

# 糖尿病模型大鼠视网膜 PGC-1 $\alpha$ 表达和表观遗传修饰的变化

耿爽 陈有信 姚翔 徐海燕 张古沐阳 夏松 刘子扬

100730 北京, 中国医学科学院 北京协和医院眼科

通信作者: 陈有信, Email: chenyouxinpumch@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.06.003

**【摘要】目的** 通过检测糖尿病模型大鼠视网膜过氧化物酶体增生物激活受体  $\gamma$  辅助激活因子 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) mRNA 和蛋白表达以及 *PPARGC1A* 启动子区 DNA 甲基化的改变, 探讨糖尿病发生和发展过程中 PGC-1 $\alpha$  的变化趋势、表观遗传学修饰改变及其在糖尿病视网膜病变 (DR) 代谢记忆中的作用。**方法** 取清洁级 6~7 周龄雄性 SD 大鼠 80 只, 其中 60 只采用腹腔内注射链脲佐菌素 (STZ) 的方法建立糖尿病大鼠模型。将 60 只糖尿病模型大鼠应用随机数字表法随机分为 3 个组: 血糖控制不佳组大鼠造模后 4 个月内血糖水平控制不佳; 血糖半控制组大鼠造模后 2 个月内血糖水平控制不佳, 2 个月后维持正常血糖水平; 血糖控制组大鼠造模后 4 个月内均保持正常血糖水平, 每组各 20 只。对照组为周龄匹配的正常饲养大鼠 20 只。分离各实验组大鼠视网膜组织, 应用实时荧光定量 PCR 法检测 PGC-1 $\alpha$  及超氧化物歧化酶 2 (SOD2) mRNA 的表达, 应用 Western blot 法检测 PGC-1 $\alpha$  及锰超氧化物歧化酶 (MnSOD) 蛋白的表达, 应用亚硫酸氢钠测序法 (BSP) 检测 *PPARGC1A* 启动子区 DNA 甲基化状态的变化。**结果** 造模后 4 个月, 对照组大鼠体质量明显高于血糖控制不佳组、血糖半控制组和血糖控制组, 血糖控制不佳组血糖水平显著高于对照组, 差异均有统计学意义 (均  $P=0.000$ )。血糖控制组、血糖半控制组和血糖控制不佳组大鼠视网膜组织中 PGC-1 $\alpha$  mRNA 相对表达量依次下降, 均低于对照组, 差异均有统计学意义 (均  $P=0.000$ ); 血糖控制组 PGC-1 $\alpha$  mRNA 相对表达量明显高于血糖控制不佳组, 差异有统计学意义 ( $P=0.002$ )。血糖控制组、血糖半控制组和血糖控制不佳组大鼠视网膜组织中 SOD2 mRNA 表达依次增加, 均高于对照组, 差异均有统计学意义 ( $P=0.006, 0.000, 0.000$ ); 血糖控制组与血糖控制不佳组 SOD2 mRNA 相对表达量比较, 差异有统计学意义 ( $P=0.001$ )。血糖控制不佳组、血糖半控制组和血糖控制组大鼠视网膜中 PGC-1 $\alpha$  蛋白和 MnSOD 蛋白相对表达量显著低于对照组, 血糖控制组大鼠视网膜 PGC-1 $\alpha$  蛋白相对表达量显著高于血糖控制不佳组, 差异均有统计学意义 (均  $P<0.05$ )。糖尿病模型大鼠视网膜组织中 *PPARGC1A* 启动子区 DNA 甲基化水平升高, 血糖控制不佳组、血糖半控制组大鼠视网膜组织中 *PPARGC1A* 启动子区 DNA 甲基化的水平较对照组明显升高, 差异均有统计学意义 ( $P=0.008, 0.031$ ), 血糖半控制组与血糖控制不佳组间比较, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。**结论** 糖尿病模型大鼠视网膜 PGC-1 $\alpha$  mRNA 及蛋白表达均下降, 视网膜 SOD2 mRNA 表达升高, MnSOD 蛋白表达下降, 具有代谢记忆的特点。*PPARGC1A* 启动子区 DNA 甲基化水平的升高可能与 PGC-1 $\alpha$  表达受到抑制以及代谢记忆相关。

**【关键词】** 糖尿病视网膜病变; 过氧化物酶体增生物激活受体  $\gamma$  辅助激活因子 1 $\alpha$ ; 代谢记忆; 表观遗传修饰; 锰超氧化物歧化酶

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81371026)

## The alterations of PGC-1 $\alpha$ expression and epigenetic modifications in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats

Geng Shuang, Chen Youxin, Yao Xiang, Xu Haiyan, Zhang Gumuyang, Xia Song, Liu Ziyang

Department of Ophthalmology, Peking Union Medical College Hospital, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

Corresponding author: Chen Youxin, Email: chenyouxinpumch@163.com

**【Abstract】Objective** To investigate the role of epigenetic regulations of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) in the development of diabetic retinopathy and the metabolic memory

phenomenon after hyperglycemia was terminated. **Methods** Diabetic rat model was established by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ). Sixty diabetic rats were randomly divided into 3 groups, poor glycemic control group rats were maintained in poor glycemic control for 4 months; semi glycemic control group rats were maintained in poor glycemic control for 2 months, followed by good glycemic control for 2 additional months; good glycemic control group rats were maintained in good glycemic control for 4 months. Twenty normal rats served as control group. The mRNA expression of PGC-1 $\alpha$  and superoxide dismutase 2 (SOD2) of retina were measured by real-time PCR; the expression of PGC-1 $\alpha$  and manganese superoxide dismutase (MnSOD) protein were measured by Western blot; the situation of DNA methylation in the promotor region of *PPARGC1A* was measured by bisulfite sequencing. **Results** The body-weight in the control group was significantly higher than that in the poor glycemic control group, semi glycemic control group and good glycemic control group (all at  $P=0.000$ ). The blood glucose value in the poor glycemic control group was significantly higher than that in the control group ( $P=0.000$ ). The expression levels of PGC-1 $\alpha$  mRNA were significantly lower and the expression levels of SOD2 mRNA were significantly higher in the good glycemic control group, semi glycemic control group and poor glycemic control group than those in the control group (all at  $P<0.05$ ). The expression levels of PGC-1 $\alpha$  and SOD2 mRNA were significantly different between the good glycemic control group and poor glycemic control group (both at  $P<0.05$ ). Compared with the control group, the expression levels of PGC-1 $\alpha$  and MnSOD protein were decreased in the diabetic model groups, with significant differences between them (all at  $P<0.05$ ). The expression level of PGC-1 $\alpha$  protein was significantly higher in the good glycemic control group than that in the poor glycemic control group ( $P<0.05$ ). Diabetes increased DNA methylation in the promotor region of *PPARGC1A* gene of retina. The DNA methylation level was significantly higher in the poor glycemic control group and semi glycemic control group than that in the control group ( $P=0.008, 0.031$ ). No statistical difference was found between the poor glycemic control group and semi glycemic control group ( $P>0.05$ ). **Conclusions** The expressions of PGC-1 $\alpha$  mRNA and protein and MnSOD protein in the retina of STZ induced diabetic rats are decreased, the expression of SOD2 mRNA is increased, the expression changes have metabolic memory characteristics. Increased DNA methylation in the promotor region of *PPARGC1A* when exposed to high glucose may have a role in the regulation of PGC-1 $\alpha$  expression and metabolic memory.

[Key words] Diabetic retinopathy; Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ ; Metabolic memory; Epigenetic modifications; Manganese superoxide dismutase

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81371026)

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病的常见并发症,亦是致盲的主要原因之一<sup>[1]</sup>。糖尿病控制及并发症试验 (Diabetes Control and Complications Trial, DCCT)、糖尿病干预与并发症流行病学试验 (Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications, EDIC) 等多个大型临床试验证实早期血糖控制不佳的患者,即使后续血糖控制在合理范围,仍较早期血糖控制良好的患者更易发生包括 DR 在内的各种并发症,因此早期血糖控制对糖尿病并发症的发生及进展具有长期影响,这种现象称为“代谢记忆”<sup>[2-8]</sup>。表观遗传学是指基因在 DNA 序列不变的情况下,其表型发生可遗传的改变并能稳定地进行遗传。表观遗传学的改变包括 DNA 甲基化、组蛋白氨基酸残基修饰和非编码 RNA。随着研究的深入,越来越多的证据表明染色质的改变和表观遗传学因素在代谢记忆的建立、发展以及基因的持续表达方面发挥着关键性作用<sup>[9-11]</sup>。由于表观遗传学改变存在潜在的可逆性,

可能为 DR 的防治提供新的有效方法<sup>[12]</sup>。高血糖所致的线粒体活性氧增多是 DR 多种机制的始动环节。锰超氧化物歧化酶 (manganese superoxide dismutase, MnSOD) 是一种活性蛋白酶,特异性地存在于细胞线粒体内,其反应中心含有金属元素锰,是活性氧类有效的清除剂,在保护视网膜免受高糖所致的氧化应激损害方面起到非常重要的作用<sup>[13-14]</sup>。过氧化物酶体增生物激活受体  $\gamma$  辅助激活因子 1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ ) 是 MnSOD 的重要调节因子之一,通过辅助激活过氧化物酶体增生物激活受体  $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ , PPAR- $\alpha$ )、PPAR- $\gamma$  等核受体,调节目的基因转录及转录后的修饰过程,广泛参与机体线粒体生物合成、能量代谢和糖脂代谢及适应性产热等多条代谢通路的调节,在葡萄糖和脂肪酸代谢中起重要作用<sup>[15-16]</sup>。本研究中通过检测糖尿病大鼠视网膜 PGC-1 $\alpha$  mRNA 和蛋白表达及 *PPARGC1A* 启动子区

DNA 甲基化的改变,明确糖尿病发生和发展过程中 PGC-1 $\alpha$  的变化趋势,探讨其表观遗传学修饰在 DR 代谢记忆中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 清洁级 6~7 周龄雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 80 只,体质量 180~200 g,购自北京维通利华实验动物有限公司。实验动物的饲养和使用符合国家科学技术部颁布的《实验动物管理条例》规定。

**1.1.2 主要试剂** 链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ)、DEPC 水(美国 Sigma 公司);精蛋白锌胰岛素注射液(徐州万邦生化制药有限公司);Trizol 试剂、SYBR Green PCR master Mix 试剂盒(美国 Invitrogen 公司);逆转录试剂盒(美国 Promega 公司);RNA 酶抑制剂、HsTaq 酶(日本 Takara 公司);兔抗鼠 PGC-1 $\alpha$  抗体、PVDF 膜(美国 Millipore 公司);兔抗鼠 MnSOD 抗体(美国 Abcam 公司);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L chain)多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L chain)多克隆抗体(日本 MBL 公司);BCA 蛋白检测试剂盒、ECL 反应液、高相对分子质量预染蛋白梯度标准(蛋白 Marker)(美国 Thermo 公司);鼠 $\beta$ -actin 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);蛋白酶抑制剂(美国 Roche 公司);甲基化 DNA 检测试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒、T 载体连接试剂盒(中国康为世纪有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 实验分组及糖尿病大鼠模型的建立** 将 80 只 SD 大鼠按照随机数字表法随机分为对照组 20 只和糖尿病组 60 只。对照组为周龄匹配的正常饲养大鼠。糖尿病组大鼠腹腔内注射 60 mg/kg STZ 建立 1 型糖尿病模型。注射后 3 d 尾静脉取血检测血糖水平,血糖  $\geq 16.7$  mmol/L 为造模成功;不达标者,以 50 mg/kg STZ 腹腔内补充注射。糖尿病组大鼠按照随机数字表法随机平均分为 3 个亚组:血糖控制不佳组大鼠在造模后 4 个月中血糖控制不佳,每日接受 1 次 1~2 单位长效胰岛素皮下注射治疗。血糖半控制组大鼠在造模后持续 2 个月血糖控制不佳,每日接受 1 次 1~2 单位长效胰岛素皮下注射治疗;后 2 个月维持正常血糖水平,每日接受长效胰岛素皮下注射治疗 2 次,每次 2~5 单位。血糖控制组大鼠在造模后 4 个月中均保持血糖正常,每日接受长效胰岛素皮下注射治疗 2 次,每次 2~5 单位。

**1.2.2 大鼠视网膜组织分离** 于造模后 4 个月各组

大鼠经体积分数 3% 戊巴比妥钠腹腔内注射麻醉后,迅速摘除眼球,冰浴中在显微镜下剪除角膜,摘除晶状体,分离出视网膜组织。 $-80$   $^{\circ}\text{C}$  低温冰箱保存。

**1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测各实验组大鼠视网膜组织 PGC-1 $\alpha$ 、SOD2 mRNA 表达水平** 采用 Trizol 试剂盒提取视网膜组织中总 RNA,测定 RNA 纯度,使用逆转录试剂盒进行 cDNA 合成,按照 20  $\mu\text{l}$  体系进行 PCR 扩增反应,引物序列见表 1。扩增反应条件:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;95  $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s,56  $^{\circ}\text{C}$  退火 15 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 20 s,共 45 个循环。反应结束后,收集溶解曲线,以  $\beta$ -actin 作为内参基因,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算各目的基因的相对表达量。

表 1 大鼠 PGC-1 $\alpha$ 、SOD2 和  $\beta$ -actin 引物序列

引物	引物序列(5'-3')
PGC-1 $\alpha$	F: CACCAAACCCACAGAGAACA
	R: GGGTCATTTGGTGACTCTGG
SOD2	F: CGTCACCGAGGAGAAGTACCACGA
	R: CAGCCTGAACCTTGGACTCCACACA
$\beta$ -actin	F: CCACACCCGCCACCACTTCG
	R: GGCCCGGGGAGCATCCTC

注:PGC:过氧化物酶体增殖生物激活受体  $\gamma$  辅助激活因子;SOD:超氧化物歧化酶

**1.2.4 Western blot 法检测各实验组大鼠视网膜组织中 PGC-1 $\alpha$ 、MnSOD 蛋白表达水平** 将大鼠视网膜组织样品剪切成小块,加入组织裂解液(含蛋白酶抑制剂),超声裂解组织样品,离心取上清,BCA 法测定蛋白浓度。进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳并转印至 PVDF 膜上。将膜浸入质量分数 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,分别加入 PGC-1 $\alpha$  (1:1 000)、MnSOD (1:1 000)、 $\beta$ -actin (1:1 000) 抗体,4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, TBST 漂洗,加入辣根过氧化物酶标记 IgG(H+L chain) (1:5 000),室温孵育 1 h, TBST 漂洗。ECL 显影,定影,以  $\beta$ -actin 作为内参,采用 Image J 软件处理系统分别检测内参和目的蛋白条带的灰度值,计算各目的蛋白相对表达量。

**1.2.5 亚硫酸氢钠测序法检测 PPAR $\gamma$  启动子区 DNA 甲基化状态** 根据基因序列信息,使用 Primer 5 软件设计 PPAR $\gamma$  基因启动子区引物并合成引物:上游引物为 5'-GGGAGAAAAAAGAATTTTATGG-3';下游引物为 5'-ACCTCCCTTCTCTATACAACCTTACT-3'。采用 DNA 提取试剂盒提取各组视网膜样品 DNA,参照甲基化 DNA 检测试剂盒说明书对 PPAR $\gamma$  启动子区 DNA 进行修饰,PCR 扩增,使用 DNA 纯化回收试剂盒纯化产物后,根据 T 载体连接试剂盒说明书建立连接

体系,连接转化后行菌落鉴定,挑取阳性克隆提取 DNA 并测序。

使用 METHPRIMER 在线软件分析,选取 CpG 岛评判标准:GC 含量(CG%)大于 55%,实际 CpG 位点与理论 CpG 位点的比值(ObsCpG/ExpCpG)大于 0.65,片段长度至少为 500 bp。选取 *PPARGC1A* 起始位点上游约 500 bp 区域进行 CpG 位点甲基化状态的检测。在该段序列中,共 6 个 CpG 位点,分别为-529、-477、-326、-215、-186、-178 bp,编号为 1~6(图 2)。检测各实验组大鼠视网膜组织中该 6 个 CpG 双核苷酸位点的甲基化状态。各实验组大鼠视网膜组织中 *PPARGC1A* 启动子区甲基化水平用发生甲基化的 CpG 位点数占所有被检测的 CpG 位点数的百分比表示。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行统计分析。本研究各检测数据经单样本 Kolmogorov-Smirnov 检验证实呈正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示。各组数据方差齐性,各组数据的比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。血糖半控制组大鼠血糖控制前后的血糖、体质量的比较采用配对 *t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠一般情况比较

对照组大鼠饮食、饮水及尿量正常,毛色柔顺有光泽;各糖尿病大鼠成模后逐渐出现多饮、多食、多尿,毛色枯黄无光泽,精神萎靡;血糖控制组大鼠接受胰岛素治疗后多饮、多食、多尿症状明显减轻,接近对照组大鼠;血糖半控制组大鼠血糖控制后,饮食量、饮水量、尿量与血糖控制前比较无明显改变。

### 2.2 各组大鼠体质量、血糖比较

对照组大鼠体质量逐渐增加;血糖控制组大鼠接受胰岛素治疗后体质量逐渐增加;血糖半控制组大鼠早期未控制血糖时体质量增加缓慢或下降,造模后 2 个月体质量为  $(331.00 \pm 32.80)$  g,于造模后第 3 个月开始接受胰岛素治疗后体质量有所增加,造模后 4 个月体质量为  $(405.63 \pm 54.19)$  g,血糖控制前后体质量比较,差异有统计学意义( $P = 0.000$ )。各组大鼠造模后 4 个月体质量总体比较差异有统计学意义( $F = 54.253, P = 0.000$ );其中对照组大鼠体质量明显高于血糖控制不佳组、血糖半控制组和血糖控制组,差异均有统计学意义(均  $P = 0.000$ )(表 2)。

各组造模后 4 个月血糖总体比较差异有统计学意义( $F = 456.324, P = 0.000$ );其中血糖控制不佳组血

糖水平显著高于对照组,差异有统计学意义( $P = 0.000$ )(表 2)。血糖半控制组大鼠血糖控制前后血糖值分别为  $(26.54 \pm 1.99)$  mmol/L 和  $(6.13 \pm 3.39)$  mmol/L,差异有统计学意义( $P = 0.000$ )。

表 2 各组大鼠造模后 4 个月体质量和血糖值比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	体质量(g)	血糖值(mmol/L)
对照组	20	590.60±46.11	5.67±0.22
血糖控制不佳组	20	316.25±53.79 <sup>a</sup>	28.02±1.76 <sup>a</sup>
血糖半控制组	20	405.63±54.19 <sup>a</sup>	6.13±3.39
血糖控制组	20	478.13±53.02 <sup>a</sup>	5.63±1.14
F 值		54.253	456.324
P 值		0.000	0.000

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ (单因素方差分析,SNK-*q* 检验)

### 2.3 各实验组大鼠视网膜组织中 PGC-1 $\alpha$ 、SOD2 mRNA 表达水平比较

各组大鼠视网膜中 PGC-1 $\alpha$  mRNA 相对表达量总体比较,差异有统计学意义( $F = 45.353, P = 0.000$ );其中血糖控制不佳组、血糖半控制组和血糖控制组大鼠视网膜中 PGC-1 $\alpha$  mRNA 相对表达量显著低于对照组,血糖控制组大鼠视网膜 PGC-1 $\alpha$  mRNA 相对表达量明显高于血糖控制不佳组,差异有统计学意义( $P = 0.002$ )(表 3)。

各组大鼠视网膜中 SOD2 mRNA 相对表达量总体比较,差异有统计学意义( $F = 28.098, P = 0.000$ );其中血糖控制组、血糖半控制组和血糖控制不佳组大鼠视网膜中 SOD2 mRNA 相对表达量显著高于对照组,差异均有统计学意义( $P = 0.006, 0.000, 0.000$ ),血糖控制组大鼠视网膜中 SOD2 mRNA 相对表达量显著低于血糖控制不佳组,差异有统计学意义( $P = 0.001$ )(表 3)。

表 3 各组大鼠视网膜中 PGC-1 $\alpha$  和 SOD2 mRNA 相对表达量比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	PGC-1 $\alpha$ mRNA	SOD2 mRNA
		相对表达量	相对表达量
对照组	5	1.00±0.00	1.00±0.00
血糖控制不佳组	5	0.04±0.02 <sup>a</sup>	1.48±0.06 <sup>a</sup>
血糖半控制组	5	0.22±0.05 <sup>a</sup>	1.39±0.04 <sup>a</sup>
血糖控制组	5	0.44±0.21 <sup>ab</sup>	1.21±0.12 <sup>ab</sup>
F 值		45.353	28.098
P 值		0.000	0.000

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与血糖控制不佳组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ (单因素方差分析,SNK-*q* 检验) PGC:过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  辅助激活因子;SOD:超氧化物歧化酶

### 2.4 各组大鼠视网膜组织中 PGC-1 $\alpha$ 、MnSOD 蛋白表达水平

各组大鼠视网膜组织中 PGC-1 $\alpha$  蛋白和 MnSOD 蛋白表达量的总体比较, 差异均有统计学意义 (PGC-1 $\alpha$ :  $F = 16.877, P = 0.001$ ; MnSOD:  $F = 9.468, P = 0.005$ ); 其中血糖控制不佳组、血糖半控制组和血糖控制组大鼠视网膜中 PGC-1 $\alpha$  蛋白和 MnSOD 蛋白相对表达量显著低于对照组, 血糖控制组大鼠视网膜中 PGC-1 $\alpha$  蛋白相对表达量显著高于血糖控制不佳组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (图 1, 表 4)。

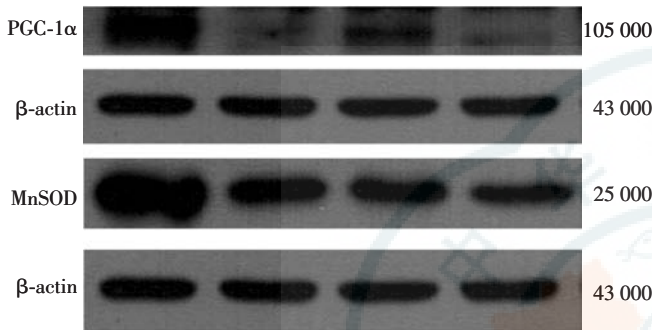


图 1 各组大鼠视网膜组织中 PGC-1 $\alpha$  和 MnSOD 蛋白表达电泳图  
PGC: 过氧化物酶体增殖生物激活受体  $\gamma$  辅助激活因子; MnSOD: 锰超氧化物歧化酶

表 4 各组大鼠视网膜组织中 PGC-1 $\alpha$ 、MnSOD 蛋白表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	PGC-1 $\alpha$ 蛋白	MnSOD 蛋白
对照组	5	1.27 $\pm$ 0.39	2.40 $\pm$ 0.47
血糖控制不佳组	5	0.18 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	1.35 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>
血糖半控制组	5	0.20 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	1.24 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
血糖控制组	5	0.65 $\pm$ 0.13 <sup>ab</sup>	1.61 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>
<i>F</i> 值		16.877	9.468
<i>P</i> 值		0.001	0.005

注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与血糖控制不佳组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$  (单因素方差分析, SNK- $q$  检验) PGC: 过氧化物酶体增殖生物激活受体  $\gamma$  辅助激活因子; MnSOD: 锰超氧化物歧化酶

### 2.5 各组大鼠视网膜组织中 PPARGC1A 启动子区甲基化状态

与对照组相比, PPARGC1A 启动子区 -529、-477、-326、-215、-186、-178 位点 CpG 甲基化比例增加 (图 2)。

对照组、血糖控制不佳组、血糖半控制组和血糖控制组大鼠视网膜组织中 PPARGC1A 启动子区 DNA 甲基化水平总体比较, 差异有统计学意义 ( $F = 4.216, P = 0.030$ )。与对照组相比, 血糖控制组大鼠视网膜组织中 PPARGC1A 启动子区 DNA 甲基化的水平升高, 但差异无统计学意义 ( $P = 0.349$ ); 血糖控制不佳组、血糖半控制组大鼠视网膜组织中 PPARGC1A 启动子区

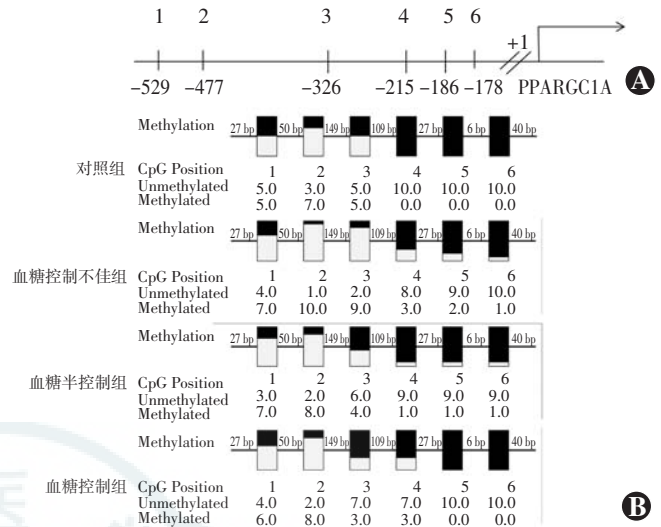


图 2 PPARGC1A 基因各 CpG 检测位点甲基化比例 A: 各 CpG 检测位点示意图 B: 各组不同 CpG 检测位点的甲基化比例 每个 CpG 位点甲基化比例以柱状图表示, 黑色代表非甲基化比例, 白色代表甲基化比例

DNA 甲基化的水平较对照组明显升高, 差异均有统计学意义 ( $P = 0.008, 0.031$ ); 血糖控制组 PPARGC1A 启动子区 DNA 甲基化, 水平较血糖控制不佳组低, 差异有统计学意义 ( $P = 0.033$ ); 血糖控制不佳组与血糖半控制组启动子区 DNA 甲基化的水平比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (表 5)。

表 5 各组大鼠视网膜 PPARGC1A 启动子区 DNA 甲基化水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	甲基化程度 (%)
对照组	5	30.93 $\pm$ 5.00
血糖控制不佳组	5	42.48 $\pm$ 7.06 <sup>a</sup>
血糖半控制组	5	39.34 $\pm$ 3.62 <sup>a</sup>
血糖控制组	5	34.45 $\pm$ 2.30 <sup>b</sup>
<i>F</i> 值		4.216
<i>P</i> 值		0.030

注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与血糖控制不佳组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$  (单因素方差分析, SNK- $q$  检验)

### 3 讨论

氧化应激是糖尿病并发症发病机制中的重要因素, 在 DR 的发生中发挥关键性作用。线粒体是糖类、脂肪和氨基酸最终氧化释放能量的场所, 也是活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 最主要的来源。线粒体的动态变化参与糖尿病及其并发症的病理生理学改变, 其数目的减少、功能的受损和形态的改变与糖尿病及其并发症的发生密切相关<sup>[17]</sup>。

PGC-1 $\alpha$  通过对于线粒体融合蛋白 1 (mitochondrial

fusion protein 1, Mfn1)、Mfn2、1 型视神经萎缩蛋白(optic atrophy protein 1, Opal)、动力相关蛋白 1(dynamic related protein 1, Drp1)、线粒体分裂蛋白 1(mitochondrial fission protein 1, Fis1)的调控,影响线粒体形态。此外,PGC-1 $\alpha$ 可维持线粒体膜电位稳定,增加线粒体基因表达及线粒体自身复制增生,促进能量产生,诱导线粒体抗氧化应激防御系统生成来对抗线粒体氧化应激,具有增强细胞功能及抗凋亡的作用。

本研究结果显示,血糖控制不佳组、血糖半控制组大鼠视网膜组织中 PGC-1 $\alpha$  mRNA 含量明显降低,且二者间差异无统计学意义,说明早期血糖控制不佳的糖尿病大鼠,后续血糖控制达标后其视网膜中 PGC-1 $\alpha$  mRNA 含量仍降低,即糖尿病大鼠视网膜中 PGC-1 $\alpha$  mRNA 含量的改变具有代谢记忆的特征。

MnSOD 是线粒体内 ROS 有效的清除剂。多个研究已经表明 PGC-1 $\alpha$  能促进多种 ROS 清除酶的表达。最初的研究表明,在肌肉细胞中异位表达 PGC-1 $\alpha$  能增加 MnSOD 和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPX1)的表达,促进过氧化物的清除。此后,又有研究报道了 PGC-1 $\alpha$  能调控多个 ROS 清除酶,包括各种位于线粒体、细胞质以及过氧化物酶体中的 ROS 清除酶<sup>[18-20]</sup>。这些研究结果均同时提示了在细胞中过表达 PGC-1 $\alpha$  能增强氧化应激损伤时细胞的存活能力,而抑制 PGC-1 $\alpha$  表达会使得细胞更难以抵抗氧化应激损伤。本研究结果显示,糖尿病大鼠视网膜中 PGC-1 $\alpha$  和 MnSOD 蛋白的表达降低,且二者变化趋势一致,提示 PGC-1 $\alpha$  可能做为 MnSOD 的上游调节因子,通过对线粒体功能形态的调节,在氧化应激中发挥作用,促进 DR 的发生。本研究中发现 SOD2 mRNA 表达增加而 MnSOD 蛋白表达降低,其原因可能在于一方面 ROS 的增加导致 MnSOD 的消耗增加,反馈性上调 SOD2 mRNA 的表达,另一方面 PGC-1 $\alpha$  除了作为辅激活因子外,可能在转录后加工的过程中起到作用。

表观遗传学改变中 DNA 甲基化是指在 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)的催化下,以 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)为甲基供体,将甲基转移到特定碱基上的过程。在哺乳动物中, DNA 甲基化主要发生在 5'-CpG-3' 的 C 碱基上,生成 5-甲基胞嘧啶(5<sup>m</sup>C)。特定基因甲基化水平的增加可以抑制该基因的表达<sup>[21-22]</sup>。van Hecke 等<sup>[23]</sup>报道 DR 患者外周血中 SAM 水平降低,提示 DR 患者可能存在 DNA 或组蛋白的甲基化。Chen 等<sup>[24]</sup>测定 EDIC 受试者全血及单核细胞甲基化水平,全血出现 153 个位点低甲基化,225 个位点高甲基化,单核细胞出现 155 个

位点低甲基化,247 个位点高甲基化,其中包括与高糖血症以及其并发症相关的硫氧还原蛋白相互作用蛋白。

PGC-1 $\alpha$  由 *PPARGC1A* 编码,*PPARGC1A* 启动子区的 CpG 甲基化可影响 2 型糖尿病患者和 2 型糖尿病高风险患病人群胰岛  $\beta$  细胞胰岛素的分泌及肝脏和骨骼肌等胰岛素反应性组织对于胰岛素的敏感性<sup>[25-30]</sup>。孕期高血糖可造成胎盘组织中与褐色脂肪相关的 *PRDM16*、*BMP7*、*CTBP2* 和 *PPARGC1A* 基因甲基化水平升高,进而介导脐带血瘦素水平升高<sup>[31]</sup>。

CpG 可以 2 种形式存在,一种是分散于 DNA 中,另一种是 CpG 结构高度集中的 CpG 岛。CpG 岛一般位于基因的启动子区,有时还包括基因 5' 端的外显子和内含子中。健康人基因组 CpG 岛中 CpG 位点通常处于非甲基化状态,而在 CpG 岛以外的 CpG 位点则是甲基化的。通过 DNA 甲基化预测,本研究中选取 *PPARGC1A* 起始位点上游约 500 bp 区域内 -529、-477、-326、-215、-186 和 -178 共 6 个 CpG 位点,对各实验组大鼠视网膜组织中 *PPARGC1A* 启动子区甲基化状态进行检测,结果显示糖尿病大鼠视网膜组织中 *PPARGC1A* 启动子区 DNA 甲基化水平升高。血糖控制不佳组、血糖半控制组大鼠视网膜组织中 *PPARGC1A* 启动子区 DNA 甲基化的水平较对照组明显升高,差异有统计学意义。结合大鼠视网膜 PGC-1 $\alpha$  基因及蛋白表达变化趋势,分析糖尿病大鼠视网膜组织中 *PPARGC1A* 启动子区 DNA 甲基化水平升高可能是 PGC-1 $\alpha$  mRNA 和蛋白的表达受抑制和代谢记忆形成的原因。

综上所述,本研究证实糖尿病可导致大鼠视网膜组织中 PGC-1 $\alpha$  基因和蛋白表达下降,且糖尿病大鼠视网膜中 PGC-1 $\alpha$  表达的改变存在代谢记忆现象。*PPARGC1A* 启动子区 DNA 甲基化水平的增加可能与 PGC-1 $\alpha$  表达受到抑制以及代谢记忆相关。

## 参考文献

- [1] Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R, et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy [J]. *Diabetes Care*, 2012, 35 (3) : 556-564. DOI:10.2337/dc11-1909.
- [2] Nathan DM. The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: overview [J]. *Diabetes Care*, 2014, 37 (1) : 9-16. DOI:10.2337/dc13-2112.
- [3] Aiello LP. Diabetic retinopathy and other ocular findings in the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study [J]. *Diabetes Care*, 2014, 37 (1) : 17-23. DOI:10.2337/dc13-2251.
- [4] Writing Team for the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Intervention and Complications Research Group. Effect of intensive therapy on the microvascular complications of type 1 diabetes mellitus [J]. *JAMA*, 2002, 287 (19) : 2563-2569.
- [5] Lachin JM, White NH, Hainsworth DP, et al. Effect of intensive diabetes therapy on the progression of diabetic retinopathy in patients with type 1

- diabetes; 18 years of follow-up in the DCCT/EDIC [J]. *Diabetes*, 2015, 64 (2) : 631-642. DOI:10.2337/db14-0930.
- [6] UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33) [J]. *Lancet*, 1998, 352(9131) : 837-853.
- [7] UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34) [J]. *Lancet*, 1998, 352(9131) : 854-865.
- [8] Holman RR, Paul SK, Bethel MA, et al. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(15) : 1577-1589. DOI:10.1056/NEJMoa0806470.
- [9] Mishra M, Kowluru RA. The role of DNA methylation in the metabolic memory phenomenon associated with the continued progression of diabetic retinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(13) : 5748-5757. DOI:10.1167/iovs.16-19759.
- [10] Zhong Q, Kowluru RA. Epigenetic modification of Sod2 in the development of diabetic retinopathy and in the metabolic memory: role of histone methylation [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(1) : 244-250. DOI:10.1167/iovs.12-10854.
- [11] Zhao S, Li T, Li J, et al. miR-23b-3p induces the cellular metabolic memory of high glucose in diabetic retinopathy through a SIRT1-dependent signalling pathway [J]. *Diabetologia*, 2016, 59(3) : 644-654. DOI:10.1007/s00125-015-3832-0.
- [12] Shikun He, Sha Ouyang. 表观遗传学: 生物医学研究和眼科研究的新时代 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2016, 34(10) : 865-873. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.10.001.  
He SK, Onyang S. Epigenetics—the new era of biomedical and ophthalmological research [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2016, 34(10) : 865-873. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.10.001.
- [13] Kowluru RA, Kowluru V, Xiong Y, et al. Overexpression of mitochondrial superoxide dismutase in mice protects the retina from diabetes-induced oxidative stress [J]. *Free Radic Biol Med*, 2006, 41(8) : 1191-1196. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2006.01.012.
- [14] Kowluru RA, Atasi L, Ho YS. Role of mitochondrial superoxide dismutase in the development of diabetic retinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(4) : 1594-1599. DOI:10.1167/iovs.05-1276.
- [15] Puigserver P, Wu Z, Park CW, et al. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis [J]. *Cell*, 1998, 92(6) : 829-839.
- [16] Oberkofler H, Linnemayr V, Weitgasser R, et al. Complex haplotypes of the PGC-1alpha gene are associated with carbohydrate metabolism and type 2 diabetes [J]. *Diabetes*, 2004, 53(5) : 1385-1393.
- [17] Trudeau K, Molina AJ, Roy S. High glucose induces mitochondrial morphology and metabolic changes in retinal pericytes [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(12) : 8657-8664. DOI:10.1167/iovs.11-7934.
- [18] Ling C, Poulsen P, Carlsson E, et al. Multiple environmental and genetic factors influence skeletal muscle PGC-1alpha and PGC-1beta gene expression in twins [J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(10) : 1518-1526. DOI:10.1172/JCI21889.
- [19] St-Pierre J, Lin J, Krauss S, et al. Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(29) : 26597-26603. DOI:10.1074/jbc.M301850200.
- [20] St-Pierre J, Drori S, Uldry M, et al. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators [J]. *Cell*, 2006, 127(2) : 397-408. DOI:10.1016/j.cell.2006.09.024.
- [21] Bird A. Perceptions of epigenetics [J]. *Nature*, 2007, 447(7143) : 396-398. DOI:10.1038/nature05913.
- [22] Razin A, Riggs AD. DNA methylation and gene function [J]. *Science*, 1980, 210(4470) : 604-610.
- [23] van Hecke MV, Dekker JM, Nijpels G, et al. Homocysteine, S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine are associated with retinal microvascular abnormalities; the Hoorn Study [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2008, 114(7) : 479-487. DOI:10.1042/CS20070275.
- [24] Chen Z, Miao F, Paterson AD, et al. Epigenomic profiling reveals an association between persistence of DNA methylation and metabolic memory in the DCCT/EDIC type 1 diabetes cohort [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(21) : 3002-3011. DOI:10.1073/pnas.1603712113.
- [25] Barrès R, Osler ME, Yan J, et al. Non-CpG methylation of the PGC-1alpha promoter through DNMT3B controls mitochondrial density [J]. *Cell Metab*, 2009, 10(3) : 189-198. DOI:10.1016/j.cmet.2009.07.011.
- [26] Ribel-Madsen R, Fraga MF, Jacobsen S, et al. Genome-wide analysis of DNA methylation differences in muscle and fat from monozygotic twins discordant for type 2 diabetes [J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(12) : e51302 [2017-08-22]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23251491>. DOI:10.1371/journal.pone.0051302.
- [27] Brøns C, Jacobsen S, Nilsson E, et al. Deoxyribonucleic acid methylation and gene expression of PPARGC1A in human muscle is influenced by high-fat overfeeding in a birth-weight-dependent manner [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(6) : 3048-3056. DOI:10.1210/jc.2009-2413.
- [28] Gillberg L, Jacobsen SC, Rönn T, et al. PPARGC1A DNA methylation in subcutaneous adipose tissue in low birth weight subjects—impact of 5 days of high-fat overfeeding [J]. *Metabolism*, 2014, 63(2) : 263-271. DOI:10.1016/j.metabol.2013.10.003.
- [29] Jørgensen SW, Brøns C, Bluck L, et al. Metabolic response to 36 hours of fasting in young men born small vs appropriate for gestational age [J]. *Diabetologia*, 2015, 58(1) : 178-187. DOI:10.1007/s00125-014-3406-6.
- [30] Sookoian S, Rosselli MS, Gemma C, et al. Epigenetic regulation of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease: impact of liver methylation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha promoter [J]. *Hepatology*, 2010, 52(6) : 1992-2000. DOI:10.1002/hep.23927.
- [31] Côté S, Gagné-Ouellet V, Guay SP, et al. PPARGC1alpha gene DNA methylation variations in human placenta mediate the link between maternal hyperglycemia and leptin levels in newborns [J/OL]. *Clin Epigenetics*, 2016, 8 : 72 [2017-10-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4918074>. DOI:10.1186/s13148-016-0239-9.

(收稿日期:2017-10-27 修回日期:2018-05-06)

(本文编辑:张宇)

读者·作者·编者

## 本刊对论文中关键词的著录要求

本刊投稿的论文请分别在中英文摘要下方标引 3~5 个关键词以便于编制文献索引。关键词应选取能反映文章主题概念的词或词组,中英文关键词应一致。投稿作者可登陆 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh> 或 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=mesh> 网站从美国国立医学图书馆的 MeSH 数据库中选取关键词,其中文译名可参照中国医学科学院信息研究所编译的《医学主题词注释表》。未被词表收录的新的专业术语(自由词)可直接作为关键词使用,但应排序在最后。中医药关键词应从中国中医科学院中医药信息研究所编写的《中医药主题词表》中选取。关键词中的缩写词应按《医学主题词注释表》还原为全称,各关键词之间用“;”分隔。

(本刊编辑部)