

内质网应激对光照诱导的人视网膜色素上皮细胞损伤的促进作用

姜文静 张丽娜 于晓 牛膺筠

266033 青岛市海慈医疗集团眼科(姜文静);266071 青岛大学附属医院眼科(张丽娜、牛膺筠);266042 青岛市第三人民医院眼科(于晓)

通信作者:张丽娜,Email:zhanglina1105@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.09.010

【摘要】 背景 视网膜色素上皮(RPE)细胞的光损伤模型是多种视网膜变性类疾病的研究工具,光诱导 RPE 细胞损伤的主要病理基础是凋亡及炎症反应,但是内质网应激(ERS)反应是否参与其病理机制的研究国内外少有报道。目的 探讨 ERS 对光损伤诱导的人 RPE 细胞凋亡的作用及其机制。方法 体外培养人 RPE 细胞株(ARPE-19),将培养的细胞分为正常对照组及光照 3、6、12 和 24 h 组,各光照组在培养箱内以(2 000±500)lx 的白色荧光灯光照细胞建立光损伤模型,正常对照组细胞在暗环境中培养且不予光照,筛选实验最适光照时间。将细胞分为正常对照组、光照组(光照 12 h)和苯基丁酸(4-PBA)预处理+光照组,4-PBA 预处理+光照组先用 ERS 抑制剂 4-PBA 培养细胞 30 min,然后光照细胞 12 h。采用流式细胞仪检测各组人 RPE 细胞的凋亡率和细胞内活性氧(ROS)的荧光强度;采用 ELISA 法检测各组细胞上清液中炎症因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)质量浓度;分别采用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 法检测人 RPE 细胞中 ERS 标志物活化转录因子-6(ATF-6)、C/增强结合蛋白同源蛋白(CHOP)和细胞凋亡标志物半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-12(caspase-12)mRNA 及其蛋白的表达。结果 光照后细胞形态呈长梭形改变,边界不清,细胞质脱颗粒,细胞碎片增多,且随光照时间的延长而加重。流式细胞仪检测发现,随光照时间的延长,人 RPE 细胞内 ROS 含量逐渐增加,细胞凋亡率逐渐升高,差异均有统计学意义($F=763.00、119.30$,均 $P<0.01$)。ELISA 法检测发现,与正常对照组比较,光照后 6 h 细胞上清液中 IL-1 β 和 TNF- α 质量浓度均明显升高,12 h 达峰。实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测显示,与正常对照组比较,光照后人 RPE 细胞中 ATF-6、CHOP 和 caspase-12 mRNA 及其蛋白的相对表达量均明显升高,均于光照后 12 h 达峰或升高,故选择光照 12 h 为最适光照时间作为后续研究。4-PBA 预处理+光照组细胞中 ATF-6、CHOP 和 caspase-12 mRNA 的相对表达量均明显低于光照组,差异均有统计学意义($F=281.69、473.88、308.45$,均 $P<0.01$);ATF-6、CHOP 和 caspase-12 蛋白的相对表达量均明显低于光照组,差异均有统计学意义($F=47.86、57.93、106.59$,均 $P<0.01$);细胞凋亡率、细胞上清液中 IL-1 β 和 TNF- α 质量浓度均明显低于光照组,差异均有统计学意义($F=88.64、245.47、101.01$,均 $P<0.01$)。结论 (2 000±500)lx 的光照可诱导人 RPE 细胞内 ROS 增加,并激活细胞的 ERS 反应,导致 RPE 细胞凋亡及炎症反应。ERS 抑制剂 4-PBA 可抑制光损伤导致的 ERS 反应,进而降低 RPE 细胞凋亡率并抑制炎症反应过程。

【关键词】 氧化应激;光/不良作用;内质网/异常;眼色素上皮细胞/异常状态;细胞系;人;凋亡;炎症

基金项目: 国家自然科学基金项目(30572010);山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(BS2013YY051);青岛市应用基础研究计划项目(15-9-1-68-jch)

Mediated effects of endoplasmic reticulum stress on light-induced apoptosis and inflammation of human retinal pigment epithelial cell Jiang Wenjing, Zhang Lina, Yu Xiao, Niu Yingjun

Department of Ophthalmology, Qingdao Hiser Medical Center, Qingdao 266033, China (Jiang WJ); Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266071, China (Zhang LN, Niu YJ); Department of Ophthalmology, the Third People's Hospital of Qingdao, Qingdao 266042, China (Yu X)

Corresponding author: Zhang Lina, Email: zhanglina1105@163.com

[Abstract] Background The light damage model of retinal pigment epithelium (RPE) cells is a research direction of retinal degeneration diseases, and RPE cell apoptosis induced by light damage and inflammation is an important pathologic basis of light-induced RPE cell damage. However, whether endoplasmic reticulum stress (ERS) participates in light-induced RPE cell damage is rarely reported. **Objective** This study was to explore the effects of ERS on light-induced RPE cell damage. **Methods** Human RPE cell line (ARPE-19) was cultured, and light damage models were created by irradiating the cells for 3-, 6-, 12- and 24-hours with white fluorescent lamp with the intensity of $(2\ 000\pm 500)$ lx for the selection of optimal irradiating time, and the cells in the normal control group were cultured in the dark environment. The cells were divided into normal control group, light exposure group and 4-phenylbutyric acid (4-PBA) pretreated+light exposure group. The cells from 4-PBA pretreated+light exposure group were cultured firstly with 4-PBA for 30 minutes and followed by light exposure for 12 hours. The apoptosis rate of the cells and intracellular reactive oxygen species (ROS) content were detected by flow cytometry; the concentrations of interleukin 1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the cell supernatant were assayed by ELISA. The relative expressing levels of activating transcription factor 6 (ATF-6), C/enhancer binding protein homologous protein (CHOP) and caspase-12 mRNA and protein in the cells were detected by real-time quantitative PCR and Western blot, respectively. **Results** The cultured cells showed a long spindle shape, the border was not clear, the cytoplasm was degranulation, and the cell fragments increased. Flow cytometry showed that compared with the normal control group, the ROS content in the cells and the apoptosis rate were evidently increased with the lapse of light exposure time ($F=763.00, 119.30$, both at $P<0.01$). ELISA results showed that the concentrations of IL-1 β and TNF- α in the cell supernatant were significantly higher in the light exposure 6-hour group than those in the normal control group with the peak value in the light exposure 12-hour group. Compared with the normal control group, the relative expression levels of ATF-6, CHOP and caspase-12 mRNA and protein in the cells were elevated in the light exposure group and peaked in the light exposure 12-hour group. In addition, the relative expression levels of ATF-6 mRNA, CHOP mRNA and caspase-12 mRNA in the cells were significantly reduced in 4-PBA pretreated+light exposure group compared with the light exposure group ($F=281.69, 473.88, 308.45$, all at $P<0.01$), and their proteins were also significantly reduced ($F=47.86, 57.93, 106.59$, all at $P<0.01$). The apoptosis rate, concentrations of IL-1 β and TNF- α in the cell supernatant were significantly reduced in 4-PBA pretreated+light exposure group compared with the light exposure group ($F=88.64, 245.47, 101.01$, all at $P<0.01$). **Conclusions** The light exposure at $(2\ 000\pm 500)$ lx induces intracellular ROS accumulation and activates the ERS response, which results in apoptosis and inflammatory process of human RPE cells. 4-PBA, a inhibitor of ERS, can suppress light-induced ERS response and therefore reduces the apoptosis rate and inhibits inflammatory process.

[Key words] Oxidative stress; Light/adverse effects; Endoplasmic reticulum/pathology; Pigment epithelium of eye/pathology; Cell line; Human; Apoptosis; Inflammation

Fund program: National Natural Science Foundation of China (30572010); Research Award Fund for Outstanding Young Scientists Project in Shandong Province (BS2013YY051); Qingdao Application Basic Research Project (15-9-1-68-jch)

视网膜是视觉形成的重要结构,同时也容易受到光的损伤。研究表明,多种视网膜变性疾病与可见光的长期照射有关,环境和人造光源也是视网膜光损伤的潜在威胁^[1-2]。本研究组前期的研究发现,光照过强对视网膜色素上皮层(retinal pigment epithelium, RPE)具有细胞毒性作用,可造成视网膜的光损伤^[3]。近年来的基础研究结果显示,缺血-再灌注损伤、氧化应激、钙稳态失调及紫外线等多种因素诱发的内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)参与阿尔兹海默病、帕金森病以及亨廷顿舞蹈病等多种神经变性类疾病的过程^[4-5], ERS在RPE光损伤中可能发挥重要

作用^[6],但其作用机制目前尚不清楚。本研究探讨RPE光损伤与ERS之间的关系,为视网膜光化学损伤相关性视网膜变性类疾病的防治提供新的靶点及依据。

1 材料与方法

1.1 材料

成人ARPE-19细胞株(美国ATCC细胞库); Dulbecco改良Eagle培养基、新生牛血清、胰蛋白酶、2,7-二氯氢化荧光素二乙酸酯(2,7-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA)、BCA蛋白浓度检测试剂盒、SDS-PAGE、ELISA试剂盒(南京碧云天生物技术公司);兔

抗人转录激活因子 6 (activating transcription factor 6, ATF-6) (抗体编号: AB62484)、C/增强结合蛋白 (enhancer binding protein, EBP) 同源蛋白 (C/EBP homologous protein, CHOP) (抗体编号: ab11419)、caspase-12 多克隆抗体 (抗体编号: ab11909) (美国 Abcam 公司); 苯基丁酸 (4-phenylbutyric acid, 4-PBA) (加拿大 Sigma Aldrich 公司); RIPA 细胞裂解液 (美国 Cell Signaling Technology 公司); 活性氧测试盒 (南京建成生物工程研究所); Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒 (美国 Becton Dickinson Pharmingen 公司); 实时荧光定量 PCR 试剂盒 (德国 Macherey Nagel 公司); 逆转录试剂盒及引物 (大连宝生物有限公司)。8 W 白色荧光灯 (荷兰 Philips 公司); ST-III 型光照度计 (上海光电研究所); Guava EasyCyte 流式细胞仪 (德国 Merck Millipore 公司); Mx3000P 型荧光定量 PCR 仪 (美国 Agilent Stratagene 公司)。

1.2 方法

1.2.1 人 RPE 细胞的培养及光损伤细胞模型的建立

人 RPE 细胞 (ARPE-19 细胞株) 用 DMEM 培养基在体积分数 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱中进行培养, 将生长良好的人 RPE 第 3 ~ 5 代传代细胞接种于 6 孔板, 密度为 4 × 10⁵/孔, 用正常培养液培养 48 h 吸出原培养液。将培养的人 RPE 细胞分为正常对照组和光照 3、6、12 和 24 h 组, 各组细胞均用正常培养液继续培养, 待细胞铺满瓶底时各光照组细胞进行光照。光照器放在有自动调温功能的培养箱中, 排除温度升高引起细胞光热损伤的可能。光照在培养箱内密闭进行, 无自然光干扰, 光照时箱内温度为 36.5 ~ 37.5 °C。以白色荧光灯作为光源, 光照强度为 (2 000 ± 500) lx, 光照后 12 h 继续培养细胞, 分别于光照后 3、6、12 和 24 h 终止培养。正常对照组细胞的处理参照文献 [7] 的方法, 用双层高压消毒锡纸包裹培养器皿, 细胞放在同样的孵箱中构成黑暗环境。

1.2.2 ERS 抑制剂的预处理 将培养的细胞分为正常对照组、光照组 (于光照后 12 h 终止培养) 和 4-PBA 预处理+光照组 (更换含 10 mmol/L 的 4-PBA 培养基培养细胞 30 min, 然后再放入培养箱中光照处理, 根据上述实验中筛选的最适光照时间光照 12 h)。

1.2.3 流式细胞仪检测各组细胞活性氧 采用 DCFH-DA 法检测细胞内活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 含量。光照不同时间后各光照组培养液中加入 10 μmol/L DCFH-DA。各组细胞置于 37 °C 培养箱中孵育细胞 30 min, 用 1 倍 PBS 洗涤 2 次, 用质量分数 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 加入培养基终止消

化, 制成细胞悬液, 离心半径为 7.7 cm, 室温下 1 000 r/min 离心 5 min, 用 1 倍 PBS 洗涤 2 次, 收集细胞, 用流式细胞仪检测细胞荧光强度。

1.2.4 流式细胞仪检测人 RPE 细胞凋亡率 用 0.25% 胰蛋白酶消化各组培养的细胞, PBS 轻轻重悬细胞并计数。将细胞以 5 × 10⁴/ml 的密度收集于 15 ml 离心管中离心, 弃上清, 加入 195 μl Annexin V-FITC 结合液以轻轻重悬细胞; 加入 5 μl Annexin V-FITC, 轻轻混匀, 加入 10 μl PI 染色液轻轻混匀; 避光, 于 20 ~ 25 °C 条件下静置反应 20 min, 行流式细胞仪检测。

1.2.5 ELISA 法检测人 RPE 细胞中白细胞介素-1β 和肿瘤坏死因子-α 的含量 在光照不同时间后收集各组细胞上清液, 按照试剂盒说明书进行操作, 用自动酶标分析仪在 450 nm 单波长下读取细胞中白细胞介素 (interleukin, IL)-1β 和肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)-α 吸光度 (A 值), 根据标准品 A 值, 应用 Curve Expert 1.3 软件绘制标准曲线, 分别计算细胞上清液中 IL-1β 和 TNF-α 的质量浓度。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 法检测目标基因的相对表达量 按照分组在不同时间点收集细胞, 按照试剂盒说明提取各组细胞总 RNA。根据逆转录试剂盒说明书对提取的 ATF-6、caspase-12 的 mRNA 进行逆转录, 引物序列见表 1。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 10 s; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 60 s, 共 50 个循环。每个循环结束后采集荧光信号, 绘制溶解曲线, 以 β-actin 为内参照, 采用 2^{-ΔΔCt} 计算各目的基因的相对表达量。实验重复至少 3 次, 取平均值。

表 1 目的基因引物序列

基因名称	探针引物序列 (5' - 3')	产物长度 (bp)
ATF-6	F: TCGCCTTTTAGTCCGGTTCCT R: GGCTCCATAGGCTGACTCC	190
CHOP	F: CTCGCTCTCCAGATTCCAGTC R: CTTTCATGCGTTGCTTCCCA	125
caspase-12	F: GCCCTCATCATCTGCAACAA R: TGCTTCACCCACAGATTCC	251
β-actin	F: GGCTGTATTCCCCTCCATCG R: CCAGTTGGTAAACAATGCCATGT	154

注: F: 上游序列; R: 下游序列; ATF: 活化转录因子; CHOP: C/增强结合蛋白同源蛋白; caspase: 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶

1.2.7 Western bolt 法检测各目的蛋白表达量 收集各组细胞, 用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, BCA 法检测蛋白浓度, -70 °C 保存备用。SDS-PAGE 电泳分离蛋白样本, 采用质量分数 5% 积层胶和质量分数 12% 分离胶, 电转印法将电泳条带转移到 PVDF 膜, 并以封

闭液室温封闭 2 h; 分别加入各种特异性一抗工作液 (1:500), 4 °C 过夜, 用含 Tween20 的 PBS 冲洗, 加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗, 37 °C 孵育 1 h。ECL 化学发光法显色, 采用 Touching 凝胶成像系统分析条带灰度值, 以 β -actin 作为内参照。实验重复至少 3 次, 取平均值。蛋白表达量 = 目的蛋白/ β -actin。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件 (美国 IBM 公司) 进行统计分析。本研究中各检测指标的数据资料经 W 检验呈正态分布, 均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间数据资料经 Levene 检验证实方差齐 (均 $P > 0.05$)。采用均衡分组单因素干预多水平研究设计, 正常对照组及光照 3、6、12 和 24 h 组间以及正常对照组、光照组和 4-PBA 预处理+光照组间人 RPE 细胞凋亡率、细胞上清液中 IL-1 β

和 TNF- α 质量浓度、细胞中 ATF-6、CHOP 和 caspase-12 mRNA 及其蛋白相对表达量的总体差异比较均采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。采用双尾检测法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 光损伤模型细胞的形态学表现

正常培养的 RPE 细胞呈多边形贴壁生长, 边界清晰, 细胞质内均匀分布有色素颗粒, 细胞融合时呈铺路石样排列; 光照 3 h 细胞形态未见明显改变; 光照 6 h, 细胞呈长梭形改变, 边界不清, 细胞质内色素颗粒分布不均, 部分脱色素, 失去铺路石样排列特性, 且细胞碎片增多; 光照 12 h、24 h 细胞损伤随着时间的延长逐渐加重 (图 1)。

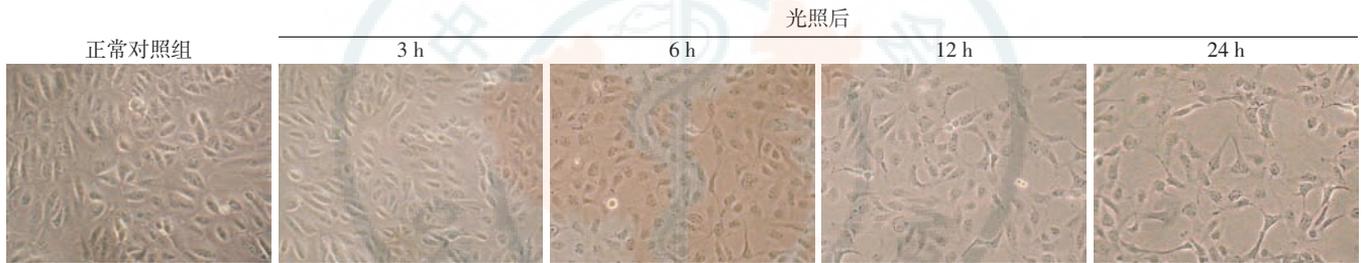


图 1 光照不同时间人 RPE 细胞形态的变化 ($\times 100$) 正常对照组中正常培养的人 RPE-19 细胞呈多边形, 细胞质中含有色素颗粒; 光照后 6 h 组细胞呈长梭形改变, 边界不清, 细胞质脱色素, 且随光照时间延长而加重

2.2 各组细胞中 ROS 含量

正常对照组及光照后 3、6、12 和 24 h 组细胞内 ROS 含量分别为 56.69 ± 10.22 、 237.25 ± 22.59 、 496.13 ± 38.27 、 814.69 ± 47.35 和 1257.54 ± 56.11 , 总体比较差异有统计学意义 ($F = 763.00, P = 0.00$)。光照后 3 h 组细胞内 ROS 含量开始增加, 光照后 6、12 和 24 h 组细胞内 ROS 含量随着时间延长逐渐增加, 均明显高于正常对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$) (图 2)。

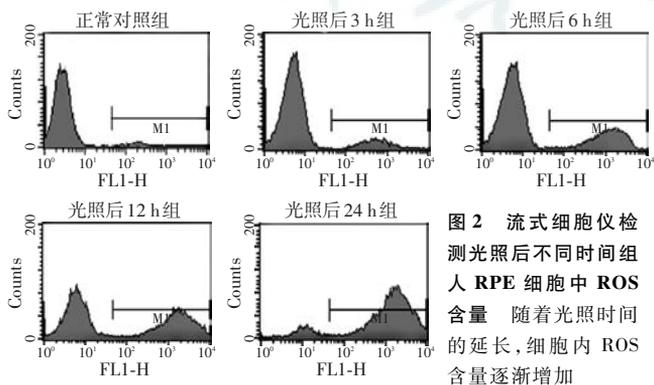


图 2 流式细胞仪检测光照后不同时间组人 RPE 细胞中 ROS 含量 随着光照时间的延长, 细胞内 ROS 含量逐渐增加

12 和 24 h 组细胞凋亡率分别为 $(5.12 \pm 0.60)\%$ 、 $(6.73 \pm 0.95)\%$ 、 $(11.42 \pm 2.51)\%$ 、 $(14.97 \pm 1.65)\%$ 和 $(24.10 \pm 1.32)\%$, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 119.30, P = 0.00$)。与正常对照组相比, 光照后 3 h 组细胞凋亡率轻度增加, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 光照后 6、12 和 24 h 组细胞凋亡率均明显增加, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$) (图 3)。

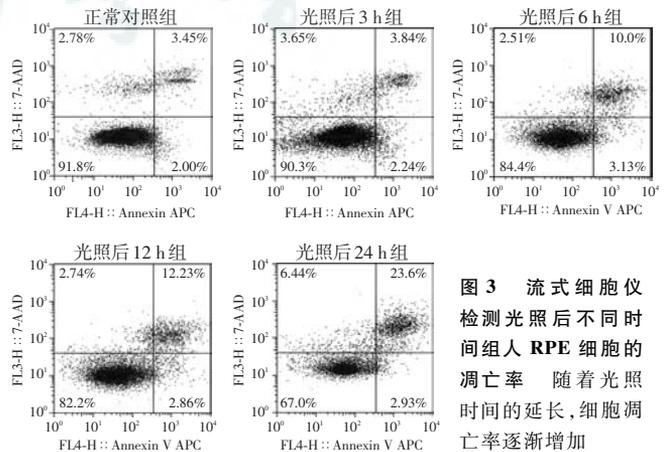


图 3 流式细胞仪检测光照后不同时间组人 RPE 细胞的凋亡率 随着光照时间的延长, 细胞凋亡率逐渐增加

2.3 各组 RPE 细胞的凋亡率

流式细胞仪检测显示, 正常对照组及光照后 3、6、

2.4 各组 RPE 细胞上清液中 IL-1 β 和 TNF- α 质量浓度变化

正常对照组及光照后 3、6、12 和 24 h 组 RPE 细胞上清液中 IL-1 β 质量浓度总体比较差异有统计学意义 ($F=186.57, P=0.00$), 其中与正常对照组和光照后 3 h 组比较, 光照后 6、12 和 24 h 组细胞上清液中 IL-1 β 质量浓度均明显升高, 光照后 12 h 和 24 h 组细胞上清液中 IL-1 β 质量浓度均明显高于光照后 6 h 组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.01$)。各组间人 RPE 细胞上清液中 TNF- α 质量浓度的总体比较差异有统计学意义 ($F=62.18, P=0.00$), 其中光照后 3、6、12 和 24 h 组细胞上清液中 TNF- α 质量浓度均明显高于正常对照组, 且随着光照时间的延长, 细胞上清液中 TNF- α 质量浓度均逐渐增加, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$)。光照后 24 h 组细胞上清液中 IL-1 β 和 TNF- α 质量浓度较光照后 12 h 组均增加, 但差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$) (表 2)。

表 2 各组人 RPE 细胞上清液中 IL-1 β 和 TNF- α 质量浓度的比较 ($\bar{x}\pm s, \text{ng/L}$)

组别	样本量	IL-1 β	TNF- α
正常对照组	5	24.56 \pm 4.33	34.51 \pm 4.45
光照后 3 h 组	5	33.24 \pm 5.25	42.67 \pm 7.21 ^a
光照后 6 h 组	5	97.68 \pm 7.79 ^{ab}	82.67 \pm 9.00 ^{ab}
光照后 12 h 组	5	115.68 \pm 9.66 ^{abc}	96.48 \pm 9.87 ^{ab}
光照后 24 h 组	5	124.96 \pm 9.83 ^{abc}	108.67 \pm 13.56 ^{abc}
F 值		186.57	62.18
P 值		0.00	0.00

注:与各自的正常对照组比较,^a $P<0.01$;与光照后 3 h 组比较,^b $P<0.01$;与光照后 6 h 组比较,^c $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验) RPE:视网膜色素上皮;IL:白细胞介素;TNF:肿瘤坏死因子

2.5 各组人 RPE 细胞 ERS 相关基因和蛋白表达量变化

2.5.1 光照后不同时间组 ERS 相关基因 mRNA 的表达变化 实时荧光定量 PCR 检测显示, 正常对照组及光照后 3、6、12 和 24 h 组间 RPE 细胞中 ATF-6、CHOP 和 caspase-12 mRNA 相对表达量的总体比较差异均有统计学意义 ($F=178.82, 276.71, 195.19$, 均 $P<0.01$), 其中与正常对照组比较, ATF-6 mRNA 的表达在光照后 3 h 组开始增加, 光照后 12 h 组表达达峰值, 光照后 24 h 维持高表达, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$); CHOP mRNA 和 caspase-12 mRNA 相对表达量在光照后 3 h 组均稍有增加, 但与正常对照组比较差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$), 光照后 6 h 组细胞中 CHOP mRNA 和 caspase-12 mRNA 相对表达量开始增加, 光照后 12 h 达峰, 光照后 24 h 维持高表达, 与正常对照

组比较差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$) (表 3)。

表 3 各组人 RPE 中 ATF-6、CHOP 和 caspase-12 mRNA 相对表达量的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	ATF-6 mRNA	CHOP mRNA	caspase-12 mRNA
正常对照组	5	2.26 \pm 0.13	1.00 \pm 0.08	1.68 \pm 0.11
光照后 3 h 组	5	3.74 \pm 0.21 ^a	1.22 \pm 0.23	2.05 \pm 0.13
光照后 6 h 组	5	4.24 \pm 0.32 ^{ab}	3.12 \pm 0.31 ^{ab}	4.02 \pm 0.24 ^{ab}
光照后 12 h 组	5	6.32 \pm 0.45 ^{abc}	5.13 \pm 0.22 ^{abc}	4.95 \pm 0.32 ^{abc}
光照后 24 h 组	5	6.49 \pm 0.29 ^{abc}	5.36 \pm 0.26 ^{abc}	5.05 \pm 0.37 ^{abc}
F 值		178.82	276.71	195.19
P 值		0.00	0.00	0.00

注:与各自的正常对照组比较,^a $P<0.01$;与光照后 3 h 组比较,^b $P<0.05$;与光照后 6 h 组比较,^c $P<0.01$ (单因素方差分析, LSD- t 检验) RPE:视网膜色素上皮;ATF:活化转录因子;CHOP:C/增强结合蛋白同源蛋白;caspase:半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶

2.5.2 不同时间组人 RPE 细胞中 ERS 相关蛋白的表达变化 Western blot 法检测显示, RPE 细胞中 ATF-6、CHOP 和 caspase-12 蛋白的表达条带随着光照时间的延长均逐渐增强 (图 4)。正常对照组及光照后 3、6、12 和 24 h 组间 RPE 细胞内质网中 ATF-6、CHOP 和 caspase-12 蛋白相对表达量的总体比较差异均有统计学意义 ($F=71.74, 97.60, 37.12$, 均 $P<0.01$), ATF-6、CHOP 和 caspase-12 蛋白在正常对照组细胞内质网中均呈弱表达, 光照后随着时间的延长, ATF-6、CHOP 和 caspase-12 蛋白相对表达量均逐渐增加。与正常对照组比较, 光照后 3 h 组细胞内质网内 ATF-6、CHOP 和 caspase-12 蛋白相对表达量均少量增加, 但差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$); 光照后 6 h 组细胞中 ATF-6 蛋白的相对表达量明显增加, 之后随光照时间的延长细胞内质网中 ATF-6 蛋白相对表达量逐渐增加; CHOP 及 caspase-12 蛋白在光照后 12 h 和 24 h 组表达量均明显高于光照后 6 h 组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.01$) (表 4)。

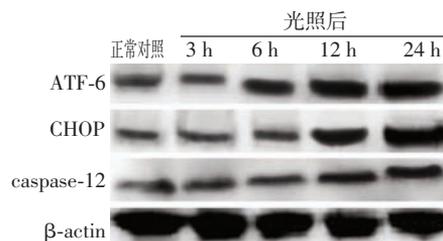


图 4 Western blot 法检测各组人 RPE 细胞内质网中 ATF-6、CHOP 和 caspase-12 蛋白表达 随着光照时间的延长, 各组人 RPE 细胞内质网中 ATF-6、CHOP 和 caspase-12 蛋白的表达条带均逐渐增强 ATF: 活化转录因子; CHOP: C/增强结合蛋白同源蛋白; caspase: 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶

表 4 各组人 RPE 细胞中 ATF-6、CHOP 和 caspase-12 蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	ATF-6	CHOP	caspase-12
正常对照组	5	0.37±0.02	0.29±0.02	0.31±0.02
光照后 3 h 组	5	0.38±0.03	0.35±0.03	0.33±0.02
光照后 6 h 组	5	0.57±0.06 ^{ab}	0.43±0.06 ^a	0.34±0.03 ^a
光照后 12 h 组	5	0.83±0.09 ^{abc}	0.81±0.09 ^{abc}	0.43±0.05 ^{abc}
光照后 24 h 组	5	0.86±0.08 ^{abc}	0.85±0.07 ^{abc}	0.57±0.06 ^{abc}
F 值		1.74	97.60	37.12
P 值		0.00	0.00	0.00

注:与各自正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与光照后 3 h 组比较,^b $P < 0.01$;与光照后 6 h 组比较,^c $P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) RPE:视网膜色素上皮;ATF:活化转录因子;CHOP:C/增强结合蛋白同源蛋白;caspase:半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶

2.6 ERS 抑制剂 4-PBA 对光照诱导的 RPE 细胞损伤的保护作用

2.6.1 4-PBA 对光照诱导的 RPE 细胞 ERS 的抑制作用

荧光定量 PCR 法检测结果显示,光照后可引起人 RPE 细胞中 ATF-6、CHOP 和 caspase-12 mRNA 的表达上调,正常对照组、光照组和 4-PBA 预处理+光照组人 RPE 细胞中 ATF-6、CHOP 和 caspase-12 mRNA 相对表达量总体比较差异均有统计学意义($F = 281.69$ 、 473.88 、 308.45 , 均 $P < 0.01$),光照组人 RPE 细胞中 ATF-6、CHOP 和 caspase-12 mRNA 的相对表达量均明显高于正常对照组和 4-PBA 预处理+光照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$),4-PBA 预处理+光照组间人 RPE 细胞中 ATF-6、CHOP 和 caspase-12 mRNA 相对表达量稍高于正常对照组,但差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)(表 5)。Western bolt 法检测显示,各组间人 RPE 细胞中 ATF-6、CHOP 和 caspase-12 蛋白表达量明显不同,以光照组最高,组间总体比较差异均有统计学意义($F = 47.86$ 、 57.93 、 106.59 , 均 $P < 0.01$),各组间 RPE 细胞中 ATF-6、CHOP 和 caspase-12 蛋白表达量变化趋势与其基因表达趋势相同(图 5,表 6)。

表 5 各组人 RPE 细胞中 ATF-6、CHOP 和 caspase-12 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	ATF-6 mRNA	CHOP mRNA	caspase-12 mRNA
正常对照组	5	2.31±0.12	1.05±0.09	1.62±0.12
光照组	5	6.40±0.42 ^a	5.22±0.35 ^a	4.98±0.33 ^a
4-PBA 预处理+光照组	5	2.64±0.29 ^b	1.26±0.21 ^b	1.75±0.23 ^b
F 值		281.69	473.88	308.45
P 值		0.00	0.00	0.00

注:与各自的正常对照组比较,^a $P < 0.01$;与光照组比较,^b $P < 0.01$ (单因素方差分析, Dunnett *t* 检验) RPE:视网膜色素上皮;ATF:活化转录因子;CHOP:C/增强结合蛋白同源蛋白;caspase:半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶;PBA:苯基丁酸

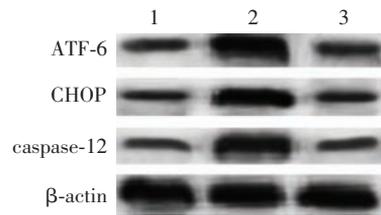


图 5 Western blot 法检测各组人 RPE 细胞内质网中 ATF-6、CHOP 和 caspase-12 蛋白表达 光照组人 RPE 细胞内质网中 ATF-6、CHOP 和 caspase-12 蛋白表达条带均强于正常对照组和 4-PBA 预处理+光照组,光照组与 4-PBA 预处理+光照组间 ATF-6、CHOP 和 caspase-12 蛋白表达条带强度接近 1:正常对照组 2:光照组 3:4-PBA 预处理+光照组 ATF:活化转录因子;CHOP:C/增强结合蛋白同源蛋白;caspase:半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶

表 6 各组人 RPE 细胞内质网中 ATF-6、CHOP 和 caspase-12 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	ATF-6	CHOP	caspase-12
正常对照组	5	0.46±0.05	0.31±0.03	0.28±0.02
光照组	5	0.86±0.08 ^a	0.62±0.06 ^a	0.69±0.07 ^a
4-PBA 预处理+光照组	5	0.55±0.07 ^b	0.37±0.05 ^b	0.34±0.04 ^b
F 值		47.86	57.93	106.59
P 值		0.00	0.00	0.00

注:与各自的正常对照组比较,^a $P < 0.01$;与光照组比较,^b $P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) RPE:视网膜色素上皮;ATF:活化转录因子;CHOP:C/增强结合蛋白同源蛋白;caspase:半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶;PBA:苯基丁酸

2.6.2 各组 RPE 细胞凋亡率比较

流式细胞仪检测显示,正常对照组、光照组和 4-PBA 预处理+光照组细胞凋亡率分别为(5.23±0.73)%、(15.03±1.69)%和(6.62±1.17)%,组间总体比较差异有统计学意义($F = 88.64$, $P < 0.01$)。与正常对照组和 4-PBA 预处理+光照组比较,光照组细胞凋亡率明显增加,差异均有统计学意义($t = 17.40$ 、 14.93 , 均 $P < 0.01$);4-PBA 预处理+光照组细胞凋亡率接近正常对照组,差异无统计学意义($t = 2.46$, $P > 0.05$)(图 6)。

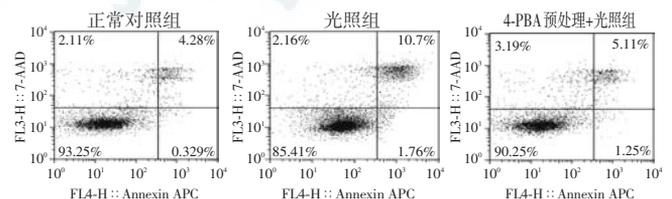


图 6 流式细胞仪检测正常对照组、光照组及 4-PBA 预处理+光照组人 RPE 细胞凋亡率 与正常对照组和 4-PBA 预处理+光照组比较,光照组细胞凋亡率均明显增加,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);4-PBA 预处理+光照组细胞凋亡率接近正常对照组,差异无统计学意义($P > 0.05$)(LSD-*t* 检验) PBA:苯基丁酸

2.6.3 各组人 RPE 细胞上清液中 IL-1 β 和 TNF- α 质量浓度变化

ELISA 法检测显示,光照可导致 RPE 细胞分泌炎症因子增加,正常对照组、光照组和 4-PBA

预处理+光照组细胞上清液中 IL-1 β 和 TNF- α 质量浓度总体比较差异均有统计学意义 ($F=245.47, 101.01$, 均 $P<0.01$), 与正常对照组和 4-PBA 预处理+光照组比较, 光照组人 RPE 细胞上清液中 IL-1 β 、TNF- α 质量浓度明显增加, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.01$), 4-PBA 预处理+光照组细胞上清液中 IL-1 β 和 TNF- α 质量浓度稍高于正常对照组, 但差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$) (表 7)。

表 7 各组人 RPE 细胞上清液中 IL-1 β 和 TNF- α 质量浓度比较 ($\bar{x}\pm s$, ng/L)

组别	样本量	IL-1 β	TNF- α
正常对照组	5	27.63 \pm 4.30	38.25 \pm 4.60
光照组	5	120.35 \pm 10.79 ^a	97.78 \pm 9.81 ^a
4-PBA 预处理+光照组	5	35.22 \pm 5.20 ^b	44.25 \pm 6.49 ^b
<i>F</i> 值		245.47	101.01
<i>P</i> 值		0.00	0.00

注: 与各自的正常对照组比较, ^a $P<0.01$; 与光照组比较, ^b $P<0.01$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) RPE: 视网膜色素上皮; IL: 白细胞介素; TNF: 肿瘤坏死因子; PBA: 苯基丁酸

3 讨论

随着手机、计算机等电子产品在大众工作和生活过程中的广泛应用和眼科光学诊疗器械的大量使用, 光照诱导视网膜损伤的风险逐渐增加。研究发现, 光暴露所产生的光化学性损害所导致的视网膜组织病理学改变与年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 相似^[1], 且长期光照能诱导 RPE 细胞或感光细胞的炎症反应和凋亡, 造成视网膜, 尤其是黄斑部的光化学损伤, 从而导致视网膜功能异常和视力丧失^[8], 本研究也证实, 光照后 6 h 人 RPE 细胞凋亡率及炎症因子的释放明显增加, 细胞的损伤程度呈时间依赖性。

内质网内稳态失调或功能紊乱可导致蛋白质的错误折叠以及未折叠蛋白在腔内聚集引起内质网平衡紊乱的状态称为 ERS。ERS 是细胞的一种自我保护性机制, 可提高细胞在有害因素下的生存能力, 表现为蛋白质合成减弱甚至暂时停滞、内质网伴侣蛋白表达上调和细胞凋亡等, 这些表现包括未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR)、整合应激反应和内质网相关性降解 (ER-associated degradation, ERAD) 之间相互关联的动态过程中^[9]。

ATF-6 是真核细胞内质网膜上的 II 型跨膜蛋白, 由 670 个氨基酸组成, 有 ATF-6 α 和 ATF-6 β 2 种构型^[10]。ERS 诱导 ATF-6 与葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein 78, GRP78) 解离后转运入高

尔基体, 水解为活性片断, 进而发挥自身活性。ATF-6 裂解后运送到细胞核, 在 ERAD 和细胞凋亡中发挥重要作用^[11]。本研究中, 光照后 6 h 人 RPE 细胞中 ATF-6 蛋白表达量明显升高, 可以认为是 ERS 开始启动, 但随着光化学损伤的进展, 过度的 ERS 在调控 ATF-6 的同时损伤内质网的功能, ATF-6 诱导 ERS 基因的转录, 光照后 12 h ERS 启动激活的下游凋亡相关调控因子 CHOP^[12] 表达升高, 验证了文献^[13] 报道的过度 ERS 可诱导细胞中 CHOP 高表达, 并导致细胞凋亡的现象。

本研究中发现, ERS 介导的凋亡信号通路启动后可使 caspase-12 定位于内质网的外膜。Caspase-12 是 ERS 进入凋亡途径的关键蛋白酶, 产生于内质网, 并仅在 ERS 时被活化, 因此 caspase-12 是 ERS 介导凋亡途径的特异分子^[14]。本研究发现, 光照后 12 h 人 RPE 细胞中 caspase-12 蛋白的表达明显增加, 这可能是 ATF-6 信号通路启动了 ERS 特有的下游凋亡信号分子 caspase-12 的激活所致^[15], 总之长期过强的 ERS 可以引起细胞凋亡^[16], 同时本研究中应用 ERS 抑制剂 4-PBA 预处理 RPE 后再对细胞光照 12 h, 发现细胞中 ATF-6、CHOP 和 caspase-12 表达均明显低于单纯光照的细胞, 进一步证实 ERS 反应促进光照诱导的人 RPE 细胞凋亡。

RPE 细胞是人眼主要的炎症因子来源, 调控局部的炎症反应及血管生成。IL- β 和 TNF- α 是重要的促炎因子, 产生于炎症的起始阶段, 并促使相关炎症细胞分泌更多的促炎因子^[17-18], 这与本研究中发现的光照后 6 h 细胞上清液中 IL- β 和 TNF- α 质量浓度即明显增高的结果相符。研究表明, 炎症介质的表达水平与 ERS 程度呈正相关, 未折叠蛋白反应和炎症中的信号通路通过各种机制相互关联, 包括 ROS 的产生和激活各种炎症因子的激活, 从而导致细胞 ERS 反应和自由基的相互促进, 引发炎症过程及细胞凋亡^[19]。氧自由基的增加是触发 ERS 的因素之一^[6], 大量活性氧自由基的累积引起的氧化应激反应也可诱导光损伤后 RPE 细胞的凋亡^[20], 本研究中, 光照刺激引发 ROS 的生成, 诱导氧化应激反应, 光照后 6 h 细胞中 ER 标志物 ATF-6 的大幅增加启动 ERS 反应, 表明光照刺激通过氧化应激诱导 ERS 反应。因此炎症介质的参与、氧化应激反应与 ERS 反应共同参与光化学损伤过程, 并最终诱导 RPE 细胞凋亡。

综上所述, 本研究从光损伤的角度探讨 ERS 反应在人 RPE 细胞凋亡中的作用, 一定程度上为视网膜光损伤相关病变的病理改变及其机制提供了实验依据。

本研究仅对白色荧光灯对 RPE 细胞的损害作用进行研究,后续的相关工作将探讨不同波长的光线对 RPE 的损伤作用,并进一步观察光损伤后 RPE 细胞的超微结构和形态学改变,进一步验证本研究的结果。

参考文献

- [1] Izawa H, Inoue Y, Ohno Y, et al. Protective effects of antiplacental growth factor antibody against light-induced retinal damage in mice[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015, 56(11): 6914-6924. DOI:10.1167/iov.15-16748.
- [2] Okano K, Maeda A, Chen Y, et al. Retinal cone and rod photoreceptor cells exhibit differential susceptibility to light-induced damage[J]. J Neurochem, 2012, 121(1): 146-156. DOI:10.1111/j.1471-4159.2012.07647.x.
- [3] 姜文静,赵颖,牛膺筠.促红细胞生成素对光损伤后视网膜色素上皮层基质金属蛋白酶表达的影响[J].中华实验眼科杂志,2012,30(11):999-1003. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.11.009.
Jiang WJ, Zhao Y, Niu YJ. Influence of erythropoietin on expression of matrix metalloproteinases in retinal pigment epithelium with photic injury[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2012, 30(11): 999-1003. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.11.009.
- [4] Zhang K, Kaufman RJ. The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease[J]. Neurology, 2006, 66(2 Suppl 1): S102-109. DOI:10.1212/01.wnl.0000192306.98198.ec.
- [5] Ermilov VV, Nesterova AA. β -amyloidopathy in the pathogenesis of age-related macular degeneration in correlation with neurodegenerative diseases[J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 854: 119-125. DOI:10.1007/978-3-319-17121-0_17.
- [6] Feng J, Chen X, Sun X, et al. Expression of endoplasmic reticulum stress markers GRP78 and CHOP induced by oxidative stress in blue light-mediated damage of A2E-containing retinal pigment epithelium cells[J]. Ophthalmic Res, 2014, 52(4): 224-233. DOI:10.1159/000363387.
- [7] 孟岩,牛膺筠,曲虹,等.rhEPO对光损伤诱导的RPE细胞Caspase-3表达的作用[J].眼科研究,2007,25(6):404-407.
Meng Y, Niu YJ, Qu H, et al. Effect of recombinant human erythropoietin on caspase-3 expression in light-injured human RPE cells[J]. Chin Ophthalmic Res, 2007, 25(6): 404-407.
- [8] Bailey TA, Kanuga N, Romero IA, et al. Oxidative stress affects the junctional integrity of retinal pigment epithelial cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45(2): 675-684.
- [9] Sundar RS, Srinivasan V, Balasubramanyam M, et al. Endoplasmic reticulum (ER) stress & diabetes[J]. Indian J Med Res, 2007, 125(3): 411-424.
- [10] Yamamoto K, Sato T, Matsui T, et al. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1[J]. Dev Cell, 2007, 13(3): 365-376. DOI:10.1016/j.devcel.2007.07.018.
- [11] Zhang SX, Sanders E, Fliesler SJ, et al. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein responses in retinal degeneration[J]. Exp Eye Res, 2014, 125: 30-40. DOI:10.1016/j.exer.2014.04.015.
- [12] 关丽英,许彩民,潘华珍.内质网应激介导的细胞凋亡[J].生物化学与生物物理进展,2007,34(11):1136-1141.
Guan LY, Xu CM, Pan HZ. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis[J]. Prog Biochem Biophys, 2007, 34(11): 1136-1141.
- [13] Li P, Zhang L, Zhang M, et al. Uric acid enhances PKC-dependent eNOS phosphorylation and mediates cellular ER stress; a mechanism for uric acid-induced endothelial dysfunction[J]. Int J Mol Med, 2016, 37(4): 989-997. DOI:10.3892/ijmm.2016.2491.
- [14] Bitko V, Barik S. An endoplasmic reticulum-specific stress-activated caspase (caspase-12) is implicated in the apoptosis of A549 epithelial cells by respiratory syncytial virus[J]. J Cell Biochem, 2001, 80(3): 441-454.
- [15] Li RJ, He KL, Li X, et al. Salubrinal protects cardiomyocytes against apoptosis in a rat myocardial infarction model via suppressing the dephosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 α [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(1): 1043-1049. DOI:10.3892/mmr.2015.3508.
- [16] Momoi T. Caspases involved in ER stress-mediated cell death[J]. J Chem Neuroanat, 2004, 28(1-2): 101-105. DOI:10.1016/j.jchemneu.2004.05.008.
- [17] 宋宗明,惠延年,瞿佳,等.白介素1受体拮抗剂抑制视网膜色素上皮细胞炎症因子的表达[J].中华眼底病杂志,2002,18(1):49-51.
Song ZM, Hui YN, Qu J, et al. Interleukin 1 receptor antagonist inhibits proinflammatory factor production by human retinal pigment epithelial cells in vitro[J]. Chin J Ocul Fund Dis, 2002, 18(1): 49-51.
- [18] 丘创华,侯敢,黄迪南.TNF- α 信号传导通路的分子机理[J].中国生物化学与分子生物学报,2007,23(6):430-435.
Qiu CH, Hou G, Huang DN. Molecular mechanism of TNF- α signal transduction[J]. Chin J Biochem Mol Bio, 2007, 23(6): 430-435.
- [19] Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, et al. ER stress-induced inflammation: does it aid or impede disease progression? [J]. Trends Mol Med, 2012, 18(10): 589-598. DOI:10.1016/j.molmed.2012.06.010.
- [20] 邹秀兰,俞永珍,徐哲,等.蓝光诱导的人视网膜色素上皮细胞的氧化损伤及其线粒体机制[J].中华实验眼科杂志,2015,33(2):129-134. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.02.007.
Zou XL, Yu YZ, Xu Z, et al. Oxidative damage of human retinal pigment epithelium cells induced by blue light irradiation and mitochondria-participated mechanism[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2015, 33(2): 129-134. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.02.007.

(收稿日期:2016-09-10)

(本文编辑:尹卫靖)

读者·作者·编者

本刊征稿启事

《中华实验眼科杂志》是由中国科学技术协会主管、中华医学会主办、河南省立眼科医院 河南省眼科研究所承办的眼科专业学术期刊,月刊,每月10日出版。本刊的报道范围主要为眼科基础和临床研究领域领先的科研成果,主要栏目设有专家述评、实验研究、临床研究、调查研究、综述、病例报告等,学术内容涉及眼科疾病的基因学研究、基因诊断和基因靶向治疗、眼科遗传学研究、分子生物学研究、眼科微生物学研究、眼科药理学研究、眼科生物材料研究、眼科表观遗传研究、眼科疾病的动物模型、眼科疾病的流行病学研究、眼科疾病的多中心或单中心随机对照临床试验、循证医学临床实践及眼科疾病的临床研究等。本刊拟刊出海外学者的中文或英文原创性论文或评述类文章,欢迎国内外眼科研究人员踊跃投稿。

(本刊编辑部)