

引文格式:温艳君,张雪蕊,韦严,赵培泉.高糖环境下 Ndufa4 线粒体复合体相关蛋白 2(Ndufa4l2)对小鼠视网膜感光细胞 661W 的影响[J].眼科新进展,2022,42(4):262-266. doi:10.13389/j.cnki.rao.2022.0053

【实验研究】

高糖环境下 Ndufa4 线粒体复合体相关蛋白 2(Ndufa4l2)对小鼠视网膜感光细胞 661W 的影响[△]

温艳君 张雪蕊 韦 严 赵培泉

【摘要】 目的 探讨高糖环境下 Ndufa4 线粒体复合体相关蛋白 2(Ndufa4l2)对视网膜感光细胞 661W 功能的影响及其相关机制。方法 体内实验:选取 C57BL/6J 小鼠 12 只,采用随机数字表法分为糖尿病组和正常组,每组各 6 只,糖尿病组小鼠采用腹腔注射链脲佐菌素造模,正常组小鼠腹腔注射等体积柠檬酸缓冲液。采用免疫组织化学法检测 Ndufa4l2 蛋白在正常组和糖尿病组小鼠视网膜中的表达情况。体外实验:将 661W 细胞随机分组为对照组(细胞采用正常培养基培养 24 h)、高糖组(细胞采用含葡萄糖浓度为 50 mmol · L⁻¹ 高糖培养基培养 24 h)、si-NC 组(细胞转染 si-NC 无序序列后,采用正常培养基培养 24 h)、si-NC + HG 组(细胞转染 si-NC 无序序列后,采用含 50 mmol · L⁻¹ 葡萄糖的培养基培养 24 h)和 si-Ndufa4l2 + HG 组(细胞转染 si-Ndufa4l2 特异敲低序列后,采用含 50 mmol · L⁻¹ 葡萄糖的培养基培养 24 h);采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测对照组和高糖组细胞中 Ndufa4l2 的表达情况。CCK-8 法检测 si-Ndufa4l2 对 661W 细胞活性的影响,采用活性氧(ROS)试剂盒检测 si-Ndufa4l2 对 661W 细胞中 ROS 水平的影响,采用乳酸检测试剂盒检测 si-Ndufa4l2 对 661W 细胞中乳酸水平的影响。结果 体内实验结果表明,与正常组小鼠相比,糖尿病组小鼠视网膜中 Ndufa4l2 蛋白表达降低。体外实验结果显示,对照组和高糖组 661W 细胞中 Ndufa4l2 mRNA 相对表达量分别为 1.001 ± 0.069 和 0.356 ± 0.071, Ndufa4l2 蛋白相对表达量分别为 1.000 ± 0.078 和 0.795 ± 0.070,与对照组相比,高糖组 661W 细胞中的 Ndufa4l2 mRNA 和蛋白表达水平均下降(均为 $P < 0.05$)。CCK-8 法检测发现,si-Ndufa4l2 + HG 组 661W 的细胞活力低于 si-NC + HG 组($P < 0.001$)。ROS 检测结果表明,si-Ndufa4l2 + HG 组 661W 细胞的荧光亮度高于 si-NC + HG 组。细胞上清乳酸检测结果显示,si-NC 组、si-NC + HG 组和 si-Ndufa4l2 + HG 组细胞上清中乳酸含量分别为 (10.470 ± 0.140) mmol · L⁻¹、(7.480 ± 0.270) mmol · L⁻¹ 和 (6.080 ± 0.240) mmol · L⁻¹, si-Ndufa4l2 + HG 组与 si-NC + HG 组相比,细胞上清中乳酸含量进一步降低($P < 0.001$)。结论 线粒体 Ndufa4l2 蛋白在高糖条件下低表达, Ndufa4l2 水平下降会通过氧化磷酸化途径损伤细胞的代谢功能从而进一步抑制 661W 的细胞活力。**【关键词】** 糖尿病视网膜病变;线粒体;Ndufa4 线粒体复合体相关蛋白 2;活性氧**【中图分类号】** R774.1

作者简介: 温艳君 (ORCID: 0000-0002-4950-642X), 女, 1997 年 4 月出生,福建福州人,在读硕士研究生。研究方向:眼底病。E-mail: 4-357-302@qq.com

通信作者: 赵培泉 (ORCID: 0000-0002-5092-9550), 男, 1965 年 2 月出生,山东东营人,主任医师,博士研究生导师,上海市科委优秀学术带头人,上海市领军人才。研究方向:视网膜疾病。E-mail: zhaopeiquan@126.com

收稿日期: 2021-11-16
修回日期: 2022-02-22
本文编辑: 申蓝

△基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 81770964, 81770933)

作者单位: 200092 上海市杨浦区,上海交通大学医学院附属新华医院眼科 (温艳君,张雪蕊,赵培泉); 200031 上海市徐汇区,复旦大学附属眼耳鼻喉科医院眼科 (韦严)

糖尿病视网膜病变 (DR) 是中老年人群视力丧失的主要原因^[1-2]。线粒体在细胞的生长和功能活性中发挥着关键作用,许多视网膜疾病是由线粒体功能障碍导致的。因此,研究线粒体在 DR 发生发展中的作用具有重要意义。有研究表明,高糖条件下,线粒体功能失调会导致细胞功能受损,活性氧 (ROS) 积累增加^[3]。Taurino 等^[4]发现,线粒体复合体 I 的活性抑制是 1 型糖尿病患者糖尿病性脑病发病的关键因素;Pesta 等^[5]研究显示, Ndufb6 与 2 型糖尿病发病相关。因此,我们推断 Ndufa4 线粒体复合体相关蛋白 2 (Ndufa4l2) 作为线粒体电子转运链复合物 I 的一个亚基可能参与 DR 的发生发展过程。然而, Ndufa4l2 在 DR 中的作用和相关机制的报道较少。本研究旨在通过构建 DR 小鼠体内模型和高糖刺激感光细胞 661W 的体外模型探讨 Ndufa4l2 在 DR 的 661W 细胞中的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料 C57BL/6J 小鼠 (12 只,购自上海吉辉实验动物有限公司), 661W 细胞 (实验室自存,上海交通大学医学院附属新华医院眼科实验室), 胎牛血清 (美国 Gibco 公司), DMEM 培养基 (美国 Hyclone 公司), 2.5 g · L⁻¹ 胰蛋白酶、乙二胺四乙酸 (EDTA) 消化液、D-葡萄糖溶液 (美国 Thermo 公司), 二甲基亚砜 (美国 Amresco 公司), NDUFA4L2 抗体、β-Actin 抗体 (中国爱博泰克 ABclonal 公司)。RNA 提取试剂盒 (中国 EZBioscience 公司), 反转录 cDNA 试剂盒 (日本 Takara 公司), 2 × TaqMaster Mix 染料 (南京诺唯赞公司), 链脲佐菌素 (STZ) 和 ROS 检测试剂盒 (上海懋康生物科技有限公司), 乳酸检测试剂盒 (南京建成公司), 化学发光法显色试剂盒 (美国 Thermo Fisher Science 公司), siRNA 序列由上海吉满生物科技有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 生物学信息分析 从 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 获取 GSE160305 芯片表达数据,使用 R 语言分析差异表达基因,差异筛选条件为校正后的 $P > 0.05$ 和 $|\log\text{FoldChange}| > 0.5$ (FoldChange:差异倍数)。

1.2.2 DR 动物模型的构建及分组 SPF 级 4 周龄 C57BL/6J 小鼠饲养于上海交通大学医学院附属新华动物实验中心,饲养温度 22 ~ 25 ℃,饲养湿度 45% ~ 55%,在安静环境下自由进食和饮水。饲养和实验过程均严格按照《上海交通大学医学院附属新华医院医学伦理委员会条例》进行。适应环境 1 周后开始造模。STZ 溶液用柠檬酸钠溶解,现用现配。小鼠空腹 24 h 后,采用随机数字表法分成糖尿病组(腹腔注射 50.0 mg · kg⁻¹ STZ 溶液)和正常组(腹腔注射等量的柠檬酸钠溶液),每组各 6 只,均连续注射 5 d。最后 1 次注射 1 周后剪尾测量血糖。小鼠血糖 ≥ 13.9 mmol · L⁻¹ 代表造模成功,纳入后续动物实验。

1.2.3 免疫组织化学法检测小鼠视网膜中 Ndufa4l2 蛋白的表达水平 造模后的 C57BL/6J 小鼠持续饲养 2 个月后,采取颈椎脱臼的方法处死,取小鼠眼球进行固定、包埋和切片。将切片脱蜡,抗原修复后,3.0 g · L⁻¹ H₂O₂ 室温孵育 15 min,加山羊血清封闭。分别滴加一抗(Ndufa4l2 1 : 1000)、二抗、HRP 标记亲和素,进行 DAB 染色,苏木素复染,梯度乙醇脱水,透明,中性树胶封片,晾干。显微镜下观察,拍照,采用 ImageJ 图像处理软件分析结果。

1.2.4 661W 细胞系的培养 661W 细胞接种于 10 cm 培养皿中,细胞融合度为 70% ~ 80% 时置于含体积分数 10% 胎牛血清、10.0 g · L⁻¹ 青-链霉素溶液的 DMEM 培养基,在 37 ℃、含体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养。将 661W 细胞采用随机数字表法分为对照组(细胞采用正常培养基培养 24 h)、高糖组(细胞采用含 50.0 mmol · L⁻¹ 葡萄糖的培养基培养 24 h)、Ndufa4l2 沉默对照(si-NC)组(细胞转染 si-NC 无序序列后,采用正常培养基培养 24 h)、Ndufa4l2 高糖沉默对照(si-NC + HG)组(细胞转染 si-NC 无序序列后,采用含 50.0 mmol · L⁻¹ 葡萄糖的培养基培养 24 h)和 Ndufa4l2 高糖沉默(si-Ndufa4l2 + HG)组(细胞转染 si-Ndufa4l2 特异敲低序列后,采用含 50.0 mmol · L⁻¹ 葡萄糖的培养基培养 24 h)。

1.2.5 CCK-8 法检测 Ndufa4l2 对 661W 细胞活性的影响 si-NC 组、si-NC + HG 组和 si-Ndufa4l2 + HG 组 661W 细胞接种于 96 孔板,每孔 100 μL 培养基,含有 2000 个细胞,贴壁 24 h 后每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,培养箱内培养 1 h,采用酶标仪测量 450 nm 波长处的光密度(D)。相对细胞活性 = $(D_{\text{实验组}} - D_{\text{空白组}}) / (D_{\text{对照组}} - D_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。实验重复 3 次。

1.2.6 ROS 检测试剂盒检测 661W 细胞中 ROS 水平 采用 H₂DCFDA 荧光法测定 ROS 水平,将 661W 细胞按照每孔 0.2 × 10⁶ 个均匀铺于 12 孔板爬片,贴壁 24 h 后将 si-NC 组、si-NC + HG 组和 si-Ndufa4l2 + HG 组 661W 细胞加入不同糖浓度的培养基(1 mL),孵育 24 h 后用 PBS 清洗 2 次,加入 10 μmol · L⁻¹ 的 H₂DCFDA 染色液,在 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱中孵育 30 min,荧光显微镜下观察荧光亮度,拍照并保存。

1.2.7 qRT-PCR 检测 661W 细胞中 Ndufa4l2 mRNA 表达水平 采用 RNA 试剂盒提取正常组和高糖组 661W 细胞总 RNA。利用逆转录酶扩增 cDNA,SYBRgreen qRT-PCR 混合物测定 Ndufa4l2 mRNA 在 661W 细胞中的表达,β-Actin 作为内参。Ndufa4l2 引物序列:上游引物为 5'-TAGGGACCCGCTTCTACCG-3',下游引物为 5'-GGCAAGTCGCAGCAAGTAGA-3';si-Ndufa4l2 引物序列:上游引物为 5'-UUGC-CGUUUAACCCGACUACA-3';下游引物为 5'-UGUAGUCGGUUGAAACGGCAA-3';β-Actin 序列:上游引物为 5'-TTCGTTGCCGTCACACCCC-3';下游引物为 5'-GCTTTGCACATGCCGGAGCC-3'。利用 2^{-ΔΔCt} 方法计算 661W 细胞中 Ndufa4l2 mRNA 的相对表达水平。

1.2.8 乳酸检测试剂盒检测 661W 细胞上清中乳酸含量 收取 si-NC 组、si-NC + HG 组和 si-Ndufa4l2 + HG 组细胞上清放于 1.5 mL 离心管中,10 000 r · min⁻¹ 离心 10 min。去除沉淀,将细胞培养的上清吸出转移至新的离心管中待测。按照乳酸试剂盒说明书配制所需试剂,按说明时间反应后,采用酶标仪测量 450 nm 波长处的 D,按照公式转换成乳酸浓度:乳酸浓度 = $(D_{\text{测定值}} - D_{\text{空白值}}) / (D_{\text{标准值}} - D_{\text{空白值}}) \times 3$ 。

1.2.9 Western blot 检测 661W 细胞中 Ndufa4l2 蛋白表达水平 待 661W 细胞覆盖培养皿底部 80% 时,吸除培养皿中的完全培养基,在室温环境下,PBS 清洗 3 次。RIPA 裂解液与蛋白酶抑制剂按体积比 100 : 1 混合后,每孔加入适量的混合液,放置在冰上 10 min 充分裂解。用细胞刮刀将细胞刮下后转移放置在新的离心管中,在 4 ℃ 环境下 13 000 r · min⁻¹ 离心 15 min,取上清。上清蛋白经过 SDS PAGE 电泳后,将蛋白条带转至 PVDF 膜,使用快速封闭液封闭,分别使用兔抗小鼠 Ndufa4l2 一抗,山羊抗兔二抗完成孵育与洗涤,使用 ECL 化学发光显色试剂盒进行显色。显色后,条带使用 ImageJ 软件分析计算 Ndufa4l2 蛋白的相对表达水平。以各样品对应的 β-Actin 相对含量为基准。

1.3 统计学方法 采用 Graphpad 8.0 软件进行实验数据的描述性统计分析,计量资料以均数 ± 标准差表示。在计量数据符合正态分布的前提下,两组间比较采用 t 检验。检验水准:α = 0.05。

2 结果

2.1 生物信息学工具预测可能参与增生型 DR 发生发展的基因 在 GSE160305 数据中包含 20 例正常人视网膜和 20 例糖尿病但未出现 DR 患者的视网膜,34 例非增生型 DR (NPDR) 患者的视网膜和 5 例增生型 DR (PDR) 患者的视网膜。利用 R 包 (limma) 做差异分析,将糖尿病但未出现 DR 患者的视网膜、NPDR 患者的视网膜和 PDR 患者的视网膜分别与正常组做差异分析,取得差异表达基因。将差异表达基因取交集后得到 16 个差异基因 (图 1)。在 16 个差异基因间,本研究选取了与线粒体相关的 Ndufa4l2 基因进行差异表达验证,并进一步探究 Ndufa4l2 基因在 DR 中潜在的作用机制。

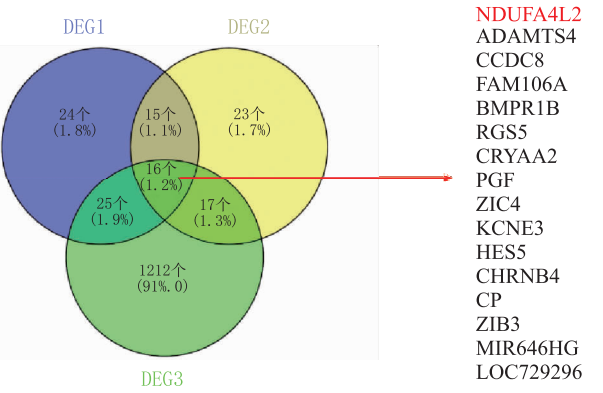


图 1 差异基因取交集后的基因列表 DEG1:正常视网膜与 NPDR 患者视网膜的差异表达基因;DEG2:正常视网膜与 PDR 患者视网膜的差异表达基因;DEG3:正常视网膜与糖尿病但未出现 DR 患者视网膜的差异表达基因。

2.2 与 Ndufa4l2 表达模式相似基因的功能注释及 KEGG 通路富集分析 通过 R Studio 数据整理分析,计算与 Ndufa4l2 基因的相关性,分析得到相关系数,取与之关系密切的基因列表 (取 $P < 0.05$),再通过对这些基因进行功能注释和通路富集分析,推测 Ndufa4l2 在 DR 中可能发挥作用的方式。通过 GO 分析可知,在生物学进程方面,Ndufa4l2 可能主要涉及膜电位调节、细胞外围的蛋白质定位和多细胞机体信号等信号通路。在细胞组分方面,主要涉及突触、跨膜转运蛋白复合体、离子通道复合体等信号通路。在分子功能方面,Ndufa4l2 可能与跨膜转运蛋白的活性、离子通道活性、电压门控通道等信号通路相关。KEGG 通路富集分析结果显示,Ndufa4l2 可能主要与氧化磷酸化通路相关,所以后续主要分析 Ndufa4l2 在氧化磷酸化中的作用 (图 2)。

2.3 小鼠视网膜中 Ndufa4l2 蛋白表达水平比较 糖尿病组小鼠和正常组小鼠相比,体重降低,血糖升高,差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.001$),这表明糖尿病小鼠模型造模成功。免疫组织化学检测结果

显示,正常组和糖尿病组小鼠的 D 分别为 0.441 ± 0.037 和 0.354 ± 0.002 ,与正常组相比,糖尿病组小鼠视网膜中 Ndufa4l2 蛋白表达水平降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 3)。

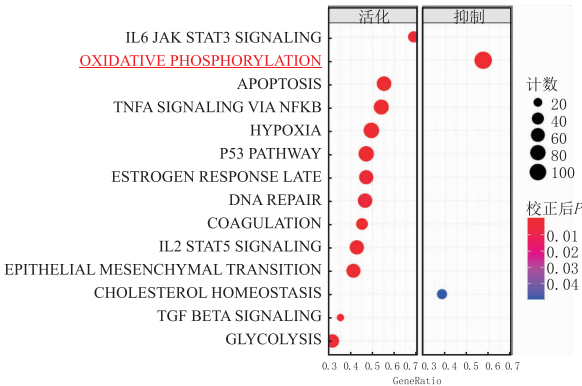


图 2 KEGG 富集分析与 Ndufa4l2 功能相近基因

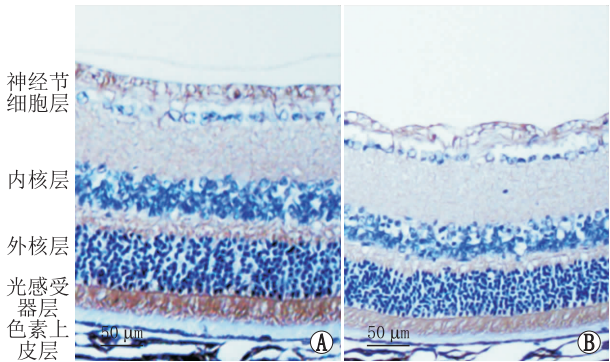


图 3 免疫组织化学检测小鼠视网膜中 Ndufa4l2 蛋白表达情况 A:正常组;B:糖尿病组。

2.4 661W 细胞中 Ndufa4l2 mRNA 和蛋白表达水平 以对照组 661W 细胞中 Ndufa4l2 的表达量为基准,对照组和高糖组中 Ndufa4l2 mRNA 表达量分别为 1.001 ± 0.069 和 0.360 ± 0.070 。与对照组相比,高糖组中 Ndufa4l2 mRNA 表达降低,差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。对照组和高糖组 661W 细胞中 Ndufa4l2 蛋白表达水平分别为 1.000 ± 0.079 和 0.780 ± 0.070 ,高糖组中 Ndufa4l2 蛋白表达水平下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。说明体外高糖条件下,661W 细胞中 Ndufa4l2 的表达较正常培养环境降低 (图 4)。

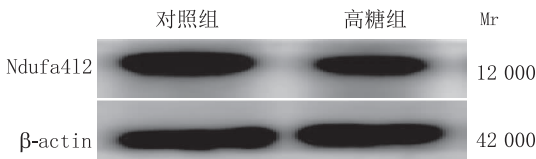


图 4 661W 细胞中 Ndufa4l2 蛋白表达

2.5 661W 细胞活力比较 CCK-8 法检测结果显示,si-NC 组、si-NC + HG 组和 si-Ndufa4l2 + HG 组细胞活力分别为 $99.68\% \pm 0.56\%$ 、 $83.82\% \pm 8.18\%$ 和 $66.25\% \pm 4.26\%$,si-NC + HG 组与 si-NC 组和 si-Ndufa4l2 + HG 组 661W 细胞活力相比差异均有统计学意义(均为 $P < 0.01$)。以上结果表明,高糖刺激会导致 661W 细胞活力下降,而 Ndufa4l2 的表达降

低会进一步加剧高糖对细胞的损伤。

2.6 Ndufa4l2 沉默后对 661W 细胞 ROS 产生的影响 细胞 ROS 检测结果显示,si-NC + HG 组 ROS 荧光检测水平明显高于 si-NC 组;si-Ndufa4l2 + HG 组和 si-NC + HG 组相比,ROS 荧光程度进一步提高,说明高糖条件下 Ndufa4l2 表达下降会进一步提高 661W 细胞产生的 ROS 水平(图 5)。

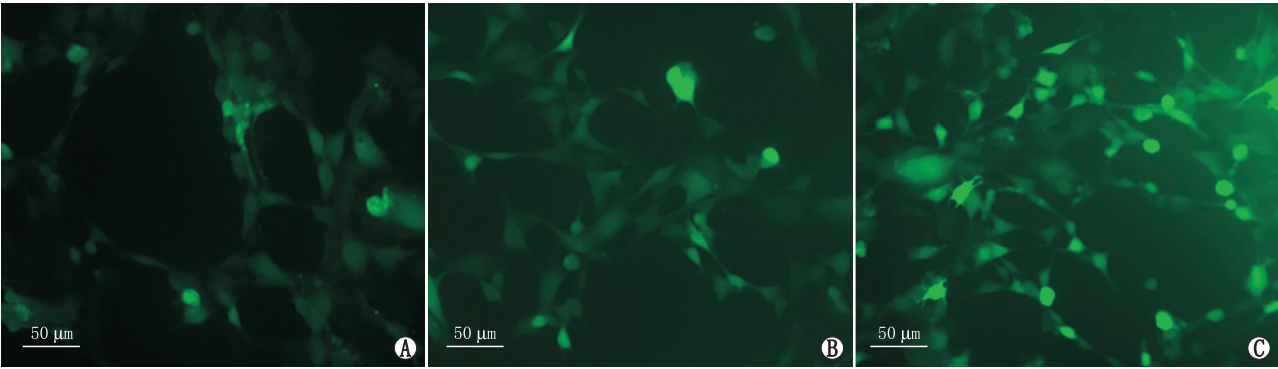


图 5 沉默 Ndufa4l2 对 661W 细胞内 ROS 水平的影响 A:si-NC 组;B:si-NC + HG 组;C:si-Ndufa4l2 + HG 组。

2.7 Ndufa4l2 沉默后对 661W 细胞中乳酸水平的影响 si-NC 组、si-NC + HG 组和 si-Ndufa4l2 + HG 组 661W 细胞上清中乳酸含量分别为 $(10.470 \pm 0.140) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $(7.480 \pm 0.270) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $(6.080 \pm 0.240) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,si-NC + HG 组 661W 细胞上清中乳酸含量与 si-NC 组相比减少($P < 0.001$); si-Ndufa4l2 + HG 组和 si-NC + HG 组相比,661W 细胞上清中乳酸含量进一步降低($P < 0.001$),这说明 Ndufa4l2 表达下降会进一步损害 661W 细胞的代谢功能。

3 讨论

DR 患者在临床上尚无有效的治疗方法,因此,全面了解 DR 的发生发展机制可以为临床医师防治 DR 提供依据。线粒体是细胞功能和代谢的场所,也是细胞呼吸发生的细胞器。它的主要作用是产生三磷酸腺苷(ATP),控制细胞代谢和调节细胞凋亡。高糖状态下,ROS 在视网膜长期过量产生,氧化作用增强可导致线粒体功能障碍^[3]。在 DR 进展中,线粒体发挥着重要的作用,持续的高血糖会损害视网膜线粒体,表现为线粒体结构、功能和基因组异常。高糖条件下,线粒体细胞膜受损,细胞色素 C 渗出,膜电位改变^[6]。有报道称,糖尿病患者视网膜线粒体 mtDNA 受损,碱基错配增加,mtDNA 转录减少,导致电子传递链系统受损^[7]。电子传递链功能失调后可引发自由基的恶性循环^[8]。因此,线粒体在 DR 中扮演了一个重要的角色。然而,线粒体在高血糖环境中受损是一个复杂的过程。

本研究利用 GEO 数据库,挑选了 DR 患者视网膜的测序数据。通过差异分析,筛选得到 Ndufa4l2,并推测该基因可能在 DR 的发展中发挥作用。Ndu-

fa4l2 是线粒体呼吸链复合物 I 的一个亚基,能调节线粒体呼吸链复合物 I 的活性,从而介导线粒体激活氧化磷酸化和 ROS 的产生^[9],并在多种癌症的代谢中起重要作用。据报道,HIF-1 α 调控的 Ndufa4l2 通过抑制 ROS 生成促进骨肉瘤细胞转移和上皮间充质转化^[10]。也有研究表明,Ndufa4l2 不仅与乳腺癌的发生发展有关^[11],还与胶质母细胞瘤相关^[12]。也有研究指出,平滑肌中 Ndufa4l2 促进缺氧性肺动脉高压血管重构^[13]。还有研究报道称,线粒体 Ndufa4l2 蛋白通过促进心脏干细胞存活调节心脏再生^[14]。然而,Ndufa4l2 在 DR 中的作用尚不明确。

本研究首先通过验证测序数据发现,在糖尿病组小鼠视网膜中 Ndufa4l2 蛋白表达明显低于正常组,表明高血糖对 Ndufa4l2 表达有一定的影响。此外,体外细胞实验结果显示,高糖环境下,661W 感光细胞中的 Ndufa4l2 mRNA 和蛋白水平表达均有一定程度的下降。这些结果表明,体内高血糖和体外高糖环境均抑制了 Ndufa4l2 的表达。当 661W 细胞暴露在高糖环境下时,采用 siRNA 沉默 Ndufa4l2 的表达后,661W 的细胞活力受到抑制,这表明 Ndufa4l2 表达降低会进一步损伤细胞活力。此外,ROS 检测结果显示,Ndufa4l2 表达降低会增加 ROS 水平。在本研究中,KEGG 富集分析发现,Ndufa4l2 与氧化磷酸化途径相关。因此,本研究还观察了 Ndufa4l2 沉默后对 661W 细胞上清中乳酸水平的影响,结果显示,Ndufa4l2 表达水平下降会导致细胞培养上清中乳酸含量减少,乳酸在细胞内堆积会进一步损害细胞的代谢过程。这些结果说明,高糖环境会抑制 661W 细胞中 Ndufa4l2 表达,从而影响 661W 的细胞活力与代谢功能。

综上所述,本研究首次提出 Ndufa4l2 可能通过视网膜感光细胞的氧化磷酸化过程来抑制其细胞活力,为研究治疗 DR 的分子机制提供新的思路。

参考文献

- [1] FRANK R N. Diabetic retinopathy[J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(1):48-58.
- [2] ANTONETTI D A, KLEIN R, GARDNER T W. Diabetic retinopathy[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(13):1227-1239.
- [3] MADSEN-BOUTERSE S A, MOHAMMAD G, KANWAR M, KOWLURU R A. Role of mitochondrial DNA damage in the development of diabetic retinopathy, and the metabolic memory phenomenon associated with its progression[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 13(6):797-805.
- [4] TAURINO F, STANCA E, SICULELLA L, TRENTADUE R, PAPA S, ZANOTTI F, et al. Mitochondrial proteome analysis reveals depression of the ndufs3 subunit and activity of complex I in diabetic rat brain[J]. *J Proteomics*, 2012, 75(8):2331-2341.
- [5] PESTA D, JELENIK T, ZAHARIA O P, BOBROV P, GÖRGENS S, BÓDIS K, et al. Ndufb6 polymorphism is associated with physical activity-mediated metabolic changes in type 2 diabetes[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12:693683.
- [6] DURAISAMY A J, MOHAMMAD G, KOWLURU R A. Mitochondrial fusion and maintenance of mitochondrial homeostasis in diabetic retinopathy[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019, 1865(6):1617-1626.
- [7] TEWARI S, SANTOS J M, KOWLURU R A. Damaged mitochondria

- drial DNA replication system and the development of diabetic retinopathy[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 17(3):492-504.
- [8] KANWAR M, CHAN P S, KERN T S, KOWLURU R A. Oxidative damage in the retinal mitochondria of diabetic mice: possible protection by superoxide dismutase[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48(8):3805-3811.
- [9] VINOGRADOV A D, GRIVENNIKOVA V G. Oxidation of NADH and ROS production by respiratory complex I[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1857(7):863-871.
- [10] XU W N, YANG R Z, ZHENG H L, JIANG L S, JIANG S D. Ndufa4l2 regulated by hif-1 α promotes metastasis and epithelial-mesenchymal transition of osteosarcoma cells through inhibiting ROS production[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8:515051.
- [11] YUAN Y, GAO H, ZHUANG Y, WEI L, YU J, ZHANG Z, et al. Ndufa4l2 promotes trastuzumab resistance in her2-positive breast cancer[J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2021, 13:177-182.
- [12] CHEN Z, WEI X, WANG X, ZHENG X, CHANG B, SHEN L, et al. Ndufa4l2 promotes glioblastoma progression, is associated with poor survival, and can be effectively targeted by apatinib[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(4):377.
- [13] LIU Y, NIE X, ZHU J, WANG T, LI Y, WANG Q, et al. Ndufa4l2 in smooth muscle promotes vascular remodeling in hypoxic pulmonary arterial hypertension[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(2):1221-1237.
- [14] ZHENG J, ZHANG M, WENG H. Induction of the mitochondrial ndufa4l2 protein by hif-1 α regulates heart regeneration by promoting the survival of cardiac stem cell[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(4):2226-2233.

Effects of Ndufa4 mitochondrial complex associated like 2 on 661W cells exposed to high glucose

WEN Yanjun¹, ZHANG Xuerui¹, WEI Yan², ZHAO Peiquan¹

1. Department of Ophthalmology, Xinhua Hospital Affiliated to Medicine School of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200092, China
2. Department of Ophthalmology, EYE&ENT Hospital of Fudan University, Shanghai 200031, China

Corresponding author: ZHAO Peiquan, E-mail: zhaopeiquan@126.com

[Abstract] Objective To investigate the effects of Ndufa4 mitochondrial complex associated like 2 (Ndufa4l2) on the function of the retinal photoreceptor cell line 661W in a high glucose (HG) environment and its related mechanisms.

Methods In vivo experiment: twelve C57BL/6J mice were randomly divided into the diabetes mellitus (DM) group and normal group, with six in each group. The diabetic mice were intraperitoneally injected with streptozotocin (STZ), and the normal mice were intraperitoneally injected with equivalent citric acid buffer. The protein expression of Ndufa4l2 in retinal tissues was detected by immunohistochemistry. In vitro experiment: 661W cells were randomly grouped as follows: control group (cells were cultured in normal medium for 24 h), HG group (cells were cultured in 50 mmol · L⁻¹ high glucose medium for 24 h), si-NC group (cells were transfected with si-NC first and then cultured in normal medium for 24 h), si-NC + HG group (cells were transfected with si-NC first and then cultured in 50 mmol · L⁻¹ high glucose medium for 24 h), and si-Ndufa4l2 + HG group (cells were transfected with si-Ndufa4l2 knockdown sequence first and then cultured in 50 mmol · L⁻¹ high glucose medium for 24 h). The expression of Ndufa4l2 in the control group and HG group was detected by the quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blot. CCK-8 was used to detect the effect of si-Ndufa4l2 on the activity of 661W cells, the reactive oxygen species (ROS) assay kit was used to detect the effect of si-Ndufa4l2 on the level of ROS in 661W cells, and the lactic acid (LA) assay kit was used to detect the effect of si-Ndufa4l2 on the level of LA in 661W cells. **Results** In vivo experiment results showed that Ndufa4l2 protein expression was reduced in the retinas of diabetic mice compared with normal mice. In vitro experiment results showed that the mRNA levels of Ndufa4l2 in the control group and HG group were 1.001 ± 0.069 and 0.356 ± 0.071, respectively, while the protein levels of Ndufa4l2 were 1.000 ± 0.078 and 0.795 ± 0.070, respectively, and compared with the control group, the mRNA and protein levels of Ndufa4l2 in 661W cells of mice in the HG group were decreased (both $P < 0.05$). CCK-8 assay results showed that cell viability in the si-Ndufa4l2 + HG group was lower than that in the si-NC + HG group ($P < 0.001$). ROS assay results showed that the fluorescence intensity in the si-Ndufa4l2 + HG group was higher than that in the si-NC + HG group. LA assay results showed that LA content in the supernatant of 661W cells in the si-NC, si-NC + HG, and si-Ndufa4l2 + HG groups were (10.470 ± 0.140) mmol · L⁻¹, (7.480 ± 0.270) mmol · L⁻¹, and (6.080 ± 0.240) mmol · L⁻¹, respectively, and compared with the si-NC + HG group, LA content in the si-Ndufa4l2 + HG group was decreased ($P < 0.001$). **Conclusion** Exposed to HG, the protein level of mitochondrial Ndufa4l2 is decreased. Down-regulation of Ndufa4l2 inhibits the viability of 661W cells by affecting their metabolic function through oxidative phosphorylation pathway.

[Key words] diabetic retinopathy; mitochondria; Ndufa4 mitochondrial complex associated like 2; reactive oxygen species