

doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2020.11.25

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1000-4432.2020.11.25>

· 论著 ·

转醛醇酶与大鼠脉络膜新生血管形成的相关性及其作用机制

覃珂, 许燕, 周希媛, 刘丹宁

(重庆医科大学附属第二医院眼科, 重庆 400010)

[摘要] 目的: 探讨转醛醇酶(transaldolase, TAL)在氩激光诱导的BN大鼠脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)中的表达变化及其可能的作用机制。方法: 给予2组20只BN大鼠行氩激光光凝视网膜, 诱导BN大鼠建立CNV模型。在光凝后21 d行荧光素眼底血管造影(fluorescein fundus angiography, FFA), 确定模型建立成功后摘除眼球。采用蛋白质印迹法检测TAL、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)和还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)蛋白质表达, 并测定TAL活性。采用小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)抑制下TAL在人视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)ARPE-19细胞中的表达, 蛋白质印迹法检测抑制前后TAL, NADPH和GSH表达水平的变化。结果: 光凝后21 d见明显新生血管生成, 表明模型成功建立。CNV增殖区TAL活性明显高于正常大鼠中TAL活性(67.16 ± 3.38 vs 182.57 ± 1.83 , $P < 0.001$); TAL蛋白质表达明显高于正常大鼠中TAL表达(0.87 ± 0.33 vs 2.09 ± 0.21 , $P = 0.005$); NADPH和GSH表达明显低于其在正常大鼠中的表达(0.92 ± 0.20 vs 0.14 ± 0.05 , $P < 0.01$; 0.84 ± 0.31 vs 0.29 ± 0.11 , $P < 0.05$)。通过对人视网膜色素上皮ARPE-19细胞不做干预、加入Lipofectamine™ 2000稀释液、加入TAL-siRNA/Lipofectamine™ 2000复合物, 将其分为正常对照组、阴性对照组及TAL-siRNA组, 干预48 h后, TAL-siRNA组中TAL蛋白质表达明显低于正常对照组和阴性对照组(0.26 ± 0.13 vs 1.39 ± 0.42 和 1.15 ± 0.19 , $P < 0.01$); NADPH和GSH表达明显高于正常对照组($P < 0.01$)和阴性对照组($P < 0.05$)。结论: CNV形成的过程中, TAL的活性增强、表达上调, 证实TAL与CNV发生发展密切相关, 其可能通过调控NADPH和GSH的表达参与CNV的发生发展。

[关键词] 转醛醇酶; 脉络膜新生血管; 磷酸戊糖途径

Correlation between transaldolase and choroidal neovascularization and its mechanism in rat models

QIN Ke, XU Yan, ZHOU Xiyuan, LIU Danning

(Department of Ophthalmology, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract Objective: To observe the expression of transaldolase (TAL) in choroidal neovascularization (CNV) induced by

收稿日期 (Date of reception): 2020-07-27

通信作者 (Corresponding author): 周希媛, Email: zhouxiyuan2002@aliyun.com; 刘丹宁, 981558104@qq.com

基金项目 (Foundation item): 重庆市科学技术委员会 (cstc2016jcyjA0122); 重庆市卫生和计划生育委员会 (ZY201702079)。This work was supported by the Chongqing Science and Technology Bureau (cstc2016jcyjA0122), and Chongqing Municipal Commission Health and Family Planning (ZY201702079), China.

krypton laser in BN rats and investigate its possible mechanism. **Methods:** Twenty rats in two groups were given with krypton laser photocoagulation retina to induce CNV BN rat models. After fluorescein fundus angiography (FFA) was performed 21 days after photocoagulation, the eyeballs were removed, and TAL, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) and reduced glutathione (GSH) proteins were detected by Western blot, and TAL activity was determined. The siRNA was used to inhibit the expression of TAL in ARPE-19 cells. The changes of TAL, NADPH and GSH expression levels before and after inhibition were compared by Western blot. **Results:** Significant neovascularization was observed 21 days after photocoagulation. The TAL activity in the CNV group was significantly higher than that in the control group (67.16 ± 3.38 vs 182.57 ± 1.83 , $P < 0.001$); TAL protein expression in the CNV group was significantly higher than that in the control group (0.87 ± 0.33 vs 2.09 ± 0.21 , $P = 0.005$); NADPH and GSH expression in the CNV group was significantly lower than that in the control group (0.92 ± 0.20 vs 0.14 ± 0.05 , $P < 0.01$; 0.84 ± 0.31 vs 0.29 ± 0.11 , $P < 0.05$). After TAL-siRNA transfection of ARPE-19 cells for 48h, the expression of TAL protein in the CNV group was significantly lower than that of the control group and negative control group (0.26 ± 0.13 vs 1.39 ± 0.42 vs 1.15 ± 0.19 , $P < 0.01$). The expression levels of NADPH and GSH in the CNV group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.01$) and negative control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** CNV is positively correlated with TAL expression, and TAL can participate in the development of CNV by regulating the expression levels of NADPH and GSH.

Keywords transaldolase; choroidal neovascularization; pentose phosphate pathway

脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)也称为视网膜下新生血管(subretinal neovascularization, SRNV),可出现在许多眼底疾病中,如年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD),病理性近视和脉络膜撕裂等^[1]。由于新生血管管壁的通透性较正常血管高,可引起反复出血及渗出,最终造成瘢痕形成甚至视力丧失,但目前临床上尚无特殊的有效治疗措施。其发生机制目前尚未完全明确,主要与缺氧、炎症、视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞的衰老、Bruch膜老化及破裂、细胞内脂质沉积、玻璃膜疣的形成以及各种细胞因子的刺激有关^[2]。

转醛醇酶(transaldolase, TAL)是磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway, PPP)非氧化阶段的关键酶^[3],其主要调控PPP产生还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)和5-磷酸核糖,前者广泛参与生物体内多种代谢反应,充当供氢体和还原当量的角色,可维持谷胱甘肽(glutathione, GSH)保持还原状态。因此, TAL是生物新陈代谢所必需的。已有研究^[4-9]表明, TAL对氧化应激、淋巴细胞凋亡、神经多发性硬化、炎症和恶性肿瘤等病理过程中有着重要作用。

本实验小组前期通过蛋白质组学研究已经发现, TAL在已确诊发生CNV的湿性AMD患者的泪液中表达显著上调($P < 0.05$; 未发表资料),但其机制尚不明确。本研究进一步探讨TAL, NADPH和GSH在实验性CNV中表达的变化及TAL活性变化,尝试发现TAL与CNV机制上可能的联系,为研究CNV的机制以及治疗靶点提供新的思考。

1 对象与方法

1.1 对象

采用重庆医科大学动物中心提供的无特定病原体(specific pathogen free, SPF)BN大鼠20只,雄性,6~8周龄,体重200~250 g。TAL活性测定试剂购自美国Sigma公司,BCA蛋白浓度测定试剂盒和RIPA蛋白提取试剂盒购自碧云天生物技术有限公司,大鼠TAL, NADPH, GSH和内参 β -Actin引物购自美国Cell Signaling Technology (CST)公司,人视网膜色素上皮ARPE-19细胞本实验室保存, siRNA试剂盒、高速离心机购自美国Thermo Scientific公司, DMED培养基购自美国Corning公司,胎牛血清购自德国Capricorn公司,垂直电泳槽Mini Protean Tatra、凝胶成像系统ChemiDoc XRS购自美国Bio-Rad公司,移液器购自德国Eppendorf

公司, 海德堡激光扫描眼底血管造影机购自德国Leica公司, 多波长激光机为美国科医人Novus Varia Dpss, 光学显微镜为OlympusBX50。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及造模

随机将20只BN大鼠分为对照组和实验组: 每组10只(20只眼), 其中对照组未做干预, 实验组进行造模。7%水合氯醛现配现用, 0.7 mL/100 g, 腹腔注射。复方托品卡胺滴双眼散瞳, 检查大鼠眼前节及眼底均正常, 氦离子激光治疗机光凝选用参数531 nm, 曝光时间0.1 s, 光斑直径100 μ m, 激光功率150 mW, 围绕视盘距视盘等距离视网膜处光凝5个点。根据文献[10], 造模后第21天麻醉散瞳后, 两组大鼠腹腔内注射20%荧光素钠0.1~0.2 mL进行眼底荧光造影, 观察新生血管生成情况后摘除眼球, 去除眼前节及玻璃体。

1.2.2 TAL 酶活性测定

参照Lachaise等^[9]描述的方法改良, TAL活性为读取NADH光密度衰变率参照TAL标准品活性得出。配置反应终体系含有5 mmol/L 6-磷酸果糖, 0.5 mmol/L 4-磷酸赤藓糖, 1.75 U/mL α -磷酸甘油脱氢酶, 0.15 mmol/L NADH, 10 U/mL磷酸丙糖异构酶, 加样10~50 μ g总蛋白, 室温下在340 nm处连续读取吸光度30~60 min, 至吸光度降为0.1~0.2为止。比较对照组和实验组中TAL活性, 做统计学分析。

1.2.3 蛋白质印迹法检测大鼠眼内 TAL, NADPH 和 GSH 水平

提取大鼠RPE-Bruch膜-脉络膜复合体蛋白后, 采用BCA试剂盒测定蛋白浓度。各组取蛋白40 μ g进行凝胶电泳, 250 mA转膜120 min; 5%脱脂牛奶室温下封闭60 min, TBST洗膜, 每次10 min, 共3次; 4 $^{\circ}$ C下孵育一抗过夜, 洗膜10 min, 共3次; 室温下孵育二抗60 min, 洗膜10 min, 共3次。 β -Actin作为总蛋白定量内参照。免疫印迹结果经ChemiDoc XRS图像分析系统作半定量分析。

1.2.4 细胞来源及分组

采用本实验保存的人视网膜色素上皮ARPE-19细胞。分组为正常对照组, 阴性对照组(加入LipofectamineTM 2000稀释液), 实验组(加入TAL-siRNA/LipofectamineTM 2000复合物)。

1.2.5 siRNA 转染

根据制造商Invirogen提供的LipofectamineTM

2000转染试剂转染ARPE-19细胞。转染前24 h将处于对数生长期的ARPE-19细胞接种到6孔板, 细胞汇合度需达80%~90%。用适量不包含血清的DMEM培养基稀释siRNA寡聚物, 并轻轻混匀。使用LipofectamineTM 2000前轻轻混匀, 稀释适量试剂加入DMEM无血清培养基中, 轻轻摇动混匀后在室温下孵育5 min。将稀释后的LipofectamineTM 2000和稀释后的siRNA寡聚物轻轻混匀, 在室温下孵育20 min, 以形成复合物。将siRNA寡聚物/LipofectamineTM 2000复合物2 mL加入包含ARPE-19细胞和培养基的孔中, 轻轻摇动使之充分混合。正常对照组不做干预, 阴性对照组中加入scrambled-siRNA 2 mL, 在转染后4~6 h更换新鲜培养基, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂培养箱孵育48 h。

蛋白质印迹法检测上述3组细胞在转染48 h后TAL, NADPH和GSH的蛋白表达, 方法及步骤同前。

1.3 统计学处理

采用SPSS 21.0软件分析。数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 2组间差异采用Student's *t*-test, 3组以上的组间差异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 FFA 结果

已有研究^[10]表明, 光凝造模后7 d大鼠开始出现CNV, 21 d达到高峰, 之后CNV变化不明显, 因此本研究选择造模后21 d进行眼底荧光造影。正常大鼠眼底造影显示视网膜血管粗细均匀、管壁完整, 血管周围无荧光素渗漏; 实验组可见5个围绕视盘的激光斑, 每处均出现明显荧光素渗漏, 造影早期呈现高荧光, 晚期荧光斑扩散并持续不退(图1)。

2.2 TAL 活性比较

对照组与实验组TAL活性的比较见表1, 结果显示实验组中TAL活性较对照组中TAL活性明显增强($P<0.001$)。

2.2 蛋白质印迹法检测造模后大鼠 RPE-Bruch 膜 - 脉络膜复合体中 TAL, NADPH 和 GSH 蛋白表达的结果

软件密度扫描分析显示实验组TAL的表达水平较对照组明显上升($P=0.005$), NADPH和GSH的表达水平较对照组明显下降($P<0.05$, 图2)。

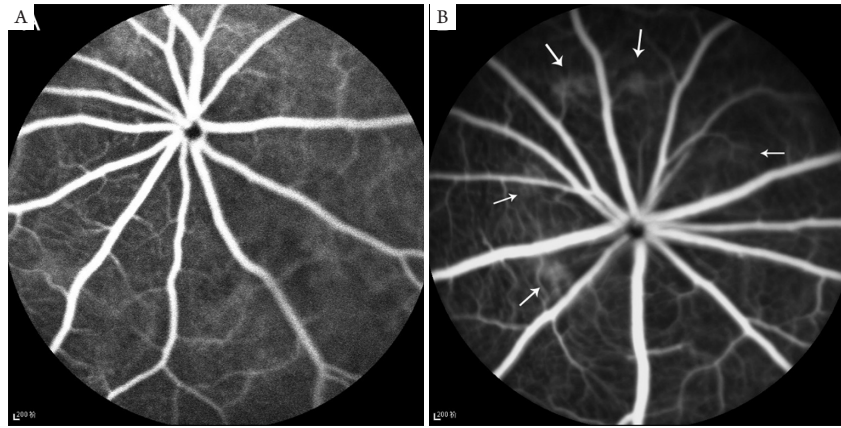


图1 两组大鼠荧光素眼底FFA结果

Figure 1 FFA results of rat models between two groups

(A)对照组; (B)实验组。

(A) Control group; (B) Experimental group.

表1 正常对照组与实验组TAL活性比较

Table 1 Comparison of TAL activity between the control and experimental groups

组别	TAL活性
对照组	67.16 ± 3.38
实验组	182.57 ± 1.83*

* $P < 0.01$.

2.2 蛋白质印迹法检测 siRNA 转染后 ARPE-19 细胞中 TAL, NADPH 和 GSH 蛋白表达的结果

软件密度扫描分析显示实验组TAL的表达水平较对照组明显下降($P < 0.01$), NADHP和GSH的表达水平较对照组明显上升($P < 0.05$, 图3)。

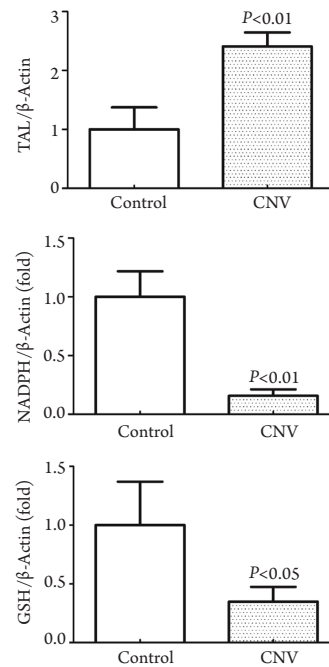
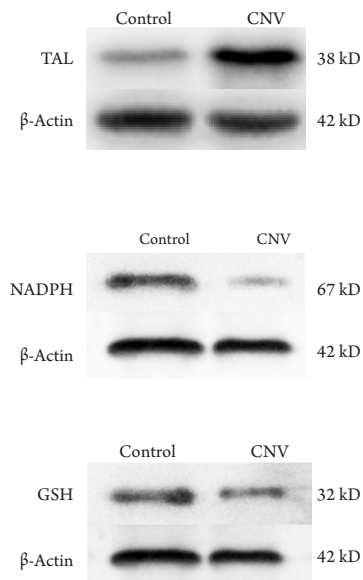


图2 蛋白质印迹法检测造模21天后大鼠RPE-Bruch膜-脉络膜复合体组织中TAL, NADHP和GSH的表达

Figure 2 Western blot of TAL, NADHP and GSH protein levels in the rat RPE-Bruch membrane-choroid complex tissue 21 days after photocoagulation

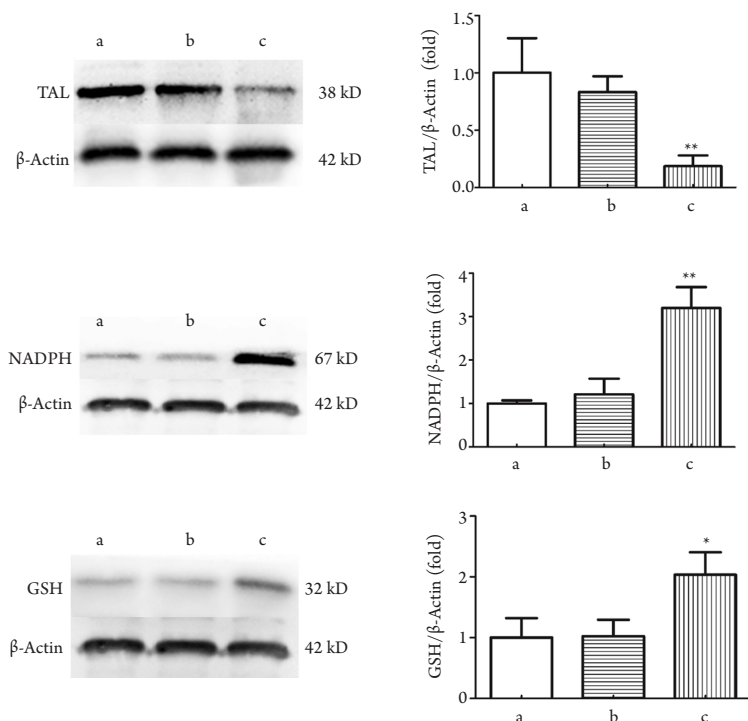


图3 蛋白质印迹法检测siRNA转染48 h后ARPE-19细胞中TAL, NADPH和GSH的表达

Figure 3 Western blot of TAL, NADPH and GSH protein levels in ARPE-19 cells 48h after the transfection of siRNA

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. a: 正常对照组; b: 阴性对照组; c: TAL-siRNA组。

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. a: control group; b: negative control group; c: TAL-siRNA group.

3 讨论

CNV作为湿性AMD的主要特点, 迄今尚无早期确诊及治愈方法^[11]。CNV发生发展过程中有年龄、免疫、光损伤、氧化应激和遗传等多种因素参与其中, RPE细胞在其中起着重要调控作用^[12]。正常情况下, Bruch膜是两种细胞间的重要屏障, 湿性AMD患者的RPE细胞由于衰老等众多因素, 其吞噬和代谢光感受器外节膜盘的功能下降, 胞浆中累计脂褐素不断沉积在Bruch膜上, 形成玻璃膜疣。多种因素同时作用使Bruch膜破裂, 各种刺激因素可直接或间接作用于脉络膜毛细血管内皮细胞(choroidal microvascular endothelial cells, CEC), 从而促使新生血管由脉络膜长入RPE下, 形成CNV。

TAL是PPP中非氧化阶段重要的关键酶, 主要通过调控PPP途径氧化和非氧化阶段之间的平衡, 从而调控PPP途径的两大产物: 5-磷酸核糖和NADPH。其中, NADPH作为供氢体参与生物体内的多种代谢反应, 充当还原当量的角色, 维持

GSH保持还原状态。研究^[13]表明: 非氧化阶段产生的还原当量NADPH至少占总量的44%。总而言之, TAL作为非氧化阶段的关键酶对于保证细胞新成代谢所需要的NADPH的供应具有重要意义。已有研究^[4-9]表明, TAL对HIV引起的氧化应激、白血病、神经多发性硬化、恶性肿瘤和细胞凋亡等疾病和病理过程中有重要作用, 但目前尚未有TAL在CNV中的研究文献。本实验小组前期通过蛋白质组学研究已经发现, TAL在已确诊发生CNV的湿性AMD患者泪液中表达显著上调, 因此, 深入研究TAL在CNV发生发展过程中的作用及可能的调控机制, 将有助于揭发CNV的病理机制, 并将为CNV的防治提供新思考。

本研究发现: 实验组大鼠TAL活性及蛋白的表达明显高于对照组, 并且NADPH和GSH的蛋白表达明显低于对照组。推测在CNV发生发展过程中, TAL可能通过影响PPP途径减少NADPH和GSH的产生并增强眼底氧化应激。Banki等^[5,13]发现TAL的过表达降低了6-磷酸葡萄糖脱氢酶的活性, 从而减少了NADPH和GSH的产生, 使细胞易对凋亡信

号敏感而发生凋亡, 增强了人Jurkat白血病T细胞系的氧化应激。进一步体外实验^[5]证明, 在TAL-siRNA转染后的ARPE-19细胞中, TAL蛋白表达下调的同时增强了NADPH和GSH的蛋白表达水平。由此推断, TAL可通过PPP途径影响NADPH和GSH的表达。

AMD的主要病变区在黄斑部, 组织病理学研究^[14]表明, 患病早期病变区的光感受器就受到不同程度的损害。视锥细胞生长因子(rod derived cone survival factor, RdCVF)是一种硫氧还蛋白样蛋白, Cronin等^[15]发现RdCVF的破坏会导致光感受器功能障碍以及增加氧化应激的易感性。而NADPH是硫氧还蛋白还原酶的辅助因子, 对于还原RdCVF是必需的: RdCVF一旦被氧化, 就只能被硫氧还蛋白还原酶还原^[16]。因此推测TAL还可能通过PPP影响NADPH的生成, 从而导致氧化型RdCVF还原障碍, 但其具体机制有待进一步探究。还原型GSH是细胞质中由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸残基组成的一种三肽, 是细胞内抗氧化系统的重要组成部分。已有研究^[17]表明, 还原型GSH在视网膜光损伤中起重要保护作用, 保护细胞免受过量脂质过氧化损伤。本实验中实验组中GSH的含量明显低于对照组, 说明GSH的减少确实存在于CNV的发生发展过程中, 而NADPH作为GSH还原酶的辅酶, 其表达下调使氧化型GSH不能被还原, 使视网膜失去GSH的保护作用, 从而加剧CNV的发生发展。然而, 在缺氧条件下RPE细胞中TAL, NADPH和GSH的蛋白表达是否有变化, 需要进一步研究探讨。

综上所述, 本实验验证了TAL在大鼠CNV模型中蛋白质表达上调且活性有显著提高, 同时减少了眼内NADPH和GSH的表达水平; 在TAL-siRNA转染后的ARPE-19细胞中, TAL的表达下调同时增强了NADPH和GSH的表达水平。揭示TAL可能通过影响PPP途径减少NADPH和GSH的表达, 增强眼内氧化应激及细胞凋亡, 从而参与CNV的发生发展。本实验首次在大鼠CNV模型中研究TAL的活性及蛋白质表达变化, 结果与我们前期研究已确诊发生CNV的湿性AMD患者泪液中TAL的蛋白表达趋势一致(未发表资料), 并验证了TAL与NADPH和GSH的蛋白质表达水平的关系, 为探索CNV的发生机制及寻找治疗靶点提供了新的思考。

参考文献

1. 王雨生, 朱洁. 脉络膜新生血管性疾病的治疗现状[J]. 第四军医大学学报, 2006, 27(6): 481-483.
WANG Yusheng, ZHU Jie. Current situation in treatment of choroidal neovascularization[J]. Journal of The Fourth Military Medical University, 2006, 27(6): 481-483.
2. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function[J]. *Physiol Rev*, 2005, 85(3): 845-881.
3. Light SH, Anderson WF. Arabinose 5-phosphate covalently inhibits transaldolase[J]. *J Struct Funct Genomics*, 2014, 15(1): 41-44.
4. Banki K, Hutter E, Gonchoroff, et al. Elevation of mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen intermediate levels are early events and occur independently from activation of caspases in Fas signaling[J]. *J Immunol*, 1999, 162(3): 1466-1479.
5. Banki K, Hutter E, Colombo E, et al. Glutathione levels and sensitivity to apoptosis are regulated by changes in transaldolase expression[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(51): 32994-33001.
6. Esposito M, Venkatesh V, Otvos L, et al. Human transaldolase and cross-reactive viral epitopes identified by autoantibodies of multiple sclerosis patients[J]. *J Immunol*, 1999, 163(7): 4027-4032.
7. Colombo E, Banki K, Tatum AH, et al. Comparative analysis of antibody and cell-mediated autoimmunity to transaldolase and myelin basic protein in patients with multiple sclerosis[J]. *J Clin Invest*, 1997, 99(6): 1238-1250.
8. Banki K, Colombo E, Sia F, et al. Oligodendrocyte-specific expression and autoantigenicity of transaldolase in multiple sclerosis[J]. *J Exp Med* 1994, 180(5): 1649-1663.
9. Lachaise F, Martin G, Drougard C, et al. Relationship between posttranslational modification of transaldolase and catalase deficiency in UV-sensitive repair-deficient xeroderma pigmentosum fibroblasts and SV40-transformed human cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2001, 30(12): 1365-1373.
10. 赵世红, 何守志. 氩激光诱导的大鼠脉络膜新生血管模型研究[J]. 中华眼科杂志, 2003, 39(5): 298-302.
ZHAO Shihong, HE Shouzhi. Study on the experimental model of krypton laser-induced choroidal neovascularization in the rats[J]. *Chinese Journal of Ophthalmology*, 2003, 39(5): 298-302.
11. Bhutto I, Luttj, G. Understanding age-related macular degeneration (AMD): Relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex[J]. *Mol Aspects Med*, 2012, 33(4): 295-317.
12. 朱洁, 王雨生, 惠延年. 脉络膜新生血管的生成和抑制[J]. 眼科

- 新进展, 2004, 24(1): 57-60.
- ZHU Jie, WANG Yusheng, HUI Yannian. Formation of choroidal neovascularization and its inhibition[J]. Recent Advances in Ophthalmology, 2004, 24(1): 57-60.
13. Banki K, Hutter E, Gonchoroff, et al. Molecular ordering in HIV-induced apoptosis[J]. Biochemistry, 1998, 273, 11944-11953.
 14. 闫焱, 王玲. 年龄相关性黄斑变性发病机制的研究进展[J]. 国际眼科杂志, 2008, 8(9): 1888-1890.
YAN Yan, WANG Ling. Recent advance of the study on pathogenesis of age-related macular degeneration[J]. International Journal of Ophthalmology 2008, 8(9): 1888-1890.
 15. Cronin T, Raffelsberger W, Lee-Rivera I, et al. The disruption of the rod-derived cone viability gene leads to photoreceptor dysfunction and susceptibility to oxidative stress[J]. Cell Death Differ, 2010, 17(7): 1199-1210.
 16. Holmgren A. Thioredoxin and glutaredoxin: general aspects and involvement in redox regulation[M]//Aro EM, Andersson B. Regulation of photosynthesis. advances in photosynthesis and respiration. Dordrecht: Springer, 2003: 321-330.
 17. Cai J, Nelson KC, Wu M, et al. Oxidative damage and protection of the RPE[J]. Prog Retin Eye Res, 2000, 19(2): 205-221.

本文引用: 覃珂, 许燕, 周希媛, 刘丹宁. 转醛醇酶与大鼠脉络膜新生血管形成的相关性及其作用机制[J]. 眼科学报, 2020, 35(6): 393-399. doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2020.11.25

Cite this article as: QIN Ke, XU Yan, ZHOU Xiyuan, LIU Danning. Correlation between transaldolase and choroidal neovascularization and its mechanism in rat models[J]. Yan Ke Xue Bao, 2020, 35(6): 393-399. doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2020.11.25