

FOXO4 对高糖环境下视网膜血管内皮细胞氧化应激和凋亡的影响

陆 骏,秦 瑜,肖文玮,张 梅

作者单位:(200082)中国上海市,上海中医药大学附属上海市中西医结合医院眼科

作者简介:陆骏,毕业于上海第二医科大学,主治医师,研究方向:眼底病。

通讯作者:陆骏.maq480008@163.com

收稿日期:2018-07-02 修回日期:2018-11-08

Effects of FOXO4 on oxidative stress and apoptosis of retinal vascular endothelial cells under high glucose environmental conditions

Jun Lu, Yu Qin, Wen-Wei Xiao, Mei Zhang

Department of Ophthalmology, Shanghai Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200082, China

Correspondence to: Jun Lu. Department of Ophthalmology, Shanghai Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200082, China. maq480008@163.com

Received:2018-07-02 Accepted:2018-11-08

Abstract

• **AIM:** To study the effects of FOXO4 on oxidative stress and apoptosis of retinal vascular endothelial cells under high glucose environmental conditions.

• **METHODS:** Human retinal vascular endothelial cells were cultured with high glucose medium. Real-time PCR and Western blot were used to detect the expressions of FOXO4 within cells; meanwhile, both FOXO4 RNAi lentivirus and control vector lentivirus were infected the retinal vascular endothelial cells cultured in high sugar culture medium. Real-time PCR and Western blot techniques were used to detect the interference efficiency. After collection of supernatant and cells treated with various interferences, the SOD activity, MDA content in the supernatants and ROS level within cells were detected. Flow cytometry was used to determine the changes of cell apoptosis. Western blot was used to detect the expressions of apoptotic protein cleaved Caspase-3 and cleaved Caspase-9 within cells.

• **RESULTS:** The expression of FOXO4 was increased in retinal vascular endothelial cells after treatment with high glucose medium. FOXO4 RNAi lentivirus infection reduced the expression level of FOXO4 in retinal vascular endothelial cells under high glucose environmental

conditions. By contrast, control vector lentivirus had no effect on FOXO4 expression in cells. High glucose induced elevated levels of ROS in retinal vascular endothelial cells, reduced the activity of SOD in cell culture medium, increased the content of MDA, elevated the rate of apoptosis, and promoted the expressions of cleaved Caspase-3 and cleaved Caspase-9 proteins in cells. After down-regulation of FOXO4 expression, retinal endothelial cells were induced by high glucose, the activity of SOD in the cell culture medium increased, the levels of MDA, ROS, apoptosis, and the levels of cleaved Caspase-3 and cleaved Caspase-9 proteins decreased in cells as compared with those of retinal vascular endothelial cells. Moreover, compared with those did not interfere with FOXO4 expression, there was statistically significant differences ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** High glucose induces the expression of FOXO4 in retinal vascular endothelial cells. Knocking-down of FOXO4 expression reduces oxidative stress and apoptosis induced by high glucose medium.

• **KEYWORDS:** retinal vascular endothelial cells; oxidative stress; apoptosis; FOXO4

Citation: Lu J, Qin Y, Xiao WW, et al. Effects of FOXO4 on oxidative stress and apoptosis of retinal vascular endothelial cells under high glucose environmental conditions. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018;18(12):2146-2150

摘要

目的:研究叉头框转录因子O4(FOXO4)对高糖环境下视网膜血管内皮细胞氧化应激和凋亡的影响。

方法:以高糖培养人视网膜血管内皮细胞,Real-Time PCR和Western blot检测细胞中FOXO4表达变化。以FOXO4 RNAi慢病毒、对照载体慢病毒感染视网膜血管内皮细胞,以高糖培养液培养,Real-Time PCR和Western blot检测干扰效率。收集培养液上清和细胞,用试剂盒检测培养液上清中超氧化物歧化酶(superoxide orgotein dismutase,SOD)活性、丙二醛(malonaldehyde,MDA)含量和细胞中活性氧(reactive oxygen species,ROS)水平。流式细胞术测定细胞凋亡变化,Western blot检测细胞中凋亡蛋白Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9的表达变化。

结果:高糖处理后的视网膜血管内皮细胞中FOXO4表达上调,FOXO4 RNAi慢病毒感染下调高糖环境下视网膜血管内皮细胞中FOXO4表达水平,对照载体慢病毒对细胞中FOXO4表达水平没有影响。高糖诱导视网膜血管内皮细胞中ROS水平升高,降低细胞培养液中SOD活性,提高MDA含量,增加细胞凋亡率,促进细胞中Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9蛋白表达。下调FOXO4表

达的视网膜血管内皮细胞经高糖诱导后,细胞培养液中的SOD活性升高,MDA水平降低,细胞中ROS水平降低,细胞凋亡减少,细胞中Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9蛋白水平降低,与未干扰FOXO4表达的视网膜血管内皮细胞比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

结论:高糖诱导视网膜血管内皮细胞表达FOXO4,敲低其表达降低高糖诱导的细胞氧化应激和凋亡水平。

关键词:视网膜血管内皮细胞;氧化应激;凋亡;叉头框转录因子O4

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.12.06

引用:陆骏,秦瑜,肖文玮,等. FOXO4对高糖环境下视网膜血管内皮细胞氧化应激和凋亡的影响. 国际眼科杂志 2018; 18(12):2146-2150

0 引言

糖尿病视网膜病变是常见的糖尿病并发症之一,具有特异性的眼底病理变化,其中视网膜血管内皮细胞损伤是其发生的基础^[1-2]。高血糖诱导视网膜血管内皮细胞氧化损伤和细胞过度凋亡^[3]。叉头框转录因子O4(forkhead box O4, FOXO4)是叉头框蛋白家族的成员之一,其在人类的多种组织和器官中表达,可以通过影响细胞生物学特性发挥病理和生理作用^[4]。近年的研究表明,FOXO4的DNA结合区域含有一个5个氨基酸构成的片段,受到胰岛素等的调控,并且其在胰岛素外周靶器官中广泛表达,与糖尿病并发症的发生有关^[5-6]。目前在糖尿病视网膜病变中发现FOXO4过度表达,并且在 α -黑素细胞刺激素抗视网膜血管内皮细胞氧化应激过程中表达下调,而关于FOXO4对糖尿病视网膜病变视网膜血管内皮细胞的影响尚不明确^[7-8]。本实验以人视网膜血管内皮细胞为探讨对象,研究FOXO4在高糖环境下视网膜血管内皮细胞氧化应激和凋亡中的作用,为明确糖尿病视网膜病变发生机制提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料 青霉素、链霉素购自北京索莱宝生物有限公司;RNA提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;蛋白定量试剂盒购自美国Pierce;超氧化物歧化酶(superoxide orgotein dismutase, SOD)活性检测试剂盒、丙二醛(malonaldehyde, MDA)含量检测试剂盒购自南京建成生物研究所;Prime Script II 1st Strand cDNA Synthesis Kit、SYBR Real-Time PCR kit购自大连TaKaRa;活化型Caspase-3(Cleaved Caspase-3)抗体购自美国GeneTex;FOXO4抗体购自美国ABGENT;活化型Caspase-9(Cleaved Caspase-9)购自美国Cell Signaling Technology;活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量测定试剂盒购自上海前尘生物科技有限公司;FOXO4 RNAi慢病毒、对照载体慢病毒由上海吉玛构建。

1.2 方法

1.2.1 细胞株培养 人视网膜血管内皮细胞购自美国ScienCell实验室,细胞在含有体积分数为100mL/L胎牛血清的L-DMEM中培养,同时在培养液中添加100U/mL青霉素和100mg/mL链霉素。培养条件为:37℃,饱和湿度,5% CO₂培养箱。

1.2.2 高糖处理后视网膜血管内皮细胞中FOXO4表达检测 人视网膜血管内皮细胞分别以含有5.5、

30.0mmol/L葡萄糖的细胞培养液培养,设为对照组和高糖组,分别培养24h以后,进行Real-Time PCR和Western blot检测。

1.2.2.1 Real-Time PCR 收集对照组和高糖组细胞,在细胞中加入Trizol裂解液,按照RNA提取试剂盒提取视网膜血管内皮细胞中RNA, RNA溶解于RNase-free water中,分装,保存于-20℃。依照Prime Script II 1st Strand cDNA Synthesis Kit逆转录合成cDNA,引物序列为:FOXO4: F 5'-CTTTCTGAAGACTGGCAGGAATGTG-3', R 5'-GATCTAGGTCTATATCGCGGCAG-3'。GAPDH: F 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3', R 5'-TGCTGAAGACCAGTGGA-3'。取cDNA,用SYBR Real-Time PCR kit测定FOXO4表达水平,内参为GAPDH。

1.2.2.2 Western blot 收集对照组和高糖组细胞,添加含有PMSF的裂解液各500 μ L,将细胞瓶置于冰上反应30min,把裂解液收集到离心管中,置于4℃高速离心15min。用移液枪把上清液转移分装以后,常规BCA法测定各样品浓度。按照每孔上样量为30 μ g进行SDS-PAGE电泳,电压设置为恒压90V,电泳时间约为3h。将凝胶取出以后,用半干法转膜,转膜条件为100mA电流转膜50min,把电转后的PVDF膜置于5%牛血清白蛋白中,放在室温孵育2h。再将PVDF膜放在1:400稀释的FOXO4抗体反应液中,置于室温孵育2h,再与二抗1:2000稀释液反应2h,用DAB显色。分析条带的灰度值,内参为GAPDH,计算FOXO4与GAPDH灰度值的比值表示FOXO4蛋白水平。

1.2.3 慢病毒转染 取人视网膜血管内皮细胞,接种到24孔板中,细胞接种数量为每孔10⁵个。培养24h以后,在细胞中加入含有6 μ g/mL polybrene的新鲜培养液,同时添加病毒液,MOI=40。置于37℃孵育培养12h。更换新鲜的培养液,继续培养3d以后,荧光显微镜下观察荧光表达情况,嘌呤霉素筛选抗性细胞。人视网膜血管内皮细胞转染对照载体慢病毒后用含有30.0mmol/L葡萄糖的细胞培养液,记为阴性组。人视网膜血管内皮细胞转染FOXO4 RNAi慢病毒后用含有30.0mmol/L葡萄糖的细胞培养液,记为干扰组。同时设置对照组和高糖组,处理方法同1.2.2。以Real-Time PCR和Western blot检测方法检测高糖组、阴性组、干扰组细胞培养24h后FOXO4表达水平,检测干扰效果,步骤同1.2.2。

1.2.4 细胞培养液中SOD活性、MDA含量和细胞中ROS水平检测 对照组、高糖组、阴性组、干扰组细胞按照上述方法培养24h以后,收集培养液上清和细胞,分别用试剂盒检测培养上清中SOD活性和MDA含量,用试剂盒检测细胞中ROS变化水平。

1.2.5 细胞凋亡检测 对照组、高糖组、阴性组、干扰组细胞按照上述方法培养24h以后,收集各组视网膜血管内皮细胞,以PBS洗涤以后,加入195 μ L的结合缓冲液均匀混合,添加5 μ L的PI和5 μ L Annexin V-FITC,在室温、避光条件下结合10min,再添加190 μ L结合缓冲液,放在室温中结合10min。于60min内上流式细胞仪测定凋亡变化。同时以Western blot方法检测细胞中Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9蛋白表达变化,步骤同1.2.2。

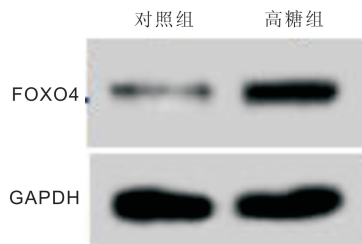


图1 Western blot 检测高糖处理后视网膜血管内皮细胞中 FOXO4 蛋白表达水平。

表1 高糖处理后视网膜血管内皮细胞中 FOXO4 表达水平

组别	FOXO4 mRNA	FOXO4 蛋白	$\bar{x} \pm s$
对照组	1.00±0.00	0.24±0.02	
高糖组	3.58±0.17	0.69±0.06	
<i>t</i>	26.286	12.324	
<i>P</i>	<0.001	<0.001	

表2 慢病毒转染经高糖处理后视网膜血管内皮细胞中 FOXO4 表达水平

组别	FOXO4 mRNA	FOXO4 蛋白	$\bar{x} \pm s$
高糖组	1.00±0.00	0.58±0.08	
阴性组	1.01±0.08	0.60±0.09	
干扰组	0.30±0.03	0.20±0.04	
<i>F</i>	204.288	28.398	
<i>P</i>	<0.001	0.001	

统计学分析:实验数据经 SPSS21.0 软件分析后,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组数据比较采用独立样本 *t* 检验,多组数据比较采用方差分析,组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高糖诱导后视网膜血管内皮细胞中 FOXO4 的表达

高糖组视网膜血管内皮细胞中 FOXO4 蛋白和 mRNA 水平均高于对照组,差异有统计学意义 (*P* < 0.05, 图 1, 表 1)。高糖诱导视网膜血管内皮细胞中 FOXO4 表达。

2.2 FOXO4 RNAi 慢病毒转染后高糖环境下视网膜血管内皮细胞中 FOXO4 的表达

三组视网膜血管内皮细胞中 FOXO4 蛋白和 mRNA 的水平比较,差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。阴性组视网膜血管内皮细胞中 FOXO4 蛋白和 mRNA 的水平与高糖组比较,差异无统计学意义 ($t_{\text{mRNA}} = 0.248, P_{\text{mRNA}} = 0.812; t_{\text{蛋白}} = 0.334, P_{\text{蛋白}} = 0.750$)。干扰组视网膜血管内皮细胞中 FOXO4 蛋白和 mRNA 的水平低于高糖组,差异有统计学意义 ($t_{\text{mRNA}} = 17.380, P_{\text{mRNA}} < 0.001; t_{\text{蛋白}} = 6.353, P_{\text{蛋白}} = 0.001$)。成功构建了高糖环境下下调 FOXO4 表达的视网膜血管内皮细胞株(图 2,表 2)。

2.3 下调 FOXO4 表达后高糖条件下视网膜血管内皮细胞培养液中 SOD 和 MDA 的变化

高糖组细胞培养液中 SOD 活性明显降低,MDA 含量明显升高,与对照组比较,差异有统计学意义 ($t_{\text{SOD}} = 5.549, P_{\text{SOD}} = 0.025; t_{\text{MDA}} = 7.876, P_{\text{MDA}} < 0.001$)。阴性组细胞培养液中 SOD 活性和 MDA 含量与高糖组比较,差异无统计学意义 ($t_{\text{SOD}} =$



图2 Western blot 检测慢病毒转染后细胞干扰效率。

表3 下调 FOXO4 后高糖处理下视网膜血管内皮细胞培养液中 SOD 和 MDA 的变化

组别	SOD 活性(U/mg)	MDA 含量(nmol/mg)	$\bar{x} \pm s$
对照组	128.63±9.17	4.25±0.47	
高糖组	90.25±8.45	8.36±0.72	
阴性组	89.66±8.59	8.54±0.79	
干扰组	109.63±7.60	6.85±0.52	
<i>F</i>	14.379	28.905	
<i>P</i>	0.001	<0.001	

0.085, $P_{\text{SOD}} = 0.934; t_{\text{MDA}} = 0.345, P_{\text{MDA}} = 0.739$)。干扰组细胞培养液中 SOD 活性明显升高,MDA 含量明显降低,与高糖组比较,差异有统计学意义 ($t_{\text{SOD}} = 2.802, P_{\text{SOD}} = 0.023; t_{\text{MDA}} = 2.894, P_{\text{MDA}} = 0.020$)。下调 FOXO4 降低高糖环境下视网膜血管内皮细胞中抗氧化酶活性,降低细胞中脂质过氧化水平(表 3)。

2.4 下调 FOXO4 表达后高糖条件下视网膜血管内皮细胞中 ROS 水平的变化

对照组、高糖组、阴性组、干扰组细胞中 ROS 水平依次为: (100.00±0.00)%、(187.45±12.36)%、(186.59±12.78)%、(145.20±10.56)%。四组细胞中 ROS 水平比较,差异有统计学意义 ($F = 48.379, P < 0.001$)。高糖组细胞中 ROS 水平明显高于对照组,差异有统计学意义 ($t = 10.359, P < 0.001$)。阴性组细胞中 ROS 水平与高糖组比较,差异无统计学意义 ($t = 0.102, P = 0.921$)。干扰组细胞中 ROS 水平明显低于高糖组,差异有统计学意义 ($t = 5.005, P = 0.001$)。下调 FOXO4 可降低高糖环境下视网膜血管内皮细胞中 ROS 水平。

2.5 下调 FOXO4 表达后高糖条件下视网膜血管内皮细胞凋亡水平的变化

四组细胞凋亡率及 Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9 蛋白水平比较,差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。高糖组细胞凋亡率及 Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9 蛋白水平明显高于对照组,差异有统计学意义 ($t_{\text{凋亡率}} = 13.169, P_{\text{凋亡率}} < 0.001; t_{\text{Cleaved Caspase-3}} = 8.104, P_{\text{Cleaved Caspase-3}} < 0.001; t_{\text{Cleaved Caspase-9}} = 7.203, P_{\text{Cleaved Caspase-9}} < 0.001$)。阴性组细胞凋亡率及 Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9 蛋白水平与高糖组比较,差异无统计学意义 ($t_{\text{凋亡率}} = 0.223, P_{\text{凋亡率}} = 0.829; t_{\text{Cleaved Caspase-3}} = 0.180, P_{\text{Cleaved Caspase-3}} = 0.862; t_{\text{Cleaved Caspase-9}} = 0.189, P_{\text{Cleaved Caspase-9}} = 0.854$)。干扰组细胞凋亡率及 Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9 蛋白水平明显低于高糖组,差异有统计学意义 ($t_{\text{凋亡率}} = 6.638, P_{\text{凋亡率}} < 0.001; t_{\text{Cleaved Caspase-3}} = 4.142, P_{\text{Cleaved Caspase-3}} = 0.003; t_{\text{Cleaved Caspase-9}} = 2.654, P_{\text{Cleaved Caspase-9}} = 0.029$)。下调 FOXO4 可降低高糖对视网膜血管内皮细胞凋亡的影响(图 3,表 4)。

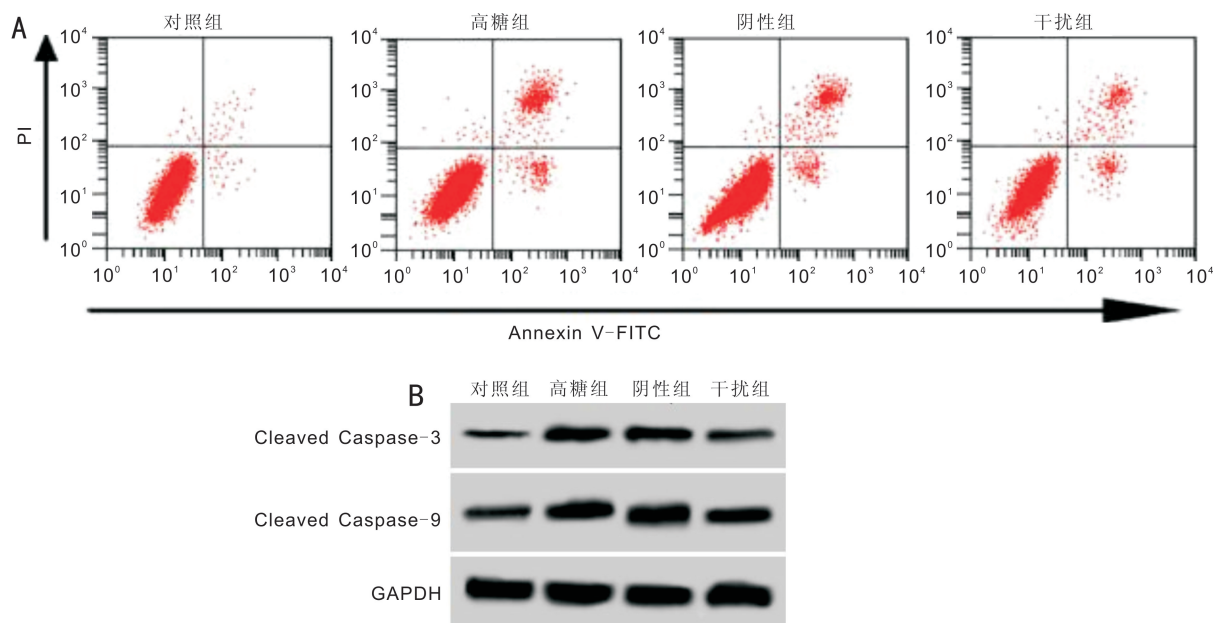


图3 下调 FOXO4 表达后高糖环境下视网膜血管内皮细胞凋亡变化 A:流式细胞术测定视网膜血管内皮细胞凋亡水平;B:Western blot 测定视网膜血管内皮细胞中凋亡蛋白 Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9 表达水平。

表4 下调 FOXO4 表达后高糖条件下视网膜血管内皮细胞凋亡率和 Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9 蛋白水平变化

组别	凋亡率(%)	Cleaved Caspase-3	Cleaved Caspase-9
对照组	4.15±0.32	0.23±0.02	0.40±0.05
高糖组	16.53±1.42	0.68±0.09	0.78±0.09
阴性组	16.32±1.45	0.67±0.08	0.79±0.06
干扰组	10.29±1.04	0.45±0.06	0.64±0.05
F	78.149	29.508	23.731
P	<0.001	<0.001	<0.001

3 讨论

糖尿病视网膜病变以视网膜血管内皮细胞损伤为早期标志,血糖增高是糖尿病视网膜病变发生的主要诱因,糖尿病患者血糖处于高水平状态,而高水平的血糖能够诱导视网膜血管内皮细胞凋亡^[9-10]。本实验的结果表明,高糖诱导视网膜血管内皮细胞凋亡水平升高,同时高糖还可以诱导视网膜血管内皮细胞氧化损伤,说明成功构建了糖尿病条件下的视网膜血管内皮细胞损伤模型。

叉头框蛋白家族能够调控正常机体的多种生理功能,如 DNA 损伤、分化、凋亡、氧化应激等,该蛋白家族有 4 个亚型,其中 FOXO4 在糖尿病条件下表达下调可以发挥保护内皮细胞的功能,FOXO4 参与内皮组织损伤和功能障碍^[11-13]。FOXO4 受到营养物质、胰岛素、氧化应激等多种因素刺激以后,FOXO4 与 DNA 结合能力被改变,导致下游蛋白的泛素化、乙酰化、磷酸化等异常^[14-15]。FOXO4 参与葡萄糖代谢和胆固醇合成等过程,FOXO4 转基因小鼠对葡萄糖清除的速度增加,在高表达瘦素的小鼠中发现 FOXO4 表达上调^[12,16-17]。糖尿病视网膜病变是糖尿病并发症之一,目前在糖尿病视网膜病变视网膜组织中发现 FOXO4 表达上调,FOXO4 可能参与糖尿病视网膜血管内皮细胞损伤过程^[7,18]。本研究表明,高糖处理后的视网膜血管内皮细胞中 FOXO4 表达水平升高,FOXO4 可能参与

糖尿病视网膜病变,这与上述研究报道一致。

糖尿病视网膜病变的发病机制较为复杂,其中视网膜氧化应激是其发病机制之一,生理条件下的氧自由基不断合成的同时被氧自由基清除剂不断地降解,而在病理条件下,自由基的生成和清除平衡被打破,细胞内的抗氧化酶如 SOD 活性降低,导致细胞内的 ROS 含量升高,引起细胞内脂质发生过氧化,破坏细胞膜完整结构,导致细胞膜通透性发生改变,而脂质发生过氧化的同时会生成大量的 MDA,因此,检测细胞外 SOD 活性和 MDA 含量可以间接反映细胞氧化损伤程度。众所周知,氧化应激诱导细胞凋亡发生,其可以通过激活细胞内 Caspase 级联反应诱导细胞凋亡^[19-23]。有研究表明,FOXO4 参与机体代谢过程与调控细胞氧化损伤有关,在动脉粥样硬化、胰岛 β 细胞中等已经证实^[24-25]。本实验的结果表明,下调 FOXO4 可以逆转高糖对视网膜血管内皮细胞氧化损伤、细胞凋亡和细胞中 Caspase-3、Caspase-9 的表达影响,说明 FOXO4 下调可以减轻高糖对视网膜血管内皮细胞损伤。

总之,FOXO4 参与糖尿病视网膜病变发生过程,下调其表达可以发挥保护视网膜血管内皮细胞的作用,这对于以后研究 FOXO4 在糖尿病视网膜血管内皮细胞损伤中的作用奠定了基础,为明确糖尿病视网膜病变分子发病机制提供了参考。

参考文献

- Balaratnasingam C, Inoue M, Ahn S, *et al.* Visual acuity is correlated with the area of the foveal avascular zone in diabetic retinopathy and retinal vein occlusion. *Ophthalmology* 2016;123(11):2352-2367
- 张凤俊,易敬林,李晶明,等. 糖尿病视网膜病变发病机制研究进展. *眼科新进展* 2016;36(6):584-587
- Xing Q, Zhang G, Kang L, *et al.* The suppression of kallistatin on high-glucose-induced proliferation of retinal endothelial cells in diabetic retinopathy. *Ophthalmic Res* 2016; 57(3):141-149
- Ubieta K, Garcia M, Grötsch B, *et al.* Fra-2 regulates B cell development by enhancing IRF4 and Foxo1 transcription. *J Exp Med*

2017;214(7):2059-2071

5 Liu ZP, Wang Z, Yanagisawa H, *et al.* Phenotypic modulation of smooth muscle cells through interaction of Foxo4 and myocardin. *Dev Cell* 2005;9(2):261-270

6 Chuang PY, Yu Q, Fang W, *et al.* Advanced glycation endproducts induce podocyte apoptosis by activation of the FOXO4 transcription factor. *Kidney Int* 2007;72(8):965-976

7 张丽娟. α -MSH对糖尿病视网膜血管内皮细胞保护作用的机制研究. 天津医科大学 2014

8 魏晓伟,马晓伟,郭晓惠. FoxO4与糖尿病及其并发症的研究进展. 中国糖尿病杂志 2014;22(3):276-279

9 李蕾,张红霞,李清楚,等. 运动诱发电位对2型糖尿病马尾神经近端损害的诊断价值. 郑州大学学报(医学版) 2016;51(3):401-405

10 Ding J, Wong TY. Current epidemiology of diabetic retinopathy and diabetic macular edema. *Curr Diab Rep* 2012;12(4):346-354

11 Iglesias-de la Cruz Mc, Ziyadeh FN, Isono M, *et al.* Effects of high glucose and TGF- β 1 on the expression of collagen IV and vascular endothelial growth factor in mouse podocytes. *Kidney Int* 2002;62(3):901-913

12 Wang B, Zhu J, Mounzih K, *et al.* Overexpression of the transcription factor Foxo4 is associated with rapid glucose clearance. *Mol Cell Endocrinol* 2009;307(1-2):217-223

13 Dansen TB, Smits LMM, Triest MHV, *et al.* Redox-sensitive cysteines bridge p300/CBP-mediated acetylation and FoxO4 activity. *Nat Chem Biol* 2009;5(9):664-672

14 Tang TT, Lasky LA. The forkhead transcription factor FOXO4 induces the down-regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha by a von Hippel-Lindau protein-independent mechanism. *J Biol Chem* 2003;278(32):30125-30135

15 Kuscu N, Celik-Ozenci C. FOXO1, FOXO3, AND FOXO4 are differently expressed during mouse oocyte maturation and preimplantation embryo development. *Gene Expr Patterns* 2015;18(1-2):16-20

16 Wilk A, Urbanska K, Yang S, *et al.* Insulin-like growth factor-I-forkhead box O transcription factor 3a counteracts high glucose/tumor necrosis factor- α -mediated neuronal damage; implications for human immunodeficiency virus encephalitis. *J Neurosci Res* 2011;89(2):183-198

17 Lüpertz R, Chovolou Y, Unfried K, *et al.* The forkhead transcription factor FOXO4 sensitizes cancer cells to doxorubicin-mediated cytotoxicity. *Carcinogenesis* 2008;29(11):2045-2052

18 Min D, Yi X, Wagner RJ, *et al.* Adiponectin Induces Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation via Repression of mTORC1 and FoxO4. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31(6):1403-1410

19 陈伟,马磊,杨立山. 甘草次酸对哮喘大鼠的抗氧化应激作用及NF- κ B信号通路的调控. 郑州大学学报(医学版) 2016;51(6):762-765

20 Devi TS, Hosoya KI, Terasaki T, *et al.* Critical role of TXNIP in oxidative stress, DNA damage and retinal pericyte apoptosis under high glucose: Implications for diabetic retinopathy. *Exp Cell Res* 2013;319(7):1001-1012

21 Santos JM, Mohammad G, Zhong Q, *et al.* Diabetic Retinopathy, Superoxide Damage and Antioxidants. *Curr Pharm Biotechnol* 2011;12(3):352-361

22 Arden GB, Sivaprasad S. Hypoxia and oxidative stress in the causation of diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev* 2011;7(5):291-304

23 Ola MS, Nawaz MI, Khan HA, *et al.* Neurodegeneration and Neuroprotection in Diabetic Retinopathy. *Int J Mol Sci* 2013;14(2):2559-2572

24 Zhu M, Zhang QJ, Wang L, *et al.* FoxO4 inhibits atherosclerosis through its function in bone marrow derived cells. *Atherosclerosis* 2011;219(2):492-498

25 Hettiarachchi KD, Zimmet PZ, Myers MA. The plecomacrolide vacuolar-ATPase inhibitor bafilomycin, alters insulin signaling in MIN6 β -cells. *Cell Biol Toxicol* 2006;22(3):169-181