

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 名 稱	： 探討活化GLP-1訊息減少糖脂毒性所導致視網膜色素上 皮細胞病變之機轉研究
------------	--

執行計畫學生：李祐維

學生計畫編號：MOST 109-2813-C-040-037-B

研究期間：109年07月01日至110年02月28日止，計8個月

指導教授：黃建寧

處理方式：本計畫可公開查詢

執行單位：中山醫學大學醫學研究所

中華民國 110年03月31日

計畫名稱：探討活化 GLP-1 訊息減少糖脂毒性所導致視網膜色素上皮細胞病變之機轉研究

Investigating the mechanism of activated GLP-1 messages to reduce retinal pigment epithelial cell pathology caused by glycolipid toxicity

摘要

糖尿病視網膜病變(Diabetic retinopathy, DR)是最常見的糖尿病併發症之一，也是我國青壯年人口失明的主要原因。DR 的致病機制非常複雜，但病程進展基本上與視網膜血管病變相關，然而近年來許多證據顯示 DR 的血管病變惡化可能與視網膜屏障受損有所關聯，而此屏障是由視網膜色素上皮細胞(Retinal pigment epithelium cell, RPE)的細胞間緊密接合蛋白來形成與維持。另外最新研究也指出高脂對 DR 的發展同樣有關鍵性的影響，RPE 細胞內過多的脂質累積所造成的氧化壓力傷害，有可能會加速視網膜屏障受損。GLP-1 類似物是近年來常用來治療糖尿病的臨床用藥，已知其可以藉由活化 AMPK/SIRT1 來減少細胞的脂質累積與氧化壓力，然而 GLP-1 對於 DR 的影響則所知仍十分有限。對此，本實驗預計分為三大主軸，一為探討高糖高脂因素對 DR 病情發展的關聯性，再來是研究視網膜屏障在 DR 中是否因糖脂毒性而出現損傷，最後是評估利用 GLP-1 類似物 Liraglutide 延緩 DR 發展的潛在可能性。我們將採用 ARPE-19 人類視網膜色素上皮細胞建立高糖高脂的 DR 細胞疾病模型，藉由螢光攝影、西方墨點法分析細胞的 ROS 含量、抗氧化能力、脂質顆粒堆積、細胞連接蛋白表現等，並透過加入 Liraglutide 來探討 AMPK/SIRT1 訊息對於 ARPE-19 保護作用的影響。預期我們研究結果將能釐清活化 GLP-1 訊息在糖脂毒性下對於 RPE 的影響，有助於在未來發展出增加 DR 治療的新型策略。

關鍵字：糖尿病視網膜病變、糖脂毒性、氧化壓力、AMPK/SIRT1、GLP-1

Abstract

Diabetic retinopathy (DR) is one of the most common complications of diabetes, and it is also the main cause of blindness among young and middle-aged people in our country. The pathogenesis of DR is very complicated, but the progression of the disease is basically related to retinal vascular disease. However, in recent years, many evidences show that the deterioration of DR may be related to the damage of the retinal barrier, which is composed of retinal pigment epithelial cells (RPE cells) ,which needs the intracellular tight junction protein to form and maintain. The latest foreign research also pointed out that hyperlipidemia also has a key impact on the development of DR. The oxidative stress damage caused by excessive lipid accumulation in RPE cells may accelerate the damages of the retinal barrier. GLP-1 analogues are commonly used as clinical drugs to treat diabetes in recent years. It is known that they have ability to reduce lipid accumulation and oxidative stress in cells by activating AMPK/SIRT1 pathway. However, the effect of GLP-1 on DR is still not very clear. To sum up, this experiment is expected to be divided into three main axes, one is to explore the relevance of high-sugar and high-fat factors to the development of DR, the second is to study whether the retinal barrier is damaged due to glycolipid toxicity in DR, and the last is to evaluate the potential possibility of GLP-1 analogue, Liraglutide to delay the development of DR. We will use ARPE-19 human retinal pigment epithelial cells to establish a high-sugar and high-fat DR cell disease model. Fluorescence photography and Western blotting will be used to analyze the cell's ROS content, antioxidant capacity, lipid particle accumulation, and cell junction protein performance. Etc. and explored the influence of AMPK/SIRT1 message on the protection of ARPE-19 by adding Liraglutide. It is expected that the results of our research will clarify the effect of activated GLP-1 messages on RPE cell under glycolipid toxicity, and help to develop new strategies to improve DR treatment in the future.

Keywords: diabetic retinopathy, glycolipid toxicity, oxidative stress, AMPK/SIRT1, GLP-1

目錄

(一) 研究動機與目的	1
(二) 文獻回顧與探討	1
1. 糖尿病視網膜病變	1
2. DR 與 oBRB 損傷之間的關係	1
3. 糖尿病高血脂與 DR 的關係	2
4. 玻璃膜疣(drusen)與 RPE 的影響	2
5. 氧化壓力傷害是誘發 RPE 屏障結構損傷的重要誘因	2
6. 高脂與 RPE 的 EMT 相關	2
7. AMPK/SIRT1 路徑可減少脂質堆積所造成的氧化壓力傷害	3
8. GLP-1 可活化 AMPK 訊息活性達到保護 RPE 的作用	4
(三) 研究方法與步驟	5
1. 流程圖	5
2. 細胞培養	5
3. 建立高糖高脂的細胞疾病模型	5
4. MTT assay	5
5. 實驗分組	5
6. 檢測 RPE 脂質累積	6
7. 氧化壓力觀察	6
8. EMT 現象與細胞間緊密連接破壞之觀察	6
9. 實驗數據分析	6
(四) 實驗結果與討論	7
1. 高糖高脂條件會影響人類視網膜色素上皮細胞 ARPE-19 的細胞型態	7
2. 高糖高脂於不同濃度以及作用時間對 ARPE-19 細胞存活影響	7
3. 誘導 ARPE-19 細胞產生視網膜色素上皮細胞內的脂質蓄積	7
4. 對高糖高脂環境下 ARPE-19 細胞產生的氧化壓力之影響	7
5. GLP-1 活化 AMPK 路徑	8
6. GLP-1 恢復 ARPE-19 細胞的緊密接合	8
7. EMT 現象會因為細胞生長狀況發生紊亂	9
(五) 實驗結果附圖	9
(六) 結語	17
(七) 參考資料	18

(一) 研究動機與目的

2010 年糖尿病視網膜病變患者約 1.266 億，預計到 2030 年將增加到 1.91 億。目前在臨床上糖尿病視網膜病變(Diabetic retinopathy, DR)的治療多偏向抑制血管異常增生或病變，但治療效果有限且十分昂貴，此外血管病變屬於 DR 較後期的症狀，對於 DR 初期仍須尋覓有效的保護策略，因此有必要針對此點尋找新興的藥物研究。而類昇糖素胜肽(Glucagon-like peptide-1, GLP-1)類似物已在糖尿病療有廣泛應用，已知在視網膜色素上皮層 (retinal pigment epithelium, RPE) 細胞中有豐富的 GLP-1 受體表達，但相關的作用機制仍有許多未知之處。因此我們期望可透過執行本計畫書，釐清在糖脂毒性的類糖尿病模式下，GLP-1 在 RPE 細胞中的相關分子作用機制，以幫助在未來發展出新式的 DR 治療策略，提升病患的生活品質。

(二) 文獻回顧與探討

1. 糖尿病視網膜病變

糖尿病視網膜病變(Diabetic retinopathy, DR)是非常嚴重的糖尿病併發症，其病程可依新生血管的出現分為早期的非增生性(nonproliferative diabetic retinopathy, NPDR)與末期的增生性(proliferative diabetic retinopathy, PDR)視網膜病變。DR 最具標誌性的兩個症狀分別是糖尿病性黃斑部水腫(diabetic macular edema, DME)和增生性糖尿病視網膜病變。前者是因脈絡膜血管滲出物堆積在黃斑部周圍，後者則是出現血管新生，兩者若病情惡化甚至會滲入玻璃體，直接造成不可逆的視神經傷害。目前尚無抑制 DR 進展的有效方法，然而最近越來越多的證據指出，外側血視網膜屏障(outer blood-retinal barrier, oBRB)的破壞可能扮演著關鍵的因素，然而其中詳細的病理機制目前仍不明，也是本研究最主要的探討目標。

2. DR 與 oBRB 損傷之間的關係

人類視網膜屏障在結構上分為內外兩層，其中 oBRB 主要功能是避免循環中的毒素或外來物從血管滲入玻璃體，在視神經保護方面扮演重要的角色，而 oBRB 最主要的構成細胞便是 RPE[1]。人類 RPE 型態為排列緊密的多邊形，可以維持 oBRB 的穩定，並負責感光神經元的代謝、訊號傳遞及營養運輸等功能。RPE 主要是依賴相鄰細胞的緊密接合(tight junction)與粘連接合(adherent junction)相關蛋白來達成屏障結構，其組成蛋白包括前者的閉合蛋白 Zonula occludens-1 (ZO-1)、Zonula occludens-2 (ZO-2)、Occludin，以及後者的鈣連接蛋白 C-cadherin、E-cadherin 等[2]。而在 DR 的疾病發展過程中，ZO-1、Cadherin 皆會有減少並導致滲漏增加的現象[3]，導致視網膜屏障的緊密度受到破壞。由於 RPE 對視網膜的保護與營養供給是不可或缺的存在，因此若能降低 RPE 在 DR 中的損傷，對於緩解 DR 病情的發展及提升病患的生活品質將有很大的助益，然而目前對 DR 中 RPE 損傷的確切病理機制仍有許多待釐清之處，因此上述相關蛋白的變化將是實驗中細胞保護作用的重要觀察指標。

3. 糖尿病高血脂與 DR 的關係

高血糖與高血脂為糖尿病主要的病理特徵，尤其是血脂異常患者有更高的視網膜異常發生頻率[4]。2019年台灣有一項大型的研究指出，針對18,000多名年齡和性別相匹配的糖尿病患者進行分析，發現降血脂藥物可顯著降低視網膜病變及黃斑水腫發生率[5]。此流行病學的結果顯示了高脂在DR病程進展中似乎具有一定的影響力，亦即脂質可能在視網膜病變的惡化中扮演重要角色，但仍需要更多實驗來佐證脂質與DR的相互關聯。

4. 玻璃膜疣(drusen)與 RPE 的影響

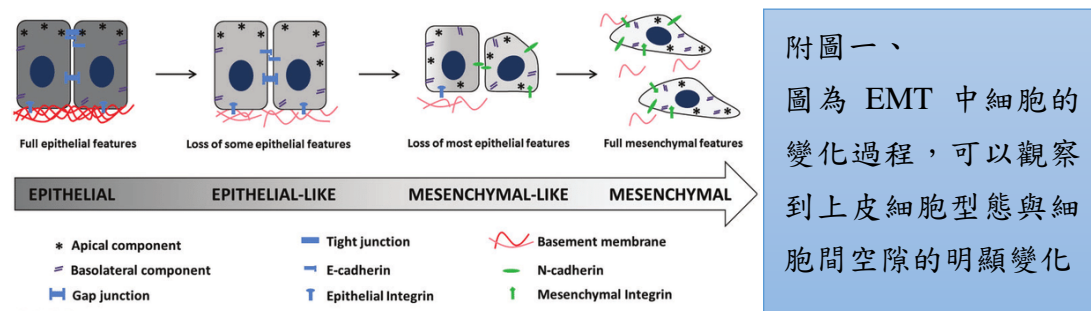
玻璃膜疣(drusen)是老年性黃斑部病變(Age related macular degeneration, AMD)和DR的共同標誌物[6]。Drusen由RPE分泌產出，在檢查眼底時可以發現drusen呈深色點狀分布在黃斑部及視網膜屏障之間，其成分主要由未酯化或酯化長鏈脂肪酸和蛋白質共同組成[7]。有流行病學研究指出糖尿病及高血脂能增加AMD的致病風險與drusen累積[8]，而細胞實驗發現ARPE-19細胞會表達apoB100載脂蛋白[9]，並分泌出中性脂質和脂質顆粒[10]，而加入油酸時也發現會促進油滴的產生[11]。這些結果說明了高脂與RPE脂質生成間有密切關係，雖drusen在視網膜中沉積的病理意義及對疾病的影響仍不清楚，但似乎與脂質誘發的RPE氧化壓力及屏障結構損壞有關，因此若能證明阻斷drusen生成的路徑對於改善BRB屏障結構破壞有所助益，就有希望藉此開發出新型的有效治療方法來減緩DR早期的病程進展。

5. 氧化壓力傷害是誘發 RPE 屏障結構損傷的重要誘因

氧化壓力傷害是造成糖尿病周邊病變的重要原因[12]，並同樣在DR中扮演重要的角色。糖脂毒性被認為是誘發DR氧化壓力的主要來源[13]，其會產生過多的活性氧(Reactive oxygen species, ROS)，而過量的ROS在細胞累積時會導致蛋白質、核酸、細胞膜等結構損壞，最終造成細胞衰老及凋亡。已知高糖環境會增加ROS的產生，並誘導了許多代謝異常，包括多元醇途徑、蛋白激酶C(Protein kinase C, PKC)、高級糖基化終產物(Advanced glycation end products, AGEs)和己糖胺(Hexos)途徑的活化，這些醣類代謝物皆會促進細胞發炎與加劇氧化壓力傷害，並與DR病理機制密切相關[14]。而高脂則會引起脂質相關的氧化壓力傷害[15]，特別在肥胖型的糖尿病患者中發現細胞會有過量的脂質累積而導致大量ROS產生，誘發脂質過氧化及發炎並造成細胞的壞死。細胞實驗證實在脂毒性下RPE細胞有脂質顆粒累積的現象[16]，表示脂質確實可能參與DR中RPE的氧化壓力傷害，因此如何減輕氧化壓力成為目前DR治療的重要目標之一。

6. 高脂與 RPE 的 EMT 有關

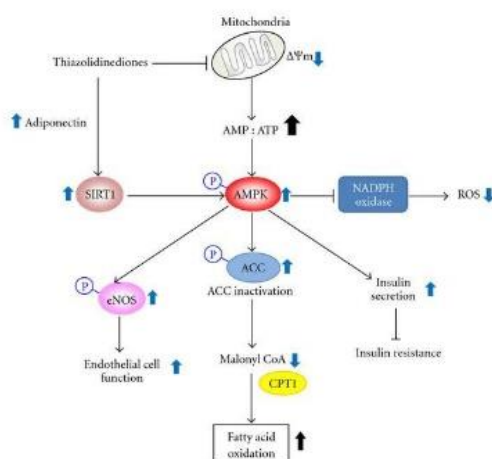
上皮細胞間質細胞轉化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是正常的細胞分化過程，也是癌症轉移的關鍵機制。病理特徵從上皮細胞之間的 E-cadherin 的降解開始，使上皮細胞的緊密連接受損。能促進 EMT 的因素眾多，而研究證實過量的脂質確實可促進在癌症進展和轉移中的 EMT 作用。最近幾年亦有研究發現，RPE 細胞會發生 EMT 的現象，並與緊密連結喪失及視網膜剝離有所關聯[17]。綜合以上，糖脂毒性除了會造成發炎、RPE 氧化壓力及屏障結構損傷之外，也可能會造成 EMT 過度活化，因此我們推論脂質可能在 DR 中的 EMT 扮演著一定程度的促進作用。由於目前針對 EMT 與 DR 關聯性的研究非常少，我們相信本研究將有助於釐清糖脂毒性與 EMT 在 DR 中所扮演的角色。



7. AMPK/SIRT1 路徑可減少脂質堆積所造成的氧化壓力傷害

AMP-activated protein kinase (AMPK)是細胞能量感受器和代謝的主要調節器[18]，能維持細胞能量的恆定，並調控葡萄糖和脂質的代謝。在抗氧化方面，AMPK 能調控抗氧化基因的表達，包括間接活化超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、抗氧化相關轉錄因子 nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)等[19, 20]。另外 AMPK 也可以透過抑制 Acetyl-CoA Carboxylase (ACC)，減低下游的脂質合成酶 Fatty acid synthase (FAS)和 sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1)活性來減少脂質生合成，同時促進 β -oxidation 來增加脂質的氧化分解[21]。除此之外，研究亦發現 AMPK 可以感受 NAD^+ 的增加進而活化 SIRT1，而 SIRT1 又可以活化 AMPK 的上游蛋白 LKB1 來增加 AMPK 的表達，兩者屬於互相活化的協同關係[22]。SIRT1 又稱長壽基因，是 NAD^+ 依賴型去乙酰蛋白家族

的一員，研究證實 SIRT1 與降低 RPE 中的發炎反應、細胞凋亡有關[23]，也參與肝臟脂質的清除代謝[24]，但幾乎沒有 AMPK 對 RPE 中脂質代謝影響的研究。

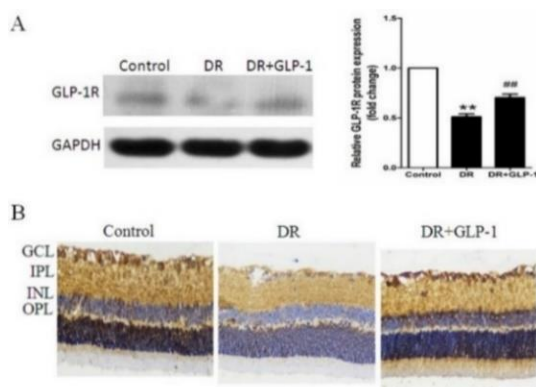


附圖二、
圖示為 AMPK/SIRT1 在細胞中受 ATP 啟動代謝調節的路徑，包含脂質氧化分解、氧化壓力的消除和增加胰島素分泌等，但在 RPE 中的機轉仍不清楚

此外糖尿病環境下會使 AMPK 活性下降，增加氧化壓力與發炎[25]，且在肥胖的條件下亦發現 SIRT1 表達受到抑制[26]。已知活化 AMPK/SIRT1 路徑在 DR 中具抗氧化、抗發炎等保護效果，尤其是抑制脂肪合成能力使它成為對抗高脂相關氧化壓力傷害的新型策略[27]，若能證明活化 AMPK/SIRT1 路徑也能調控 RPE 的脂質代謝，或許就能藉此有效阻斷 DR 的惡化。

8. GLP-1 可活化 AMPK 訊息活性達到保護 RPE 的作用

內生性昇糖素類似肽 (glucagon-like peptide 1, GLP-1) 是腸泌素的一種，由迴腸的 Langerhans 細胞所分泌約 30 個胺基酸的肽，與血糖恆定有關。然而 GLP-1 在人體會立刻被雙基肽酶-4 (dipeptidyl peptidase 4, DPP-4) 辨識與分解，半衰期僅約 2 分鐘[28]。人工合成的 GLP-1 類似物 (GLP-1 agonist, GLP-1A) 則對 DPP-4 有阻抗性，其中利拉魯肽 Liraglutide 是人體內生性 GLP-1 改造而來，半衰期約 12 小時，已經廣泛應用在第二型糖尿病的臨床治療上[29]。有趣的是，另外 GLP-1 受體 (GLP-1 receptor, GLP-1R) 尤其在 RPE 細胞上有豐富的表達，甚至比腸道還多[30]，由於 RPE 細胞通過形成 oBRB 的功能在維持視網膜穩定中有著核心作用，使 GLP-1 訊息在調控 RPE 細胞方面受到重視。例如研究發現 SOD2 的表現會因處理 GLP-1 而增加[31]，這表明 GLP-1 處理可以減輕糖尿病大鼠的氧化壓力，而氧化壓力與 BRB 損害有關。另外因在糖尿病的條件下體內的 GLP-1R 會減少，實驗證實對糖尿病大鼠給予 GLP-1 治療後，視網膜的 GLP-1R 表達恢復原本的水平[31]。以上結果表明玻璃體內注射 GLP-1 RA 在 DR 中對視網膜屏障的早期受損似乎有保護的現象，但其中的分子機制仍需要進一步的釐清。已知 GLP-1 可以活化下游的 AMPK，而 AMPK/SIRT1 的協同作用對於降低細胞脂質累積有所助益[32]。綜合以上，我們假設 RPE 細胞在 DR 中的損傷來自脂質的堆積和脂毒性，而 GLP-1 可能透過活化 AMPK/SIRT1 路徑來減少 DR 損傷，但 GLP-1 是否確實能減少 RPE 中的脂質累積，目前仍缺乏足夠的實驗佐證，因此希望透過執行本計畫書來釐清 GLP-1 在 RPE 中的生理作用，使 DR 的治療效果更精準、全面，並且在未來尋找適合的替代藥物上做出貢獻。



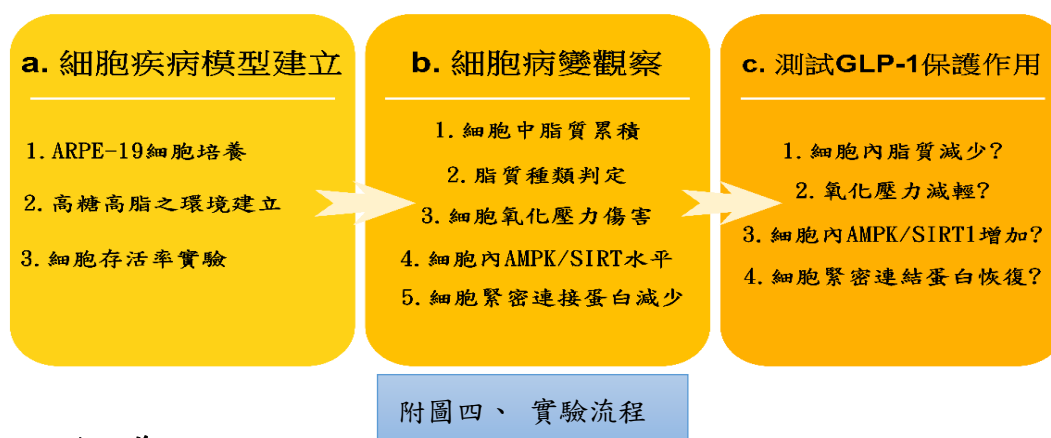
附圖三、

左圖顯示 GLP-1 受體在 DR 中有明顯減少的現象，而添加 GLP-1 似乎能有效恢復其受體的表現，視網膜結構也有明顯改善。鑒於 GLP-1 對 DR 可能的治療效果，這個發現十分重要。

(三)研究方法與步驟

1. 實驗流程圖

本實驗主要分為三大階段探討其對 RPE 的保護作用及對 DR 的治療潛能。



2. 細胞培養

本計畫使用的是 ARPE-19 人類視網膜色素上皮細胞株，購買自生物資源保存及研究中心(Bioresource collection and research center, BCRC)，培養於 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco, Carlsbad, CA, USA)與 Ham's F12 medium 混和培養液中，其中包含 10% FBS、12 g/L sodium bicarbonate、25 mM glutamine，將細胞培養於 10cm 培養皿中，培養條件為 37C 和 5% CO₂，每日觀察並大約 3 到 4 天左右即準備細胞繼代。

3. 建立高糖高脂細胞疾病模型

本次實驗使用高糖高脂來模擬糖尿病誘導的的視網膜色素上皮細胞病變。使用油酸(Oleic acid) 和棕梠酸(Palmitic acid)的比例 2:1 來配置高脂情況，並且加入 30 mM 的高葡萄糖(High glucose) (DMEM 本來 glucose 的濃度為 25mM，故最終 High glucose 濃度為 55 mM)。OA、PA 及高葡萄糖皆購買於 Sigma (Munche, Germany)。

4. MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay

臨床上檢查發現 DR 病患的色素上皮層大多是完整的，意謂 RPE 細胞並沒有明顯的死亡。為在細胞實驗重現此條件，我們利用 MTT cell viability test。其實驗方法為：將細胞接種在 24 well 中培養 24 小時，待細胞貼盤後接著每個 well 加入不同濃度(0、125、250、500 μM)的 OAPA，每個濃度重複三次。分別在 24 與 48 小時後，去除上清液後每個 well 加入 10% MTT 試劑，培養箱放置 30 分鐘後去除上清液。用 DMSO (Dimethyl sulfoxide)溶出藍紫色結晶，取出 100 μL 至 96 孔盤中，使用 ELISA reader 以波長 570 nm 進行讀取吸光值。最後將不同濃度 (0、125、250、500 μM)與相對的吸光值畫成統計圖表。

5. 實驗分組

本次計畫中的實驗分組主要分為兩大部分。第一部分為了觀察濃度連續提升的高糖高脂環境對細胞存活、脂質累積、氧化壓力、緊密接合等等的影響，將細胞以以下方表格一進行實驗分組。第二部分為探討 GLP-1 對 RPE 的保護作用，本次實驗使用的 GLP-1 類似物中文商品名為胰妥善(Victoza)，學名為 Liraglutide，購買自台灣諾華諾德藥品股份有限公司。為充分了解 GLP-1 的作用我們依下方表格二作為實驗分組。

	控制組	低濃度組	中高濃度組	高濃度組
High Glucose(mM)	25	55	55	55
OAPA (μ M)	0	125	250	500

表格一

	控制組	疾病組	治療組	實驗組
High Glucose(55 mM)	-	+	-	+
OAPA (250 μ M)	-	+	-	+
GLP-1(Liraglutide) (0.1 μ M)	-	-	+	+

表格二

6. 檢測 RPE 脂質累積

本實驗將探討 Liraglutide 是否有減少 RPE 細胞內脂質的累積。預計使用 Nile red 螢光染劑做細胞螢光顯微攝影，觀察細胞內脂質在疾病模式與 Liraglutide 處理下分別的累積狀況。方法如下：將細胞依實驗組別種於 24 孔盤中，進行螢光染色前將 Nile red 染劑與無添加胎牛血清之 medium 混和成新 medium 並將細胞盤中的 medium 抽乾與之置換，於室溫下反應 20 分鐘後利用螢光顯微鏡進行觀察。

7. 氧化壓力觀察

氧化壓力是影響 DR 發展最關鍵的因素，為了釐清 Liraglutide 在 RPE 中抗氧化的能力，我們將利用 DCFH-DA 和 DHE 螢光染色進行螢光攝影以觀察 RPE 中 ROS 的含量變化。另外也會利用西方墨點法觀察抗氧化岐化酶 SOD-1、SOD-2 的表現量來研判細胞的抗氧化能力。

8. EMT 現象與細胞間緊密連接破壞之觀察

近年來的研究中發現 DR 發展與血視網膜屏障破壞的關係越來越明顯。為探討 Liraglutide 與保護 RPE 細胞間連接的關聯性，本實驗將利用西方墨點法觀察 Occludin 等維持 RPE Tight junction 的蛋白表現。另外 E-cadherin 是 EMT 中上皮細胞狀態的重要標誌，而 N-cadherin、Vimentin 則是 EMT 中間質細胞狀態的重要標誌，本實驗也將利用西方墨點法分析 N-cad、E-cad、Vimentin 的表現在高糖高脂下細胞型態是否發生轉變。

9. 統計分析數據以 means \pm SD 表示。實驗中評估統計差異以*為 p<0.05 表示顯著差異，**為 p<0.01 表示極顯著差異。

(四) 實驗結果與討論

1. 高糖高脂條件會影響人類視網膜色素上皮細胞 ARPE-19 的細胞型態

首先將細胞種於 10 公分培養皿，等待 24 小時細胞貼盤後使用固定濃度的葡萄糖 55mM 偕同特定脂肪酸 OAPA 250 μ M 處理 48 小時後，利用倒立顯微鏡進行細胞型態的觀察。在 10 倍物鏡下，相較於控制組細胞，疾病組細胞內深色顆粒數目有顯著的增加，甚至有聚集成團的現象(圖 1 B)；另外改使用 40 倍物鏡觀察時可以發現經過高糖高脂處理的細胞出現外型皺縮、細胞間接合處較疏鬆的現象(圖 1 D)。

2. 高糖高脂於不同濃度以及作用時間對 ARPE-19 細胞存活影響

將細胞種於 24 孔盤中，以固定濃度的葡萄糖 55mM，加上依序濃度為 0 μ M、125 μ M、250 μ M、500 μ M 的 OAPA 處理，並分別在作用 24、48 小時後，以 MTT assay 測量其細胞存活率。由結果可以得知糖脂壓力的強弱或作用時間的長短對 ARPE-19 細胞的存活影響皆不大(圖 2)，其中又以 High glucose 55mM + 250 μ M(HG+ OAPA 250)的濃度下細胞型態最穩定，故使用此高糖高脂濃度作為疾病組別。另外，為確定 GLP-1 藥物對正常細胞沒有細胞毒性，在與以上相同的實驗組別中皆再加入濃度 0.1 μ M 的 GLP-1，並在 24 小時後進行 MTT assay，結果發現存活率相較控制組也無顯著變化，代表在本次實驗中使用 GLP-1 藥物並不會造成細胞額外的傷害或死亡。

3. 誘導 ARPE-19 細胞產生視網膜色素上皮細胞內的脂質蓄積

將 ARPE-19 細胞種於 24 well 盤中，待 24 小時細胞貼盤後，分別加入 0 μ M、125 μ M、250 μ M、500 μ M 的 OAPA，再加入 High glucose 55 mM 培養 24 小時後以 Nile red 觀察細胞內脂質變化。經染色後可看到(圖 3 A) High glucose + OAPA 的組別中細胞內脂質螢光訊號大幅增加，細胞內更出現清晰可見的脂質油滴(圖 3 A a ,b)，而混以 GLP-1 0.1 μ M 後細胞內的螢光訊號及脂質油滴均有下降趨勢(圖 3 B)。說明 GLP-1 能有效減少視網膜色素上皮細胞內因糖脂毒性產生而多餘的脂滴，並具有保護細胞之功效。

4. GLP-1 對高糖高脂環境下 ARPE-19 細胞產生的氧化壓力之影響

氧化壓力被認為是 DR 惡化最關鍵的原因，其中脂質累積也與 ROS 的產生有關，而對氧化壓力最直接的觀察就是進行細胞螢光染色。首先，取 24 孔盤將細胞以 0 μ M、125 μ M、250 μ M、500 μ M 的 OAPA 處理，24 小時後利用 DCFH-DA 螢

光染劑去觀察細胞內的氧化壓力水平，結果發現隨著 OAPA 的濃度提高，ARPE-19 細胞內產生的氧化壓力也會隨之提高(圖 4 A)，而將細胞以 GLP-1 0.1 μ M 處理，24 小時後改使用 DHE 螢光染劑觀察 GLP-1 對氧化壓力的影響，結果得知 GLP-1 可以大幅的減少細胞因糖脂壓力產生的氧化壓力(圖 4 B)。另外，為了解 GLP-1 對細胞抗氧化能力的影響，相同條件下 24 小時後利用細胞裂解液取得蛋白，定量後進行 Western blotting 分析 SOD-1、SOD-2 的蛋白表現。結果表明 HG+OAPA 會使細胞 SOD-1 減少(圖 4 C)，而在加入 GLP-1 後結果發現 SOD-2 的蛋白表現並沒有顯著提升(圖 4 D)。以上結果說明，細胞在高糖高脂環境下的抗氧化能力會減弱，而 GLP-1 可能不是藉由提高抗氧化能力來減緩氧化壓力，其真正原因仍需繼續探討。

5. GLP-1 活化 AMPK 路徑

由以上實驗結果說明，GLP-1 有顯著減少脂質堆積和氧化壓力的效果，因此為了探索 GLP-1 的對 RPE 可能的保護機制，採用西方墨點法檢測了 p-Thr172-AMPK 磷酸化的信號通路。首先使用 HG+OAPA 建立疾病模式，並分別作用 24、36、48 小時後，加入細胞裂解液收取蛋白，定量後再進行 western blotting 分析 p-Thr172-AMPK 的表現量。從(圖 5 A、B)現可以得知在糖脂毒性的作用下，p-Thr172-AMPK 水平從控制組的 52%下降至 31%，(樣本數=4， $p < 0.01$)；另外疾病組經過 GLP-1 處理後，發現 GLP-1 能大幅提高 p-Thr172-AMPK 能力，p-Thr172-AMPK 水平也從疾病組的 31%恢復至 49%(樣本數 = 4， $p < 0.05$)。再來進一步探討若細胞將糖脂毒性處理的時間延長至 36 及 48 小時，可以發現隨著糖脂毒性作用時間的延長，仍不影響 GLP-1 的作用效果(圖 5 C)。結果說明 GLP-1 可以穩定的拯救被糖脂毒性下調的磷酸化能力。

6. GLP-1 恢復 ARPE-19 細胞的緊密接合

上皮細胞間的緊密接合蛋白與維持視網膜結構至關重要，另外 EMT 作用可能與 RPE 細胞間連結強度弱化有關，為確認細胞間 Tight junction 在 DR 中有無產生變化，將細胞在高糖高脂環境下培養 24 小時後，利用西方墨點法檢測 EMT 相關蛋白 N-cadherin、E-cadherin、Vimentin，還有 Tight junction 相關蛋白 Occludin。首先以遞增的 OAPA 濃度處理細胞，24 小時後收取蛋白進行 western blotting 分析 N-cadherin、Occludin 的蛋白表現如(圖 6 A、B)，另外從(圖 7 A、B、C、D)的實驗結果發現 N-cadherin、Vimentin 都發生了大幅的增加，E-cadherin 表現也發生了下降，且都達到統計學上的顯著差異，代表在 DR 初期 RPE 細胞可能發生 Tight junction 受損，細胞型態改變。而在加入 GLP-1 處理後，結果表明 GLP-

1 可以反轉 EMT 現象，且可以有效恢復細胞間的緊密連接蛋白表現(圖 6 C、D)。

7. EMT 現象會因為細胞生長狀況發生紊亂

上述實驗結果說明，ARPE-19 細胞在糖脂壓力下會發生 EMT 現象，為觀察糖脂壓力作用時間延長對細胞 Tight junction 的影響，將細胞以 OAPA 250 μ M 處理，經過 36、48 小時後收取蛋白進行 western blotting 分析 N-cadherin 和 Vimentin 在蛋白表現，結果發現 N-cadherin 和 Vimentin 在糖脂壓力下表現下降(圖 7 A)，與先前作用 24 小時發生的 EMT 現象相違背。在收取細胞時以倒立顯微鏡發現細胞經過糖脂壓力長時間作用，細胞會出現互相堆疊的現象(圖 7 B)，以上述實驗結果推論，RPE 細胞在過度生長時，細胞會自行調節細胞間的緊密度，造成 EMT 作用紊亂的結果。

(五)實驗結果附圖

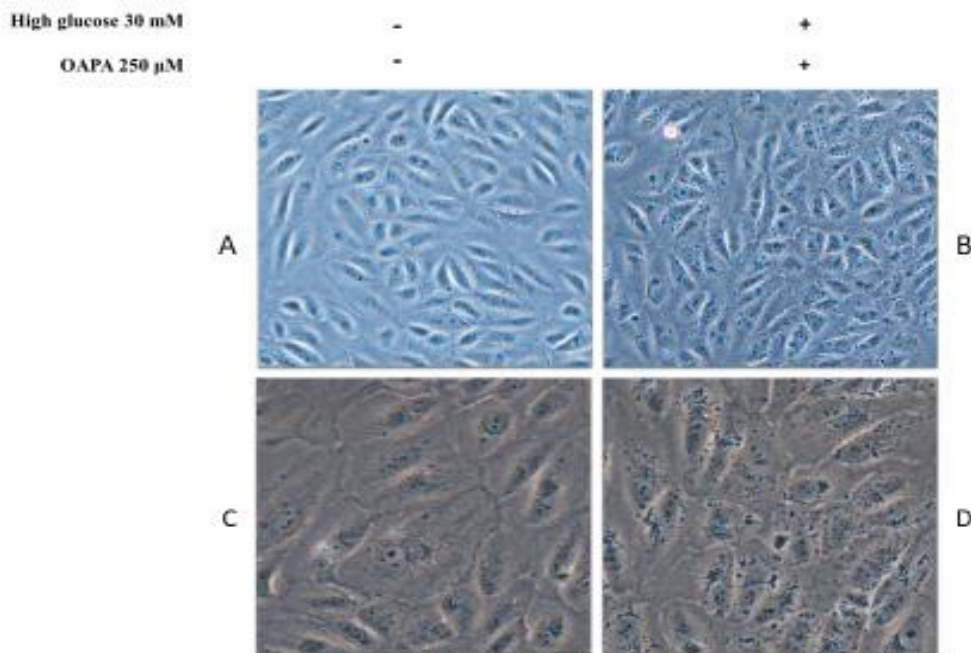


圖 1、糖脂毒性誘發 ARPE-19 視網膜色素上皮細胞產生型態變化

(A)、(B)組別以 10 倍物鏡觀察，(C)、(D)以 40 倍物鏡觀察。(A)、(C)為控制組(25 mM glucose only)。(B)、(D)為疾病組(55 mM high glucose + 250 μ M OAPA)。

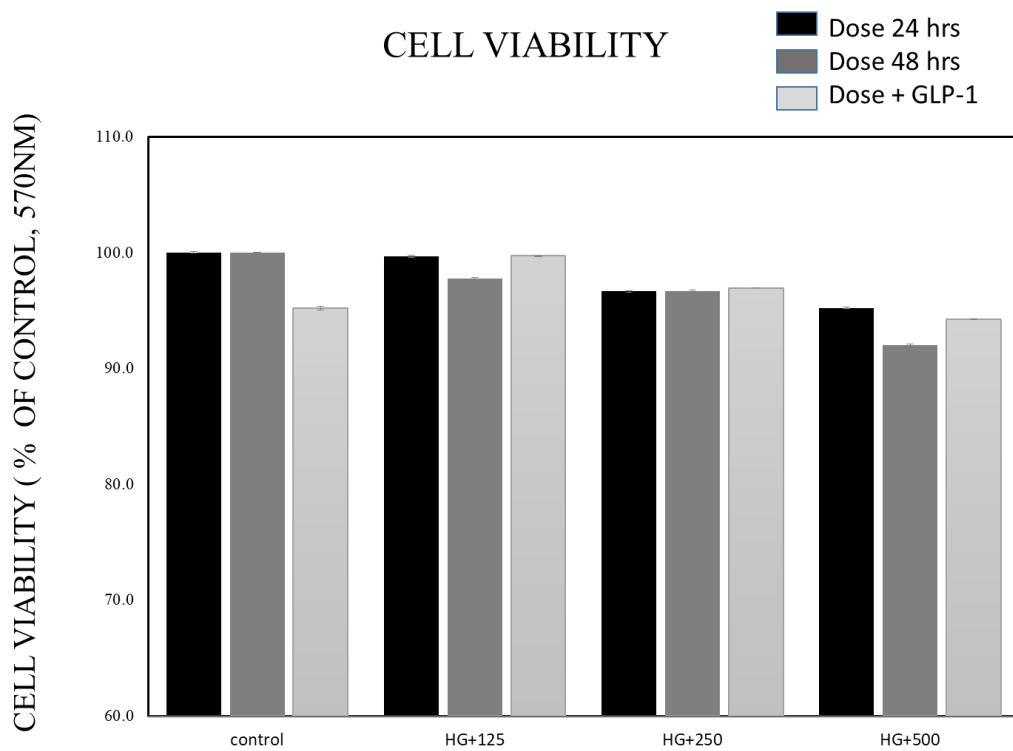


圖 2、糖脂壓力對細胞存活率的影響不明顯

將細胞固定添加高濃度葡萄糖 HG 55mM，再依序以 0、125、250、500 μ M 的混和脂肪酸 OAPA 處理，是為 Dose 組別，並分別處理 24、48 小時，再使用 MTT assay 分析細胞存活率。淺灰色長條圖為添加 GLP-1 0.1 μ M。圖表以 (relative quantification, R.Q.) 之平均 \pm 標準差顯示。

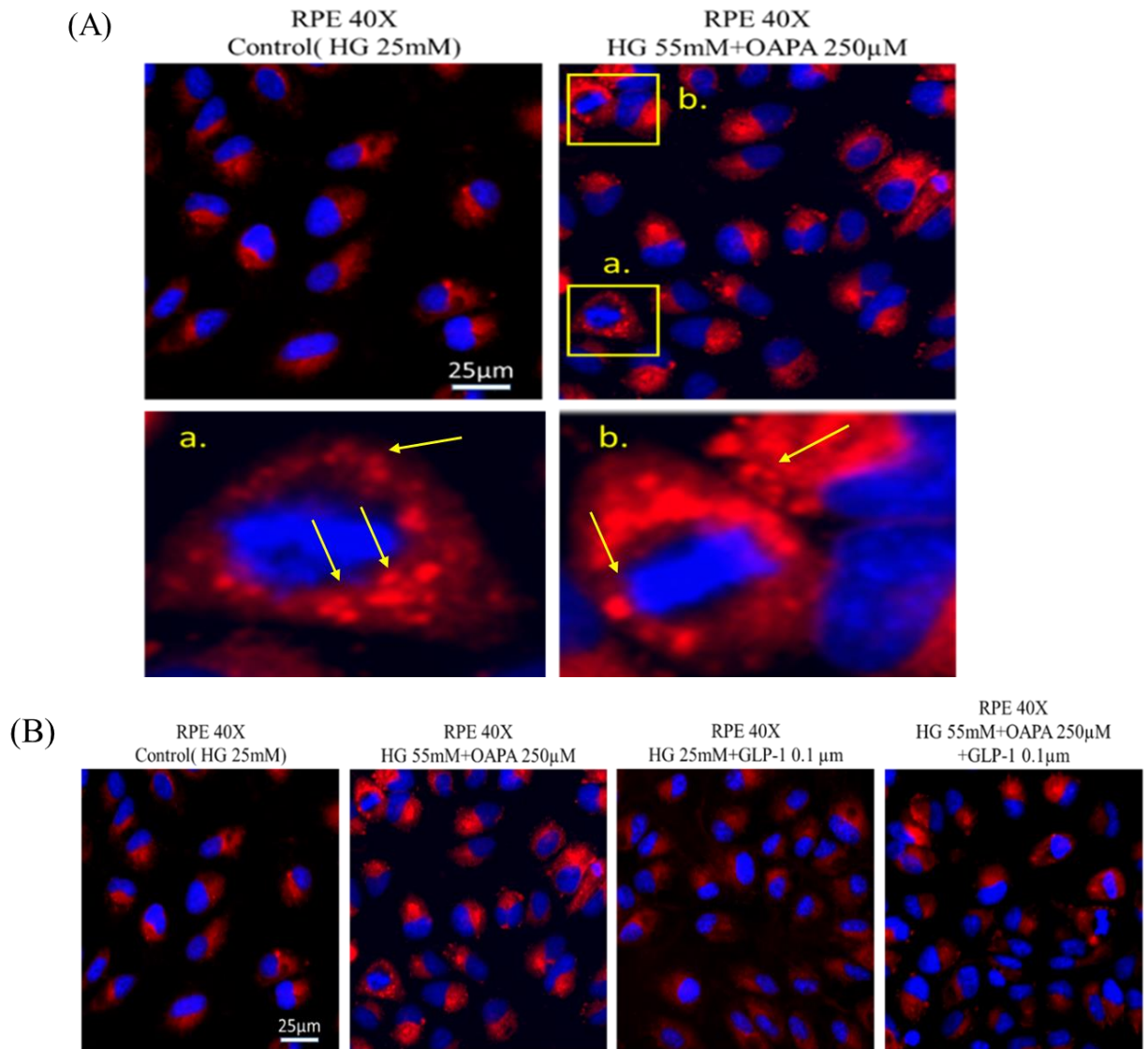


圖 3、糖脂壓力誘發 ARPE-19 細胞產生脂質顆粒累積

(A) 以 HG + OAPA 提供 ARPE-19 細胞模擬於糖尿病的高糖高脂環境，培養 24 小時後，將 medium 替換後以 Nile red 螢光染劑染色 20 分鐘，最後利用螢光顯微鏡觀察，可以看到清楚的油脂顆粒堆積在細胞內(黃色箭頭處)。(B) 與控制組相比疾病組出現大量的脂質顆粒，另外以濃度 0.1 μ M 的 GLP-1 處理後，實驗結果表明細胞內脂質堆積有顯著減少。

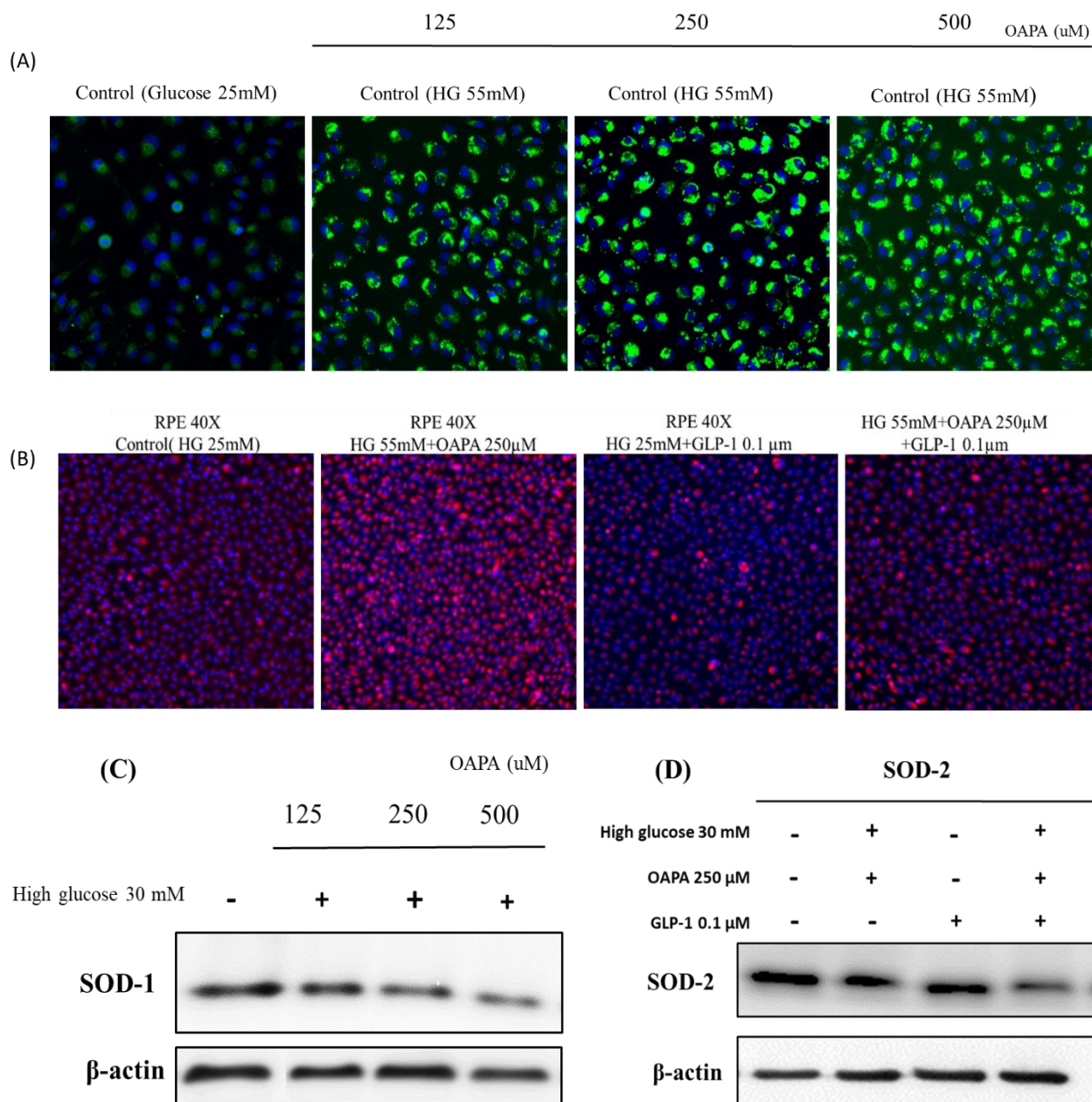


圖 4、GLP-1 對 ARPE-19 細胞中的氧化壓力之影響

(A) 將 ARPE-19 細胞以遞增濃度的 OAPA 處理，再使用 DCFH-DA 螢光染劑將細胞內的氧化壓力程度以綠色螢光表示。(B) 將細胞額外以 0.1 µM 的 GLP-1 處理，再使用 DHE 螢光染劑將細胞內的氧化壓力以紅色螢光表示。結果顯示糖脂壓力可以誘發顯著的氧化壓力，而 GLP-1 似乎有保護效果。(C) 以西方墨點法觀察 SOD-1 的蛋白表現。(D) 以西方墨點法觀察 SOD-2 的蛋白表現。

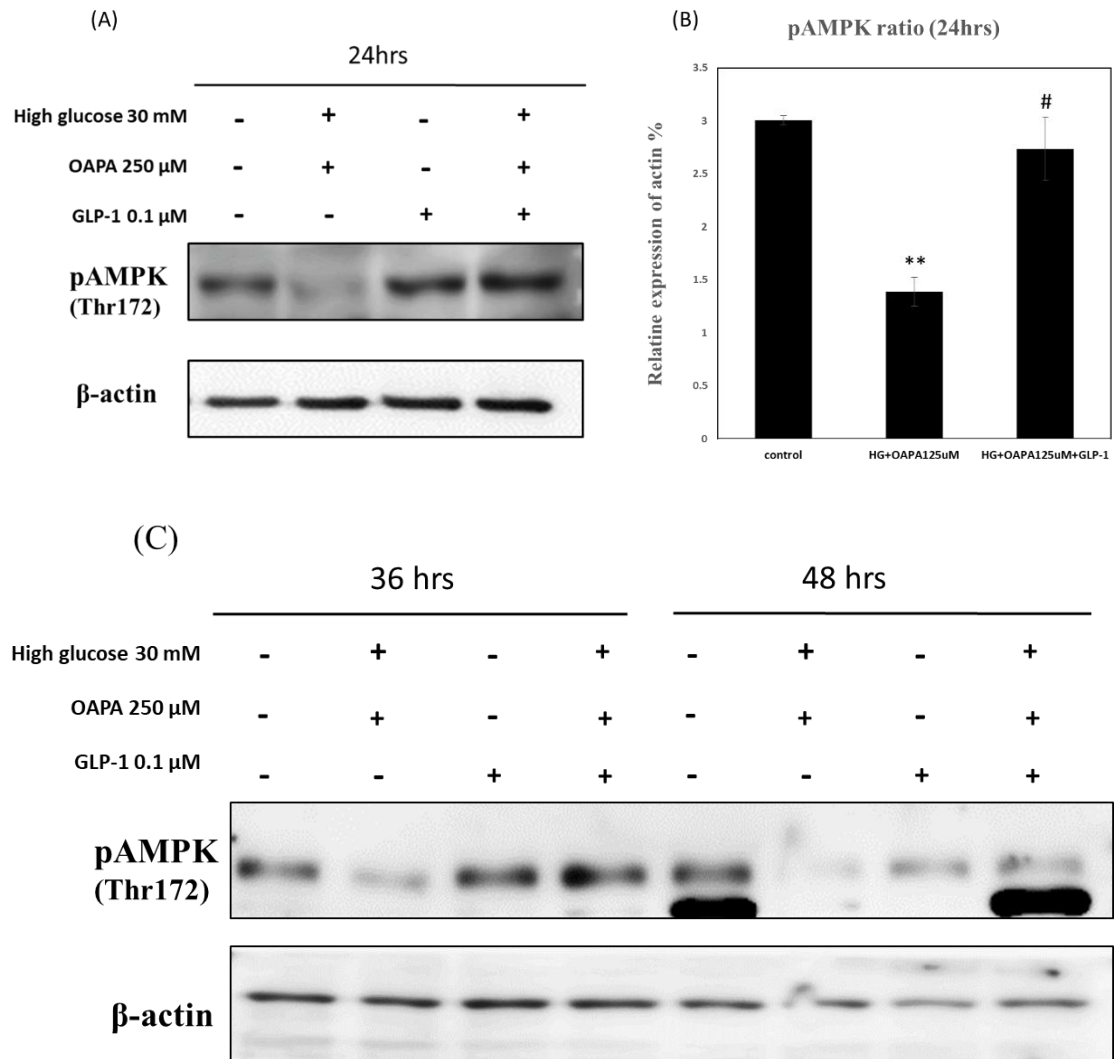


圖 5、GLP-1 可以有效恢復 AMPK 在糖脂壓力下被下調的磷酸化水平

(A) 將 ARPE-19 細胞以 control、HG+OAPA、GLP-1 only、HG_OAPA+GLP-1 處理後 AMPK 的磷酸化水平表現。(B)將蛋白表現量量化成數據後，顯著差異與 control 作對照以* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 表示，與疾病組做對照則以# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。(C)相同的實驗組別改培養 36、48 小時後，進行西方墨點法。

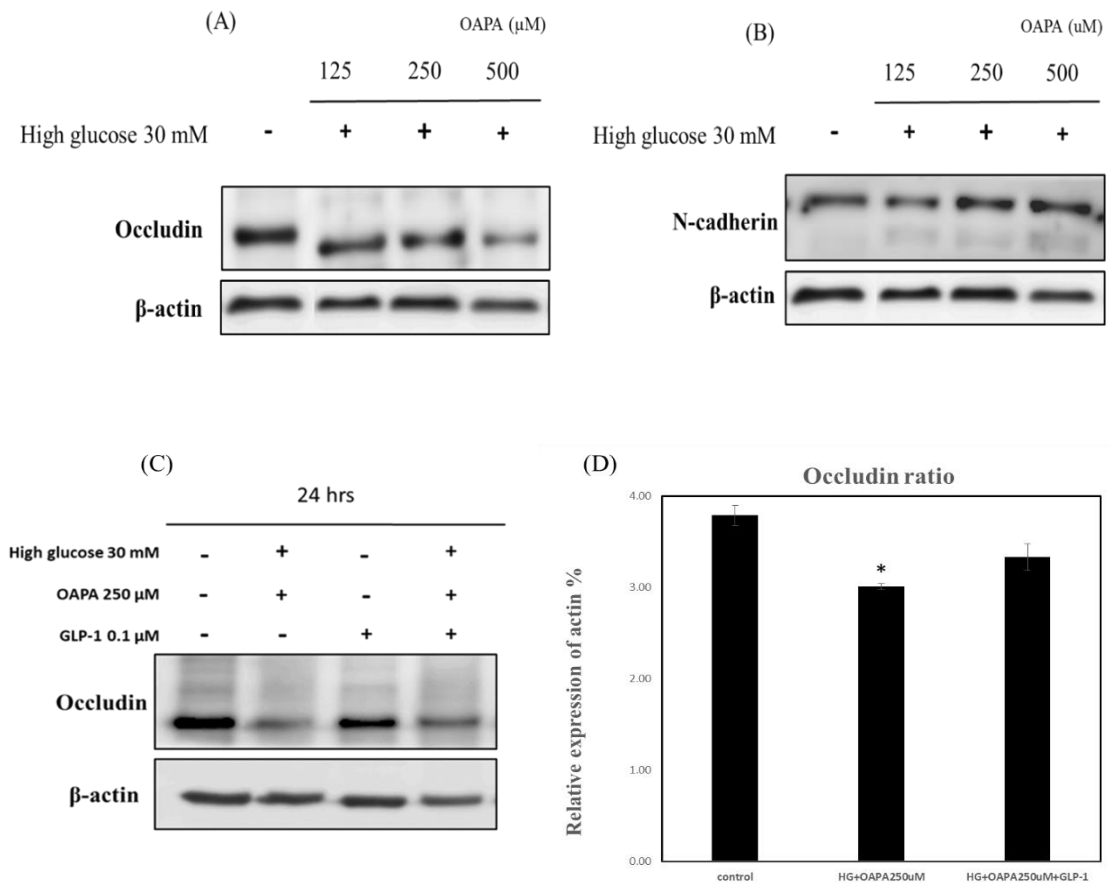


圖 6、糖脂壓力與細胞間隙緊密程度的影響 I

(A) Occludin 為主要組成 tight junction 的蛋白，以西方墨點法觀察之。(B) N-Cadherin 的增強是上皮細胞轉化為間質細胞之標誌蛋白，以西方墨點法觀察之。(C)將細胞混以 0.1 μ M GLP-1 處理，再以以西方點墨法觀察 tight junction 蛋白表現。(D)將(C)的蛋白表現量量化成數據後，顯著差異與 control 作對照以* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 表示，與疾病組做對照則以# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

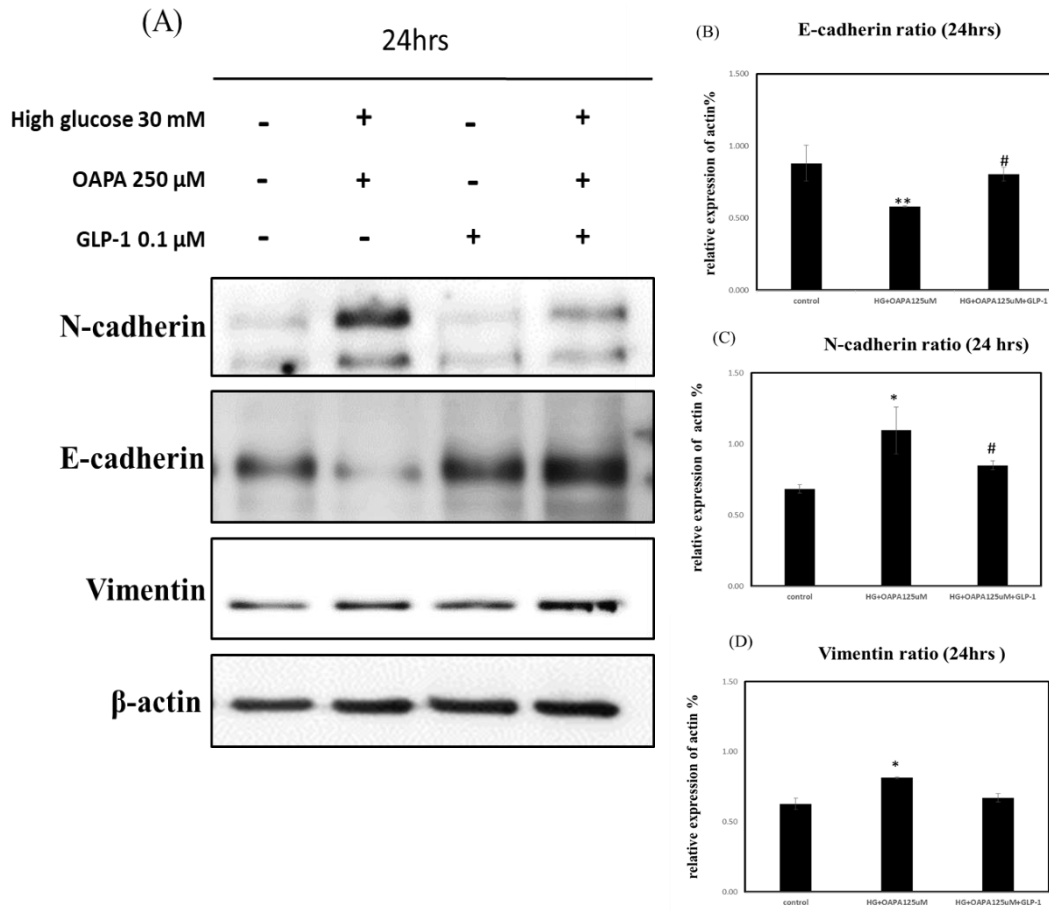
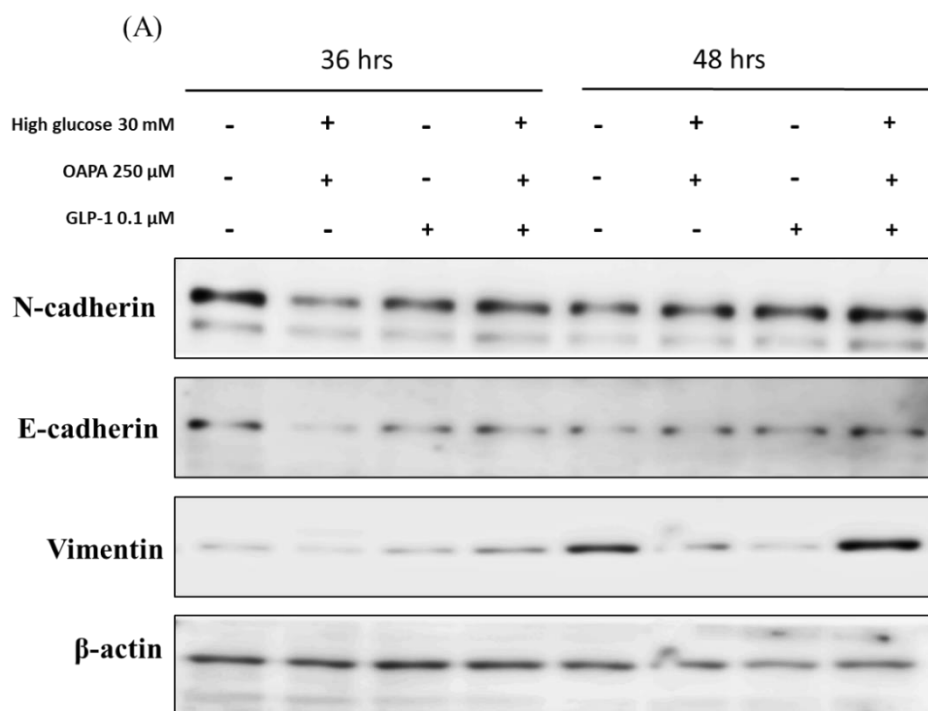


圖 7、糖脂壓力與細胞間隙緊密程度的影響 II

(A)以西方墨點法觀察在糖脂壓力下三種 EMT 標誌性蛋白: N-cadherin、E-cadherin、Vimentin 的蛋白表現。(B)、(C)、(D) 將三種標誌性蛋白的蛋白表現量化成數據後後，顯著差異與 control 作對照以* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 表示，與疾病組做對照則以# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。



(B)

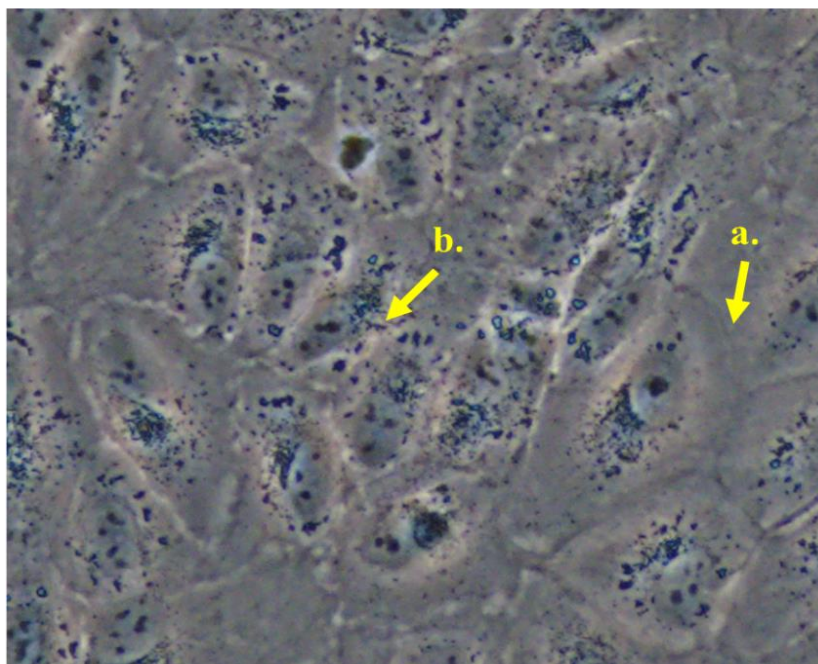


圖 8、細胞過度生長會使細胞在糖脂壓力誘發的 EMT 現象發生紊亂

(A)將細胞以 control、HG+OAPA、GLP-1 only、HG_OAPA+GLP-1 處理，並延長培養至 36、48 小時，結果發生與 24 小時不一致之紊亂現象。(B)圖為以 OAPA 250 μ M 培養 48 小時之 ARPE-19 細胞，在 40 倍物鏡觀察下可以發現 a.為型態正常的細胞，b.則因為過度生長出現細胞皺縮、堆疊的情形。

(六)結語

DR 是一種嚴重的糖尿病併發症，也是我國糖尿病患者失明最主要的原因之一。台灣的一份統計學的研究表明，長期服用降血脂藥物的糖尿病病患，其 DR 發展與惡化的速度會減慢，於是研究高血脂與 DR 的關係是本次計畫的研究主軸。首先將人類視網膜色素上皮細胞 ARPE cell 以高糖高脂進行培養，本實驗證實細胞在糖脂壓力下出現了細胞型態的變化，也誘發了細胞內的脂質顆粒堆積。細胞內脂質若發生異常堆積，會誘發脂質過氧化、ROS 等氧化壓力，正巧目前普遍認為氧化壓力是 DR 惡化最關鍵的因素，而實驗也證實細胞在糖脂壓力作用下，細胞內會出現顯著的氧化壓力，以上結果可以說明在高糖高脂下 ARPE 細胞內產生的氧化壓力可能來自蓄積的脂質，並且會造成細胞的慢性損傷，進而加速 DR 的發展從初期轉向惡化。與針對 DR 末期抑制血管增生的治療策略不同，本計畫認為在 DR 初期保護 RPE 細胞避免惡化才是解決之道，而如何減低細胞內的脂肪蓄積與氧化壓力便成為研究重點。AMPK 是調控細胞代謝的重要系統，其活化的下游蛋白與減少脂質形成和提升抗氧化能力相關，本實驗結果發現 ARPE 細胞在糖脂毒性下，AMPK 的磷酸化會遭到抑制使下游蛋白無法被活化，使細胞自我調節能力下降。另外，西方墨點法的結果顯示，在糖尿病的糖脂壓力下 ARPE 細胞一方面組成 tight junction 的蛋白發生降解，另一方面的緊密度因細胞發生 EMT 而減弱，證實了細胞間隙在 DR 中確實發生擴大並可能與臨床觀察到的視網膜滲漏有高度關係。GLP-1 是臨床上普遍使用的降血糖與血脂藥物，在本次實驗的結果皆說明 GLP-1 確實能藉由活化在糖脂壓力下遭到抑制的 AMPK，進而發揮 AMPK 調節脂質累積與氧化壓力的能力。另外 GLP-1 也可有效的反轉 EMT 現象並恢復細胞緊密程度以維持視網膜的健康。綜合本次計畫所有的實驗成果，我們驗證了 GLP-1 對 DR 強大的治療潛能，但是對於 GLP-1 活化 AMPK 調節脂肪生成與堆積的確切路徑、在細胞內引發 EMT 作用的訊號通路，或是實驗出保護效果最佳的 GLP-1 濃度...等仍是我需要繼續研究的目標。希望未來有朝一日可以利用 GLP-1 針對 DR 初期患者建置一個嶄新的治療平台，大幅改善糖尿病患者的生活品質，給予每一位患者更加光明的未來！

(七) 文献探討

1. Reichhart, N. and O. Strauss, *Ion channels and transporters of the retinal pigment epithelium*. *Exp Eye Res*, 2014. **126**: p. 27-37.
2. Rizzolo, L.J., et al., *Integration of tight junctions and claudins with the barrier functions of the retinal pigment epithelium*. *Prog Retin Eye Res*, 2011. **30**(5): p. 296-323.
3. Antonetti, D.A., et al., *Molecular mechanisms of vascular permeability in diabetic retinopathy*. *Semin Ophthalmol*, 1999. **14**(4): p. 240-8.
4. Hammer, S.S. and J.V. Busik, *The role of dyslipidemia in diabetic retinopathy*. *Vision Res*, 2017. **139**: p. 228-236.
5. Kang, E.Y., et al., *Association of Statin Therapy With Prevention of Vision-Threatening Diabetic Retinopathy*. *JAMA Ophthalmol*, 2019. **137**(4): p. 363-371.
6. Klein, R., et al., *The epidemiology of retinal reticular drusen*. *Am J Ophthalmol*, 2008. **145**(2): p. 317-326.
7. Wang, L., et al., *Abundant lipid and protein components of drusen*. *PLoS One*, 2010. **5**(4): p. e10329.
8. Adams, M.K., et al., *Abdominal obesity and age-related macular degeneration*. *Am J Epidemiol*, 2011. **173**(11): p. 1246-55.
9. Wang, L., et al., *Lipoprotein particles of intraocular origin in human Bruch membrane: an unusual lipid profile*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009. **50**(2): p. 870-7.
10. Li, C.M., et al., *Retina expresses microsomal triglyceride transfer protein: implications for age-related maculopathy*. *J Lipid Res*, 2005. **46**(4): p. 628-40.
11. Wu, T., et al., *Apolipoprotein B100 secretion by cultured ARPE-19 cells is modulated by alteration of cholesterol levels*. *J Neurochem*, 2010. **114**(6): p. 1734-44.
12. Johansen, J.S., et al., *Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice*. *Cardiovasc Diabetol*, 2005. **4**: p. 5.
13. Li, C., et al., *Oxidative Stress-Related Mechanisms and Antioxidant Therapy in Diabetic Retinopathy*. *Oxid Med Cell Longev*, 2017. **2017**: p. 9702820.
14. Brownlee, M., *The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism*. *Diabetes*, 2005. **54**(6): p. 1615-25.
15. Ceriello, A., R. Testa, and S. Genovese, *Clinical implications of oxidative stress and potential role of natural antioxidants in diabetic vascular complications*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2016. **26**(4): p. 285-92.
16. Chen, Q., et al., *Oxidative stress mediated by lipid metabolism contributes to high glucose-induced senescence in retinal pigment epithelium*. *Free Radic Biol Med*, 2019. **130**: p. 48-58.
17. Ishikawa, K., et al., *Resveratrol inhibits epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelium and development of proliferative vitreoretinopathy*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 16386.

18. Cao, S., et al., *Effects of exercise on AMPK signaling and downstream components to PI3K in rat with type 2 diabetes*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51709.
19. Tian, S., et al., *Ramipril protects the endothelium from high glucose-induced dysfunction through CaMKKbeta/AMPK and heme oxygenase-1 activation*. J Pharmacol Exp Ther, 2014. **350**(1): p. 5-13.
20. Forouhi, N.G. and N.J. Wareham, *Epidemiology of diabetes*. Medicine (Abingdon), 2014. **42**(12): p. 698-702.
21. Boudaba, N., et al., *AMPK Re-Activation Suppresses Hepatic Steatosis but its Downregulation Does Not Promote Fatty Liver Development*. EBioMedicine, 2018. **28**: p. 194-209.
22. Lan, F., et al., *SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation*. J Biol Chem, 2008. **283**(41): p. 27628-35.
23. Karbasforooshan, H. and G. Karimi, *The role of SIRT1 in diabetic retinopathy*. Biomed Pharmacother, 2018. **97**: p. 190-194.
24. Xu, F., et al., *SIRT1 mediates the effect of GLP-1 receptor agonist exenatide on ameliorating hepatic steatosis*. Diabetes, 2014. **63**(11): p. 3637-46.
25. Zhang, B.B., G. Zhou, and C. Li, *AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome*. Cell Metab, 2009. **9**(5): p. 407-16.
26. Costa Cdos, S., et al., *SIRT1 transcription is decreased in visceral adipose tissue of morbidly obese patients with severe hepatic steatosis*. Obes Surg, 2010. **20**(5): p. 633-9.
27. Smith, B.K., et al., *Treatment of nonalcoholic fatty liver disease: role of AMPK*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2016. **311**(4): p. E730-E740.
28. Drucker, D.J. and M.A. Nauck, *The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes*. Lancet, 2006. **368**(9548): p. 1696-705.
29. Kim, D.I., et al., *Hyperglycemia-induced GLP-1R downregulation causes RPE cell apoptosis*. Int J Biochem Cell Biol, 2015. **59**: p. 41-51.
30. Hernandez, C., et al., *Topical Administration of GLP-1 Receptor Agonists Prevents Retinal Neurodegeneration in Experimental Diabetes*. Diabetes, 2016. **65**(1): p. 172-87.
31. Cai, X., et al., *GLP-1 Treatment Improves Diabetic Retinopathy by Alleviating Autophagy through GLP-1R-ERK1/2-HDAC6 Signaling Pathway*. Int J Med Sci, 2017. **14**(12): p. 1203-1212.
32. Ben-Shlomo, S., et al., *Glucagon-like peptide-1 reduces hepatic lipogenesis via activation of AMP-activated protein kinase*. J Hepatol, 2011. **54**(6): p. 1214-23.