

过表达 PGC-1 α 抑制高糖条件下小鼠视网膜感光细胞凋亡*

李朝辉, 张睿, 何俊文, 李祥芸, 吴建华 Δ

(武汉爱尔眼科医院眼底病科, 湖北 武汉 430063)

[摘要] **目的:** 探讨过表达过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子 1 α (PGC-1 α) 对高糖条件下视网膜感光细胞凋亡的影响及其相关机制。**方法:** 本研究建立小鼠视网膜感光细胞株 RGC-5 高糖模型, 将细胞分为 4 组: 正常组、高糖组、空载组和 PGC-1 α 过表达组。MTT 检测各组细胞的活力; Hoechst 33258 染色和流式细胞术检测各组细胞凋亡水平; Western blot 检测各组细胞 Bax、p53、Bcl-2、神经生长因子 (NGF)、血管内皮生长因子 (VEGF)、PGC-1 α 、线粒体转录因子 A (TFAM)、DNA 聚合酶 γ (POLG)、ATP 合酶 O 亚基 (ATP5O)、细胞色素 C 氧化酶 5b 亚基 (COX5b)、超氧化物歧化酶 (SOD) 1 和 SOD2 蛋白的表达量。**结果:** 与空载组相比, 过表达 PGC-1 α 组细胞的活力增强, 凋亡率降低, Bax 和 p53 蛋白的表达量显著降低, Bcl-2、NGF、VEGF、PGC-1 α 、TFAM、POLG、ATP5O、COX5b、SOD1 和 SOD2 蛋白的表达量显著升高 ($P < 0.05$)。**结论:** 过表达 PGC-1 α 可促进高糖条件下 RGC-5 细胞活力, 抑制其凋亡, 减轻氧化应激及线粒体损伤。

[关键词] 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子 1 α ; 糖尿病视网膜病变; 感光细胞; 氧化应激; 线粒体损伤

[中图分类号] R587.2; R363.2

[文献标志码] A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.06.011

Over-expression of PGC-1 α inhibits apoptosis of mouse retinal photoreceptor cells induced by high glucose

LI Zhao-hui, ZHANG Rui, HE Jun-wen, LI Xiang-yun, WU Jian-hua

(Department of Vitreous & Retinal Diseases, Wuhan Aier Eye Hospital, Wuhan 430063, China. E-mail: jhwuwh@vip.163.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the effect of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α) over-expression on high glucose-induced apoptosis of retinal photoreceptor cells and its related mechanisms. **METHODS:** The high glucose model of mouse retinal photoreceptor cell line RGC-5 was established. The cells were divided into 4 groups: normal group, high glucose group, empty vector group and PGC-1 α over-expression group. MTT assay was used to measure the viability of the RGC-5 cells in each group. Hoechst 33258 staining and flow cytometry were used to analyze the apoptosis. The protein expression levels of Bax, p53, Bcl-2, nerve growth factor (NGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), PGC-1 α , mitochondrial transcription factor A (TFAM), DNA polymerase gamma (POLG), ATP synthase subunit O (ATP5O), cytochrome C oxidase subunit 5b (COX5b), superoxide dismutase (SOD) 1 and SOD2 were determined by Western blot. **RESULTS:** Compared with empty vector group, over-expression of PGC-1 α enhanced the cell viability, decreased the apoptotic rate, and significantly decreased the protein expression of Bax and p53, but significantly increased the protein expression of Bcl-2, NGF, VEGF, PGC-1 α , TFAM, POLG, ATP5O, COX5b, SOD1 and SOD2 ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** Over-expression of PGC-1 α promotes the viability of RGC-5 cells treated with high glucose, inhibits the apoptosis, and attenuates the oxidative stress and mitochondrial damage.

[KEY WORDS] Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α ; Diabetic retinopathy; Photoreceptor cells; Oxidative stress; Mitochondrial damage

[收稿日期] 2018-08-23

[修回日期] 2018-11-21

* [基金项目] 湖北省卫计委基金资助项目 (No. WJ2017M204); 武汉市中青年医学骨干人才培养工程 (2017 年第 5 批)

 Δ 通讯作者 Tel: 027-68893839; E-mail: jhwuwh@vip.163.com

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 特有和常见的微血管并发症之一, 可使患者出现严重的视力损伤^[1]。目前认为 DR 患者在出现微血管系统病变前会出现神经组织损伤, 其病理特征主要表现为神经元凋亡、内层视网膜变薄及神经胶质细胞异常活跃等^[2]。DR 的发生发展是一个错综复杂的过程, 目前认为 DR 的发病机制与高血糖、细胞凋亡、多元醇代谢异常、氧化应激、线粒体损伤、细胞因子及自由基作用等多种因素相关, 且细胞凋亡是糖尿病大鼠视网膜神经元损害的主要形式^[3-4]。由于神经组织损伤后的再生能力较差, 因此, 研究神经保护在 DR 治疗中的作用具有重要意义。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子 1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α , PGC-1 α) 是一种强有力的线粒体和氧化代谢调节酶, 已有研究证明它和视网膜血管的发生以及缺血状态时新生血管的形成密切相关^[5]。基于 PGC-1 α 在新陈代谢和线粒体氧化作用中的关键作用, 我们猜想 PGC-1 α 在糖尿病视网膜病变早期视网膜感光细胞的凋亡中也扮演着重要的角色。本研究在视网膜感光细胞中过表达 PGC-1 α , 探讨其对视网膜感光细胞凋亡的影响, 为 DR 中神经元的保护提供一种新的思路。

材 料 和 方 法

1 实验材料

小鼠视网膜感光细胞株 RGC-5 购自武汉华联科生物技术有限公司。高糖 DMEM 培养基、普通 DMEM 培养基和胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 均购自 Gibco; Annexin V-FITC/PI 试剂盒购自 BD; 0.125% 胰蛋白酶、Hoechst 33258、PBS 及兔抗 GAPDH 单克隆抗体和羊抗兔多克隆抗体均购自 Bioswamp; 兔抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 单克隆抗体、兔抗神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 多克隆抗体、兔抗 PGC-1 α 多克隆抗体、兔抗 Bel-2 多克隆抗体、兔抗 Bax 单克隆抗体、兔抗 p53 多克隆抗体、兔抗线粒体转录因子 A (mitochondrial transcription factor A, TFAM) 多克隆抗体、兔抗 DNA 聚合酶 γ (DNA polymerase gamma, POLG) 单克隆抗体、兔抗 ATP 合酶 O 亚基 (ATP synthase subunit O, ATP5O) 多克隆抗体、兔抗细胞色素 C 氧化酶 5b 亚基 (cytochrome C oxidase subunit 5b, COX5b) 单克隆抗体、兔抗超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 1 多克隆抗体和兔抗 SOD2 单

克隆抗体均购自 Abcam。

2 方法

2.1 细胞培养和处理 用含 10% FBS 的普通 DMEM 培养 RGC-5 细胞, 细胞贴壁生长且密度达到 90% 后用 0.125% 胰蛋白酶消化, 取传代后对数生长期的细胞用含不同浓度 (10 mmol/L、15 mmol/L、20 mmol/L、25 mmol/L 和 30 mmol/L) 葡萄糖、无 FBS 的 DMEM 培养基培养细胞 24 h、48 h 和 72 h, 采用 MTT 法检测细胞在不同浓度葡萄糖与不同作用时间条件下的活力, 通过绘制浓度-时间生长曲线, 选择最佳的葡萄糖浓度与时点, 建立 RGC-5 细胞高糖模型。

2.2 载体构建 根据 GenBank 中小鼠 PGC-1 α 的基因序列 (NM_008904), 采用 Primer 5 软件设计引物, 上游引物序列为 5'-CTAGCTAGCATGGCTTGGG-CATGTGC-3', 下游引物序列为 5'-CCGCTCGAGT-TACCTGCGCAAGCTTCTC-3', 分别在引物的 5' 端添加 Xho I 和 Nhe I 的酶切位点, 引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。反应条件为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 45 s, 54 °C 30 s, 72 °C 60 s, 共 31 个循环; 72 °C 再延伸 5 min。扩增产物凝胶回收后, 与真核表达质粒 pcDNA-3.1 分别进行 Xho I 和 Nhe I 双酶切, T4 DNA 连接酶连接构建重组质粒 pcDNA-3.1-PGC-1 α , 并转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 挑取阳性克隆, PCR 初步鉴定, 确定阳性质粒。

2.3 实验分组 取传代后处于对数生长期的细胞分为正常 (normal) 组、高糖 (high glucose, HG) 组、空载 (empty vector, EV) 组和 PGC-1 α 过表达 (PGC-1 α) 组, 处理方法如下: 正常组细胞使用普通 DMEM 培养基处理; 高糖组、空载组和过表达 PGC-1 α 组细胞使用最佳葡萄糖浓度的 DMEM 培养基处理; 空载组细胞转染空载体; PGC-1 α 过表达组细胞转染 pcDNA-3.1-PGC-1 α 重组质粒。

2.4 MTT 实验检测细胞活力 将处于对数生长期的各组细胞分别接种于 96 孔板中 (每孔 1×10^6 个细胞), 每孔 100 μ L, 每组设 3 个复孔。各组细胞分别于培养 24 h 后, 每孔加入 20 μ L MTT 溶液, 继续培养 3 ~ 6 h, 每孔加入 100 μ L 甲臞溶解液孵育, 在酶标仪上测定各孔吸光度 (A) 值, 同一时点的 A 值取其 3 个复孔的平均值。

2.5 Hoechst 33258 染色 分别收集各组细胞于 6 孔培养板中培养 24 h, 小心吸出培养基, 4% 多聚甲醛室温固定 10 min, 弃上清后于 PBS 中保存玻片。用 0.2% 的 TritonX-100 通透 20 ~ 30 min 后弃去培养液, 用 PBS 洗涤玻片 3 次, 加入 Hoechst 33258 染料,

在含 5% CO₂ 的培养箱中 37 °C 避光染色 10 min,再用 PBS 避光洗涤玻片 3 次,干燥,封片,荧光显微镜观察,拍照保存。

2.6 流式细胞术检测各组细胞凋亡情况 将各组细胞分别接种在 6 孔培养板中培养 24 h,弃去培养基并加入 0.125% 的胰蛋白酶消化,收集各组细胞,PBS 洗涤 2 次后用 PBS 重悬细胞,加入 5 μL Annexin V-FITC 染色液避光孵育 10 min,再次离心并用 PBS 重悬细胞,加入 5 μL PI 染色液,利用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。

2.7 Western blot 实验 采用 RIPA 法提取细胞总蛋白,BCA 法进行蛋白定量。12% SDS-PAGE 分离目的蛋白,湿转至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,加入 I 抗 4 °C 孵育过夜,PBST 冲洗 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的特异性 II 抗,室温孵育 1 h,PBST 冲洗 3 次,ECL 试剂盒显影曝光。

3 统计学分析

本研究采用 SPSS 19.0 统计分析软件进行数据处理,实验数据以均数 ± 标准差 (mean ± SD) 表示,采用单因素方差分析进行多组间差异的比较,各组均数间两两比较采用 SNK-*q* 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1 MTT 法筛选最佳葡萄糖浓度与作用时间

采用 10、15、20、25 和 30 mmol/L 浓度的葡萄糖处理细胞 24 h、48 h 和 72 h 后,MTT 法检测结果(图 1)显示,不同浓度的葡萄糖处理细胞 24 h,对细胞活力的影响较小,因此选择 24 h 作为最佳作用时间。随着葡萄糖浓度的上升,细胞活力逐渐减弱,说明葡萄糖可抑制 RGC-5 细胞增殖,根据抑制程度,选择 20 mmol/L 葡萄糖作为最佳浓度。

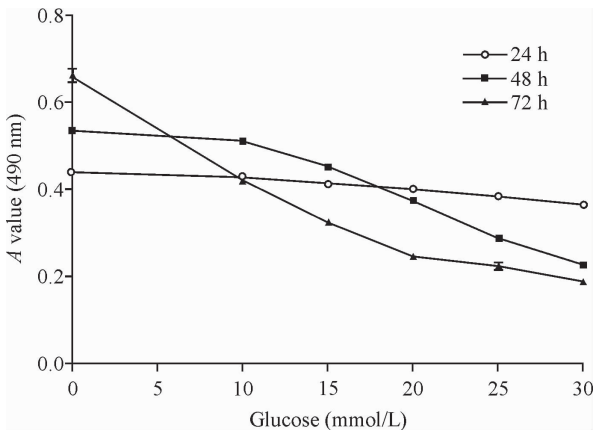


Figure 1. Screening of glucose concentration and action time by MTT assay. Mean ± SD. $n = 3$.

图 1 MTT 法筛选最佳葡萄糖浓度与作用时间

2 过表达 PGC-1 α 促进高糖刺激 RGC-5 细胞的活力

与正常组相比,高糖组细胞的活力显著减弱 ($P < 0.05$);空载组和高糖组细胞活力之间的差异无统计学显著性 ($P > 0.05$);与空载组相比,PGC-1 α 过表达组细胞的活力显著增强 ($P < 0.05$),见图 2。

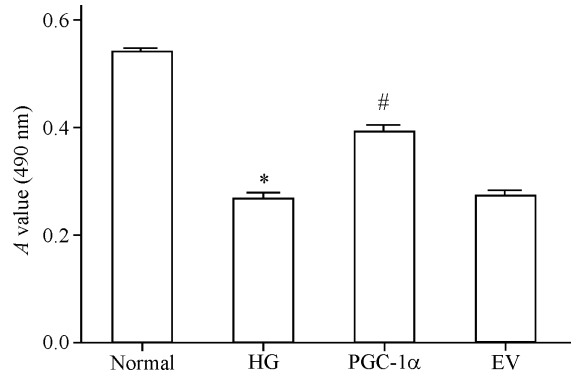


Figure 2. The cell viability was measured by MTT assay. Mean ± SD. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs normal group; # $P < 0.05$ vs EV group.

图 2 MTT 法检测细胞活力

3 过表达 PGC-1 α 抑制高糖刺激的 RGC-5 细胞凋亡

Hoechst 33258 染色和流式细胞术检测凋亡结果显示,正常组细胞核呈现椭圆形或圆形,其染色质呈较均匀蓝色,凋亡细胞较少;但高糖组和空载组凋亡细胞较多,且凋亡细胞核呈分叶状或点状,其染色质发生凝集并呈亮蓝色;PGC-1 α 过表达组凋亡细胞少于空载组,见图 3A。

流式细胞术检测结果表明,高糖组和空载组细胞凋亡率较正常组显著增高 ($P < 0.05$),PGC-1 α 过表达组细胞凋亡率较空载组显著降低 ($P < 0.05$),但仍高于正常组 ($P < 0.05$),见图 3B。

Western blot 检测结果显示,与正常组相比,高糖组和空载组细胞 Bax 和 p53 蛋白的表达量显著升高 ($P < 0.05$),Bcl-2 蛋白的表达量显著降低 ($P < 0.05$);与空载组相比,PGC-1 α 过表达组细胞 Bax 和 p53 蛋白的表达量显著降低 ($P < 0.05$),Bcl-2 蛋白的表达量显著升高 ($P < 0.05$),见图 4。

4 过表达 PGC-1 α 对高糖刺激的 RGC-5 细胞氧化应激的影响

Western blot 检测结果显示,与正常组相比,高糖组和空载组细胞 NGF、VEGF、PGC-1 α 、TFAM、POLG、ATP5O、COX5b、SOD1 和 SOD2 蛋白的表达量显著降低 ($P < 0.05$);与空载组相比,PGC-1 α 过表达组细胞 NGF、VEGF、PGC-1 α 、TFAM、POLG、ATP5O、COX5b、SOD1 和 SOD2 蛋白的表达量显著升高 ($P < 0.05$),见图 5。

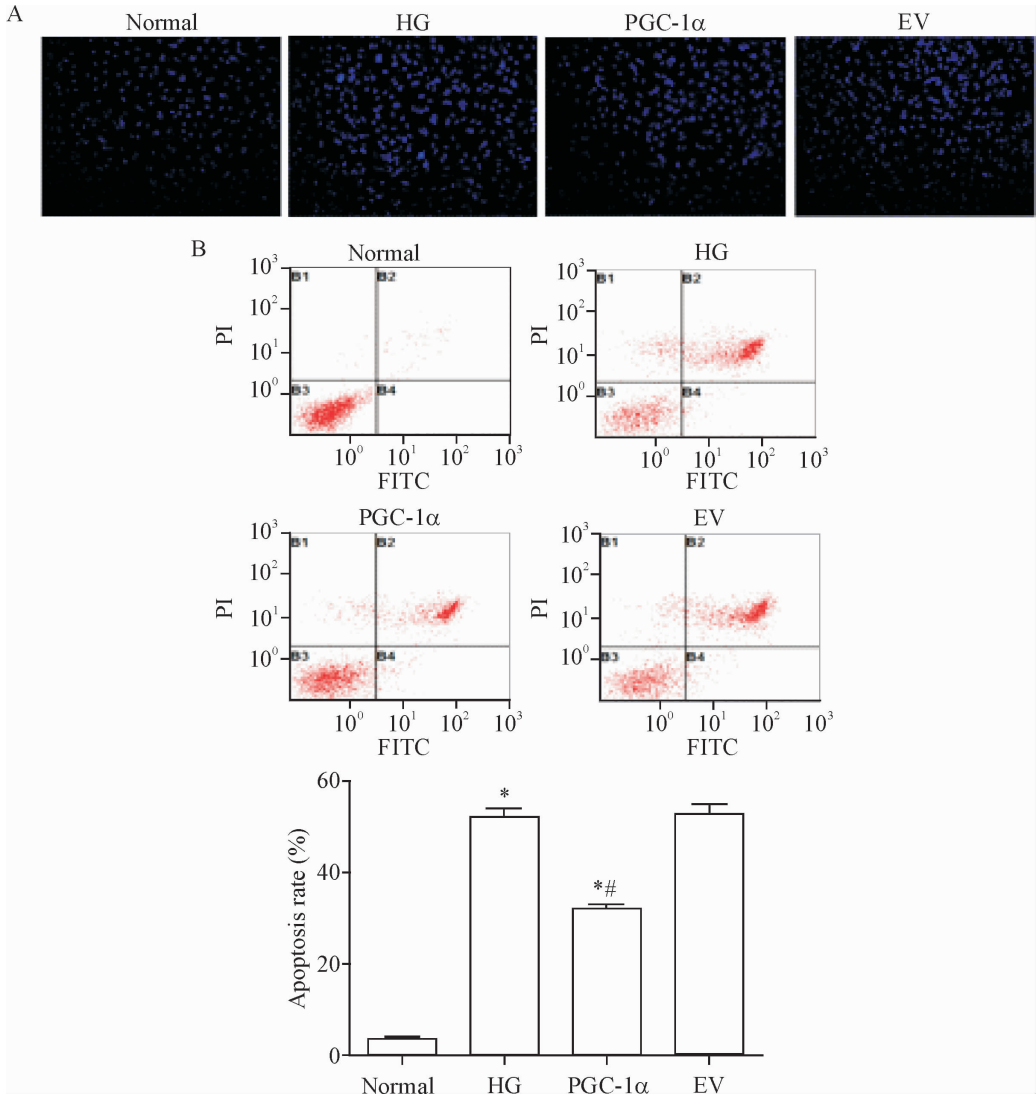


Figure 3. Over-expression of PGC-1α inhibited apoptosis. A; the apoptosis was detected by Hoechst 33258 staining (×200); B; the apoptosis rate was analyzed by flow cytometry. Mean ± SD. *n* = 3. **P* < 0.05 vs normal group; #*P* < 0.05 vs EV group.

图3 过表达 PGC-1α 抑制细胞凋亡

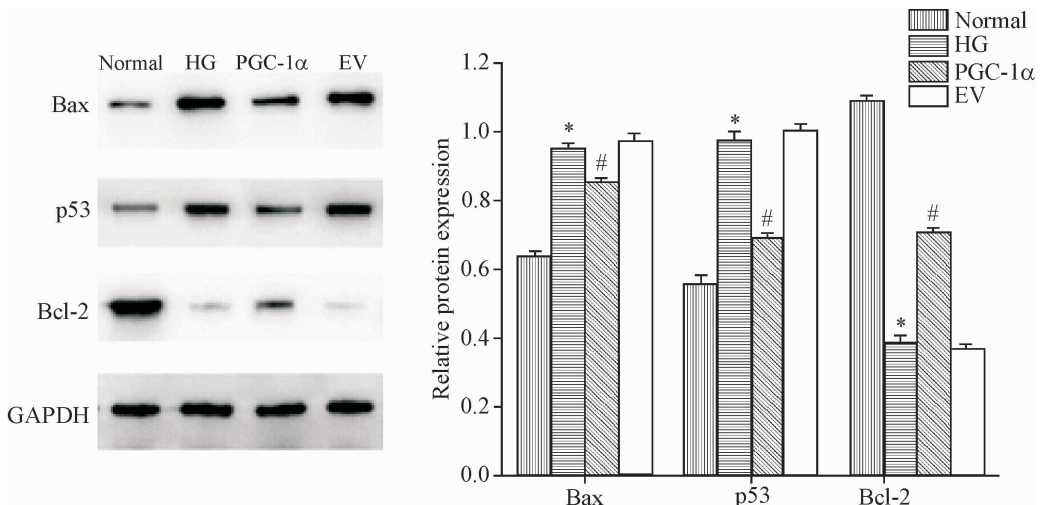


Figure 4. The expression of apoptosis-related proteins. Mean ± SD. *n* = 3. **P* < 0.05 vs normal group; #*P* < 0.05 vs EV group.

图4 凋亡相关蛋白表达的变化

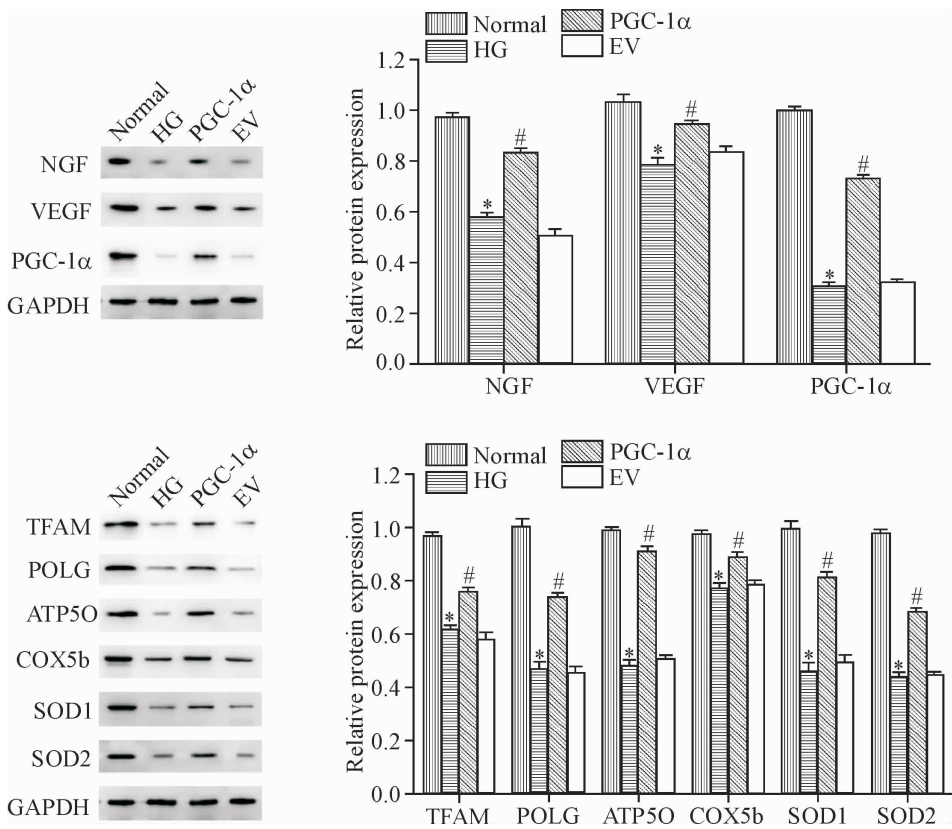


Figure 5. The effects of PGC-1α over-expression on oxidative stress of RGC-5 cells. Mean ± SD. *n* = 3. * *P* < 0.05 vs normal group; # *P* < 0.05 vs EV group.

图5 过表达 PGC-1α 对高糖模型 RGC-5 细胞氧化应激的影响

讨 论

DR 是糖尿病引发的一系列眼内并发症,是成年人致盲的重要原因之一,其具体发病机制尚未完全阐明。视网膜神经节细胞对高血糖介导的细胞凋亡具有高度敏感性,而视网膜感光细胞也是 DR 所致凋亡的主要细胞类型之一^[6]。研究发现,在糖尿病动物模型中感光细胞凋亡增加^[7];在糖尿病患者中也扫描出光感受器层变薄现象^[8]。感光细胞在 DR 早期的发展过程中发挥着被以往研究忽略了的重要作用^[9]。

PGC-1α 是一种强有力的线粒体和氧化代谢调节酶,在多种组织中均有表达。已经有研究证明它和视网膜血管的发生以及缺血状态时新生血管的形成密切相关^[10]。此外,PGC-1α 激酶还与光损伤下的光感受器存活相关^[11]。耿慧霞等^[12]的研究显示 PGC-1α 过表达可抑制氧糖剥夺/复氧诱导的神经元凋亡,抑制 ROS 的产生,促进线粒体生成和维护线粒体功能。有研究发现,高糖诱导的体外足细胞模型中 PGC-1α 表达显著下调,而 PGC-1α 表达下调导致细胞凋亡^[13]。但 PGC-1α 对视网膜感光细胞的作用

我们知之甚少。本研究结果表明过表达 PGC-1α 增强高糖模型 RGC-5 细胞的活力,抑制细胞凋亡,表明 PGC-1α 参与视网膜感光神经元病变,过表达 PGC-1α 可能是遏制 DR 恶化的关键靶点。NGF 的生物学作用非常广泛,其参与视网膜细胞的分化、生长以及死亡,内源性 NGF 可沿轴突逆行至神经元发挥作用,也可以通过轴突顺行转运影响其远端的靶细胞,视网膜是高度分化的神经胶质细胞,对感光细胞、双极细胞及神经节细胞等起到营养、支持、绝缘和保护作用^[14]。氧化应激损伤、ROS 过度堆积、内源性抗氧化系统紊乱以及线粒体损伤是导致糖尿病引起视网膜病变的重要原因^[15]。TFAM 参与线粒体基因的表达、维持 mtDNA 的完整性以及 mtDNA 损伤的修复过程^[16]。POLG 是迄今为止在线粒体中发现的唯一一种 DNA 聚合酶,它在 mtDNA 复制与修复过程中扮演着重要的角色^[17]。线粒体参与多种生物学功能,可调节细胞增殖与凋亡。糖尿病可通过氧化应激损伤线粒体 DNA 及线粒体抗氧化防御系统^[18]。杜月光等^[19]研究发现,中药治疗促进糖尿病大鼠 PGC-1α 表达,降低了 MDA 含量,提高了 SOD 活性,从而减轻胰岛素抵抗、氧化应激及炎症反应。本研究结果也

显示过表达 PGC-1 α 可提高高糖模型 RGC-5 细胞 NGF、VEGF、TFAM、POLG、ATP5O、COX5b、SOD1 和 SOD2 蛋白的表达量,即过表达 PGC-1 α 可对抗糖尿病引起的过氧化物堆积,减轻氧化应激及线粒体损伤,有效减缓 DR 的发展。

综上所述,过表达 PGC-1 α 可提高高糖模型 RGC-5 细胞的活力,抑制其凋亡,减轻氧化应激及线粒体损伤,从而减缓 DR 的发展。

[参 考 文 献]

[1] Simó R, Hernández C. Novel approaches for treating diabetic retinopathy based on recent pathogenic evidence[J]. *Prog Retinal Eye Res*, 2015, 48:160-180.

[2] Hernández C, Monte MD, Simó R, et al. Neuroprotection as a therapeutic target for diabetic retinopathy[J]. *J Diabetes Res*, 2016, 2016:9508541.

[3] 张凤俊, 易敬林, 李晶明, 等. 糖尿病视网膜病变发病机制研究进展[J]. *眼科新进展*, 2016, 36(6):584-587.

[4] Simó R, Hernández C. Neurodegeneration is an early event in diabetic retinopathy: therapeutic implications[J]. *Br J Ophthalmol*, 2012, 96(10):1285-1290.

[5] 李东洁, 吴迪, 张旭乡. 糖尿病视网膜神经节细胞损伤的研究进展[J]. *国际眼科杂志*, 2016, 16(4):670-672.

[6] Arroba AI, Mazzeo A, Cazzoni D, et al. Somatostatin protects photoreceptor cells against high glucose-induced apoptosis[J]. *Mol Vis*, 2016, 22:1522-1531.

[7] Park SH, Park JW, Park SJ, et al. Apoptotic death of photoreceptors in the streptozotocin-induced diabetic rat retina[J]. *Diabetologia*, 2003, 46(9):1260-1268.

[8] Boynton GE, Stem MS, Kwark L, et al. Multimodal characterization of proliferative diabetic retinopathy reveals alterations in outer retinal function and structure[J]. *Ophthalmology*, 2015, 122(5):957-967.

[9] Du Y, Veenstra A, Palczewski K, et al. Photoreceptor

cells are major contributors to diabetes-induced oxidative stress and local inflammation in the retina[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(41):16586-16591.

[10] Kelly DP, Scarpulla RC. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function[J]. *Genes Dev*, 2004, 18(4):357-368.

[11] Egger A, Samardzija M, Sothilingam V, et al. PGC-1 α determines light damage susceptibility of the murine retina[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2):e31272.

[12] 耿慧霞, 李莺歌, 石贞玉, 等. PGC-1 α 过表达逆转 OGD/R 诱导的神经元线粒体功能降低和凋亡[J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(11):2078-2083.

[13] 陈恩平, 杜丽根, 邬银伟, 等. 高糖通过下调 PGC-1 α 激活 NFAT 并促进足细胞凋亡[J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(4):620-626.

[14] 李铮, 梁汇珉, 李赵伟, 等. 神经生长因子在糖尿病大鼠视网膜突触可塑性中的作用[J]. *眼科新进展*, 2017, 37(9):816-818.

[15] 岳嵩, 胡悦东, 王馨鹤, 等. 线粒体功能障碍及氧化应激与糖尿病视网膜病变关系的研究[J]. *国际眼科杂志*, 2014, 14(12):2176-2178.

[16] Mattingly KA, Ivanova MM, Riggs KA, et al. Estradiol stimulates transcription of nuclear respiratory factor-1 and increases mitochondrial biogenesis[J]. *Mol Endocrinol*, 2008, 22(3):609-622.

[17] Yakubovskaya E, Chen Z, Carrodegua JA, et al. Functional human mitochondrial DNA polymerase gamma forms a heterotrimer[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(1):374-382.

[18] Tien T, Zhang J, Muto T, et al. High glucose induces mitochondrial dysfunction in retinal Müller cells: implications for diabetic retinopathy[J]. *Invest Ophthalmol Visual Sci*, 2017, 58(7):2915-2921.

[19] 杜月光, 陈伟燕, 姜雪尔, 等. 糖肾方对糖尿病肝损伤和肝组织中 SIRT1 和 PGC-1 α 表达的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(4):711-716.

(责任编辑: 卢萍, 罗森)