

阿魏酸对糖尿病小鼠视网膜和高糖诱导的人 RPE 细胞损伤的抑制作用及其机制

朱德军¹ 邹文青¹ 曹相枚² 王潇飞³ 陆钊罡⁴

¹宁夏回族自治区人民医院 宁夏眼科医院, 银川 750002; ²宁夏医科大学基础医学院病理学系, 银川 750002; ³华北理工大学附属医院病理科, 唐山 063000; ⁴宁夏回族自治区人民医院药理学部, 银川 750002

通信作者: 邹文青, Email: zouwenqing0706@163.com

【摘要】 目的 探讨阿魏酸对糖尿病小鼠视网膜和高糖诱导的人视网膜色素上皮(RPE)细胞损伤的抑制作用及其机制。方法 选取 SPF 级雄性 8 周龄 2 型糖尿病 db/db 小鼠 30 只, 采用随机数字表法将小鼠分为模型组和阿魏酸组, 每组 15 只, 另选取 15 只同周龄 db/m 小鼠作为对照组。模型组和对照组每日采用生理盐水灌胃(5 ml/kg), 阿魏酸组采用阿魏酸溶液灌胃(0.05 g/kg), 治疗后 2 个月处死各组小鼠并摘除眼球。采用苏木精-伊红染色观察小鼠视网膜组织形态学变化; 采用免疫荧光染色法和 Western blot 法检测各组小鼠视网膜组织线粒体钙离子单向转运蛋白(MCU)、p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)、磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p-p38 MAPK)蛋白荧光强度和表达水平。取人 RPE 细胞, 将其分为对照组、二甲基亚砜(DMSO)组、高糖组和高糖+阿魏酸组, 其中对照组不做任何处理, 其余各组用相应试剂培养 24 h。采用活性氧簇(ROS)检测试剂盒检测各组 RPE 细胞 ROS 水平; 采用线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)检测各组 RPE 细胞线粒体膜电位水平; 采用微丝绿色荧光探针检测各组 RPE 细胞 MCU 和微丝荧光强度; 通过慢病毒转染技术沉默和过表达 MCU 蛋白水平探讨 MCU 与 p38 MAPK、p-p38MAPK 间的调控关系; 采用免疫荧光染色法和 Western blot 法检测各组 RPE 细胞 MCU、p38 MAPK、p-p38MAPK 蛋白荧光强度和表达水平。结果 与对照组比较, 模型组小鼠视网膜组织外核层、内核层和神经节细胞层细胞间隙增大、排列紊乱, 阿魏酸组小鼠视网膜组织明显改善。与对照组比较, 模型组、阿魏酸组小鼠视网膜组织 MCU、p-p38 MAPK 和 MCU+p-p38 MAPK 蛋白荧光强度显著升高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 与模型组比较, 阿魏酸组小鼠视网膜组织 MCU、p-p38 MAPK 和 MCU+p-p38 MAPK 蛋白荧光强度显著降低, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与对照组比较, 模型组小鼠视网膜组织 MCU、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白相对表达量显著升高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 与模型组比较, 阿魏酸组小鼠视网膜组织 MCU、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白相对表达量显著降低, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。对照组、DMSO 组、高糖组和高糖+阿魏酸组细胞 ROS 荧光强度分别为 0.22 ± 0.02 、 0.22 ± 0.03 、 0.30 ± 0.02 和 0.24 ± 0.02 , 总体比较差异均有统计学意义($F = 7.845, P < 0.01$), 其中高糖组细胞 ROS 荧光强度明显高于对照组和 DMSO 组, 高糖+阿魏酸组细胞 ROS 荧光强度明显低于高糖组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。高糖组、高糖+阿魏酸组细胞线粒体膜电位水平明显低于对照组和 DMSO 组, 高糖+阿魏酸组细胞线粒体膜电位水平明显高于高糖组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与对照组、DMSO 组比较, 高糖组 MCU 荧光强度较高, 并伴随着细胞微丝减少和变细; 高糖+阿魏酸组 MCU 蛋白荧光强度明显下降, 细胞微丝数量明显增加。与对照组、DMSO 组比较, 高糖组细胞 MCU、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白荧光强度和相对表达量显著升高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 与高糖组比较, 高糖+阿魏酸组细胞 MCU、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白荧光强度和相对表达量显著降低, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与对照组和空载体组比较, MCU 过表达组细胞 MCU、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白相对表达量显著升高, MCU shRNA 组、MCU 过表达+阿魏酸组细胞 MCU、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白相对表达量显著降低, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 与 MCU 过表达组比较, MCU shRNA 组、MCU 过表达+阿魏酸组细胞 MCU、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白相对表达量显著降低, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 阿魏酸能够调控氧化应激和线粒体功能障碍, 进而改善糖尿病小鼠视网膜和高糖诱导的 RPE 细胞损伤, 其可能通过 MCU 及 p38MAPK 信号通路发挥保护作用。

【关键词】 阿魏酸; 糖尿病; 视网膜; 视网膜色素上皮细胞; 线粒体钙离子单向转运蛋白; 氧化

应激; 线粒体功能障碍

基金项目: 宁夏回族自治区重点研发计划 (2021BEG03110)

DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20231114-00173

Inhibitory effect of ferulic acid on the retina of diabetic mice and high glucose-induced human retinal pigment epithelium cell injury and the mechanism

Zhu Dejun¹, Zou Wenqing¹, Cao Xiangmei², Wang Xiaofei³, Lu Zhaogang⁴

¹Ningxia Eye Hospital, People's Hospital of Ningxia Hui Autonomous Region, Yinchuan 750002, China; ²Department of Pathology, School of Basic Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750002, China; ³Department of Pathology, North China University of Science and Technology Affiliated Hospital, Tangshan 063000, China; ⁴Department of Pharmacy, People's Hospital of Ningxia Hui Autonomous Region, Yinchuan 750002, China

Corresponding author: Zou Wenqing, Email: zouwenqing0706@163.com

[Abstract] Objective To investigate the inhibitory effect of ferulic acid on the retina of diabetic mice and high glucose-induced human retinal pigment epithelium (RPE) cell injury and the mechanism. **Methods** Thirty 8-week-old SPF male type 2 diabetic db/db mice were selected and divided into a model group and a ferulic acid group by the random number table method, with 15 mice in each group. Another 15 db/m mice of the same age were selected as a control group. The model and control groups received normal saline (5 ml/kg) by gavage daily, and the ferulic acid group received ferulic acid solution (0.05 g/kg) by gavage daily. After two months of treatment, the mice were sacrificed and the eyeballs were removed. The morphological changes of mouse retinal tissues were observed by hematoxylin-eosin staining. The fluorescence intensity and expression levels of mitochondrial calcium uniporter (MCU), p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) and phosphorylated p38 MAPK (p-p38 MAPK) in mouse retinal tissues were detected by immunofluorescence staining and Western blot. Human RPE cells were divided into control group, dimethyl sulfoxide (DMSO) group, high glucose group and high glucose+ferulic acid group. The control group received no treatment, and the other cell groups were cultured with the corresponding reagents for 24 hours. The reactive oxygen (ROS) level of RPE cells in each group was detected with the ROS detection kit. The mitochondrial membrane potential level of RPE cells was detected with the a mitochondrial membrane potential detection kit (JC-1). The MCU and microfilament fluorescence intensity of RPE cells were detected with the a microfilament green fluorescent probe. To explore the regulatory relationship between MCU, p38 MAPK and p-p38 MAPK, the MCU protein level was silenced and overexpressed by lentivirus transfection technology. The fluorescence intensity and expression levels of MCU, p38 MAPK and p-p38 MAPK proteins in RPE cells were detected by immunofluorescence staining and Western blot. The use and feeding of experimental animals followed the 3R principle and the Statement of the Association for Research in Vision and Ophthalmology on the Use of Animals in Ophthalmology and Vision Research. This study protocol was approved by the Ethics Committee of Ningxia Eye Hospital, People's Hospital of Ningxia Hui Autonomous Region (No. 2019085). **Results** The intercellular space of the outer nuclear layer, inner nuclear layer and ganglion cell layer of the retinal tissue in the model group was increased and the cell arrangement was disordered compared with the control group, and the retinal tissue in the ferulic acid group was significantly improved. Compared with the control group, the fluorescence intensity of MCU, p-p38 MAPK and MCU+p-p38 MAPK protein of mouse retinal tissue in model group and ferulic acid group was significantly increased (all at $P < 0.05$). Compared with the model group, the fluorescence intensity of MCU, p-p38 MAPK and MCU+p-p38 MAPK protein of mice retinal tissue in ferulic acid group was significantly decreased (all at $P < 0.05$). Compared with the control group, the relative expression levels of MCU, p38 MAPK and p-p38 MAPK proteins of mouse retinal tissue in model group were significantly increased (all at $P < 0.05$). Compared with the model group, the relative expression levels of MCU, p38 MAPK and p-p38 MAPK proteins of mice retinal tissue in ferulic acid group were significantly decreased (all at $P < 0.05$). The ROS fluorescence intensities in the control group, DMSO group, high glucose group and high glucose+ferulic acid group were 0.22 ± 0.02 , 0.22 ± 0.03 , 0.30 ± 0.02 and 0.24 ± 0.02 , respectively, and the overall difference was statistically significant ($F = 7.845$, $P < 0.01$). The ROS fluorescence intensity was significantly higher in the high glucose group than in the control and DMSO groups, and it was significantly lower in the high glucose+ferulic acid group than in the high glucose group (all at $P < 0.05$). The

mitochondrial membrane potential was significantly lower in high glucose group and high glucose+ferulic acid group than in control and DMSO groups, and significantly higher in high glucose+ferulic acid group than in high glucose group (all at $P < 0.05$). Compared with the control group and DMSO group, the fluorescence intensity of MCU was higher in the high glucose group, accompanied by the decrease and thinning of cell microfilaments, and the fluorescence intensity of MCU protein was significantly decreased in high glucose+ferulic acid group, with the number of microfilaments increased significantly. Compared with the control group and DMSO group, the fluorescence intensity and relative expressions of MCU, p38 MAPK and p-p38 MAPK proteins were significantly increased in the high glucose group (all at $P < 0.05$). Compared with the high glucose group, the fluorescence intensity and relative expressions of MCU, p38 MAPK and p-p38 MAPK proteins were significantly decreased in the high glucose+ferulic acid group (all at $P < 0.05$). Compared with the control group and the empty vector group, the relative expressions of MCU, p38 MAPK and p-p38 MAPK proteins were significantly increased in the MCU overexpression group and significantly decreased in the MCU shRNA group and the MCU overexpression+ferulic acid group (all at $P < 0.05$). Compared with MCU overexpression group, the relative expressions of MCU, p38 MAPK and p-p38 MAPK proteins were significantly decreased in MCU shRNA group and MCU overexpression+ferulic acid group, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.05$). **Conclusions** Ferulic acid can regulate oxidative stress and mitochondrial dysfunction, thereby ameliorating retinal damage and high glucose-induced RPE cell injury in diabetic mice, which may play a protective role through MCU and p38MAPK signaling pathways.

[Key words] Ferulic acid; Diabetes mellitus; Retina; Retinal pigment epithelial cell; Mitochondrial calcium uniporter; Oxidative stress; Mitochondrial dysfunction

Fund program: The Ningxia Hui Autonomous Region Key R&D Plan Project (2021BEG03110)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20231114-00173

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是一种由糖尿病引起的微血管并发症,也是我国成年人致盲的主要原因之一,严重影响患者的正常生活^[1]。DR 的发生过程中,氧化应激、钙稳态失调、能量代谢失衡等多种途径发挥重要作用,其中,高糖诱导的氧化应激损伤是导致视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞损伤的主要原因之一^[2-4]。近年来,尽管对 DR 的发病机制进行了广泛研究,但 DR 的临床治疗效果仍不令人满意,因此,探索治疗 DR 的新药具有重要意义。阿魏酸是诸多中药的天然药物成分,具有抗炎、抗氧化、抗凋亡作用。前期研究发现,阿魏酸可以通过降低 p53、B 淋巴细胞瘤 2 关联 X 蛋白 (B-cell lymphoma-2-associated X protein, Bax) 表达缓解高糖诱导的人晶状体上皮细胞损伤^[5]。随后,本课题组通过动物实验和体外实验发现,阿魏酸可通过调节 p53、Bax、Bcl-2 表达,减轻高糖诱导的 RPE 细胞凋亡,改善 db/db 小鼠视网膜病变^[6]。在 DR 进展中,线粒体功能紊乱发挥关键作用,其中线粒体钙稳态调节信号的异常是导致视网膜损伤的加速器^[7]。Yuan 等^[8]研究发现,线粒体钙离子单向转运蛋白 (mitochondrial calcium uniporter, MCU) 与糖尿病并发症的发生有关,抑制 MCU 表达可显著改善糖尿病肾病。本研究以线粒体钙稳态信号为突破口,探讨阿魏酸通过调节钙稳态相关蛋白缓解高糖诱导 RPE 细胞损伤的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及细胞来源 选取 SPF 级雄性 8 周龄 2 型糖尿病 db/db 小鼠 30 只,体质量 32~36 g, 雌性 8 周龄正常 db/m 小鼠 15 只,体质量 16~18 g [许可证号:SCXK(苏)2021-0013], 均购自常州卡文斯实验动物有限公司,饲养与实验均在宁夏医科大学实验动物中心进行。实验动物使用和喂养遵循 3R 原则和视觉与眼科研究协会 (ARVO) 关于动物用于眼科和视力研究的声明,本研究经宁夏回族自治区人民医院 (宁夏眼科医院) 伦理委员会批准 (批文号:2019085)。人 RPE 细胞购自中国科学院细胞库/干细胞库,用含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和 1% 双抗 DMEM 培养基,在 37 °C、5% CO₂ 条件下对人 RPE 细胞进行培养,每 2~3 天传代 1 次。

1.1.2 主要试剂及仪器 阿魏酸、2',7'-二氯荧光素二乙酸酯 (2',7'-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA) 荧光探针 (美国 Sigma 公司); DMEM 培养基、FBS、青霉素、链霉素溶液 (美国 Gibco 公司); 小鼠单克隆 MCU 抗体 (sc-515930) (美国 Santa Cruz 公司); 兔多克隆 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 抗体 (14064-1-AP)、兔多克隆 β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (20536-1-AP) (武汉 Proteintech 公

司);兔多克隆磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase, p-p38MAPK) 抗体 (AF4001) (常州 Affinity 公司);活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒 (S0033S)、线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1, C2006)、Actin-Tracker Green-488 微丝绿色荧光探针检测试剂盒 (C2201S) (上海碧云天生物技术有限公司);二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、4% 多聚甲醛 (北京 Solarbio 公司);辣根酶标记山羊抗兔 IgG (ZB-2301)、辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG (ZB-2305)、Alexa Fluor[®] 594 标记山羊抗小鼠 IgG (ZF-0513)、Alexa Fluor[®] 488 标记山羊抗兔 IgG (ZF-0511) (北京中杉金桥生物技术有限公司);葡萄糖溶液 (吉林天瑞生物科技公司)。荧光显微镜 (日本 Olympus 公司);核酸蛋白电泳仪 (美国伯乐公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及干预 (1) 动物实验 采用随机数字表法将 30 只 2 型糖尿病 db/db 小鼠随机分成模型组 15 只和阿魏酸组 15 只,另选取 15 只同周龄正常 db/m 小鼠作为对照组。模型组和对照组每日采用生理盐水灌胃 (5 ml/kg),阿魏酸组采用阿魏酸溶液灌胃 (0.05 g/kg),2 个月后,通过腹腔内注射过量戊巴比妥钠溶液 (200 mg/kg) 对小鼠实施安乐死,立即摘除小鼠眼球,用 4% 多聚甲醛固定,经过常规处理后,将解剖后的视网膜样本包埋入石蜡块中。(2) 细胞实验 用 1 g/L DMSO 将阿魏酸制成 2 g/L 阿魏酸混悬液,将人 RPE 细胞分为对照组、DMSO 组、高糖组、高糖+阿魏酸组。对照组不做任何处理,DMSO 组加入 1 g/L DMSO,高糖组加入 30 mmol/L 葡萄糖溶液,高糖+阿魏酸组加入 30 mmol/L 葡萄糖+2 g/L 阿魏酸混悬液,干预处理 24 h。

1.2.2 苏木精-伊红染色法观察小鼠视网膜组织形态 取视网膜组织石蜡切片,二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,苏木素染色 5 min,酸性乙醇分化液处理 3 s,水洗 2 min。伊红染色 30 s,脱水,封片,光学显微镜下观察小鼠视网膜组织形态学改变。

1.2.3 免疫组织荧光染色法检测小鼠视网膜组织 MCU、p38MAPK 和 p-p38MAPK 蛋白荧光强度 小鼠视网膜石蜡切片脱蜡至水,枸橼酸盐缓冲液中高压修复抗原 10 min,室温下冷却,磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 清洗 3 次,0.5% Triton X-100 孵育 15 min, PBS 清洗 3 次,3% H₂O₂ 处理 10 min, PBS 清洗 3 次,山羊血清封闭 30 min,分别滴加 MCU (1:100)、p38MAPK (1:200)、p-p38MAPK (1:200) 一抗稀

释液,4 ℃ 孵育过夜;PBS 清洗 3 次,滴加相应的荧光二抗工作液孵育 30 min, DAPI 染色 5 min,含抗荧光淬灭剂的封片剂封片,荧光显微镜下拍照,采用 Image-ProPlus 6.0 图像分析软件进行荧光强度分析。

1.2.4 Western blot 法检测小鼠视网膜组织 MCU、p38MAPK、p-p38MAPK 蛋白表达 取小鼠视网膜组织,匀浆后加入 100 μl 组织裂解液,离心半径 8 cm, 12 000 r/min 离心 20 min 后取上清,BCA 法测定总蛋白浓度,100 ℃ 加热 5 min 使蛋白变性,上样进行 SDS-PAGE 电泳,转膜,0.5% 脱脂奶粉封闭 2 h,分别滴加 MCU (1:500)、p38MAPK (1:1 000)、p-p38MAPK (1:1 000) 一抗稀释液,4 ℃ 孵育过夜,次日复温后加入相应二抗 (1:6 000),1 h 后进行 ECL 显影,采用 ImageJ 软件分析各条带灰度值,以 β-actin 为内参,目标蛋白相对表达量 = 目标蛋白条带灰度值/β-actin 蛋白条带灰度值。

1.2.5 ROS 检测试剂盒检测 RPE 细胞 ROS 水平 按照实验分组对细胞进行处理,接种于 6 孔板中,无血清培养基清洗 2 次,按照 ROS 检测试剂盒说明书,加入 10 μmol/L DCFH-DA 溶液,37 ℃ 避光孵育 30 min,荧光显微镜下拍照,采用 Image-ProPlus 6.0 图像分析软件进行荧光强度分析。

1.2.6 JC-1 法检测 RPE 细胞线粒体膜电位水平 按照实验分组对细胞进行处理,接种于 6 孔板中,加入 JC-1 染色工作液 0.5 ml,37 ℃ 孵育 30 min,离心半径 14 cm,2 000 r/min 离心 3 min,弃上清,加入 JC-1 缓冲液 1 ml 重悬细胞,荧光显微镜下观察并拍照,采用 Image-ProPlus 6.0 图像分析软件进行荧光强度分析。

1.2.7 Actin-Tracker Green-488 微丝绿色荧光探针法检测 RPE 细胞 MCU 和微丝荧光强度 取各组细胞, PBS 清洗 2 次,4% 多聚甲醛溶液室温固定细胞 10 min, PBS 清洗 2 次,0.5% Triton X-100 孵育 15 min,滴加 MCU 一抗 (1:100),4 ℃ 孵育过夜, PBS 冲洗 3 次,加入相应二抗 (1:100) 孵育 1 h, PBS 冲洗 2 次,然后将 Actin-Tracker Green 工作液按 1:40 的比例稀释配置染色工作液,每组玻片滴加 200 μl 染色液,室温避光孵育 30 min, PBS 清洗 2 次,避光晾干,滴加 DAPI 封片,荧光显微镜下拍照,采用 Image-ProPlus 6.0 图像分析软件进行荧光强度分析。

1.2.8 免疫细胞荧光染色法检测 RPE 细胞 MCU、p38MAPK、p-p38MAPK 蛋白荧光强度 取各组细胞进行爬片, PBS 清洗 3 次,4% 多聚甲醛固定 15 min, 0.5% Triton X-100 孵育 15 min, PBS 清洗 3 次,山羊血清封闭 30 min,分别滴加 MCU (1:100)、p38MAPK

(1:200)、p-p38MAPK(1:200)一抗稀释液,4℃孵育过夜,其余步骤同 1.2.3。

1.2.9 细胞转染沉默和过表达 MCU 蛋白水平 构建 MCU 沉默序列 sh-RNA(克隆编号:PLVE2986):5'-CCGGGACATTGGTCCAGCACTATACTCGAGTATAGTTGCTGGACCAATGTCTTTTTTG-3'; sh-NC:5'-CCGGGTTCTCCGAACGTGTCACGTACTCGAGTACGTGACACGTTCCGAGAAGCTTTTTTG-3'。构建 MCU 过表达质粒(200707HE6725-5R12),克隆位点:BamHI/EcoRI,载体:pcDNA3.1(+). MCU shRNA 序列、MCU 过表达质粒均由上海生工生物工程股份有限公司合成。取处于对数生长期的细胞,接种于 6 孔板中,每孔加入约 1×10⁵ 个细胞,细胞融合度达 70%~80%时,分为对照组、空载体组、MCU 过表达组、MCU shRNA 组和 MCU 过表达+阿魏酸组,严格按照 LipofectamineTM8000 转染试剂说明书进行细胞转染,转染后 6 h 更换培养液,继续培养 48 h。

1.2.10 Western blot 法检测 RPE 细胞 MCU、p38MAPK、p-p38MAPK 蛋白表达 取各组细胞,PBS 清洗 2 次,加入 500 μl 细胞裂解液,离心半径 8 cm,12 000 r/min 离心 20 min 后取上清,BCA 法测定总蛋白浓度,其余步骤同 1.2.4。

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,采用 Levene 检验证实方差齐,组间 ROS 水平、线粒体膜电位水平、微丝荧光强度和 MCU、p38 MAPK、p-p38 MAPK 蛋白荧光强度及相对表达量比较采用单因素方差分析,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 不同处理组小鼠视网膜组织形态学比较

苏木精-伊红染色结果显示,对照组小鼠视网膜组织形态无异常变化,模型组小鼠视网膜组织

外核层、内核层和神经节细胞层细胞间隙增大、排列紊乱,阿魏酸组小鼠视网膜组织外核层、内核层和神经节细胞层细胞结构基本恢复到正常水平(图 1)。

2.2 不同处理组小鼠视网膜组织 MCU、p-p38 MAPK 和 MCU+p-p38 MAPK 蛋白荧光强度比较

模型组小鼠视网膜组织 MCU 和 p-p38 MAPK 荧光强度明显强于对照组,阿魏酸组 MCU 和 p-p38 MAPK 荧光强度与模型组比较明显减弱(图 2)。对照组、模型组、阿魏酸组小鼠视网膜组织 MCU、p-p38 MAPK 和 MCU+p-p38 MAPK 蛋白荧光强度总体比较,差异均有统计学意义(*F*=83.481,59.030,90.682,均 *P*<0.001)。与对照组比较,模型组、阿魏酸组小鼠视网膜组织 MCU、p-p38 MAPK 和 MCU+p-p38 MAPK 蛋白荧光强度显著升高,差异均有统计学意义(均 *P*<0.05);与模型组比较,阿魏酸组小鼠视网膜组织 MCU、p-p38 MAPK 和 MCU+p-p38 MAPK 蛋白荧光强度显著降低,差异均有统计学意义(均 *P*<0.05)(表 1)。

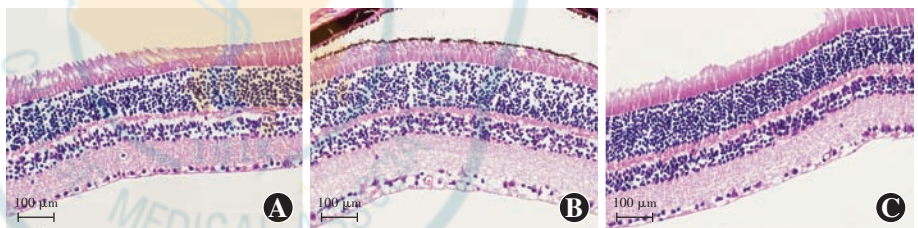


图 1 不同处理组小鼠视网膜组织形态学变化(HE ×400,标尺=100 μm) 对照组小鼠视网膜组织形态无异常变化,模型组小鼠视网膜组织外核层、内核层和神经节细胞层细胞间隙增大、排列紊乱,阿魏酸组小鼠视网膜组织外核层、内核层和神经节细胞层细胞结构基本恢复到正常水平 A:对照组 B:模型组 C:阿魏酸组

Figure 1 Morphological changes of mice retinal tissue in different treatment groups (HE ×400, scale bar=100 μm) The retinal tissue of mice in the control group had no abnormal morphological changes. In the model group, the cell gap of outer nuclear layer, inner nuclear layer and ganglion cell layer increased and cell arrangement was disordered. In the ferulic acid group, the cell structure of outer nuclear layer, inner nuclear layer and ganglion cell layer basically returned to normal level A: Control group B: Model group C: Ferulic acid group

表 1 各组小鼠视网膜组织 MCU 和 p-p38 MAPK 蛋白荧光强度比较($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of fluorescence intensity of MCU and p-p38 MAPK proteins in mouse retinal tissue among different groups ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 样本量 | MCU 蛋白 | p-p38 MAPK 蛋白 | MCU+p-p38 MAPK 蛋白 |
|------------|-----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 对照组 | 15 | 0.12±0.01 | 0.15±0.01 | 0.14±0.01 |
| 模型组 | 15 | 0.29±0.02 ^a | 0.28±0.02 ^a | 0.32±0.02 ^a |
| 阿魏酸组 | 15 | 0.17±0.01 ^{ab} | 0.19±0.01 ^{ab} | 0.18±0.02 ^{ab} |
| <i>F</i> 值 | | 83.481 | 59.030 | 90.682 |
| <i>P</i> 值 | | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

注:与对照组比较,^a*P*<0.05;与模型组比较,^b*P*<0.05(单因素方差分析,LSD-*t* 检验) MCU:线粒体钙离子单向转运蛋白;p-p38 MAPK:磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶

Note: Compared with control group, ^a*P*<0.05; compared with model group, ^b*P*<0.05 (One-way ANOVA, LSD-*t* test) MCU: mitochondrial calcium uniporter; p-p38 MAPK: phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase

2.3 不同处理组小鼠视网膜组织 MCU、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白相对表达量比较

与对照组比较,模型组小鼠视网膜组织 MCU、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白条带较强;与模型组比较,阿魏酸组 MCU、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白条带强度明显减弱(图 3)。对照组、模型组、阿魏酸组小鼠视网膜组织 MCU、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白相对表达量总体比较,差异均有统计学意义($F = 224.939, 652.211, 169.435$, 均 $P < 0.001$)。与对照组比较,模型组小鼠视网膜组织 MCU、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白相对表达量显著升高,阿魏酸组 MCU 和 p-p38 MAPK 蛋白相对表达量显著降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);与模型组比较,阿魏酸组小鼠视网膜组织 MCU、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白相对表达量显著降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表 2)。

2.4 不同处理组 RPE 细胞 ROS 水平比较

对照组、DMSO 组、高糖组和高糖+阿魏酸组 RPE 细胞 ROS 荧光强度分别为 0.22 ± 0.02 、 0.22 ± 0.03 、 0.30 ± 0.02 和 0.24 ± 0.02 , 总体比较差异有统计学意义($F = 7.845, P < 0.01$), 其中与对照组、DMSO 组比较,高糖组细胞 ROS 荧光强度明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);与高糖组比较,高糖+阿魏酸组细胞 ROS 荧光强度明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)(图 4)。

2.5 不同处理组 RPE 细胞线粒体膜电位水平比较

对照组、DMSO 组、高糖组、高糖+阿魏酸组 RPE 细胞线粒体膜电位水平分别为 0.32 ± 0.03 、 0.32 ± 0.03 、 0.08 ± 0.01 和 0.25 ± 0.02 , 总体比较差异有统计学意义($F = 53.711, P < 0.001$), 其中与对照组、DMSO 组比较,高糖组、高糖+阿魏酸组细胞线粒体膜电位水平明显降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);与高糖组比较,高糖+阿魏酸组细胞线粒体膜电位水平明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)(图 5)。

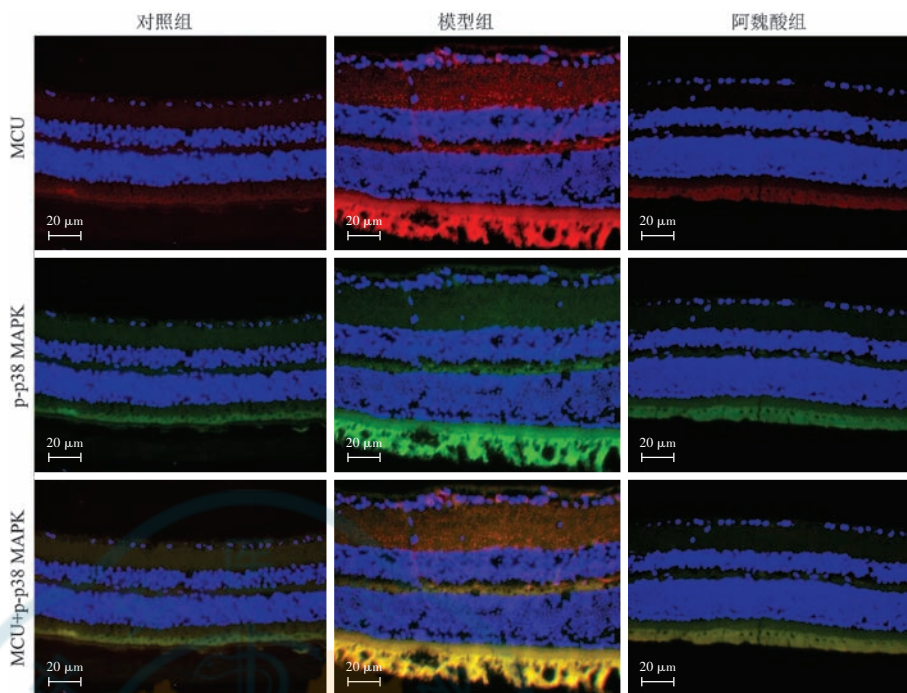


图 2 不同处理组小鼠视网膜组织 MCU、p-p38 MAPK 和 MCU+p-p38 MAPK 蛋白荧光染色图 (Alexa Fluor[®] 594, Alexa Fluor[®] 488 $\times 400$, 标尺 = 20 μm) 与对照组比较,模型组小鼠视网膜组织 MCU(红色)和 p-p38 MAPK(绿色)荧光强度显著增强;阿魏酸组 MCU 和 p-p38 MAPK 荧光强度较模型组明显减弱 MCU:线粒体钙离子单向转运蛋白;p-p38 MAPK:磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶

Figure 2 Fluorescence staining of MCU, p-p38 MAPK and MCU+p-p38 MAPK proteins in mouse retinal tissue in different treatment groups (Alexa Fluor[®] 594, Alexa Fluor[®] 488 $\times 400$, scale bar = 20 μm) Compared with the control group, the fluorescence intensity of MCU (red) and p-p38 MAPK (green) in mouse retinal tissue of model group was significantly enhanced. The fluorescence intensity of MCU and p-p38 MAPK in ferulic acid group was significantly decreased compared with model group MCU: mitochondrial calcium uniporter; p-p38 MAPK: phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase

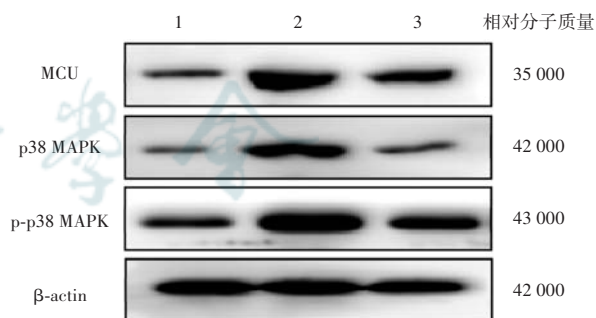


图 3 不同处理组小鼠视网膜组织 MCU、p38 MAPK、p-p38 MAPK 蛋白表达电泳图 1:对照组;2:模型组;3:阿魏酸组 MCU:线粒体钙离子单向转运蛋白;p38 MAPK:p38 丝裂原活化蛋白激酶;p-p38 MAPK:磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶; β -actin: β -肌动蛋白

Figure 3 Electrophoretogram of MCU, p38 MAPK and p-p38 MAPK proteins expression in mouse retina in different treatment groups 1: control group; 2: model group; 3: ferulic acid group MCU: mitochondrial calcium uniporter; p38 MAPK: p38 mitogen-activated protein kinase; p-p38 MAPK: phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase

2.6 不同处理组 RPE 细胞 MCU 和微丝荧光强度比较

与对照组、DMSO 组比较,高糖组 RPE 细胞 MCU 蛋白荧光强度较高,并伴随着细胞微丝减少和变细;高糖+阿魏酸组 MCU 蛋白荧光强度明显下降,细胞微丝数量明显增加(图 6)。对照组、DMSO 组、高糖组、高糖+阿魏酸组 RPE 细胞 MCU 和微丝荧光强度总体比较,差异均有统计学意义($F = 16.722, 180.790$,均 $P <$

0.01),其中与对照组、DMSO 组比较,高糖组细胞 MCU 蛋白荧光强度明显升高,微丝荧光强度明显降低,高糖+阿魏酸组细胞微丝荧光强度明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);与高糖组比较,高糖+阿魏酸组细胞 MCU 蛋白荧光强度明显降低,微丝荧光强度明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表 3)。

表 2 各组小鼠视网膜组织 MCU、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of relative expression levels of MCU, p38 MAPK and p-p38 MAPK proteins in mouse retinal tissue among different groups ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 样本量 | MCU | p38 MAPK | p-p38 MAPK |
|------|-----|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| 对照组 | 15 | 0.17±0.01 | 0.11±0.02 | 0.24±0.02 |
| 模型组 | 15 | 0.93±0.06 ^a | 0.89±0.05 ^a | 0.92±0.06 ^a |
| 阿魏酸组 | 15 | 0.56±0.05 ^{ab} | 0.16±0.02 ^b | 0.52±0.05 ^{ab} |
| F 值 | | 224.939 | 652.211 | 169.435 |
| P 值 | | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD- t 检验) MCU:线粒体钙离子单向转运蛋白;p38 MAPK:p38 丝裂原活化蛋白激酶;p-p38 MAPK:磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶

Note: Compared with control group, ^a $P < 0.05$; compared with model group, ^b $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test) MCU: mitochondrial calcium uniporter; p38 MAPK: p38 mitogen-activated protein kinase; p-p38 MAPK: phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase

表 3 各组 RPE 细胞 MCU 和微丝荧光强度比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of MCU and microfilament fluorescence intensity of RPE cells among different groups ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 样本量 | MCU | 微丝 |
|---------|-----|-------------------------|--------------------------|
| 对照组 | 3 | 0.17±0.02 | 0.16±0.01 |
| DMSO 组 | 3 | 0.17±0.02 | 0.17±0.01 |
| 高糖组 | 3 | 0.25±0.02 ^{ab} | 0.05±0.01 ^{ab} |
| 高糖+阿魏酸组 | 3 | 0.15±0.01 ^c | 0.22±0.01 ^{abc} |
| F 值 | | 16.722 | 180.790 |
| P 值 | | <0.01 | <0.001 |

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 DMSO 组比较,^b $P < 0.05$;与高糖组比较,^c $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD- t 检验) RPE:视网膜色素上皮; MCU:线粒体钙离子单向转运蛋白;DMSO:二甲基亚砜

Note: Compared with control group, ^a $P < 0.05$; compared with DMSO group, ^b $P < 0.05$; compared with high glucose group, ^c $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test) RPE: retinal pigment epithelium; MCU: mitochondrial calcium uniporter; DMSO: dimethyl sulfoxide

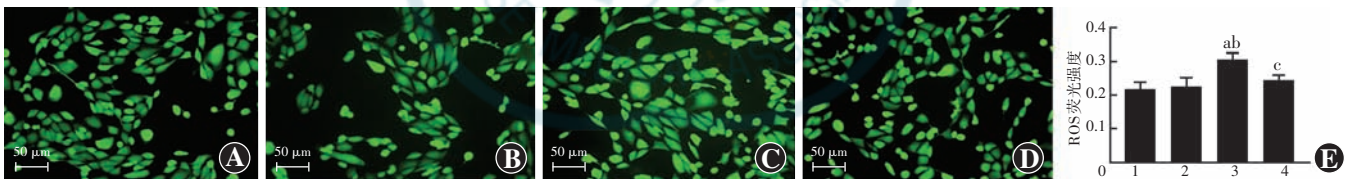


图 4 不同处理组 RPE 细胞内 ROS 水平比较 A~D:对照组、DMSO 组、高糖组和高糖+阿魏酸组 RPE 细胞 ROS 荧光染色图(DCFH-DA $\times 200$, 标尺 = 50 μm) E:不同处理组 RPE 细胞 ROS 荧光强度量化比较 $F = 7.845, P < 0.01$ 。与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 DMSO 组比较,^b $P < 0.05$;与高糖组比较,^c $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD- t 检验, $n = 3$) 1:对照组;2:DMSO 组;3:高糖组;4:高糖+阿魏酸组 ROS:活性氧簇

Figure 4 Comparison of ROS expression in RPE cells among different treatment groups A-D:ROS fluorescence staining of RPE cells in control group, DMSO group, high glucose group and high glucose+ferulic acid group (DCFH-DA $\times 200$, scale bar = 50 μm) E: Quantitative comparison of ROS fluorescence intensity in RPE cells among different treatment groups $F = 7.845, P < 0.01$. Compared with control group, ^a $P < 0.05$; compared with DMSO group, ^b $P < 0.05$; compared with high glucose group, ^c $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test, $n = 3$) 1: control group; 2: DMSO group; 3: high glucose group; 4: high glucose+ferulic acid group ROS: reactive oxygen species

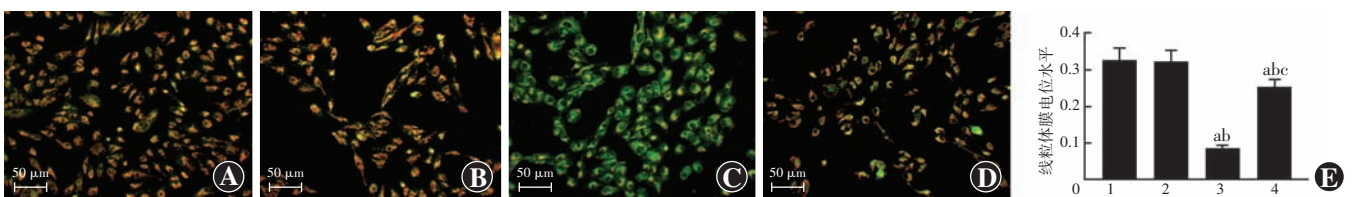


图 5 不同处理组 RPE 细胞线粒体膜电位水平比较 A~D:对照组、DMSO 组、高糖组和高糖+阿魏酸组 RPE 细胞线粒体膜电位荧光染色图(JC-1 $\times 200$, 标尺 = 50 μm) E:不同处理组 RPE 细胞线粒体膜电位水平量化比较 $F = 53.711, P < 0.001$ 。与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 DMSO 组比较,^b $P < 0.05$;与高糖组比较,^c $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD- t 检验, $n = 3$) 1:对照组;2:DMSO 组;3:高糖组;4:高糖+阿魏酸组

Figure 5 Comparison of mitochondrial membrane potential level of RPE cells among different treatment groups A-D: Mitochondrial membrane potential fluorescence staining of RPE cells in control group, DMSO group, high glucose group and high glucose+ferulic acid group (JC-1 $\times 200$, scale bar = 50 μm) E: Quantitative comparison of mitochondrial membrane potential levels in RPE cells among different treatment groups $F = 53.711, P < 0.001$. Compared with control group, ^a $P < 0.05$; compared with DMSO group, ^b $P < 0.05$; compared with high glucose group, ^c $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test, $n = 3$) 1: control group; 2: DMSO group; 3: high glucose group; 4: high glucose+ferulic acid group

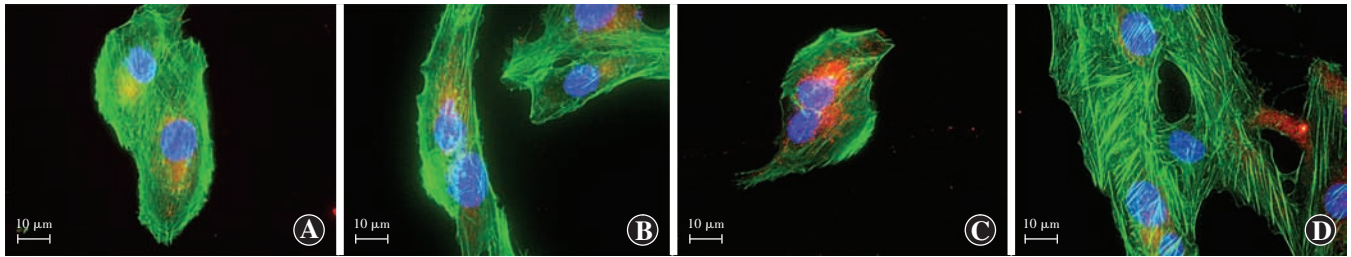


图 6 不同处理组 RPE 细胞 MCU 和微丝荧光染色图 (Actin-Tracker Green $\times 1\ 000$, 标尺 = $10\ \mu\text{m}$) 与对照组、DMSO 组比较, 高糖组 RPE 细胞 MCU (红色) 蛋白荧光强度较高, 并伴随着细胞微丝 (绿色) 减少和变细; 高糖+阿魏酸组 MCU 蛋白荧光强度明显下降, 细胞微丝数量明显增加 A: 对照组 B: DMSO 组 C: 高糖组 D: 高糖+阿魏酸组

Figure 6 Fluorescence staining of MCU and microfilament fluorescence intensity of RPE cells in different treatment groups (Actin-Tracker Green $\times 1\ 000$, scale bar = $10\ \mu\text{m}$) Compared with control group and DMSO group, the MCU (red) protein fluorescence intensity of RPE cells was stronger in high glucose group, and the cell microfilaments (green) were reduced and narrowed. The fluorescence intensity of MCU protein in high glucose+ferulic acid group was significantly decreased, and the number of microfilaments was significantly increased A: Control group B: DMSO group C: High glucose group D: High glucose+ferulic acid group

2.7 不同处理组 RPE 细胞 MCU、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白荧光强度比较

与对照组、DMSO 组比较, 高糖组 RPE 细胞 MCU、p38 MAPK、p-p38 MAPK 荧光强度显著增强, 以细胞质内升高为主, 与高糖组比较, 高糖+阿魏酸组 MCU、p38 MAPK、p-p38 MAPK 荧光强度显著降低 (图 7)。对照组、DMSO 组、高糖组、高糖+阿魏酸组 RPE 细胞 MCU、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白荧光强度总体比较, 差异均有统计学意义 ($F = 10.014, 31.132, 10.273$, 均 $P < 0.01$), 其中与对照组、DMSO 组比较, 高糖组细胞 MCU、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白荧光强度显著升高, 高糖+阿魏酸组细胞 p38 MAPK 蛋白荧光强度显著升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 与高糖组比较, 高糖+阿魏酸组细胞 MCU、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白荧光强度显著降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 4)。

2.8 不同处理组 RPE 细胞 MCU、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白表达比较

与对照组、DMSO 组比较, 高糖组 RPE 细胞 MCU、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白条带强度较高; 与高糖组比较, 高糖+阿魏酸组 MCU、p38

MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白条带强度明显降低 (图 8)。对照组、DMSO 组、高糖组、高糖+阿魏酸组 RPE 细胞 MCU、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义 ($F = 68.931, 26.979, 29.993$, 均 $P < 0.001$)。与对照组、DMSO 组比较, 高糖组、高糖+阿魏酸组细胞 MCU、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白相对表达量显著升高, 差异均有统

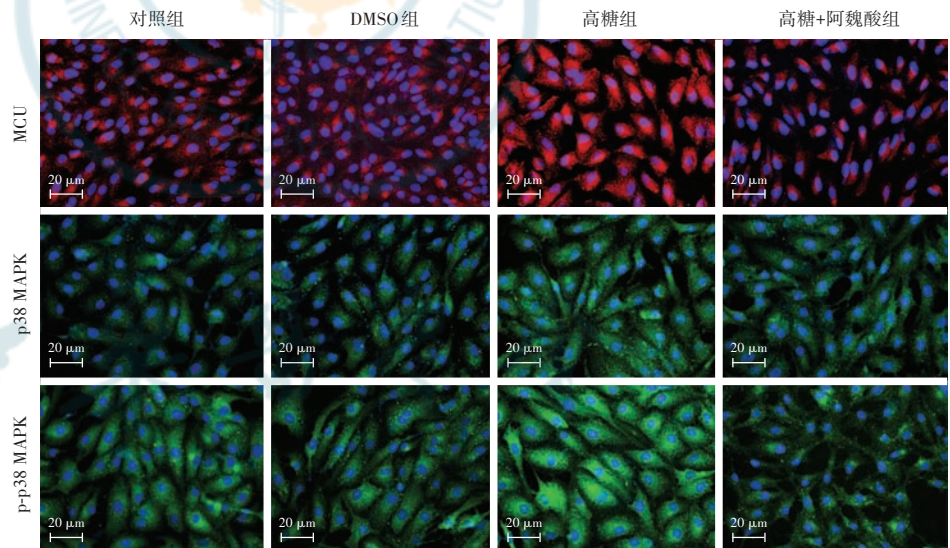


图 7 不同处理组 RPE 细胞 MCU、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白荧光染色图 (Alexa Fluor[®] 594、Alexa Fluor[®] 488 $\times 400$, 标尺 = $20\ \mu\text{m}$) 与对照组、DMSO 组比较, 高糖组 RPE 细胞 MCU (红色)、p38 MAPK (绿色)、p-p38 MAPK (绿色) 荧光强度显著增强, 主要以细胞质内升高为主; 与高糖组比较, 高糖+阿魏酸组 MCU、p38 MAPK、p-p38 MAPK 荧光强度显著降低 MCU: 线粒体钙离子单向转运蛋白; p38 MAPK: p38 丝裂原活化蛋白激酶; p-p38 MAPK: 磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶; DMSO: 二甲基亚砜

Figure 7 Fluorescence staining of MCU, p38 MAPK and p-p38 MAPK proteins of RPE cells in different treatment groups (Alexa Fluor[®] 594, Alexa Fluor[®] 488 $\times 400$, scale bar = $20\ \mu\text{m}$) Compared with control group and DMSO group, the fluorescence intensity of MCU (red), p38 MAPK (green) and p-p38 MAPK (green) of RPE cells in high glucose group was significantly enhanced, mainly in cytoplasm. The fluorescence intensity of MCU, p38 MAPK and p-p38 MAPK in high glucose + ferulic acid group was significantly decreased compared with that in high glucose group MCU: mitochondrial calcium uniporter; p38 MAPK: p38 mitogen activated protein kinase; p-p38 MAPK: phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase; DMSO: dimethyl sulfoxide

计学意义(均 $P < 0.05$);与高糖组比较,高糖+阿魏酸组细胞 MCU、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白相对表达量显著降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表 5)。

2.9 沉默和过表达 MCU 后各组 RPE 细胞 p38 MAPK、p-p38 MAPK 和 MCU 表达比较

与对照组、空载体组比较,MCU 过表达组 RPE 细

胞 MCU、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白条带强度较高;与 MCU 过表达组比较,MCU shRNA 组、MCU 过表达+阿魏酸组 MCU、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白条带强度明显降低(图 9)。对照组、空载体组、MCU 过表达组、MCU shRNA 组、MCU 过表达+阿魏酸组 RPE 细胞 MCU、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白相对表达

表 4 各组 RPE 细胞 MCU、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白荧光强度比较($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of fluorescence intensity of MCU, p38 MAPK and p-p38 MAPK proteins in RPE cells among different groups ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 样本量 | MCU | p38 MAPK | p-p38 MAPK |
|---------|-----|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 对照组 | 3 | 0.22±0.03 | 0.15±0.02 | 0.24±0.02 |
| DMSO 组 | 3 | 0.21±0.02 | 0.14±0.02 | 0.24±0.02 |
| 高糖组 | 3 | 0.30±0.02 ^{ab} | 0.27±0.02 ^{ab} | 0.33±0.02 ^{ab} |
| 高糖+阿魏酸组 | 3 | 0.23±0.02 ^c | 0.19±0.02 ^{abc} | 0.25±0.03 ^c |
| F 值 | | 10.014 | 31.132 | 10.273 |
| P 值 | | <0.01 | <0.001 | <0.01 |

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 DMSO 组比较,^b $P < 0.05$;与高糖组比较,^c $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验) RPE:视网膜色素上皮;MCU:线粒体钙离子单向转运蛋白;p38 MAPK:p38 丝裂原活化蛋白激酶;p-p38 MAPK:磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶;DMSO:二甲亚砜

Note: Compared with control group,^a $P < 0.05$; compared with DMSO group,^b $P < 0.05$; compared with high glucose group,^c $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) RPE: retinal pigment epithelium; MCU: mitochondrial calcium uniporter; p38 MAPK: p38 mitogen activated protein kinase; p-p38 MAPK: phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase; DMSO: dimethyl sulfoxide

表 5 各组 RPE 细胞 MCU、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of expression levels of MCU, p38 MAPK and p-p38 MAPK proteins in RPE cells among different groups ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 样本量 | MCU | p38 MAPK | p-p38 MAPK |
|---------|-----|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 对照组 | 3 | 0.32±0.04 | 0.45±0.05 | 0.43±0.06 |
| DMSO 组 | 3 | 0.33±0.04 | 0.44±0.07 | 0.45±0.06 |
| 高糖组 | 3 | 0.83±0.07 ^{ab} | 0.84±0.06 ^{ab} | 0.84±0.06 ^{ab} |
| 高糖+阿魏酸组 | 3 | 0.60±0.05 ^{abc} | 0.62±0.07 ^{abc} | 0.68±0.07 ^{abc} |
| F 值 | | 68.931 | 26.979 | 29.993 |
| P 值 | | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 DMSO 组比较,^b $P < 0.05$;与高糖组比较,^c $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验) RPE:视网膜色素上皮;MCU:线粒体钙离子单向转运蛋白;p38 MAPK:p38 丝裂原活化蛋白激酶;p-p38 MAPK:磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶;DMSO:二甲亚砜

Note: Compared with control group,^a $P < 0.05$; compared with DMSO group,^b $P < 0.05$; compared with high glucose group,^c $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) RPE: retinal pigment epithelium; MCU: mitochondrial calcium uniporter; p38 MAPK: p38 mitogen activated protein kinase; p-p38 MAPK: phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase; DMSO: dimethyl sulfoxide

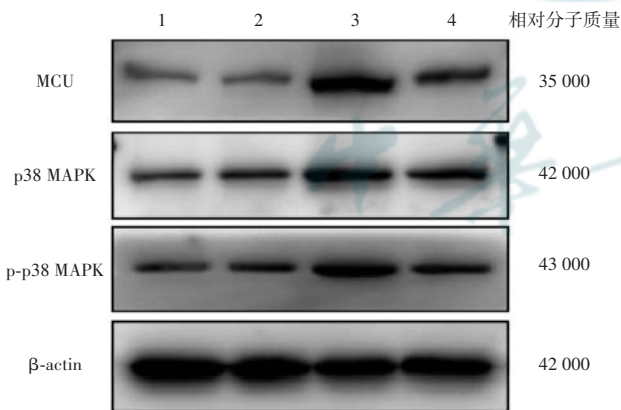


图 8 不同处理组 RPE 细胞 MCU、p38 MAPK、p-p38 MAPK 蛋白表达电泳图 1:对照组;2:DMSO 组;3:高糖组;4:高糖+阿魏酸组 MCU:线粒体钙离子单向转运蛋白;p38 MAPK:p38 丝裂原活化蛋白激酶;p-p38 MAPK:磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶;β-actin:β-肌动蛋白

Figure 8 Electrophoretogram of MCU, p38 MAPK, and p-p38 MAPK protein expression in RPE cells in different treatment groups 1: control group; 2: DMSO group; 3: high glucose group; 4: high glucose+ferulic acid group MCU: mitochondrial calcium uniporter; p38 MAPK: p38 mitogen activated protein kinase; p-p38 MAPK: phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase

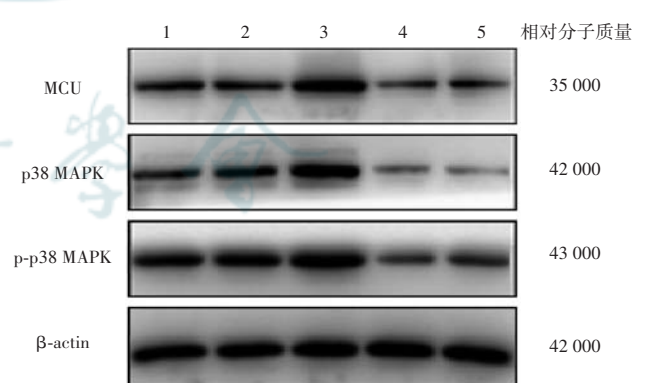


图 9 不同处理组 RPE 细胞 MCU、p38 MAPK、p-p38 MAPK 蛋白表达电泳图 1:对照组;2:空载体组;3:MCU 过表达组;4:MCU shRNA 组;5:MCU 过表达+阿魏酸组 MCU:线粒体钙离子单向转运蛋白;p38 MAPK:p38 丝裂原活化蛋白激酶;p-p38 MAPK:磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶;β-actin:β-肌动蛋白

Figure 9 Electrophoretogram of MCU, p38 MAPK, and p-p38 MAPK proteins expression in RPE cells in different treatment groups 1: control group; 2: empty vector group; 3: MCU overexpression group; 4: MCU shRNA group; 5: MCU overexpression + ferulic acid group MCU: mitochondrial calcium uniporter; p38 MAPK: p38 mitogen activated protein kinase; p-p38 MAPK: phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase

量总体比较,差异均有统计学意义($F = 23.043$ 、 23.347 、 26.348 ,均 $P < 0.001$),其中与对照组、空载体组比较,MCU 过表达组细胞 MCU、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白相对表达量明显升高,MCU shRNA 组、MCU 过表达+阿魏酸组细胞 MCU、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白相对表达量明显降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);与 MCU 过表达组比较,MCU shRNA 组、MCU 过表达+阿魏酸组细胞 MCU、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白相对表达量明显降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表 6)。

表 6 各组 RPE 细胞 MCU、p38 MAPK 和 p-p38 MAPK 蛋白水平比较($\bar{x} \pm s$)
Table 6 Comparison of expression levels of MCU, p38 MAPK and p-p38 MAPK proteins in RPE cells among different groups ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 样本量 | MCU | p38 MAPK | p-p38 MAPK |
|--------------|-----|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 对照组 | 3 | 0.59±0.06 | 0.49±0.04 | 0.66±0.06 |
| 空载体组 | 3 | 0.57±0.05 | 0.48±0.05 | 0.67±0.06 |
| MCU 过表达组 | 3 | 0.77±0.07 ^{ab} | 0.66±0.06 ^{ab} | 0.88±0.08 ^{ab} |
| MCU shRNA 组 | 3 | 0.42±0.04 ^{abc} | 0.34±0.04 ^{abc} | 0.43±0.04 ^{abc} |
| MCU 过表达+阿魏酸组 | 3 | 0.45±0.03 ^{abc} | 0.33±0.05 ^{abc} | 0.44±0.06 ^{abc} |
| F 值 | | 23.043 | 23.347 | 26.348 |
| P 值 | | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与空载体组比较,^b $P < 0.05$;与 MCU 过表达组比较,^c $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验) RPE:视网膜色素上皮;MCU:线粒体钙离子单向转运蛋白;p38 MAPK:p38 丝裂原活化蛋白激酶;p-p38 MAPK:磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶

Note:Compared with control group,^a $P < 0.05$;compared with empty vector group,^b $P < 0.05$;compared with MCU overexpression group,^c $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) RPE:retinal pigment epithelium;MCU:mitochondrial calcium uniporter;p38 MAPK:p38 mitogen activated protein kinase;p-p38 MAPK:phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase

3 讨论

近年来,全球糖尿病患病率逐年升高,DR 仍是糖尿病常见的眼部并发症,有研究报道,约 22.27% 的糖尿病患者患有 DR,预计 2045 年 DR 患病人数将达到 1.6 亿^[9]。DR 是一种进行性疾病,早期症状不明显,主要表现为微动脉瘤、棉绒斑、视网膜内微血管异常、硬性渗出和静脉串珠,经过及时治疗在一定程度上可以逆转,如延迟治疗,病情进一步发展到增殖期,将严重损害视力,严重者可致盲。探索 DR 进展中关键分子的作用机制是寻找新的治疗靶点和开发治疗药物的关键。

阿魏酸是一种天然抗氧化剂,对糖尿病相关的血管损伤具有预防作用。有研究证实,阿魏酸可以抑制机体氧化应激,减少晶状体上皮细胞中淀粉样蛋白聚

集,改善白内障患者晶状体混浊^[10]。Kohno 等^[11]研究也发现,阿魏酸可以减轻碘酸钠诱导的 ARPE-19 细胞和小鼠视网膜损伤。本研究苏木精-伊红染色结果显示,阿魏酸治疗后,2 型糖尿病小鼠视网膜组织损伤明显好转,提示阿魏酸对糖尿病视网膜损伤具有抑制作用,这与 Kohno 等^[11]的研究结果一致。此外,本研究采用 2 型糖尿病 db/db 小鼠模型,更贴近糖尿病患者的发病机制,避免了药物造模的不可控性,更直观地体现了阿魏酸的保护作用。

随着对 DR 发病机制研究的不断深入,越来越多研究证实,氧化应激和线粒体功能障碍在 DR 发生过程中发挥着重要作用^[12],长期高血糖状态可加剧机体氧化应激反应,刺激 ROS 产生增加,引起局部炎症、线粒体功能障碍、微血管功能障碍和细胞凋亡,促进视网膜毛细血管通透性增加,基底膜增厚,新生血管生成,最终导致视网膜氧化损伤^[13-15]。Salin Raj 等^[16]研究发现,阿魏酸可改善高糖诱导的 H9c2 细胞线粒体功能障碍和氧化应激反应。本研究也发现,阿魏酸治疗后,高糖诱导的 RPE 细胞中 ROS 产生明显减少,线粒体膜电位水平明显升高,细胞骨架重塑情况明显改善,进一步提示阿魏酸对高糖诱导的 RPE 细胞损伤具有一定治疗作用,其可能通过抑制氧化应激产生,改善线粒体功能障碍,起到改善高糖诱导 RPE 细胞损伤的作用。

线粒体 Ca^{2+} 过量会破坏 ROS 形成和清除之间的平衡,加剧氧化应激并诱导细胞凋亡,与包括糖尿病在内的多种疾病有关。MCU 是线粒体和细胞稳态的关键调节剂,参与细胞线粒体 Ca^{2+} 摄取、ROS 产生、能量代谢、程序性死亡等多种生理过程^[17]。有研究表明,钆红可通过抑制 MCU 的表达来降低 ROS 水平,升高线粒体膜电位水平,阻止 ATP 耗竭和线粒体通透性转换孔开放,进而缓解急性胰腺炎的症状^[18]。Panahi 等^[19]研究也发现,抑制 MCU 表达可显著减弱 HepG2 细胞中高糖诱导的胰岛素抵抗和炎症反应。在糖尿病引起的视网膜炎中,糖尿病大鼠视网膜组织中 p-p38MAPK 蛋白表达明显增加,高糖可通过诱导 p38MAPK 磷酸化激活 p38MAPK 信号通路,进而促进视网膜神经节细胞凋亡^[20-21]。本研究发现,过表达 MCU 可显著上调 p38MAPK、p-p38MAPK 蛋白表达,尤其是 p-p38MAPK 表达升高更为显著,而沉默 MCU 表达可显著抑制 p38MAPK、p-p38MAPK 蛋白表达,提示 MCU 参与调节 p38MAPK 的磷酸化过程,这对于能量代谢非常重要。此外,本研究还发现,高糖可显著上调 MCU、p38MAPK、p-p38MAPK 蛋白表达,提示高糖可能通过诱导 MCU、p38MAPK、p-p38MAPK 表达进而促进

线粒体功能障碍和氧化应激的发生,最终导致 RPE 细胞损伤。而阿魏酸治疗后, RPE 细胞中 MCU、p38MAPK、p-p38MAPK 表达水平显著降低,并且可上调线粒体膜电位水平和减少 ROS 产生,改善线粒体功能。此外,本研究将阿魏酸与过表达 MCU 组联合应用发现,阿魏酸可阻断 MCU 调节 p38MAPK、p-p38MAPK 表达的作用,这些结果进一步表明,阿魏酸可能通过 MCU 调控 p38MAPK 信号通路,进而改善高糖诱导的 RPE 细胞损伤。

综上所述,本研究结果表明阿魏酸能够调控氧化应激和线粒体功能障碍,进而改善糖尿病小鼠视网膜和高糖诱导的 RPE 细胞损伤,其调控机制可能与 MCU 和 p38MAPK 信号通路有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 朱德军:设计实验、论文撰写及修改;邹文青:指导研究、论文修改及定稿;曹相枚:实施研究、论文修改和指导;王潇飞:实施研究、采集数据、分析/解释数据、统计分析;陆钊罡:指导研究、论文修改

参考文献

- [1] Sabanayagam C, Banu R, Chee ML, et al. Incidence and progression of diabetic retinopathy: a systematic review [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2019, 7(2): 140–149. DOI: 10.1016/S2213-8587(18)30128-1.
- [2] 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表达的表达[J]. *南方医科大学学报*, 2017, 37(9): 1217–1221. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4254.2017.09.13.
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.
- [3] Tang A, Zhang Y, Wu L, et al. Klotho's impact on diabetic nephropathy and its emerging connection to diabetic retinopathy [J/OL]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 14: 1180169 [2024-01-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37143722/>. DOI: 10.3389/fendo.2023.1180169.
- [4] Yang J, Hua Z, Zheng Z, et al. Acteoside inhibits high glucose-induced oxidative stress injury in RPE cells and the outer retina through the Keap1/Nrf2/ARE pathway [J/OL]. *Exp Eye Res*, 2023, 232: 109496 [2024-01-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37268044/>. DOI: 10.1016/j.exer.2023.109496.
- [5] 朱德军, 王潇飞, 薛中洪, 等. 阿魏酸对高糖诱导的人晶状体上皮细胞损伤的保护作用[J]. *眼科新进展*, 2020, 40(2): 115–119. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2020.0028.
Zhu DJ, Wang XF, Xue ZQ, et al. Effects of ferulic acid in reducing injury of human lens epithelial cells induced by high glucose [J]. *Res Adv Ophthalmol*, 2020, 40(2): 115–119. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2020.0028.
- [6] Zhu D, Zou W, Cao X, et al. Ferulic acid attenuates high glucose-induced apoptosis in retinal pigment epithelium cells and protects retina in db/db mice [J/OL]. *PeerJ*, 2022, 10: e13375 [2024-01-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35669949/>. DOI: 10.7717/peerj.13375.
- [7] Wu Y, Zou H. Research progress on mitochondrial dysfunction in diabetic retinopathy [J/OL]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(11): 2250 [2024-01-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36421435/>. DOI: 10.3390/antiox11112250.
- [8] Yuan Z, Cao A, Liu H, et al. Calcium uptake via mitochondrial uniporter contributes to palmitic acid-induced apoptosis in mouse podocytes [J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(9): 2809–2818. DOI: 10.1002/jcb.25930.
- [9] Teo ZL, Tham YC, Yu M, et al. Global prevalence of diabetic retinopathy and projection of burden through 2045: systematic review and meta-analysis [J]. *Ophthalmology*, 2021, 128(11): 1580–1591. DOI: 10.1016/j.ophtha.2021.04.027.
- [10] Nagai N, Kotani S, Mano Y, et al. Ferulic acid suppresses amyloid β production in the human lens epithelial cell stimulated with hydrogen peroxide [J/OL]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 5343010 [2024-01-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28409157/>. DOI: 10.1155/2017/5343010.
- [11] Kohno M, Musashi K, Ikeda HO, et al. Oral administration of ferulic acid or ethyl ferulate attenuates retinal damage in sodium iodate-induced retinal degeneration mice [J/OL]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 8688 [2024-01-26]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32457394/>. DOI: 10.1038/s41598-020-65673-y.
- [12] 唐敏, 樊莹, 傅扬, 等. 视网膜色素上皮细胞线粒体 DNA 的氧化损伤研究 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2007, 25(11): 861–864. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2007.11.015.
Tang M, Fan Y, Fu Y, et al. Mitochondrial DNA damage induced by oxidative stress in retinal pigment epithelial cells [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2007, 25(11): 861–864. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2007.11.015.
- [13] Wu MY, Yiang GT, Lai TT, et al. The oxidative stress and mitochondrial dysfunction during the pathogenesis of diabetic retinopathy [J/OL]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 3420187 [2024-01-26]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30254714/>. DOI: 10.1155/2018/3420187.
- [14] Mahajan N, Arora P, Sandhir R. Perturbed biochemical pathways and associated oxidative stress lead to vascular dysfunctions in diabetic retinopathy [J/OL]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 8458472 [2024-01-26]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30962865/>. DOI: 10.1155/2019/8458472.
- [15] Miller WP, Sunilkumar S, Dennis MD. The stress response protein REDD1 as a causal factor for oxidative stress in diabetic retinopathy [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 165: 127–136. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.01.041.
- [16] Salin Raj P, Swapna S, Raghu KG. High glucose induced calcium overload via impairment of SERCA/PLN pathway and mitochondrial dysfunction leads to oxidative stress in H9c2 cells and amelioration with ferulic acid [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2019, 33(4): 412–425. DOI: 10.1111/fcp.12452.
- [17] D'Angelo D, Vecellio Reane D, Raffaello A. Neither too much nor too little: mitochondrial calcium concentration as a balance between physiological and pathological conditions [J/OL]. *Front Mol Biosci*, 2023, 10: 1336416 [2024-01-27]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38148906/>. DOI: 10.3389/fmolb.2023.1336416.
- [18] Yu X, Dai C, Zhao X, et al. Ruthenium red attenuates acute pancreatitis by inhibiting MCU and improving mitochondrial function [J/OL]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 635: 236–243 [2024-01-27]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36283336/>. DOI: 10.1016/j.bbrc.2022.10.044.
- [19] Panahi G, Pasalar P, Zare M, et al. MCU-knockdown attenuates high glucose-induced inflammation through regulating MAPKs/NF- κ B pathways and ROS production in HepG2 cells [J/OL]. *PLoS One*, 2018, 13(4): e0196580 [2024-01-27]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29709004/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0196580.
- [20] Liu F, Ma Y, Xu Y. Taxifolin shows anticataractogenesis and attenuates diabetic retinopathy in STZ-diabetic rats via suppression of aldose reductase, oxidative stress, and MAPK signaling pathway [J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2020, 20(4): 599–608. DOI: 10.2174/1871530319666191018122821.
- [21] Fu Y, Xie TH, Zhang YL, et al. The effect of human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes on diabetic retinal neurodegeneration in a rat model [J/OL]. *J Chem Neuroanat*, 2022, 126: 102181 [2024-01-28]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36330881/>. DOI: 10.1016/j.jchemneu.2022.102181.

(收稿日期:2024-03-16 修回日期:2024-06-30)

(本文编辑:刘艳 施晓萌)