中山大学 中山眼科中心 ZHONGSHAN OPHTHALMIC CENTER, SUN YAT-SEN UNIVERSITY

全文收录于 Lighthouse Scholar

眼科学报

官网：journal.gzzoc.org.cn



doi: 10.12419/24110601
View this article at: https://doi.org/10.12419/24110601

• 论 著 •

激活 TREK–TRAAK K_2P 对氧化损伤人 RPE 细胞吞噬功能的保护作用

郑文斌[1,3]，余清花[2]，陈 菁[3]，李乃洋[3]

(1. 暨南大学附属第一医院眼科, 广州 510630；2. 中山市人民医院健康管理中心, 中山 528400；
3. 中山市人民医院眼科, 中山 528400)

文章亮点

1. 关键发现

• 弱内向整流相关及花生四烯酸激活的弱内向整流相关双孔钾离子通道 (tandem of pore domains in a weak inward rectifying related-tandem of pore domains in a weak inward rectifying related arachidonic acid activated two pore-domain potassium channels, TREK TRAAK K_2P) 表达于人视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelial, RPE) 细胞质。

• 激活 TREK-TRAAK K_2P 通道可提高氧化损伤 RPE 细胞的存活率。

• 激活 TREK-TRAAK K_2P 通道可保护氧化损伤的人 RPE 细胞吞噬功能。

2. 已知与发现

• TREK-TRAAK K_2P 广泛表达于大脑及视网膜组织，具有维持细胞稳态的作用。

• RPE 细胞吞噬功能对维持感光细胞存活具有重要作用，慢性氧化损伤导致的 RPE 细胞吞噬功能障碍是年龄相关性黄斑变性 (age related macular degeneration, AMD) 重要的发病机制之一。

3. 意义与改变

• 激活 TREK-TRAAK K_2P 通道可以保护氧化损伤的人 RPE 细胞吞噬功能，有望成为 AMD 的潜在治疗靶点。

[摘　要]　**目的：**观察弱内向整流相关及花生四烯酸激活的弱内向整流相关双孔钾离子通道 (tandem of pore domains in a weak inward rectifying related-tandem of pore domains in a weak inward rectifying related arachidonic acid activated two pore-domain potassium channels, TREK-TRAAK K_2P) 激活对氧化损伤的人视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelial, RPE) 细胞吞噬功能的影响。**方法：**免疫荧光法检测 TREK-1、

收稿日期(Received): 2025-04-07; **修订日期(Revised):** 2025-08-09; **接收日期(Accepted):** 2025-10-07

通信作者(Corresponding author): 李乃洋，Email：naiyangli@foxmail.com

基金项目(Foundation items): 广东省医学科学技术研究基金项目 (2023102620446665)；中山市人民医院青年拔尖计划项目。This work was supported by the Guangdong Medical Science and Technology Research Fund Project (2023102620446665) and Zhongshan People's Hospital Youth Elite Program Project.

作者贡献声明: 1) 构思设计：郑文斌；2) 行政支持：李乃洋；3) 提供研究材料：郑文斌；4) 数据收集与汇总：郑文斌，余清花；5) 数据分析与解读：郑文斌，陈菁；6) 稿件撰写：郑文斌，李乃洋；7) 稿件最终修订与同意：所有作者

Contributions: Conception and design: ZHENG Wenbin; Administrative support: LI Naiyang; Provision of study materials: ZHENG Wenbin; Collection and assembly of data: ZHENG Wenbin, YU Qinghua; Data analysis and interpretation: ZHENG Wenbin, CHEN Jing; Manuscript writing: ZHENG Wenbin, LI Naiyang; Final approval of manuscript: All authors

电子全文

TREK-2 及 TRAAK 通道蛋白在人 RPE 细胞的表达，以不同时间和浓度梯度的叔丁基过氧化氢 (tert-butyl hydroperoxide, t-BHP) 诱导人 RPE 细胞氧化损伤。分对照组、t-BHP 组、利鲁唑加 t-BHP 组，利鲁唑组，向各组加入 2×10^7/mL 的荧光微球或 FITC 标记猪感光细胞外节膜盘孵育 6 h，固定染色后荧光显微镜拍照，Image-Pro Plus 6.0 软件分析计算 RPE 细胞吞噬率和吞噬指数。**结果：**TREK-1、TREK-2、TREEK 通道蛋白亚型在人 RPE 细胞质中均高表达。人 RPE 细胞在 t-BHP 干预后存活率呈浓度和时间依赖性，200 μmol/L t-BHP 干预 6 h 与对照组存活率比较差异无统计学意义 (P>0.05)，400 μmol/L t-BHP 干预 6 h 致半数死亡。特异性吞噬指数：t-BHP 组低于其他各组 (P<0.001)，而利鲁唑组高于对照组，差异无统计学意义 (P>0.05)。特异性吞噬率：t-BHP 组低于其他各组，差异无统计学意义 (P>0.05)。非特异性吞噬指数：t-BHP 组低于其他各组 (P<0.001)；非特异性吞噬率：t-BHP 组低于利鲁唑加 t-BHP 组，差异无统计学意义 (P>0.05)，两两比较，仅利鲁唑组高于 t-BHP 组 (P<0.05)。**结论：**激活 TREK-TRAAK K_2P 通道可保护氧化损伤人 RPE 细胞的吞噬功能。

[关键词] 年龄相关性黄斑变性；氧化损伤；视网膜色素上皮细胞；吞噬功能；TREK-TRAAK K_2P

[中图分类号] R774.1，Q25 **[文献标志码]** A

引用本文：郑文斌, 余清花, 陈菁, 李乃洋. 激活 TREK-TRAAK K_2P 对氧化损伤人 RPE 细胞吞噬功能的保护作用[J]. 眼科学报, 2026, 41(2): 105-113. DOI: 10.12419/24110601.

Protective effect of activating TREK-TRAAK K_2P on the phagocytic function of oxidative damaged human RPE

ZHENG Wenbin[1,3], YU Qinghua[2], CHEN Jing[3], LI Naiyang[3]

(1. Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, China; 2. Health Management Center, Zhongshan City People's Hospital, Zhongshan 528400, China; 3. Department of Ophthalmology, Zhongshan City People's Hospital, Zhongshan 528400, China)

Abstract **Objective**: To observe the effect of TREK-TRAAK K_2P activation on the phagocytic function of oxidative damaged human retinal pigment epithelial cells (RPE). **Methods**: Immunofluorescence staining was used to detect the expression of TREK-1, TREK-2 and TRAAK channel proteins in human RPE cells, and the RPE cell oxidative damage model was induced by tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) at different time and concentration gradients. The study was divided into control group, t-BHP model group, riluzole plus t-BHP group, and riluzole group. 2×10^7/mL fluorescent microspheres or FITC-labeled porcine photoreceptor outer segment membrane discs were added to each group for 6h incubation, fluorescence photos were obtained after fixation and staining, and the phagocytosis rate and phagocytosis index of RPE cells was analyzed and calculated by Image-Pro Plus 6.0 software. **Results**: TREK-1, TREK-2, and TREEK channel subtype proteins were all highly expressed in the human RPE cytoplasm. The survival rate of human RPE cells after t-BHP intervention was concentration- and time-dependent. There was no statistical difference in the survival rate between 200 μmol/L t-BHP intervention for 6 hours and the control group (P>0.05), and 400 μmol/L t-BHP intervention for 6 hours induced half death. Specific phagocytic index: The t-BHP group was lower than other groups (P<0.001). Specific phagocytosis rate: the t-BHP group was lower than other groups, with no statistical difference (P>0.05).

Nonspecific phagocytic index: the t-BHP group was lower than other groups (P<0.001); nonspecific phagocytic rate: the t-BHP model group was lower than the riluzole plus t-BHP group, with no statistical difference (P>0.05), and only the riluzole group was higher than the t-BHP model group (P<0.05) in pairwise comparison. **Conclusions**: Activation of TREK-TRAAK K_2P can protect the phagocytic function of human RPE cells damaged by oxidative stress.

Keywords age related macular degeneration; oxidative stress; RPE; phagocytic function; TREK-TRAAK K_2P

Cite this article as: ZHENG Wenbin, YU Qinghua, CHEN Jing, LI Naiyang. Protective effect of activating TREK-TRAAK K_2P on the phagocytic function of oxidative damaged human RPE[J]. Yan Ke Xue Bao, 2026, 41(2): 105-113. DOI: 10.12419/24110601.

年龄相关性黄斑变性 (age related macular degeneration, AMD) 是导致 65 岁以上老年人视力丧失的首要原因，预计到 2024 年，全球将有 2.88 亿 AMD 患者[1]。根据是否有新生血管形成分为干性 AMD 和湿性 AMD，脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 的形成及视网膜地图样萎缩是 AMD 的晚期事件，尽管可以通过抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 或基因治疗控制疾病进展，但病变对感光细胞的损害往往很难恢复[2-4]。视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelial, RPE) 细胞的吞噬功能障碍是 AMD 的早期事件和重要因素[3]。早期纠正 RPE 细胞的吞噬功能损害有助于预防和延缓 AMD 的发生和发展。

双孔钾离子通道 (two pore-domain potassium channels, K_2P) 广泛表达于中枢神经系统及视网膜组织，主要作用是介导钾离子外流，对维持细胞静息电位和稳态起重要作用，弱内向整流相关及花生四烯酸激活的弱内向整流相关双孔钾离子通道 (tandem of pore domains in a weak inward rectifying related-tandem of pore domains in a weak inward rectifying related arachidonic acid activated two pore-domain potassium channels, TREK-TRAAK K_2P) 是其中的重要亚型，对花生四烯酸及机械牵拉敏感，可以被利鲁唑特异性激活[5-6]。笔者前期研究发现，激活 TRAAK 通道可以减轻人视网膜色素上皮细胞系 (adult retinal pigment epithelial cell line-19, ARPE-19) 细胞氧化损伤导致的细胞凋亡[7]，但激活该通道对氧化损伤的 RPE 吞噬功能是否有影响还不明确。为进一步探索该通道去激活对氧化损伤 RPE 细胞吞噬功能的影响，本研究构建了人 RPE 细胞氧化损伤模型，通过 TREK-TRAAK K_2P 通道的特异性激活剂利鲁唑激活通道开放，观察其对 RPE 细胞吞噬功能的影响，现将结果报道如下。

1　材料和方法

1.1　主要试剂和仪器

TREK-1、TREK-2、TRAAK 单克隆抗体 (以色列 Alomone)，利鲁唑 (美国 Sigma)，叔丁基过氧化氢 (tert-butyl hydroperoxide, t-BHP)(美国 MP)，酶标仪 (美国 Bio-Tex)，光学显微镜 (德国 Leica)，免疫荧光显微镜 (日本 Olympus)。

1.2　人 RPE 细胞的提取、鉴定及培养

本研究所用的人 RPE 细胞来自中山大学中山眼科中心眼科学国家重点实验室的馈赠。本实验所用的冻存人原代 RPE 细胞来源于 3 只眼球，均来自广东省眼库提供的意外死亡的年轻眼球捐献者，分别为 13 岁、28 岁、43 岁。本研究严格遵循《赫尔辛基宣言》，眼球组织的获取经捐献者家属知情同意后签署知情同意书，并通过中山大学中山眼科中心伦理委员会批准 (伦理批件号：2021KYPJ196)，RPE 细胞从角膜移植术后残留的眼球组织提取。参考文献操作步骤提取人原代 RPE 细胞[8-9]，并使用 RPE 细胞特异性 RPE65 抗体进行细胞免疫荧光鉴定，取 3~5 代的人 RPE 细胞用于后续实验。

1.3　免疫荧光检测 TREK-TRAAK K_2P 定位表达

以 1×10^5/mL 密度将 RPE 细胞接种于细胞玻片，4% 多聚甲醛溶液固定，0.1%Trion 溶液与 1% 牛血清白蛋白缓冲溶液 (bovine serum albumin, BSA) 混合液封闭打孔，实验组分别加 50 μL：1 200

的 TREK-1、TREK-2、TRAAK 抗体，对照组加入等量磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS)，分别加入 1∶500 的 488 荧光二抗，50 μL 4', 6-二脒基 -2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 溶液染细胞核，封片后用荧光显微镜拍照。

1.4 氧化应激模型构建及细胞活力检测

实验分组：对照组、t-BHP 组 (200、300、500、1 000 μmol/L 6 h、300 μmol/L 分别作用 3、12、24 h)，MTT 法检测细胞存活率。简要操作步骤：将 RPE 细胞种于 96 孔板，每孔 10 000 个细胞，待细胞 80% 融合时，分别加入不同终浓度含 t-BHP 的完全培养基 0.1 mL，对照组加入含等量溶质 (蒸馏水) 的完全培养基 0.1 mL，37℃ 孵育预定时间；随后每孔加入 20 μL MTT 和 180 μl 无血清 DMEM/F12 培养液，避光孵育后吸出原液，再加入 150 μL 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)，使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪上 490 nm 波长读取 OD 值。细胞存活率=(实验组 OD 值−空白调零 OD 值)/(对照组 OD 值−空白调零 OD 值)×100%。

1.5 感光细胞外节提取

参考文献提取新鲜猪眼感光细胞外节 (photoreceptor outer segment, POS)[10]。简要步骤：新鲜猪眼以 PBS 溶液充分清洗，剪开眼球，小心分离取出视网膜组织，随后将视网膜剪成 1 mm×1 mm 的碎片，置于 20 mmol/L Tris-HCL 溶液中振荡 1 min，1 500 r/min 离心 5 min，重复以上步骤吸取上清液后与 Tris-HCL 溶液 1∶1 混合，4℃ 下 15 000 r/min 离心 45 min，收获的沉淀即猪眼 POS。将提取的 POS 重悬于 10 mmol/L 钠-PBS，−80 ℃ 冻存备用。

1.6 FITC-POS 及荧光微球颗粒的制备

异硫氰酸荧光素 (fluorescein Isothiocyanate, FITC) 标记的感光细胞外节膜盘 FITC-POS 制备：冻存的 POS 室温下解冻，15 000 r/min 离心 30 min 去上清，加入 1 mg/mL FITC 混合，室温孵育 1 h，离心后去上清，再加入含血清的 DMEM/F12 溶液重悬，FITC 密度调整为 1×10^6/mL 备用。荧光微球制备：取出 1 mL 荧光微球颗粒，PBS 洗涤 3 次，去上清后以含血清的 DMEM/F12 溶液重悬，荧光微球密度调整为 1×10^6/mL 备用。

1.7 RPE 细胞吞噬实验

细胞分 4 组：对照组、模型组 (200 μmol/L t-BHP 6 h)、模型加药组 (100 μmol/L 利鲁唑预培养 6 h 后加入 200 μmol/L t-BHP 培养 6 h)、利鲁唑组 (100 μmol/L 利鲁唑 12 h)。各组分别加入等量 FITC-POS 或荧光微球进行吞噬实验。简要步骤：密度为 1×10^5 /mL 的 RPE 细胞悬液接种在玻璃片上，待 60% 融合时按上述分组干预。PBS 洗涤后，分别加入浓度为 2×10^6 /mL 的 FITC-POS 或荧光微球颗粒，37 ℃ 孵育 6 h 后吸出培养基，PBS 漂洗。特异性吞噬组以 0.2% 台盼蓝溶液浸 10 min，4% 多聚甲醛固定，各组加入 0.8 μg/mL DAPI 10 min，封片后荧光显微镜拍摄 (40 倍镜下每块玻片随机选取 3 个视野拍照，图片计数或 Image-Pro Plus 6.0 软件分析荧光面积)。评价指标：细胞吞噬率=吞噬细胞数/视野下细胞总数×100%，非特异性吞噬指数=细胞吞噬颗粒总数/细胞总数，特异性吞噬指数为平均每个细胞吞噬 FITC-POS 面积。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件分析数据。符合正态分布的计数资料以 ($x\pm s$) 表达，计量资料多间比较使用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-t 检验，率的比较采用 χ^2 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TREK-TRAAK K_2P 表达于人 RPE 细胞质

TREK-1、TREK-2 及 TRAAK 三种蛋白亚型在人 RPE 细胞上均有较高表达，免疫定位相似，主要为细胞质表达，在核周胞质荧光有增强 (图 1)。

2.2 t-BHP 氧化损伤模型的建立

正常对照组细胞存活率为 100%，200 μmol/L t-BHP 干预 6 h 细胞存活率与对照组比较差异无统计学意义 (P>0.05)，500 μmol/L t-BHP 干预 6 h 细胞平均存活率仅为 28.1%，SPSS 软件 Probit 回归分析计算得到 t-BHP 干预 6 h 细胞半数致死浓度为 400 μmol/L。随着 t-BHP 浓度的增加或作用时间的延长，细胞的存活率进一步下降，300 μmol/L t-BHP 作用 24 h，细胞基本死亡 (表 1)。为模拟慢性氧化损伤对 RPE 细胞功能影响，最终选择 200 μmol/L t-BHP 干预 6 h 作为后续实验的体外细

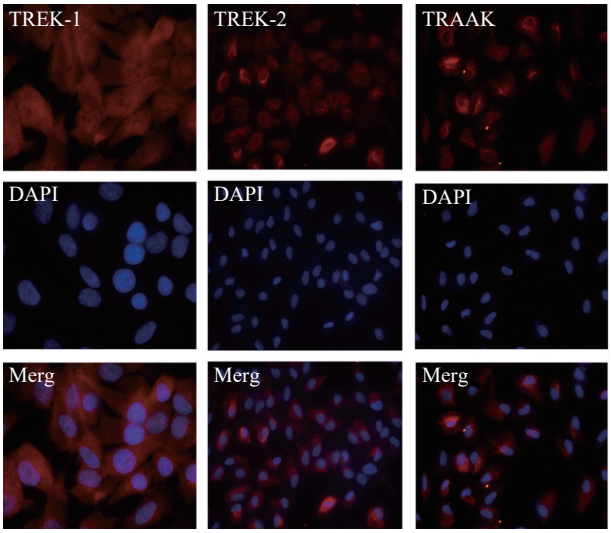


图 1　TREK-TRAAK K_2P 在人 RPE 细胞的荧光表达分布

Figure 1　Expression and distribution of TREK-TRAAK K_2P channels in human RPE cells

TREK-1(×100)、TREK-2 及 TRAAK 蛋白 (×40) 在人 RPE 细胞质中均匀表达，围绕细胞核的荧光增强。

Immunofluorescence labeling demonstrates that TREK-1 (×100), TREK-2, and TRAAK proteins (×40) were distributed throughout the cytoplasm, with intensified fluorescence around the nucleus.

胞造模方法。

2.3　人 RPE 细胞对 POS 和荧光微球的吞噬

100 倍荧光显微镜下观察用于吞噬实验的经 FITC 标记的 POS 颗粒在 488 nm 荧光下显示绿光，表现为大小均匀一致的块状物质 (图 2A)，荧光标记的微球颗粒表现为均匀的圆形绿色颗粒 (图 2C)。经过 6 h 的共同孵育，人 RPE 细胞吞噬了 FITC-POS 和荧光微球，分布在细胞质内，细胞核边缘 (图 2B、D)。

2.4　利鲁唑激活 TREK-TRAAK K_2P 可改善氧化损伤的人 RPE 细胞的特异性吞噬功能

如图 3 所示，荧光显微镜下拍照，Image-Pro Plus 6.0 软件分析绿色荧光面积指数 (即吞噬的 FITC-POS 特异性吞噬指数)，对照组、利鲁唑组、t-BHP 组、利鲁唑加 t-BHP 组的吞噬指数分别为 671±47、675±65、155±26、450±58。单因素方差分析进行组间比较，t-BHP 组吞噬指数低于其他各组，与各组之间比较差异均有统计学意义 (P<0.001)，而利鲁唑组吞噬指数稍高于对照组，

表 1　MTT 法检测不同浓度和时间 t-BHP 诱导氧化损伤后 RPE 细胞存活率 (n=5, x±s)

Table 1　Survival rate of RPE cells detected by MTT assay after induction of oxidative damage by different concentrations and durations of t-BHP (n=5, x±s)

组别	细胞存活率/%
正常对照组	100
200 μmol t-BHP 6 h组	95.7±6.8
300 μmol t-BHP 6 h组	67.5±4.0
500 μmol t-BHP 6 h组	28.1±3.9
1 000 μmol t-BHP 6 h组	22.7±2.7
300 μmol t-BHP 3 h组	97.5±1.7
300 μmol t-BHP 12 h组	10.7±3.0
300 μmol t-BHP 24 h组	1.68±0.1

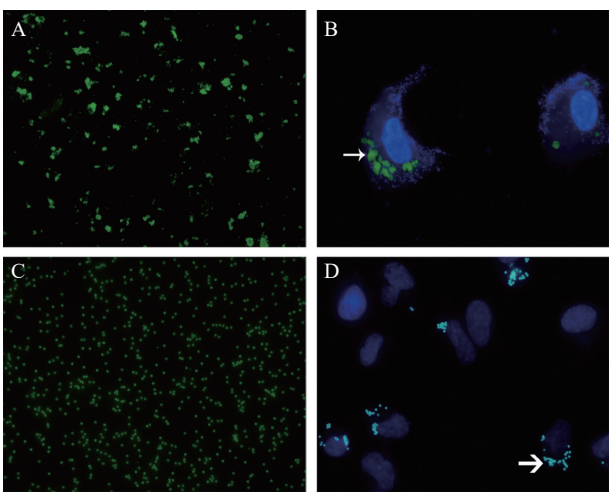


图 2　FITC-POS 和荧光微球及人 RPE 细胞的吞噬

Figure 2　Phagocytosis of FITC-POS and fluorescent microspheres by human RPE cells

(A) 经 FITC 标记稀释的猪视网膜外节膜盘 (FITC-POS)；(B)RPE 细胞与 FITC-POS 共同孵育 6 h，RPE 细胞吞噬的 POS(白色细箭头)；(C) 经稀释的荧光微球颗粒；(D)RPE 细胞与 FITC-POS 共同孵育 6 h，RPE 细胞吞噬的荧光微球颗粒 (白色粗箭头)。

(A) Diluted POS labeled with FITC (FITC-POS); (B) Human RPE cells after a 6-hour co-incubation with FITC-POS, internalized POS are indicated by thin white arrows; (C) Diluted fluorescent microsphere particles; (D) Human RPE cells after a 6-hour co-incubation with fluorescent microspheres, phagocytosed microspheres are indicated by thick white arrows.

但差异无统计学意义 (P>0.05)。

各组的特异性吞噬率：对照组 (96.0±1.0)%、利鲁唑组 (89.7±2.1)%、t-BHP 组 (80.7±8.3)%、利鲁唑加 t-BHP 组 (81.0±2.6)%，t-BHP 组吞噬率低于其他各组，但两两比较差异无统计学意义 (P>0.05)，正常组吞噬率大于利鲁唑组，但差异亦无统计学意义 (P>0.05)。

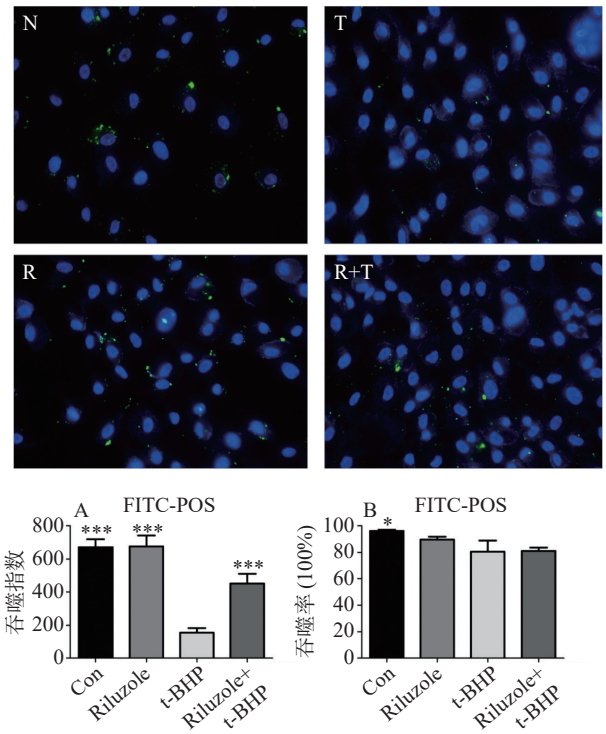


图 3 各组处理后 RPE 细胞对 FITC-POS 的特异性吞噬

Figure 3 Specific phagocytosis of FITC-POS by RPE cells following different treatments

N：对照组，R：利鲁唑组，T：t-BHP 组，R+T：利鲁唑加 t-BHP 组；各组经 6 h 的吞噬，可见大部分 RPE 细胞内有 FITC-POS 荧光。(A) 吞噬指数：t-BHP 组显著低于其他各组 (P<0.001)，利鲁唑加 t-BHP 组显著高于 t-BHP 组 (P<0.001)；(B) 吞噬指数：仅对照组高于 t-BHP 模型组 (P<0.05)，其他组间差异无统计学意义。*: P<0.05，***: P<0.001。

N: Control group; R: Riluzole group; T: t-BHP group; R+T: Riluzole plus t-BHP group. After 6 hours of phagocytosis, FITC-POS fluorescence was observed inside the majority of RPE cells across all groups. (A) Phagocytic index: The t-BHP group was significantly lower than all other groups (P<0.001), while the Riluzole plus t-BHP group was significantly higher than the t-BHP group (P<0.001). (B) Phagocytic index: Only the control group was significantly higher than the t-BHP model group (P<0.05). No statistically significant differences were observed among the other groups. *: P<0.05, ***: P<0.001.

2.5 利鲁唑激活 TREK-TRAAK K_2P 可保护氧化损伤的人 RPE 细胞的非特异性吞噬功能

如图 4 所示，荧光显微镜下拍照，各组的吞噬指数 (即平均每个细胞吞噬的荧光微球颗粒数)：正常组 (11.4±0.9)、t-BHP 组 (5.6±0.2)、利鲁唑加 t-BHP 组 (9.8±1.3)、利鲁唑组 (12.6±1.6)。单因素方

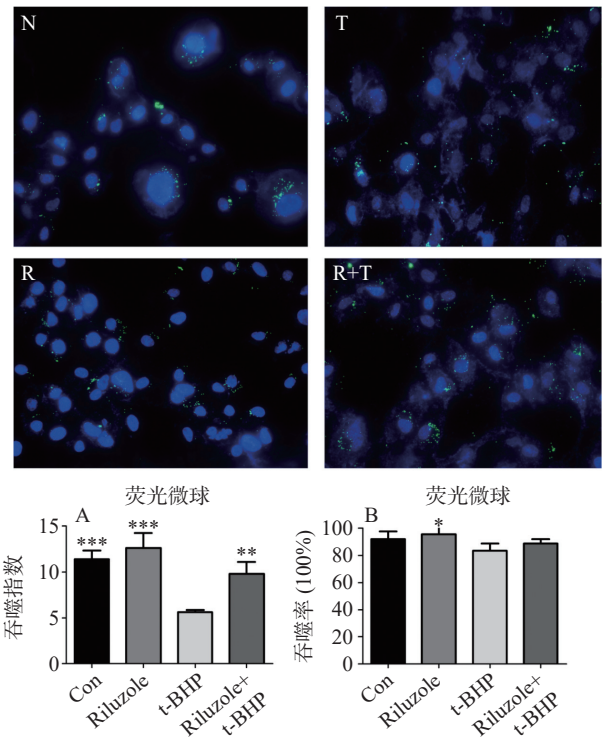


图 4 各组处理后 RPE 细胞对荧光微球的非特异性吞噬

Figure 4 Non-specific phagocytosis of fluorescent microspheres by RPE cells following different treatments

N：对照组，R：利鲁唑组，T：t-BHP 组，R+T：利鲁唑加 t-BHP 组；各组经 6 h 的吞噬，可见大部分 RPE 细胞内有荧光微球颗粒。(A) 非特异性吞噬指数：t-BHP 组显著低于其他组；(B) 非特异性吞噬率：利鲁唑组稍高于 t-BHP 组，其他组间差异无统计学意义。*: P<0.05，**: P<0.01，***: P<0.001。

N: Control group; R: Riluzole group; T: t-BHP group; R+T: Riluzole plus t-BHP group. After 6 hours of phagocytosis, fluorescent microsphere particles were observed inside the majority of RPE cells in all groups. (A) Non-specific phagocytic index: The t-BHP group was significantly lower than all other groups. (B) Non-specific phagocytic rate: The Riluzole group was slightly higher than the t-BHP group. No statistically significant differences were observed among the other groups. *: P < 0.05, **: P < 0.01, ***: P < 0.001.

差分析进行各组间比较，t-BHP 组吞噬指数低于其他各组，与各组之间差异均有统计学意义 (P<0.001)，而利鲁唑组吞噬指数稍高于对照组，但差异无统计学意义 (P>0.05)。

各组的吞噬率：正常组 (92.0±5.7)%、利鲁唑组 (95.5±6.1)%、t-BHP 组 (83.5±5.3)%、利鲁唑加 t-BHP 组 (88.8±3.3)%，单因素方差分析进行各组间比较，t-BHP 组吞噬率均数低于利鲁唑加 t-BHP 组，但差异无统计学意义 (P>0.05)，两两比较，仅利鲁唑组吞噬率高于 t-BHP 组，差异有统计学意义 (P<0.05)。

3　讨论

AMD 是一种光感受器细胞-RPE 细胞-Bruch's 膜-脉络膜毛细血管复合体的退行性病变，是 65 岁以上老年人不可逆盲的首要原因[3]。其最终的病理转归是各类视网膜细胞的凋亡或者坏死，机制复杂[1-2]。

氧化应激导致的 RPE 细胞损伤被认为是 AMD 的重要发病因素[4]。AMD 患者视网膜的玻璃膜疣成分中存在大量氧化的脂质和蛋白质[11]，而在 AMD 患者的 RPE 细胞中抗氧化物酶的表达和相关的受体大量增加[12]，这些都直接或间接表明氧化损伤参与了 AMD 的发生和发展。本研究使用不同浓度梯度的 t-BHP 干预不同时间体外诱导 RPE 细胞氧化损伤，结果和既往文献报道一致，细胞存活率呈现时间和剂量依赖性[13]。视网膜处于高代谢状态，大量耗氧过程中产生大量活性氧并产生代谢产物。在 AMD 早期，主要病理改变为 RPE 细胞和 Bruch's 膜间出现玻璃膜疣，黄斑区色素紊乱，随着病情的进展，玻璃膜疣增多，又进一步导致 RPE 细胞脱离、凋亡、坏死，在这个过程中坏死的 RPE 细胞可进一步募集各种炎症反应因子参与其中，分泌 VEGF 增加，RPE 细胞功能障碍，特别是吞噬功能障碍进一步继发感光细胞凋亡坏死、脉络膜萎缩，出现典型的地图样萎缩，少部分最终可发展为 CNV[2,14-15]。

TREK-TRAAKK_2P 家族是新近发现的一个钾离子通道亚家族，包括 TREK-1、TREK-2 和 TRAAK 三个亚型成员，在中枢神经系统高表达，主要维持细胞的背景电流，参与细胞正常生理功能维持和病理状态调节[16-17]。既往也有研究发现该家族通道蛋白在 müller 细胞及小胶质细胞上表达[18-19]。本研究发现 TREK-1、TREK-2 和 TRAAK 蛋白在人 RPE 细胞均有明显表达。研究发现，TREK-TRAAK K_2P 参与了细胞凋亡的调控，在凋亡早期介导细胞内钾离子浓度改变以维持细胞内外环境的稳态，拮抗细胞凋亡[20]。研究显示，中国仓鼠卵巢细胞过表达 TREK-1 能够拮抗 H_2O_2 氧化损伤所致的细胞凋亡，表现出明显的细胞保护作用，但具体的机制尚不清楚。在我们的前期研究中也发现 TRAAK 与视网膜的发育密切相关，并且 TREK-TRAAK K_2P 激动剂能够减少氧化损伤的 RPE 早期凋亡，推测可能和 TRAAK 通道开放维持细胞稳态相关及影响凋亡相关信号通路有关[21]。

RPE 细胞的吞噬作用对维持视网膜稳态具有重要意义。RPE 细胞除对感光细胞外节膜盘的特异性吞噬作用外还具有吞噬细胞碎片、酵母菌、色素颗粒、乳胶微球的非特异性吞噬作用[9,22]。其中，RPE 细胞吞噬功能和感光细胞的外节更新密切相关，RPE 吞噬功能障碍将导致视网膜变性疾病 (包括 AMD) 的发生。研究表明，感光细胞的外节膜盘每天约更新 10%，脱落的 POS 直接被与之相邻的 RPE 细胞吞噬，吞噬过程包括识别、结合、内吞、消化等步骤，最终被 RPE 细胞消除，部分不能完全消化的将被沉积下来形成脂褐质或被排出细胞外，成为玻璃膜疣的一部分[23]。本研究中，200 μmol/L 干预 6 h 非致死量的 t-BHP 诱导人 RPE 细胞氧化损伤后，与对照组相比，细胞对 POS 的吞噬量下降了 75%，对荧光乳胶微球的吞噬率下降了 50%。该结果说明，氧化损伤抑制了 RPE 细胞的吞噬功能，且对特异性吞噬功能的抑制明显强于非特异性吞噬功能。由于吞噬过程是一个大量酶活化，信号传导和肌球蛋白运动的过程，所以消耗大量的 ATP。一方面，氧化损伤可以导致 RPE 细胞膜表面吞噬相关受体的表达下降，影响结合、内吞等过程[24]；另一方面，氧化损伤影响 RPE 细胞线粒体功能，干扰能量代谢，从而使得吞噬这个大量消耗能量的过程受阻[25]。在本研究中，利鲁唑作用下 RPE 细胞吞噬功能并没有明显变化，但利鲁唑预处理却能明显地提高氧化应激损伤 RPE 细胞的吞噬功能，提示利鲁唑并没有上调吞噬相关的蛋白分子的表达，可能的机制是 TREK-TRAAK K_2P 通道的开放调节了细胞内外的钾离子平衡，维持了细胞的稳态，是否还与进

一步减少了氧化损伤所致的吞噬相关蛋白表达下降有关，具体的机制有待进一步研究。

本研究的局限性：1) 主要是体外实验，还需要体内实验进一步验证；2) 对 TREK-TRAAK K_2P 通道开放保护氧化损伤的人 RPE 细胞吞噬功能的具体分子机制需要进一步深入研究。

综上所述，TREK-TRAAK K_2P 通道的激活不但可以维持氧化损伤导致的 RPE 细胞存活，而且可以保护 RPE 细胞吞噬功能，为其作为 AMD 治疗的潜在靶点提供了科学依据。

声明

在论文撰写中未使用生成式人工智能。论文撰 写中的所有内容均由作者独立完成，并对出版物的 真实性和准确性承担全部责任。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突。

开放获取声明

本文适用于知识共享许可协议 (Creative Commons)，允许第三方用户按照署名 (BY)-非商业性使用 (NC)-禁止演绎 (ND)(CC BY-NC-ND) 的方式共享，即允许第三方对本刊发表的文章进行复制、发行、展览、表演、放映、广播或通过信息网络向公众传播，但在这些过程中必须保留作者署名、仅限于非商业性目的、不得进行演绎创作。详情请访问： https://creativecommons.org/licenses/by-ncnd/4.0/。

参考文献

1. Guymer RH, Campbell TG. Age-related macular degeneration[J]. Lancet, 2023, 401(10386): 1459-1472. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)02609-5.
2. Fleckenstein M, Keenan TDL, Guymer RH, et al. Age-related macular degeneration[J]. Nat Rev Dis Primers, 2021, 7: 31. DOI: 10.1038/s41572-021-00265-2.
3. Fleckenstein M, Schmitz-Valckenberg S, Chakravarthy U. Age-related macular degeneration: a review[J]. Jama, 2024, 331(2): 147. DOI: 10.1001/jama.2023.26074.
4. Hughes S, Foster RG, Peirson SN, et al. Expression and localisation of two-pore domain (K2P) background leak potassium ion channels in the mouse retina[J]. Sci Rep, 2017, 7: 46085. DOI: 10.1038/srep46085.
5. Cadaveira-Mosquera A, Pérez M, Reboreda A, et al. Expression of K2P channels in sensory and motor neurons of the autonomic nervous system[J]. J Mol Neurosci, 2012, 48(1): 86-96. DOI: 10.1007/s12031-012-9780-y.
6. Khanani AM, Thomas MJ, Aziz AA, et al. Review of gene therapies for age-related macular degeneration[J]. Eye, 2022, 36(2): 303-311. DOI: 10.1038/s41433-021-01842-1.
7. Shen C, Ma W, Zheng W, et al. The antioxidant effects of riluzole on the APRE-19 celll model injury-induced by t-BHP[J]. BMC Ophthalmol, 2017, 17(1): 210. DOI: 10.1186/s12886-017-0614-0.
8. Flood MT, Gouras P, Kjeldbye H. Growth characteristics and ultrastructure of human retinal pigment epithelium *in vitro*[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1980, 19(11): 1309-1320. DOI: 10.1016/s0022-5320(66)80008-4.
9. 陈明, 高殿文, 陈珺, 等. 人视网膜色素上皮细胞对色素颗粒的吞噬作用[J]. 中国实用眼科杂志, 2000, 18(2): 87-88. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1006-4443.2000.02.010.
Chen M, Gao DW, Chen J, et al. Repigmentation of human retinal pigment epithelial cells *in vitro*[J]. Chin J Pract Ophthalmol, 2000, 18(2): 87-88. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1006-4443.2000.02.010.
10. Huo SJ, Li YC, Xie J, et al. Transplanted olfactory ensheathing cells reduce retinal degeneration in Royal College of Surgeons rats[J]. Curr Eye Res, 2012, 37(8): 749-758. DOI: 10.3109/02713683.2012.697972.
11. Crabb JW, Miyagi M, Gu X, et al. Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(23): 14682-14687. DOI: 10.1073/pnas.222551899.
12. Decanini A, Nordgaard CL, Feng X, et al. Changes in select redox proteins of the retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration[J]. Am J Ophthalmol, 2007, 143(4): 607-615. DOI: 10.1016/j.ajo.2006.12.006.
13. Zareba M, Raciti MW, Henry MM, et al. Oxidative stress in ARPE-19 cultures: do melanosomes confer cytoprotection?[J]. Free Radic Biol Med, 2006, 40(1): 87-100. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.015.
14. Hageman GS, Luthert PJ, Victor Chong NH, et al. An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration[J]. Prog Retin Eye

Res, 2001, 20(6): 705-732. DOI: 10.1016/s1350-9462(01)00010-6.

15. Dorey CK, Wu G, Ebenstein D, et al. Cell loss in the aging retina. Relationship to lipofuscin accumulation and macular degeneration[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1989, 30(8): 1691-1699.
16. Douguet D, Honoré E. Mammalian mechanoelectrical transduction: structure and function of force-gated ion channels[J]. Cell, 2019, 179(2): 340-354. DOI: 10.1016/j.cell.2019.08.049.
17. Judge SIV, Smith PJ. Patents related to therapeutic activation of K(ATP) and K(2P) potassium channels for neuroprotection: ischemic/hypoxic/anoxic injury and general anesthetics[J]. Expert Opin Ther Pat, 2009, 19(4): 433-460. DOI: 10.1517/13543770902765151.
18. Weller J, Steinhäuser C, Seifert G. pH-sensitive K^+ currents and properties of K2P channels in murine hippocampal astrocytes [M]//Ion Channels as Therapeutic Targets, Part A. Amsterdam: Elsevier, 2016: 263-294. DOI: 10.1016/bs.apcsb.2015.10.005.
19. Yamamoto Y, Hatakeyama T, Taniguchi K. Immunohistochemical colocalization of TREK-1, TREK-2 and TRAAK with TRP channels in the trigeminal ganglion cells[J]. Neurosci Lett, 2009, 454(2): 129-133. DOI: 10.1016/j.neulet.2009.02.069.
20. Huang H, Li H, Shi K, et al. TREK-TRAAK two-pore domain potassium channels protect human retinal pigment epithelium cells from oxidative stress[J]. Int J Mol Med, 2018, 42(5): 2584-2594. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3813.
21. 沈朝兰, 李楚, 朱晓波, 等. 双孔钾离子通道激动剂利鲁唑对叔丁基过氧化氢诱导的人视网膜色素上皮细胞氧化损伤的作用[J]. 中华眼底病杂志, 2013, 29(4): 400-405. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2013.04.013.

    Shen (C/Z)L, Li C, Zhu XB, et al. Effect of TRAAK activator riluzole on t-BHP induced injury of human retinal pigment epithelial cells[J]. Chin J Ocul Fundus Dis, 2013, 29(4): 400-405. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2013.04.013.
22. Klettner A, Möhle F, Lucius R, et al. Quantifying FITC-labeled latex beads opsonized with photoreceptor outer segment fragments: an easy and inexpensive method of investigating phagocytosis in retinal pigment epithelium cells[J]. Ophthalmic Res, 2011, 46(2): 88-91. DOI: 10.1159/000323271.
23. Kevany BM, Palczewski K. Phagocytosis of retinal rod and cone photoreceptors[J]. Physiology, 2010, 25(1): 8-15. DOI: 10.1152/physiol.00038.2009.
24. Qin S, Rodrigues GA. Roles of αvβ5, FAK and MerTK in oxidative stress inhibition of RPE cell phagocytosis[J]. Exp Eye Res, 2012, 94(1): 63-70. DOI: 10.1016/j.exer.2011.11.007.
25. 安刚, 洪晶, 孙煜昭, 等. 人视网膜色素上皮细胞吞噬过程中细胞内钙离子浓度的变化[J]. 中华眼科杂志, 2006, 42(5): 451-453. DOI: 10.3760/j:issn:0412-4081.2006.05.015.

    An G, Hong J, Sun YZ, et al. Alterations in intracellular calcium concentration during the phagocytic process in human retinal pigment epithelial cells[J]. Chin J Ophthalmol, 2006, 42(5): 451-453. DOI: 10.3760/j:issn:0412-4081.2006.05.015.

（责任编委：吉宇莹；编辑：殷秋霞）