

枸杞子 - 丹参对rd10小鼠视网膜内质网应激PERK-ATF4-CHOP通路的影响

蒋鹏飞^{1*}, 欧晨¹, 彭俊^{2#}, 姚震¹, 田野¹, 杨毅敬¹, 宋厚盼¹, 徐剑³, 彭清华^{1#}

¹湖南中医药大学, 湖南 长沙

²湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙

³上海市东方医院, 上海

Email: 619926567@qq.com, #1544511101@qq.com, #pqh410007@126.com

收稿日期: 2021年7月29日; 录用日期: 2021年9月7日; 发布日期: 2021年9月14日

摘要

目的: 观察枸杞子 - 丹参对rd10小鼠视网膜内质网应激PERK-ATF4-CHOP通路的影响。方法: 将40只rd10小鼠随机平均分为5组: 空白组、对照组、枸杞组、丹参组、杞参组, 分别予以生理盐水、维生素A溶剂、枸杞子中药配方颗粒溶液、丹参中药配方颗粒溶液、枸杞子加丹参中药配方颗粒溶液灌胃; 8只C57小鼠为野生组, 灌胃生理盐水。给药28天后, Western blot法检测各组小鼠视网膜GRP78、ATF4、eIF2 α 、CHOP相对表达情况。结果: 杞参组小鼠视网膜GRP78、ATF4、eIF2 α 、CHOP相对表达量均低于空白组、对照组、枸杞组、丹参组($P < 0.05$)。结论: 枸杞子 - 丹参可以通过调控内质网应激PERK-ATF4-CHOP通路, 抑制rd10小鼠视网膜细胞的凋亡, 维持视网膜正常功能结构, 从而保护视功能。

关键词

视网膜色素变性, 内质网应激, 细胞凋亡, 枸杞子 - 丹参

Effect of *Lycium barbarum* and *Salvia miltiorrhiza* on PERK-ATF4-CHOP Pathway in Endoplasmic Reticulum Stress of Retina in rd10 Mice

*第一作者。

#通讯作者。

Pengfei Jiang^{1*}, Chen Ou¹, Jun Peng^{2#}, Zhen Yao¹, Ye Tian¹, Yijing Yang¹, Houpan Song¹, Jian Xu³, Qinghua Peng^{1#}

¹Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan

²First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan

³Shanghai Dongfang Hospital, Shanghai

Email: 619926567@qq.com, #1544511101@qq.com, #pqh410007@126.com

Received: Jul. 29th, 2021; accepted: Sep. 7th, 2021; published: Sep. 14th, 2021

Abstract

Objective: To observe the effect of *Lycium barbarum-Salvia miltiorrhiza* on the PERK-ATF4-CHOP pathway of rd10 mouse retinal endoplasmic reticulum stress. **Methods:** Forty rd10 mice were randomly divided into blank group, control group, *Lycium barbarum* group, *Salvia miltiorrhiza* group, and *Lycium barbarum-Salvia miltiorrhiza* group (the qishen group), and they were given intragastrically: normal saline, vitamin A solvent, wolfberry Chinese medicine formula granule solution, *Salvia miltiorrhiza* Chinese medicine formula granule solution, *Lycium barbarum* and *Salvia miltiorrhiza* granule solution by gavage; eight C57 mice were in the wild group and normal saline was gavage. After 28 days of administration, the relative expressions of GRP78, ATF4, eIF2 α and CHOP in the retina of each group were detected by Western blot. **Results:** The relative expression levels of GRP78, ATF4, eIF2 α , and CHOP in the retina of mice in the Qishen group were lower than those of the blank group, control group, *lycium barbarum* group, and *Salvia miltiorrhiza* group ($P < 0.05$). **Conclusion:** *Lycium barbarum-Salvia miltiorrhiza* can regulate the endoplasmic reticulum stress PERK-ATF4-CHOP pathway, inhibit the apoptosis of rd10 mouse retinal cells, maintain the normal functional structure of the retina, and protect visual function.

Keywords

Retinitis Pigmentosa, Endoplasmic Reticulum Stress, Apoptosis, *Lycium barbarum-Salvia miltiorrhiza*

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)是常见的眼底病变,以慢性进行性视力损害并伴有眼底色素变化为特点,早期有夜盲症状,也可有旁中心暗点,晚期对视力、视野损伤较大[1]。本团队前期对 RP 病因病机、治疗等方面进行了大量研究,发现 RP 患者多为虚中夹瘀之证,故提出以补虚活血法治疗 RP,已得到中医眼科同道的广泛认可[2] [3] [4]。基础研究表明,补虚活血代表性药物枸杞子-丹参能抑制 RP 动物模型感光细胞凋亡,维持视网膜超微结构正常功能和形态[5] [6] [7],但枸杞子-丹参治疗 RP 的深层分子生物学机制尚不明确。内质网应激是内源性凋亡途径的一种,PERK-ATF4-CHOP 通路是内质网应激途径的关键通路[8],本研究在前期研究的基础上,研究了枸杞子-丹参对 RP 动物模型 rd10 小鼠视网膜内

质网应激 PERK-ATF4-CHOP 通路的影响, 以探讨枸杞子-丹参治疗 RP 的内在分子生物学机制。

2. 材料与方法

2.1. 动物

40 只 4 周龄 SPF 级 rd10 小鼠(证书编号: NO. 191A11353), 8 只 4 周龄 SPF 级 C57 小鼠(证书编号: 43004700062254), 均雌雄各半, 饲养于湖南斯莱克景达公司动物实验中心 SPF 房, 室温(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 湿度 50%~55%, 定期更换垫料, 自由饮食。本研究经湖南斯莱克景达公司动物实验中心伦理审批。

2.2. 药物

枸杞子中药超微配方颗粒(批号: 190247), 丹参中药超微配方颗粒(批号: 190131), 维生素 A 软胶囊(批号: 140701)。

2.3. 主要试剂与仪器

GRP78 (abcam 公司, 货号: ab21685)、ATF4 (abcam 公司, 货号: ab184909)、eIF2 α (abcam 公司, 货号: ab169528)、CHOP (abcam 公司, 货号: ab11419)、GAPDH (abcam 公司, 货号: ab10009)。Tris (美国 Sigma, 货号: V900483)、APS (中国上海国药, 货号: 10002618)。摇床(其林贝尔, 型号: TS-92)、显微镜(Motic, 型号: BA210T)、电泳仪(中国北京六一, 型号: DYY-2C)、水平琼脂糖电泳槽(中国北京六一, 型号: DYCP-31DN)。

2.4. 分组与给药

采用随机数表法将 40 只 SPF 级 rd10 小鼠随机平均分为 5 组, 分别为: 空白组、对照组、枸杞组、丹参组、杞参组, 每组 8 只; 8 只 SPF 级 C57 小鼠为野生组; 每组雌雄分开饲养。

所有小鼠适应性饲养 1 周后给予灌胃, 灌胃时间为 28 天, 灌胃剂量均为 20 mL/kg·d。野生组与空白组灌胃生理盐水, 对照组灌胃 VitA 溶剂(维生素 A 溶于 DMSO 溶剂, 再配置成水溶液), 枸杞组灌胃枸杞子中药配方颗粒溶液(3 g 配方颗粒溶于 40 mL 灭菌蒸馏水中), 丹参组灌胃丹参中药配方颗粒溶液(1.8 g 配方颗粒溶于 40 mL 灭菌蒸馏水中), 杞参组灌胃枸杞子加丹参中药配方颗粒溶液(3 g 枸杞子配方颗粒 + 1.8 g 丹参配方颗粒溶于 40 mL 灭菌蒸馏水中)。

2.5. Western blot 法检测 rd10 小鼠视网膜 GRP78, ATF4, eIF2 α , CHOP 蛋白表达

冰预冷 PBS 清洗视网膜组织, 加入 150 μL RIPA 裂解液于生物样品均质仪中, 冰上裂解 10 分钟, 离心 15 min, 将离心后的上清转移倒 1.5 mL 的离心管中。经制胶、电泳、转膜、一抗孵育、二抗孵育、显色曝光后, 显影冲洗。

2.6. 统计学方法

实验数据采用 SPSS23.0 分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组比较采用方差分析或秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3. 结果

杞参组小鼠视网膜 GRP78, ATF4, eIF2 α , CHOP 平均光密度低于空白组、对照组、枸杞组、丹参组($P < 0.05$), 见表 1, 图 1。

Table 1. Relative expression of targets related to endoplasmic reticulum stress pathway in mouse retina of each group (n = 8, $\bar{x} \pm s$)**表 1.** 各组小鼠视网膜内质网应激通路相关靶点相对表达量(n = 8, $\bar{x} \pm s$)

组别	GRP78	ATF4	eIF2 α	CHOP
野生组	0.26 \pm 0.07	0.29 \pm 0.21	0.33 \pm 0.13	0.16 \pm 2.33
空白组	1.53 \pm 0.51 [*]	0.83 \pm 0.27 [*]	1.32 \pm 0.35 [*]	1.35 \pm 0.38 [*]
对照组	1.12 \pm 0.31 ^{*#}	0.76 \pm 0.34 [*]	1.26 \pm 0.47 [*]	1.08 \pm 0.47 ^{*#}
枸杞组	0.83 \pm 0.25 ^{*#}	0.62 \pm 0.19 ^{*#}	1.05 \pm 0.23 ^{*#}	0.87 \pm 0.22 ^{*#}
丹参组	0.82 \pm 0.36 ^{*#}	0.63 \pm 0.17 ^{*#}	0.91 \pm 1.13 ^{*#}	0.92 \pm 0.37 ^{*#}
杞参组	0.54 \pm 0.19 ^{*#$\Delta$$\circ$}	0.41 \pm 0.15 ^{*#$\Delta$$\circ$}	0.55 \pm 0.18 ^{*#$\Delta$$\circ$}	0.48 \pm 0.23 ^{*#$\Delta$$\circ$}

注: *表示与野生组相比 $P < 0.05$; #表示与空白组相比 $P < 0.05$; Δ 表示与对照组相比 $P < 0.05$; Δ 表示与枸杞组相比 $P < 0.05$; \circ 表示与丹参组相比 $P < 0.05$ 。

**Figure 1.** Retinal protein expression of mice in each group**图 1.** 各组小鼠视网膜蛋白表达情况

4. 讨论

目前多认为 RP 视力不可逆性下降的主要原因是视网膜感光细胞的凋亡, 内质网凋亡途径是细胞凋亡途径的一种, 主要包括内质网应激诱导凋亡、内质网钙离子诱导凋亡、内质网凋亡底物介导的凋亡[9][10]。内质网腔内包含多种凋亡相关蛋白, 如 Caspase-12、Bcl-2 等, 本团队前期研究发现枸杞子-丹参能提高抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 降低促凋亡蛋白 Caspase-12 的表达[11][12]。

内质网应激时, 未折叠或错误折叠蛋白在内质网内蓄积, 触发未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)。UPR 可以激活蛋白激酶 R 样内质网激酶(Protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK), 上调内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)基因表达, 在早期可以促进视网膜中蛋白质的合成, 但随着 UPR 的进展, 过度的 UPR 引起视网膜 Ca^{2+} 紊乱, 加速细胞凋亡[13], PERK 位于内质网膜上, 与葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein78, GRP78)解离后形成同源二聚体, 并发生自身磷酸化激活, PERK 激活后可促进真核起始因子 2 α (eukaryotic translation-initiation factor 2 α , eIF2 α)磷酸化, 也可通过下游的激活转录因子 4 (activating transcription factor 4, ATF4)上调 C/EBP 同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)的表达[14], 最终在 GADD34、Bim 等基因的共同作用下, 引发了细胞凋亡。在 RP 病变中, ERS 诱导的凋亡与 RP 疾病进展有关[15], 在视网膜使用 KUS121, 可以抑制 ERS, 从而很明显抑制细胞凋亡, 保护了光感受器细胞, 尤其视锥细胞, 这对维持晚期 RP 患者的中心视力有非常积极、重要的作用[16]。

枸杞子味甘, 性平, 归入肝经与肾经, 有补益肝肾的功效, 丹参味苦, 性微寒, 归入心、肝经, 有活血化瘀的功效。网络药理学研究表明枸杞子 - 丹参治疗 RP 的主要作用靶点是视紫红质(Rhodopsin, RHO)蛋白, 而作用途径主要是通过抑制视网膜感光细胞的凋亡通路。虹膜色素上皮细胞(Iris pigment epithelial cells, IPEc)与视网膜色素上皮(Retinal pigment epithelial cells, RPEc)细胞的基因表达具有明显的差异性, 而枸杞子的有效活性成分如黄豆素黄酮、花色苷、亚麻酸乙酯、五羟黄酮、岩皂甙醇等能够作用于 IPEc 与 RPEc 的差异基因, 促进 IPEc 分化为 RPEc, 从而治疗 RP [17]。RHO 又名视网膜变性蛋白, 是最早被发现的 RP 基因, 主要分布于视杆细胞的细胞膜上, RP 的发生与 RHO 功能障碍有关, 网络药理学还发现枸杞子能调控 RHO 蛋白的表达[18]。丹参中所含的隐丹参酮、木犀草素、丹参酮 IIA 等化学成分, 能干预 RP 病理过程中的细胞周期等通路, 抑制视网膜感光细胞的凋亡等过程, 减少感光细胞损伤[19]。枸杞子 - 丹参药对共有 19 个入血活性成分, 可作用于与 RP 相关的 79 个致病基因[20]。

本研究对各组小鼠视网膜中内质网应激相关蛋白 GRP78、ATF4、eIF2 α 、CHOP 进行了检测, 发现在 rd10 小鼠的视网膜细胞中内质网应激蛋白表达较 C57 小鼠增高, 经过枸杞子 - 丹参灌胃干预 28 天后, rd10 小鼠视网膜内质网应激蛋白表达明显降低, 说明枸杞子 - 丹参可抑制内质网应激, 进而调控内质网凋亡途径, 减轻 rd10 小鼠视网膜感光细胞的凋亡。但本研究仅检测了内质网应激相关蛋白的主要指标, 枸杞子 - 丹参可能也对内质网应激相关的其他蛋白起作用, 今后可更加深入地研究枸杞子 - 丹参治疗 RP 的分子生物学机制, 为创新药物的研发提供理论依据。

基金项目

国家自然科学基金资助项目(81804150, 82074196), 湖南省自然科学基金项目(2019JJ40226), 湖南省研究生科研创新项目(CX2018B497), 湖南中医药大学研究生创新课题(2018CX40)。

参考文献

- [1] Bunel, M., Chaudieu, G., Hamel, C., Lagoutte, L., Manes, G., Botherel, N., *et al.* (2019) Natural Models for Retinitis Pigmentosa: Progressive Retinal Atrophy in Dog Breeds. *Human Genetics*, **138**, 441-453. <https://doi.org/10.1007/s00439-019-01999-6>
- [2] 彭清华, 李传课. 视网膜色素变性虚中夹瘀的机理研究小结[J]. 中国医药学报, 1993(6): 7-10+61.
- [3] 彭俊, 杨毅敬, 李波, 等. 中医综合治疗视网膜色素变性患者 973 例疗效观察[J]. 辽宁中医杂志, 2021, 48(5): 95-97+222.
- [4] 彭俊, 杨毅敬, 李波, 等. 中医综合疗法治疗日本籍视网膜色素变性 297 例回顾性分析[J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(7): 788-791.
- [5] 蒋鹏飞, 欧晨, 彭俊, 等. 枸杞子 - 丹参对小鼠视网膜 Caspase-12 前体、Caspase-2 表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(4): 504-511.
- [6] 欧晨, 彭俊, 蒋鹏飞, 等. 枸杞丹参对 rd10 小鼠感光细胞凋亡及氧化应激的影响[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(11): 2580-2582.
- [7] 蒋鹏飞, 欧晨, 彭俊, 等. 基于凋亡通路探讨枸杞子 - 丹参对 rd10 小鼠视网膜感光细胞的干预机制[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(7): 3958-3961.
- [8] 曹智怡, 李玲, 范丽丽, 等. 酸枣仁 - 合欢花对抑郁模型大鼠行为学及内质网应激 PERK/ATF4/CHOP 通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(7): 66-72.
- [9] Darling, N.J., Balmannol, K. and Cook, S.J. (2017) ERK1/2 Signalling Protects against Apoptosis Following Endoplasmic Reticulum Stress but Cannot Provide Long-Term Protection against BAX/BAK-Independent Cell Death. *PLoS ONE*, **12**, e0184907. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184907>
- [10] Huang, C., Haataja, L., Galasso, R., Butler, A.E., Wu, X., Soeller, W.C., *et al.* (2017) Induction of Endoplasmic Reticulum Stress Induced Beta Cell Apoptosis and Accumulation of Polyubiquitinated Proteins by Human Islet Amyloid Polypeptide. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, **293**, e1656-e1662. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00318.2007>

- [11] 蒋鹏飞, 欧晨, 彭俊, 等. 枸杞子 - 丹参对 rd10 小鼠视网膜 Caspase-8、Caspase-12、Caspase-3、 α B-crystallin 表达的影响及作用机制研究[J/OL]. 中国中医药信息杂志: 1-7[2021-08-06].
<https://doi.org/10.19879/j.cnki.1005-5304.202105502>
- [12] 彭俊, 王英, 蒋鹏飞, 等. 枸杞丹参对 RCS 大鼠视网膜组织中 Bcl-2、Bid 表达的影响[J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2020, 22(4): 1166-1175.
- [13] 余爱华, 柯敏, 田朕, 等. P58~(IPK)基因在视网膜 Müller 细胞内质网应激 PERK 通道中的作用[J]. 武汉大学学报(医学版), 2018, 39(2): 213-218.
- [14] 来小丹, 欧阳净, 石英. 内质网应激 PERK-ATF4-CHOP 通路在苦参碱诱导视网膜母细胞瘤细胞凋亡中的作用[J]. 中国药业, 2015, 24(22): 56-58.
- [15] Lin, J.H. and Lavail, M.M. (2010) Misfolded Proteins and Retinal Dystrophies. In: Anderson, R., Hollyfield, J. and LaVail, M., Eds., *Retinal Degenerative Diseases*, Vol. 664, Springer, New York, 115-121.
https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1399-9_14
- [16] Tomoko, H., Yuki, M., Hanako, O.I., Tsuruyama, T., Kondo, M., Terasaki, H., *et al.* (2016) Neuroprotective Efficacies by KUS121, a VCP Modulator, on Animal Models of Retinal Degeneration. *Scientific Reports*, **6**, Article No. 31184. <https://doi.org/10.1038/srep31184>
- [17] 宋厚盼, 曾梅艳, 陈小娟, 等. 枸杞子促进虹膜色素上皮细胞定向分化治疗视网膜色素变性的分子网络调控机制研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2019, 24(12): 1402-1414.
- [18] 宋厚盼, 曾梅艳, 陈小娟, 等. 枸杞子治疗视网膜色素变性分子机制的网络药理学研究[J]. 数字中医药(英文版), 2019, 2(3): 136-146.
- [19] 宋厚盼, 曾梅艳, 彭俊, 等. 丹参对视网膜色素变性病理过程 Müller 细胞特征性基因变化及关键蛋白表达的影响[J]. 中草药, 2019, 50(8): 1863-1872.
- [20] 宋厚盼, 曾梅艳, 彭俊, 等. 枸杞子 - 丹参药对治疗视网膜色素变性的分子机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(14): 199-206.