· 实验研究 ·

m6A 去甲基化酶 ALKBH5 在形觉剥夺性近视豚鼠中的表达变化及其意义

向小玲[1]　廖萱[1]　孟茄玉[2]　周桂梅[1]　周红[1]　周美媚[1]

[1]川北医学院附属医院眼科　川北医学院眼视光医学院，南充 637000；[2]电子科技大学医学院四川省人民医院医学遗传中心　四川省人类疾病基因研究重点实验室，成都 611731

通信作者：廖萱，Email：aleexand@163.com

【摘要】 **目的**　探讨形觉剥夺性近视（FDM）豚鼠视网膜中 m6A 去甲基化酶 AlkB 同源蛋白 5（ALKBH5）表达变化及其参与近视的作用机制。 **方法**　采用随机数字表法将 30 只健康 SPF 级 3 周龄三色豚鼠分为正常对照组和实验组，每组 15 只。实验组中眼罩遮盖右眼作为 FDM 组，暴露左眼为自身对照组。分别于实验前及实验 1、2、3 和 4 周时进行豚鼠眼生物学参数测量。采用带状光检影镜测量屈光度，采用 A 型超声仪测量眼轴长度。实验 4 周，通过免疫组织化学染色和免疫荧光染色检测 ALKBH5 在豚鼠视网膜中的表达分布。采用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 法检测豚鼠视网膜中 ALKBH5 mRNA 和蛋白表达情况。 **结果**　与正常对照组和自身对照组相比，实验 2、3 和 4 周，FDM 组豚鼠近视屈光度明显增加，眼轴显著增长，差异均有统计学意义（均 $P<0.001$）。免疫组织化学染色和免疫荧光染色显示，ALKBH5 分布在视网膜神经纤维层、视锥视杆细胞层和视网膜色素上皮（RPE）层，其中以神经纤维层和 RPE 层为主。正常对照组、自身对照组和 FDM 组豚鼠 ALKBH5 蛋白相对荧光强度值分别为 1.000±0.204、0.874±0.076 和 0.571±0.053，FDM 组视网膜中 ALKBH5 蛋白荧光强度值明显小于正常对照组和自身对照组，差异均有统计学意义（$t=4.069$，$P=0.006$；$t=5.176$，$P=0.014$）。造模后 4 周，FDM 组豚鼠视网膜中 ALKBH5 mRNA 和蛋白相对表达量明显低于正常对照组和自身对照组，差异均有统计学意义（均 $P<0.01$）。 **结论**　FDM 组豚鼠视网膜中 m6A 去甲基化酶 ALKBH5 表达下降，ALKBH5 及相关 m6A 甲基化修饰可能参与了近视的发生和发展。

【关键词】 近视；豚鼠；AlkB 同源蛋白 5，RNA 去甲基酶；m6A 甲基化；发病机制

基金项目： 四川省科技厅自然科学基金（2023NSFSC0595）；南充市市校科技战略合作项目（22SXFWDF0003）；川北医学院附属医院科研发展计划重点项目（2023ZD010）

DOI：10.3760/cma.j.cn115989-20231028-00156

Changes in m6A demethylase ALKBH5 expression in form-deprivation myopic guinea pigs and its significance

Xiang Xiaoling[1], Liao Xuan[1], Meng Jiayu[2], Zhou Guimei[1], Zhou Hong[1], Zhou Xianmei[1]

[1]Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Medical School of Ophthalmology & Optometry, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China; [2]The Sichuan Provincial Key Laboratory for Human Disease Gene Study, the Center for Medical Genetics, Sichuan Provincial People's Hospital, School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 611731, China

Corresponding author: Liao Xuan, Email: aleexand@163.com

[**Abstract**] **Objective**　To investigate the alteration of m6A demethylase AlkB homolog 5 (ALKBH5) expression and its impact on form-deprivation myopia (FDM) retina in guinea pigs. **Methods**　Thirty normal SPF grade 3-week-old tricolor guinea pigs were randomly divided into normal control group and experimental group, with 15 in each group. In the experimental group, the right eyes were covered as FDM group and the left eyes uncovered were set as self-control group. Ocular biometry was performed at one-week intervals from baseline to week 4 of the experiment. Spherical equivalent was detected by streak retinoscopy and axial length was measured by A-scan ultrasonography. Animals were sacrificed after 4 weeks of modeling. The distribution and expression of ALKBH5 protein in the guinea pig retina was detected by immunohistochemical and immunofluorescence staining. Expression of ALKBH5 mRNA and protein in guinea pig retina was detected by real-time fluorescence quantitative PCR and

中華醫學會雜誌社 Chinese Medical Association Publishing House 版权所有 违者必究

Western blot, respectively. The use of animals in ophthalmic and vision research followed the tenets of Animal Research in Vision and Ophthalmology, and the study was approved by the Ethics Committee of North Sichuan Medical College (No. 2023087). **Results** At weeks 2, 3, and 4 after myopia induction, diopters and axial lengths were significantly higher in the FDM group than in the normal control group and the self-control group (all at $P<0.001$). Immunohistochemistry and immunofluorescence assays showed that ALKBH5 protein was expressed in the retinal nerve fiber layer, rod/cone photoreceptor cells, and retinal pigment epithelium (RPE) layer, and was highly expressed in the retinal nerve fiber layer and RPE layer. The relative ALKBH5 immunofluorescence intensity in the normal control group, self-control group and FDM group was 1.000±0.204, 0.874±0.076 and 0.571±0.053, respectively, which was lower in the FDM group than in the normal control and self-control groups, showing statistically significant differences ($t=4.069$, $P=0.006$; $t=5.176$, $P=0.014$). After 4 weeks of modeling, ALKBH5 mRNA and protein expressions were significantly lower in FDM group than in normal control and self-control groups (both at $P<0.01$). **Conclusions** The expression of m6A demethylase ALKBH5 is decreased in the retina of FDM guinea pigs, suggesting that ALKBH5 and related m6A methylation modification may be involved in the development and progression of myopia.

[**Key words**] Myopia; Guinea pigs; AlkB homolog 5, RNA demethylase; m6A methylation; Pathogenesis

Fund program: Natural Science Foundation Project of Sichuan Provincial Department of Science and Technology (2023NSFSC0595); Project of the Strategic Cooperation of City and College in Nanchong (22SXFWDF0003); Key Projects of the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College (2023ZD010)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20231028-00156

近年来，近视发病率持续上升并呈现低龄化、高度化趋势，已成为重要的公共卫生问题。高度近视可能导致近视性黄斑病变、视网膜变性及后巩膜葡萄肿等一系列眼底病变的形成和进展，给个人和社会带来沉重负担[1-2]。近视是一种受遗传因素、环境因素及遗传与环境交互作用影响的多因素复杂疾病，目前仍无法完全揭示其发生和发展机制。针对近视的表观遗传学研究逐渐进入人们视野，DNA 甲基化、非编码 RNA 调控、组蛋白修饰及 mRNA 修饰等遗传作用已被证实与近视及其并发症相关[3]。作为表观遗传学的一部分，RNA 甲基化修饰也发挥重要作用。动态可逆的 N6 甲基腺苷（N6 methyladenine, m6A）修饰是真核生物 mRNA 修饰中非常广泛和重要的一类，在细胞通信中发挥关键作用，对细胞生物学过程具有显著调控作用，包括 RNA 稳定、翻译、降解、昼夜节律调控、能量稳态和代谢等[4-7]。m6A 甲基化修饰主要通过甲基转移酶（METTL3、METTL14 和 WTAP）、去甲基化酶［AlkB 同源蛋白 5（AlkB homolog 5, ALKBH5）和 FTO］和结合蛋白（YTHDF1、YTHDF2 和 YTHDF3）这 3 类调节因子参与协调完成。关于 m6A 甲基化修饰的研究，在肿瘤和代谢性疾病方面已有报道[7-8]。眼部疾病中，m6A 甲基化修饰被证实与角膜新生血管、白内障、青光眼、脉络膜疾病、视网膜疾病和眼部肿瘤等相关[9-11]。最近关于高度近视眼核性白内障的研究发现，晶状体前囊膜中包括 ALKBH5 在内的 m6A 甲基化修饰相关酶可能通过改变下游基因甲基化状态和调节细胞外基质的组成来促进高度近视的病理状态[12]。也有研究通过豚鼠近视模型发现，维持脉络膜血管功能的关键因子 tRF-22 通过介导 m6A 修饰调节脉络膜血管功能和巩膜氧供来参与调节近视进展[13]。这些研究证实了 m6A 甲基化修饰可能与近视的发生和发展相关。本研究通过建立豚鼠形觉剥夺性近视（form-deprivation myopia, FDM）模型，检测 m6A 去甲基化酶 ALKBH5 的表达及定位，并探索 ALKBH5 及其相关的 m6A 甲基化修饰在近视发生和发展中的作用。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物　选取健康 3 周龄 SPF 级三色雄性豚鼠 30 只，由川北医学院实验动物中心提供［许可证号：SYXK（川）2018-076］，体质量 130～150 g。所有豚鼠均饲养于 SPF 级实验室，温度（25±2）℃，湿度为 60%，光照强度约为 300 lx，每日光照/黑暗时间为 12 h/12 h（光照时间为 8:00—20:00）。豚鼠的喂养及操作完全遵循《视觉和眼科动物研究声明》原则，研究方案经川北医学院伦理委员会审核批准（批文号：2023087）。

1.1.2　主要试剂及仪器　复方托吡卡胺滴眼液、盐酸奥布卡因滴眼液（日本参天制药株式会社）；Trizol（上海碧云天生物技术有限公司）；逆转录及 PCR 试剂盒（日本 TaKaRa 公司）；兔抗 ALKBH5 多克隆抗体（16837-1-AP）、山羊抗兔 594 荧光二抗（SA00013-4,

中华医学会杂志社 Chinese Medical Association Publishing House 版权所有 违者必究

武汉三鹰生物技术有限公司);兔抗 GAPDH 单克隆抗体(ET1601-4,杭州华安生物技术有限公司);DAPI 溶液(北京索莱宝科技有限公司)。Cinescan A/B 型超声检查仪(法国光太公司);YZ24B 带状光检影镜(苏州六六视觉科技股份有限公司);实时荧光定量 PCR 仪(法国 Roche 公司);酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);全自动凝胶成像图像分析仪(法国 Vilber 公司);显微镜(德国 Leica 公司)。

1.2　方法

1.2.1　实验动物分组处理　采用随机数字表法将豚鼠分为正常对照组和 FDM 组,每组 15 只。正常对照组双眼不做任何处理;FDM 组豚鼠右眼采用半透明乳胶气球连续遮盖 4 周,左眼不予任何处理设为自身对照组。

1.2.2　眼生物学参数的测量　参照文献[14-15],分别于实验前及实验 1、2、3 和 4 周行豚鼠屈光度和眼轴长度测量。采用复方托吡卡胺滴眼液充分扩瞳,于暗室行带状光检影测量屈光度,换算为等效球镜度。采用盐酸奥布卡因滴眼液进行豚鼠角膜表面麻醉后,采用 A 型超声仪测量眼轴长度,即前房深度、晶状体厚度和玻璃体腔长度三者之和。测量时仪器探头垂直接触角膜平面并对准瞳孔中心,取较理想的波形。每眼测量 5 次,选择重复性较好的 3 次取平均值。

1.2.3　免疫组织化学染色和免疫荧光染色检测视网膜 ALKBH5 蛋白表达分布　造模结束后,每组任取 5 只豚鼠,过量七氟烷深度麻醉后采用断颈法处死,立即摘取眼球,依次固定、包埋和切片。经二甲苯和梯度乙醇脱蜡,微波炉抗原修复和 3% H_2O_2 去除内源性过氧化物酶,待牛血清白蛋白封闭后滴加 ALKBH5 一抗(1∶250)4 ℃孵育过夜。次日滴加二抗(1∶100)孵育 1 h,依次经 DAB 显色、苏木素染液染核、盐酸乙醇分化、梯度乙醇脱水、二甲苯透明,树脂封片。风干后采集图像。对于免疫荧光染色的组织切片同样用 ALKBH5 抗体(1∶250)孵育过夜,594 荧光二抗(1∶100)37 ℃孵育 1 h,经过 DAPI 染核,充分洗涤后封片,于荧光显微镜下观察。采用 ImageJ 软件分析目的蛋白荧光强度。

1.2.4　实时荧光定量 PCR 法检测 ALKBH5 mRNA 表达水平　造模结束后,每组豚鼠任取 4 只,摘取眼球,剥离视网膜组织。采用常规 Trizol 法提取视网膜总 RNA,按照逆转录试剂盒制备 cDNA。以 cDNA 为模板,按照 PCR 试剂盒说明书进行实时荧光定量 PCR。反应条件:95 ℃预变性 30 s;95 ℃变性 5 s,59 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 20 s,共 40 个循环。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,序列如下:ALKBH5 正向引物为 5′-AGGGGAAGCGTGACTGTGC-3′,反向引物为 5′-GGGTGCATCTAATCTTGTCTTCC-3′;GAPDH 正向引物为 5′-GGTATTCCTTCTTCCCGTGC-3′,反向引物为 5′-CCAAATCCGTTCACTCCGA-3′。以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因相对表达量。

1.2.5　Western blot 法检测视网膜 ALKBH5 蛋白表达　造模结束后,每组各取 6 只豚鼠,剥离出视网膜样本剪碎,加裂解混合液匀浆提取蛋白。采用 BCA 试剂盒进行蛋白定量,取蛋白上清与缓冲液混匀,金属浴变性备用。采用 SDS-PAGE 凝胶恒压电泳,通过湿转法转膜,经 5%脱脂奶粉室温摇床封闭膜 1.5 h,洗涤。分别加入 ALKBH5 一抗(1∶2 000)和 GAPDH(1∶4 000)4 ℃孵育过夜,次日洗涤后用二抗(1∶4 000)室温孵育 1.5 h,洗涤后显影。采用 ImageJ 软件分析条带灰度值。ALKBH5 蛋白相对表达量 = ALKBH5 蛋白条带灰度值/GAPDH 蛋白条带灰度值。

1.3　统计学方法

采用 SPSS 26.0 统计学软件进行统计分析。计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实服从或接近正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示。FDM 组与正常对照组、FDM 组与自身对照组不同时间点屈光度和眼轴长度比较均采用重复测量两因素方差分析,多重比较采用 LSD-t 检验。FDM 组与正常对照组豚鼠视网膜 ALKBH5 mRNA 和蛋白相对表达量及荧光信号强度比较采用独立样本 t 检验;FDM 组与自身对照组参数比较采用配对 t 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　各组豚鼠不同时间点屈光度和眼轴长度比较

实验前豚鼠均呈远视状态,眼轴较短。正常对照组与 FDM 组豚鼠不同时间点屈光度和眼轴长度总体比较,差异均有统计学意义(屈光度:$F_{组别}=137.738$,$P<0.001$;$F_{时间}=346.109$,$P<0.001$. 眼轴长度:$F_{组别}=46.527$,$P<0.001$;$F_{时间}=428.062$,$P<0.001$),其中与正常对照组相比,实验 2、3 和 4 周,FDM 组豚鼠近视屈光度明显增加,眼轴显著增长,差异均有统计学意义(均$P<0.001$)(表 1,2)。自身对照组与 FDM 组豚鼠不同时间点屈光度和眼轴长度总体比较,差异均有统计学意义(屈光度:$F_{组别}=107.601$,$P<0.001$;$F_{时间}=259.205$,$P<0.001$. 眼轴长度:$F_{组别}=36.174$,$P<0.001$;$F_{时间}=299.927$,$P<0.001$),其中与自身对照组相比,实验 2、3 和 4 周,FDM 组豚鼠近视屈光度明显加深,眼轴明显增长,差异均有统计学意义(均$P<0.001$)(表 3,4)。

中华医学会杂志社 Chinese Medical Association Publishing House 版权所有 违者必究

表 1　正常对照组与 FDM 组不同时间点豚鼠屈光度比较($\bar{x}\pm s$, D)

Table 1　Comparison of diopter at different time points between normal control group and FDM group ($\bar{x}\pm s$, D)

组别	眼数	实验前	实验 1 周	实验 2 周	实验 3 周	实验 4 周
正常对照组	15	3.625±0.626	3.313±0.490	3.333±0.431	3.125±0.446	3.021±0.470
FDM 组	15	3.417±0.586	2.917±0.599	0.972±0.879[a]	−1.444±0.966[a]	−2.944±0.597[a]

注：$F_{组别}$ = 137.738，P<0.001；$F_{时间}$ = 346.109，P<0.001；$F_{交互作用}$ = 255.027，P<0.001. 与相应时间点正常对照组比较，[a]P<0.001（重复测量两因素方差分析，LSD-t 检验）　FDM：形觉剥夺性近视

Note：F_{group} = 137.738，P<0.001；F_{time} = 346.109，P<0.001；$F_{interaction}$ = 255.027，P<0.001. Compared with normal control group at corresponding time points，[a]P<0.001（Two-way repeated measures ANOVA，LSD-t test）　FDM：form-deprivation myopia

表 2　正常对照组与 FDM 组不同时间点豚鼠眼轴长度比较($\bar{x}\pm s$, mm)

Table 2　Comparison of axial length at different time points between normal control group and FDM group ($\bar{x}\pm s$, mm)

组别	眼数	实验前	实验 1 周	实验 2 周	实验 3 周	实验 4 周
正常对照组	15	7.527±0.091	7.642±0.103	7.714±0.111	7.761±0.066	7.849±0.045
FDM 组	15	7.534±0.106	7.692±0.091	7.950±0.076[a]	8.140±0.080[a]	8.319±0.084[a]

注：$F_{组别}$ = 46.527，P<0.001；$F_{时间}$ = 428.062，P<0.001；$F_{交互作用}$ = 89.078，P<0.001. 与相应时间点正常对照组比较，[a] P<0.001（重复测量两因素方差分析，LSD-t 检验）　FDM：形觉剥夺性近视

Note：F_{group} = 46.527，P<0.001；F_{time} = 428.062，P<0.001；$F_{interaction}$ = 89.078，P<0.001. Compared with normal control group at corresponding time points，[a]P<0.001（Two-way repeated measures ANOVA，LSD-t test）　FDM：form-deprivation myopia

表 3　自身对照组与 FDM 组不同时间点豚鼠屈光度比较($\bar{x}\pm s$, D)

Table 3　Comparison of diopter at different time points between self-control group and FDM group ($\bar{x}\pm s$, D)

组别	眼数	实验前	实验 1 周	实验 2 周	实验 3 周	实验 4 周
自身对照组	15	3.556±0.527	3.389±0.601	3.139±0.561	3.028±0.475	2.667±0.375
FDM 组	15	3.417±0.586	2.917±0.599	0.972±0.879[a]	−1.444±0.966[a]	−2.944±0.597[a]

注：$F_{组别}$ = 107.601，P<0.001；$F_{时间}$ = 259.205，P<0.001；$F_{交互作用}$ = 159.374，P<0.001. 与相应时间点自身对照组比较，[a]P<0.001（重复测量两因素方差分析，LSD-t 检验）　FDM：形觉剥夺性近视

Note：F_{group} = 107.601，P<0.001；F_{time} = 259.205，P<0.001；$F_{interaction}$ = 159.374，P<0.001. Compared with self-control group at corresponding time points，[a]P<0.001（Two-way repeated measures ANOVA，LSD-t test）　FDM：form-deprivation myopia

表 4　自身对照组与 FDM 组不同时间点豚鼠眼轴长度比较($\bar{x}\pm s$, mm)

Table 4　Comparison of axial length at different time points between self-control group and FDM group ($\bar{x}\pm s$, mm)

组别	眼数	实验前	实验 1 周	实验 2 周	实验 3 周	实验 4 周
自身对照组	15	7.530±0.118	7.646±0.530	7.722±0.795	7.801±0.115	7.898±0.062
FDM 组	15	7.534±0.106	7.692±0.091	7.950±0.076[a]	8.140±0.080[a]	8.319±0.084[a]

注：$F_{组别}$ = 36.174，P<0.001；$F_{时间}$ = 299.927，P<0.001；$F_{交互作用}$ = 46.195，P<0.001. 与相应时间点自身对照组比较，[a]P<0.001（重复测量两因素方差分析，LSD-t 检验）　FDM：形觉剥夺性近视

Note：F_{group} = 36.174，P<0.001；F_{time} = 299.927，P<0.001；$F_{interaction}$ = 46.195，P<0.001. Compared with self-control group at corresponding time points，[a]P<0.001（Two-way repeated measures ANOVA，LSD-t test）　FDM：form-deprivation myopia

2.2　各组视网膜 ALKBH5 蛋白表达定位及荧光强度比较

免疫组织化学染色和免疫荧光染色显示，ALKBH5 分布在视网膜神经纤维层、视锥视杆细胞层和视网膜色素上皮（retinal pigment epithelium，RPE）层，其中以神经纤维层和 RPE 层为主。正常对照组、自身对照组和 FDM 组豚鼠视网膜 ALKBH5 蛋白相对荧光强度值分别为 1.000±0.204、0.874±0.076 和 0.571±0.053，FDM 组视网膜 ALKBH5 蛋白荧光强度值均小于正常对照组和自身对照组，差异均有统计学意义（t = 4.069，P = 0.006；t = 5.176，P = 0.014）（图 1，2）。

中華醫學會雜誌社 Chinese Medical Association Publishing House 版权所有 违者必究

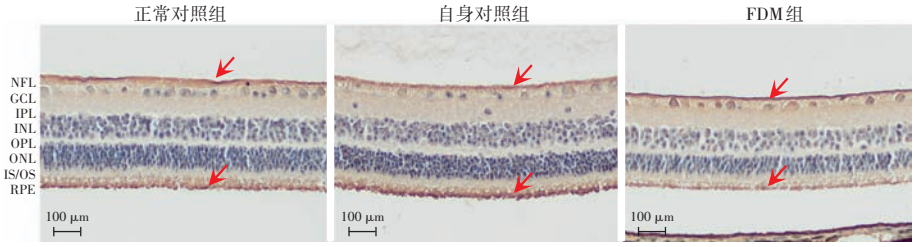

图 1　各组视网膜 ALKBH5 免疫组织化学染色（DAB ×200，标尺 = 100 μm）　ALKBH5（箭头）分布在视网膜神经纤维层、视锥视杆细胞层和 RPE 层；与正常对照组和自身对照组比较，FDM 组豚鼠视网膜上 ALKBH5 蛋白染色程度较低　FDM：形觉剥夺性近视；NFL：神经纤维层；GCL：神经节细胞层；IPL：内丛状层；INL：内核层；OPL：外丛状层；ONL：外核层；IS/OS：光感受器内节/外节段；RPE：视网膜色素上皮

Figure 1　Immunohistochemical staining of ALKBH5 protein in retina in different groups（DAB ×200, scale bar = 100 μm）　ALKBH5（arrows）was expressed in the retinal nerve fiber layer, rod/cone photoreceptor cells and RPE layer. Compared with the normal control group and self-control group, the staining intensity of the protein was weaker in FDM group　FDM: form-deprivation myopia; NFL: nerve fiber layer; GCL: ganglion cell layer; IPL: inner plexiform layer; INL: inner nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; ONL: outer nuclear layer; IS/OS: inner and outer segments of the photoreceptor; RPE: retinal pigment epithelium

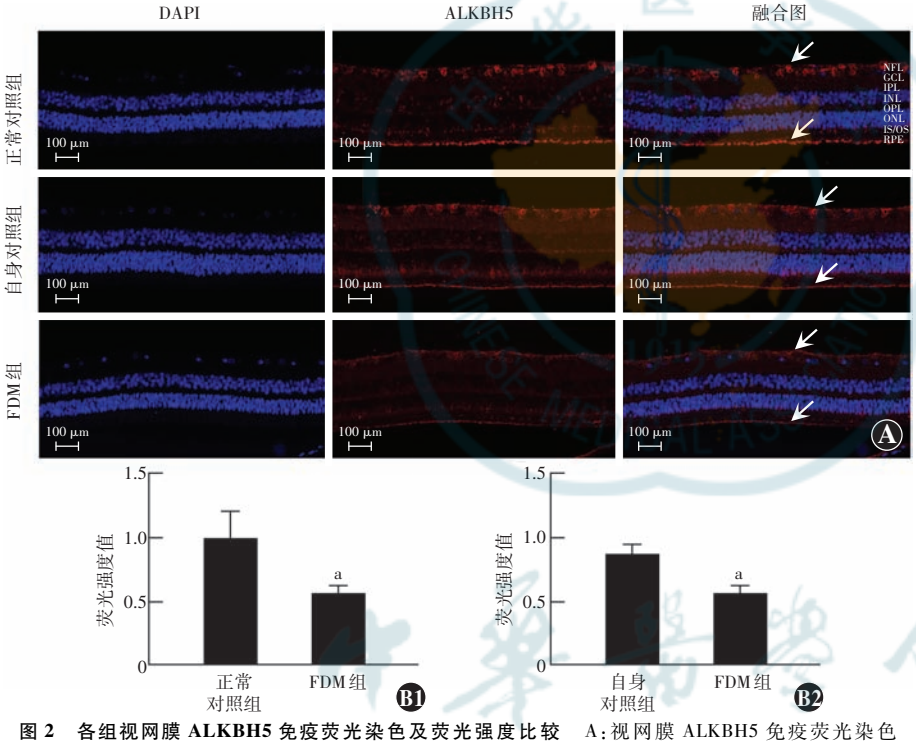

图 2　各组视网膜 ALKBH5 免疫荧光染色及荧光强度比较　A：视网膜 ALKBH5 免疫荧光染色（×200，标尺 = 100 μm）　ALKBH5（箭头）主要在视网膜神经纤维层和 RPE 层表达，呈红色荧光（CoraLite594），细胞核呈蓝色荧光（DAPI），FDM 组豚鼠视网膜 ALKBH5 蛋白荧光信号弱于正常对照组和自身对照组　B1：FDM 组与正常对照组荧光强度比较　与正常对照组比较，$^{a}P<0.01$（独立样本 t 检验，$n=5$）　B2：FDM 组与自身对照组荧光强度比较　与自身对照组比较，$^{a}P<0.05$（配对 t 检验，$n=5$）　DAPI：4′，6-二脒基-2-苯基吲哚；ALKBH5：AlkB 同源蛋白 5；FDM：形觉剥夺性近视；NFL：神经纤维层；GCL：神经节细胞层；IPL：内丛状层；INL：内核层；OPL：外丛状层；ONL：外核层；IS/OS：光感受器内节/外节段；RPE：视网膜色素上皮

Figure 2　Immunofluorescence staining of ALKBH5 in retina and comparison of fluorescence intensity between different groups　A: ALKBH5 immunofluorescence staining in the retina（×200, scale bar = 100 μm）　ALKBH5 protein（arrows）in red（CoraLite594）was expressed mainly in the retinal nerve fiber layer and RPE layer, and nuclei were shown in blue（DAPI）. ALKBH5 protein fluorescence intensity was weaker in FDM group than in normal control and self-control groups　B1: Comparison of ALKBH5 fluorescence intensity between FDM group and normal control group　Compared with normal control group, $^{a}P<0.01$（Independent samples t-test, $n=5$）　B2: Comparison of ALKBH5 fluorescence intensity between FDM group and self-control group　Compared with self-control group, $^{a}P<0.05$（Paired t-test, $n=5$）　DAPI: 4′, 6-diamidino-2-phenylindole; ALKBH5: AlkB homolog 5; FDM: form-deprivation myopia; NFL: nerve fiber layer; GCL: ganglion cell layer; IPL: inner plexiform layer; INL: inner nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; ONL: outer nuclear layer; IS/OS: inner and outer segments of the photoreceptor; RPE: retinal pigment epithelium

2.3　各组 ALKBH5 mRNA 相对表达量比较

造模后 4 周，正常对照组、自身对照组和 FDM 组豚鼠视网膜中 ALKBH5 mRNA 相对表达量分别为 1.086±0.114、0.967±0.045 和 0.684±0.085，FDM 组豚鼠视网膜中 ALKBH5 mRNA 相对表达量明显低于正常对照组和自身对照组，差异均有统计学意义（$t=4.886$，$P=0.008$；$t=11.650$，$P=0.007$）（图 3）。

2.4　各组 ALKBH5 蛋白相对表达量比较

FDM 组视网膜 ALKBH5 蛋白表达条带强度明显弱于正常对照组和自身对照组。造模后 4 周，正常对照组、自身对照组和 FDM 组豚鼠视网膜 ALKBH5 蛋白相对表达量分别为 1.000±0.202、0.973±0.163 和 0.602±0.153，FDM 组视网膜 ALKBH5 蛋白相对表达量较正常对照组和自身对照组均明显下降，差异均有统计学意义（$t=3.510$，$P=0.008$；$t=4.693$，$P=0.009$）（图 4）。

3　讨论

豚鼠因其屈光状态和正视化机制与人类相似，且对形觉剥夺高度敏感，近年来常被作为实验动物近视模型[16]。本研究通过眼罩遮盖诱导豚鼠近视形成，与正常对照组和自身对照组相比，随遮盖时间的延长 FDM 组豚鼠向近视方向发展且近视程度逐渐加深，同时伴有眼轴长度明显增长，与姜波等[17]的研究结果类似。本研究结果显示，FDM 组豚鼠视网膜中 m6A 去甲基化酶 ALKBH5 表达下调，提示 ALKBH5 及其相关的 m6A 甲基化修饰可能在豚鼠近视发生和发展过程中发挥重要作用。

中華醫學會雜誌社 Chinese Medical Association Publishing House 版权所有 违者必究

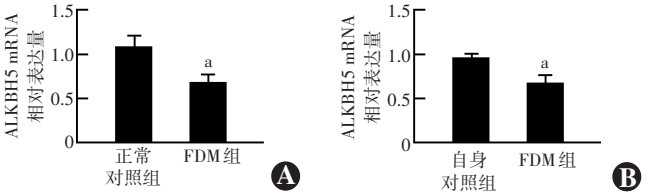

图 3　各组视网膜 ALKBH5 mRNA 相对表达量比较　A：FDM 组与正常对照组视网膜 ALKBH5 mRNA 相对表达量比较　与正常对照组比较，$^aP<0.01$（独立样本 t 检验，$n=4$）　B：FDM 组与自身对照组视网膜 ALKBH5 mRNA 相对表达量比较　与自身对照组比较，$^aP<0.01$（配对样本 t 检验，$n=4$）　ALKBH5：AlkB 同源蛋白 5；FDM：形觉剥夺性近视

Figure 3　Comparison of ALKBH5 mRNA expression in retina between different groups　A: Comparison of ALKBH5 mRNA expression between FDM group and normal control group　Compared with normal control group, $^aP<0.01$ (Independent samples t-test, $n=4$)　B: Comparison of ALKBH5 mRNA expression between FDM group and self-control group　Compared with self-control group, $^aP<0.01$ (Paired samples t-test, $n=4$)　ALKBH5: AlkB homolog 5; FDM: form-deprivation myopia

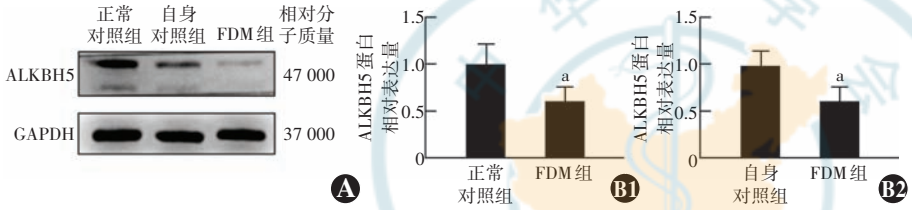

图 4　各组视网膜 ALKBH5 蛋白表达比较　A：各组 ALKBH5 蛋白表达电泳图　正常对照组和自身对照组 ALKBH5 蛋白表达条带均强于 FDM 组　B1：FDM 组与正常对照组 ALKBH5 蛋白相对表达量比较　与正常对照组比较，$^aP<0.01$（独立样本 t 检验，$n=6$）　B2：FDM 组与自身对照组 ALKBH5 蛋白相对表达量比较　与自身对照组比较，$^aP<0.01$（配对 t 检验，$n=6$）　FDM：形觉剥夺性近视；ALKBH5：AlkB 同源蛋白 5；GAPDH：甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Figure 4　Comparison of ALKBH5 protein expression in retina between different groups　A: Electrophoretogram of ALKBH5 protein expression　The ALKBH5 protein expression bands were stronger in the normal control group and self-control group than in FDM group　B1: Comparison of ALKBH5 protein expression between FDM group and normal control group　Compared with normal control group, $^aP<0.01$ (Independent samples t-test, $n=6$)　B2: Comparison of ALKBH5 protein expression between FDM group and self-control group　Compared with self-control group, $^aP<0.01$ (Paired t-test, $n=6$)　FDM: form-deprivation myopia; ALKBH5: AlkB homolog 5; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

ALKBH5 基因位于 17 号染色体，是一种依赖 Fe^{2+} 和 α-酮戊二酸的核酸氧化酶。ALKBH5 是 m6A 甲基化修饰中去甲基化酶中的一员，主要对已发生 m6A 甲基化的 RNA 碱基发挥去甲基化修饰作用。m6A 甲基化修饰位点集中于终止密码子和 3′非翻译区，在转录后水平调节 RNA。研究表明，m6A 甲基化可以修饰包括 mRNA、miRNA、circRNA 和 LncRNA 在内的多种 RNA，从而在各种生理和病理过程中发挥重要作用[18]。已有研究证实，m6A 甲基化修饰与哺乳动物的胚胎发育有关，对视网膜的发育起保护作用，并且参与了视力、视紫红质代谢和视觉适应等正常功能的维持[19]。

既往研究证实，m6A 甲基化修饰与近视相关[3]。Liu 等[13]研究发现，tRF-22 是参与近视进展过程中调节脉络膜血管功能的关键因子，在实验性近视中表达下调，由此引起视网膜和巩膜缺氧与营养供应不足，同时伴随脉络膜的 m6A 修饰水平升高。通过玻璃体腔注射 tRF-22 激动剂后，发现 tRF-22 可保护脉络膜血管功能，抑制缺氧诱导的巩膜细胞外基质重塑，最终延缓近视进展，这一过程主要是通过 tRF-22 抑制 METTL3 介导的 m6A 修饰来实现。Wen 等[12]对比分析了单纯核性白内障和高度近视核性白内障患者晶状体前囊膜中 m6A 甲基化水平，发现二者 m6A 甲基化修饰水平存在显著差异，后者晶状体前囊膜中 m6A 甲基化修饰相关酶的表达水平异常，进一步通过功能富集分析显示差异甲基化基因在调节细胞外基质重塑途径中富集。因此，m6A 甲基化修饰可能是通过调节其编码蛋白进而影响细胞外基质重塑，改变眼球解剖结构来影响屈光发育状态。

Sun 等[20]研究发现，ALKBH5 可通过其去甲基化活性维持 RPE 层结构和功能正常，腺病毒 ALKBH5 过表达处理后的小鼠视力受损。研究已证实，视网膜 RPE 层可分泌多种神经递质和生长因子，通过视网膜-脉络膜-巩膜信号级联调控离子稳态和代谢物质转运，进而在近视的发生和发展中发挥重要作用[21]。本研究发现，ALKBH5 蛋白主要在豚鼠视网膜神经纤维层和 RPE 层表达，FDM 组豚鼠视网膜上 ALKBH5 表达下调，其表达变化可能与屈光发育之间存在一定关联。一方面，可能与巩膜重塑有关，高度近视病理状态下，包括 ALKBH5 在内的 m6A 甲基化修饰相关酶动态失衡，利用 MeRIP-seq 技术发现这些异常表达的酶通过调控下游靶标 m6A 修饰水平影响蛋白编码，并最终调控细胞外基质组成成分[12]。另一方面，Zhang 等[22]研究表明 *ALKBH5* 是缺氧诱导因子 1α（hypoxia inducible factor-1α，HIF-1α）的下游靶基因，可与其启动子区结合调节转录。作为重要的转录因子，HIF-1α 对低氧反应中的基因表达发挥重要的调节作用。近视动物视网膜、脉络膜和巩膜上 HIF-1α 转录和翻译水平均上调[23-25]。这些发现提示 *ALKBH5* 基因参与近视的调控作用，可能与 HIF-1α 信号有关。此外，*ALKBH5* 基因对近视的调控也可能与调控昼夜节律有关。研究已证实，昼夜节律紊乱可能通过多巴胺和褪黑素异常分泌、眼轴长度和脉络膜厚度昼夜节律的破坏等途径导致眼球生长或近视发展[26]。*PER1* 是经典核心昼夜节律基因之一，在控制哺乳动物昼夜节律、细胞周期和 DNA 损伤反应中发挥着关键作用。

中华医学会杂志社 Chinese Medical Association Publishing House 版权所有 违者必究

Wang 等[27]研究观察到正常小鼠视网膜上 PER1 节律性表达，且与“核心”时钟基因 *Cry1* 相一致。而 Guo 等[6]通过 RNA-seq 和 m6A-seq 分析将 PER1 鉴定为 ALKBH5 介导的 m6A 甲基化修饰的下游靶标，因此两者之间存在一定关联。关于 ALKBH5 在近视发生和发展中的确切作用机制还需进一步研究。

本研究结果提示，m6A 去甲基化酶 ALKBH5 表达于豚鼠视网膜组织中，且 FDM 眼视网膜中 ALKBH5 蛋白表达下调，ALKBH5 蛋白主要在豚鼠视网膜神经纤维层和 RPE 层表达，推测 ALKBH5 及相关的甲基化修饰可能与近视的发生和发展之间存在一定的联系。ALKBH5 可能是近视调控过程中重要的信号分子，但其具体调控机制尚待进一步探索。

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　向小玲：参与研究设计和实施、收集数据、资料分析及解释、文章撰写及修改；廖萱：参与研究设计、文章修改、对文章的知识性内容作批判性审阅及定稿；孟茄玉：分析/解释数据、统计分析；周桂梅、周红、周羡媚：采集数据、资料分析和解释

参考文献

[1] Morgan IG, French AN, Ashby RS, et al. The epidemics of myopia: aetiology and prevention[J]. Prog Retin Eye Res, 2018, 62: 134-149. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2017.09.004.

[2] 杨怡芳，谢伯林，钟华. 近视诊治的社会经济负担评估进展[J]. 中华实验眼科杂志，2019，37(7)：582-586. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.07.017.
Yang YF, Xie BL, Zhong H. Evaluation progress of socioeconomic burden of diagnosis and treatment of myopia[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2019, 37(7): 582-586. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.07.017.

[3] 龚蔚，刘堃，何鲜桂. 近视的表观遗传学机制[J]. 中华实验眼科杂志，2023，41(9)：939-943. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210330-00221.
Gong W, Liu K, He XG. Epigenetic mechanism of myopia[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2023, 41(9): 939-943. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210330-00221.

[4] Chen P, Li S, Zhang K, et al. N^6-methyladenosine demethylase ALKBH5 suppresses malignancy of esophageal cancer by regulating microRNA biogenesis and RAI1 expression[J]. Oncogene, 2021, 40(37): 5600-5612. DOI: 10.1038/s41388-021-01966-4.

[5] Huang J, Sun W, Wang Z, et al. FTO suppresses glycolysis and growth of papillary thyroid cancer via decreasing stability of APOE mRNA in an N6-methyladenosine-dependent manner[J/OL]. J Exp Clin Cancer Res, 2022, 41(1): 42[2023-10-10]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35090515/. DOI: 10.1186/s13046-022-02254-z.

[6] Guo X, Li K, Jiang W, et al. RNA demethylase ALKBH5 prevents pancreatic cancer progression by posttranscriptional activation of PER1 in an m6A-YTHDF2-dependent manner[J/OL]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 91[2023-10-10]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32429928/. DOI: 10.1186/s12943-020-01158-w.

[7] Wang T, Kong S, Tao M, et al. The potential role of RNA N6-methyladenosine in cancer progression[J/OL]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 88[2023-10-11]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32398132/. DOI: 10.1186/s12943-020-01204-7.

[8] Zhu X, Tang H, Yang M, et al. N6-methyladenosine in macrophage function: a novel target for metabolic diseases[J]. Trends Endocrinol Metab, 2023, 34(2): 66-84. DOI: 10.1016/j.tem.2022.12.006.

[9] Shan K, Zhou RM, Xiang J, et al. FTO regulates ocular angiogenesis via m^6A-YTHDF2-dependent mechanism[J/OL]. Exp Eye Res, 2020, 197: 108107[2023-10-11]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32531187/. DOI: 10.1016/j.exer.2020.108107.

[10] Li P, Yu H, Zhang G, et al. Identification and characterization of N6-methyladenosine circRNAs and methyltransferases in the lens epithelium cells from age-related cataract[J/OL]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2020, 61(10): 13[2023-10-13]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32761139/. DOI: 10.1167/iovs.61.10.13.

[11] Ni Y, Zhang H, Chu L, et al. m6A modification-association with oxidative stress and implications on eye diseases[J/OL]. Antioxidants (Basel), 2023, 12(2): 510[2023-10-14]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36830067/. DOI: 10.3390/antiox12020510.

[12] Wen K, Zhang Y, Li Y, et al. Comprehensive analysis of transcriptome-wide m^6A methylome in the anterior capsule of the lens of high myopia patients[J]. Epigenetics, 2021, 16(9): 955-968. DOI: 10.1080/15592294.2020.1834917.

[13] Liu C, Li M, Shen Y, et al. Targeting choroidal vasculopathy via up-regulation of tRNA-derived fragment tRF-22 expression for controlling progression of myopia[J/OL]. J Transl Med, 2023, 21(1): 412[2023-10-14]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37355654/. DOI: 10.1186/s12967-023-04274-5.

[14] Zhong W, Lan C, Gu Z, et al. The mechanosensitive piezo1 channel mediates mechanochemical transmission in myopic eyes[J/OL]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2023, 64(7): 1[2023-10-15]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37261388/. DOI: 10.1167/iovs.64.7.1.

[15] Yang Q, Tan QQ, Lan CJ, et al. The changes of KCNQ5 expression and potassium microenvironment in the retina of myopic guinea pigs[J/OL]. Front Physiol, 2021, 12: 790580[2023-10-15]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35002772/. DOI: 10.3389/fphys.2021.790580.

[16] 周桂梅，兰长骏，廖萱. 实验性近视豚鼠模型研究进展[J]. 国际眼科杂志，2023，23(3)：430-434. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2023.3.16.
Zhou GM, Lan CJ, Liao X. Advances in experimental myopic guinea pig models[J]. Int Eye Sci, 2023, 23(3): 430-434. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2023.3.16.

[17] 姜波，吴章友，朱子诚，等. 豚鼠进展性近视眼巩膜中 Smad3 和 Ⅰ 型胶原的动态表达变化[J]. 中华实验眼科杂志，2017，35(6)：491-497. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.06.003.
Jiang B, Wu ZY, Zhu ZC, et al. Dynamic expression changes of Smad3 and type Ⅰ collagen in sclera of progressive myopia in guinea pigs[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2017, 35(6): 491-497. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.06.003.

[18] Kumari R, Ranjan P, Suleiman ZG, et al. mRNA modifications in cardiovascular biology and disease: with a focus on m6A modification[J]. Cardiovasc Res, 2022, 118(7): 1680-1692. DOI: 10.1093/cvr/cvab160.

[19] Li X, Ma B, Liao M, et al. Potential impact of N6-methyladenosine RNA methylation on vision function and the pathological processes of ocular diseases: new discoveries and future perspectives[J/OL]. Front Biosci (Landmark Ed), 2022, 27(7): 207[2023-10-15]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35866387/. DOI: 10.31083/j.fbl2707207.

[20] Sun RX, Zhu HJ, Zhang YR, et al. ALKBH5 causes retinal pigment epithelium anomalies and choroidal neovascularization in age-related macular degeneration via the AKT/mTOR pathway[J/OL]. Cell Rep, 2023, 42(7): 112779[2023-10-16]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37436898/. DOI: 10.1016/j.celrep.2023.112779.

[21] 姜倩，蒋文君，徐福如，等. 视网膜色素上皮与近视发病机制研究进展[J]. 眼科新进展，2020，40(10)：985-989. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2020.0221.
Jiang Q, Jiang WJ, Xu FR, et al. Advances in the relationship between retinal pigment epithelium and the pathogenesis of myopia[J]. Rec Adv Ophthalmol, 2020, 40(10): 985-989. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2020.0221.

[22] Zhang C, Samanta D, Lu H, et al. Hypoxia induces the breast cancer stem cell phenotype by HIF-dependent and ALKBH5-mediated m^6A-demethylation of NANOG mRNA[J/OL]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(14): E2047-2056[2023-10-16]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27001847/. DOI: 10.1073/pnas.1602883113.

[23] Tong L, Cui D, Zeng J. Topical bendazol inhibits experimental myopia progression and decreases the ocular accumulation of HIF-1α protein in young rabbits[J]. Ophthalmic Physiol Opt, 2020, 40(5): 567-576. DOI: 10.1111/opo.12717.

[24] Li T, Li X, Hao Y, et al. Inhibitory effect of miR-138-5p on choroidal fibrosis in lens-induced myopia guinea pigs via suppressing the HIF-1α signaling pathway[J/OL]. Biochem Pharmacol, 2023, 211: 115517[2023-10-27]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36966935/. DOI: 10.1016/j.bcp.2023.115517.

[25] Yang J, Ouyang X, Fu H, et al. Advances in biomedical study of the myopia-related signaling pathways and mechanisms[J/OL]. Biomed Pharmacother, 2022, 145: 112472[2023-10-17]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34861634/. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112472.

[26] Lingham G, Mackey DA, Lucas R, et al. How does spending time outdoors protect against myopia? A review[J]. Br J Ophthalmol, 2020, 104(5): 593-599. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2019-314675.

[27] Wang Z, Ji S, Huang Y, et al. The daily gene transcription cycle in mouse retina[J/OL]. Exp Eye Res, 2021, 207: 108565[2023-10-17]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33838143/. DOI: 10.1016/j.exer.2021.108565.

（收稿日期：2023-10-28　修回日期：2024-02-26）

（本文编辑：刘艳　施晓萌）

中华医学会杂志社 Chinese Medical Association Publishing House 版权所有 违者必究