–2636.
- [25] Ribatti D, Vacca A, Roccato AM, et al. Erythropoietin as an angiogenic factor [J]. *Eur J Clin Invest*, 2003, 33(10) : 891–896.
- [26] Li Y, Lu ZY, Ogle M, et al. Erythropoietin prevents blood brain barrier damage induced by focal cerebral ischemia in mice [J]. *Neurochem Res*, 2007, 32(12) : 2132–2141. DOI:10.1007/s11064-007-9387-9.
- [27] Grierson I, Kissin R, Ayad S, et al. The morphological features of bovine meshwork cells *in vitro* and their synthetic activities [J]. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*, 1985, 223(5) : 225–236.
- [28] 卢艳, 李美玉. 上皮状牛眼小梁细胞选择性体外培养 [J]. 眼科新进展, 1997, 17(4) : 209–211.
- Lu Y, Li MY. Epithelial-like bovine trabecular meshwork cells selective cultured *in vitro* [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 1997, 17(4) : 209–211.
- [29] Coroneo MT, Korbacher C, Flügel C, et al. Electrical and morphological evidence for heterogeneous populations of cultured bovine trabecular meshwork cells [J]. *Exp Eye Res*, 1991, 52(4) : 375–388.

(收稿日期:2015-11-25)

(本文编辑:尹卫靖 刘艳)