

· 实验研究 ·

ROS/NLRP3/Caspase-1 信号通路在高糖诱导视网膜色素上皮细胞凋亡中的作用

李宏松¹ 李蓉² 王丽君¹ 廖丁莹¹ 王建明¹

¹西安交通大学第二附属医院眼科 710004; ²西安医学院第一附属医院眼科 710077

通信作者:王建明, Email: xajdwjm@163.com

【摘要】 **目的** 探讨核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族含 Pyrin 结构域蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体在高糖诱导人视网膜色素上皮细胞 ARPE-19 增生及凋亡中的作用及机制。 **方法** 将体外培养的 ARPE-19 细胞分为正常对照组和高糖组, 分别用常规培养液和含终浓度 30 mmol/L 葡萄糖培养液培养 48 h, 采用荧光探针检测各组细胞活性氧簇 (ROS) 含量, 采用生物化学检验法检测超氧化物歧化酶 (SOD) 活力值及丙二醛 (MDA) 浓度。取正常对照组和高糖组细胞分别加入 0、2、5、10、15 和 20 $\mu\text{mol/L}$ NLRP3 抑制剂 CY-09 培养 48 h, 采用细胞计数试剂盒 8 (CCK-8) 检测细胞的增生率, 选取 CY-09 作用的适宜浓度。将细胞分为正常对照组、正常+CY-09 组、高糖组和高糖+CY-09 组, 其中正常+CY-09 组和高糖+CY-09 组细胞培养液中添加 15 $\mu\text{mol/L}$ CY-09 进行培养, 采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率, 采用 Western blot 法检测各组 NLRP3、凋亡相关点状蛋白 (ASC)、半胱氨酸蛋白酶 1 前体 (pro-Caspase-1) 及活化片段 (cleaved-Caspase-1), 凋亡相关蛋白 B 淋巴细胞瘤 2 (Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、半胱氨酸蛋白酶 3 前体 (pro-Caspase-3) 及活化片段 (cleaved-Caspase-3) 的相对表达量。 **结果** 高糖组细胞中 ROS 荧光强度值为 120.020 ± 3.245 , MDA 浓度为 $(4.92 \pm 0.09) \text{ nmol/mg}$, 明显高于正常对照组的 35.426 ± 8.11 和 $(1.78 \pm 0.03) \text{ nmol/mg}$, 高糖组细胞中 SOD 活力值为 $(35.65 \pm 1.22) \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$, 明显低于正常对照组的 $(74.96 \pm 1.41) \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$, 差异均有统计学意义 ($t = 35.760, 46.960, 29.830$, 均 $P < 0.05$)。高糖组细胞增生率明显低于正常对照组, 差异有统计学意义 ($t = 18.820, P < 0.05$)。高糖组中随着 CY-09 浓度的增加细胞增生率逐渐升高, 其中 10、15 和 20 $\mu\text{mol/L}$ CY-09 处理细胞的增生率明显高于 0 $\mu\text{mol/L}$ CY-09 处理细胞, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 正常对照组中 15 $\mu\text{mol/L}$ CY-09 处理细胞与 0 $\mu\text{mol/L}$ CY-09 处理细胞的增生率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。高糖组细胞凋亡率为 $(21.68 \pm 0.41)\%$, 明显高于正常对照组的 $(6.67 \pm 1.05)\%$ 和高糖+CY-09 组的 $(13.96 \pm 0.07)\%$, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。高糖组 NLRP3、ASC、cleaved-Caspase-1、cleaved-Caspase-3 和 Bax 蛋白相对表达量较正常对照组明显升高, Bcl-2 蛋白相对表达量较正常对照组明显下降, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 正常+CY-09 组和高糖+CY-09 组与正常对照组和高糖组比较, NLRP3、ASC、cleaved-Caspase-1、Bax、cleaved-Caspase-3 蛋白相对表达量下降, Bcl-2 蛋白相对表达量升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。 **结论** NLRP3 炎症小体通过 ROS/NLRP3/Caspase-1 信号通路介导了体外高糖环境诱导 RPE 细胞的凋亡过程。

【关键词】 氧化应激; 炎症小体; 核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族含 Pyrin 结构域蛋白 3; 高糖; 视网膜色素上皮

基金项目: 陕西省重点研发计划项目 (2018ZDXM-SF-045); 西安市科技计划项目 [2017116SF/YX010 (10)]

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210420-00267

Effect of ROS/NLRP3/Caspase-1 signaling pathway on the apoptosis of retinal pigment epithelial cells induced by high glucose

Li Hongsong¹, Li Rong², Wang Lijun¹, Liao Dingying¹, Wang Jianming¹

¹Department of Ophthalmology, The Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China; ²Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an 710077, China
Corresponding author: Wang Jianming, Email: xajdwjm@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of the nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing 3 (NLRP3) inflammasome on the proliferation and apoptosis of human retinal pigment epithelial cell line ARPE-19 exposed to high glucose and its mechanism. **Methods** ARPE-19 cells cultured *in vitro* were divided into normal control group and high-glucose group, and were cultured in conventional medium and medium containing 30 mmol/L glucose for 48 hours, respectively. The content of reactive oxygen species

(ROS) were detected by fluorescent probe, and the activity of superoxide dismutase (SOD) and the concentration of malondialdehyde (MDA) were tested by biochemical assay. The cells of the two groups were cultured with 0, 2, 5, 10, 15 and 20 $\mu\text{mol/L}$ NLRP3 inhibitor CY-09 for 48 hours, respectively. The proliferation rate of ARPE-19 cells under various concentrations of CY-09 treatment was detected by cell counting kit-8, and the appropriate concentration of CY-09 was determined. ARPE-19 cells were divided into normal control group, normal+CY-09 group, high-glucose group and high glucose+CY-09 group. The culture medium in the normal+CY-09 group and high glucose+CY-09 group was supplemented with 15 $\mu\text{mol/L}$ CY-09. Flow cytometry was used to detect the apoptosis rate of each group, and Western blot was used to detect the relative expression levels of NLRP3, apoptosis-associated point protein (ASC), Caspase-1 precursor (pro-Caspase-1) and active fragments (cleaved-Caspase-1), B lymphocytoma-2 protein (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), Caspase-3 precursor (pro-Caspase-3) and active fragments (cleaved-Caspase-3). **Results** The intensity of ROS fluorescence and MDA concentration were $120\ 020\pm 3\ 245$, (4.92 ± 0.09) nmol/mg in the high-glucose group, which were both significantly higher than $35\ 426\pm 811$ and (1.78 ± 0.03) nmol/mg in the normal control group, and the SOD activity was (35.65 ± 1.22) $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ in the high-glucose group, which was significantly lower than (74.96 ± 1.41) $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ in the normal control group, showing statistically significant differences between the two groups ($t=35.760, 46.960, 29.830$; all at $P<0.05$). The proliferation rate of RPE cells in high-glucose group was significantly lower than that in normal control group, and the difference was statistically significant ($t=18.820, P<0.05$). With the increase of CY-09 concentration, the proliferation rate of cells in the high-glucose group was gradually increased. The proliferation rates of cells treated with 10, 15 and 20 $\mu\text{mol/L}$ CY-09 were all significantly higher than those treated with 0 $\mu\text{mol/L}$ CY-09, showing statistically significant differences between them (all at $P<0.05$). The proliferation rates of cells treated with 15 $\mu\text{mol/L}$ and 0 $\mu\text{mol/L}$ CY-09 were not significantly different in the normal control group ($P>0.05$). The apoptosis rate of cells in the high-glucose group was (21.68 ± 0.41)%, which was significantly higher than (6.67 ± 1.05)% in the normal control group and (13.96 ± 0.07)% in the high-glucose+CY-09 group, and the differences were statistically significant (both at $P<0.05$). The relative expression levels of NLRP3, ASC, cleaved-Caspase-1, cleaved-Caspase-3 and Bax proteins were significantly higher and the relative expression levels of Bcl-2 protein were significantly lower in the high-glucose group compared with the normal control group, and the differences were statistically significant (all at $P<0.05$). The relative expression levels of NLRP3, ASC, the active fragment of cleaved-Caspase-1, Bax and cleaved-Caspase-3 proteins were decreased and the relative expression levels of Bcl-2 protein were increased in the normal+CY-09 group and high glucose+CY-09 group compared with the normal control group and high glucose group, and the differences were statistically significant (all at $P<0.05$). **Conclusions** NLRP3 inflammasome mediates the high glucose induced RPE cells apoptosis through ROS/NLRP3/Caspase-1 signaling pathway.

[Key words] Oxidative stress; Inflammasomes; NLR family, pyrin domain-containing 3 protein; High glucose; Retinal pigment epithelium

Fund program: Key Research and Development Project of Shaanxi Province (2018ZDXM-SF-045); Science and Technology Program of Xi'an (2017116SF/YX010 [10])

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20210420-00267

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病常见的眼部并发症之一,是一种与持续性高血糖相关的慢性、进行性、可致盲的视网膜微血管病变^[1]。研究表明,高血糖、氧化应激和慢性炎症是 DR 发生的重要机制^[2]。核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族含 Pyrin 结构域蛋白 3 (nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing 3, NLRP3)炎症小体是固有免疫的重要组分,是参与多种炎症相关疾病的关键因子,其能被活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)激活,并调控下游的炎症反应及细胞凋亡等病理生理过程^[3]。有研究显示,DR 患者玻璃体腔纤维增生膜中 NLRP3 高表达^[4]。视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞

是 DR 增生膜的重要细胞来源,位于神经视网膜和脉络膜之间,组成血-视网膜屏障,从而维持视网膜正常功能,而且 RPE 细胞具有清除自由基、分泌色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等活性物质的功能^[5]。RPE 细胞功能异常会导致血-视网膜屏障的破坏以及 PEDF 和 VEGF 分泌失衡,最终引起新生血管的产生,而且 RPE 细胞间紧密连接的破坏会引起细胞迁移和增生,最终参与增生膜的形成^[6]。因此,RPE 细胞在 DR 发生和发展中具有重要作用。目前,NLRP3 炎症小体在高糖诱导 RPE 细胞损伤中的作用及其机制尚不清楚。本研究拟探讨 NLRP3 炎症小体途径在高糖损伤 RPE 细胞中的作用

及机制,以期为 DR 的预防和治疗提供新靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 人 RPE 细胞株 ARPE-19 购自美国 ATCC 细胞库。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM/F12 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司);兔抗凋亡相关斑点样蛋白单克隆抗体(apoptosis associated speck-like protein containing CARD,ASC)(ab155970)、兔抗 Caspase-1 单克隆抗体(ab207802)(英国 Abcam 公司);兔抗 NLRP3 多克隆抗体(NBP2-12446)(美国 Novus Biologicals 公司);兔抗凋亡相关蛋白 B 淋巴瘤 2(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)多克隆抗体(3869)、兔抗 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)多克隆抗体(2772)、兔抗 Caspase-3 多克隆抗体(9662)(美国 CST 公司);兔抗磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)多克隆抗体(AB-P-R 001)(杭州贤至生物有限公司);NLRP3 抑制剂 CY-09(美国 Selleck 公司);细胞计数试剂盒 8(cell counting kit, CCK-8)(美国 MedChemExpress 公司);APC/7-AAD 细胞凋亡试剂盒(天津三箭生物技术股份有限公司);活性氧检测试剂盒、RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)及丙二醛(malondialdehyde, MDA)生化试剂盒(南京建成生物工程研究所)。CO₂ 恒温培养箱(日本 Sanyo 公司);倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);全自动酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司);电泳仪及电泳槽(北京六一仪器厂);室温低速离心机(德国 Eppendorf 公司);低温高速离心机(上海力康生物医疗科技公司)。

1.2 方法

1.2.1 高糖诱导 RPE 细胞损伤模型建立 取 ARPE-19 细胞株,用含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液,置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 恒温培养箱中培养。取处于对数生长期、生长状态良好的细胞分为正常对照组和高糖组,分别置于正常培养液和含终浓度 30 mmol/L 葡萄糖培养液中培养 48 h。

1.2.2 荧光探针及生物化学检验法检测正常对照组和高糖组细胞氧化应激相关指标 (1)DCFH-DA 荧光探针检测各组细胞中 ROS 含量 取各组培养 48 h 的细胞,质量浓度 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,

1 500 r/min 离心 5 min,收集细胞;用无血清培养液按照 1:1 000 稀释 DCFH-DA,使终浓度为 10 μmol/L,用稀释好的 DCFH-DA 重悬细胞,于 37 °C 恒温培养箱内孵育 20 min,流式细胞仪上机检测。(2)生物化学检验法检测各细胞中 SOD 活力值和 MDA 浓度 将细胞以 2×10⁵ 个/ml 密度接种于 6 孔板中,收集各组细胞放入 EP 管中,加入 200 μl 双蒸水,直接放入液氮 3~5 s,立即取出并转入 -20 °C 冰箱中放置 20~30 s,取出于室温下解冻约 5 min(EP 管内冰融化即可),上述操作重复 3 次,形成匀浆液;将匀浆液于 5 000 r/min 离心 5~10 min,取上清液待用。分别根据 SOD 和 MDA 生化试剂盒说明书对上清液进行 SOD 活力值和 MDA 浓度检测。

1.2.3 CCK-8 法检测不同浓度 CY-09 作用后细胞增生率 取处于对数生长期的细胞,制成 5×10⁴ 个/ml 的单细胞悬液,按照每孔 100 μl 单细胞悬液均匀接种至 96 孔板中,同时设置空白孔作为对照,置于 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度的条件下培养过夜。按照 1.2.1 部分进行分组处理,并取正常对照组和高糖组细胞分别加入 0、2、5、10、15 和 20 μmol/L CY-09 培养 48 h,向每孔加入 10 μl CCK-8 溶液,于 37 °C 培养 4 h,振荡 10 min,使用全自动酶标仪测定各孔在 450 nm 处的吸光度(A)值。计算各组不同浓度 CY-09 处理后细胞增生率,细胞增生率(%)=(实验组 A 值-空白孔 A 值)/(正常对照组 A 值-空白孔 A 值)×100%。根据细胞增生率选择 CY-09 作用的适宜浓度。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡率 将细胞以 2×10⁵ 个/ml 密度接种于 6 孔板中,将细胞分为正常对照组、正常+CY-09 组、高糖组和高糖+CY-09 组,其中正常+CY-09 组和高糖+CY-09 组培养液中添加 15 μmol/L CY-09;培养 48 h,1 500 r/min 离心 5 min,收集细胞。按照 Annexin-APC/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒说明书进行操作,磷酸盐缓冲液洗涤细胞,加入 500 μl 上样缓冲液重悬细胞,分别加入 5 μl 7-AAD 和 Annexin-APC 染色,室温下避光孵育 15 min,用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率。

1.2.5 Western blot 法检测细胞炎症小体相关蛋白、凋亡相关蛋白的表达 按照 1.2.4 部分收集各组细胞,加入 400 μl RIPA 裂解液充分裂解细胞,12 000 r/min 离心 10 min,提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。每孔上样 40 μg 蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白转印至 PVDF 膜;取膜于含有 50 g/L 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液内室温封闭 2 h,加入 GAPDH、NLRP3、ASC、Caspase-1、Bcl-2、Bax、Caspase-3

一抗(均 1:1 000 稀释),4 ℃ 孵育过夜,含体积分数 0.1%吐温 20 的 TBS 缓冲液(TBST)洗膜;用 TBST 稀释 HRP 标记羊抗兔二抗(1:50 000)室温下摇床上孵育 2 h。超敏 ECL 化学发光液显色曝光后扫描胶片,并采用 ImageJ 软件进行图像处理与分析。以 GAPDH 作为内参,以目的蛋白与 GAPDH 的蛋白产物条带灰度值之比作为其蛋白的相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计学软件进行统计分析,采用 Graphpad Prism 8.0 软件绘制图表。计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示。采用均衡分组单因素干预多水平研究设计,正常对照组与高糖组间各计量资料差异比较采用独立样本 t 检验;多组间计量资料总体差异比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常对照组与高糖组 RPE 细胞内 ROS 含量、MDA 浓度和 SOD 活力值的比较

高糖组 RPE 细胞内 ROS 荧光强度值为 $120\,020 \pm 3\,245$,明显高于正常对照组的 $35\,426 \pm 811$,差异有统计学意义($t = 35.760, P < 0.05$)。高糖组 RPE 细胞内 MDA 浓度为 $(4.92 \pm 0.09) \text{ nmol/mg}$,明显高于正常对照组的 $(1.78 \pm 0.03) \text{ nmol/mg}$,差异有统计学意义($t = 46.960, P < 0.05$);高糖组 SOD 活力值为 $(35.65 \pm 1.22) \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$,明显低于正常对照组的 $(74.96 \pm 1.41) \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$,差异有统计学意义($t = 29.830, P < 0.05$)(图 1)。

2.2 各组内不同浓度 CY-09 处理细胞的增生率比较

倒置显微镜下可见,正常对照组 RPE 细胞贴壁良好,形态多呈较为饱满的多边形及梭形,细胞质丰富,相邻细胞呈聚集状态;高糖组 RPE 细胞呈散在分布,细胞活力及细胞密度均较正常对照组降低(图 2)。高糖组细胞增生率明显低于正常对照组,差异有统计学意义($t = 18.820, P < 0.05$)。正常对照组中不同浓度 CY-09 处理细胞的增生率总体比较,差异有统计学意义($F = 6.729, P = 0.003$),其中 2、5、10 和 15 $\mu\text{mol/L}$ CY-09 处理细胞的增生率与 0 $\mu\text{mol/L}$ CY-09 处理细胞比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);20 $\mu\text{mol/L}$ CY-09 处理细胞的增生率明显低于 0 $\mu\text{mol/L}$ CY-09 处理细胞,差异有统计学意义($P < 0.05$)。高糖组中不同质量浓度 CY-09 处理细胞的增生率总体比较差异有统计学意义

($F = 39.490, P < 0.001$),其中 2 $\mu\text{mol/L}$ 和 5 $\mu\text{mol/L}$ CY-09 处理细胞的增生率与 0 $\mu\text{mol/L}$ CY-09 处理细胞比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);10、15 和 20 $\mu\text{mol/L}$ CY-09 处理细胞的增生率明显高于 0 $\mu\text{mol/L}$ CY-09,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表 1)。15 $\mu\text{mol/L}$ CY-09 处理细胞的增值值达到高糖组峰值且该浓度对正常细胞增生率无明显影响。因此,确定 15 $\mu\text{mol/L}$ CY-09 为实验组后续干预浓度。

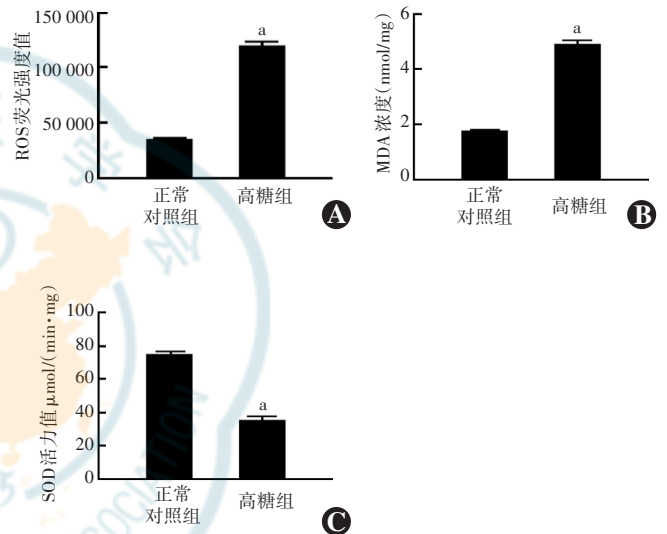


图 1 正常对照组与高糖组 RPE 细胞内 ROS 含量、MDA 浓度、SOD 活力值比较 A:各组 ROS 荧光强度值比较 B:各组 MDA 浓度比较 C:各组 SOD 活力值定量比较,与正常对照组比较, $^{\#}P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) ROS:活性氧簇;MDA:丙二醛;SOD:超氧化物歧化酶

Figure 1 Comparison of ROS content, MDA concentration and SOD activity in RPE cells between the two groups A: Comparison of ROS fluorescence intensity B: Comparison of MDA concentration C: Comparison of SOD activity Compared with the normal control group, $^{\#}P < 0.05$ (Independent samples t -test, $n = 3$) ROS: reactive oxygen species; MDA: malondialdehyde; SOD: superoxide dismutase

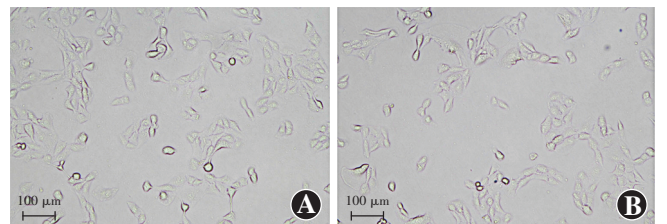


图 2 正常对照组和高糖组培养后 48 h RPE 细胞形态($\times 100$, 标尺 = 100 μm) A:正常对照组细胞形态多呈较为饱满的多边形,相邻细胞呈聚集状态 B:高糖组细胞呈低密度散在分布

Figure 2 Morphology of RPE cells after 48-hour culture in the two groups ($\times 100$, bar = 100 μm) A: Cells were full polygons in shape and gathered in clusters in the normal control group B: Cells were scatteredly distributed with low density in the high-glucose group

表 1 正常对照组和高糖组不同浓度 CY-09 处理细胞增生率比较 (mean±SD, %)
Table 1 Comparison of proliferation rate of cells among different concentrations of CY-09 treatment in the two groups (mean±SD, %)

不同浓度 CY-09	样本量	正常对照组细胞增生率	高糖组细胞增生率
0 μmol/L	3	100.00±1.98	66.50±1.56
2 μmol/L	3	100.28±2.39	67.78±1.73
5 μmol/L	3	99.86±1.55	70.78±0.53
10 μmol/L	3	99.33±2.63	79.51±2.53 ^a
15 μmol/L	3	95.14±2.65	87.90±2.08 ^a
20 μmol/L	3	90.43±1.43 ^a	79.36±2.17 ^a
<i>F</i> 值		6.729	39.490
<i>P</i> 值		0.003	<0.001

注:与各自组内 0 μmol/L CY-09 处理比较, ^a*P*<0.05 (单因素方差分析, LSD-*t* 检验)

Note: Compared with the respective 0 μmol/L CY-09 treatment, ^a*P*<0.05 (One-way ANOVA, LSD-*t* test)

2.3 各组细胞 NLRP3 炎症小体相关蛋白表达比较

正常对照组、正常+CY-09 组、高糖组和高糖+CY-09 组 NLRP3、ASC、活化 Caspase-1 (cleaved-Caspase-1, 相对分子质量为 20 000) 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义 (*F* = 158.700、172.100、135.100, 均 *P*<0.05)。Caspase-1 前体 (pro-Caspase-1, 相对分子质量为 45 000) 相对表达量总体比较, 差异无统计学意义 (*F* = 0.195, *P* = 0.897)。正常+CY-09 组 NLRP3 和 ASC 蛋白相对表达量明显低于正常对照组, 高糖组 NLRP3、ASC 和 cleaved-Caspase-1 相对表达量明显高于正常对照组和高糖+CY-09 组差异均有统计学意义 (均 *P*<0.05) (图 3, 表 2)。

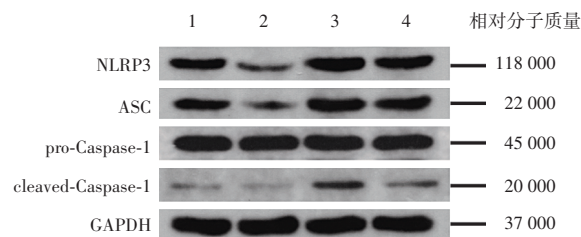


图 3 各组 RPE 细胞内炎症小体 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 蛋白表达电泳图 正常+CY-09 组 NLRP3、ASC 和 cleaved-Caspase-1 蛋白条带灰度弱于正常对照组, 高糖组 NLRP3、ASC、cleaved-Caspase-1 蛋白条带灰度强于正常对照组和高糖+CY-09 组; pro-Caspase-1 蛋白条带灰度在各组间无明显差异 1: 正常对照组; 2: 正常+CY-09 组; 3: 高糖组; 4: 高糖+CY-09 组 NLRP3: 核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族含 Prrin 结构域蛋白 3; ASC: 凋亡相关斑点样蛋白; GAPDH: 磷酸甘油醛脱氢酶

Figure 3 Electrophoretogram of NLRP3, ASC and Caspase-1 in different groups detected by Western blot Compared with the normal control group, the intensity of NLRP3, ASC and cleaved-Caspase-1 bands was decreased in normal+CY-09 group. Compared with the high-glucose group, the intensity of NLRP3, ASC and cleaved-Caspase-1 bands was decreased in the normal control group and the high-glucose+CY-09 group. The intensity of pro-Caspase-1 bands was not significantly different among various groups 1: normal control group; 2: normal+CY-09 group; 3: high-glucose group; 4: high-glucose+CY-09 group NLRP3: nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing 3; ASC: apoptosis associated speck-like protein containing CARD; GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

2.4 各组细胞凋亡率比较

正常对照组、正常+CY-09 组、高糖组、高糖+CY-09 组细胞凋亡率分别为 (6.67±1.05)%、(5.12±0.19)%、(21.68±0.41)% 和 (13.96±0.07)%, 总体比较差异有统计学意义 (*F* = 346.300, *P*<0.05), 其中高糖组细胞凋亡率明显高于正常对照组和高糖+CY-09 组, 差异均有统计学意义 (均 *P*<0.05); 正常+CY-09 组细胞凋亡率略低于正常对照组, 差异无统计学意义 (*P*>0.05) (图 4)。

表 2 各组细胞中 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 蛋白相对表达量比较 (mean±SD)
Table 2 Comparison of the relative expression levels of NLRP3, ASC and Caspase-1 among various groups (mean±SD)

组别	样本量	NLRP3 蛋白相对表达量	ASC 蛋白相对表达量	pro-Caspase-1 蛋白相对表达量	cleaved-Caspase-1 蛋白相对表达量
正常对照组	3	0.186±0.030	0.207±0.004	0.419±0.038	0.048±0.003
正常+CY-09 组	3	0.078±0.003 ^a	0.112±0.007 ^a	0.417±0.044	0.025±0.009 ^a
高糖组	3	0.398±0.002 ^a	0.489±0.034 ^a	0.399±0.030	0.156±0.010 ^a
高糖+CY-09 组	3	0.277±0.004 ^b	0.339±0.003 ^b	0.421±0.007	0.089±0.002 ^b
<i>F</i> 值		158.700	172.100	0.195	135.100
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	0.897	<0.01

注:与各自正常对照组比较, ^a*P*<0.05; 与各自高糖组比较, ^b*P*<0.05 (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) NLRP3: 核苷酸结合寡聚化结合域样受体家族含 Prrin 结构域蛋白 3; ASC: 凋亡相关斑点样蛋白

Note: Compared with the respective normal control group, ^a*P*<0.05; compared with the respective high-glucose group, ^b*P*<0.05 (One-way ANOVA, LSD-*t* test) NLRP3: nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing 3; ASC: apoptosis associated speck-like protein containing CARD

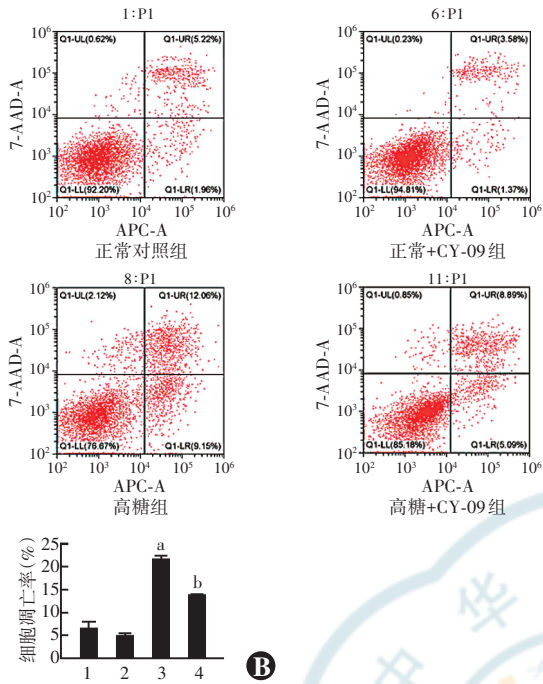


图 4 各组细胞凋亡情况 A: 各组细胞凋亡流式细胞检测图 B: 各组细胞凋亡率比较 $F = 346.300, P < 0.05$ 。与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与高糖组比较, ^b $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n = 3$) 1: 正常对照组; 2: 正常+CY-09 组; 3: 高糖组; 4: 高糖+CY-09 组

Figure 4 Apoptosis of the RPE cells in various groups A: Flow cytometry results of various groups B: Comparison of the apoptosis rate among various groups $F = 346.300, P < 0.05$ 。Compared with the normal control group, ^a $P < 0.05$; compared with the high-glucose group, ^b $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test, $n = 3$) 1: normal control group; 2: normal +CY-09 group; 3: high-glucose group; 4: high-glucose +CY-09 group

2.5 各组细胞 Bax、Bcl-2 及 Caspase-3 蛋白表达比较

正常对照组、正常+CY-09 组、高糖组和高糖+CY-09 组间细胞 cleaved-Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 蛋白相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义 ($F = 85.930, 239.200, 332.200$, 均 $P < 0.01$), 各组间 pro-Caspase-3 蛋白相对表达量总体比较, 差异无统计学意义 ($F = 0.525, P = 0.677$)。正常+CY-09 组 Bax 及 cleaved-Caspase-3 蛋白相对表达量低于正常对照组, Bcl-2 蛋白相对表达量高于正常对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 高糖组 Bax 及 cleaved-Caspase-3 蛋白相对表达量高于正常对照组和高糖组 +CY-09 组, Bcl-2 蛋白相对表达量低于正常对照组和高糖组 +CY-09 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 5, 表 3)。

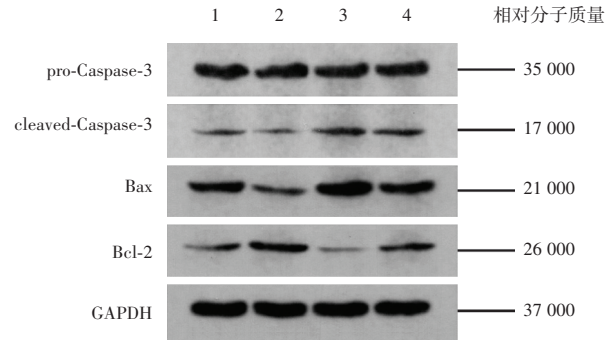


图 5 各组细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2、Caspase-3 表达电泳图 正常+CY-09 组 cleaved-Caspase-3 和 Bax 蛋白条带灰度弱于正常对照组, Bcl-2 蛋白条带灰度强于正常对照组; 高糖组 cleaved-Caspase-3 和 Bax 蛋白条带灰度强于正常对照组和高糖组 +CY-09 组, Bcl-2 蛋白条带灰度弱于正常对照组和高糖组 +CY-09 组; pro-Caspase-3 蛋白条带灰度在各组间无明显差异 1: 正常对照组; 2: 正常+CY-09 组; 3: 高糖组; 4: 高糖+CY-09 组 Bax: Bcl 相关 X 蛋白; Bcl-2: B 淋巴细胞瘤; GAPDH: 磷酸甘油醛脱氢酶

Figure 5 Electrophoretogram of Bax, Bcl-2 and Caspase-3 in different groups detected by Western blot Compared with the normal control group, the intensity of cleaved-Caspase-3 and Bax bands was decreased and the intensity of Bcl-2 band was increased in normal+CY-09 group. Compared with the high-glucose group, the intensity of cleaved-Caspase-3 and Bax bands was decreased and the intensity of Bcl-2 band was increased in the normal control group and the high-glucose +CY-09 group; the intensity of pro-Caspase-3 bands was not significantly different among various groups 1: normal control group; 2: normal +CY-09 group; 3: high-glucose group; 4: high-glucose + CY-09 group Bax: Bcl-2 associated X protein; Bcl-2: B cell lymphoma-2; GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

3 讨论

高糖环境可激活 RPE 细胞内氧化应激反应, 产生大量 ROS, 造成细胞毒性损伤, 或直接通过损伤线粒体造成 RPE 细胞凋亡^[7-8]。RPE 细胞凋亡可影响 ROS 的清除及 PEDF 等活性因子的分泌, 有可能促进

表 3 各组细胞中 Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 蛋白相对表达量比较 (mean±SD)
Table 3 Comparison of the relative expression levels of Caspase-3, Bax and Bcl-2 proteins among various groups (mean±SD)

组别	样本量	pro-Caspase-3 相对表达量	cleaved-Caspase-3 相对表达量	Bax 蛋白 相对表达量	Bcl-2 蛋白 相对表达量
正常对照组	3	0.604±0.025	0.083±0.005	0.301±0.028	0.100±0.001
正常+CY-09 组	3	0.617±0.013	0.051±0.006 ^a	0.123±0.006 ^a	0.244±0.006 ^a
高糖组	3	0.613±0.012	0.190±0.011 ^a	0.685±0.022 ^a	0.050±0.004 ^a
高糖+CY-09 组	3	0.598±0.010	0.137±0.011 ^b	0.572±0.029 ^b	0.174±0.010 ^b
F 值		0.525	85.930	239.200	332.200
P 值		0.677	<0.01	<0.01	<0.01

注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与高糖组比较, ^b $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) Bax: Bcl 相关 X 蛋白; Bcl-2: B 淋巴细胞瘤因子-2

Note: Compared with the normal control group, ^a $P < 0.05$; compared with the high-glucose group, ^b $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) Bax: Bcl-2 associated X protein; Bcl-2: B cell lymphoma factor-2

DR 的发生和发展。本研究采用高糖诱导 RPE 细胞氧化损伤模型,也发现高糖条件下 RPE 细胞中 ROS 含量和脂质过氧化物 MDA 浓度均升高,SOD 活力值降低,细胞的增生受到明显抑制,证实了高糖能诱导 RPE 细胞发生氧化应激,抑制细胞增生。本研究结果还显示,高糖组中 10、15 和 20 $\mu\text{mol/L}$ CY-09 处理细胞的增生率明显高于 0 $\mu\text{mol/L}$ CY-09 处理细胞,推测 NLRP3 参与高糖环境下 RPE 细胞增生调控。

高糖环境下线粒体发生氧化应激,引起细胞内 NLRP3 介导的信号通路激活^[9]。NLRP3 炎症小体是由 NLRP3、接头蛋白 ASC 和蛋白酶 pro-Caspase-1 组成的多蛋白复合物。Pro-Caspase-1 被激活后自剪切形成的 cleaved-Caspase-1 介导白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 和 IL-18 等促炎因子的分泌^[10-11];NLRP3 炎症小体也可以通过激活 Caspase-3 引起细胞凋亡^[12]。Wang 等^[13]在增生性玻璃体疾病患者的玻璃体液中发现 NLRP3、ASC、Caspase-1 及其他炎症因子显著高表达,而且 NLRP3 炎症小体可以诱导体外培养的人视网膜微血管内皮细胞发生凋亡。

细胞凋亡是一个极其复杂的生命活动过程,涉及多种凋亡通路。Bcl-2 蛋白通过阻止细胞色素 C 从线粒体释放来抑制细胞凋亡,Bax 通过与线粒体上的膜通道结合促使细胞色素 C 释放而促进凋亡^[14]。Caspase-3 在细胞凋亡的级联反应途径中位于核心位置,是执行细胞凋亡的关键因子^[15-16]。王卫等^[12]研究发现,下调肾小管上皮细胞中 NLRP3 表达水平可以抑制高糖诱导的细胞凋亡。本研究结果显示,与正常对照组比较,高糖组 RPE 细胞凋亡率、炎症小体相关蛋白、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达均明显升高,而 Bcl-2 蛋白表达明显下降;正常+CY-09 组与正常对照组相比,高糖+CY-09 组与高糖组相比,RPE 细胞凋亡率下降,NLRP3、ASC、cleaved-Caspase-1、Bax 和 cleaved-Caspase-3 表达均降低,Bcl-2 的表达则上调。以上结果充分显示高糖环境可激活炎症小体 NLRP3,引起 RPE 细胞凋亡。

综上所述,本研究证实高糖环境可提高 RPE 细胞内 ROS 含量和 MDA 浓度,抑制 RPE 细胞增生并促进其凋亡;NLRP3 抑制剂可提高高糖环境下 RPE 细胞的增生率并抑制其凋亡,推测 NLRP3 炎症小体参与了高糖条件下 RPE 细胞的凋亡过程。然而,本研究尚未明确 NLRP3 炎症小体通路与细胞凋亡之间的直接关系;未进行 IL 等下游分子的检测;仅为体外细胞学研究,尚需进一步开展实验动物研究。我们需进一步探讨 NLRP3 炎症小体与细胞凋亡的分子机制,为预防和治疗 DR 提供潜在的靶向目标。

利益冲突 所有作者均声明不存在任何利益冲突

参考文献

- [1] 葛坚,王宁利.眼科学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2015:332.
- [2] Sahajpal NS,Goel RK,Chaubey A,et al. Pathological perturbations in diabetic retinopathy: hyperglycemia, AGEs, oxidative stress and inflammatory pathways [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2019, 20 (1) : 92-110. DOI: 10. 2174/1389203719666180928123449.
- [3] 张聿剑,季敏,管怀进. NLRP3 炎症小体与眼部疾病 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2020, 38 (4) : 365-368. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20200325-00203.
- [4] Zhang YJ, Ji M, Guan HJ. NLRP3 inflammasome and eye diseases [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2020, 38 (4) : 365-368. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20200325-00203.
- [5] Loukovaara S, Piippo N, Kinnunen K, et al. NLRP3 inflammasome activation is associated with proliferative diabetic retinopathy [J]. *Acta Ophthalmol*, 2017, 95 (8) : 803-808. DOI: 10. 1111/aos. 13427.
- [6] 陈镜妃,罗启慧,黄超,等. 血管内皮生长因子与色素上皮衍生因子在糖尿病猕猴视网膜病变早期的表达 [J]. *南方医科大学学报*, 2017, 37 (9) : 1217-1221. DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4254. 2017. 09. 13.
- [7] Chen JF, Luo QH, Huang C, et al. Expression of VEGF and PEDF in early-stage retinopathy in diabetic Macaca mulatta [J]. *J South Med Univ*, 2017, 37 (9) : 1217-1221. DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4254. 2017. 09. 13.
- [8] Al-Shabraway M, Mussell R, Kahook K, et al. Increased expression and activity of 12-lipoxygenase in oxygen-induced ischemic retinopathy and proliferative diabetic retinopathy: implications in retinal neovascularization [J]. *Diabetes*, 2011, 60 (2) : 614-624. DOI: 10. 2337/db10-0008.
- [9] 郑海燕. 高糖状态下人视网膜色素上皮细胞氧化应激损伤情况以及上皮-间质转化情况评估 [J]. *海南医学院学报*, 2017, 23 (4) : 566-569. DOI: 10. 13210/j. cnki. jhmu. 20161201. 006.
- [10] Zheng HY. Assessment of the oxidative stress damage of human retinal pigment epithelium and epithel i-al-mesenchymal transition under high glucose state [J]. *J Hainan Med Univ*, 2017, 23 (4) : 566-569. DOI: 10. 13210/j. cnki. jhmu. 20161201. 006.
- [11] Liu WY, Liou SS, Hong TY, et al. The benefits of the citrus flavonoid diosmin on human retinal pigment epithelial cells under high-glucose conditions [J/OL]. *Molecules*, 2017, 22 (12) : 2251 [2020-08-12]. <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29258224>. DOI: 10. 3390/molecules22122251.
- [12] Zhang H, Chen X, Zong B, et al. Gypenosides improve diabetic cardiomyopathy by inhibiting ROS-mediated NLRP3 inflammasome activation [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22 (9) : 4437-4448. DOI: 10. 1111/jcmm. 13743.
- [13] Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes [J]. *Cell*, 2010, 140 (6) : 821-832. DOI: 10. 1016/j. cell. 2010. 01. 040.
- [14] Sebastian-Valverde M, Pasinetti GM. The NLRP3 inflammasome as a critical actor in the inflamming process [J/OL]. *Cells*, 2020, 9 (6) : 1552 [2020-08-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32604771>. DOI: 10. 3390/cells9061552.
- [15] 王卫,李荣山,赵宏宇,等. NLRP3 炎症复合体在高糖培养的肾小管上皮细胞中的表达及其与细胞凋亡的关系 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2013, 21 (7) : 651-654. DOI: 10. 3969/j. issn. 1006-6187. 2013. 07. 022.
- [16] Wang W, Li RS, Zhao HY, et al. The expression of NLRP3 inflammasome in high glucose cultured renal tubular epithelial cells and its relationship with apoptosis [J]. *Chin J Diabetes*, 2013, 21 (7) : 651-654. DOI: 10. 3969/j. issn. 1006-6187. 2013. 07. 022.
- [17] Wang Y, Tao J, Yao Y. Prostaglandin E2 activates NLRP3 inflammasome in endothelial cells to promote diabetic retinopathy [J]. *Horm Metab Res*, 2018, 50 (9) : 704-710. DOI: 10. 1055/a-0664-0699.
- [18] Dlugosz PJ, Billen LP, Annis MG, et al. Bcl-2 changes conformation to inhibit Bax oligomerization [J]. *EMBO J*, 2006, 25 (11) : 2287-2296. DOI: 10. 1038/sj. emboj. 7601126.
- [19] Boland K, Flanagan L, Prehn JH. Paracrine control of tissue regeneration and cell proliferation by Caspase-3 [J/OL]. *Cell Death Dis*, 2013, 4 : e725 [2021-11-30]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23846227>. DOI: 10. 1038/cddis. 2013. 250.
- [20] Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, et al. Old, new and emerging functions of caspases [J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22 (4) : 526-539. DOI: 10. 1038/cdd. 2014. 216.

(收稿日期:2020-10-15 修回日期:2021-11-30)

(本文编辑:张宇)