

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

陈婷妍¹, 周洋²

引用: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

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(No. 2019D01C271)

作者单位:¹(610041)中国四川省成都市,成都华夏眼科医院小儿斜弱视科;²(830000)中国新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市,新疆医科大学第五附属医院眼科

作者简介:陈婷妍,毕业于新疆医科大学,硕士研究生,副主任医师,研究方向:眼科疾病的临床治疗及相关研究。

通讯作者:周洋,毕业于新疆医科大学,硕士研究生,主治医师,研究方向:眼科疾病的治疗与相关基础研究. sweetwords2001@163.com

收稿日期:2019-08-18 修回日期:2020-06-11

摘要

目的:探讨槲皮素通过 Nrf2/Keap1/ARE 通路对小鼠年龄相关性黄斑变性的保护作用及机制研究。

方法:以昆明小鼠为研究对象,分为:对照组、模型组、槲皮素组;眼底检查各组小鼠眼底是否出现黄白色似玻璃疣物质;OCT 检查各组小鼠视网膜厚度;HE 染色观察各组小鼠视网膜形态的改变;FFA 观察各组小鼠眼底血管完整性;ELISA 检测小鼠血清中 SOD、GSH-Px、CAT 活性和 ROS、MDA 含量变化;Western blot 检测各组小鼠视网膜中 Nrf2/Keap1/ARE 相关蛋白的表达情况。

结果:槲皮素能使小鼠眼底的黄白色似玻璃疣物质减少且视网膜厚度增加($P<0.05$),视网膜血管渗漏点明显减少;与模型组比较,槲皮素组小鼠的 a 波振幅、b 波振幅较模型组均明显上升($P<0.01$);槲皮素能使小鼠视网膜结构比较清晰,部分外核层发生坏死脱落,且使小鼠血清中 ROS、MDA 含量降低(均 $P<0.05$),SOD、GSH-Px、CAT 活性提高(均 $P<0.05$);与模型组比较,槲皮素组小鼠视网膜细胞质中 Nrf2 蛋白表达上调($P<0.05$),细胞核中 Nrf2 蛋白表达下调($P<0.05$),小鼠视网膜中 Keap1、HO-1、NQO-1、GCL 蛋白表达下调(均 $P<0.05$)。

结论:槲皮素可能通过 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,对年龄相关性黄斑变性具有保护作用。

关键词:槲皮素;Nrf2/Keap1/ARE 通路;年龄相关性黄斑变性

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2020.7.04

Study on the protective effect of quercetin on age-related macular degeneration in mice based on Nrf2/Keap1/ARE pathway

Ting-Yan Chen¹, Yang Zhou²

Foundation item: Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region(No.2019D01C271)

¹Department of Pediatric Strabismus and Amblyopia, Chengdu Huaxia Ophthalmological Hospital, Chengdu 610041, Sichuan Province, China; ²Department of Ophthalmology, Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Correspondence to: Yang Zhou. Department of Ophthalmology, Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. sweetwords2001@163.com

Received:2019-08-18 Accepted:2020-06-11

Abstract

• **AIM:** To investigate the protective effect and mechanism of quercetin on age-related macular degeneration in mice through Nrf2/Keap1/ARE pathway.

• **METHODS:** Kunming mice were used as research objects, which were divided into control group, model group and quercetin group. Fundus examination was showed whether yellow-white like glassy sputum substances appeared in the fundus of each group of mice; OCT was used to examine the retinal thickness of each group of mice; HE staining was used to observe the changes of retinal morphology in each group of mice; FFA was observed the fundus vascular integrity of each group of mice. The activities of SOD, GSH-Px, CAT and the contents of ROS and MDA in serum were detected by ELISA; Western blot was used to detect the expression of Nrf2/Keap1/ARE related proteins in the retina of each group.

• **RESULTS:** Quercetin can reduce the yellow and white glassy wart substance in the fundus of mice and increase the thickness of the retina ($P<0.05$), and the points of retinal vascular leakage is significantly reduced. Compared with the model group, the a-wave amplitude and b-wave amplitude of the quercetin group were significantly higher than those of the model group ($P<0.01$); Quercetin can make the retinal structure of mice clearer, necrosis and shed part of the outer nuclear layer, and reduce the content of ROS and MDA in mouse serum (all $P<0.05$), and increase the activities of SOD, GSH-Px, and CAT (all

$P < 0.05$). Compared with the model group, the expression of Nrf2 protein in the retinal cytoplasm of mice in the quercetin group was up-regulated ($P < 0.05$), and the expression of Nrf2 protein in the nucleus was down-regulated ($P < 0.05$), GCL protein expression was down-regulated ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** Quercetin improved the oxidative stress state after retinal photodamage through the Nrf2/Keap1/ARE pathway, protected the retinal function, and protected against age-related macular degeneration.

• **KEYWORDS:** quercetin; Nrf2/Keap1/ARE pathway; age-related macular degeneration

Citation: Chen TY, Zhou Y. Study on the protective effect of quercetin on age-related macular degeneration in mice based on Nrf2/Keap1/ARE pathway. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2020; 20(7):1132-1138

0 引言

年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, ARMD) 是老年人失明最常见的原因, 全球患病率为 8%^[1]。近三分之一的早期 ARMD 发展为新生血管性 ARMD (nARMD)。衰老、遗传、饮食、吸烟、肥胖和血管疾病都与 ARMD 的发病机制有关^[2]。转录因子 NF-E2 相关因子 (NF-E2-related factor 2, Nrf2) 是一种关键转录因子, 已被确定能够激活抗氧化反应^[3]。正常生理情况下, Nrf2 与 Keap1 蛋白存在于细胞质中, 处于相对稳定状态。当受到氧化应激因子等刺激后, Nrf2 与 Keap1 迅速解离, 并从细胞质进入细胞核, 与抗氧化反应元件 (anti-oxidative response element, ARE) 结合^[4]。此外, 最近的研究还发现, Nrf2 信号传导是抗氧化酶去除活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和其他有害物质并保护身体免受氧化应激所必需的关键途径^[5]。槲皮素 (Quercetin) 为壳斗科植物伊比利亚栎的皮和叶中提取的苷类化合物, 能够抑制离体恶性细胞的生长、抑制癌细胞 DNA、RNA 和蛋白质合成^[6]。同时还能抑制血小板聚集和 5-羟色胺的释放, 对 ADP、凝血酶和血小板活化因子诱导的血小板聚集均有明显抑制作用。但槲皮素在年龄相关性黄斑变性治疗方面研究甚少。本课题将研究槲皮素是否通过 Nrf2/Keap1/ARE 通路对年龄相关性黄斑变性小鼠具有保护作用, 进一步探讨其作用机制, 为临床上治疗年龄相关性黄斑变性提供新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 60 只体质量 18~22g 昆明小鼠购自中国科学院上海斯莱克实验动物有限公司, 本研究经过了我院的伦理审查。SOD 试剂盒 (批号: CSB-E14981r)、GSH-Px 试剂盒 (批号: CSB-E12146r)、CAT 试剂盒 (批号: CSB-EL004563PL)、MDA 试剂盒 (批号: CSB-E08588r) 购于美国 CUSABIO 公司。RIPA 裂解液 (批号: R0020-100) 购自北京索莱宝科技有限公司。多克隆抗体 Nrf2 (批号: ab76026)、多克隆抗体 Keap1 (批号: ab139729)、多克隆抗体 LaminB1 (批号: ab16048)、单克隆抗体 HO-1 (批号: ab1894911)、单克隆抗体 NQO-1 (批号: ab34173)、单克隆抗体 GCL (批号: ab207777)、单克隆抗体 GAPDH (批号: ab8245) 购自美国 Abcam 公司。山羊抗兔 IgG 二抗 (批号: 2985S) 和山羊抗鼠 IgG 二抗 (批号: 5873S) 购自美国 Cell

Signaling Technology 公司。PVDF 膜 (批号: IPVH08130) 购自 Millipore 公司。HE 试剂盒 (批号: ZF-0328) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。切片机 RM2016 (货号: 20160032) 购自德国徕卡公司。多功能微孔板读板机 Molecular Devices (货号: SpectraMax iD5) 购自美国 Molecular Devices 公司。倒置生物显微镜 (批号: CKX53) 购自日本 Olympus 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与给药 将 60 只昆明小鼠在室温 (25°C ± 2°C) 下保持 12h 黑暗/光照循环饲养。小鼠喂养适量的水和正常的饲料, 并且在开始实验之前使小鼠适应环境至少 2wk。将小鼠分别随机分为 3 组: 对照组、模型组和槲皮素组, 每组 20 只。造模 3d 后, 槲皮素组小鼠给予槲皮素 200mg/(kg·d) 灌胃治疗 30d, 对照组和模型组则同步给予等体积生理盐水, 每天定点给小鼠灌胃。

1.2.2 模型制作 参照 Sykes 等^[7] 和 Hansson^[8] 方法制作光损伤装置。光照箱的上方安装排风孔, 下方安装排气孔, 并且在箱内放置两个有机玻璃透明箱, 其体积为 40cm×25cm×25cm。光照箱的每个面都安装白色荧光灯管, 且箱内中心向各方向照度 2000Lx, 箱内的温度应与动物房间内的温度一致, 控制在 23°C~27°C。小鼠均在 12h 明 (20~50Lx) 和 12h 暗 (0~12Lx) 的循环光环境中适应 7d, 在玻璃乙醚麻醉缸中逐只放入小鼠约 3min 进行吸入麻醉, 待小鼠麻醉后, 缝线开睑。小鼠清醒后逐只进入光照箱, 接受 12h 持续光照射。光照结束后立即拆除开睑缝线, 送回暗环境中。实验前预留出正常小鼠。在造模过程中, 模型组死亡 1 只小鼠。造模结束后进行眼底照相检查: 小鼠眼底出现大量黄白色似玻璃膜疣物质, 说明造模成功, 可进行后续的实验。

1.2.3 小鼠眼底检查和 OCT 检查 小鼠用戊巴比妥钠麻醉后, 用 Retina Imaging System 给小鼠眼底照相。使用 SD-OCT 检测小鼠视网膜厚度。

1.2.4 HE 染色观察小鼠视网膜形态的改变 取小鼠视网膜标本, 在 4% 多聚甲醛溶液中固定过夜。脱水后, 石蜡包埋, 切片, 厚度为 4μm, 并在 65°C 下烘烤 1h。接下来, 将切片脱蜡并用苏木精和曙红染色。最后, 在倒置显微镜下观察视网膜形态的改变情况。

1.2.5 FFA 观察小鼠眼底血管完整性 小鼠麻醉后用复方托吡卡胺滴眼液进行散瞳, 腹腔注射荧光素溶液, 在注射 5min 后定量荧光素渗漏斑点。

1.2.6 小鼠视网膜电图 使用 Espion 视觉电生理系统记录视网膜电图。将小鼠暗适应过夜, 用强度为 600(cd·s)/m² 的 Ganzfeld 光刺激器通过闪光刺激引发视网膜电图。记录并分析双眼中的 a 波和 b 波振幅。

1.2.7 小鼠血清中 SOD、GSH-Px、CAT 活性和 ROS、MDA 含量测定 实验结束后, 各组小鼠眼球采血于离心管中, 待凝固后, 3000r/min, 离心 15min, 分离血清, 采用 ELISA 试剂盒测定各组小鼠血清中 SOD、GSH-Px、CAT 活性和 MDA 含量, ROS 检测采用 Fenton 反应及 Griess 试剂显色法测定。

1.2.8 Western blot 检测小鼠视网膜组织中 Nrf2、Keap-1、HO-1、NQO-1、GCL 蛋白的表达 取小鼠视网膜组织于离心管中, 加入 1mL 制备好的 RIPA 裂解液提取蛋白, 用 BCA 法测定总蛋白含量。取等量蛋白质样品上样, SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质后转膜, 用 5% 脱脂奶

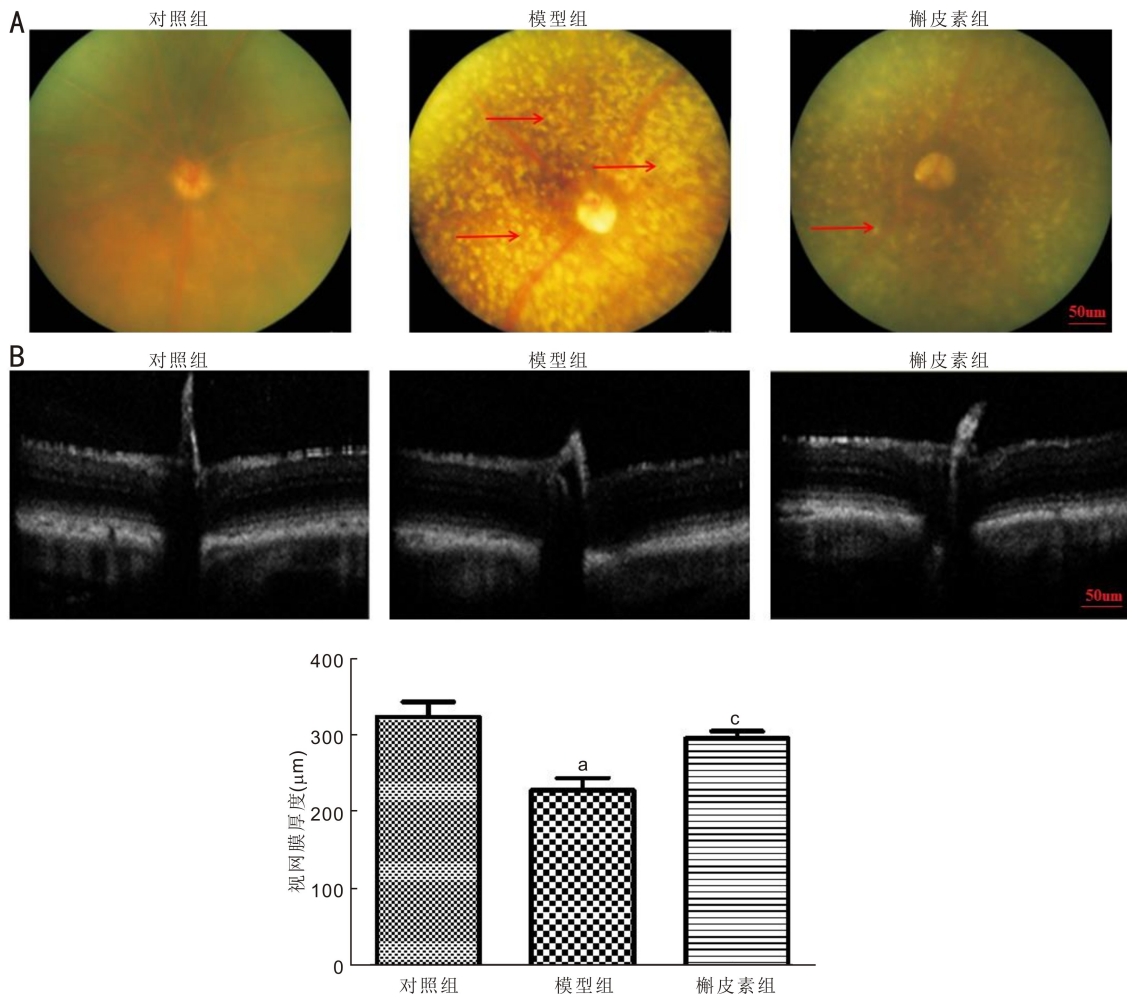


图1 各组小鼠眼底照相及OCT检查结果 A:各组小鼠眼底照相结果,红色箭头指向黄白色似玻璃膜疣物质;B:各组小鼠OCT检查结果。^a $P < 0.05$ vs 对照组, ^c $P < 0.05$ vs 模型组。

粉封闭 1h, 之后加入稀释后的 Nrf2、Keap1、LaminB、HO-1、NQO-1、GCL 和 GAPDH 一抗, 4℃ 摇床上孵育过夜。用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10min, 加入对应于一抗种属来源的 HRP 标记的二抗, 在室温摇床上孵育 1h, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10min。使用 ECL 化学发光液显色发光, 凝胶成像系统拍照, Image Pro Plus 图像分析系统对蛋白条带进行分析。

统计学分析: 采用统计学软件 SPSS 19.0 进行, 至少取 3 次独立实验结果, 以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间数据比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组小鼠眼底及视网膜厚度的变化 眼底照相结果显示: 对照组小鼠眼底未见黄白色似玻璃膜疣物质; 模型组小鼠眼底出现大量黄白色似玻璃膜疣物质, 说明造模成功; 槲皮素组小鼠眼底出现黄白色似玻璃膜疣物质, 但较模型组明显减少, 见图 1A。OCT 检查结果显示, 对照组、模型组、槲皮素组小鼠视网膜厚度分别为 319.23 ± 12.34 、 234.46 ± 11.23 、 $300.56 \pm 12.12 \mu\text{m}$, 差异有统计学意义 ($F = 18.082, P < 0.05$)。与对照组相比, 模型组小鼠视网膜厚度减少 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 槲皮素组小鼠视网膜厚度增加 ($P < 0.05$), 见图 1B。

2.2 槲皮素对小鼠眼底血管完整性的影响 FFA 结果显示: 对照组、模型组、槲皮素组小鼠视网膜血管渗漏点分别

为 4.34 ± 0.98 、 28.56 ± 1.45 、 17.78 ± 1.23 个, 差异具有统计学意义 ($F = 57.367, P < 0.001$)。对照组小鼠的视网膜血管无渗漏现象发生, 与对照组相比, 模型组小鼠的视网膜血管发生渗漏, 可以看见明显的渗漏点 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 槲皮素组小鼠视网膜血管发生渗漏, 但渗漏点较模型组明显减少 ($P < 0.05$), 见图 2。

2.3 槲皮素对小鼠视网膜电图的影响 视网膜电图结果显示: 对照组、模型组、槲皮素组小鼠 a 波振幅、b 波振幅差异均具有统计学意义 ($F = 60.547, P < 0.001$; $F = 62.645, P < 0.001$)。与对照组比较, 模型组小鼠 a 波振幅、b 波振幅均显著下降 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 槲皮素组小鼠 a 波振幅、b 波振幅均明显上升 ($P < 0.01$), 见图 3, 表 1。

2.4 槲皮素对小鼠视网膜形态改变的影响 HE 染色结果显示: 对照组小鼠视网膜各层结构清晰, 无坏死脱落现象; 模型组小鼠视网膜各层结构不清晰, 部分发生坏死脱落; 槲皮素组小鼠视网膜结构比较清晰, 部分外核层发生坏死脱落, 见图 4。

2.5 槲皮素对小鼠血清中 ROS、MDA 含量的影响 Griess 试剂显色法结果显示, 对照组、模型组、槲皮素组小鼠血清中 ROS 含量差异具有统计学意义 ($F = 20.563, P < 0.01$)。与对照组相比, 模型组小鼠血清中 ROS 含量明显增加 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 槲皮素组小鼠血清中 ROS 含量降低 ($P < 0.05$)。ELISA 结果显示, 对照组、模型组、槲皮素

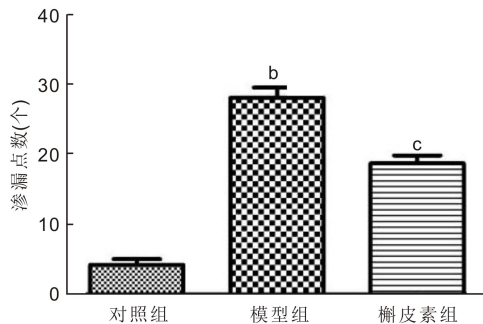
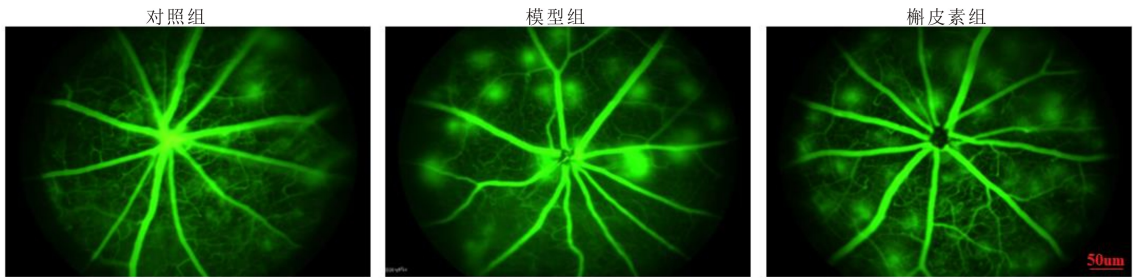


图2 FFA检查各组小鼠眼底血管完整性 ^b $P < 0.001$ vs 对照组, ^c $P < 0.05$ vs 模型组。

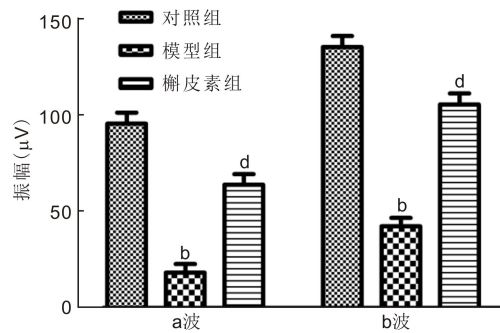


图3 各组小鼠视网膜a波和b波振幅结果 ^b $P < 0.001$ vs 对照组, ^d $P < 0.01$ vs 模型组。

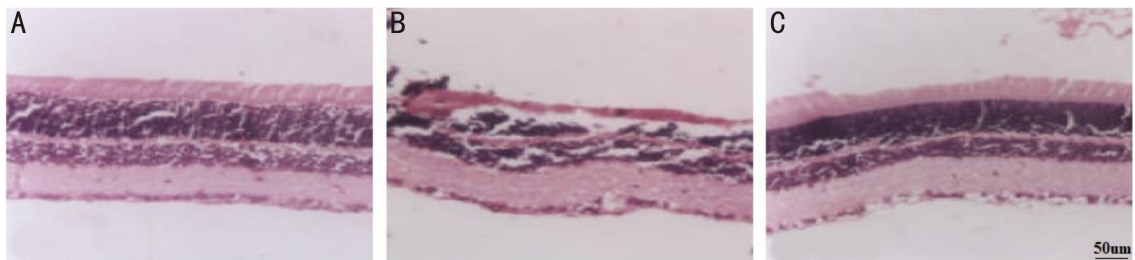


图4 HE染色观察各组小鼠视网膜形态的改变($\times 100$) A:对照组;B:模型组;C:槲皮素组。

表1 各组小鼠视网膜a波和b波振幅变化 ($\bar{x} \pm s, \mu V$)

组别	n	a波	b波
对照组	20	98.34 \pm 1.87	138.23 \pm 2.02
模型组	19	18.56 \pm 1.01 ^b	43.67 \pm 1.45 ^b
槲皮素组	20	64.21 \pm 1.12 ^d	108.98 \pm 1.56 ^d

注: ^b $P < 0.001$ vs 对照组, ^d $P < 0.01$ vs 模型组。

表2 各组小鼠血清中ROS、MDA含量变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ROS(荧光强度)	MDA(nmol/mL)
对照组	20	1502.56 \pm 28.54	13.45 \pm 0.78
模型组	19	4001.75 \pm 35.67 ^b	29.78 \pm 0.99 ^b
槲皮素组	20	2453.67 \pm 29.78 ^c	19.87 \pm 0.86 ^d

注: ^b $P < 0.01$ 与对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 模型组。

组小鼠血清中MDA含量差异具有统计学意义($F = 36.678, P < 0.001$)。与对照组相比,模型组小鼠血清中MDA含量明显增加($P < 0.01$);与模型组相比,槲皮素组小鼠血清中MDA含量降低($P < 0.01$),见图5,表2。

2.6 槲皮素对小鼠血清中SOD、GSH-Px、CAT活性的影响 ELISA结果显示,对照组、模型组、槲皮素组小鼠血清中SOD、GSH-Px、CAT活性差异具有统计学意义($F = 20.457, P < 0.01$; $F = 59.487, P < 0.001$; $F = 57.452, P < 0.001$)。与对照组相比,模型组小鼠血清中SOD、GSH-

Px、CAT活性均明显下降($P < 0.01$);与模型组相比,槲皮素组小鼠血清中SOD、GSH-Px、CAT活性提高($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.05$),见图6和表3。

2.7 槲皮素对小鼠视网膜中Nrf2蛋白表达的影响 Western blot结果表明,对照组、模型组、槲皮素组小鼠视网膜中Nrf2蛋白表达差异均具有统计学意义($F = 56.023, P < 0.001$; $F = 58.459, P < 0.001$)。与对照组相比,模型组小鼠视网膜细胞质中Nrf2蛋白表达下调($P < 0.001$),细胞核中Nrf2蛋白表达上调($P < 0.001$);与模

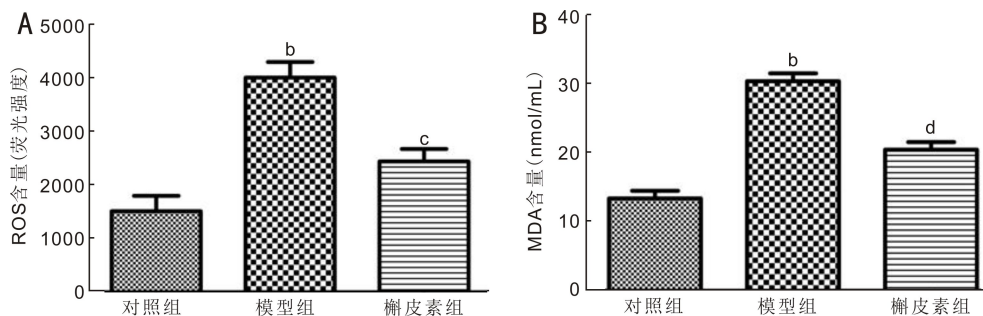


图5 各组小鼠血清中 ROS、MDA 含量的变化 A:ROS;B:MDA。^b $P<0.01$ vs 对照组;^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ vs 模型组。

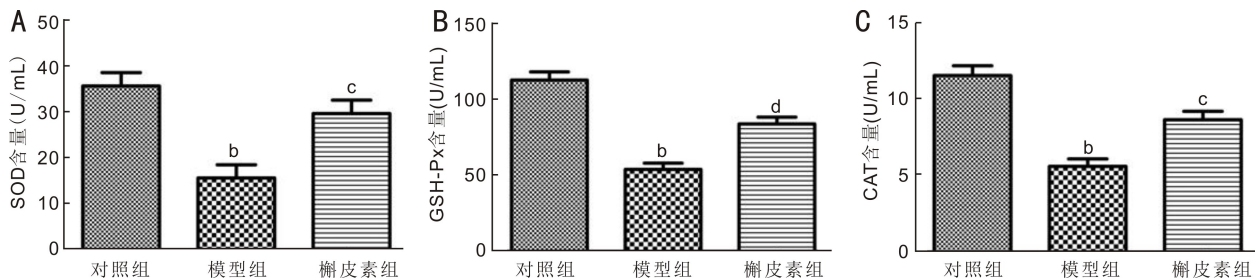


图6 ELISA 检测各组小鼠血清中 SOD、GSH-Px、CAT 活性的表达 A: SOD; B: GSH-Px; C: CAT。^b $P<0.01$ vs 对照组;^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ vs 模型组。

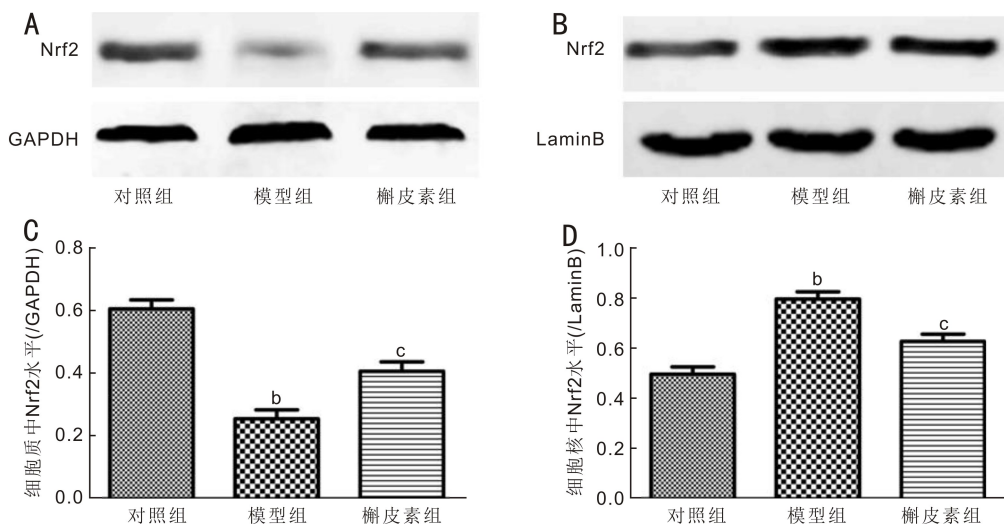


图7 Western blot 检测各组小鼠视网膜中 Nrf2 蛋白表达情况 A、C:各组小鼠视网膜细胞质中 Nrf2 蛋白表达情况;B、D:各组小鼠视网膜细胞核中 Nrf2 蛋白表达情况。^b $P<0.001$ vs 对照组,^c $P<0.05$ vs 模型组。

表3 各组小鼠血清中 SOD、GSH-Px、CAT 活性表达

组别	n	SOD	GSH-Px	CAT
对照组	20	37.89±1.76	112.56±1.34	12.38±1.25
模型组	19	19.04±1.45 ^b	53.67±0.89 ^b	5.97±1.02 ^b
槲皮素组	20	31.56±1.23 ^c	78.96±0.79 ^d	8.65±1.03 ^c

注:^b $P<0.01$ vs 对照组;^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ vs 模型组。

表4 各组小鼠视网膜中 Nrf2 蛋白表达情况

组别	n	Nrf2/GAPDH	Nrf2/LaminB
对照组	20	0.61±0.13	0.53±0.09
模型组	19	0.28±0.07 ^b	0.79±0.07 ^b
槲皮素组	20	0.43±0.06 ^c	0.63±0.05 ^c

注:^b $P<0.001$ vs 对照组,^c $P<0.05$ vs 模型组。

型组相比,槲皮素组小鼠视网膜细胞质中 Nrf2 蛋白表达上调($P<0.05$),细胞核中 Nrf2 蛋白表达下调($P<0.05$),见图7和表4。

2.8 槲皮素对小鼠视网膜中 Keap1、HO-1、NQO-1、GCL 蛋白表达的影响 Western blot 结果表明,对照组、模型组、槲皮素组小鼠视网膜中 Keap1、HO-1、NQO-1、GCL 蛋白表达差异均具有统计学意义($F=26.621, P<0.01$; $F=30.421, P<0.01$; $F=46.785, P<0.001$; $F=40.123, P<0.001$)。与对照组相比,模型组小鼠视网膜中 Keap1、HO-1、NQO-1、GCL 蛋白表达均上调($P<0.01$);与模型组相比,槲皮素组小鼠视网膜中 Keap1、NQO-1、GCL 蛋白表达均下调($P<0.05, P<0.001, P<0.01$),见图8和表5。

3 讨论

ARMD 是一种复杂的神经退行性疾病,导致老年人视力丧失。ARMD 的发展是基于年龄相关的视网膜色素上皮细胞(RPE)和脉络膜毛细血管的变化,但是从典型的年龄相关变化向病理过程的转变的确切机制仍然知之甚少。ARMD 的特征在于神经元和光感受器的进展性丧失,从而导致失明。视网膜细胞死亡受复杂机制控制,目前尚不清楚。这种状况阻碍了 ARMD 有效治疗的发展^[9]。

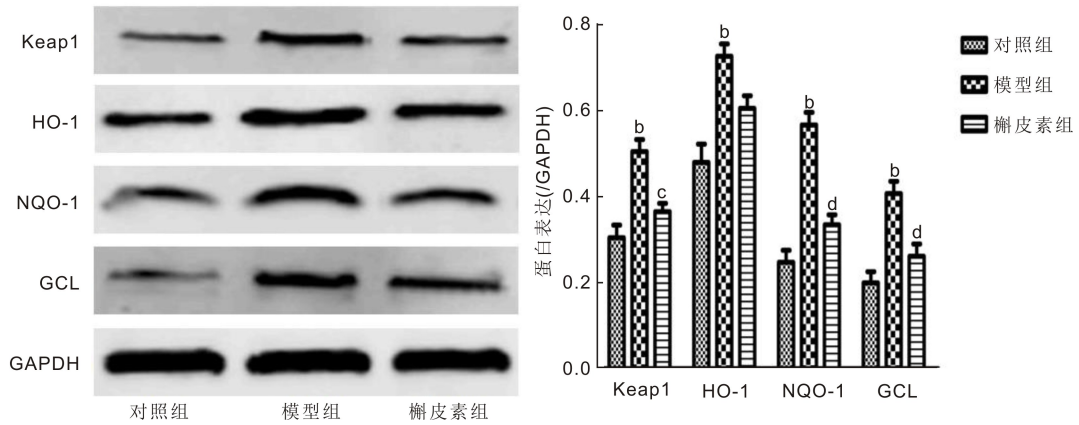


图8 Western blot 检测各组小鼠视网膜中 Keap-1、HO-1、NQO-1、GCL 蛋白表达情况 ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 模型组。

表5 各组小鼠视网膜中 Keap-1、HO-1、NQO-1、GCL 蛋白表达变化

组别	n	Keap-1/GAPDH	HO-1/GAPDH	NQO-1/GAPDH	GCL/GAPDH	$\bar{x} \pm s$
对照组	20	0.29±0.13	0.45±0.17	0.25±0.12	0.19±0.06	
模型组	19	0.56±0.14 ^b	0.75±0.14 ^b	0.58±0.13 ^b	0.40±0.09 ^b	
槲皮素组	20	0.36±0.09 ^c	0.61±0.16	0.32±0.08 ^d	0.27±0.07 ^d	

注: ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 模型组。

研究表明, Nrf2/Keap1/ARE 信号通路是细胞中抗氧化应激重要的信号通路。研究发现, 在正常情况下, Nrf2 和 Keap1 结合在一起并存在于细胞质中。当受到氧化应激时, 这种稳态状态被打破, Nrf2 和 Keap1 形成的二聚体被打破, Nrf2 和 Keap1 分离, Nrf2 迅速从细胞浆进入到细胞核, 与 ARE 结合, 启动其下游靶基因, 调节 SOD、GSH-Px、CAT、HO-1、NQO-1、GCL 等的转录活性^[10]。其中这些酶可降低血清中 MDA 含量, 清除细胞内 ROS, 从而发挥抗氧化作用, 减轻氧化损伤, 降低机体内氧化应激状态^[11]。氧化应激能导致视网膜功能障碍和变性, 与 ARMD 相关, 减轻氧化应激是认为治疗视网膜疾病有效的方法。

槲皮素又名槲皮黄素, 是一种黄酮类化合物, 其以苷的形式存在于大多数植物的花、叶、果实。研究证实, 槲皮素具有抗炎、清除自由基、抗氧化、抑制新生血管生成等作用^[12]。Xu 等^[13]研究发现, 槲皮素磷脂复合物能使氧化损伤的视网膜色素细胞中 Nrf2 通路相关蛋白和其下游抗氧化酶及 II 相代谢酶提高, 从而发挥抗氧化作用, 说明槲皮素对于年龄相关性黄斑变性的治疗具有潜在价值。在本实验室前期的实验中, 我们发现槲皮素对年龄相关性黄斑变性有一定的治疗作用, 其中当槲皮素的剂量为 200mg/kg 作用效果最佳, 因此, 后续实验选择此浓度。

在本实验中, 我们先进行了眼底照相, 结果显示, 与对照组相比, 模型组小鼠眼底出现大量黄白色似玻璃膜疣物质且视网膜厚度减少, 然而槲皮素可以减少小鼠眼底的黄白色似玻璃膜疣物质减少且增加视网膜厚度, 提示造模成功且槲皮素对年龄相关性黄斑变性有一定的治疗作用。OCT 实验结果表明, 与对照组相比, 模型组小鼠的视网膜血管发生明显渗漏, 槲皮素组小鼠视网膜血管发生渗漏, 但渗漏面积较模型组明显减少。在小鼠视网膜电图中我们发现, 与对照组比较, 模型组小鼠 a 波振幅、b 波振幅均显著下降, 与模型组比较, 槲皮素组小鼠 a 波振幅、b 波振

幅均明显上升。HE 染色结果表明, 对照组小鼠视网膜各层结构清晰, 无坏死脱落现象, 模型组小鼠视网膜各层结构不清晰, 部分发生坏死脱落, 槲皮素组小鼠视网膜结构比较清晰, 部分外核层发生坏死脱落。ELISA 实验显示, 与对照组相比, 模型组小鼠血清中 ROS、MDA 含量明显增加, SOD、GSH-Px、CAT 活性明显下降, 与模型组相比, 槲皮素组小鼠血清中 ROS、MDA 含量降低, SOD、GSH-Px、CAT 活性提高, 提示槲皮素可以减轻氧化应激反应, 对年龄相关性黄斑变性有保护作用。进一步探讨了槲皮素对 Nrf2/Keap1/ARE 信号途径的作用, 结果表明, 与对照组相比, 模型组小鼠视网膜细胞质中 Nrf2 蛋白表达下调, 细胞核中 Nrf2 蛋白表达上调, 与模型组相比, 槲皮素组小鼠视网膜细胞质中 Nrf2 蛋白表达上调, 细胞核中 Nrf2 蛋白表达下调。与对照组相比, 模型组小鼠视网膜中 Keap1、HO-1、NQO-1、GCL 蛋白表达上调, 与模型组相比, 槲皮素组小鼠视网膜中 Keap1、HO-1、NQO-1、GCL 蛋白表达下调。因此, 槲皮素通过 Nrf2/Keap1/ARE 通路对年龄相关性黄斑变性具有保护作用。

综上所述, 槲皮素通过 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, 对年龄相关性黄斑变性具有保护作用。因此, 槲皮素在年龄相关性黄斑变性的治疗和预后方面带来新的应用。

参考文献

- Burlina PM, Joshi N, Pacheco KD, et al. Use of Deep Learning for Detailed Severity Characterization and Estimation of 5-Year Risk Among Patients With Age-Related Macular Degeneration. *JAMA Ophthalmol* 2018;136(12):1359-1366
- Mitchell P, Liew G, Gopinath B, et al. Age-related macular degeneration. *Lancet* 2018;392(10153):1147-1159
- Sireesh D, Dhamodharan U, Ezhilarasi K, et al. Association of NF-E2 Related Factor 2 (Nrf2) and inflammatory cytokines in recent onset Type 2 Diabetes Mellitus. *Sci Rep* 2018;8(1):5126
- Wang XY, Wang ZY, Zhu YS, et al. Alleviation of cadmium-induced

oxidative stress by trehalose via inhibiting the Nrf2 - Keap1 signaling pathway in primary rat proximal tubular cells. *J Biochem Mol Toxicol* 2018;32(1):e22011

5 Canella R, Benedusi M, Martini M, *et al.* Role of Nrf2 in preventing oxidative stress induced chloride current alteration in human lung cells. *J Cell Physiol* 2018;8(223):6018-6027

6 Du F, Feng Y, Fang J, *et al.* MicroRNA - 143 enhances chemosensitivity of Quercetin through autophagy inhibition via target GABARAPL1 in gastric cancer cells. *Biomed Pharmacother* 2015; 74: 169-177

7 Sykes SM, Robison WG Jr, Waxler M, *et al.* Damage to the monkey retina by broad - spectrum fluorescent light. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981;20:425-434

8 Hansson HA. A histochemical study of oxidative in rat retina damages by

visible light. *Exp Eye Res* 1970;9(2):285-296

9 van Lookeren Campagne M, LeCouter J, Yaspan BL, *et al.* Mechanisms of age - related macular degeneration and therapeutic opportunities. *J Pathol* 2014;232(2):151-164

10 Rene C, Lopez E, Claustres M, *et al.* NF-E2-related factor 2, a key in inducer of antioxidant defenses, negatively regulates the CFTR transcription. *Cell Mol Life Sci* 2010;67(13):2297-2309

11 陈维维. 基于 Nrf2 信号通道研究芹菜素对氧化损伤小鼠视网膜的保护作用. 南京中医药大学 2017

12 王海燕, 杨金龙, 谷山林, 等. 桑叶槲皮素提取物抗氧化活性研究. *丝绸* 2018;55(3):15-20

13 Xu XR, Yu HT, Yang Y, *et al.* Quercetin phospholipid complex significantly protects against oxidative injury in ARPE-19 cells associated with activation of Nrf2 pathway. *Europ J Pharmacol* 2016;770:1-8

中国科技核心期刊眼科学类期刊主要指标及排名

刊名	核心总被引频次		核心影响因子		综合评价总分	
	数值	排名	数值	排名	数值	排名
中华眼科杂志	1891(3036)	2(2)	0.954(1.191)	1(4)	71.5	1
眼科新进展	1428(2775)	3(3)	0.902(1.656)	2(1)	65.3	2
中华实验眼科杂志	1021(1721)	4(4)	0.775(1.292)	3(3)	49.9	3
国际眼科杂志	2257(5484)	1(1)	0.628(1.628)	5(2)	49.3	4
中华眼科医学杂志电子版	108	10	0.340	10	48.0	5
中华眼底病杂志	843	5	0.668	4	45.4	6
临床眼科杂志	467	7	0.470	6	33.9	7
中华眼视光学与视觉科学杂志	579	6	0.448	7	24.8	8
眼科	404	8	0.412	9	23.5	9
中国斜视与小儿眼科杂志	253	9	0.448	7	18.0	10

摘编自 2019 版《中国科技期刊引证报告》核心版和扩展版(括号里面为扩展版的统计指标)