

视网膜色素变性中 *VSIG4* 基因变异对小胶质细胞功能的影响及其作用机制

徐春龙 张国伟 杜君 贾珍 王静萍 王梓文 李杨 陆宏

南通大学附属医院眼科 南通大学医学院, 南通 226001

通信作者: 陆宏, Email: luhong@ntu.edu.cn

【摘要】 目的 研究视网膜色素变性(RP)中的 V-set 和免疫球蛋白结构域 4(*VSIG4*) 基因变异对小胶质细胞功能的影响及其作用机制。方法 利用免疫荧光染色检测 *VSIG4* 在小鼠视网膜中的定位。给 HMC3 细胞(人小胶质细胞系)转染野生型(Len-WT)、突变型(Len-Mut) *VSIG4* 基因以及转染空载病毒(Len-Cont), 并通过有或无脂多糖(LPS)刺激 HMC3 细胞分为对照组、LPS-Len-WT 组、LPS-Len-Mut 组、LPS-Len-Cont 组、Len-WT 组、Len-Mut 组和 Len-Cont 组。采用实时荧光定量 PCR 检测炎症因子白细胞介素 1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的 mRNA 表达水平;采用 Western blot 法检测核因子红细胞系 2 相关因子 2(Nrf2)、血红素加氧酶 1(HO-1)、谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)、核转录因子 κ B(NF- κ B) p65 亚单位(P65)和磷酸化 P65(PP65)的蛋白表达水平;采用吞噬实验检测细胞吞噬功能;采用细胞划痕和 Transwell 实验检测细胞迁移能力。将 LPS 刺激状态下的 HMC3 细胞与 661W 细胞(小鼠视网膜感光细胞)共培养,采用 Western blot 法检测 B 细胞淋巴瘤因子 2(Bcl-2)和 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)表达水平,采用凋亡实验检测 661W 细胞的凋亡数量。结果 *VSIG4* 定位于小鼠视网膜小胶质细胞。实时荧光定量 PCR 检测结果显示,与 LPS-Len-WT 组相比,LPS-Len-Mut 组 HMC3 细胞 IL-1 β 、TNF- α mRNA 相对表达量均显著升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。Western blot 检测结果显示,与 LPS-Len-WT 组相比,LPS-Len-Mut 组 HMC3 细胞 Nrf2、HO-1、GPX4 的蛋白表达水平均显著降低,PP65/P65 比值显著升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。吞噬实验检测结果显示,Len-Cont 组、LPS-Len-Cont 组、LPS-Len-WT 组和 LPS-Len-Mut 组细胞吞噬率分别为(35.67 \pm 3.22)%、(63.67 \pm 10.07)%、(84.00 \pm 3.46)%和(64.67 \pm 2.31)%,各组 HMC3 细胞吞噬率总体比较差异有统计学意义($F = 59.06, P < 0.001$)。与 LPS-Len-WT 组相比,LPS-Len-Mut 组 HMC3 细胞吞噬率显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。细胞划痕和 Transwell 实验检测结果显示,与 LPS-Len-WT 组相比,LPS-Len-Mut 组 HMC3 细胞 24、48 h 时迁移率和 24 h 时单位面积侵袭细胞数显著降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与 LPS-Len-WT 组相比,共培养系统中 LPS-Len-Mut 组 Bax/Bcl-2 蛋白表达量比值及细胞凋亡数量显著升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 *VSIG4* 定位于小鼠视网膜小胶质细胞。RP 中的 *VSIG4* 基因变异后,LPS 刺激状态下的 HMC3 细胞 NF- κ B 信号通路激活,Nrf2/HO-1 信号通路活化程度减弱,细胞分泌炎症因子增多;吞噬和迁移能力减弱;共培养系统中细胞凋亡增加。

【关键词】 V-set 和免疫球蛋白结构域 4; 基因变异; 视网膜色素变性; 小胶质细胞; 吞噬

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK20221273)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20240304-00063

Effect and mechanism of *VSIG4* gene mutation on the function of microglia in retinitis pigmentosa

Xu Chunlong, Zhang Guowei, Du Jun, Jia Zhen, Wang Jingping, Wang Ziwen, Li Yang, Lu Hong

Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Nantong University, Medical School of Nantong University, Nantong 226001, China

Corresponding author: Lu Hong, Email: luhong@ntu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effect and mechanism of the V-set and immunoglobulin domain-containing 4 (*VSIG4*) gene mutation on the function of microglia in retinitis pigmentosa (RP).

Methods Localization of *VSIG4* in the retina was detected by immunofluorescence. HMC3 cells (human microglial cells) were transfected with wild-type (Len-WT) *VSIG4* gene, mutant type (Len-Mut) *VSIG4* gene and empty vector virus (Len-Cont) and stimulated by the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS), then divided into control group, LPS-Len-Mut group, LPS-Len-WT group, LPS-Len-Cont group, Len-Mut group, Len-WT group and Len-Cont group. The mRNA expression levels of the inflammatory factors interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. Protein expression levels of nuclear factor

erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase 1 (HO-1), glutathione peroxidase 4 (GPX4), nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) p65 subunit (P65), and phosphorylated P65 (PP65) were detected by Western blot. Cell phagocytic function was detected by phagocytosis assay. Cell migration ability was detected by cell scratch and transwell migration assay. LPS-stimulated HMC3 cells were co-cultured with 661W cells (mouse retinal photoreceptor cells), and the expression levels of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2-associated X (Bax) proteins of the cells were detected by Western blot. The number of apoptotic cells was determined by apoptosis assay.

Results VSIG4 was localized to microglia in mouse retina. The real-time fluorescence quantitative PCR results showed that compared with LPS-Len-WT group, the relative expression levels of IL-1 β and TNF- α mRNA in HMC3 cells were significantly increased in LPS-Len-Mut group (both at $P < 0.05$). The Western blot results showed that compared with LPS-Len-WT group, the protein expression levels of Nrf2, HO-1, and GPX4 in HMC3 cells were significantly reduced in LPS-Len-Mut group, and the PP65/P65 ratio was significantly increased (all at $P < 0.05$). The phagocytic experiment results showed that the phagocytic rates of HMC3 cells in Len-Cont group, LPS-Len-Cont group, LPS-Len-WT group, and LPS-Len-Mut group were (35.67 \pm 3.22)%, (63.67 \pm 10.07)%, (84.00 \pm 3.46)%, and (64.67 \pm 2.31)%, respectively, showing a statistically significant difference ($F = 59.06, P < 0.001$). Compared with LPS-Len-WT group, the phagocytic rate of HMC3 cells was significantly reduced in LPS-Len-Mut group ($P < 0.05$). The results of cell scratch and transwell migration assay showed that compared with LPS-Len-WT group, the migration rate of HMC3 cells at 24 and 48 hours and the number of invading cells per unit area at 24 hours were significantly reduced in LPS-Len-Mut group (all at $P < 0.05$). Compared with LPS-Len-WT group, the expression ratio of Bax/Bcl-2 protein and the number of cell apoptosis were significantly increased in the LPS-Len-Mut group under the co-culture system (both at $P < 0.05$). **Conclusions** VSIG4 is localized to mouse retinal microglia. When the VSIG4 gene in RP mutates, HMC3 cells under LPS stimulation exhibit a series of changes, including activation of the NF- κ B signaling pathway, decreased activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway, increased secretion of inflammatory cytokines, reduced phagocytic and migratory abilities, and increased cell apoptosis in co-culture systems.

[Key words] VSIG4; Genetic mutation; Retinitis pigmentosa; Microglia; Phagocytosis

Fund program: Science and Technology Support Program of Jiangsu Province (BK20221273)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20240304-00063

视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 是一类以感光细胞或视网膜色素上皮细胞结构、功能相关基因变异为主的遗传性疾病^[1]。世界范围内 RP 的患病率为 1/4 000, 中国为 1/3 000^[2-3]。RP 特征性的临床表现为光感受器变性、骨细胞样色素沉着、夜视能力差和视野缺损。在 RP 病程早期可出现夜盲, 晚期中心视力被破坏, 导致全盲^[4]。V-set 和免疫球蛋白结构域 4 (V-set and immunoglobulin domain-containing 4, VSIG4) 被称为 Ig 超家族蛋白 39 或免疫球蛋白超家族的补体受体^[5], 是 RP 的致病基因。VSIG4 基因全长 18.3 kb, 包含 8 个外显子。VSIG4 仅在部分组织的巨噬细胞中被检测到, 如腹腔巨噬细胞、肝库普弗细胞、心脏间质巨噬细胞、肾脏巨噬细胞以及肺泡状巨噬细胞^[5]。VSIG4 可负向调节巨噬细胞 M1 极化, 减少促炎因子的分泌, 抑制炎症反应^[6]。目前, 尚无报道证实 VSIG4 在眼部组织中的定位。小胶质细胞是视网膜组织驻留的巨噬细胞, 在 RP 发病机制中发挥关键作用^[7]。适度激活的小胶质细胞可迁移至视网膜受损部位, 吞噬死亡或变性的感光细胞, 维持视网膜内环境稳态, 但其过度激活可释放大量促炎因子, 破坏氧化应激系统稳态, 加速 RP 病程^[8-11]。在大鼠 RP 模型

中, 过度激活的小胶质细胞吞噬功能减弱, 大量外节膜盘堆积于视网膜下腔, 导致视觉功能障碍, 加速 RP 进展^[12]。因此, 变异的 VSIG4 基因可能影响小胶质细胞激活状态及吞噬功能, 导致 RP 发展。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 可诱导小胶质细胞过度激活^[13]。因此, 本研究选择 LPS 刺激 HMC3 细胞模拟其在 RP 中过度激活状态, 研究变异的 VSIG4 基因对 HMC3 细胞分泌炎症因子、吞噬和迁移等能力的影响, 以及对共培养系统中细胞凋亡的影响, 探讨 VSIG4 基因变异通过影响小胶质细胞功能在 RP 发病机制中的作用, 为基因治疗 RP 提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 HMC3 细胞系 (人小胶质细胞) 购自南京赛泓瑞生物科技有限公司, 293T 细胞系 (人胚肾细胞) 和 661W 细胞系 (小鼠视网膜感光细胞) 由南通大学神经再生重点实验室赠送。

1.1.2 主要试剂及仪器 鼠抗人 VSIG4 一抗 [M044899, 艾比玛特生物医药 (上海) 有限公司]; 兔抗人离子化钙结合适配分子 1 (recombinant ionized

calcium-binding adapter molecule 1, Iba1) 一抗 (81728-1-RR)、兔抗人核因子红细胞系 2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 一抗 (16396-1-AP)、兔抗人血红素加氧酶 1 (heme oxygenase 1, HO-1) 一抗 (10701-1-AP)、鼠抗人谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 一抗 (67763-1-Ig)、兔抗人 B 细胞淋巴瘤因子 2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 一抗 (12789-1-AP)、兔抗人 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X, Bax) 一抗 (50599-2-Ig)、兔抗人 β -肌动蛋白 (β -actin) 一抗 (20536-1-AP) (美国 Proteintech 公司); 兔抗人核转录因子- κ B (nuclear transcription factor- κ B) p65 亚单位 (p65 subunit, P65) 一抗 (A2547)、兔抗人磷酸化 P65 (PP65) 一抗 (AP0475)、兔抗人甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 一抗 (AC002) (武汉 Abclonal 公司); Alexa Fluor 568 标记山羊抗兔 IgG 二抗 (#2155282)、Alexa Fluor 488 标记山羊抗鼠二抗 (#2140660) (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗 (#111-005-003)、HRP 标记山羊抗鼠 IgG 二抗 (#115-035-003) (美国 Jacksonimmuno Research 公司); LPS (美国 Sigma-Aldrich 公司); 嘌呤霉素、聚凝胺 (上海碧云天公司); Lipo8000 脂质体转染试剂盒、逆转录试剂盒、SYBR Green Master Mix (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 质粒 pLenti-CMV-VSIG4-3 * HA-RFP-Puro、pLenti-CMV-VSIG4 (C338Y)-3 * HA-RFP-Puro、pLenti-CMV-Puro (南京晶麦生物科技有限公司); 异硫氰酸荧光素荧光微球 (美国 Polysciences 公司); 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamino-2-phenyl indole, DAPI) (江苏连云港伊势久生物科技有限责任公司)。荧光显微镜 (德国 Leica 公司); 荧光定量 PCR 仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 蛋白免疫印迹仪 (上海宾智生物科技公司); 半干转膜仪 (南京金斯瑞生物科技公司)。

1.2 方法

1.2.1 慢病毒包装、细胞转染实验分组及处理 293T 细胞以 6×10^6 个/皿的密度接种于直径 10 cm 皿中。细胞生长至 80% 融合时,按 Lipo8000 脂质体转染试剂盒说明书进行脂质体转染。依次将 750 μ l opti-MEM 培养基、6 μ g psPAX2 质粒、3 μ g pMD2G 质粒和 7.5 μ g 表达质粒 (pLenti-CMV-VSIG4-3 * HA-RFP-Puro 或 pLenti-CMV-VSIG4 (C338Y)-3 * HA-RFP-Puro 或 pLenti-CMV-Puro) 加至 EP 管中,静置 5 min;将 24 μ l 转染试剂加入上述 EP 管中,静置 15 min;将混合液体滴入 293T 细胞的培养皿中,12 h 后更换新鲜培养液;约

72 h 后,将上清液用 0.45 μ m 滤器过滤后分装。按上述方法同时制备野生型 (wild type, WT)、突变型 (mutant type, Mut) 和空白对照 (control, Cont) 病毒液。

HMC3 细胞以 6×10^5 个/孔密度接种于 6 孔板中。细胞生长至 60% 融合时进行慢病毒转染。每孔加入约 1.5 ml MEM 完全培养基、1 μ l Polybrene 液和 1.5 ml 病毒液转染 12 h 后更换新鲜完全培养基;继续培养 24 h 后更换为含有 2 μ g/ml puromycin 液的完全培养基。根据漂浮细胞数量每天调整 puromycin 用量,筛选 3~5 d。在荧光显微镜下观察细胞表达荧光蛋白情况,以判断感染效率。

将 HMC3 细胞分为 7 个组:(1)对照组 未经转染的 HMC3 细胞;(2)Len-Cont 组 无 LPS 处理的转染空载病毒的 HMC3 细胞;(3)Len-WT 组 无 LPS 处理的过表达野生型 VSIG4 基因的 HMC3 细胞;(4)Len-Mut 组 无 LPS 处理的过表达突变型 VSIG4 基因的 HMC3 细胞;(5) LPS-Len-Cont 组 经 LPS 溶液 (2 μ g/ml, 6 h) 处理的转染空载病毒的 HMC3 细胞;(6) LPS-Len-WT 组 经 LPS 溶液 (2 μ g/ml, 6 h) 处理的过表达野生型 VSIG4 基因的 HMC3 细胞;(7) LPS-Len-Mut 组 经 LPS 溶液 (2 μ g/ml, 6 h) 处理的过表达突变型 VSIG4 基因的 HMC3 细胞。

1.2.2 细胞共培养实验分组及处理 取对数期生长的 661W 细胞和转染后的 HMC3 细胞,661W 细胞以 6×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,HMC3 细胞以 4×10^5 个/孔接种于 6 孔板上层的 Transwell 小室 (小室膜孔径 1.0 μ m)。将 LPS 溶液 (2 μ g/ml, 6 h) 刺激的 HMC3 细胞与 661W 细胞共培养。基于共培养体系中 2 种细胞的培养基不同,共分 7 个组,其中 MEM 组上层 Transwell 小室内仅加入 MEM 培养基,无 HMC3 细胞;其余分组同 1.2.1 (除对照组外)。

1.2.3 免疫荧光染色检测小鼠视网膜内 VSIG4、Iba1 表达 B6 小鼠视网膜的冰冻切片由南通大学附属医院眼科研究所提供。将冰冻切片 65 $^{\circ}$ C 烘干 15 min, 5% BSA 封闭液室温封闭组织 2 h 后,滴加 200 μ l VSIG4 和 Iba1 一抗混合抗体 (均 1:200 稀释),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;PBS 洗涤 3 次,避光加入荧光染料标记的 200 μ l 二抗混合抗体 (1:200),室温避光孵育 2 h;PBS 洗涤 3 次,避光加入 500 μ l DAPI 溶液 (1:8 000),室温避光染 20 min;PBS 洗涤 3 次,在组织上滴 20 μ l 甘油,附加盖玻片,置于荧光显微镜下进行图像采集。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测细胞内 VSIG4、白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 表达 提取各组细胞的总 RNA,逆转录得到 cDNA。操作过程均按照试剂说明

书进行。各引物序列见表 1,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。反应条件:95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 5 s、60 °C 退火 30 s,共 40 个循环。以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因相对表达量。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列
Table 1 Primer sequence of quantitative real-time PCR

引物	引物序列(5'-3')	扩增片段长度(bp)
VSIG4	正向:AGCAGGCAAAGTACCAGGG	97
	反向:TGGCTCCGGTCATCCATCT	
IL-1 β	正向:ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA	132
	反向:CTGGGAGATTCGTAGCTGGA	
TNF- α	正向:AACCTCCTCTCTGCCATCAA	125
	反向:CTGAGTCGGTCACCCCTTCTC	
GAPDH	正向:ACAACCTTGGTATCGTGAAGG	101
	反向:GCCATCACGCCACAGTTTC	

注:PCR:聚合酶链式反应;VSIG4:V-set 和免疫球蛋白结构域 4;IL:白细胞介素;TNF:肿瘤坏死因子;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Note:PCR: polymerase chain reaction; VSIG4: V-set and immunoglobulin domain-containing 4; IL: interleukin; TNF: tumor necrosis factor; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

1.2.5 Western blot 法检测各蛋白表达水平 将细胞用 PBS 洗涤 3 次后,加入 100 μ l/孔 RIPA 裂解液。刮下细胞,置于 4 °C 裂解 30 min;离心半径 20 cm,4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 30 min,提取上清,BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度;在蛋白上清中加入蛋白上样缓冲液,100 °C 加热 10 min;按 20 μ g 蛋白量上样,120 V 电泳 1 h,半干转系统转 PVDF 膜 30 min;5% 脱脂牛奶封闭 2 h,TBST 洗膜 3 次,添加 Nrf2(1:2 000)、HO-1(1:3 000)、GPX4(1:1 000)、P65(1:1 000)、PP65(1:1 000)、Bax(1:1 000)、Bel-2(1:1 000)一抗 4 °C 孵育过夜;TBST 洗膜 3 次后,添加相应二抗(1:5 000)在室温下孵育 2 h;TBST 洗膜 3 次后,ECL 显影。采用 ImageJ 软件分析条带灰度值,以 GAPDH 为内参,计算目的蛋白相对表达量。目的蛋白相对表达量=目的蛋白条带灰度值/GAPDH 蛋白条带灰度值。

1.2.6 细胞吞噬实验检测各组细胞吞噬能力 HMC3 细胞以 5×10^4 个/孔密度接种于铺有细胞玻片的 24 孔板内,培养 24 h 后,加入 LPS 刺激 6 h;每孔需加入 0.5 μ l 荧光微球(约 2.25×10^7 个)培养 6 h;PBS 洗涤 3 次,各孔加入 200 μ l 4% 多聚甲醛溶液,固定 20 min;PBS 洗涤 3 次,在载玻片上滴 20 μ l 甘油,取出细胞玻片并倒扣于甘油上,放置于荧光显微镜下任意选取 5 个不同区域进行拍照,荧光微球在荧光显微镜的绿色激发光下可呈现强绿色荧光。在显微镜的白光下荧光微球可呈现黑色,细胞内的黑色圆点即为吞噬

的荧光微球。计算各组 HMC3 细胞吞噬荧光微球数量,细胞吞噬率(%)=吞噬荧光微球数超过 5 个的细胞数/观察的总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.2.7 细胞划痕实验检测各组细胞迁移能力 HMC3 细胞以 6×10^5 个/孔密度接种于 6 孔板中,待细胞生长达到 100% 融合度时,用 200 μ l 枪头做三条垂直线划开细胞层;PBS 洗净漂浮细胞,无血清培养基继续培养。按照分组情况在有或无 LPS 处理细胞 6 h 后,更换无血清培养基,并在划痕后 0、24 和 48 h 用倒置显微镜在固定位置拍摄。图像用 ImageJ 进行分析,测量细胞划痕面积,最终计算各组细胞平均迁移率。细胞迁移率(%)=(0 h 划痕面积-24 h 或 48 h 划痕面积)/0 h 划痕面积 $\times 100\%$ 。

1.2.8 Transwell 小室实验检测细胞迁移能力 将预处理(细胞转染、加药)的 HMC3 细胞用胰蛋白酶消化后制备细胞悬液;24 孔板的下室加入 600 μ l 完全培养基,放置 Transwell 小室(孔径 5.0 μ m),上室内加入 200 μ l 细胞悬液(细胞数约 3×10^4 个/孔)培养 24 h;PBS 洗涤小室 3 次,擦去小室上表面未穿膜的细胞;每孔加入 500 μ l 甲醇溶液,固定 20 min;PBS 洗涤小室 3 次,每孔加入 500 μ l 0.1% 结晶紫溶液,染色 30 min;PBS 洗涤小室 3 次,在载玻片上滴加甘油,取下小室聚酯透明膜,倒扣甘油上,附加盖玻片;在倒置显微镜下任意选取 5 个区域的视野进行拍照,计算各组 HMC3 细胞穿透 Transwell 小室基底膜的细胞数量。

1.2.9 凋亡实验检测各组凋亡细胞数量 去除共培养系统中 6 孔板的上室,PBS 洗涤 3 次;每孔加入 500 μ l 10 μ mol/L PI 工作液,染色 15 min;PBS 洗涤 3 次,每孔加入 100 μ l Hoechst 液,染色 15 min;PBS 洗涤 3 次,将 6 孔板放置于荧光显微镜下任意选取 5 个不同区域进行拍照。PI 染料将凋亡细胞核染成红色,计算各组凋亡细胞数。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 10 软件对数据进行统计分析。计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间各检测指标差异总体比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 视网膜组织 VSIG4 和 Iba1 的表达

免疫荧光染色检测结果显示,VSIG4 染色与小胶质细胞标志物 Iba1 染色可共定位于 B6 小鼠视网膜外丛状层(图 1)。

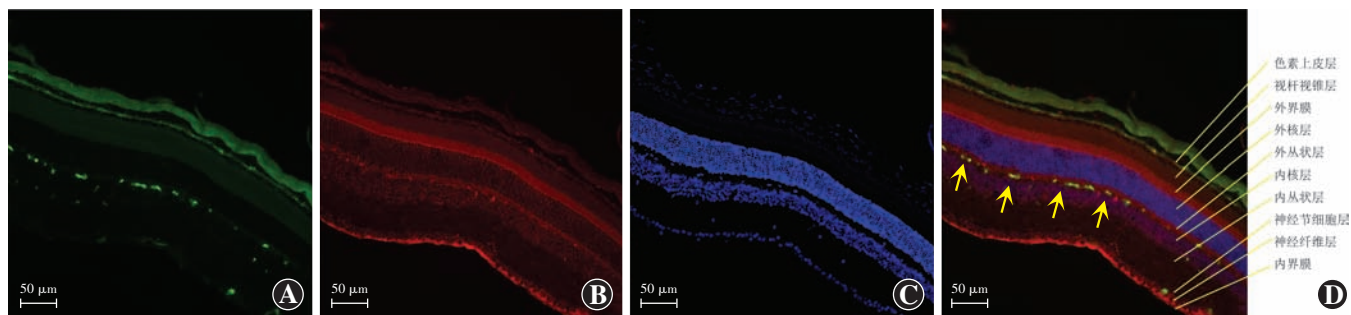


图 1 免疫荧光染色观察 VSIG4 在小鼠视网膜中的定位情况 (Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 568, DAPI ×100, 标尺 = 50 μm) VSIG4 与 Iba1 染色共定位于小鼠视网膜外丛状层 (黄色箭头) A: VSIG4 染色 B: Iba1 染色 C: 细胞核 DAPI 染色 D: 融合图

Figure 1 Immunofluorescence staining of VSIG4 localization in mouse retina (Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 568, DAPI ×100, scale bar = 50 μm) Co-localization of VSIG4 and Iba1 staining (yellow arrow) in the outer plexiform layer of mouse retina A: VSIG4 staining B: Iba1 staining C: DAPI staining of cell nucleus D: Merged image

2.2 各组细胞 VSIG4 mRNA 和蛋白相对表达量比较

对照组、Len-Cont 组、Len-WT 组、Len-Mut 组 HMC3 细胞 VSIG4 的 mRNA 和蛋白表达水平总体比较差异均有统计学意义 ($F = 1\ 438.00, 115.10$, 均 $P < 0.001$)。与 Len-Cont 组相比, Len-WT 组和 Len-Mut 组 HMC3 细胞 VSIG4 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); Len-Mut 组 HMC3 细胞 VSIG4 的 mRNA 和蛋白表达水平明显低于 Len-WT 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 2, 表 2)。

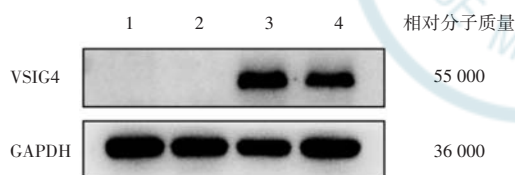


图 2 各组 HMC3 细胞 VSIG4 蛋白表达电泳图 1: 对照组; 2: Len-Cont 组; 3: Len-WT 组; 4: Len-Mut 组 VSIG4: V-set 和免疫球蛋白结构域 4; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Figure 2 Electrophoretogram of VSIG4 protein of HMC3 cells in four groups by Western blot 1: control group; 2: Len-Cont group; 3: Len-WT group; 4: Len-Mut group VSIG4: V-set and immunoglobulin domain-containing 4; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

2.3 各组细胞 IL-1β 和 TNF-α 的 mRNA 相对表达量比较

Len-Cont 组、LPS-Len-Cont 组、LPS-Len-WT 组、LPS-Len-Mut 组 HMC3 细胞 IL-1β 和 TNF-α mRNA 相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F = 730.00, 482.30$, 均 $P < 0.001$)。与 Len-Cont 组相比, LPS-Len-Cont 组 HMC3 细胞 IL-1β、TNF-α mRNA 相对表达量均显著升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。与 LPS-Len-WT 组相比, LPS-Len-Cont 组和 LPS-Len-Mut 组 HMC3 细胞 IL-1β、TNF-α mRNA 相对表达量均显著升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 3)。

表 2 各组 HMC3 细胞 VSIG4 mRNA 和蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of mRNA and protein expression levels of VSIG4 in HMC3 cells among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	VSIG4 mRNA 表达水平	VSIG4 蛋白表达水平
对照组	3	1.015 ± 0.204	0.028 ± 0.023
Len-Cont 组	3	1.069 ± 0.155	0.020 ± 0.020
Len-WT 组	3	824.000 ± 34.440 ^a	1.421 ± 0.198 ^a
Len-Mut 组	3	490.200 ± 24.850 ^{ab}	0.847 ± 0.091 ^{ab}
F 值		1 438.00	115.10
P 值		<0.001	<0.001

注: 与 Len-Cont 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 Len-WT 组比较, ^b $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) VSIG4: V-set 和免疫球蛋白结构域 4; Cont: 对照; WT: 野生型; Mut: 突变型

Note: Compared with Len-Cont group, ^a $P < 0.05$; compared with Len-WT group, ^b $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) VSIG4: V-set and immunoglobulin domain-containing 4; Cont: control; WT: wild type; Mut: mutant type

表 3 各组 HMC3 细胞 IL-1β 和 TNF-α mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of mRNA expression levels of IL-1β and TNF-α in HMC3 cells among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	IL-1β	TNF-α
Len-Cont 组	3	1.000 ± 0.067	1.003 ± 0.091
LPS-Len-Cont 组	3	6.275 ± 0.433 ^{ab}	15.980 ± 0.763 ^{ab}
LPS-Len-WT 组	3	5.028 ± 0.147	7.774 ± 0.122
LPS-Len-Mut 组	3	6.745 ± 0.242 ^b	12.380 ± 0.766 ^b
F 值		730.00	482.30
P 值		<0.001	<0.001

注: 与 Len-Cont 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 LPS-Len-WT 组比较, ^b $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) IL-1β: 白细胞介素 1β; TNF-α: 肿瘤坏死因子 α; Cont: 对照; LPS: 脂多糖; WT: 野生型; Mut: 突变型

Note: Compared with Len-Cont group, ^a $P < 0.05$; compared with LPS-Len-WT group, ^b $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) IL-1β: interleukin-1β; TNF-α: tumor necrosis factor-α; Cont: control; LPS: lipopolysaccharide; WT: wild type; Mut: mutant type

2.4 各组细胞 Nrf2、HO-1、GPX4、P65 和 PP65 蛋白相对表达量比较

Western blot 结果显示, Len-Cont 组、LPS-Len-Cont 组、LPS-Len-WT 组、LPS-Len-Mut 组 HMC3 细胞 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白相对表达量及 PP65/P65 比值的总体比较差异均有统计学意义 ($F = 6.76, 6.21, 5.97, 23.11$, 均 $P < 0.01$)。与 Len-Cont 组相比, LPS-Len-Cont 组 HMC3 细胞 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白相对表达量均显著降低, PP65/P65 比值显著升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。与 LPS-Len-WT 组相比, LPS-Len-Cont 组和 LPS-Len-Mut 组 HMC3 细胞 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白相对表达量均显著降低, PP65/P65 比值显著升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 3, 表 4)。

2.5 各组细胞吞噬能力比较

LPS-Len-Cont 组 HMC3 细胞吞噬的荧光微球多于 Len-Cont 组, LPS-Len-Cont 组和 LPS-Len-Mut 组 HMC3 细胞吞噬的荧光微球少于 LPS-Len-WT 组 (图 4)。Len-Cont 组、LPS-Len-Cont 组、LPS-Len-WT 组、LPS-Len-Mut 组细胞吞噬率分别为 (35.67 ± 3.22)%、(63.67 ± 10.07)%、(84.00 ± 3.46)% 和 (64.67 ± 2.31)%。Len-Cont 组、LPS-Len-Cont 组、LPS-Len-WT 组、LPS-Len-Mut 组 HMC3 细胞吞噬率总体比较差异有统计学意义 ($F = 59.06$, $P < 0.001$)。与 Len-Cont 组相比, LPS-Len-Cont 组 HMC3 细胞吞噬率显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 LPS-Len-WT 组相比, LPS-Len-Cont 组和 LPS-Len-Mut 组 HMC3 细胞吞噬率显著降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 4)。

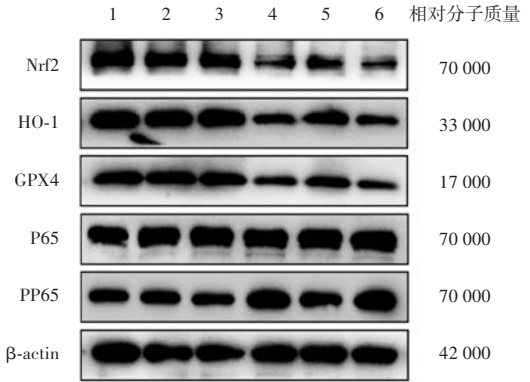


图 3 各组 HMC3 细胞 Nrf2、HO-1、GPX4、P65 和 PP65 蛋白表达电泳图 1: Len-Cont 组; 2: Len-WT 组; 3: Len-Mut 组; 4: LPS-Len-Cont 组; 5: LPS-Len-WT 组; 6: LPS-Len-Mut 组 Nrf2: 核因子红细胞系 2 相关因子 2; HO-1: 血红素加氧酶 1; GPX4: 谷胱甘肽过氧化物酶 4; P65: 核转录因子 κB p65 亚单位; PP65: 磷酸化 P65; β -actin: β -肌动蛋白

表 4 各组 HMC3 细胞 Nrf2、HO-1、GPX4 和 PP65/P65 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 4 Comparison of relative expression levels of Nrf2, HO-1, GPX4, and PP65/P65 proteins in HMC3 cells among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	Nrf2	HO-1	GPX4	PP65/P65
Len-Cont 组	3	0.980 \pm 0.193	1.086 \pm 0.191	1.007 \pm 0.234	0.734 \pm 0.105
LPS-Len-Cont 组	3	0.595 \pm 0.032 ^{ab}	0.652 \pm 0.116 ^{ab}	0.545 \pm 0.099 ^{ab}	1.062 \pm 0.054 ^{ab}
LPS-Len-WT 组	3	0.754 \pm 0.128	0.798 \pm 0.022	0.831 \pm 0.064	0.804 \pm 0.026
LPS-Len-Mut 组	3	0.465 \pm 0.082 ^b	0.620 \pm 0.110 ^b	0.625 \pm 0.086 ^b	1.043 \pm 0.075 ^b
F 值		6.76	6.21	5.97	23.11
P 值		0.003	0.005	0.005	<0.001

注: 与 Len-Cont 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 LPS-Len-WT 组比较, ^b $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) Nrf2: 核因子红细胞系 2 相关因子 2; HO-1: 血红素加氧酶 1; GPX4: 谷胱甘肽过氧化物酶 4; PP65: 磷酸化 P65; P65: 核转录因子 κB p65 亚单位; Cont: 对照; LPS: 脂多糖; WT: 野生型; Mut: 突变型

Note: Compared with Len-Cont group, ^a $P < 0.05$; compared with LPS-Len-WT group, ^b $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) Nrf2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2; HO-1: heme oxygenase 1; GPX4: glutathione peroxidase 4; PP65: phosphorylated P65; P65: nuclear transcription factor- κB p65 subunit; Cont: control; LPS: lipopolysaccharide; WT: wild type; Mut: mutant type

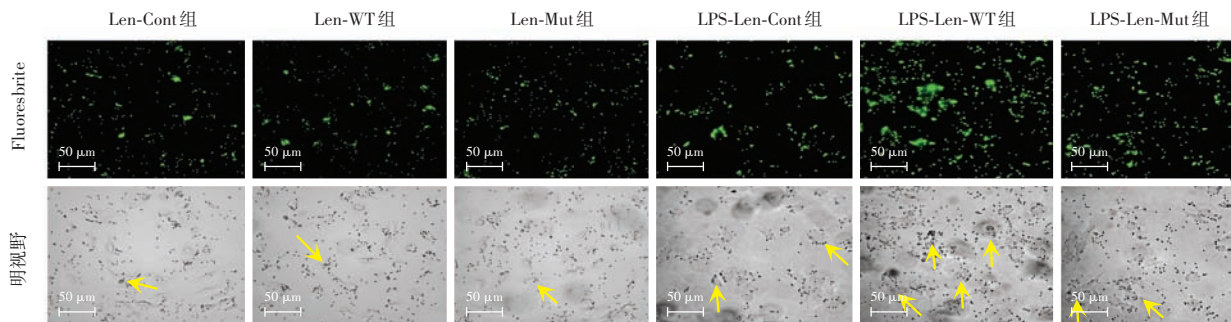


图 4 VSIG4 对 HMC3 细胞吞噬能力的影响 ($\times 200$, 标尺 = 50 μm) LPS-Len-Cont 组 HMC3 细胞吞噬的荧光微球 (黄色箭头) 多于 Len-Cont 组, LPS-Len-Cont 组和 LPS-Len-Mut 组 HMC3 细胞吞噬的荧光微球少于 LPS-Len-WT 组 Cont: 对照; WT: 野生型; Mut: 突变型; LPS: 脂多糖

2.6 各组细胞迁移能力比较

细胞划痕实验和 Transwell 实验结果显示, 各组 HMC3 细胞 24、48 h 时迁移率和 24 h 时穿透基底膜细胞数总体比较差异均有统计学意义 ($F = 120.30$ 、 249.20 、 365.50 , 均 $P < 0.001$)。与 Len-Cont 组相比, LPS-Len-Cont 组 HMC3 细胞的迁移率和穿透基底膜细胞数显著升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。与 LPS-Len-WT 组相比, LPS-Len-Cont 组和 LPS-Len-Mut 组 HMC3 细胞的迁移率及细胞穿透基底膜细胞数量显著降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 5, 6, 表 5)。

2.7 各组细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达相对表达量及凋亡细胞数量比较

各组共培养系统中 661W 细胞 Bax/Bcl-2 蛋白表达量比值及凋亡细胞数量总体比较差异均有统计学意义 ($F = 7.014$ 、 313.50 , 均 $P < 0.01$)。与 Len-Cont 组相比, LPS-Len-Cont 组 Bax/Bcl-2 比值及

细胞凋亡数量显著升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。与 LPS-Len-WT 组相比, LPS-Len-Cont 组和 LPS-Len-Mut 组 Bax/Bcl-2 比值及细胞凋亡数量显著升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 7, 8, 表 6)。

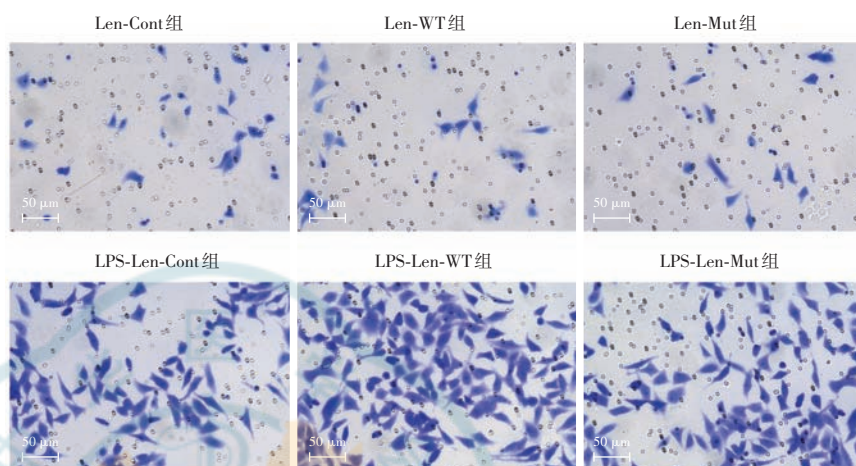


图 6 Transwell 实验中 VSIG4 对 HMC3 细胞迁移功能的影响 (结晶紫溶液 $\times 100$, 标尺 = $50 \mu\text{m}$) 与 Len-Cont 组相比, LPS-Len-Cont 组 HMC3 细胞穿透基底膜细胞数显著升高; 与 LPS-Len-WT 组相比, LPS-Len-Cont 组和 LPS-Len-Mut 组 HMC3 细胞穿透基底膜细胞数量显著降低 Cont: 对照; WT: 野生型; Mut: 突变型; LPS: 脂多糖

Figure 6 Effect of VSIG4 on HMC3 cell migration function in Transwell experiment (Crystal violet solution $\times 100$, scale bar = $50 \mu\text{m}$) Compared with Len-Cont group, the number of HMC3 cells penetrating the basement membrane was significantly increased in the LPS-Len-Cont group. Compared with LPS-Len-WT group, the number of HMC3 cells penetrating the basement membrane was significantly reduced in the LPS-Len-Cont and LPS-Len-Mut groups Cont: control; WT: wild type; Mut: mutant type; LPS: lipopolysaccharide

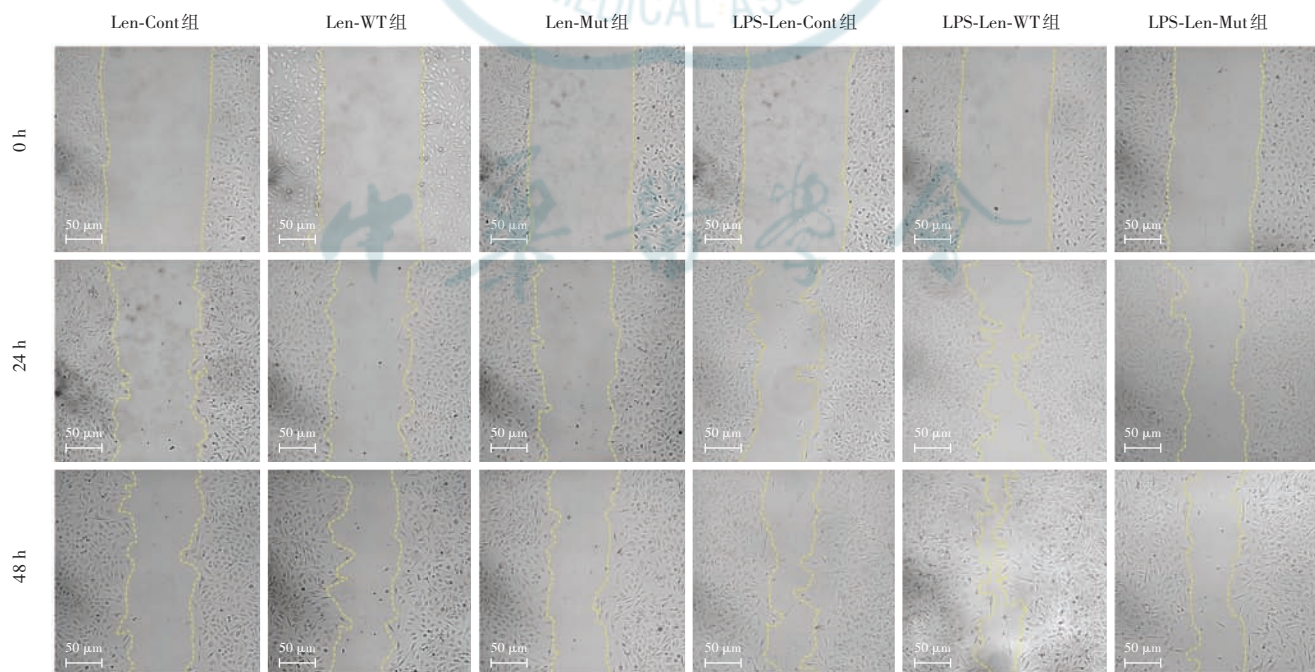


图 5 细胞划痕实验中 VSIG4 对 HMC3 细胞迁移功能的影响 ($\times 50$, 标尺 = $50 \mu\text{m}$) 与 Len-Cont 组相比, LPS-Len-Cont 组 HMC3 细胞迁移数显著升高; 与 LPS-Len-WT 组相比, LPS-Len-Cont 组和 LPS-Len-Mut 组 HMC3 细胞迁移数显著降低 Cont: 对照; WT: 野生型; Mut: 突变型; LPS: 脂多糖

Figure 5 Effect of VSIG4 on the migration function of HMC3 cells in scratch experiments ($\times 50$, scale bar = $50 \mu\text{m}$) Compared with Len-Cont group, HMC3 cell migration number was significantly increased in LPS-Len-Cont group. Compared with LPS-Len-WT group, the migration number of HMC3 cells was significantly decreased in LPS-Len-Cont and LPS-Len-Mut groups Cont: control; WT: wild type; Mut: mutant type; LPS: lipopolysaccharide

表 5 各组 HMC3 细胞迁移情况比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 5 Comparison of migration rate and invasion ability in HMC3 cells among different groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	24 h 细胞迁移率 (%)	48 h 细胞迁移率 (%)	单位面积侵袭细胞数(个)
Len-Cont 组	5	25.48±0.90	38.31±1.92	23±2
LPS-Len-Cont 组	5	46.11±6.35 ^{ab}	58.15±2.35 ^{ab}	79±6 ^{ab}
LPS-Len-WT 组	5	59.17±1.54	74.55±3.45	101±8
LPS-Len-Mut 组	5	44.43±2.62 ^b	55.99±1.16 ^b	82±2 ^b
F 值		120.30	249.20	365.50
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与 Len-Cont 组比较,^a $P<0.05$;与 LPS-Len-WT 组比较,^b $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验) Cont:对照;LPS:脂多糖;WT:野生型;Mut:突变型

Note:Compared with Len-Cont group,^a $P<0.05$;compared with LPS-Len-WT group,^b $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) Cont:control;LPS:lipopolysaccharide;WT:wild type;Mut:mutant type

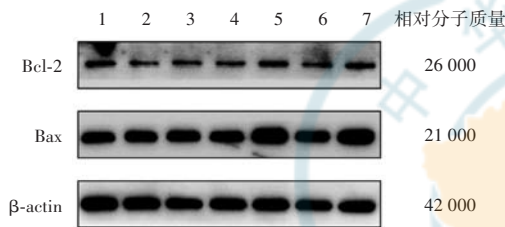


图 7 各组 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达电泳图 1:MEM 组;2:Len-Cont 组;3:Len-WT 组;4:Len-Mut 组;5:LPS-Len-Cont 组;6:LPS-Len-WT 组;7:LPS-Len-Mut 组 Bcl-2:B 细胞淋巴瘤因子 2;Bax:Bcl-2 相关 X 蛋白; β -actin: β -肌动蛋白

Figure 7 Electrophoretogram of Bax and Bcl-2 proteins expression in HMC3 cells in different groups by Western blot 1:MEM group; 2:Len-Cont group;3:Len-WT group;4:Len-Mut group;5:LPS-Len-Cont group;6:LPS-Len-WT group;7:LPS-Len-Mut group Bcl-2: B-cell lymphoma-2;Bax:Bcl-2-associated X

表 6 各组共培养系统中 Bax/Bcl-2 比值及凋亡细胞数量比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 6 Comparison of Bax/Bcl-2 ratio and number of apoptotic cells in co-culture systems among different groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	Bax/Bcl-2	凋亡细胞数(个)
Len-Cont 组	3	1.119±0.010	2±1
LPS-Len-Cont 组	3	1.350±0.020 ^{ab}	16±1 ^{ab}
LPS-Len-WT 组	3	0.920±0.130	9±1
LPS-Len-Mut 组	3	1.372±0.180 ^b	25±2 ^b
F 值		7.01	313.50
P 值		<0.001	<0.001

注:与 Len-Cont 组比较,^a $P<0.05$;与 LPS-Len-WT 组比较,^b $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验) Bax:Bcl-2 相关 X 蛋白;Bcl-2:B 细胞淋巴瘤因子 2;Cont:对照;LPS:脂多糖;WT:野生型;Mut:突变型

Note:Compared with Len-Cont group,^a $P<0.05$;compared with LPS-Len-WT group,^b $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) Bax:Bcl-2-associated X;Bcl-2:B-cell lymphoma-2;Cont:control;LPS:lipopolysaccharide;WT:wild type;Mut:mutant type

3 讨论

本课题组前期在 XLRP 家系中发现 *VSIG4* 基因 (NM_001257403, Variant 5) 第 8 个外显子区域发生变异 (c:1013G>A, p. C338Y)。Small 等^[14] 对人类 *VSIG4* (huVSIG4) 的 2 种选择性剪接形式 (huVSIG4L、huVSIG4S) 和 3 种变异转录形式进行总结。huVSIG4 (L) 的胞外区域同时存在 IgV 和 IgC2 型的末端 Ig 结构域。huVSIG4 (S) 仅存在 1 个 V 型 Ig 结构域,其余部分与 huVSIG4L 完全一致。以最长的 huVSIG4 (L)

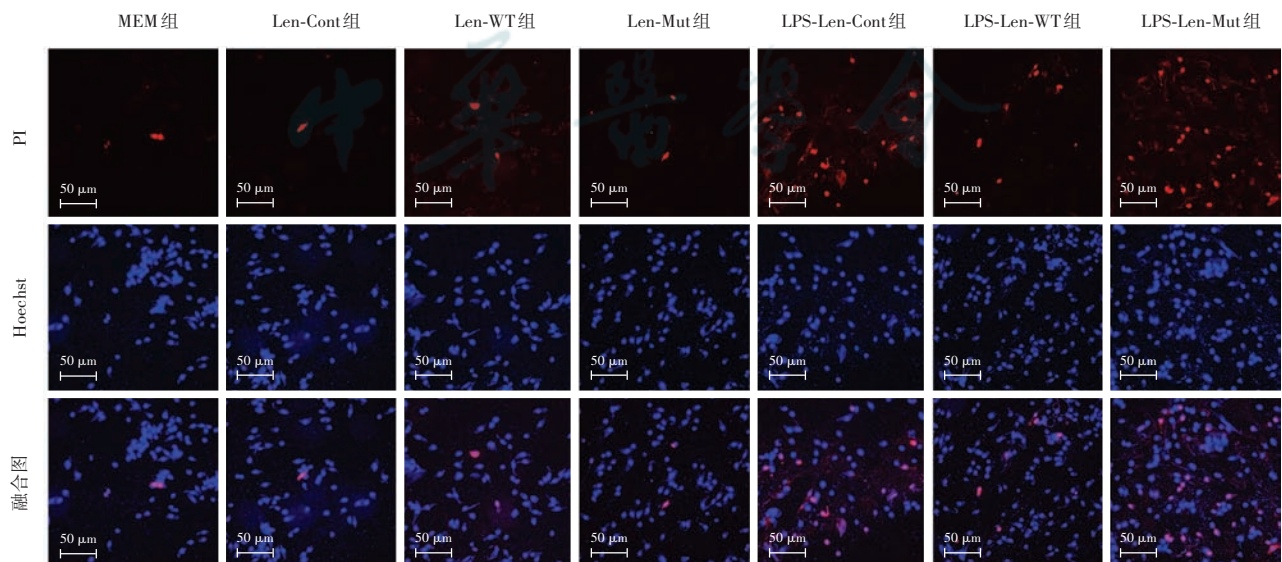


图 8 各共培养系统中 661W 细胞凋亡情况 (PI+Hoechst $\times 100$, 标尺 = 50 μm) 与 Len-Cont 组相比,LPS-Len-Cont 组细胞凋亡数量显著增多;与 LPS-Len-WT 组相比,LPS-Len-Cont 组和 LPS-Len-Mut 组细胞凋亡数量显著增多 Cont:对照;WT:野生型;Mut:突变型;LPS:脂多糖

Figure 8 Apoptosis of 661W cells in co-culture system (PI+Hoechst $\times 100$, scale bar = 50 μm) Compared with Len-Cont group, the number of apoptotic cells was significantly increased in LPS-Len-Cont group. Compared with LPS-Len-WT group, the number of apoptotic cells in LPS-Len-Cont and LPS-Len-Mut groups was significantly increased Cont:control;WT:wild type;Mut:mutant type;LPS:lipopolysaccharide

(Variant 1) 作为参考, VSIG4 外显子结构显示, 信号肽、免疫球蛋白结构域 V 型、免疫球蛋白结构域 C2 型 (immunoglobulin domain C2-type, Ig-C2) 和跨膜区分别由外显子 1、2、3 和 6 特异性编码, 细胞质结构域 (cytoplasmic domain, CD) 由外显子 7 和 8 编码。huVSIG4(S) (Variant 2) 缺少第 3 外显子, 导致 Ig-C2 结构域的缺失。Variant 3 缺少 Ig-C2 结构域, 且部分 CD 缺失。Variant 4 的特征是与 Variant 3 相同的 CD 缺失, 但存在 Ig-C2 结构域。Variant 5 的外显子 8 部分缺失, 在外显子 7、8 连接处的 AGG(精氨酸) 变化为 AGC(丝氨酸), 随后发生“移码”, 在下游产生终止密码子。

本研究结果显示, VSIG4 定位于小鼠视网膜小胶质细胞。视网膜小胶质细胞是眼内重要免疫细胞。在正常视网膜中, 小胶质细胞呈静息态; 而在 RP 的视网膜中, 大量小胶质细胞呈过度激活态^[15]。在小鼠 RP 模型中, 凋亡的感光细胞导致小胶质细胞过度激活, 促使其分泌大量炎症物质, 导致视网膜炎症状态^[16]。在 T17M 视紫红质突变小鼠 RP 模型中, 发现与促炎因子 NF- κ B、IL-1 β 相关的炎症反应^[17]。也有研究证实, 抑制炎症反应可以负向调控 RP 病程。在敲除炎症信号髓样分化因子的 RP 小鼠中, 抑制 NF- κ B 通路激活, 可减缓 RP 进展^[18]。在 RP 小鼠模型中, 通过药物阻断促炎细胞因子 IL-1 β 表达, 可减少光感受器凋亡, 减缓 RP 进展^[19]。过度激活的小胶质细胞可产生 TNF- α 、IL-1 β 、活性氮、活性氧等多种免疫效应分子, 损害神经元, 导致组织炎症反应, 影响整个 RP 病程^[11]。本研究中给 HMC3 细胞转染人野生型、突变型 VSIG4 基因, 并通过实时荧光定量 PCR 和 Western blot 进行验证, 显示野生型、突变型 VSIG4 基因在 HMC3 细胞中转染成功。本研究中选择 LPS 刺激 HMC3 细胞模拟其在 RP 中过度激活状态, 结果提示 VSIG4 可抑制 LPS 刺激下 HMC3 细胞分泌炎症因子, 减轻炎症反应; VSIG4 基因变异后, HMC3 细胞分泌炎症因子增多, 炎症反应加重。

在遗传性 RP 小鼠模型中, 过表达 Nrf2 可保护感光细胞和神经节细胞, 延长神经元存活, 抑制 RP 进程^[20]。腺相关病毒介导 HO-1 基因过表达对 RP 模型大鼠的视网膜具有保护作用^[21]。Nrf2/HO-1 信号通路发挥着重要的抗氧化和抗炎作用^[22]。在生理情况下, Nrf2 与 Keap1 蛋白稳定结合在细胞质中^[23]。当被刺激后, Nrf2 从细胞质解离并激活, 进入细胞核, 促进 HO-1 和 GPX4 的表达^[24], 调控氧化应激反应, 抑制炎症反应^[25]。研究发现, 激活 Nrf2/HO-1 信号通路和抑

制 NF- κ B 信号通路, 可降低小胶质细胞的激活水平, 减少炎症因子以及氧化化合物的产生, 起到抗炎和抗氧化作用, 减轻神经退行性疾病的严重程度^[26]。VSIG4 与 Nrf2 信号通路关系密切。外源性 VSIG4 可通过增强 Nrf2 的表达, 减轻肾移植后小鼠肾组织中的氧化应激反应和活性氧积累^[27]。Nrf2 与 NF- κ B 之间可相互影响。激活的 Nrf2 可下调 NF- κ B 信号, NF- κ B 也可负反馈调节 Nrf2 信号^[28]。已有研究证实 VSIG4 通过调节 NF- κ B/焦亡信号通路抑制炎症相关疾病进展。Huang 等^[29]发现 VSIG4 可激活 JAK2-STAT3-A20 信号通路, 抑制 NF- κ B 信号通路的激活, 减轻细胞焦亡, 抑制炎症相关疾病进展。因此, 我们需要在细胞炎症模型中研究 VSIG4 与 Nrf2/NF- κ B 信号通路的关系, 结果显示在 LPS 诱导的 HMC3 细胞炎症模型中, VSIG4 促进 Nrf2/HO-1 信号通路激活, 抑制 NF- κ B 信号通路激活; VSIG4 基因变异后, NF- κ B 信号通路激活, Nrf2/HO-1 信号通路活化程度减弱。

Gupta 等^[16]在 RP 患者视网膜外核层中发现视紫红质颗粒的包涵体被激活态的小胶质细胞所吞噬。小胶质细胞可清除在视网膜发育和变性过程中的凋亡细胞, 减轻炎症和自身免疫反应^[30], 保护视锥细胞, 维持中心视力^[31]。吞噬功能异常会导致多种眼部疾病, 如 RP 和年龄相关性黄斑变性^[32]。在 RP 小鼠的视网膜中, 过度激活态的小胶质细胞吞噬凋亡细胞的功能显著减弱, 且分泌过多炎症物质, 进一步促进感光细胞凋亡^[16]。VSIG4 与巨噬细胞吞噬功能密切相关。在细菌感染初期, VSIG4 可促进巨噬细胞对细菌的吞噬作用^[33]。本研究中吞噬实验结果显示, 在 LPS 刺激下, VSIG4 可提升 HMC3 细胞的吞噬功能; VSIG4 基因变异后, 细胞吞噬功能减弱。在 RP 中, 受损的光感受器会吸引内层视网膜中的小胶质细胞向外层视网膜迁移, 吞噬死亡的视杆细胞残骸^[34]。本研究中的细胞划痕和 Transwell 实验结果显示, 在 LPS 刺激下, VSIG4 可增强细胞迁移能力; VSIG4 基因变异后, 细胞迁移能力减弱。

目前 RP 的致病机制尚未完全明确, 但已有研究指出, 感光细胞凋亡是 RP 形成的共同终末进程^[35]。在 RP 中, 视网膜可出现大量感光细胞死亡, 导致患者视力严重下降^[36]。过度激活的小胶质细胞可分泌大量炎症因子, 导致感光细胞死亡, 最终加速 RP 的进展。对 RP 小鼠模型的研究表明, 过度激活的视网膜小胶质细胞积聚可能与感光细胞死亡的程度有关^[37]。小胶质细胞释放细胞因子, 诱导神经毒性, 激活细胞凋亡信号通路, 导致光感受器的变性^[38]。炎症因子 IL-1 β

可引起视网膜的炎症反应,诱导视杆细胞凋亡^[39]。炎症因子 TNF- α 与细胞存活和凋亡密切相关,结合 TNF- α 受体后激活外源性凋亡途径来触发细胞凋亡^[40]。TNF- α 上调可促进炎症、氧化应激反应,导致光感受器细胞凋亡,加重视网膜变性^[41]。因此,研究 VSIG4 调控小胶质细胞激活水平的同时,也需要研究其对感光细胞的间接影响。本研究结果提示,在 LPS 诱导的 HMC3 细胞炎症模型中,VSIG4 可间接抑制细胞凋亡;VSIG4 基因变异后,抑制细胞凋亡的能力减弱,细胞凋亡增加。

综上所述,本研究结果表明,当 VSIG4 基因变异后,LPS 刺激状态下的 HMC3 细胞 NF- κ B 信号通路激活,Nrf2/HO-1 信号通路活化程度减弱,细胞分泌炎症因子增多;细胞吞噬和迁移能力减弱;共培养系统中 661W 细胞凋亡数量增加。我们根据以上结论推测,在 RP 发病机制中,可能由于 VSIG4 (Variant 5) 的外显子 8 变异导致 VSIG4 转录和翻译水平降低,使其抑制炎症和吞噬等功能发生变化。凋亡的感光细胞诱导 VSIG4 基因变异的小胶质细胞聚集,促使其过度激活。小胶质细胞分泌大量炎症因子导致更多感光细胞凋亡。同时伴有小胶质细胞吞噬功能减弱,造成凋亡细胞大量堆积,诱导更多的小胶质细胞发生聚集和激活,形成恶性循环。这就导致视网膜长期处于炎症状态,破坏视网膜内环境稳定,促进 RP 发展。越来越多的变异基因在 RP 中被发现,由于缺乏变异基因致病机制的研究,能用于临床治疗的基因却很少。对于中晚期视网膜变性类疾病的治疗,基因替代治疗和抗凋亡/神经营养因子相结合的新疗法可能是一个较好的选择^[42]。本研究发现表达于视网膜小胶质细胞的 VSIG4 可能在 RP 的发病机制中起着重要的调控作用,这为基因治疗 RP 提供了多种可能。一种可能是通过外源性补充稳定的 VSIG4,抑制视网膜小胶质细胞过度激活,减轻炎症反应,提升吞噬功能以清除变性或死亡的视杆细胞,维持视网膜内环境稳定,阻止 RP 病情恶化。另一种可能是开发新型基因治疗技术,更改突变基因 VSIG4 的结构,抑制其有害作用,延缓 RP 的进展。本研究为体外实验,可能与体内病理过程存在差别。因此,后续我们仍需通过 RP 动物模型和临床试验进一步验证 VSIG4 基因的功能,研究更加详细的 RP 发病机制,以期为临床应用提供更加确切的理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 徐春龙:实验操作、资料分析、撰写及修改文章;张国伟:参与选题、设计实验;杜君:指导论文写作及修改文章;贾珍:

收集及分析数据;王静萍:收集数据;王梓文:分析数据;李杨:解释数据;陆宏:参与选题、指导论文写作、对文章知识性内容的审阅及定稿

参考文献

- [1] Piano I, D'Antoni Giovanni V, Testai L, et al. A nutraceutical strategy to slowing down the progression of cone death in an animal model of retinitis pigmentosa [J/OL]. *Front Neurosci*, 2019, 13 : 461 [2024-02-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31156364/>. DOI: 10.3389/fnins.2019.00461.
- [2] Caras IW, Collins LR, Creasey AA. A stem cell journey in ophthalmology: from the bench to the clinic [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2021, 10 (12) : 1581-1587. DOI: 10.1002/sctm.21-0239.
- [3] Xiao X, Cao Y, Chen S, et al. Whole exome sequencing reveals novel EYS mutations in Chinese patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa [J]. *Mol Vis*, 2019, 25 : 35-46.
- [4] Newton F, Megaw R. Mechanisms of photoreceptor death in retinitis pigmentosa [J/OL]. *Genes (Basel)*, 2020, 11 (10) : 1120 [2024-02-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32987769/>. DOI: 10.3390/genes11101120
- [5] Helmy KY, Katschke KJ Jr, Gorgani NN, et al. CRIg: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens [J]. *Cell*, 2006, 124 (5) : 915-927. DOI: 10.1016/j.cell.2005.12.039.
- [6] Jung K, Kang M, Park C, et al. Protective role of V-set and immunoglobulin domain-containing 4 expressed on kupffer cells during immune-mediated liver injury by inducing tolerance of liver T- and natural killer T-cells [J]. *Hepatology*, 2012, 56 (5) : 1838-1848. DOI: 10.1002/hep.25906.
- [7] He J, Zhao C, Dai J, et al. Microglia mediate synaptic material clearance at the early stage of rats with retinitis pigmentosa [J/OL]. *Front Immunol*, 2019, 10 : 912 [2024-02-21]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31105708/>. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00912.
- [8] Tripathi A, Thangaraj A, Chivero ET, et al. Antiretroviral-mediated microglial activation involves dysregulated autophagy and lysosomal dysfunction [J/OL]. *Cells*, 2019, 8 (10) : 1168 [2024-02-21]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31569373/>. DOI: 10.3390/cells8101168.
- [9] Aratani Y. Myeloperoxidase: its role for host defense, inflammation, and neutrophil function [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2018, 640 : 47-52. DOI: 10.1016/j.abb.2018.01.004.
- [10] Peluso I, Morabito G, Urban L, et al. Oxidative stress in atherosclerosis development: the central role of LDL and oxidative burst [J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2012, 12 (4) : 351-360. DOI: 10.2174/187153012803832602.
- [11] Noailles A, Fernández-Sánchez L, Lax P, et al. Microglia activation in a model of retinal degeneration and TUDCA neuroprotective effects [J/OL]. *J Neuroinflammation*, 2014, 11 : 186 [2024-02-21]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25359524/>. DOI: 10.1186/s12974-014-0186-3.
- [12] Zou T, Gao L, Zeng Y, et al. Organoid-derived C-Kit (+)/SSEA4 (-) human retinal progenitor cells promote a protective retinal microenvironment during transplantation in rodents [J/OL]. *Nat Commun*, 2019, 10 (1) : 1205 [2024-02-21]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30872578/>. DOI: 10.1038/s41467-019-08961-0.
- [13] Zheng K, Lv B, Wu L, et al. Protecting effect of emodin in experimental autoimmune encephalomyelitis mice by inhibiting microglia activation and inflammation via Myd88/PI3K/Akt/NF- κ B signalling pathway [J]. *Bioengineered*, 2022, 13 (4) : 9322-9344. DOI: 10.1080/21655979.2022.2052671.
- [14] Small AG, Al-Baghdadi M, Quach A, et al. Complement receptor immunoglobulin: a control point in infection and immunity, inflammation and cancer [J/OL]. *Swiss Med Wkly*, 2016, 146 : w14301 [2024-02-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27045607/>. DOI: 10.4414/smw.2016.14301.

- [15] Rana T, Kotla P, Fullard R, et al. TNF α knockdown in the retina promotes cone survival in a mouse model of autosomal dominant retinitis pigmentosa [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(1): 92–102. DOI: 10.1016/j.bbdis.2016.10.008.
- [16] Gupta N, Brown KE, Milam AH. Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration [J]. *Exp Eye Res*, 2003, 76(4): 463–471. DOI: 10.1016/S0014-4835(02)00332-9.
- [17] Rana T, Shinde VM, Starr CR, et al. An activated unfolded protein response promotes retinal degeneration and triggers an inflammatory response in the mouse retina [J/OL]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(12): e1578 [2024-02-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25522272/>. DOI: 10.1038/cddis.2014.539.
- [18] Syeda S, Patel AK, Lee T, et al. Reduced photoreceptor death and improved retinal function during retinal degeneration in mice lacking innate immunity adaptor protein MyD88 [J]. *Exp Neurol*, 2015, 267: 1–12. DOI: 10.1016/j.expneurol.2015.02.027.
- [19] Zhao L, Zabel MK, Wang X, et al. Microglial phagocytosis of living photoreceptors contributes to inherited retinal degeneration [J]. *EMBO Mol Med*, 2015, 7(9): 1179–1197. DOI: 10.15252/emmm.201505298.
- [20] Xiong W, MacColl Garfinkel AE, Li Y, et al. NRF2 promotes neuronal survival in neurodegeneration and acute nerve damage [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(4): 1433–1445. DOI: 10.1172/JCI79735.
- [21] 梁郁萍, 陈蔚琪, 洪玉, 等. AAV 介导 *HO-1* 基因转染对视网膜色素变性大鼠视网膜的保护作用 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2021, 39(8): 693–699. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20201108-00754.
- Liang YP, Chen WQ, Hong Y, et al. Protective effect of adeno-associated virus vector mediated heme oxygenase-1 overexpression on retinitis pigmentosa in rats [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2021, 39(8): 693–699. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20201108-00754.
- [22] Otterbein LE, Foresti R, Motterlini R. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in the heart: the balancing act between danger signaling and pro-survival [J]. *Circ Res*, 2016, 118(12): 1940–1959. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.306588.
- [23] Namani A, Li Y, Wang XJ, et al. Modulation of NRF2 signaling pathway by nuclear receptors: implications for cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(9): 1875–1885. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2014.05.003.
- [24] Sedighi M, Baluchnejadmojarad T, Afshin-Majd S, et al. Anti-aging klotho protects SH-SY5Y cells against amyloid β 1-42 neurotoxicity: involvement of Wnt1/pCREB/Nrf2/HO-1 signaling [J]. *J Mol Neurosci*, 2021, 71(1): 19–27. DOI: 10.1007/s12031-020-01621-9.
- [25] Dayalan Naidu S, Kostov RV, Dinkova-Kostova AT. Transcription factors Hsf1 and Nrf2 engage in crosstalk for cytoprotection [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2015, 36(1): 6–14. DOI: 10.1016/j.tips.2014.10.011.
- [26] Yang S, Chu S, Ai Q, et al. Anti-inflammatory effects of higenamine (Hig) on LPS-activated mouse microglia (BV2) through NF- κ B and Nrf2/HO-1 signaling pathways [J/OL]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 85: 106629 [2024-02-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32535536/>. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106629.
- [27] Zhang J, Li KY, Liu XY, et al. Up-regulation of VSIG4 alleviates kidney transplantation-associated acute kidney injury through suppressing inflammation and ROS via regulation of AKT signaling [J/OL]. *Free Radic Biol Med*, 2021: S0891–5849(21)00843–1 [2024-02-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34856328/>. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.11.035.
- [28] Mu W, Wang Q, Jia M, et al. Hepatoprotective effects of albumin-encapsulated nanoparticles of a curcumin derivative COP-22 against lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver injury in mice [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(9): 4903 [2024-02-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35563293/>. DOI: 10.3390/ijms23094903.
- [29] Huang X, Feng Z, Jiang Y, et al. VSIG4 mediates transcriptional inhibition of *Nlrp3* and *Il-1 β* in macrophages [J/OL]. *Sci Adv*, 2019, 5(1): eaau7426 [2024-02-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30662948/>. DOI: 10.1126/sciadv.aau7426.
- [30] Sun H, Zhi K, Hu L, et al. The activation and regulation of β 2 integrins in phagocytes and phagocytosis [J/OL]. *Front Immunol*, 2021, 12: 633639 [2024-02-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33868253/>. DOI: 10.3389/fimmu.2021.633639.
- [31] Santos AM, Calvente R, Tassi M, et al. Embryonic and postnatal development of microglial cells in the mouse retina [J]. *J Comp Neurol*, 2008, 506(2): 224–239. DOI: 10.1002/cne.21538.
- [32] Kim SY. Retinal phagocytes in age-related macular degeneration [J/OL]. *Macrophage (Houst)*, 2015, 2(1): e698 [2024-02-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26052551/>. DOI: 10.14800/macrophage.698.
- [33] Kim KH, Choi BK, Kim YH, et al. Extracellular stimulation of VSIG4/complement receptor Ig suppresses intracellular bacterial infection by inducing autophagy [J]. *Autophagy*, 2016, 12(9): 1647–1659. DOI: 10.1080/15548627.2016.1196314.
- [34] Peng B, Xiao J, Wang K, et al. Suppression of microglial activation is neuroprotective in a mouse model of human retinitis pigmentosa [J]. *J Neurosci*, 2014, 34(24): 8139–8150. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5200-13.2014.
- [35] 高青, 沈吟. 视网膜色素变性疾病的药物治疗基础研究进展 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2018, 36(1): 70–74. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.01.015.
- Gao Q, Shen Y. Advances in basic researches of pharmacological approaches of retinitis pigmentosa [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2018, 36(1): 70–74. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.01.015.
- [36] Xie J, Li Y, Dai J, et al. Olfactory ensheathing cells grafted into the retina of RCS rats suppress inflammation by down-regulating the JAK/STAT pathway [J/OL]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 341 [2024-02-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31402855/>. DOI: 10.3389/fncel.2019.00341.
- [37] Makabe K, Sugita S, Mandai M, et al. Microglia dynamics in retinitis pigmentosa model: formation of fundus whitening and autofluorescence as an indicator of activity of retinal degeneration [J/OL]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 14700 [2024-02-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32895435/>. DOI: 10.1038/s41598-020-71626-2.
- [38] Silverman SM, Wong WT. Microglia in the retina: roles in development, maturity, and disease [J]. *Annu Rev Vis Sci*, 2018, 4: 45–77. DOI: 10.1146/annurev-vision-091517-034425.
- [39] Charles-Messance H, Blot G, Couturier A, et al. IL-1 β induces rod degeneration through the disruption of retinal glutamate homeostasis [J/OL]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 1 [2024-02-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31900165/>. DOI: 10.1186/s12974-019-1655-5.
- [40] Ni G, Chen S, Chen M, et al. Host-defense peptides caerin 1.1 and 1.9 stimulate TNF- α -dependent apoptotic signals in human cervical cancer hela cells [J/OL]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 676 [2024-02-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32850805/>. DOI: 10.3389/fcell.2020.00676.
- [41] Olivares-González L, Velasco S, Millán JM, et al. Intravitreal administration of adalimumab delays retinal degeneration in rd10 mice [J/OL]. *FASEB J*, 2020, 34(10): 13839–13861 [2024-02-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32816354/>. DOI: 10.1096/fj.202000044RR.
- [42] 庞继景. 视网膜疾病基因治疗的现状与未来 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2014, 32(8): 673–676. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.08.001.
- Pang JJ. Current situation and the future of retinal gene therapy [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2014, 32(8): 673–676. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.08.001.

(收稿日期: 2024-06-10 修回日期: 2024-08-27)

(本文编辑: 刘艳 施晓萌)

