

# 全反式视黄酸对视网膜色素上皮细胞内质网应激反应的诱导作用及途径

吴娟,曾骏文,崔冬梅

引用:吴娟,曾骏文,崔冬梅.全反式视黄酸对视网膜色素上皮细胞内质网应激反应的诱导作用及途径.国际眼科杂志 2021; 21(6):963-968

基金项目:国家自然科学基金项目(No.81170872)

作者单位:(510060)中国广东省广州市,中山大学中山眼科中心近视与低视力专科

作者简介:吴娟,毕业于中山医科大学,博士,主治医师,研究方向:屈光与低视力。

通讯作者:曾骏文,毕业于中山医科大学,博士,主任医师,研究方向:屈光与低视力. [zeng\\_zoc@163.com](mailto:zeng_zoc@163.com)

收稿日期:2020-05-25 修回日期:2021-05-10

## 摘要

目的:从分子水平探讨全反式视黄酸(ATRA)诱导 ARPE-19 细胞的内质网应激反应(ERS)。

方法:应用免疫荧光法、实时定量-聚合酶链反应和蛋白印记法等方法,检测 ATRA 诱导 ARPE-19 细胞产生 ERS 过程中相关信号通路蛋白及 mRNA 表达水平的变化。

结果:检测结果显示,随着 ATRA 浓度的累积,ERS 标记蛋白 CHOP 及 BIP 的蛋白及 mRNA 水平显著上升 ( $P < 0.001$ );下游信号通路中,PERK、EIF2 $\alpha$ 、ATF4、IRE1 $\alpha$  及 XBP1 表达上调 ( $P < 0.001$ ),ATF6 表达无变化 ( $P > 0.05$ )。

结论:过度累积的 ATRA 诱导 ARPE-19 细胞产生 ERS,并激活其中 PERK-EIF2 $\alpha$ -ATF4 及 IRE1 $\alpha$ -XBP1 信号途径。  
关键词:全反式视黄酸;视网膜色素上皮细胞;内质网应激反应

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2021.6.05

## All - trans retinoic acid induces endoplasmic reticulum stress signaling pathway in ARPE-19 cells

Juan Wu, Jun-Wen Zeng, Dong-Mei Cui

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No.81170872)

Department of Myopia and Low Vision, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China

Correspondence to: Jun-Wen Zeng, Department of Myopia and Low Vision, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China. [zeng\\_zoc@163.com](mailto:zeng_zoc@163.com)

Received:2020-05-25 Accepted:2021-05-10

## Abstract

• AIM: To investigate the endoplasmic reticulum stress (ERS) induced by all-trans retinoic acid (ATRA) in ARPE-19 cells.

• METHODS: Immunofluorescence, real-time quantitative polymerase chain reaction and Western blot were used to detect the protein and mRNA expression of related signal pathways during the process of endoplasmic reticulum stress response induced by ATRA in ARPE-19 cells.

• RESULTS: With the accumulation of ATRA concentration, the protein and mRNA levels of endoplasmic reticulum stress response marker proteins chop and BiP were significantly increased ( $P < 0.001$ ); in the downstream signaling pathways, perk, eIF2 $\alpha$ , ATF4, IRE1 $\alpha$  and XBP1 were up-regulated ( $P < 0.001$ ), while the expression of ATF6 did not change ( $P > 0.05$ ).

• CONCLUSION: Over accumulation of ATRA induces ERS in ARPE-19 cells and activates PERK-EIF2 $\alpha$ -ATF4 and IRE1 $\alpha$ -XBP1 signaling pathways

• KEYWORDS: all-trans retinoic acid; retinal pigment epithelial cells; endoplasmic reticulum stress

Citation: Wu J, Zeng JW, Cui DM. All-trans retinoic acid induces endoplasmic reticulum stress signaling pathway in ARPE-19 cells. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2021;21(6):963-968

## 0 引言

年龄相关性黄斑病变(age-related macular degeneration, ARMD)是视网膜黄斑区光感受器细胞凋亡导致中央视力缺失的一种眼部疾病。ARMD的光感受器凋亡主要由于视网膜色素上皮(retinal pigment epithelial, RPE)细胞失去向光感受器提供氧气和营养,并运走废物质的功能导致<sup>[1]</sup>。由于RPE特殊的解剖位置、高代谢活性以及对光感受器外段的吞噬作用,使得RPE尤其容易受到伤害<sup>[2-3]</sup>。全反式视黄酸(ATRA)是视觉循环中不可缺少的部分,作为视网膜内的一种内源性化合物,ATRA通常通过RDH(如RDH11)还原而被清除,或形成一系列困在RPE溶酶体中的视网膜衍生物<sup>[4-6]</sup>。ATRA在RPE细胞内的过度积累导致细胞毒性并导致细胞凋亡<sup>[7-8]</sup>,并在眼底变性疾病的病因中起到作用。以往的研究表明,由ATRA诱导并通过还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶介导的活性氧(ROS)产生参与了光感受器和RPE细胞的变性退化<sup>[9]</sup>。但关于RPE细胞变性的分子机制仍不清楚。本课题组在之前的研究中已证实ATRA过度累积导致caspase12被激活,caspase12与内质网应激反应(ERS)关系密切,本文通过对ERS进一步研究了ATRA诱导的ARPE-19凋亡的过程。证明ATRA过度累积激活了ERS中PERK-EIF2 $\alpha$ -ATF4及IRE1 $\alpha$ -XBP1信号途径,抑制了

表1 实时定量 PCR 中引物序列

基因	基因库号码	引物序列
CHOP	NM_001195057.1	Forward: 5'-CTCCCTTGGTCTTCCTCCTC-3' Reverse: 5'-CTTCTCTGGCTTGGCTGACT-3'
BIP	NM_005347.4	Forward: 5'-CACCTTGAACGGCAAGAACT-3' Reverse: 5'-AAGAACCAGCTCACCTCCAA-3'
PERK	NM_001313915.1	Forward: 5'-ATTTGCTACTGTTGGGCTTG-3' Reverse: 5'-TGGCTGTGATAATGCTTCCA-3'
EIF2 $\alpha$	NM_001319043.1	Forward: 5'-TGGTGAATGTCAGATCCATTGC-3' Reverse: 5'-TAGAACGGATACGCCTTCTGG-3'
ATF4	XM_017028807.1	Forward: 5'-ATGACCGAAATGAGCTTCCTG-3' Reverse: 5'-GCTGGAGAACCATGAGGT-3'
ATF6	NM_007348.3	Forward: 5'-ACCGAGGAGACGAGACTGAA-3' Reverse: 5'-ACATTTGGGACATCAACAACC-3'
XBP1	NM_001079539.1	Forward: 5'-AAGGGAGGCTGGTAAGGAAC-3' Reverse: 5'-TTGGCATTCTGGACAACCT-3'
IRE1 $\alpha$	XM_642100.1	Forward: 5'-TGGACACAAAGTGGGACATC-3' Reverse: 5'-GGCGAACAGAATACACCAT-3'
GAPDH	NM_001256799.2	Forward: 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3' Reverse: 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'

注:CHOP:C/EBP 同源蛋白;BIP:结合免疫球蛋白;PERK:蛋白激酶 RNA (PKR) 样 ER 激酶;EIF2 $\alpha$ :真核翻译起始因子 2 $\alpha$ ;ATF4:激活转录因子 4;ATF6:激活转录因子 6;XBP1:X-结合蛋白 1;IRE1 $\alpha$ :肌醇必需蛋白-1 $\alpha$ ;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

ATF6 信号途径。我们的发现为视网膜病变中的 ATRA 毒性提供了新的见解。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** ARPE-19 细胞(美国 ATCC 细胞库);DMEM/F12 培养基(Gibco);胎牛血清、全反式视黄酸(ATRA)(Sigma);蛋白印迹检测系统(merck);Trizol 试剂(Invitrogen);Brilliant SYBR Green 试剂盒(Takara);引物序列(上海生工科技公司);抗 BIP 抗体(CST3177)、抗 CHOP 抗体(CST2895)、抗 GAPDH 抗体(CST5174);cfx96 实时聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测系统(Bio-Rad);Bio-Rad Quantity One 成像软件(Bio-Rad);酶标仪(日本 OLYMPUS 公司);激光共聚焦光谱显微镜(Zeiss)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 本研究不涉及人体或动物实验,ARPE-19 细胞购自美国 ATCC 细胞库。ARPE-19 细胞在 DMEM/F12 中常规培养,辅以 10% BSA,青-链霉素(100 $\mu$ g/mL)。细胞在 37 $^{\circ}$ C 下含 5% 二氧化碳的加湿培养箱中培养。每 2~3d 更换一次培养基。细胞采用含 0.25% EDTA 的胰蛋白酶于培养箱中消化 2min,并以 1:4~1:6 的比例接种于 25mm<sup>2</sup> 培养瓶中进行传代培养。取对数生长期的细胞用于后续实验。将 ATRA 溶解于二甲基亚砜(DMSO)中至 10 $\mu$ mol/L 的储备浓度。用 DMEM/F12 稀释 ATRA 至工作浓度,在-20 $^{\circ}$ C 下冷冻成小份,避免光照。

**1.2.2 qRT-PCR 检测** 取 ARPE-19 细胞以 2.5 $\times$ 10<sup>5</sup>/mL 密度接种于 6 孔板,用不同浓度的 ATRA (0、2.5、5、10、20 $\mu$ mol/L) 分别处理 ARPE-19 细胞 24h 后收集细胞,并按 ATRA 浓度分为五组,包括对照组(0 $\mu$ mol/L)和四个浓度实验组,按 PureLink RNA mini kit 试剂盒的操作说明提取总的 RNA,Trizol 试剂纯化细胞 RNA,逆转录试剂盒逆转录合成 cDNA。qRT-PCR 检测基因表达情况,配制 20 $\mu$ L PCR 体系,反应条件:95 $^{\circ}$ C 10min,95 $^{\circ}$ C 15s,60 $^{\circ}$ C

50s,60 $^{\circ}$ C 50s,40 个循环,GAPDH 为内参基因,2<sup>- $\Delta$ CT</sup> 法计算靶基因的相对表达水平。所有样本重复检测 3 次,取平均值。引物序列由中国上海生工科技公司提供,见表 1。

**1.2.3 蛋白质印迹分析** 用不同浓度的 ATRA (0、2.5、5、10、15、20 $\mu$ mol/L) 处理 ARPE-19 细胞 24h 收集细胞。然后用 PBS 洗涤,并用 RIPA 裂解缓冲液溶解,然后在 4 $^{\circ}$ C 以 14000r/min 离心 15min。上清液蛋白采用 SDS-PAGE 凝胶电泳。转膜,并在室温下用 5% 脱脂牛奶封闭 1h。CHOP (1:1000)、BIP (1:1000) 一抗孵育,辣根过氧化物酶(HRP)结合山羊抗鼠或山羊抗兔二抗孵育,采用 ECL 蛋白印迹检测系统观察条带,并使用 Bio-Rad Quantity One 成像软件分析条带。

**1.2.4 免疫荧光检测** 用 ATRA (10 $\mu$ mol/L) 处理 ARPE-19 细胞 24h 收集细胞。在 PBS 中洗涤 3 次后,用 4% 多聚甲醛固定 15min,然后在含有 1% 胎牛血清(BSA)和 0.1% Triton X-100 的 PBS 室温中放置 2h,加入 CHOP (1:200) 和 BIP (1:400) 4 $^{\circ}$ C 湿盒内孵育过夜,次日用 PBS 洗涤 3 次,每次 5min,用抗兔或抗鼠二抗 (1:400) 孵育 1h。用 DAPI (5mg/mL) 染色细胞核 10min,用 PBS 洗涤后,抗荧光衰减剂封片,激光共聚焦光谱显微镜观察并拍照,图片放大倍数 1000,拍摄图片比例尺寸为 20 $\mu$ m。

统计学分析:采用统计学软件 SPSS 22.0 对数据进行统计学分析,并用 GraphPad Prism 7 作图。本研究中测量指标的计量资料经 *W* 检验呈正态分布,经 Levene 检验方差齐性。对照组与不同浓度实验组间差异总体比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 ATRA 处理 ARPE-19 细胞后引起 ERS** CHOP、BIP 为 ERS 的标志性蛋白。用不同浓度的 ATRA (0、2.5、5、10、15、20 $\mu$ mol/L) 处理 ARPE-19 细胞 24h 后,免疫荧光法检测结果提示,ATRA 诱导了 CHOP (图 1A) 和 BIP (图 1B) 的产生。Western blot 法检测蛋白表达结果见图 1C,

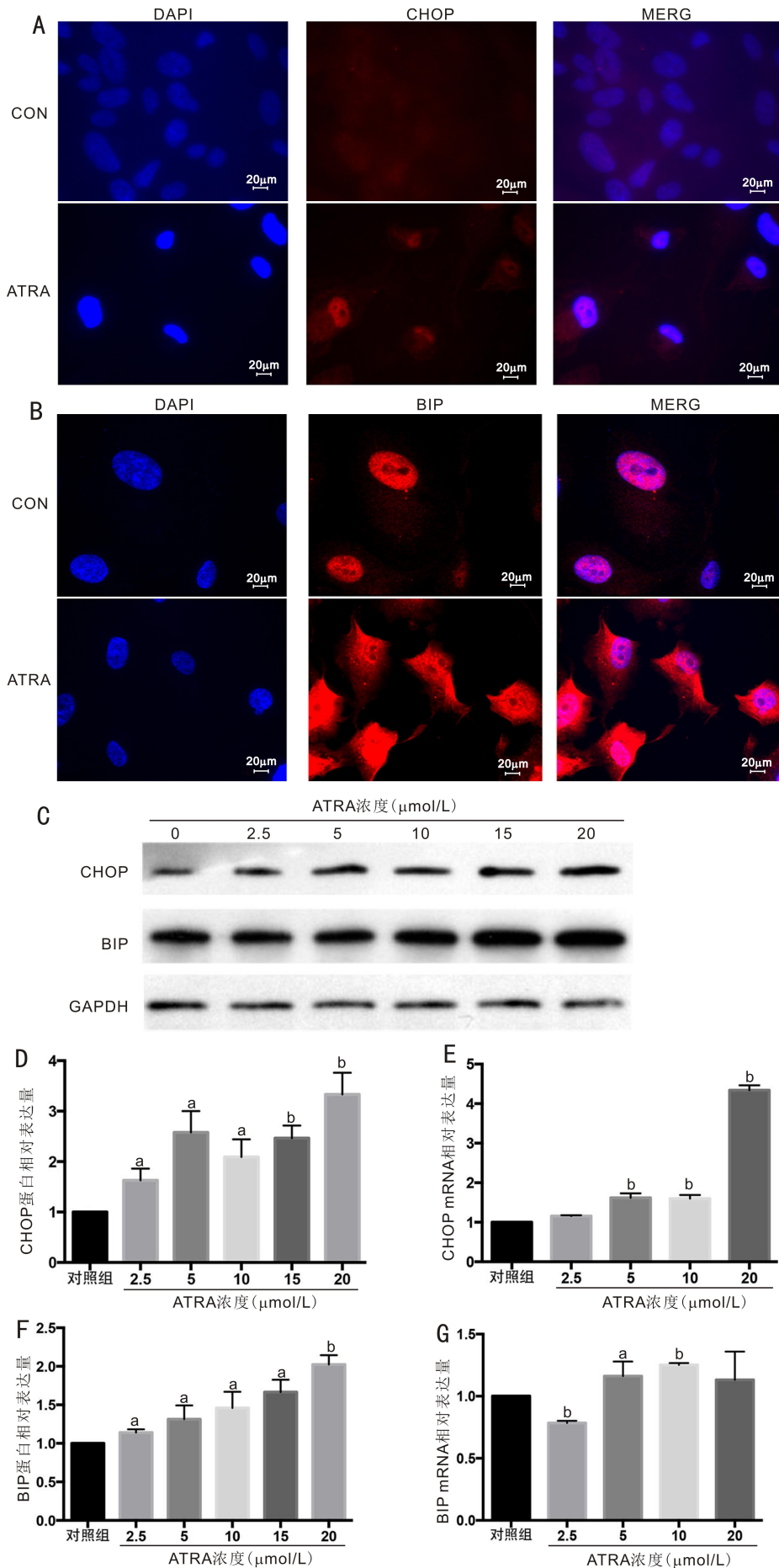


图 1 ERS 蛋白及 mRNA 表达 A,B:免疫荧光法 CHOP 和 BIP 蛋白表达;C:用不同浓度的 ATRA 处理 ARPE-19 24h,CHOP,BIP 的蛋白质印迹表达; D,F:与对照组相比,ATRA 增加 CHOP 和 BIP 蛋白水平;E,G:qRT-PCR 检测随着 ATRA 累积,CHOP 和 BIP 的 mRNA 表达增加。DAPI:2-(4-氨基苯基)-6-吡啶甲酰胺二盐酸盐;CON:对照组;<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.001$  vs 对照组。

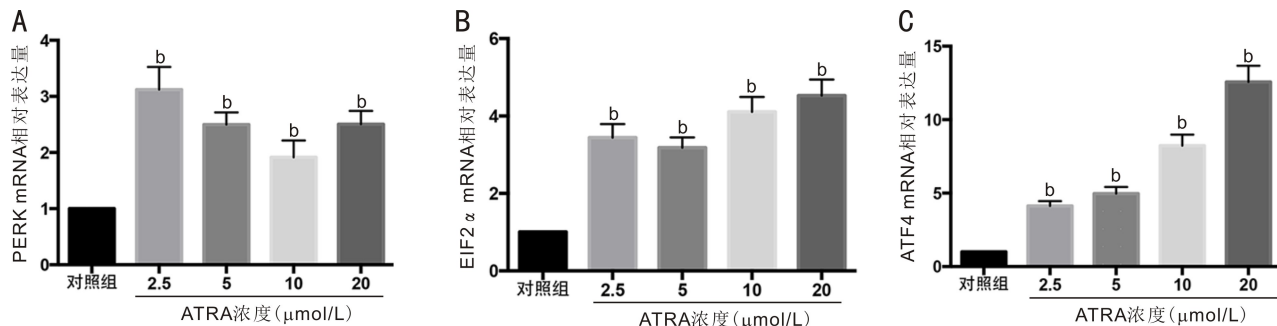


图2 不同浓度的 ATRA 处理 ARPE-19 细胞 24h, PERK-EIF2α-ATF4 通路中 PERK, EIF2α, ATF4 mRNA 的表达水平 A: PERK mRNA; B: EIF2α mRNA; C: ATF4 mRNA。<sup>b</sup> $P < 0.001$  vs 对照组。

表2 不同浓度 ATRA 对 ERS 标志性蛋白 CHOP、BIP 的蛋白及 mRNA 表达水平的影响

组别	样本量	CHOP 蛋白	BIP 蛋白	CHOP mRNA	BIP mRNA	$\bar{x} \pm s$
对照组	3	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	
2.5μmol/L 组	3	1.63±0.23	1.14±0.04	1.15±0.02	0.78±0.02	
5μmol/L 组	3	2.58±0.42	1.31±0.18	1.61±0.11	1.16±0.12	
10μmol/L 组	3	2.09±0.35	1.46±0.21	1.59±0.08	1.25±0.01	
15μmol/L 组	3	2.46±0.25	1.67±0.16	-	-	
20μmol/L 组	3	3.33±0.43	2.02±0.12	4.34±0.12	1.13±0.23	
<i>F</i>		19.61	21.07	770.6	7.49	
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	

分析显示 CHOP(图 1D)、BIP(图 1F)蛋白表达随着 ATRA 浓度累积而上调;同时 CHOP(图 1E)、BIP(图 1G)的 mRNA 表达也升高。通过 3 次独立实验,检测的不同组间 CHOP 蛋白水平比较,差异有统计学意义( $F = 19.61, P < 0.001$ ),当 ATRA 浓度在 2.5、5、10、15、20μmol/L 时,CHOP 蛋白的产生较对照组显著升高,差异有统计学意义( $P = 0.009, 0.003, 0.005, < 0.001, < 0.001$ );检测的不同组间 BIP 蛋白水平比较,差异有统计学意义( $F = 21.07, P < 0.001$ ),当 ATRA 浓度在 2.5、5、10、15、20μmol/L 时,CHOP 蛋白的产生较对照组呈浓度依赖性升高,差异有统计学意义( $P = 0.004, 0.039, 0.019, 0.0019, < 0.001$ );检测的不同组间 CHOP 的 mRNA 水平比较,差异有统计学意义( $F = 770.6, P < 0.001$ ),当 ATRA 浓度在 5、10、20μmol/L 时,CHOP 的 mRNA 水平较对照组升高,差异均有统计学意义( $P < 0.001$ );检测的不同组间 BIP 的 mRNA 水平比较,差异有统计学意义( $F = 7.49, P < 0.001$ ),当 ATRA 浓度在 2.5μmol/L 时,BIP 的 mRNA 水平较对照组下降,差异有统计学意义( $P < 0.001$ );当 ATRA 浓度在 5、10μmol/L 时,BIP 的 mRNA 水平较对照组上升,差异有统计学意义( $P = 0.048, < 0.001$ ),见表 2。

## 2.2 ERS 三条主要通路反应

### 2.2.1 PERK-EIF2α-ATF4 通路

PERK, EIF2α, ATF4 为 ERS 下游 PERK-EIF2α-ATF4 通路的标志性蛋白,用不同浓度的 ATRA(0、2.5、5、10、20μmol/L)处理 ARPE-19 细胞 24h 后,PERK(图 2A)、EIF2α(图 2B)、ATF4(图 2C)的 mRNA 表达水平较对照组上调,差异均有统计学意义( $P < 0.001$ ),证明 ATRA 过度累积激活 ARPE-19 细胞 ERS 中的 PERK-EIF2α-ATF4 通路。通过 3 次独立实验,检测的不同组间 PERK 的 mRNA 水平比较,差异有统计学意义( $F = 26.95, P < 0.001$ ),当 ATRA 浓度在 2.5、5、10、

20μmol/L 时,PERK 的 mRNA 水平较对照组水平上升,差异均有统计学意义( $P < 0.001$ );检测的不同组间 EIF2α 的 mRNA 水平比较,差异有统计学意义( $F = 55.06, P < 0.001$ ),当 ATRA 浓度在 2.5、5、10、20μmol/L 时,EIF2α 的 mRNA 水平较对照组水平上升,差异均有统计学意义( $P < 0.001$ );检测的不同组间 ATF4 的 mRNA 水平比较,差异有统计学意义( $F = 140.5, P < 0.001$ ),当 ATRA 浓度在 2.5、5、10、20μmol/L 时,ATF4 的 mRNA 水平较对照组水平上升,差异均有统计学意义( $P < 0.001$ ),见表 3。

### 2.2.2 IRE1α-XBP1 通路

IRE1α, XBP1 为 ERS 下游 IRE1α-XBP1 通路的标志性蛋白,用不同浓度的 ATRA(0、2.5、5、10、20μmol/L)处理 ARPE-19 细胞 24h 后,XBP1(图 3A)、IRE1α(图 3B)的 mRNA 水平表达水平较对照组上调,差异均有统计学意义( $P < 0.001$ ),证明 ATRA 过度累积激活 ARPE-19 细胞 ERS 中的 IRE1α-XBP1 通路。通过 3 次独立实验,检测的不同组间 IRE1α 的 mRNA 水平比较,差异有统计学意义( $F = 43.08, P < 0.001$ ),当 ATRA 浓度在 10、20μmol/L 时,IRE1α 的 mRNA 水平较对照组水平上升,差异均有统计学意义( $P < 0.001$ );检测的不同组间 XBP1 的 mRNA 水平比较,差异有统计学意义( $F = 19.90, P < 0.001$ ),当 ATRA 浓度在 2.5、5、10、20μmol/L 时,XBP1 的 mRNA 水平较对照组水平上升,差异均有统计学意义( $P < 0.001$ ),见表 3。

### 2.2.3 ATF6 通路

ATF6 为 ERS 下游 ATF6 通路的标志性蛋白,用不同浓度的 ATRA(0、2.5、5、10、20μmol/L)处理 ARPE-19 细胞 24h 后,ATF6 的 mRNA 水平较对照组差异无统计学意义( $P = 0.36, 0.24, 0.58, 0.61$ ,图 4,表 3),证明 ATRA 过度累积未激活 ARPE-19 细胞 ERS 中的 ATF6 通路。通过三次独立实验,检测的不同组间 ATF6 的 mRNA 水平比较,差异无统计学意义( $F = 0.74, P > 0.05$ )。

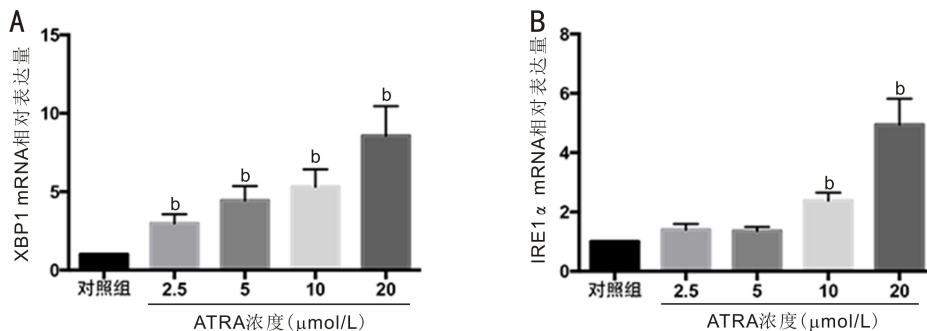


图3 不同浓度的 ATRA 处理 ARPE-19 细胞 24h, IRE1 $\alpha$ -XBP1 通路中 IRE1 $\alpha$ , XBP1 mRNA 表达水平 A: XBP1 mRNA 表达水平; B: IRE1 $\alpha$  mRNA 表达水平。<sup>b</sup> $P < 0.001$  vs 对照组。

表3 不同浓度 ATRA 对 ERS 三条通路标志性蛋白的 mRNA 表达水平的影响

组别	样本量	PERK mRNA	EIF2 $\alpha$ mRNA	ATF4 mRNA	IRE1 $\alpha$ mRNA	XBP1 mRNA	ATF6 mRNA
对照组	3	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
2.5 $\mu$ mol/L 组	3	3.12 $\pm$ 0.40	3.44 $\pm$ 0.35	4.13 $\pm$ 0.31	1.40 $\pm$ 0.19	2.99 $\pm$ 0.58	0.95 $\pm$ 0.09
5 $\mu$ mol/L 组	3	2.49 $\pm$ 0.22	3.18 $\pm$ 0.26	4.97 $\pm$ 0.45	1.36 $\pm$ 0.14	4.45 $\pm$ 0.91	1.04 $\pm$ 0.13
10 $\mu$ mol/L 组	3	1.91 $\pm$ 0.30	4.10 $\pm$ 0.38	8.23 $\pm$ 0.75	2.39 $\pm$ 0.36	5.32 $\pm$ 1.10	0.96 $\pm$ 0.11
20 $\mu$ mol/L 组	3	2.51 $\pm$ 0.23	4.53 $\pm$ 0.41	12.57 $\pm$ 1.09	4.94 $\pm$ 0.88	8.56 $\pm$ 1.89	1.04 $\pm$ 0.12
<i>F</i>		26.95	55.06	140.5	43.08	19.09	0.74
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	>0.05

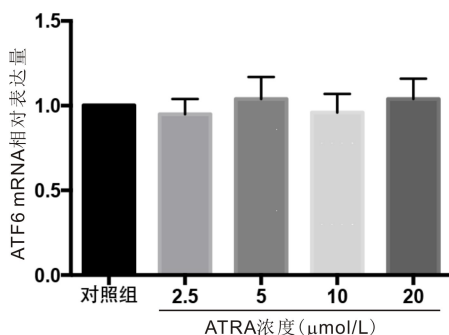


图4 不同浓度的 ATRA 处理 ARPE-19 细胞 24h, ATF6 通路中 ATF6 mRNA 表达水平。

### 3 讨论

ERS 与氧化应激、血管生成和细胞凋亡相关,被认为是 ARMD 发生发展的关键致病机制<sup>[10]</sup>。ERS 和未折叠蛋白反应(UPR)可由 ARMD 危险因素(如氧化、蛋白质毒性和代谢应激)和细胞因子引起,对视网膜变性疾病的研究证明,在其中 RPE 细胞中存在错误折叠的蛋白质分子<sup>[11]</sup>。UPR 的主要功能是维持正常的内质网功能和保护细胞免受环境损伤<sup>[12]</sup>,其中大部分和 ERS 相关的途径是由 BIP 调节的<sup>[13-14]</sup>。BIP 是一种重要的内质网伴侣,调节 ERS 相关通路,并防止错误折叠和展开的蛋白质的积累,其表达是由 ERS 和错误折叠的蛋白质触发的<sup>[15-16]</sup>。这个重要的内质网伴侣防止错误折叠和未折叠蛋白的积累,其表达是由 ERS 和错误折叠蛋白触发的<sup>[17-18]</sup>。在我们的研究中,经 ATRA 处理后的 ARPE-19 细胞中的 BIP 表达水平升高,说明 ERS 参与了这一实验过程。关于未折叠蛋白反应的信号途径,ERS 传感器引发的三种途径(PERK、IRE1 $\alpha$  和 ATF6)在细胞 ERS 方面最受关注<sup>[19]</sup>。大多数数据支持这样一种观点,即 CHOP 是由 PERK/EIF2 $\alpha$ /ATF4 以及 IRE1 $\alpha$ /XBP1 和 ATF6 亚通路诱导的,从而激活促调

亡基因表达、恢复翻译起始并增加内腔的氧化电位<sup>[20]</sup>。CHOP 是 ERS 时 ATF4 转录因子的主要靶点和细胞凋亡的执行者<sup>[11]</sup>。CHOP 的许多转录靶点也与介导细胞凋亡有关。其中包括 Ero1 $\alpha$ 、GADD34 和 BIM。BIM 是一个仅 BH3 结构域的基因,启动线粒体凋亡途径,导致线粒体膜电势( $\Delta\psi_m$ )下降。任何通过线粒体呼吸链的电子传递损伤都会导致氧的不完全还原,最终导致 ROS 的形成<sup>[21]</sup>。CHOP 在 ERS 期间介导了 Ero1 $\alpha$  表达的激活,从而加重了应激细胞内质网中 ROS 的积累<sup>[22]</sup>。除了 PERK 介导的 UPR 外,研究还发现 IRE1 $\alpha$  有助于 ERS 应激诱导的细胞死亡<sup>[23]</sup>。IRE1 $\alpha$  有一个 RNase 结构域,在 ERS 应激下激活,Oakes 等发现 IRE1 $\alpha$  切割了通常抑制 caspase 2 合成的 microRNA<sup>[24]</sup>,从而引起 caspase 2 水平升高,最终导致细胞死亡<sup>[25]</sup>。也有研究发现在人脐静脉内皮细胞中当 IRE1 $\alpha$  途径被激活,CHOP 表达也会自发激活,ROS 生成增加,IRE1 $\alpha$  抑制剂 STF-083010 可有效降低 CHOP 的表达水平及 ROS 水平<sup>[26]</sup>。说明 PERK 及 IRE1 $\alpha$  介导的 UPR 均可能诱导 CHOP 的表达,并进一步导致 ROS 的积累。在本研究中,ATRA 通过 PERK-EIF2 $\alpha$ -ATF4 信号通路和 IRE1 $\alpha$ -XBP1 信号通路激活细胞 ERS。随着 ATRA 浓度的升高,相关通路的 mRNA 表达也随之升高。当以最高剂量孵育时,PERK 相关 mRNA 的表达趋势会变小,这可能归因于负反馈回路。PERK 激活在数小时内诱导 ATF4,并且在不久后诱导 ATF4 的转录靶点,PERK/ATF4 信号也具有负反馈环,在 1~2d 内抑制其活性<sup>[27]</sup>。先前的研究表明,EIF2 $\alpha$  抑制剂 Salubrinal,能显著降低 ATRA 诱导的 RPE 细胞凋亡水平<sup>[28]</sup>,与本文研究结果相符。ATRA 介导的活性氧过度产生是 ERS 诱导的 RPE 细胞凋亡的早期事件,并且通过抗氧化作用清除活性氧。抗氧化剂可能是一种有效地保护视网膜细胞免受过量 ATRA 侵害的策略。

尽管 ATRA 对视力是必不可少的,但这种分子在 RPE 细胞内的过度积累会导致细胞毒性。本研究从 ERS 的角度进行阐述,扩大了我们对 ATRA 对人 RPE 细胞毒性的认识,在减轻 ATRA 对细胞器有害作用的基础上,为靶向治疗开辟了新的途径。

#### 参考文献

- 1 Ambati J, Atkinson JP, Gelfand BD. Immunology of age-related macular degeneration. *Nat Rev Immunol* 2013;13(6):438-451
- 2 He SK, Yaung J, Kim YH, et al. Endoplasmic Reticulum stress induced by oxidative stress in retinal pigment epithelial cells. *Albrecht Von Graefes Arch Fur Klinische Und Exp Ophthalmol* 2008;246(5):677-683
- 3 Boulton M, Dayhaw-Barker P. The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes. *Eye (Lond)* 2001;15(pt 3):384-389
- 4 Maeda A, Maeda T, Golczak M, et al. Retinopathy in mice induced by disrupted all-trans-retinal clearance. *J Biol Chem* 2008;283(39):26684-26693
- 5 Masutomi K, Chen CH, Nakatani K, et al. All-trans retinal mediates light-induced oxidation in single living rod photoreceptors. *Photochem Photobiol* 2012;88(6):1356-1361
- 6 Sparrow JR, Wu Y, Kim CY, et al. Phospholipid meets all-trans-retinal: the making of RPE bisretinoids. *J Lipid Res* 2010;51(2):247-261
- 7 Li J, Cai XH, Xia QQ, et al. Involvement of endoplasmic Reticulum stress in all-trans-retinal-induced retinal pigment epithelium degeneration. *Toxicol Sci* 2015;143(1):196-208
- 8 Maeda A, Maeda T, Golczak M, et al. Involvement of all-trans-retinal in acute light-induced retinopathy of mice. *J Biol Chem* 2009;284(22):15173-15183
- 9 Chen Y, Okano K, Maeda T, et al. Mechanism of all-trans-retinal toxicity with implications for stargardt disease and age-related macular degeneration. *J Biol Chem* 2012;287(7):5059-5069
- 10 Oakes SA, Papa FR. The role of endoplasmic Reticulum stress in human pathology. *Annu Rev Pathol* 2015;10:173-194
- 11 Ariyasu D, Yoshida H, Hasegawa Y. Endoplasmic Reticulum (ER) stress and endocrine disorders. *Int J Mol Sci* 2017;18(2):E382
- 12 Cybulsky AV. Endoplasmic Reticulum stress, the unfolded protein response and autophagy in kidney diseases. *Nat Rev Nephrol* 2017;13(11):681-696
- 13 Ryoo HD. Long and short (timeframe) of endoplasmic Reticulum stress-induced cell death. *FEBS J* 2016;283(20):3718-3722
- 14 Pobre KFR, Poet GJ, Hendershot LM. The endoplasmic Reticulum (ER) chaperone BiP is a master regulator of ER functions; Getting by

with a little help from ERdj friends. *J Biol Chem* 2019;294(6):2098-2108

- 15 Hetz C, Mollereau B. Disturbance of endoplasmic Reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2014;15(4):233-249
- 16 Hiramatsu N, Chiang WC, Kurt TD, et al. Multiple mechanisms of unfolded protein response-induced cell death. *Am J Pathol* 2015;185(7):1800-1808
- 17 Hardy B, Raiter A. Peptide-binding heat shock protein GRP78 protects cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis. *J Mol Med (Berl)* 2010;88(11):1157-1167
- 18 Leitman J, Barak B, Benyair R, et al. ER Stress-Induced eIF2-alpha Phosphorylation Underlies Sensitivity of Striatal Neurons to Pathogenic Huntingtin. *PLoS One* 2014;9(3):e90803
- 19 Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 2011;334(6059):1081-1086
- 20 Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, et al. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic Reticulum. *Genes Dev* 2004;18(24):3066-3077
- 21 Shigemitsu Z, Manabe K, Hara N, et al. Methylseleninic acid and sodium selenite induce severe ER stress and subsequent apoptosis through UPR activation in PEL cells. *Chem Biol Interact* 2017;266:28-37
- 22 Dou GR, Sreekumar PG, Spee C, et al. Deficiency of alphaB crystallin augments ER stress-induced apoptosis by enhancing mitochondrial dysfunction. *Free Radic Biol Med* 2012;53(5):1111-1122
- 23 Li XZ, Zhu HF, Huang HZ, et al. Study on the effect of IRE1a on cell growth and apoptosis via modulation PLK1 in ER stress response. *Mol Cell Bio Chem* 2012;365(1-2):99-108
- 24 Upton JP, Wang LK, Han D, et al. IRE1alpha cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2. *Science* 2012;338(6108):818-822
- 25 Lai E, Teodoro T, Volchuk A. Endoplasmic Reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiol Bethesda Md* 2007;22:193-201
- 26 Hou Y, Wang XF, Lang ZQ, et al. Adiponectin is protective against endoplasmic Reticulum stress-induced apoptosis of endothelial cells in Sepsis. *Braz J Med Biol Res* 2018;51(12):e7747
- 27 Song BB, Scheuner D, Ron D, et al. Chop deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *J Clin Invest* 2008;118(10):3378-3389
- 28 Wu J, Gao ZY, Cui DM, et al. All-trans retinoic acid induces apoptosis of ARPE-19 cells via activation of reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress pathways. *Int J Ophthalmol* 2020;13(9):1345-1350