

Adgrv1 基因经 Hedgehog 通路调控纤毛发育致视网膜色素变性的研究

张磊^{1*}, 张国云^{1*}, 王千洋², 王茹¹, 方琪¹, 强薇¹, 白淑玮¹, 王海燕¹

引用: 张磊, 张国云, 王千洋, 等. *Adgrv1* 基因经 Hedgehog 通路调控纤毛发育致视网膜色素变性的研究. 国际眼科杂志, 2024, 24(11): 1701-1707.

基金项目: 陕西省重点研发项目 (No.2023-YBSF-537); 陕西省自然科学基金基础研究计划项目 (No.2024JC-YBQN-0912); 陕西省中医药管理局科研项目 (No.SZY-KJCYC-2023-097); 西安市科技计划项目 (No.24YXYJ0091); 西安市卫生健康委员会面上培育科研项目 (No.2024ms18); 西安市卫生健康委员会中医药科研项目 (No.SZJ202406); 白求恩·朗沐中青年眼科科研基金 (No.BJ-LM2021011J); 西安市人民医院 (西安市第四医院) 孵化基金 (No.ZD-7)

作者单位: ¹(710004) 中国陕西省西安市人民医院 (西安市第四医院) 陕西省眼科医院 西安市眼影像数字化医疗技术重点实验室; ²(250000) 中国山东省济南市, 山东中医药大学眼科与视光医学院

*: 张磊和张国云对本文贡献一致。

作者简介: 张磊, 硕士, 主治医师, 研究方向: 视觉功能鉴定; 张国云, 博士, 主治医师, 眼视光中心副主任, 研究方向: 近视发病机制。

通讯作者: 王海燕, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 陕西省眼科医院副院长, 研究方向: 眼底病. haiyanwang@med.nwu.edu.cn

收稿日期: 2024-05-17 修回日期: 2024-09-25

摘要

目的: 从 Hedgehog (Hh) 信号通路分析 *Adgrv1* 基因变异致 Usher 综合征 (USH) 的机制。

方法: 基于 *Adgrv1* 变异模型小鼠 (*Adgrv1*^{-/-}), 野生型 (WT) C57BL/6 小鼠为对照, 从细胞水平和视网膜组织水平采用 qRT-PCR、HE、视网膜透射电镜和免疫荧光方法验证 *Adgrv1* 基因变异对纤毛结构的影响, 分析 Hh 信号通路关键因子的表达变化。

结果: *Adgrv1* 基因在视网膜和原代培养肺成纤维细胞中均有表达, 但 *Adgrv1*^{-/-} 小鼠表达量显著降低。 *Adgrv1* 基因变异可造成光感受器外节盘膜溶解, 以及原代肺成纤维细胞纤毛长度明显缩短, 在视网膜组织和细胞水平 Hh 信号通路上 *Ptch1*、*Gli* 基因表达明显下降, 而 *PKA* 基因表达上升。

结论: *Adgrv1* 基因变异致视网膜色素变性, 与 Hh 通路中 *PTCH1*、*GLI1* 蛋白表达降低, 使得细胞纤毛缩短, 视网膜光感受器细胞外节盘膜溶解有关。

关键词: *Adgrv1* 基因; Hedgehog 信号通路; 纤毛; Usher 综合征; 视网膜色素变性 (RP)

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2024.11.03

Ciliary development regulated by *Adgrv1* gene through Hedgehog pathway in retinitis pigmentosa

Zhang Lei^{1*}, Zhang Guoyun^{1*}, Wang Qianfeng², Wang Ru¹, Fang Qi¹, Qiang Wei¹, Bai Shuwei¹, Wang Haiyan¹

Foundation items: Key Research and Development Program of Shaanxi Province, China (No. 2023 - YBSF - 537); the Natural Science Basis Research Plan in Shaanxi Province of China (No. 2024JC - YBQN - 0912); Scientific Research Project of Shaanxi Administration of Traditional Chinese Medicine (No. SYZ - KJCYC - 2023 - 097); Xi'an Science and Technology Project (No. 24YXYJ0091); General Cultivation Project of Municipal Health Commission in Xi'an (No. 2024ms18); The Chinese Medicine Research Project of Municipal Health Commission in Xi'an (No. SZJ202406); Bethune · Lumitin Research Funding for the Young and Middle - aged Ophthalmologists (No. BJ - LM2021011J); Research Incubation Fund of Xi'an People's Hospital (Xi'an Fourth Hospital) (No. ZD-7)

¹Xi'an People's Hospital (Xi'an Fourth Hospital); Shaanxi Eye Hospital; Xi'an Key Laboratory of Digital Medical Technology of Ophthalmologic Imaging, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China; ²Medical College of Optometry and Ophthalmology, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250000, Shandong Province, China

* Co-first authors; Zhang Lei and Zhang Guoyun

Correspondence to: Wang Haiyan. Xi'an People's Hospital (Xi'an Fourth Hospital); Shaanxi Eye Hospital; Xi'an Key Laboratory of Digital Medical Technology of Ophthalmologic Imaging, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China. haiyanwang@med.nwu.edu.cn
Received: 2024-05-17 Accepted: 2024-09-25

Abstract

• AIM: To analyze the mechanism of Usher syndrome (USH) caused by *Adgrv1* gene variation through the Hedgehog (Hh) signaling pathway.

• METHODS: Based on *Adgrv1* gene variant mice (*Adgrv1*^{-/-}), taking wild type (WT) C57BL/6 mice as controls, the expression of *Adgrv1* gene and the structure of retina and cell cilia were analyzed by qRT-PCR, HE, transmission electron microscopy, and immunofluorescence. Additionally, the changes of key factors in the Hh signaling pathway caused by *Adgrv1* gene variation were observed.

• **RESULTS:** The *Adgrv1* gene was expressed in both the retina and primary cultured lung fibroblasts of *Adgrv1*^{-/-} mice, but the expression levels were significantly decreased. The *Adgrv1* gene variation can cause dissolution of the outer disc membrane of the retinal photoreceptors and significantly shorten the cilia length in primary lung fibroblasts. In the Hh signaling pathway, the expression of *Ptch1* and *Gli* genes of *Adgrv1*^{-/-} was significantly reduced, while the expression of *PKA* genes was increased.

• **CONCLUSION:** The *Adgrv1* gene variation leads to shortened cell cilia and dissolution of the outer disc membrane of the retinal photoreceptors, resulting in retinitis pigmentosa, which is related to decreased expression of *PTCH1* and *GLI1* proteins in the Hh pathway.

• **KEYWORDS:** *Adgrv1* gene; Hedgehog signaling pathway; cilia; Usher syndrome; retinitis pigmentosa (RP)

Citation: Zhang L, Zhang GY, Wang QF, et al. Ciliary development regulated by *Adgrv1* gene through Hedgehog pathway. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)*, 2024,24(11):1701-1707.

0 引言

Usher 综合征 (USH) 是最常见的视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 合并耳聋的综合征型纤毛疾病^[1]。2 型 USH (USH2) 是最常见的亚型, 约占 70%, 主要表现为先天性至重度感音神经性耳聋, 青春期或之后发生双眼 RP^[2]。已有研究证实, G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptors, GPCR) 家族成员 *Adgrv1* 基因在视网膜和耳蜗纤毛中均有表达^[3], *Adgrv1* 致病变异会导致 USH2^[2], 但具体分子机制未知。

至今 ADGRV1 蛋白没有已知的内源性配体, 是孤儿受体。ADGRV1 蛋白作为 GPCR, 可通过 G 蛋白途径发挥调控作用, 但其调控纤毛发育的信号传导通路尚不清楚, 所以仍需要进一步的研究阐明。纤毛作为细胞外信号刺激的感受器, 基因变异引起的功能异常可导致一类被称为“纤毛病”的遗传疾病。Hedgehog (Hh) 信号通路主要发生在初始纤毛内, 由位于纤毛根部的跨膜受体 (patched1, *PTCH1*), 跨膜平滑蛋白 (smoothed protein, *SMO*), 融合抑制因子 (suppressor of fused, *SUFU*) 以及 3 个锌指转录因子 *GLI* (*GLI1*, *GLI2* 和 *GLI3*) 构成^[4-5]。研究证实纤毛结构和功能的改变存在 Hh 信号通路的活性异常, 反过来 Hh 信号通路的异常也可以影响纤毛的发育和功能, 该通路在视网膜和耳蜗发育过程中也发挥着重要作用^[6-7]。而许多定位在纤毛上的 GPCR 与哺乳动物中 Hh 信号通路发生交联 (cross talk)^[4]。

本研究我们将锁定纤毛这一特殊结构, 观察 *Adgrv1* 变异致纤毛发育异常的机制, 明确 Hh 通路异常在其中的作用, 为开展人类 USH 疾病的临床研究打开新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 *Adgrv1* 基因变异 (*Adgrv1*^{-/-}) 小鼠 10 月

龄 6 只, 2 月龄 2 只, 1 月龄 3 只, 雄鼠, 由空军军医大学航空航天医学系张作明教授赠送, 野生型 (wild-type, WT) C57BL/6 小鼠 10 月龄 6 只, 2 月龄 2 只, 1 月龄 3 只, 雄鼠, 购于北京华卓康生物科技股份有限公司 [实验动物生产许可证号: SCXK (京) 2020-0004], 置于条件为: 室温 22-25 °C、明暗交替 12/12 h 的环境中, 适应性饲养 3 d, 食水不限。实验动物的使用遵循视觉与眼科研究协会 (The Association for Research in Vision and Ophthalmology, ARVO) 相关规定, 以及我国《实验动物管理条例》。本研究动物实验设计和实施方案通过了西安市人民医院 (西安市第四医院) 伦理委员会审核和批准 (No.20210087)。

1.1.2 试剂 DMEM 低糖细胞培养基 (美国 Sigma 公司, 批号 SLBT7314); 磷酸盐缓冲液 (PBS, 批号 121D039)、胰蛋白酶 (批号 HJ202410)、青霉素链霉素双抗 (索莱宝科技有限公司, 批号 HJ202605); 胎牛血清 (赛澳美细胞技术有限公司, 批号 20180524); 山羊抗兔 IgG 二抗 (杭州联科生物技术有限公司)、ADGRV1 一抗 (LifeSpan BioSciences 公司, 批号 LS-A1729)、Arl13b 一抗 (Proteintech 公司, 批号 66739-1-1g)、GLI-1 一抗 (Biotechnne 公司, 批号 AF3455-SP)、PTCH1 一抗 (Biotechnne 公司, 批号 MAB41051-SP)、GLI-2 一抗 (Biotechnne 公司, 批号 AF3635-SP)、PKA 一抗 (美国 abcam 公司, 批号 ab75991)。

1.1.3 仪器 3001 多功能酶标仪 (美国 Thermo 公司); SW-CJ-2FD 超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司); DMI3000B 倒置显微镜、激光共聚焦显微镜 (德国 Leica 公司); CO₂ 培养箱 (美国 Thermo 公司); AllegraX® - 12series 离心机 (美国 BECK MAN Coulter); CYT5MFV 微孔板成像系统 (美国 BioTek 公司)。

1.2 方法

1.2.1 视网膜病理组织石蜡切片苏木精-伊红染色制作

CO₂ 吸入法安乐死 10 月龄 *Adgrv1*^{-/-} 小鼠和 C57BL/6 小鼠各 3 只, 取出眼球, 置于固定液中, 4 °C 固定 2 h 后, 剪开小鼠角膜, 继续固定 24 h。常规梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 浸蜡, 包埋, 按 4 μm 厚度进行组织切片。选取经过视神经的切片, 各个眼球准备 3 张普通载玻片 (每张载玻片上捞 2 个组织), 烤片 70 °C 20 min 后, 二甲苯脱蜡, 梯度酒精水化, 苏木精着染 (10 min), 盐酸分化, 氨水返蓝, 伊红染色 (1 min) 后, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片, 显微镜下观察, 在高倍镜下选取距离视神经 500 μm 处视野进行拍照。

1.2.2 视网膜透射电镜 CO₂ 吸入法安乐死 10 月龄 *Adgrv1*^{-/-} 小鼠和 C57BL/6 小鼠各 3 只, 取出双眼球, 视网膜取材, 置于 4 °C 固定过夜, 隔日剥离标本, 移入青霉素小瓶, 1% 四氧化钼 4 °C 浸润 15-30 min, 常规系列丙酮脱水, 加入包埋剂, 室温放置 30 min, 弃上述包埋剂, 加 EPON812 包埋剂 1 mL 过夜。包埋, 修块, 制备超薄切片, 3% 水合双氧钼乙酸染色, 电镜观察。观察小鼠视网膜光感受器外节、内节超微结构。

1.2.3 小鼠肺成纤维细胞原代培养和传代 同上安乐死 2 月龄 *Adgrv1*^{-/-} 小鼠和 C57BL/6 小鼠各 2 只, 全身置于 75% 酒精里浸泡, 在超净台中用剪刀和镊子将皮肤剪开,

剪开胸部肌层,露出肺,小心取出放在盛有 PBS 的玻璃平皿中,冲洗去血,转移到一个装有 30 mL PBS 的 50 mL 离心管中,轻轻颠倒两次,倒掉 PBS,再重复此步骤一次,转移到另一装有 PBS 的平皿中,并用手术刀片将其切碎。用 200 μ L 的移液枪反复、快速地吹打平皿中的液体,转移至 15 mL 离心管中,于 4 $^{\circ}$ C 1 500 r/min 离心 5 min,倒掉上清,以 10 mL 胰酶重悬沉淀,放在 37 $^{\circ}$ C 水浴中消化 30 min,且每隔 5 min 轻轻晃动,使之充分消化。将上层细胞悬液倒入一个装有 10 mL 培养基的 50 mL 离心管中,用 200 目的尼龙网过滤后,以 1 500 r/min 离心 5 min 收集细胞,再用 30 mL 培养基洗涤 2 次。细胞沉淀用 15 mL 培养基重悬后进行细胞计数。 3×10^6 细胞悬浮于 15 mL 培养基中,接种到培养瓶中。24 h 后更换新鲜的培养基。细胞长满后,胰酶消化传代。

1.2.4 qRT-PCR TRIzol 法提取视网膜组织和细胞总 RNA。DEPC 水溶解总 RNA,紫外分度光度计定量,使用反转录试剂(#RR036A, Takara),各样品按 500 ng RNA 进行反转录,使用 qRT-PCR 仪,运用 SYBR Premix 试剂(#RR820A, Takara),分别加入引物, β -actin 为内参进行实时扩增,即 95 $^{\circ}$ C 5 min,然后 30 个循环 95 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 15 s,72 $^{\circ}$ C 15 s。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的表达水平。引物序列见表 1。

1.2.5 免疫荧光 视网膜组织免疫荧光:安乐死 1 月龄 *Adgrv1*^{-/-} 小鼠和 C57BL/6 小鼠各 3 只后取视网膜固定,放入 15% 蔗糖水溶液中 4 $^{\circ}$ C 过夜。待组织完全沉底后,用冰冻切片连续切片,切片厚度为 10 μ m,贴切片于挂胶载玻片上。室温下干燥冰冻切片,将切片经 0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min \times 3 次;用 1% 山羊血清封闭 1 h,倾倒入液加一抗,孵育 4 $^{\circ}$ C 过夜;经 0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min \times 3 次,加入 FITC 免疫荧光二抗孵育 1 h;倾倒入液加 DIPA 染色 30 min;经 0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min \times 3 次,加入 TRITC 免疫荧光二抗孵育 2 h;自来水冲洗 30 min,50% 甘油封片;激光共聚焦显微镜观察。用 Image-Pro Plus 软件对免疫荧光阳性区域进行半定量分析。

细胞免疫荧光:将爬片浸在细胞培养基内,细胞在爬片上生长。在培养板中将已爬好细胞的玻片用 PBS 浸洗 3 次,每次 3 min。用 4% 的多聚甲醛固定爬片 15 min, PBS 浸洗玻片 3 次,每次 3 min。0.5% Triton X-100(PBS 配制)室温通透 20 min。PBS 浸洗玻片 3 次,每次 3 min,吸水纸吸干 PBS,在玻片上滴加血清,室温封闭 30 min。吸水纸吸掉封闭液,不洗,每张玻片滴加足够量的稀释好的一抗并放入湿盒,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。浸洗爬片 3 次,每次 3 min,吸水纸吸干爬片上多余液体后滴加稀释好的荧光二抗,湿盒中 20-37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,浸洗切片 3 次,每次 3 min。复染核:滴加 DAPI 避光孵育 5 min,对标本进行染核,洗去多余的 DAPI。用吸水纸吸干爬片上的液体,用含抗荧光淬灭剂的封片液封片,然后在激光共聚焦显微镜观察。用 Image-Pro Plus 软件对免疫荧光阳性区域进行半定量分析。

统计学分析:采用 SPSS 26.0 软件进行数据分析,符合正态分布的计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间

表 1 基因引物序列

基因	引物序列
<i>Adgrv1</i>	5'- GTTCCTATGCTAACATAACTGTCA -3'(forward)
	5'- GAGCCACTACATCAATATCAGAAG -3'(reverse)
<i>PKA</i>	5'-GGTGTATGACGGTGACAAC-3'(forward)
	5'-ACTCCCACGGTTATCATAGTTA-3'(reverse)
<i>Ptch1</i>	5'-GCTCCGCACAGAGTATGA-3'(forward)
	5'-GAGGCTGGACTCTGAGAAC-3'(reverse)
<i>Smo</i>	5'-GCACCACCTACCAGCCTCTC-3'(forward)
	5'-CACTCACGGAGTCTCCATCTACC-3'(reverse)
<i>Sufu</i>	5'-GCAGCCATCTACGGAGAG-3'(forward)
	5'-CGGACCACCCAACCAGTAC-3'(reverse)
<i>Gli1</i>	5'-AAGGCTGTGCGAAGTCTATTCA-3'(forward)
	5'-GCGGTCACTGGCATTGCTAA-3'(reverse)
<i>Gli2</i>	5'-CAGCCCAGCCTTCACTTTTCC-3'(forward)
	5'-GTGCTGATGGAGGTGAGACTCA-3'(reverse)
β -actin	5'-CTTCCTCCCTGGAGAAGAGCTATG-3'(forward)
	5'-CCAAGAAGGAAGGCTGGAAAAGAG-3'(reverse)

比较采用独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。使用 Origin2021 软件制作统计图表。

2 结果

2.1 两组小鼠视网膜组织和原代肺成纤维细胞中的 *Adgrv1* 基因 mRNA 表达和蛋白阳性表达面积比较

qRT-PCR 结果显示,*Adgrv1* 基因 mRNA 在 *Adgrv1* 基因变异(*Adgrv1*^{-/-})小鼠的视网膜和原代培养肺成纤维细胞中均有表达,但表达量显著低于野生(Wild type, WT)小鼠,差异均有统计学意义($P < 0.05$,表 2,图 1A)。免疫荧光结果显示,ADGRV1 蛋白在视网膜外节表达(图 1B),在细胞胞浆中表达(图 1C),且阳性表达区域在 *Adgrv1*^{-/-} 小鼠视网膜组织和其来源的原代细胞中的明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$,表 2,图 1D)。

2.2 *Adgrv1* 基因变异对小鼠视网膜和原代肺成纤维细胞中纤毛形态的影响

虽然 HE 染色结果显示 *Adgrv1* 基因变异对 10 月龄小鼠视网膜组织形态没有明显影响(图 2A),但电镜结果可见 *Adgrv1* 基因变异可造成视网膜光感受器外节盘膜溶解(图 2B)。同时,对小鼠原代肺成纤维细胞进行免疫荧光染色,来检测纤毛标识物 Arl13b 的表达情况,并对细胞核复染色(DAPI),*Adgrv1*^{-/-} 小鼠来源的原代细胞纤毛长度明显缩短(图 2C)。

2.3 两组小鼠视网膜 Hh 信号通路关键因子 mRNA 表达比较

Adgrv1^{-/-} 小鼠视网膜 Hh 信号通路上 *Ptch1*、*Gli1* 基因 mRNA 表达较 WT 小鼠明显下降,而 *PKA* 基因表达上升,差异均有统计学意义($P < 0.05$,表 3,图 3A),*Adgrv1*^{-/-} 小鼠视网膜 PKA 蛋白的上升,PTCH1 蛋白和 GLI1 蛋白明显下降,差异均有统计学意义($P < 0.01$,表 4,图 3B)。免疫荧光显示 PKA 蛋白在 *Adgrv1*^{-/-} 小鼠光感受器外节表达,且明显上升,GLI1 蛋白表达也在光感受器外节(图 3C)。

2.4 两组小鼠原代肺成纤维细胞中 Hh 信号通路关键因子 mRNA 表达和蛋白阳性表达面积比较

进一步在细胞水平验证 *Adgrv1* 基因变异对 Hh 信号通路关键因子表达的影响,qRT-PCR 显示来源于 *Adgrv1*^{-/-} 小鼠的原代肺成纤

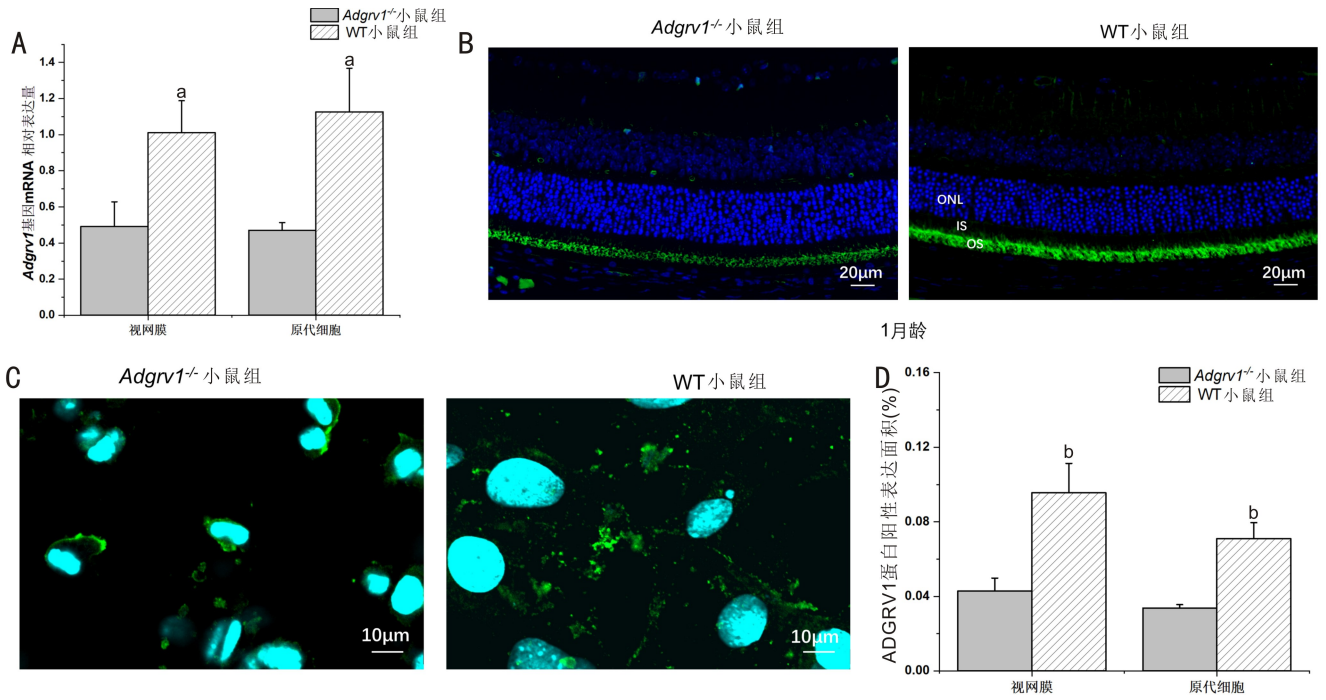


图1 两组小鼠视网膜组织和原代肺成纤维细胞中 *Adgrv1* 基因 mRNA 表达和蛋白阳性表达面积比较 A: 视网膜组织和原代肺成纤维细胞中 *Adgrv1* mRNA 相对表达量 (^a $P < 0.05$ vs *Adgrv1*^{-/-} 小鼠组, 1月龄, $n = 3$); B: 视网膜组织 ADGRV1 蛋白免疫荧光(绿色:ADGRV1 蛋白;蓝色:DAPI); C: 原代肺成纤维细胞 ADGRV1 蛋白免疫荧光(绿色:ADGRV1 蛋白;蓝色:DAPI); D: ADGRV1 蛋白免疫荧光阳性表达面积定量分析(^b $P < 0.01$ vs *Adgrv1*^{-/-} 小鼠组, $n = 3$); ONL: 外核层; IS: 内节段; OS: 外节段。

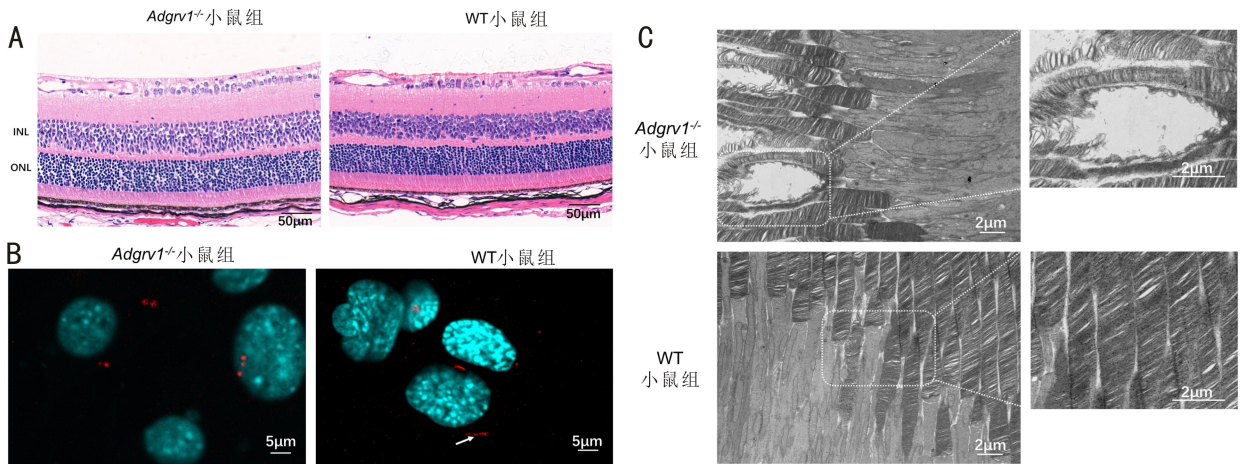


图2 *Adgrv1* 基因变异导致视网膜和细胞纤毛形态变化 A: *Adgrv1*^{-/-} 小鼠和 WT 小鼠视网膜组织形态学(10月龄); B: 原代肺成纤维细胞纤毛染色(红色: Arl13b 蛋白;蓝色:DAPI; 白色箭头指向纤毛); C: *Adgrv1*^{-/-} 小鼠和 WT 小鼠视网膜光感受器细胞外节透射电镜(10月龄,右侧图为白框区域放大); INL: 内核层; ONL: 外核层。

表2 两组小鼠视网膜组织和原代肺成纤维细胞中的 *Adgrv1* 基因 mRNA 表达和蛋白阳性表达面积比较 $\bar{x} \pm s$

分组	<i>Adgrv1</i> 基因 mRNA 表达		ADGRV1 蛋白阳性表达面积(%)	
	视网膜	原代细胞	视网膜	原代细胞
<i>Adgrv1</i> ^{-/-} 小鼠组	0.49±0.14	0.47±0.04	0.043±0.007	0.034±0.002
WT 小鼠组	1.01±0.18	1.12±0.24	0.095±0.015	0.071±0.009
<i>t</i>	-4.006	-4.622	-5.268	-7.267
<i>P</i>	0.016	0.01	0.006	0.002

表3 两组小鼠视网膜 Hh 信号通路关键因子 mRNA 表达比较 $\bar{x} \pm s$

分组	<i>PKA</i>	<i>Ptch1</i>	<i>Smo</i>	<i>Sufu</i>	<i>Gli1</i>	<i>Gli2</i>
<i>Adgrv1</i> ^{-/-} 小鼠组	3.07±0.1	1.00±0.09	1.23±0.24	1.22±0.10	0.71±0.04	1.26±0.41
WT 小鼠组	1.26±0.19	1.65±0.07	1.35±0.22	1.18±0.17	1.12±0.17	1.73±0.09
<i>t</i>	14.664	-9.342	-0.619	0.356	-3.990	-1.918
<i>P</i>	<0.01	0.001	0.570	0.740	0.016	0.128

维细胞中 PKA 基因表达升高,但 *Ptch1*、*Gli1* 基因 mRNA 表达明显下降,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$, 表 5, 图 4A),免疫荧光同样存在 *Adgrv1*^{-/-}小鼠原代肺成纤维细胞 PKA 蛋白的上升,PTCH1 蛋白和 GLI1 蛋白明显下降,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 5, 图 4B),其中在变异细胞中 PTCH1 束状阳性结构紊乱(图 4C)。

3 讨论

USH 是最常见的 RP 合并耳聋疾病,发病率约为 1/6000,是一种常染色体隐性遗传病^[1]。USH 具有高度的临床和遗传异质性,其发病机制尚未阐明,临床上缺乏特异性的治疗方法。根据视听症状的发病年龄、损伤的严重程度以及前庭受累分为三型:USH1,USH2 和 USH3。

USH2 占 Usher 综合征比例超过 50%,是最常见的一型,表现为幼年即发生中重度听力丧失,而在青春期后才发生视网膜色素变性,前庭功能多数正常^[8]。与 USH2 相关的致病基因主要包括 *Ush2a*、*Adgrv1* (*USH2C*) 和 *Whirlin* (*USH2D*)^[3]。人类 USH2 表型,视觉功能障碍一般是在听力发病后表现出来^[8],使得 USH2 患者在诊断后可有一定的时间开展视网膜治疗^[9],因此,阐明其发病机制有重要的理论意义和临床指导作用。

纤毛作为细胞外信号刺激的感受器,基因变异引起的功能异常可导致一类被称为“纤毛病”的遗传疾病。USH 的病理改变是视网膜感光细胞及内耳毛细胞的纤毛逆行性变,也是一种综合征型遗传性纤毛疾病^[2]。*Adgrv1* 的致

表 4 两组小鼠视网膜 Hh 信号通路关键因子蛋白阳性表达面积比较

($\bar{x} \pm s, \%$)

分组	PKA	PTCH1	GLI1	GLI2
<i>Adgrv1</i> ^{-/-} 小鼠组	0.042±0.003	0.088±0.012	0.027±0.007	0.017±0.005
WT 小鼠组	0.022±0.018	0.19±0.012	0.064±0.007	0.025±0.001
<i>t</i>	9.867	0.843	0.798	0.069
<i>P</i>	0.001	<0.01	0.003	0.058

表 5 两组小鼠原代肺成纤维细胞 Hh 信号通路关键因子 mRNA 表达和蛋白阳性表达面积比较

$\bar{x} \pm s$

分组	Hh 关键因子 mRNA 表达				Hh 关键因子蛋白阳性表达面积(%)		
	<i>PKA</i>	<i>Ptch1</i>	<i>Gli1</i>	<i>Gli2</i>	PKA	PTCH1	GLI1
<i>Adgrv1</i> ^{-/-} 小鼠组	4.03±0.13	0.20±0.004	0.25±0.09	0.72±0.22	0.44±0.06	0.52±0.08	0.009±0.001
WT 小鼠组	1.11±0.50	1.00±0.05	1.00±0.03	1.00±0.04	0.11±0.01	0.88±0.12	0.018±0.003
<i>t</i>	11.314	-29.643	-16.247	-2.399	9.376	-4.393	-4.513
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	0.053	0.001	0.012	0.011

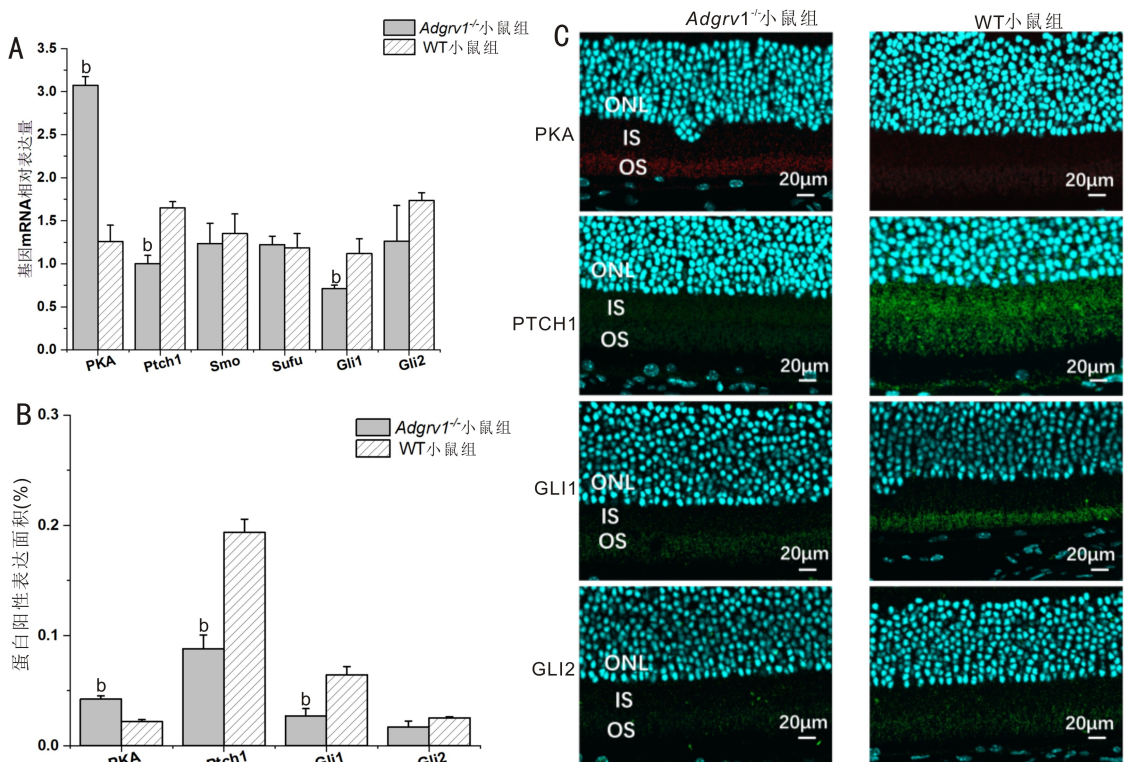


图 3 两组小鼠视网膜 Hh 信号通路关键因子 mRNA 表达和蛋白阳性表达面积比较 A: 视网膜组织 Hh 信号通路关键因子 mRNA 相对表达量 ($^b P < 0.01$ vs WT 小鼠组, $n = 3$); B: 视网膜免疫荧光 Hh 信号通路因子蛋白阳性表达面积定量分析 ($^b P < 0.01$ vs WT 小鼠组, $n = 3$); C: 视网膜组织 Hh 信号通路关键因子免疫荧光(红色:PKA 蛋白;绿色:PTCH1、GLI1、GLI2 蛋白;蓝色:DAPI);ONL:外核层;IS:内节段;OS:外节段。

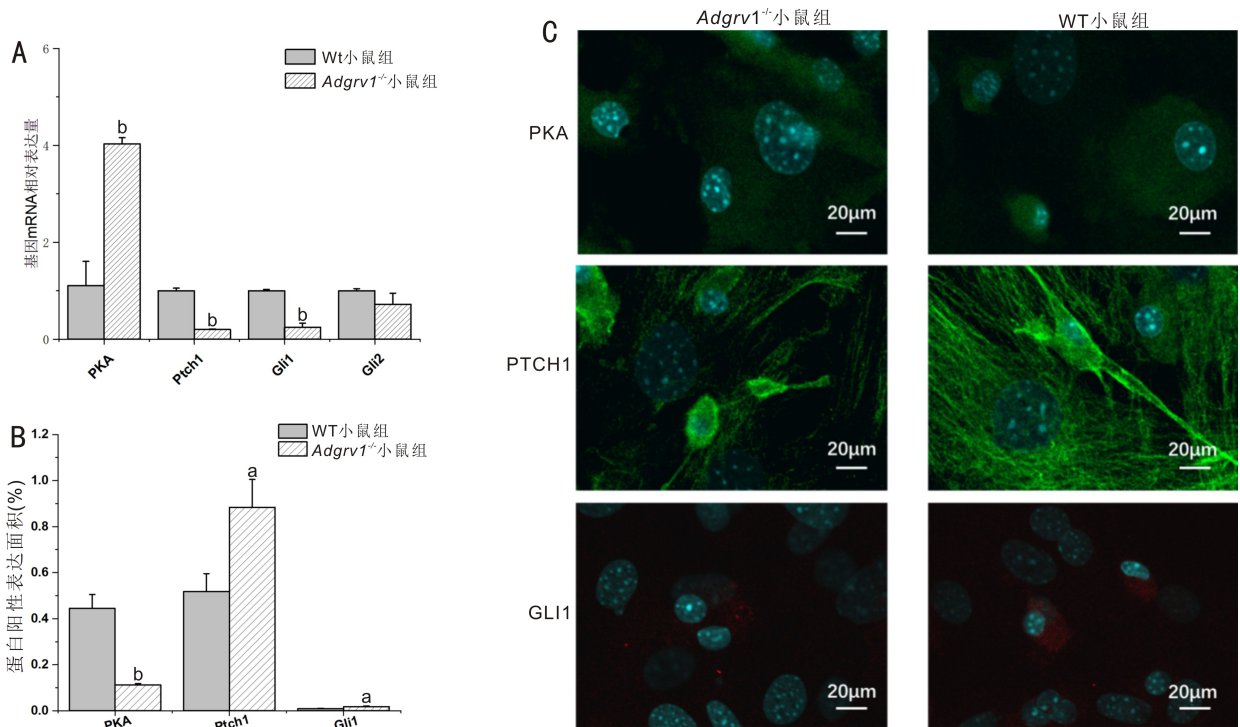


图4 两组小鼠原代肺成纤维细胞Hh信号通路关键因子mRNA表达和蛋白阳性表达面积比较 A:原代肺成纤维细胞中Hh信号通路关键因子mRNA相对表达量(^b $P < 0.01$ vs WT小鼠组, $n = 4$); B:细胞免疫荧光Hh信号通路因子蛋白阳性表达面积定量分析(^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs WT小鼠组, $n = 3$); C:细胞Hh信号通路关键因子免疫荧光(红色:GLI1蛋白;绿色:PKA、PTCH1蛋白;蓝色:DAPI)。

病性变异可致USH2,ADGRV1蛋白主要表达于纤毛根部。在视网膜中,ADGRV1蛋白定位于光感受器的纤毛膜蛋白复合体^[10]。我们前期发现了一种与人类USH2表型类似的小鼠,经鉴定致病基因为Adgrv1基因的自发变异,人类USH家系报道有相似变异类型^[11]。以往研究发现该小鼠存在耳蜗外毛细胞静纤毛束退化,但视网膜组织未发现明显改变^[12]。光感受器外节是一种特殊的感受纤毛,眼部纤毛疾病几乎都与其缺陷相关,本研究中视网膜外节在组织形态上虽未观察到明显的改变,但通过电镜在超微结构上可发现存在光感受器外节盘膜溶解,下一步需细化观察时间分析视网膜外节的病理进展。由于纤毛是在几乎所有细胞上均有的毛发状突起,原代培养的Adgrv1^{-/-}小鼠肺成纤维细胞中同样可见纤毛长度明显变短。因此,本研究验证Adgrv1基因变异可致纤毛异常。

ADGRV1蛋白作为GPCR家族,在细胞内信号转导的分子机制及其导致USH的机理目前仍不清楚。ADGRV1蛋白是迄今为止最大的GPCR,包含一个极长的细胞外结构域(extracellular domain,ECD)、一个典型的7次跨膜结构域(7 transmembrane domains,7TM)和一个短胞质内结构域(intracellular domain,ICD)。G α 信号通路中cAMP被认为是第二信使,而PKA是次级效应器,G α s和G α i/o途径的效应物都是生成cAMP的腺苷酸环化酶(adenylate cyclase,AC)。与其他黏附GPCR一样,ADGRV1蛋白可自水解为 α 亚基和 β 亚基,并与特定的G蛋白亚基偶联而介导下游信号通路^[13]。一项研究通过分子生物学方法,在HEK293细胞克隆表达ADGRV1片段蛋白水解后 β 亚基可与G α i蛋白偶联而抑制AC酶活性,C末端的致病变异Y6236fs可增强对AC酶活性的抑制,而发生在氨基酸R6002A变异则减弱其与G α i偶联的活性^[14],说明不同

的变异位点会影响ADGRV1与G蛋白偶联活性。本研究从细胞和组织水平发现Adgrv1^{-/-}小鼠视网膜Adgrv1 mRNA表达下降可伴有PKA激活,Adgrv1^{-/-}小鼠来源的原代肺成纤维细胞同样伴有细胞PKA的激活,这与Michalski等^[15]研究一致,其发现Adgrv1基因缺失会使AC6补偿性表达增加。但Shin等^[16]发现在小鼠脑部上下丘中正常的ADGRV1蛋白可激活PKA和PKC以响应细胞外钙信号,说明在不同的生理/病理条件下,GPCR也可通过不同类别G蛋白向细胞内部传递信号^[17]。本研究证实ADGRV1蛋白可将细胞外信号经G蛋白途径传导至下游信号通路,但如何调控纤毛发育的具体作用机制仍不明确。

Hh信号通路主要发生在初始纤毛内,在视网膜和耳蜗发育过程中Hh信号通路发挥着重要作用,它能决定光感受细胞的发育及视网膜的分层结构,也参与确定内耳的腹侧极性、螺旋神经元的诱导及毛细胞发育等^[6-7]。本研究中Adgrv1^{-/-}小鼠视网膜和原代成纤维细胞中均存在Hh信号通路两个关键分子PTCH1、GLI1表达出现下调。纤毛也被认为是GPCR信号传递的重要纽带。多种GPCR及其下游效应分子定位于哺乳动物细胞的纤毛上^[4,18]。研究发现,细胞对Hh配体的敏感性可受G α i-和G α s-偶联GPCR的影响,它控制第二信使3',5'-环磷酸腺苷(cAMP)的产生,进而激活PKA作为Hh信号的抑制剂和/或激活剂^[18]。脊椎动物细胞亦可利用纤毛内外不同空间的PKA池,调节Hh信号传导,以传递不同的信息^[19]。在视网膜上PKA两个催化(C)亚基,C α 定位于连接纤毛的基部和视网膜外节,C β 定位于内节椭圆体,定位的差异表明这些亚单位具有特殊的生理功能^[20]。而有文献报道Hh信号通路中关键因子GLI1定位于视网膜外

节^[21]。这些研究表明位于纤毛的 GPCR 可选择性参与调节 Hh 信号通路,组成纤毛内的交联信号承担调控作用。我们研究发现 *Adgrv1*^{-/-}小鼠视网膜中 ADGRV1 的蛋白表达缺失与激活的 PKA 和下调的 GLI1 共定位于外节,与既往研究一致^[20-21],PTCH1 在内外节表达均明显下降。结合本研究结果,我们推测 ADGRV1 蛋白可与 Gαi 偶联,抑制 AC 酶活性,减少 cAMP 的生成,而 *Adgrv1* 基因变异导致抑制作用解除,cAMP 补偿性增加,持续激活 PKA,进而抑制 Hh 信号的核心受体 PTCH1,使得 GLI1 表达下降,抑制下游靶基因的转录,最终导致视细胞和毛细胞纤毛发育障碍。

纤毛可以感受外环境中的机械与化学刺激,是个体发育过程中重要的信号转导中心。近期研究发现 Hh 活性与骨髓间充质干细胞的机械力反应性正相关^[22],而另一项研究表明 ADGRV1 蛋白可作为机械传感器,感知细胞外环境机械信号^[23-24]。在发育中眼耳分别接收光和声音刺激,不同的外界信号纤毛会有不同的反应,已知 ADGRV1 蛋白形成的连接中,耳蜗处的踝连接相邻静纤毛之间存在机械力,但最新研究发现视网膜光感受器也存在具有机械力的纤维链^[25],ADGRV1 参与其中。因此,ADGRV1 蛋白作为 GPCR 可能参与 Hh 信号通路对细胞外机械信号的传递。

近年来研究发现越来越多的疾病都与纤毛异常相关,深入探索纤毛的发生不仅对完善生物学基础理论,而且对理解纤毛病等人类疾病的病理机制具有重要启示。ADGRV1 蛋白作为迄今为止最大的 GPCR,采用现今常用的腺病毒载体^[26]进行基因治疗无法实现,对其功能、下游分子信号通路的研究,揭示其中调控的关键位点,可为下一步动物的基因治疗开展和临床治疗靶点选择提供依据。但本研究还有诸多问题仍需解释,包括细化解析 *Adgrv1* 基因变异调控 Hh 信号通路的具体作用机制,明确 *Adgrv1* 基因缺陷对视网膜和耳蜗纤毛发育的影响,对深入理解 ADGRV1 蛋白的生物学功能、视网膜纤毛发生机制、USH2 发病机理具有重要意义。

参考文献

[1] Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. *Lancet*, 2006,368(9549):1795-1809.

[2] Tsang SH, Aycinena ARP, Sharma T. Ciliopathy: Usher syndrome. *Adv Exp Med Biol*, 2018,1085:167-170.

[3] Stemerink M, García-Bohórquez B, Schellens R, et al. Genetics, pathogenesis and therapeutic developments for Usher syndrome type 2. *Hum Genet*, 2022,141(3):737-758.

[4] Saad F, Hipfner DR. Extensive crosstalk of G protein-coupled receptors with the Hedgehog signalling pathway. *Development*, 2021,148(7):dev189258.

[5] 陈佳静,李超鹏,王其龙,等. Hedgehog 及 WNT 信号通路在眼睑基底细胞癌中的研究进展. *国际眼科杂志*, 2022,22(11):1822-1826.

[6] Nager AR, Goldstein JS, Herranz-Pérez V, et al. An actin network dispatches ciliary GPCRs into extracellular vesicles to modulate signaling. *Cell*, 2017,168(1-2):252-263.e14.

[7] Anvarian Z, Myktyyn K, Mukhopadhyay S, et al. Cellular signalling by primary cilia in development, organ function and disease. *Nat Rev Nephrol*, 2019,15(4):199-219.

[8] Pater JA, Green J, O'Rielly DD, et al. Novel Usher syndrome pathogenic variants identified in cases with hearing and vision loss. *BMC Med Genet*, 2019,20(1):68.

[9] Fuster-García C, García-Bohórquez B, Rodríguez-Muñoz A, et al. Usher syndrome: genetics of a human ciliopathy. *Int J Mol Sci*, 2021,22(13):6723.

[10] Mathur P, Yang J. Usher syndrome: Hearing loss, retinal degeneration and associated abnormalities. *Biochim Biophys Acta*, 2015,1852(3):406-420.

[11] Wei CL, Yang LS, Cheng JL, et al. A novel homozygous variant of GPR98 causes usher syndrome type IIC in a consanguineous Chinese family by next generation sequencing. *BMC Med Genet*, 2018,19(1):99.

[12] Yan WM, Long P, Chen T, et al. A natural occurring mouse model with *Adgrv1* mutation of usher syndrome 2C and characterization of its recombinant inbred strains. *Cell Physiol Biochem*, 2018,47(5):1883-1897.

[13] Knapp B, Roedig J, Roedig H, et al. Affinity proteomics identifies interaction partners and defines novel insights into the function of the adhesion GPCR VLGR1/ADGRV1. *Molecules*, 2022,27(10):3108.

[14] Hu QX, Dong JH, Du HB, et al. Constitutive Gαi coupling activity of very large G protein-coupled receptor 1 (VLGR1) and its regulation by PDZD7 protein. *J Biol Chem*, 2014,289(35):24215-24225.

[15] Michalski N, Michel V, Bahloul A, et al. Molecular characterization of the ankle-link complex in cochlear hair cells and its role in the hair bundle functioning. *J Neurosci*, 2007,27(24):6478-6488.

[16] Shin D, Lin ST, Fu YH, et al. Very large G protein-coupled receptor 1 regulates myelin-associated glycoprotein via Gαs/Gαq-mediated protein kinases A/C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013,110(47):19101-19106.

[17] Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*, 1997,390(6655):88-91.

[18] Hwang SH, Somatilaka BN, White K, et al. Ciliary and extraciliary Gpr161 pools repress hedgehog signaling in a tissue-specific manner. *eLife*, 2021,10:e67121.

[19] Truong ME, Bilekova S, Choksi SP, et al. Vertebrate cells differentially interpret ciliary and extraciliary cAMP. *Cell*, 2021,184(11):2911-2926.e18.

[20] Roa JN, Ma YL, Mikulski Z, et al. Protein kinase A in human retina: differential localization of Cβ, Cα, RIIα, and RIIβ in photoreceptors highlights non-redundancy of protein kinase A subunits. *Front Mol Neurosci*, 2021,14:782041.

[21] Gupta PR, Pendse N, Greenwald SH, et al. Ift172 conditional knock-out mice exhibit rapid retinal degeneration and protein trafficking defects. *Hum Mol Genet*, 2018,27(11):2012-2024.

[22] Johnson GP, Fair S, Hoey DA. Primary Cilium-mediated MSC mechanotransduction is dependent on Gpr161 regulation of hedgehog signalling. *Bone*, 2021,145:115846.

[23] Kusluri DK, Güler BE, Knapp B, et al. Adhesion G protein-coupled receptor VLGR1/ADGRV1 regulates cell spreading and migration by mechanosensing at focal adhesions. *iScience*, 2021,24(4):102283.

[24] Güler BE, Linnert J, Wolfrum U. Monitoring paxillin in astrocytes reveals the significance of the adhesion G protein coupled receptor VLGR1/ADGRV1 for focal adhesion assembly. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2023,133(4):301-312.

[25] Verschuere A, Boucherit L, Ferrari U, et al. Planar polarity in primate cone photoreceptors: a potential role in stiles Crawford effect phototropism. *Commun Biol*, 2022,5(1):89.

[26] 邓方圆,韩梦雨,邓婷婷,等. 视网膜色素变性基因治疗的相关研究进展. *国际眼科杂志*, 2021,21(7):1205-1208.