

玉米黄素对内质网应激引发的 SH-SY5Y 细胞凋亡的保护作用

商迎辉, 魏俊, 李梦洁, 刘芸如, 黄汉昌, 劳凤学*

(北京市生物活性物质和功能食品重点实验室 北京联合大学功能因子与脑科学研究院 北京 100191)

摘要 目的:研究玉米黄素对内质网应激引起的细胞凋亡的保护作用。试验分为空白对照组、衣霉素(TM)损伤组(5 μg/mL)、玉米黄素保护组(5 μmol/L)和损伤加保护组。采用 Caspase 3 试剂盒检测 Caspase 3 活性的变化;采用 Western Blot 法测定凋亡相关蛋白 PERK、CHOP,PERK 下游信号分子 eIF2α 和 ATF4,以及自噬相关蛋白 Beclin 1。结果显示:与 TM 模型组相比,玉米黄素处理后 PERK 及其下游调控蛋白 eIF2α 和 ATF4 的表达水平显著下降($P<0.01$),Beclin 1 的水平显著升高($P<0.01$)。与未加自噬抑制剂相比,玉米黄素组的 GRP78 水平显著升高($P<0.01$)。与对照组相比,TM 模型组的 CHOP 蛋白的表达水平极显著升高($P<0.01$),而玉米黄素处理组 CHOP 蛋白的表达水平极显著低于 TM 模型组($P<0.01$)。结论:玉米黄素能减轻由内质网应激引起的损伤作用,并且可逆转 TM 引起的损伤。其作用机制是:玉米黄素通过抑制 PERK 通路,进而抑制 GRP78 与 ERS 感受器的分离,降低促凋亡因子 CHOP 的水平,通过调控保护性自噬来缓解 ERS。

关键词 玉米黄素;内质网应激;SH-SY5Y 细胞;细胞凋亡

文章编号 1009-7848(2023)07-0037-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.07.005

阿尔茨海默症(Alzheimer's disease,AD)是一种退行性疾病。全球每 3 s 会有 1 位痴呆症患者产生,目前至少有 5 000 万痴呆症患者,到 2050 年,预计将达到 1.52 亿人,其中 60%~70% 是 AD 患者^[1]。在中国目前约有 1 000 万阿尔茨海默症患者,到 2050 年,预计将超过 4 000 万人^[2]。目前阿尔茨海默症的发病机制不明,并缺乏有效的预防、诊断及治疗方法^[3]。阿尔茨海默症病理症状出现前,内质网应激(Endoplasmic reticulum stress,ERS)被激活,错误折叠蛋白质增多,引发内质网内稳态的失衡,是 AD 的早期事件^[4]。当神经元中发生内质网应激后,未折叠蛋白反应(Unfolded-protein response,UPR)被激活,并引起下游一系列相关蛋白信号的表达^[5-7]。3 种感受器参与 UPR,包括 PKR 样 ER 调节激酶(PKR-like ER kinase,PERK)、抑制物阻抗性酯酶 1α(Inositol-requiring enzyme-1α,IRE1α)和活化转录因子 6(Activating transcription factor 6,ATF6)^[8]。

类胡萝卜素是天然的脂溶性抗氧化剂,在水果和蔬菜中作为彩色色素大量存在,至少有 600 种类胡萝卜素是天然存在的^[9]。其中,玉米黄素

(Zeaxanthin,Zea)是一种具有强抗氧化活性的类胡萝卜素^[10],以中药枸杞子中含量最多^[11]。玉米黄素有 3 种立体异构体,分别是(3R,3'R)型、(3R,3'S)型和(3S,3'S)型,自然界中绝大多数以(3R,3'R)型存在(分子结构见图 1)。其分子中的 11 个共轭双键与尾端基团的羟基,使得它们具有较强的抗氧化能力。研究表明,叶黄素/玉米黄素异构体能够通过改善神经营养因子和突触蛋白以及大脑皮层的氧化能力来有效减少神经变性^[12]。玉米黄素具有穿过血脑屏障并在神经组织中积累的能力,且存在 β 环,可能会防止形成或破坏 β-淀粉样蛋白的聚集,因此玉米黄素等类胡萝卜素具有预防和治疗 AD 的巨大潜力^[13]。

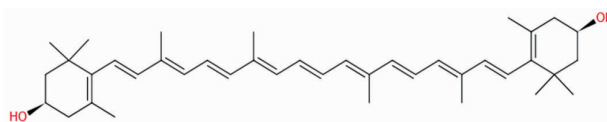


图 1 玉米黄素分子结构式

Fig.1 Molecular structural formula of zeaxanthin

衣霉素(Tunicamycin, TM)作为天然抗生素现已广泛应用于内质网应激模型^[14-15],进而引起细胞凋亡^[16-17]。研究表明,TM 诱导的持续 UPR 表达导致软骨细胞凋亡,并激活自噬与 GRP78 的结合^[18]。课题组前期研究发现^[19],TM 质量浓度为 5 μg/mL

收稿日期:2022-07-10

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31471587)

第一作者:商迎辉,女,硕士,高级实验师

通信作者:劳凤学 E-mail: fengxue@buu.edu.cn

时,可对 SH-SY5Y 细胞造成损伤;建立有效 ERS 模型,2~10 $\mu\text{mol/L}$ 玉米黄素可明显减轻 TM 损伤,其中浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$,预处理 6 h,保护效果最好。本试验采用 5 $\mu\text{g/mL}$ TM 处理建立 ERS 细胞模型,5 $\mu\text{mol/L}$ 玉米黄素对其进行干预,研究玉米黄素通过 PERK/CHOP 通路对 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响,对 AD 的靶点治疗提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

玉米黄素(纯度为 85.7%,无水乙醇溶解,配制成 30 mmol/L 的储存液,避光于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存),上海源叶生物科技有限公司。

TM 用 DMSO 溶解,配制成 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的储存液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,北京华越洋生物科技有限公司;神经母瘤细胞(SH-SY5Y),中国医学科学院细胞资源中心;3-甲基腺嘌呤,美国 Selleckchem 公司;胎牛血清、1640 培养基,美国 Gibco;L-谷氨酰胺、羟乙基哌嗪乙硫磺酸、双抗,北京 Solarbio 公司;BCA 试剂盒,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;Caspase 3 活性检测试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司;Anti-PERK、Anti-p-eIF2 α 、Anti-ATF4、Anti- β -actin 和 Anti-CHOP 抗体,美国 Sigma 公司;Anti-GRP78 抗体,美国 Bioworld Technology 公司;Anti-Beclin 抗体,跨国 BD Transduction Laboratories 公司;辣根过氧化物酶山羊抗鼠 IgG (H+L),中杉金桥公司。

1.2 仪器与设备

E1911R 型 CO_2 细胞培养箱,美国金西盟公司;CKX41 倒置显微镜,Olympus 公司;Varioskan Flash 多功能酶标仪,美国赛默飞世尔科技公司;5043BR57802 转膜装置,BIO-RAD 公司;凝胶成像分析仪,Image Quant RTECL 公司。

1.3 方法

1.3.1 SH-SY5Y 细胞培养 复苏 SH-SY5Y 细胞,在含有 10%胎牛血清的 RPIM 1640 培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养,选择对数生长期的细胞进行传代培养。

1.3.2 细胞内质网应激损伤模型的建立 将 SH-SY5Y 细胞用胰酶消化、细胞计数,接种于培养皿

内, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 条件下培养 24 h,以达到贴壁状态,弃去上清液,加入由 RPIM 1640 培养液配制的 TM 溶液。TM 处理 36 h 后,提取细胞蛋白,进行后续试验。

1.3.3 细胞试验分组 细胞培养过程同 1.3.1 所述方法,细胞试验分为空白对照组、玉米黄素保护组、TM 损伤组、损伤加保护组,TM 损伤组使用 5 $\mu\text{g/mL}$ TM 处理 36 h,玉米黄素保护组使用 5 $\mu\text{mol/L}$ 玉米黄素预处理 6 h,损伤加保护组为 5 $\mu\text{mol/L}$ 玉米黄素预处理 6 h 后再加入 5 $\mu\text{g/mL}$ TM 处理 36 h。

1.3.4 检测 Caspase 3 活性 细胞培养及处理过程同 1.3.1 和 1.3.3 节,Caspase 3 活性根据检测试剂盒说明书进行检测。收集经处理后的 SH-SY5Y 细胞,并用细胞裂解液收集总蛋白,Bradford 法对总蛋白定量后与 Caspase 3 底物 Ac-DEVD-pNA 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 2 h,发现颜色变化比较明显时,用酶标仪在 405 nm 波长处测量吸光度 OD 值。将 TM 组的 Caspase 3 的活性定义为 100%。使用公式(1)计算 Caspase 3 活性。

$$\text{Caspase 3 活性}(\%) = \frac{\text{OD}_{\text{试验组}}}{\text{OD}_{\text{TM组}}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.5 Western Blot 分析 使用预冷的 PBS 将药物处理后的细胞洗涤 2~3 次,加入适量 RIPA 细胞裂解液(含蛋白酶抑制剂),置于冰上 30 min,12 000 r/min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min,收集上清,BCA 方法测定蛋白浓度。按体积比 1:4 将 5 \times SDS 上样缓冲液加入到剩余上清液中,煮沸 5 min, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存蛋白样品。样品采用 SDS-PAGE 电泳分离,转移到 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,一抗孵育 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜。TBST 洗涤 3 次,室温下用二抗孵育 2 h,TBST 慢速摇动 10 min,洗涤 3 次。ECL 发光液检测 PVDF 膜上条带的光密度值,用 β -actin 作为内参,分析条带的灰度值。

1.4 数据分析

数据测定结果采用“平均值 \pm 标准差”表示,每组试验做 3 组平行,SPSS 19.0 数据分析,Origin 7.5 绘制图表。试验组与对照组比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),用 Bonferroni 法多重比较, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 极显著差异。

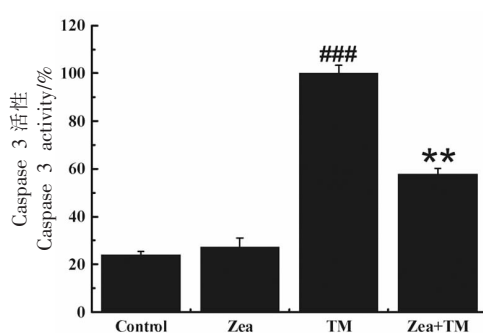
2 结果与分析

2.1 玉米黄素对 ERS 细胞模型中 Caspase 3 的影响

促进凋亡的 Caspase (Cysteine-requiring aspartate protease) 家族在 ERS 导致的细胞凋亡过程中也起到重要作用, Caspase 在细胞凋亡中发挥关键性作用, 是哺乳动物细胞中研究较多的一个蛋白, 当细胞受损时, 可激活 Caspase 3, Caspase 3 激活后能够特异性剪切许多特定的凋亡底物, 引发细胞凋亡。除此之外, Caspase 3 可导致染色体固缩、DNA 片段化等一系列导致细胞核凋亡的事件。因此, 用 Caspase 3 试剂盒对各组细胞进行检测, 并按要求将 TM 处理后的 ERS 细胞模型组的 Caspase 3 活性定义为 100%。结果如图 2 所示, 可以看出, 经过 5 $\mu\text{mol/L}$ 玉米黄素处理后, 其 Caspase 3 活性显著低于 ERS 模型组 ($P<0.01$)。因此可以初步判断, 玉米黄素能抑制 TM 引起的 Caspase 3 活性的上升, 对凋亡具有一定的作用。至于对凋亡早期阶段和晚期阶段的影响还需试验进一步说明。

2.2 玉米黄素作用于 ERS 细胞模型后对凋亡的影响

2.2.1 玉米黄素通过抑制 PERK 通路来缓解 ERS 引起的凋亡 PERK 蛋白是细胞内一种重要的 UPR 近端感受器, 当神经元中引发内质网应激后, PERK 会与 GRP78 解离, 并且可通过跨膜磷酸化而传到 ERS 反应信号。并通过磷酸化下游翻译起始因子 (Eukaryotic initiation factor 2, eIF2) 的 α 亚基进而抑制细胞内蛋白质合成, 同时活化转录活化因子 4 (ATF4), 上调促凋亡因子 CHOP, 促进细胞的程序性死亡。



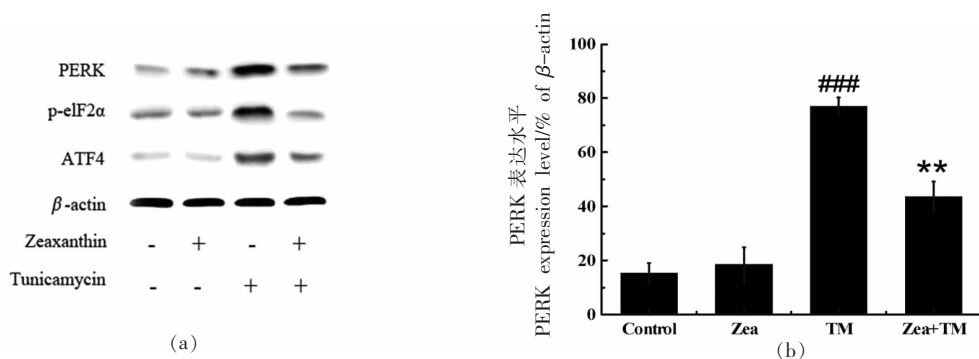
注: 与对照组相比, #. $P<0.05$; ##. $P<0.01$; ###. $P<0.005$; 与 TM 组相比, *. $P<0.05$; **. $P<0.01$; ***. $P<0.005$, 下同。

图 2 玉米黄素对 TM 诱导后的 SH-SY5Y 细胞 Caspase 3 活性的影响

Fig.2 Effect of zeaxanthin on caspase 3 activity of SH-SY5Y cells damaged by TM

因此在 ERS 产生后, PERK 通路的异常变化对神经细胞的凋亡产生重要影响。为探究玉米黄素能否在 ERS 细胞模型中对 PERK-eIF2 α 通路产生影响, 用 Western Blot 同时检测了 PERK 及其下游的 eIF2 α 蛋白和 ATF4 蛋白的表达情况。结果如图 3 所示, 与 TM 模型组相比, 当 5 $\mu\text{mol/L}$ 的玉米黄素作用于 ERS 模型细胞后, 结果显示 PERK 及其下游调控蛋白 eIF2 α 和 ATF4 的表达能显著下降 ($P<0.01$), 说明玉米黄素可通过调控 PERK 通路来缓解 SH-SY5Y 细胞的内质网应激, 可能机制是阻止 PERK 蛋白与 GRP78 的分离。

2.2.2 玉米黄素抑制促凋亡因子 CHOP 的产生 CHOP 是 PERK 通路下游的蛋白, 是细胞从抗凋亡向促凋亡转换的一种关键信号因子。为进一步探究玉米黄素对 ERS 细胞模型的保护作用机制, 同时对各组的 CHOP 蛋白进行分析, Western Blot 结果如图 4 所示, 与对照组相比, TM 模型组的



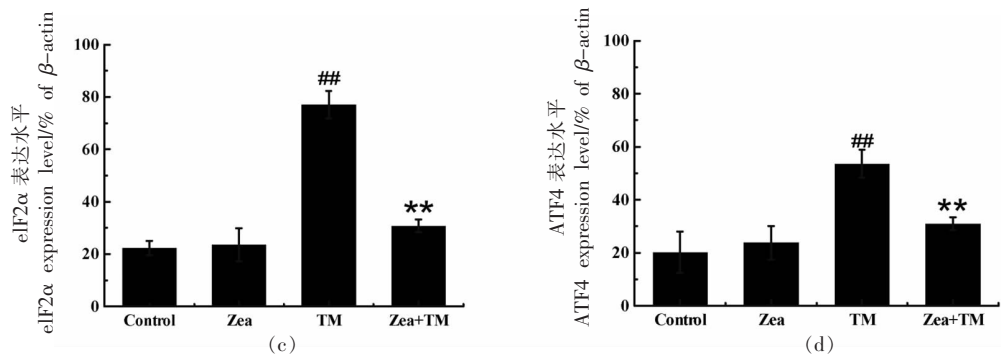
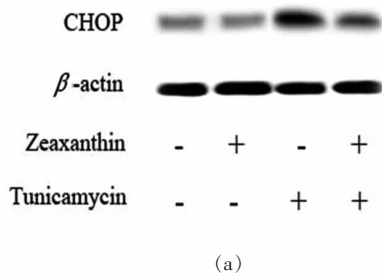


图3 玉米黄素对 ERS 模型中 PERK 通路的影响

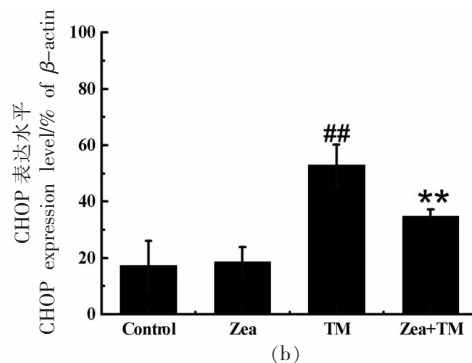
Fig.3 Effect of zeaxanthin on PERK pathway in ERS model

CHOP 蛋白的表达水平极显著升高 ($P<0.005$), 而玉米黄素处理组 CHOP 蛋白的表达水平极显著低于 TM 模型组 ($P<0.01$), 这说明玉米黄素可以通过

调控 PERK 通路来抑制 ERS 细胞模型中促凋亡蛋白 CHOP 的升高。



(a)



(b)

图4 玉米黄素对 ERS 模型中 CHOP 表达水平的影响

Fig.4 Effect of zeaxanthin on CHOP expression in ERS model

2.3 玉米黄素作用于 ERS 细胞模型后对自噬的影响

2.3.1 玉米黄素缓解 ERS 引起的自噬 自噬溶酶体系统是清除错误蛋白和损伤细胞器的一个复杂的系统, 对维持细胞内稳态平衡发挥着重要作用。越来越多的研究表明, 内质网应激可诱导自噬^[20], 并且指出自噬是发生在内质网应激过程中的一种适应性反应, 然而这些研究相继报道了自噬在细胞死亡中的双重作用, 即它可以保护细胞使其免于凋亡, 而自噬的过度激活也会促进内质网应激诱导细胞死亡^[21-22]。

为了阐明玉米黄素作用于 ERS 细胞模型后的保护作用与自噬之间的关系, 深入研究了玉米黄素作用于 ERS 细胞模型后自噬标志性蛋白 Beclin 1 的变化。Beclin 1 基因是被证实的哺乳动物

的自噬基因, 在自噬体的形成过程中至关重要^[23]。如图 5 所示, TM 作用 24 h 后玉米黄素组的 Beclin 1 水平明显高于 TM 组, 结果有极显著差异 ($P<0.01$), 说明在初期阶段玉米黄素组自噬水平显著增强, 然而当 TM 作用 36 h 后, TM 组 Beclin 1 的水平持续升高, 没有降低的趋势, 而玉米黄素组的 Beclin 1 水平与 TM 组相比极显著降低 ($P<0.01$), 由此可以说明玉米黄素能在 ERS 初始阶段促进自噬, 当 ERS 持续存在时, 玉米黄素又能稳定自噬水平。可能的原因是, 在 ERS 初期阶段, 错误折叠及未折叠蛋白增多, 此阶段玉米黄素能促进自噬对错误蛋白或未折叠蛋白进行清除降解, 此时的自噬是作为细胞的一种保护性机制, 然而当 ERS 长期且持续进行时, 细胞内产生的错误蛋白及未折叠蛋白增多至超出负荷, 细胞应激失去控

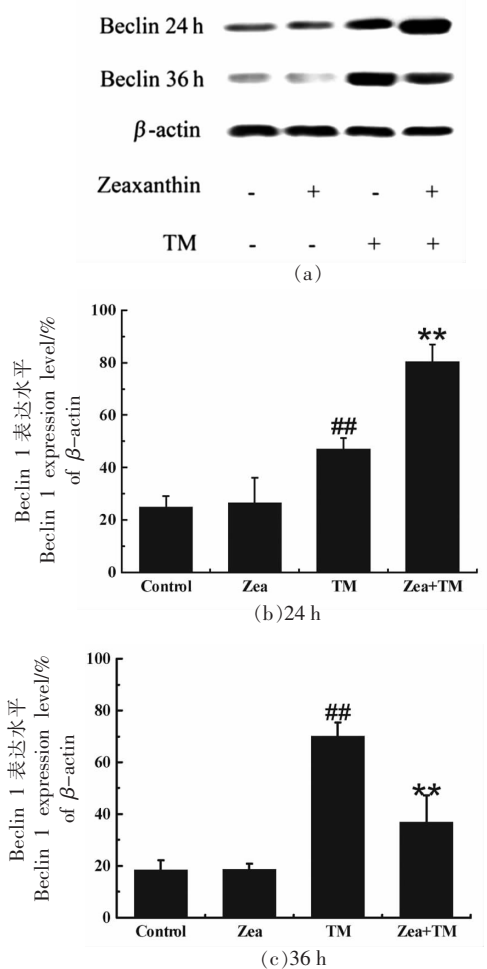


图 5 玉米黄素对 ERS 模型中 Beclin 1 表达水平的影响

Fig.5 Effects of zeaxanthin on Beclin 1 expression in ERS model

制,激活的自噬无法正常发挥功能,为防止自噬功能紊乱导致的细胞死亡,玉米黄素在此阶段可以降低自噬,避免自噬导致的细胞死亡。而 TM 组由于没有玉米黄素的调控,自噬持续增加,最终导致失控而引起细胞死亡。

2.3.2 抑制自噬会减弱玉米黄素对 ERS 的缓解作用 为了进一步明确玉米黄素对 ERS 细胞模型的保护作用与自噬之间的关系,研究采用自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤 (3-Methyladenine, 3MA) 进一步检测自噬被抑制后玉米黄素对细胞内 ERS 的影响。3MA 是细胞试验中常用的自噬抑制剂,可抑制自噬体的形成^[24]。用自噬抑制剂 3MA 抑制自噬后,分析 Beclin 1 和 GRP78 的变化情况,以深入探究玉米黄素在 ERS 细胞模型中与自噬的

关系。细胞分组后,自噬抑制组用 10 mmol/L 3MA 预处理 6 h 后,加入 5 μ g/mL TM 继续处理 36 h。由图 6 的 Western Blot 结果可知,加入 3MA 后,无论是 TM 组还是玉米黄素组 (Zea+TM) Beclin 1 的表达水平均降低,表明自噬被抑制,且内质网应激标志性蛋白 GRP78 的表达水平均高于未添加组。从图 6b 柱形图也可直观的看出,加入 3MA 抑制自噬后,玉米黄素组的 GRP78 水平与未加 3MA 的玉米黄素组相比极显著升高 ($P < 0.01$),说明自噬被抑制后玉米黄素缓解 ERS 的能力被减弱。综合以上结果证明玉米黄素对 SH-SY5Y 细胞中内质网应激的缓解作用与自噬的调控有关,抑制自噬会减弱玉米黄素对 ERS 的缓解作用。

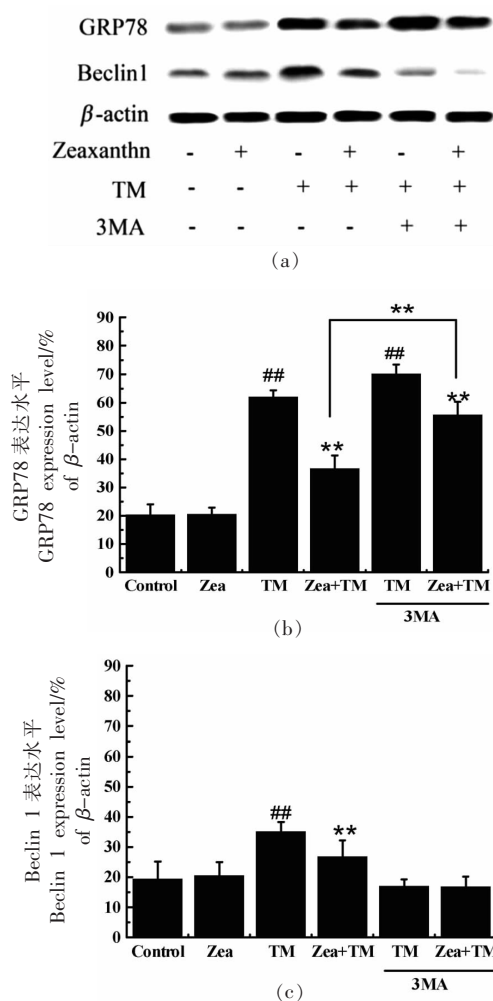


图 6 自噬抑制剂会减弱玉米黄素对 ERS 的缓解作用

Fig.6 Autophagy inhibitor decreased the alleviative effect of zeaxanthin on ERS cell model

3 讨论

AD作为一种中枢神经系统退行性疾病,是威胁老年人群健康的较常见的危险疾病。多数在65岁之后发病,少于5%的患者在65岁之前发病。中国在步入老龄化阶段后,AD的患病率将逐年升高,尤其随着人均寿命延长,这不仅会使AD患者生活质量下降,还会给照顾者、家庭和公共卫生部门造成巨大负担^[25]。针对AD治疗的药物无法完全治愈本病,对AD的治疗策略更加注重早期预防^[26]。蛋白质构象变化和蛋白质错误折叠是AD病理生理学的关键事件,因此,ERS也是其一^[27],且发生在AD早期,是一种早期的应激性反应^[28]。长期过度的ERS会激活凋亡和自噬且发挥反面作用导致自噬功能紊乱,过度的自噬也会引起细胞死亡^[29]。因此探讨通过有效的生物活性物质来调控ERS,进而抑制早期AD病理,具有重要意义。

多项研究表明类胡萝卜素对AD具有保护作用,最近一项通过系统评价和荟萃分析的研究显示,血浆中的玉米黄素浓度与AD风险呈负相关^[30]。此外,类胡萝卜素的酮 β -环和 κ -环,可能防止或抑制 β -淀粉样蛋白的聚集。研究显示,玉米黄素通过激活AKT信号通路抑制氧化应激缓解高糖诱导的系膜细胞凋亡^[31],也可以通过调控细胞周期等信号途径抑制细胞凋亡^[32]。一项流行性调查发现,膳食类胡萝卜素可能会限制自由基对神经元的损伤,增加叶黄素和玉米黄素的摄入量可能有助于预防或减缓认知能力下降^[33]。因此,玉米黄素可能具有预防或治疗AD的潜力。

本研究用TM建立SH-SY5Y细胞内质网应激模型,研究玉米黄素对ERS引起的细胞凋亡的机制,进而探究其在预防AD中的潜力。试验结果表明,玉米黄素能抑制TM引起的凋亡蛋白Caspase 3的活性;下调ERS模型中PERK及其下游调控蛋白eIF2 α 和ATF4的表达,抑制促凋亡蛋白CHOP的升高。在ERS初期阶段,自噬作为细胞的一种保护性机制,玉米黄素能促进自噬,然而当ERS长期且持续进行时,激活的自噬失常,为防止自噬功能紊乱导致的细胞死亡,玉米黄素在此阶段可以降低自噬,避免自噬功能紊乱造成的细胞死亡。

综上所述,玉米黄素对内质网应激引起的神

经细胞损伤具有保护作用,具体机制可能是通过调控PERK/CHOP通路,缓解并抑制细胞凋亡来实现的。

参 考 文 献

- [1] ASSOCIATION A. 2020 Alzheimer's disease facts and figures[J]. *Alzheimer's & Dementia*, 2020, 16(3): 391-392.
- [2] CHRISTINA P. World Alzheimer Report 2018 The state of the art of dementia research; New frontiers [EB/OL]. *Alzheimer's Disease International*, World Alzheimer Report 2018. <https://www.alzint.org/resource/world-alzheimer-report-2018/>
- [3] FISH P V, STEADMAN D, BAYLE E D, et al. New approaches for the treatment of Alzheimer's disease[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2019, 29(2): 125-133.
- [4] XING F, HUI H, HE Y, et al. Roles of endoplasmic reticulum stress in NECA-induced cardioprotection against ischemia/reperfusion injury[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017(20): 1-10.
- [5] MURAO N, NISHITOH H. Role of the unfolded protein response in the development of central nervous system[J]. *Journal of Biochemistry*, 2017, 162(3): 155-162.
- [6] LIU P P, XIE Y, MENG X Y, et al. History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2019, 4: 29.
- [7] HETZ C, SAXENA S. ER stress and the unfolded protein response in neurodegeneration[J]. *Nature Reviews Neurology*, 2017, 13(8): 477-491.
- [8] ZHANG M, HAN N, JIANG Y, et al. EGFR confers radioresistance in human oropharyngeal carcinoma by activating endoplasmic reticulum stress signaling PERK-eIF2 α -GRP94 and IRE1 α -XBP1-GRP78[J]. *Cancer Medicine*, 2018, 7(12): 6234-6246.
- [9] JOHRA F T, BEPARI A K, BRISTY A T, et al. A mechanistic review of β -carotene, lutein, and zeaxanthin in eye health and disease[J]. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 2020, 9(11): 1046.
- [10] ZHAO B, LIU M, LIU H, et al. Zeaxanthin promotes browning by enhancing mitochondrial biogene-

- sis through the PKA pathway in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Food & Function*, 2021, 12(14): 6283-6293.
- [11] 廉洁. 有利于眼睛保健的食品[J]. *家庭中医药*, 2021, 28(7): 28-29.
- LIAN J. Foods that is beneficial for eye health[J]. *Family & Traditional Chinese Medicine*, 2021, 28(7): 28-29.
- [12] CEMAL O, FUSUN E, BESIR E, et al. Lutein/zeaxanthin isomers regulate neurotrophic factors and synaptic plasticity in trained rats[J]. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 2021, 51(4): 2167-2176.
- [13] LAKEY-BEITIA J, DOENS D, JAGADEESH KUMAR D, et al. Anti-amyloid aggregation activity of novel carotenoids: Implications for Alzheimer's drug discovery[J]. *Clinical Interventions in Aging*, 2017, 12: 815-822.
- [14] BRODNANOVA M, HATOKOVA Z, EVINOVA A, et al. Differential impact of imipramine on thapsigargin- and tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction in neuroblastoma SH-SY5Y cells[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2021, 902: 174073.
- [15] ALBAYRAK D, DOĞANLAR O, ERDOĞAN S, et al. Naringin combined with NF- κ B inhibition and endoplasmic reticulum stress induces apoptotic cell death via oxidative stress and the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP axis in HT29 colon cancer cells [J]. *Biochemical Genetics*, 2021, 59(1): 159-184.
- [16] AFSAR E, KIRIMLIOGLU E, ÇEKER T, et al. Effect of ER stress on sphingolipid levels and apoptotic pathways in retinal pigment epithelial cells[J]. *Redox Biology*, 2020, 30: 101430.
- [17] CHEN Y, ZHANG H, CHEN Y, et al. Resveratrol alleviates endoplasmic reticulum stress-associated hepatic steatosis and injury in mice challenged with tunicamycin [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2020, 64(14): e2000105.
- [18] WU H, MENG Z, JIAO Y, et al. The endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin affects the viability and autophagy activity of chondrocytes [J]. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2020, 34(10): e23437.
- [19] 魏俊, 赵范范, 刘馨君, 等. 玉米黄素对衣霉素诱导的SH-SY5Y细胞损伤的保护作用[J]. *食品科学*, 2019, 40(7): 163-168.
- WEI J, ZHAO F F, LIU X J, et al. Protective effect of zeaxanthin on SH-SY5Y cell injury induced by tunicamycin[J]. *Food Science*, 2019, 40(7): 163-168.
- [20] KIRIYAMA Y, NOCHI H. The function of autophagy in neurodegenerative diseases[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(11): 26797-26812.
- [21] DAI R, ZHANG S, DUAN W, et al. Enhanced autophagy contributes to protective effects of GM1 ganglioside against A β 1-42-induced neurotoxicity and cognitive deficits[J]. *Neurochemical Research*, 2017, 42(8): 2417-2426.
- [22] YI M, ZHANG L, LIU Y, et al. Autophagy is activated to protect against podocyte injury in adriamycin-induced nephropathy[J]. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 2017, 313(1): F74-F84.
- [23] KIHARA A, KABEYA Y, OHSUMI Y, et al. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network[J]. *EMBO Reports*, 2001, 2(4): 330-335.
- [24] WU Y T, TAN H L, SHUI G, et al. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(14): 10850-10861.
- [25] SARA E L, JEM B, ADELINA C H. World Alzheimer Report 2019 Attitudes to dementia [EB/OL]. *Alzheimer's Disease International, World Alzheimer Report 2019*. <https://www.alzint.org/u/WorldAlzheimerReport2019-Summary.pdf>
- [26] CAO J, HOU J, PING J, et al. Advances in developing novel therapeutic strategies for Alzheimer's disease [J]. *Molecular Neurodegeneration*, 2018, 13(1): 64.
- [27] SINGH R, KAUR N, DHINGRA N, et al. Protein misfolding, ER stress and chaperones: An approach to develop chaperone-based therapeutics for Alzheimer's disease [J]. *The International Journal of Neuroscience*, 2023, 133(7): 714-734.
- [28] KEHOE E G, MCNULTY J P, MULLINS P G, et al. Advances in MRI biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease [J]. *Biomarkers in Medicine*, 2014, 8(9): 1151-1169.

- [29] ZARE-SHAHABADI A, MASLIAH E, JOHNSON G V, et al. Autophagy in Alzheimer's disease[J]. *Reviews in the Neurosciences*, 2015, 26(4): 385-395.
- [30] QU M, SHI H, WANG K, et al. The associations of plasma/serum carotenoids with Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis[J]. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 2021, 82(3): 1055-1066.
- [31] YING C, CHEN L, WANG S, et al. Zeaxanthin ameliorates high glucose-induced mesangial cell apoptosis through inhibiting oxidative stress via activating AKT signalling-pathway[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacothera-*
- pie*, 2017, 90: 796-805.
- [32] 章丽娜, 李梦洁, 商迎辉, 等. 玉米黄素对衣霉素诱导的 SH-SY5Y 细胞周期、自噬、凋亡的保护作用[J]. *食品科学*, 2021, 43(7): 112-119.
- ZHANG L N, LI M J, SHANG Y H, et al. Protective effect of zeaxanthin on tunicamycin-induced cell cycle arrest, autophagy and apoptosis of SH-SY5Y cells[J]. *Food Science*, 2021, 43(7): 112-119.
- [33] CHRISTENSEN K, GLEASON C E, MARES J A. Dietary carotenoids and cognitive function among US adults, NHANES 2011-2014[J]. *Nutritional Neuroscience*, 2020, 23(7): 5545-5562.

Protection of Zeaxanthin on Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis in SH-SY5Y Cells

Shang Yinghui, Wei Jun, Li Mengjie, Liu Yunru, Huang Hanchang, Lao Fengxue*

(Beijing Key Laboratory of Bioactive Substances and Functional Foods, Institute of Functional Factors and Brain Science, Beijing Union University, Beijing 100191)

Abstract Objective: To study the protective effect of zeaxanthin on endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. The research was divided into blank control group, TM injury group (5 $\mu\text{g/mL}$), zeaxanthin protection group (5 $\mu\text{mol/L}$) and injury plus protection group. The Caspase 3 activity detection kit is used for detecting changes of Caspase 3 enzyme activity. The apoptosis-related proteins PERK and CHOP, the downstream signal molecules eIF2 α and ATF4 of PERK, and the autophagy-related protein Beclin 1 were determined by Western Blot. The results showed that compared with the TM model group, the expressions of PERK and its downstream regulatory proteins eIF2 α and ATF4 after zeaxanthin treatment were significantly decreased ($P<0.01$), and the level of Beclin 1 was significantly increased ($P<0.01$). The level of GRP78 in the zeaxanthin group was significantly higher than that in the absence of 3MA autophagy inhibitor ($P<0.01$). Compared with the control group, the CHOP protein expression level in the TM model group was significantly increased ($P<0.01$), while the CHOP protein expression level in the zeaxanthin treatment group was significantly lower than that in the TM model group ($P<0.01$). Conclusion: Zeaxanthin can reduce the damage caused by endoplasmic reticulum stress and reverse the damage caused by TM to a certain extent. The mechanism is that by inhibiting the PERK pathway and further inhibiting the separation of GRP78 and ERS receptors, the level of pro-apoptotic factor CHOP is reduced, and alleviate ERS by regulating protective autophagy.

Keywords zeaxanthin; endoplasmic reticulum stress; SH-SY5Y cells; cell apoptosis