DOI:10.16016/j.2097-0927.202403058

Gpr124 对高糖环境下视网膜微血管内皮细胞增殖、迁移和血管形成的调控作用

王玉雯,李芙蓉,袁容娣 400037 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第二附属医院眼科

[摘要] **目的** 研究高糖环境下人视网膜微血管内皮细胞(human retinal microvascular endothelial cell,HRMEC)中 G 蛋白偶联受体 124(Gpr124)表达的变化,以及干扰 Gpr124 对 HRMEC 的调控作用。**方法** 免疫荧光观察 Gpr124 在 HRMEC 中的表达;高糖刺激 HRMEC,将细胞分为空白组和高糖组,CCK-8、EdU 检测细胞活力与增殖情况;病毒抑制 Gpr124 表达后,将细胞分为空白对照组、高糖对照组、高糖+shRNA 组以及高糖+Gpr124 shRNA 组,划痕实验评估细胞迁移,基质凝胶评估细胞小管形成能力。Western blot 检测 Gpr124、VEGFA、MMP9 和 β-catenin 相对蛋白表达水平。**结果** 相较于空白组,HRMEC 在高糖组中显示出显著提升的细胞活力和增殖细胞数($P<0.01$)。高糖环境下,Gpr124、VEGFA 以及 MMP9 的表达水平也显著增加($P<0.01$)。同时,在各个时间点,高糖对照组的迁移面积以及体外血管形成面积和管径长度均显著高于空白对照组($P<0.01$)。然而,在敲低 Gpr124 的表达后,高糖+Gpr124 shRNA 组的 HRMEC 在迁移和体外血管形成能力上相较于高糖+shRNA 组有显著的降低($P<0.01$),并且高糖+Gpr124 shRNA 组相比于高糖+shRNA 组 VEGFA、MMP9 以及 β-catenin 蛋白表达减少($P<0.01$)。**结论** Gpr124 能够调控高糖环境下 HRMEC 的增殖、迁移以及管形成能力,并且还可以抑制 VEGFA 和 MMP9 的过度表达,这一影响可能是通过调节 Wnt/β-catenin 经典通路来实现的。

[关键词] 糖尿病视网膜病变;G 蛋白偶联受体 124;血管内皮细胞;细胞迁移实验;血管形成
[中图法分类号] R322.13; R363.13; R774.1 [文献标志码] A

Regulatory effect of Gpr124 on proliferation, migration and angiogenesis of retinal microvascular endothelial cells under high-glucose condition

WANG Yuwen, LI Furong, YUAN Rongdi Department of Ophthalmology, Second Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400037, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the changes in G protein-coupled receptor 124 (Gpr124) expression in human retinal microvascular endothelial cells (HRMEC) under high-glucose condition and the regulatory effect of Gpr124 interference on HRMEC. **Methods** Immunofluorescence assay was used to observe the expression of Gpr124 in HRMEC. The cells were divided into a blank group and a high glucose group. CCK-8 assay and EdU cell proliferation assay were used to detect cell viability and proliferation, respectively. The Gpr124 expression was knocked down by transducting lentiviral virus carrying shRNA targeting Gpr124. Thus, the cells were divided into a blank control group, a high glucose control group, a high glucose+shRNA group, and a high glucose+Gpr124 shRNA group. Cell scratch test was performed to evaluate cell migration, and Matrigel plug assay was employed to assess the cell tubule formation. Western blotting was applied to detect the protein levels of Gpr124, VEGFA, MMP9, and β-catenin. **Results** The HRMEC from the high glucose group showed enhanced cell viability and increased number of proliferating cells compared to the cells of the blank group ($P<0.01$). High glucose treatment also induced increased expression

[通信作者] 袁容娣,E-mail: yuanrongdi@126.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

levels of Gpr124, VEGFA and MMP9 ($P<0.01$), and larger migratory area and *in vitro* angiogenic area as well as longer tube diameter at all time points when compared with the conditions in the blank control group ($P<0.01$). However, knockdown of Gpr124 resulted in a significant decrease in HRMEC migration and *in vitro* angiogenic capacity, accompanied by decreases in protein expression of VEGFA, MMP9 and β-catenin ($P<0.01$). **Conclusion** Gpr124 can regulate the proliferation, migration, and tube formation ability of HRMEC under high-glucose condition, and also inhibit the overexpression of VEGFA and MMP9, which may be through regulating the classical Wnt/β-catenin pathway.

[**Key words**] diabetic retinopathy; G protein-coupled receptor 124; vascular endothelial cells; cell migration assay; angiogenesis

Corresponding author: YUAN Rongdi, E-mail: yuanrongdi@126.com

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy,DR)是常见的致盲性眼病,它最典型的病理变化是视网膜微血管病变[1-2]。持续的高血糖状态通过复杂的病理生理机制损伤内皮细胞,导致视网膜严重缺血缺氧,多种调控血管生成的因子上调,血管内皮细胞的增殖、迁移、出芽,进一步引起新生血管的形成。新生血管如果不及时治疗,可能会导致新生血管性青光眼、玻璃体出血以及牵引性视网膜脱落等严重并发症,最终引起严重的视力丧失[3]。目前,针对血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)的抗 VEGF 治疗已成为预防 DR 进展、延缓新生血管生成的主要治疗手段[4]。尽管这种治疗方法在改善 DR 严重程度方面取得了显著成效,但仍存在一定的局限性。例如药物半衰期有限增加了患者的治疗负担;部分患者可能对抗 VEGF 治疗产生耐药性,且治疗后可能出现局部和全身不良反应[5]。因此,积极寻找新的靶分子,并开发出更为有效的药物来控制病理性新生血管的形成,对于延缓 DR 的进展、保护患者的视觉功能具有至关重要的意义。

Gpr124 是 GPCR 黏附家族中的一员,具有 7 次跨膜结构膜蛋白。该蛋白最初在人类结直肠恶性肿瘤新生血管的内皮细胞中被发现,因此也被称为肿瘤内皮标记物 5(tumor endothelial marker 5,TEM5)[6]。研究发现,Gpr124 在推动肿瘤血管生成中扮演着关键角色,通过抑制其蛋白表达,能够有效地遏制肿瘤的生长[7]。进一步的研究揭示,Gpr124 在大脑血管的内皮细胞中广泛表达,并且在血管生成过程中扮演了重要角色。在小鼠的发育阶段,Gpr124 表达上调并参与脑血管新生的精细调控。此外,内皮细胞中 Gpr124 的缺失会进一步影响脑血管性疾病中内皮细胞间的紧密连接[8-9]。这些结果表明,Gpr124 对维持 CNS 血管病理生理至关重要,调控其表达对 CNS 血管疾病研究有重要意义。尽管目前关于 Gpr124 在视网膜以及视网膜血管中的研究几乎为空白,考虑到视网膜与脑在发育过程中的相似性,即由同源的祖细胞发育分化而来,猜测 Gpr124 在视网膜血管内皮细胞中也可能存在表达并且发挥重要作用。

本研究通过将人视网膜微血管内皮细胞(human retinal microvascular endothelial cell,HRMEC)暴露于高糖环境,模拟了糖尿病视网膜病变状态,明确 Gpr124 在高糖环境下对 HRMEC 迁移和管腔形成的调控作用及可能的分子机制,为理解 Gpr124 在 DR 中如何调控内皮细胞的功能提供了理论依据,同时也为探索 DR 的创新治疗手段开辟了新的视角和途径。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

D-葡萄糖(G8150)、组织细胞固定液(P1110)购自索莱宝公司;PAGE 凝胶(1610183)购自 Bio-Rad 公司;Isolectin GS-IB4 Alexa Fluor™ 594(I21413)、RIPA 裂解缓冲液(89900)购自赛默飞世尔科技公司;CCK-8 试剂盒(HY-K0301)购自 MCE 公司;EdU 试剂盒(C6017M)购自上海百赛生物。细胞培养方面,内皮细胞培养基 ECM(1001)购自 ScienCell 公司;基质凝胶(0827045)购自上海 ABW 生物科技公司;rhVEGF(ab9571)购自 Abcam 公司。在抗体方面,兔源 anti-Gpr124(ab199817)、兔源 anti-GAPDH(ab181602)购自 Abcam 公司;鼠源 anti-CD31(sc-376764)购自 Santa 公司;兔源 anti-MMP9(A11147)购自 ABclonal 公司;鼠源 anti-VEGFA(#8945)购自 Proteintech 公司。在二抗方面,HRP 标记的抗鼠 IgG(G-21040)和抗兔 IgG(31460)购自 Invitrogen 公司;Alexa488 标记的抗兔 IgG(4412S)和 Alexa594 标记的抗鼠 IgG(8890S)购自 CST 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及传代 原代人视网膜微血管内皮细胞(HRMEC)细胞由丰晖生物公司(中国湖南,产品编号 FHHUM-CELL-0012)提供,在 ECM 培养基、37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。细胞覆盖 60%~70%时,使用 0.25%胰酶消化细胞,按照 1∶3比例传代。

1.2.2 CCK-8 实验 调整 HRMEC 细胞悬液浓度为 1×10^4/mL,接种至 48 孔板,分别加入不同浓度的葡萄糖(0、25、50、100、200 mmol/L)作为处理组,另设置不同浓度 rhVEGF(0、1、2、4、8 ng/mL)作为阳性对照组,每组设 4 个重复。基于课题组以往的实践经验[10],设置葡萄糖对 HRMEC 的适宜刺激时间为 16 h。处理完成后,去除原培养基,添加 CCK-8 与培养基的 1∶10 混合液,37 ℃、5% CO_2 中静置 2 h。之后用酶标仪在 450 nm 波长下测吸光度,获取光密度值。统计并计算各处理组光密度值与对照组光密度值的比值,即细胞活力=处理组光密度值/对照组光密度值。

1.2.3 病毒转染 慢病毒载体(LV)Gpr124 shRNA 以及空载病毒 shRNA(具有绿色荧光蛋白[GFP]标签)由汉恒生物公司(中国上海)构建,靶序列如下:ACCCTGCTCTTGAGCAATAAC。HRMEC 传代于 6 孔板,生长至 60%~70%进行病毒转染。转染前换 2 mL 新鲜 ECM 培养基,病毒接种浓度设为 5 μL/mL,助染剂 1 μL/mL。感染后 37 ℃、5% CO_2 培养 12 h 换液。48 h 后在荧光共聚焦显微镜下观察转染效果,转染率超 80%则继续实验。

1.2.4 5-乙炔-2-脱氧尿苷荧光标记(EdU)增殖实验 HRMEC 制成浓度为 1×10^4/mL 细胞悬液,接种至 24 孔板,分为空白组和高糖组(加 25 mmol/L 葡萄糖),各 4 个重复孔,37 ℃、5% CO_2 孵育 16 h。随后,去培养基,加含 50 μmol/L EdU 的 ECM 培养基,再孵育 2 h。4%多聚甲醛固定细胞 20 min,0.1% Triton 打孔 20 min,Click-iT 工作液孵育 30min,Hoechst 3342 染核 30 min。完成上述步骤后,共聚焦荧光显微镜测量和分析 EdU 阳性细胞指数,并统计分析:

细胞增殖数=每个视野下增殖细胞的数量;

细胞增殖率(%)=(每个视野下增殖细胞的数量/显微镜每个视野下总细胞核数)×100%。

1.2.5 划痕迁移实验 将细胞分为 4 组:空白对照组、高糖对照组、高糖+shRNA 组和高糖+Gpr124 shRNA 组。HRMEC 细胞制成 1×10^5/mL 悬液,接种在 6 孔板,每组 3 个复孔,37 ℃、5% CO_2 培养 24 h 至细胞覆盖孔底。接下来,在超净工作台上,用灭菌枪头划 3 条平行线,确认划痕中无细胞。然后,更换新 ECM 培养基;同时,向高糖组培养基中加入 25 mmol/L 的葡萄糖,静置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。在划痕后的第 12、24 h,使用倒置显微镜观察并拍摄细胞的迁移情况。Image J 软件测量未迁移部分,量化迁移能力。

$S_{迁移区域}=S_{0\ h空白区域}-S_{16/24\ h空白区域}$;

$S_{迁移率}=S_{迁移面积}/S_{0\ h空白面积}\times100\%$。

1.2.6 基质胶小管形成实验 实验前将 Matrigel 基质胶移至冰盒 4 ℃融化并预冷枪头。细胞分组同迁移实验,接种在 6 孔板中。在高糖组培养基中预先加入 25 mmol/L 的葡萄糖,37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育 12 h。第 2 天,基质胶与 DMEM(无血清)按 2∶1比例稀释,铺 48 孔板底,每孔 300 μL,置于培养箱中等待凝固 40 min。细胞重悬并调整浓度为 3×10^4 个/mL(高糖组的重悬液中加入 25 mmol/L 葡萄糖),各组重悬液滴加到基质胶上,等待 4 h。倒置显微镜下随机拍摄 5 个视野的图片,使用 Image J-Angiogenesis Analyzer 分析小管数据。

1.2.7 免疫荧光染色 将细胞传代至孔板,孔板中放入细胞爬片。细胞生长至爬片后,用 4%多聚甲醛固定细胞 30 min,0.3%Triton 溶液打孔 30min,山羊血清封闭 30 min;加入一抗抗体,置于 4 ℃冰箱过夜;去除一抗后加入荧光二抗,置于 37 ℃恒温箱中避光等待 1.5 h;完成二抗孵育后,滴加 DAPI 溶液室温染核 8 min;将爬片转移至载玻片上,滴加抗荧光淬灭剂后封片。共聚焦显微镜下观察并随机选取 5 个区域拍照。

1.2.8 Western blot 实验 细胞分组接种于 6 孔板,调整浓度为 2×10^5/mL,每组 6 复孔,高糖组培养基中加 25 mmol/L 葡萄糖,37 ℃、5% CO_2 孵育 16 h。将细胞转移至 EP 管,加 150 μL RIPA 裂解液(含蛋白酶抑制剂)提取蛋白,BCA 法测蛋白浓度。将样品加样至两配制好的胶中,初始上样量为 40 μg。剪裁凝胶大小的 PVDF 膜,与胶固定在夹板中,冰水浴转膜 140 min。膜置于快速封闭液中封闭 1 h,4 ℃一抗孵育过夜。次日洗膜后加二抗孵育 1.5 h。使用免疫印迹发光液并在高分子凝胶成像分析仪下曝光条带。实验重复 3 次,用 Image J 分析灰度值,以 GAPDH 为内参,统计对比视网膜组织中蛋白的相对蛋白含量,并将对照组数据设定为参照(即与对照组的比值)。

1.3 统计学分析

使用 GraphPad Prism(9.0 版;GraphPad Software,美国加利福尼亚州)进行统计,每个实验至少重复 3 次,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。符合正态分布的 2 组间比较

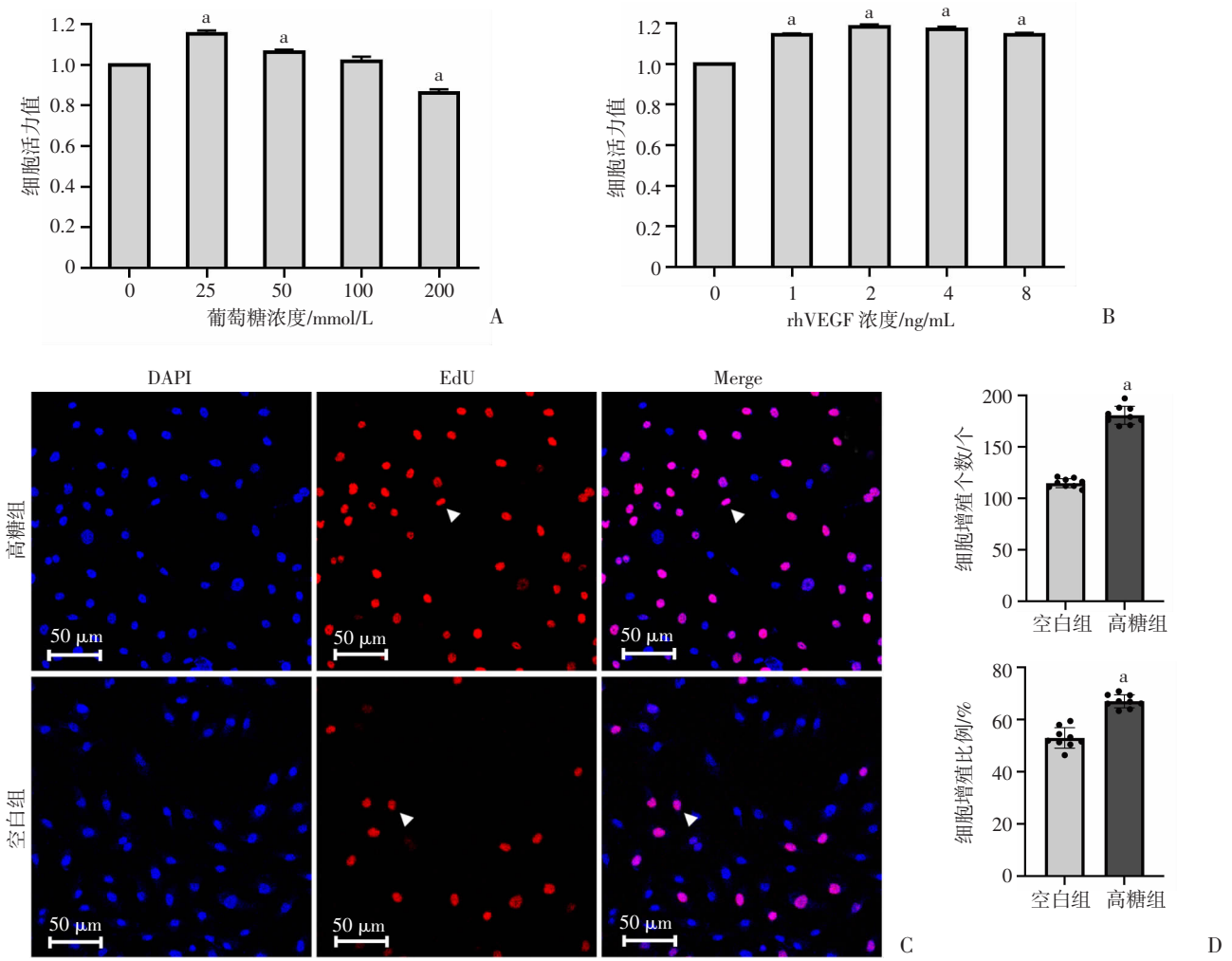
采用独立样本 t 检验;多重比较采用单因素方差分析,各组间进行 Dunnett's 多重比较检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HRMEC 在高糖刺激下细胞活力提高、增殖增加

经过对 HRMEC 细胞的体外培养并进行 CCK-8 实验,发现当加入 25 和 50 mmol/L 浓度的葡萄糖时,细胞的活力显著提升($P<0.01$,图 1A)。然而,当葡萄糖浓度高达 200 mmol/L 时,细胞死亡率则呈现增加趋势($P<0.01$)。同时,使用 rhVEGF 作为阳性对照,将 1~8 ng/mL 浓度的 rhVEGF 添加到培养基中,结果也观察到了类似的细胞活力增强效果($P<0.01$,图 1B)。因此选择 25 mmol/L 浓度的葡萄糖作为适宜的刺激浓度进行后续实验。

通过 EdU 实验进一步探究,在加入 25 mmol/L 浓度的葡萄糖并刺激细胞 16 h 后,与空白组相比,高糖组的 HRMEC 细胞增殖数在平均单个视野下增加了约 40.33 个,平均增殖率也相应提升了 17.25%($P<0.01$,图 1C、D)。



A:CCK-8 实验检测不同浓度葡萄糖对细胞活力的影响;B:CCK-8 实验检测不同浓度 rhVEGF 对细胞活力的影响;a:$P<0.01$,与对照(0ng/mL)比较;C:EdU 检测 HRMEC 的增殖情况,细胞核呈蓝色,增殖细胞呈红色,箭头示增殖的细胞;D:定量分析 HRMEC 的细胞增殖数和细胞增殖率;a:$P<0.01$,与空白组比较

图 1 高糖刺激对 HRMEC 的影响

2.2 高糖刺激上调 HRMEC 中 Gpr124、VEGFA、MMP9 的表达

经过对 HRMEC 进行免疫荧光染色实验,观察到 Gpr124 在细胞膜和细胞质中均有表达(图 2A)。此外,通过 Western blot 分析,进一步发现在高糖刺激下,高糖组 HRMEC 中的 Gpr124 相对蛋白表达量相较于空白组显著上升($P<0.01$,图 2B)。与此同时,高糖组中 VEGFA 和 MMP9 的相对蛋白表达量相对于空白组也有上调($P<0.01$,图 2C、D)。

2.3 抑制 Gpr124 表达后 HRMEC 的迁移被抑制

在病毒转染后的 48 h,观察到 GFP 荧光主要聚集在细胞核内。在每个显微镜观察视野中,表达 GFP 荧光的细胞核占总数的比例高达 80%以上(图 3A)。通过 Western blot 实验对比了高糖+shRNA 组与高糖+Gpr124 shRNA 组的蛋白表达情况。结果显示,在高糖+Gpr124 shRNA 组中,Gpr124 蛋白的表达水平相对于高糖组显著降低($P<0.01$,图 3B),证明了病毒能够有效抑制目标蛋白 Gpr124 的表达。

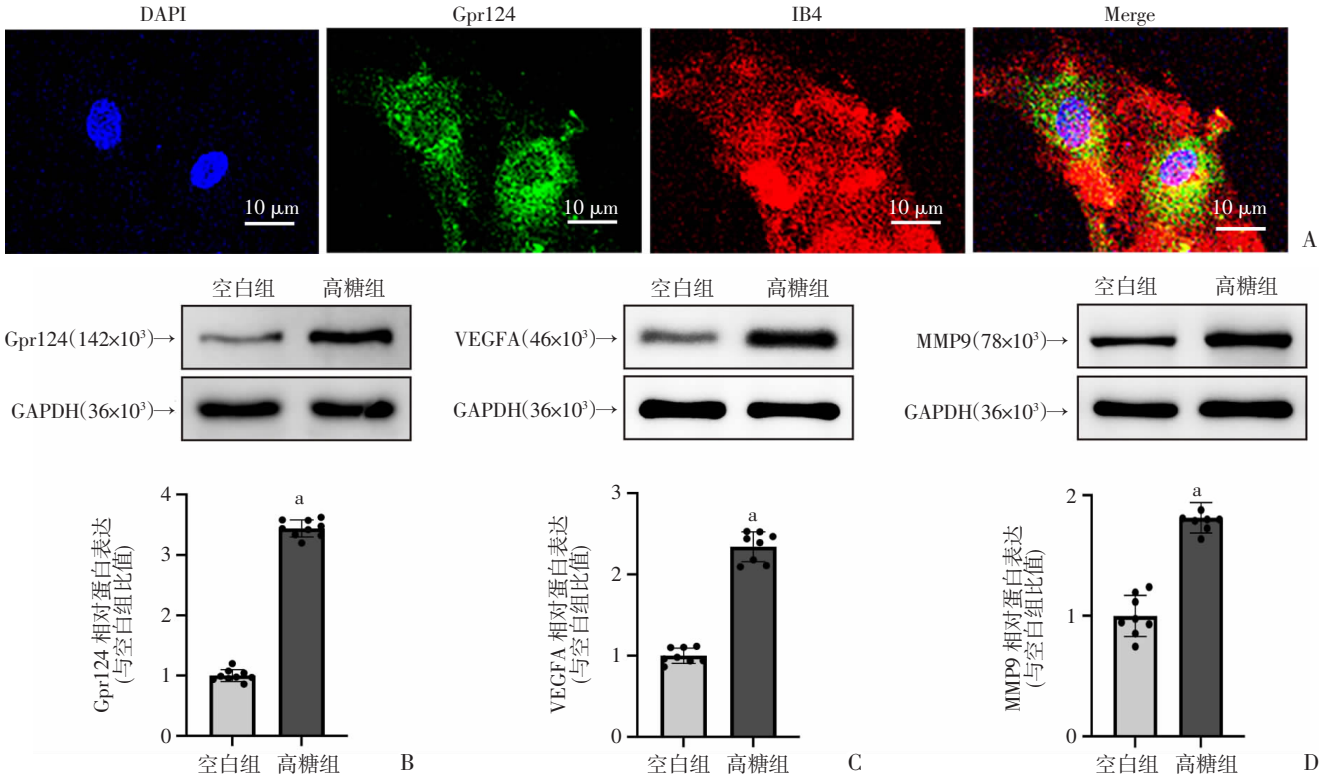
划痕迁移实验结果表明,随着时间的推移,HRMEC 的迁移面积逐渐增大。然而,在各个时间点,高糖对照组迁移率明显高于空白对照组,高糖对照组与高糖+shRNA 组的迁移率无显著差异,但抑制 Gpr124 表达后,高糖+Gpr124 shRNA 组迁移率下降,显著低于高糖+shRNA 组($P<0.01$,图 3C)。

2.4 抑制 Gpr124 表达后 HRMEC 的血管形成被抑制

通过 Matrigel 基质胶管形成实验,观察 Gpr124 在高糖环境下对 HRMEC 体外血管形成的影响(图 4A)。实验数据显示,对比空白对照组,高糖对照组与高糖+shRNA 组细胞的血管百分比面积、总血管长度显著升高($P<0.01$)。当我们特异性敲低 Gpr124 的表达时,观察到高糖+Gpr124 shRNA 组血管百分比面积、总血管长度相较高糖组均显著降低($P<0.01$,图 4B)。

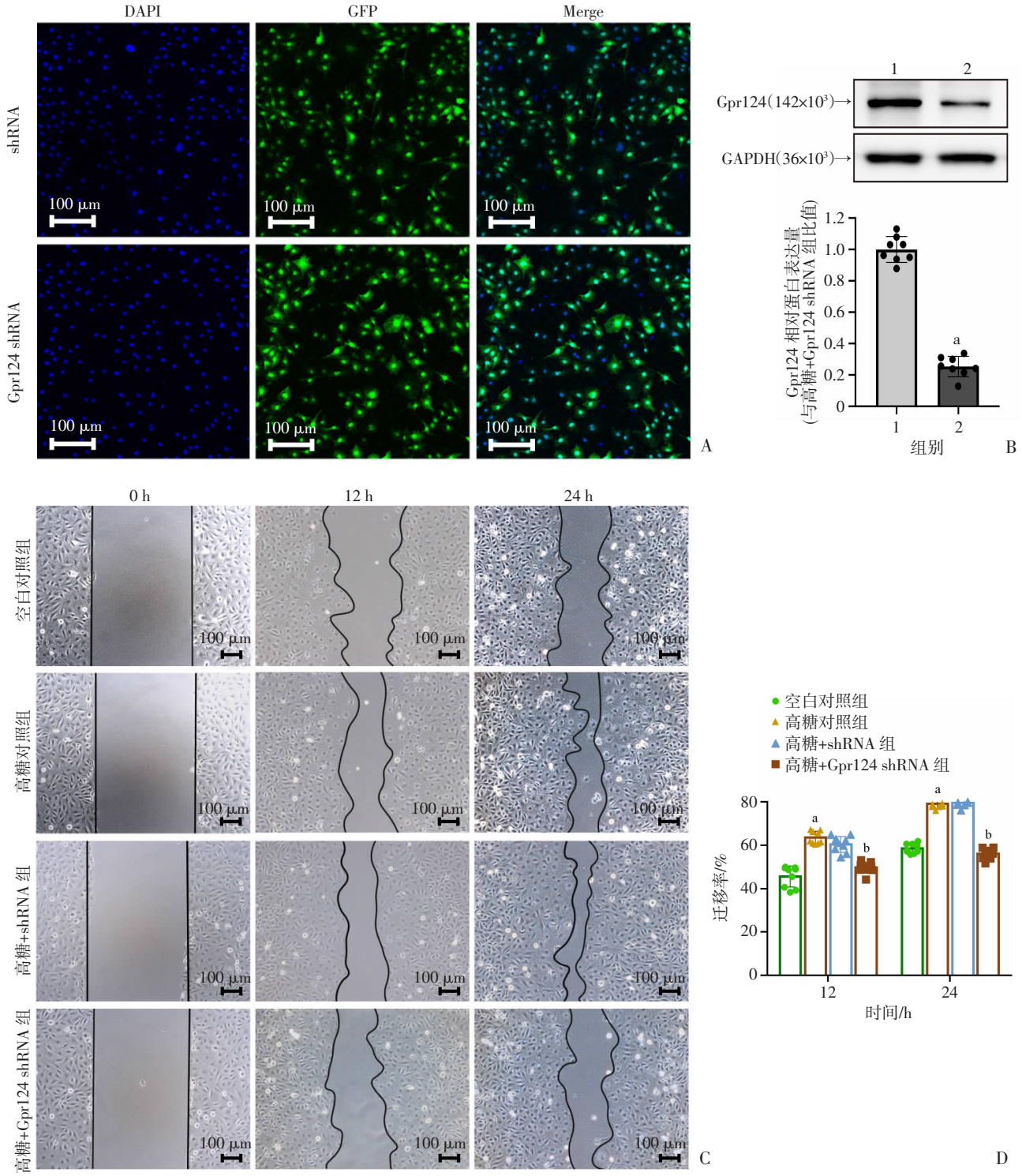
2.5 抑制 Gpr124 表达后 β-catenin、VEGFA、MMP9 的表达下调

首先检测 3 个不同治疗组中 β-catenin 的相对蛋白含量。结果显示,对比空白对照组,高糖+shRNA 组的 HRMEC 的 β-catenin 表达量显著上调,而高糖+Gpr124 shRNA 组比高糖+shRNA 组的 β-catenin 表达水平降低($P<0.01$,图 5A)。随后,进一步检测 HRMEC 中 MMP9 和 VEGFA 的相对蛋白含量,结果表明,相比于高糖+shRNA 组,高糖+Gpr124 shRNA 组的 MMP9 和 VEGFA 表达被明显抑制($P<0.01$,图 5B、C)。



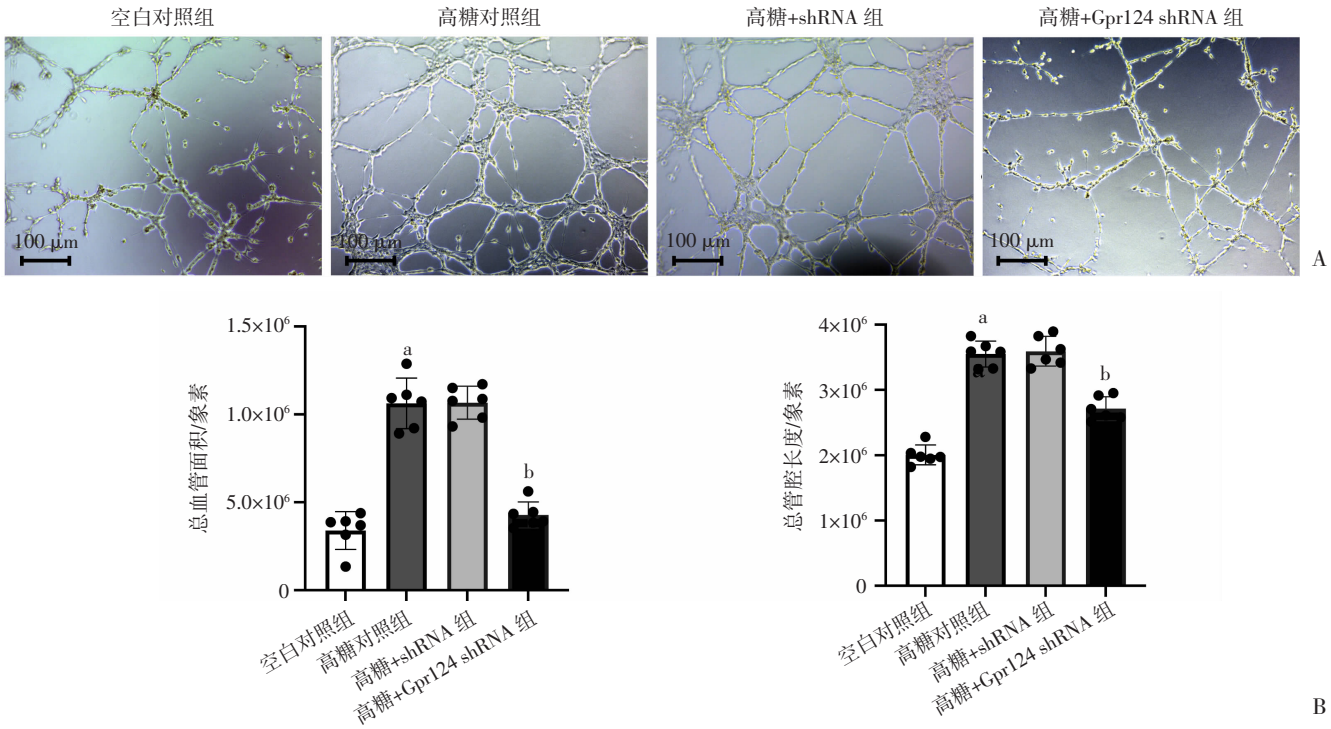
A:HRMEC 免疫荧光共染,Gpr124 呈绿色,CD31 呈红色;B:HRMEC 中 Gpr124 的表达水平与半定量分析;C:HRMEC 中 VEGFA 的表达水平与半定量分析;D:HRMEC 中 MMP9 的表达水平与半定量分析;a:$P<0.01$,与空白组比较

图 2 高糖刺激后 Gpr124、VEGFA、MMP9 在 HRMEC 中的表达变化



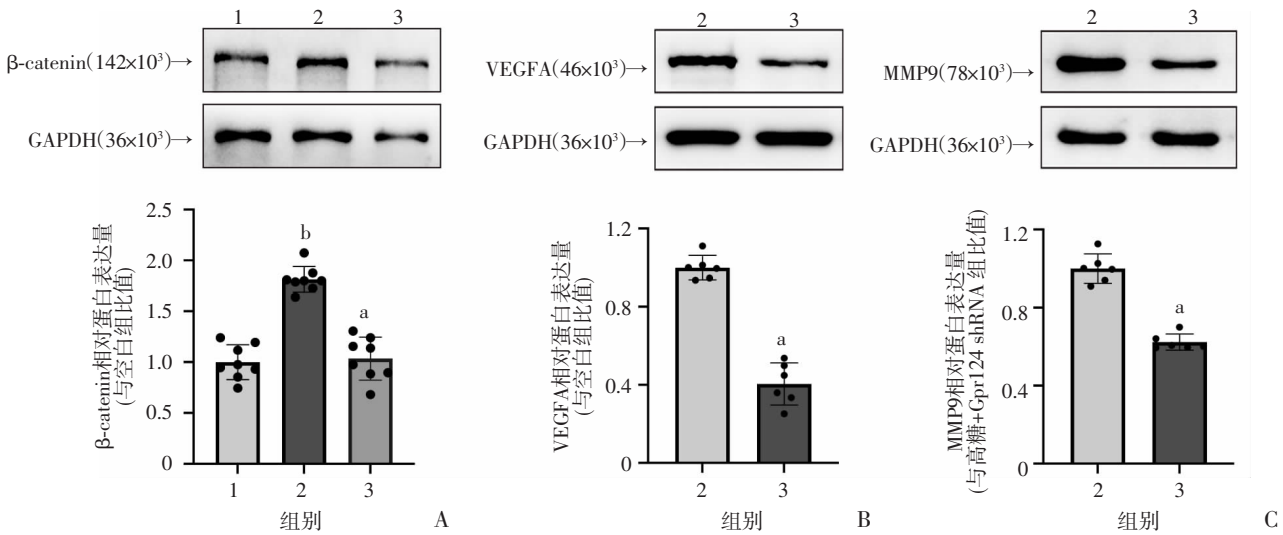
A:HRMEC 病毒感染的荧光显微镜观察,细胞核呈蓝色,病毒 GFP 呈绿色;B:HRMEC 中 Gpr124 的表达水平与半定量分析 1:高糖+shRNA 组;2:高糖+Gpr124 shRNA 组;a:$P<0.01$,与高糖+shRNA 组比较;C:划痕后 0,12 和 24 h HRMEC 的迁移图,边缘用黑线表示;D:定量分析 HRMEC 迁移区域;a:$P<0.01$,与空白对照组比较;b:$P<0.01$,与高糖+shRNA 组比较

图 3 病毒抑制 Gpr124 表达后对 HRMEC 的迁移影响



A:HRMEC 在不同处理后形成毛细血管样小管;B:定量分析血管百分比面积、总血管长度;a:P<0.01,与空白对照组比较;b:P<0.01,与高糖+shRNA 组比较

图 4 病毒抑制 Gpr124 表达后对 HRMEC 血管形成的影响



A:HRMEC 中 β-catenin 的表达水平和半定量分析;B:HRMEC 中 VEGFA 的表达水平和半定量分析;C:HRMEC 中 MMP9 的表达水平和半定量分析;a:P <0.01,与高糖+shRNA 组比较;b:P <0.01,与空白对照组比较;1:空白对照组;2:高糖+shRNA 组;3: 高糖+Gpr124 shRNA 组

图 5 病毒抑制 Gpr124 表达后 HRMEC 内 β-catenin、VEGFA 和 MMP9 的表达变化

3 讨论

本研究探讨了 Gpr124 对高糖环境下视网膜微血管内皮细胞血管生成的作用。血管生成是复杂的多步骤过程,依赖多种细胞和因子的相互作用[13-16]。这一过程与视网膜微血管内皮细胞的增殖、迁移以及管道形成紧密相关[11-12]。其中静止的内皮细胞受刺激后获“促血管生成表型”,增殖并迁移到周围基质,形成新血管,随后基底膜沉积,周细胞和平滑肌细胞募集,新血管成熟[17]。

本研究通过实验发现高糖环境能显著促进 HRMEC 的活跃增殖。正常人体空腹葡萄糖值 3.9~6.1 mmol/L,培养基含 5.5mmol/L 属正常,而 20~25 mmol/L 为高糖处理[18-21]。当使用浓度介于 25~50 mmol/L 的葡萄糖对人视网膜微血管内皮细胞(HRMEC)进行 16h 的刺激后,发现细胞活力会明显提升;尤其当葡萄糖浓度维持在 25 mmol/L 时,细胞活力将达到最高点,并且显著促进 HRMEC 的增殖,上调 Gpr124、VEGFA 和 MMP9 的表达。当敲低 Gpr124 的表达后,能有效降低高糖诱导的内皮细胞过度迁移。并且利用基质胶模拟高糖环境下 HRMEC 的成管能力[22],观察到在高糖条件下,HRMEC 更倾向于形成血管结构,显示出成管能力的增强。但是,这种趋势可以通过抑制 HRMEC 中 Gpr124 的表达得到逆转。这些实验结果提示高糖环境下,Gpr124 表达的升高能够促进内皮细胞迁移以及体外血管形成。

此外,下调 Gpr124 的表达能够降低 HRMEC 中 MMP9、VEGFA 的蛋白水平。VEGFA 及其受体对血管内皮细胞的分化、增殖和存活具有至关重要的作用,不仅是介导生理性血管生成的核心信号通路,还构成了重要的治疗靶点[23];MMP9 作为基质金属蛋白酶类明胶酶中的核心成员,具有破坏基底膜和细胞外基质中Ⅳ型胶原的能力,在视网膜血管生成过程中扮演着至关重要的角色[24]。因此,Gpr124 在调节 HRMEC 中 VEGFA 和 MMP9 表达方面的作用进一步证实了其对 HRMEC 血管生成的调控作用。

根据以往脑内皮细胞的研究结果,我们猜测 Gpr124 对 HRMEC 的调控可能涉及对 Wnt/β-catenin 经典通路的调节。Wnt 经典途径通过 β-catenin 转录活性介导。途径激活时,GSK3b 失活,阻止 β-catenin 磷酸化,使其在细胞质积累并转移至核内,与 TCF4/LEF 结合,促进 Wnt 靶基因表达[25]。在中枢神经系统血管疾病的研究中,脑内皮细胞中 Gpr124 可作为 Wnt7 特异性 β-catenin 信号的共激活剂,在内皮细胞中删除 Wnt7 或 β-catenin 后,敲除 Gpr124 也可观察到类似的血管发育缺陷[26-28]。Wnt 通路与 DR 显著相关。通过对人眼切片进行的研究发现,DR 患者视网膜内层细胞中的 β-catenin 水平显著升高,并伴随着核转位的增强。此外,β-catenin 在视网膜内层中被激活的位点与 DR 的病理改变紧密相关[29],DR 中纤维血管膜的 Wnt 信号通路相关基因与黄斑裂孔样本相比存在差异表达[30]。在本研究中发现,高糖刺激会导致 HRMEC 中 β-catenin 表达增加。然而,当我们敲低 Gpr124 的表达时,β-catenin 的异常上调被明显抑制。基于这些观察,我们猜测 Gpr124 在阻止 β-catenin 在 HRMEC 中的降解、积聚以及核转位过程中起着关键的上游调控作用。

综上所述,本研究认为高糖刺激会促使视网膜内皮细胞中 Gpr124 的表达上升。这一变化进而引发 β-catenin 的积聚和核移位,使其与靶基因结合,同时使内皮细胞从静止状态被激活,增强其增殖、迁移以及血管形成的能力。并且 Gpr124 的上调还会增加 VEGFA 和 MMP9 的表达,从而参与内皮细胞的发芽和新血管形成过程。这一结果提示,Gpr124 或为 DR 病理性血管新生的新治疗靶点。通过调控视网膜内皮细胞中 Gpr124 的表达,可能会抑制 DR 中的病理性血管生成,对 DR 治疗意义重大。目前本研究仅在细胞层面探索,未来将在动物模型上验证并深入探究。

参考文献:

[1] ANTONETTI D A, SILVA P S, STITT A W. Current understanding of the molecular and cellular pathology of diabetic retinopathy[J]. Nat Rev Endocrinol, 2021, 17(4): 195-206. DOI: 10.1038/s41574-020-00451-4.

[2] TEO Z L, THAM Y C, YU M, *et al*. Global prevalence of diabetic retinopathy and projection of burden through 2045: systematic review and meta-analysis[J]. Ophthalmology, 2021, 128(11): 1580-1591. DOI: 10.1016/j.ophtha.2021.04.027.

[3] YANG J, LIU Z S. Mechanistic pathogenesis of endothelial dysfunction in diabetic nephropathy and retinopathy[J]. Front Endocrinol, 2022, 13: 816400. DOI: 10.3389/fendo.2022.816400.

[4] GONZALEZ-CORTES J H, MARTINEZ-PACHECO V A, GONZALEZ-CANTU J E, *et al*. Current treatments and innovations in diabetic retinopathy and diabetic macular edema[J]. Pharmaceutics, 2022, 15(1): 122. DOI: 10.3390/pharmaceutics15010122.

[5] KARAMAN S, LEPPÄNEN V M, ALITALO K. Vascular endothelial growth factor signaling in development and disease[J]. Development, 2018, 145(14): dev151019. DOI: 10.1242/dev.151019.

[6] VALLON M, ROHDE F, JANSSEN K P, *et al*. Tumor endothelial marker 5 expression in endothelial cells during capillary morphogenesis is induced by the small GTPase Rac and mediates contact inhibition of cell proliferation[J]. Exp Cell Res, 2010, 316(3): 412-421. DOI: 10.1016/j.yexcr.2009.10.013.

[7] WANG Y, CHO S G, WU X, *et al*. G-protein coupled receptor 124 (GPR124) in endothelial cells regulates vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced tumor angiogenesis[J]. Curr Mol Med, 2014, 14(4): 543-554. DOI: 10.2174/1566524014666140414205943.

[8] CHANG J L, MANCUSO M R, MAIER C, *et al*. Gpr124 is essential for blood-brain barrier integrity in central nervous

system disease[J]. Nat Med, 2017, 23(4): 450-460. DOI: 10.1038/nm.4309.
[9] ZHOU Y L, NATHANS J. Gpr124 controls CNS angiogenesis and blood-brain barrier integrity by promoting ligand-specific canonical Wnt signaling[J]. Dev Cell, 2014, 31(2): 248-256. DOI: 10.1016/j.devcel.2014.08.018.
[10] LAN J, YANG M, CHEN X, *et al*. Haem relieves hyperoxia-mediated inhibition of HMEC-1 cell proliferation, migration and angiogenesis by inhibiting BACH1 expression [J]. BMC Ophthalmol, 2021, 21(1): 104. DOI: 10.1186/s12886-021-01866-x.
[11] TIAN R, LIU Z X, ZHANG H, *et al*. Investigation of the regulation of round about4 by hypoxia-inducible factor-1α in microvascular endothelial cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015, 56(4): 2586-2594. DOI: 10.1167/iovs.14-14409.
[12] SHARMA N K, GARDINER T A, ARCHER D B. A morphologic and autoradiographic study of cell death and regeneration in the retinal microvasculature of normal and diabetic rats[J]. Am J Ophthalmol, 1985, 100(1): 51-60. DOI: 10.1016/s0002-9394(14)74982-7.
[13] SELVAM S, KUMAR T, FRUTTIGER M. Retinal vasculature development in health and disease[J]. Prog Retin Eye Res, 2018, 63: 1-19. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2017.11.001.
[14] EELEN G, DE ZEEUW P, SIMONS M, *et al*. Endothelial cell metabolism in normal and diseased vasculature[J]. Circ Res, 2015, 116(7): 1231-1244. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.302855.
[15] HOYING J B, UTZINGER U, WEISS J A. Formation of microvascular networks: role of stromal interactions directing angiogenic growth[J]. Microcirculation, 2014, 21(4): 278-289. DOI: 10.1111/micc.12115.
[16] KANG Q Z, YANG C X. Oxidative stress and diabetic retinopathy: Molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications[J]. Redox Biol, 2020, 37: 101799. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101799.
[17] VISHWAKARMA S, KAUR I. Molecular mediators and regulators of retinal angiogenesis[J]. Semin Ophthalmol, 2023, 38(2): 124-133. DOI: 10.1080/08820538.2022.2152706.
[18] SACKS D B, ARNOLD M, BAKRIS G L, *et al*. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus[J]. Diabetes Care, 2023, 46(10): e151-e199. DOI: 10.2337/dci23-0036.
[19] LIU Y, CHEN J G, LIANG H W, *et al*. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells not only ameliorate blood glucose but also protect vascular endothelium from diabetic damage through a paracrine mechanism mediated by MAPK/ERK signaling[J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1): 258. DOI: 10.1186/s13287-022-02927-8.
[20] YAO Y F, SONG Q X, HU C Q, *et al*. Endothelial cell metabolic memory causes cardiovascular dysfunction in diabetes[J]. Cardiovasc Res, 2022, 118(1): 196-211. DOI: 10.1093/cvr/cvab013.
[21] LI M N, DENG L, XU G S. METTL14 promotes glomerular endothelial cell injury and diabetic nephropathy via m6A modification of α-klotho[J]. Mol Med, 2021, 27(1): 106. DOI: 10.1186/s10020-021-00365-5.
[22] PASSANITI A, KLEINMAN H K, MARTIN G R. Matrigel: history/background, uses, and future applications[J]. J Cell Commun Signal, 2022, 16(4): 621-626. DOI: 10.1007/s12079-021-00643-1.
[23] CAMPOCHIARO P A, AKHLAQ A. Sustained suppression of VEGF for treatment of retinal/choroidal vascular diseases [J]. Prog Retin Eye Res, 2021, 83: 100921. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2020.100921.
[24] POUW A E, GREINER M A, COUSSA R G, *et al*. Cell-matrix interactions in the eye: from *Cornea* to choroid[J]. Cells, 2021, 10(3): 687. DOI: 10.3390/cells10030687.
[25] HE X, SEMENOV M, TAMAI K, *et al*. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way[J]. Development, 2004, 131(8): 1663-1677. DOI: 10.1242/dev.01117.
[26] CHO C, SMALLWOOD P M, NATHANS J. Reck and Gpr124 are essential receptor cofactors for Wnt7a/Wnt7b-specific signaling in mammalian CNS angiogenesis and blood-brain barrier regulation[J]. Neuron, 2017, 95(5): 1221-1225. DOI: 10.1016/j.neuron.2017.08.032.
[27] VALLON M, YUKI K, NGUYEN T D, *et al*. A RECK-WNT7 receptor-ligand interaction enables isoform-specific regulation of Wnt bioavailability[J]. Cell Rep, 2018, 25(2): 339-349.e9. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.09.045.
[28] TA S, RONG X F, GUO Z N, *et al*. Variants of WNT7A and GPR124 are associated with hemorrhagic transformation following intravenous thrombolysis in ischemic stroke[J]. CNS Neurosci Ther, 2021, 27(1): 71-81. DOI: 10.1111/cns.13457.
[29] CHEN Y, HU Y, ZHOU T, *et al*. Activation of the Wnt pathway plays a pathogenic role in diabetic retinopathy in humans and animal models[J]. Am J Pathol, 2009, 175(6): 2676-2685. DOI: 10.2353/ajpath.2009.080945.
[30] VISHWAKARMA S, GUPTA R K, JAKATI S, *et al*. Molecular assessment of epiretinal membrane: activated microglia, oxidative stress and inflammation [J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9(8): 654. DOI: 10.3390/antiox9080654.

(收稿:2024-03-13;修回:2024-04-30)
(编辑 张 维)