

非接触共培养体系下抑制 ARPE-19 中 CAMK II 表达对 HUVECs 迁移和侵袭及管腔形成的影响

徐卫星^{1,2}, 刘 华^{1,2}, 张 岩²

引用:徐卫星,刘华,张岩.非接触共培养体系下抑制 ARPE-19 中 CAMK II 表达对 HUVECs 迁移和侵袭及管腔形成的影响. 国际眼科杂志, 2024,24(4):508-514.

作者单位:¹(116000) 中国辽宁省大连市,大连医科大学;
²(121000) 中国辽宁省锦州市,锦州医科大学

作者简介:徐卫星,男,在读博士研究生,主治医师,研究方向:年龄相关性黄斑变性。

通讯作者:刘华,女,博士,主任医师,教授,研究方向:近视防控及老年性眼部疾病. lh@jzmu.edu.cn

收稿日期:2023-09-25 修回日期:2023-12-20

摘要

目的:探讨非接触共培养体系下抑制人视网膜色素上皮细胞 (ARPE) 中 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (CAMK II) 表达对入脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 迁移、侵袭、管腔形成的影响。

方法:将过表达 CAMK II- δ 的 ARPE-19 样本进行 RNA 测序,应用生物信息学分析差异基因参与的功能。使用 transwell 小室构建 ARPE-19 和 HUVECs 非接触共培养体系,根据实验干预措施分为:空白组;仅接种未共培养的 HUVECs,无 ARPE-19 细胞;对照组:ARPE-19 和 HUVECs 细胞均使用完全培养基进行共培养;AIP 组 (CAMK II 抑制组):ARPE-19 使用含有 AIP (160 nmol/L) 的完全培养基, HUVECs 使用完全培养基,进行共培养。检测 HUVECs 迁移、侵袭和管腔形成能力的变化,并通过 Western blotting 检测 CAMK II/AMPK/mTOR/VEGFA 蛋白表达水平。

结果:生信分析发现差异基因参与细胞生长与死亡和细胞运动等生物学过程。划痕和 transwell 迁移实验均表明 AIP 组的 HUVECs 相对迁移率均明显低于对照组 (均 $P < 0.05$)。而侵袭和小管形成实验表明, AIP 组的相对侵袭率和相对管腔形成率较对照组无明显改变 (均 $P > 0.05$)。Western blotting 结果表明 AIP 组 CAMK II、P-mTOR、VEGFA 蛋白表达较对照组均明显下调,而 P-AMPK 蛋白表达较明显上调 (均 $P < 0.05$)。

结论:在非接触共培养体系下抑制 ARPE-19 细胞中 CAMK II 表达可以显著降低 HUVECs 迁移能力,但不能改变侵袭和管腔形成能力,这可能是通过 AMPK/mTOR/VEGFA 信号通路实现的。

关键词: Ca^{2+} /钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (CAMK II); 自生肽 2 相关抑制肽 (AIP); 迁移; 人视网膜色素上皮细胞 (ARPE); 人脐静脉内皮细胞 (HUVECs)

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2024.4.03

Effects of inhibiting CAMK II expression in ARPE-19 cells on the migration, invasion, and tube formation of HUVECs in a non-contact co-culture system

Xu Weixing^{1,2}, Liu Hua^{1,2}, Zhang Yan²

¹Dalian Medical University, Dalian 116000, Liaoning Province, China; ²Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China

Correspondence to: Liu Hua. Dalian Medical University, Dalian 116000, Liaoning Province, China; Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China. lh@jzmu.edu.cn

Received:2023-09-25 Accepted:2023-12-20

Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of inhibiting Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CAMK II) expression in adult retinal pigment epithelial cell line-19 (ARPE-19) cells on the migration, invasion, and tube formation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in a non-contact co-culture system.

• **METHODS:** RNA sequencing was performed on ARPE-19 cells overexpressing CAMK II- δ , and bioinformatics was used to analyze the biological functions of the differentially expressed genes. Transwell inserts was used to construct a non-contact co-culture system of ARPE-19 and HUVECs. The experimental groups included: blank group: only HUVECs were inoculated without ARPE-19 cells; control group: ARPE-19 and HUVECs cells were co-cultured with complete medium; AIP group (CAMK II inhibition group): ARPE-19 cells in AIP (160 nmol/L) were co-cultured with HUVECs in complete medium. The migration, invasion and tube formation abilities of HUVECs were detected. The protein expression levels of CAMK II/AMPK/mTOR/VEGFA were detected by Western blotting.

• **RESULTS:** Bioinformatics analysis found that the differentially expressed genes could affect biological processes such as cell growth and death and cell movement. The scratch test and transwell migration test showed that the relative mobility of HUVECs in the AIP group was significantly lower than that in the control group (all $P < 0.05$). However, the invasion and tube formation assay showed that the relative invasion rate and tube formation rate of the AIP group were not significantly different from those of the control group (both $P > 0.05$).

Western blotting results showed that the expression levels of CAMK II, P-mTOR, and VEGFA proteins in the AIP group were significantly lower than those in the control group, while the expression level of the P-AMPK protein was significantly higher than that in the control group (all $P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** In the non-contact co-culture system, inhibition of CAMK II expression in ARPE-19 cells significantly reduced the migration ability of HUVECs, but it cannot change the invasion and tube formation ability, which may be achieved by AMPK/mTOR/VEGFA.

• **KEYWORDS:** Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CAMK II); autacamtide-2-related inhibitory peptide (AIP); migration; adult retinal pigment epithelial cell (ARPE); human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)

Citation: Xu WX, Liu H, Zhang Y. Effects of inhibiting CAMK II expression in ARPE-19 cells on the migration, invasion, and tube formation of HUVECs in a non-contact co-culture system. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)*, 2024, 24(4): 508-514.

0 引言

眼内新生血管是包括增殖期糖尿病视网膜病变、早产儿视网膜病变、湿性年龄相关性黄斑变性等多种致盲眼病的病理生理基础。新生血管由于管壁不完整容易造成出血和渗漏,最终形成瘢痕,造成视力永久丧失^[1-2]。视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)作为血眼屏障的重要组成部分,可以极性分泌多种生长因子,维持眼内稳态,参与视循环代谢等多种生物学功能^[3-4]。RPE功能障碍时可破坏促血管生成因子[如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)]与抑制血管生成因子[如色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)]间的动态平衡^[5-6]。因此,RPE在新生血管生成中有至关重要的作用。钙(Ca^{2+})是一种高度通用的细胞内信号,负责控制增殖、分化和凋亡等一系列细胞过程^[7]。 Ca^{2+} 稳态的丢失,通常以细胞质增加的形式导致细胞损伤^[8]。在兴奋性毒性和视神经损伤等损伤后,异常的 Ca^{2+} 激活参与了视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC)的死亡^[9]。 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II, CAMK II)作为一种多功能激酶,是 Ca^{2+} 信号转导的中心协调者和执行者^[10]。CAMK II已被确定为治疗多种血管疾病的重要靶点,可以抑制多种血管生成信号通路^[11-14]。CAMK II是缺血诱导冠状动脉血管生成的重要介质,其中CAMK II触发的VEGF表达起关键作用^[15]。抑制CAMK II表达会通过NOX2/miROS/p-VEGFR2/STAT3信号通路损害血管生成,加重心脏重构和心力衰竭^[16]。然而,关于CAMK II在RPE细胞的研究却少有报道。我们通过核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)测序及生信分析发现,CAMK II参与了细胞运动等多种生物学过程。因此,本研究构建了人视网膜色素上皮细胞-19(adult retinal pigment epithelial cell line-19, ARPE-19)和人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)非接触共培养体系,充分模拟RPE和血管内皮细胞的非接触体内生长环境,以此来研究ARPE-19中CAMK II对HUVECs迁移、

侵袭、管腔形成的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 ARPE-19 购自美国模式培养物集存库(ATCC; Manassas, VA, USA); HUVECs 购自北纳生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂与仪器 自生肽 2 相关抑制肽 (autocamide-2-related inhibitory peptide, AIP) (CAMK II 特异性抑制剂) 购于美国 Cayman Chemical 公司; transwell 小室、Matrigel 基质胶购自美国 Corning 公司; CAMK II、AMP 依赖的蛋白激酶 [adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK]、磷酸化 AMPK (P-AMPK)、血管内皮细胞生长因子 A (vascular endothelial growth factor, VEGFA) 抗体购自英国 Abcam 公司, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)、磷酸化 mTOR (P-mTOR)、 β -肌动蛋白 (β -Actin) 购自美国 Affinity 公司; 吉姆萨 (Giemsa) 染色液购自上海碧云天公司。实验设备由锦州医科大学辽宁省黄斑变性重点实验室提供, 主要包括: 电泳仪 (美国 BIO-RAD 公司)、倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 RNA 测序和生信分析 过表达慢病毒 LV-CAMKII- δ 由上海吉凯基因公司包装, 根据细胞感染复数 (MOI) 及病毒滴度, 加入相应病毒量感染 ARPE-19, 并使用嘌呤霉素进行筛选扩增。将筛选扩增后的 ARPE-19 制作成 RNA 样本, RNA 文库测序采用 Illumina HiSeqTM 2500/4000 芯片, 由中国广州基迪奥生物技术有限公司完成。采用实时交互式在线数据分析平台 Omicsmart (<http://www.omicsmart.com>) 进行生物信息学分析。

1.2.2 非接触共培养体系建立 使用 transwell 小室 (24 mm PET 膜, 孔径 0.4 μ m) 在 6 孔板中进行非接触式共培养体系构建, 将 ARPE-19 接种于 transwell 小室中, HUVECs 接种于六孔板中 (图 1A), 使用完全培养基共培养 7 d 后进行后续实验^[17-18]。

1.2.3 细胞培养及分组 ARPE-19 和 HUVECs 使用 10% 胎牛血清 (FBS) 和 1% 青霉素-链霉素的 DME-F12 混合液共培养, 并在 37°C、5% CO_2 湿化条件下细胞培养箱中孵育。根据实验干预措施分为: 空白组: 仅接种未共培养的 HUVECs 在完全培养基中培养, 无 ARPE-19 细胞; 对照组: ARPE-19 和 HUVECs 细胞均使用完全培养基进行共培养; AIP 组 (CAMK II 抑制组): ARPE-19 使用含有 AIP (160 nmol/L) 的完全培养基, HUVECs 使用完全培养基, 进行共培养。

1.2.4 划痕实验检测细胞水平迁移能力 使用 transwell 小室 (24 mm PET 膜, 孔径 0.4 μ m) 和 6 孔板进行划痕实验。

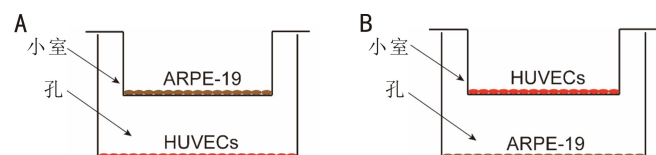


图 1 transwell 非接触共培养体系构建及划痕、迁移、小管形成实验细胞接种示意图 A: ARPE-19 接种在小室中, HUVECs 接种在孔板中; B: HUVECs 接种在小室中, ARPE-19 细胞接种在孔板中。

非接触共培养 7 d 后,将 8×10^5 个/孔 HUVECs (每组 3 个重复) 接种于 6 孔板中,将 3×10^5 个 ARPE-19 接种于 transwell 小室中(图 1A)。使用未共培养的 HUVECs 接种于 6 孔板作为空白对照(空白组)。根据实验分组进行相应处理,当 HUVECs 融合时,用 1 mL 无菌枪头垂直匀速划出“一”字划痕,采用无血清培养基共培养,分别于划痕后 0、24h 使用倒置相差显微镜拍照(40 \times)。使用 Image-Pro Plus 6.0 测定划痕平均宽度,计算相对水平迁移率:相对水平迁移率 = $(W_0 - W_{24}) / W_B$,其中 W_0 为初始划痕面积的平均宽度, W_{24} 为 24h 剩余划痕面积的平均宽度, W_B 为空白组的水平迁移距离($W_0 - W_{24}$),空白组迁移距离视为 1。

1.2.5 transwell 小室检测细胞垂直迁移能力 使用 transwell 小室(6.5 mm PC 膜,孔径 8 μ m)和 24 孔板进行垂直迁移实验。共培养 7 d 后,将 1×10^4 个/孔 HUVECs (每组 3 个重复)接种于含无血清培养基的 transwell 小室中,将 3×10^5 个 ARPE-19/孔接种于含有完全培养基的 24 孔板中(图 1B)。使用未共培养的 HUVECs 接种于 transwell 小室中作为空白对照(空白组)。根据实验分组进行相应处理,共培养 24 h 后,清洗 transwell 滤膜上表面的细胞,并用 Giemsa 染色液对滤膜下表面的迁移细胞进行染色。对上、下、左、右、中 5 个视野的细胞数进行计数并取平均值,将空白组迁移细胞数设为 1,计算相对垂直迁移率。

1.2.6 侵袭实验检测细胞侵袭能力 使用 transwell 小室(6.5 mm PC 膜,孔径 8 μ m)和 24 孔板进行侵袭实验。将 Matrigel 基质胶用不含 FBS 的冷 DME-F12 以 1:8 比例稀释,加入 transwell 小室放入 37 $^{\circ}$ C 孵箱进行包被。共培养 7 d 后,将 2×10^4 个/孔 HUVECs (每组 3 个重复)接种在含无血清培养基的 transwell 小室中,将 3×10^5 个/孔 ARPE-19 接种于含有完全培养基的 24 孔板中(图 1B)。使用未共培养的 HUVECs 接种于 transwell 小室中作为空白对照(空白组)。根据实验分组进行相应处理,其他实验步骤和检测方法同 transwell 垂直迁移实验。

1.2.7 小管形成实验检测细胞管腔形成能力 使用 transwell 小室(6.5 mm PET 膜,孔径 0.4 μ m)和 24 孔板进行小管形成实验。将基质胶均匀铺于 24 孔板中,并置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。共培养 7 d 后,将 1.5×10^5 个/孔 HUVECs (每组 3 个重复)接种于 24 孔板中,将 3×10^5 个 ARPE-19 接种于 transwell 小室中,使用完全培养基进行共培养(图 1A)。使用未共培养的 HUVECs 接种于 24 孔板中作为空白对照(空白组)。根据实验分组进行相应处理,37 $^{\circ}$ C 孵育 12 h 后,在上、下、左、右、中 5 个视野内计数管腔形成数量,并取平均值。将空白组数据作为 1,计算小管数量相对形成率。

1.2.8 Western blot 检测 CAMK II/AMPK/mTOR/VEGFA 蛋白表达 AIP 作用 ARPE-19 24 h 后,使用 RIPA、PMSF 和磷酸酶抑制剂混合液裂解 ARPE-19,提取总蛋白,将收集到的蛋白质配制成等浓度样品。加入等体积的样品进行电泳,然后转移到 PVDF 膜。使用 β -Actin 作为内参蛋白,采用 ImageJ 软件测量蛋白条带灰度值。

统计学分析:每个实验重复至少 3 次,采用 GraphPad Prism 8 进行统计分析和作图。两组比较采用独立样本 t 检验,三组或三组以上数据采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 Tukey 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LV-CAMK II- δ 慢病毒感染效果和 RNA 测序及生信分析 慢病毒感染效果见图 2A。RNA 测序及生信分析发现,CAMK II- δ 过表达样本有 62 个转录本显著上调,101 个转录本显著下调(图 2B)。其中与血管生成密切相关的基因显著上调,例如:ITGB3、P3R3URF-PIK3R3 等。将这 163 个差异基因进行 KEGG(kyoto encyclopedia of genes and genomes)富集分析,发现差异基因主要富集在细胞生长与死亡(cell growth and death)、运输和分解代谢(transport and catabolism)、细胞群落-真核生物(cellular community-eukaryotes)、细胞运动(cell motility)细胞生物学过程中(图 2C)。

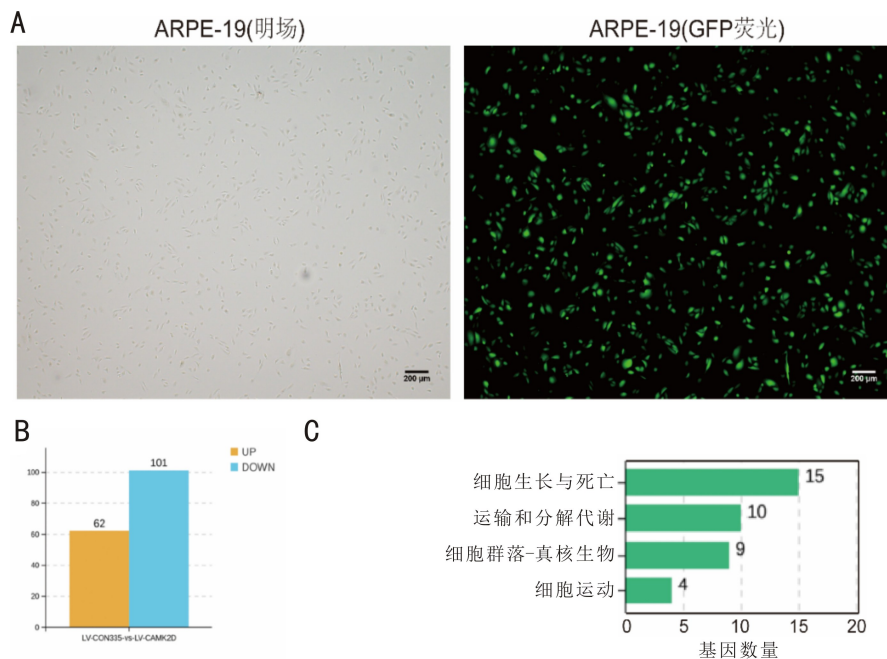


图 2 慢病毒感染及 RNA 测序生物信息学分析 A:慢病毒感染 ARPE-19 GFP 表达效果图;B:显著性差异基因柱状图;C:显著差异基因的 KEGG 富集分析条形图。

2.2 抑制 ARPE-19 中 CAMK II 表达降低 HUVECs 的水平迁移能力 划痕实验结果表明,对照组相对水平迁移率较空白组明显升高,而 AIP 组相对水平迁移率较对照组明显下降($F=19.66, P<0.05$,图 3)。这表明,非接触共培养体系下,ARPE-19 可以提高 HUVECs 的水平迁移能力,而 AIP 抑制 ARPE-19 中 CAMK II 表达可以降低 HUVECs 的水平迁移能力。

2.3 抑制 ARPE-19 中 CAMK II 表达降低 HUVECs 的垂直迁移能力 transwell 实验结果表明,对照组相对垂直迁移率较空白组明显升高,而 AIP 组相对垂直迁移率较对照组明显下降($F=40.17, P<0.05$,图 4)。这表明,非接触共培养体系下,ARPE-19 细胞可以提高 HUVECs 的垂直迁移能力,而 AIP 抑制 ARPE-19 中 CAMK II 表达可以降低 HUVECs 的垂直迁移能力。

2.4 抑制 ARPE-19 中 CAMK II 表达对 HUVECs 侵袭能力的影响 侵袭实验表明,三组相对侵袭率差异有统计学意义($F=13.70, P<0.05$),但 AIP 组相对侵袭率和对照组

相比无明显变化($P>0.05$,图 5)。这表明,非接触共培养体系下,AIP 抑制 ARPE-19 中 CAMK II 表达不能改变 HUVECs 的侵袭能力。

2.5 抑制 ARPE-19 中 CAMK II 表达对 HUVECs 小管形成的影响 小管形成实验表明,AIP 组相对管腔形成率和对对照组相比无明显变化($F=0.8053, P>0.05$,图 6)。这表明,非接触共培养体系下,AIP 抑制 ARPE-19 中 CAMK II 表达不能改变 HUVECs 的管腔形成能力。

2.6 CAMK II 调控 AMPK/mTOR/VEGFA 信号通路 AIP 组和对对照组 ARPE-19 中 CAMK II、P-AMPK、P-mTOR、VEGFA 蛋白表达水平差异均有统计学意义($t=4.135、4.044、3.344、4.810$,均 $P<0.05$)。其中,AIP 组 CAMK II、P-mTOR、VEGFA 蛋白表达水平较对照组明显下调(图 7A、B、F、G、I、J),AIP 组 P-AMPK 蛋白表达水平较对照组明显上调(图 7C、D)。AIP 组和对对照组 AMPK、mTOR 蛋白表达水平差异无显著统计学意义($t=0.2615、0.04421$,均 $P>0.05$,图 7C、E、F、H)。

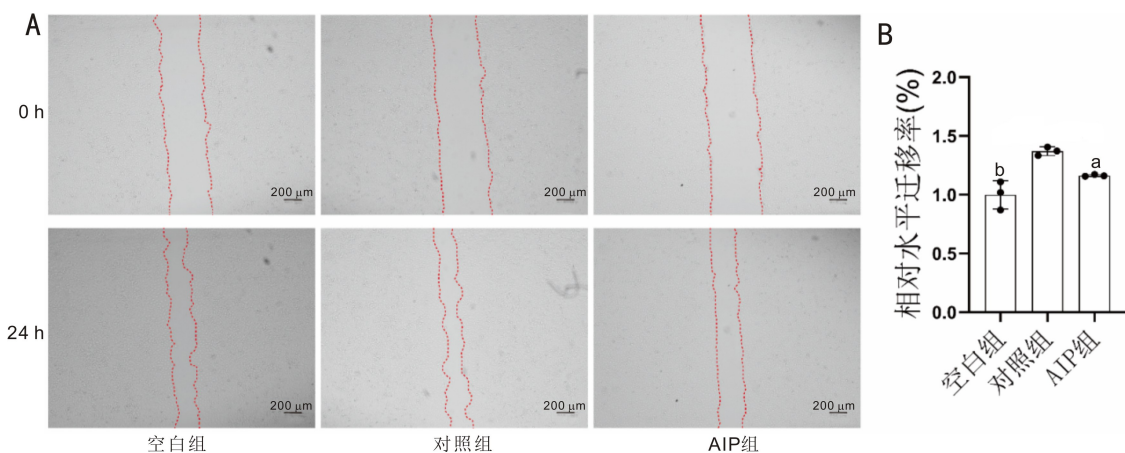


图 3 划痕实验检测水平迁移能力 A:各组 HUVECs 在 0、24 h 的划痕面积;B:相对水平迁移率的定量分析表明,AIP 作用 ARPE-19 降低 HUVECs 的水平迁移能力;^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ vs 对照组。

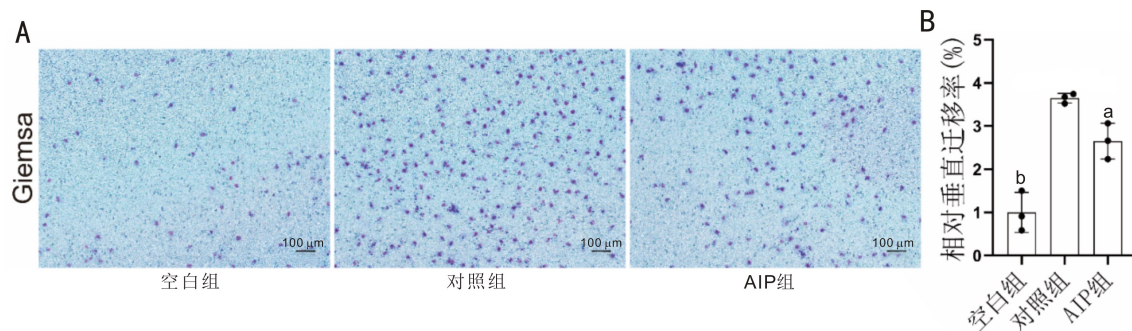


图 4 transwell 实验检测垂直迁移能力 A:各组 HUVECs 垂直迁移细胞数;B:相对垂直迁移率的定量分析表明,AIP 作用 ARPE-19 细胞降低 HUVECs 的垂直迁移能力;^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ vs 对照组。

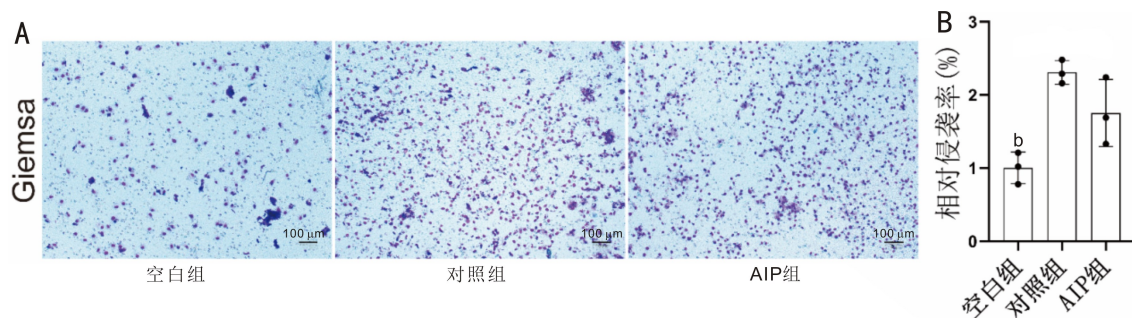


图 5 侵袭实验检测侵袭能力 A:各组 HUVECs 侵袭细胞数;B:相对侵袭率的定量分析表明,AIP 作用 ARPE-19 细胞不能改变 HUVECs 的侵袭能力;^a $P<0.01$ vs 对照组。

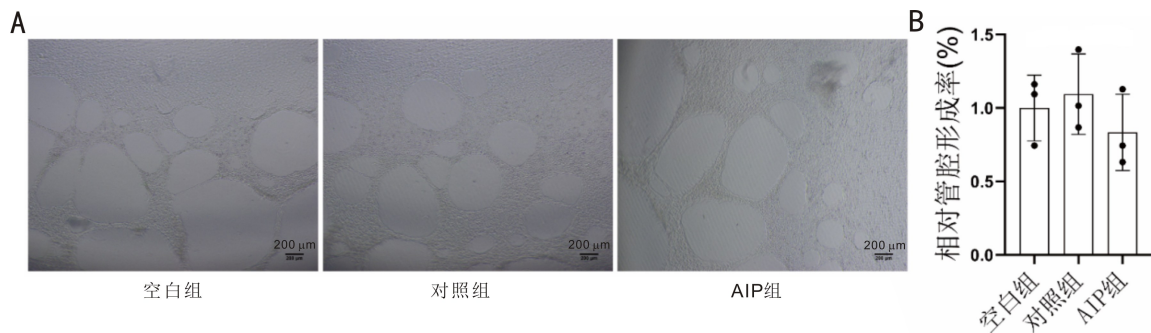


图6 小管形成实验检测管腔形成能力 A:各组 HUVECs 管腔形成数;B:相对管腔形成率的定量分析表明,AIP 作用 ARPE-19 不能改变 HUVECs 的管腔形成能力。

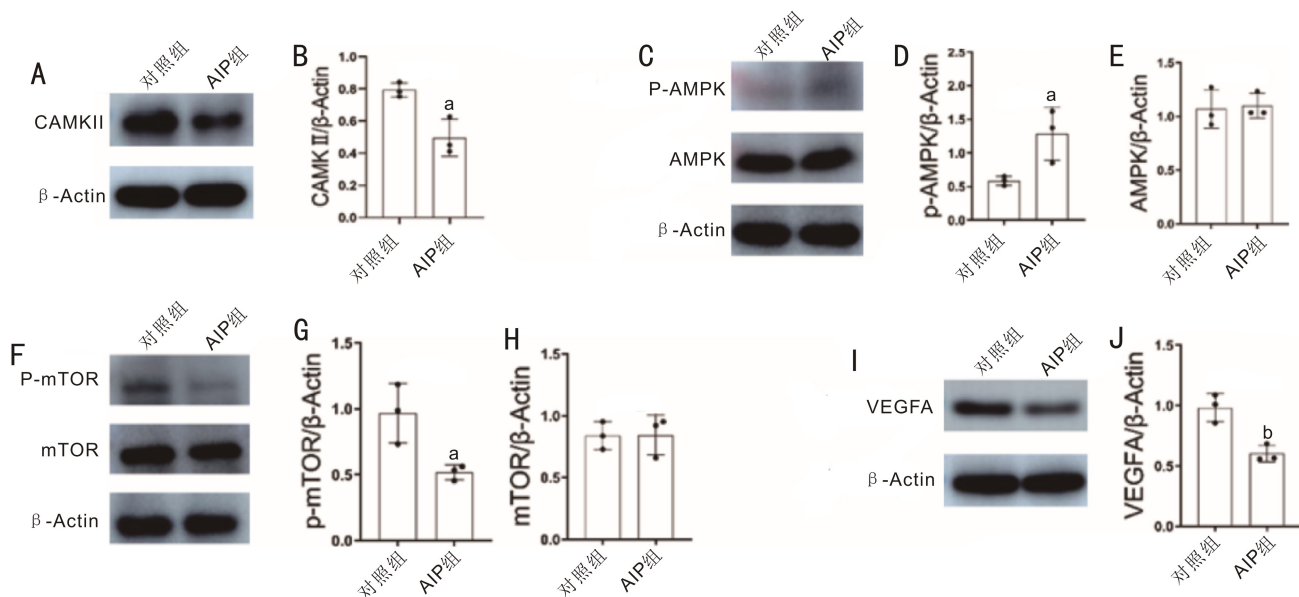


图7 Western blotting 检测 AIP 作用下 ARPE-19 中 CAMK II/AMPK/mTOR/VEGFA 信号通路相关蛋白表达 A:AIP 降低 CAMK II 蛋白表达水平;B:根据 A 图结果对 CAMK II 蛋白表达进行定量分析($^aP<0.05$ vs 对照组);C:AIP 增强 P-AMPK 蛋白表达水平,对 AMPK 蛋白表达无明显影响;D:根据 C 图结果对 P-AMPK 蛋白表达进行定量分析($^aP<0.05$ vs 对照组);E:根据 C 图结果对 AMPK 蛋白表达进行定量分析;F:AIP 降低 P-mTOR 蛋白表达水平,对 mTOR 蛋白表达无明显影响;G:根据 F 图结果对 P-mTOR 蛋白表达进行定量分析($^aP<0.05$ vs 对照组);H:根据 F 图结果对 mTOR 蛋白表达进行定量分析;I:AIP 降低 VEGFA 蛋白表达水平;J:根据 I 图结果对 VEGFA 蛋白表达进行定量分析($^bP<0.01$ vs 对照组)。

3 讨论

血管新生是指在原有血管的基础上形成新的血管,在生理发育和病理过程中都起着至关重要的作用^[19-20]。眼内新生血管是多种致盲眼病的病理生理基础,例如,增殖期糖尿病视网膜病变和早产儿视网膜病变由于视网膜前血管过度生长,引发纤维瘢痕形成,最终导致视网膜脱离^[21];湿性年龄相关性黄斑变性的发生与脉络膜新生血管生成有关,新生血管生成可诱发出血和渗漏,最终形成瘢痕,造成视力永久丧失^[22]。因此,如何有效抑制血管新生已经成为临床治疗新生血管眼病亟待解决的难题。目前,抗 VEGF 药物如雷珠单抗注射液等成为临床治疗眼科新生血管性疾病的主流药物,但是存在病情不能根治、需反复玻璃体腔注射治疗等缺陷,不仅增加了感染、出血的风险,加之昂贵的费用,给患者带来了沉重的经济负担^[23]。因此,寻找一种经济有效的替代治疗方案仍旧是科研工作者努力的方向。

CAMK II 作为一种多功能激酶,是 Ca^{2+} 信号转导的中心协调者和执行者^[10]。目前,在人体组织中已鉴定出

CAMK II 的四种亚型(α 、 β 、 γ 、 δ)^[24]。这些亚型在组织中表达不同, α 和 β 亚型主要在神经系统中表达,视网膜中仅表达于神经节和无长突细胞^[7,14],而 γ 和 δ 亚型在心血管系统和其他组织中表达,是内皮细胞中表达的主要亚型^[10,24-28]。CAMK II 已被确定为治疗多种血管疾病的重要靶点^[11-13]。Ashraf 等^[14]在研究中证明了 CAMK II 在视网膜血管生成中的关键作用,不同的亚型对新生血管生成的影响并不相同,如 CAMK II- δ 基因敲除不仅抑制病理性视网膜新生血管,而且对修复性血管生成产生不利影响。因此,我们推测如果仅仅抑制眼内血管内皮细胞 CAMK II 的表达,在治疗病理性新生血管的同时还会产生不可预测的副作用。RPE 作为血眼屏障的重要组成部分,以动态平衡的方式极性分泌多种血管生长因子,在抑制病理新生血管生成有至关重要的作用^[3-4]。因此,我们通过在体外构建 ARPE-19 和 HUVECs 非接触共培养体系来模拟体内 RPE 与眼内血管内皮细胞的生态环境,通过抑制 ARPE-19 中 CAMK II 的表达来研究其对 HUVECs 血管生成能力的影响。

我们首先将过表达 CAMK II- δ 的 ARPE-19 样本进行 RNA 测序和生信分析发现,差异基因的功能主要富集在细胞生长与死亡、运输和分解代谢、细胞群落-真核生物、细胞运动细胞生物学过程中。其中,细胞生长与死亡和细胞运动都与血管生成有着密切的关系。这为我们后续的实验验证提供了一定的生物学理论依据。划痕实验和 transwell 迁移实验均证明抑制 ARPE-19 中 CAMK II 的表达可以抑制 HUVECs 迁移能力。但是侵袭实验和小管形成实验表明抑制 ARPE-19 中 CAMK II 的表达并不能改变 HUVECs 的侵袭和管腔形成能力。血管内皮细胞的迁移是血管生成的前提条件和关键步骤^[29]。因此,我们认为抑制 CAMK II 的表达可以在一定程度上增强 RPE 抗病理新生血管生成的能力。CAMK II 可以通过多种信号通路影响血管生成。有研究表明,丹参通过调节 CAMKK β /AMPK 等信号通路影响 VEGF 表达^[30]。CAMKK β 作为 CAMKK 的一种亚型,可以催化并激活 CAMK II。AMPK 即 AMP 依赖的蛋白激酶,是生物能量代谢调节的关键分子。AMPK 可以通过 PI3K/Akt/mTOR 等信号通路抑制肿瘤促转移因子诱导的血管生成^[31]。mTOR 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,属于磷脂酰肌醇 3-激酶相关激酶 (phosphatidylinositol-3kinase-related kinase, PIKK) 蛋白家族。一旦被激活,mTOR 介导转录、细胞骨架组织、细胞生长和细胞存活^[32]。VEGFA 被公认为是最关键的血管生成因子^[33]。有研究表明,VEGFA 与 mTOR 活性表达呈正相关^[34]。因此,我们推测 CAMK II 可能是通过 AMPK/mTOR/VEGFA 信号通路参与血管生成的。我们通过 Western blotting 检测 AIP 作用下 ARPE-19 蛋白表达证实了这一点。Western blotting 结果表明 CAMK II、P-mTOR、VEGFA 蛋白表达均明显下调,而 P-AMPK 蛋白表达明显上调。这与李钰洁等^[33] 研究中表明的 VEGFA 与 mTOR 活性表达呈正相关的结论相一致。以上实验结果表明,CAMK II 可能通过 AMPK/mTOR/VEGFA 信号通路来影响细胞的迁移能力。

综上所述,在非接触共培养体系下抑制 ARPE-19 中 CAMK II 表达可以显著降低 HUVECs 迁移能力,但不能改变侵袭和管腔形成能力,这可能是通过 AMPK/mTOR/VEGFA 信号通路实现的。因此,CAMK II 对预防或治疗多种眼内新生血管性疾病具有重要的潜在价值,但仍需要大量实验去验证。

参考文献

[1] 宋娅琴,马雪英,王笃亲,等. 全视网膜光凝技术联合康柏西普对新生血管性青光眼的疗效. 安徽医科大学学报, 2020,55(12):1941-1945.

[2] 闫秀丽,王钦,陆相庆. 血清 TLR4 和 VEGFA 表达对糖尿病视网膜病变的临床诊断及预后价值评估. 国际眼科杂志, 2023,23(10):1709-1713.

[3] 荣军博. 全反式视黄酸(atRA)对人视网膜色素上皮(RPE)屏障功能影响的研究. 中南大学, 2011.

[4] Han SX, Chen JJ, Hua JJ, et al. MITF protects against oxidative damage-induced retinal degeneration by regulating the NRF2 pathway in the retinal pigment epithelium. Redox Biol, 2020,34:101537.

[5] Popescu M, Bogdan C, Pinteau A, et al. Antiangiogenic cytokines as potential new therapeutic targets for resveratrol in diabetic retinopathy. Drug Des Devel Ther, 2018,12:1985-1996.

[6] Sheibani N, Wang SJ, Darjatmoko SR, et al. Novel anti-angiogenic PEDF-derived small peptides mitigate choroidal neovascularization. Exp Eye Res, 2019,188:107798.

[7] Guo XZ, Zhou J, Starr C, et al. Preservation of vision after CAMK II-mediated protection of retinal ganglion cells. Cell, 2021,184(16):4299-4314.e12.

[8] Dong Z, Saikumar P, Weinberg JM, et al. Calcium in cell injury and death. Annu Rev Pathol, 2006,1:405-434.

[9] Hartwick AT, Hamilton CM, Baldrige WH. Glutamatergic calcium dynamics and deregulation of rat retinal ganglion cells. J Physiol, 2008,586(14):3425-3446.

[10] Chi MN, Evans H, Gilchrist J, et al. Phosphorylation of calcium/calmodulin-stimulated protein kinase II at T286 enhances invasion and migration of human breast cancer cells. Sci Rep, 2016,6:33132.

[11] Cuello F, Lorenz K. Inhibition of cardiac CAMK II to cure heart failure: step by step towards translation? Basic Res Cardiol, 2016,111(6):66.

[12] Mollova MY, Katus HA, Backs J. Regulation of CAMK II signaling in cardiovascular disease. Front Pharmacol, 2015,6:178.

[13] Toussaint F, Charbel C, Allen BG, et al. Vascular CAMK II: heart and brain in your arteries. Am J Physiol Cell Physiol, 2016,311(3):C462-C478.

[14] Ashraf S, Bell S, O'Leary C, et al. CAMK II as a therapeutic target for growth factor-induced retinal and choroidal neovascularization. JCI Insight, 2019,4(6):e122442.

[15] Chen ZB, Li BL, Dong QQ, et al. Repetitive transient ischemia-induced cardiac angiogenesis is mediated by CAMK II activation. Cell Physiol Biochem, 2018,47(3):914-924.

[16] Ni YJ, Deng J, Bai HY, et al. CAMK II inhibitor KN-93 impaired angiogenesis and aggravated cardiac remodelling and heart failure via inhibiting NOX2/mtROS/p-VEGFR2 and STAT3 pathways. J Cell Mol Med, 2022,26(2):312-325.

[17] Shiomi R, Shigetomi K, Inai T, et al. CAMK II regulates the strength of the epithelial barrier. Sci Rep, 2015,5:13262.

[18] Geisen P, McColm JR, Hartnett ME. Choroidal endothelial cells transigrate across the retinal pigment epithelium but do not proliferate in response to soluble vascular endothelial growth factor. Exp Eye Res, 2006,82(4):608-619.

[19] Popovic N, Hooker E, Barabino A, et al. COCO/DAND5 inhibits developmental and pathological ocular angiogenesis. EMBO Mol Med, 2021,13(3):e12005.

[20] 殷路. METTL14 介导 N6-甲基腺苷修饰 MAP2 在人 RPE 细胞中的作用研究. 大连医科大学, 2021.

[21] 龚轶,邵彦,李筱荣. 糖尿病玻璃体性状特点及其与增殖性糖尿病视网膜病变的关系. 国际眼科杂志, 2023,23(9):1482-1485.

[22] 陈玉红,赵学章,郑璨. 玻璃体腔注射雷珠单抗治疗湿性年龄相关性黄斑变性的临床效果. 中国现代药物应用, 2021,15(13):199-201.

[23] 欧阳灵艺,邢怡桥. 抗 VEGF 药物在湿性年龄相关性黄斑变性中的应用进展. 国际眼科杂志, 2020,20(1):74-78.

[24] Tobimatsu T, Fujisawa H. Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. J Biol Chem, 1989,264(30):17907-17912.

[25] Guo T, Zhang T, Ginsburg KS, et al. CAMK II δ C slows [Ca]²⁺ decline in cardiac myocytes by promoting Ca Sparks. Biophys J, 2012,102(11):2461-2470.

[26] Mishra S, Ling HY, Grimm M, et al. Cardiac hypertrophy and heart failure development through Gq and CaM kinase II signaling.

J Cardiovasc Pharmacol, 2010,56(6):598-603.
[27] Singh MV, Swaminathan PD, Luczak ED, et al. MyD88 mediated inflammatory signaling leads to CAMK II oxidation, cardiac hypertrophy and death after myocardial infarction. J Mol Cell Cardiol, 2012,52(5):1135-1144.
[28] Swaminathan PD, Purohit A, Soni S, et al. Oxidized CAMK II causes cardiac sinus node dysfunction in mice. J Clin Invest, 2011,121(8):3277-3288.
[29] Lamalice L, Le Boeuf F, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis. Circ Res, 2007,100(6):782-794.
[30] Jia QQ, Zhu RY, Tian YM, et al. Salvia miltiorrhiza in diabetes: a review of its pharmacology, phytochemistry, and safety. Phytomedicine,

2019,58:152871.
[31] Li Y, Sun R, Zou J, et al. Dual roles of the AMP-activated protein kinase pathway in angiogenesis. Cells, 2019,8(7):E752.
[32] Chong ZZ, Shang YC, Zhang LJ, et al. Mammalian target of rapamycin; hitting the bull's-eye for neurological disorders. Oxid Med Cell Longev, 2010,3(6):374-391.
[33] 李钰洁, 侯旭, 张茜. NVG患者房水和血清中 VEGF-A 和 PDGF 及 PEDF 的临床意义. 国际眼科杂志, 2020, 20(12):2151-2154.
[34] 白卫星, 郭德华, 何艳艳, 等. 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白在脑动静脉畸形中的表达及其对病灶血管内皮组织增殖与凋亡的影响. 中国脑血管病杂志, 2022,19(10):685-690,711.

《科技期刊世界影响力指数(WJCI)报告》 2023版中国眼科期刊入选名单及排名

《科技期刊世界影响力指数(WJCI)报告》2023版经严格评议,精选全球优秀科技期刊1555种为《世界引文数据库》来源期刊,中国期刊1772种,其中中文期刊1350种。期刊名录及指标、收录证书等可通过网络免费查阅,网址为:[HTTP://WJCI.CNKI.NET](http://WJCI.CNKI.NET)。入选《科技期刊世界影响力指数(WJCI)报告》2023版的中国眼科期刊共9种,其WJCI学科排名及分区等各项评价指标如下表。

2023版《科技期刊世界影响力指数(WJCI)报告》中国眼科期刊入选名单及排名

序号	刊名	ISSN/EISSN	出版商/主办单位	总被引频次	影响因子	WAJCI	WI	WJCI	WJCI学科排名	分区
1	EYE AND VISION	2326-0246/ 2326-0254	浙江省新闻出版广电局	1294	5.349	1.816	0.139	1.955	20/95	Q1
2	INTERNATIONAL JOURNAL OF OPHTHALMOLOGY	2222-3959/ 2227-4898	中华医学会 西安分会	4233	1.564	0.915	0.208	1.123	50/95	Q3
3	中华眼科杂志	0412-4081/	中华医学会	1864	1.647	0.710	0.227	0.937	56/95	Q3
4	国际眼科杂志	1672-5123/	中华医学会 西安分会	1203	0.412	0.217	0.264	0.481	76/95	Q4
5	中华实验眼科杂志	2095-0160/	中华医学会	818	0.595	0.244	0.048	0.292	82/95	Q4
6	眼科新进展	1003-5141/	新乡医学院	682	0.456	0.182	0.076	0.258	86/95	Q4
7	中华眼视光学与视觉科学杂志	1674-845X/	中华医学会	550	0.479	0.177	0.030	0.207	88/95	Q4
8	中华眼底病杂志	1005-1015/	中华医学会	429	0.367	0.126	0.043	0.169	89/95	Q4
9	中国眼耳鼻喉科杂志	1671-2420/	复旦大学附属 眼耳鼻喉科医院	240	0.215	0.054	0.048	0.102	91/95	Q4

摘自中国知网;<https://wjci.cnki.net/Home/JournalList?code=004>