

引文格式:焦军杰,姚文艳,张前辉,李秀娇,常昆,马萧萧,等.转甲状腺素蛋白介导 STAT4/miR-223-3p/FBXW7 通路对高糖诱导的人视网膜内皮细胞新生血管生成的影响[J].眼科新进展,2023,43(2):99-104. doi:10.13389/j.cnki.rao.2023.0020

【实验研究】

转甲状腺素蛋白介导 STAT4/miR-223-3p/FBXW7 通路对高糖诱导的人视网膜内皮细胞新生血管生成的影响[△]

焦军杰 姚文艳 张前辉 李秀娇 常 昆 马萧萧 李晓鹏

作者简介:焦军杰 (ORCID: 0000-0003-0267-6971), 女, 1981 年 8 月出生, 河南新乡人, 硕士, 副主任医师。研究方向: 白内障及眼底病。E-mail: 42451623@qq.com

通信作者: 李晓鹏 (ORCID: 0000-0002-6987-7332), 男, 1971 年 6 月出生, 河南新乡人, 硕士, 主任医师。研究方向: 白内障。E-mail: lxp3029631@126.com

收稿日期: 2022-06-02
修回日期: 2022-10-21
本文编辑: 盛丽娜

△基金项目: 河南省医学科技攻关计划 (联合共建) 项目 (编号: LHGJ20190492)

作者单位: 453003 河南省新乡市, 新乡医学院第三附属医院

【摘要】 目的 分析转甲状腺素蛋白 (TTR) 介导信号转导和转录激活因子 4 (STAT4)/miR-223-3p/F-box WD 重复蛋白 7 (FBXW7) 通路对高糖 (HG) 诱导的人视网膜内皮细胞 (hRECs) 新生血管生成的影响。方法 将 hRECs 分为对照组、HG 组、HG + TTR 组、HG + NC mimic 组、HG + miR-223-3p mimic 组和 HG + TTR + miR-223-3p mimic 组。生物信息学分析 STAT4 与 miR-223-3p 的靶向关系, 并采用双荧光素酶报告实验进行验证。ELISA 检测细胞中 TTR 水平, RT-PCR 检测 miR-223-3p 水平, CCK-8 法检测细胞增殖, 血管生成实验分析血管生成率, Western blot 检测血管内皮生长因子 (VEGF)、TTR、STAT4 和 FBXW7 蛋白表达。结果 与对照组相比, HG 组 hRECs 中 TTR 水平升高 ($P < 0.05$)。培养 24 h 时, 与 HG 组相比, HG + TTR 组细胞活力明显下降 ($P < 0.05$)。与 HG 组血管生成率 ($38.12 \pm 4.91\%$) 相比, HG + TTR 组 hRECs 血管生成率 [$(19.46 \pm 2.12)\%$] 明显较小 ($P < 0.05$)。与 HG + NC mimic 组相比, HG + miR-223-3p mimic 组 hRECs 中 miR-223-3p 表达上调, 细胞活力增加 (均为 $P < 0.05$); 与 HG + miR-223-3p mimic 组相比, HG + TTR + miR-223-3p mimic 组 hRECs 中 miR-223-3p 表达下调, 细胞活力下降 (均为 $P < 0.05$)。与 HG + NC mimic 组血管生成率 ($40.11 \pm 4.10\%$) 相比, HG + miR-223-3p mimic 组 hRECs 血管生成率 [$(61.52 \pm 6.25)\%$] 增多 ($P < 0.05$); 与 HG + miR-223-3p mimic 组相比, HG + TTR + miR-223-3p mimic 组 hRECs 血管生成率 [$(42.24 \pm 4.33)\%$] 减少 ($P < 0.05$), 且与 HG + NC mimic 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。生物信息学分析结果显示, STAT4 与 miR-223-3p 启动子区域相互作用。与 HG 组相比, HG + TTR 组 hRECs 中 miR-223-3p、STAT4 蛋白表达均降低, FBXW7 和 VEGF 蛋白表达均升高 (均为 $P < 0.05$); 与 HG + TTR 组相比, HG + miR-223-3p mimic 组 hRECs 中 miR-223-3p、STAT4 蛋白表达均升高, FBXW7 和 VEGF 蛋白表达均降低 (均为 $P < 0.05$); 与 HG + miR-223-3p mimic 组相比, HG + TTR + miR-223-3p mimic 组 hRECs 中 miR-223-3p、STAT4 蛋白表达均降低, FBXW7 和 VEGF 蛋白表达均升高 (均为 $P < 0.05$); 与 HG + TTR 组相比, HG + TTR + miR-223-3p mimic 组 hRECs 中 miR-223-3p、VEGF、STAT4 和 FBXW7 蛋白表达差异均无统计学意义 (均为 $P > 0.05$)。结论 TTR 可能通过调节 STAT4/miR-223-3p/FBXW7 通路抑制 HG 诱导的 hRECs 的血管生成。

【关键词】 转甲状腺素蛋白; 人视网膜内皮细胞; 糖尿病视网膜病变; 信号转导和转录激活因子 4; miR-223-3p; F-box WD 重复蛋白 7

【中图分类号】 R774.1

糖尿病视网膜病变(DR)是糖尿病常见的慢性并发症,其发病率较高,病变以视网膜缺血、缺氧、反复出血为特点,对患者视功能影响较大^[1-2]。该病早期症状不明显,随着病情发展,患者视功能受到较大影响,DR是成年人失明最常见的原因之一^[3-4]。DR中视网膜新生血管的生成是增生型DR(PDR)的重要标志,PDR对患者视功能影响更严重,通常预后较差。因此,了解DR患者视网膜新生血管的生成机制对控制PDR的发生发展具有重大意义。转甲状腺素蛋白(TTR)又被称为前白蛋白,主要由肝脏和脉络膜分泌,存在于血液和脑脊液中,其主要生理功能是转运甲状腺素和协同视黄醇结合蛋白共同转运维生素A^[5]。有研究表明^[6-7],TTR与DR的进程有关,正常结构TTR可以抑制视网膜新生血管生成,促进血管上皮细胞和内皮细胞凋亡,对阻遏DR病情发展具有重大意义。但TTR在DR中的作用机制仍

不十分清楚。本研究旨在分析 TTR 在 DR 中抑制新生血管的机制,为临床治疗此类患者提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 TTR 购于北京义翘神州科技有限公司;RIPA 细胞裂解液购于北京索莱宝科技有限公司;TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription kit 逆转录试剂盒和 Lipofectamine²⁰⁰⁰ 购于赛默飞世尔科技有限公司;CCK-8 检测试剂盒购于美国 Sigma 公司;ELISA 试剂盒购于武汉伊莱瑞特生物科技有限公司兔抗人信号转导和转录激活因子 4 (STAT4)、miR-223-3p、F-box WD 重复蛋白 7 (FBXW7) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 单克隆抗体均购于美国 Santa Cruz 公司;ECL 化学发光检测试剂盒购于上海吉至生化科技有限公司。细胞培养箱购于上海玉研科学仪器有限公司;酶标仪购于北京泽平科技有限责任公司

公司;凝胶成像系统购于杭州申花科技有限公司。

1.2 细胞来源及培养 人视网膜内皮细胞(hRECs)购于中国科学院上海细胞库。将hRECs置于含体积分数10%胎牛血清和 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 青链霉素混合液的DMEM细胞培养基中,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 含体积分数5% CO_2 的培养箱中进行培养,选取对数生长期细胞进行实验。

1.3 TTR对hRECs生物学行为的影响

1.3.1 实验分组与转染方法 实验随机分为3组,其中,对照组:正常处理细胞;HG组:用含有 $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖的培养基孵育hRECs;HG+TTR组:用含有 $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖的培养基孵育转染TTR的hRECs。各组细胞均置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,含体积分数5% CO_2 的培养箱中培养24 h后用于后续实验。细胞转染方法:取对数生长期的hRECs以每孔 2×10^5 个接种至6孔板中,细胞长至约80%融合时,按照Lipofectamine²⁰⁰⁰试剂盒说明书转染TTR过表达质粒。

1.3.2 ELISA检测TTR蛋白含量 将对照组、HG组和HG+TTR组的hRECs分组处理后接种于6孔板中,每组各设置3个复孔,分别培养24 h、48 h、72 h后,PBS洗2次,胰蛋白酶消化2 min后, $3000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,采用ELISA检测试剂盒按说明书操作检测各时间点各组细胞上清液中TTR含量。

1.3.3 TTR对细胞增殖的影响 将HG组和HG+TTR组的hRECs分组处理后以每孔 5×10^3 个接种于96孔板,分别于培养0 h、6 h、12 h、18 h、24 h时每孔加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ 的CCK-8溶液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 继续孵育2 h,于450 nm波长处采用酶标仪检测细胞吸光度,计算各组细胞活力。

1.3.4 血管生成实验 采用基底膜基质进行血管生成实验。将基质装入48孔板中,每孔 $300\text{ }\mu\text{L}$,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下聚合30 min,将HG组和HG+TTR组hRECs以每孔 3×10^4 个接种后,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育24 h。利用Olympus显微镜观察hRECs血管生成情况并拍照,以形成管状结构的面积占比代表血管生成率(血管生成率=管状结构的面积/培养孔面积 $\times 100\%$)。其中,每组细胞接种3个复孔,结果取平均值。

1.4 miR-223-3p对hRECs生物学行为的影响

1.4.1 实验分组 实验随机分为3组,其中,HG+NC mimic组:用含有 $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖培养基孵育转染NC mimic的hRECs;HG+miR-223-3p mimic组:用含有 $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖培养基孵育转染miR-223-3p mimic的hRECs;HG+TTR+miR-223-3p mimic组:用 $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖培养基孵育转染miR-223-3p mimic和TTR的hRECs。各组细胞均置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 含体积分数5% CO_2 的培养箱中培养24 h后进行后续实验。细胞转染方法参见1.3.1。

1.4.2 RT-PCR检测miR-223-3p表达 将HG+NC mimic组、HG+miR-223-3p mimic组和HG+TTR+miR-223-3p mimic组细胞培养48 h,Trizol法提取细胞中总RNA,紫外分光光度计法测定RNA的浓度。

按TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription kit逆转录试剂盒说明书以RNA为模板进行逆转录获得cDNA并置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,扩增后置于RT-PCR仪中进行测定,设置反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min预变性; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性20 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火5 s, $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸200 s,共45个循环。以GAPDH为内参,引物序列如下:miR-223-3p上游引物为5'-CAGAAAGCCCAATTCATCT-3',下游引物为5'-GGGCAAATGGATACCATACC-3';GAPDH上游引物为5'-GGCTCTCTGCTCCTCCCTGTTCTAG-3',下游引物为5'-CGTCCGATACGGCCAAATCCGT-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目标基因mRNA相对表达量。

1.4.3 miR-223-3p对细胞增殖的影响 参见1.3.3方法检测HG+NC mimic组、HG+miR-223-3p mimic组和HG+TTR+miR-223-3p mimic组hRECs的细胞活力。

1.4.4 血管生成实验 观察HG+NC mimic组、HG+miR-223-3p mimic组和HG+TTR+miR-223-3p mimic组hRECs的血管生成情况,详细方法见1.3.4。

1.5 STAT4与miR-223-3p的相互作用

1.5.1 生物信息学分析 通过生物信息学在线数据库UCSC (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgNear>)和PROMO (http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3)分析潜在的启动子,包括STAT4。

1.5.2 实验分组 实验随机分为3组,其中,HG组:用含有 $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖培养基孵育hRECs;HG+siNC组:用含有 $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖培养基孵育转染siNC的hRECs;HG+siSTAT4组:用含有 $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖培养基孵育转染siSTAT4的hRECs。细胞转染方法参见1.3.1。

1.5.3 RT-PCR检测miR-223-3p表达 收集HG组、HG+siNC组和HG+siSTAT4组细胞,并提取细胞内总RNA,行RT-PCR检测各组细胞中miR-223-3p表达,具体方法参见1.4.2。引物序列如下:miR-223-3p上游引物为5'-CAGAAAGCCCAATTCATCT-3',下游引物为5'-GGGCAAATGGATACCATACC-3';STAT4上游引物为5'-TTGTCTGCTCTACCATTCGCTG-3',下游引物为5'-CTTTCTCTCCGCAACACG-3';GAPDH上游引物为5'-GGCTCTCTGCTCCTCCCTGTTCTAG-3',下游引物为5'-CGTCGATACGGCCAAATCCGT-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目标基因mRNA相对表达量。

1.5.4 双荧光素酶报告实验 构建野生型报告基因载体STAT4-WT与突变型报告基因载体STAT4-MT,将该载体分别与miR-NC或miR-223-3p mimic共转染到hRECs中。置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、体积分数5% CO_2 培养箱继续培养48 h,用荧光素酶检测试剂盒测量各组细胞中的荧光素酶活性。

1.6 Western blot检测VEGF、TTR、STAT4和FBXW7蛋白表达 细胞分组处理后加入RIPA蛋白裂解液,冰上裂解30 min后离心15 min,提取总蛋白,采用BCA试剂盒检测蛋白浓度。经 $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜上,脱脂奶粉封闭蛋白 1 h,加入一抗 VEGF(1 : 1000)、TTR(1 : 1000)、STAT4(1 : 1000)和 FBXW7(1 : 1000),4 ℃ 过夜孵育,PBS 洗膜 3 次。添加 HRP 标记二抗(1 : 10 000)于室温孵育 2 h,PBS 洗膜 3 次。最后滴入 ECL 显色,以 GAPDH 作为内参照,凝胶图像成像系统成像获得蛋白条带,ImageJ 分析目的蛋白的灰度值。

1.7 统计学分析 采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析。计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间差异比较采用单因素方差分析,组间差异采用两独立样本 *t* 检验比较。检验水准: $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 TTR 过表达后在 hRECs 中含量变化 培养 24 h、48 h 和 72 h 时,与对照组相比,HG 组和 HG + TTR 组 hRECs 中 TTR 水平均显著升高(均为 $P < 0.05$);与 HG 组相比,HG + TTR 组中 TTR 水平均显著升高(均为 $P < 0.05$)(表 1)。

表 1 各组 hRECs 中 TTR 水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TTR/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)		
	24 h	48 h	72 h
对照组	15.86 ± 2.01	17.36 ± 1.98	21.68 ± 2.85
HG 组	55.23 ± 4.12 *	52.45 ± 3.87 *	73.24 ± 4.49 *
HG + TTR 组	64.72 ± 3.96 **	61.69 ± 3.73 **	80.99 ± 4.38 **

注:与对照组相比,* $P < 0.05$;与 HG 组相比,** $P < 0.05$ 。

2.2 TTR 过表达对 hRECs 增殖和血管生成的影响

培养 24 h 时,与 HG 组相比,HG + TTR 组 hRECs 细胞活力明显下降($P < 0.05$),其余时间点(0 h、6 h、12 h、18 h)两组间 hRECs 细胞活力相比差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)(图 1A)。培养 24 h 时,HG 组和 HG + TTR 组 hRECs 血管生成率分别为(38.12 ± 4.91)%、(19.46 ± 2.12)%,HG + TTR 组血管生成率明显小于 HG 组($P < 0.05$)(图 1B)。

2.3 TTR 逆转 miR-223-3p 对 hRECs 的作用

RT-PCR 结果显示,与 HG + NC mimic 组相比,HG + miR-223-3p mimic 组 hRECs 中 miR-223-3p 表达上调($P < 0.05$);与 HG + miR-223-3p mimic 组相比,HG + TTR + miR-223-3p mimic 组中 miR-223-3p 表达下调($P < 0.05$)(图 2A)。细胞增殖实验结果显示,各组细胞活力随着时间增加而增加(均为 $P < 0.05$),培养 72 h 时,与 HG + NC mimic 组相比,HG + miR-223-3p mimic 组 hRECs 的细胞活力明显增加($P < 0.05$);与 HG + miR-223-3p mimic 组相比,HG + TTR + miR-223-3p mimic 组 hRECs 的细胞活力明显下降($P < 0.05$),且与 HG + NC mimic 组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)(图 2B)。血管生成实验结果显示,HG + NC mimic、HG + miR-223-3p mimic 组和 HG + TTR + miR-223-3p mimic 组 hRECs 血管生成率分别为(40.11 ± 4.10)%、(61.52 ± 6.25)%和(42.24 ± 4.33)%,与 HG + NC mimic 组相比,

HG + miR-223-3p mimic 组 hRECs 血管生成率增高($P < 0.05$);与 HG + miR-223-3p mimic 组相比,HG + TTR + miR-223-3p mimic 组 hRECs 血管生成率降低($P < 0.05$),且与 HG + NC mimic 组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)(图 2C)。

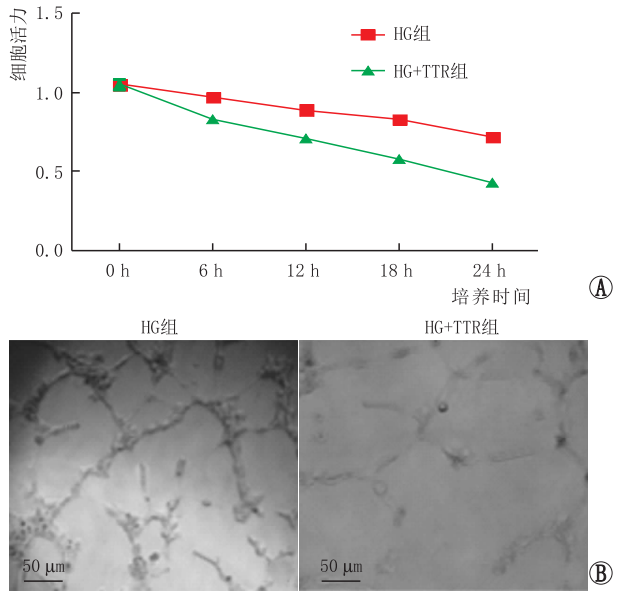


图 1 TTR 过表达对 hRECs 增殖和血管生成的影响 A:细胞活力实验;B:血管生成实验(×200)。

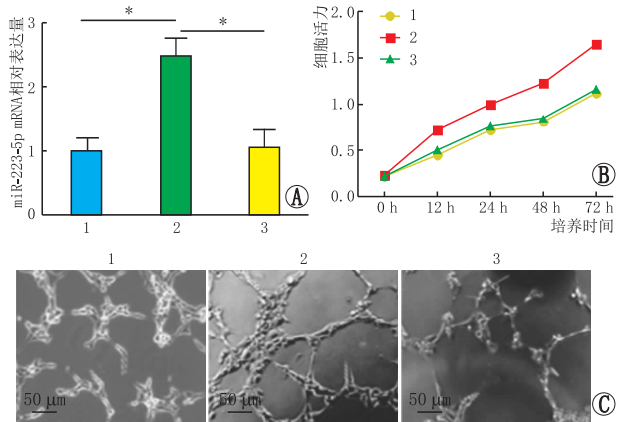


图 2 TTR 逆转 miR-223-3p 对 hRECs 的作用 A:RT-PCR 检测各组细胞 miR-223-3p mRNA 表达;B:细胞活力实验;C:血管生成实验(×200)。1:HG + NC mimic 组;2:HG + miR-223-3p mimic 组;3:HG + TTR + miR-223-3p mimic 组。* 示 $P < 0.05$ 。

2.4 STAT4 与 miR-223-3p 启动子结合并调节其水平

生物信息学分析结果显示,STAT4 与 miR-223-3p 启动子区域相互作用(图 3A)。双荧光素酶报告实验结果显示,STAT4-WT 与 miR-223-3p mimic 共转染致荧光素酶活性降低($P < 0.05$)(图 3B)。RT-PCR 结果显示,HG 组与 HG + siNC 组 hRECs 中 miR-223-3p 表达相比差异无统计学意义($P > 0.05$);与 HG + siNC 组相比,HG + siSTAT4 组 hRECs 中 miR-223-3p 表达下降($P < 0.05$)(图 3C)。

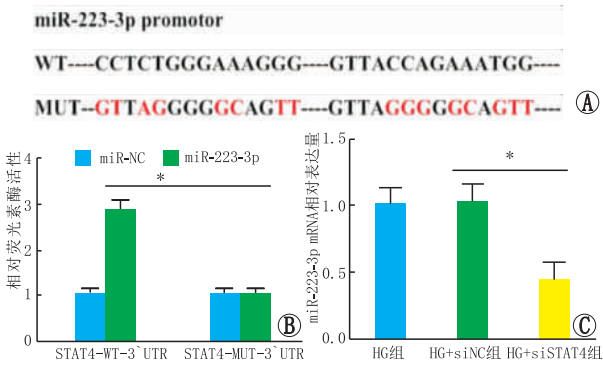


图3 STAT4与miR-223-3p启动子结合并调节其水平 A:STAT4与miR-223-3p启动子结合;B:双荧光素酶报告实验;C:RT-PCR检测各组细胞miR-223-3p mRNA表达。*示 $P<0.05$ 。

2.5 TTR调控hRECs中STAT4、miR-223-3p、FBXW7和VEGF表达 与HG组相比,HG+TTR组hRECs中miR-223-3p、STAT4蛋白表达均降低,FBXW7和VEGF蛋白表达均升高(均为 $P<0.05$)。与HG+TTR组相比,HG+miR-223-3p mimic组hRECs中miR-223-3p、STAT4蛋白表达均升高,FBXW7和VEGF蛋白表达均降低(均为 $P<0.05$)。与HG+miR-223-3p mimic组相比,HG+TTR+miR-223-3p mimic组hRECs中miR-223-3p、STAT4蛋白表达均降低,FBXW7和VEGF蛋白表达均升高(均为 $P<0.05$)。与HG+TTR组相比,HG+TTR+miR-223-3p mimic组hRECs中miR-223-3p、VEGF、STAT4和FBXW7蛋白表达差异均无统计学意义(均为 $P>0.05$)(图4)。

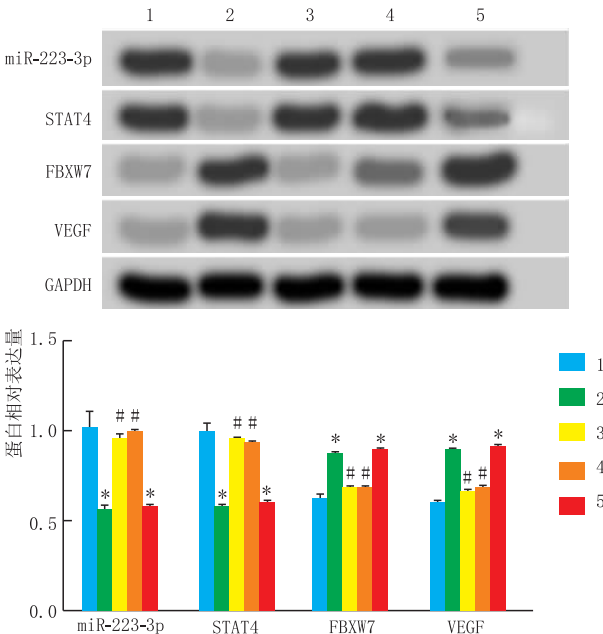


图4 各组细胞相关蛋白表达水平 1:HG组;2:HG+TTR组;3:HG+NC mimic组;4:HG+miR-223-3p mimic组;5:HG+TTR+miR-223-3p mimic组。与HG组相比,* $P<0.05$;与HG+TTR组相比,# $P<0.05$ 。

3 讨论

DR是糖尿病患者常见的并发症之一,严重时可导致患者失明,该病现已成为世界范围内的公共卫生问题^[8]。DR发病机制并不十分清晰,多认为与VEGF异常表达、小胶质细胞异常活化以及氧化应激反应有关。此外,目前尚无早期发现和干预的方法。因此,分析DR发病的作用机制,寻找治疗DR关键通路,可为临床治疗DR提供潜在的靶点。

本研究结果显示,培养24 h、48 h、72 h时,与对照组相比,HG组hRECs中TTR水平均显著升高(均为 $P<0.05$);与HG组相比,HG+TTR组hRECs中TTR水平均显著升高;并且在HG处理hRECs中转染TTR,细胞活力明显下降。TTR是一种甲状腺激素结合蛋白,位于人类18号染色体(18q11.2~18q12.1),由肝脏或脉络膜产生后易位到血液或脑脊液中,以四聚体形式存在,其主要作用是运输全视黄醇结合蛋白和甲状腺素,其功能异常可导致神经系统相关疾病^[9-10]。野生型TTR可引起各种形式的系统性淀粉样蛋白沉积^[11]。现有研究显示^[12],TTR异常表达与糖尿病和高度近视有关,提示TTR可能在DR发生发展中扮演重要角色。本研究还发现,培养24 h时,与HG组相比,HG+TTR组细胞活力下降;与HG组相比,HG+TTR组细胞血管生成减少,提示TTR处理hRECs可明显抑制细胞增殖和血管生成。基于此,我们推测hRECs损伤可促使DR的发生,提示TTR升高可能是DR发生的危险因素。

miRNAs是一种小分子无法编码的RNA,是转录后调节基因表达关键因子,参与细胞生长、增殖、迁移和侵袭等多种生物学过程^[13-14]。国内外有多项研究表明,miRNA参与DR发生发展过程中的血管生成,能够逆转血脂异常,减缓DR发展进程,具有治疗DR的潜在价值^[15-16]。本研究结果显示,培养72 h时,与HG+NC mimic组相比,HG+miR-223-3p mimic组hRECs细胞活力增加;与HG+miR-223-3p mimic组相比,HG+TTR+miR-223-3p mimic组hRECs的细胞活力下降;与HG+NC mimic组相比,HG+miR-223-3p mimic组hRECs血管生成率增高;与HG+miR-223-3p mimic组相比,HG+TTR+miR-223-3p mimic组hRECs血管生成率降低。既往研究显示^[7],TTR在HG诱导的hRECs中高表达,其可以抑制细胞增殖、迁移和血管生成,说明TTR对hRECs增殖和血管生成具有抑制作用,其机制可能与调节miR-223-3p表达相关。本研究进一步分析发现,STAT4与miR-223-3p启动子区域相互作用,双荧光素酶报告实验结果显示,STAT4-WT与miR-223-3p mimic共转染致荧光素酶活性降低,提示STAT4与miR-223-3p可能存在靶向关系。RT-PCR检测结果显示,与HG+siNC组相比,HG+siSTAT4组hRECs中miR-223-3p表达下降,说明STAT4和miR-223-3p

存在靶向调节关系。在之前的实验中,TTR 被证实可以抑制 hRECs 增殖和血管生成。本研究中,在 HG 处理后 hRECs 中添加外源性 TTR 后,细胞中 miR-223-3p 和 STAT4 蛋白表达均降低,FBXW7 和 VEGF 蛋白表达均升高;而在 HG 处理后过表达 miR-223-3p,细胞中 miR-223-3p、STAT4 蛋白表达均升高,FBXW7 和 VEGF 蛋白表达均降低。TTR 作为转运蛋白将甲状腺素转运至细胞核或线粒体,可参与眼部生长发育过程^[17]。有研究显示^[18],DR 是一种炎症反应,其视网膜功能与血管生成有关,DR 患者产生的晚期糖基化终末产物、活性物质等可使 VEGF 表达增加。VEGF 是一种促新生血管因子,具有促进血管内皮有丝分裂的功能,对内皮细胞凋亡具有抑制作用,因此,它能促进细胞迁移、增殖来修复受损血管^[19]。据报道^[20],FBXW7 在细胞信号转导及细胞增殖、分化、迁移和凋亡中均发挥重要作用,被认为是肿瘤抑制因子。已有研究证实,FBXW7 是 miR-223-3p 的直接结合靶标,miR-223-3p 通过与 FBXW7 的 3'-UTR 结合来抑制 FBXW7 的表达^[21]。结合本研究结果我们认为,TTR 具有抑制 DR 新生血管生成的作用,其可能是通过介导 STAT4/miR-223-3p/FBXW7 信号轴实现的。

综上所述,TTR 在 HG 处理的 hRECs 中高表达,且在添加外源性 TTR 后,hRECs 增殖和血管生成被显著抑制,而加入 TTR 的同时转染 miR-223-3p mimic 则逆转了 TTR 对 hRECs 的抑制作用,且 STAT4 与 miR-223-3p 启动子结合并调节其水平,miR-223-3p 与 FBXW7 靶向结合,推测 TTR 对 hRECs 的抑制作用可能是通过调控 STAT4/miR-223-3p/FBXW7 信号轴实现的。但本研究对于 miR-223-3p 和 FBXW7 的靶向关系并未深入研究,尚需进一步研究分析 TTR 抑制 DR 新生血管生成的具体机制。

参考文献

[1] AZAD R, SINHA S, NISHANT P. Asymmetric diabetic retinopathy[J]. *Indian J Ophthalmol*, 2021, 69(11):3026-3034.

[2] JAMPOL L M, GLASSMAN A R, SUN J. Evaluation and care of patients with diabetic retinopathy[J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(17):1629-1637.

[3] LIN K Y, HSIH W H, LIN Y B, WEN C Y, CHANG T J. Update in the epidemiology, risk factors, screening, and treatment of diabetic retinopathy[J]. *J Diabetes Investig*, 2021, 12(8):1322-1325.

[4] BEHERA U C, BRAR A S. Socioeconomic status and diabetic retinopathy in India[J]. *Indian J Ophthalmol*, 2021, 69(11):2939-2943.

[5] GILLMORE J D, GANE E, TAUBEL J, KAO J, FONTANA M, MAITLAND M L, et al. CRISPR-Cas9 in vivo gene editing for transthyretin amyloidosis[J]. *N Engl J Med*, 2021, 385(6):493-502.

[6] SUN W, SHI Y, YANG J, SONG X, ZHANG Y, ZHANG W, et al. Transthyretin and retinol-binding protein as discriminators of

diabetic retinopathy in type 1 diabetes mellitus[J]. *Int Ophthalmol*, 2022, 42(4):1041-1049.

[7] 齐新刚,顾永欣,肖云,杜雷. 转甲状腺素蛋白对人视网膜色素上皮细胞增殖、迁移和血管生成的影响机制研究[J]. *华南国防医学杂志*, 2020, 34(11):757-761,776.

QI X G, GU Y X, XIAO Y, DU L. Study on the effect mechanism of transthyretin on the proliferation, migration and angiogenesis of human retinal pigment epithelial cells 19 [J]. *Mil Med J South Chin*, 2020, 34(11):757-761,776.

[8] UEKI K, SASAKO T, OKAZAKI Y, MIYAKE K, NANGAKU M, OHASHI Y, et al. Multifactorial intervention has a significant effect on diabetic kidney disease in patients with type 2 diabetes[J]. *Kidney Int*, 2021, 99(1):256-266.

[9] YADAV J D, OTHEE H, CHAN K A, MAN D C, BELLIVEAU P P, TOWLE J. Transthyretin amyloid cardiomyopathy-current and future therapies[J]. *Ann Pharmacother*, 2021, 55(12):1502-1514.

[10] RAPEZZI C, ELLIOTT P, DAMY T, NATIVI-NICOLAU J, BERK J L, VELAZQUEZ E J, et al. Efficacy of tafamidis in patients with hereditary and wild-type transthyretin amyloid cardiomyopathy: further analyses from attract [J]. *JACC Heart Fail*, 2021, 9(2):115-123.

[11] 秦莹,孙筱璐,王东. 野生型转甲状腺素蛋白心脏淀粉样变一例[J]. *中华心血管病杂志*, 2021, 49(10):1023-1026.

QIN Y, SUN X L, WANG D. A case of wild-type transthyretin cardiac amyloidosis [J]. *Chin J Cardiol*, 2021, 49(10):1023-1026.

[12] 胡晓丽. 转甲状腺素蛋白与 2 型糖尿病、糖调节受损的关联性研究[D]. 华中科技大学, 2019.

HU X L. Correlation between transthyretin and type 2 diabetes mellitus, impaired glucose regulation [D]. *Huazhong Univ Sci Technol*, 2019.

[13] JUCHNICKA I, KUZMICKI M. Influence of miRNAs in gestational diabetes mellitus development[J]. *Ginekol Pol*, 2021, 92(8):579-582.

[14] POURHANIFEH M H, MEHRZADI S, HOSSEINZADEH A. Melatonin and regulation of miRNAs: novel targeted therapy for cancerous and noncancerous disease[J]. *Epigenomics*, 2021, 13(1):65-81.

[15] JIANG Q, LIU C, LI C P, XU S S, YAO M D, GE H M, et al. Circular RNA-ZNF532 regulates diabetes-induced retinal pericyte degeneration and vascular dysfunction[J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(7):3833-3847.

[16] 林莹,黎绮雯,林小媚. miR-15 和 miR-29a 在糖尿病视网膜病变患者血清中的表达及临床意义[J]. *中国医师杂志*, 2020, 22(3):398-402.

LIN Y, LI Q W, LIN X M. Expressions and clinical significances of miR-15 and miR-29a in serum of patients with diabetic retinopathy [J]. *J Chin Physician*, 2020, 22(3):398-402.

[17] IZUMIYA Y, HAYASHI H, ISHIKAWA H, SHIBATA A, YOSHIIYAMA M. How to identify transthyretin cardiac amyloidosis at an early stage[J]. *Intern Med*, 2021, 60(1):1-7.

[18] YIN Z, TAN R, YUAN T, CHEN S, QUAN Y. Berberine prevents diabetic retinopathy through inhibiting HIF-1 α /VEGF/ NF- κ B pathway in db/db mice [J]. *Pharmazie*, 2021, 76(4):165-171.

[19] WANG L, YANG J, XIAO X, ZHENG C, MING D. VEGF modulates the neural dynamics of hippocampal subregions in chronic global cerebral ischemia rats [J]. *Neuromolecular Med*, 2021, 23(3):416-427.

[20] NIE X, JIA W, LI X, PAN X, YIN R, LIU N, et al. FBXW7 induces apoptosis in glioblastoma cells by regulating HDAC7 [J]. *Cell Biol Int*, 2021, 45(10):2150-2158.

[21] WANG Y, SHI S, WANG Y, ZHANG X, LIU X, LI J, et al. miR-223-3p targets FBXW7 to promote epithelial-mesenchymal transition and metastasis in breast cancer[J]. *Thorac Cancer*, 2022, 13(3):474-482.

Effect of the transthyretin on high glucose-induced angiogenesis of human retinal endothelial cells via mediating the signal transducer and activator of transcription 4/miR-223-3p/F-box and WD repeat domain containing 7 pathway

JIAO Junjie, YAO Wenyan, ZHANG Qianhui, LI Xiujiao, CHANG Kun, MA Xiaoxiao, LI Xiaopeng

Department of Ophthalmology, the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China

Corresponding author: LI Xiaopeng, E-mail: lxp3029631@126.com

[Abstract] Objective To analyze the effects of the transthyretin (TTR) on high glucose (HG)-induced angiogenesis of human retinal endothelial cells (hRECs) by mediating the pathway of the signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4)/miR-223-3p/F-box and WD repeat domain containing 7 (FBXW7). **Methods** The hRECs were divided into the control group, HG group, HG + TTR group, HG + negative control (NC) mimic group, HG + miR-223-3p mimic group and HG + TTR + miR-223-3p mimic group. The targeted relationship between STAT4 and miR-223-3p was analyzed via bioinformatics, which was verified by dual-luciferase reporter assay. The TTR level in cells was detected by the enzyme-linked immunosorbent assay. The miR-223-3p level was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. Cell proliferation was detected through the Cell Counting Kit-8. The rate of angiogenesis was detected via the angiogenesis experiment. The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), TTR, STAT4 and FBXW7 was detected via Western blot. **Results**

Compared with the control group, the TTR level in hRECs increased in the HG group ($P < 0.05$). After 24-hour incubation, compared with the HG group, cell activity significantly decreased in the HG + TTR group ($P < 0.05$). Compared with the HG group [$(38.12 \pm 4.91)\%$], the rate of angiogenesis was significantly lower in the HG + TTR group [$(19.46 \pm 2.12)\%$] ($P < 0.05$). Compared with the HG + NC mimic group, expression of miR-223-3p was up-regulated, and the cell activity increased in the HG + miR-223-3p mimic group (both $P < 0.05$). Compared with the HG + miR-223-3p mimic group, expression of miR-223-3p was down-regulated, and cell activity decreased in the HG + TTR + miR-223-3p mimic group (both $P < 0.05$). Compared with the HG + NC mimic group [$(40.11 \pm 4.10)\%$], the rate of angiogenesis increased in the HG + miR-223-3p mimic group [$(61.52 \pm 6.25)\%$] ($P < 0.05$). The rate of angiogenesis decreased in the HG + TTR + miR-223-3p mimic group [$(42.24 \pm 4.33)\%$] ($P < 0.05$) compared with the HG + miR-223-3p mimic group, and had no significant difference from that in the HG + NC mimic group ($P > 0.05$). Bioinformatics analysis results showed an interaction between STAT4 and miR-223-3p promoter region. Compared with the HG group, the expression of miR-223-3p and STAT4 decreased, while the expression of FBXW7 and VEGF increased in the HG + TTR group (all $P < 0.05$). Compared with the HG + TTR group, the expression of miR-223-3p and STAT4 increased, while the expression of FBXW7 and VEGF decreased in the HG + miR-223-3p mimic group (all $P < 0.05$). Compared with the HG + miR-223-3p mimic group, the expression of miR-223-3p and STAT4 decreased, while the expression of FBXW7 and VEGF increased in the HG + TTR + miR-223-3p mimic group (all $P < 0.05$). There was no significant difference in the expression of miR-223-3p, VEGF, STAT4 or FBXW7 between the HG + TTR group and the HG + TTR + miR-223-3p mimic group (all $P > 0.05$). **Conclusion** TTR may inhibit HG-induced angiogenesis in hRECs via regulating the STAT4/miR 223 3p/FBXW7 pathway.

[Key words] transthyretin; human retinal endothelial cells; diabetic retinopathy; signal transducer and activator of transcription 4; miR-223-3p; F-box and WD repeat domain containing 7