

枸杞多糖对 LPS 诱导的人视网膜色素上皮细胞炎症反应的影响及机制

闫梅¹, 马倩², 马雅玲^{1,2}, 刘媛¹, 马立萍²

引用: 闫梅, 马倩, 马雅玲, 等. 枸杞多糖对 LPS 诱导的人视网膜色素上皮细胞炎症反应的影响及机制. 国际眼科杂志 2021; 21(3):411-416

基金项目: 宁夏自然科学基金项目 (No.2018AAC03148)
作者单位: ¹(750004) 中国宁夏回族自治区银川市, 宁夏医科大学; ²(750000) 中国宁夏回族自治区银川市, 宁夏医科大学总医院眼科

作者简介: 闫梅, 女, 在读硕士研究生, 学士, 主治医师, 研究方向: 视网膜血管病。

通讯作者: 马雅玲, 女, 毕业于南京医科大学, 硕士, 教授, 主任医师, 眼科副主任, 眼视光中心主任, 研究方向: 眼视光学、白内障、视网膜血管病. myeye@163.com

收稿日期: 2020-05-07 修回日期: 2021-02-03

摘要

目的: 探索枸杞多糖 (LBP) 对细菌脂多糖 (LPS) 诱导的人视网膜色素上皮 (ARPE-19) 细胞的炎症反应的影响及其可能介导的信号通路。

方法: 通过 LPS 刺激体外培养的 ARPE-19 细胞构建炎症反应模型。将细胞随机分为 5 组, 空白组使用完全培养基培养, LPS 组给予含 10 μ g/mL LPS 的完全培养基刺激 24h, 低、中、高浓度 LBP 组分别给予 0.1、0.5、1mg/mL LBP 完全培养基孵育 24h 后给予含 10 μ g/mL LPS 的完全培养基刺激 24h。应用 CCK-8 观察细胞存活率、实时荧光定量 PCR 检测相关炎症因子的 mRNA 表达量及 Western-blot 检测 NF- κ B/MAPK 信号通路相关磷酸化蛋白表达量的变化。

结果: 与正常细胞相比, LPS 刺激后, ARPE-19 的存活率下降。同时, 随着外源性 LBP 浓度增加, ARPE-19 的细胞存活率升高, 且细胞内炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 MCP-1 的表达量降低, 并伴随 NF- κ B/MAPK 通路的相关磷酸化蛋白 (p-p65、p-I κ B α 、p-JNK、p-ERK 及 p-p38) 的表达下降。

结论: 枸杞多糖通过抑制胞内炎症因子及 NF- κ B/MAPK 通路相关因子的磷酸化, 从而阻止 LPS 诱导人视网膜色素上皮细胞产生的炎症反应。

关键词: 枸杞多糖; 细菌脂多糖; 人视网膜色素上皮细胞; 炎症反应; NF- κ B; MAPK

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2021.3.06

Effect and relative mechanism of Lycium Barbarum Polysaccharide on LPS-induced inflammatory response within human retinal pigment epithelial cells

Mei Yan¹, Qian Ma², Ya-Ling Ma^{1,2}, Yuan Liu¹, Li-Ping Ma²

Foundation item: Natural Science Foundation of Ningxia Hui

Autonomous Region (No.2018AAC03148)

¹Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; ²Department of Ophthalmology, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750000, Ningxia Hui Autonomous Region, China

Correspondence to: Ya-Ling Ma. Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; Department of Ophthalmology, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750000, Ningxia Hui Autonomous Region, China. myeye@163.com

Received:2020-05-07 Accepted:2021-02-03

Abstract

• **AIM:** To explore the effect of lycium barbarum polysaccharides (LBP) on inflammatory response of human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19) induced by lipopolysaccharide (LPS) and its possible signal pathway.

• **METHODS:** ARPE-19 cells were stimulated by LPS *in vitro* to construct the inflammatory injury cell model. Primarily, the cells were divided into five groups randomly. The blank group was cultured in complete medium, and the LPS group was stimulated with complete medium containing 10 μ g/mL LPS for 24h. The low, medium and high concentration LBP groups were incubated with complete medium importing 0.1, 0.5 and 1mg/mL LBP for 24h separately, and then stimulated with complete medium containing 10 μ g/mL LPS for 24h. We used the CCK-8 method to observe the cell survival rate, real-time fluorescent quantitative PCR to detect the mRNA expression of inflammatory factors and Western blot to test the changes of phosphorylated protein within the signaling pathway of NF- κ B/MAPK.

• **RESULTS:** Compared with normal cells, the survival rate of ARPE-19 cells was decreased after the LPS stimulation. With the increase of exogenous LBP concentration, the survival rate of ARPE-19 cell was gradually increased, while the inflammatory factors expression of cytokines IL-1 β , IL-6 and MCP-1 were reduced accompany with the phosphorylated proteins (p-p65, P-I κ B α , p-JNK, p-ERK and p-p38) of NF- κ B/MAPK signaling pathway were decreased.

• **CONCLUSION:** LBP prevents LPS-induced inflammatory response of ARPE-19 by inhibiting the intracellular inflammatory factors and the phosphorylation of the related protein within NF- κ B/MAPK signaling pathway.

• **KEYWORDS:** Lycium barbarum polysaccharide; lipopolysaccharide; human retinal pigment epithelial cells; inflammatory response; NF- κ B; MAPK

Citation: Yan M, Ma Q, Ma YL, *et al.* Effect and relative mechanism of Lycium Barbarum Polysaccharide on LPS-induced inflammatory response within human retinal pigment epithelial cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2021;21(3):411-416

0 引言

年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, ARMD) 是一种影响视网膜黄斑区, 导致中央视力逐渐丧失的疾病, 多发生于 60 岁以上的人群中, 是造成视觉损害的主要原因之一^[1-2]。我国现已步入老龄化社会, 人口老龄化呈指数增长, 其患病率将进一步上升。研究发现, ARMD 的发病机制涉及氧化应激、光损伤、炎症、遗传基因等方面^[3-5]。其中, 视网膜色素上皮 (retina pigment epithelium, RPE) 的炎性损伤是重要环节^[1,3]。RPE 具有维持视网膜感光细胞层的功能, 可保护视网膜免受过度光照, 并参与形成血-视网膜屏障及视网膜中央黄斑的免疫防御等^[4-5]。研究表明, 各种刺激形成的 RPE 炎性损伤能够促进新生血管生成, 加速病情进展为渗出性 ARMD^[3-6]。所以, 抑制 RPE 细胞内炎性损伤, 同时预防 RPE 的丢失, 是开发治疗 ARMD 新方案的关键。研究证实, 枸杞多糖 (lycium barbarum polysaccharide, LBP) 具有抗炎、抗氧化应激、抗衰老等作用^[7-9]。本课题组既往研究也表明枸杞多糖对糖尿病大鼠视网膜具有保护作用, 对氧化应激造成视网膜神经节细胞的凋亡具有抑制作用^[10-11], 但是, 枸杞多糖对 RPE 炎性反应的影响尚不明确。所以, 本实验通过细菌脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 刺激人视网膜色素上皮 (ARPE-19) 细胞构建 ARMD 的体外炎症反应模型, 探索枸杞多糖对 RPE 炎性反应的影响及机制, 为治疗渗出性 ARMD 及 RPE 炎症相关疾病提供新思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 ARPE-19 细胞株 (中科院上海细胞库)、枸杞多糖 (宁夏沃福百瑞)、LPS (美国 Sigma)、胎牛血清 (美国 Gibco)、DMEM-F12 培养基 (美国 Hyclone)、0.25% 胰蛋白酶+EDTA (索莱宝)、青-链霉素混合液 (100×) (索莱宝)、RT-PCR 逆转录试剂盒 (Invitrogen)、SYBR Green qPCR Master Mix (DBI Bioscience)、总 RNA 提取试剂盒 (北京天根)、引物 (上海生工)、CCK-8 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒 (上海贝博)、全蛋白提取试剂盒 (凯基生物)、BCA 蛋白定量试剂盒 (凯基生物)、ECL 高敏检测试剂盒 (凯基生物)。一抗:p-IκBα、IκBα、p-ERK、p-p38 及 p-JNK (Affinity, CAT: 5002、2002、1015、4001、3318), p-p65、p65 (CST, CAT: 3033、8242), ERK、p38 及 JNK (万类生物, CAT: 01864、00764、01295), β-Actin (中杉金桥, CAT: TA-09)。

1.1.2 仪器 Infinite M200 Pro 酶标仪 (瑞士 TECAN)、PowerPac 200 电泳仪 (美国 Bio-Rad)、IQ5 Real-Time PCR 仪 (美国 Bio-Rad)、ChemiDoc Touch 化学发光成像系统 (美国 Bio-Rad)。

1.2 方法

1.2.1 ARPE-19 细胞培养 收到 ARPE-19 细胞后放置入培养箱, 于 37℃、5% CO₂ 条件下培养, 待细胞密度约为 85% 时使用胰酶进行消化, 1200r/min 离心 5min, 1:3 传代, 接种于 T25 培养瓶中, 加入完全培养基培养 (10% FBS, 1% 青-链霉素混合液, 89% DMEM-F12), 2d 换液一次, 稳定传代后取 2~4 代用于实验。同时, 细胞密度为 85% 时进行消化离心, 加入冻存液 (10% DMSO, 90% FBS) 重悬, 放入 -80℃ 冰箱冻存, 次日投入液氮长期保存。

1.2.2 实验分组及处理 将细胞随机分为空白组、LPS 组、低浓度 LBP 组、中浓度 LBP 组、高浓度 LBP 组。所有

分组加药前均使用不含血清的培养基饥饿 24h。空白组使用完全培养基培养, 与其余组同时换液; LPS 组给予含 10μg/mL LPS 的完全培养基刺激 24h; LBP 组分别给予含有低浓度 LBP (0.1mg/mL)、中浓度 LBP (0.5mg/mL) 及高浓度 LBP (1mg/mL) 的完全培养基孵育 24h, 再以同样方式给予 10μg/mL LPS 作用 24h。

1.2.3 CCK-8 观察各组细胞存活率 细胞以浓度为 1×10⁴ 个/mL 接种于 96 孔板中, 每孔加入 200μL 培养基, 培养 24h, 待细胞贴壁后 PBS 冲洗两遍并给以无血清 DMEM 培养基饥饿 24h。各组处理同上, 处理后 PBS 冲洗换液加入含 10% CCK-8 的无血清培养基, 37℃ 培养箱中避光孵育 2h, 酶标仪 450nm 检测 OD 值, 使用公式: 细胞存活率 = [(实验孔-空白孔)/(对照孔-空白孔)] × 100%, 计算出细胞存活率。

1.2.4 Real Time-PCR 检测各组细胞内炎性因子的 mRNA 表达量 上述各组细胞接受处理后按照天根总 RNA 提取试剂盒步骤过柱提取, 提取后测定 RNA 浓度并用琼脂糖凝胶电泳验证纯度后, 每组取等量 RNA 参照 Invitrogen 逆转录试剂盒步骤, 进行逆转录合成为 cDNA, -80℃ 保存。使用 DBI SYBR Green qPCR Master Mix 试剂盒, 严格按照步骤, 以 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 扩增。引物序列列表 1。反应体系为: 20μL。采用试剂盒中标准三步法进行 Real Time-PCR 扩增, 反应条件为: 预变性, 95℃ 2min; PCR 反应, 95℃ 10s, 50℃ ~ 60℃ 30~34s, 72℃ 30s, 共 40 循环。熔解曲线, 55℃ ~ 98℃ 84 循环。得出 Ct 值, 以 GAPDH 为内参, 使用相对定量法, 计算 2^{-ΔΔCt} 值。

1.2.5 Western-blot 检测各组蛋白表达量 各组细胞接受处理后, 根据全蛋白提取试剂盒步骤, 冷 PBS 洗涤细胞 2 次, 加入提前配置的裂解液并刮出细胞, 收集悬液放置冰上, 间隔 4min 震荡一次, 每次持续 1min, 循环 5 次。离心机 12000r/min, 4℃ 离心 20min 取上清液, 依照 BCA 蛋白定量试剂盒步骤进行蛋白定量。定量后加入 5× 上样缓冲液, 100℃ 变性 5min 备用。配制 10% SDS-PAGE 凝胶, 取 40μg 蛋白 (p-p65、p65、p-IκBα、IκBα) 或 80μg 蛋白 (p-p38、p-ERK、p-JNK、p38、ERK、JNK) 上样, 加入电泳液, 连接电泳仪调整电压为 80V 进行电泳, 至分离胶时转 120V 电泳至底部, 打开切胶进行转膜 (PVDF 膜, 湿转, 220mA, 60min), 5% 脱脂奶粉或 5% BSA 溶液 (磷酸化蛋白) 封闭 4h, 洗膜 (0.1% PBST 5min, 重复 3 次) 后一抗封闭过夜, 第 2d 洗膜后二抗孵育 2h, 再洗膜, 取出表面滴 ECL 发光液进行曝光。一抗浓度: p-p65、p65、p-IκBα、IκBα、p-p38、p38 及 p-ERK (均 1:1000), p-JNK 及 JNK (1:800), ERK (1:500), β-Actin (1:1000)。二抗浓度: 1:10000。使用 Image J 软件分析条带, p-p65 与 p65 比值, p-IκBα、IκBα 与 β-Actin 比值进行计算, p-p38、p-ERK 及 p-JNK 分别与 p38、ERK 和 JNK 比值进行计算。

统计学分析: 采用 SPSS23.0 软件进行统计分析, GraphPad Prism 7 作图。实验数据符合正态性、方差齐性, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-t 检验。P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 枸杞多糖对 LPS 诱导下 ARPE-19 细胞活力的影响 空白组、LPS 组、低浓度 LBP 组、中浓度 LBP 组、高浓度

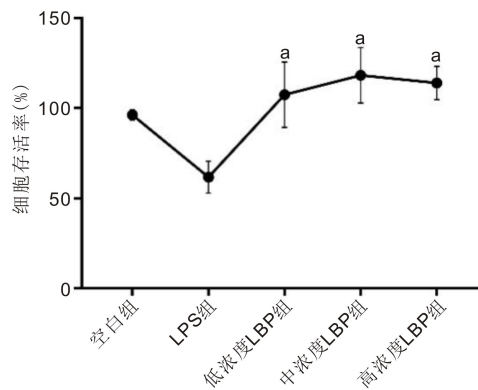


图1 枸杞多糖对LPS诱导ARPE-19细胞活力的影响 ^a $P < 0.05$ vs LPS组。

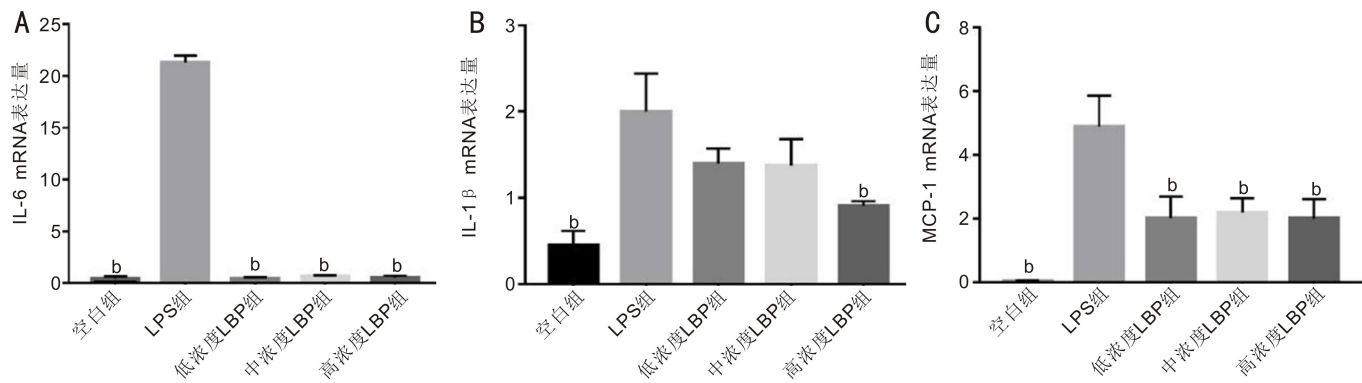


图2 枸杞多糖对LPS诱导ARPE-19细胞内炎症因子的影响 A:IL-6的mRNA表达量;B:IL-1β的mRNA表达量;C:MCP-1的mRNA表达量。^b $P < 0.01$ vs LPS组。

表1 RT-PCR引物序列

基因名称	方向	扩增片段长度(bp)	序列
IL-1β	forward	138	TGCCTATTACAGTGGCAATGAGGATG
IL-1β	reverse	138	TGTAGTGGTGGTGGGAGATTCCTAG
IL-6	forward	95	GGTGTTCCTGCTGCCTTCC
IL-6	reverse	95	GTTCTGAAGAGGTGAGTGGCTGTC
MCP-1	forward	137	AGTCTCTGCCGCCCTTCTGTG
MCP-1	reverse	137	GCCTCTGCACTGAGATCTTCCTATTG
GAPDH	forward	138	CAGGAGGCATTGCTGATGAT
GAPDH	reverse	138	GAAGGCTGGGGCTCATTT

LBP组细胞存活率分别为(96.33±6.51)%、(61.79±19.78)%、(107.58±40.47)%、(118.29±34.42)%、(114.01±20.70)%,差异有统计学意义($F = 3.496, P = 0.026$)。与空白组相比,LPS组细胞存活率下降,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。相较于LPS组,各LBP处理组细胞存活率升高,均大于80%,差异有统计学意义($P < 0.05$),但各浓度处理组之间相比差异均无统计学意义($P > 0.05$),表明一定浓度的LBP对LPS诱导ARPE-19细胞的炎症损伤具有抑制作用,见图1。

2.2 各组细胞内炎症因子mRNA表达量的变化 各组细胞内炎症因子IL-6、IL-1β和MCP-1的mRNA表达量比较,差异均有统计学意义($P < 0.001$),见表2。其中,LPS组表达量较空白组均明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.001$);与LPS组相比,低、中、高浓度LBP组的IL-6及MCP-1表达量均明显下降,高浓度LBP组的IL-1β表达量也明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。但各因子的三个LBP浓度组之间进行比较,表达量未见明显变化,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。可见,在转录水平,

表2 各组细胞内炎症因子mRNA的表达 $\bar{x} \pm s$

组别	IL-6	IL-1β	MCP-1
空白组	0.47±0.18 ^b	0.45±0.16 ^b	0.05±0.02 ^b
LPS组	21.27±0.67	2.00±0.44	4.89±0.97
低浓度LBP组	0.49±0.09 ^b	1.40±0.18	2.02±0.68 ^b
中浓度LBP组	0.67±0.11 ^b	1.37±0.31	2.20±0.45 ^b
高浓度LBP组	0.52±0.20 ^b	0.91±0.05 ^b	2.01±0.62 ^b
<i>F</i>	2395.897	14.57	22.662
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:空白组:使用完全培养基培养;LPS组:给予10μg/mL LPS;低浓度LBP组:0.1mg/mL LBP预处理后给予10μg/mL LPS;中浓度LBP组:0.5mg/mL LBP预处理后给予10μg/mL LPS;高浓度LBP组:1mg/mL LBP预处理后给予10μg/mL LPS。^b $P < 0.01$ vs LPS组。

LBP能够抑制LPS诱导的ARPE-19细胞中炎症因子IL-1β、IL-6及MCP-1的表达,而此作用与LBP的剂量无关,见图2。

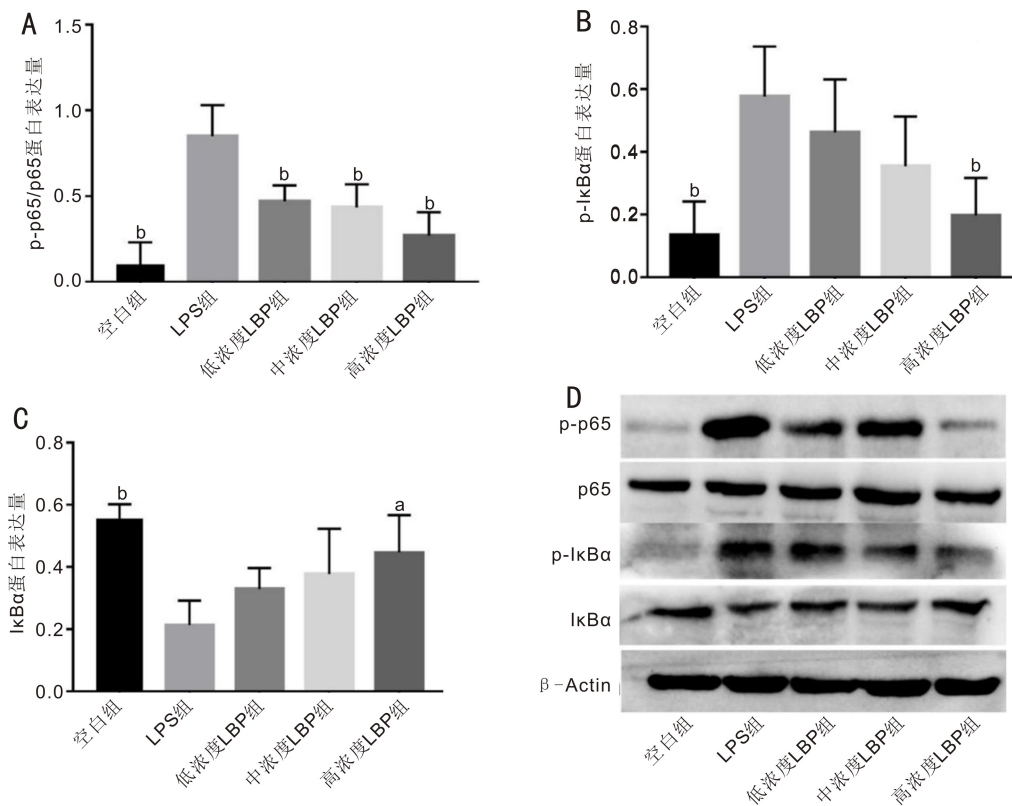


图3 枸杞多糖对LPS诱导的ARPE-19细胞内NF-κB通路相关因子蛋白表达量的影响 A:p-p65相对蛋白表达量;B:p-IκBα相对蛋白表达量;C:IκBα相对蛋白表达量;D:蛋白表达检测条带。^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs LPS组。

表3 各组细胞内NF-κB/MAPK通路相关蛋白的表达

组别	NF-κB 通路			MAPK 通路			$\bar{x} \pm s$
	p-p65	p-IκBα	IκBα	p-JNK	p-ERK	p-p38	
空白组	0.10±0.13 ^b	0.13±0.11 ^b	0.56±0.05 ^b	0.36±0.06 ^a	0.37±0.18 ^a	0.19±0.05 ^b	
LPS组	0.85±0.18	0.58±0.16	0.21±0.08	1.10±0.16	0.78±0.13	0.82±0.31	
低浓度LBP组	0.47±0.09 ^b	0.46±0.17	0.33±0.07	0.69±0.39	0.79±0.06	0.41±0.16 ^a	
中浓度LBP组	0.43±0.14 ^b	0.35±0.16	0.38±0.15	0.38±0.26 ^a	0.46±0.31	0.34±0.24 ^a	
高浓度LBP组	0.27±0.14 ^{b,c}	0.20±0.12 ^{b,c}	0.45±0.12 ^a	0.40±0.36 ^{a,c}	0.34±0.23 ^{a,c}	0.19±0.05 ^{a,c}	
<i>F</i>	20.564	7.944	5.056	3.945	3.720	5.434	
<i>P</i>	<0.001	0.001	0.017	0.036	0.042	0.014	

注:空白组:使用完全培养基培养;LPS组:给予10μg/mL LPS;低浓度LBP组:0.1mg/mL LBP预处理后给予10μg/mL LPS;中浓度LBP组:0.5mg/mL LBP预处理后给予10μg/mL LPS;高浓度LBP组:1mg/mL LBP预处理后给予10μg/mL LPS。^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs LPS组; ^c*P*<0.05 vs 低浓度LBP组。

2.3 各组细胞内NF-κB/MAPK通路相关蛋白表达量的变化

2.3.1 NF-κB通路 各组NF-κB通路的p-p65、p-IκBα及IκBα蛋白表达水平比较,差异均有统计学意义(*P*<0.05,表3)。LPS组的p-p65、p-IκBα表达水平较空白组明显升高,而IκBα蛋白表达量降低,差异均有统计学意义(*P*<0.05);与LPS组相比,低、中、高浓度LBP组的p-p65表达量均明显降低,差异均有统计学意义(*P*<0.01);与低浓度LBP组比较,高浓度LBP组的p-p65、p-IκBα蛋白表达量均降低,差异均有统计学意义(*P*<0.05),可见LBP的作用随浓度升高而增强;同时,高浓度LBP组的IκBα表达量较LPS组升高,而p-IκBα表达量降低,差异均有统计学意义(*P*<0.05),表明LBP能够抑制IκBα蛋白向p-IκBα转化。所以,枸杞多糖能够抑制LPS刺激ARPE-

19细胞NF-κB通路的激活,并可通过抑制NF-κB通路相关蛋白p65、IκBα的磷酸化发挥效应,且呈现出LBP剂量依赖性,见图3。

2.3.2 MAPK通路 检测各组MAPK通路磷酸化因子的蛋白相对表达量进行比较,差异均有统计学意义(*P*<0.05),见表3。与空白组相比,LPS刺激后p-JNK、p-ERK及p-p38的蛋白表达量升高,差异均有统计学意义(*P*<0.05);与LPS组相比较,低、中、高浓度LBP组p-p38的蛋白表达量可见明显下降,中、高浓度LBP组p-JNK的蛋白表达量降低,并且在高浓度LBP组的细胞中p-ERK的蛋白表达量有所减少,差异均具有统计学意义(*P*<0.05);比较低浓度LBP组与高浓度LBP组,发现三种磷酸化蛋白表达量随着LBP浓度的升高均有降低,差异均有统计学意义(*P*<0.05),见图4。由此可见,枸杞多糖能

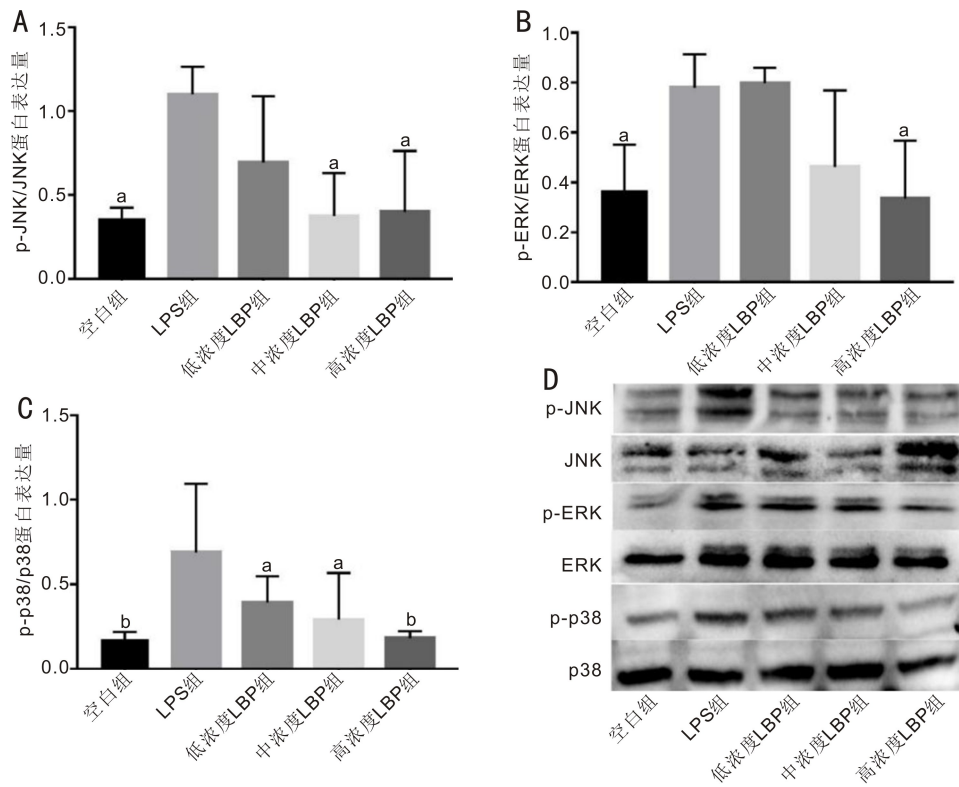


图4 枸杞多糖对LPS诱导的ARPE-19细胞内MAPK通路相关因子蛋白表达量的影响 A:p-JNK相对蛋白表达量;B:p-ERK相对蛋白表达量;C:p-p38相对蛋白表达量;D:蛋白表达检测条带。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs LPS组。

够抑制LPS刺激ARPE-19细胞内JNK、ERK及p38的磷酸化,并具有剂量依赖性,揭示枸杞多糖可通过JNK/ERK/p38通路抑制LPS诱导的ARPE-19炎症反应。

3 讨论

LBP具有明确的抗炎作用,研究发现它可通过抗炎、抗氧化和抗凋亡等机制发挥神经保护作用^[12-13]。在小鼠巨噬细胞中,LBP可通过抑制TLR4/NF- κ B信号通路减轻LPS诱导的炎症反应^[14];并且,LBP可通过MAPK通路调节促炎细胞因子的变化,进而抑制小鼠肝脑损伤及运动障碍^[15]。眼科研究中,已证实雷公藤、血管紧张素转换酶2激动剂等药物可通过NF- κ B/MAPK通路抑制LPS诱导的RPE炎症性反应^[16-17]。所以,我们采用LPS诱导ARPE-19细胞建立炎症反应模型观察LBP的作用,证实LPS可诱导ARPE-19发生炎症损伤、细胞存活率下降,并且发现一定浓度的LBP预处理能提高炎症损伤后的RPE细胞活力。而且,LPS与LBP同时应用并未降低细胞活力,证实了LBP应用的无毒性,这可为预防RPE的炎症损伤提供一种安全的新药物。

在ARMD的机制及治疗研究中,炎症因子一直受到广泛关注。近年研究发现,眼部衰老相关疾病可伴随有IL-6、IL-1 β 及MCP-1等炎症因子的增加^[18-19];有人使用IL-1 β 刺激RPE细胞,发现IL-6、IL-8及MCP-1等炎症因子的升高^[20];还发现通过LPS刺激RPE细胞也可出现IL-6、IL-8及MCP-1等升高^[17-21]。而在本实验中,我们也观察到LPS诱导ARPE-19细胞后,细胞内炎症因子IL-6、IL-1 β 及MCP-1的表达量明显升高,并且发现LBP可发挥明显的抗炎作用,降低这些炎症因子的表达,为LBP能够抑制RPE细胞的炎症反应提供了有力证据。另外,细胞产生炎症反应时,几乎都存在NF- κ B通路的激

活。比如LPS刺激细胞后,可与细胞表面的Toll样受体结合,激活I κ B α 激酶,合成I κ B α 复合物,进一步诱导I κ B α 磷酸化、泛素化,后被相应蛋白酶识别降解,使得p50/p65从I κ B α 复合物中释放出来,形成p50/p65二聚体,再迅速发生核转位,由p65形成p-p65,最后启动细胞核中如TNF- α 、IL-1 β 、IL-6及MCP-1等细胞炎症因子的靶基因表达^[22-24]。在本实验中我们观察到LPS诱导后ARPE-19细胞中I κ B α 、p65的磷酸化水平升高,进一步证实LPS能够通过诱导RPE细胞中NF- κ B通路的激活发挥其致炎作用。在此基础上新发现LBP可上调RPE细胞中I κ B α 蛋白水平,下调磷酸化因子p-I κ B α 、p-p65的表达,表明LBP能够抑制胞内NF- κ B通路激活、阻碍I κ B α 及p65向磷酸化转化。此结果明确了在RPE细胞中,LBP的抗炎作用机制可通过抑制NF- κ B通路进行。并且我们还对LBP在三个浓度梯度下的抗炎作用进行了研究,发现浓度越高,LBP抑制NF- κ B通路激活的作用越强。这显示出LBP的抗炎作用存在剂量依赖性,可为下一步进行体内及临床研究时选择药物浓度提供参考。

MAPK通路 with 细胞增殖、应激、炎症、凋亡等信号转导通路密切相关。作为这些通路的交汇点,它将胞外信号经受体、G蛋白、蛋白激酶、转录因子等组成信号网络,传递到胞内,参与细胞分化、癌变、迁移、凋亡等细胞生理生理过程。MAPK通路是信号从细胞表面到细胞核内部的重要传递者,分为ERK、p38、JNK和ERK5等亚族,其激活通过级联过程进行,被激活后表现为逐级的磷酸化^[25]。研究表明,LPS刺激可通过激活细胞内信号通路适配器MyD88蛋白的表达进行,再启动下游信号转导级联,引起MAPK通路中p-JNK、p-ERK及p-p38的激活^[26-27]。我们的实验结果也证实了这一点。同时发现LBP可降低

LPS 刺激后 RPE 细胞内 JNK、ERK 及 p38 的磷酸化表达, 这显示 LBP 是通过抑制 MAPK 中亚级通路 JNK/ERK/p38 的激活来降低 RPE 炎症反应。除此之外, 不同浓度 LBP 作用强度不同, 在低浓度 LBP 的处理下抑制 MAPK 通路激活的作用并不明显, 但在高浓度 LBP 组中, 三种因子的磷酸化表达均有很大程度的减低, 所以, LBP 的抗炎作用与药物用量密切相关。再者, 由于 MAPK 通路与细胞增殖及凋亡联系紧密, 所以 ARMD 中 RPE 细胞的炎症相关死亡方式也值得关注。

本实验虽然得出细胞水平的结论, 无体内实验证据, 但可为下一步继续深入探讨 LBP 对 ARMD 中炎症方面的作用提供基本依据。基于细胞实验, 还可进行细胞死亡方式的研究, 并观察其他可能参与 RPE 炎症反应的信号通路, 为 ARMD 及眼科 RPE 相关炎症性疾病的治疗提供新靶点。

综上所述, 枸杞多糖对于 LPS 诱导的人视网膜色素上皮细胞炎症反应具有抑制作用, 并通过抑制 NF- κ B/MAPK 通路相关因子的磷酸化及阻碍细胞内炎症因子 IL-1 β 、IL-6 及 MCP-1 的转录过程而发挥影响。

参考文献

- 1 Mitchell P, Liew G, Gopinath B, et al. Age-related macular degeneration. *Lancet* 2018;392(10153):1147-1159
- 2 Wong WL, Su X, Li X, et al. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health* 2014;2(2):e106-e116
- 3 Kauppinen A, Paterno JJ, Blasiak J, et al. Inflammation and its role in age-related macular degeneration. *Cell Mol Life Sci* 2016;73(9):1765-1786
- 4 Datta S, Cano M, Ebrahimi K, et al. The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in non-neovascular ARMD. *Prog Retin Eye Res* 2017;60:201-218
- 5 Guillonneau X, Eandi CM, Paques M, et al. On phagocytes and macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* 2017;61:98-128
- 6 Shaw PX, Stiles T, Douglas C, et al. Oxidative stress, innate immunity, and age-related macular degeneration. *AIMS Mol Sci* 2016;3(2):196-221
- 7 Xiao J, Wang F, Liang EC, et al. Lycium barbarum polysaccharides improve hepatic injury through NF κ B and NLRP3/6 pathways in a methionine choline deficient diet steatohepatitis mouse model. *Int J Biol Macromol* 2018;120(Pt B):1480-1489
- 8 Gao Y, Wei Y, Wang Y, et al. Lycium Barbarum: A Traditional Chinese Herb and A Promising Anti-Aging Agent. *Aging Dis* 2017;8(6):778-791
- 9 Liu Y, Zhang Y. Lycium barbarum polysaccharides alleviate hydrogen peroxide-induced injury by up-regulation of miR-4295 in human trabecular meshwork cells. *Exp Mol Pathol* 2019;106:109-115
- 10 李贞, 马雅玲. 枸杞多糖对 H₂O₂ 诱导的视网膜神经节细胞凋亡的影响. *宁夏医科大学学报* 2015;40(1):24-28
- 11 李小璐, 陈男雄, 马雅玲. 枸杞多糖对糖尿病大鼠视网膜病理改变及其 VEGF 表达的影响. *中华实验眼科杂志* 2014;32(4):334-339

- 12 Yu Y, Wu X, Pu J, et al. Lycium barbarum polysaccharide protects against oxygen glucose deprivation/reoxygenation-induced apoptosis and autophagic cell death via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in primary cultured hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 2018;495(1):1187-1194
- 13 Liu WJ, Jiang HF, Rehman FU, et al. Lycium Barbarum Polysaccharides Decrease Hyperglycemia - Aggravated Ischemic Brain Injury through Maintaining Mitochondrial Fission and Fusion Balance. *Int J Biol Sci* 2017;13(7):901-910
- 14 Peng Q, Liu H, Shi S, et al. Lycium ruthenicum polysaccharide attenuates inflammation through inhibiting TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Int J Biol Macromol* 2014;67:330-335
- 15 Sun X, Lv Y, Huang L, et al. Pro-inflammatory cytokines serve as communicating molecules between the liver and brain for hepatic encephalopathy pathogenesis and Lycium barbarum polysaccharides protection. *J Ethnopharmacol* 2020;248:112357
- 16 Zhang J, Zhou K, Zhang X, et al. Celastrol Ameliorates Inflammation in Human Retinal Pigment Epithelial Cells by Suppressing NF- κ B Signaling. *J Ocul Pharmacol Ther* 2019;35(2):116-123
- 17 Tao L, Qiu Y, Fu X, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 activator diminazene aceturate prevents lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibiting MAPK and NF- κ B pathways in human retinal pigment epithelium. *J Neuroinflammation* 2016;13:35
- 18 Engelbrecht C, Sardinha LR, Rizzo LV. Cytokine and Chemokine Concentration in the Tear of Patients with Age-Related Cataract. *Curr Eye Res* 2020;45(9):1101-1106
- 19 Ten Berge JC, Fazil Z, van den Born I, et al. Intraocular cytokine profile and autoimmune reactions in retinitis pigmentosa, age-related macular degeneration, glaucoma and cataract. *Acta Ophthalmol* 2019;97(2):185-192
- 20 Chen X, Han R, Hao P, et al. Nepetin inhibits IL-1 β induced inflammation via NF- κ B and MAPKs signaling pathways in ARPE-19 cells. *Biomed Pharmacother* 2018;101:87-93
- 21 Chen C, Guo D, Lu G. Wogonin protects human retinal pigment epithelium cells from LPS-induced barrier dysfunction and inflammatory responses by regulating the TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Mol Med Rep* 2017;15(4):2289-2295
- 22 Taniguchi K, Karin M. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat Rev Immunol* 2018;18(5):309-324
- 23 Sun SC. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2017;17(9):545-558
- 24 Zhang Q, Lenardo MJ, Baltimore D. 30 Years of NF- κ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. *Cell* 2017;168(1-2):37-57
- 25 Kim EK, Choi EJ. Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. *Arch Toxicol* 2015;89(6):867-882
- 26 Zhu G, Cheng Z, Lin C, et al. MyD88 Regulates LPS-induced NF- κ B/MAPK Cytokines and Promotes Inflammation and Malignancy in Colorectal Cancer Cells. *Cancer Genomics Proteomics* 2019;16(6):409-419
- 27 Haque MA, Jantan I, Harikrishnan H, et al. Standardized extract of Zingiber zerumbet suppresses LPS-induced pro-inflammatory responses through NF- κ B, MAPK and PI3K-Akt signaling pathways in U937 macrophages. *Phytomedicine* 2019;54:195-205