

## 【实验研究】

皮百木 宋玫侠

**1.1 材料** 链脲佐菌素(STZ)、PACAP38(美国 Sigma Aldrich 公司), Micron IV 视网膜影像系统(美国 Phoenix Research Lab), GenTeal 凝胶(美国 Novartis 公司), 光学显微镜(德国 Zeiss Axioplan 公司), RIPA 裂解液(瑞士 Roche Diagnostics 公司), BCA 蛋白质检测试剂盒(美国 Pierce 公司), 山羊抗 TRPC6、鼠抗  $\beta$ -actin 一抗、辣根过氧化物酶标记的二抗 IgG(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司), MTT 试剂盒与超敏 ECL 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司), 胎牛血清 FBS(美国 HyClone 公司), DMEM/F12 完全培养基(美国 Thermo Scientific 公司)等。

## 1.2 方法

**1.2.1 动物饲养** 6~8 周龄 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 30 只, 体质量 100~120 g, 购自上海 SIPPR/BK 实验动物有限公司(动物合格证编号: SCXK2008-0016)。将其饲养于温度为 25~28 °C、相对湿度为 70%~85%、明/暗周期为 12 h 的标准化动物实验室, 自由进食与饮水。

**1.2.2 动物模型的构建及分组** 将 SD 大鼠分为空白对照组及 DR 模型组(STZ 组), 每组 15 只。大鼠糖尿病模型是通过单次腹腔注射 STZ 构建的。具体操作: 注射 STZ 前大鼠禁食 12 h, 取适量 STZ 溶于柠檬酸钠缓冲液(pH 4.5), 按照 60 mg·kg<sup>-1</sup> 体质量对大鼠进行一次性腹腔注射。对照组大鼠注射相同体积的柠檬酸钠缓冲液。药物注射 48 h 后检测大鼠血糖, 其血糖浓度超过 16.7 mmol·L<sup>-1</sup>、尿量及饮水明显增多即视为建模成功。STZ 组根据不同的干预措施, 再进行分组。注射 STZ 后 2 周, 一次性向大鼠一眼玻璃体内注射含 100 μmol·L<sup>-1</sup> PACAP38 PBS 溶液 4 μL, 为 STZ+PACAP38 组; 另一眼以同样的方法注射相同体积的 PBS 作为对照, 为 STZ 对照组。注射 PACAP38 6 周后, 腹腔注射致死量的戊巴比妥钠使各组大鼠安乐死, 立即收集大鼠视网膜组织, 一部分置于冰冻缓冲液中匀浆, 进行 Western blot 检测, 另一部分置于 40 g·L<sup>-1</sup> 多聚甲醛中固定, 用于后续免疫组织化学分析。

**1.2.3 光学相干断层扫描** 应用 Micron IV 视网膜影像系统分别在注射前及 PACAP38 注射后 3 周、6 周对大鼠进行光学相干断层扫描(OCT)以确定大鼠视网膜厚度。具体操作: 将大鼠麻醉, 用 10 g·L<sup>-1</sup> 托品酰胺滴眼散大瞳孔。用 GenTeal 凝胶润滑角膜, 并将 Micron 目镜置于凝胶与眼睛直接接触的位置。使用全扫描设置以平均 10 帧·s<sup>-1</sup> 扫描速度捕获 OCT 图像。每只眼睛在相对于视神经上、下和鼻、颞方向各拍摄 3 张图像。

**1.2.4 免疫组织化学分析** 取固定于 40 g·L<sup>-1</sup> 多聚甲醛的视网膜组织, 用石蜡包埋, 常规切片(厚 3 μm), 脱蜡、水化, 并将切片置于体积分数 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/甲醇溶液中孵育 30 min 以淬灭内源性过氧化物酶活性, 随后用 PBS 漂洗 20 min。将切片用 PBS 中的体积分数 1% 牛血清白蛋白(BSA)处理 1 h 以减少非特异性染色, 4 °C 下与山羊抗 TRPC6 孵育过夜(1:100)。PBS 漂洗后将切片于室温下辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1000)孵育 10 min, PBS 冲洗后与二氨基联苯胺孵育 5 min, 苏木精复染。取染色的部分切片进行脱水、透化, 最后用中性树脂封片, 于光学显微镜下观察。

**1.2.5 Western blot 检测各组大鼠视网膜组织中 TRPC6 的表达** 收集各组大鼠视网膜组织, 取适量置于含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液中冰浴进行裂解, 低温离心收集上清液。采用 BCA 蛋白质检测试

剂盒测定各组大鼠视网膜组织中蛋白质浓度。调整各组蛋白样本 35 μg 进行上样, 采用 100 g·L<sup>-1</sup> SDS-PAGE 分离胶进行电泳, 随后采用湿法转膜将蛋白质转移于 PVDF 膜。将膜用 50 g·L<sup>-1</sup> 脱脂牛奶在室温下封闭 2 h, 随后将 PVDF 膜分别置于含山羊抗 TRPC6(1:800)和兔抗 β-actin(1:1000)一抗稀释液中 4 °C 下孵育过夜。第 2 天用 TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min, 室温下用辣根过氧化物酶标记的二抗稀释液中(1:5000)孵育 1 h。TBST 漂洗同前。采用超敏 ECL 试剂盒(上海碧云天生物公司)显影曝光, 采用自动图像分析系统对蛋白质条带进行扫描和光密度分析, 以 β-actin 作为内参, 进行统计分析。实验独立重复 3 次。

**1.3 RGC-5 细胞培养** 人 RGC-5 细胞购自美国 ATCC 公司, 将其置于含有体积分数 10% 胎牛血清、100×10<sup>3</sup> U·L<sup>-1</sup> 青霉素和 100×10<sup>3</sup> U·L<sup>-1</sup> 链霉素的 DMEM/F12 完全培养基中, 置于 37 °C、含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。每 1~2 d 换液 1 次, 每周按照 1:2 的比例传代培养 1 次, 取传至 3 代对数生长期的细胞用于后续实验。

**1.3.1 RGC-5 细胞分组及处理** 取对数生长期的 RGC-5 细胞, 用胰蛋白酶消化后, 调整细胞密度为 500×10<sup>3</sup> 个·mL<sup>-1</sup> 接种于 HTS Transwell 渗透板上培养 7 d, 隔天换液。随后, 将 Transwell 渗透板中一半的细胞用含 5.5 mmol·L<sup>-1</sup> D-葡萄糖 DMEM/F12 完全培养基继续培养 7 d, 作为对照(NG)组; 另一半细胞用含 25 mmol·L<sup>-1</sup> D-葡萄糖 DMEM/F12 培养液继续培养 7 d, 作为高葡萄糖(HG)组。

收集部分 HG 组细胞, 调整细胞浓度为 5000 个·mL<sup>-1</sup> 接种于 96 孔板中, 用含 25 mmol·L<sup>-1</sup> D-葡萄糖 DMEM/F12 培养液培养过夜。第 2 天弃去原有培养基, 用单独含 100 μmol·L<sup>-1</sup> 低氧模拟剂去铁胺(desferrioxamine, DFO)或分别联合含 100 nmol·L<sup>-1</sup> PACAP38、100 nmol·L<sup>-1</sup> TRPC6 通道激动剂(OAG)、10 μmol·L<sup>-1</sup> PAC1 受体拮抗剂(PACAP6-38)、20 nmol·L<sup>-1</sup> TRPC6 通道阻滞剂(SKF96365)的高糖 DMEM/F12 培养液培养 24 h。NG 组细胞以相同的密度接种于 96 孔板中, 用含 5.5 mmol·L<sup>-1</sup> D-葡萄糖 DMEM/F12 完全培养基于 37 °C、含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养。实验结束后, 用 MTT 法检测各组细胞的活性。

**1.3.2 MTT 法检测各组 RGC-5 细胞的活力** 每孔按照 20 μL MTT 溶液(0.5 g·L<sup>-1</sup> MTT 溶于 PBS)加入 96 孔板中, 于 37 °C、含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 4 h。将 96 孔板低速离心后, 弃去原培养基, 加入 150 μL 二甲亚砜室温下孵育 10 min。采用 FL-600 酶标仪于 570 nm 波长处检测各组的吸光度(A)值, 每组 5 个复孔, 实验独立重复 3 次。细胞活力 =  $A_{\text{实验组}} / A_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

**1.4 统计学方法** 数据采用 SPSS 17.0 统计学软件



进行分析。计量数据采用均数 ± 标准差表示,组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)进行检验。检验水准:α=0.05。

2 结果

2.1 各组大鼠体质量和血糖变化 与空白对照组大鼠相比,STZ 组大鼠注射 STZ 后 2 周以及注射 PACAP38 1 周后、3 周后、6 周后体质量均显著降低(均为  $P<0.05$ ),且血糖水平均明显升高(均为  $P<0.05$ )。见表 1。

表 1 各组大鼠体质量和血糖浓度变化 (n=8,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	时间	体质量/g	血糖浓度/mmol · L <sup>-1</sup>
空白对照组	造模前	139.38 ± 12.05	4.45 ± 0.54
	注射 STZ 1 周后	153.82 ± 14.07	4.46 ± 0.50
	注射 STZ 2 周后	178.60 ± 15.25	4.40 ± 0.52
	注射 PACAP38 1 周后	204.83 ± 19.46	4.44 ± 0.52
	注射 PACAP38 3 周后	258.77 ± 21.03	4.47 ± 0.55
	注射 PACAP38 6 周后	335.33 ± 26.05	4.48 ± 0.53
STZ 组	造模前	141.81 ± 13.42	4.48 ± 0.52
	注射 STZ 1 周后	152.22 ± 10.87	19.07 ± 1.46 **
	注射 STZ 2 周后	159.74 ± 11.21 *	24.36 ± 1.48 **
	注射 PACAP38 1 周后	172.31 ± 12.46 *	24.85 ± 1.52 **
	注射 PACAP38 3 周后	193.13 ± 14.57 **	25.01 ± 1.64 **
	注射 PACAP38 6 周后	209.42 ± 15.13 **	25.58 ± 1.61 **

注:与同时时间点空白对照组相比, \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$

2.2 PACAP38 对 DR 大鼠视网膜厚度的影响

OCT 扫描结果显示:造模前各组大鼠视网膜厚度相似。注射 PACAP38 3 周后,STZ 对照组和 STZ + PACAP38 组的视网膜厚度显著高于空白对照组 ( $P<0.05$ ),且 STZ 对照组的视网膜厚度显著高于

STZ + PACAP38 组 ( $P<0.05$ )。玻璃体内注射 PACAP38 6 周后,STZ 对照组的视网膜厚度显著高于空白对照组 ( $P<0.05$ ),而 STZ + PACAP38 组视网膜厚度较空白对照组略高,其差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。见表 2。

表 2 PACAP38 对 DR 大鼠视网膜厚度的影响

组别	视网膜厚度/μm		
	实验前	注射 PACAP38 3 周后	注射 PACAP38 6 周后
空白对照组	77.36 ± 3.82	78.15 ± 3.24	78.06 ± 3.49
STZ 对照组	78.11 ± 3.19	87.17 ± 3.91 **	88.75 ± 2.86 **
STZ + PACAP38 组	77.84 ± 3.12	82.34 ± 3.56 **	79.16 ± 2.91 **

注:与空白对照组相比, \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.001$ ;与 STZ 对照组相比, #  $P<0.05$ , ##  $P<0.01$

2.3 PACAP38 对 DR 大鼠视网膜组织中 TRPC6 表达的影响

免疫组织化学检测结果显示:空白对照组大鼠视网膜组织中发现较弱 TRPC6 的阳性表达(呈黄褐色斑点,图 1A)。与空白对照组相比,STZ 对照组大鼠视网膜神经节细胞层(ganglion cell layer, GCL)、内丛状层(inner plexiform layer, IPL)、内核层(inner kernel layer, INL)和外丛状层(outer plexiform layer, OPL)中均发现 TRPC6 阳性表达较显著(图 1B);STZ + PACAP38 组大鼠 GCL、IPL、INL、OPL 中 TRPC6 阳性表达较 STZ 对照组大鼠明显减少(图 1C)。Western blot 检测结果显示:与空白对照组相比,STZ 对照组和 STZ + PACAP38 组大鼠视网膜组织中 TRPC6 蛋白表达均显著增加(均为  $P<0.05$ ),且 STZ 对照组大鼠视网膜 TRPC6 蛋白表达显著高于 STZ + PACAP38 组 ( $P<0.01$ )。见图 2、表 3。

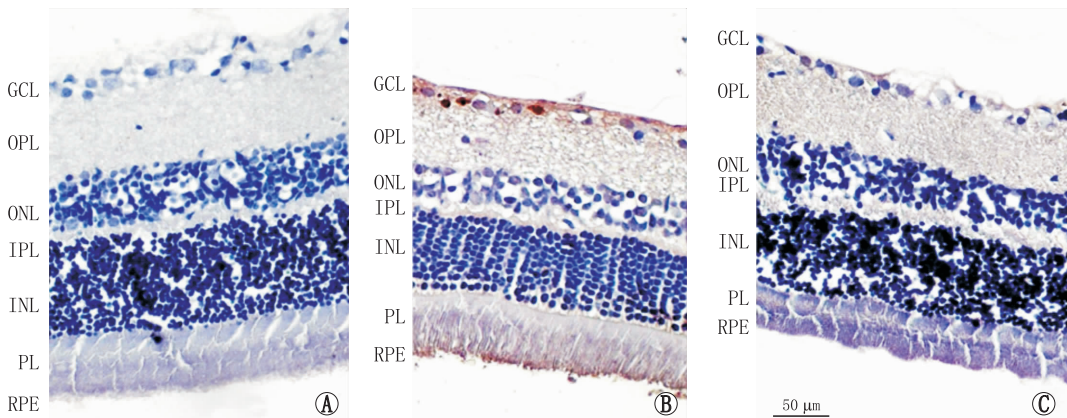


图 1 PACAP38 对 DR 大鼠视网膜组织中 TRPC6 表达的影响 A:空白对照组;B:STZ 对照组;C:STZ + PACAP38 组

2.4 PACAP38 对 RGC-5 细胞活力的影响 MTT 检测结果显示:与 NG 组相比,HG + DFO 组的细胞活性显著降低 ( $P<0.001$ )。与 HG + DFO 组相比,PACAP38 或 SKF96365 处理可增强 HG + DFO 培养的细胞活力(均为  $P<0.01$ )。与 HG + DFO 组相比,PAC1 受体拮抗剂(PACAP6-38)或 TRPC6 通道激动

剂(OAG)处理 24 h 后 RGC-5 细胞活力明显降低(均为  $P<0.05$ )。与 HG + DFO + OAG 组相比,HG + DFO + PACAP38 + OAG 组 RGC-5 细胞活力显著增加 ( $P<0.01$ );相反,与 HG + DFO + SKF96365 组相比,HG + DFO + SKF96365 + PACAP638 组细胞活力未见增加。见表 4。

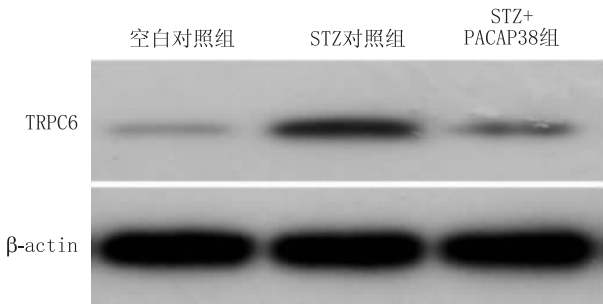


图2 Western blot 检测 PACAP38 对 DR 大鼠视网膜组织中 TRPC6 蛋白表达的影响

表3 PACAP38 对 DR 大鼠视网膜组织中 TRPC6 蛋白相对表达的影响

组别	TRPC6 蛋白相对表达	F 值	P 值
空白对照组	1.01 ± 0.09	3.76	-
STZ 对照组	3.24 ± 0.58 *	6.04	0.000
STZ + PACAP38 组	1.62 ± 0.11 #	4.65	0.008

注:与空白对照组相比, \*  $P < 0.001$ ; 与 STZ 对照组相比, #  $P < 0.01$

表4 PACAP38 对暴露于高血糖/低氧的 RGC-5 细胞活力的影响

组别	RGC-5 细胞活力	F 值	P 值
NG 组	1.04 ± 0.08	2.06	-
HG 组	0.62 ± 0.25 *	3.14	0.000
HG + DFO 组	0.38 ± 0.22 **	2.97	0.000
HG + DFO + OAG 组	0.29 ± 0.17 * &&	4.01	0.007
HG + DFO + PACAP38 组	0.57 ± 0.18 * &&	4.23	0.000
HG + DFO + SKF96365 组	0.54 ± 0.14 * &&	3.78	0.006
HG + DFO + PACAP638 组	0.32 ± 0.15 * &	2.56	0.014
HG + DFO + PACAP38 + SKF96365 组	0.51 ± 0.11 *	2.34	0.000
HG + DFO + PACAP38 + OAG 组	0.35 ± 0.16 * △	2.67	0.009

注:与 NG 组相比, \*  $P < 0.001$ ; 与 HG 组相比, #  $P < 0.001$ ; 与 HG + DFO 组相比, &  $P < 0.05$ , &&  $P < 0.01$ ; 与 HG + DFO + OAG 组相比, △  $P < 0.01$

3 讨论

STZ 大鼠是目前公认的经典 DR 模型,可模拟人体 DR 的大致病理变化<sup>[10]</sup>。本研究中腹腔一次性注射 STZ 诱导 DR 大鼠动物模型,与空白对照组相比,经腹腔注射 STZ 48 h 后,STZ 大鼠血糖浓度大于 16.7 mmol · L<sup>-1</sup>,尿量及饮水明显增多,且随着注射时间延长,其血糖及较空白对照组显著升高,体质量较对照组大鼠明显降低( $P < 0.05$ )。这提示 DR 动物模型制作成功,以确保后续实验结果顺利进行。

近年来有研究证实,内源性 PACAP 的减少导致 N-甲基-D-天冬氨酸引起的神经元损伤增加,但外源性 PACAP 的加入具有代偿作用。由于 PACAP 和垂体腺苷酸环化酶 1 激活受体 (pituitary adenylate cyclase 1 activated receptor, PAC1-R) 均在 RGCs 中表达,玻璃体内注射 PACAP 可通过自分泌或旁分泌系统发挥视网膜神经保护作用<sup>[2]</sup>。有学者发现,PAC-

AP 可促使视网膜细胞分裂和诱导神经节细胞分化,有助于视网膜色素上皮的发展<sup>[11]</sup>。此外,还有学者发现 PACAP38 能够调节 VEGF 的释放,可在高糖/低氧双重损伤后恢复外部血-视网膜屏障完整性<sup>[12]</sup>。Seki 等<sup>[13]</sup>研究证明,玻璃体内注射 100 μmol · L<sup>-1</sup> 的 PACAP38 具有良好的神经保护作用。因此,本研究采用与 Seki 等<sup>[13]</sup>报道相似的干预措施,发现 PACAP38 有效逆转了糖尿病大鼠视网膜增厚,且 PACAP38 处理可提高暴露于高血糖/低氧环境中 RGC-5 细胞活力。这说明 PACAP38 对 DR 期间发生的一些病理生理变化具有保护作用。

近年来还有研究表明,PACAP 的某些生物效应是通过 TRPC 介导的<sup>[8-9]</sup>。自果蝇光转导突变中首次发现 TRPC 以来,越来越多的证据表明 TRPC 在神经退行性疾病中扮演着重要作用。汪书越<sup>[14]</sup>对视网膜 TRPC 的某些功能进行了初步研究,结果表明,TRPC 可能介导 RGC 的基础 Ca<sup>2+</sup> 流入,激活 TRPC 导致视网膜 Ca<sup>2+</sup> 超载变性。最近有研究发现,抑制内源性 TRPC6 可能有助于改善视网膜缺血,发挥神经保护作用<sup>[15]</sup>。TRPC6 的活化在视网膜损伤产生的反应性星形胶质细胞中大量表达,同时触发了表征反应性胶质增生的其他几种基因的上调或下调<sup>[16]</sup>。本研究免疫组织化学结果发现,STZ 对照组大鼠视网膜的 GCL、IPL、INL 和 OPL 中均发现 TRPC6 阳性表达,这与 Wang 等<sup>[15]</sup>报道结果相一致,表明代谢异常的糖尿病微环境会触发星形胶质细胞的活化,从而产生多种促炎症细胞因子,导致 TRPC6 活化<sup>[17]</sup>。此外本研究还发现,PACAP38 的干预可逆转由 STZ 诱导 DR 大鼠视网膜组织中 TRPC6 阳性表达,这提示 PACAP38 可通过调控 TRPC6 通路活化保护 DR 损害的视网膜屏障。

为阐明 PACAP38 与 TRPC6 通路之间的关系对 DR 生理病理变化的影响,本研究通过视网膜屏障的体外细胞模型作初步分析。将 RGC-5 细胞暴露于高糖/低氧环境中,来模拟 DR 的体内微环境。由 MTT 检测结果可知:与 HG 组及 HG + DFO 组相比,PACAP38 处理可明显提高 HG + DFO 培养的 RGC-5 细胞活力( $P < 0.01$ );与 HG + DFO + PACAP38 组相比,采用 PACAP38 和 OAG 联合处理暴露于高糖/低氧环境中 RGC-5 细胞可显著降低细胞活性( $P < 0.05$ )。有研究发现 TRPC6 活化涉及多种细胞生理过程,包括细胞增殖、运动性和黏附性<sup>[18-19]</sup>。本研究结果提示 PACAP38 与 TRPC6 之间的相互作用与视神经细胞存活有关,且外源性 PACAP38 干预可提高高糖/低氧环境中 RGC-5 细胞的活性。

有关 PACAP38 与 TRPC6 的关联性在 DR 中的作用目前还尚未见报道。本研究采用 STZ 腹腔注射诱导大鼠 DR 模型,玻璃体内注射给予 PACAP38 干预,发现 PACAP38 可减轻 STZ 诱导的 DR 损伤,且通过抑制 TRPC6 的过表达有效逆转了糖尿病大鼠视

网膜增厚,提高了暴露于高血糖/低氧环境中 RGC-5 细胞活力。这提示 PACAP38 与 TRPC6 参与 DR 的进程,具体的分子机制仍需进一步研究。

## 参考文献

- [1] CAO D, YANG D, HUANG Z, ZENG Y, WANG J, HU Y, *et al.* Optical coherence tomography angiography discerns preclinical diabetic retinopathy in eyes of patients with type 2 diabetes without clinical diabetic retinopathy [J]. *Acta Diabetol*, 2018, 55 (5): 469-477.
- [2] D'AMICO A G, MAUGERI G, REITANO R, BULOCCO C, SACCONI S, DRAGO F, *et al.* PACAP modulates expression of hypoxia-inducible factors in streptozotocin-induced diabetic rat retina [J]. *J Mol Neurosci*, 2015, 57 (4): 501-509.
- [3] LAKK M, SZABO B, VOLGYI B, GABRIEL R, DENES V. Development-related splicing regulates pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptors in the retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53 (12): 7825-7832.
- [4] ISOBE K, YOKOYAMA T, MORIGUCHI-MORI K, KUMAGAI M, SATOH Y I, KUJI A, *et al.* Role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in intracellular calcium dynamics of neurons and satellite cells in rat superior cervical ganglia [J]. *Biomed Res*, 2017, 38 (2): 99-109.
- [5] 颜秋霞, 马义. PACAP 及其衍生物治疗糖尿病及其并发症的研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2018, 38 (1): 62-68.  
YAN Q X, MA Y. Research progress of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as a new potential therapeutic peptide in diabetes and its complications [J]. *Chin J Biotechnol*, 2018, 38 (1): 62-68.
- [6] ARREDONDO Z D, NOGUEZ R I, BAUTISTA A C, VAZQUEZ R O, BERNARDINI M, FIORIO P A, *et al.* Dual contribution of TRPV4 antagonism in the regulatory effect of vasoinhibins on blood-retinal barrier permeability: diabetic milieu makes a difference [J]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1): 9652.
- [7] SACHDEVA R, SCHLOTTERER A, SCHUMACHER D, MATKA C, MATKA I, DIETRICH N, *et al.* TRPC proteins contribute to development of diabetic retinopathy and regulate glyoxalase 1 activity and methylglyoxal accumulation [J]. *Mol Metab*, 2018, 9: 156-167.
- [8] ROY A, DERAHHAN F, WILSON R J. Stress peptide PACAP engages multiple signaling pathways within the carotid body to initiate excitatory responses in respiratory and sympathetic chemosensory afferents [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2013, 304 (12): R1070-R1084.
- [9] MERRIAM L A, ROMAN C W, BARAN C N, GIRARD B M, MAY V, PARSONS R I. Pretreatment with nonselective cationic channel inhibitors blunts the pacap-induced increase in guinea pig cardiac neuron excitability [J]. *J Mol Neurosci*, 2012, 48 (3): 721-729.
- [10] 李立, 汤永强. 糖尿病大鼠视网膜缺氧诱导因子-1 $\alpha$  和血管内皮生长因子的表达 [J]. 第四军医大学学报, 2007, 28 (7): 641-644.  
LI L, TANG Y Q. Expressions of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor in retina of streptozotocin induced diabetic rats [J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2007, 28 (7): 641-644.
- [11] LAKK M, DENES V, KOVACS K, HIDEIG O, SZABO B F, GABRIEL R. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP), a novel secretagogue, regulates secreted morphogens in newborn rat retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58 (1): 565-572.
- [12] D'AMICO A G, MAUGERI G, RASA D M, BUCOLO C, SACCONI S, FEDERICO C, *et al.* Modulation of IL-1 $\beta$  and VEGF expression in rat diabetic retinopathy after PACAP administration [J]. *Peptides*, 2017, 97: 64-69.
- [13] SEKI T, ITOH H, NAKAMACHI T, SHIODA S. Suppression of ganglion cell death by pacap following optic nerve transection in the rat [J]. *J Mol Neurosci*, 2008, 36 (1-3): 57-60.
- [14] 汪书越. TRPC 通道在大鼠视网膜的表达及 TRPC6 对慢性高血压 RGC 凋亡的作用 [D]. 上海: 复旦大学, 2014.  
WANG S Y. Expression of rat channel in rat retina and effect of TRPC6 on apoptosis of chronic high intraocular pressure RGC [D]. Shanghai: Fudan University, 2014.
- [15] WANG X, TENG L, LI A, GE J, LATIES A M, ZHANG X. TRPC6 channel protects retinal ganglion cells in a rat model of retinal ischemia/reperfusion-induced cell death [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51 (11): 5751-5758.
- [16] SHIRAKAWA H, KATSUMOTO R, IIDA S, MIYAKE T, HIGUCHI T, NAGASHIMA T, *et al.* Sphingosine-1-phosphate induces Ca<sup>2+</sup> signaling and CXCL1 release via TRPC6 channel in astrocytes [J]. *Glia*, 2017, 65 (6): 1005-1016.
- [17] KO A R, KANG T C. TRPC6-mediated ERK1/2 phosphorylation prevents dentate granule cell degeneration via inhibiting mitochondrial elongation [J]. *Neuropharmacology*, 2017, 121: 120-129.
- [18] 张礼均, 冯华. 星形胶质细胞活化后瞬时受体电位通道 6 在 TBI 中的作用 [J]. 重庆医学, 2017, 46 (18): 2456-2458.  
ZHANG L J, FENG H. Role of transient receptor potential channel 6 in TBI after astrocyte activation [J]. *Chongqing Med*, 2017, 46 (18): 2456-2458.
- [19] 侯常青, 虞必光. 瞬时受体电位通道和消化系统肿瘤的关系研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29 (6): 129-134.  
HOU C Q, TUO B G. Research progress on the relationship between transient receptor potential channels and digestive system tumors [J]. *Chin J Comparat Med*, 2019, 29 (6): 129-134.

## Regulation effect of PACAP38 on TRPC6 expression in diabetic retinopathy rats

PI Baimu<sup>1</sup>, SONG Meixia<sup>2</sup>

1. Department of Ophthalmology, Kaifeng Eye Hospital, Kaifeng Central Hospital, Kaifeng 475000, Henan Province, China
2. Department of Ophthalmology, Joint Logistics Support Force 988 Hospital, Zhengzhou 450007, Henan Province, China

Corresponding author: SONG Meixia, E-mail: baypii@163.com

**[Abstract] Objective** To investigate whether the effect of pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP38) on retina in diabetic retinopathy (DR) was mediated by transient receptor potential channel 6 (TRPC6). **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into a normal control group and a streptozotocin (STZ) model group, with 15 in each group. A single intraperitoneal injection of STZ induced an animal model of diabetes in rats. According to different intervention methods, two weeks after STZ injection, 100  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> PACAP38 (STZ + PACAP38 group) was injected into the vitreous cavity of one eye of rat at one time, and the same amount of PBS was used as a control (STZ group) in the other eye. Western blot and immunohistochemistry were used to analyze the expression of TRPC6 in retinal tissue. Retinal thickness of rats was measured by means of optical coherence tomography. Retinal ganglion cell line (RGC-5 cells) were exposed to hyperglycemia and hypoxia, and were treated with PACAP38, TRPC6 channel agonist (OAG), PAC1 receptor antagonist (PACAP6-38), and TRPC6 channel blocker (SKF96365) respectively, while the normal control group was treated normally in complete medium. The cell viability of each group was analyzed by MTT methods. **Results** Compared with



引文格式:桂馥,吴宏禧,游志鹏,章余兰. miR-21 对视网膜母细胞瘤细胞增殖的影响及作用机制[J]. 眼科新进展, 2020, 40(7): 630-633. doi:10. 13389/j. cnki. rao. 2020. 0144

【实验研究】

# miR-21 对视网膜母细胞瘤细胞增殖的影响及作用机制

桂馥 吴宏禧 游志鹏 章余兰

**【摘要】 目的** 探讨 MicroRNA-21 (miR-21) 对视网膜母细胞瘤 (RB) 细胞增殖的影响及作用机制。**方法** 采用 Real-time PCR 技术检测 miR-21 在正常视网膜组织和确诊 RB 组织中的表达情况;然后在转染的基础上运用 MTT 检查 RB 细胞存活率、流式细胞仪检测细胞凋亡率。Western blot 法检测与细胞凋亡相关蛋白 PDCD4、Bax、Bcl-2 的表达。**结果** 与正常视网膜组织 miR-21 表达 ( $0.703 \pm 0.071$ ) 相比, RB 组织 miR-21 为高表达 ( $2.214 \pm 0.162$ ), 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。在 Weri-Rb-1 细胞中, 与 NC 组 ( $2.245 \pm 0.213$ ) 相比, miR-21 抑制剂转染后明显降低了 miR-21 的表达水平, miR-21 inhibitor 组为  $0.683 \pm 0.075$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。两组细胞转染后 24 h、48 h、72 h、96 h, MTT 测定法检测细胞活力结果显示: 两组 24 h 的 A 值比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), miR-21 inhibitor 组在 48 h、72 h、96 h 的 A 值均低于 NC 组, 差异均有统计学意义 (均为  $P < 0.01$ )。流式细胞术检测结果显示: NC 组凋亡细胞在总细胞中百分比为 ( $3.045 \pm 0.301$ )% 和 ( $4.832 \pm 0.493$ )%, miR-21 inhibitor 组凋亡细胞在总细胞中百分比为 ( $2.593 \pm 0.257$ )% 和 ( $40.167 \pm 4.014$ )%, miR-21 inhibitor 组 Weri-Rb-1 细胞的凋亡率明显高于 miR-21 NC 组 ( $P < 0.01$ )。Western blot 检测结果显示: NC 组 PDCD4 表达 ( $0.192 \pm 0.045$ ) 相比 miR-21 inhibitor 组 ( $0.683 \pm 0.091$ ) 表达明显减少, NC 组 Bax 的蛋白表达水平 ( $0.143 \pm 0.036$ ) 相比 miR-21 inhibitor 组 ( $1.192 \pm 0.054$ ) 也明显减少, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), NC 组 Bcl-2 蛋白表达 ( $0.864 \pm 0.038$ ) 相比 miR-21 inhibitor 组 ( $0.257 \pm 0.026$ ) 明显增多, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论** miR-21 是 RB 的促癌基因, miR-21 抑制剂可以通过降低 miR-21 表达抑制肿瘤细胞的增殖、促进细胞凋亡, 这一过程与 PDCD4、Bax、Bcl-2 等凋亡相关蛋白有关。

**【关键词】** miR-21; 视网膜母细胞瘤; 细胞增殖; 凋亡

**【中图分类号】** R774

视网膜母细胞瘤 (RB) 是婴幼儿中最常见的原发性眼内恶性肿瘤, 在婴幼儿易患的全部恶性肿瘤中占 3%。因本病发病年龄小, 易造成诊断与治疗的延迟、肿瘤细胞的恶化与迁移, 进而引发较高的死亡率<sup>[1-2]</sup>。因此, 为了减轻患者的痛苦以及延长寿命, 及时的疾病诊断以及有效的治疗是必不可少的。微小 RNA (microRNAs, miR) 是参与细胞中基因表达转录后调控的短链非编码 RNA, 影响着多种生物学过程, 如细胞发育、增殖及分化等。有研究表明<sup>[3]</sup>, miRNA 既可以扮演致癌基因, 又可以起到抑癌基因的作用来调节肿瘤的增殖及凋亡过程。miR-21 在多种类型的肿瘤以及肿瘤细胞系中都呈高表达, 并且是最显著的促癌因子之一<sup>[4-6]</sup>。但是 miR-21 作为一

个特殊的 miRNA, 是如何在 RB 发生发展过程中发挥作用的, 而且其影响细胞生长或凋亡的具体机制及途径也未知。因此, 本研究旨在探讨 miR-21 在 RB 组织及 Weri-Rb-1 细胞 (人视网膜神经胶质瘤细胞) 中的表达及其对细胞增殖的影响及其作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 材料和分组** Weri-Rb-1 细胞购买于中国科学院细胞库。miR-21 抑制剂和 miR-21 阴性对照购买于上海吉码药物有限责任公司。收集 2015 年 1 月至 2018 年 5 月在南昌大学第二附属医院诊断为 RB 并行眼球摘除术的 15 例患者组织标本和 15 例角膜移植供体眼的视网膜组织标本。在标本离体后 30

the normal control group, the thickness of the retina in the STZ group increased significantly ( $P < 0.05$ ), while the thickness of the retina in the STZ + PACAP38 group was thinner than that in the STZ group ( $P < 0.05$ ). From the results of immunohistochemistry, compared with the control group, TRPC6 immunopositive signals were detected in the ganglion cell layer, inner plexiform layer, inner core layer and outer plexiform layer of the STZ group and STZ + PACAP38 group. The expression of TRPC6 immunopositive signal in STZ group was significantly higher than that in STZ + PACAP38 group ( $P < 0.05$ ). Western blot analysis showed that the expression of TRPC6 protein in STZ group was significantly higher than that in STZ + PACAP38 group ( $P < 0.01$ ). Compared with the HG + DFO + OAG group, the combined treatment of PACAP38 and OAG significantly increased the viability of RGC-5 cells ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** PACAP38 can inhibit retinal thickening of DR rats induced by STZ, and increase the viability of RGC-5 cells exposed to hyperglycemia/hypoxia *in vitro*. The possible mechanism is that it can effectively reverse the retinopathy of diabetic rats by regulating TRPC6 overexpression.

**【Key words】** pituitary adenylate cyclase activating peptide; transient receptor potential channel 6; diabetic retinopathy; retinal ganglion cell; rat model