

· 实验研究 ·

N-乙酰半胱氨酸及 salubrinal 对全反式视黄酸诱导视网膜色素上皮细胞凋亡的抑制作用

吴娟 崔冬梅 曾骏文

中山大学中山眼科中心 眼科学国家重点实验室 广东省眼科视觉科学重点实验室, 广州 510060

通信作者: 曾骏文, Email: zeng_zoc@163.com

【摘要】 目的 观察抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸(NAC)及选择性内质网应激反应抑制剂 salubrinal 在全反式视黄酸(ATRA)诱导视网膜色素上皮细胞(RPE)凋亡中的作用。方法 取 ARPE-19 细胞系进行培养, 并将其分为正常对照组、模型对照组、NAC 处理组、salubrinal 处理组、NAC+salubrinal 组, 分别采用完全培养基、含 10 $\mu\text{mol/L}$ ATRA、含 10 $\mu\text{mol/L}$ ATRA+5 mmol/L NAC、含 10 $\mu\text{mol/L}$ ATRA+40 $\mu\text{mol/L}$ salubrinal、含 10 $\mu\text{mol/L}$ ATRA+5 mmol/L NAC+40 $\mu\text{mol/L}$ salubrinal 的完全培养基培养细胞 24 h。采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡比率、多重含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Multicaspase)阳性比率、活性氧簇(ROS)水平。Western blot 法检测各组细胞血管内皮生长因子 A(VEGF-A)、C/EBP 同源蛋白(CHOP)、剪切含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3(cleaved-caspase 3)的表达水平。结果 流式细胞检测结果显示, 各处理组细胞凋亡比率、Multicaspase 阳性比率及 ROS 水平总体比较差异均有统计学意义($F = 113.23, 602.41, 160.39$, 均 $P < 0.001$), 其中正常对照组、NAC 处理组、salubrinal 处理组及 NAC+salubrinal 组细胞凋亡比率、Multicaspase 阳性比率、ROS 水平均明显低于模型对照组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。Western blot 检测结果显示, 各组 VEGF-A、CHOP、cleaved-caspase 3 相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义($F = 24.62, 36.35, 60.25$, 均 $P < 0.001$), 其中正常对照组、NAC 处理组、salubrinal 处理组及 NAC+salubrinal 组 VEGF-A、CHOP、cleaved-caspase 3 蛋白相对表达量明显低于模型对照组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 ATRA 诱导 RPE 细胞产生氧化应激及内质网应激损伤并导致细胞凋亡, NAC 及 salubrinal 可通过抑制应激反应, 有效减轻细胞凋亡水平。

【关键词】 视网膜色素上皮; 细胞凋亡; N-乙酰半胱氨酸; 全反式视黄酸; 内质网应激; Salubrinal

基金项目: 国家自然科学基金项目(81170872)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200414-00262

Inhibitory effects of N-acetylcysteine and salubrinal on apoptosis of retinal pigment epithelial cells induced by all-trans-retinoic acid

Wu Juan, Cui Dongmei, Zeng Junwen

State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Ophthalmology and Visual Science, Guangzhou 510060, China

Corresponding author: Zeng Junwen, Email: zeng_zoc@163.com

[Abstract] **Objective** To observe the effect of the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) and selective endoplasmic reticulum stress response inhibitor salubrinal on the apoptosis of retinal pigment epithelial cells induced by all-trans-retinoic acid (ATRA). **Methods** Human ARPE-19 cell line was used as the experimental cell line, and was divided into normal control group cultured with complete medium, model control group cultured with complete medium containing 10 $\mu\text{mol/L}$ ATRA, NAC treatment group cultured with complete medium containing 10 $\mu\text{mol/L}$ ATRA+5 mmol/L NAC, salubrinal group cultured with complete medium containing 10 $\mu\text{mol/L}$ ATRA+40 $\mu\text{mol/L}$ salubrinal, NAC+salubrinal group cultured with complete medium containing 10 $\mu\text{mol/L}$ ATRA+5 mmol/L NAC+40 $\mu\text{mol/L}$ salubrinal. After 24-hour culture, apoptosis rate, multicaspase level and reactive oxygen species (ROS) level of ARPE-19 cells were detected by flow cytometry. The expressions of vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), C/EBP-homologous protein (CHOP), cleaved-caspase 3 in cells were detected by Western blot.

Results There were significant differences in the apoptosis rate, multicaspase and ROS levels among the five groups

($F=113.23, 602.41, 160.39$; all at $P<0.001$). The apoptosis rate, multicaspase and ROS levels of normal control group, NAC treatment group, salubrinal group and NAC+salubrinal group were significantly lower than those of model control group (all at $P<0.05$). There were significant differences in the expression levels of VEGF-A, CHOP and cleaved-caspase 3 among the five groups ($F=24.62, 36.35, 60.25$; all at $P<0.001$). The protein expression levels of VEGF-A, CHOP and cleaved-caspase 3 of normal control group, NAC treatment group, salubrinal group and NAC+salubrinal group were significantly lower than those of model control group (all at $P<0.05$). **Conclusions** ATRA can induce RPE cells to produce oxidative stress and endoplasmic reticulum stress injury, which leads to apoptosis. NAC and salubrinal can effectively reduce the RPE cell apoptosis by inhibiting stress response.

[Key words] Retinal pigment epithelium; Apoptosis; N-acetylcysteine; All-trans-retinoic acid; Endoplasmic reticulum stress; Salubrinal

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81170872)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200414-00262

年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 是视网膜黄斑区光感受器细胞凋亡导致中心视力缺失的一种眼部疾病。视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞具有向光感受器提供氧气和营养, 并运走代谢废物的功能, 该功能的丢失可导致 AMD 的光感受器凋亡^[1]。氧自由基堆积引起 RPE 细胞损伤, 是 AMD 发病的主要原因。全反式视黄酸 (all-trans-retinoic acid, ATRA) 是视觉循环中不可缺少的物质。作为视网膜内的一种内源性化合物, ATRA 通常通过全反式视黄酸脱氢酶 (all trans retinol dehydrogenase, RDH) (如 RDH11) 还原而被清除, 或形成一系列 RPE 溶酶体中的视网膜衍生物^[2], 研究已证实 ATRA 代谢障碍可引起 RPE 细胞毒素及活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 的生成, 导致脂褐素的积累, 造成光感受器细胞和 RPE 细胞的凋亡^[3-5]。以往的研究发现, ATRA 可诱导 RPE 细胞产生氧化应激反应及内质网应激反应 (endoplasmic reticulum stress, ERS), 从而导致细胞凋亡^[6]。抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸 (N-acetylcysteine, NAC) 与选择性 ERS 抑制剂 salubrinal 均已作为药物广泛应用于临床, 然而, NAC 抑制 RPE 细胞凋亡及其过程的研究报道较少。本研究拟探讨 NAC 和 salubrinal 对 ATRA 诱导下 ARPE-19 细胞凋亡的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 ARPE-19 细胞购自美国模式菌种收集中心。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM/F12(modified Eagle medium/Ham F12) 培养基、质量分数 0.25% 胰蛋白酶/乙二胺四乙酸 (ethylenediamine tetraedetic acid, EDTA) (美国 Gibco 公司); 牛血清白蛋白 (bovine serum

albumin, BSA)、ATRA、二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO) (美国 Sigma 公司); 青霉素/链霉素 (100 $\mu\text{g/ml}$) (美国 Invitrogen 公司); NAC、真核翻译起始因子 2 α (eukaryotic translation initiation factor 2 α , eIF2 α) 去磷酸抑制剂 salubrinal、RIPA 裂解缓冲液 (上海碧云天生物技术有限公司); 膜联蛋白 V-荧光素异硫氰酸盐 (annexin V-fluorescein isothiocyanate, annexin-V) 凋亡试剂盒 (美国 Becton 公司); 多重含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (Multicaspase) 分析试剂盒 (MCH100109)、活性氧检测试剂盒、聚偏氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜 (美国 Merck Millipore 公司); 兔源抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)-A 单克隆抗体 (#ab46154) (美国 Abcam 公司); 兔源抗剪切含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (cleaved-caspase 3) 单克隆抗体 (#9964)、鼠源抗 C/EBP 同源蛋白 (C/EBP homologous protein, CHOP) 单克隆抗体 (#2895)、兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 单克隆抗体 (#5174) (美国 Cell Signaling Technology 公司)。ECL 蛋白印迹检测系统 (美国 Millipore 公司); Bio-Rad Quantity One 成像软件 (美国 Bio-Rad 公司); 流式细胞仪 (美国 Beckman 公司)。

1.2 方法

1.2.1 药物配制 将 ATRA 溶解于 DMSO 中配制 0.1 mmol/L 的储备浓度, 分装成 10 ml 于 -20°C 下冷冻保存, 避光条件下使用 DMEM/F12 稀释 ATRA 至工作浓度。

1.2.2 细胞培养 向 ARPE-19 细胞中加入含体积分数 10% BSA 和 100 $\mu\text{g/ml}$ 青链霉素的 DMEM/F12, 并置于 37°C 下含体积分数 5% CO_2 的饱和湿度培养箱中培养, 每 2~3 d 更换 1 次培养基。细胞达到 70%~80% 融

合时,将细胞置于含 0.25% 胰蛋白酶/EDTA 溶液中消化 2 min,并以 1:4~1:6 的比例传代至 25 mm² 细胞培养瓶中持续培养。取 ARPE-19 细胞以 2.5×10⁵/ml 密度接种于 6 孔板,每孔培养基 2 ml,于 37 °C 饱和湿度培养箱中培养 24 h。

1.2.3 实验分组及处理 将细胞正常对照组、模型对照组、NAC 处理组、salubrinal 处理组、NAC+salubrinal 组,分别采用完全培养基、含 10 μmol/L ATRA、含 10 μmol/L ATRA+5 mmol/L NAC、含 10 μmol/L ATRA+40 μmol/L salubrinal、含 10 μmol/L ATRA+5 mmol/L NAC+40 μmol/L salubrinal 的完全培养基培养细胞;各组细胞均培养 24 h。光学显微镜下观察各组细胞状态。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡水平 取各组培养的细胞,胰蛋白酶消化,用预冷磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗 1 次,低速离心 3 min 弃上清,预冷 PBS 洗 1 次,低速离心 3 min 收集细胞;参照 annexin-V 凋亡试剂盒说明书步骤,将细胞重新悬浮在含有 annexin-V 和碘化丙啶(propidium iodide, PI)的 1×结合缓冲液中暗室孵育 30 min;用流式细胞仪在 488 nm 激发波长下检测红色荧光及光散射情况,根据阴性对照组设定细胞分区计算凋亡细胞区荧光值。实验独立重复 3 次。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞 Multicaspase 水平 参照 1.2.4 方法收集各组细胞,加入含有 7-氨基放线菌素 D 和 PI 的 1×结合缓冲液,孵育 30 min,用流式细胞仪在 488 nm 激发波长下检测红色荧光及光散射情况,根据阴性对照组设定细胞分区,并进行固定分区,统计死细胞区+晚调细胞区+早调细胞区荧光值作为 Multicaspase 阳性比率。实验独立重复 3 次。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞 ROS 水平 按照 1.2.4 方法收集各组细胞,加入 1 μmol/L ROS 和荧光探针 DCFH-DA 孵育 30 min,用流式细胞仪在 488 nm 激发波长下检测红色荧光及光散射情况,荧光染色阳性数值即为 ROS 水平。实验独立重复 3 次。

1.2.7 Western blot 法检测蛋白表达水平 按照 1.2.4 方法收集各组细胞,用 RIPA 裂解缓冲液进行裂解,用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离。将蛋白质转移到 PVDF 膜,并置于含质量分数 5% 脱脂牛奶的 TBST 溶液中,室温下封闭 1 h,并置于抗 VEGF-A 抗体(1:1 000)、抗 CHOP 抗体(1:1 000)、抗 cleaved-caspase 3 抗体(1:1 000)、抗 GAPDH 抗体(1:500)溶液中,摇床上室温孵育 30 min,并 4 °C 孵育过夜(≥12 h),TBST 洗膜 3 次,每次 5 min;加入相应二抗(1:2 000),摇床上室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,每次 5 min;采用 ECL 显色,并使用 Bio-Rad Quantity One 成像软件分析条带灰度值,以 GAPDH 为内参照,计算各目的蛋白相对表达量。实验独立重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析。计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示;经 Levene 检验方差齐性。各不同处理组间细胞凋亡率、Multicaspase 水平、ROS 水平及各蛋白相对表达量差异总体比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Dunnett-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同处理组细胞形态变化

正常对照组细胞形态保持正常,模型对照组部分细胞开始皱缩,NAC 处理组及 salubrinal 处理组中细胞形态均保持正常,NAC+salubrinal 组大部分细胞形态正常,少许细胞出现皱缩现象(图 1)。

2.3 不同处理组细胞凋亡比率、Multicaspase 阳性比率及 ROS 水平比较

流式细胞图显示,模型对照组细胞凋亡比率、Multicaspase 阳性比率及 ROS 水平较正常对照组明显升高,NAC 处理组、salubrinal 处理组以及 NAC+salubrinal 组细胞凋亡比率、Multicaspase 阳性比率及 ROS 水平较模型对照组明显下降(图 2)。

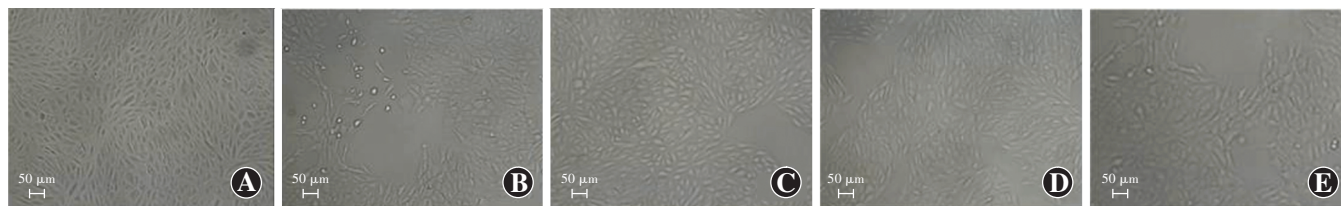


图 1 光学显微镜下各处理组 ARPE-19 细胞形态(标尺=50 μm) A:正常对照组 细胞形态正常 B:模型对照组 部分细胞出现皱缩变圆 C:NAC 处理组 细胞形态正常 D:Salubrinal 处理组 细胞形态正常 E:NAC+salubrinal 组 少量细胞出现皱缩现象

Figure 1 ARPE-19 cells morphology under an optical microscope (bar=50 μm) A:Normal control group Cell morphology was normal B:Model control group Some cells shrank and turned round C:NAC treatment group Cell morphology was normal D:Salubrinal treatment group Cell morphology was normal E:NAC+salubrinal group A few cells shrank

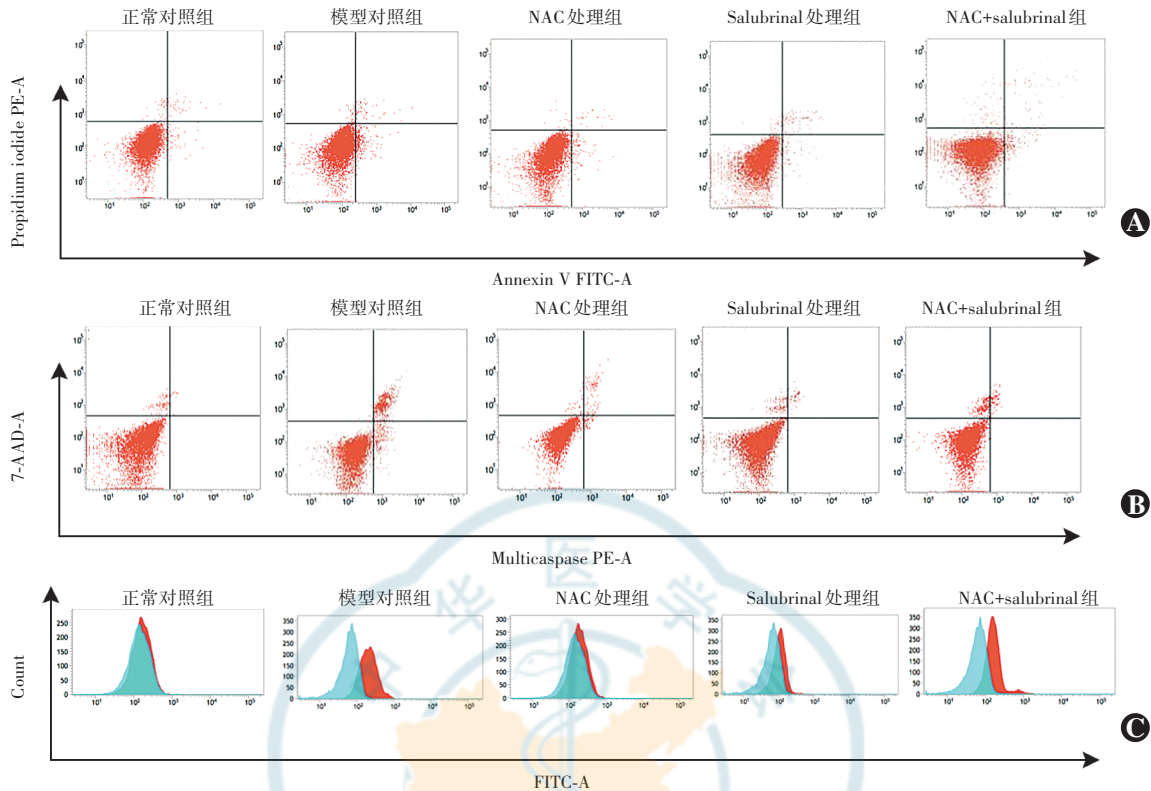


图 2 不同处理组 ARPE-19 细胞凋亡水平、Multicaspase 水平及 ROS 水平流式细胞图 NAC 处理组、salubrinal 处理组和 NAC+salubrinal 组细胞凋亡比率、Multicaspase 阳性比率及 ROS 水平较模型对照组明显下降 A: 细胞凋亡流式细胞图 B: Multicaspase 流式细胞图 C: ROS 流式细胞图 NAC: N-乙酰半胱氨酸

Figure 2 Flow cytometry of apoptosis, multicaspase and ROS levels of different ARPE-19 cell groups The apoptosis rate, multicaspase and ROS levels were significantly decreased in NAC treatment group, salubrinal treatment group and NAC+salubrinal group in comparison with the model control group A: Apoptosis flow cytometry B: Multicaspase flow cytometry C: ROS flow cytometry NAC: N-acetylcysteine

各处理组细胞凋亡比率、Multicaspase 阳性比率、ROS 水平总体比较差异有统计学意义 ($F = 113.23, 602.41, 160.39$, 均 $P < 0.001$)。正常对照组、NAC 处理组、salubrinal 处理组及 NAC+salubrinal 组细胞凋亡比率、Multicaspase 阳性比率、ROS 水平均明显低于模型对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 1)。

2.4 不同处理组细胞中 VEGF-A、CHOP、cleaved-caspase 3 表达水平比较

Western blot 电泳图显示, 模型对照组 VEGF-A、CHOP、cleaved-caspase 3 蛋白电泳条带灰度较正常对照组明显增强, NAC 处理组、salubrinal 处理组以及 NAC+salubrinal 组 VEGF-A、CHOP、cleaved-caspase 3 蛋白电泳条带灰度较模型对照组减弱 (图 3)。

各处理组细胞中 VEGF-A、CHOP、cleaved-caspase 3 相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义 ($F = 24.62, 36.35, 60.25$, 均 $P < 0.001$), 其中正常对照组、NAC 处理组、salubrinal 处理组及 NAC+salubrinal 组 VEGF-A、CHOP、cleaved-caspase 3 相对表达量明显低于模型对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 2)。

表 1 不同处理组细胞凋亡比率、Multicaspase 阳性比率及 ROS 水平比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)
Table 1 Comparison of apoptosis rate, multicaspase and ROS levels among various cell groups ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	凋亡比率	Multicaspase 阳性比率	ROS 水平
正常对照组	3	1.60±0.17 ^a	1.251±0.09 ^a	1.50±0.27 ^a
模型对照组	3	5.72±0.49	12.59 ±0.70	29.48±3.37
NAC 处理组	3	1.87±0.12 ^a	1.69 ±0.04 ^a	3.99±0.49 ^a
Salubrinal 处理组	3	2.03±0.07 ^a	2.07 ±0.10 ^a	3.56±0.31 ^a
NAC+salubrinal 组	3	3.26±0.29 ^a	4.57 ±0.22 ^a	7.93±0.68 ^a
F 值		113.23	602.41	160.39
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: 与模型对照组比较, ^a $P < 0.05$ (单因素方差分析, Dunnett-t 检验) Multicaspase: 多重含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶; ROS: 活性氧簇; NAC: N-乙酰半胱氨酸

Note: Compared with model control group, ^a $P < 0.05$ (One-way ANOVA, Dunnett-t test) ROS: reactive oxygen species; NAC: N-acetylcysteine

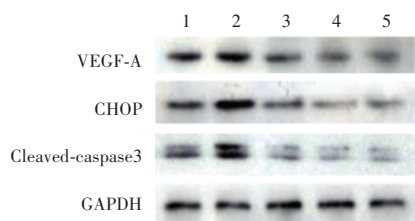


图3 不同处理组 ARPE-19 细胞中 VEGF-A、CHOP、cleaved-caspase 3 蛋白 Western blot 电泳图 模型对照组细胞中 VEGF-A、CHOP、cleaved-caspase 3 蛋白电泳条带灰度明显强于其他组 1:正常对照组;2:模型对照组 3:NAC 处理组;4:Salubrinal 处理组;5:NAC+salubrinal 组 VEGF-A:血管内皮生长因子 A;CHOP:C/EBP 同源蛋白;cleaved-caspase 3:剪切含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3

Figure 3 Electrophoretogram of VEGF-A, CHOP, cleaved-caspase 3 in ARPE-19 cells by Western blot The grayscale of VEGF-A, CHOP and cleaved-caspase 3 protein bands in model control group was significantly higher than that in other four groups 1: normal control group; 2: model control group; 3: NAC treatment group; 4: salubrinal treatment group; 5: NAC + salubrinal group VEGF-A: vascular endothelial growth factor A; CHOP: C/EBP homologous protein

表 2 不同处理组 ARPE-19 细胞中 VEGF-A、CHOP 和 cleaved-caspase 3 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of relative expressions of VEGF-A, CHOP and cleaved-caspase 3 among various ARPE-19 cell groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	VEGF-A	CHOP	cleaved-caspase 3
正常对照组	3	1.00±0.00 ^a	1.00±0.00 ^a	1.00±0.00 ^a
模型对照组	3	1.31±0.08	1.87±0.16	2.33±0.24
NAC 处理组	3	0.85±0.09 ^a	0.92±0.21 ^a	0.83±0.13 ^a
Salubrinal 处理组	3	0.73±0.11 ^a	0.74±0.11 ^a	0.78±0.11 ^a
NAC+salubrinal 组	3	0.71±0.09 ^a	0.71±0.11 ^a	0.81±0.15 ^a
F 值		24.62	36.35	60.25
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与模型对照组比较,^a $P < 0.05$ (单因素方差分析, Dunnett-*t* 检验) VEGF-A:血管内皮生长因子 A;CHOP:C/EBP 同源蛋白;cleaved-caspase 3:剪切含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3;NAC:N-乙酰半胱氨酸

Note: Compared with model control group, ^a $P < 0.05$ (One-way ANOVA, Dunnett-*t* test) VEGF-A: vascular endothelial growth factor A; CHOP: C/EBP homologous protein; NAC: N-acetylcysteine

3 讨论

本课题组前期研究结果显示,10 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 促进细胞内 ROS、Multicaspase 和凋亡/坏死的产生,同时该浓度低于细胞半数生存的浓度^[7]。因此本研究选用 10 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 作为诱发细胞凋亡的实验浓度。同时预实验结果显示,5 mmol/L NAC 及 40 $\mu\text{mol/L}$ salubrinal 是不引起细胞凋亡并导致 ROS 及 Multicaspase 水平变化的最大浓度。而本研究中,NAC 和 salubrinal 能有效抑制 ATRA 诱导细胞凋亡、Multicaspase 和 ROS 水平的升高,进一步证实 ROS 和 ERS 参与了 ATRA 诱导的 RPE 功能障碍。本研究结

果还显示,当 NAC 与 salubrinal 联合应用对 ATRA 毒性的抑制作用并没有显著强于单用 NAC 或 salubrinal,推测这 2 种药物合用并没有叠加效应。此外,ERS 抑制剂 salubrinal 可抑制 ATRA 诱导的细胞 ROS 水平升高,表明 ROS 和 ERS 存在相互作用。以往也有研究表明,细胞内 ROS 过量产生可直接诱导内质网损伤,阻碍 ROS 生成蛋白的正确折叠^[8]。

有研究表明 ATRA 以剂量和时间依赖的方式增加了 ARPE-19 细胞中 VEGF-A mRNA 和蛋白的表达^[9]。视网膜中 VEGF-A 的过度表达并刺激视网膜下新生血管的形成是 AMD 的主要特征^[10]。本研究中,模型对照组 VEGF-A 表达上调,而 NAC 和 salubrinal 处理可抑制 ATRA 诱导的 VEGF-A 蛋白表达上调,表明 ERS 和 ROS 均能影响 VEGF 的表达。研究表明,氧化应激可增加 RPE 细胞外泌体的分泌,并促进血管生成^[11]。ERS 可激活双链 RNA 依赖性蛋白激酶样 ER 激酶-eIF2 α -活化转录因子 4 (activating transcription factor 4, ATF4) 通路,导致 ATF4 的表达上调,ATF4 诱导多种基因的表达,包括编码 GRP78 和 VEGF 的基因^[12]。CHOP 是内质网应激时 ATF4 转录因子的主要靶点和细胞凋亡的执行者^[13]。已有研究表明 CHOP 在内质网应激期间激活 Ero1 α 表达,从而加重了内质网中 ROS 的积累^[14]。本研究结果也显示,ATRA 处理后细胞中 CHOP 表达水平升高,而 NAC 可抑制 CHOP 表达水平的升高,进一步证明 ROS 与 ERS 相互影响。氧化应激状态下,caspase 3 被激活形成 cleaved-caspase 3,进而催化主要细胞蛋白的分裂和染色质的凝聚,cleaved-caspase 3 还激活 DNA 酶,导致 DNA 断裂,最终导致细胞凋亡^[15]。本研究中,ATRA 诱导细胞 cleaved-caspase 3 水平显著升高,NAC 和 salubrinal 可抑制 ATRA 诱导的 cleaved-caspase 3 表达上调,证实 ROS 和 ERS 在 AMD 患者 RPE 细胞变性中起重要作用。

研究证实,过量积累 ATRA 会导致 ARPE-19 细胞产生 ROS 和 ERS,该方式模拟了急性和强烈的光照或 ATRA 清除的破坏导致 RPE 中的维甲酸过度沉积的体内条件,这是 AMD 发生和发展的相关因素,因此控制 ATRA 可能是治疗 AMD 的另一个方法^[16]。视循环的抑制减少了脂褐素的积累,使细胞对光诱导损伤更具抵抗力^[17]。ERS 抑制剂 4-苯基丁基膦酰乙酸可以通过抑制 RPE 细胞的 VEGF 上调,进而抑制 AMD 的发生^[18-20]。临床中,抗 VEGF 治疗可一定程度上改善湿性 AMD 患者的视力^[21-22],但大多数患者治疗后视力并没有恢复到最初的水平。因此,预防 AMD 的发

生将更为重要。只有玻璃疣的患者尚未达到玻璃体腔注射抗 VEGF 药物的治疗指征,但可以考虑采用口服抑制 ATRA 的药物进行预防,尤其是对老年患者^[23]。据报道,一种合成的维甲酸衍生物芬雷奈德降低了视循环的基质水平,已经在临床试验 II 期评估了其在治疗干性 AMD 中的作用^[24]。

综上,外源性 ATRA 可诱导 ARPE-19 细胞氧化应激、内质网应激损伤及凋亡,这一过程可被 NAC 和 salubrinal 所抑制,故推测 ROS 和 ERS 可能参与 ATRA 诱导的 RPE 功能障碍。鉴于 ATRA 和氧化应激的协同细胞毒性作用,基于抑制视网膜代谢途径的 AMD 新治疗策略或将成为可能。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明 吴娟: 酝酿和设计实验、实施研究、采集数据、分析/解释数据、起草文章、统计分析; 崔冬梅、曾骏文: 对文章的知识性内容作批评性审阅、指导研究

参考文献

- Ambati J, Atkinson JP, Gelfand BD. Immunology of age-related macular degeneration [J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13(6): 438-451. DOI: 10.1038/nri3459.
- Parker RO, Crouch RK. Retinol dehydrogenases (RDHs) in the visual cycle [J]. Exp Eye Res, 2010, 91(6): 788-792. DOI: 10.1016/j.exer.2010.08.013.
- Saari JC. Vitamin A and vision [J]. Subcell Biochem, 2016, 81: 231-259. DOI: 10.1007/978-94-024-0945-1_9.
- Ao J, Wood JP, Chidlow G, et al. Retinal pigment epithelium in the pathogenesis of age-related macular degeneration and photobiomodulation as a potential therapy? [J]. Clin Exp Ophthalmol, 2018, 46(6): 670-686. DOI: 10.1111/ceo.13121.
- Tokarz P, Piastowska-Ciesielska AW, Kaarniranta K, et al. All-trans retinoic acid modulates DNA damage response and the expression of the VEGF-A and MKI67 genes in ARPE-19 cells subjected to oxidative stress [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(6). DOI: 10.3390/ijms17060898.
- Tokarz P, Kaarniranta K, Blasiak J. Inhibition of DNA methyltransferase or histone deacetylase protects retinal pigment epithelial cells from DNA damage induced by oxidative stress by the stimulation of antioxidant enzymes [J]. Eur J Pharmacol, 2016, 776: 167-175. DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.02.049.
- 吴娟, 崔冬梅, 杨晓, 等. 全反式视黄酸诱导 ARPE-19 细胞凋亡的信号途径 [J]. 中华实验眼科杂志, 2021, 39(6): 490-497. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20190704-00293.
Wu J, Cui DM, Yang X, et al. All-trans retinoic acid-induced apoptosis signaling pathway in ARPE-19 cells [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2021, 39(6): 490-497. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20190704-00293.
- Li J, Cai X, Xia Q, et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress in all-trans-retinal-induced retinal pigment epithelium degeneration [J]. Toxicol Sci, 2015, 143(1): 196-208. DOI: 10.1093/toxsci/ktu223.
- Chen JT, Liang JB, Chou CL, et al. Retinoic acid induces VEGF gene expression in human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19) [J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2005, 21(6): 413-419. DOI: 10.1089/jop.2005.21.413.
- Rating P, Freimuth MA, Stuschke M, et al. Adjuvant radiotherapy during anti-VEGF in neovascular age-related macular degeneration [J]. Ophthalmology, 2017, 114(4): 370-374. DOI: 10.1007/s00347-017-0451-9.
- Atienzar-Aroca S, Flores-Bellver M, Serrano-Heras G, et al. Oxidative stress in retinal pigment epithelium cells increases exosome secretion and promotes angiogenesis in endothelial cells [J]. J Cell Mol Med, 2016, 20(8): 1457-1466. DOI: 10.1111/jcmm.12834.
- Matsui A, Kaneko H, Kachi S, et al. Expression of vascular endothelial growth factor by retinal pigment epithelial cells induced by amyloid- β is depressed by an endoplasmic reticulum stress inhibitor [J]. Ophthalmic Res, 2015, 55(1): 37-44. DOI: 10.1159/000440885.
- Minasyan L, Sreekumar PG, Hinton DR, et al. Protective mechanisms of the mitochondrial-derived peptide humanin in oxidative and endoplasmic reticulum stress in RPE cells [J/OL]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 2017: 1675230 [2022-11-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28814984>. DOI: 10.1155/2017/1675230.
- Tangvarasittichai O, Tangvarasittichai S. Oxidative stress, ocular disease and diabetes retinopathy [J]. Curr Pharm Des, 2018, 24(40): 4726-4741. DOI: 10.2174/1381612825666190115121531.
- Lossi L, Castagna C, Merighi A. Caspase-3 mediated cell death in the normal development of the mammalian cerebellum [J/OL]. Int J Mol Sci, 2018, 19(12): 3999 [2022-11-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30545052>. DOI: 10.3390/ijms19123999.
- Maiti P, Kong J, Kim SR, et al. Small molecule RPE65 antagonists limit the visual cycle and prevent lipofuscin formation [J]. Biochemistry, 2006, 45(3): 852-860. DOI: 10.1021/bi0518545.
- Maeda A, Maeda T, Goleczak M, et al. Involvement of all-trans-retinal in acute light-induced retinopathy of mice [J/OL]. J Biol Chem, 2009, 284(22): 15173-15183 [2022-11-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19304658>. DOI: 10.1074/jbc.M900322200.
- Oh S, Hong HS, Hwang E, et al. Amyloid peptide attenuates the proteasome activity in neuronal cells [J]. Mech Ageing Dev, 2005, 126(12): 1292-1299. DOI: 10.1016/j.mad.2005.07.006.
- Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, et al. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes [J]. Science, 2006, 313(5790): 1137-1140. DOI: 10.1126/science.1128294.
- Qi X, Hosoi T, Okuma Y, et al. Sodium 4-phenylbutyrate protects against cerebral ischemic injury [J]. Mol Pharmacol, 2004, 66(4): 899-908. DOI: 10.1124/mol.104.001339.
- Brown DM, Kaiser PK, Michels M, et al. Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration [J]. N Engl J Med, 2006, 355(14): 1432-1444. DOI: 10.1056/NEJMoa062655.
- Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, et al. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration [J]. N Engl J Med, 2006, 355(14): 1419-1431. DOI: 10.1056/NEJMoa054481.
- Ijima R, Kaneko H, Ye F, et al. Suppression of laser-induced choroidal neovascularization by the oral medicine targeting histamine receptor H4 in mice [J/OL]. Transl Vis Sci Technol, 2015, 4(2): 6 [2022-11-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25774332>. DOI: 10.1167/tvst.4.2.6.
- Mata NL, Lichter JB, Vogel R, et al. Investigation of oral fenretinide for treatment of geographic atrophy in age-related macular degeneration [J]. Retina, 2013, 33(3): 498-507. DOI: 10.1097/IAE.0b013e318265801d.

(收稿日期: 2022-06-14 修回日期: 2022-12-05)

(本文编辑: 张宇)