

· 实验研究 ·

虾青素对晶状体上皮细胞氧化应激损伤的抑制作用及其机制

李勇¹ 刘钊臣² 彭华琮³¹孝感爱尔眼科医院, 孝感 432000; ²孝感市中心医院眼科, 孝感 432000; ³武汉艾格眼科医院, 武汉 430019

通信作者: 刘钊臣, Email: 6213157@qq.com

【摘要】 目的 研究虾青素对过氧化氢(H₂O₂)诱导晶状体上皮细胞 HLEB-3 氧化应激损伤的调控作用及其可能的作用机制。方法 将 HLEB-3 细胞于不同浓度 H₂O₂(0、50、100、200、500、750 μmol/L)下培养, 噻唑蓝(MTT)法检测细胞抑制率, 计算半数抑制浓度(IC₅₀)。将 HLEB-3 细胞使用不同浓度(0、5、10、20、50 μmol/L)虾青素培养, MTT 法检测细胞存活率。将 HLEB-3 细胞分为 4 个组, 其中正常对照组用完全培养基培养, 氧化应激组于 250 μmol/L H₂O₂ 培养基中培养, 10 μmol/L 虾青素组和 20 μmol/L 虾青素组分别于相应浓度虾青素+250 μmol/L H₂O₂ 培养基中培养, 各组均培养 24 h。采用流式细胞仪检测细胞凋亡率; 采用 ELISA 法检测细胞一氧化氮(NO)浓度、超氧化物歧化酶(SOD)活性、还原型谷胱甘肽(GSH)活性和丙二醛(MDA)含量; 采用 Western bolt 法检测细胞核核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)、细胞质 Nrf2 和血红素加氧酶-1(HO-1)、醌氧化还原酶 1(NQO1)蛋白表达。另将细胞分为正常对照-小干扰 RNA(NC-siRNA)组、Nrf2-siRNA 组、NC-siRNA+虾青素组和 Nrf2-siRNA+虾青素组, 分别转染 NC-siRNA 或 Nrf2-siRNA, 转染后 24 h 分别于含 0 或 10 μmol/L 虾青素和 250 μmol/L H₂O₂ 培养基中培养 24 h。采用流式细胞仪检测细胞凋亡率, 采用 ELISA 法检测细胞 NO 浓度、SOD 活性、GSH 活性和 MDA 含量。结果 随着 H₂O₂ 浓度的增加, HLEB-3 细胞抑制率升高, 不同浓度 H₂O₂ 处理细胞的抑制率总体比较差异有统计学意义($F = 12.358, P < 0.05$)。H₂O₂ 对 HLEB-3 细胞的 IC₅₀ 为 264.20 μmol/L。0、5、10、20、50 μmol/L 虾青素处理 HLEB-3 细胞的存活率分别为(100.00±0.00)%、(102.20±1.34)%、(109.50±3.60)%、(115.40±4.13)%和(93.60±2.59)%, 后续选取 10 μmol/L 和 20 μmol/L 作为实验剂量。氧化应激组细胞凋亡率为(38.50±2.38)%, 高于正常对照组的(9.20±0.24)%, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 10 μmol/L 虾青素组细胞凋亡率为(27.60±4.33)%, 低于氧化应激组, 高于 20 μmol/L 虾青素组的(14.90±1.23)%和正常对照组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。氧化应激组细胞中 NO 浓度、MDA 含量高于正常对照组、10 μmol/L 虾青素组和 20 μmol/L 虾青素组, SOD、GSH 活性低于正常对照组、10 μmol/L 虾青素组和 20 μmol/L 虾青素组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 10 μmol/L 虾青素组 NO 浓度、MDA 含量高于 20 μmol/L 虾青素组和正常对照组, SOD、GSH 活性低于 20 μmol/L 虾青素组和正常对照组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。各组间细胞核 Nrf2、细胞质 Nrf2、HO-1 和 NQO1 蛋白相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义($F = 43.512, 20.381, 31.014, 23.435$, 均 $P < 0.001$); 正常对照组、氧化应激组、10 μmol/L 虾青素组和 20 μmol/L 虾青素组细胞质 Nrf2 蛋白相对表达量逐渐下降, 细胞核 Nrf2、HO-1 和 NQO1 蛋白相对表达量逐渐升高, 组间两两比较, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。Nrf2-siRNA 组和 Nrf2-siRNA+虾青素组细胞凋亡率高于 NC-siRNA 组和 NC-siRNA+虾青素组, NC-siRNA 组细胞凋亡率高于 NC-siRNA+虾青素组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); Nrf2-siRNA+虾青素组和 Nrf2-siRNA 组细胞凋亡率差异无统计学意义($P > 0.05$)。Nrf2-siRNA 组细胞 NO 浓度、MDA 含量高于 NC-siRNA 组, SOD、GSH 活性低于 NC-siRNA 组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); NC-siRNA+虾青素组 NO 浓度、MDA 含量低于 NC-siRNA 组和 Nrf2-siRNA+虾青素组, SOD、GSH 活性高于 NC-siRNA 组和 Nrf2-siRNA+虾青素组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); Nrf2-siRNA+虾青素组细胞 NO 浓度、SOD 和 GSH 活性及 MDA 含量与 Nrf2-siRNA 组比较, 差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。结论 虾青素能提高晶状体上皮细胞抗 H₂O₂ 诱导的氧化应激损伤能力, 其作用可能是通过活化 Nrf2 相关信号通路而实现的。

【关键词】 晶状体上皮细胞; 虾青素; 氧化应激; Nrf2 信号通路

基金项目: 湖北省卫计委科研立项项目 (WJ2015MB257)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200624-00448

Inhibitory effect of astaxanthin on oxidative stress damage in lens epithelial cells and its mechanismLi Yong¹, Liu Zhaochen², Peng Huacong³¹Xiaogan Aier Eye Hospital, Xiaogan 432000, China; ²Department of Ophthalmology, Xiaogan Central Hospital, Xiaogan 432000, China; ³Wuhan Aige Eye Hospital, Wuhan 430019, China

Corresponding author: Liu Zhaochen, Email: jrzc_2088@163.com

[Abstract] **Objective** To investigate the regulatory effect of astaxanthin on oxidative stress injury induced by hydrogen peroxide (H_2O_2) in lens epithelial cells and its possible mechanism. **Methods** The HLEB-3 cells were cultured with different concentrations (0, 50, 100, 200, 500, 750 $\mu\text{mol/L}$) of H_2O_2 . The cell inhibition rate was detected by the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method, and the 50% inhibiting concentration (IC50) was calculated. HLEB-3 cells were cultured with different concentrations (0, 5, 10, 20, 50 $\mu\text{mol/L}$) of astaxanthin. The cell survival rate was detected by the MTT method. HLEB-3 cells were divided into four groups for 24-hour culture, namely normal control group cultured with complete medium, oxidative stress group cultured with 250 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 , 10 $\mu\text{mol/L}$ astaxanthin group cultured with 10 $\mu\text{mol/L}$ astaxanthin and 250 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 , and 20 $\mu\text{mol/L}$ astaxanthin group cultured with 20 $\mu\text{mol/L}$ astaxanthin and 250 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 . The cell apoptosis rate was determined by flow cytometry. The nitric oxide (NO) concentration, superoxide dismutase (SOD) activity, glutathione (GSH) activity and malondialdehyde (MDA) content were detected by ELISA. The protein expressions of nuclear factor erythroid-2 related factor 2 (Nrf2) in nuclei, cytoplasmic Nrf2, heme oxygenase-1 (HO-1) and NAD(P)H, quinone oxidoreductase 1 (NQO1) were detected by Western blot. The cells were divided into four groups, namely normal control-small interfering RNA (NC-siRNA) group, Nrf2-siRNA group, NC-siRNA + astaxanthin group and Nrf2-siRNA+astaxanthin group. The cells were transfected with NC-siRNA or Nrf2-siRNA accordingly. The cells were co-cultured for 24 hours with 0/10 $\mu\text{mol/L}$ astaxanthin and 250 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 24 hours after transfection, respectively. The cell apoptosis rate was determined by flow cytometry. The NO concentration, SOD activity, GSH activity and MDA content were detected by ELISA. **Results** With the increase of H_2O_2 concentration, the inhibition rate of HLEB-3 cells increased. There were significant differences in the inhibition rate of HLEB-3 cells treated with different concentrations of H_2O_2 ($F=12.358, P<0.05$). The IC50 value of H_2O_2 on HLEB-3 cells was 264.20 $\mu\text{mol/L}$. The survival rates of HLEB-3 cells treated with 0, 5, 10, 20 and 50 $\mu\text{mol/L}$ astaxanthin were (100.00 \pm 0.00)%, (102.20 \pm 1.34)%, (109.50 \pm 3.60)%, (115.40 \pm 4.13)%, (93.60 \pm 2.59)%, respectively. Then 10 $\mu\text{mol/L}$ and 20 $\mu\text{mol/L}$ were chosen as the experimental dose. The cell apoptosis rate of oxidative stress group was (38.50 \pm 2.38)%, which was higher than (9.20 \pm 0.24)% of normal control group, with a statistically significant difference ($P<0.05$). The cell apoptosis rate of 10 $\mu\text{mol/L}$ astaxanthin group was (27.60 \pm 4.33)%, which was lower than (38.50 \pm 2.38)% of oxidative stress group, but higher than (14.90 \pm 1.23)% of 20 $\mu\text{mol/L}$ astaxanthin group and (9.20 \pm 0.24)% of normal control group, showing statistically significant differences (all at $P<0.05$). The NO and MDA contents were higher and the SOD and GSH concentrations were lower in oxidative stress group than in normal control group, 10 $\mu\text{mol/L}$ astaxanthin group and 20 $\mu\text{mol/L}$ astaxanthin group, and the differences were statistically significant (all at $P<0.05$). The NO and MDA contents were higher and the SOD and GSH concentrations were lower in 10 $\mu\text{mol/L}$ astaxanthin group than in normal control group and 20 $\mu\text{mol/L}$ astaxanthin groups, and the differences were statistically significant (all at $P<0.05$). There were significant differences in the relative expression levels of nuclear Nrf2, cytoplasmic Nrf2, HO-1 and NQO1 proteins among normal control group, oxidative stress group, 10 $\mu\text{mol/L}$ astaxanthin group and 20 $\mu\text{mol/L}$ astaxanthin group ($F=43.512, 20.381, 31.014, 23.435$; all at $P<0.001$). The relative expression of nuclear Nrf2 protein gradually decreased, and the relative expression of nuclear Nrf2, HO-1 and NQO1 proteins increased gradually in normal control group, oxidative stress group, 10 $\mu\text{mol/L}$ astaxanthin group and 20 $\mu\text{mol/L}$ astaxanthin group, and there were significant differences when compared in pairs (all at $P<0.05$). The apoptosis rates of Nrf2-siRNA group and Nrf2-siRNA + astaxanthin group were higher than those of NC-siRNA group and NC-siRNA + astaxanthin group, and the differences were statistically significant (all at $P<0.05$). The cell apoptosis rate was higher in NC-siRNA group than in NC-siRNA + astaxanthin group, showing a statistically significant difference ($P<0.05$). There was no significant difference in the apoptosis rate between Nrf2-siRNA + astaxanthin group and Nrf2-siRNA group ($P>0.05$). The NO and MDA concentrations were higher and the SOD and GSH activities were lower in Nrf2-siRNA group than in the NC-siRNA group, with statistically significant differences (all at $P<0.05$). The NO and MDA concentrations were

lower and the SOD and GSH activities were higher in NC-siRNA+astaxanthin group than in NC-siRNA group and Nrf2-siRNA+astaxanthin group, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.05$). There was no significant difference in NO and MDA concentrations or the SOD and GSH activities between Nrf2-siRNA+astaxanthin group and Nrf2-siRNA group (all at $P > 0.05$). **Conclusions** Astaxanthin enhances the resistance of lens epithelial cells to H_2O_2 -induced oxidative stress damage, which may be achieved by activating the Nrf2-related signaling pathway.

[Key words] Lens epithelial cells; Astaxanthin; Oxidative stress; Nrf2 signaling pathway

Fund program: Hubei Health and Family Planning Commission Scientific Research Projects (WJ2015MB257)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200624-00448

白内障是一种由氧化损伤、钙紊乱、年龄、遗传等多种因素诱发的致盲眼病,其表现为晶状体混浊。晶状体的透明性和正常功能依赖晶状体上皮细胞数量、结构和功能的完整性^[1]。研究证实,高浓度过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)是导致晶状体上皮细胞凋亡的重要因素之一,氧化应激所产生的一系列产物使晶状体上皮细胞的通透性、蛋白构象发生改变,其生理功能也随之改变,从而导致晶状体混浊^[2-3]。因此提高晶状体上皮细胞的抗氧化应激能力有助于预防和控制白内障。虾青素是叶黄素家族的一种,广泛存在于海洋动物、藻类及少数陆生植物体内^[4]。研究证实,虾青素有强大的抗氧化能力,能有效清除氧自由基,抑制氧化应激损伤^[5-6]。核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid-2 related factor 2, Nrf2) 与氧化应激密切相关,参与白内障形成^[7],通过抑制 Nrf2 信号通路可预防糖尿病大鼠白内障进展^[8]。有报道,虾青素对糖尿病性白内障模型大鼠晶状体氧化应激损伤有缓解作用,也能减少紫外线诱发的晶状体上皮细胞凋亡^[9-10]。Li 等^[11]研究证实,虾青素能通过调控 Nrf2/Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1 (Kelch-like epichlorohydrin-associated protein 1, Keap1) 通路抵抗赭曲霉毒素 A 诱发的小鼠肾脏氧化应激损伤;闫孟利等^[12]证实,虾青素能通过激活 Nrf2 通路从而抑制 H_2O_2 诱导的 Hela 细胞凋亡;Kubo 等^[13]报道虾青素刺激 Nrf2 通路防止氧化应激损伤,改善吸烟所致的小鼠肺气肿。以上研究提示虾青素能通过刺激 Nrf2 信号通路活性缓解多种细胞的氧化应激损伤,但虾青素对于晶状体上皮细胞氧化应激损伤的作用机制尚鲜有报道。基于此,本研究拟探索虾青素对 H_2O_2 诱导人晶状体上皮细胞氧化应激损伤的调控作用及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 永生型人晶状体上皮细胞系 (HLEB-3) 购自中国科学院上海细胞库。

1.1.2 主要试剂及仪器 膜联蛋白 V/碘化丙啶 (Annexin V FITC/PI) 凋亡试剂盒 (德国美天旎公司); 兔抗人 Nrf2 一抗 (710574)、兔抗人血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 一抗 (PA5-77833)、兔抗人醌氧化还原酶 1 [NAD (P) H, quinone oxidoreductase 1, NQO1] 一抗 (39-3700)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 和 H3 抗体 (美国 Invitrogen 公司); 山羊抗兔 IgG 二抗 (ab205719)、BCA 蛋白定量检测试剂盒、DEME/F12 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (英国 Abcam 公司); 一氧化氮 (NO)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司)。CytoFLEX 流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司); Multiskan GO 酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); DYCP-31DN 电泳仪 (北京六一生物科技有限公司); Tanon Fine Do X6 全自动化学发光图像分析系统 (上海天能科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将冻存的 HLEB-3 细胞解冻、复苏,重悬于含体积分数 10% FBS 和青霉素双抗的 DMEM 培养基中,于 37 °C、体积分数 5% CO_2 培养箱中培养,待细胞融合达到 80% 左右时进行传代。

1.2.2 噻唑蓝法检测不同浓度 H_2O_2 处理细胞的抑制率 取对数期 HLEB-3 细胞,按 5×10^4 个/ml 接种于 96 孔板,待细胞贴壁后更换为含 0、50、100、200、500、750 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 的新鲜完全培养液,每个浓度设置 6 个复孔,继续培养 24 h。每孔加入 20 μl 新配制的噻唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 溶液 (5 mg/mL),继续培养 4 h,弃上清液,每孔加入 150 μl Formazan 溶解液,将 96 孔板置于酶标仪中,检测 480 nm 波长处的吸光度 (absorbance, A) 值,取 6 个孔 A 值的平均值,计算不同浓度 H_2O_2 处理细胞的抑制率,细胞抑制率 = $(1 - \text{各浓度 } H_2O_2 \text{ 处理组 } A \text{ 值}) /$

0 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 组 A 值 $\times 100\%$ 。Graphpad 软件计算细胞的半数抑制浓度 (50% inhibiting concentration, IC50)。

1.2.3 MTT 法检测不同浓度虾青素处理细胞的存活率 将对数期 HLEB-3 细胞接种于 96 孔板, 分别加入 0.5、10、20 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 虾青素, 继续培养 24 h。参照 1.2.2 部分方法检测各组细胞的存活率, 细胞存活率 = 各浓度虾青素组 A 值 / 0 $\mu\text{mol/L}$ 虾青素处理组 A 值 $\times 100\%$ 。

1.2.4 细胞分组和处理 将细胞按 5×10^4 个/ml 接种于 96 孔板中, 分为正常对照组、氧化应激组、10 $\mu\text{mol/L}$ 虾青素组和 20 $\mu\text{mol/L}$ 虾青素组。其中氧化应激组细胞培养于含 250 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 的完全培养基中, 10 $\mu\text{mol/L}$ 虾青素组和 20 $\mu\text{mol/L}$ 虾青素组在氧化应激组条件下分别添加终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 的虾青素, 正常对照组用完全培养基培养。培养 24 h 后进行后续实验。

1.2.5 流式细胞仪检测各组细胞凋亡率 取各组细胞, 胰蛋白酶消化, 预冷磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤 2 次, 离心半径 3 cm 1 000 r/min 离心 10 min 后重悬于 200 μl Binding Buffer 中, 加入 5 μl Annexin V-FITC 混匀, 冰浴条件下避光反应 15 min, 继续加入 300 μl Binding Buffer, 加入 5 μl PI 后 1 h 内流式细胞仪上样检测细胞凋亡率。左下象限为活细胞, 左上象限为死亡细胞, 右上象限为晚期凋亡细胞, 右下象限为早期凋亡细胞。细胞凋亡率 = 早期凋亡率 + 晚期凋亡率。实验独立重复 3 次。

1.2.6 ELISA 法检测各组细胞氧化应激指标

(1) SOD 活性检测 收集细胞, 吸净培养液, PBS 洗涤, 加入 SOD 样品制备液, 吹打裂解细胞, 离心半径 10 cm, 12 000 r/min 离心 3 min, 取上清作为待测样品。BCA 试剂盒测定样品的蛋白浓度, 使用试剂盒中提供的检测缓冲液稀释样品, 参照试剂盒说明书配制酶工作液, 设置样品孔 (待测样品、酶工作液、反应启动工作液)、空白对照 1 孔 (检测缓冲液、酶工作液、反应启动工作液)、空白对照 2 孔 (检测缓冲液、酶工作液) 和空白对照 3 孔 (待测样品、检测缓冲液、酶工作液), 各孔 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 使用酶标仪在 450 nm 处测定 A 值。抑制百分率 = $[(A_{\text{空白对照}1} - A_{\text{空白对照}2}) - (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白对照}3})] / (A_{\text{空白对照}1} - A_{\text{空白对照}2}) \times 100\%$, 待测样品中 SOD 酶活力单位 = 抑制百分率 / (1 - 抑制百分率)。**(2) MDA 含量检测** 取各组裂解细胞上清液, 根据试剂盒说明书配制工作液, 将待测样本或标准品与试剂混匀, 以裂解液作为空白对照, 95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴

40 min, 流水冷却, 离心半径 3 cm, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 采用酶标仪检测 530 nm 波长处 A 值。

MDA 含量 = (样本 A 值 - 空白对照 A 值) / (标准品 A 值 - 空白对照 A 值) \times 标准品浓度 $\times 2$ / 待测样本浓度。

(3) NO 浓度检测 取各组裂解细胞上清液, 在 96 孔板加入标准品及样品, 在各孔中加入置于室温的 Griess Reagent I 和 Griess Reagent II, 采用酶标仪测量 540 nm 波长处 A 值。NO 浓度 = (样品 A 值 - 标准品 A 值) / 标准曲线斜率。**(4) GSH 活性检测** 取各组裂解细胞上清液, 按照说明书将试剂与待测样本混合均匀, 离心半径 3 cm, 4 000 r/min 离心 10 min, 每管取 1 ml 上清液, 进行显色反应; 另按照说明书要求配制试剂, 并将试剂与待测样本混合均匀, 室温孵育 15 min, 于酶标仪 412 nm 处检测 A 值, GSH 活性 = $(A_{\text{非酶管}} - A_{\text{酶管}}) / (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \times$ 标准管浓度 \times 稀释倍数 \times 样本稀释倍数。每个实验结果独立重复 3 次。

1.2.7 Western bolt 法检测细胞内 Nrf2 信号通路相关蛋白表达 收集各组细胞, 加入 RIPA 裂解液, 冰上裂解 30 min, 离心半径 3 cm, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液即为细胞质蛋白; 收集沉淀, 加入 200 μl 核蛋白提取剂, 高速涡旋 30 s, 离心半径 3 cm, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液即为核蛋白。按照 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度。取细胞质蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳并转印至 PVDF 膜上, 用质量分数 0.5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 h, TBST 充分洗涤后分别加入 Nrf2 (1 : 1 000)、HO-1 (1 : 500)、NQO1 (1 : 1 000)、GAPDH (1 : 2 000) 一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min, 加入相应二抗 (1 : 5 000), 室温下孵育 1 h; TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min, 化学发光试剂 (electrochemiluminescence, ECL) 显色, 采用 Image J 软件分析蛋白灰度。取核蛋白, 加入 Nrf2 (1 : 1 000)、H3 (1 : 2 000) 一抗, 检测 Nrf2 蛋白表达, 步骤同上。细胞质蛋白以 GAPDH 为内参, 细胞核蛋白以 H3 为内参, 计算各目的蛋白相对表达量。每组实验独立重复 3 次。

1.2.8 细胞转染和分组 取对数期 HLEB-3 细胞按 1×10^6 个/ml 接种于 6 孔板内, 分别将 5 μg Nrf2-小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) (序列为 5'-GCTTAGGCTTAGGCTTAGGC-3') 或正常对照-siRNA (normal control-siRNA, NC-siRNA) (上海吉玛制药技术有限公司合成) 加入 6 μl Tuebofect 和 200 μl 不含 FBS 的 DMEM 混合液中, 混合均匀后加入 6 孔板内, 于细胞培养箱中培养 24 h。将转染后细胞分为 NC-siRNA 组、Nrf2-siRNA 组、NC-siRNA + 虾青素组、

Nrf2-siRNA + 虾青素组, 其中 NC-siRNA 组和 Nrf2-siRNA 组培养于含终浓度 250 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 的培养基中, NC-siRNA+虾青素组和 Nrf2-siRNA+虾青素组细胞分别培养于含终浓度 10 $\mu\text{mol/L}$ 虾青素和 250 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 的培养基。培养 24 h 后采用流式细胞仪检测细胞凋亡率, 采用相应试剂盒检测细胞中 NO 浓度、SOD 及 GSH 活性和 MDA 含量。每组实验独立重复 3 次。

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。多组间细胞凋亡率、NO 浓度、MDA 含量、SOD 及 GSH 活性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。采用双尾检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 H_2O_2 处理 HLEB-3 细胞抑制率比较

0、50、100、200、500、750 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 对 HLEB-3 细胞的抑制率分别为 (0.00 \pm 0.00)%、(10.38 \pm 2.01)%、(18.53 \pm 2.25)%、(39.18 \pm 3.49)%、(64.59 \pm 5.42)%、(87.94 \pm 7.43)% , 随着 H_2O_2 浓度的增加, 细胞抑制率随之增加, 不同浓度 H_2O_2 对细胞抑制率总体比较差异有统计学意义 ($F = 12.358, P < 0.05$)。 H_2O_2 对 HLEB-3 细胞的 IC₅₀ 为 264.2 $\mu\text{mol/L}$ (图 1)。

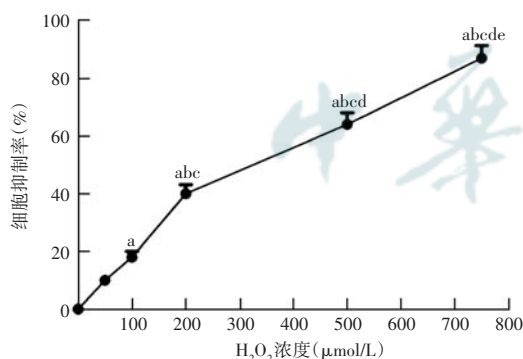


图 1 不同浓度 H_2O_2 处理 HLEB-3 细胞抑制率比较 $F = 12.358, P < 0.05$ 。与 0 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 比较, ^a $P < 0.05$; 与 50 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 比较, ^b $P < 0.05$; 与 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 比较, ^c $P < 0.05$; 与 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 比较, ^d $P < 0.05$; 与 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 比较, ^e $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n = 6$)

Figure 1 Comparison of inhibition rates of different H_2O_2 concentrations on the growth of HLEB-3 cells $F = 12.358, P < 0.05$. Compared with 0 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 , ^a $P < 0.05$; compared with 50 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 , ^b $P < 0.05$; compared with 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 , ^c $P < 0.05$; compared with 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 , ^d $P < 0.05$; compared with 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 , ^e $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test, $n = 6$)

2.2 不同浓度虾青素处理 HLEB-3 细胞存活率比较

0、5、10、20、50 $\mu\text{mol/L}$ 虾青素处理 HLEB-3 细胞后存活率分别为 (100.00 \pm 0.00)%、(102.20 \pm 1.34)%、(109.50 \pm 3.60)%、(115.40 \pm 4.13)%、(93.60 \pm 2.59)% , 提示 5~20 $\mu\text{mol/L}$ 范围内虾青素对 HLEB-3 细胞无毒性作用, 而 50 $\mu\text{mol/L}$ 虾青素对 HLEB-3 细胞有明显毒性, 后续选取 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 虾青素作为实验剂量。

2.3 各组细胞凋亡率比较

正常对照组、氧化应激组、10 $\mu\text{mol/L}$ 虾青素组和 20 $\mu\text{mol/L}$ 虾青素组细胞凋亡率分别为 (9.20 \pm 0.24)%、(38.50 \pm 2.38)%、(27.60 \pm 4.33)% 和 (14.90 \pm 1.23)% , 各组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 18.344, P < 0.001$) , 两两比较差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 2)。

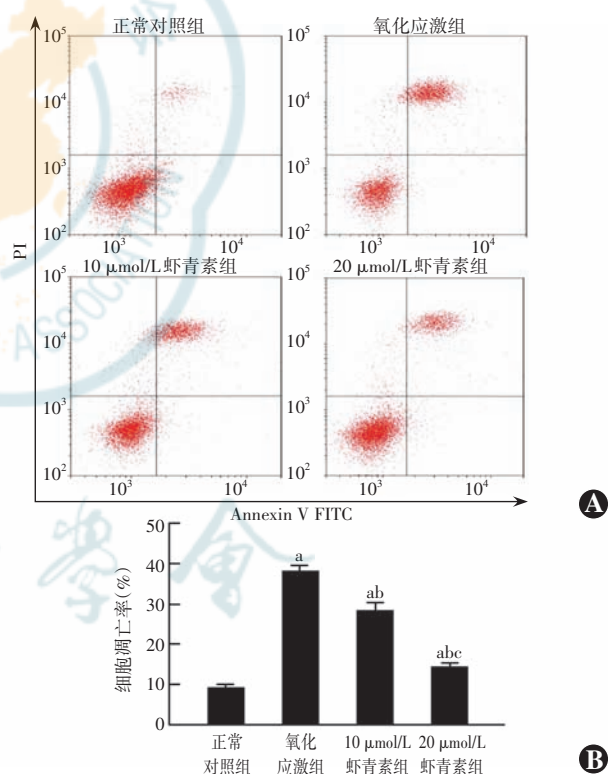


图 2 流式细胞仪检测各组细胞凋亡率 A: 各组细胞凋亡流式细胞图 氧化应激组细胞凋亡率明显高于其他 3 个组 B: 各组细胞凋亡率比较 $F = 18.344, P < 0.001$ 。与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与氧化应激组比较, ^b $P < 0.05$; 与 10 $\mu\text{mol/L}$ 虾青素组比较, ^c $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n = 3$)

Figure 2 Cell apoptosis rate in different groups by flow cytometry

A: Flow cytometry of cell apoptosis The apoptosis rate in oxidative stress group was significantly higher than that in the other three groups **B:** Comparison of apoptosis rate among different groups $F = 18.344, P < 0.001$. Compared with normal control group, ^a $P < 0.05$; compared with oxidative stress group, ^b $P < 0.05$; compared with 10 $\mu\text{mol/L}$ astaxanthin group, ^c $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test, $n = 3$)

2.4 各组细胞氧化应激指标比较

各组 NO 浓度、MDA 含量、GSH 和 SOD 活性总体比较差异均有统计学意义 ($F = 17.024、29.520、33.354、24.052$, 均 $P < 0.001$)。氧化应激组细胞中 NO 浓度、MDA 含量较正常对照组、10 $\mu\text{mol/L}$ 虾青素组和 20 $\mu\text{mol/L}$ 虾青素组升高, SOD、GSH 活性较正常对照组、10 $\mu\text{mol/L}$ 虾青素组和 20 $\mu\text{mol/L}$ 虾青素组降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 10 $\mu\text{mol/L}$ 虾青素组中 NO 浓度、MDA 含量高于 20 $\mu\text{mol/L}$ 虾青素组和正常对照组, GSH、SOD 活性低于 20 $\mu\text{mol/L}$ 虾青素组和正常对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 1)。

2.5 各组细胞 Nrf2 信号通路相关蛋白表达比较

正常对照组、氧化应激组、10 $\mu\text{mol/L}$ 虾青素组和 20 $\mu\text{mol/L}$ 虾青素组细胞质 Nrf2 蛋白条带灰度逐渐减弱, 细胞核 Nrf2 和细胞质中 HO-1 及 NQO1 蛋白条带灰度逐渐增强 (图 3)。各组间细胞核 Nrf2、细胞质 Nrf2、HO-1 和 NQO1 蛋白相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义 ($F = 43.512、20.381、31.014、23.435$, 均 $P < 0.001$); 各组间各蛋白相对表达量两两比较差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 2)。

2.6 各转染组细胞凋亡率比较

NC-siRNA 组、Nrf2-siRNA 组、NC-siRNA + 虾青素组、Nrf2-siRNA + 虾青素组细胞凋亡率分别为 (37.50 ± 2.31)%、(48.30 ± 3.25)%、(25.60 ± 1.38)% 和 (52.30 ± 4.11)% , 总体比较差异有统计学意义 ($F = 12.946, P < 0.001$), 其中 Nrf2-siRNA 组和 Nrf2-siRNA + 虾青素组细胞凋亡率高于 NC-siRNA 组和 NC-siRNA + 虾青素组, NC-siRNA 组细胞凋亡率高于 NC-siRNA + 虾青素组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); Nrf2-siRNA + 虾青素组与 Nrf2-siRNA 组细胞凋亡率差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 4)。

2.7 各转染组细胞氧化应激反应指标比较

各组 NO 浓度、MDA 含量、GSH 和 SOD 活性总体比较差异均有统计学意义 ($F = 5.021、10.341、9.367、16.588$, 均 $P < 0.001$), 其中 Nrf2-siRNA 组细胞 NO 浓度、MDA 含量高于 NC-siRNA 组, SOD、GSH 活性低于

NC-siRNA 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); NC-siRNA + 虾青素组 NO 浓度、MDA 含量低于 NC-siRNA 组和 Nrf2-siRNA + 虾青素组, SOD、GSH 活性高于 NC-siRNA 组和 Nrf2-siRNA + 虾青素组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); Nrf2-siRNA + 虾青素组与 Nrf2-siRNA 组细胞 NO 浓度、SOD 和 GSH 活性及 MDA 含量比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (表 3)。

表 1 各组细胞中 NO、MDA、SOD、GSH 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of NO, MDA, SOD and GSH contents among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	NO ($\mu\text{mol/L}$)	MDA (nmol/L)	GSH (U/g)	SOD (U/mg)
正常对照组	3	2.01 ± 0.09	1.42 ± 0.02	6.48 ± 0.25	18.52 ± 2.05
氧化应激组	3	6.32 ± 0.25 ^a	5.68 ± 0.26 ^a	2.33 ± 0.08 ^a	5.63 ± 1.67 ^a
10 $\mu\text{mol/L}$ 虾青素组	3	4.28 ± 0.11 ^{ab}	3.82 ± 0.13 ^{ab}	3.96 ± 0.06 ^{ab}	10.33 ± 1.51 ^{ab}
20 $\mu\text{mol/L}$ 虾青素组	3	2.81 ± 0.04 ^{abc}	2.11 ± 0.02 ^{abc}	5.45 ± 0.03 ^{abc}	15.85 ± 2.02 ^{abc}
F 值		17.024	29.520	33.354	24.052
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$;与氧化应激组比较, ^b $P < 0.05$;与 10 $\mu\text{mol/L}$ 虾青素组比较, ^c $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) NO:一氧化氮;MDA:丙二醛;GSH:谷胱甘肽过氧化物酶;SOD:超氧化物歧化酶

Note: Compared with normal control group, ^a $P < 0.05$; compared with oxidative stress group; ^b $P < 0.05$, compared with 10 $\mu\text{mol/L}$ astaxanthin group; ^c $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) NO: nitric oxide; MDA: malondialdehyde; GSH: glutathione peroxidase; SOD: superoxide dismutase

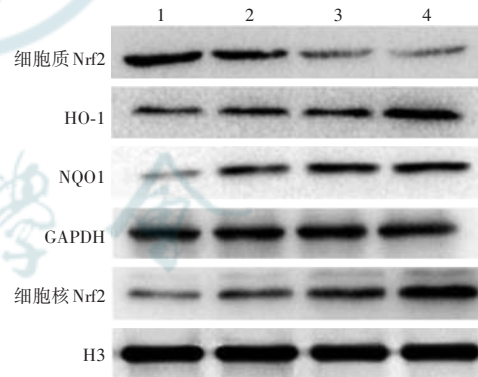


图 3 各组 HLEB-3 细胞中细胞核 Nrf2 及细胞质 Nrf2、HO-1 和 NQO1 蛋白表达电泳图 正常对照组细胞质 Nrf2 蛋白条带灰度强于其他组, 细胞核 Nrf2、HO-1 和 NQO1 蛋白条带灰度弱于其他组
1: 正常对照组; 2: 氧化应激组; 3: 10 $\mu\text{mol/L}$ 虾青素组; 4: 20 $\mu\text{mol/L}$ 虾青素组 Nrf2: 核因子 E2 相关因子 2; HO-1: 血红素加氧酶-1; NQO1: 醌氧化还原酶

Figure 3 Electrophoretogram of nuclear Nrf2, cytoplasmic Nrf2, HO-1 and NQO1 protein expressions in HLEB-3 cells Nrf2 protein band in the cytoplasm was stronger and the grayscale of Nrf2, HO-1 and NQO1 protein bands in the nucleus was lower in normal control group than in other three groups 1: normal control group; 2: oxidative stress group; 3: 10 $\mu\text{mol/L}$ astaxanthin group; 4: 20 $\mu\text{mol/L}$ astaxanthin group Nrf2: nuclear factor E2 related factor 2; HO-1: heme oxygenase-1; NQO1: NAD (P) H, quinine oxidoreductase 1

表 2 各组 HLEB-3 细胞中 Nrf2 信号通路相关蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of expression levels of Nrf2 signaling pathway-related proteins in HLEB-3 cells among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	细胞质 Nrf2	细胞核 Nrf2	HO-1	NQO1
正常对照组	3	1.03±0.17	0.23±0.08	0.48±0.06	0.11±0.02
氧化应激组	3	0.83±0.10 ^a	0.42±0.08 ^a	0.59±0.04 ^a	0.52±0.05 ^a
10 μmol/L 虾青素组	3	0.46±0.04 ^{ab}	0.60±0.10 ^{ab}	0.71±0.11 ^{ab}	0.82±0.10 ^{ab}
20 μmol/L 虾青素组	3	0.33±0.06 ^{abc}	0.88±0.12 ^{abc}	0.92±0.12 ^{abc}	1.03±0.13 ^{abc}
F 值		20.381	43.512	31.014	23.435
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与氧化应激组比较,^b $P < 0.05$;与 10 μmol/L 虾青素组比较,^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;HO-1:血红素加氧酶-1;NQO1:醌氧化还原酶

Note: Compared with normal control group, ^a $P < 0.05$; compared with oxidative stress group, ^b $P < 0.05$; compared with 10 μmol/L astaxanthin group, ^c $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) Nrf2: nuclear factor E2 related factor 2; HO-1: heme oxygenase-1; NQO1: NAD (P) H, quinine oxidoreductase 1

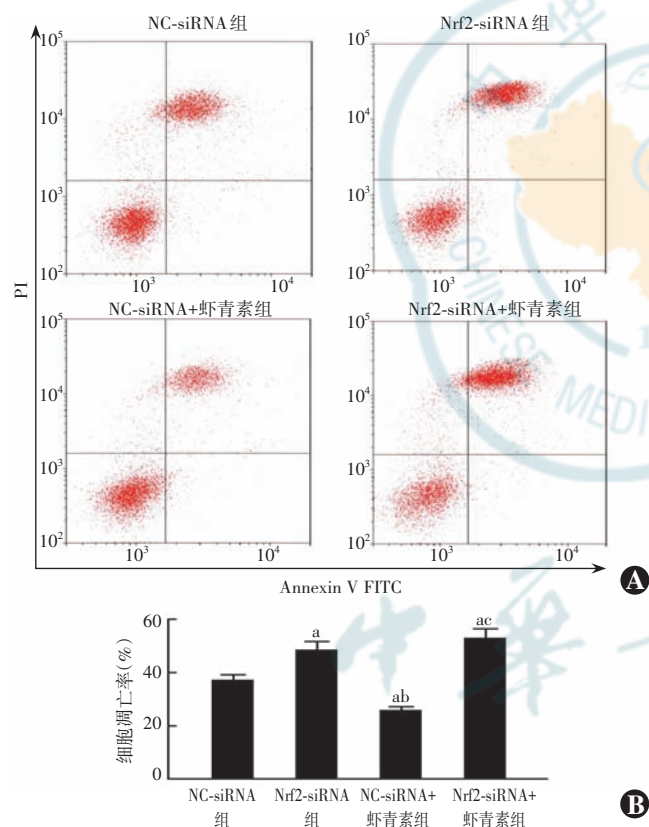


图 4 流式细胞仪检测各转染组细胞凋亡率 A: 各组细胞凋亡流式细胞图 Nrf2-siRNA 组和 Nrf2-siRNA+虾青素组细胞凋亡率高于其他组 B: 各组细胞凋亡率比较 $F = 12.946, P < 0.001$. 与 NC-siRNA 组比较,^a $P < 0.05$;与 Nrf2-siRNA 组比较,^b $P < 0.05$;与 NC-siRNA+虾青素组比较,^c $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验, $n = 3$)

Figure 4 Cell apoptosis rate in different transfection groups by flow cytometry A: Flow cytometry of cell apoptosis Apoptosis rates were higher in Nrf2-siRNA and Nrf2-siRNA+astaxanthin groups than in other groups B: Comparison of apoptosis rate among different groups $F = 12.946, P < 0.001$. Compared with NC-siRNA group, ^a $P < 0.05$; compared with Nrf2-siRNA group, ^b $P < 0.05$; compared with NC-siRNA+astaxanthin group, ^c $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test, $n = 3$)

3 讨论

生理条件下,人晶状体内存在一定数量的自由基,同时也存在过氧化氢酶、SOD、GSH 等一系列活性氧组成的抗氧化体系,使晶状体内活性氧自由基的产生和清除保持动态平衡。在外界诱因刺激下,晶状体内自由基生成增多,抗氧化体系受到抑制,可引发晶状体上皮细胞发生氧化应激损伤,诱发白内障^[14-15]。白内障患者房水中 H₂O₂ 浓度升高是介导早期晶状体氧化应激损伤的主要因素之一^[16]。虾青素作为类胡萝卜素的一类强抗氧化剂,已被证实对白内障动物模型和晶状体上皮细胞有调控作用。Yang 等^[17]研究证实,虾青素能通过降低氧化损伤而延缓 1 型糖尿病大鼠代谢性白内障的发生和发展;Ishikawa 等^[18]证实,在糖皮质激素诱导的鸡胚胎代谢性白内障中,虾青素能阻止 GSH 的氧化,维持还原电位。本研究结果显示, H₂O₂ 能诱导 HLEB-3 细胞 NO 浓度、MDA 含量升高,而抑制 SOD、GSH 等抗氧化酶的活性,使细胞发生氧化损伤,继而诱发凋亡和抑制生长,而虾青素能逆转 H₂O₂ 诱导的氧化损伤,抑制细胞凋亡。

表 3 氧化应激条件下各组 HLEB-3 细胞中 NO、MDA、SOD、GSH 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Comparison of NO, MDA, SOD, GSH contents in HLEB-3 cells among various groups under different oxidative stress conditions ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	NO (μmol/L)	MDA (nmol/L)	GSH (U/g)	SOD (U/mg)
NC-siRNA 组	3	6.49±0.21	6.01±0.15	2.18±0.11	5.44±0.85
Nrf2-siRNA 组	3	8.56±0.38 ^a	7.91±0.22 ^a	1.02±0.03 ^a	3.04±0.52 ^a
NC-siRNA+虾青素组	3	4.33±0.11 ^{ab}	4.03±0.26 ^{ab}	3.88±0.14 ^{ab}	11.21±1.34 ^{ab}
Nrf2-siRNA+虾青素组	3	8.81±0.24 ^{ac}	7.52±0.16 ^{ac}	1.25±0.06 ^{ac}	3.12±0.11 ^{ac}
F 值		5.021	10.341	9.367	16.588
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 NC-siRNA 组比较,^a $P < 0.05$;与 Nrf2-siRNA 组比较,^b $P < 0.05$;与 NC-siRNA+虾青素组比较,^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;SOD:超氧化物歧化酶;GSH:谷胱甘肽过氧化物酶;MDA:丙二醛

Note: Compared with NC-siRNA group, ^a $P < 0.05$; compared with Nrf2-siRNA group, ^b $P < 0.05$; compared with NC-siRNA+astaxanthin group, ^c $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) Nrf2: nuclear factor E2 related factor 2; SOD: superoxide dismutase; GSH: glutathione peroxidase; MDA: malondialdehyde

Nrf2 广泛表达于机体的各个组织,是重要的氧化还原敏感性转录因子,对缓解氧化应激损伤有重要作用。生理状态下, Nrf2 被胞浆蛋白 Keap1 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1 锚定,以非活性的复合物形式存

在于细胞质中;氧化应激状态下,Nrf2 被激活,与 Keap1 解离,转位进入细胞核内,与 DNA 上一段特异序列抗氧化反应原件结合,介导其下游 II 相解毒酶和抗氧化酶基因的转录活性,如 HO-1、NQO1,增强细胞清除活性氧自由基的能力,降低氧化应激对细胞、组织的损伤^[19]。朱丽华等^[20]研究证实,Nrf2 在人晶状体上皮细胞中的表达及核易位能增加抗氧化酶和抗凋亡蛋白的含量,降低促凋亡蛋白的含量,从而起到抗氧化损伤和抗凋亡的作用。本研究发现,在外源性 H₂O₂ 的刺激下,HLEB-3 细胞中 Nrf2 发生明显的核转移,且下游 HO-1、NQO1 蛋白表达增加;同时,沉默 Nrf2 基因后,HLEB-3 细胞的 NO 浓度和 MDA 含量上调,而抗氧化酶 SOD 和 GSH 活性下调,细胞凋亡率升高。这一结果提示氧化应激状态下 Nrf2 在 HLEB-3 细胞内发生核转移并活化。在 H₂O₂ 诱发的氧化应激环境下,虾青素能刺激 HLEB-3 细胞发生 Nrf2 的核转移,继而激发 HO-1、NQO1 基因转录,而沉默 Nrf2 的表达后,可逆转虾青素对 HLEB-3 细胞的这些作用,提示虾青素对 H₂O₂ 诱发 HLEB-3 细胞氧化应激引发的细胞凋亡的调控作用可能是通过激活 Nrf2 通路实现的。

综上所述,本研究证实虾青素能提高晶状体上皮细胞抗 H₂O₂ 诱导的氧化应激损伤能力,这一作用可能是通过活化 Nrf2 相关信号通路实现的。本研究参照以往文献并通过预实验仅选取了 2 个不同剂量虾青素进行了研究,未验证更多不同剂量的效果,且尚未进行在体动物实验验证,未来仍需纳入更多虾青素剂量及开展在体动物实验进一步探索。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 李勇:实验设计及操作、论文撰写;刘钊臣:统计分析、研究指导及论文修改;彭华琮:数据整理和分析

参考文献

- [1] 王勇,管怀进. DNA 甲基化在晶状体发育及白内障中的研究进展[J]. 中华实验眼科杂志,2017,35(8):747-751. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.08.017.
- [2] 车选义,赵清侠,李迪. 硫氧还蛋白-2 在氧化损伤的人晶状体上皮细胞中的表达及其意义[J]. 中南大学学报:医学版,2018,43(3):253-259. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2018.03.004.
- [3] Zhao WJ, Yan YB. Increasing susceptibility to oxidative stress by cataract-causing crystallin mutations[J]. Int J Biol Macromol, 2018, 108:665-673. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2017.12.013.
- [4] 董宝莲,郭玲. 虾青素的研究进展[J]. 中国临床药理学杂志,2019,35(8):821-824.
- [5] 林清飞,王华军,林静,等. 虾青素对糖尿病大鼠血管内皮功能的保护作用及机制[J]. 中华高血压杂志,2015,23(6):530-536.

- [6] 王素玲,何路军,何天博,等. 虾青素对红细胞氧化应激及膜过氧化损伤的影响[J]. 中国实验血液学杂志,2015,23(2):552-556. DOI:10.7534/j.issn.1009-2137.2015.02.050.
- [7] Hilliard A, Mendonca P, Russell TD, et al. The protective effects of flavonoids in cataract formation through the activation of Nrf2 and the inhibition of MMP-9[J/OL]. Nutrients, 2020, 12(12):3651[2023-03-28]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33261005. DOI:10.3390/nu12123651.
- [8] Zhang D, Li M. Puerarin prevents cataract development and progression in diabetic rats through Nrf2/HO-1 signaling[J]. Mol Med Rep, 2019, 20(2):1017-1024. DOI:10.3892/mmr.2019.10320.
- [9] 杨明,王志军,邓婷婷,等. 虾青素对 1 型糖尿病大鼠代谢性白内障的预防作用及其机制[J]. 中华实验眼科杂志,2017,35(3):217-224. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.03.007.
- [10] 陈希,胡宝荣,赵文婷,等. 虾青素对紫外线诱导人晶状体上皮细胞氧化损伤的保护作用[J]. 中国医院药学杂志,2014,34(17):1468-1471. DOI:10.13286/j.cnki.chinpharm.2014.17.11.
- [11] Li L, Chen Y, Jiao D, et al. Protective effect of astaxanthin on ochratoxin A-induced kidney injury to mice by regulating oxidative stress-related NRF2/KEAP1 pathway[J/OL]. Molecules, 2020, 25(6):1386[2022-08-06]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32197464. DOI:10.3390/molecules25061386.
- [12] 闫孟利,杨力,刘科. 虾青素抑制 H₂O₂ 诱导的 HeLa 细胞凋亡[J]. 四川大学学报(自然科学版),2019,56(6):1163-1168. DOI:10.3969/j.issn.0490-6756.2019.06.027.
- [13] Kubo H, Asai K, Kojima K, et al. Astaxanthin suppresses cigarette smoke-induced emphysema through Nrf2 activation in mice[J/OL]. Mar Drugs, 2019, 17(12):673[2022-08-12]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31795292. DOI:10.3390/md17120673.
- [14] Liu X, Zhao X, Cheng R, et al. Autophagy attenuates high glucose-induced oxidative injury to lens epithelial cells[J/OL]. Biosci Rep, 2020,40(4):BSR20193006[2022-08-12]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32186721. DOI:10.1042/BSR20193006.
- [15] Singh A, Bodakhe SH. Resveratrol delay the cataract formation against naphthalene-induced experimental cataract in the albino rats[J/OL]. J Biochem Mol Toxicol, 2020, 34(1):e22420[2022-08-12]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31746523. DOI:10.1002/jbt.22420.
- [16] Wang S, Guo C, Yu M, et al. Identification of H₂O₂ induced oxidative stress associated microRNAs in HLE-B3 cells and their clinical relevance to the progression of age-related nuclear cataract[J/OL]. BMC Ophthalmol, 2018, 18(1):93[2022-08-12]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29653565. DOI:10.1186/s12886-018-0766-6.
- [17] Yang M, Chen Y, Zhao T, et al. Effect of astaxanthin on metabolic cataract in rats with type 1 diabetes mellitus[J/OL]. Exp Mol Pathol, 2020,113:104372[2022-08-12]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31923424. DOI:10.1016/j.yexmp.2020.104372.
- [18] Ishikawa S, Hashizume K, Nishigori H, et al. Effect of astaxanthin on cataract formation induced by glucocorticoids in the chick embryo[J]. Curr Eye Res, 2015, 40(5):535-540. DOI:10.3109/02713683.2014.935445.
- [19] Ma TJ, Lan DH, He SZ, et al. Nrf2 protects human lens epithelial cells against H₂O₂-induced oxidative and ER stress; the ATF4 may be involved[J]. Exp Eye Res, 2018, 169:28-37. DOI:10.1016/j.exer.2018.01.018.
- [20] 朱丽华,李佳,李兵. 核因子 E2 相关因子 2 在晶状体上皮细胞抗氧化损伤中的作用[J]. 中国现代医学杂志,2019,29(11):25-30. DOI:10.3969/j.issn.1005-8982.2019.11.005.

(收稿日期:2022-09-30 修回日期:2023-04-09)

(本文编辑:张宇 骆世平)

