

引文格式:李兰根,王伟,张玉凤,格日乐图. 信号转导/转录激活因子3抗ARPE-19细胞氧化应激研究[J].

【实验研究】

眼科新进展,2016,36(11):1020-1023. doi:10.13389/j.cnki.rao.2016.0272

信号转导/转录激活因子3抗ARPE-19细胞氧化应激研究[△]

李兰根 王伟 张玉凤 格日乐图

Protective effects of STAT3 on retinal pigmented epithelium cells against oxidative stress

LI Lan-Gen, WEI Wei, ZHANG Yu-Feng, GERILETU

【Key words】 oxidized low density lipoprotein; signal transduction/activation of transcription factor 3; human retinal pigment epithelial cells-19; cell senescence; reactive oxygen species

【Abstract】 **Objective** To observe the protective effects of signal transduction/activation of transcription factor 3 (STAT3) on retinal pigment epithelial (RPE) cells against oxidative stress, and explore its role in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD). **Methods** APRE-19 cell lines were cultured *in vitro* and the oxidative stress injury was induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) and H_2O_2 . The rates of proliferation and apoptosis, levels of intracellular reactive oxygen species (ROS) and cell senescence of RPEs were evaluated. qRT-PCR technology was used to assess the STAT3-mRNA. Furthermore, STAT3 overexpressed in ARPE-19 cells and the cells were pre-treated with nicotinamide, and interfered with H_2O_2 and ox-LDL. The proliferation, apoptosis, ROS level and cell senescence were analyzed to know the effects of STAT3 on RPE against oxidative stress. **Results** Compared with the control group, H_2O_2 and ox-LDL could increase the ROS level and promote the cell senescence, and the proliferation was obviously decreased, and the apoptosis significantly increased (all $P < 0.05$). Under oxidative stress, the STAT3-mRNA expression was increased and the expression density of ox-LDL and H_2O_2 were 3.3 ± 1.2 and 3.5 ± 1.1 , respectively, there were statistical differences compared with control group (all $P < 0.05$). STAT3 could protect cells from oxidative stress damage, increased cell proliferation, decreased apoptosis and ROS accumulation; But could not modulate the cell senescence during oxidative stress. **Conclusion** STAT3 can anti-oxidative stress damage independently, and prompt the application of STAT3 in the treatment of AMD.

作者简介:李兰根,男,1973年10月出生,内蒙古呼和浩特人,博士,副主任医师。联系电话:18047192608;E-mail:lilangen@sina.com;ORCID:0000-0001-6372-045X

About LI Lan-Gen: Male, born in October, 1973. Doctor degree. Tel: 18047192608; E-mail: lilangen@sina.com; ORCID: 0000-0001-6372-045X

收稿日期:2016-04-25

修回日期:2016-06-12

本文编辑:付中静

△基金项目:内蒙古自治区自然科学基金资助项目(编号:2016MS0872)

作者单位:010017 内蒙古自治区呼和浩特市,内蒙古自治区人民医院眼科

Received date: Apr 25, 2016

Accepted date: Jun 12, 2016

Foundation item: Foundation of Provincial Natural Science of Inner Mongolia Autonomy Region (No: 2016MS0872)

From the Department of Ophthalmology, Inner Mongolia People's Hospital, Huhehaote 010017, Inner Mongolia Autonomy Region, China

【中图分类号】 R774

【关键词】 氧化低密度脂蛋白;信号转导/转录激活因子3;人视网膜色素上皮细胞-19;细胞衰老;活性氧族

【摘要】 **目的** 本研究旨在观察信号转导/转录激活因子3(signal transduction/activation of transcription factor3, STAT3)对视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelium cells, RPE)氧化应激损伤的保护作用,并探讨STAT3在年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)发病机制中的意义。**方法** 体外培养ARPE-19细胞系,氧化低密度脂蛋白及 H_2O_2 干预培养细胞诱导氧化应激损伤,通过对细胞增殖、凋亡、活性氧族(reactive oxygen species, ROS)水平及细胞衰老分析研究,评估氧化应激损伤对RPE的影响;实时荧光定量技术分析氧化应激过程中STAT3-mRNA表达状况;STAT3过表达载体转染ARPE-19细胞,烟

[21] GENBACEV O, KRTOLICA A, ZDRAVKOVIC T, BRUNETTE E, POWELL S, NATH A, *et al.* Serum-free derivation of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeders[J]. *Fertil Steril*, 2005, 83(5): 1517-1529.

[22] SAXENA S, HANWATE M, DEB K, SHARMA V, TOTEY S. FGF2 secreting human fibroblast feeder cells: a novel culture system for human embryonic stem cells[J]. *Mol Reprod Dev*, 2008, 75(10): 1523-1532.

[23] JI K, LIU Y, LU W, YANG F, YU J, WANG X, *et al.* Periodontal tissue engineering with stem cells from the periodontal ligament of human retained deciduous teeth[J]. *J Periodontol Res*, 2013, 48(1): 105-116.

[24] LIAO W, XIE J, ZHONG J, LIU Y, DU L, ZHOU B, *et al.* Therapeutic effect of human umbilical cord multipotent mesenchymal stromal cells in a rat model of stroke[J]. *Transplantation*, 2009, 87(3): 350-359.

[25] MARKEL TA, CRAFTS TD, JENSEN AR, HUNSBERGER EB, YODER MC. Human mesenchymal stromal cells decrease mortality after intestinal ischemia and reperfusion injury[J]. *J Surg Res*, 2015, 199(1): 56-66.

[26] QUAN C, CHO MK, SHAO Y, MIANECKI LE, LIAO E, PERRY D, *et al.* Dermal fibroblast expression of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) promotes epidermal keratinocyte proliferation in normal and diseased skin[J]. *Protein Cell*, 2015, 6(12): 890-903.

[27] OIE Y, HAYASHI R, TAKAGI R, YAMATO M, TAKAYANAGI H, TANO Y, *et al.* A novel method of culturing human oral mucosal epithelial cell sheet using post-mitotic human dermal fibroblast feeder cells and modified keratinocyte culture medium for ocular surface reconstruction[J]. *Br J Ophthalmol*, 2010, 94(9): 1244-1250.

酰胺预处理细胞再经 H₂O₂ 及氧化低密度脂蛋白干预后通过对增殖、凋亡、ROS 及细胞衰老状态的分析,了解 STAT3 抗 RPE 氧化应激效果。**结果** 与对照组相比,H₂O₂ 和氧化低密度脂蛋白能显著增加 ROS 水平,促使细胞衰老增加,细胞的增殖显著下降而细胞凋亡显著上升(均为 $P < 0.05$)。氧化应激状况下 STAT3 上游产物表达上升,氧化低密度脂蛋白及 H₂O₂ 组荧光表达强度分别是 3.3 ± 1.2 及 3.5 ± 1.1 ,与对照组相比差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$);STAT3 能保护 ARPE-19 细胞抗氧化应激损伤,使细胞增殖增加、凋亡减少及 ROS 累积,但不造成细胞衰老状况加剧,说明 ARPE-19 细胞衰老不受 STAT3 调节。**结论** STAT3 在细胞氧化损伤中能独立地发挥抗氧化应激作用,提示了 STAT3 在 AMD 治疗过程中的应用前景。

年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)是最常见的导致老年患者中央视野缺损的原因之一,也是目前老年人最普遍的致盲原因之一^[1-2]。AMD 病因形成复杂,是不同疾病所表现出的一种综合征。信号转导和转录激活因子 3(signal transduction/activation of transcription factor 3, STAT3)属于 STATs 家族。STAT3 通路广泛分布于机体主要组织器官,包括心脏、视网膜等,在生理条件下调节细胞生长分化及信号转导^[3-4]。然而 AMD 发病过程中是否同样存在 STAT3 表达及功能紊乱需要深入研究,通过对其机制深入阐述,将为 AMD 防治提供思路。

ARPE-19 细胞是来源于原代视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)培养过程的一株细胞系,拥有 RPE 细胞主要形态和生化特征。过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂)干预 RPE 细胞可直接有效诱导 AMD 细胞模型。因此本研究拟从细胞增殖、凋亡、活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)水平及细胞衰老状态角度分析 RPE 氧化损伤;实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术对 STAT3-mRNA 表达进行分析;构建 STAT3 过表达载体稳定表达 RPE 细胞系,探讨氧化干预后 STAT3 过表达对细胞增殖、凋亡、ROS 水平及细胞衰老状态的影响。以期对氧化应激状态下 STAT3 表达及功能进行全面阐述,为临床 AMD 防治提供研究思路。

1 材料与方法

1.1 材料 ARPE-19 细胞系(美国标准菌库);DMEM 培养液及胎牛血清(Gibco, 美国);链霉素及青霉素(哈尔滨医药公司);H₂O₂ 及氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL;上海远大生物有限公司);DCFH-DA(2', 7' dichlorodi-hydro fluorescein diacetate)细胞内 ROS 测试试剂盒(美国);Cell Titer 96® AQueous One Solution 试剂及 AVFL/PI 凋亡检测试剂、烟酰胺(nicotinamide, NA; Sigma, 美国);细胞衰老分析试剂盒(Cell Biolabs, 美国)。pRC/CMV STAT3 和 pRC/CMV 表达载体(STAT3OV 及 C STAT3OV, 美国);RNeasy 试剂盒(Qiagen, 美国);SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒(Takara Bio, 日本)。ABI7500(Applied Biosystems Life Technologies, 美国);CO₂ 全湿空气培养箱(Thermo, 美国)。

1.2 细胞培养 ARPE-19 细胞冻存于 -70 ℃ 液氮中,用时将冻存管快速融化至 37 ℃,将细胞悬液吸到离心管中。1000 r · min⁻¹ 离心 10 min,弃上清,加

10 mL 培养液,吹打均匀;再离心 10 min,弃上清,加 10 mL 培养基后将细胞转移至培养瓶中,37 ℃ 培养,倒置显微镜下观察细胞生长状况。改良杜氏(DMEM)培养液内含体积分数 10% 胎牛血清、 $100 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素和 $100 \times 10^3 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素,pH 值为 7.0。37 ℃、体积分数 5% CO₂ 孵箱培养,每 2~3 d 更换培养液。细胞达 80% 汇合后,1:3~1:4 传代,选取对数生长期细胞进行实验^[5]。本研究分别采用反映氧化损伤的各项客观指标,如 ROS 累积水平、细胞衰老状态、细胞增殖及凋亡,来评价氧化应激损伤。

1.3 H₂O₂ 及 ox-LDL 干预 ARPE-19 细胞诱导氧化应激损伤 依据预实验^[5] 研究选取 H₂O₂ ($5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 及 ox-LDL ($0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 分别孵育 ARPE-19 细胞 24 h 诱导氧化应激细胞模型。随后分别进行细胞增殖、凋亡、ROS 水平及细胞衰老状态分析;同时在此基础上进行 STAT3-mRNA 表达水平研究。未经 ox-LDL 及 H₂O₂ 处理者作为对照组。

为了深入探讨 STAT3 作用,pRC/CMV STAT3 和 PCRC/CMV 表达载体分别转染细胞构建稳定表达 ARPE-19 细胞系,H₂O₂ 及 ox-LDL 干预前 NA ($5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 分别孵育细胞,用于评价 STAT3 过表达对细胞氧化应激损伤的影响。

1.4 细胞增殖和凋亡分析 细胞增殖、凋亡常被作为评价氧化剂诱导 ARPE-19 细胞氧化应激损伤的主要指标。ARPE-19 细胞每孔约 2000 个接种于 96 孔培养板,分别采用 ox-LDL 及 H₂O₂ 各 10 μL 预处理 24 h。分别采用单溶液细胞增殖检测试剂盒及荧光素标记膜联蛋白 V/碘化丙啶凋亡检测试剂盒进行细胞增殖和凋亡研究^[6]。采用流式细胞仪进行分析。CellQuest™ Pro 软件计数结果,采用增殖、凋亡细胞占总细胞数百分比表示数据。

1.5 ROS 水平分析 本研究通过 ROS 累积水平来反映 ARPE-19 细胞氧化损伤。ARPE-9 细胞按每孔 1×10^6 个接种于 6 孔板中,待长满 80% 时加入 50 μL $10 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DCFH-DA,37 ℃ 孵育 30 min。随后 H₂O₂ 及 ox-LDL 各 10 μL 作用 ARPE-9 细胞 24 h。490 nm 荧光显微镜观察细胞裂解液的 DCFH-DA 荧光,以 200 倍镜观察并采集图像。采用 Image J software v1.4 进行荧光强度半定量分析。

1.6 半乳糖苷酶对细胞衰老状态分析 大多数正常细胞在不能分裂后就进入衰老状态。此时细胞仍然是存活的,但基因和蛋白表达谱发生巨大改变。

通常体积变大、表达高酶活性 β -半乳糖苷酶,而氧化应激状态下细胞常常处于一种衰老状态^[7]。因此本实验采用半乳糖苷酶分析评估 H_2O_2 及 ox-LDL 诱导的 RPE 细胞衰老。

ARPE-19 细胞每孔约 2000 个接种于 96 孔培养板,37℃ 孵箱中分别同 ox-LDL ($0.2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 或 H_2O_2 ($5\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 10 μL 共孵育 24 h。PBS 洗 1 次,加入 1 mL β -半乳糖苷酶,固定液染色,室温固定 15 min。PBS 洗 3 次 $\times 3\text{ min}$ 。新鲜配置荧光底物 37℃ 暗室中暴露 2 h。普通光学显微镜下观察表达蓝色 β -半乳糖苷酶细胞的荧光强度,Image J software v1.4 进行半定量,取 5 个视野平均荧光强度均值进行统计学分析。

1.7 qRT-PCR 分析 STAT3-mRNA 表达 提取 ARPE-19 细胞总 RNA,SuperScriptIII 合成互补 DNA 第一链。qRT-PCR 分析采用 SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒进行,ABI7500 上操作,GAPDH 为内参。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行相对定量数据标准化。

STAT3 上游引物:5'-GGGTGGAGAAGGACAT-CAGCGGTAA-3',下游引物:5'-GCCGACAATACT-TTCCGAATCC-3'; GAPDH 上游引物:5'-GGAGT-CAACGGATTTGGTC-3',下游引物:5'-GGAATCATT-GGAACATGTAAAC-3'。

反应条件:95℃ 加热 5 min,95℃ 变性 15 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延长 1 min,40 个循环周期后 72℃ 延伸 10 min。随后进行凝胶电泳,凝胶成像分析系统对目的 DNA 条带进行扫描及半定量分析。

1.8 STAT3 过表达载体转染 ARPE-19 细胞 为深入了解氧化应激状态下 STAT3 对 ARPE-19 细胞的保护作用,我们构建 STAT3 过表达质粒载体并将其转染于 ARPE-19 细胞,抗氧化剂 NA 预处理细胞后观察其抗氧化效果。pRC/CMV STAT3 表达载体(过表达组)及 pRC/CMV 空载体(对照组)(STAT3OV 及 C STAT3OV)分别转染至 ARPE-19 细胞,经电泳酶切、质粒测序及荧光显微镜观察结果提示成功构建 STAT3 过表达稳定转染 RPE 细胞系,并使用抗氧化剂 NA 与之相互作用,观察氧化应激各项指标。

1.9 统计学分析 本研究采用 SPSS 17.0 统计软件分析数据。数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。所有实验均重复 3 次。两组间差异采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 3 STAT3 与 NA 保护 ARPE-19 细胞氧化损伤并调节细胞衰老状态

组别	增殖/%		凋亡/%		ROS		衰老	
	NA +	NA -	NA +	NA -	NA +	NA -	NA +	NA -
过表达组	36.88 \pm 3.18	25.18 \pm 4.05	9.19 \pm 2.33	7.84 \pm 2.76	401.77 \pm 34.79	473.51 \pm 53.38	510.41 \pm 107.45	400.26 \pm 67.23
对照组	15.60 \pm 2.29	20.21 \pm 3.16	25.41 \pm 6.75	15.00 \pm 1.48	1434.87 \pm 320.06	810.69 \pm 85.08	516.23 \pm 76.19	374.10 \pm 44.72
t	13.142	-2.371	-5.521	-5.784	-8.060	-7.882	-0.030	0.789
P	0.000	0.039	0.000	0.000	0.000	0.000	0.916	0.449

2 结果

2.1 H_2O_2 及 ox-LDL 干预后细胞增殖、凋亡、ROS 水平及细胞衰老状况分析 研究表明,与对照组相比, H_2O_2 和 ox-LDL 能显著增加 ROS 水平,促使细胞衰老增加(H_2O_2 组除外),细胞的增殖显著下降而细胞凋亡显著上升,与对照组相比,差异均具有统计学意义(均为 $P < 0.05$;见表 1)。

表 1 H_2O_2 及 ox-LDL 干预 ARPE-19 细胞氧化应激损伤的作用

分组	ROS	衰老	增殖/%	凋亡/%
H_2O_2	958.53 \pm 225.91	218.57 \pm 32.51	18.66 \pm 3.16	19.38 \pm 3.20
Ox-LDL	644.99 \pm 79.98	320.33 \pm 22.81	17.47 \pm 2.61	19.17 \pm 4.08
对照组	537.49 \pm 20.11	293.86 \pm 3.15	29.56 \pm 2.03	6.87 \pm 2.37
t_1	-3.443	4.785	7.097	-7.806
P_1	0.040	0.001	0.000	0.000
t_2	-3.512	-3.210	8.955	-6.384
P_2	0.016	0.022	0.000	0.000

注: t_1 、 P_1 为 H_2O_2 干预组与对照组比较; t_2 、 P_2 为 Ox-LDL 干预组与对照组比较

2.2 H_2O_2 及 ox-LDL 干预后对 ARPE-19 细胞 STAT3-mRNA 表达水平的影响 外源性氧化剂作用于 ARPE-19 细胞后,采用 qRT-PCR 技术分析 ARPE-19 细胞 STAT3 mRNA 表达量的改变。与对照组相比, H_2O_2 和 ox-LDL 干预后 STAT3 mRNA 表达量显著上升(均为 $P < 0.05$;见表 2)。

表 2 H_2O_2 及 ox-LDL 干预后对 ARPE-19 细胞 STAT3-mRNA 表达水平的影响

分组	荧光相对值	t	P
H_2O_2	3.5 \pm 1.1	-5.361 *	0.003 *
Ox-LDL	3.3 \pm 1.2	-4.655 **	0.005 **
对照组	1.0 \pm 0.1	-	-

注:* 为 H_2O_2 干预组与对照组比较;** 为 Ox-LDL 干预组与对照组比较

2.3 STAT3 与 NA 保护 ARPE-19 细胞氧化损伤并调节细胞衰老状态 通过 STAT3 过表达组与对照组比较,发现 STAT3 增强细胞增殖能力、减少细胞凋亡并导致 ROS 水平下降(均为 $P < 0.05$)。然而,STAT3 并不能影响细胞衰老($P > 0.05$;见表 3)。通过有或无 NA 干预的比较,可知 NA 组 STAT3 作用更加明显。上述结果表明,STAT3 具有直接保护细胞抗氧化应激损伤作用,同时证实氧化应激状态下 STAT3 防护作用同细胞衰老的调节作用没有关联,也表明 NA 能够加强 STAT3 的作用。

3 讨论

氧化应激是指机体在遭受多种内源性及外源性有害刺激时,体内ROS产生过多,超过抗氧化系统的清除能力,造成氧化系统和抗氧化系统失衡,导致组织损伤。人体视网膜处于不断产生ROS的微环境,且其本身为高耗氧组织。生理情况下,氧化损伤通常由一系列抗氧化和高效修复系统使其损害达到最小化。然而随年龄增长,抗氧化能力及修复系统效率降低,导致组织氧化应激损伤,从而形成早期AMD,并逐渐进展为晚期AMD^[8-9]。

大量研究^[10]论证了氧化应激是AMD发病过程中重要的病理生理过程,研究表明氧化应激过程中最常见的的特征为ROS累积,因而本研究通过ROS水平来反映氧化损伤。氧化应激状态下细胞常常处于一种衰老状态,同时与生物老化及细胞衰老增加显著相关,因此本实验采用半乳糖苷酶方法分析评估H₂O₂及ox-LDL诱导的RPE细胞衰老。本研究发现由H₂O₂及ox-LDL诱导ARPE-19细胞损伤的病理生理过程中细胞内ROS累积明显,与此同时伴随发生的病理损害包括细胞增殖下降与细胞代谢减慢,使得机体处于一种老化状态,因而证实氧化应激的确参与AMD的发生发展过程。同时证实细胞凋亡率显著上升。因此众多学者认为抗氧化应激保护应成为AMD防治中的一种治疗策略。

STAT3在调节细胞存活、凋亡,迁移和分化的过程中发挥多种功能^[11]。因此在本研究中我们观察了STAT3在AMD发病机制中对RPE抗氧化应激的保护作用,通过qRT-PCR技术分析发现氧化应激条件下,RPE细胞积极动员上游STAT3-mRNA,使其表达增强(均为 $P<0.05$),进一步促进下游STAT3蛋白表达增加,从而发挥其显著的抗氧化作用,与相关研究结论相一致^[12]。为深入了解氧化应激状态下STAT3对ARPE-19细胞保护作用,我们构建STAT3过表达质粒载体并将其转染于ARPE-19细胞,构建STAT3过表达稳定细胞系用于深入研究。NA为体内一种水溶性维生素,广泛分布于体内,作为辅酶I和辅酶II组成部分在机体氧化呼吸链中起着递氢作用,参与机体抗氧化及新陈代谢等病理生理过程^[13]。我们采用NA预处理STAT3过表达ARPE-19

细胞后,通过观察氧化效果的各项指标,证实STAT3能保护ARPE-19细胞抗氧化应激损伤,是一种直接抗氧化应激调节因子。本研究表明NA存在时STAT3使得细胞增殖明显,ROS水平及细胞凋亡下降,因而我们认为NA与STAT3在抗氧化损伤作用中发挥相互协同作用。但值得注意的是STAT3并不能独立调节细胞衰老状态,提示细胞尽管处于氧化应激及代谢程度减慢的状态,但仍可能存在其他的机制调节及管控细胞的衰老,这将是我們下一步研究的重心。

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>, 2014-06-30.

[3] PATEL AK and HACKAM AS. Toll like receptor 3 (TLR3) protects retinal pigmented epithelium (RPE) cells from oxidative stress through a STAT3 dependent mechanism [J]. *Mol Immunol*, 2013, (54):122-131.

[4] BOURGEAIS J, GOUILLEUX GRUART V, GOUILLEUX F. Oxidative metabolism in cancer: A STAT affair [J]? *JAK STAT*, 2013, 2(4):e25764.

[5] 李兰根, 王伟, 张玉凤, 格日乐图, 杨佳, 张艳梅, 等. SIRT1抗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.

[6] 李琴, 沈恩允, 王明群, 赵鹏飞, 原振龔, 曹邦. 新型HER3单克隆抗体逆转胃癌HER2过表达N87细胞Lapatinib耐药的研究 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2014, 8(13):1225-1228.

[7] 刘玲英, 柴家科, 侯玉森, 段红杰, 郁永辉, 尹会男, 等. 严重烧伤患者血清对人脐带MSCs生物学特性的影响 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2013, 7(27):769-774.

[8] YILDIRIM Z, UCGUN NI, YILDIRIM F. The role of oxidative stress and antioxidants in the pathogenesis of age-related macular degeneration [J]. *Clinics*, 2011, 66(5):743-746.

[9] KAGAN DB, LIU H, CINDY HUTNIK ML. Efficacy of various antioxidants in the protection of the retinal pigment epithelium from oxidative stress [J]. *Clin Ophthalmol*, 2012, 6:1471-1476.

[10] CHAMBIAL S, DWIVEDI S, SHUKLA KK, JOHN PJ, SHARMA P. Vitamin C in disease prevention and cure: an overview [J]. *Indian J Clin Biochem*, 2013, 28(4):314-328.

[11] MOLLY S, KAREN W, CAREN G, ALLEN T. Diminishing risk for age-related macular degeneration with nutrition: a current view [J]. *Nutrients*, 2013, 5(7):2405-2456.

[12] KOZLOWSKI MR. RPE cell senescence: a key contributor to age related macular degeneration [J]. *Med Hypotheses*, 2012, 78(4):505-510.

[13] MIMURA T, KAJI Y, NOMA H, FUNATSU H, OKAMOTO S. The role of SIRT1 in ocular aging [J]. *Exp Eye Res*, 2013, 116(7):17-26.