

白藜芦醇对高糖环境下视网膜血管内皮细胞线粒体 DNA 的影响及机制

韦艳, 苏晓庆, 李红, 吴冰

基金项目: 国家青年科学基金 (No. 81500748)

作者单位: (730050) 中国甘肃省兰州市, 兰州总医院眼科中心
作者简介: 韦艳, 女, 毕业于第四军医大学, 学士, 主治医师, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 吴冰, 男, 毕业于第四军医大学, 博士, 主治医师, 研究方向: 老年血管病。110931817@qq.com

收稿日期: 2017-06-22 修回日期: 2017-11-30

Effects of resveratrol on mitochondrial DNA copy in retinal vascular endothelial cells cultured under high glucose conditions and its mechanism

Yan Wei, Xiao-Qing Su, Hong Li, Bing Wu

Foundation item: National Science Foundation for Young Scientists of China (No. 81500748)

Department of Ophthalmology, General Hospital of Lanzhou Military Command, Lanzhou 730050, Gansu Province, China

Correspondence to: Bing Wu. Department of Ophthalmology, General Hospital of Lanzhou Military Command, Lanzhou 730050, Gansu Province, China. 110931817@qq.com

Received: 2017-06-22 Accepted: 2017-11-30

Abstract

• **AIM:** To investigate effects of resveratrol on mitochondrial DNA copy in retinal vascular endothelial cells cultured under high glucose conditions and its mechanism.

• **METHODS:** Human retinal vascular endothelial cells were cultured in low glucose or high glucose medium, the genomic DNA was extracted and copy number of mitochondrial DNA was detected by real-time PCR. Effects of resveratrol on the mitochondrial DNA copy in retinal vascular endothelial cells cultured under high glucose medium were studied. The expression of mitochondrial transcription factor A (TFAM) and acetylated proliferator-activated receptor coactivator-1 alpha (PGC-1 α) were analyzed by Western blot and coimmunoprecipitation.

• **RESULTS:** High glucose inhibited the copy number of mitochondrial DNA in retinal vascular endothelial cells. However, resveratrol decreased the level of acetylated PGC-1 α in retinal vascular endothelial cells, increased the expression of TFAM and the copy number of mitochondrial DNA.

• **CONCLUSION:** Resveratrol may improve mitochondrial

function of retinal vascular endothelial cells exposed to a high glucose environment via activation of the PGC-1 α -TFAM signaling pathway.

• **KEYWORDS:** resveratrol; retinal vascular endothelial cells; mitochondrial DNA copy; mitochondrial transcription factor A; proliferator-activated receptor coactivator-1 alpha

Citation: Wei Y, Su XQ, Li H, et al. Effects of resveratrol on mitochondrial DNA copy in retinal vascular endothelial cells cultured under high glucose conditions and its mechanism. *Guoji Yanke Zazhi* 2018;18(1):32-34

摘要

目的: 探讨白藜芦醇对高糖环境下视网膜血管内皮细胞线粒体 DNA 的影响及机制。

方法: 人视网膜血管内皮细胞培养于正常或高糖环境, 提取细胞基因组 DNA, Real-time PCR 检测线粒体 DNA 拷贝数, 研究白藜芦醇对高糖培养的视网膜血管内皮细胞线粒体 DNA 的影响。通过 Western-blot 及免疫共沉淀检测线粒体转录因子 A (mitochondrial transcription factor A, TFAM) 表达及 PGC-1 α 乙酰化。

结果: 高糖对视网膜血管内皮细胞线粒体 DNA 的拷贝数有明显的抑制作用, 白藜芦醇能够降低视网膜血管内皮细胞 PGC-1 α 的乙酰化, 提高 TFAM 的表达, 增加线粒体 DNA 的拷贝数。

结论: 白藜芦醇可能通过激活 PGC-1 α -TFAM 信号通路改善高糖环境下视网膜血管内皮细胞的线粒体功能。

关键词: 白藜芦醇; 视网膜血管内皮细胞; 线粒体 DNA; TFAM; PGC-1 α

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.1.07

引用: 韦艳, 苏晓庆, 李红, 等. 白藜芦醇对高糖环境下视网膜血管内皮细胞线粒体 DNA 的影响及机制. *国际眼科杂志* 2018;18(1):32-34

0 引言

视网膜病变是糖尿病最严重的并发症之一。研究表明, 氧化应激是糖尿病视网膜病变的重要致病原因, 线粒体视网膜超氧化物水平升高, 过氧化物清除酶、锰超氧化物歧化酶、电子传递链异常, 线粒体 DNA 损伤。线粒体转录因子 A (mitochondrial transcription factor A, TFAM) 是参与线粒体 DNA 转录调控, 调节线粒体 DNA 拷贝数的重要因子。TFAM 可转移至线粒体, 启动线粒体 DNA 的转录和复制。然而, 糖尿病患者视网膜线粒体中 TFAM 表达降低, 导致线粒体 DNA、线粒体编码蛋白的合成及氧化磷酸

化能力降低^[1]。白藜芦醇是一种多酚类化合物,已证实对动脉粥样硬化、高血压、脑卒中、心肌梗塞及心力衰竭等心血管疾病有潜在的治疗作用,并能抑制糖尿病视网膜病变的发展^[2]。而且,体内及体外实验均证实白藜芦醇能够提高线粒体的功能^[3]。因此,本研究拟探讨白藜芦醇对高糖环境下视网膜血管内皮细胞线粒体 DNA 及 TFAM 的影响及其作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 人视网膜血管内皮细胞(HREC 6530)为本实验室冻存,白藜芦醇购自 Sigma 公司,基因组 DNA 提取试剂盒及细胞线粒体分离试剂盒购自碧云天生物技术公司,SYBR[®] Premix Ex TaqTM II 购自 TaKaRa 公司,TFAM、PGC-1 α 、COX IV、乙酰化赖氨酸、Tubulin 单克隆抗体购自美国 CST 公司,线粒体 DNA 引物由上海基康生物公司合成,免疫共沉淀试剂盒购自 Thermo 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 取出液氮保存的 HREC 6530 细胞,快速放于 37℃ 水浴箱内融化,立即加入 8mL 细胞培养基吹打混匀,1000r/min 离心 5min,弃上清。沉淀加入培养基重悬细胞。培养的人视网膜血管内皮细胞分为 NG 组(正常血糖组,含有 1g/L 葡萄糖)、HG 组(高糖组,含有 4.5g/L 葡萄糖,处理 48h)、HG+REV 组(含有 4.5g/L 葡萄糖+100 μ mol/L 白藜芦醇,同时处理 48h)。

1.2.2 提取细胞基因组 DNA 胰酶消化,收集细胞。加入含蛋白酶 K 的样品裂解液,充分混匀裂解,50℃ 水浴消化过夜。加入 Tris 平衡苯酚及氯仿抽提样品,吸取上清液;加入 10mol/L 醋酸铵和无水乙醇,颠倒数次混匀,此时可见 DNA 沉淀产生。10000g 离心 1min,弃上清。加入 70% 乙醇洗涤 DNA 沉淀 2 次。吸除残余的乙醇,加入 Nuclease Free Water 溶解 DNA。

1.2.3 Real-time PCR 检测线粒体 DNA 拷贝数 检测线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 II (CO II) 代表线粒体 DNA 拷贝数。根据文献^[4] 设计正向引物 5' - TGAGCCATCCCTTACTAGG - 3', 反向引物 5' - TGAGCCGCAAATTCAGAG - 3'。反应体系:2 \times Premix Ex Taq II 10 μ L, 引物各 0.4 μ L, 50 \times ROX Reference Dye 0.4 μ L, gDNA 2 μ L, dH₂O 6.8 μ L, 共 20 μ L。采用标准的扩增程序,95℃ 预变性 30s;95℃ 5s,60℃ 30s,共 40 个循环。

1.2.4 提取细胞线粒体蛋白 胰酶消化、离心、收集细胞。PBS 缓冲液重悬细胞,计数,1000g,4℃ 离心 5min 后弃上清。加入 2mL 线粒体分离试剂悬浮细胞,冰浴 15min,匀浆 30 次左右,1000g,4℃ 离心 10min。取上清至新管中,11000g,4℃ 离心 10min,去除上清,沉淀即为线粒体。加入 200 μ L 含有 PMSF 的线粒体裂解液裂解线粒体,冰浴 20min,12000g,4℃ 离心 10min,取上清。

1.2.5 Western-blot 检测线粒体 TFAM 蛋白表达 根据检测蛋白分子量配制不同浓度的 SDS-PAGE 凝胶,将已定量的细胞蛋白加入梳孔中,进行电泳。待溴酚蓝到达凝胶远端,应用 BIO-RAD 转膜装置转膜。5% BSA 封闭 2h,4℃ 一抗孵育过夜。次日孵育二抗 1h,化学法发光、拍照,以 COX IV 为内参。

1.2.6 免疫共沉淀检测 PGC-1 α 蛋白乙酰化 用 500 μ L 1 \times 交联缓冲液预洗 Protein A/G 磁珠 2 次,与通用的乙酰化抗体 5 μ g 结合 15min,再用交联缓冲液洗磁珠 3 次。用

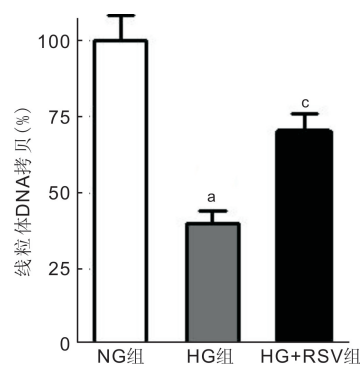


图1 白藜芦醇对高糖培养的 HREC 6530 中线粒体 DNA 拷贝的影响 ^a $P < 0.05$ vs NG 组, ^c $P < 0.05$ vs HG 组。

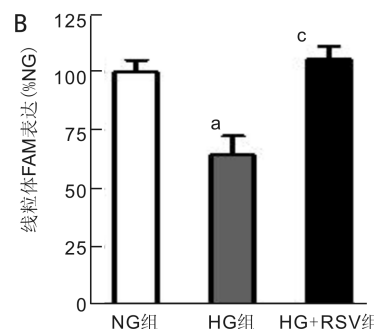
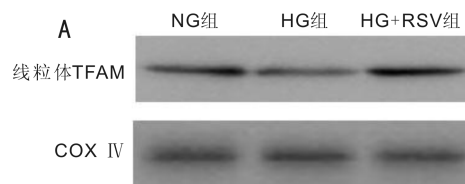


图2 白藜芦醇对高糖培养的 HREC 6530 中线粒体 TFAM 蛋白表达的影响 A: Western-blot 检测细胞线粒体 TFAM 蛋白表达; B: 线粒体 TFAM 蛋白表达差异, ^a $P < 0.05$ vs NG 组, ^c $P < 0.05$ vs HG 组。

DSS 进行抗体与磁珠的交联 30min 后,100 μ L 洗脱液漂洗磁珠 3 次,再用 200 μ L 免疫沉淀裂解缓冲液洗磁珠 2 次。室温下孵育 1~2h,用 500 μ L 免疫沉淀裂解缓冲液洗磁珠 2 次,之后用 500 μ L 纯水洗脱结合的抗原,用通用的乙酰化抗体和 PGC-1 α 抗体进行 Western-blot 检测。

统计学分析:采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析。各组间计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较用单因素方差分析,组间均数的两两比较用 SNK- q 检验。以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 白藜芦醇对高糖培养的视网膜血管内皮细胞线粒体 DNA 拷贝的影响 与正常培养组比较,高糖环境培养的 HREC 6530 细胞线粒体 DNA 拷贝数明显降低,而给予白藜芦醇处理后能显著提高高糖培养组的线粒体 DNA 拷贝数,组间差异具有统计学意义 ($F = 12.357, P < 0.05$),见图 1。

2.2 白藜芦醇对线粒体 TFAM 蛋白表达的影响 Western-blot 检测正常培养组、高糖培养组及白藜芦醇组线粒体 TFAM 蛋白表达,结果表明:与正常培养组比较,高糖培养组线粒体 TFAM 蛋白表达明显降低,而给予白藜芦醇处理后能显著提高高糖培养组的线粒体 TFAM 蛋白表达,组间差异具有统计学意义 ($F = 7.432, P < 0.05$),见图 2。

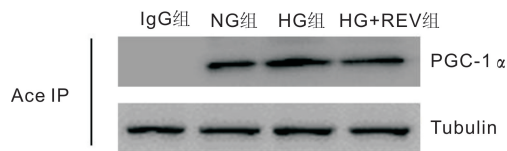


图3 白藜芦醇对高糖培养的 HREC 6530 中 PGC-1 α 乙酰化的影响。

2.3 白藜芦醇对 PGC-1 α 蛋白乙酰化的影响 Western-blot 检测正常培养组、高糖培养组及白藜芦醇组 PGC-1 α 乙酰化程度。结果表明:与正常培养组相比,高糖培养组 PGC-1 α 蛋白乙酰化增加,而白藜芦醇能显著降低高糖培养组 PGC-1 α 蛋白的乙酰化,组间差异具有统计学意义 ($F=8.359, P<0.05$)。

3 讨论

视网膜病变是糖尿病最严重的并发症之一,线粒体损伤在糖尿病视网膜病变的发生中发挥重要的作用。糖尿病患者视网膜细胞线粒体 DNA 及电子传递链功能障碍,因此,改善视网膜细胞线粒体 DNA 功能可能减轻糖尿病视网膜病变。本研究中,我们发现与正常培养组相比,高糖环境培养的视网膜血管内皮细胞中线粒体 DNA 的拷贝数减低。糖尿病患者视网膜中线粒体 DNA 对氧化应激损伤高度敏感,易于发生损伤,导致线粒体拷贝数降低。即使终止高糖环境,线粒体功能障碍仍难以纠正,促使糖尿病视网膜病变的发生^[5]。减轻糖尿病患者视网膜血管内皮细胞线粒体 DNA 的损伤,可能会延缓或减少糖尿病视网膜病变的发生。

TFAM 作为线粒体 DNA 的转录因子,可通过不依赖序列的方式与 DNA 结合,在线粒体损伤修复中发挥重要作用^[6]。心肌梗塞小鼠模型中 TFAM 高表达可增加线粒体 DNA 的数量,减轻心脏功能障碍。本研究发现:高糖导致视网膜血管内皮细胞线粒体 TFAM 减低,而白藜芦醇可以增加高糖环境下视网膜血管内皮细胞线粒体 TFAM 的表达,从而提高线粒体 DNA 的数量。但白藜芦醇是通过何种机制提高视网膜血管内皮细胞中 TFAM 表达的呢?既往的研究发现,白藜芦醇是 SIRT1 的激动剂,抑制高糖环境下视网膜血管内皮细胞增殖^[7],而且能通过调节 P65 的乙酰化,延缓糖尿病视网膜病变的发展^[2]。而且,白藜芦醇能通过调节谷氨酸转运蛋白及谷氨酰氨合成酶的表达,减轻糖尿病大鼠视网膜病变^[8]。白藜芦醇增加线粒体能量,减轻丙烯醛诱导的视网膜上皮细胞损伤^[9]。在血清移除的视网膜神经节细胞,白藜芦醇提高 SIRT1 的表达,PGC-1 α 向细胞核内迁移,提高线粒体数量和 DNA 拷贝^[10]。在高糖培养条件下,大鼠晶状体上皮细胞死亡率明显增高,线粒体膜电位降低,活性氧增多;经白藜芦醇干预后,细胞凋亡率显著降低,线粒体膜电位升高,活性氧产生明显减少^[11]。本研究发现:白藜芦醇能够降低高糖诱

导视网膜血管内皮细胞中 PGC-1 α 的乙酰化。高糖环境下 PGC-1 α 乙酰化增加,活性降低,而 PGC-1 α 是刺激线粒体生物合成的重要的转录调节因子,通过上调细胞核呼吸因子 1 和 TFAM,增加线粒体 DNA 的复制和基因转录^[12]。

综上所述,本研究发现白藜芦醇能够降低高糖环境下视网膜血管内皮细胞 PGC-1 α 的乙酰化,提高其活性,从而增加线粒体 TFAM 的表达,促进线粒体 DNA 的生成,有利于细胞线粒体的损伤修复,为白藜芦醇治疗糖尿病视网膜病变提供了新的理论依据。

参考文献

- 1 Ekstrand MI, Falkenberg M, Rantanen A, et al. Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Hum Mol Genet* 2004;13(9):935-944
- 2 Kowluru RA, Santos JM, Zhong Q. Sirt1, a negative regulator of matrix metalloproteinase-9 in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(9):5653-5660
- 3 de Oliveira MR, Nabavi SF, Manayi A, et al. Resveratrol and the mitochondria: From triggering the intrinsic apoptotic pathway to inducing mitochondrial biogenesis, a mechanistic view. *Biochim Biophys Acta* 2016;1860(4):727-745
- 4 Santos JM, Kowluru RA. Role of mitochondria biogenesis in the metabolic memory associated with the continued progression of diabetic retinopathy and its regulation by lipoic acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(12):8791-8798
- 5 Mishra M, Kowluru RA. Retinal mitochondrial DNA mismatch repair in the development of diabetic retinopathy, and its continued progression after termination of hyperglycemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(10):6960-6967
- 6 Kang D, Kim SH, Hamasaki N. Mitochondrial transcription factor A (TFAM): roles in maintenance of mtDNA and cellular functions. *Mitochondrion* 2007;7(1-2):39-44
- 7 韦艳,李红,苏晓庆,等.白藜芦醇对高糖环境下视网膜血管内皮细胞增殖及 HMGB1 乙酰化的影响. *国际眼科杂志* 2015;15(12):2049-2051
- 8 Zeng K, Yang N, Wang D, et al. Resveratrol Prevents Retinal Dysfunction by Regulating Glutamate Transporters, Glutamine Synthetase Expression and Activity in Diabetic Retina. *Neurochem Res* 2016;41(5):1050-1064
- 9 Sheu SJ, Liu NC, Ou CC, et al. Resveratrol stimulates mitochondrial bioenergetics to protect retinal pigment epithelial cells from oxidative damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54(9):6426-6438
- 10 Chen S, Fan Q, Li A, et al. Dynamic mobilization of PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis for the protection of RGC-5 cells by resveratrol during serum deprivation. *Apoptosis* 2013;18(7):786-799
- 11 钟晓东,罗卫民,刘越峰,等.白藜芦醇对高糖条件下大鼠晶状体上皮细胞线粒体活性氧产生及内质网的影响. *现代生物医学进展* 2013;13(3):424-426
- 12 Kang C, Li Ji L. Role of PGC-1 α signaling in skeletal muscle health and disease. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1271:110-117