

# Mcc950 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 ARPE-19 细胞炎性损伤的保护作用

李淑艳<sup>1,2</sup>, 李晓峰<sup>2</sup>, 许星照<sup>3</sup>, 刘庆淮<sup>1</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(210029)中国江苏省南京市,南京医科大学第一附属医院眼科;<sup>2</sup>(223300)中国江苏省淮安市,南京医科大学附属淮安第一医院眼科;<sup>3</sup>(213003)中国江苏省常州市第一人民医院眼科

作者简介:李淑艳,毕业于南京医科大学,本科,主任医师,研究方向:眼底病。

通讯作者:刘庆淮,主任医师,教授,眼科主任,研究方向:眼底病. liuqh@njmu.edu.cn

收稿日期:2018-02-21 修回日期:2018-07-31

## Protection of Mcc950 against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - induced inflammatory injury in ARPE - 19 cells

Shu-Yan Li<sup>1,2</sup>, Xiao-Feng Li<sup>2</sup>, Xing-Zhao Xu<sup>3</sup>, Qing-Huai Liu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital with Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, The Affiliated Huai'an No.1 People's Hospital of Nanjing Medical University, Huai'an 223300, Jiangsu Province, China; <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, The First People's Hospital of Changzhou, Changzhou 213003, Jiangsu Province, China

**Correspondence to:** Qing - Huai Liu. Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital with Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. liuqh@njmu.edu.cn

Received:2018-02-21 Accepted:2018-07-31

## Abstract

• **AIM:** To research the protection of Mcc950, the inhibitor of NLRP3, against the inflammatory injury to human retinal pigment epithelium cell line ARPE-19.

• **METHODS:** Cultured cell line ARPE-19 was divided into control group, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treating group, Mcc950 treating group and Mcc950 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treating group. Different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Mcc950 were used to treat the cells. Cell activity was detected by using CCK8 and proper experimental concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Mcc950 were determined. After the treatment, the concentration of IL-1 $\beta$  were detected by using ELISA. The change of NLRP3 related proteins were detected by Western blot. And cell apoptosis was examined by TUNEL stain.

• **RESULTS:** Cell ability was gradually decreased along with the increasing treating concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cell ability showed statistical difference when the

concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> arrived 400 $\mu$ mol/L. With the concentration of 0.1 and 1 $\mu$ mol/L, Mcc950 had no effect on cell ability. So we chose 400 $\mu$ mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 1 $\mu$ mol/L Mcc950 as the experimental concentrations. Compared with the normal control group, the cell viability in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treating group was significantly reduced, the IL-1 $\beta$  in the supernatant was significantly increased, and the apoptosis rate was significantly increased, with statistically significant differences ( $P < 0.05$ ). In Mcc950+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treating group, cell viability was significantly increased, the IL-1 $\beta$  in the supernatant and the apoptosis rate were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). By Western blot, after treated with 400 $\mu$ mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the IL-1 $\beta$ , NLRP3, pro-caspase1 and caspase1 were obviously increased compared to control group. After treated with Mcc950, the NLRP3 and pro-caspase1 still were at high level, the expression of caspase1 was suppressed, which indicated that Mcc950 effectively inhibited the activation of NLRP3 inflammasome consequently disturbed the formation of caspase1.

• **CONCLUSION:** Mcc950 can inhibits the function of NLRP3, leading to increasing of the cell ability and decreasing of the cell apoptosis.

• **KEYWORDS:** Mcc950; NLRP3 inflammasome; human retinal pigment epithelium; IL - 1 $\beta$ ; age - related macular degeneration

**Citation:** Li SY, Li XF, Xu XZ, *et al.* Protection of Mcc950 against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - induced inflammatory injury in ARPE - 19 cells. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2018;18(9):1583-1588

## 摘要

**目的:**探讨 Mcc950 对过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)诱导的人视网膜色素上皮细胞(ARPE-19 细胞)炎性损伤的保护作用。

**方法:**将 ARPE-19 细胞分为正常对照组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组、单纯 Mcc950 给药组、Mcc950 预处理+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组,采用 CCK-8 法检测细胞活力并确定 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 Mcc950 合适的实验浓度,ELISA 法检测细胞分泌的 IL-1 $\beta$  浓度,免疫印迹(Western blot)法检测细胞中 NLRP3 炎性小体相关蛋白的表达情况,TUNEL 染色法观察细胞凋亡情况。

**结果:**细胞活力随 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激浓度的增加逐渐下降,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度为 400 $\mu$ mol/L 时细胞活力显著降低;而 0.1、1 $\mu$ mol/L Mcc950 对细胞活力无显著影响,故选取 400 $\mu$ mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 1 $\mu$ mol/L Mcc950 作为合适的实验浓度。与正常对照组相比,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组细胞活力显著降低,细胞上清液中 IL-1 $\beta$  浓度显著升高,细胞凋亡率明显增加,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),而与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组比

较, Mcc950 预处理+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组细胞活力明显升高, 细胞上清液中IL-1 $\beta$  浓度和细胞凋亡率均降低, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。Western blot 检测结果显示, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能够促进细胞中 NLRP3、Pro-caspase1 和 caspase1 的表达, 而 Mcc950 预处理+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组细胞中 NLRP3、Pro-caspase1 依然保持高表达, 但 caspase1 表达水平得到明显抑制, 表明 Mcc950 能有效抑制 NLRP3 炎性小体的激活从而干扰具有细胞凋亡作用的成熟 caspase1 的产生。

**结论:** Mcc950 能够有效抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 NLRP3 炎性小体激活, 恢复细胞活力, 抑制细胞凋亡。

**关键词:** Mcc950; NLRP3 炎性小体; 人视网膜色素上皮细胞; IL-1 $\beta$ ; 年龄相关性黄斑变性

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.9.06

**引用:** 李淑艳, 李晓峰, 许星照, 等. Mcc950 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 ARPE-19 细胞炎症损伤的保护作用. 国际眼科杂志 2018; 18(9):1583-1588

## 0 引言

年龄相关性黄斑变性(ARMD)是全球老年人失明及致盲的主要病因<sup>[1-2]</sup>, 多发生于 50 岁以上人群, 发病率随年龄的增长而增高。世界人口老龄化所致的 ARMD 防治负担的增加将对医疗体系造成巨大的负担<sup>[3]</sup>。ARMD 是一种渐进性眼病, 具体病因和发病机制尚不明确, 目前认为与炎症、慢性氧化应激、自噬水平下降等病理因素相关<sup>[4-7]</sup>。位于光感受器外的视网膜色素上皮(RPE)细胞极其容易受到氧化应激的影响, 导致细胞内自噬再循环和降解减少, 进一步诱导炎症的发生<sup>[8-9]</sup>。因此, RPE 细胞在 ARMD 病理机制中的作用备受关注。

研究发现, 多种视网膜疾病<sup>[10-11]</sup>的发展过程中均伴有 NLRP3 炎性小体的激活。NLRP3 炎性小体属于机体内固有免疫系统, 是人体的第一道免疫防线, 发挥重要的免疫监视作用。NLRP3 炎性小体是 NLRP3、ASC、caspase1 三种蛋白的复合体<sup>[12]</sup>, 其激活可以促进 Pro-caspase1、Pro-IL-1 $\beta$  两种炎症介质前体的活化, 进而转变成具有凋亡作用的 caspase1 和具有炎性损伤作用的 IL-1 $\beta$ <sup>[13]</sup>。Mcc950 作为 NLRP3 炎性小体的特异性激活抑制剂, 在多种外源性炎性刺激下的巨噬细胞、成肌细胞、树突状细胞<sup>[14-16]</sup>中发挥有效的抗炎作用。然而, Mcc950 能否对人 RPE 细胞的炎症反应起作用至今并未得到验证, 故本研究以氧化损伤的人 RPE 细胞作为模型, 探究 Mcc950 在 ARMD 的发展过程中的作用及机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人 RPE 细胞(ARPE-19 细胞株, 广州吉妮欧生物科技有限公司, 批号: ATCC8CRL-2302TM), DMEM/F12 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(南京化学试剂有限公司), CCK-8 试剂盒(中国 Biosharp 生物技术公司), 人 IL-1 $\beta$  ELISA 检测试剂盒(美国 R&D 公司), TUNEL 试剂盒(德国罗氏生物科学公司), Mcc950 (Cat. No. 5479, 英国 Tocris 生物科学公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 细胞培养在含 10% 胎牛血清、100U/mL 青霉素及 100 $\mu$ g/mL 链霉素的 DMEM/F12 培养基中, 将 ARPE-19 细胞置于 37%, 体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培

养箱内培养, 细胞生长至近融合状态时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化、传代, 3~8 代细胞用于本研究。

**1.2.2 细胞处理** (1) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤浓度的筛选: 不同浓度(0、200、400、600 $\mu$ mol/L) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分别处理 ARPE-19 细胞 48h, 采用 CCK-8 法检测细胞活力, ARPE-19 细胞活力显著下降时的最小 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度即为适用于本研究的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤浓度。(2) Mcc950 用药浓度的筛选: 不同浓度(0、0.1、1、10 $\mu$ mol/L) Mcc950 分别处理 ARPE-19 细胞 48h, 采用 CCK-8 法检测细胞活力, 当出现 ARPE-19 细胞活力明显下降, 凋亡明显增加的现象即出现药物毒性反应, 适用于本研究的 Mcc950 浓度即为前一数量级的药物浓度。(3) Mcc950 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激的 ARPE-19 细胞的影响: 将细胞分为正常对照组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组、单纯 Mcc950 给药组、Mcc950 预处理+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组, 其中正常对照组细胞常规培养; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组细胞采用适宜浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 48h; 单纯 Mcc950 给药组细胞采用适宜浓度 Mcc950 处理 48h; Mcc950 预处理+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组细胞先采用适宜浓度 Mcc950 预处理细胞 3h, 再采用适宜浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 Mcc950 共同处理细胞 48h。

**1.2.3 CCK-8 法检测细胞活力** 将对数生长期的 ARPE-19 细胞接种到 96 孔板, 2 $\times$ 10<sup>3</sup> 个/孔, 培养箱中培养 24h, 待细胞贴壁根据处理条件进行处理后, 弃去细胞培养基, 加入新的培养基并加入 CCK-8 检测液 10 $\mu$ L/孔, 置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中避光培养 2h 后, 在酶标仪上检测波长 450nm 处的吸光度(A)值。正常对照孔为正常培养细胞, 未予任何处理。空白孔中无细胞, 只含有 CCK-8 检测液的培养基。每组均取 4 个复孔的均值。细胞活力(%) =  $(A_{\text{加药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

**1.2.4 ELISA 法检测 IL-1 $\beta$  浓度** 正常对照组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组、单纯 Mcc950 给药组、Mcc950 预处理+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组细胞处理结束后, 将培养皿中的上清液移至 EP 管中, 参照 BCA 法测定蛋白浓度的方法检测 IL-1 $\beta$  浓度, 设标准孔、待测蛋白孔和空白孔。标准孔中加入标准品 100 $\mu$ L/孔, 待测蛋白孔加入待测蛋白 100 $\mu$ L/孔, 空白孔加入蒸馏水 100 $\mu$ L/孔, 最后加入酶标记溶液 50 $\mu$ L/孔。酶标板用封口胶密封后, 37 $^{\circ}$ C 恒温孵育 1h。孵育结束后弃去液体, 充分清洗酶标板 5 次, 将水分彻底吸干。在各孔中依次加入显色液 A 50 $\mu$ L 和显色液 B 50 $\mu$ L。37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15min 后, 每孔加 50 $\mu$ L 反应终止液终止反应。在酶标仪 450nm 波长处检测各孔吸光度(OD)值。绘制标准曲线, 根据待测样品的 OD 值由标准曲线查出相应的浓度, 再乘以稀释倍数, 即为样品的实际浓度。

**1.2.5 Western blot 法检测 NLRP3 炎性小体相关蛋白的表达** 正常对照组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组、Mcc950 预处理+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组细胞处理结束后, 吸除培养基, 使用 RIPA 蛋白裂解液对细胞进行冰上裂解 30min, 低温离心 13 000r/min, 采用 BCA 法测定各组蛋白浓度, 制备上样蛋白混合液。待测样品经 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜封闭, 加入一抗[兔抗 NLRP3 多克隆抗体(Proteintech, 1:1000)、兔抗 Pro-caspase1 多克隆抗体(Abcam, 1:1000)、兔抗 caspase-1 多克隆抗体(Cell Signaling Technology, 1:1000)]置于 4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜, 洗膜, 加入相应二抗置于摇床室温孵育 2h, 洗膜, 曝光显影, 检测各组 NLRP3 炎性小体相关蛋白的表达情况。

**1.2.6 TUNEL 染色检测细胞凋亡情况** 正常对照组、

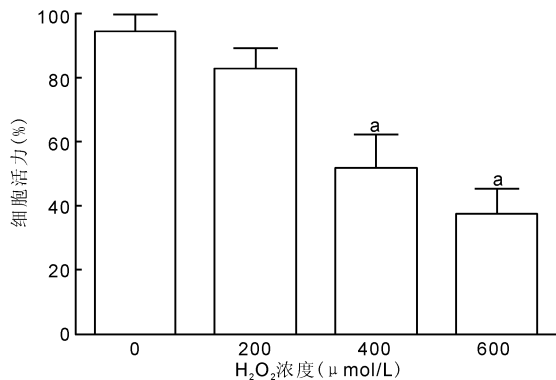


图1 不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对 ARPE-19 细胞活力的影响 <sup>a</sup>*P*<0.05 vs 0μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。

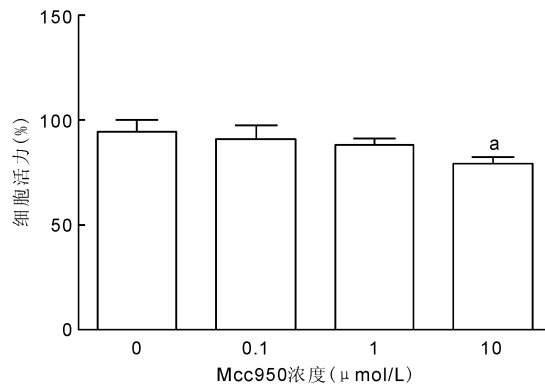


图2 不同浓度 Mcc950 对 ARPE-19 细胞活力的影响 <sup>a</sup>*P*<0.05 vs 0μmol/L Mcc950。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤组、Mcc950 预处理+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤组细胞处理结束后,吸除培养基,用4%多聚甲醛固定30min,PBS缓冲液清洗3次。采用蛋白酶K工作液(pH 7.4,15μg/mL,10mmol/L Tris-HCl)通透细胞5min。将新鲜配制的TUNEL反应液(1:9)滴加于细胞表面,在湿盒、暗室中37℃加盖孵育60min。用PBS缓冲液冲洗3次后在样品上滴加1滴DAPI染色液对细胞核染色1min后,于荧光显微镜下观察,选择激发光波长450~500nm(绿色)范围内检测。凋亡细胞的细胞核荧光较强,呈致密浓染。每组图片各随机选取5个视野计数,并计算细胞凋亡率。细胞凋亡率(%)=凋亡细胞数/总细胞数×100%。

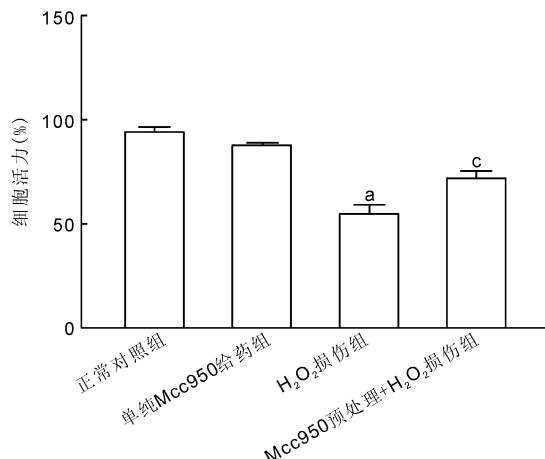


图3 Mcc950 处理对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激的 ARPE-19 细胞活力的影响 <sup>a</sup>*P*<0.05 vs 正常对照组,<sup>c</sup>*P*<0.05 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤组。

统计学分析:采用SPSS17.0软件进行统计学分析。计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。*P*<0.05为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对 ARPE-19 细胞活力的影响** 不同浓度(0、200、400、600μmol/L)H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>分别处理ARPE-19细胞48h后,细胞活力分别为94.7%±2.9%、83.1%±3.6%、52%±6.1%、37.33%±4.6%,差异有统计学意义(*F*=35.34,*P*=0.02)。随着H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度的升高,经H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激后细胞活力逐渐降低,200μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理的细胞活力与0μmol/L相比,差异无统计学意义(*P*=0.065),而400、600μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理的细胞活力分别与0μmol/L相比,差异均有统计学意义(*P*=0.032、0.0005),见图1。由于600μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理后细胞活力过低,可能影响实验结果的可靠性,故本研究选择400μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>进行实验。

**2.2 不同浓度 Mcc950 对 ARPE-19 细胞活力的影响** 不同浓度(0、0.1、1、10μmol/L)Mcc950分别处理ARPE-19细胞48h后,细胞活力分别为94.33%±3.2%、90.67%±3.8%、88.00%±1.5%、78.67%±1.9%,差异有统计学意义(*F*=5.839,*P*=0.02)。与0μmol/L Mcc950处理的细胞活力比较,经Mcc950处理的细胞活力均降低,但经0.1、1μmol/L Mcc950处理的细胞活力与0μmol/L相比,差异无统计学意义(*P*=0.503、0.147),而经10μmol/L Mcc950处理的细胞活力与0μmol/L相比,差异有统计学意义(*P*=0.0131),见图2。本研究选择1μmol/L Mcc950进行实验。

**2.3 Mcc950 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激的 ARPE-19 细胞活力的影响** 正常对照组、单纯 Mcc950 给药组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组、Mcc950

预处理+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤组细胞活力分别为93.67%±4.5%、87.3%±2.1%、54.67%±4.4%、71.67%±3.4%,差异有统计学意义(*F*=31.35,*P*<0.001)。单纯 Mcc950 给药组细胞活力与正常对照组相比,差异无统计学意义(*P*=0.51),而经400μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激48h后细胞活力明显降低,差异有统计学意义(*P*=0.016)。经1μmol/L Mcc950预处理3h,再接受400μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激48h后的细胞活力则明显高于H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤组,差异有统计学意义(*P*=0.009),见图3。以上结果表明,Mcc950对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激的ARPE-19细胞具有保护作用。

**2.4 Mcc950 抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 ARPE-19 细胞 IL-1β 的表达** 成熟型 IL-1β 是细胞内 NLRP3 炎性小体活化的重要炎症指标,故可通过检测细胞上清液中 IL-1β 浓度观察细胞内 NLRP3 炎性小体的活化程度。ELISA 检测结果显示,正常对照组、单纯 Mcc950 给药组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组、Mcc950 预处理+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组细胞上清液中 IL-1β 的浓度差异有统计学意义(*F*=78.18,*P*<0.001)。与正常对照组相比,经400μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激48h后细胞上清液中释放的 IL-1β 浓度明显增加至106.00±4.2pg/mL,差异有统计学意义(*P*<0.001),而经1μmol/L Mcc950预处理3h,再接受400μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激48h后的细胞上清液中释放的 IL-1β 浓度下降至78.67±8.1pg/mL,与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤组比较差异有统计学意义(*P*=0.03),见图4。

**2.5 Mcc950 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 ARPE-19 细胞 NLRP3 炎性小体相关蛋白表达的影响** Western blot 检测结果显示



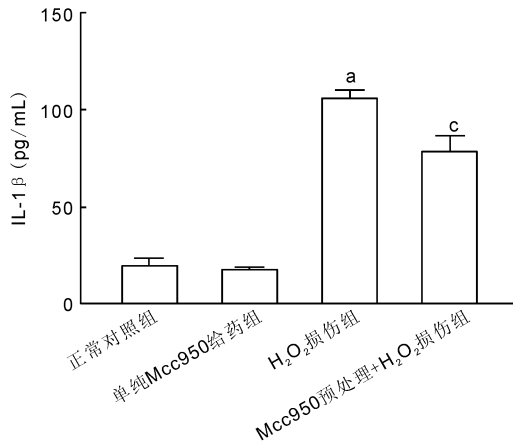


图4 Mcc950对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的ARPE-19细胞分泌IL-1β的影响 <sup>a</sup>*P*<0.05 vs 正常对照组, <sup>c</sup>*P*<0.05 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤组。

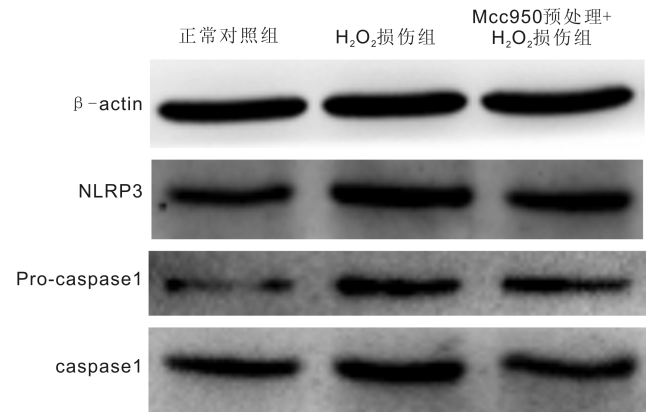


图5 Mcc950对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的ARPE-19细胞内NLRP3炎症小体相关蛋白表达的影响。

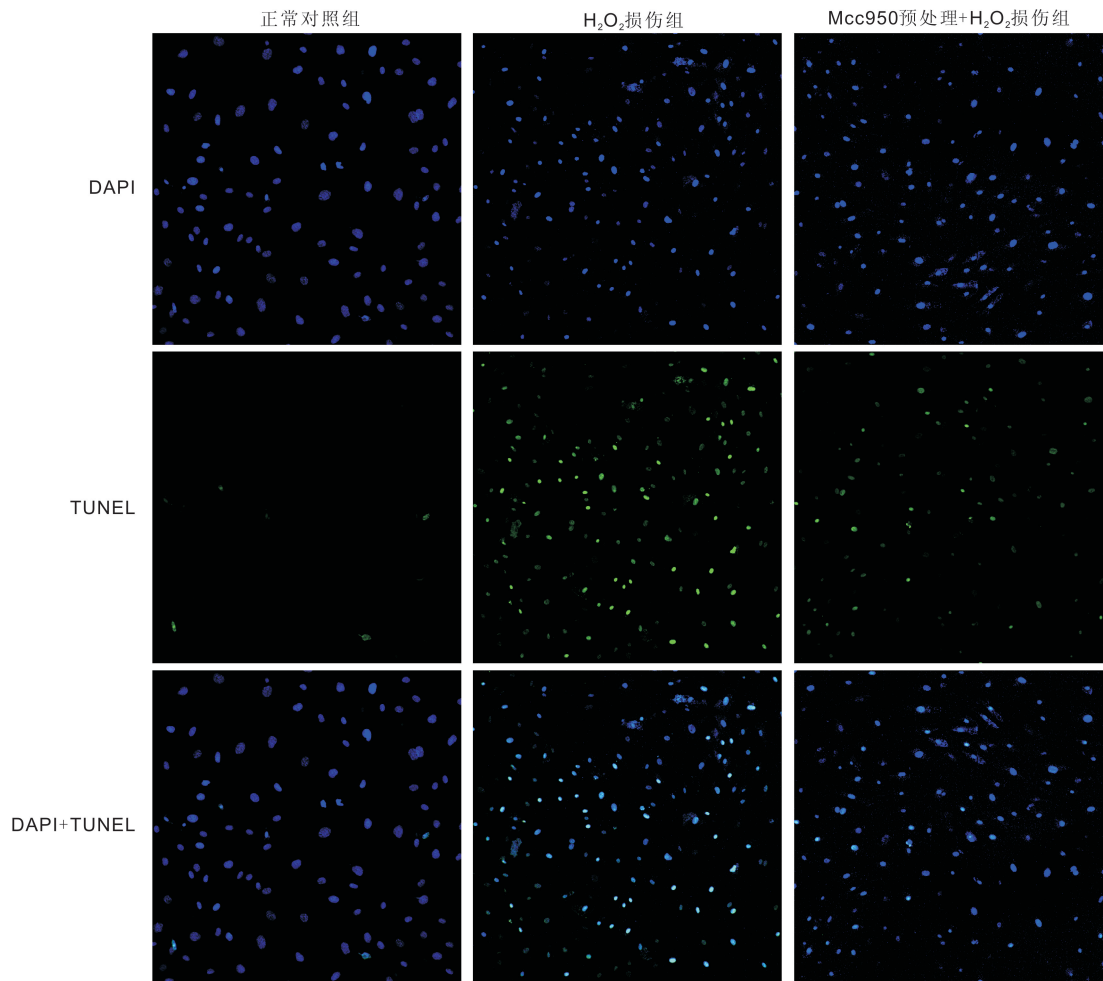


图6 Mcc950对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的ARPE-19细胞凋亡的影响(×400)。

(图5),与正常对照组相比,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤组细胞中NLRP3、Pro-caspase1、caspase1蛋白表达水平明显升高,经过Mcc950预处理+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤组细胞中NLRP3、Pro-caspase1依然保持高表达,但caspase1表达水平得到明显抑制,表明Mcc950能有效抑制NLRP3炎症小体的激活从而干扰具有细胞凋亡作用的成熟caspase1的产生。

**2.6 Mcc950抑制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的ARPE-19细胞凋亡**  
 TUNEL染色结果显示(图6),正常对照组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤组、Mcc950预处理+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤组细胞凋亡率分别为4%±1.2%、59.6%±6.8%、33%±6.4%,差异有统计学意义(*F*=27.51,*P*=0.001)。正常对照组中仅能观察到数个细

胞凋亡,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激后细胞凋亡率明显升高,差异有统计学意义(*P*=0.0013),而预先给予Mcc950处理再进行H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激,细胞凋亡率较H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤组显著降低,差异有统计学意义(*P*=0.043),表明Mcc950在抑制NLRP3炎症小体活化的同时具有抗凋亡作用。

### 3 讨论

氧化损伤和炎症反应之间具有不可分割的联系。近年来,关于ARMD发病机制的研究中,除了关注氧化损伤因素外,炎症和ARMD发生发展的关系也日益成为研究热点<sup>[17-18]</sup>。Hollyfield等<sup>[19-21]</sup>研究发现,ARMD发病机制中,氧化损伤可转化为炎症反应损伤。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>是公认的能

够引起 RPE 细胞氧化应激反应的实验模型<sup>[22]</sup>,故本研究采用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激 ARPE-19 细胞建立受氧化刺激的 ARMD 细胞模型,进一步探索氧化损伤引起的炎症损伤在 ARMD 中的作用和影响。

RPE 细胞能够通过吞噬光感受器外节产生过量的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,过量的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 会进一步损伤 RPE 细胞,导致细胞凋亡<sup>[23-28]</sup>。既往研究表明,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可以上调 ARPE-19 细胞内的 miR-143-3p 表达<sup>[24]</sup>,也可以通过调控 PI3K/AKT 信号通路导致氧化应激损伤<sup>[25]</sup>。那么,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 是否可以通过 NLRP3 炎性小体激活途径介导 RPE 细胞的氧化应激反应和凋亡尚不清楚。本研究发现,在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激下,ARPE-19 细胞内 NLRP3 炎性小体激活,致凋亡因子即成熟的 caspase1 表达明显增加,细胞分泌至细胞外的炎症因子 IL-1 $\beta$  浓度升高,细胞活力降低,凋亡率升高,表明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的氧化应激可以通过介导 NLRP3 炎性小体激活途径对 ARPE-19 细胞产生损伤,NLRP3 炎性小体激活后,成熟的 caspase1 导致 ARPE-19 细胞的凋亡增加,同时细胞上清液中高浓度的 IL-1 $\beta$  作为炎症介质进一步趋化和启动炎症反应从而加重 ARPE-19 细胞的炎性损伤。

NLRP3 炎性小体特异性抑制剂 Mcc950 是一种含二芳基磺酰脲的复合物,其在多种炎症疾病(如 cryopyrin 相关综合征、皮肤和肺部炎症、肾纤维化、高血压、心肌梗死)模型中有效抑制炎症反应<sup>[29-33]</sup>。本研究发现,适宜浓度 Mcc950 干预 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 介导的氧化应激反应,也能够有效抑制 NLRP3 炎性小体激活及其下游产物 IL-1 $\beta$  的大量释放和 caspase1 的产生,恢复细胞活力,降低细胞凋亡率,表明 Mcc950 可以在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 介导的氧化损伤过程中发挥重要的抗炎、抗凋亡效果。

综上所述,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能够通过 NLRP3 炎性小体激活途径介导 ARPE-19 细胞的氧化应激反应,NLRP3 炎性小体抑制剂 Mcc950 能够有效抑制该过程,显著提高 ARPE-19 细胞对抗 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的细胞损伤的能力,发挥其抗炎、抗凋亡的作用。但本研究仅在体外环境中讨论了 Mcc950 对于 ARPE-19 细胞的保护作用,在以后的研究将通过动物模型进一步探究 Mcc950 的治疗效果及具体的作用机制。

#### 参考文献

- Ambati J, Fowler BJ. Mechanisms of age - related macular degeneration. *Neuron* 2012;75(1):26-39
- Ambati J, Ambati BK, Yoo SH, et al. Age - related macular degeneration; etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Surv Ophthalmol* 2003;48(3):257-293
- Pascolini D, Mariotti SP. Global estimates of visual impairment;2010. *Br J Ophthalmol* 2012;96(5):614-618
- Jarrett SG, Boulton ME. Consequences of oxidative stress in age - related macular degeneration. *Mol Aspects Med* 2012;33(4):399-417
- Ambati J, Atkinson JP, Gelfand BD. Immunology of age - related macular degeneration. *Nat Rev Immunol* 2013;13(6):438-451
- Viiri J, Amadio M, Marchesi N, et al. Autophagy activation clears ELAVL1/HuR - mediated accumulation of SQSTM1/p62 during proteasomal inhibition in human retinal pigment epithelial cells. *PLoS One* 2013;8(7):e69563
- Piippo N, Korkmaz A, Hytti M, et al. Decline in cellular clearance

- systems induces inflammasome signaling in human ARPE - 19 cells. *Biochim Biophys Acta* 2014;1843(12):3038-3046
- Kaamiranta K, Tokarz P, Koskela A, et al. Autophagy regulates death of retinal pigment epithelium cells in age - related macular degeneration. *Cell Biol Toxicol* 2016;33(2):113-128
- Wiktorowska-Owczarek A, Nowak JZ. Pathogenesis and prophylaxis of AMD: focus on oxidative stress and antioxidants. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2010;64:333-343
- Hu Z, Zhang Y, Wang J, et al. Knockout of Ccr2 alleviates photoreceptor cell death in rodent retina exposed to chronic blue light. *Cell Death Dis* 2016;7(11):e2468
- Singh LP. Thioredoxin Interacting Protein (TXNIP) and Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *J Clin Exp Ophthalmol* 2013;4:10
- Ratsimandresy RA, Dorfleutner A, Stehlik C. An Update on PYRIN Domain - Containing Pattern Recognition Receptors: From Immunity to Pathology. *Front Immunol* 2013;4:440
- Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 2010;140(6):821-832
- Primiano MJ, Lefker BA, Bowman MR, et al. Efficacy and Pharmacology of the NLRP3 Inflammasome Inhibitor CP - 456, 773 (CRID3) in Murine Models of Dermal and Pulmonary Inflammation. *J Immunol* 2016;197(6):2421-2433
- Ludwig - Portugall I, Bartok E, Dhana E, et al. An NLRP3 - specific inflammasome inhibitor attenuates crystal - induced kidney fibrosis in mice. *Kidney Int* 2016;90(3):525-539
- Nalbandian A, Khan AA, Srivastava R, et al. Activation of the NLRP3 Inflammasome Is Associated with Valosin - Containing Protein Myopathy. *Inflammation* 2017;40(1):21-41
- Chen M, Xu H. Parainflammation, chronic inflammation, and age - related macular degeneration. *J Leukoc Biol* 2015;98(5):713-725
- 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
- Hollyfield JG, Bonilha VL, Rayborn ME, et al. Oxidative damage - induced inflammation initiates age - related macular degeneration. *Nat Med* 2008;14(2):194-198
- Mao K, Shu W, Qiu Q, et al. Salvianolic acid A protects retinal pigment epithelium from OX - LDL - induced inflammation in an age - related macular degeneration model. *Discov Med* 2017; 23(125):129-147
- Du Z, Wu X, Song M, et al. Oxidative damage induces MCP - 1 secretion and macrophage aggregation in age - related macular degeneration (AMD). *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2016;254(12):2469-2476
- Fang Y, Su T, Qiu X, et al. Protective effect of alpha - mangostin against oxidative stress induced - retinal cell death. *Sci Rep* 2016; 6:21018
- Bailey TA, Kanuga N, Romero IA, et al. Oxidative stress affects the junctional integrity of retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(2):675-684
- Ayaz L, Dinc E. Evaluation of microRNA responses in ARPE-19 cells against the oxidative stress. *Cutan Ocul Toxicol* 2018;37(2):121-126
- Zha X, Wu G, Zhao X, et al. PRDX6 Protects ARPE - 19 Cells from Oxidative Damage via PI3K/AKT Signaling. *Cell Physiol Biochem* 2015; 36(6):2217-2228
- Zhang LL, Huang S, Ma XX, et al. Angiotensin (1 - 7) attenuated

Angiotensin II - induced hepatocyte EMT by inhibiting NOX - derived H2O2 - activated NLRP3 inflammasome/IL - 1beta/Smad circuit. *Free Radic Biol Med* 2016;97:531-543

27 Liu X,Zhang X,Ding Y, *et al.* Nuclear Factor E2-Related Factor-2 Negatively Regulates NLRP3 Inflammasome Activity by Inhibiting Reactive Oxygen Species - Induced NLRP3 Priming. *Antioxid Redox Signal* 2017;26(1):28-43

28 Abais JM,Xia M,Li G, *et al.* Contribution of endogenously produced reactive oxygen species to the activation of podocyte NLRP3 inflammasomes in hyperhomocysteinemia. *Free Radic Biol Med* 2014;67:211-220

29 Coll RC,Robertson AA,Chae JJ, *et al.* A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat Med* 2015;21(3):248-255

30 Brydges SD, Mueller JL, McGeough MD, *et al.* Inflammasome - mediated disease animal models reveal roles for innate but not adaptive immunity. *Immunity* 2009;30(6):875-887

31 Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, *et al.* Mutation of a new gene encoding a putative pyrin - like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle - Wells syndrome. *Nat Genet* 2001;29(3):301-305

32 Krishnan SM, Dowling JK, Ling YH, *et al.* Inflammasome activity is essential for one kidney/deoxycorticosterone acetate/salt - induced hypertension in mice. *Br J Pharmacol* 2016;173(4):752-765

33 van Hout GP, Bosch L, Ellenbroek GH, *et al.* The selective NLRP3 - inflammasome inhibitor MCC950 reduces infarct size and preserves cardiac function in a pig model of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2017;38(11):828-836

## 2017 中国眼科期刊 CiteScore 世界排名 (全球共收录 108 种)

近期,学术出版巨头爱思唯尔(Elsevier)依据 Scopus 数据库发布了 2017 年度期刊引用指数榜 CiteScore。CiteScore 是一个全新的衡量期刊影响因子的指标。计算方法是:期刊连续 3 年论文在第 4 年度的篇均引用次数,且不剔除任何类型的文章。以下是 2017 CiteScore 中国眼科期刊在全球 108 种眼科期刊的排名:

刊名	出版地	语言	CiteScore	排名
International Journal of Ophthalmology (国际眼科杂志英文版)	中国大陆	英文	1.21	51/108
Chinese Journal of Ophthalmology (中华眼科杂志)	中国大陆	中文	0.23	86/108
Chinese Journal of Experimental Ophthalmology (中华实验眼科杂志)	中国大陆	中文	0.18	88/108
International Eye Science (国际眼科杂志中文版)	中国大陆	中文	0.03	101/108
Ophthalmology in China (眼科)	中国大陆	中文	0.03	101/108

备注:中国大陆共有眼科专业期刊 20 余种,被 SCOPUS 收录的只有以上 5 种,所以其它眼科期刊不在其中。

源自:<https://scopus.com/sources>