

引文格式: 孟婷宇, 范晶, 郑柳, 杨彬彬, 丁芝祥. 二甲双胍对高糖诱导的 RF/6A 细胞增殖、迁移和血管形成的影响及其可能机制[J]. 眼科新进展, 2023, 43(5): 346-351. doi: 10. 13389/j. cnki. rao. 2023. 0070

【实验研究】

二甲双胍对高糖诱导的 RF/6A 细胞增殖、迁移和血管形成的影响及其可能机制[△]

孟婷宇 范晶 郑柳 杨彬彬 丁芝祥

【摘要】 目的 研究二甲双胍(MET)对高糖诱导的恒河猴脉络膜-视网膜内皮细胞 RF/6A 增殖、迁移和血管形成的影响,并初步探讨其作用机制。方法 RF/6A 细胞随机分为 5 组: NC 组、HG 组、HG + 15 mmol · L⁻¹ MET 组、HG + 30 mmol · L⁻¹ MET 组、HG + 45 mmol · L⁻¹ MET 组, CCK-8 法检测细胞增殖情况。将 RF/6A 细胞随机分为 4 组: NC 组和 NC + 15 mmol · L⁻¹ MET 组、NC + 30 mmol · L⁻¹ MET 组、NC + 45 mmol · L⁻¹ MET 组, CCK-8 法检测 MET 的细胞毒性。将 RF/6A 细胞随机分为 3 组: NC 组、HG 组和 HG + 15 mmol · L⁻¹ MET 组, 细胞划痕法和 Transwell 法检测细胞迁移, Matrigel 法检测细胞血管形成, RT-PCR、Western blot 检测 Hippo 信号通路的核心成分 YAP、TEAD1 的 mRNA 及蛋白表达。结果 CCK-8 法检测结果显示,与 NC 组比较, HG 组 RF/6A 细胞的增殖活性升高($P < 0.001$); 与 HG 组比较, HG + 15 mmol · L⁻¹ MET 组、HG + 30 mmol · L⁻¹ MET 组和 HG + 45 mmol · L⁻¹ MET 组 RF/6A 细胞的增殖活性均降低(均为 $P < 0.001$)。与 NC 组比较, NC + 15 mmol · L⁻¹ MET 组 RF/6A 细胞增殖活性无变化($P = 0.2273$), 因此选择 15 mmol · L⁻¹ MET 进行后续实验。细胞划痕法和 Transwell 法检测结果显示,与 NC 组比较, HG 组 RF/6A 细胞的迁移率升高、迁移个数增加(均为 $P < 0.01$); 与 HG 组比较, HG + 15 mmol · L⁻¹ MET 组 RF/6A 细胞的迁移率降低、迁移个数减少(均为 $P < 0.01$)。Matrigel 法检测结果显示,与 NC 组比较, HG 组 RF/6A 细胞的血管相对总长度增加($P < 0.05$); 与 HG 组比较, HG + 15 mmol · L⁻¹ MET 组 RF/6A 细胞的血管相对总长度减少($P < 0.01$)。RT-PCR 检测结果显示,与 NC 组比较, HG 组 RF/6A 细胞的 YAP 和 TEAD1 mRNA 相对表达量均增加(均为 $P < 0.05$); 与 HG 组比较, HG + 15 mmol · L⁻¹ MET 组 RF/6A 细胞的 YAP 和 TEAD1 mRNA 相对表达量均减少(均为 $P < 0.05$)。Western blot 检测结果显示,与 NC 组比较, HG 组 RF/6A 细胞的 YAP 和 TEAD1 蛋白相对表达量均增加(均为 $P < 0.05$); 与 HG 组比较, HG + 15 mmol · L⁻¹ MET 组 RF/6A 细胞的 YAP 和 TEAD1 蛋白相对表达量均减少(均为 $P < 0.05$)。结论 MET 可抑制高糖诱导的 RF/6A 细胞增殖、迁移和血管形成, 下调 YAP、TEAD1 的 mRNA 及蛋白表达, 推测其作用机制与 Hippo 信号通路有关。

【关键词】 糖尿病视网膜病变; 二甲双胍; RF/6A 细胞; 高糖; 细胞增殖; 细胞迁移; 血管形成; Hippo 信号通路

【中图分类号】 R774

作者简介: 孟婷宇 (ORCID: 0000-0002-7058-6786), 女, 1996 年 2 月出生, 湖北十堰人, 在读硕士研究生。研究方向: 白内障、眼底疾病、近视眼防治。E-mail: 476914880@qq.com

通信作者: 丁芝祥 (ORCID: 0000-0001-8573-8703), 男, 1974 年 3 月出生, 湖南宁乡人, 博士研究生, 教授、主任医师。研究方向: 白内障和眼底病。E-mail: 651302137@qq.com

收稿日期: 2022-10-07
修回日期: 2023-01-05
本文编辑: 盛丽娜
△基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 82160197)
作者单位: 541100 广西壮族自治区桂林市, 桂林医学院 (孟婷宇, 范晶); 541001 广西壮族自治区桂林市, 桂林医学院附属医院 (郑柳, 杨彬彬, 丁芝祥)

糖尿病视网膜病变 (DR) 是 2 型糖尿病患者常见的微血管并发症, 也是劳动年龄人群失明的主要原因之一。DR 的特征是视网膜微血管功能和完整性发生改变, 导致视网膜进行性缺血, 最终促使其新生血管形成。尽管关于 DR 新生血管形成的研究繁多, 但其潜在的分子机制仍不清楚。近年来, Hippo 信号通路 与 DR 之间的关系成为研究热点, 越来越多的证据表明, Hippo 信号通路在 DR 视网膜新生血管形成的过程中起着突出作用。

二甲双胍 (MET) 是一种廉价且安全的双胍衍生物, 被广泛用于 2 型糖尿病治疗的一线药物。MET 治疗 DR 的作用机制存在抑制血管内皮生长因子 (VEGF) 信号转导、抑制视网膜炎症反应、改善胰岛素抵抗等多种学说^[1-3]。以往许多研究证实了 MET 对 DR 患者和动物模型的有益作用^[4-5]。同时, MET 作为 Hippo 信号通路的阻断剂, 已在细胞水平证实它可通过 Hippo 信号通路起到抑制肿瘤的作用^[6]。基于此, 我们设计本实验来观察 MET 对高糖诱导的

恒河猴脉络膜-视网膜内皮细胞 RF/6A 增殖、迁移和血管形成的影响, 并分析其与 Hippo 信号通路的关系, 为开发新的 DR 治疗方法提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 RF/6A 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.1.2 主要实验试剂及仪器 特级胎牛血清、MEM (ATCC 改良) 基础培养基 (武汉普诺赛生命科技有限公司); D-无水葡萄糖、MET、组织细胞固定液 (多聚甲醛)、结晶紫染色液、RIPA 细胞裂解液、PMSF 溶液、蛋白质上样缓冲液 (北京索莱宝科技有限公司); Cell Counting Kit-8 (CCK-8) (美国 GLPBIO 公司); Matrigel (上海诺娃医药科技有限公司); MonScript™ RTIII All-in-One Mix with dsDNase、MonAmp™ 2 × Taq Mix Pro (+ Dye) (莫纳生物科技有限公司); 一步法 Western blot 专用封闭液 (北京

康为世纪生物科技有限公司)。酶标仪(南宁博美生物科技有限公司);核酸检测仪(北京凯奥科技发展有限公司);凝胶成像分析仪(上海天能科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 RF/6A 细胞置于含体积分数 10% 特级胎牛血清的 MEM(含 $1000\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ D-葡萄糖)完全培养基中,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 、饱和湿度的细胞培养箱中正常培养。每周换液 2~3 次。当细胞融合度超过 80% 时进行传代处理,传代比例为 1:2~1:4。取复苏后第 2 代至第 5 代对数生长期的 RF/6A 细胞进行消化、重悬、计数,用于实验。

1.2.2 CCK-8 法检测 MET 对高糖诱导的 RF/6A 细胞增殖活性的影响 取 RF/6A 细胞制成 $1.2 \times 10^5\text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞悬液,以每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$ 接种于 96 孔板上,在 MEM 基础培养基(无血清)中饥饿 24 h 后,NC 组细胞置于 MEM 基础培养基中培养 48 h, HG 组细胞置于高糖培养基(含 $4500\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ D-葡萄糖)中培养 48 h, HG + $15\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MET 组、HG + $30\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MET 组、HG + $45\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MET 组细胞分别置于含不同浓度($15\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $30\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $45\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) MET 的高糖培养基中培养 48 h。然后,弃掉上清液,每孔加入含体积分数 10% CCK-8 的 MEM 基础培养基 $100\text{ }\mu\text{L}$,孵育 2 h 后,使用酶标仪检测 450 nm 波长下的吸光度。

1.2.3 CCK-8 法检测 MET 对 RF/6A 细胞毒性的影响 取按 1.2.2 方法饥饿了 24 h 的 RF/6A 细胞,NC 组细胞置于 MEM 基础培养基中培养 48 h, NC + $15\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MET 组、NC + $30\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MET 组、NC + $45\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MET 组细胞分别置于含不同浓度($15\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $30\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $45\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) MET 的 MEM 基础培养基中培养 48 h。然后,弃掉上清液,每孔加入含体积分数 10% CCK-8 的 MEM 基础培养基 $100\text{ }\mu\text{L}$,孵育 2 h 后,使用酶标仪检测 450 nm 波长下的吸光度。

1.2.4 细胞划痕法检测 MET 对高糖诱导的 RF/6A 细胞迁移的影响 用记号笔在 6 孔板每孔的背面画 5 条平行的横线,每隔 $0.5\sim 1.0\text{ cm}$ 一条。取 RF/6A 细胞制成细胞浓度为 $1.5 \times 10^5\text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞悬液,以每孔 2 mL 接种于 6 孔板上。培养至 100% 铺满板底后,用 $200\text{ }\mu\text{L}$ 枪头垂直板底,垂直于背面的 5 条平行横线自上而下划痕。弃掉上清液,沿 6 孔板侧壁缓慢加入 1 mL PBS,轻摇使板底铺满 PBS 后弃掉,重复 3 次,去除划下的细胞。NC 组置于 MEM 基础培养基、HG 组置于高糖培养基、HG + $15\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MET 组置于含 $15\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MET 的高糖培养基中培养 48 h。加药后 0 h、48 h 时,在倒置生物显微镜下拍照记录。采用 ImageJ 软件测量并计算细胞迁移率。细胞迁移率 = (0 h 划痕面积 - 48 h 划痕面积)/0 h 划痕面积 $\times 100\%$ 。

1.2.5 Transwell 法检测 MET 对高糖诱导的 RF/6A 细胞迁移的影响 取 RF/6A 细胞制成细胞浓度为 $5 \times 10^4\text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞悬液,以每孔 $200\text{ }\mu\text{L}$ 接种于 Transwell 上室,在 Transwell 下室加入 $500\text{ }\mu\text{L}$ MEM 完全培养基后培养 24 h。然后,弃掉 Transwell 上室、下室中的液体。NC 组的上室加入 MEM 基础培养基 $200\text{ }\mu\text{L}$,下室加入含体积分数 20% 特级胎牛血清的 MEM 基础培养基 $500\text{ }\mu\text{L}$ 。HG 组、HG + $15\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MET 组上室分别加入高糖培养基和含 $15\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MET 的高糖培养基 $200\text{ }\mu\text{L}$,下室加入含体积分数 20% 特级胎牛血清的高糖培养基 $500\text{ }\mu\text{L}$ 。培养 48 h 后,用 $40\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多聚甲醛固定 30 min , $1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 结晶紫染色液染色 20 min 。待自然干燥后,在倒置生物显微镜下随机取 5 个视野拍照记录。采用 ImageJ 软件测量细胞迁移数,所得细胞迁移数的平均值用于统计分析。

1.2.6 Matrigel 法检测 MET 对高糖诱导的 RF/6A 细胞血管形成的影响 取 RF/6A 细胞制成细胞浓度为 $1 \times 10^5\text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞悬液,以每孔 2 mL 接种于 6 孔板上。待细胞贴壁后,弃掉上清液,NC 组细胞置于 MEM 完全培养基、HG 组细胞置于高糖完全培养基、HG + $15\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MET 组细胞置于含 $15\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MET 的高糖完全培养基中培养 48 h。Matrigel 置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜后,用 MEM 基础培养基稀释 1 倍。将 Matrigel 以每孔 $50\text{ }\mu\text{L}$ 加入 96 孔板中,孵育 60 min 使胶凝固。取培养了 48 h 的 RF/6A 细胞制成 $1.2 \times 10^5\text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞悬液,以每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$ 接种于铺好胶的 96 孔板上,孵育 6 h。然后,在倒置生物显微镜下随机取 3 个视野拍照记录。采用 ImageJ 软件测量血管的总长度,所得血管的总长度的平均值用于统计分析。

1.2.7 RT-PCR 检测 MET 对高糖诱导的 RF/6A 细胞中 YAP、TEAD1 mRNA 表达的影响 取按 1.2.6 方法培养了 48 h 的 RF/6A 细胞,用 TRIzol 法提取 RNA。使用核酸检测仪检测提取的 RNA 浓度和纯度并记录,要求样品的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 处于 $1.8\sim 2.0$ 。然后,使用 MonScript™ RTIII All-in-One Mix with dsDNase 合成第一链 cDNA。PCR 扩增反应组分为第一链 cDNA、正向引物、反向引物各 $1\text{ }\mu\text{L}$, MonAmp™ 2 \times Taq Mix Pro (+ Dye) $10\text{ }\mu\text{L}$, ddH₂O $7\text{ }\mu\text{L}$ 。反应程序为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min , $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s , $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 终延伸 5 min (变性、退火、延伸循环 25 次)。反应程序结束后,取 $5\text{ }\mu\text{L}$ PCR 反应液进行琼脂糖凝胶电泳。通过凝胶成像分析仪对其进行拍照记录。采用 ImageJ 软件检测 mRNA 表达量并以 β -actin 为内参计算 YAP、TEAD1 的 mRNA 相对表达量。YAP: 正向引物为 5'-AACACTGGAGCAGGATGCTG-3', 反向引物为 5'-GGGTTTCGAGGGACACTGTAG-3'; TEAD1: 正向引物为 5'-CAAGGTTTGAGAATGCCGATTT-3', 反向引

物为 5'-GTTGTGGCTCCGTGTTCACTATTT-3'; β -actin; 正向引物为 5'-CTCACCATGGATGATGATATCGC-3', 反向引物为 5'-CACATAGGAATCCTTCTGAC-CCA-3'。

1.2.8 Western blot 检测 MET 对高糖诱导的 RF/6A 细胞中 YAP、TEAD1 蛋白表达的影响 取按 1.2.6 方法培养了 48 h 的 RF/6A 细胞,用 RIPA 细胞裂解液和 PMSF 溶液($100\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)($100:1$)裂解细胞,再用超声波细胞破碎仪进一步裂解。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min,用 BCA 法测定蛋白浓度。取上清液,加入相应体积的蛋白质上样缓冲液(4 倍稀释)。 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 热浴 10 min 使蛋白变性, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存。SDS-PAGE 电泳、转膜,用一步法 Western 专用封闭液封闭 1 h。放入稀释好的一抗(均按 $1:1000$ 稀释)中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。 $1 \times \text{TBST}$ 充分洗膜后放入稀释好的二抗(均按 $1:2000$ 稀释)中,常温孵育 2 h。 $1 \times \text{TBST}$ 充分洗膜后化学发光。采用 ImageJ 软件检测蛋白表达量,并以 β -actin 为内参计算 YAP、TEAD1 的蛋白相对表达量。

1.3 统计学方法 采用 GraphPad Prism 8 统计学软件进行统计分析,数据以均数 \pm 标准差表示。多组间整体比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 t 检验。检验水准: $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 MET 对高糖诱导的 RF/6A 细胞增殖活性的影响 CCK-8 法检测结果显示,与 NC 组比较,HG 组 RF/6A 细胞的增殖活性升高;与 HG 组比较,HG + $15\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MET 组、HG + $30\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MET 组和 HG + $45\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MET 组 RF/6A 细胞的增殖活性降低,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.001$) (图 1)。

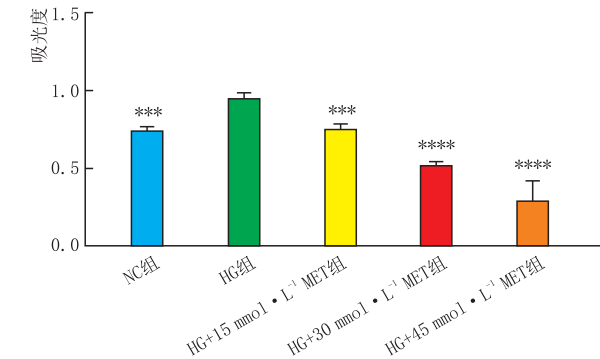


图 1 MET 对高糖诱导的 RF/6A 细胞增殖活性的影响与 HG 组比较,*** $P < 0.001$,**** $P < 0.0001$ 。

2.2 MET 对 RF/6A 细胞增殖的影响 CCK-8 法检测结果显示,与 NC 组比较,NC + $30\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MET 组和 NC + $45\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MET 组细胞增殖活性均降低,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.0001$)。而 NC 组与 NC + $15\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MET 组比较,细胞增

殖活性差异无统计学意义($P = 0.2273$),表明 $15\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MET 对 RF/6A 细胞的存活率无影响,因此选择 $15\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MET 进行后续实验(图 2)。

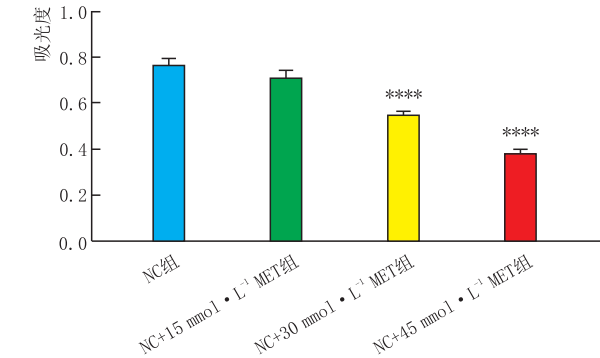


图 2 MET 对 RF/6A 细胞增殖的影响与 NC 组比较,**** $P < 0.0001$ 。

2.3 MET 对高糖诱导的 RF/6A 细胞迁移的影响 细胞划痕法检测结果显示,NC 组、HG 组、HG + $15\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MET 组 RF/6A 细胞迁移率分别为(10.790 ± 0.948)%、(23.040 ± 2.149)%、(2.823 ± 1.188)%。与 NC 组比较,HG 组 RF/6A 细胞的迁移率升高($P < 0.01$);与 HG 组比较,HG + $15\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MET 组 RF/6A 细胞的迁移率降低($P < 0.01$) (图 3)。Transwell 法检测结果显示,NC 组、HG 组、HG + $15\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MET 组 RF/6A 细胞的迁移个数分别为(359.30 ± 3.84)个、(772.80 ± 65.68)个、(278.90 ± 23.42)个。与 NC 组比较,HG 组 RF/6A 细胞的迁移个数增加($P < 0.01$);与 HG 组比较,HG + $15\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MET 组 RF/6A 细胞的迁移个数减少($P < 0.01$) (图 4)。

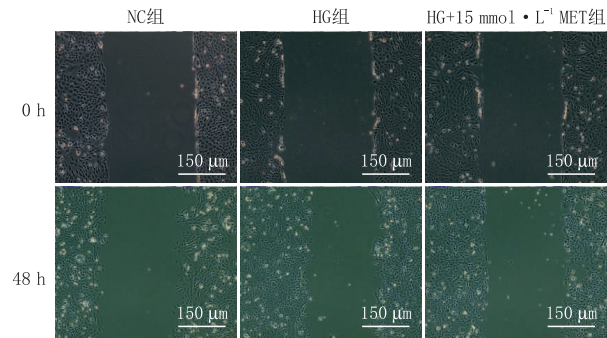


图 3 细胞划痕法检测 MET 对高糖诱导的 RF/6A 细胞迁移的影响

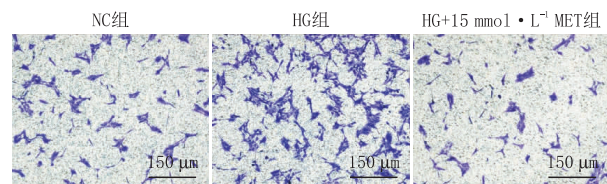


图 4 Transwell 法检测 MET 对高糖诱导的 RF/6A 细胞迁移的影响

2.4 MET 对高糖诱导的 RF/6A 细胞血管形成的影响 Matrigel 法检测结果显示,NC 组 KF/6A 细胞的血管总长度为 100.00 ± 15.79 ,HG 组、HG + 15 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MET 组 RF/6A 细胞的血管相对总长度分别为 212.80 ± 20.64 , 88.82 ± 13.92 。与 NC 组比较,HG 组 RF/6A 细胞的血管相对总长度增加($P < 0.05$);与 HG 组比较,HG + 15 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MET 组 RF/6A 细胞的血管相对总长度减少($P < 0.01$)(图 5)。

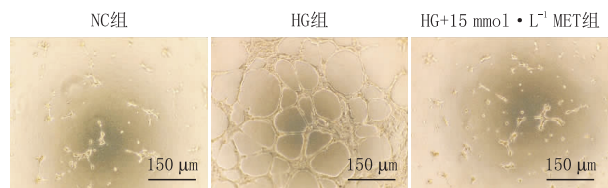


图 5 MET 对高糖诱导的 RF/6A 细胞血管形成的影响

2.5 MET 对高糖诱导的 RF/6A 细胞中 YAP、TEAD1 mRNA 表达的影响 RT-PCR 检测结果显示,与 NC 组比较,HG 组 RF/6A 细胞的 YAP、TEAD1 mRNA 相对表达量均增加(均为 $P < 0.05$);与 HG 组比较,HG + 15 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MET 组 RF/6A 细胞的 YAP、TEAD1 mRNA 相对表达量均减少(均为 $P < 0.05$)(图 6)。

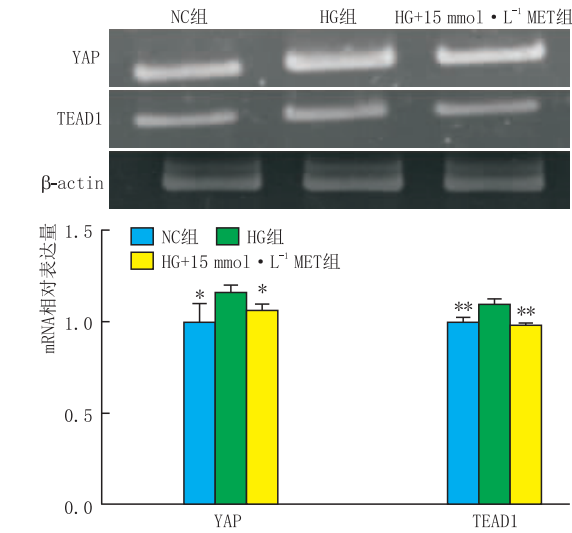


图 6 MET 对高糖诱导的 RF/6A 细胞中 YAP、TEAD1 mRNA 表达的影响 与 HG 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

2.6 MET 对高糖诱导的 RF/6A 细胞中 YAP、TEAD1 蛋白表达的影响 Western blot 法检测结果显示,与 NC 组比较,HG 组 RF/6A 细胞的 YAP、TEAD1 蛋白相对表达量均增加(均为 $P < 0.05$);与 HG 组比较,HG + 15 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MET 组 RF/6A 细胞的 YAP、TEAD1 蛋白相对表达量均减少(均为 $P < 0.05$)(图 7)。

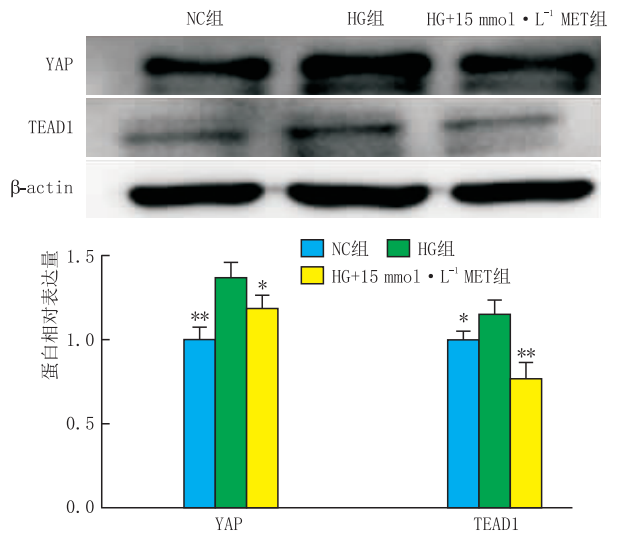


图 7 MET 对高糖诱导的 RF/6A 细胞中 YAP、TEAD1 蛋白表达的影响 与 HG 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

3 讨论

DR 是临床上十分常见的致盲性眼病。随着生活水平的改善和人口老龄化程度的加深,DR 已成为全球重大公共卫生问题。DR 新生血管发生的机制错综复杂。高血糖所导致的氧化应激、多元醇通路激活、蛋白激酶 C 活化、晚期糖基化终末产物堆积、炎症等不同程度地造成了视网膜微血管损伤,血-视网膜屏障的破坏和毛细血管无灌注导致视网膜缺血,促血管生成因子水平上调,从而驱动病理性新生血管形成^[7]。

Hippo 信号通路最初是在果蝇身上发现的,与细胞的存活、生长、增殖、迁移、凋亡,组织、器官的生长发育,肿瘤的发生发展,免疫调节等众多生物学反应息息相关,是组织生长的关键调节因子。Hippo 信号通路在哺乳动物细胞中的主要核心组分包含:激酶级联哺乳动物 STE20 样激酶 1/2(MST1/2)和大肿瘤抑制因子激酶 1/2(LATS1/2);调节分子萨尔瓦多家族 WW 结构域蛋白 1(SAV1)和 MOB 激酶激活剂 1(MOB1);以及下游效应因子 YAP/含有 PDZ 结合位点转录共激活因子(TAZ)和 TEADs。MST-LATS-YAP/TAZ-TEADs 轴被称为 Hippo 信号通路的经典轴。而越来越多的证据表明,Hippo 信号通路在 DR 的发病机制中也扮演着重要角色。在动物水平,视网膜组织中已经检测到 TEAD 和 YAP 的表达^[8-9],并且它们在视网膜血管的形成和病理过程中都起着重要作用^[10-11]。Xing 等^[12]的研究发现:高糖环境可促进 RF/6A 细胞增殖、迁移、小管形成并使 YAP 的 mRNA 和蛋白、VEGF 及 VEGF 受体表达显著增加,而 YAP 沉默则抑制细胞迁移、血管形成和 VEGF 的表达。Hao 等^[13]的研究进一步在动物水平揭示了

Hippo 信号通路与 DR 之间的关系:链脉佐菌素诱导的糖尿病 SD 大鼠的视网膜中 LATS、TAZ、TEAD 蛋白的表达水平明显升高,磷酸化 MST 和磷酸化 YAP 的表达水平明显降低。本研究发现,高糖条件可促进 RF/6A 细胞增殖、迁移、血管形成,并使细胞中 YAP、TEAD1 的 mRNA 及蛋白表达水平升高,与既往的研究结果相符。

有大量文献描述了 MET 对新生血管的影响。陈冠吉等^[14]的研究表明,MET 被初步证实能有效抑制大鼠肝癌新生血管。而在眼的相关研究中发现,MET 能抑制小鼠角膜新生血管^[15]。与文献中描述的一致,本研究中,在高糖条件下,MET 降低了 RF/6A 细胞的增殖活性,减少了 RF/6A 细胞的迁移个数、迁移率和血管的总长度。因此我们推测,MET 对 DR 的作用是通过抑制新生血管形成来实现的。

MET 作为 2 型糖尿病的一线药物,也具有抗肿瘤作用,能抑制肿瘤生长,降低癌症风险和改善预后,并具有安全性和可耐受性。MET 可通过诱导腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK),直接使 YAP 磷酸化,从而抑制 YAP 的转录活性。在细胞和动物水平,MET 已被证实可通过 AMPK 非依赖性途径减少 YAP 的核定位,抑制乳腺癌的发展^[16]。Zhang 等^[17]的研究表明,MET 可使 YAP 磷酸化后失活,抑制 YAP 从细胞质到细胞核的移位,从而抑制其转录活性,进而抑制结直肠癌细胞 PD-L1 的表达。在本研究中,高糖诱导的 RF/6A 细胞中 YAP、TEAD1 的 mRNA 及蛋白表达水平升高,MET 可以下调 YAP、TEAD1 的 mRNA 及蛋白表达水平。故我们推测,MET 对 DR 的作用机制可能与 Hippo 信号通路有关。

本研究结果显示,MET 能抑制高糖诱导的 RF/6A 细胞增殖、迁移和血管形成,下调 YAP、TEAD mRNA 及蛋白的表达,提示 MET 对高糖诱导的 RF/6A 细胞的增殖、迁移和血管形成有抑制作用,其作用机制可能与 Hippo 信号通路有关。本研究首次在体外实验水平初步探索了 MET 在高糖条件下对 RF/6A 细胞增殖、迁移、血管形成的影响及其与 Hippo 信号通路的关系,为进一步了解 Hippo 信号通路在眼底新生血管疾病中的重要作用以及 MET 用于 DR 的治疗提供了新见解。但 MET 如何通过 Hippo 信号通路抑制高糖条件下 RF/6A 细胞的增殖、迁移、血管形成尚需要进一步研究来证实。另外,本研究仅做了体外细胞模型的实验,还需要在动物模型及人体试验中进一步验证。

参考文献

- [1] JOE S G, YOON Y H, CHOI J A, KOH J Y. Anti-angiogenic effect of metformin in mouse oxygen-induced retinopathy is mediated by reducing levels of the vascular endothelial growth factor receptor Flk-1 [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119708.
- [2] HAN J, LI Y, LIU X, ZHOU T, SUN H, EDWARDS P, et al. Metformin suppresses retinal angiogenesis and inflammation in

- vitro and in vivo [J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0193031.
- [3] LEE S K, LEE J O, KIM J H, KIM S J, YOU G Y, MOON J W, et al. Metformin sensitizes insulin signaling through AMPK-mediated PTEN down-regulation in preadipocyte 3T3-L1 cells [J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(5): 1259-1267.
- [4] FAN Y P, WU C T, LIN J L, HSIUNG C A, LIU H Y, LAI J N, et al. Metformin treatment is associated with a decreased risk of nonproliferative diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus: a population-based cohort study [J]. *J Diabetes Res*, 2020, 2020: 9161039.
- [5] ALOMAR S Y, M BARAKAT B, ELDOSOKY M, ATEF H, MOHAMED A S, ELHAWARY R, et al. Protective effect of metformin on rat diabetic retinopathy involves suppression of toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B expression and glutamate excitotoxicity [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 90: 107193.
- [6] HAJIMORADI-JAVARSANI M, SAJEDIANFARD J, HAGHJOOY JAVANMARD S. The effects of metformin on the hippo pathway in the proliferation of melanoma cancer cells: a preclinical study [J]. *Arch Physiol Biochem*, 2022, 128(5): 1150-1155.
- [7] SATARI M, AGHADAVID E, MIRHOSSEINI N, ASEMI Z. The effects of microRNAs in activating neovascularization pathways in diabetic retinopathy [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(6): 9514-9521.
- [8] APPUKUTTAN B, MCFARLAND T J, DAVIES M H, ATCHANEE-YASAKUL L O, ZHANG Y, BABRA B, et al. Identification of novel alternatively spliced isoforms of RTEF-1 within human ocular vascular endothelial cells and murine retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48(8): 3775-3782.
- [9] CHOI H J, ZHANG H, PARK H, CHOI K S, LEE H W, AGRAWAL V, et al. Yes-associated protein regulates endothelial cell contact-mediated expression of angiopoietin-2 [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6943.
- [10] SHIE J L, WU G, WU J, LIU F F, LAHAM R J, OETTGEN P, et al. RTEF-1, a novel transcriptional stimulator of vascular endothelial growth factor in hypoxic endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(24): 25010-25016.
- [11] 杨军, 周佳莹, 董德坤, 刘盈. YAP 在氧诱导小鼠视网膜新生血管形成中的表达及意义 [J]. *数理医药学杂志*, 2017, 30(4): 551-552.
- [12] YANG J, ZHOU J Y, DONG D K, LIU Y. Expression and significance of YAP in oxygen-induced retinal neovascularization in mice [J]. *J Math Med*, 2017, 30(4): 551-552.
- [13] XING W, SONG Y, LI H, WANG Z, WU Y, LI C, et al. Fufang Xueshuantong protects retinal vascular endothelial cells from high glucose by targeting YAP [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 120: 109470.
- [14] HAO G M, LV T T, WU Y, WANG H L, XING W, WANG Y, et al. The Hippo signaling pathway: a potential therapeutic target is reversed by a Chinese patent drug in rats with diabetic retinopathy [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17(1): 187.
- [15] 陈冠吉, 王春燕. 二甲双胍调控 IL-6/STAT3 信号通路对大鼠肝糖血管形成的影响 [J]. *肝胆外科杂志*, 2022, 30(2): 149-153.
- [16] CHEN G J, WANG C Y. The effect of metformin-regulated IL-6/STAT3 signaling pathway on the angiogenesis of liver cancer in rats [J]. *J Hepatobiliary Sur*, 2022, 30(2): 149-153.
- [17] LIU D, WU Q, ZHU Y, LIU Y, XIE X, LI S, et al. Co-delivery of metformin and levofloxacin hydrochloride using biodegradable thermosensitive hydrogel for the treatment of corneal neovascularization [J]. *Drug Deliv*, 2019, 26(1): 522-531.
- [18] LIU J, LI J, CHEN H, WANG R, LI P, MIAO Y, et al. Metformin suppresses proliferation and invasion of drug-resistant breast cancer cells by activation of the Hippo pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(10): 5786-5796.
- [19] ZHANG J J, ZHANG Q S, LI Z Q, ZHOU J W, DU J. Metformin attenuates PD-L1 expression through activating Hippo signaling pathway in colorectal cancer cells [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(11): 6965-6976.

Effects of metformin on proliferation and migration of choroid-retinal endothelial cells as well as angiogenesis induced by high glucose and their possible mechanisms

MENG Tingyu¹, FAN Jing¹, ZHENG Liu², YANG Binbin², DING Zhixiang²

1. Guilin Medical University, Guilin 541100, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

2. Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Corresponding author: DING Zhixiang, E-mail: 651302137@qq.com

[Abstract] Objective To investigate the impact of metformin (MET) on the high glucose-induced proliferation and migration of choroid-retinal endothelial cells (RF/6A cells) and angiogenesis in rhesus monkeys and explore its mechanism preliminarily. **Methods** The RF/6A cells were randomly divided into five groups: normal control (NC) group, high glucose (HG) group, HG + 15 mmol · L⁻¹ MET group, HG + 30 mmol · L⁻¹ MET group, and HG + 45 mmol · L⁻¹ MET group, and Cell Counting Kit-8 (CCK-8) was used to detect the cell proliferation. The RF/6A cells were randomly divided into four groups: NC group, NC + 15 mmol · L⁻¹ MET group, NC + 30 mmol · L⁻¹ MET group, and NC + 45 mmol · L⁻¹ MET group, and CCK-8 was adopted to detect the cytotoxicity. The RF/6A cells were randomly divided into three groups: NC group, HG group, and HG + 15 mmol · L⁻¹ MET group, cell migration was detected by cell scratch assay and Transwell assay, angiogenesis was detected by the Matrigel method, and the messenger ribonucleic acid (mRNA) and protein expressions of yes-associated protein (YAP) and transcriptional enhanced associate domain 1 (TEAD1), core components of the Hippo signaling pathway, were measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot. **Results** The CCK-8 results showed that the proliferative activity of RF/6A cells in the HG group was higher than that in the NC group ($P < 0.001$), while that in the HG + 15 mmol · L⁻¹ MET group, HG + 30 mmol · L⁻¹ MET group and HG + 45 mmol · L⁻¹ MET group was lower than the HG group (all $P < 0.001$). As the proliferative activity of RF/6A cells in the NC + 15 mmol · L⁻¹ MET group had no difference from that in the NC group ($P = 0.2273$), the concentration of 15 mmol · L⁻¹ was selected for the follow-up experiment. The results of cell scratch assay and Transwell assay showed that the migration rate and migration number of RF/6A cells in the HG group were higher than those in the NC group (both $P < 0.01$), while those in the HG + 15 mmol · L⁻¹ MET group were lower than the HG group (both $P < 0.01$). The detection using Matrigel method showed that the total vessel length of RF/6A cells in the HG group was higher than that in the NC group ($P < 0.05$), and that in the HG + 15 mmol · L⁻¹ MET group was lower than the HG group ($P < 0.01$). The RT-PCR results showed that the mRNA expressions of YAP and TEAD1 in RF/6A cells in the HG group were higher than those in the NC group (both $P < 0.05$), while those in the HG + 15 mmol · L⁻¹ MET group were lower than the HG group (both $P < 0.05$). The Western blot results showed that the relative protein expressions of YAP and TEAD1 in RF/6A cells in the HG group were higher than those in the NC group (both $P < 0.05$), while those in the HG + 15 mmol · L⁻¹ MET group were lower than the HG group (both $P < 0.05$). **Conclusion** MET can inhibit the proliferation and migration of RF/6A cells as well as angiogenesis induced by high glucose, and down-regulate the mRNA and protein expressions of YAP and TEAD1. It is speculated that its mechanism is related to the Hippo signaling pathway.

[Key words] diabetic retinopathy; metformin; choroid-retinal endothelial cells; high glucose; cell proliferation; cell migration; angiogenesis; Hippo signaling pathway