

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.10.023

PDCD4 沉默通过调控 NLRP3/NLRP6 炎症小体的平衡来减轻视网膜缺血再灌注损伤后的神经炎症反应

魏 丽¹, 刘晓环², 王连婷¹, 朱慧颖¹, 王晓蓉^{2△}

1. 黑龙江省牡丹江市中医医院眼科, 黑龙江牡丹江 157000; 2. 黑龙江省眼病防治所, 黑龙江哈尔滨 150001

摘要:目的 探究程序性细胞死亡因子 4(PDCD4)通过含 NOD 样受体家族 Pyrin 域蛋白(NLRP)3/NLRP6 信号通路活性对视网膜缺血再灌注(RIR)损伤后神经炎症反应的抑制作用及机制。**方法** 选取 50 只 SD 大鼠作为研究对象,根据不同处理方式,分为 Sham 组(空白对照组)、RIR 模型组、MCC950 组(NLRP3/NLRP6 抑制组)、si-PDCD4 组(PDCD4 沉默组)、si-PDCD4+MCC950 组(PDCD4 沉默+NLRP3/NLRP6 抑制组),每组 10 只大鼠。除去空白对照组大鼠外,剩余大鼠均构建 RIR 损伤模型,并进行相应处理;Western-blot 检测视网膜组织内 PDCD4、NLRP3、NLRP6、天冬氨酸蛋白水解酶-1(Caspase-1)、抗坏血酸过氧化物酶(ASC)表达水平;苏木精-伊红(HE)染色分析视网膜组织病理变化;终端尿苷酸核苷酸末端标记法检测视网膜组织细胞凋亡能力;酶联免疫吸附试验检测大鼠眼球血、视网膜组织内炎症因子白细胞介素(IL)-6、IL-18、IL-1 β 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 水平;Western-blot 检测视网膜组织内细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2、Cleaved-caspase-3 表达水平。**结果** 与 Sham 组比较,RIR 模型组 PDCD4、NLRP3、NLRP6、Caspase-1、ASC、IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 水平及细胞凋亡指数(AI)均升高,Bcl-2 表达水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 RIR 模型组比较,MCC950 组、si-PDCD4 组大鼠 NLRP3、NLRP6、Caspase-1、ASC、IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 水平及 AI 均降低,Bcl-2 表达水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 si-PDCD4 组及 MCC950 组比较,si-PDCD4+MCC950 组 PDCD4、NLRP3、NLRP6、Caspase-1、ASC、IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 水平及 AI 进一步降低,Bcl-2 表达水平进一步升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** PDCD4 沉默具有减轻 RIR 病理损伤,抑制视网膜细胞凋亡的作用,其分子机制可能与抑制 NLRP3/NLRP6 炎症小体诱导神经炎症反应有关。

关键词:程序性细胞死亡因子 4; NLRP3/NLRP6 炎症小体; 视网膜缺血再灌注损伤; 神经炎症; 白细胞介素; 肿瘤坏死因子- α

中图法分类号:R774

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2024)10-1461-07

PDCD4 deficiency reduces neuroinflammatory response after retinal ischemia-reperfusion injury by regulating the balance of NLRP3/NLRP6 inflammasome

WEI Li¹, LIU Xiaohuan², WANG Lianting¹, ZHU Huiying¹, WANG Xiaorong^{2△}

1. Department of Ophthalmology, Mudanjiang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Mudanjiang, Heilongjiang 157000, China; 2. Heilongjiang Eye Disease Prevention and Treatment Institute, Harbin, Heilongjiang 150001, China

Abstract: Objective Exploring the role of programmed cell death factor 4 (PDCD4) in regulating NOD like receptor thermal protein domain associated protein (NLRP)3/NLRP6 for the inhibitory effect and mechanism of signal pathway activity on neuroinflammatory response after retinal ischemia-reperfusion (RIR) injury. **Methods** Fifty SD rats were divided into Sham group (blank control group), RIR model group, MCC950 group (NLRP3/NLRP6 inhibition group), si-PDCD4 group (PDCD4 silencing group), si-PDCD4 + MCC950 group (PDCD4 silencing + NLRP3/NLRP6 inhibition group), with 10 rats in each group. Except for rats in the blank control group, the remaining rats were established retinal ischemia-reperfusion (RIR) injury model and treated accordingly. The protein expressions of PDCD4, NLRP3, NLRP6, Caspase-1 and ascorbate peroxidase (ASC) in retinal tissue were detected by Western-blot. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to analyze the pathological changes of retinal tissue. Terminal transferase uridyl nick end labeling (TUNEL) method was used to detect the apoptosis of retinal cells. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the levels of inflammatory factors interleukin (IL) -6, IL-18, IL-1 β and tumor necrosis factor (TNF) - α in eyeball blood and retinal tissue. The expressions of apoptosis-related proteins Bax, Bcl-2 and Cleaved-caspase-3 in retinal tissue were detected by Western-blot. **Results** Compared with the Sham group, the levels of PDCD4, NLRP3, NLRP6, Caspase-1, ASC, IL-6, IL-8, IL-1 β and TNF- α and the index of apoptosis (AI) increased, while

the expression of Bcl-2 decreased in the RIR model group ($P < 0.05$). Compared with those in the RIR model group, the levels of NLRP3, NLRP6, Caspase-1, ASC, IL-6, IL-8, IL-1 β , TNF- α and AI decreased, while the expression of Bcl-2 increased in MCC950 group and si-PDCD4 group, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared those in the MCC950 group and si-PDCD4 group, the levels of PDCD4, NLRP3, NLRP6, Caspase-1, ASC, IL-6, IL-8, IL-1 β and TNF- α and the AI were further down-regulated, and the expression of Bcl-2 was further up-regulated in the si-PDCD4 + MCC950 group, with statistically significant differences ($P < 0.05$). **Conclusion** PDCD4 silencing has the effect of alleviating pathological damage in RIR and inhibiting retinal cell apoptosis. Its molecular mechanism may be related to inducing neuroinflammatory response by inhibiting NLRP3/NLRP6 inflammasome.

Key words: programmed cell death factor 4; NLRP3/NLRP6 inflammasome; retinal ischemia-reperfusion injury; neuroinflammation; interleukin; tumor necrosis factor- α

视网膜缺血再灌注(RIR)损伤在诸多眼科疾病中发挥重要作用,属于引起急性青光眼、糖尿病并发症、视网膜病变的主要病变过程^[1-2],严重的会出现视网膜变性、功能丧失,最终出现视力损伤,严重危害患者身心健康^[3-4]。近年来,诸多学者提出以神经保护为基础的相关治疗可以改善 RIR 导致的损伤^[5]。有研究表明,炎症级联反应与 RIR 损伤关系密切,炎症小体的激活可以参与上述病理过程,导致视网膜周围的炎症级联反应程度明显加重,使视网膜功能发生改变^[6-7]。炎症小体在 RIR 的进展中作用明显,含 NOD 样受体家族 Pyrin 域蛋白(NLRP)3 属于 NOD 受体类型之一,主要以 NLRP、抗坏血酸过氧化物酶(ASC)、半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-1(Caspase-1)为主要核心蛋白,炎症小体的持续激活会释放大量炎症因子,如白细胞介素(IL)-1 β 、IL-18、IL-6 等,进而导致其他炎症小体的激活^[8-9]。目前研究已经证实,在视网膜烧伤过程中其固有免疫系统被激活, NLRP3/NLRP6 炎症小体信号轴表达水平失衡,导致其病理发展^[10-11]。程序性细胞死亡因子 4(PDCD4)属于一种新的凋亡相关基因,随着临床上对其研究的深入,发现 PDCD4 对肿瘤细胞的生物活性具有调控性,同时参与诸多免疫源性、代谢性及相关炎症疾病的进展^[12-13]。既往研究发现,PDCD4 可能参与心血管疾病动脉粥样硬化炎症病变、结肠炎炎症进展的过程^[14-15],但其是否与 RIR 后导致的神经炎症反应之间存在联系目前尚未阐述。本研究进一步探究了 NLRP3/NLRP6 炎症小体信号轴在 RIR 发生及发展进程中扮演的角色,并重点阐述了 PDCD4 沉默对 RIR 导致的神经炎症反应的影响,以及与 NLRP3/NLRP6 炎症小体信号轴的调控机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 50 只健康、无眼部疾病的 SD 雄性大鼠作为研究对象,大鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SYXK(京)2022-0052],8~10 周龄,体质量为 250~300 g。按照随机数字表法分为 Sham 组(空白对照组)、RIR 模型组、MCC950 组、si-PDCD4 组、si-PDCD4 + MCC950 组,每组 10 只。所有大鼠统一在笼内进行饲养,温度控制在(24 \pm 2) $^{\circ}$ C,

湿度控制在 50%~60%;光亮与黑暗交替 12 h。研究中对相关动物的处理均遵循《实验动物伦理条例》中相关要求。本研究通过本院医学伦理委员会审核批准。

1.2 仪器与试剂 使用主要仪器包括流式细胞仪、全自动生化检测仪、反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测试仪、RT-100 酶标仪、Mini 电泳仪、分子转膜仪、电泳设备、凝胶系统、工作台、倒置显微镜、台式离心机、微量可调节器,均购自美国 Abcam 公司。

胎牛血清、胰蛋白酶购自上海玉博生物科技有限公司;胎牛血清、甘油明胶、蛋白浓度检测试剂盒、SDS-PAGE 凝胶、磷酸盐缓冲液(PBS)、电化学发光(ECL)法检测试剂盒、终端尿苷酸核苷酸末端标记法(TUNEL)检测细胞盒均购自美国 Sigma 公司;兔抗鼠 ASC 抗体、Caspase-1 抗体、NLRP3 抗体、NLRP6 抗体、Bax 抗体、Bcl-2 抗体、Cleaved-caspase-3 抗体、糖酵解磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体均购自美国 ABC 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记一抗、二抗均购自上海碧云天生物技术有限公司;IL-1 β 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、IL-6、IL-18 水平检测相关酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒、TUNEL 检测试剂盒均购自国药集团化学试剂有限公司;si-PDCD4 模拟物购自上海吉玛制药技术有限公司;苏木精-伊红(H-E)染色试剂、NLRP3/NLRP6 信号小体抑制剂 MCC950 均购自阿拉丁化学试剂(上海)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 RIR 模型的制备 除 Sham 组大鼠外,将其余准备制备 RIR 模型的大鼠固定在恒温板上,大鼠的四肢及头部采用胶布进行固定,选取右眼,滴加眼部麻醉剂、散瞳剂丙美卡因及复方托吡卡胺,将输液瓶与胰岛素注射器进行连接,排净空气。等待大鼠瞳孔完全散之后,沿着大鼠纵轴侧角膜边缘进针处理。将针头采用胶布固定,开始输液,将输液瓶升高,确认 SD 大鼠虹膜及眼底苍白后,提示 RIR 模型构建成功。继续观察 1 h 后,再次降低输液瓶的高度,虹膜血流得到恢复,提示视网膜再灌注形成。模型构建后,将针头拔出,涂抹红霉素软膏预防感染^[16]。

1.3.2 实验分组及处理 Sham 组:设置为空白对

照,SD 大鼠不做任何处理;RIR 模型组;设置为 SD 大鼠 RIR 损伤模型,建模后不做任何处理;si-PDCD4 组:设置为 PDCD4 沉默组,建模后,在大鼠眼球内注射 si-PDCD4 慢病毒(5.5 μg/g);MCC950 组:设置为 NLRP3/NLRP6 抑制组,建模后,在大鼠眼球内注射 NLRP3/NLRP6 抑制剂 MCC950(5.5 μg/g);si-PDCD4 + MCC950 组:设置为 PDCD4 沉默 + NLRP3/NLRP6 抑制组建模后,在大鼠眼球内注射 si-PDCD4 慢病毒(5.5 μg/g)和 NLRP3/NLRP6 抑制剂 MCC950(5.5 μg/g)。

1.3.3 ELISA 检测血清、视网膜组织内炎症因子水平 在 RIR 模型建立 24 h 后,取所有大鼠眼球血,经水合氯醛麻醉后,采用颈椎脱臼法处死 SD 大鼠,摘取大鼠眼球后,摘除角膜、晶状体、玻璃体后,将视网膜剥离,采用 ELISA 检测血清因子 IL-1β、TNF-α、IL-6、IL-18 水平;设置标准浓度梯度,计算出标准曲线后,在 450 nm 波长下检测各个孔的吸光度,计算血清 IL-1β、TNF-α、IL-6、IL-18 水平。整个过程严格按照 ELISA 检测试剂盒标准流程进行。

1.3.4 H-E 染色分析大鼠视网膜组织病理变化 取大鼠视网膜组织,采用 10% 的福尔马林进行固定,经梯度酒精脱水、二甲苯透明处理、浸蜡处理后切片,切片厚度为 4 μm 之后进行烘烤处理。石蜡切片后进行二甲苯脱蜡,进行梯度酒精水化,冲洗后,经苏木精染色,再进行冲洗,酒精分化后进行返蓝处理,后续采用伊红染色处理,最终采用中性树脂封片,在显微镜下(200 倍)随机选择 30 个左右视野,观察视网膜组织病理形态。

1.3.5 TUNEL 法检测大鼠视网膜组织细胞凋亡情况 采用 PBS 冲洗视网膜组织,石蜡包埋后切成 4 μm 的切片。采用 TUNEL 染色试剂盒检测视网膜切片组织的凋亡细胞数:在室温下加入 4,6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)5 min,在荧光显微镜下观察 TUNEL 阳性细胞,其中凋亡细胞呈现绿色荧光。

1.3.6 Western-blot 检测相关蛋白表达水平 取视网膜组织,进行匀浆裂解处理,提取蛋白质,采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法分离蛋白,接着将其转移到 PVDF 膜上,脱脂牛奶封闭

反应。采用 HRP 一抗在 5 °C 下孵育过夜,接着采用 HRP 二抗孵育 1.5 h,经 Tris Hcl 盐缓冲液洗涤后采用红外系统进行扫描,通过 Image 软件进行蛋白灰度分析,其中 HRP 一抗稀释比例 ASC(1 : 1 500)、Caspase-1(1 : 1 500)、NLRP3(1 : 1 000)、NLRP6(1 : 1 500)、Cleaved-caspase-3(1 : 1 500)、Bax(1 : 1 000)、Bcl-2(1 : 1 000)、GAPDH(1 : 1 500)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS23.0 统计软件进行数据处理及统计分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用 One-Way ANOVA 分析;相关性分析采用 Pearson 相关。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PDCD4 沉默对 NLRP3/NLRP6 炎症小体通路活性的抑制作用 与 Sham 组比较,RIR 模型组 PDCD4、NLRP3、NLRP6、Caspase-1、ASC 表达水平升高,差异有统计学意义(*P* < 0.05);与 RIR 模型组比较,si-PDCD4 组 PDCD4 表达水平降低,MCC950 组、si-PDCD4 组 NLRP3、NLRP6、Caspase-1、ASC 表达水平降低,差异有统计学意义(*P* < 0.05);与 si-PDCD4 组及 MCC950 组比较,si-PDCD4 + MCC950 组 NLRP3、NLRP6、Caspase-1、ASC 表达水平进一步降低,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。见图 1、表 1。

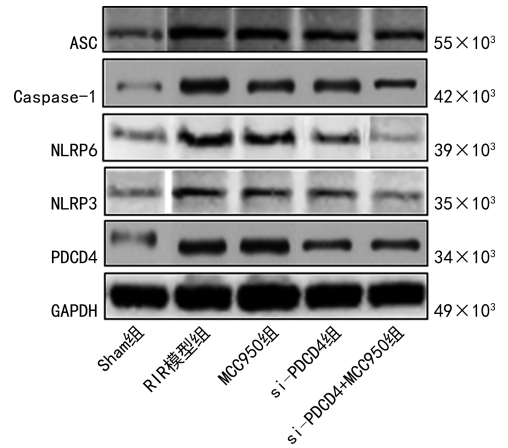


图 1 Western-blot 检测各组大鼠视网膜组织内 PDCD4、NLRP3/NLRP6 炎症小体信号通路关键蛋白表达水平

表 1 各组大鼠视网膜组织内 PDCD4、NLRP3/NLRP6 炎症小体信号通路关键蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	PDCD4	NLRP3	NLRP6	Caspase-1	ASC
Sham 组	10	0.34 ± 0.15	0.30 ± 0.18	0.34 ± 0.20	0.29 ± 0.11	0.35 ± 0.13
RIR 模型组	10	0.89 ± 0.34 ^a	0.62 ± 0.24 ^a	0.70 ± 0.39 ^a	0.75 ± 0.30 ^a	0.79 ± 0.26 ^a
MCC950 组	10	0.85 ± 0.28	0.47 ± 0.19 ^b	0.56 ± 0.25 ^b	0.54 ± 0.23 ^b	0.59 ± 0.23 ^b
si-PDCD4 组	10	0.47 ± 0.32 ^b	0.43 ± 0.14 ^b	0.49 ± 0.22 ^b	0.57 ± 0.30 ^b	0.54 ± 0.20 ^b
si-PDCD4 + MCC950 组	10	0.49 ± 0.38 ^d	0.33 ± 0.05 ^{cd}	0.32 ± 0.09 ^{cd}	0.40 ± 0.11 ^{cd}	0.38 ± 0.12 ^{cd}
<i>F</i>		6.55	5.45	4.02	5.96	6.54
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 Sham 组比较,^a*P* < 0.05;与 RIR 模型组比较,^b*P* < 0.05;与 si-PDCD4 组比较,^c*P* < 0.05;与 MCC950 组比较,^d*P* < 0.05。

2.2 PDCD4 沉默对 RIR 大鼠视网膜组织病理变化的影响 Sham 组大鼠视网膜内膜平滑完整, 视网膜神经节细胞 (RGC) 排列度整齐, 核内染色质分布均匀; 与 Sham 组比较, RIR 模型组大鼠视网膜内层出现水肿, 细胞排列明显疏松、紊乱, RGC 细胞数量减

少; 与 RIR 模型组比较, MCC950 组、si-PDCD4 组大鼠视网膜内界膜恢复平滑, 水肿程度减轻; 与 si-PDCD4 组及 MCC950 组比较, si-PDCD4 + MCC950 组大鼠视网膜病理形态进一步改善, 视网膜内层水肿状态明显改善。见图 2。

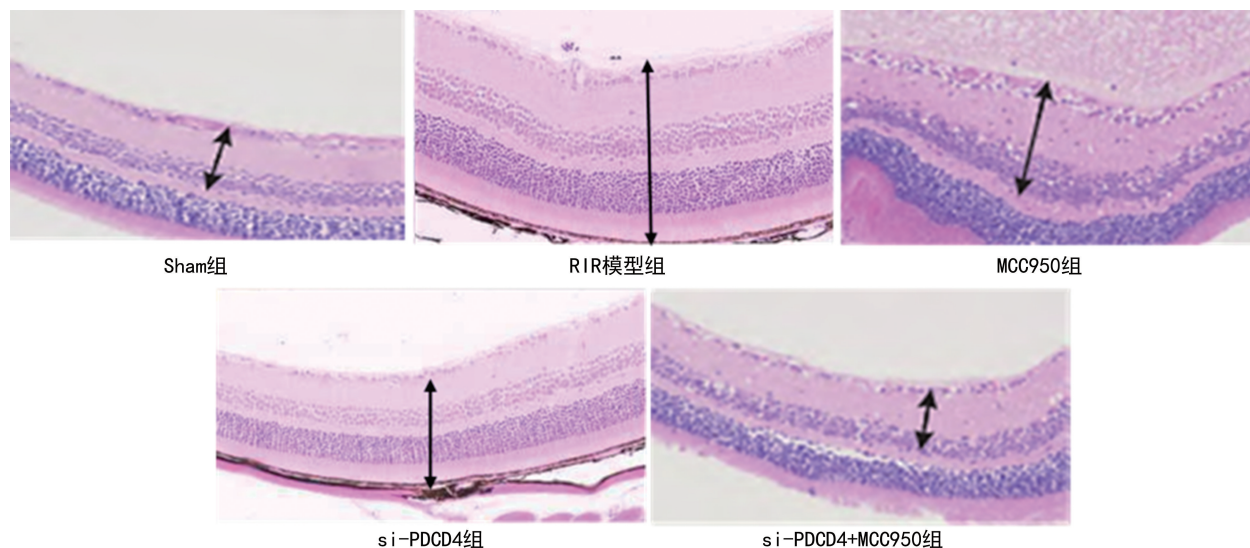


图 2 HE 染色分析各组大鼠视网膜组织病理变化 (×100)

2.3 PDCD4 沉默对 RIR 大鼠眼球血及视网膜组织炎症因子水平的影响

2.3.1 各组大鼠眼球血内相关炎症因子水平比较 与 Sham 组比较, RIR 模型组血清炎症因子 IL-6、IL-8、IL-1β、TNF-α 水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 RIR 模型组比较, MCC950 组、si-PDCD4 组大鼠血清 IL-6、IL-8、IL-1β、TNF-α 水平均降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 si-PDCD4 组及 MCC950 组比较, si-PDCD4 + MCC950 组大鼠血清 IL-6、IL-8、IL-1β、TNF-α 水平进一步降低, 差异有统

计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3.2 各组大鼠视网膜组织内血内相关炎症因子水平比较 与 Sham 组比较, RIR 模型组大鼠炎症因子 IL-6、IL-8、IL-1β、TNF-α 水平明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 RIR 模型组比较, MCC950 组、si-PDCD4 组 IL-6、IL-8、IL-1β、TNF-α 水平均降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 si-PDCD4 组及 MCC950 组比较, si-PDCD4 + MCC950 组 IL-6、IL-8、IL-1β、TNF-α 水平进一步降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 2 各组大鼠眼球血内相关炎症因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	n	IL-6	IL-8	IL-1β	TNF-α
Sham 组	10	3.34 ± 2.78	4.05 ± 1.80	5.90 ± 1.22	1.25 ± 0.25
RIR 模型组	10	12.87 ± 4.25 ^a	15.06 ± 3.24 ^a	24.55 ± 6.34 ^a	18.30 ± 0.94 ^a
MCC950 组	10	7.67 ± 3.10 ^b	11.29 ± 3.28 ^b	15.08 ± 4.12 ^b	11.44 ± 0.73 ^b
si-PDCD4 组	10	6.69 ± 3.08 ^b	8.78 ± 2.74 ^b	12.03 ± 2.22 ^b	10.34 ± 0.62 ^b
si-PDCD4 + MCC950 组	10	4.50 ± 1.19 ^{bcd}	5.66 ± 1.95 ^{bcd}	9.34 ± 1.49 ^{bcd}	8.46 ± 0.54 ^{bcd}
F		15.23	27.11	38.32	870.10
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与 Sham 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 RIR 模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与 si-PDCD4 组比较, ^c $P < 0.05$; 与 MCC950 组比较, ^d $P < 0.05$ 。

2.4 PDCD4 沉默对 RIR 大鼠视网膜组织细胞凋亡的影响

2.4.1 各组大鼠视网膜组织细胞凋亡情况 Sham 组、RIR 模型组、MCC950 组、si-PDCD4 组、

si-PDCD4 + MCC950 组细胞凋亡指数 (AI) 分别为 (4.39 ± 0.38)%、(27.80 ± 4.55)%、(15.89 ± 4.38)%、(12.33 ± 3.59)%、(7.80 ± 2.41)%、5 组 AI 比较, 差异有统计学意义 ($F = 69.59, P < 0.001$)。与

Sham 组比较, RIR 模型组大鼠视网膜组织 AI 升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 RIR 模型组比较, MCC950 组、si-PDCD4 组大鼠视网膜组织 AI 均降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 MCC950 组及 si-PDCD4 组比较, si-PDCD4+MCC950 组 RIR 大鼠视网膜组织 AI 进一步降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 3。

2.4.2 各组大鼠视网膜组织内细胞凋亡蛋白表达情况 与 Sham 组比较, RIR 模型组大鼠 Bax、Cleaved-

caspase-3 表达水平升高, Bcl-2 表达水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 RIR 模型组比较, MCC950 组、si-PDCD4 组 Bax、Cleaved-caspase-3 表达水平降低, Bcl-2 表达水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 si-PDCD4 组及 MCC950 组比较, si-PDCD4+MCC950 组 Bax、Cleaved-caspase-3 表达水平进一步降低, Bcl-2 表达水平进一步升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 4、表 4。

表 3 各组大鼠视网膜组织内血内相关炎症因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	n	IL-6	IL-8	IL-1 β	TNF- α
Sham 组	10	7.80 \pm 3.40	10.78 \pm 4.27	25.34 \pm 8.22	3.44 \pm 0.38
RIR 模型组	10	25.49 \pm 8.79 ^a	34.11 \pm 12.50 ^a	45.38 \pm 12.78 ^a	20.38 \pm 0.74 ^a
MCC950 组	10	17.45 \pm 4.34 ^b	23.56 \pm 10.28 ^b	37.00 \pm 10.28 ^b	16.42 \pm 0.53 ^b
si-PDCD4 组	10	15.34 \pm 3.11 ^b	20.22 \pm 8.32 ^b	34.29 \pm 9.12 ^b	10.26 \pm 0.42 ^b
si-PDCD4+MCC950 组	10	12.39 \pm 2.57 ^{cd}	13.09 \pm 6.23 ^{cd}	27.81 \pm 7.45 ^{cd}	6.77 \pm 0.34 ^{cd}
F		17.39	11.08	6.63	1 896.64
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与 Sham 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 RIR 模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与 si-PDCD4 组比较, ^c $P < 0.05$; 与 MCC950 组比较, ^d $P < 0.05$ 。

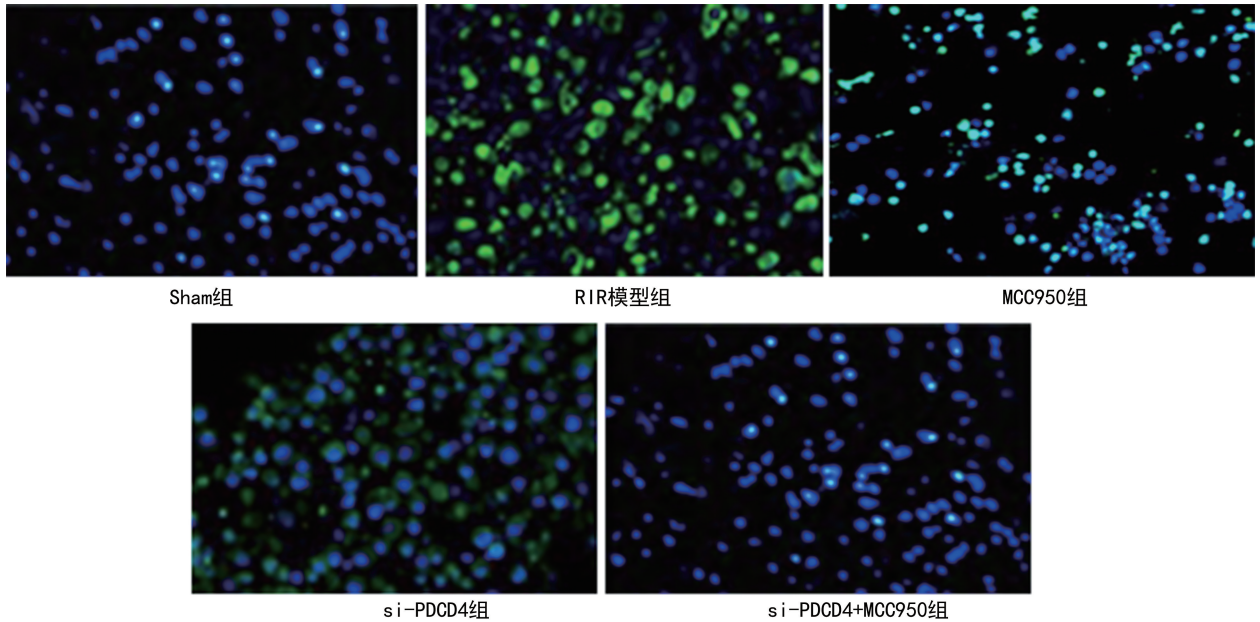


图 3 各组大鼠视网膜组织细胞凋亡能力 ($\times 50$)

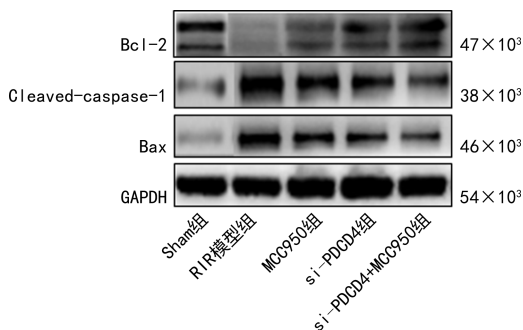


图 4 各组大鼠视网膜组织内细胞凋亡蛋白表达情况

表 4 各组大鼠视网膜组织内细胞凋亡蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bax	Cleaved-caspase-3	Bcl-2
Sham 组	10	0.21 \pm 0.08	0.31 \pm 0.15	0.63 \pm 0.18
RIR 模型组	10	0.68 \pm 0.28 ^a	0.78 \pm 0.35 ^a	0.23 \pm 0.10 ^a
MCC950 组	10	0.45 \pm 0.19 ^b	0.53 \pm 0.29 ^b	0.36 \pm 0.19 ^b
si-PDCD4 组	10	0.40 \pm 0.22 ^b	0.47 \pm 0.25 ^b	0.45 \pm 0.21 ^b

续表 4 各组大鼠视网膜组织内细胞凋亡蛋白表达水平($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bax	Cleaved-caspase-3	Bcl-2
si-PDCD4+MCC950 组	10	0.35±0.18 ^{cd}	0.38±0.12 ^{cd}	0.54±0.29 ^{cd}
F		7.31	5.31	5.85
P		<0.001	<0.001	<0.001

注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.05$;与 RIR 模型组比较,^b $P < 0.05$;与 si-PDCD4 组比较,^c $P < 0.05$;与 MCC950 组比较,^d $P < 0.05$ 。

3 讨论

RIR 损伤在眼科中较为常见,其病因与青光眼、视网膜阻塞、视网膜病变等因素有关^[17]。RIR 被证实可以对眼部产生视力危害,严重的会导致视力丧失,临床上治疗 RIR 的手段主要包括控制眼压、改变视网膜周围血流,以及给予营养等,但是效果不够理想^[18]。因此,深入地了解 RIR 损伤的过程,探究 RIR 损伤的治疗方法对于临床改善患者视力具有重要意义。

RIR 持续性损伤与神经炎症反应密切相关,NLRP3 诱导的神经炎症反应参与眼科疾病的发生及发展过程^[19]。NLRP3、NLRP6 属于炎症小体的核心蛋白类型,其激活可以有效地促进 IL-18、IL-1 β 的剪切成熟度,介导炎症介质大量释放,加剧视网膜细胞 DNA 的损伤,导致细胞渗透压发生改变,形成炎症级联瀑布效应,导致细胞凋亡的产生。以往的研究已经证实炎症小体参与 RIR 的病理发展过程^[20]。本研究结果显示,给予 RIR 大鼠眼部注射 NLRP3/NLRP6 炎症小体信号通路抑制剂 MCC950 后,RIR 大鼠的病理特征得到明显的改善,大鼠视网膜内层水肿程度,细胞排列疏松、紊乱度,以及 RGC 细胞数量减少趋势均得到明显改善,同时大鼠眼球血及视网膜组织内炎症因子 IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 水平及 AI 均明显降低,提示 NLRP3/NLRP6 炎症小体信号通路参与 RIR 损伤的病理发展,对其活性进行抑制可以明显改善 RIR 损伤的病理特征。以上结果可能为临床干预视网膜 RIR 损伤神经炎症反应提供新的借鉴。

PDCD4 首次在大鼠的体内被发现,其分子结构保存有两个高度保守的 MA-3 结构域,可以充分结合竞争性的分子组织核糖体,形成复合物,从而在翻译水平上促进细胞凋亡。有研究结果表明,PDCD4 除在恶性肿瘤发生、发展中发挥重要作用外,也可以参与到炎症相关疾病的发展中^[21]。在大鼠抗原诱导的哮喘肺炎模拟模型中,PDCD4 表达水平明显升高,诱导其缺失表达后,大鼠气道炎症反应明显降低,研究还表明,PDCD4 对机体多种炎症反应均有促进作用,但是机制较为复杂^[22]。本研究对大鼠眼部视网膜进行了 PDCD4 沉默表达,结果显示,PDCD4 沉默表达可以明显改善 RIR 损伤大鼠的病理形态及视网膜水

肿程度,同时炎症因子 IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 水平及 AI 均明显降低,有效地证实了 PDCD4 参与 RIR 损伤后神经炎症反应,诱导其缺失表达可以明显改善 RIR 损伤引起的神经炎症反应。值得一提的是,本研究对 RIR 损伤大鼠同时进行了 PDCD4 沉默及 NLRP3/NLRP6 炎症小体信号通路活性抑制处理,结果显示,PDCD4 的缺失可以抑制 NLRP3/NLRP6 炎症小体信号通路活性,且二者联合可以进一步改善 RIR 大鼠病理特征,大鼠视网膜水肿程度及炎症状态均得到明显改善。

综上所述,PDCD4 沉默具有减轻 RIR 病理损伤,抑制视网膜细胞凋亡的作用,其分子机制可能与抑制 NLRP3/NLRP6 炎症小体诱导神经炎症反应有关。在后续的研究中将基于表观遗传学,进一步探究影响 RIR 病理损伤的分子机制,试图从炎症微环境角度深入研究影响 RIR 病程的分子机制,为临床干预 RIR 损伤治疗提供新的依据。

参考文献

- [1] CHEN D, PENG C, DING X M, et al. Interleukin-4 promotes microglial polarization toward a neuroprotective phenotype after retinal ischemia/reperfusion injury[J]. *Neural Regen Res*, 2022, 17(12): 2755-2760.
- [2] TANG D Y, LIU X, CHEN J, et al. Mitoquinone intravitreal injection ameliorates retinal ischemia-reperfusion injury in rats involving SIRT1/Notch1/NADPH axis[J]. *Drug Dev Res*, 2022, 83(3): 800-810.
- [3] LUO H D, ZHUANG J J, HU P P, et al. Resveratrol delays retinal ganglion cell loss and attenuates gliosis-related inflammation from ischemia-reperfusion injury[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59(10): 3879-3888.
- [4] 李娟娟, 陈晨, 张利伟, 等. 视网膜缺血-再灌注损伤中小胶质细胞对微循环的破坏作用[J]. *眼科新进展*, 2019, 39(7): 625-630.
- [5] XU Z H, CHO H K, HARTSOCK M J, et al. Neuroprotective role of Nrf2 for retinal ganglion cells in ischemia-reperfusion[J]. *J Neurochem*, 2015, 133(2): 233-241.
- [6] 夏江南, 沈蕾, 李晶晶. KLF7 对 TLR4/NLRP3 炎症小体激活的抑制作用及其对视网膜缺血-再灌注损伤大鼠细胞凋亡的影响[J]. *眼科新进展*, 2022, 42(9): 699-703.
- [7] 石颖, 陈胜, 冯春燕, 等. NLRP3 炎症小体/白介素-1 β 信号通路与糖尿病视网膜病变[J]. *中外医学研究*, 2023, 21(1): 181-184.
- [8] YANG K L, LI W H, LIU Y J, et al. Hydrogen sulfide attenuates neuroinflammation by inhibiting the NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway in retina or brain neuron following rat ischemia/reperfusion[J]. *Brain Sciences*, 2022, 12(9): 1245.
- [9] SHI Y H, LIU Y D, WU C Q, et al. N, N-Dimethyl-3 β -hydroxycholeamide attenuates neuronal death and retinal inflammation in retinal ischemia/reperfusion injury by in-

- hibiting Ninjurin 1 [J]. *J Neuroinflammation*, 2023, 20(1):91.
- [10] YAN W T, ZHAO W J, HU X M, et al. PANoptosis-like cell death in ischemia/reperfusion injury of retinal neurons[J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(2):357-363.
- [11] 肖云兰, 冯霞. NLRP3/IL-1 β 通路在增殖性糖尿病视网膜病变中的作用机制[J]. *国际眼科杂志*, 2019, 19(9):1559-1562.
- [12] YANG W H, GEORGE A P, WANG C M, et al. Tumor suppressor p53 down-regulates programmed cell death protein 4 (PDCD4) Expression[J]. *Curr Oncol*, 2023, 30(2):1614-1625.
- [13] LI J B, XIE M R, DUAN M L, et al. Over-expression of programmed death-ligand 1 and programmed death-1 on antigen-presenting cells as a predictor of organ dysfunction and mortality during early sepsis; a prospective cohort study[J]. *World J Emerg Med*, 2023, 14(3):179-185.
- [14] 王佳, 林雪容, 高恒波, 等. miR-21 靶向 CCL20 及 PDCD4 对脓毒症大鼠心肌中细胞凋亡及炎症反应的调节作用[J]. *中国免疫学杂志*, 2022, 38(4):389-394.
- [15] 杨永强, 李娟, 钟海川, 等. 炎症性肠病患者肠黏膜组织中 miR-129 与 PDCD4 表达水平的关系及意义[J]. *国际消化病杂志*, 2022, 42(4):231-236.
- [16] 斯庆布日古德, 都日娜. 建立视网膜缺血再灌注损伤模型方法的选择[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(26):167-168.
- [17] XU J, GUO Y Y, LIU Q, et al. Pregabalin mediates retinal ganglion cell survival from retinal ischemia/reperfusion injury via the Akt/GSK3 β / β -catenin signaling pathway[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2022, 63(12):7.
- [18] XU J, LIU Q, MA M, et al. Involvement of moesin phosphorylation in ischemia/reperfusion induced inner blood-retinal barrier dysfunction[J]. *Int J Ophthalmol*, 2020, 13(4):545-551.
- [19] 孔慧, 崔彦. CD40-ATP-P2X7/NLRP3 炎症信号通路在糖尿病视网膜病变中的作用研究进展[J]. *眼科新进展*, 2021, 41(9):879-882.
- [20] LIU Z H, QU M, YU L L, et al. Artesunate inhibits renal ischemia-reperfusion-mediated remote lung inflammation through attenuating ros-induced activation of NLRP3 inflammasome[J]. *Inflammation*, 2018, 41(4):1546-1556.
- [21] JIN J, XU G X, YU G H, et al. microRNA-21 could promote the apoptosis of retinal neurons by down-regulating PDCD4 in a rat model of diabetes mellitus[J]. *Intern J Clin Experim Med*, 2017, 10(4):6029-6041.
- [22] YU Z Y, ZHUO Y H, ZHANG Y, et al. TNF- α stimulation enhances the neuroprotective effects of gingival MSCs derived exosomes in retinal ischemia-reperfusion injury via the MEG3/miR-21a-5p axis[J]. *Biomaterials*, 2022, 63(7):29-75.

(收稿日期:2023-12-14 修回日期:2024-02-08)

(上接第 1460 页)

- [7] 胡格, 徐秀理, 王丹, 等. CD4⁺/CD8⁺、B 淋巴细胞与抑制/细胞毒性 T 细胞预测宫颈癌放疗患者放射性肠炎的价值[J]. *中国临床研究*, 2022, 35(6):779-783.
- [8] ZHENG L H, ZHAO J, ZHENG L K, et al. Effect of dexmedetomidine on perioperative stress response and immune function in patients with tumors [J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2020, 19:1533033820977542.
- [9] 陈素华, 马天江, 张国耀, 等. II ~ III 期结肠癌患者根治术后肿瘤转移的影响因素[J]. *实用癌症杂志*, 2022, 37(4):650-652.
- [10] THOMMEN D S, SCHUMACHER T N. T cell dysfunction in cancer[J]. *Cancer Cell*, 2018, 33(4):547-562.
- [11] 翟素平, 张成辉, 马昕炜. 肿瘤标志物及 T 淋巴细胞亚群在肺癌化疗患者中的变化及临床意义[J]. *癌症进展*, 2021, 19(16):1678-1681.
- [12] ENGELHARD V, CONEJO-GARCIA J R, AHMED R, et al. B cells and cancer[J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(10):1293-1296.
- [13] 李玥婷, 施鹏旭, 英子伟, 等. 自然杀伤细胞、CD19⁺ 对乳腺癌患者保乳手术治疗后复发预测价值研究[J]. *临床军医杂志*, 2019, 47(3):250-252.
- [14] CASTILHO J L, BIAN A H, JENKINS C A, et al. CD4/CD8 ratio and cancer risk among adults with HIV[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2022, 114(6):854-862.
- [15] OVERGAARD N H, JUNG J W, STEPTOE R J, et al. CD4⁺/CD8⁺ double-positive T cells: more than just a developmental stage[J]. *J Leukoc Biol*, 2015, 97(1):31-38.
- [16] BOHNER P, CHEVALIER M F, CESSON V, et al. Double positive CD4⁺CD8⁺ T cells are enriched in urological cancers and favor T helper-2 polarization[J]. *Front Immunol*, 2019, 10:622.
- [17] LU J, DING Y, YI X, et al. CD19⁺ B cell subsets in the peripheral blood and skin lesions of psoriasis patients and their correlations with disease severity[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2016, 49(9):e5374.
- [18] ROYA N, FATEMEH T, FARAMARZ M A, et al. Frequency of IL-10+CD19⁺ B cells in patients with prostate cancer compared to patients with benign prostatic hyperplasia[J]. *Afr Health Sci*, 2020, 20(3):1264-1272.
- [19] KLUGMAN M, FAZZARI M, XUE X, et al. The associations of CD4 count, CD4/CD8 ratio, and HIV viral load with survival from non-small cell lung cancer in persons living with HIV[J]. *AIDS Care*, 2022, 34(8):1014-1021.
- [20] LEE P H, YANG T Y, CHEN K C, et al. Higher CD4/CD8 ratio of pleural effusion predicts better survival for lung cancer patients receiving immune checkpoint inhibitors[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):9381.
- [21] NISHIDA K, KAWASHIMA A, KANAZAWA T, et al. Clinical importance of the expression of CD4⁺CD8⁺ T cells in renal cell carcinoma[J]. *Int Immunol*, 2020, 32(5):347-357.

(收稿日期:2023-10-16 修回日期:2024-01-29)