

网络出版时间:2022-08-30 11:38 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220829.1638.009.html

人参皂苷 RG1 调控丙酮酸激酶 M2 影响视网膜 毛细血管内皮细胞糖酵解和血管形成

薛黎萍¹, 胡敏¹, 李亚娣¹, 张晓帆¹, 张洁莹¹, 周园¹, 梁佳芮¹, 张传宏¹, 丁鹏²

摘要 **目的** 探讨人参皂苷 Rg1 (GRg1)通过调控丙酮酸激酶 M2 (PKM2) 的表达对人视网膜微血管内皮细胞 (HRMECs)糖酵解的影响。**方法** 在体外培养 HRMECs,将其分为对照组 (NC) 组、高葡萄糖 (HG) 组、HG + 人参皂苷 Rg1 (HG + GRg1) 组、HG + 人参皂苷 Rg1 + 低表达 PKM2 (HG + GRg1 + si-PKM2) 组、HG + 人参皂苷 Rg1 + 过表达 PKM2 (HG + GRg1 + OE-PKM2) 组, si-PKM2、OE-PKM2 通过细胞转染方式转染至 HRMECs 中。采用 qRT-PCR 法检测 HRMECs 中 PKM2 mRNA 的表达情况;通过 Western blot 检测 HRMECs 中相关蛋白表达量;在倒置显微镜下观察细胞体外管腔生成数量,以量化血管形成能力;收集各组细胞培养液,分别用葡萄糖检测试剂盒、乳酸检测试剂盒和腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP) 检测试剂盒检测葡萄糖摄取量、乳酸产量以及 ATP 含量。**结果** HG 诱导会显著增加 HRMECs 的血管形成数量、糖酵解及 PKM2 的表达,而在加入 GRg1 处理后, HG 所致的血管数量、糖酵解及 PKM2 的表达均明显减少;转染 si-PKM2 可协助 GRg1 对糖酵解和血管形成的抑制作用,而转染 OE-PKM2 会干扰 GRg1 的功能。**结论** GRg1 通过抑制 PKM2 减少 HRMECs 糖酵解抑制血管形成。

关键词 糖尿病视网膜病变;人参皂苷 RG1;人视网膜微血管内皮细胞;丙酮酸激酶 M2;糖酵解;血管形成

中图分类号 R 774.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)10-1559-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.10.009

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是最常见、最严重的糖尿病微血管并发症之一, DR 的基本病理特征是新生血管的生成^[1]。有研究^[2]表明内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 代谢在血管生成中的关键作用, ECs 的增殖和迁移依赖于糖酵解产生的能量,因此,抑制 ECs 中的糖酵解可能

会抑制 DR 中新血管形成。丙酮酸激酶 M2 (pyruvate kinase M2, PKM2) 是糖酵解末端步骤的限速酶,它促进磷酸烯醇式丙酮酸释放能量,为细胞生长提供有利条件^[3]。Liu et al^[4] 报道,高葡萄糖 (high glucose, HG) 可诱导人视网膜微血管内皮细胞 (human retinal microvascular endothelial cells, HRMECs) 中 PKM2 表达增加,而抑制 PKM2 后可逆转 HG 诱导的 HRMECs 损伤和凋亡。人参皂苷 Rg1 (ginsenoside Rg1, GRg1) 是人参中的一种主要皂苷,在糖尿病中具有抗血管生成和抗凋亡活性^[5],但在 DR 中,鲜有关于 GRg1 是否通过调控糖酵解过程影响血管形成的报道。因此,该研究旨在探讨 GRg1 通过调控 PKM2 的表达对 HRMECs 糖酵解的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂 人视网膜微血管内皮细胞 HRMECs (上海泽叶生物科技有限公司); Lipofectamine™2000 转染试剂盒、TRIzol 试剂、Western blot 试剂盒 (美国 Thermo Fisher 公司); Qiagen RNeasy mini 试剂盒 (广州健仑生物科技有限公司); PrimeScript RT 试剂盒 (北京智杰方远科技有限公司); 葡萄糖检测试剂盒和 ATP 检测试剂盒 (生工生物工程股份有限公司); 乳酸含量检测试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司); 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、血管生成素-1 (angiopoietin-1, Ang-1)、血管生成素-2 (angiopoietin-2, Ang-2)、成纤维细胞生长因子 2 (fibroblast growth factor2, FGF2) 和 GAPDH (英国 Abcam 公司); ECs 专用培养基 (武汉普诺赛生命科技有限公司)

1.2 细胞培养及转染 HRMECs 在含有 5% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、1% 青霉素/链霉素和 1% ECs 生长因子的 HRMECs 特异性 ECs 培养基中培养。所有细胞均在 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。每 2 d 更换一次培养基。正常葡萄糖条件下的葡萄糖浓度为 5 mmol/L, HG 条件下的葡萄糖浓度为 25 mmol/L, 细胞在 HG 条件下培养 48 h 后加入 10 μmol/L GRg1, 继续培养 48 h 进行后续实验。

2022-07-10 接收

基金项目:云南省中青年学术和技术带头人后备人才项目 (编号: 202005AC160021); 云南省科技厅科技计划项目 [编号: 2019FE001 (-169)]

作者单位:¹ 云南大学附属医院儿童眼科, 昆明 650000

² 昆明医科大学第一附属医院神经外科, 昆明 650000

作者简介:薛黎萍,女,主任医师;

丁鹏,男,教授,责任作者, E-mail: pengdwfmc@163.com

根据 Lipofectamine 2000 转染试剂盒说明将阴性对照物(NC)、靶向 PKM2 的小干扰 RNA(si-PKM2)和过表达 PKM2(OE-PKM2)的质粒转染至 HRMECs。

1.3 qRT-PCR 检测 HRMECs 中 PKM2 mRNA 的表达情况 收集各组细胞,使用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA,根据 PrimeScript RT 试剂盒说明将 1 μg 总 RNA 逆转录合成 cDNA,以 GAPDH 为内参,进行定量 PCR 反应,反应体系为:ddH₂O 7 μl,SYBR Green PCR Master Mix 10 μl,cDNA 2 μl,上游引物 0.5 μl,下游引物 0.5 μl,总体积共 20 μl。PCR 反应条件为:95 ℃ 预变性 10 min,然后 3 步反应,95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 退火 30 s,共 45 个循环。引物序列见表 1。

表 1 引物序列	
基因名	序列(5'-3')
PKM2	F: 5'-GGAAGATCTGTAGTCTGTCTGTTGGTCAG-3'
	R: 5'-CCCAAGCTTCTGAAGAACTGCTCCGCC-3'
PKM2-siRNA	sense: 5'-UGCCAUCUACCACUUGCAATT-3'
	anti-sense: 5'-UUGCAAGUGUAGAUGGCATT-3'
GAPDH	F: 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3'
	R: 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGCAT-3'

1.4 Western blot 检测 HRMECs 中相关蛋白表达量 使用 RIPA 缓冲液裂解细胞,BCA 蛋白检测试剂盒分析蛋白质浓度,然后加载到十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳微型凝胶上并转移到聚偏二氟乙烯膜上。将膜在含有 5% 脱脂奶粉的封闭缓冲液中封闭,并在 4 ℃ 下加入提前稀释好的一抗(VEGF,1:10 000;Ang-1,1:10 000;Ang-2,1:5 000;FGF2,1:1 000;GAPDH,1:2 500),室温孵育 2 h。然后在室温下将膜与 HRP 标记的二抗孵育 1 h,ECL 显色,凝胶成像系统成像分析,使用 ImageJ 软件进行蛋白质印迹结果的定量。

1.5 血管形成实验检测 HRMECs 血管形成能力 将 Matrigel(90 μl)涂到 24 孔板中,在 37 ℃ 下硬化 30 min,将 HRMECs 以每孔 1.2 × 10⁵ 个细胞的密度接种到 Matrigel 包被的孔顶部,于 100% 湿度、37 ℃、5% CO₂ 的无菌培养箱中培养 6 h,然后在倒置显微镜下观察体外管腔生成结果并拍照,使用 Image Pro Plus 软件分析计算视野内 Matrigel 小管形成的数量,以此量化血管形成能力。

1.6 HRMECs 中葡萄糖摄取量和乳酸产量 收集细胞到离心管内,离心后弃上清液,每组收集 5 × 10⁵ 个细胞,加入 100 μl 蒸馏水,超声波破碎细胞(冰浴,功率 200 W,超声 3 s,间隔 10 s,重复 30

次),95 ℃ 水浴 10 min,冷却后,25 ℃、10 600 r/min 离心 10 min,取上清液备用;酶标仪预热 30 min 以上,按照试剂盒说明书加入各试剂,根据公式计算葡萄糖摄取量。同样,按照乳酸含量检测试剂盒说明书检测乳酸产量。

1.7 HRMECs 中 ATP 含量 收集各组细胞,每组收集 5 × 10⁵ 个细胞,加入 100 μl 提取液,冰浴下超声波破碎 1 min,4 ℃、11 818 r/min 离心 10 min,取上清液至另一离心管,加入 500 μl 的氯仿充分震荡混匀,4 ℃、11 818 r/min 离心 3 min,取上清液,置冰上待测。根据试剂盒说明加入反应液,检测酶标仪 340 nm 波长处的光密度(optical density,OD)值,根据公式计算腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate,ATP)含量。

1.8 统计学处理 本研究至少进行 3 个独立实验,所有数据采用平均值 ± 标准偏差($\bar{x} \pm s$)表示,使用 GraphPad Prism 7.0 软件进行数据分析和绘图,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GRg1 抑制 HRMECs 血管形成 Western blot 检测结果显示,与 NC 组相比,HG 组细胞的 VEGF、Ang-1、Ang-2、FGF2 的表达水平增强,经 GRg1 处理后,VEGF、Ang-1、Ang-2、FGF2 的表达下降(*P* < 0.05),见图 1A;同时分析视野内 Matrigel 小管形成的数量,结果显示,与 NC 组细胞相比,HG 组细胞血管形成数量增多(*P* < 0.01),而 GRg1 处理 HG 诱导的 HRMECs 后,其血管形成数量减少(*P* < 0.05),见图 1B。

2.2 GRg1 抑制 HG 诱导的 HRMECs 糖酵解 在 HG 的处理下,HRMECs 对葡萄糖的摄取量高于 NC 组(*P* < 0.001),其乳酸和 ATP 产量也高于 NC 组(*P* < 0.001);用 GRg1 处理 HG 组细胞后,与 HG 组相比,细胞对葡萄糖的摄取减少(*P* < 0.01),乳酸及 ATP 产量与 HG 组相比也降低(*P* < 0.01),见图 2。

2.3 GRg1 调控 HRMECs 中 PKM2 表达 qRT-PCR 检测结果显示,HG 组细胞 PKM2 mRNA 的表达增加(*P* < 0.001),在 GRg1 处理后,PKM2 mRNA 的表达有所下调(*P* < 0.01),见图 3A;Western blot 检测 HRMECs 中表达量发现,PKM2 在 HG 组中的表达高于 NC 组(*P* < 0.01),而经 GRg1 处理后,其在 HRMECs 中的表达降低(*P* < 0.05),见图 3B。

2.4 GRg1 通过调控 PKM2 的表达减少 HRMECs

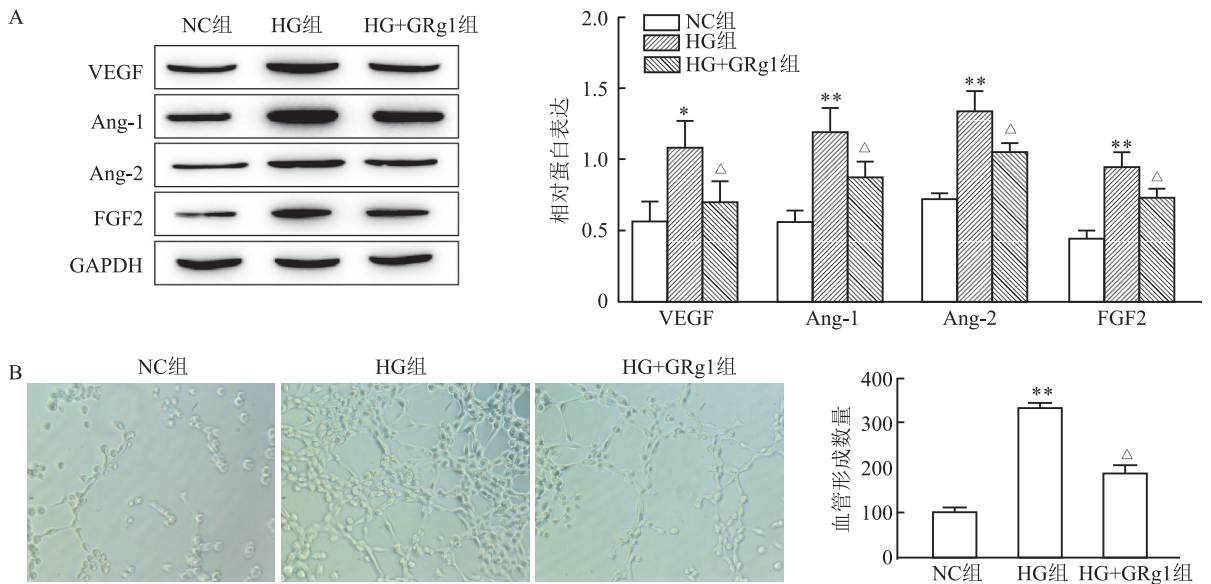


图1 GRg1抑制HRMECs血管形成

A: GRg1处理后HRMECs的相关蛋白表达情况; B: GRg1处理后HRMECs的血管生成情况×200; 与NC组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与HG组比较: [△] $P < 0.05$

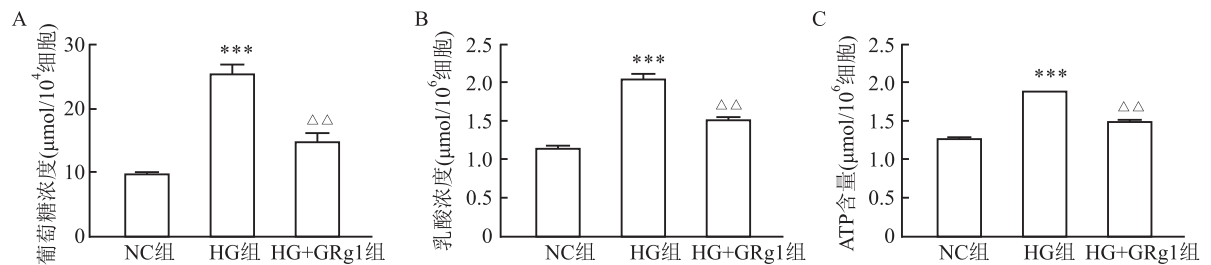


图2 GRg1抑制HG诱导的HRMECs糖酵解

A: GRg1处理后HRMECs的葡萄糖摄取量; B: GRg1处理后HRMECs的乳酸产量; C: GRg1处理后HRMECs的乳酸产量; 与NC组比较: *** $P < 0.001$; 与HG组比较: ^{△△} $P < 0.01$

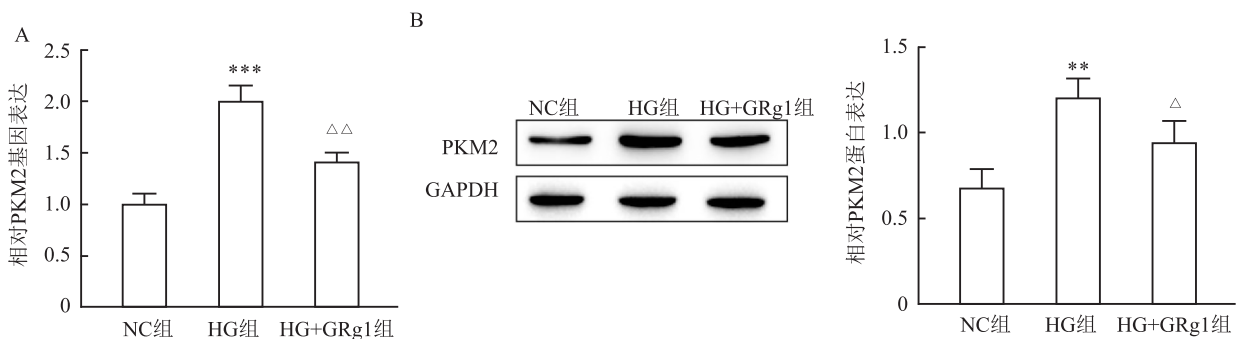


图3 GRg1调控HRMECs中表达

A: GRg1处理对HRMECs中PKM2 mRNA表达的影响; B: Western blot检测HRMECs中PKM2的表达; 与NC组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与HG组比较: [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$

糖酵解抑制血管形成 qRT-PCR检测 si-PKM2 和 OE-PKM2 的转染效率,结果显示,转染 si-PKM2 后,其表达量降低 ($P < 0.001$),见图 4A。转染 OE-

PKM2 后,其表达量升高 ($P < 0.001$),见图 4B。表明细胞转染效率佳。对每组细胞的糖酵解过程检测发现,与 HG + GRg1 组相比, HG + GRg1 + OE-PKM2

组细胞的葡萄糖摄取量、乳酸和 ATP 产量均升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而 HG + GRg1 + si-PKM2 组细胞的葡萄糖摄取量、乳酸和 ATP 产量均降低($P < 0.01$),见图 4C-4E。检测 HRMECs 中相关蛋白表达量,结果如图 4F,在 HG + GRg1 + OE-PKM2 组细胞中,VEGF、Ang-1、Ang-2、FGF2 的表达量高于 HG + GRg1 组($P < 0.05$),HG + GRg1 + si-PKM2 组的蛋白表达量则降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。最后,通过血管形成实验进一步验证, HG + GRg1 + OE-PKM2 组细胞的血管生成数量多于 HG + GRg1 组($P < 0.01$),而 HG + GRg1 + si-PKM2 组的血管形成数量比 HG + GRg1 组减少($P < 0.05$),见图 4G。

3 讨论

DR 的发展与高血糖相关,长期的高血糖环境可损伤视网膜血管内皮,引起一系列眼底病变,如微血管瘤、新生血管、玻璃体增生甚至视网膜脱离^[6],视网膜新生血管被认为是 DR 中不可逆失明的主要原因。通过对高糖诱导下的 HRMECs 进行研究,可以发现 HG 环境可以诱导 HRMECs 的血管生成。

GRg1 是人参中的主要活性成分之一,具有抗炎、抗氧化、神经保护等多种药理活性^[7]。Zhu et al^[8]报道 GRg1 可以减轻 HG 诱导的人脐静脉 ECs

屏障功能障碍;Ying et al^[9]报道 GRg1 通过激活 IRS-1/Akt/GSK3 β 信号传导,保护过度磷酸化 Tau 诱导的糖尿病视网膜神经变性,阻止 DR 的进展。由此可知,GRg1 可能在 DR 的血管病变中发挥作用。PKM2 在所有核酸合成率高的细胞中均有表达,如胚胎细胞、正常增殖细胞和肿瘤细胞^[10]。PKM2 的四聚体通常与正常细胞中 ATP 的产生和糖酵解中间体的分解代谢增加有关^[11]。目前已有研究^[12]表明 PKM2 在肿瘤发生和伤口愈合过程中具有调节血管生成的作用。此外,PKM2 也已经被证实参与调控 DR 中 HRMECs 的炎症、凋亡和功能障碍^[4]。本研究结果显示,HG 处理 HRMECs 后可上调 PKM2 表达,PKM2 表达被抑制后可减少 HG 诱导的糖酵解和血管形成。GRg1 可抑制 HG 诱导的 PKM2 表达升高,抑制 PKM2 诱导的糖酵解过程,进而抑制 HG 诱导的血管形成。

DR 的发病机制不仅受多种因素通过整合的分子信号通路和细胞过程的调节,ECs 的葡萄糖代谢通过控制 ECs 增殖、迁移和新血管形成在 DR 的眼部新生血管疾病中也发挥重要作用^[13]。Feng et al^[14]的研究表明,通过在视网膜病变小鼠玻璃体内注射 PFKFB3 的小干扰 RNA 可以减少糖酵解,并且抑制了脉络膜和视网膜 ECs 新生血管形成。Pedro

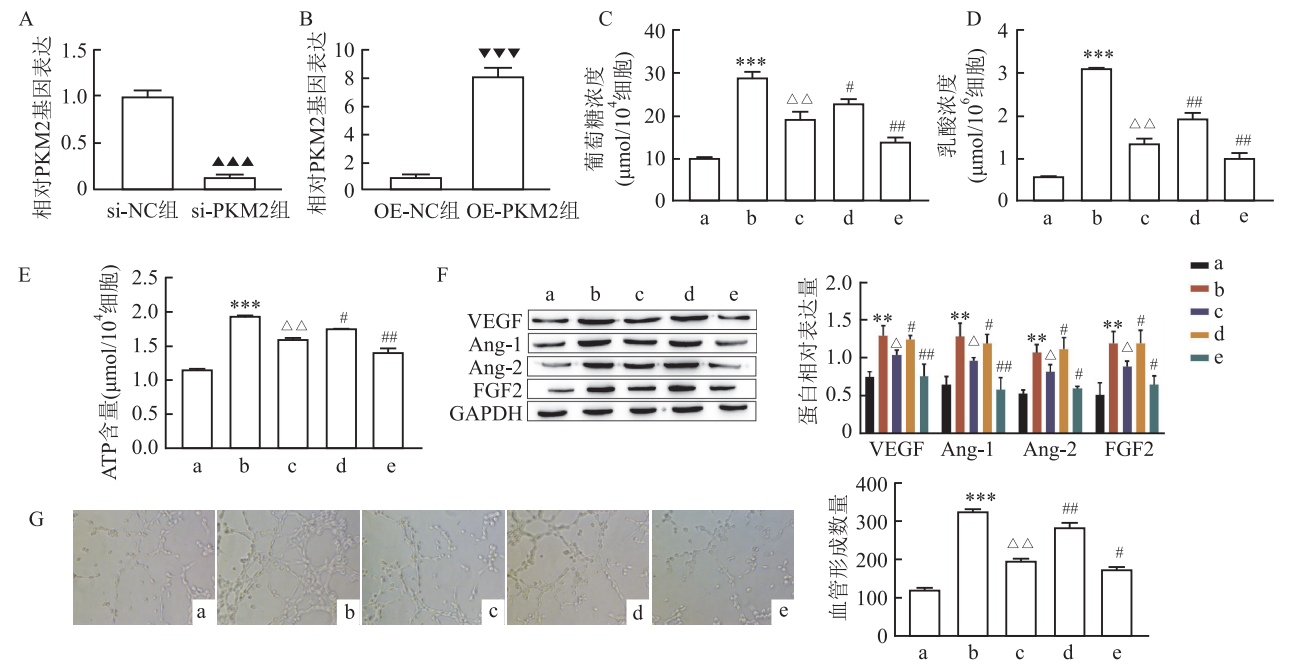


图4 GRg1 通过调控 PKM2 的表达减少 HRMECs 糖酵解抑制血管形成

A: qRT-PCR 检测 si-PKM2 的转染效率; B: qRT-PCR 检测 OE-PKM2 的转染效率; C: 各组 HRMECs 的葡萄糖摄取量; D: 各组 HRMECs 的乳酸生成量; E: 各组 HRMECs 的 ATP 产量; F: 各组 HRMECs 的蛋白表达; G: 各组 HRMECs 的血管生成情况 $\times 200$; a: NC 组; b: HG 组; c: HG + GRg1 组; d: HG + GRg1 + OE-PKM2 组; e: HG + GRg1 + si-PKM2 组; 与 si-NC 组比较: ▲▲▲ $P < 0.001$; 与 OE-NC 组比较: ▼▼▼ $P < 0.001$; 与 NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 HG 组比较: △△ $P < 0.05$, △△△ $P < 0.01$; 与 HG + GRg1 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

et al^[15]发现糖原合成、戊糖循环和糖酵解途径对 VEGF 和 FGF 刺激下的 ECs 增殖至关重要。由此可知,ECs 糖酵解在 DR 新血管形成中发挥重要作用,调节视网膜 ECs 糖酵解途径的分子或药物对 DR 的治疗有重要意义。对 HRMECs 的葡萄糖、乳酸和 ATP 生成量进行研究发现,在 HG 的影响下,三者的生成量均显著升高,而在加入 GRg1 后,降低了葡萄糖、乳酸和 ATP 生成量;但如图 4 内容所示,HG + GRg1 组导致的效应改变应该可以通过 HG + GRg1 + OE-PKM2 组来逆转,但本研究结果并未完全逆转,因此 GRg1 对视网膜血管生成的影响是否仍有其他机制和分子参与还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 高翔,刘扣,桂衍超,等.卡托普利抑制糖尿病视网膜病变大鼠脂代谢紊乱的作用及机制[J].安徽医科大学学报,2021,56(4):5.
- [2] Huang H. Pericyte-endothelial interactions in the retinal microvasculature [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(19):7413.
- [3] Park J H, Kundu A, Lee S H, et al. Specific pyruvate kinase M2 inhibitor, compound 3K, induces autophagic cell death through disruption of the glycolysis pathway in ovarian cancer cells [J]. Int J Biol Sci, 2021, 17(8): 1895–908.
- [4] Liu L, Xu H, Zhao H, et al. STEAP4 inhibits HIF-1 α /PKM2 signaling and reduces high glucose-induced apoptosis of retinal vascular endothelial cells [J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2020, 13(8):2573–82.
- [5] Gao Y, Ji Y, Luo Y, et al. Ginsenoside Rg1 prevents early diabetic retinopathy via reducing retinal ganglion cell layer and inner nuclear layer cell apoptosis in db/db mice [J]. Ann Transl Med, 2020, 8(5): 232.
- [6] Qian C, Liang S, Wan G, et al. Salidroside alleviates high-glucose-induced injury in retinal pigment epithelial cell line ARPE-19 by down-regulation of miR-138 [J]. RNA Biol, 2019, 16(10): 1461–70.
- [7] Zhang Z, Song Z, Shen F, et al. Ginsenoside Rg1 prevents PTSD-Like behaviors in mice through promoting synaptic proteins, reducing Kir4.1 and TNF- α in the hippocampus [J]. Mol Neurobiol, 2021, 58(4): 1550–63.
- [8] Zhu T, Wang H, Wang L, et al. Ginsenoside Rg1 attenuates high glucose-induced endothelial barrier dysfunction in human umbilical vein endothelial cells by protecting the endothelial glycocalyx [J]. Exp Ther Med, 2019, 17(5): 3727–33.
- [9] Ying Y, Zhang Y L, Ma C J, et al. Neuroprotective effects of ginsenoside Rg1 against hyperphosphorylated Tau-induced diabetic retinal neurodegeneration via activation of IRS-1/Akt/GSK3 β signaling [J]. J Agri Food Chem, 2019, 67(30): 8348–60.
- [10] Ren R, Guo J, Shi J, et al. PKM2 regulates angiogenesis of VREPCs through modulating glycolysis, mitochondrial fission, and fusion [J]. J Cell Physiol, 2020, 235(9): 6204–17.
- [11] Zhang W, Zhang X, Huang S, et al. FOXM1D potentiates PKM2-mediated tumor glycolysis and angiogenesis [J]. Mol Oncol, 2021, 15(5): 1466–85.
- [12] Azoitei N, Becher A, Steinestel K, et al. PKM2 promotes tumor angiogenesis by regulating HIF-1 α through NF- κ B activation [J]. Mol Cancer, 2016, 15:3.
- [13] Liu Z, Yan S, Wang J, et al. Endothelial adenosine A2a receptor-mediated glycolysis is essential for pathological retinal angiogenesis [J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 584.
- [14] Feng Y, Zou R, Zhang X, et al. YAP promotes ocular neovascularization by modifying PFKFB3-driven endothelial glycolysis [J]. Angiogenesis, 2021, 24(3):489–504.
- [15] Pedro V, Susana S T, Gema A V, et al. Characterization of the metabolic changes underlying growth factor angiogenic activation; identification of new potential therapeutic targets [J]. Carcinogenesis, 2009, 30(6): 946–52.

Ginsenoside RG1 regulates pyruvate kinase M2 on glycolysis and angiogenesis of retinal capillary endothelial cells

Xue Liping¹, Hu Min¹, Li Yadi¹, Zhang Xiaofan¹, Zhang Jieying¹, Zhou Yuan¹,
Liang Jiarui¹, Zhang Chuanhong¹, Ding Peng²

(¹Dept of Pediatric Ophthalmology, Affiliated Hospital of Yunnan University, Kunming 650000;

²Dept of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650000)

Abstract Objective To investigate the effect of ginsenoside Rg1 (GRg1) on human retinal microvascular endothelial cells (HRMECs) glycolysis by regulating pyruvate kinase M2 (PKM2) expression. **Methods** HRMECs were cultured *in vitro* and divided into normal control (NC) group, high glucose (HG) group, high glucose + ginsenoside Rg1 (HG + GRg1) group, high glucose + ginsenoside Rg1 + low expression PKM2 (HG + GRg1 + si-PKM2) group, and high glucose + ginsenoside Rg1 + overexpression PKM2 (HG + GRg1 + OE-PKM2) group. si-PKM2 and OE-PKM2 were transfected into HRMECs cells by cell transfection. The expression of PKM2 mRNA in

弓形虫 Chinese 1 基因型虫株感染 对小鼠海马体细胞超微结构的影响

王 崇^{1,2,3}, 蔡亦红^{1,2,3}

摘要 目的 观察弓形虫 Chinese 1 优势基因型 TgCtwh3 和 TgCtwh6 虫株对小鼠海马体细胞超微结构的影响。方法 6 周龄的雌性 C57BL/6 小鼠随机分为 3 组:对照组、TgCtwh3 感染组、TgCtwh6 感染组,每组 6 只。对照组腹腔注射无菌 PBS;TgCtwh3 感染组腹腔注射 4 000 个 TgCtwh3 速殖子,饲养 6 d;TgCtwh6 感染组灌胃 20 个 TgCtwh6 包囊,饲养 6 周。所有动物经取材、制片,并用透射电子显微镜观察。结果 与对照组相比,TgCtwh3 感染组海马体细胞出现核皱缩坏死,胞质、轴突肿胀,细胞器消失,轴索断裂等病理变化。与对照组相比,TgCtwh6 感染组海马体细胞出现线粒体肿胀、空泡化、嵴断裂消失、膜破裂,脂褐素沉积,高尔基体扩张等病理变化。结论 TgCtwh3 和 TgCtwh6 感染小鼠均出现海马体细胞超微结构的改变,TgCtwh3 感染组多表现为不可逆的细胞坏死,而 TgCtwh6 感染组表现出线粒体结构破坏为主的慢性细胞损伤,这为探讨弓形虫脑病的致病机制奠定基础。

关键词 弓形虫;海马;超微结构;小鼠

中图分类号 R 382.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)10-1564-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.10.010

刚地弓形虫是一种顶复门胞内寄生原虫,具有广泛的中间宿主(包括人类),其终宿主为猫科动物,在世界各地约有三分之一的人口感染^[1],弓形虫感染可对宿主脑部功能产生严重的不良影响,如神经退行性疾病、弓形虫脑炎和先天性弓形虫脑病等^[1-3]。海马体对生命机体至关重要,其功能异常与癫痫发作^[4]、精神分裂症、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)^[5]、帕金森病^[6]、抑郁症^[5]等多种疾病相关。小鼠慢性感染 ME49 虫株模型初步形态学研究^[7]显示,海马体中存在弓形虫包囊,并伴有神经胶质细胞增生和坏死。因此,课题组选择海马体作为 Chinese 1 优势基因型虫株导致的弓形虫脑病伴精神障碍致病机制的研究靶点。该研究利用透射电镜技术观察弓形虫 Chinese 1 优势基因型中 TgCtwh3 和 TgCtwh6 这两种不同毒力虫株对小鼠海马体细胞超微结构的影响,有助于分析其致病机制,并为弓形虫急性和慢性阶段的脑损伤机制研究提供线索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 虫株 Chinese 1 优势基因型虫株(TgCt-

2022-05-13 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81572801);安徽医科大学博士
科研资助基金(编号:XJ202005)作者单位:¹ 安徽医科大学公共卫生学院卫生检验与检疫,合肥
230032² 安徽医科大学病原生物学安徽省重点实验室,合肥
230032³ 安徽医科大学人畜共患病安徽高校省级重点实验室,合
肥 230032作者简介:王 崇,女,硕士研究生;
蔡亦红,女,博士,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:
yihongcai2022@163.com

HRMECs was detected by qRT-PCR. The expression levels of related proteins in HRMECs were detected by Western blot. The number of lumen formation *in vitro* was observed under an inverted microscope to quantify the angiogenesis ability. Cell culture medium of each group was collected, and glucose intake, lactate production and adenosine triphosphate(ATP) content were detected by glucose detection kit, lactate detection kit and ATP detection kit, respectively. **Results** HG induced HRMECs significantly increased the number of blood vessel formation, glycolysis and PKM2 expression, while GRg1 treatment significantly reduced the number of blood vessel formation, glycolysis and PKM2 expression; transfection of si-PKM2 assisted the inhibitory effect of GRg1 on glycolysis and angiogenesis while transfection of OE-PKM2 interfered with the function of GRg1. **Conclusion** GRg1 inhibits angiogenesis by inhibiting PKM2 to reduce glycolysis of HRMECs.

Key words diabetic retinopathy; GRg1; HRMECs; PKM2; glycolysis; angiogenesis