

基于 Pink-1/Parkin 信号通路补青颗粒含药血清对高糖诱导人晶状体上皮细胞线粒体自噬的影响

李文珊¹, 牛阳^{1,2*}, 南一¹, 马会明¹, 阙平¹, 马琼¹, 范博研¹, 潘雪军¹

(1. 宁夏医科大学, 银川 750004;

2. 宁夏医科大学回医药现代化省部共建教育部重点实验室, 银川 750004)

[摘要] 目的:探讨补青颗粒含药血清对高糖诱导的人晶状体上皮(HLE)细胞线粒体自噬的影响。方法:体外培养 HLE 细胞,空白组将 HLE 细胞在正常培养液中培养 48 h,模型组在空白组培养液中添加 30 mmol·L⁻¹葡萄糖,实验组在模型组基础上加入不同含药血清刺激培养 48 h。采用 CCK-8 法检测不同含药血清对高糖诱导的 HLE 细胞增殖活力的影响;利用免疫荧光技术及蛋白免疫印迹(Western blot)法检测 Pink-1, Parkin, p62 蛋白表达。结果:CCK-8 法结果显示模型组较空白组 HLE 细胞增殖活力增强($P < 0.01$);与模型组比较,杞菊组与补青颗粒高、中、低剂量组细胞增殖活力均降低($P < 0.01$);与杞菊组比较,补青颗粒中剂量组细胞增殖活力明显降低($P < 0.01$);补青颗粒不同剂量组间比较,补青颗粒中剂量组细胞增殖活力显著降低($P < 0.01$)。细胞免疫荧光结果显示 Pink-1, Parkin, p62 蛋白主要在细胞胞浆表达,细胞核内亦有少量表达。Western blot 结果显示与空白组比较,模型组 Pink-1, Parkin 表达增加($P < 0.01$), p62 表达降低($P < 0.01$);与模型组比较,杞菊组与补青颗粒中剂量组 Pink-1, Parkin 表达增加($P < 0.01$), p62 表达降低($P < 0.01$);与杞菊组比较,补青颗粒中剂量组 Pink-1, Parkin 表达增加($P < 0.01$, $P < 0.05$), p62 表达降低($P < 0.01$)。结论:补青颗粒对高糖诱导的 HLE 细胞线粒体自噬相关蛋白的表达有显著影响,线粒体自噬的改变可能是补青颗粒改善白内障发病的机制之一。

[关键词] 补青颗粒; 晶状体上皮细胞; 高糖; Pink-1/Parkin 通路; 线粒体自噬

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)14-0128-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017140128

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170427.1049.024.html>

[网络出版时间] 2017-04-27 10:49

Effect of Buqing Granules Medicated Sera on Mitochondrial Autophagy in High Glucose-induced Human Lens Epithelial Cells Based on Pink-1/Parkin Signaling Pathway

LI Wen-shan¹, NIU Yang^{1,2*}, NAN Yi¹, MA Hui-ming¹, QUE Ping¹, MA Qiong¹, FAN Bo-yan¹, PAN Xue-jun¹

(1. Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. Key Laboratory of Hui Medicine Modernization Co-sponsored by Province and Ministry of Education, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss the effect of Buqing granules-mediated sera on the human lens epithelial cells induced by high glucose. **Method:** Human lens epithelial (HLE) cell lines were cultured *in vitro*. HLE cells of blank control group were cultured in the normal nutrient solution for 48 h. In addition to that, model group was also added with 30.0 mmol·L⁻¹ glucose for 48 h. In addition to that, treatment group was also added with different medicated sera and cultured for 48 h. The cell's activity of proliferation was detected by CCK-8 assay. Protein expressions of Pink-1, Parkin, p62 were detected by Western blot. **Result:** According to CCK-8

[收稿日期] 20170212(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81560749)

[第一作者] 李文珊, 硕士, 从事中医药防治眼科疾病研究, Tel:15008675338, E-mail:362155935@qq.com

[通讯作者] *牛阳, 教授, 主任医师, 博士生导师, 从事中医内科及眼科疾病研究, Tel:0951-6880527, E-mail:niuyang@163.com

assay, model group showed a higher HLE cells proliferation activity than the blank group ($P < 0.01$). Compared with model group, the cell's activity of proliferation of Qiju group and high, middle and low-dose Buqing granules groups were lower ($P < 0.01$). Compared with Qiju group, the cell's activity of proliferation of middle-dose Buqing granules group was obviously decreased ($P < 0.01$). Among different Buqing granules groups, the cell's activity of proliferation of middle-dose Buqing Granules group was significantly decreased ($P < 0.01$). According to immunofluorescence staining, Pink-1, Parkin, p62 proteins were expressed mainly in cell cytoplasm and rarely in nuclei. According to Western blot, compared with blank group, protein expression levels of Pink-1, Parkin of model group were increased ($P < 0.01$), and p62 expression was decreased ($P < 0.01$). Compared with model group, protein expression levels of Pink-1, Parkin of Qiju group and middle-dose Buqing granules group were increased ($P < 0.01$), and p62 expression was decreased ($P < 0.01$). Compared with Qiju group, protein expression levels of Pink-1, Parkin of middle-dose Buqing granules group were increased ($P < 0.01$), and p62 expression was decreased ($P < 0.01$). **Conclusion:** Buqing granules have a significant effect on protein expressions related to mitochondrial autophagy of HLE cells induced by high glucose. The change in mitochondrial autophagy may be one of the mechanisms of Buqing Granules in alleviating cataract.

[**Key words**] Buqing granules; lens epithelial cells; high glucose; Pink-1/Parkin signaling pathways; mitochondrial autophagy

线粒体是细胞的能量工厂,通过氧化磷酸化为细胞的生存提供能量和生物合成的底物,当线粒体在代谢过程中受到损伤,会释放促凋亡蛋白,导致细胞凋亡。为维持细胞的正常活动,受损伤或不需要的线粒体会以“线粒体自噬”的方式被清除掉^[1]。研究发现^[2-4],在高葡萄糖刺激下“线粒体自噬”蛋白的改变能够导致晶状体丧失对应激的抵抗或晶状体分化,最终导致白内障。Pink-1/Parkin 信号传导通路是线粒体自噬依赖的重要通路,在调控晶状体上皮细胞应激损伤的过程中发挥着重要作用^[5]。当细胞受到病理因素的刺激而导致线粒体受损时,可通过 Pink-1/Parkin 通路诱导受损线粒体自噬,其与白内障的发生关系密切^[6]。在这个过程中 p62 也被募集到线粒体上,启动了线粒体自噬^[7]。

补青颗粒出自《杨氏家藏方》,具有补肝益肾,利水消肿功效。前期研究显示^[8]其能减轻 D-半乳糖性白内障大鼠晶状体中脂质过氧化损伤程度,增强机体的抗氧化能力。同时还使 D-半乳糖性白内障的发生、发展得到不同程度的抑制^[9]。本研究拟以人晶状体上皮(HLE)细胞为研究对象,观察其正常及受损伤时 Pink-1/Parkin 通路上 Pink-1, Parkin, p62 蛋白表达的变化及应用补青颗粒含药血清干预后对其变化的影响,探讨补青颗粒治疗糖尿病性白内障的机制,为中医药治疗糖尿病性白内障的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠,75 只,清洁级,体重

(200 ± 20)g,由宁夏医科大学实验动物中心提供,动物合格证号 SCXK(宁)2016-0001。所有工作的进行均符合宁夏医科大学动物实验相关条件及动物实验伦理审查委员会的相关要求。

1.2 药品与试剂 补青颗粒出自《杨氏家藏方》,组成为菟丝子 20 g,熟地黄 20 g,枸杞子 20 g,车前子 10 g,地骨皮 10 g,茯苓 20 g,甘菊花 10 g。制剂由宁夏医科大学药学院制备,用蒸馏水配制成高、中、低质量浓度 4,2,1 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混悬液备用。杞菊地黄丸(兰州佛慈制药股份有限公司,批号 15H62,用蒸馏水配制成质量浓度为 1 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混悬液备用)。DMEM/F-12 培养基(GlutaMAX™,北京九州天瑞科技有限公司,批号 10565042),D-葡萄糖(美国 Sigma 公司,批号 AQJS-0080),胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号 051126),Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒(日本 Donjindo 公司,货号 CK04)。免疫荧光试剂盒(中国博士德生物公司),HRP 标记山羊抗兔 IgG 抗体(美国 Santa Cruz 公司,货号 ZB-2301),全蛋白抽提试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司,批号 C510003),封闭液(美国 Rockford Pierce 公司),浓缩型 SABC-FITC(小鼠 IgG,美国 Rockford Pierce 公司)。SDS-PAGE 凝胶电泳试剂盒,蛋白免疫印迹(Western blotting)检测试剂盒(南京凯基生物发展有限公司,批号分别为 PE0018,KGPI201);Anti-Pink1 antibody(Abcam 公司,批号 ab23707);Rabbit Anti-Parkin antibody,Rabbit Anti-SQSTM1 antibody(北京博奥森生物技术有限公司,

批号分别为 bs-1865R, bs-2951R)。

1.3 细胞 人晶状体上皮细胞永生系 SR01/04(细胞编号 6550),由美国 Sciencell 公司提供。

1.4 仪器 HS-840U 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),T02323 型细胞培养箱(力新仪器有限公司),Model680 型酶标仪(美国 BIO-RAD 公司),5804-R 型超速低温冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司),DYY-7c 型电泳仪(北京六一仪器厂),F-4600 型荧光分光光度计(日本 Hitachi 公司),BL310/BL21S 型分析天平(德国 Sartorius 公司)。

2 方法

2.1 补青颗粒的准备及含药血清的制备

2.1.1 补青颗粒的准备 延续使用本课题组前期实验研究所制备补青颗粒^[9]。药材加 8 倍量水煎煮 2 h,滤过,煎液另存;药渣再加 7 倍量水煎煮 1.5 h,过滤,合并 2 次煎液,静置 24 h,取上清液浓缩至比重为 1.06 的清膏,干燥,粉碎成细粉,加入辅料,混匀,制成颗粒,干燥,即得。

2.1.2 动物分组与含药血清的制备 SD 大鼠按随机数表法分为补青颗粒高、中、低剂量组,杞菊地黄丸组(以下简称杞菊组),空白组,每组 15 只,分别以补青颗粒水溶液 10,5,1 g·kg⁻¹,杞菊地黄丸水溶液 5 g·kg⁻¹,蒸馏水 10 g·kg⁻¹,灌胃给药 2 次/d,连续给药 7 d,于末次给药 1 h 后乙醚麻醉,腹主动脉采血,将所采血液室温条件下放置 3~4 h,以 3 000 r·min⁻¹离心 10 min,分离的血清即为含药血清,存放于 -80 °C 冰箱备用。

2.2 晶状体上皮细胞的体外培养及高糖模型的制备

2.2.1 晶状体上皮细胞的体外培养 将晶状体上皮细胞 SRA01/04 悬液以 2 × 10⁵ 个/mL 密度接种于 25 cm² 的培养瓶中,于 37 °C,5% 的 CO₂ 饱和适度的培养箱培养;2~3 d 换液 1 次,置于显微镜下观察细胞形态及生长情况,待细胞贴壁达 80%~90% 时,弃培养基后用磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗涤细胞,加入 0.25% 含 EDTA 胰蛋白酶 3 mL 进行消化,于显微镜下观察,待细胞明显收缩,间隙变大,开始脱落时,加入完全培养基终止消化;反复吹打细胞成单个并计数,收集细胞悬液置于 15 mL 离心管中,以 1 000 r·min⁻¹离心 5 min,弃上清液后加入含 10% 胎牛血清、青霉素(100 U·mL⁻¹)和链霉素(100 mg·L⁻¹)的 RPMI 1640 培养液重悬,按 1:2 比例进行传代培养。收集 P3 代细胞用于实验。

2.2.2 高糖模型的制备 本课题组前期研究结果

表明^[9],当高糖浓度在 30 mmol·L⁻¹时,细胞增殖活性达到峰值,且随着高糖暴露时间的延长,在 48 h 时细胞的增殖活力更加显著^[10]。细胞传代、贴壁 24 h 后弃细胞液,PBS 清洗 2 次后给予 30 mmol·L⁻¹葡萄糖培养 24 h,即可造成本实验所需细胞模型。

2.3 细胞培养液的制备及分组给药

2.3.1 培养液的制备 空白组培养液:1640 培养基 + 空白组血清(血清浓度均为培养体系的 10%);模型组培养液:含 30 mmol·L⁻¹葡萄糖 1640 培养基 + 空白组血清;阳性组培养液:模型组培养液 + 杞菊组血清;补青颗粒高、中、低浓度培养液:模型组培养液 + 补青颗粒高、中、低浓度组血清。

2.3.2 分组与给药 空白组给予该组血清培养液进行干预;模型组给予高糖血清培养液进行干预;杞菊组给予杞菊地黄丸血清培养液进行干预;实验组分别给予补青血清高、中、低浓度培养液进行干预。

2.4 指标检测

2.4.1 细胞计数板计数(CCK)-8 法检测不同含药血清对高糖诱导下 HLE 细胞的增殖活力 取对数生长期的人晶状体上皮细胞,以 0.25% 胰酶消化,计数,接种于 96 孔板内,每孔 100 μL,使每孔细胞密度为 1 × 10⁴ 个。培养 24 h 后弃培养液,每孔给予 100 μmol·L⁻¹ 含葡萄糖(30 mmol·L⁻¹)的 1640 培养基培养细胞,每组设 6 个平行孔,并设空白调零孔。37 °C 培养 24 h 弃培养液后,每孔加入 100 μmol·L⁻¹ 上述 6 组培养液即空白血清组,模型组,杞菊血清组,补青血清高、中、低浓度组。培养 24 h 后弃上清液,于避光条件下每孔加入 CCK-8 混合液 100 μL(CCK-8-1640 为 1:10)37 °C 继续培养 4 h 后,置于微孔板分光光度计 450 nm 波长处,分别检测各组的吸光度 A。

$$\text{细胞活性} = A_{\text{实验组}} / A_{\text{空白组}} \times 100\%$$

2.4.2 细胞免疫荧光技术检测蛋白 Pink-1, Parkin, p62 的表达 取对数生长期的人晶状体上皮细胞,以 1 × 10⁵ 个/mL 细胞密度接种于 6 孔细胞培养板中,置于 37 °C 5% CO₂ 培养 24 h。后弃培养基,PBS 清洗 3 次,4% 多聚甲醛固定 10 min。取出预冷 4 °C PBS 清洗 4 次,每次 5 min。5% BSA 室温下封闭 1 h。分别加入 Pink-1, Parkin, p62 多克隆抗体(1:200),4 °C 孵育过夜湿盒保湿。后吸净液体,4 °C PBS 清洗 4 次,每次 5 min。避光加入二抗(1:100),37 °C 孵育 1 h。避光吸净液体,4 °C PBS 清洗 4 次,每次 5 min。加入 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)30 μL。后避光吸净液体,4 °C PBS 清洗

2 次,每次 5 min,取出盖玻片,吸净液体,滴加甘油 PBS,将盖玻片倒扣在载玻片上,用荧光显微镜观测并采集图像。

2.4.3 Western blot 法检测 Pink-1, Parkin 和 p62 蛋白表达水平 根据文献[11]中的具体步骤, BAC 法测定蛋白浓度后,取蛋白样品 15 μg 进行 SDS-PAGE 电泳,转膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入 Pink-1, Parkin 和 p62 一抗(1:1 000)4 ℃ 孵育过夜;漂洗后加入 HRP 标记的二抗(1:5 000)常温孵育 2 h;置于 ECL 化学发光剂中,显影,定影,X 射线片压片曝光,凝胶成像系统测定 Pink-1, Parkin 和 p62 蛋白表达水平。目标蛋白水平用相应条带灰度与 β-actin 的比值,以对照组比值作为 100% 进行标准化。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。CCK-8 实验所测值的比较采用重复测量的方差分析。免疫荧光技术检测蛋白表达的定位, Western blot 法检测蛋白表达量, 5 组间的比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 SNK 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 补清颗粒对 HLE 细胞增殖活力的影响 与空白组比较,模型组细胞增殖活力增高($P < 0.01$);与模型组比较,杞菊组与补清颗粒高、中、低剂量组细胞增殖活力均降低($P < 0.01$);与杞菊组比较,补清颗粒中剂量组细胞增殖活力明显降低($P < 0.01$);补清颗粒不同剂量组间比较,补清颗粒中剂量组细胞增殖活力降低明显($P < 0.01$)。见表 1。

3.2 补清颗粒中剂量组对 HLE 细胞 Pink-1, Parkin 和 p62 蛋白表达的影响 Pink-1, Parkin 和 p62 蛋白

表 1 补清颗粒对各组 HLE 细胞增殖活力的影响($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Table 1 Effect of Buqing granules on HLE cells' proliferation activity of each group($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	质量浓度/g·mL ⁻¹	A
空白	-	0.101 ± 0.018
模型	-	0.613 ± 0.078 ¹⁾
杞菊地黄丸	1.0	0.424 ± 0.042 ²⁾
补清颗粒	4.0	0.461 ± 0.126 ^{2,4)}
	2.0	0.214 ± 0.014 ^{2,3)}
	1.0	0.411 ± 0.126 ^{2,4)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与杞菊地黄丸组比较³⁾ $P < 0.01$;与补清颗粒中剂量组比较⁴⁾ $P < 0.01$ 。

均主要表达于细胞质中,细胞核内亦有少量表达。见图 1。

3.3 补青颗粒对 HLE 细胞中 Pink-1 蛋白相对表达的影响 与空白组比较,模型组 Pink-1 表达增加($P < 0.01$);与模型组比较,杞菊组与补清颗粒中剂量组 Pink-1 表达均增加($P < 0.05, P < 0.01$);与杞菊组比较,补清颗粒中剂量组 Pink-1 表达增加($P < 0.01$)。见图 2,表 2。

3.4 补青颗粒对 HLE 细胞中 Parkin 蛋白相对表达的影响 与空白组比较,模型组 Parkin 表达增加($P < 0.01$);与模型组比较,杞菊组与补清颗粒中剂量组 Parkin 表达均增加($P < 0.01$);与杞菊组比较,补清颗粒中剂量组 Parkin 表达增加($P < 0.01$)。见图 2,表 2。

3.5 补青颗粒对 HLE 细胞中 p62 蛋白相对表达的影响 与空白组比较,模型组 p62 表达降低($P < 0.01$);与模型组比较,杞菊组与补清颗粒中剂量组 p62 表达均降低($P < 0.01$);与杞菊组比较,补清颗粒中剂量组 p62 表达降低($P < 0.01$)。见图 2,表 2。

表 2 补青颗粒中剂量组对 HLE 细胞中 Pink-1, Parkin, p62 相对表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Table 2 Effect of middle-dose Buqing granules group on relative protein expressions of Pink-1, Parkin, p62 in HLE cells($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	质量浓度/g·mL ⁻¹	Pink-1/β-actin	Parkin/β-actin	p62/β-actin
空白	-	1.370 ± 0.157	0.729 ± 0.106	0.638 ± 0.137
模型	-	1.538 ± 0.113 ¹⁾	1.044 ± 0.197 ²⁾	0.434 ± 0.085 ¹⁾
杞菊地黄丸	1.0	1.693 ± 0.135 ³⁾	1.353 ± 0.106 ⁴⁾	0.288 ± 0.013 ²⁾
补清颗粒	2.0	2.157 ± 0.256 ^{4,5)}	1.882 ± 0.176 ^{4,5)}	0.211 ± 0.089 ^{2,3)}

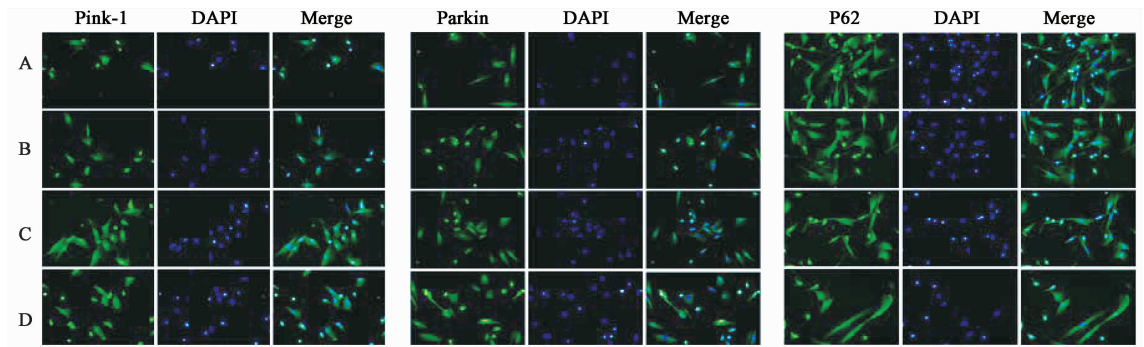
注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05, ^2) P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05, ^4) P < 0.01$;与杞菊地黄丸组比较⁵⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

糖尿病性白内障(diabetic cataract, DC)是一组由胰岛素分泌缺陷,或胰岛素作用缺陷导致的以慢性血糖增高为特征的代谢性疾病^[12]。DC 的病理基础主要为晶状体上皮细胞的损伤。人晶状体上皮细胞是位于晶状体前囊内面直至赤道部的一单层细胞,在晶状体结构中代谢活跃,是唯一具有分裂活性

的细胞。晶状体上皮细胞的异常增殖可打破晶状体内环境的稳态,导致晶状体浑浊,是诱发白内障的主要因素之一。

补青颗粒出自《杨氏家藏方》,由枸杞子、熟地黄、当归、菊花、茯苓、车前子、菟丝子、地骨皮组成。全方寓补肝益肾,利水消肿明目于一体,达标本兼治之效。这正与糖尿病性白内障的治疗法则“滋补肝



A. 空白组; B. 模型组; C. 杞菊组; D. 补青中剂量组 (图 2 同); DAPI. 核酸和染色体复染; Merge. 重叠

图 1 补青颗粒中剂量组对 HLE 细胞 Pink-1, Parkin, p62 蛋白表达的影响 (免疫荧光, $\times 400$)

Fig. 1 Effect of middle-dose Buqing granules group on protein expressions of Pink-1, Parkin, p62 in HLE cells (Immunocytochemistry, $\times 400$)

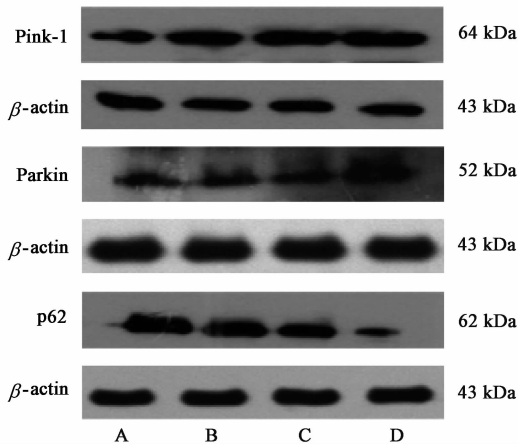


图 2 补青颗粒中剂量组对细胞 Pink-1, Parkin, p62 蛋白含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Fig. 2 Effect of middle-dose Buqing granules group on protein expression contents of Pink-1, Parkin, p62 in HLE cells ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

肾”相吻合。

本实验结果显示,在高浓度葡萄糖的刺激下,人晶状体上皮细胞的增殖活力增加,再一次验证了本课题组前期研究的高糖诱导晶状体上皮细胞增殖活力的结论。CCK-8 实验结果显示,在高糖诱导 HLE 细胞增殖的实验基础上,给予不同浓度补青颗粒含药血清和杞菊地黄丸含药血清干预 24 h 后,细胞增殖活力显著降低。即两种含药血清对高糖诱导的晶状体上皮细胞的增殖活力均有不同程度的抑制作用。其中中浓度的补青颗粒含药血清对 HLE 细胞增殖活力影响最为突出。

线粒体自噬是机体选择性清除受损线粒体,维持细胞内环境稳态的一种自我保护性应激反应^[13]。线粒体自噬过程可分为自噬诱导和受损线粒体启动两个阶段,涉及多个信号通路。其中线粒体膜电位的降低可导致 Pink-1/Parkin 通路介导的线粒体自噬^[14]。线粒体功能障碍是糖尿病性白内障发生的

重要机制之一,高糖能导致线粒体膜电位下降^[15]。多项研究表明, Pink-1 和 Parkin 蛋白参与了膜电位降低引起的线粒体自噬的发生^[16-17]。Pink-1 是一种哺乳动物细胞线粒体外膜蛋白,由细胞核编码后在细胞质中合成,最后被转运至线粒体外膜,正常情况下, Pink-1 蛋白通过线粒体膜电位依赖的降解作用被转运至线粒体内膜后迅速水解,从而在外膜维持较低水平^[18-21]; Parkin 蛋白是一个 E3 泛素连接酶,大量研究发现^[22], Parkin 几乎不同程度地表达于人体所有组织,主要存在于细胞质中,其能与线粒体转录因子 A 结合,增强线粒体活性, p62 是一种泛素结合蛋白,也是自噬的选择性底物之一,在胞浆中以散在点状或者聚集形式存在,在线粒体自噬过程中发挥适配子功能。当线粒体膜电位降低时, Pink-1 蛋白向内膜转运途径受阻,大量聚集于线粒体外膜,在受损线粒体外膜上高表达,同时募集胞浆蛋白 Parkin,使其转位到线粒体外膜后被磷酸化激活,与此同时, p62 通过电压依赖性阴离子通道蛋白 1 在线粒体膜上聚集,进一步泛素化线粒体外膜上的融合分裂蛋白,促使线粒体自噬发生,清除受损线粒体^[23]。

本研究结果显示,通过免疫荧光的方法,笔者观测到蛋白 Pink-1, Parkin 及 p62 均大量表达于细胞质,胞核亦有少量表达。生理状态下,晶状体上皮细胞中 Pink-1 和 Parkin 含量较低,当用 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的高浓度葡萄糖诱导时,细胞受到高糖的刺激,线粒体自噬被激活, Pink-1 和 Parkin 表达量较正常状态时有所升高,在给予补青颗粒干预后,其表达量显著增加;而蛋白 p62 在正常晶状体上皮细胞中含量较高,当线粒体自噬被启动时,消耗量增大,其表达量较正常状态时下降,给予补青颗粒干预后,其表达量显著下降。这就提示,补青颗粒可能通过干预 Pink-1/Parkin 通路介导线粒体自噬选择性清除晶状体上

皮细胞内受损线粒体,降低受损线粒体在晶状体上皮细胞中的聚集量,从而减轻高糖对晶状体上皮细胞的损伤,最终维持晶状体的透明性;试验中用补青颗粒含药血清进行干预后,Pink-1, Parkin 蛋白表达量增加,p62 蛋白表达量降低,很可能是因为补青颗粒能增强自噬的活性来实现的,但更为详尽的机制仍未被证实,还需进一步研究。

综上所述,补青颗粒在改善因高糖引起的,以晶状体上皮细胞混浊为特征的白内障发挥着积极的防治作用。因此,积极探索中医药对眼部功能的保护作用及其机制研究,对于白内障的防治具有重要意义,而挖掘整理中医药治疗 DC 对于发挥中医药的优势至关重要。

[参考文献]

[1] Ginter E, Simko V. Global prevalence and future of diabetes mellitus [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 771 (9):35-41.

[2] Brennan L A, Kantorow W L, Chauss D, et al. Spatial expression patterns of autophagy genes in the eye lens and induction of autophagy in lens cells [J]. *Mol Vis*, 2012, 18 (17):1773-1786.

[3] Costello M J, Brennan L A, Basu S, et al. Autophagy and mitophagy participate in ocular lens organelle degradation [J]. *Exp Eye Res*, 2013, 116(5):141-150.

[4] Morishita H, Eguchi S, Kimura H, et al. Deletion of autophagy-related 5 (Atg5) and Pik3c3 genes in the lens causes cataract independent of programmed organelle degradation [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288 (16): 11436-11447.

[5] Ivatt R M, Whitworth A J. The many faces of mitophagy [J]. *EMBO Rep*, 2014, 15(1): 5-6.

[6] Narendra D, Tanaka A, Suen D F, et al. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy [J]. *J Cell Biol*, 2008, 183 (5):795-803.

[7] Gilkerson R W, De Vries R L, Lebot P, et al. Mitochondrial autophagy in cells with mtDNA mutations results from synergistic loss of transmembrane potential and mTORC1 inhibition [J]. *Hum Mol Genet*, 2012, 21 (5):978-990.

[8] 邓自辉,牛阳,王荣,等.补青汤不同提取方式防治大鼠 D-半乳糖性白内障的对比试验 [J]. *辽宁中医杂志*, 2013, 40(1):173-175.

[9] 邓自辉,牛阳,王荣,等.补青颗粒防治大鼠 D-乳糖性白内障的研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19 (13):205-208.

[10] 任洁,牛阳,袁玲,等.高浓度葡萄糖对人晶状体上皮细胞增殖、周期及迁移的影响 [J]. *宁夏医科大学学*

报, 2015, 37(6):669-672.

[11] 刘敬霞,任非非,刘会贤,等.扎里奴思方干预骨髓间充质干细胞移植对脑缺血再灌注损伤大鼠突触结构可塑性的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22 (12):144~151.

[12] 李文珊,牛阳.中医药治疗糖尿病性白内障的优势与思考 [J]. *中国老年学杂志*, 2016, 17(36):4367-4369.

[13] Lemasters J J. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging [J]. *Rejuvenation Res*, 2005, 8(1):3-5.

[14] 柏杖勇,李清华. PINK1/parkin, 线粒体自噬与帕金森病 [J]. *中国老年学杂志*, 2014, 5(34):2609-2613.

[15] ZHANG Y, Babcock S A, HU N, et al. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) protects against streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy: role of GSK3beta and mitochondrial function [J]. *BMC Med*, 2012, 10(2):40-45.

[16] Narendra D, Tanaka A, Suen D F, et al. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy [J]. *J Cell Biol*, 2008, 183 (5):795-803.

[17] Narendra D P, Jin S M, Tanaka A, et al. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin [J]. *PLoS Biol*, 2010, 8(1):e1000298.

[18] Greene A W, Grenier K, Aguilera M A, et al. Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment [J]. *EMBO Rep*, 2012, 13(4):378-385.

[19] Kim Y, Park J, Kim S, et al. PINK1 controls mitochondrial localization of Parkin through direct phosphorylation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 377(3):975-980.

[20] Park J, Lee G, Chung J. The PINK1-Parkin pathway is involved in the regulation of mitochondrial remodeling process [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 378 (3):518-523.

[21] Vives-Bauza C, ZHOU C, HUANG Y, et al. PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2010, 107(1): 378-383.

[22] Iguchi M, Kujuro Y, Okatsu K, et al. Parkin-catalyzed ubiquitin-ester transfer is triggered by PINK1-dependent phosphorylation [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288 (30), 22019-22032.

[23] 陈易斯,宋福永.选择性自噬接头蛋白 p62/sequestosome1 的研究进展 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2016, 30(3):258-264.

[责任编辑 邹晓翠]