

# 缺氧条件下 $\gamma$ -氨基丁酸能系统 对视网膜色素上皮的保护作用

曲忠花<sup>1</sup>,迟令懿<sup>2</sup>,马志勇<sup>1</sup>,程振英<sup>1,3</sup>,王旭平<sup>1</sup>

(1.山东大学齐鲁医院络病理理论创新转化全国重点实验室,心血管重构和功能研究教育部和国家卫健委重点实验室,山东 济南 250012; 2.山东大学齐鲁医院神经外科,山东 济南 250012; 3.山东大学齐鲁医院眼科,山东 济南 250012)

**摘要:**目的 探讨缺氧条件下  $\gamma$ -氨基丁酸(gama-aminobutyric acid, GABA)能系统在人视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞中的作用及其机制,为防治缺氧相关视网膜疾病提供理论依据。方法 分离并培养人RPE细胞,采用RT-PCR法、Western blotting法检测GABA相关分子[谷氨酸脱羧酶65/67(glutamic acid decarboxylase 65/67, GAD65/67)、 $\gamma$ -氨基丁酸转氨酶(GABA transaminase, GABA-T)、囊泡性GABA转运体(vesicular GABA transporter, VGAT)、GABA转运体1/2(GABA transporters 1/2, GAT-1/2)]的表达。利用免疫荧光技术检测人RPE细胞及人视网膜组织中GAD67、GABA-T和GAT-2的表达与定位。将RPE细胞暴露于缺氧环境中(1% O<sub>2</sub>, 37°C, 48 h),检测GAD67、GABA-T和GAT-2表达变化、单层细胞通透性和紧密连接蛋白(zonula occludens-1, ZO-1)水平。将细胞分为常氧空载体对照组、常氧基因过表达组、低氧空载体组以及低氧基因过表达组。通过腺病毒载体分别过表达GAD67、GABA-T或GAT-2,评估其对缺氧诱导的RPE细胞屏障功能损伤的影响。结果 人RPE细胞表达GAD67、GABA-T和GAT-2,但未检测到GAD65、VGAT和GAT-1的表达。与常氧对照组相比,低氧组各基因蛋白GAD67[(17.54±6.89)%,  $t=2.595$ ,  $P<0.05$ ]、GABA-T[(18.64±3.56)%,  $t=3.563$ ,  $P<0.01$ ]和GAT-2[(31.79±8.49)%,  $t=4.147$ ,  $P<0.01$ ]表达显著下调;同时单层RPE细胞的通透性增加[(78.83±34.79)%,  $t=-3.222$ ,  $P<0.05$ ], ZO-1水平降低[(22.24±8.31)%,  $t=3.217$ ,  $P<0.01$ ]。与低氧空载体对照组相比,低氧过表达GAD67或GABA-T组中升高的RPE细胞通透性减轻了(21.97±11.02)%和(21.40±7.65)%,差异有统计学意义( $F_{GAD67}=14.146$ ,  $F_{GABA-T}=35.715$ ,  $P_{GAD67}<0.05$ ,  $P_{GABA-T}<0.01$ )。与低氧空载体对照组相比,低氧GAT-2过表达组在无外源GABA添加时未表现出明显保护作用(组间 $P=0.001$ ,  $P>0.05$ ),但在加入外源GABA后, GAT-2过表达使得缺氧诱导下的RPE细胞通透性下降了(34.49±14.70)%( $F=20.084$ ,  $P<0.01$ )。此外, GAD67、GABA-T和GAT-2的过表达均未能逆转缺氧导致的ZO-1蛋白降低。结论 人RPE细胞表达GABA能系统。在缺氧条件下, GABA能相关蛋白表达降低并伴随屏障功能损伤。增强GAD67、GABA-T表达可显著改善缺氧诱导的RPE细胞屏障功能异常, GAT-2过表达在补充外源GABA时亦有保护作用,提示GABA能系统可能成为改善缺氧相关视网膜疾病RPE屏障功能的潜在靶点。

**关键词:**视网膜色素上皮细胞;  $\gamma$ -氨基丁酸;  $\gamma$ -氨基丁酸能系统; 缺氧; 屏障功能; 紧密连接蛋白

中图分类号: R774.1

文献标志码: A

## Protective role of GABAergic system in retinal pigment epithelium under hypoxia

QU Zhonghua<sup>1</sup>, CHI Lingyi<sup>2</sup>, MA Zhiyong<sup>1</sup>, CHENG Zhenying<sup>1,3</sup>, WANG Xuping<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory for Innovation and Transformation of Luobing Theory, Key Laboratory of Cardiovascular Remodeling and Function Research, Chinese Ministry of Education, Chinese National Health Commission, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China; 2. Department of Neurosurgery, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China; 3. Department of Ophthalmology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China)

**Abstract: Objective** To investigate the role and mechanism of the  $\gamma$ -aminobutyric acid-ergic (GABAergic) system in human retinal pigment epithelial (RPE) cells under hypoxic conditions, and to provide a theoretical basis for the prevention and treatment of hypoxia-related retinal diseases. **Methods** Human RPE cells were isolated and cultured. The expression of GABA-related molecules—glutamic acid decarboxylase 65/67 (GAD65/67), GABA transaminase (GABA-T), vesicular GABA transporter (VGAT), and GABA transporters 1/2 (GAT-1/2)—was detected by RT-PCR and Western blotting. Immunofluorescence was employed to examine the expression and localization of GAD67, GABA-T, and GAT-2 in cultured human RPE cells and human retinal tissue. Cells were exposed to a hypoxic environment (1% O<sub>2</sub>, 37 °C, 48 h), and changes in GAD67, GABA-T, and GAT-2 expression, monolayer permeability, and zonula occludens-1 (ZO-1) level were analyzed. RPE cells were divided into four groups; empty vector + normoxia, gene overexpression + normoxia, empty vector + hypoxia, and gene overexpression + hypoxia. Adenoviral vectors were used to overexpress GAD67, GABA-T, and GAT-2, and their protective effects against hypoxia-induced barrier dysfunction in RPE cells were evaluated. **Results** RT-PCR and Western blotting analyses revealed that human RPE cells expressed GAD67, GABA-T, and GAT-2, whereas GAD65, VGAT, and GAT-1 were undetectable. Compared with the normoxic group, hypoxia significantly downregulated GAD67 [(17.54±6.89)%,  $t=2.595$ ,  $P<0.05$ ], GABA-T [(18.64±3.56)%,  $t=3.563$ ,  $P<0.01$ ], and GAT-2 [(31.79±8.49)%,  $t=4.147$ ,  $P<0.01$ ]; increased RPE monolayer permeability [(78.83±34.79)%,  $t=-3.222$ ,  $P<0.05$ ]; and reduced ZO-1 levels [(22.24±8.31)%,  $t=3.217$ ,  $P<0.01$ ]. Compared with the hypoxic empty vector, overexpression of GAD67 or GABA-T alleviated the hypoxia-induced increase in RPE cell permeability by (21.97±11.02)% and (21.40±7.65)%, respectively. The differences were statistically significant ( $F_{\text{GAD67}}=14.146$ ,  $F_{\text{GABA-T}}=35.715$ ,  $P_{\text{GAD67}}<0.05$ ,  $P_{\text{GABA-T}}<0.01$ ). In contrast to the hypoxic empty vector control group, GAT-2 overexpression did not exhibit a significant protective effect in the absence of exogenous GABA (intergroup  $P=0.001$ ,  $P>0.05$ ). However, with the addition of exogenous GABA, GAT-2 overexpression reduced the hypoxia-induced RPE cell permeability by (34.49±14.70)% ( $F=20.084$ ,  $P<0.01$ ). None of the overexpressed genes reversed hypoxia-induced reduction of ZO-1 protein. **Conclusions** Human RPE cells express key components of the GABAergic system. Hypoxia reduces the expression of GABA-related proteins and impairs barrier integrity. Upregulation of GAD67 or GABA-T expression significantly alleviates hypoxia-induced barrier dysfunction in RPE cells. Overexpression of GAT-2 also exhibits a protective effect when supplemented with exogenous GABA. These findings suggest that the GABAergic system may serve as a potential target for improving RPE barrier function in hypoxia-related retinal diseases.

**Key words:** Retinal pigment epithelial cells;  $\gamma$ -aminobutyric acid; GABAergic system; Hypoxia; Barrier function; Tight junction protein

视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 位于视网膜神经层与脉络膜之间, 是血-视网膜屏障 (blood-retinal barrier, BRB) 的重要组成部分, 对维持视网膜稳态、支持光感受器代谢与视觉功能至关重要<sup>[1-4]</sup>。RPE 通过选择性转运营养物质与离子、清除代谢产物、吞噬光感受器外节并吸收散射光, 维持光感受器存活与视觉功能。RPE 细胞间的紧密连接是 BRB 完整性的结构基础, 其通透性直接反映屏障功能状态。RPE 通透性升高可导致血液成分异常渗入视网膜, 引发炎症反应、氧化应激及异常血管生成, 进而参与包括年龄相关性黄斑变性和糖尿病视网膜病变等致盲性疾病的发生与发展<sup>[5-7]</sup>。鉴于 RPE 在视网膜稳态与疾病发生中的核心作用, 阐明影响 RPE 屏障功能的分子机制对缺血缺氧相关视网膜疾病的防治具有重要意义。

$\gamma$ -氨基丁酸 ( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA) 是中枢神经系统的主要抑制性递质, 通过激活 GABA<sub>A</sub>、GABA<sub>B</sub> 和 GABA<sub>C</sub> 受体调控神经元兴奋性<sup>[8]</sup>。

GABA 的合成由两种谷氨酸脱羧酶 (glutamic acid decarboxylase, GAD)—GAD65 和 GAD67—催化, 其降解由 GABA 转氨酶 (GABA transaminase, GABA-T) 介导; 囊泡性 GABA 转运体 (vesicular GABA transporter, VGAT) 负责囊泡储存与释放, 而膜转运体 (GABA transporter, GAT, 包括 GAT-1 和 GAT-2 等) 负责胞外 GABA 的摄取和清除。这些分子共同决定局部 GABA 的浓度与信号传递<sup>[9-12]</sup>。在视网膜组织中, GABA 通过参与光感受器、双极细胞及无长突细胞等神经元细胞的信号整合<sup>[13-14]</sup>。近年研究表明, 除神经元外, 某些非神经元细胞 (如气道上皮、平滑肌、内皮细胞等) 亦表达 GABA 代谢与转运相关分子, 提示 GABA 能系统可能参与非神经元细胞的代谢和功能调控<sup>[15-17]</sup>。

缺氧是糖尿病视网膜病变、视网膜静脉阻塞等视网膜缺血性疾病的共同病理环节, 可诱导氧化应激、炎症反应及 RPE 功能失衡, 从而破坏 BRB 并加重视网膜损伤<sup>[7, 18-20]</sup>。尽管已有研究提示, GABA

能相关分子在视网膜中的分布与功能,但人 RPE 细胞中 GABA 合成、降解、及转运的系统性研究仍不充分,其在缺氧条件下对 RPE 屏障功能的调控机制亦鲜有研究。

基于上述背景,本研究旨在系统检测人 RPE 细胞中 GABA 合成、降解与转运相关分子的表达与定位,分析缺氧对这些分子的调控作用及其对 RPE 屏障功能及紧密连接蛋白 ZO-1 水平(zonula occludens-1, ZO-1)的影响,并通过基因过表达策略明确 GABA 能相关分子在缺氧诱导的 RPE 屏障功能障碍中的作用,从而为揭示缺氧相关视网膜疾病的发病机制和寻找潜在的干预靶点提供新的实验依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

#### 1.1.1 人眼组织样本

本研究使用的人眼组织来源于济南市第二人民医院眼库,取材于行角膜移植术后 24 h 内的 12 只人眼组织(6 位成年捐献者,其中男 3 例,年龄分别为 38、56 和 68 岁;女 3 例,年龄分别为 43、52 和 64 岁;所有捐献者均为汉族)。所有捐献者生前均无已知眼部疾病史(从每位捐献者的一只眼球分离原代 RPE 细胞进行培养,用于 RT-PCR 法和 Western blotting 等方法检测,  $n=6$ ;将另一只眼球用于免疫荧光染色,  $n=6$ 。所有实验数据均来自独立的生物学样本)。所有眼组织捐献均获得了捐献者或其近亲属的知情同意,并签署了书面知情同意书。本研究已获得山东大学齐鲁医院伦理委员会的批准(批准号: KYLL-2016(KS)-215),并符合《赫尔辛基宣言》的原则。

#### 1.1.2 主要试剂

DMEM 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司, TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司, Prime-Script™ RT 试剂盒和 Ex Taq® PCR 试剂购自日本

Takara 公司,伊文思蓝染料购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

#### 1.1.3 主要仪器

NanoDrop 2000 分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司), Biometra Tone PCR 仪(德国 Analytik Jena 公司), iBright™ CL750(美国 Thermo Scientific 公司), CKX53 显微镜(日本 Olympus 公司), 三气培养箱(美国 Thermo 公司), Synergy H1 多功能微孔板检测仪(美国 BioTek 公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 RPE 细胞培养

移除眼球的前节和玻璃体,用预冷的 PBS 冲洗后部的眼杯 5 min,去除残留组织。小心剥离神经视网膜,置于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冻存,作为 RT-PCR 和 Western blotting 实验的阳性对照。随后,使用 0.1% 的胰蛋白酶-乙二胺四乙酸消化后眼杯的 RPE 层,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  消化 30 min,并通过轻柔刮擦的方法收集 RPE 细胞。将收集到的细胞接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,置于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的加湿培养箱中进行培养。为鉴定 RPE 细胞的特性,使用 RPE 特异性标记物 RPE65 进行免疫染色。实验所用细胞均为传代  $\leq 5$  代的 RPE 细胞。

### 1.2.2 采用 RT-PCR 法检测 GABA 能关键基因表达

利用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA,并通过分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度。取  $1\text{ }\mu\text{g}$  总 RNA,使用 PrimeScript™ RT 试剂盒反转录为 cDNA。采用 TaKaRa Ex Taq® 试剂进行 PCR,反应条件:  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s,共 28/32 个循环,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  终延伸 3 min。引物序列见表 1。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳并用 GelRed™ 染色成像。实验设神经视网膜组织阳性对照(P.C),无模板阴性对照(N.C)。ACTB(编码  $\beta$ -actin)作为内参基因。每个样品设 3 个技术重复,实验至少重复 2 次(生物学重复)。

表 1 PCR 引物序列及扩增产物(片段)大小  
Table 1 Primer sequences and amplicon product sizes used in PCR

基因名称	引物序列 (5'-3')	片段大小(bp)
ACTB(编码 Beta actin)	F: CATGTACGTTGCTATCCAGGC R: CTCCTTAATGTACGCACGAT	250
GAD2(编码 GAD65)	F: TGTCAACTACGCGTTTCTCCA R: AGTTGATTGAAGTATCTAGGATGCC	288
GAD1(编码 GAD67)	F: CGGCTAAGAACGGTGAGGAG R: AATCGAGGATGACCTGTGCG	247
ABAT(编码 GABA-T)	F: GATGACCCAGCAGACGTGAT R: CGGGAGTATCGAAGGAGCAA	298

续表

基因名称	引物序列 (5'-3')	片段大小(bp)
SLC32A1(编码 VGAT)	F: CATTGCGACGACCTCGACT R: AGCACGAACATGCCCTGGA	269
SLC6A1(编码 GAT-1)	F: CGGCTGCTGTGCTATCATT R: ACACAAGGATCCAGGCGATG	294
SLC6A13(编码 GAT-2)	F: CAACGGCTCCCTGAATGGTA R: AGGACCACCAGCATGAGGTA	240

### 1.2.3 采用 Western blotting 法检测 GABA 能关键分子的蛋白表达

使用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液提取 RPE 细胞总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度。取等量蛋白样品于 12% SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离后,转移至 PVDF 膜。膜以 5% 脱脂牛奶的封闭

1 h(室温),4℃与一抗孵育过夜。经 TBST 洗涤后,与 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h。采用 ECL 法显色,使用 iBright CL750 成像系统获取条带图像。抗体详细信息见表 2。实验以人神经视网膜组织作为阳性对照(P.C),以 GAPDH 作为内参蛋白。

表 2 Western blotting 检测中所用的抗体信息  
Table 2 Summary of antibodies utilized in western blotting assays

抗原名称	生产商	抗体货号	稀释比例
GAD65	Novus Biologicals	NBP1-33284	1:1 000
GAD67	Novus Biologicals	NBP1-48272	1:2 000
GABA-T	Abcam	ab216465	1:1 000
VGAT	Novus Biologicals	NBP2-20857	1:2 000
GAT-1	Novus Biologicals	NBP1-59878	1:1 000
GAT-2	Abcam	ab229815	1:1 000
ZO-1	Abcam	ab276131	1:1 000
GAPDH	Abcam	ab8245	1:5 000
抗兔 IgG	Cell Signaling Technology	#7074	1:2 000
抗鼠 IgG	Cell Signaling Technology	#7076	1:2 000

### 1.2.4 采用免疫荧光染色法检测 GABA 能关键分子在 RPE 中的表达及定位

培养的 RPE 细胞用 4% 多聚甲醛在室温下固定 5 min,随后用含 1% 牛血清白蛋白、10% 正常驴血清、0.3 mol/L 甘氨酸及 0.1% 吐温-20 的 PBS 封闭液室温封闭 1 h。加入稀释的一抗(RPE65、GAD67、GABA-T 或 GAT-2),4℃孵育过夜。次日加入荧光标记的二抗,37℃孵育 30 min。DAPI 复染细胞核

后,使用含抗淬灭剂的封片剂封片。取眼球组织,用 4% 多聚甲醛固定 24 h,包埋前利用蔗糖梯度溶液(10%、20%、30%、50%)脱水,包埋剂包埋后进行冰冻切片。切片于室温干燥 30 min 后,使用含 10% 驴血清和 0.3 mol/L 甘氨酸的 PBS 封闭液封闭 1 h。加入稀释的一抗,4℃孵育过夜。次日加入荧光标记的二抗,37℃孵育 30 min。DAPI 复染细胞核后,使用含抗淬灭剂的封片剂封片。抗体信息详见列表 3。

表 3 免疫荧光染色所用的抗体信息  
Table 3 Antibody information for fluorescence immunostaining

抗原名称	生产商	抗体货号	稀释比例
RPE65	Abcam	ab235950	1:100
RPE65	Novus Biologicals	NB100-355	1:100
GAD67	Novus Biologicals	NBP1-48272	1:50
GABA-T	Abcam	ab216465	1:100
GAT-2	Abcam	ab229815	1:200
Alexa Fluor 488-驴抗兔 IgG	Invitrogen	R37118	1:1 000
Alexa Fluor 568-驴抗鼠 IgG	Invitrogen	A10037	1:500
Alexa Fluor 488-驴抗鼠 IgG	Invitrogen	R37114	1:1 000

### 1.2.5 RPE 细胞的缺氧处理

将 RPE 细胞在常氧培养箱(37℃,21% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、74% N<sub>2</sub>)中培养至汇合。细胞分为常氧对照组和低氧组。将低氧组细胞转移至三气培养箱中,设定气体浓度为 1% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> 和 94% N<sub>2</sub>。实验

所用培养基需预先置于缺氧环境中平衡至少 2 h。将细胞暴露于缺氧环境 48 h 后,所有操作均在缺氧条件下,以避免复氧对实验结果的影响。常氧组细胞继续在常氧条件下培养。

### 1.2.6 腺病毒感染与细胞分组

将 RPE 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 6 孔板中,培养 24 h 至贴壁后,用重组腺病毒载体 Ad-GAD1、Ad-ABAT、Ad-SLC6A13 或空载体对照 Ad-NC(Ad5/CMV 启动子;维真生物科技有限公司;病毒滴度:  $2 \sim 5 \times 10^8$  IFU/mL) 感染相应组得细胞,感染复数(MOI)为 20。感染过程中,每孔加入含 2% FBS 的 DMEM 培养基 1.5 mL,  $37^\circ\text{C}$  培养 12 h, 更换为含 10% FBS 的 DMEM 培养基继续培养 72 h。采用 Western blotting 法检测目的蛋白的表达水平,以验证蛋白的过表达效率。细胞分为常氧空载体对照组(空载+常氧)、常氧基因过表达组(GAD1/ABAT/SLC6A13+常氧)、低氧空载体组(空载+低氧)以及低氧基因过表达组(GAD1/ABAT/SLC6A13+低氧)。

### 1.2.7 RPE 单层细胞通透性测定

将 RPE 细胞以每孔  $1 \times 10^5$  个接种于 I 型胶原包被的 Transwell 上室(聚碳酸酯膜,孔径  $0.4 \mu\text{m}$ ) 中培养 24 h 后,置于常氧或缺氧条件下继续培养 24 h。向上室加入含伊文思蓝染料( $0.5 \text{ mg/mL}$ ) 的培养基,孵育 5 min。随后收集下室培养基,使用酶标仪在  $470 \text{ nm}$  激发波长和  $620 \text{ nm}$  发射波长下测定吸光度值,以评估 RPE 单层细胞通透性。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计学软件。利用 Shapiro-Wilk 检验评估数据的正态分布特性,符合正态分布

的数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用 Levene's 检验评估数据的方差齐性。对于满足方差齐性假设的数据,两组间比较使用独立样本  $t$  检验;多组间比较采用单因素方差分析,事后两两比较采用 Tukey 法;对于不满足方差齐性假设的数据,则采用非参数检验;两组间比较使用 Mann-Whitney  $H$  检验,多组间比较使用 Kruskal-Wallis 检验,事后两两比较采用 Dunn 方法。采用 GraphPad Prism 9.0 软件绘制统计图。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 GABA 能相关基因和蛋白在人 RPE 细胞中的表达

在培养 2~3 周后,原代 RPE 细胞形成紧密汇合的单层。RT-PCR 检测结果显示,在培养的 RPE 细胞和神经视网膜组织(阳性对照)中均可检测到 GAD67 (GAD1, 247 bp)、GABA-T(ABAT, 298 bp)和 GAT-2 (SLC6A13, 240 bp) 基因的特异性扩增条带。相反,GAD65(GAD2, 288bp)、VGAT(SLC32A1, 269bp)和 GAT-1(SLC6A1, 294bp)的扩增产物仅在神经视网膜组织中检出,在培养的 RPE 样品中未见到相应信号(图 1A)。Western blotting 分析结果与 RT-PCR 一致:在 RPE 细胞和神经视网膜组织中均可检测到 GAD67、GABA-T 和 GAT-2 蛋白,而 GAD65、VGAT 和 GAT-1 蛋白仅在神经视网膜组织中检出,在 RPE 样品中未见明显信号(图 1B)。

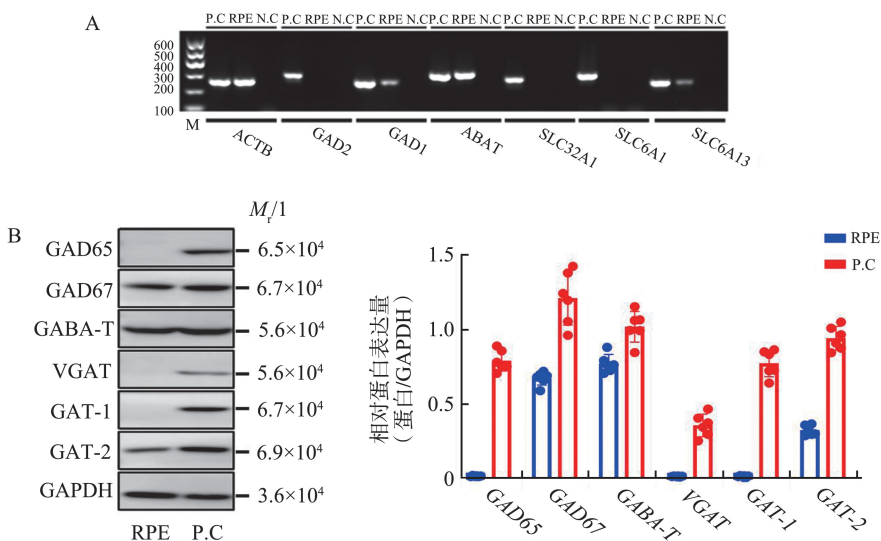


图 1 GABA 能相关基因和蛋白在人 RPE 细胞中的表达

A: RT-PCR 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上的电泳图(M: DNA 分子量标记;RPE: 人视网膜色素上皮细胞;N.C: 无模板阴性对照;P.C: 神经视网膜组织阳性对照);B: Western blotting 结果及相应蛋白表达量。

Figure 1 Expression of GABAergic-related genes and proteins in cultured human RPE cells

A: Electrophoresis of RT-PCR amplification products on a 1.5% agarose gel(M: DNA molecular weight marker; RPE, human retinal pigment epithelium cells; N. C: no-template negative control; P. C: neural retinal tissue (positive control));B: Western blotting images and corresponding protein expression levels.

## 2.2 GABA 能相关蛋白在 RPE 细胞及视网膜组织中的表达及定位

免疫荧光染色结果显示,在培养的人 RPE 细胞

中均可检测到 GAD67、GABA-T 和 GAT-2,呈胞质分布(图 2A)。在视网膜组织的 RPE 层中也可检测到相应蛋白的阳性信号(图 2B)。

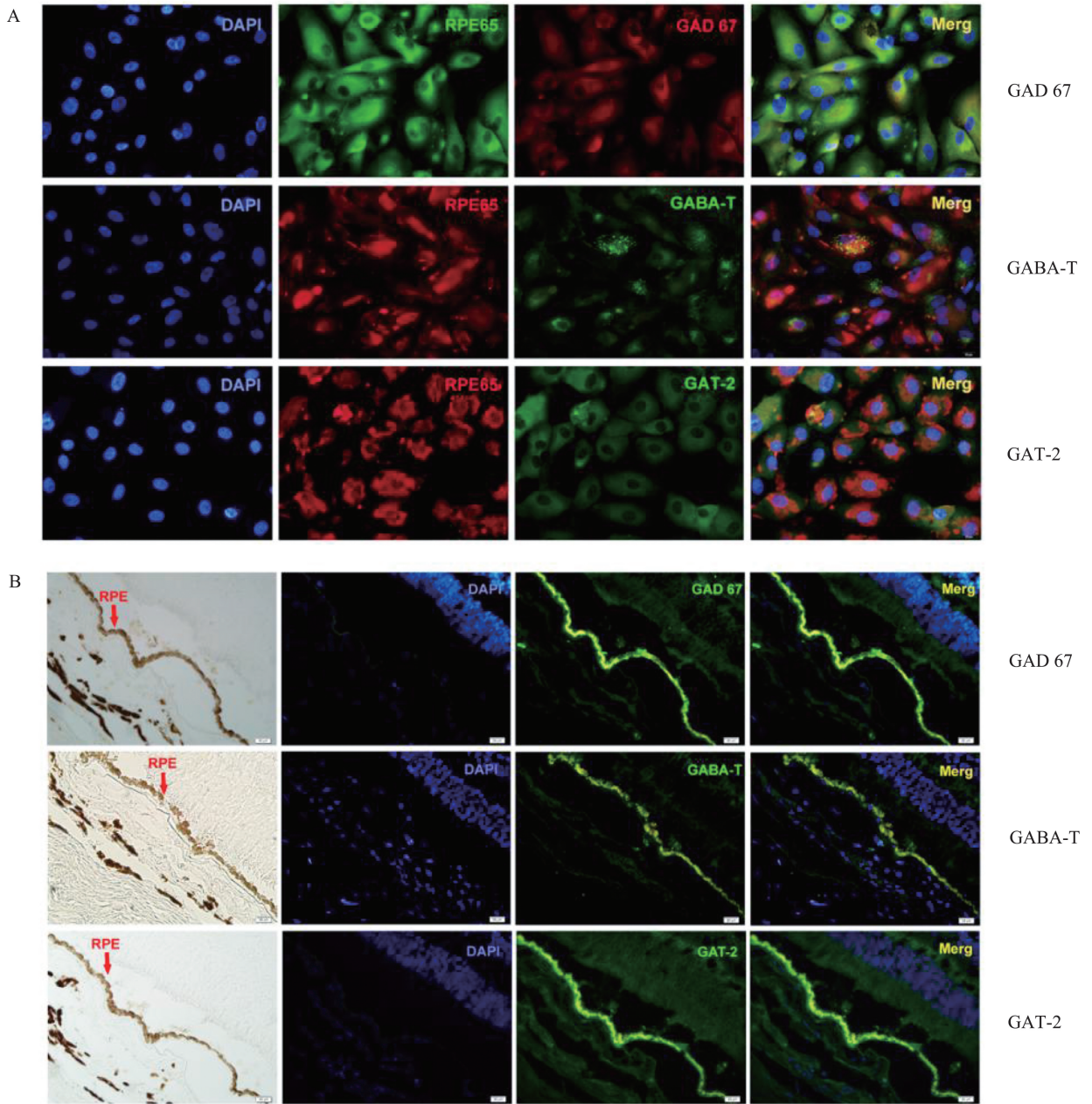


图 2 GABA 能相关蛋白在 RPE 细胞及视网膜组织中的表达与定位

A: 人 RPE 细胞免疫荧光图(40 $\times$ ); B: 人视网膜组织免疫荧光图(10 $\times$ )。DAPI(蓝)显示细胞核位置。比例尺=50  $\mu$ m。

Figure 2 Expression and localization of GABAergic-related proteins in RPE cells and retinal tissue

A: Immunofluorescence staining for cultured human RPE cells (40 $\times$ ). B: Immunofluorescence staining for human retinal tissue (10 $\times$ ). DAPI (blue) indicates nuclei. Scale bar=50  $\mu$ m.

## 2.3 缺氧对 GABA 能相关蛋白、RPE 单层细胞通透性及紧密连接蛋白 ZO-1 表达的影响

在 1%  $O_2$  条件下处理 48 h 后,Western blotting 结果显示,低氧组与常氧对照组相比,RPE 细胞内 GAD67、GABA-T 和 GAT-2 蛋白表达水平均显著下降[(17.54 $\pm$ 6.89)%、(18.64 $\pm$ 3.56)%和(31.79 $\pm$

8.49)%。GAD67: $t=2.595, P<0.05$ ;GABA-T: $t=3.563, P<0.01$ ;GAT-2: $t=4.147, P<0.01$ ],见图 3A。同时,缺氧显著增加了单层 RPE 细胞的通透性[(78.83 $\pm$ 34.79)%, $t=3.222, P<0.05$ ],并降低了细胞内 ZO-1 蛋白的表达水平[(22.24 $\pm$ 8.31)%, $t=3.217, P<0.01$ ],见图 3B。

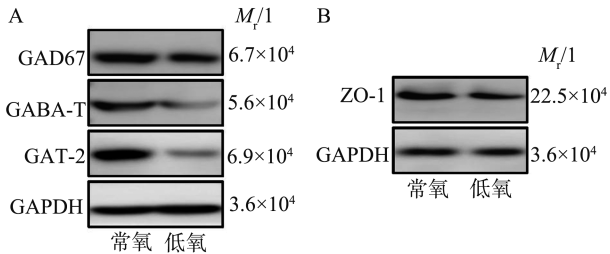


图3 缺氧对GABA能相关蛋白及紧密连接蛋白ZO-1表达的影响

A: 缺氧对GAD67、GABA-T及GAT-2表达的影响; B: 缺氧对紧密连接蛋白ZO-1表达的影响。

Figure 3 Effect of hypoxia on GABAergic-related proteins and the tight junction protein ZO-1 expression

A: Effect of hypoxia on GAD67, GABA-T and GAT-2 expression; B: Effect of hypoxia on ZO-1 expression.

### 2.4 过表达GAD67、GABA-T和GAT-2对缺氧诱导变化的影响

在缺氧条件下,与空载体对照组相比,GAD67或GABA-T过表达组中低氧诱导的RPE细胞通透性升高均显著减轻,细胞通透性分别降低了(21.97±11.02)%和(21.40±7.65)%,差异有统计学意义( $F_{GAD67} = 14.146$ ,  $F_{GABA-T} = 35.715$ ,  $P_{GAD67} < 0.05$ ,  $P_{GABA-T} < 0.01$ ),见图4A、B。与空载体对照组相比,GAT-2过表达组在无外源GABA添加时未表现出明显保护作用(组间 $P = 0.001$ ,  $P > 0.05$ ),但在加入外源GABA后,GAT-2过表达使得缺氧诱导下的RPE细胞通透性下降了(34.49±14.70)%( $F = 20.084$ ,  $P < 0.01$ ),图4C。

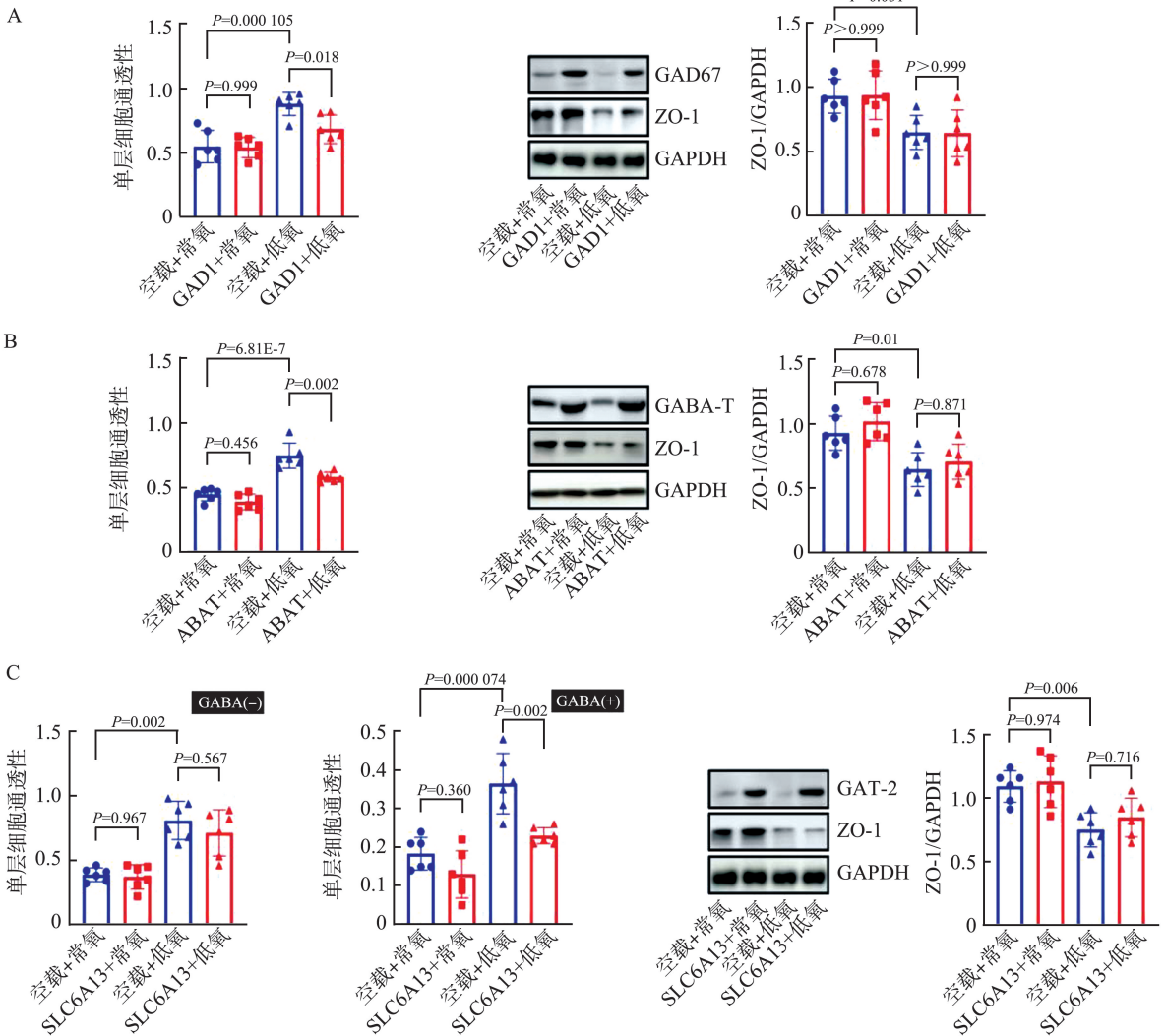


图4 GAD67、GABA-T或GAT-2过表达对RPE单层细胞通透性及ZO-1表达的影响

A: GAD67过表达对RPE单层细胞通透性及ZO-1蛋白表达的影响; B: GABA-T过表达的影响; C: GAT-2过表达的影响。GABA(-):培养基不加GABA;GABA(+):培养基中加入100 μg/mL GABA。

Figure 4 Effects of GAD67, GABA-T or GAT-2 overexpression on RPE monolayer permeability and ZO-1 expression

A: Effect of GAD67 overexpression on RPE monolayer permeability and ZO-1 protein expression; B: Effect of GABA-T overexpression; C: Effect of GAT-2 overexpression. GABA(-): no exogenous GABA in the medium; GABA(+): 100 μg/mL GABA added to the medium.

在缺氧条件下,与空载体对照组相比,低氧 GAD67、GABA-T 或 GAT-2 过表达组中均未显著改善缺氧引起的 ZO-1 水平降低 ( $F_{\text{GAD67}} = 6.409$ ,  $F_{\text{GABA-T}} = 9.937$ ,  $F_{\text{GAT-2}} = 8.333$ ,  $P$  均  $>0.05$ ), 见图 4A~C。

### 3 讨 论

有研究表明,GABA 不仅是中枢神经系统的主要抑制性神经递质,还参与非神经元细胞的生理调控,如离子稳态、代谢调节及屏障维持等<sup>[21-23]</sup>。在鸡或小鼠的 RPE 细胞中,已有报道发现 GABA 部分代谢相关酶和转运体的表达<sup>[24-25]</sup>,但其在人 RPE 细胞中的分布特征及其功能仍缺乏系统性研究。

本研究在成人 RPE 细胞中检测到与 GABA 能相关关键分子 GAD67、GABA-T 和 GAT-2 的表达,提示 RPE 具备持续合成、催化代谢及调节细胞内外 GABA 的能力。视网膜缺氧或灌注不足视网膜缺氧或灌注不足是破坏血-视网膜屏障、加速疾病进展的重要因素<sup>[7,26-27]</sup>。本研究结果显示,在缺氧条件下 RPE 中的 GAD67、GABA-T 及 GAT-2 蛋白表达下降,并伴随 RPE 单层细胞通透性的增加和紧密连接蛋白 ZO-1 表达的降低,提示 GABA 能相关分子可能在 RPE 屏障功能中发挥作用。

为进一步明确 GAD67、GABA-T 及 GAT-2 蛋白在 RPE 细胞屏障中的作用,本研究采用腺病毒载体对其在 RPE 细胞中的表达进行调控,结果显示,在缺氧条件下过表达 GAD67 或 GABA-T 可部分逆转 RPE 细胞通透性的增加,表明增强 GABA 合成或代谢有助于维持屏障的完整性。而单独上调 GAT-2 在无外源 GABA 补充时并未产生显著的保护作用;其屏障保护效应仅在补充外源 GABA 后方能显现。这一现象提示,GAT-2 转运功能可能受能量代谢或膜电位等条件限制,需在底物充足的条件下才能充分发挥作用。该特性不同于神经元中依赖囊泡 GABA 转运体(VGAT)的递质释放机制<sup>[11]</sup>,从而揭示了 RPE 细胞通过调控局部 GABA 合成与膜转运以维持自身功能稳定的独特途径。

ZO-1 是构成细胞紧密连接的关键结构蛋白,其表达水平的下降通常反映了细胞间连接受损,并伴随屏障功能减弱。为探究 GABA 能系统在 RPE 细胞屏障功能中的具体作用机制,本研究进一步检测了紧密连接蛋白 ZO-1 的表达变化。结果显示,GAD67、GABA-T 或 GAT-2 并未引起 ZO-1 总蛋白水平的显著改变,提示 GABA 能系统对 RPE 屏障的保护作用并非通过调控 ZO-1 的表达量实现,而

可能依赖其他机制:①调节 ZO-1 在细胞膜连接处的定位分布或与细胞骨架的相互作用,改善紧密连接的结构完整性<sup>[28-29]</sup>;②影响其他紧密连接蛋白(如 claudin、occludin)或黏附连接分子的表达、构象与功能<sup>[30-32]</sup>;③通过调节细胞代谢、钙稳态或相关信号转导通路(如 cAMP/PKA、Rho/ROCK)间接增强连接稳定性<sup>[33-34]</sup>。后续研究将结合免疫荧光共定位、细胞骨架成像及信号通路干预实验,进一步揭示其具体分子机制。

综上所述,本研究系统的阐释了 GABA 能系统关键分子(GAD67、GABA-T 与 GAT-2)在抵抗缺氧性 RPE 屏障损伤中的保护作用,并揭示了其作用机制独立于 ZO-1 蛋白表达水平。该发现为深入研究 GABA 能系统在视网膜缺氧相关疾病中的作用提供了实验基础,为开发针对视网膜缺氧相关疾病的干预策略提供了潜在的靶点。

### 参考文献:

- [1] Hellinen L, Sato K, Reinisalo M, et al. Quantitative protein expression in the human retinal pigment epithelium; comparison between apical and basolateral plasma membranes with emphasis on transporters[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2019, 60(15): 5022-5034.
- [2] Yang S, Yu F, Yang ML, et al. CYLD maintains retinal homeostasis by deubiquitinating ENKD1 and promoting the phagocytosis of photoreceptor outer segments[J]. Adv Sci, 2024, 11(45): 2404067.
- [3] Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function[J]. Physiol Rev, 2005, 85(3): 845-881.
- [4] Rizzolo LJ, Peng SM, Luo Y, et al. Integration of tight junctions and claudins with the barrier functions of the retinal pigment epithelium [J]. Prog Retin Eye Res, 2011, 30(5): 296-323.
- [5] Yang S, Zhou J, Li DW. Functions and diseases of the retinal pigment epithelium [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 727870. doi: 10.3389/fphar.2021.727870.
- [6] Wong JHC, Ma JYW, Jobling AI, et al. Exploring the pathogenesis of age-related macular degeneration: a review of the interplay between retinal pigment epithelium dysfunction and the innate immune system [J]. Front Neurosci, 2022, 16: 1009599. doi: 10.3389/fnins.2022.1009599
- [7] Xu HZ, Le YZ. Significance of outer blood-retina barrier breakdown in diabetes and ischemia[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(5): 2160-2164.
- [8] Zhang QL, Zhu L, Li HL, et al. Insights and progress on the biosynthesis, metabolism, and physiological functions of gamma-aminobutyric acid (GABA): a review [J]. PeerJ, 2024 12:18712. doi: 10.7717/peerj.18712
- [9] Soghomonian JJ, Martin DL. Two isoforms of glutamate

- decarboxylase: why? [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 1998, 19(12): 500-505.
- [10] Le HV, Hawker DD, Wu R, et al. Design and mechanism of tetrahydrothiophene-based  $\gamma$ -aminobutyric acid aminotransferase inactivators [J]. *J Am Chem Soc*, 2015, 137(13): 4525-4533.
- [11] McIntire SL, Reimer RJ, Schuske K, et al. Identification and characterization of the vesicular GABA transporter[J]. *Nature*, 1997, 389(6653): 870-876.
- [12] Conti F, Minelli A, Melone M. GABA transporters in the mammalian cerebral cortex: localization, development and pathological implications[J]. *Brain Res Rev*, 2004, 45(3): 196-212.
- [13] Huang B, Mitchell CK, Redburn-Johnson DA. GABA and GABA (A) receptor antagonists alter developing cone photoreceptor development in neonatal rabbit retina [J]. *Vis Neurosci*, 2000, 17(6): 925-935.
- [14] Song YB, Slaughter MM. GABAB receptor feedback regulation of bipolar cell transmitter release[J]. *J Physiol*, 2010, 588(24): 4937-4949.
- [15] Zaidi S, Gallos G, Yim PD, et al. Functional expression of  $\gamma$ -amino butyric acid transporter 2 in human and guinea pig airway epithelium and smooth muscle [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 45(2): 332-339.
- [16] Li SY, Kumar T P, Joshee S, et al. Endothelial cell-derived GABA signaling modulates neuronal migration and postnatal behavior [J]. *Cell Res*, 2018, 28(2): 221-248.
- [17] Negri S, Scolari F, Vismara M, et al. GABAA and GABAB receptors mediate GABA-induced intracellular  $Ca^{2+}$  signals in human brain microvascular endothelial cells[J]. *Cells*, 2022, 11(23): 3860.
- [18] Henning Y, Blind US, Larafa S, et al. Hypoxia aggravates ferroptosis in RPE cells by promoting the Fenton reaction[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13: 662. doi: 10.1038/s41419-022-05121-z
- [19] Zhu JM, Ding DM, Sun T, et al. Oridonin preserves retinal pigmented epithelial cell tight junctions and ameliorates choroidal neovascularization[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2025, 66(2): 56.
- [20] Kernt M, Thiele S, Liegl RG, et al. Axitinib modulates hypoxia-induced blood-retina barrier permeability and expression of growth factors[J]. *Growth Factors*, 2012, 30(1): 49-61.
- [21] 欧阳昌汉, 郭莲军, 吕青, 等.  $\gamma$ -氨基丁酸对急性不完全性全脑缺血大鼠脑组织氨基酸和钙离子含量的影响 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2004, 18(4): 248-252. OUYANG Changhan, GUO Lianjun, LV Qing, et al. Effects of  $\gamma$ -aminobutyric acid on amino acids and calcium levels in rat brain of acute incomplete global cerebral ischemia[J]. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2004, 18(4): 248-252.
- [22] 王庆胜, 曹杰, 袁莉.  $\gamma$ -氨基丁酸对代谢相关脂肪性肝病糖脂代谢紊乱的影响[J]. *中国医药导报*, 2025, 22(6): 25-31. WANG Qingsheng, CAO Jie, YUAN Li. Effect of gamma-aminobutyric acid on glucose and lipid metabolism in metabolism disorders in metabolism-related fatty liver disease [J]. *China Medical Herald*, 2025, 22(6): 25-31.
- [23] 蒋廷媛, 岳源, 李芳华.  $\gamma$ -氨基丁酸改善2,4,6-三硝基苯磺酸-乙醇诱导的结肠炎肠黏膜屏障损伤作用[J]. *医药导报*, 2018, 37(8): 931-938. JIANG Tingyuan, YUE Yuan, LI Fanghua. Improvement of Gamma-aminobutyric Acid on Intestinal Mucosal Barrier Injury of Colitis Induced by 2, 4, 6-trinitrobenzene Sulfonic Acid and Alcohol[J]. *Herald of Medicine*, 2018, 37(8): 931-938.
- [24] Cheng ZY, Wang XP, Schmid KL, Li, et al. Identification of GABA receptors in chick retinal pigment epithelium [J]. *Neurosci Lett*, 2013, 539: 43-47. doi: 10.1016/j.neulet.2013.01.038
- [25] Choi EH, Suh S, Einstein DE, et al. An inducible Cre mouse for studying roles of the RPE in retinal physiology and disease[J]. *JCI Insight*, 2021, 6(9): e146604.
- [26] 魏丹丹, 宋宇涵, 王淇, 等. 年龄相关性黄斑变性的研究进展[J]. *基础医学与临床*, 2024, 44(4): 553-557. WEI Dandan, SONG Yuhan, WANG Qi, et al. Research advances on the age-related macular degeneration [J]. *Basic and Clinical Medicine*, 2024, 44(4): 553-557.
- [27] 韦嘉仪, 王方. 视网膜色素上皮细胞间连接完整性的新认识[J]. *中华实验眼科杂志*, 2022, 40(7): 670-674. WEI Jiayi, WANG Fang. New insights into the integrity of intercellular junctions between retinal pigment epithelial cells[J]. *Chinese Journal of Experimental Ophthalmology*, 2022, 40(7): 670-674.
- [28] Fanning AS, Ma TY, Anderson JM. Isolation and functional characterization of the actin binding region in the tight junction protein ZO-1 [J]. *FASEB J*, 2002, 16(13): 1835-1837.
- [29] Itoh M, Furuse M, Morita K, et al. Direct binding of three tight junction-associated Maguks, Zo-1, Zo-2, and Zo-3, with the CooH termini of claudins[J]. *J Cell Biol*, 1999, 147(6): 1351-1363.
- [30] Furuse M, Hata M, Furuse K, et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier [J]. *J Cell Biol*, 2002, 156(6): 1099-1111.
- [31] Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability[J]. *J Cell Sci*, 2008, 121(13): 2115-2122.
- [32] Balda MS, Matter K. Tight junctions at a glance[J]. *J Cell Sci*, 2008, 121(22): 3677-3682.
- [33] Strauss RE, Gourdie RG. Cx43 and the actin cytoskeleton: novel roles and implications for cell-cell junction-based barrier function regulation [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(12): 1656.
- [34] Gündüz D, Aslam M, Krieger U, et al. Opposing effects of ATP and adenosine on barrier function of rat coronary microvasculature[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 52(5): 962-970.