

• 实验研究 •

早期糖尿病视网膜病变中 eEF2K 活性变化的实验观察

廖恂 何卉 张兆强 孟菊峰 叶立军 张越华

【摘要】 目的 观察早期糖尿病大鼠视网膜中真核生物延伸因子 2 激酶(eEF2K)的变化 探讨 eEF2K 活性变化在早期糖尿病视网膜病变(DR)中的意义。方法 建立 SD 大鼠链脲佐菌素(STZ)糖尿病高血糖模型 造模成功后 设立糖尿病大鼠(DM)组和正常对照(NC)组。qRT-PCR 检测 DM 组和 NC 组 4 周和 8 周时大鼠神经视网膜中 eEF2K 的表达情况。免疫荧光法观察定位神经视网膜中 eEF2K 激活标志物-磷酸化真核生物延伸因子 2(p-eEF2)和 Müller 细胞活化标志物胶质纤维酸性蛋白(GFAP)表达情况。结果 4 周和 8 周时 DM 组大鼠神经视网膜中 eEF2K 的表达水平与 NC 组相比无明显变化。8 周时 DM 组大鼠神经视网膜各层均出现 eEF2K 激活表现 即 p-eEF2 表达增强。神经节细胞层出现细胞凋亡样改变 凋亡样神经节细胞中 eEF2 的磷酸化水平增强最为明显。神经视网膜中 Müller 细胞活化 GFAP 蛋白表达增强。结论 STZ 诱导糖尿病大鼠早期视网膜病变中神经视网膜内 eEF2K 激活 在凋亡样神经节细胞中 eEF2K 活性上升最为显著。

【关键词】 糖尿病视网膜病变;真核生物延伸因子 2 激酶;神经节细胞;凋亡;胶质纤维酸性蛋白

[临床眼科杂志 2019 27:84]

Activity changes of eukaryotic elongation factor-2 kinase in early stages of diabetic retinopathy Liao Yi¹ He Hui¹ Zhang Zhaoqiang¹ Meng Jufeng¹ Ye Lijun¹ Zhang Yuehua². ¹Eye Institute of Xiamen University Fujian Provincial Key Laboratory of Ophthalmology and Visual Science School of Medicine Xiamen University Xiamen Fujian 361102; ²Xiamen University Laboratory Animal Center Xiamen Fujian 361100 China

【Abstract】 Objective To investigate the changes of eukaryotic elongation factor 2 kinase (eEF2K) in retina of diabetic rat at early stage ,and discuss the role of eEF2K at early-stage diabetic retinopathy. **Method** Diabetic model was induced by streptozotocin in SD rat ,and separated into diabetic model (DM) group and normal control (NC) group accordingly to blood glucose levels. qRT-PCR was applied to study the expression of Eef2k in rat neuroretina at 4 weeks and 8 weeks in DM and NC group. Immunofluorescence was adopted to examine the localization and expression of phospho-eukaryotic elongation factor 2 (p-eEF2) ,an indicator of eEF2K activity ,and glial fibrillary acidic protein (GFAP) ,a marker of Müller cell activation in neuroretina. **Results** There is no significant change of the expression of Eef2k mRNA in neuroretina of DM group rat at 4 weeks and 8 weeks in comparison with NC group rat. An elevation of the phosphorylation of eEF2 was detected in different layers of neuroretina of DM rat at 8 weeks ,indicating the activation of eEF2K. Apoptotic-like changes in cells were observed in ganglion cell layer (GCL) ,and a robust increase of eEF2 phosphorylation was present in these cells. Moreover ,Müller cells were activated in neuroretina ,and the expression of GFAP was increased. **Conclusion** eEF2K was activated in neuroretina of early-stage diabetic rat induced by STZ ,and a robust increase of eEF2K activity was detected in apoptotic ganglion cells.

【Key words】 diabetic retinopathy ,DR; eukaryotic elongation factor 2 kinase ,eEF2K; apoptosis; glial fibrillary acidic protein GFAP

[J Clin Ophthalmol 2019 27:84]

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy ,DR)是糖尿病(diabetes mellitus ,DM)全身并发症中最严重的微血管病变之一 ,也是 DM 患者致盲或低视力的主

要原因^[1]。研究提示视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell ,RGC)在糖尿病发生后短时间内即可受到损伤 并早于血管性损伤^[2]。临床检查也发现 DM 患者在眼底检查未发现 DR 时已出现视觉对比灵敏度、色觉和视网膜电图振荡电位的异常 提示 DR 视网膜神经细胞的损害早于微血管病变^[3]。

真核生物延伸因子 2 激酶(eukaryotic elongation factor 2 kinase eEF2K)是一种 Ca²⁺/CaM 依赖性蛋白激酶 真核生物延伸因子 2(phospho-eukaryotic elongation factor 2 p-eEF2)是其惟一的底物。eEF2K 磷酸

DOI: 10. 3969/j. issn. 1006-8422. 2019. 01. 023

基金项目:福建省自然科学基金项目(2016J 01412);国家自然科学基金青年项目(81700864)

作者单位:1361102 厦门大学眼科研究所 福建省眼科与视觉科学重点实验室 厦门大学医学院(廖恂、何卉、张兆强、孟菊峰、叶立军); 361100 厦门大学实验动物中心(张越华)

通讯作者:廖恂(E-mail: liaoyilori@xmu.edu.cn)

化 eEF2 56 位苏氨酸使其失活,降低 eEF2 与核糖体的结合能力进而抑制肽链延伸,因此 eEF2K 在蛋白质延伸过程中起着关键作用^[4]。在细胞应激(如饥饿、缺氧、氧化应激等)条件下,高水平激活的 eEF2K 能够阻断 eEF2 的蛋白质翻译,使细胞适应应激,促进细胞生存。因此 eEF2K 活性的改变影响细胞的许多生理进程,例如,细胞周期、细胞分化、细胞凋亡以及自噬等。在早期 DR 的病理过程中, eEF2K 对于视网膜神经细胞生存的影响尚未见研究报道。本文初步观察了早期 DR 中 eEF2K 活性的变化,为进一步开展相关研究提供线索。

资料与方法

一、材料

1. 实验动物:8 周龄 SPF 雄性 SD 大鼠(180 ~ 220 g)由厦门大学实验动物中心提供[许可证:SYXK(闽)2018-0010],饲养于厦门大学实验动物中心 SPF 级动物房,室温 18 ~ 25 °C 相对湿度 55% ~ 70%,12 h 光照/12 h 黑夜循环光照环境中。共 20 只大鼠,按照体重随机分为正常对照(NC)组 8 只和糖尿病造模组 12 只。动物自由饮水与饮食。动物实验遵循《试验动物管理条例》并通过厦门大学动物实验伦理委员会批准。

主要试剂:链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)、DAB 显色剂、DAPI(美国 Sigma 公司);TRIeasy(上海翊圣公司)、逆转录酶(上海 Thermo 公司);dNTP(10 mmol · L⁻¹)、2 Ex TaqMix、DL2000 相对分子质量标准(北京宝日生物技术有限公司);DNase I、RNase 抑制剂(北京 Promega 生物技术有限公司);p-eEF2 抗体(上海 Cell Signaling Technology 公司);GFAP 抗体(武汉 Proteintech 公司);抗兔荧光二抗(488,上海 Invitrogen 公司)。

二、方法

1. 糖尿病动物模型制作:将 STZ 溶解于 0.1 mol/l 柠檬酸缓冲液(pH = 4.5)中,配制成 20 g/l 的溶液,造模组大鼠禁食 12 h 并称体重,按 60 mg/kg 剂量一次性腹腔注射。正常对照(NC)组大鼠腹腔注射等量的柠檬酸缓冲液。

动物造模 7 d 和 14 d 禁食 12 h,取尾尖血,血糖仪(Abbott 公司)测血糖,血糖 > 16.7 mmol/l 大鼠为造模成功,选定 8 只为糖尿病(DM)组。分别于造模成功后的 4、8 周各组处死 4 只大鼠,取右眼做冰冻切片进行相关免疫荧光染色实验,对侧眼取视网膜提取 mRNA 进行荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 eEF2K

表达水平。

2. qRT-PCR 方法:取 DM 和 NC 组大鼠视网膜提取总 RNA,逆转录后在 Applied Biosystems Quantitative Real Time PCR 检测仪上进行分析测定 eEF2K 的表达水平,以 Actin 作为内参,以 2^{-ΔΔCt} 表示相对表达量。引物序列(5'→3'),eEF2K 上游引物 GGC-CAGGGCTACTACAACAA, eEF2K 下游引物 CGGTGA-CAGCATTGTACCTG, Actin 上游引物 CAACCTTCTTG-CAGCTCCTC, Actin 下游引物 ACCCATACCCACCAT-CACAC。建立 10 μl 反应体系(5 μl 2 × Master Mix, 0.2 μl 正向引物,0.2 μl 反向引物,0.2 μl Rox, 4 μl DNA 模板,0.4 μl 超纯水),循环条件为 95 °C 预变性 10 s,95 °C 变性 5 s,60 °C 退火并延伸 35 s 并观察荧光水平,共 40 个循环。

3. 免疫荧光染色:将冰冻大鼠视网膜制作为 8 μm 厚切片,室温风干 2 h, PBS 复水后,冷丙酮处理 30 min 固定,0.02% Triton X-100 透膜 30 min。采用 2% BSA 封闭 1 h 后,分别加入 p-eEF2 抗体(1:100 稀释)或 GFAP 抗体(1:100 稀释)4 °C 孵育过夜,抗兔 488 二抗(1:100 稀释)室温孵育 3 h,采用带有 DAPI 的封片剂封片后进行观察。

结果

一、糖尿病大鼠神经视网膜中 eEF2K 的基因表达变化

造模 4 周和 8 周时,大鼠神经视网膜中 eEF2K 的基因表达均未见显著变化(图 1)。

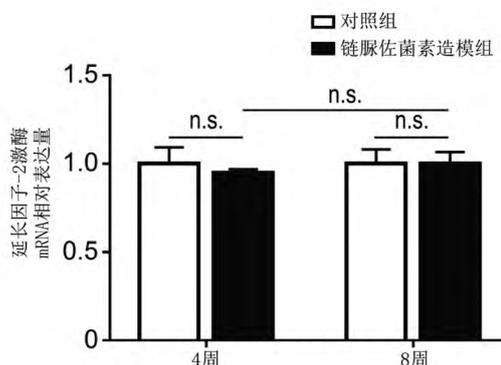


图 1 糖尿病大鼠造模 4 周和 8 周时神经视网膜中 eEF2K 基因表达变化

二、糖尿病大鼠神经视网膜中 p-eEF2 的表达变化

造模 4 周时大鼠神经视网膜中未见 p-eEF2 表达。造模 8 周时大鼠神经视网膜中各层均出现 p-eEF2 表达,神经节细胞层出现细胞凋亡样改变,凋亡

样神经节细胞中 p-eEF2 表达增强最为明显(图 2)。

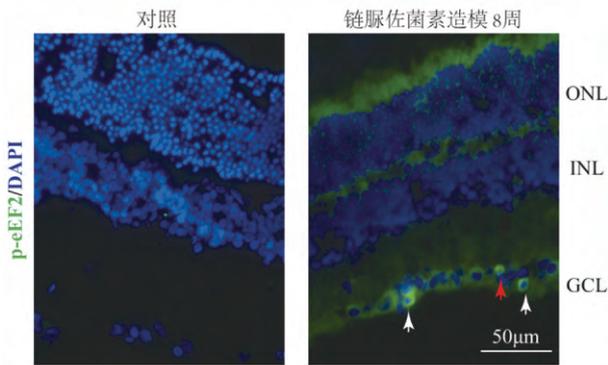


图 2 造模 8 周时糖尿病大鼠神经视网膜中 p-eEF2 的表达变化 (ONL: 外核层, INL: 内核层, GCL: 神经节细胞层)

注 白色箭头: 具有凋亡样固缩细胞核的神经节细胞 p-eEF2 水平升高; 红色箭头: 高表达 p-eEF2 的凋亡样神经节细胞细胞核丢失

三、糖尿病大鼠神经视网膜中 Müller 细胞活化标志物 GFAP 的表达变化

造模 4 周时大鼠神经视网膜中 Müller 细胞未见明显活化,胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 的表达与对照组比较无明显差异。造模 8 周时大鼠神经视网膜中 Müller 细胞明显活化, GFAP 的表达与对照组比较明显增强(图 3)。

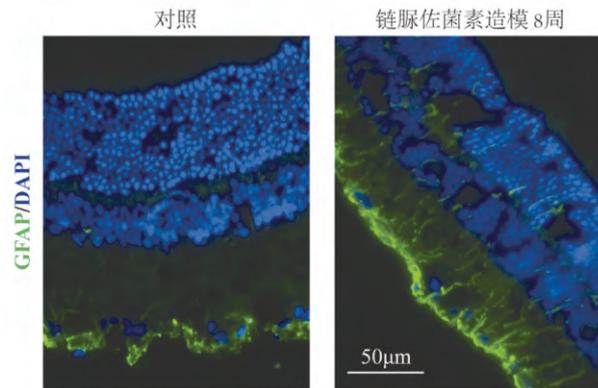


图 3 造模 8 周时糖尿病大鼠神经视网膜中 GFAP 的表达变化 (比例尺为 50 µm)

讨 论

eEF2K 是独特的 Ca^{2+} /CaM 依赖性蛋白激酶, eEF2K 激活后能迅速磷酸化 eEF2 抑制其活性,最终抑制蛋白质合成,减少细胞对营养和能量的消耗,帮助细胞适应不良的环境^[5]。eEF2K 参与调节多种细胞生物过程,如蛋白质合成、细胞周期、细胞转化及肿瘤发生。当前,细胞中 eEF2K 的功能与作用机制的研究主要集中于其调节肿瘤细胞的生存和凋亡方面^[6,7]。近来有研究报道了 eEF2K 通过调节细胞凋亡和自噬水平,促进细胞增殖和组织重塑,影响肥厚

性心肌病、特发性肺纤维化等慢性增生性疾病和动脉粥样硬化、高血压、肺动脉高压等慢性血管性疾病的病理过程^[8-10]。

在视网膜退行性病变中, eEF2K 是否参与 DR 过程尚未见研究报道。本试验观察首次发现, STZ 造模 8 周时 SD 大鼠神经视网膜中 p-eEF2 表达增强,提示在早期 DR 中各层神经细胞中 eEF2K 均被激活。我们的试验还观察到,在神经节细胞(RGC)层出现细胞凋亡样改变,特别是在凋亡样 RGC 中 p-eEF2 表达最为明显。以上现象提示 RGC 中 p-eEF2 的水平可能与 RGC 的凋亡有联系。在 STZ 造模 4 周和 8 周后, qRT-PCR 检测显示大鼠神经视网膜中 eEF2K 的表达情况没有显著变化,提示糖尿病大鼠早期神经视网膜中 eEF2K 的变化主要为活性改变,而不是转录量改变,其蛋白质表达水平尚有待进一步研究。目前,对 DR 发病机制的认识尚不明确。近年来神经退行性病变被认为是 DR 视力损伤的一个重要因素^[11]。RGC 作为视觉转导通路中的枢纽,其结构、数量变化和凋亡在 DR 视力损害中扮演着重要的角色,可作为早期发现 DR 的一项有效的观察指标。欧阳正隆等采用荧光金逆行标记发现 STZ 诱导糖尿病大鼠造模 4 周后 RGC 计数降低,说明 RGC 在糖尿病早期即受到损害,提示 RGC 是视网膜中对高糖损伤最为敏感的神经细胞之一^[12]。同时,电镜观察也发现 RGC 的细胞超微结构改变为 DR 中神经细胞最早的异常改变^[12]。与前期研究一致,本文研究结果也提示 RGC 可能是糖尿病早期神经视网膜病变中最早受到损害的细胞。关于早期糖尿病神经视网膜病变中 eEF2K 激活的机制以及其在 RGC 凋亡损伤中的作用有待后续进一步研究。

在 DR 早期, Müller 细胞的活化是另一关键改变。Müller 细胞是哺乳动物神经视网膜中特有的神经胶质细胞,贯穿分布于视网膜内界膜与外界膜以及视网膜神经元的胞体和纤维之间。在神经视网膜特有的“神经-血管耦连”中 Müller 细胞起着关键性的作用。病理状态下,任何视网膜疾病与损伤都能引起 Müller 细胞反应性胶质化增生(reactive gliosis),胶质化的主要特征是胶质激活即胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 表达升高。在高血糖环境下,早期即可出现神经视网膜 Müller 细胞活化^[13], Müller 细胞活化常作为糖尿病神经视网膜早期损伤的标志。本试验观察到造模 8 周后大鼠神经视网膜中 Müller 细胞明显活化, GFAP 的表达与对照组比较明显增强,在时间上与 eEF2K 激活同步,但

GFAP 的表达是否与 eEF2K 活化直接相关以及二者之间的联系在糖尿病神经视网膜病变中的作用值得探讨。有研究认为在 DR 的早期病理改变中, Müller 细胞的表型和功能改变具有关键性作用^[14]。DR 既可引起 Müller 细胞发生反应性增生,又可导致 Müller 细胞分泌大量的炎症介质和血管内皮生长因子(VEGF) 进而导致血-视网膜屏障功能发生障碍^[15]。因此,如何降低 Müller 细胞胶质化、减少视网膜神经元的凋亡进而延缓糖尿病神经视网膜病变的进程将成为保护糖尿病患者视神经功能的新方向。其中,我们的研究结果提示 eEF2K 活性的调控也可能成为新的治疗靶点。

参考文献

- [1] Lu L, Lu Q, Chen W, et al. Vitamin D3 protects against diabetic retinopathy by inhibiting high-glucose-induced activation of the ROS/TXNIP/NLRP3 inflammasome pathway [J]. *J Diabetes Res* 2018, 2018: 8193523.
- [2] 欧阳正隆, 余韵, 胡玉新, 等. 自噬在早期糖尿病大鼠视网膜神经病变中的作用[J]. *广东医学* 2017, 38(16): 2444-2449.
- [3] Fletcher EL, Phipps JA, Ward MM, Puthusser YT, et al. Neuronal and glial cell abnormality as predictors of progression of diabetic retinopathy [J]. *Curr Pharm Des* 2007, 13(26): 2699-2712.
- [4] 宋洪美, 马建华, 祝鸿程, 等. 真核延长因子 II 激酶在肿瘤细胞中的作用[J]. *医学综述*, 2016, 22(12): 2342-2345.
- [5] Leprévier G, Remke M, Rotblat B, et al. The eEF2 kinase confers resistance to nutrient deprivation by blocking translation elongation [J]. *Cell* 2013, 153: 1064-1079.
- [6] Fu LL, Xie T, Zhang SY, et al. Eukaryotic elongation factor 2 kinase (eEF2K): a potential therapeutic target in cancer [J]. *Apoptosis*, 2014, 19: 1527-1531.
- [7] 肖婷, 刘锐, 王明伟. 癌症治疗的新靶点-eEF2K [J]. *生命的化学*, 2016, 36(3): 397-403.
- [8] Wang YN, Huang GJ, Wang ZX, et al. Elongation factor-2 kinase acts downstream of p38 MAPK to regulate proliferation, apoptosis and autophagy in human lung fibroblasts [J]. *Exp Cell Res* 2018, 363(2): 291-298.
- [9] Kameshima S, Okada M, Ikeda S, et al. Coordination of changes in expression and phosphorylation of eukaryotic elongation factor 2 (eEF2) and eEF2 kinase in hypertrophied cardiomyocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2016, 477: 218-224.
- [10] Kodama T, Okada M, Yamawaki H. Mechanisms underlying the relaxation by A484954, a eukaryotic elongation factor 2 kinase inhibitor, in rat isolated mesenteric artery [J]. *J Pharma Sci* 2018, 137: 86-92.
- [11] Jindal V. Neurodegeneration as a primary change and role of neuroprotection in diabetic retinopathy [J]. *Mol Neurobiol* 2015, 51: 878884.
- [12] Li X, Zhang M, Zhou H. The morphological features and mitochondrial oxidative stress mechanism of the retinal neurons apoptosis in early diabetic rats [J]. *J Diabetes Res*, 2014, 678123.
- [13] 陶丹, 梅妍. Müller 细胞活化对糖尿病视网膜病变视功能影响的综述 [J]. *昆明理工大学学报(自然科学版)* 2018, 43: 91-94.
- [14] Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, et al. Müller cells in the healthy and diseased retina [J]. *Progress in retinal and eye research* 2006, 25: 397-424.
- [15] Coorey NJ, Shen W, Chung SH, et al. The role of glia in retinal vascular disease [J]. *Clin Exp Optom* 2012, 95: 266-281.

(收稿: 2018-11-16)

• 消息 •

《角膜胶原交联技术及临床应用》一书出版

《角膜胶原交联技术及临床应用》由厦门大学附属厦门眼科中心吴护平教授和林志荣博士主编, 厦门大学出版社出版。全书共有 11 章, 20 余万字, 插图 140 余幅, 全面介绍了角膜生物力学和角膜交联的原理、常规手术步骤及参数优化、交联在各种常见疾病中的应用、并发症及其处理等内容, 对交联在圆锥角膜及感染性角膜病中的应用作了重点分析和阐述。本书以编者团队 6 年来的临床经验及研究成果为基础, 注重临床应用, 图文并茂, 内容规范、可读性强, 具有较高的学术价值和实用价值, 可作为各级眼科医师和医学生的参考书。本书定价 78 元, 邮购可与厦门大学附属厦门眼科中心林伟玉联系, 电话: 18106931761。

(林伟玉)