

ROCK2 在 ARC 中的表达及对晶状体上皮细胞的自噬及氧化损伤的影响*

严一杰 魏丽娟 孙建红 张开颜 李雷

(海南省人民医院眼科, 海南 海口 570000)

【摘要】目的 探讨 Rho 激酶 2(ROCK2)在年龄相关性白内障(ARC)晶状体前囊膜中的表达及其对 H_2O_2 诱导的人晶状体上皮细胞自噬及氧化损伤的影响。**方法** 收集 2020 年 6 月~2021 年 4 月在我院行超声乳化白内障吸出术的 ARC 患者 20 例,获取晶状体前囊膜,并获取眼科标本库中无眼科疾病、眼球结构完整且晶状体透明的正常晶状体前囊膜。免疫组织化学染色和 Western blot 检测 ROCK2 蛋白表达;将人晶状体上皮细胞 HLE-B3 随机分为对照组、 H_2O_2 组、sh-NC+ H_2O_2 组和 sh-ROCK2+ H_2O_2 组,转染 sh-NC 或 sh-ROCK2 至对应组细胞,并用 H_2O_2 处理细胞,实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测细胞转染效率,MTT 法检测各处理组细胞增殖活性,透射电镜观察细胞内自噬现象,自噬双标腺病毒 mRFP-GFP-LC3 转染细胞后观察自噬溶酶体和自噬体水平,Western blot 检测细胞中自噬相关蛋白表达情况,DCFH-DA 法检测活性氧(ROS)水平,试剂盒测定超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性及丙二醛(MDA)含量。**结果** 与正常组织比较,ARC 中 ROCK2 表达增高($P<0.05$);转染 sh-ROCK2 后成功下调了 HLE-B3 细胞中 ROCK2 表达水平($P<0.05$);与对照组比较, H_2O_2 处理细胞后,细胞增殖活性显著下降,自噬体明显增多,明显激活了自噬溶酶体和自噬体水平,Beclin-1 蛋白相对表达量显著升高,LC3-II/LC3-I 比值显著上调,ROS 水平显著上升,SOD 和 GSH-Px 的活性均显著降低,MDA 含量则显著升高(均 $P<0.05$);与 H_2O_2 组比较,细胞转染 sh-ROCK2 后再用 H_2O_2 处理,细胞增殖活性显著提高,自噬体减少,自噬溶酶体和自噬体水平受到抑制,Beclin-1 蛋白相对表达量显著降低,LC3-II/LC3-I 比值显著下调(均 $P<0.05$),同时,细胞内 ROS 水平显著下降,SOD 和 GSH-Px 的活性均显著升高,MDA 含量显著降低(均 $P<0.05$)。**结论** ROCK2 在 ARC 晶状体前囊膜中高表达,下调其表达能够抑制 H_2O_2 诱导的人晶状体上皮细胞过度自噬,减少氧化损伤。

【关键词】 年龄相关性白内障;Rho 激酶 2;人晶状体上皮细胞;自噬;氧化损伤

【中图分类号】 R774.1 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2023. 02. 007

The expression of Rho kinase 2 in age-related cataracts and its effect on autophagy and oxidative damage of lens epithelial cells

YAN Yijie, WEI Lijuan, SUN Jianhong, ZHANG Kaiyan, LI Lei

(Department of Ophthalmology, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou 570000, China)

【Abstract】 Objective To explore the expression of Rho-associated coiled-coil-forming protein kinase 2 (ROCK2) in the anterior lens capsule of age-related cataract (ARC), and its effect on the autophagy and oxidative damage of human lens epithelial cells induced by H_2O_2 . **Methods** The anterior capsule of ARC patients and normal lens were collected, and the expression of ROCK2 protein was detected by immunohistochemical staining and Western blot; Human lens epithelial cells HLE-B3 were randomly divided into control group, H_2O_2 group, sh-NC+ H_2O_2 group and sh-ROCK2+ H_2O_2 group, transfected sh-NC or sh-ROCK2 to the corresponding group of cells, and treated the cells with H_2O_2 , Real-time fluorescent quantitative PCR and Western blot detected the cell transfection efficiency, MTT method detected the cell proliferation activity of each treatment group, transmission electron microscopy observed the phenomenon of autophagy in cells; After autophagy double-labeled adenovirus mRFP-GFP-LC3 was transfected into cells, autophagolysosome

基金项目:海南省卫生健康行业科研项目(20A200302)

引用本文:严一杰,魏丽娟,孙建红,等. ROCK2 在 ARC 中的表达及对晶状体上皮细胞的自噬及氧化损伤的影响[J]. 西部医学, 2023, 35(2):

188-194, 202. DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2023. 02. 007

and autophagosome levels were observed, Western blot detected the expression of autophagy-related proteins in cells, DCFH-DA method detected the level of reactive oxygen species (ROS), the kit measured the activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and the content of malondialdehyde (MDA). **Results** Compared with normal tissues, the expression of ROCK2 in ARC was increased ($P < 0.05$). After transfection with sh-ROCK2, the expression level of ROCK2 in HLE-B3 cells was successfully down-regulated ($P < 0.05$). Compared with the control group, after H_2O_2 treatment of cells, cell proliferation activity decreased significantly, autophagosomes increased significantly, autophagolysosome and autophagosome levels were obviously activated, and the relative expression of Beclin-1 protein increased significantly, the ratio of LC3-II/LC3-I was significantly increased, the level of ROS was significantly increased, the activities of SOD and GSH-Px were significantly reduced, and the content of MDA was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the H_2O_2 group, the cells were transfected with sh-ROCK2 and then treated with H_2O_2 , the cell proliferation activity was significantly increased, the autophagosomes were reduced, the levels of autophagolysosomes and autophagosomes were inhibited, the relative expression of Beclin-1 protein was significantly reduced, the ratio of LC3-II/LC3-I was significantly down-regulated. At the same time, the intracellular ROS level was significantly decreased, the activities of SOD and GSH-Px were both significantly increased, and the MDA content was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** ROCK2 is highly expressed in the anterior capsule of ARC lens, down-regulating its expression can inhibit H_2O_2 -induced excessive autophagy in human lens epithelial cells and reduce oxidative damage.

【Key words】 Age-related cataract; Rho-associated coiled-coil-forming protein kinase 2; Human lens epithelial cells; Autophagy; Oxidative damage

视力障碍是全球性疾病负担,也是致盲的重要原因。随着我国人口老龄化的发展趋势,年龄相关性白内障(Age-related cataract, ARC)的发病率也越来越高,现已成为可逆性视力障碍和失明的首要原因^[1-2]。目前,ARC的发病机制尚不完全明确,但已知该疾病发生发展与紫外线辐射、氧化应激、代谢紊乱、药物和其他毒性因素有关^[3]。对ARC发展过程中的具体分子机制进行深入研究和阐明,寻找该疾病的病因,开发有效的抗白内障药物,预防、延缓甚至逆转晶状体混浊,最大限度地保护患者的视觉功能^[4],这些对于减轻ARC患者压力和社会经济负担具有重要的理论和社会意义。

Rho相关激酶(Rho-associated coiled-coil-forming protein kinase 2, ROCK2)也称为Rho相关卷曲螺旋形成蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶,是蛋白激酶A、G和C(PKA/PKG/PKC)家族的成员。ROCK有两个高度同源的异构体,即ROCK1和ROCK2,现已证实ROCK2参与细胞多种生物学过程,例如增殖、凋亡、收缩、粘附和迁移等^[4-5],在病理过程中,ROCK2的过度活化会导致血管内皮损伤,内皮细胞的迁移也受到ROCK途径的调控^[6]。此外,ROCK2在包括视网膜在内的许多器官中均有表达,而其过度表达会导致多种眼部疾病的发生,如糖尿病视网膜病变和青光眼^[7-8]。但关于ROCK2在ARC中的相关作用及机制报道较少。本研究通过检测ARC晶状体前囊膜中ROCK2表达后,利用 H_2O_2 诱导人晶状体上皮细胞建立体外ARC模型,观察下调ROCK2表达对人晶状体上皮细胞自噬及氧化损伤的影响,探讨ROCK2在

白内障病理过程中可能的作用及其机制,同时为白内障靶向治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集2020年6月~2021年4月在我院进行超声乳化白内障吸出术的ARC患者20例,获取晶状体前囊膜,男11例,女9例,年龄51~72岁,平均 (58.91 ± 5.43) 岁,并取眼科标本库中无眼科疾病、眼球结构完整且晶状体透明的前囊膜。本研究通过医院伦理委员会审核通过。

1.2 主要材料 人晶状体上皮细胞系HLE-B3(中国科学院上海细胞库);胎牛血清和DMEM培养基(美国Gibco公司); H_2O_2 (美国Sigma公司);免疫组织化学染色试剂盒(北京索莱宝生物公司);Lipofectamine® RNAiMAX(美国Invitrogen公司);Trizol、反转录及荧光定量试剂盒(日本Takara公司);免疫荧光染色试剂盒(上海翌圣生物公司);MTT试剂盒、Bradford蛋白测定试剂盒、ECL试剂液和DCFH-DA试剂盒(上海碧云天生物研究所);超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)及丙二醛(MDA)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);兔抗人ROCK2单克隆抗体、兔抗人Beclin-1、LC3-II、LC3-I、GAPDH多克隆抗体及生物素标记山羊抗兔IgG抗体(英国Abcam公司);自噬双标腺病毒mRFP-GFP-LC3(美国GeneCopoeia公司);sh-NC和sh-ROCK2载体均有广州锐博生物公司合成构建,引物序列交由上海生工生物工程公司合成。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学染色 将ARC及正常晶状体

前囊膜清洗后,立即置于 10% 福尔马林溶液中固定,常规石蜡包埋,组织块连续切片,获得厚度约为 4 μm 的切片。通过 60℃ 烤箱烤片,浸入枸橼酸缓冲液煮沸 10 min,进行热抗原修复,再置于 0.3% 过氧化氢中室温孵育 10 min,以 10% 山羊血清室温封闭后,采用稀释的兔抗人 ROCK2 单克隆抗体(1:200)作为第一抗体,与切片在 4℃ 下共孵育过夜。PBS 冲洗切片后,滴加稀释的生物素标记山羊抗兔 IgG 抗体(1:1000),室温继续共孵育 1 h。利用 DAB 显色,苏木精复染,脱水、透明,中性树胶封片,光学显微镜下观察染色情况,捕获图像,其中黄色至棕色颗粒即为阳性表达,随机选择 5 个视野,Image J 软件分析所选区域的平均密度。

1.3.2 细胞转染与分组 将冻存的 HLE-B3 细胞取出,置于 37℃ 水浴锅中融化,再以 1000 rpm/min 离心 3 min,弃上清,在沉淀中加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 低糖培养基,吹打成单细胞悬液,置于 37℃、5%CO₂ 条件下培养,2 d 更换一次培养基。实验分组与处理具体如下:①对照组:HLE-B3 细胞正常培养。②H₂O₂ 组:100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H₂O₂ 处理 HLE-B3 细胞 24 h。③sh-NC+H₂O₂ 组:转染 sh-NC 至 HLE-B3 细胞,以 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H₂O₂ 处理 HLE-B3 细胞 24 h。④sh-ROCK2+H₂O₂ 组:转染 sh-ROCK2 至 HLE-B3 细胞,以 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H₂O₂ 处理 HLE-B3 细胞 24 h。利用 Lipofectamine® RNAiMAX 分别将 sh-NC 和 sh-ROCK2 序列转染至 HLE-B3 细胞,严格参照试剂盒说明书操作。

1.3.3 实时荧光定量 PCR Trizol 试剂提取转染后 HLE-B3 细胞总 RNA,通过反转录操作合成 cDNA。以 cDNA 为模板,根据实时荧光定量 PCR 试剂盒说明检测扩增,以定量 ROCK2 mRNA 的表达水平,选择 β -actin 作为内参基因。反应系统的程序设置为:95℃ 预变性 3 min,1 次循环;95℃ 变性 20 s,60℃ 退火 15 s,72℃ 延伸 45 s,42 次循环。实验重复 3 次,反应结束后,采用 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 法计算 ROCK2 的 mRNA 相对表达量。引物序列如下:ROCK2 上游 5'-ATTCAG-CAGCTGGAATCTAA-3',下游 5'-GTCTCTTCTC-CAGTTCTAC-3'; β -actin 上游 5'-ATCGTCCACCG-CAAATGCTTCT-A-3',下游 5'-AGCCATGC-CAATCTCATCTTGTT-3'。

1.3.4 Western blot 在转染后或各处理组的 HLE-B3 细胞中加入预冷 RIPA 缓冲液,冰上裂解,通过 4000 rpm 离心 15 min 以提取总蛋白,Bradford 法定量。制备 10% SDS-PAGE 凝胶,将提取的各组蛋白样品等量上样后,凝胶电泳分离,再电转至 PVDF 膜,以

5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, TBST 洗膜,加入各稀释的一抗抗体,4℃ 下共孵育过夜。弃去原液, TBST 洗膜,加入对应的二抗,室温继续孵育 1 h, TBST 洗膜。利用 ECL 显色,凝胶成像系统拍摄各个蛋白条带,以 GAPDH 作为内参蛋白,Image J 软件分析灰度值,计算各目的蛋白的相对表达量。

1.3.5 MTT 法 取生长状态良好的 HLE-B3 细胞,调整密度按 1×10⁵ 个/孔植入 96 孔板内,置于 37℃、5%CO₂ 条件下培养。培养过夜后,按照 1.3.2 分 4 组进行对应处理,结束后,继续培养至 24、48、72 h,加入 50 μL 1×MTT 至待测细胞孔,混匀,37℃ 孵育 4 h,洗掉上清,每孔加入 150 μL DMSO,置于摇床振荡 10 min,待结晶物完全溶解,酶标仪检测 490 nm 处各孔的吸光度值(OD 值)。

1.3.6 透射电镜观察 收集各处理组 HLE-B3 细胞,以 2000 rpm 离心 5 min,利用 4% 多聚甲醛和 4% 戊二醛混合液固定细胞。将细胞样品包埋并制备成超薄切片,以 3% 醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色。透射电镜下观察细胞内自噬体,并捕获细胞超微结构图像。

1.3.7 细胞免疫荧光染色 将各处理组 HLE-B3 细胞接种于共聚焦小皿中,置于 37℃、5% CO₂ 条件下培养至贴壁,加入 mRFP-GFP-LC3 病毒液感染细胞,MOI 为 50,继续孵育 2~6 h 后,弃掉原培养基,加入新鲜培养基培养。收集细胞,4% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 洗涤,封片液封片,共聚焦显微镜观察染色情况,摄取图片,结果中两种荧光融合后出现的黄色斑点代表自噬体,融合后出现的红色斑点代表自噬溶酶体,通过对不同颜色斑点的计数来判断细胞内自噬流水平,每组随机选择 3 个视野,计数 100 个细胞中的红点与黄点数目来定量自噬水平。

1.3.8 DCFH-DA 法 首先在 DCFH-DA 试剂液加入无血清培养液进行稀释(比例为 1:1000),收集各处理组 HLE-B3 细胞,以 2000 rpm 离心 5 min,弃上清,加入稀释的 DCFH-DA 重悬细胞,调整密度按 2×10⁴ 个/孔植入 24 孔板内,37℃ 下孵育 20 min,期间每隔 5 min 轻晃 1 次。结束后,以 1000 rpm 离心 10 min, PBS 洗涤细胞并将沉淀重悬,通过流式细胞仪进行检测分析 ROS。

1.3.9 氧化反应指标测定 采用细胞裂解液裂解各处理组 HLE-B3 细胞,收集上清液,并进行蛋白电量。按照试剂盒说明书处理样品,酶标仪测定对应波长下各孔 A 值,检测各组细胞内超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性以及丙二醛(MDA)含量。

1.4 统计学分析 使用 GraphPad Prism 8.30 软件

分析实验数据并绘制统计图。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组独立样本比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组内的两两比较采用 LSD- t 法,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ROCK2 在 ARC 患者晶状体囊膜中的表达

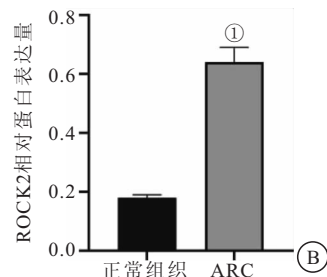
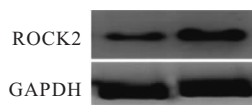
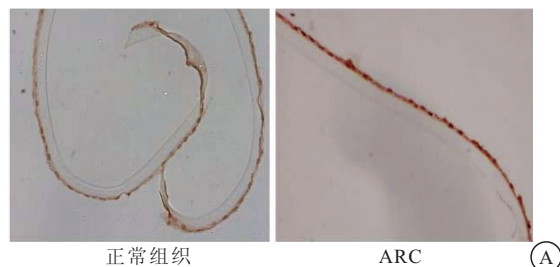


图 1 年龄相关性白内障患者晶状体囊膜中 ROCK2 表达检测

Figure 1 Detection of ROCK2 expression in the lens capsule of age-related cataract patients

注:A. 免疫组织化学染色检测 ROCK2 表达(400 $\times$);B. Western blot 检测 ROCK2 蛋白表达。与正常组织比较,① $P<0.05$

2.2 HLE-B3 细胞转染效果检测 HLE-B3 细胞转染后,通过实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测结果显示,与对照组和 sh-NC 组比较,sh-ROCK2 组细

胞中 ROCK2 的 mRNA 相对表达量和蛋白相对表达量均显著降低($P<0.05$),说明转染 sh-ROCK2 后成功下调 HLE-B3 细胞中 ROCK2 表达水平,见图 2。

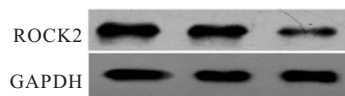
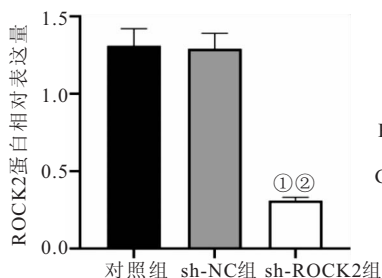
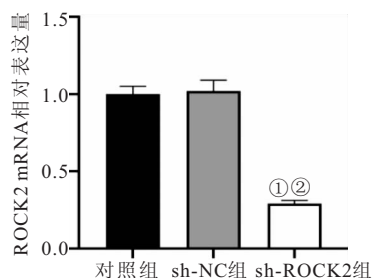


图 2 HLE-B3 细胞转染效率测定

Figure 2 Determination of transfection efficiency of HLE-B3 cells

注:与对照组比较,① $P<0.05$;与 sh-NC 组比较,② $P<0.05$

2.3 下调 ROCK2 对 H_2O_2 刺激下晶状体上皮细胞增殖活性的影响 MTT 法检测各处理组 HLE-B3 细胞增殖活性,结果显示,与对照组比较, H_2O_2 组在转染后 24、48、72 h,细胞增殖活性均显著下降($P<0.05$);而相较于 H_2O_2 组,细胞转染 sh-ROCK2 后经 H_2O_2 处理时,其增殖活性均显著升高($P<0.05$),见图 3。

2.4 下调 ROCK2 对 H_2O_2 诱导的晶状体上皮细胞自噬的影响 通过透射电镜观察各处理组 HLE-B3 细胞内自噬情况,对照组细胞内内质网结构紧密,未见自噬体, H_2O_2 组和 sh-NC+ H_2O_2 组细胞胞质内均可见多个由单层膜或双层膜的自噬体,数目明显多于对照组,sh-ROCK2+ H_2O_2 组细胞偶有自噬体,数目较 H_2O_2 组明显减少(见图 4)。通过免疫荧光染色观察各组 HLE-B3 细胞内自噬流,与对照组比较, H_2O_2

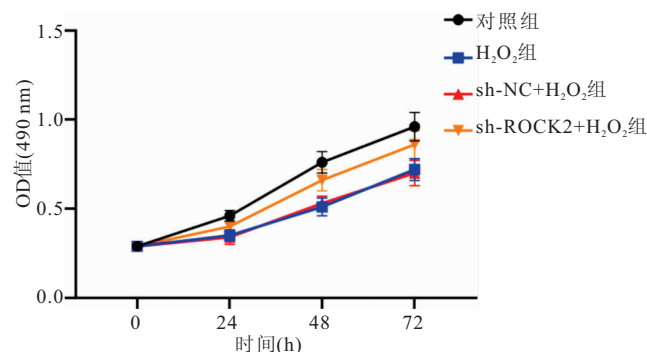


图 3 各组 HLE-B3 细胞增殖活性比较

Figure 3 Comparison of the proliferation activity of HLE-B3 cells in each group

组细胞内红色斑点和黄色斑点的荧光强度均明显增强,说明 H_2O_2 明显激活了自噬溶酶体和自噬体水平($P<0.05$);与 H_2O_2 组比较,sh-ROCK2+ H_2O_2 组细

胞内红色斑点和黄色斑点的荧光强度均明显减弱,细胞内自噬溶酶体和自噬体水平受到抑制($P<0.05$)(见图 5)。Western blot 法检测结果显示,与对照组比较, H_2O_2 组 HLE-B3 细胞中 Beclin-1 蛋白相对表

达量显著升高,LC3-II/LC3- I 比值显著上调($P<0.05$);与 H_2O_2 组比较,sh-ROCK2+ H_2O_2 组细胞中 Beclin-1 蛋白相对表达量显著降低,LC3-II/LC3- I 比值显著下调($P<0.05$),见图 6。

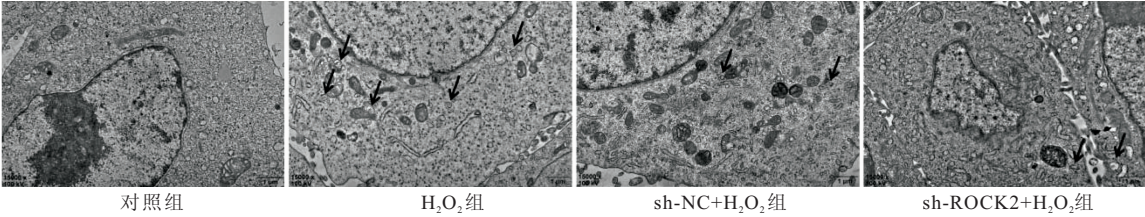


图 4 各组 HLE-B3 细胞内自噬体观察(10000×)

Figure 4 Observation of autophagosomes in HLE-B3 cells in each group

注:箭头所指为自噬体

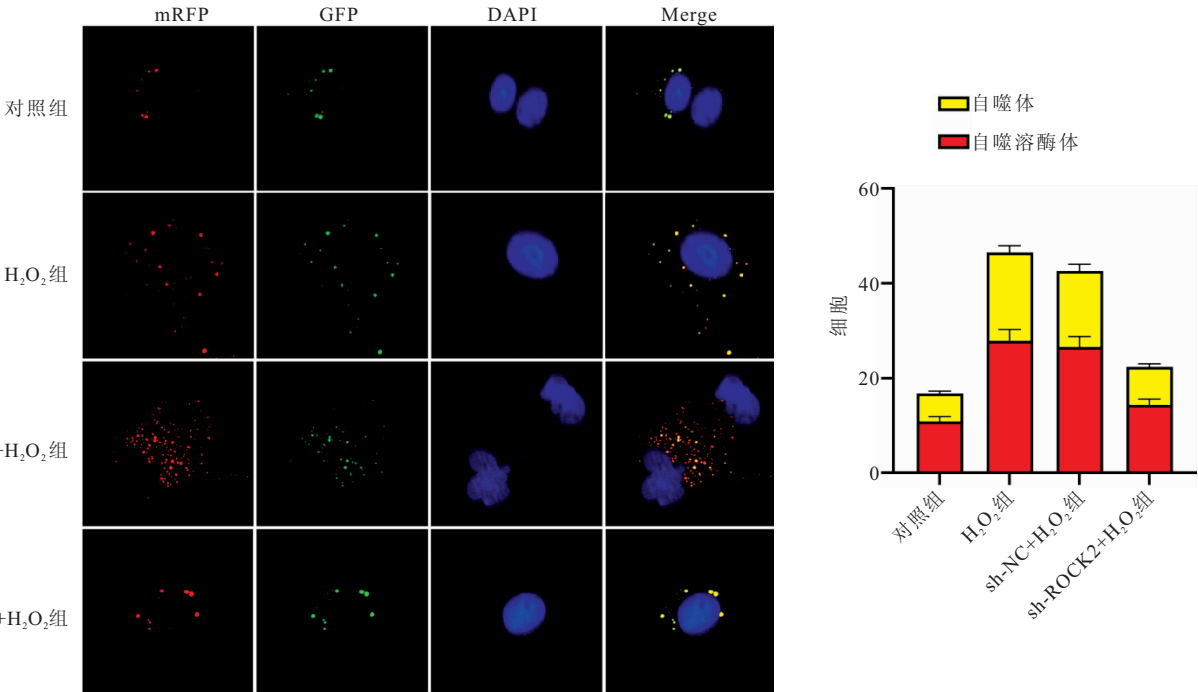


图 5 各组 HLE-B3 细胞内自噬流水平(100×)

Figure 5 Intracellular levels of autophagy in HLE-B3 cells in each group

注:红色斑点是自噬溶酶体(mRFP);黄色斑点是自噬体(mRFP+GFP)

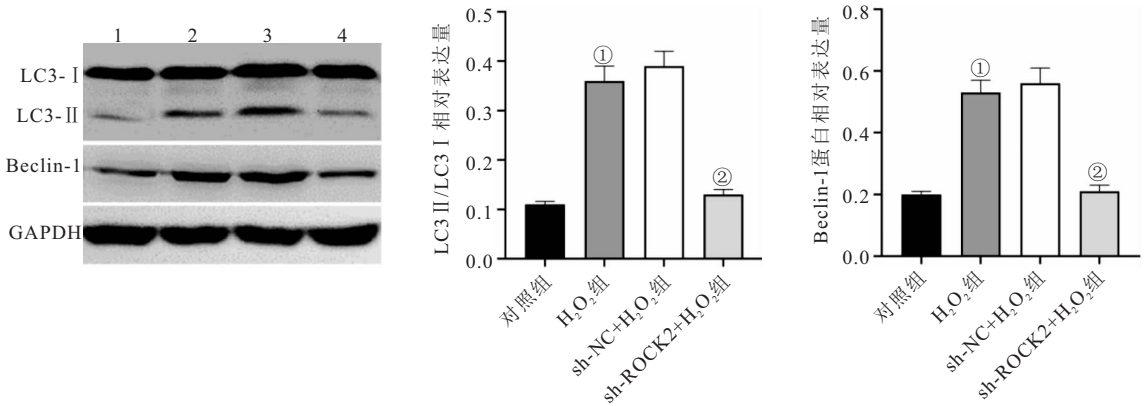


图 6 各组 HLE-B3 细胞中自噬相关蛋白表达

Figure 6 Autophagy-related protein expression in HLE-B3 cells in each group

注:与对照组比较,① $P<0.05$;与 H_2O_2 组比较,② $P<0.05$

2.5 下调 ROCK2 对 H₂O₂ 诱导的晶状体上皮细胞氧化应激反应的影响 DCFH-DA 法检测各处理组 HLE-B3 细胞内 ROS 水平, H₂O₂ 组细胞 ROS 水平较对照组显著上升($P<0.05$); 而 sh-ROCK2+H₂O₂ 组细胞 ROS 水平较 H₂O₂ 组则显著下降($P<0.05$) (见

图 7)。H₂O₂ 组 HLE-B3 细胞中 SOD 和 GSH-Px 的活性均显著低于对照组($P<0.05$), MDA 含量显著高于对照组($P<0.05$); 而相较于 H₂O₂ 组, sh-ROCK2+H₂O₂ 组细胞中 SOD 和 GSH-Px 的活性均显著升高, MDA 含量则显著降低($P<0.05$), 见表 1。

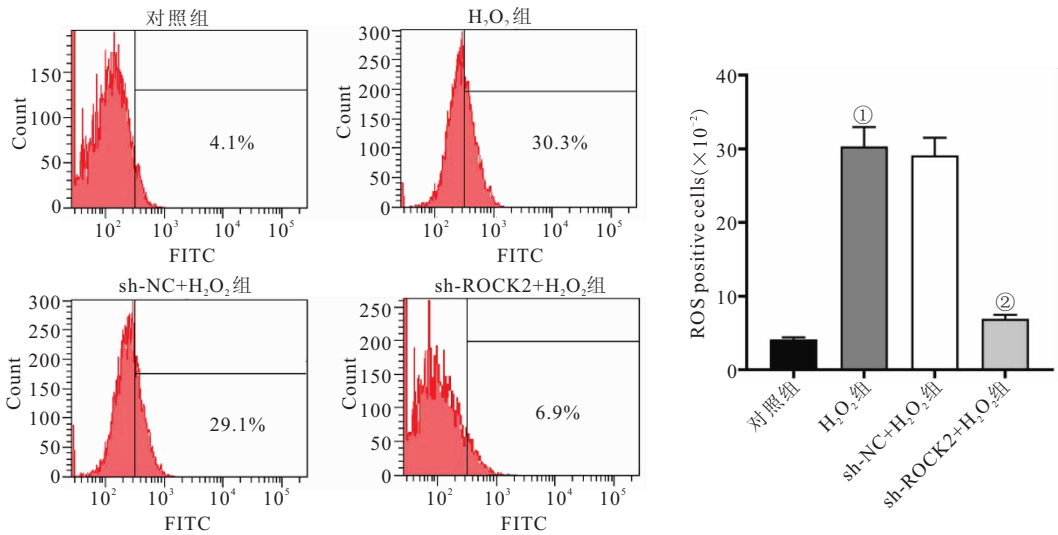


图 7 各组 HLE-B3 细胞内 ROS 水平检测

Figure 7 Detection of ROS levels in HLE-B3 cells in each group

注: 与对照组比较, ① $P<0.05$; 与 H₂O₂ 组比较, ② $P<0.05$

表 1 各组 HLE-B3 细胞 SOD 和 GSH-Px 活性及 MDA 含量比较($\bar{x}\pm s$)
Table 1 Comparison of SOD and GSH-Px activities and MDA content of HLE-B3 cells in each group

分组	SOD /U·mL ⁻¹	GSH-Px /U·mL ⁻¹	MDA /nmol·mL ⁻¹
对照组	84.98±7.59	182.65±16.29	45.78±4.23
H ₂ O ₂ 组	36.27±3.04 ^①	85.46±8.27 ^①	91.76±8.98 ^①
sh-NC+H ₂ O ₂ 组	38.01±3.55	84.13±8.34	93.61±9.07
sh-ROCK2+H ₂ O ₂ 组	65.16±6.40 ^②	133.91±11.86 ^②	57.04±5.43 ^②

注: 与对照组比较, ① $P<0.05$; 与 H₂O₂ 组比较, ② $P<0.05$

3 讨论

根据世界卫生组织数据显示, 由白内障引起的失明约占所有失明人数的 50%, 而且还在以每年 0.4~120 万的速度增长, 其中 ARC 的比例最高^[2]。迄今为止, 手术切除仍是 ARC 唯一有效的治疗方法, 但手术风险、术后并发症及社会经济负担等因素均限制该疗法^[9-10]。因此, 开发安全且低成本的方案来预防或治疗 ARC, 是当前眼科疾病临床研究的一项重点内容。

在 Rho 家族成员中, RhoA 不仅在调节细胞骨架、维持细胞形态、平滑肌细胞收缩等细胞活动中起重要作用, 而且参与调节多种生物学活动, 如平滑肌细胞增殖与细胞粘附。在细胞代谢过程中, Rho 蛋白以磷酸鸟嘌呤三核苷酸(GTP)和磷酸鸟嘌呤二核苷酸(GDP)结合形式存在, 通过 GDP 磷酸化和 GTP 去磷酸化之间的相互转换, 诱导或终止细胞级联激活的

反应^[11-12]。ROCK2 作为小 GTP 酶 Rho 亚家族的下效应子, 在与 Rho 中 GTP 酶相互作用后被激活, 并通过一系列途径作用于细胞骨架及其靶蛋白, 从而发挥多种生物学效应^[4,13]。目前, 关于 ROCK2 在疾病中的研究较为广泛, 且多项研究证明抑制 ROCK2 可在一些疾病中发挥积极作用, 如 Knipe 等^[14]研究指出 ROCK1 和 ROCK2 均有助于博来霉素诱导的肺损伤后组织纤维化的发展, 而在 ROCK1 或 ROCK2 单倍体不足的小鼠中 ROCK1 或 ROCK2 的表达降低能够减轻其受博来霉素诱导的肺纤维化; Yang 等^[15]发现 ROCK2 抑制剂 Ripasudil 通过调节 ROCK2/eNOS 信号通路抑制脂多糖诱导的肺微血管内皮细胞凋亡和炎症反应。此外, 关于 ROCK2 在眼科疾病中的研究也已有报道, Gao 等^[16]研究表明 ROCK2 抑制剂 Ripasudil 通过上调 miR-136-5p 表达可减轻视网膜色素上皮细胞的炎症损伤, 经验证还发现 miR-136-5p 对 ROCK1 和 ROCK2 均有靶向作用; Hida 等^[17]研究指出抑制 ROCK 通路能够显著抑制视网膜静脉阻塞的恶化, 减少视网膜水肿与非灌注区的大小, 并改善了视网膜血流量。本研究结果显示, 通过靶向下调 HLE-B3 中 ROCK2 的表达后能够抑制 H₂O₂ 诱导的 HLE-B3 细胞增殖活性的下降。这一结果同样也提示, 抑制 ROCK2 表达能够减轻 H₂O₂ 诱导下人晶状

体上皮细胞的损伤,推测这可能对于 ARC 造成的人晶状体上皮细胞损伤起到改善作用。

随着年龄的增长,眼部的不同组织会发生一系列变化,包括线粒体代谢失调、葡萄糖和脂质利用模式改变、甲基化代谢物积累以及牛磺酸代谢受损,这些变化都可能归因于眼病的发生^[18]。同时,内源性抗氧化剂如 SOD 和 GSH-Px 的活性明显降低,而 ROS 的产生却增加,ROS 的过量产生对包括 DNA 和蛋白质在内的生物分子造成了结构性损伤,阻碍眼部相关受损细胞核和线粒体 DNA 的修复过程,从而导致细胞基因组的不稳定、细胞衰老和年龄相关疾病的发生^[19-21]。本研究中,在 H₂O₂ 诱导下 HLE-B3 细胞发生了氧化损伤,而下调 HLE-B3 细胞中 ROCK2 表达能够明显抑制 ROS 水平,降低 MDA 含量,并提高 SOD 和 GSH-Px 的活性,对 H₂O₂ 诱导下 HLE-B3 细胞的氧化损伤起到一定的保护作用。

自噬是一种进化上保守的分解代谢过程,负责依赖溶酶体的降解和再循环,在维持真核生物的细胞内稳态和活力方面发挥着重要作用。在细胞自噬过程中,可以降解异常物质和功能失调的细胞器,以满足和维持细胞的代谢需要,因此,自噬可由多种应激信号诱导,例如饥饿、缺氧、电离辐射、化疗药物以及感染等^[22-23]。在一些情况下,自噬可以在细胞中起到机制保护作用,然而,过度自噬引起过度降解,从而对机体造成不利影响,能够引起自噬性细胞死亡。越来越多的研究报道指出自噬与多种眼部疾病有关,如自噬失调会损害小梁网房水流出的通路并促进青光眼的恶化^[24],晶状体在氧化应激下过度的自噬反应会导致细胞活力丧失从而进一步促进白内障的发展^[25]。现已知,过量的 ROS 会通过触发线粒体氧化应激,进而导致过度自噬发生^[26],本研究检测结果同样显示,经 H₂O₂ 诱导下 HLE-B3 细胞 ROS 水平升高,同时,细胞内自噬体和自噬溶酶体增加,自噬相关蛋白 Beclin-1 相对表达量显著升高,LC3-II/LC3-I 比值也显著上调,细胞出现过度自噬现象。通过进一步研究发现,在下调 HLE-B3 细胞中 ROCK2 表达后细胞内自噬体和自噬溶酶体均减少,自噬相关蛋白 Beclin-1 相对表达量显著降低,LC3-II/LC3-I 比值显著下调,由此说明,下调 HLE-B3 细胞中 ROCK2 表达抑制了 H₂O₂ 诱导下的过度自噬,从而发挥了相关的功能作用。随着医学技术的不断发展,临床上治疗白内障的方法也在增多,并不断提高与完善,生物靶向治疗现已成为国内外学者在 ARC 方面研究的热点内容,包括一些抗晶状体上皮细胞增生药物的局部应用,或者通过制备转染抗晶状体上皮细胞抗体和免疫毒素的载体

以抑制晶状体上皮细胞的增生等^[27]。本研究结果也为 ARC 的生物靶向治疗研究提供了新的思路。随着生物靶向治疗进一步臻熟和临床应用,相信 ARC 将得到有效的防治。但 ARC 的发生涉及多种致病因素,需要从多方位着手以探究有效的综合防治策略。

4 结论

本研究结果提示,ROCK2 在 ARC 晶状体前囊膜中高表达,下调人晶状体上皮细胞系 HLE-B3 中 ROCK2 表达能够明显改善 H₂O₂ 诱导下细胞内的过度自噬以及氧化损伤,对该细胞达到较好的保护作用。

【参考文献】

- [1] JIANG Y, QIN Y, BU S, *et al.* Distribution and internal correlations of corneal astigmatism in cataract patients[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):11514.
- [2] 万新娟,蒋晨,谢小东. 术前前房深度对年龄相关性白内障患者超声乳化术后屈光状态的影响[J]. *中国医药导报*, 2021, 18(18):119-122,130.
- [3] JEE D, KANG S, HUANG S, *et al.* Polygenetic-risk scores related to crystallin metabolism are associated with age-related cataract formation and interact with hyperglycemia, hypertension, western-style diet, and na intake[J]. *Nutrients*, 2020,12(11):3534.
- [4] HARTMANN S, RIDLEY A J, LUTZ S. The function of rho-associated kinases ROCK1 and ROCK2 in the pathogenesis of cardiovascular disease[J]. *Front Pharmacol*, 2015, 6:276.
- [5] JULIAN L, OLSON M F. Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): structure, regulation, and functions[J]. *Small GTPases*, 2014, 5:e29846.
- [6] TAKEDA Y, MATOBA K, KAWANAMI D, *et al.* ROCK2 regulates monocyte migration and cell to cell adhesion in vascular endothelial cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(6):1331.
- [7] CHEN Y L, REN Y, XU W, *et al.* Constriction of retinal venules to endothelin-1: obligatory roles of ETA receptors, extracellular calcium entry, and Rho kinase[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59(12):5167-5175.
- [8] GOLDHAGEN B, PROIA A D, EPSTEIN D L, *et al.* Elevated levels of RhoA in the optic nerve head of human eyes with glaucoma[J]. *J Glaucoma*, 2012,21(8):530-538.
- [9] LIU Y, CAI Q. Does cataract surgery improve the progression of age-related macular degeneration? a meta-analysis[J]. *J Ophthalmol*, 2020,2020:7863987.
- [10] MEHTA H. Management of cataract in patients with age-related macular degeneration[J]. *J Clin Med*, 2021,10(12):2538.
- [11] HAGA R B, RIDLEY A J. Rho GTPases: Regulation and roles in cancer cell biology[J]. *Small GTPases*, 2016,7(4):207-221.
- [12] NUNES K P, WEBB R C. New insights into RhoA/Rho-kinase signaling: a key regulator of vascular contraction[J]. *Small GTPases*, 2021,12(5-6):458-469.

- [8] 龙航, 谭亚夏, 邱源, 等. CKLF1-C19 多肽对 TGF- β 诱导原代人肺成纤维细胞向肌成纤维细胞转化的干预作用[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(11):2047-2052.
- [9] CHENG R H, WANG Y P, CHANG J Y, *et al.* Genetic susceptibility and protein expression of extracellular matrix turnover-related genes in oral submucous fibrosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21):8104.
- [10] 郝盛德, 王璐. 浅谈地区口腔肿瘤的预防[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(97):193-194.
- [11] MORE C B, JATTI PATIL D, RAO N R. Medicinal management of oral submucous fibrosis in the past decade-A systematic review[J]. *J Oral Biol Craniofac Res*, 2020, 10(4):552-568.
- [12] 赵强, 白海, 苏毅, 等. 间充质干细胞与成纤维细胞生物学特性的比较及研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2021, 43(5):1068-1074.
- [13] 林炜栋, 刘伟伟, 江万里, 等. 增生性瘢痕胶原结节中成纤维细胞生物学行为的研究[J]. 同济大学学报(医学版), 2017, 38(4):13-16, 30.
- [14] MONTEIRO R, HALLIKERI K, SUDHAKARAN A. PTEN and α -SMA expression and diagnostic role in oral submucous fibrosis and oral squamous cell carcinoma with concomitant oral submucous fibrosis[J]. *J Oral Maxillofac Res*, 2021, 12(1):3.
- [15] KONG L L, WANG Z Y, HAN N, *et al.* Neutralization of chemokine-like factor 1, a novel C-C chemokine, protects against focal cerebral ischemia by inhibiting neutrophil infiltration via MAPK pathways in rats[J]. *J Neuroinflammation*, 2014, 20(11):112.
- [16] ZHANG T, QIAO Z, CHEN F, *et al.* Antagonistic effect of C19 on migration of vascular smooth muscle cells and intimal hyperplasia induced by chemokine-like factor 1[J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(4):2939-2946.
- [17] ZHENG Y, WANG Y, ZHANG X, *et al.* C19, a C-terminal peptide of CKLF1, decreases inflammation and proliferation of dermal capillaries in psoriasis[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):13890.
- [18] CADIGAN KM, NUSSE R. Wnt signaling: a common theme in animal development[J]. *Genes Dev*, 1997, 11(24):3286-3305.
- [19] 高月, 唐芳, 马武开, 等. Wnt 信号通路中调节因子分泌型卷曲相关蛋白在风湿病中的研究进展[J]. 风湿病与关节炎, 2021, 10(10):59-63.
- [20] 张亚龙, 孙佳瑶, 宗斌, 等. 经典 Wnt 信号通路及牙周膜干细胞成骨分化[J]. 口腔医学, 2021, 41(10):936-941.
- [21] 吴彬, 宋启斌, 姚颐, 等. 调控肌成纤维细胞活化的信号通路[J]. 武汉大学学报(医学版), 2021, 42(1):162-166.
- [22] WU Y, LIU X, ZHENG H, *et al.* Multiple roles of sFRP2 in cardiac development and cardiovascular disease[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(5):730-738.
- [23] CHEN M H, LIU J C, LIU Y, *et al.* MicroRNA-199a regulates myocardial fibrosis in rats by targeting SFRP5[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(9):3976-3983.

(收稿日期:2021-09-09;修回日期:2021-12-20;编辑:王小菊)

(上接第 194 页)

- [13] SHIMIZU T, LIAO J K. Rho kinases and cardiac remodeling[J]. *Circ J*, 2016, 80(7):1491-1498.
- [14] KNIPE R S, PROBST C K, LAGARES D, *et al.* The Rho kinase isoforms ROCK1 and ROCK2 each contribute to the development of experimental pulmonary fibrosis[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2018, 58(4):471-481.
- [15] YANG J, RUAN F, ZHENG Z. Ripasudil attenuates lipopolysaccharide (LPS)-mediated apoptosis and inflammation in pulmonary microvascular endothelial cells via ROCK2/eNOS signaling[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 3212-3219.
- [16] GAO Z, LI Q, ZHANG Y, *et al.* Ripasudil alleviated the inflammation of RPE cells by targeting the miR-136-5p/ROCK/NLRP3 pathway[J]. *BMC Ophthalmol*, 2020, 20(1):134.
- [17] HIDA Y, NAKAMURA S, NISHINAKA A, *et al.* Effects of ripasudil, a ROCK inhibitor, on retinal edema and nonperfusion area in a retinal vein occlusion murine model[J]. *J Pharmacol Sci*, 2018, 137(2):129-136.
- [18] FRANCISCO S G, SMITH K M, ARAGONÈS G, *et al.* Dietary patterns, carbohydrates, and age-related eye diseases[J]. *Nutrients*, 2020, 12(9):2862.
- [19] DAVALLI P, MITIC T, CAPORALI A, *et al.* ROS, cell senescence, and novel molecular mechanisms in aging and age-related diseases[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 3565127.
- [20] FANG C, GU L, SMERIN D, *et al.* The interrelation between reactive oxygen species and autophagy in neurological disorders[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017:8495160.
- [21] CHAN C M, HUANG D Y, SEKAR P, *et al.* Reactive oxygen species-dependent mitochondrial dynamics and autophagy confer protective effects in retinal pigment epithelial cells against sodium iodate-induced cell death[J]. *J Biomed Sci*, 2019, 26(1):40.
- [22] YANG X, PAN X, ZHAO X, *et al.* Autophagy and age-related eye diseases[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 5763658.
- [23] GALLUZZI L, GREEN D R. Autophagy-independent functions of the autophagy machinery[J]. *Cell*, 2019, 177(7):1682-1699.
- [24] PORTER K, HIRT J, STAMER WD, *et al.* Autophagic dysregulation in glaucomatous trabecular meshwork cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(3):379-385.
- [25] ZHOU J, YAO K, ZHANG Y, *et al.* Thioredoxin binding protein-2 regulates autophagy of human lens epithelial cells under oxidative stress via inhibition of Akt phosphorylation[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 4856431.
- [26] SU L J, ZHANG J H, GOMEZ H, *et al.* Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019:5080843.
- [27] 赵瑞苓, 赵梅生. 后发性白内障的生物靶向治疗[J]. 中华实验眼科杂志, 2012(1):91-93.

(收稿日期:2022-04-06;修回日期:2022-05-11;编辑:王小菊)