

魏抗抗,董伟华,帖红艳,等. 基于 miR-34a/SIRT1 轴研究柚皮素对 H₂O₂ 诱导的人视网膜色素上皮细胞氧化损伤的保护作用[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 78-85.

Wei KK, Dong WH, Tie HY, et al. The protective effect of naringenin on H₂O₂-induced oxidative damage of human retinal pigment epithelial cells via the miR-34a/SIRT1 axis [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 78-85.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 04. 011

基于 miR-34a/SIRT1 轴研究柚皮素对 H₂O₂ 诱导的人视网膜色素上皮细胞氧化损伤的保护作用

魏抗抗^{1*}, 董伟华¹, 帖红艳², 何章彪¹, 赵琳¹

(1. 商丘医学高等专科学校五官科教研室, 河南 商丘 476006;

2. 郑州大学基础医学院人体解剖学教研室, 郑州 450001)

【摘要】 目的 基于 miR-34a/沉默信息调节因子 1(SIRT1)轴探讨柚皮素对 H₂O₂ 诱导的人视网膜色素上皮细胞(RPE)氧化损伤的保护作用。**方法** MTT 法检测不同浓度的柚皮素对 H₂O₂ 诱导的人视网膜色素上皮细胞 ARPE-19 存活率的影响以选取适宜柚皮素浓度为后续实验浓度。取对数期生长的 ARPE-19 细胞分为对照组、H₂O₂ 组(200 μmol/L)、20 μg/mL 柚皮素组、20 μg/mL 柚皮素+mimics NC 组、20 μg/mL 柚皮素+miR-34a mimics 组。采用 RT-qPCR 检测细胞中 miR-34a 和 SIRT1 mRNA 的表达,MTT 法及 Annexin V-FITC/PI 双染分别检测细胞存活与凋亡情况,荧光探针检测细胞内 ROS 水平,生化法检测 SOD 活性、MDA 和 GSH 水平,并采用 JC-1 法检测线粒体膜电位(MMP),Western blot 检测 SIRT1 及 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达。**结果** 与对照组相比,H₂O₂ 组 ARPE-19 细胞中 miR-34a 表达、ARPE-19 细胞凋亡率、ROS、MDA 含量、Bax 和 Caspase-3 表达显著升高($P<0.05$),SIRT1 mRNA 表达、ARPE-19 细胞存活率、SOD、GSH 含量、MMP 水平、SIRT1 和 Bcl-2 表达显著降低($P<0.05$);与 H₂O₂ 相比,柚皮素可改善 H₂O₂ 诱导的 ARPE-19 细胞损伤,下调 miR-34a 表达,降低 ROS、MDA、Bax 和 Caspase-3 含量($P<0.05$),上调 SIRT1、MMP、Bcl-2 表达,增加 GSH、SOD 活性($P<0.05$);上调 ARPE-19 细胞 miR-34a 的表达,可逆转柚皮素对 H₂O₂ 诱导的 RPE 细胞氧化损伤的保护作用。**结论** 柚皮素可能通过下调 miR-34a,促进 SIRT1 的表达,抑制 RPE 细胞凋亡,保护 H₂O₂ 诱导的 RPE 细胞氧化损伤。

【关键词】 柚皮素;视网膜色素上皮细胞;氧化损伤;miR-34a;沉默信息调节因子 1

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 04-0078-08

The protective effect of naringenin on H₂O₂-induced oxidative damage of human retinal pigment epithelial cells via the miR-34a/SIRT1 axis

WEI Kangkang^{1*}, DONG Weihua¹, TIE Hongyan², HE Zhangbiao¹, ZHAO Lin¹

(1. Department of Otolaryngology, Shangqiu Medical College, Shangqiu 476006, China.

2. Department of Human Anatomy, School of Basic Medicine, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001)

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect of naringenin on H₂O₂-induced oxidative damage of human retinal pigment epithelial (RPE) cells via the miR-34a/silent information regulator 1 (SIRT1) axis. **Methods** MTT assay was used to detect the effect of naringenin at different concentrations on the survival rate of ARPE-19 cells treated with H₂O₂, and the appropriate naringenin concentration for subsequent experiments was identified. ARPE-19 cells

【基金项目】 2016 年度河南省医学科技攻关计划项目(201602105)。

【作者简介】 魏抗抗(1985—),女,本科,讲师,研究方向:眼科疾病诊断及教学。E-mail: wkk29491871@163.com

in logarithmic phase were divided into the control group, H_2O_2 group (200 $\mu\text{mol/L}$), 20 $\mu\text{g/mL}$ naringenin group, 20 $\mu\text{g/mL}$ naringenin+mimics NC group and 20 $\mu\text{g/mL}$ naringenin+miR-34a mimics group. RT-qPCR was used to detect the expression of miR-34a and SIRT1 mRNA, MTT assay and Annexin V-FITC/PI double staining were used to detect cell survival and apoptosis, respectively. A fluorescence probe was used to detect the level of ROS, and a biochemical method was used to detect the activity of SOD and levels of MDA and GSH. JC-1 method was used to detect the mitochondrial membrane potential (MMP), and Western blot was used to detect the proteins expression of SIRT1 and Bcl-2, Bax and Caspase-3. **Results** The expression of miR-34a, apoptosis rate, contents of ROS and MDA and expression of Bax and Caspase-3 in ARPE-19 cells were significantly increased in the H_2O_2 group compared with those in the control group ($P < 0.05$). The expression of SIRT1 mRNA, survival rate of APRE-19 cells, contents of SOD and GSH, level of MMP, expression of SIRT1 and Bcl-2 were significantly decreased in the H_2O_2 group compared with those in the control group ($P < 0.05$). Naringenin improved the damage of ARPE-19 cells induced by H_2O_2 , down-regulated the expression of miR-34a, decreased the contents of ROS, MDA, Bax and Caspase-3 ($P < 0.05$), up-regulated the expression of SIRT1, MMP and Bcl-2 and increased the activities of GSH and SOD compared with effects in the H_2O_2 group ($P < 0.05$). Up-regulation of miR-34a expression in ARPE-19 cells reversed the protective effect of naringenin on H_2O_2 -induced oxidative damage in RPE cells. **Conclusions** Naringenin down-regulates miR-34a, promotes the expression of SIRT1, inhibits the apoptosis of RPE cells and protects RPE cells from oxidative damage induced by H_2O_2 .

【Keywords】 naringenin; retinal pigment epithelial cells; oxidative damage; miR-34a; silence information regulator 1

年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 是一种累进性和变性性眼病, 会影响视网膜的黄斑区域, 是导致老年人严重和永久性视力障碍及失明的常见原因^[1]。AMD 发生率较高, 据估计全球范围内 AMD 的人数到 2040 年将增加到 3 亿^[2], 严重影响患者的生活质量, 也给经济造成沉重负担。AMD 的主要表现为视网膜色素上皮细胞 (retinal pigment epithelial cells, RPE) 对视细胞外节盘膜吞噬消化能力降低, 导致未被完全消化的盘膜残余小体存在, 形成玻璃膜疣, 从而导致视力受损甚至失明^[3]。虽然 AMD 的发病机制尚未完全了解, 但 RPE 功能障碍在 AMD 的进展中发挥中心作用^[4-6]。

据报道, miR-34a 在调节细胞增殖、迁移、分化和凋亡中至关重要, 可抑制 RPE 细胞的增殖和迁移^[7]; miR-34a 的调节功能与年龄相关性疾病 (包括 AMD) 中的沉默信息调节因子 1 (silence information regulator 1, SIRT1) 有关, 研究显示 miR-34a 的显著上调, 可导致细胞中 SIRT1 表达降低, 使 ARPE-19 细胞对氧化应激的耐受性降低^[8]。氧化应激在 AMD 的发展进程中起关键作用, 抗氧化系统组分活性与 AMD 的严重程度有关, 补充抗氧化剂可以保护 RPE 免受氧化应激损伤, 可预防或治疗 AMD^[9]。柚皮素是一类黄酮类化合物, 在柑橘类物种中含量丰富, 具有强大的抗炎^[10] 和抗氧化活性^[11]。研究

发现柚皮素可抑制视网膜组织神经节细胞凋亡, 降低糖尿病视网膜病变大鼠氧化应激损伤^[12]; 然而, 目前尚不清楚柚皮素是否可以预防 AMD, 且柚皮素在氧化应激诱导的 RPE 损伤中的作用尚未可知。为此, 本研究采用 H_2O_2 诱导人 RPE 氧化损伤, 初步探讨柚皮素能否通过调控 miR-34a 减轻 RPE 氧化应激损伤。

1 材料和方法

1.1 细胞

人视网膜色素上皮细胞系 ARPE-19 (ATCC) 购自上海青旗生物科技发展有限公司, 货号: BFN60807591。

1.2 主要试剂与仪器

柚皮素 ($\geq 95\%$, 货号: 67604-48-2)、过氧化氢 (H_2O_2 , $\geq 98\%$, 货号: 247079-84-1) 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司; miR-34a 模拟物 (mimics) 和阴性对照 (NC) 购自上海 GenePharma 公司; TRIzol RNA 分离试剂 (日本 TaKaRa, 货号: 9108-1); SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 试剂盒 (日本 TaKaRa, 货号: HRR041A-1); PCR 引物的设计合成由美国赛默飞世尔科技公司完成; Lipofectamine 2000 (11668019) 购自美国 Invitrogen 公司; 胎牛血清、DMEM 培养基、胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司, 货号: 16000044、10569-044、25200056), MTT、BCA、JC-1

法线粒体膜电位检测及 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、RIPA 裂解液均购自碧云天生物科技公司(碧云天生物科技公司,货号:C0009 S、P0010、C2006、C1062 L、P0013B);活性氧(ROS)检测试剂盒 DCFH-DA(北京索莱宝科技有限公司,货号:CA1410-500);WST-1 法超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、TBA 法丙二醛(malondialdehyde, MDA)及微板法还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号:A001-3-2、A003-1-2、A006-2-1);兔抗人 SIRT1(ab32441)、Bcl-2(ab32124)、Bax(ab182733)、Caspase-3(ab32150)、 β -actin(ab8227)、山羊抗兔 IgG H&L(HRP)(ab205718)购自英国 abcam 公司。

细胞培养箱购于美国赛默飞世尔科技公司;IX73 倒置荧光显微镜购于日本奥林巴斯公司;ABI Prism[®] 7300 型荧光定量 PCR 仪购于美国应用生物系统公司;BD FACSCanto II 流式细胞仪、iMark680 多功能酶标仪及蛋白转膜装置均来于美国 Bio-Rad 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 柚皮素浓度的筛选

ARPE-19 细胞置于 DMEM 培养基(100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素及 10% 胎牛血清)中培养,条件为 37℃,5% CO₂。取对数期生长的 ARPE-19 细胞,以 6×10^3 细胞/孔的浓度接种到 96 孔板中,待细胞贴壁后,向培养基中添加不同浓度(0、5、10、20、40 μ g/mL)的柚皮素预处理 24 h,然后用 200 μ mol/L H₂O₂ 处理 12 h,每个浓度设置 6 个复孔。在 37℃ 的 5% CO₂ 中继续培养,随后将 MTT 溶液(5 mg/mL,20 μ L)在 12、24、48 h 时加入各孔并孵育 4 h,吸去上层清液后每孔加入 150 μ L 的 DMSO,490 nm 波长处测定各孔吸光度(OD),计算细胞存活率。选取可增加 ARPE-19 细胞活性的柚皮素浓度为后续实验浓度。细胞存活率=(用药组 OD 值-调零孔的 OD 值)/(对照组 OD 值-调零孔的 OD 值)×100%。

1.3.2 实验分组及转染

将对数期生长的 ARPE-19 细胞分成 5 个处理组:(1)对照组:未经处理的 ARPE-19 细胞;(2)H₂O₂ 组:ARPE-19 细胞用 200 μ mol/L H₂O₂ 处理 12

h^[3];(3)20 μ g/mL 柚皮素组:ARPE-19 细胞用 20 μ g/mL 柚皮素预处理 24 h,再用 200 μ mol/L H₂O₂ 处理 12 h;(4)20 μ g/mL 柚皮素 + NC 组:用 Lipofectamine 2000 将 100 nmol/L miR-34a 阴性对照(NC)转染 ARPE-19 细胞,转染 24 h 后,给予 20 μ g/mL 柚皮素预处理 24 h,再用 200 μ mol/L H₂O₂ 处理 12 h;(5)20 μ g/mL 柚皮素 + miR-34a mimics 组:用 Lipofectamine 2000 将 100 nmol/L miR-34a mimics 转染 ARPE-19 细胞,转染 24 h 后,给予 20 μ g/mL 柚皮素预处理 24 h,再用 200 μ mol/L H₂O₂ 处理 12 h。在 37℃ 的 5% CO₂ 中继续培养 48 h。

1.3.3 RT-qPCR 检测 mRNA

48 h 后从培养 ARPE-19 细胞中提取总 RNA,后反转录为 cDNA 并扩增。20 μ L 反应体系:cDNA (200 ng/ μ L)2 μ L,SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (2×)10 μ L,上下游引物各 0.4 μ L,ddH₂O 7.2 μ L。反应条件:40 个循环,先预变性 10 min(94℃),后变性 15 s(95℃),随后退火 20 s(60℃),最后延伸 20 s(75℃)。相对 miR-34a(对照 U6)和 SIRT1 mRNA(对照 GAPDH)的表达量采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法计算,引物序列见表 1。

1.3.4 MTT 法检测细胞活力

对数期生长 ARPE-19 细胞接种到 96 孔板,浓度 6×10^3 细胞/孔,按照 1.3.2 项步骤处理,48 h 后每孔中加入 20 μ L 的 MTT 溶液(5 mg/mL),于培养箱中孵育 4 h,吸去上层清液后加入 150 μ L 的 DMSO,各孔吸光度(OD)在 490 nm 波长处测定,计算细胞存活率。

1.3.5 流式细胞术检测细胞凋亡

取对数期生长的 ARPE-19 细胞,按照 1.3.2 项步骤处理,将培养的 ARPE-19 细胞用 0.25% 胰蛋白酶进行消化处理,离心,去除上层清液,PBS 洗涤,随后将细胞重悬,密度为每毫升 1×10^6 细胞,避光孵育

表 1 RT-qPCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of RT-qPCR

基因 Gene	引物序列 Primer sequence
miR-34a	F:5'-GCCCTGGCAGTGTCTTAG-3'
	R:5'-CAGTGCCTGTCGTGGAGT-3'
U6	F:5'-CGCTTCGGCAGCACATATAC-3'
	R:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'
SIRT1	F:5'-GGAGGAGCTGGATTTTGGGACTGAT-3'
	R:5'-GGTGGAACAATTCCTGTACCTGCACA-3'
GAPDH	F:5'-GAGTCAACGGATTTGGTCTG-3'
	R:5'-TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3'

15 min(需加入 5 μ L Annexin V-FITC 及 5 μ L PI), 细胞凋亡率用流式细胞仪分析并依步骤操作。

1.3.6 荧光探针检测细胞内 ROS 水平

取对数期生长的 ARPE-19 细胞,按照 1.3.2 项步骤处理,ARPE-19 细胞用 PBS 洗涤 3 次,与 10 mmol/L 的 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)于 37℃ 避光孵育 30 min。后用酶标仪检测二氯荧光素(DCF)荧光(激发波长 488 nm、发射波长 525 nm),其荧光强度代表 ROS 水平。

1.3.7 生化法检测 SOD 活性、MDA 和 GSH 水平

按照 1.3.2 项步骤处理 ARPE-19 细胞,收集细胞培养上清液,按照试剂盒说明书的操作检测 SOD 活性、MDA 和 GSH 水平。

1.3.8 JC-1 法检测线粒体膜电位(MMP)

按照线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1 法)说明书步骤进行染色。按照 1.3.2 项步骤处理,向每孔加入 JC-1(DMSO 溶解为浓度 5 mg/mL),使终浓度为 10 μ g/mL,于培养箱中避光孵育 20 min,将 96 孔板置于多功能荧光酶标仪检测荧光值,激发光为 488 nm,发射光为 530 nm 时(绿色荧光,检测 JC-1 单体)的荧光值为 A1;激发光为 529 nm,发射光为 590 nm 时(红色荧光,检测 JC-1 聚合物)的荧光值为 A2。各组的荧光值 $A = A2/A1$,最终以相对荧光值对 MMP 进行定量分析。相对荧光值 = 实验组 A/对照组 A。

1.3.9 Western blot 检测 SIRT1 和凋亡相关蛋白表达

使用 RIPA 裂解液提取 ARPE-19 细胞中蛋白质

并测定蛋白浓度(BCA 法),随后取等量蛋白质样品上样,每条泳道 30 μ g/泳道,SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜封闭,加入一抗 SIRT1、Bcl-2、Bax、Caspase-3、 β -actin(1 : 1000),孵育过夜(4℃)后加入二抗(1 : 5000),室温孵育 1 h,ECL 显色。内参均为 β -actin,并计算目的条带相对表达水平。

1.4 统计学方法

SPSS 22.0 和 Image-Pro Plus 分析数据。平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用单向方差分析(ANOVA)和 Tukey 事后检验比较多组测量数据之间的差异。以上所有实验均重复 3 次, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

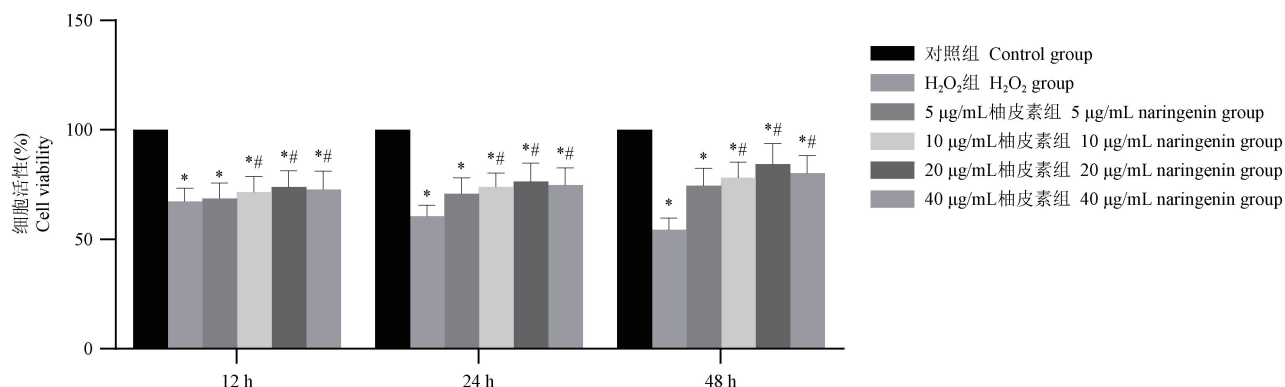
2 结果

2.1 柚皮素的浓度筛选

MTT 结果显示,柚皮素在浓度为 10、20 μ g/mL 时培养 48 h 后可显著提高 H_2O_2 诱导的 ARPE-19 细胞活力($P < 0.05$),且浓度为 20 μ g/mL 时对 ARPE-19 细胞活力的促进作用优于 10 μ g/mL,而 40 μ g/mL 柚皮素处理的细胞活性较 20 μ g/mL 柚皮素明显降低,见图 1;因此选择 20 μ g/mL 柚皮素为后续实验药物干预浓度。

2.2 柚皮素对 H_2O_2 诱导的 ARPE-19 细胞 miR-34a 和 SIRT1 mRNA 表达的作用

与对照组相比, H_2O_2 组 miR-34a 表达明显升高,而 SIRT1 mRNA 表达明显降低($P < 0.05$);与 H_2O_2 组相比,20 μ g/mL 柚皮素组和 20 μ g/mL 柚皮素+mimics NC 组细胞中 miR-34a 表达明显降低,



注:与对照组比,* $P < 0.05$;与 H_2O_2 组比,# $P < 0.05$ 。

图 1 不同浓度的柚皮素对细胞活性的影响

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with the H_2O_2 group, # $P < 0.05$.

Figure 1 Effects of naringenin at different concentrations on cell viability

SIRT1 mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$) ; 与 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素组相比, 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素 + miR-34a mimics 组细胞中 miR-34a 表达明显升高, SIRT1 mRNA 表达明显降低 ($P < 0.05$) , 见图 2。

2.3 柚皮素对 H_2O_2 诱导的 ARPE-19 细胞活力的作用

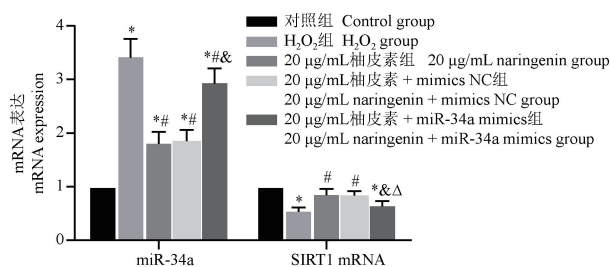
与对照组相比, H_2O_2 组细胞存活率明显降低 ($P < 0.05$) ; 与 H_2O_2 组相比, 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素组和 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素 + mimics NC 组细胞存活率明显升高 ($P < 0.05$) ; 与 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素组相比, 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素 + miR-34a mimics 组细胞存活率明显降低 ($P < 0.05$) , 见图 3。

2.4 柚皮素对 H_2O_2 诱导的 ARPE-19 细胞凋亡的作用

与对照组 (3.28 ± 0.41) % 相比, H_2O_2 组 ARPE-19 细胞凋亡率 (17.85 ± 1.23) % 明显升高 ($P < 0.05$) ; 与 H_2O_2 组相比, 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素组 (9.63 ± 0.95) % 和 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素 + mimics NC 组 (10.07 ± 1.03) % 细胞凋亡率明显降低 ($P < 0.05$) ; 与 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素组相比, 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素 + miR-34a mimics 组 (14.86 ± 1.17) % 细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.05$) , 见图 4。

2.5 柚皮素对 H_2O_2 诱导的 ARPE-19 细胞内 ROS、SOD、MDA 和 GSH 含量的作用

与对照组相比, H_2O_2 组 ARPE-19 细胞内 ROS、



注: 与对照组比, * $P < 0.05$; 与 H_2O_2 组比, # $P < 0.05$;

与 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素组比, & $P < 0.05$ 。下同。

图 2 各组细胞中 miR-34a 和 SIRT1 mRNA 的表达

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with the H_2O_2 group, # $P < 0.05$. Compared with the 20 $\mu\text{g/mL}$ naringenin group, & $P < 0.05$. The same as below.

Figure 2 Expression of miR-34a and SIRT1 mRNA in each group

MDA 含量明显升高, SOD、GSH 含量明显降低 ($P < 0.05$) ; 与 H_2O_2 组相比, 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素组和 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素 + mimics NC 组细胞内 ROS、MDA 含量明显降低, SOD、GSH 含量明显升高 ($P < 0.05$) ; 与 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素组相比, 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素 + miR-34a mimics 组细胞内 ROS、MDA 含量明显升高, SOD、GSH 含量明显降低 ($P < 0.05$) , 见图 5。

2.6 柚皮素对 H_2O_2 诱导的 ARPE-19 细胞 MMP 的作用

与对照组 (1.00 ± 0.00) 相比, H_2O_2 组 ARPE-19 细胞内 MMP 水平 (0.45 ± 0.05) 明显降低 ($P < 0.05$) ; 与 H_2O_2 组相比, 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素组 (0.83 ± 0.07) 和 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素 + mimics NC 组 (0.85 ± 0.08) 细胞内 MMP 水平明显升高 ($P < 0.05$) ; 与 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素组相比, 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素 + miR-34a mimics 组 (0.69 ± 0.06) 细胞内 MMP 水平明显降低 ($P < 0.05$) , 见图 6。

2.7 柚皮素对 H_2O_2 诱导的 ARPE-19 细胞 SIRT1 和凋亡相关蛋白表达的作用

与对照组相比, H_2O_2 组 ARPE-19 细胞 SIRT1、Bcl-2 表达明显降低, 而 Bax、Caspase-3 表达明显升高 ($P < 0.05$) ; 与 H_2O_2 组相比, 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素组和 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素 + mimics NC 组细胞 SIRT1、Bcl-2 表达明显升高, 而 Bax、Caspase-3 表达明显降低 ($P < 0.05$) ; 与 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素组相比, 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素 + miR-34a mimics 组细胞 SIRT1、Bcl-2 表达明显降低, 而 Bax、Caspase-3 表达明显升高 ($P < 0.05$) , 见图 7。

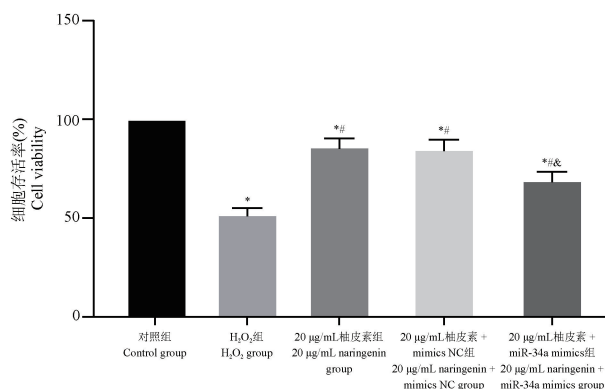
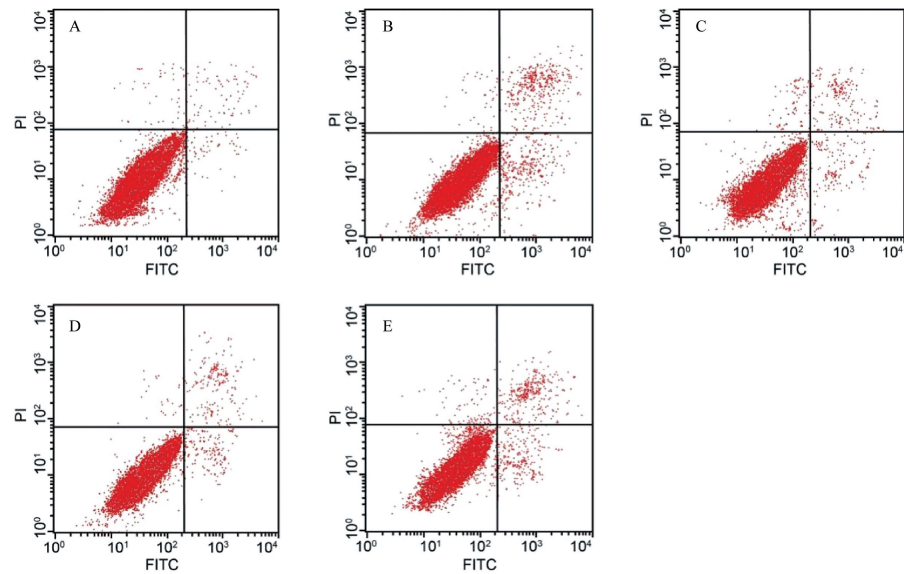


图 3 各组细胞中细胞存活率

Figure 3 Cell viability in each group of cells

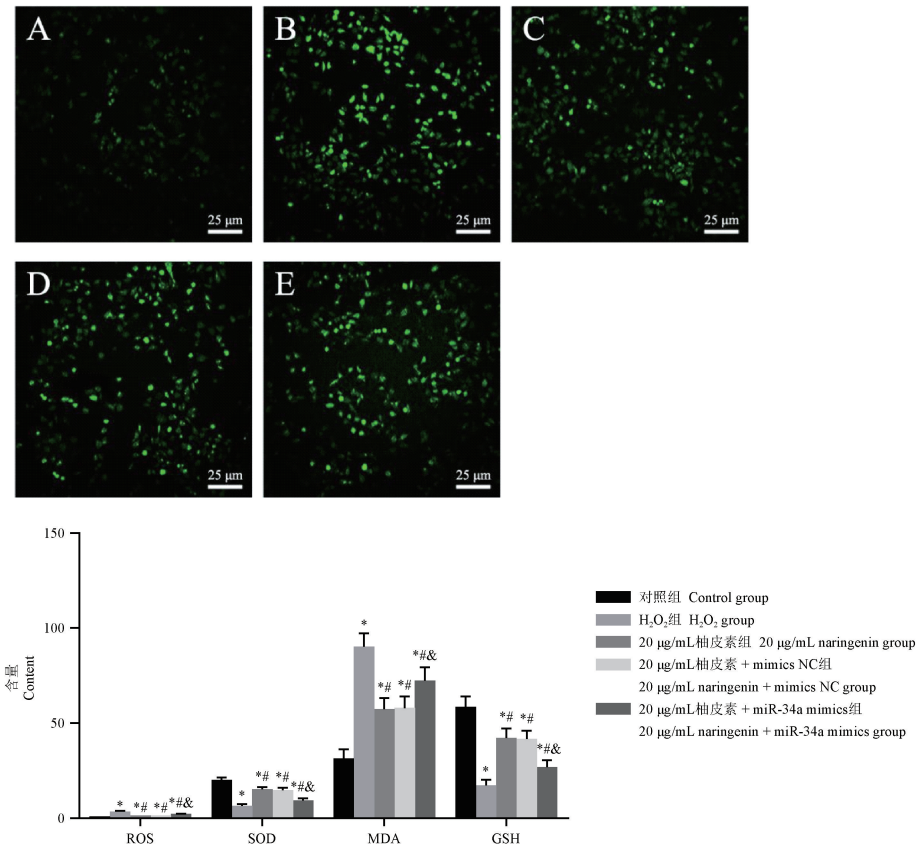


注:A:对照组;B:H₂O₂ 组;C:20 μg/mL 柚皮素组;D:20 μg/mL 柚皮素+mimics NC 组;E:20 μg/mL 柚皮素+miR-34a mimics 组。

图 4 各组 ARPE-19 细胞凋亡率

Note. A, Control group. B, H₂O₂ group. C, 20 μg/mL naringenin group. D, 20 μg/mL naringenin+mimics NC group. E, 20 μg/mL naringenin+miR-34a mimics group.

Figure 4 Apoptotic rate of ARPE-19 cells in each group



注:A:对照组;B:H₂O₂ 组;C:20 μg/mL 柚皮素组;D:20 μg/mL 柚皮素+mimics NC 组;E:20 μg/mL 柚皮素+miR-34a mimics 组。

图 5 各组 ARPE-19 细胞内 ROS、SOD、MDA 及 GSH 含量

Note. A, Control group. B, H₂O₂ group. C, 20 μg/mL naringenin group. D, 20 μg/mL naringenin+mimics NC group. E, 20 μg/mL naringenin+miR-34a mimics group.

Figure 5 Contents of ROS, SOD, MDA and GSH in ARPE-19 cells of each group

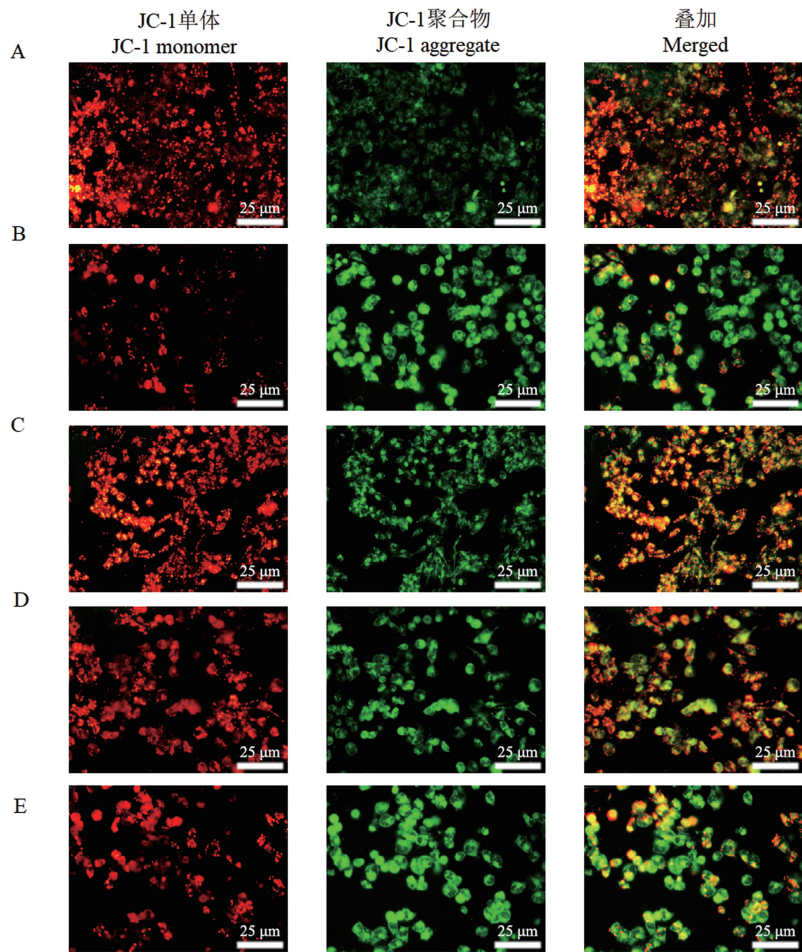


图 6 各组 ARPE-19 细胞 MMP

Figure 6 MMP in ARPE-19 cells of each group

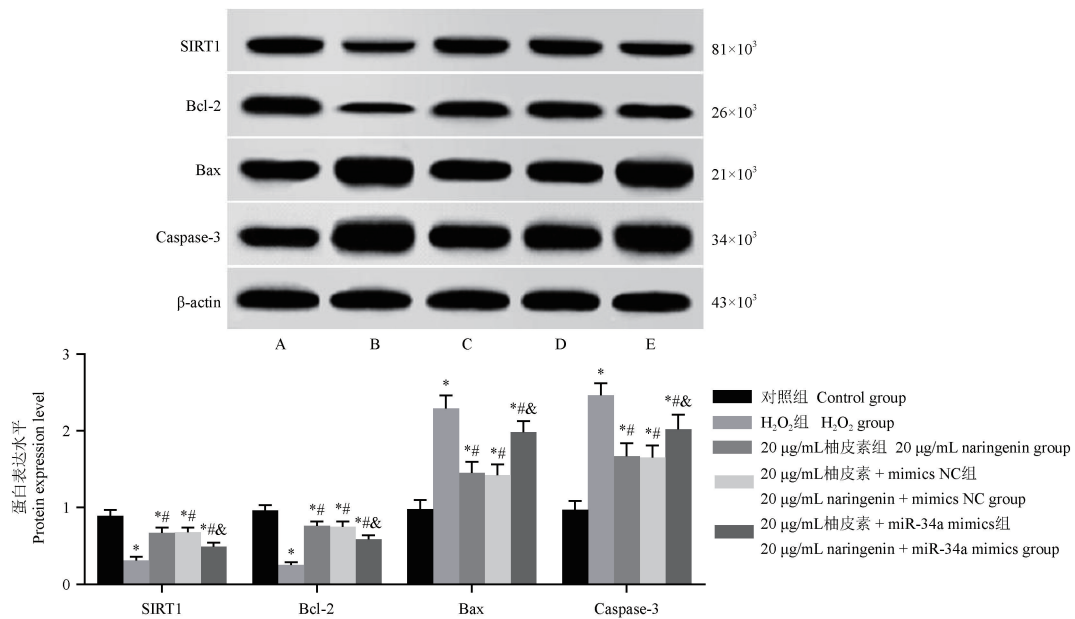


图 7 各组细胞 SIRT1、Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达

Figure 7 Protein expression of SIRT1, Bcl-2, Bax and Caspase-3 in each group

3 讨论

眼睛持续暴露于环境刺激中,如辐射、化学物质、大气中的氧气^[13]。在正常情况下,这些刺激引起的氧化应激可以通过机体的抗氧化系统消除^[14]。然而,随着人口老龄化,年龄介导的氧化应激和抗氧化剂水平下降导致蛋白质修饰和氧化,引起 RPE 功能障碍和随后的细胞凋亡^[15],RPE 细胞介导的氧化应激在 AMD 的发病机理和进程中起着重要作用。氧化应激是 ROS 水平在机体内大量产生和积累的结果。在各种 ROS 中, H_2O_2 被确定为可以介导各种细胞作用的第二信使分子,其过量产生是氧化还原信号传导和氧化应激的中心枢纽^[16]。因此, H_2O_2 通常在体外实验中用于诱导氧化应激^[17]。据报道,用 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 处理 ARPE-19 细胞 12 h,可显著抑制 ARPE-19 细胞活力,促进 ARPE-19 细胞 ROS 产生和凋亡,并诱导细胞出现氧化应激损伤^[3]。因此,本研究使用 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 诱导建立 RPE 细胞氧化损伤模型。有文献报道,阿霉素会诱导心肌细胞损伤,产生大量的 ROS,柚皮素可升高 GSH 含量及 SOD 酶活力,降低 ROS 水平,产生抗氧化应激作用,减轻心肌细胞损伤^[18-19]。本研究发现 H_2O_2 诱导后细胞活力下降,而 ROS 水平增加,柚皮素减轻了 RPE 细胞中 H_2O_2 对细胞活力和 ROS 产生的影响。此外,柚皮素还可以降低 H_2O_2 诱导的 RPE 细胞中 MDA 水平,增加内源性抗氧化剂 GSH 及抗氧化酶 SOD 活性。表明柚皮素处理提高了 H_2O_2 诱导的 RPE 细胞中的 GSH 水平和 SOD 活性。提示柚皮素处理逆转了 RPE 细胞中 H_2O_2 诱导的氧化应激。

ROS 介导的氧化应激可能导致 RPE 细胞凋亡^[20]。而柚皮素可以降低 Caspase-3 蛋白表达,升高 Bcl-2 蛋白水平及 Bcl-2/Bax 比值,抑制细胞凋亡,减轻心肌细胞损伤^[18-19]。本研究结果显示,柚皮素处理可抑制 H_2O_2 诱导的 RPE 细胞凋亡,Western blot 结果进一步显示柚皮素抑制了 RPE 细胞中促凋亡 Bax 蛋白的表达,并诱导抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达。此外,柚皮素还阻止了 H_2O_2 诱导的 RPE 细胞中 Caspase-3 的活化。MMP 参与细胞凋亡的发展和进程,MMP 的降低是细胞凋亡的特异性标志^[21]。JC-1 是一种碳氮化合物类阳离子荧光染料,广泛用于检测 MMP。正常情况下,JC-1 能依赖跨膜电位聚集在线粒体的基质中,形成红色荧光的聚合

物;当发生凋亡则降低跨膜电位,释放线粒体中的 JC-1,在胞质内以单体的形式存在发绿色荧光^[22];柚皮素可明显升高红/绿荧光比值,升高 MMP 水平。这些结果均提示柚皮素可抑制 H_2O_2 诱导的 RPE 细胞凋亡。

此外,本研究发现 H_2O_2 诱导的 RPE 细胞中 miR-34a 水平显著增加,而 SIRT1 mRNA 水平显著降低。有报道显示 miR-34a 是 RPE 细胞中高度表达的调节因子之一,miR-34a 上调可通过直接或间接抑制 c-Met 和其他细胞周期相关分子的表达来抑制 RPE 细胞的增殖和迁移^[7],证实了其可调节 RPE 细胞功能。SIRT1 已被证明是 miR-34a 的靶基因,在细胞分化、衰老、凋亡、转录调节、氧化应激等多种重要的生物学过程中发挥重要作用;既往研究已经证实 SIRT1 可通过抗炎、抗氧化、减少凋亡等机制发挥细胞保护作用^[23-24]。Tong 等^[8]发现过表达 miR-34a 可显著抑制 SIRT1 转录后表达,同时 H_2O_2 诱导的 ARPE-19 细胞对氧化应激的耐受性降低。本研究结果显示柚皮素可下调 miR-34a,促进 SIRT1 mRNA 和蛋白表达;采用 Lipofectamine 2000 将 miR-34a 转染 ARPE-19 细胞上调 miR-34a,结果显示 miR-34a 转染 ARPE-19 细胞后,miR-34a 水平明显增加,而 SIRT1 的表达降低,明显逆转了柚皮素对 H_2O_2 诱导的 RPE 细胞氧化损伤的保护作用。提示,柚皮素的保护作用可能是由 miR-34a/SIRT1 信号通路介导的。

综上所述,柚皮素可通过下调 miR-34a,促进 SIRT1 表达,抑制 RPE 细胞凋亡,保护 H_2O_2 诱导的 RPE 细胞氧化应激损伤。然而,本研究存在一定的局限性, H_2O_2 诱导氧化损伤后柚皮素是否能发挥较长时间的保护作用需要进一步的实验,且需要进行体内动物研究以及柚皮素与其他药物相比的功效进一步明确柚皮素的保护作用。

参考文献:

- [1] Dieguez HH, Romeo HE, Alaimo A, et al. Oxidative stress damage circumscribed to the central temporal retinal pigment epithelium in early experimental non-exudative age-related macular degeneration [J]. Free Radic Biol Med, 2019, 131: 72-80.
- [2] Jonas JB, Cheung CMG, Panda-Jonas S. Updates on the epidemiology of age-related macular degeneration [J]. Asia Pac J Ophthalmol (Phila), 2017, 6(6): 493-497.
- [3] Zhao B, Wang Z, Han J, et al. Rhizoma paridis total saponins alleviate H_2O_2 -induced oxidative stress injury by upregulating the

- Nrf2 pathway [J]. Mol Med Rep, 2020, 21(1): 220–228.
- [4] Mitchell P, Liew G, Gopinath B, et al. Age-related macular degeneration [J]. Lancet, 2018, 392(10153): 1147–1159.
- [5] Ricci F, Bandello F, Navarra P, et al. Neovascular age-related macular degeneration: therapeutic management and new-upcoming approaches [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(21): 8242–8282.
- [6] Hallak JA, de Sisternes L, Osborne A, et al. Imaging, genetic, and demographic factors associated with conversion to neovascular age-related macular degeneration: secondary analysis of a randomized clinical trial [J]. JAMA Ophthalmol, 2019, 137(7): 738–744.
- [7] Hou Q, Tang J, Wang Z, et al. Inhibitory effect of microRNA-34a on retinal pigment epithelial cell proliferation and migration [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54(10): 6481–6488.
- [8] Tong N, Jin R, Zhou Z, et al. Involvement of microRNA-34a in age-related susceptibility to oxidative stress in ARPE-19 cells by targeting the silent mating type information regulation 2 homolog 1/p66shc pathway: implications for age-related macular degeneration [J]. Front Aging Neurosci, 2019, 11: 137–143.
- [9] Ułańczyk Z, Grabowicz A, Cecerska-Heryć E, et al. Dietary and lifestyle factors modulate the activity of the endogenous antioxidant system in patients with age-related macular degeneration: correlations with disease severity [J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9(10): 954.
- [10] Bai J, Li SY, Wu G, et al. Naringin inhibits lipopolysaccharide-induced activation of microglia cells [J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2019, 65(5): 38–42.
- [11] Pengnet S, Prommaouan S, Sumarithum P, et al. Naringin reverses high-cholesterol diet-induced vascular dysfunction and oxidative stress in rats via regulating LOX-1 and NADPH oxidase subunit expression [J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 3708497.
- [12] 徐辉勇, 陈金鹏, 章剑. 柚皮素对糖尿病视网膜病变大鼠氧化损伤、细胞凋亡及 Nrf2-ARE 的影响 [J]. 临床和实验医学杂志, 2020, 19(2): 128–132.
- [13] Matos AL, Bruno DF, Ambrósio AF, et al. The benefits of flavonoids in diabetic retinopathy [J]. Nutrients, 2020, 12(10): 3169–3195.
- [14] Zhou J, Chen F, Yan A, et al. Madecassoside protects retinal pigment epithelial cells against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptosis through the activation of Nrf2/HO-1 pathway [J]. Biosci Rep, 2020, 40(10): BSR20194347.
- [15] Kaarniranta K, Pawlowska E, Szczepanska J, et al. Role of mitochondrial DNA damage in ROS-mediated pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD) [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(10): 2374.
- [16] Cui R, Tian L, Lu D, et al. Exendin-4 protects human retinal pigment epithelial cells from H₂O₂-induced oxidative damage via activation of NRF2 signaling [J]. Ophthalmic Res, 2020, 63(4): 404–412.
- [17] 白振军, 张慧宇, 郭敏芳. 毛蕊异黄酮通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路减轻 H₂O₂ 导致的 SH-SY5Y 细胞损伤 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(10): 37–43.
- [18] 刘欢, 雷欢, 梁瑞华, 等. 柚皮素对阿霉素致心肌细胞损伤的保护作用及机制研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(7): 788–793.
- [19] 李燕, 冯健, 谢发江, 等. 柚皮素通过调控 AMPK/Nrf2/HO-1 信号通路减轻糖尿病小鼠心肌损伤 [J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(1): 38–46.
- [20] He HJ, Wei DH, Liu H, et al. Glycyrrhizin protects against sodium iodate-induced RPE and retinal injury through activation of AKT and Nrf2/HO-1 pathway [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(5): 3495–3504.
- [21] 傅增辉, 姜岩, 刘晶, 等. 白桦脂醇对 A β_{25-35} 诱导的 PC12 细胞氧化应激和凋亡的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(6): 54–61.
- [22] 李晓文, 周越菡, 邓健志, 等. 穿心莲内酯对急性淋巴细胞白血病细胞的生长抑制及凋亡诱导作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(6): 977–984.
- [23] Song L, Chen TY, Zhao XJ, et al. Pterostilbene prevents hepatocyte epithelial-mesenchymal transition in fructose-induced liver fibrosis through suppressing miR-34a/Sirt1/p53 and TGF- β 1/Smads signalling [J]. Br J Pharmacol, 2019, 176(11): 1619–1634.
- [24] 田河, 王志龙, 张智慧, 等. 白藜芦醇通过靶向 SIRT1 激活 Keap1-Nrf2-HO-1 途径发挥对草酸钙肾结石形成的调控作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(2): 77–83.

[收稿日期] 2021-01-25