

基于 Nrf2 通道研究柚皮素磷脂复合物对氧化损伤 ARPE-19 细胞的保护作用

吉洁¹, 于海涛², 周春刚¹, 唐颖¹, 唐苗苗¹, 周倩倩¹, 徐新荣³

引用: 吉洁, 于海涛, 周春刚, 等. 基于 Nrf2 通道研究柚皮素磷脂复合物对氧化损伤 ARPE-19 细胞的保护作用. 国际眼科杂志 2021;21(7):1156-1161

基金项目: 无锡市卫生和计划生育委员会科研项目 (No. MS201403)

作者单位:¹ (214071) 中国江苏省无锡市中医医院眼科;
² (210029) 中国江苏省南京市, 南京中医药大学药学院;
³ (210029) 中国江苏省南京市, 江苏省中医院眼科

作者简介: 吉洁, 毕业于南京中医药大学, 博士研究生, 主任医师, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 徐新荣, 毕业于南京医科大学, 博士研究生, 主任医师, 研究方向: 眼底病. xinrong_xu@aliyun.com

收稿日期: 2020-06-11 修回日期: 2021-06-03

摘要

目的: 研究柚皮素 (Nar) 及其磷脂复合物 (NPC) 对叔丁基氢过氧化物 (t-BHP) 诱导产生的氧化损伤人视网膜色素上皮细胞 (ARPE-19 细胞) 的保护作用及其作用机制。

方法: 根据文献最佳制作工艺制备 NPC。将体外培养的 ARPE-19 细胞分为溶媒组 (用 DMSO 培养)、模型组 (用 200 μmol/L t-BHP 干预)、Nrf2-siRNA 组 (针对 Nrf2 基因进行细胞转染)、柚皮素组 (200 μmol/L 柚皮素培养基预处理后加入 200 μmol/L t-BHP)、NPC 组 (200 μmol/L NPC 培养基预处理后加入 200 μmol/L t-BHP)、Nrf2-siRNA+柚皮素组 (200 μmol/L 柚皮素预处理后 Nrf2 基因干扰, 再加入 200 μmol/L t-BHP)、Nrf2-siRNA+NPC 组 (200 μmol/L NPC 预处理后 Nrf2 基因干扰, 再加入 200 μmol/L t-BHP)。检测各组细胞内活性氧、丙二醛、超氧化物歧化酶、总抗氧化能力水平, 分别采用 RT-PCR 和 Western blot 法检测各组细胞内血红素加氧酶-1 (HO-1)、醌氧化还原酶-1 (NQO-1)、谷氨酰半胱氨酸连接酶 (GCL) 和核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 的表达水平。

结果: NPC 较柚皮素能明显降低 ARPE-19 细胞内丙二醛、活性氧的含量, 提高细胞内超氧化物歧化酶、总抗氧化能力水平。柚皮素和 NPC 预保护 ARPE-19 细胞后, Nrf2、HO-1、NQO-1 和 GCL mRNA 的相对表达量和蛋白表达水平均较模型组和 Nrf2-siRNA 组升高。柚皮素组与 NPC 组, Nrf2-siRNA+柚皮素组与 Nrf2-siRNA+NPC 组细胞内 4 种基因和蛋白相对表达水平均有差异。Nrf2-siRNA+柚皮素组与 Nrf2-siRNA 组 Nrf2、HO-1、NQO-1 蛋白表达无显著差异。Nrf2-siRNA+NPC 组与 Nrf2-siRNA 组 4 种蛋白表达均有差异, NPC 作用明显强于柚皮素。

结论: 柚皮素磷脂复合物能明显提高细胞内抗氧化能力, 降低氧化水平, 其通过激活 Nrf2/ARE 抗氧化应激通路上调 Nrf2 及其下游抗氧化酶和 II 相解毒酶的表达对氧化损

伤的 ARPE-19 细胞起到更好的保护作用。

关键词: 柚皮素; 磷脂复合物; 人视网膜色素上皮细胞; 氧化损伤; 核因子 E2 相关因子 2

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2021.7.04

Protective effects of naringin phospholipid complex on oxidative injury in ARPE-19 cells associated with activation of Nrf2 pathway

Jie Ji¹, Hai-Tao Yu², Chun-Gang Zhou¹, Ying Tang¹, Miao-Miao Tang¹, Qian-Qian Zhou¹, Xin-Rong Xu³

Foundation item: Scientific Research Project of Wuxi Municipal Health and Family Planning Commission (No. MS201403)

¹ Department of Ophthalmology, Wuxi Hospital of Chinese Medicine, Wuxi 214071, Jiangsu Province, China; ² School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China; ³ Department of Ophthalmology, Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Xin-Rong Xu. Department of Ophthalmology, Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. xinrong_xu@aliyun.com

Received: 2020-06-11 Accepted: 2021-06-03

Abstract

• AIM: To investigate the protective effects of naringin (Nar) phospholipid complex (NPC) on oxidative injury in retinal pigment epithelium cells (ARPE-19 cells) induced by tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) and elucidate the underlying mechanism.

• METHODS: The NPC was prepared by solvent method. Experimental cells are divided into seven groups: control group [cultured with dimethylsulfoxide (DMSO)], model group (intervention with 200 μmol/L t-BHP), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)-siRNA group (cell transfection for Nrf2 gene), naringin group (add 200 μmol/L t-BHP after pretreatment with 200 μmol/L naringin medium), NPC group (add 200 μmol/L t-BHP after pretreatment with 200 μmol/L NPC medium), Nrf2-siRNA + naringin group (after 200 μmol/L naringin pretreatment, Nrf2 gene interference, then add 200 μmol/L t-BHP) and Nrf2-siRNA + NPC group (after 200 μmol/L NPC pretreatment, Nrf2 gene interference, then add 200 μmol/L t-BHP). The intracellular levels of superoxide

dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and total antioxidant capacity (T-AOC) were detected, intracellular level of reactive oxygen species (ROS) was detected by DCFH-DA staining method. The mRNA and protein expressions of HO-1, NQO-1, GCL and Nrf2 were detected by real-time PCR and western blot, respectively.

• **RESULTS:** NPC more significantly increased the levels of SOD and T-AOC, reduced the contents of ROS and MDA than naringin in t-BHP-treated ARPE-19 cells. After naringin and NPC pre-protected ARPE-19 cells, the relative expression and protein expression of Nrf2, HO-1, NQO-1 and GCL mRNA were higher than those of the model group and Nrf2-siRNA group. There were statistically significant differences in the relative expression of 4 genes and the expression levels of 4 proteins in the naringin group and the NPC group, the Nrf2-siRNA+naringin group and the Nrf2-siRNA+NPC group. The expression of Nrf2, HO-1 and NQO-1 protein in the Nrf2-siRNA+naringin group was not significantly different than that in the Nrf2-siRNA group. Compared with the Nrf2-siRNA group, the expression of 4 proteins in the Nrf2-siRNA+NPC group was statistically significant, and the effect of NPC was significantly stronger than that of naringin.

• **CONCLUSION:** After naringin forms a phospholipid complex, it can significantly increase the antioxidant capacity in cells and reduce the oxidation level. It up-regulates the expression of Nrf2 and its downstream antioxidant enzymes and phase II detoxification enzymes by activating the Nrf2/ARE antioxidative stress pathway to better protect ARPE-19 cells from oxidative damage.

• **KEYWORDS:** naringin; phospholipid complex; ARPE-19 cell; oxidative injury; nuclear factor erythroid 2-related factor 2

Citation: Ji J, Yu HT, Zhou CG, *et al.* Protective effects of naringin phospholipid complex on oxidative injury in ARPE-19 cells associated with activation of Nrf2 pathway. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2021;21(7):1156-1161

0 引言

流行病学调查显示,氧化应激与干性年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, ARMD)密切相关。视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)体系和视网膜光感受器是人体平均耗氧最多的环境之一,对氧化应激非常敏感。干性 ARMD 中,脂褐质及其他代谢产物堆积在 RPE 与脉络膜之间,补体系统及炎症反应被激活,氧化应激反应加速,破坏了正常视网膜内的抗氧化修复系统。RPE 因氧化损伤造成活性氧化产物生成增多是干性 ARMD 发生发展的重要原因^[1]。

核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 是一种重要的氧化还原转录因子,敏感性高,细胞内 II 相解毒酶和抗氧化酶通过其诱导调控表达,使机体的氧化应激状态得到改善,稳定细胞的氧化还原状态,促进细胞存活。当细胞受到活性氧或亲电体的攻击时, Nrf2 从 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1(kelch-like ECH associated protein-1, Keap1) 中解离,迅速进入细胞核与小 Maf 蛋白结合形成异二聚体,再结合抗氧化反应元件

(antioxidant response element, ARE), 转录激活受 Nrf2 调控的抗氧化酶[醌氧化还原酶-1(quinone oxidoreductase-1, NQO-1)、血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)、谷氨酸半胱氨酸连接酶(glutamate-cysteine ligase, GCL)] 基因表达^[2]。Nrf2/ARE 是人体最为重要的抗氧化应激防御性转导通路^[3]。

柚皮素(naringenin, Nar) 是一种二氢黄酮类单体化合物,取自芸香科植物柚,具有抗氧化、抗炎、抗癌、解痉和利胆作用,能够清除活性氧自由基从而减轻氧化应激反应^[4]。为了提高柚皮素的生物利用度,本研究参考文献制备了柚皮素磷脂复合物(naringin phospholipid complex, NPC), 观察其对氧化损伤 ARPE-19 细胞内氧化指标、抗氧化指标含量的影响和对 Nrf2/ARE 抗氧化应激通路中 Nrf2 及其下游抗氧化酶和 II 相解毒酶表达的影响,实验过程及结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 人视网膜色素上皮细胞(ARPE-19 细胞)购自美国模式培养物研究所(ATCC 公司)。

1.1.2 主要实验试剂和仪器 细胞总 RNA 快速提取试剂盒(上海捷瑞生物工程有限公司);逆转录试剂盒(赛默飞世尔公司);PCR 检测试剂盒(天根生化科技有限公司);SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5×)、ECL Plus 发光试剂盒、Western blot 及 PMSF、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、IP 细胞裂解液(碧云天公司);Nrf2、GCL、NQO-1、HO-1 抗体(Abcam, ab62352、ab124827、ab28947、ab13243)。微量加样器(德国 Eppendorf 公司);OD 值测量仪(高精度分光光度计)(Merinton, SMA4000);荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems, ABI StepOne Plus);台式高速冷冻离心机(上海卢湘仪器厂, H1650R);酶标仪 SPECTRA max Plus 384(Molecular Devices 公司);凝胶成像仪、电泳系统(Bio-RAD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 NPC 制备 参考文献[5]中根据单因素试验确定的磷脂复合物最佳制作工艺制备 NPC。将质量比为 1:2 的柚皮素和大豆磷脂溶解于适量乙酸乙酯中,柚皮素质量浓度为 5g/L。反应温度 40℃,恒温搅拌 2h。反应结束后减压后除去乙酸乙酯。洗涤真空干燥 12h 即得到 NPC。研磨后过 100 目筛,放置在干燥器中备用。

1.2.2 细胞转染 按照 Lipofectamine 2000 Reagent 试剂说明书进行细胞转染。将对数期生长的 APRE-19 细胞在转染前 1d 以每孔 3×10^5 个细胞接种入 6 孔板中,放置在完全培养基(10%胎牛血清-RPMI DMEM)中,在 5% CO₂ 饱和度培养箱,恒温 37℃ 过夜培养 20~24h。吸去完全培养基,在 37℃ 下预热 PBS 和无血清 RPMI 1640 培养基,分别用之洗涤细胞。145μL Opti-MEM 培养基中加入 5μL 转染试剂(UUCUCCGAACGUGUCACGUTT),将枪头混合均匀,标为混合物 1。150μL Opti-MEM 培养基中放入 Nrf2-siRNA(GUUUUUCCAGCUCATACUCTT) 7.8μL,轻轻稀释混匀,标为混合物 2。混合物 1 中加入混合物 2,保持室温,静置 20min 使形成 DNA-脂质体复合物。用 Opti-MEM 培养基洗涤细胞 1 次,无血清和抗生素的 RPMI DMEM 培养基 1.7mL 加入到每孔中,300μL 上述混合物再逐滴加入,轻轻混匀后 5% CO₂ 饱和度培养箱 37℃ 培养 48h。

表1 引物序列

基因	F	R
Nrf2	TGAGGTTTCTTCGGCTACGTT	CTTCTGTCTAGTTTGGCTTCTGG
HO-1	CTGGAGGAGGAGATTGAGCG	ATGGCTGGTGTGTAGGGGAT
NQO-1	GCGTCTGGAGACTGTCTGGG	CGGCTGGAATGGACTTGC
GCL	ATCAAACCTTTCATCATCAAC	GATTAACCTCCATCTTCAATAGG
β-actin	CCACACCTTCTACAATGAGC	GGTCTCAAACATGATCTGGG

表2 柚皮素及其磷脂复合物对细胞内氧化应激水平的影响

(n=5, nmol/mg)

组别	MDA	ROS	SOD	T-AOC
溶媒组	1.16±0.06	0.36±0.06	2.55±0.02	3.36±0.07
模型组	3.18±0.10 ^b	2.18±0.10 ^b	0.45±0.03 ^b	1.05±0.07 ^b
Nrf2-siRNA 组	2.61±0.07 ^b	2.17±0.02 ^b	0.75±0.08 ^b	1.21±0.03 ^b
柚皮素组	1.64±0.07 ^{b,d}	1.64±0.07 ^{b,d}	1.66±0.04 ^{b,d}	1.73±0.06 ^{b,d}
NPC 组	1.31±0.04 ^{b,d,f}	1.31±0.04 ^{b,d,f}	1.73±0.06 ^{b,d,e}	2.03±0.09 ^{b,d,f}
Nrf2-siRNA+柚皮素组	2.08±0.03 ^{b,h}	2.08±0.03 ^{b,g}	1.03±0.03 ^{b,h}	1.43±0.05 ^{b,h}
Nrf2-siRNA+NPC 组	1.92±0.07 ^{b,h,j}	1.92±0.07 ^{b,h,j}	1.12±0.03 ^{b,h,i}	1.58±0.12 ^{b,h,j}
F	551.977	560.189	1067.555	536.442
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:^bP<0.01 vs 溶媒组;^dP<0.01 vs 模型组;^eP<0.05, ^fP<0.01 vs 柚皮素组;^gP<0.05, ^hP<0.01 vs Nrf2-siRNA; ⁱP<0.05, ^jP<0.01 vs Nrf2-siRNA+柚皮素组。

1.2.3 模型制备及细胞分组 在无菌培养瓶中接种 ARPE-19 细胞,加入适量 DMEM 培养液后,置于 37℃ 含 5% CO₂ 的培养箱内培养。收集对数期细胞,每孔加入 200μL 培养基。铺板使细胞密度为 4000 个/孔,边缘用无菌 PBS 填充,培养箱内孵育,至细胞单层铺满孔底。将 ARPE-19 细胞分为溶媒组、模型组、Nrf2-siRNA 组、柚皮素组、NPC 组、Nrf2-siRNA+柚皮素组、Nrf2-siRNA+NPC 组。溶媒组:用二甲基亚砜(DMSO)培养,小心吸弃上清液,每孔加入 150μL 二甲基亚砜(DMSO),置摇床上低速振荡 10min,使结晶物溶解;模型组:加入 200μmol/L 叔丁基氢过氧化物(t-BHP)培养基,培养箱内孵育 24h;Nrf2-siRNA 组:针对 Nrf2 基因进行细胞转染;柚皮素组:加入 200μmol/L 柚皮素培养基预处理 24h 后再加入 200μmol/L t-BHP 培养基孵育 24h;NPC 组:加入 200μmol/L NPC 培养基预处理 24h 后再加入 200μmol/L t-BHP 培养基孵育 24h;Nrf2-siRNA+柚皮素组:APRE-19 细胞加入 200μmol/L 柚皮素培养基预处理 24h, Nrf2 基因干扰 6h 后再加入 200μmol/L t-BHP 培养基孵育 24h;Nrf2-siRNA+NPC 组:APRE-19 细胞加入 200μmol/L NPC 培养基预处理 24h, Nrf2 基因干扰 6h 后再加入 200μmol/L t-BHP 培养基孵育 24h。

1.2.4 观察指标

1.2.4.1 细胞内氧化应激水平测定 丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平检测:取适量 10nmol/mg 标准品用蒸馏水稀释至 1、2、5、10、20、50μmol/L,加入 0.1mL 上述不同浓度标准品用于制作标准曲线,加入 0.1mL 各组 APRE-19 细胞用于测定;随后加入 0.2mL MDA 检测工作液,混匀后,100℃ 加热 15min。水浴冷却至室温,1000g 室温离心 10min。取 200μL 上清液加入到 96 孔板中,用酶标仪测定波长 532nm 的吸光度。活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平检测:装载 DCFH-DA 探针于培养基中,工作浓度为 10μmol/L,37℃ 孵育 30min。胰酶消化细胞 2min,加入培养基终止消化,600g 离心 5min 收集各组

ARPE-19 细胞,用预冷的 1×PBS 洗 2 次,离心收集细胞沉淀物,将离心好的细胞用 PBS 重悬,用酶标仪检测 525nm 波长的吸光度。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)水平检测:胰酶消化各组 ARPE-19 细胞 2min,加入培养基终止消化,600g 离心 5min 收集细胞,加入显色剂混匀,室温反应 10min, SOD 酶标仪测 550nm 波长的吸光度, T-AOC 酶标仪测 520nm 波长的吸光度。分别计算 MDA、ROS、SOD、T-AOC 水平。

1.2.4.2 RT-PCR 检测 胰酶消化终止后收集各组细胞,裂解。用氯仿、Trizol、无水乙醇等试剂离心柱法提取总 RNA,计算 RNA 溶液浓度,判断 RNA 提取质量。参照逆转录试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cDNA,根据 RNA OD 值报告的浓度值计算 ddH₂O 量,稀释 RT 产物到一致水平,进行 PCR 扩增。引物序列见表 1。内参基因为 β-actin,按照 2^{-ΔΔCt}法对 mRNA 的表达进行相对定量分析。

1.2.4.3 Western blot 检测 上述细胞用 PBS 洗涤,收集裂解后,于 4℃ 下 12000r/min 离心 10min,转移上清到新的离心管中,-70℃ 保存。BCA 法测定蛋白浓度。10% 分离胶,5% 浓缩胶,加入 5×上样缓冲液混匀,上样量为每泳道 30μg,电泳。转膜、封闭。转移 PVDF 膜到含有一抗(1:1 000)的小袋中,保持 4℃ 孵育过夜后再转移到含二抗(1:5000)的玻璃平皿中,室温下孵育 2h。内参为 β-actin。PVDF 膜表面加 ECL 试剂,以化学光敏模式在凝胶成像分析仪中曝光显影。

统计学分析:采用统计学软件 SPSS 21.0 进行数据分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)描述,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-t 检验。P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 柚皮素及其磷脂复合物对细胞内氧化应激水平的影响 柚皮素、NPC 对细胞内 MDA、ROS、SOD、T-AOC 水平的影响检测结果见表 2。模型组较溶媒组细胞内 MDA、

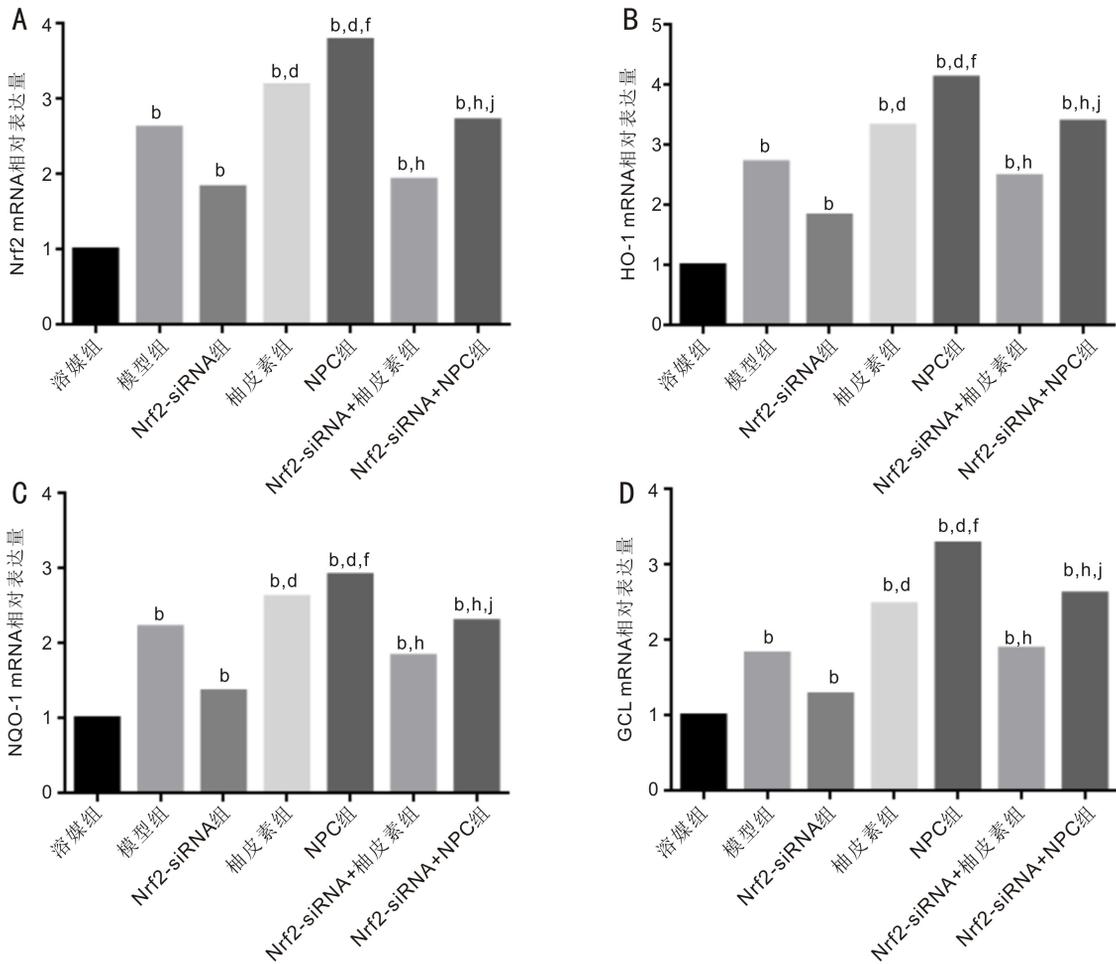


图1 柚皮素及其磷脂复合物对细胞内 Nrf2、HO-1、NQO-1、GCL mRNA 表达的影响 A: Nrf2; B: HO-1; C: NQO-1; D: GCL。^b $P < 0.01$ vs 溶媒组; ^d $P < 0.01$ vs 模型组; ^f $P < 0.01$ vs 柚皮素组; ^h $P < 0.01$ vs Nrf2-siRNA 组; ^j $P < 0.01$ vs Nrf2-siRNA+柚皮素组。

ROS 水平明显提高, SOD、T-AOC 水平明显降低。NPC 组较柚皮素组、Nrf2-siRNA+NPC 组较 Nrf2-siRNA+柚皮素组细胞内 MDA、ROS 水平明显降低, SOD、T-AOC 水平明显提高。

2.2 柚皮素及其磷脂复合物对细胞内 Nrf2、HO-1、NQO-1、GCL mRNA 表达的影响 柚皮素、NPC 对细胞内 Nrf2、HO-1、NQO-1、GCL mRNA 表达的影响检测结果见图 1。各组细胞内 Nrf2、HO-1、NQO-1、GCL mRNA 相对表达量差异均有统计学意义 ($F = 871723.636, 178297.326, 211246.177, 279859.963$, 均 $P < 0.01$)。与溶媒组相比, 其余 6 组细胞内 4 种基因相对表达量差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 柚皮素组和 NPC 组细胞内 4 种基因表达水平差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 与柚皮素组相比, NPC 组细胞内 4 种基因相对表达量差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 与 Nrf2-siRNA 组相比, Nrf2-siRNA+柚皮素组和 Nrf2-siRNA+NPC 组细胞内 4 种基因相对表达量差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 与 Nrf2-siRNA+柚皮素组相比, Nrf2-siRNA+NPC 组细胞内 4 种基因相对表达量差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.3 柚皮素及其磷脂复合物对细胞内 Nrf2、NQO-1、HO-1、GCL 蛋白表达的影响 柚皮素、NPC 对细胞内 Nrf2、NQO-1、HO-1、GCL 蛋白表达的影响检测结果见图 2、3。各组细胞内 Nrf2、HO-1、NQO-1、GCL 蛋白表达量差异均有统计学意义 ($F = 64.852, 123.594, 26.617, 51.759$, 均 $P < 0.01$)。与溶媒组相比, 其余 6 组细胞内 4 种

蛋白表达水平差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 柚皮素组和 NPC 组细胞内 4 种蛋白表达水平差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 与柚皮素组相比, NPC 组细胞内 4 种蛋白表达水平差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 与 Nrf2-siRNA 组相比, Nrf2-siRNA+NPC 组细胞内 4 种蛋白表达水平差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 Nrf2-siRNA 组相比, Nrf2-siRNA+柚皮素组细胞内 GCL 蛋白表达水平差异有统计学意义 ($P = 0.004$), 其余 3 种蛋白表达差异无统计学意义 ($P_{Nrf2} = 0.069, P_{HO-1} = 0.174, P_{NQO-1} = 0.817$); 与 Nrf2-siRNA+柚皮素组相比, Nrf2-siRNA+NPC 组细胞内 4 种蛋白表达水平差异均有统计学意义 ($P_{Nrf2} = 0.009, P_{HO-1} < 0.01, P_{GCL} < 0.01, P_{NQO-1} = 0.021$)。

3 讨论

目前对于干性 ARMD 尚无有效的治疗方法, 其发病机制尚不明确, 但已有研究表明, 氧化应激损伤是干性 ARMD 发生发展的重要原因。Abokyi 等^[6]认为视网膜氧化损伤在 ARMD 形成途径中起中心作用。孙子雯等^[7]就氧化应激介导 ARMD 的发生机制及 ARMD 抗氧化剂的应用作过简要综述。临床和基础研究通过使用维生素、多不饱和脂肪酸和其他植物提取的抗氧化物进行治疗, 对抑制干性 ARMD 的晚期发展有明显效果。年龄相关性眼病研究组 (Age-Related Eye Disease Study, AREDS) 证实, 抗氧化剂的使用可以降低 25% 晚期 ARMD 在 5a 内进展的风险, 降低 19% 中度视力下降的风险^[8]。

Nrf2 抗氧化应激通路在 ARMD 的发病过程中具有重

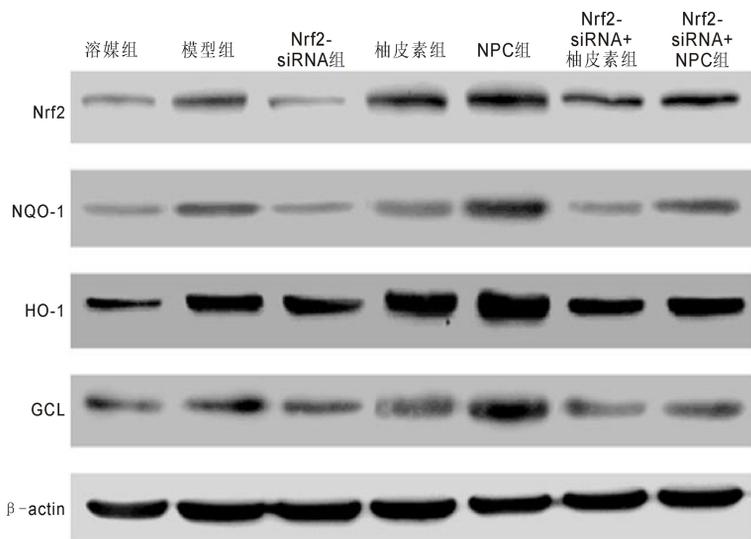


图2 Western blot 检测 Nrf2、NQO-1、HO-1、GCL 蛋白表达。

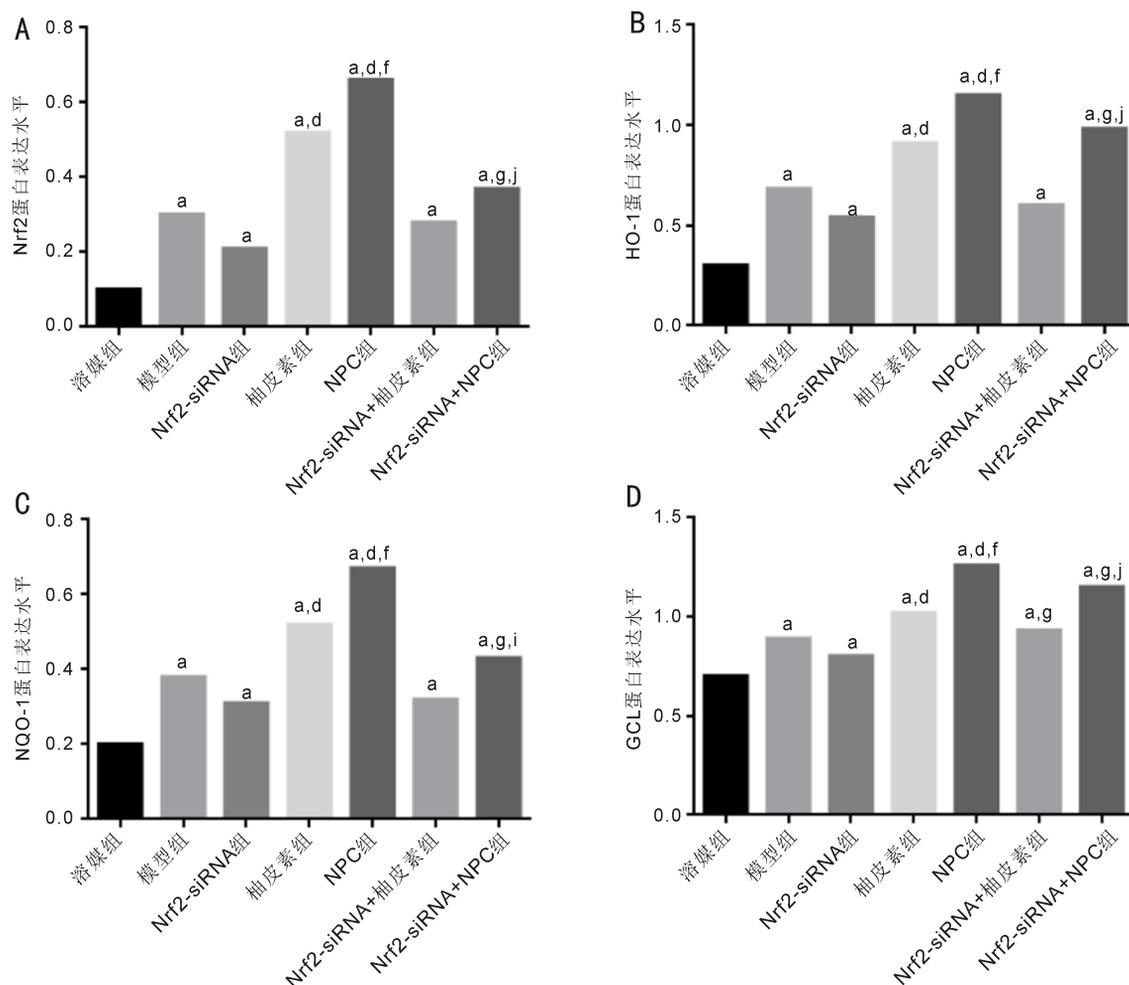


图3 柚皮素及其磷脂复合物对细胞 Nrf2、HO-1、NQO-1、GCL 蛋白表达的影响 A: Nrf2; B: HO-1; C: NQO-1; D: GCL。^a $P < 0.05$ vs 溶媒组; ^d $P < 0.01$ vs 模型组; ^f $P < 0.01$ vs 柚皮素组; ^e $P < 0.05$ vs Nrf2-siRNA 组; ⁱ $P < 0.05$, ^j $P < 0.05$ vs Nrf2-siRNA+柚皮素组。

要作用, Zhao 等^[9] 研究显示, Nrf2 缺陷小鼠视网膜出现了 ARMD 样改变。既往研究证实, 激活 Nrf2 通路对氧化损伤的 RPE 细胞具有保护作用^[10-11]。陈婷妍等^[12] 研究发现柚皮素可能通过 Nrf2/Keap1/ARE 通路改善视网膜光损伤后的氧化应激状态, 保护视网膜功能, 对 ARMD 具有保护作用。

柚皮素具有抗氧化作用, 但柚皮素难溶于水, 生物利用度低, 其磷脂复合物能明显改善原药的理化性质, 增强

药理作用。杨艳等^[13] 研究显示磷脂复合物中磷脂可显著提高柚皮素在水中的溶解度, 约为原药的 3 倍, 磷脂复合物和物理混合物均可显著提高柚皮素在氯仿中的溶解度, 前者作用更明显。

ROS 是需氧细胞在代谢过程中产生, 可以氧化细胞膜上的不饱和脂肪酸, 最终的反应产物是 MDA。脂质过氧化过程中重要的反应产物之一是 MDA, 可通过测定 MDA 的含量了解脂质过氧化的程度。ROS 和 MDA 是两

种有代表性的氧化指标。SOD 是机体内一种重要的抗氧化酶,是重要的 ROS 清除剂,体内的超氧阴离子、氧自由基及脂质过氧化物可以被消除。SOD 可以防止和减轻机体组分在分子水平、细胞水平受到过氧化损伤。T-AOC 是反映机体整体抗氧化水平高低的重要指标。SOD 和 T-AOC 是两种具有代表性的抗氧化指标。本研究中模型组与溶媒组比较,细胞内 MDA、ROS 含量明显增加,SOD、T-AOC 水平明显降低,NPC 较柚皮素能明显降低 ARPE-19 细胞内 MDA、ROS 的含量,明显提高细胞内 SOD、T-AOC 水平。

小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 可以通过多种不同转染技术导入细胞内,以单链形式与外源基因表达的 mRNA 相结合,并诱导相应 mRNA 降解,敲弱特定基因的功。经过适当剪裁的 siRNA,可以利用它的互补性来标定已知序列的基因,所以在基因功能与药物目标的研究中 siRNA 成为了一项重要工具。本研究运用 siRNA 干扰技术抑制 ARPE-19 细胞 Nrf2 基因表达,观察柚皮素及其磷脂复合物对 Nrf2/ARE 抗氧化应激通路的作用。杨艳等^[13]在研究槲皮素磷脂复合物对氧化损伤 ARPE-19 细胞的保护作用的研究中发现,槲皮素磷脂复合物能显著提高原药的生物活性,对氧化损伤 ARPE-19 细胞比槲皮素起到更好的保护作用。本研究结果显示,ARPE-19 细胞受到 t-BHP 氧化应激损伤后,Nrf2 由细胞质进入细胞核,与 ARE 结合,启动抗氧化蛋白及 II 相解毒酶靶基因的转录激活,Nrf2、HO-1、NQO-1、GCL 转录均升高,Nrf2-siRNA 组较 t-BHP 模型组均下降;柚皮素和 NPC 预保护 ARPE-19 细胞后,4 种基因表达水平较模型组和 Nrf2-siRNA 组均升高;Nrf2-siRNA+柚皮素组较 Nrf2-siRNA 组 Nrf2、HO-1、NQO-1 蛋白表达无显著差异;Nrf2-siRNA+NPC 组较 Nrf2-siRNA 组 4 种蛋白表达差异均有统计学意义,NPC 作用明显强于柚皮素。

综上所述,NPC 增强了原药的药理作用,提高了柚皮素的生物利用度,其通过激活 Nrf2/ARE 抗氧化应激通路上调 Nrf2 及其下游抗氧化酶和 II 相解毒酶的表达,对氧化损伤 ARPE-19 细胞起到更好的保护作用。

参考文献

- 1 Fanjul - Moles ML, López - Riquelme GO. Relationship between oxidative stress, circadian rhythms, and AMD. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 7420637
- 2 Heiss EH, Schachner D, Zimmermann K, et al. Glucose availability is a decisive factor for Nrf2-mediated gene expression. *Redox Biol* 2013; 1: 359-365
- 3 Williamson TP, Johnson DA, Johnson JA. Activation of the Nrf2-ARE pathway by siRNA knockdown of Keap1 reduces oxidative stress and provides partial protection from MPTP - mediated neurotoxicity. *Neurotoxicology* 2012; 33(3): 272-279
- 4 Muthaiah VP, Venkitesamy L, Michael FM, et al. Neuroprotective role of naringenin on carbaryl induced neurotoxicity in mouse neuroblastoma cells. *J Pharmacol Pharmacother* 2013; 4(3): 192-197
- 5 王建筑, 李菲, 毕研平, 等. 柚皮素磷脂复合物的制备和表征. *中成药* 2018; 40(7): 1612-1614
- 6 Abokyi S, To CH, Lam TT, et al. Central role of oxidative stress in age-related macular degeneration: evidence from a review of the molecular mechanisms and animal models. *Oxid Med Cell Longev* 2020; 2020: 7901270
- 7 孙子雯, 汤垚, 陈晨, 等. 年龄相关性黄斑变性的发病机制与抗氧化治疗. *国际眼科杂志* 2020; 20(3): 468-471
- 8 Trivedi RH, Wilson ME. Posterior capsule opacification in pediatric eyes with and without traumatic cataract. *J Cataract Refract Surg* 2015; 41(7): 1461-1464
- 9 Zhao Z, Chen Y, Wang J, et al. Age-related retinopathy in NRF2-deficient mice. *PLoS One* 2011; 6(4): e19456
- 10 Zhang YZ, Yang Y, Yu HT, et al. Apigenin protects mouse Retina against oxidative damage by regulating the Nrf2 pathway and autophagy. *Oxidative Med Cell Longev* 2020; 2020: 9420704
- 11 Cui Y, Li Y, Huang N, et al. Structure based modification of Chalcone analogue activates Nrf2 in the human retinal pigment epithelial cell line ARPE-19. *Free Radic Biol Med* 2020; 148: 52-59
- 12 陈婷妍, 周洋. 基于 Nrf2/Keap1/ARE 通路研究槲皮素对小鼠年龄相关性黄斑变性的保护作用. *国际眼科杂志* 2020; 20(7): 1132-1138
- 13 杨艳, 于海涛, 杭丽, 等. 槲皮素磷脂复合物激活 Nrf2 信号通道增强对氧化损伤 ARPE-19 细胞的保护作用. *眼科新进展* 2016; 36(10): 923-927, 931