

重组蛋白PTD-HSP27进入细胞保护视网膜神经节 细胞抗氧化损伤

吴怡凝^{1,2}, 陈梦婷¹, 沙霄媛¹, 刘莲¹, 钟敬祥¹

(1. 暨南大学附属第一医院眼科, 广东广州 510630; 2. 广东省妇幼保健院眼科, 广东广州 511400)

摘要:【目的】观察重组蛋白PTD-HSP27穿透视网膜神经节细胞RGC-5的能力及其效率,测定重组蛋白PTD-HSP27对氯化钴(CoCl₂)诱导的视网膜神经节细胞(RGC-5)细胞损伤的保护作用并初步探讨其机制。【方法】用FITC标记重组蛋白PTD-HSP27,荧光显微镜观察PTD-HSP27-FITC的穿透细胞膜的能力,用紫外分光光度计检测PTD-HSP27-FITC的穿膜效率,随后建立RGC-5细胞损伤模型。实验分为正常对照组、CoCl₂损伤组、PTD-HSP27+CoCl₂处理组,分别进行相应处理后,通过Annexin V-FITC/PI双染法检测各组细胞凋亡比例;Western Blotting检测各组细胞Bcl-2、Bax和Caspase-3等凋亡相关蛋白的表达水平。【结果】荧光显微镜下观察到重组蛋白PTD-HSP27-FITC能够有效通过细胞膜进入RGC-5细胞内,其进入细胞的效率为(47.29±2.33)%。CoCl₂浓度依赖性地抑制RGC-5细胞存活率。比较正常对照组、CoCl₂损伤组和PTD-HSP27+CoCl₂处理组的检测结果示:PTD-HSP27能有效抑制CoCl₂诱导的RGC-5细胞早期凋亡($P<0.01$);PTD-HSP27能有效提高Bcl-2/Bax的表达比例,并抑制Caspase-3的激活($P<0.01$)。【结论】重组蛋白PTD-HSP27能有效地穿过细胞膜进入RGC-5细胞内,且对CoCl₂诱导的RGC-5细胞氧化应激损伤有保护作用,机制可能是通过调控Bcl-2/Bax的蛋白比例抑制细胞的早期凋亡。

关键词:视网膜神经节细胞;氧化损伤;热休克蛋白27;蛋白转导域;细胞凋亡

中图分类号:R774.6 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2019)02-0237-07

Cell-penetrating Ability and Protective Effect of Recombinant PTD-HSP27 on RGC Against Hypoxia-induced Damage

WU Yi-Ning^{1,2}, CHEN Meng-Ting¹, SHA Xiao-Yuan¹, LIU Lian¹, ZHONG Jing-Xiang¹

(1. Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, China;

2. Department of Ophthalmology, Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou 511400, China)

Correspondence to: LIU Lian; E-mail: liulianbb@163.com

Abstract: 【Objective】To detect the ability and the efficiency of recombinant PTD-HSP27 transport across RGC-5 cells and measure the role of recombinant PTD-HSP27 against oxidative stress damage induced by cobalt chloride on RGC-5 cells, and explored its potential mechanism tentatively. 【Methods】RGC-5 cells were incubated with PTD-HSP27 labeled with FITC, followed by the observation of fluorescence using fluorescence microscope. We also lysed the cells by radio immunoprecipitation assay and measure the transport efficiency of PTD-HSP27-FITC through ultraviolet spectrophotometer subsequently. We established the RGC-5 cell damage model. Cellular experiments were divided into three groups: normal control group, cobalt chloride damage group, PTD-HSP27 + cobalt chloride treatment group. Those three groups of cells were experimented using Annexin V-FITC/PI staining kit: to detect apoptotic cell ratio; Western Blotting: to detect the expression level of apoptosis related protein, including Bcl-2, Bax and Caspase-3. 【Results】The

收稿日期:2018-11-28

基金项目:广东省中医药局科研项目(20161071);广东省医学科研基金(A2017076)

作者简介:吴怡凝,硕士,研究方向:青光眼,E-mail: 173138365@qq.com;陈梦婷,硕士在读,共同第一作者,研究方向:白内障,E-mail:

qcm0528@163.com;刘莲,通信作者,博士,副主任医师,硕士生导师,E-mail: liulianbb@163.com

fluorescence of PTD-HSP27-FITC was visualized inside the RGC-5 cells using the fluorescence microscope, while the transport efficiency of PTD-HSP27-FITC was $(47.29 \pm 2.33)\%$. Cobalt chloride inhibited the survival vitality of RGC-5 cells in a concentration-dependent manner. The comparison among normal control group, cobalt chloride damage group and PTD-HSP27+CoCl₂ treatment group showed: PTD-HSP27 could effectively suppressed early apoptosis induced by cobalt chloride ($P < 0.01$). Western Blotting results showed that PTD-HSP27 could effectively enhance the expression ratio of Bcl-2/Bax, and suppressed the activation of Caspase-3 ($P < 0.01$). 【Conclusions】 Recombinant protein PTD-HSP27 could protect RGC-5 cells against oxidative stress injury induced by cobalt chloride. It mainly regulated the expression ratio of Bcl-2/Bax, suppressed early apoptosis and improved cell viability in RGC-5 cells.

Key words: retinal ganglion cells; oxidative damage; heat shock protein 27; protein transduction domain; cell apoptosis

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2019, 40(2): 237-243]

青光眼是全球第二位致盲性眼病,最主要的病理表现为视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGC)的大量死亡和及其轴突的丢失。眼内压(intraocular pressure, IOP)升高是青光眼的主要危险因素,同时影响视功能的其他伴随因素也起着重要作用,包括活性氧族(reactive oxygen species, ROS)引起的氧化损伤^[1]、谷氨酸水平的提高^[2]、一氧化氮代谢的改变^[3]和特异基因突变^[4]。所以,青光眼是一种复杂的多病因引起的慢性退行性疾病。在细胞发生应激反应时,热休克蛋白27(heat shock protein 27, HSP27)的表达水平增高,并过多种途径发挥其细胞保护作用,包括作为分子伴侣的作用,直接干扰Caspase激活,调节氧化应激和调节细胞骨架等^[5]。蛋白转导域(protein transduction domain, PTD)能够穿透生物膜,介导各种分子跨膜进入细胞质,并增高细胞内水平,促进与靶点的相互作用,因此常被用于各种物质(包括蛋白质,多肽,核苷酸, siRNA, 脂质体等)向细胞和体内模型的转运^[6-7]。本研究验证带有穿膜肽的重组蛋白PTD-HSP27能否有效通过RGC-5细胞膜进入细胞内;应用氯化钴(cobalt chloride, CoCl₂)构建RGC氧化应激损伤模型,明确带有穿膜肽的重组蛋白PTD-HSP27在小鼠RGC-5细胞氧化应激损伤中的作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

小鼠RGC-5细胞株(购于ATCC细胞库);重

组蛋白PTD-HSP27(本课题组制备^[8]);荧光素蛋白标记试剂盒(Herobio 中国);CoCl₂(II)六水合物(Sigma 美国);RIPA裂解液(Beyotime 中国);CCK-8试剂盒(同仁日本);Annexin V-FITC/PI凋亡试剂盒(凯基中国);MMP检测试剂盒(JC-1)(BD 美国);Caspase-3兔单克隆抗体、 α -Tubulin兔单克隆抗体、Bcl-2兔单克隆抗体、Bax兔单克隆抗体(Cell Signaling Technology 美国)等。

1.2 实验方法

1.2.1 RGC-5细胞的培养 小鼠视网膜神经节细胞株RGC-5培养于100 mL/L胎牛血清和1%双抗(青/链霉素)的DMEM/F12培养基,37℃、含体积分数为5%CO₂的细胞培养箱中,常规传代培养。

1.2.2 重组蛋白PTD-HSP27穿膜能力检测 RGC-5细胞常规培养于六孔板中,当融合度达六孔板底面积80%左右时,更换为含PTD-HSP27-FITC重组蛋白标记液的无血清培养基孵育2 h,设立含FITC荧光染料的阴性对照组;PBS缓冲液冲洗细胞3次,每次10 min;40 g/L多聚甲醛溶液固定细胞30 min;PBS缓冲液冲洗细胞3次,每次10 min;倒置荧光显微镜下观察,并摄像分析。

1.2.3 重组蛋白PTD-HSP27穿膜效率检测 RGC-5细胞常规培养于六孔板中,当融合度达六孔板底面积80%左右时,更换为含PTD-HSP27-FITC重组蛋白标记液的培养基孵育2 h,孵育完成后培养基,用预冷的PBS洗3次,吸干,加入RIPA细胞裂解液,冰上裂解30 min,收集细胞裂解液。以RIPA为空白对照,用分光光度计检测细胞裂解液对495 nm的吸光度($A_{495\text{nm}}$)。按以下算式计算PTD-HSP27穿膜效率:进入细胞的标记蛋白量=

$A_{495 \text{ nm}}$ /蛋白标记效率;蛋白标记效率(进入细胞的标记蛋白量/每孔标记蛋白总量) $=3.053 \times A_{495 \text{ nm}} / (A_{280 \text{ nm}} - 0.225 \times A_{495 \text{ nm}})$ 。

1.2.4 CoCl₂ 诱导 RGC-5 细胞氧化应激损伤模型的建立 用含不同浓度 CoCl₂ 的培养基常规培养细胞, CoCl₂ 终浓度分别为 0、50、100、200、400 和 800 μmol/L; CCK-8 检测: RGC-5 细胞经各浓度 CoCl₂ 处理 24 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8, 37 °C 培养箱中孵育 2 h, 然后用酶标仪检测 450 nm 吸光度($A_{450 \text{ nm}}$); IC₅₀ 计算: 按以下公式计算 RGC-5 细胞的存活率, SPSS 19.0 软件绘制成图表, 细胞存活率为 50% 时的浓度即为 IC₅₀; 以 CoCl₂ 对 RGC-5 细胞干预 24 h 的 IC₅₀ 作为构建 CoCl₂ 诱导 RGC-5 细胞氧化应激损伤模型的作用浓度。细胞存活率(%) $= [(A_s - A_b) / (A_c - A_b)] \times 100\%$ [A_s: 实验孔(含有细胞的培养基、CoCl₂) A_c: 对照孔(含有细胞的培养基、不含 CoCl₂) A_b: 空白孔(不含细胞和 CoCl₂ 的培养基)]。

1.2.5 PTD-HSP27 在 CoCl₂ 诱导 RGC-5 细胞损伤中最佳干预浓度的筛选 用含 PTD-HSP27 的完全培养基常规条件培养细胞 2 h, PTD-HSP27 终浓度分别为 0、0.125、0.25、0.5 和 1 μmol/L, 每组设 5 个复孔; 弃去原培养基, 更换为含 200 μmol/L CoCl₂ 的培养基, 继续培养 24 h, 加入 10 μL 的 CCK-8, 37 °C 培养箱中孵育 2 h, 用酶标仪检测 450 nm 吸光度($A_{450 \text{ nm}}$)。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡种板 取对数生长期的 RGC-5 细胞, 经胰酶消化离心后用培养基重悬, 显微镜下计数, 以 5×10^4 /孔接种于 6 孔板, 实验分为 3 组: 正常对照组、CoCl₂ 损伤组、PTD-HSP27 + CoCl₂ 处理组, 培养过夜; 干预: 细胞过夜贴壁后, 进行相关干预, CoCl₂ 损伤组: 加入 200 μmol/L 的 CoCl₂ 培养 24 h; PTD-HSP27 + CoCl₂ 处理组: 加入 0.5 μmol/L 的 PTD-HSP27 培养 2 h 后, 以 200 μmol/L 的 CoCl₂ 培养 24 h; 收集细胞: 收集漂浮在培养基上的细胞, 用胰酶消化并收集贴壁细胞, PBS 洗涤细胞一次, 600 ×g 离心 5 min; 染色: 加入 250 μL 的 Binding Buffer 重悬细胞, 加入 5 μL Annexin V-FITC, 5 μL Propidium Iodide, 混匀, 室温下避光反应 15 min; 流式细胞仪分析: 用流式细胞仪检测, 通过 FITC 通道 (FL1) 检测 Annexin V-FITC 的绿色荧光, FL3 通道检测 PI 的红色荧光。

1.2.7 蛋白免疫印迹法 (Western blotting) 检测

蛋白表达 用蛋白裂解液裂解细胞, 得裂解液后离心取上清, 用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品加入 5×SDS-PAGE 上清缓冲液混匀后沸水变性 10 min, 冷却后 -20 °C 保存。SDS-PAGE 电泳: 配胶-上样-转膜-封闭-一抗孵育-二抗孵育-洗膜-显影(在膜上加入 ECL 发光液于暗室使用胶片曝光显影, 用扫描仪扫描胶片灰度)-定量分析(以 α-Tubulin 为内参, 用 image J 软件定量分析目的蛋白条带灰度值)。

1.3 统计学分析

采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析, 计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)或中位数 $P_{50}(P_{25}, P_{75})$ 描述, 对实验数据进行正态性检验和方差齐性检验, 当数据不符合正态分布及方差齐性时, 则多组计量资料的比较采用完全随机设计多个样本比较的秩和检验即 Kruskal-Wallis H 检验, 多重比较用 Tamhane's T_2 检验, $P < 0.05$ 时为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 重组蛋白 PTD-HSP27 的穿膜能力

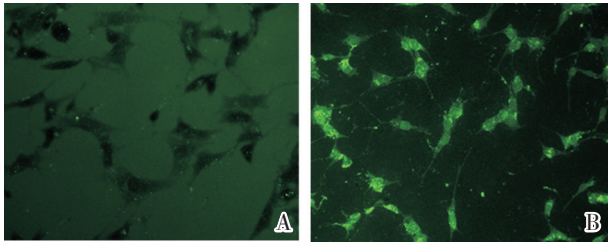
FITC 是常用的蛋白标记荧光探针, 可发出绿色可见光。用 FITC 对重组蛋白 PTD-HSP27 进行标记后, 用含 PTD-HSP27-FITC 的无血清培养基孵育 RGC-5 细胞 2 h, 荧光显微镜下观察细胞内绿色荧光。结果显示(图 1), 阴性对照组(图 1A)中的细胞内没有显著的荧光信号, 而 PTD-HSP27-FITC 组(图 1B)在细胞内可见有明显绿色荧光, 表明重组蛋白 PTD-HSP27 能够顺利通过细胞膜进入细胞。

2.2 重组蛋白 PTD-HSP27 的穿膜效率

按照 1.2.3 的方法计算, 得到重组蛋白 PTD-HSP27 的标记效率为 $(10.24 \pm 0.53) A_{495 \text{ nm}}/\text{mg}$; 重组蛋白 PTD-HSP27-FITC 进入 RGC-5 细胞的效率为 $(47.29 \pm 2.33)\%$, 证明 PTD-HSP27 能有效穿过 RGC-5 细胞膜进入细胞内。

2.3 构建 CoCl₂ 诱导 RGC-5 细胞氧化应激损伤模型

为模拟青光眼 RGC 的损伤, 我们用低氧诱导剂 CoCl₂ 体外诱导 RGC-5 细胞缺氧, 构建 RGC-5 细胞氧化应激损伤模型。不同浓度梯度(50、100、200、400、600、800 μmol/L) 的 CoCl₂ 体外干预 RGC-5 细胞 24 h 后, CCK-8 法检测检测细胞存活



A: No significant green fluorescence was observed in the cells of the negative control-FITC incubation group; B: Significant green fluorescence was observed in the cells of the PTD-HSP27-FITC incubation group($\times 200$).

图1 PTD-HSP27对RGC-5细胞的穿膜能力检测

Fig.1 Transmembrane ability detection of PTD-HSP27 on RGC-5 cells

率。结果如图2所示, CoCl_2 呈浓度依赖性的抑制RGC-5细胞存活率($P < 0.01$), 经计算, 其 IC_{50} 为 $196.21 \mu\text{mol/L}$, 因此后续试验以 $200 \mu\text{mol/L}$ 的 CoCl_2 干预RGC-5细胞24 h, 作为构建细胞损伤模型的最佳条件。

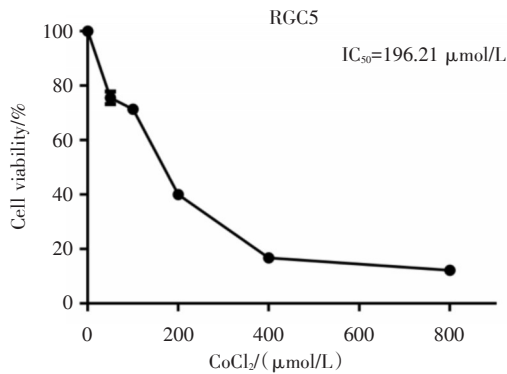
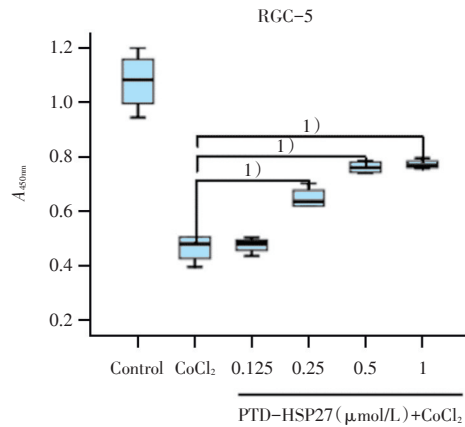


图2 CoCl_2 浓度依赖性的降低RGC-5细胞存活率

Fig.2 Cobalt chloride concentration-dependent reduction of RGC-5 cell survival rate

2.4 PTD-HSP27对 CoCl_2 诱导RGC-5细胞损伤的最佳作用浓度筛选

CCK-8法检测细胞存活率, 结果(图3)显示与阴性对照组相比, $0.125 \mu\text{mol/L}$ 的PTD-HSP27对细胞存活率并无影响, 当PTD-HSP27浓度为 $0.25 \mu\text{mol/L}$ 时能提高细胞存活率($P < 0.05$, 图3), 0.5 和 $1 \mu\text{mol/L}$ 的PTD-HSP27能更显著提高细胞存活率($P < 0.05$, 图3), 而 0.5 与 $1 \mu\text{mol/L}$ 两组间的细胞存活率没有明显统计学差异($P > 0.05$, 图3)。因此, 选取 $0.5 \mu\text{mol/L}$ 为后续实验的PTD-HSP27作用浓度。



1) $P < 0.05$. Kruskal-Wallis H test was used, $H = 21.170$, $P = 0.001$; Tamhane's T2 test showed there is no significant difference between 0.5 and $1 \mu\text{mol/L}$ groups ($P = 1.000$), $n = 4$.

图3 PTD-HSP27对 CoCl_2 所诱导RGC-5细胞损伤的保护作用

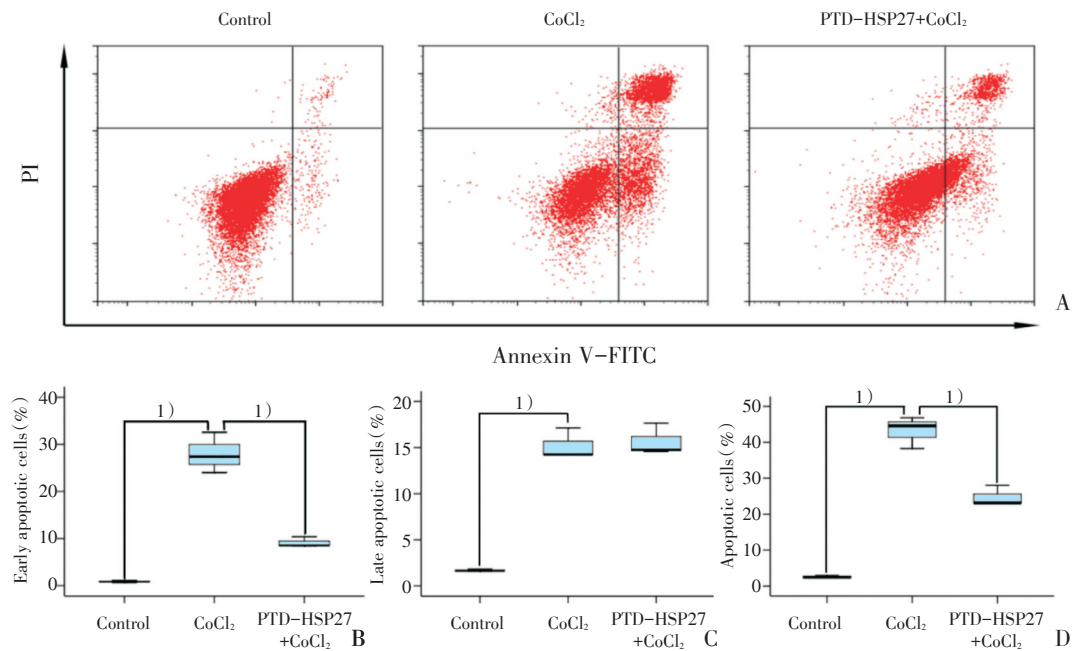
Fig.3 Protective effect of PTD-HSP27 on RGC-5 cell injury induced by cobalt chloride

2.5 PTD-HSP27抑制 CoCl_2 诱导的RGC-5细胞凋亡

通过Annexin V-FITC/PI染色后进行流式细胞仪检测, 结果(图4)显示, CoCl_2 处理后早期凋亡细胞比例为 27.40% (24.00% , 32.55%), 比空白对照组 0.83% (0.65% , 1.06%)明显增高, 而经PTD-HSP27孵育2 h后再进行 CoCl_2 处理, 则可将早期细胞凋亡比例降至 8.53% (8.41% , 10.37%)。所以, PTD-HSP27能显著抑制 CoCl_2 引起的RGC-5细胞早期凋亡($P < 0.05$, 图4)。如图4C所示, 与空白对照组 1.64% (1.60% , 1.84%)相比, CoCl_2 损伤24 h后能显著提高晚期凋亡细胞比例 14.25% (14.24% , 17.13%), 而经PTD-HSP27预处理2 h, CoCl_2 损伤所致的晚期细胞凋亡比例为 14.74% (14.55% , 17.65%), 并无明显差异($P > 0.05$, 图4)。当综合分析凋亡细胞时, CoCl_2 可诱导 44.53% (38.24% , 46.80%)的RGC-5细胞凋亡, 而PTD-HSP27预处理组为 23.15% (23.08% , 28.02%), 所以PTD-HSP27可显著抑制 CoCl_2 所诱导的RGC-5细胞凋亡($P < 0.05$, 图4)。

2.6 PTD-HSP27对 CoCl_2 诱导RGC-5细胞损伤后凋亡相关蛋白水平的影响

Western blotting检测PTD-HSP27预处理后, 凋亡相关蛋白表达水平的变化。结果显示(图5), 与空白对照组相比, CoCl_2 能抑制RGC-5细胞



A: Annexin V-FITC/PI double staining detection of apoptosis by flow cytometry results; B: Early apoptotic cell statistics, $H=7.2$, $P=0.027$; C: Late apoptotic cell statistics, $H=5.956$, $P=0.051$; D: Apoptotic cell statistics, $H=7.2$, $P=0.027$; kruskal wallis H test was used, 1) $P<0.05$, $n=3$.

图4 PTD-HSP27抑制CoCl₂所致RGC-5细胞凋亡

Fig.4 PTD-HSP27 inhibits apoptosis of RGC-5 cells induced by cobalt chloride

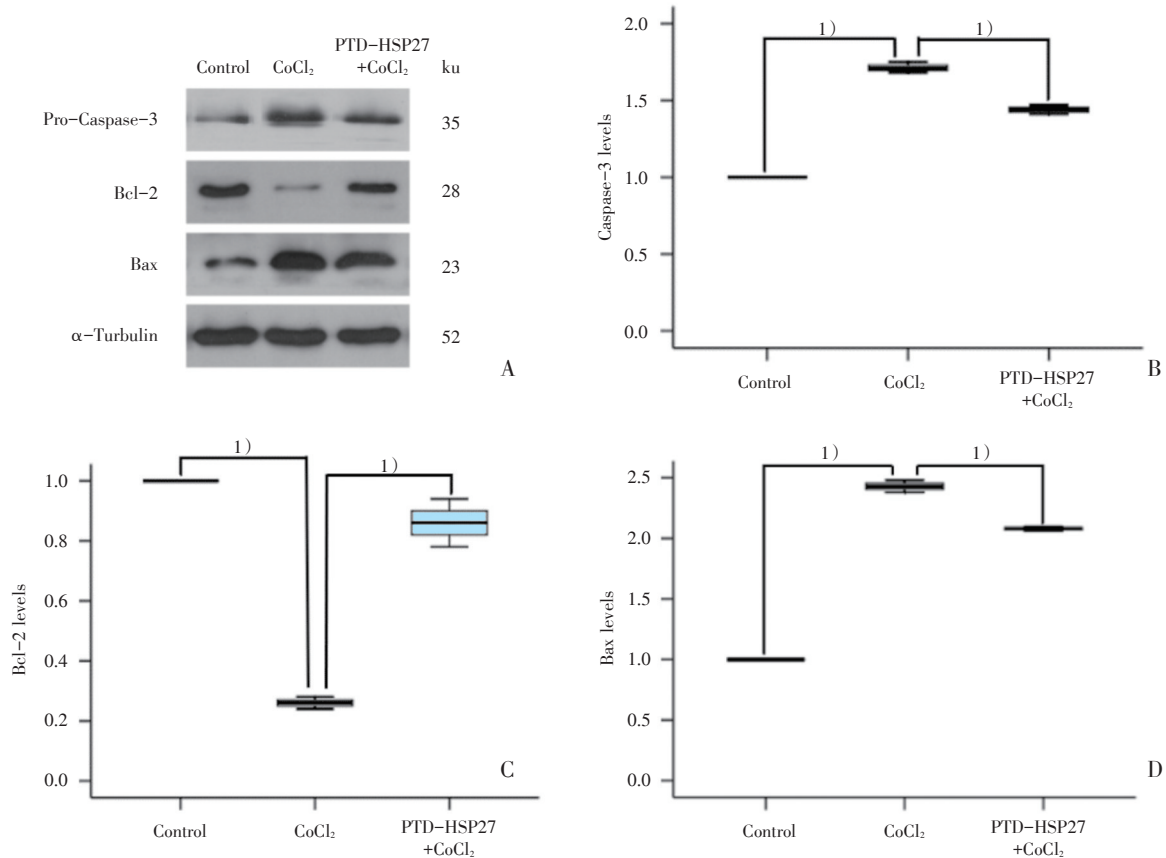
Bcl-2的表达,并激活Bax的表达,进而显著提高Bcl-2/Bax的表达比例。同时,CoCl₂还能激活Caspase-3,从而引起细胞凋亡。而当用PTD-HSP27孵育细胞,能有效提高Bcl-2的表达,并抑制Bax,同时抑制Caspase-3的激活($P<0.05$,图5)。所以,PTD-HSP27主要通过抑制Bcl-2/Bax的表达比例,抑制Caspase-3的激活,进而在CoCl₂诱导的RGC-5细胞氧化应激损伤中发挥细胞保护作用。

3 讨论

青光眼是全球第二大不可逆性致盲眼病,其最重要的病理变化是RGC及其轴突的病理性丢失,从而引起视野进行性缺损^[9]。在引起青光眼的危险因素中,病理性眼压升高是最重要的因素之一,也是目前青光眼手术及药物治疗的主要靶点^[10]。RGC对体内和体外病理环境中的氧化应激都非常敏感,所以氧化应激损伤被认为是造成青光眼RGC损伤和凋亡的主要原因^[11]。由于RGC及其神经纤维的损伤和死亡是青光眼进展的最主要的病理表现,所以近些年有很多学者尝试通过开发神经保护剂来阻止视神经节细胞的死亡,进而达到治疗青光眼的目的^[12]。

CoCl₂是一种实验中常用的缺氧诱导剂^[13]。我们通过CoCl₂诱导RGC-5细胞缺氧损伤,模拟青光眼中RGC的氧化应激损伤。结果证明CoCl₂能浓度依赖性的抑制RGC-5细胞的增殖活力,并计算出CoCl₂对RGC-5干预24h的IC₅₀,用作后续实验的处理条件。同时,CoCl₂能显著改变RGC-5细胞的形态,促进细胞皱缩,破碎和凋亡。CoCl₂对RGC-5细胞的增殖抑制和促凋亡作用和之前的研究的结果相似^[14],证明以CoCl₂诱导RGC-5细胞损伤,模拟青光眼中RGC损伤的细胞模型是可行的。

HSP27属于小热休克蛋白家族,当细胞发生应激反应时,HSP27表达水平增高,并发挥其细胞保护作用^[15]。Whitlock等^[16]发现CoCl₂干预RGC-5细胞后能通过激活HIF-1上调HSP27的表达水平,并且在大鼠的体内实验中发现,CoCl₂干预后能上调HSP27而发挥对视网膜缺血损伤的保护作用。本课题组在前期研究中已证实外源性PTD-HSP27可以保护人晶状体上皮细胞抵抗凋亡^[8],为研究外源性PTD-HSP27能否穿透RGC-5细胞膜进入细胞内并对CoCl₂所致RGC-5细胞损伤有保护作用,我们用PTD-HSP27孵育RGC-5细胞后,用CoCl₂损伤细胞24h,最后检测其细胞活性,



A: Western blotting detection of apoptosis-related proteins; B-D: Statistical graph of relative expression levels of apoptosis-related proteins, with α -Tubulin as an internal reference; kruskal wallis H test was used, 1) $P < 0.05$, $n = 3$.

图5 PT-D-HSP27对CoCl₂诱导RGC-5细胞损伤的凋亡相关蛋白表达的影响

Fig.5 Effect of PT-D-HSP27 on the expression of apoptosis-related proteins in RGC-5 cells induced by cobalt chloride

结果显示PT-D-HSP27能有效进入RGC-5细胞并显著抑制CoCl₂所致RGC-5细胞损伤,发挥细胞保护作用。另外,流式细胞计数法检测细胞凋亡发现,PT-D-HSP27主要通过减少细胞早期凋亡,而发挥其抗凋亡作用。结果证明,外源性的PT-D-HSP27和内源性的HSP27一样,能有效保护细胞,抑制氧化应激损伤。

Bcl-2家族包括抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白,如Bcl-2和Bax,是调控线粒体依赖凋亡途径的关键蛋白。Bax可以通过调节线粒体通透性转换孔的开放而改变线粒体膜通透性,引起MMP的下降及细胞色素C释放,线粒体释放的细胞色素C可激活Caspase-9,引起细胞凋亡,而Bcl-2可通过与Bax的竞争性结合而抑制其活性^[17]。而Caspase-3是执行细胞凋亡的关键蛋白,负责许多关键蛋白的水解。据文献报道,HSP27能通过直接抑制Caspase的激活而抑制细胞凋亡^[18],或通过直接与细胞色素C作用而抑制Pro-Caspase-9的激活,进

而抑制凋亡复合体的形成和功能^[19],并且与Pro-Caspase-3直接作用而抑制Caspase-3的活性^[20]。Havasi等^[21]的研究发现,HSP27能抑制Bax的活化,进而抑制Bax诱导的线粒体损伤和细胞凋亡。在我们的实验中,PT-D-HSP27能显著改善CoCl₂引起的Bcl-2/Bax比例的下降,并抑制Caspase-3的活性。所以,我们认为PT-D-HSP27主要通过提高Bcl-2/Bax的表达比例,从而抑制Caspase-3的激活,发挥其细胞保护作用。

综上所述,本研究以HSP27为切入点,研究证明外源性PT-D-HSP27对氧化应激损伤的RGC具有保护作用,为青光眼的视神经保护治疗提供新的方法和思路,为今后临床的青光眼治疗提供了新的可行性依据。但外源性PT-D-HSP27能否成为青光眼治疗中的一种RGC保护剂,需要实现从基础研究到临床应用的转化,仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Chrysostomou V, Rezaia F, Trounce IA, et al. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in glaucoma[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2013, 3(1): 12-15.
- [2] Nucci C, Tartaglione R, Rombolà L, et al. Neurochemical evidence to implicate elevated glutamate in the mechanisms of high intraocular pressure (IOP)-induced retinal ganglion cell death in rat[J]. *Neurotoxicology*, 2005, 26(5): 935-941.
- [3] Ricca AM, Morshedi RG, Wirosko BM. High intraocular pressure following anti-vascular endothelial growth factor therapy: proposed pathophysiology due to altered nitric oxide metabolism [J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2015, 31(1): 2-10.
- [4] Wiggs JL, Pasquale LR. Genetics of glaucoma [J]. *Hum Mol Genet*, 2017, 26(R1): R21-R27.
- [5] Singh MK, Sharma B, Tiwari PK, et al. The small heat shock protein Hsp27: Present understanding and future prospects[J]. *J Therm Biol*, 2017, 69: 149-154.
- [6] Wang F, Wang Y, Zhang X, et al. Recent progress of cell-penetrating peptides as new carriers for intracellular cargo delivery[J]. *J Control Release*, 2014, 174: 126-136.
- [7] Zhang X, Zhang X, Wang F. Intracellular transduction and potential of Tat PTD and its analogs: from basic drug delivery mechanism to application[J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2012, 9(4): 457-472.
- [8] Liu L, YR, Shi Y, et al. Transduced protein transduction domain linked HSP27 protected LECs against UVB radiation-induced damage [J]. *Exp Eye Res*, 2014(120): 36-42.
- [9] Quigley HA. Glaucoma[J]. *Lancet*, 2011, 377(9774): 1367-1377.
- [10] Sihota R, Angmo D, Ramaswamy D, et al. Simplifying "target" intraocular pressure for different stages of primary open-angle glaucoma and primary angle-closure glaucoma[J]. *Indian J Ophthalmol*, 2018, 66(4): 495-505.
- [11] Pinazo-Durán MD, Zanón-Moreno V, Gallego-Pinazo R, et al. Oxidative stress and mitochondrial failure in the pathogenesis of glaucoma neurodegeneration[J]. *Prog Brain Res*, 2015, 220: 127-153.
- [12] Nucci C, Martucci A, Giannini C, et al. Neuroprotective agents in the management of glaucoma [J]. *Eye (Lond)*, 2018, 32(5): 938-945.
- [13] Chen R, Xu J, She Y, et al. Necrostatin-1 protects C2C12 myotubes from CoCl₂-induced hypoxia [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(5): 2565-2572.
- [14] Li SY, Lo AC. Lutein protects RGC-5 cells against hypoxia and oxidative stress[J]. *Int J Mol Sci*, 2010, 11(5): 2109-2117.
- [15] Concannon CG, Gorman AM, Samalli A. On the role of HSP27 in regulating apoptosis[J]. *Apoptosis*, 2003, 8(1): 61-70.PMID: 12510153.
- [16] Whitlock NA, Agarwal N, Ma JX, et al. HSP27 up-regulation by HIF-1 signaling offers protection against retinal ischemia in rats [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(3): 1092-1098.
- [17] Luna-Vargas MP, Chipuk JE. The deadly landscape of pro-apoptotic BCL-2 proteins in the outer mitochondrial membrane[J]. *FEBS J*, 2016, 283(14): 2676-2689.
- [18] Tian X, Zhao L, Song X, et al. HSP27 inhibits homocysteine-induced endothelial apoptosis by modulation of ROS production and mitochondrial caspase-dependent apoptotic pathway [J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 4847874.
- [19] Garrido C, Bruey JM, Fromentin A, et al. HSP27 inhibits cytochrome C-dependent activation of procaspase-9[J]. *FASEB J*, 1999, 13(14): 2061-2070.
- [20] Pandey P, Farber R, Nakazawa A, et al. HSP27 functions as a negative regulator of cytochrome C-dependent activation of procaspase-3[J]. *Oncogene*, 2000, 19(16): 1975-1981.
- [21] Havasi A, Li Z, Wang Z, et al. HSP27 inhibits Bax activation and apoptosis via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(18): 12305-12313.

(编辑 余 菁)