

沉默 GFAP 基因调控高糖诱导的视网膜微血管内皮细胞增殖与凋亡

焦亮亮, 朱文魁, 罗翠平, 雷建平

引用: 焦亮亮, 朱文魁, 罗翠平, 等. 沉默 GFAP 基因调控高糖诱导的视网膜微血管内皮细胞增殖与凋亡. 国际眼科杂志 2020; 20(11): 1871-1875

作者单位: (467000) 中国河南省平顶山市, 平煤神马医疗集团总医院眼科

作者简介: 焦亮亮, 本科, 研究方向: 白内障、青光眼、糖尿病性视网膜病变、黄斑疾病。

通讯作者: 焦亮亮. jiaoliang999999@163.com

收稿日期: 2019-10-05 修回日期: 2020-09-29

摘要

目的: 研究沉默胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 基因对高糖诱导的人视网膜微血管内皮细胞 (hRMECs) 增殖和凋亡的影响及其机制。

方法: 采用 qRT-PCR 法检测高糖 (30mmol/mL) 和低糖 (5mmol/mL) 处理的 hRMECs 中 GFAP 的表达。通过慢病毒介导法建立 GFAP 基因稳定沉默的高糖诱导的 hRMECs 细胞模型, 用 SRI-011381 (TGF- β 信号通路特异性激活剂)、二甲基亚砜 (DMSO) 处理该细胞模型, 采用 Western blot 法检测细胞中 GFAP、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、转录激活因子 2 (Smad2)、Smad3 蛋白的表达, 并分别采用 CCK-8 法和流式细胞术检测细胞增殖和凋亡。

结果: 高糖处理的 hRMECs 中 GFAP 表达水平显著升高。通过慢病毒介导法可成功构建 GFAP 基因沉默的高糖诱导的 hRMECs 细胞模型, 且沉默 GFAP 后, 细胞的增殖能力明显提高, 凋亡率明显抑制, TGF- β 信号通路关键基因 TGF- β 1、Smad2、Smad3 的蛋白表达均明显抑制, 而激活 TGF- β 信号通路可逆转沉默 GFAP 对高糖诱导的 hRMECs 细胞的增殖促进和凋亡抑制作用。

结论: 沉默 GFAP 基因可促进高糖诱导的人视网膜微血管内皮细胞增殖, 抑制细胞凋亡, 其机制可能与 TGF- β 信号通路失活相关。

关键词: 胶质纤维酸性蛋白; 高糖诱导的视网膜微血管内皮细胞; TGF- β 信号通路; 增殖; 凋亡

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2020.11.06

Silencing GFAP gene regulates the proliferation and apoptosis of high glucose-induced retinal microvascular endothelial cells

Liang-Liang Jiao, Wen-Kui Zhu, Cui-Ping Luo, Jian-Ping Lei

Department of Ophthalmology, General Hospital of Pingdingshan

Pingmei Shenma Medical Group, Pingdingshan 467000, Henan Province, China

Correspondence to: Liang - Liang Jiao. Department of Ophthalmology, General Hospital of Pingdingshan Pingmei Shenma Medical Group, Pingdingshan 467000, Henan Province, China. jiaoliang999999@163.com

Received: 2019-10-05 Accepted: 2020-09-29

Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of silencing glial fibrillary acidic protein gene (GFAP) on proliferation and apoptosis of high glucose-induced human retinal microvascular endothelial cells (hRMECs) and its mechanism.

• **METHODS:** Expression of GFAP in hRMECs treated with high sugar (30mmol/mL) and low sugar (5mmol/mL) was detected by qRT-PCR. The high glucose-induced hRMECs cells of silencing GFAP gene was established by lentiviral-mediated method. High glucose-induced hRMECs cells were treated with SRI-011381 (TGF- β signaling pathway activator) and dimethyl sulfoxide (DMSO); Expression of GFAP, transforming growth factor-1 (TGF- β 1), activating transcription factor 2 (Smad2), Smad3 proteins were measured by Western blot, and cell proliferation and apoptosis were detected by CCK-8 and flow cytometry, respectively.

• **RESULTS:** Expression of GFAP was significantly increased in high glucose treated hRMECs. The high glucose induced hRMECs cell model of GFAP gene silencing was successfully constructed by lentivirus mediation, and the cell proliferation ability was significantly improved, the apoptosis rate is significantly inhibited, and expression of TGF-1, Smad2 and Smad3 proteins in the TGF- β signaling pathway was significantly inhibited after silencing GFAP, while activation of TGF- β signaling pathway could reverse the inhibitory effect of silencing GFAP on the proliferation and apoptosis in high glucose hRMECs.

• **CONCLUSION:** Silencing GFAP gene can promote the proliferation of high glucose-induced human retinal microvascular endothelial cells and inhibit cell apoptosis, the mechanism may be related to the inactivation of TGF- β signaling pathway.

• **KEYWORDS:** glial fibrillary acidic protein gene; high glucose-induced retinal microvascular endothelial cells; TGF- β signaling pathway; proliferation; apoptosis

Citation: Jiao LL, Zhu WK, Luo CP, et al. Silencing GFAP gene regulates the proliferation and apoptosis of high glucose-induced retinal microvascular endothelial cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2020;20(11):1871-1875

0 引言

糖尿病是一种日益普遍的慢性疾病,主要由缺乏胰岛素、高血糖、血脂异常和神经血管损伤引起,可损害各个器官系统,影响患者生活质量,并带来严重的经济负担^[1-2]。糖尿病视网膜病变是1型和2型糖尿病的常见并发症,在临床上相对于传统药物,新生物标志物会更有利于提高糖尿病视网膜病变的预后。胶质纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein, GFAP)是星形胶质细胞的重要中间丝蛋白,其可用来标记中枢神经胶质细胞各个阶段的变化^[3-4],且在糖尿病视网膜病变中具有调控作用,但是具体的作用机制仍有待研究。转化生长因子-β(TGF-β)信号通路在人类的很多疾病中均表现出活性异常升高^[5-6],其中包括糖尿病视网膜神经病变^[7],TGF-β1和转录因子 Smad2、Smad3、Smad4 是 TGF-β 信号级联传递的关键蛋白^[8-9]。但是 GFAP 在糖尿病视网膜病变中的功能机制与 TGF-β 信号通路之间的关系尚且未知。本研究拟以高糖诱导的人视网膜微血管内皮细胞(hRMECs)为研究对象,检测慢病毒介导的 GFAP 基因沉默对高糖诱导 hRMECs 细胞增殖和凋亡的影响,分析 GFAP、TGF-β 信号通路关键基因的表达,以揭示 GFAP 在糖尿病视网膜病变中的功能,为 GFAP 用于糖尿病视网膜病变的生物治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 细胞:人视网膜微血管内皮细胞(hRMECs)购自美国 Angio-Proteomie 公司。主要试剂:D-甘露醇购自 Merck 公司;DMEM 培养基购自 Gibco 公司;胎牛血清购自杭州四季青公司;TGF-β 信号通路特异性激活剂 SRI-011381(纯度:98%)、CCK-8 试剂盒购自美国 Gpibio 公司;膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)和碘化丙啶(PI)试剂盒购自碧云天公司;鼠抗人 GFAP(sc-33673)、TGF-β1(sc-130348)、Smad2(sc-101153)、Smad3(sc-101154)单克隆蛋白抗体以及山羊抗鼠 IgG 二抗(sc-516102)购于美国 Santa Cruz 公司。主要仪器设备:荧光定量 PCR 仪(7500 型)购于美国 ABI 公司;流式细胞仪(型号 CytoFLEX)购于美国 Beckman 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 hRMECs 用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养于 37℃、5% CO₂ 的恒温细胞培养箱中,每 2~3d 传代一次,取生长状态良好的对数生长期细胞用于实验研究。

1.2.2 细胞处理与分组 (1)将正常培养的 hRMECs 用 5、30mmol/mL 葡萄糖、30mmol/mL D-甘露醇处理 24h,分别标记为 NG+hRMECs 组、HG+hRMECs 组、高渗对照组。(2)将高糖诱导(30mmol/mL 葡萄糖作用 24h)的 hRMECs 随机分为 sh RNA 组、sh GFAP 组,分别将 sh RNA(5'-GCAGCAACTGGAGGATCTAGA-3')、sh GFAP(5'-AGGAATTAAGAGAAGCAACAT-3')目的片段进行 pGCL-GFP 载体质粒重组构建和病毒包装,用 Lipofectamine™ 2000 试剂盒将其转染至高糖诱导的 hRMECs 中,转染 48h 后,用 qRT-PCR 法和 Western blot 检测基因沉默效率,基因沉默成功后用于后续实验研究,流式细胞术检测细胞凋亡率。(3)将稳定沉默 GFAP 的高糖诱导的 hRMECs 随机

分为 sh GFAP+DMSO 组、sh GFAP+SRI-011381 组,分别用 DMSO、SRI-011381 处理 24h,采用 Western blot 检测 TGF-β 信号通路相关蛋白的表达,流式细胞术检测细胞凋亡率。

1.2.3 qRT-PCR 法检测细胞中 GFAP mRNA 的表达 收集细胞,按照 RNA 抽提试剂盒、逆转录试剂盒说明书要求操作提取 RNA,并快速将其反转录为 cDNA。根据 qRT-PCR 试剂盒说明书操作进行 GFAP mRNA 检测。以 GAPDH 为内参,用 2^{-ΔΔCt} 法计算 GFAP mRNA 的相对表达量。引物信息:GFAP 上游引物 5'-CTGAATTCTGCTGGCTTCAAGG-3',下游引物 5'-CTAAGCTTGCTGTGCGTTGCGG-3';GAPDH 上游引物 5'-GTCAGCCGCATCTTCTTTT-3',下游引物 5'-GCGCCCAATACGACCAATC-3'。

1.2.4 Western blot 检测细胞中相关蛋白的表达 收集细胞,用 RIPA 裂解液在冰上裂解 30min,12000r/min 离心 10min,取上清转移至 EP 管中,沸水煮沸 10min 进行变性。将上清液用 5×SDS 上样缓冲液稀释,电泳后用转膜仪将蛋白转移至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭 2h,洗膜,加入一抗(鼠抗人 GFAP、TGF-β1、Smad2、Smad3 单克隆蛋白抗体,工作浓度 1:400~1:1000),4℃ 孵育过夜,洗膜,加二抗(山羊抗鼠辣根过氧化物酶标记的 IgG 抗体,1:1000),4℃ 2h。加发光液,曝光。

1.2.5 CCK-8 法检测细胞增殖能力 收集分组处理后的细胞并调整至细胞密度为 10⁵个/mL 的悬液,接种至 96 孔板,每孔 100μL,37℃、5% CO₂ 的条件下培养 24、48、72h。取出后每孔加入 20μL CCK-8 溶液,于酶标仪 490nm 波长下测吸光度值(A₄₅₀)。细胞的增殖能力与吸光度值呈正比,可用于评估细胞的增殖能力。

1.2.6 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡 收集细胞,用结合缓冲液调整细胞密度至 10⁶个/mL,每孔加入 100μL 细胞液,再加入 Annexin V-FITC(5μL)、PI(10μL)避光反应 15min,结束后,上流式细胞仪分析凋亡情况。

统计学分析:采用 SPSS 22.0 进行数据分析,GraphPad Prism 7.0 软件进行图片绘制。计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-q 检验;两组间比较采用独立样本 t 检验。以 P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GFAP 在高糖诱导的 hRMECs 中的表达 采用 Western blot 和 qRT-PCR 检测高糖诱导的 hRMECs 中 GFAP 蛋白和 mRNA 的相对表达水平,结果显示,与 NG+hRMECs 组相比,HG+hRMECs 组细胞中 GFAP 蛋白和 mRNA 表达水平均显著升高(P<0.05,图 1,表 1),表明 GFAP 在高糖诱导的人视网膜血管内皮细胞中表达明显升高。

2.2 沉默 GFAP 的高糖诱导的细胞模型建立 采用 Western blot 和 qRT-PCR 检测经慢病毒介导沉默 GFAP 的高糖诱导的 hRMECs 中 GFAP 蛋白和 mRNA 的相对表达水平,结果显示,与 sh RNA 组相比,sh GFAP 组细胞中 GFAP 蛋白和 mRNA 表达水平均显著降低(P<0.001,图 2,表 2),表明成功建立慢病毒介导沉默 GFAP 的高糖诱导的人视网膜血管内皮细胞模型。

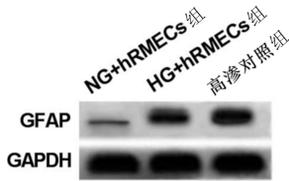


图1 高糖诱导的hRMECs中GFAP蛋白的表达。

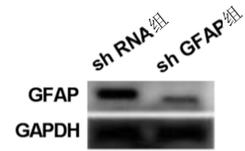


图2 沉默GFAP的高糖诱导的细胞中GFAP蛋白的表达。

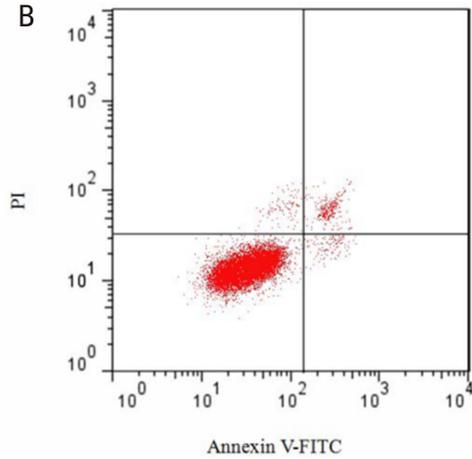
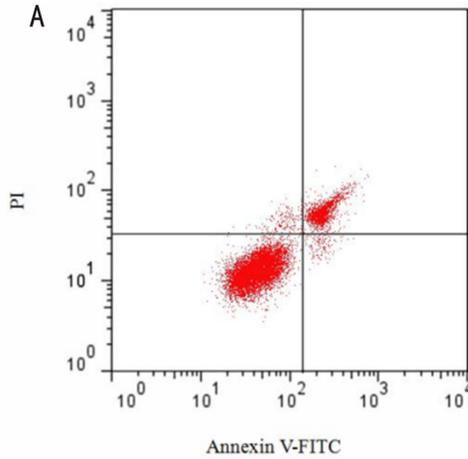


图3 沉默GFAP对高糖诱导的hRMECs凋亡的影响 A:sh RNA组;B:sh GFAP组。

表1 GFAP在高糖诱导的hRMECs中的表达 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

分组	GFAP mRNA	GFAP 蛋白
NG+hRMECs 组	1.00±0.08	1.01±0.06
HG+hRMECs 组	3.67±0.33 ^a	1.81±0.11 ^a
高渗对照组	1.03±0.10	1.04±0.08
<i>F</i>	506.363	251.226
<i>P</i>	<0.001	<0.001

注:^a*P*<0.05 vs NG+hRMECs 组。

表2 GFAP在沉默GFAP的高糖诱导的hRMECs中的表达

分组	GFAP mRNA	GFAP 蛋白
sh RNA 组	0.99±0.08	1.00±0.06
sh GFAP 组	0.53±0.05	0.32±0.03
<i>t</i>	14.628	30.411
<i>P</i>	<0.001	<0.001

2.3 沉默GFAP对高糖诱导的hRMECs增殖和凋亡的影响

采用CCK-8法检测沉默GFAP对高糖诱导的hRMECs增殖的影响,结果显示,与sh RNA组相比,48、72h时,sh GFAP组细胞的增殖能力均显著升高(*P*<0.001,表3)。采用流式细胞术检测沉默GFAP对高糖诱导的hRMECs凋亡的影响,结果显示,与sh RNA组相比,sh GFAP组细胞凋亡率显著降低(*P*<0.001,图3,表3)。上述结果表明,沉默GFAP可促进高糖诱导的人视网膜血管内皮细胞增殖,抑制其凋亡。

2.4 沉默GFAP对高糖诱导的hRMECs中TGF-β信号通路的影响

采用Western blot检测经慢病毒介导沉默GFAP的高糖诱导的hRMECs中TGF-β信号通路相关蛋白的相对表达水平,结果显示,与sh RNA组相比,sh GFAP组细胞中TGF-β1、Smad2、Smad3蛋白表达水平均

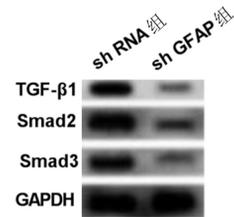


图4 TGF-β信号通路相关蛋白的表达。

表3 沉默GFAP对高糖诱导的hRMECs增殖和凋亡的影响

分组	细胞增殖(<i>A</i> ₄₅₀)			细胞凋亡率(%)
	24h	48h	72h	
sh RNA 组	0.31±0.03	0.36±0.03	0.45±0.04	16.69±1.51
sh GFAP 组	0.33±0.03	0.51±0.05	0.88±0.08	7.67±0.68
<i>t</i>	1.414	7.717	14.423	16.340
<i>P</i>	0.177	<0.001	<0.001	<0.001

表4 TGF-β信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

分组	TGF-β1 蛋白	Smad2 蛋白	Smad3 蛋白
sh RNA 组	1.02±0.08	0.99±0.08	1.01±0.08
sh GFAP 组	0.27±0.02	0.31±0.03	0.24±0.02
<i>t</i>	27.285	23.876	28.013
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

显著降低(*P*<0.001,图4,表4),表明沉默GFAP可抑制高糖诱导的人视网膜血管内皮细胞中TGF-β信号通路的活性。

2.5 激活TGF-β信号通路逆转沉默GFAP对高糖诱导的细胞增殖和凋亡的调控作用

Western blot检测结果显示,与sh GFAP+DMSO组相比,sh GFAP+SRI-011381组细胞中TGF-β1、Smad2、Smad3的蛋白表达量均显著升高

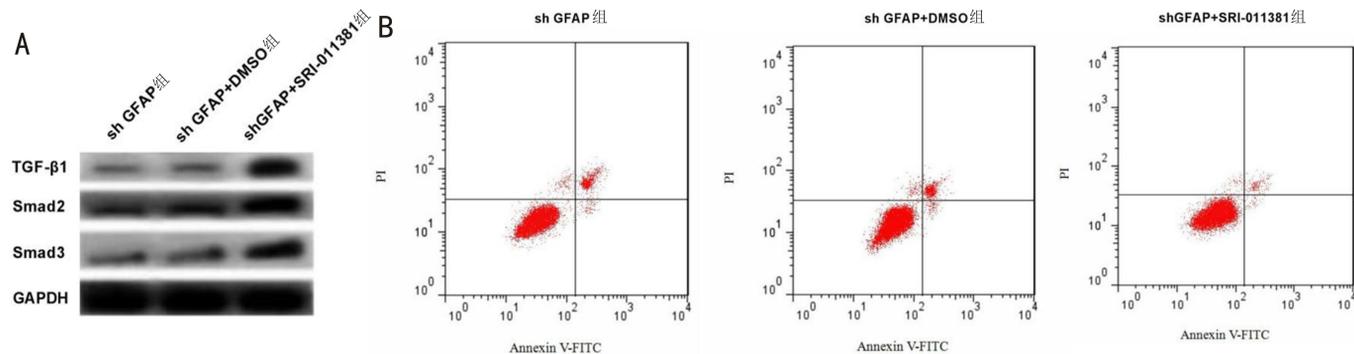


图5 激活 TGF-β 信号通路逆转沉默 GFAP 对高糖诱导的 hRMECs 的调控作用 A:Western blot 检测 TGF-β 信号通路相关蛋白的表达;B:流式细胞术检测细胞凋亡率。

表5 激活 TGF-β 信号通路逆转沉默 GFAP 对高糖诱导的 hRMECs 的调控作用 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

分组	TGF-β 信号通路相关蛋白			细胞增殖(A_{450})			细胞凋亡率(%)
	TGF-β1	Smad2	Smad3	24h	48h	72h	
sh GFAP 组	1.01±0.05	0.99±0.07	1.00±0.09	0.35±0.03	0.58±0.05	0.89±0.06	8.02±0.67
sh GFAP+DMSO 组	1.00±0.07	1.00±0.06	1.01±0.05	0.36±0.03	0.56±0.05	0.86±0.05	7.85±0.71
sh GFAP+SRI-011381 组	1.69±0.11 ^a	1.82±0.16 ^a	1.89±0.18 ^a	0.34±0.03	0.38±0.03 ^a	0.46±0.04 ^a	17.82±1.58 ^a
<i>t</i>	216.600	179.657	163.947	1.000	55.525	202.091	255.005
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	0.383	<0.001	<0.001	<0.001

注:^a $P<0.05$ vs sh GFAP+DMSO 组。

($P<0.05$, 图 5A, 表 5)。CCK-8 检测结果显示,与 sh GFAP+DMSO 组相比,48、72h 时,sh GFAP+SRI-011381 组细胞增殖能力均显著降低($P<0.05$, 表 5)。流式细胞术检测结果显示,与 sh GFAP+DMSO 组相比,sh GFAP+SRI-011381 组细胞凋亡率显著升高($P<0.05$, 图 5B, 表 5)。上述结果表明,激活 TGF-β 信号通路可逆转沉默 GFAP 对高糖诱导的视网膜血管内皮细胞的增殖促进及凋亡抑制作用。

3 讨论

糖尿病视网膜病变被认为是全世界失明的主要原因之一,寻找新的治疗策略以防止其进展成为该领域科学研究的重点。GFAP 在糖尿病视网膜病变的早期、后期均出现表达异常,其在疾病的进展中占有重要地位^[10-11]。早在 2007 年,Zhang 等^[12]已报道,在高糖诱导的大鼠视网膜病变中 GFAP 的表达明显升高,且牛磺酸可通过降低高糖诱导的 GFAP 上调而发挥减缓大鼠早期糖尿病视网膜病变的作用。近期,Bahr 等^[13]在糖尿病视网膜病变的研究中也报道,GFAP 的表达水平异常升高,且度洛西汀可通过下调 GFAP 在糖尿病视网膜病变中发挥治疗作用。但是 GFAP 在糖尿病视网膜病变中的功能及机制仍有待探索。本研究在体外建立了高糖诱导的 hRMECs 细胞模型,通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测了其中 GFAP 的表达,结果显示,GFAP 的表达水平明显升高。进一步研究中,通过慢病毒介导 GFAP 基因稳定沉默的高糖诱导的 hRMECs 细胞模型,为深入研究 GFAP 在糖尿病视网膜病变中的功能奠定基础,也为本课题组后续的实验研究进行铺垫。本研究通过 CCK-8 法、流式细胞术检测细胞的增殖和凋亡发现,沉默 GFAP 的高糖诱导的 hRMECs 细胞增殖明显上调,细胞凋亡明显下调,该结果揭示了 GFAP 沉默在高糖诱导的 hRMECs 细胞中的增殖促进和凋亡抑制

作用,提示 GFAP 抑制剂在糖尿病视网膜病变中的治疗价值,为 GFAP 生物制剂的开发提供参考。不足的是,本研究结果并未在动物体内进行验证。此外,本研究发现,沉默 GFAP 后,TGF-β 信号通路关键基因 TGF-β1、Smad2、Smad3 的蛋白表达水平均明显降低,揭示了沉默 GFAP 可抑制高糖诱导的 hRMECs 中 TGF-β 信号通路的活性,推测 TGF-β 信号通路可能与 GFAP 在糖尿病视网膜病变中的功能相关。

TGF-β 信号通路的异常在人类的多数疾病中均可表现,包括心血管疾病、免疫疾病和胚胎发育异常、肿瘤等^[14]。Lou 等^[15]在糖尿病视网膜病变的研究中发现,在糖尿病视网膜病变大鼠模型中 TGF-β 信号通路关键基因 TGF-β1、p-Smad3 的表达均显著升高,即 TGF-β 信号通路活性异常升高。Li 等^[16]研究也报道,上调 TGF-β1 信号通路的活性可作为长链非编码 RNA 心肌梗死相关转录物(LncRNA-MIAT)抑制人视网膜色素上皮细胞增殖的作用机制。虽然,GFAP 在神经损伤、脑缺血-再灌注损伤和胶质瘤中均通过调控 TGF-β 信号通路发挥作用^[17-18],但是在糖尿病视网膜病变中该通路是否会发挥同样的功能有待验证。本研究检测了激活 TGF-β 信号通路后慢病毒介导沉默 GFAP 基因的高糖诱导的 hRMECs 的增殖和凋亡情况发现,激活 TGF-β 信号通路逆转了沉默 GFAP 对高糖诱导的 hRMECs 的增殖促进、凋亡抑制作用,提示在高糖诱导的 hRMECs 中不仅 GFAP 可正向调控 TGF-β 信号通路的活性,相反,TGF-β 信号通路的活性也可以逆向反作用于 GFAP 在高糖诱导的 hRMECs 中的表达和功能。上述研究结果为 GFAP 在糖尿病视网膜病变中的生物价值开发提供了理论参考。

综上所述,沉默 GFAP 可促进高糖诱导的人视网膜微血管内皮细胞的增殖并抑制凋亡,发挥保护作用,其作用

机制与调控 TGF- β 信号通路的活性相关,为糖尿病视网膜病变的治疗提供了新的理论参考。

参考文献

- 1 Wild S, Roglic G, Green A, *et al.* Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27(5):1047-1053
- 2 Miller EJ, Brines CM. Canine Diabetes Mellitus Associated Ocular Disease. *Top Companion Anim Med* 2018; 33(1): 29-34
- 3 Middeldorp J, Hol EM. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol* 2011; 93(3): 421-443
- 4 Petito CK, Morgello S, Felix JC, *et al.* The two Patterns of reactive astrocytosis in postischemic rats brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 10(6): 850-859
- 5 Meng XM, Nikolic PDJ, Lan HY. TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 2016; 12(6): 325-338
- 6 Xie F, Ling L, van Dam H, *et al.* TGF- β signaling in cancer metastasis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2018; 50(1): 121-132
- 7 Daneshmandi S, Karimi MH, Pourfathollah AA. TGF- β engineered mesenchymal stem cells (TGF- β /MSCs) for treatment of Type 1 diabetes (T1D) mice model. *Int Immunoph* 2017; 44(1): 191-196
- 8 Xu F, Liu C, Zhou D, *et al.* TGF- β /SMAD pathway and its regulation in hepatic fibrosis. *J Histochem Cytochem* 2016; 64(3): 157-167
- 9 Lan HY. Diverse roles of TGF- β /Smads in renal fibrosis and inflammation. *Int J Biol Sci* 2011; 7(7): 1056-1067
- 10 廖怿,何卉,张兆强,等. 早期糖尿病视网膜病变中 eEF2K 活性变化的实验观察. *临床眼科杂志* 2019; 27(1): 88-91

- 11 Dennis JC, Coleman ES, Swyers SE, *et al.* Changes in mitotic rate and GFAP expression in the primary olfactory axis of Streptozotocin-induced diabetic rats. *J Neurocy* 2005; 34(1-2): 3-10
- 12 Zhang YJ, Hong XXU, Zeng KH, *et al.* Effect of taurine on GFAP and TauT expressions in rat retinal Müller cells in high glucose culture. *J Med Colle PLA* 2007; 22(3):137-142
- 13 Bahr HI, Abdelghany AA, Galhom RA, *et al.* Duloxetine protects against experimental diabetic retinopathy in mice through retinal GFAP downregulation and modulation of neurotrophic factors. *Exp Eye Res* 2019; 186(1): 107742
- 14 Wu M, Chen G, Li YP. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res* 2016; 4(4): 16009
- 15 Lou HD, Wang SY, Guo T, *et al.* Role of miR-21 in rats with proliferative diabetic retinopathy via TGF- β signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019; 23(3 Suppl): 9-16
- 16 Li Q, Pang L, Yang W, *et al.* Long non-coding RNA of myocardial infarction associated Transcript (LncRNA - MIAT) promotes diabetic retinopathy by upregulating transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) signaling. *Med Sci Monit* 2018; 24(1): 9497-9503
- 17 de Sampaio e Spohr TC, Martinez R, da Silva EF, *et al.* Neuro-glia interaction effects on GFAP gene: a novel role for transforming growth factor-beta1. *Eur J Neurosci* 2002;16(11):2059-2069
- 18 张极星,张淑荣,赵亮,等. 老年脑恶性胶质瘤患者血清 TGF- β 和 GFAP 的表达及与临床预后的关系. *中国老年学杂志* 2018; 38(20): 52-54