

热休克转录因子 1 对视网膜色素上皮细胞抗氧化和抗衰老的调控作用

蒋明君¹ 尚国辉² 张凤妍¹ 殷凡响³ 薛梦姣¹ 胡延忠¹ 彭旭艳¹

¹郑州大学第一附属医院眼科 眼科学与视觉科学实验室, 郑州 450052; ²郑州大学基础医学院医学遗传与细胞生物学系, 郑州 450051; ³郑州大学第一附属医院转化医学中心, 郑州 450052

通信作者: 彭旭艳, Email: xuyanpeng331@163.com; 胡延忠, Email: hyz@henu.edu.cn

【摘要】 目的 探讨热休克转录因子 1(HSF1)对人视网膜色素上皮细胞 (ARPE-19) 抗氧化和抗衰老的作用。方法 利用成簇规律间隔短回文重复序列及相关蛋白 9(CRISPR/Cas9) 基因编辑技术敲除人 ARPE-19 细胞系中 *HSF1* 基因, 构建并获得 2 种 HSF1 缺失 ARPE 细胞株 (ARPE/Hsf1^{-/-}), 分别命名为 H8、H9 细胞株。取野生型、H8 和 H9 细胞株, 应用 DHE 探针染色结合流式分析技术测定细胞内活性氧簇 (ROS) 含量, 应用流式细胞分析方法测定细胞周期; 采用细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 法测定不同培养时间点细胞活力值; 采用结晶紫染色实验测定细胞相对存活率; 采用 β -半乳糖苷酶 (SA- β -gal) 染色实验检测衰老细胞比率; 采用 Western blot 法检测各细胞株中热休克蛋白 (HSP) 70、HSP27、聚集素 (CLU)、p53、p21 和白细胞介素 (IL)-1 β 蛋白表达水平; 采用实时荧光定量 PCR 法测定各细胞株中 p53、p21、IL-6、IL-8、IL-1 β 、单核细胞趋化蛋白 1 (MCP1) mRNA 表达水平。比较各细胞株在不同热休克处理条件下和 HSP90 抑制剂 IPI504 处理下热休克反应相关蛋白相对表达量, 比较各细胞株不同浓度 H₂O₂ 处理后相对存活率, 比较各细胞株经或未经 ROS 清除剂 N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 处理后 p21 蛋白相对表达量。结果 基因测序显示 H8 和 H9 细胞株成功携带突变基因, Western blot 检测结果显示 H8、H9 细胞株不表达 HSF1 蛋白, HSF1 在 ARPE-19 细胞中被成功敲除。与野生型细胞株相比, H8、H9 细胞株中的 HSP70、HSP27、CLU 蛋白相对表达水平显著降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 各细胞株 HSP90 蛋白相对表达水平总体比较, 差异无统计学意义 ($F = 0.29, P > 0.05$)。在不同热休克刺激和 IPI504 诱导下野生型细胞株中 HSP70、HSP27、CLU 蛋白相对表达水平显著升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 与野生型细胞株相比, H8 和 H9 细胞株的 HSP70、HSP27、CLU 蛋白相对表达水平显著低于相应处理的野生型细胞, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。与野生型细胞株相比, H8 和 H9 细胞株培养 24、48、72 和 96 h 的细胞活力均显著降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。与野生型细胞株比较, H8 和 H9 细胞株 G1 期细胞百分比显著升高, 细胞周期抑制因子 p53、p21 的 mRNA 和蛋白相对表达水平显著升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), SA- β -gal 染色阳性细胞比率显著增加, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$); 衰老相关炎症因子 IL-6、IL-8、IL-1 β 、MCP1 mRNA 相对表达量显著下降, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$)。H8 和 H9 细胞株 ROS 含量明显高于野生型细胞株, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$); H8 和 H9 细胞株经 NAC 处理后 p21 蛋白相对表达量较未经 NAC 处理明显降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。H8 和 H9 细胞株 200、400、600、800 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 处理条件下细胞相对存活率明显低于野生型细胞, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。结论 敲除 HSF1 可下调 HSP 的表达, 激活 ROS/P53/P21 通路, 诱导 RPE 细胞衰老, 并增加 RPE 对氧化应激刺激的敏感性。HSF1 在 RPE 细胞中可能具有抗衰老和抗氧化调控作用。

【关键词】 热休克转录因子 1; 年龄相关性黄斑变性; 细胞衰老; 视网膜色素上皮; 衰老治疗; 氧化应激

基金项目: 国家自然科学基金 (U1604171、31802314、81970785); 河南省医学科技攻关项目 (SBGJ202102157、SBGJ202103068); 河南省科技攻关项目 (222102310467)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20230905-00093

Regulatory role of heat shock transcription factor 1 in antioxidant and anti-aging function of the retinal pigment epithelial cells

Jiang Mingjun¹, Shang Guohui², Zhang Fengyan¹, Yin Fanxiang³, Xue Mengjiao¹, Hu Yanzhong¹, Peng Xuyan¹

¹Laboratory of Ophthalmology and Visual Science, the Division of Ophthalmology and Vision Science, Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; ²Department of Medical Genetics and Cell Biology, School of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450051, China; ³Translational Medical Center, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China
Corresponding authors: Peng Xuyan, Email: xuyanpeng331@163.com; Hu Yanzhong, Email: hyz@henu.edu.cn

[Abstract] **Objective** To investigate the anti-aging and antioxidant effect of the heat shock transcription factor 1 (HSF1) on human retinal pigment epithelial cells. **Methods** Two HSF1-deficient ARPE cells (ARPE/Hsf1^{-/-}) were constructed by using the clustered regularly interspaced short palindromic repeat and associated protein 9 (CRISPR/Cas9) gene editing system and named H8, H9 knockout cell strains. Experiments were operated on the 3 cell strains: wild-type, H8 and H9 cells. The content of reactive oxygen species in ARPE-19 cell was measured by DHE probe staining combined with flow cytometry technology, and the cell cycle was measured by flow cytometry technology. The cell viability at different time points was measured using cell counting kit-8 (CCK-8). Crystal violet staining assay was used to measure the relative ratio of cell survival. SA- β -gal staining assay was used to detect the ratio of ARPE-19 senescent cells. The expressions of HSP70, HSP27, clusterin (CLU), p53, p21 and interleukin (IL)-1 β proteins were measured by Western blot technology. The expressions of p53, p21, IL-6, IL-8, IL-1 β and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1) mRNA were measured by quantitative real-time PCR technology. Relative expression of heat shock response protein under different heat shock treatment conditions and HSP90 inhibitor IPI504, relative survival with different concentrations of H₂O₂, relative expression of p21 protein after treatment with or without ROS scavenger N-acetylcysteine (NAC) were compared in each cell strain. **Results** Gene sequencing showed that H8 and H9 cell strains successfully carried mutated genes. Western blot experiment results showed that H8 and H9 cell strains did not express HSF1 protein, and HSF1 was successfully knocked out in ARPE-19 cells. Compared with wild-type cell, the expression levels of HSP70, HSP27 and CLU proteins in H8 and H9 cell strains significantly decreased, with statistically significant differences (all at $P < 0.05$), and no significant difference was found in the relative HSP90 protein expression level ($F = 0.29, P > 0.05$). Under different heat shock stimulation and IPI504 induction, the HSP70, HSP27, and CLU protein levels significantly increased in wild-type cells compared with before treatment, and the HSP70, HSP27, and CLU protein levels were significantly lower in H8 and H9 cell strains than in corresponding treated wild-type cells (all at $P < 0.05$). Compared with wild-type cell strains, cell viability significantly decreased in H8 and H9 cell strains at 24, 48, 72, and 96 hours (all at $P < 0.05$). Compared with wild-type cell strains, the percentage of cells in G1 phase was significantly higher and the mRNA and protein levels of the cell cycle inhibitors p53 and p21 significantly increased in H8 and H9 strains, showing statistically significant differences (all at $P < 0.05$), and the ratio of positive cells for SA- β -gal staining significantly increased, showing statistically significant differences (all at $P < 0.001$). The relative expression of aging-related inflammatory factors IL-6, IL-8, IL-1 β , and MCP1 mRNA decreased, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.001$). In addition, compared with wild-type cell strains, the content of reactive oxygen species (ROS) was higher in H8 and H9 cell strains, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.001$). The expression of p21 protein in H8 and H9 cell strains with NAC treatment decreased significantly compared with non-NAC treatment cells (both at $P < 0.05$). Compared with wild-type cell strains, H8 and H9 cell viability decreased at 200, 400, 600, and 800 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ treatment conditions, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.05$). **Conclusions** Knockdown of HSF1 can downregulate the expression of heat shock proteins, activate the ROS/P53/P21 pathway, induce senescence in RPE cells, and increase the sensitivity of RPE to oxidative stress stimuli. HSF1 may have anti-senescence and anti-oxidant regulatory effects in RPE cells.

[Key words] Heat shock transcription factor 1; Age-related macular degeneration; Cellular senescence; Retinal pigment epithelium; Senotherapy; Oxidative stress

Fund program: National Natural Science Foundation of China (U1604171, 31802314, 81970785); Medical Science and Technology Research Project of Henan Province (SBGJ202102157, SBGJ202103068); Science and Technology Research Project of Henan Province (222102310467)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20230905-00093

年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 是 55 岁以上老年人中枢性视力丧失的主要原因^[1-2]。其中 85% 的患者为干性 AMD, 主要病理变化为视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞退化和色素异常, 以及由慢性氧化应激、蛋白聚集和炎症引起的溶酶体脂褐素和细胞外玻璃膜疣的形成^[3]。目前, 干性 AMD 尚无合适的预防或治疗药物靶点。现有研究表明 RPE 细胞衰老和相关功能障碍是 AMD 关键的早期病变^[4]。衰老 RPE 细胞可分泌高水平的细胞因子, 如 γ 干扰素、白细胞介素 (interleukin, IL) 1 β 和肿瘤坏死因子 α 。在老年人供体分离出的 RPE 细胞中, p16、p21 和 p53 蛋白表达增加^[5]。衰老的 RPE 细胞经历氧化应激、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸耗竭以及显著的 DNA 损伤^[6]。研究表明 RPE 细胞中活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 生成增加, 通过激活哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路加速 RPE 衰老^[7]。因此, RPE 的抗衰老调控在干性 AMD 药物防治研究中具有重要作用。

衰老细胞的特征包括溶酶体酶衰老相关 β -半乳糖苷酶 (senescence-associated beta-galactosidase, SA- β -gal) 的活性增加、衰老相关异染色质病灶的形成、肿瘤抑制因子和细胞周期调节蛋白 (如 p53 和 p21) 的表达以及炎性细胞因子和基质降解蛋白酶的分泌, 被称为衰老相关分泌表型 (senescence-associated secretory phenotype, SASP)。热休克转录因子 1 (heat shock transcription factor 1, HSF1) 是感受细胞内外应激、上调热休克反应的关键转录因子, 通过转录激活热休克蛋白 (heat shock protein, HSP) 的表达在蛋白质稳态中起核心作用^[8]。HSF1 在细胞衰老、细胞存活和抗氧化功能中的重要作用已引起关注。然而, 其在 RPE 细胞衰老中的调控作用及机制尚未阐明。本文旨在通过成簇规律间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 和 CRISPR 相关蛋白 9 (CRISPR-associated protein 9, Cas9) 构建 *HSF1* 基因敲除的人视网膜色素上皮细胞系 ARPE-19, 探讨 HSF1 在 RPE 蛋白质稳态、抗氧化应激和抗衰老过程中的作用及可能的机制, 为 RPE 的抗衰老治疗靶点筛选提供参考依据, 进而为干性 AMD 的防治提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株和质粒来源 ARPE-19 购于美国菌种保藏中心。慢病毒载体 pLVX-Lenti-cas9、pLVX-Lenti-

gRNA、psPAX2 和 pMD2.G 由郑州大学基础医学院医学遗传与细胞生物学系尚国辉课题组赠予。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM/F12 培养基 (上海康宁公司); 胎牛血清 (德国 PAN 公司); 青霉素/链霉素溶液 (北京酷莱博科技有限公司); Trizol、胰蛋白酶 [赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司]; 兔抗人 HSF1 (4356S)、兔抗人 HSP90 (4877S)、大鼠抗人 HSP70 (4873S)、兔抗人 HSP27 (95357S)、兔抗人聚集素 (clusterin, CLU) (42143S)、小鼠抗人 p53 (2524S) (美国 CST 公司); 兔抗人 p21 (10355-1-AP)、兔抗人 GAPDH (10494-1-AP)、 β -actin (66009-1-Ig)、小鼠抗人 IL-1 β (66737-1-Ig) (武汉三鹰生物技术有限公司); HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (AS003)、山羊抗鼠 IgG 二抗 (AS014) (武汉爱博泰克生物科技有限公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司); ECL 化学发光试剂盒 (美国 Millipore 公司); 细胞周期检测试剂盒 (上海吉凯基因医学科技股份有限公司); DHE 探针 (北京百奥莱博科技有限公司); CCK-8 试剂盒 (日本同仁化学研究所); cDNA 逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司); SA- β -gal 染色试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); 结晶紫溶液 (美国 Sigma 公司); IPI504、N-乙酰半胱氨酸 (N-acetylcysteine, NAC) (美国 MCE 生物科技公司); H₂O₂ (山东利尔康医疗科技股份有限公司)。化学成像仪 (美国 GE AI 公司); 超微量分光光度计、细胞培养箱 (美国 Thermo 公司); 倒置相差显微镜 (德国蔡司公司); 流式细胞仪、Western blot 电泳系统 (美国 BD 公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); 高速冷冻离心机 (日本日立公司); 多功能酶标仪 (奥地利 Molecular Devices 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 在含 5% CO₂ 的 37 °C 细胞培养箱中, 采用含有 10% 胎牛血清、1% 青链霉素的 DMEM/F12 培养基培养 APRE-19 细胞, 培养基每 2 d 更换 1 次。细胞接种至直径 100 mm 培养皿中, 当融合率达到 80%~90% 时, 加入含有 0.25% EDTA 的胰蛋白酶消化 5 min, 300 \times g 离心 5 min 收集细胞沉淀后传代至 3 个 100 mm 培养皿中继续培养。

1.2.2 CRISPR/Cas9 技术制备 H8、H9 细胞株 ARPE/Hsf1^{-/-} 细胞株 *HSF1* 基因号为 3297, 转录本号 (NM_005526.4、XM_005272315.4、XM_005272316.4、XM_005272316.4、XM_047421742.1、XM_047421743.1、XM_047421743.1、XM_011517006.3), NM_005526.4 转录本的 2 号外显子为 *HSF1* 基因所有转录本距 ATG 下

游最近的外显子,本研究选取在 *HSF1* 基因的 2 号外显子的原间隔序列邻近基序上设计向导 RNA (guide RNA, gRNA) 序列, cas9 剪切酶在此位点附近发生 DNA 双链剪切,达到敲除 *HSF1* 基因的目的(图 1)。选取酶切位点为 BsmBI,设计 gRNA 引物序列:gRNA3 正向为 5'-CACCGTACTTCAAGCACAACAACATGG-3',反向为 5'-AAACCCATGTTGTTGTGCTTGAAGTAC-3'; gRNA4 正向为 5'-CACCGCAACATGGCCAGCTTCGTGGC-3',反向为 5'-AAACCCGCACGAAGCTGGCCATGTTGC-3'。gRNA 引物退火反应后克隆到 pLVX-Lenti-gRNA 载体中,构成 pLVX-Lenti-*HSF1*-gRNA 质粒。将 pLVX-Lenti-cas9、pLVX-Lenti-*HSF1*-gRNA 重组质粒分别与包装质粒 psPAX2、pMD2.G 共转染 HEK293 细胞,产生特异性表达 Cas9、*HSF1* gRNA3 和 gRNA4 病毒的培养上清液。取 2 ml 经 0.45 μm 滤器过滤的 HEK293 细胞培养上清液与 2 μl 聚凝胺(8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 混匀加入含 2 ml DMEM/F12 培养基,加入宿主细胞 ARPE-19 中感染 24 h,移去培养基,取 2 μl 杀稻瘟菌素(20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 和 1.6 μl 嘌呤霉素(10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 与 DMEM/F12 培养基混匀,加入上述感染过的细胞培养 48 h,筛选成功感染的宿主细胞群体。将感染成功的 RPE 细胞进行单细胞克隆培养,提取基因组测定单细胞克隆中 *HSF1* 基因组水平的 DNA 序列,获得 *HSF1* 纯合敲除的 ARPE-19 细胞株。以 Cas9 慢病毒感染的野生型 ARPE-19 细胞为对照组,*HSF1* gRNA3 和 gRNA4 双病毒感染 ARPE-19/Cas9 细胞产生 ARPE/*Hsf1*^{-/-} 细胞,获得 H8 型组和 H9 型组。

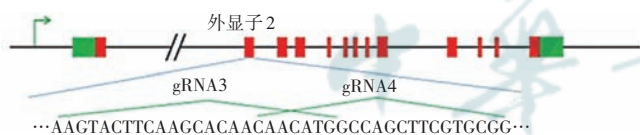


图 1 CRISPR/Cas9 基因编辑系统构建 *HSF1* 敲除 ARPE-19 细胞策略图 gRNA:向导 RNA

Figure 1 Construction strategies of *HSF1* knockout ARPE-19 cell line by using CRISPR/Cas9 gene editing system gRNA:guide RNA

1.2.3 Western blot 法测定 ARPE-19 细胞中相应因子蛋白相对表达量 取各细胞株采用含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液裂解细胞,提取细胞总蛋白质,14 000 \times g 离心 5 min 收集上清液,采用 BCA 法测定蛋白质浓度。取 30 μg 总蛋白上样电泳,根据蛋白相对分子质量选择不同浓度的 SDS-PAGE 胶电泳分离蛋白质并转印至 PVDF 膜;取 PVDF 膜,用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,分别滴加 *HSF1*、*HSP70*、*HSP27*、p21、p53 和 IL-1 β 一抗(均 1:1 000 稀释),

4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 漂洗 3 次,滴加相应 HRP 标记的二抗(1:1 000 稀释)室温下孵育 2 h,TBST 漂洗 3 次;加入 ECL 发光液,化学发光凝胶成像仪采集图像信息,采用 ImageJ 软件分析蛋白条带灰度值,以 GAPDH 为内参,以野生型细胞未经处理为实验对照组,对照组蛋白相对表达量归一化处理为 1,计算各目的蛋白的相对表达量。另取经 0、2 mmol/L NAC 处理 24 h 的各细胞株,提取蛋白进行 Western blot 实验,以 β -actin 为内参,计算 p21 蛋白的相对表达量。实验独立重复 3 次,取平均值。

1.2.4 热刺激和 IPI504 诱导 ARPE-19 的热休克反应 取贴壁后的野生型、H8 和 H9 细胞,更换为 43 $^{\circ}\text{C}$ 水浴后的培养基,立即转入提前预热的 43 $^{\circ}\text{C}$ CO₂ 细胞培养箱,对细胞进行 43 $^{\circ}\text{C}$ 热休克刺激 1 h,立即更换为 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养基并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中分别恢复 2 h 和 12 h。另取各组细胞株,用含有 0.5 $\mu\text{mol/L}$ HSP90 抑制剂 IPI504 的 DMEM/F12 培养基处理 24 h 诱导热休克反应。采用 Western blot 法检测不同细胞株 HSP 的相对表达量,评估各种细胞的热休克反应程度。实验独立重复 3 次,取平均值。

1.2.5 SA- β -gal 染色法测定 ARPE-19 细胞内衰老细胞比率 采用 SA- β -gal 染色试剂盒测定 SA- β -gal 活性,以确定 ARPE-19 细胞的衰老程度。取野生型、H8、H9 细胞按照 2×10^5 个/孔接种至 6 孔板中常规培养 24 h,用固定液在室温下固定 15 min,PBS 清洗 3 次,每次 5 min;滴加 2 ml SA- β -gal 染色液,在无 CO₂ 的 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱内孵育细胞 12 h,PBS 清洗 3 次,每次 5 min;光学显微镜 200 倍镜下任意选取 10 个视野,衰老细胞呈蓝色染色,计算 SA- β -gal 阳性细胞比例。

1.2.6 CCK-8 实验检测 ARPE-19 细胞活力 将野生型、H8 和 H9 细胞株以 2 000 个/孔的密度接种于 96 孔板,采用 DMEM/F12 培养基分别培养细胞 24、48、72 和 96 h,移去培养基,将 100 μl 10% CCK-8 试剂添加于培养基中 2 h,采用多功能酶标仪测量 450 nm 处的吸光度(absorbance,A)值。比较各组细胞不同时间点的细胞活力。实验独立重复 5 次,取平均值。

1.2.7 流式细胞术检测细胞周期 取各细胞株按照 2×10^5 个/孔接种至 6 孔板中培养 24 h,低速离心 15 min 收集细胞,滴加 1 ml 70% 冰乙醇于冰上固定细胞 2 h,PBS 清洗 2 次;滴加 1 ml 含 RNase A 的碘化丙啶(propidium iodide,PI)染色液,混匀,室温孵育 30 min,PBS 清洗 2 次;将细胞重悬在 PBS 中进行流式细胞仪上机检测,采用 FlowJo 软件分析数据资料。实验独立重复 3 次,取平均值。

1.2.8 结晶紫染色法测定不同浓度 H₂O₂ 处理条件下 ARPE-19 存活率 将各细胞株以 2 000 个/孔的密度接种于 96 孔板,用 100 μl 完全培养基进行培养,细胞贴壁后分别用含有 0、200、400、600、800 μmol/L H₂O₂ 的 DMEM/F12 培养基培养细胞 48 h;用 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min, PBS 清洗 3 次,每次 5 min;用 20% 甲醇固定细胞 10 min, PBS 清洗 3 次,每次 5 min;每孔加入 100 μl 0.23% 结晶紫溶液染色 10 min, PBS 反复润洗至上清液澄清,除尽 PBS,加入 100 μl 33% 乙酸溶液进行结晶紫脱色,摇匀,用酶标仪测定 570 nm 处的 A 值,以各细胞株未经 H₂O₂ 处理的细胞作为对照,计算不同浓度 H₂O₂ 处理细胞的相对存活率。细胞相对存活率 = H₂O₂ 处理细胞 A 值 / 对照细胞 A 值 × 100%。实验独立重复 3 次,取平均值。

1.2.9 流式细胞术检测细胞内 ROS 含量 取各细胞株按照 2 × 10⁵ 个/孔接种至 6 孔板培养 24 h,滴加 1 ml 预先配制好的浓度为 10 μmol/L DHE 探针,于 37 °C、5% CO₂ 条件下孵育 30 min, PBS 清洗 2 次; PBS 重悬细胞,过细胞筛,立即采用流式细胞仪测定细胞内荧光强度。实验独立重复 3 次,取平均值。

1.2.10 实时荧光定量 PCR 法检测细胞内 p53、p21 和 SASP 因子 mRNA 相对表达量 取各细胞株采用 Trizol 法提取总 RNA。以 2.5 μg 总 RNA 为模板,参照逆转录试剂盒进行 20 μl 体系的逆转录反应;以 cDNA 为模板,以每孔 10 ng 的模板、20 μl 的反应体系进行 PCR 扩增。各基因引物序列见表 1,由北京擎科生物有限公司合成;以 GAPDH 为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算各基因相对表达量。实验独立重复 3 次,取平均值。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism9 统计学软件对数据进行统计分析。各检测指标量值经 Shapiro-Wilk 检验证实符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示, Levene 检验证实数据服从方差齐性。同一细胞株 2 种处理条件下的检测指标差异比较采用独立样本 t 检验。不同细胞株各检测指标或同一细胞株不同处理前后各检测指标的总差异比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-t 检验。不同细胞株不同处理前后或不同时间点各检测指标

的总体差异比较采用两因素方差分析,两两比较采用 LSD-t 检验。采用双侧检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。

表 1 基因引物序列
Table 1 Gene primer sequences

基因	引物序列(5'-3')
p53	正向: ACCTATGGAAACTACTTCTCGAAA 反向: CTGGCATTCTGGGAGCTTCA
p21	正向: AAGTCAGTTCCTTGTGGAGC 反向: GCCATTAGCGCATCACAGTC
GAPDH	正向: GACAGTCAGCCGCATCTTCT 反向: GCGCCCAATACGACCAAATC
IL-1β	正向: AGTACCTGAGCTCGCCAGT 反向: TGGTGGTCGGAGATTCGTAG
IL-6	正向: TGAACCTCTTCCACAAGCC 反向: CCGTCGAGGATGTACCGAAT
IL-8	正向: GCTCTGTGTGAAGTGCAGTT 反向: ACCCAGTTTCTCTGGGGTC
MCP-1	正向: CGCCTCCAGCATGAAAGTCT 反向: AGTGACTGGGGCATTGATT

注: GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; IL: 白细胞介素; MCP: 单核细胞趋化蛋白

Note: GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; IL: interleukin; MCP: monocyte chemoattractant protein

2 结果

2.1 ARPE/Hsf1^{-/-} 细胞的建立情况及验证

测序峰图结果表明, 获取到 2 株敲除 HSF1 基因的细胞株分别携带 -ACA/+T (H8)、+A/-TCGTGCGG CAGCT (H9) 移码突变(图 2A)。Western blot 检测结果显示, H8、H9 细胞株不表达 HSF1 蛋白; 与野生型细胞株相比, H8、H9 细胞株中 HSP70、HSP27 和 CLU 蛋白条带强度明显减弱(图 2B)。野生型、H8 和 H9 细胞株中 HSP90 蛋白相对表达量总体比较差异无统计学意义 (F = 0.29, P = 0.76), HSP70、HSP27 和 CLU 蛋



图 2 HSF1 敲除 ARPE-19 细胞的构建 A: 各细胞株 HSF1 测序结果 B: 各细胞株 HSF1、不同 HSPs 及 CLU 蛋白表达电泳图 HSF: 热休克转录因子; HSP: 热休克蛋白; CLU: 聚集素; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Figure 2 Construction of HSF1 knockout ARPE-19 cells A: HSF1 sequencing results for each cell strain B: HSF1, HSPs and CLU expression electrophoresis diagram in different cell strains HSF: heat shock transcription factor; HSP: heat shock protein; CLU: clusterin; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

白相对表达量总体差异均有统计学意义 ($F = 101.30$ 、 18.59 、 8.07 , 均 $P < 0.05$), 其中 H8 和 H9 细胞株中 HSP70、HSP27 和 CLU 蛋白相对表达量均低于野生型细胞株, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 2)。

表 2 不同细胞株中 HSP 相关蛋白及 CLU 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of relative expression of HSPs and CLU proteins among different cell strains ($\bar{x} \pm s$)

细胞株	样本量	各蛋白相对表达量			
		HSP90 蛋白	HSP70 蛋白	HSP27 蛋白	CLU 蛋白
野生型	3	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
H8	3	0.88±0.09	0.45±0.06 ^a	0.34±0.13 ^a	0.36±0.25 ^a
H9	3	0.96±0.25	0.56±0.01 ^a	0.48±0.14 ^a	0.47±0.14 ^a
<i>F</i> 值		0.29	101.30	18.59	8.07
<i>P</i> 值		0.76	<0.001	<0.01	<0.05

注: 与野生型细胞株比较, ^a $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验)
HSP: 热休克蛋白; CLU: 聚集素
Note: Compared with wild-type cell strain, ^a $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) HSP: heat shock protein; CLU: clusterin

2.2 各细胞株在不同刺激和 IPI504 诱导下热休克反应相关蛋白相对表达量比较

野生型细胞中, 与 37 °C 处理组相比, 各不同热休克处理细胞中 HSF1 蛋白及其下游蛋白 HSP70、HSP27 和 CLU 蛋白条带灰度均增强; 与相同热休克处理条件下野生型细胞相比, H8 和 H9 细胞中 HSP70、HSP27 和 CLU 蛋白条带灰度减弱 (图 3A)。在野生型细胞株中, 不同热休克处理后 HSF1 蛋白相对表达量总体比较差异有统计学意义 ($F = 55.40$, $P < 0.01$); 与 37 °C 处理相比, 43 °C 1 h 恢复 2 h 和恢复 12 h 处理细胞中 HSF1 蛋白相对表达量均升高, 差异均有统计学意义

(均 $P < 0.01$) (表 3)。各细胞株不同热休克处理条件下 HSP70、HSP27 和 CLU 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F_{\text{细胞株}} = 114.90$ 、 178.30 、 522.70 , 均 $P < 0.01$; $F_{\text{处理}} = 15.79$ 、 84.70 、 21.26 , 均 $P < 0.05$); 与野生型细胞株比较, 相应 43 °C 热休克处理条件下 H8、H9 细胞株 HSP70、CLU 蛋白相对表达量均明显下降, H9 细胞株 HSP27 蛋白相对表达量明显下降, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 4)。

表 3 野生型细胞不同热休克处理后 HSF1 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Comparison of relative expression of HSF1 protein after different heat shock treatment in wild-type cell ($\bar{x} \pm s$)

热休克处理	样本量	HSF1 蛋白相对表达量
37 °C	3	1.00±0.00
43 °C 1 h	3	1.15±0.06
43 °C 1 h 恢复 2 h	3	1.65±0.07 ^a
43 °C 1 h 恢复 12 h	3	1.95±0.14 ^a
<i>F</i> 值		55.40
<i>P</i> 值		<0.01

注: 与 37 °C 处理比较, ^a $P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验)
HSF: 热休克转录因子
Note: Compared with 37 °C treatment, ^a $P < 0.01$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) HSF: heat shock transcription factor

野生型细胞株中, 与未处理细胞株相比, IPI504 处理后 HSF1 蛋白条带灰度无明显变化, HSP70、HSP27 和 CLU 蛋白条带灰度增强; H8 和 H9 细胞株 IPI504 处理条件下 HSP70、HSP27 和 CLU 蛋白条带灰度较野生型细胞株减弱 (图 3B)。野生型细胞未经 IPI504 处理与 IPI504 处理后 HSF1 蛋白相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($t = 2.69$, $P = 0.24$) (表 5)。各细胞株不同 IPI504 处理条件下 HSP70、HSP27、和 CLU 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F_{\text{细胞株}} = 45.80$ 、 11.37 、 15.81 , 均 $P < 0.05$; $F_{\text{处理}} = 20.36$ 、 18.72 、 21.79 , 均 $P < 0.05$); 其中野生型细胞株 IPI504 处理条件下 HSP70、HSP27 和 CLU 蛋白相对表达量均较非 IPI504 处理细胞升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 与野生型细胞株相比, 相同处理条件下 H9 细胞株中 HSP70 和

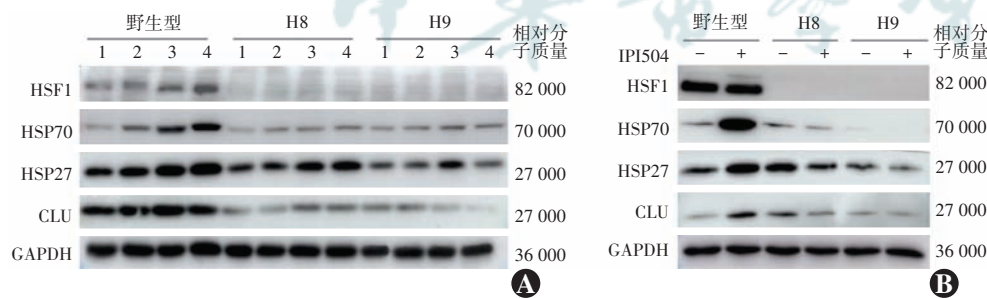


图 3 热休克和 IPI504 应激处理后不同细胞株中热休克反应相关蛋白表达电泳图 A: 不同热休克处理后各组热休克反应相关蛋白的表达电泳图 1: 37 °C 正常培养; 2: 43 °C 热休克处理 1 h; 3: 43 °C 热休克处理 1 h 后 37 °C 正常培养恢复 2 h; 4: 43 °C 热休克处理 1 h 后 37 °C 正常培养恢复 12 h B: IPI504 处理后各组热休克反应相关蛋白表达电泳图 HSF: 热休克转录因子; HSP: 热休克蛋白; CLU: 聚集素; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Figure 3 Heat shock response-associated proteins expression electrophoretogram in each group after heat shock and IPI504 treatment A: Electrophoretogram in each group after different heat shock treatment 1: 37 °C normal culture; 2: 43 °C heat shock treatment for 1 hour; 3: 43 °C heat shock treatment for 1 hour, 37 °C normal culture recovery 2 hours; 4: 43 °C heat shock treatment for 1 hour, 37 °C normal culture recovery 12 hours B: Electrophoretogram in each group after different IPI504 treatment HSF: heat shock transcription factor; HSP: heat shock protein; CLU: clusterin; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

表 4 各细胞株不同热休克处理后 HSP70、HSP27、CLU 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 4 Comparison of relative expression of HSP70, HSP27 and CLU proteins among different cell strains after different heat shock treatment ($\bar{x}\pm s$)

细胞株	样本量	不同热休克处理后 HSP70 蛋白相对表达量			
		37 °C	43 °C 1 h	43 °C 1 h 恢复 2 h	43 °C 1 h 恢复 12 h
野生型	3	1.00±0.00	2.28±0.48 ^a	3.16±0.57 ^a	4.32±0.87 ^a
H8	3	0.79±0.08	0.96±0.03 ^b	1.02±0.19 ^b	1.48±0.10 ^b
H9	3	0.86±0.08	0.56±0.10 ^b	1.14±0.11 ^b	0.71±0.02 ^b

细胞株	样本量	不同热休克处理后 HSP27 蛋白相对表达量			
		37 °C	43 °C 1 h	43 °C 1 h 恢复 2 h	43 °C 1 h 恢复 12 h
野生型	3	1.00±0.00	1.41±0.13	2.08±0.21 ^a	2.53±0.13 ^a
H8	3	0.52±0.05 ^b	0.82±0.10 ^b	1.71±0.20 ^a	2.53±0.13 ^a
H9	3	0.33±0.04 ^b	0.86±0.08 ^b	0.33±0.04 ^{ab}	0.66±0.06 ^b

细胞株	样本量	不同热休克处理后 CLU 蛋白相对表达量			
		37 °C	43 °C 1 h	43 °C 1 h 恢复 2 h	43 °C 1 h 恢复 12 h
野生型	3	1.00±0.00	1.11±0.16	1.63±0.21 ^a	1.29±0.16
H8	3	0.31±0.06 ^b	0.32±0.01 ^b	0.70±0.03 ^{ab}	0.75±0.04 ^{ab}
H9	3	0.66±0.06	0.76±0.03 ^b	0.46±0.06 ^b	0.23±0.07 ^{ab}

注: HSP70: $F_{\text{细胞株}} = 114.90, P < 0.01; F_{\text{处理}} = 15.79, P < 0.05$. HSP27: $F_{\text{细胞株}} = 178.30, P < 0.01; F_{\text{处理}} = 84.70, P < 0.01$. CLU: $F_{\text{细胞株}} = 522.70, P < 0.001; F_{\text{处理}} = 21.26, P < 0.05$. 与各自 37 °C 处理比较, ^a $P < 0.05$; 与同种处理野生型细胞株比较, ^b $P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) HSP: 热休克蛋白; CLU: 聚集素
 Note: HSP70: $F_{\text{cell strain}} = 114.90, P < 0.01; F_{\text{treatment}} = 15.79, P < 0.05$. HSP27: $F_{\text{cell strain}} = 178.30, P < 0.01; F_{\text{treatment}} = 84.70, P < 0.01$. CLU: $F_{\text{cell strain}} = 522.70, P < 0.001; F_{\text{treatment}} = 21.26, P < 0.05$. Compared with respective 37 °C treatment, ^a $P < 0.05$; compared with wild-type cell strain with the same treatment, ^b $P < 0.05$ (Two-way ANOVA, LSD-*t* test) HSP: heat shock protein; CLU: clusterin

HSP27 蛋白相对表达量明显下降, H8 细胞株中 HSP27 蛋白相对表达量明显下降, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 6)。

2.3 不同细胞株细胞中 SA-β-gal 阳性细胞比例比较

与野生型细胞株相比, H8、H9 细胞株中蓝色染色细胞数目增多 (图 4)。3 种细胞株中 SA-β-gal 阳性细胞比例总体比较差异有统计学意义 ($F = 210.10, P < 0.001$); 其中与野生型细胞株相比, H8 和 H9 细胞株中 SA-β-gal 阳性细胞比例显著升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$) (表 7)。

表 5 野生型细胞 IPI504 处理后 HSF1 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 5 Comparison of relative expression of HSF1 protein in wild-type cell strains after IPI504 treatment ($\bar{x}\pm s$)

热休克处理	样本量	HSF1 蛋白相对表达量
IPI504 处理后	3	0.88±0.10
未经 IPI504 处理	3	1.00±0.00
<i>t</i> 值		2.69
<i>P</i> 值		0.24

注: (独立样本 *t* 检验) HSF: 热休克转录因子
 Note: (Independent sample *t*-test) HSF: heat shock transcription factor

表 6 各细胞株 IPI504 处理前后 HSP70、HSP27 和 CLU 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 6 Comparison of relative expression of HSP70, HSP27 and CLU proteins among different cell strains with or without IPI504 treatment ($\bar{x}\pm s$)

细胞株	样本量	HSP70 蛋白相对表达量	
		未经 IPI504 处理	经 IPI504 处理
野生型	3	1.00±0.00	5.52±1.29 ^a
H8	3	0.99±0.18	0.32±0.05 ^b
H9	3	0.22±0.14 ^b	0.13±0.12 ^b

细胞株	样本量	HSP27 蛋白相对表达量	
		未经 IPI504 处理	经 IPI504 处理
野生型	3	1.00±0.00	2.23±0.51 ^a
H8	3	0.50±0.11 ^b	0.88±0.16 ^b
H9	3	0.59±0.11 ^b	0.46±0.09 ^b

细胞株	样本量	CLU 蛋白相对表达量	
		未经 IPI504 处理	经 IPI504 处理
野生型	3	1.00±0.00	1.69±0.27 ^a
H8	3	0.90±0.05	0.52±0.17 ^b
H9	3	0.95±0.09	0.93±0.03 ^b

注: HSP70: $F_{\text{细胞株}} = 45.80, P < 0.01; F_{\text{处理}} = 20.36, P < 0.05$. HSP27: $F_{\text{细胞株}} = 11.37, P < 0.05; F_{\text{处理}} = 18.72, P < 0.05$. CLU: $F_{\text{细胞株}} = 15.81, P < 0.001; F_{\text{处理}} = 21.79, P < 0.001$. 与各自未经 IPI504 处理比较, ^a $P < 0.001$; 与同种处理条件下野生型细胞株比较, ^b $P < 0.01$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) HSP: 热休克蛋白; CLU: 聚集素
 Note: HSP70: $F_{\text{cell strain}} = 45.80, P < 0.01; F_{\text{treatment}} = 20.36, P < 0.05$. HSP27: $F_{\text{cell strain}} = 11.37, P < 0.05; F_{\text{treatment}} = 18.72, P < 0.05$. CLU: $F_{\text{cell strain}} = 15.81, P < 0.001; F_{\text{treatment}} = 21.79, P < 0.001$. Compared with respective non-IPI504 treatment, ^a $P < 0.001$; compared with wild-type cell strain with the same treatment, ^b $P < 0.01$ (Two-way ANOVA, LSD-*t* test) HSP: heat shock protein; CLU: clusterin

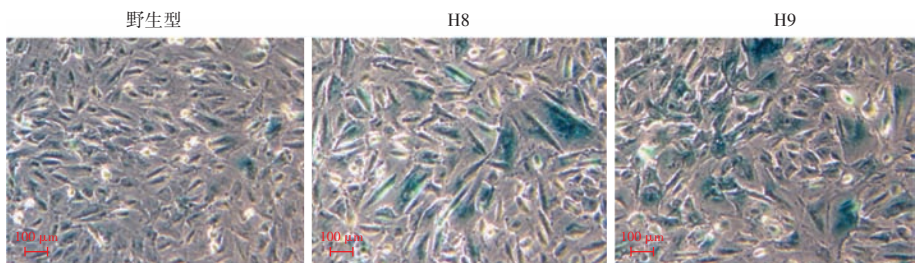


图 4 不同细胞株 SA-β-gal 染色图 (×200, 标尺 = 100 μm) 衰老细胞呈蓝色染色
Figure 4 SA-β-gal staining images in different cell lines (×200, scale bar = 100 μm) Senescent cells were stained in blue

表 7 不同细胞株 SA-β-gal 阳性细胞比例比较 ($\bar{x}\pm s$, %)
Table 7 Comparison of percentage of SA-β-gal-positive cell among different cell strains ($\bar{x}\pm s$, %)

细胞株	样本量	SA-β-gal 阳性细胞比例
野生型	10	5.69±2.41
H8	10	23.54±1.96 ^a
H9	10	28.40±2.95 ^a
F 值		210.10
P 值		<0.001

注:与野生型细胞株比较,^a $P<0.001$ (单因素方差分析,LSD- t 检验)
 Note:Compared with wild-type cell strain,^a $P<0.001$ (One-way ANOVA, LSD- t test)

2.4 不同细胞株细胞活力值和细胞周期比较

各细胞株不同培养时间点细胞活力 A_{450} 值总体比较差异均有统计学意义 ($F_{\text{细胞株}} = 1\ 637.00, P<0.001$; $F_{\text{时间}} = 3\ 277.00, P<0.001$), 其中与野生型细胞株相比, H8 和 H9 细胞株各相应时间点 A_{450} 值显著降低, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$) (表 8)。

表 8 不同培养时间点各细胞株中细胞活力值比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 8 Comparison of cell viability among different cell strains at different time points ($\bar{x}\pm s$)

细胞株	样本量	不同培养时间点细胞活力 A_{450} 值			
		24 h	48 h	72 h	96 h
野生型	5	0.31±0.01	0.68±0.04 ^b	1.21±0.03 ^b	2.69±0.08 ^b
H8	5	0.11±0.01 ^a	0.18±0.01 ^{ab}	0.39±0.03 ^{ab}	1.01±0.10 ^{ab}
H9	5	0.22±0.02 ^a	0.32±0.01 ^{ab}	0.59±0.06 ^{ab}	1.35±0.06 ^{ab}

注: $F_{\text{细胞株}} = 1\ 637.00, P<0.001$; $F_{\text{时间}} = 3\ 277.00, P<0.001$. 与同一时间点野生型细胞比较,^a $P<0.05$;与各自 24 h 比较,^b $P<0.05$ (两因素方差分析,LSD- t 检验) A:吸光度

Note: $F_{\text{cell strain}} = 1\ 637.00, P<0.001$; $F_{\text{time}} = 3\ 277.00, P<0.001$. Compared with wild-type cell strain at the same time point,^a $P<0.05$; compared with respective 24 hours,^b $P<0.05$ (Two-way ANOVA, LSD- t test) A: absorbance

野生型、H8 和 H9 细胞株的 G1 期细胞百分比分别为 (24.50±1.82)%、(45.87±2.80)% 和 (38.73±4.36)%, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 23.57, P<0.01$); 与野生型细胞株比较, H8 和 H9 细胞株 G1 期细胞百分比显著升高, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.01$) (图 5)。

2.5 不同浓度 H₂O₂ 处理下各细胞株相对存活率比较

不同浓度 H₂O₂ 处理各细胞株相对存活率总体比较差异有统计学意义 ($F_{\text{浓度}} = 952.00, P<0.001$, $F_{\text{细胞株}} = 294.50, P<0.001$), 其中 400、600、800 μmol/L H₂O₂ 处理 H8 和 H9 细胞株的相对存活率明显低于野生型细胞, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$); 各细胞株相对存活率随 H₂O₂ 剂量增加而逐渐下降, 呈现 H₂O₂ 剂量依赖性 (表 9)。

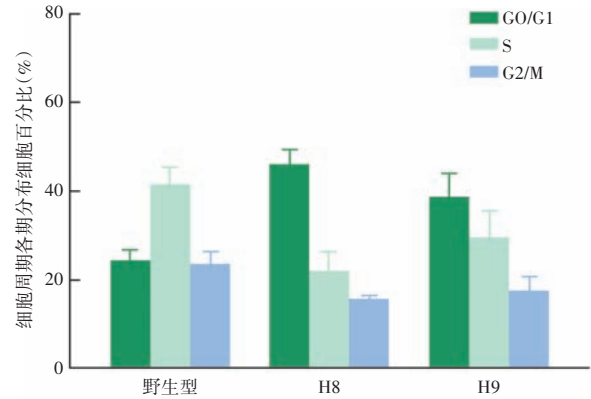


图 5 不同细胞株中细胞周期分布情况
Figure 5 Cell cycle distribution in different cell strains

表 9 不同浓度 H₂O₂ 处理后不同细胞株相对存活率比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 9 Comparison of relative survival rate of different cell strains after H₂O₂ treatment ($\bar{x}\pm s$)

H ₂ O ₂ 浓度	样本量	不同细胞株相对存活率		
		野生型	H8	H9
0 μmol/L	3	1.00±0.00	1.00±0.06	1.00±0.08
200 μmol/L	3	0.97±0.01	0.91±0.02	0.84±0.03 ^a
400 μmol/L	3	0.84±0.01	0.61±0.02 ^a	0.72±0.02 ^a
600 μmol/L	3	0.70±0.03	0.44±0.01 ^{ab}	0.42±0.01 ^{ab}
800 μmol/L	3	0.33±0.03 ^b	0.11±0.03 ^{ab}	0.12±0.02 ^{ab}

注: $F_{\text{浓度}} = 952.00, P<0.001$; $F_{\text{细胞株}} = 294.50, P<0.001$. 与野生型细胞相比较,^a $P<0.05$;与各自 24 h 比较,^b $P<0.05$ (两因素方差分析,LSD- t 检验)

Note: $F_{\text{concentration}} = 952.00, P<0.001$; $F_{\text{cell strain}} = 294.50, P<0.001$. Compared with wild-type cell strain,^a $P<0.05$; compared with respective 0 μmol/L H₂O₂ treatment,^b $P<0.05$ (Two-way ANOVA, LSD- t test)

2.6 不同细胞株中 ROS 含量比较

野生型、H8 和 H9 细胞株中 ROS 荧光强度总体比较差异有统计学意义 ($F = 43.83, P<0.001$), 其中与野生型细胞株相比, H8 和 H9 细胞株中 ROS 荧光强度均显著增强, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.01$) (表 10)。

表 10 不同细胞株中 ROS 荧光强度比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 10 Comparison of ROS fluorescence intensity among different cell strains ($\bar{x}\pm s$)

细胞株	样本量	ROS 荧光强度值
野生型	3	106.67±4.11
H8	3	191.00±9.27 ^a
H9	3	157.67±9.74 ^a
F 值		43.83
P 值		<0.001

注:与野生型细胞株比较,^a $P<0.01$ (单因素方差分析,LSD- t 检验)
 ROS:活性氧
 Note:Compared with wild-type cell strain,^a $P<0.01$ (One-way ANOVA, LSD- t test) ROS:reactive oxygen species

2.7 不同细胞株中 SASP 相关基因蛋白和 mRNA 表达情况比较

与野生型细胞株比较, H8、H9 细胞株中 p53、p21 蛋白条带灰度增强, IL-1β 蛋白条带灰度减弱(图 6)。各细胞株中 p53、p21 和 IL-1β 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义($F = 9.38、16.69、11.49$, 均 $P < 0.05$); 其中与野生型细胞株相比, H8 和 H9 细胞株中 p53 和 p21 蛋白相对表达量均明显升高, IL-1β 蛋白相对表达量明显下降, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表 11)。

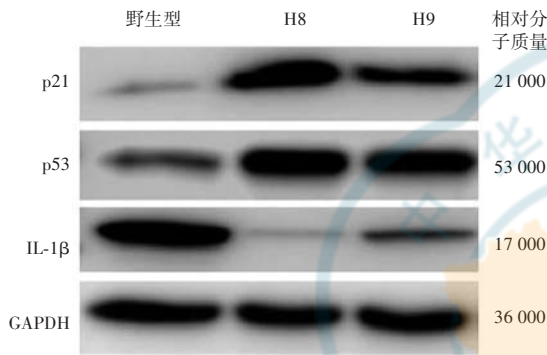


图 6 各细胞系中衰老标志物 p53、p21、IL-1β 蛋白表达电泳图
IL: 白细胞介素; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶
Figure 6 Electrophoretogram of senescence markers p53, p21 and IL-1β expression in different cell strains IL: interleukin; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

各细胞株中 p53、p21、IL-1β、IL-6、IL-8 和 MCP1 mRNA 相对表达量总体比较差异均有统计学意义($F = 596.00、35.99、174.60、16 649.00、149.10、61.39$, 均 $P < 0.05$)。与野生型细胞株相比, H8 和 H9 细胞株中 p53 和 p21 mRNA 相对表达量显著升高, IL-1β、IL-6、IL-8、MCP1 mRNA 相对表达量明显下降, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)(表 12)。

2.8 各细胞株 NAC 处理后 p21 蛋白表达变化比较

与未经 NAC 处理相比, NAC 处理后 H8、H9 细胞株中 p21 蛋白条带灰度减弱(图 7)。各细胞株不同处理条件下 p21 蛋白相对表达量总体比较差异有统计学意义($F_{\text{细胞株}} = 80.45, F_{\text{处理}} = 171.70$, 均 $P < 0.01$); 未经 NAC 处理条件下, H8、H9 细胞株中 p21 蛋白相对表达量均较野生型细胞株升高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$); 与未经 NAC 处理相比, H8、H9 细胞株经 NAC 处理后 p21 蛋白相对表达量均明显降低, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表 13)。

表 11 不同细胞株 p53、p21 和 IL-1β 蛋白相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)
Table 11 Comparison of relative expressions of p53, p21 and IL-1β proteins among different cell strains ($\bar{x} \pm s$)

细胞株	样本量	各目的蛋白相对表达量		
		p53	p21	IL-1β
野生型	3	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
H8	3	4.88±1.36 ^a	4.76±1.12 ^a	0.34±0.18 ^a
H9	3	4.46±1.02 ^a	3.03±0.18 ^a	0.36±0.21 ^a
<i>F</i> 值		9.38	16.69	11.49
<i>P</i> 值		0.01	<0.01	<0.01

注: 与野生型细胞株比较, ^a $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验)
Note: Compared with wild-type cell strain, ^a $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test)

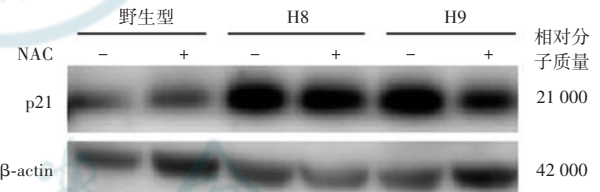


图 7 各细胞株不同 NAC 处理后 p21 蛋白表达电泳图 NAC: N-乙酰半胱氨酸
Figure 7 Electrophoretogram of p21 protein expression in different cell strains treated with or without NAC NAC: N-acetylcysteine

表 12 不同细胞株中 SASP 相关基因 mRNA 相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)
Table 12 Comparison of relative mRNA expression levels of SASP-related genes among different cell strains ($\bar{x} \pm s$)

细胞株	样本量	SASP 相关基因 mRNA 相对表达量					
		p53	p21	IL-1β	IL-6	IL-8	MCP1
野生型	3	0.99±0.01	1.02±0.20	1.00±0.07	1.00±0.01	1.01±0.12	1.01±0.15
H8	3	2.64±0.05 ^a	2.89±0.28 ^a	0.11±0.01 ^a	0.04±0.00 ^a	0.01±0.00 ^a	0.20±0.04 ^a
H9	3	1.67±0.07 ^a	2.31±0.19 ^a	0.57±0.03 ^a	0.02±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.08±0.00 ^a
<i>F</i> 值		596.00	35.99	174.60	16 649.00	149.10	61.39
<i>P</i> 值		<0.001	<0.01	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与野生型细胞株比较, ^a $P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) SASP: 衰老相关分泌表型; IL: 白细胞介素; MCP: 单核细胞趋化蛋白
Note: Compared with wild-type cell strain, ^a $P < 0.01$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) SASP: senescence-associated secretory phenotype; IL: interleukin; MCP: monocyte chemoattractant protein

表 13 各细胞株不同 NAC 处理后 p21 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 13 Comparison of relative expression of p21 protein among different cell strains with and without NAC treatment ($\bar{x} \pm s$)

细胞株	样本量	不同处理条件下 p21 蛋白相对表达量	
		未经 NAC 处理	NAC 处理
野生型	3	1.00±0.00	1.08±0.07
H8	3	5.19±0.56 ^a	1.46±0.31 ^b
H9	3	1.95±0.30 ^a	1.20±0.11 ^b

注: $F_{\text{细胞株}} = 80.45, P < 0.001$; $F_{\text{处理}} = 171.70, P = 0.006$ 。与未经 NAC 处理野生型细胞株相比, ^a $P < 0.05$; 与未经 NAC 处理同种细胞相比, ^b $P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) NAC: N-乙酰半胱氨酸

Note: $F_{\text{cell strain}} = 80.45, P < 0.001$; $F_{\text{treatment}} = 171.70, P = 0.006$. Compared with non-NAC treated wild-type cell strain, ^a $P < 0.05$; compared with respective untreated, ^b $P < 0.05$ (Two-way ANOVA, LSD-*t* test) NAC: N-acetylcysteine

3 讨论

随着老龄化进程加剧, AMD 患者的数量将持续增加^[2], 目前尚无有效药物可以阻止 AMD 疾病的进展, 开发新的 AMD 药物防治靶点成为迫切需求。衰老是 AMD 进展的主要危险因素, 氧化应激是 RPE 细胞面临的主要应激刺激, 是干性 AMD 的主要致病因素^[9]。因此, 延缓 RPE 衰老和增强其抗氧化应激能力成为治疗 AMD 的潜在策略。

本研究采用 CRISPR/Cas9 基因编辑系统, 首次在体外建立 ARPE/Hsf1^{-/-} 细胞模型。Cas9 核酸内切酶在 DNA 双链上发生定点剪切, 通过细胞同源重组修复机制, 错误修复的碱基有可能通过发生移码突变导致提前产生终止密码子或产生错义突变, 从而彻底阻断 HSF1 蛋白的生成, 且稳定地遗传给子代细胞。相比小干扰 RNA, 此方法的蛋白表达更稳定, 且免受转染试剂的干扰。本研究结果显示 HSF1 敲除后的细胞仍有增殖能力, 表明 HSF1 敲除不会对细胞产生致死效应, 为研究 HSF1 在干性 AMD 中的作用提供一种可持续的体外模型。

HSF1 主要通过刺激编码伴侣蛋白如 HSP90、HSP70、HSP27、CLU 等的基因转录, 上调其表达, 从而保护细胞免受错误折叠蛋白堆积引起的细胞毒性, 在蛋白质稳态中起核心作用^[10]。为研究 HSF1 敲除后对热休克反应的影响, 本研究采用热休克刺激和 HSP90 抑制剂 IPI504 处理不同细胞株, 后者通过影响 HSF1 的活性显著激活 HSF1 介导的 HSP 表达, 但不影响 HSF1 本身的水平; 结果显示, 敲除 HSF1 基因的 ARPE-19 细胞, 正常培养条件下 HSP70、HSP27 和

CLU 的表达均降低, 热休克应激和 IPI504 蛋白毒性应激诱导的 HSP 表达也降低。这表明 HSF1 敲除诱导 RPE 细胞蛋白内稳态失衡和热休克反应的抑制。

在各种衰老模型系统中, HSF1 的激活和热休克反应的诱导呈年龄依赖性下降^[11-12]。HSF1 的缺乏会引起蛋白平衡破坏, 导致干细胞老化^[13]。也有研究报道单纯抑制 HSP72 和 HSP27 可以导致癌细胞衰老^[14]。本研究发现, HSF1 敲除的 ARPE-19 细胞中衰老细胞的比例显著升高, 细胞活力显著降低, G1 期细胞比例显著升高, 细胞周期抑制蛋白 p53 和 p21 表达水平显著升高, 表明 HSF1 敲除的 ARPE-19 细胞发生衰老、增殖能力降低、细胞周期阻滞在 G1 期, 验证了 HSF1 与 RPE 细胞生长和衰老之间的关系。SASP 是细胞衰老的主要特征之一, 通常表现为炎症因子、趋化因子和生长因子表达上调, 但不同衰老类型中 SASP 的表达具有异质性^[15]。不同的是, 本研究中发现, HSF1 敲除的 ARPE-19 细胞中炎症因子 IL-1 β 、IL-6、IL-8、MCP1 mRNA 水平显著下调, 但 p53 和 p21 mRNA 水平显著上调, 提示 HSF1 敲除主要通过激活 p53/p21 通路诱导 RPE 细胞的衰老。推测 HSF1 对炎症因子存在其他调控作用, 并且这些炎症因子和趋化因子不参与 HSF1 敲除介导的 RPE 细胞 SASP, 其具体调控机制有待进一步探究。

ROS 是多数应激刺激包括氧化应激诱导细胞衰老的主要物质, ROS 过度积累被认为是 DNA 损伤诱导细胞衰老的关键机制^[16]。ROS 升高抑制细胞生长的基因转录, 并诱导 p53 和 p21 上调, 从而促进细胞凋亡或衰老^[17-18]。本研究发现, HSF1 敲除后 ARPE-19 细胞内的 ROS 含量显著升高, 且经 ROS 清除剂 NAC 处理后 p21 蛋白表达水平降低, 提示 HSF1 敲除通过上调 ROS 激活 p53/p21 通路, 从而调控 ARPE-19 细胞的衰老。

HSF1 在保护细胞免受氧化应激损伤方面起重要作用, 已有研究报道 HSF1 参与调控氧化磷酸化, 缺失 HSF1 可导致干细胞发生氧化应激损伤^[13]。此外, H₂O₂ 可引起 RPE 细胞发生严重的氧化损伤和过早衰老^[19-20]。抑制氧化应激可减少 RPE 细胞衰老, 如富勒烯可通过其抗氧化活性和激活去乙酰化酶 1 减轻氧化应激诱导的 RPE 细胞衰老^[21]。因此, 本研究测试了 HSF1 是否参与 RPE 细胞抵抗氧化应激。本研究中, 与野生型细胞相比, 200、400、600、800 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 处理后 HSF1 敲除细胞的相对存活率显著降低, 表明 HSF1 敲除增加了 RPE 对氧化应激的敏感性, 提示 RPE 细胞中的 HSF1 具有抗氧化应激的作用。然而, HSF1 在 RPE 细胞中抗氧化作用的分子机制尚不清楚。

综上所述,本研究发现 HSF1 敲除通过下调 HSP 表达和激活 ROS/p53/p21 通路诱导 RPE 细胞衰老,增加 RPE 对氧化应激的敏感性,提示 HSF1 可作为 RPE 细胞抗衰老和抗氧化应激的潜在靶点。靶向提高 RPE 细胞中 HSF1 的活性可能成为干性 AMD 患者潜在的治疗策略。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 蒋明君:设计实验、实施研究、采集数据、分析/解释数据、统计绘图、撰写及修改文章;尚国辉、殷凡响、薛梦姣:研究实施、技术指导;张凤研:参与实验设计、技术指导;胡延忠、彭旭艳:酝酿和设计实验,文章的知识性内容审阅及定稿

参考文献

- [1] Mitchell P, Liew G, Gopinath B, et al. Age-related macular degeneration [J]. *Lancet*, 2018, 392 (10153) : 1147–1159. DOI: 10. 1016/S0140-6736 (18) 31550-2.
- [2] Wong WL, Su X, Li X, et al. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis [J/OL]. *Lancet Glob Health*, 2014, 2 (2) : e106–e116 [2023-07-08]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32831993>. DOI: 10. 1016/S2214-109X (13) 70145-1.
- [3] Fleckenstein M, Keenan T, Guymer RH, et al. Age-related macular degeneration [J/OL]. *Nat Rev Dis Primers*, 2021, 7 (1) : 31 [2023-07-08]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32831993>. DOI: 10. 1038/s41572-021-00265-2.
- [4] Zhang ZY, Bao XL, Cong YY, et al. Autophagy in age-related macular degeneration: a regulatory mechanism of oxidative stress [J/OL]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020 : 2896036 [2023-07-08]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32831993>. DOI: 10. 1155/2020/2896036.
- [5] Mishima K, Handa JT, Aotaki-Keen A, et al. Senescence-associated beta-galactosidase histochemistry for the primate eye [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40 (7) : 1590–1593.
- [6] Ren C, Hu C, Wu Y, et al. Nicotinamide mononucleotide ameliorates cellular senescence and inflammation caused by sodium iodate in RPE [J/OL]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022 : 5961123 [2023-07-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35898618>. DOI: 10. 1155/2022/5961123.
- [7] Yu B, Ma J, Li J, et al. Mitochondrial phosphatase PGAM5 modulates cellular senescence by regulating mitochondrial dynamics [J/OL]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1) : 2549 [2023-07-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32439975>. DOI: 10. 1038/s41467-020-16312-7.
- [8] Pincus D. Regulation of Hsf1 and the heat shock response [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1243 : 41–50. DOI: 10. 1007/978-3-030-40204-4_3.
- [9] Deng Y, Qiao L, Du M, et al. Age-related macular degeneration: epidemiology, genetics, pathophysiology, diagnosis, and targeted therapy [J]. *Genes Dis*, 2022, 9 (1) : 62–79. DOI: 10. 1016/j. genedis. 2021. 02. 009.
- [10] Watanabe K, Ohtsuki T. Inhibition of HSF1 and SAFB granule formation enhances apoptosis induced by heat stress [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (9) : 4982 [2023-07-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34067147>. DOI: 10. 3390/ijms22094982.
- [11] Hipp MS, Kasturi P, Hartl FU. The proteostasis network and its decline in ageing [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20 (7) : 421–435. DOI: 10. 1038/s41580-019-0101-y.
- [12] Santra M, Dill KA, de Graff A. Proteostasis collapse is a driver of cell aging and death [J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116 (44) : 22173–22178 [2023-07-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31619571>. DOI: 10. 1073/pnas. 1906592116.
- [13] Kruta M, Sunshine MJ, Chua BA, et al. Hsf1 promotes hematopoietic stem cell fitness and proteostasis in response to ex vivo culture stress and aging [J]. *Cell Stem Cell*, 2021, 28 (11) : 1950–1965. DOI: 10. 1016/j. stem. 2021. 07. 009.
- [14] Meng L, Gabai VL, Sherman MY. Heat-shock transcription factor HSF1 has a critical role in human epidermal growth factor receptor-2-induced cellular transformation and tumorigenesis [J]. *Oncogene*, 2010, 29 (37) : 5204–5213. DOI: 10. 1038/onc. 2010. 277.
- [15] Watanabe S, Kawamoto S, Ohtani N, et al. Impact of senescence-associated secretory phenotype and its potential as a therapeutic target for senescence-associated diseases [J]. *Cancer Sci*, 2017, 108 (4) : 563–569. DOI: 10. 1111/cas. 13184.
- [16] Weyemi U, Lagente-Chevallier O, Boufraquech M, et al. ROS-generating NADPH oxidase NOX4 is a critical mediator in oncogenic H-Ras-induced DNA damage and subsequent senescence [J]. *Oncogene*, 2012, 31 (9) : 1117–1129. DOI: 10. 1038/onc. 2011. 327.
- [17] Yang Z, Li H, Luo P, et al. UNC5B promotes vascular endothelial cell senescence via the ROS-mediated P53 pathway [J/OL]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021 : 5546711 [2023-07-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34239689>. DOI: 10. 1155/2021/5546711.
- [18] Zhou Z, Yin Y, Chang Q, et al. Downregulation of B-myb promotes senescence via the ROS-mediated p53/p21 pathway, in vascular endothelial cells [J/OL]. *Cell Prolif*, 2017, 50 (2) : e12319 [2023-07-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27878894>. DOI: 10. 1111/cpr. 12319.
- [19] Dörschmann P, Thalenhorst T, Seeba C, et al. Comparison of fucoidans from *Saccharina latissima* regarding age-related macular degeneration relevant pathomechanisms in retinal pigment epithelium [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (9) : 7939 [2023-07-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37175646>. DOI: 10. 3390/ijms24097939.
- [20] Marazita MC, Dugour A, Marquioni-Ramella MD, et al. Oxidative stress-induced premature senescence dysregulates VEGF and CFH expression in retinal pigment epithelial cells: implications for age-related macular degeneration [J]. *Redox Biol*, 2016, 7 : 78–87. DOI: 10. 1016/j. redox. 2015. 11. 011.
- [21] Zhuge CC, Xu JY, Zhang J, et al. Fullerol protects retinal pigment epithelial cells from oxidative stress-induced premature senescence via activating SIRT1 [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55 (7) : 4628–4638. DOI: 10. 1167/iovs. 13-13732.

(收稿日期:2023-09-16 修回日期:2024-04-14)

(本文编辑:张宇 骆世平)

读者·作者·编者

本刊对实验研究中动物使用方面的要求

为了提高实验研究论文中实验动物这个基础环节在国际上的认可度,本刊要求作者投稿时提供以下相应信息:(1)实验动物的种属、来源、一般信息及饲养条件;(2)实验动物的等级;(3)实验所遵循的相关实验动物保护条例或法规的具体名称以及颁布的机构名称。

(本刊编辑部)