DOI:10.16016/j.1000-5404.202003092

肝 X 受体激动剂通过激活 SIRT1 信号级联改善 Aβ 诱导的视网膜色素上皮细胞炎症和凋亡反应

甘 敏,周巧雅,洪美静,李 雪,彭 惠 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院眼科,眼科学重庆市市级重点实验室,重庆市眼科研究所

[**摘要**] **目的** 探讨 LXR-SIRT1 调控轴在淀粉样 β(amyloidβ, Aβ)诱导的视网膜上皮(retinal pigment epithelial, RPE)细胞炎症和凋亡中的作用。**方法** 体外培养 ARPE-19 细胞系,收集湿性年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration,AMD)患者和正常受试者的人外周血单个核细胞(human peripheral blood mononuclear cell, PBMC)并检测其中沉默信息调节因子 1(silencing information regulator 1, SIRT1)的 mRNA 表达。用 1.0、5.0 μmol/L 的 Aβ1-40 和 5.0 μmol/L Aβ40-1 处理 ARPE-19 细胞 24 h,Real-time PCR 检测 SIRT1、IL-1β、p21 在 ARPE-19 细胞中的表达,探讨 Aβ 对 ARPE-19 细胞炎症、凋亡的影响。用 5.0 μmol/L Aβ1-40 和 5.0 μmol/L TO90 处理 ARPE-19 细胞,Western blot 检测 SIRT1、LXRα、ace-NF-κB、NF-κB、ace-p53、p53、p21 的表达,研究 Aβ1-40 刺激及 TO90 预处理对 SIRT1 信号级联的影响。在敲低 SIRT1 后,Western blot 检测 NF-κB 和 p53 信号通路的表达,进一步验证 TO90 对 SIRT1 信号级联的调控作用。**结果** SIRT1 在湿性 AMD 患者的 PBMC 中明显下调($P<0.01$)。Aβ1-40 刺激 ARPE-19 细胞后,SIRT1 在 mRNA 及蛋白水平明显下调($P<0.05$),p21 在 mRNA 及蛋白水平明显上调($P<0.05$),IL-1β 在基因水平明显上调($P<0.05$),ace-NF-κB、NF-κB、ace-p53、p53 在蛋白水平显著上调($P<0.05$),而 TO90 预处理则可逆转 Aβ1-40 对这些因子的调节($P<0.05$)。SIRT1 敲低后,TO90 对 ace-NF-κB、NF-κB、ace-p53、p53 上调的逆转作用显著下降($P<0.05$)。**结论** LXR 激动剂通过激活 SIRT1 信号级联改善 Aβ 诱导的 ARPE-19 细胞炎症及凋亡反应。

[**关键词**] 视网膜色素上皮;肝 X 受体;沉默信息调节因子 1;淀粉样 β;年龄相关性黄斑变性

[**中图法分类号**] R329.25; R774.5; R977.6 [**文献标志码**] A

Liver X receptor agonist ameliorates amyloid β-induced inflammation and apoptosis in retinal pigment epithelial cells by activating SIRT1 signaling cascade

GAN Min, ZHOU Qiaoya, HONG Meijing, LI Xue, PENG Hui Department of Ophthalmology, Chongqing Eye Institute, Chongqing Key Laboratory of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role of liver X receptor (LXR)-SIRT1 regulatory axis in inflammation and apoptosis of retinal pigment epithelial (RPE) cells induced by β-amyloid (Aβ). **Methods** Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were collected from patients with wet age-related macular degeneration (AMD) and normal subjects for detection of SIRT1 mRNA expression. And then, human RPE cell line ARPE-19 stimulated with 1.0, 5.0 μmol/L Aβ1-40 or 5.0 μmol/L Aβ40-1 was examined for expression of SIRT1, IL-1β and p21 using real-time PCR to investigate the effects of Aβ on cell inflammation and apoptosis; Subsequently, the expression levels of SIRT1, LXRα, ace-NF-κB, NF-κB, ace-p53, p53, and p21 proteins in ARPE-19 cells treated with 5.0 μmol/L Aβ1-40, 5.0 μmol/L TO90, or both

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81670881)

[**通信作者**] 彭 惠,E-mail:pengh9@sina.com

were detected using Western blotting to analyze the effect of Aβ1-40 stimulation and TO90 pretreatment on SIRT1 signaling cascade. Finally, after knocking down SIRT1, the expression of NF-κB and p53 signaling pathways was detected by Western blot analysis to further verify the regulatory effect of TO90 on the SIRT1 signaling cascade. **Results** SIRT1 was significantly down-regulated in the PBMCs of patients with wet AMD ($P<0.05$). Aβ stimulation of ARPE-19 cells caused obvious downregulation of SIRT1 ($P<0.05$) and upregulation of p21 at both the mRNA and protein levels ($P<0.05$), upregulation of IL-1β at the mRNA level ($P<0.05$), and upregulation of ace-NF-κB, NF-κB, ace-p53, and p53 at the protein level ($P<0.05$); TO90 pretreatment effectively abolished the effects of Aβ on these factors ($P<0.05$). After SIRT1 knockdown, the reverse effect of TO90 on the upregulation of ace-NF-κB, NF-κB, ace-p53, and p53 was significantly reduced ($P<0.05$). **Conclusion** LXR agonists improve Aβ-induced inflammation and apoptosis in ARPE-19 cells by activating the SIRT1 signaling cascade.

[**Key words**] retinal pigment epithelium; liver X receptor; silencing information regulator 1; β-amyloid; age-related macular degeneration

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China(81670881). Corresponding author: PENG Hui, E-mail: pengh9@sina.com

年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration,AMD)是导致西方国家中老年人视力丧失的主要原因,其发病率随着社会人口老龄化而增加[1]。早期AMD的主要表现为视网膜玻璃膜疣的形成和视网膜色素沉着[2],其中玻璃疣的主要成分为淀粉样蛋白β(amyloid β,Aβ)[3]。研究表明Aβ可诱导视网膜上皮(retinal pigment epithelial, RPE)细胞炎症和凋亡反应,并参与AMD的发生和发展[4]。肝X受体(liver X receptor,LXR)属于核受体超家族,其成员包括LXRα和LXRβ,不仅在胆固醇和脂质代谢中起重要作用[5],还参与炎症[6]和免疫[7]的调节。LXRβ在视网膜中普遍表达,相反LXRα的表达却很少[8]。研究表明:在不同的病理条件下,LXR激动剂激活不同的LXR亚型来发挥作用,比如在实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveitis,EAU)小鼠模型中[9],LXR激动剂主要通过激活LXRα来抑制眼内炎症,提示LXRα可能在抗炎中起主要作用;而在N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate,NMDA)诱导的视网膜变性小鼠中[10],LXR激动剂则主要通过激活LXRβ来保护视网膜神经元免受损伤,提示LXRβ似乎在神经保护中占主导地位。与之类似,课题组前期研究表明[11]:LXR激动剂TO90(一种人工合成的针对LXRα和LXRβ的选择性激动剂)可通过激活LXRα缓解Aβ诱导的RPE细胞炎症反应,但其具体作用机制尚不清楚。沉默信息调节因子1(silencing information regulator 1,SIRT1)是一种烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖性(nicotinamide adenine dinucleotide-dependent,NADP)脱乙酰化酶,可通过与炎症相关因子NF-κB和凋亡相关因子p53结合并使其脱乙酰化,减少乙酰化-NF-κB(acetylated NF-κB, ace-NF-κB)和乙酰化-p53(acetylated p53, ace-p53)的表达,从而抑制这两条通路的活性,导致终末炎症因子及p53下游因子p21的表达下降,发挥抗炎和抗凋亡反应的作用[12]。有研究表明LXR激动剂可通过增加SIRT1信号传导来调节脂质代谢[13]。另外,LXR和SIRT1作为共同体在糖尿病性视网膜病变中参与脂质调节[14]。但LXR是否可通过调节SIRT1参与AMD的病理生理过程,尚不清楚。本研究检测湿性AMD患者外周血单核细胞(human peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中SIRT1的mRNA表达,采用Aβ刺激ARPE-19细胞系来模拟早期AMD体外微环境,评估LXR-SIRT1轴在Aβ诱导的RPE炎症和凋亡反应中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验细胞 从14例未接受抗VEGF治疗的湿性AMD患者和14例同年龄段健康受试者的静脉中抽取10 mL外周血用以提取PBMC。参与者的基本信息见表1。RPE细胞系ARPE-19来自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。本研究取得患者知情同意,并获得重庆医科大学附属第一医院伦理委员会审批[2019年科研伦理(2019-130)号]。

表1 参与者基本信息

参与者	n	年龄/岁[中位数(范围)]	女性[例(%)]	男性[例(%)]
正常受试者	14	69.5(62~78)	7(50.0)	7(50.0)
湿性AMD患者	14	66.5(63~78)	6(42.9)	8(57.1)

1.1.2 主要试剂与仪器 Aβ1-40和Aβ40-1购自美国Sigma公司;TO901317(TO90)购自美国Cayman公司;DMEM/F12培养基购自美国Gibco公司;细胞计

数试剂盒 8(CCK-8)购自美国 Bryotime;TRIzol、PrimeScript© RT、Green PCR Kit 试剂盒购自 TaKaRa 公司;特异性抗 SIRT1、LXRα、NF-κB、ace-NF-κB、p53、ace-p53、p21、RPE65、ZO-1 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司;GAPDH 特异性抗体购自中国杭州贤至公司;特异性二抗购自美国 Proteintech 公司;包含有 SIRT1-shRNA 和乱序 shRNA 的慢病毒购自上海吉凯公司。多功能酶标仪(Thermo Fisher Scientific,美国);ABI 7500 Real-time PCR 仪(Applied Biosystems,美国)。

1.2 方法

1.2.1 寡聚 Aβ1-40 的制备 寡聚 Aβ 的制备方法见文献[15],1 mg Aβ1-40 或 Aβ40-1 冻干粉溶解在 400 μL 六氟异丙醇中,将所得溶液在室温下孵育 60 min,随后在冰上静置 10 min,以 100 μL/管分装至 4 个离心管中,每管加入 200 μL 双蒸水,室温下孵育 20 min 后,用氮气流轻吹 15 min 以蒸发溶液中的六氟异丙醇,最后在 37 ℃下孵育 4 d,于-80 ℃保存备用。

1.2.2 TO90 的处理和使用 5 μmol/L 浓度的 TO90 可在避免细胞毒性的前提下激活 RPE 细胞中 LXRα 而不是 LXRβ 来发挥作用[16],因此在实验中使用 5 μmol/L 的 TO90 浓度。将 TO90 粉剂溶解在二甲基亚砜(DMSO)中至 100 mg/mL 浓度,-80 ℃下储存备用。Aβ 处理 ARPE-19 细胞前 6 h,预防性给予 TO90 或载体。TO90 在使用时用 DMEM/F12 培养基稀释,使终浓度为 5 μmol/L 且 DMSO 含量小于 2%。载体为含有 2%DMSO 的培养基。

1.2.3 CCK-8 测定 ARPE-19 细胞增殖活力 ARPE-19 细胞(10^4/孔)接种在 96 孔培养板上,达到融合后,将其饥饿 12 h。0、0.1、1.0、5.0、10.0 μmol/L 浓度的寡聚 Aβ1-40 刺激 ARPE-19 细胞 24、48、72 h 后,更换原培养基为含有 10%WST-8 的 DMEM/F12 培养基(100 μL/孔)。随后将 ARPE-19 细胞在 37 ℃温育 2~4 h,使用多功能酶标仪在 450 nm 波长下读取上清液的光密度值。刺激组细胞的光密度用未刺激组细胞的光密度标准化,实验重复 3~4 次。另外,用同样的步骤将已转染和未转染的 ARPE-19 细胞接种在 96 孔培养板上,检测病毒转染对 ARPE-19 细胞增殖活力的影响。

1.2.4 Real-time PCR 检测 IL-1β、SIRT1 和 p21 的表达 将 ARPE-19 细胞分为未刺激组,1.0、5.0 μmol/L Aβ1-40 组,5.0 μmol/L Aβ40-1 组。用 TRIzol 法提取 RNA,然后使用反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA,-20 ℃保存备用。检测时,根据荧光定量试剂盒使用说明在 ABI 7500 上扩增 cDNA 并检测荧光强度。每个样品设置 1 个副孔,并计算两者的平均 Ct 值作为最终 Ct 值,使用内源性对照 β-肌动蛋白将数据标准化。对于每个样品,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行统计,计算 SIRT1、IL-1β 和 p21 的 mRNA 表达,实验重复 3~5 次。基因的引物序列见表 2。

表 2 Real-time PCR 引物序列

基因名称	登记号	序列
SIRT1	NM_012238.5	正义链:5′-TAGCCTTGTCAGATAAGGAAGGA-3′
		反义链:5′-TGTTCTGGGTATAGTTGCGAAGT-3′
IL-1β	NM_000576.2	正义链:5′-CTCGCCAGTGAAATGATGGCT-3′
		反义链:5′-GTCGGAGATTCGTAGCTGGAT-3′
P21	NM_001291549.1	正义链:5′-TCCTCATCCCGTGTTCTCCT-3′
		反义链:5′-CCCTTCAAAGTGCCATCTGTT-3′
β-actin	NM_001101.3	正义链:5′-GGATGCAGAAGGAGATCACTG-3′
		反义链:5′-TGTTCTGGGTATAGTTGCGAAGT-3′

1.2.5 Western blot 检测 SIRT1、LXRα、NF-κB、ace-NF-κB、p53、ace-p53、p21 和 RPE65 的表达 首先检测 ARPE-19 细胞中 RPE65 的蛋白表达以确定细胞来源,随后将细胞分为未刺激组、5.0 μmol/L Aβ1-40 组、5.0 μmol/L Aβ1-40+5.0 μmol/L TO90 组、5.0 μmol/L TO90 组,检测 SIRT1、LXRα、NF-κB、ace-NF-κB、p53、ace-p53 和 p21 的蛋白表达。最后在 ARPE-19 细胞中敲低 SIRT1,将 ARPE-19 细胞分为未刺激组、5.0 μmol/L Aβ1-40 组、5.0 μmol/L Aβ1-40+阴性对照(NC)组、5.0 μmol/L Aβ1-40+NC+5.0 μmol/L TO90 组、5.0 μmol/L Aβ1-40+iSIRT1 组、5.0 μmol/L Aβ1-40+iSIRT1+5.0 μmol/L TO90 组,检测 NF-κB、ace-NF-κB、p53、ace-p53 和 p21 的蛋白表达。ARPE-19 细胞总蛋白用苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride,PMSF)和放射免疫沉淀分析(RIPA)裂解液的混合液(PMSF∶RIPA=1∶100)提取,随后向提取的蛋白质中加入上样缓冲液并于沸水中煮沸 5 min 使蛋白质变性,-20 ℃保存备用。电泳时,每个样品的蛋白上样量保持一致(40~60 μg),用 12%SDS-PAGE 凝胶分离蛋白,并电转到聚偏二氟乙烯膜上。随后将膜用 5%脱脂牛奶封闭 1 h,并与 SIRT1(1∶1 000)、LXRα(1∶500)、NF-κB(1∶10 000)、ace-NF-κB(1∶500)、p53(1∶500)、ace-p53(1∶500)、p21(1∶1 000)、RPE65(1∶500)和 GAPDH(1∶2 000)的特异性一抗在 4 ℃孵育 12~16 h。然后将条带洗涤 3 次,与相应的二抗(1∶5 000)在 37 ℃孵育 1 h。条带蛋白信号用 ECL 试剂盒检测,Image J 分析蛋白条带密度。使用内源对照 GAPDH 将数据标准化,实验重复 3~6 次。

1.2.6 慢病毒转染敲低 ARPE-19 细胞中 SIRT1 的表达 RPE 细胞接种在 6 孔板或 12 孔板中,待达到 30%~40%融合后,用含有 SIRT1-shRNA 和乱序-

shRNA 的慢病毒感染 ARPE-19 细胞(MOI=10)。转染 12~16 h 后将原培养基更换为不含病毒的培养基,培养至 ARPE-19 细胞融合后,在荧光显微镜下观察 ARPE-19 细胞荧光评估感染效率。分别使用 Real-time PCR 和 Western blot 在基因和蛋白质水平评估 SIRT1 的敲低效率。

1.2.7　免疫荧光检测 RPE65 和 ZO-1 的表达　将 ARPE-19 细胞接种到细胞爬片上,当细胞达到融合时,用 4%多聚甲醛固定爬片 15 min。PBS 洗涤爬片 3 次,用 0.1%Triton X-100 作用 5 min 穿透细胞膜,再次洗涤 3 次后,用含 10%山羊血清的 PBS 封闭爬片 1 h,随后与含 RPE65(1∶100)和 ZO-1(1∶100)特异性一抗的混合液在 4 ℃下孵育过夜。PBS 洗涤 3 次后,将爬片与抗鼠和抗兔荧光二抗(1∶50)的混合液在 37 ℃下孵育 1 h。最后洗涤爬片 3 次,将细胞核用 DAPI 染色 5 min,封片液封闭爬片,在共聚焦荧光显微镜下观察所有荧光图像,照相并保存。

1.3　统计学分析

所有数据用 $\bar{x}\pm s$ 描述。人 PBMC 中 SIRT1 mRNA 表达采用 SPSS 20 统计软件行非参数检验分析。其余结果通过 GraphPad Prism 5.0 行单因素方差分析。检验水准:$\alpha=0.05$。

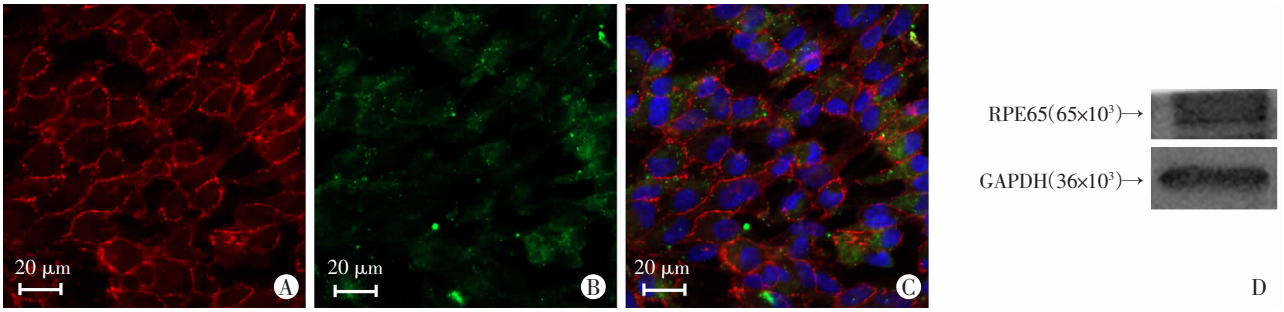
2　结果

2.1　ARPE-19 细胞中 RPE65 和 ZO-1 的表达

免疫荧光结果显示:ARPE-19 细胞系 ZO-1 染色阳性(图 1A、C),表明细胞之间紧密连接的形成,细胞处于融合状态。免疫荧光及 Western blot 检测结果显示 RPE65 表达阳性(图 1B~D),证实 ARPE-19 是 RPE 来源细胞。

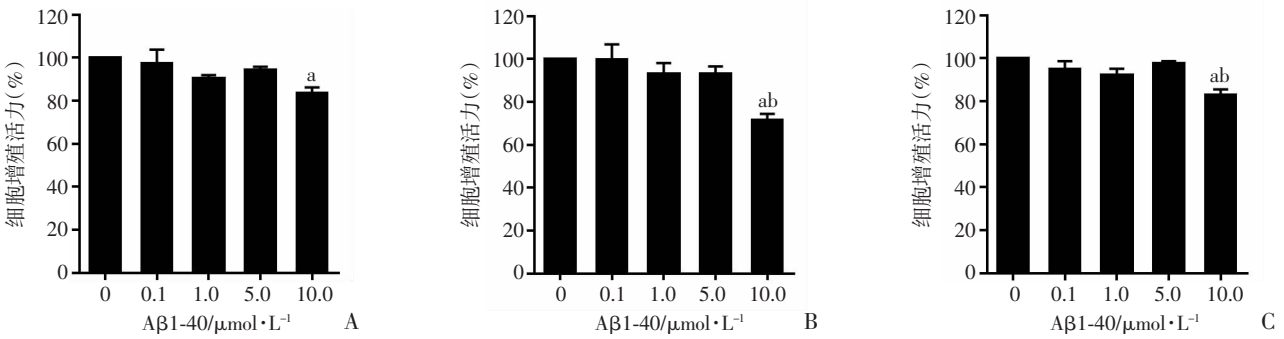
2.2　Aβ1-40 对 ARPE-19 细胞增殖活力的影响

CCK-8 检测结果显示:与未刺激组相比,0.1、1.0、5.0 μmol/L 的 Aβ1-40 刺激 ARPE-19 细胞 24、48、72 h 均不会影响细胞增殖活力。而与未刺激组相比,10.0 μmol/L Aβ1-40 处理 ARPE-19 细胞 24、48、72 h 均显著降低细胞增殖活力($P<0.05$,图 2)。为了避免细胞毒性,后续实验分别使用 1.0、5.0 μmol/L Aβ1-40 的浓度刺激 24 h,以评估 Aβ1-40 对 ARPE-19 细胞炎症和凋亡反应的影响。



A:ZO-1 染色阳性;B:RPE65 染色阳性;C:共同显示 ZO-1、RPE65 和 DAPI 染色;D:Western blot 检测结果显示 RPE65 阳性表达

图 1　免疫荧光和 Western blot 检测 ARPE-19 细胞中 RPE65 和 ZO-1 的表达



a:$P<0.05$,与未刺激组比较;b:$P<0.05$,与 0.1 μmol/L 刺激组比较

图 2　CCK-8 检测不同浓度的 Aβ1-40 刺激 24 h(A)、48 h(B)、72 h(C)后对 ARPE-19 细胞增殖活力的影响

2.3 Aβ1-40 对 SIRT1、p21 和 IL-1β mRNA 表达的影响

Real-time PCR 检测结果显示:与未刺激组和 5.0 μmol/L Aβ40-1 组相比,1.0、5.0 μmol/L Aβ1-40 均降低 SIRT1 的 mRNA 表达($P<0.05$,图 3A),同时增加 IL-1β 的表达($P<0.05$,图 3B)。但仅有浓度为 5.0 μmol/L 的 Aβ1-40 增加 p21 的 mRNA 表达($P<0.05$,图 3C)。因此,本研究使用 5.0 μmol/L 浓度的 Aβ1-40 建立 ARPE-19 细胞的炎症和凋亡反应模型。与正常受试者相比,湿性 AMD 患者 PBMC 中 SIRT1 的 mRNA 表达降低($P<0.01$,图 3D)。

2.4 LXR 激动剂预处理及 Aβ1-40 刺激对 LXRα、SIRT1 表达的影响

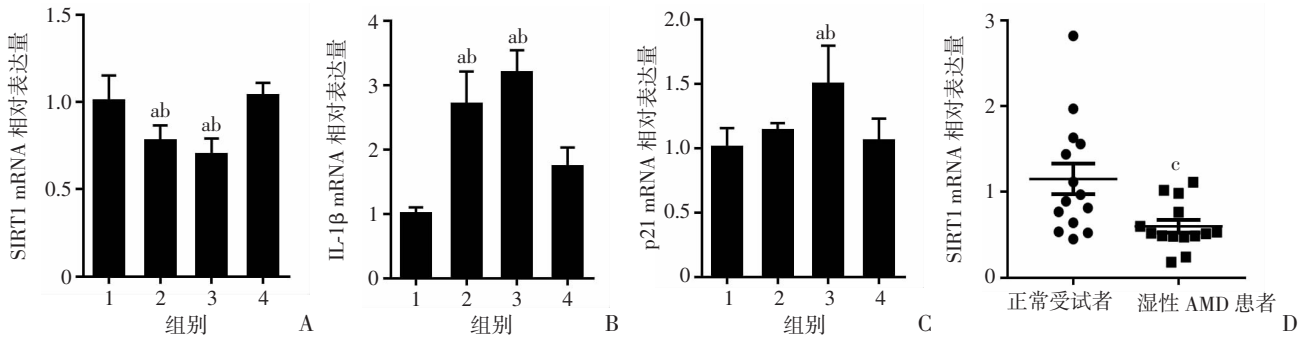
Western blot 检测结果显示:与未用 TO90 处理组相比,TO90 处理组 LXRα 蛋白表达升高,表明 TO90 成功激活 LXRα($P<0.01$,图 4A、C)。Real-time PCR 和 Western blot 结果显示:与 Aβ1-40 组相比,Aβ1-40+TO90 组 SIRT1 的表达在 mRNA 及蛋白水平上调($P<0.01$,图 4A、B、D),表明 TO90 在基因和蛋白水平上显著逆转了由 Aβ1-40 引起的 SIRT1 的下调。

2.5 LXR 激动剂预处理及 Aβ1-40 刺激对 NF-κB 和 p53 信号通路的影响

Western blot 检测结果显示:与未刺激组相比,Aβ1-40 组中 SIRT1 下游因子 ace-NF-κB(p65)、NF-κB、ace-p53、p53 和 p21 的蛋白表达显著增加($P<0.05$),表明 Aβ1-40 通过增加 NF-κB 和 p53 信号通路的乙酰化和活化来诱导 ARPE-19 细胞炎症和凋亡反应。与 Aβ1-40 组相比,Aβ1-40+TO90 组中上述因子的蛋白表达下调($P<0.05$,图 5),表明 LXR 激动剂通过增加 SIRT1 的脱乙酰化酶活性来抑制 NF-κB 和 p53 信号通路的乙酰化和活化。

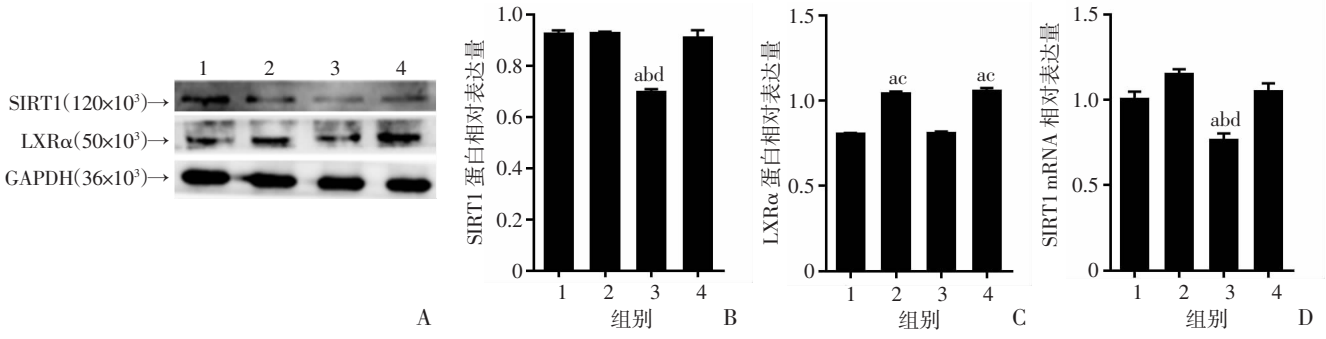
2.6 慢病毒转染敲低 ARPE-19 中 SIRT1 的表达

CCK-8 检测结果显示:相对于未处理组,阴性对照(NC)组细胞增殖活力降低。此外,与 NC 组比较,iSIRT1 组细胞增殖活力进一步降低($P<0.01$,图 6A)。Real-time PCR 和 Western blot 检测结果显示:与未处理组和 NC 组相比,iSIRT1 组 SIRT1 的表达降低($P<0.01$,图 6B~D)。表明病毒转染本身不影响 SIRT1 的表达,iSIRT1 成功降低了 SIRT1 的表达。



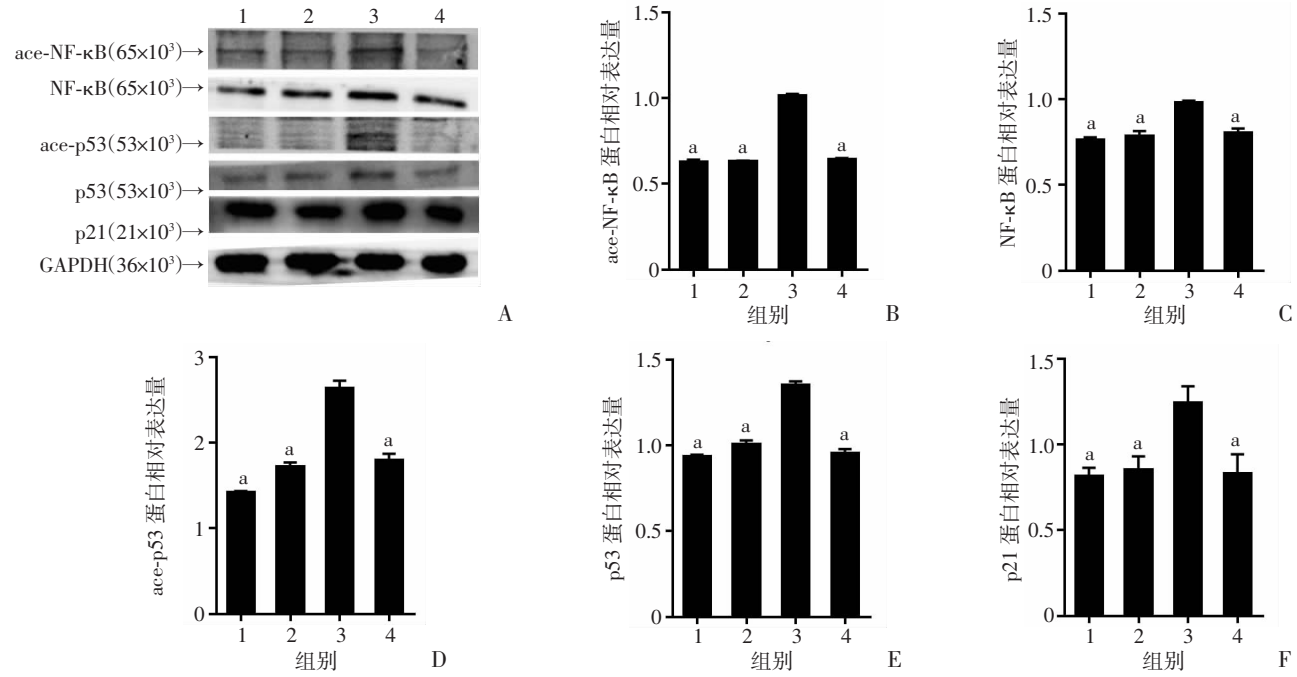
A~C:分别为 ARPE-19 细胞中 SIRT1、IL-1β、p21 mRNA 的表达;D:湿性 AMD 患者和正常受试者 PBMC 中 SIRT1 mRNA 表达($n=14$) 1:DMEM/F12;2:1.0 μmol/L Aβ1-40;3:5.0 μmol/L Aβ1-40;4:5.0 μmol/L Aβ40-1;a:$P<0.05$,与 DMEM/F12 组比较;b:$P<0.05$,与 5 μmol/L Aβ40-1 组比较;c:$P<0.01$,与正常受试者比较

图 3 RT-PCR 检测 Aβ1-40 刺激对 ARPE-19 细胞 SIRT1、IL-1β 和 p21 mRNA 表达的影响及湿性 AMD 患者 PBMC 中 SIRT1 mRNA 的表达



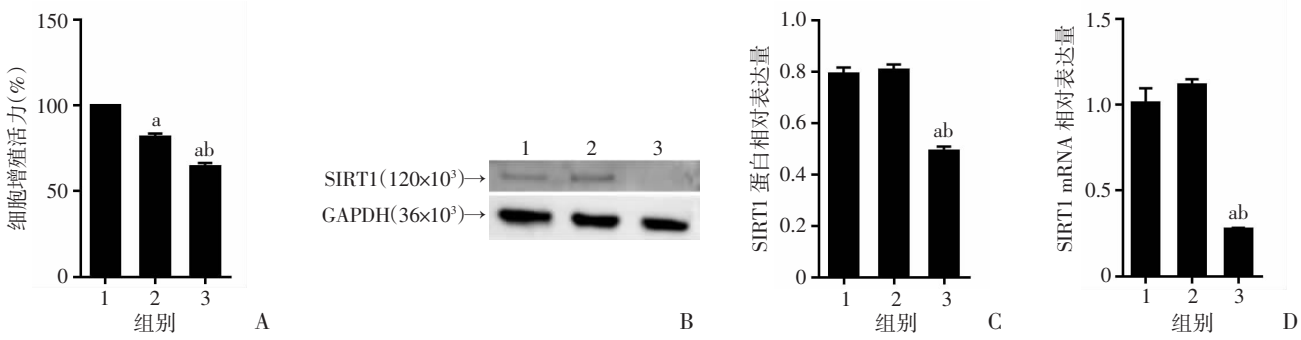
A~C:分别为 SIRT1、LXRα 蛋白表达;D:SIRT1 mRNA 表达 1:未刺激组;2:Aβ1-40+TO90 组;3:Aβ1-40 组;4:TO90 组;a:$P<0.01$,与未刺激组比较;b:$P<0.01$,与 Aβ1-40+TO90 组比较;c:$P<0.01$,与 Aβ1-40 组比较;d:$P<0.01$,与 TO90 组比较

图 4 RT-PCR 和 Western blot 检测 TO90 预处理及 Aβ1-40 刺激对 ARPE-19 细胞 SIRT1 和 LXRα 表达的影响



1:未刺激组;2:Aβ1-40+TO90 组;3:Aβ1-40 组;4:TO90 组;a:$P<0.05$,与 Aβ1-40 比较

图 5 Western blot 检测 TO90 预处理及 Aβ1-40 刺激对 ARPE-19 细胞 ace-NF-κB(A、B)、NF-κB(A、C)、ace-p53(A、D)、p53(A、E)和 p21(A、F)蛋白表达的影响



A:病毒转染对 ARPE-19 细胞增殖活力的影响;B~D:SIRT1 的蛋白和 mRNA 表达 1:未处理组;2:NC 组;3:SIRT1 组;a:$P<0.01$,与未处理组比较;b:$P<0.01$,与 NC 组比较

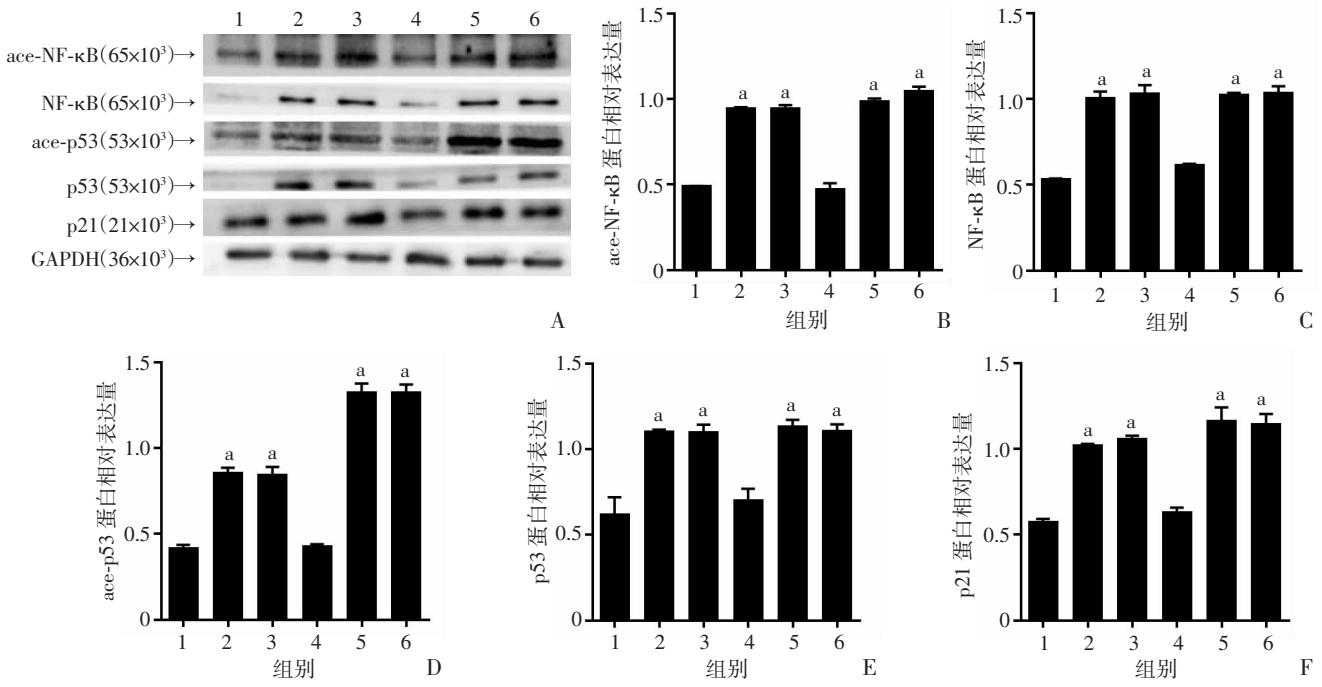
图 6 病毒转染对 ARPE-19 细胞增殖活力及 SIRT1 表达的影响

2.7 iSIRT1 对 LXR 激动剂在改善 Aβ 导致的 ARPE-19 细胞炎症和凋亡反应中的影响

Western blot 检测结果显示:与 Aβ1-40+NC+TO90 组相比,Aβ1-40+iSIRT1+TO90 组 ace-NF-κB、NF-κB、ace-p53、p53 和 p21 的蛋白表达显著增加($P<0.01$,图 7),结果表明 LXR 激动剂虽然可以抑制 Aβ 引起的 NF-κB 和 p53 信号通路的乙酰化和活化,但 iSIRT1 减弱 LXR 激动剂的这种抑制作用,进一步证实 SIRT1 参与 LXR 激动剂的抗炎和抗凋亡作用。

3 讨论

本研究除了证实 Aβ 引起 IL-1β 的上调外,还证明了在 Aβ 诱导的 RPE 损伤和湿性 AMD 患者 PBMC 中,SIRT1 表达降低同时伴有凋亡相关基因 p21 表达升高。另外,我们发现 LXR 激动剂通过增加 SIRT1 的去乙酰化酶活性,促进 NF-κB 和 p53 信号通路的去乙酰化并抑制其活化,从而达到抗炎和抗凋亡反应的作用。敲低 SIRT1 后,LXR 激动剂对 NF-κB 和 p53 信号



1:未刺激组;2:Aβ1-40+载体;3:Aβ1-40+NC;4:Aβ1-40+NC+TO90;5:Aβ1-40+iSIRT1;6:Aβ1-40+iSIRT1+TO90;a:$P<0.01$,与Aβ1-40+NC+TO90 比较

图 7 Western blot 检测 iSIRT1、TO90 预处理及 Aβ1-40 刺激对 ARPE-19 细胞 ace-NF-κB(A、B)、NF-κB(A、C)、ace-p53(A、D)、p53(A、E)和 p21(A、F)蛋白表达的影响

通路的抑制作用显著降低,进一步表明 SIRT1 信号级联在 LXR 激动剂的抗炎和抗凋亡作用中的关键性。在这项研究中,我们的数据证实 LXR 激动剂通过 SIRT1 信号级联改善 Aβ 诱导的 RPE 细胞炎症和凋亡反应。

Aβ 的作用一直是国内外研究的焦点,它不仅沉积在玻璃膜疣中与 AMD 的发生和发展密切相关,而且与其他年龄相关性疾病如阿尔茨海默病和动脉粥样硬化关系密切,因为后两者疾病患者的血管壁和结缔组织中沉积物的主要成分也为 Aβ,且与疾病的病理表现和临床症状密切相关[17-18]。由此得出,Aβ 作为这些沉积物的共同主要成分,在这些疾病中可能引发相似的病理过程。研究证实:小鼠眼内注射 Aβ 可引起视网膜炎症和细胞凋亡反应,但不会引起组织学改变,这与 AMD 患者的早期临床表现一致[19]。RPE 细胞的炎症和凋亡被认为在 AMD 的发病机制中起着关键作用,而 Aβ 可引发 RPE 细胞一系列炎症反应[20]并加速细胞凋亡[21],这与早期 AMD 的视网膜微环境类似。ARPE-19 细胞是人类 RPE 来源的永生化单个细胞系,与 RPE 细胞在体内参与形成视网膜屏障的融合状态存在差异。但是,也有研究表明 ARPE-19 细胞在体外经过一段时间的培养后,确实可以重新分化出 RPE 表型[22]。本实验通过细胞免疫荧光确实检测到了 RPE 细胞特异性蛋白 RPE65 以及细胞间紧密连接 ZO-1 的存在,尽可能使细胞状态接近其生理状态下在体内的状态。我们用 Aβ 刺激 ARPE-19 细胞建立早期 AMD 体外模型作为研究对象。前期有大量的研究已经证实 Aβ 对 ARPE-19 细胞毒性作用的时间-剂量关系[23],本研究结果表明 ARPE-19 细胞增殖活力与 Aβ 刺激时间和浓度呈负相关,这与 YE 等[4]的研究结果类似,但与 MASUDA 等[24]的研究结果不同,该研究认为低浓度的 Aβ 提高细胞增殖活力,高浓度的 Aβ 降低细胞增殖活力。由于 IL-1β 参与 Aβ 诱导的炎症反应[25],同时是 RPE 细胞刺激后释放的早期重要炎症因子之一[26],并受 NF-κB 的调控[27],因此,在本研究中,选择 IL-1β 作为炎症反应的指标。本研究结果表明:Aβ 通过增加 RPE 细胞中的 NF-κB 乙酰化和活化来诱导炎症。此外,Aβ 增加 ARPE-19 细胞中 p53 信号通路的乙酰化和活化,表明细胞凋亡途径参与 Aβ 对 ARPE-19 细胞的损伤。本研究支持 Aβ 增加 RPE 细胞的炎症和凋亡反应的结论。

在 AMD 的发生和发展中,大量体内外实验证实 SIRT1 在其中发挥保护作用。比如 SIRT1 通过激活 HIF-2α 抑制脉络膜新生血管生成和 VEGF-A 的表达[28]。SIRT1 使 p53 脱乙酰化以预防氧化应激引起的细胞凋亡[29]。与这些研究一致,本研究结果表明:在湿性 AMD 患者的 PBMC 及 Aβ 刺激造成的 RPE 损

伤中,SIRT1 表达下调,伴有 NF-κB 和 p53 信号通路在蛋白水平的乙酰化和活化,而用 LXR 激动剂治疗可以抵消这些不利影响;并且敲低 SIRT1 后,LXR 激动剂的这种作用显著降低,表明 LXR 通过调控 SIRT1 改善 Aβ 诱导的 RPE 炎症和凋亡反应。然而,与本研究结果不同的是,有研究表明 SIRT1 可反过来增加 LXR 的脱乙酰化并使其激活[30]。但是,另一项研究却表明 SIRT1 的过表达不能增强 LXR 相关信号通路的活性[31],这说明两者之间可能存在其他调控机制。另外,ATP 结合盒转运蛋白 A1(ATP-binding cassette transporters A1,ABCA1)是 LXRs 的重要靶基因,参与胆固醇和磷脂的转运,并调节细胞脂质稳态[32]。除 SIRT1 外,研究也表明 ABCA1 参与 LXR 的抑炎作用[33]。我们前期的研究也提示:在 Aβ 诱导的视网膜炎症中,TO90 还可通过激活 LXRα-ABCA1 轴来发挥抑炎作用[34]。

本研究由于从干性 AMD 患者收集的 PBMC 样本不足,因此无法检测干性 AMD 患者 PBMC 中 SIRT1 的表达。当然,本研究也没有解决 LXR 对 SIRT1 的特定调控机制,这需要更深入的实验来证实,例如 ChIP 或免疫共沉淀实验。

综上所述,本研究证明了 LXR 激动剂和 SIRT1 信号传导在 Aβ 刺激导致的 RPE 细胞损伤中的作用,并表明 LXR 激动剂对 SIRT1 具有一定的调节作用,主要与 NF-κB 和 p53 信号通路的乙酰化和活化相关。通过敲低 SIRT1,我们的假设得到了进一步证实。这些发现可能为前瞻性临床试验中评估 LXR 激动剂对 AMD 患者的作用提供理论依据。

参考文献:

[1] WONG W L, SU X Y, 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[J]. Lancet Glob Health, 2014, 2(2): e106-e116. DOI: 10.1016/S2214-109X(13)70145-1.

[2] FERRIS F L 3rd, WILKINSON C P, BIRD A, *et al*. Clinical classification of age-related macular degeneration[J]. Ophthalmology, 2013, 120(4): 844-851. DOI: 10.1016/j.ophtha.2012.10.036.

[3] ANDERSON D H, TALAGA K C, RIVEST A J, *et al*. Characterization of beta amyloid assemblies in drusen: the deposits associated with aging and age-related macular degeneration[J]. Exp Eye Res, 2004, 78(2): 243-256. DOI: 10.1016/j.exer.2003.10.011.

[4] YE Z, HE S Z, LI Z H. Effect of Aβ protein on inhibiting proliferation and promoting apoptosis of retinal pigment epithelial cells[J]. Int J Ophthalmol, 2018, 11(6): 929-934. DOI: 10.18240/ijo.2018.06.06.

[5] WANG B, TONTONOZ P. Liver X receptors in lipid signalling and membrane homeostasis[J]. Nat Rev Endocrinol, 2018, 14(8): 452-463. DOI: 10.1038/s41574-018-0037-x.

[6] CEROI A, DELETTRE F A, MAROTEL C, *et al*. The anti-inflammatory effects of platelet-derived microparticles in human plasmacytoid dendritic cells involve liver X receptor activation[J]. Haematologica, 2016, 101(3): e72-e76. DOI: 10.3324/haematol.2015.135459.

[7] CAO E Y, LINDGREN A, MARTINSSON S, *et al*. Promoting intestinal lymphatic transport targets a liver-X receptor (LXR) agonist (WAY-252, 623) to lymphocytes and enhances immunomodulation[J]. J Control Release, 2019, 296: 29-39. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.01.002.

[8] ZHENG W C, REEM R E, OMAROVA S, *et al*. Spatial distribution of the pathways of cholesterol homeostasis in human Retina[J]. PLoS ONE, 2012, 7(5): e37926. DOI: 10.1371/journal.pone.0037926.

[9] YANG H X, ZHENG S J, QIU Y G, *et al*. Activation of liver X receptor alleviates ocular inflammation in experimental autoimmune uveitis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(4): 2795-2804. DOI: 10.1167/iovs.13-13323.

[10] ZHENG S J, YANG H X, CHEN Z H, *et al*. Activation of liver X receptor protects inner retinal damage induced by N-methyl-D-aspartate[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015, 56(2): 1168-1180. DOI: 10.1167/iovs.14-15612.

[11] DAI B L, LEI C Y, LIN R, *et al*. Activation of liver X receptor α protects amyloid β1-40 induced inflammatory and senescent responses in human retinal pigment epithelial cells[J]. Inflamm Res, 2017, 66(6): 523-534. DOI: 10.1007/s00011-017-1036-4.

[12] TSENG R C, WANG Y C. SIRT1 (sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1 (S. cerevisiae))[J]. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol, 2010, 14(12): 1152. DOI: 10.4267/2042/44919.

[13] HAN X, CUI Z Y, SONG J, *et al*. Acanthoic acid modulates lipogenesis in nonalcoholic fatty liver disease via FXR/LXRs-dependent manner[J]. Chem Biol Interact, 2019, 311: 108794. DOI: 10.1016/j.cbi.2019.108794.

[14] HAMMER S S, BELI E, KADY N, *et al*. The mechanism of diabetic retinopathy pathogenesis unifying key lipid regulators, sirtuin 1 and liver X receptor[J]. EBioMedicine, 2017, 22: 181-190. DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.07.008.

[15] KURJI K H, CUI J Z, LIN T, *et al*. Microarray analysis identifies changes in inflammatory gene expression in response to amyloid-beta stimulation of cultured human retinal pigment epithelial cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(2): 1151-1163. DOI: 10.1167/iovs.09-3622.

[16] LEI C Y, LIN R, WANG J M, *et al*. Amelioration of amyloid β-induced retinal inflammatory responses by a LXR agonist TO901317 is associated with inhibition of the NF-κB signaling and NLRP3 inflammasome[J]. Neuroscience, 2017, 360: 48-60. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2017.07.053.

[17] SELKOE D J, PODLISNY M B, JOACHIM C L, *et al*. Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85(19): 7341-7345. DOI: 10.1073/pnas.85.19.7341.

[18] DE MEYER G R, DE CLEEN D M, COOPER S, *et al*. Platelet phagocytosis and processing of beta-amyloid precursor protein as a mechanism of macrophage activation in atherosclerosis[J]. Circ Res, 2002, 90(11): 1197-1204. DOI: 10.1161/01.res.0000020017.84398.61.

[19] LIU C Q, CAO L N, YANG S, *et al*. Subretinal injection of amyloid-β peptide accelerates RPE cell senescence and retinal degeneration[J]. Int J Mol Med, 2015, 35(1): 169-176. DOI: 10.3892/ijmm.2014.1993.

[20] CARRERO I, GONZALO M R, MARTIN B, *et al*. Oligomers of β-amyloid protein (Aβ1-42) induce the activation of cyclooxygenase-2 in astrocytes via an interaction with interleukin-1β, tumour necrosis factor-α, and a nuclear factor κ-B mechanism in the rat brain[J]. Exp Neurol, 2012, 236(2): 215-227. DOI: 10.1016/j.expneurol.2012.05.004.

[21] MÜLLER T, MEYER H E, EGENSPERGER R, *et al*. The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics-relevance for Alzheimer's disease[J]. Prog Neurobiol, 2008, 85(4): 393-406. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2008.05.002.

[22] SAMUEL W, JAWORSKI C, POSTNIKOVA O A, *et al*. Appropriately differentiated ARPE-19 cells regain phenotype and gene expression profiles similar to those of native RPE cells[J]. Mol Vis, 2017, 23: 60-89.

[23] BRUBAN J, GLOTIN A L, DINET V, *et al*. Amyloid-beta (1-42) alters structure and function of retinal pigmented epithelial cells[J]. Aging Cell, 2009, 8(2): 162-177. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2009.00456.x.

[24] MASUDA N, TSUJINAKA H, HIRAI H, *et al*. Effects of concentration of amyloid β (Aβ) on viability of cultured retinal pigment epithelial cells[J]. BMC Ophthalmol, 2019, 19(1): 70. DOI: 10.1186/s12886-019-1076-3.

[25] HALLE A, HORNUNG V, PETZOLD G C, *et al*. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta[J]. Nat Immunol, 2008, 9(8): 857-865. DOI: 10.1038/ni.1636.

[26] KAARNIRANTA K, SALMINEN A. Age-related macular degeneration: activation of innate immunity system *via* pattern recognition receptors[J]. J Mol Med, 2009, 87(2): 117-123. DOI: 10.1007/s00109-008-0418-z.

[27] HISCOTT J, MAROIS J, GAROUFALIS J, *et al*. Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop[J]. Mol Cell Biol, 1993, 13(10): 6231-6240. DOI: 10.1128/mcb.13.10.6231.

[28] BALAIYA S, KHETPAL V, CHALAM K V. Hypoxia initiates sirtuin1-mediated vascular endothelial growth factor activation in choroidal endothelial cells through hypoxia inducible factor-2α[J]. Mol Vis, 2012, 18: 114-120.

[29] ZHUGE C C, XU J Y, ZHANG J F, *et al*. Fullerenol protects retinal pigment epithelial cells from oxidative stress-induced premature senescence *via* activating SIRT1[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(7): 4628-4638. DOI: 10.1167/iovs.13-13732.

[30] LI X L, ZHANG S W, BLANDER G, *et al*. SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR[J]. Mol Cell, 2007, 28(1): 91-106. DOI: 10.1016/j.molcel.2007.07.032.

[31] ESCOLÀ-GIL J C, JULVE J, LLAVERIAS G, *et al*. Resveratrol administration or SIRT1 overexpression does not increase LXR signaling and macrophage-to-feces reverse cholesterol transport in vivo[J]. Transl Res, 2013, 161(2): 110-117. DOI: 10.1016/j.trsl.2012.10.008.

[32] PHILLIPS M C. Molecular mechanisms of cellular cholesterol efflux[J]. J Biol Chem, 2014, 289(35): 24020-24029. DOI: 10.1074/jbc.R114.583658.

[33] ITO A, HONG C, RONG X, *et al*. LXRs link metabolism to inflammation through Abca1-dependent regulation of membrane composition and TLR signaling[J]. Elife, 2015, 4: e08009. DOI: 10.7554/eLife.08009.

[34] LEI C Y, LIN R, WANG J M, *et al*. Amelioration of amyloid β-induced retinal inflammatory responses by a LXR agonist TO901317 is associated with inhibition of the NF-κB signaling and NLRP3 inflammasome[J]. Neuroscience, 2017, 360: 48-60. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2017.07.053.

(**收稿**:2020-03-10;**修回**:2020-04-30)

(编辑 张 维)