

中文摘要

老年性黃斑部病變是近年來常見的眼部疾病之一，其成因是於色素上皮細胞上產生的發炎性病變，目前發現預防老年性黃斑部病變惡化的酵素表現是有提高視網膜色素上皮細胞抗發炎 / 抗氧化的效果。而哺乳動物的 Glutaredoxin 3 (Grx-3) 已被認為是調節細胞氧化還原恆定性的關鍵蛋白之一，並與某些癌細胞的存活與轉移也有相當的關係。因此我們想探討 Grx-3 在人類色素上皮細胞 (ARPE-19) 中所扮演的角色與功能，然而在我們的研究中發現，短時間過度表現 Grx-3 細胞的存活率並無顯著差異，但長時間的過度表現 Grx-3 會使細胞的存活率下降，並且在 Hela 細胞中也得到相同的情形，而細胞中的 ROS 含量也會有所提升，由於之前的文獻指出 Grx-3 在細胞中與鐵的運輸與代謝有關。因此我們在 Calcein Release Assay 與檢測細胞中 Aconitase activity 的實驗裡發現了長時間過度表現 Grx-3 會使細胞中游離態鐵離子增加，由此我們推斷長時間的過度表現 Grx-3 的細胞損傷是因游離態鐵離子增加而造成，另一方面，我們發現 Grx-3 無法對抗 Diamide 誘導的凋亡，但會影響 caspase 3/7 的活化，實驗在過度表現 Grx-3 的細胞裡 caspase 3/7 的活性會有所下降，並能抑制由 Diamide 所誘導的 caspase 3/7 上升，此外，我們研究中發現，人類視網膜色素上皮細胞 (ARPE-19) 經由 TNF- α 的誘導，會有 NF- κ B (p65) 活化，ICAM-1 的表現量增加，以及 THP-1 (單核球) 黏附現象提高的情形。但在過度表現 Grx-3 後，可降低 NF- κ B (p65) 活化，因而使貼附因子 ICAM-1 表現下降，單核球黏附現象下降，因此亦具有抗發炎的果。由此我們推論 Grx-3 確實有幫助細胞對抗發炎的作用及抑

制凋亡路徑，但當長時間過度表現 Grx-3 時會產生過多的游離態鐵離子使細胞中 ROS 提升進而對細胞造成傷害。因此細胞中產生過多或過少的 Grx-3 皆可能影響細胞生存的平衡狀態。

中文摘要

老年性黃斑部病變是近年常見眼疾，色素上皮細胞的發炎性病變為部分成因。目前發現預防老年性黃斑部病變惡化的酵素表現有助於視網膜色素上皮細胞抗發炎/抗氧化；而哺乳動物的 Glutaredoxin 3 (Grx-3) 已被認為是調節細胞氧化還原恆定性的關鍵蛋白之一，因此我們想探討 Grx-3 在人類色素上皮細胞 (ARPE-19) 中所扮演的角色。我們研究發現，短時間過度表現 Grx-3，細胞的存活率相較於控制組並無顯著差異，然而長時間的過度表現則會降低細胞存活率，細胞中的 ROS 含量也有所提升；在 Hela 細胞中也得到相同結果。曾有文獻指出，Grx-3 在細胞中與鐵的運輸及代謝有關，而我們對此在 Calcein Release Assay 與細胞中 Aconitase activity 的檢測中發現：長時間過度表現 Grx-3 會使細胞中游離鐵增加，因而推斷長時間過度表現 Grx-3 的細胞損傷是由此造成。另一方面，我們發現 Grx-3 儘管無法阻止 Diamide 誘導的細胞凋亡，卻會影響 caspase 3/7 的活化；實驗中，過度表現 Grx-3 的細胞除了 caspase 3/7 的活性下降，由 Diamide 誘導的 caspase 3/7 活性上升也受到抑制。此外，我們還發現，過度表現 Grx-3 的 ARPE-19 抑制了經 TNF- α 處理誘導的 NF- κ B (p65) 活化而降低 ICAM-1 表現量，進而減少了 THP-1 的黏附，亦可看出 Grx3 抗發炎的作用。

綜上所述，我們推論 Grx-3 有幫助細胞抗發炎及抑制凋亡路徑的作用，但長時間過度表現 Grx-3 會產生過多的游離態鐵離子使細胞中 ROS 提升，進而傷害細胞，因此過多或過少的 Grx-3 皆可能影響細胞的生存。

英文摘要 English Abstract

Age-related macular degeneration (AMD) is one of the common ocular diseases recently. Inflammatory lesion of retinal pigment epithelium is one aspect of the pathogenesis. Enzymes that prevent AMD from worsening has been reported to promote anti-inflammatory or antioxidant effects on retinal pigment epithelial cells (RPE cells). Mammalian glutaredoxin-3 (Grx-3) is considered one of the crucial proteins regulating cellular redox homeostasis, also related to the survival and transfer of several cancer cells. Therefore, we aimed to investigate the role of Grx-3 in human retinal epithelial cell line, ARPE-19. While there was no significant difference in ARPE-19 cell viability after a short-term Grx-3 overexpression, a long-term overexpression decreased cell viability and increased cellular ROS level. Identical results were observed in HeLa cells. Some studies have indicated the role of Grx-3 in cellular iron transport and metabolism, which led us to discovering the rise of intracellular free iron after a long-term Grx-3 overexpression through calcein release assay and cellular aconitase activity measurement. We infer this phenomenon to the reason of decreased cell viability. In addition, although Grx-3-overexpressed cells cannot resist diamide-induced apoptosis, caspase 3/7 activity in both normal and diamide-treated cells were limited. Besides, during our research, Grx-3 showed the ability to ameliorate inflammation in ARPE-19 cells by inhibiting TNF- α induced NF- κ B (p65) activation, which consequently downregulated ICAM-1 and reduced monocyte (THP-1) adhesion.

In conclusion, our research indicates that Grx-3 is capable of protecting RPE cells from inflammatory damage and interfering with apoptotic pathway. However, overexpressing Grx-3 for too long will release too much free iron

and increase cellular ROS, contributing to cell damage. This study suggests that excessive or deficient Grx-3 both influence the homeostasis affecting RPE cell survival.