

自噬相关基因在早产儿视网膜病变模型视网膜组织中的表达及临床意义

王洁¹ 郑运亮² 杜尔罡¹

1. 浙江中医药大学附属第一医院 杭州 310006 2. 浙江大学医学院附属第一医院

摘要: [目的] 探讨自噬相关基因 P62、微管相关蛋白轻链 3-Ⅱ (microtubule associated protein light chain 3-Ⅱ, LC3-Ⅱ) 和自噬相关基因 5 (autophagy related genes 5, ATG5) 在早产儿视网膜病变 (retinopathy of prematurity, ROP) 动物模型视网膜组织中的表达情况及其临床意义。[方法] 将 18 只出生 7d 的 C57BL/6 小鼠分为 3 组, ROP 模型组 6 只小鼠放入高氧装置构建 ROP 模型, 自噬干预组 6 只小鼠玻璃体腔注射自噬激活剂雷帕霉素 (rapamycin, RAPA) 后放入高氧装置, 正常对照组 6 只小鼠饲养在正常环境中。采用荧光造影视网膜血管灌注观察各组小鼠视网膜血管的变化; 定量实时聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR) 检测各组 P62、LC3-Ⅱ 和 ATG5 的 mRNA 表达水平的变化。[结果] ROP 模型构建成功, ROP 模型组小鼠视盘周围大片无灌注区, 周边视网膜血管异常迂曲; 自噬干预组玻璃体腔注射 RAPA 后, 视盘周围无灌注区减少。与正常对照组比较, ROP 模型组 P62 mRNA 表达升高 ($P < 0.01$), LC3-Ⅱ 和 ATG5 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.05$); 与 ROP 模型组比较, 自噬干预组 P62 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$), 而 LC3-Ⅱ 和 ATG5 mRNA 表达水平升高, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$, $P > 0.05$)。[结论] ROP 的发生发展可能与视网膜组织自噬活性降低有关。

关键词: 视网膜病变; 早产儿; 自噬活性; 视网膜血管; P62; LC3-Ⅱ; ATG5

中图分类号: R331 文献标识码: A 文章编号: 1005-5509(2020)05-0426-04

DOI: 10.16466/j.issn1005-5509.2020.05.004

Expression and Clinical Significance of Autophagy Related Genes in the Retina of Mice Model of Retinopathy of Prematurity WANG Jie¹, ZHENG Yunliang², DU Ergang¹ 1. The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310006), China; 2. The First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University

Abstract: [Objective] To investigate the expression of P62, microtubule associated protein light chain 3-Ⅱ (LC3-Ⅱ) and autophagy related genes 5 (ATG5) in the retina of mice model of retinopathy of prematurity (ROP) and to explore their correlations in the development of ROP. [Methods] Eighteen C57BL/6 infant mice were divided into three groups, six mice in ROP model group were exposed to (75±0.5)% oxygen from postnatal day-of-life 7 (P7) to P12, after which they were brought into room air and raised to P17; six mice in autophagy intervention group were intravitreal injected with rapamycin (RAPA), then exposed to (75±0.5)% oxygen as ROP model group; six mice in normal control group were raised in normal environment. All mice underwent fluorescein angiography of the retinal vasculature on P17. The mRNA expression of P62, LC3-Ⅱ and ATG5 in the retina tissue was assessed by quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR). [Results] The ROP model was successfully constructed. In ROP model group, there was a large non perfusion area around the optic disc, and the peripheral retinal vessels were abnormal tortuous. After injecting autophagy agonist into the vitreous cavity, the nonperfusion area around the optic disc decreased in autophagy intervention group. Compared with normal control group, the mRNA expression of P62 increased in ROP model group ($P < 0.01$), the expression of LC3-Ⅱ and ATG5 decreased ($P < 0.05$, $P < 0.05$). Compared with ROP model group, the mRNA expression of P62 decreased in autophagy intervention group ($P < 0.05$); while the expression of LC3-Ⅱ and ATG5 increased, but the difference were not statistically significant ($P > 0.05$, $P > 0.05$). [Conclusion] The development of ROP may be related to the decrease of autophagy activity in the retina.

Key words: retinopathy; prematurity; autophagy activity; retinal vasculature; P62; LC3-Ⅱ; ATG5

早产儿视网膜病变 (retinopathy of prematurity, ROP) 是一种发生于早产儿和低出生体重婴幼儿的视网膜血管增生性疾病。临床上重度 ROP 表现为视网膜新生血管、视网膜出血、玻璃体腔积血伴牵拉性视网

膜脱离等, 严重影响患儿视功能和生活质量, 给家庭和社会带来沉重的经济压力。随着围生医学的不断发展, 早产儿的存活率不断增高, ROP 的发病率也逐年上升。ROP 病因众多, 发病机制复杂, 确切的病理机制

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (LQ18H120003、LY19H280011); 浙江省医药卫生科技计划项目 (2018KY554)

Fund projects: Zhejiang Provincial Natural Science Foundation Project (LQ18H120003, LY19H280011); Zhejiang Provincial Medical and Health Science and Technology Project (2018KY554)

通讯作者: 郑运亮, E-mail: ylzhen2007@zju.edu.cn

仍不明确。目前关于ROP的研究主要集中于视网膜血管的改变,临床上以抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)治疗为主,但是疗效有限,患儿视力预后不佳^[1],鲜有研究关注视网膜细胞本身的变化。研究证实,细胞自噬在视网膜疾病和功能障碍发生过程中具有重要作用,视网膜细胞代谢失衡所引起的细胞自噬与多种眼底疾病的发生发展密切相关。在温和应激反应条件下,激活自噬有助于视网膜细胞存活;而严重应激反应容易导致自噬过度激活,又可引发视网膜细胞死亡^[2]。因此本研究拟从视网膜自噬活性改变的角度入手,以期阐明ROP的发病机制及临床防治提供新的思路和研究方向。

1 材料和方法

1.1 实验动物 SPF级C57BL/6孕鼠18只购于上海斯莱克实验动物有限公司[实验动物生产许可证号码:SCXK(沪)2017-0005],于浙江中医药大学动物实验中心SPF级屏障系统饲养和繁殖[实验动物使用许可证号码:SYXK(浙)2018-0012]。实验动物饲养和干预遵循浙江中医药大学的动物伦理操作要求。

1.2 主要试剂和仪器 P62、微管相关蛋白轻链3-II(microtubule-associated protein light chain 3-II, LC3-II)、自噬相关基因5(autophagy-related gene 5, ATG5)引物购于上海生工生物有限公司(批号:900170023);FITC-Dextran、雷帕霉素(rapamycin, RAPA)购于美国Sigma公司(批号:FD2000S、553211);RNA提取及PCR荧光定量试剂盒均购自日本TAKARA公司(批号:639542、639505);复方托吡卡胺购自日本参天制药有限公司(批号:H20057919)。PCR仪为美国ABI公司产品;LSM880激光共聚焦显微镜购于德国卡尔蔡司光学有限公司。

1.3 ROP动物模型的构建 将18只C57BL/6乳鼠分为3组,ROP模型组6只C57BL/6乳鼠出生后7d(postnatal day of life, P7)和母鼠一同放置在氧浓度为(75±0.5)%的高氧装置中饲养5d(至P12),然后取出乳鼠和母鼠,置于正常氧浓度环境下饲养,至鼠龄17d(P17)^[3]。控制室温(22±2)℃,光照12h循环。正常对照组6只乳鼠从出生到P17均随母鼠生活在正常氧浓度环境下,室温及光照时间同ROP模型组。

1.4 ROP动物模型的自噬干预 自噬干预组6只乳鼠P7放入高氧装置前行RAPA玻璃体腔注射。4%水合氯醛0.01mL/g腹腔注射麻醉后,以1滴复方托吡卡胺

滴眼液滴眼散大瞳孔,解剖显微镜下采用10μL微量注射器经角膜缘后约0.5mm的位置向右眼玻璃体腔注入1μL浓度为1nmol·μL⁻¹的RAPA,左眼注入1μL无菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)。术后以氧氟沙星眼膏涂眼。小鼠苏醒后与母鼠共同放入高氧装置饲养5d至P12,然后取出小鼠在正常氧浓度环境下饲养至P17,饲养条件同ROP模型组。

1.5 荧光素视网膜血管灌注 P17造模结束后,从3组中各选小鼠3只,仰卧固定后以4%水合氯醛0.01mL/g腹腔注射麻醉,小心剪开胸腔,暴露心脏。在50mg FITC-Dextran中加入1mL蒸馏水,配置FITC-Dextran灌注液。以FITC-Dextran灌注液缓慢行左心室灌注,并穿刺右心房作回流,持续约3min,小鼠口唇、鼻尖及趾尖呈黄绿色表示心脏灌注成功。CO₂麻醉处死小鼠后摘下双眼球,并以4%多聚甲醛固定2h。在显微镜下分离视网膜,将载玻片放入多聚甲醛溶液中,托出视网膜并铺平。中性树脂胶封片后盖上盖玻片,立即置于激光共聚焦显微镜下,观察小鼠视网膜血管形态并照相。

1.6 定量实时聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR) 检测小鼠视网膜组织自噬相关基因表达 P17造模结束后,从3组各选取余下小鼠3只,以CO₂麻醉处死小鼠,分离视网膜组织,按照Trizol试剂操作流程提取视网膜总RNA,按照操作说明书程序完成逆转录,并以实时荧光定量PCR仪进行扩增。反应条件:95℃ 3min, 95℃ 10s, 60℃ 30s,共48个循环。溶解曲线:从55℃开始,每30s升高0.5℃,直到95℃,循环1次。PCR引物序列见表1。各组小鼠视网膜中P62、LC3-II及ATG5的mRNA相对表达量采用公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算。

1.7 统计学分析 采用SPSS 19.0统计软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组数据均行正态性分析,符合正态分布的资料,两组间比较采用 t 检验;多组间比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ROP模型的建立 正常对照组小鼠视网膜血管自视盘向四周放射状均匀分布,血管分布规则整齐,无闭塞。见图1A。ROP模型组小鼠视盘周围视网膜见大片无灌注区,血管分支减少,中周边视网膜血管扭曲、扩张,可见大量新生血管。见图1B、C。证明本研究

表 1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

目的基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
P62	ACGCAGAACAGAGTTACGAAGGC	CCAGTCATCTTGTCCGTAGGCTTC
LC3-Ⅱ	TCGCCGACCGCTGTAAGGAG	CGCCGGATGATCTTGACCAACTC
ATG5	GCAAGCCAAGGAGGAGAAGATTCC	GTGTCTCAGCGAAGCACTGGTG
β -actin	GTGCTATGTTGCTCTAGACTTCG	ATGCCACAGATTCCATACC

ROP动物模型建立成功。

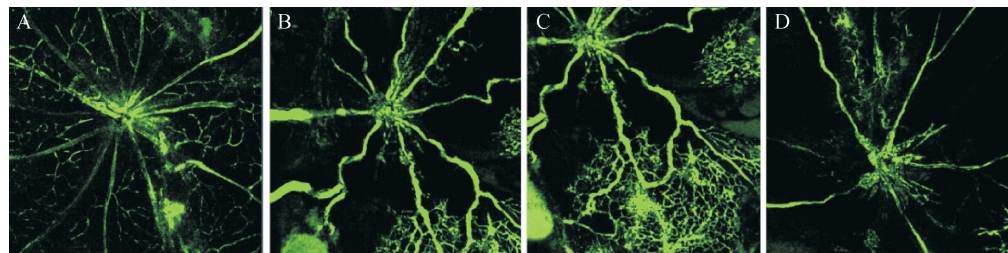
2.2 RAPA对视网膜血管的影响 自噬干预组小鼠视网膜铺片显示,视盘周围视网膜血管稀疏,无灌注区较ROP模型组减少。见图1D。提示RAPA干预后,视网膜无灌注区较前减少。

2.3 各组小鼠 P62、LC3-Ⅱ 及 ATG5 的 mRNA 表达比较 与正常对照组比较,ROP 模型组小鼠 P17 时 P62 的 mRNA 相对表达量由 1.00 ± 0.05 升高到 1.29 ± 0.06 ,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与 ROP 模型组比较,自噬干预组 P62 的 mRNA 相对表达量下降到 1.14 ± 0.07 ,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与正常对照组比较,ROP 模型组 LC3-Ⅱ 和 ATG5 的 mRNA 相对表

达量分别由 1.00 ± 0.10 、 1.00 ± 0.11 下降到 0.75 ± 0.09 和 0.81 ± 0.09 ,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.05$),自噬干预后 LC3-Ⅱ 和 ATG5 的 mRNA 相对表达量分别升高到 0.81 ± 0.05 、 0.87 ± 0.4 ,但是 ROP 模型组与自噬干预组间差异无统计学意义($P > 0.05$, $P > 0.05$)。见图 2。提示 ROP 模型组小鼠视网膜自噬活性发生改变。

3 讨论

ROP 是一种视网膜血管未发育完全,伴视网膜血管新生及纤维组织增生的眼部血管性视网膜病变,是早产儿及低出生体重儿主要致盲性眼病之一。目前临床上对 ROP 的诊断多聚焦在视网膜血管的改变上,比如后极部膨胀的小静脉和迂曲的小动脉被认为

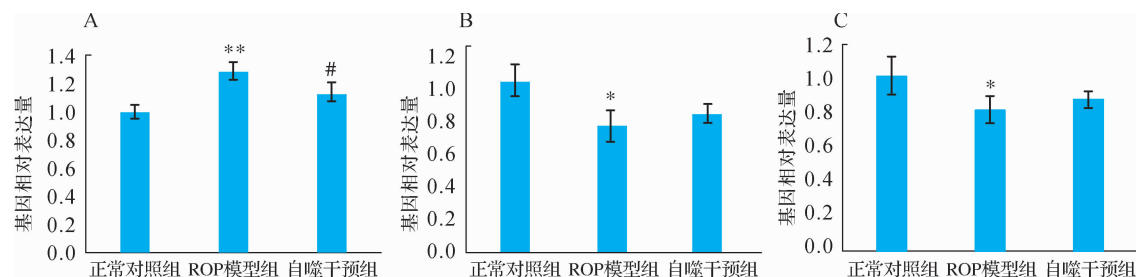


注:A.正常对照组;B.ROP 模型组;C.ROP 模型组;D.自噬干预组

Note: A.Normal control group; B. ROP model group; C.ROP model group; D.Autophagy intervention group

图 1 荧光造影视网膜血管形态观察(10 $\times$)

Fig.1 Fluorescein angiography of retinal blood vessels(10 $\times$)



注:A.P62;B.LC3-Ⅱ;C.ATG5。与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 ROP 模型组比较,# $P < 0.05$

Note: A.P62; B.LC3-Ⅱ; C.ATG5. Compared with normal control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with ROP model group, # $P < 0.05$

图 2 各组小鼠 P62、LC3-Ⅱ 和 ATG5 mRNA 水平比较

Fig.2 Comparison of mRNA expression of P62, LC3-Ⅱ, ATG5 in each group

是 ROP 发生的高危表现^[4]。但是 ROP 的特征不仅仅是视网膜血管异常,ROP 患者长期神经视网膜功能低下,说明其视网膜细胞也发生了功能障碍^[5]。本研究发现,ROP 发生发展过程中,除了视网膜血管发生异常增生改变外,视网膜细胞中自噬相关指标的活性也发生了改变。

自噬是细胞质成分运输到溶酶体进行降解的胞内途径,正常生理状态下细胞通过自噬清除衰老细胞器及突变蛋白,以维持自身结构稳定及功能正常。自噬功能障碍会导致有害蛋白和废弃细胞器的积聚,影响细胞内稳态,从而引起细胞功能丧失,导致疾病发生和发展^[6]。研究证实,眼部细胞包括角膜细胞和视网膜色素上皮细胞等都依赖自噬以维持正常的结构和生理功能^[2,7]。

LC3 是自噬相关基因 8 (autophagy related gene 8, ATG8) 在人体内的 3 种同源体之一,在自噬泡形成阶段起着至关重要的作用^[8]。本研究发现,与正常对照组比较,ROP 模型组中 LC3-Ⅱ 的 mRNA 水平表达降低,表明经过高氧和正常氧浓度环境处理后,小鼠视网膜组织的自噬活性受到抑制。P62 可连接 LC3 和泛素化的底物,并在自噬溶酶体中降解细胞器,同时还参与形成 RAPA 靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 复合物。当自噬受到抑制时,自噬体积聚,P62 表达水平升高^[9]。本研究显示,ROP 模型组中视网膜组织 P62 mRNA 表达升高,同样证明视网膜组织自噬活性被抑制。ATG 调控细胞质中大分子物质和一些内源性底物在自噬囊泡中的降解过程^[10],ROP 模型组中 ATG5 的 mRNA 表达也降低,再次提示视网膜组织中自噬活性被抑制。

mTOR 信号转导通路是自噬过程中的经典信号通路,是唯一的抑制性信号转导通路,在自噬水平的调控中起着重要作用^[11]。本研究应用中自噬激动剂,也是 mTOR 信号通路抑制剂的 RAPA 进行玻璃体腔注射后,自噬干预组视网膜视盘周围的无灌注区减少,同时 P62 mRNA 表达略有下降,提示 mTOR 信号通路可能通过调控视网膜细胞的自噬活性参与 ROP 疾病的发生。

本研究通过观察正常对照组、ROP 模型组以及

自噬干预组小鼠视网膜血管形态改变,并分析自噬相关基因 P62、LC3-Ⅱ 和 ATG5 表达水平的变化,结果提示 ROP 的发生发展可能与自噬活性下降有关。目前自噬在视网膜病变中的具体机制仍不明确,了解自噬在 ROP 中的作用,有助于为 ROP 防治提供新的思路。

参考文献:

References:

- [1] Huang C Y, Kuo R J, Li C H, et al. Prediction of visual outcomes by an artificial neural network following intravitreal injection and laser therapy for retinopathy of prematurity[J]. Br J Ophthalmol, 2019, pii: 314860.
- [2] Dehdashtian E, Mehrzadi S, Yousefi B, et al. Diabetic retinopathy pathogenesis and the ameliorating effects of melatonin; involvement of autophagy, inflammation and oxidative stress[J]. Life Sci, 2018, 193: 20–33.
- [3] Connor K M, Krah N M, Dennison R J, et al. Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse: A model of vessel loss, vessel regrowth and pathological angiogenesis [J]. Nat Protoc, 2009, 4(11): 1565–1573.
- [4] Akula J D, Hansen R M, Martinez-Perez M E, et al. Rod photoreceptor function predicts blood vessel abnormality in retinopathy of prematurity[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(9): 4351–4359.
- [5] Wellard J, Lee D, Valter K, et al. Photoreceptors in the rat retina are specifically vulnerable to both hypoxia and hyperoxia[J]. Vis Neurosci, 2005, 22(4): 501–507.
- [6] Liu S, Hartleben B, Kretz O, et al. Autophagy plays a critical role in kidney tubule maintenance, aging and ischemia-reperfusion injury[J]. Autophagy, 2012, 8(5): 826–837.
- [7] Frost L S, Mitchell C H, Boesze-Battaglia K. Autophagy in the eye: implications for ocular cell health[J]. Exp Eye Res, 2014, 124: 56–66.
- [8] Barth S, Glick D, Macleod K F. Autophagy: Assays and artifacts[J]. J Pathol, 2010, 221(2): 117–124.
- [9] Pankiv S, Clausen T H, Lamark T, et al. P62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy[J]. J Biol Chem, 2007, 282(33): 24131–24145.
- [10] Otomo C, Metlagel Z, Takaesu G, et al. Structure of the human Atg12-Atg5 conjugate required for LC3 lipidation in autophagy[J]. Nat Struct Mol Biol, 2013, 20(1): 59–66.
- [11] Harrison D E, Strong R, Sharp Z D, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice[J]. Nature, 2009, 460(7253): 392–395.

(收稿日期: 2019-10-31)