

# 基于 Nrf2/HO-1/GPX4 信号通路探讨葫芦巴碱对 ARPE-19 铁死亡的干预研究

岳欣欣<sup>1</sup>, 付洋<sup>2</sup>, 金海哲<sup>3</sup>, 尹晓燕<sup>1</sup>, 傅全威<sup>4</sup>

引用: 岳欣欣, 付洋, 金海哲, 等. 基于 Nrf2/HO-1/GPX4 信号通路探讨葫芦巴碱对 ARPE-19 铁死亡的干预研究. 国际眼科杂志, 2025, 25(2): 191-197.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.72171042); 辽宁省教育厅高校项目 (No.LJKMZ20221981)

作者单位: <sup>1</sup>(110163) 中国辽宁省沈阳市, 辽宁何氏医学院; <sup>2</sup>(110000) 中国辽宁省沈阳市, 北部战区总医院和平院区烧伤整形科; <sup>3</sup>(110167) 中国辽宁省沈阳市, 东北大学; <sup>4</sup>(516000) 中国广东省惠州市, 中信惠州医院

作者简介: 岳欣欣, 硕士研究生, 副教授, 副主任医师, 研究方向: 内分泌与代谢病学。

通讯作者: 尹晓燕, 硕士研究生, 副教授, 内科教研室主任, 研究方向: 内分泌与代谢病学. yinxiaoyan@huh.edu.cn; 傅全威, 博士, 教授, 院长, 研究方向: 干细胞治疗放射性肺损伤机制研究、医院管理研究. fuqw@163.com

收稿日期: 2024-05-13 修回日期: 2024-12-31

## 摘要

**目的:** 基于 Nrf2/HO-1/GPX4 途径探讨和阐明葫芦巴碱 (TRG) 保护人视网膜色素上皮 (ARPE-19) 铁死亡的干预机制。

**方法:** 用不同浓度的葫芦巴碱干预 ARPE-19 细胞筛选葫芦巴碱干预 ARPE-19 细胞的最佳浓度, 随后进行分组 (NC 组、HG 组、Fer-1 组、TRG 组), 收集样本进行相关指标测定。按照谷胱甘肽 (GSH)、丙二醛 (MDA) 和铁离子检测试剂盒说明书评价各组细胞中 GSH、MDA 和铁离子变化水平; 流式细胞术检测各组细胞中 ROS 变化水平; Western blot 分析各组细胞核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)、血红素加氧酶-1 (HO-1)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4)、酰基辅酶 A 合成酶长链家族 4 (ACSL4) 的表达情况。

**结果:** 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  葫芦巴碱的预处理干预措施可有效减轻高糖造成的细胞活性的降低。HG 组 ROS、MDA 的水平显著高于 NC 组; 与 HG 组相比, TRG 组 ROS、MDA 的水平显著下降, 各组 GSH 变化情况与 ROS、MDA 相反, Fer-1 组和 TRG 组中 ACSL4 蛋白和铁离子水平表达降低, Fer-1 组和 TRG 组中 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白相对表达水平升高 (均  $P < 0.01$ )。

**结论:** 葫芦巴碱保护 ARPE-19 细胞免于高糖损伤是通过靶向抑制 Nrf2/HO-1/GPX4 信号通路抗铁死亡实现的。

**关键词:** 葫芦巴碱; 铁死亡; 核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2); 血红素加氧酶-1 (HO-1); 谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4); 氧化应激; 糖尿病视网膜病变; 人视网膜色素上皮 (ARPE-19)

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2025.2.03

## Study on the intervention of trigonelline on ferroptosis of ARPE-19 based on Nrf2/HO-1/GPX4 signaling pathway

Yue Xinxin<sup>1</sup>, Fu Yang<sup>2</sup>, Jin Haizhe<sup>3</sup>, Yin Xiaoyan<sup>1</sup>, Fu Quanwei<sup>4</sup>

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (No.72171042); Research Projects of Colleges and Universities in Liaoning Province (No.LJKMZ20221981)

<sup>1</sup>He University, Shenyang 110163, Liaoning Province, China;

<sup>2</sup>Department of Burns and Plastic Surgery, General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang 110000, Liaoning Province, China; <sup>3</sup>Northeastern University, Shenyang 110167, Liaoning Province, China; <sup>4</sup>CITIC Huizhou Hospital, Huizhou 516000, Guangdong Province, China

**Correspondence to:** Yin Xiaoyan. He University, Shenyang 110163, Liaoning Province, China. yinxiaoyan@huh.edu.cn; Fu Quanwei. CITIC Huizhou Hospital, Huizhou 516000, Guangdong Province, China. fuqw@163.com

Received: 2024-05-13 Accepted: 2024-12-31

## Abstract

• **AIM:** To investigate and clarify the intervention mechanism of trigonelline (TRG) in preventing ferroptosis in ARPE-19 cells based on the Nrf2/HO-1/GPX4 pathway.

• **METHODS:** The ARPE-19 cells were cultured and subsequently treated with varying concentrations of trigonelline to ascertain the most effective concentration for modulating the cells. Then the cells were categorized into distinct groups, including normal control (NC) group, high glucose (HG) group, Fer-1 group, TRG group based on the determined concentration. Samples from each group were then gathered to assess relevant indicators. The intracellular levels of glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), and Ferrion were quantified in accordance with the protocols provided by the GSH, MDA, and Ferrion detection kits. Flow cytometry was employed to measure the ROS levels within each group. Additionally, Western blot analysis was conducted to examine the expression of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), glutathione peroxidase (GPX4), and acyl-CoA synthetase

long-chain family member 4 (ACSL4) across the different groups.

• **RESULTS:** The preconditioning intervention with 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TRG effectively mitigated the decline in cell activity induced by high glucose levels. The levels of reactive oxygen species (ROS) and MDA in the HG group were markedly elevated compared to the NC group; and the TRG group exhibited significantly reduced levels of ROS and MDA compared to those of the HG group, with the antioxidant stress index GSH showing opposite trends to those of ROS and MDA across all the groups. Whereas the Fer-1 and TRG groups showed decreased expression levels of ACSL4 protein and iron ions, and the expression levels of Nrf2, HO-1 and GPX4 in the Fer-1 and TRG groups were increased.

• **CONCLUSION:** TRG protects ARPE-19 cells from the detrimental effects of high glucose by targeting the Nrf2/HO-1/GPX4 signaling pathway to counter ferroptosis.

• **KEYWORDS:** trigonelline; ferroptosis; nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf-2); heme oxygenase-1 (HO-1); glutathione peroxidase (GPX4); oxidative stress; diabetic retinopathy; adult retinal pigment epithelial (ARPE)

**Citation:** Yue XX, Fu Y, Jin HZ, et al. Study on the intervention of trigonelline on ferroptosis of ARPE-19 based on Nrf2/HO-1/GPX4 signaling pathway. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)*, 2025, 25(2):191-197.

## 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,也是导致成人失明的首要病因<sup>[1]</sup>,由于糖尿病视网膜病变的发病机制复杂,其治疗和早期预防措施尚存在不足<sup>[1]</sup>。视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, 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,也是早期治疗和预防糖尿病视网膜病变的关键<sup>[2-3]</sup>。因此,进一步探索高糖损伤 RPE 细胞的分子机制不仅有利于进一步阐明 DR 的发病机制,也有利于拓展 DR 新的治疗和预防措施<sup>[2]</sup>。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,既往研究已经证实其与多种疾病密切相关,尤其是糖尿病及其并发症,如糖尿病肾病、糖尿病视网膜病变等的发生发展<sup>[4-5]</sup>。葫芦巴碱(trigonelline, TRG)是一种两性化合物,具有降血糖、降血脂和抗肿瘤等作用,它可改善糖尿病动物模型中胰岛素抵抗,调节葡萄糖和脂质代谢<sup>[6]</sup>。既往葫芦巴碱和铁死亡之间关联的研究甚少,本研究欲在高糖条件下,基于 Nrf2/HO-1/GPX4 信号途径探讨和阐明葫芦巴碱保护人视网膜色素上皮(ARPE-19)细胞的产生铁死亡抗性的分子机制,为 DR 的治疗提供实验依据,拓展新的治疗和预防策略。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 细胞株:人 RPE 细胞株 ARPE-19(美国 ATCC 公司)。主要试剂:DMEM 高糖培养基(HyClone, Thermo Scientific);0.25%胰蛋白酶 EDTA 消化液(Solarbio, Thermo Scientific);胎牛血清(Gibco, Thermo Scientific);CCK8 试剂盒、二喹啉甲酸(BCA)法蛋白定量试剂盒(南京建成);DCFH-DA 探针(上海西格玛奥德里奇);谷胱甘肽(GSH, 上海碧云天)、丙二醛(MDA,上海碧云天)、铁离子试剂盒(南京建成);Ferrostatin-1(Fer-1, Selleckchem 公司); $\beta$ -actin 抗体(上海碧云天)、核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)抗体(上海碧云天)、血红素加氧酶-1(HO-1)抗体(上海碧云天)、谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)抗体(上海碧云天)、酰基辅酶 A 合成酶长链家族 4(ACSL4)抗体(Cell Signaling Technology,上海碧云天);山羊抗兔 IgG(H+L)二抗(上海碧云天)、山羊抗鼠 IgG(H+L)二抗(武汉三鹰)。主要设备:CO<sub>2</sub>培养箱(德国 heraeus 公司);组织-器官水浴系统(上海奥尔科特生物科技有限公司);紫外分光光度计(日本日立);超净工作台(SW-CJ-2F,苏州博莱尔净化设备有限公司);多功能酶标仪(美国博腾仪器有限公司, BioTek Synergy H1);流式细胞仪(BD FACSCalibur, Thermo Scientific);倒置光学显微镜(日本 Olympus)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 细胞复苏后,用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12(含双抗)培养基培养细胞,将细胞接种于细胞培养瓶中,将细胞培养瓶平放在二氧化碳浓度为 5% 的 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养,当培养瓶中的 ARPE-19 细胞生长密度达到 80% 以上时,可以对培养瓶中的细胞进行细胞传代培养;将 ARPE-19 细胞培养 3 代后用于后续实验。

**1.2.2 细胞存活率检测** 将视网膜色素上皮细胞均匀打散接种在 96 孔板中( $1 \times 10^4/\text{well}$ ),细胞达到 80% 融合时,用含有不同浓度葫芦巴碱(0、10、20、40、80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的培养基孵育细胞 24 h,然后以 30 mmol/L 葡萄糖培养 48 h,随后检测细胞活性,通过此实验结果,评估及筛选可进行实验干预的葫芦巴碱浓度。采用 CCK-8 法检测细胞存活率,根据说明书在 96 孔板每个孔中加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液,细胞培养箱中孵育 4 h 后,用酶标仪测定 450 nm 处的 OD 值。计算各孔平均 OD 值,以对照组细胞活性为 100%,计算各孔的细胞活力 = (OD 处理/OD 对照)  $\times$  100%。

**1.2.3 分组与干预措施** 根据 1.2.2 实验结果进行分组,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)和高糖+葫芦巴碱组(TRG 组)。NC 组:以正常培养液培养 48 h;HG 组:以 30 mmol/L 葡萄糖培养 48 h;Fer-1 组:以 1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  Fer-1 预处理 12 h,然后以 30 mmol/L 葡萄糖培养 48 h;TRG 组:以 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  葫芦巴碱预处理 24 h,然后以 30 mmol/L 葡萄糖培养 48 h。

**1.2.4 细胞中氧化应激指标 GSH 和 MDA 及 ROS 含量测定** 各组细胞根据分组条件处理后取上清,先用 BCA 法测定蛋白浓度,分别按照 GSH、MDA 试剂盒说明书,检

测并计算各组细胞上清中 GSH、MDA 的水平。然后再检测各组细胞内活性氧 (ROS) 的水平,弃培养基后加入 1 mL 无血清培养基配的 DCFH-DA 溶液 (10  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ), 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 20 min,弃培养液后,收集细胞,采用流式细胞仪进行检测各组细胞内 ROS 的水平。

**1.2.5 细胞中铁含量测定** 各组细胞根据分组条件处理后取上清,BCA 法测定蛋白浓度,按照铁离子检测试剂盒说明书,检测并计算各组细胞上清中铁离子水平。

**1.2.6 Western blot 检测** 按照 Western blot 细胞裂解液说明书提取蛋白,用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。取 30  $\mu\text{g}$  蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,转移到 PVDF 膜上后用 5% BSA 或 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,然后与各种一抗在 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。一抗稀释度分别为 Nrf2 (1:1000)、HO-1 (1:1000)、GPX4 (1:1000)、ACSL4 (1:1000)、和  $\beta$ -actin (1:1000)。TBS 洗涤 3 次后加入二抗,室温摇床 2 h 后,加入 ECL 发光液反应,曝光后拍照分析。

统计学分析:采用 Graphpad prism 8.0 软件进行数据分析和绘图。对连续型数值变量用均数 $\pm$ 标准差表示,对符合正态性和方差齐性的检验采用方差分析,进一步的两两比较采用 LSD-*t* 检验;如果数据不满足正态性和方差齐性的检验,可采取 WelchANOVA 来处理方差不齐的情况。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 不同浓度的葫芦巴碱预处理对高糖处理的 ARPE-19 细胞增殖活性的影响** 为了评估葫芦巴碱的预处理是否能够改善高糖导致的 ARPE-19 细胞活性下降及其细胞毒性作用,先将 ARPE-19 细胞分别用 0、10、20、40、80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  葫芦巴碱孵育 24 h 后,再用 30 mmol/L 葡萄糖处理细胞 48 h,然后测定 ARPE-19 的细胞活性。0、10、20、40、80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  葫芦巴碱处理组 ARPE-19 细胞活力分别为 (49.78 $\pm$ 2.51)%、(63.03 $\pm$ 2.57)%、(74.31 $\pm$ 1.72)%、(90.56 $\pm$ 0.84)%、(84.36 $\pm$ 1.37)%,各组间 ARPE-19 细胞活力差异有统计学意义 ( $F=218.2, P<0.01$ );与 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  葫芦巴碱处理组相比,10、20、40、80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  葫芦巴碱均可使 ARPE-19 细胞活性增加,差异有统计学意义 ( $t=8.45、15.64、25.97、22.02$ ,均  $P<0.01$ ),见图 1;其中 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  葫芦巴碱预处理 ARPE-19 细胞后,其细胞活性升高至 90.56 $\pm$ 0.84%,此结果表明,40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  葫芦巴碱的预处理浓度是改善高糖诱导 ARPE-19 细胞损伤的最适宜浓度。

**2.2 葫芦巴碱预处理对 ARPE-19 细胞中 ROS 及 MDA 和 GSH 的影响** 根据 2.1 结果,选取 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  葫芦巴碱作为预处理浓度,同时根据既往研究进行实验分

组<sup>[3,7]</sup>,评估各组中细胞 ROS、MDA 和 GSH 的表达情况。采用流式细胞仪检测各组细胞内 ROS 的变化水平,各组间 ROS 变化差异有统计学意义 ( $P<0.01$ );与 NC 组相比, HG 组、Fer-1 组和 TRG 组 ROS 的水平均升高 ( $t=93.71、42.3、45.69$ ,均  $P<0.01$ );与 HG 组相比, Fer-1 组和 TRG 组 ROS 的水平显著下降 ( $t=51.41、48.01$ ,均  $P<0.01$ ); TRG 组与 Fer-1 组 ROS 的水平相比差异无统计学意义 ( $t=3.39, P>0.05$ ),见表 1,图 2、3,这一结果提示 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  葫芦巴碱的预处理干预可减低高糖诱导的 ARPE-19 细胞内 ROS 的水平。随后检测各组 ARPE-19 细胞中的 MDA 变化情况,发现其与 ROS 变化趋势相似 (表 1,图 4),且各组间 MDA 变化差异有统计学意义 ( $F=106.6, P<0.01$ );与 NC 组相比, HG 组、Fer-1 组和 TRG 组中 MDA 水平均升高,差异具有统计学意义 ( $t=17.36、10.18、12.38$ ,均  $P<0.01$ );与 HG 组相比, Fer-1 组和 TRG 组 MDA 水平降低,差异有统计学意义 ( $t=7.18、4.98$ ,均  $P<0.01$ );TRG 组与 Fer-1 组 MDA 的水平相比差异无统计学意义 ( $t=2.19, P>0.05$ ),这一结果提示 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  葫芦巴碱的预处理干预能够显著降低高糖导致的 ARPE-19 细胞内氧化应激终产物 MDA 的水平。与此同时,检测各组 ARPE-19 细胞中 GSH 水平差异有统计学意义 ( $F=204.5, P<0.01$ );与 NC 组相比, HG 组、Fer-1 组和 TRG 组中 GSH 水平均减低,差异具有统计学意义 ( $t=34.88、20.14、19.00$ ,均  $P<0.01$ );与 HG 组相比, Fer-1 组和 TRG 组 GSH 水平升高,差异具有统计学意义 ( $t=14.74、15.88$ ,均  $P<0.01$ ); TRG 组与 Fer-1 组中 GSH 的水平相比差异无统计学意义 ( $t=1.14, P>0.05$ ),见表 1,图 5,这提示 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  葫芦巴碱的预处理干预可升高抗氧化酶 GSH 的活性。

**2.3 葫芦巴碱预处理对 ARPE-19 细胞中铁离子含量的影响** 检测各组 ARPE-19 细胞中铁离子变化水平,发

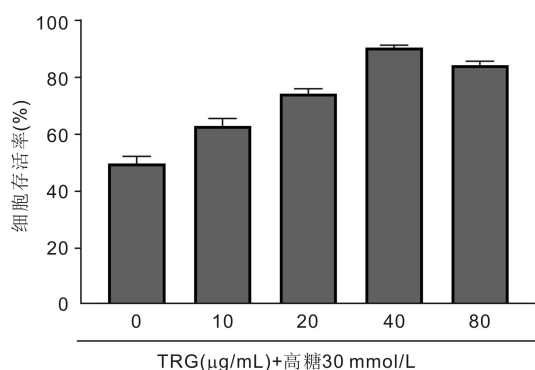


图 1 不同浓度葫芦巴碱预处理对高糖处理的 ARPE-19 细胞增殖活性的影响。

表 1 各组 ARPE-19 细胞中 ROS、MDA、GSH、铁离子变化情况

$\bar{x}\pm s$

分组	ROS (%)	MDA (mmol/mg)	GSH (mmol/mg)	铁离子 ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )
NC 组	6.945 $\pm$ 0.38	5.58 $\pm$ 0.35	40.26 $\pm$ 1.90	1.28 $\pm$ 0.03
HG 组	46.76 $\pm$ 0.98 <sup>b</sup>	20.20 $\pm$ 1.43 <sup>b</sup>	14.10 $\pm$ 1.32 <sup>b</sup>	3.85 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>
Fer-1 组	24.92 $\pm$ 0.99 <sup>b,d</sup>	14.16 $\pm$ 1.52 <sup>b,d</sup>	25.15 $\pm$ 1.25 <sup>b,d</sup>	2.19 $\pm$ 0.02 <sup>b,d</sup>
TRG 组	26.36 $\pm$ 0.89 <sup>b,d</sup>	16.01 $\pm$ 1.09 <sup>b,d</sup>	26.01 $\pm$ 1.44 <sup>b,d</sup>	2.27 $\pm$ 0.05 <sup>b,d</sup>

注:<sup>b</sup> $P<0.01$  vs NC 组;<sup>d</sup> $P<0.01$  vs HG 组。

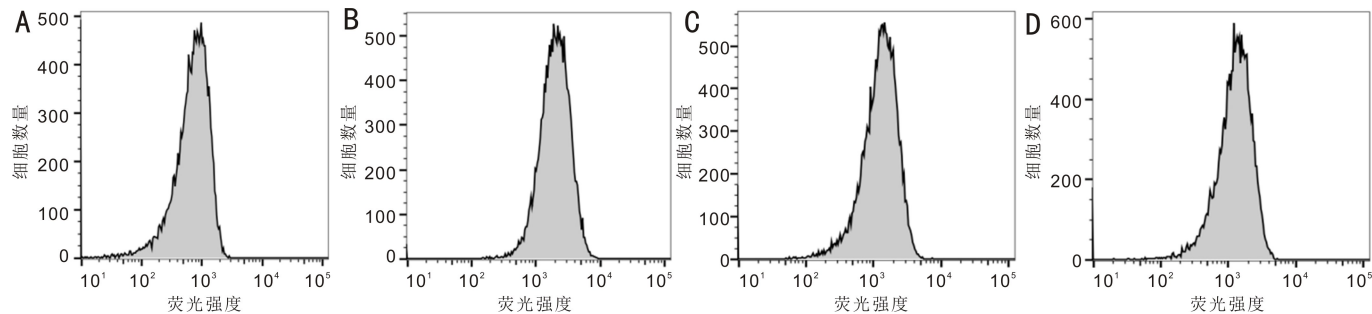


图2 各组 ARPE-19 细胞中 ROS 变化情况 A:NC 组;B:HG 组;C: Fer-1 组;D:TRG 组。

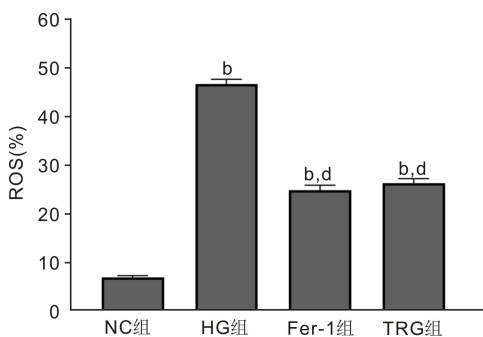


图3 各组 ARPE-19 细胞中 ROS 变化比较 <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs NC 组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs HG 组。

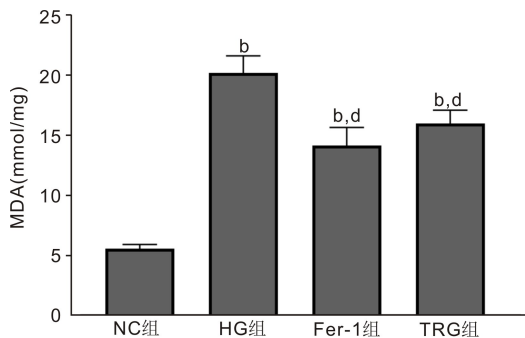


图4 各组 ARPE-19 细胞中 MDA 变化情况 <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs NC 组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs HG 组。

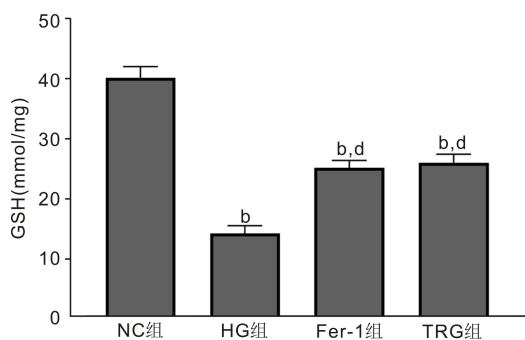


图5 各组 ARPE-19 细胞中 GSH 变化情况 <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs NC 组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs HG 组。

现各组间铁离子水平差异有统计学意义 ( $F = 1698, P < 0.01$ ); 与 NC 组相比, HG 组、Fer-1 组和 TRG 组中 ARPE-19 细胞中铁离子水平升高, 差异具有统计学意义 ( $t = 99.2, 35.04, 38.13, 均 P < 0.01$ ); 与 HG 组相比, Fer-1 组和 TRG 组铁离子水平降低, 差异有统计学意义 ( $t = 64.16, 61.07, 均 P < 0.01$ ); TRG 组与 Fer-1 组中铁离子水平相比差异无统计学意义 ( $t = 3.09, P > 0.05$ ), 见表 1, 图 6, 这一结

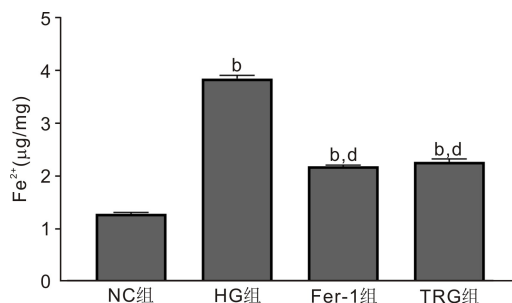


图6 各组 ARPE-19 细胞中 Fe<sup>2+</sup> 水平变化情况 <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs NC 组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs HG 组。

果提示 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  葫芦巴碱的预处理干预可有效减轻高糖损伤导致的 ARPE-19 细胞中铁离子蓄积。

**2.4 葫芦巴碱预处理对各组 ARPE-19 细胞中铁死亡标志蛋白 ACSL4 的影响** 检测各组 ARPE-19 细胞中铁死亡标志蛋白 ACSL4 的变化情况, 发现各组间 ACSL4 蛋白相对表达水平差异有统计学意义 ( $F = 172.4, P < 0.01$ )。与 NC 组相比, HG 组、Fer-1 组和 TRG 组中 ARPE-19 细胞中 ACSL4 蛋白相对表达水平均升高, 差异具有统计学意义 ( $t = 31.82, 12.04, 13.52, 均 P < 0.01$ ); 与 HG 组相比, Fer-1 组和 TRG 组中 ACSL4 蛋白相对表达水平降低, 差异具有统计学意义 ( $t = 19.78, 18.3, 均 P < 0.01$ ); TRG 组与 Fer-1 组中 ACSL4 蛋白相对表达水平相比差异无统计学意义 ( $t = 1.47, P > 0.05$ ), 见图 7。这提示 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  葫芦巴碱的预处理干预可降低铁死亡标志蛋白 ACSL4 的表达水平。

**2.5 葫芦巴碱预处理对各组 ARPE-19 细胞中 Nrf2/HO-1/GPX4 信号途径的影响** 检测各组 ARPE-19 细胞中 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白相对表达水平, 发现各组间 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白相对表达水平差异均具有统计学意义 ( $F = 52.75, 49.36, 33.14, 均 P < 0.01$ )。与 NC 组相比, HG 组中 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白相对表达水平减低, 差异具有统计学意义 ( $t = 17.42, 17.03, 13.86, 均 P < 0.01$ ); 与 HG 组相比, Fer-1 组中 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白相对表达水平升高 ( $t = 11.71, 10.56, 8.90, 均 P < 0.01$ ), TRG 组中 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白相对表达水平升高, 差异具有统计学意义 ( $t = 10.51, 8.56, 6.55, 均 P < 0.01$ )。与 Fer-1 组相比, TRG 组中 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白表达水平差异无统计学意义 (均  $P > 0.05$ ), 见图 8。这提示 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  葫芦巴碱的预处理干预可改善高糖诱导的 ARPE-19 细胞中 Nrf2/HO-1/GPX4 信号途径的抑制作用。

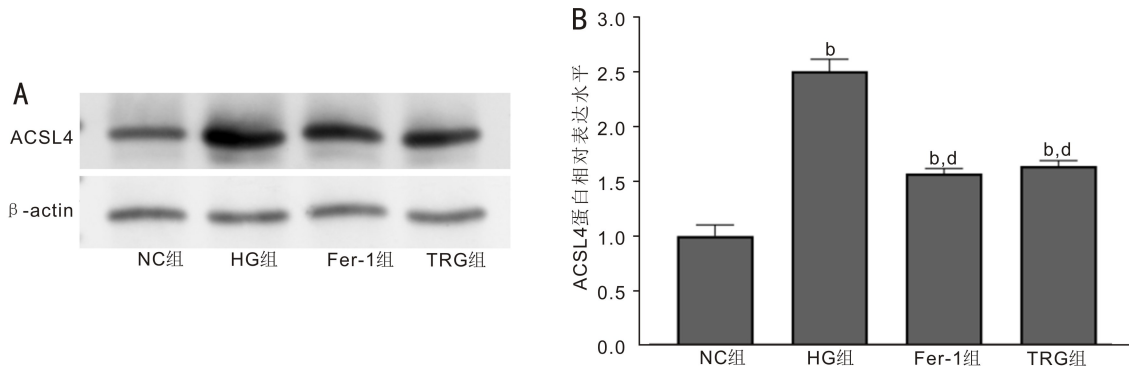


图7 各组 ARPE-19 细胞中铁死亡标志蛋白 ACSL4 变化情况 A:蛋白印记法显示各组中铁死亡标志蛋白 ACSL4 表达水平;B:各组 ARPE-19 细胞中铁死亡标志蛋白 ACSL4 相对表达水平比较;<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs NC 组;<sup>d</sup> $P < 0.01$  vs HG 组。

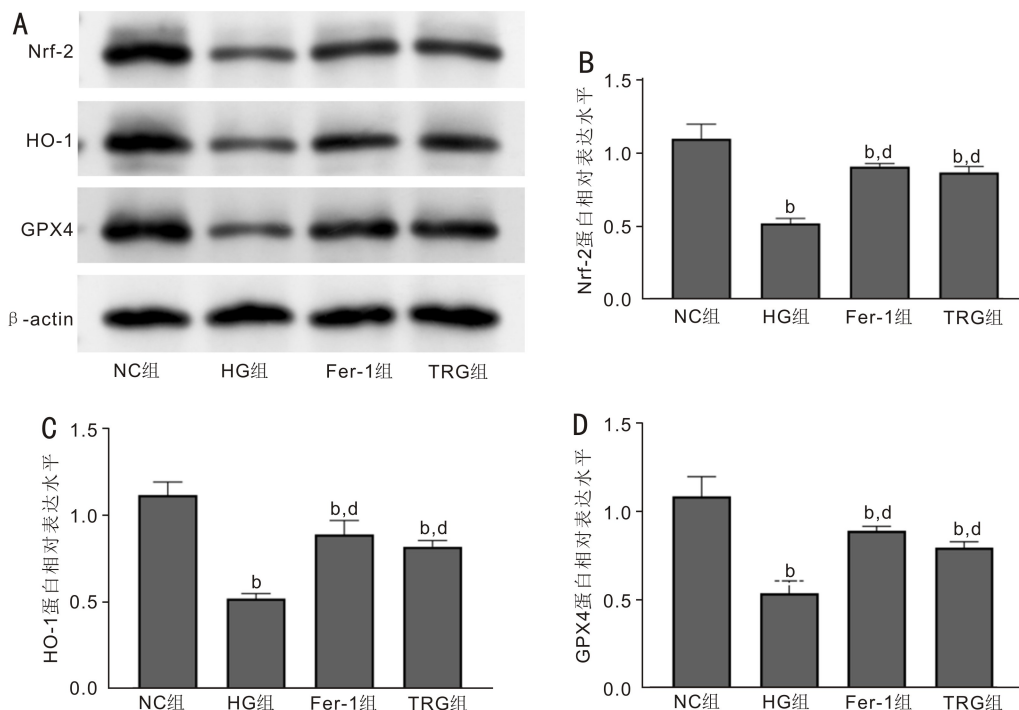


图8 各组 ARPE-19 细胞中 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白相对水平变化情况 A:蛋白印记法显示各组中 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白表达水平;B:Nrf2;C:HO-1;D:GPX4。<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs NC 组;<sup>d</sup> $P < 0.01$  vs HG 组。

### 3 讨论

糖尿病视网膜病变是糖尿病微血管并发症之一,其主要特点是早期症状不典型,发病机制复杂,预后不佳,同时它也是导致成人失明的主要原因之一<sup>[8]</sup>。目前已有研究认为,RPE 是血-视网膜屏障的重要组成部分,其功能障碍是导致糖尿病视网膜病变的主要机制和治疗靶点之一<sup>[9]</sup>,因此,本研究选取高糖干预 ARPE-19 细胞作为体外实验的模型,模拟糖尿病视网膜病变的进展进行相关的后续实验。

既往研究证实血-视网膜屏障中存在双向铁流,铁流的方向取决于 RPE 细胞中铁的含量与状态,RPE 细胞中铁离子的分布、浓度及代谢状况有可能作为评估糖尿病视网膜病变早期发生和病情监控的有效指标<sup>[10]</sup>。同时,近期研究发现铁死亡可以通过诱导 RPE 细胞氧化应激、促进视网膜新生血管形成、介导异常免疫反应等方面影响糖尿病视网膜病变的进展<sup>[11]</sup>,因此本研究欲基于调控铁死亡途径,探讨如何早期治疗和预防糖尿病视网

膜病变的可能。

铁死亡的发生,依赖转铁蛋白与转铁蛋白受体结合把铁从细胞外转移到细胞内促进其发生,其主要的调控途径有 5 种:铁代谢紊乱、脂质过氧化积累、GPX4 活性下降、胱氨酸/谷氨酸逆向转运体 (SystemXc) 的抑制、P53 通路的激活<sup>[12]</sup>。高糖条件下,铁死亡的发生是由于 GSH 的耗竭和 GPX4 的活性下降,Fe<sup>2+</sup>氧化脂质产生过量的 ROS,ROS 在细胞内的累积导致细胞发生氧化应激,最终导致 RPE 细胞发生损伤<sup>[13]</sup>。已知,GPX4 是一种 GSH 过氧化物酶,可抑制 ROS 的产生,因此靶向干预 GPX4 的活性是产生铁死亡抗性的重要途径<sup>[14]</sup>。葫芦巴碱作为一种天然生物碱,具有多种药理学作用,其抗氧化应激作用和治疗糖尿病的作用已得到初步证实<sup>[15-19]</sup>。在既往研究基础上,本研究欲探讨葫芦巴碱是否具有保护 ARPE-19 细胞免于高糖导致的氧化应激作用。本研究结果发现,葫芦巴碱可改善高糖诱导的 ARPE-19 细胞中 ROS 和 MDA 的水平升高,这提示葫芦巴碱可降低高糖产生的氧化应激反应中

ROS 和 MDA 的水平,抑制氧化应激损伤。本研究同时发现葫芦巴碱也可改善高糖诱导的 ARPE-19 细胞中 GSH 水平的降低,GSH 具有抗氧化作用,可影响 ROS 和 GPX4 变化水平,进一步提示葫芦巴碱具有保护 ARPE-19 细胞免于高糖氧化应激损伤的作用,这与既往研究结果一致<sup>[17,19]</sup>,都阐述了葫芦巴碱的抗氧化应激作用。随之,下一步本研究欲解释葫芦巴碱如何调控铁死亡途径保护 ARPE-19 细胞免于高糖氧化应激损伤,其关键点在于阐述葫芦巴碱如何靶向调控 GPX4 的活性。

Nrf2 是抗氧化应激的重要核转录因子,其生物学作用主要是维持氧化还原和蛋白质稳态及调节代谢和炎症等<sup>[20-21]</sup>。当 Nrf2 受到 ROS 刺激时,Nrf2 与 Keap1 解离,调控下游 NADPH、HO-1、SOD 等蛋白表达,调控 Nrf2 的表达使其发挥抗氧化机制有利于保护细胞<sup>[22]</sup>。已有研究证实,Nrf2/HO-1 信号通路是重要的调控氧化应激治疗糖尿病视网膜病变的重要途径<sup>[23-25]</sup>。目前关于葫芦巴碱调控 Nrf2/HO-1/GPX4 信号通路影响铁死亡的研究较少。基于既往研究结果和研究理论基础,本研究提出假设,即“葫芦巴碱调控 Nrf2/HO-1/GPX4 信号通路可干预高糖诱导 ARPE-19 细胞的铁死亡发生”。首先本研究发现葫芦巴碱可以抑制高糖诱导的 ARPE-19 细胞中铁死亡蛋白 ACSL4 的表达水平和铁离子水平的升高,由此实验结果可阐述氧化应激和铁死亡之间的关系,即高糖时,ARPE-19 细胞发生氧化应激,ROS 和 MDA 水平增加,GSH 水平减低;随之,Fe<sup>2+</sup> 累积和 ROS 增加相互促进,铁死亡蛋白 ACSL4 表达水平增加,ARPE-19 细胞发生铁死亡;进一步探讨了葫芦巴碱可保护 ARPE-19 细胞免于高糖诱导的铁死亡的发生可能与调控氧化应激有关。为了进一步验证假设,探讨葫芦巴碱对 RPE 细胞的保护作用是如何通过激活 Nrf2/HO-1/GPX4 通路产生抑制铁死亡的作用实现的,本研究发现,葫芦巴碱可改善高糖诱导的 ARPE-19 细胞中 Nrf2/HO-1/GPX4 通路的抑制作用。最终验证了本研究的假设,阐述了葫芦巴碱可调控 Nrf2/HO-1/GPX4 通路,产生铁死亡抗性,保护 ARPE-19 细胞免于高糖损伤。本研究的创新性之一,在既往研究发现葫芦巴碱可改善胰岛素抵抗的基础上,创新建立葫芦巴碱和糖尿病视网膜病变之间的治疗关联,探讨了葫芦巴碱早期治疗和干预糖尿病病变的可能性及相关机制;本研究的创新性之二,在既往研究发现葫芦巴碱可产生铁死亡抗性的基础上,提出葫芦巴碱可调控 Nrf2/HO-1/GPX4 通路,产生铁死亡抗性,保护 ARPE-19 细胞的假设并验证,弥补了目前研究中关于葫芦巴碱在糖尿病视网膜病变中作用机制的不足,为未来葫芦巴碱在临床应用中作为辅助治疗药物提供了理论依据。

本研究也具有一定的局限性:(1)众所周知糖尿病视网膜病变的发生机制和影响因素复杂,糖尿病视网膜病变发生时,不仅有高糖作为影响条件,缺氧和缺血同样是糖尿病视网膜病变的影响条件,下一步实验应该在缺氧条件下进一步阐述葫芦巴碱保护 ARPE-19 细胞的分子机制;(2)本研究只选择 ARPE-19 细胞进行体外实验研究,还

需进行糖尿病视网膜病变的动物实验研究,探索和阐述葫芦巴碱对糖尿病视网膜病变组织影响的分子机制;(3)葫芦巴碱作为一种天然生物碱,其药效动力学及药理代谢过程还需深入,在药理学研究方向为其在早期治疗和预防糖尿病视网膜病变提供更为安全和可靠的数据。

综合上述,葫芦巴由于生物活性成分多,资源丰富,药物疗效多,使用安全性高在我国中草药研究和应用方向上历史悠久,葫芦巴碱是其重要的组成成分,在糖尿病治疗领域已经得到初步认可<sup>[18,26]</sup>。在现代科学技术和中医药理论的双重加持下,提升和深度发掘其药用价值,将为临床医生解决糖尿病视网膜病变的预防难题。

**利益冲突声明:** 本文不存在利益冲突。

**作者贡献声明:** 岳欣欣负责论文选题与修改,初稿撰写;付洋、金海哲文献检索和数据分析;尹晓燕、傅全威负责选题指导,论文修改及审阅。所有作者阅读并同意最终的文本。

#### 参考文献

- [1] 张凤俊,李晶明,刘秋平. 糖尿病视网膜病变发病机制及潜在治疗研究进展. 眼科新进展, 2020,40(7):677-685.
- [2] 余蓉,贾伟平. 神经血管单元障碍在糖尿病视网膜病变发病机制中的作用. 中华内科杂志, 2023,62(4):460-464.
- [3] 李娟英,张文芳. 铁死亡在眼底疾病中的研究进展. 国际眼科杂志, 2024,24(5):767-771.
- [4] 任邵杰,徐漫鸿,李筱荣. 铁死亡参与糖尿病视网膜病变发病机制的研究进展. 中华眼底病杂志, 2023,39(10):868-872.
- [5] Liu P, Zhang ZD, Cai YC, et al. Ferroptosis: Mechanisms and role in diabetes mellitus and its complications. Ageing Res Rev, 2024, 94:102201.
- [6] Mohamadi N, Sharififar F, Pournamdari M, et al. A review on biosynthesis, analytical techniques, and pharmacological activities of trigonelline as a plant alkaloid. J Diet Suppl, 2018,15(2):207-222.
- [7] 岳欣欣,付洋,李怡然,等. 基于 HIF-1 $\alpha$ /自噬途径探讨二氯化钴调控 3T3-L1 脂肪细胞炎症反应及胰岛素抵抗的机制. 中国比较医学杂志, 2023,33(11):33-38.
- [8] 赵颖,刘大川. 糖尿病视网膜病变进展的影响因素. 国际眼科杂志, 2024,24(6):943-949.
- [9] 惠延年. 神经血管单元与糖尿病视网膜病变. 国际眼科杂志, 2023,23(3):353-355.
- [10] Chen YJ, Chen JT, Tai MC, et al. Serum iron and risk of diabetic retinopathy. Nutrients, 2020,12(8):2297.
- [11] Wang R, Rao S, Zhong Z, et al. Emerging role of ferroptosis in diabetic retinopathy: a review. J Drug Target, 2024,32(4):393-403.
- [12] Jiang XJ, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021,22:266-282.
- [13] Forcina GC, Dixon SJ. GPX4 at the crossroads of lipid homeostasis and ferroptosis. Proteomics, 2019,19(18):e1800311.
- [14] Ursini F, Maiorino M. Lipid peroxidation and ferroptosis: The role of GSH and GPx4. Free Radic Biol Med, 2020,152:175-185.
- [15] 汤舒玲,黎晓红,段亚菊,等. 葫芦巴碱调节 PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B 信号通路对变应性接触性皮炎大鼠免疫反应的影响. 河北医药, 2023,45(21):3211-3216.
- [16] 张艳红,王柯静,李丽娟,等. 葫芦巴碱对妊娠期糖尿病大鼠血脂代谢及胰岛素抵抗的影响. 中国比较医学杂志, 2023,33(8):68-74.

[17] 陈玉凤, 屠丽亚, 李晶, 等. 葫芦巴碱通过调控 Nrf2/ROS 信号通路诱导卵巢癌 SKOV-3 细胞凋亡. 中药材, 2022, 45(7): 1746-1752.

[18] 刘子怡. 葫芦巴籽中葫芦巴碱的提取及应用研究进展. 现代盐化工, 2021, 48(4): 8-9.

[19] 陈静, 周慧敏, 钟纯正, 等. 葫芦巴碱对脑梗死大鼠认知障碍及氧化应激损伤的影响. 中华老年心脑血管病杂志, 2023, 25(6): 643-647.

[20] Yi M, Cruz Cisneros L, Cho EJ, et al. Nrf2 pathway and oxidative stress as a common target for treatment of diabetes and its comorbidities. Int J Mol Sci, 2024, 25(2): 821.

[21] Dodson M, Shakya A, Anandhan A, et al. NRF2 and diabetes: the good, the bad, and the complex. Diabetes, 2022, 71(12): 2463-2476.

[22] Chen JW, Wang Q, Li RY, et al. The role of Keap1-Nrf2 signaling pathway during the progress and therapy of diabetic retinopathy. Life Sci, 2024, 338: 122386.

[23] 杨馥宇, 苏杰, 王玲, 等. 还原型谷胱甘肽调控 Nrf2/iNOS 信号对 DR 大鼠视网膜的保护机制. 转化医学杂志, 2022, 11(1): 36-41.

[24] 王樱奎, 宿星杰, 张剑, 等. 莱菔硫烷对糖尿病视网膜病变 Nrf2 通路和 NLRP3 炎性小体的影响. 黑龙江医药科学, 2023, 46(6): 1-4.

[25] 刘素珍, 杨浩东, 张花治, 等. 信号通路 with 糖尿病视网膜病变的关系及中医药干预研究进展. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(22): 265-275.

[26] 张彦昕, 柴贝贝, 石玉节, 等. 基于网络药理学探究“葫芦巴-迷迭香”提取物治疗 II 型糖尿病的潜在作用机制及实验验证. 云南化工, 2024, 51(2): 48-54.

## 2024 版《中国科技期刊引证报告》核心版眼科期刊主要指标及排名 (以综合评价总分为序)

期刊名称	核心总被引频次		核心影响因子		综合评价总分	
	数值	排名	数值	排名	数值	排名
中华眼科杂志	2013	2	1.328	1	63.8	1
<b>国际眼科杂志</b>	<b>2806</b>	<b>1</b>	<b>1.125</b>	<b>2</b>	<b>58.2</b>	<b>2</b>
眼科新进展	1208	3	0.826	3	52.7	3
中国眼耳鼻喉科杂志	423	7	0.542	7	40.9	4
中华眼科医学杂志电子版	173	11	0.318	10	32.0	5
中华实验眼科杂志	924	4	0.614	5	30.2	6
中华眼底病杂志	684	6	0.549	6	29.1	7
临床眼科杂志	336	8	0.278	11	23.0	8
中华眼视光学与视觉科学杂志	764	5	0.767	4	22.9	9
眼科	292	9	0.323	9	19.8	10
中国斜视与小儿眼科杂志	236	10	0.385	8	13.4	11

摘编自 2024 版《中国科技期刊引证报告》核心版