

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.03.002

## TXNIP 在高糖诱导的小鼠视网膜 Müller 细胞自噬中的作用及相关机制\*

张敏<sup>1,2</sup> 周佳<sup>2</sup> 沈玺<sup>1Δ</sup> 陆琼<sup>2</sup> 孙劼<sup>2</sup>

(1 上海交通大学医学院附属瑞金医院 上海 200020; 2 上海交通大学医学院附属瑞金医院卢湾分院眼科 上海 200020)

**摘要 目的:**探讨硫氧还蛋白相互作用蛋白(thioredoxin interacting protein, TXNIP)对高糖诱导的小鼠视网膜 Müller 细胞自噬的影响及其可能机制。**方法:**采用高糖诱导体外培养的小鼠视网膜 Muller 细胞,通过 RNA 干扰降低 TXNIP 的表达,免疫荧光、Western blot 和 Real-time PCR 检测自噬相关蛋白及丝氨酸/苏氨酸激酶/雷帕霉素靶蛋白 (serine/threonine kinase 1/mechanistic target of rapamycin kinase, AKT/mTOR)的表达。**结果:**高糖诱导的 Muller 细胞中 TXNIP、微管相关蛋白 1 轻链 3α(microtubule associated protein 1 light chain 3 alpha, LC3 II)、Sequestosome1(p62/SQSTM1)的表达均显著增加( $P<0.05$ );而 TXNIP 敲降的 Muller 细胞中自噬相关特征性蛋白(LC3 II、P62)的表达则显著降低( $P<0.05$ )。**结论:**TXNIP 可能通过 AKT/mTOR 信号通路来抑制糖尿病性视网膜病变中 Müller 细胞自噬活性,并引起细胞发生凋亡。

**关键词:**糖尿病视网膜病变;硫氧还蛋白相互作用蛋白;Müller 细胞;自噬;凋亡

**中图分类号:**R-33;R587.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)03-408-05

## Role of TXNIP on Autophagy in Mouse Retinal Müller Glia under Hyperglycemia Conditions and Its Mechanisms\*

ZHANG Min<sup>1,2</sup>, ZHOU Jia<sup>2</sup>, SHEN Xi<sup>1Δ</sup>, LU Qiong<sup>2</sup>, SUN Jie<sup>2</sup>

(1 Department of Ophthalmology, Rui Jin Hospital, LuWan branch, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200020, China; 2 Department of Ophthalmology, Rui Jin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200020, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the molecular mechanism of autophagy of Muller cells induced by thioredoxin interacting protein (TXNIP) during DR development. **Methods:** Muller cells were high-glucose cultured and knockdown TXNIP using RNAi, then investigated the autophagy associated proteins and AKT/mTOR signaling pathway using immunofluorescence, Western blot and realtime PCR. **Results:** TXNIP and autophagy associated proteins such as LC3II and p62 were observed to be highly expressed in Muller cells within high glucose culture. While LC3II and p62 were declining upon TXNIP knockdown. **Conclusion:** TXNIP may inhibition Muller cells autophagy and apoptosis via AKT/mTOR pathway in the early stage of DR.

**Key words:** Diabetic retinopathy; thioredoxin interacting protein; Muller; Autophagy; Apoptosis

**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R587.2 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2020)03-408-05

## 前言

糖尿病性视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是一种糖尿病最为常见的血管并发症,糖尿病患者中有 43.1%为 DR 患者<sup>[1]</sup>,常常因视网膜出血、渗出、牵引性视网膜脱离而失明,是全球成年人群中的最主要也最严重的致盲性眼病之一。近年来的研究表明 DR 早期, Muller 细胞功能异常将直接导致神经节细胞的死亡,甚至早于血管病变<sup>[2]</sup>。既往研究显示<sup>[3]</sup>糖尿病大鼠视网膜中谷氨酰胺合成酶(GS, glutamine synthetase)主要表达在视网膜的内核层和神经节细胞层,高糖环境下的 Muller 细胞的 GS

的表达明显减少,GS 的减少将导致 Muller 的功能异常,而致神经节细胞的凋亡。进一步研究表明<sup>[4-6]</sup>硫氧还蛋白相互作用蛋白 (TXNIP, Thioredoxin interacting protein) 在其中发挥重要作用。高糖环境中, Muller 细胞的 TXNIP 的表达量增加,GS 的表达量下降, Muller 细胞损伤加重。通过 Azaserine 抑制 TXNIP 的表达后,GS 的表达量增加, Muller 细胞受损减少,提示 TXNIP 参与了糖尿病视网膜病变的过程。但 TXNIP 如何导致 Muller 细胞的异常以及引起细胞防御和生存机制的变化亟待进一步研究。

研究表明自噬异常与糖尿病及其并发症的发生过程关系

\* 基金项目:上海市卫生和计划生育委员会面上项目(20184019)

作者简介:张敏(1982-),硕士研究生,主治医师,研究方向:眼底病, E-mail: bbzhang1978@sina.com

Δ 通讯作者:沈玺,博士,主任医师,研究方向:眼外伤、复杂性白内障、各种原因玻璃体积血、视网膜脱离、糖尿病性视网膜病变,

E-mail: carl\_shen2005@126.com

(收稿日期:2019-06-28 接受日期:2019-07-23)

密切,高血糖环境通过抑制视网膜组织中细胞自噬导致活性氧、糖化终末产物等代谢产物大量累积,最终造成视网膜损伤<sup>[7]</sup>。2012年研究显示<sup>[8]</sup>TXNIP可抑制Müller细胞中自噬,但具体的机制还不是很明确。更深入的理解自噬分子机制可能为糖尿病视网膜病变的治疗提供新的思路。因此,本研究构建小鼠Müller细胞离体模型,观察高糖低氧对Müller细胞中TXNIP表达、自噬以及AKT serine/threonine kinase 1/mechanistic target of rapamycin kinase (Akt-mTOR)信号通路的影响,旨在明确高糖低氧是否通过对TXNIP的调控改善DR。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 清洁级C57小鼠20只,体重15-20g,购自上海斯莱克公司。小鼠合笼并于次日检测雌鼠阴道口精栓。雌鼠约18天左右分娩,新生鼠将用于Müller原代细胞制备。

1.1.2 试剂 小牛血清、DMEM培养基、胰酶、Trizol 购自Thermo公司。滤网购自Millipore公司。TXNIP RNAi序列"反义链5'-AGAAAGTTTCCTGCATGTTt-3';正义链5'-AACATGCAGGAACTTTCTTct-3'"以hU6-MCS-CMV-GFP-SV40-Neomycin为质粒载体,购自上海吉凯公司。Triton X-100,4%多聚甲醛购自国药集团。GS、TXNIP、LC3 II、P62、p-mTOR、p-AKT和actin抗体及相应二抗购自Santa Cruz公司。Western blot相关试剂耗材购自碧云天公司。逆转录与PCR相关酶和试剂购自Takara公司。

1.1.3 引物 利用Primer 5软件设计PCR扩增引物。TXNIP引物F:5'-CGAGTCAAAGCCGTCAGGAT-3',R:5'-TTCATAGCGCAAGTAGTCCAAGGT-3'扩增片段长度为400bp,退火温度为55度;P62引物F:5'-CCTCTGAGTCTCGGGAATTTC-A-3',R:5'-GACTTACTGCACGTTTGGGC-3'扩增片段长度为400bp,退火温度为55度;β-actin引物F:5'-AGGAGCAATGATCTTGATCTT-3',R:5'-TGCCAACACAGTGTCTGTCT-3'扩增片段长度为400bp,退火温度为55度;LC3-II引物F:5'-GATGTCCGACTTATTCGAGAGC-3'R:5'-TTGAGCTGTAA-GCGCCTTCTA-3'扩增片段长度为400bp,退火温度为60度。

### 1.2 方法

1.2.1 Müller原代细胞培养 将出生3d的C57小鼠麻醉处死,摘取眼球,在解剖显微镜下剥取视网膜,用0.25%胰蛋白酶消化10min,经400目筛网过滤,以1000rpm,离心5.5min,弃上清,用含10%FBS的低糖DMEM调整细胞密度为 $3 \times 10^6/L$ ,接种于25cm<sup>2</sup>的培养瓶中,于37℃、5%的CO<sub>2</sub>培养箱内培养,每3天换液一次,待生长至细胞密度约90%即以1:2方式进行传代培养。取对数生长期细胞,用0.25%胰蛋白酶消化处理为单细胞悬液后铺于12孔板中,每个孔细胞密度约为 $6 \times 10^4$ ,待生长至细胞密度约70-80%,分别放入1)低氧培养箱培养0、4、8、12、24、48小时后收集细胞;2)加入浓度4.5g/Lglu高糖、2.75g/Lglu中糖培养基及1.0g/Lglu低糖培养基作用0、24、48、72小时后收集细胞;3)分别加入浓度4.5g/Lglu高糖、1.0g/Lglu低糖培养基培养24小时后加入TXNIP-siRNA干扰质粒作用24小时后收集细胞。

1.2.2 免疫荧光 将预先涂有多聚赖氨酸的无菌圆玻片置于

培养皿,将传至第2代的Müller细胞接种于此平皿内进行不同糖浓度培养,待细胞增长至80%左右,将圆玻片取出,4%多聚甲醛固定10min,0.4%的Triton X-100破膜10min后,用1:1000马血清4℃封闭2h,GS(1:500)和TXNIP(1:200)一抗4℃孵育过夜,PBS洗3次,每次5分钟,FITC标记二抗室温避光孵育30min,含400×DAPI的封闭液封片,镜下观察,Image J分析阳性染色数量。

1.2.3 Western Blot 细胞加入蛋白裂解液,BCA法测定蛋白浓度,取40ng总蛋白用聚丙烯酰胺凝胶(4%浓缩胶、10%分离胶)在80V电压下电泳2h后,转印至硝酸纤维素膜上。5%脱脂奶粉室温封闭2h后,按1:1000比例分别加入GS、TXNIP、microtubule associated protein 1 light chain 3 alpha, (LC3 II), sequestosome 1, (P62), p-mTOR, p-AKT和actin一抗,室温孵育2h。TBST缓冲液洗膜3次,每次5min,辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(1:5000)室温孵育1h, TBST缓冲液洗膜3次,每次5min,与ECL化学发光试剂显色1~2min,暗室X胶片曝光。Image J进行灰度分析。

1.2.4 Real-time PCR Trizol法提取RNA,根据逆转录反应试剂盒使用说明及实验步骤配制逆转录反应体系,逆转录合成相应的cDNA。根据实时荧光定量PCR试剂盒使用说明配制real-time PCR反应体系。应用实时定量PCR仪检测TXNIP、P62、LC3基因表达水平,以β-actin基因作为内参基因进行校正。mRNA表达水平的计算方法为,用空白组的平均ΔCT为标准计算出rmEPO组的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ ( $\Delta\Delta CT = \text{rmEPO组平均}\Delta CT - \text{空白组平均}\Delta CT$ )来计算差异的倍数。以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 代表目的基因的相对表达水平。实时荧光定量PCR检测的具体反应步骤和条件为:预变性94℃,5min,94℃,15s和60℃,45s,40次循环。

### 1.3 统计学分析

采用SPSS20.0统计软件和GraphPad Prism 7.0软件处理。计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用S-N-K法,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 高糖刺激对Müller细胞中TXNIP的表达的影响及TXNIP表达降低对Müller细胞中GS表达的影响

相较于低葡萄糖组,在高葡萄糖条件下,TXNIP的表达明显增加,而GS的表达则有所下降( $P < 0.01$ );另一方面,在TXNIP敲低组TXNIP的表达明显减少,而GS的表达增加( $P < 0.01$ )(图1)。

### 2.2 高糖对Müller细胞自噬和凋亡相关蛋白表达的影响

与低糖组相比,高糖诱导的Müller细胞中TXNIP、P62、LC3II蛋白表达随时间点呈波峰变化,且在24h时达到峰值( $P < 0.01$ ),同时,细胞凋亡指标Bax的表达量也随之改变;p-mTOR、p-ERK和p-AKT都有所增加( $P < 0.01$ );中糖干预组与高糖组TXNIP、P62、LC3-II、Bax表达较低糖对照组亦明显升高( $P < 0.05$ ),见图2。

### 2.3 敲低TXNIP的表达对高糖诱导的Müller细胞自噬相关蛋白表达及凋亡相关蛋白表达的影响

与正常组相比,经高糖诱导之后,Muller 细胞中 TXNIP、LC3-II、P62、Bax 和 p-mTOR、p-AKT 蛋白表达显著增高( $P<0.05$ );TXNIP 敲低组分别相比于空白质粒组,无论高糖组还是低

糖组,Muller 细胞中的 TXNIP、LC3-II、P62、Bax 和 p-mTOR、p-AKT 蛋白表达上有所减少( $P<0.05$ );TXNIP 敲低组较空质粒对照组 TXNIP 与 LC3 的 mRNA 表达皆有下降( $P<0.01$ ),见图4。

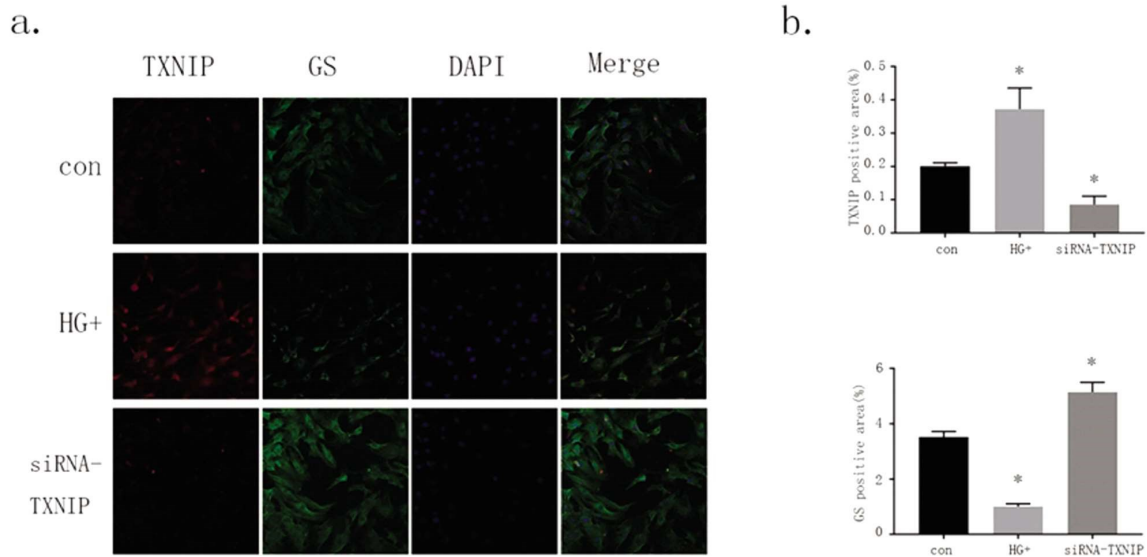


图1 TXNIP 和 GS 在 Muller 细胞中的表达。

a.FITC:在 Muller 细胞上的 TXNIP 表达(红色)和 GS 表达(绿色),DAPI 染核(蓝色)及共染(merge) (显微倍数,200× );

b.TXNIP 和 GS 的荧光亮度在不同条件干预后的变化(\* $P<0.01$ )

Fig.1 TXNIP and GS expression in Muller cells

(a) The expression of TXNIP (red) and GS (green) in Muller cells using immunofluorescence.

(b) The statistical analysis of positive staining of TXNIP and GS(\* $P<0.01$ ).

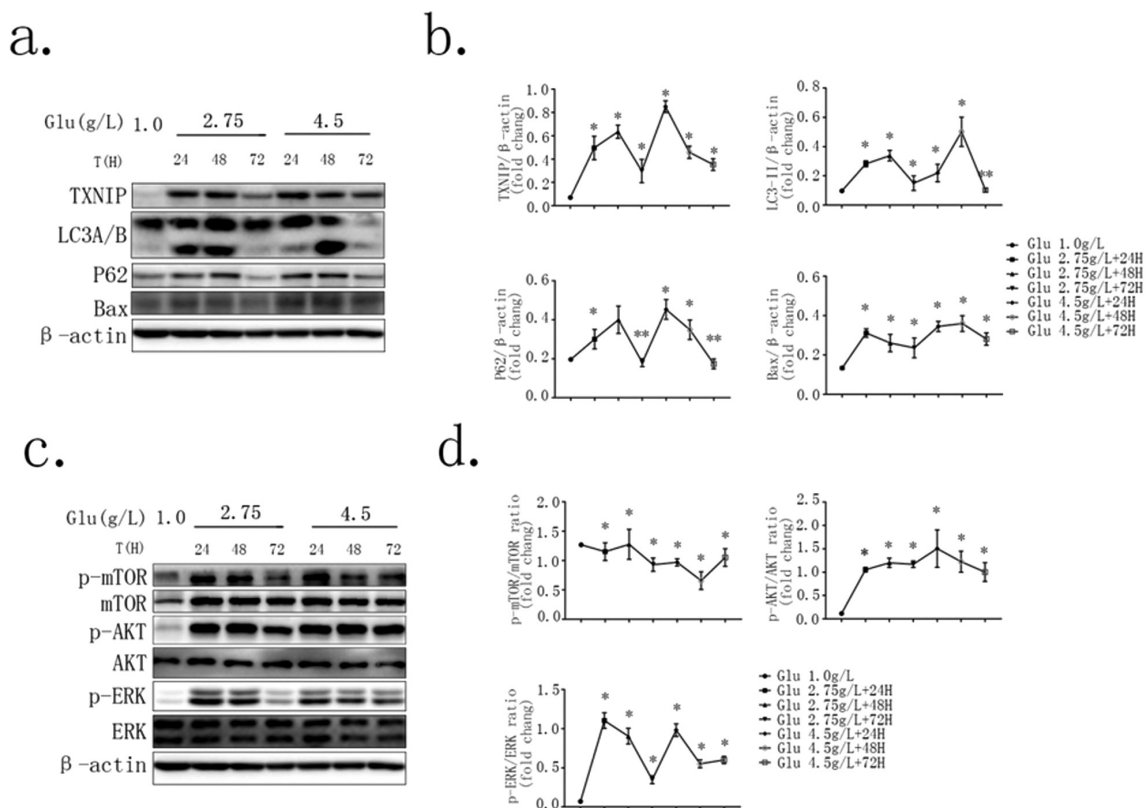


图2 a、c:Muller 细胞中 TXNIP、P62、LC3、Bax、p-mTOR、p-AKT、p-ERK 分别在低糖、中糖(24、48、72 小时)、高糖(24、48、72 小时)干预下蛋白表达量的变化。b、d 对 a、c 图蛋白进行半定量分析(\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ )。

Fig.2 The expression of TXNIP and autophagy associated proteins in Muller cells upon different concentration of glucose culture. The expression of TXNIP, LC3II, Bax and P62 (a, b) and p-mTOR, p-AKT and p-ERK (c, d) with low, medium (24, 48, 72 h) and high glucose (24, 48, 72 h) (\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ).

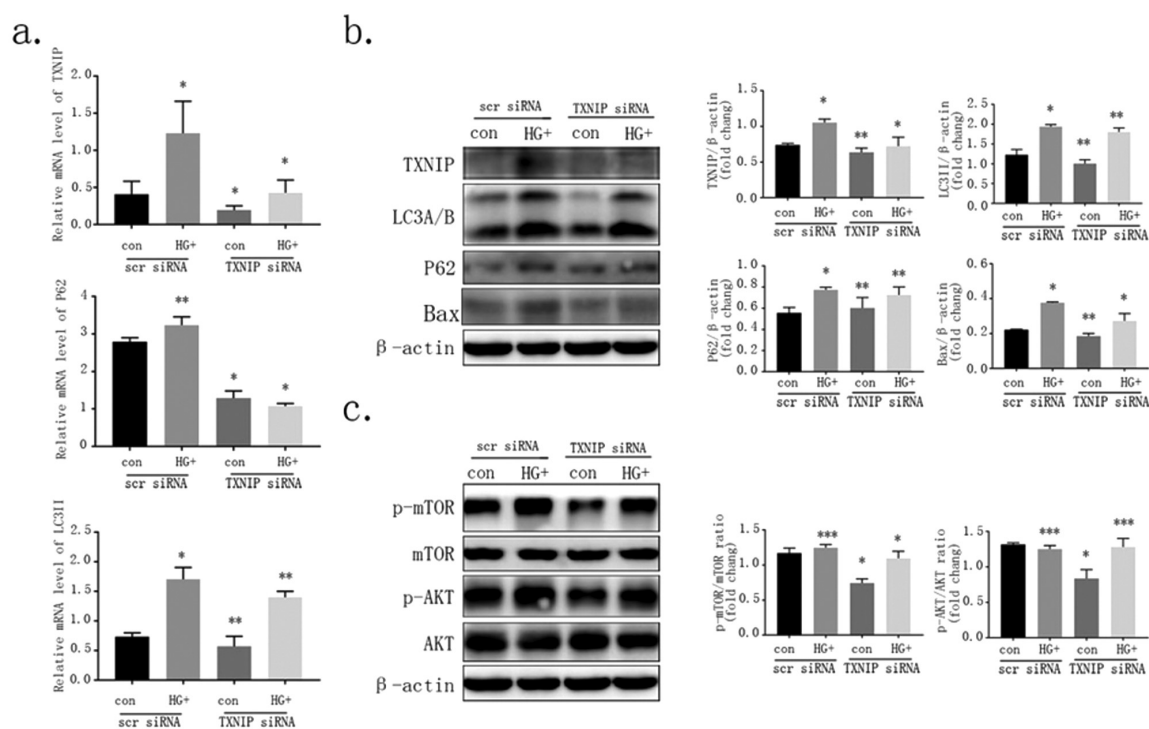


图3 a、Muller 细胞中 TXNIP、LC3、P62 空白质粒(scr-siRNA)和TXNIP-siRNA 质粒转染干预后 mRNA 表达变化。b.c muller 细胞经高糖培养后分别用空白质粒(scr-siRNA)和 TXNIP-siRNA 质粒转染干预后 TXNIP、P62、LC3、Bax、p-mTOR、p-AKT 的蛋白表达量的变化(\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ )  
Fig.3 The expression of TXNIP and autophagy associated proteins in Muller cells with TXNIP knockdown. The mRNA (a) and protein (b, c) levels of TXNIP, LC3II, Bax and P62 and p-mTOR, p-AKT and p-ERK in TXNIP knockdown (\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ).

### 3 讨论

硫氧还蛋白相互作用蛋白(Thioredoxin-interacting protein, TXNIP)又称维生素 D3 上调蛋白 1(vitamin D3-upregulated protein 1, VDUP-1), 属于 TRX 系统中的一种内源性抑制蛋白,能够通过拮抗 TRX 从而调节体内 ROS 平衡<sup>[9-11]</sup>。此前有研究认为 TXNIP 参与了糖尿病性视网膜病变的发生发展过程。我们的前期研究<sup>[4]</sup>也证实高糖能够显著上调视网膜内 Muller 细胞 TXNIP 蛋白和基因的表达,从而造成 Muller 细胞的异常,最终引起神经节细胞的损伤。

本研究进一步探究了 TXNIP 介导 Muller 细胞的损伤的可能机制。研究结果显示在高诱导的 muller 细胞 TXNIP 呈高表达,且自噬相关蛋白 LC3-II 和 P62 蛋白表达水平显著上调,凋亡相关蛋白 Bax 表达亦有上调;敲低 TXNIP 能够调节高糖诱导的 muller 细胞中自噬活性,细胞中自噬相关蛋白 LC3-II 和 P62 蛋白表达水平下调,Bax 蛋白表达同时下调<sup>[12,13]</sup>。以上结果提示高糖可诱导小鼠视网膜 Muller 细胞自噬功能障碍和溶酶体损伤,继而导致有害物在细胞内积累,导致 Muller 细胞的进一步损伤,使细胞发生凋亡;Muller 细胞的自噬作用和 TXNIP 呈高相关性,并且是正相关,TXNIP 高表达,LC3-II 和 P62 蛋白表达水平显著上调,TXNIP 敲低,LC3-II 和 P62 蛋白表达水平显著下降,Bax 蛋白表达亦下降。以上结果提示 TXNIP 的表达可以调节高糖诱导的 muller 细胞中自噬活性,从而影响细胞活性。这与 Lopes de Faria JB 等人<sup>[14]</sup>研究发现一致。在高糖环境下,高糖会促进 RMCs 自噬过程的开启,但溶酶体功能障碍使早期自噬标记物 p62 和晚期自噬标记物 SQSTM1 明显增加<sup>[15-18]</sup>。因此,RMCs 在高糖条件下中溶酶体的功能障碍和自噬抑制是

RMCs 反应性增高后释放血管内皮生长因子的主要原因之一,也是 DR 病理改变中的早期主要变化。细胞自噬受损与糖尿病视网膜病变之间密切相关,参与了糖尿病视网膜病的发生与发展。

另外,本研究结果显示高糖诱导的 Muller 细胞 p-Akt、p-mTOR 蛋白表达水平呈显著上调趋势;敲低 TXNIP 表达后 p-Akt、p-mTOR 蛋白表达水平出现对应降低,提示 TXNIP 介导的自噬可能是通过 Akt/mTOR 信号通路发挥作用的。Akt/mTOR 信号通路是由激酶级联反应介导的信号传导通路,丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Akt 通过协同磷脂酰肌醇依赖性蛋白激酶作用,促进 Akt 由胞浆向膜转移并发生磷酸化激活,激活的 Akt 再进一步促进其下游蛋白 mTOR 的磷酸化,从而激活靶基因转录,参与细胞分化、凋亡、自噬、血管形成等生理过程<sup>[19-23]</sup>。雷帕霉素(Rapamycin)是一种 mTOR 蛋白特异性抑制剂,可通过与细胞内受体 FKBP-12 结合形成复合物后直接结合 mTOR 中的 FRB(FKBP-12-rapamycin binding)结构域从而阻断其蛋白活性<sup>[24-26]</sup>。Rapamycin 以非凋亡的方式阻断活化 T 细胞增殖<sup>[27-30]</sup>,能够阻断蛋白合成和诱导细胞循环停滞在 G1 期。通过抑制 Akt/mTOR 信号通路可使自噬作用减弱。而抑制 TXNIP 的表达可下调 Akt/mTOR 信号通路相关蛋白的表达,为 DR 的研究打开新的思路。

总之,本实验研究表明 TXNIP 在高糖诱导的小鼠 muller 细胞中可能通过 Akt/mTOR 信号通路抑制自噬活性,并引起细胞凋亡。因此,抑制 Muller 细胞内 TXNIP 高表达可能会成为治疗 DR 以及相关血管性病变的潜在靶点。

#### 参考文献(References)

- [1] Kowluru RA, Zhong Q. Beyond AREDS: is there a place for antioxidant therapy in the prevention/ treatment of eye disease [J]. Invest

- Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(12): 8665-8671
- [2] Mizutani M, Gerhardinger C, Lorenzi M. Müller cell changes in human diabetic retinopathy[J]. Diabetes, 1998, 47(3): 445-449
  - [3] Ward M, Jobling A, Kalloniatis M, Fletcher EL: Glutamate uptake in retinal glial cells during diabetes [J]. Diabetologia, 2005, 48 (2): 351-360
  - [4] Zhou J, Shen X, Lu Q, et al. Thioredoxin-Interacting protein(TXNIP) suppresses expression of glutamine synthetase by inducing oxidative stress in retinal Muller glia under diabetic conditions [J]. Med Sci Monit, 2016, 22(1): 1460-1466
  - [5] Devi TS, Somayajulu M, Kowluru RA, et al. TXNIP regulates mitophagy in retinal Müller cells under high-glucose conditions: implications for diabetic retinopathy[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(5): e2777
  - [6] Wang S, Zhao X, Yang S, et al. Salidroside alleviates high glucose-induced oxidative stress and extracellular matrix accumulation in rat glomerular mesangial cells by the TXNIP-NLRP3 inflammasome pathway[J]. Chem Biol Interact, 2017, 25(12): 278: 48-53
  - [7] Rosa MD, Distefano G, Gagliano C, et al. Autophagy in diabetic retinopathy[J]. Curr Neuroparmacol, 2016, 14(8): 810-825
  - [8] Devi TS, Lee I, Huttemann M, et al. TXNIP links innate host defense mechanisms to oxidative stress and inflammation in retinal Muller glia under chronic hyperglycemia: implications for diabetic retinopathy[J]. Experimental Diabetes Research, 2012, Article ID 438238, 19 pages
  - [9] Du C, Wu M, Liu H, et al. Thioredoxin-interacting protein regulates lipid metabolism via Akt/mTOR pathway in diabetic kidney disease [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2016, (10): 79: 1-13
  - [10] Nasoohi S, Ismael S, Ishrat T. Thioredoxin-Interacting Protein (TXNIP) in Cerebrovascular and Neurodegenerative Diseases: Regulation and Implication[J]. Mol Neurobiol, 2018, 55(10): 7900-7920
  - [11] Abu El Maaty MA, Wölfl S. Vitamin D as a Novel Regulator of Tumor Metabolism: Insights on Potential Mechanisms and Implications for Anti-Cancer Therapy[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(10). pii: E2184
  - [12] Wang J, Wang J, Wang JJ, et al. Role of autophagy in TXNIP overexpression-induced apoptosis of INS-1 islet cells[J]. Sheng Li Xue Bao, 2017, 69(4): 445-451
  - [13] Huang C, Lin MZ, Cheng D, et al. Thioredoxin-interacting protein mediates dysfunction of tubular autophagy in diabetic kidneys through inhibiting autophagic flux [J]. Lab Invest, 2014, 94 (3): 309-320
  - [14] Lopes de Faria JM, Duarte DA, Montemurro C, et al. Lopes de Faria JB. Defective autophagy in diabetic retinopathy[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2016, 57(10): 4356-4366
  - [15] Peshdary V, Gagnon A, Landry A, et al. Elevated Carbohydrate Response Element-Binding Protein Beta (ChREBP $\beta$ ) and Thioredoxin Interacting Protein (TXNIP) Levels in Human Adipocytes Differentiated in High Glucose Concentrations [J]. Can J Diabetes, 2018, pii: S1499-2671(18)30369-30371
  - [16] Jiang B, Chen Y, Yao G, et al. Effects of differences in serum total homocysteine, folate, and vitamin B12 on cognitive impairment in stroke patients[J]. BMC Neurol, 2014, 30(11): 14: 217
  - [17] Long Y, Nie J. Homocysteine in renal injury [J]. Kidney Dis (Basel), 2016, 2(2): 80-87
  - [18] Heras-Sandoval D, Pérez-Rojas JM, Hernández-Damián J, et al. The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration [J]. Cell Signal, 2014, 26(12): 2694-2701
  - [19] Zhang J, Zhang JX, Zhang QL. PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy in the development of autism spectrum disorder[J]. Brain Res Bull, 2016, 10(6): 125:152-158
  - [20] Wang J, Li J, Cao N, et al. Resveratrol, an activator of SIRT1, induces protective autophagy in non-small-cell lung cancer via inhibiting Akt/mTOR and activating p38-MAPK [J]. Onco Targets Ther, 2018, 11(11): 7777-7786
  - [21] Munasinghe PE, Riu F, Dixit P, et al. Type-2 diabetes increases autophagy in the human heart through promotion of Beclin-1 mediated pathway[J]. Int J Cardiol, 2016, 1(1), 202: 13-20
  - [22] Nakahara T, Morita A, Yagasaki R, et al. Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) as a Potential Therapeutic Target in Pathological Ocular Angiogenesis[J]. Biol Pharm Bull, 2017, 40(12): 2045-2049
  - [23] Waldner M, Fantus D, Solari M, et al. New perspectives on mTOR inhibitors (rapamycin, rapalogs and TORKinibs) in transplantation[J]. Br J Clin Pharmacol, 2016, 82(5): 1158-1170
  - [24] Oh B, Yoon J, Farris A 3rd, et al. Kwun J. Rapamycin Interferes With Postdepletion Regulatory T Cell Homeostasis and Enhances DSA Formation Corrected by CTLA4-Ig[J]. Am J Transplant, 2016, 16(9): 2612-2623
  - [25] Pollizzi KN, Patel CH, Sun IH, et al. mTORC1 and mTORC2 selectively regulate CD8<sup>+</sup>T cell differentiation [J]. J Clin Invest, 2015, 125 (5): 2090-2108
  - [26] Chaoul N, Fayolle C, Desrues B, et al. Rapamycin Impairs Antitumor CD8<sup>+</sup>T-cell Responses and Vaccine-Induced Tumor Eradication [J]. Cancer Res, 2015, 75(16): 3279-3291
  - [27] Chatterjee A, Mukhopadhyay S, Tung K, et al. Rapamycin-induced G1 cell cycle arrest employs both TGF- $\beta$  and Rb pathways [J]. Cancer Lett, 2015, 360(2): 134-140
  - [28] Tian J, Wang Y, Liu X, et al. Rapamycin ameliorates IgA nephropathy via cell cycle-dependent mechanisms [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2015, 240(7): 936-945
  - [29] Lesniewski LA, Seals DR, Walker AE, et al. Dietary rapamycin supplementation reverses age-related vascular dysfunction and oxidative stress, while modulating nutrient-sensing, cell cycle, and senescence pathways [J]. Aging Cell, 2017, 16(1): 17-26
  - [30] Muri J, Heer S, Matsushita M, et al. The thioredoxin-I system is essential for fueling DNA synthesis during T-cell metabolic reprogramming and proliferation[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 1851