

# 自噬调节高浓度葡萄糖诱导的人晶状体上皮细胞上皮间质转化

马济远, 叶巍, 李吉, 裴瑞, 何梦梅, 苏静波, 孙董洁, 周其武, 周健

引用: 马济远, 叶巍, 李吉, 等. 自噬调节高浓度葡萄糖诱导的人晶状体上皮细胞上皮间质转化. 国际眼科杂志 2020; 20(5): 759-767

基金项目: 陕西省自然科学基金 (No.2019JM-065); 国家自然科学基金 (No.81370998)

作者单位: (710032) 中国陕西省西安市, 空军军医大学西京医院眼科 全军眼科研究所

作者简介: 马济远, 空军军医大学在读博士研究生, 研究方向: 白内障基础与临床研究。

通讯作者: 周健, 博士, 主任医师, 教授, 研究方向: 白内障基础与临床研究. [zhoujian@fmmu.edu.cn](mailto:zhoujian@fmmu.edu.cn)

收稿日期: 2020-02-12 修回日期: 2020-04-13

## 摘要

目的: 探究自噬水平变化对高糖诱导人晶状体上皮细胞上皮间质转化 (EMT) 的影响及其机制。

方法: 人晶状体上皮细胞 (HLE-B3) 分为正常对照组 (NC 组) 和高糖处理组 (HG 组), 分别用含 5.5mmol/L 葡萄糖的 DMEM 和添加了 30mmol/L 葡萄糖的上述 DMEM 培养 12、24、48h, 用 Western blot 检测上皮间质转化标志蛋白 (E-cadherin、 $\alpha$ -SMA) 和自噬标志蛋白 (LC3、Beclin 1 和 SQSTM1/p62) 的表达变化, 用划痕实验观察细胞的移行能力以明确高糖对晶状体上皮细胞自噬和 EMT 的影响。利用雷帕霉素调节自噬水平, 将细胞分为正常对照组 (NC 组)、高糖处理组 (HG 组), 高糖处理细胞的同时添加 DMSO 溶剂组 (DMSO 组) 和添加 200nmol/L 雷帕霉素的雷帕霉素组 (RAPA 组), 处理细胞 24h, 用 Transwell 实验观察细胞的移行能力, 用 Western blot 检测 EMT、自噬标志蛋白和 TGF- $\beta$  信号通路蛋白 (TGF- $\beta$ 2、Smad2/3、p-Smad2/3、Snail) 的表达。用细胞免疫荧光染色观察 SQSTM1/p62 与 Smad2/3 在细胞内的表达, 免疫共沉淀方法检测细胞中 SQSTM1/p62 与 Smad2/3 之间的相互结合。

结果: 在高糖刺激后 12、24、48h, HG 组细胞 E-cadherin、LC3 II/I 和 Beclin 1 蛋白表达逐渐降低 ( $F=67.52$ 、 $163.206$ , 均  $P<0.0001$ ), 而  $\alpha$ -SMA、SQSTM1/p62 蛋白表达增加 ( $F=53.37$ 、 $302.1$ , 均  $P<0.0001$ ), 细胞移行也较 NC 组增加 (均  $P<0.001$ ), 提示高糖刺激后细胞发生 EMT, 而自噬水平降低; 雷帕霉素处理后, 与 HG 组和 DMSO 组相比, RAPA 组 LC3 II/I 和 E-cadherin 蛋白表达水平增加,  $\alpha$ -SMA、p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 及 Snail 蛋白表达降低 (均  $P<0.05$ ), TGF- $\beta$ 2 表达无明显改变 (均  $P>0.05$ ), 细胞移行被抑制 (均  $P<0.001$ ), 提示雷帕霉素在提高自噬水平的同时下调了 TGF- $\beta$  信号通路分子的表达进而抑制了 EMT。细胞免疫荧光染色结果显示 SQSTM1/p62 与 Smad2/3 在胞浆内存在共定位, 免疫共沉淀实验证

实了 SQSTM1/p62 与 Smad2/3 蛋白相互结合。

结论: 高糖可刺激 HLE-B3 细胞发生 EMT, 下调细胞的自噬水平; 自噬通过 SQSTM1/p62 与 Smad2/3 相互作用, 改变了 TGF- $\beta$  信号通路中 Smad2/3 的表达, 实现对 EMT 的调节。

关键词: 自噬; 上皮间质转化; 晶状体上皮细胞; 雷帕霉素; TGF- $\beta$  信号通路

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2020.5.04

## Autophagy regulates high glucose-induced epithelial - mesenchymal transition in human lens epithelial cells

Ji-Yuan Ma, Wei Ye, Ji Li, Rui Pei, Meng-Mei He, Jing-Bo Su, Dong-Jie Sun, Qi-Wu Zhou, Jian Zhou

Foundation items: Natural Science Foundation of Shaanxi Province (No.2019JM-065); National Natural Science Foundation of China (No.81370998)

Department of Ophthalmology, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Eye Institute of PLA, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Jian Zhou. Department of Ophthalmology, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Eye Institute of PLA, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. [zhoujian@fmmu.edu.cn](mailto:zhoujian@fmmu.edu.cn)

Received: 2020-02-12 Accepted: 2020-04-13

## Abstract

• AIM: To investigate the regulation of autophagy on high glucose - induced epithelial - mesenchymal transition (EMT) in human lens epithelial cells.

• METHODS: In order to investigate the changes of EMT and autophagy induced by high glucose, HLE-B3 cells were divided into two groups. In NC group, cells were cultured in DMEM with 5.5mmol/L glucose, and in HG group, cells were treated with DMEM in addition with 30mmol/L glucose for 12h, 24h, and 48h. Western blot was used to detect the expression of EMT - marker proteins (E - cadherin and  $\alpha$  - SMA) and autophagy - marker proteins (LC3, Beclin 1 and SQSTM1/p62). Wound healing assay was conducted to observe the migration ability. To investigate the regulation of autophagy on EMT, we employed rapamycin, an agonist of autophagy. HLE-B3 cells were divided into 4 groups. Two of them were mentioned as above, and the other two

groups were treated with high glucose combined with DMSO (DMSO) and high glucose combined with 200nmol/L rapamycin (RAPA), respectively. Migration ability of cells was evaluated by Transwell assay. Expressions of proteins, such as EMT marker proteins, molecules in TGF- $\beta$  signaling pathway (TGF- $\beta$ 2, Smad2/3, p-Smad2/3, Snail), and autophagy markers were detected by Western blot. The intracellular co-localization of SQSTM1/p62 and Smad2/3 was observed by immunofluorescence staining, and their interaction was confirmed by co-immunoprecipitation assay.

• **RESULTS:** The expression of E-cadherin, LC3 II/I, and Beclin 1 in HLE-B3 cells of HG group gradually decreased ( $F = 67.52, 163, 206$ ; all  $P < 0.0001$ ), the expressions of  $\alpha$ -SMA, SQSTM1/p62 increased with time ( $F = 53.37, 302.1$ ; all  $P < 0.0001$ ), and cell migration also increased compared with the cells in NC group (all  $P < 0.001$ ), indicating that high glucose stimulated EMT and suppressed autophagy. After treatment with rapamycin, the expressions of LC3 II/I and E-cadherin increased, the expressions of  $\alpha$ -SMA, p-Smad2/Smad2, p-Smad3/Smad3 and Snail decreased (all  $P < 0.05$ ), and the expressions of TGF- $\beta$ 2 did not change (all  $P > 0.05$ ) in RAPA group compared with HG group and DMSO group, cell migration was also suppressed (all  $P < 0.001$ ), indicating that Rapamycin down regulated the expressions of molecules in TGF- $\beta$  signaling pathway after activation of autophagy, which resulted in inhibiting EMT. Immunofluorescence staining showed co-localization of SQSTM1/p62 and Smad2/3 in cytoplasm. Co-immunoprecipitation confirmed the combination between SQSTM1/p62 and Smad2/3.

• **CONCLUSION:** High glucose stimulates the process of EMT and suppresses the autophagy in HLE-B3 cells. Autophagy regulates EMT by interacting with Smad2/3 via SQSTM1/p62, altering the amount of Smad2/3 which works in the TGF- $\beta$  signaling pathway.

• **KEYWORDS:** autophagy; epithelial-mesenchymal transition; lens epithelial cells; rapamycin; TGF- $\beta$  signaling pathway

**Citation:** Ma JY, Ye W, Li J, et al. Autophagy regulates high glucose-induced epithelial-mesenchymal transition in human lens epithelial cells. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2020;20(5):759-767

## 0 引言

白内障是糖尿病患者的眼部常见并发症之一,其患白内障的风险是普通人的2~5倍,且发生的年龄更早<sup>[1]</sup>、原因复杂,上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)在糖尿病白内障的形成中起了重要作用<sup>[2-4]</sup>。自噬(autophagy)是一种维持细胞稳态,调节细胞信号传导和促进细胞存活的基本细胞降解机制<sup>[5]</sup>。越来越多的研究表明自噬与EMT之间密切相关<sup>[6]</sup>,一方面,细胞依赖自噬激活后发生EMT而在受到外界刺激后得以存活,如在心肌细胞H9c2缺氧/复氧模型中发现高迁移率族1蛋白1(high mobility group box 1, HMGB1)通过增加盘状结构域受体1(discoidin domain receptor 1, DDR1)的表达和抑制由哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of

rapamycin, mTOR)的磷酸化激活的自噬而诱导细胞发生EMT<sup>[7]</sup>;与此相反,另一方面自噬还有抑制肿瘤信号的作用,这阻碍了EMT过程,如沉默自噬相关蛋白Beclin 1和ATG7的表达可使胶质母细胞瘤细胞中调节EMT的转录因子Snail和Slug的表达增高,从而增强这种细胞的EMT过程;然而,当用饥饿和mTOR抑制剂激活细胞自噬时,细胞迁移和侵袭能力却减弱<sup>[8]</sup>。

目前,对高浓度葡萄糖(简称高糖)刺激后人晶状体上皮细胞(human lens epithelial cell, HLEC)中自噬水平的变化情况,以及干预自噬后对EMT影响的相关研究还少有报道。本研究观察了高糖环境下人晶状体上皮细胞的自噬和EMT水平的变化,并观察用自噬激动剂雷帕霉素改变自噬水平后对晶状体上皮细胞EMT的影响,探讨自噬对EMT的调节作用及机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞 永生化人晶状体上皮细胞系HLE-B3获自北京眼科研究所张伟教授馈赠。HLE-B3细胞交由北京擎科新业生物技术有限公司进行细胞系短串联重复序列(short tandem repeat, STR)鉴定,结果与收录在DSMZ数据库的SRA01/04细胞系完全匹配,SRA01/04细胞系为人类晶状体上皮细胞系,结果可证明本研究所用HLE-B3细胞为晶状体上皮细胞。

1.1.2 试剂 雷帕霉素(rapamycin)购自美国Med Chem Express公司;蛋白酶抑制剂(No. 539131)、磷酸酶抑制剂(No. 524629)以及TGF- $\beta$ 2抗体(No. AEB586)均购自美国EMD Millipore公司;LC3(No. 12741)、E-cadherin(No. 14472)、Smad2/3(No. 8685)、p-Smad2(No. 3108)、p-Smad3(No. 9520)以及Snail(No. 3879)抗体均购自美国Cell Signaling Technology公司; $\alpha$ -SMA(No. ab5694)、SQSTM1/p62(No. ab56416)以及Beclin 1(No. ab62557)抗体均购自美国Abcam公司;GAPDH(No. 60004-1-Ig)抗体、HRP标记山羊抗兔IgG抗体以及HRP标记山羊抗小鼠IgG抗体均购自中国武汉三鹰公司;Alexa Fluor 594标记的驴抗兔IgG抗体和Alexa Fluor 488标记的驴抗小鼠IgG抗体均购自上海翊圣生物科技有限公司;含DAPI的抗荧光淬灭封片剂购自西安赫特生物科技有限公司;BCA蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒以及IP裂解液均购自中国上海碧云天公司;ECL化学发光检测试剂盒购自中国北京ZETA公司;protein A/G磁珠购自美国赛默飞世尔科技公司。

1.1.3 仪器设备 Transwell小室(Millipore公司,美国), SDS-PAGE电泳仪、电泳槽及化学发光仪(Bio-Rad公司,美国),倒置显微镜(Olympus公司,日本),共聚焦显微镜(Olympus公司,日本)

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 HLE-B3细胞培养在添加了10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素的低浓度葡萄糖(5.5mmol/L)杜氏培养基(DMEM)中,并置于37℃的5%CO<sub>2</sub>培养箱内,每2d更换1次培养基,细胞达到80%~90%融合度后进行传代。在细胞长至密度约为70%后,转移至无血清培养基中饥饿2h后,高糖处理组(HG组)细胞更换添加了30mmol/L葡萄糖的DMEM(总葡萄糖浓度35.5mmol/L)中培养,而正常对照组(NC组)细胞仍用上述低浓度葡萄糖DMEM培养基培养。分别在高糖处理前

(0h)、处理后 12、24、48h 观察自噬和 EMT 相关指标。在 200nmol/L 雷帕霉素干预高糖处理的 HLE-B3 细胞实验中,将细胞分为 4 组,在原有的 NC 组和 HG 组基础上,增加雷帕霉素组(RAPA 组)和溶剂组(DMSO 组),即在高糖处理细胞的同时,用 200nmol/L 雷帕霉素和其等量的溶剂 DMSO 分别处理细胞 24h,并观察相关指标。

**1.2.2 Western blot 实验** 经过处理的 HLE-B3 细胞,在弃去培养液之后用 PBS 清洗 3 遍,再加入 1mL PBS 并使用细胞刮刀刮取细胞,将含有细胞的 PBS 转移至 EP 管中,在 5000r/min 转速下离心 5min,弃去上清液后加入配置好的含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液 120 $\mu$ L,经过充分裂解和超声粉碎后于 4 $^{\circ}$ C、12000r/min 离心 15min,吸取上清液。取 20 $\mu$ L 蛋白样品用 BCA 法测定蛋白浓度。在剩余的 100 $\mu$ L 蛋白提取液中加入 25 $\mu$ L 5 $\times$  上样缓冲液,于 100 $^{\circ}$ C 金属浴中加热 10min,冷却到室温。向电泳槽内加入电泳缓冲液,根据测定的蛋白浓度从每个样本取 30 $\mu$ g 蛋白,上样到配置好的 8% 或 15% 的 SDS-PAGE 胶加样孔内,在 Bio-Rad 标准电泳装置上进行电泳分离,再将分离的蛋白使用 Bio-Rad 标准湿式转膜装置冰浴下转移至 PVDF 膜上。剩余的变性后蛋白置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。在室温下用 5% 脱脂牛奶封闭 PVDF 膜 3h,4 $^{\circ}$ C 下孵育相应的一抗(稀释浓度均为 1:1000)过夜。TBST 漂洗 PVDF 膜 3 次,每次 5min。再使用相应的辣根过氧化物酶标记的二抗(稀释浓度均为 1:3000)37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,TBST 漂洗 PVDF 膜 3 次,每次 5min。配置化学发光显色液(A 液:B 液=1:1),在 Bio-Rad 化学发光仪下进行化学发光显影,并获得图像。使用 Image J 软件对相应条带灰度值进行测量。

**1.2.3 划痕实验** 将细胞接种于 6 孔板中培养,确保过夜后细胞 100% 融合。次日使用 1mL 移液枪枪头在 6 孔板内笔直划线,形成一条划痕(原始划痕),然后用 PBS 清洗 3 次,洗去脱落的细胞。将划痕处理后的细胞分别置于常规 DMEM 培养基(NC 组)和含高糖的 DMEM 培养基(HG 组)中培养,分别在 0、12、24、48h 于倒置显微镜下观察并拍照划痕(新划痕)变化情况,每组随机挑选 3 个视野。用 Image J 软件标记图片中划痕范围并计算划痕的面积。细胞迁移百分比(%)=(原始划痕面积-新的划痕面积)/原始划痕面积 $\times$ 100%。

**1.2.4 Transwell 实验** 将 200 $\mu$ L HLE-B3 细胞悬液接种于 Transwell 小室的上室( $1 \times 10^4$ /孔),下室根据分组(NC 组、HG 组、DMSO 组、RAPA 组)分别添加相应的培养基 500 $\mu$ L,在培养箱中培养 24h。将小室置于 4% 多聚甲醛中固定 0.5h,小心拭去上室细胞,将小室用结晶紫染色 15min。用 PBS 洗 3 次后在倒置显微镜下观察细胞数量,随机取 5 个视野拍照并计数。

**1.2.5 细胞免疫荧光染色** 将正常培养的 HLE-B3 细胞接种于放置细胞爬片的 12 孔板内,培养 24h,待细胞长至 70% 时,吸除培养基,加入 PBS 浸洗细胞 3 次,每次 5min。向孔内加入 4% 多聚甲醛 1mL 固定细胞 30min 后,吸去多聚甲醛,用 PBS 洗 3 次,每次 5min。然后向孔内加入含有 1% Tritonx-100 和 1% BSA 的 PBS 室温放置 2h 后吸去孔内液体,加入 Smad2/3 和 SQSTM1/p62 一抗稀释液(稀释浓度均为 1:100)4 $^{\circ}$ C 湿盒内孵育过夜。次日先吸去一抗稀释液,用 PBS 漂洗 3 次,每次 5min,再滴加 Alexa Fluor 594 标记的驴抗兔 IgG 抗体(1:100)和 Alexa Fluor 488 标

记的驴抗小鼠 IgG 抗体(1:100),在室温下避光孵育 2h 后用 PBS 洗 3 次,每次 5min。将含 DAPI(0.4 $\mu$ g/mL)的封片剂滴于载玻片上,取出细胞爬片,将有细胞面向载玻片方向贴于载玻片上。在激光共聚焦显微镜下观察并照相。

**1.2.6 免疫共沉淀实验** 经过分组处理后的 HLE-B3 细胞,在弃去培养液后用 PBS 清洗 3 遍,加入 1mL PBS,使用细胞刮刀刮取细胞,将含有细胞的 PBS 转移至 EP 管中,在 5000r/min 转速下离心 5min,弃去上清后加入含蛋白酶抑制剂的 IP 裂解液 1mL,轻轻吹悬后置于 4 $^{\circ}$ C 裂解 1h。在 12000r/min 下离心 30min 后取上清液,取 20 $\mu$ L 用于 BCA 蛋白定量,取 50 $\mu$ L 加入 2 $\times$  上样缓冲液 50 $\mu$ L,100 $^{\circ}$ C 金属浴中加热 10min 作为 Input 样品。在其余细胞裂解液加入 5 $\mu$ L p62 抗体,4 $^{\circ}$ C 摇床上缓慢摇晃过夜。在上述混合液中加入 protein A/G 磁珠 20 $\mu$ L,经孵育 4h 后将样品置于磁力架轻轻颠倒 10 次,此时含有 IP 的分子及其结合的蛋白的磁珠被吸附在 EP 管壁上。弃去上清液,再加入 IP 裂解液轻轻颠倒 10 次,重复 3 遍,弃去上清,在含磁珠的 EP 管中加入 2 $\times$  上样缓冲液 50 $\mu$ L,充分震荡混匀后于 100 $^{\circ}$ C 金属浴中加热 10min,即为 IP 样品。根据测定的蛋白浓度从每个 Input 样品中取 30 $\mu$ g 蛋白上样,根据一次 Western blot 预实验结果调整正式 IP 时的上样量,保证每个组免疫沉淀物中的 SQSTM1/p62 的量基本一致。

统计学分析:本研究采用 GraphPad Prism 7.0 进行统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,重复测量数据采用重复测量数据的方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验;其余组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较采用 Tukey 法检验。以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 高糖促进晶状体上皮细胞发生 EMT** Western blot 结果显示,随着高糖刺激时间(0~48h)的延长,HLE-B3 细胞的上皮细胞标志蛋白 E-cadherin 表达量逐渐降低( $F = 67.52, P < 0.0001$ ),而间充质细胞标志蛋白  $\alpha$ -SMA 表达量逐渐升高( $F = 53.37, P < 0.0001$ ),而且各时间点与高糖处理前(0h)相比,E-cadherin 和  $\alpha$ -SMA 表达量均有显著性差异( $P_{12h} = 0.015, 0.033; P_{24h} = 0.0003, 0.0006$ ;均  $P_{48h} < 0.0001$ ;图 1A~C,表 1)。同时,划痕实验结果显示,高糖处理 12、24、48h 时,划痕面积较 NC 组明显缩小,HG 组细胞迁移百分比均比 NC 组高,差异均有统计学意义( $P < 0.001$ ,图 1D、E,表 2),提示高糖刺激增强了细胞的移行能力,这与 Western blot 结果相一致。以上结果提示晶状体上皮细胞在高糖培养环境下发生了 EMT。

**2.2 高糖抑制 HLE-B3 细胞内自噬水平** 为探究高糖环境下细胞自噬水平的变化,我们检测了高糖处理 HLE-B3 细胞 0~48h 自噬标志蛋白水平的变化。LC3、Beclin 1 和 SQSTM1/p62 是参与自噬过程的重要蛋白,LC3 参与自噬体溶酶体膜的延伸<sup>[9]</sup>;Beclin 1 在自噬的起始阶段发挥重要作用;SQSTM1/p62 结合泛素化蛋白后与 LC3 形成复合物,最终在溶酶体内降解<sup>[10]</sup>。Western blot 结果显示,随着高糖刺激时间的增加,细胞 LC3 II/I 和 Beclin 1 的表达量逐渐降低,而且在 24h 时达到最低,48h 不再有明显改变( $F = 163, 206$ ,均  $P < 0.0001$ ,图 2A~C,表 3);而 SQSTM1/p62 的表达量随着时间的延长逐渐增加( $F = 302.1, P < 0.0001$ ,图 2A、D,表 3)。

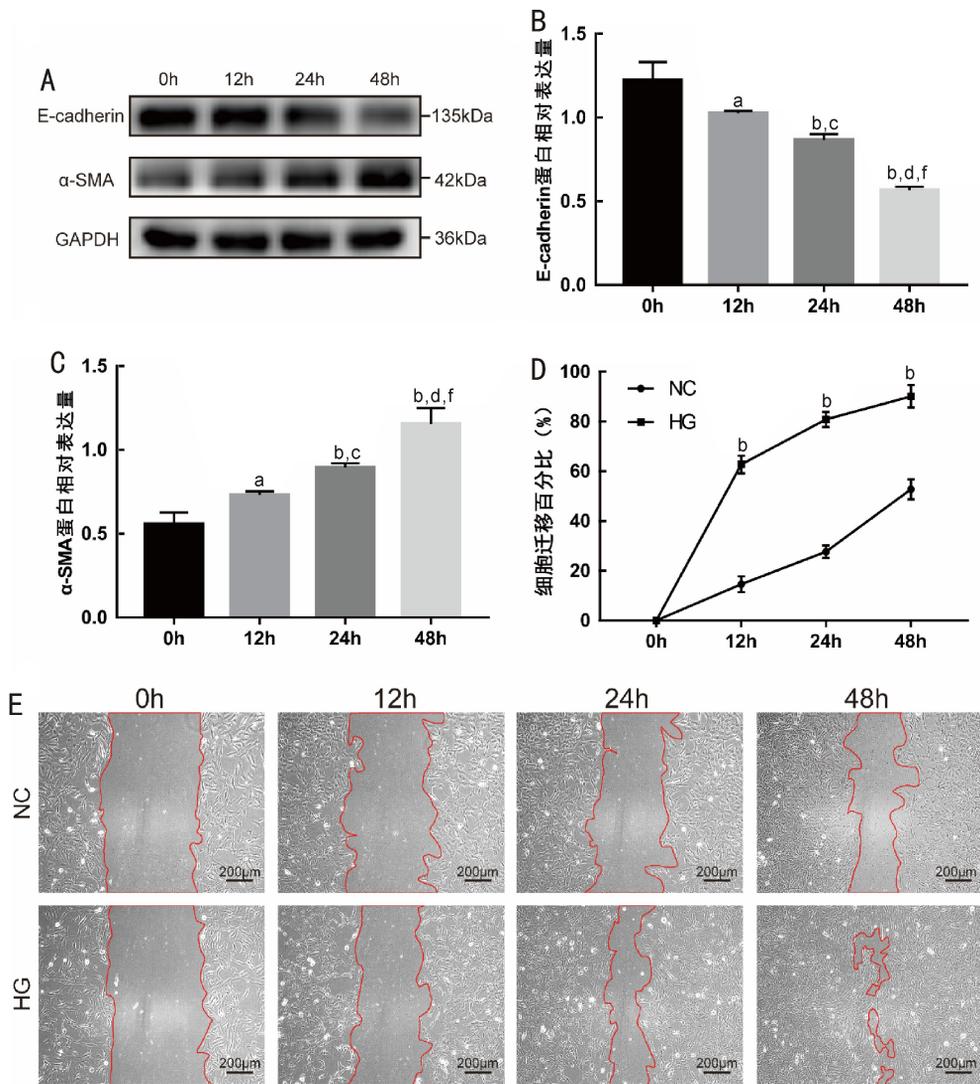


图1 HLE-B3细胞在高糖环境下发生EMT A:Western blot 检测高糖刺激HLE-B3细胞48h后EMT标志蛋白E-cadherin和 $\alpha$ -SMA的表达;B~C:E-cadherin和 $\alpha$ -SMA的表达量化分析(<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 0h;<sup>c</sup> $P < 0.05$ ,<sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 12h;<sup>e</sup> $P < 0.01$  vs 24h);D:细胞划痕实验检测细胞迁移百分比的量化分析(<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs NC组);E:细胞划痕实验结果( $\times 100$ )。

表1 高糖环境对HLE-B3细胞E-cadherin和 $\alpha$ -SMA蛋白相对表达水平的影响  $\bar{x} \pm s$

| 培养时间     | E-cadherin                       | $\alpha$ -SMA                    |
|----------|----------------------------------|----------------------------------|
| 0h       | 1.22 $\pm$ 0.11                  | 0.56 $\pm$ 0.07                  |
| 12h      | 1.03 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>     | 0.73 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>     |
| 24h      | 0.87 $\pm$ 0.03 <sup>a,c</sup>   | 0.90 $\pm$ 0.03 <sup>a,c</sup>   |
| 48h      | 0.57 $\pm$ 0.02 <sup>a,c,e</sup> | 1.16 $\pm$ 0.09 <sup>a,c,e</sup> |
| <i>F</i> | 67.52                            | 53.37                            |
| <i>P</i> | <0.0001                          | <0.0001                          |

注:<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 0h;<sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 12h;<sup>e</sup> $P < 0.05$  vs 24h。

表2 高糖环境对HLE-B3细胞迁移百分比的影响 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

| 组别       | 0h | 12h                           | 24h                           | 48h                           |
|----------|----|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| NC组      | 0  | 14.63 $\pm$ 3.13              | 27.69 $\pm$ 2.52              | 52.75 $\pm$ 4.00              |
| HG组      | 0  | 62.76 $\pm$ 3.51 <sup>b</sup> | 80.84 $\pm$ 3.06 <sup>b</sup> | 90.17 $\pm$ 4.51 <sup>b</sup> |
| <i>t</i> | -  | 17.71                         | 23.26                         | 10.75                         |
| <i>P</i> | -  | <0.0001                       | <0.0001                       | 0.0004                        |

注:*F*<sub>时间</sub> = 698.8, *P*<sub>时间</sub> < 0.0001; *F*<sub>组间</sub> = 72.95, *P*<sub>组间</sub> = 0.001; *F*<sub>组间 $\times$ 时间</sub> = 12.87, *P*<sub>组间 $\times$ 时间</sub> = 0.0005。<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs NC组。

2.3 上调HLE-B3细胞的自噬水平可抑制高糖诱导的EMT 为了探讨自噬对HLE-B3细胞发生EMT的调节作用,我们使用自噬激动剂雷帕霉素(200nmol/L)对高糖刺激的HLE-B3细胞处理24h,用Western blot检测HLE-B3细胞自噬和EMT标志蛋白的表达变化。结果表明,与NC组相比,HG组HLE-B3细胞LC3 II/I及E-cadherin蛋白表达降低( $P = 0.0042, 0.0001$ ),而 $\alpha$ -SMA蛋白表达增加( $P < 0.0001$ ),这与2.1部分的结果一致;RAPA组与HG组、DMSO组相比,LC3 II/I、E-cadherin蛋白表达水平有所提高( $P < 0.0001, = 0.0087; P < 0.0001, = 0.0245$ ), $\alpha$ -SMA蛋白表达水平有所降低( $P = 0.0001, < 0.0001$ ),但与NC组相比差异有统计学意义( $P = 0.0051, 0.0136, < 0.0001$ ),DMSO组与HG组相比差异无统计学意义( $P = 0.9997, 0.8625, 0.7128$ ),见图3A~D,表4,提示雷帕霉素可逆转高糖引起的自噬水平降低及EMT增强的变化。Transwell实验结果表明,与NC组相比,HG组和DMSO组细胞的移行数量显著增加(均 $P < 0.0001$ ),提示高糖促进了HLE-B3细胞的移行,而RAPA组细胞的移行数量明显低于HG组和DMSO组( $P = 0.0002, 0.0004$ ),但仍高于NC组( $P = 0.0021$ ),提示雷帕霉素对高糖诱导的细胞移行有所抑制,与Western Blot结果相一致(图3E、F,表4)。

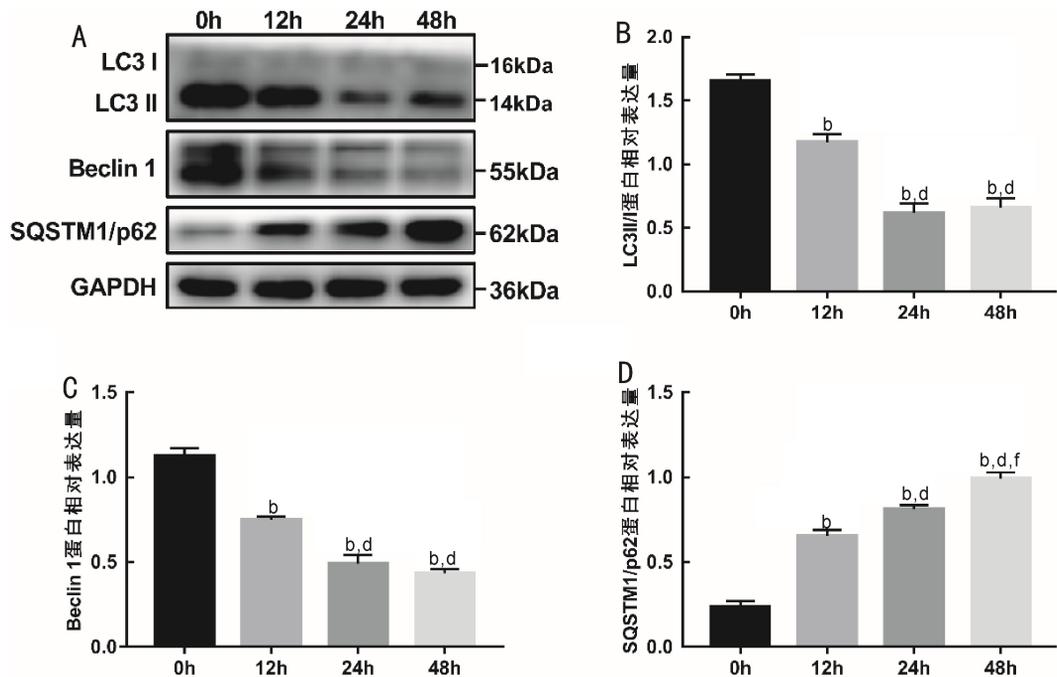


图2 HLE-B3 细胞在高糖环境下自噬水平下降 A: Western blot 检测高糖刺激 HLE-B3 细胞 48h 自噬标志蛋白 LC3、Beclin 1、SQSTM1/p62 的表达变化; B~D: LC3、Beclin 1、SQSTM1/p62 蛋白表达的量化分析 (<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 0h; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 12h; <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs 24h)。

表3 高糖环境对 HLE-B3 细胞自噬相关蛋白相对表达水平的影响  $\bar{x} \pm s$

| 培养时间     | LC3 II / I               | Beclin 1                 | SQSTM1/p62                 |
|----------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 0h       | 1.65±0.05                | 1.13±0.05                | 0.24±0.03                  |
| 12h      | 1.17±0.06 <sup>b</sup>   | 0.75±0.02 <sup>b</sup>   | 0.66±0.03 <sup>b</sup>     |
| 24h      | 0.62±0.07 <sup>b,d</sup> | 0.49±0.05 <sup>b,d</sup> | 0.81±0.02 <sup>b,d</sup>   |
| 48h      | 0.66±0.07 <sup>b,d</sup> | 0.43±0.03 <sup>b,d</sup> | 0.99±0.04 <sup>b,d,f</sup> |
| <i>F</i> | 163                      | 206                      | 302.1                      |
| <i>P</i> | <0.0001                  | <0.0001                  | <0.0001                    |

注: <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 0h; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 12h; <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs 24h。

#### 2.4 上调 HLE-B3 的自噬水平可抑制 TGF-β 信号通路

既往研究表明,晶状体上皮细胞在高糖培养下,细胞 TGF-β 信号通路被激活,表现为分泌型 TGF-β 和 Smad2/3 磷酸化蛋白水平升高<sup>[3,11-13]</sup>。TGF-β 信号通路是细胞发生 EMT 的经典通路,自噬可能通过影响 TGF-β 信号通路而影响 EMT。因此我们检测了雷帕霉素对高糖刺激的 HLE-B3 细胞中 TGF-β2、Smad2/3、p-Smad2/3 及 Snail 蛋白水平的影响。Western blot 结果显示,与 NC 组相比,高糖刺激 (HG 组、DMSO 组) 细胞中 TGF-β2 ( $P = 0.0044$ 、 $0.008$ )、p-Smad2/Smad2 (均  $P < 0.0001$ )、p-Smad3/Smad3 (均  $P < 0.0001$ ) 及 Snail (均  $P < 0.0001$ ) 蛋白水平均有所升高;加入雷帕霉素处理后,相较高糖刺激 (HG 组、DMSO 组) 细胞, TGF-β2 表达无明显改变 ( $P = 0.8142$ 、 $0.5504$ , 图 4A、B, 表 5), 但 p-Smad2/Smad2 ( $P = 0.0015$ 、 $0.0001$ )、p-Smad3/Smad3 ( $P = 0.0111$ 、 $0.0042$ ) 以及 Snail ( $P = 0.0042$ 、 $0.0016$ ) 的表达量明显降低 (图 4A、C~E, 表 5); 但相较 NC 组, 这些指标仍有比较明显的升高 ( $P < 0.0001$ 、 $= 0.0018$ 、 $0.0131$ , 表 5)。以上结果表明上调细胞自噬水平可部分抑制高糖激活的由 TGF-β2 介导的 EMT 信号通路。

**2.5 自噬通过 SQSTM1/p62 与 Smad2/3 相互作用实现对 EMT 的调节** 为了探究自噬信号通路与 TGF-β 信号

通路之间的串扰,我们观察了 SQSTM1/p62 与 Smad2/3 之间的直接交互作用。首先,通过细胞免疫荧光染色观察两者的胞内分布情况,发现 SQSTM1/p62 与 Smad2/3 均位于细胞质,并存在共定位的情况 (图 5A)。

对不同处理的 HLE-B3 细胞进行了 SQSTM1/p62 的免疫共沉淀实验, Input 部分结果表明, Smad2/3 与 SQSTM1/p62 在各处理组细胞中均存在,且 Smad2/3 和 SQSTM1/p62 在 HG 组表达高于 NC 组,而 RAPA 组与 HG 组、DMSO 组相比, SQSTM1/p62 表达有所降低 (图 5B, Input), 证实雷帕霉素可以激活细胞的自噬,同时细胞中存在 SQSTM1/p62 和 Smad2/3 蛋白表达 (阳性对照)。在用 SQSTM1/p62 抗体进行免疫共沉淀的蛋白复合物中,通过 Western blot 检测到 SQSTM1/p62 和 Smad2/3 蛋白,表明 SQSTM1/p62 与 Smad2/3 存在相互作用,而且在 SQSTM1/p62 表达量基本一致的情况下,与 NC 组相比, HG 组结合的 Smad2/3 更少, RAPA 组与 HG 组相比有所增加,提示高糖可能抑制了 SQSTM1/p62 和 Smad2/3 的结合,而雷帕霉素部分逆转了这一现象 (图 5B, IP)。

#### 3 讨论

白内障是糖尿病患者视力损害的主要原因之一<sup>[14]</sup>。白内障摘除术仍是目前唯一有效的治疗方法<sup>[15]</sup>。与非糖尿病患者相比,糖尿病患者出现手术并发症风险较高,如囊膜收缩和混浊、黄斑水肿和糖尿病视网膜病变加重等<sup>[16]</sup>。所以,研究药物防治糖尿病白内障很有必要。人们对糖尿病白内障发病机理的探索从未停止,陈文静等<sup>[17]</sup>发现高糖可以抑制 HLE-B3 细胞葡萄糖关键代谢酶 (6-磷酸果糖激酶-1、丙酮酸激酶、己糖激酶、柠檬酸合成酶、α-酮戊二酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶) 的表达,从而诱导细胞凋亡。本研究采用高糖刺激 HLE-B3 细胞以模拟糖尿病患者中晶状体上皮细胞的生存状态,观察晶状体上皮细胞 EMT 及自噬水平的改变,并通过雷帕霉素干预自噬水平,观察对细胞发生 EMT 的影响,探讨自噬对晶

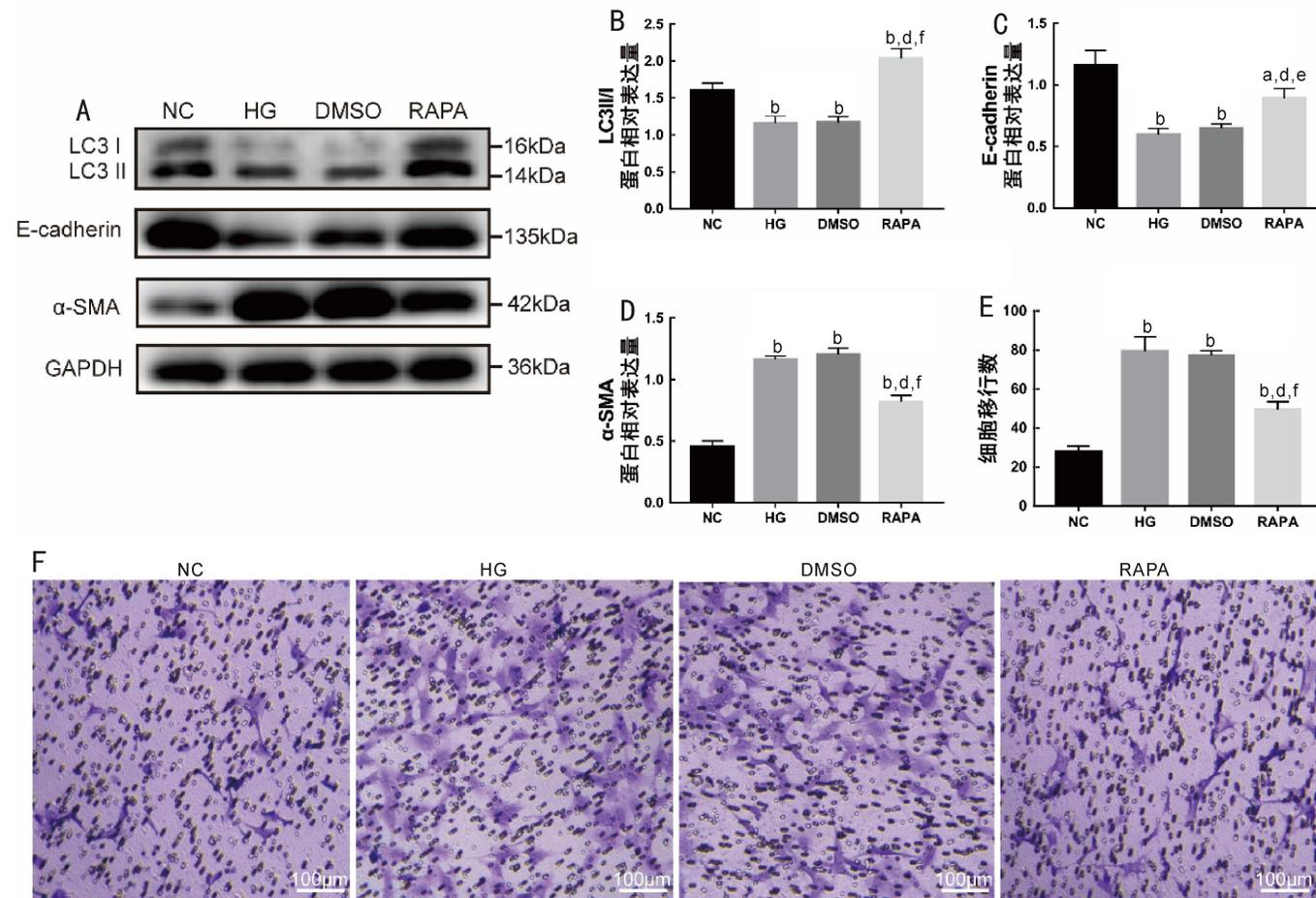


图3 雷帕霉素增强细胞自噬并抑制高糖诱导的HLE-B3细胞发生EMT A:Western blot检测雷帕霉素对高糖刺激HLE-B3细胞自噬和EMT标志蛋白LC3、E-cadherin和α-SMA表达的影响;B~D:LC3、E-cadherin和α-SMA蛋白表达的量化分析;E:Transwell实验中细胞迁移数量的量化分析;F:Transwell实验结果(×200)。<sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01 vs NC; <sup>d</sup>*P*<0.01 vs HG; <sup>e</sup>*P*<0.05, <sup>f</sup>*P*<0.01 vs DMSO。

表4 雷帕霉素对HLE-B3细胞自噬相关蛋白表达及迁移的影响

| 组别       | LC3 II / I               | E-cadherin                 | α-SMA                      | 迁移细胞数(个)                    | $\bar{x} \pm s$ |
|----------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------|
| NC组      | 1.61±0.10                | 1.16±0.12                  | 0.45±0.05                  | 26.67±3.06                  |                 |
| HG组      | 1.16±0.10 <sup>a</sup>   | 0.60±0.05 <sup>a</sup>     | 1.16±0.04 <sup>a</sup>     | 79.33±7.37 <sup>a</sup>     |                 |
| DMSO组    | 1.17±0.08 <sup>a</sup>   | 0.65±0.04 <sup>a</sup>     | 1.21±0.05 <sup>a</sup>     | 77.00±2.65 <sup>a</sup>     |                 |
| RAPA组    | 2.04±0.14 <sup>a,e</sup> | 0.89±0.08 <sup>a,c,e</sup> | 0.81±0.06 <sup>a,c,e</sup> | 49.33±4.04 <sup>a,c,e</sup> |                 |
| <i>F</i> | 45.52                    | 31.41                      | 157.2                      | 83.26                       |                 |
| <i>P</i> | <0.0001                  | <0.0001                    | <0.0001                    | <0.0001                     |                 |

注:<sup>a</sup>*P*<0.05 vs NC组; <sup>b</sup>*P*<0.05 vs HG组; <sup>c</sup>*P*<0.05 vs DMSO组。

状上皮细胞EMT的调节作用及其机制。

细胞发生EMT的标志是失去粘附连接和细胞极性,获得间充质表型及获得运动性和侵袭性<sup>[18]</sup>,表现在上皮标志物E-cadherin、ZO-1的下调以及间充质标志物N-cadherin、α-SMA、Fibronectin、Vimentin等的上调。本课题组前期实验已证明高糖可通过c-Src/TGF-β信号途径诱导人晶状体上皮细胞发生EMT<sup>[4]</sup>。Zhang等<sup>[2]</sup>观察到在白内障患者中,晶状体上皮细胞E-cadherin较正常人表达减少,而间充质细胞标志物α-SMA和Vimentin表达增加,表明EMT是糖尿病白内障患者晶状体上皮细胞中的重要事件。本研究发现,随着高糖刺激时间的延长,HLE-B3细胞内E-cadherin表达量逐渐下调,而α-SMA表达量上调;细胞划痕实验提示HLE-B3细胞在高糖环境下获得了更强的移行能力,证实高糖刺激晶状体上皮细胞

发生了EMT。

自噬是一种进化保守的分解代谢过程,通过形成双层膜的自噬体,将细胞质内的大分子和细胞器等传递至溶酶体进行降解,实现再利用。根据底物进入溶酶体途径的不同,可将自噬分为分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy)、微自噬(microautophagy)和巨自噬(macroautophagy),其中研究的最为透彻是巨自噬。巨自噬受多种信号途径的调控,mTOR是自噬的主要调控因子,其驱动主要的抑制信号<sup>[19]</sup>,既往研究已经发现雷帕霉素—mTORC1的抑制剂,具有促进自噬的作用<sup>[20]</sup>。LC3被称为微管相关蛋白1轻链3(MAP1LC3),是公认的自噬标志物。LC3 I被Atg7和Atg3相关的泛素样系统修饰和处理,与磷脂酰乙醇胺结合形成LC3 II<sup>[21]</sup>。通常用LC3 II与LC3 I的比值表示细胞自噬水平的高低,比值高代表

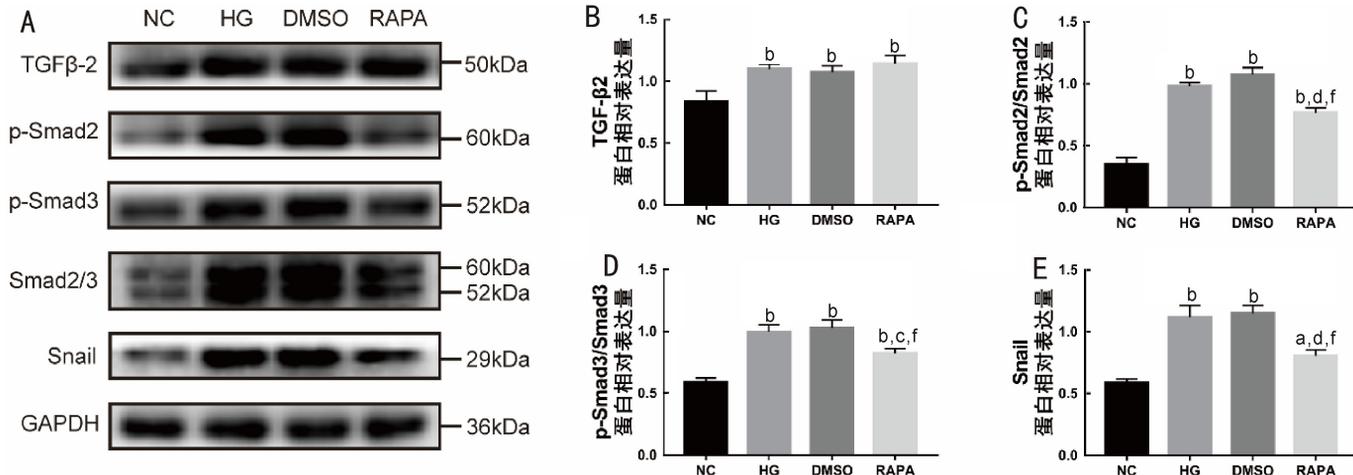


图4 雷帕霉素抑制高糖激活的HLE-B3细胞中TGF- $\beta$ 信号通路 A:Western blot检测雷帕霉素对高糖刺激HLE-B3细胞中TGF- $\beta$ 2、Smad2/3、p-Smad2/3、Snail的蛋白表达的影响;B~E:TGF- $\beta$ 2、Smad2/3、p-Smad2/3、Snail的蛋白表达的量化分析(<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs NC; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs HG; <sup>e</sup> $P < 0.01$  vs DMSO)。

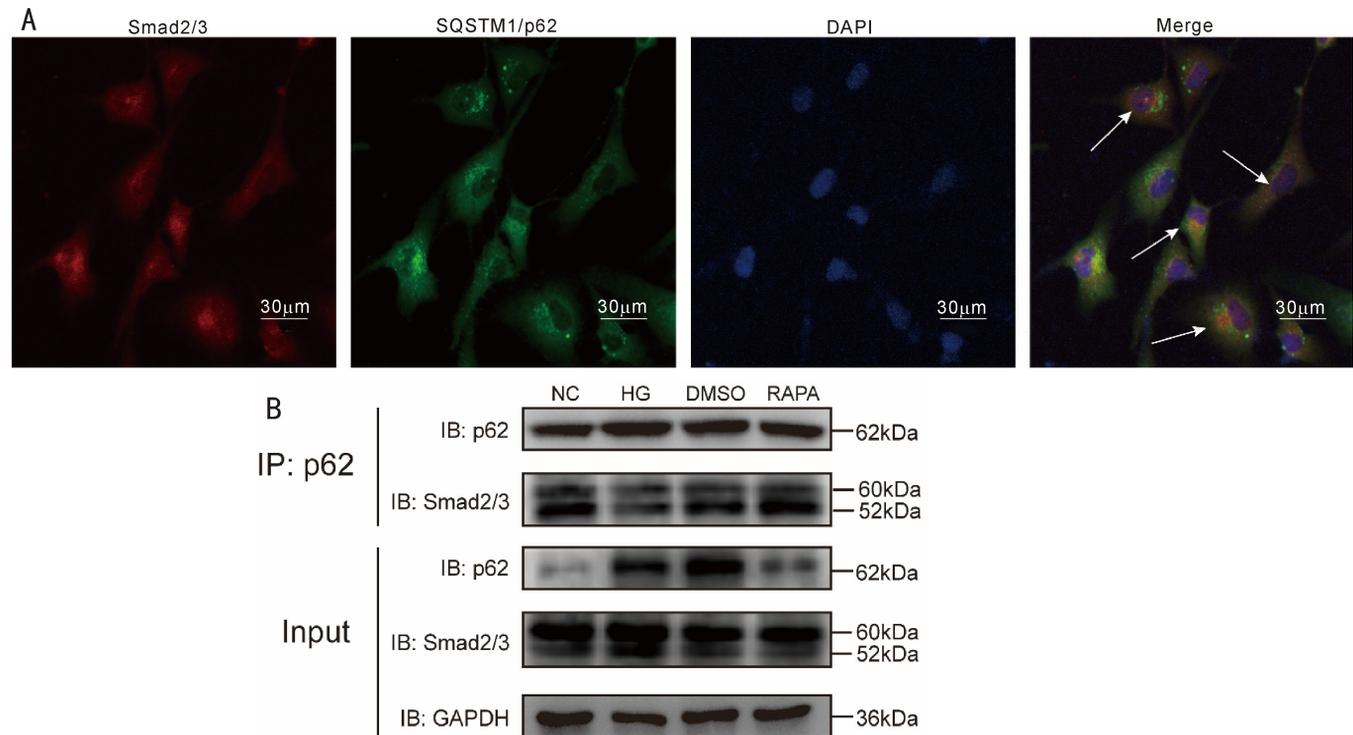


图5 HLE-B3细胞中SQSTM1/p62与Smad2/3蛋白之间的相互作用 A:细胞免疫荧光染色结果,红色为Smad2/3,绿色为SQSTM1/p62,蓝色为细胞核,白色箭头所示为黄色,即Smad2/3与SQSTM1/p62共定位所在( $\times 60$ );B:免疫共沉淀实验结果,Input为阳性对照,Western blot检测各组细胞均可表达Smad2/3与SQSTM1/p62蛋白;IP为实验组,用SQSTM1/p62抗体免疫共沉淀后,经Western blot检测蛋白复合物中SQSTM1/p62、Smad2/3的表达情况。

表5 雷帕霉素对HLE-B3细胞TGF- $\beta$ 信号通路的影响

| 组别    | TGF- $\beta$ 2               | p-Smad2/Smad2                    | p-Smad3/Smad3                    | Snail                            | $\bar{x} \pm s$ |
|-------|------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------|
| NC组   | 0.84 $\pm$ 0.09              | 0.35 $\pm$ 0.05                  | 0.59 $\pm$ 0.03                  | 0.59 $\pm$ 0.03                  |                 |
| HG组   | 1.10 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup> | 0.98 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>     | 1.00 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>     | 1.12 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>     |                 |
| DMSO组 | 1.07 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup> | 1.08 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>     | 1.03 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>     | 1.15 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>     |                 |
| RAPA组 | 1.14 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup> | 0.77 $\pm$ 0.04 <sup>a,c,e</sup> | 0.82 $\pm$ 0.04 <sup>a,c,e</sup> | 0.81 $\pm$ 0.05 <sup>a,c,e</sup> |                 |
| F     | 14.05                        | 159.1                            | 49.86                            | 51.93                            |                 |
| P     | 0.0015                       | <0.0001                          | <0.0001                          | <0.0001                          |                 |

注:<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs NC组; <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs HG组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs DMSO组。

细胞内自噬水平高。Beclin 1作为自噬复合体的重要组成部分,在自噬活性发挥关键作用<sup>[22]</sup>,其表达水平与自噬活性呈正相关。作为重要的选择性自噬接头蛋白,SQSTM1/

p62在自噬清除泛素化蛋白过程中作为受体参与其中,其表达量与自噬水平呈负相关<sup>[23]</sup>。本研究中,高糖处理的HLE-B3细胞LC3 II/I和Beclin 1随着时间的推移明显

降低,并在24h后维持在较低水平;而SQSTM1/p62随着时间的延长表达明显增加。结果表明,高糖抑制了HLE-B3细胞的自噬。

糖尿病对不同细胞自噬水平的影响似乎不尽相同,但最终对细胞EMT可产生类似的影响。Zhuang等<sup>[24]</sup>发现糖尿病肾病中肾小管上皮细胞自噬受到抑制,抑制血清和糖皮质激素诱导激酶1(serum and glucocorticoid induced kinase,SGK1)可通过PI3K/AKT/mTOR通路促进肾小管上皮细胞自噬和抑制EMT,Jin等<sup>[25]</sup>研究表明HMGB1通过诱导足细胞自噬参与糖尿病肾病的发展, HMGB1 siRNA联合雷帕霉素可通过抑制AKT/mTOR和TGF- $\beta$ /Smad信号通路防止足细胞凋亡和EMT进展。既往有关晶状体上皮细胞的研究表明,在用TGF- $\beta$ 诱导的后囊膜混浊细胞模型中,使用mTOR抑制剂PP242或者靶向mTOR的siRNA可提高细胞的自噬水平,进而抑制晶状体上皮细胞的增殖和迁移<sup>[26-27]</sup>。本研究结果显示,雷帕霉素提高了高糖环境下细胞的自噬水平,部分抑制了高糖诱导的HLE-B3细胞发生的EMT。

为了探究雷帕霉素抑制HLE-B3细胞发生EMT的原因,我们检测了雷帕霉素对EMT的经典信号通路—TGF- $\beta$ 信号通路关键蛋白的影响。研究发现,在高糖刺激的HLE-B3细胞中TGF- $\beta$ 2、p-Smad2/3以及EMT关键转录因子Snail的表达增加。雷帕霉素处理后,TGF- $\beta$ 2表达未见明显改变,而p-Smad2/3以及Snail的表达受到了抑制。提示提高HLE-B3细胞的自噬水平可以抑制高糖激活的TGF- $\beta$ 信号通路,继而抑制细胞的EMT。那么自噬信号通路又是怎样与TGF- $\beta$ 信号通路产生串扰呢?研究结果表明,SQSTM1/p62与Smad2/3存在相互作用,在高糖环境中这种相互作用有所减弱,雷帕霉素处理后两者的结合增强。我们推测SQSTM1/p62作为自噬接头蛋白,与Smad2/3结合并介导了Smad2/3通过自噬而降解。高糖环境下,自噬受到抑制,Smad2/3得以累积,而雷帕霉素提高细胞自噬水平后,自噬对Smad2/3的降解增加,可能引起其中p-Smad2/3的量减少,Smad2/3下游分子Snail也受到抑制,从而抑制了高糖诱导HLE-B3细胞发生的EMT。

综上所述,晶状体上皮细胞HLE-B3在高糖刺激下发生EMT,同时自噬受到抑制;利用雷帕霉素提高细胞的自噬水平可以通过SQSTM1/p62与Smad2/3的相互作用下调p-Smad2/3的表达,从而抑制了TGF- $\beta$ 信号通路,起到抑制细胞EMT的作用,表明提高细胞自噬水平可能对高糖刺激的晶状体上皮细胞具有保护作用,这为未来从自噬角度研发糖尿病白内障的防治药物提供了理论依据。但本研究还存在一些局限性,目前的结果提示200nmol/L雷帕霉素可部分逆转高糖诱导的晶状体上皮细胞EMT,能否通过改变雷帕霉素的剂量达到完全逆转EMT的作用还有待进一步研究,此外,以上研究结果还有待在体内实验进行证实。

#### 参考文献

- 1 Sayin N, Kara N, Pekel G. Ocular complications of diabetes mellitus. *World J Diabetes* 2015;6(1): 92-108
- 2 Zhang L, Wang Y, Li W, et al. MicroRNA-30a Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition in Diabetic Cataracts Through Targeting SNAI1. *Sci Rep* 2017; 7(1): 1117

- 3 Du L, Hao M, Li C, et al. Quercetin inhibited epithelial mesenchymal transition in diabetic rats, high-glucose-cultured lens, and SRA01/04 cells through transforming growth factor-beta2/phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Mol Cell Endocrinol* 2017;452: 44-56
- 4 Han ZH, Wang F, Wang FL, et al. Regulation of transforming growth factor beta-mediated epithelial-mesenchymal transition of lens epithelial cells by c-Src kinase under high glucose conditions. *Exp Ther Med* 2018; 16(2): 1520-1528
- 5 Dower CM, Wills CA, Frisch SM, et al. Mechanisms and context underlying the role of autophagy in cancer metastasis. *Autophagy* 2018; 14(7): 1110-1128
- 6 Gugnoni M, Sancisi V, Manzotti G, et al. Autophagy and epithelial-mesenchymal transition: an intricate interplay in cancer. *Cell Death Dis* 2016; 7(12): e2520
- 7 Ouyang F, Huang H, Zhang M, et al. HMGB1 induces apoptosis and EMT in association with increased autophagy following H/R injury in cardiomyocytes. *Int J Mol Med* 2016; 37(3): 679-689
- 8 Catalano M, D'Alessandro G, Lepore F, et al. Autophagy induction impairs migration and invasion by reversing EMT in glioblastoma cells. *Mol Oncol* 2015;9(8): 1612-1625
- 9 Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 2000; 19(21): 5720-5728
- 10 Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, et al. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ* 2011; 18(4): 571-580
- 11 Kim YS, Kim NH, Jung DH, et al. Genistein inhibits aldose reductase activity and high glucose-induced TGF-beta2 expression in human lens epithelial cells. *Eur J Pharmacol* 2008; 594(1-3): 18-25
- 12 Kim NH, Kim YS, Jung DH, et al. KIOM-79 prevents xylose-induced lens opacity and inhibits TGF-beta2 in human lens epithelial cells cultured under high glucose. *J Ethnopharmacol* 2010; 130(3): 599-606
- 13 Lu Q, Yang T, Zhang M, et al. Preventative effects of Ginkgo biloba extract (EGb761) on high glucose-cultured opacity of rat lens. *Phytother Res* 2014; 28(5): 767-773
- 14 Harding JJ, Egerton M, Van Heyningen R, et al. Diabetes, glaucoma, sex, and cataract: analysis of combined data from two case control studies. *Br J Ophthalmol* 1993; 77(1): 2-6
- 15 Kelkar A, Kelkar J, Mehta H, et al. Cataract surgery in diabetes mellitus: A systematic review. *Indian J Ophthalmol* 2018; 66(10): 1401-1410
- 16 Haddad NM, Sun JK, Abujaber S, et al. Cataract surgery and its complications in diabetic patients. *Semin Ophthalmol* 2014; 29(5-6): 329-337
- 17 陈文静, 刘平. 高糖诱导的人晶状体上皮细胞葡萄糖关键代谢酶的表达. *国际眼科杂志* 2019; 19(9): 1462-1465
- 18 Nieto MA. Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science* 2013; 342(6159): 1234850
- 19 Nazio F, Cecconi F. Autophagy up and down by outsmarting the incredible ULK. *Autophagy* 2017; 13(5): 967-968
- 20 Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol* 2004; 6(11): 1122-1128
- 21 Banduseela VC, Chen YW, Kultima HG, et al. Impaired autophagy, chaperone expression, and protein synthesis in response to critical illness interventions in porcine skeletal muscle. *Physiol Genomics* 2013; 45(12): 477-486
- 22 Wrighton KH. Autophagy: Kinase crosstalk through beclin 1. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; 14(7): 402-403

23 Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* 2011; 7(3): 279-296  
 24 Zhuang L, Jin G, Hu X, et al. The inhibition of SGK1 suppresses epithelial-mesenchymal transition and promotes renal tubular epithelial cell autophagy in diabetic nephropathy. *Am J Transl Res* 2019; 11(8): 4946-4956  
 25 Jin J, Gong J, Zhao L, et al. Inhibition of high mobility group box 1 (HMGB1) attenuates podocyte apoptosis and epithelial-mesenchymal

transition by regulating autophagy flux. *J Diabetes* 2019; 11(10): 826-836  
 26 Zhang C, Liu J, Jin N, et al. SiRNA targeting mTOR effectively prevents the proliferation and migration of human lens epithelial cells. *PLoS One* 2016; 11(12): e0167349  
 27 Feng H, Yang Z, Bai X, et al. Therapeutic potential of a dual mTORC1/2 inhibitor for the prevention of posterior capsule opacification: An *in vitro* study. *Int J Mol Med* 2018; 41(4): 2099-2107

## 中国科技核心期刊眼科学类期刊主要指标及排名

| 刊名            | 核心总被引频次           |             | 核心影响因子              |             | 综合评价总分      |          |
|---------------|-------------------|-------------|---------------------|-------------|-------------|----------|
|               | 数值                | 排名          | 数值                  | 排名          | 数值          | 排名       |
| 中华眼科杂志        | 1891(3036)        | 2(2)        | 0.954(1.191)        | 1(4)        | 71.5        | 1        |
| 眼科新进展         | 1428(2775)        | 3(3)        | 0.902(1.656)        | 2(1)        | 65.3        | 2        |
| 中华实验眼科杂志      | 1021(1721)        | 4(4)        | 0.775(1.292)        | 3(3)        | 49.9        | 3        |
| <b>国际眼科杂志</b> | <b>2257(5484)</b> | <b>1(1)</b> | <b>0.628(1.628)</b> | <b>5(2)</b> | <b>49.3</b> | <b>4</b> |
| 中华眼科医学杂志电子版   | 108               | 10          | 0.340               | 10          | 48.0        | 5        |
| 中华眼底病杂志       | 843               | 5           | 0.668               | 4           | 45.4        | 6        |
| 临床眼科杂志        | 467               | 7           | 0.470               | 6           | 33.9        | 7        |
| 中华眼视光学与视觉科学杂志 | 579               | 6           | 0.448               | 7           | 24.8        | 8        |
| 眼科            | 404               | 8           | 0.412               | 9           | 23.5        | 9        |
| 中国斜视与小儿眼科杂志   | 253               | 9           | 0.448               | 7           | 18.0        | 10       |

摘编自 2019 版《中国科技期刊引证报告》核心版和扩展版(括号里面为扩展版的统计指标)