

木犀草素调控 Nrf2/HO-1 通路保护视网膜色素上皮细胞氧化损伤

洪 萌¹, 洪道先², 石荣先¹, 魏 聪¹, 赵晓丽¹, 李叔达¹

引用: 洪萌, 洪道先, 石荣先, 等. 木犀草素调控 Nrf2/HO-1 通路保护视网膜色素上皮细胞氧化损伤. 国际眼科杂志 2021; 21(1):21-26

基金项目: 开封市科技发展计划项目 (No.1903065)

作者单位: (475001) 中国河南省开封市, 河南大学第一附属医院¹眼科; ²麻醉科

作者简介: 洪萌, 毕业于河南大学, 硕士, 主治医师, 研究方向: 眼部疾病、小儿眼科。

通讯作者: 洪道先, 毕业于郑州大学, 学士, 主任医师, 研究方向: 局部手术麻醉. hdx_study@163.com

收稿日期: 2019-11-15 修回日期: 2020-12-07

摘要

目的: 探讨木犀草素对 H₂O₂ 诱导的视网膜色素上皮 (RPE) 细胞氧化损伤的保护作用及其机制。

方法: 将 ARPE-19 细胞分为对照组、H₂O₂ 组、不同剂量木犀草素组和 Nrf2 抑制剂组, 除对照组外均采用 100 μmol/L H₂O₂ 制备 RPE 氧化损伤模型。采用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 法检测细胞活力并确定木犀草素处理浓度, 采用流式细胞仪检测细胞凋亡率及活性氧 (ROS) 含量, 采用试剂盒法检测细胞中丙二醛 (MDA) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 含量, 采用 Western blot 检测细胞 Caspase-3、多聚腺苷酸二磷酸核糖聚合酶 (PARP)、B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2)、核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 及血红素氧化酶-1 (HO-1) 蛋白表达水平。

结果: 100 μmol/L 木犀草素对 ARPE-19 具有毒性作用, 因此选择 25 μmol/L 和 50 μmol/L 木犀草素进行后续实验。与 H₂O₂ 组比较, 25 μmol/L 和 50 μmol/L 木犀草素组细胞活力明显升高, 凋亡率降低, ROS 和 MDA 含量明显减少, SOD 活性明显升高, Caspase-3 和 PARP 蛋白表达水平明显降低, Bcl-2、Nrf2 及 HO-1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。与 50 μmol/L 木犀草素组比较, Nrf2 抑制剂组细胞活力明显降低, 凋亡率明显升高, ROS 和 MDA 含量明显升高 [$(654.96 \pm 26.99) \text{ vs } (446.52 \pm 29.42)$], $(3.89 \pm 0.29) \text{ nmol/mL vs } (2.06 \pm 0.19) \text{ nmol/mL}$], SOD 活性明显降低 [$(13.83 \pm 1.49) \text{ U/mL vs } (22.69 \pm 1.83) \text{ U/mL}$], Caspase-3 和 PARP 蛋白表达水平明显升高, Bcl-2、Nrf2 及 HO-1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。

结论: 木犀草素能够改善 H₂O₂ 诱导的 RPE 细胞氧化损伤, 其作用机制与激活 Nrf2/HO-1 通路有关。

关键词: 木犀草素; 视网膜色素上皮细胞; 氧化损伤; 核因子 E2 相关因子 2; 血红素氧化酶-1

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2021.1.04

Protective effect of Luteolin on oxidative damage of retinal pigment epithelium cells by regulating the Nrf2/HO-1 pathway

Meng Hong¹, Dao-Xian Hong², Rong-Xian Shi¹, Cong Wei¹, Xiao-Li Zhao¹, Quan-Da Li¹

Foundation item: Kaifeng Science and Technology Development Projects (No.1903065)

¹Department of Ophthalmology; ²Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Henan University, Kaifeng 475001, Henan Province, China

Correspondence to: Dao - Xian Hong. Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Henan University, Kaifeng 475001, Henan Province, China. hdx_study@163.com

Received: 2019-11-15 Accepted: 2020-12-07

Abstract

• **AIM:** To investigate the protective effect and mechanism of luteolin on H₂O₂ - induced oxidative damage of retinal pigment epithelium (RPE) cells.

• **METHODS:** ARPE-19 cells were divided into the control group, H₂O₂ group, different doses of luteolin groups and Nrf2 inhibitor group, and the oxidative damage model of RPE was prepared by 100 μmol/L H₂O₂, except for the control group. Cell activity was detected by Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay and proper experimental concentration of luteolin was determined. The cell morphology and activity was observed in each group. Cell apoptosis rate and reactive oxygen species (ROS) were detected by flow cytometry, malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) were detected by kit method, and the expression of caspase-3, poly adeno-sine diphosphate ribose polymerase (PARP), B cell lymphoma-2 (Bcl-2), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase-1 (HO-1) proteins were detected by Western blot.

• **RESULTS:** 100 μmol/L luteolin has toxic effects on ARPE-19 cells, so 25 μmol/L and 50 μmol/L luteolin were selected for subsequent experiments. The cell activity, SOD activity and the protein expression levels of Bcl-2, Nrf2, HO-1 in 25 μmol/L and 50 μmol/L luteolin groups were significantly higher than the H₂O₂ group ($P < 0.05$). The apoptosis rate, ROS, MDA content and the protein expression levels of Caspase-3 and PARP in 25 μmol/L and 50 μmol/L luteolin groups were significantly lower

than the H_2O_2 group ($P < 0.05$). The cell activity, SOD activity [(13.83 ± 1.49) U/mL vs (22.69 ± 1.83) U/mL] and the protein expression levels of Bcl-2, Nrf2 and HO-1 protein expression in the Nrf2 inhibitor group were significantly lower than the $50\mu\text{mol/L}$ luteolin group ($P < 0.05$). The apoptosis rate, ROS, MDA content [(654.96 ± 26.99) vs (446.52 ± 29.42) , (3.89 ± 0.29) nmol/mL vs (2.06 ± 0.19) nmol/mL] and the protein expression levels of Caspase-3 and PARP in the Nrf2 inhibitor group were significantly higher than the $50\mu\text{mol/L}$ luteolin group ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** Luteolin can improve the oxidative damage of RPE cells induced by H_2O_2 , and its mechanism may be related to the activation of the Nrf2/HO-1 pathway.

• **KEYWORDS:** luteolin; retinal pigment epithelium; oxidative damage; nuclear factor erythroid 2-related factor 2; heme oxygenase-1

Citation: Hong M, Hong DX, Shi RX, et al. Protective effect of Luteolin on oxidative damage of retinal pigment epithelium cells by regulating the Nrf2/HO-1 pathway. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2021;21(1):21-26

0 引言

年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, ARMD) 是一种累及黄斑部的不可逆退行性病变,是老年人视力损伤的主要病因之一^[1]。随着我国人口老龄化的进展,ARMD 的发病人群逐年增多^[2]。ARMD 的具体病因及发病机制尚不明确,但越来越多的研究表明视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞的氧化应激损伤与 ARMD 的发生、发展密切相关^[3-4]。因此,保护 RPE 细胞免受氧化应激损伤是防治 ARMD 的重要途径。已知 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)/血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 是机体内源性抗过氧化物的关键蛋白,被激活后可抑制过氧化物诱导细胞损伤^[5]。因此调控 Nrf2 通路对于 ARMD 的防治具有潜在价值。木犀草素是一种天然黄酮类化合物,广泛存在于金银花等多种药用植物中,具有抗炎、抗氧化及抗病毒等多种药理学作用^[6]。目前研究表明木犀草素对 RPE 细胞及视网膜损伤具有保护作用^[7-8],但其是否能够增强 RPE 细胞的抗氧化活性及其抗氧化机制尚不清楚。因此,本研究采用 H_2O_2 损伤 RPE 细胞建立体外氧化应激损伤模型,观察木犀草素对 RPE 细胞氧化损伤的保护作用,并探讨其作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 人 RPE 细胞株 ARPE-19 (美国 ATCC 公司);木犀草素 (南京景竹生物科技有限公司);DMEM/F12 培养液、胎牛血清、胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司);Nrf2 抑制剂全反式维甲酸、四甲基偶氮唑盐 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 和 H_2O_2 等 (美国 Sigma 公司);丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒及酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒等 (北京索莱宝科技有限公司),Caspase-3 单克隆抗体、多聚腺苷酸二磷酸核糖聚合酶 (poly adeno-sine diphosphate ribose

polymerase, PARP) 单克隆抗体、B 细胞淋巴瘤-2 (B cell lymphoma-2, Bcl-2) 单克隆抗体、Nrf2 单克隆抗体、HO-1 单克隆抗体及辣根过氧化物酶标记的 IgG 二抗 (英国, Abcam)。主要仪器设备:台式离心机 (Thermo Fisher Micro21R, 美国),流式细胞仪 (BD FACSCalibur, 美国 BD),酶标仪 (HBS-1096C, 南京德铁实验设备有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 ARPE-19 细胞复苏后接种于 DMEM/F12 培养基 (含 10% 胎牛血清、100U/mL 青霉素和 100mg/mL 链霉素) 中,于 37°C , 5% CO_2 的培养箱中培养,待细胞生长融合至 80% 时,用 0.25% 胰蛋白酶进行消化并传代,选取对数生长期的细胞进行后续实验。

1.2.2 分组及给药 将 ARPE-19 细胞分为对照组、 H_2O_2 组、不同剂量木犀草素组和 Nrf2 抑制剂组。对照组:不做任何处理; H_2O_2 组:培养基中加入 $100\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 培养 24h;不同剂量木犀草素组:培养基中分别加入 25、 $50\mu\text{mol/L}$ 木犀草素预处理 2h 后加入 $100\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 培养 24h;Nrf2 抑制剂组:培养基中加入木犀草素 $50\mu\text{mol/L}$ + $10\mu\text{g/mL}$ 全反式维甲酸预处理 2h,然后加入 $100\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 培养 24h。显微镜下观察各组细胞形态变化。

1.2.3 MTT 法检测细胞活力 取对数期生长的 ARPE-19 细胞,以 1×10^5 个/毫升接种于 96 孔板中,细胞贴壁后用不同浓度 (0、25、50、 $100\mu\text{mol/L}$) 的木犀草素培养基培养或按照 1.2.2 的分组及给药方式培养 24h 后,更换培养基,每孔加入 $20\mu\text{L}$ MTT (5mg/mL),培养 4h 后弃培养基,每孔加入 $200\mu\text{L}$ 二甲基亚砜 (DMSO) 溶液,震荡 10min 后,采用酶标仪测定波长 490nm 处的光密度 (A) 值。细胞活力 (%) = 实验组 A 值 / 对照组 A 值 $\times 100\%$ 。

1.2.4 细胞凋亡的检测 取对数期生长的 ARPE-19 细胞,以 1×10^6 个/毫升接种于 96 孔板中,按照 1.2.2 的分组及给药方式培养后,离心收集细胞。加入 $195\mu\text{L}$ 结合液重悬细胞,然后加入 $5\mu\text{L}$ Annexin V-FITC 混匀,室温避光孵育 10min;离心弃上清,加入 $190\mu\text{L}$ 结合液重悬细胞,然后加入 $10\mu\text{L}$ PI 染液混匀, 4°C 避光孵育 10min。流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.5 细胞内氧化应激水平的测定

1.2.5.1 细胞内 ROS 水平测定 取对数期生长的 ARPE-19 细胞,以 1×10^6 个/毫升接种于 96 孔板中,按照 1.2.2 的分组及给药方式培养后,胰蛋白酶消化, PBS 洗涤后加入荧光探针 DCFH-DA, 37°C 避光孵育 30min,使探针与细胞充分接触,消化后离心收集细胞,用流式细胞仪 (激发波长 488nm,发射波长 525nm) 检测细胞内的平均荧光强度,即 ROS 水平。

1.2.5.2 细胞内 MDA 和 SOD 含量的测定 收集各组细胞,超声波破碎,离心取上清。采用硫代巴比妥酸比色法测定 MDA 含量,黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性,实验步骤严格按照试剂盒说明方法进行。

1.2.6 Western blot 检测蛋白表达 收集各组细胞,分别加入适量的蛋白裂解液 (含 PMSF),冰上裂解 30min, 4°C 离心 15min,提取细胞总蛋白,并采用 BCA 法测定蛋白浓度。取 $40\mu\text{g}$ 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳,将蛋白转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭过夜,分别加入 Caspase-3、PARP、Bcl-2、Nrf2、HO-1、 β -actin 一抗 (稀释比例均为 1:1000), 4°C 孵育过夜。加二抗 (稀释比例为 1:2000),室温孵育 1h。电化学发光显影后,采用 Image J 凝胶图像分

表1 各组细胞 ROS、MDA 及 SOD 水平比较

分组	ROS 荧光强度	MDA (nmol/mL)	SOD (U/mL)
对照组	311.21±21.78	1.26±0.14	27.45±2.05
H ₂ O ₂ 组	691.49±41.36 ^a	4.72±0.31 ^a	10.22±1.41 ^a
25μmol/L 木犀草素组	509.73±32.45 ^{a,c}	3.41±0.26 ^{a,c}	16.71±1.67 ^{a,c}
50μmol/L 木犀草素组	446.52±29.42 ^{a,c}	2.06±0.19 ^{a,c}	22.69±1.83 ^{a,c}
Nrf2 抑制剂组	654.96±26.99 ^{a,c,e}	3.89±0.29 ^{a,c,e}	13.83±1.49 ^{a,c,e}

注:^a $P<0.05$ vs 对照组;^c $P<0.05$ vs H₂O₂组;^e $P<0.05$ vs 50μmol/L 木犀草素组。

析系统计算目的条带与内参条带灰度值的比值,即目的蛋白的相对表达量。

统计学分析:采用 SPSS 19.0 进行统计学分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P<0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 木犀草素对 ARPE-19 细胞活力的影响 采用 MTT 法检测木犀草素对 ARPE-19 细胞活力的影响,结果显示,各组细胞活力差异有统计学意义($F=4.351, P=0.008$),见图 1。组间两两比较发现,100μmol/L 木犀草素组细胞活力明显低于对照组($P<0.05$),其余各组间差异无统计学意义($P>0.05$),说明 100μmol/L 木犀草素能抑制 ARPE-19 细胞活性。因此选择 25、50μmol/L 木犀草素进行后续研究。

2.2 木犀草素对 H₂O₂ 诱导的 ARPE-19 细胞活力的影响 各组细胞增殖活力比较差异有统计学意义($F=217.539, P<0.01$),见图 2。组间两两比较发现,H₂O₂ 组细胞活力明显低于对照组($P<0.05$);25μmol/L 和 50μmol/L 木犀草素组细胞活力明显高于 H₂O₂ 组($P<0.05$),且 50μmol/L 木犀草素组变化更明显($P<0.05$);而 Nrf2 抑制剂组细胞活力明显低于 50μmol/L 木犀草素组($P<0.05$)。

2.3 木犀草素对 H₂O₂ 诱导的 ARPE-19 细胞形态学的影响 对照组 ARPE-19 细胞呈梭形贴壁生长,细胞轮廓清晰;H₂O₂ 组细胞皱缩、变小、变圆,失去正常形态,部分细胞不能贴壁生长;25μmol/L 和 50μmol/L 木犀草素组细胞形态得到改善,50μmol/L 木犀草素组较 25μmol/L 组更为明显。Nrf2 抑制剂组部分细胞形态异常,与 25μmol/L 木犀草素组细胞类似(图 3)。

2.4 木犀草素对 H₂O₂ 诱导的 ARPE-19 细胞凋亡的影响 流式细胞仪检测结果见图 4A,各组细胞凋亡率比较,差异有统计学意义($F=139.473, P<0.01$)。组间两两比较发现,H₂O₂ 组细胞凋亡率明显高于对照组($P<0.05$);25μmol/L 和 50μmol/L 木犀草素组细胞凋亡率明显低于 H₂O₂ 组($P<0.05$),且 50μmol/L 木犀草素组变化更明显($P<0.05$);而 Nrf2 抑制剂组细胞凋亡率明显高于 50μmol/L 木犀草素组($P<0.05$)。

Western blot 分析结果见图 4B,各组细胞 Caspase-3、PARP 及 Bcl-2 蛋白表达水平比较,差异均有统计学意义($F=217.776, 172.167, 190.00$,均 $P<0.01$)。组间两两比较发现,H₂O₂ 组细胞 Caspase-3 和 PARP 的蛋白表达水平明显高于对照组($P<0.05$),Bcl-2 水平明显低于对照组($P<0.05$);25μmol/L 和 50μmol/L 木犀草素组细胞

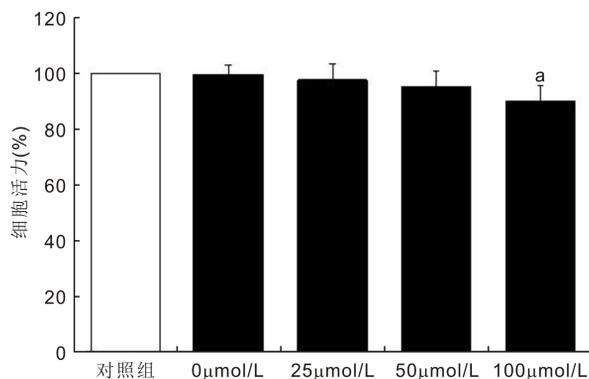


图1 木犀草素对 ARPE-19 细胞活力的影响 ^a $P<0.05$ vs 对照组。

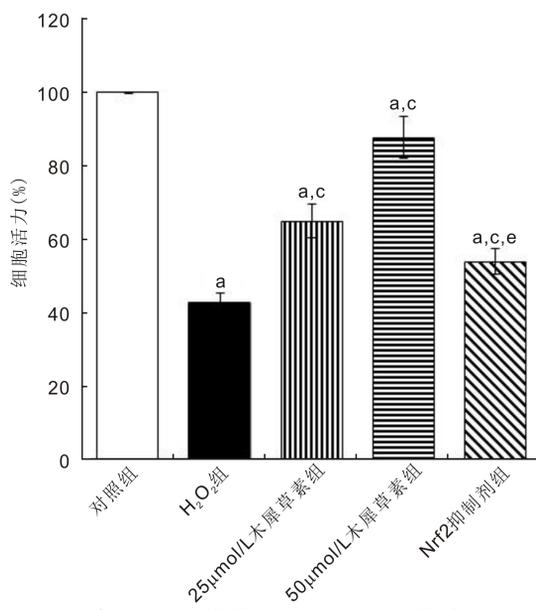


图2 木犀草素对 H₂O₂ 诱导的 ARPE-19 细胞活力的影响

^a $P<0.05$ vs 对照组;^c $P<0.05$ vs H₂O₂ 组;^e $P<0.05$ vs 50μmol/L 木犀草素组。

Caspase-3 和 PARP 的蛋白表达水平明显低于 H₂O₂ 组($P<0.05$), Bcl-2 水平明显高于 H₂O₂ 组($P<0.05$),且 50μmol/L 木犀草素组变化更明显($P<0.05$);Nrf2 抑制剂组细胞 Caspase-3 和 PARP 的蛋白表达水平明显高于 50μmol/L 木犀草素组($P<0.05$), Bcl-2 水平明显低于 50μmol/L 木犀草素组($P<0.05$)。

2.5 木犀草素对 H₂O₂ 诱导的 ARPE-19 细胞氧化应激水平的影响 各组细胞 ROS、MDA 和 SOD 水平比较,差异均有统计学意义($F=150.065, 192.916, 98.318$,均 $P<0.01$),见表 1。组间两两比较发现,H₂O₂ 组细胞 ROS 和 MDA 含量明显高于对照组,SOD 活性明显低于对照组($P<0.05$);25μmol/L 和 50μmol/L 木犀草素组细胞 ROS 和 MDA 含

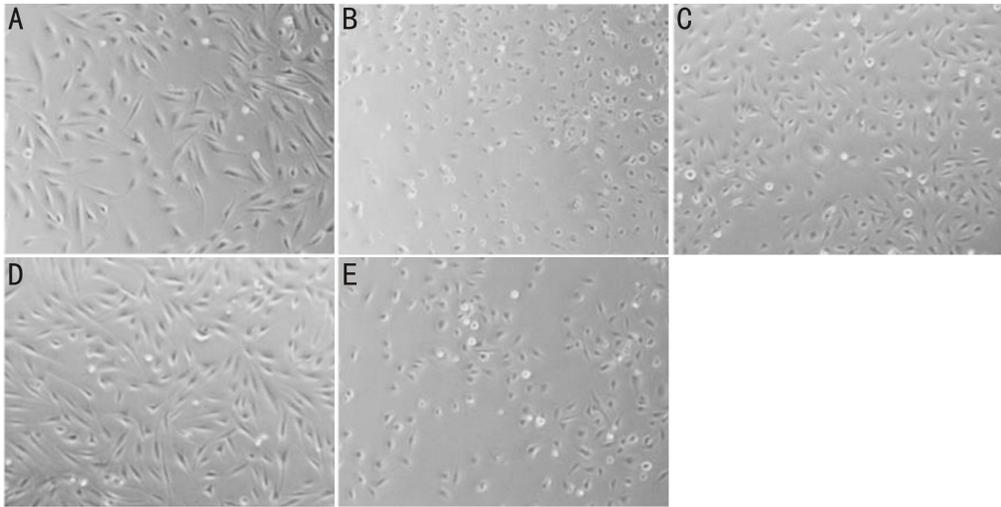


图3 木犀草素对H₂O₂诱导的ARPE-19细胞形态学的影响(×100) A:对照组;B:H₂O₂组;C:25μmol/L木犀草素组;D:50μmol/L木犀草素组;E:Nrf2抑制剂组。

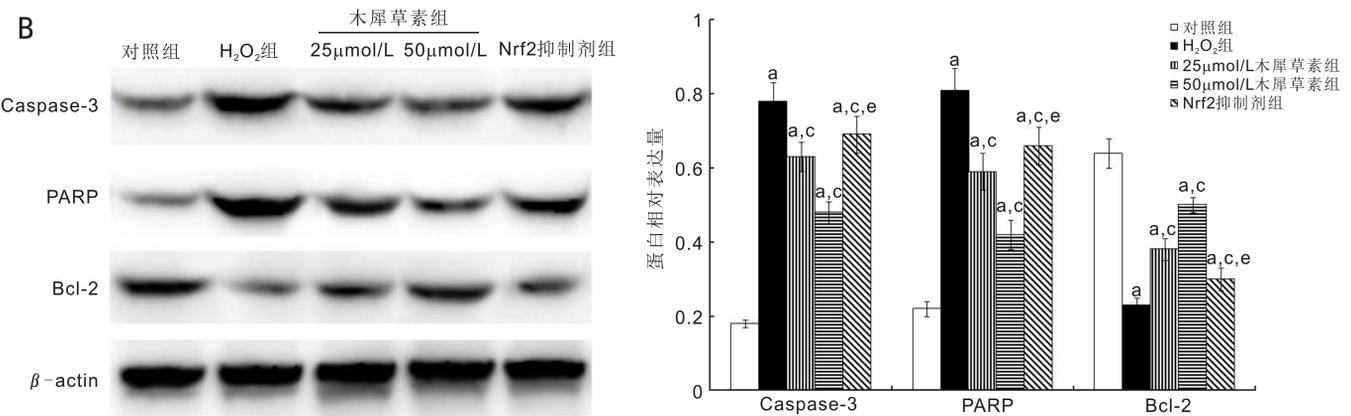
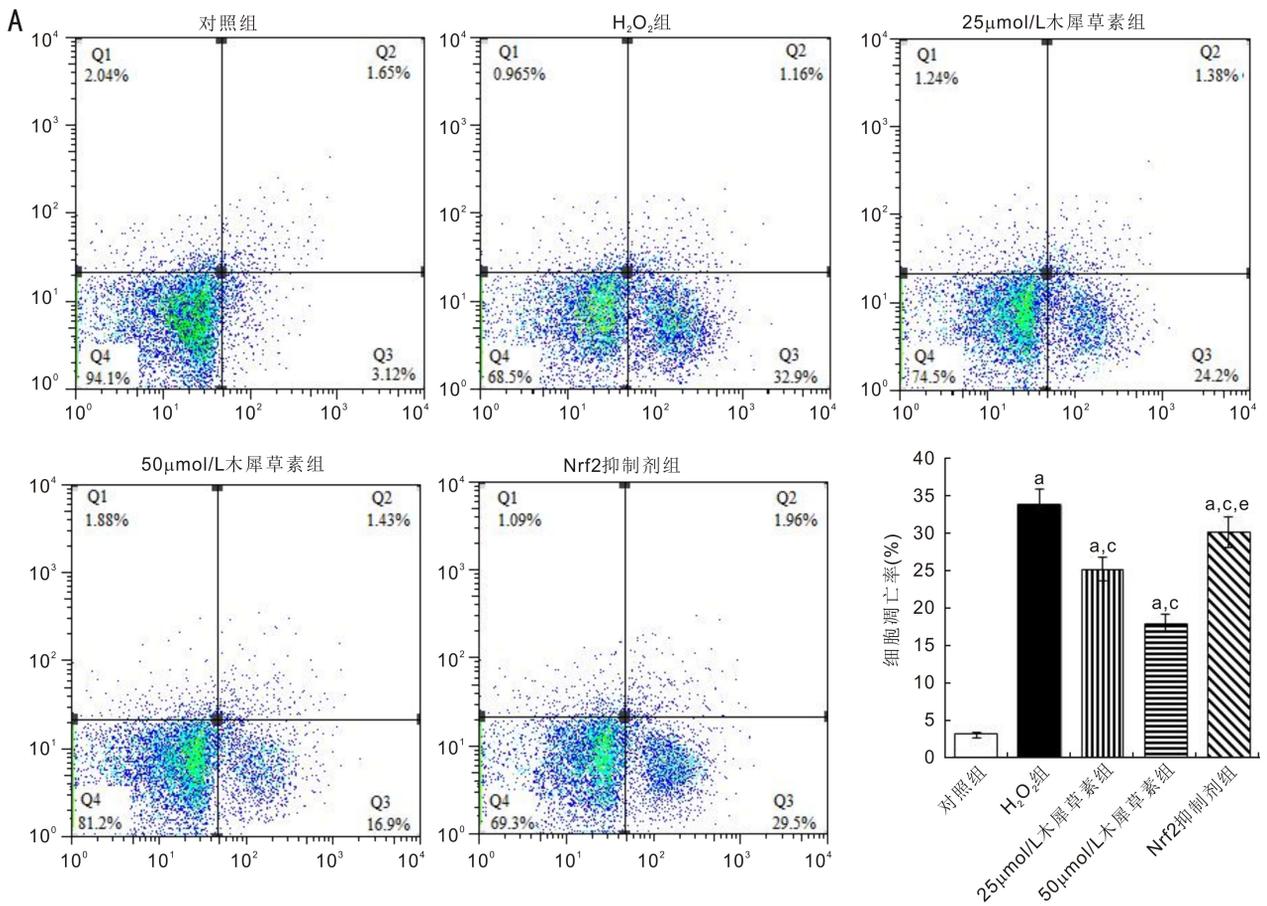


图4 木犀草素对H₂O₂诱导的ARPE-19细胞凋亡的影响 A:流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况;B:各组细胞Caspase-3、PARP及Bcl-2蛋白水平比较。^a*P*<0.05 vs 对照组;^b*P*<0.05 vs H₂O₂组;^c*P*<0.05 vs 50μmol/L木犀草素组。

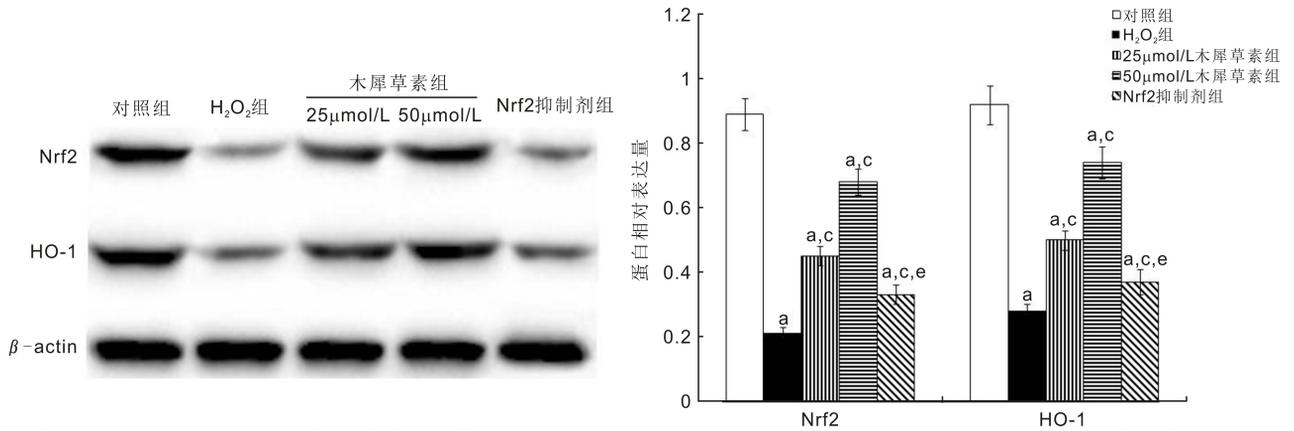


图5 各组细胞 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平比较 ^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$ vs H₂O₂组; ^e $P < 0.05$ vs 50 μmol/L 木犀草素组。

量明显低于 H₂O₂ 组, SOD 活性明显高于 H₂O₂ 组, 且 50 μmol/L 木犀草素组变化更明显 ($P < 0.05$); Nrf2 抑制剂组细胞 ROS 和 MDA 含量明显高于 50 μmol/L 木犀草素组 ($P < 0.05$), SOD 活性明显低于 50 μmol/L 木犀草素组 ($P < 0.05$)。

2.6 木犀草素对 H₂O₂ 诱导的 ARPE-19 细胞 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达的影响 Western blot 分析显示, 各组细胞 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平比较, 差异有统计学意义 ($F = 121.475, 117.352$, 均 $P < 0.01$), 见图 5。组间两两比较发现, H₂O₂ 组细胞 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平明显低于对照组 ($P < 0.05$); 25 μmol/L 和 50 μmol/L 木犀草素组细胞 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平明显高于 H₂O₂ 组 ($P < 0.05$), 且 50 μmol/L 木犀草素组变化更明显 ($P < 0.05$); Nrf2 抑制剂组细胞 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平明显低于 50 μmol/L 木犀草素组 ($P < 0.05$)。

3 讨论

ARMD 是盲的主要原因, 随着人类寿命的延长, 其发病率逐年提高。当前研究发现长期氧化应激导致的 RPE 细胞结构与功能异常是引发 ARMD 的重要原因之一^[9-10]。目前, 通过抗氧化剂治疗 ARMD 已成为研究热点。木犀草素是一种天然黄酮类化合物, 具有抗氧化、清除氧自由基等生物学活性^[11-12]。本研究利用 100 μmol/L H₂O₂ 建立 RPE 细胞氧化损伤模型, 观察木犀草素对 ARPE-19 细胞的保护作用及其可能的机制。本研究使用 MTT 法检测 ARPE-19 细胞活性, 结果发现给予 H₂O₂ 处理时细胞活力显著下降; 而给予不同剂量木犀草素预处理后给予 H₂O₂ 诱导, 细胞活力明显升高, 其中 50 μmol/L 木犀草素预处理的细胞活性最高, 表明木犀草素对 H₂O₂ 诱导的 ARPE-19 细胞损伤具有保护作用。同时 Hytti 等^[7] 研究发现木犀草素对氧化应激损伤后的 RPE 细胞具有保护和修复作用; 魏达亨等^[8] 研究发现木犀草素通过降低 HMGB1 表达减轻 NF-κB 介导的炎症, 抑制碘酸钠诱导的 RPE 细胞凋亡, 保护视网膜免受损伤。说明木犀草素对多种因素引起的视网膜损伤均具有一定的保护作用。此外, 本研究还发现各剂量木犀草素能降低 ROS 和 MDA 含量, 增强 SOD 活性, 表明木犀草素可以清除 H₂O₂ 诱导生成的 ROS, 促进 RPE 细胞内抗氧化物质含量增加, 提高 RPE 细胞抗氧化应激能力, 在一定程度上逆转 H₂O₂ 引起的细胞氧化应激损伤, 进一步说明木犀草素对视网膜氧化损伤具有保护作用。同时肖童等^[13] 研究发现木犀草素预处理对

H₂O₂ 诱导的大鼠心肌 H9C2 细胞氧化应激损伤具有保护作用。提示木犀草素对 H₂O₂ 诱导的细胞损伤具有一定的保护作用。

研究显示 RPE 细胞功能受损时可以引起细胞凋亡, 而木犀草素具有显著的抗凋亡特性^[14-15]。我们使用流式细胞术检测发现, H₂O₂ 处理后 ARPE-19 细胞凋亡率明显升高, 而给予木犀草素处理后细胞凋亡率明显降低, 且 Caspase-3 和 PARP 蛋白表达水平明显降低, Bcl-2 水平明显升高, 提示木犀草素能够抑制 H₂O₂ 诱导的细胞凋亡。同时魏达亨等^[8] 研究发现, 木犀草素可以抑制碘酸钠诱导的 ARPE-19 细胞凋亡。提示木犀草素能对 RPE 细胞功能受损引起的细胞凋亡具有一定抑制作用。

Nrf2 通路作为重要的内源性抗氧化应激通路, 在氧化应激反应应答中起关键作用^[16]。Nrf2 是调节氧化还原平衡的关键转录因子^[17]。静息状态下, Nrf2 在细胞浆中与 Keap1 结合, 经泛素化-蛋白酶体降解^[18]。氧化应激状态下, 氧化还原平衡被打破, Nrf2 被活化, 从 Keap1 中释放并转移至细胞核, 与核内的抗氧化反应元件 (ARE) 结合, 上调下游 II 相解毒酶和抗氧化基因的表达, 提高抗氧化酶 GSH-Px 和 SOD 的活性, 从而实现抗氧化应激作用^[19-20]。HO-1 作为 Nrf2 调控的下游蛋白, 可以催化血红素降解生成胆绿素、一氧化碳和游离铁, 四者共同形成细胞抗氧化应激损伤的内源性保护系统, 减弱氧化应激及炎症反应, 同时抑制促凋亡蛋白的表达, 抑制细胞凋亡^[21-22]。本研究结果发现, 木犀草素能上调 H₂O₂ 诱导的 ARPE-19 细胞中 Nrf2 及 HO-1 蛋白的表达, 而加入 Nrf2 抑制剂后, Nrf2 和 HO-1 蛋白表达明显降低, 说明木犀草素能够通过某种方式激活 Nrf2, 从而上调下游抗氧化基因 HO-1 蛋白的表达, 增强细胞清除 ROS 的能力, 维持细胞内氧化还原状态的平衡, 抑制氧化应激反应, 保护细胞免受氧化应激损伤, 而 Nrf2 抑制剂能逆转木犀草素对 H₂O₂ 诱导的细胞氧化应激损伤保护作用, 进一步说明了木犀草素可通过激活 Nrf2 来抑制 H₂O₂ 诱导的氧化应激损伤。已有研究发现木犀草素可以激活人脐静脉内皮 EA.hy926 细胞 Nrf2 信号通路, 抑制 H₂O₂ 诱导的细胞毒性, 对细胞具有氧化损伤保护作用^[23]。提示木犀草素可通过 Nrf2 来发挥抗氧化作用。

综上所述, 木犀草素对 H₂O₂ 诱导的 ARPE-19 细胞氧化应激损伤具有保护作用, 其机制可能与激活 Nrf2/HO-1 信号通路, 抑制氧化应激反应有关, 为临床治疗 ARMD 提供了新策略。

参考文献

1 Maguire MG, Martin DF, Ying GS, *et al.* Five-Year Outcomes with Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration: The Comparison of Age-Related Macular Degeneration Treatments Trials. *Ophthalmology* 2016; 123 (8): 1751-1761

2 王琴,赵海生,李立. 补体因子 I 与年龄相关性黄斑变性发生研究进展. *中华实验眼科杂志* 2015;33(2):189-192

3 Xu X, Liu X, Wang X, *et al.* Retinal Pigment Epithelium Degeneration Associated With Subretinal Drusenoid Deposits in Age-Related Macular Degeneration. *Am J Ophthalmol* 2017;175:87-98

4 黄晓旭,苏荣健,刘华. 青蒿素对过氧化氢诱导的人视网膜色素上皮(RPE)细胞氧化应激损伤的抑制作用. *眼科新进展* 2019;39(4):306-311

5 梁莉,阙琳玲,曹宝山,等. Nrf2在姜黄素保护UVB所致细胞氧化损伤中的作用. *中华放射医学与防护杂志* 2014;34(8):583-587

6 Xiong J, Wang K, Yuan C, *et al.* Luteolin protects mice from severe acute pancreatitis by exerting HO-1-mediated anti-inflammatory and antioxidant effects. *Int J Mol Med* 2016;39(1):113-125

7 Hytti M, Piippo N, Korhonen E, *et al.* Fisetin and luteolin protect human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress-induced cell death and regulate inflammation. *Sci Rep* 2015;5:17645

8 魏达亨,孙丽丽,何慧君,等. 木犀草素对碘酸钠诱导的视网膜色素上皮细胞及视网膜损伤的保护作用. *眼科新进展* 2019;39(9):814-819

9 张姝雅,孔玮,孔珺. 视网膜色素上皮细胞的功能及其抗新生血管作用. *国际眼科杂志* 2016;16(2):265-269

10 Promsote W, Veeranan - Karmegam R, Ananth S, *et al.* L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid attenuates oxidative stress and inflammation in retinal pigment epithelium. *Mol Vis* 2014;20:73-88

11 Kanai K, Nagata S, Hatta T, *et al.* Therapeutic anti-inflammatory effects of luteolin on endotoxin-induced uveitis in Lewis rats. *J Vet Medl Sci* 2016;78(8):1381-1384

12 李越,沈磊. 木犀草素对小鼠结肠炎的作用. *中华实验外科杂志*

2018;35(3):453-456

13 肖童,钟焯,孙雅涵,等. 木犀草素预处理对H2O2诱导大鼠心肌H9C2细胞损伤的保护机制研究. *天然产物研究与开发* 2018;30(9):22-29

14 Dunaief JL, Dentshev T, Ying GS, *et al.* The Role of Apoptosis in Age-Related Macular Degeneration. *Arch Ophthalmol* 2002;120(11):1435-1442

15 贺兰芝,孟雅坤,韩延忠,等. 木犀草素对乙酰氨基酚诱导的L02肝细胞损伤的保护作用. *中国中药杂志* 2016;41(22):4234-4239

16 Qaisiya M, Coda Zabetta CD, Bellarosa C, *et al.* Bilirubin mediated oxidative stress involves antioxidant response activation via Nrf2 pathway. *Cell Signal* 2014;26(3):512-520

17 谭亲友,张靖. Nrf2-ARE信号通路功能与临床疾病及相关药物的研究新进展. *中国医院药学杂志* 2016;36(15):1331-1336

18 李珊珊,陈忠云,李婧,等. Keap1/Nrf2/ARE信号通路在中枢神经系统疾病中的研究进展. *中国全科医学* 2014;30:3641-3644

19 Hu T, Wei G, Xi M, *et al.* Synergistic cardioprotective effects of Danshensu and hydroxysafflor yellow A against myocardial ischemia-reperfusion injury are mediated through the Akt/Nrf2/HO-1 pathway. *Int J Mol Med* 2016;38(1):83-94

20 Zhu C, Dong Y, Liu H, *et al.* Hesperetin protects against H2O2-triggered oxidative damage, via, upregulation of the Keap1-Nrf2/HO-1 signal pathway in ARPE-19 cells. *Biomed Pharmacother* 2017;88:124-133

21 Basu A, Roy SS, Bhattacharjee A, *et al.* Vanadium(III)-L-cysteine protects cisplatin-induced nephropathy through activation of Nrf2/HO-1 pathway. *Free Radic Res* 2015;50(1):39-55

22 Choi YH. Berberine Hydrochloride Protects C2C12 Myoblast Cells Against Oxidative Stress-Induced Damage via Induction of Nrf-2-Mediated HO-1 Expression. *Drug Dev Res* 2016;77(6):310-318

23 陈洪忠. 木犀草素对EA.hy926细胞Nrf2信号通路的激活作用及H2O2致氧化损伤的保护作用. *山东大学学报:医学版* 2014;11:6-10, 15