网络出版时间:2019-9-3 17:26 网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190830.1433.008.html

CYLD 干扰对实验性视网膜脱离中光感受器细胞坏死性凋亡伴发自噬的影响

杨 南[1],丁 婕[2],闫原野[2],鲁 理[3],董 凯[3]

摘要 **目的** 探讨圆柱瘤基因(CYLD)干扰对实验性视网膜脱离中光感受器细胞坏死性凋亡伴发自噬的影响。**方法** 大鼠视网膜下注射慢病毒载体3周后,在各实验组建立视网膜脱离的模型,分为正常对照组、未干预组、CYLD干预组、阴性干预组。建模3 d后,使用电镜观察光感受器细胞的形态学特点并判断其死亡方式。采用Western blot法检测视网膜裂解的LC3蛋白、beclin-1蛋白表达。**结果** 电镜检测结果显示CYLD干预组光感受器细胞坏死数明显低于未干预组和阴性干预组($P<0.05$)。Western blot结果表明CYLD干预组LC3蛋白、beclin-1蛋白表达水平显著低于未干预组和阴性干预组($P<0.01$)。**结论** 电镜检测和Western blot检测结果共同显示CYLD干扰可以通过抑制LC3和beclin-1的活化,从而抑制光感受器细胞的坏死性凋亡伴发的自噬。

关键词 视网膜脱离;光感受器细胞;坏死性凋亡;自噬
中图分类号 R 774.1+2
文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)10-1531-04
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.10.007

2019-06-19 接收
基金项目:国家自然科学基金(编号:81400407);安徽省自然科学基金(编号:1408085QH159)
作者单位:[1] 安徽医科大学附属省立医院,合肥 230001
[2] 皖南医学院眼科,芜湖 241000
[3] 安徽医科大学附属省立医院眼科,合肥 230001
作者简介:杨 南,男,硕士研究生;
董 凯,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:happysubmison@163.com

视网膜脱离后光感受器细胞死亡的方式有多种,本课题组在国际上首次发现光感受器细胞的坏死性凋亡的形态学改变[1]。同时还发现,半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶抑制剂(carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-fluoromethylketone,z-VAD-FMK)不仅诱导光感受器细胞的坏死性凋亡,同时还参与了自噬的激活[2]。另外,圆柱瘤基因(cylindromatosis,CYLD)干扰可以抑制视网膜脱离后光感受器细胞中的坏死性凋亡和凋亡[3],但是对坏死性凋亡中的自噬有无影响尚不清楚。另一方面,活性氧、Beclin1、雷帕霉素靶蛋白、磷酸肌醇三磷酸激酶、LC3-Ⅱ等多种蛋白质和信号通路参与了自噬的发生[4]。Beclin1是早期自噬体形成的必需组分,与自噬体膜的形成有关,并引导募集其他自噬相关蛋白定位于自噬体膜[5]。LC3-Ⅰ向LC3-Ⅱ的转换是自噬体形成的标志[6]。该研究探讨CYLD干扰对实验性视网膜脱离中光感受器细胞坏死性凋亡伴发自噬有无影响,为视网膜脱离后的视功能恢复提供一定理论基础和干预思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物 普通级健康雄性SD大鼠48只,体质量260~280 g,由安徽医科大学附属省立医院和上海交通大学附属第一人民医院提供,大鼠在室温18~25 ℃、湿度<60%环境下饲养。

/Sedlin-Y115F were transformed into BL21 cells. Western blot and Coomassie brilliant blue staining were used to dectect its expression. Immunofluorescence experiment in COS7 cells was performed to detect the co-localization of Sedlin mutants with RB1. ***Results*** The recombinant plasmids pcDNA3.1-GFP-SedlinN/Sedlin-Y115A/-Sedlin-Y115F and pGEX-3X-SedlinN/Sedlin-Y115A/Sedlin-Y115F were constructed successfully, which could be highly expressed in HEK 293T cells and BL21 competent cells, and the expression of Sedlin mutants were found both in nucleus and in cytoplasms, and they colocalized with RB1 in nucleus. ***Conclusion*** Sedlin and its mutants are effectively expressed in BL21 and HEK 293T cells. In COS7 cells, Sedlin is mainly expressed in the nucleus, however, its mutants are expressed in bothnucleus and cytoplasm, with a considerable amount in cytoplasm. The mutants were colocalized with RB1 protein, indicating that thecarboxyl terminus of Sedlin and the phosphorylation of Y in NPFYmotif did not affect its co-localization with RB1 protein.

Key words sedlin mutants; plasmids construction; protein expression; immunofluorescence

1.2 实验方法

1.2.1 视网膜脱离动物模型的建立 设计 CYLD 干扰靶序列为 5′-GGTTGTACGGATGGAACTTTC-3′，根据靶序列构建慢病毒载体，转染大鼠视网膜细胞[3]。慢病毒干扰 3 周后，大鼠分为正常对照组、未干预组、CYLD 干预组、阴性干预组，每组 12 只大鼠，用于电镜和 Western blot 检测各 6 只。实验大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛(400 mg/kg)麻醉，术前 0.5% 的托吡卡胺扩瞳；左氧氟沙星滴眼液冲洗结膜囊(苏州参天制药有限公司)，右眼注入透明质酸钠(1% 美国博士伦公司)50 μl 于视网膜下建立网脱模型，网膜隆起范围约 1/3 ~ 1/2。结膜 10-0 缝线标记脱离范围，以便取材时定位[1-3]。在各实验组建立视网膜脱离模型的同时，视网膜下注入 z-VAD-FMK (300 μmol/L，美国 Enzo 公司) 5 μl。实验组大鼠只在右眼建立模型，左眼不做处理做对照。

1.2.2 电镜检测 建模第 3 天后，水合氯醛腹腔麻醉大鼠，摘取眼球，沿角巩膜缘剪开，清除角膜、晶体及玻璃体，剩下的眼杯使用 2.5% 戊二醛固定 12 h，取出视网膜并制成 1 mm × 3 mm 大小条块，用无水酒精脱水后用环氧树脂对标本包埋。做成超薄切片，枸橼酸铅和醋酸铀双染法染色[1]。切片的观察和摄片是使用 JEM-1230EX 透射电镜(日本电子公司)，观察光感受器细胞层的超微结构改变。

确定光感受器位置，单个切片随机选取观察的光感受器细胞为 200 个，确定光感受器细胞的死亡方式是通过视网膜脱离后第 3 天观察其形态学改变。通常光感受器细胞凋亡形态学表现为细胞体积缩小和细胞核浓缩，细胞坏死的表现为细胞肿胀、溶解，细胞膜破裂、不完整[2,7]。

1.2.3 Western blot 建模第 3 天取视网膜组织，用 RIPA 裂解液与 1% 的蛋白酶抑制剂充分裂解，组织匀浆、超声、离心 BCA 行蛋白浓度检测定量；取等量蛋白上样后凝胶电泳(SDS-PAGE)，初始 65 V，当蛋白位于浓缩胶、分离胶交界处，提升为 125 V；冰上转膜 2 h，25 V；5% 脱脂牛奶室温封闭 40 min；封闭后，膜与 LC-3(1 ∶ 500)、Beclin-1(1 ∶ 1 000)、β-肌动蛋白(1 ∶ 1 000)抗体 4 ℃ 孵育过夜。复温后 TBST 缓冲液洗膜 3 次，用 HRP 标记的二抗(在 TBST 中 1 ∶ 5 000稀释，圣克鲁斯生物技术)室温孵育 2 h，根据说明，通过化学发光剂 ECL 显现条带[2-3]。使用 Bandscan 4.3 软件(加拿大 Glyko 公司)检测电泳条带的灰度值。LC3 蛋白、Beclin-1 蛋白与内参照 β-actin 相比，作为其相对表达水平。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 进行统计分析，结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间变量数据的比较采用单因素方差分析，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CYLD 干扰对视网膜脱离后光感受器细胞的影响 建立视网膜脱离模型 3 d 后，电镜观察发现，视网膜脱离后光感受器细胞不仅出现凋亡和坏死，而且还可以观察到坏死性凋亡的形态学改变，其与坏死细胞类似，但染色质固缩边聚，同时可以观察到明显的空泡样改变和自噬泡。见图 1。CYLD 干预组感光细胞坏死数明显低于未干预组和阴性干预组，差异有统计学意义($F = 19.19$，$P < 0.05$)。见图 2。

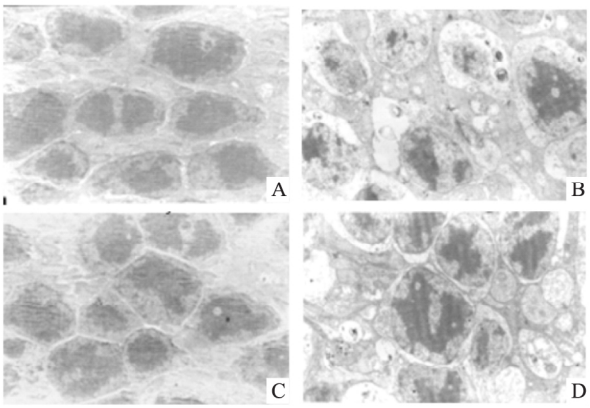

图 1 电镜下光感受器细胞形态学特点 ×4 000

A: 正常对照组; B: 未干预组; C: CYLD 干预组; D: 阴性干预组

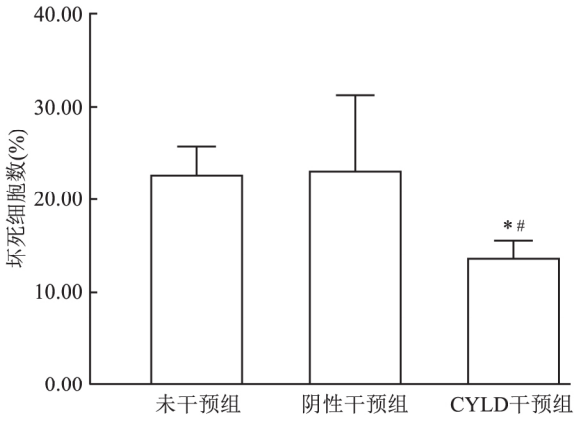

图 2 电镜下光感受器细胞坏死数

与未干预组比较: * $P < 0.05$; 与阴性干预组比较: # $P < 0.05$

2.2 CYLD 干扰对 LC3 蛋白表达的影响 Western blot 检测结果显示，CYLD 干预组的 LC3 蛋白相对表达较未干预组和阴性干预组明显降低，差异有

统计学意义($F=1623.81$,$P<0.01$)。见图3。

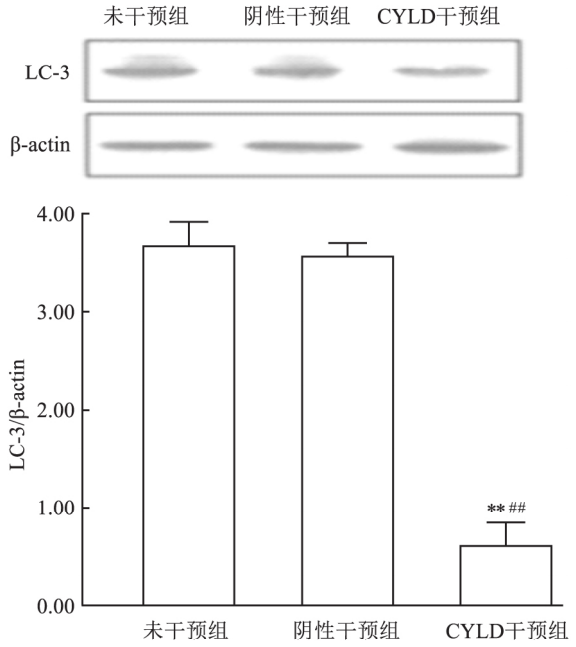

图3 Western blot检测大鼠视网膜LC3蛋白表达

与未干预组比较: $^{**}P<0.01$; **与阴性干预组比较:** $^{\#\#}P<0.01$

2.3 CYLD干扰对Beclin-1蛋白表达的影响

Western blot检测结果显示,CYLD干预组的Beclin-1蛋白相对表达较未干预组和阴性干预组明显降低,差异有统计学意义($F=121.37$,$P<0.01$)。见图4。

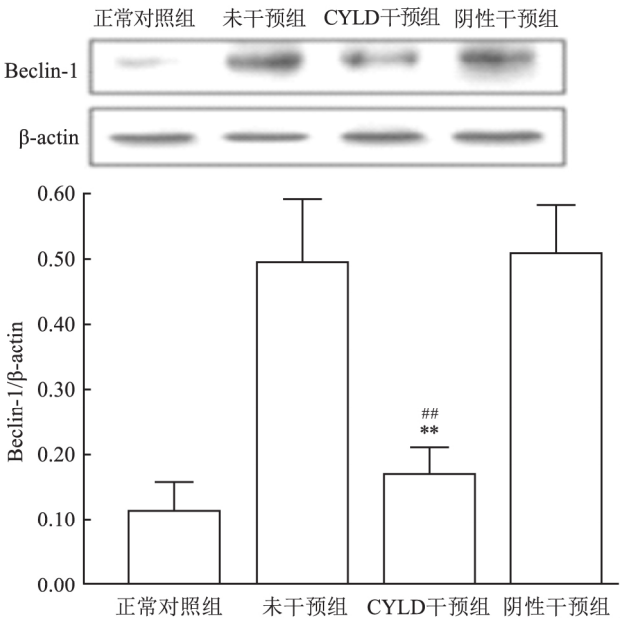

图4 Western blot检测大鼠视网膜Beclin-1蛋白表达

与未干预组比较: $^{**}P<0.01$; **与阴性干预组比较:** $^{\#\#}P<0.01$

3 讨论

本研究结果显示,慢病毒载体进行大鼠视网膜下注射3周后,建立视网膜脱离模型,网脱模型建立后3 d,取视网膜组织进行电镜检测,光感受器细胞的病理学形态改变不仅是凋亡和坏死,同时部分细胞也表现为染色质固缩边聚,同时可以观察到明显的空泡样改变和自噬泡,符合坏死性凋亡伴自噬的表现[8]。LC3、Beclin-1蛋白参与实验性视网膜脱离后光感受器细胞的坏死性凋亡伴自噬的发生,CYLD干扰后,LC3、Beclin-1蛋白表达明显降低,表明光感受器细胞的坏死性凋亡伴发的自噬受抑制,其机制可能是抑制了LC3和Beclin-1的活化。从而可以得出CYLD干扰后,不仅可以抑制光感受器细胞的坏死和凋亡,同时还可以抑制坏死性凋亡中自噬的发生。

早期研究[9]表明,使用zVAD(一种具有广泛特异性的泛半胱天冬酶抑制剂)可以诱导L929细胞的自噬和死亡。这种细胞死亡过程需要丝氨酸苏氨酸激酶1受体相互作用蛋白,提示自噬参与坏死性凋亡。有研究[10]已经证明自噬和坏死都参与了海马体的神经损伤,而姜黄素确实通过多方面的机制对神经元细胞死亡有神经保护作用。Degterev et al[11]发现在坏死性凋亡过程中,自噬也可以被激活,并且与微管相关蛋白LC-3I转化为LC-3II相关。Rosenbaum et al[12]在视网膜缺血模型中发现,使用z-VAD-FMK预处理后,坏死抑制素-1不仅能抑制坏死,还能抑制自噬,改善功能结果。这进一步验证了本实验结果,证实CYLD干扰后,不仅抑制视网膜脱离后光感受器细胞的坏死和凋亡,同时抑制了光感受器细胞的坏死性凋亡伴发的自噬。

目前认为自噬主要作为一种保护机制,可以防止细胞死亡,维持细胞完整性主要通过亚细胞碎片的清除和再生代谢前体[13]。在儿童急性淋巴细胞白血病细胞中,需要诱导自噬依赖性坏死性凋亡,以克服糖皮质激素的耐药性[14]。Kim et al[15]发现在肺癌的研究中利用紫草素抑制自噬后发现坏死性凋亡增加。相反,本课题组前期观察结果表明,自噬标志物LC-3II的活化受坏死信号的控制,这表明自噬参与坏死也导致细胞损伤[2]。这些都表明自噬和坏死性凋亡有对应关系,但是自噬是一个复杂的过程,在坏死性凋亡的过程中自噬是如何被激活的尚不清楚,因此在未来的研究中,有必要探索自噬和坏死性凋亡的联系。

综上所述,在小分子干扰 RNA 介导的 CYLD 干扰的大鼠实验性视网膜脱离模型中,通过抑制 LC3 和 Beclin-1 的活化,抑制光感受器细胞的坏死性凋亡伴发的自噬。进一步研究自噬、凋亡和坏死性凋亡之间的调控关系,为最大限度抑制细胞死亡,促进细胞存活,保护视网膜细胞提供新的理论依据和治疗思路是本课题后续研究方向。

参考文献

[1] Dong K,Zhu H,Song Z,et al. Necrostatin-1 protects photoreceptors from cell death and improves functional outcome after experimental retinal detachment [J]. Am J Pathol,2012,181(5):1634-41.

[2] Dong K,Zhu Z C,Wang F H,et al. Activation of autophagy in photoreceptor necroptosis after experimental retinal detachment [J]. Int J Ophthalmol,2014,7(5):745-52.

[3] Dong K, Han L, Liu J, et al. RNA interference reveals the coregulatory effects of cylindromatosis on apoptosis and necroptosis of photoreceptor cells in experimental retinal detachment [J]. Am J Pathol,2017,187(8):1763-71.

[4] Tanaka K, Matsuda N. Proteostasis and neurodegeneration: the roles of proteasomal degradation and autophagy [J]. Biochim Biophys Acta,2014,1843(1):197-204.

[5] Chang S H,Minai-Tehrani A,Shin J Y,et al. Beclin1-induced autophagy abrogates radioresistance of lung cancer cells by suppressing osteopontin [J]. J Radiat Res,2012,53(3):422-32.

[6] Chifenti B,Locci M T,Lazzeri G,et al. Autophagy-related protein LC3 and Beclin-1 in the first trimester of pregnancy [J]. Clin Exp Reprod Med,2013,40(1):33-7.

[7] Kroemer G,Galluzzi L,Vandenabeele P,et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009 [J]. Cell Death Differ,2009,16(1):3-11.

[8] Degterev A,Huang Z,Boyce M,et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury [J]. Nat Chem Biol,2005,1(2):112-9.

[9] Yu L,Alva A,Su H,et al. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8 [J]. Science,2004,304(5676):1500-2.

[10] Zhou H, Beevers C S, Huang S. The targets of curcumin [J]. Current drug targets,2011,12(3):332-47.

[11] Degterev A,Hitomi J,Germscheid M,et al. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins [J]. Nat Chem Biol,2008,4(5):313-21.

[12] Rosenbaum D M,Degterev A,David J,et al. Necroptosis, a novel form of caspase-independent cell death, contributes to neuronal damage in a retinal ischemia-reperfusion injury model [J]. J Neurosci Res,2010,88(7):1569-76.

[13] Choi A M,Ryter S W,Levine B. Autophagy in human health and disease [J]. N Engl J Med,2013,368(19):1845-6.

[14] Bonapace L,Bornhauser B C,Schmitz M,et al. Induction of autophagy-dependent necroptosis is required for childhood acute lymphoblastic leukemia cells to overcome glucocorticoid resistance [J]. J Clin Invest,2010,120(4):1310-23.

[15] Kim H J, Hwang K E, Park D S, et al. Shikonin-induced necroptosis is enhanced by the inhibition of autophagy in non-small cell lung cancer cells [J]. J Transl Med,2017,15(1):123.

Effects of cylindromatosis interference on autophagy in necroptosis of photoreceptor cells in experimental retinal detachment

Yang Nan[1], Ding Jie[2], Yan Yuanye[2], et al

([1]*The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei* 230001;
[2]*Dept of Ophthalmology, Wannan Medical College, Wuhu* 241000)

Abstract ***Objective*** To evaluate the effects of cylindromatosis(CYLD) on the autophagy in necroptosis of photoreceptor cells in experimental retinal detachment. ***Methods*** Three weeks after subretinal injection of lentivirus CYLD shRNA, retinal detachment model was established in each group. The rats were divided into the following four groups: attached group, untreated group, sh-CYLD group, and sh-neg group. Three days after modeling, the morphological characteristics and death pattern of photoreceptor cell were observed by electron microscopy. Cleaved protein LC3 and Beclin-1 were measured by Western blot. ***Results*** Three days after modeling, transmission electron microscopy showed that necrosis of photoreceptor cells significantly decreased in the sh-CYLD group compared with that in the untreated group and the sh-neg group($P<0.05$). Western blot showed that the protein expression of cleaved protein LC3 and Beclin-1 significantly decreased in the sh-CYLD group compared with that in the untreated group and the sh-neg group($P<0.01$). ***Conclusion*** The results of transmission electron microscopy and Western blot show that CYLD interference can protect photoreceptors from autophagy in necroptosis through inhibit the activation of LC3 and Beclin-1.

Key words retinal detachment; photoreceptor; necroptosis; autophagy