DOI:10.16016/j.1000-5404.201911118

二甲双胍对血管内皮细胞自噬的作用

李冰玉[1],刘威远[2],林 鑫[2],赵祉颖[2],王 志[2],刘杨东[1],王 韵[2] 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院血管外科[1],400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)基础医学院细胞生物学教研室[2]

[**摘要**] **目的** 观察二甲双胍对内皮细胞自噬的影响,并探讨其可能的调控机制。**方法** 以不同浓度二甲双胍(0、2.5、5、10、20、40 mmol/L)处理人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells,HUVEC)24 h,并以 5 mmol/L 二甲双胍分别处理细胞 24、48、72 h,用 CCK-8 法检测细胞存活率;药物处理细胞分 4 组:对照组(ctl)、二甲双胍组(Met)、TGFβ1 组(TGF)、二甲双胍+TGFβ1 处理组(M+T),透射电镜观察各组细胞中自噬体的形成;免疫荧光和 Western Blot 检测自噬相关分子 LC3Ⅱ、Beclin-1 的表达。在原分组基础上进一步加入 Hippo 信号通路抑制剂 XMU-MP-1 和 Hippo 信号转录因子 YAP 阻断剂维替泊芬处理,包括 XMU-MP-1 处理组(XMU),二甲双胍+XMU-MP-1 处理组(M+X)、维替泊芬组(Ver)、维替泊芬+TGFβ1 共处理组(V+T)、维替泊芬+XMU-MP-1 共处理组(V+X),Western Blot 检测 LC3Ⅱ、YAP、pYAP 及其靶蛋白 CTGF 的表达。**结果** CCK-8 结果表明,与 0 mmol/L 组相比,10、20、40 mmol/L 二甲双胍处理 24 h,细胞存活率显著降低($P<0.01$),因此后续实验采用 5 mmol/L 二甲双胍处理 24 h;电镜、免疫荧光及 Western blot 结果表明,与 ctl 组比较,TGF 组细胞内自噬体形成增多,LC3Ⅱ、Beclin-1 的表达上调($P<0.05$),YAP 磷酸化水平降低($P<0.01$),CTGF 表达上调($P<0.01$),加入二甲双胍共处理的 M+T 组中上述变化明显被阻断;与 TGF 组比较,V+T 组 LC3Ⅱ和 CTGF 表达均下调($P<0.01$)。此外,与 ctl 组比较,XMU 组 LC3Ⅱ表达增强($P<0.01$)、YAP 磷酸化水平降低($P<0.01$)、CTGF 表达($P<0.01$)显著上调,与 TGF 组表达趋势一致;经二甲双胍处理(M+X 组),同样逆转上述变化,与 M+T 组表达趋势一致;与 XMU 组比较,加入维替泊芬的 V+X 组 LC3Ⅱ和 CTGF 的表达均下调($P<0.01$)。**结论** 二甲双胍通过阻断 YAP 信号分子的激活抑制了 TGFβ1 诱导的内皮细胞自噬,从而可能对血管起到保护作用。

[**关键词**] 血管损伤;内皮细胞;自噬;TGFβ1;二甲双胍;YAP
[**中图法分类号**] R322.12;R966;R977.15 [**文献标志码**] A

Effect of metformin on autophagy in human umbilical vein endothelial cells

LI Bingyu[1], LIU Weiyuan[2], LIN Xin[2], ZHAO Zhiying[2], WANG Zhi[2], LIU Yangdong[1], WANG Yun[2] [1]Department of Vascular Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To observe the effects of metformin on the autophagy of endothelial cells and explore the underlying mechanism. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were treated with 0, 2.5, 5, 10, 20 and 40 mmol/L metformin for 24 h or with 5 mmol/L metformin for 24, 48 and 72 h, and cell survival after the treatment was assessed using CCK-8 assay. The formation of autophagosomes in HUVECs treated with metformin and transforming growth factor-β1 (TGF-β1), alone or in

[**基金项目**] 陆军军医大学人才扶持项目(2019);重庆市教委科学技术研究项目(KJ1600208);重庆市卫计委基金项目(2016ZDXM004);国家自然科学基金面上项目(81470963)
[**通信作者**] 刘杨东,E-mail:Liuyangdong06@163.com
王 韵,E-mail:yunwang@tmmu.edu.cn

combination, was observed with transmission electron microscopy, and the expression levels of autophagy-related molecules LC3II and Beclin-1 were detected using immunofluorescence assay and Western blotting. The effects of XMU-MP-1 (an inhibitor of Hippo signaling pathway) and verteporfin (a blocker of Hippo signal transcription factor YAP) in the absence or presence of metformin or TGF-β1 on the expression levels of LC3II, YAP, pYAP and CTGF (the target protein of pYAP) were detected using Western blotting. **Results** CCK-8 assay showed that compared with the control cells, HUVECs treated with 10, 20 and 40 mmol/L metformin for 24 h exhibited significantly reduced cell survival rates (all $P<0.01$), and we therefore used 5 mmol/L metformin for 24 h in the subsequent experiments. The results of electron microscopy, immunofluorescence assay and Western blotting showed that treatment with TGF-β1 significantly increased the number of autophagosomes, enhanced the expression of LC3II and Beclin-1 ($P<0.05$), lowered the expression of pYAP ($P<0.01$), and up-regulated CTGF expression in HUVECs ($P<0.01$). These changes were significantly blocked by metformin. The expression of levels LC3II and CTGF were also inhibited in the cells by treatment with verteporfin and TGF-β1 ($P<0.01$). XMU-MP-1 showed similar effects to TGF-β1 and significantly up-regulated the expression of LC3II ($P<0.01$), decreased the expression of pYAP ($P<0.01$), and enhanced the expression of CTGF ($P<0.01$); such effects of XMU-MP-1 were also significantly blocked by metformin (all $P<0.05$). The expression levels of CTGF and LC3II were obviously down-regulated in the cells treated with both verteporfin and XMU-MP-1 ($P<0.01$). **Conclusion** Metformin may protect the veins by inhibiting TGF-β1-induced autophagy and blocking the activation of YAP signaling in the endothelial cells.

[**Key words**] vascular injury; endothelial cells; autophagy; transforming growth factor-β1; metformin; yes-associated protein

Supported by the Talent Support Program of Army Medical University (2019), the Science and Technology Research Project of Chongqing Education Commission (KJ1600208), the Foundation of Health and Family Planning Commission of Chongqing (2016ZDXM004) and the General Program of National Natural Science Foundation of China (81470963). Corresponding author: LIU Yangdong, E-mail: Liuyangdong06@163.com; WANG Yun, E-mail: yunwang@tmmu.edu.cn

慢性肾病引起的心血管并发症一直是临床上亟待解决的问题。慢性肾病患者体内高表达的转化生长因子(transformation growth factor β1, TGFβ1)促进内皮间质化,导致内皮细胞功能失调,是引起血管新生内膜增生及血管狭窄的主要因素之一[1-2]。有报道表明TGFβ家族成员在诱导内皮间质化的同时还促进了内皮细胞自噬[3]。自噬是细胞维持自身稳态的有效机制,当血管受到急性损伤时,促进平滑肌细胞自噬可以降低炎症反应,减少细胞外基质的沉积,减轻血管狭窄程度[4]。CHANG等[5]研究则发现阻止内皮细胞自噬可减少内皮细胞损伤。表明自噬在血管损伤修复过程中发挥重要作用,阻止内皮细胞自噬很有可能对血管起到保护作用。

二甲双胍(Metformin)是临床上常用降糖药。研究表明二甲双胍可促进平滑肌细胞自噬来抑制新生内膜增生,从而起到血管保护作用[6]。另有报道二甲双胍可抑制肾小管上皮细胞自噬从而保护细胞免受蛋白尿引起的氧化应激损伤[7]。但是二甲双胍对内皮细胞自噬的影响及其调控机制目前并不清楚。

YAP(yes-associated protein)是新近发现在细胞增殖、分化等调控上具有重要功能的Hippo信号通路的转录因子[8],YAP的异常调节可引起血管新生内膜增生及血管狭窄[9]。本研究观察TGFβ1和二甲双胍对内皮细胞自噬的影响,并进一步探讨YAP信号在其中的作用,以期为临床用药调控血管损伤修复提供实验参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

RPMI 1640(C11875500BT)购自美国Gibco公司,胎牛血清(SV30087.03)购自美国HyClone公司,二甲双胍(D150959)购自美国Sigma公司,TGFβ1(100-21)购自美国Peprotech公司,XMU-MP-1(S8334)购自美国selleck公司,维替泊芬(Verteporfin,HY-B0146)购自美国MedChemExpress公司,CCK-8(CK04)购自日本DOJINDO公司,ECL化学发光显影试剂盒(P0018S)购自中国碧云天公司;一抗(均为兔源):LC3 Ⅰ/Ⅱ(1271S)购自美国Cell Signaling Technology公司,Beclin-1(AP0768)、YAP(BS9920M)、pYAP(BS94007)、CTGF(BS7445)和GAPDH(AP0063)均购自美国Bioworld公司;二抗:辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(A0208)和Cy3标记山羊抗兔IgG(A0516)购

自中国碧云天公司。

1.2 细胞培养和处理

HUVEC 细胞株为本室保存,用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基在 37 ℃、5%CO_2 培养箱中传代培养,选择处于对数期的细胞进行研究。HUVEC 接种并生长到 70%~80%后按不同分组加入 5 mmol/L 二甲双胍、10 ng/mL TGFβ1、2 μmol/L XMU-MP-1、0.25 μmol/L 维替泊芬(Verteporfin)[10]进行处理。在检测 TGFβ1 和二甲双胍对自噬的影响实验中,细胞分为 4 组:对照组(ctl)、二甲双胍处理组(Met)、TGFβ1 处理组(TGF)、二甲双胍和 TGFβ1 共处理组(M+T);在对 YAP 激活情况与自噬关系的研究中,除上述 4 组外,增加 XMU-MP-1 处理组(XMU)、二甲双胍+XMU-MP-1 共处理组(M+X)、Verteporfin 处理组(Ver)、Verteporfin+TGFβ1 共处理组(V+T)、Verteporfin+XMU-MP-1 共处理组(V+X),共 9 组。其中共处理组二甲双胍或 Verteporfin 均先加 1 h 后再加入 TGFβ1 或 XMU-MP-1,24 h 后收取细胞总蛋白质或进行后续实验。

1.3 CCK-8(Cell Counting Kit-8)检测

细胞以 2 000 个/孔的密度接种于 96 孔板,分别予以不同浓度(0、2.5、5、10、20、40 mmol/L)二甲双胍处理 24 h,又以 5 mmol/L 浓度的二甲双胍分别处理 HUVEC 24、48、72 h,每组设 3 个复孔,同时设空白对照组。按试剂盒说明书加入 10 μL CCK-8 试剂孵育 3 h 后,在酶标仪 450 nm 波长下测定各孔吸光度。计算细胞存活率=(实验组-空白对照组)/(对照组-空白对照组)×100%。

1.4 透射电镜检测

待测各组细胞经药物处理后,以胰酶消化并离心,取细胞数约 8×10^5 个用 PBS 重悬再离心,吸去 PBS 后沿管壁滴入 500 μL 戊二醛进行固定,制样后于扫描电镜下观察。

1.5 细胞免疫荧光

细胞接种于盖玻片上,经相应处理后以 PBS 漂洗 2 次,室温下 4%多聚甲醛固定 20 min,0.3% TritonX-100 处理 15 min,封闭 20 min,加入兔源 LC3 Ⅰ/Ⅱ抗体(1∶100)于 4 ℃孵育过夜,PBS 漂洗 3 次后,Cy3 标记山羊抗兔 IgG(1∶1 000)室温孵育 1.5 h 后,PBS 漂洗 3 次,滴加 DAPI 室温孵育 5 min,PBS 漂洗 3 次后,封片,在荧光显微镜下观察拍照。

1.6 Western blot 检测

8×10^5 个细胞经含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液冰上裂解 5 min,刮取细胞裂解液于 EP 管中,8 000×g 离心 10 min,吸取上清,BCA 法测定蛋白浓度,以 5×SDS 上样缓冲液于 105 ℃煮沸 5 min。20 μg 蛋白样品经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,以 250 mA 恒流 1.5 h 转移到硝酸纤维素膜上,室温封闭 1 h。4 ℃下将硝酸纤维素膜分别浸入 LC3Ⅰ/Ⅱ(1∶500)、Beclin-1(1∶1 000)、YAP(1∶1 000)、pYAP(1∶1 000)、CTGF(1∶1 000)、GAPDH(1∶3 000)一抗中孵育过夜,TBST(Tris-Buffered Saline Tween-20)洗膜 5 min×3 次,浸入辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(1∶1 000),室温孵 1 h 后用 TBST 洗膜 5 min×3 次,滴加 ECL 化学发光试剂盒显影,图像使用 Adobe Photoshop 2020 软件进行灰度值定量分析。

1.7 统计学分析

实验均重复至少 3 次,计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 GraphPad Prism 8 进行统计分析并制图,采用 t 检验进行两组间比较,单因素方差分析 Dunnett-t 检验进行多组间比较。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 二甲双胍对 HUVEC 存活率的影响

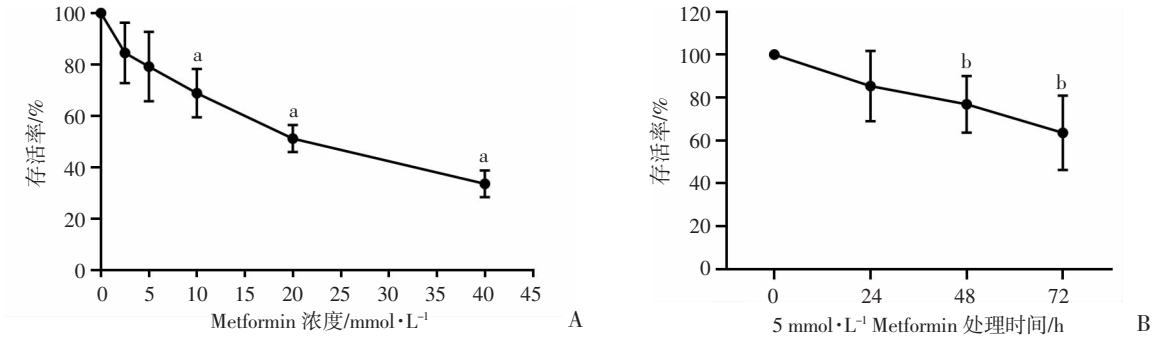
以 0、2.5、5、10、20、40 mmol/L 的二甲双胍处理 HUVEC 24 h,随后进行 CCK-8 检测。单因素方差分析结果显示,二甲双胍浓度对 HUVEC 存活率有显著影响($F=22.21$,$P<0.01$),随着二甲双胍浓度的升高,细胞存活率逐渐下降。二甲双胍浓度在 10、20、40 mmol/L 时,细胞存活率与 0 mmol/L 相比显著降低($P<0.01$,图 1A)。在此基础上,进一步检测 5 mmol/L 二甲双胍处理 24、48、72 h 时细胞存活率。结果表明,单因素方差分析提示二甲双胍处理时间对 HUVEC 存活率同样存在显著影响($F=7.542$,$P<0.01$),与 0 h 处理组相比,48、72 h 处理均显著抑制了 HUVEC 存活率($P<0.05$,图 1B)。因此,后续实验选择 5 mmol/L 二甲双胍处理 24 h。

2.2 二甲双胍抑制 TGFβ1 诱导的内皮细胞内自噬体形成

电镜观察可见,与对照组比较,TGFβ1 处理后细胞中有较多自噬体出现。经二甲双胍处理后,细胞内自噬体明显减少(图 2)。

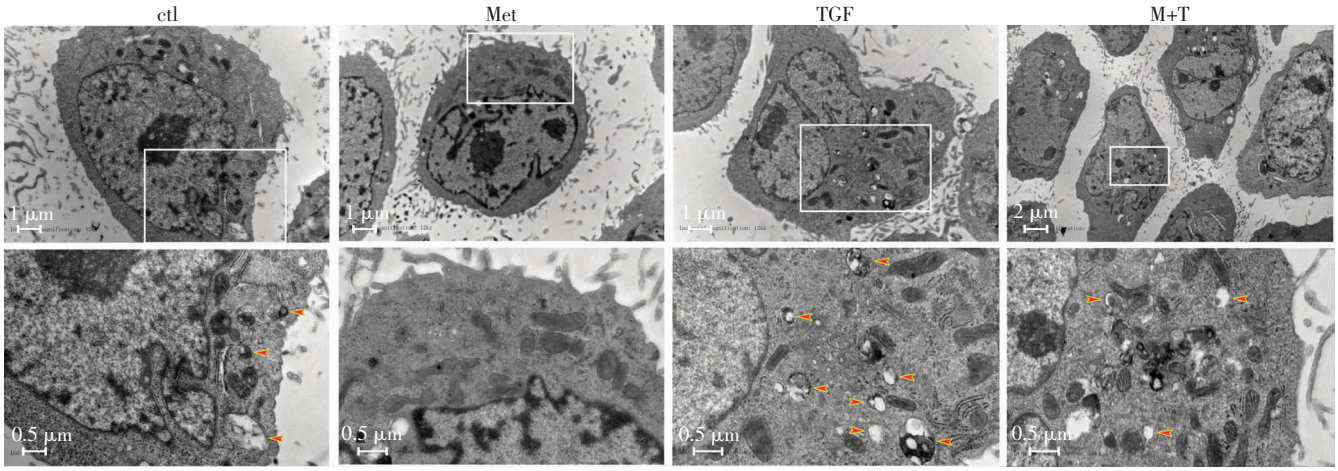
2.3 二甲双胍下调 TGFβ1 诱导的自噬相关分子表达

LC3 Ⅱ和 Beclin-1 是细胞自噬标志分子,进一步检测 HUVEC 中这两种分子的表达水平。Western blot 结果显示,TGFβ1 促进了 LC3 Ⅱ和 Beclin-1 的表达(图 3A、B),二甲双胍处理逆转了 TGFβ1 对这两种分子表达的诱导效应。免疫荧光实验与 Western Blot 结果一致(图 3C)。结果表明二甲双胍明显抑制了 TGFβ1 诱导的细胞自噬。



A:不同浓度二甲双胍处理 24 h 后 HUVEC 的存活率 a:$P<0.01$,与 0 mmol/L 组比较
B:5 mmol/L 的二甲双胍处理不同时间后 HUVEC 的存活率 b:$P<0.01$,与 0 h 组比较

图 1 二甲双胍处理 HUVEC 后细胞存活率

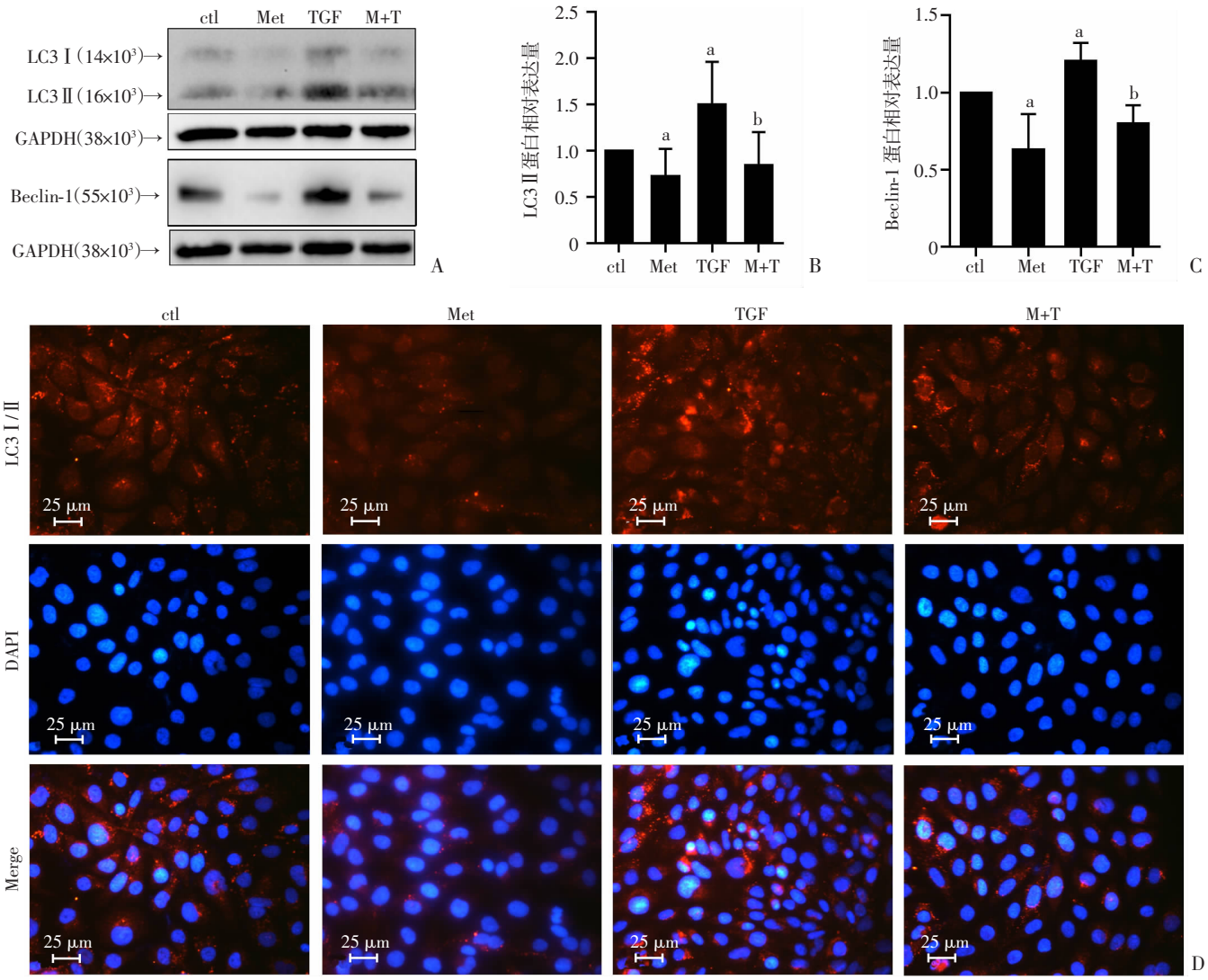


ctl:对照组;Met:5 mmol/L 二甲双胍处理组;TGF:10 ng/mL TGFβ1 处理组;M+T:二甲双胍和 TGFβ1 共处理组;下图为对应上图方框放大;箭头示自噬体

图 2 透射电镜观察 HUVEC 内自噬体

2.4 二甲双胍阻遏 TGFβ1 诱导的 YAP 激活

为了了解二甲双胍抑制 TGFβ1 诱导的自噬是否与 YAP 激活相关,采用 YAP 上游激酶 MST1/2(mammalian Ste20-like kinases 1/2)的特异性抑制剂 XMU-MP-1 和 YAP 特异性抑制剂 Verteporfin 分别处理 HUVEC,Western blot 检测内皮细胞中 LC3Ⅱ表达、YAP 磷酸化水平及其下游靶蛋白结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)的表达情况。如图 4 所示,TGFβ1 处理后内皮细胞 YAP 磷酸化水平下降($P<0.01$,图 4A、B),总蛋白水平也有所降低(图 4AC),CTGF 表达升高($P<0.01$,图 4A、D),与 YAP 上游激酶抑制剂 XMU-MP-1 处理内皮细胞后 YAP 及 CTGF 表达变化一致($P<0.01$,图 4A、B、C、D),表明 TGFβ1 阻止了 YAP 的失活。TGFβ1 和 XMU-MP-1 处理均促进了 LC3Ⅱ表达($P<0.01$,图 4A、E),提示我们 TGFβ1 很有可能通过保持 YAP 活化来促进自噬。经 YAP 特异性抑制剂 Verteporfin 处理后,TGFβ1 和 XMU-MP-1 引起的 CTGF 表达被降低($P<0.01$,图 A、D),二者所诱导的 LC3Ⅱ的表达也受到抑制($P<0.01$,图 4A、E),这些结果表明 YAP 的活化状态与自噬水平呈正相关。经二甲双胍处理后,细胞中 YAP 表达均出现降低趋势(图 4A、B),且与 TGFβ1 和 XMU-MP-1 单处理组分别比较可见,联用二甲双胍明显促进了 YAP 磷酸化($P<0.05$,图 4A、B),CTGF 表达被显著降低(分别 $P<0.01$,$P<0.05$,图 4A、D)。此外,二甲双胍也减弱了 TGFβ1 和 XMU-MP-1 诱导的 LC3Ⅱ的表达($P<0.05$,图 4A、E)。由图 4 可见,二甲双胍对 LC3Ⅱ和 CTGF 的表达变化趋势与 Verteporfin 影响一致。这些结果提示,二甲双胍很可能通过抑制 YAP 的表达并促进 YAP 失活介导了对 HUVEC 自噬的抑制作用。



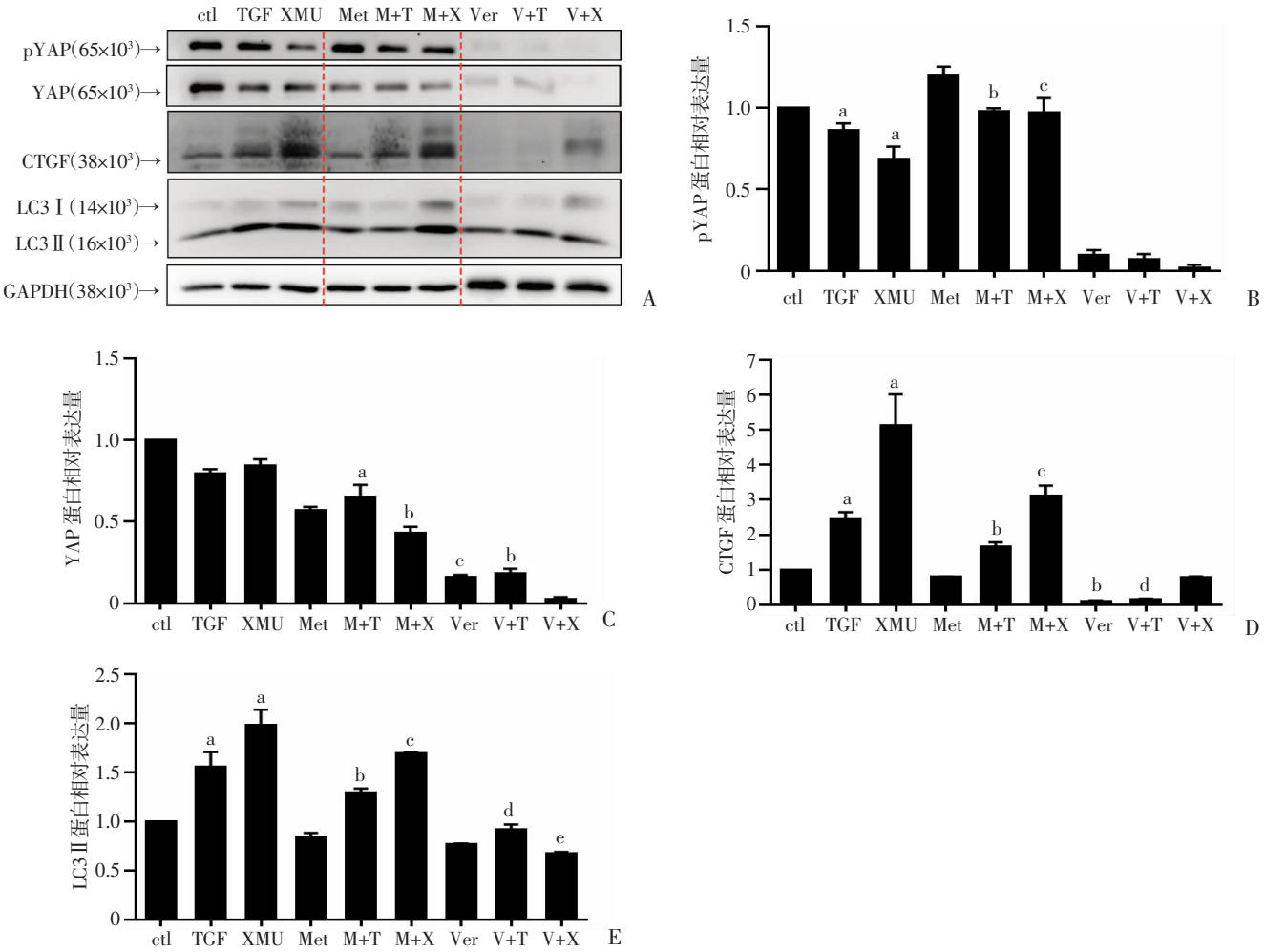
ctl:对照组;Met:5 mmol/L 二甲双胍处理组;TGF:10 ng/mL TGFβ1 处理组;M+T:二甲双胍和 TGFβ1 共处理组。A:Western Blot 检测 LC3Ⅰ/Ⅱ、Beclin-1 表达;B:LC3Ⅰ/Ⅱ表达的量化分析;C:Beclin-1 表达的量化分析;(a:$P<0.05$,与 ctl 组比较;b:$P<0.05$,与 TGF 组比较);D:免疫荧光观察 HUVEC 经处理后 LC3Ⅰ/Ⅱ的表达情况(400×)

图 3 HUVEC 经二甲双胍、TGFβ1 处理后自噬标志分子的表达检测 ($n=3$)

3 讨论

慢性肾病患者心血管疾病发病率和死亡率均高于正常人,探索对慢性肾病患者心血管并发症的有效治疗方法一直是临床的重要课题。TGFβ1 是慢性肾病患者体内高表达的细胞因子之一,我们以往也报道了 TGFβ1 会加重损伤血管的新生内膜增生,造成血管狭窄[11]。WANG 等[3]报道了 TGFβ2 在引起内皮间质化的同时促进细胞自噬。提示我们 TGFβ1 很有可能也会引起内皮细胞自噬。自噬在血管损伤修复过程中有着重要作用,阻止内皮细胞自噬很有可能对血管起到保护作用。本研究显示,二甲双胍可通过阻止 Hippo 信号通路下游转录因子 YAP 的激活抑制 TGFβ1 诱导的内皮细胞自噬。

除了降低血糖的功能外,二甲双胍在抗衰老、抗肿瘤方面的新功能逐渐被认识[12]。二甲双胍对心血管是否具有保护作用也得到了越来越多的关注。LU 等[6]研究报道二甲双胍可促进球囊损伤颈动脉处平滑肌细胞自噬,抑制新生内膜增生,阻止血管狭窄,从而起到血管保护作用。CHANG 等[5]关于静脉移植模型的研究发现,利用 3-甲基腺嘌呤阻止内皮细胞自噬,可减轻血管新生内膜增生和血管狭窄程度。本研究发现二甲双胍可抑制 TGFβ1 诱导的 HUVEC 自噬,提示二甲双胍很有可能通过阻止内皮细胞自噬来发挥血管保护功能。



ctl:对照组;TGF:10 ng/mL TGFβ1 处理组;XMU:2 μmol/L XMU-MP-1 处理组;Met:5 mmol/L 二甲双胍处理组;M+T:二甲双胍和 TGFβ1 共处理组;M+X:二甲双胍和 XMU-MP-1 共处理组;Ver:0.25 μmol/L 维替泊芬处理组;V+T:维替泊芬和 TGFβ1 共处理组;V+X:维替泊芬和 XMU-MP-1 共处理组

A:Western blot 检测 YAP 相关分子及 LC3Ⅰ/Ⅱ表达;B:pYAP 蛋白表达的量化分析; a:$P<0.01$,与 ctl 组比较;b:$P<0.05$,与 TGF 组比较;c:$P<0.05$,与 XMU 组比较;C:YAP 蛋白表达的量化分析; a:$P<0.05$,与 TGF 组比较; b:$P<0.01$,与 XMU 组比较;c:$P<0.01$,与 TGF 组比较;D:CTGF 蛋白表达的量化分析; a:$P<0.01$,与 ctl 组比较;b:$P<0.01$,与 TGF 组比较;c:$P<0.05$,与 XMU 组比较;d:$P<0.01$,与 XMU 组比较;E:LC3 Ⅱ蛋白表达的量化分析; a:$P<0.01$,与 ctl 组比较;b:$P<0.05$,与 TGF 组比较; c:$P<0.05$,与 XMU 组比较;d:$P<0.01$,与 TGF 组比较; e:$P<0.01$,与 XMU 组比较

图 4 HUVEC 的 YAP 激活情况和 LC3Ⅱ表达检测 ($n=3$)

内皮细胞内 Hippo 信号通路转录因子 YAP 激活引起自噬[13],因此我们推测二甲双胍、TGFβ1 对自噬的调控可能与 YAP 激活相关。Hippo 信号通路参与了心血管系统的发育和生理功能的调节[14]。当 Hippo 通路被激活时,上游的 MST1/2 等激酶磷酸化,继而磷酸化 YAP 使其失活。未磷酸化的 YAP 可由胞质转位入核,发挥转录因子作用,调节基因表达[15]。CTGF 是 YAP 激活后的靶基因之一[16],其表达水平可反映 YAP 激活并入核发挥作用的程度。本研究利用两种对 YAP 特异性调控的药物 XMU-MP-1 和 Verteporfin 分别处理细胞,检测 TGFβ1 引起的自噬是否与 YAP 信号相关。XMU-MP-1 可选择性地抑制 MST1/2 激酶,阻止 YAP 磷酸化,从而促进 YAP 转位入核发挥作用[17]。Verteporfin 特异性阻断 YAP-TEAD 相互作用,起到抑制 YAP 的作用[18]。从图 4 可见,TGFβ1 抑制 YAP 磷酸化,可阻止 YAP 失活并促进细胞自噬,与 XMU-MP-1 的作用一致;而二甲双胍单独处理或与 TGFβ1 联用的情况下,与相应对照组或 TGFβ1 处理组相比,均可促进 YAP 磷酸化、阻遏 YAP 的作用并抑制 LC3Ⅱ表达,与 Verteporfin 的作用趋势一致。这些结

果表明二甲双胍对 HUVEC 自噬的抑制很有可能是通过阻止 YAP 激活实现的。

综上所述,本研究发现了二甲双胍可通过阻止 YAP 的激活抑制 TGFβ1 诱导的内皮细胞自噬。二甲双胍是否能够通过调控内皮细胞自噬,抑制损伤血管新生内膜增生,进而对血管起到保护作用还需要进一步在体实验验证。

参考文献:

[1] BRAHMBHATT A, REMUZZI A, FRANZONI M, *et al*. The molecular mechanisms of hemodialysis vascular access failure [J]. Kidney Int, 2016, 89(2): 303-316. DOI: 10.1016/j.kint.2015.12.019.

[2] TIAN D Y, JIN X R, ZENG X, *et al*. Notch signaling in endothelial cells: is it the therapeutic target for vascular neointimal hyperplasia? [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(8): 1615. DOI: 10.3390/ijms18081615.

[3] WANG J, FENG Y, WANG Y, *et al*. Autophagy regulates Endothelial-Mesenchymal transition by decreasing the phosphorylation level of Smad3[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 487(3): 740-747. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.04.130.

[4] LUO X, YANG D, WU W, *et al*. Critical role of histone demethylase Jumonji domain-containing protein 3 in the regulation of neointima formation following vascular injury[J]. Cardiovasc Res, 2018, 114(14): 1894-1906. DOI: 10.1093/cvr/cvy176.

[5] CHANG Y J, HUANG H C, HSUEH Y Y, *et al*. Role of excessive autophagy induced by mechanical overload in vein graft neointima formation: prediction and prevention[J]. Sci Rep, 2016, 6: 22147. DOI: 10.1038/srep22147.

[6] LU J, JI J, MENG H, *et al*. The protective effect and underlying mechanism of metformin on neointima formation in fructose-induced insulin resistant rats[J]. Cardiovasc Diabetol, 2013, 12: 58. DOI: 10.1186/1475-2840-12-58.

[7] ALLOUCH S, MUNUSAMY S. Metformin attenuates albumin-induced alterations in renal tubular cells in vitro[J]. J Cell Physiol, 2017, 232(12): 3652-3663. DOI: 10.1002/jcp.25838.

[8] MENG Z, MOROISHI T, GUAN K L. Mechanisms of Hippo pathway regulation[J]. Genes Develop, 2016, 30(1): 1-17. DOI: 10.1101/gad.274027.115.

[9] YU Q, LI W, JIN R, *et al*. PI3Kγ (phosphoinositide 3-kinase γ) regulates vascular smooth muscle cell phenotypic modulation and neointimal formation through CREB (cyclic AMP-response element binding protein)/YAP (yes-associated protein) signaling[J]. Arterioscl, Throm Vasc Biol, 2019, 39(3): e91-e105. DOI: 10.1161/ATVBAHA.118.312212.

[10] MORISHITA T, HAYAKAWA F, SUGIMOTO K, *et al*. The photosensitizer verteporfin has light-independent anti-leukemic activity for Ph-positive acute lymphoblastic leukemia and synergistically works with dasatinib[J]. Oncotarget, 2016, 7(35): 56241-56252. DOI: 10.18632/oncotarget.11025.

[11] WANG Y, LIANG A, LUO J, *et al*. Blocking Notch in endothelial cells prevents arteriovenous fistula failure despite CKD[J]. J Am Soc Nephrol, 2014, 25(4): 773-783. DOI: 10.1681/ASN.2013050490.

[12] PODHORECKA M, IBANEZ B, DMOSZYŃSKA A. Metformin—its potential anti-cancer and anti-aging effects[J]. Postepy Hig Med Dosw, 2017, 71: 170-175. DOI: 10.5604/01.3001.0010.3801.

[13] YAO L, HE J, LI B, *et al*. Regulation of YAP by mammalian target of rapamycin complex 1 in endothelial cells controls blood pressure through COX-2/mPGES-1/PGE cascade [J]. Hypertension, 2019, 74(4): 936-946. DOI: 10.1161/hypertensionaha.119.12834.

[14] ZHOU W, ZHAO M. How Hippo signaling pathway modulates cardiovascular development and diseases[J]. J Immunol Res, 2018, 2018: 3696914-3696914. DOI: 10.1155/2018/3696914.

[15] BASU-ROY U, BAYIN N S, RATTANAKORN K, *et al*. Sox2 antagonizes the Hippo pathway to maintain stemness in cancer cells[J]. Nat Commun, 2015, 6: 6411. DOI: 10.1038/ncomms7411.

[16] MA R, REN J M, LI P, *et al*. Activated YAP causes renal damage of type 2 diabetic nephropathy[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(2): 755-763. DOI: 10.26355/eurrev_201901_16890.

[17] FAN F, HE Z, KONG LL, *et al*. Pharmacological targeting of kinases MST1 and MST2 augments tissue repair and regeneration[J]. Sci Transl Med, 2016, 8(352): 352ra108. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf2304.

[18] ZHANG L, HE X, LIU X, *et al*. Single-cell transcriptomics in medulloblastoma reveals tumor-initiating progenitors and oncogenic cascades during tumorigenesis and relapse[J]. Cancer Cell, 2019, 36(3): 302-318 e307. DOI: 10.1016/j.ccell.2019.07.009.

(收稿:2019-11-14;修回:2020-02-09)

(编辑 汪勤俭)