

糖尿病氧化应激环境中 α -Klotho 对巨噬细胞-血管内皮细胞串扰的影响

李青博¹, 王佩玉¹, 胡立影¹, 李筱荣¹, 邵彦^{1,2}

引用: 李青博, 王佩玉, 胡立影, 等. 糖尿病氧化应激环境中 α -Klotho对巨噬细胞-血管内皮细胞串扰的影响. 国际眼科杂志, 2024,24(7):1020-1026.

基金项目: 天津市教委科研计划项目 (No.2022KJ258)

作者单位:¹(300384)中国天津市,天津医科大学眼科医院 天津医科大学近视光学院 天津医科大学眼科研究所 天津市视网膜功能与疾病重点实验室 天津市眼科学与视觉科学国际联合研究中心;²(850000)中国西藏自治区拉萨市,西藏藏医药大学

作者简介: 李青博,男,在读硕士研究生,研究方向:糖尿病视网膜膜病变。

通讯作者: 邵彦,女,博士,主任医师,副教授,硕士研究生导师,研究方向:糖尿病视网膜膜病变. sytmueh@163.com

收稿日期: 2024-01-18 修回日期: 2024-04-12

摘要

目的:探讨糖尿病氧化应激环境中过表达 α -Klotho (KL) 的小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 (RAW264.7) 对人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 增生、迁移、管腔形成以及紧密连接的影响。

方法:将 RAW264.7 细胞分为对照组、4-羟壬二酸酯 (4HNE) 组、4HNE + KL 组,采用免疫荧光实验检测 RAW264.7 细胞 F4/80 的表达。制备 3 组细胞的条件培养基用于培养 HUVECs,分为 M ϕ -NC 组、M ϕ -4HNE 组和 M ϕ -4HNE+KL 组。采用 CCK8 实验检测血管内皮细胞增生,采用划痕实验和 Transwell 实验检测迁移,采用管腔形成实验检测管腔形成,采用 Western blot 实验检测闭合蛋白 5 (Claudin 5)、咬合蛋白 (Occludin)、带状闭合蛋白 1 (ZO 1) 表达水平。

结果:免疫荧光实验结果显示,4HNE 组 RAW264.7 细胞 F4/80 荧光强度较对照组明显增强,而 4HNE+KL 组 F4/80 荧光强度较 4HNE 组明显减弱 (均 $P < 0.05$)。CCK8 实验结果显示,相比于 M ϕ -NC 组,M ϕ -4HNE 组 HUVECs 增生显著增加,而 M ϕ -4HNE+KL 组 HUVECs 增生较 M ϕ -4HNE 组显著下降 (均 $P < 0.01$)。划痕实验和 Transwell 实验结果显示,相比于 M ϕ -NC 组,M ϕ -4HNE 组 HUVECs 迁移显著增强,而 M ϕ -4HNE+KL 组 HUVECs 迁移较 M ϕ -4HNE 组显著减弱 (均 $P < 0.01$)。管腔形成实验结果显示,相比于 M ϕ -NC 组,M ϕ -4HNE 组 HUVECs 管腔数显著增加,而 M ϕ -4HNE+KL 组管腔数较 M ϕ -4HNE 组显著下降 (均 $P < 0.01$)。Western blot 实验结果显示,相比于 M ϕ -NC 组,M ϕ -4HNE 组 HUVECs 中 Claudin 5、Occludin、ZO 1 蛋白的相对表达量明显减少,而 M ϕ -4HNE+KL 组 Claudin 5、Occludin、ZO 1 蛋白的相对表达量较 M ϕ -4HNE 组明显增加 (均 $P < 0.01$)。

结论:KL 通过改变糖尿病氧化应激环境中巨噬细胞激活

状态抑制了 HUVECs 的增生、迁移、管腔形成,并增强了 HUVECs 的紧密连接。

关键词:氧化应激;巨噬细胞;血管内皮细胞;增生;迁移;管腔形成;紧密连接;视网膜新生血管

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2024.7.03

Effect of α -Klotho on macrophage-vascular endothelial cell crosstalk in diabetic oxidative stress environment

Li Qingbo¹, Wang Peiyu¹, Hu Liying¹, Li Xiaorong¹, Shao Yan^{1,2}

Foundation item: The Science & Technology Development Fund of Tianjin Municipal Education Commission (No.2022KJ258)

¹Tianjin Medical University Eye Hospital; School of Optometry & Eye Institute; Tianjin Key Laboratory of Retinal Functions and Diseases; Tianjin International Joint Research and Development Centre of Ophthalmology and Vision Science, Tianjin 300384, China; ²University of Tibetan Medicine, Lhasa 850000, Tibet Autonomous Region, China

Correspondence to: Shao Yan. Tianjin Medical University Eye Hospital; School of Optometry & Eye Institute; Tianjin Key Laboratory of Retinal Functions and Diseases; Tianjin International Joint Research and Development Centre of Ophthalmology and Vision Science, Tianjin 300384, China; University of Tibetan Medicine, Lhasa 850000, Tibet Autonomous Region, China. sytmueh@163.com

Received:2024-01-18 Accepted:2024-04-12

Abstract

• AIM: To investigate the effects of overexpressing α -Klotho (KL) in RAW264.7 cells stimulated by oxidative stress on the proliferation, migration, tube-formation and tight junction of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs).

• METHODS: RAW264.7 cells were categorized into control, 4-hydroxynonenal (4HNE), and 4HNE + KL groups, with F4/80 expression assessed via immunofluorescence staining. Three groups of conditional media were prepared for HUVECs and culture divided into M ϕ -NC, M ϕ -4HNE, and M ϕ -4HNE + KL groups. Cell proliferation was evaluated using CCK8 assay, while scratch test and Transwell assays were employed to measure cell migration. Additionally, tube-formation assay was conducted to assess cell tubule formation, and Western blot assay was utilized to detect the protein

expression levels of Claudin 5, Occludin and ZO 1.

• **RESULTS:** The results of immunofluorescence staining showed that the fluorescence intensity of F4/80 of RAW264.7 cells in the 4HNE group was significantly enhanced compared with the control group, while that of F4/80 in the 4HNE+KL group was significantly decreased compared with the 4HNE group (all $P < 0.05$). The CCK8 assay results revealed a significant increase in the proliferation of HUVECs in the M ϕ -4HNE group compared with the M ϕ -NC group. Conversely, the proliferation of the M ϕ -4HNE+KL group exhibited a significant decrease compared with that in the M ϕ -4HNE group (all $P < 0.01$). The results of scratch test and Transwell assays demonstrated a significant increase in the migration of HUVECs in the M ϕ -4HNE group compared with the M ϕ -NC group, while the migration of the M ϕ -4HNE+KL group exhibited a significant decrease compared with the M ϕ -4HNE group (all $P < 0.01$). In the tube-formation assay, it was observed that the number of tubes formed by HUVECs in the M ϕ -4HNE group was significantly increased compared with the M ϕ -NC group, while that of tubes formed in the M ϕ -4HNE+KL group was significantly decreased compared with the M ϕ -4HNE group (all $P < 0.01$). Additionally, the Western blot results revealed a significant decrease in the relative expression levels of Claudin 5, Occludin, and ZO 1 in the M ϕ -4HNE group compared with the M ϕ -NC group. Conversely, in the M ϕ -4HNE+KL group, there was a significant increase in the relative expression levels of Claudin 5, Occludin, and ZO 1 compared to the M ϕ -4HNE group (all $P < 0.01$).

• **CONCLUSIONS:** KL inhibits the proliferation, migration, and tube-formation of HUVECs while enhancing the tight junction by changing the activation state of macrophages in the diabetic oxidative stress environment.

• **KEYWORDS:** oxidative stress; macrophage; vascular endothelial cells; proliferation; migration; tube-formation; tight junction; retinal neovascularization

Citation: Li QB, Wang PY, Hu LY, et al. Effect of α -Klotho on macrophage-vascular endothelial cell crosstalk in diabetic oxidative stress environment. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)*, 2024,24(7): 1020-1026.

0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病最常见、最严重的神经微血管并发症之一,是成人失明的主要原因^[1]。目前DR的确切机制尚不清楚,但氧化应激是DR发生发展的关键因素^[2]。随着病情进展,DR患者眼底逐渐出现微动脉瘤、出血斑、棉絮斑等病理改变,最终视网膜新生血管和纤维血管膜的出现标志着DR进入增殖期,引发一系列严重的并发症^[3]。视网膜新生血管的临床治疗主要依赖抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)药物,但其在部分患者中疗效不显著且存在费用昂贵、治疗周期长的缺点^[4]。

巨噬细胞是增殖型视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)的重要驱动因素^[5],异常激活的巨噬细

胞不仅促进新生血管生成,还是纤维血管膜的主要细胞群^[6]。抗衰老蛋白 α -Klotho(KL)主要由肾小管上皮和脑脉络丛分泌并释放入血^[7-8],具有抗氧化,抑制细胞凋亡,抗炎和抗纤维化的功能^[9]。有研究表明,KL可以抑制脉络膜新生血管小鼠模型中视网膜微血管渗漏和病理性新生血管形成^[10],并改变了巨噬细胞的激活状态^[11]。然而KL在DR中的治疗作用尚不清楚,且巨噬细胞与内皮细胞间的相互作用尚不明确。

因此,本研究拟采用小鼠单核巨噬细胞白血病细胞(RAW264.7)的条件培养基(conditional medium, CM)培养人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs),观察4-羟壬二酸酯(4-hydroxynonenal, 4HNE)刺激和过表达KL的RAW264.7细胞的CM对HUVECs增生、迁移、成管以及紧密连接的影响,旨在丰富PDR的病理机制研究,为临床治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料 RAW264.7细胞系购自美国ATCC公司;HUVECs细胞购自湖南丰晖生物科技有限公司;4HNE购自美国Cayman公司;DMEM培养基、青-链霉素、2.5 g/L胰蛋白酶、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国Gibco公司;内皮细胞专用培养基(endothelial cell medium, ECM)购自美国ScienCell公司;Cell Counting Kit-8(CCK8)试剂盒购自美国MCE公司;Transwell小室购自德国Millipore公司;基质胶购自美国Thermofisher公司;ZO 1(61-7300)、Claudin 5(35-2500)抗体购自美国Thermofisher公司;Occludin(13409-1-AP)、Vinculin(66305-1-Ig)购自武汉三鹰公司;F4/80(sc-377009)购自美国Santa Cruz Biotechnology公司;羊抗兔488免疫荧光二抗(ab150077)、羊抗鼠488免疫荧光二抗(ab150113)购自英国Abcam公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 RAW264.7在含有10% FBS和1%青霉素-链霉素的DMEM培养基中培养,第3-8代用于实验。将细胞分为对照组、4HNE组、4HNE+KL组。对照组为细胞培养基中添加10 μ mol/L无水乙醇作为溶剂对照;4HNE组为细胞培养基中添加10 μ mol/L 4HNE;4HNE+KL组为转染KL腺病毒(MOI=100)后细胞培养基中添加10 μ mol/L 4HNE。HUVECs在含有5% FBS、1%青霉素-链霉素和1%内皮生长补充剂的内皮细胞专用培养基中培养,第3-8代用于实验。将细胞分为3组:M ϕ -NC组培养基为对照组CM;M ϕ -4HNE组培养基为4HNE组CM;M ϕ -4HNE+KL培养基为4HNE+KL组CM。

1.2.2 CM的制备 将RAW264.7(1×10^6 /孔)接种到六孔板中,过夜后转染KL腺病毒及对照腺病毒(MOI=100),24 h后换液,添加10 μ mol/L 4HNE及无水乙醇,继续在培养箱中培养48 h,后更换DMEM基础培养基继续培养48 h,后收集培养基作为CM(图1)。

1.2.3 CCK8实验 将HUVECs(2×10^3 /孔)接种到96孔板中,每组设10个副孔,过夜后添加100 μ L相应的CM,24 h后加入10 μ L CCK8工作液,继续在培养箱中培养2 h,用酶标仪在490 nm处测定各孔光密度值(OD)。

1.2.4 划痕实验 将HUVECs(3×10^5 /孔)接种到6孔板中,当细胞融合度达到90%时,用100 μ L无菌移液枪头划痕,磷酸盐缓冲液(pH 7.4)溶液(phosphate buffer saline, PBS)清洗

脱落细胞,分别加入相应的CM,放入培养箱孵育24h,使用倒置显微镜观察拍照,并用Image J软件分析,实验重复3次。细胞迁移率=(0h划痕面积-24h划痕面积)/0h划痕面积×100%。

1.2.5 Transwell 实验 将HUVECs(2×10^4 /孔)接种到Transwell上室中,并将500 μ L相应的CM添加到下室,放入培养箱孵育24h,然后将小室置于4%多聚甲醛中30min,擦拭小室上腔后,用结晶紫染色20min。超纯水清洗3次后使用倒置显微镜观察拍照,并用Image J软件分析,实验重复3次。

1.2.6 管腔形成实验 基质胶于4℃冰箱中过夜解冻,将100 μ L基质胶加入48孔板中,避免产生气泡,放入培养箱静置30min。将用相应CM重悬的HUVECs(6×10^4 /孔)接种到48孔板中,6h后使用倒置显微镜观察拍照,并用Image J软件分析,实验重复3次。

1.2.7 免疫荧光染色 用4%多聚甲醛固定细胞爬片20min,然后在0.2%牛血清白蛋白、5%山羊血清、0.3% Triton X-100的PBS中4℃封闭30min,后加入一抗稀释液(1:100)在4℃下孵育过夜。洗涤3次后,加入二抗稀释液(1:1000)在室温下孵育2h,用含4,6-二氨基-2-苯基吲哚(4,6-diamino-2-phenyl indol, DAPI)封片液进行封片,在共聚焦显微镜下观察拍照,并用Image J软件分析,实验重复3次。

1.2.8 Western blot 检测蛋白表达水平 收集相应CM刺激24h的HUVECs,加入RIPA裂解液后超声处理,14000 r/min离心30min,检测上清液蛋白浓度。加入20 μ g蛋白进行电泳分离,将蛋白转至PVDF膜上。转膜后使用快速封闭液封闭20min,后加入一抗稀释液(1:1000)在4℃下孵育过夜。洗涤3次后,加入二抗稀释液(1:2000)在室温下孵育2h,使用凝胶成像系统显影,并用Image J软件分析,实验重复3次。

统计学分析:使用SPSS 17.0统计学软件和GraphPad Prism 10.0软件进行分析。数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素方差分析,进一步的两两比较采用

LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 KL对4HNE处理后RAW264.7细胞激活状态的影响

采用免疫荧光实验检测各组RAW264.7细胞F4/80表达,结果表明4HNE组RAW264.7细胞F4/80荧光强度较对照组明显增强,而4HNE+KL组中F4/80荧光强度较4HNE组明显减弱,差异均有统计学意义($F = 24.71, P < 0.01$,图2)。

2.2 过表达KL的RAW264.7细胞的CM对HUVECs增生的影响 采用CCK8实验检测4HNE刺激和过表达KL的RAW264.7细胞的CM对HUVECs增生的影响。结果显示, $M\phi$ -NC组、 $M\phi$ -4HNE组和 $M\phi$ -4HNE+KL组的OD值分别为 $0.61 \pm 0.06, 0.91 \pm 0.09, 0.80 \pm 0.04$,差异有统计学意义($F = 41.03, P < 0.0001$)。相比于 $M\phi$ -NC组, $M\phi$ -4HNE组HUVECs增生显著增加,而 $M\phi$ -4HNE+KL组HUVECs增生较 $M\phi$ -4HNE组显著下降,差异均有统计学意义($P < 0.01$,图3)。

2.3 过表达KL的RAW264.7细胞的CM对HUVECs迁移的影响 采用划痕实验检测4HNE刺激和过表达KL的RAW264.7细胞的CM对HUVECs迁移的影响。结果显示, $M\phi$ -NC组、 $M\phi$ -4HNE组和 $M\phi$ -4HNE+KL组的细胞迁移率分别为 $11.57\% \pm 1.56\%, 36.94\% \pm 2.99\%, 9.45\% \pm 2.57\%$,差异有统计学意义($F = 117.1, P < 0.0001$)。相比于 $M\phi$ -NC组, $M\phi$ -4HNE组HUVECs迁移率显著增加,而 $M\phi$ -4HNE+KL组HUVECs迁移率较 $M\phi$ -4HNE组显著下降,差异均有统计学意义($P < 0.001$,图4)。采用Transwell实验检测4HNE刺激和过表达KL的RAW264.7细胞的CM对HUVECs迁移的影响。结果显示, $M\phi$ -NC组、 $M\phi$ -4HNE组和 $M\phi$ -4HNE+KL组的细胞迁移数分别为 $43.67 \pm 5.86, 94.67 \pm 7.57, 16.33 \pm 3.21$ 个,差异有统计学意义($F = 139.5, P < 0.0001$)。相比于 $M\phi$ -NC组, $M\phi$ -4HNE组HUVECs迁移数显著增加,而 $M\phi$ -4HNE+KL组HUVECs迁移数较 $M\phi$ -4HNE组显著下降,差异均有统计学意义($P < 0.001$,图5)。

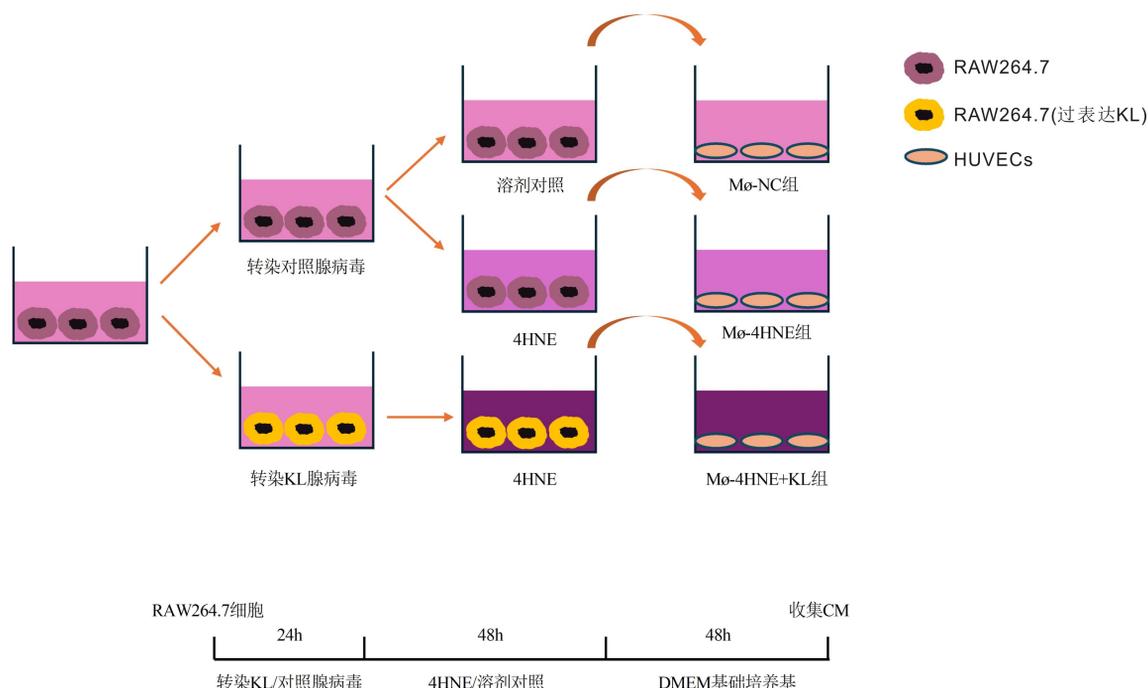


图1 CM制备流程及分组。

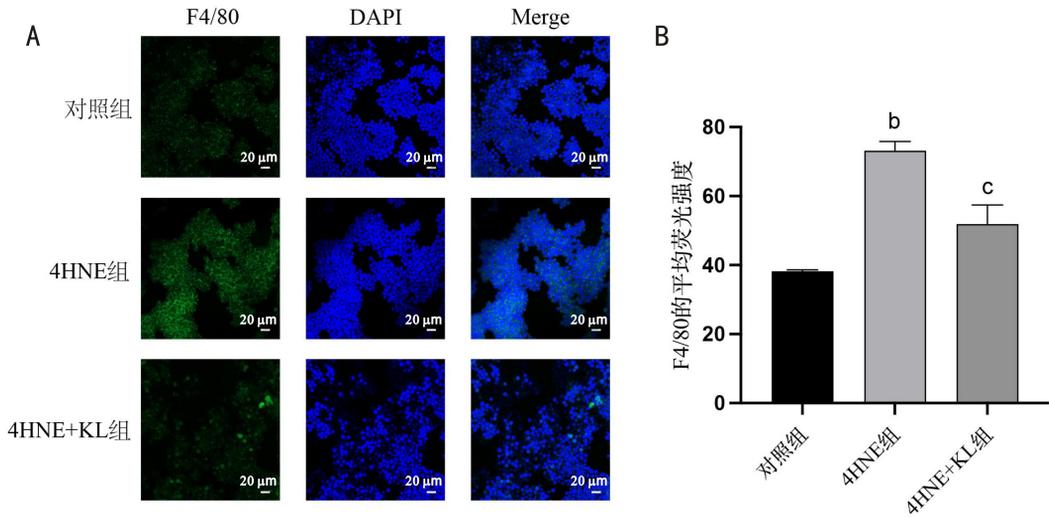


图2 免疫荧光实验检测各组 RAW264.7 细胞 F4/80 表达 A:免疫荧光实验检测结果;B:平均荧光强度统计图;^b $P<0.01$ vs 对照组;^c $P<0.05$ vs 4HNE 组。

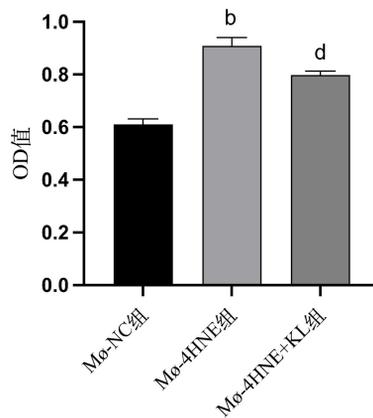


图3 CCK8 实验检测各组 CM 作用 24 h 后 HUVECs 增生 ^b $P<0.01$ vs M0-NC 组;^d $P<0.01$ vs M0-4HNE 组。

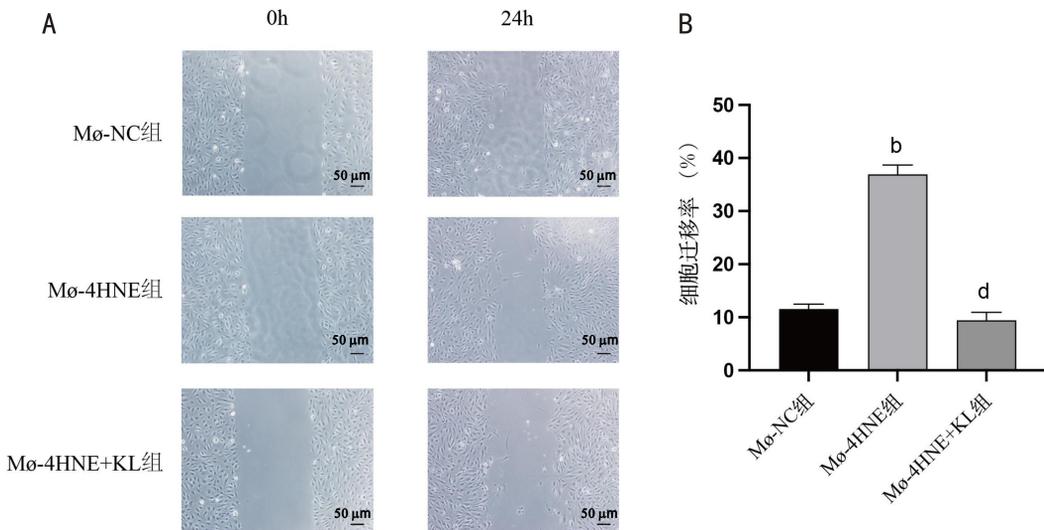


图4 划痕实验检测各组 CM 作用 24 h 后 HUVECs 迁移 A:划痕实验检测结果;B:迁移率统计图;^b $P<0.01$ vs M0-NC 组;^d $P<0.01$ vs M0-4HNE 组。

2.4 过表达 KL 的 RAW264.7 细胞的 CM 对 HUVECs 管腔形成的影响 采用管腔形成实验检测 4HNE 刺激和过表达 KL 的 RAW264.7 细胞的 CM 对 HUVECs 成管的影响。结果显示, M0-NC 组、M0-4HNE 组和 M0-4HNE+KL 组的分支数分别为 93.00 ± 25.53 、 181.67 ± 16.07 、 111.33 ± 16.56 个, 差异有统计学意义 ($F = 16.64$, $P < 0.01$)。相比于 M0-NC 组, M0-4HNE 组 HUVECs 管腔数显著增加, 而 M0-4HNE+KL 组管腔数较 M0-4HNE 组显著下降, 差异

均有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 6)。

2.5 过表达 KL 的 RAW264.7 细胞的 CM 对 HUVECs 紧密连接的影响 采用免疫荧光实验检测 4HNE 刺激和过表达 KL 的 RAW264.7 细胞的 CM 对 HUVECs 中闭合蛋白 5 (Claudin 5) 的影响, 结果表明 M0-4HNE 组 Claudin 5 荧光强度较 M0-NC 组明显减弱, 而 M0-4HNE+KL 组 Claudin 5 荧光强度较 M0-4HNE 组明显增强, 差异均有统计学意义 ($F = 44.1$, $P < 0.001$, 图 7)。

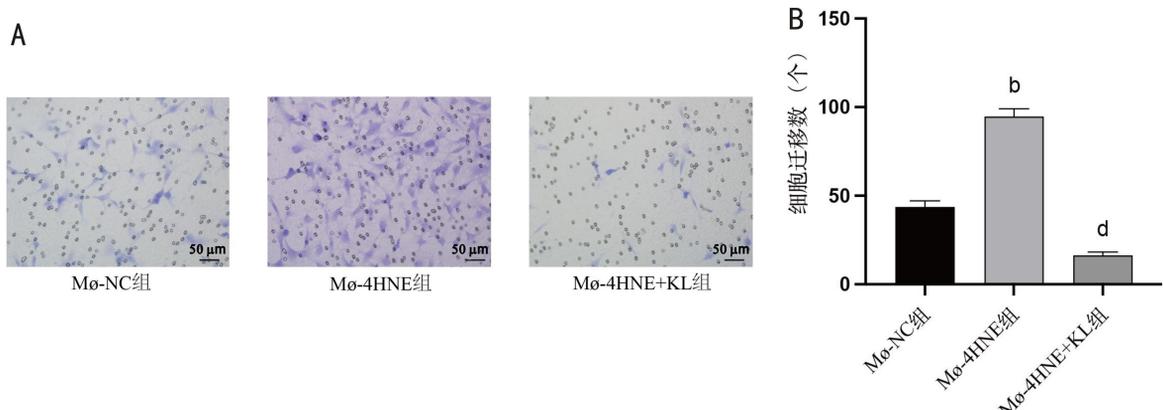


图5 Transwell 实验检测各组 CM 作用 24 h 后 HUVECs 迁移数; A: Transwell 实验检测结果; B: 迁移数统计图; ^b $P < 0.01$ vs Mø-NC 组; ^d $P < 0.01$ vs Mø-4HNE 组。

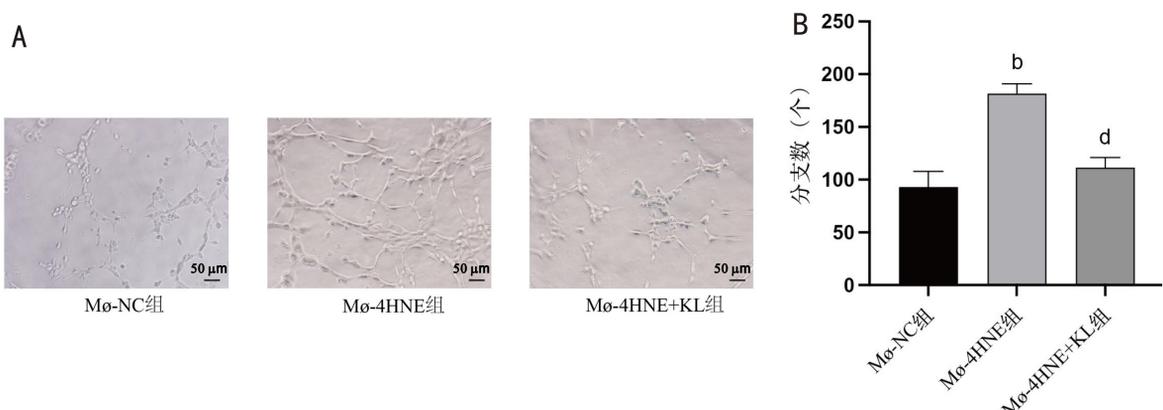


图6 管腔形成实验检测各组 CM 作用 6 h 后 HUVECs 管腔形成; A: 管腔形成实验检测结果; B: 分支数统计图; ^b $P < 0.01$ vs Mø-NC 组; ^d $P < 0.01$ vs Mø-4HNE 组。

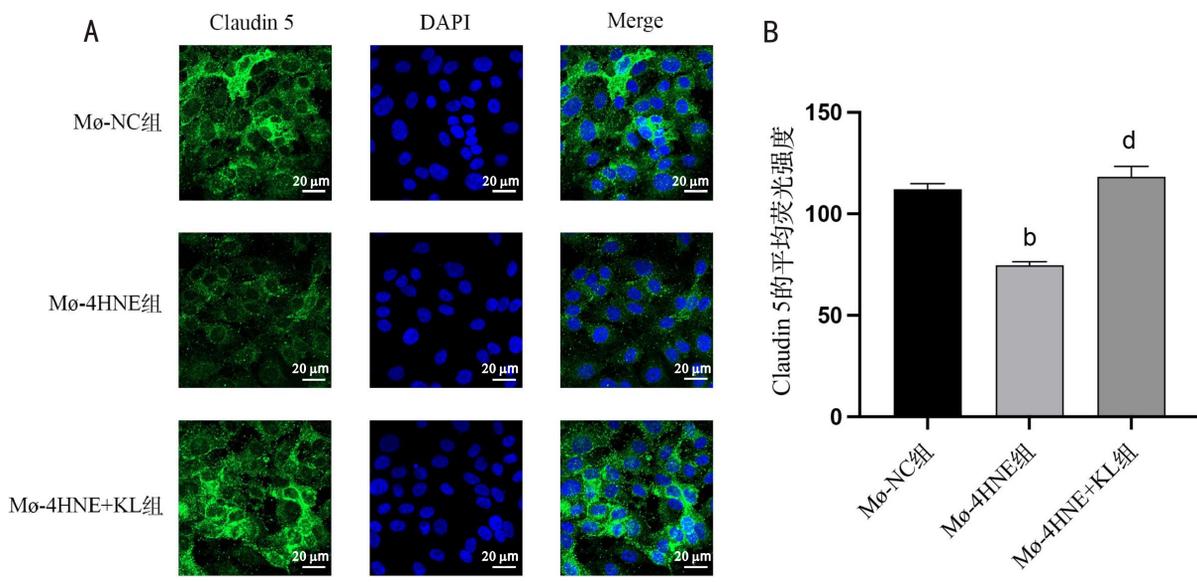


图7 免疫荧光实验检测各组 CM 作用 24 h 后 HUVECs 的 Claudin 5 表达; A: 免疫荧光实验检测结果; B: 平均荧光强度统计图; ^b $P < 0.01$ vs Mø-NC 组; ^d $P < 0.01$ vs Mø-4HNE 组。

Western blot 实验结果表明,与 Mø-NC 组相比, Mø-4HNE 组 Claudin 5、咬合蛋白(Occludin)、带状闭合蛋白 1(ZO 1)的相对表达量明显减少,而 Mø-4HNE+KL 组 Claudin 5、Occludin、ZO 1 蛋白的相对表达量较 Mø-4HNE 组明显增加,差异均有统计学意义($P < 0.01$),见图 8。

3 讨论

巨噬细胞作为单核吞噬细胞系统的主要细胞群,在

DR 发生发展中发挥重要作用。在 DR 早期,巨噬细胞可以极化成 M1 型巨噬细胞,通过分泌炎症因子,参与炎症过程;在 DR 晚期,M2 型巨噬细胞逐渐发挥作用,通过分泌 VEGF,促进新生血管和纤维血管膜形成^[12]。慢性高血糖和线粒体功能障碍会导致活性氧产生增加,诱发脂质过氧化反应,进而产生 4HNE 等活性羰基类物质,4HNE 在糖尿病患者和糖尿病动物模型的体液和组织中蓄积,进一

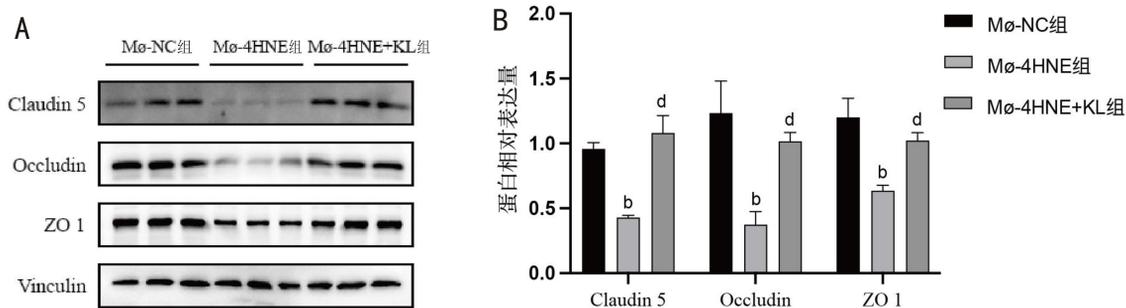


图8 Western blot 实验检测各组 CM 作用 24 h 后 HUVECs 紧密连接蛋白表达 A: Western blot 实验检测结果; B: 蛋白相对表达量统计图; $P < 0.01$ vs M0-NC 组; $P < 0.01$ vs M0-4HNE 组。

步加剧氧化应激^[13]。4HNE 是糖尿病及其并发症的重要生物标志物^[13], 糖尿病患者和糖尿病动物视网膜中均检测到 4HNE 水平增加^[14-17], 因此本研究采用 4HNE 刺激模拟糖尿病氧化应激环境在细胞层面上证明了 DR 进展中巨噬细胞的异常激活。KL 是一种长寿因子, 高血糖、氧化应激、炎症等均可显著抑制 KL 表达^[18]。在 DR 患者血清中 KL 水平显著降低, 这可能是 DR 的独立危险因素^[19]。Ji 等^[19]证明 KL 抑制棕榈酸诱导的人视网膜血管内皮细胞凋亡, 提示 KL 可能通过拮抗脂毒性在血管保护中发挥重要作用; 而 Xie 等^[10]通过脉络膜新生血管动物模型证明了 KL 对新生血管的抑制。但 KL 在 DR 中的治疗作用尚不明确, 我们猜测 KL 通过巨噬细胞-血管内皮细胞串扰抑制新生血管形成。本研究结果表明, KL 可以逆转 4HNE 诱导的巨噬细胞异常激活。巨噬细胞通过分泌蛋白酶重塑细胞外基质促进血管内皮细胞的出芽, 并通过分泌促血管生成因子促进血管内皮细胞的增生与迁移^[20]。但目前对 DR 中巨噬细胞与血管内皮细胞串扰的研究较少, 因此需要深入探讨。

血管生成的步骤包括细胞外基质降解、内皮细胞迁移、细胞增生、管腔形成和血管壁重塑^[21]。其中, 内皮细胞的迁移和管腔形成被认为是血管生成的重要步骤^[22]。本研究采用 4HNE 刺激和过表达 KL 的 RAW264.7 细胞的 CM 处理 HUVECs, 观察 KL 对巨噬细胞-血管内皮细胞串扰的影响。本研究结果表明, 在 4HNE 刺激下异常激活的巨噬细胞促进了血管内皮细胞的增生、迁移、管腔形成, 而 KL 通过逆转巨噬细胞异常激活状态抑制了血管内皮细胞的增生、迁移、管腔形成。紧密连接存在于内皮细胞间连接的最顶端, 由闭合蛋白、密封蛋白、ZO 蛋白等蛋白组成^[23-24]。紧密连接是维持血-视网膜屏障 (blood-retinal barrier, BRB) 功能的关键因素^[25], 而 BRB 功能障碍是血管通透性增加和视网膜毛细血管变性的根本原因^[26]。BRB 功能障碍导致黄斑区液体积聚, 加速 DR 患者视力的丧失^[27-28]。本研究结果表明, 在 4HNE 刺激下异常激活的巨噬细胞抑制 Claudin 5、Occludin、ZO 1 蛋白表达, 从而破坏内皮细胞间的紧密连接, 而 KL 通过逆转巨噬细胞异常激活状态增加血管内皮细胞的紧密连接蛋白表达发挥 BRB 保护作用。

综上所述, 本研究证明, KL 通过改变巨噬细胞激活状态抑制了血管内皮细胞的增生、迁移、管腔形成, 并增强了血管内皮细胞间紧密连接, 为 KL 抑制视网膜微血管渗漏和病理性新生血管形成提供了体外理论支持。目前我们的研究仅在细胞中进行了验证, KL 在体内的治疗效果及对巨噬细胞-血管内皮细胞串扰的影响仍需要进一步明确。后续我们将通过氧诱导视网膜病变小鼠模型对 KL 的新生血管抑制作用进行验证, 并通过免疫荧光染色验证视网膜巨噬细胞与新生血管的关系, 进而阐明 KL 的治疗机制。

参考文献

- [1] Simó-Servat O, Hernández C, Simó R. Diabetic retinopathy in the context of patients with diabetes. *Ophthalmic Res*, 2019, 62 (4): 211-217.
- [2] Hussain A, Ashique S, Afzal O, et al. A correlation between oxidative stress and diabetic retinopathy: an updated review. *Exp Eye Res*, 2023, 236:109650.
- [3] Antonetti DA, Silva PS, Stitt AW. Current understanding of the molecular and cellular pathology of diabetic retinopathy. *Nat Rev Endocrinol*, 2021, 17(4):195-206.
- [4] Shughoury A, Bhatwadekar A, Jusufbegovic D, et al. The evolving therapeutic landscape of diabetic retinopathy. *Expert Opin Biol Ther*, 2023, 23(10):969-985.
- [5] Wolf J, Rasmussen DK, Sun YJ, et al. Liquid-biopsy proteomics combined with AI identifies cellular drivers of eye aging and disease in vivo. *Cell*, 2023, 186(22):4868-4884.
- [6] Hu ZZ, Mao XY, Chen MK, et al. Single-cell transcriptomics reveals novel role of microglia in fibrovascular membrane of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes*, 2022, 71(4):762-773.
- [7] Jiang W, Gan C, Zhou XD, et al. Klotho inhibits renal ox-LDL deposition via IGF-1R/RAC1/OLR1 signaling to ameliorate podocyte injury in diabetic kidney disease. *Cardiovasc Diabetol*, 2023, 22(1):293.
- [8] Kuro-o M. Klotho. *Pflugers Arch*, 2010, 459(2):333-343.
- [9] Typiak M, Piwkowska A. Antiinflammatory actions of klotho: implications for therapy of diabetic nephropathy. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2):956.
- [10] Xie LQ, Wang Y, Li Q, et al. The HIF-1 α /p53/miRNA-34a/Klotho axis in retinal pigment epithelial cells promotes subretinal fibrosis and exacerbates choroidal neovascularization. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(3):1700-1711.

- [11] Jia YJ, Zheng ZJ, Xue M, et al. Extracellular vesicles from albumin-induced tubular epithelial cells promote the M1 macrophage phenotype by targeting klotho. *Mol Ther*, 2019,27(8):1452-1466.
- [12] Yao YJ, Li JJ, Zhou YF, et al. Macrophage/microglia polarization for the treatment of diabetic retinopathy. *Front Endocrinol*, 2023, 14:1276225.
- [13] Dham D, Roy B, Gowda A, et al. 4-Hydroxy-2-nonenal, a lipid peroxidation product, as a biomarker in diabetes and its complications: challenges and opportunities. *Free Radic Res*, 2021,55(5):547-561.
- [14] Augustine J, Troendle EP, Barabas P, et al. The role of lipoxidation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Front Endocrinol*, 2020,11:621938.
- [15] Zhou T, Zhou KK, Lee K, et al. The role of lipid peroxidation products and oxidative stress in activation of the canonical wingless-type MMTV integration site (WNT) pathway in a rat model of diabetic retinopathy. *Diabetologia*, 2011,54(2):459-468.
- [16] Ali TK, Matragoon S, Pillai BA, et al. Peroxynitrite mediates retinal neurodegeneration by inhibiting nerve growth factor survival signaling in experimental and human diabetes. *Diabetes*, 2008,57(4):889-898.
- [17] Du G, Yan Y, Gao JF, et al. Therapeutic effect of folic acid combined with decitabine on diabetic mice. *Int J Ophthalmol*, 2023,16(11):1766-1772.
- [18] Puddu A, Maggi DC. Klotho: a new therapeutic target in diabetic retinopathy? *World J Diabetes*, 2023,14(7):1027-1036.
- [19] Ji BL, Wei HL, Ding Y, et al. Protective potential of klotho protein on diabetic retinopathy: evidence from clinical and *in vitro* studies. *J Diabetes Investig*, 2020,11(1):162-169.
- [20] Kalucka J, Bierhansl L, Wielockx B, et al. Interaction of endothelial cells with macrophages - linking molecular and metabolic signaling. *Pflugers Arch*, 2017,469(3-4):473-483.
- [21] Cross MJ, Claesson-Welsh L. FGF and VEGF function in angiogenesis; signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci*, 2001,22(4):201-207.
- [22] Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, 2000,6(4):389-395.
- [23] Heinemann U, Schuetz A. Structural features of tight-junction proteins. *Int J Mol Sci*, 2019,20(23):6020.
- [24] Li H, Mei XY, Wang MN, et al. Scutellarein alleviates the dysfunction of inner blood-retinal-barrier initiated by hyperglycemia-stimulated microglia cells. *Int J Ophthalmol*, 2020,13(10):1538-1545.
- [25] Robles-Osorio ML, Sabath E. Tight junction disruption and the pathogenesis of the chronic complications of diabetes mellitus: a narrative review. *World J Diabetes*, 2023,14(7):1013-1026.
- [26] Rudraraju M, Narayanan SP, Somanath PR. Regulation of blood-retinal barrier cell-junctions in diabetic retinopathy. *Pharmacol Res*, 2020,161:105115.
- [27] Duh EJ, Sun JK, Stitt AW. Diabetic retinopathy: current understanding, mechanisms, and treatment strategies. *JCI Insight*, 2017, 2(14):e93751.
- [28] Wang W, Lo ACY. Diabetic retinopathy: pathophysiology and treatments. *Int J Mol Sci*, 2018,19(6):1816.