

黄芩苷对 ARPE-19 细胞氧化应激损伤的保护作用

李兰根¹, 武秀芬², 张丽娜¹, 段超¹, 云丽霞^{1*}

(1. 内蒙古自治区人民医院 眼科, 内蒙古 呼和浩特 010017; 2. 呼和浩特市妇幼保健院 病案室, 内蒙古 呼和浩特 010030)

【摘要】目的 本研究旨在揭示黄芩苷对氧化应激状态下视网膜色素上皮细胞的保护作用。方法 AMD 模型构建及氧化应激损伤评估; 实验组、对照组及黄芩苷干预组分别作用于细胞, 检测细胞衰老状态, ROS(reactive oxidative species) 累积, 细胞增殖、凋亡(apoptosis) 状态以及 Real-Time 定量荧光聚合酶链反应分析 SIRT1 mRNA 水平。结果 1. 氧化应激能造成 ARPE 损伤, 并导致 SIRT1 mRNA 表达水平下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。2. 黄芩苷高、低剂量组能显著改善细胞衰老状态, 促进增殖, 降低凋亡, 并显著改善 SIRT1 mRNA 水平, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 ARPE 细胞氧化应激损伤中黄芩苷能起到负向调节作用, 意味着黄芩苷具有抗氧化应激损伤的作用, 为临床 AMD 治疗提供了思路。

【关键词】 黄斑变性; 氧化应激; 黄芩苷; 去乙酰化酶-1

中图分类号: R451.3

文献标识码: B

文章编号: 2095-512X(2022)05-0526-04

年龄相关黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)是一种持续进展的黄斑病变, 近年我国 AMD 发病率呈上升趋势, 因此其防治变得日益重要。溯本求源, 寻找病因病机成为治疗 AMD 的关键一环。研究表明, 氧化应激在 AMD 病理过程中的研究正日益成为热点。

研究揭示视网膜是人体耗氧较高的组织之一, 视网膜色素上皮细胞(retinal pigmented epithelium cells, RPE)代谢过程产生氧自由基, 易受到氧化攻击, 表现为细胞处于衰老状态、ROS(reactive oxidative species)累积、线粒体功能异常、细胞坏死(necrosis)及凋亡(apoptosis)增加。特异性细胞保护蛋白去乙酰化酶-1(silent information regulator of transcription 1, SIRT1)在机体抗氧化应激过程中发挥作用, SIRT1 是去乙酰化酶蛋白 III 系列之一, 作为特异性细胞保护蛋白参与机体抗氧化应激过程, 发挥重要调节作用^[1,2]。黄芩苷(baicalin, BC)是黄芩中一种有效活性成分, 属黄酮类。黄芩苷由于具有多层次、多途径、多靶点的药理活性作用而日益受到国内外学者的关注^[3]。近年来, 随着对 BC 功效不断深入研究, 发现其主要功效是抗氧化损伤, 对自由基有清除作用。ARPE-19 细胞在强氧化剂作用下, 会发生类似 AMD 病理变化, 可有效模拟 AMD 的细胞模型^[4,5]。

基于以上背景, 本研究采用 H₂O₂ 诱导下的 ARPE-19 细胞作为 AMD 细胞模型, 在黄芩苷干预下对模型细胞氧化应激状态影响进行分析研究, 观察其对 ARPE-19 细胞抗氧化损伤作用; 进而对黄芩苷的保护机制进行研究, 为 AMD 防治提供理论依据及思路。

1 材料及方法

1.1 ARPE-19 细胞培养

将含 10% 胎牛血清, 100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素 DMEM 培养液加入 ARPE-19 细胞, 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育。待细胞满度为 90% 左右, 利用胰蛋白酶消化离心后传代。

1.2 实验分组

对照组, DMEM 基础培养液孵育 ARPE-19 细胞 24 h; 实验组, H₂O₂ 预处理 ARPE-19 细胞, 共孵育 24 h; 黄芩干预组, 高(30 mg/L)低、(10 mg/L)剂量组黄芩苷(baicalin, BC)预处理 ARPE-19 细胞, 后与 H₂O₂ 共孵育 ARPE-19 细胞 24 h。实验组和黄芩干预组后添加过氧化氢酶使 H₂O₂ 解毒。

1.3 检测细胞内活性氧水平

乙酰乙酸钠(DCFH-DA)荧光探针检测细胞内活性氧(ROS)水平。试剂盒操作流程如下: 各组

收稿日期: 2021-08-08; 修回日期: 2022-08-30

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目(2016MS0872); 内蒙古自治区人民医院博士启动基金项目(BS201704)

第一作者: 李兰根(1973-), 男, 博士, 主任医师。研究方向: 眼底病、白内障、视光学。E-mail: 18047192608@qq.com

*通信作者: 云丽霞, 女, 硕士, 主任医师, 硕士研究生导师。研究方向: 眼底病、白内障。E-mail: dryunlixia163.com

ARPE细胞和DCFH-DA 孵育 30 min后,收集,加入 500 μ L 浓度 1 μ mol/L DCFH-DA 工作液吹打混匀, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱内孵育 30 min,避光。荧光显微镜观察,同时采集荧光图像。使用图形分析软件 Image J software V 1.4 对样本图像的荧光强度半定量分析,分析 5 个视野,计算平均强度。观察氧化应激损伤及黄芩苷对细胞内 ROS 水平的影响。

1.4 检测细胞增殖

通过 Cell Titer 96[®] AQueous One Solution 单溶液细胞增殖检测法对细胞增殖活力进行分析。试剂盒操作流程如下:各组 ARPE-19 细胞接种于 96 孔培养板,使用 4% 多聚甲醛 0.5 mL 固定, PBS 清洗 (3 min/次 \times 2 次),培养孔中加入 Cell Titer 96[®] AQueous 试剂 0.5 mL,孵育 1 h~4 h。读板仪记录 490 nm 吸光率。观察氧化应激损伤及黄芩苷对增殖活力水平的影响。

1.5 检测细胞凋亡

膜联蛋白 V/碘化丙啶 (annexin V fluorescein isothiocyanate and propidium iodide, AVFI/PI) 对凋亡率进行分析,试剂盒操作流程如下:各组 ARPE-19 细胞接种于 96 孔培养板。重悬,调定细胞浓度为 10⁶/mL,取 100 μ L 悬液加入 5 μ L Annexin V,孵育 10 min,洗涤,固定,碘化丙啶 (PI) 染色液 0.5 mL 孵育 10 min。采用 FACS 流式细胞仪进行检测。结果计数使用 TM Pro 软件。观察氧化应激损伤及黄芩苷对细胞细胞凋亡的影响。

1.6 分析细胞衰老状态

采用 SA- β -gal 方法分析细胞衰老状态。细胞衰老分析试剂盒 (CA, Cell Biolabs, San Diego, USA) 操作流程如下:ARPE 细胞按照每孔约 2000 个接种于 96 孔培养板,加入 1 mL β -半乳糖苷酶,染色固定液室温固定 15 min;吸除细胞固定液,用 PBS 洗涤细胞 3 次,每次 3 min,吸除 PBS,在暗室 37 $^{\circ}$ C 环境暴露荧光底物 2 h。采用图形分析软件 Image J software V 1.4 半定量分析。观察氧化应激损伤及黄芩苷对细胞衰老状态的影响。

1.7 RNA 的提取和 Real-Time 定量荧光聚合酶链反应 (RT-PCR)

使用 RNeasy 试剂盒 (CA, Qiagen, Valencia, USA) 提取 RPE 细胞总 RNA,互补 DNA 第一链 (Invitrogen Life Technologies) 使用 SuperScript III 合成。RT-qPCR 使用 SYBRPremixEx Taq[™] 试剂盒 (Takara Bio, Inc, Otsu, JAPAN),操作在 ABI7500 上完成 (Applied Biosystems Life Technologies, Foster City,

CA, USA)。Gapdh 为内参。相对定量数据标准化处理采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法进行。SIRT1 上游引物:5'-TGTGGTAGAGCTTGCATTGATCTT-3';下游引物:5'-GGCCTGTTGCTCTCCTCAT-3'。GAPDH 上游引物:5'-GGAGTCAACGGATTTGGTC-3';下游引物:5'-GGAATCATTGGAACATGTA AAC-3'。PCR 条件及过程:95 $^{\circ}$ C 加热 5 min,95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。进行 40 个循环。再 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,采用琼脂凝胶电泳,电泳图像利用凝胶成像分析系统进行扫描半定量分析。观察黄芩苷对 ARPE-19 细胞氧化应激是否具有保护作用。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 18.0 software 统计学软件,实验重复 3 次。采用 $\bar{x} \pm s$ 表示计量资料。组间比较采用单因素方差检验。检验水准为 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 说明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芩苷对细胞增殖、凋亡率的影响

黄芩苷干预后,与实验组相比,细胞增殖率显著上升,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而凋亡率显著下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (见图 1、图 2)。

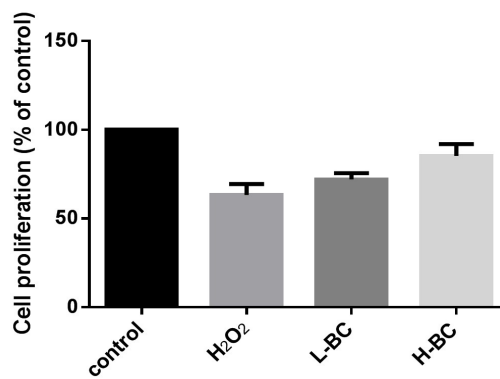


图1 H₂O₂ 和 BC 对 ARPE 细胞增殖影响

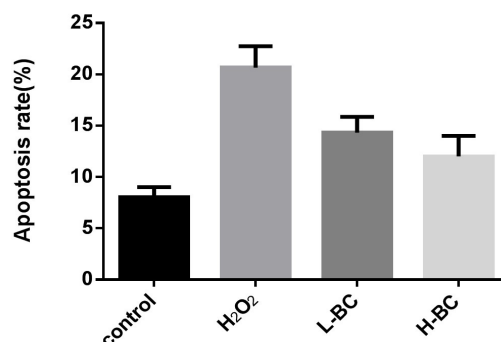


图2 H₂O₂ 和 BC 对 ARPE 细胞凋亡影响

2.2 H₂O₂ 干预及黄芩苷处理后对细胞衰老状态的研究

黄芩苷干预后,与实验组相比,细胞衰老状态改善($P < 0.05$)(见图3)。

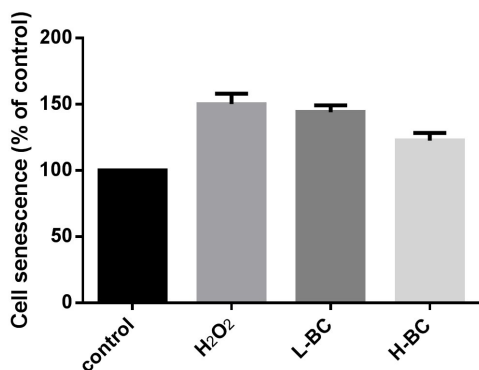


图3 H₂O₂ 和 BC 对 ARPE 细胞衰老影响

2.3 黄芩苷预处理对细胞内 ROS 影响

结果提示,H₂O₂能使 ARPE 细胞 ROS 累积增加,而黄芩苷预处理可显著对抗 H₂O₂的毒性作用,与实验组相比能显著下降细胞内生活性氧水($P < 0.05$)(见图4)。

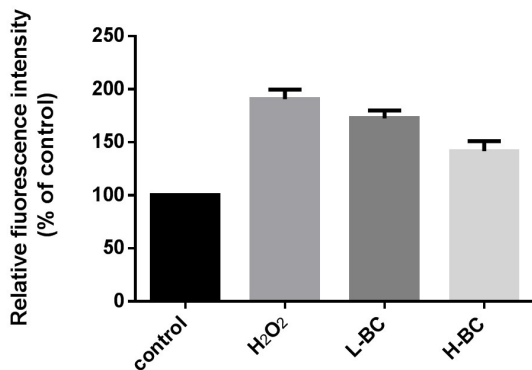


图4 H₂O₂ 和 BC 对 ARPE 细胞内 ROS 影响

2.4 Real-time 荧光定量 PCR 技术检测 ARPE 去乙酰化酶-1mRNA 的表达。

结果显示,H₂O₂能使 Sirt1 mRNA 表达下降,而黄芩苷预处理可提高 Sirt1 mRNA 表达($P < 0.05$)(见图5)。

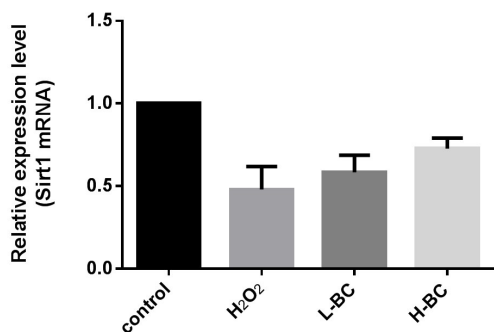


图5 H₂O₂ 和 BC 对 ARPE 细胞 Sirt1 mRNA 表达影响

3 讨论

AMD 是一种常见致盲眼病,近年来其发病率呈上升趋势。研究证实氧化应激损伤在黄斑变性发生中起着关键作用^[2]。抗氧化剂治疗可有效减少 AMD 发生的风险及延缓疾病进展^[6]。AMD 发病机制中的氧化应激学说已经受到广泛的认可。在文献查证及前期研究工作的基础上,理论上氧化应激损伤主要表现在细胞衰老状态、ROS(reactive oxidative species, ROS)累积、线粒体异常、细胞坏死(necrosis)及凋亡(apoptosis)等^[7]。

研究发现在抗细胞衰老、凋亡和氧化应激损伤等诸多方面,SIRT1 对细胞发挥保护作用^[3],同样,多项研究表明,对 AMD 细胞模型同样具有保护作用^[5,8]。因此,SIRT1 被认为是有前景的治疗部分视网膜疾病靶点。前期研究表明在 H₂O₂ 作用于 ARPE 细胞可以作为 AMD 的较好细胞模型,表现为细胞凋亡率上升、增殖率下降,细胞内 ROS 累积明显与细胞代谢的减缓,因此本研究依然采用 H₂O₂ 诱导 RPE 细胞损伤模型^[9]。

目前业界普遍认为激光治疗、雷珠单抗等是有效治疗手段,介于其治疗价格昂贵及局限性,寻找性价比适度的治疗手段显得极为重要。黄芩苷是植物黄芩的干燥根中提取分离出来的一种黄酮类化合物。而黄芩为一种广泛应用的中药。黄芩苷具有显著的生物活性,具有抑菌、利尿、泻火、解毒、安胎、抗变态反应等作用,也具有较强的抗癌反应和生理效能。然而,目前开展较多的研究领域集中于心血管疾病,理论上来说 BC 用于 AMD 治疗也是切实可行的。

本研究观察了细胞增殖率、凋亡率、衰老,细胞内 ROS 水平以及 SIRT1 RNA 表达水平多项指标,结果表明 BC 具有保护 ARPE 细胞氧化应激损伤的作用,高剂量 BC 组能更好地抑制凋亡、诱导增殖,降低 ROS 水平,使细胞维持在较活跃状态。通过与实验组相比,黄芩苷干预组能显著增加 SIRT1-mRNA 表达水平,前期研究也证实 SIRT1 在细胞内具清除 ROS、减少凋亡、增加细胞代谢的功能,从而实现保护细胞、抗氧化应激作用。因此,我们认为 BC 能增加 SIRT1 抗氧化应激的协同作用。氧化应激在 AMD 的发病机制中同样发挥着重要作用,因而可能为 AMD 的防治提供治疗思路,成为 AMD 治疗的潜在靶点。

(下转第 533 页)

存。因此,提高对该病的认识,包括对临床表现、内镜下特点的早期识别能力,尽早诊治,可以明显改善患者预后。

参考文献

- [1]中华医学会病理学分会消化病学组,2020年中国胃肠胰神经内分泌肿瘤病理诊断共识专家组.中国胃肠胰神经内分泌肿瘤病理诊断共识(2020版)[J].中华病理学杂志,2021,50(1):14-20
- [2]Dasari A, Shen C, Halperin D, et al. Trends in the incidence, prevalence, and survival outcomes in patients with neuroendocrine tumors in the united states[J]. JAMA Oncol, 2017, 3(10):1335-1342
- [3]Toshihiko M, Tetsuhide I, Izumi K, et al.Recent epidemiology of patients with gastro- entero- pancreatic neuroendocrine neoplasms(GEP- NEN) in Japan: a population-based study[J]. BMC cancer, 2020, 20(1):1104
- [4]刘万鲁,李永柏,丁杰,等.胃肠胰神经内分泌肿瘤的诊治分析[J].贵阳中医学院学报,2019,41(6):31-37
- [5]李变霞,陈鑫,郑忠青,等.39例胃肠神经内分泌肿瘤经内镜黏膜下剥离术的治疗效果评价[J].中国肿瘤临床,2018,45(12):623-627
- [6]Lawrence B, Gustafsson BI, Chan A, et al. The epidemiology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors[J]. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 2011, 40(1):1-18
- [7]Cao LL, Lu J, Lin JX, et al. Incidence and survival trends for gastric neuroendocrine neoplasms:an analysis of 3523 patients in the SEER database[J]. European Journal of Surgical Oncology, 2018, 44(10):1628-1633
- [8]李云龙,杜正华,张慧敏,等.胃肠胰神经内分泌肿瘤临床治疗及预后分析[J].临床外科杂志,2022,30(2):166-170
- [9]贾坤,张静,刘娟.儿童阑尾经典型类癌1例[J].中国介入影像与治疗学,2020,17(1):26
- [10]岳宏宇,陈平,丛春莉,等.miRNA在胃癌的发病机制及诊治方面的研究进展[J].内蒙古医科大学学报,2020,42(3):325-328
- [11]李景南,徐天铭.胃肠胰神经内分泌肿瘤诊断进展[J].中华消化杂志,2019,39(8):505-507
- [12]蒋磊,刘弋.97例胃肠胰神经内分泌肿瘤临床特征与预后分析[J].中华疾病控制杂志,2017,21(8):830-834
- [13]Xu JM, Shen L, Zhou ZW, et al. Surufatinib in advanced extrapancreatic neuroendocrine tumours (SANET ep: a Randomised, double blind, placebo controlled, phase 3 study[J]. Lancet Oncol, 2020, 21(11):1500-1512
- [14]Ahmed M. Gastrointestinal neuroendocrine tumors in 2020[J]. World J Gastrointest Oncol, 2020, 12(8):791-807
- [15]Pavel M, Oberg K, Falconi M, et al. Gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms:ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and followup[J]. Ann Oncol, 2020, 31(7):844-860
- [16]中华医学会消化病学分会胃肠激素与神经内分泌肿瘤学组.胃肠胰神经内分泌肿瘤诊治专家共识(2020·广州)[J].中华消化杂志,2021,41(2):76-77

(上接第528页)

参考文献

- [1]Paulina T, Kai K, Janusz B. Role of antioxidant enzymes and small molecular weight antioxidants in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD) [J].Biogerontology, 2013,14(5):461-482
- [2]WHO Prevention of Blindness and Visual Impairment; Priority Eye Diseases. Available online: <http://www.who.int/blindness/causes/priority/en/index8.html>,2020-06-30.
- [3]Patel AK, Hackam AS.Toll like receptor 3 (TLR3) protects retinal pigmented epithelium (PPE) cells from oxidative stress through a STAT3 dependent mechanism[J]. Mol Immunol, 2019, (54):122-131
- [4]Guo M, Gao XY, Song HH, et al. Anti-tumor effect of synthetic baicalin-rare earth metal complex drugs on SMMC-7721 cells [J]. Environ Geochem Health, 2020, 42:3851-3864
- [5]李兰根. Sirt1及STAT3保护视网膜色素上皮细胞抗氧化应激作用的实验研究[D].武汉:武汉大学,2015
- [6]Chambial S, Dwivedi S, Shukla KK, et al. Vitamin C in disease prevention and cure: an overview[J]. Indian Clin Biochem, 2017, 28(4):314-328
- [7]Yllidirim Z, Ucgun NI, Yllidirim F. The role of oxidative stress and antioxidants in the pathogenesis of age-related macular degeneration [J]. Clinics, 2018, 66(5):743-746
- [8]李兰根, 伟伟, 张艳梅. SIRT1视网膜色素上皮细胞氧化应激作用的实验研究[J].山东大学耳鼻喉眼学报, 2015, 29(6):56-63
- [9]李兰根, 伟伟, 张艳梅. H₂O₂及 ox-LDL 诱导视网膜色素上皮细胞氧化应激作用的观察[J].内蒙古医科大学学报, 2015, 37(6):525-529