

铁死亡在高糖诱导的视网膜色素上皮细胞损伤中的作用及机制

张进¹, 贾爱华², 高岩¹, 刘承秀¹, 梁涛¹

引用:张进,贾爱华,高岩,等. 铁死亡在高糖诱导的视网膜色素上皮细胞损伤中的作用及机制. 国际眼科杂志 2023; 23(6): 894-899

作者单位:¹(266000)中国山东省青岛市,青岛大学附属医院眼科;²(719000)中国陕西省榆林市第一医院内分泌科

作者简介:张进,青岛大学在读硕士研究生,主任医师,研究方向:眼底病、白内障。

通讯作者:梁涛,毕业于青岛大学,博士,主任医师,副教授,研究方向:青光眼. lt19722000@126.com

收稿日期:2023-01-04 修回日期:2023-05-06

摘要

目的:观察铁死亡在高糖(HG)诱导的视网膜色素上皮(RPE)细胞损伤中的作用及机制,为糖尿病视网膜病变(DR)的治疗提供新思路。

方法:将体外培养的ARPE-19细胞分为正常对照组(NC组)、高糖组(HG组)、高糖+铁死亡抑制剂组(Fer-1组)。采用CCK-8法检测各组细胞活力;使用ELISA试剂盒检测白细胞介素6(IL-6)、IL-1 β 及单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的表达水平;使用化验试剂盒检测丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)水平;使用铁离子检测试剂盒检测细胞铁含量;通过透射电子显微镜观察细胞线粒体变化;通过Western blotting和免疫荧光染色技术检测铁死亡相关蛋白长链脂酰CoA合成酶4(ACSL4)、GPX4以及血管内皮生长因子(VEGF)蛋白的表达。

结果:与NC组相比,HG组细胞活力显著下降,细胞上清液中炎症因子表达水平升高,细胞中氧化应激指标MDA和铁含量显著升高,GSH含量和GPX4活性显著降低(均 $P<0.01$),且线粒体皱缩,ACSL4及VEGF蛋白表达增加,GPX4蛋白表达降低(均 $P<0.01$)。与HG组相比,Fer-1组细胞活力明显增加,细胞上清液中炎症因子表达水平下降,细胞中MDA和铁含量明显下降,GSH含量和GPX4活性显著提高(均 $P<0.05$),且线粒体形态改善,ACSL4及VEGF蛋白表达减少,GPX4蛋白表达升高(均 $P<0.05$)。

结论:铁死亡参与高糖诱导的RPE细胞损伤,抑制铁死亡能改善细胞活性,降低炎症及氧化应激水平,减轻高糖诱导的RPE细胞损伤。

关键词:铁死亡;糖尿病视网膜病变;视网膜色素上皮细胞;Ferrostatin-1;炎症;氧化应激

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2023.6.02

Effects and mechanisms of ferroptosis on high glucose - induced retinal pigment epithelial cells injury

Jin Zhang¹, Ai-Hua Jia², Yan Gao¹, Cheng-Xiu Liu¹, Tao Liang¹

¹Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong Province, China; ²Department of Endocrinology, the First Hospital of Yulin, Yulin 719000, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Tao Liang. Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong Province, China. lt19722000@126.com
Received:2023-01-04 Accepted:2023-05-06

Abstract

• **AIM:** To observe the effects and mechanisms of ferroptosis on high glucose (HG) - induced retinal pigment epithelium (RPE) cells injury, and to provide new ideas for the treatment of diabetic retinopathy (DR).

• **METHODS:** The ARPE-19 cell lines cultured *in vitro* were divided into normal control group (NC group), high glucose group (HG group), and high glucose+Ferrostatin-1 group (Fer-1 group). The cell viability of each group was detected by CCK-8 assay. The expressions of interleukin 6 (IL-6), IL-1 β and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) were detected using ELISA kits. The levels of malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), glutathione peroxidase 4 (GPX4) and iron content were detected using the corresponding assay kits. The mitochondrial changes in ARPE-19 cells were observed by transmission electron microscopy. The expressions of ferroptosis-related proteins including long-chain lipoyl CoA synthase 4 (ACSL4) and GPX4, as well as vascular endothelial growth factor (VEGF) were detected by Western blotting and immunofluorescence staining.

• **RESULTS:** Compared with NC group, the cell viability of HG group decreased significantly, the expression levels of inflammatory factors in cell supernatant increased, the contents of MDA and iron significantly increased, GSH and GPX4 significantly decreased (all $P<0.01$), the mitochondria of ARPE-19 cells shrunk, the expression of proteins ACSL4 and VEGF increased, while the expression of GPX4 decreased (all $P<0.01$). Compared with HG group, the cell viability of Fer-1 group significantly increased, the expression levels of inflammatory factors in cell supernatant decreased, MDA and iron contents significantly decreased, GSH contents and GPX4 viability significantly increased (all $P<0.05$), the morphology of

mitochondria in ARPE-19 cells improved, the expression of ACSL4 and VEGF decreased, while the expression of GPX4 increased (all $P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** Ferroptosis is involved in the injury of RPE induced by HG. Inhibiting ferroptosis can improve cell viability, reduce inflammation and oxidative stress, and alleviate HG-induced RPE cells injury.

• **KEYWORDS:** ferroptosis; diabetic retinopathy; retinal pigment epithelium; Ferrostatin - 1; inflammation; oxidative stress

Citation: Zhang J, Jia AH, Gao Y, *et al.* Effects and mechanisms of ferroptosis on high glucose-induced retinal pigment epithelial cells injury. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2023;23(6):894-899

0 引言

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病患者常见的并发症之一,其严重损害患者的视力,带来巨大的健康负担^[1-2]。DR 发病机制复杂,既往研究认为,氧化应激导致的视网膜相关组织和细胞损伤,尤其是视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 损伤,可导致 DR 病情进展^[3-4]。RPE 位于视网膜和脉络膜之间,是血-视网膜屏障 (blood-retinal barrier, BRB) 的重要组成部分,对维持视网膜正常代谢具有重要作用^[5]。因此,了解 RPE 细胞的损伤机制对于阐明 DR 的病理机制以开发新的治疗策略至关重要。

铁死亡 (ferroptosis) 是以脂质过氧化增加和铁离子依赖为特征的调节性细胞死亡方式^[6-8],已被证实涉及多种眼科疾病,如在年龄相关性黄斑变性中发现 RPE 发生铁死亡^[9]。然而,DR 期间 RPE 是否发生铁死亡,以及其可能如何影响细胞死亡,仍有待进一步研究。本研究旨在模拟 DR 高糖微环境,观察铁死亡在 RPE 细胞损伤中的作用,探究 DR 的发病机制,以期寻找新的治疗靶点。

1 材料和方法

1.1 材料 实验细胞:人视网膜色素上皮细胞 (ARPE-19 细胞) 购自上海中乔新舟生物公司。主要试剂:胎牛血清购自美国 Gibco 公司;Ferrostatin - 1 (Fer - 1) 购自美国 Selleckchem 公司;CCK-8 细胞活力和细胞凋亡检测试剂盒购自美国 Abcam 公司;白细胞介素 (interleukin, IL) - 6、IL - 1 β 及单核细胞趋化蛋白 - 1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1) ELISA 试剂盒购自江苏酶免公司;丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4)、铁离子检测试剂盒购自南京建成公司;长链脂酰 CoA 合成酶 4 (long-chain lipoyl CoA synthase 4, ACSL4)、GPX4 及血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 抗体购自美国 Abcam 公司。主要仪器设备:二氧化碳恒温培养箱 (HERA cell CO₂ 型,美国 Beckman 公司);超净工作台 (SW-CJ-2F 型,苏州博莱尔净化设备有限公司);低速离心机 (LDZ5-2 型,北京时代北利离心机有限公司);小型高速离心机 (5418 R 型号,法国 Eppendorf 公司);倒置荧光显微镜 (CKX53 型,日本 OLYMPUS 公司);酶标仪 (Elx800 型,美国 BIO-TEK 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 将 ARPE-19 细胞用含 10% 胎牛血清 + 1% 青-链霉素 + DMEM/F12 的培养基传代培养 3 代

后用于实验。实验分组:正常对照组 (NC 组) 以 5.5mmol/L 葡萄糖培养 48h;高糖组 (HG 组) 以 30mmol/L 葡萄糖培养 48h;铁死亡抑制剂组 (Fer-1 组) 以 1 μ mol/L Fer-1 预处理 12h,然后以 30mmol/L 葡萄糖培养 48h^[10]。

1.2.2 细胞活力检测 使用 CCK-8 试剂盒分析各组 ARPE-19 细胞活力。各组细胞处理 48h 后,每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,然后将细胞在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 2h。使用酶标仪 450nm 检测吸光度值。细胞活力 = 各组吸光度 / 对照组吸光度 \times 100%。

1.2.3 炎症因子的表达水平检测 各组细胞处理 48h 后,收集上清液,2 500r/min 离心 30min,放入 -80 $^{\circ}$ C 备用。严格按照 ELISA 试剂盒说明书步骤测定 IL - 6、IL - 1 β 、MCP-1 表达水平。

1.2.4 氧化应激指标及铁含量检测 各组细胞处理 48h 后,收集细胞,分别按照检测试剂盒说明书,使用 MDA、GSH、GPX4 和铁离子检测试剂盒检测各组细胞 MDA、GSH 含量、GPX4 活性及铁离子含量。

1.2.5 透射电子显微镜观察线粒体形态 各组细胞处理 48h 后,收集细胞,使用 2.5% 戊二醛和 1% 四氧化二锇固定后,梯度乙醇进行脱水,70% 醋酸铀染色,用环氧树脂包埋,使用超薄切片机制成 100nm 超薄切片,枸橼酸铅和醋酸铀酰染色,用透射电子显微镜进行观察并拍摄超微结构。

1.2.6 Western blotting 检测蛋白表达水平 各组细胞处理 48h 后,使用 RIPA 细胞裂解液提取各组总蛋白,取 30 μ g 蛋白上样,SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,电泳转移至 PVDF 膜,室温下封闭 2h,然后与 ACSL4、GPX4 和 VEGF 一抗 (1:1000) 在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜,TBST 洗膜后加入二抗,室温孵育 2h,加入超敏化学发光液进行曝光,使用 Image J 软件对条带密度进行量化分析。

1.2.7 免疫荧光染色观察 ACSL4 和 VEGF 蛋白的表达 将各组细胞以 4 \times 10⁴/mL 的密度接种于 96 孔板,每孔 100 μ L,待细胞贴壁生长至 70% 时,PBS 洗涤 3 次;用 4% 多聚甲醛固定,PBS 冲洗 3 次;0.5% Triton X-100 通透 20min,PBS 冲洗 3 次;15% 胎牛血清封闭 1h;弃去血清,滴加对应 ACSL4 和 VEGF 一抗 (1:50),4 $^{\circ}$ C 避光孵育过夜,PBS 冲洗 3 次;滴加荧光标记二抗 CY3 (1:100),37 $^{\circ}$ C 避光反应 1h,PBS 冲洗 3 次;用荧光封片剂封片。荧光显微镜暗室观察 ACSL4 和 VEGF 蛋白在细胞中的表达和分布。

统计学分析:使用 GraphPad Prism 软件进行统计学分析。所有数据结果均采用均数 \pm 标准差表示,多组比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA),两组间比较采用 Tukey 法。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 ARPE-19 细胞形态及活力 倒置光学显微镜观察培养 48h 后各组细胞形态显示,NC 组细胞形态正常,生长良好;与 NC 组相比,高糖处理后 (HG 组) 细胞生长状态差,形态不规则,细胞出现圆缩、聚集等现象;而 Fer-1 预处理后 (Fer-1 组) 细胞形态及密度较 HG 组趋于正常,见图 1A。CCK-8 检测结果显示,NC 组、HG 组、Fer-1 组细胞活力分别为 (100.00 \pm 0.00)%、(68.74 \pm 4.12)%、(86.31 \pm 3.02)% ,各组细胞活力差异具有统计学意义 ($F = 47.85$, $P < 0.01$),且与 NC 组相比,HG 组细胞活力显著降低 ($q = 13.80$, $P < 0.01$);与 HG 组相比,Fer-1 组细胞活力改善 ($q = 7.75$, $P < 0.01$,图 1B)。

2.2 各组 ARPE-19 细胞外分泌炎症因子水平 各组细胞

上清液中 IL-6、IL-1 β 及 MCP-1 表达水平差异均具有统计学意义 ($F=60.16, 49.97, 106.5$, 均 $P<0.05$), 且与 NC 组相比, HG 组 IL-6、IL-1 β 及 MCP-1 水平均升高 ($q=15.48, 14.14, 20.43$, 均 $P<0.01$); 与 HG 组相比, Fer-1 组 IL-6、IL-1 β 及 MCP-1 水平均降低 ($q=8.50, 7.01, 7.67$, 均 $P<0.01$), 见表 1。

2.3 各组 ARPE-19 细胞氧化应激指标及铁含量 各组细胞 MDA、GSH 含量、GPX4 活性和铁含量差异均具有统计学意义 ($F=46.38, 72.40, 49.33, 83.53$, 均 $P<0.01$), 且与 NC 组相比, HG 组细胞 MDA 和铁含量显著升高 ($q=13.58, 18.09$, 均 $P<0.01$), GSH 含量和 GPX4 活性显著降低 ($q=16.95, 14.00$, 均 $P<0.01$); 与 HG 组相比, Fer-1 组中 MDA 和铁含量明显下降 ($q=5.91, 11.37$, 均 $P<0.05$), GSH 含量和 GPX4 活性均显著提高 ($q=7.20, 7.98$, 均 $P<0.01$), 见表 2。

2.4 各组 ARPE-19 细胞线粒体形态学变化 透射电子显微镜结果显示, NC 组细胞线粒体无显著变化, HG 组细胞线粒体出现萎缩伴膜密度增加, 线粒体嵴减少, 而 Fer-1 组线粒体形态变化较 HG 组显著改善, 见图 2。

2.5 各组 ARPE-19 细胞中 ACSL4 和 GPX4 及 VEGF 蛋白的表达 Western blotting 检测结果显示, 各组 ARPE-19 细胞中 ACSL4、GPX4 和 VEGF 蛋白相对表达量差异均有统计学意义 ($F=14.60, 9.69, 74.75$, 均 $P<0.01$), 见图 3A。与 NC 组相比, HG 组 ACSL4 和 VEGF 蛋白相对表达量显著升高 ($q=7.52, 17.14$, 均 $P<0.01$), GPX4 蛋白相对表达量显著降低 ($q=5.97, P<0.01$); 与 HG 组相比, Fer-1 组 ACSL4 和 VEGF 蛋白相对表达量显著降低 ($q=4.90, 10.56$, 均 $P<0.05$), 而 GPX4 蛋白相对表达量显著升高 ($q=4.50, P<0.05$), 见图 3B、C、D。

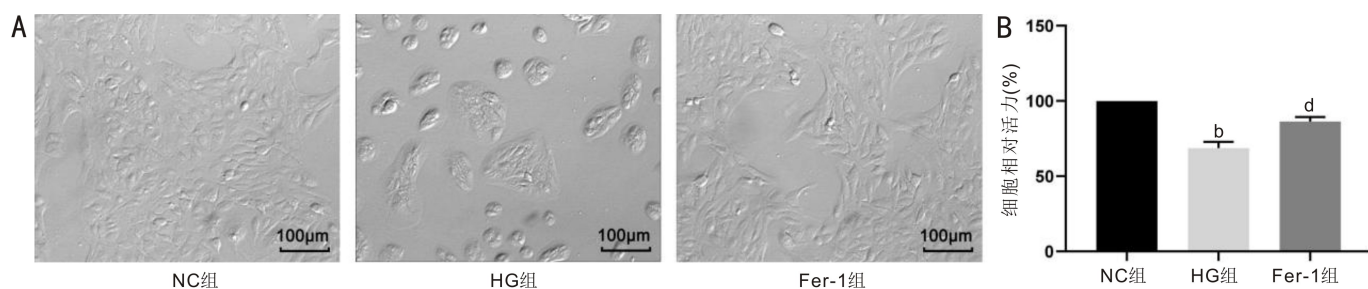


图 1 各组 ARPE-19 细胞形态及活力 A: 倒置荧光显微镜观察各组细胞密度及形态的变化; B: 各组细胞活力的比较, ^b $P<0.01$ vs NC 组; ^d $P<0.01$ vs HG 组。

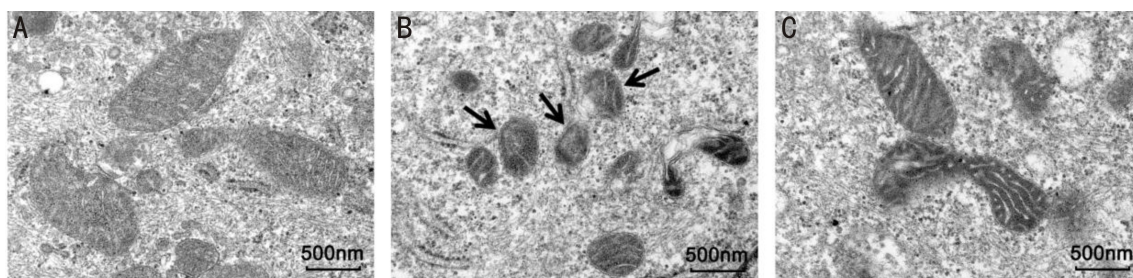


图 2 透射电子显微镜下观察各组细胞线粒体超微结构 A: NC 组; B: HG 组 (黑色箭头示萎缩的线粒体); C: Fer-1 组。

组别	IL-6	IL-1 β	MCP-1
NC 组	2.75 \pm 0.36	22.75 \pm 2.67	34.35 \pm 3.74
HG 组	16.67 \pm 2.08 ^b	41.26 \pm 2.30 ^b	182.51 \pm 13.14 ^b
Fer-1 组	9.03 \pm 1.68 ^d	32.08 \pm 1.73 ^d	126.91 \pm 16.94 ^d
<i>F</i>	60.16	49.97	106.5
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05

注: ^b $P<0.01$ vs NC 组; ^d $P<0.01$ vs HG 组。

组别	MDA (nmol/mg)	GSH (nmol/mg)	GPX4 (U/mg)	Fe ²⁺ ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
NC 组	5.45 \pm 1.02	41.73 \pm 3.65	21.64 \pm 2.84	1.21 \pm 0.14
HG 组	19.24 \pm 1.76 ^b	12.98 \pm 2.55 ^b	6.04 \pm 0.78 ^b	3.79 \pm 0.38 ^b
Fer-1 组	14.61 \pm 1.24 ^c	25.19 \pm 2.47 ^d	14.93 \pm 1.57 ^d	2.17 \pm 0.16 ^d
<i>F</i>	46.38	72.40	49.33	83.53
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注: ^b $P<0.01$ vs NC 组; ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ vs HG 组。

2.6 各组 ARPE-19 细胞中 ACSL4 和 VEGF 蛋白的表达及定位 激光共聚焦显微镜观察显示,与 NC 组相比,HG 组细胞中 ACSL4 和 VEGF 均呈强阳性表达,二者在细胞膜与细胞质中均呈强荧光染色;而 Fer-1 组细胞中 ACSL4 和 VEGF 表达较 HG 组减弱,见图 4。

3 讨论

DR 导致工作年龄人群视觉受损,被认为是成年人失明的主要原因^[11-13]。虽然 DR 的治疗已经取得了很大进展,但由于其发病机制复杂,预后仍然不良^[14-15]。BRB 的破坏,通透性增加和新生血管形成是 DR 的主要特点,RPE 是血-眼屏障的重要组成部分,其功能障碍被认为是 DR 进展的重要原因。本研究采用经典的造模方法,将 RPE 细胞置于高剂量葡萄糖中进行细胞 DR 模型的诱导,在体外模拟 DR 的进展过程^[16]。目前,对高糖所致 RPE 损伤的分子机制尚不十分清楚。一般认为高糖导致线粒

体电子传递链功能障碍,最终导致细胞内活性氧(reactive oxygen species,ROS)产生增加,通过氧化应激损伤 RPE 细胞^[17-18]。MDA 是脂质过氧化的标志物,其含量也作为反映氧化应激程度的指标^[19]。GSH 是一种重要的细胞内抗氧化剂,是氢过氧化物还原反应的重要底物。GPX4 是一种 GSH 过氧化物酶,作为主要的磷脂氢过氧化物酶抑制 ROS 的产生^[20]。本研究发现,ARPE-19 细胞活力在高糖条件下被显著抑制,MDA 含量明显升高,GSH 含量和 GPX4 活性显著降低,提示氧化应激在 DR 中发挥重要作用,与既往研究^[19]结果一致。

铁代谢紊乱诱发的铁死亡是一种新发现的、以 GSH 耗尽和脂质过氧化、细胞内脂质 ROS 堆积为特征的程序性细胞死亡模式,还具有不同于其他死亡方式的形态学改变,如线粒体皱缩、嵴减少或消失、膜增厚等细胞形态改变,涉及癌症、神经系统疾病、缺血/再灌注和其他病理过

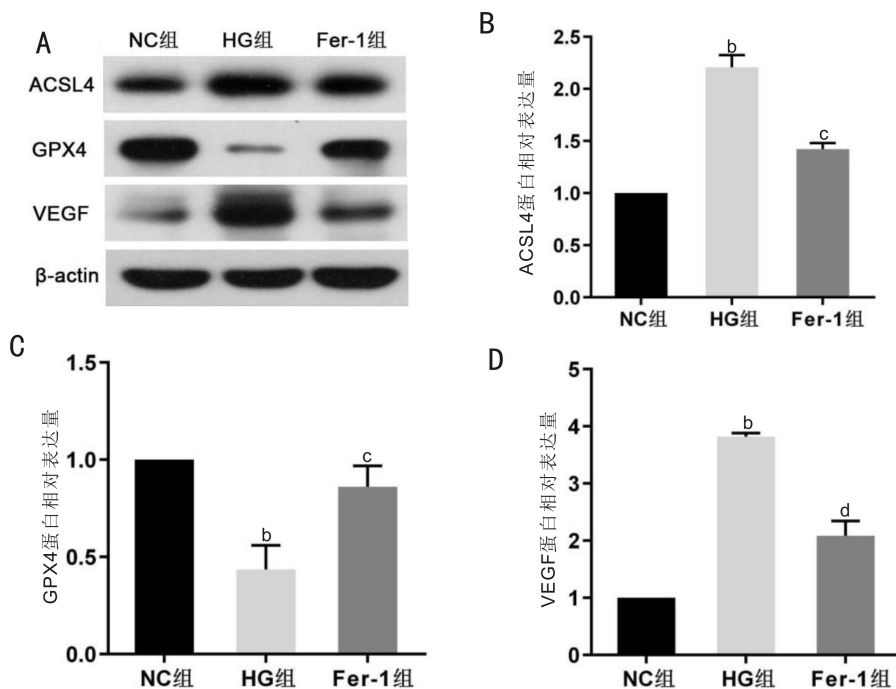


图3 Western blotting 法检测各组 ARPE-19 细胞中 ACSL4 和 GPX4 及 VEGF 蛋白表达情况 A:Western blotting 检测结果; B:ACSL4 蛋白相对表达水平量化分析; C: GPX4 蛋白相对表达水平量化分析; D: VEGF 蛋白相对表达水平量化分析。^b $P < 0.01$ vs NC 组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs HG 组。

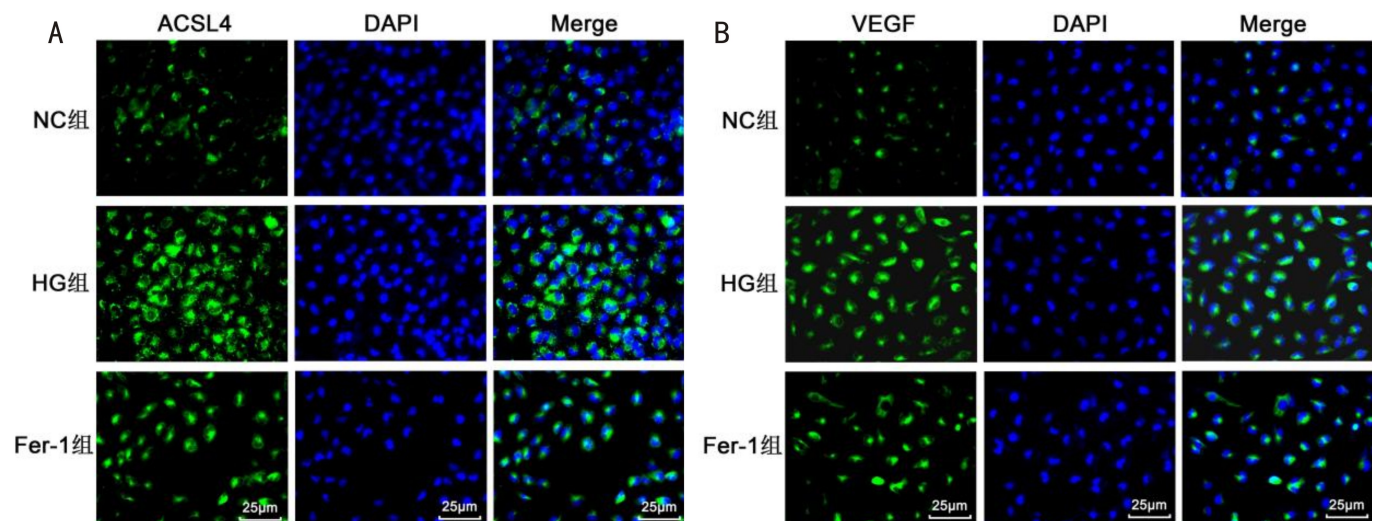


图4 免疫荧光染色观察各组 ARPE-19 细胞中 ACSL4 和 VEGF 蛋白的表达 A: 各组细胞中 ACSL4 蛋白的表达; B: 各组细胞中 VEGF 蛋白的表达。绿色荧光代表目的蛋白 ACSL4 和 VEGF 的表达,蓝色荧光代表细胞核染色。

程^[21-23]。目前关于铁死亡的机制还处于探索阶段,近年发现了一些诱发铁死亡的因子,其中 ACSL4 是重要的诱发因子,其通过增加细胞膜中长链多不饱和 $\omega 6$ 脂肪酸的含量刺激铁死亡^[24]。近年研究表明,眼科相关疾病也涉及铁死亡,如青光眼、视网膜缺血再灌注损伤、视网膜母细胞瘤、视网膜色素变性等^[25-26]。铁是维持机体生命活动最重要的微量元素之一,与机体氧气运输、DNA、ATP 的合成均密切相关,因此维持体内铁的含量与铁的稳态至关重要。关于 DR 的研究发现,与正常小鼠相比,1 型和 2 型糖尿病模型小鼠视网膜铁积累增加,且糖尿病患者视网膜样本中同样出现铁积累^[27]。GPX4 是铁死亡过程中重要的调节因素,GSH 可在 GPX4 的作用下还原 ROS 和活性氮从而减少细胞毒性。在高糖损伤的 RPE 细胞模型中发现,GSH 含量和 GPX4 活性显著降低^[16]。临床研究发现,铁死亡相关生物标志物,包括铁、脂质过氧化物、ROS、GPX4 和 GSH 水平与 DR 病情程度相关,可作为 DR 的标志物^[28]。因此,铁死亡正逐渐成为研究 DR 病理机制和治疗策略的新方向。本研究发现,高糖条件下 RPE 细胞脂质过氧化加重,线粒体形态固缩,铁含量及铁死亡相关蛋白增加,这些结果均证实 RPE 细胞发生了铁死亡。Fer-1 是一种有效的铁死亡抑制剂,可以防止脂质 ROS 的累积,广泛用于有关铁死亡的实验研究中^[16]。本研究发现,Fer-1 预处理可在一定程度上降低高糖下的脂质过氧化损伤,即下调 MDA 含量,提高 GSH 含量和 GPX4 活性,并提高 RPE 细胞活力,表明靶向抑制铁死亡可能改善 DR 期间的 RPE 损伤。

慢性炎症是糖尿病和代谢综合征的核心致病过程,DR 的视网膜微血管病变实际上是一种由低级别、持续的白细胞激活引起反复发作的毛细血管闭塞和进行性的消耗性视网膜缺血。脂质和糖代谢紊乱可导致白细胞活化从而促发炎症级联反应,在 DR 的发病和发展中起着至关重要的作用^[29]。DR 患者玻璃体和视网膜中 IL-6、IL-1 β 、MCP-1、肿瘤坏死因子- α 等多种炎症因子及 VEGF 均明显升高^[30];缺氧和氧化应激刺激 RPE 细胞分泌大量 VEGF 及 IL-6、IL-1 β 等炎症因子^[31]。这些炎症因子与 VEGF 等生长因子共同导致 DR 并发糖尿病性黄斑水肿和增殖性糖尿病视网膜病变的 BRB 破坏、血管损伤和神经炎症及病理性血管新生^[30]。有证据表明,铁死亡在炎症中起着重要作用,且在某些疾病的实验模型中,作为铁死亡抑制剂的抗氧化剂已被证明具有抗炎作用^[32]。本研究探讨了高糖环境下,RPE 细胞中铁死亡的发生与炎症因子及 VEGF 的关系,并通过抑制铁死亡观察其对这些因子表达的影响。结果表明,高糖条件下 RPE 细胞铁死亡激活且 IL-6、IL-1 β 、MCP-1 及 VEGF 表达上调,而 Fer-1 可有效抑制 RPE 细胞铁死亡,并降低了这些细胞因子的表达。这些结果提示 RPE 铁死亡损伤可能促进这些细胞因子表达,共同参与 DR 的病理过程。因此,针对炎症因子及 VEGF 异常分泌也是治疗 DR 的关键环节。

总之,本研究通过体外实验发现,高糖条件下 ARPE-19 细胞发生氧化应激介导的细胞铁死亡,并激活炎症因子和 VEGF 的表达,通过拮抗铁死亡可增强细胞活性和抗氧化能力,并减少炎症因子及 VEGF 的异常表达。本研究结果有助于理解高糖诱导的 RPE 细胞损伤的机制,为将铁死亡作为 DR 的治疗靶点提供了实验依据。然而,本研究仅

在体外观察了 RPE 细胞铁死亡在 DR 中的可能作用,铁死亡如何参与 DR 的发生和进展及相关的分子信号通路还需要进一步研究,并利用动物模型甚至临床标本加以验证。

参考文献

- 1 Wang H, Tao Y. Choroidal structural changes correlate with severity of diabetic retinopathy in diabetes mellitus. *BMC Ophthalmol* 2019; 19 (1):186
- 2 Groeneveld Y, Tavenier D, Blom JW, et al. Incidence of sight-threatening diabetic retinopathy in people with Type 2 diabetes mellitus and numbers needed to screen: a systematic review. *Diabet Med* 2019;36 (10):1199-1208
- 3 Rodríguez ML, Pérez S, Mena-Mollá S, et al. Oxidative stress and microvascular alterations in diabetic retinopathy: future therapies. *Oxid Med Cell Longev* 2019;2019:4940825
- 4 Jo DH, Yun JH, Cho CS, et al. Interaction between microglia and retinal pigment epithelial cells determines the integrity of outer blood-retinal barrier in diabetic retinopathy. *Glia* 2019;67(2):321-331
- 5 Naylor A, Hopkins A, Hudson N, et al. Tight junctions of the outer blood retina barrier. *Int J Mol Sci* 2019;21(1):211
- 6 Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 2012; 149 (5): 1060-1072
- 7 Jiang XJ, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2021;22(4):266-282
- 8 Stockwell BR. Ferroptosis turns 10: emerging mechanisms, physiological functions, and therapeutic applications. *Cell* 2022; 185 (14):2401-2421
- 9 Yang M, Tsui MG, Tsang JKW, et al. Involvement of FSP1-CoQ₁₀-NADH and GSH-GPx-4 pathways in retinal pigment epithelium ferroptosis. *Cell Death Dis* 2022;13(5):468
- 10 Li SW, Zheng LS, Zhang J, et al. Inhibition of ferroptosis by up-regulating Nrf2 delayed the progression of diabetic nephropathy. *Free Radic Biol Med* 2021;162:435-449
- 11 Vujosevic S, Aldington SJ, Silva P, et al. Screening for diabetic retinopathy: new perspectives and challenges. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2020;8(4):337-347
- 12 Tomkins-Netzer O, Niederer R, Lightman S. The role of statins in diabetic retinopathy. *Trends Cardiovasc Med* 2022 [Published online ahead of print]
- 13 Li C, Zhu B, Zhang JE, et al. Epidemiology, health policy and public health implications of visual impairment and age-related eye diseases in mainland China. *Front Public Health* 2022;10:966006
- 14 Vivian S, Jody B, Van Huet Ramon AC, et al. Long-term outcomes of vitrectomy for proliferative diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol* 2020; 99(1):83-89
- 15 Lin TZ, Shi C, Pazo EE, et al. Prognosis value of Chinese Ocular Fundus Diseases Society classification for proliferative diabetic retinopathy on postoperative visual acuity after pars Plana vitrectomy in type 2 diabetes. *Int J Ophthalmol* 2022;15(10):1627-1633
- 16 Tang XY, Li XY, Zhang DY, et al. Astragaloside-IV alleviates high glucose-induced ferroptosis in retinal pigment epithelial cells by disrupting the expression of miR-138-5p/Sirt1/Nrf2. *Bioengineered* 2022;13(4):8240-8254
- 17 Liu W, Liou SS, Hong TY, et al. Hesperidin prevents high glucose-induced damage of retinal pigment epithelial cells. *Planta Med* 2018;84 (14):1030-1037
- 18 Farnoodian M, Halbach C, Slinger C, et al. High glucose promotes the migration of retinal pigment epithelial cells through increased oxidative stress and PEDF expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 2016; 311(3):C418-C436
- 19 Khalili F, Vaisi-Raygani A, Shakiba E, et al. Oxidative stress

parameters and keap 1 variants in T2DM; association with T2DM, diabetic neuropathy, diabetic retinopathy, and obesity. *J Clin Lab Anal* 2022;36(1):e24163

20 Ursini F, Maiorino M. Lipid peroxidation and ferroptosis: the role of GSH and GPx4. *Free Radic Biol Med* 2020;152:175-185

21 Zhang YL, Shi JJ, Liu XG, et al. BAP1 links metabolic regulation of ferroptosis to tumour suppression. *Nat Cell Biol* 2018; 20 (10): 1181-1192

22 Stockwell BR, Friedmann Angeli JP, Bayir H, et al. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease. *Cell* 2017;171(2):273-285

23 Li Y, Feng DC, Wang ZY, et al. Ischemia-induced ACSL4 activation contributes to ferroptosis-mediated tissue injury in intestinal ischemia/reperfusion. *Cell Death Differ* 2019;26(11):2284-2299

24 Doll S, Proneth B, Tyurina YY, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition. *Nat Chem Biol* 2017;13(1):91-98

25 田溪雯, 秦波, 刘身文. 铁死亡在眼科疾病中的应用研究进展. *眼科新进展* 2021;41(2):182-188

26 王巧云, 解来青. 铁死亡机制在视网膜色素上皮细胞损伤相关眼病中的研究进展. *国际眼科杂志* 2023;23(1):75-78

27 Chaudhary K, Promsote W, Ananth S, et al. Iron overload accelerates the progression of diabetic retinopathy in association with increased retinal renin expression. *Sci Rep* 2018;8(1):3025

28 Mu L, Wang DH, Dong ZG, et al. Abnormal levels of serum ferroptosis-related biomarkers in diabetic retinopathy. *J Ophthalmol* 2022;2022:3353740

29 Forrester JV, Kuffova L, Delibegovic M. The role of inflammation in diabetic retinopathy. *Front Immunol* 2020;11:583687

30 Tang L, Xu GT, Zhang JF. Inflammation in diabetic retinopathy: possible roles in pathogenesis and potential implications for therapy. *Neural Regen Res* 2023;18(5):976-982

31 Arjamaa O, Aaltonen V, Piippo N, et al. Hypoxia and inflammation in the release of VEGF and interleukins from human retinal pigment epithelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2017; 255 (9): 1757-1762

32 Sun YT, Chen P, Zhai BT, et al. The emerging role of ferroptosis in inflammation. *Biomedicine Pharmacother* 2020;127:110108