

· 实验研究 ·

SC79 对高糖诱导 RPE 细胞凋亡的拮抗作用 及其对 AKT-XIAP 信号通路的调控机制

郑磊 马大卉 陈妙虹 张国明

暨南大学附属深圳眼科医院 深圳眼科学重点实验室, 深圳 518040

通信作者: 张国明, Email: 13823509060@163.com

【摘要】目的 探讨特异性 AKT 激活剂 SC79 对体外高糖诱导人视网膜色素上皮 (ARPE)-19 细胞凋亡的拮抗作用及其潜在机制。**方法** 将体外培养的 ARPE-19 细胞分别置于含 5、10、20 μg/ml SC79 的高糖 (30 mmol/L 葡萄糖) 培养液中培养 6、12、24 h, 根据细胞增生率探索最佳的作用浓度和作用时间。将细胞分为 4 个组, 其中正常对照组、甘露醇组和高糖组、分别于含 5.6 mmol/L 葡萄糖正常培养液、含 5.6 mmol/L 葡萄糖和 24.4 mmol/L 甘露醇培养液、高糖培养液中培养 48 h, 高糖+SC79 组细胞于含 10 μg/ml SC79 正常培养液中培养 12 h, 然后于高糖培养液中继续培养 36 h。采用 MTS 法检测细胞的增生率, 采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率, 采用 Western blot 法检测磷酸化的蛋白激酶 B (p-Akt)、X 连锁凋亡抑制蛋白 (XIAP)、caspase-9、caspase-3 及活化片段 active-caspase-3 的相对表达量。将细胞分为 Neg-shRNA 组、AKT shRNA 组和空白对照组分别加入相应转染复合物和无血清培养基, 采用实时荧光定量 PCR 检测各转染组 Akt mRNA 表达。将转染细胞分为 Neg-shRNA+SC79 组和 AKT shRNA+SC79 组, 参照高糖+SC79 组处理方式进行培养, 采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。**结果** 不同浓度 SC79 处理不同时间细胞中以 10 μg/ml SC79 预处理 12 h 细胞的增生率最高。高糖组细胞增生率明显低于正常对照组、甘露糖组和高糖+SC79 组, 差异具有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。高糖组细胞凋亡率为 $(52.27 \pm 3.21)\%$, 明显高于正常对照组的 $(3.90 \pm 0.71)\%$ 和高糖+SC79 组的 $(20.70 \pm 3.62)\%$, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。高糖组 p-Akt、XIAP、caspase-9 及 caspase-3 蛋白相对表达量明显低于正常对照组和高糖+SC79 组, active-caspase-3 蛋白相对表达量明显高于正常对照组和高糖+SC79 组, 差异均具有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。正常对照组、Neg-shRNA 组和 AKT shRNA 组 Akt mRNA 相对表达量分别为 0.60 ± 0.07 、 0.59 ± 0.03 和 0.11 ± 0.10 , 总体比较差异有统计学意义 ($F = 30.44$, $P < 0.01$)。AKT shRNA+SC79 组细胞凋亡率明显高于高糖+SC79 组和 Neg-shRNA+SC79 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$)。**结论** SC79 可以部分拮抗高糖诱导的 ARPE-19 细胞凋亡, 其机制可能与活化 AKT/XIAP 通路, 抑制凋亡执行蛋白 caspase 家族有关。

【关键词】 高糖; 视网膜色素上皮细胞; SC79; 凋亡

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82003794); 深圳市科创委基础研究 (面上项目) (JCYJ20190808170609490)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210710-00405

Antagonistic effect of SC79 on high glucose-induced apoptosis of RPE cells and its regulatory mechanism on AKT-XIAP signaling pathway

Zheng Lei, Ma Dahui, Chen Miaohong, Zhang Guoming

Affiliated Shenzhen Eye Hospital of Jinan University, Shenzhen Key Laboratory of Ophthalmology, Shenzhen 518040, China

Corresponding author: Zhang Guoming, Email: 13823509060@163.com

[Abstract] **Objective** To investigate the antagonistic effect and potential mechanism of specific AKT activator SC79 on the apoptosis of human retinal pigment epithelial (ARPE)-19 cells induced by high glucose *in vitro*. **Methods** The ARPE-19 cells were cultured in high glucose medium (containing 30 mmol/L glucose) plus 5, 10 or 20 μg/ml SC79, respectively. After 6-, 12- and 24-hour culture, the optimal experimental concentration and timing were determined according to cell proliferation rate. Then ARPE-19 cells were divided into four groups, normal control group cultured in normal medium containing 5.6 mmol/L glucose for 48 hours, mannitol group cultured in medium containing 5.6 mmol/L glucose and 24.4 mmol/L mannitol for 48 hours, high glucose group cultured in



high glucose medium for 48 hours, and high glucose+SC79 group cultured in normal medium containing 10 μg/ml SC79 for 12 hours plus in high glucose medium for 36 hours. The proliferation rate of ARPE-19 cells was detected by MTS assay. The apoptosis rate was measured by flow cytometry. The relative expression levels of phosphorylated protein kinase B (p-Akt), X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), caspase-9, caspase-3 and its active fragments (active-caspase-3) were assayed by Western blot. The ARPE-19 cells were divided into Neg-shRNA group, AKT shRNA group and blank control group and were treated with the corresponding transfection complex and serum-free medium. The AKT mRNA expression was detected by real-time PCR. The transfected ARPE-19 cells were divided into Neg-shRNA+SC79 group and AKT shRNA+SC79 group and were cultured according to the culturing method of high-glucose+SC79 group. The apoptosis rate of the two groups was tested by flow cytometry. **Results** Among different concentrations of SC79 and treatment times, the proliferation rate of cells treated with 10 μg/ml SC79 for 12 hours was the highest. The proliferation rate of ARPE-19 cells in high-glucose group was significantly lower than that in normal control group, mannitol group and high-glucose+SC79 group, and the differences were statistically significant (all at $P<0.01$). The apoptosis rate of cells in the high-glucose group was (52.27±3.21)%, which was significantly higher than (3.90±0.71)% in normal control group and (20.70±3.62)% in high-glucose+SC79 group (both at $P<0.01$). The relative expression levels of p-Akt, XIAP, caspase-9 and caspase-3 were significantly lower and the relative expression level of active-caspase-3 was significantly higher in high glucose group than those in normal control group and high-glucose+SC79 group (all at $P<0.05$). The relative expression level of AKT mRNA in normal control group, Neg-shRNA group and AKT shRNA group was 0.60±0.07, 0.59±0.03 and 0.11±0.10, respectively, showing a statistically significant difference among the groups ($F=30.44, P<0.01$). The apoptosis rate of cells in the AKT shRNA+SC79 group was significantly higher than that in high-glucose+SC79 group and Neg-shRNA+SC79 group (both at $P<0.001$). **Conclusions** SC79 can partially antagonize the apoptosis of ARPE-19 cells induced by high glucose, which is related to the activation of AKT/XIAP pathway and the inhibition of the caspase family.

[Key words] High glucose; Retinal pigment epithelial cell; SC79; Apoptosis

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82003794); Basic Research (General Project) Supported by Shenzhen Science and Technology Innovation Commission (JCYJ20190808170609490)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20210710-00405

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病的严重并发症之一,是全世界范围内工作年龄人群排名第一位的致盲疾病,严重威胁患者的生活质量,同时也给患者家庭和社会带来沉重的经济负担^[1-2]。视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞参与构成血-视网膜外屏障,在维持视网膜正常的生理功能方面发挥重要作用^[3-4]。而高糖状态可以导致RPE细胞凋亡,破坏视网膜外屏障完整性、加剧黄斑水肿形成和光感受器细胞损伤等^[5-7]。蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)通路是细胞生理过程中的经典通路之一,参与增生、分化、凋亡和葡萄糖转运等多种细胞功能的调节^[8-9]。近年来研究发现AKT通路的抑制可能参与了高糖诱导RPE细胞凋亡的病理过程^[10]。SC79是一种特异性的AKT激活剂,已在角膜损伤模型、肝损伤模型以及脑缺血模型等多种疾病体外模型中被证实可通过活化AKT而促进组织修复^[11-13]。因此我们推测SC79对高糖环境下的视网膜细胞具有一定的保护作用。本研究拟探索SC79对高糖环境中RPE细胞的保护作用及其可能的作用机制,以期为DR治疗药物研究提供细胞层面的线索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 人视网膜色素上皮细胞系(human retinal pigment epithelial cells-19, ARPE-19)购自美国菌种保藏中心。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM/F12培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、质量分数0.25%胰蛋白酶、MTS(美国Gibco公司);膜联蛋白V-荧光异硫氰酸盐(annexin V-fluorescein isothiocyanate, Annexin V)/碘化丙啶(propidium iodide, PI)双染凋亡检测试剂盒、SC79、二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)、青链霉素(100 μg/ml)、Trizol试剂(美国Sigma公司);兔源p-AKT单克隆抗体(4060)、兔源X连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)单克隆抗体(14334)、鼠源caspase-9单克隆抗体(9508)、兔源caspase-3单克隆抗体(9662)、兔源active-caspase-3单克隆抗体(9661)、鼠源Actin单克隆抗体(3700)(美国CST公司);羊抗鼠IgG和羊抗兔IgG荧光二抗(美国Licor公司);RIPA裂解缓冲液(上海碧云天生物技术



有限公司);LipofectamineTM 2000 转染试剂、RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒(美国 Invitrogen 公司);AKT 短发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA)质粒(上海吉玛制药技术有限公司);逆转录试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司)。流式细胞仪(美国 Beckman 公司);Odyssey 双色红外成像系统(美国 Licor 公司);超微量核酸分析仪(美国 Thermo Fisher 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组处理 ARPE-19 细胞用含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基(含有 1% 的青链霉素)培养于 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱内,每 3 天传代 1 次,取对数期生长的细胞进行实验。将细胞分别置于含 5、10、20 μg/ml SC79 的高糖(30 mmol/L 葡萄糖)培养液中培养 6、12、24 h,更换高糖培养基继续培养细胞至 48 h 检测细胞增生情况,并筛选最佳药物浓度及作用时间。另将培养的细胞分为 4 个组,其中正常对照组于含 5.6 mmol/L 葡萄糖的 DMEM/F12 培养基培养 48 h,甘露醇组于含 5.6 mmol/L 葡萄糖和 24.4 mmol/L 甘露醇的 DMEM/F12 培养液培养 48 h,高糖组于含高糖的 DMEM/F12 培养液培养 48 h,高糖 + SC79 组于含 10 μg/ml SC79 的高糖培养液中预处理后 12 h 更换为含高糖的 DMEM/F12 培养液继续培养 36 h。

1.2.2 MTS 法测定细胞增生率 取生长状态良好的 ARPE-19 细胞,制成细胞悬液并计数,细胞密度为 1×10^5 个/ml。按照 1.2.1 分组方案以 200 μl/孔接种于 96 孔板;加入 MTS 20 μl,置于 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱中继续培养 4 h;以加入 MTS 溶液 20 μl/孔作为空白孔。采用酶标仪于 490 nm 波长处检测各孔的吸光度值(absorbance, A 值)。计算细胞增生率 = (各组 A 值 - 空白孔 A 值)/(正常对照组 A 值 - 空白孔 A 值) × 100%。所有实验均独立重复 3 次。

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡水平 取对数生长期 ARPE-19 细胞,收集并调整细胞密度至 2×10^5 个/ml,接种于 6 孔板,按照分组方案加入相应的培养液 2 ml/孔,培养 48 h。用 0.25% 胰酶消化后收集细胞,预冷 PBS 洗 1 次,常规 Annexin-V/PI 染色后采用流式细胞仪检测细胞凋亡,统计流式细胞图中右上及右下象限凋亡细胞比率。所有实验均独立重复 3 次。

1.2.4 Western blot 法检测相应靶蛋白表达量 收集各组培养 48 h 的细胞,用 PBS 洗涤,加入 RIPA 裂解缓冲液溶解细胞,离心半径 8 cm,13 000 r/min 离心 10 min,收集上清液蛋白,采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白质转印至 PVDF 膜。将 PVDF 膜置于含质量分数 5% 脱脂奶粉中室温封闭 1 h,加入质量分数

5% BSA 稀释的 p-Akt(1:1 000)、XIAP(1:1 000)、active-caspase-3(1:500)、caspase-9(1:1 000)、caspase-3(1:1 000)、Actin(1:1 000)抗体,摇床上室温孵育 30 min,4 ℃ 孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 5 min;加入相应 IRDye 680CW 或 IRDye 800CW 荧光二抗(均 1:1 000),室温避光孵育 1 h,使用 LICOR-Odyssey 系统显影分析。以 actin 为内参照,计算各目的蛋白相对表达量。

1.2.5 细胞转染及分组 将 ARPE-19 细胞分为正常对照组、无义寡核苷酸阴性对照组(Neg-shRNA)和 AKT shRNA 转染组,其中正常对照组不做任何处理,无义寡核苷酸质粒和 AKT shRNA 质粒由上海吉玛制药技术有限公司提供。待 ARPE-19 细胞生长至 90% 融合时,用培养基将细胞制成密度为 2.0×10^5 个/ml 的细胞悬液,按 0.5 ml/孔接种于 24 孔板,置于 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h,用无血清、不含双抗的培养基分别稀释 AKT shRNA 质粒(1:50)、无义 shRNA 质粒(1:50)和 Lipo2000(1:50),室温放置 5 min;将稀释好的 AKT shRNA 和无义 shRNA 与 Lipo2000 混匀,室温下孵育 20 min;将混合物按 400 μl/孔加入 24 孔板中,置于 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 4~6 h,去掉转染液,更换常规培养基,继续培养 24 h,收集细胞按照高糖+SC79 组方式进行处理,分别作为 Neg-shRNA + SC79 组和 AKT shRNA + SC79 组,并采用流式细胞术检测细胞凋亡率。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 法检测 AKT mRNA 表达 收集转染后细胞,用 Trizol 法提取总 RNA,取 500 ng RNA 在 10 μl 逆转录反应体系中合成 cDNA,以 2 μl cDNA 为模板加入基因引物。AKT 基因正向引物序列为 5'-GCCCGAGATCACCATCAC-3',反向引物序列为 5'-CTATCGTCCAGGGCAGTCCA-3';GAPDH 正向引物序列为 5'-GATCGAATTAAACCTTATCGTCGT-3',反向引物序列为 5'-AGCAGCAGAACTTCCACTCGGT-3'。引物由上海吉玛制药技术有限公司合成。扩增体系为 20 μl,扩增条件:95 ℃ 预变性 30 s;95 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 退火 20 s,72 ℃ 延伸 20 s,共 40 个循环。以 GAPDH 为内参照,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 AKT mRNA 的相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析。计量资料经 Shapiro-Wilk 检验符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,Levene 检验方差齐。各组间差异比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 SC79 对高糖培养下 ARPE-19 细胞增生能力的影响

MTS 法检测结果显示,不同浓度 SC79 处理组细胞培养 6、12 和 24 h 细胞增生率总体比较差异均有统计学意义 ($F = 56.09, 47.78, 12.25$, 均 $P < 0.01$)。5 μg/ml、10 μg/ml、20 μg/ml SC79 组培养 6、12 和 24 h 后细胞增生率较 0 μg/ml SC79 组升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);其中以 10 μg/ml SC79 预处理 12 h 细胞的增生率最高(表 1)。因此在后续实验中选择该药物浓度和作用时间。

表 1 不同浓度 SC79 处理高糖状态下 ARPE-19 细胞后不同时间点细胞增生率比较($\bar{x} \pm s$, %)

Table 1 Comparison of proliferation rates of ARPE-19 cells in high glucose at different time points treated with different concentrations of SC79 ($\bar{x} \pm s$, %)

组别	样本量	不同时间点细胞增生率		
		6 h	12 h	24 h
0 μg/ml SC79 组	3	22.19 ± 1.04	19.73 ± 3.25	16.62 ± 1.59
5 μg/ml SC79 组	3	24.85 ± 2.28 ^a	29.65 ± 5.68 ^a	37.00 ± 2.84 ^a
10 μg/ml SC79 组	3	43.63 ± 3.30 ^a	71.24 ± 11.46 ^a	64.49 ± 12.80 ^a
20 μg/ml SC79 组	3	43.17 ± 3.38 ^a	63.13 ± 6.22 ^a	56.30 ± 3.30 ^a
F 值		56.09	47.78	12.25
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

注:与 0 μg/ml SC79 组比较, ^a $P < 0.01$ (单因素方差分析,LSD-t 检验)

Note: Compared with respective 0 μg/ml SC79 group, ^a $P < 0.01$ (One-way ANOVA, LSD-t test)

2.2 各组细胞增生率比较

MTS 法检测结果显示,正常对照组、甘露醇组、高糖组、高糖+SC79 组细胞增生率总体比较差异有统计学意义 ($F = 104.41, P < 0.01$);甘露醇组与正常对照组细胞增生率比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$);高糖组细胞增生率明显低于正常对照组和高糖+SC79 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)(表 2)。

表 2 各组 ARPE-19 细胞增生率比较($\bar{x} \pm s$, %)

Table 2 Comparison of proliferation rates of ARPE-19 cells among different groups ($\bar{x} \pm s$, %)

组别	样本量	细胞增生率
正常对照组	3	100.00 ± 0.00
甘露醇组	3	98.82 ± 1.04
高糖组	3	20.67 ± 2.15 ^a
高糖+SC79 组	3	70.04 ± 9.67 ^{ab}
F 值		104.41
P 值		<0.01

注:与正常对照组比较, ^a $P < 0.01$;与高糖组比较, ^b $P < 0.01$ (单因素方差分析,LSD-t 检验)

Note: Compared with normal control group, ^a $P < 0.01$; compared with high glucose group, ^b $P < 0.01$ (One-way ANOVA, LSD-t test)

2.3 各组细胞凋亡率比较

流式细胞术检测结果显示,正常对照组、甘露醇组、高糖+SC79 组细胞凋亡率分别为 (3.90 ± 0.71)%、(3.74 ± 0.42)%、(52.27 ± 3.21)% 和 (20.70 ± 3.62)%,总体比较差异有统计学意义 ($F = 149.90, P < 0.05$)。其中,甘露醇组与正常对照组细胞凋亡率无明显变化,差异无统计学意义 ($P > 0.05$);高糖组细胞凋亡率明显高于正常对照组和高糖+SC79 组,差异有统计学意义(均 $P < 0.01$)(图 1)。

2.4 各组细胞 Akt/XIAP 通路及凋亡相关蛋白表达比较

正常对照组、甘露醇组、高糖组和高糖+SC79 组间细胞 p-Akt、XIAP、caspase-9、caspase-3 和 active-caspase-3 蛋白相对表达量总体比较,差异均有统计学意义 ($F = 18.79, 43.43, 27.05, 45.58, 52.16$, 均 $P < 0.001$)。其中,甘露醇组与正常对照组各蛋白相对

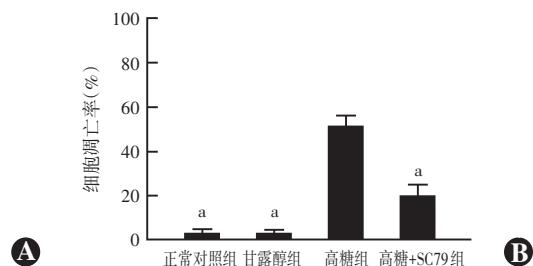
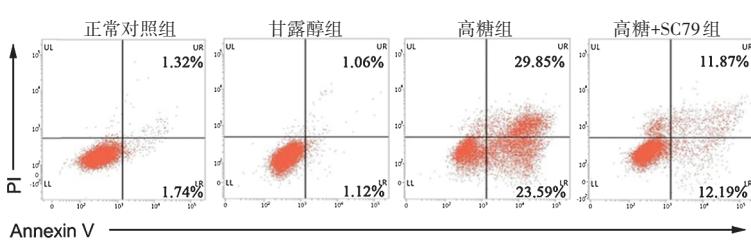


图 1 各组细胞凋亡情况 A: 各组细胞凋亡流式细胞检测图 高糖组凋亡细胞数明显多于其他组 $P < 0.05$ 。与高糖组比较, ^a $P < 0.01$ (单因素方差分析,LSD-t 检验, $n = 3$)

Figure 1 Apoptosis of RPE cells in different groups A: Flow cytometry results There were more apoptotic cells in high glucose group than in other groups B: Comparison of apoptosis rates among different groups $F = 149.90, P < 0.05$. Compared with high glucose group, ^a $P < 0.01$ (One-way ANOVA, LSD-t test, $n = 3$)



表达量比较,差异均无统计学意义(均 $P>0.05$);高糖组p-Akt、XIAP、caspase-9及caspase-3蛋白相对表达量明显低于正常对照组和高糖+SC79组,active-caspase-3蛋白相对表达量高于正常对照组和高糖+SC79组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)(图2,表3)。

2.5 各组AKT mRNA相对表达量比较

正常对照组、Neg-shRNA组和AKT shRNA组AKT mRNA相对表达量分别为 0.60 ± 0.07 、 0.59 ± 0.03 和 0.11 ± 0.10 ,总体比较差异有统计学意义($F=30.44$, $P<0.01$);其中AKT shRNA组AKT mRNA相对表达量明显低于正常对照组和Neg-shRNA组,差异均有统计学意义(均 $P<0.001$)(图3)。

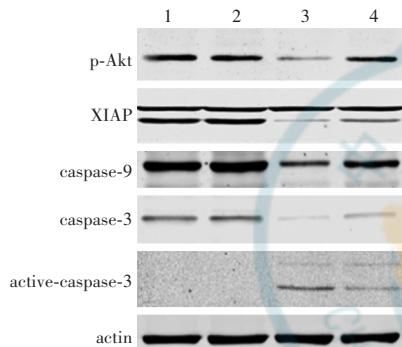


图2 各组细胞内Akt/XIAP通路及凋亡相关蛋白表达电泳图 高糖组p-Akt、XIAP、caspase-3和caspase-9蛋白条带灰度弱于其他组,active-caspase-3蛋白条带灰度强于其他组 1:正常对照组;2:甘露醇组;3:高糖组;4:高糖+SC79组 Akt:蛋白激酶B;XIAP:X链锁凋亡抑制蛋白

Figure 2 Electrophoretogram of Akt/XIAP pathway and apoptosis-related protein expressions detected by Western blot The band intensity of p-Akt, XIAP, caspase-3 and caspase-9 proteins was weaker and the band intensity of active-caspase-3 was stronger in high glucose group than in normal control group, mannitol group, and HG+SC79 group 1: normal control group; 2: mannitol group; 3: high glucose group; 4: HG+SC79 group Akt: protein kinase B; XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis protein

表3 各组细胞Akt/XIAP通路及凋亡相关蛋白相对表达量比较($\bar{x}\pm s$)
Table 3 Comparison of relative expression levels of Akt/XIAP pathway and apoptosis-related proteins in ARPE-19 cells among different groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	不同蛋白相对表达量				
		p-Akt	XIAP	caspase-9	caspase-3	active-caspase-3
正常对照组	3	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
甘露醇组	3	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
高糖组	3	0.32 ± 0.12^a	0.21 ± 0.08^a	0.33 ± 0.07^a	0.19 ± 0.02^a	1.48 ± 0.23^a
高糖+SC79组	3	0.87 ± 0.23^{ab}	0.45 ± 0.11^{ab}	0.79 ± 0.14^{ab}	0.33 ± 0.07^{ab}	1.14 ± 0.06^{ab}
F值		18.79	43.43	27.05	45.58	52.16
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常对照组相比,^a $P<0.05$;与高糖组相比,^b $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD-t检验) AKT:蛋白激酶B;XIAP:X链锁凋亡抑制蛋白

Note: Compared with respective normal control group,^a $P<0.05$; compared with respective high glucose group,^b $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD-t test) AKT: protein kinase B; XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis protein

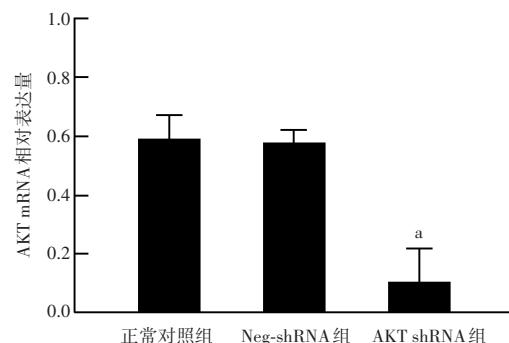


图3 各转染组细胞中AKT mRNA相对表达量比较 $F=30.44$, $P<0.01$. 与正常对照组比较,^a $P<0.001$ (单因素方差分析,LSD-t检验, $n=3$) AKT:蛋白激酶B;shRNA:短发夹RNA

Figure 3 Comparison of AKT mRNA in RPE cells among different transfection groups $F=30.44$, $P<0.01$. Compared with normal control group, ^a $P<0.001$ (One-way ANOVA, LSD-t test, $n=3$) AKT: protein kinase B; shRNA: short hairpin RNA

2.6 不同转染组高糖诱导后细胞凋亡率比较

正常对照组、高糖+SC79组、Neg-shRNA+SC79组、AKT shRNA+SC79组细胞凋亡率分别为 $(3.90\pm0.71)\%$ 、 $(20.70\pm4.43)\%$ 、 $(21.90\pm1.62)\%$ 和 $(43.38\pm5.66)\%$,总体比较差异有统计学意义($F=102.40$, $P<0.01$)。其中,AKT shRNA+SC79组细胞凋亡率明显高于高糖+SC79组和Neg-shRNA+SC79组,差异均有统计学意义(均 $P<0.001$)(图4)。

3 讨论

DR是由于长期高血糖导致的视网膜内微血管异常,晚期可因新生血管形成、纤维血管性增生、牵拉性视网膜脱离等原因致盲^[14]。据国际糖尿病联合会公布数据显示,2019年我国20~79岁糖尿病患者数量已高达1.164亿,位居全球第一^[15]。而在成年人糖尿病

患者中,DR患病率为24.7%~37.5%^[16]。由此可见,DR的防治工作迫在眉睫。然而,导致DR发生的相关混杂因素众多,发病机制至今未充分阐明。

RPE细胞介于视网膜神经上皮层与脉络膜毛细血管层之间,在维持正常的视觉功能和保持视网膜结构、生理功能的完整性等方面发挥重要作用^[17]。视网膜内细胞代谢旺盛,所需能量在很大程度上依赖于RPE细胞从血液循环中摄取葡萄糖并递送至视网膜内,因此RPE细胞更容易受



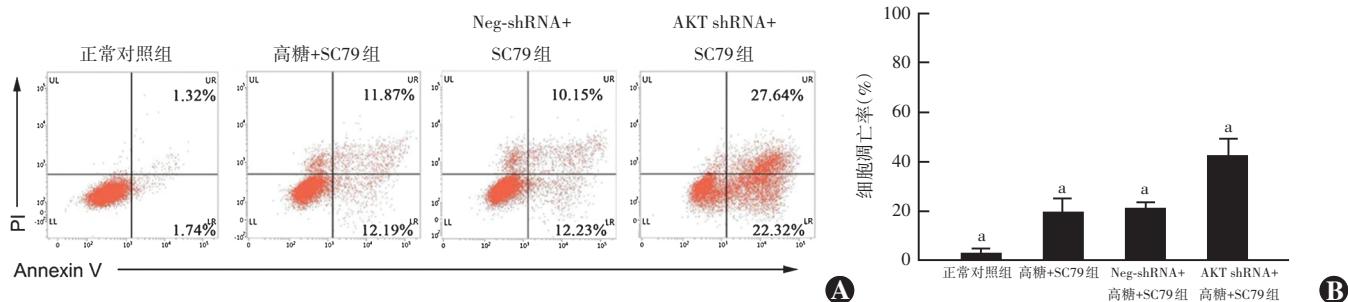


图 4 不同转染组细胞凋亡情况 A:各组细胞凋亡流式细胞检测图 AKT shRNA+SC79 组凋亡细胞数明显多于其他组 B:各组细胞凋亡率比较 $F = 102.40, P < 0.01$ 。与 AKT shRNA+SC79 组比较, $^aP < 0.001$ (单因素方差分析,LSD-t 检验, $n=3$) Akt:蛋白激酶 B;shRNA:短发夹 RNA

Figure 4 Apoptosis of RPE cells in different transfection groups A: Flow cytometry results There were more apoptotic cells in AKT shRNA+SC79 group than in other groups B: Comparison of apoptosis rates among different groups $F = 102.40, P < 0.01$. Compared with AKT shRNA + SC79 group, $^aP < 0.001$ (One-way ANOVA, LSD-t test, $n=3$) Akt:protein kinase B;shRNA:short hairpin RNA

血糖水平的影响^[18]。大量的研究证明慢性高血糖可以造成 RPE 细胞的损伤,破坏视网膜外屏障的完整性,是 DR 的主要致病因素之一,例如,高糖可抑制 RPE 细胞增生、诱导细胞凋亡或焦亡、抑制自噬功能等^[19~21]。在本研究中,高糖(30 mmol/L)处理 48 h 可明显抑制 RPE 细胞增生,并且细胞凋亡率明显升高。为了排除高渗因素对 RPE 细胞的影响,本研究用甘露醇培养基作为渗透压对照组,发现高渗并不会影响细胞的增生和凋亡。

AKT 通路被证实在高糖诱导 RPE 反应中发挥重要作用。Zha 等^[20]报道甲基转移酶样蛋白 3 在高糖状态下对 RPE 细胞的保护作用与 PTEN/Akt 通路的活化有关。Qin 等^[22~23]证实上调 RPE 细胞血管紧张素 1 型受体相关蛋白的内源性配体可以促进 RPE 细胞在高糖刺激后增生和迁移能力的恢复,而一旦抑制 Akt 通路的激活,RPE 细胞的活力明显受到影响,甚至会影响 RPE 细胞释放血管内皮生长因子、白细胞介素 1 β 、转化生长因子 β 1 等 DR 发病相关细胞因子。由此,我们提出添加 Akt 激动剂也可以逆转体外高糖对 RPE 细胞损伤的假设。

SC79 是近年来新发现的一种 Akt 激活剂,它可以特异性结合 Akt 的 PH 结构域,有利于上游蛋白激酶磷酸化的构象,从而增强 Akt 通路的信号传导^[24]。目前,多项研究将 SC79 用于多种生理和病理状态下 Akt 的活化,展现出其细胞保护功能,例如其能够促进蛛网膜下腔出血早期脑损伤的修复^[25];还可以通过激活 Akt-Nrf2 信号通路减轻 RPE 细胞的紫外线辐射损伤^[26]。本研究中发现 10 μ g/mL SC79 预处理 12 h 可以明显改善高糖状态下的 RPE 细胞增生能力,部分逆转高糖诱导的细胞凋亡,显示出 SC79 对 RPE 细胞良好的保护作用。为了进一步证实这种保护作用与 AKT 信号通路有关,本研究利用 shRNA 技术敲低

ARPE-19 细胞中 Akt 的表达水平,发现 SC79 对高糖状态下细胞的保护能力大幅度减弱,从而证实了 SC79 确实是通过活化 AKT 发挥作用。

细胞凋亡是程序性细胞死亡的一种方式,在维持机体组织稳态中起着至关重要的作用^[27]。其中,caspase 家族是细胞凋亡的关键执行者^[28]。在本研究中,高糖培养可以明显消耗凋亡执行关键蛋白 caspase-9 和 caspase-3,增加 active-caspase-3 的表达,诱导细胞凋亡。然而,SC79 处理后则可以部分逆转高糖下 caspase-9 和 caspase-3 的消耗,下调 active-caspase-3 的表达,其机制与 SC79 激活 Akt,增加下游重要靶点 XIAP 的表达有关。XIAP 是一种凋亡抑制因子,可以对细胞的外源性刺激作出反应,并直接与 caspase 家族作用,促进后者发生蛋白酶体依赖性的降解,从而抑制起始和效应 caspase 的活性^[29]。Akt 的活化可以促进 XIAP 在 Ser87 位点的磷酸化,XIAP 磷酸化后可以有效抑制其自身泛素化降解^[30]。

综上所述,本研究通过体外实验初步证实 SC79 可以拮抗体外高糖诱导的 RPE 细胞凋亡,促进细胞存活,其机制与激活 RPE 细胞体内 Akt-XIAP 通路、抑制 caspase 家族的表达有关。SC79 对高糖状态下的 RPE 细胞具有一定的保护作用,但还需进一步开展在体动物实验以验证 SC79 在体内的实际作用,以期为 DR 的药物研发和发病机制研究提供新的思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在任何利益冲突

作者贡献声明 郑磊:实验操作、论文撰写、统计分析;陈妙虹:数据整理和分析;马大卉:研究指导;张国明:研究指导、论文修改及定稿

参考文献

- Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy [J]. Lancet, 2010, 376(9735): 124~136. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)62124-3.
- Teo ZL, Tham YC, Yu M, et al. Global prevalence of diabetic retinopathy and projection of burden through 2045: systematic review and meta-analysis[J]. Ophthalmology, 2021, 128(11): 1580~1591.

- DOI:10.1016/j.ophtha.2021.04.027.
- [3] Caceres PS, Rodriguez-Boulan E. Retinal pigment epithelium polarity in health and blinding diseases [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2020, 62 : 37–45. DOI:10.1016/j.ceb.2019.08.001.
- [4] Lakkaraju A, Umapathy A, Tan LX, et al. The cell biology of the retinal pigment epithelium[J/OL]. *Prog Retin Eye Res*, 2020 : 100846 [2022-05-26]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32105772>. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2020.100846.
- [5] Jo DH, Yun JH, Cho CS, et al. Interaction between microglia and retinal pigment epithelial cells determines the integrity of outer blood-retinal barrier in diabetic retinopathy[J]. *Glia*, 2019, 67(2) : 321–331. DOI: 10.1002/glia.23542.
- [6] Tonade D, Kern TS. Photoreceptor cells and RPE contribute to the development of diabetic retinopathy [J/OL]. *Prog Retin Eye Res*, 2021, 83 : 100919 [2022-05-26]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33188897>. DOI:10.1016/j.preteyeres.2020.100919.
- [7] Tâlu S, Nicoara SD. Malfunction of outer retinal barrier and choroid in the occurrence and progression of diabetic macular edema[J]. *World J Diabetes*, 2021, 12(4) : 437–452. DOI:10.4239/wjd.v12.i4.437.
- [8] Song M, Bode AM, Dong Z, et al. AKT as a therapeutic target for cancer [J]. *Cancer Res*, 2019, 79 (6) : 1019 – 1031. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-2738.
- [9] Jafari M, Ghadami E, Dadkhah T, et al. PI3k/AKT signaling pathway: erythropoiesis and beyond [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234 (3) : 2373–2385. DOI:10.1002/jcp.27262.
- [10] Chen Q, Tang L, Xin G, et al. Oxidative stress mediated by lipid metabolism contributes to high glucose-induced senescence in retinal pigment epithelium[J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 130 : 48–58. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.419.
- [11] Couture C, Desjardins P, Zaniolo K, et al. Enhanced wound healing of tissue-engineered human corneas through altered phosphorylation of the CREB and AKT signal transduction pathways [J]. *Acta Biomater*, 2018, 73 : 312–325. DOI:10.1016/j.actbio.2018.04.021.
- [12] Jing ZT, Liu W, Xue CR, et al. AKT activator SC79 protects hepatocytes from TNF- α -mediated apoptosis and alleviates d-Gal/LPS-induced liver injury[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2019, 316 (3) : G387–G396. DOI:10.1152/ajpgi.00350.2018.
- [13] Liu X, Kiss GK, Mellender SJ, et al. Activation of Akt by SC79 decreased cerebral infarct in early cerebral ischemia-reperfusion despite increased BBB disruption[J]. *Neurosci Lett*, 2018, 681 : 78–82. DOI: 10.1016/j.neulet.2018.05.046.
- [14] Ghamdi A. Clinical predictors of diabetic retinopathy progression; a systematic review[J]. *Curr Diabetes Rev*, 2020, 16 (3) : 242 – 247. DOI:10.2174/1573399815666190215120435.
- [15] Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition[J/OL]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2019, 157 : 107843 [2022-06-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31518657>. DOI: 10.1016/j.diabres.2019.107843.
- [16] Cheloni R, Gandolfi SA, Signorelli C, et al. Global prevalence of diabetic retinopathy: protocol for a systematic review and meta-analysis [J/OL]. *BMJ Open*, 2019, 9 (3) : e022188 [2022-06-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30833309>. DOI:10.1136/bmjopen-2018-022188.
- [17] Kwon W, Freeman SA. Phagocytosis by the retinal pigment epithelium: recognition, resolution, recycling [J/OL]. *Front Immunol*, 2020, 11 : 604205 [2022-06-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33281830>. DOI:10.3389/fimmu.2020.604205.
- [18] Ponnalagu M, Subramani M, Jayadev C, et al. Retinal pigment epithelium-secretome:a diabetic retinopathy perspective[J]. *Cytokine*, 2017, 95 : 126–135. DOI:10.1016/j.cyto.2017.02.013.
- [19] Maugeri G, Bucolo C, Drago F, et al. Attenuation of high glucose-induced damage in RPE cells through p38 MAPK signaling pathway inhibition[J/OL]. *Front Pharmacol*, 2021, 12 : 684680 [2022-06-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34025440>. DOI: 10.3389/fphar.2021.684680.
- [20] Zha X, Xi X, Fan X, et al. Overexpression of METTL3 attenuates high-glucose induced RPE cell pyroptosis by regulating miR-25-3p/PTEN/Akt signaling cascade through DGCR8[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12 (9) : 8137–8150. DOI:10.18632/aging.103130.
- [21] Zhao X, Wang J, Li P, et al. Casein kinase 2-interacting protein-1 alleviates high glucose-reduced autophagy, oxidative stress, and apoptosis in retinal pigment epithelial cells via activating the p62/KEAP1/NRF2 signaling pathway[J/OL]. *J Ophthalmol*, 2021, 2021 : 6694050 [2022-06-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33628480>. DOI:10.1155/2021/6694050.
- [22] Qin D, Zheng XX, Jiang YR. Apelin-13 induces proliferation, migration, and collagen I mRNA expression in human RPE cells via PI3K/Akt and MEK/Erk signaling pathways[J]. *Mol Vis*, 2013, 19 : 2227–2236.
- [23] Qin D, Jiang YR. Tangeretin inhibition of high-glucose-induced IL-1 β , IL-6, TGF- β 1, and VEGF expression in human RPE cells[J/OL]. *J Diabetes Res*, 2020, 2020 : 9490642 [2022-06-08]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33354576>. DOI: 10.1155/2020/9490642.
- [24] Zhu JL, Wu YY, Wu D, et al. SC79, a novel Akt activator, protects dopaminergic neuronal cells from MPP $^{+}$ and rotenone[J]. *Mol Cell Biochem*, 2019, 461 (1-2) : 81–89. DOI:10.1007/s11010-019-03592-x.
- [25] Zhang D, Zhang H, Hao S, et al. Akt specific activator SC79 protects against early brain injury following subarachnoid hemorrhage[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2016, 7 (6) : 710 – 718. DOI:10.1021/acschemneuro.5b00306.
- [26] Gong YQ, Huang W, Li KR, et al. SC79 protects retinal pigment epithelium cells from UV radiation via activating Akt-Nrf2 signaling [J/OL]. *Oncotarget*, 2016, 7 (37) : 60123 – 60132 [2022-06-08]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27517753>. DOI:10.18632/oncotarget.11164.
- [27] D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy[J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43 (6) : 582 – 592. DOI:10.1002/cbin.11137.
- [28] Kabigting J, Toyama Y. Interplay between caspase, Yes-associated protein, and mechanics:a possible switch between life and death? [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2020, 67 : 141 – 146. DOI:10.1016/j.ceb.2020.10.010.
- [29] Yun SE, Nam MK, Rhim H. Quantitative biochemical characterization and biotechnological production of caspase modulator, XIAP: therapeutic implications for apoptosis-associated diseases[J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2018, 1862 (7) : 1602–1611. DOI:10.1016/j.bbagen.2018.04.005.
- [30] Dan HC, Sun M, Kaneko S, et al. Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) [J/OL]. *J Biol Chem*, 2016, 291 (43) : 22846 [2022-06-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27825084>. DOI:10.1074/jbc.A116.312044.

(收稿日期:2022-07-05 修回日期:2022-12-30)

(本文编辑:张宇 骆世平)

