

# 白藜芦醇对人角膜上皮细胞炎症和氧化应激损伤的保护作用

朱琳<sup>1</sup>, 韩瑞芳<sup>2</sup>, 王培红<sup>1</sup>, 李轩<sup>1,2</sup>

引用:朱琳,韩瑞芳,王培红,等.白藜芦醇对人角膜上皮细胞炎症和氧化应激损伤的保护作用.国际眼科杂志 2021;21(12):2038-2043

基金项目:国家自然科学基金项目(No.81670837);天津市科技计划项目(No.20JCYBJC01450);天津市眼科医院科技基金项目(No.YKQN1921)

作者单位:<sup>1</sup>(300020)中国天津市,天津医科大学眼科临床学院;<sup>2</sup>(300020)中国天津市,天津市眼科医院南开大学附属眼科医院天津市眼科研究所天津市眼科学与视觉科学重点实验室

作者简介:朱琳,天津医科大学在读硕士研究生,医师,研究方向:角膜病、眼表疾病。

通讯作者:李轩,毕业于日本福井大学,博士,主任医师,博士研究生导师,研究方向:角膜病、眼表疾病. xuanli08@yahoo.com

收稿日期:2021-03-23 修回日期:2021-11-08

## 摘要

**目的:**探讨白藜芦醇(RSV)对人角膜上皮细胞(HCECs)炎症和氧化应激损伤的保护作用。

**方法:**用肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )诱导HCECs发生炎症反应,设对照组、TNF- $\alpha$ 组、RSV+TNF- $\alpha$ 组;用H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导HCECs发生氧化应激反应,设正常组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组、RSV+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组。采用MTT法检测细胞活力;RT-qPCR及酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测相关炎症因子IL-1、IL-6、IL-8的表达;免疫荧光染色法及Western blot法检测核因子- $\kappa$ B p65(NF- $\kappa$ B p65)的核转位;2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)荧光探针法检测细胞内活性氧(ROS)水平。

**结果:**在HCECs炎症反应中,RT-qPCR及ELISA结果均显示,与对照组相比,TNF- $\alpha$ 组的HCECs IL-1、IL-6、IL-8的表达水平均显著升高。RSV预处理细胞后,以上指标较TNF- $\alpha$ 组显著下降;免疫荧光染色及Western blot结果均显示,TNF- $\alpha$ 组NF- $\kappa$ B p65核转位增加,而RSV预处理细胞后NF- $\kappa$ B p65核转位受到抑制。在HCECs氧化应激反应中,MTT和DCFH-DA荧光探针染色结果分别显示,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激使HCECs活力显著下降,HCECs内ROS的产生增多。而RSV预处理后,细胞活力显著上升,且RSV抑制了H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的HCECs内ROS的产生。

**结论:**RSV对HCECs的炎症和氧化应激反应具有抑制作用,RSV通过抑制NF- $\kappa$ B通路激活以抑制炎症反应。

**关键词:**白藜芦醇;角膜上皮细胞;炎症反应;氧化应激反应;NF- $\kappa$ B

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2021.12.04

## Protective effects of Resveratrol on inflammation and oxidative stress damage in human corneal epithelial cells

Lin Zhu<sup>1</sup>, Rui - Fang Han<sup>2</sup>, Pei - Hong Wang<sup>1</sup>, Xuan Li<sup>1,2</sup>

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (No. 81670837); Tianjin Science and Technology Plan Program (No.20JCYBJC01450); Science and Technology Fund Project of Tianjin Eye Hospital (No.YKQN1921)

<sup>1</sup>Clinical College of Ophthalmology, Tianjin Medical University, Tianjin 300020, China; <sup>2</sup>Tianjin Key Laboratory of Ophthalmology and Visual Science; Tianjin Institute of Ophthalmology; Nankai University Affiliated Eye Hospital; Tianjin Eye Hospital, Tianjin 300020, China

**Correspondence to:** Xuan Li. Clinical College of Ophthalmology, Tianjin Medical University, Tianjin 300020, China; Tianjin Key Laboratory of Ophthalmology and Visual Science; Tianjin Institute of Ophthalmology; Nankai University Affiliated Eye Hospital; Tianjin Eye Hospital, Tianjin 300020, China. xuanli08@yahoo.com

Received: 2021-03-23 Accepted: 2021-11-08

## Abstract

• **AIM:** To investigate the protective effects of resveratrol (RSV) on inflammation and oxidative stress damage in human corneal epithelial cells (HCECs).

• **METHODS:** The inflammation of HCECs was induced by Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and the experiment was divided into: control group, TNF- $\alpha$  group and RSV+TNF- $\alpha$  group. The oxidative stress response of HCECs was induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and they were divided into normal group, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group and RSV+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group. MTT assay was used to detect the viability of HCECs; RT-qPCR and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) methods were used to detect the expression of IL-1, IL-6 and IL-8; Immunofluorescence staining and Western blot were used to observe the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B p65. 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescent probe was applied to detect the level of reactive oxygen species (ROS).

• **RESULTS:** In the inflammatory response of HCECs, RT-qPCR and ELISA showed that the expression levels of IL-1, IL-6 and IL-8 were increased significantly in the TNF- $\alpha$  group compared with the control group, the above indicators were lower after pretreatment of RSV than those in TNF- $\alpha$  group; Immunofluorescence staining and Western blot showed that the nuclear translocation of

NF- $\kappa$ B p65 was increased in TNF- $\alpha$  group, while it was inhibited after pretreatment of RSV. In the oxidative stress response of HCECs, the results of MTT and DCFH-DA fluorescent probe staining showed that  $H_2O_2$  significantly decreased the viability of HCECs and increased the production of ROS in HCECs. After pretreatment of RSV, cell viability increased significantly, and RSV inhibited the generation of ROS in HCECs induced by  $H_2O_2$ .

• CONCLUSION: RSV has an inhibitory effect on inflammation and oxidative stress damage in human corneal epithelial cells, and it has been confirmed that RSV inhibits inflammation by inhibiting the activation of the NF- $\kappa$ B pathway.

• KEYWORDS: Resveratrol; corneal epithelial cells; inflammatory response; oxidative stress response; NF- $\kappa$ B

**Citation:** Zhu L, Han RF, Wang PH, *et al.* Protective effects of Resveratrol on inflammation and oxidative stress damage in human corneal epithelial cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2021; 21(12):2038-2043

## 0 引言

目前,眼表炎症的患病率仍然较高,且重度的眼表炎症对患者生活质量造成了极大的影响,使其治疗成为日益严重的医疗保健问题。临床上许多眼科疾病与眼表炎症相关,包括感染、干眼、眼睑疾病、理化损伤等<sup>[1]</sup>。眼表炎症中往往伴随着氧化应激的发生<sup>[2-3]</sup>。氧化应激中过量产生的活性氧(reactive oxygen species, ROS)可通过靶向DNA、蛋白质和细胞内通路诱导细胞损伤<sup>[4]</sup>。因此,细胞内ROS的过度生成被认为是眼表炎症在内的眼表疾病发病机制的关键因素<sup>[5]</sup>。白藜芦醇(resveratrol, RSV)是一种植物多酚。研究证实,RSV在葡萄膜炎、糖尿病视网膜病变、年龄相关性黄斑变性等眼部疾病中可发挥抗氧化和抗炎的保护作用<sup>[6-8]</sup>。但目前,RSV在眼表炎症中的研究鲜有报道。因此,本研究应用人角膜上皮细胞(human corneal epithelial cells, HCECs)探讨了RSV的抗炎和抗氧化作用,以期着眼表炎症的治疗提供新的思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞 HCECs细胞(美国 ATCC)。

1.1.2 主要试剂 肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , 美国 R&D SYSTEMS)、RSV(美国 SIGMA)、RPMI-1640培养基(美国 Hyclone)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 美国 Gibco)、青链霉素混合液(青霉素  $10 \times 10^3$  U/mL, 链霉素  $10 \times 10^3$   $\mu$ g/mL, 美国 Gibco)、2.5g/L胰蛋白酶(美国 Gibco)、细胞总RNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)、实时定量PCR引物(北京赛百盛基因技术有限公司)、MMLV逆转录酶、Taq DNA聚合酶(美国 Promega)、TB Green Premix Ex TaqII(日本 Takara)、人IL-6/IL-8酶联免疫检测(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(安徽巧伊生物科技有限公司)、BCA蛋白浓度测试试剂盒(美国 Thermo)、核蛋白-胞浆蛋白提取试剂盒(美国 Thermo)、蛋白marker(美国 Biotopped)、核因子- $\kappa$ B p65(nuclear factor- $\kappa$ B p65, NF- $\kappa$ B p65)抗体(ab 16502, 美国 Abcam)、Histone H1抗体(ab 134914, 美国 Abcam)、GAPDH抗体(ab 181602, 美国 Abcam)、辣根过氧

化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔二抗(A11034, 美国 Thermo)、RDye 800CW山羊抗兔二抗(C70926-05, 美国 LI-COR)、MTT溶液(美国 Soiarbio)、ROS检测试剂盒(美国 Soiarbio)。

1.1.3 主要仪器设备  $CO_2$ 培养箱(德国 Heraeus)、酶标仪(美国 Bio Tek)、实时荧光定量基因扩增仪(美国 Roche)、荧光显微镜(日本 Nikon)、双色红外激光成像系统(美国 LI-COR)、荧光分析仪(美国 Bio Tek)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HCECs每2d换液1次,细胞生长至近融合状态时,用胰蛋白酶消化细胞并进行传代。培养条件: RPMI-1640培养基+10% FBS+1%青链霉素混合液,置于37 $^{\circ}C$ ,饱和湿度,5%  $CO_2$ 培养箱中无菌培养。

#### 1.2.2 研究 RSV 的抗炎作用

1.2.2.1 实验分组 实验分设3组:对照组、TNF- $\alpha$ 组(10ng/mL TNF- $\alpha$ 刺激)、RSV+TNF- $\alpha$ 组(10 $\mu$ mol/L RSV预处理2h)。

1.2.2.2 MTT法检测细胞活力 细胞用不同浓度(0、5、10、25、50、100 $\mu$ mol/L)RSV分别处理HCECs 24h,更换培养基,加入MTT(5mg/mL)孵育4h后,去除各孔内液体,加入二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶液,震荡10min后采用酶标仪测定波长570nm处吸光度(optical density, OD)值,按公式计算得各组的细胞活力:细胞活力=实验组OD值/对照组OD值 $\times 100\%$ 。

1.2.2.3 RT-qPCR法检测炎症因子IL-1和IL-6及IL-8 mRNA的相对表达量 细胞按实验设计分组并做相应处理。TNF- $\alpha$ 组用TNF- $\alpha$ 处理18h。使用细胞总RNA提取试剂盒提取总RNA,逆转录成cDNA后-20 $^{\circ}C$ 保存。采用实时荧光定量基因扩增仪对各组cDNA进行目的基因扩增。IL-1上游引物:GCTTCTCTCTGGTCCTTGG,下游引物:AGGGCAGGGTAGAGAAGAG; IL-6上游引物:CAAACCTCCTGGAGTTCACC,下游引物:TGTCCAATG GACAGGATG; IL-8上游引物:ACCTCACTGTGC AAATTCAG,下游引物:TATGACTCTTGCTGCTCAGC; GAPDH上游引物:TGCCCTCAACGACCACCTTTG,下游引物:CTGGTGGTCCAGGGGTCTTA。扩增程序:95 $^{\circ}C$ 预变性3min,95 $^{\circ}C$ 变性12s,62 $^{\circ}C$ 退火延伸45s,共40个循环。熔解曲线:95 $^{\circ}C$ 反应10s,65 $^{\circ}C$ 反应1min,97 $^{\circ}C$ 反应1s,37 $^{\circ}C$ 冷却降温30s。以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因mRNA的相对表达量。

1.2.2.4 ELISA法检测各组细胞培养液上清中炎症因子IL-6及IL-8的质量浓度 细胞按实验设计分组并做相应处理。TNF- $\alpha$ 组用TNF- $\alpha$ 处理24h。按照试剂盒说明书要求进行操作。将细胞培养液上清、浓度梯度稀释标准品及相关抗体药品加入包被了抗体的检测板中,将各组校准后OD值代入标准曲线中,计算得到各组IL-6、IL-8的质量浓度。

#### 1.2.2.5 免疫荧光染色法检测 NF- $\kappa$ B p65 的核转位情况

细胞按实验设计分组并做相应处理。TNF- $\alpha$ 组用TNF- $\alpha$ 处理1h,细胞用PBS洗涤,4%多聚甲醛固定25min, PBS洗涤,0.1% Triton X-100透核膜10min,5% BSA封闭1h, PBS洗涤,4 $^{\circ}C$ 下孵育一抗NF- $\kappa$ B p65(Abcam, ab16502, 1:200)过夜, PBS洗涤,室温下孵育HRP标记的山羊抗兔二抗(Thermo, A 11034, 1:200)1h, PBS洗涤, DAPI染核15min, PBS洗涤,50%甘油封片。荧

光显微镜拍照,观察各组细胞中 NF- $\kappa$ B p65 蛋白的核转位情况。

**1.2.2.6 Western blot 法检测胞质和胞核中 NF- $\kappa$ B p65 蛋白的表达** 细胞按实验设计分组并做相应处理。TNF- $\alpha$  组用 TNF- $\alpha$  处理 1h,提取细胞的胞质和胞核蛋白,采用 BCA 法测定各组样本蛋白浓度。与 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液混合,100 $^{\circ}$ C 10min 使蛋白变性。根据测定的蛋白浓度确定各组样本上样量,在聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)中电泳后采用 PVDF 膜转膜,5%脱脂牛奶室温封闭 1h,裁膜,分别加入一抗 NF- $\kappa$ B p65 (Abcam, ab 16502, 1:1000)、细胞核内参 Histone H 1 (Abcam, ab 134914, 1:1000) 和细胞质内参 GAPDH (Abcam, ab 181602, 1:1000),4 $^{\circ}$ C 过夜, TBST 洗膜后加入山羊抗兔二抗 (LI-COR, C70926-05, 1:5000),室温孵育 1h,洗膜后使用双色红外激光成像系统曝光,实验至少重复 3 次。使用 Image J 软件分析条带。

### 1.2.3 研究 RSV 的抗氧化作用

**1.2.3.1 实验分组** 实验分设 3 组:正常组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组 (300 $\mu$ mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激 HCECs 24h)、RSV+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组 (10 $\mu$ mol/L RSV 预处理 HCECs 2h,300 $\mu$ mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激 HCECs 24h)。

**1.2.3.2 MTT 法检测细胞活力** 用不同浓度 (0、200、300、400 $\mu$ mol/L) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分别处理 HCECs 24h,或按照 1.2.3.1 中实验分组及给药方式做相应处理,按照 1.2.2.2 中操作步骤进行实验,检测各组细胞活力。

**1.2.3.3 应用 DCFH-DA 探针检测各组细胞的 ROS 水平**

细胞按实验设计分组并做相应处理。用含 10 $\mu$ mol/L DCFH-DA 探针的培养液于 37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育细胞 20min。用 PBS 将多余的探针洗去。显微镜下观察细胞绿色荧光着染的情况。随后,将细胞用胰酶消化后 PBS 重悬,488nm 激发波长,525nm 发射波长,荧光分析仪检测各孔荧光强度。

统计学分析:采用 SPSS23.0 以及 GraphPad Prism8.0 软件对实验数据进行分析,呈正态分布的定量数据采用  $\bar{x}\pm s$  进行描述,各项实验结果的多组间比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD-*t* 检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 不同浓度 RSV 对 HCECs 活力的影响** MTT 结果显示,不同浓度 (0、5、10、25、50、100 $\mu$ mol/L) RSV 分别处理 HCECs 24h 后,细胞活力分别为 (100.00 $\pm$ 0.00)%、(106.40 $\pm$ 2.76)%、(108.81 $\pm$ 4.05)%、(102.20 $\pm$ 5.12)%、(96.70 $\pm$ 7.51)%、(67.23 $\pm$ 2.91)%,差异有统计学意义 ( $F=11.98, P<0.001$ )。与对照组 (0 $\mu$ mol/L RSV) 相比,100 $\mu$ mol/L RSV 组细胞活力明显下降 ( $P<0.001$ );其余各组与对照组相比差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ ),见图 1。本研究选择 10 $\mu$ mol/L RSV 进行后续实验。

**2.2 各组 HCECs 炎症因子 IL-1 和 IL-6 及 IL-8 mRNA 的相对表达量比较** RT-qPCR 结果显示,比较各组 IL-1、IL-6、IL-8 mRNA 的相对表达量,差异均有统计学意义 ( $P<0.01$ )。与对照组相比,TNF- $\alpha$  组 IL-1、IL-6、IL-8 mRNA 的相对表达量明显升高 (均  $P<0.05$ );与 TNF- $\alpha$  组相比,RSV+TNF- $\alpha$  组 IL-1、IL-6、IL-8 mRNA 的相对表达量明显降低 ( $P<0.05$ ),见表 1。表明 RSV 有效抑制了 HCECs 炎症反应中 IL-1、IL-6、IL-8 的表达。

**2.3 各组 HCECs 培养液上清中炎症因子 IL-6 和 IL-8 的蛋白浓度比较** ELISA 结果显示,比较各组 IL-6、IL-8 的

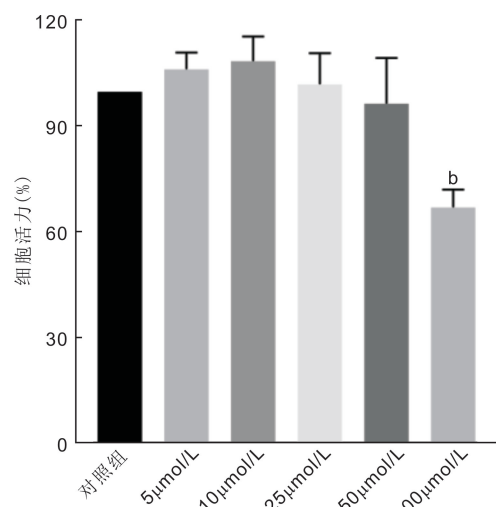


图 1 不同浓度 RSV 作用下 HCECs 的细胞活力 <sup>b</sup> $P<0.01$  vs 对照组。

表 1 各组 HCECs 炎症因子 mRNA 的相对表达量  $\bar{x}\pm s$

组别	IL-1 mRNA	IL-6 mRNA	IL-8 mRNA
对照组	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
TNF- $\alpha$ 组	7.83 $\pm$ 0.86 <sup>b</sup>	12.43 $\pm$ 1.07 <sup>b</sup>	47.99 $\pm$ 3.05 <sup>b</sup>
RSV+TNF- $\alpha$ 组	4.67 $\pm$ 0.85 <sup>c</sup>	4.72 $\pm$ 0.96 <sup>d</sup>	33.67 $\pm$ 4.65 <sup>c</sup>
<i>F</i>	23.89	49.29	56.38
<i>P</i>	<0.01	<0.001	<0.001

注:<sup>b</sup> $P<0.01$  vs 对照组;<sup>c</sup> $P<0.05$ ,<sup>d</sup> $P<0.01$  vs TNF- $\alpha$  组。

表 2 各组 HCECs 培养液上清中炎症因子的蛋白浓度比较

组别	IL-6	IL-8
对照组	16.64 $\pm$ 1.88	13.34 $\pm$ 24.33
TNF- $\alpha$ 组	114.70 $\pm$ 1.94 <sup>b</sup>	945.50 $\pm$ 116.40 <sup>b</sup>
RSV+TNF- $\alpha$ 组	74.42 $\pm$ 12.29 <sup>c</sup>	631.90 $\pm$ 32.64 <sup>c</sup>
<i>F</i>	46.03	44.41
<i>P</i>	<0.001	<0.001

注:<sup>b</sup> $P<0.01$  vs 对照组;<sup>c</sup> $P<0.05$  vs TNF- $\alpha$  组。

蛋白浓度,差异均有统计学意义 ( $P<0.01$ )。与对照组相比,TNF- $\alpha$  组 IL-6、IL-8 的蛋白浓度明显升高 ( $P<0.05$ );与 TNF- $\alpha$  组相比,RSV+TNF- $\alpha$  组 IL-6、IL-8 的蛋白浓度明显降低 ( $P<0.05$ ),见表 2。表明 RSV 有效抑制了细胞培养液上清中炎症因子 IL-6、IL-8 的蛋白分泌。

**2.4 各组 HCECs NF- $\kappa$ B p65 的核转位比较** 免疫荧光检测结果显示,与对照组相比,TNF- $\alpha$  组中 NF- $\kappa$ B p65 荧光标记主要集中于细胞核,表示 NF- $\kappa$ B p65 激活从细胞质转移到细胞核;与 TNF- $\alpha$  组相比,RSV+TNF- $\alpha$  组 NF- $\kappa$ B p65 入核量显著减少,见图 2。表明 RSV 有效抑制了 NF- $\kappa$ B p65 的激活。

**2.5 各组 HCECs NF- $\kappa$ B p65 蛋白的相对表达量比较** Western blot 结果显示,对照组、TNF- $\alpha$  组、RSV+TNF- $\alpha$  组细胞质中 NF- $\kappa$ B p65 蛋白的相对表达量分别为 1.08 $\pm$ 0.07、0.46 $\pm$ 0.04、1.22 $\pm$ 0.05,差异有统计学意义 ( $F=52.12, P<0.001$ )。与对照组相比,TNF- $\alpha$  组细胞质中 NF- $\kappa$ B p65 蛋白的相对表达量明显减少 ( $P<0.001$ );与

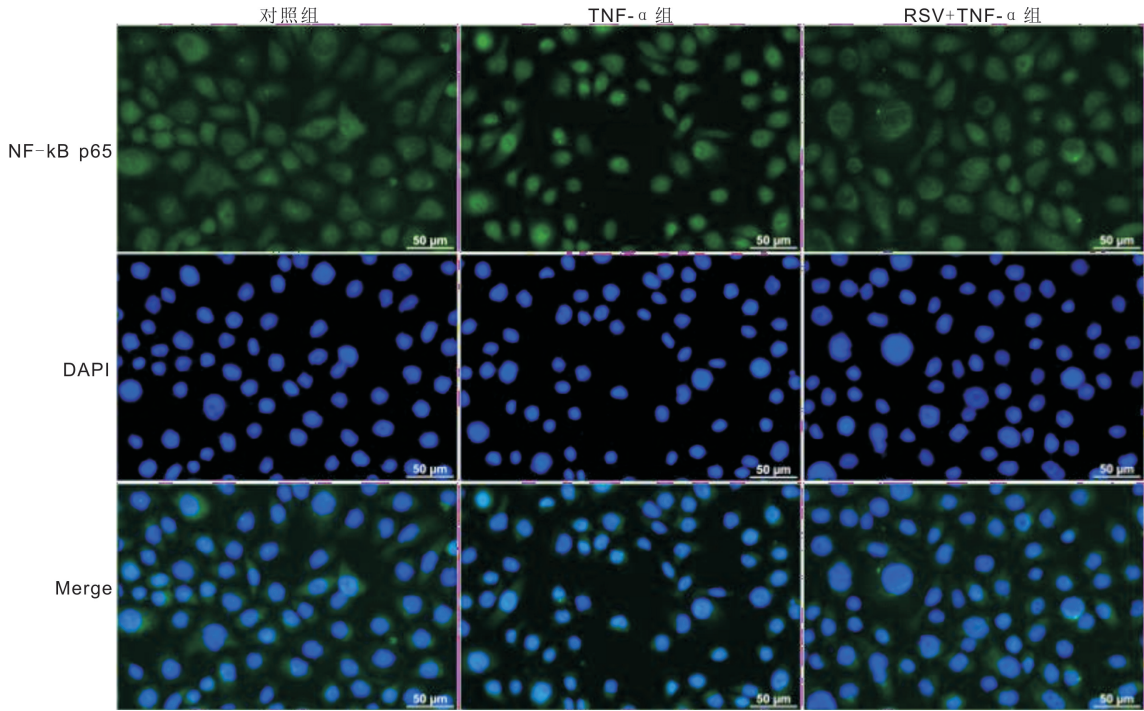


图2 各组 HCECs NF-κB p65 的核转位情况。

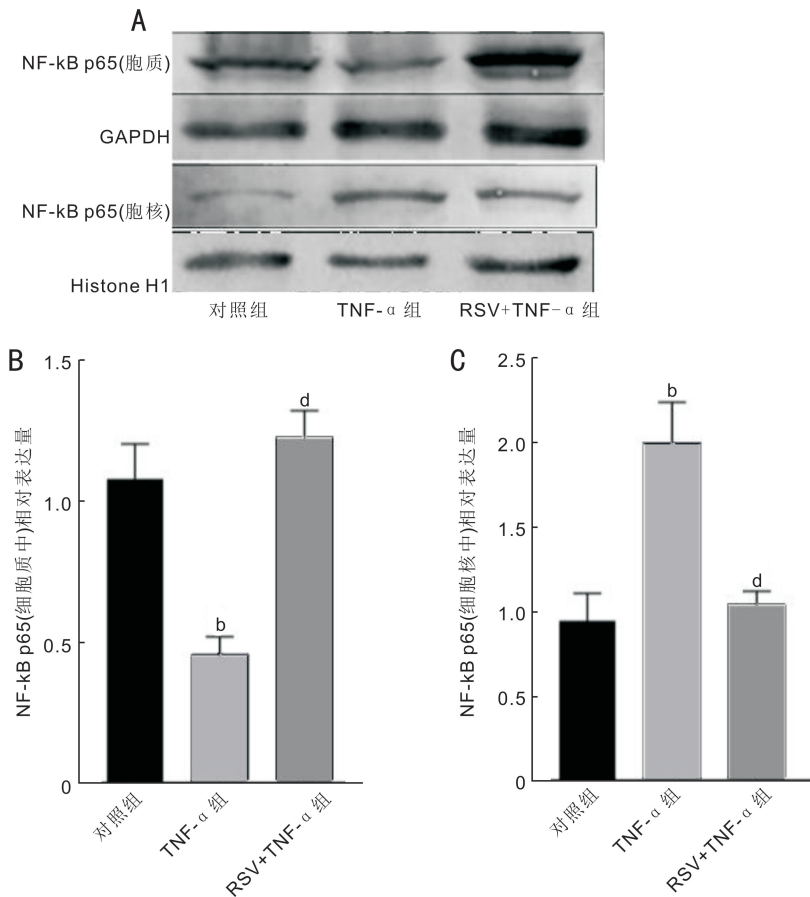


图3 各组 HCECs NF-κB p65 蛋白的表达 A: Western blot 结果; B: 细胞质中 NF-κB p65 蛋白的相对表达量; C: 细胞核中 NF-κB p65 蛋白的相对表达量。<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs TNF-α 组。

TNF-α 组相比, RSV+TNF-α 组细胞质中 NF-κB p65 蛋白的相对表达量明显增多 ( $P < 0.001$ )。对照组、TNF-α 组、RSV+TNF-α 组细胞核中 NF-κB p65 蛋白的相对表达量分别为  $0.95 \pm 0.09$ 、 $1.99 \pm 0.14$ 、 $1.04 \pm 0.05$ , 差异有统计学意义 ( $F = 33.38$ ,  $P < 0.001$ )。与对照组相比, TNF-α 组细胞核中 NF-κB p65 蛋白的相对表达量明显增多 ( $P < 0.001$ );

与 TNF-α 组相比, RSV+TNF-α 组细胞核中 NF-κB p65 蛋白的相对表达量明显减少 ( $P < 0.01$ ), 见图 3。

**2.6 不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 HCECs 活力的影响** MTT 结果显示, 不同浓度 (0、200、300、400 μmol/L) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分别处理 HCECs 24h 后, 细胞活力分别为 ( $100.00 \pm 0.00$ )%、( $90.33 \pm 2.57$ )%、( $61.23 \pm 6.11$ )%、( $31.36 \pm 3.97$ )%, 差异有统计学

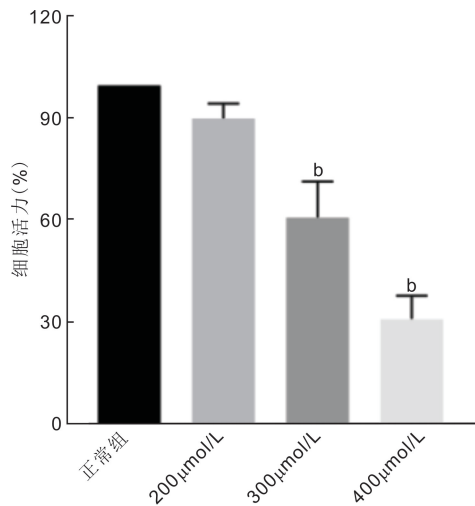


图4 不同浓度  $H_2O_2$  作用下 HCECs 的细胞活力 <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常组。

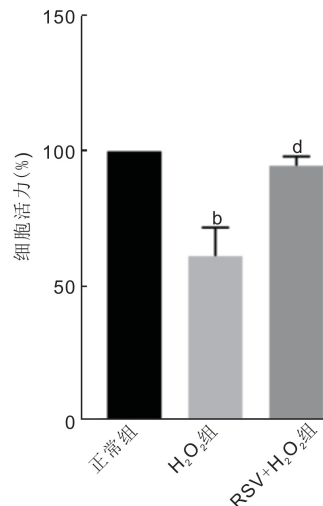


图5 各组 HCECs 的细胞活力 <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs  $H_2O_2$ 组。

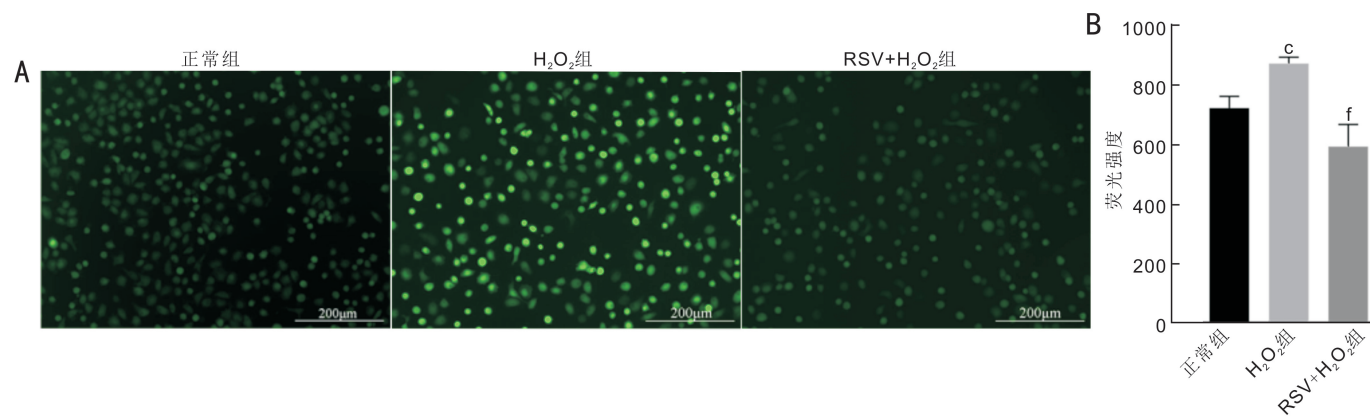


图6 各组 HCECs ROS 的生成 A: 荧光显微镜下各组细胞着染情况; B: 荧光分析仪检测各组细胞 ROS 荧光强度。 <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 正常组; <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs  $H_2O_2$ 组。

意义 ( $F = 64.32, P < 0.001$ )。与正常组 ( $0 \mu\text{mol/L } H_2O_2$ ) 相比,  $300, 400 \mu\text{mol/L } H_2O_2$  组细胞活力与正常组相比均明显下降 ( $P < 0.001$ );  $200 \mu\text{mol/L } H_2O_2$  组细胞活力与正常组相比差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见图 4。本研究选择  $300 \mu\text{mol/L } H_2O_2$  进行后续实验。

**2.7 RSV 对  $H_2O_2$  诱导 HCECs 氧化应激反应细胞活力的影响** MTT 结果显示, 正常组、 $H_2O_2$  组、RSV+ $H_2O_2$  组细胞活力分别为 ( $100.00 \pm 0.00$ )%、( $61.23 \pm 6.11$ )%、( $94.67 \pm 2.03$ )%, 差异有统计学意义 ( $F = 31.94, P < 0.001$ )。与正常组相比,  $H_2O_2$  组 HCECs 活力明显下降 ( $P < 0.001$ ); 与  $H_2O_2$  组相比, RSV+ $H_2O_2$  组细胞活力明显升高 ( $P < 0.01$ ), 见图 5。

**2.8 RSV 对 HCECs ROS 水平的影响** DCFH-DA 探针染色后检测 ROS, 与正常组相比,  $H_2O_2$  组镜下细胞呈现明显的强阳性着染, ROS 的生成明显增多; 与  $H_2O_2$  组相比, RSV+ $H_2O_2$  组镜下细胞呈现明显的弱阳性着染, ROS 的生成明显减少, 见图 6A。用荧光分析仪检测各组 ROS 荧光强度, 正常组、 $H_2O_2$  组、RSV+ $H_2O_2$  组的荧光强度分别为  $722.70 \pm 22.76, 871.70 \pm 12.72, 594.00 \pm 42.57$ , 差异有统计学意义 ( $F = 23.24, P < 0.01$ )。与正常组相比,  $H_2O_2$  组荧光强度明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与  $H_2O_2$  组相比, RSV+ $H_2O_2$  组荧光强度明显降低 ( $P < 0.01$ ), 见图 6B。

### 3 讨论

角膜是眼球前部的无血管组织, 角膜最外层的角膜上皮层通过其屏障功能以及抗血管生成和免疫调节作用在保护角膜的同时维持角膜的透明性<sup>[9-10]</sup>。在世界范围内, 角膜炎仍然是主要致盲眼病之一<sup>[11]</sup>。在角膜炎症中, 角膜上皮细胞受损会释放炎症因子, 导致眼表炎性细胞浸润, 而过度的炎症反应会使促血管生成因子大量上调, 角膜新生血管生成, 进而影响视力<sup>[12-13]</sup>。研究表明<sup>[13-14]</sup>, TNF- $\alpha$  在体外条件下会破坏 HCECs 的屏障功能, 诱导炎症反应及促炎性细胞因子包括 IL-6、IL-8 和单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 的炎症应答, 在角膜炎症中起关键作用。故本研究采用 TNF- $\alpha$  体外诱导 HCECs 炎症反应。

RSV 是一种天然存在的植物多酚, 具有抗氧化、抗凋亡、抗肿瘤、抗炎、抗血管生成和扩张等多种药理作用<sup>[15]</sup>。已证实 RSV 通过抑制 NF- $\kappa$ B 通路激活在多种细胞中发挥其抗炎作用<sup>[16-18]</sup>。在眼部, RSV 可抑制视网膜色素上皮中 NF- $\kappa$ B 通路的激活, 减弱与年龄相关性黄斑变性有关的视网膜色素上皮细胞炎症反应<sup>[19]</sup>。鉴于 NF- $\kappa$ B 是炎症级联反应的关键调节因子, 可通过调控多种炎性细胞因子 (如 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 和 TNF- $\alpha$  等) 的转录而快速响应炎症刺激, 靶向 NF- $\kappa$ B 通路是抑制炎症的一项关键策

略<sup>[20]</sup>。目前,RSV 在眼表炎症中的研究鲜有报道。本研究探讨了 NF- $\kappa$ B 在 HCECs 炎症反应中的作用。在本研究中,TNF- $\alpha$  刺激细胞后,NF- $\kappa$ B p65 入核量显著增加,而 RSV 预处理细胞后,NF- $\kappa$ B p65 入核量显著减少,表明 RSV 可以抑制 HCECs 中 TNF- $\alpha$  诱导的 NF- $\kappa$ B 通路的激活。此外,TNF- $\alpha$  诱导细胞炎症因子 IL-1、IL-6、IL-8 的表达增加,表明 TNF- $\alpha$  通过激活 NF- $\kappa$ B 通路诱导 HCECs 炎症反应。RSV 预处理 HCECs 后显著降低了炎症因子的表达。因此,RSV 对 HCECs 炎症反应的抑制与 RSV 抑制 NF- $\kappa$ B 通路的激活有关。

由于角膜高度暴露在紫外线辐射和高氧张力下,因此易受氧化应激的影响。氧化应激与眼表炎症在内的其他多种眼部疾病的发病机制息息相关,氧化应激相关因子的表达水平可随炎症活动的增加而增加<sup>[3]</sup>。近年来,已有多项研究集中于探讨 RSV 对炎症和氧化应激的潜在抑制作用。RSV 可以通过阻断 Bax-caspase-3 依赖性凋亡途径和抑制缺血后灌注损伤后视网膜胶质增生相关的炎症来预防视网膜神经节细胞凋亡<sup>[21]</sup>;RSV 可改善氧化应激和炎症反应下视网膜色素上皮细胞的细胞活力和抑制 ROS 产生<sup>[22]</sup>。在本研究中,通过 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HCECs 发生氧化应激损伤。一定浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 使细胞活力显著下降,RSV 预处理细胞后,细胞活性较 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组有显著提高。且与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组相比,RSV+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组 ROS 荧光强度明显降低,表明 RSV 能有效抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导产生的 ROS,从而保护 HCECs 免受氧化应激损伤。

综上所述,本研究结果表明 RSV 对 HCECs 炎症和氧化应激反应具有抑制作用,其对 HCECs 炎症反应的抑制与抑制 NF- $\kappa$ B 通路激活有关。这为临床上防治眼表炎症提供了一种新的思路。

#### 参考文献

- 1 Torrecilla J, Del Pozo - Rodríguez A, Vicente - Pascual M, et al. Targeting corneal inflammation by gene therapy: Emerging strategies for keratitis. *Exp Eye Res* 2018;176:130-140
- 2 Abengózar - Vela A, Calonge M, Stern ME, et al. Quercetin and resveratrol decrease the inflammatory and oxidative responses in human ocular surface epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56(4):2709-2719
- 3 Dogru M, Kojima T, Simsek C, et al. Potential role of oxidative stress in ocular surface inflammation and dry eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2018;59(14):DES163-DES168
- 4 Seen S, Tong L. Dry eye disease and oxidative stress. *Acta Ophthalmol* 2018;96(4):e412-e420
- 5 Marek V, Mélik - Parsadaniantz S, Villette T, et al. Blue light phototoxicity toward human corneal and conjunctival epithelial cells in basal and hyperosmolar conditions. *Free Radic Biol Med* 2018;126:27-40
- 6 Kubota S, Kurihara T, Mochimaru H, et al. Prevention of ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis with resveratrol by inhibiting

- oxidative damage and nuclear factor- $\kappa$ B activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(7):3512
- 7 Losso JN, Truax RE, Richard G. Trans - resveratrol inhibits hyperglycemia - induced inflammation and connexin downregulation in retinal pigment epithelial cells. *J Agric Food Chem* 2010;58(14):8246-8252
- 8 Neal SE, Buehne KL, Besley NA, et al. Resveratrol protects against hydroquinone-induced oxidative threat in retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2020;61(4):32
- 9 Reins RY, Baidouri H, McDermott AM. Vitamin D activation and function in human corneal epithelial cells during TLR - induced inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56(13):7715-7727
- 10 Yazdanpanah G, Jabbehdari S, Djalilian AR. Limbal and corneal epithelial homeostasis. *Curr Opin Ophthalmol* 2017;28(4):348-354
- 11 Zhu S, Xu X, Liu K, et al. PApEp, a small peptide derived from human pancreatitis-associated protein, attenuates corneal inflammation *in vivo* and *in vitro* through the IKK $\alpha$ / $\beta$ /I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Pharmacol Res* 2015;102:113-122
- 12 Ljubimov AV, Saghizadeh M. Progress in corneal wound healing. *Prog Retin Eye Res* 2015;49:17-45
- 13 Panigrahi T, Shivakumar S, Shetty R, et al. Trehalose augments autophagy to mitigate stress induced inflammation in human corneal cells. *Ocul Surf* 2019;17(4):699-713
- 14 Lee SH, Kim KW, Joo K, et al. Angiogenin ameliorates corneal opacity and neovascularization via regulating immune response in corneal fibroblasts. *BMC Ophthalmol* 2016;16:57
- 15 Abu - Amero KK, Kondkar AA, Chalam KV. Resveratrol and ophthalmic diseases. *Nutrients* 2016;8(4):200
- 16 Cao X, Tian S, Fu M, et al. Resveratrol protects human bronchial epithelial cells against nickel - induced toxicity via suppressing p38 MAPK, NF- $\kappa$ B signaling, and NLRP3 inflammasome activation. *Environ Toxicol* 2020;35(5):609-618
- 17 Rasheduzzaman M, Jeong JK, Park SY. Resveratrol sensitizes lung cancer cell to TRAIL by p53 independent and suppression of Akt/NF- $\kappa$ B signaling. *Life Sci* 2018;208:208-220
- 18 Tsai MH, Hsu LF, Lee CW, et al. Resveratrol inhibits urban particulate matter-induced COX-2/PGE<sub>2</sub> release in human fibroblast-like synoviocytes via the inhibition of activation of NADPH oxidase/ROS/NF- $\kappa$ B. *Int J Biochem Cell Biol* 2017;88:113-123
- 19 Kutty RK, Samuel W, Abay R, et al. Resveratrol attenuates CXCL11 expression induced by proinflammatory cytokines in retinal pigment epithelial cells. *Cytokine* 2015;74(2):335-338
- 20 Ye J, Xu YF, Lou LX, et al. Anti-inflammatory effects of hinokitiol on human corneal epithelial cells: an *in vitro* study. *Eye (Lond)* 2015;29(7):964-971
- 21 Luo H, Zhuang J, Hu P, et al. Resveratrol delays retinal ganglion cell loss and attenuates gliosis - related inflammation from ischemia - reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2018;59(10):3879-3888
- 22 Abengózar - Vela A, Schaumburg CS, Stern ME, et al. Topical quercetin and resveratrol protect the ocular surface in experimental dry eye disease. *Ocul Immunol Inflamm* 2019;27(6):1023-1032