

胡椒碱通过调控H19/miR-29b通路改善高糖低氧诱导的视网膜色素上皮细胞损伤

朱俊东^{1,2*}, 邓文^{1,3*}, 周峥晖², 张谱^{1,2#}

¹长沙爱尔眼科医院眼外伤科, 湖南 长沙

²暨南大学附属爱尔眼科医院眼外伤科, 广东 广州

³爱尔眼科研究所, 湖南 长沙

收稿日期: 2025年5月10日; 录用日期: 2025年6月3日; 发布日期: 2025年6月12日

摘要

目的: 研究胡椒碱对视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞在高糖 + 低氧条件下的保护作用机制。方法: 高糖(25 mM)及低氧(5% O₂持续24小时)构建RPE细胞体外(D407细胞系)糖尿病视网膜病变模型。实验主要分为对照组、高糖低氧模型组及胡椒碱干预组等。通过RT-qPCR及免疫荧光法检测lncRNA H19、miR-29b及VEGFA的mRNA或蛋白表达水平, 使用划痕实验评估D407细胞的迁移能力。结果: 与对照组相比, 高糖及低氧条件下, D407细胞lncRNA H19及VEGFA mRNA的转录增加, miR-29b的转录减少; VEGFA蛋白表达增加; 细胞迁移能力下降。使用胡椒碱干预后, 可部分逆转上述现象。结论: 胡椒碱可能通过lncRNA H19/miR-29b通路减轻高糖低氧诱导的RPE细胞损伤, 为糖尿病视网膜病变的防治提供了新的潜在治疗策略。

关键词

糖尿病视网膜病变, RPE细胞, lncRNA H19/miR-29b通路, VEGFA, 胡椒碱

Piperine Ameliorates High Glucose and Hypoxia-Induced Retinal Pigment Epithelial Cell Injury by Regulating the H19/miR-29b Pathway

Jundong Zhu^{1,2*}, Wen Deng^{1,3*}, Zhenghui Zhou², Pu Zhang^{1,2#}

¹Department of Ocular Traumatology, Changsha Aier Eye Hospital, Changsha Hunan

²Department of Ocular Traumatology, Aier Eye Hospital, Jinan University, Guangzhou Guangdong

*共同第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 朱俊东, 邓文, 周峥晖, 张谱. 胡椒碱通过调控 H19/miR-29b 通路改善高糖低氧诱导的视网膜色素上皮细胞损伤[J]. 眼科学, 2025, 14(2): 88-97. DOI: 10.12677/hjo.2025.142012

³Aier Eye Institute, Changsha HunanReceived: May 10th, 2025; accepted: Jun. 3rd, 2025; published: Jun. 12th, 2025

Abstract

Objective: To investigate the protective mechanism of piperine on retinal pigment epithelium (RPE) cells under conditions of high glucose and hypoxia. **Methods:** An in vitro model of diabetic retinopathy was established using the D407 cell line, subjected to high glucose (25 mM) and hypoxic conditions (5% O₂ for 24 hours). The experiments were primarily divided into a control group, a high glucose and hypoxia model group, and a piperine intervention group. The expression levels of long non-coding RNA (lncRNA) H19, microRNA-29b (miR-29b), and vascular endothelial growth factor A (VEGFA) mRNA were measured using reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). VEGFA protein expression was assessed using immunofluorescence techniques. The migration ability of D407 cells was evaluated through a scratch assay. **Results:** Compared to the control group, the high glucose and low oxygen group exhibited increased expression levels of lncRNA H19 and VEGFA mRNA, decreased expression of miR-29b, elevated VEGFA protein expression, and reduced cell migration. Treatment with piperine partially reversed these effects. **Conclusion:** Piperine may mitigate high glucose and hypoxia-induced damage in RPE cells via the lncRNA H19/miR-29b pathway, offering a novel potential therapeutic strategy for the prevention and treatment of diabetic retinopathy.

Keywords

Diabetic Retinopathy, Retinal Pigment Epithelium Cells, lncRNA H19/miR-29b Pathway, Vascular Endothelial Growth Factor A, Piperine

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Open Access

1. 引言

糖尿病(diabetic mellitus, DM)是一种由于胰岛素相对或绝对不足引起血糖增高为特征的慢性代谢性疾病。据估计,全球目前约有 3.87 亿糖尿病患者,预计到 2035 年将增至 5.92 亿人[1]。我国大约有 9200 万患者和 1.5 亿临床前期个体,DM 及其相关并发症的治疗给国家和社会带来了巨大的财政负担[2]。无论是 1 型糖尿病(type 1 diabetes mellitus, T1DM)还是 2 型糖尿病(T2DM),持续的高血糖状态最终可导致全身多器官受损。其中,糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病最常见且致残的微血管并发症之一,严重威胁患者视力,对患者的生活质量造成重大影响。已有研究表明,糖尿病发病 10 年后,约有 50%的 T2DM 和 70%的 T1DM 患者将发展为 DR [3]。

DR 的发病原因复杂,作为 DR 的始动因素,高血糖对视网膜毒性的机制包括:低氧的局部微环境、非酶糖基化致糖基化终末产物形成(advanced glycation end products, AGEs)、增强的过氧化反应及过氧化产物生成、内质网应激以及多元醇通路、甘油二酯/蛋白激酶 C 通路(protein kinase C, PKC)、血管紧张素系统(reninangiotensin system, RAS)和血管激肽系统的激活等[4]。但单一的机制并不能完全解释 DR 的发病机理,因此仍需更进一步的研究。

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一种超过 200 个核苷酸的非蛋白编码转录产物, 近年来的研究发现, lncRNA 参与了许多疾病的进程, 包括肿瘤、心脏疾病及眼部疾病[5] [6]。LncRNA H19 是一种定位于人类 11 号染色体的印记基因, 其在胚胎形成时大量表达, 并随着年龄的增长而表达急剧下降[6]。有研究发现 DM 患者外周血中的 H19 含量显著升高, 表明其与 DM 的疾病发展有关[7], 同时, 也有研究表明, 在 DM 患者骨骼肌中的 H19 含量却是下降的, 并通过影响脂质代谢的通路而导致胰岛素抵抗[8]。而在 DR 中, H19 是否对眼部病变存在调控作用仍未知, 需进一步研究[9]。

目前 DR 的治疗主要是针对导致危及视功能的视网膜并发症, 治疗手段包括玻璃体内注射抗血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA) 和或类固醇激素等药物、以及全视网膜光凝、玻璃体切除手术等。尽管这些治疗能有效地延缓 DR 的进展, 但仍然不能完全消除视力丧失的风险。而且抗 VEGFA 治疗还存在一些缺点, 如药物抵抗、加重高危人群的心脑血管缺血事件等全身毒副作用、以及对非 VEGFA 依赖的血管增殖机制无效等[3]。同时, 上述治疗对轻度和中度的非增殖期 DR (nonproliferative DR, NPDR) 并不适合, 因为其风险显著大于患者获益, 目前可用于 NPDR 的药物主要有递法明及羟苯磺酸钙, 均可对视网膜血管发挥保护作用, 其中羟苯磺酸钙可通过减少视网膜自由基、抑制醛糖还原酶、减少白细胞聚集等途径治疗 DR, 但也存在许多副作用, 如发热、胃肠道反应、皮疹、关节疼痛甚至罕见的粒细胞缺乏症等[10], 因此, 积极寻找能够延缓乃至阻止 NPDR 进展、针对增殖期 DR (proliferative DR, PDR) 的多靶点药物(尤其是副作用小的药物)而阻止 DR 的进展显得尤为迫切。

有研究表明在增生性玻璃视网膜病变中, H19、miR-29b 及 VEGFA 之间存在相互调控关系[11], 但其在 DR 中的作用机制仍未完全阐明。因此, 本研究将进一步探讨其相互作用机制, 并使用胡椒碱干预, 以期对 DR 的临床治疗及新型药物的开发提供理论依据与实验基础。

2. 材料与方法

2.1. 细胞培养

D407 细胞系购自雅吉生物公司(上海, 中国), 并使用免疫荧光法对细胞进行了鉴定(图 1(A))。细胞培养于含 10% 胎牛血清及 1% 双抗(vol./vol.; Gibco)的 DMEM (含 5 mM D-葡萄糖, Gibco, CA, USA)培养液中, 温度 37℃, 置于 5% CO₂ 的恒温培养箱中。细胞在 10 cm 培养皿中培养并每 2 天换液, 然后被接种于不同的培养皿中进行后续实验。以含 25 mM D-葡萄糖的 DMEM 培养液+ 5% O₂ 的培养箱中培养 24 小时建立糖尿病视网膜病变细胞模型, 以含 5 mM D-葡萄糖的 DMEM 培养液为正常糖对照, 以含 5 mM D-葡萄糖及 20 mM 甘露醇的 DMEM 培养液为高渗对照。由此, 将细胞实验分为 8 组, 正常糖对照组(normal glucose control, NG), 正常糖 + 低氧对照组(NG-low oxygen, NG-LO₂)、高渗 + 低氧对照组(hyperosmosis-LO₂, HO-LO₂)、高糖 + 低氧对照组(high glucose-LO₂, HG-LO₂)、乙醇溶剂对照组(HG-LO₂-alcohol)、1 μM 胡椒碱组(piperine, PIP1)、10 μM 胡椒碱组(PIP10)和 100 μM 胡椒碱组(PIP100)。其他平衡液体化合物购自中国医药集团责任有限公司(上海, 中国)。

2.2. 细胞活性分析

依据制造商提供的实验步骤, 应用细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK8; 七海生物, 上海, 中国)研究胡椒碱(MedChemExpress, NJ, USA)、低氧环境及高糖环境下的细胞活性。简要流程如下: 依据不同的实验要求, 将 5×10^3 cells/孔接种于 96 孔板, 然后加入不同浓度的胡椒碱或低氧 + 高糖分别培养 24 或 48 小时。培养后, 每孔加入 10 μL CCK8 试剂并继续培养 1 小时。设置一列无细胞培养基作为背景对照, 使用酶标仪在 450 nm 波长下读取各孔的光密度(Optical density, OD)值。细胞活性按以下公式计算:

$$[(OD_{\text{durg}} - OD_{\text{background}})/(OD_{\text{solvent}} - OD_{\text{background}})] \times 100\%。$$

2.3. 实时定量 PCR 检测

按生产商的操作流程, D407 细胞的总 RNA 使用 TRIzol (Thermo Fisher Scientific, CA, USA)提取; miRNA 使用 PureLink miRNA 分离试剂盒(Thermo Fisher Scientific, CA, USA)提取。使用普通逆转录试剂盒(诺唯赞生物, 南京, 中国)或茎环法 MicroRNA 逆转录试剂盒(锐博生物, 广州, 中国)将等量的 RNA 逆转录为 cDNA。使用 StepOne Plus Real-Time PCR 系统(Thermo Fisher Scientific, CA, USA)及荧光 PCR 试剂盒(诺唯赞生物, 南京, 中国), 在 20 μ L 体系及特定的引物下对 cDNA 进行扩增。使用引物如表 1 所示。2 步法的热循环条件为: DNA 聚合物 95 $^{\circ}$ C 活化 20 s, 分别于 95 $^{\circ}$ C 3 s 及 65 $^{\circ}$ C 30 s 退火及延伸, 共 40 个循环。扩增特异性由溶解曲线分析确认。 β -actin 或 U6 作为目标 RNA 或 miRNA 的内参, 并使用相对 Ct 值($2^{-\Delta\Delta C_t}$)法计算特定基因的转录水平。

Table 1. Primers used in quantitative real-time PCR amplification

表 1. 实时定量 PCR 使用引物序列

Gene symbol	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
VEGFA	CGAAACCATGAACTTTCTGC	CCTCAGTGGGCACACACTCC
H19	AAATGGTGCTACCCAGCTCA	TCCAGAGCCGATTCTCTGAGT
β -actin	GGCATGGGTGTCAGAAGGATT	TGGTGCCAGATTTTCTCCA
hsa-miR-29b-3p	CGGCTAGCACCATTGAAATC	ACTGCAGGGTCCGAGGTATT
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT
hsa-miR-29b-3p-RT	GTCGTATCGACTGCAGGGTCCGAGGTATT	TCGCAGTCGATACGACAACACT

2.4. 细胞免疫荧光

将 D407 细胞接种于含细胞爬片的 24 孔板中, 按照特定的实验目的处理细胞后, 使用多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA)固定细胞 15 分钟。去除固定液, 磷酸盐冲液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤后, 再用 0.2%的 Triton X-100 室温通透 5 分钟, 然后用 10%小牛血清封闭 60 分钟, 使用视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞抗体 RPE65 (ab231782, Abcam, Cambridge, England)或 VEGFA (ab51745, Abcam, Cambridge, England) 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育。去除一抗并洗涤后, 加入荧光二抗(#11005, Thermo, MA, USA)室温避光孵育 90 分钟后洗涤, 再加入 DAPI 避光孵育 5 分钟后 PBS 洗涤, 滴抗荧光猝灭封片液并封片, 使用荧光显微镜(Zeiss, Jena, Germany)观察细胞。使用 ImageJ 软件(National Institute of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>)计算细胞质内的平均光密度值(average optical density, AOD)。

2.5. 蛋白质免疫印迹(Western Blot, WB)实验

使用标准化的 WB 法进行分析。简要步骤为: 细胞由含蛋白酶及磷酸酶抑制剂(Thermo, MA, USA)的 RIPA (碧云天生物, 上海, 中国)进行裂解。裂解后的蛋白离心后取上清并使用双吡啶甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒(联科生物, 杭州, 中国)进行定量。然后 35 μ g~40 μ g 的总蛋白在 4%~12%的 FuturePAGE 蛋白预制胶(伯仪生物, 苏州, 中国)中电泳分离并电转膜至 NC 膜(Merck Millipore, MA, USA)上。5%脱脂牛奶室温封闭 1 小时后, 使用以下抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜: AKT (#4691, CST, USA), phospho-AKT (Ser473) (#9271, CST, USA), ERK1/2 (#4695, CST, USA), phospho-p44/42 ERK1/2 (#4370, CST, USA), GAPDH (#5174, CST, USA)。0.1% PBST 洗涤后, 室温下以 HRP 包被羊抗兔二抗(A-11012, ThermoFisher Invitrogen, MA, USA)孵育 1 小时。洗涤后, 使用 WB 显影液(Millipore, MA, USA)进行孵育显影。条带密度在 Gel Doc 1000 显影系统(Bio-Rad, CA, USA)检测并使用 ImageJ 软件进行分析。计算每个条带的积分

光密度值(integrated optical density, IOD)并使用 GAPDH 的值进行标准化(相对 IOD 值, relative IOD, RIOD)。

2.6. 细胞迁移实验

细胞迁移能力通过划痕实验进行评估。简要流程如下: 将 D407 细胞接种于 6 孔板中培养至单层细胞铺满后, 使用 200 μL 吸头垂直划出一道伤口。PBS 清洗三次以去除浮游细胞后, 更换为无血清培养基, 并根据实验分组进行相应干预。干预 24 小时后拍照, 使用 ImageJ 软件测量划痕宽度并进行定量分析。

2.7. 统计分析

采用 SPSS 25.0 软件(IBM, USA)包进行统计分析, 计量资料采用均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示, 每个实验重复 3 次。K-S 检验符合正态分布的计量资料, 多组之间比较均数采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)后再以最小显著性差异(Least Significant Difference, LSD)法比较各组的差异, 方差不齐时使用 One-Way ANOVA 不等方差假设下的 Tamane's T2 检验。不符合正态分布的资料采用秩和检验。 $P < 0.05$ 时差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. 高糖及低氧对 D407 细胞的影响

首先使用免疫荧光染色对 D407 细胞进行鉴定, 结果显示其表达 RPE 特异性标志物 RPE65, 证实其为视网膜色素上皮(RPE)细胞(图 1(A))。接着使用 CCK8 法研究细胞活性, 发现 1 μM 的胡椒碱在低氧 + 高糖 24 小时可提高细胞活性, 促进细胞增殖; 100 μM 的胡椒碱在低氧 + 高糖 48 小时下, 可显著抑制细胞活性; 高渗及高糖对低氧 24 小时细胞活性无显著影响, 高渗及高糖可显著增加低氧 48 小时下的细胞活性(图 1(B))。我们选择以高糖(25mM D-葡萄糖) + 5% O_2 培养 24 小时建立糖尿病细胞模型[12] [13]。发现高糖 + 低氧可使细胞 H19 及 VEGFA mRNA 的转录增加, miR-29b 的转录减少(图 2(A)); 使 p-AKT 蛋白表达增加, 使 ERK1/2 及 AKT 蛋白的表达减少(图 2(B)、图 2(C)), 同时使 VEGFA 蛋白的表达增加(图 3), 但对 p-ERK1/2 蛋白的表达无影响(图 2(B)、图 2(C))。进一步的划痕实验表明, 高糖 + 低氧显著抑制细胞的迁移(图 4)。

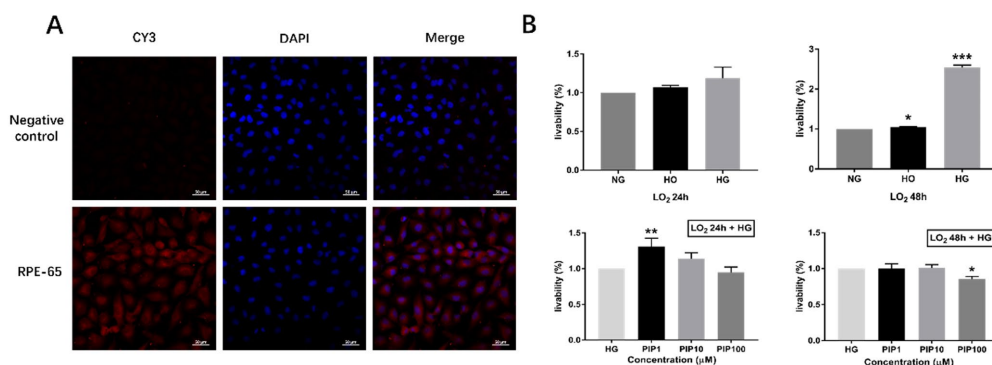


Figure 1. Immunofluorescence identification and activity detection of retinal pigment epithelium cells. A. Immunofluorescence staining of RPE cells. RPE, retinal pigment epithelium cells; CY3, Cyanine 3; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; scale bar, 50 μm . B. Cell viability assay. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared to the values of HG control, respectively. LO₂, low oxygen; NG, normal glucose; HO, hyperosmosis; HG, high glucose; PIP, piperine, the congruous number is concentration ($\mu\text{mol/L}$). Data are mean $\pm$ SD

图 1. RPE 细胞免疫荧光鉴定及活性检测。A. RPE 细胞免疫荧光染色。RPE, 视网膜色素上皮; 标尺, 50 μm 。B. CCK8 法检测细胞活力。与 HG 对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。LO₂, 低氧; NG, 正常糖; HO, 高渗; HG, 高糖; PIP, 胡椒碱, 接着的数字表示浓度($\mu\text{mol/L}$)。数据以均数 $\pm$ 标准差表示(mean $\pm$ SD)表示

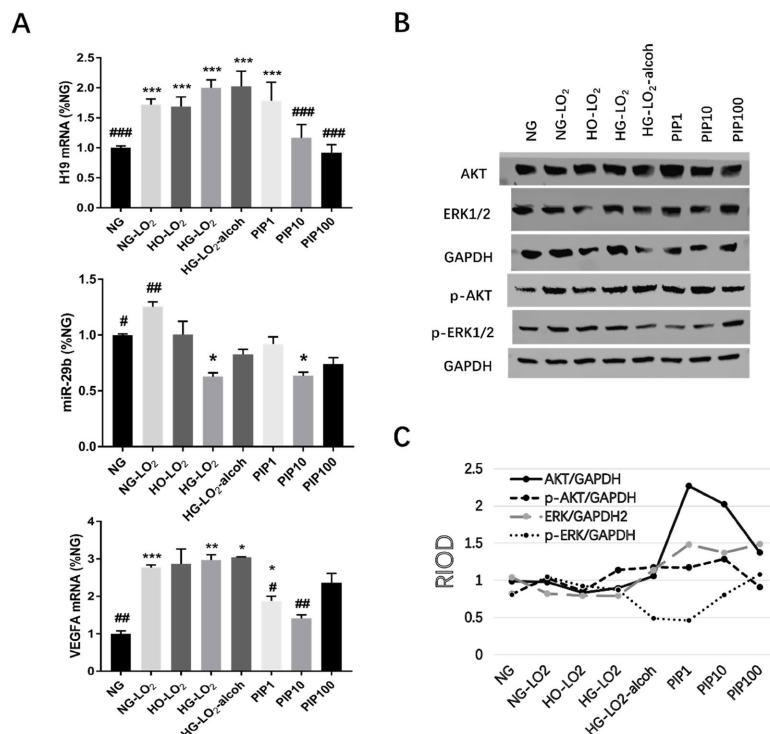


Figure 2. Effects of piperine on the transcription and expression of related genes in D407 cells. A. Effect of piperine on mRNA expression levels of H19, miR-29b, and VEGFA. B and C. WB images and statistical results of the influence of piperine on AKT/p-AKT, ERK1/2/p-ERK1/2 protein expression. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ compared to the values of NG control, respectively. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, and ### $P < 0.001$ compared to the values of HG-LO₂ control, respectively. LO₂, low oxygen; NG, normal glucose; HO, hyperosmosis; HG, high glucose; alcoh, alcohol; PIP, piperine, the congruous number is concentration ($\mu\text{mol/L}$). Data are mean $\pm$ SD

图 2. 胡椒碱对 D407 细胞的相关基因转录及表达的影响。A. 胡椒碱对 H19、miR-29b 及 VEGFA mRNA 表达水平的影响。B、C. 胡椒碱对 AKT/p-AKT 及 ERK1/2/p-ERK1/2 蛋白表达的影响, 包括代表性的 WB 图像及定量分析结果。与 NG 对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 及 *** $P < 0.001$; 与 HG-LO₂ 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 及 ### $P < 0.001$ 。LO₂, 低氧; NG, 正常糖; HO, 高渗; HG, 高糖; alcoh, 乙醇; PIP, 胡椒碱, 接着的数字表示浓度($\mu\text{mol/L}$)。数据以均数 $\pm$ 标准差表示(mean $\pm$ SD)表示

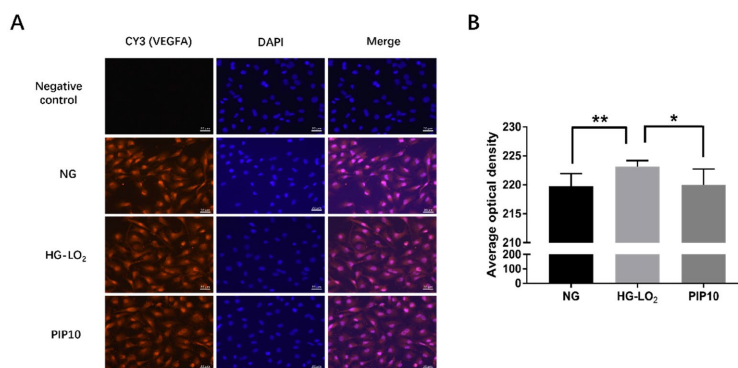


Figure 3. Immunofluorescence staining of VEGFA in D407 cells. The effect of piperine on the expression of VEGFA in D407 cells was represented in pictures (A) and statistics (B). CY3, Cyanine 3; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; LO₂, low oxygen; NG, normal glucose; HG, high glucose; PIP, piperine, the congruous number is concentration ($\mu\text{mol/L}$). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$. Data are mean $\pm$ SD; scale bar, 20 μm

图 3. 胡椒碱对 D407 细胞 VEGFA 表达的影响。图示为 VEGFA 表达的代表性图像(A)及分析结果(B)。LO₂, 低氧; NG, 正常糖; HG, 高糖; PIP, 胡椒碱, 接着的数字表示浓度($\mu\text{mol/L}$)。* $P < 0.05$ 及 ** $P < 0.01$ 。数据以均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示。标尺, 20 μm

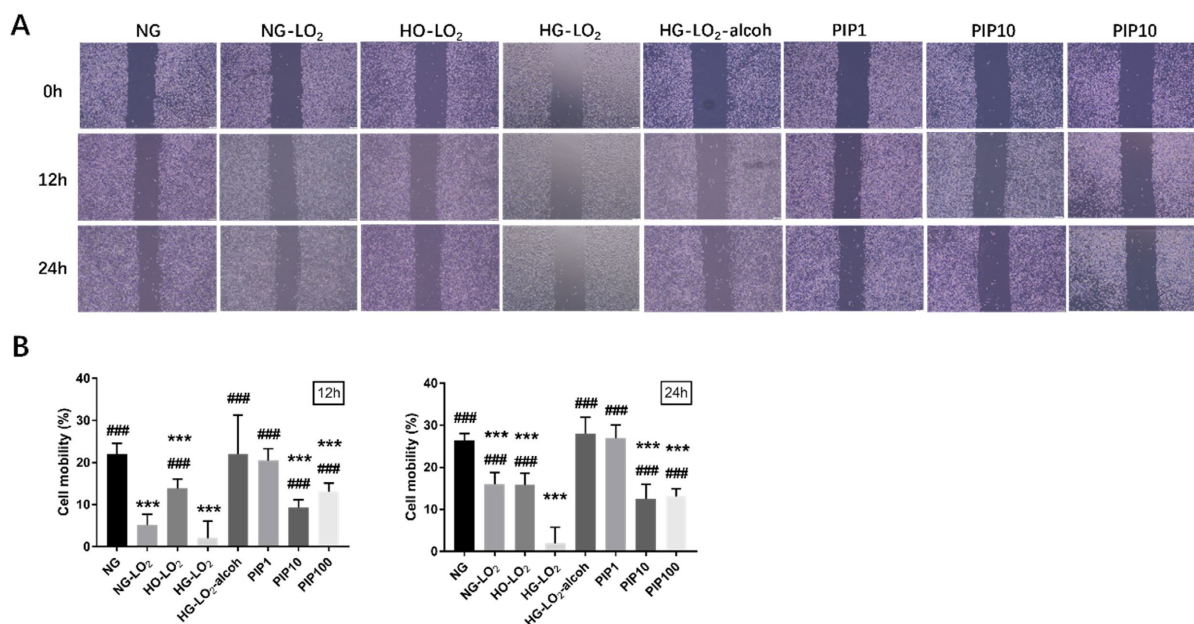


Figure 4. Effect of piperine on the migratory ability of D407 cells. Representative images of the cell migration in (A), with corresponding quantitative analysis in (B). *** $P < 0.001$ compared to the values of NG control. ### $P < 0.001$ compared to the values of HG-LO₂ control. LO₂, low oxygen; NG, normal glucose; HO, hyperosmosis; HG, high glucose; alcohol, alcohol; PIP, piperine, the congruous number is concentration ($\mu\text{mol/L}$). Data are mean $\pm$ SD; scale bar, 200 μm

图 4. 胡椒碱对 D407 细胞迁移能力的影响。图示为细胞迁移实验的代表性图片(A)及统计结果(B)。与 NG 对照组相比, *** $P < 0.001$; 与 HG-LO₂ 组相比, ### $P < 0.001$ 。LO₂, 低氧; NG, 正常糖; HO, 高渗; HG, 高糖; alcohol, 乙醇; PIP, 胡椒碱, 接着的数字表示浓度($\mu\text{mol/L}$)。数据以均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示。标尺, 200 μm

3.2. 胡椒碱对 D407 细胞的保护作用

在高糖 + 低氧条件下, 与 HG-LO₂ 组相比, 10 μM 及 100 μM 的胡椒碱可显著抑制 H19 mRNA 的转录; 1 μM 及 10 μM 的胡椒碱可显著抑制 VEGFA mRNA 的转录; 但胡椒碱对 miR-29b 的转录无影响(图 2(A))。WB 实验表明, 1 μM 、10 μM 的胡椒碱可显著增加 AKT、ERK1/2 及 p-AKT 蛋白的表达, 但胡椒碱对 p-ERK1/2 蛋白的表达无影响(图 2(B)、图 2(C)); 免疫荧光实验也证明, 10 μM 的胡椒碱可显著减少 D407 细胞质中 VEGFA 蛋白含量(图 3)。进一步的划痕实验表明, 1 μM 、10 μM 及 100 μM 的胡椒碱均可显著促进 D407 细胞的迁移(图 4)。

4. 讨论

本研究中, 使用高糖及低氧条件诱导 RPE 细胞模拟糖尿病视网膜病变细胞模型, 发现胡椒碱通过抑制 H19 的转录, 使 VEGFA 的转录及表达下降, 并通过增加 AKT、ERK1/2 及 p-AKT 的蛋白水平的表达促进 RPE 细胞的迁移。

DR 的发病原因复杂, 作为 DR 的始动因素, 高血糖对视网膜毒性的机制包括: AGEs 形成、增强的过氧化反应及过氧化产物生成、内质网应激以及多元醇通路、PKC 通路、RAS、血管激肽系统的激活及低氧诱导因子-1/VEGFA 通路的激活等[4] [14]。RPE 作为视网膜的外屏障, 可以转运许多营养物质以及分泌一些蛋白, 从而维持神经视网膜的稳态[15] [16], 因此, 本研究研究 RPE 细胞并以高糖及低氧在体外模拟 DR 的环境并研究其发病机制。

作为酪氨酸激酶家族的一员, VEGFA 在眼内可由 RPE 细胞、视网膜血管内皮细胞(retinal vascular endothelial cells, RVECs)等合成及分泌[17], 并与 2 种受体结合: 血管内皮生长因子受体 1 (vascular

endothelial growth factor receptor 1, VEGFR1)和 VEGFR2 结合, 且 VEGFA 主要与 VEGFR2 结合促进新生血管生成。早期 VEGFA 的反应性升高可通过扩张视网膜血管、增加血流而增加氧含量, 发挥代偿功能。但是长期升高的 VEGFA, 可通过破坏内皮细胞的紧密连接而促进视网膜血管渗漏[4]。与其他研究类似, 本研究发现, 高糖及低氧会使 VEGFA 的表达显著增加, 临床上大量抗 VEGFA 药物在 PDR 治疗中的应用也证实了 VEGFA 的重要作用[18] [19]。

LncRNA H19 是一种定位于人类 11 号染色体的印记基因, 其在胚胎形成时大量表达, 并随着年龄的增长而表达急剧下降[6]。H19 通过与 miR-29b 结合, 从而抵消 miR-29b 对 VEGFA mRNA 的负性调节作用, 进而间接使 VEGFA 的表达增加。与他人的研究类似[11] [20], 本研究也发现, 高糖及低氧条件下, H19 的转录显著增加, miR-29b 的转录显著减少, 提示其在 DR 中有重要作用, 是一个潜在的治疗靶点。

胡椒碱(piperine, PIP), 是自荜茇、胡椒中提取出的主要有效成分, 其拥有广泛的药理作用, 包括抗惊厥、抗炎、抗肿瘤、抗菌、抗新生血管等作用[21]。Choi 等[22]发现胡椒碱(50 mg/kg)可显著降低肝脏甘油三酯、游离脂肪酸及胆固醇含量, 同时通过增加胰岛素受体底物 1 (insulin receptor substrate 1, IRS1)活性而缓解胰岛素抵抗, 提示其可能应用于糖尿病的治疗。作为一种安全的食物提取脂溶性生物碱, 胡椒碱具有穿透血-眼屏障的能力, 因此可能通过全身应用而治疗眼部疾病, 既往我们的研究已证实了其在糖尿病小鼠模型中的治疗作用[23], 本研究进一步发现, 胡椒碱可通过 H19/miR-29b 通路减少 RPE 细胞 VEGFA 的表达, VEGFA 的靶组织为视网膜微血管, 即可能通过减少视网膜内的新生血管形成发挥保护作用; 同时, 其通过增加 AKT、ERK1/2 及 p-AKT 的表达而促进 RPE 细胞的迁移, 提示其可在高糖及低氧条件下可保持 RPE 细胞的活性。虽然临床上眼内注射抗 VEGF 药物在 DME 和 PDR 治疗中取得了良好疗效, 但 VEGFA 本身是一种血管及神经必需的生存因子, 拮抗后可能导致血管及神经细胞死亡而引起血管阻塞、神经萎缩的可能性, 因此, 理想的 DR 治疗策略应当通过多途径干预其发病机制, 同时具备较低的副作用风险。既往我们的研究表明, 胡椒碱可在减少促新生血管因子 VEGFA 表达的同时, 增加抗新生血管因子及神经保护因子色素上皮衍生因子(pigment epithelium derived factor, PEDF)的表达, 提示其具备调控血管新生与神经保护的双重作用[23], 由此推测, 胡椒碱可能作为一种治疗 DR 的潜在多靶点、相对安全的药物。

本研究也存在一些不足之处。首先, 本研究发现胡椒碱可促进 RPE 细胞的迁移, 但未检测其对细胞死亡相关的影响, 下一步实验将进一步探究其在细胞凋亡或焦亡等存活率相关方面的影响[24]。其次, 本研究未进行体内实验, 但作为一个机制的初步研究, 体外实验结果已提供了初步的可靠方向, 且我们前期的研究也证实了胡椒碱在糖尿病小鼠视网膜中的保护作用[23], 下一步将进一步研究 H19/miR-29b/VEGFA 通路在体内实验中的影响。其三, 本研究仅探讨了视网膜外屏障的主要组成细胞 RPE 的机制, 阐明了胡椒碱对 RPE 细胞 VEGFA 分泌功能的影响, 下一步将通过共培养等实验进一步研究 H19/miR-29b/VEGFA 通路对 VEGFA 的主要效应组织——视网膜微血管——的影响机制。最后, 本研究尚未深入研究 H19/miR-29b/VEGFA 通路的精细调控机制, 后续的研究将通过双荧光素酶报告基因实验预测三者的结合关系, 运用单细胞测序实验明确差异化表达基因, 并通过 RNA 干扰及过表达手段, 进一步明确 H19/miR-29b/VEGFA 通路对相关差异表达基因的调控作用及其潜在机制。

总之, 据我们所知, 本研究首次探明了胡椒碱对高糖及低氧条件下 RPE 细胞 H19/miR-29b/VEGFA 通路的影响机制, 并初步发现了其对 RPE 细胞的保护作用, 为胡椒碱在 DR 中的应用提供了实验基础。

基金项目

湖南省自然科学基金: 2025JJ90270, 2024JJ9026, 2023JJ70014, 2022JJ30085。

参考文献

- [1] Renner, S., Dobenecker, B., Blutke, A., Zöls, S., Wanke, R., Ritzmann, M., *et al.* (2016) Comparative Aspects of Rodent and Nonrodent Animal Models for Mechanistic and Translational Diabetes Research. *Theriogenology*, **86**, 406-421. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.055>
- [2] Yang, W., Lu, J., Weng, J., Jia, W., Ji, L., Xiao, J., *et al.* (2010) Prevalence of Diabetes among Men and Women in China. *The New England Journal of Medicine*, **362**, 1090-101. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1004671>
- [3] Mi, X., Yuan, T., Zhong, J., Ding, Y. and So, K. (2014) Choosing Preclinical Study Models of Diabetic Retinopathy: Key Problems for Consideration. *Drug Design, Development and Therapy*, **8**, 2311-2319. <https://doi.org/10.2147/dddt.s72797>
- [4] Barrett, E.J., Liu, Z., Khamaisi, M., King, G.L., Klein, R., Klein, B.E.K., *et al.* (2017) Diabetic Microvascular Disease: An Endocrine Society Scientific Statement. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **102**, 4343-4410. <https://doi.org/10.1210/jc.2017-01922>
- [5] Zhang, L., Dong, Y., Wang, Y., Gao, J., Lv, J., Sun, J., *et al.* (2019) Long Non-Coding RNAs in Ocular Diseases: New and Potential Therapeutic Targets. *The FEBS Journal*, **286**, 2261-2272. <https://doi.org/10.1111/febs.14827>
- [6] Gui, W., Zhu, W.F., Zhu, Y., Tang, S., Zheng, F., Yin, X., *et al.* (2020) LncRNAH19 Improves Insulin Resistance in Skeletal Muscle by Regulating Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1. *Cell Communication and Signaling*, **18**, Article No. 173. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00654-2>
- [7] Parvar, S.N., Mirzaei, A., Zare, A., Doustimotlagh, A.H., Nikooei, S., Arya, A., *et al.* (2022) Effect of Metformin on the Long Non-Coding RNA Expression Levels in Type 2 Diabetes: An *in Vitro* and Clinical Trial Study. *Pharmacological Reports*, **75**, 189-198. <https://doi.org/10.1007/s43440-022-00427-3>
- [8] Alvarez, M.L. and DiStefano, J.K. (2013) The Role of Non-Coding Rnas in Diabetic Nephropathy: Potential Applications as Biomarkers for Disease Development and Progression. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **99**, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2012.10.010>
- [9] Yang, J., Zhao, S. and Tian, F. (2019) SP1-Mediated LncRNA PVT1 Modulates the Proliferation and Apoptosis of Lens Epithelial Cells in Diabetic Cataract via miR-214-3p/MMP2 Axis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **24**, 554-561. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14762>
- [10] Solà-Adell, C., Bogdanov, P., Hernández, C., Sampedro, J., Valeri, M., Garcia-Ramirez, M., *et al.* (2017) Calcium Dobesilate Prevents Neurodegeneration and Vascular Leakage in Experimental Diabetes. *Current Eye Research*, **42**, 1273-1286. <https://doi.org/10.1080/02713683.2017.1302591>
- [11] Li, M., Li, H., Liu, X., Xu, D. and Wang, F. (2016) MicroRNA-29b Regulates TGF- β 1-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition of Retinal Pigment Epithelial Cells by Targeting AKT2. *Experimental Cell Research*, **345**, 115-124. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.09.026>
- [12] Tan, J., Xiao, A., Yang, L., Tao, Y., Shao, Y. and Zhou, Q. (2024) Diabetes and High-Glucose Could Upregulate the Expression of Receptor for Activated C Kinase 1 in Retina. *World Journal of Diabetes*, **15**, 519-529. <https://doi.org/10.4239/wjd.v15.i3.519>
- [13] Lai, Y., Hu, D., Rosen, R., Sassoon, J., Chuang, L., Wu, K., *et al.* (2016) Hypoxia-Induced Vascular Endothelial Growth Factor Secretion by Retinal Pigment Epithelial Cells Is Inhibited by Melatonin via Decreased Accumulation of Hypoxia-inducible Factors-1 α Protein. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, **45**, 182-191. <https://doi.org/10.1111/ceo.12802>
- [14] Gao, X., Li, Y., Wang, H., Li, C. and Ding, J. (2016) Inhibition of HIF-1 α Decreases Expression of Pro-Inflammatory IL-6 and TNF- α in Diabetic Retinopathy. *Acta Ophthalmologica*, **95**, e746-e750. <https://doi.org/10.1111/aos.13096>
- [15] Yan, H., Yao, P., Hu, K., Li, X. and Li, H. (2021) Long Non-Coding Ribonucleic Acid Urothelial Carcinoma-Associated 1 Promotes High Glucose-induced Human Retinal Endothelial Cells Angiogenesis through Regulating Micro-Ribonucleic Acid-624-3p/Vascular Endothelial Growth Factor C. *Journal of Diabetes Investigation*, **12**, 1948-1957. <https://doi.org/10.1111/jdi.13617>
- [16] Calado, S.M., Alves, L.S., Simão, S. and Silva, G.A. (2016) GLUT1 Activity Contributes to the Impairment of PEDF Secretion by the RPE. *Molecular Vision*, **22**, 761-770.
- [17] Li, Y., Chen, D., Sun, L., Wu, Y., Zou, Y., Liang, C., *et al.* (2019) Induced Expression of *VEGFC*, *ANGPT*, and *EFNB2* and Their Receptors Characterizes Neovascularization in Proliferative Diabetic Retinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **60**, 4084-4096. <https://doi.org/10.1167/iovs.19-26767>
- [18] Liu, Y., Zheng, Y., Zhou, Y., Liu, Y., Xie, M., Meng, W., *et al.* (2020) The Expression and Significance of mTORC1 in Diabetic Retinopathy. *BMC Ophthalmology*, **20**, Article No. 297. <https://doi.org/10.1186/s12886-020-01553-3>
- [19] Kim, S., Jung, S., Lee, Y., Han, J.Y., Choi, Y., Hong, H., *et al.* (2015) Dammareniol-II Prevents VEGF-Mediated Microvascular Permeability in Diabetic Mice. *Phytotherapy Research*, **29**, 1910-1916. <https://doi.org/10.1002/ptr.5480>
- [20] Li, X., Lv, X., Li, Z., Li, C., Li, X., Xiao, J., *et al.* (2019) Long Noncoding RNA ASLNC07322 Functions in VEGF-C

- Expression Regulated by SMAD4 during Colon Cancer Metastasis. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, **18**, 851-862. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.10.012>
- [21] Lee, S.H., Kim, H.Y., Back, S.Y. and Han, H. (2017) Piperine-Mediated Drug Interactions and Formulation Strategy for Piperine: Recent Advances and Future Perspectives. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, **14**, 43-57. <https://doi.org/10.1080/17425255.2018.1418854>
- [22] Choi, S., Choi, Y., Choi, Y., Kim, S., Jang, J. and Park, T. (2013) Piperine Reverses High Fat Diet-Induced Hepatic Steatosis and Insulin Resistance in Mice. *Food Chemistry*, **141**, 3627-3635. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.028>
- [23] Zhang, P., Zhou, Y., Tan, Y. and Gao, L. (2021) Protective Effects of Piperine on the Retina of Mice with Streptozotocin-Induced Diabetes by Suppressing HIF-1/VEGFA Pathway and Promoting PEDF Expression. *International Journal of Ophthalmology*, **14**, 656-665. <https://doi.org/10.18240/ijo.2021.05.04>
- [24] Guo, J., Chen, Y., Xu, J., Li, L., Dang, W., Xiao, F., *et al.* (2022) Long Noncoding RNA PVT1 Regulates the Proliferation and Apoptosis of ARPE-19 Cells *in Vitro* via the miR-1301-3p/KLF7 Axis. *Cell Cycle*, **21**, 1590-1598. <https://doi.org/10.1080/15384101.2022.2058839>