

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訊息路徑減緩糖脂毒性所誘發的神經細胞損傷之分子機轉
------------	--------------------------------------

執行計畫學生：楊聿荃

學生計畫編號：MOST 109-2813-C-040-023-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：林志立

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

(一) 摘要.....	1
(二) 研究動機與研究問題.....	1
(三) 文獻回顧與探討.....	1
1. 糖尿病視網膜病變.....	1
2. 神經退化始於 DR 初期.....	1
3. 糖尿病視網膜病變之神經細胞凋亡.....	2
4. 氧化壓力傷害影響視網膜神經細胞.....	2
5. AMPK/SIRT1 訊息可對抗氧化壓力傷害.....	2
6. AMPK 與胰島素訊息路徑.....	3
7. GLP-1 可透過活化 AMPK/SIRT1 及胰島素路徑達到神經保護作用.....	3
(四) 研究方法及步驟.....	4
1. 細胞培養.....	4
2. DR 糖脂毒性的疾病模型.....	5
3. 初步實驗分組.....	5
4. 細胞凋亡.....	5
5. 氧化壓力傷害.....	5
6. AMPK 路徑.....	5
(五) 結果與討論.....	6
1. OAPA 及高濃度葡萄糖降低 Y79 細胞存活率.....	6
2. Liraglutide 無法改善糖脂毒性所造成的 Y79 視神經細胞損傷.....	7
3. 高糖高脂誘導 Y79 視神經細胞凋亡.....	7
5. 高糖高脂誘發氧化壓力.....	8
4. 高糖高脂抑制 AMPK 磷酸化.....	11
(六) 結論.....	11
(七) 參考資料.....	12

(一) 摘要

糖尿病視網膜病變(diabetic retinopathy, DR)之危險因子包括高糖及高脂，病理特徵主要為血管病變與神經退化，其中神經病變於病程早期便會發生，但目前尚未有良好的策略來防止或減緩神經細胞的損傷。先前研究曾指出 GLP-1 receptor agonists (GLP-1RA)對部分神經退化相關疾病具有保護效果，但 GLP-1RA 對於視網膜神經之保護作用則仍未完全了解。因此本研究採用人類視網膜母細胞瘤 Y79 細胞株，在高糖高脂環境下模擬 DR 的狀態，並加入 GLP-1 類似物 Liraglutide 來活化 GLP-1 訊息，探討其對於 AMPK 的調控，分析細胞存活率、ROS 含量、抗氧化與自噬能力，並觀察胰島素路徑是否與 Liraglutide 的神經保護作用有所關聯。預期本研究將釐清 GLP-1RA 是否能藉由活化 AMPK 以減少糖脂毒性所造成的氧化壓力傷害及細胞凋亡，並有助於在未來藉此開發出新型的 DR 治療策略。

(二) 研究動機與研究問題

DR 為糖尿病患者中常見的併發症，更是成年人口失明的主要原因。然而目前臨床治療策略大多是針對血管病變及異常增生，僅能暫時緩解症狀，因此有待開發新型神經保護藥物。先前研究曾指出 GLP-1 路徑可活化 AMPK/SIRT1 與胰島素訊息進而促進下游抗氧化機制，已知視網膜神經細胞有豐富的 GLP-1 受體表現，但目前仍不清楚 GLP-1 訊息在 DR 對視網膜神經細胞內 AMPK 的調控角色，因此期望能透過本實驗設計，使用 GLP-1RA 探討 GLP-1 訊息對於 DR 中神經損傷的影響以及其中的分子機轉。

(三) 文獻回顧與探討

1. 糖尿病視網膜病變

根據統計 DR 是造成勞動人口失明的主要原因，且超過三分之一的糖尿病患者最終都會產生 DR，並有 10% 會造成明顯的視力受損[1]。目前治療 DR 的藥物以抗血管新生因子(anti-VEGF)為主，anti-VEGF 雖可阻止血管新生並降低微血管滲漏、減緩視網膜水腫，然而此藥物僅能暫時緩解症狀，且部分患者使用後並無明顯療效[2, 3]。此外 anti-VEGF 半衰期短，需要頻繁的眼內注射，可能造成眼內炎(endophthalmitis)、白內障等副作用。由於使用 anti-VEGF 時通常已是血管發生異常的中晚期，此時 DR 已惡化至一定程度，視力受損的情況往往難以恢復，因此急需開發新式的治療策略及早阻止視神經持續退化[4]。

2. 神經退化始於 DR 初期

2014 年 Simó and Hernández 等人觀察 DR 患者的視網膜樣本後，指出神經退化在 DR 發病初期便會發生，其結果會使視網膜神經節細胞(RGC)凋亡造成視

神經纖維層(nerve fiber layer)變薄[5]；而 2013 年 Valverde 等人在患有輕微非增殖性 DR (mild non-proliferative DR)的人類視網膜樣本中發現，細胞凋亡相關分子(包括 FasL、procaspase-8、active caspase-8、total Bid、truncated Bid、Bim 和 active caspase-3)明顯增加[6]，此外也有文獻指出視網膜神經元退化在血管病變之前便會發生[7]。由此可見視神經病變除了是 DR 患者視力退化的原因外，也是病程進展早期之病理特徵，因此以神經保護作為治療策略可能是重要的研究方向。然而現今治療主要是針對血管病變及異常增生，仍待釐清 DR 神經病變之分子機轉。

3. 糖尿病視網膜病變之神經細胞凋亡

細胞凋亡是由各種路徑引起的一連串凋亡相關分子活化造成細胞程序性死亡，其可分為內源性凋亡途徑與外源性凋亡途徑。Bcl-2 平時可抑制促凋亡蛋白如 Bak、Bax，而當內源性途徑啟動時，經由特定蛋白抑制 Bcl-2 活性，造成 Bak 或 Bax 聚合在粒線體膜上形成孔洞，促使釋放 cytochrome C 及其它促凋亡分子，引起 Apaf1 的 dATP 水解並與其結合形成次單元，七個次單元之 dADP 置換成 dATP 後聚合形成凋亡小體(apoptosome)，凋亡小體再與 Caspase-9 結合並促進其切割及活化，接著活化 Caspase-3/6/7 造成細胞凋亡。外源性途徑以 Fas 為例，當 Fas ligand 結合受體後，下游的 FADD 或 TRADD 誘導 pro-caspase-8 共同形成 DISC (death inducing signaling complex)，切割並活化 caspase-8，而 caspase-8 可促進粒線體釋放促凋亡分子並同樣透過活化 Caspase-3/6/7 引起凋亡。由於細胞凋亡是神經病變之重要特徵，因此應設法釐清造成視網膜神經細胞凋亡之起因與機轉。

4. 氧化壓力傷害影響視網膜神經細胞

細胞內的 ROS 多數來自粒線體，也是造成細胞氧化壓力傷害的主要原因，若細胞內 ROS 過度累積將導致細胞內蛋白質、核酸、細胞膜之結構改變與功能異常，對細胞造成傷害最終引起凋亡。而已知糖尿病的高糖高脂狀態會引起 ROS 增加，並刺激如多元醇(polyol)、PKC、晚期糖基化終產物(AGE)、己糖胺(hexosamine)等異常代謝途徑增加[8]。而視網膜是體內代謝最活躍的組織之一，因此容易受到高糖高脂的影響，造成視網膜 ROS 增加誘發細胞凋亡[9]。文獻指出糖尿病會造成視網膜神經元粒線體功能異常，並減少抗氧化酶 superoxide dismutase (SOD)表現量造成 ROS 過度累積[10]。由於 DR 的致病機制是一個複雜的過程，儘管目前尚未闡明其背後的機制，但氧化壓力被認為是其中的關鍵因素。

5. AMPK/SIRT1 訊息可對抗氧化壓力傷害

AMPK 可調節細胞內多種代謝途徑、維持細胞能量平衡，並調控葡萄糖、脂肪代謝，以及發揮如抗發炎、抗氧化壓力等細胞保護之功效[11]，此外 AMPK 也能促進粒線體自噬作用(mitophagy)並維持粒線體健康[12]，是故活化 AMPK 可改善氧化壓力誘導的神經損傷[13]。而 AMPK 也可藉由提高 NAD⁺活化下游的 SIRT1，相對地 SIRT1 亦可透過 liver kinase B1 (LKB1)活化 AMPK 共同調節細胞代謝[14]。SIRT1 是著名的長壽相關基因，下游調控路徑包括 DNA 修復、粒線

體保護、對抗氧化壓力傷害及減少細胞凋亡等，先前在阿茲海默症大鼠的實驗中，曾證實活化 AMPK/SIRT1 路徑確實可抑制海馬迴神經凋亡[15]。SIRT1 可增加轉錄因子 nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)，進而提高抗氧化酶 SOD 表現量，是重要的抗氧化機制[16]，而研究亦曾指出活化 SIRT1 可避免 DR 小鼠視網膜神經層厚度減少，並維持神經元正常功能[17]。由於糖尿病引起的高糖高脂會引起 AMPK 活性下降以及胰島素阻抗加劇[11]，並抑制 SIRT1 的現象[18]，代表在 DR 的病程進展中 AMPK 及 SIRT1 可能會被抑制，而兩者皆有助於神經細胞對抗氧化壓力、維持正常代謝，因此若能設法活化視網膜神經的 AMPK/SIRT1 路徑，或許具有避免神經病變延緩病情惡化的效果。

6. AMPK 與胰島素訊息路徑

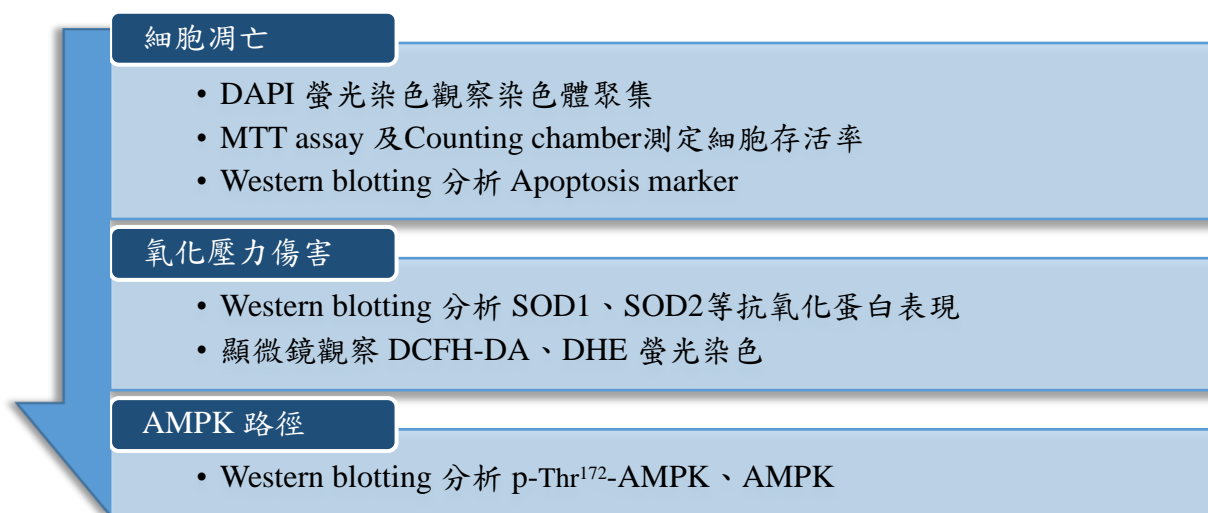
胰島素訊息阻抗除了引起血糖異常及代謝紊亂外，也可能是神經病變的誘發原因之一，而已知人類視網膜內神經節細胞層(ganglion cell layer, GCL)、外核層(outer nuclear layer, ONL)、外限膜(outer limiting membrane, OLM)及感光細胞(Rod and cone cell)的 inner segments 皆有胰島素受體表現，且其在糖尿病患者的表現量會明顯減少[19]。另外動物實驗也證實糖尿病大鼠視網膜中胰島素受體激酶活性(Insulin receptor kinase activity)、PI3-K 活性、Akt 活性、胰島素受體含量、IRS-1/2 含量、GSK-3 β (Ser9)磷酸化皆有異常下降的現象，而使用胰島素治療可回復胰島素受體激酶活性[20]，因此提高胰島素訊息的活性，被認為有助於加強神經細胞對抗糖尿病糖脂毒性的保護機制。如先前本實驗室研究曾指出，活化神經細胞的胰島素路徑能維持粒線體功能並減少細胞內 ROS [21]，因而提高處理 A β 細胞的存活率[22]；另有研究也指出胰島素可增加 Bcl-2 含量，降低大腦皮質內 Bax / Bcl-2 比值抑制細胞凋亡[23]。因此我們推論胰島素阻抗亦可能會參與在 DR 的神經病變致病機轉中，因此若能設法回復胰島素訊息活性，或許能達到視網膜神經保護的效果。事實上已知 metformin 可透過活化 AMPK 來緩解胰島素阻抗，因此被廣泛作為糖尿病第一線用藥，而神經細胞在高糖環境下 AMPK 活性下降，進而減弱 p-Akt 引起胰島素阻抗[24]，相對地活化 AMPK 則可促進神經細胞 IRS-1 酪胺酸殘基磷酸化以增強胰島素訊息傳遞[25]，因此 metformin 被認為也具有神經保護作用，此外 metformin 提高體內類升糖素勝肽(Glucagon-like peptide-1, GLP-1)濃度，或許是調控神經的另一條潛在途徑[26, 27]，這些結果意味著若能活化 AMPK 或許能促進胰島素及其下游路徑，便有機會減少 DR 所造成的神經細胞傷害。

7. GLP-1 可透過活化 AMPK/SIRT1 及胰島素路徑達到神經保護作用

GLP-1 是一種腸泌素，進食後由迴腸及升結腸分泌並促進 β 細胞分泌胰島素，由於身體各處細胞中的 dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4)快速將內生性 GLP-1 轉為不具生物活性的產物，因此 GLP-1 半衰期僅約 1~2 分鐘。本實驗預計使用的 Liraglutide 之胺基酸序列與內生性 GLP-1 約有 97%相似，且不易被 DPP-4 分解，

屬於長效型 GLP-1RA，目前用於治療第二型糖尿病。事實上活化 GLP-1 路徑被認為具有保護視網膜神經之潛力，2015 年 Hernández 等人便發現人類視網膜神經細胞內有大量 GLP-1R 表現，主要分布在 GCL，其次為內核層(inner nuclear layer, INL)及 ONL，視網膜內的表現量甚至明顯大於腸道和肝臟，但糖尿病患者及非糖尿病患者的表現量並無明顯差異，GLP-1 的分泌量也同樣主要存在於 GCL，但糖尿病患者的表現量則明顯降低；此外動物實驗則指出，Liraglutide 透過皮下注射或直接滴入角膜，皆能降低糖尿病小鼠視網膜神經(GCL、INL、ONL)凋亡率[28]。2019 年 Sampedro 等人的研究則證實 GLP-1 滴劑可降低 cleaved caspase 9 / total caspase 9 比值，避免糖尿病小鼠 phospho-Akt / total Akt 比值下降，活化胰島素訊息，並因此減少糖尿病小鼠神經細胞凋亡[29]。本實驗室先前在路易氏體失智症研究則發現，施以 Liraglutide 或胰島素可透過回復胰島素路徑，減少神經細胞凋亡、提高 Nrf2/SOD1/Sirt1 蛋白表現量對抗氧化壓力傷害，並且活化 AMPK 促進細胞自噬增進神經保護作用[30]。而 Liraglutide 亦可活化 SOD、AMPK、Akt，減少 caspase-3 並增加 Bcl-2 表現，緩解 doxorubicin 造成的心臟毒性[31]，然而 Liraglutide 是否能利用以上路徑達到視網膜神經保護作用，仍有待進一步實驗釐清。我們推測 GLP-1RA 似乎能透過活化 AMPK/SIRT1 及胰島素路徑達到保護作用，調節細胞代謝並對抗氧化壓力，進而阻止細胞凋亡，但 GLP-1 下游路徑對於視網膜神經細胞之作用機轉則尚未明瞭，尚待更深入的研究來加以釐清。

(四) 研究方法及步驟



1. 細胞培養

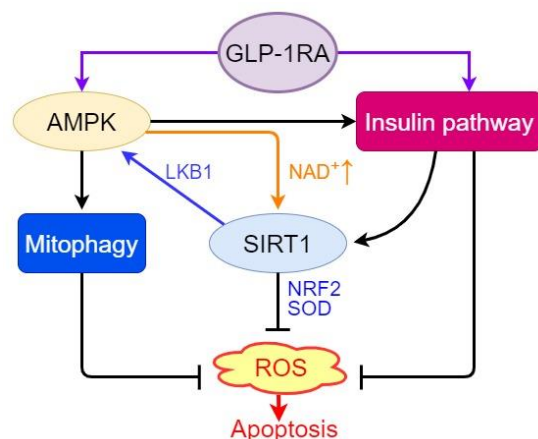
本研究使用人類視網膜母細胞瘤 Y79 細胞株，購於生物資源保存及研究中心(BCRC)，屬於懸浮型生長的細胞，培養液為 RPMI 1640 含 2 mM L-glutamine, 1.5 g/L sodium bicarbonate, 4.5 g/L glucose, 10 mM HEPES, 80% 1 mM sodium pyruvate 和 20% fetal bovine serum (FBS)，約 2-3 天進行繼代培養。

2. DR 糖脂毒性的疾病模型

人體內主要的脂肪酸包括 oleic acid (OA)與 palmitic acid (PA)，為了模擬生理狀況我們參考 Yao 等人的配方 OA：PA = 2：1 [32]，再加入 55 mM 葡萄糖 (glucose)，OA、PA 及 Glucose 皆購買自 Sigma (München, Germany)。

3. 初步實驗分組

本實驗使用 GLP-1 類似物商品名為胰妥善 (Victoza)，學名 Liraglutide，購買自台灣諾和諾德藥品股份有限公司，胰島素 (Insulin) 購買自 Sigma (München, Germany)。我們初步實驗分為控制組和三個實驗組。疾病組含 OAPA 及 glucose 55 mM，另一組為疾病組加入 liraglutide 0.1 μ M，為了觀察胰島素是否能加成 liraglutide 的作用，最後一組為疾病組同時加入 liraglutide 0.1 μ M 及胰島素。未來將加入更多實驗組別，進行更完善的研究。



實驗假設

4. 細胞凋亡

為了觀察 Liraglutide 及胰島素是否能提高細胞存活率，將使用 MTT cell viability assay 推算存活率、Counting chamber 計算存活及死亡細胞比例。細胞啟動凋亡途徑時會造成染色體聚集，可利用 DAPI 螢光染色觀察。同時使用 Western blotting 分析 PARP、Caspase-3 等促凋亡分子。

5. 氧化壓力傷害

Liraglutide 及胰島素可能透過提高細胞抗氧化能力、降低 ROS 生成保護細胞。SOD 與 Catalase 是代表性的抗氧化酶，被認為是氧化壓力的指標。我們將使用 Western blotting 分析 SOD1、SOD2 蛋白表現量，DCFH-DA、DHE 螢光染色後使用顯微鏡觀察。

6. AMPK 路徑

為了探討 Liraglutide 是否是透過 AMPK 調控細胞，我們將使用 Western blotting 分析 p-Thr¹⁷²-AMPK、AMPK。

(五) 結果與討論

1. OAPA 及高濃度葡萄糖降低 Y79 細胞存活率

過去研究得知 DR 初期可能起因於神經退化，其中視網膜神經細胞凋亡是重要特徵。為了模擬糖尿病高血糖與高血脂所誘發視網膜神經細胞受損情況，我們選擇 Y79 視網膜神經細胞來進行實驗，首先給予 Y79 細胞不同濃度的 OAPA 和 55mM 的葡萄糖處理 24 小時來模擬高糖高脂情況，使用 MTT assay 測量細胞存活率，圖 1 結果顯示 OAPA 明顯造成 Y79 細胞存活率下降，同時影響細胞型態 (圖 2)。緊接著我們使用 Acridine orange (AO) 與 Propidium iodide (PI) 染色以正立螢光顯微鏡觀察，圖 3 顯示 OAPA 和 55mM 的葡萄糖使細胞的紅色螢光增加，確認高糖高脂環境造成 Y79 細胞死亡。

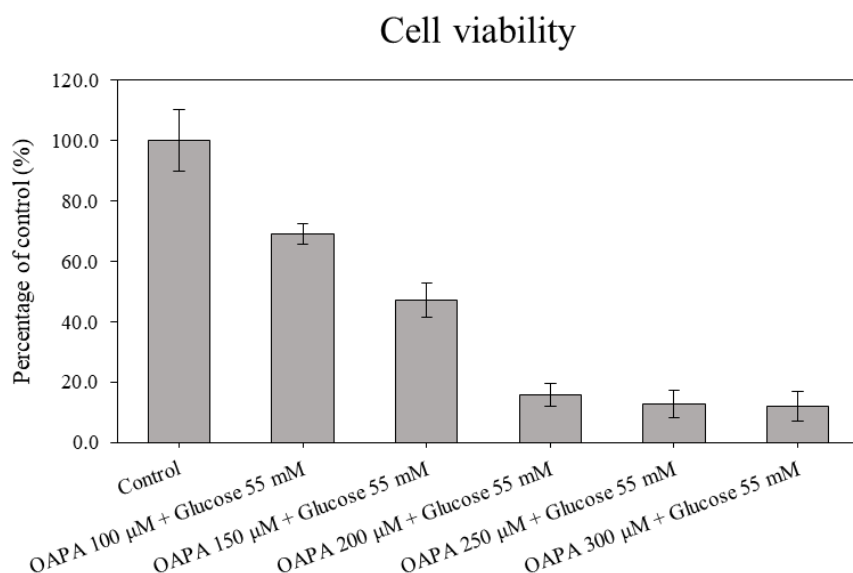


圖 1：OAPA 及高濃度葡萄糖降低細胞存活率

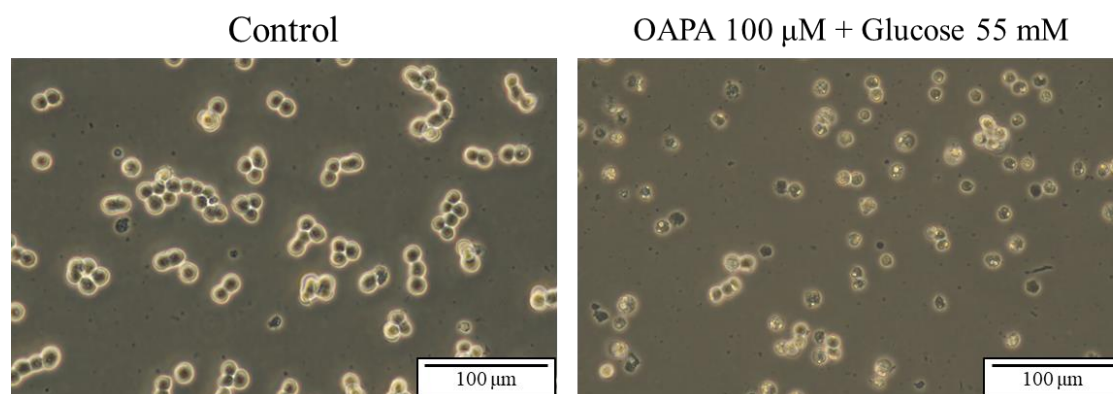


圖 2：使用倒立顯微鏡觀察細胞型態

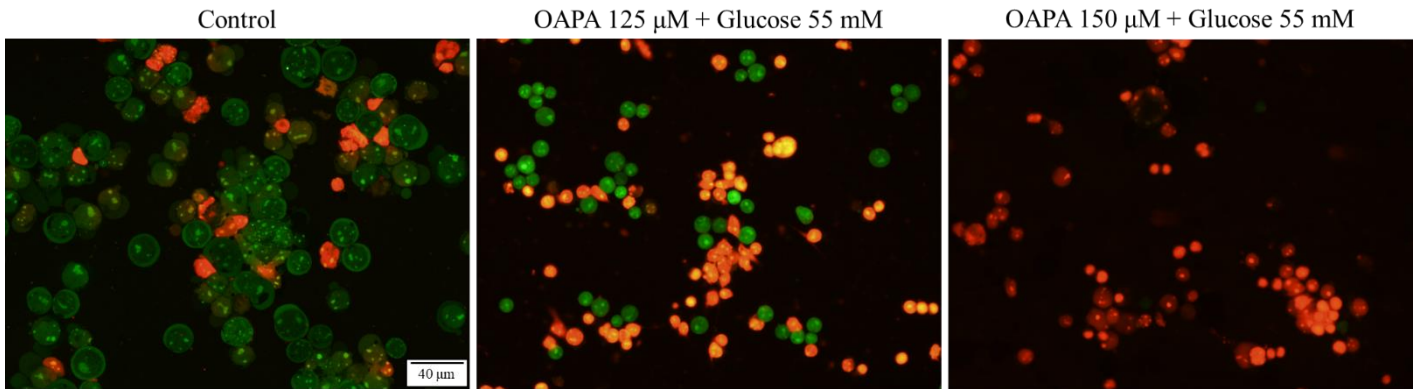


圖 3：使用 PI 螢光染色觀察 OAPA 及高濃度葡萄糖造成的細胞死亡

2. Liraglutide 無法改善糖脂毒性所造成的 Y79 視神經細胞損傷

首先我們透過 Western blotting 確認 Y79 細胞具有 GLP-1 receptor，接著探討高糖高脂模式下 Liraglutide 對於 Y79 細胞存活率的影響，我們透過 Trypan blue 染色，使用 Counting chamber 計數細胞，圖 4 結果顯示給予 0.1 μM Liraglutide 無法提高細胞存活率。

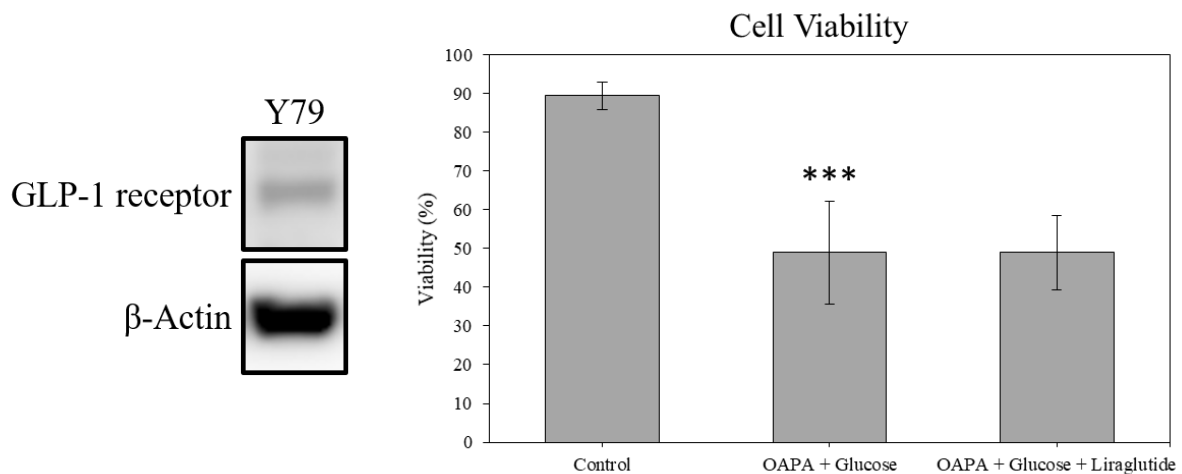


圖 4：確認 Y79 細胞具有 GLP-1 receptor

圖 5：探討 OAPA、高濃度葡萄糖及 Liraglutide 之影響與 Control 比較之統計結果 $p < 0.001$ 設定為***。

3. 高糖高脂誘導 Y79 視神經細胞凋亡

為了確認高糖高脂毒性是否透過誘發凋亡途徑造成細胞死亡，我們使用 DAPI 染色以正立螢光顯微鏡觀察細胞核皺縮情形。圖 6 結果顯示給予 OAPA 和 55mM 的葡萄糖處理 24 小時後，出現較多染色體聚集的情形。接著利用 Western blotting 探討高脂高糖、Liraglutide 與胰島素對凋亡相關蛋白的影響，從圖 7 可得知高糖高脂後細胞凋亡相關蛋白表現量增加，有趣的是組別 8 的 Liraglutide 與胰島素略微減少高糖高脂所誘發的細胞凋亡蛋白表現。

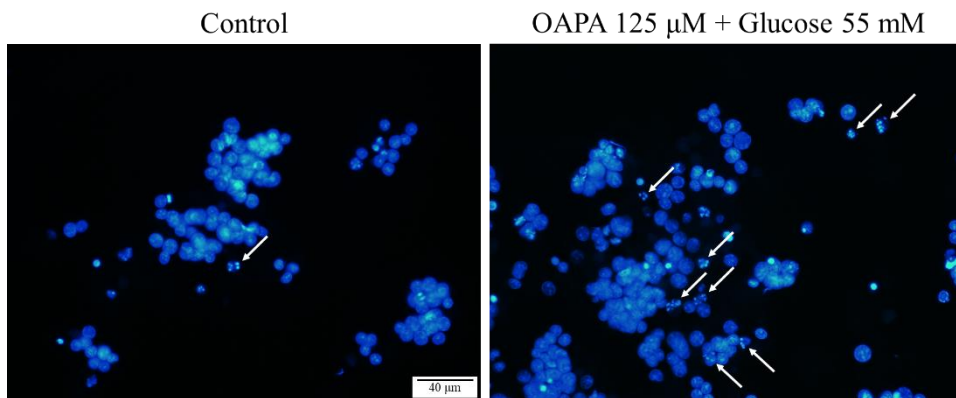


圖 6：高糖高脂引起染色體聚集

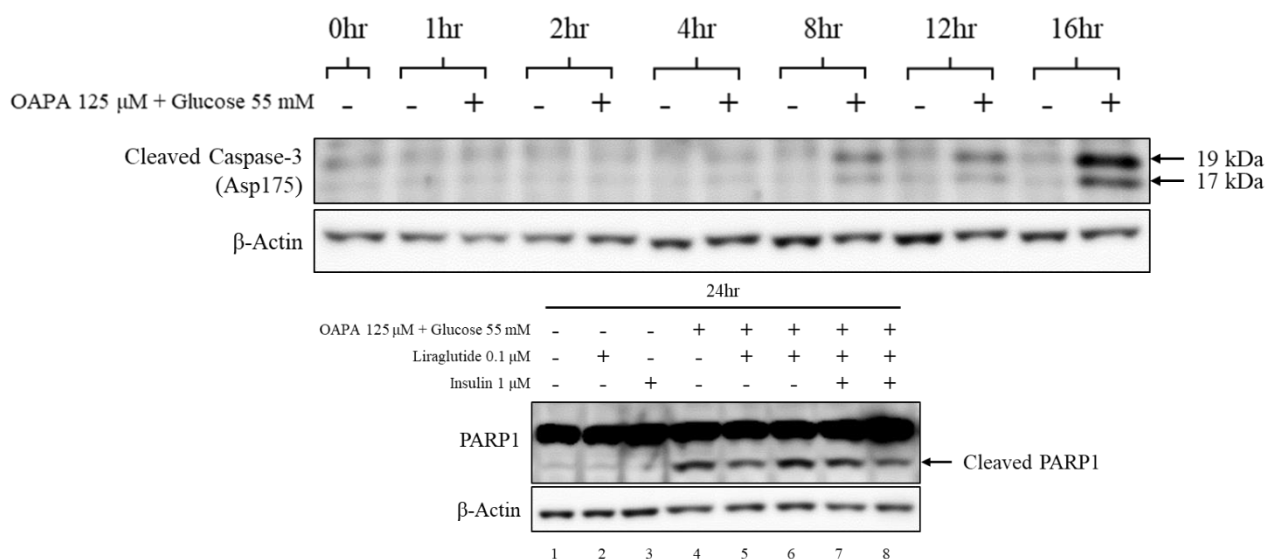
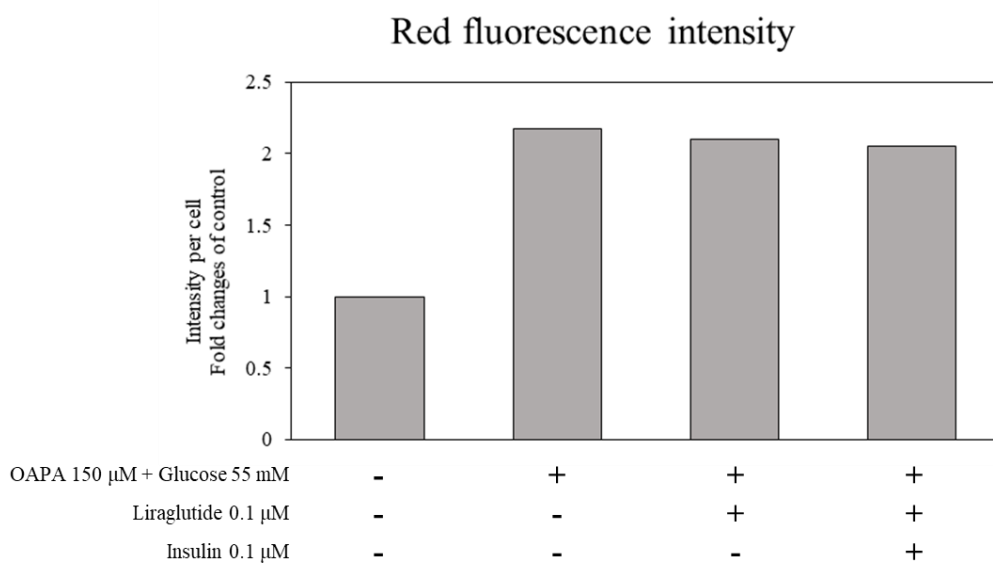
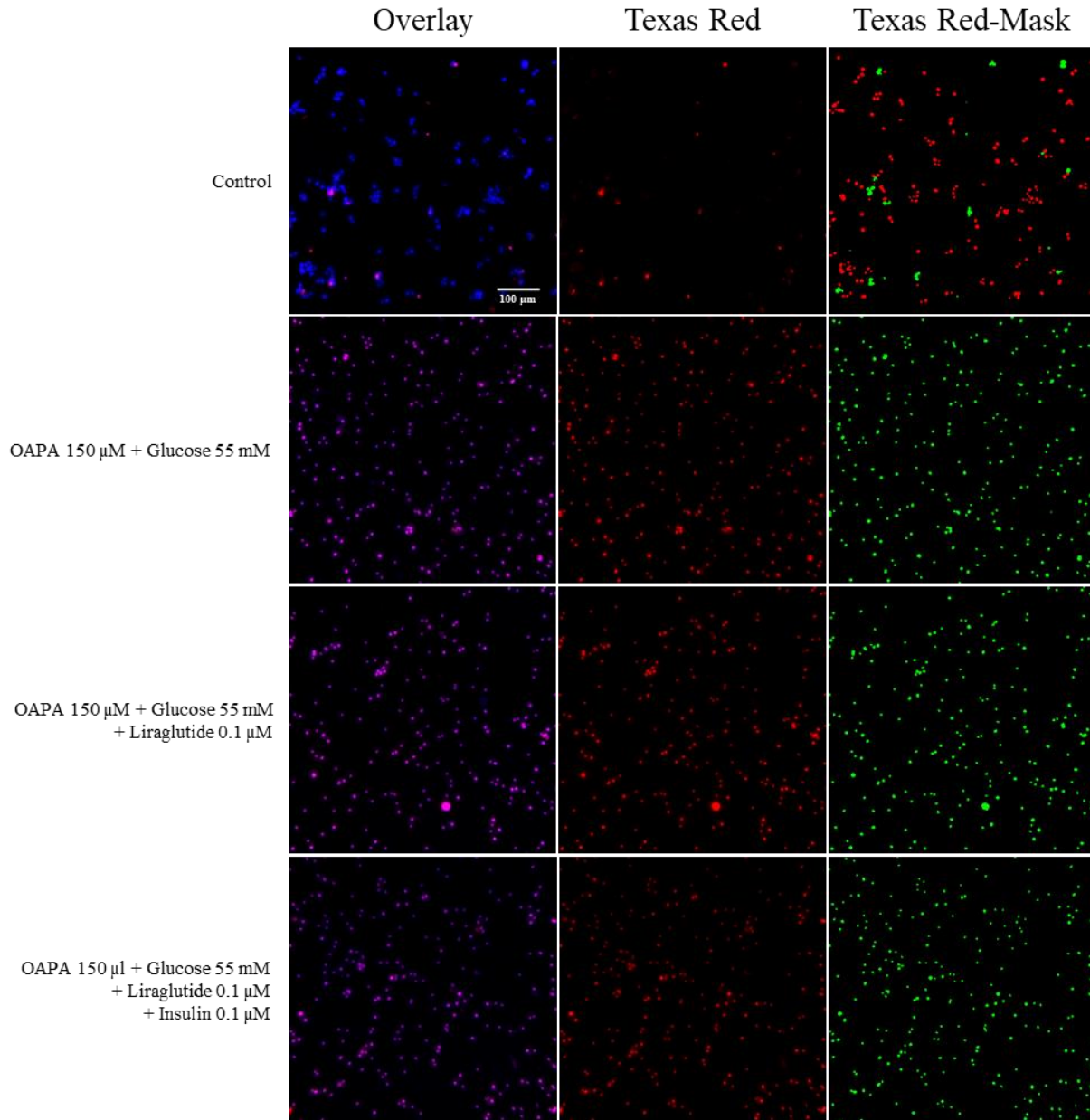


圖 7：高糖高脂對 PARP1 及 Caspase-3 之影響

組別 5：加入 OAPA、葡萄糖同時給予 Liraglutide；組別 6：先加入 OAPA、葡萄糖，3 小時後給予 Liraglutide；組別 7：加入 OAPA、葡萄糖同時給予 Liraglutide、Insulin；組別 8：先加入 OAPA、葡萄糖，3 小時後給予 Liraglutide、Insulin。

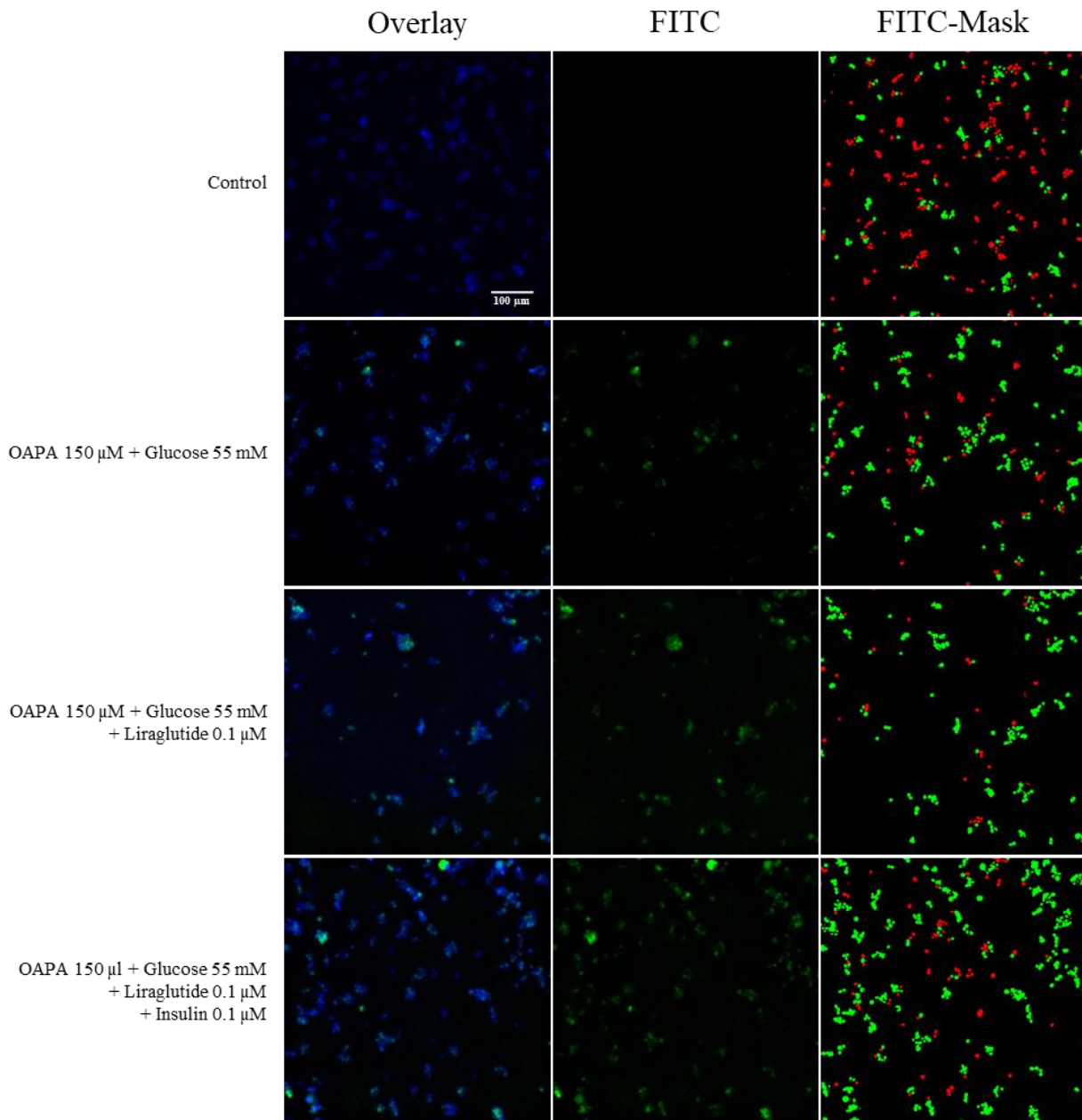
5. 高糖高脂誘發氧化壓力

為了確認高糖高脂是否誘發氧化壓力進而引起細胞凋亡，我們使用 Dihydroethidium (DHE) 和 Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) 螢光染劑觀察 ROS 在細胞內的含量。DHE、DCFH-DA 進入細胞與自由基反應之產物，經入射光激發後分別放射出紅色與綠色螢光，經由 MetaXpress 軟體分析得知高糖高脂提高細胞內 ROS 含量，但 Liraglutide 與胰島素並未降低 ROS 在細胞內累積的情形 (圖 8、9)。我們接著利用 Western blotting 觀察抗氧化相關酵素，圖 9 結果顯示高糖高脂造成 SOD1、SOD2 蛋白表現量減少，Liraglutide 與胰島素並未回復 SOD1、SOD2 表現量。



Texas red mask :
 綠色代表偵測到紅色螢光的細胞
 紅色為未偵測到紅色螢光的細胞

圖 8：使用 DHE stain 觀察細胞氧化壓力

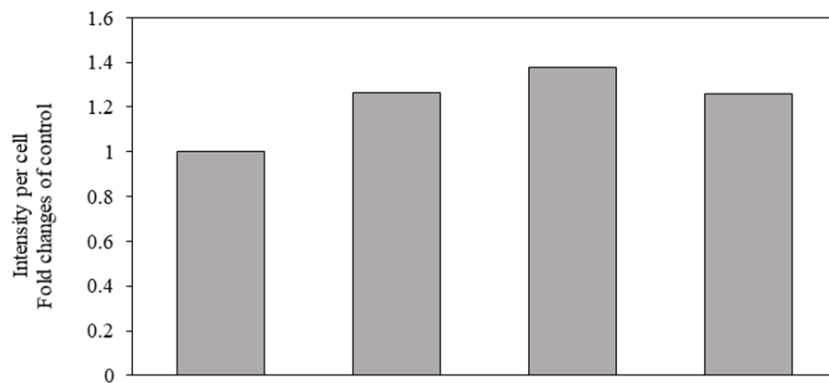


Green fluorescence intensity

FITC mask :

綠色代表偵測到綠色螢光的細胞

紅色為未偵測到綠色螢光的細胞



OAPA 150 μ M + Glucose 55 mM	-	+	+	+
Liraglutide 0.1 μ M	-	-	+	+
Insulin 0.1 μ M	-	-	-	+

圖 9：使用 DCFH-DA stain 觀察細胞氧化壓力

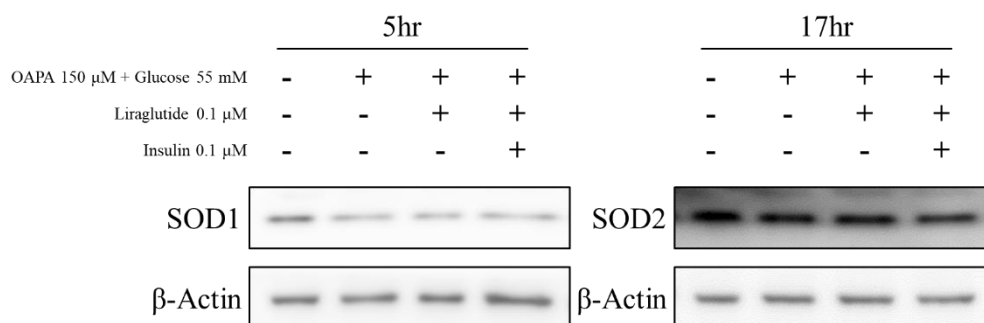


圖 10、高糖高脂、Liraglutide 與胰島素對 SOD1、SOD2 之影響

4. 高糖高脂抑制 AMPK 磷酸化

從過去文獻得知高糖高脂所造成的細胞損傷可能是透過減少 AMPK 磷酸化的表現，AMPK 可調控 SIRT1 進而影響抗氧化相關蛋白的表現量。因此我們為了探討高糖高脂是否透過減少 AMPK 磷酸化的表現造成視神經細胞損傷，我們使用 Western blotting 觀察 AMPK 的磷酸化程度，由圖 11 可得知高糖高脂處理 24 小時後 p-Thr172-AMPK 與 AMPK 的比值明顯下降，但 Liraglutide 與胰島素並未回復 AMPK 的活性。

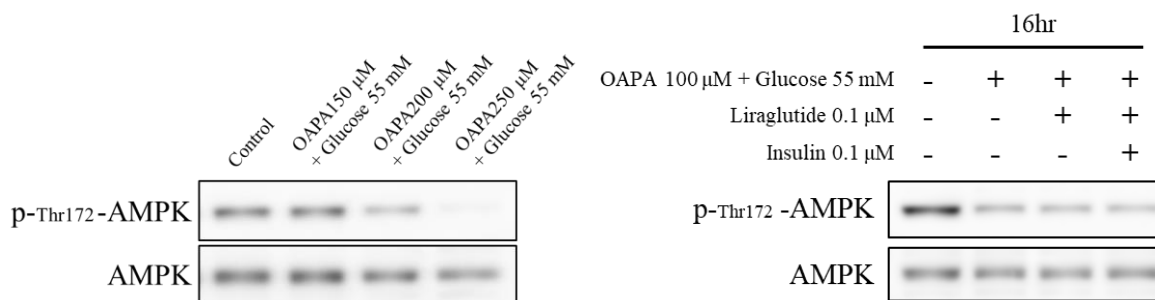


圖 11：高糖高脂、Liraglutide 與胰島素對 AMPK 磷酸化之影響

(六) 結論

綜合以上結果，高糖高脂造成 ROS 累積、降低 SOD 表現量並抑制 AMPK，造成 Y79 神經細胞凋亡。GLP1、胰島素並未如同預期達到神經保護作用，無法減少高糖高脂引起的細胞凋亡，並未透過 AMPK 途徑調控 Y79 細胞，也未能回復高糖高脂誘發的氧化壓力傷害。

為釐清 GLP1、胰島素對於 Y79 細胞的調控與分子機轉，未來需增加不同的實驗條件進一步探討，以驗證實驗結果。目前實驗的時間點為高糖高脂處理後 24 小時以內，計畫將 OAPA 濃度降低並延長藥物作用時間，或許能觀察到 Liraglutide 對細胞較明顯的影響。

本研究使用的 Y79 細胞為懸浮生長，部分實驗受限於此特性無法順利執行，未能在時間內達到預期成果。文獻指出 Poly-D-lysine 有助於 Y79 細胞貼附生長 [33]，也曾有 DR 相關研究使用 Poly-D-lysine coated plates 培養 Y79 細胞 [34]，若細胞能確實達到單層貼附，可避免細胞堆疊、聚集成團，同時降低染色過程中抽取上清液損失的細胞，藉此簡化實驗步驟、降低誤差，並且確保拍照過程不會因失焦造成分析困難。因此，如何建立可供 Y79 細胞貼附的培養環境是將來研究的首要項目。已知感光細胞功能失常可能發生於糖尿病初期，為視網膜病變的特徵之一 [35]。過去曾有視網膜退化相關的研究使用 Poly-D-lysine coated culture plates 同時給予 Laminin 培養 Y79 細胞再加入 Sodium butyrate 誘導 Y79 分化為 photoreceptor-like cells [36]。或許我們也可以利用 Y79 的分化潛力，建立新的疾病模型，模擬 DR 患者的特定神經元病變。

總結來說，本實驗利用 MTT、Western blotting 及細胞影像驗證高糖高脂對 Y79 的傷害，但尚未了解 Liraglutide 的影響及調控路徑，有待進一步實驗探討其它神經保護途徑，如先前文獻探討中提到的 SIRT1、Nrf2、胰島素路徑。目前仍欠缺 qPCR 及流式細胞儀的實驗數據，未來計畫增加實驗項目、修改實驗設計，並且嘗試新的培養條件，希望能有所突破，深入了解 Liraglutide 對於 DR 疾病模式下 Y79 細胞的調控作用與確切分子機轉。

(七) 參考資料

1. Sivaprasad, S. and E. Pearce, *The unmet need for better risk stratification of non-proliferative diabetic retinopathy*. Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association, 2019. **36**(4): p. 424-433.
2. Zhao, Y. and R.P. Singh, *The role of anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) in the management of proliferative diabetic retinopathy*. Drugs Context, 2018. **7**: p. 212532.
3. Browning, D.J., M.W. Stewart, and C. Lee, *Diabetic macular edema: Evidence-based management*. Indian J Ophthalmol, 2018. **66**(12): p. 1736-1750.
4. Rossino, M.G., M. Dal Monte, and G. Casini, *Relationships Between Neurodegeneration and Vascular Damage in Diabetic Retinopathy*. Frontiers in neuroscience, 2019. **13**: p. 1172-1172.
5. Simo, R. and C. Hernandez, *Neurodegeneration in the diabetic eye: new insights and therapeutic perspectives*. Trends Endocrinol Metab, 2014. **25**(1): p. 23-33.
6. Valverde, A.M., et al., *Proapoptotic and survival signaling in the neuroretina at early stages of diabetic retinopathy*. Mol Vis, 2013. **19**: p. 47-53.

7. Adams, A.J. and M.A. Bearnse, Jr., *Retinal neuropathy precedes vasculopathy in diabetes: a function-based opportunity for early treatment intervention?* Clin Exp Optom, 2012. **95**(3): p. 256-65.
8. Giacco, F. and M. Brownlee, *Oxidative stress and diabetic complications.* Circ Res, 2010. **107**(9): p. 1058-70.
9. Wu, M.Y., et al., *The Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction during the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy.* Oxid Med Cell Longev, 2018. **2018**: p. 3420187.
10. Haider, S.Z., et al., *Early Diabetes Induces Changes in Mitochondrial Physiology of Inner Retinal Neurons.* Neuroscience, 2019. **406**: p. 140-149.
11. Jeon, S.M., *Regulation and function of AMPK in physiology and diseases.* Exp Mol Med, 2016. **48**(7): p. e245.
12. Herzig, S. and R.J. Shaw, *AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. **19**(2): p. 121-135.
13. Zhao, X., et al., *Artemisinin Attenuated Hydrogen Peroxide (H₂O₂)-Induced Oxidative Injury in SH-SY5Y and Hippocampal Neurons via the Activation of AMPK Pathway.* Int J Mol Sci, 2019. **20**(11).
14. Gu, X., et al., *Effects of Huang-Lian-Jie-Du Decoction on Oxidative Stress and AMPK-SIRT1 Pathway in Alzheimer's Disease Rat.* Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM, 2020. **2020**: p. 6212907-6212907.
15. Sun, P., et al., *Protective role of Dihydromyricetin in Alzheimer's disease rat model associated with activating AMPK/SIRT1 signaling pathway.* Biosci Rep, 2019. **39**(1).
16. Samimi, F., et al., *Possible antioxidant mechanism of coenzyme Q10 in diabetes: impact on Sirt1/Nrf2 signaling pathways.* Res Pharm Sci, 2019. **14**(6): p. 524-533.
17. Mishra, M., A.J. Duraisamy, and R.A. Kowluru, *Sirt1: A Guardian of the Development of Diabetic Retinopathy.* Diabetes, 2018. **67**(4): p. 745-754.
18. Yerra, V.G., A.K. Kalvala, and A. Kumar, *Isoliquiritigenin reduces oxidative damage and alleviates mitochondrial impairment by SIRT1 activation in experimental diabetic neuropathy.* J Nutr Biochem, 2017. **47**: p. 41-52.
19. Naeser, P., *Insulin receptors in human ocular tissues. Immunohistochemical demonstration in normal and diabetic eyes.* Ups J Med Sci, 1997. **102**(1): p. 35-40.
20. Reiter, C.E., et al., *Diabetes reduces basal retinal insulin receptor signaling: reversal with systemic and local insulin.* Diabetes, 2006. **55**(4): p. 1148-56.

21. Kornelius, E., et al., *DPP-4 Inhibitor Linagliptin Attenuates Abeta-induced Cytotoxicity through Activation of AMPK in Neuronal Cells*. CNS Neurosci Ther, 2015. **21**(7): p. 549-57.
22. Kornelius, E., et al., *Mevastatin promotes neuronal survival against Abeta-induced neurotoxicity through AMPK activation*. Metab Brain Dis, 2017. **32**(6): p. 1999-2007.
23. Zakharova, I.O., et al., *The Protective Effect of Insulin on Rat Cortical Neurons in Oxidative Stress and Its Dependence on the Modulation of Akt, GSK-3beta, ERK1/2, and AMPK Activities*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(15).
24. Peng, Y., et al., *Mitochondrial dysfunction precedes depression of AMPK/AKT signaling in insulin resistance induced by high glucose in primary cortical neurons*. J Neurochem, 2016. **137**(5): p. 701-13.
25. Ng, R.C., et al., *Chronic adiponectin deficiency leads to Alzheimer's disease-like cognitive impairments and pathologies through AMPK inactivation and cerebral insulin resistance in aged mice*. Mol Neurodegener, 2016. **11**(1): p. 71.
26. Ruegsegger, G.N., et al., *Exercise and metformin counteract altered mitochondrial function in the insulin-resistant brain*. JCI insight, 2019. **4**(18): p. e130681.
27. Paudel, Y.N., et al., *Emerging neuroprotective effect of metformin in Parkinson's disease: A molecular crosstalk*. Pharmacol Res, 2020. **152**: p. 104593.
28. Hernandez, C., et al., *Topical Administration of GLP-1 Receptor Agonists Prevents Retinal Neurodegeneration in Experimental Diabetes*. Diabetes, 2016. **65**(1): p. 172-87.
29. Sampedro, J., et al., *New Insights into the Mechanisms of Action of Topical Administration of GLP-1 in an Experimental Model of Diabetic Retinopathy*. J Clin Med, 2019. **8**(3).
30. 謝佳羚, *GLP-1 訊息透過回復胰島素訊息活性減緩路易氏體失智症相關之神經毒性*, in 醫學研究所. 2018, 中山醫學大學. p. 1-86.
31. Abbas, N.A.T. and S.L. Kabil, *Liraglutide ameliorates cardiotoxicity induced by doxorubicin in rats through the Akt/GSK-3beta signaling pathway*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2017. **390**(11): p. 1145-1153.
32. Yao, H.-R., et al., *Lipotoxicity in HepG2 cells triggered by free fatty acids*. American journal of translational research, 2011. **3**(3): p. 284-291.
33. Albin, A., et al., *Laminin-induced retinoblastoma cell differentiation: possible involvement of a 100-kDa cell-surface laminin-binding protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(6): p. 2257-61.

34. Garcia-Ramírez, M., et al., *Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) is downregulated at early stages of diabetic retinopathy*. Diabetologia, 2009. **52**(12): p. 2633-41.
35. Weglarz, M., et al., *Involvement of serum anti-retinal antibodies in the pathophysiology of diabetic retinopathy: a pilot study*. J Physiol Pharmacol, 2020. **71**(5).
36. Wang, K., et al., *Neuroprotective effect of tetramethylpyrazine against all-trans-retinal toxicity in the differentiated Y-79 cells via upregulation of IRBP expression*. Experimental Cell Research, 2017. **359**(1): p. 120-128.