DOI:10.16016/j.2097-0927.202204038

川芎嗪通过调控 NRF2/HO-1 途径抑制高糖诱导的中性粒细胞外捕获网形成

陈金泉,赵 龙,丁渲恒,王令达,文 艳,谢 昊,彭 惠 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院眼科,眼科学重庆市市级重点实验室,重庆市眼科研究所

[摘要] **目的** 探讨川芎嗪(tetramethylpyrazine, TMP)对高糖诱导的中性粒细胞外捕获网(neutrophil extracellular traps, NETs)形成的影响及机制。**方法** 运用 CCK-8 检测不同浓度(0、5、10、20、40、80 μmol/L)的 TMP 处理 4 h 后中性粒细胞的活性。将中性粒细胞分为 7 组:Control 组(1.5 g/L 葡萄糖)、TMP 组(40 μmol/L TMP)、HG 组(4.5 g/L 葡萄糖)、HG+TMP 组(40 μmol/L TMP+4.5 g/L 葡萄糖)、HG+TMP+ML385 组(4.5 g/L 葡萄糖+40 μmol/L TMP+10 μmol/L ML385)、HG+ML385 组(4.5 g/L 葡萄糖+10 μmol/L ML385)和 HG+DPI 组(4.5 g/L 葡萄糖+10 μmol/L DPI)。通过免疫荧光观察 NETs 的结构;运用 DHE 和 DCFH-DA 检测中性粒细胞内 ROS 和超氧化物阴离子的表达量;采用 ELISA 试剂盒检测培养基中 MPO-DNA 的含量,Pico-Green kit 试剂盒检测培养基中 dsDNA 含量,Western blot 检测细胞内 H3-cit、NRF2、HO-1、NOX2 等的表达,评估 TMP 对 NRF2 信号级联的调控作用。**结果** 80 μmol/L 的 TMP 会降低中性粒细胞活性($P<0.01$),其余浓度的 TMP 对中性粒细胞活性无显著影响。与 Control 组比较,TMP 组中性粒细胞 NRF2、HO-1 表达明显上升($P<0.01$)。与 HG 组比较,HG+TMP 组中性粒细胞产生的 H3-cit 表达显著降低($P<0.05$),并且培养基中 dsDNA 和 MPO-DNA 含量明显下降($P<0.01$)。免疫荧光未观察到 HG+TMP 组中 NETs 形成;HG+TMP 组中性粒细胞产生的 ROS 和超氧化物阴离子较 HG 组中性粒细胞显著降低($P<0.01$)。使用 NRF2 抑制剂 ML385 处理后,TMP 对 H3-cit、NRF2 和 HO-1 的作用被逆转;培养基中 dsDNA 和 MPO-DNA 含量明显上升($P<0.01$),并且胞内 ROS 和超氧化物阴离子相较 HG+TMP 组的中性粒细胞显著升高($P<0.01$)。**结论** TMP 可以激活 NRF2/HO-1 通路并抑制 ROS 的形成,从而抑制高糖诱导的中性粒细胞外捕获网形成。

[关键词] 川芎嗪;中性粒细胞;中性粒细胞外捕获网;活性氧;高糖;NRF2/HO-1

[中图法分类号] R285.5; R331.144; R392.12 [文献标志码] A

Tetramethylpyrazine inhibits NETs formation induced by high glucose by regulating NRF2/HO-1 pathway

CHEN Jinquan, ZHAO Long, DING Xuanheng, WANG Lingda, WEN Yan, XIE Hao, PENG Hui Department of Ophthalmology, Chongqing Eye Institute, Chongqing Key Laboratory of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect and mechanism of tetramethylpyrazine (TMP) on the formation of neutrophil extracellular traps (NETs) induced by high glucose. **Methods** The viability of neutrophils treated with TMP of 0, 5, 10, 20, 40, and 80 μmol/L for 4 h was measured by CCK-8 assay. Neutrophils were divided into Control group (1.5 g/L glucose), TMP group (40 μmol/L TMP), HG group (4.5 g/L glucose), HG+TMP group (40 μmol/L TMP+4.5 g/L glucose), HG+TMP+ML385 group (4.5 g/L glucose+40 μmol/L TMP+10 μmol/L ML385), HG+ML385 group (4.5 g/L glucose+10 μmol/L ML385) and HG+DPI group (4.5 g/L glucose+10 μmol/L DPI). The structure of NETs was observed with immunofluorescence assay. The contents of reactive oxygen species (ROS) and superoxide anions were detected using dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay and dihydroethidine (DHE) method. MPO-DNA and dsDNA in the culture medium was measured with ELISA and Pico-Green kit, respectively. Western blotting was used to detect the intracellular expression of H3-cit, NRF2, HO-1, and NOX2 proteins.

[通信作者] 彭 惠,E-mail:pengh9@sina.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Results TMP of 80 μmol/L had significant effect on neutrophil ($P<0.01$), but no such effects were seen in TMP at other doses viability. Compared with the Control group, the expression levels of NRF2 and HO-1 were increased significantly in TMP group ($P<0.01$), while that of H3-cit was obviously decreased after TMP treatment ($P<0.05$), and the contents of dsDNA and MPO-DNA in the medium were decreased notably ($P<0.01$). NETs formation was not observed by immunofluorescence assay in the HG + TMP group. The productions of ROS and superoxide anions in the HG+TMP group were significantly lower than those produced in the HG group ($P<0.01$). The effects of TMP on the expression of H3-cit, NRF2, and HO-1 were reversed after treatment with NRF2 inhibitor ML385. Compared with the HG+TMP group, the contents of dsDNA and MPO-DNA were increased significantly ($P<0.01$), and the contents of intracellular ROS and superoxide anions were elevated remarkably in HG+TMP+ML385 group ($P<0.01$). **Conclusion** TMP can activate the NRF2/HO-1 pathway and then suppress the production of ROS, and thus inhibit the NETs formation induced by high glucose.

[**Key words**] tetramethylpyrazine; neutrophils; neutrophil extracellular traps; reactive oxygen species; diabetic retinopathy; high glucose; NRF2/HO-1

Corresponding author: PENG Hui, E-mail:pengh9@ sina.com

糖尿病性视网膜病(diabetic retinopathy,DR)是糖尿病患者眼部的并发症,同时也是导致患者失明的主要原因[1-2]。研究表明,血糖升高会导致视网膜微血管损伤,从而使得血视网膜屏障(blood-retinal barrier,BRB)破裂、视网膜内出血[3-4]。

中性粒细胞是血液中最丰富的免疫细胞,在先天免疫系统中发挥着重要作用,是细胞防御第一道防线[5]。中性粒细胞受到刺激后,会释放中性粒细胞外捕获网(neutrophil extracellular traps, NETs)来清除病原体。释放 NETs 的过程被称为 NETosis[6-7]。NETosis 是中性粒细胞特有的细胞死亡形式,其形态学特征是核膜与胞质颗粒膜溶解,染色质与胞质内颗粒组合,核膜破裂,随后释放至细胞外的网状结构,这个结构称为 NETs[8]。NETs 是由解旋染色质和多种蛋白组成,其中包括髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)、中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)、蛋白酶 3 (proteinase 3, PR3)、LL37 和 4 种组蛋白[9]。目前缺乏对 NETs 直接定量的方法。既往研究中使用免疫荧光观察 NETs 的形态,然后检测培养基中 NETs 的标志性蛋白和 dsDNA 来间接评估 NETs 的含量[10]。虽然 NETs 的产生有利于应对病原体的入侵,但过量的 NETs 会导致一系列的自身免疫性疾病[11]。研究表明,NETs 会导致新生血管形成,并且 NETs 还参与了干眼症、葡萄膜炎等疾病[12]。DR 患者在使用 anti-VEGF 治疗后,玻璃体中的 NETs 含量下降。提示 NETs 参与了 DR 的发病[13]。

研究表明,传统中草药川芎的有效成分川芎嗪(tetramethylpyrazine, TMP)具有较强的抗炎能力[14]。TMP 因具有抗氧化、抗炎作用,被推荐用于治疗各种视网膜病[15]。TMP 可以通过 MAPK 通路改善 IL-1β 诱导的血视网膜屏障破坏[16]。然而 TMP 对 DR 患者视网膜保护作用的分子机制尚不清楚。本研究进一步探讨 TMP 对中性粒细胞产生 NETs 的影响,为阐述 TMP 对 DR 患者的保护作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验细胞 2021 年 3 月至 2022 年 3 月,从本院眼科实验室选取 5 位健康受试者,各抽取 10 mL 外周血用以提取中性粒细胞。本研究获得患者知情同意,并获得重庆医科大学附属第一医院伦理委员会审批(审查批号:2021-711)。

1.1.2 主要试剂与仪器 中性粒细胞分离试剂盒购于中国 TBD 公司;高糖培养基、低糖培养基购于美国 Gibco 公司;CCK-8 试剂购于美国 Bryotime 公司;细胞计数板购于上海睿钰生物科技有限公司;Pico-Green Kit 购于美国 Sigma 公司;人 MPO-DNA 复合物酶联反应试剂盒购于中国酶科公司;TMP、ML385 购于美国陶素生物公司;特性抗体 HO-1、NRF2、β-actin 购于中国 Affinity 公司;特异性抗体 H3-cit 购于美国 Abcam 公司;DHE 和 DCFH-DA 试剂购于中国碧云天公司;DPI 购于美国 MCE 公司。

1.2 方法

1.2.1 分离人中性粒细胞 取中性粒细胞分离液 4 mL 于离心管中,然后使用滴管将人外周血小心加入离心管中离心(600×g,25 min,21 ℃)。离心结束后,小心吸取试管中的中性粒细胞于另一支试管。使用 PBS 洗涤细胞,21 ℃,1 050 r/min,离心 5 min。使用红细胞裂解液去除残余的红细胞。使用低糖培养基 1 mL 重悬,台盼蓝检测活细胞比例。

1.2.2 CCK-8 测定中性粒细胞活性 将中性粒细胞(10^4/孔)接种在 96 孔板中,加入低糖培养液置于 37 ℃孵箱。培养 30 min 后,加入 CCK-8 试剂 10 μL,

随后加入0、5、10、20、40、80 μmol/L的TMP处理中性粒细胞4 h,使用多功能酶标仪测量波长450 nm处光密度值[*D*(450)],实验重复3~4次。

1.2.3 主要试剂及细胞处理方法 TMP处理方法:取1 mg的TMP粉末溶解于730 μL的DMSO中,配置为10 mmol/L终浓度的TMP原液,培养基稀释至所需浓度。NADPH氧化酶(NOX)抑制剂DPI处理方法:取1 mg的DPI粉末溶解于317 μL的DMSO中,配置为10 mmol/L终浓度的DPI原液,届时使用培养基稀释至所需浓度。NRF2抑制剂ML385处理方法:取1 mg的ML385粉末溶解于100 μL的DMSO中,配置为20 mmol/L终浓度的ML385原液,届时使用培养基稀释至所需浓度。TMP、DPI与高糖(high glucose,HG)同时处理中性粒细胞。ML385预先处理中性粒细胞30 min后,再加入TMP与HG。

1.2.4 中性粒细胞分组 将中性粒细胞分为:Control组(1.5 g/L葡萄糖),TMP组(40 μmol/L TMP),HG组(4.5 g/L葡萄糖),HG+TMP组(40 μmol/L TMP+4.5 g/L葡萄糖),HG+TMP+ML385组(4.5 g/L葡萄糖+40 μmol/L TMP+10 μmol/L ML385),HG+ML385组(4.5 g/L葡萄糖+10 μmol/L ML385),HG+DPI组(4.5 g/L葡萄糖+10 μmol/L DPI)。

1.2.5 Western blot检测 中性粒细胞总蛋白使用蛋白提取液(RIPA:PMSF=100:1)提取,离心12 000 r/min,15 min,4 ℃。吸取上清液,随后向上清液中加入蛋白上样缓冲液。最后将EP管放入沸水中5 min,-20 ℃保存。电泳时,每个样品的蛋白量保持一致(30~50 μg),使用12%、15% SDS-PAGE凝胶分离蛋白,电转至PVDF膜上。随后将PVDF膜用5%脱脂牛奶封闭1 h,加入H3-cit(1∶1 000)、HO-1(1∶1 000)、NRF2(1∶1 000)、β-actin(1∶1 000)、NOX2(1∶1 000)的特异性一抗,4 ℃孵育12~16 h。然后将条带洗涤3次,加入相应的二抗(1∶10 000),37 ℃孵育2 h。条带蛋白信号使用ECL试剂盒检测,Image J分析条带密度。使用内源对照β-actin将数据标准化,重复实验3次。

1.2.6 细胞内ROS和超氧化物阴离子检测 将分离出来的人中性粒细胞重悬在1 mL低糖培养基中,向培养基中分别加入DCFH-DA、DHE试剂1 μL,将试管放入孵箱中,孵育30 min后,使用低糖培养基洗去残余的探针并计数,向96孔板中加入中性粒细胞(10^5/孔)。设置相应培养基作为空白孔,于孵箱中培养4 h。DCFH-DA以488 nm激发波长,525 nm发射波长,使用多功能酶标仪检测荧光强度。DHE以535 nm激发波长,以610 nm发射波长,使用多功能酶标仪检测荧光强度。

1.2.7 免疫荧光检测H3-cit的表达 将中性粒细胞接种在多聚赖氨酸处理过的细胞爬片上,按照分组处理,并于孵箱中孵育4 h,然后取出细胞爬片,使用4%的多聚甲醛固定细胞15 min。PBS洗涤3次,使用0.1% Triton X-100作用5 min穿透细胞膜,再次洗涤3次,使用5%山羊血清封闭细胞爬片1 h,随后加入H3-cit(1∶100)特异性一抗混合液在4 ℃孵育过夜。PBS洗涤3次后,将细胞用DAPI染色15 min,并洗涤3次。使用荧光显微镜观察所有荧光图像,照相并保存。

1.2.8 Pico-Green试剂盒检测培养基中的dsDNA含量 将中性粒细胞(1×10^6)接种在24孔板中,按照细胞分组,处理4 h后,收集24孔板中的培养基于EP管中,保存在-80 ℃。然后将DNA标准品加入黑色酶标板中,并设置复孔和空白孔。加入待测培养基50 μL于黑色酶标板中,将Pico-green探针试剂以1∶200稀释后,50 μL加入到每孔中,室温静置5 min。多功能酶标仪检测在485 nm激发波长、535 nm发射波长检测荧光强度,并带入标准曲线计算。

1.2.9 MPO-DNA复合物酶联反应试剂盒 将中性粒细胞(1×10^6)接种在24孔板中,按照细胞分组,处理4 h后,收集24孔板中的培养基于EP管中,保存在-80 ℃。然后使用双蒸水配置洗涤液(1∶20),配置MPO-DNA标准品,浓度分别为1 000、500、250、125、62.5、31.25 pg/mL,每个浓度设置1个复孔,并设置空白孔。加入标准品和待测样本,100 μL/孔。室温孵育2 h。弃去孔中液体,洗涤液洗板3次,拍干酶标板。加入预先配置好的工作液,室温孵育1 h,洗涤液洗板3次,拍干酶标板。加入预先配置的显色剂100 μL/孔,避光室温孵育30 min,加入终止液100 μL/孔,混匀后,测量*D*(450)值,带入标准曲线计算浓度。

1.3 统计学分析

使用GraphPad Prism 5.0分析,多组数据采用单因素方差分析,单组数据采用独立样本*t*检验分析。检验水准:$\alpha=0.05$。

2 结果

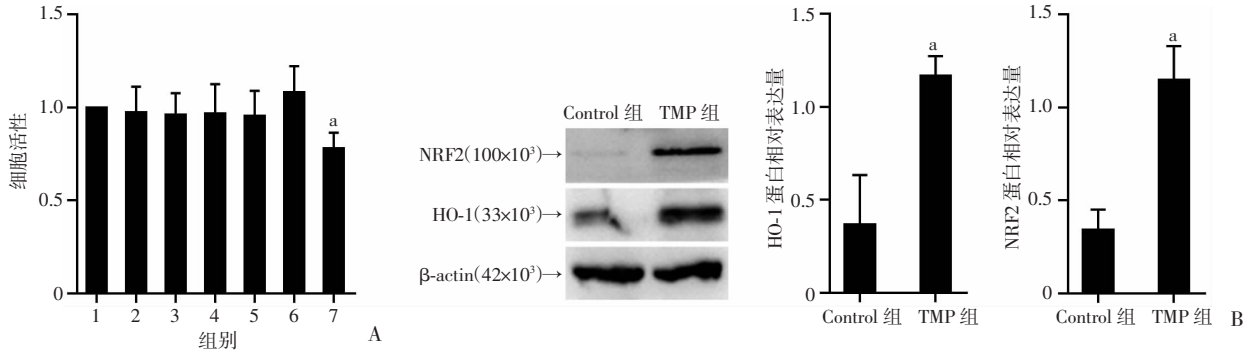
2.1 TMP诱导中性粒细胞NRF2/HO-1通路激活

CCK-8检测结果显示,中性粒细胞在不同浓度TMP处理后,40 μmol/L TMP处理后的中性粒细胞活性与Control组无明显差异;80 μmol/L TMP处理后,中性粒细胞活性下降($P<0.01$,图1A)。Western blot检测结果显示,TMP(40 μmol/L)组细胞内NRF2、HO-1蛋白表达量显著升高($P<0.01$,图1B)。以上结果说明TMP可以诱导中性粒细胞内NRF2和HO-1升高。

2.2 TMP抑制高糖诱导的NETs形成

Pico-Green检测结果显示,HG组中性粒细胞培养基中dsDNA的表达升高,5、10 μmol/L TMP无法逆转其升高;而20 μmol/L可逆转其升高($P<0.05$),40 μmol/L TMP可显著逆转其升高($P<0.01$,图2A)。免疫荧光结果显示,HG组可以观察到DNA网状结构及其上附着的H3-cit,而TMP(40 μmol/L)组和HG+

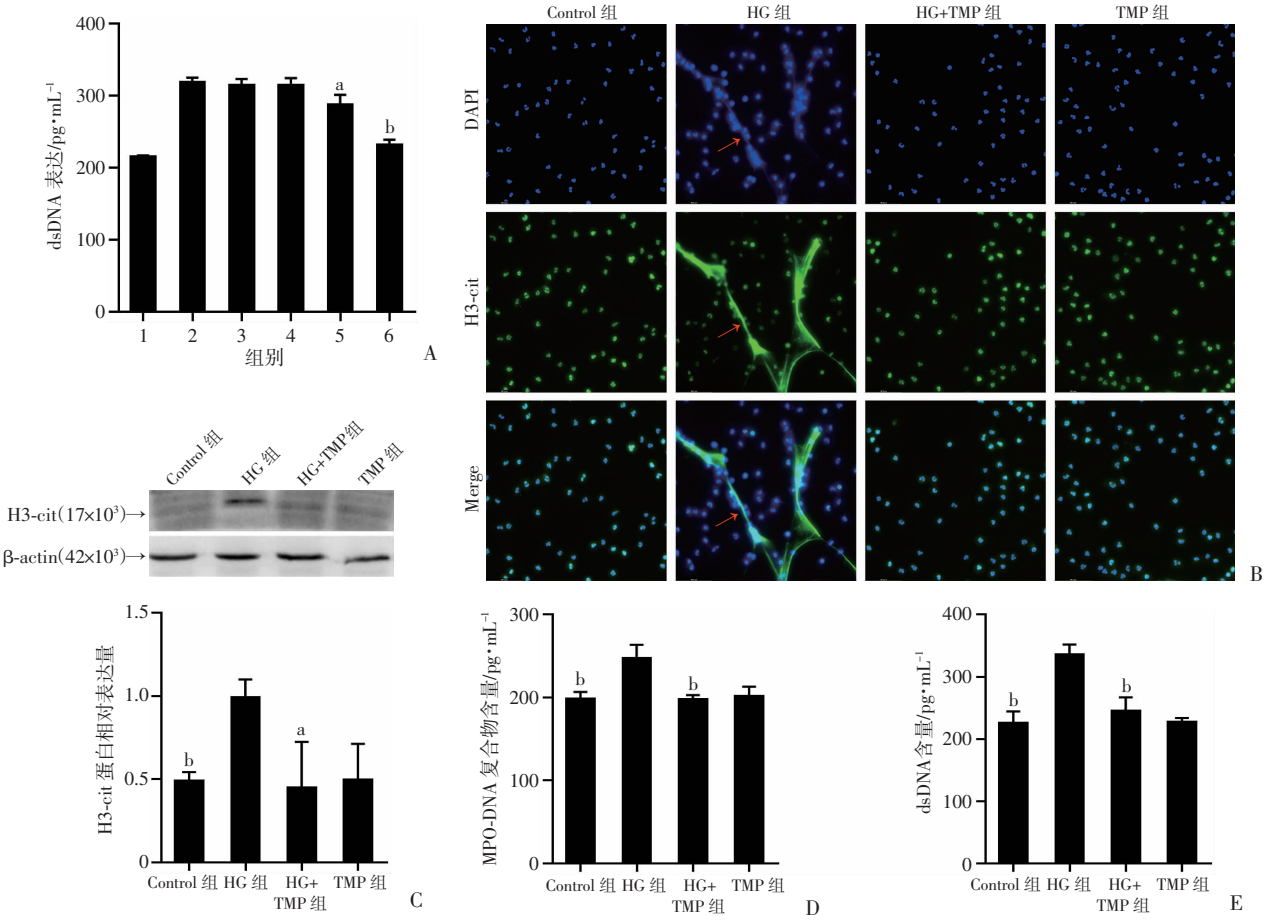
TMP 组均未观察到 NETs 的形成(图 2B)。Western blot 检测结果显示,与 Control 组相比,HG 组中性粒细胞 H3-cit 表达显著升高,TMP 组差异无统计学意义;与 HG 组相比,HG+TMP 组 H3-cit 表达下降($P<0.05$,图 2C)。ELISA 和 Pico-Green 检测结果显示,与 Control 组相比,HG 组 MPO-DNA 和 dsDNA 含量显著升高($P<0.01$),TMP 组无显著差异;与 HG 组相比,HG+TMP 组 MPO-DNA 和 dsDNA 含量显著下降($P<0.01$,图 2D、E)。结果表明 TMP 可以抑制高糖诱导中性粒细胞形成 NETs。



a:$P<0.01$,与 Control 组比较

A:CCK-8 检测不同浓度的 TMP 处理中性粒细胞 4 h 后细胞存活率 1:Control 组;2:DMSO 组;3~7:分别为 5、10、20、40、80 μmol/L TMP 组;B:Western blot 检测中性粒细胞内 NRF2 和 HO-1 蛋白的表达及半定量分析

图 1 TMP 对中性粒细胞活性及 NRF2 和 HO-1 表达的影响



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 HG 组比较

A:Pico-green 检测不同浓度 TMP 处理中性粒细胞后培养基中 dsDNA 的含量 1:Control 组;2:HG 组;3~6:分别为 5、10、20、40 μmol/L TMP 组;B:免疫荧光观察 NETs 的 DNA 结构及 H3-cit 分布(×400) 红色箭头示 NETs;C:Western blot 检测 H3-cit 蛋白表达量及其半定量分析;D:MPO-DNA 复合物含量分析;E:dsDNA 含量分析

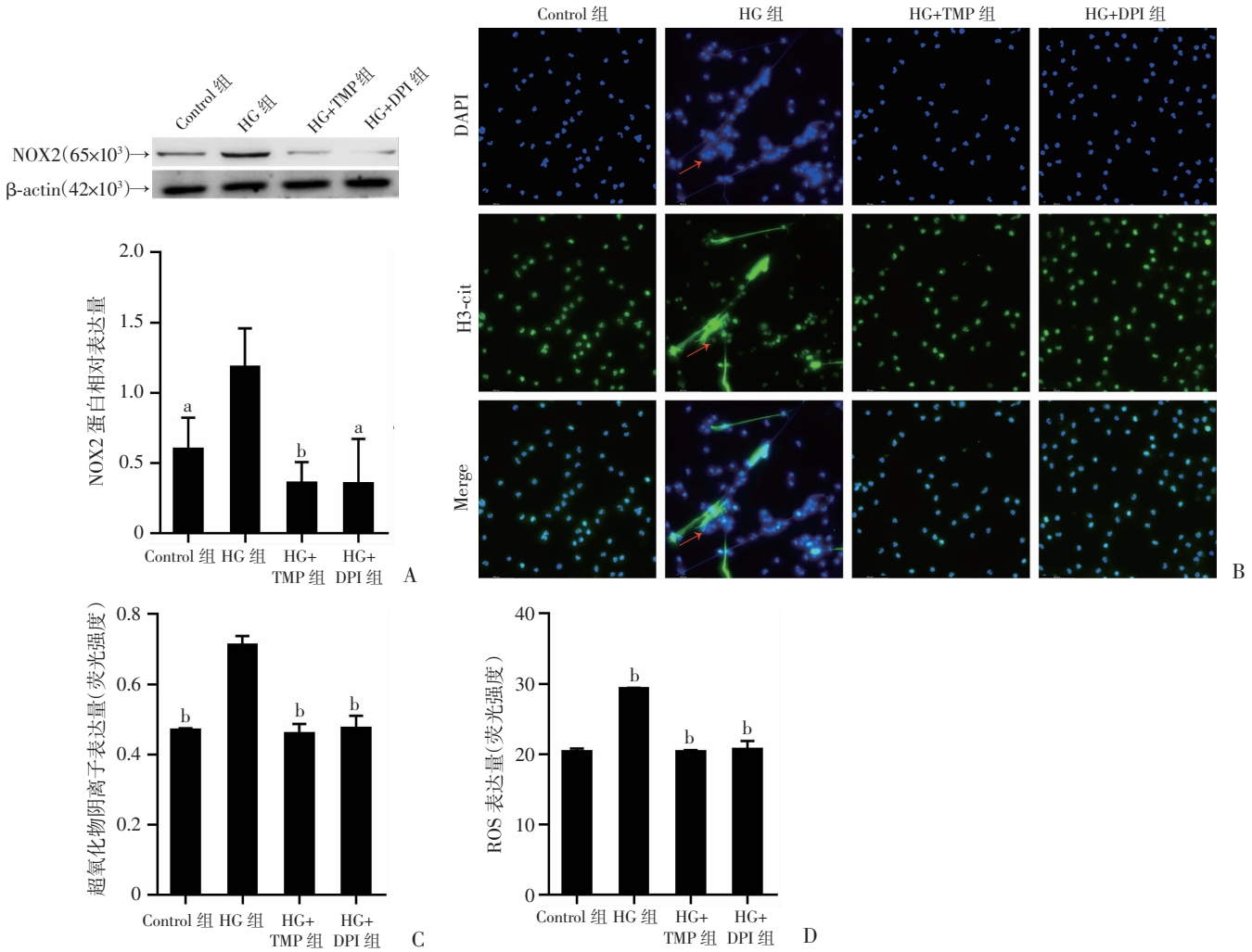
图 2 TMP 对高糖刺激下中性粒细胞形成 NETs 的影响

2.3　TMP 对中性粒细胞内活性氧和超氧化物阴离子的影响

Western blot 结果显示,与 HG 组相比,HG+TMP 组、HG+DPI 组 NOX2 蛋白表达明显下降($P<0.05$,图 3A)。免疫荧光显示,HG 组可观察到 DNA 网状结构及其上附着的 H3-cit,HG+TMP 组和 HG+DPI 组未观察到 DNA 网状结构(图 3B)。DHE 和 DCFH-DA 结果显示,与 Control 组相比,HG 组细胞内超氧化物阴离子和 ROS 显著升高($P<0.01$);与 HG 组相比,HG+TMP 组、HG+DPI 组超氧化物阴离子和 ROS 显著下降($P<0.01$,图 3C、D)。上述结果表明,TMP 可通过抑制 NADPH 氧化酶从而抑制 NETs 的形成。

2.4　TMP 通过升高 NRF2 和 HO-1 抑制 NETs 生成

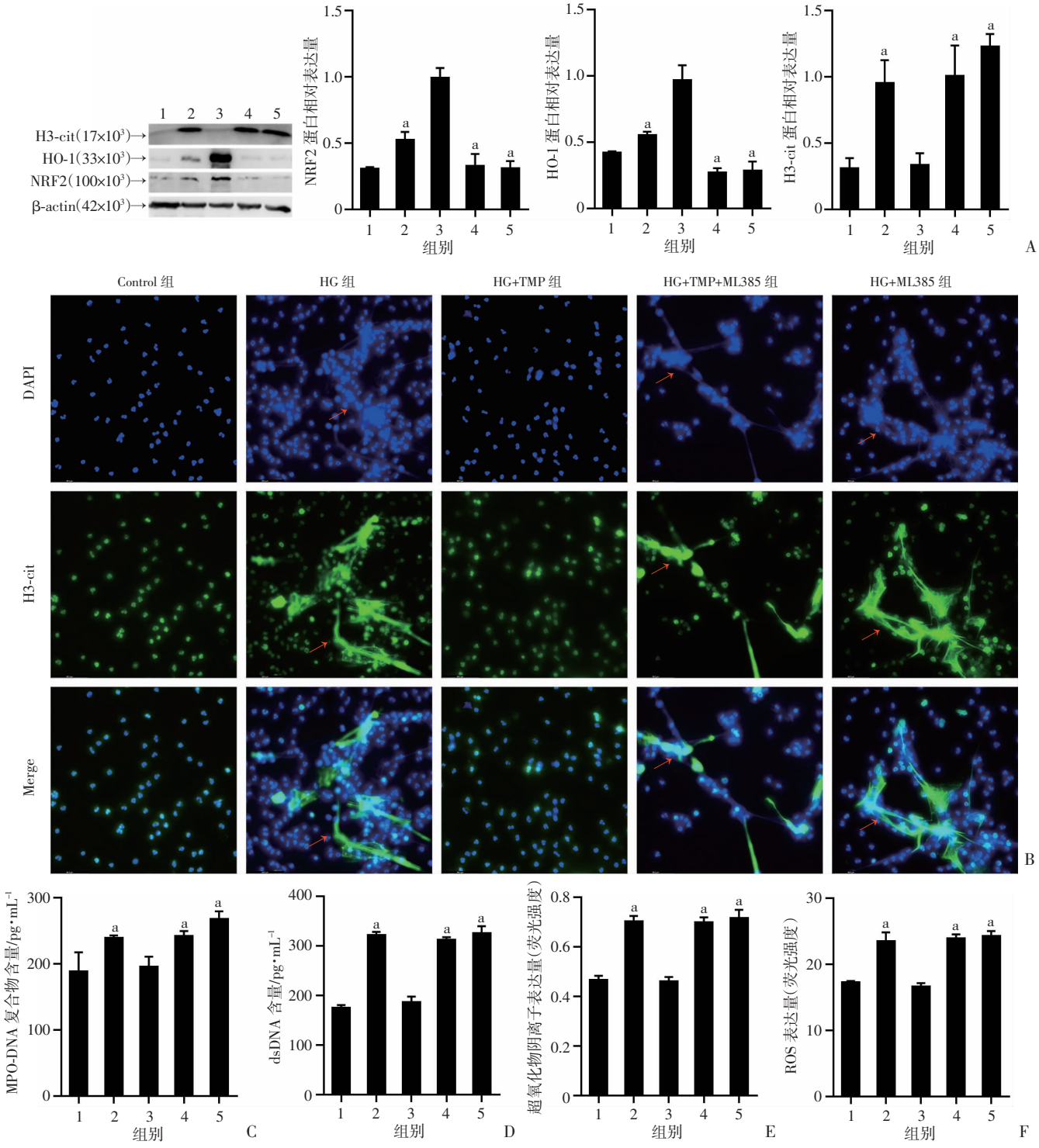
Western blot 结果显示,与 HG+TMP 组相比,HG 组、HG+TMP+ML385 组、HG+ML385 组中性粒细胞 H3-cit 表达显著升高($P<0.01$),NRF2、HO-1 表达量显著降低($P<0.01$,图 4A)。免疫荧光观察显示,HG 组、HG+TMP+ML385 组、HG+ML385 组可观察到 DNA 网状结构及其上附着的 H3-cit,HG+TMP 组未观察到 DNA 网状结构(图 4B)。ELISA 和 Pico-Green 结果显示:与 HG+TMP 组相比,HG 组、HG+TMP+ML385 组、HG+ML385 组 MPO-DNA 和 dsDNA 含量升高($P<0.01$,图 4C、D)。DHE 和 DCFH-DA 检测显示:与 HG+TMP 组相比,HG 组、HG+TMP+ML385 组、HG+ML385 组中性粒细胞内超氧化物阴离子和 ROS 的表达显著升高($P<0.01$,图 4E、F)。以上结果表明 TMP 可能通过升高 NRF2 和 HO-1 的表达来抑制高糖诱导的中性粒细胞产生 NETs。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 HG 组比较

A:Western blot 检测中性粒细胞内 NOX2 的表达及其半定量分析结果;B:免疫荧光观察 NETs 的 DNA 结构及 H3-cit 分布(×400)　红色箭头示 NETs;C:超氧化物阴离子相对表达量分析;D:ROS 相对表达量分析

图 3　TMP 可通过 NADPH 途径抑制 NETs 的形成



1:Control 组;2:HG 组;3:HG+TMP 组;4:HG+TMP+ML385 组;5:HG+ML385 组;a: $P<0.01$,与 HG+TMP 组比较

A: Western blot 检测 NETs 标志性蛋白 H3-cit 及细胞内 HO-1、NRF2 的表达及半定量分析;B: 免疫荧光观察 NETs 的 DNA 结构及 H3-cit 分布(×400) 红色箭头示 NETs;C:MPO-DNA 复合物含量分析;D: dsDNA 含量分析;E: 超氧化物阴离子相对表达量分析;F: ROS 相对表达量分析

图 4 TMP 可通过 NRF2/HO-1 途径抑制 NETs 的产生

3 讨论

糖尿病患病率在我国逐年升高,糖尿病患者体内持续高糖是诱导糖尿病视网膜病变的重要原因之一,而氧化应激、细胞凋亡等因素可以促进糖尿病性视网膜病的发生、发展[17]。目前的治疗方案是以激光光凝和玻璃体腔注射抗 VEGF 药物为主,但取得的治疗效果欠佳,所以亟需一种新的治疗方法和靶点。

NETs 的形成是中性粒细胞应对病原体入侵的手段之一[18]。NETs 的形成主要依赖于 Raf/Merk/ERK 信号通路和 NOX 依赖途径[19]。以往的研究报道发现 NETs 结构上所附着的抗菌组蛋白、MPO、蛋白酶可导致内皮细胞功能失调,从而诱发一系列的自身免疫和血管炎症并伴随中性粒细胞胞浆抗体产生(ANCAs)[20]。因此,合理应对 NETs 的形成可能成为慢性炎症潜在的治疗靶点。以往研究发现在糖尿病视网膜病患者血清及糖尿病视网膜病大鼠模型血清中发现 NETs 的表达升高,并且通过玻璃体腔抗 VEGF 处理后,发现大鼠模型玻璃体中 NETs 的含量下降。这些结果说明 NETs 参与了糖尿病性视网膜病的发生、发展[13]。

TMP 是川芎的有效成分,其具有广泛的药理学活性,在临床上应用广泛。以往的研究表明 TMP 对 IL-1β 诱导视网膜神经节细胞损伤具有保护作用[21]。并且有研究发现,TMP 可以抑制肝移植大鼠血清中 NETs 的形成从而减轻肝移植后的氧化应激损伤[22]。因此探讨 TMP 对高糖诱导的 NETs 的影响,来探究 TMP 是否有潜力作为糖尿病视网膜病辅助治疗的药物。

研究报道,HO-1 参与 iNOS 和 NO 的调控,正常生理条件下,HO-1 表达相对较低,而在受到外来刺激时表达量升高[14]。HO-1 可以保护细胞免受 ROS 的影响。而 HO-1 主要受到 E2 相关因子 2(NRF2)的调控,所以 NRF2/HO-1 可以抑制炎症和抗氧化应激反应[23]。本研究结果发现适宜浓度的 TMP 处理可以上调中性粒细胞内 NRF2/HO-1 的表达,并且使用 TMP 处理的中性粒细胞在受到高糖刺激下无法形成 NETs。同时发现在高糖诱导下,中性粒细胞内 ROS 升高,而使用 TMP 处理后中性粒细胞内 ROS 下降。

超过细胞调节能力的 ROS 升高和调节细胞 ROS 水平的酶活性会导致细胞氧化应激。过量的 ROS 诱导中性粒细胞内线粒体膜电位的变化从而诱导中性粒细胞释放 NETs。当 ROS 超载时,NRF2 作为主要的抗氧化控制器,可以通过调节多种抗氧化酶的表达从而发挥抗氧化保护作用[24]。本研究表明在高糖刺激下,中性粒细胞内 NRF2 和 HO-1 表达升高,但高糖刺激下的 ROS 产生超过细胞自我调节能力,无法抑制 NETs 产生。使用 TMP 处理后,中性粒细胞内 NRF2 和 HO-1 表达升高,并且能够有效抑制 NETs 的形成。使用 NRF2 抑制剂可以有效抑制 TMP 对中性粒细胞的保护作用。由此我们推断 TMP 可能通过 NRF2/HO-1 途径产生抗氧化应激的作用。

综上所述,本研究结果表明,高糖可诱发中性粒细胞氧化应激,并诱导 NETs 的形成,适宜浓度的 TMP 处理可以通过上调 NRF2/HO-1 通路抑制中性粒细胞形成 NETs。推测 TMP 可能激活 NRF2/HO-1 途径参与到高糖诱导的氧化应激反应,从而对糖尿病性视网膜病的发生、发展提供保护作用。然而,以上结果仍需要体内实验进一步论证。本研究有助于了解 TMP 在中性粒细胞氧化应激损伤中的保护作用,为糖尿病性视网膜病的治疗提供潜在靶点。

参考文献:

[1] SHAN K, LIU C, LIU B H, *et al*. Circular noncoding RNA $HIPK_3$ mediates retinal vascular dysfunction in diabetes mellitus[J]. Circulation, 2017, 136(17): 1629-1642. DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029004.

[2] WANG B, WANG F, ZHANG Y, *et al*. Effects of RAS inhibitors on diabetic retinopathy: a systematic review and meta-analysis[J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2015, 3(4): 263-274. DOI:10.1016/S2213-8587(14)70256-6.

[3] Writing Committee for the Diabetic Retinopathy Clinical Research Network, GROSS J G, GLASSMAN A R, *et al*. Panretinal photocoagulation *vs* intravitreous ranibizumab for proliferative diabetic retinopathy: a randomized clinical trial[J]. JAMA, 2015, 314(20): 2137-2146. DOI:10.1001/jama.2015.15217.

[4] ZHANG X, YANG Y H, JING L N, *et al*. Pyruvate kinase M2 contributes to TLR-mediated inflammation and autoimmunity by promoting Pyk2 activation[J]. Front Immunol, 2021, 12: 680068. DOI:10.3389/fimmu.2021.680068.

[5] PARK J H, KIM J E, GU J Y, *et al*. Evaluation of circulating markers of neutrophil extracellular trap (NET) formation as risk factors for diabetic retinopathy in a case-control association study[J]. and, 2016, 124(9): 557-561. DOI:10.1055/s-0042-101792.

[6] PAPAYANNOPOULOS V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease[J]. Nat Rev Immunol, 2018, 18(2): 134-147. DOI:10.1038/nri.2017.105.

[7] ZHOU X, YANG L, FAN X T, *et al*. Neutrophil chemotaxis and NETosis in murine chronic liver injury *via* cannabinoid receptor 1/Gα i/o/ROS/p38 MAPK signaling pathway[J].

Cells, 2020, 9(2): 373. DOI:10.3390/cells9020373.

[8] YIPP B G, KUBES P. NETosis: how vital is it? [J]. Blood, 2013, 122(16): 2784-2794. DOI:10.1182/blood-2013-04-457671.

[9] TSOUROUKTSOGLOU T D, WARNATSCH A, IOANNOU M, *et al*. Histones, DNA, and citrullination promote neutrophil extracellular trap inflammation by regulating the localization and activation of TLR4 [J]. Cell Rep, 2020, 31(5): 107602. DOI:10.1016/j.celrep.2020.107602.

[10] WONG S L, DEMERS M, MARTINOD K, *et al*. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing [J]. Nat Med, 2015, 21(7): 815-819. DOI:10.1038/nm.3887.

[11] CASTANHEIRA F V S, KUBES P. Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation [J]. Blood, 2019, 133(20): 2178-2185. DOI:10.1182/blood-2018-11-844530.

[12] AN S, RAJU I, SURENKHUU B, *et al*. Neutrophil extracellular traps (NETs) contribute to pathological changes of ocular graft-*vs*.-host disease (oGVHD) dry eye: implications for novel biomarkers and therapeutic strategies [J]. Ocul Surf, 2019, 17(3): 589-614. DOI:10.1016/j.jtos.2019.03.010.

[13] WANG L, ZHOU X, YIN Y Z, *et al*. Hyperglycemia induces neutrophil extracellular traps formation through an NADPH oxidase-dependent pathway in diabetic retinopathy [J]. Front Immunol, 2018, 9: 3076. DOI:10.3389/fimmu.2018.03076.

[14] GONG X Z, IVANOV V N, DAVIDSON M M, *et al*. Tetramethylpyrazine (TMP) protects against sodium arsenite-induced nephrotoxicity by suppressing ROS production, mitochondrial dysfunction, pro-inflammatory signaling pathways and programed cell death [J]. Arch Toxicol, 2015, 89(7): 1057-1070. DOI:10.1007/s00204-014-1302-y.

[15] HAN X K, CHEN X, CHEN S L, *et al*. Tetramethylpyrazine attenuates endotoxin-induced retinal inflammation by inhibiting microglial activation *via* the TLR4/NF-κB signalling pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 128: 110273. DOI:10.1016/j.biopha.2020.110273.

[16] ODURO P K, FANG J M, NIU L, *et al*. Pharmacological management of vascular endothelial dysfunction in diabetes: TCM and western medicine compared based on biomarkers and biochemical parameters [J]. Pharmacol Res, 2020, 158: 104893. DOI:10.1016/j.phrs.2020.104893.

[17] LESSIEUR E M, LIU H T, SAADANE A, *et al*. Neutrophil-derived proteases contribute to the pathogenesis of early diabetic retinopathy [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2021, 62(13): 7. DOI:10.1167/iovs.62.13.7.

[18] ALDABBOUS L, ABDUL-SALAM V, MCKINNON T, *et al*. Neutrophil extracellular traps promote angiogenesis: evidence from vascular pathology in pulmonary hypertension [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016, 36(10): 2078-2087. DOI:10.1161/ATVBAHA.116.307634.

[19] AWASTHI D, NAGARKOTI S, KUMAR A, *et al*. Oxidized LDL induced extracellular trap formation in human neutrophils *via* TLR-PKC-IRAK-MAPK and NADPH-oxidase activation[J]. Free Radic Biol Med, 2016, 93: 190-203. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2016.01.004.

[20] BARNADO A, CROFFORD L J, OATES J C. At the Bedside: Neutrophil extracellular traps (NETs) as targets for biomarkers and therapies in autoimmune diseases[J]. J Leukoc Biol, 2016, 99(2): 265-278. DOI:10.1189/jlb.5BT0615-234R.

[21] ERESCH J, STUMPF M, KOCH A, *et al*. Sphingosine kinase 2 modulates retinal neovascularization in the mouse model of oxygen-induced retinopathy[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2018, 59(2): 653-661. DOI:10.1167/iovs.17-22544.

[22] LIU Y Y, QIN X Y, LEI Z L, *et al*. Tetramethylpyrazine inhibits neutrophil extracellular traps formation and alleviates hepatic ischemia/reperfusion injury in rat liver transplantation[J]. Exp Cell Res, 2021, 406(1): 112719. DOI:10.1016/j.yexcr.2021.112719.

[23] WANG C, WANG P, ZENG W, *et al*. Tetramethylpyrazine improves the recovery of spinal cord injury *via* Akt/Nrf2/HO-1 pathway[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2016, 26(4): 1287-1291. DOI:10.1016/j.bmcl.2016.01.015.

[24] TU W J, WANG H, LI S, *et al*. The anti-inflammatory and anti-oxidant mechanisms of the Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway in chronic diseases[J]. Aging Dis, 2019, 10(3): 637-651. DOI:10.14336/AD.2018.0513.

(收稿:2022-04-05;修回:2022-06-13)

(编辑 张 维)