

Crybb2 基因敲除对小鼠晶状体自噬的影响

高 谦^{1*}, 李建翠^{2*}, 段玉萍¹, 袁想妹¹, 厉 倩¹

引用: 高谦, 李建翠, 段玉萍, 等. Crybb2 基因敲除对小鼠晶状体自噬的影响. 国际眼科杂志 2020;20(10):1704-1707

基金项目: 长海医院青年启动基金 (No.CH201706)

作者单位:¹(200940) 中国上海市第一人民医院宝山分院检验科;²(271100) 中国山东省济南市中西医结合医院内科

*: 高谦和李建翠对本文贡献一致。

作者简介: 高谦, 毕业于第二军医大学, 硕士, 检验主管技师, 研究方向: β B2 晶状体蛋白; 李建翠, 毕业于潍坊医学院, 本科, 医师, 研究方向: 晶状体疾病。

通讯作者: 厉倩, 毕业于浙江大学, 硕士, 副主任技师, 研究方向: 妊娠子痫、白内障. aqianmerry@163.com

收稿日期: 2019-07-17 修回日期: 2020-09-04

摘要

目的: 研究 beta-B2 晶状体蛋白 (CRYBB2) 缺失对小鼠晶状体自噬的影响。

方法: 取 6 月龄野生型 (WT) 和 Crybb2 基因敲除型 (Crybb2^{KO}) 小鼠各 6 只, 取晶状体组织, 透射电子显微镜观察各组小鼠晶状体组织自噬的改变, 用 Western blot 法检测两组小鼠自噬相关蛋白的相对表达量。

结果: 透射电子显微镜下观察发现, 与 WT 小鼠相比, Crybb2^{KO} 小鼠晶状体核区线粒体累积明显, 皮质区自噬小体数量增多。Western blot 结果显示, Crybb2^{KO} 小鼠晶状体组织 LC3B 表达显著低于 WT 小鼠 (0.09±0.01 vs 0.26±0.05), P62 及 p-mTOR 表达 (0.64±0.09 和 0.41±0.03) 显著高于 WT 小鼠 (0.43±0.07 和 0.27±0.02)。

结论: CRYBB2 晶状体蛋白缺失会影响晶状体自噬, 其机制可能与 mTOR 信号通路的自噬相关, 最终导致白内障产生。

关键词: 白内障; 自噬; beta-B2 晶状体蛋白; 自噬小体; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2020.10.08

Effects of lens autophagy in Crybb2 knockout mice

Qian Gao^{1*}, Jian-Cui Li^{2*}, Yu-Ping Duan¹, Xiang-Mei Yuan¹, Qian Li¹

Foundation item: Changhai Hospital Youth Startup Fund (No. CH201706)

¹Department of Clinical Laboratory, Baoshan Campus, Shanghai General Hospital, Shanghai 200940, China; ²Department of Medicine, Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Jinan 271100, Shandong Province, China

Co-first authors: Qian Gao and Jian-Cui Li

Correspondence to: Qian Li. Department of Clinical Laboratory, Baoshan Campus, Shanghai General Hospital, Shanghai 200940, China. aqianmerry@163.com

Received: 2019-07-17 Accepted: 2020-09-04

Abstract

• AIM: To evaluate the effects of Beta - B2 crystallin (CRYBB2) knockout on autophagy of mouse lens.

• METHODS: Six-month-old WT and Crybb2^{KO} mice were selected respectively. The morphological changes of autophagy of lens were observed by transmission electron microscopy. The expression of autophagy related proteins in the two groups were detected by Western blot method.

• RESULTS: Compared with the control group, transmission electron microscopy revealed that mitochondria was accumulated and the number of autophagosomes in lens were higher in Crybb2^{KO} mice. The relative expression of LC3B in Crybb2^{KO} group was lower (0.09±0.01 vs 0.26±0.05). The P62 protein and p-mTOR (0.64±0.09 and 0.41±0.03) was higher than WT group (0.43±0.07 and 0.27±0.02).

• CONCLUSION: The deletion of CRYBB2 may affect the process of lens autophagy by mTOR pathway and lead to cataract formation.

• KEYWORDS: cataract; autophagy; CRYBB2; autophagic body; mTOR

Citation: Gao Q, Li JC, Duan YP, et al. Effects of lens autophagy in Crybb2 knockout mice. Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci) 2020;20(10):1704-1707

0 引言

白内障是人类第一位致盲眼病, 占所有失明疾病的 47.8%。据估计, 到 2025 年全球白内障失明人数将达到 4 000 万^[1]。诸多因素如老化、眼损伤、糖尿病、紫外线照射及某些药物使用等均可导致白内障的发生^[2-3], 其中老化所引起的年龄相关性白内障占绝大部分。白内障的主要特征是晶状体混浊, 晶状体主要由 α 、 β 、 γ 三类晶状体蛋白组成, 三类晶状体蛋白对维持晶状体的透光性具有重要的作用。 β 晶状体蛋白在年轻人晶状体蛋白中比例约占 40%, 并随着年龄增长因其晶状体修饰变化较大, 老年人晶状体内不溶性蛋白比例升高, 可能对年龄相关性白内障产生具有重要影响^[4]。 β -B2 晶状体蛋白 (CRYBB2) 是 β 晶状体蛋白的一种亚组分, 与白内障的发生发展关系极为密切, 其基因突变或敲除可以导致白内障产生^[5-6], 但对于晶状体透明性维持确切作用尚不清楚。

自噬是机体一种依赖于溶酶体水解酶和酸性脂肪酶的吞噬自身细胞组分 (如蛋白质聚集体、脂质、细胞器) 并对其降解的过程。自噬通过去除毒性蛋白质聚集体

和损伤的细胞器保护细胞,而年龄相关性白内障的发生发展恰恰与变性的晶状体蛋白聚集、损伤纤维细胞、破坏晶状体的结构密切相关。然而,自噬识别和降解错误折叠或聚集蛋白质的确切机制尚未阐明。近年研究发现,自噬与白内障形成关系密切^[7-9],是一种新发现的重要致病途径。自噬参与晶状体细胞器退化^[10]及蛋白质降解过程,晶状体细胞自噬中断造成细胞器和异常蛋白降解缺陷,晶状体蛋白基因突变或缺失会影响细胞自噬功能,导致白内障产生。

本课题组于2006年与国外合作单位共同构建、顺利饲养繁殖 *Crybb2* 基因敲除 (*Crybb2*^{KO}) 小鼠,并进行 CRYBB2 功能的相关研究,发现 *Crybb2*^{KO} 小鼠在出生 6~8 周龄时在皮质后部观察到点状白内障,4mo 时更明显,6mo 时开始出现点状皮质白内障,主要部位在后皮层和前皮层,白内障严重程度随年龄增长而加重;18mo 时整个晶状体完全混浊;*Crybb2*^{KO} 小鼠晶状体重量和轴向直径明显小于野生型 (WT) 小鼠;扫描电镜显示 6 月龄 *Crybb2*^{KO} 小鼠晶状体纤维细胞排列不规则,并有突起;WT 小鼠晶状体纤维呈放射状排列,排列规则;透射电镜显示 *Crybb2*^{KO} 小鼠晶状体细胞发生扭曲变形,而 WT 小鼠晶状体细胞形态规则^[5]。通过对 CRYBB2、自噬与白内障发病机制的研究,对于白内障的预防和治疗有重要的作用,可为防治白内障提供新的思路和理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 实验组小鼠为 *Crybb2*^{KO} 小鼠,由美国 iGTL (in Genious Targeting Laboratory) 实验室赠送,并成功在国内进行繁殖^[5]。对照组小鼠为野生型 C57BL/C 小鼠,购自第二军医大学实验动物中心。所有小鼠在无病原体的小鼠室中维持 12h 光照/12h 黑暗循环,随意自由获取食物和水喂养。本研究涉及的全部方法均符合动物伦理委员会的要求,同时获得了上海市第一人民医院动物伦理委员会批准。

1.1.2 主要试剂和仪器 兔 LC3B 多克隆抗体 (NB600-1384C, 美国 Novus Biologicals 公司);兔 P62 单克隆抗体 (abl09012, 英国 Abcam 公司);兔雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 多克隆抗体 (2983S, 美国 CST 公司);兔 p-mTOR 多克隆抗体 (5536S, 美国 CST 公司);兔 GAPDH 多克隆抗体 (ab9485, 英国 Abcam 公司);辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG (ZB-2301, 北京中杉金桥公司);JEM1230 透射电子显微镜 (日本电子 Jeol 公司)。

1.2 方法

1.2.1 透射电子显微镜下观察晶状体自噬情况 分别用 6 月龄 WT 和 *Crybb2*^{KO} 小鼠各 3 只,取双眼晶状体组织,切取皮质层及核心区分别放入 4% 戊二醛溶液中固定 24h。采用磷酸盐缓冲液 (pH 值为 7.4) 冲洗 1% 戊二醛后固定,用乙醇梯度脱水,100% 丙酮浸透,环氧树脂包埋、制片。将铺于铜网上的切片经枸橼酸铅及醋酸双氧铀染色后,用透射电子显微镜观察两组小鼠晶状体皮质区和核心区细胞器退化情况及自噬小体数量。

1.2.2 Western blot 法检测晶状体自噬相关蛋白的表达

分别取 6 月龄 WT 和 *Crybb2*^{KO} 小鼠各 3 只,双眼晶状体组织放入含有蛋白酶抑制剂的蛋白抽提试剂中研磨匀浆后转移至离心管中,4℃、12000r/min 离心 20min。取上清,BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量,加入加样缓冲液

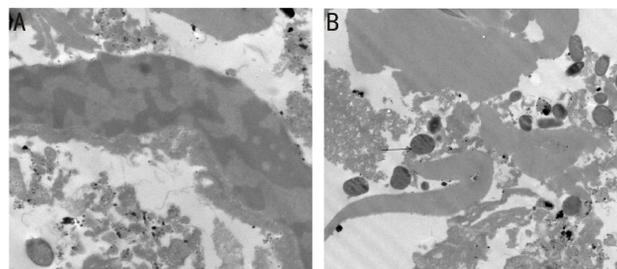


图1 透射电子显微镜检查 ($\times 10000$) A: WT 小鼠,晶状体核心区线粒体完全退化;B: *Crybb2*^{KO} 小鼠,晶状体核心区存在未完全退化线粒体 (黑色箭头)。

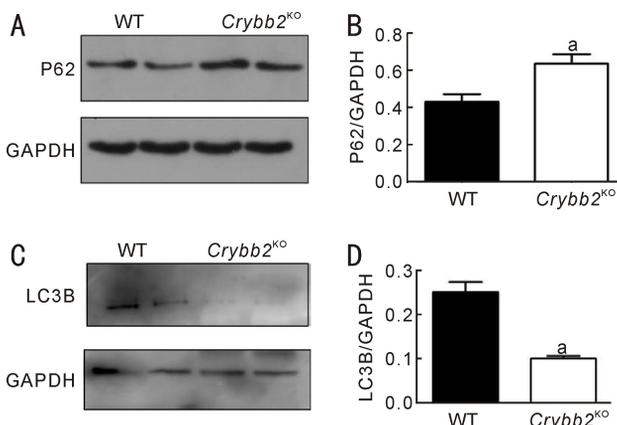


图2 小鼠晶状体 P62 和 LC3B 表达变化 A: Western blot 法检测小鼠晶状体 P62 的表达;B: *Crybb2*^{KO} 和 WT 小鼠晶状体 P62 表达水平比较;C: Western blot 法检测小鼠晶状体 LC3B 的表达;D: *Crybb2*^{KO} 和 WT 小鼠晶状体 LC3B 表达水平比较。* $P < 0.05$ vs WT。

变性;SDS-PAGE 蛋白电泳;通过电转仪将蛋白转移至硝酸纤维素膜;5% 脱脂奶粉封闭, TBST 洗 3 次;5% BSA 稀释一抗 (LC3B、P62、mTOR、p-mTOR、GAPDH, 1:2000), 孵育后洗涤;5% BSA 稀释二抗 (1:10000), 孵育后洗涤, Odyssey 扫描成像。ECL 化学发光液显影成像, 暗室压片洗片。采用 Image J 图像分析软件分析 LC3B、P62、mTOR、p-mTOR 表达的灰度值, 以 GAPDH 为内参照, 计算各目的蛋白相对表达量。实验至少重复 3 次, 取平均值。

统计学分析: 采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析。本研究中计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间相关蛋白差异比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠晶状体线粒体形态变化 透射电子显微镜下观察发现, *Crybb2*^{KO} 小鼠晶状体核心区存在未完全退化的线粒体, 线粒体嵴部分断裂 (图 1)。

2.2 小鼠晶状体细胞自噬情况 6 月龄 WT 小鼠晶状体皮质区自噬小体数量 (11.0 ± 0.86 AVs/100 μm^2) 少于 *Crybb2*^{KO} 小鼠 (20.0 ± 2.16 AVs/100 μm^2), 差异有统计学意义 ($t = -6.705, P < 0.01$)。

2.3 小鼠晶状体 P62 和 LC3B 表达变化 *Crybb2*^{KO} 小鼠晶状体组织中 P62 的表达 (0.64 ± 0.09) 显著高于 WT 小鼠 (0.43 ± 0.07), LC3B 的表达 (0.09 ± 0.01) 则显著低于 WT 小鼠 (0.26 ± 0.05), 差异均有统计学意义 ($t = 3.1905, -5.774$, 均 $P < 0.05$, 图 2), 表明 *Crybb2*^{KO} 小鼠晶状体细胞自噬明显减弱, P62 等蛋白出现集聚, 提示 CRYBB2 晶状体蛋白缺失很可能会影响晶状体自噬, 从而导致白内障发生。

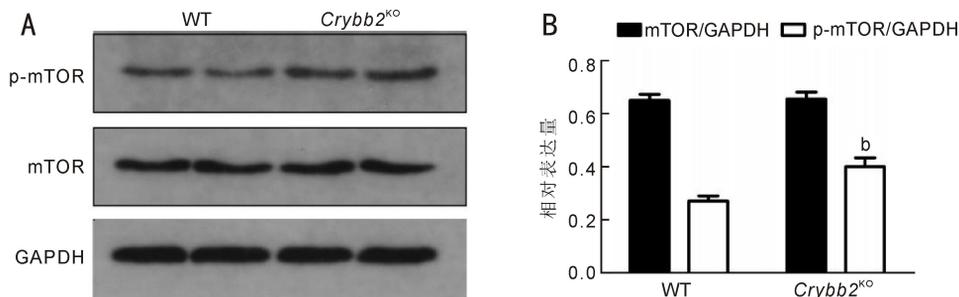


图3 小鼠晶状体 mTOR 和 p-mTOR 表达变化 A: Western blot 法检测小鼠晶状体 mTOR 和 p-mTOR 的表达; B: *Crybb2^{KO}* 和 WT 小鼠晶状体 mTOR 和 p-mTOR 表达水平比较, ^b $P < 0.01$ vs WT。

2.4 小鼠晶状体 mTOR 和 p-mTOR 表达变化 采用 Western blot 法检测小鼠晶状体组织 mTOR 信号通路的活化,发现 *Crybb2^{KO}* 小鼠晶状体组织中 p-mTOR 的表达 (0.41 ± 0.03) 高于 WT 小鼠 (0.27 ± 0.02), 差异有统计学意义 ($t = 5.774, P < 0.01$), mTOR 表达无差异 (图 3)。提示 *Crybb2^{KO}* 小鼠晶状体组织中 mTOR 存在活化, 可能参与了 *Crybb2^{KO}* 小鼠晶状体自噬的抑制。

3 讨论

晶状体蛋白占晶状体水溶性蛋白的 90%, 是晶状体的主要组成部分, 在维持晶状体透明度中起关键作用。目前研究发现, 晶状体蛋白缺失或突变会影响细胞的自噬功能, 使不溶性蛋白的清除受阻, 从而导致白内障发生^[11-13]。aB-R120G 和 aA-R49C 突变纯合子小鼠晶状体自噬受到抑制, 引起晶状体内异常蛋白的降解障碍而聚集, 导致遗传性白内障的形成^[11-12]。βA3 基因敲除小鼠会产生先天性核性白内障, 其晶状体自噬过程被阻断; 该小鼠的晶状体出现溶酶体清除缺陷, 异常蛋白在外皮质区域细胞核和线粒体聚集, 自噬小体增多而积聚; 同时, 该小鼠晶状体细胞内 Ca^{2+} 水平和钙蛋白酶-3 的表达和活性均增加。表明晶状体因缺少 βA3 晶状体蛋白或该蛋白的相应功能, 改变了钙的稳态, 从而导致细胞内溶酶体功能受损和钙蛋白酶活化。这些缺陷正是导致 βA3 基因敲除鼠晶状体发生核性白内障的主要原因^[13]。

Crybb2 基因突变导致先天性白内障, 突变通常发生在外显子 6 上。突变可使表达的晶状体蛋白折叠发生改变, 从而造成晶状体结构异常, 并减弱了其在水溶状态下的稳定性, 进而引起晶状体透明性改变, 最终导致先天性白内障的发生^[14-15]。CRYBB2 蛋白缺失会引起皮质性白内障, 本研究对 6 月龄 WT 和 *Crybb2^{KO}* 小鼠晶状体进行自噬相关研究, 透射电子显微镜结果显示 *Crybb2^{KO}* 小鼠晶状体自噬明显减弱, 其晶状体皮质区自噬小体明显多于 WT 小鼠。自噬在晶状体纤维细胞成熟, 构成无细胞器区 (organelle-free zone, OFZ) 的过程中起着重要作用。自噬通过降解受损蛋白质和线粒体以及通过纤维细胞成熟过程中线粒体的清除来形成晶状体的 OFZ 区, 对于维持晶状体稳态非常重要^[16], 没有降解和回收累积的线粒体会影响晶状体的状态, *Crybb2^{KO}* 小鼠 OFZ 区存在未完全退化的线粒体结构, 且线粒体累积明显, 其自噬小体的数目增多可能与其破坏自噬流, 增加自噬小体堆积有关。

自噬形成时, 胞浆型 LC3 会酶解掉一小段多肽形成

LC3-I, LC3-I 与 PE 结合转变为 (自噬体) 膜型 (即 LC3-II), LC3-II 对自噬体的形成是非常重要的, LC3-II/I 比值的大小可估计自噬水平的高低^[13]。Sequestosome-1 (SQSTM1)/P62 可以被自噬特异性降解, 反映蛋白质聚集体的积累和自噬激活程度, 可以用做自噬被中断的标记^[17], 一般用 P62 联合 LC3 指标进行自噬流的评估。本研究发现 WT 小鼠晶状体组织 LC3B 表达显著高于 *Crybb2^{KO}* 小鼠, P62 表达低于 *Crybb2^{KO}* 小鼠, 提示 CRYBB2 晶状体蛋白缺失很可能会影响晶状体自噬, 晶状体细胞自噬的减弱或阻断使不溶性蛋白和细胞器的清除受到严重影响, 最终导致白内障的发生发展。自噬过程受多种信号传导通路调控, 可分为依赖于或独立于哺乳动物 mTOR 通路, mTOR 是 PI3K/Akt 下游的一种重要的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶, 可通过激活核糖体激酶, 调控多种细胞的生物学功能; mTOR 激活还可显著抑制自噬的激活^[18]。本研究中, *Crybb2^{KO}* 小鼠晶状体组织 p-mTOR 表达显著高于 WT 小鼠, 提示 CRYBB2 晶状体蛋白可能与 mTOR 信号通路调控自噬相关。

综上所述, CRYBB2 晶状体蛋白缺失会影响晶状体自噬, 其机制可能与 mTOR 信号通路调控自噬相关。本研究仅检测了 *Crybb2* 基因缺失后, 小鼠晶状体组织自噬及其相关蛋白的改变, 今后应进一步研究 CRYBB2 晶状体蛋白在自噬相关的 mTOR 信号通路的具体调控机制来明确白内障的发病机制, 为白内障的防治提供理论基础。

参考文献

- 1 Yu X, Zheng H, Chan MT, et al. MicroRNAs: new players in cataract. *Am J Transl Res* 2017; 9(9): 3896-3903
- 2 Hall MD, Schultheiss TE, Smith DD, et al. Dose response for radiation cataractogenesis: a meta-regression of hematopoietic stem cell transplantation regimens. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2015; 91(1): 22-29
- 3 Nguyen TV, Pham VH, Abe K. Pathogenesis of Congenital Rubella Virus Infection in Human Fetuses: Viral Infection in the Ciliary Body Could Play an Important Role in Cataractogenesis. *EBioMedicine* 2015; 2(1): 59-63
- 4 Ghaffari-Sharaf M, Cetinel S, Semenchenko V, et al. Peptides for targeting βB2-crystallin fibrils. *Exp Eye Res* 2017; 165: 109-117
- 5 Zhang J, Li J, Huang C, et al. Targeted Knockout of the Mouse βB2-crystallin Gene (BetaB2) Induces Age-Related Cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49(12): 5476-5483
- 6 Zhou Y, Zhai Y, Huang L, et al. A Novel CRYBB2 Stopgain Mutation Causing Congenital Autosomal Dominant Cataract in a Chinese Family. *J Ophthalmol* 2016; 2016: 4353957

- 7 Chai P, Ni H, Zhang H, *et al.* The Evolving Functions of Autophagy in Ocular Health: A Double-edged Sword. *E Int J Biol Sci* 2016; 12(11): 1332-1340
- 8 Morishita H, Mizushima N. Autophagy in the lens. *Exp Eye Res* 2016; 144: 22-28
- 9 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. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 4856431
- 10 Basu S, Rajakaruna S, Reyes B, *et al.* Suppression of MAPK/JNK-MTORC1 signaling leads to premature loss of organelles and nuclei by autophagy during terminal differentiation of lens fiber cells. *Autophagy* 2014; 10(7): 1193-1211
- 11 Wignes JA, Goldman JW, Weihl CC, *et al.* p62 expression and autophagy in α B-crystallin R120G mutant knock-in mouse model of hereditary cataract. *Exp Eye Res* 2013; 115: 263-273
- 12 Andley UP, Goldman JW. Autophagy and UPR in alpha-crystallin mutant knock-in mouse models of hereditary cataracts. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1860(1 Pt B): 234-239
- 13 Hegde S, Kesterson RA, Srivastava OP. CRY β A3/A1 - Crystallin Knockout Develops Nuclear Cataract and Causes Impaired Lysosomal Cargo Clearance and Calpain Activation. *PLoS One* 2016; 11(2): e0149027
- 14 Ching YH, Yeh JI, Fan WL, *et al.* A CRYBB2 mutation in a Taiwanese family with autosomal dominant cataract. *J Formos Med Assoc* 2019; 118(1 Pt 1): 57-63
- 15 Li L, Fan DB, Zhao YT, *et al.* Two novel mutations identified in ADCC families impair crystallin protein distribution and induce apoptosis in human lens epithelial cells. *Sci Rep* 2017; 7(1): 17848
- 16 Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12(1): 9-14
- 17 Li H, Miao D, Zhu Q, *et al.* MicroRNA - 17 - 5p contributes to osteoarthritis progression by binding p62/SQSTM1. *Exp Ther Med* 2018; 15(2): 1789-1794
- 18 Singh P, Subbian S. Harnessing the mTOR Pathway for Tuberculosis Treatment. *Front Microbiol* 2018; 9: 70