

基于 MAPK 信号通路研究艾柱燃烧产物减轻蓝光诱导 ARPE-19 细胞损伤的作用机制

陈如一, 黄妍, 徐文静, 赵鑫钰, 夏道宗*

浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

摘要:目的 探讨艾柱燃烧产物(moxa smoke extract, MSE)对蓝光诱导人视网膜色素上皮(adult retinal pigment epithelium-19, ARPE-19)细胞损伤的保护作用及其作用机制。方法 体外培养 ARPE-19 细胞, CCK-8 法检测不同质量浓度(0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、5.00、10.00、50.00、100.00、150.00 $\mu\text{g/mL}$) MSE 对 ARPE-19 细胞活力的影响。设置对照组、对照+MSE 高剂量组、蓝光组、蓝光+叶黄素组、蓝光+MSE 低剂量组和蓝光+MSE 高剂量组。对照组和蓝光组加入空白培养基, 其余 4 组分别加入相应的含药培养基干预 24 h 后, 除对照组以及对照+MSE 高剂量组外, 各组均在蓝光(430 nm, 96.1 W/m^2)下刺激 1 h。建立 ARPE-19 细胞损伤模型后, 采用乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)法检测质膜完整性; 采用倒置荧光显微镜观察细胞形态学变化; 采用流式细胞仪检测细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平; 采用试剂盒检测细胞内氧化应激指标丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)水平和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、过氧化氢酶(catalase, CAT)以及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性; 采用 Western blotting 法检测丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)信号通路相关蛋白表达。结果 与对照组相比, MSE(0.25~4.00 $\mu\text{g/mL}$)对 ARPE-19 细胞活力没有显著影响。与蓝光组相比, MSE 可以显著降低培养上清中的 LDH 活性($P<0.01$), 减轻质膜损伤以及细胞形态学变化, 调节 MAPK 信号通路关键蛋白 Ras、磷酸化 c-Raf(phosphorylated c-Raf, p-c-Raf)、磷酸化细胞外调节蛋白激酶 1/2(phosphorylated extracellular regulated protein kinase 1/2, p-Erk1/2)、磷酸化丝裂原活化的细胞外信号调节激酶 1/2(phosphorylated mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase 1/2, p-MEK1/2)和 p-p38 MAPK 表达($P<0.05$ 、 0.01), 调节细胞内 SOD、CAT、GSH-Px 活性以及 GSH、MDA、ROS 水平($P<0.05$ 、 0.01), 改善 ARPE-19 细胞氧化应激反应。结论 MSE 可能通过调控 ROS 介导的 MAPK 信号通路相关蛋白的表达, 对蓝光诱导的 ARPE-19 细胞氧化应激损伤起保护作用。

关键词:艾柱燃烧产物; ARPE-19; 蓝光; 氧化应激; 丝裂原活化蛋白激酶信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)11-3376-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.11.013

Mechanism of moxa smoke extract on attenuating blue light induced ARPE-19 cell injury based on MAPK signaling pathway

CHEN Ru-yi, HUANG Yan, XU Wen-jing, ZHAO Xin-yu, XIA Dao-zong

School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of moxa smoke extract (MSE) on blue light-induced ARPE-19 cells injury. **Methods** ARPE-19 cells were cultured *in vitro*, and effect of MSE at different concentrations (0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00, 5.00, 10.00, 50.00, 100.00, 150.00 $\mu\text{g/mL}$) on viability of ARPE-19 cells was detected by CCK-8 method. Control group, control + MSE high-dose group, blue-light group, blue-light + lutein group, blue-light + MSE low-dose group and blue-light + MSE high-dose group were set. Blank medium was added to control group and blue light group, and corresponding drug-containing medium was added to the other four groups, after intervention for 24 h, except for control group and control + MSE high-dose group, all groups were stimulated under blue light (430 nm, 96.1 W/m^2) for 1 h. After ARPE-19 cell injury model was established, integrity of plasma membrane was detected by lactate dehydrogenase (LDH) method; Morphological changes of cells were observed by inverted

收稿日期: 2022-02-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82074085); 浙江省自然科学基金资助项目(LY21H280006)

作者简介: 陈如一(1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药药理学。Tel: 15700068486 E-mail: 498996135@qq.com

*通信作者: 夏道宗, 博士生导师, 教授, 主要从事中药药理学研究。Tel: (0571)86633361 E-mail: xiadaozong@zcmu.edu.cn

fluorescence microscope; Intracellular reactive oxygen species (ROS) level were detected by flow cytometry species; Kits were used to detect intracellular oxidative stress indicators malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) levels and glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities; Western blotting was used to detect mitogen-activated protein kinases (MAPK) signaling pathway-related proteins expressions. **Results** Compared with control group, MSE (0.25—4.00 $\mu\text{g/mL}$) had no significant effect on viability of ARPE-19 cells. Compared with blue light group, MSE significantly reduced LDH activity in culture supernatant ($P < 0.01$), alleviated the damage of plasma membrane and cell morphological changes, regulated key proteins expressions of MAPK signaling pathway such as Ras, phosphorylated c-Raf (p-c-Raf), phosphorylated extracellular regulated protein kinase 1/2 (p-Erk1/2), phosphorylated mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p-MEK1/2) and p-p38 MAPK ($P < 0.05, 0.01$), regulated intracellular SOD, CAT, GSH-Px activities and GSH, MDA, ROS levels ($P < 0.05, 0.01$), and improved the oxidative stress response of ARPE-19 cells. **Conclusion** MSE may protect ARPE-19 cells from blue light-induced oxidative stress injury by regulating the expression of ROS-mediated MAPK signaling pathway-related proteins.

Key words: moxa smoke extract; ARPE-19 cells; blue light; oxidative stress; mitogen-activated protein kinases signaling pathway

视频终端视疲劳综合征 (visual display terminal symptom, VDTS) 是一种使用智能手机、平板电脑等视频终端进行工作或学习时, 出现不自觉的短暂性斜视或自觉的包括眼睛酸痛、视物模糊和眨眼频繁等眼部症状的综合征^[1]。研究表明, 视频终端在使用过程中会产生大量蓝光, 进而诱发视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelial, RPE) 细胞产生大量活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 导致蛋白质、脂质以及核酸的氧化损伤和视网膜细胞形态的改变^[2-4]。近年来, 由于国家对新型冠状病毒肺炎 (corona virus disease 2019, COVID-19) 流行病的防控布控, 区域之间的封锁导致人们对数字设备的使用时长急剧增加^[5], 由此带来的眼部健康问题亟待解决。本课题组前期研究表明, 艾柱燃烧产物 (moxa smoke extract, MSE) 中的主要成分为苯酚 (3.01%)、3-呋喃甲醇 (2.77%) 和豆甾醇 (2.18%) 等小分子化合物, 具有较好的体外抗氧化作用^[6]。然而, 目前对于 MSE 保护成人视网膜色素上皮 (adult retinal pigment epithelium-19, ARPE-19) 细胞损伤的调控机制尚不明确。

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 是细胞内激酶的成员之一, 能够感受并传导外界环境的变化, 进而调节多种细胞生理过程。近来研究发现, MAPK 信号通路能够抑制由过氧化氢、白细胞介素-1 β 以及高浓度葡萄糖等因素诱导的 RPE 细胞损伤, 通过抑制 p38 MAPK 的表达对 RPE 细胞产生保护作用^[7-9]。本研究通过制备蓝光诱导 ARPE-19 细胞损伤模型, 以 MAPK 信号通路调控 ROS 生成, 抑制 ARPE-19 细胞氧化应激损伤为切入点, 探讨 MSE 是否可通过调控 ARPE-19 细胞内的氧化还原平衡, 减少氧化应激损伤, 从

而发挥对 ARPE-19 细胞的保护作用。

1 材料

1.1 细胞

ARPE-19 细胞购自广州吉妮欧生物科技有限公司。

1.2 药物

艾柱 (批号 20190415) 购自浙江乾一生物科技有限公司; 叶黄素 (批号 F10J10M92153) 购自上海源叶生物科技有限公司。

1.3 试剂

CCK-8 试剂盒 (批号 71011500) 购自白鲨生物科技有限公司; 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 批号分别为 20201119、20200815、20200819、20200820、20200822、20200820; ROS 检测试剂盒 (批号 061521210723) 购自碧云天生物技术有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 030321210621) 购自上海碧云天生物技术有限公司; Ras 抗体、c-Raf 抗体、磷酸化 c-Raf (phosphorylated c-Raf, p-c-Raf) 抗体、细胞外调节蛋白激酶 1/2 (extracellular regulated protein kinase 1/2, Erk1/2) 抗体、磷酸化 Erk1/2 (phosphorylated Erk1/2, p-Erk1/2) 抗体、丝裂原活化的细胞外信号调节激酶 1/2 (mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase 1/2, MEK1/2) 抗体、磷酸化 MEK1/2 (phosphorylated MEK1/2, p-MEK1/2) 抗体、p38 MAPK 抗体、磷酸化 p38 MAPK (phosphorylated

p38 MAPK, p-p38 MAPK)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体购自美国 CST 公司, 批号分别为 5、1、10、28、24、2、18、9、13、8; 荧光标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (批号 C70428-05)、荧光标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体 (批号 C70124-05) 购自美国 LI-COR 公司。

1.4 仪器

RE52CS-1 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); SHB-III 型循环水式真空泵 (巩义市予华仪器有限公司); W201B 型数控恒温水浴锅 (上海申胜生物技术有限公司); BSA224S-CW 型电子天平 (德国 Sartorius 公司); 超净台、CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 5427R 型高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); PL-LED100F 型光源 (北京普林塞斯科技有限公司); 数字式照度计 (深圳聚茂源科技有限公司); Synergy H1MFD 型多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司); Mini-PROTEAN Tetra System 垂直电泳槽、PowerPacTMHC 型高电流电源 (美国 Bio-Rad 公司); Odyssey CLx 型双色红外激光成像系统 (美国 LI-COR 公司); ECLIPSE Ti-S 型倒置荧光显微镜 (日本 Nikon 公司); CytoFLEX 流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司)。

2 方法

2.1 MSE 的制备

称取 200 g 艾柱于自制燃烧装置中暗火燃烧, 在吸收瓶中加入适量无水乙醇作为烟雾吸收溶剂, 缓冲瓶与真空泵连接。通过调节循环水泵控制艾柱的燃烧速度, 使艾烟能够被充分吸收。将饱和的艾烟吸收溶剂过滤, 减压蒸馏直到无馏分馏出, 得到 MSE^[6]。称定质量, 用无水乙醇稀释到 35 mg/mL 备用。

2.2 ARPE-19 细胞培养和处理

ARPE-19 细胞以含 10% 胎牛血清和 100 U/mL 青霉素/链霉素的 RPMI 1640 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 待细胞融合至 70%~80% 时用胰酶消化收集细胞, 调整细胞密度为 2×10^5 个/mL, 铺板/皿适应 12 h 后, 按照以下分组处理: 对照组和蓝光组更换新鲜培养基培养; 对照+MSE 高剂量组和蓝光+MSE 高剂量组, 换用含 2 μg/mL MSE 的培养基培养; 蓝光+MSE 低剂量组, 换用含 1 μg/mL MSE 的培养基培养; 蓝光+叶黄素组换用含 30 μmol/L 叶黄素^[10]的培养基培养。药物预保护 24 h

后, 根据 Park 等^[11]方法稍作修改建立蓝光诱导 ARPE-19 细胞损伤模型: 从 CO₂ 培养箱中取出细胞恢复室温, 加入适量 PBS 补充光照导致的水分蒸发。在室温下将对照和对照+MSE 高剂量组置于桌面避光放置, 其余分组均置于桌面用 LED 蓝光源 (430 nm, 96.1 W/m²) 从正上方均匀光照 1 h, 即得蓝光诱导 ARPE-19 细胞损伤模型。

2.3 CCK8 检测细胞存活率

取处于对数生长期的 ARPE-19 细胞, 调整细胞密度为 5×10^4 个/mL, 以每孔 100 μL 接种于 96 孔板中, 置于 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养 12 h。设置空白组、对照组和给药组 (分别加入 MSE 至终质量浓度为 0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、5.00、10.00、50.00、100.00、150.00 μg/mL), 孵育 24 h 后小心吸走培养液, 加入预混的 CCK8 工作液 (每 100 μL 新鲜基础培养液+10 μL CCK8), 37 °C 避光孵育 45 min, 采用多功能酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 (*A*) 值, 计算细胞存活率, 以对细胞无毒性的质量浓度作为后续实验用浓度范围。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{MSE}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.4 LDH 活性的测定

取处于对数生长期的 ARPE-19 细胞, 接种于 96 孔板中, 按照“2.2”项下方法进行分组及处理后, 收集上清液, 按试剂盒说明书检测细胞上清液中 LDH 活性。

2.5 MSE 对蓝光诱导的 ARPE-19 细胞形态的影响

取处于对数生长期的 ARPE-19 细胞, 接种于 6 cm 细胞培养皿中, 按照“2.2”项下方法进行分组及处理后, 小心吸走培养液, 用 PBS 缓冲液清洗 1 遍, 加入 2 mL PBS 缓冲液后, 于倒置荧光显微镜下观察各组细胞状态, 并拍照记录。

2.6 流式细胞术和倒置荧光显微镜观察 ARPE-19 细胞 ROS 水平

取处于对数生长期的 ARPE-19 细胞, 接种于 6 cm 细胞培养皿中, 按照“2.2”项下方法进行分组及处理后, 小心吸走培养液, 用 PBS 缓冲液清洗 1 遍, 每孔加入 1 mL 用 RPMI 1640 培养基稀释的终浓度为 20 μmol/L 的 DCFH-DA 荧光染色液, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 60 min, 小心吸走 DCFH-DA 荧光染色液, 用 PBS 缓冲液清洗 3 遍, 以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA 荧光探针, 于倒置荧光显微镜下观察各组 ARPE-19 细胞中 ROS 表达情况, 并拍照记录。随后, 收集 ARPE-19 细胞, 加入 0.4

mL PBS 缓冲液混匀。冰浴避光, 30 min 内在流式细胞仪上检测细胞中 ROS 水平。

2.7 ARPE-19 细胞中 MDA、GSH 水平及 GSH-Px、CAT、SOD 活性检测

取处于对数生长期的 ARPE-19 细胞, 接种于 10 cm 细胞培养皿中, 按照“2.2”项下方法进行分组及处理后, 收集细胞。ARPE-19 细胞冰上匀浆后用于后续分析抗氧化参数。采用 BCA 法对各组细胞匀浆进行蛋白定量。随后, 按照试剂盒说明书操作, SOD 活性使用 WST-1 法检测, CAT、GSH-Px 活性使用可见光法测定, GSH 水平使用微量酶标法检测, MDA 水平测定使用硫代巴比妥酸法。

2.8 Western blotting 检测 MAPK 信号通路相关蛋白的表达

取处于对数生长期的 ARPE-19 细胞, 接种于 10 cm 细胞培养皿中, 按照“2.2”项下方法进行分组及处理后, 收集细胞。细胞裂解后提取总蛋白, 采用 BCA 法进行蛋白定量, 加入适量上样缓冲液后, 100 °C 恒温金属浴变性 10 min, 得到蛋白样品。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 于 5% 脱脂牛奶中室温封闭 1 h, 分别加入 Ras、c-Raf、p-c-Raf、Erk1/2、p-Erk1/2、MEK1/2、p-MEK1/2、p38 和 p-p38 抗体 (1 : 1000), 4 °C 冰箱内摇床上孵育过夜, 以 GAPDH (1 : 5000) 作为内参, 3 次 TBST 缓冲液洗膜后, 加入荧光标记的二抗 (1 : 10 000), 室温避光孵育 2 h; 3 次 TBST 洗膜后, 用 Odyssey CLx 双色红外激光成像系统显影成像, 用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.9 统计学分析

所有数据均采用 Graphpad Prism 8.0 软件进行统计学处理并作图表示, 统计变量以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 MSE 对 ARPE-19 细胞存活率的影响

不同质量浓度的 MSE 处理 ARPE-19 细胞 24 h, 如图 1 所示, 0.25~4.00 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度的 MSE 对细胞活力没有显著影响, 说明 MSE 在 0.25~4.00 $\mu\text{g/mL}$ 对 ARPE-19 细胞无细胞毒性; 当 MSE 质量浓度超过 4.00 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞活力明显下降 ($P < 0.05$ 、0.01), 说明超过 4.00 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度不宜作为实验浓度, 为了保持细胞处于最佳的活力, 因此在后续实验中 MSE 低、高剂量组分别设置为 1、2 $\mu\text{g/mL}$ 。

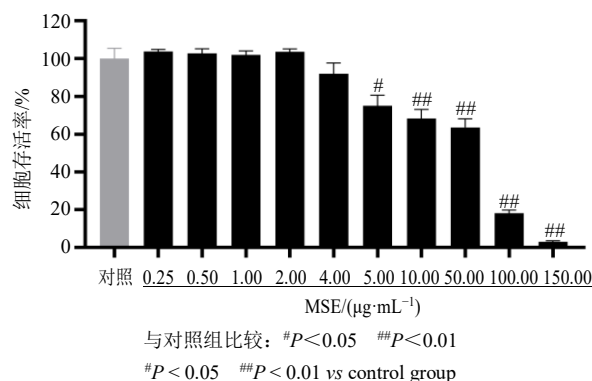


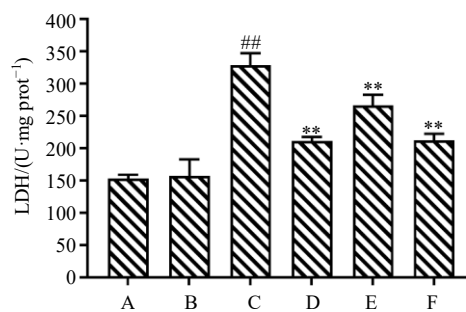
图 1 MSE 对 ARPE-19 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
Fig. 1 Effect of MSE on survival rate of ARPE-19 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.2 MSE 对蓝光诱导 ARPE-19 细胞损伤的影响

在蓝光 (430 nm, 96.1 W/m²) 下光照 ARPE-19 细胞 1 h, 如图 2 所示, 高剂量的 MSE 对于对照组细胞并无显著影响; 而蓝光组细胞上清液中 LDH 活性显著升高 ($P < 0.01$); 给予 30 $\mu\text{mol/L}$ 叶黄素之后 LDH 活性显著下降 ($P < 0.01$); 给予 MSE 后, 上清液中的 LDH 活性显著下降 ($P < 0.01$), 且呈剂量相关性。表明蓝光诱导的 ARPE-19 细胞损伤模型成功成立, MSE 对蓝光诱导的 ARPE-19 细胞损伤有显著的保护作用, 且呈剂量相关性。

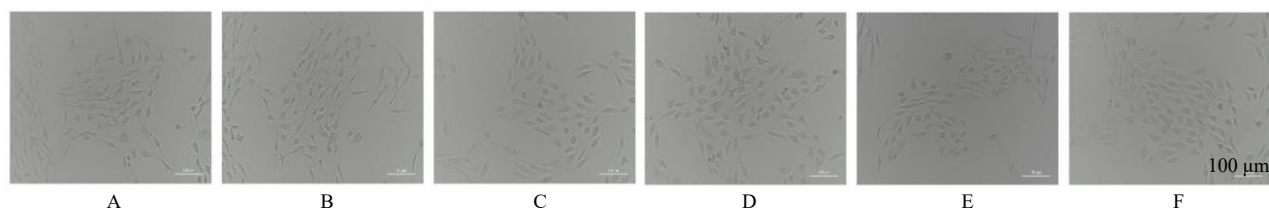
3.3 MSE 对蓝光诱导 ARPE-19 细胞形态学的影响

如图 3 所示, 对照组 ARPE-19 细胞之间具有明显的网状连接; 与对照组相比, 对照+MSE 高剂量



A-对照组 B-对照+MSE 高剂量组 C-蓝光组 D-蓝光+叶黄素组 E-蓝光+MSE 低剂量组 F-蓝光+MSE 高剂量组 与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与蓝光组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同
A-control group B-control + MSE high-dose group C-blue light group D-blue light + lutein group E-blue light + MSE low-dose group F-blue light + MSE high-dose group ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs blue light group, same as below figures

图 2 MSE 对蓝光暴露后 ARPE-19 细胞上清液中 LDH 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
Fig. 2 Effect of MSE on LDH activity in supernatant of ARPE-19 cells after blue light exposure ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

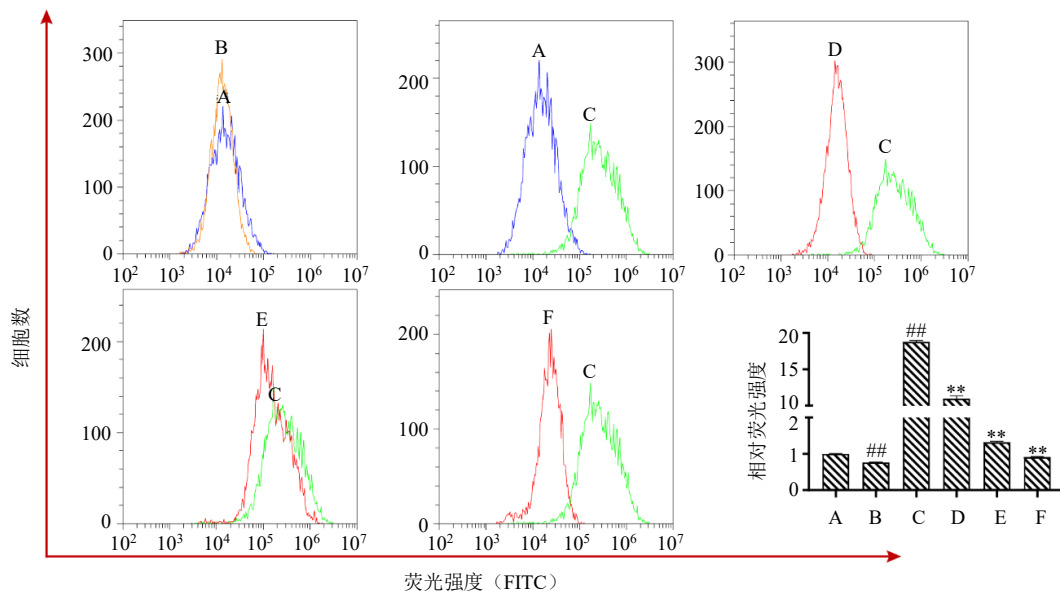
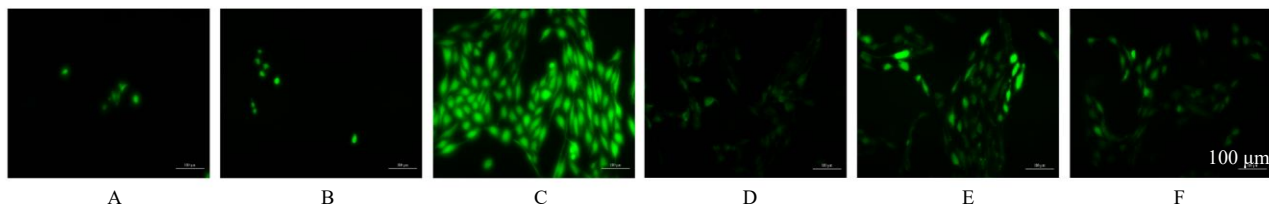
图 3 MSE 对蓝光诱导 ARPE-19 细胞形态的影响 ($\times 200$)Fig. 3 Effect of MSE on morphology of ARPE-19 cells induced by blue light exposure ($\times 200$)

组无显著变化,网状连接明显;而蓝光组中 ARPE-19 细胞间网状连接明显消失,细胞间距增大,呈分散趋势,由此说明蓝光照射对于 ARPE-19 细胞造成了损伤。与蓝光组相比,随着给予叶黄素以及 MSE 浓度的增大,细胞间的网状连接得到保护,蓝光 + MSE 高剂量组基本接近对照组。表明 MSE 能够显著改善蓝光诱导下受损的 ARPE-19 细胞形态。

3.4 MSE 对蓝光诱导 ARPE-19 细胞 ROS 水平的影响

采用流式细胞仪,以 DCFH-DA 作为荧光探针

对 ARPE-19 细胞内 ROS 水平进行检测,如图 4 所示,对照 + MSE 高剂量组的 ROS 荧光水平较对照组显著降低 ($P < 0.01$),说明 MSE 不仅针对受损细胞,对正常 ARPE-19 细胞亦具有一定的保护作用;而蓝光组较对照组 ROS 水平显著上升 ($P < 0.01$),且随着 MSE 浓度的增加,细胞内 ROS 荧光水平显著降低 ($P < 0.01$);在给予叶黄素预保护 24 h 后,ARPE-19 细胞中 ROS 荧光水平显著降低 ($P < 0.01$)。倒置荧光显微镜下的结果(图 5)与上述结果一致。

图 4 流式细胞术检测 MSE 对蓝光诱导 ARPE-19 细胞中 ROS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 4 Effect of MSE on ROS level in ARPE-19 cells induced by blue light was measured by flow cytometry ($\bar{x} \pm s, n = 3$)图 5 倒置荧光显微镜法检测 MSE 对蓝光诱导 ARPE-19 细胞 ROS 水平的影响 ($\times 200$)Fig. 5 Effect of MSE on ROS level in ARPE-19 cells induced by blue light was observed by inverted fluorescence microscope ($\times 200$)

3.5 MSE 对蓝光诱导 ARPE-19 细胞 MDA、GSH 水平及 GSH-Px、CAT、SOD 活性的影响

如图 6 所示, 与对照组相比, 对照+MSE 高剂量组 MDA、GSH 水平及 GSH-Px、CAT、SOD 活性未见明显改变; 蓝光组细胞内 MDA 水平显著升高 ($P<0.01$), GSH 水平和 GSH-Px、CAT、SOD 抗氧化酶活性显著下降 ($P<0.01$); 与蓝光组相比, MSE 组细胞内 GSH 水平和 SOD、CAT、GSH-Px 活性均

显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01), MDA 水平显著降低 ($P<0.01$), 呈剂量相关性; 给予叶黄素后, 各项指标均有所改善。

3.6 MSE 对蓝光诱导 ARPE-19 细胞中 MAPK 通路相关蛋白表达的影响

如图 7 所示, 与对照组相比, 对照+MSE 高剂量组细胞 MAPK 通路相关蛋白表达并无显著差异; 而经蓝光诱导后的 ARPE-19 细胞中的 Ras、p-Raf、

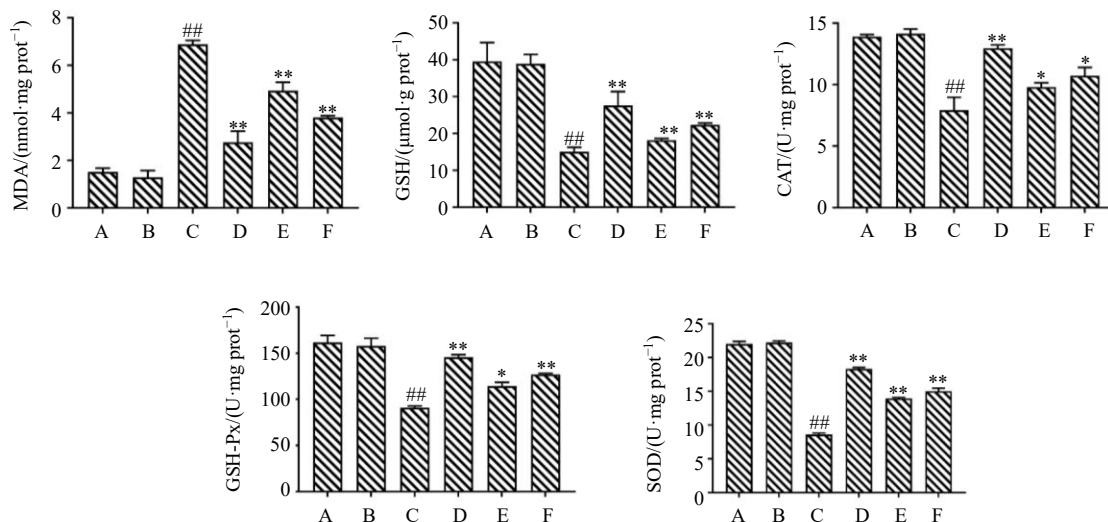


图 6 MSE 对蓝光诱导 ARPE-19 细胞中 MDA、GSH 水平及 CAT、GSH-Px、SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Effect of MSE on levels of MDA, GSH and activities of GSH-Px, CAT and SOD in ARPE-19 cells induced by blue light ($\bar{x} \pm s, n=3$)

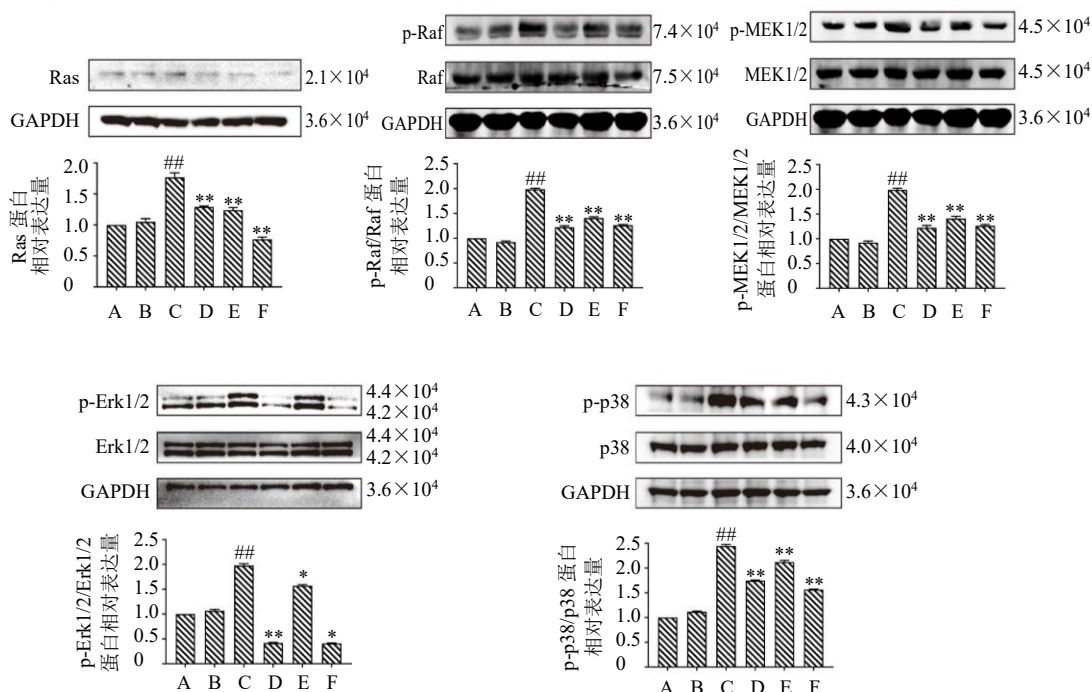


图 7 MSE 对蓝光诱导 ARPE-19 细胞 MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Effect of MSE on MAPK signaling pathway related proteins expressions in ARPE-19 cells induced by blue light ($\bar{x} \pm s, n=3$)

p-MEK1/2、p-Erk1/2、p-p38 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$)；叶黄素能显著降低细胞 Ras、p-Raf、p-MEK1/2、p-Erk1/2、p-p38 蛋白表达水平 ($P < 0.01$)；MSE 组细胞上述蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)，并呈剂量相关性。

4 讨论

本课题组前期研究已经在体外验证了 MSE 较艾柱挥发油具有更好的抗氧化性能。为了阐明 MSE 保护蓝光诱导 ARPE-19 细胞损伤作用的具体机制，从其抑制 ARPE-19 细胞内氧化应激反应以及 MAPK 信号通路相关蛋白表达 2 方面的影响进行探索。1985 年，“氧化应激”作为氧化还原生物学和医学中的 1 个概念被正式提出，其有 2 部分组成：有氧代谢以氧化还原平衡稳态的形式存在以及用专业的术语表达了这种平衡之间潜在的张力，即生物体的应激反应^[12]。视网膜是人体中耗氧量最高的组织之一^[13]。高强度的有氧代谢以及持续的光照都会诱导视网膜中产生过量的 ROS^[14-15]。研究证明，400~500 nm 波长的蓝光可诱导 RPE 细胞产生过量的 ROS^[16]，过量的 ROS 与细胞内脂质反应产生 MDA，进而破坏细胞膜完整性及流动性，引起细胞膜损伤^[17]。同时，过量的 ROS 会导致线粒体功能的破坏，此过程往往伴随着细胞内酶（包括 LDH）的大量释放，而与其他所有酶相比，LDH 在这一过程中增加地更多^[18]。因此，本研究通过检测 LDH 活性证明了蓝光暴露能够诱导 ARPE-19 细胞损伤模型。通过对蓝光照射前后 ARPE-19 细胞形态学的观察，进一步确认了蓝光照射对 ARPE-19 细胞造成了损伤，使细胞间的网状连接消失，细胞间距增大。研究证明，机体内部的抗氧化防御的主要作用是由抗氧化酶实现的，而不是小分子的抗氧化物^[12]。如在 GSH-Px 的催化下，GSH 向 ROS 提供 1 个质子以稳定氧自由基，并转换为氧化型谷胱甘肽（glutathione disulfide, GSSG）^[19]。

叶黄素是一种在人类脑组织中占主导地位的类胡萝卜素^[20-21]，能够自由地穿过血视网膜屏障^[22]，并通过过滤高能短波的光线来减弱视网膜处的光化学损伤。叶黄素通过清除过量的 ROS、超氧化物和羟基自由基，避免视网膜磷脂的过氧化，减少脂褐素的形成，进而减轻光诱导的相关损伤^[23]。以叶黄素为阳性对照药物，本研究发现 MSE 能够有效降低 ARPE-19 细胞中 ROS 和 MDA 水平，提高 GSH 水平；显著提高细胞内抗氧化酶 GSH-Px、CAT 和

SOD 活性，MSE 高剂量组在部分实验指标上甚至优于阳性对照药物。由此推测 MSE 保护 ARPE-19 细胞免受蓝光损伤的机制可能在于其中含有某种脂溶性成分能够渗透血视网膜屏障，进而恢复细胞内的氧化还原稳态，提高细胞活力。

另一方面，由于方法学的重大进展，将这种生物体内的氧化还原转换同磷酸化与去磷酸化信号联系起来的重要性得到了充分的认识^[12]。MAPK 级联反应信号通路是最关键的细胞内信号途径之一^[24-25]。环境应激会引起 MAPK 信号通路相关蛋白活性的改变^[26]，其激活状态依赖相关蛋白激酶与其磷酸化蛋白的共同调节，这种调节是可逆的，机体会根据体内环境的变化而进行动态调整，使其处于一种动态平衡的状态^[27]。Ras 和 Raf 是最早被报道的癌蛋白^[28-29]，Ras 的激活会将 Raf 或 Raf/MEK 异二聚体募集到质膜，随后 Raf 和 MEK 组装瞬时四聚体，通过背对背二聚化促进 Raf 的激活^[30]。Raf 一旦被激活，就会对 217 和 221 位 MEK1/2 上丝氨酸残基进行磷酸化，进一步导致 Erk1/2 的磷酸化^[31]。本研究结果显示，蓝光组 Ras、p-c-Raf/c-Raf、p-MEK1/2/MEK1/2、p-ERK1/2/ERK1/2 及 p-p38/p38 均显著高于对照组，说明氧化应激导致了 Ras、Raf、MEK1/2、Erk1/2、p38 信号通路的级联反应，这与以往的研究结果一致^[32-33]。研究表明，UV 诱导的 Erk1/2-MAPK 的激活是通过 ROS 的生成介导的^[34]，ROS 在激活 Erk1/2-MAPK 信号通路中起核心作用^[35]。而 MSE 在有效降低蓝光诱导的 ARPE-19 细胞中 ROS 含量的同时，显著降低了 Ras 蛋白以及 Raf、MEK1/2、Erk1/2、p38 磷酸化蛋白的表达。这说明 MSE 可能是通过抑制 ROS 介导的氧化应激反应来保护蓝光诱导的 ARPE-19 细胞损伤。

综上，MSE 对蓝光诱导的 ARPE-19 细胞损伤具有显著的保护作用，其机制可能与改善细胞内氧化还原稳态，抑制 MAPK 信号通路有关，然而蓝光诱导的 ARPE-19 细胞损伤是否经由铁死亡途径诱发，MSE 能否在调节 MAPK 信号通路的基础上进一步通过核因子 E2 相关因子 2（nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2）/胱氨酸/谷氨酸逆向转运蛋白溶质载体家族 7 成员 11（solute carrier family 7 member 11, SLC7A11，也称为 xCT）信号通路减轻 ARPE-19 细胞铁死亡有待进一步研究。本课题组将在今后继续围绕 Nrf2/xCT 信号通路结合分子对接技术对 MSE 中的药效物质成分展开研究，

深入探讨 MSE 基于调控 Nrf2/xCT 信号通路保护 ARPE-19 防治视疲劳的作用机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 朱然, 梁舒. 视频终端视疲劳综合征的治疗进展 [J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2019, 13(9): 702-706.
- [2] Margrain T H, Boulton M, Marshall J, *et al.* Do blue light filters confer protection against age-related macular degeneration? [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2004, 23(5): 523-531.
- [3] Mantha N, Burra S, Rajagopal K, *et al.* Protein stability and photostability under *in vitro* vitreal conditions-implications for long acting delivery of protein therapeutics for ocular disease [J]. *Pharm Res*, 2020, 37(5): 85.
- [4] Yacout S M, Gaillard E R. The anthocyanins, oenin and callistephin, protect RPE cells against oxidative stress [J]. *Photochem Photobiol*, 2017, 93(2): 590-599.
- [5] Bahkir F A, Grandee S S. Impact of the COVID-19 lockdown on digital device-related ocular health [J]. *Indian J Ophthalmol*, 2020, 68(11): 2378-2383.
- [6] 陈如一, 史悦悦, 张晓熙, 等. 艾柱挥发油和燃烧产物成分 GC-MS 分析及抗氧化活性比较 [J]. 中成药, 2021, 43(12): 3507-3512.
- [7] Liu X Y, Zheng F, Li S, *et al.* Malvidin and its derivatives exhibit antioxidant properties by inhibiting MAPK signaling pathways to reduce endoplasmic reticulum stress in ARPE-19 cells [J]. *Food Funct*, 2021, 12(16): 7198-7213.
- [8] Maugeri G, Bucolo C, Drago F, *et al.* Attenuation of high glucose-induced damage in RPE cells through p38 MAPK signaling pathway inhibition [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 684680.
- [9] Cheng S C, Huang W C, Pang J H S, *et al.* Quercetin inhibits the production of IL-1 β -induced inflammatory cytokines and chemokines in ARPE-19 cells via the MAPK and NF- κ B signaling pathways [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(12): 2957.
- [10] Kim J, Jin H L, Jang D S, *et al.* Quercetin-3-O- α -l-arabinopyranoside protects against retinal cell death via blue light-induced damage in human RPE cells and Balb-c mice [J]. *Food Funct*, 2018, 9(4): 2171-2183.
- [11] Park S I, Jang Y P. The protective effect of brown-, gray-, and blue-tinted lenses against blue LED light-induced cell death in A2E-laden human retinal pigment epithelial cells [J]. *Ophthalmic Res*, 2017, 57(2): 118-124.
- [12] Sies H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine [J]. *Redox Biol*, 2015, 4: 180-183.
- [13] Yu D Y, Cringle S J. Retinal degeneration and local oxygen metabolism [J]. *Exp Eye Res*, 2005, 80(6): 745-751.
- [14] Hanus J, Anderson C, Wang S S. RPE necroptosis in response to oxidative stress and in AMD [J]. *Ageing Res Rev*, 2015, 24(Pt B): 286-298.
- [15] Kim J, Cho K, Choung S Y. Protective effect of *Prunella vulgaris* var. L extract against blue light induced damages in ARPE-19 cells and mouse retina [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 152: 622-631.
- [16] Scimone C, Alibrandi S, Scalinci S Z, *et al.* Expression of pro-angiogenic markers is enhanced by blue light in human RPE cells [J]. *Antioxidants*, 2020, 9(11): 1154.
- [17] Chan T C, Wilkinson Berka J L, Deliyanti D, *et al.* The role of reactive oxygen species in the pathogenesis and treatment of retinal diseases [J]. *Exp Eye Res*, 2020, 201: 108255.
- [18] Jurisic V, Radenkovic S, Konjevic G. The actual role of LDH as tumor marker, biochemical and clinical aspects [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2015, 867: 115-124.
- [19] Suárez-Barrio C, del Olmo-Aguado S, García-Pérez E, *et al.* Antioxidant role of PRGF on RPE cells after blue light insult as a therapy for neurodegenerative diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): E1021.
- [20] Jeon S, Neuringer M, Johnson E E, *et al.* Effect of carotenoid supplemented formula on carotenoid bioaccumulation in tissues of infant rhesus macaques: A pilot study focused on lutein [J]. *Nutrients*, 2017, 9(1): E51.
- [21] Lieblein-Boff J C, Johnson E J, Kennedy A D, *et al.* Exploratory metabolomic analyses reveal compounds correlated with lutein concentration in frontal cortex, hippocampus, and occipital cortex of human infant brain [J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0136904.
- [22] Snodderly D M. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins [J]. *Am J Clin Nutr*, 1995, 62(6): 1448S-1461S.
- [23] Jia Y P, Sun L, Yu H S, *et al.* The pharmacological effects of lutein and Zeaxanthin on visual disorders and cognition diseases [J]. *Molecules*, 2017, 22(4): E610.
- [24] Mathien S, Tesnière C, Meloche S. Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways by the ubiquitin-proteasome system and its pharmacological potential [J]. *Pharmacol Rev*, 2021, 73(4): 263-296.
- [25] Guo Y J, Pan W W, Liu S B, *et al.* ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(3): 1997-2007.
- [26] Hotamisligil G S, Davis R J. Cell signaling and stress

- responses [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, 8(10): a006072.
- [27] 孙琪, 郭维, 陈晓梅, 等. 逍遥散对慢性应激大鼠海马组织 DUSP14 基因表达及对 MAPK 信号通路的影响 [J]. 新中医, 2020, 52(23): 21-24.
- [28] Zhou B Y, der C J, Cox A D. The role of wild type RAS isoforms in cancer [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2016, 58: 60-69.
- [29] Holderfield M, Deuker M M, McCormick F, *et al.* Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond [J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(7): 455-467.
- [30] Degirmenci U, Wang M, Hu J C. Targeting aberrant RAS/RAF/MEK/ERK signaling for cancer therapy [J]. *Cells*, 2020, 9(1): 198.
- [31] Fang J Y, Richardson B C. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer [J]. *Lancet Oncol*, 2005, 6(5): 322-327.
- [32] Diniyah N, Alam M B, Choi H J, *et al.* *Lablab purpureus* protects HaCaT cells from oxidative stress-induced cell death through Nrf2-mediated heme oxygenase-1 expression via the activation of p38 and ERK1/2 [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(22): E8583.
- [33] Katiyar S K, Meeran S M. Obesity increases the risk of UV radiation-induced oxidative stress and activation of MAPK and NF-kappaB signaling [J]. *Free Radic Biol Med*, 2007, 42(2): 299-310.
- [34] Busch M, Wasmuth S, Spital G, *et al.* Activation of the ERK1/2-MAPK signaling pathway by complement serum in UV-POS-pretreated ARPE-19 cells [J]. *Ophthalmologica*, 2018, 239(4): 215-224.
- [35] 都研文, 郑瑞芳, 曾诚, 等. 香青兰总黄酮对阿霉素心肌毒性的保护机制研究 [J]. 中草药, 2019, 50(24): 6045-6051.

[责任编辑 李亚楠]