

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.11.005

文章编号: 1005-8982 (2019) 11-0025-06

## 核因子 E2 相关因子 2 在晶状体上皮细胞 抗氧化损伤中的作用\*

朱丽华<sup>1</sup>, 李佳<sup>2</sup>, 李兵<sup>2</sup>

(1. 山东中医药大学附属眼科医院 山东省中西医结合眼病防治重点实验室, 山东 济南 250002; 2. 锦州医科大学附属第一医院, 辽宁 锦州 121000)

**摘要:** **目的** 探讨核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 在晶状体上皮细胞抗过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 氧化损伤和凋亡中的作用。**方法** 通过 MTT 测定不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对人晶状体上皮细胞 (HLECs) 活力的影响; 流式细胞术检测正常对照组 (不加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组 (100、200 及 300 μmol/L) 和 Nrf2 抑制组 (GSK-3β + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300 μmol/L) 活性氧 (ROS) 及超氧化物歧化酶 (SOD) 的含量; Western blotting 检测凋亡相关蛋白剪切型 Caspase-3 (Cleaved-Caspase-3)、Bax、Bcl-2、Nrf2 总蛋白、Nrf2 核蛋白及 Nrf2 浆蛋白的表达; 免疫荧光法检查 Nrf2 在晶状体上皮细胞的表达和定位。**结果** 当 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度为 400 μmol/L 时, 晶状体上皮细胞不可逆死亡。细胞经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 48 h 后, 各组 ROS 的表达量比较, 差异有统计学意义 (P < 0.05), 与正常对照组比较, 各处理组 ROS 含量升高 (P < 0.05), Nrf2 抑制组与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 高浓度组比较, 差异无统计学意义 (P > 0.05)。处理 48 h 后, 各组 SOD 的含量比较, 差异有统计学意义 (P < 0.05); 与正常对照组比较, 各处理组的 SOD 含量降低 (P < 0.05), 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 高浓度组比较, Nrf2 抑制组 SOD 含量下降 (P < 0.05)。处理 48 h 后, 各组 Cleaved-Caspase-3、Bax、Bcl-2 表达的比较, 差异有统计学意义 (P < 0.05), 与正常对照组比较, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 各个浓度组 Caspase-3、Bax 降低 (P < 0.05), Bcl-2 升高 (P < 0.05), 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 高浓度组比较, Nrf2 抑制组的 Cleaved-Caspase-3、Bax 升高 (P < 0.05), 而 Bcl-2 降低 (P < 0.05); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 各浓度组中 Nrf2 相对表达相应增多且有核内转移的趋势, Nrf2 抑制组无 Nrf2 表达。**结论** Nrf2 在人晶状体上皮细胞中的表达及核易位能增加抗氧化酶和抗凋亡蛋白的含量, 降低促凋亡蛋白含量, 从而起到自身抗氧化损伤和抗凋亡的作用。

**关键词:** 晶状体; 上皮细胞; 氧化应激; 凋亡

**中图分类号:** R776; R34

**文献标识码:** A

## Anti-oxidative effect of Nrf2 in human lens epithelial cells\*

Li-hua Zhu<sup>1</sup>, Jia Li<sup>2</sup>, Bing Li<sup>2</sup>

(1. Shandong Provincial Key Laboratory of Integrated Chinese and Western Medicine for Eye Disease Prevention and Treatment, Affiliated Eye Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250002, China; 2. The First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning, 121000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the role of Nrf2 in the oxidative damage and apoptosis of crystal epithelial cells. **Methods** Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) with different concentration was co-cultured with human lens epithelial cells (HLECs) for establishment of oxidative stress with or without Nrf2. Cellular activity was determined by MTT assay. Flow cytometry was used to detect the apoptosis, reactive oxygen species (ROS) and the superoxidase dismutase (SOD). The expression of Cleaved-Caspase-3, Bax, Bcl-2, Nrf2 protein, Nrf2 protein and

收稿日期: 2018-12-03

\* 基金项目: 山东省医药卫生科技发展计划项目面上项目 (No: 2018WS196)

[通信作者] 李兵, E-mail: jzslibingv@163.com

Nrf2 protein were detected by Western blotting. Cellular localization of Nrf2 in epithelial cells were identified by immunofluorescence. **Results** The crystal epithelial cells irreversibly died when concentration of  $H_2O_2$  was more than  $400 \mu\text{mol/L}$ . ROS production was increased while expression of SOD was decreased significantly with treatment of  $H_2O_2$  for 48 hours when compared with normal control group ( $P < 0.05$ ), which was attenuated by Nrf2 ( $P < 0.05$ ). Western blotting data suggested that  $H_2O_2$  induced an obvious increase of Bcl-2 ( $P < 0.05$ ) and decrease of cleaved-Caspase-3 and Bax ( $P < 0.05$ ), all of which was abolished by Nrf2 treatment ( $P < 0.05$ ). Expression of Nrf2 in  $H_2O_2$  group was increased, along with tendency of nuclear translocation. **Conclusions** The expression and nuclear translocation of Nrf2 in human lens epithelial cells enhances anti-oxidative and anti-apoptotic capability.

**Keywords:** crystalline lens; crystal epithelial cells; oxidative stress; apoptosis

全世界主要的致盲疾病中, 白内障占首要位置。晶状体上皮细胞是晶状体前囊膜下一层单层细胞, 维持晶状体的正常代谢, 阻挡房水内任何有害物质进入晶状体, 一旦晶状体上皮细胞功能障碍, 就会引起晶状体代谢紊乱, 出现混浊, 最终导致白内障。白内障的诱发因素很多, 氧化应激是主要原因, 其次是细胞凋亡, 氧化损伤也是细胞凋亡的诱发因素之一<sup>[1]</sup>。过量的活性氧 (ROS) 可以直接攻击脂质、蛋白质和 DNA, 导致晶状体受损, 还可以作为信号通路的上游信号分子, 激活细胞内多种信号转导通路和转录因子并介导过氧化氢  $H_2O_2$  对晶状体的损伤<sup>[2]</sup>。

核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 是细胞抵御氧化损伤、抗凋亡的重要转录因子。近来研究发现, Nrf2 蛋白对各种以氧化应激和凋亡为主要发病机制的疾病都具有保护作用<sup>[3-4]</sup>。本研究主要探讨 Nrf2 在晶状体上皮细胞对抗  $H_2O_2$  氧化损伤和凋亡的作用, 并为今后探讨防治白内障提供新的思路和途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

人晶状体上皮细胞 (SRA01/04) 购自中国科学院上海细胞所, MEM 培养基购自美国 BI 公司, 活性氧检测试剂盒购自上海碧云天生物有限公司, 超氧化物歧化酶 (SOD) 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所, Nrf2 一抗、剪切型 Caspase-3 (Cleaved-Caspase-3)、Bax、Bcl-2 一抗购自美国 Absci 公司, GAPDH、辣根过氧化物酶二抗购自杭州弗德生物公司, Dapi 染色液购自北京索莱宝公司, 荧光二抗购自北京博奥森公司, 核浆蛋白提取试剂盒购自上海碧云天生物有限公司。

### 1.2 仪器和设备

恒温水浴箱 (上海森信 RP-9160), 转印槽 (美国 Biorad 公司), 垂直电泳槽 (美国 Biorad 公司), 电

泳凝胶成像分析系统 (上海天能公司), 台式高速冷冻离心机 (美国 Beckman 公司), 免疫荧光显微镜 (日本 Olympus 公司), 酶标仪、流式细胞仪、超净台及孵育箱 (美国 Biorad 公司), 恒温摇床 (美国 Forma Scientific 公司), 超微量分光光度计 (美国 Biotech/EPoch 公司), 制冰机 (意大利 Scotsman AF100 公司)

### 1.3 方法

**1.3.1 细胞培养** 将 SRA01/04 培养在含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 MEM 培养基中, 置于  $37^\circ\text{C}$ 、5% 二氧化碳  $\text{CO}_2$  培养箱中培养, 用 0.25% 胰酶常规传代。

**1.3.2 MTT 检测不同浓度  $H_2O_2$  处理的 SRA01/04 活性** 将细胞按照不同处理方式分组。分为正常对照组 (不加入  $H_2O_2$ )、 $H_2O_2$  50  $\mu\text{mol/L}$  组 (加入 50  $\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$ )、 $H_2O_2$  100  $\mu\text{mol/L}$  组 (加入 100  $\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$ )、 $H_2O_2$  200  $\mu\text{mol/L}$  组 (加入 200  $\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$ )、 $H_2O_2$  300  $\mu\text{mol/L}$  组 (加入 300  $\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$ ) 和  $H_2O_2$  400  $\mu\text{mol/L}$  组 (加入 400  $\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$ )。取对数生长期的 SRA01/04 按  $2 \times 10^3$  个 /  $100 \mu\text{l}$  浓度接种在 96 孔板, MEM 培养基 (含 10% FBS) 培养 24 h 使细胞贴壁, 后加入稀释好的含不同浓度  $H_2O_2$  的 MEM 培养基中, 分别培养 24 和 48 h 后酶标仪检测光密度 (OD) 值。

**1.3.3 细胞分组** 将细胞按照不同处理方式分组: 正常对照组 (不加入  $H_2O_2$ ),  $H_2O_2$  低浓度组 ( $H_2O_2$  浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$ ),  $H_2O_2$  中浓度组 ( $H_2O_2$  浓度为 200  $\mu\text{mol/L}$ ),  $H_2O_2$  高浓度组 ( $H_2O_2$  浓度为 300  $\mu\text{mol/L}$ ), Nrf2 抑制组 (GSK-3 $\beta$  +  $H_2O_2$  300  $\mu\text{mol/L}$ )。

**1.3.4 流式细胞术检测 ROS 含量** 5 组细胞处理 48 h 后, 将细胞收集于稀释好的 DCFH-DA 中, 细胞培养箱中培养 20 min。用无血清培养液洗涤细胞 3 次, 充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。

**1.3.5 SOD 含量检测** 将 5 组细胞处理 48 h 后, 收集细胞和上清液, 每组分为空白管、对照空白管、测试管和对照测试管, 混匀,  $37^\circ\text{C}$  孵育 20 min, 450 nm 处酶标仪读数, 细胞中 SOD 活力 = SOD 抑制率 /  $50\% \times 12 \times$  样品稀释倍数。

**1.3.6 Western blotting 检测 Nrf2 总蛋白、核蛋白、浆蛋白, Cleaved-Caspase-3, Bax 和 Bcl-2 相对表达** 将 5 组细胞处理 48 h 后, 每组的 1/2 细胞用于提取细胞中的核蛋白、浆蛋白, 其余 1/2 细胞用于提取总蛋白。考马斯亮蓝定量。蛋白经过 SDS-PAGE 分离后转移到 PVDF 膜, 用脱脂奶粉封闭 1 h, 封闭好的 PVDF 膜分别浸于不同的一抗孵育液里(兔抗 Nrf2 以 1 : 500, 兔抗 Cleaved-Caspase-3, Bax 和 Bcl-2 以 1 : 500 稀释, 兔抗 GAPDH 以 1 : 1 000 稀释) 4℃ 孵育过夜, TBST 清洗。将 PVDF 膜浸于辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (1 : 1 000) 孵育液中 1.5 h, TBST 清洗。利用高敏感性化学发光检测方法成像。

**1.3.7 免疫荧光检测 Nrf2 在细胞内的表达和定位** 将 4 组细胞按 3 000 个 /100  $\mu$ l 接种于有小圆玻片上的 6 孔板上, 在细胞培养箱贴壁 24 h, 按照分组相应处理 48 h 后, 磷酸盐缓冲液冲洗玻片, 4% 多聚甲醛固定 5 min, 磷酸盐缓冲液冲洗玻片, 0.5% 聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton X-100) 透明 10 min 增加细胞膜通透性, 1% 牛血清白蛋白封闭 1 h, 兔抗 Nrf2 一抗 4℃ 封闭过夜, 羊抗兔二抗 1 h, 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole 4', DAPI) 染核 10 min, 磷酸盐缓冲液冲洗, 将小圆玻片置于载玻片上, 荧光显微镜下观察。

## 1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料以均数  $\pm$  标准 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用重复测量设计的方差分析和单因素方差分析, 两两比较用 LSD-*t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组不同时间的细胞活力比较

各个浓度实验组与正常对照组不同时间点的细胞

活力比较, 经重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点的细胞活力有差异 ( $F = 268.540, P = 0.000$ ), 处理时间为 48 h 时, 细胞活力最低。②组间细胞活力有差异 ( $F = 126.450, P = 0.001$ ), 在 48 h 时, 各浓度组的细胞活力的变化最有意义。③各浓度实验组与正常对照组的细胞活力变化趋势有差异 ( $F = 254.110, P = 0.002$ )。与正常对照组比较,  $H_2O_2$  50  $\mu$ mol/L 组、 $H_2O_2$  100  $\mu$ mol/L 组、 $H_2O_2$  200  $\mu$ mol/L 组及  $H_2O_2$  300  $\mu$ mol/L 组的细胞活力均下降 ( $P < 0.05$ ), 当浓度为 400  $\mu$ mol/L 时, 细胞不可逆死亡。见表 1。

### 2.2 各组 ROS 含量比较

处理 48 h 后, 各组 ROS 含量的比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 2 851.340, P = 0.000$ ), 与正常对照组比较, 各处理组的 ROS 含量升高 ( $P < 0.05$ ), Nrf2 抑制组与  $H_2O_2$  高浓度组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 1 和表 2。

### 2.3 各组 SOD 含量比较

处理 48 h 后, 各组 SOD 含量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与正常对照组比较, 各处理组的 SOD 含量降低 ( $P < 0.05$ ), 与  $H_2O_2$  高浓度组比较, Nrf2 抑制组 SOD 含量减少 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

### 2.4 各组各蛋白表达的比较

处理 48 h 后, 各组 Bax、Bcl-2、Cleaved-Caspase-3、Nrf2 总蛋白、Nrf2 核蛋白、Nrf2 浆蛋白表达的比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与正常对照组比较,  $H_2O_2$  各个浓度组 Bax 表达下降 ( $P < 0.05$ ); 与正常对照组比较,  $H_2O_2$  低浓度组 Bcl-2 表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 其余各组差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );  $H_2O_2$  各个浓度组 Cleaved-Caspase-3 表达下降 ( $P < 0.05$ ); 各个浓度组 Nrf2 总蛋白、核蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ ); Nrf2 浆蛋白表达下降 ( $P < 0.05$ )。与

表 1 各组不同时间的细胞活力比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                         | 12 h              | 24 h              | 48 h              |
|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 正常对照组                      | 0.762 $\pm$ 0.113 | 0.756 $\pm$ 0.021 | 0.751 $\pm$ 0.020 |
| $H_2O_2$ 50 $\mu$ mol/L 组  | 0.712 $\pm$ 0.010 | 0.709 $\pm$ 0.091 | 0.711 $\pm$ 0.012 |
| $H_2O_2$ 100 $\mu$ mol/L 组 | 0.586 $\pm$ 0.041 | 0.487 $\pm$ 0.030 | 0.411 $\pm$ 0.012 |
| $H_2O_2$ 200 $\mu$ mol/L 组 | 0.391 $\pm$ 0.024 | 0.352 $\pm$ 0.031 | 0.231 $\pm$ 0.043 |
| $H_2O_2$ 300 $\mu$ mol/L 组 | 0.305 $\pm$ 0.102 | 0.272 $\pm$ 0.087 | 0.178 $\pm$ 0.010 |
| $H_2O_2$ 400 $\mu$ mol/L 组 | 0.013 $\pm$ 0.001 | 0.004 $\pm$ 0.009 | 0.001 $\pm$ 0.006 |

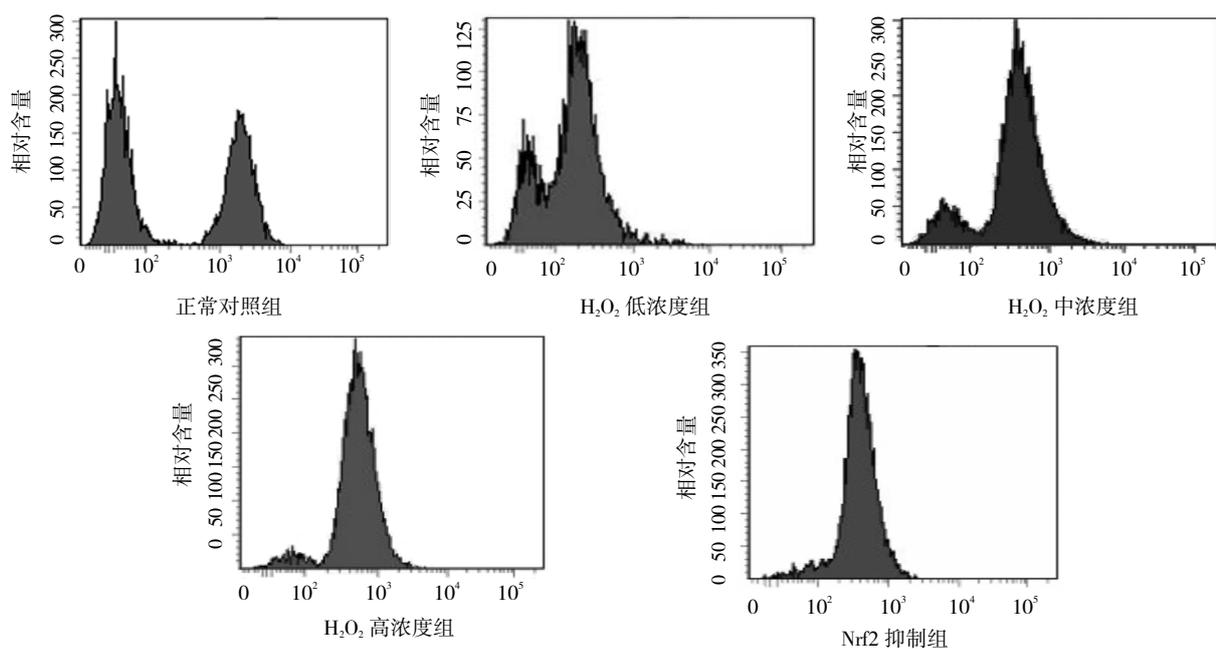


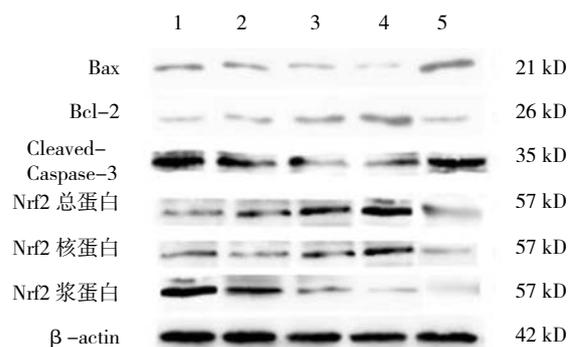
图 1 各组 ROS 含量比较

表 2 各组细胞 ROS 和 SOD 含量 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                                 | ROS                        | SOD                          |
|------------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| 正常对照组                              | 46.52 ± 3.25               | 89.93 ± 2.29                 |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 低浓度组 | 55.48 ± 2.96 <sup>1)</sup> | 72.00 ± 7.73 <sup>1)</sup>   |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 中浓度组 | 69.58 ± 4.43 <sup>1)</sup> | 52.70 ± 6.08 <sup>1)</sup>   |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 高浓度组 | 83.18 ± 3.93 <sup>1)</sup> | 45.08 ± 5.47 <sup>1)</sup>   |
| Nrf2 抑制组                           | 75.98 ± 6.56 <sup>1)</sup> | 13.78 ± 4.84 <sup>1)2)</sup> |
| F 值                                | 22 851.349                 | 12 075.170                   |
| P 值                                | 0.000                      | 0.000                        |

注: 1) 与正常对照组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 高浓度组比较,  $P < 0.05$

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 高浓度组比较, Nrf2 抑制组 Bax 表达升高 ( $P < 0.05$ )、Bcl-2 表达降低 ( $P < 0.05$ )、Cleaved-Caspase-3



1: 正常对照组; 2: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 低浓度组; 3: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中浓度组; 4: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 高浓度组; 5: Nrf2 抑制组

图 2 Bax、Bcl-2、Cleaved-Caspase-3 及 Nrf2 总蛋白、核蛋白、浆蛋白的相对表达量

表达升高 ( $P < 0.05$ ), Nrf2 抑制组的 Nrf2 总蛋白、核蛋白、浆蛋白基本不表达。见图 2 和表 3。

表 3 各组细胞内各蛋白的相对表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                                 | Bax                         | Bcl-2                       | Cleaved-Caspase-3           | Nrf2 总蛋白                    | Nrf2 核蛋白                    | Nrf2 浆蛋白                    |
|------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 正常对照组                              | 0.23 ± 0.02                 | 0.19 ± 0.31                 | 1.41 ± 0.05                 | 0.51 ± 0.02                 | 0.25 ± 0.03                 | 1.18 ± 0.21                 |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 低浓度组 | 0.13 ± 0.11 <sup>1)</sup>   | 0.26 ± 0.33                 | 1.02 ± 0.11 <sup>1)</sup>   | 0.59 ± 0.03 <sup>1)</sup>   | 0.29 ± 0.04 <sup>1)</sup>   | 0.87 ± 0.18 <sup>1)</sup>   |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 中浓度组 | 0.08 ± 0.02 <sup>1)</sup>   | 0.42 ± 0.05 <sup>1)</sup>   | 0.75 ± 0.05 <sup>1)</sup>   | 0.81 ± 0.07 <sup>1)</sup>   | 0.53 ± 0.12 <sup>1)</sup>   | 0.40 ± 0.07 <sup>1)</sup>   |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 高浓度组 | 0.03 ± 0.12 <sup>1)</sup>   | 0.61 ± 0.04 <sup>1)</sup>   | 0.55 ± 0.07 <sup>1)</sup>   | 1.10 ± 0.10 <sup>1)</sup>   | 0.74 ± 0.08 <sup>1)</sup>   | 0.16 ± 0.03 <sup>1)</sup>   |
| Nrf2 抑制组                           | 0.43 ± 0.03 <sup>1)2)</sup> | 0.22 ± 0.02 <sup>1)2)</sup> | 0.92 ± 0.12 <sup>1)2)</sup> | 0.12 ± 0.05 <sup>1)2)</sup> | 0.10 ± 0.03 <sup>1)2)</sup> | 0.05 ± 0.03 <sup>1)2)</sup> |
| F 值                                | 565.320                     | 2 871.210                   | 300.650                     | 23.110                      | 6 964.410                   | 462.170                     |
| P 值                                | 0.000                       | 0.000                       | 0.000                       | 0.000                       | 0.000                       | 0.000                       |

注: 1) 正常对照组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 高浓度组比较,  $P < 0.05$

## 2.5 Nrf2 在细胞内的表达和定位

细胞经  $H_2O_2$  各浓度组处理 48 h 后, 与正常对照组比较, Nrf2 表达增多, 且发生核内转移,  $H_2O_2$  高浓

度组核内转移最为明显。Nrf2 抑制组检测不到 Nrf2 的表达。见图 3。

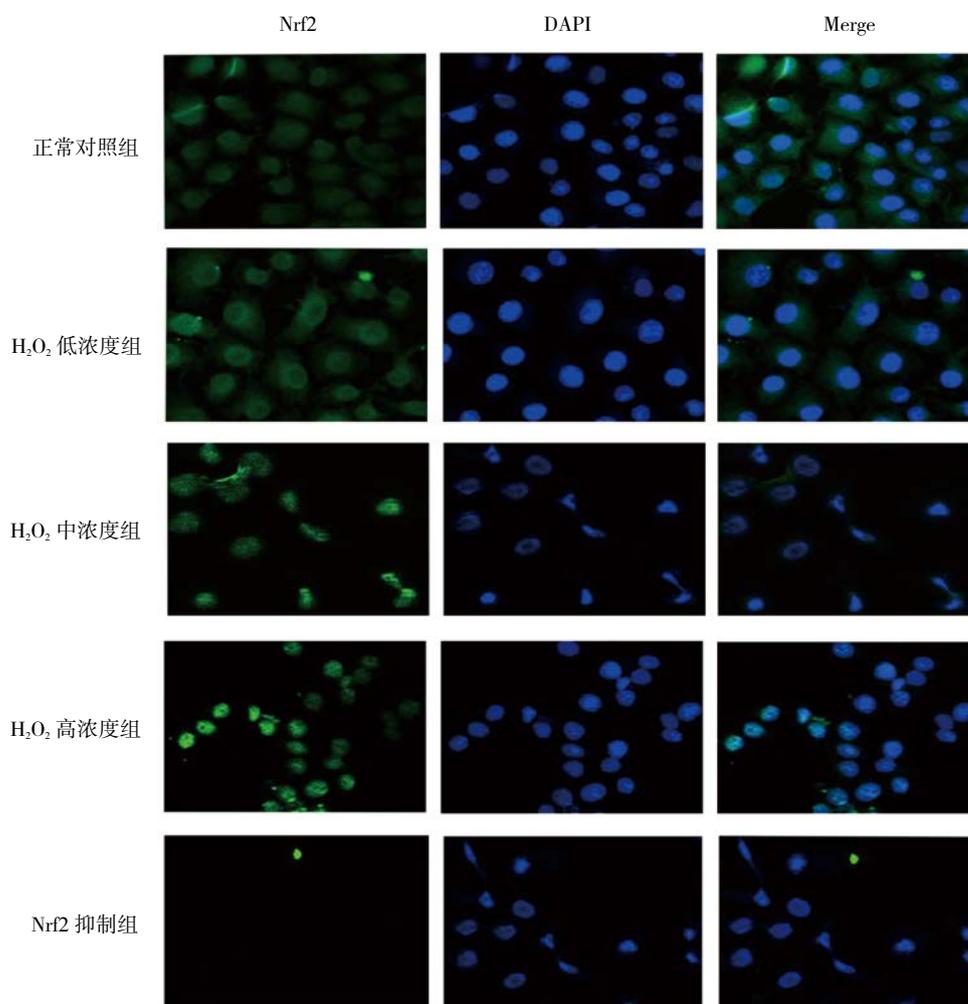


图 3 Nrf-2 的表达和定位 (免疫荧光  $\times 200$ )

## 3 讨论

Nrf2 广泛存在于多个组织器官内, 在正常环境下的细胞中, Nrf2 处于静止状态, 并不表达。当细胞处于氧化应激状态时, Nrf2 与 Keap1 解离并释放<sup>[5-6]</sup>, Nrf2 进入细胞核, Nrf2-ARE 信号通路活化并发挥细胞保护作用, 经研究证实, Nrf2-ARE 信号通路调节的内源性保护基因有 200 多个, 在增强组织抗氧化能力、保护组织细胞免受毒物损害、抗凋亡、抗炎、抗肿瘤等方面起着非常重要的作用<sup>[7-8]</sup>。该信号通路上调其基因产物的表达对帕金森病、脑出血、白癜风、糖尿病肾病等均具有很强的组织细胞保护能力<sup>[9-11]</sup>。ROS 能引起一系列的生化改变, 包括脂质、蛋白、核酸损伤。

晶状体上皮细胞细胞膜由脂质组成。当受到自由基的攻击, 产生过氧化物。氧化损伤也可以让蛋白结构和构向改变, 导致晶状体混浊, 自由基也可以导致 DNA 损伤, 引起细胞生物活性改变, 导致细胞凋亡、突变, 最终晶状体变混浊。

Bcl-2 家族与 Caspase 家族, 作为重要的抗凋亡蛋白, 在线粒体通路中分别发挥着凋亡调节作用和凋亡执行作用。Bax、Bak 等存在于胞质中, 是 Bcl-2 家族的促凋亡蛋白, 而 Bcl-2、Bcl-xL 等则是抑凋亡蛋白, 位于线粒体膜上。Cleaved-Caspase-3 是 Caspase 家族中最重要的凋亡执行蛋白, 是细胞凋亡的主要效应因子, 它的活化表明细胞凋亡进入不可逆阶段, 是 Caspase 家族中最重要的促凋亡蛋白。

笔者还发现,促凋亡基因 Cleaved-Caspase-3 和 Bax 随  $H_2O_2$  浓度升高而下降,而抑凋亡蛋白 Bcl-2 随  $H_2O_2$  浓度升高而升高,表明晶状体上皮细胞自身有一定的凋亡能力,推测这可能与晶状体上皮细胞氧化应激后, Nrf2 表达增多有关。研究发现, Nrf2 的负性调节除了 Keap1 之外, Gsk-3 $\beta$  可以介导核内 Nrf2 的出核降解,从而负性调节 Nrf2 相关通路<sup>[12]</sup>。在本实验中,当 Nrf2 活性受到抑制后,晶状体上皮细胞受到上游相同的 ROS 的刺激,产生的抗氧化酶 SOD 下降,促凋亡基因 Cleaved-Caspase-3 及 Bax 升高,而抑凋亡蛋白 Bcl-2 降低,验证晶状体上皮细胞自身的抗氧化应激与抗凋亡能力与 Nrf2 表达有关。

随着  $H_2O_2$  浓度的升高, Nrf2 蛋白表达增多,并且在  $H_2O_2$  中浓度组出现核易位趋势,在  $H_2O_2$  高浓度组出现明显核易位,这表明 Nrf2 表达增多和核易位增强了晶状体上皮细胞自身抗氧化损伤的能力。

本研究显示, Nrf2 蛋白表达和核易位在晶状体上皮细胞自身抗氧化损伤和凋亡中起重要作用,可为白内障形成机制和药物治疗的研制提供一个新的思路。

#### 参 考 文 献:

- [1] 王道光, 刘梅. 氧化锌抑制紫外线诱导的人晶状体上皮细胞  $Ca^{2+}$ -ATP 酶表达 [J]. 眼科新进展, 2017, 1(11): 12-15.
- [2] 刘礼婷, 郑文韬, 刘平, 等. 红景天苷对诱导的人晶状体上皮细胞氧化应激损伤的保护作用 [J]. 国际眼科杂志, 2017, 6(10): 20-23.
- [3] 林强, 李洪伟, 郭开今, 等. 咖啡酸苯乙酯通过  $\beta$ -途径抑制地塞米松诱导的成骨细胞凋亡 [J]. 东南国方医药, 2017, 20(3): 9-12.
- [4] SHANG G, GAO P, ZHAO Z, et al. Diiodo-L-thyronine ameliorates diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1832(5): 674-684.
- [5] URUNO A, MOTOHASSHI H. The Keap1-Nrf2 system as an in vivo sensor for electrophils [J]. Nitric Oxide, 2011, 25(8): 153-160.
- [6] SATOH T, MCKERCHER S R, LIPTON S A. Reprint of: Nrf2/ARE-mediated antioxidant actions of pro-electrophilic drugs [J]. Free Radic Biol Med, 2014, 66(8): 45-57.
- [7] 李梅, 金晶. 五味子乙素激活通路对顺铂致-细胞氧化应激损伤的保护作用 [J]. 药科学报, 2012, 47(11): 1434-1439.
- [8] SHEN Z, WANG Y, SU Z, et al. Activation of p62-keap1-Nrf2 antioxidant pathway in the early stage of acetaminophen-induced acute liver injury in mice [J]. Chem Biol Interact, 2018, 10(1): 2797-2800.
- [9] WANG W, WU Y, ZHANG G, et al. Activation of Nrf2-ARE signal pathway protects the brain from damage induced by epileptic seizure [J]. Brain Res, 2014, 28(1544): 54-61.
- [10] WANG W, WANG W P, ZHANG G L, et al. Activation of Nrf2-ARE signal pathway in hippocampus of amygdala kindling rats [J]. Neurosci Lett, 2013, 543: 38-63.
- [11] HERROON M K, RAJAGURUBANDARA E, DIEDRICH J D, et al. Adipocyte-activated oxidative and ER stress pathways promote tumor survival in bone via upregulation of Heme Oxygenase 1 and Survivin [J]. Sci Rep, 2018(8): 31-40.
- [12] GUO GUO S, AKAIKE T, TAO J, et al. Hui LHGF-mediated inhibition of oxidative stress by 8-nitro-cGMP in high glucose-treated rat mesangial cells [J]. Free Radic Res, 2012, 46(10): 1238-1248.

(王荣兵 编辑)