

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.03.001

View this article at: <https://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2022.03.001>

· 论著 ·

沉默 E2F1 对高糖诱导视网膜神经节细胞的保护作用

雷永华¹, 刘俊保¹, 徐蓉娟², 李红², 郑志攀¹, 陈原邻¹, 杨明¹

(1. 河南省人民医院中医科, 郑州大学人民医院, 河南大学临床医学院, 郑州 450003;

2. 上海中医药大学附属龙华医院内分泌科, 上海 200032)

[摘要] 目的: 探讨E2F1对高糖诱导的视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)存活和凋亡的影响及其作用机制。方法: 以RGC-5细胞为研究对象, 构建高糖损伤模型, 将RGC-5细胞转染后分为空白对照组、高糖组、高糖+si-E2F1组、高糖+si-con组、高糖+si-E2F1+PBS组、高糖+si-E2F1+SD19组。分别采用实时荧光定量PCR(real-time RT-PCR)与蛋白质印迹法检测细胞中E2F1 mRNA表达; 四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)检测细胞存活率, TUNEL法和流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测细胞凋亡。蛋白质印迹法检测细胞中E2F1、磷酸化的转录激活子3(p-signal transducer and activator of transcription 3, p-STAT3)、STAT3、磷酸化的Janus蛋白酪氨酸激酶2(p-Janus kinase 2, p-JAK2)、JAK2、活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3(cleaved caspase-3)和活化的多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶(cleaved poly-ADP-ribose polymerase, cleaved PARP)蛋白表达。结果: 与空白对照组相比, 高糖组RGC-5细胞中E2F1表达水平升高, 细胞存活率明显下降, p-STAT3、p-JAK2、cleaved caspase-3、cleaved PARP、E2F1表达及细胞凋亡率显著升高; 沉默E2F1表达后, 细胞存活率明显升高, 而cleaved caspase-3蛋白和cleaved PARP蛋白表达及细胞凋亡率降低。SD19可部分逆转沉默E2F1对RGC-5细胞的保护作用。结论: 抑制E2F1表达能够减轻高糖诱导的RGCs凋亡, 其机制可能与抑制JAK2/STAT3信号通路有关。

[关键词] 视网膜神经节细胞; 凋亡; 转录因子E2F1; 糖尿病

Protective effect of silencing E2F1 on retinal ganglion cells induced by high glucose

LEI Yonghua¹, LIU Junbao¹, XU Rongjuan², LI Hong², ZHENG Zhipan¹, CHEN Yuanlin¹, YANG Ming¹

(1. Department of Traditional Chinese Medicine, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou University People's Hospital, Henan University Clinical Medical College, Zhengzhou 450003; 2. Department of Endocrinology, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effect of E2F1 on the survival and apoptosis of retinal ganglion cells (RGCs) induced by high glucose and its mechanism. **Methods:** A high-glycemic injury model was constructed with.

收稿日期 (Date of reception): 2020-11-28

通信作者 (Corresponding author): 杨明, Email: hnsmyzyk@163.com

基金项目 (Foundation item): 国家自然科学基金 (81373617). This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81373617).

RGC-5 cells used as the research object. After transfection, RGC-5 cells were divided into a blank control group, a high-sugar group, a high-sugar + si-E2F1 group, a high-sugar + si-con group, a high glucose + si-E2F1 + PBS group, and a high glucose + si-E2F1 + SD19 group. Real-time RT-PCR and Western blotting were used to detect the expression of E2F1 mRNA in cells; methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) was used to detect cell viability; TUNEL and flow cytometry (FCM) were used to detect cell apoptosis. E2F1, p-signal transducer and activator of transcription 3 (p-STAT3), STAT3, p-Janus kinase 2 (p-JAK2), JAK2, cleaved caspase-3, and cleaved poly-ADP-ribose polymerase (cleaved PARP) protein expression in cells detected by Western blotting. **Results:** Compared with blank control group, E2F1 expression level increased in RGC-5 cells in the high glucose group, cell survival rate was significantly decreased, p-STAT3, p-JAK2, cleaved caspase-3, cleaved PARP, E2F1 expression, and apoptotic rate were increased. After silencing E2F1 expression, the cell survival rate was significantly increased, while cleaved caspase-3 protein expression, cleaved PARP protein expression, and apoptotic rate were decreased. SD19 partially reversed the protective effect of silencing E2F1 on RGC-5 cells. **Conclusion:** Inhibition of E2F1 expression can reduce high glucose-induced apoptosis in RGCs. The mechanism may be related to the inhibition of the JAK2/STAT3 signaling pathway.

Keywords retinal ganglion cells; apoptosis; transcription factor E2F1; diabetes

糖尿病是一个涉及多学科和多器官的代谢性疾病, 糖尿病性视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是其中一种常见的并发症, 是目前最主要的致盲眼病病因之一^[1]。视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)凋亡是DR早期的重要标志, 其可促进视网膜毛细血管发生改变, 最终导致视网膜微血管病变^[2-3]。转录因子E2F1是多种信号级联反应的下游效应因子, 参与DNA合成、细胞周期、细胞分化以及细胞凋亡, 在维持细胞稳态中具有重要作用^[4]。研究^[5]发现糖尿病患者肝脏中E2F1表达增加, E2F1高表达可促进糖异生升高血糖, 而E2F1表达缺失则抑制原代肝细胞的糖异生。糖尿病所致的血糖升高还可引起血管内皮损伤, 而抑制E2F1表达可减轻高糖所致的血管内皮细胞功能障碍^[6]。然而, E2F1表达异常是否与高糖所致RGCs损伤相关仍未可知。因此本研究通过构建高糖诱导的RGCs损伤模型, 分析E2F1表达与高糖处理RGCs损伤的关系, 以期对糖尿病并发症的预防和治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

RGC-5购自美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection, ATCC); 杜尔伯格氏伊戈尔培养基(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium,

MTT)与二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)均购自美国Sigma公司; 细胞裂解液与二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂均购自北京碧云天生物技术研究; 活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3(cleaved caspase-3)、E2F1多克隆抗体、活化的多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶(cleaved poly-ADP-ribose polymerase, cleaved PARP)多克隆抗体均购自美国Santa Cruz公司; 兔源Janus蛋白酪氨酸激酶2(Janus kinase 2, JAK2)多克隆抗体、磷酸化的JAK2抗体(p-JAK2)多克隆抗体、兔源信号转导和转录激活子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)单克隆抗体、兔源磷酸化的STAT3(p-STAT3)单克隆抗体和 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体购于美国Abcam公司; si-E2F1及阴性对照序列均购自上海吉玛制药技术有限公司; LipofectamineTM 2000转染试剂与实时荧光定量PCR(real-time RT-PCR)试剂盒均购自美国Invitrogen公司; 膜联蛋白V(Annexin V)-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)/碘化丙啶(propidium iodide, PI)凋亡检测试剂盒与双荧光素酶活性检测试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及模型制造

将RGC-5用含10% FBS的DMEM培养液, 放在恒温培养箱中培养, 待细胞呈正常增殖状态时, 将含有FBS的DMEM培养液更换为葡萄糖浓度为

50 mmol/L的培养基继续培养24、48、72 h, 然后收集细胞进行后续试验。

1.2.2 细胞转染

使用Lipofectamine™ 2000脂质体将高糖处理和转染si-con(高糖+si-con组)、高糖处理和转染si-E2F1(高糖+si-E2F1组)、高糖处理和转染si-E2F1加入PBS溶液(高糖+si-E2F1+PBS组)、高糖处理和转染si-E2F1加入SD19溶液(高糖+si-E2F1+SD19组), 转染至RGC-5细胞。转染成功后, 按照1.2.1方法制备高糖细胞模型, 成功后将各组细胞用于蛋白质印迹(Western blotting)实验、real-time RT-PCR实验、Annexin V-FITC/PI双染色法细胞凋亡检测实验、双荧光素酶报告基因检测实验。

1.2.3 蛋白质印迹实验

取适量对数生长期1.2.2各组细胞, 用放射免疫沉淀缓冲液(radioimmunoprecipitation assay, RIPA)裂解, 提取总蛋白质, BCA法进行蛋白质定量后变性, 进行蛋白质电泳, 再行聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)转膜, 封闭2 h, 然后用一抗, 4 ℃孵育过夜。次日, 洗膜后用辣根过氧化物酶标记的二抗37 ℃孵育2 h。结束后加入显影混合液, 显影曝光。以目的条带灰度值与 β -actin灰度值的比值表示目的蛋白E2F1、cleaved caspase-3、cleaved PARP的水平。

1.2.4 Real-time RT-PCR 实验

使用TRIzol试剂盒进行提取RGC-5细胞总RNA。cDNA合成: 根据反转录试剂盒说明书操作。E2F1引物序列: 正向引物5'-CATCCAGGAAAAGGTGTGAAATCC-3', 反向引物5'-CTGAAAGTTCTCCGAAGACTCCAC-3'。GAPDH引物序列: 正向引物5'-TGGTATCGTGGAAGGACTCATGAC-3', 反向引物5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC-3'; RT-PCR反应: 体系为SYBR Premix Ex Taq II(2 \times)10 μ L/孔, cDNA 2 μ L/孔, 正反向引物各0.8 μ L/孔, ROX Reference Dye(50 \times)0.4 μ L/孔, ddH₂O 6 μ L/孔; 反应条件为95 ℃ 5 min, 95 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s(35次循环)。反应结束后导出数据, 采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算miR-140-3p、E2F1 mRNA相对表达量。

1.2.5 MTT 法检测细胞增殖

收集各组对数生长期RGC-5细胞, 接种至96孔板, 每孔分别加入10 μ L质量分数为5 g/L的MTT试剂, 培养4 h后, 弃上清, 每孔再加入150 μ L的DMSO, 振荡10 min, 利用酶标仪检测各孔

在波长为490 nm处的吸光度值(optical density, OD), 细胞存活=(处理组吸光度值/对照组吸光度值) \times 100%。

1.2.6 Annexin V-FITC/PI 双染色法检测细胞凋亡

取适量对数生长期1.2.2各组细胞, 用预冷的PBS洗涤3次。另用结合缓冲液 500 μ L 悬浮细胞, 之后加入5 μ L的Annexin V-FITC和PI, 混匀, 室温避光静置15 min。细胞凋亡率采用流式细胞仪分析测定。细胞凋亡率=早期凋亡率+晚期凋亡率。

1.2.7 TUNEL 检测 RGC-5 细胞凋亡

按照TUNEL检测试剂盒说明书检测各组荧光强度。收集各组RGC-5细胞, 对细胞进行爬片和固定, 加入TUNEL检测液, 用抗荧光淬灭封片后使用荧光显微镜观察, 并使用Image J软件进行荧光分析。

1.3 统计学处理

实验所用数据均使用SPSS 21.0软件分析。计量资料符合正态分布用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两组比较采用 t 检验, 多组比较采用单因素方差分析, 两两比较采用SNK- q 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度葡萄糖诱导对 RGC-5 细胞 E2F1 表达的影响

与空白组比较, 高糖处理可显著促进E2F1 mRNA和E2F1蛋白的表达($P<0.05$), 48 h时差异最为显著(表1, 图1)。

2.2 沉默 E2F1 促进高糖诱导 RGC-5 细胞存活

与空白组比较, 高糖组细胞在24、48、72 h存活率显著降低($P<0.05$); 与高糖+si-con组比较, 高糖+si-E2F1组细胞E2F1蛋白表达降低($P<0.05$), 24、48、72 h时的存活率显著升高($P<0.05$, 表2)。

2.3 沉默 E2F1 抑制高糖诱导 RGC-5 细胞凋亡

与空白组相比, 高糖组RGC-5细胞E2F1蛋白表达升高($P<0.05$), 凋亡率显著升高($P<0.05$), cleaved caspase-3和cleaved PARP蛋白表达增加($P<0.05$); 与高糖+si-con组比较, 高糖+si-E2F1组RGC-5细胞E2F1蛋白表达降低($P<0.05$), 凋亡率显著下降($P<0.05$), cleaved caspase-3和cleaved PARP蛋白表达降低($P<0.05$; 表3, 图2)。

表1 高糖诱导对RGC-5细胞E2F1表达的影响($n=9$)Table 1 Effect of high glucose induction on E2F1 expression in RGC-5 cells ($n=9$)

| 组别 | E2F1 mRNA | | | E2F1蛋白 | | |
|----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 24 h | 48 h | 72 h | 24 h | 48 h | 72 h |
| 空白组 | 1.02 ± 0.04 | 1.05 ± 0.08 | 1.02 ± 0.05 | 0.18 ± 0.03 | 0.14 ± 0.03 | 0.12 ± 0.03 |
| 高糖组 | 2.21 ± 0.15* | 4.25 ± 0.27* | 3.32 ± 0.24* | 0.35 ± 0.06* | 0.55 ± 0.06* | 0.43 ± 0.06* |
| <i>t</i> | 22.996 | 34.091 | 25.128 | 7.603 | 18.336 | 13.864 |
| <i>P</i> | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

与空白组比较, * $P<0.05$ 。

Compared with the blank group, * $P<0.05$.

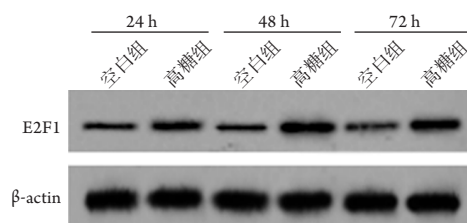


图1 蛋白质印迹法检测RGC-5细胞中E2F1蛋白表达

Figure 1 E2F1 protein expression in RGC-5 cells detected by Western blotting

表2 沉默E2F1对高糖诱导RGC-5细胞存活的影响($n=9$)Table 2 Effect of silencing E2F1 on the survival of RGC-5 cells induced by high glucose ($n=9$)

| 组别 | E2F1 | 细胞存活(相对于空白组)/% | | |
|-------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | 24 h | 48 h | 72 h |
| 空白组 | 0.15 ± 0.05 | 103.35 ± 3.25 | 97.34 ± 4.35 | 99.37 ± 2.67 |
| 高糖组 | 0.48 ± 0.06* | 73.26 ± 4.08* | 64.54 ± 3.46* | 58.22 ± 3.89* |
| 高糖+si-con组 | 0.51 ± 0.07 | 72.58 ± 4.37 | 62.21 ± 4.68 | 59.34 ± 3.27 |
| 高糖+si-E2F1组 | 0.32 ± 0.04 [#] | 81.64 ± 4.68 [#] | 85.64 ± 5.28 [#] | 82.97 ± 5.26 [#] |
| <i>F</i> | 78.571 | 108.915 | 128.161 | 234.416 |
| <i>P</i> | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

与空白组比较, * $P<0.05$; 与高糖+si-con组比较, [#] $P<0.05$ 。

Compared with the blank group, * $P<0.05$; compared with the high glucose + si-con group, [#] $P<0.05$.

表3 沉默E2F1对高糖诱导RGC-5细胞存活、细胞凋亡及cleaved caspase-3和cleaved PARP蛋白表达的影响($n=9$)Table 3 Effect of silencing E2F1 on the survival and apoptosis of high glucose-induced RGC-5 cells and the expression of cleaved caspase-3 and cleaved PARP proteins ($n=9$)

| 组别 | Cleaved caspase-3 | Cleaved PARP | FCM/% | TUNEL/% |
|-------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 空白组 | 0.15 ± 0.03 | 0.08 ± 0.01 | 5.07 ± 0.59 | 5.07 ± 0.85 |
| 高糖组 | 0.38 ± 0.04* | 0.41 ± 0.04* | 24.37 ± 3.66* | 43.87 ± 08.71* |
| 高糖+si-con组 | 0.34 ± 0.05 | 0.38 ± 0.05 | 23.64 ± 3.37 | 41.72 ± 7.64 |
| 高糖+si-E2F1组 | 0.23 ± 0.04 [#] | 0.17 ± 0.03 [#] | 14.46 ± 2.86 [#] | 13.93 ± 3.42 [#] |
| <i>F</i> | 59.818 | 182.118 | 89.109 | 92.408 |
| <i>P</i> | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

与空白组比较, * $P<0.05$; 与高糖+si-con组比较, [#] $P<0.05$ 。

Compared with the blank group, * $P<0.05$; compared with the high glucose + si-con group, [#] $P<0.05$.

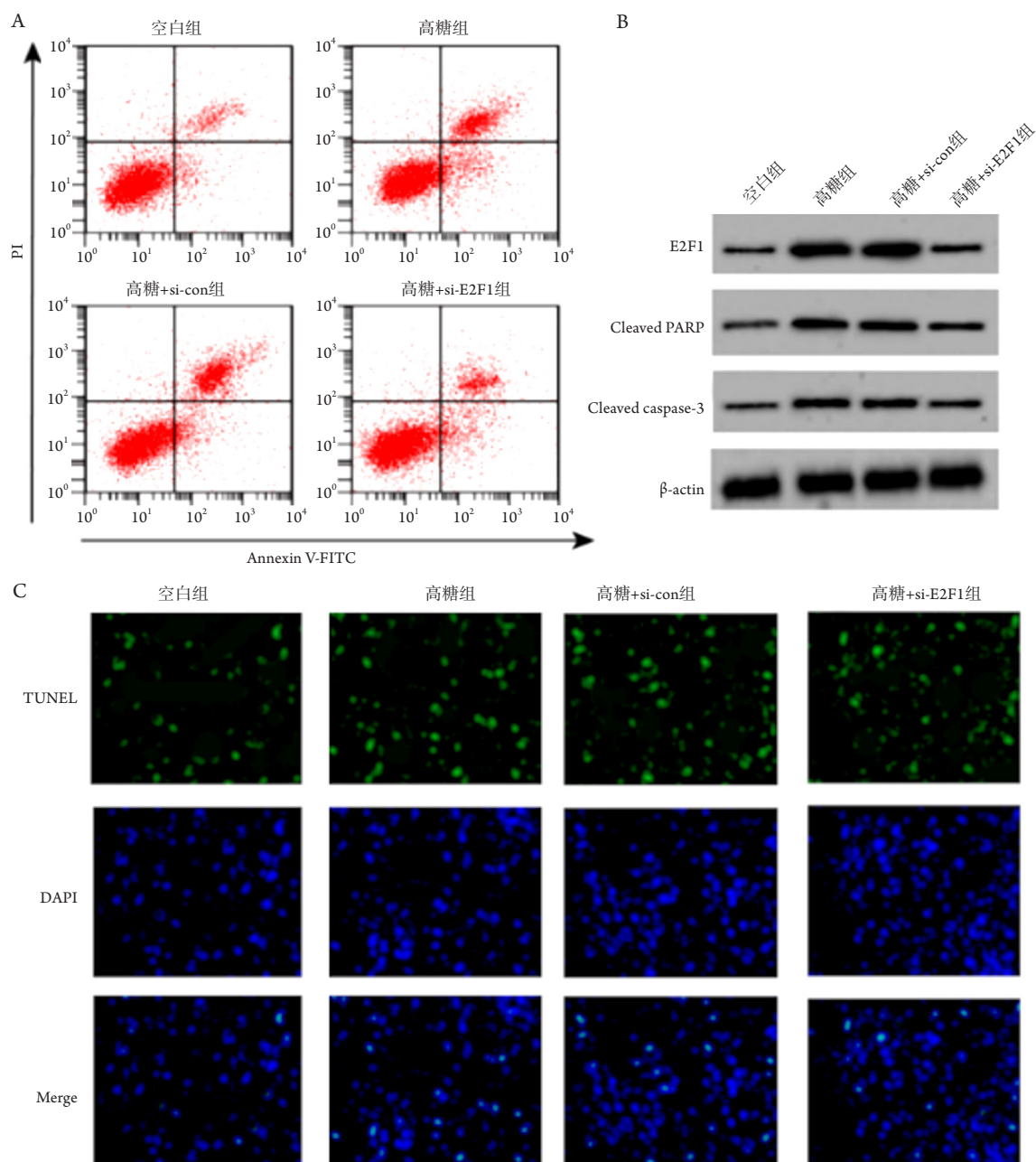


图2 沉默E2F1对RGC-5细胞凋亡和凋亡蛋白表达的影响

Figure 2 Effect of silencing E2F1 on RGC-5 cell apoptosis and the expression of apoptotic proteins

(A) 流式细胞术检测RGC-5细胞凋亡; (B) 蛋白质印迹法检测RGC-5细胞蛋白表达; (C) TUNEL检测RGC-5细胞凋亡。

(A) Flow cytometry to detect RGC-5 cell apoptosis; (B) Western blotting to detect RGC-5 cell protein expression; (C) TUNEL to detect RGC-5 cell apoptosis.

2.4 沉默 E2F1 对高糖诱导 RGC-5 细胞 JAK/STAT3 信号通路的影响

与空白组相比, 高糖组RGC-5细胞p-STAT3和p-JAK2蛋白表达增加($P < 0.05$), 而STAT3和JAK2蛋白表达无显著差异($P > 0.05$), p-STAT3/STAT3比值、p-JAK2/JAK2比值增大; 与高糖+si-con组比较, 高糖+si-E2F1组细胞p-STAT3和p-JAK2蛋白表

达降低($P < 0.05$), STAT3和JAK2蛋白表达无显著差异($P > 0.05$), p-STAT3/STAT3比值、p-JAK2/JAK2比值减小($P < 0.05$; 图3, 表4)。

2.5 JAK/STAT3 信号通路激活剂部分逆转沉默 E2F1 对 RGC-5 细胞的保护作用

与高糖+si-E2F1+PBS组比较, 高糖+si-

E2F1+SD19组细胞E2F1蛋白表达升高($P<0.05$), 在24、48、72 h存活率显著降低($P<0.05$); 细胞凋亡率显著升高($P<0.05$), cleaved caspase-3和cleaved PARP蛋白表达增加($P<0.05$); p-STAT3和

p-JAK2蛋白表达增加($P<0.05$), 而STAT3和JAK2蛋白表达无显著差异($P>0.05$), p-STAT3/STAT3比值、p-JAK2/JAK2比值增大($P<0.05$; 表5, 表6, 图4)。

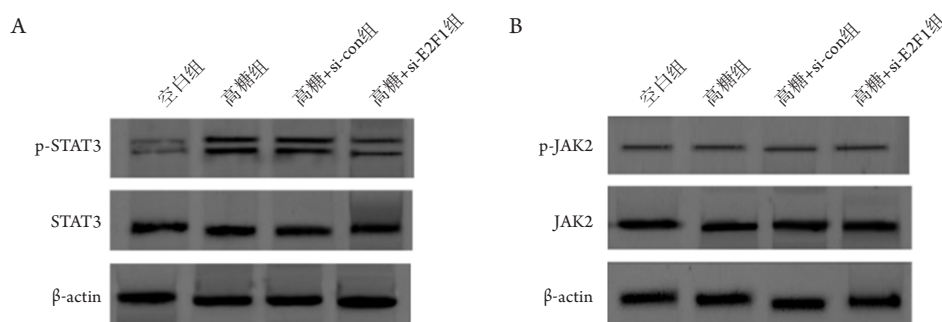


图3 沉默E2F1对RGC-5细胞STAT3信号通路的影响

Figure 3 Effect of silencing E2F1 on the STAT3 signaling pathway of RGC-5 cells

(A) 蛋白质印迹法检测RGC-5细胞p-STAT3和STAT3蛋白表达; (B) 蛋白质印迹法检测RGC-5细胞p-JAK2和JAK2蛋白表达。

(A) p-STAT3 and STAT3 protein expression in RGC-5 cells detected by Western blotting; (B) p-JAK2 and JAK2 protein expression in RGC-5 cells detected by Western blotting.

表4 沉默E2F1对高糖诱导RGC-5细胞p-STAT3、STAT3、p-JAK2和JAK2蛋白表达的影响($n=9$)

Table 4 Effect of silencing E2F1 on the expression of p-STAT3, STAT3, p-JAK2, and JAK2 in high glucose-induced RGC-5 cells ($n=9$)

| 组别 | p-STAT3 | STAT3 | p-STAT3/STAT3 | p-JAK2 | JAK2 | p-JAK2/JAK2 |
|-------------|--------------------------|-------------|--------------------------|--------------------------|-------------|--------------------------|
| 空白组 | 0.19 ± 0.02 | 0.76 ± 0.05 | 0.25 ± 0.03 | 0.26 ± 0.06 | 0.68 ± 0.05 | 0.38 ± 0.04 |
| 高糖组 | 0.46 ± 0.04* | 0.74 ± 0.07 | 0.62 ± 0.06* | 0.64 ± 0.07* | 0.63 ± 0.04 | 1.02 ± 0.07* |
| 高糖+si-con组 | 0.48 ± 0.06 | 0.79 ± 0.08 | 0.61 ± 0.05 | 0.64 ± 0.08 | 0.65 ± 0.05 | 0.98 ± 0.08 |
| 高糖+si-E2F1组 | 0.23 ± 0.04 [#] | 0.74 ± 0.06 | 0.31 ± 0.04 [#] | 0.41 ± 0.06 [#] | 0.64 ± 0.04 | 0.64 ± 0.05 [#] |
| F | 114.333 | 1.155 | 159.174 | 67.633 | 2.049 | 214.052 |
| P | <0.001 | 0.342 | <0.001 | <0.001 | 0.127 | <0.001 |

与空白组比较, * $P<0.05$; 与高糖+si-con组比较, [#] $P<0.05$ 。

Compared with the blank group, * $P<0.05$; compared with the high glucose + si-con group, [#] $P<0.05$.

表5 STAT3信号通路激活剂SD19和沉默E2F1对视网膜神经节细胞的影响($n=9$)

Table 5 Effects of STAT3 signaling pathway activator SD19 and silencing E2F1 on retinal ganglion cells ($n=9$)

| 组别 | E2F1 | 细胞存活(相对于空白组)/% | | | FCM/% | TUNEL/% |
|------------------|--------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | | 24 h | 48 h | 72 h | | |
| 高糖+si-E2F1+PBS组 | 0.28 ± 0.04 | 99.13 ± 4.84 | 102.51 ± 4.42 | 98.86 ± 3.84 | 14.22 ± 1.83 | 11.09 ± 2.13 |
| 高糖+si-E2F1+SD19组 | 0.45 ± 0.03* | 77.33 ± 5.36* | 69.27 ± 4.92* | 58.64 ± 4.36* | 21.49 ± 3.69* | 32.38 ± 4.34* |
| t | 10.200 | 9.056 | 15.032 | 20.768 | 5.295 | 13.211 |
| P | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

与高糖+si-E2F1+PBS组比较, * $P<0.05$ 。

Compared with high glucose + si-E2F1 + PBS group, * $P<0.05$.

表6 STAT3信号通路激活剂SD19和沉默E2F1对RGC-5细胞蛋白表达的影响(n=9)

Table 6 Effect of STAT3 signaling pathway activator SD19 and silencing E2F1 on protein expression in RGC-5 cells (n=9)

| 组别 | Cleaved PARP | Cleaved caspase-3 | p-STAT3 | STAT3 | p-STAT3/STAT3 | p-JAK2 | JAK2 | p-JAK2/JAK2 |
|------------------|--------------|-------------------|--------------|-------------|---------------|--------------|-------------|--------------|
| 高糖+si-E2F1+PBS组 | 0.18 ± 0.02 | 0.25 ± 0.03 | 0.19 ± 0.02 | 0.76 ± 0.05 | 0.25 ± 0.03 | 0.26 ± 0.06 | 0.68 ± 0.05 | 0.38 ± 0.04 |
| 高糖+si-E2F1+SD19组 | 0.29 ± 0.03* | 0.36 ± 0.04* | 0.46 ± 0.04* | 0.74 ± 0.07 | 0.62 ± 0.06* | 0.64 ± 0.07* | 0.64 ± 0.04 | 1.02 ± 0.07* |
| t | 9.153 | 6.600 | 18.112 | 0.697 | 16.547 | 12.365 | 1.874 | 23.815 |
| P | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | 0.079 | <0.001 |

与高糖+si-E2F1+PBS组比较, *P<0.05。

Compared with high glucose + si-E2F1 + PBS group, *P<0.05.

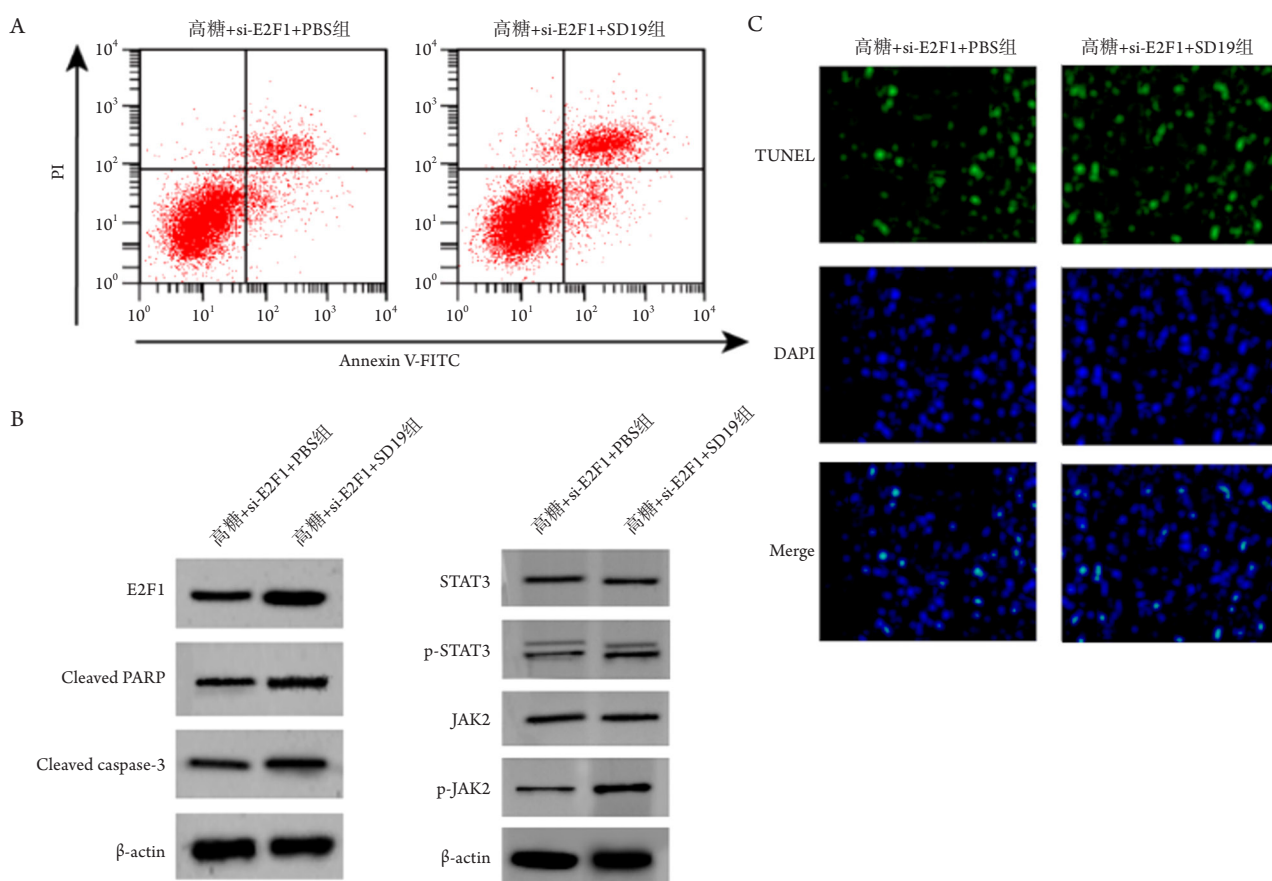


图4 STAT3信号通路激活剂SD19和沉默E2F1对RGC-5细胞凋亡和凋亡蛋白的影响

Figure 4 Effect of STAT3 signaling pathway activator SD19 and silencing E2F1 on apoptosis and apoptotic proteins of RGC-5 cells

(A) 流式细胞术检测RGC-5细胞凋亡; (B) 蛋白质印迹法检测RGC-5细胞蛋白表达; (C) TUNEL检测RGC-5细胞凋亡。

(A) Flow cytometry to detect RGC-5 cell apoptosis; (B) Western blotting to detect RGC-5 cell protein expression; (C) TUNEL to detect RGC-5 cell apoptosis.

3 讨论

DR是糖尿病患者常见的一种并发症, 其发病机制与视网膜血管微循环本身, 或者视网膜微血

管周围神经细胞组织的病变相关^[7]。糖尿病患者长期的 高糖微环境条件下, RGCs和神经胶质细胞对高糖环境更敏感, 高糖可造成RGCs和糖脂代谢紊乱^[7]。RGCs与DR的关系成为研究DR发病机制的

热点问题。

E2F1是已发现转录因子E2F家族中的成员之一,是细胞周期过程中由G₁期以及S期中至关重要的转录因子^[8]。E2F1基因可通过调控增殖相关蛋白的表达进行细胞周期调控,进一步影响细胞增殖和凋亡等一系列生理活动^[9]。Wang等^[10]研究发现E2F1介导高糖诱导的小鼠视网膜外植体神经元死亡,抑制E2F1表达可挽救高糖诱导的视网膜神经元异位分裂和细胞死亡。Yuan等^[6]指出在高糖诱导人血管内皮细胞损伤过程中E2F1表达上调,下调E2F1抑制雷帕霉素哺乳动物靶蛋白复合体1(mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1)介导的自噬和腺苷酸活化蛋白激酶 α 2(AMP-activated protein kinase, AMPK α 2)介导的凋亡可减轻高糖诱导的人血管内皮细胞功能障碍。本研究结果显示:高糖处理RGC-5细胞后E2F1表达水平显著升高,细胞存活率显著降低,凋亡率显著增加,提示E2F1表达改变可能与高糖诱导的RGC-5细胞损伤有关。转染si-E2F1后进行的功能分析显示:沉默E2F1表达显著增加RGC-5细胞存活率,减轻高糖诱导的RGC-5细胞凋亡。PARP是一种DNA修复酶,在凋亡信号刺激下PARP作为caspase-3切割底物失去酶活性,PARP剪切是细胞凋亡的重要指标^[11]。本研究中高糖刺激后RGC-5细胞中cleaved caspase-3和cleaved PARP蛋白表达明显增加,而沉默E2F1表达可逆转高糖诱导的cleaved caspase-3和cleaved PARP蛋白表达改变,这与沉默E2F1表达的抗凋亡作用一致。以上研究表明沉默E2F1表达对高糖诱导的RGC-5细胞损伤具有保护作用。

JAK/STAT3信号转导途径影响多种信号分子向核的信号转导,参与调控细胞分化、胚胎发育,并且广泛参与各种细胞存活、细胞周期、血管生成、细胞转移、免疫逃避、细胞凋亡等生物学过程^[12]。研究^[13]表明STAT3介导高血糖刺激的血管内皮细胞的凋亡、炎症和氧化应激损伤。联合抑制半胱氨酸天冬氨酸酶2基因(caspase-2, CASP2)和CASP6通过睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)介导的JAK/STAT3信号通路可防止RGCs凋亡、促进轴突再生^[14]。此外,有研究^[15]表明下调维生素D受体对高糖诱导的RGCs损伤的保护作用可能与抑制STAT3活化有关。本研究显示:高糖处理明显促进RGC-5细胞中STAT3和JAK2的磷酸化,沉默E2F1表达则抑制STAT3和JAK2的磷酸化,而使用SD19激活JAK/STAT3信号通路则部分逆转沉默E2F1对

高糖诱导的RGC-5细胞损伤的保护作用。这表明沉默E2F1可能通过抑制JAK/STAT3信号通路发挥保护作用。

综上所述,沉默E2F1表达可抑制高糖诱导的RGCs凋亡,促进细胞存活,具有保护作用,其机制可能与抑制STAT3信号通路有关。这些发现为临床治疗DR提供了非常有意义的方向,为深入研究DR发生机制提供新的靶点。

参考文献

1. 苟文军,吕红彬,杨旭,等.罗格列酮对糖尿病大鼠视网膜神经节细胞凋亡的影响[J].眼科新进展,2016,36(9):818-821.
GOU Wenjun, LÜ Hongbin, YANG Xu, et al. Effects of rosiglitazone on retinal ganglion cells apoptosis in rats with diabetes mellitus[J]. Recent Advances in Ophthalmology, 2016, 36(9): 818-821.
2. Asnaghi V, Gerhardinger C, Hoehn T, et al. A role for the polyol pathway in the early neuroretinal apoptosis and glial changes induced by diabetes in the rat[J]. Diabetes, 2003, 52(2): 506-511.
3. Zhang J, Liu R, Kuang HY, et al. Protective treatments and their target retinal ganglion cells in diabetic retinopathy[J]. Brain Res Bull, 2017, 132: 53-60.
4. Poppy Roworth A, Ghari F, La Thangue NB. To live or let die—complexity within the E2F1 pathway[J]. Mol Cell Oncol, 2015, 2(1): e970480.
5. Giralt A, Denechaud PD, Lopez-Mejia IC, et al. E2F1 promotes hepatic gluconeogenesis and contributes to hyperglycemia during diabetes[J]. Mol Metab, 2018, 11: 104-112.
6. Yuan Y, Li X, Li M. Overexpression of miR-17-5p protects against high glucose-induced endothelial cell injury by targeting E2F1-mediated suppression of autophagy and promotion of apoptosis[J]. Int J Mol Med, 2018, 42(3): 1559-1568.
7. Tabrizi R, Moosazadeh M, Lankarani KB, et al. The effects of synbiotic supplementation on glucose metabolism and lipid profiles in patients with diabetes: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Probiotics Antimicrob Proteins, 2018, 10(2): 329-342.
8. 赵玉,郭艳,张温阳,等.二苯乙烯苷对AngII诱导人脐静脉内皮细胞衰老的保护作用[J].中成药,2019,41(6):1248-1253.
ZHAO Yu, GUO Yan, ZHANG Wenyang, et al. Protective effects of 2, 3, 5, 4-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside on Ang II-induced human umbilical vein endothelial cellular senescence[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2019, 41(6): 1248-1253.
9. Denechaud PD, Lopez-Mejia IC, Giralt A, et al. E2F1 mediates sustained lipogenesis and contributes to hepatic steatosis[J]. J Clin

- Invest, 2016, 126(1): 137-150.
10. Wang Y, Zhou Y, Xiao L, et al. E2f1 mediates high glucose-induced neuronal death in cultured mouse retinal explants[J]. Cell Cycle, 2017, 16(19): 1824-1834.
 11. 车选义, 赵清侠, 李迪. siRNA靶向沉默载脂蛋白2(Lcn2)对缺氧诱导视网膜神经节细胞-5细胞凋亡的作用及机制[J]. 眼科新进展, 2017, 37(11): 1027-1031.
CHE Xuanyi, ZHAO Qingxia, LI Di. T Effects of siRNA targeted Lcn2 gene silencing on cell apoptosis induced by hypoxia in RGC-5 cells and its mechanisms[J]. Recent Advances in Ophthalmology, 2017, 37(11): 1027-1031.
 12. Johnson DE, O'Keefe RA, Grandis JR. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2018, 15(4): 234-248.
 13. Chen J, Zhang W, Xu Q, et al. Ang-(1-7) protects HUVECs from high glucose-induced injury and inflammation via inhibition of the JAK2/STAT3 pathway[J]. Int J Mol Med, 2018, 41(5): 2865-2878.
 14. Vigneswara V, Akpan N, Berry M, et al. Combined suppression of CASP2 and CASP6 protects retinal ganglion cells from apoptosis and promotes axon regeneration through CNTF-mediated JAK/STAT signalling[J]. Brain, 2014, 137: 1656-1675.
 15. Lei XJ, Xu YL, Yang YQ, et al. Vitamin D receptor regulates high-level glucose induced retinal ganglion cell damage through STAT3 pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(21): 7509-7516.

本文引用: 雷永华, 刘俊保, 徐蓉娟, 李红, 郑志攀, 陈原邻, 杨明. 沉默E2F1对高糖诱导视网膜神经节细胞的保护作用[J]. 临床与病理杂志, 2022, 42(3): 517-525. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.03.001

Cite this article as: LEI Yonghua, LIU Junbao, XU Rongjuan, LI Hong, ZHENG Zhipan, CHEN Yuanlin, YANG Ming. Protective effect of silencing E2F1 on retinal ganglion cells induced by high glucose[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2022, 42(3): 517-525. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.03.001