DOI:10.16016/j.1000-5404.201602078

凋亡信号调节激酶1通过c-Jun氨基末端激酶通路调控高糖诱导的视网膜神经节细胞损伤

许治国,朱 江,党晓洁,任 梅 (710004 西安,西安市第四医院眼科,陕西省眼科诊疗中心)

[摘要] **目的** 研究细胞凋亡信号调节激酶1(apoptosis signal-regulating kinase1, ASK1)对高糖诱导的视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC)损伤的保护作用及其可能的机制。**方法** 建立大鼠RGC细胞的分离培养和体外高糖(50 mmol/L葡萄糖)损伤模型。转染ASK1 siRNA沉默ASK1的表达。实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测ASK1 mRNA表达水平;Western blot检测ASK1、JNK蛋白表达量和c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)磷酸化水平;MTT和CCK-8方法、Ki67染色分别检测RGC生长活力和增殖情况;Annexin-V FITC/PI方法和TUNEL检测RGC凋亡情况;试剂盒方法检测Caspase-3活性。**结果** RGC高糖环境下培养4d,细胞生长活力降低明显($P<0.05$);ASK1表达水平在高糖损伤的RGC中明显上升($P<0.05$);ASK1 siRNA的转染实验结果显示:ASK1的表达水平明显下降($P<0.05$),说明沉默表达实验成功;ASK1表达被抑制后RGC的生长活力($P<0.05$)和增殖能力($P<0.05$)明显上升,RGC的凋亡($P<0.01$)和Caspase-3的活力($P<0.01$)明显降低。沉默ASK1的表达有效地降低JNK蛋白的磷酸化水平。**结论** 抑制ASK1的表达对RGC的高糖损伤有保护作用,其机制可能与抑制JNK通路有关。

[关键词] 凋亡信号调节激酶1;视网膜神经节细胞;c-Jun氨基末端激酶通路;小干扰RNA
[中图法分类号] R394.3;R589.1;R774.102 [文献标志码] A

ASK1 mediates high glucose-induced retinal ganglion cell injury *via* JNK pathway

Xu Zhiguo, Zhu Jiang, Dang Xiaojie, Ren Mei (Department of Ophthalmology, Shaanxi Diagnosis and Treatment Center of Ophthalmology, Xi'an Fourth Hospital, Xi'an, Shanxi Prouince, 710004, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the protective effect of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) on high glucose-induced injury in retinal ganglion cells (RGCs) and its possible mechanism. **Methods** Rat RGCs were isolated, cultured and subjected to high glucose (50 mmol/L) environment to establish an RGCs injury model. Gene silencing of ASK1 was performed by transfection of ASK1 siRNA into RGCs. The mRNA expression of ASK1 was measured by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The protein expression levels of ASK1, total JNK and phosphorylated JNK were detected by Western blotting. Cell growth and viability, and cell proliferation of RGCs were measured by MTT and CCK-8 assays and Ki67 staining, respectively. The apoptosis of RGCs was detected by Annexin-V FITC/PI and TUNEL staining. Caspase-3 activity was measured by fluorescent assay kit. **Results** Cell growth and viability of RGCs was significantly decreased after treated with high glucose for 4 d ($P<0.05$). qRT-PCR measurement showed that ASK1 was significantly up regulated in RGCs treated with high glucose ($P<0.05$). The expression of ASK1 was significantly down regulated in the ASK1 siRNA-transfected RGCs ($P<0.05$), suggesting a successful silencing of ASK1. The silencing of ASK1 remarkably increased cell growth and viability ($P<0.05$) and proliferation ($P<0.05$), as well as significantly suppressed the apoptosis ($P<0.01$) and Caspase-3 activity ($P<0.01$). Furthermore, inhibition of ASK1 effectively restricted the phosphorylation of JNK. **Conclusion** ASK1 inhibition has a protective effect on high glucose-induced injury of retinal ganglion cells, which is partly modulated by JNK pathway.

[通信作者] 许治国,E-mail:xinguangyangxa@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160601.0839.003.html(2016-06-01)

[**Key words**] apoptosis signal-regulating kinase 1; retinal ganglion cells; JNK pathway; small interfere RNA

Corresponding author: Xu Zhiguo, E-mail:xinguangyangxa@163.com

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是引起视力损伤和失明的主要因素,而糖尿病被认为是引起DR的主要致病因素,这与引起的视网膜氧化应激导致的细胞凋亡有关[1]。作为糖尿病的最主要并发症,目前尚没有非常有效的治疗方法。虽然对DR发病机制的研究主要集中于视网膜毛细血管微循环,但视网膜神经组织如视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC)也渐渐得到广泛的关注[2]。因此本研究以RGC为研究基础,探讨对高糖损伤的RGC的保护,从而对DR的防治提供一定的理论参考依据。

细胞凋亡信号调节激酶1(apoptosis signal-regulating kinase 1,ASK1)是细胞丝裂原活化蛋白激酶MAPKKK家族成员之一,是细胞凋亡过程中的重要分子[3]。多种细胞系中的ASK1高表达能诱导细胞凋亡[4-5]。有研究表明,在内皮细胞和小鼠系膜细胞中,ASK1可以调控高糖引起的细胞凋亡[6]。迄今为止,还没有关于ASK1在RGC的高糖损伤中作用的研究。c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)属于促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族[7]。活化的ASK1依次激活MKK4/MKK7-JNK途径,从而使JNK磷酸化,对应激做出应答和促使细胞凋亡[8-9]。因此,我们拟通过抑制ASK1探讨其在RGC高糖损伤中的作用和分子机制,为DR的防治提供一定的理论参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物:出生小于1~3 d的SD大鼠,由第四军医大学实验动物中心提供。

实验材料:青霉素、链霉素、DMEM/F12和胎牛血清购自美国HyClone公司;小鼠抗大鼠信号调节蛋白(SIRP,CD172G)单克隆抗体(克隆号: MRC OX-41)、小鼠抗大鼠及小鼠Thy-1单克隆抗体(克隆号: OX-7)均购自美国Chemicon公司;GAPDH兔单克隆抗体、ASK1兔单克隆抗体、JNK1/2兔单克隆抗体、JNK1/2(phospho T183 + Y185)兔单克隆抗体购自英国Abcam公司;BCA试剂盒购自美国Pierce公司;二抗购自北京博奥森生物技术有限公司;反转录试剂盒、TRIzol和SYBR Premix Ex *Taq* Ⅱ购自大连宝生物工程有限公司;CCK-8试剂盒购自上海碧云天公司;MTT购自上海生工公司。Ki67细胞增殖检测试剂盒购自江苏雨桐生物科技有限公司;TUNEL原位细胞凋亡试剂盒购自美国Chemicon公司。

1.2 方法

1.2.1 视网膜神经节细胞的分离培养及高糖培养

将视网膜神经层于解剖显微镜下由出生24 h的SD大鼠眼球上取下,随即用含100 U/mL的青霉素、100 U/mL链霉素的PBS缓冲液冲洗4次,0.25%胰酶37 ℃消化25 min,而后充分吹打,加入含10%胎牛血清(FBS)、100 U/mL青霉素和50 U/mL链霉素的DMEM/F12培养基,吹打后,细胞悬液于1200 r/min离心5 min。含10% FBS的DMEM/F12重悬细胞并置于OX-41包被的6孔板,37 ℃孵育30 min,并且每10 min请换1次。将未粘附的置于OX-7包被的6孔板,于室温下孵育30 min,去掉悬液后PBS冲洗3次,最后加入2 mL含FBS的DMEM/F12,于37 ℃,含5% CO_2的细胞培养箱中培养RGC。另外,高糖培养是将分离的视网膜神经节细胞培养在含有50 mmol/L葡萄糖的培养基中,高糖浓度参考文献[10],并将细胞分为高糖组:高糖培养的细胞和正常组:无高糖处理的正常培养的细胞。

1.2.2 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测

TRIzol法提取细胞的总RNA,以总RNA为模板,根据反转录试剂盒说明书,将RNA反转成cDNA,而后以cDNA为模板进行qRT-PCR的定量检测。ASK1引物:上游引物:5′- ACAGCAGATACTCTCAGCC-3′;下游引物: 5′- CATTGTCACCCTTTATGTCCC-3′。GAPDH引物:上游引物: 5′-CGTCTTCACCACCATGGAGA-3′;下游引物: 5′-CGGCCATCACGCCACAGTTT-3′。反应程序为:预变性94 ℃ 5 min;95 ℃ 10 s,60 ℃ 30 s,共40个循环;后延伸72 ℃ 10 min。反应体系20 μL,其中SYBR Premix *Ex Taq* Ⅱ 10 μL。GAPDH作为内参,利用2-ΔΔCt方法计算基因相对表达量,每个样品设置3个重复。

1.2.3 蛋白免疫印记(Western blot)检测

RIPA裂解液裂解细胞提取蛋白质,利用BCA试剂盒测定蛋白质浓度,取25 μg蛋白质进行蛋白质凝胶电泳(SDS-PAGE)实验。将电泳后的蛋白质电转移至PVDF膜,5%脱脂奶粉的TBST溶液封闭2 h,相应一抗4 ℃孵育过夜:GAPDH兔单克隆抗体、ASK1兔单克隆抗体、JNK1/2兔单克隆抗体、JNK1/2(phospho T183 + Y185)兔单克隆抗体;稀释度均为1∶800。PBS冲洗3次,羊抗兔的二抗温室孵育1 h。GAPDH作为内参。凝胶成像系统观察结果,利用Image-Pro Plus 6.0软件测定条

带灰度值,计算蛋白相对表达量。实验重复3次。

1.2.4　细胞转染　　将细胞加到6孔板中培养,将ASK1 siRNA(5′- GCACUCCUUCAUCGAGCUAUU-3′,5 μg)和non-specific siRNA(5 μg)分别加入6 μL Turbofect和200 μL不含血清的DMEM/F12混合液,充分混合分别滴入6孔板不同的孔中。于37 ℃,含5% CO_2的细胞培养箱中孵育24 h。ASK1 siRNA组为转染ASK1 siRNA的细胞;non-specific siRNA组为转染non-specific siRNA的细胞;Control组为无转染处理的细胞。

1.2.5　细胞生长活力测定　　96孔板中,每孔接种细胞个数为5×10^4,而后加入浓度为5 g/L的MTT溶液20 μL,置于37 ℃,含5% CO_2的细胞培养箱中孵育5 h。每孔以150 μL的二甲基亚砜替换掉孔内液体,室温振荡将结晶溶解,于490 nm处测量光密度值[D(490)],设置3个重复,平均数为实验结果。

1.2.6　CCK-8方法和Ki67检测细胞增殖情况　　将细胞接种在96孔板中,每孔中细胞为5×10^3个,置于37 ℃,含5% CO_2细胞培养箱中培养24 h。每100 μL培养基中加入10 μL CCK-8,于细胞培养箱中孵育3 h,450 nm处检测光密度值,每组设置3个复孔。另外,利用Ki67细胞增殖检测试剂盒检测细胞增殖,操作方法按照说明书进行。Hoechst 33342复染细胞核。

1.2.7　Annexin-V FITC/P和TUNEL检测细胞凋亡

利用Annexin-V FITC/PI细胞凋亡定量检测试剂盒检测细胞凋亡情况,操作过程参照试剂盒说明书。用预冷的PBS将细胞预冷,然后加入10 μL Annexin-V FITC(1 μL/mL),于4 ℃孵育细胞30 min,PBS洗细胞1次,加入10 μL PI孵育7 min。最后用流式细胞分析仪检测细胞凋亡情况。利用TUNEL原位细胞凋亡试剂盒定性检测细胞凋亡,方法参照说明书进行。Hoechst 33342(10 μg/mL)复染细胞核,荧光显微镜下观察结果。

1.2.8　Caspase-3活性检测　　收集细胞,按照试剂盒(BD ApoAlert Caspase-3 Fluorescent Assay Kit)说明书检测Caspase-3活性,记录结果。

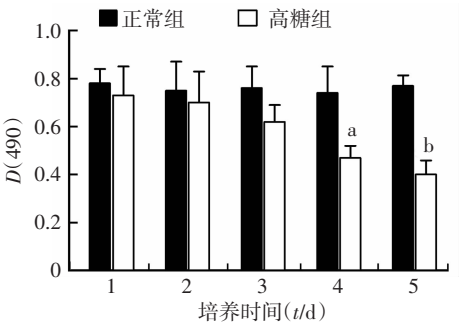
1.3　统计学分析

采用SPSS 16.0统计软件进行分析,数值均以$\bar{x}\pm s$表示。两组比较为t检验,多组间比较为单因素方差分析。

2　结果

2.1　RGC高糖损伤上调ASK1的表达

首先我们将分离出来的RGC细胞培养在含有50 mmol/L葡萄糖的培养基中,并检测了不同培养时长对细胞生长活力的影响,结果显示在培养第4天,细胞的生长活力显著下降($P<0.05$,图1)。后续的所有实验都是建立在高糖环境下培养4d的RGC上。为了检测ASK1是否参与调控高糖诱导的RGC损伤,我们检测了高糖环境下培养第4天后RGC中ASK1的表达量的变化。结果显示ASK1 mRNA(图2A)和蛋白表达水平(图2B)较正常组显著上升($P<0.05$),表明ASK1可能参与调控RGC高糖损伤。

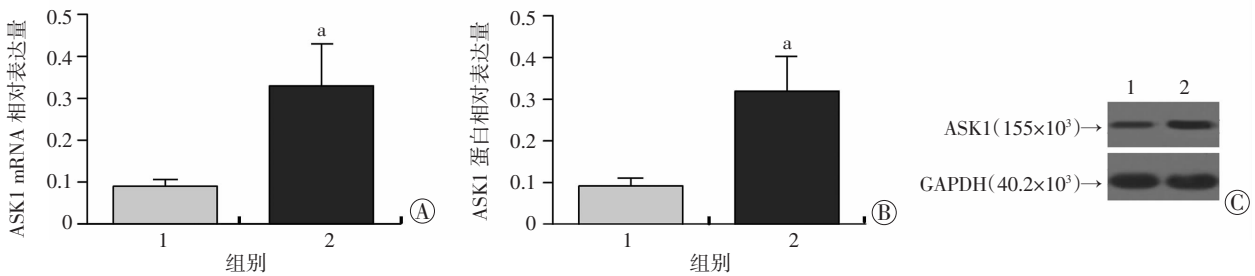


a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与正常组比较

图1　高糖环境下不同培养时间对RGC生长活力的影响

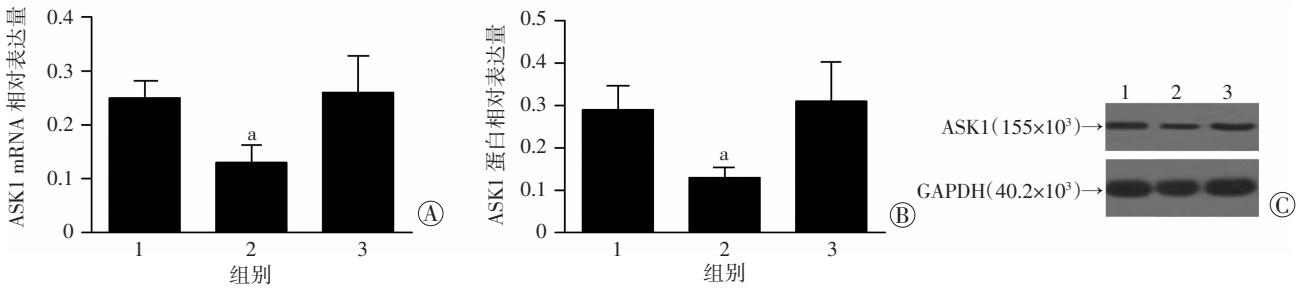
2.2　抑制ASK1在RGC中的表达

为了进一步确定ASK1对RGC高糖损伤的调控作用,我们通过转染ASK1 siRNA构建了ASK1沉默表达的细胞模型。转染效率由qRT-PCR和Western blot方法检测。结果显示,ASK1 mRNA(图3A)和蛋白表达量(图3B)在ASK1 siRNA组较non-specific siRNA组或Control组显著降低($P<0.05$),说明ASK1被成功抑制表达。由ASK1 siRNA组mRNA表达量/Control组mRNA计算得转染效率达52%。



1:正常组;2:高糖组;A:高糖损伤对RGC中ASK1 mRNA表达量的影响;B:高糖损伤对RGC中ASK1蛋白表达量的影响;C:高糖损伤的RGC中ASK1蛋白电泳结果　a:$P<0.05$,与正常组比较

图2　高糖损伤对RGC中ASK1表达量的影响

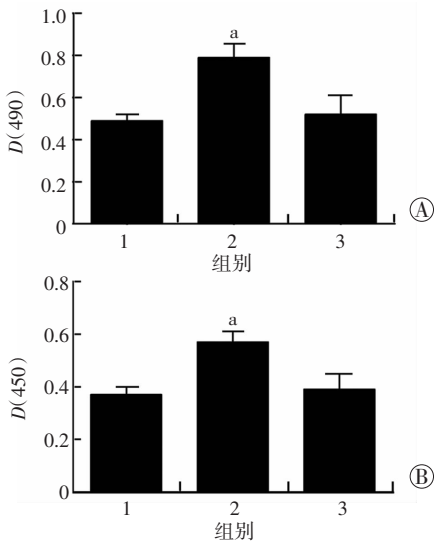


A:转染后 RGC 中 ASK1 的 mRNA 表达量变化;B:转染后 RGC 中 ASK1 的蛋白表达量变化;C:转染后 RGC 中 ASK1 的蛋白电泳结果 1:Control 组;2:ASK1 siRNA 组;3:non-specific siRNA 组;a:$P<0.05$,与 non-specific siRNA 组比较

图 3 转染后 RGC 中 ASK1 的表达量变化

2.3 抑制 ASK1 减轻高糖对 RGC 生长和增殖的抑制

为了检测 ASK1 调控 RGC 高糖损伤的生物学效应,我们利用 MTT 法和 CCK-8 方法、Ki67 染色分别检测 RGC 的生长活力和增殖能力。结果显示,3 组在高糖环境下生长活力(图 4A)和增殖能力(图 4B)ASK1 siRNA 组较 non-specific siRNA 组或 Control 组显著升高($P<0.05$)。另外,Ki67 染色显示 ASK1 siRNA 组(图 5A)的细胞增殖较 non-specific siRNA 组(图 5B)升高。说明抑制 ASK1 可以减轻高糖对 RGC 的生长和增殖的抑制作用。

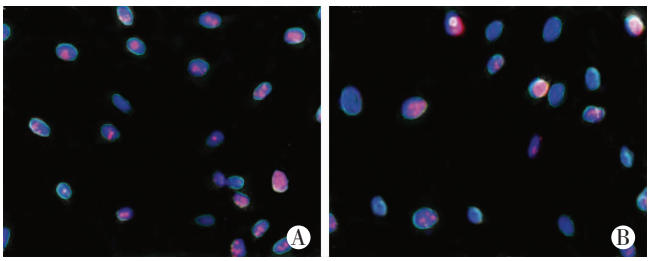


A:抑制 ASK1 对 RGC 生长活力的影响;B:抑制 ASK1 对 RGC 增殖能力的影响 1:Control 组;2:ASK1 siRNA 组;3:non-specific siRNA 组;a:$P<0.05$,与 non-specific siRNA 组比较

图 4 抑制 ASK1 对 RGC 生长活力和增殖能力的影响

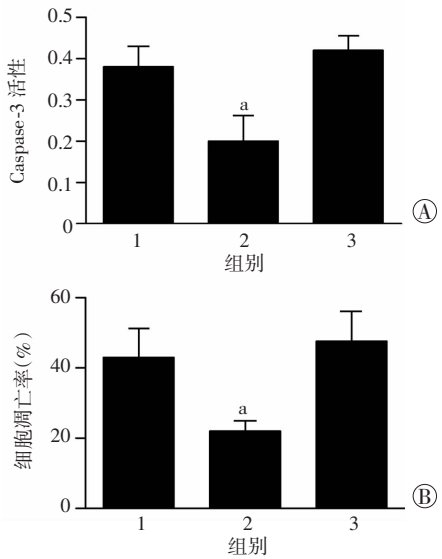
2.4 抑制 ASK1 表达降低高糖损伤的 RGC 的凋亡

为了检测抑制 ASK1 对高糖损伤 RGC 凋亡的作用,我们检测了 Caspase-3 活性并且利用 Annexin-V FITC/PI 和 TUNEL 检测细胞凋亡。结果显示,3 组在高糖环境下 Caspase-3 活性(图 6A)和 Annexin-V FITC/PI(图 6B)在 ASK1 siRNA 组较 non-specific 组或 Control 组显著降低($P<0.01$)。另外 TUNEL 检测结果显示细胞凋亡在 ASK1 siRNA 组较 non-specific 组显著减少(图 7)。因此,结果表明抑制 ASK1 可以降低高糖损伤引起的 RGC 的凋亡。



A:ASK1 siRNA 组 Ki67 染色(红色)及 Hoechst 33342 复染细胞核(蓝色);B:non-specific siRNA 组 Ki67 染色(红色)及 Hoechst 33342 复染细胞核(蓝色)

图 5 Ki67 染色检测抑制 ASK1 后 RGC 增殖的变化(×400)



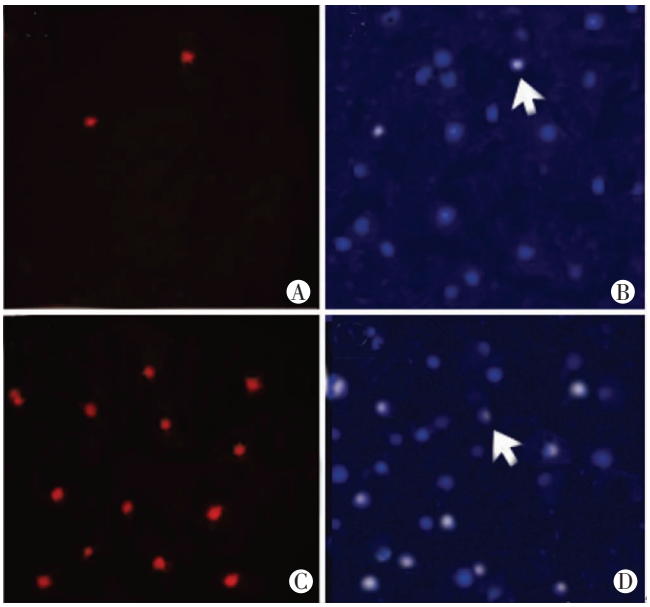
A:抑制 ASK1 对 Caspase-3 活性的影响;B:抑制 ASK1 对 RGC 凋亡的影响 1:Control 组;2:ASK1 siRNA 组;3:non-specific siRNA 组;a:$P<0.01$,与 non-specific siRNA 组比较

图 6 抑制 ASK1 对 Caspase-3 活性和 RGC 凋亡的影响

2.5 抑制 ASK1 表达使 JNK 通路被抑制从而降低 RGC 的高糖损伤

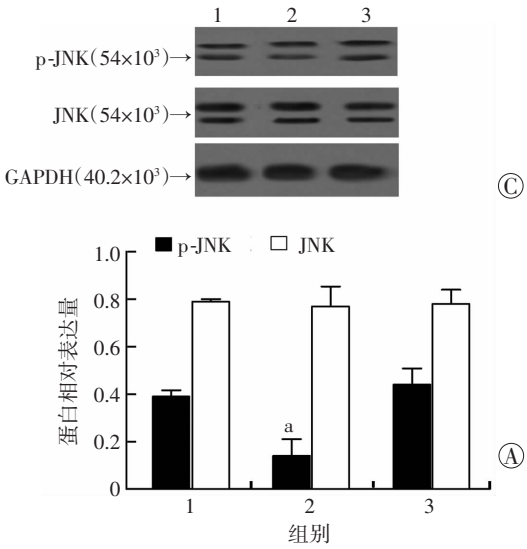
JNK 通路的激活可以促进细胞凋亡,为了检测

ASK1 调控的 RGC 高糖损伤是否与 JNK 通路有关,我们利用 Western blot 检测 JNK 蛋白的磷酸化水平。结果表明,3 组在高糖环境下 JNK 蛋白的磷酸化水平(图 8)ASK1 siRNA 组较 non-specific 组或 Control 组显著降低($P<0.01$)。这一结果表明 ASK1 调控的 RGC 高糖损伤与 JNK 通路有关。



A:ASK1 siRNA 组(红色);B:ASK1siRNA 组 Hoechst 33342 复染细胞核(蓝色);C:non-specific siRNA 组(红色);D:non-specific siRNA 组 Hoechst 33342 复染细胞核(蓝色);箭头所指为凋亡细胞

图 7　抑制 ASK1 后 RGC 凋亡的变化　(TUNEL×200)



A:Western blot 检测结果;B:半定量分析结果　1:Control 组;2:ASK1 siRNA 组;3:non-specific siRNA 组;a:$P<0.05$,与 non-specific siRNA 组比较

图 8　抑制 ASK1 对 JNK 活化的影响

3　讨论

糖尿病是由胰岛素分泌、胰岛素作用缺陷引发高血糖的一类新陈代谢疾病,糖尿病的慢性高血糖可以造成不同器官的长期损伤,机能障碍,如眼睛、肾脏、神经、心脏和血管等[9,11-12]。DR 是糖尿病的常见并发症之一,可以引发失明[13]。随着人们生活水平和生活方式的改变,糖尿病的发病率逐年上升,同时 DR 的发生率也呈上升趋势。然而,迄今为止对 DR 还没有非常有效的治疗手段。本研究以体外高糖培养的 RGC 为研究对象,探究 ASK1 对高糖损伤的 RGC 的保护作用,为 DR 的预防和治疗提供新的理论参考依据。

ASK1 是细胞丝裂原活化蛋白激酶家族成员,多种应激刺激都可诱导 ASK1,引起细胞凋亡[5]。ASK1 活化可以激活有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPKK)家族中的 MAPKK4、MAPKK7 等,进而活化有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族中两个促凋亡蛋白激酶——JNK 和 p38,从而引起细胞的凋亡[14]。已有研究表明,ASK1 表达量上调可促进细胞的凋亡[5,15]。虽然已有研究显示 ASK1 在高糖引起的损伤中表达量升高,并且对由该损伤引起的细胞凋亡起调控作用[6,16-17],但是对于 RGC 的高糖损伤,还没有 ASK1 的相关报道。在本研究中,我们发现 ASK1 的表达量在高糖损伤中呈显著升高,并且当 ASK1 的表达量被抑制后,RGC 的生长活力明显增强,RGC 凋亡和 Caspase-3 活性显著降低。因此,ASK1 表达被抑制可以起到对 RGC 高糖损伤的保护作用。JNK 通路在凋亡通路中起关键作用,JNK 通过特异性转录因子的转录或磷酸化调节与凋亡相关的蛋白质的活性,从而激活细胞凋亡信号且促进凋亡基因的上调,介导细胞的凋亡[18]。有研究表明,JNK 是轴突创伤性视网膜神经节细胞凋亡的主要调节因子[19]。在本研究中,抑制 ASK1 可以下调 JNKs 的磷酸化水平,抑制 JNKs 的活性,因此 ASK1 可以通过调控 JNK 通路来对 RGC 的高糖损伤起保护作用。

Caspase-3 是同源半胱氨酸蛋白酶,在凋亡过程中起关键作用,是凋亡过程的促动剂[20]。细胞内死亡信号被激活,Caspase-3 活化并且引发细胞骨架蛋白等靶蛋白的水解,促进细胞的凋亡[21]。本实验中,我们发现 ASK1 表达被抑制,JNK 的活化和 Caspase-3 的活性均降低。

综上所述,本实验中我们发现 RGC 的高糖损伤引起 ASK1 表达量上调,当 ASK1 表达被抑制可以促进细胞生长和增殖能力,且抑制 Caspase-3 活性和细胞凋亡。表明 ASK1 抑制对 RGC 高糖损伤起保护作用。另外,抑制 ASK1 下调了 JNK 磷酸化水平,提示抑制

ASK1 通过调控 JNK 通路对 RGC 高糖损伤起保护作用。因此,ASK1 可以作为 DR 的潜在防治靶标分子,为 DR 的防治提供新的理论基础。

参考文献:

[1] Yau J W, Rogers S L, Kawasaki R, *et al*. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy [J]. Diabetes Care, 2012, 35(3): 556 - 564. DOI:10.2337/dc11-1909

[2] van-Dijk H W, Verbraak F D, Stehouwer M, *et al*. Association of visual function and ganglion cell layer thickness in patients with diabetes mellitus type 1 and no or minimal diabetic retinopathy[J]. Vision Res, 2011, 51(2): 224 - 228. DOI:10.1016/j.visres.2010.08.024

[3] Tzeng H E, Tsai C H, Chang Z L, *et al*. Interleukin-6 induces vascular endothelial growth factor expression and promotes angiogenesis through apoptosis signal-regulating kinase 1 in human osteosarcoma[J]. Biochem Pharmacol, 2013, 85(4): 531 - 540. DOI:10.1016/j.bcp.2012.11.021

[4] Kim D S, Jeon B K, Lee Y E, *et al*. Diosgenin Induces Apoptosis in HepG2 Cells through Generation of Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Pathway[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012, 2012:981675. DOI: 10.1155/2012/981675

[5] Kim H W, Cho K J, Lee S K, *et al*. Apoptosis signal-regulating kinase 1 (Ask1) targeted small interfering RNA on ischemic neuronal cell death[J]. Brain Res, 2011, 1412: 73 - 78. DOI: 10.1016/j.brainres.2011.07.018

[6] Yokoi T, Fukuo K, Yasuda O, *et al*. Apoptosis signal-regulating kinase 1 mediates cellular senescence induced by high glucose in endothelial cells[J]. Diabetes, 2006, 55(6): 1660 - 1665. DOI: 10.2337/db05-1607

[7] Soga M, Matsuzawa A, Ichijo H. Oxidative Stress-Induced Diseases *via* the ASK1 Signaling Pathway[J]. Int J Cell Biol, 2012, 2012: 439587. DOI:10.1155/2012/439587

[8] Liu D H, Yuan F G, Hu S Q, *et al*. Endogenous nitric oxide induces activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 *via* S-nitrosylation in rat hippocampus during cerebral ischemia-reperfusion[J]. Neuroscience, 2013, 229: 36 - 48. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.10.055

[9] Rains J L, Jain S K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes[J]. Free Radic Biol Med, 2011, 50(5): 567 - 575. DOI:10.1016/j. freeradbiomed.2010.12.006

[10] 喻小龙, 谭钢, 刘二华, 等. 罗格列酮对高糖诱导视网膜神经节细胞损伤的保护作用[J]. 眼科新进展, 2013, 33(2): 101 - 105. DOI: 10.13389/j.cnki. rao.2013.02.006

[11] Fox C S, Matsushita K, Woodward M, *et al*. Associations of kidney disease measures with mortality and end-stage renal disease in individuals with and without diabetes: a meta-analysis[J]. Lancet, 2012, 380(9854): 1662 - 1673. DOI:10.1016/S0140-6736(12)61350-6

[12] Adams J N, Raffield L M, Freedman B I, *et al*. Analysis of common and coding variants with cardiovascular disease in the Diabetes Heart Study[J]. Cardiovasc Diabetol, 2014, 13: 77. DOI:10.1186/1475-2840-13-77

[13] Barzilai N, Guo H, Mahoney E M, *et al*. Efficacy and tolerability of sitagliptin monotherapy in elderly patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial[J]. Curr Med Res Opin, 2011, 27(5): 1049 - 1058. DOI:10.1185/03007995.2011.568059

[14] Kim S M, Chung M J, Ha T J, *et al*. Neuroprotective effects of black soybean anthocyanins *via* inactivation of ASK1-JNK/p38 pathways and mobilization of cellular sialic acids[J]. Life Sci, 2012, 90(21/22): 874 - 882. DOI: 10.1016/ j.lfs.2012.04.025

[15] Yamada S, Ding Y, Tanimoto A, *et al*. Apoptosis signal-regulating kinase 1 deficiency accelerates hyperlipidemia-induced atheromatous plaques *via* suppression of macrophage apoptosis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(7): 1555 - 1564. DOI: 10.1161/ ATVBAHA.111.227140

[16] Wang F, Wu Y, Gu H, *et al*. Ask1 gene deletion blocks maternal diabetes-induced endoplasmic reticulum stress in the developing embryo by disrupting the unfolded protein response signalosome [J]. Diabetes, 2015, 64(3): 973 - 988. DOI:10.2337/db14-0409

[17] Goldberg H, Whiteside C, Fantus I G. O-linked beta-N-acetylglucosamine supports p38 MAPK activation by high glucose in glomerular mesangial cells [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011, 301(4): E713 - E726. DOI:10.1152/ ajpendo.00108.2011

[18] Vin H, Ojeda S S, Ching G, *et al*. BRAF inhibitors suppress apoptosis through off-target inhibition of JNK signaling [J]. Elife, 2013, 2: e00969. DOI:10.7554/eLife.009692

[19] Fernandes K A, Harder J M, Fornarola L B, *et al*. JNK2 and JNK3 are major regulators of axonal injury-induced retinal ganglion cell death[J]. Neurobiol Dis, 2012, 46(2): 393 - 401. DOI:10. 1016/j.nbd.2012.02.003

[20] Suffert G, Malterer G, Hausser J, *et al*. Kaposi's sarcoma herpesvirus microRNAs target caspase 3 and regulate apoptosis[J]. PLoS Pathog, 2011, 7(12): e1002405. DOI:10.1371/journal.ppat. 1002405

[21] Fang J, Song X W, Tian J, *et al*. Overexpression of microRNA-378 attenuates ischemia-induced apoptosis by inhibiting caspase-3 expression in cardiac myocytes[J]. Apoptosis, 2012, 17(4): 410 - 423. DOI:10.1007/s10495-011-0683-0

(**收稿**:2016-02-23;**修回**:2016-05-21)

(编辑 张 维)