

## · 实验研究 ·

# 敲减天冬酰胺合成酶对视网膜色素上皮细胞衰老的延缓作用及其机制

丁杰<sup>1</sup> 辛向阳<sup>2</sup> 赵鑫<sup>3</sup><sup>1</sup>内蒙古科技大学包头医学院, 包头 014040; <sup>2</sup>包头市中心医院眼科, 包头 014042; <sup>3</sup>内蒙古包钢医院眼科, 包头 014010

通信作者: 辛向阳, Email: xinxiangyang\_2006@163. com

**【摘要】 目的** 探究敲减天冬酰胺合成酶(ASNS)对视网膜色素上皮(RPE)细胞衰老的影响及其可能的分子机制。**方法** 取人 RPE 细胞系 ARPE-19, 分为对照组、ASNS 短发夹 RNA(shASNS)组、对照+JAK 抑制剂组和 shASNS+JAK 抑制剂组, 分别转染对照慢病毒+二甲基亚砜(DMSO)、shASNS+DMSO、对照+JAK 抑制剂、shASNS+JAK 抑制剂 12 h。采用 500  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  处理细胞 24 h 构建 RPE 细胞衰老模型。采用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 分别检测各组 ASNS 和 JAK mRNA 及蛋白表达水平; 应用试剂盒检测细胞活性氧(ROS)水平; 应用流式细胞仪检测细胞周期及细胞凋亡率; 采用 MTT 法测定各组培养 1~5 d 细胞活力值; 采用  $\beta$ -半乳糖苷酶染色检测衰老细胞比率; 采用免疫荧光染色检测细胞损伤情况; 采用 Western blot 法检测各组细胞中衰老相关蛋白 p16、pRb 以及 RPE 特征性标志物 KRT18、CTNNB1、TJP1 及 BEST1 的表达水平。**结果** 与对照组相比, shASNS 组、对照+JAK 抑制剂组和 shASNS+JAK 抑制剂组 ASNS 和 JAK 的 mRNA 和蛋白相对表达量均减少, 差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ ); DCFH-DA 染色结果显示 shASNS 组、对照+JAK 抑制剂组、shASNS+JAK 抑制剂组 ROS 水平均明显低于对照组, 差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ ); 流式细胞仪检测显示, shASNS 组、对照+JAK 抑制剂组、shASNS+JAK 抑制剂组 G2 期细胞比例较对照组明显增加, 细胞凋亡率较对照组明显降低, 差异均有统计学意义(均  $P<0.01$ ); MTT 检测 shASNS 组、对照+JAK 抑制剂组及 shASNS+JAK 抑制剂组各培养时间点细胞活力值均明显高于对照组, 差异均有统计学意义(均  $P<0.01$ );  $\beta$ -半乳糖苷酶染色检测显示, shASNS 组、对照+JAK 抑制剂组和 shASNS+JAK 抑制剂组  $\beta$ -半乳糖苷酶阳性细胞占比分别为  $(42.36\pm1.28)\%$ 、 $(43.20\pm1.89)\%$  和  $(25.97\pm1.13)\%$ , 均明显低于对照组的  $(52.25\pm0.64)\%$ , 差异均有统计学意义(均  $P<0.001$ ); shASNS 组、对照+JAK 抑制剂组、shASNS+JAK 抑制剂组 p16 和 pRb 蛋白相对表达量均较对照组降低, 差异均有统计学意义(均  $P<0.01$ )。shASNS 组、对照+JAK 抑制剂组、shASNS+JAK 抑制剂组  $\gamma$ -H2AX 相对荧光强度均较对照组减弱, 差异均有统计学意义(均  $P<0.001$ )。shASNS 组、对照+JAK 抑制剂组及 shASNS+JAK 抑制剂组中 KRT18 及 CTNNB1 蛋白相对表达量均较对照组增加, TJP1 和 BEST1 蛋白相对表达量均较对照组减少, 差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ ); shASNS+JAK 抑制剂组 KRT18、CTNNB1 蛋白相对表达量较 shASNS 组和对照+JAK 抑制剂组增加, TJP1、BEST1 蛋白相对表达量较 shASNS 组和对照+JAK 抑制剂组减少, 差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ )。**结论** 敲减 ASNS 可通过抑制 JAK 通路促进 RPE 细胞增殖, 减轻 RPE 细胞损伤, 并延缓其衰老进程。

**【关键词】** 天冬酰胺合成酶; 黄斑变性; 视网膜色素上皮细胞; 衰老; JAK 通路**基金项目:** 内蒙古自治区卫生健康委员会课题 (2023GLLH0239)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20241207-00337

## Inhibitory effect of asparagine synthetase knockdown on retinal pigment epithelial cell senescence and its underlying mechanism

Ding Jie<sup>1</sup>, Xin Xiangyang<sup>2</sup>, Zhao Xin<sup>3</sup><sup>1</sup>Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014040, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Baotou Central Hospital, Baotou 014042, China; <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, Inner Mongolia Baogang Hospital, Baotou 014010, China

Corresponding author: Xin Xiangyang, Email: xinxiangyang\_2006@163. com

**[Abstract] Objective** To investigate the effect of asparagine synthetase (ASNS) knockdown on the senescence of retinal pigment epithelial (RPE) cells and its potential molecular mechanism. **Methods** Human ARPE-19 RPE cells were divided into four groups: control group, short hairpin RNA targeting ASNS (shASNS) group, control+(Janus kinase) JAK inhibitor group, and shASNS+JAK inhibitor group, which were treated with short hairpin RNA control+dimethyl sulfoxide (DMSO), shASNS+DMSO, control+JAK inhibitor and shASNS+JAK inhibitor for 12 hours, respectively. An RPE cell senescence model was established by cell treatment with 500  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 24 hours. The mRNA and protein levels of ASNS and JAK were detected by real-time fluorescent quantitative PCR and Western blot, respectively. Reactive oxygen species (ROS) level within cells was measured using a kit. Cell cycle phase distribution and apoptosis rates were analyzed by flow cytometry. Cell viability from day 1 to day 5 of culturing was assessed via MTT assay. Senescent cell ratio was determined by  $\beta$ -galactosidase staining. Cellular damage was evaluated via immunofluorescence staining. Senescence-associated proteins (p16, pRb), and RPE markers (KRT18, CTNNB1, TJP1, BEST1) were quantified by Western blot. **Results** Compared with the control group, mRNA and protein expression levels of ASNS and JAK were significantly reduced in the shASNS group, control+JAK inhibitor group, and shASNS+JAK inhibitor groups (all  $P<0.05$ ). DCFH-DA staining revealed significantly lower ROS level in the shASNS group, control+JAK inhibitor group, and shASNS+JAK inhibitor group than in the control group (all  $P<0.05$ ). Flow cytometry showed that there were more G2-phase cells and significantly reduced apoptosis rate in the shASNS group, control+JAK inhibitor group, and shASNS+JAK inhibitor group compared with the control group (all  $P<0.01$ ). MTT assay indicated higher cell viability at all time points in the shASNS group, control+JAK inhibitor group, and shASNS+JAK inhibitor group compared with the control group, with statistically significant differences (all  $P<0.01$ ).  $\beta$ -galactosidase-positive cell ratios in the shASNS, control+JAK inhibitor, and shASNS+JAK inhibitor groups were  $(42.36\pm1.28)\%$ ,  $(43.20\pm1.89)\%$ ,  $(25.97\pm1.13)\%$ , respectively, which were significantly lower than  $(52.25\pm0.64)\%$  in the control group (all  $P<0.001$ ). p16 and pRb protein expression were decreased and  $\gamma$ -H2AX fluorescence intensity was attenuated in the shASNS group, control+JAK inhibitor group, and shASNS+JAK inhibitor group compared with the control group (all  $P<0.01$ ). KRT18 and CTNNB1 expressions were upregulated, whereas TJP1 and BEST1 were downregulated in the shASNS group, control+JAK inhibitor group, and shASNS+JAK inhibitor group compared with the control group (all  $P<0.05$ ). The shASNS+JAK inhibitor group exhibited higher KRT18 and CTNNB1 expressions and lower TJP1 and BEST1 expressions than the shASNS and control+JAK inhibitor groups (all  $P<0.05$ ). **Conclusions** ASNS knockdown can promote RPE cell proliferation, mitigate cellular damage, and delay senescence by suppressing the JAK pathway.

**[Key words]** Asparagine synthase; Macular degeneration; Retinal pigment epithelial cells; Aging; JAK pathway

**Fund program:** Project of the Inner Mongolia Autonomous Region Health Commission (2023GLLH0239)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20241207-00337

年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 是一种进行性视网膜疾病, 主要累及黄斑区。疾病早期和中期可能无明显症状, 但进展至晚期可能会造成严重的视力损害。在发达国家, AMD 是 55 岁以上人群视力丧失的主要原因; 预测到 2040 年, 全球有 2.88 亿人受累<sup>[1-2]</sup>。AMD 的发生与多种因素相关, 其中视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞的衰老在 AMD 的病理过程中起核心作用<sup>[3-4]</sup>。目前临床上针对 AMD 仍无有效的治疗办法。

天冬酰胺合成酶 (asparagine synthetase, ASNS) 是一种重要的氨基酸代谢酶, 能够催化天冬氨酸和谷氨酰胺生成天冬酰胺和谷氨酸, 主要参与细胞内氨基酸

代谢、细胞应激反应等<sup>[5]</sup>。ASNS 在细胞衰老中扮演重要角色, 通过调控天冬酰胺合成影响细胞增殖。研究表明, p53 可下调 ASNS 表达, 抑制天冬酰胺生成, 导致细胞周期停滞与衰老<sup>[6]</sup>。此外, ASNS 与氧化应激水平相关, 抑制其表达会降低骨髓间充质干细胞抗氧化能力, 促进其衰老与凋亡<sup>[7]</sup>。天冬氨酸对视网膜健康至关重要, 其代谢失衡可能导致视网膜细胞损伤, 且 ASNS 表达与氧化应激反应密切相关, 这在 AMD 的病理过程中具有重要意义<sup>[8]</sup>。JAK/STAT 信号通路是细胞信号传导的重要通路之一, 可介导造血、免疫适应性、组织修复、炎症、细胞凋亡和脂肪生成等过程<sup>[9-10]</sup>。JAK/STAT 信号通路不仅在多种免疫介导的疾病和癌症中被激活, 而且在遗传性视网膜营养不良及视网膜

缺血再灌注损伤等视网膜疾病中也被激活<sup>[11-14]</sup>。有研究报道 JAK/STAT 信号通路参与 AMD 的病理生理过程<sup>[15]</sup>。目前,调控 ASNS 表达对 RPE 细胞衰老的影响及 JAK/STAT 信号通路在其中的作用尚未见报道。本研究旨在探究 ASNS 对 RPE 细胞衰老的影响,并探讨其在 AMD 中的分子机制,以期为进一步理解 RPE 细胞衰老机制和 AMD 的预防和治疗提供理论依据和新靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞和病毒载体** 人 RPE 细胞系 ARPE-19 购自中科院上海细胞库;慢病毒载体 LV-006 购自上海吉凯科技有限公司。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 二甲基亚砜(美国 Gaylord 公司);ASNS 一抗(ab247296)、H2AX 一抗(ab124781)(美国 Abcam 公司);ASNS 二抗(S0001)、H2AX 二抗(S0008)(美国 Affinity 公司);AgeI/EcoRI 酶切(上海吉凯科技有限公司);胎牛血清(10099-141,美国 Invitrogen 公司);JAK 抑制剂(HY-151285,上海 MCE 公司);活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(CA1410)、 $\beta$ -半乳糖苷酶染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);细胞周期检测试剂盒(P4170)、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)(B2064)(美国 Sigma 公司);实时荧光定量 PCR 试剂盒、MTT 试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司];细胞凋亡检测试剂盒(美国 EB 公司);逆转录试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司)。流式细胞仪(Guava easyCyte HT,美国 Millipore 公司);Western blot 电泳系统(上海天能生命科学有限公司);台式冷冻高速离心机(5417R,德国 Eppendorf 公司);NanoDrop 分光光度计(2000/2000C,美国 Thermo 公司);倒置荧光显微镜(IX73,日本 Olympus 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 ASNS 短发夹 RNA 干扰慢病毒载体构建** 以 ASNS 为模板,设计 3 个 RNA 干扰靶点序列,完成 RNA 干扰靶点设计后,合成含干扰序列的单链 DNA oligo,退火配对产生双链 DNA;随后通过其两端酶切位点直接连入酶切后的慢病毒载体;将连接产物转入制备好的大肠杆菌感受态细胞,PCR 鉴定阳性重组子,送测序验证,对测序结果比对正确的克隆进行慢病毒抽提。将质检合格的质粒进行病毒包装。

**1.2.2 细胞培养和分组处理** ARPE-19 细胞放置在 37℃、含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中,用含体积分数 10% 胎牛血清及 10 g/L 双抗的 DMEM/F12 培养基

培养,每 3 天更换 1 次培养基,细胞生长融合至 80%~90% 时将其分为对照组、shASNS 组、对照+JAK 抑制剂组、shASNS+JAK 抑制剂组,分别转染短发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA)对照(shRNA control, shCtrl)+二甲基亚砜、ASNS shRNA(shASNS)+二甲基亚砜、shCtrl+JAK 抑制剂、shASNS+JAK 抑制剂 12 h。

**1.2.3 慢病毒感染 ARPE-19 细胞系** 将 ARPE-19 细胞系培养至 80%~90% 融合度后,进行慢病毒感染。将各组细胞悬液以密度  $1 \times 10^5$ /ml 接种于细胞培养板中;待细胞贴壁后,弃去上层的完全培养基,根据不同的感染复数值分别加入相应剂量的感染液,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 18~20 h;将细胞悬液转移至新鲜配制的完全培养基中继续培养 72 h。通过荧光显微镜观察荧光表达情况并评估感染效率。

**1.2.4 RPE 细胞衰老模型的构建** 取各组成功感染的细胞悬液分别以  $1 \times 10^6$ /ml 的浓度接种于 96 孔板中,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养过夜。待细胞密度达到 80% 时,用 500  $\mu$ mol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 24 h。本团队前期研究已证实 500  $\mu$ mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能抑制细胞增殖,降低细胞活性<sup>[16]</sup>,因此本研究中采用同样方法构建细胞衰老模型。

**1.2.5 实时荧光定量 PCR 检测 ASNS 和 JAK 表达** 取各组处于对数生长期的 ARPE-19 细胞,以  $1 \times 10^5$  个/孔接种至 6 孔板内并连续培养 48 h。用 Trizol 试剂提取各组细胞总 RNA, NanoDrop 分光光度计测定纯度及浓度,经琼脂糖凝胶电泳检测完整性,采用逆转录试剂盒逆转录为 cDNA。ASNS 正向引物序列为 5'-AACAGTTCGTGCTTCAGT-3',反向引物序列为 5'-ATGTAACCCTGCGTAAGT-3';JAK2 正向引物序列为 5'-TTTGTACAAGGAAGCGAATA-3',反向引物序列为 5'-CCTCACCTGAAGGACCAC-3';GAPDH 正向引物序列为 5'-TGACTTCAACAGCGACACCCA-3',反向引物序列为 5'-CACCTGTTGCTGTAGCCAAA-3'。以 cDNA 为模板,于 ABI7300 系统上进行实时荧光定量 PCR 分析,设定反应条件为:95℃ 预变性 2 min;95℃ 变性 15 s,60℃ 退火及延伸 30 s,共 40 个循环;熔解曲线反应条件:95℃ 5 s,65℃ 5 s,95℃ 30 s。以 GAPDH 为内参,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 ASNS 和 JAK2 的相对表达量。实验独立重复 3 次。

**1.2.6 Western blot 法检测 ASNS、衰老相关蛋白 JAK2 及 RPE 特征性标志物表达** 取各组细胞,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)清洗 1 次, RIPA 裂解缓冲液提取细胞蛋白,用 BCA 法测定总蛋白浓度,上样 20  $\mu$ g 总蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳

分离,湿法转印至 PVDF 膜;含 5% 脱脂牛奶的 TBST (含吐温比例为 0.05%) 溶液室温摇床封闭 1 h,置于 ASNS, JAK2, 衰老相关蛋白 p16、pRb 以及 RPE 特征标志物 KRT18、CTNNB1、TJP1 和 BEST1 一抗(均 1:2 000 稀释)中 4 ℃ 孵育过夜, TBS 洗膜 3 次;辣根过氧化物酶偶联的二抗(1:3 000 稀释)室温孵育 1 h, TBS 洗膜 3 次;ECL 发光液显色,全自动凝胶成像系统拍照。采用 ImageJ 软件分析各蛋白条带灰度值,以 GAPDH 为内参照,计算各目的蛋白相对表达量。实验独立重复 3 次。

**1.2.7 ROS 试剂盒检测细胞内 ROS 水平** 取各组转染后细胞,按每孔  $5 \times 10^3$  个细胞接种于 48 孔板,待细胞贴壁后分组造模。造模完成后去除细胞培养液,每孔加入 10  $\mu\text{mol/L}$  DCFH-DA, 37 ℃ 孵育 20 min, 无血清培养基洗 3 遍,加入 100  $\mu\text{l}$  PBS。在倒置荧光显微镜下,设置激发波长为 488 nm,发射波长为 525 nm 检测 ROS 水平。实验独立重复 3 次。

**1.2.8 流式细胞仪检测细胞凋亡水平** 取各组造模后细胞,以每孔  $1 \times 10^5$  个细胞接种至 6 孔板内并连续培养 48 h。胰蛋白酶消化,低速(1 500 r/min)离心 5 min 收集细胞, PBS 洗涤 1 次;参照细胞周期检测试剂盒,加入细胞染色缓冲液重悬并调整细胞密度,连续加入 5  $\mu\text{l}$  Annexin V-FITC 溶液和 PI 溶液,避光染色 15 min,采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。实验独立重复 3 次。

**1.2.9 流式细胞仪检测细胞周期** 取各组造模后细胞,以每孔  $1 \times 10^5$  个细胞接种至 6 孔板内并连续培养 48 h。胰蛋白酶消化,低速离心 5 min 收集细胞, PBS 洗涤 1 次, 70% 乙醇固定细胞 1 h, 参照细胞凋亡检测试剂盒,加入细胞染色液重悬,采用流式细胞仪检测细胞周期。实验独立重复 3 次。

**1.2.10 MTT 法检测细胞活力值** 取各组造模后细胞,胰蛋白酶消化并收集细胞,参照 MTT 试剂盒说明书,调整铺板细胞密度为 2 000 个/孔,接种于 5 个 96 孔板中,每组设置 3 个复孔,连续检测 5 d。分别于铺板后第 2~5 天,每日任取 1 个板,每孔加入 20  $\mu\text{l}$  5 mg/ml MTT,孵育 4 h 后完全吸去培养液,加入 100  $\mu\text{l}$  二甲基亚砷溶解的甲瓖溶液,室温振荡 2~5 min,酶标仪 490 nm 检测吸光度值,计算细胞活力值。细胞活力值=(加药组吸光度-空白组吸光度)/(对照组吸光度-空白组吸光度)×100%。实验独立重复 3 次。

**1.2.11  $\beta$ -半乳糖苷酶染色检测细胞衰老情况** 取各组造模后细胞, PBS 洗涤 1 次,加入 1 ml  $\beta$ -Gal 固定液,室温固定 15 min; PBS 洗涤细胞 3 次,每次 3 min;

每孔加入 1 ml 染色工作液, 37 ℃ 孵育过夜。光学显微镜下观察并计数  $\beta$ -半乳糖苷酶阳性细胞,计算  $\beta$ -半乳糖苷酶阳性细胞占比。实验独立重复 3 次。

**1.2.12 免疫荧光检测细胞损伤情况** 取各组成功造模的细胞,接种至含有盖玻片的 24 孔板, 37 ℃、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h, PBS 洗涤 1 次,加入含 4% 多聚甲醛 PBS 4 ℃ 孵育过夜, TBS 漂洗 3 次;加入 BSA 稀释 H2AX 一抗(1:100 稀释),室温孵育 1 h, PBST(吐温比例为 0.05%)漂洗 3 次;滴加荧光标记二抗(1:200 稀释)室温孵育 1 h, PBST 漂洗 3 次;加入 DAPI 室温避光染色 5 min, PBST 漂洗 3 次,盖玻片上滴 1 滴封片液后扣在载玻片上,指甲油封闭四周。倒置荧光显微镜观察并拍照。实验独立重复 3 次。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 26.0 统计学软件进行统计分析。计量资料数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间各指标总体比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。采用双尾检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组细胞 ASNS mRNA 和蛋白表达水平比较

对照组、shASNS 组、对照+JAK 抑制剂组和 shASNS+JAK 抑制剂组 ASNS mRNA 相对表达量分别为  $1.004 \pm 0.108$ 、 $0.409 \pm 0.032$ 、 $0.749 \pm 0.069$  和  $0.174 \pm 0.030$ , 总体比较差异有统计学意义 ( $F = 87.21$ ,  $P < 0.001$ )。其中 shASNS 组较对照组、shASNS+JAK 抑制剂组较对照+JAK 抑制剂组 ASNS mRNA 相对表达量均降低,差异均有统计学意义(均  $P < 0.001$ )(图 1)。

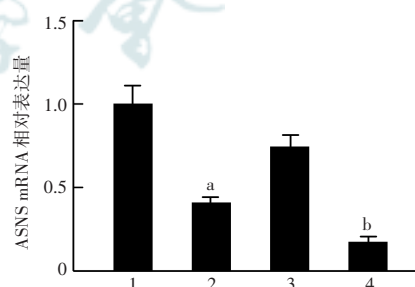
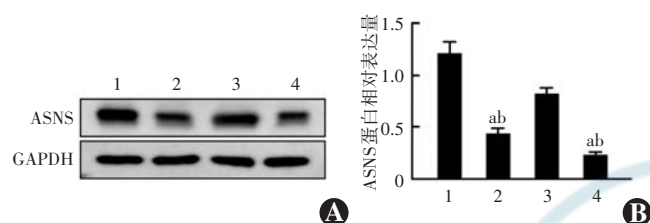


图 1 各组细胞 ASNS mRNA 相对表达量比较  $F = 87.21$ ,  $P < 0.001$ 。与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.001$ ;与对照+JAK 抑制剂组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验;  $n = 3$ ) 1: 对照组; 2: shASNS 组; 3: 对照+JAK 抑制剂组; 4: shASNS+JAK 抑制剂组 ASNS: 天冬酰胺合成酶

**Figure 1 Comparison of relative ASNS mRNA expression in cells among different groups**  $F = 87.21$ ,  $P < 0.001$ . Compared with control group, <sup>a</sup> $P < 0.001$ ; compared with control+JAK inhibitor group, <sup>b</sup> $P < 0.05$  (One-way ANOVA, LSD-*t* test;  $n = 3$ ) 1: control group; 2: shASNS group; 3: control+JAK inhibitor group; 4: shASNS+JAK inhibitor group ASNS: asparagine synthetasesh

对照组、shASNS 组、对照 + JAK 抑制剂组和 shASNS+JAK 抑制剂组 ASNS 蛋白相对表达量为  $1.21 \pm 0.11$ 、 $0.44 \pm 0.05$ 、 $0.82 \pm 0.06$  和  $0.23 \pm 0.03$ , 总体比较差异有统计学意义 ( $F = 117.40$ ,  $P < 0.001$ )。其中 shASNS 组和 shASNS+JAK 抑制剂组 ASNS 蛋白相对表达量均较对照组和对照 + JAK 抑制剂组明显降低, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.001$ ) (图 2)。



**图 2 Western blot 检测各组细胞 ASNS 蛋白水平** A: 各组 ASNS 蛋白表达电泳图 B: 各组 ASNS 蛋白相对表达量比较  $F = 117.40$ ,  $P < 0.001$ 。与对照组比较,  $^a P < 0.001$ ; 与对照 + JAK 抑制剂组比较,  $^b P < 0.001$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验;  $n = 3$ ) 1: 对照组; 2: shASNS 组; 3: 对照 + JAK 抑制剂组; 4: shASNS + JAK 抑制剂组 ASNS: 天冬酰胺合成酶; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

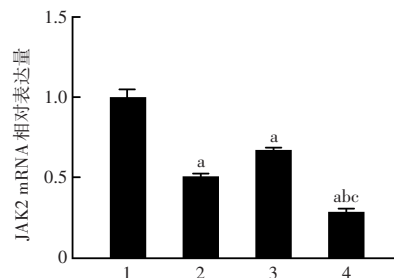
**Figure 2 ASNS protein expression in cells of different groups detected by Western blot** A: Electrophoretogram of ASNS protein expression in different groups B: Comparison of relative ASNS protein expression among different groups  $F = 117.40$ ,  $P < 0.001$ . Compared with control group,  $^a P < 0.001$ ; compared with control + JAK inhibitor group,  $^b P < 0.001$  (One-way ANOVA, LSD- $t$  test;  $n = 3$ ) 1: control group; 2: shASNS group; 3: control + JAK inhibitor group; 4: shASNS + JAK inhibitor group ASNS: asparagine synthetase; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

## 2.2 各组细胞 JAK2 mRNA 和蛋白表达水平比较

对照组、shASNS 组、对照 + JAK 抑制剂组和 shASNS+JAK 抑制剂组的 JAK2 mRNA 相对表达量分别为  $1.001 \pm 0.049$ 、 $0.511 \pm 0.012$ 、 $0.677 \pm 0.011$  和  $0.289 \pm 0.019$ , 蛋白相对表达量分别为  $0.90 \pm 0.05$ 、 $0.66 \pm 0.02$ 、 $0.78 \pm 0.02$  和  $0.36 \pm 0.04$ , 总体比较差异均有统计学意义 ( $F = 350.20$ 、 $122.50$ , 均  $P < 0.001$ )。其中 shASNS 组、对照 + JAK 抑制剂组及 shASNS+JAK 抑制剂组 JAK2 mRNA 和蛋白相对表达量均较对照组降低, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ); shASNS + JAK 抑制剂组中 JAK2 mRNA 和蛋白相对表达量较 shASNS 组和对照 + JAK 抑制剂组均降低, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.001$ ) (图 3, 4)。

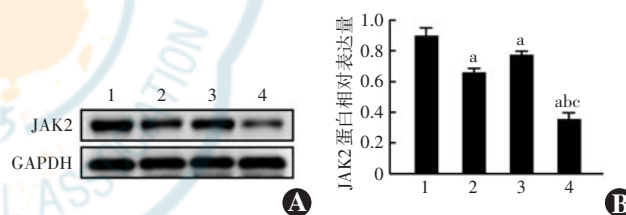
## 2.3 各组细胞内 ROS 水平比较

对照组、shASNS 组、对照 + JAK 抑制剂组和 shASNS+JAK 抑制剂组 ROS 水平分别为  $1.00 \pm 0.04$ 、 $0.53 \pm 0.04$ 、 $0.84 \pm 0.05$  和  $0.38 \pm 0.03$ , 总体比较差异有统计学意义 ( $F = 145.60$ ,  $P < 0.001$ )。其中 shASNS



**图 3 各组细胞 JAK2 mRNA 相对表达水平比较**  $F = 350.2$ ,  $P < 0.001$ 。与对照组比较,  $^a P < 0.001$ ; 与 shASNS 组比较,  $^b P < 0.001$ ; 与对照 + JAK 抑制剂组比较,  $^c P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验;  $n = 3$ ) 1: 对照组; 2: shASNS 组; 3: 对照 + JAK 抑制剂组; 4: shASNS + JAK 抑制剂组 JAK: Janus 激酶; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; shCtrl: 短发夹 RNA 对照; DMSO: 二甲基亚砜; shASNS: 天冬酰胺合成酶短发夹 RNA

**Figure 3 Comparison of relative JAK2 mRNA expression in cells of different groups**  $F = 350.2$ ,  $P < 0.001$ . Compared with control group,  $^a P < 0.001$ ; compared with shASNS group,  $^b P < 0.001$ ; compared with control + JAK inhibitor group,  $^c P < 0.05$  (One-way ANOVA, LSD- $t$  test;  $n = 3$ ) 1: control group; 2: shASNS group; 3: control + JAK inhibitor group; 4: shASNS + JAK inhibitor group JAK: Janus kinase; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; shCtrl: shRNA control; DMSO: dimethyl sulfoxide; shASNS: short hairpin RNA targeting asparagine synthetase



**图 4 Western blot 检测各组细胞 JAK2 蛋白水平** A: 各组 JAK2 蛋白表达电泳图 B: 各组 JAK2 蛋白相对表达量比较  $F = 122.50$ ,  $P < 0.001$ 。与对照组比较,  $^a P < 0.001$ ; 与 shASNS 组比较,  $^b P < 0.001$ ; 与对照 + JAK 抑制剂组比较,  $^c P < 0.001$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验;  $n = 3$ ) 1: 对照组; 2: shASNS 组; 3: 对照 + JAK 抑制剂组; 4: shASNS + JAK 抑制剂组 JAK: Janus 激酶; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

**Figure 4 JAK2 protein expression in cells of different groups detected by Western blot** A: Electrophoretogram of JAK2 protein expression in different groups B: Comparison of relative JAK2 protein expression among different groups  $F = 122.50$ ,  $P < 0.001$ . Compared with control group,  $^a P < 0.001$ ; compared with shASNS group,  $^b P < 0.001$ ; compared with control + JAK inhibitor group,  $^c P < 0.001$  (One-way ANOVA, LSD- $t$  test;  $n = 3$ ) 1: control group; 2: shASNS group; 3: control + JAK inhibitor group; 4: shASNS + JAK inhibitor group JAK: Janus kinase; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

组、对照 + JAK 抑制剂组和 shASNS+JAK 抑制剂组 ROS 水平均较对照组降低, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ); shASNS + JAK 抑制剂组 ROS 水平较 shASNS 组、对照 + JAK 抑制剂组均降低, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.001$ ) (图 5)。

## 2.4 各组细胞凋亡率比较

对照组、shASNS 组、对照 + JAK 抑制剂组和

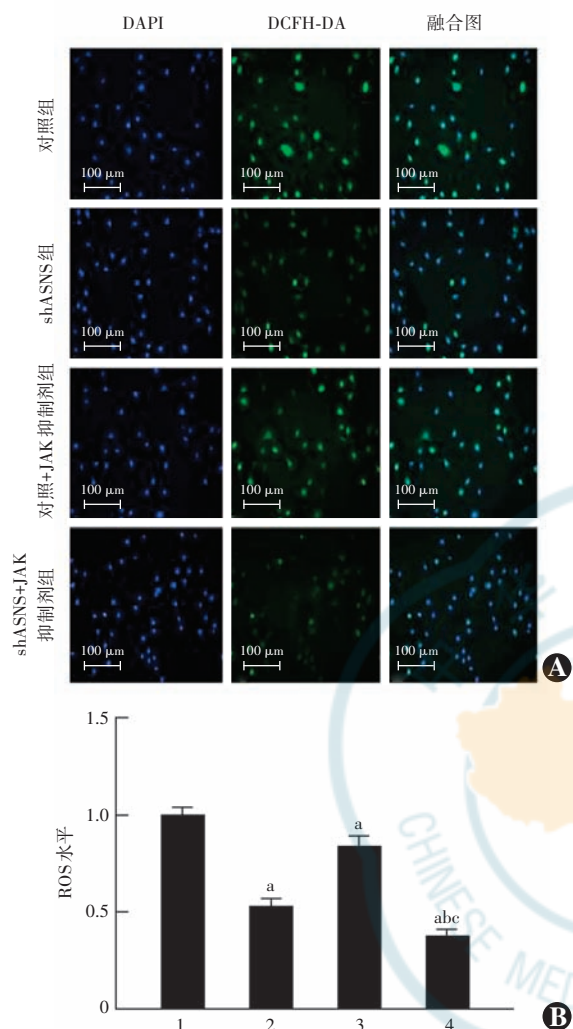


图5 荧光探针 DCFH-DA 检测各组细胞内 ROS 水平 A: 各组 DCFH-DA 荧光染色图 ( $\times 200$ , 标尺 =  $100 \mu\text{m}$ ) B: 各组 ROS 水平比较  $F = 145.60, P < 0.001$ 。与对照组比较,  $^a P < 0.001$ ; 与 shASNS 组比较,  $^b P < 0.001$ ; 与对照+JAK 抑制剂组比较,  $^c P < 0.001$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验;  $n = 3$ ) 1: 对照组; 2: shASNS 组; 3: 对照+JAK 抑制剂组; 4: shASNS+JAK 抑制剂组 shASNS: 天冬酰胺合成酶短发夹 RNA; JAK: Janus 激酶; ROS: 活性氧

**Figure 5 ROS level in cells of different groups detected by fluorescent probe DCFH-DA** A: DCFH-DA fluorescence staining images across groups ( $\times 200$ , scale bar =  $100 \mu\text{m}$ ) B: Comparison of ROS level among different groups  $F = 145.60, P < 0.001$ . Compared with control group,  $^a P < 0.001$ ; compared with shASNS group,  $^b P < 0.001$ ; compared with control + JAK inhibitor group,  $^c P < 0.001$  (One-way ANOVA, LSD- $t$  test;  $n = 3$ ) 1: control group; 2: shASNS group; 3: control + JAK inhibitor group; 4: shASNS + JAK inhibitor group shASNS: short hairpin RNA targeting asparagine synthetase; JAK: Janus kinase; ROS: reactive oxygen species

shASNS+JAK 抑制剂组细胞凋亡率分别为 ( $11.61 \pm 0.53\%$ )、( $6.53 \pm 0.09\%$ )、( $8.67 \pm 0.31\%$ ) 和 ( $5.20 \pm 0.07\%$ )，总体比较差异有统计学意义 ( $F = 237.50, P < 0.001$ )。其中 shASNS 组、对照+JAK 抑制剂组、shASNS+JAK 抑制剂组细胞总凋亡率均较对照组降低，

差异均有统计学意义 (均  $P < 0.001$ )。shASNS+JAK 抑制剂组细胞总凋亡率较 shASNS 组和对照+JAK 抑制剂组均降低, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.001$ ) (图 6)。

## 2.5 各组不同细胞周期比例比较

各组处于 G1 期、S 期和 G2 期的细胞比例总体比较, 差异均有统计学意义 ( $F = 518.90, 150.00, 1115.00$ , 均  $P < 0.001$ )。其中 shASNS 组、对照+JAK 抑制剂组和 shASNS+JAK 抑制剂组 G1 期细胞比例较对照组减少、处于 S 期和 G2 期细胞比例均较对照组增加, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.001$ )；shASNS+JAK 抑制剂组 G1 期细胞比例较 shASNS 组和对照+JAK 抑制剂组均降低, S 期细胞比例较 shASNS 组增加、较对照+JAK 抑制剂组减少, G2 期细胞比例较 shASNS 组和对照+JAK 抑制剂组均增加, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.001$ ) (图 7, 表 1)。

## 2.6 各组细胞活力比较

各组细胞培养 1、2、3、4、5 d 细胞活力值总体比较, 差异均有统计学意义 ( $F = 1.03, 116.40, 172.00, 664.60, 934.20$ , 均  $P < 0.001$ )。其中相对于对照组, shASNS 组、对照+JAK 抑制剂组及 shASNS+JAK 抑制剂组培养 1 d 时细胞活力值均降低, 培养 2、3、4、5 d 时细胞活力值均明显升高, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.01$ )；shASNS+JAK 抑制剂组各时间点细胞活力较 shASNS 组和对照+JAK 抑制剂组升高, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.001$ ) (表 2)。

## 2.7 各组细胞衰老情况比较

**2.7.1 各组  $\beta$ -半乳糖苷酶阳性细胞占比比较** 对照组、shASNS 组、对照+JAK 抑制剂组和 shASNS+JAK 抑制剂组  $\beta$ -半乳糖苷酶阳性细胞占比分别为 ( $52.25 \pm 0.64\%$ )、( $42.36 \pm 1.28\%$ )、( $43.20 \pm 1.89\%$ ) 和 ( $25.97 \pm 1.13\%$ )，总体比较差异有统计学意义 ( $F = 208.30, P < 0.001$ )。其中 shASNS 组、shASNS+JAK 抑制剂组  $\beta$ -半乳糖苷酶阳性细胞占比均较对照组降低, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.001$ )；shASNS+JAK 抑制剂组  $\beta$ -半乳糖苷酶阳性细胞占比比较 shASNS 组和对照+JAK 抑制剂组均降低, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.001$ ) (图 8)。

**2.7.2 各组衰老相关蛋白 p16、pRb 表达比较** 对照组、shASNS 组、对照+JAK 抑制剂组和 shASNS+JAK 抑制剂组 p16 蛋白相对表达量分别为  $0.83 \pm 0.06$ 、 $0.46 \pm 0.05$ 、 $0.69 \pm 0.04$  和  $0.45 \pm 0.05$ , pRb 蛋白相对表达量分别为  $0.76 \pm 0.03$ 、 $0.30 \pm 0.04$ 、 $0.57 \pm 0.02$  和  $0.14 \pm 0.05$ , 总体比较差异均有统计学意义 ( $F = 44.49, P < 0.001$ ;  $F = 164.50, P < 0.01$ )。其中与对照组比较, shASNS 组、对照+JAK 抑制剂组、shASNS+JAK 抑制剂

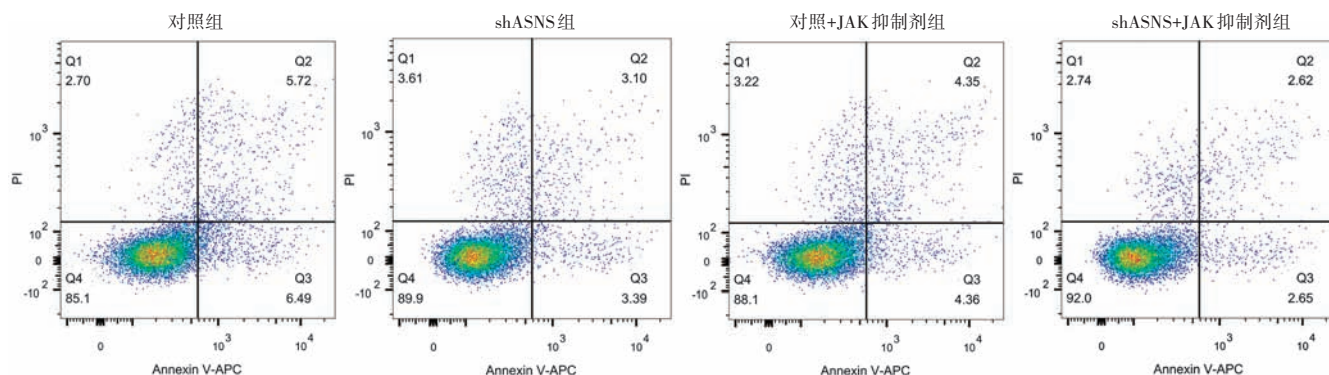


图 6 各组细胞凋亡流式细胞图 shASNS:天冬酰胺合成酶短发夹 RNA;JAK:Janus 激酶

Figure 6 Cell apoptosis detected by flow cytometry shASNS:short hairpin RNA targeting asparagine synthetase;JAK:Janus kinase

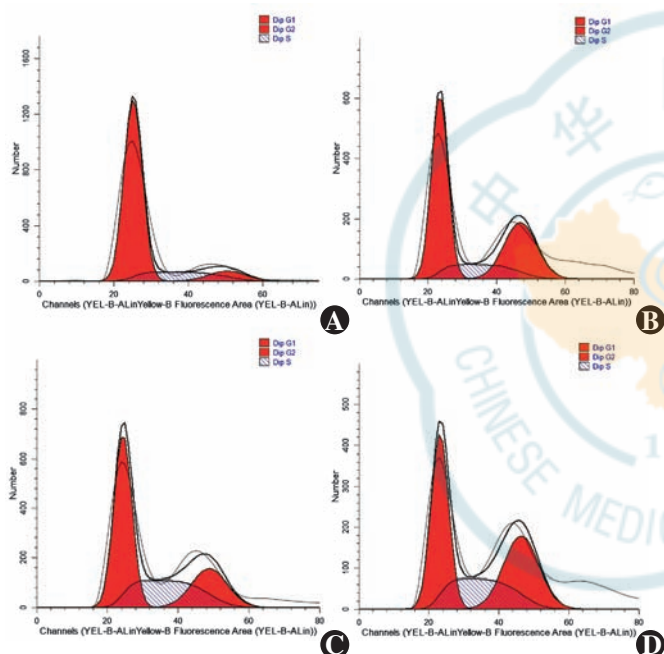


图 7 各组细胞周期流式细胞图 A: 对照组 B: shASNS 组 C: 对照+JAK 抑制剂组 D: shASNS+JAK 抑制剂组

Figure 7 Flow cytometry plots of cell cycle phases in different groups A: Control group B: shASNS group C: Control+JAK inhibitor group D: shASNS+JAK inhibitor group

表 1 各组不同细胞周期比例比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )  
Table 1 Comparison of proportions across different cell cycle phases among various groups ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

| 组别              | 样本量 | G1 期                            | S 期                             | G2 期                            |
|-----------------|-----|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 对照组             | 3   | 76.42 $\pm$ 0.96                | 15.53 $\pm$ 0.66                | 8.04 $\pm$ 0.38                 |
| shASNS 组        | 3   | 53.12 $\pm$ 1.17 <sup>a</sup>   | 16.16 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>   | 30.73 $\pm$ 1.02 <sup>a</sup>   |
| 对照+JAK 抑制剂组     | 3   | 46.99 $\pm$ 1.63 <sup>a</sup>   | 31.73 $\pm$ 1.91 <sup>a</sup>   | 21.28 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>   |
| shASNS+JAK 抑制剂组 | 3   | 41.35 $\pm$ 0.73 <sup>abc</sup> | 25.24 $\pm$ 0.62 <sup>abc</sup> | 33.41 $\pm$ 0.31 <sup>abc</sup> |
| F 值             |     | 518.90                          | 150.00                          | 1 115.00                        |
| P 值             |     | <0.001                          | <0.001                          | <0.001                          |

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.001$ ;与 shASNS 组比较,<sup>b</sup> $P<0.001$ ;与对照+JAK 抑制剂组比较,<sup>c</sup> $P<0.001$ (单因素方差分析,LSD- $t$  检验) shASNS:天冬酰胺合成酶短发夹 RNA;JAK:Janus 激酶

Note: Compared with control group, <sup>a</sup> $P<0.001$ ; compared with shASNS group, <sup>b</sup> $P<0.001$ ; compared with control+JAK inhibitor group, <sup>c</sup> $P<0.001$  (One-way ANOVA, LSD- $t$  test) shASNS: short hairpin RNA targeting asparagine synthetase; JAK: Janus kinase

组 p16 和 pRb 蛋白相对表达量均降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$ );shASNS+JAK 抑制剂组 pRb 蛋白相对表达量较 shASNS 组降低,差异有统计学意义( $P<0.01$ );shASNS+JAK 抑制剂组 p16 和 pRb 蛋白相对表达量较对照+JAK 抑制剂组均降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.001$ )(图 9)。

## 2.8 各组细胞损伤情况比较

对照组、shASNS 组、对照+JAK 抑制剂组及 shASNS+JAK 抑制剂组的  $\gamma$ -H2AX 相对荧光强度分别为  $1.00 \pm 0.09$ 、 $0.55 \pm 0.06$ 、 $0.59 \pm 0.06$  及  $0.36 \pm 0.05$ , 总体比较差异有统计学意义( $F = 48.92, P<0.001$ )。其中 shASNS 组、对照+JAK 抑制剂组、shASNS+JAK 抑制剂组  $\gamma$ -H2AX 相对荧光强度较对照组均减弱,差异均有统计学意义(均 $P<0.001$ );shASNS+JAK 抑制剂组  $\gamma$ -H2AX 相对荧光强度较 shASNS 组和对照+JAK 抑制剂组均减弱,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ )(图 10)。

## 2.9 各组细胞 RPE 特征性蛋白表达水平比较

各组 KRT18、CTNNB1、TJP1 及 BEST1 相对表达量总体比较,差异均有统计学意义( $F = 70.83, 22.42, 41.35, 26.94$ , 均 $P<0.001$ )。与对照组相比,shASNS 组、对照+JAK 抑制剂组和 shASNS+JAK 抑制剂组 KRT18 及 CTNNB1 蛋白相对表达量增加,TJP1 和 BEST1 蛋白相对表达量减少,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ );与 shASNS 组和对照+JAK 抑制剂组相比,shASNS+JAK 抑制剂组 KRT18、CTNNB1 蛋白相对表达量增加,TJP1、BEST1 蛋白相对表达量减少,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ )(图 11,表 3)。



表 2 各组不同时间点细胞活力值比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )  
Table 2 Comparison of cell viability at different time points among different groups ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

| 组别              | 样本量 | 不同时间点细胞活力值比较               |                            |                            |                            |                            |
|-----------------|-----|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                 |     | 培养 1 d                     | 培养 2 d                     | 培养 3 d                     | 培养 4 d                     | 培养 5 d                     |
| 对照组             | 3   | 0.556±0.012                | 0.567±0.006                | 0.535±0.012                | 0.495±0.007                | 0.430±0.016                |
| shASNS 组        | 3   | 0.546±0.009 <sup>a</sup>   | 0.636±0.009 <sup>a</sup>   | 0.696±0.014 <sup>a</sup>   | 0.714±0.010 <sup>a</sup>   | 0.729±0.003 <sup>a</sup>   |
| 对照+JAK 抑制剂组     | 3   | 0.542±0.007 <sup>a</sup>   | 0.605±0.006 <sup>a</sup>   | 0.638±0.011 <sup>a</sup>   | 0.645±0.008 <sup>a</sup>   | 0.640±0.006 <sup>a</sup>   |
| shASNS+JAK 抑制剂组 | 3   | 0.546±0.013 <sup>abc</sup> | 0.662±0.004 <sup>abc</sup> | 0.719±0.005 <sup>abc</sup> | 0.766±0.006 <sup>abc</sup> | 0.800±0.007 <sup>abc</sup> |
| F 值             |     | 1.03                       | 116.40                     | 172.00                     | 664.60                     | 934.20                     |
| P 值             |     | <0.001                     | <0.001                     | <0.001                     | <0.001                     | <0.001                     |

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与 shASNS 组比较,<sup>b</sup> $P<0.001$ ;与对照+JAK 抑制剂组比较,<sup>c</sup> $P<0.001$ (单因素方差分析,LSD- $t$  检验) shASNS:天冬酰胺合成酶短发夹 RNA;JAK:Janus 激酶  
Note:Compared with control group,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;compared with shASNS group,<sup>b</sup> $P<0.001$ ;compared with control+JAK inhibitor group,<sup>c</sup> $P<0.001$  (One-way ANOVA,LSD- $t$  test) shASNS:short hairpin RNA targeting asparagine synthetase;JAK:Janus kinase

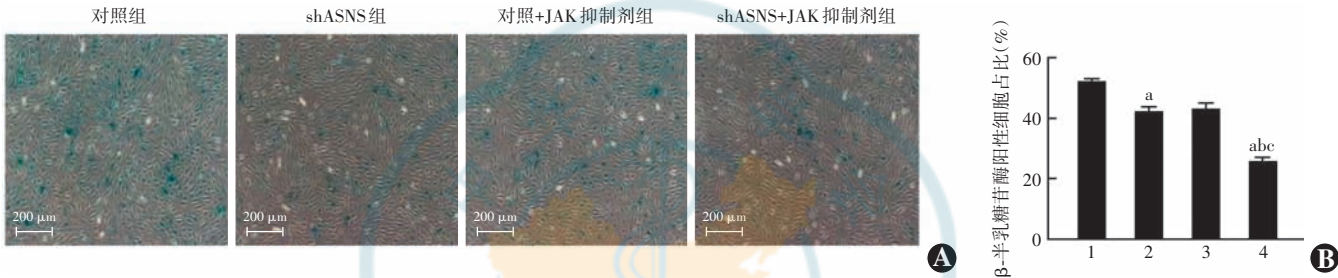


图 8 各组细胞衰老情况 A:各组细胞  $\beta$ -半乳糖苷酶染色图( $\times 100$ ,标尺=200  $\mu\text{m}$ ) B:各组  $\beta$ -半乳糖苷酶阳性细胞占比的比较  $F=208.30$ ,  $P<0.001$ .与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.001$ ;与 shASNS 组比较,<sup>b</sup> $P<0.001$ ;与对照+JAK 抑制剂组比较,<sup>c</sup> $P<0.001$ (单因素方差分析,LSD- $t$  检验; $n=3$ ) 1:对照组;2:shASNS 组;3:对照+JAK 抑制剂组;4:shASNS+JAK 抑制剂组 shASNS:天冬酰胺合成酶短发夹 RNA;JAK:Janus 激酶  
Figure 8 Cellular senescence in different groups A: $\beta$ -galactosidase staining images ( $\times 100$ ,scale bar = 200  $\mu\text{m}$ ) B:Comparison of  $\beta$ -galactosidase-positive cell percentages among groups  $F=208.30$ ,  $P<0.001$ . Compared with control group,<sup>a</sup> $P<0.001$ ; compared with shASNS group,<sup>b</sup> $P<0.001$ ; compared with control+JAK inhibitor group,<sup>c</sup> $P<0.001$  (One-way ANOVA,LSD- $t$  test; $n=3$ ) 1:control group;2:shASNS group;3:control+JAK inhibitor group;4:shASNS+JAK inhibitor group shASNS:short hairpin RNA targeting asparagine synthetase;JAK:Janus kinase

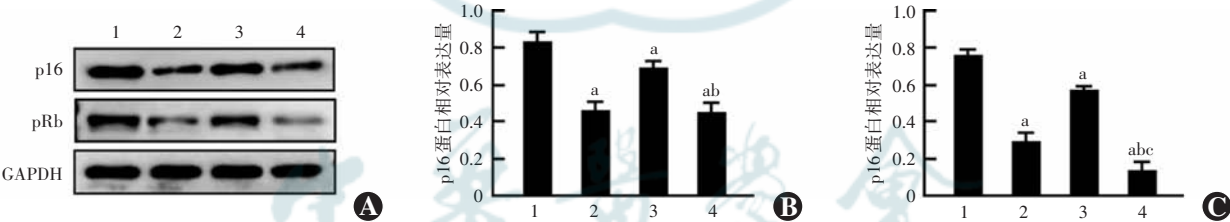
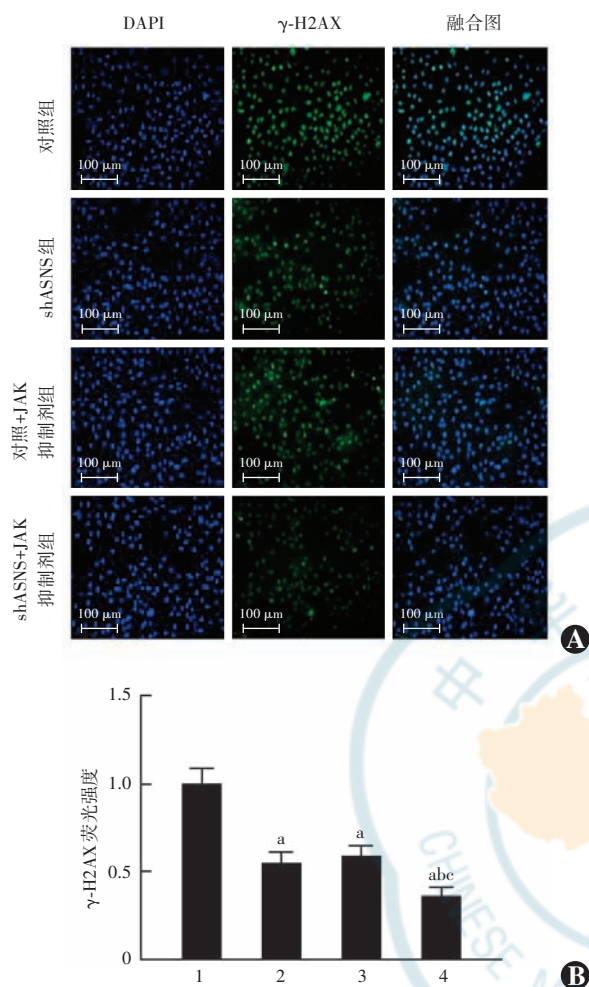


图 9 Western blot 检测各组细胞 p16、pRb 蛋白水平 A:p16、pRb 蛋白表达电泳图 B:各组 p16 蛋白相对表达量比较  $F=44.31$ ,  $P<0.001$ .与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.001$ ;与 shASNS 组比较,<sup>b</sup> $P<0.001$ ;与对照+JAK 抑制剂组比较,<sup>c</sup> $P<0.001$ (单因素方差分析,LSD- $t$  检验; $n=3$ ) C:各组 pRb 蛋白相对表达量比较  $F=171.20$ ,  $P<0.001$ .与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.001$ ;与 shASNS 组比较,<sup>b</sup> $P<0.001$ ;与对照+JAK 抑制剂组比较,<sup>c</sup> $P<0.001$ (单因素方差分析,LSD- $t$  检验; $n=3$ ) 1:对照组;2:shASNS 组;3:对照+JAK 抑制剂组;4:shASNS+JAK 抑制剂组 GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶  
Figure 9 p16 and pRb protein expression in different groups detected by Western blot A:Electrophoretogram of p16 and pRb protein expressions B:Comparison of relative p16 protein expression level among different groups  $F=44.31$ ,  $P<0.001$ . Compared with control group,<sup>a</sup> $P<0.001$ ; compared with shASNS group,<sup>b</sup> $P<0.001$ ; compared with control+JAK inhibitor group,<sup>c</sup> $P<0.001$  (One-way ANOVA,LSD- $t$  test; $n=3$ ) C:Comparison of relative pRb protein expression level among different groups  $F=171.20$ ,  $P<0.001$ . Compared with control group,<sup>a</sup> $P<0.001$ ; compared with shASNS group,<sup>b</sup> $P<0.001$ ; compared with control+JAK inhibitor group,<sup>c</sup> $P<0.001$  (One-way ANOVA,LSD- $t$  test; $n=3$ ) 1:control group;2:shASNS group;3:control+JAK inhibitor group;4:shASNS+JAK inhibitor group GAPDH:glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

3 讨论

近年来越来越多的研究表明,细胞内的氨基酸代谢在视网膜疾病中发挥重要作用<sup>[17-19]</sup>。Kersten 等<sup>[20]</sup>利用微型液相色谱质谱联用技术(microLC-MS)鉴定了

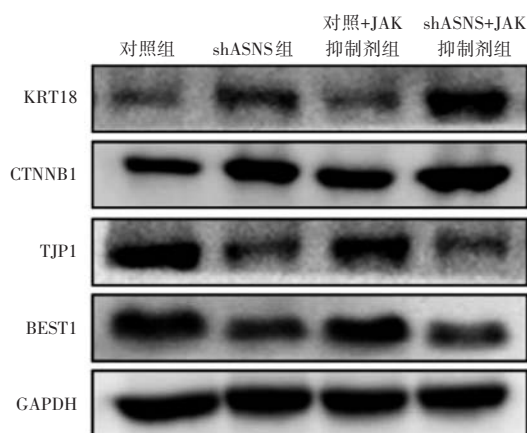
AMD 患者血清中谷氨酰胺水平高于健康人群;Laíns 等<sup>[21]</sup>利用超高效液相色谱质谱联用技术(UHPLC-MS)同样发现 AMD 患者血清中谷氨酰胺水平高于健康人群。ASNS 作为重要的氨基酸代谢酶,其在细胞应激和代谢中的调节作用日益受到关注。本课题组前期研究



**图 10 细胞免疫荧光检测各组细胞损伤情况** A: 各组细胞免疫荧光染色图 (异硫氰酸荧光素 ×200, 标尺 = 100 μm) B: 各组 γ-H2AX 荧光强度比较  $F=48.92, P<0.001$ 。与对照组比较,  $^a P<0.001$ ; 与 shASNS 组比较,  $^b P<0.001$ ; 与对照+JAK 抑制剂组比较,  $^c P<0.001$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验;  $n=3$ ) 1: 对照组; 2: shASNS 组; 3: 对照+JAK 抑制剂组; 4: shASNS+JAK 抑制剂组 shASNS: 天冬酰胺合成酶短发夹 RNA; JAK: Janus 激酶

**Figure 10 Cell damage detected by immunofluorescence staining** A: Immunofluorescence staining images (FITC × 200, scale bar = 100 μm) B: Comparison of γ-H2AX fluorescence intensity among groups  $F=48.92, P<0.001$ . Compared with control group,  $^a P<0.001$ ; compared with shASNS group,  $^b P<0.001$ ; compared with control+JAK inhibitor group,  $^c P<0.001$  (One-way ANOVA, LSD- $t$  test;  $n=3$ ) 1: control group; 2: shASNS group; 3: control + JAK inhibitor group; 4: shASNS+JAK inhibitor group shASNS: short hairpin RNA targeting asparagine synthetase; JAK: Janus kinase

成功采用  $H_2O_2$  处理 ARPE-19 细胞构建细胞氧化应激损伤模型以研究 AMD 的机制, 该模型已然成为揭示 RPE 细胞衰老及 AMD 病理机制的重要工具<sup>[16]</sup>。故本次实验延续采用  $H_2O_2$  处理细胞构建 AMD 细胞模型。本实验结果发现 shASNS 组中 RPE 细胞增殖能力增强, 衰老 RPE 细胞数降低, 推测敲减 ASNS 可能促进 RPE 细胞的增殖, 并抑制其衰老和凋亡。



**图 11 各组细胞 KRT18、CTNNB1、TJP1 和 BEST1 蛋白表达电泳图** KRT18: 细胞角蛋白 18; CTNNB1: β-连环蛋白; TJP1: 紧密连接蛋白 1; BEST1: 视网膜离子通道蛋白; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; shASNS: 天冬酰胺合成酶短发夹 RNA; JAK: Janus 激酶

**Figure 11 Electrophoretogram of KRT18, CTNNB1, TJP1, and BEST1 proteins expression in different groups** KRT18: keratin 18; CTNNB1: β-Catenin; TJP1: tight junction protein 1; BEST1: bestrophin-1; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; shASNS: short hairpin RNA targeting asparagine synthetase; JAK: Janus kinase

在 AMD 患者中, RPE 细胞的老化是 AMD 发生和发展的早期事件, 并且与 AMD 的严重程度密切相关<sup>[22]</sup>。研究表明, RPE 细胞的衰老会导致其对光氧化应激的抵抗力降低, 从而加速细胞凋亡和功能丧失, 这一过程在 AMD 的病理生理中发挥着核心作用<sup>[23]</sup>。JAK/STAT 信号通路是一个进化上保守的信号通路, 由 JAK 家族和 STAT 家族共同组成, 在炎症过程中起重要作用<sup>[24-25]</sup>。虽然 AMD 的病因目前尚不清楚, 但有证据表明炎症在其发生和发展中起重要作用<sup>[26]</sup>。研究发现 JAK/STAT 信号通路的激活与 AMD 的发生和发展密切相关<sup>[27-28]</sup>。Duncan 等<sup>[29]</sup>发现 TLR3 激活后通过 NF-κB 诱导促炎细胞因子释放, 这些细胞因子与其受体结合后, 激活 JAK-STAT 信号通路, JAK-STAT 驱动 TLR3/NF-κB 正反馈循环导致炎症信号放大, 这可能与 AMD 病理机制相关。Hallak 等<sup>[30]</sup>研究发现患有自身免疫性疾病的人群中, JAK 抑制剂的使用能显著降低 AMD 发生风险。在本研究中, shASNS+JAK 抑制剂组和对照+JAK 抑制剂组中衰老的 RPE 细胞较对照组明显减少, 提示敲低 ASNS 或使用 JAK 抑制剂能降低 AMD 的风险, 进一步加深了 JAK/STAT 通路在 AMD 中的调控作用。本研究发现, ASNS 可能通过调节 JAK/STAT 通路影响 RPE 细胞衰老, shASNS 组 JAK2 mRNA 和蛋白表达较对照组降低, shASNS+JAK 抑制剂组 JAK2 mRNA 和蛋白表达较对照+JAK 抑制剂组降低, 表明下调 ASNS 可通过抑制 JAK 通路调节细胞存活和增殖。shASNS 组 ROS 水平较对照组显著

表 3 各组细胞 RPE 特征性蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x}\pm s, \%$ )

Table 3 Comparison of characteristic proteins expressions of RPE cells among different groups ( $\bar{x}\pm s, \%$ )

| 组别              | 样本量 | KRT18                    | CTNNB1                   | TJP1                     | BEST1                    |
|-----------------|-----|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 对照组             | 3   | 0.15±0.04                | 0.40±0.04                | 0.80±0.08                | 1.00±0.09                |
| shASNS 组        | 3   | 0.41±0.03 <sup>a</sup>   | 0.71±0.06 <sup>a</sup>   | 0.42±0.05 <sup>a</sup>   | 0.61±0.07 <sup>a</sup>   |
| 对照+JAK 抑制剂组     | 3   | 0.32±0.04 <sup>a</sup>   | 0.65±0.11 <sup>a</sup>   | 0.62±0.09 <sup>a</sup>   | 0.81±0.10 <sup>a</sup>   |
| shASNS+JAK 抑制剂组 | 3   | 0.68±0.07 <sup>abc</sup> | 1.02±0.13 <sup>abc</sup> | 0.23±0.04 <sup>abc</sup> | 0.40±0.08 <sup>abc</sup> |
| F 值             |     | 70.83                    | 22.42                    | 41.35                    | 26.94                    |
| P 值             |     | <0.001                   | <0.001                   | <0.001                   | <0.001                   |

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与 shASNS 组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与对照+JAK 抑制剂组比较,<sup>c</sup> $P<0.001$ (单因素方差分析,LSD- $t$  检验) RPE:视网膜色素上皮;KRT18:细胞角蛋白 18;CTNNB1:β-连环蛋白;TJP1:紧密连接蛋白 1;BEST1:视网膜离子通道蛋白;shASNS:天冬酰胺合成酶短发夹 RNA;JAK:Janus 激酶

Note:Compared with control group,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;compared with shASNS group,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;compared with control+JAK inhibitor group,<sup>c</sup> $P<0.001$ (One-way ANOVA,LSD- $t$  test) RPE:retinal pigment epitheliu;KRT18:keratin 18;CTNNB1:β-Catenin;TJP1:tight junction protein 1;BEST1:bestrophin-1;shASNS: short hairpin RNA targeting asparagine synthetase;JAK:Janus kinase

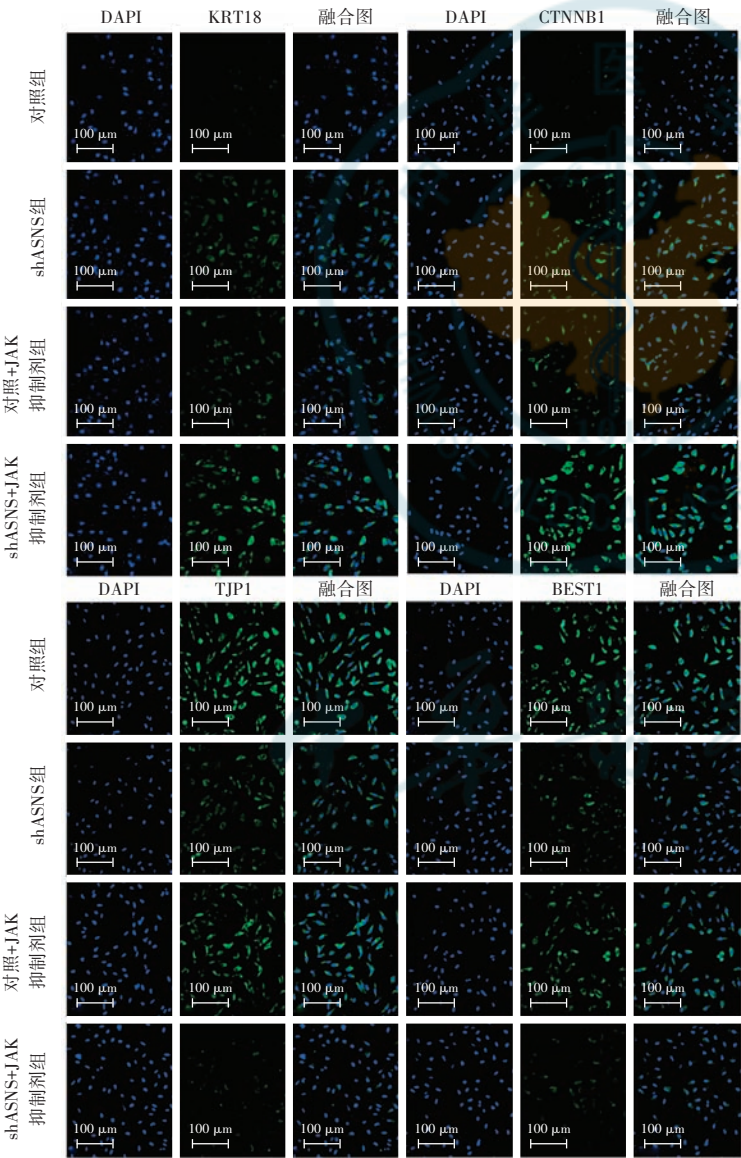


图 12 各组细胞蛋白免疫荧光染色图(异硫氰酸荧光素×200,标尺=100 μm) shASNS:天冬酰胺合成酶短发夹 RNA;JAK:Janus 激酶;KRT18:细胞角蛋白 18;CTNNB1:β-连环蛋白;TJP1:紧密连接蛋白 1;BEST1:视网膜离子通道蛋白

Figure 12 Immunofluorescence staining images of proteins expressions in different groups detected by immunofluorescence staining (FITC × 200, scale bar = 100 μm) shASNS: short hairpin RNA targeting asparagine synthetase; JAK: Janus kinase; KRT18: keratin 18; CTNNB1: β-Catenin; TJP1: tight junction protein 1; BEST1: bestrophin-1

降低,表明 ASNS 敲低可能增强细胞的抗氧化应激能力,推测 ASNS 可能是细胞氧化还原平衡的关键调节因子。流式细胞仪检测结果显示,shASNS 组细胞凋亡率下降、G2 期细胞增加,表明 ASNS 敲低可能导致 G2 期细胞增多,提示 ASNS 在细胞周期调控中可能发挥重要作用。MTT 实验结果显示,相对于对照组,shASNS 组、对照+JAK 抑制剂组和 shASNS+JAK 抑制剂组中细胞增殖速度加快;相对于 shASNS 组,对照+JAK 抑制剂组细胞增殖速度减慢、shASNS+JAK 抑制剂组中细胞增殖速度加快,提示抑制 ASNS 可能通过影响细胞代谢途径来促进细胞增殖。为进一步研究 ASNS 基因敲减对 RPE 细胞衰老及损伤的影响,本研究通过 β-半乳糖苷酶染色检测各组细胞衰老情况,结果显示,shASNS 组和对照+JAK 抑制剂组的细胞衰老程度相较于对照组显著降低,尤其是 shASNS+JAK 抑制剂组的衰老细胞比例显著降低。本研究进一步检测了各组衰老相关蛋白 p16、pRb 的表达,证实 shASNS 可抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 RPE 细胞衰老。

Western blot 结果显示,shASNS 组细胞 KRT18 和 CTNNB1 蛋白表达增加,而 TJP1 和 BEST1 蛋白表达下降,表明 ASNS 敲低改变了与衰老 RPE 细胞功能和完整性相关的关键标志物的表达。这种分子-表型关系证明了 ASNS 在维持细胞稳态中的重要性,并凸显了其作

为细胞存活和增殖失调相关疾病治疗靶点的潜力。同样对照+JAK 抑制剂组细胞 KRT18 和 CTNNB1 蛋白表达增加,而 TJP1 和 BEST1 蛋白表达下降,说明 JAK 通路的抑制可能与 RPE 细胞的特征性标志物表达增强相关,表明该通路在 RPE 细胞的生物学功能中可能扮演着复杂的调控角色。

本研究揭示了敲减 ASNS 可通过抑制 JAK 通路延缓 RPE 细胞的衰老,为 AMD 研究提供了新的视角。未来应进一步探讨 ASNS 在不同类型的 AMD,如湿性和干性 AMD 中的作用,以及深入研究 ASNS 或 JAK/STAT 通路调控机制,以实现 AMD 的早期预警和治疗。此外,进一步的动物模型实验和临床研究将有助于验证 ASNS 作为潜在治疗靶点的实际效果。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 丁杰:研究实施、数据分析、起草文章、论文撰写;辛向阳:酝酿和设计实验、审阅及修改文章、定稿;赵鑫:研究实施、数据整理、统计分析

## 参考文献

- [1] Fleckenstein M, Schmitz-Valckenberg S, Chakravarthy U. Age-related macular degeneration: a review [J]. JAMA, 2024, 331 (2) : 147-157. DOI: 10. 1001/jama. 2023. 26074.
- [2] Fleckenstein M, Keenan T, Guymer RH, et al. Age-related macular degeneration [J]. Nat Rev Dis Primers, 2021, 7 (1) : 31. DOI: 10. 1038/s41572-021-00265-2.
- [3] 雷艺, 颜华. 衰老与年龄相关性黄斑变性 [J]. 中华实验眼科杂志, 2024, 42 (1) : 76-79. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20200602-00392.
- Lei Y, Yan H. Aging and age-related macular degeneration [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2024, 42 (1) : 76-79. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20200602-00392.
- [4] Lee KS, Lin S, Copland DA, et al. Cellular senescence in the aging retina and developments of senotherapies for age-related macular degeneration [J]. J Neuroinflammation, 2021, 18 (1) : 32. DOI: 10. 1186/s12974-021-02088-0.
- [5] Chiu M, Taurino G, Bianchi MG, et al. Asparagine synthetase in cancer: beyond acute lymphoblastic leukemia [J]. Front Oncol, 2019, 9 : 1480. DOI: 10. 3389/fonc. 2019. 01480.
- [6] Deng L, Yao P, Li L, et al. p53-mediated control of aspartate-asparagine homeostasis dictates LKB1 activity and modulates cell survival [J]. Nat Commun, 2020, 11 (1) : 1755. DOI: 10. 1038/s41467-020-15573-6.
- [7] Ma Y, Zhao C, Feng J, et al. MSC-sEVs exacerbate senescence by transferring bisecting GlcNAcylated GPNMB [J]. Stem Cell Res Ther, 2025, 16 (1) : 23. DOI: 10. 1186/s13287-025-04140-9.
- [8] Yu JJ, Azzam DB, Chwa M, et al. Age-related macular degeneration (AMD) transmittochondrial cybrids protected from cellular damage and death by human retinal progenitor cells (hRPCs) [J/OL]. Stem Cells Int, 2021, 2021 : 6655372 [2024-10-22]. http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/33628267. DOI: 10. 1155/2021/6655372.
- [9] Owen KL, Brockwell NK, Parker BS. JAK-STAT signaling: a double-edged sword of immune regulation and cancer progression [J]. Cancers (Basel), 2019, 11 (12) : 2002. DOI: 10. 3390/cancers11122002.
- [10] Xin P, Xu X, Deng C, et al. The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases [J/OL]. Int Immunopharmacol, 2020, 80 : 106210 [2024-10-22]. http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/31972425. DOI: 10. 1016/j. intimp. 2020. 106210.
- [11] Xue C, Yao Q, Gu X, et al. Evolving cognition of the JAK-STAT signaling pathway: autoimmune disorders and cancer [J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8 (1) : 204. DOI: 10. 1038/s41392-023-01468-7.
- [12] Favoino E, Prete M, Catacchio G, et al. Working and safety profiles of JAK/STAT signaling inhibitors. Are these small molecules also smart? [J/OL]. Autoimmun Rev, 2021, 20 (3) : 102750 [2024-10-22]. http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/33482338. DOI: 10. 1016/j. autrev. 2021. 102750.
- [13] Hollingsworth TJ, Wang X, White WA, et al. Chronic proinflammatory signaling accelerates the rate of degeneration in a spontaneous polygenic model of inherited retinal dystrophy [J/OL]. Front Pharmacol, 2022, 13 : 839424 [2024-10-22]. http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/35387333. DOI: 10. 3389/fphar. 2022. 839424.
- [14] Zhang X, Hu Q, Jiang B, et al. Role of interleukin-21 in retinal ischemia-reperfusion injury: unveiling the impact on retinal ganglion cell apoptosis [J/OL]. Int Immunopharmacol, 2024, 128 : 111480 [2024-10-22]. http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/38194747. DOI: 10. 1016/j. intimp. 2023. 111480.
- [15] Liisborg C. Age-related macular degeneration and myeloproliferative neoplasms - a common pathway [J]. Acta Ophthalmol, 2022, 100 Suppl 271 : 3-35. DOI: 10. 1111/aos. 15247.
- [16] Zhang X, Zhao X, Xin X. PCSK7, a potential target for the treatment of age-related macular degeneration: inhibition of retinal epithelial cell death [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2024, 17 (10) : 371-380. DOI: 10. 62347/LEHU9944.
- [17] Green CR, Bonelli R, Ansell B, et al. Divergent amino acid and sphingolipid metabolism in patients with inherited neuro-retinal disease [J/OL]. Mol Metab, 2023, 72 : 101716 [2024-10-26]. http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/36997154. DOI: 10. 1016/j. molmet. 2023. 101716.
- [18] Jiang H, Zhang H, Jiang X, et al. Overexpression of D-amino acid oxidase prevents retinal neurovascular pathologies in diabetic rats [J]. Diabetologia, 2021, 64 (3) : 693-706. DOI: 10. 1007/s00125-020-05333-y.
- [19] Zhang X, Xia M, Wu Y, et al. Branched-chain amino acids metabolism and their roles in retinopathy: from relevance to mechanism [J]. Nutrients, 2023, 15 (9) : 2161. DOI: 10. 3390/nu15092161.
- [20] Kersten E, Dammeier S, Ajana S, et al. Metabolomics in serum of patients with non-advanced age-related macular degeneration reveals aberrations in the glutamine pathway [J/OL]. PLoS One, 2019, 14 (6) : e0218457 [2024-10-26]. http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/31220133. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0218457.
- [21] Lafins I, Chung W, Kelly RS, et al. Human plasma metabolomics in age-related macular degeneration: meta-analysis of two cohorts [J]. Metabolites, 2019, 9 (7) : 127. DOI: 10. 3390/metabo9070127.
- [22] Kaamiranta K, Blasiak J, Liton P, et al. Autophagy in age-related macular degeneration [J]. Autophagy, 2023, 19 (2) : 388-400. DOI: 10. 1080/15548627. 2022. 2069437.
- [23] Maurya M, Bora K, Blomfield AK, et al. Oxidative stress in retinal pigment epithelium degeneration: from pathogenesis to therapeutic targets in dry age-related macular degeneration [J]. Neural Regen Res, 2023, 18 (10) : 2173-2181. DOI: 10. 4103/1673-5374. 369098.
- [24] Luo Y, Alexander M, Gadina M, et al. JAK-STAT signaling in human disease: from genetic syndromes to clinical inhibition [J]. J Allergy Clin Immunol, 2021, 148 (4) : 911-925. DOI: 10. 1016/j. jaci. 2021. 08. 004.
- [25] Hu X, Li J, Fu M, et al. The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6 (1) : 402. DOI: 10. 1038/s41392-021-00791-1.
- [26] Arrigo A, Aragona E, Bandello F. The role of inflammation in age-related macular degeneration: updates and possible therapeutic approaches [J]. Asia Pac J Ophthalmol (Phila), 2023, 12 (2) : 158-167. DOI: 10. 1097/APO. 0000000000000570.
- [27] Byrne EM, Llorián-Salvador M, Tang M, et al. IL-17A damages the blood-retinal barrier through activating the janus kinase 1 pathway [J]. Biomedicine, 2021, 9 (7) : 831. DOI: 10. 3390/biomedicine9070831.
- [28] Chen X, Sun R, Yang D, et al. LINC00167 regulates RPE differentiation by targeting the miR-203a-3p/SOCS3 axis [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2020, 19 : 1015-1026. DOI: 10. 1016/j. omtn. 2019. 12. 040.
- [29] Duncan RS, Rohowetz L, Vogt A, et al. Repeat exposure to polyinosinic: polycytidylic acid induces TLR3 expression via JAK-STAT signaling and synergistically potentiates NFκB-RelA signaling in ARPE-19 cells [J/OL]. Cell Signal, 2020, 66 : 109494 [2024-10-26]. http://www. ncbi. nlm. nih. gov/pubmed/31809875. DOI: 10. 1016/j. cellsig. 2019. 109494.
- [30] Hallak JA, Abbasi A, Goldberg RA, et al. Janus kinase inhibitor therapy and risk of age-related macular degeneration in autoimmune disease [J]. JAMA Ophthalmol, 2024, 142 (8) : 750-758. DOI: 10. 1001/jamaophthalmol. 2024. 2376.

(收稿日期:2024-12-07 修回日期:2025-06-29)

(本文编辑:张宇 骆世平)

