

· 实验研究 ·

昼夜节律变化对 RORs 表达及 RORs 激动剂 SR1078 对角膜上皮创伤修复的影响

徐鹏洋¹ 李志杰² 薛芸霞²¹暨南大学基础医学院病理生理学系, 广州 510632; ²暨南大学基础医学院眼科研究所, 广州 510632

通信作者: 薛芸霞, Email: xueyx@jnu.edu.cn

【摘要】 目的 探讨昼夜节律变化对视黄酸相关孤儿受体(RORs)表达量及 RORs 激动剂 SR1078 对角膜上皮创伤修复的影响。方法 选取 SPF 级 6~8 周龄 C57BL/6 雌性小鼠 228 只, 采用随机数表法将其中 180 只小鼠分为昼夜节律正常组、全昼组、全夜组、昼夜颠倒 12 h 组和昼夜颠倒 3 周组, 每组 36 只。将剩余 48 只小鼠采用随机数表法随机分为磷酸盐缓冲液(PBS)对照组和 SR1078 组, 每组 24 只。按照分组, 将小鼠置于可控制光照(光照强度 300 lx)及黑暗时间的节律箱中, 其中昼夜节律正常组、PBS 对照组和 SR1078 组节律箱的光照时间为 7:00~19:00, 黑暗时间为 19:00~次日 7:00。根据 Zeitgeber Time 计时法, 以开始光照时间 7:00 记为 ZT0, 以关闭光照时间 19:00 记为 ZT12。采用实时荧光定量 PCR 法检测昼夜节律正常组、全夜组、全昼组、昼夜颠倒 12 h 组和昼夜颠倒 3 周组 ZT1、ZT5、ZT9、ZT13、ZT17、ZT21 各时间点 ROR α 和 ROR γ mRNA 相对表达量。PBS 对照组和 SR1078 组采用高尔夫样刀建立小鼠角膜上皮损伤模型并按照分组情况用相应试剂点眼, 每隔 6 h 给药 1 次。采用 Adobe Photoshop CC2019 软件测量角膜上皮缺损面积, 计算并比较 2 个组角膜上皮缺损率。分析昼夜节律正常组、全昼组、全夜组、昼夜颠倒 12 h 组和昼夜颠倒 3 周组小鼠角膜上皮 ROR α 和 ROR γ mRNA 相对表达量与 PBS 对照组和 SR1078 组角膜上皮缺损率的相关性。采用全角膜铺片及免疫荧光染色法观察角膜上皮修复情况, 计算并比较 PBS 对照组和 SR1078 组小鼠角膜上皮分裂细胞数量。结果 与昼夜节律正常组比较, 全昼组、全夜组、昼夜颠倒 12 h 组和昼夜颠倒 3 周组小鼠 ROR α /ROR γ mRNA 相对表达量整体呈减少趋势。造模后不同时间点 PBS 对照组和 SR1078 组小鼠角膜上皮缺损率总体比较差异有统计学意义($F_{\text{组别}} = 74.01, P < 0.001$; $F_{\text{时间}} = 5171.48, P < 0.001$), 其中造模后 12 h SR1078 组角膜上皮缺损率显著低于 PBS 对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。角膜组织中 ROR α 和 ROR γ mRNA 相对表达量与小鼠角膜上皮缺损率均呈中度正相关($r = 0.614, 0.537$, 均 $P < 0.01$); ROR α mRNA 相对表达量与角膜上皮缺损率变化量的直线回归方程为 $Y = 33.153X - 43.052$ ($F = 20.58, P < 0.001$), ROR γ mRNA 相对表达量与角膜上皮缺损率变化量的直线回归方程为 $Y = 2.764X - 1.364$ ($F = 13.11, P < 0.001$)。造模后不同时间点 SR1078 组和 PBS 对照组小鼠角膜上皮分裂细胞数量总体比较差异有统计学意义($F_{\text{分组}} = 160.55, P < 0.001$; $F_{\text{时间}} = 83.57, P < 0.001$), 其中造模后 24、30、36 h SR1078 组分裂细胞数目显著少于 PBS 对照组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 昼夜节律变化使小鼠角膜中 ROR α 和 ROR γ mRNA 表达减少, SR1078 可通过促进角膜上皮 ROR α 和 ROR γ mRNA 的表达使小鼠角膜上皮分裂细胞数量减少, 抑制角膜创伤后的修复过程。

【关键词】 角膜; 昼夜节律; 创伤修复; SR1078; 时钟基因

基金项目: 国家自然科学基金项目(81770962、81700808); 广东省医学科研基金项目(A2020318)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20201117-00778

Effect of circadian rhythm changes on the expression of RORs and the RORs agonist SR1078 on corneal epithelial wound repair

Xu Pengyang¹, Li Zhijie², Xue Yunxia²¹Department of Pathophysiology, Medical College of Jinan University, Guangzhou 510632, China; ²Institute of Ophthalmology, Medical College of Jinan University, Guangzhou 510632, China

Corresponding author: Xue Yunxia, Email: xueyx@jnu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effect of circadian rhythm changes on the expression of retinoic acid-related orphan receptors (RORs) and the RORs agonist SR1078 on corneal epithelial wound repair. **Methods** A total of 228 SPF C57BL/6 female mice aged 6–8 weeks old were selected, and 180 mice were divided into the normal circadian rhythm group, full-day group, full-night group, 12-hour reversed circadian rhythm group and 3-week reversed circadian rhythm group, with 36 mice in each group. The remaining 48 mice were randomly divided into phosphate buffered saline (PBS) control group and SR1078 group by random number table method, with 24 mice in each group. According to grouping, the mice were placed in a light box where the light (light intensity of 300 lx) and

dark time could be controlled. The light time of the normal circadian rhythm group, the PBS control group and the SR1078 group in the light box was from 7:00 to 19:00, and the dark time was from 19:00 to 7:00 the next day. According to the Zeitgeber Time method, the starting time of light at 7:00 was recorded as ZT0, and the time of closing light at 19:00 was recorded as ZT12. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction was used to detect the relative expression levels of ROR α and ROR γ mRNA at ZT1, ZT5, ZT9, ZT13, ZT17, ZT21 in the five groups. In the PBS control group and SR1078 group, a golf-like knife was used to establish the mouse corneal epithelial injury model, and the model eyes were administered with drugs once every 6 hours according to the grouping. The corneal epithelial defect area was measured with Adobe Photoshop CC2019 software, and the corneal epithelial defect rate was calculated and compared between the two groups. The correlation between the relative expression levels of ROR α and ROR γ mRNA in mice corneal epithelium of the five groups and corneal epithelial defect rate in the PBS control group and SR1078 group was analyzed. The corneal epithelium repair was observed by whole cornea spreading and immunofluorescence staining, and the number of corneal epithelial dividing cells in the PBS control group and the SR1078 group was calculated and compared. The use and care of animals complied with the ARVO statement. This study protocol was approved by the Laboratory Animal Ethics Committee of Jinan University (No. JN-A-2002-01).

Results Compared with the normal circadian rhythm group, the relative expression levels of ROR α /ROR γ mRNA in the full-day group, full-night group, 12-hour reversed circadian rhythm group and 3-week reversed circadian rhythm group showed an overall decreasing trend. There was a statistically significant difference in the corneal epithelial defect rate between the PBS control group and the SR1078 group at different time points after modeling ($F_{\text{group}} = 74.01$, $P < 0.001$; $F_{\text{time}} = 5171.48$, $P < 0.001$). Twelve hours after modeling, the corneal epithelial defect rate in the SR1078 group was significantly lower than that in the PBS control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The relative expression levels of ROR α and ROR γ mRNA in corneal tissue was moderately positively correlated with the corneal epithelial defect rate in mice ($r = 0.614, 0.537$; both at $P < 0.01$); The regression equation of the straight line between the relative expression level of ROR α mRNA and the change in corneal epithelial defect rate was $Y = 33.153X - 43.052$ ($F = 20.58$, $P < 0.001$), and the linear regression equation between the relative expression level of ROR γ mRNA and the change of corneal epithelial defect rate was $Y = 2.764X - 1.364$ ($F = 13.11$, $P < 0.001$). There was a significant overall difference in the number of corneal epithelial dividing cells at various time points following modeling between the PBS control group and the SR1078 group ($F_{\text{group}} = 160.55$, $P < 0.001$; $F_{\text{time}} = 83.57$, $P < 0.001$). The number of dividing cells in the SR1078 group was significantly less than that in the PBS control group at 24, 30, and 36 hours following modeling, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.05$).

Conclusions Circadian rhythm changes reduce the expression of ROR α and ROR γ mRNA in the mouse cornea. SR1078 can promote the expression of ROR α and ROR γ mRNA in corneal epithelium to decrease the number of mouse corneal epithelial dividing cells, and inhibit the repair after corneal trauma.

[Key words] Cornea; Circadian rhythm; Wound healing; SR1078; Clock gene

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81770962, 81700808); The Medical Science and Technology Research Fund of Guangdong Grant (A2020318)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20201117-00778

角膜上皮细胞通过不断更新的方式来保持角膜上皮的稳态,角膜上皮细胞更新节律异常会造成角膜上皮稳态的失衡,引起角膜上皮缺损^[1]。角膜损伤的修复是一个复杂的过程,主要过程为创口区域炎症反应的触发引起炎症细胞从角膜缘周围血管渗出,清除损伤区域的坏死组织,并伴随着炎症反应的消退,使基底细胞重塑角膜基质。视黄酸相关孤儿受体(retinoic acid-related orphan receptors, RORs)由 ROR α 、ROR β 和 ROR γ 3 个成员组成,分布在全身各个部位,在生理节律调节、新陈代谢紊乱、炎症发生以及免疫系统调节等生理病理过程中扮演重要角色。ROR 基因转录具有节律性,当小鼠 ROR α 缺失时,会扰乱生物钟基因 *Bmal1* 的调控,引起昼夜节律的异常^[2]。相关研究表明,小鼠缺乏 ROR α /ROR γ 可显著降低 *Cry1*、*Bmal1*、*Rev-Erba* 和 *Per2* 等时钟基因的活性^[3]。RORs 激动剂

SR1078 能够合成 ROR α /ROR γ ,提高 ROR α 和 ROR γ RNA 的表达活性,促使 ROR α /ROR γ 与目的基因启动子上的 ROR 调控元件(ROR response element, RORE)结合,刺激 ROR α /ROR γ 目的基因的表达^[4]。昼夜节律是生命适应内部环境周期变化演变而来的内在计时机制,其中环境对机体的节律性改变最大的机制是光照/黑暗循环,在维持细胞活动(如激素分泌、细胞增生和细胞内代谢等)的转化及有序性和协同性方面发挥重要作用。研究表明,不同的光照条件下角膜上皮的有丝分裂能力会发生明显改变,影响角膜创伤修复的能力^[5-7]。可见光的光子会破坏 DNA 和细胞膜、线粒体等细胞器,并通过产生活性氧和破坏细胞色素而影响细胞的呼吸作用^[8-9]。研究发现昼夜节律对角膜的正常生长发育和角膜厚度变化具有较大影响^[10],角膜上皮的更新具有日节律性^[7],光照节律也能够引起大鼠

视网膜中时钟基因的表达发生改变^[11]。越来越多的证据表明,许多疾病的发生与基因突变或环境因素引起的昼夜节律改变密切相关^[12],*ROR α /ROR γ* 在角膜、大脑、胸腺、肝脏和肺脏等多种组织中均有表达,目前关于*ROR α /ROR γ* 的相关研究主要聚焦于各种癌症、脑部及淋巴细胞发育的研究,而*ROR α /ROR γ* 对角膜影响的相关研究较少。本研究拟探讨 SR1078 对角膜上皮修复的动力学影响,观察不同昼夜节律下*ROR α /ROR γ* 表达量的动态变化及 SR1078 作用下角膜创伤修复动力学以及分裂细胞的动态变化,为 SR1078 对角膜上皮细胞创伤修复的调控及其影响因素的研究提供新的实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 选取 SPF 级健康无眼疾雌性 6~8 周龄 C57BL/6 小鼠 222 只(购于广东省医学实验动物中心),饲养于(24±2)℃、SPF 级动物房中,饲养过程中自由进食。本研究严格遵循美国视觉与眼科学协会制定的 ARVO 声明,暨暨南大学实验动物伦理委员会审核批准(批文号:JN-A-2002-01)。

1.1.2 主要试剂及仪器 SR1078(1246525-60-9)(美国 MedChemExpress 公司);磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)(广州瑞泰生物科技有限公司);RNAsimple 总 RNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司);体积分数 10% Triton-X100、水合氯醛、荧光素钠、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)(广州斯佳生物技术有限公司);4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染液(上海碧云天生物试剂公司);ReverTra Ace qPCR RT 试剂盒、SYBR Green Master Mix(日本 Bio-Toyobo 公司);引物(美国 Thermo Fisher 公司)。实时荧光定量 PCR 仪、梯度 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);高尔夫样刀(美国 Accutome 公司);SZ61 体式显微镜、正置荧光显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 小鼠分组及干预 根据小鼠饲养室接受的光照节律不同,采用随机数表法将 180 只小鼠分为昼夜节律正常组、全昼组、全夜组、昼夜颠倒 12 h 组、昼夜颠倒 3 周组,每组 36 只;根据接受的干预不同,采用随机数表法将 48 只小鼠角膜损伤模型分为 SR1078 组和 PBS 对照组,每组 24 只。各组小鼠造模前均置于可控制光照(光照强度 300 lx)及黑暗时间的节律箱中,其中昼夜节律正常组、PBS 对照组和 SR1078 组节律箱

的连续光照时间为 7:00~19:00,连续黑暗时间为 19:00~次日 7:00;昼夜颠倒 12 h 组光干预节律时间相反;昼夜颠倒 3 周组黑暗/光照模式同昼夜颠倒 12 h 组,但连续 3 周;全昼组为连续 24 h 光照状态;全夜组为连续 24 h 黑暗状态。SR1078 组和 PBS 对照组于角膜上皮损伤及修复模型造模后 0 h 分别采用 SR1078 溶液和 PBS 每隔 6 h 点眼 1 次,持续至造模后 48 h。根据 Zeitgeber Time 计时法,以开始光照时间 7:00 记为 ZT0,以关闭光照时间 19:00 记为 ZT12。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 法测定角膜中 *ROR α* 和 *ROR γ* mRNA 表达量 采用颈椎脱臼法将不同光干预节律组小鼠处死,每组各时间点(ZT1、ZT5、ZT9、ZT13、ZT17、ZT21)获取 3 只小鼠,双眼含带角膜缘的完整角膜。采用 RNAsimple 总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,通过 ReverTra Ace qPCR RT 试剂盒合成 cDNA,总反应体系为 30 μ l,反应条件为:33 $^{\circ}$ C 20 min,96 $^{\circ}$ C 7 min,3 $^{\circ}$ C 3 min,置于-20 $^{\circ}$ C 保存备用。采用 SYBR Green Master Mix 在 Applied Biosystems 7900HT 实时 PCR 系统中进行定量 PCR,分别以小鼠 *ROR α* 和 *ROR γ* 为引物,*ROR α* 正向引物序列为 5'-TCAGCA GAGCAATGCCACCTAC-3',反向引物序列为 5'-TGGA CATCCGACCAAACCTTGAC-3';*ROR γ* 正向引物序列为 5'-CAAGTCATCTGGCATCCACTACGG-3',反向引物序列为 5'-GCGGCTGTTTCGGTCAATGG-3;以 GAPDH 为内参,*GAPDH* 正向引物序列为 5'-GAAGGAC ACTGAGCAAGAG-3',反向引物序列为 5'-TGCAGCG AACTTTATTGATG-3'。热循环方案为:95 $^{\circ}$ C 510 s,60 $^{\circ}$ C 15 s,72 $^{\circ}$ C 15 s。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算各组不同时间点 *ROR α* 和 *ROR γ* mRNA 相对表达量。

1.2.3 角膜上皮损伤及修复模型的建立 PBS 对照组和 SR1078 组各选取 3 只小鼠,参照文献[13]中的方法,小鼠腹腔内注射质量分数 10%水合氯醛(0.05~0.1 ml)进行全身麻醉,在解剖台用直径 0.2 cm 的环钻标记小鼠双眼角膜中央区域,采用高尔夫样刀机械性刮除标记区域的角膜上皮。采用质量分数 2%荧光素钠点眼评估角膜上皮缺损面积。造模后即刻(0 h)开始,每隔 4 h 采用 Adobe Photoshop CC2019 软件测量角膜上皮缺损面积,直至角膜完全上皮化。计算并比较 2 个组小鼠角膜上皮缺损率。角膜上皮缺损率=造模后某时间点上皮缺损面积/造模后 0 h 角膜缺损面积×100%。造模后 0 h 角膜上皮缺损率为 100%。

1.2.4 全角膜铺片及免疫荧光染色法观察角膜上皮基底细胞分裂数 分别于造模后 12、18、24、30、36、42 和 48 h 采用颈椎脱臼法处死 PBS 对照组和 SR1078

组小鼠各 3 只,摘取双侧眼球,体积分数 2% 甲醛溶液中固定 40~60 min。在 PBS 中取出含角膜缘的完整角膜。用调速摇床振荡器将角膜上皮置于 PBS 中清洗 3 次,每次 5 min,置于质量分数 2% BSA 溶液 200 ml 中封闭 15 min,用手术刀片将角膜上皮分为中央相连的 4 个瓣,角膜上皮面朝上呈放射状置于载玻片上,滴加含有 DAPI 的封片剂,盖上盖玻片,4 ℃ 避光保存。正置荧光显微镜下观察角膜上皮分裂细胞,DAPI 染色细胞的细胞质呈亮蓝色,细胞核为白色,未分裂的角膜上皮基底细胞呈圆形或椭圆形,分裂细胞呈哑铃状。

1.2.5 小鼠角膜分区及上皮分裂细胞计数 根据文献[14]的方法对角膜进行分区(图 1),从角膜缘到角膜中央共将角膜分为 5 个区,在 5 个区的角膜中选取经角膜中央的纵向和横向 2 条相互垂直的径线,荧光显微镜下在其横向径线和纵向径线分别均匀选取 9 个目标视野进行观察并拍照,评估分裂细胞的增生及迁移情况,各视野分裂细胞之和作为完整角膜的分裂细胞数,对 PBS 对照组和 SR1078 组小鼠角膜上皮分裂细胞数量进行比较。

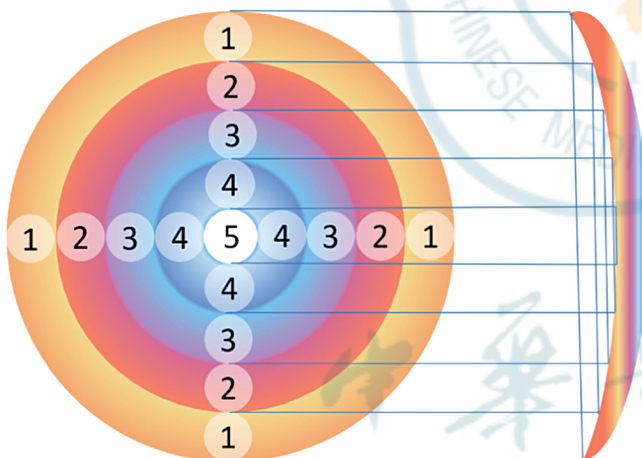


图 1 角膜分裂细胞计数分区示意图

Figure 1 Schematic diagram of corneal zoning

1.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计学软件(美国 IBM 公司)和 GraphPad Prism 6.0 软件(美国 Graphpad Software 公司)进行统计学分析和统计图绘制。本研究测试指标的计量资料经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据经 Levene 检验方差齐。各组不同时间点小鼠角膜上皮 ROR α 和 ROR γ mRNA 相对表达量及分裂细胞数量总体差异比较均采用两因素方差分析,多重比较采用 Tukey 检验。PBS 对照组与 SR1078 组造模后不同时间点角膜上皮缺损率的总体

差异比较采用两因素方差分析,多重比较采用 LSD-*t* 检验。昼夜节律正常组、全昼组、全夜组、昼夜颠倒 12 h 组和昼夜颠倒 3 周组小鼠角膜上皮 ROR α 和 ROR γ mRNA 相对表达量与角膜上皮缺损率的关联评估采用 Pearson 线性相关分析,各组小鼠角膜上皮 ROR α 和 ROR γ mRNA 相对表达量与角膜上皮缺损率变化值关系分析采用一元线性回归分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组不同时间点小鼠角膜 ROR α 和 ROR γ mRNA 相对表达量比较

昼夜节律正常组、全昼组、全夜组、昼夜颠倒 12 h 组和昼夜颠倒 3 周组不同时间点小鼠角膜 ROR α mRNA 相对表达量总体比较差异均有统计学意义($F_{\text{分组}} = 143.28, P < 0.001; F_{\text{时间}} = 30.11, P < 0.001$),其中与昼夜节律正常组比较,全夜组小鼠在 ZT5、ZT9、ZT13 和 ZT17 角膜中 ROR α mRNA 相对表达量均显著降低,全昼组小鼠在 ZT5、ZT9 和 ZT13 角膜中 ROR α mRNA 相对表达量均显著降低,昼夜颠倒 12 h 组 ROR α mRNA 相对表达量在 ZT9、ZT13 和 ZT17 均显著降低,昼夜颠倒 3 周组 ROR α mRNA 相对表达量在 ZT9、ZT13、ZT17 和 ZT21 均显著降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表 1)。

昼夜节律正常组、全昼组、全夜组、昼夜颠倒 12 h 组和昼夜颠倒 3 周组不同时间点小鼠角膜 ROR γ mRNA 相对表达量总体比较差异均有统计学意义($F_{\text{分组}} = 91.27, P < 0.001; F_{\text{时间}} = 66.34, P < 0.001$),其中与昼夜节律正常组比较,全夜组和全昼组小鼠角膜 ROR γ mRNA 相对表达量在 ZT13、ZT17、ZT21 均显著降低,昼夜颠倒 12 h 组 ROR γ mRNA 相对表达量在 ZT13 和 ZT17 均显著降低,昼夜颠倒 3 周组 ROR γ mRNA 相对表达量在 ZT9、ZT13、ZT17 和 ZT21 均显著降低,在 ZT5 显著增加,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)(表 2)。

2.2 PBS 对照组与 SR1078 组小鼠角膜上皮缺损率比较

随着造模后时间的延长,SR1078 组和 PBS 对照组小鼠角膜上皮荧光素染色面积逐渐缩小,造模后 48 h 角膜染色消失,角膜上皮光滑。造模后 12 h SR1078 组小鼠角膜上皮荧光素染色面积小于 PBS 对照组,造模后 24 h 2 个组角膜上皮染色面积接近(图 2)。造模后 12 h,SR1078 组角膜上皮缺损面积明显小于 PBS 对照组。造模后不同时间点 PBS 对照组

与 SR1078 组小鼠角膜角膜上皮缺损率总体比较差异均有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 74.01, P < 0.001$; $F_{\text{时间}} = 5171.48, P < 0.001$), 其中造模后 12 h SR1078 组角膜上皮角膜缺损率明显低于 PBS 对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 造模后 18 h 和 24 h, 2 个组角膜上皮角膜缺损率比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (表 3)。

2.3 小鼠角膜上皮缺损率与 ROR α 和 ROR γ mRNA 相对表达量的关联性

ROR α 和 ROR γ mRNA 相对表达量与小鼠角膜上皮缺损率均呈中度正相关 ($r = 0.614, 0.537$, 均 $P < 0.01$)。ROR α mRNA 相对表达量是小鼠角膜上皮缺损率高的主要影响因素, 其对角膜上皮缺损率的影响量约为 38%, 线性回归方程为 $Y = 33.153X - 43.052 (F = 20.58, P < 0.001)$; ROR γ mRNA 相对表达量对小鼠角膜上皮缺损率的影响量约为 29%, 线性回归方程为 $Y = 2.764X - 1.364 (F = 13.11, P < 0.001)$ (图 3)。

2.4 SR1078 组与 PBS 对照组小鼠角膜上皮分裂细胞数量比较

DAPI 染色后荧光显微镜下可见角膜上皮基底细胞的细胞质呈亮蓝色, 细胞核呈白色。未分裂的细胞呈圆或椭圆形, 分裂细胞呈哑铃状 (图 4)。造模后不同时间点 SR1078 组与 PBS 对照组小鼠角膜上皮分裂细胞数量总体比较差异有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 160.55, P < 0.001$; $F_{\text{时间}} = 83.57, P < 0.001$), 其中造模后 24、30、36 h SR1078 组分裂细胞数目显著少于 PBS 对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 4)。

表 1 各组不同时间点小鼠角膜中 ROR α mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of the relative expression level of ROR α mRNA in mouse cornea at various time points among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	不同时间点 ROR α mRNA 相对表达量					
		ZT1	ZT5	ZT9	ZT13	ZT17	ZT21
昼夜节律正常组	6	2.43±0.08	2.63±0.28	7.40±1.27	4.40±1.04	4.67±1.31	2.83±0.97
全夜组	6	0.66±0.02	0.34±0.45 ^a	2.35±0.59 ^a	0.69±0.07 ^a	1.07±0.28 ^a	2.11±0.82
全昼组	6	2.19±0.12	1.12±0.18 ^a	1.43±0.18 ^a	0.93±0.25 ^a	3.33±0.99	2.97±0.60
昼夜颠倒 12 h 组	6	1.59±0.55	2.24±0.35	3.73±0.21 ^a	2.19±0.23 ^a	2.37±0.55 ^a	1.71±0.14
昼夜颠倒 3 周组	6	0.96±0.19	1.05±0.24	0.22±0.21 ^a	0.91±0.49 ^a	1.09±0.01 ^a	0.13±0.03 ^a

注: $F_{\text{分组}} = 143.28, P < 0.001$; $F_{\text{时间}} = 30.11, P < 0.001$ 。与各自时间点昼夜节律正常组比较, ^a $P < 0.05$ (两因素方差分析, Tukey 检验) ROR: 视黄酸相关孤儿受体
Note: $F_{\text{group}} = 143.28, P < 0.001$; $F_{\text{time}} = 30.11, P < 0.001$. Compared with the normal circadian rhythm group at corresponding time points, ^a $P < 0.05$ (Two-way ANOVA, Tukey test) ROR: retinoic acid-related orphan receptor

表 2 各组不同时间点小鼠角膜中 ROR γ mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of the relative expression level of ROR γ mRNA in mouse cornea at various time points among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	不同时间点 ROR γ mRNA 相对表达量					
		ZT1	ZT5	ZT9	ZT13	ZT17	ZT21
昼夜节律正常组	6	15.97±1.88	7.22±1.03	10.04±1.38	21.23±3.21	29.60±2.82	23.71±0.53
全夜组	6	13.91±1.82	4.52±0.97	8.59±1.34	10.47±5.21 ^a	13.11±2.12 ^a	2.11±0.56 ^a
全昼组	6	6.29±3.51	10.80±1.64	11.86±1.63	5.00±1.98 ^a	10.08±3.17 ^a	10.11±1.05 ^a
昼夜颠倒 12 h 组	6	13.26±1.09	5.95±1.30	12.91±2.84	15.12±1.08 ^a	18.55±5.58 ^a	20.54±2.65
昼夜颠倒 3 周组	6	7.90±1.13	17.60±0.69 ^a	2.30±0.37 ^a	2.28±0.51 ^a	2.59±1.62 ^a	5.00±0.17 ^a

注: $F_{\text{分组}} = 91.27, P < 0.001$; $F_{\text{时间}} = 66.34, P < 0.001$ 。与各自时间点昼夜节律正常组比较, ^a $P < 0.05$ (两因素方差分析, Tukey 检验) ROR: 视黄酸相关孤儿受体
Note: $F_{\text{group}} = 91.27, P < 0.001$; $F_{\text{time}} = 66.34, P < 0.001$. Compared with the normal circadian rhythm group at corresponding time points, ^a $P < 0.05$ (Two-way ANOVA, Tukey test) ROR: retinoic acid-related orphan receptor

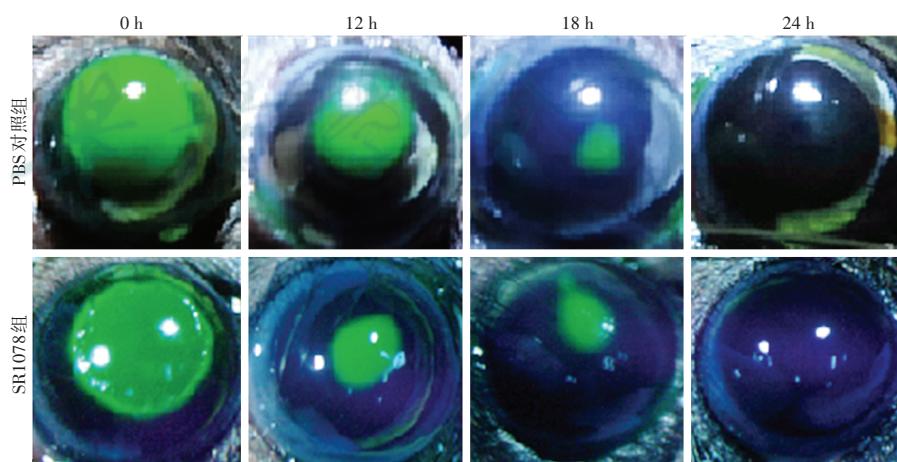


图 2 PBS 对照组和 SR1078 组造模后各时间点角膜荧光素染色面积变化 随着造模后时间的延长, 2 个组小鼠角膜荧光素染色面积均逐渐缩小, 造模后 12 h SR1078 组小鼠角膜荧光素染色面积小于 PBS 对照组, 造模后 48 h 2 个组角膜荧光素染色均消失 PBS: 磷酸盐缓冲液; SR1078: 视黄酸受体相关孤儿受体激动剂

Figure 2 Comparison of corneal fluorescein staining area at various time points between the PBS control group and SR1078 group The corneal fluorescein staining area was gradually shrunk in the two groups over time. The corneal fluorescein staining area was smaller in the SR1078 group compared with the PBS control group at 12 hours after modeling. The corneas were clear at 48 hours after modeling in both groups PBS: phosphate buffered saline; SR1078: retinoic acid receptor-related orphans receptor agonist

表 3 PBS 对照组和 SR1078 组小鼠角膜创伤后

不同时间点角膜上皮缺损率比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 3 Comparison of corneal epithelial defect rate at different time points between PBS control group and SR1078 group ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	创伤后不同时间点角膜上皮缺损率		
		0 h	12 h	18 h
PBS 对照组	6	100.000±0.000	45.717±1.902	20.122±3.421
SR1078 组	6	100.000±0.000	25.997±2.969 ^a	19.118±3.270

注: $F_{\text{组别}} = 74.01, P < 0.001; F_{\text{时间}} = 5171.48, P < 0.001$. 与 PBS 对照组比较, ^a $P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) PBS: 磷酸盐缓冲液; SR1078: 视黄酸受体相关孤儿受体激动剂

Note: $F_{\text{group}} = 74.01, P < 0.001; F_{\text{time}} = 5171.48, P < 0.001$. Compared with the PBS control group, ^a $P < 0.05$ (Two-way ANOVA, LSD-*t* test) PBS: phosphate buffered saline; SR1078: retinoic acid receptor-related orphan receptor agonist

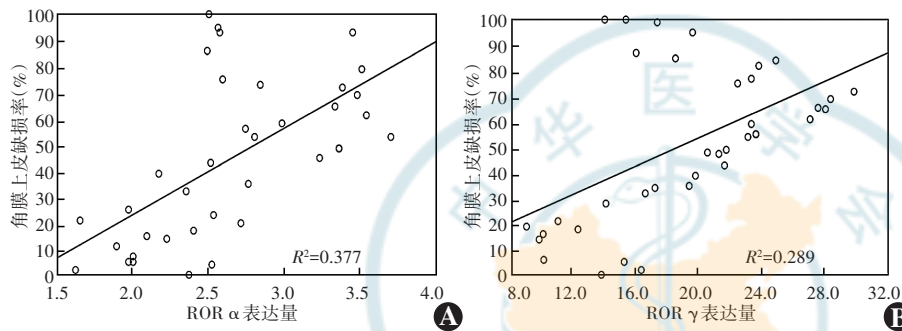


图 3 ROR α 和 ROR γ mRNA 相对表达量与角膜上皮缺损率的关联分析 (Pearson 线性相关分析, 一元线性回归分析, $n = 36$) A: ROR α mRNA 表达量与角膜上皮缺损率呈中度正相关 ($r = 0.614, P < 0.01$), 其对角膜上皮缺损率的影响约为 38% ($R^2 = 0.377$) B: ROR γ mRNA 表达量与角膜上皮缺损率呈中度正相关 ($r = 0.537, P < 0.01$), 其对角膜上皮缺损率的影响约为 29% ($R^2 = 0.289$) ROR: 视黄酸相关孤儿受体

Figure 3 Association analysis of relative expression of ROR α , ROR γ mRNA and corneal epithelial defect rate (Pearson linear correlation analysis, unary linear regression analysis, $n = 36$) A: ROR α mRNA expression and corneal epithelial defect rate was positively correlated ($r = 0.614, P < 0.01$), and the contribution of ROR α mRNA expression to corneal epithelial defect rate was 38% ($R^2 = 0.377$) B: ROR γ mRNA expression was positively correlated with corneal epithelial defect rate ($r = 0.537, P < 0.01$), and the contribution of ROR γ mRNA expression to corneal epithelial defect rate was 29% ($R^2 = 0.289$) ROR: retinoic acid-related orphan receptor

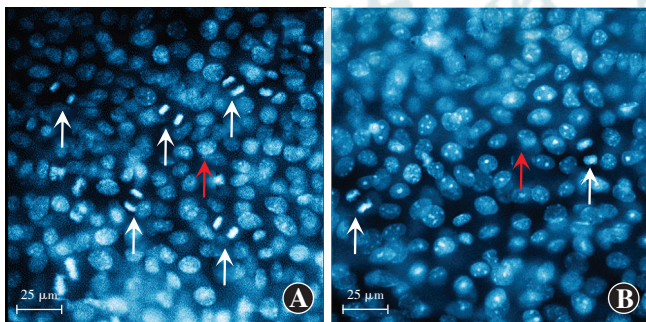


图 4 造模后 36 h PBS 对照组与 SR1078 组小鼠角膜上皮基底细胞分裂细胞数比较 (DAPI $\times 40$, 标尺 = 25 μm) 完整角膜上皮基底细胞呈圆或椭圆形 (红箭头), 分裂的细胞呈哑铃状 (白箭头) SR1078 组角膜上皮分裂细胞数明显少于 PBS 对照组 A: PBS 对照组 B: SR1078 组

Figure 4 Comparison of the number of mouse corneal epithelial mitotic cells between the PBS control group and SR1078 group at 36 hours after corneal trauma (DAPI $\times 40$, bar = 25 μm) The normal cells (red arrow) were round or oval, and the mitotic cell (white arrow) was dumbbell-like. The number of mitotic cells was less in the SR1078 group compared with the PBS control group A: PBS control group B: SR1078 group

3 讨论

研究表明, ROR α /ROR γ 的缺乏会引起组织中时钟基因 *Cry1*、*Bmal1*、*E4bp4*、*Rev-Erb α* 和 *Per2* 的峰值表达水平显著降低^[15]。时钟基因的表达受环境的调控, 其中主要的环境因子为光周期。光线从视网膜直接投射传送到视交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN), SCN 再将节律信号传送到其他器官, 发挥组织生物钟同步化的作用^[16], 生物钟是由 4 个时钟基因 *Clock*、*Bmal1*、*Per2* 和 *Cry* 组成的正负调节所调控, 这一回路是“转录-翻译-逆转录”机制构成的反馈环路^[17]。有研究表明, 当小鼠受到连续光照或处于 12 h 时差反应的条件时, 通过昼夜节律控制去甲肾上腺素分泌, 交感神经系统会明显改变造血干细胞向外周血的昼夜节律释放^[18]。考虑到角膜上皮有丝分裂中的昼夜节律变化, 推测调控时钟基因的 ROR α /ROR γ 可能在一天中的不同时间存在差异表达, 并且它们的表达量可能受环境明暗周期变化的调节, 进而影响动物的生理病理过程。本研究采用实时荧光定量 PCR 法测定正常昼夜节律下 24 h 内小鼠角膜中 ROR α /ROR γ mRNA 表达量的动态变化, 发现与正常昼夜节律比较, 在 24 h 持续光照或黑暗条件下小鼠角膜中 ROR α /ROR γ mRNA 表达量呈下降趋势, 说明 ROR α /ROR γ mRNA 表达量会受到小鼠昼夜节律的影响。在连续 24 h 的黑暗或光照模拟状态下, 小鼠由于生物钟节律的紊乱, 角膜中 ROR α /ROR γ mRNA 的表达量在某些时间段发生异常变化。为了验证小鼠角膜中 ROR α /ROR γ mRNA 的表达量是否与生物钟紊乱有关, 本研究又设立了昼夜颠倒 12 h 组和昼夜颠倒 3 周组对上述结论进行验证, 发现当小鼠昼夜节律与正常小鼠完全颠倒时, 小鼠角膜中 ROR α /ROR γ mRNA 表达量同样呈降低趋势, 且随时间的延长该效应越明显。相关研究表明, ROR α /ROR γ 对于机体昼夜节律的调控

表 4 各组小鼠角膜创伤后不同时间点分裂细胞数量比较 ($\bar{x} \pm s$, 个/角膜)
Table 4 Comparison of the number of mitotic cells at various time points between the two groups ($\bar{x} \pm s$, pcs/cornea)

组别	样本量	创伤后不同时间点分裂细胞数量						
		12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	42 h	48 h
PBS 对照组	6	38±7	33±8	128±3	150±26	221±31	80±21	30±9
SR1078 组	6	25±2	52±3	53±2 ^a	74±10 ^a	75±13 ^a	43±2	29±3

注: $F_{\text{分组}} = 160.55, P < 0.001$; $F_{\text{时间}} = 83.57, P < 0.001$. 与 PBS 对照组比较, ^a $P < 0.001$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) PBS: 磷酸盐缓冲液; SR1078: 视黄酸受体相关孤儿受体激动剂

Note: $F_{\text{group}} = 160.55, P < 0.001$; $F_{\text{time}} = 83.57, P < 0.001$. Compared with the PBS control group, ^a $P < 0.001$ (Two-way ANOVA, LSD-*t* test) PBS: phosphate buffered saline; SR1078: retinoic acid receptor-related orphan receptor agonist

具有重要作用, ROR α 对机体节律性的调控主要是由 *bmal1* 基因通过与 RORE 位点结合而调控基因转录, 而 *Bmal1* 基因是生物节律体系中的重要因子, 其含量随着时间的变化不断呈现规律性的增长和消退, 其中 ROR α 能激活 *Bmal1* 基因, 而 REV-ERB α 的作用则相反, 与 ROR α 竞争性地结合 RORE 位点, 从而抑制或激活 *Bmal1* 基因的转录^[19]。对斑马鱼的研究中也同样说明, 斑马鱼的 *Per2* 基因可通过与 ROR α 结合增强 *bmal1b* 基因的表达^[20]。

根据相关研究, 斑马鱼肠道细胞分裂具有节律性^[21], 角膜缘的干细胞也同样具有节律性, 且对创伤十分敏感, 角膜上皮细胞受到损伤时, 基底细胞会迅速进行分裂以补足损伤区域, 以完成再分化过程。研究表明, 小鼠角膜创伤后 12 h 和 18 h 角膜再上皮化速度加快, 角膜上皮分裂细胞的正常节律受到睡眠颠倒的影响而发生改变^[22]。本研究中通过 SR1078 的作用对小鼠角膜创伤模型进行恢复实验, 在创伤修复过程中应用 SR1078 点眼, 但与 PBS 对照组比较总体恢复时间无明显变化, 而给药后的小鼠角膜上皮分裂细胞数明显少于 PBS 对照组, 这也许意味着 ROR α /ROR γ 的增多具有抑制创伤修复的作用。根据相关研究, 时钟基因在细胞分化生长方面具有重要作用, 如 *Per* 基因具有抑制细胞生长和抑制肿瘤的功能, *Per2* 基因的缺失会引起小鼠异常的细胞凋亡和癌症的发生, 也会导致细胞分裂的错误发生, 使正常的细胞分裂过程受到干扰^[23-24]。因此根据本研究结果我们推测, SR1078 点眼后, 小鼠角膜中 ROR α /ROR γ 的表达量增多, 阻碍了小鼠角膜上皮分裂细胞的分化, 可能是由于大量外源性 ROR α /ROR γ 的侵入, 使 ROR α /ROR γ 调控的基因表达发生改变, 如 ROR γ 通过 RORE 对 *BMAL1* 基因的表达过剩, 同时 ROR α 和 *Per2* 基因的大量结合, 引起 *Per2* 基因减少, 使时钟基因无法正常表达。

角膜创伤修复的目的是促进角膜上皮修复过程, 并使阻碍角膜创伤的因素降到最低。有效阻断影响角膜创伤修复过程的不良因素可最大程度地促进角膜创伤的修复过程, 并减轻其所造成的不良反应发生风险。本研究全昼组小鼠的持续光照可产生焦躁情绪, 引起应激反应, 对实验结果可能造成一定误差。但本研究仍然提示, 正常昼夜节律的扰乱加速了角膜创伤修复的过程, 其原因可能是机体对外界昼夜周期的

变化发生反应, 导致 ROR α /ROR γ 的表达量下降, 促进了角膜上皮细胞的分裂过程。角膜作为视觉系统重要的屈光介质之一, 与外界直接接触发生损伤的风险极大, 因此了解与角膜创伤修复相关调节因子的昼夜节律变化对角膜创伤修复的防治具有重要意义。本研究针对 SR1078 是否对角膜创伤修复产生影响这一问题, 通过昼夜节律的改变对角膜中 ROR α /ROR γ 的表达量进行分析, 分别从组织和细胞水平研究 ROR α /ROR γ 激动剂 SR1078 对角膜上皮细胞分化的影响, 阐释 SR1078 在角膜创伤修复中的作用机制, 为角膜创伤修复的临床防治提供新的理论基础。

综上所述, ROR α /ROR γ 激动剂 SR1078 对角膜创伤修复的过程能够产生调节作用。光线不规律照射破坏了小鼠正常昼夜节律, 激活 REV-ERB α 与 ROR α 竞争性结合 RORE 位点的活性, 从而抑制或激活 *Bmal1* 基因的转录, 进而使小鼠角膜中 ROR α 和 ROR γ mRNA 的表达量下降, 而 SR1078 通过促进角膜上皮 ROR α 和 ROR γ 的表达, 使小鼠角膜上皮分裂细胞数目下降, 抑制角膜创伤后修复。SR1078 对时钟基因作用的机制仍需进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在任何利益冲突

作者贡献声明 徐鹏洋: 实施研究方案、采集数据、制作图表、撰写及修改论文; 李志杰: 指导研究方案、修改论文; 薛芸霞: 设计与指导研究方案、审核研究数据、修改论文

参考文献

- [1] Liu CY, Kao WW. Corneal epithelial wound healing[J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2015, 134: 61-71. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2015.05.002.
- [2] Gibbs JE, Ray DW. The role of the circadian clock in rheumatoid arthritis[J/OL]. Arthritis Res Ther, 2013, 15(1): 205 [2021-06-10]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23427807/. DOI: 10.1186/ar4146.
- [3] Takeda Y, Jothi R, Birault V, et al. ROR γ directly regulates the circadian expression of clock genes and downstream targets *in vivo*

- [J/OL]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(17): 8519–8535 [2021–06–10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22753030/>. DOI: 10.1093/nar/gks630.
- [4] Wang Y, Kumar N, Nuhant P, et al. Identification of SR1078, a synthetic agonist for the orphan nuclear receptors ROR α and ROR γ [J]. ACS Chem Biol, 2010, 5(11): 1029–1034. DOI: 10.1021/cb100223d.
- [5] Takasu NN, Nakamura TJ, Tokuda IT, et al. Recovery from age-related infertility under environmental light-dark cycles adjusted to the intrinsic circadian period [J]. Cell Rep, 2015, 12(9): 1407–1413. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.07.049.
- [6] Tamai TK, Young LC, Cox CA, et al. Light acts on the zebrafish circadian clock to suppress rhythmic mitosis and cell proliferation [J]. J Biol Rhythms, 2012, 27(3): 226–236. DOI: 10.1177/0748730412440861.
- [7] Xue Y, Liu P, Wang H, et al. Modulation of circadian rhythms affects corneal epithelium renewal and repair in mice [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2017, 58(3): 1865–1874. DOI: 10.1167/iovs.16-21154.
- [8] Whitmore D, Foulkes NS, Sassone-Corsi P. Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock [J]. Nature, 2000, 404(6773): 87–91. DOI: 10.1038/35003589.
- [9] King A, Gottlieb E, Brooks DG, et al. Mitochondria-derived reactive oxygen species mediate blue light-induced death of retinal pigment epithelial cells [J]. Photochem Photobiol, 2004, 79(5): 470–475. DOI: 10.1562/le-03-17.1.
- [10] Cohen Y, Belkin M, Yehezkel O, et al. Dependency between light intensity and refractive development under light-dark cycles [J]. Exp Eye Res, 2011, 92(1): 40–46. DOI: 10.1016/j.exer.2010.10.012.
- [11] 徐金华, 林琳, 王育良, 等. 光照节律改变对大鼠视网膜中 Cry2 表达的影响 [J]. 中华实验眼科杂志, 2012, 30(11): 994–998. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.11.008.
- Xu JH, Lin L, Wang YL, et al. Effect of light rhythm on the expression of cryptochrom 2 in retina [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2012, 30(11): 994–998. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.11.008.
- [12] Evans JA, Davidson AJ. Health consequences of circadian disruption in humans and animal models [J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2013, 119: 283–323. DOI: 10.1016/B978-0-12-396971-2.00010-5.
- [13] Li Z, Burns AR, Han L, et al. IL-17 and VEGF are necessary for efficient corneal nerve regeneration [J]. Am J Pathol, 2011, 178(3): 1106–1116. DOI: 10.1016/j.ajpath.2010.12.001.
- [14] Byeseda SE, Burns AR, Dieffenbaugher S, et al. ICAM-1 is necessary for epithelial recruitment of gammadelta T cells and efficient corneal wound healing [J]. Am J Pathol, 2009, 175(2): 571–579. DOI: 10.2353/ajpath.2009.090112.
- [15] Takeda Y, Jothi R, Birault V, et al. ROR γ directly regulates the circadian expression of clock genes and downstream targets *in vivo* [J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(17): 8519–8535. DOI: 10.1093/nar/gks630.
- [16] Lehman MN, Silver R, Gladstone WR, et al. Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain [J]. J Neurosci, 1987, 7(6): 1626–1638. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.07-06-01626.1987.
- [17] Ciarleglio CM, Ryckman KK, Servick SV, et al. Genetic differences in human circadian clock genes among worldwide populations [J]. J Biol Rhythms, 2008, 23(4): 330–340. DOI: 10.1177/0748730408320284.
- [18] Méndez-Ferrer S, Lucas D, Battista M, et al. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations [J]. Nature, 2008, 452(7186): 442–447. DOI: 10.1038/nature06685.
- [19] DeBruyne JP, Weaver DR, Reppert SM. CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock [J]. Nat Neurosci, 2007, 10(5): 543–545. DOI: 10.1038/nn1884.
- [20] Wang M, Zhong Z, Zhong Y, et al. The zebrafish period2 protein positively regulates the circadian clock through mediation of retinoic acid receptor (RAR)-related orphan receptor α (Ror α) [J]. J Biol Chem, 2015, 290(7): 4367–4382. DOI: 10.1074/jbc.M114.605022.
- [21] Peyric E, Moore HA, Whitmore D. Circadian clock regulation of the cell cycle in the zebrafish intestine [J/OL]. PLoS One, 2013, 8(8): e73209 [2021–06–15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24013905/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0073209.
- [22] 何靖新, 林妍, 徐鹏洋, 等. 昼夜节律颠倒对小鼠角膜上皮创伤修复的影响 [J]. 中华实验眼科杂志, 2019, 37(7): 514–520. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.07.004.
- He JX, Lin Y, Xu PY, et al. Wound healing of corneal epithelium in mice affected by reversed circadian rhythms [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2019, 37(7): 514–520. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.07.004.
- [23] Fu L, Lee CC. The circadian clock: pacemaker and tumour suppressor [J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(5): 350–361. DOI: 10.1038/nrc1072.
- [24] Toh KL, Jones CR, He Y, et al. An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome [J]. Science, 2001, 291(5506): 1040–1043. DOI: 10.1126/science.1057499.

(收稿日期:2021-07-10 修回日期:2022-01-04)

(本文编辑:尹卫靖 刘艳)

广告目次

- 瑞秀复(眼科用生物羊膜) 广州瑞泰生物科技有限公司……封二
- 尼目克司(醋甲唑胺片) 杭州仟源保灵药业有限公司……前插页
- 沃丽汀(卵磷脂络合碘片) 广东泰恩康医药股份有限公司……前插页
- 同息通(曲安奈德注射液) 广东省医药进出口公司珠海公司……后插页
- 递法明片 惠州市百吉瑞医药有限公司……后插页
- 欧蓝(人工晶状体) 天津高视晶品医疗技术有限公司……封三
- 迈达科技 天津迈达科技股份有限公司……封底