

β-谷甾醇调控 PON1/Caspase-3 通路减轻碘酸钠诱导视网膜损伤的机制研究

栗小丽, 王伟, 李娟, 赵朝霞

引用: 栗小丽, 王伟, 李娟, 等. β-谷甾醇调控 PON1/Caspase-3 通路减轻碘酸钠诱导视网膜损伤的机制研究. 国际眼科杂志, 2025, 25(11): 1728-1734.

作者单位: (450000) 中国河南省郑州市, 河南大学附属爱尔眼科医院 郑州爱尔眼科医院
作者简介: 栗小丽, 女, 硕士研究生, 副主任医师, 研究方向: 黄斑病变的发病机制与防治。
通讯作者: 赵朝霞, 女, 硕士研究生, 主任医师, 副院长, 硕士生导师, 研究方向: 眼底疾病的发病机制与治疗. zhaoxia0602@163.com
收稿日期: 2025-04-20 修回日期: 2025-09-26

摘要
目的:探讨 β-谷甾醇对碘酸钠 (NaIO₃) 诱导的干性年龄相关性黄斑变性 (ARMD) 模型小鼠视网膜结构和功能的保护作用及其分子机制。
方法:建立 NaIO₃ 诱导的小鼠干性 ARMD 模型, 通过眼底照相、组织病理学 (HE 染色) 及视网膜电图 (ERG) 评估 β-谷甾醇干预效果。利用网络药理学筛选 β-谷甾醇在 ARMD 中的潜在作用靶点, 并通过分子对接技术验证 β-谷甾醇与潜在靶点的结合能力。通过 CCK-8、Hoechst 染色及 Western blot 分析 β-谷甾醇对 ARPE-19 细胞活性、凋亡通路的影响。
结果:β-谷甾醇显著减轻模型小鼠视网膜结构损伤 (使视网膜及外核层厚度增加, 黄白色渗出灶减少) 及功能损伤 (a 波、b 波振幅部分恢复)。网络药理学筛选出 β-谷甾醇的关键作用靶点 PON1; 分子对接显示 β-谷甾醇通过疏水键及氢键结合 PON1。细胞实验表明 β-谷甾醇 (10 μmol/L) 可提升 ARPE-19 细胞活性 ($P<0.01$), 减少凋亡 ($P<0.01$), 并上调 PON1 表达 ($P<0.01$), 同时抑制 cleaved-Caspase3 表达 ($P<0.01$)。
结论:β-谷甾醇可能通过调控 PON1 抑制 Caspase3 依赖性凋亡通路, 从而减轻氧化应激诱导的视网膜损伤, 为干性 ARMD 治疗开发新药物提供实验依据。
关键词: 年龄相关性黄斑变性; β-谷甾醇; PON1; 凋亡
DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2025.11.03

Mechanism of β-sitosterol regulating the PON1/Caspase-3 pathway to alleviate sodium iodate-induced retinal injury

Li Xiaoli, Wang Wei, Li Juan, Zhao Zhaoxia

Aier Eye Hospital Affiliated to Henan University; Zhengzhou Aier Eye Hospital, Zhengzhou 450000, Henan Province, China

Correspondence to: Zhao Zhaoxia. Aier Eye Hospital Affiliated to Henan University; Zhengzhou Aier Eye Hospital, Zhengzhou 450000, Henan Province, China. zhaoxia0602@163.com
Received: 2025-04-20 Accepted: 2025-09-26

Abstract

• **AIM:** To investigate the protective effect of β-sitosterol on retinal structure and function and its underlying molecular mechanism in a sodium iodate (NaIO₃) - induced mouse model of dry age - related macular degeneration (ARMD).
• **METHODS:** A dry ARMD mouse model was established by NaIO₃ injection. The therapeutic effect of β-sitosterol intervention was evaluated using fundus photography, histopathology (HE staining), and electroretinography (ERG). Network pharmacology was employed to screen potential targets of β-sitosterol in ARMD, and molecular docking was used to validate the binding ability between β-sitosterol and these targets. The impact of β-sitosterol on ARPE-19 cell viability and apoptosis pathways was analyzed using CCK-8 assay, Hoechst staining, and Western blotting.
• **RESULTS:** The β-sitosterol significantly alleviated structural damage in the retinas of model mice (increased retinal and outer nuclear layer thickness, reduced yellowish-white drusen-like deposits) and functional impairment (partial restoration of a-wave and b-wave amplitudes). Network pharmacology identified PON1 as a key target of β-sitosterol; molecular docking demonstrated that β-sitosterol binds to PON1 via hydrophobic interactions and hydrogen bonds. *In vitro* experiments showed that β-sitosterol (10 μmol/L) significantly increased ARPE-19 cell viability ($P<0.01$), reduced apoptosis ($P<0.01$), upregulated PON1 expression ($P<0.01$), and concurrently suppressed cleaved-Caspase3 expression ($P<0.01$).
• **CONCLUSION:** The β-sitosterol likely protects against oxidative stress-induced retinal damage by modulating PON1 to suppress the Caspase3-dependent apoptotic pathway. These findings provide experimental evidence supporting the development of β-sitosterol as a novel therapeutic agent for dry ARMD.
• **KEYWORDS:** age-related macular degeneration; β-sitosterol; PON1; apoptosis

Citation: Li XL, Wang W, Li J, et al. Mechanism of β-sitosterol regulating the PON1/Caspase-3 pathway to alleviate sodium iodate-induced retinal injury. Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci), 2025, 25(11): 1728-1734.

0 引言

年龄相关性黄斑变性 (age - related macular degeneration, ARMD) 是一种视网膜退行性疾病,其发病机制复杂,涉及年龄、遗传因素以及吸烟、饮食等环境因素的共同作用。ARMD 是工业化国家致盲的首要原因。全球范围内,ARMD 患者数量预计将从 2020 年的 1.96 亿增至 2040 年的 2.88 亿^[1-5]。干性 ARMD 是全球 50 岁以上人群不可逆视力丧失的首要病因,占 ARMD 病例的 90% 以上^[6]。干性 ARMD 的病理特征包括视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞萎缩、玻璃膜疣 (drusen) 沉积及光感受器细胞进行性退化^[7],患者逐渐出现阅读困难、人脸识别障碍及色觉异常,最终中心视力完全丧失^[8],严重影响生活质量^[9]。据统计,晚期干性 ARMD [地图样萎缩 (geographic atrophy, GA)] 患者 5 a 内视力下降至 20/200 的比例高达 30%^[10],且伴随抑郁、社交孤立等心理问题,对社会医疗资源造成沉重负担^[11]。目前,针对干性 ARMD 的临床治疗手段极为有限,临床治疗仍面临重大挑战。尽管抗氧化剂 (如 AREDS 配方) 可延缓早期病变进展,但其对晚期 GA 无效^[12]。近年来,针对补体系统 (如 C3、CFH) 的靶向药物虽在临床试验中展现出潜力,但存在免疫抑制风险且疗效有限^[13]。因此,为干性 ARMD 开发新的治疗药物仍然是临床亟待解决的难题。

β -谷甾醇 (β -sitosterol) 作为天然甾醇类化合物的典型代表,广泛分布于植物来源物质中,具有显著的抗氧化与抗凋亡活性^[14]。其作用机制涉及激活 Nrf2/ARE 通路以增强超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPx) 的表达^[15],同时通过抑制 Bax/Bcl-2 失衡及线粒体膜通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) 开放,阻断 Caspase 级联反应^[16]。有研究表明, β -谷甾醇可能通过调控 p53 等信号通路在青光眼视神经保护中发挥关键作用^[17]。 β -谷甾醇作为多种组方的核心成分,可参与改善视网膜血管病变以及其他糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 相关症状^[18]。Yang 等^[19]研究发现, β -谷甾醇作为障眼明片主要有效成分通过发挥抗凋亡和抗新生血管的作用改善 DR。以上研究表明, β -谷甾醇在视网膜疾病治疗中具有重要价值。近年来,研究提示 β -谷甾醇可通过靶向调控一种关键抗氧化酶对氧磷酶 1 (paraoxonase 1, PON1) 增强其对氧化脂质的水解能力,从而减轻 RPE 细胞的氧化损伤^[20],这一发现为 β -谷甾醇在干性 ARMD 中的应用提供了重要理论依据。

然而,目前关于 β -谷甾醇在视网膜疾病中的研究仍处于起步阶段,其具体作用靶点及信号通路尚未完全阐明。本研究通过整合网络药理学、分子对接及细胞、动物实验,首次揭示 β -谷甾醇通过 PON1/Caspase-3 通路抑制 RPE 细胞凋亡的分子机制,旨在为干性 ARMD 的药物干预提供新策略,并推动 β -谷甾醇的临床转化研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及细胞 选用 SPF 级别 C57BL/6 近交系雄性小鼠 18 只作为实验动物 (8 周龄,体质量 20 ± 2 g)。由北京维通利华实验动物技术有限公司提供 (实验动物生产许可证号:SCXK-京 2021-0006),实施标准化饲养管理。饲养参数设定包括:恒温控制 23 ± 1 °C,人工光照系

统 12 h 明暗交替循环及昼夜节律调控^[2, 21]。实验细胞使用人 RPE 细胞系 ARPE-19 (ATCC® CRL-2302™),培养于 DMEM/F12 培养基 (含 10% 胎牛血清, Gibco)。本研究符合伦理学标准,且通过伦理学委员会审查 (审批号: 2023048)。

1.1.2 主要试剂与仪器 NaIO_3 (Sigma-Aldrich, I4386); β -谷甾醇 (MedChemExpress, HY - N0151); PON1 抗体 (Abcam, ab24261); cleaved-Caspase3 抗体 (CST, 9664S); 羧甲基纤维素钠 (Macklin, C804625); 生理盐水 (碧云天, ST341); Micron IV 系统 (Phoenix Research Labs); 显微镜 (尼康 Eclipse); 电泳仪 (Bio-Rad Mini-PROTEAN 系统)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型建立与分组 将小鼠随机分为 3 组 (每组 $n=6$): 对照组尾静脉注射生理盐水,次日起每天灌胃 1 mL 0.5% 羧甲基纤维素钠;模型组建立 NaIO_3 诱导的小鼠干性 ARMD 模型^[22],使用 NaIO_3 40 mg/kg 单次尾静脉注射,次日起每天灌胃 1 mL 0.5% 羧甲基纤维素钠;治疗组使用 40 mg/kg NaIO_3 单次尾静脉注射后,次日起每天灌胃 1 mL 20 mg/kg β -谷甾醇 (溶于 0.5% 羧甲基纤维素钠)^[23-26]。各组均持续灌胃 14 d。

1.2.2 眼底照相 小鼠经 3% 异氟烷混合气体 (氧流量 1.5 L/min) 实施吸入式麻醉。参照国际视网膜成像标准操作流程,首先采用 0.5% 复方托吡卡胺滴眼液进行双眼散瞳处理,随后使用 Micron IV 小动物专用眼底成像系统 (Phoenix Research Labs, 美国) 在标准化暗室条件下采集视网膜血管造影图像^[2]。

1.2.3 视网膜电图 遵循国际临床视觉电生理学会标准操作规范,实验对象在完成 12 h 标准化暗适应处理后经异氟烷诱导麻醉,并采用 Micron IV 小动物视网膜电生理系统 (Phoenix Research Labs, 美国) 进行全视野闪光视网膜电图 (ff-ERG) 检测,各组刺激参数 (Flash Strength: 6.2 log (cd/m²), Duration: 10 ms, Delay Between Sweeps: 5.0 sec.) 均保持一致^[21]。

1.2.4 取材与切片制作及 HE 染色 异氟烷麻醉小鼠后,心脏灌注生理盐水和多聚甲醛,分离固定眼球。眼球石蜡包埋后脱水透明浸蜡,切片固定于载玻片。依据标准组织处理流程,石蜡切片依次经二甲苯脱蜡 (3×10 min)、梯度乙醇 (100%-70%) 复水后,采用 Harris 苏木精-伊红染色体系完成染色与分化返蓝。脱水透明后以中性树脂封片,使用光学显微镜系统进行视网膜组织形态学分析,Image-Pro Plus 软件测量视网膜厚度、外核层厚度及渗出灶面积,将对照组测量数据平均值视为 1,计算各组指标相对值^[27-29]。

1.2.5 网络药理学分析 (1) β -谷甾醇作用靶点筛选: β -谷甾醇满足以“生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 ”为筛选条件的化学活性成分要求,通过 TCSP 数据库 (<http://tcmspw.com/>) 进一步检索 β -谷甾醇的作用靶点^[30]; (2) 疾病靶点获取:以“dry age-related macular degeneration”为关键词,检索 ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>)、OMIM (<https://omim.org/>) 与 DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>) 数据库,获取 ARMD 相关靶点^[31-32]; (3) 交集靶点获取:使用 Venny 2.1 绘制韦恩图,获取 β -谷甾醇和 ARMD 疾病交集靶点信息^[33]。

1.2.6 分子对接 通过 PubChem 数据库获取目标化合物三维结构(SDF 格式),经 Open Babel 2.3.2 软件将文件格式转换为 PDB 格式。受体蛋白晶体结构取自 RCSB PDB 数据库,经 PYMOL 2.3.4 软件去除水分子及非必需配体后,使用 AutoDock Tools 1.5.7 软件完成质子化及电荷平衡,最终将受体-配体系统统一转换为 pdbqt 对接格式。利用 AutoDock Vina 软件(1.1.2)对受体蛋白与配体小分子进行对接,并利用 PLIP 分析对接结果。分子相互作用可视化采用 PYMOL 软件实现^[34-40]。

1.2.7 CCK-8 法检测 将 ARPE-19 细胞以 8 000 个/孔接种于 96 孔板,培养至完全贴壁。移除原培养基后,按以下分组及干预措施进行处理:对照组(使用不额外添加的完全培养基培养),模型组(1 200 μg/mL NaIO₃),低浓度组(1 200 μg/mL NaIO₃+5 μmol/L β-谷甾醇),中浓度组(1 200 μg/mL NaIO₃+10 μmol/L β-谷甾醇),高浓度组(1 200 μg/mL NaIO₃+15 μmol/L β-谷甾醇),向 96 孔板对照组以外各组中加入 1 200 μg/mL NaIO₃ 孵育 24 h 后弃去各孔培养液,向孔板中加入不同浓度的 β-谷甾醇继续孵育 6 h。处理结束后,弃去各孔培养液,每孔加入 90 μL 基础培养基与 10 μL CCK-8 试剂的混合液,继续孵育 3 h,采用酶标仪于 450 nm 波长处测定吸光度(OD 值),以未处理组细胞活性为基准(设为 1),计算各实验组相对细胞活性。

1.2.8 Hoechst 33342 染色 Hoechst 33342 染色检测细胞凋亡。ARPE-19 细胞系在预置无菌盖玻片的 6 孔细胞培养板中完成铺板培养。按实验分组处理后,每孔加入 2 mL 含 1 μg/mL Hoechst 33342 的染色液,避光孵育 30 min。孵育结束后,用 1×PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,滴加抗荧光淬灭封片剂固定盖玻片。全程避光操作,采用荧光显微镜拍摄^[21]。计算凋亡比例=(Hoechst 33342 阳性细胞数/细胞总数)×100%。

1.2.9 Western blot 实验 RIPA 裂解细胞提取总蛋白,以 β-Actin 为内参,SDS-PAGE 电泳后转膜,5%脱脂牛奶封闭 1 h,一抗(PON1 1:1000,cleaved-Caspase3 1:2000)4 ℃ 孵育过夜,HRP 标记二抗室温孵育 1 h,ECL 显影,Image J 量化条带灰度值。

统计学分析:数据以均数±标准差表示,使用 GraphPad Prism 软件进行单因素方差分析(ANOVA)及 Tukey 事后检验,*P*<0.05 为差异具有统计学意义^[41]。

2 结果

2.1 各组小鼠视网膜结构对比 眼底照相分析可见,对照组小鼠视网膜色泽均匀呈淡红色,视盘边界清晰且呈生理性淡黄色;模型组表现为视盘苍白伴视神经萎缩,视网膜广泛分布黄白色类玻璃膜疣样沉积物(drusen-like deposits);而治疗组 drusen 样病变面积较模型组明显减少(图 1A)。通过 HE 染色进行组织病理学观察可见对照组视网膜层次分明,RPE 层、光感受器层及外核层细胞排列紧密,未见异常沉积物;模型组呈现显著退行性病理特征,RPE 层连续性中断,光感受器外节紊乱,外核层细胞密度显著降低,层间结构模糊并伴多处黑色素沉积(渗出灶);β-谷甾醇干预后,治疗组视网膜结构完整性明显改善,外核层细胞密度增加,沉积物显著减少(图 1B)。

和对照组(视网膜全层厚度相对值:1.00±0.06,外核层厚度相对值:1.00±0.10,渗出灶面积相对值:1.00±0.21)

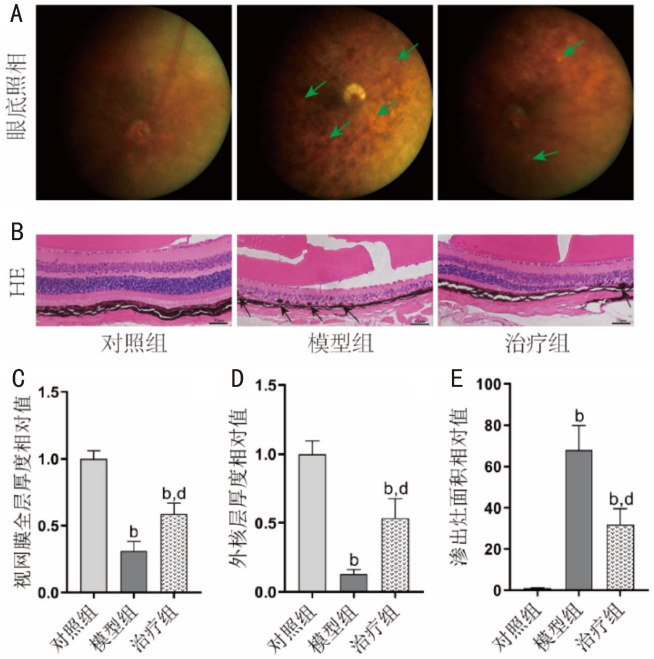


图 1 各组小鼠视网膜结构对比 A:各组小鼠眼底照相结果,绿色箭头指示玻璃膜疣沉积;B:各组小鼠视网膜 HE 染色结果,黑色箭头指示沉积物;C:基于视网膜 HE 染色的视网膜全层厚度相对值分析;D:外核层厚度相对值分析;E:渗出灶面积相对值分析;^b*P*<0.01 vs 对照组;^d*P*<0.01 vs 模型组。

相比,模型组(视网膜全层厚度相对值:0.31±0.07,外核层厚度相对值:0.13±0.03,渗出灶面积相对值:68.08±11.85)视网膜全层(图 1C)及外核层(图 1D)均明显变薄(均 *P*<0.01),而渗出灶面积较对照组明显增加(*P*<0.01,图 1E)。治疗组(视网膜全层厚度相对值:0.59±0.08,外核层厚度相对值:0.54±0.14,渗出灶面积相对值:31.69±7.98)视网膜全层(图 1C)及外核层(图 1D)较模型组均明显变厚(均 *P*<0.01),而渗出灶面积较模型组明显减少(*P*<0.01,图 1E)。以上结果表明,β-谷甾醇可以显著减轻 NaIO₃ 诱导的小鼠视网膜结构改变。

2.2 各组小鼠视网膜功能对比 如图 2 所示,与对照组(a 波振幅:57.68±18.64 μV,b 波振幅:182.0±18.99 μV)相比,模型组(a 波振幅:13.55±5.63 μV,b 波振幅:60.53±17.96 μV)小鼠在视网膜电图检测中表现出 a 波和 b 波信号幅度显著下降(均 *P*<0.01)。经 β-谷甾醇干预后,治疗组(a 波振幅:37.12±5.73 μV,b 波振幅:128.8±14.08 μV)视网膜电生理明显改善,其 a 波和 b 波振幅较模型组显著提升(均 *P*<0.01)。以上研究结果表明,β-谷甾醇可有效缓解 NaIO₃ 诱导的小鼠视网膜电生理异常。

2.3 交集靶点基因筛选 在 TCMSp 数据库(<http://tcmspw.com/>)检索到 β-谷甾醇作用靶点 31 个。在 ClinVar、OMIM 和 DisGeNET 数据库中共检索到 ARMD 疾病靶点基因 98 个。如图 3 所示,将 ARMD 疾病靶点(98 个)与 β-谷甾醇作用靶点(31 个)导入 Venny 2.1 在线数据库,获得 1 个交集靶点 PON1。

2.4 分子对接 分子对接结果表明,β-谷甾醇可与活性位点附近的 LYS-192、PHE-292、PHE-347、PHE-222、THR-332、VAL-346、ILE-291 七种氨基酸形成疏水键或氢键结合到 PON1(图 4)。

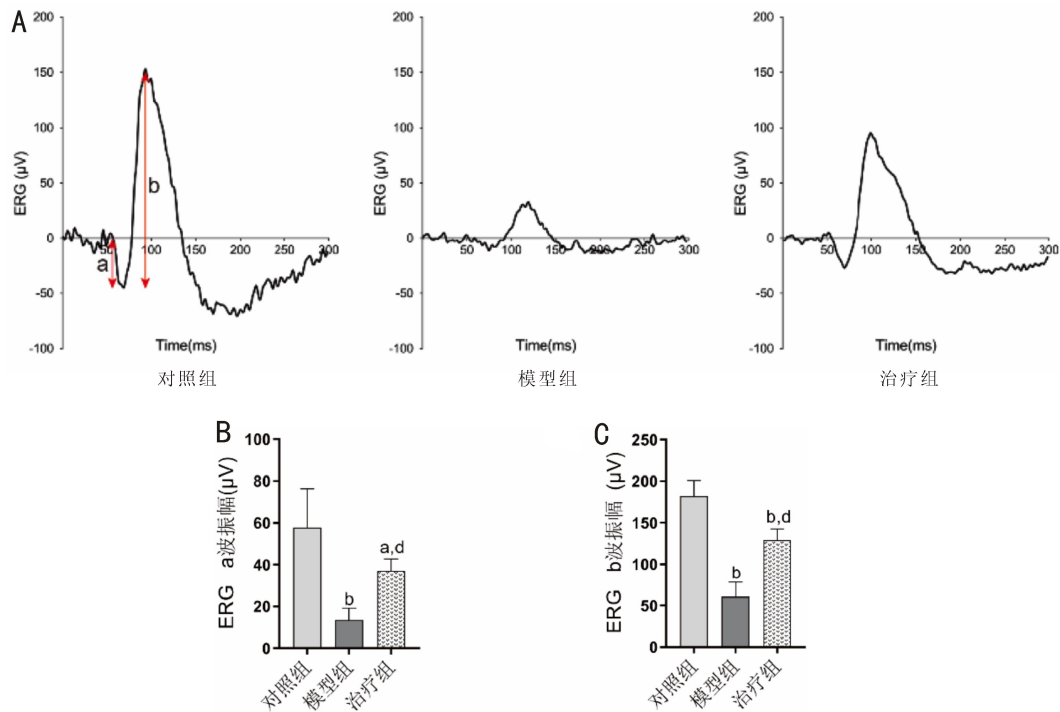


图2 各组小鼠视网膜功能对比 A:各组小鼠视网膜电图;B:各组小鼠a波振幅统计分析;C:各组小鼠b波振幅统计分析。 $n=6$;
^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ vs 对照组;^d $P<0.01$ vs 模型组。

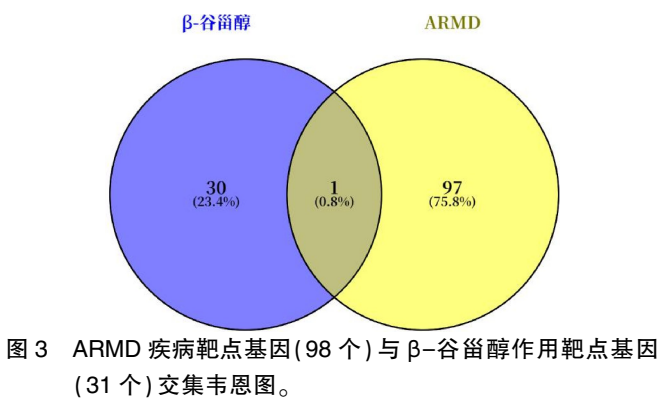


图3 ARMD疾病靶点基因(98个)与β-葡萄糖苷酶作用靶点基因(31个)交集韦恩图。

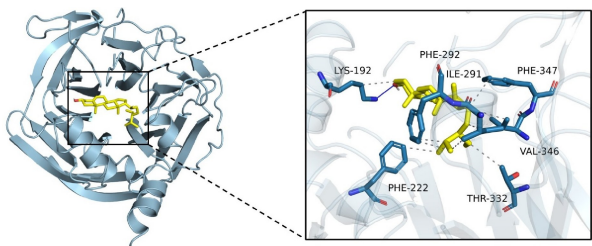


图4 β-葡萄糖苷酶与PON1分子对接图。

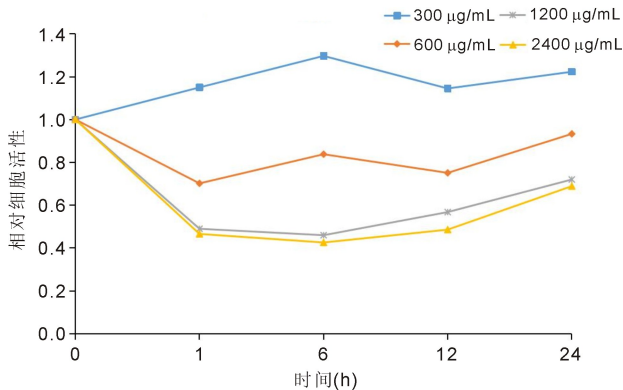


图5 CCK-8检测不同浓度NaIO₃处理对ARPE-19细胞活性的影响。

2.5 NaIO₃ 细胞造模条件探索 CCK-8 实验结果显示, NaIO₃ 对 ARPE-19 细胞活力呈现剂量与时间依赖性双重效应。低剂量处理(300 μg/mL)可短暂激活细胞代谢活性,而浓度超过300 μg/mL时,细胞存活率随剂量增加呈显著下降。1200 μg/mL NaIO₃ 干预24 h时,细胞存活率维持在72.0%±4.3%,表明该浓度在24 h可诱导亚致死损伤,适用于后续氧化应激模型构建(图5)。

2.6 CCK-8 检测 β-葡萄糖苷酶对细胞活性的影响 CCK-8 实验结果表明,β-葡萄糖苷酶作用 ARPE-19 细胞6 h时细胞活性最高(图6A)。设置三组不同浓度β-葡萄糖苷酶对NaIO₃

(1200 μg/mL)诱导的细胞损伤模型作用6 h进行干预,分别为低浓度组(5 μmol/L)、中浓度组(10 μmol/L)、高浓度组(15 μmol/L),结果显示与模型组(0.52±0.05)相比,中浓度组(0.89±0.04)β-葡萄糖苷酶处理可显著增加NaIO₃损伤后的细胞活性($P<0.01$,图6B)。因此选择β-葡萄糖苷酶10 μmol/L作用6 h进行后续实验。

2.7 β-葡萄糖苷酶对 NaIO₃ 诱导的细胞凋亡的影响 Hoechst 33342 染色结果表明,模型组(30.36%±2.94%)Hoechst 33342 阳性细胞较对照组(4.37%±0.77%)明显增加,而β-葡萄糖苷酶中浓度组(13.03%±1.87%)阳性细胞较模型组明显减少,差异有统计学意义($P<0.01$,图7A,B),表明β-葡萄糖苷酶可以显著减少NaIO₃诱导的ARPE-19细胞凋亡发生。

2.8 Western blot 检测各组蛋白表达 Western blot 实验结果显示,模型组(0.39±0.13)PON1蛋白表达较对照组(0.90±0.10)显著下调,而β-葡萄糖苷酶中浓度组(0.88±0.08)PON1表达较模型组显著上调(均 $P<0.01$,图8A,B)。此

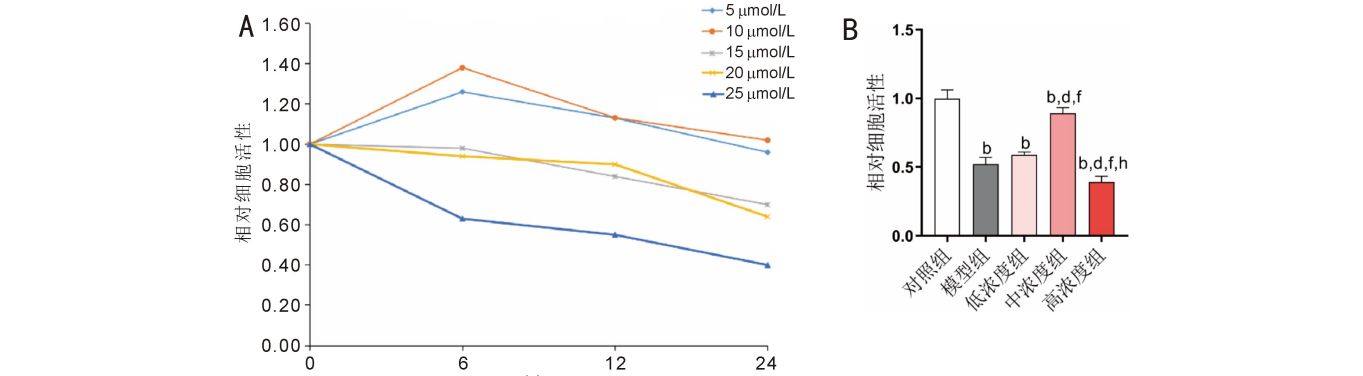


图 6 CCK-8 检测 β-谷甾醇对 ARPE-19 细胞活性的影响 A: β-谷甾醇对 ARPE-19 细胞活性的影响; B: CCK-8 检测 β-谷甾醇处理 6 h 时不同浓度 β-谷甾醇对 ARPE-19 细胞活性的影响; ^b*P*<0.01 vs 对照组; ^d*P*<0.01 vs 模型组; ^f*P*<0.01 vs 低浓度组; ^h*P*<0.01 vs 中浓度组。

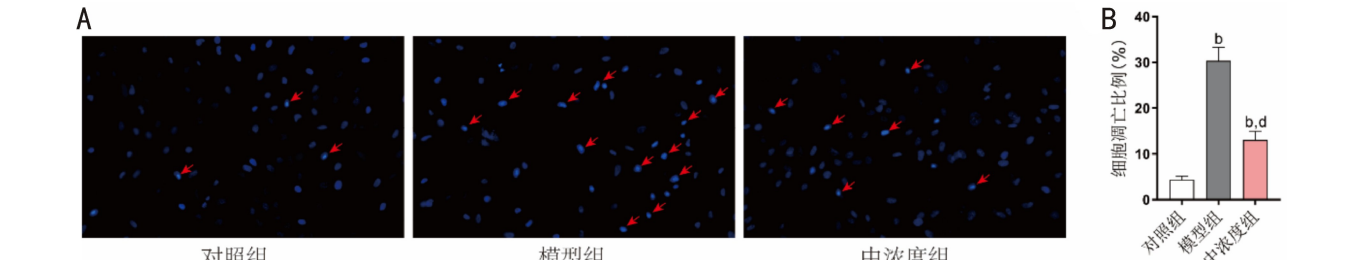


图 7 Hoechst 33342 染色检测凋亡 A: Hoechst 33342 染色结果(红色箭头指示凋亡细胞); B: ARPE-19 细胞凋亡比例分析。n = 6; ^b*P*<0.01 vs 对照组; ^d*P*<0.01 vs 模型组。

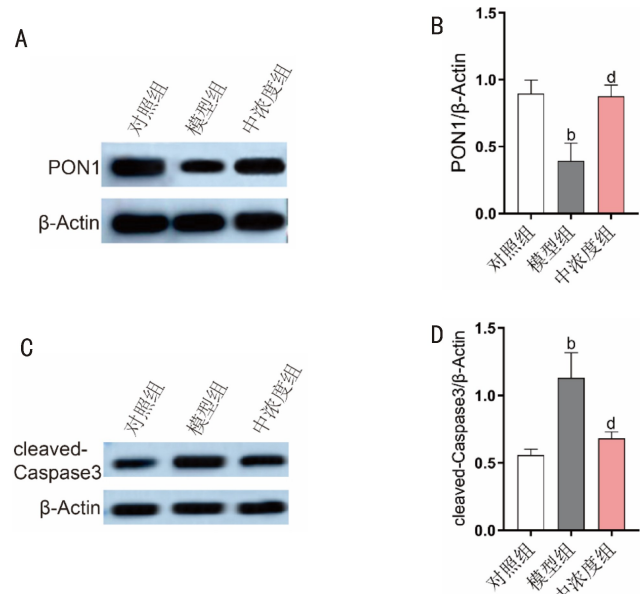


图 8 Western blot 检测蛋白表达 A: Western blot 检测各组 PON1 蛋白表达情况; B: PON1 蛋白定量分析; C: Western blot 检测各组 cleaved-Caspase3 蛋白表达情况; D: cleaved-Caspase3 蛋白定量分析。n = 3; ^b*P*<0.01 vs 对照组; ^d*P*<0.01 vs 模型组。

外,模型组(1.13±0.19) cleaved-Caspase3 蛋白表达较对照组(0.56±0.04)显著上调,而 β-谷甾醇中浓度组(0.68±0.05) cleaved-Caspase3 表达较模型组显著下调(均 *P*<0.01,图 8C,D)。以上结果表明,NaIO₃ 诱导的 ARPE-19 细胞损伤模型中,PON1 蛋白表达下调,cleaved-Caspase3 表达上调。而 β-谷甾醇(10 μmol/L)可以缓解这一情况,

使 PON1 蛋白表达升高,cleaved-Caspase3 表达下降。
3 讨论

β-谷甾醇作为植物甾醇的代表,可通过激活 Nrf2/ARE 通路增强抗氧化酶表达,并抑制线粒体膜电位下降^[15]。有研究表明,β-谷甾醇被用于保护上皮细胞免受脂多糖(LPS)诱导的细胞损伤,显著降低氧化应激和炎症,同时增加抗凋亡蛋白的表达,抑制细胞凋亡,提高脂质合成相关基因的表达^[42]。本研究在动物模型层面证实了 β-谷甾醇对视网膜结构和功能的显著保护作用。β-谷甾醇干预显著减少了模型小鼠视网膜特征性的黄白色类玻璃膜疣沉积,且有效增加因 NaIO₃ 损伤而变薄的视网膜全层及外核层厚度,并减少渗出灶面积。这些结构改善伴随视网膜电图记录到的功能恢复,表现为受损的 a 波和 b 波振幅的提升。这些结果证明了 β-谷甾醇在体内可有效对抗 NaIO₃ 诱导的视网膜退行性改变。

为深入探究其分子机制,我们整合了网络药理学预测与分子对接验证。网络药理学筛选出抗氧化酶 PON1 为 β-谷甾醇干预干性 ARMD 的关键潜在靶点,PON1 是抗氧化防御系统的关键分子,其基因多态性与 ARMD 风险显著相关^[20]。分子对接结果显示 β-谷甾醇能通过疏水键及氢键(关键涉及 LYS-192、PHE-222 等氨基酸)精确结合于 PON1 的活性口袋,这为 β-谷甾醇可能激活或稳定 PON1 功能提供了理论依据。CCK-8 实验证实 β-谷甾醇能显著提升 NaIO₃ 诱导的 ARPE-19 细胞氧化损伤模型活力,Hoechst 33342 染色结果进一步显示,β-谷甾醇能有效减少 NaIO₃ 诱导的细胞凋亡,并上调损伤模型中下调的 PON1 蛋白表达,同时抑制凋亡执行蛋白 cleaved-Caspase3 的表达。Caspase-3 作为凋亡执行者,cleaved-Caspase3 的

活化是 RPE 细胞死亡的标志事件^[43]。这与任衍开等^[44]提出的“PON1-线粒体凋亡通路”调控机制基本相符,清晰地勾勒出“β-谷甾醇 → PON1 ↑ → cleaved-Caspase3 ↓ → 抑制 RPE 凋亡”的信号传递链条,阐明了其保护作用的分子基础。不仅深化了对 β-谷甾醇视网膜保护机制的认识,也首次将 PON1 与 Caspase-3 依赖性凋亡通路在干性 ARMD 的氧化损伤场景中联系起来,为“PON1-线粒体凋亡通路”调控假说提供了直接实验证据。β-谷甾醇兼具抗氧化(通过激活 PON1 等)与抗凋亡双重功效,相较于单一抗氧化剂(如 AREDS 配方)或靶向补体药物(如抗 C3/C5 抗体),可能提供更全面的神经保护,同时作用于疾病早期(氧化应激)和进展期(细胞死亡)。

研究通过整合网络药理学预测、分子对接验证及体内外实验,系统阐明了 β-谷甾醇靶向 PON1/Caspase-3 通路减轻氧化应激诱导视网膜损伤的核心机制,首次将 β-谷甾醇的作用靶点锁定于 PON1,并通过分子对接揭示了其与 PON1 活性口袋中关键氨基酸(LYS-192、PHE-222 等)的精确结合模式(疏水键+氢键),为理解其激活 PON1 的分子基础提供了结构生物学依据。但尚缺乏直接的因果性证据,未来研究将利用 CRISPR-Cas9 等技术特异性敲除视网膜组织中的 PON1 基因,明确 β-谷甾醇的保护作用是否依赖于 PON1 的存在。

然而,研究仍存在一定局限性,NaIO₃ 诱导的小鼠模型模拟干性 ARMD 氧化损伤虽然被广泛应用,但该模型主要反映急性氧化应激,与人类干性 ARMD 的慢性、多因素致病过程存在差异。未来需要在更贴近人类疾病的慢性模型(如衰老模型、特定基因敲除模型)中验证 β-谷甾醇的长期疗效。

综上所述,β-谷甾醇可通过调控 PON1 抑制 Caspase-3 依赖性凋亡通路,从而缓解 NaIO₃ 诱导的视网膜氧化损伤。本研究首次揭示 β-谷甾醇通过靶向 PON1/Caspase-3 通路减轻视网膜损伤的作用机制。这一发现不仅为干性 ARMD 治疗提供了实验依据,也为开发基于 PON1 调控的新型疗法奠定了理论基础。然而本研究仍存在一定局限性,未来需要在 ARMD 慢性模型中验证 β-谷甾醇的长期疗效,并通过 CRISPR-Cas9 敲除 PON1 以验证其作用的必要性。

利益冲突声明:本文不存在利益冲突。

作者贡献声明:栗小丽论文选题与修改,初稿撰写;王伟、李娟文献检索、数据分析;赵朝霞选题指导,论文修改及审阅。所有作者阅读并同意最终的文本。

参考文献

[1] Keenan TDL, Cukras CA, Chew EY. Age-related macular degeneration; epidemiology and clinical aspects. *Adv Exp Med Biol*, 2021,1256:1-31.

[2] 梁晓茜,陈王灵,陈运信. 基于自噬探讨玻璃体腔注射贝伐珠单抗对年龄相关性黄斑变性视网膜损伤的保护作用. *中国医院用药评价与分析*, 2023,23(3):281-286.

[3] Sheth JU, Stewart MW, Narayanan R, et al. Macular neovascularization. *Surv Ophthalmol*, 2025,70(4):653-675.

[4] Wheeler S, Mahmoudzadeh R, Randolph J. Treatment for dry age-related macular degeneration; where we stand in 2024. *Curr Opin*

Ophthalmol, 2024,35(5):359-364.

[5] Cvekl A, Vijg J. Aging of the eye: Lessons from cataracts and age-related macular degeneration. *Ageing Res Rev*, 2024,99:102407.

[6] Evans JR, Lawrenson JG. Antioxidant vitamin and mineral supplements for slowing the progression of age-related macular degeneration. *Cochrane Database Syst Rev*, 2023,9(9):CD000254.

[7] 智心禹. 褪黑激素通过调控 Nrf2 核移位抑制干性年龄相关性黄斑变性感光器细胞铁死亡. *中国医科大学*, 2023.

[8] 王巧云,解来青. 视网膜色素上皮细胞间紧密连接及其在 AMD 发病过程中的作用研究进展. *国际眼科杂志*, 2023,23(2):232-235.

[9] Bakri SJ, Bektas M, Sharp D, et al. Geographic atrophy: Mechanism of disease, pathophysiology, and role of the complement system. *J Manag Care Spec Pharm*, 2023,29(5-a Suppl): S2-S11.

[10] Heier JS, Cohen MN, Chao DL, et al. Phase 1 study of JNJ-81201887 gene therapy in geographic atrophy secondary to age-related macular degeneration. *Ophthalmology*, 2024,131(12):1377-1388.

[11] Dinarvand D, Panthakey J, Hassan A, et al. Frailty and visual impairment in elderly individuals: improving outcomes and modulating cognitive decline through collaborative care between geriatricians and ophthalmologists. *Diseases*, 2024,12(11):273.

[12] Chew EY, Clemons TE, Agrón E, et al. Long-term outcomes of adding lutein/Zeaxanthin and ω-3 fatty acids to the AREDS supplements on age-related macular degeneration progression: AREDS2 report 28. *JAMA Ophthalmol*, 2022,140(7):692-698.

[13] Enzbrenner A, Zulliger R, Biber J, et al. Sodium iodate-induced degeneration results in local complement changes and inflammatory processes in murine retina. *Int J Mol Sci*, 2021,22(17):9218.

[14] 谢雨芳. β-谷甾醇调节胶质瘤增殖、迁移和凋亡的作用及机制研究. *石河子大学*, 2022.

[15] Peng S, Liao L, Deng H, et al. Alleviating effect of lipid phytochemicals in seed oil (*Brassica napus* L.) on oxidative stress injury induced by H2O2 in HepG2 cells via Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway. *Nutrients*, 2024,16(17):2820.

[16] 王星烨,孔祥日,金梦丽,等. β-谷甾醇对阿尔茨海默病模型小鼠认知功能的改善作用及其机制. *吉林大学学报(医学版)*, 2023,49(3):599-607.

[17] 杨凤姣. 基于 SIRT1/p53 通路探究补精益视片保护 C57BL/6J 小鼠慢性高血压模型视网膜及 RGCs 的作用及机制研究. *成都中医药大学*, 2023.

[18] 闫月飞,刘健,刘毅,等. 基于整合用药网络探究中药治疗 DR 的药物机制. *中国中医眼科杂志*, 2024,34(9):812-819.

[19] Yang MM, Liu HL, Zhou JW, et al. Combining network pharmacological analysis and animal experiments to explore the pharmacological mechanism of zhangyanming tablets in diabetic retinopathy. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2025,18:1323-1339.

[20] Oczos J, Grimm C, Barthelmes D, et al. Regulatory regions of the paraoxonase 1 (PON1) gene are associated with neovascular age-related macular degeneration (AMD). *Age (Dordr)*, 2013,35(5):1651-1662.

[21] 徐卫星. CAMK2D 对磺酸钠诱导视网膜损伤、激光诱导 CNV 生成及 RPE 屏障功能的影响. *大连医科大学*, 2024.

[22] 李妍,牟琳,陈廷. 健脾补肾益视方对小鼠干性年龄相关性黄斑变性的保护作用及其机制. *国际眼科杂志*, 2024,24(7):1032-1037.

[23] 肖桂兰. β-谷甾醇对戊四唑诱导癫痫模型小鼠的保护作用研究. *赣南医科大学*, 2025.

[24] 郭惠智. 基于网络药理学探讨 β-谷甾醇抑制破骨细胞和减少去卵巢小鼠骨丢失的作用机制. *广州中医药大学*, 2022.

[25] 闫芷越. β -谷甾醇配伍黄芪甲苷 IV 促糖尿病创面愈合的机制研究. 天津医科大学, 2022.

[26] Ma LY, Ma Y, Liu YX. β -Sitosterol protects against food allergic response in BALB/c mice by regulating the intestinal barrier function and reconstructing the gut microbiota structure. *Food Funct*, 2023,14(10):4456-4469.

[27] 李兆焕. IRI/scFv 异靶点共载脂质体的制备及其用于结直肠癌治疗的研究. 潍坊医学院, 2022.

[28] 王凯, 李卫, 李志芳, 等. β -谷甾醇靶向 CDC25B 抑制肝癌细胞增殖. 中山大学学报(医学科学版), 2022,43(4):675-684.

[29] 武萌萌, 张欣, 苏志伟, 等. 芪黄疽愈方调节 ApoE-/-小鼠巨噬细胞相关因子干预动脉粥样硬化形成的机制研究. 中华中医药杂志, 2024,39(1):376-381.

[30] Gao S, Tang LY, Ma JY, et al. Evaluation of the mechanism of Gong Ying San activity on dairy cows mastitis by network pharmacology and metabolomics analysis. *PLoS One*, 2024,19(4):e0299234.

[31] Piñero J, Rodriguez Fraga PS, Valls-Margarit J, et al. Genomic and proteomic biomarker landscape in clinical trials. *Comput Struct Biotechnol J*, 2023,21:2110-2118.

[32] Han YH, Wang YQ, Bo JQ, et al. ABCC1 is a predictive biomarker for prognosis and therapy in hepatocellular carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2023,27(8):3597-3611.

[33] He QM, Liu C, Wang XH, et al. Exploring the mechanism of curcumin in the treatment of colon cancer based on network pharmacology and molecular docking. *Front Pharmacol*, 2023,14:1102581.

[34] 石峻力, 王旭, 盛沛, 等. 运用数据挖掘和网络药理学探讨糖尿病认知功能障碍中医用药规律和作用机制. 天然产物研究与开发, 2021,33(7):1223-1235.

[35] 周宇石, 张明雪. 基于网络药理学和分子对接技术探讨瓜蒌薤白半夏汤治疗冠心病作用机制. 辽宁中医药大学学报, 2022,24(7):122-128.

[36] 季嘉城, 袁敏艳, 张硕, 等. 基于网络药理学方法和分子对接技术探讨刺梨治疗高血脂症的作用机制. 中国药理学通报, 2022,38(10):1572-1578.

[37] 麻巧巧. 17 β -羟基类固醇脱氢酶的分子改造及应用. 江南大学, 2024.

[38] 张靖鹏, 张得钧. 基于网络药理-分子对接-体外抗氧化探究沙棘防治高血压的作用机制. 实用中西医结合临床, 2024,24(15):1-9.

[39] 谢诗琴, 邓娜. 结合网络药理学和分子对接技术分析绞股蓝皂苷在肥胖小鼠中的微生态调节机制. 中国微生态学杂志, 2024,36(8):907-914,921.

[40] 雷本蓝, 杨江平, 陈艳芳, 等. 基于网络药理学结合实验验证探讨桔梗皂苷 D 抗鼻咽癌的作用机制. 广西医科大学学报, 2025,42(1):65-73.

[41] 王丽, 田飞鸿, 饶木艳, 等. 芹菜素对糖尿病小鼠肠动力障碍的调节作用研究. 医学食疗与健康, 2020,18(2):7,9.

[42] Fan YT, Shen JL, Liu XL, et al. β -sitosterol suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation and lipogenesis disorder in bovine mammary epithelial cells. *Int J Mol Sci*, 2023,24(19):14644.

[43] 甄昕. 基于 JNK/Caspase-3 信号通路探究连桂宁心汤治疗心律失常的作用机制. 天津中医药大学, 2023.

[44] 任衍开. 硫化氢对甲醛损伤 PC12 细胞的保护作用及其机制. 南华大学, 2011.