

## · 实验研究 ·

# 晚期糖基化终末产物对人视网膜色素上皮细胞铁死亡的诱导作用

童俊<sup>1</sup> 解正高<sup>2</sup> 雷黄依<sup>3</sup> 包延波<sup>3</sup> 黄振平<sup>1</sup>

<sup>1</sup>南京大学医学院附属金陵医院眼科,南京 210002;<sup>2</sup>南京大学医学院附属鼓楼医院眼科,南京 210008;<sup>3</sup>南京医科大学鼓楼临床医学院眼科,南京 210029

通信作者:黄振平,Email:hzp19633@126.com

**【摘要】** 目的 探讨晚期糖基化终末产物(AGEs)对体外培养的人视网膜色素上皮(ARPE-19)细胞铁死亡的影响。方法 ARPE-19 细胞系在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养并传代,选取第 3~6 代的细胞进行研究。分别在培养板中加入 0、50、100、200、400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  AGEs,培养 48 h,采用细胞计数试剂盒 8 检测各组细胞活性。选取 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  AGEs 培养细胞 48 h,采用脂质过氧化试剂盒(Bodipy 581/591 C11)联合流式细胞术测定细胞脂质过氧化水平;采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)和 Western blot 检测铁死亡标志蛋白溶质载体家族 7 成员 11(SLC7A11)及谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)的相对表达水平;采用透射电子显微镜观察各组细胞线粒体形态。结果 ARPE-19 细胞活性随着 AGEs 浓度的增加逐渐下降,0、50、100、200、400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  AGEs 组细胞活性总体比较差异有统计学意义( $F=6.21, P<0.01$ ),200、400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  AGEs 组 ARPE-19 细胞活性均低于对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ )。流式细胞仪检测结果显示,AGEs 组荧光强度为  $622.0\pm 11.3$ ,明显高于对照组的  $487.7\pm 12.8$ ,差异有统计学意义( $t=6.809, P=0.002$ )。qRT-PCR 检测结果显示,AGEs 组细胞中 SLC7A11、GPX4 mRNA 和蛋白相对表达量明显低于对照组,差异均有统计学意义(mRNA: $t=3.72、7.14$ ,均 $P<0.05$ ;蛋白: $t=6.20、5.15$ ,均 $P<0.05$ )。透射电子显微镜观察结果显示,AGEs 组中线粒体皱缩,体积较对照组明显缩小,线粒体脊较对照组减少,线粒体膜密度较对照组增加。结论 AGEs 能诱导体外培养的 ARPE-19 细胞发生铁死亡。

**【关键词】** 铁死亡;晚期糖基化终末产物;人视网膜色素上皮细胞;糖尿病视网膜病变

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20240318-00074

## Inducing effect of advanced glycation end products on ferroptosis in human retinal pigment epithelial cells

Tong Jun<sup>1</sup>, Xie Zhenggao<sup>2</sup>, Lei Huangyi<sup>3</sup>, Bao Yanbo<sup>3</sup>, Huang Zhenping<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Nanjing Jinling Hospital, Affiliated Hospital of Medical School, Nanjing University, Nanjing 210002, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Nanjing Drum Tower Hospital, Affiliated Hospital of Medical School, Nanjing University, Nanjing 210008, China; <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, Nanjing Drum Tower Hospital Clinical College of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Corresponding author: Huang Zhenping, Email:hzp19633@126.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effect of advanced glycation end products (AGEs) on ferroptosis in human retinal pigment epithelium (RPE) cell cultured *in vitro*. **Methods** ARPE-19 cell lines were cultured in DMEM medium containing 10% fetal bovine serum (FBS), and the 3rd to 6th generations of cells were used for further study. Cell activity was detected by using the cell counting kit 8 after ARPE-19 were cultured with AGEs at 0, 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for 48 hours. The cells were cultured with 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  AGEs for 48 hours. Cell lipid peroxidation level was measured by Lipid Peroxidation Assay Kit (Bodipy 581/591 C11) combined with flow cytometry. The relative mRNA and protein expression levels of solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11) and glutathione peroxidase 4 (GPX4) were determined by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blot. The morphology of mitochondria was observed by transmission electron microscope. **Results** The activity of ARPE-19 cells decreased with increasing AGEs concentration, and the overall difference of ARPE-19 activity among 0, 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  AGEs groups was statistically significant ( $F=6.21, P<0.01$ ). The cell activity of ARPE-19 cells in

200 and 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  AGEs groups was lower than that in control group (both  $P < 0.05$ ). Flow cytometry showed that the fluorescence intensity in AGEs group was  $622.0 \pm 11.3$ , which was significantly higher than  $487.7 \pm 12.8$  in control group ( $t = 6.809, P = 0.002$ ). qRT-PCR showed that the mRNA and protein relative expression levels of SLC7A11 and GPX4 were lower in AGEs group than those in control group (mRNA:  $t = 3.72, 7.14$ , both  $P < 0.05$ ; protein:  $t = 6.20, 5.15$ , both  $P < 0.05$ ). Transmission electron microscopy showed that mitochondria in AGEs group shrank with significantly reduced volume, decreased mitochondrial cristae, and increased mitochondrial membrane density.

**Conclusions** AGEs can induce ferroptosis in ARPE-19 cultured *in vitro*.

**[Key words]** Ferroptosis; Advanced glycation end products; Human retinal pigment epithelial cell; Diabetic retinopathy

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20240318-00074

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病的主要眼部并发症,约占糖尿病患者的 30%~40%<sup>[1-2]</sup>。全球 DR 患者超过 1 亿,是导致工作人群视力损伤和盲的主要原因<sup>[1-3]</sup>。晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)是 DR 中导致神经血管损伤的主要病理因素之一。有研究显示,糖尿病患者皮肤及玻璃体液中 AGEs 水平高于非糖尿病患者,且较高的 AGEs 水平与 DR 的进展独立相关<sup>[4-5]</sup>。此外,较高的 AGEs 水平也是增生性 DR 的危险因素<sup>[4]</sup>。AGEs 在体内产生后优先积累在结构蛋白上,Bruch 膜中的 AGEs 水平与视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞功能密切相关<sup>[6]</sup>。因此,研究 AGEs 对 RPE 细胞的影响及其发生机制具有重要意义。铁死亡作为一种新型的程序性细胞死亡方式,主要由铁依赖性的脂质过氧化物积累引起,与传统的凋亡或坏死机制不同,其特征在于细胞内铁离子的过量积聚和抗氧化能力下降<sup>[7]</sup>。在 DR 中,高糖诱导下产生的大量活性氧可促进脂质过氧化物生成,从而触发铁死亡;另一方面,缺乏抗氧化酶,如谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4),可使细胞更易受到氧化应激影响,加速 DR 的发展<sup>[8-9]</sup>。一些研究还发现,抑制铁死亡可以显著减轻 DR 模型小鼠中的视网膜损伤,并改善其视觉功能<sup>[10-11]</sup>。AGEs 作为糖尿病患者体内常见的一类有害物质,影响细胞的抗氧化能力,从而加剧了铁死亡的发生<sup>[12]</sup>。在 DR 中,AGEs 能否诱导 RPE 细胞发生铁死亡尚不清楚。本研究探讨 AGEs 能否诱导 RPE 细胞发生铁死亡,从而为 DR 的发病机制研究及治疗方法探索提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞来源** ARPE-19 细胞系购自武汉普诺赛公司。

**1.1.2 主要试剂及仪器** DMEM 低糖培养基、胎牛血

清(BC-SE-FBS08)、胰蛋白酶(BC-CE-005,南京生航生物技术有限公司);BSA-AGE 试剂(ab51995)、GPX4(125066,美国 Abcam 公司);细胞计数试剂盒 8(cell counting kit-8, CCK-8)[40203ES60,翌圣生物科技(上海)股份有限公司];Bodipy 581/591 C11 试剂盒(D3861,美国 Thermo Fisher Scientific 公司);RNA 抽提试剂盒(R711)、逆转录试剂盒(R312)、实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)试剂盒(Q711,南京诺唯赞生物科技股份有限公司);兔抗溶质载体家族 7 成员 11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)抗体(A2413)、羊抗兔 IgG 二抗、GAPDH 抗体(A19056)(武汉爱博泰克生物技术有限公司);Ferrostatin-1(347174-05-4,美国 MedChemExpress 公司)。酶标仪(Elx800,美国 Bio-Tek 公司);流式细胞仪(FACSCalibur,美国 BD 公司);PCR 仪(美国 ABI 公司);超微量分光光度计(NanoDrop™ One/OneC,美国 Thermo Fisher Scientific 公司);透射电子显微镜(HITACHI HT7700,日本日立公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养与传代** 细胞中加入含 10% 胎牛血清、100 g/ml 链霉素、100 g/ml 青霉素的 DMEM 培养基,置于 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^{\circ}\text{C}$  细胞培养箱中培养;待细胞融合达 90% 以上时加入 0.05% 胰蛋白酶消化 3 min,130 $\times g$  离心 3 min 收集细胞,将细胞重悬后进行传代培养,取第 3~6 代细胞用于实验。

**1.2.2 CCK-8 法检测细胞活性** 将 100  $\mu\text{l}$  ARPE-19 细胞悬液接种于 96 孔板中,细胞密度约为 6 000 个/孔,待细胞融合达 60%~70% 时加入 AGEs 质量浓度分别为 0、50、100、200、400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的培养液,每个浓度设 3 个复孔,继续培养 48 h;每孔加入 10  $\mu\text{l}$  CCK-8 溶液置于培养箱中继续培养 1 h,待培养基颜色变化后用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度(absorbance, A)值。以 0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  AGEs 处理细胞为对照组,计算各质量浓度 AGEs 组细胞相对活性。细胞相对活性 = 各浓度 AGEs

组 A 值/对照组 A 值 $\times 100\%$ 。

**1.2.3 流式细胞仪测定细胞脂质过氧化水平** 将细胞分为 AGEs 组和对照组,常规培养 24 h 后,分别更换为含 200 和 0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  AGEs 的无血清培养基继续培养 48 h;用胰蛋白酶消化,130 $\times g$  离心 3 min 收集细胞,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)清洗 2 次,每管加入 5  $\mu\text{mol}/\text{L}$  BODIPY 581/591 C11 重悬细胞并置于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中孵育 30 min,130 $\times g$  离心 3 min 收集细胞,PBS 清洗 3 次,加入 200  $\mu\text{l}$  PBS 重悬细胞。采用流式细胞仪进行检测,设置激发波长为 488 nm,采用 Flowjo 流式数据处理软件分析绿色荧光强度,细胞内脂质过氧化水平 = AGEs 组荧光强度/对照组荧光强度 $\times 100\%$ 。

**1.2.4 qRT-PCR 检测各组细胞中 GPX4、SLC7A11 mRNA 相对表达水平** 将细胞接种于 12 孔板中,接种密度约  $1\times 10^5/\text{孔}$ ,细胞分组及处理同 1.2.3,分组处理 48 h 后,用 PBS 清洗 3 次,加入 1 ml Trizol 吹打细胞后收集细胞悬液。按照 RNA 抽提试剂盒说明书抽提总 RNA,在超微量分光光度仪下检测 RNA 的浓度和纯度。按照逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录为 cDNA,-20  $^{\circ}\text{C}$  保存或直接用于 qRT-PCR。根据 qRT-PCR 试剂盒说明书加入相应试剂,反应体系为 10  $\mu\text{l}$ ,分别加入 cDNA 和引物 0.4 和 0.5  $\mu\text{l}$ ,反应条件:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s,95  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s,60  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 20 s,共 40 个循环。SLC7A11 引物序列:正向为 5'-TCAAATGCAGTGGCAGTGAC-3',反向为 5'-AAACACACCACCGTTCATGG-3';GPX4 引物序列:正向为 5'-ATACGCTGAGTGTGGTTTGC-3',反向为 5'-CACGCAGATCTTGCTGAACA-3';GAPDH 引物序列:正向为 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3',反向为 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'。所有引物均由南京金斯瑞生物科技有限公司设计合成。以 GAPDH 为内参,采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算 GPX4、SLC7A11 的相对表达量。

**1.2.5 Western blot 法检测各组细胞中 GPX4 和 SLC7A11 蛋白表达水平** 将细胞接种于 6 孔板中,接种密度约  $2\times 10^5/\text{孔}$ ,细胞分组及处理同 1.2.3,分组处理 48 h 后,PBS 清洗 3 次,每孔中加入 150  $\mu\text{l}$  细胞裂解液、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的混合液,4  $^{\circ}\text{C}$  裂解细胞 30 min 后,收集裂解液在 4  $^{\circ}\text{C}$  下 12 000 $\times g$  离心 20 min,收集上清即为总蛋白,用 BSA 法测定蛋白浓度。取 25  $\mu\text{g}$  总蛋白加入 1/5 体积上样缓冲液后 100  $^{\circ}\text{C}$  金属浴 10 min 使蛋白变性,采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,将蛋白转移至 PVDF

膜,用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后分别加入 GPX4 (1:3 000)、SLC7A11(1:1 000)和 GAPDH(1:5 000)一抗稀释液 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,TBST 清洗 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗(1:5 000)室温孵育 1 h,TBST 清洗 3 次,滴加发光液显影。采用 ImageJ 图像分析软件分析并计算各条带灰度值,以 GAPDH 为内参,计算各目的蛋白相对表达量。

**1.2.6 透射电子显微镜观察各组细胞线粒体形态** 将细胞接种于 6 孔板中,接种密度约  $2\times 10^5/\text{孔}$ ,细胞分组及处理同 1.2.3,分组处理 48 h 后,完全弃去培养基迅速加入预冷的 4% 戊二醛溶液,用细胞刮轻轻刮取细胞,1 000 r/min,130 $\times g$  离心 3 min 收集到如“绿豆”大小细胞沉淀,弃去上清,加入新的 4% 戊二醛溶液室温固定 2 h,1% 锇酸固定液进一步固定样品 2 h,梯度乙醇脱水,将脱水后的细胞包埋树脂中进行切片,切片经过醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色后使用透射电子显微镜观察。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析。计量资料经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以  $\bar{x}\pm s$  表示。不同浓度 AGEs 处理的细胞活性总体差异比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 Dunnett  $t$  检验。AGEs 组与对照组脂质过氧化细胞比例及 GPX4、SLC7A11 mRNA 和蛋白相对表达量差异比较均采用独立样本  $t$  检验。采用双侧检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度 AGEs 处理 ARPE-19 细胞活性比较

0、50、100、200 和 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  AGEs 组 ARPE-19 细胞活性分别为  $(99.98\pm 2.94)\%$ 、 $(98.16\pm 5.83)\%$ 、 $(86.73\pm 7.24)\%$ 、 $(80.86\pm 2.30)\%$  和  $(72.42\pm 2.94)\%$ ,组间总体比较差异有统计学意义( $F=6.21$ , $P=0.009$ ),其中 200、400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  AGEs 组细胞活性明显低于 0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  AGEs 组,差异均有统计学意义( $P=0.049$ 、 $0.006$ )(图 1)。

### 2.2 2 个组细胞脂质过氧化水平比较

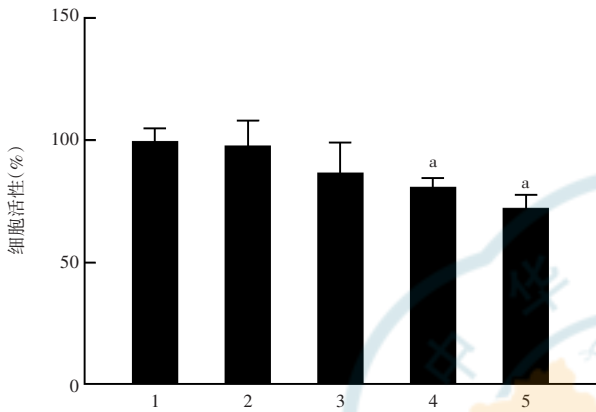
流式细胞仪检测显示,200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  AGEs 组荧光强度为  $(622.0\pm 11.3)$ ,明显高于对照组的  $(487.7\pm 12.8)$ ,差异有统计学意义( $t=6.809$ , $P=0.002$ )(图 2)。AGEs 组细胞内脂质过氧化水平为  $(127.7\pm 4.1)\%$ 。

### 2.3 2 个组细胞 GPX4、SLC7A11 mRNA 和蛋白相对表达量比较

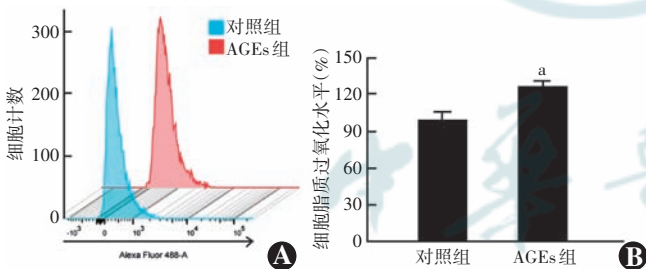
AGEs 组细胞中 SLC7A11 和 GPX4 mRNA 相对表



定量分别为  $1.040 \pm 0.091$  和  $1.001 \pm 0.044$ , 分别低于对照组的  $0.830 \pm 0.034$  和  $0.783 \pm 0.029$ , 差异均有统计学意义 ( $t = 3.72, P = 0.020; t = 7.14, P = 0.002$ ) (图 3)。AGEs 组 SLC7A11 和 GPX4 蛋白相对表达量分别为  $0.400 \pm 0.042$  和  $0.481 \pm 0.097$ , 分别低于对照组的  $0.998 \pm 0.086$  和  $1.069 \pm 0.060$ , 差异均有统计学意义 ( $t = 6.20, P = 0.003; t = 5.15, P = 0.007$ ) (图 4)。



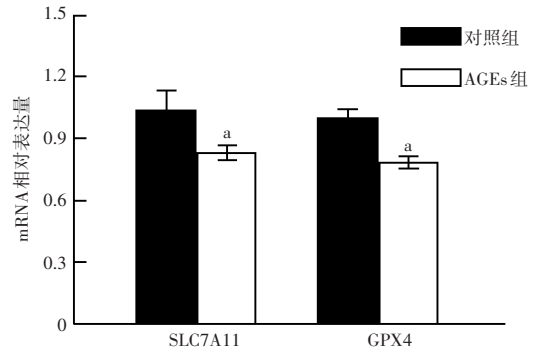
**图 1 不同浓度 AGEs 处理组细胞活性比较**  $F = 6.21, P < 0.01$ . 与  $0 \mu\text{g/ml}$  AGEs 组相比,  $^a P < 0.05$  (单因素方差分析, Dunnett  $t$  检验,  $n = 3$ ) 1:  $0 \mu\text{g/ml}$  AGEs 组; 2:  $50 \mu\text{g/ml}$  AGEs 组; 3:  $100 \mu\text{g/ml}$  AGEs 组; 4:  $200 \mu\text{g/ml}$  AGEs 组; 5:  $400 \mu\text{g/ml}$  AGEs 组  
**Figure 1 Comparison of cell activity treated by different concentrations of AGEs**  $F = 6.21, P < 0.01$ . Compared with  $0 \mu\text{g/ml}$  AGEs group,  $^a P < 0.05$  (One-way ANOVA, Dunnett  $t$  test,  $n = 3$ ) 1:  $0 \mu\text{g/ml}$  AGEs group; 2:  $50 \mu\text{g/ml}$  AGEs group; 3:  $100 \mu\text{g/ml}$  AGEs group; 4:  $200 \mu\text{g/ml}$  AGEs group; 5:  $400 \mu\text{g/ml}$  AGEs group



**图 2 2 个组细胞脂质过氧化水平比较** A: 各组细胞脂质过氧化水平流式细胞图 B: 各组细胞脂质过氧化水平比较 与对照组比较,  $^a P < 0.05$  (独立样本  $t$  检验,  $n = 3$ ) AGEs: 晚期糖基化终末产物  
**Figure 2 Comparison of cell lipid peroxidation levels between two groups** A: Flow cytometry of lipid peroxidation levels of cells B: Comparison of lipid peroxidation levels Compared with control group,  $^a P < 0.05$  (Independent samples  $t$ -test,  $n = 3$ ) AGEs: advanced glycation end products

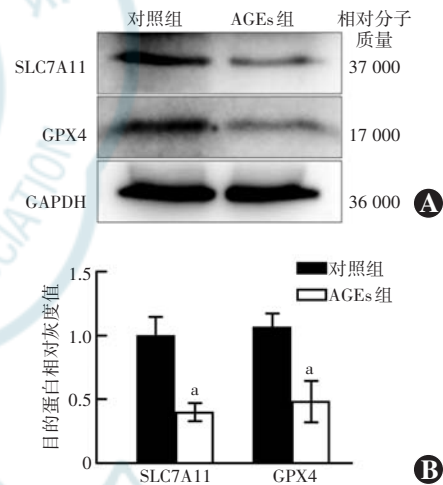
#### 2.4 2 个组 ARPE-19 细胞线粒体形态变化

利用透射电子显微镜观察 2 个组细胞线粒体形态发现, AGEs 组中线粒体皱缩, 体积较对照组明显缩小, 线粒体脊较对照组减少, 线粒体膜密度较对照组增加 (图 5)。



**图 3 2 个组细胞 SLC7A11、GPX4 mRNA 相对表达量比较** 与对照组相比,  $^a P < 0.05$  (独立样本  $t$  检验,  $n = 3$ ) AGEs: 晚期糖基化终末产物; SLC7A11: 溶质载体家族 7 成员 11; GPX4: 谷胱甘肽过氧化物酶 4

**Figure 3 Comparison of relative expression levels of SLC7A11 and GPX4 mRNA between two groups** Compared with the control group,  $^a P < 0.05$  (Independent samples  $t$ -test,  $n = 3$ ) AGEs: advanced glycation end products; SLC7A11: solute carrier family 7 member 11; GPX4: glutathione peroxidase 4



**图 4 2 个组细胞 SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达比较** A: 各组 SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达电泳图 与对照组相比, AGEs 组 SLC7A11、GPX4 蛋白条带灰度明显降低 B: 各组 SLC7A11、GPX4 蛋白相对表达量比较 与对照组比较,  $^a P < 0.01$  (独立样本  $t$  检验,  $n = 3$ ) AGEs: 晚期糖基化终末产物; SLC7A11: 溶质载体家族 7 成员 11; GPX4: 谷胱甘肽过氧化物酶 4

**Figure 4 Comparison of expression of SLC7A11 and GPX4 proteins between two groups** A: Electrophoretogram of SLC7A11 and GPX4 proteins expression Compared with the control group, the gray values of SLC7A11 and GPX4 proteins in AGEs group were significantly decreased B: Comparison of relative expressions of SLC7A11 and GPX4 proteins Compared with the control group,  $^a P < 0.01$  (Independent samples  $t$ -test,  $n = 3$ ) AGEs: advanced glycation end products; SLC7A11: solute carrier family 7 member 11; GPX4: glutathione peroxidase 4

### 3 讨论

RPE 细胞位于光感受器细胞和脉络膜毛细血管层之间, 具有屏障、吞噬、抗氧化以及分泌功能, 对视网

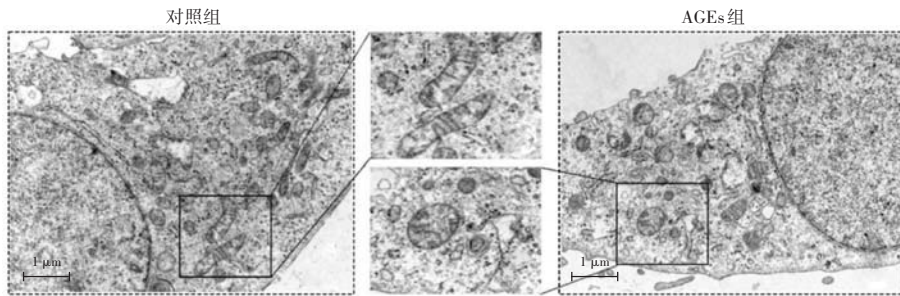


图 5 2 个组细胞线粒体形态(醋酸双氧铀+柠檬酸铅 $\times 7$ , 标尺 = 1  $\mu\text{m}$ ) 中间所示为方框内放大图 AGEs:晚期糖基化终末产物

**Figure 5 Mitochondrial morphology of cells in two groups** (Uranyl acetate+lead citrate  $\times 7$ , scale bar = 1  $\mu\text{m}$ ) The middle images were enlarged view within the boxes AGEs:advanced glycation end products

膜功能的维持至关重要<sup>[13-14]</sup>。因此,了解 RPE 细胞损伤的机制对于阐明 DR 的病理机制,制定新的治疗策略至关重要。

铁死亡作为一种新型的铁依赖程序性细胞死亡,与各种眼病的病理生理状态密切相关,如青光眼、年龄相关性黄斑变性、视网膜色素变性<sup>[15-17]</sup>。在糖尿病早期,RPE 细胞即可发生铁死亡并最终损伤视网膜功能<sup>[18]</sup>。Tang 等<sup>[19]</sup>报道高糖可诱导 RPE 细胞铁死亡。糖尿病引起的组织缺氧也可以诱导 RPE 细胞发生铁死亡<sup>[20]</sup>。AGEs 合成的增加会导致视网膜组织损伤,但其是否能诱导 RPE 细胞发生铁死亡尚不清楚。本研究结果显示,200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  AGEs 处理 ARPE-19 细胞后 48 h,铁死亡相关蛋白 SLC7A11、GPX4 mRNA 和蛋白水平均显著降低,脂质过氧化水平明显升高,线粒体皱缩、脊减少、膜密度增加。说明在 AGEs 积累的情况下 ARPE-19 细胞发生铁死亡。但本研究仅纳入了单一浓度的 AGEs,为了更准确地评估 AGEs 与铁死亡的关系,未来研究中需设置多个浓度的 AGEs 处理组,以观察不同浓度 AGEs 处理后铁死亡的发生情况,从而确定是否存在浓度依赖性关系。在 AGEs 诱导的成骨细胞铁死亡中,采用铁死亡抑制剂能有效抑制 AGEs 诱导的细胞铁死亡<sup>[21]</sup>。本研究推测铁死亡抑制剂也能抑制 AGEs 诱导的 RPE 细胞铁死亡,有待进一步验证。

在糖尿病相关并发症中,AGEs 也是除高糖以外引起铁死亡的重要因素之一,例如 AGEs 会促进骨母细胞的铁死亡,从而影响骨密度,导致糖尿病性骨质疏松症的发生和发展<sup>[21]</sup>;在糖尿病性心脏病患者中,AGEs 也被证实与心肌细胞铁死亡有关,可加重心脏功能障碍<sup>[22]</sup>。研究表明 AGEs 促进铁死亡的发生是通过诱导氧化应激和炎症反应促进细胞内铁离子的积累,这为铁死亡提供了必要条件<sup>[12]</sup>。其次,AGEs 还能抑制抗氧化系统,使细胞更易受到氧化损伤,进一步加

速铁死亡过程<sup>[23]</sup>。AGEs 诱导的组织损伤可由 AGEs 受体诱导,AGEs/AGEs 受体相互作用可以激活多个细胞通路,并与 DR 的病理生理学相关,例如激活 NADPH-NF- $\kappa\text{B}$  轴、ras-细胞外信号调节激酶 1/2 轴和 ras-有丝分裂原活化蛋白激酶轴等参与炎症反应<sup>[24-27]</sup>。AGEs 诱导的 ARPE-19 铁死亡是由 AGE-AGEs 受体介导还是由其他机制介导尚不清楚,仍需进一步研究。

AGEs 积累可诱导活性氧的生成,引发炎症反应,进而引起细胞发生凋亡、焦亡<sup>[28-29]</sup>。本研究证实 AGEs 还可诱导细胞发生铁死亡,但在细胞死亡过程中,焦亡、凋亡和铁死亡过程是独立发生还是同时发生以及对 DR 中神经元的损伤作用还有待进一步探索。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 童俊:研究实施、数据统计、论文撰写;解正高:实验设计、指导研究;雷黄依、包延波:研究实施;黄振平:实验设计与指导、论文修改和定稿

## 参考文献

- [1] Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R, et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy [J]. *Diabetes Care*, 2012, 35 (3) : 556-564. DOI: 10. 2337/dc11-1909.
- [2] Ruta LM, Magliano DJ, Lemesurier R, et al. Prevalence of diabetic retinopathy in type 2 diabetes in developing and developed countries [J]. *Diabet Med*, 2013, 30 (4) : 387-398. DOI: 10. 1111/dme. 12119.
- [3] Ting DS, Cheung GC, Wong TY. Diabetic retinopathy: global prevalence, major risk factors, screening practices and public health challenges: a review [J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2016, 44 (4) : 260-277. DOI: 10. 1111/ceo. 12696.
- [4] Takayanagi Y, Yamanaka M, Fujihara J, et al. Evaluation of relevance between advanced glycation end products and diabetic retinopathy stages using skin autofluorescence [J/OL]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9 (11) : 1100 [2024-03-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33182320>. DOI: 10. 3390/antiox9111100.
- [5] Kakehashi A, Inoda S, Mameuda C, et al. Relationship among VEGF, VEGF receptor, AGEs, and macrophages in proliferative diabetic retinopathy [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2008, 79 (3) : 438-445. DOI: 10. 1016/j. diabres. 2007. 10. 018.
- [6] Sourris KC, Forbes JM. Interactions between advanced glycation end-products (AGE) and their receptors in the development and progression of diabetic nephropathy—are these receptors valid therapeutic targets [J]. *Curr Drug Targets*, 2009, 10 (1) : 42-50. DOI: 10. 2174/138945009787122905.
- [7] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149 (5) : 1060-1072. DOI: 10. 1016/j. cell. 2012. 03. 042.
- [8] Liu P, Zhang Z, Cai Y, et al. Ferroptosis: mechanisms and role in diabetes mellitus and its complications [J/OL]. *Ageing Res Rev*, 2024, 94 : 102201 [2024-03-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/38242213>. DOI: 10. 1016/j. arr. 2024. 102201.
- [9] Li L, Dai Y, Ke D, et al. Ferroptosis: new insight into the mechanisms of diabetic nephropathy and retinopathy [J/OL]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 14 : 1215292 [2024-03-02]. <http://www.ncbi.>

- nlm.nih.gov/pubmed/37600716. DOI: 10.3389/fendo.2023.1215292.
- [10] Zhang G, Yu J, Wan Y. USP48 deubiquitination stabilizes SLC1A5 to inhibit retinal pigment epithelium cell inflammation, oxidative stress and ferroptosis in the progression of diabetic retinopathy [J]. J Bioenerg Biomembr, 2024, 56(3): 311-321. DOI: 10.1007/s10863-024-10008-z.
- [11] Li SY, Zhao N, Wei D, et al. Ferroptosis in the ageing retina: a malevolent fire of diabetic retinopathy [J/OL]. Ageing Res Rev, 2024, 93: 102142 [2024-03-02]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/38030091. DOI: 10.1016/j.arr.2023.102142.
- [12] Chen Y, Meng Z, Li Y, et al. Advanced glycation end products and reactive oxygen species: uncovering the potential role of ferroptosis in diabetic complications [J/OL]. Mol Med, 2024, 30(1): 141 [2024-12-06]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/39251935. DOI: 10.1186/s10020-024-00905-9.
- [13] Tonade D, Kern TS. Photoreceptor cells and RPE contribute to the development of diabetic retinopathy [J/OL]. Prog Retin Eye Res, 2021, 83: 100919 [2024-03-02]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33188897. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2020.100919.
- [14] Afshari FT, Fawcett JW. Improving RPE adhesion to Bruch's membrane [J]. Eye (Lond), 2009, 23(10): 1890-1893. DOI: 10.1038/eye.2008.411.
- [15] Yao F, Peng J, Zhang E, et al. Pathologically high intraocular pressure disturbs normal iron homeostasis and leads to retinal ganglion cell ferroptosis in glaucoma [J]. 2023, 30(1): 69-81. DOI: 10.1038/s41418-022-01046-4.
- [16] Tang Z, Ju Y, Dai X, et al. HO-1-mediated ferroptosis as a target for protection against retinal pigment epithelium degeneration [J/OL]. Redox Biol, 2021, 43: 101971 [2024-03-06]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33895485. DOI: 10.1016/j.redox.2021.101971.
- [17] Yang M, So KF, Lam WC, et al. Cell ferroptosis: new mechanism and new hope for retinitis pigmentosa [J/OL]. Cells, 2021, 10(8): 2153 [2024-03-06]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34440922. DOI: 10.3390/cells10082153.
- [18] Liu C, Sun W, Zhu T, et al. Glia maturation factor- $\beta$  induces ferroptosis by impairing chaperone-mediated autophagic degradation of ACSL4 in early diabetic retinopathy [J/OL]. Redox Biol, 2022, 52: 102292 [2024-03-06]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35325805. DOI: 10.1016/j.redox.2022.102292.
- [19] Tang X, Li X, Zhang D, et al. Astragaloside-IV alleviates high glucose-induced ferroptosis in retinal pigment epithelial cells by disrupting the expression of miR-138-5p/Sirt1/Nrf2 [J]. Bioengineered, 2022, 13(4): 8240-8254. DOI: 10.1080/21655979.2022.2049471.
- [20] Henning Y, Blind US, Larafa S, et al. Hypoxia aggravates ferroptosis in RPE cells by promoting the Fenton reaction [J/OL]. Cell Death Dis, 2022, 13(7): 662 [2024-03-06]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35906211. DOI: 10.1038/s41419-022-05121-z.
- [21] Ge W, Jie J, Yao J, et al. Advanced glycation end products promote osteoporosis by inducing ferroptosis in osteoblasts [J/OL]. Mol Med Rep, 2022, 25(4): 140 [2024-03-06]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35211757. DOI: 10.3892/mmr.2022.12656.
- [22] Lou X, Zhang Y, Guo J, et al. What is the impact of ferroptosis on diabetic cardiomyopathy: a systematic review [J]. Heart Fail Rev, 2024, 29(1): 1-11. DOI: 10.1007/s10741-023-10336-z.
- [23] Zhang D, Wu C, Ba D, et al. Ferroptosis contribute to neonicotinoid imidacloprid-evoked pyroptosis by activating the HMGB1-RAGE/TLR4-NF- $\kappa$ B signaling pathway [J/OL]. Ecotoxicol Environ Saf, 2023, 253: 114655 [2024-03-06]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36812867. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2023.114655.
- [24] Oshitari T. Neurovascular impairment and therapeutic strategies in diabetic retinopathy [J/OL]. Int J Environ Res Public Health, 2021, 19(1): 439 [2024-03-08]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35010703. DOI: 10.3390/ijerph19010439.
- [25] Sergi D, Boulestin H, Campbell FM, et al. The role of dietary advanced glycation end products in metabolic dysfunction [J/OL]. Mol Nutr Food Res, 2021, 65(1): e1900934 [2024-03-08]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32246887. DOI: 10.1002/mnfr.201900934.
- [26] Kandarakis SA, Piperi C, Topouzis F, et al. Emerging role of advanced glycation-end products (AGEs) in the pathobiology of eye diseases [J]. Prog Retin Eye Res, 2014, 42: 85-102. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2014.05.002.
- [27] Gąsiorowski K, Brokos B, Echeverria V, et al. RAGE-TLR crosstalk sustains chronic inflammation in neurodegeneration [J]. Mol Neurobiol, 2018, 55(2): 1463-1476. DOI: 10.1007/s12035-017-0419-4.
- [28] Han C, Zhai L, Shen H, et al. Advanced glycation end-products (AGEs) promote endothelial cell pyroptosis under cerebral ischemia and hypoxia via HIF-1 $\alpha$ -RAGE-NLRP3 [J]. Mol Neurobiol, 2023, 60(5): 2355-2366. DOI: 10.1007/s12035-023-03228-8.
- [29] Kong X, Wang GD, Ma MZ, et al. Sesamin ameliorates advanced glycation end products-induced pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction and apoptosis [J]. Nutrients, 2015, 7(6): 4689-4704. DOI: 10.3390/nu7064689.

(收稿日期:2024-05-17 修回日期:2024-12-11)

(本文编辑:张宇 骆世平)

读者·作者·编者

## 本刊对来稿中计量单位的使用要求

计量单位 计量单位的使用执行 GB 3100/3101/3102-1993《国际单位制及其应用/有关量、单位和符号的一般原则/(所有部分)量和单位》的有关规定,具体执行可参照中华医学会杂志社编写的《法定计量单位在医学上的应用》第3版(人民军医出版社2001年出版)。作者在撰写论文时应注意单位名称与单位符号不可混用。组合单位符号中表示相除的斜线为2条时本刊采用  $\text{ng}/(\text{kg} \cdot \text{min})$  的形式,而不用  $\text{ng}/\text{kg}/\text{min}$  的形式。应尽可能使用单位符号,也可以与非物理单位(如:人、次、台等)的汉字构成组合形式的单位,如:次/min。在叙述中请先列出法定计量单位数值,括号内写旧制单位数值;如果同一计量单位反复出现,可在首次出现时注明法定计量单位与旧制单位的换算系数,然后只列出法定计量单位数值。参量及其公差均需附单位,当参量与其公差的单位相同时,单位可只写1次,即加圆括号将数值组合,置共同单位符号于全部数值之后。例如:“75.4  $\text{ng}/\text{L} \pm 18.2 \text{ ng}/\text{L}$ ”可以表示为“(75.4 $\pm$ 18.2)  $\text{ng}/\text{L}$ ”。量的符号一律用斜体字,如吸光度(旧称光密度)的符号为  $A$ 。

根据国家质量技术监督局和卫生部联合发出的质技监局量函[1998]126号文件《关于血压计量单位使用规定的补充通知》,凡是涉及人体及动物体内的压力测定,可以使用毫米汞柱( $\text{mmHg}$ )或厘米水柱( $\text{cmH}_2\text{O}$ )为计量单位,但首次使用时应注明  $\text{mmHg}$  或  $\text{cmH}_2\text{O}$  与  $\text{kPa}$  的换算系数( $1 \text{ mmHg} = 0.133 \text{ kPa}$ ,  $1 \text{ cmH}_2\text{O} = 0.098 \text{ kPa}$ )。

(本刊编辑部)