

AAV 介导 *HO-1* 基因转染对视网膜色素变性大鼠视网膜的保护作用

梁郁萍 陈蔚琪 洪玉 高秀云 郭茂生
福建医科大学附属第二医院眼科, 泉州 362000
通信作者: 洪玉, Email: hongyuuccd@163. com

【摘要】 目的 探讨腺相关病毒(AAV)载体介导血红素加氧酶 1(*HO-1*) 基因过表达对视网膜色素变性(RP)模型大鼠的保护作用。方法 选取健康雄性 SD 大鼠 80 只, 体质量 200~250 g, 采用完全随机分组设计, 将大鼠分为空白对照组、RP 模型组、AAV-GFP 组和 AAV-*HO-1*-GFP 组, 每组 20 只。RP 模型组、AAV-GFP 组和 AAV-*HO-1*-GFP 组以剂量 50 mg/kg 的质量分数 1% 碘酸钠溶液进行尾静脉注射, 制备碘酸钠诱导大鼠 RP 模型, 再分别予以 0.9% 氯化钠溶液、AAV-GFP 病毒、AAV-*HO-1*-GFP 病毒视网膜下腔注射; 空白对照组大鼠尾静脉仅注射等量 0.9% 氯化钠溶液。于造模后第 14 天摘出大鼠眼球。采用苏木精-伊红染色法检测各组大鼠视网膜结构及厚度; 采用 TUNEL 法检测各组视网膜组织细胞凋亡情况; 采用 Western blot 法测定各组大鼠视网膜组织中含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(caspase 3)、B 淋巴细胞瘤-2(bcl-2)、*HO-1* 蛋白的表达水平。结果 苏木精-伊红染色结果显示, 空白对照组大鼠视网膜结构正常, RP 模型组和 AAV-GFP 组大鼠视网膜结构破坏明显, 外核层呈波浪状改变, 厚度变薄, AAV-*HO-1*-GFP 组大鼠视网膜结构轻度破坏, 外核层厚度轻度变薄。与空白对照组比较, RP 模型组和 AAV-GFP 组大鼠视网膜外核层厚度明显变薄, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。RP 模型组、AAV-GFP 组和 AAV-*HO-1*-GFP 组 *HO-1* 蛋白相对表达量分别为 0.76 ± 0.21 、 0.76 ± 0.16 、 0.92 ± 0.05 , 明显高于空白对照组的 0.48 ± 0.25 , 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); AAV-*HO-1*-GFP 组 *HO-1* 蛋白相对表达量高于 RP 模型组和 AAV-GFP 组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。各组细胞凋亡率、bcl-2 和 caspase 3 蛋白相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义($F = 1596.333$ 、 1043.806 、 364.331 , 均 $P < 0.01$); 与 AAV-*HO-1*-GFP 组比较, RP 模型组和 AAV-GFP 组细胞凋亡率和 caspase 3 蛋白相对表达量增加, bcl-2 蛋白相对表达量减少, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 AAV 介导 *HO-1* 基因过表达对 RP 模型大鼠的视网膜具有保护作用。

【关键词】 血红素加氧酶-1; 视网膜色素变性; 腺相关病毒; 凋亡

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2017J01274); 福建省卫生系统中青年骨干人才培养项目(2015-ZQN-JC-26); 泉州市科技计划重点项目(2016Z053)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20201108-00754

Protective effect of adeno-associated virus vector mediated heme oxygenase-1 overexpression on retinitis pigmentosa in rats

Liang Yuping, Chen Weiqi, Hong Yu, Gao Xiuyun, Guo Maosheng

Department of Ophthalmology, The Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 362000, China

Corresponding author: Hong Yu, Email: hongyuuccd@163. com

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect of adeno-associated virus (AAV) vector-mediated heme oxygenase-1 (*HO-1*) gene overexpression on retinitis pigmentosa (RP) models in rats. **Methods** Eighty healthy male SD rats were selected and randomized into the blank control group, RP model group, AAV-GFP group and AAV-*HO-1*-GFP group, with 20 rats in each group. The RP model was established via tail vein injection of 1% sodium iodate solution at the dose of 50 mg/kg. Rats in the RP model group, AAV-GFP group and AAV-*HO-1*-GFP group were subretinally injected with normal saline, AAV-GFP virus and AAV-*HO-1*-GFP virus according to grouping. Rats in the blank control group were administrated with subretinal injection of equal volume of normal saline. The eyeballs of rats were enucleated on 14th day after molding. The retinal structure and thickness were detected by hematoxylin-eosin staining; apoptosis in retinal tissue was detected by TUNEL assay; the expression levels

of cysteinyl aspartate specific proteinase 3 (caspase 3), B-lymphoma-2 (bcl-2) and HO-1 protein in rats retina was identified by Western blot. The use and care of the animals complied with the Statement of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). The study protocol was approved by an Ethics Committee of The Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University (No. 202188). **Results** Hematoxylin-eosin staining results showed normal retinal structure in the blank control group, obvious retinal structure damage with thinned and wavy outer nuclear layer in the RP model group and AAV-GFP group, and mild retinal structure damage with slightly thinned outer nuclear layer in the AAV-HO-1-GFP group. Compared with the blank control group, the outer nuclear layer was significantly thinner in the RP model group and AAV-GFP group (both at $P < 0.05$). Relative expression level of HO-1 protein in the RP model group, AAV-GFP group, and AAV-HO-1-GFP group was 0.76 ± 0.21 , 0.76 ± 0.16 , 0.92 ± 0.05 , respectively, which were all significantly higher than 0.48 ± 0.25 in the blank control group (all at $P < 0.05$). The relative expression level of HO-1 protein in the AAV-HO-1-GFP group was significantly higher than that in the RP model group and the AAV-GFP group (both at $P < 0.05$). There were significant differences in apoptosis rate, the relative expression levels of bcl-2 and caspase 3 protein among the four groups ($F = 1596.333$, 1043.806 , 364.331 ; all at $P < 0.01$). The apoptosis rate and the relative expression level of caspase 3 were significantly higher, and the relative expression level of bcl-2 was lower in the RP model group and AAV-GFP group than those in the AAV-HO-1-GFP group (all at $P < 0.05$). **Conclusions** AAV-mediated overexpression of *HO-1* gene can protect the retina of RP rats.

[Key words] Heme oxygenase-1; Retinitis pigmentosa; Adeno-associated virus; Apoptosis

Fund program: Natural Science Foundation of Fujian Province (2017J01274); Young and Middle-aged Backbone Talents Training Project of Fujian Health System (2015-ZQN-JC-26); Key Project of Science and Technology Plan of Quanzhou City (2016Z053)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20201108-00754

视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 是指以进行性光感受器细胞和视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞功能丧失为共同表现的遗传性视网膜变性疾病, 其临床特点是 RPE 细胞和感光细胞的逐渐变性, 导致夜盲和渐进性视力下降, 眼底异常表现包括骨细胞样色素沉着、血管变细和视盘蜡样苍白^[1]。血红素加氧酶 (heme oxygenase, HO) 是血红素代谢的限速酶, 目前已知 HO 有 3 种同工酶, 即 HO-1、HO-2 和 HO-3。HO-1 属于诱导酶, 广泛存在于哺乳动物多种组织细胞的微粒体中, 在视网膜和晶状体中可被多种方式诱导表达, HO-1 可将血红素分解为胆绿素、一氧化碳 (carbon oxide, CO) 和游离铁, 这些产物参与 HO-1 的抗炎、抗氧化和抗凋亡作用。研究表明, HO-1 产生的 CO 可以保护内皮细胞免受肿瘤坏死因子 α 介导的凋亡^[2]。胆绿素及产物胆红素主要通过调节 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, bcl-2) 及 bcl-2 相关 X 蛋白 (bcl-2 associated X protein, bax) 的水平发挥抗凋亡作用。在肺缺血-再灌注损伤中, 细胞凋亡与磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶 (phosphorylated c-Jun N-terminal kinase, p-JNK) 和含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3 (cysteinyl aspartate specific proteinase 3, caspase 3) 有关, 说明胆绿素是通过抗 JNK 通路和抗凋亡作用来减轻肺缺血-再灌注损伤^[3]。既往研究表

明, 钴原卟啉可以诱导肺组织 HO-1 的高表达, 高表达的 HO-1 具有抗凋亡作用^[4]。本课题组前期体外实验已证实 *HO-1* 基因转染 RPE 细胞可使 HO-1 蛋白高效表达, 显著减少 H_2O_2 所致的凋亡, 发现 *HO-1* 基因过表达对 RPE 细胞的凋亡具有保护作用。本研究拟探讨 *HO-1* 基因过表达对 RP 大鼠的保护作用, 为进一步的 RP 治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选取健康雄性 SD 大鼠 80 只, 体质量 200~250 g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司 [许可证号: SCXK(沪)2017-0005]。实验动物的使用和喂养遵循美国视觉与眼科学研究协会制定的 ARVO 声明。本研究经福建医科大学附属第二医院伦理委员会批准 (批文号: 202188)。

1.1.2 主要材料及试剂 腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) (上海汉恒生物科技有限公司); 戊巴比妥钠 (上海麦克林生化科技有限公司); AAV 纯化试剂盒 (美国 Biomiga 公司); TUNEL 凋亡检测试剂盒、RIPA 总蛋白提取试剂盒 (大连美仑生物技术有限公司); BCA 蛋白定量试剂盒 (美国 Thermo 公司); 兔抗鼠 HO-1 单克隆抗体 (ab189491) (英国 Abcam 公

司);兔抗鼠 caspase 3 抗体(AF6311)、兔抗鼠 bcl-2 抗体(AF6139)、兔抗鼠 β -actin 抗体(AB0035-100)、羊抗兔 IgG 抗体(AB0101)(美国 Affinity 公司)。倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);眼科手术显微镜(苏州六六视觉科技公司);微量注射器(美国 Hamilton 公司)。

1.2 方法

1.2.1 AAV 载体构建 *HO-1* 基因过表达 构建靶向 *HO-1* 基因的质粒,将构建好的 AAV 载体和辅助质粒进行大量抽提,质量浓度大于 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、 $A_{260}/_{280}$ 为 1.7~1.8 用于病毒包装。进行病毒纯化,采用实时荧光定量 PCR 法进行滴度检测,得到原始数据后,制作标准曲线,最后进行滴度测定。

1.2.2 RP 模型大鼠的建立及分组 采用完全随机分组设计,将 80 只大鼠分为空白对照组、RP 模型组、AAV-GFP 组和 AAV-*HO-1*-GFP 组,每组 20 只。RP 模型组、AAV-GFP 组和 AAV-*HO-1*-GFP 组均尾静脉注射质量分数 1% 碘酸钠溶液 50 mg/kg,制备碘酸钠诱导大鼠 RP 模型,再分别予以 0.2 μl 0.9% 氯化钠溶液、AAV-GFP 病毒、AAV-*HO-1*-GFP 病毒视网膜下腔注射;空白对照组仅尾静脉注射等量 0.9% 氯化钠溶液。注射后第 14 天取材。

1.2.3 苏木精-伊红染色法检测各组大鼠视网膜结构及厚度 各组分别选取 5 只大鼠,采用过量戊巴比妥钠经腹腔内注射麻醉处死,摘出眼球后,将标记好的眼球悬于质量分数 4% 多聚甲醛固定液后,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱,继续固定 24 h。常规脱水、透明、浸蜡包埋,切片行苏木精-伊红染色,观察各组视网膜的外核层结构及厚度。

1.2.4 荧光显微镜下观察 AAV-*HO-1*-GFP、AAV-GFP 在大鼠视网膜组织中的绿色荧光信号 各组分别选取 5 只大鼠,将 AAV-*HO-1*-GFP、AAV-GFP 分别注射至碘酸钠和氯化钠溶液注射的大鼠视网膜下,取视网膜组织进行冰冻切片,在荧光显微镜下观察是否有绿色荧光的表达。

1.2.5 TUNEL 法检测各组大鼠视网膜组织中细胞凋亡情况 各组分别选取 7 只大鼠,取视网膜组织进行石蜡包埋,5 μm 厚切片,根据 TUNEL 凋亡检测试剂盒说明行大鼠视网膜组织凋亡细胞染色。以细胞核呈绿色为阳性染色,每张切片使用图像分析系统随机选取 6 个视野,计数呈现绿色荧光的凋亡细胞数,以 6 个视野得出的平均值作为最终判定指标。

1.2.6 Western blot 法检测 *HO-1*、caspase 3 和 bcl-2 蛋白的表达 各组分别选取 3 只大鼠,取视网膜组织,采用 RIPA 总蛋白提取试剂盒提取总蛋白,BCA 法进

行蛋白定量,取等量蛋白上样。经质量分数 10% SDS-PAGE 凝胶电泳后电转至 PVDF 膜。室温下封闭 2 h,洗膜,加入 1:1 000 稀释的一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜;洗膜后加入 1:10 000 稀释的二抗,室温下摇床孵育 1 h,磷酸盐缓冲液洗涤,采用 ECL 化学发光法使条带显色,凝胶成像系统采集分析。采用 ImageJ 分析软件读取图像中目的条带及 β -actin 条带的灰度值,以 β -actin 条带作为内参,将目的条带和 β -actin 条带灰度值的比值作为目的蛋白相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计学软件进行统计分析,计量资料经 W 检验证实呈正态分布,以 $\text{mean}\pm\text{SD}$ 表示,经 Levene 检验证实方差齐,各组间检测数据的总体比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *HO-1* 基因过表达 AAV 载体测序及病毒滴度测定

HO-1 基因过表达 AAV 载体测序结果显示,与目标序列一致,载体构建成功。病毒滴度测定结果显示,AAV-*HO-1*-GFP 滴度为 1.0×10^{12} vg/ml,AAV-GFP 滴度为 1.2×10^{12} vg/ml。

2.2 各组大鼠视网膜结构及外核层厚度变化

苏木精-伊红染色结果显示,空白对照组大鼠视网膜结构正常,各层细胞排列相对规则、整齐,密度较均匀、一致;RP 模型组和 AAV-GFP 组大鼠视网膜结构破坏明显,外核层呈波浪状改变,厚度变薄;AAV-*HO-1*-GFP 组大鼠视网膜结构轻度破坏,外核层轻度变薄(图 1)。空白对照组、RP 模型组、AAV-GFP 组和 AAV-*HO-1*-GFP 组大鼠视网膜外核层厚度分别为 (16.98 ± 0.18) 、 (6.59 ± 1.57) 、 (8.74 ± 4.13) 和 $(12.67\pm 0.25) \mu\text{m}$,总体比较差异有统计学意义($F=8.923, P<0.01$),其中 RP 模型组和 AAV-GFP 组大鼠视网膜外核层厚度均较空白对照组明显变薄,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);AAV-*HO-1*-GFP 组大鼠视网膜外核层较空白对照组稍变薄,差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 AAV 转染后大鼠视网膜组织中绿色荧光表达情况

AAV-GFP 和 AAV-*HO-1*-GFP 在大鼠视网膜组织中可观察到有绿色荧光表达(图 2)。

2.4 各组大鼠视网膜组织中 *HO-1* 蛋白表达比较

空白对照组 *HO-1* 蛋白表达条带较弱,RP 模型

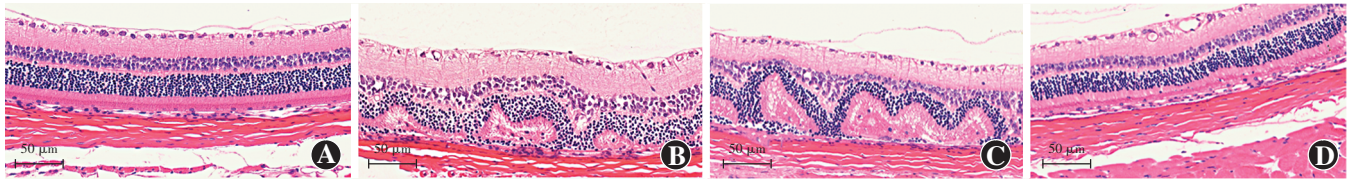


图 1 各组大鼠视网膜常规组织病理学检查 (HE ×400, 标尺 = 50 μm) A: 空白对照组视网膜结构正常, 细胞排列规则 B: RP 模型组外核层呈波浪状, 厚度变薄 C: AAV-GFP 组外核层变薄, 呈波浪状 D: AAV-HO-1-GFP 组外核层稍变薄

Figure 1 Histopathological examination of rat retinas in each group (HE ×400, bar = 50 μm) A: The retinal structure was normal in the blank control group, and the cell arrangement was regular B: The outer nuclear layer was wavy and thinned in the RP model group C: The outer nuclear layer was wavy and thinned in the AAV-GFP group D: The outer nuclear layer was slightly thinned in the AAV-HO-1-GFP group

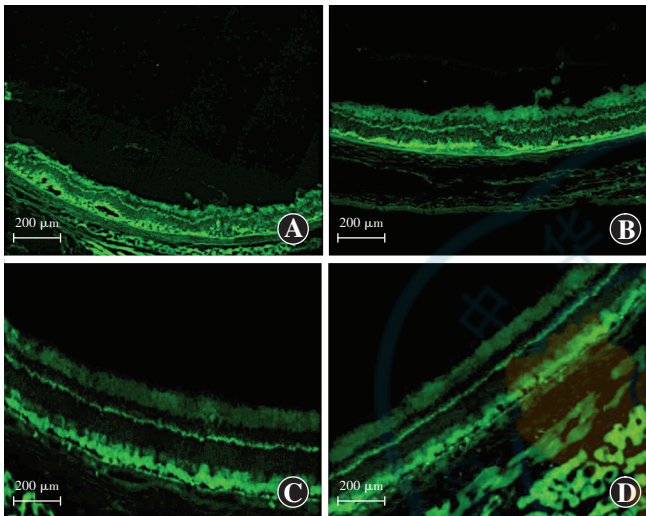


图 2 AAV 转染后各组大鼠视网膜组织中绿色荧光表达情况 (×100, 标尺 = 200 μm) A: AAV-GFP 组视网膜组织中可见绿色荧光信号 B: AAV-HO-1-GFP 组视网膜组织中可见绿色荧光信号 C: AAV-GFP 转染至正常大鼠可见绿色荧光信号 D: AAV-HO-1-GFP 转染至正常大鼠可见绿色荧光信号

Figure 2 Green fluorescence expression in retinal tissue of rats after AAV transfection (×100, bar = 200 μm) A: Green fluorescence signal was observed in retinal tissue in the AAV-GFP group B: Green fluorescence signal was observed in retinal tissue in the AAV-HO-1-GFP group C: Green fluorescence signal was observed in normal rats transfected with AAV-GFP D: Green fluorescence signal was observed in normal rats transfected with AAV-HO-1-GFP

组、AAV-GFP 组和 AAV-HO-1-GFP 组 HO-1 表达条带增强, AAV-HO-1-GFP 组 HO-1 表达条带强于 RP 模型组和 AAV-GFP 组。空白对照组、RP 模型组、AAV-GFP 组和 AAV-HO-1-GFP 组 HO-1 蛋白相对表达量分别为 0.48 ± 0.25 、 0.76 ± 0.21 、 0.76 ± 0.16 和 0.92 ± 0.05 , 总体比较差异有统计学意义 ($F = 300.116$, $P < 0.01$), 其中与空白对照组比较, AAV-HO-1-GFP 组、AAV-GFP 组和 RP 模型组 HO-1 蛋白相对表达量明显增多, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); AAV-HO-1-GFP 组 HO-1 蛋白相对表达量高于 RP 模型组和 AAV-GFP 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); RP 模型组 HO-1 蛋白相对表达量与 AAV-GFP 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 3)。

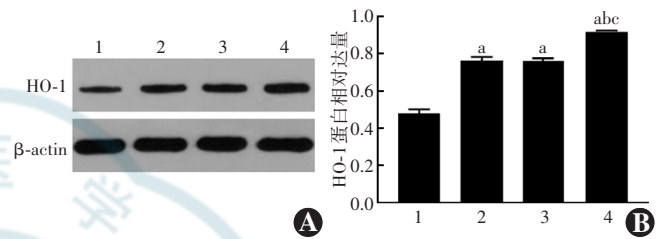


图 3 各组大鼠视网膜组织中 HO-1 蛋白表达情况比较 A: 各组大鼠视网膜组织中 HO-1 蛋白表达电泳图 B: 各组大鼠视网膜组织中 HO-1 蛋白相对表达量比较 与空白对照组比较, $^a P < 0.05$; 与 RP 模型组比较, $^b P < 0.05$; 与 AAV-GFP 组比较, $^c P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n = 3$) 1: 空白对照组; 2: RP 模型组; 3: AAV-GFP 组; 4: AAV-HO-1-GFP 组 HO: 血红素加氧酶; β -actin: β -肌动蛋白

Figure 3 Comparison of HO-1 protein expression in retinal tissue of rats among different groups A: Electrophoretogram of HO-1 protein expression in rat retinas in each group B: Comparison of relative expression levels of HO-1 protein in rat retinas among the four groups Compared with the blank control group, $^a P < 0.05$; compared with the RP model group, $^b P < 0.05$; compared with the AAV-GFP group, $^c P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test, $n = 3$) 1: blank control group; 2: RP model group; 3: AAV-GFP group; 4: AAV-HO-1-GFP group HO: heme oxygenase

2.5 各组大鼠视网膜组织细胞凋亡情况比较

TUNEL 检测结果显示, 空白对照组大鼠视网膜未见明显凋亡细胞, 其他各组大鼠视网膜凋亡细胞明显增多 (图 4); 空白对照组、RP 模型组、AAV-GFP 组和 AAV-HO-1-GFP 组细胞凋亡率分别为 $(0.33 \pm 0.13)\%$ 、 $(44.46 \pm 0.78)\%$ 、 $(43.91 \pm 1.22)\%$ 和 $(8.22 \pm 1.39)\%$, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 1596.333$, $P < 0.01$), 其中 RP 模型组和 AAV-GFP 组细胞凋亡率明显高于 AAV-HO-1-GFP 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

2.6 各组大鼠视网膜组织中 bcl-2 和 caspase 3 蛋白表达比较

空白对照组 bcl-2 蛋白表达条带较强, RP 模型组、AAV-GFP 组和 AAV-HO-1-GFP 组蛋白表达条带减弱, AAV-HO-1-GFP 组 bcl-2 蛋白表达条带强于 RP 模型组和 AAV-GFP 组。空白对照组、RP 模型组、AAV-

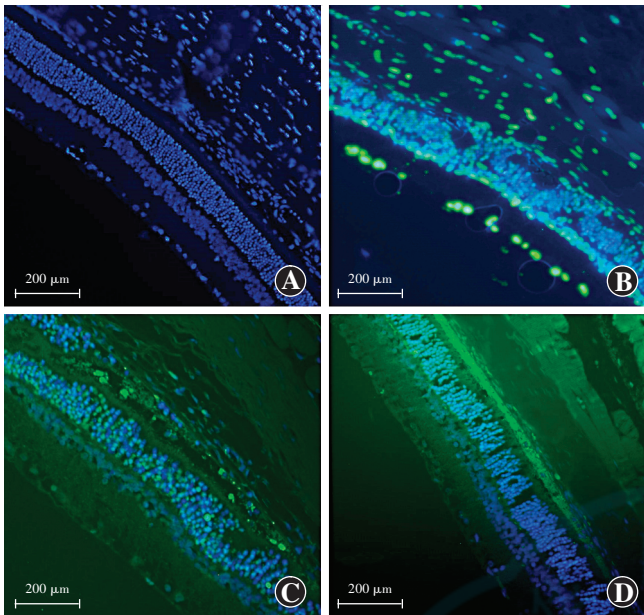


图 4 各组大鼠视网膜细胞凋亡情况比较 (TUNEL × 100, 标尺 = 200 μm) 绿色荧光为凋亡细胞 A: 空白对照组未见明显凋亡细胞 B: RP 模型组可见明显凋亡细胞 C: AAV-GFP 组可见明显凋亡细胞 D: AAV-HO-1-GFP 组可见少量凋亡细胞

Figure 4 Comparison of retinal cell apoptosis in rats among the four groups (TUNEL × 100, bar = 200 μm) Green fluorescence indicated apoptotic cells A: Almost no apoptotic cell was observed in the blank control group B: A large number of apoptotic cells were observed in the RP model group C: A large number of apoptotic cells were observed in the AAV-GFP group D: A few apoptotic cells were observed in the AAV-HO-1-GFP group

GFP 组和 AAV-HO-1-GFP 组 bcl-2 蛋白相对表达量分别为 1.16 ± 0.35 、 0.23 ± 0.08 、 0.19 ± 0.07 和 0.76 ± 0.34 , 总体比较差异有统计学意义 ($F = 1043.806, P < 0.01$), 其中与空白对照组比较, RP 模型组、AAV-GFP 组和 AAV-HO-1-GFP 组 bcl-2 蛋白相对表达量明显减少, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 与 AAV-HO-1-GFP 组比较, RP 模型组和 AAV-GFP 组 bcl-2 蛋白相对表达量明显减少, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。空白对照组 caspase 3 表达条带较弱, RP 模型组、AAV-GFP 组和 AAV-HO-1-GFP 组 caspase 3 表达条带增强, AAV-HO-1-GFP 组 caspase 3 表达条带弱于 RP 模型组和 AAV-GFP 组。空白对照组、RP 模型组、AAV-GFP 组和 AAV-HO-1-GFP 组 caspase 3 蛋白相对表达量分别为 0.12 ± 0.10 、 0.43 ± 0.14 、 0.43 ± 0.18 和 0.28 ± 0.01 , 总体比较差异有统计学意义 ($F = 364.331, P < 0.01$), 其中与空白对照组比较, RP 模型组、AAV-GFP 组和 AAV-HO-1-GFP 组 caspase 3 蛋白相对表达量增加, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 与 AAV-HO-1-GFP 组比较, RP 模型组和 AAV-GFP 组 caspase 3 蛋白相对表达量增加, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); RP 模型组 caspase 3 蛋白相对表达量与

AAV-GFP 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 5)。

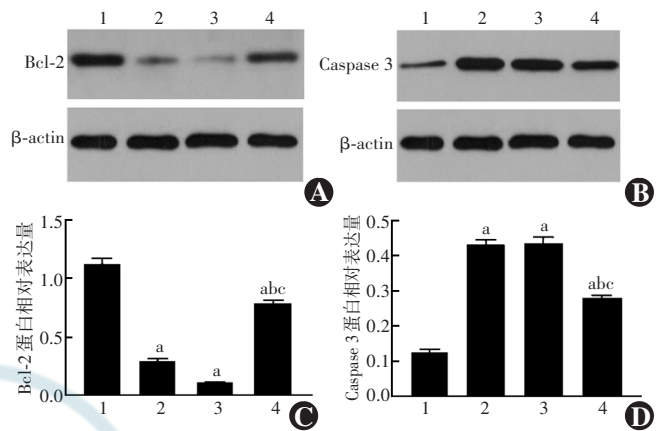


图 5 各组大鼠视网膜组织中 bcl-2 和 caspase 3 蛋白表达情况比较 A: 各组大鼠视网膜组织中 bcl-2 蛋白表达电泳图 B: 各组大鼠视网膜组织中 caspase 3 蛋白表达电泳图 C: 各组大鼠视网膜组织中 bcl-2 蛋白相对表达量比较 与空白对照组比较, $^a P < 0.05$; 与 RP 模型组比较, $^b P < 0.05$; 与 AAV-GFP 组比较, $^c P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n = 3$) D: 各组大鼠视网膜组织中 caspase 3 蛋白相对表达量比较 与空白对照组比较, $^a P < 0.05$; 与 RP 模型组比较, $^b P < 0.05$; 与 AAV-GFP 组比较, $^c P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n = 3$) 1: 空白对照组; 2: RP 模型组; 3: AAV-GFP 组; 4: AAV-HO-1-GFP 组 bcl: B 淋巴细胞瘤; β-actin: β-肌动蛋白; caspase: 含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶

Figure 5 Comparison of the expression levels of bcl-2 and caspase 3 protein in retinal tissue of rats among the four groups

A: Electrophoretogram of bcl-2 protein expression in rat retinas in the four groups B: Electrophoretogram of caspase 3 protein expression in rat retinas in the four groups C: Comparison of relative expression levels of bcl-2 protein in rat retinas among the four groups Compared with the blank control group, $^a P < 0.05$; compared with the RP model group, $^b P < 0.05$; compared with the AAV-GFP group, $^c P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test, $n = 3$) D: Comparison of relative expression levels of caspase 3 protein in rat retinas among the four groups Compared with the blank control group, $^a P < 0.05$; compared with the RP model group, $^b P < 0.05$; compared with the AAV-GFP group, $^c P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test, $n = 3$) 1: blank control group; 2: RP model group; 3: AAV-GFP group; 4: AAV-HO-1-GFP group bcl: B-lymphoma; caspase: cysteinyl aspartate specific proteinase

3 讨论

HO-1 具有抗炎、抗凋亡的作用。Stocker^[5] 研究发现, HO-1 可由各种形式的刺激因子诱导激活, 可能对细胞起保护作用。Koriyama 等^[6] 研究发现, α-硫辛酸通过 Keap1/Nrf2 信号通路诱导 HO-1 表达, 保护视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 免受氧化应激损伤。Zhu 等^[7] 研究发现, 橙皮苷对 H_2O_2 诱导的 ARPE-19 细胞氧化损伤有较好的保护作用, 其机制可能与激活 Keap1-Nrf 2/HO-1 信号通路有关。本研究结果显示, 大鼠视网膜受到碘酸钠诱导, HO-1 被激活后表达量少量增加。Hegazy 等^[8] 用慢病毒将 HO-1 基因导入鼠 RGCs, 过表达的 HO-1 能够降低 RGCs 的死亡率。Sun 等^[9] 将表达小鼠 HO-1 基因 (mHO-1) 的重

组 AAV 5 型通过视网膜下注射给环光饲养的 SD 大鼠, 结果发现 *HO-1* 基因过表达对视网膜有保护作用。本课题组前期实验已证实, 通过慢病毒将 *HO-1* 基因转染至 RPE 细胞可以提高其中晚期存活率, 对 RPE 细胞具有保护作用。为进一步证实 *HO-1* 在体内是否对 RPE 细胞具有保护作用, 本研究将 *HO-1* 基因导入大鼠视网膜, 发现过表达的 *HO-1* 基因能够减少视网膜结构损伤并抑制大鼠视网膜细胞凋亡。

AAV 反向末端重复序列中有 1 个含 20 个核苷酸的长序列, 称为 D 序列, 其介导的 *MHC-II* 基因表达下调可能被用来开发能够抑制宿主体液反应的新型 AAV 载体, 这对优化利用这些载体进行人类基因治疗具有重要意义^[10]。Wang 等^[11] 研究使用腺病毒载体表达抗炎细胞因子转化生长因子- β 的异构体, 通过基因转染拯救了 3 种携带不同致病突变的 RP 小鼠模型变性的视锥细胞。Brydon 等^[12] 研究表明, 以 RPE 细胞为靶点的基于 AAV 的基因治疗对相关 RP 患者有很好的治疗前景。Wang 等^[13] 研究了 RP 小鼠模型的免疫反应, 通过 AAV 载体传递编码小胶质细胞调节信号的基因, 结果表明 AAV 血清型 8 可溶性 CX3CL1 (*SCX3CLI*) 基因治疗在 RP 和潜在其他形式的视网膜变性中是一种很有前景的、不依赖突变来保存视力的方法。

碘酸钠是一种氧化剂, 可以造成大鼠视网膜变性。多数研究者通过单次注射碘酸钠诱导制作 RP 动物模型。Koh 等^[14] 通过全身注射不同剂量的碘酸钠诱导 SD 大鼠视网膜变性, 发现 40 mg/kg 的碘酸钠足以引起视网膜功能紊乱。该模型的病理检查结果显示视网膜退化, 并可进一步用于开发 RPE 细胞、光感受器细胞和双极细胞有效再生的方法。MoriguChi 等^[15] 研究发现 20 mg/kg 碘酸钠诱导的视网膜损伤是可逆的, 但 40 mg/kg 时损伤是永久性的。碘酸钠诱发 RP, 首先引起 RPE 结构改变, 随后引起视网膜外核层结构损伤及感光细胞凋亡。众多研究发现, 碘酸钠注射后, 视网膜损伤在 7~14 d 达峰值^[16], 因此本研究选择在碘酸钠注射后第 14 天进行苏木精-伊红染色, 结果显示视网膜外核层呈波浪状改变, 厚度变薄, 成功构建了大鼠 RP 模型。AAV-HO-1-GFP 组与 RP 模型组、AAV-GFP 组相比, 视网膜结构改变明显减轻, 说明 *HO-1* 基因过表达对视网膜有保护作用。

大多数 RP 原发于光感受器细胞损害, 感光细胞凋亡是其最终共同的病理机制^[17]。Kiuchi 等^[18] 研究发现, 碘酸钠诱发的小鼠 RP 模型中, 存在 RPE 细胞的变性及坏死、感光细胞外节断裂和感光细胞凋亡。

本研究通过 TUNEL 法检测视网膜细胞中感光细胞凋亡情况发现, 与空白对照组相比, 碘酸钠诱导的大鼠视网膜凋亡细胞显著增多, AAV-HO-1-GFP 组较 RP 模型组和 AAV-GFP 组视网膜凋亡细胞减少, 表明 *HO-1* 基因过表达可减少大鼠视网膜组织感光细胞凋亡。

细胞凋亡是受基因调控的一种程序性死亡过程, 由不同信号转导途径调控, 主要由 bcl-2 家族、caspase 家族和凋亡抑制蛋白等参与。Bcl-2 是抑制凋亡蛋白的主要成员, 能通过不同途径来抑制细胞凋亡。有研究发现, bcl-2 对感光细胞凋亡有抑制作用。环状 RNA 通过海绵化 miR-136-5p 和上调 bcl-2 抑制非小细胞肺癌细胞凋亡^[19]。Wang 等^[20] 研究发现 *DJ-1* 基因过表达后, 大鼠视网膜周细胞凋亡减少, bcl-2/bax 比值升高, 激活了 Nrf2 的表达, 通过 Nrf2 通路阻止高糖诱导的氧化应激和视网膜周细胞凋亡。Genipin 通过促进 Nrf2 信号转导, 抑制 bax 和裂解 caspase 3 表达, 促进 bcl-2 表达, 抑制细胞氧化损伤, 对 RPE 细胞起到保护作用^[21]。白藜芦醇通过调节 SOD/MDA 活性和激活 bcl-2 表达, 降低 caspase 3 裂解水平, 保护 RPE 细胞免受氧化损伤^[22]。本实验结果显示, 与空白对照组相比, RP 模型组、AAV-GFP 组和 AAV-HO-1-GFP 组的 bcl-2 表达量减少, 与 RP 模型组和 AAV-GFP 组相比, AAV-HO-1-GFP 组 bcl-2 的表达量增加, 说明 *HO-1* 基因过表达可以通过激活 bcl-2 蛋白抑制细胞凋亡, 对视网膜有保护作用。

在糖尿病视网膜病变、年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 等疾病中, 一些细胞凋亡的发生与 caspase 3 有关。研究发现, miR-455-5p 抑制高糖诱导糖尿病视网膜病变中细胞凋亡的同时伴有 bcl-2/bax 比值的增加和凋亡标志物裂解 caspase 的表达, 从而减轻高糖诱导的损伤^[23]。Alaimo 等^[24] 研究发现, 蓝光能诱导 RPE 细胞凋亡, 并激活 caspase。在氧化应激过程中, miR-1246 表达的中断增强了 Mini- α A 对 RPE 细胞的抗凋亡作用, caspase 3 和 caspase 14 是 miR-1246 参与调控碘酸钠孵育细胞凋亡的分子靶点^[25]。山奈酚通过涉及 bax/bcl-2 和 caspase 3 分子的信号通路保护 RPE 细胞免受 H_2O_2 诱导的细胞氧化损伤和凋亡^[26]。本实验结果显示 *HO-1* 基因过表达可以抑制 caspase 3 表达, 使视网膜感光细胞凋亡减少。

本研究结果表明, 碘酸钠可以诱发大鼠 RP, 引起 bcl-2、caspase 3 等线粒体途径相关细胞凋亡的发生, 通过 AAV 介导 *HO-1* 基因过表达可以对抗碘酸钠诱发的 RP, 说明过表达的 *HO-1* 蛋白在抗细胞凋亡中发

挥着重要的作用,但 HO-1 通过哪种信号通路抑制细胞凋亡仍不清楚,需要进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在任何利益冲突

参考文献

- [1] Verbakel SK, van Huet R, Boon C, et al. Non-syndromic retinitis pigmentosa [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2018, 66 : 157–186. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2018.03.005.
- [2] Brouard S, Berberat PO, Tobiasch E, et al. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide requires the activation of transcription factor NF-kappa B to protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis [J/OL]. *J Biol Chem*, 2002, 277(20) : 17950–17961 [2021–01–25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11880364/>. DOI: 10.1074/jbc.M108317200.
- [3] 孙洁芸, 张鹏, 杨欣颖, 等. 胆绿素通过抗凋亡发挥对离体肺缺血/再灌注损伤的保护作用 [J]. *中华危重病急救医学*, 2017, 29(1) : 25–29. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.01.006. Sun JY, Zhang P, Yang XY, et al. Biliverdin protects the isolated lungs from ischemia/reperfusion injury via anti-apoptosis [J]. *Chin Crit Care Med*, 2017, 29(1) : 25–29. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.01.006.
- [4] 生伟, 王海桃, 池一凡, 等. 血红素加氧酶-1 对大鼠体外循环后肺组织抗细胞凋亡的研究 [J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2017, 24(5) : 384–389. DOI: 10.7507/1007-4848.201610033. Sheng W, Wang HT, Chi YF, et al. Anti-apoptosis effect and mechanism of heme oxygenase-1 on lung injury after cardiopulmonary bypass [J]. *Chin J Clin Thorac Cardiovasc Surg*, 2017, 24(5) : 384–389. DOI: 10.7507/1007-4848.201610033.
- [5] Stocker R. Induction of heme oxygenase as a defense against oxidative stress [J]. *Free Rad Res Commun*, 1990, 9(2) : 101–112. DOI: 10.3109/10715769009148577.
- [6] Koriyama Y, Nakayama Y, Matsugo S, et al. Protective effect of lipoic acid against oxidative stress is mediated by Keap1/Nrf2-dependent heme oxygenase-1 induction in the RGC-5 cell line [J]. *Brain Res*, 2013, 1499 : 145–157. DOI: 10.1016/j.brainres.2012.12.041.
- [7] Zhu C, Dong Y, Liu H, et al. Hesperetin protects against H₂O₂-triggered oxidative damage via upregulation of the Keap1-Nrf2/HO-1 signal pathway in ARPE-19 cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 88 : 124–133. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.11.089.
- [8] Hegazy KA, Dunn MW, Sharma SC. Functional human heme oxygenase has a neuroprotective effect on adult rat ganglion cells after pressure-induced ischemia [J]. *Neuroreport*, 2000, 11(6) : 1185–1189. DOI: 10.1097/00001756-200004270-00008.
- [9] Sun MH, Pang JH, Chen SL, et al. Photoreceptor protection against light damage by AAV-mediated overexpression of heme oxygenase-1 [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48(12) : 5699–5707. DOI: 10.1167/iov.07-0340.
- [10] Kwon HJ, Qing K, Ponnazhagan S, et al. Adeno-associated virus D-sequence-mediated suppression of expression of a human major histocompatibility Class II gene: implications in the development of adeno-associated virus vectors for modulating humoral immune response [J]. *Hum Gene Ther*, 2020, 31(9–10) : 565–574. DOI: 10.1089/hum.2020.018.
- [11] Wang SK, Xue Y, Cepko CL. Microglia modulation by TGF-β1 protects cones in mouse models of retinal degeneration [J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(8) : 4360–4369. DOI: 10.1172/JCI136160.
- [12] Brydon EM, Bronstein R, Buskin A, et al. AAV-mediated gene augmentation therapy restores critical functions in mutant PRPF31^{+/−} iPSC-derived RPE Cells [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2019, 15 : 392–402. DOI: 10.1016/j.omtm.2019.10.014.
- [13] Wang SK, Xue Y, Rana P, et al. Soluble CX3CL1 gene therapy improves cone survival and function in mouse models of retinitis pigmentosa [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(20) : 10140–10149. DOI: 10.1073/pnas.1901787116.
- [14] Koh AE, Alsaedi HA, Rashid M, et al. Retinal degeneration rat model: a study on the structural and functional changes in the retina following injection of sodium iodate [J/OL]. *J Photochem Photobiol B*, 2019, 196 : 111514 [2021–02–01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31154277/>. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2019.111514.
- [15] Moriguchi M, Nakamura S, Inoue Y, et al. Irreversible photoreceptors and RPE cells damage by intravenous sodium iodate in mice is related to macrophage accumulation [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59(8) : 3476–3487. DOI: 10.1167/iov.17-23532.
- [16] Redfern WS, Storey S, Tse K, et al. Evaluation of a convenient method of assessing rodent visual function in safety pharmacology studies: effects of sodium iodate on visual acuity and retinal morphology in albino and pigmented rats and mice [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2011, 63(1) : 102–114. DOI: 10.1016/j.vascn.2010.06.008.
- [17] Chen YC, Shen SC, Lee WR, et al. Emodin induces apoptosis in human promyeloleukemic HL-60 cells accompanied by activation of caspase 3 cascade but independent of reactive oxygen species production [J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, 64(12) : 1713–1724. DOI: 10.1016/S0006-2952(02)01386-2.
- [18] Kiuchi K, Yoshizawa K, Shikata N, et al. Morphologic characteristics of retinal degeneration induced by sodium iodate in mice [J]. *Curr Eye Res*, 2002, 25(6) : 373–379. DOI: 10.1076/ceyr.25.6.373.14227.
- [19] Geng Y, Bao Y, Zhang W, et al. Circular RNA hsa_circ_0014130 inhibits apoptosis in non-small cell lung cancer by sponging miR-136-5p and upregulating BCL2 [J]. *Mol Cancer Res*, 2020, 18(5) : 748–756. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-19-0998.
- [20] Wang W, Zhao H, Chen B. DJ-1 protects retinal pericytes against high glucose-induced oxidative stress through the Nrf2 signaling pathway [J/OL]. *Sci Rep*, 2020, 10(1) : 2477 [2021–02–03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32051471/>. DOI: 10.1038/s41598-020-59408-2.
- [21] Zhao H, Wang R, Ye M, et al. Genipin protects against H₂O₂-induced oxidative damage in retinal pigment epithelial cells by promoting Nrf2 signaling [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(2) : 936–944. DOI: 10.3892/ijmm.2018.4027.
- [22] Yang Y, Wu ZZ, Cheng YL, et al. Resveratrol protects against oxidative damage of retinal pigment epithelium cells by modulating SOD/MDA activity and activating Bcl-2 expression [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(1) : 378–388. DOI: 10.26355/eurrev_201901_16786.
- [23] Chen P, Miao Y, Yan P, et al. MiR-455-5p ameliorates HG-induced apoptosis, oxidative stress and inflammatory via targeting SOCS3 in retinal pigment epithelial cells [J/OL]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(12) : 21915–21924 [2021–01–30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31041827/>. DOI: 10.1002/jcp.28755.
- [24] Alaimo A, Liñares GG, Bujamer JM, et al. Toxicity of blue led light and A2E is associated to mitochondrial dynamics impairment in ARPE-19 cells: implications for age-related macular degeneration [J]. *Arch Toxicol*, 2019, 93(5) : 1401–1415. DOI: 10.1007/s00204-019-02409-6.
- [25] Chen Q, Lin H, Deng X, et al. MiR-1246 promotes anti-apoptotic effect of mini-αA in oxidative stress-induced apoptosis in retinal pigment epithelial cells [J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2020, 48(5) : 682–688. DOI: 10.1111/ceo.13751.
- [26] Du W, An Y, He X, et al. Protection of kaempferol on oxidative stress-induced retinal pigment epithelial cell damage [J/OL]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018 : 1610751 [2021–02–05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30584457/>. DOI: 10.1155/2018/1610751.

(收稿日期:2021-03-13 修回日期:2021-06-28)

(本文编辑:刘艳 施晓萌)