

· 实验研究 ·

自噬相关因子在糖尿病小鼠晶状体上皮细胞中的表达变化

程荣 张璐 黄钰森

266071 青岛, 青岛大学医学院 山东省眼科研究所白内障科(程荣); 250012 济南, 山东大学临床医学院 山东省眼科研究所(张璐); 266071 青岛, 山东省眼科研究所 山东省眼科学重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地(黄钰森)

通信作者: 黄钰森, Email: huang_yusen@126.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.06.005

【摘要】 目的 通过检测自噬相关因子 BECN1、LC3B 和 P62 在糖尿病小鼠晶状体上皮细胞中的表达情况, 以探讨自噬在糖尿病性白内障发生和发展中的作用。**方法** 取同批次的 6~8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 80 只, 应用随机数字表法随机选取 50 只小鼠采用连续小剂量腹腔内注射链脲佐菌素(STZ) 50 mg/(kg·d) 诱导 1 型糖尿病小鼠模型作为模型组, 其余 30 只小鼠腹腔内注射适当剂量的柠檬酸盐缓冲液作为对照组。3 个月后检测模型组小鼠空腹血糖。使用透射电子显微镜观察模型组和对照组小鼠晶状体上皮细胞自噬小体的形态变化; 免疫组织化学法检测 2 个组小鼠晶状体前囊膜组织中 LC3B 和 P62 蛋白的表达和定位; 荧光定量 PCR 法检测各组小鼠晶状体前囊膜中 BECN1、LC3B 和 P62 mRNA 的表达量; Western blot 法检测 2 个组小鼠晶状体前囊膜中自噬相关蛋白的相对表达量。**结果** 透射电子显微镜下观察发现, 与对照组小鼠相比, 模型组小鼠晶状体上皮细胞中的自噬体体积更大, 且其内包含多个线粒体; 免疫组织化学法检测结果显示, 与对照组小鼠相比, 模型组小鼠晶状体前囊膜中 LC3B 和 P62 蛋白表达均增强; 荧光定量 PCR 结果显示, 模型组小鼠晶状体前囊膜中 BECN1、LC3B 和 P62 mRNA 的相对表达量分别为 1.48 ± 0.10 、 2.62 ± 0.15 和 1.89 ± 0.20 , 均高于对照组的 1.10 ± 0.02 、 1.10 ± 0.05 和 1.01 ± 0.01 , 差异均有统计学意义 ($t=6.64$ 、 14.25 、 6.14 , 均 $P<0.05$); Western blot 检测结果显示, 模型组小鼠晶状体前囊膜中 BECN1、LC3B 和 P62 蛋白的相对表达量分别为 1.50 ± 0.10 、 1.24 ± 0.09 和 3.19 ± 1.04 , 均高于对照组的 1.00 ± 0.00 、 1.00 ± 0.00 和 1.00 ± 0.00 , 差异均有统计学意义 ($t=8.75$ 、 6.10 、 3.65 , 均 $P<0.05$)。**结论** 糖尿病小鼠晶状体上皮细胞中自噬现象出现异常, 自噬功能失调可能在糖尿病性白内障的形成过程中起重要作用。

【关键词】 糖尿病性白内障; 自噬; 晶状体上皮细胞; BECN1; LC3B; P62**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (81370996、81670839); 山东省医学科学院医药卫生科技创新工程

The expression change of autophagy-related factors in lens epithelial cells of diabetic mice Cheng Rong, Zhang Lu, Huang Yusen

Medical College, Qingdao University, Shandong Eye Institute, Cataract Division, Qingdao 266071, China (Cheng R); School of Medicine, Shandong University, Shandong Eye Institute, Jinan 250012, China (Zhang L); Shandong Provincial Key Laboratory of Ophthalmology, Shandong Eye Institute, Qingdao 266071, China (Huang YS)

Corresponding author: Huang Yusen, Email: huang_yusen@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the role of autophagy in the development of diabetic cataract by detecting the expression of autophagy-related factors (BECN1, LC3B, P62) in diabetic mouse lens epithelial cells.

Methods Eighty C57BL/6 male mice were selected. Fifty C57 mice were consecutively dosed with streptozotocin (STZ) 50 mg/(kg·d) by intraperitoneal injection to induce type 1 diabetes mellitus model, and served as the model group; the remaining 30 mice were injected with appropriate dose of citrate buffer, and served as the control group. The fasting plasma glucose was tested by collecting the caudal vein blood in the model group. The morphological changes of autophagy of lens epithelial cells were observed by transmission electron microscopy. The expression and localization of LC3B and P62 protein were detected by immunohistochemistry. PCR was used to detect the expression of BECN1, LC3B and P62 mRNA in the anterior capsule. The relative expression of autophagy-related proteins in the anterior capsule was detected by Western blot. The use of animals complied with Regulations on the Management of Experimental Animals from Shandong Eye Institute. **Results** Compared with the control group, transmission

electron microscopy revealed that the autophagosomes of lens epithelial cells in model group was large and contained more mitochondria. Immunohistochemical method showed that the expression of LC3B and P62 proteins in the anterior capsule tissue of experiment group was stronger than that of the control group. The relative expression level of BECN1, LC3B and P62 mRNA in the experiment group was 1.48 ± 0.10 , 2.62 ± 0.15 and 1.89 ± 0.20 , respectively, which was higher than 1.10 ± 0.02 , 1.10 ± 0.05 and 1.01 ± 0.01 in the control group, with significant differences between the two groups ($t = 6.64, 14.25, 6.14$; all at $P < 0.05$). The relative expression of BECN1, LC3B and P62 protein in the experiment group was 1.50 ± 0.10 , 1.24 ± 0.09 and 3.19 ± 1.04 , respectively, which was higher than 1.00 ± 0.00 , 1.00 ± 0.00 and 1.00 ± 0.00 in the control group, with significant differences between the two groups ($t = 8.75, 6.10, 3.65$; all at $P < 0.05$). **Conclusions** The phenomenon of autophagy in lens epithelial cells of diabetic mice is abnormal, and autophagy dysfunction may play an important role in the formation of diabetic cataract.

[Key words] Diabetic cataract; Autophagy; Lens epithelial cells; BECN1; LC3B; P62

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81370996, 81670839); Medical Science and Technology Innovation Project of Shandong Academy of Medical Sciences

糖尿病性白内障是糖尿病患者除糖尿病视网膜病变外又一重要的致盲原因。糖尿病患者在早期就容易发生白内障,其发展速度较年龄相关性白内障更快^[1]。晶状体上皮细胞(lens epithelium cells, LECs)在晶状体发育过程中起着运输、代谢和解毒的作用^[2],其结构和功能受损直接影响白内障的发生。自噬是一种重要的细胞内降解过程,在正常状态下可将细胞质中变性、受损和衰老的蛋白质以及异常细胞器转移至溶酶体进行降解,以实现细胞稳态和细胞器的更新,对细胞有保护作用^[3-4]。但是,异常的细胞自噬可导致多种疾病^[5-7]。自噬已被证实参与多种类型白内障的病理生理过程,如遗传性白内障、后发性白内障和年龄相关性白内障^[8-11]。自噬-溶酶体途径可降解和清除 LECs 中聚集的蛋白质和受损的细胞器,对保持晶状体透明度至关重要。BECN1 是自噬体形成的关键调控性蛋白^[12];LC3B 是衡量自噬水平的重要标志^[13];P62 作为自噬特异性底物,其整体表达水平与自噬活性存在负相关^[14]。目前,糖尿病性白内障的发病机制与细胞自噬的关系报道较少,检测糖尿病小鼠和正常小鼠晶状体前囊膜组织中自噬相关因子 BECN1、LC3B 以及 P62 的表达是否存在差异,进一步研究其调控机制,以为糖尿病性白内障的发病机制和防治方法提供新的研究思路和干预靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 同批次的 6~8 周龄雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠 80 只,体质量 18~25 g,购自中国医学科学院药物研究所。12 h/12 h 明暗循环光照,温度为 25℃,湿度 50% 环境下饲养。实验动物的使用遵循山东省眼科研究所实验动物伦理委员会制定的《实验动物管理条例》。

1.1.2 主要试剂及仪器 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(美国 Sigma 公司);免疫组织化学检测试剂盒(福州迈新公司);兔 Beclin-1 多克隆抗体(3738,美国 Cell Signaling 公司);兔 LC3B 多克隆抗体(700712)(美国 Invitrogen 公司);兔 P62 单克隆抗体(ab109012)(英国 Abcam 公司);辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(ZB-2301)(北京中杉金桥公司);ECL 发光试剂盒(美国 Thermo 公司);RNA 提取试剂盒(德国 Qiagen 公司);cDNA 合成第一链试剂盒(大连 Takara 公司);Real Master Mix(SYBR Green)试剂盒(北京天根生化科技有限公司)。7500 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);旋转石蜡切片机(美国 Thermo 公司);Reichert-Jung ULTRACUT E 型超薄切片机(奥地利徕卡公司);JEM1200EX 透射电子显微镜(日本电子 Jeol 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立及分组 采用随机数字表法对小鼠进行随机分组,模型组 50 只,对照组 30 只。STZ 的注入量标准为每只小鼠 50 mg/kg,每日注射前小鼠需禁食至少 6 h。模型组小鼠连续 5 d 腹腔内注射 STZ-枸橼酸盐溶液;对照组小鼠腹腔内注射适当剂量的枸橼酸盐缓冲液。3 个月后,模型组鼠尾静脉切开取血,采用拜安康快速血糖检测仪(美国拜耳医药保健有限公司)检测其血糖浓度,浓度大于 16.7 mmol/L 认为 1 型糖尿病小鼠建模成功,其余血糖未达标的小鼠淘汰。模型组与对照组小鼠年龄匹配,自由饮食,分笼饲养。

1.2.2 标本采集 2 个组小鼠再饲养 4 个月,取鼠尾静脉血测血糖,称体质量。颈椎脱臼法处死后,立即取出 4 只小鼠双眼晶状体置于体积分数 2.5% 戊二醛中固定,用于透射电子显微镜观察;取出 4 只小鼠双眼球置于质量分数 4% 多聚甲醛中固定,用于免疫组织化

学法检测;取出 18 只小鼠双眼晶状体前囊膜于 -80°C 保存,分别用于总 RNA 的提取和总蛋白的提取,3 只小鼠的 6 个囊膜混合为一份样品。

1.2.3 透射电子显微镜下观察晶状体上皮中细胞自噬小体的形态变化 将晶状体置于 2.5% 戊二醛中固定 4 h,0.1 mol/L 磷酸漂洗液漂洗 3 次,每次 15 min;质量分数 1% 锇酸固定液固定 1.0~1.5 h,0.1 mol/L 磷酸漂洗液漂洗 3 次,每次 15 min;在体积分数 50%、70%、90% 的丙酮中依次脱水 15 min,最后在 100% 的丙酮中脱水 3 次,每次 15~20 min;用 Epon812 树脂包埋晶状体;依次在 37、45 和 60 $^{\circ}\text{C}$ 下各固定 24 h;使用 Reichert-Jung ULTRACUT E 型超薄切片机 70 nm 厚切片,铜网捞片;醋酸铀染色 15 min,枸橼酸铅染色 15 min,使用 JEM1200EX 透射电子显微镜观察并拍照。

1.2.4 免疫组织化学法检测小鼠晶状体前囊膜组织中 LC3B 和 P62 蛋白的表达分布 将小鼠眼球置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h,脱水后,常规石蜡包埋,4 μm 厚连续切片,黏附玻片摊片,60 $^{\circ}\text{C}$ 烤片过夜;石蜡切片脱蜡,高压锅加热法修复抗原,体积分数 3% 过氧化氢孵育组织以消除内源性过氧化物酶活性。山羊抗兔 LC3B 和 P62 (均 1:200) 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,PBS 清洗,增强剂 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min,相应二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。DAB 溶液显色,光学显微镜下观察显色程度。Nikon 显微摄像系统拍照,上皮细胞出现棕色着色为阳性。

1.2.5 荧光定量 PCR 法检测小鼠晶状体前囊膜 BECN1、LC3B 和 P62 mRNA 的表达 取小鼠晶状体前囊膜组织研磨,按照 RNA 提取试剂盒说明步骤提取总 RNA,在紫外分光光度计上测量样品在 260 nm 和 280 nm 处的吸光度(A)值,确定 RNA 的浓度及纯度,并逆转录成 cDNA。引物由青岛德海达生物技术有限公司设计合成,引物序列见表 1;使用 ABI 7500 real-time PCR 系统,按 Real Master Mix (SYBR Green) 试剂盒说明书加入试剂进行 PCR 反应。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 热启动 10 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 延伸与退火 60 s,共 45 个循环。以 GAPDH 为内参,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各目的基因的相对表达量。

表 1 各基因引物序列

基因	引物序列	Tm 值
BECN1	F:5'-AAGCTCAGTACCAGCGGGAGTA-3'	59
	R:5'-TGTGGAAGGTGGCATTGAAG-3'	58
LC3B	F:5'-CCCACCAAGATCCCACTGAT-3'	58
	R:5'-TTGCTTAGCATTGAGCTGCAA-3'	58
P62	F:5'-TCCCAATGTCAATTCCTGAAGA-3'	59
	R:5'-TCTGTGCTGTGCTGGAAGT-3'	60

1.2.6 Western blot 法检测晶状体前囊膜中 BECN1、LC3B 和 P62 蛋白的相对表达量 将各组前囊膜分别置于 40 μl 细胞裂解液里,提取总蛋白,BCA 法测定蛋白含量。取 10 μg 总蛋白上样行质量分数 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,80 V 恒压电泳约 125 min,待溴酚蓝到达板底时,终止电泳;在 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境下,100 mA、2.5 h 转膜至 PVDF 膜上,质量分数 5% 脱脂奶粉 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜,次日分别添加 BECN1(1:4 000)、LC3B(1:300)和 P62(1:10 000)一抗室温孵育 2 h;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1:5 000)室温下孵育 1 h。ECL 化学发光液显影成像,暗室压片洗片。采用 Image J 图像分析软件分析各目的蛋白表达的灰度值,以 GAPDH 为内参照,计算各目的蛋白相对表达量。实验至少重复 3 次,取平均值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析。本研究中计量资料数据经 Sapiro-Wilk 检验呈正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示。2 个组自噬相关因子蛋白及 mRNA 相对表达量的差异比较采用独立样本 t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 透射电子显微镜下观察晶状体上皮细胞自噬小体的形态变化

透射电子显微镜下观察显示,在对照组小鼠和模型组小鼠晶状体上皮细胞中均能发现双层膜包被的圆形或椭圆形的自噬小体,其内包裹着线粒体。与对照组小鼠相比,模型组小鼠晶状体上皮细胞中的自噬小体体积更大,且包含多个线粒体(图 1)。

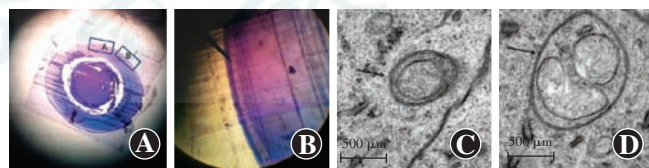


图 1 透射电子显微镜下对照组和模型组小鼠晶状体上皮细胞自噬小体形态变化 A:将小鼠晶状体树脂固定后进行切片,在晶体前囊膜的瞳孔对应位置进行定位,即 A 区和 B 区 B:定位处晶状体前囊膜下附着的一层晶状体上皮细胞 C:对照组晶状体上皮细胞中的自噬小体(箭头)($\times 50\,000$,标尺=500 nm) D:模型组小鼠晶状体上皮细胞中的自噬小体(箭头)体积更大,且包含多个线粒体($\times 50\,000$,标尺=500 nm)

2.2 2 个组小鼠晶状体上皮细胞中 LC3B 和 P62 蛋白的表达

免疫组织化学染色检测结果表明,LC3B 和 P62 蛋白在对照组和实验组小鼠中的晶状体上皮细胞中均

有表达,但在模型组小鼠晶状体上皮细胞中表达更强(图2)。

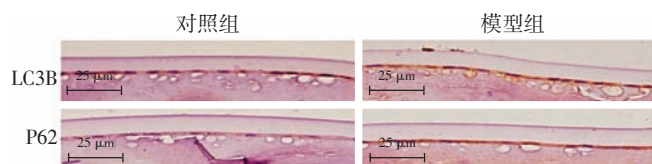


图2 免疫组织化学染色法检测2个组小鼠晶状体上皮细胞中LC3B和P62的表达($\times 400$,标尺=25 μm)与对照组相比,LC3B和P62蛋白在模型组小鼠晶状体上皮细胞中表达更强

2.3 2个组小鼠晶状体上皮细胞中 BECN1、LC3B 和 P62 mRNA 的表达变化

荧光定量 PCR 检测结果表明,模型组小鼠晶状体前囊膜中 BECN1 mRNA、LC3B mRNA 和 P62 mRNA 的相对表达量分别为 1.48 ± 0.10 、 2.62 ± 0.15 和 1.89 ± 0.20 ,明显高于对照组的 1.10 ± 0.02 、 1.10 ± 0.05 和 1.01 ± 0.01 ,差异均有统计学意义($t = 6.64$ 、 14.25 、 6.14 ,均 $P < 0.05$)(图3)。

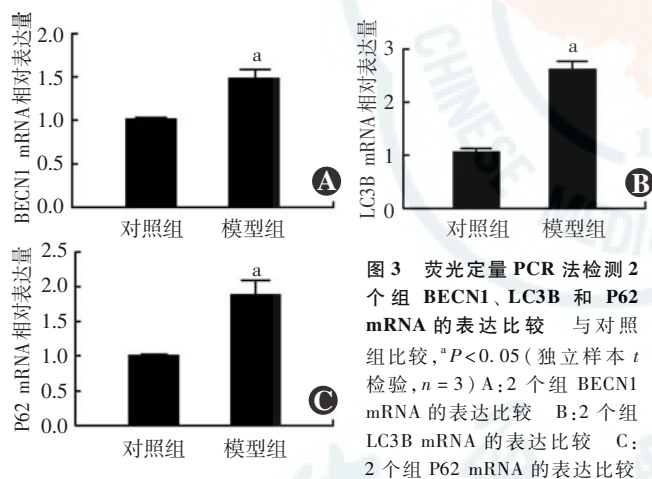


图3 荧光定量 PCR 法检测2个组 BECN1、LC3B 和 P62 mRNA 的表达比较与对照组比较, $^a P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) A:2个组 BECN1 mRNA 的表达比较 B:2个组 LC3B mRNA 的表达比较 C:2个组 P62 mRNA 的表达比较

2.4 2个组小鼠晶状体上皮细胞中 BECN1、LC3B 和 P62 蛋白的表达变化

Western blot 检测结果表明,模型组小鼠晶状体前囊膜中 BECN1、LC3B 和 P62 蛋白相对表达量分别为 1.50 ± 0.10 、 1.24 ± 0.09 和 3.19 ± 1.04 ,明显高于对照组的 1.00 ± 0.00 、 1.00 ± 0.00 和 1.00 ± 0.00 ,差异均有统计学意义($t = 8.75$ 、 6.10 、 3.65 ,均 $P < 0.05$)(图4)。

3 讨论

组织学上晶状体由晶状体囊、未分化的单层立方上皮细胞及其分化而来的纤维细胞组成。纤维细胞在分化成熟过程中会伴随细胞核、线粒体、内质网等细胞器的退化或降解来形成无细胞器区域^[15-17],从而保证

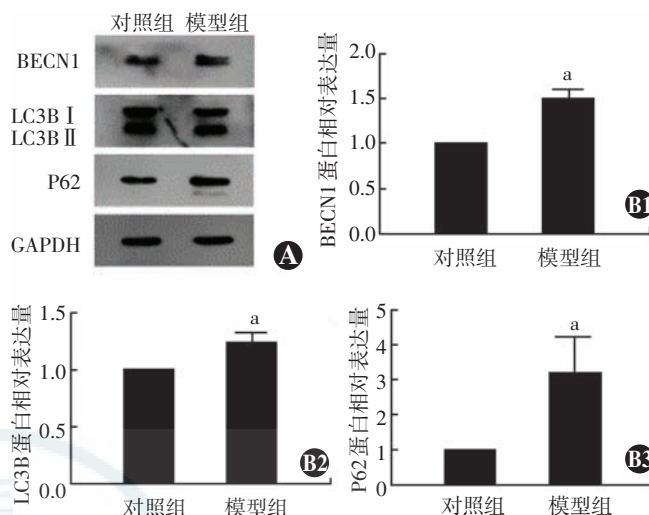


图4 Western blot 检测各组小鼠晶状体上皮细胞中 BECN1、LC3B 和 P62 蛋白的表达 A:各蛋白 Western blot 电泳图 B:2个组 BECN1、LC3B 和 P62 蛋白表达的定量比较与对照组比较, $^a P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) B1:2个组 BECN1 蛋白表达的定量比较 B2:2个组 LC3B 蛋白表达的定量比较 B3:2个组 P62 蛋白表达的定量比较

晶状体的透明性。这种由上皮细胞转化为成纤维细胞的现象持续存在,随着年龄的增加,其转化水平和速度会逐渐降低。若此分化过程出现异常,会导致晶状体发育异常,且晶状体透明性将受到影响。本研究中考考虑晶状体囊膜本身无细胞结构,而晶状体上皮细胞仅附着在前囊膜处,故取材时从后囊膜部位分离晶状体内容物(皮质和核),取整个晶状体囊膜用于实验,可最大程度地保留晶状体上皮细胞,保证后续实验。

人类晶状体上皮细胞和纤维细胞中有 42 种基因参与自噬的发生和发展过程^[18]。FYVE 锌指结构域和卷曲螺旋结构域蛋白 1(FYVE and coiled-coil-domain containing 1, FYCO1)能与 LC3B、Rab7 和 P13P 相互作用,导向运输微管和自噬囊泡,对自噬溶酶体的形成具有重要作用^[19]。自噬在多种类型白内障的发生过程中起重要作用,Chen 等^[20]研究发现先天性白内障患者晶状体缺少 FYCO1,大量自噬囊泡聚集,出现白内障。连接蛋白质 50(connexin50, CX50)是一种在晶状体中表达的连接蛋白,Lichtenstein 等^[21]通过生物化学方法和荧光定位分析显示,突变型 CX50(88 号位脯氨酸代替丝氨酸, CX50P88S)与自噬标志蛋白 LC3 共定位,细胞自噬降解不足, CX50P88S 在细胞内持续聚集,可导致先天性白内障的发生。特异性敲除 Atg5 的模型鼠中 P62、泛素化蛋白、不溶性晶状体蛋白凝集,致使年龄相关性白内障的发生; Pick3c3(即 Vsp34)参与 Atg5 依赖性细胞自噬的调控,在特异性敲除 Pick3c3 的模型鼠中,晶状体初级纤维细胞内细胞

器的降解不受影响,但晶状体的发育过程受到干预,出现先天性白内障^[11]。Wignes 等^[9]发现 α B-R120G 突变模型小鼠晶状体中自噬过程受到抑制,自噬囊泡体积增大,晶状体上皮细胞和纤维细胞中 LC3B-II 和 P62 蛋白水平增高,引发先天性白内障。以上研究均表明自噬在调控晶状体蛋白正常代谢以及维持晶状体透明性过程中发挥重要作用。

糖尿病性白内障发病机制较复杂,涉及因素多,目前较为成熟的学说有多元醇代谢异常学说、非酶糖基化学说和氧化应激学说^[22-24]。但是当前关于糖尿病性白内障的发病机制与自噬的关系报道较少。本研究通过透射电子显微镜观察发现模型组小鼠晶状体上皮细胞自噬囊泡体积较对照组更大,囊泡内包含多个线粒体,说明糖尿病小鼠晶状体上皮细胞自噬情况发生改变。BECN1 在自噬囊泡的形成和成熟过程中发挥重要作用。LC3B 定位在自噬体膜的表面,参与自噬体的形成,目前常用 LC3-II/I 的比值来评估自噬水平^[25]。P62 作为自噬底物,可连接 LC3 和泛素化的底物,随后被整合到自噬体中,并在自噬溶酶体中被降解^[26],一般用 P62 联合 LC3 指标进行自噬流的评估。本研究中模型组小鼠晶状体上皮细胞中 BECN1、LC3B 和 P62 的表达均较对照组增高,推测糖尿病模型鼠晶状体上皮细胞自噬出现紊乱,自噬体与溶酶体结合可能出现异常。

综上所述,自噬功能失调可能是造成糖尿病性白内障形成的重要原因之一。本研究仅检测了自噬相关因子在 2 个组中的差异表达,今后应进一步研究自噬在晶状体中的调控机制及其与氧化应激的相互作用关系来明确糖尿病性白内障的发病机制,为糖尿病性白内障的防治提供理论基础。

参考文献

- [1] Pollreis A, Schmidt-Erfurth U. Diabetic cataract-pathogenesis, epidemiology and treatment [J/OL]. J Ophthalmol, 2010, 2010: 608751 [2017-06-22]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20634936>. DOI: 10.1155/2010/608751.
- [2] Andley UP. The lens epithelium: focus on the expression and function of the alpha-crystallin chaperones [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40(3): 317-323. DOI: 10.1016/j.biocel.2007.10.034.
- [3] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion [J]. Nature, 2008, 451(7182): 1069-1075. DOI: 10.1038/nature06639.
- [4] Kundu M, Thompson CB. Autophagy: basic principles and relevance to disease [J]. Annu Rev Pathol, 2008, 3: 427-455. DOI: 10.1146/annurev.pathmechdis.2.010506.091842.
- [5] Zhou S, Zhao L, Kuang M, et al. Autophagy in tumorigenesis and cancer therapy: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? [J]. Cancer Lett, 2012, 323(2): 115-127. DOI: 10.1016/j.canlet.2012.02.017.
- [6] Lavandro S, Troncoso R, Rothermel BA, et al. Cardiovascular autophagy: concepts, controversies, and perspectives [J]. Autophagy, 2013, 9(10): 1455-1466. DOI: 10.4161/auto.25969.
- [7] 谢佳, 朱瑞琳, 杨柳. 自噬在年龄相关性黄斑变性和视网膜脱离中的研究进展 [J]. 中华实验眼科杂志, 2016, 34(12): 1145-1148. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.12.021.
- [8] Xie J, Zhu RL, Yang L. Research progress of autophagy in age-related macular degeneration and retinal detachment [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2016, 34(12): 1145-1148. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.12.021.
- [9] Andley UP, Goldman JW. Autophagy and UPR in alpha-crystallin mutant knock-in mouse models of hereditary cataracts [J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1860(1 Pt B): 234-239. DOI: 10.1016/j.bbagen.2015.06.001.
- [10] Wignes JA, Goldman JW, Weihl CC, et al. P62 expression and autophagy in α B-crystallin R120G mutant knock-in mouse model of hereditary cataract [J]. Exp Eye Res, 2013, 115: 263-273. DOI: 10.1016/j.exer.2013.06.026.
- [11] Chandler HL, Gervais KJ, Lutz EA, et al. Cyclosporine A prevents *ex vivo* PCO formation through induction of autophagy-mediated cell death [J]. Exp Eye Res, 2015, 134: 63-72. DOI: 10.1016/j.exer.2015.03.020.
- [12] Morishita H, Eguchi S, Kimura H, et al. Deletion of autophagy-related 5 (Atg5) and Pik3c3 genes in the lens causes cataract independent of programmed organelle degradation [J]. J Biol Chem, 2013, 288(16): 11436-11447. DOI: 10.1074/jbc.M112.437103.
- [13] Pirtoli L, Cevenini G, Tini P, et al. The prognostic role of Beclin 1 protein expression in high-grade gliomas [J]. Autophagy, 2009, 5(7): 930-936.
- [14] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing [J]. EMBO J, 2000, 19(21): 5720-5728. DOI: 10.1093/emboj/19.21.5720.
- [15] Kirkin V, McEwan DG, Novak I, et al. A role for ubiquitin in selective autophagy [J]. Mol Cell, 2009, 34(3): 259-269. DOI: 10.1016/j.molcel.2009.04.026.
- [16] Bassnett S. Mitochondrial dynamics in differentiating fiber cells of the mammalian lens [J]. Curr Eye Res, 1992, 11(12): 1227-1232.
- [17] Bassnett S. The fate of the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum during lens fiber cell differentiation [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995, 36(9): 1793-1803.
- [18] Meavoy JW, Chamberlain CG, Longh RUD, et al. Lens development [J]. Eye, 1999, 13(pt 3b)(6): 425-437.
- [19] Brennan LA, Kantorow WL, Chauss D, et al. Spatial expression patterns of autophagy genes in the eye lens and induction of autophagy in lens cells [J]. Mol Vis, 2012, 18: 1773-1786.
- [20] Pankiv S, Johansen T. FYCO1: linking autophagosomes to microtubule plus end-directing molecular motors [J]. Autophagy, 2010, 6(4): 550-552. DOI: 10.4161/auto.6.4.11670.
- [21] Chen J, Ma Z, Jiao X, et al. Mutations in FYCO1 cause autosomal-recessive congenital cataracts [J]. Am J Hum Genet, 2011, 88(6): 827-838. DOI: 10.1016/j.ajhg.2011.05.008.
- [22] Lichtenstein A, Minogue PJ, Beyer EC, et al. Autophagy: a pathway that contributes to connexin degradation [J]. J Cell Sci, 2011, 124(Pt 6): 910-920. DOI: 10.1242/jcs.073072.
- [23] Oishi N, Morikubo S, Takamura Y, et al. Correlation between adult diabetic cataracts and red blood cell aldose reductase levels [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47(5): 2061-2064. DOI: 10.1167/iov.05-1042.
- [24] Hong SB, Lee KW, Handa JT, et al. Effect of advanced glycation end products on lens epithelial cells *in vitro* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 275(1): 53-59. DOI: 10.1006/bbrc.2000.3245.
- [25] Ahmed N. Advanced glycation endproducts—role in pathology of diabetic complications [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2005, 67(1): 3-21. DOI: 10.1016/j.diabres.2004.09.004.
- [26] Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy [J]. Autophagy, 2012, 8(4): 445-544.
- [27] Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, et al. P62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy [J]. J Biol Chem, 2007, 282(33): 24131-24145. DOI: 10.1074/jbc.M702824200.

(收稿日期: 2017-12-29 修回日期: 2018-04-28)

(本文编辑: 张宇)