

· 实验研究 ·

Opn5 通过抑制 Egr-1 核转位负调控视网膜神经节细胞自噬

佟莉杨 和丹雪 傅晨曦 张玲敏 华超群

温州医科大学宁波市眼科医院, 宁波 315040

通信作者: 佟莉杨, Email: liyang_tong20@126.com

【摘要】 目的 探讨神经视蛋白(Opn5)是否通过调控早期生长反应因子 1(Egr-1)的核转位影响小鼠视网膜神经节细胞(RGC)的自噬活性。**方法** 体外培养 RGC-5 细胞,构建 Opn5-短发夹 RNA(shRNA)慢病毒感染细胞作为 shOpn5 组,以 scramble shRNA 慢病毒感染细胞作为 shRNA 对照组。采用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法检测感染后 0、24、48、72、96 和 120 h 细胞增殖活性;采用流式细胞术分析细胞凋亡率;分别采用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测 Opn5、Egr-1 及自噬标志物(LC3-II/I、p62、Beclin-1)mRNA 和蛋白表达;采用免疫荧光双染色法观察 Opn5 与 Egr-1、LC3 和 p62 的共定位;采用 mRFP-GFP-LC3 串联荧光蛋白系统监测自噬流;采用免疫共沉淀法验证 Opn5 与 Egr-1 相互作用;采用核质分离实验分析 Egr-1 亚细胞定位。**结果** 各组细胞随感染后时间延长,增殖活性呈上升趋势。与 shRNA 对照组相比,shOpn5 组感染后 96 和 120 h 细胞增殖活性明显降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$);shOpn5 组细胞在感染后 72 h 的凋亡率为 $(9.88 \pm 0.17)\%$,高于 shRNA 对照组的 $(5.44 \pm 0.15)\%$,差异有统计学意义($P < 0.001$)。shOpn5 组 Opn5 及 Egr-1 mRNA 和蛋白相对表达量均明显低于 shRNA 对照组,差异有统计学意义(均 $P < 0.001$)。shOpn5 组 LC3-II/I 比值、Beclin-1 蛋白相对表达量均高于 shRNA 对照组,p62 蛋白相对表达量低于 shRNA 对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$)。双荧光系统显示,与 shRNA 对照组比较,shOpn5 组红色荧光强度增强,自噬流增强。免疫共沉淀法显示 Opn5 与 Egr-1 直接结合,shOpn5 组 Opn5 与 Egr-1 相互作用较 shRNA 对照组减弱。核质分离实验结果显示,shRNA 对照组和 shOpn5 组 Egr-1 蛋白核质分布比例分别为 $(80.53 \pm 7.96)\%$ 和 $(13.47 \pm 1.48)\%$,组间比较差异有统计学意义($P < 0.001$)。**结论** Opn5 通过介导 Egr-1 的核转位发挥转录调控功能,进而负向调节 RGCs 的自噬活性。这一发现为阐明光感受器蛋白 Opn5 在近视发生和发展中的作用提供了新机制。

【关键词】 神经视蛋白;早期生长反应因子 1;视网膜神经节细胞;自噬;核转位

基金项目: 浙江省基础公益计划项目(LGF22H120006);浙江省医药卫生科技计划项目(2024KY362);宁波市自然科学基金项目(2022J037)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20250514-00152

Negative regulation of autophagy in retinal ganglion cells by Opn5 through inhibiting Egr-1 nuclear translocation

Tong Liyang, He Danxue, Fu Chenxi, Zhang Lingmin, Hua Chaoqun
Ningbo Eye Hospital, Wenzhou Medical University, Ningbo 315040, China
Corresponding author: Tong Liyang, Email: liyang_tong20@126.com

【Abstract】 Objective To investigate whether neuropsin (Opn5) affects the autophagy in mouse retinal ganglion cells (RGCs) by regulating the nuclear translocation of early growth response 1 (Egr-1). **Methods** RGC-5 cells were cultured *in vitro*. Cells transfected with Opn5-short hairpin RNA (shRNA) lentivirus served as the shOpn5 group and cells transfected with scramble shRNA served as the shRNA control group. Cell proliferation was detected by Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay before transfection, and at 24, 48, 72, 96 and 120 hours after transfection, and apoptosis was analyzed by flow cytometry. Reverse transcription-quantitative qPCR and Western blot were performed to detect the expression of Opn5, Egr-1, and autophagy markers (LC3-II/I ratio, p62, Beclin-1). The colocalization of Opn5 with Egr-1, LC3, or p62 was examined by double immunofluorescence staining. Autophagic flux was evaluated using the mRFP-GFP-LC3 tandem fluorescent protein system. The interaction between Opn5 and Egr-1 was verified by co-immunoprecipitation (Co-IP), and the subcellular localization of Egr-1 was analyzed by nuclear-cytoplasmic fractionation. **Results** Compared with the shRNA control group, the cell proliferation rates were significantly reduced at 96 and 120 hours after infection in the shOpn5 group (both $P < 0.001$). The apoptosis rates at 72 hours after infection were $(9.88 \pm 0.17)\%$ and $(5.44 \pm 0.15)\%$ in the shOpn5 group and the shRNA control group, respectively, with a significant difference between them ($P < 0.001$). Compared with the shRNA control group, both mRNA and protein expression levels of Opn5 and Egr-1 were significantly decreased, and the expression levels of the LC3-II/I ratio and Beclin-1 proteins were upregulated, while the expression level of p62 was significantly decreased in the shOpn5 group (all $P < 0.001$). Dual fluorescence system revealed enhanced autophagic

flux. Co-IP confirmed a direct binding between Opn5 and Egr-1 in the shRNA control group, and the binding was reduced in the shOpn5 group. The results of the nuclear-cytoplasmic fractionation assay showed that the ratios of nuclear to cytoplasmic distribution of Egr-1 protein in the shRNA control group and the shOpn5 group were $(80.53 \pm 7.96)\%$ and $(13.47 \pm 1.48)\%$, respectively, with a significant difference between them ($P < 0.001$). **Conclusions** Opn5 negatively regulates autophagy in RGCs by mediating the nuclear translocation of Egr-1, thereby influencing Egr-1 transcriptional activity. This finding provides a novel mechanistic insight into the role of photoreceptor protein Opn5 in the development of myopia.

[Key words] Neuropsin; Early growth response 1; Retinal ganglion cells; Autophagy; Nuclear translocation

Fund program: Zhejiang Provincial Basic Public Welfare Research Program (LGF22H120006); Zhejiang Provincial Medical and Health Science and Technology Project (2024KY362); Ningbo Natural Science Foundation (2022J037)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20250514-00152

近视已成为全球范围内发病率高、影响人群广的视觉健康问题。世界卫生组织数据显示,全球近视患病率已从 2000 年的 22% 攀升至 2020 年的 34%, 预计 2050 年将影响全球近 50% 的人口^[1]。近年来,近视发病年龄呈低龄化趋势,已成为儿童视力障碍的首要原因。神经视蛋白(neuropsin, Opn5)是一种对 380 nm 紫外光敏感的非视觉视蛋白,主要表达于视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)。研究表明,360~400 nm 波段的可见紫光(violet light, VL)可通过 Opn5 依赖的途径,显著抑制透镜离焦诱导的小鼠近视进展^[2]。该保护作用的潜在机制主要包括:(1)上调具有近视保护作用的基因——早期生长反应因子 1 (early growth response 1, Egr-1) 的表达;(2)调控 RGCs 的正视化功能。RGCs 作为视网膜向中枢神经系统传递视觉信号的关键神经元,其功能状态被认为在调节眼轴生长和屈光发育中发挥重要作用^[3-5]。值得注意的是,形觉剥夺作为诱导近视的经典方法,可导致 RGCs 数量减少并伴随其功能异常^[6]。这种 RGCs 的病理改变,可能通过激活细胞自噬与凋亡等途径,参与并加剧近视进展^[7]。Egr-1 作为重要的转录因子,需转位至细胞核内才能调控下游基因表达。已有研究指出,Egr-1 可抑制细胞自噬,进而诱导细胞凋亡^[8]。然而,主要定位于细胞质的 Opn5,是否通过调控 Egr-1 的核转位来影响 RGCs 的自噬功能,目前尚不清楚。本研究通过构建 Opn5 敲减的 RGC-5 细胞模型,系统探究 Opn5-Egr-1 通路调控自噬的分子机制,旨在为近视防控提供新的潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂

小鼠视网膜神经节细胞系 RGC-5 购自中国科学院上海细胞库。Opn5 短发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA)慢病毒颗粒(上海吉凯基因医学科技公司);凋亡检测试剂盒(美国 BD 公司);Trizol 试剂盒(美国

Invitrogen 公司);PrimerScript™ 反转录试剂盒、SYBR Green RT-PCR 试剂盒(大连宝生物工程有限公司);胎牛血清、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);DMEM 基础培养基(美国 HyClone 公司);细胞计数试剂盒 8 (Cell Counting Kit-8, CCK-8)(上海贝博生物科技有限公司);全蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白含量检测试剂盒(南京凯基生物科技有限公司);青链霉素、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)、核质分离试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);兔抗 Opn5 多克隆抗体(美国 Sigma 公司);兔抗 Egr-1 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)多克隆抗体、FITC 标记山羊抗兔二抗、Fluor594 标记山羊抗鼠二抗(美国 Affinity 公司);兔抗 p62、Beclin-1 和 LC3B 多克隆抗体,荧光标记鼠抗 LC3 和 p62 抗体(美国 Abcam 公司);荧光标记兔抗 Opn5 抗体(美国 Thermo 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、慢病毒转染及分组处理 将 RGC-5 细胞按 5×10^4 个/ml 的密度接种于 6 孔板中,待细胞融合度达 60%~70% 时进行慢病毒感染。根据预实验确定最佳感染复数(MOI=20),分别将浓缩的 scramble shRNA 慢病毒颗粒(shRNA 对照组)或 Opn5 靶向的 shRNA 慢病毒颗粒(shOpn5 组)与含有 5 μ g/ml 聚凝胺的完全培养基混合,加入细胞培养孔中;感染 16 h 后,更换为新鲜完全培养基继续培养;感染 72 h 后,于荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白表达情况以初步评估转染效率;随后,改用含有 2 μ g/ml 嘌呤霉素的培养基进行持续筛选,直至获得稳定转染的细胞系。通过流式细胞术进一步确认稳定细胞系的 GFP 阳性率均 > 90%。shOpn5 序列为:5'-CCGGCGCTATCTGAAGATCTGTTATCTCGAGATAACAGATCTTCAGATAGCGTTT TTTG-3'。将上述构建的稳定转染细胞系置于含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素的 DMEM 培养基中,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养,2~3 d 更换一次培

培养基;待细胞生长至约 80% 融合时,用含质量分数 0.25% 胰蛋白酶进行消化传代,用于后续实验。

1.2.2 CCK-8 法检测各组细胞增殖活性 取对数生长期细胞,以 1.5×10^5 个/ml 的密度接种于 96 孔板(每孔 100 μ l),培养 24 h 后进行分组感染,继续于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养。分别于感染后 0、24、48、72、96 和 120 h,每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 2 h 后,使用酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光度(A)值。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测各组细胞中 Opn5 和 Egr-1 mRNA 表达 按照 1.2.1 所述方法分组处理细胞,分别于感染前及感染后 72 h 收集细胞,弃去培养基,使用预冷的 PBS 轻柔洗涤细胞 2 次;每孔加入 0.25% 胰蛋白酶消化约 1 min,待细胞变圆后,加入含血清的完全培养基终止消化;将细胞悬液转移至离心管,于 4 $^{\circ}$ C、1 000 r/min 离心 5 min,收集细胞沉淀。所有操作在冰上进行以维持 RNA 稳定性。采用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,使用微量分光光度计检测 RNA 纯度与浓度,要求 A260/A280 比值介于 1.8~2.0。将各组 RNA 样本浓度统一调整为 500 ng/ μ l,并使用 PrimeScript RT Master Mix 试剂盒将 1 μ g 总 RNA 反转录为 cDNA。引物序列: Opn5 正向 5'-GCCTGGATTCCTTATGCG-3',反向 5'-TGACCTGGTAGATGATTGG-3'; Egr-1 正向 5'-CGATGGTGGAGACGAGTTA-3',反向 5'-AAGAGGTCGGAGGATTGG-3'; GAPDH 正向 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3',反向 5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'。所用引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。实时荧光定量 PCR 反应体系如下: SYBR Premix Ex Taq II 10 μ l,正、反向引物(10 μ mol/L)各 0.8 μ l, cDNA 模板 2 μ l,灭菌双蒸水 6.4 μ l。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火延伸 30 s,共 40 个循环。反应结束后,通过熔解曲线分析确认产物特异性。以 GAPDH 基因作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 Opn5 及 Egr-1 mRNA 相对表达量。所有实验均独立重复 3 次。

1.2.4 Western blot 法检测各组细胞中 Opn5、Egr-1、LC3-II/I、P62、Beclin-1 蛋白表达 分别收集生长状态良好的 shRNA 对照组与 shOpn5 组稳定感染细胞(6 孔板培养);弃去培养基,用预冷的 PBS 轻柔洗涤细胞 3 次;每孔加入 180 μ l 含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,冰上裂解 30 min;用细胞刮收集裂解物,转移至预冷的 1.5 ml 离心管中,冰浴 10 min,随后于 4 $^{\circ}$ C、15 000 $\times$ g 条件下离心 15 min,小心吸取上清液。采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定上清液中的蛋白浓度;加入 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液调整蛋白浓度后,煮沸 10 min

使蛋白变性,每孔上样 15 μ g 蛋白,经 10% 的 SDS-PAGE 电泳分离后转印至 PVDF 膜;将膜置于快速封闭液室温封闭 30 min, TBST(含 0.1% Tween-20)洗膜 3 次(每次 5 min)后,分别加入 LC3B(1:1 000)、P62(1:5 000)、Beclin-1(1:2 000)和 GAPDH(1:3 000)一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;TBST 洗膜 3 次(每次 5 min),加入相应二抗(1:5 000)室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次(每次 5 min)。使用超敏 ECL 化学发光试剂盒显影, Bio-RAD 凝胶成像系统采集图像, ImageJ 软件分析条带灰度值,以 GAPDH 为内参照,计算各目标蛋白相对表达量。

1.2.5 免疫荧光双标记法检测 Opn5 与 LC3-II/I、P62、Egr-1 的定位及表达 将两组细胞按 2×10^5 个/ml 密度接种到 24 孔板,置于培养箱中培养 24 h,吸弃培养液, PBS 清洗 3 次(每次 5 min);加入预冷的 4% 多聚甲醛溶液(PBS 配制),室温固定 15 min; PBS 清洗 3 次后,加入含 0.3% Triton X-100 的 PBS 溶液,室温破膜 10 min; PBS 清洗 3 次,加入 1% BSA,室温封闭 1 h;吸弃封闭液,直接加入用 1% BSA 稀释的 Opn5(1:200)、LC3-I/II(1:200)、p62(1:200)、Egr-1(1:100)一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; PBS 清洗 3 次(每次 5 min),加入相应 FITC 标记二抗(1:200)和 Fluor594 标记二抗(1:200),室温避光孵育 1 h;取出细胞爬片,倒扣在滴有 DAPI 的载玻片上,抗荧光淬灭剂封片,采用激光共聚焦显微镜观察并拍照。所有样本在共聚焦显微镜下以相同参数采集图像: 63 $\times$ 油镜,激光强度 10%,曝光时间 200 ms, Z-stack 步长 0.5 μ m,确保无像素饱和(最大像素值<4 095)。采用 Image J 软件进行 Rolling Ball 背景扣除(半径=50 像素)。目标蛋白(Opn5 或 p62)的荧光强度定义为: Mean Intensity = [$\sum$ (目标区域像素值-背景像素值)/目标区域面积]。为评估 Opn5 与 p62 的共定位情况,选取 30 个以上细胞,分别提取其 Opn5 通道(FITC,绿色)和 p62 通道(若无单独 p62 荧光通道,则使用 LC3 双染中的相应信号或进行单独染色)图像中目标区域的荧光强度值。采用 Pearson 相关系数评估两通道荧光信号的空间重叠程度,相关系数下降幅度 = $(1 - r_{\text{shOpn5组}}/r_{\text{shRNA对照组}}) \times 100\%$ 。

1.2.6 免疫共沉淀法检测 Opn5 与 Egr-1 的相互作用 参照 1.2.4 方法收集细胞,加入裂解液于 4 $^{\circ}$ C 裂解 30 min,于 4 $^{\circ}$ C、15 000 $\times$ g 条件下离心 10 min,取上清并采用 BCA 法测定总蛋白浓度;加入 Opn5 特异性一抗稀释倍数于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,再加入 Protein A/G 琼脂糖磁珠于 4 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,于 3 000 r/min(离心半径为

8.6 cm) 条件下离心 5 min 收集磁珠,裂解缓冲液洗涤 3~4 次,加入 1×SDS 上样缓冲液于 95 ℃ 加热 5 min 洗脱蛋白。后续 Western blot 步骤同 1.2.4,加入 Opn5 (1:1 000)、Egr-1 (1:5 000) 和 GAPDH (1:3 000) 一抗及相应二抗进行孵育,并进行 ECL 显影。

1.2.7 核质分离法检测 Egr-1 蛋白在细胞核和细胞质中的分布 取约 $5 \times 10^6 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞,于 4 ℃、500×g 条件下离心 3 min,小心吸除培养基并尽量弃净液体;用预冷的 PBS 洗涤细胞沉淀 2 次,向细胞沉淀加入 400 μl 预冷的核质分离提取液 A,涡旋振荡混匀,置于冰上振荡裂解 20~30 min;在 4 ℃、1 200×g 条件下离心 5 min,收集上清液转移至另一预冷的洁净离心管中,即为胞浆组分;剩余细胞沉淀用 PBS 重悬,于 4 ℃、2 000×g 条件下离心 5 min,弃上清,所得沉淀即为细胞核组分,用 200 μl 保存液 B 重悬;取各组分进行后续 Western blot 分析。核质分离操作全程在冰上或 4 ℃ 环境下进行,以维持蛋白稳定性。

1.2.8 流式细胞分析术检测各组细胞凋亡情况 各组细胞于慢病毒感染并完成嘌呤霉素筛选后 72 h 弃去培养基,用预冷的 PBS 轻柔洗涤细胞 1 次;加入 0.25% 胰蛋白酶,于 37 ℃ 条件下消化约 1 min;终止消化后转移至离心管中,于 4 ℃、300×g 条件下离心 5 min,收集细胞沉淀;用预冷的 PBS 重悬细胞,并调整细胞密度至 1×10^6 个/ml。取 100 μl 细胞悬液至流式管中,依次加入 5 μl Annexin V-PE 和 5 μl 7-AAD 染色液,轻轻混匀后,于室温 (25 ℃) 避光条件下孵育 15 min;孵育结束后,立即向每管中加入 400 μl 预冷的 1×Annexin V 结合缓冲液,并于 1 h 内上机检测细胞凋亡率。以 Annexin V-PE 为横坐标、7-AAD 为纵坐标设立四象限,细胞凋亡率为早期凋亡细胞 (Q3 象限) 与晚期凋亡细胞 (Q2 象限) 百分比之和。每组实验独立重复 6 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 24.0 软件进行数据分析,采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计作图。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。两组间各参数比较采用独立样本 *t* 检验。采用双尾检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Opn5 敲减效率验证及敲减后 Egr-1 的表达变化

实时荧光定量 PCR 结果显示,shOpn5 组 Opn5 mRNA 相对表达量为 0.51 ± 0.04 ,明显低于 shRNA 对照组,差异有统计学意义 ($t = 16.47, P < 0.001$),shOpn5

组细胞敲减效率为 $(48.30 \pm 5.22) \%$;shOpn5 组 Egr-1 mRNA 相对表达量为 0.46 ± 0.03 ,明显低于 shRNA 对照组,差异有统计学意义 ($t = 14.91, P < 0.001$)。Western blot 结果显示,shOpn5 组 Opn5 和 Egr-1 蛋白相对表达量为 0.13 ± 0.02 和 0.19 ± 0.03 ,均明显低于 shRNA 对照组的 1.46 ± 0.03 和 1.71 ± 0.07 ,差异均有统计学意义 ($t = 32.14, 87.33$, 均 $P < 0.001$) (图 1)。

2.2 各组细胞增殖活性和凋亡情况

CCK-8 检测结果显示,细胞增殖活力随培养时间延长而增强。shOpn5 组细胞在感染后 48 h 即开始表现出增殖抑制趋势,且在感染后 96 与 120 h 的增生 A 值明显低于 shRNA 对照组,差异具有统计学意义 (均 $P < 0.001$) (图 2)。

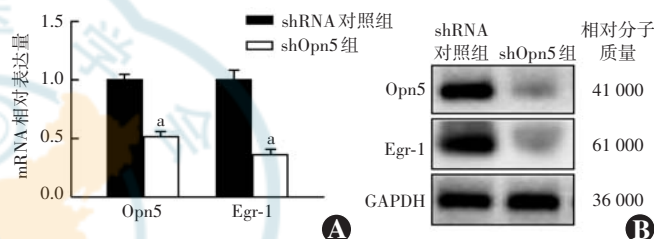


图 1 各组 Opn5 和 Egr-1 mRNA 及蛋白表达 A: 2 个组细胞 Opn5 和 Egr-1 mRNA 相对表达水平比较 与 shRNA 对照组相比, $^a P < 0.001$ (独立样本 *t* 检验, $n = 3$) B: 各组 Opn5 和 Egr-1 的蛋白表达电泳图 shRNA: 短发夹 RNA; Opn5: 神经视蛋白; Egr-1: 早期生长反应因子 1; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Figure 1 The expression of Opn5 and Egr-1 mRNA and protein between two groups A: Comparison of relative mRNA expression levels of Opn5 and Egr-1 between the two groups Compared with the shRNA control group, $^a P < 0.001$ (Independent samples *t*-test, $n = 3$) B: Electrophoretogram of Opn5 and Egr-1 protein expression shRNA: short hairpin RNA; Opn5: neuropsin; Egr-1: early growth response 1; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

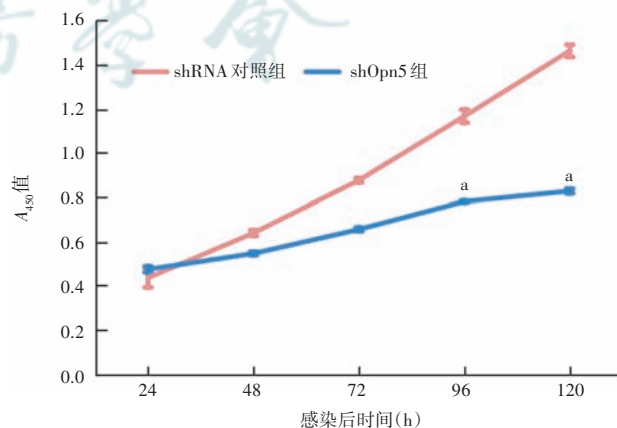


图 2 各组慢病毒感染后不同时间点增殖活性比较 与 shRNA 对照组相比, $^a P < 0.01$ (独立样本 *t* 检验, $n = 3$) shRNA: 短发夹 RNA; Opn5: 神经视蛋白

Figure 2 Comparison of cell proliferation activity at different time points after lentiviral infection Compared with the shRNA control group, $^a P < 0.01$ (Independent samples *t*-test, $n = 3$) shRNA: short hairpin RNA; Opn5: neuropsin

流式细胞术检测细胞凋亡的结果显示,在感染后 72 h, shOpn5 组细胞的凋亡率为 $(9.88 \pm 0.17)\%$,显著高于 shRNA 对照组的 $(5.44 \pm 0.15)\%$,差异具有统计学意义($t = -33.135, P < 0.001$)(图 3)。

2.3 各组自噬相关蛋白表达比较

免疫荧光共定位分析结果显示,与 shRNA 对照组相比,shOpn5 组细胞中 LC3 的荧光信号强度明显增强,而 p62 的荧光信号强度则明显减弱(图 4)。Opn5 与 p62 的共定位系数下降幅度为 $(35 \pm 6)\%$,提示 Opn5 敲低后与自噬体标志物的空间共定位关系发生了显著改变。mRFP-GFP-LC3 双荧光自噬流检测结果显示,shOpn5 组细胞 mRFP 荧光信号的自噬溶酶体平均荧光强度为 22.90 ± 1.84 ,显著高于 shRNA 对照组的 10.60 ± 0.77 ($t = 4.16, P < 0.01$)(图 5),表明自噬体与溶酶体融合及后续降解过程增强,即自噬流活性显著提升。

PCR 检测结果显示,shOpn5 组 LC3B-II 和 Beclin-1 的相对表达量分别为 1.82 ± 0.20 和 2.34 ± 0.27 ,均明显高于 shRNA 对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)(图 6A)。Western blot 结果显示,与 shRNA 对照组相比,shOpn5 组细胞中 LC3-II 和 Beclin-1 蛋白相对表达量明显升高,而 p62 蛋白相对表达量明显降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$)(图 6B,表 1)。

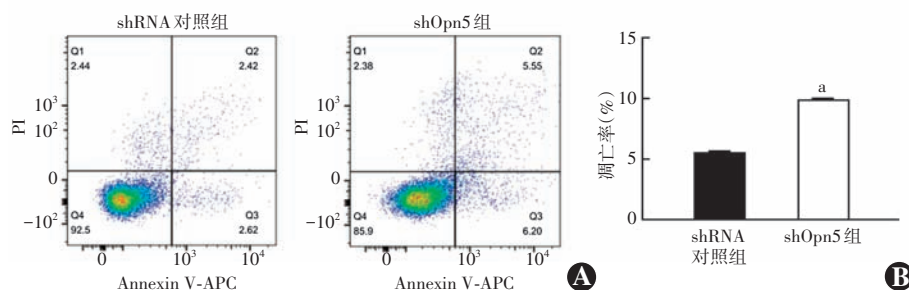


图 3 各组感染后 72 h 细胞凋亡率比较 A: 各组细胞凋亡流式细胞图 B: 各组细胞凋亡率比较 与 shRNA 对照组相比, $^*P < 0.001$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) shRNA: 短发夹 RNA; Opn5: 视神经蛋白

Figure 3 Comparison of apoptosis rates of cells 72 hours after infection between the two groups A: Flow cytometry plot of cell apoptosis in the two groups B: Comparison of apoptosis rates between the two groups Compared with the shRNA control group, $^*P < 0.001$ (Independent samples t -test, $n = 3$) shRNA: short hairpin RNA; Opn5: neuropsin

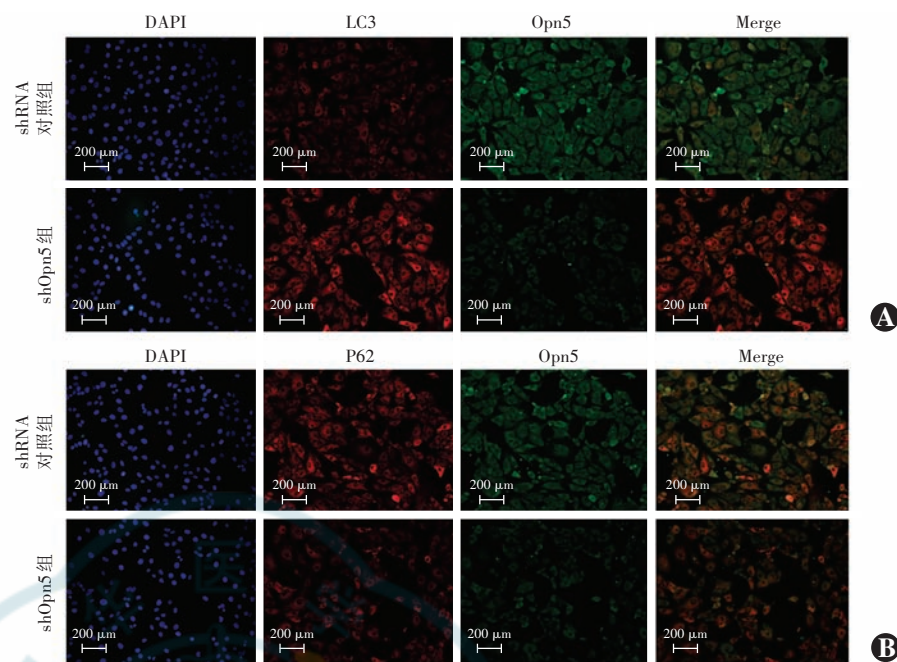


图 4 各组 Opn5 与 LC3 和 P62 免疫荧光双染色图($\times 200$, 标尺 = 200 μm) A: Opn5 与 LC3 的免疫荧光染色图 B: Opn5 与 P62 的免疫荧光染色图 Opn5: 神经视蛋白; LC3: 微管相关蛋白 1 轻链 3; shRNA: 短发夹 RNA

Figure 4 Fluorescence staining images of Opn5, LC3, and P62 in each group ($\times 200$, scale bar = 200 μm) A: Immunofluorescence staining images of Opn5 and LC3 B: Immunofluorescence staining images of Opn5 and P62 Opn5: neuropsin; LC3: microtubule-associated protein 1 light chain 3; shRNA: short hairpin RNA

2.4 Opn5 与 Egr-1 共定位分析及分子互作验证

免疫共沉淀实验证实 Opn5 与 Egr-1 直接结合, shOpn5 组 2 个蛋白相互作用较 shRNA 对照组减弱(图 7A);免疫荧光结果显示,shOpn5 组 Opn5 与 Egr-1 蛋白荧光强度均较 shRNA 对照组下降,Opn5 和 Egr-1 共定位信号减少,共定位区域主要在细胞质中(图 7B)。核质分离实验结果显示,与 shRNA 对照组比较,shOpn5 组 Egr-1 在细胞质中的蛋白含量增多,在细胞核中蛋白含量减少;shRNA 对照组和 shOpn5 组 Egr-1 蛋白核质分布比例分别为 $(80.53 \pm 7.96)\%$ 和 $(13.47 \pm 1.48)\%$,差异有统计学意义($t = 31.60, P < 0.001$)(图 8)。

3 讨论

户外环境对近视的保护作用已成为学界共识,其机制与光照强度、光谱成分等多种因素相关。近年来研究提示,VL 可能是其中起调控作用的关键环境信号之一^[2,9-10],但其在视网膜细胞中的具体作用靶点与分子机制尚不明

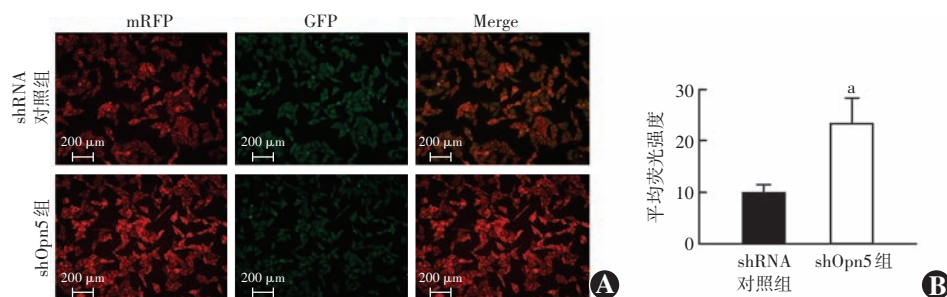


图 5 双荧光染色观察各组细胞自噬情况 A: 各组细胞 mRFP-GFP-LC3 双荧光染色图 ($\times 200$, 标尺 = 200 μm) mRFP 标记 LC3, GFP 指示自噬体及其与溶酶体融合形成自噬溶酶体, merge 后形成的黄色荧光斑点示自噬溶酶体 B: 各组 mRFP-GFP-LC3 双荧光强度比较 与 shRNA 对照组相比, $^aP < 0.01$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) Opn5: 神经视蛋白; LC3: 微管相关蛋白 1 轻链 3; shRNA: 短发夹 RNA

Figure 5 Autophagy status in each group detected by dual-fluorescence system mRFP-GFP-LC3

A: mRFP-GFP-LC3 dual-fluorescence staining images of each group ($\times 200$, scale bar = 200 μm) mRFP label LC3; GFP showed the fusion of autophagosomes and lysosomes to form autolysosomes; yellow spots in merge images indicated autolysosomes B: Comparison of mRFP-GFP-LC3 dual-fluorescence intensity between the two groups Compared with the shRNA control group, $^aP < 0.01$ (Independent samples t -test, $n = 3$) Opn5: neuropsin; LC3: microtubule-associated protein 1 light chain 3; shRNA: short hairpin RNA

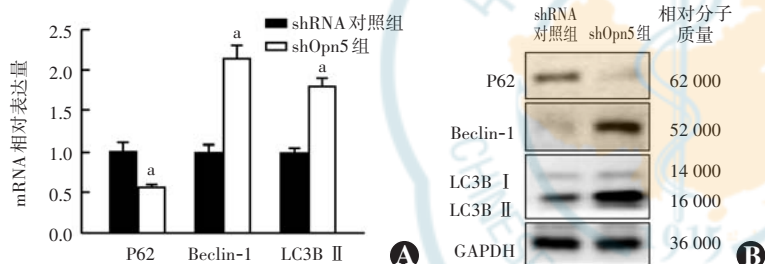


图 6 各组自噬相关蛋白 LC3-II/I、Beclin-1、P62 的 mRNA 和蛋白表达量 A: 各组细胞 LC3B II、Beclin-1、P62 mRNA 相对表达水平比较 与 shRNA 对照组相比, $^aP < 0.01$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) B: 各组 LC3-II/I、Beclin-1、P62 的蛋白表达电泳图 Opn5: 神经视蛋白; LC3: 微管相关蛋白 1 轻链 3; shRNA: 短发夹 RNA; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Figure 6 mRNA and protein expression of autophagy-related proteins LC3-I/II, Beclin-1, and P62 in each group

A: Comparison of relative mRNA expression levels of LC3B II, Beclin-1, and P62 between the two groups Compared with the shRNA control group, $^aP < 0.01$ (Independent samples t -test, $n = 3$) B: Electrophoretogram of LC3-I/II, Beclin-1, and P62 protein Opn5: neuropsin; LC3: microtubule-associated protein 1 light chain 3; shRNA: short hairpin RNA; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

确。作为 VL 在视网膜内的特异性受体, Opn5 在 RGCs 中高表达, 提示其可能介导了 VL 对视网膜信号通路及屈光发育的调控作用。然而, Opn5 如何影响 RGCs 功能及其与已知近视相关信号(如 Egr-1)的相互作用, 目前仍知之甚少。

Opn5 是一种对短波长 (360 ~ 474 nm) 敏感的 G 蛋白偶联受体, 由 Foster 等^[11]于 2003 年首次在哺乳动物神经组织中发现。作为非视觉成像视蛋白家族的重要成员, Opn5 广泛分布于眼睛、

大脑和脊髓等组织, 参与调控生物节律、神经元发育及突触可塑性等多种生理功能^[12-13]。近年来研究进一步揭示了 Opn5 的多样化作用: Nguyen 等^[14]发现 Opn5 通过多巴胺信号通路介导视网膜血管发育; 《Nature》杂志也报道了 Opn5 在调节产热和代谢中的关键作用^[15]。在 VL 刺激下, Opn5 通过结合全反式视黄醛, 激活 G 蛋白信号通路^[16]。研究表明, Opn5 吸收长波紫外线可上调成纤维细胞中基质金属蛋白酶-2 的表达, 在小鼠、小鸡和人类近视模型中均表现出抑制近视进展的作用^[9-10]。此外, 视网膜 Opn5 缺失可抑制离焦及 VL 诱导的脉络膜增厚, 而这一过程在眼球生长发育调控中至关重要^[2, 17]。以上研究提示, VL-Opn5 通路可能是近视防控的重要靶点, 但其具体分子机制仍有待深入探索。

表 1 各组细胞自噬相关蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of relative expression levels of autophagy-related proteins between two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	LC3 阳性细胞数 (个/视野)	Opn5 阳性细胞数 (个/视野)	LC3-II/LC3-I 蛋白比值	Beclin-1 蛋白 相对表达量	p62 蛋白 相对表达量
shRNA 对照组	3	35.57 $\pm$ 2.03	112.25 $\pm$ 6.01	0.22 $\pm$ 0.03	0.14 $\pm$ 0.03	0.63 $\pm$ 0.11
shOpn5 组	3	146.84 $\pm$ 8.12	12.90 $\pm$ 3.44	1.47 $\pm$ 0.10	1.59 $\pm$ 0.08	0.15 $\pm$ 0.04
t 值		32.48	40.77	36.12	28.92	17.34
P 值		<0.05	<0.05	<0.001	<0.001	<0.001

注: (独立样本 t 检验) shRNA: 短发夹 RNA; Opn5: 神经视蛋白; LC3: 微管相关蛋白 1 轻链 3; Beclin-1: 自噬相关基因 6 同源物

Note: (Independent samples t -test) shRNA: short hairpin RNA; Opn5: neuropsin; LC3: microtubule-associated protein 1 light chain 3; Beclin-1: autophagy-related gene 6 homologues



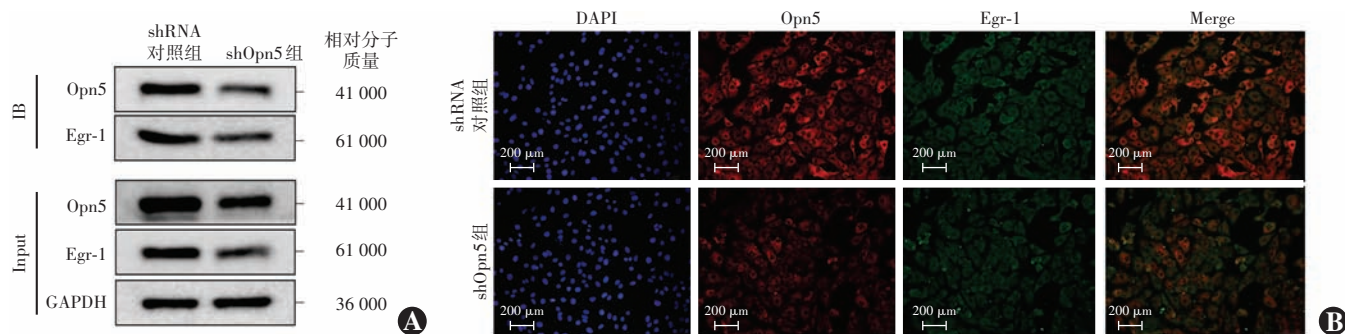


图 7 免疫共沉淀检测 Opn5 与 Egr-1 的相互作用 A: Opn5 和 Egr-1 相互作用的蛋白表达电泳图 B: Opn5 和 Egr-1 共定位荧光染色图 ($\times 200$, 标尺 = 200 μm) 共定位区域主要在细胞质中 shRNA: 短夹 RNA; Opn5: 神经视蛋白; Egr-1: 早期生长反应因子 1; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Figure 7 Detection of the interaction between Opn5 and Egr-1 by co-immunoprecipitation A: Electrophoretogram of protein expression showing the interaction between Opn5 and Egr-1 B: Co-localization fluorescence staining images of Opn5 and Egr-1 ($\times 200$, scale bar = 200 μm) The co-localization region was mainly in the cytoplasm shRNA: short hairpin RNA; Opn5: neuropsin; Egr-1: early growth response 1; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

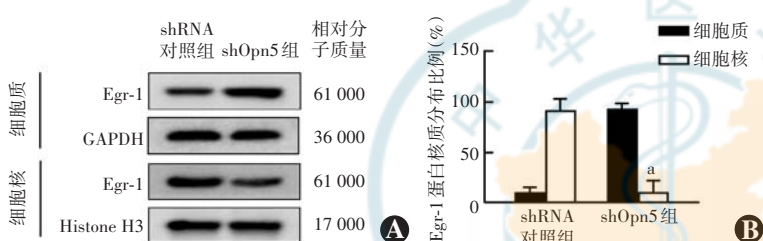


图 8 各组 Egr-1 在胞质和胞核的表达 A: 各组胞质和胞核中 Egr-1 蛋白表达电泳图 B: 各组细胞胞质和细胞核中 Egr-1 蛋白分布比例的表达 与 shRNA 对照组相比, $^aP < 0.001$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) Egr-1: 早期生长反应因子 1; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; Histone H3: 组蛋白 H3

Figure 8 Expression of Egr-1 protein in the cytoplasm and nucleus in each group A: Electrophoretogram of Egr-1 protein expression in the cytoplasm and nucleus B: Comparison of distribution ratio of Egr-1 protein in cytoplasm versus nucleus between the two groups Compared with the shRNA control group, $^aP < 0.001$ (Independent samples t -test, $n = 3$) Egr-1: early growth response 1; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Egr-1 作为即刻早期反应基因家族的核心成员,是神经元活动的敏感标志物。它通过结合靶基因启动子调控多种基因表达,参与眼球发育的精细调控^[18]。VL 可显著上调小鼠视网膜中 Egr-1 表达,进而抑制实验性近视进展;Egr-1 可通过与自噬关键蛋白 LC3 的启动子结合,调控缺氧诱导的细胞自噬和凋亡^[19-22]。自噬是细胞应对环境应激、维持稳态的重要机制,且神经元自噬缺陷会导致受损物质累积,进而影响细胞正常功能^[23-24]。自噬广泛参与眼组织的生理及病理过程,其功能贯穿昼夜节律调控和多种眼部疾病的发生和发展等多个方面^[25]。RGCs 因其轴突富含线粒体,更易受氧化应激损伤,从而触发自噬和凋亡^[3-5],这可能是近视发生发展的关键环节。

本研究通过慢病毒感染成功构建了 Opn5 低表达的 RGC-5 细胞模型。实验结果显示,Opn5 敲减不仅降低了细胞增殖活性,还增加了细胞凋亡比例,提示

Opn5 对 RGC-5 可能具有保护作用。进一步研究发现,Opn5 敲减导致自噬相关蛋白 LC3-II / I 和 Beclin-1 表达上调,而自噬底物蛋白 p62 表达下调。同时,Egr-1 表达水平降低,且免疫荧光结果显示 Opn5 与 Egr-1 存在共定位和相互作用。Opn5 敲减后 Egr-1 的核定位显著减少,提示 Opn5 可能通过调控 Egr-1 核转位来影响其转录活性,进而调节 RGC-5 的自噬进程。虽然 LC3-II / I 比值升高理论上可能反映自噬体积累而非自噬流增强,但本研究通过 mRFP-GFP-LC3 双荧光系统检测证实 shOpn5 组自噬溶酶体数量增加,提示细胞自噬流通畅。因此,Opn5 敲减导致的 LC3-II / LC3-I 升高可解释为自噬活性增强。

综上所述,本研究揭示了 Opn5 通过调控 Egr-1 核转位影响 RGC-5 细胞自噬的机制,为理解 VL-Opn5 通路在近视防控中的作用提供了实验依据。然而,关于 Opn5 介导 Egr-1 核转位的具体信号通路及其下游靶基因仍需进一步研究。后续工作将重点探究 Egr-1 调控自噬相关基因表达,以及这一过程在近视发生和发展中的精确作用机制。本研究尚存在以下局限性:(1)缺乏体内实验证据,相关表型尚未在动物模型中进一步验证;(2)未能完全排除潜在脱靶效应的影响,后续通过挽救实验(如回补 Opn5 后观察表型是否逆转)加以验证;(3)当前细胞实验未设置光刺激条件,需进一步阐明体外模型与在体光照条件之间的关联性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 佟莉杨:参与选题、酝酿和设计实验、论文撰写、对文章知识性内容的审阅和智力性内容的修改及定稿;和丹雪:参与选题、研究指导、论文撰写及修改;傅晨曦、张玲敏、华超群:实施研究、采集数据、分析和解释数据



参考文献

- [1] Holden BA, Fricke TR, Wilson DA, et al. Global prevalence of myopia and high myopia and temporal trends from 2000 through 2050 [J]. *Ophthalmology*, 2016, 123 (5) : 1036 – 1042. DOI: 10.1016/j.opht.2016.01.006.
- [2] Jiang X, Pardue MT, Mori K, et al. Violet light suppresses lens-induced myopia via neuropsin (OPN5) in mice[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(22) : e2018840118 [2025-03-15]. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8179197/>. DOI: 10.1073/pnas.2018840118.
- [3] Wang X, Lin Q, Tian L, et al. Electroacupuncture alleviates damage to myopic RGCs probably through lncRNA-XR_002789763.1-mediated mitophagy[J]. *Chin Med*, 2025, 20(1) : 16. DOI: 10.1186/s13020-025-01058-5.
- [4] Grudzińska EM, Lubiński W, Modrzejewska M. Macular function in patients with medium myopia[J]. *Doc Ophthalmol*, 2023, 146(2) : 113–120. DOI: 10.1007/s10633-022-09907-6.
- [5] Zhou G, Lan C, Yang Q, et al. Expression of SCO1 and SCO2 after form-deprivation myopia in Guinea pigs[J]. *Eur J Ophthalmol*, 2022, 32(5) : 3050–3057. DOI: 10.1177/11206721211070305.
- [6] 支知娜, 孙翠敏, 傅芊, 等. 小鼠形觉剥夺对不同类型视网膜神经节细胞形态的影响[J]. *中华眼底病杂志*, 2019, 35(5) : 451–461. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2019.05.006.
- [6] Zhi ZN, Sun CM, Fu Q, et al. The effect of form deprivation on the morphology of retinal ganglion cells in mice[J]. *Chin J Ocular Fundus Dis*, 2019, 35(5) : 451–461. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2019.05.006.
- [7] 徐翌华, 朱鸿. 视网膜光辐照实验模型研究进展[J]. *中华实验眼科杂志*, 2023, 41(12) : 1243–1248. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200520-00364.
- [7] Xu YH, Zhu H. Research progress of in vitro experimental models in retinal light irradiation[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2023, 41(12) : 1243–1248. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200520-00364.
- [8] Zhao K, Yu M, Zhu Y, et al. EGR-1/ASPP1 inter-regulatory loop promotes apoptosis by inhibiting cyto-protective autophagy[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(6) : e2869 [2025-03-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28594407/>. DOI: 10.1038/cddis.2017.268.
- [9] Torii H, Kurihara T, Seko Y, et al. Violet light exposure can be a preventive strategy against myopia progression [J]. *EBioMedicine*, 2017, 15 : 210–219. DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.12.007.
- [10] Torii H, Mori K, Okano T, et al. Short-term exposure to violet light emitted from eyeglass frames in myopic children: a randomized pilot clinical trial[J]. *J Clin Med*, 2022, 11(20) : 6000. DOI: 10.3390/jcm11206000.
- [11] Noda Y, Taniguchi K, Takano M, et al. Violet light photobiomodulation therapy for depression: a double-blind randomized crossover trial[J]. *J Affect Disord*, 2025, 376 : 325–332. DOI: 10.1016/j.jad.2025.02.031.
- [12] Pan J, Shen X, Ouyang H, et al. Immunization with OPN5 increased seasonal degradation of reproductive activity in Magang ganders [J]. *Poult Sci*, 2025, 104(2) : 104753. DOI: 10.1016/j.psj.2024.104753.
- [13] Lapajne L, Lakk M, Rudzitis CN, et al. Neuropsin, TRPV4 and intracellular calcium mediate intrinsic photosensitivity in corneal epithelial cells[J]. *Ocul Surf*, 2025, 36 : 1–9. DOI: 10.1016/j.jtos.2024.12.002.
- [14] Nguyen MT, Vemaraju S, Nayak G, et al. An opsin 5-dopamine pathway mediates light-dependent vascular development in the eye[J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(4) : 420–429. DOI: 10.1038/s41556-019-0301-x.
- [15] Zhang KX, D'Souza S, Upton BA, et al. Violet-light suppression of thermogenesis by opsin 5 hypothalamic neurons [J]. *Nature*, 2020, 585(7825) : 420–425. DOI: 10.1038/s41586-020-2683-0.
- [16] Andrabi M, Upton BA, Lang RA, et al. An expanding role for nonvisual opsins in extraocular light sensing physiology[J]. *Annu Rev Vis Sci*, 2023, 9 : 245–267. DOI: 10.1146/annurev-vision-100820-094018.
- [17] Zhang S, Zhang G, Zhou X, et al. Changes in choroidal thickness and choroidal blood perfusion in guinea pig myopia[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2019, 60(8) : 3074–3083. DOI: 10.1167/iov.18-26397.
- [18] Jeong H, Lee D, Jiang X, et al. Opsin 5 mediates violet light-induced early growth response-1 expression in the mouse retina[J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1) : 17861. DOI: 10.1038/s41598-023-44983-x.
- [19] 朱磊, 王学成, 徐妍妍, 等. 缺氧诱导因子 1 α 、Bcl-2/腺病毒 E1B19kDa 相互作用蛋白 3 在儿童创伤性脑损伤中的表达及意义 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2024, 26(4) : 378–384. DOI: 10.7499/j.issn.1008-8830.2310067.
- [19] Zhu L, Wang XC, Xu YY, et al. Expression and significance of hypoxia-inducible factor 1 α and Bcl-2/adenovirus E1B19kDa-interacting protein 3 in children with traumatic brain injury[J]. *Chin J Contemp Pediatr*, 2024, 26(4) : 378–384. DOI: 10.7499/j.issn.1008-8830.2310067.
- [20] Pang Z, Xu Y, Zhu Q. Early growth response 1 suppresses macrophage phagocytosis by inhibiting NRF2 activation through upregulation of autophagy during pseudomonas aeruginosa infection [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11 : 773665. DOI: 10.3389/fcimb.2021.773665.
- [21] Zheng GS, Tan YM, Shang YY, et al. CIDEC silencing attenuates diabetic nephropathy via inhibiting apoptosis and promoting autophagy [J]. *J Diabetes Investig*, 2021, 12(8) : 1336–1345. DOI: 10.1111/jdi.13534.
- [22] Geng Y, Lou J, Wu J, et al. NEMO-binding domain/IKK γ inhibitory peptide alleviates neuronal pyroptosis in spinal cord injury by inhibiting ASMase-induced lysosome membrane permeabilization[J/OL]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(40) : e2405759 [2025-03-22]. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11516130/>. DOI: 10.1002/adv.202405759.
- [23] 范浩, 田中雪, 马思明, 等. 氧化应激-内质网应激-自噬在高血压延髓头端腹外侧区的作用及针刺干预机制研究进展 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(7) : 4128–4131.
- [23] Fan H, Tian ZX, Ma SM, et al. Research progress of mechanism of oxidase stress-endoplasmic reticulum stress-autophagy and acupuncture in rostral ventrolateral medulla of hypertension [J]. *Chin J Trad Chin Med*, 2021, 36(7) : 4128–4131.
- [24] 姚林, 穆琼. 小胶质细胞自噬和炎症及其交互作用对脑出血调控机制的研究进展 [J]. *中国全科医学*, 2020, 23(30) : 3888–3894. DOI: 10.12114/j.issn.1007-9572.2020.00.467.
- [24] Yao L, Mu Q. Novel advances in regulatory mechanism of microglia autophagy, inflammation and their interaction in intracerebral hemorrhage [J]. *Chin General Pract*, 2020, 23(30) : 3888–3894. DOI: 10.12114/j.issn.1007-9572.2020.00.467.
- [25] Liton PB, Boesze-Battaglia K, Boulton ME, et al. Autophagy in the eye: from physiology to pathophysiology [J]. *Autophagy Rep*, 2023, 2(1) : 2178996. DOI: 10.1080/27694127.2023.2178996.

(收稿日期:2025-05-24 修回日期:2025-12-29)

(本文编辑:张宇 骆世平)

