

· 实验研究 ·

SB225002 对高糖条件下视网膜血管内皮细胞 NLRP3 炎性小体的抑制作用及机制

王晴 庄彤彤 东莉洁 王林妮

天津医科大学眼科医院 天津医科大学眼视光学院 天津医科大学眼科研究所 国家眼耳鼻喉疾病临床医学研究中心天津市分中心 天津市视网膜功能与疾病重点实验室, 天津 300384

通信作者: 王林妮, Email: wln5156@163.com

【摘要】 目的 观察白细胞介素-8(IL-8)拮抗剂 SB225002 对高糖条件下猴视网膜血管内皮细胞(RF/6A 细胞)核苷酸结合寡聚化结构样受体蛋白 3(NLRP3)炎性小体激活的影响及可能作用机制。**方法** 将体外培养的 RF/6A 细胞分为正常对照组、甘露醇组、高糖组、高糖+二甲基亚砜(DMSO)组、高糖+SB225002 组, 分别采用常规培养基、25 mmol/L 甘露醇、25 mmol/L 葡萄糖、25 mmol/L 葡萄糖+1% DMSO、25 mmol/L 葡萄糖+10 ng/ml SB225002 培养 48 h。采用细胞计数试剂盒 8 和二乙酸荧光素(FDA)染色检测各组细胞活力;采用细胞划痕实验检测各组细胞迁移率;采用 2', 7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯荧光探针、线粒体超氧化物(MitoSOX)红色荧光探针检测各组细胞中总活性氧(ROS)和 MitoSOX 水平;采用线粒体膜电位荧光探针(JC-10)检测各组细胞线粒体膜电位水平;采用免疫荧光染色检测各组细胞内 IL-8、NLRP3、半胱天冬酶-1(Caspase-1)、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、IL-1 β 、IL-18 蛋白荧光强度;采用 Western blot 法检测各组 NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 β 、IL-18、核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)、血红素加氧酶 1(HO-1)蛋白相对表达量。**结果** 正常对照组、甘露醇组、高糖组、高糖+DMSO 组、高糖+SB225002 组 IL-8 荧光强度分别为 20.56 ± 0.89 , 22.20 ± 0.91 , 40.91 ± 1.94 , 40.49 ± 2.00 , 26.15 ± 3.57 , 总体比较差异有统计学意义($F = 66.78, P < 0.001$), 其中高糖组 IL-8 荧光强度明显高于正常对照组、甘露醇组, 高糖+SB225002 组 IL-8 荧光强度明显低于高糖+DMSO 组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。高糖组细胞迁移率、FDA 荧光强度、吸光度(A)值、总 ROS 荧光强度、MitoSOX 荧光强度、单聚体荧光强度及 NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 β 、IL-18 荧光强度和蛋白相对表达量明显高于正常对照组、甘露醇组, 多聚体荧光强度、线粒体膜电位水平、Nrf2 和 HO-1 蛋白相对表达量明显低于正常对照组和甘露醇组, 高糖+SB225002 组细胞迁移率、FDA 荧光强度、A 值、总 ROS 荧光强度、MitoSOX 荧光强度、单聚体荧光强度及 NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 β 、IL-18 荧光强度和蛋白相对表达量明显低于高糖+DMSO 组, 多聚体荧光强度、线粒体膜电位水平、Nrf2 和 HO-1 蛋白相对表达量明显高于高糖+DMSO 组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** SB225002 可抑制 RF/6A 细胞内 NLRP3 炎性小体的激活, 减轻高糖条件下细胞氧化应激损伤和炎症反应, 并激活 Nrf2/HO-1 信号通路。

【关键词】 视网膜血管内皮细胞; 核苷酸结合寡聚化结构样受体蛋白 3; 炎性小体; 核因子 E2 相关因子 2**基金项目:** 天津市卫生健康科技项目(TJWJ2024MS011); 天津市医学重点学科建设项目(TJYXZDXK-3-004A-2)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20250609-00190

Inhibitory effect and mechanism of SB225002 on NLRP3 inflammasome in retinal vascular endothelial cells under high glucose

Wang Qing, Zhuang Tongtong, Dong Lijie, Wang Linni

Tianjin Key Laboratory of Retinal Functions and Diseases, Tianjin Branch of National Clinical Research Center for Ocular Disease, Eye Institute and School of Optometry, Tianjin Medical University Eye Hospital, Tianjin 300384, China

Corresponding author: Wang Linni, Email: wln5156@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effect and possible mechanism of interleukin (IL)-8 antagonist SB225002 on the activation of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome in monkey retinal vascular endothelial cells (RF/6A cells) under high glucose conditions. **Methods** The RF/6A cells cultured *in vitro* were divided into a normal control group, a mannitol group, a high glucose group, a high glucose+dimethyl sulfoxide (DMSO) group, and high glucose+SB225002 group, and were cultured with standard

culture medium, 25 mmol/L mannitol, 25 mmol/L glucose, 25 mmol/L glucose + 1% DMSO, and 25 mmol/L glucose + 10 ng/ml SB225002 for 48 hours, respectively. The cell viability in each group was detected using Cell Counting Kit-8 and fluorescein diacetate (FDA) staining. The cell migration rate was assessed by wound healing assay. Total reactive oxygen species (ROS) and MitoSOX red mitochondrial superoxide indicator levels were measured using 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate fluorescent probe and MitoSOX. The mitochondrial membrane potential was evaluated with JC-10 fluorescent probe. The fluorescence intensity of IL-8, NLRP3, cysteine-aspartic acid protease-1 (Caspase-1), apoptosis-associated speck-like protein (ASC), IL-1 β , and IL-18 in each group was detected by immunofluorescence. The relative protein expression levels of NLRP3, Caspase-1, ASC, IL-1 β , IL-18, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), and heme oxygenase 1 (HO-1) were determined by Western blot. **Results** The IL-8 fluorescence intensities in the normal control group, mannitol group, high glucose group, high glucose+DMSO group, and high glucose+SB225002 group were 20.56 ± 0.89 , 22.20 ± 0.91 , 40.91 ± 1.94 , 40.49 ± 2.00 , and 26.15 ± 3.57 , respectively, with a statistically significant overall difference ($F = 66.78$, $P < 0.001$). The IL-8 fluorescence intensity was significantly higher in the high glucose group than in the normal control group and mannitol group, while the IL-8 fluorescence intensity in the high glucose+SB225002 group was significantly lower than that in the high glucose+DMSO group (all $P < 0.05$). The cell migration rate, FDA fluorescence intensity, absorbance (A) value, total ROS fluorescence intensity, MitoSOX fluorescence intensity, monomer fluorescence intensity, as well as fluorescence intensities and relative protein expression levels of NLRP3, Caspase-1, ASC, IL-1 β , and IL-18 were significantly higher and the polymer fluorescence intensity, mitochondrial membrane potential level, as well as the relative protein expression levels of Nrf2 and HO-1 were significantly lower in the high glucose group than those in the normal control group and the mannitol group (all $P < 0.05$). The cell migration rate, FDA fluorescence intensity, A value, total ROS fluorescence intensity, MitoSOX fluorescence intensity, monomer fluorescence intensity, as well as fluorescence intensities and relative protein expression levels of NLRP3, Caspase-1, ASC, IL-1 β , and IL-18 were significantly lower and the polymer fluorescence intensity, mitochondrial membrane potential level, as well as the relative protein expression levels of Nrf2 and HO-1 were significantly higher in the high glucose+SB225002 group than those in the high glucose+DMSO group (all $P < 0.05$). **Conclusions** SB225002 can inhibit the activation of NLRP3 inflammasome in RF/6A cells, alleviate cellular oxidative stress damage and inflammatory response under high glucose conditions, and activate the Nrf2/HO-1 signaling pathway.

[Key words] Retinal vascular endothelial cells; Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3; Inflammasome; Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

Fund program: Tianjin Health Science and Technology Project (TJWJ2024MS011); Tianjin Key Medical Discipline Construction Project (TJYXZDXK-3-004A-2)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20250609-00190

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病常见的微血管并发症之一,以视网膜血管病变为主要特征,是导致成年人视力障碍和盲的主要原因^[1]。近年来发现炎症是促进 DR 发展的重要因素。白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)作为促炎细胞因子,可诱发炎症反应,改变血管通透性,通过血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)依赖性和非依赖性途径促使新生血管生成^[2-3]。活性氧(reactive oxygen species, ROS)主要来源于线粒体,过量 ROS 会导致氧化和抗氧化系统失衡,引发细胞氧化应激反应,最终导致组织损伤和疾病发生。本课题组前期研究发现,IL-8 可通过促进氧化应激细胞中 ROS 的生成诱导人视网膜血管内皮细胞(human retinal vascular endothelial cells, hRCEC)迁移,IL-8 拮抗剂 SB225002 可下调 ROS 生成,抑制细胞迁移^[4],因此抑制 IL-8 表达可能对于减缓 DR 进展有重要作用。作为

一种关键的多蛋白复合物,炎性小体在先天免疫系统中发挥着核心作用,对机体的免疫应答和病理过程产生显著影响。在已知的多种炎性小体中,核苷酸结合寡聚化结构样受体蛋白 3(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3)是研究焦点。该复合物由 NLRP3 蛋白、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein, ASC)以及半胱天冬酶-1(cysteine-aspartic acid protease-1, Caspase-1)共同构成。当 ROS 诱导的硫氧还蛋白相互作用蛋白(thioredoxin-interacting protein, TXNIP)与 NLRP3 炎性小体结合后,可触发其活化过程。这一激活机制导致 IL-1 β 和 IL-18 等细胞因子的成熟与分泌显著增强,进而引发炎症级联反应^[5-8]。增殖性糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)患者玻璃体腔中 NLRP3、IL-1 β 和 IL-18 的表达高于非 PDR 患者^[9]。核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor



erythroid-2 related factor 2, Nrf2) 是细胞内抗氧化应激损伤的关键因子, Nrf2 激活后上调血红素加氧酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 等抗氧化物质表达。Nrf2/HO-1 信号通路能够调节机体氧化还原稳态, 是重要的抗氧化防御系统。NLRP3 炎性小体可能在 DR 中发挥重要作用, 但目前有关 IL-8 与 NLRP3 炎性小体及 Nrf2/HO-1 信号通路在 DR 中的关联研究较少。猴视网膜血管内皮细胞 (RF/6A 细胞) 作为视网膜血管内皮细胞的常用模型, 在 DR 研究中被广泛使用, 具有良好的代表性^[10-12]。本研究通过构建体外高糖模型分析 IL-8 拮抗剂 SB225002 对 RF/6A 细胞 NLRP3 炎性小体激活的影响和可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 RF/6A 细胞 (CL-0194) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.1.2 主要试剂及仪器 SB225002 (182498-32-4, 美国 MCE 公司); 细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8) (C0038)、2', 7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (2', 7'-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA (S0033S, 上海碧云天生物技术有限公司); 二乙酸荧光素 (fluorescein diacetate, FDA) (IF0160, 美国 Solarbio 公司); 线粒体超氧化物 (mitochondrial superoxide, MitoSOX) 红色荧光探针 (40778ES50)、线粒体膜电位荧光探针 JC-10 (40707ES, 上海翌圣生物科技股份有限公司); 兔源 NLRP3 抗体 (19771-1-AP)、兔源 Caspase-1 抗体 (22915-1-AP)、兔源 ASC 抗体 (10500-1-AP)、兔源 HO-1 抗体 (10701-1-AP, 武汉三鹰生物技术有限公司); 兔源 IL-1 β 抗体 (AF5103)、兔源 IL-18 抗体 (DF6252)、兔源 Nrf2 抗体 (AF0639)、Alexa Fluor 488 标记的二抗 (S0018)、 β -微管蛋白 (β -tubulin) 抗体 (AF7011)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG (S0001, 美国 Affinity 公司)。荧光显微镜 (BX51T-32FB-E01, 日本 Olympus 公司); 激光扫描共聚焦显微镜 (LSM800, 美国 Zeiss 公司); 多功能酶标仪 (Infinite 200 PRO, 瑞士 TECAN 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和分组 RF/6A 细胞置于含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素混合液的 MEM 培养基中, 5% CO₂、37 °C 环境下常规培养。将细胞分为正常对照组、甘露醇组、高糖组、高糖+二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 组、高糖+SB225002 组, 分别采用常规培养基、25 mmol/L 甘露醇、25 mmol/L 葡萄糖^[13]、

25 mmol/L 葡萄糖+1% DMSO、25 mmol/L 葡萄糖+10 ng/ml SB225002 培养。

1.2.2 CCK-8 法检测 SB225002 处理后细胞活力值 细胞密度达 80% 时, 以 1×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板中, 分别加入 0、5、10、20、40 ng/ml SB225002 处理 48 h。另选用合适浓度 SB225002 处理细胞 24、48、72 h, 按照每孔 10% 的体积加入 CCK-8 溶液, 于 37 °C 培养箱中孵育 2 h。采用多功能酶标仪测定各孔 450 nm 处的吸光度 (absorbance, A) 值, 确定 SB225002 安全作用浓度与处理时间后, 对各组细胞相应处理 48 h, 测定各组细胞活力值。实验重复 3 次。

1.2.3 细胞划痕实验检测各组细胞迁移率 将细胞以单层形式接种于 6 孔板中, 待各组细胞生长至完全汇合后, 使用 100~1 000 μ l 微量加样枪头于孔板中央作“十”字形划痕, 继续培养 24 h 后在原划痕位置拍照, 观察各孔细胞迁移情况。使用 ImageJ 1.54g 软件计算细胞迁移面积。细胞迁移率 = (原始裸区面积-24 h 裸区面积)/原始裸区面积 $\times 100\%$ 。实验重复 3 次。

1.2.4 FDA 染色检测各组细胞活力 将 RF/6A 细胞接种于 48 孔板, 各组细胞进行相应处理后, 加入含 10 μ mol/L FDA 的无胎牛血清培养基, 37 °C 下避光孵育 20 min。吸出染色液, 加入 10 μ g/ml Hoechst33342 染色液复染细胞核 5 min, 荧光显微镜下拍照。绿色荧光着染细胞说明其细胞膜完整且代谢活性较高。实验重复 3 次。

1.2.5 DCFH-DA 探针、MitoSOX 红色荧光探针检测各组总 ROS、MitoSOX 表达 将 RF/6A 细胞接种于 48 孔板, 各组细胞进行相应处理后, 每孔加入 10 μ mol/L DCFH-DA 探针和 5 μ mol/L MitoSOX 探针, 37 °C 下避光孵育 20 min。弃去上清, 加入 Hoechst33342 染色液复染细胞核后使用荧光显微镜拍照。DCFH-DA 染色阳性表现为绿色荧光, MitoSOX 染色阳性表现为红色荧光。实验重复 3 次。

1.2.6 线粒体膜电位荧光探针 JC-10 检测各组线粒体膜电位变化 将 RF/6A 细胞接种于 48 孔板, 各组细胞进行相应处理后, 每孔加入 20 μ mol/L JC-10 染色液, 于 37 °C 下避光孵育 20 min。采用 Hoechst33342 染色液对细胞核进行复染, 荧光显微镜下观察并采集图像。当线粒体膜电位正常时, JC-10 可形成多体, 发出红色荧光; 当膜电位下降时, 以单聚体形式存在, 呈现绿色荧光。实验重复 3 次。

1.2.7 Western blot 法检测各组细胞内 NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 β 、IL-18、Nrf2、HO-1 蛋白相对表达量 各组细胞进行相应处理后, 提取各组细胞蛋白并

测定蛋白浓度。将样品加入 SDS-聚丙烯酰胺凝胶加样孔中进行电泳;初始以 80 V 恒压电泳 0.5 h,样品进入分离胶后改为 100 V 恒压继续电泳 1.5 h。将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜,90 V 恒压电泳 1.5 h。5%脱脂牛奶封闭 1 h,与 NLRP3(1:1 000)、Caspase-1(1:3 000)、ASC(1:3 000)、IL-1 β (1:1 000)、IL-18(1:1 000)、Nrf2(1:1 000)、HO-1(1:3 000)、(1:1 000)一抗在 4℃下孵育过夜。次日洗膜后,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1:4 000),室温孵育 2 h。采用化学发光试剂显色,通过多光谱成像系统扫描蛋白条带,应用 ImageJ 1.54g 软件进行灰度值半定量分析。以 β -tubulin 为内参,计算各目的蛋白相对表达量。实验重复 3 次。

1.2.8 免疫荧光染色法检测各组细胞内 IL-8、NLRP3、Caspase-1、ASC、IL-1 β 、IL-18 蛋白荧光强度
各组细胞进行相应处理后,每孔滴加 4%多聚甲醛固定细胞,各组细胞置于封闭液(0.1% PBST、5%牛血清蛋白、0.225 g/ml 甘氨酸)中封闭 2 h。加入 IL-8(1:400)、NLRP3(1:200)、Caspase-1(1:80)、ASC(1:200)、IL-1 β (1:200)、IL-18(1:200)一抗,4℃孵育过夜。加入 Alexa Fluor 488 标记的荧光二抗(1:400)孵育 1 h,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)封片剂封片,置于荧光显微镜下观察拍照。实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 和 Graphpad Prism 10.1.0 软件进行统计分析和作图。计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组各指标总体比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验;各组不同处理时间细胞活力总体比较采用重复测量两因素方差分析,两两比较采用 Bonferroni 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,Bonferroni 检验水准为 0.05/15。

2 结果

2.1 SB225002 不同作用浓度和时间对 RF/6A 细胞的影响

CCK-8 检测结果显示,空白对照组和 0、5、10、20、40 ng/ml SB225002 组细胞存活率分别为(99.69 $\pm$ 3.78)%、(98.17 $\pm$ 0.96)%、(96.75 $\pm$ 3.35)%、(96.62 $\pm$ 3.09)%、(69.43 $\pm$ 3.78)%、(46.83 $\pm$ 2.69)%,总体比较差异有统计学意义($F = 147.30, P < 0.001$),其中 20 与 40 ng/ml SB225002 组细胞存活率明显低于空白对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 1)。因此选择 10 ng/ml SB225002 进行后续实验。各组不同处

理时间细胞活力总体比较,差异均有统计学意义($F_{\text{组别}} = 5.96, P < 0.001; F_{\text{时间}} = 87.65, P < 0.001$),其中高糖组 24、48、72 h 细胞活力均显著高于空白对照组与甘露醇组,高糖+SB225002 组各时间点细胞活力均显著低于高糖+DMSO 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$);高糖组 24 h、72 h 细胞活力均低于 48 h 细胞活力,差异有统计学意义(均 $P < 0.01$)(表 1)。故后续实验均采用 10 ng/ml SB225002 处理细胞 48 h。

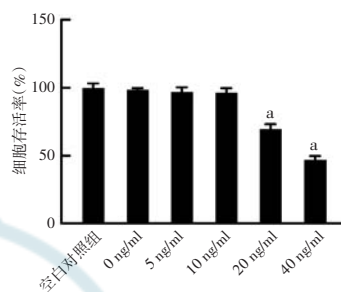


图 1 不同浓度 SB225002 处理后细胞存活率比较 $F = 147.30, P < 0.001$ 。与空白对照组比较,^a $P < 0.001$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验; $n = 3$)

Figure 1 Comparison of cell viability after treatment with different concentrations of SB225002 $F = 147.30, P < 0.001$. Compared with the blank control group, ^a $P < 0.001$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test; $n = 3$)

表 1 各组细胞不同处理时间细胞活力值比较($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of cell viability value among various cell groups at different treatment times ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	不同处理时间细胞活力值		
		24 h	48 h	72 h
空白对照组	3	1.007 $\pm$ 0.043	1.017 $\pm$ 0.039	1.007 $\pm$ 0.039
甘露醇组	3	1.034 $\pm$ 0.006	1.042 $\pm$ 0.029	1.012 $\pm$ 0.037
高糖组	3	1.259 $\pm$ 0.008 ^{abd}	1.366 $\pm$ 0.032 ^{ab}	1.215 $\pm$ 0.009 ^{abd}
高糖+DMSO 组	3	1.267 $\pm$ 0.025	1.337 $\pm$ 0.032	1.218 $\pm$ 0.014
高糖+SB225002 组	3	1.088 $\pm$ 0.017 ^c	1.107 $\pm$ 0.025 ^c	1.039 $\pm$ 0.014 ^c

注: $F_{\text{组别}} = 5.96, P < 0.001; F_{\text{时间}} = 87.65, P < 0.001; F_{\text{交互作用}} = 3.26, P < 0.01$ 。与空白对照组比较,^a $P < 0.001$;与甘露醇组比较,^b $P < 0.001$;与高糖+DMSO 组比较,^c $P < 0.001$;与本组 48 h 比较,^d $P < 0.001$ (重复测量两因素方差分析,Bonferroni 检验) DMSO:二甲基亚砜

Note: $F_{\text{group}} = 5.96, P < 0.001; F_{\text{time}} = 87.65, P < 0.001; F_{\text{interaction}} = 3.26, P < 0.01$. Compared with the normal control group, ^a $P < 0.001$; compared with the mannitol group, ^b $P < 0.001$; compared with the high glucose+DMSO group, ^c $P < 0.001$; compared with 48 h of the same group, ^d $P < 0.001$ (Two-way repeated measures ANOVA, Bonferroni test) DMSO: dimethyl sulfoxide

2.2 各组 IL-8 表达荧光强度比较

正常对照组、甘露醇组、高糖组、高糖+DMSO 组、高糖+SB225002 组 IL-8 荧光强度分别为 20.56 $\pm$ 0.89、22.20 $\pm$ 0.91、40.91 $\pm$ 1.94、40.49 $\pm$ 2.00、26.15 $\pm$ 3.57,总体比较差异有统计学意义($F = 66.78, P < 0.001$),其

中高糖组 IL-8 荧光强度明显高于正常对照组、甘露醇组, 高糖 + SB225002 组 IL-8 荧光强度明显低于高糖 + DMSO 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 2)。

2.3 各组细胞迁移和细胞活力比较

细胞划痕实验显示, 细胞培养 24 h 后, 正常对照组、甘露醇组、高糖 + SB225002 组仅有少量细胞迁移进入裸区, 高糖组、高糖 + DMSO 组可见大量细胞迁移进入裸区。正常对照组、甘露醇组、高糖组、高糖 + DMSO 组、高糖 + SB225002 组细胞迁移率、FDA 荧光强度和 A 值总体比较差异均有统计学意义 ($F = 41.25$ 、 58.52 、 56.41 , 均 $P < 0.001$), 其中高糖组细胞迁移率、FDA 荧光强度和 A 值明显高于正常对照组、甘露醇组, 高糖 + SB225002 组细胞迁移率、FDA 荧光强度和 A 值明显低于高糖 + DMSO 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 3, 表 2)。

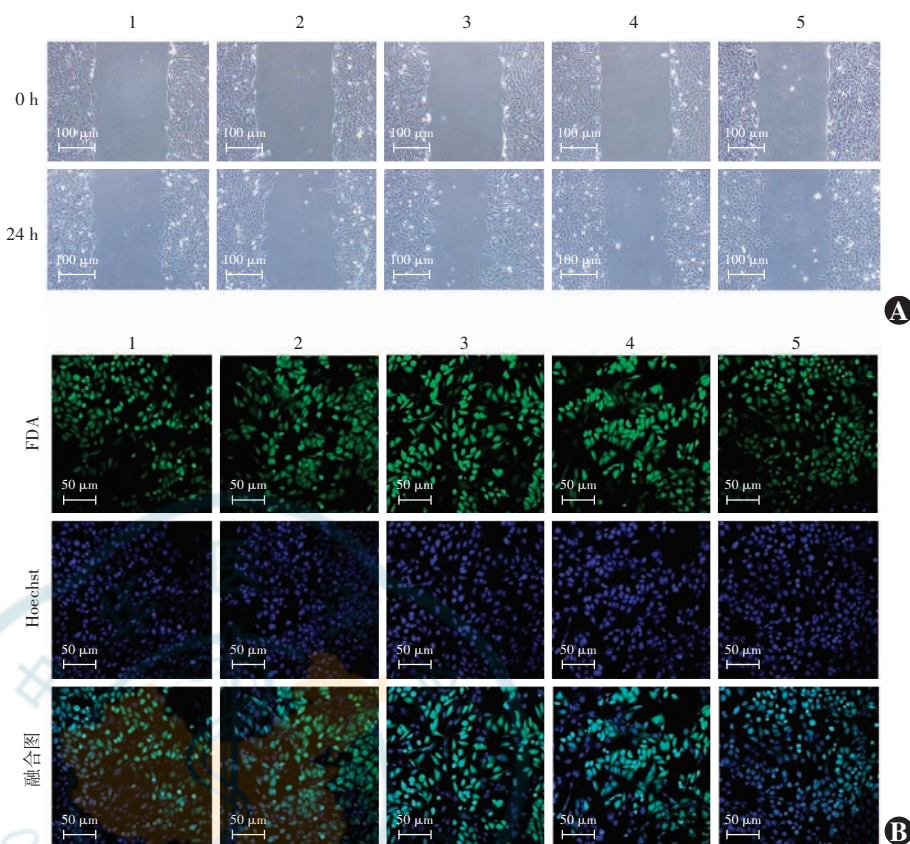


图 3 各组细胞迁移和细胞活力比较 A: 各组细胞划痕图 ($\times 40$, 标尺 = 100 μm) B: 各组 FDA 荧光染色图 ($\times 200$, 标尺 = 50 μm) 1: 正常对照组; 2: 甘露醇组; 3: 高糖组; 4: 高糖 + DMSO 组; 5: 高糖 + SB225002 组 DMSO: 二甲基亚砜; FDA: 二乙酸荧光素

Figure 3 Comparison of cell migration and cell viability in different groups A: Wound-healing assay images of cells ($\times 40$, scale bar = 100 μm) B: FDA fluorescence staining images of cells ($\times 200$, scale bar = 50 μm) 1: normal control group; 2: mannitol group; 3: high glucose group; 4: high glucose + DMSO group; 5: high glucose + SB225002 group DMSO: dimethyl sulfoxide; FDA: fluorescein diacetate

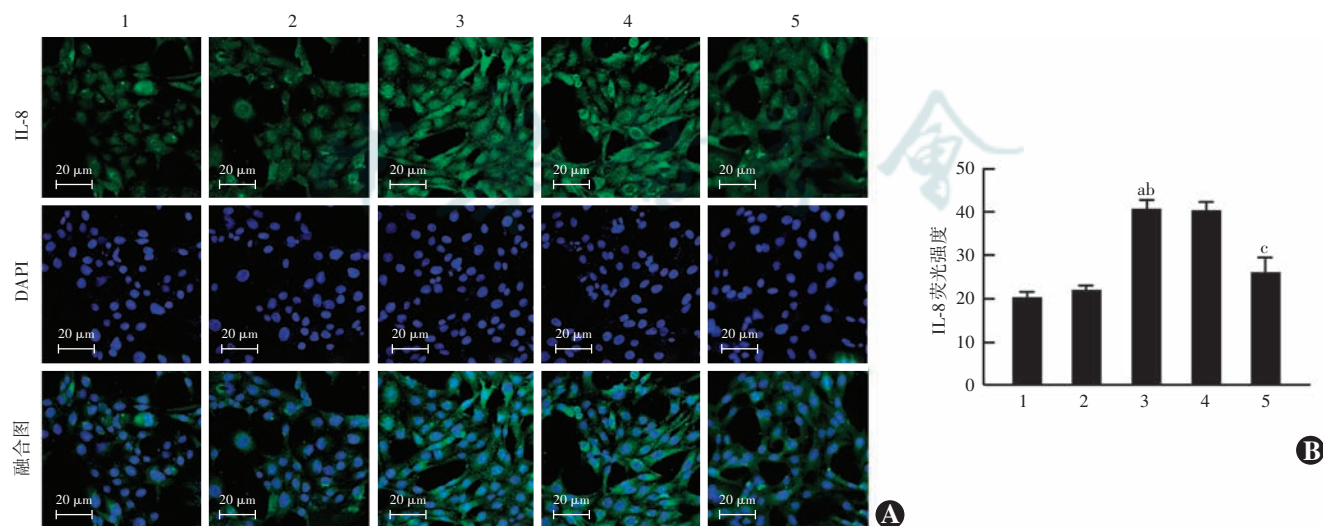


图 2 各组 IL-8 荧光强度比较 A: 各组 IL-8 荧光染色图 (Alexa Fluor 488 $\times 400$, 标尺 = 20 μm) B: 各组 IL-8 荧光强度量化比较 $F = 66.78$, $P < 0.001$. 与正常对照组比较, $^a P < 0.001$; 与甘露醇组比较, $^b P < 0.001$; 与高糖 + DMSO 组比较, $^c P < 0.001$ (单因素方差分析, LSD- t 检验; $n = 3$) 1: 正常对照组; 2: 甘露醇组; 3: 高糖组; 4: 高糖 + DMSO 组; 5: 高糖 + SB225002 组 DAPI: 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶; DMSO: 二甲基亚砜; IL: 白细胞介素

Figure 2 Comparison of IL-8 fluorescence intensity in different groups A: Fluorescence staining images of IL-8 (Alexa Fluor 488 $\times 400$, scale bar = 20 μm) B: Quantitative comparison of fluorescence intensity of IL-8 among different groups $F = 66.78$, $P < 0.001$. Compared with the normal control group, $^a P < 0.001$; compared with the mannitol group, $^b P < 0.001$; compared with the high glucose + DMSO group, $^c P < 0.001$ (One-way ANOVA, LSD- t test; $n = 3$) 1: normal control group; 2: mannitol group; 3: high glucose group; 4: high glucose + DMSO group; 5: high glucose + SB225002 group DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole; DMSO: dimethyl sulfoxide; IL: interleukin

表 2 各组细胞迁移率和细胞活力指标比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison of cell migration rate and cell viability among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	细胞迁移率 (%)	FDA 荧光强度	吸光度值
正常对照组	3	12.15 $\pm$ 1.43	27.90 $\pm$ 1.59	1.00 $\pm$ 0.03
甘露醇组	3	11.11 $\pm$ 1.58	30.71 $\pm$ 1.39	1.00 $\pm$ 0.06
高糖组	3	22.91 $\pm$ 1.77 ^{ab}	49.91 $\pm$ 4.17 ^{ab}	1.26 $\pm$ 0.02 ^{ab}
高糖+DMSO 组	3	20.34 $\pm$ 1.46	49.16 $\pm$ 2.77	1.23 $\pm$ 0.04
高糖+SB225002 组	3	13.22 $\pm$ 0.66 ^c	27.55 $\pm$ 2.05 ^c	1.04 $\pm$ 0.04 ^c
F 值		41.25	58.52	56.41
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常对照组比较,^a $P<0.001$;与甘露醇组比较,^b $P<0.001$;与高糖+DMSO 组比较,^c $P<0.001$ (单因素方差分析,LSD- t 检验) DMSO:二甲亚砜;FDA:二乙酸荧光素

Note: Compared with the normal control group, ^a $P<0.001$; compared with the mannitol group, ^b $P<0.001$; compared with the high glucose+DMSO group, ^c $P<0.001$ (One-way ANOVA, LSD- t test) DMSO: dimethyl sulfoxide; FDA: fluorescein diacetate

2.4 各组 ROS、MitoSOX、线粒体膜电位水平比较

正常对照组、甘露醇组、高糖组、高糖+DMSO 组、高糖+SB225002 组总 ROS 荧光强度、MitoSOX 荧光强度、多聚体荧光强度、单聚体荧光强度、线粒体膜电位水平总体比较差异均有统计学意义($F=236.50$ 、 206.20 、 113.10 、 96.24 、 157.60 ,均 $P<0.001$),其中高糖组总 ROS 荧光强度、MitoSOX 荧光强度、单聚体荧光强度明显高于正常对照组和甘露醇组,多聚体荧光强度、线粒体膜电位水平明显低于正常对照组和甘露醇组,高糖+SB225002 组总 ROS 荧光强度、MitoSOX 荧光强度、单聚体荧光强度明显低于高糖+DMSO 组,多聚体荧光强度、线粒体膜电位水平明显高于高糖+DMSO 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.001$)(图 4、5,表 3)。

2.5 各组 NLRP3、Caspase-1、ASC 蛋白表达比较

正常对照组、甘露醇组、高糖组、高糖+DMSO 组、高糖+SB225002 组 NLRP3、Caspase-1、ASC 荧光强度和蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义($F=231.80$ 、 185.50 、 35.57 、 18.09 、 12.90 、 26.31 ,均 $P<0.001$),其中高糖组 NLRP3、Caspase-1、ASC 荧光强度和蛋白相对表达量明显高于正常对照组和甘露醇组,高糖+SB225002 组 NLRP3、Caspase-1、ASC 荧光强度和蛋白相对表达量明显低于高糖+DMSO 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.001$)(图 6,表 4)。

2.6 各组 IL-1 β 、IL-18 蛋白表达比较

正常对照组、甘露醇组、高糖组、高糖+DMSO 组、高糖+SB225002 组 IL-1 β 、IL-18 荧光强度和蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义($F=11.08$ 、 31.73 、 67.47 、 34.16 ,均 $P<0.01$),其中高糖组 IL-1 β 、IL-18 荧光强度和蛋白相对表达量明显高于正常对照组和甘露醇组,高糖+SB225002 组 IL-1 β 、IL-18 荧光强度和蛋白相对表达量明显低于高糖+DMSO 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.001$)(图 7,表 5)。

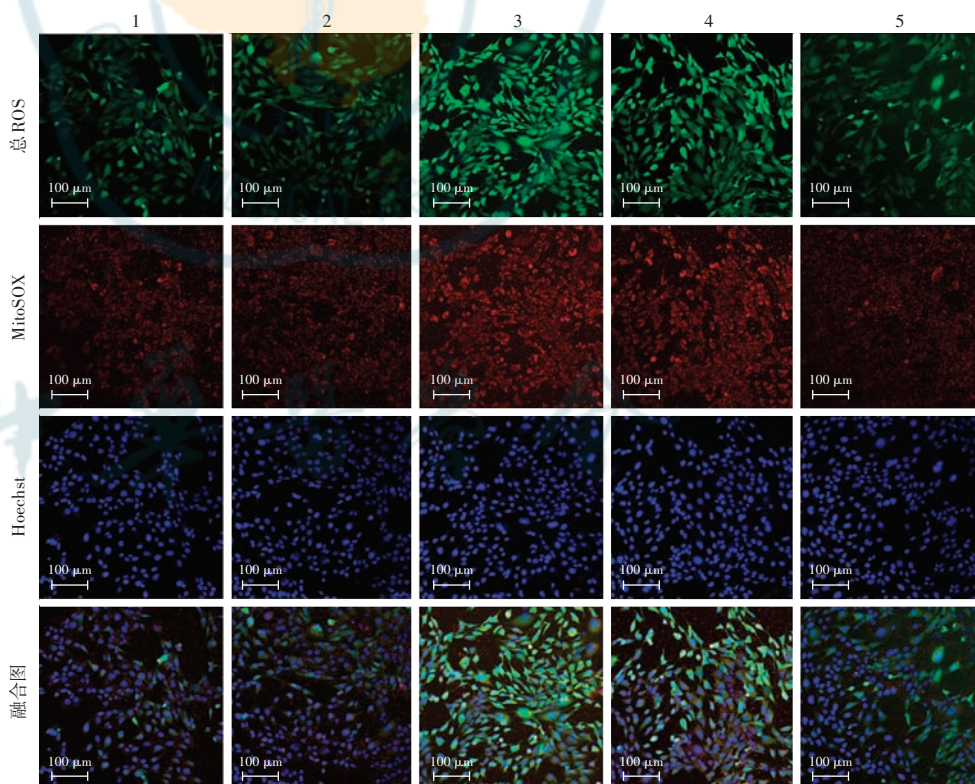


图 4 各组总 ROS、MitoSOX 荧光染色图($\times 100$,标尺=100 μm) 绿色荧光代表总 ROS,红色荧光代表 MitoSOX,蓝色荧光代表细胞核 1:正常对照组;2:甘露醇组;3:高糖组;4:高糖+DMSO 组;5:高糖+SB225002 组 DMSO:二甲亚砜;ROS:活性氧;MitoSOX:线粒体活性氧

Figure 4 Fluorescence staining images of total ROS and MitoSOX in different groups ($\times 100$, scale bar=100 μm) Green fluorescence represented total ROS, red fluorescence represented MitoSOX, and blue fluorescence represented nucleus 1: normal control group; 2: mannitol group; 3: high glucose group; 4: high glucose+DMSO group; 5: high glucose+SB225002 group DMSO: dimethyl sulfoxide; ROS: reactive oxygen species; MitoSOX: mitochondrial reactive oxygen species

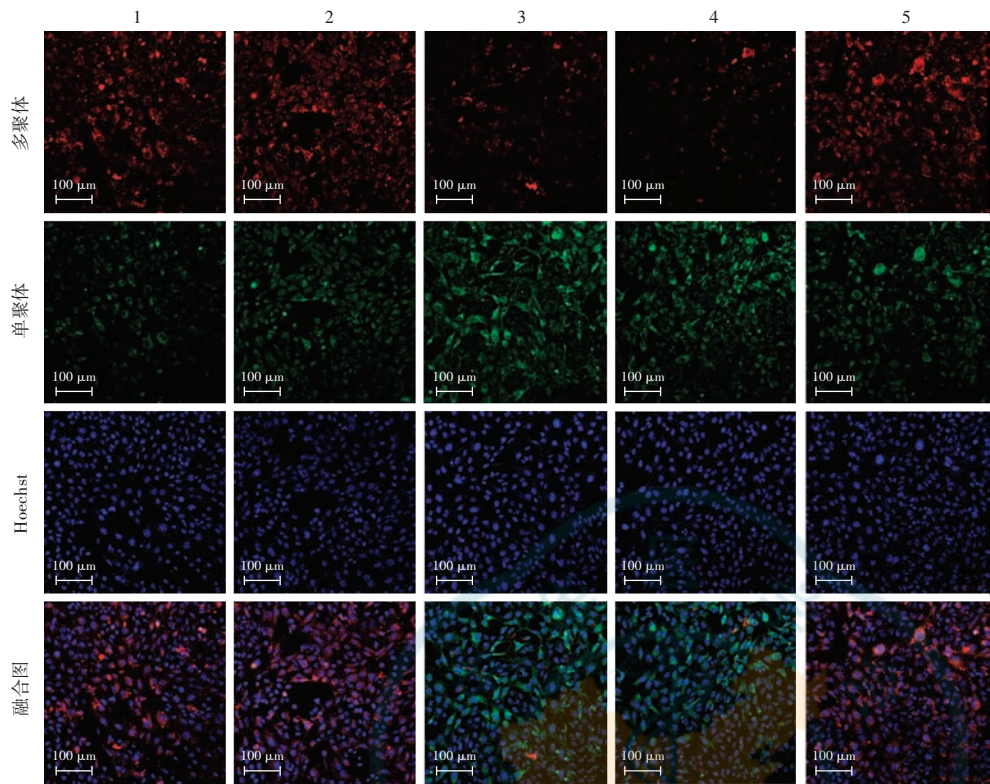


图 5 各组线粒体膜电位荧光染色图($\times 100$, 标尺 = $100\ \mu\text{m}$) 红色荧光代表 JC-10 多聚体, 绿色荧光代表 JC-10 单聚体, 蓝色荧光代表细胞核 1: 正常对照组; 2: 甘露醇组; 3: 高糖组; 4: 高糖+DMSO 组; 5: 高糖+SB225002 组 DMSO: 二甲亚砜

Figure 5 Fluorescence staining images of mitochondrial membrane potential in different groups ($\times 100$, scale bar = $100\ \mu\text{m}$) Red fluorescence represented JC-10 aggregates, green fluorescence represented JC-10 monomers, and blue fluorescence represented cell nuclei 1: normal control group; 2: mannitol group; 3: high glucose group; 4: high glucose+DMSO group; 5: high glucose+SB225002 group DMSO: dimethyl sulfoxide

2.7 各组 Nrf2、HO-1 蛋白表达比较

正常对照组、甘露醇组、高糖组、高糖+DMSO 组、高糖+SB225002 组 Nrf2 蛋白相对表达量分别为 0.97 ± 0.06 、 0.89 ± 0.07 、 0.62 ± 0.05 、 0.60 ± 0.07 、 0.87 ± 0.04 ，HO-1 蛋白相对表达量分别为 0.85 ± 0.09 、 0.88 ± 0.14 、

增殖和迁移能力的提高。

近年来许多研究表明氧化应激在 DR 的发病机制中发挥重要作用^[16-17]。细胞内 ROS 主要来源于线粒体。研究证实 ROS 在细胞内过度蓄积会导致线粒体 DNA 损伤,引起线粒体膜电位去极化增加,致使线粒

0.43 ± 0.06 、 0.65 ± 0.23 、 1.00 ± 0.12 , 总体比较差异均有统计学意义 ($F = 25.06$ 、 7.80 , 均 $P < 0.01$), 其中高糖组 Nrf2、HO-1 蛋白相对表达量明显低于正常对照组和甘露醇组, 高糖+SB225002 组 Nrf2、HO-1 蛋白相对表达量明显高于高糖+DMSO 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 8)。

3 讨论

视网膜新生血管是 DR 严重的并发症之一。持续性高血糖可增加氧化应激水平, 引发炎症反应, 造成视网膜血管内皮细胞功能障碍, 多种因素共同作用导致视网膜新生血管生成^[14-15]。本研究发现, IL-8 拮抗剂 SB225002 可抑制高糖刺激引起的视网膜血管内皮细胞活性增强、细胞

表 3 各组细胞总 ROS 荧光强度、MitoSOX 荧光强度、多聚体荧光强度、单聚体荧光强度及线粒体膜电位水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of total ROS fluorescence intensity, MitoSOX fluorescence intensity, polymer fluorescence intensity, monomer fluorescence intensity, and mitochondrial membrane potential levels among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	总 ROS 荧光强度	MitoSOX 荧光强度	多聚体荧光强度	单聚体荧光强度	线粒体膜电位水平
正常对照组	3	21.51 ± 1.78	9.907 ± 0.25	31.03 ± 1.19	14.42 ± 0.71	2.15 ± 0.04
甘露醇组	3	20.18 ± 1.12	10.71 ± 0.56	31.39 ± 1.79	15.36 ± 0.72	2.05 ± 0.20
高糖组	3	55.36 ± 2.79^{ab}	21.10 ± 0.66^{ab}	15.87 ± 1.47^{ab}	30.53 ± 0.88^{ab}	0.52 ± 0.04^{ab}
高糖+DMSO 组	3	56.33 ± 2.71	20.62 ± 1.20	16.92 ± 1.72	31.55 ± 2.65	0.54 ± 0.10
高糖+SB225002 组	3	23.37 ± 1.66^c	9.122 ± 0.62^c	30.66 ± 0.57^c	16.35 ± 1.02^c	1.86 ± 0.09^c
F 值		236.50	206.20	113.10	96.24	157.60
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常对照组比较, $^a P < 0.001$; 与甘露醇组比较, $^b P < 0.001$; 与高糖+DMSO 组比较, $^c P < 0.001$ (单因素方差分析, LSD- t 检验) ROS: 活性氧; MitoSOX: 线粒体活性氧; DMSO: 二甲亚砜

Note: Compared with the normal control group, $^a P < 0.001$; compared with the mannitol group, $^b P < 0.001$; compared with the high glucose+DMSO group, $^c P < 0.001$ (One-way ANOVA, LSD- t test) ROS: reactive oxygen species; MitoSOX: mitochondrial reactive oxygen species; DMSO: dimethyl sulfoxide

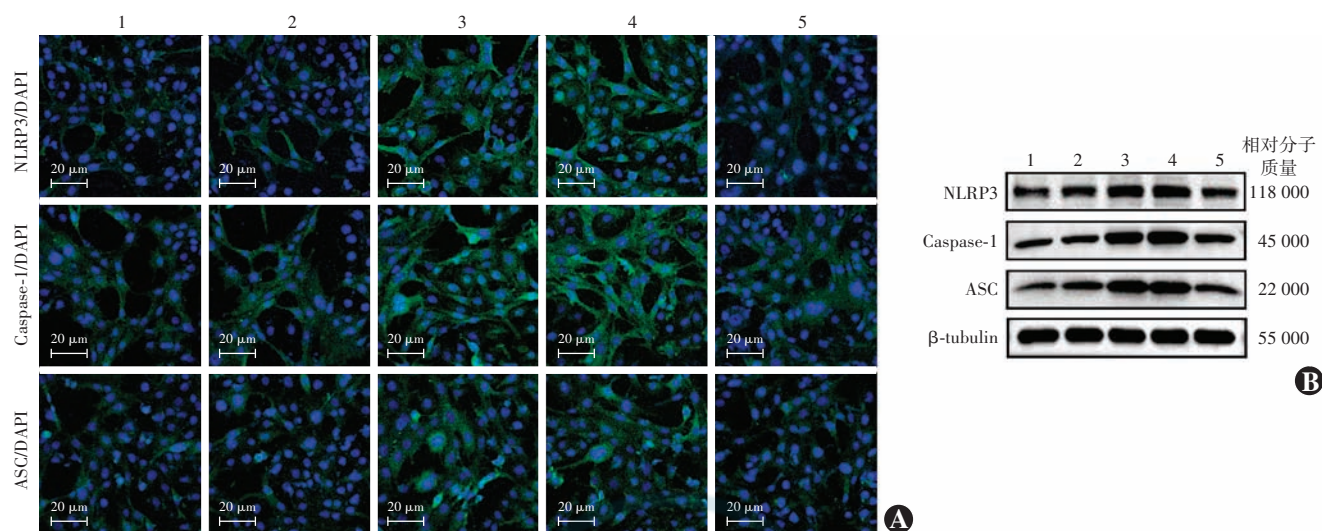


图 6 各组 NLRP3、Caspase-1、ASC 蛋白表达情况 A: 各组 NLRP3、Caspase-1、ASC 蛋白免疫荧光染色图 (Alexa Fluor 488 ×400, 标尺 = 20 μm) 蓝色荧光代表细胞核 B: 各组 NLRP3、Caspase-1、ASC 蛋白表达电泳图 1: 正常对照组; 2: 甘露醇组; 3: 高糖组; 4: 高糖 + DMSO 组; 5: 高糖 + SB225002 组 DMSO: 二甲基亚砜; DAPI: 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚; NLRP3: 核苷酸结合寡聚化结构样受体蛋白 3; Caspase-1: 半胱天冬酶-1; ASC: 凋亡相关斑点样蛋白; β-tubulin: β 微管蛋白

Figure 6 Expression of NLRP3, Caspase-1, and ASC proteins in each group A: Immunofluorescence staining images of NLRP3, Caspase-1, and ASC proteins (Alexa Fluor 488 ×400, scale bar = 20 μm) Blue fluorescence indicated cell nuclei B: Electrophoretogram of NLRP3, Caspase-1, and ASC proteins expression 1: normal control group; 2: mannitol group; 3: high glucose group; 4: high glucose+DMSO group; 5: high glucose+SB225002 group DMSO: dimethyl sulfoxide; DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole; NLRP3: nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3; Caspase-1: cysteine-aspartic acid protease-1; ASC: apoptosis-associated speck-like protein

表 4 各组细胞中 NLRP3、Caspase-1、ASC 荧光强度及蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 4 Comparison of fluorescence intensity and relative protein expression of NLRP3, Caspase-1, and ASC proteins among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	NLRP3 荧光强度	Caspase-1 荧光强度	ASC 荧光 强度	NLRP3 蛋白 相对表达量	Caspase-1 蛋白 相对表达量	ASC 蛋白 相对表达量
正常对照组	3	19.05±0.36	20.55±1.31	21.55±2.14	0.66±0.06	0.63±0.06	0.63±0.05
甘露醇组	3	19.23±0.39	22.97±1.44	21.50±1.23	0.73±0.07	0.72±0.05	0.72±0.05
高糖组	3	36.12±0.64 ^{ab}	39.56±1.34 ^{ab}	35.12±2.08 ^{ab}	0.92±0.06 ^{ab}	0.93±0.08 ^{ab}	0.97±0.04 ^{ab}
高糖+DMSO 组	3	35.92±1.83	38.17±0.66	34.62±2.30	0.91±0.05	0.88±0.02	0.94±0.02
高糖+SB225002 组	3	21.26±1.04 ^c	24.10±0.79 ^c	23.83±2.16 ^c	0.67±0.01 ^c	0.69±0.08 ^c	0.70±0.08 ^c
F 值		231.80	185.50	35.57	18.09	12.90	26.31
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.001$; 与甘露醇组比较, ^b $P < 0.001$; 与高糖+DMSO 组比较, ^c $P < 0.001$ (单因素方差分析, LSD- t 检验) DMSO: 二甲基亚砜; NLRP3: 核苷酸结合寡聚化结构样受体蛋白 3; Caspase-1: 半胱天冬酶-1; ASC: 凋亡相关斑点样蛋白

Note: Compared with the normal control group, ^a $P < 0.001$; compared with the mannitol group, ^b $P < 0.001$; compared with the high glucose+DMSO group, ^c $P < 0.001$ (One-way ANOVA, LSD- t test) DMSO: dimethyl sulfoxide; NLRP3: nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3; Caspase-1: cysteine-aspartic acid protease-1; ASC: apoptosis-associated speck-like protein

体膜电位下降, 改变线粒体膜通透性, 造成线粒体功能受损, 加剧 ROS 产生^[18-20]。当线粒体功能紊乱时, 除激活多种异常生化代谢途径外, 也会激活 NLRP3 炎症小体、干扰素基因刺激蛋白等通路^[19]。因此, 清除细胞内蓄积的 ROS 对于维持细胞正常功能具有重要作用。本课题组前期研究发现, SB225002 可显著降低氧化应激刺激后的 hRCEC 内 ROS 水平、抑制 hRCEC 迁移和新生血管形成^[4]。本研究通过检测 SB225002 对

高糖条件下 RF/6A 细胞内总 ROS、MitoSOX 表达和线粒体膜电位变化的影响, 发现 SB225002 可抑制高糖诱导的细胞内总 ROS、MitoSOX 表达的增加和线粒体膜电位的下降, 表明 SB225002 可降低细胞氧化应激水平, 同时可能改善高糖诱导的氧化应激水平增加和线粒体功能障碍。

DR 发病机制中的多种代谢途径均可诱导炎症因子释放增加, 引起炎症反应。已有大量证据表明炎症

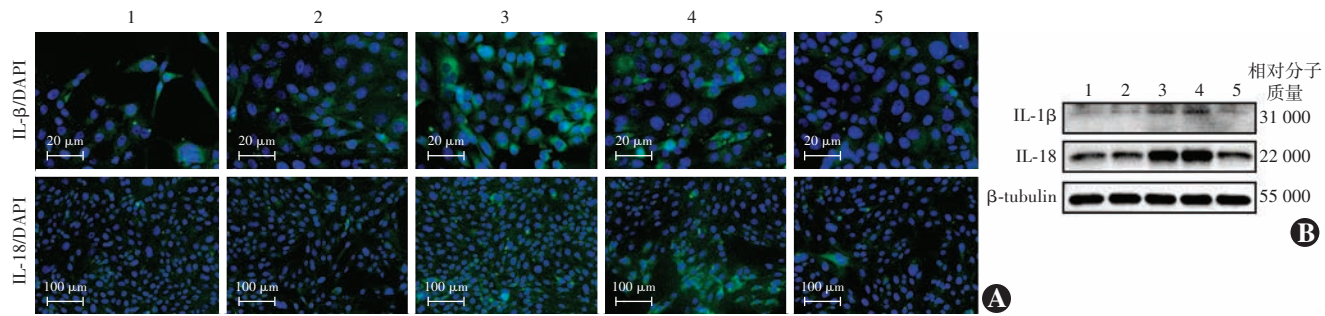


图 7 各组 IL-1β、IL-18 蛋白表达情况 A: 各组 IL-1β、IL-18 蛋白免疫荧光染色图 (Alexa Fluor 488, IL-1β: ×400, 标尺 = 20 μm; IL-18: ×100, 标尺 = 100 μm) 蓝色荧光代表细胞核 B: 各组 IL-1β、IL-18 蛋白表达电泳图 1: 正常对照组; 2: 甘露醇组; 3: 高糖组; 4: 高糖+DMSO 组; 5: 高糖+SB225002 组 DMSO: 二甲亚砜; IL: 白细胞介素; DAPI: 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚; β-tubulin: β 微管蛋白

Figure 7 Expression of IL-1β and IL-18 protein in each group A: Immunofluorescence staining images of IL-1β and IL-18 proteins (Alexa Fluor 488, IL-1β: ×400, scale bar = 20 μm; IL-18: ×100, scale bar = 100 μm) Blue fluorescence represented cell nuclei B: Electrophoretogram of IL-1β and IL-18 proteins expression 1: normal control group; 2: mannitol group; 3: high glucose group; 4: high glucose+DMSO group; 5: high glucose+SB225002 group DMSO: dimethyl sulfoxide; IL: interleukin; DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole

反应在 DR 发展中处于关键地位^[16,21-22]。NLRP3 炎性小体是具有显著特征的炎性小体,是由 NLRP3、Caspase-1、ASC 组成的大型蛋白复合物,其中 NLRP3 起核心作用。接收到刺激信号后,NLRP3 与 ASC 相互作用,募集 Caspase-1 前体完成 NLRP3 炎性小体组装,活化 Caspase-1 继而切割 IL-1β 和 IL-18 前体为成熟形式,促使细胞释放 IL-1β 和 IL-18,诱发炎症反应。NLRP3 炎性小体受多种信号途径激活,如线粒体功能障碍、ROS、溶酶体破坏、离子重分布等^[23]。ROS 通过抗氧化剂硫氧还原蛋白 (thioredoxin, TRX) 上的二硫键结合并激活 TXNIP, TXNIP 可降低 TRX 对 ROS 的清除能力,同时与 NLRP3 结合以激活 NLRP3 炎性小体。近年越来越多的研究证实 NLRP3 炎性小体与 DR 发展密切相关^[22,24-25]。DR 成人患者外周血单核细胞中 NLRP3、Caspase-1、ASC 表

表 5 各组细胞中 IL-1β、IL-18 荧光强度及蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of fluorescence intensity and relative protein expression of IL-1β、IL-18 in cells of each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	IL-1β 荧光强度	IL-18 荧光强度	IL-1β 蛋白相对表达量	IL-18 蛋白相对表达量
正常对照组	3	16.76±0.40	14.77±1.07	0.38±0.04	0.51±0.02
甘露醇组	3	15.45±3.21	16.19±0.83	0.41±0.09	0.59±0.08
高糖组	3	23.14±0.16 ^{ab}	23.95±1.92 ^{ab}	1.03±0.10 ^{ab}	0.95±0.06 ^{ab}
高糖+DMSO 组	3	21.84±1.76	21.94±1.31	0.90±0.02	0.97±0.11
高糖+SB225002 组	3	16.73±1.62 ^c	16.50±0.63 ^c	0.39±0.03 ^c	0.54±0.04 ^c
F 值		11.08	31.73	67.47	34.16
P 值		0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常对照组比较,^a $P<0.01$;与甘露醇组比较,^b $P<0.01$;与高糖+DMSO 组比较,^c $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD- t 检验) IL:白细胞介素;DMSO:二甲亚砜

Note: Compared with the normal control group, ^a $P<0.01$; compared with the mannitol group, ^b $P<0.01$; compared with the high glucose+DMSO group, ^c $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test) IL: interleukin; DMSO: dimethyl sulfoxide

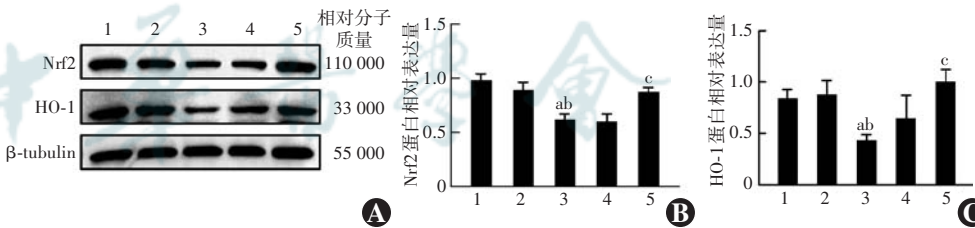


图 8 各组 Nrf2、HO-1 蛋白表达情况 A: 各组 Nrf2、HO-1 蛋白表达电泳图 B: 各组 Nrf2 蛋白表达量比较 $F=25.06, P<0.001$ 。与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与甘露醇组比较,^b $P<0.05$;与高糖+DMSO 组比较,^c $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD- t 检验; $n=3$) C: 各组 HO-1 蛋白表达量比较 $F=7.80, P=0.004$ 。与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与甘露醇组比较,^b $P<0.05$;与高糖+DMSO 组比较,^c $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD- t 检验; $n=3$) 1: 正常对照组; 2: 甘露醇组; 3: 高糖组; 4: 高糖+DMSO 组; 5: 高糖+SB225002 组 Nrf2: 核因子 E2 相关因子 2; HO-1: 血红素加氧酶 1; DMSO: 二甲亚砜; β-tubulin: β 微管蛋白

Figure 8 Expression of Nrf2 and HO-1 proteins in each group A: Electrophoretogram of Nrf2 and HO-1 proteins expression B: Quantitative comparison of Nrf2 protein expression among different groups $F=25.06, P<0.001$. Compared with the normal control group, ^a $P<0.05$; compared with the mannitol group, ^b $P<0.05$; compared with the high glucose+DMSO group, ^c $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test; $n=3$) C: Quantitative comparison of HO-1 protein expression among different groups $F=7.80, P=0.004$. Compared with the normal control group, ^a $P<0.05$; compared with the mannitol group, ^b $P<0.05$; compared with the high glucose+DMSO group, ^c $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test; $n=3$) 1: normal control group; 2: mannitol group; 3: high glucose group; 4: high glucose+DMSO group; 5: high glucose+SB225002 group Nrf2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2; HO-1: heme oxygenase 1; DMSO: dimethyl sulfoxide

达较正常成人增加, PDR 成人患者纤维血管膜中 NLRP3、ASC 表达增加, 且 DR 患者玻璃体液中 IL-1 β 、IL-18 表达增多^[26]。有研究发现维生素 D3 可抑制高糖刺激的 hRCEC ROS 生成和 NLRP3 炎性小体激活^[27]。本研究结果显示, SB225002 可降低高糖诱导的 NLRP3、Caspase-1、ASC 和 IL-1 β 、IL-18 表达的增多, 提示 SB225002 可能通过抑制高糖诱导的 NLRP3 炎性小体激活, 进而减轻高糖诱导的炎症反应。

Nrf2 是一种调节抗氧化防御的重要因子, 可通过与抗氧化反应元件结合增加机体内抗氧化蛋白 HO-1 的表达。氧化应激刺激下 Nrf2 与抗氧化反应元件结合受到阻碍, 下游抗氧化基因表达减少, 导致细胞内大量 ROS 沉积^[28]。Nrf2/HO-1 信号通路的激活已在视网膜组织中证实能够有效阻断氧化应激, 清除多余 ROS, 保护细胞免受氧化损伤。白藜芦醇通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路降低糖尿病小鼠视网膜中的氧化应激水平并抑制视网膜神经节细胞凋亡, 从而减轻高糖对视网膜造成的损伤^[29]。天然多酚 ACT 通过 Nrf2/HO-1 通路减轻糖尿病小鼠的视网膜损伤和抑制高糖诱导的视网膜色素上皮细胞氧化应激损伤^[30]。本研究结果显示, SB225002 可增加高糖诱导的 Nrf2 和 HO-1 表达, 提示 SB225002 可能激活 Nrf2/HO-1 信号通路, 减轻高糖诱导的氧化应激和炎症反应。

本研究结果表明, SB225002 可逆转高糖诱导的氧化应激水平, 抑制高糖诱导的 NLRP3 炎性小体激活并下调其表达, 此外还增加高糖状态下 Nrf2 和 HO-1 的表达, 提示 SB225002 可调控 Nrf2/HO-1 信号通路。然而, SB225002 是否通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路发挥抗氧化作用、降低 ROS 水平, 从而抑制 NLRP3 炎性小体激活, 尚缺乏直接证据, 故无法明确 Nrf2/HO-1 信号通路在 SB225002 上述作用中的必要性。因此, 未来需进一步通过实验明确 Nrf2/HO-1 信号通路是否介导 SB225002 对 NLRP3 炎性小体激活和表达的抑制作用, 进而减轻高糖对视网膜血管内皮细胞的损伤效应。

本研究通过体外高糖刺激模拟眼内 DR 环境, 在细胞层面探究了 SB225002 对 NLRP3 炎性小体的影响, 结果显示 SB225002 可通过抑制 RF/6A 细胞内 NLRP3 炎性小体的激活, 减轻高糖条件下细胞氧化应激损伤和炎症反应, 并激活 Nrf2/HO-1 信号通路。但本研究存在一定局限性: 首先, 所用 RF/6A 细胞为猴源, 其与 hRCEC 在基因表达及信号通路方面可能存在种属差异, 因此本研究结果外推至人 DR 机制时需谨慎。未来需要在人原代细胞或体内模型中进一步验证。其次, 未使用特异性抑制剂或基因沉默技术阻断

Nrf2/HO-1 信号通路, 进一步验证 SB225002 对该通路激活和上下游相关分子表达的影响。此外, 更复杂的体内生物学过程需要利用动物模型(如糖尿病小鼠模型)等进行验证。今后本课题组将进一步探索 SB225002 通过 IL-8 介导的 NLRP3 炎性小体激活在 DR 中的潜在调控作用和其他作用机制, 为寻求 DR 甚至眼内新生血管疾病的治疗策略提供新思路, 也为研究 NLRP3 炎性小体靶向治疗药物提供可靠的理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 王晴: 实施研究、采集数据、文章撰写; 庄彤彤: 实施研究、数据分析; 东莉洁: 酝酿和设计实验、指导实验; 王林妮: 研究指导、论文审阅及定稿

参考文献

- [1] Seo H, Park SJ, Song M. Diabetic retinopathy (DR): mechanisms, current therapies, and emerging strategies [J]. *Cells*, 2025, 14(5): 376. DOI: 10.3390/cells14050376.
- [2] Fousek K, Horn LA, Palena C. Interleukin-8: a chemokine at the intersection of cancer plasticity, angiogenesis, and immune suppression [J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 219: 107692. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2020.107692.
- [3] Zhang K, Dai X, Chen W, et al. JAK3/STAT5A-dependent IL-8 regulation drives ESCC angiogenesis and is suppressed by dihydroartemisinin [J]. *Int Immunopharmacol*, 2025, 161: 115042. DOI: 10.1016/j.intimp.2025.115042.
- [4] 王林妮, 曹靖靖, 邢东军, 等. 白细胞介素-8 拮抗剂通过抑制活性氧生成下调视网膜血管内皮细胞黏附和迁移 [J]. *中华眼底病杂志*, 2023, 39(11): 913-917. DOI: 10.3760/cma.j.cn511434-20220315-00148.
- Wang LN, Cao JJ, Xing DJ, et al. Interleukin-8 antagonist down regulates the adhesion and migration of retinal vascular endothelial cells by inhibiting the production of reactive oxygen species [J]. *Chin J Ocul Fundus Dis*, 2023, 39(11): 913-917. DOI: 10.3760/cma.j.cn511434-20220315-00148.
- [5] 杨可来, 匡洪宇. 糖尿病视网膜病变与 NLRP3 炎性小体 [J]. *国际内分泌代谢杂志*, 2023, 43(2): 136-139. DOI: 10.3760/cma.j.cn121383-20211214-12033.
- Yang KLE, Kuang HY. NLRP3 inflammasome and diabetic retinopathy [J]. *Int J Endocrinol Metab*, 2023, 43(2): 136-139. DOI: 10.3760/cma.j.cn121383-20211214-12033.
- [6] 李宏松, 李蓉, 王丽君, 等. ROS/NLRP3/Caspase-1 信号通路在高糖诱导视网膜色素上皮细胞凋亡中的作用 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2022, 40(1): 6-12. <https://rs.yiigle.com/cmaid/1348283>. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210420-00267-1.
- Li HS, Li R, Wang LJ, et al. Effect of ROS/NLRP3/Caspase-1 signaling pathway on the apoptosis of retinal pigment epithelial cells induced by high glucose [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2022, 40(1): 6-12. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210420-00267-1.
- [7] Kelley N, Jelte D, Duan Y, et al. The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(13): 3328. DOI: 10.3390/ijms20133328.
- [8] 闫磊, 张文静, 查才军, 等. NLRP3 炎性小体在动脉粥样硬化中的研究进展 [J]. *国际免疫学杂志*, 2021, 44(3): 355-358. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4394.2021.03.022.
- Yan L, Zhang WJ, Zha CJ, et al. Research progress of NLRP3 inflammasome in atherosclerosis [J/OL]. *Int J Immunol*, 2021, 44(3): 355-358. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4394.2021.03.022.
- [9] Raman KS, Matsubara JA. Dysregulation of the NLRP3 inflammasome in diabetic retinopathy and potential therapeutic targets [J]. *Ocul Immunol Inflamm*, 2022, 30(2): 470-478. DOI: 10.1080/09273948.2020.1811350.
- [10] Gore M, Tiwari A, Jahagirdar D, et al. Three-dimensional spheroids of choroid-retinal vascular endothelial cells as an in-vitro model for



- diabetic retinopathy: proof-of-concept investigation [J]. *Curr Res Pharmacol Drug Discov*, 2022, 3: 100111. DOI: 10.1016/j.crphar.2022.100111.
- [11] Li Q, Zhang M, Gao Q, et al. High fat-induced the upregulation of LOX-1 in RF/6A cells under high glucose condition [J]. *J Diabetes Complications*, 2025, 39(5): 109019. DOI: 10.1016/j.jdiacom.2025.109019.
- [12] Gao Q, Lai Y, He S, et al. Lysine acetyltransferase 5 contributes to diabetic retinopathy by modulating autophagy through epigenetically regulating autophagy-related gene 7 [J]. *Cytojournal*, 2025, 22: 22. DOI: 10.25259/Cytojournal_187_2024.
- [13] 曹靖靖, 寇振宇, 王晴, 等. 沉默 Nodal 抑制高糖条件下培养的视网膜血管内皮细胞的生物学行为 [J]. *中华眼底病杂志*, 2024, 40(2): 136-141. DOI: 10.3760/cma.j.cn511434-20230423-00181. Cao JJ, Kou ZY, Wang Q, et al. Silencing Nodal inhibits the biological behavior of retinal vascular endothelial cells under high glucose conditions [J]. *Chin J Ocul Fundus Dis*, 2024, 40(2): 136-141. DOI: 10.3760/cma.j.cn511434-20230423-00181.
- [14] 丁玉婉, 黄虹, 许静. 高血糖通过氧化应激诱发糖尿病视网膜病变 [J]. *国际眼科纵览*, 2023, 47(5): 424-429. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-5803.2023.05.007. Ding YW, Huang H, Xu J. Hyperglycemia induces diabetic retinopathy through oxidative stress [J/OL]. *Int Rev Ophthalmol*, 2023, 47(5): 424-429. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-5803.2023.05.007.
- [15] Clements JN, Mesawich J, Twisdale C. Current and emerging pharmacologic therapies for diabetic retinopathy [J/OL]. *Pharmacotherapy*, 2026, 46(3): e70119 [2026-06-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/41693076/>. DOI: 10.1002/phar.70119.
- [16] Andrés-Blasco I, Gallego-Martínez A, Machado X, et al. Oxidative stress, inflammatory, angiogenic, and apoptotic molecules in proliferative diabetic retinopathy and diabetic macular edema patients [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(9): 8227. DOI: 10.3390/ijms24098227.
- [17] Valle MS, Russo C, Malaguarnera L. Protective role of vitamin D against oxidative stress in diabetic retinopathy [J/OL]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2021, 37(8): e3447 [2026-06-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33760363/>. DOI: 10.1002/dmrr.3447.
- [18] Haydinger CD, Oliver GF, Ashander LM, et al. Oxidative stress and its regulation in diabetic retinopathy [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2023, 12(8): 1649. DOI: 10.3390/antiox12081649.
- [19] Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, et al. Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling [J]. *Circ Res*, 2018, 122(6): 877-902. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311401.
- [20] Zandalinas SI, Mittler R. ROS-induced ROS release in plant and animal cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 122: 21-27. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.11.028.
- [21] Forrester JV, Kuffova L, Delibegovic M. The role of inflammation in diabetic retinopathy [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 583687. DOI: 10.3389/fimmu.2020.583687.
- [22] Kim JS, Jun JH, Lee J, et al. HDAC6 mediates NLRP3 inflammasome activation in the pathogenesis of diabetic retinopathy [J]. *Metabolism*, 2025, 164: 156108. DOI: 10.1016/j.metabol.2024.156108.
- [23] Zheng X, Wan J, Tan G. The mechanisms of NLRP3 inflammasome/pyroptosis activation and their role in diabetic retinopathy [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1151185. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1151185.
- [24] Louie HH, Shome A, Kuo CY, et al. Connexin43 hemichannel block inhibits NLRP3 inflammasome activation in a human retinal explant model of diabetic retinopathy [J]. *Exp Eye Res*, 2021, 202: 108384. DOI: 10.1016/j.exer.2020.108384.
- [25] Chen Y, Yao G, Tong J, et al. MSC-derived small extracellular vesicles alleviate diabetic retinopathy by delivering miR-22-3p to inhibit NLRP3 inflammasome activation [J]. *Stem Cells*, 2024, 42(1): 64-75. DOI: 10.1093/stmcls/sxad078.
- [26] Chen H, Zhang X, Liao N, et al. Enhanced expression of NLRP3 inflammasome-related inflammation in diabetic retinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59(2): 978-985. DOI: 10.1167/iovs.17-22816.
- [27] Lu L, Lu Q, Chen W, et al. Vitamin D₃ protects against diabetic retinopathy by inhibiting high-glucose-induced activation of the ROS/TXNIP/NLRP3 inflammasome pathway [J]. *J Diabetes Res*, 2018, 2018: 8193523. DOI: 10.1155/2018/8193523.
- [28] Cai ZY, Fu MD, Liu K, et al. Therapeutic effect of Keap1-Nrf2-ARE pathway-related drugs on age-related eye diseases through anti-oxidative stress [J]. *Int J Ophthalmol*, 2021, 14(8): 1260-1273. DOI: 10.18240/ijo.2021.08.19.
- [29] Yuan D, Xu Y, Xue L, et al. Resveratrol protects against diabetic retinal ganglion cell damage by activating the Nrf2 signaling pathway [J/OL]. *Heliyon*, 2024, 10(9): e30786 [2026-06-14]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38774075/>. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e30786.
- [30] Yang J, Hua Z, Zheng Z, et al. Acteoside inhibits high glucose-induced oxidative stress injury in RPE cells and the outer retina through the Keap1/Nrf2/ARE pathway [J]. *Exp Eye Res*, 2023, 232: 109496. DOI: 10.1016/j.exer.2023.109496.

(收稿日期: 2025-11-15 修回日期: 2026-06-16)

(本文编辑: 施晓萌 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 ng/(kg·min) 的形式,而不用 ng/kg/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 ng/L±18.2 ng/L”可以表示为“(75.4±18.2) ng/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(mmHg)或厘米水柱(cmH₂O)为计量单位,但首次使用时应注明 mmHg 或 cmH₂O 与 kPa 的换算系数(1 mmHg=0.133 kPa, 1 cmH₂O=0.098 kPa)。

(本刊编辑部)

