

· 实验研究 ·

阿克苷通过SIRT1调控线粒体自噬对高糖诱导的RPE细胞氧化应激与线粒体损伤的改善作用

湛姝宏 李燕 马嘉 陈前波 席晓婷

昆明医科大学第一附属医院眼科, 昆明 650032

通信作者: 席晓婷, Email: xi_xiao_ting@163.com

【摘要】 目的 探究阿克苷对高糖诱导的人视网膜色素上皮细胞系 (ARPE-19) 氧化应激及线粒体损伤的调控作用及分子机制。 **方法** 将 ARPE-19 细胞分为正常对照组、甘露醇组、高糖组、高糖+Mito-TEMPO[活性氧(ROS)清除剂]组、高糖+阿克苷组、高糖+阿克苷+BafA1(自噬抑制剂)组、高糖+阿克苷+EX-527[沉默信息调节因子(SIRT1)抑制剂]组、高糖+阿克苷+si-SIRT1转染组, 根据分组分别进行相应处理后, 采用细胞计数试剂盒8检测各组细胞活力值; 采用三磷酸腺苷(ATP)水平测定试剂盒测定 ATP 含量; 采用 JC-1 染色检测各组线粒体膜电位; 采用 MitoSOX Red 染色检测线粒体 ROS 含量; 采用 mRFP-GFP-LC3 双荧光标记检测自噬通量; 采用 Western blot 法检测各组 SIRT1、PINK1、Parkin、LC3 II/I、p62 蛋白相对表达量。 **结果** 高糖组细胞活力值、ATP 含量、线粒体膜电位均明显低于正常对照组、甘露醇组、高糖+阿克苷组, 线粒体 ROS 含量明显高于正常对照组、甘露醇组、高糖+阿克苷组, 高糖+阿克苷+EX-527 组和高糖+阿克苷+si-SIRT1 转染组细胞活力值、ATP 含量、线粒体膜电位均低于高糖+阿克苷组, 线粒体 ROS 含量高于高糖+阿克苷组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。高糖组细胞活力值和 ATP 含量均明显低于高糖+Mito-TEMPO 组, PINK1、Parkin 蛋白相对表达量均明显低于正常对照组、甘露醇组和高糖+阿克苷组, LC3 II/I、p62 蛋白相对表达量均明显高于正常对照组、甘露醇组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。高糖+阿克苷组 LC3 II/I 蛋白相对表达量高于高糖组, 低于高糖+阿克苷+BafA1 组, p62 蛋白相对表达量低于高糖组和高糖+阿克苷+BafA1 组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。高糖+阿克苷+EX-527 组和高糖+阿克苷+si-SIRT1 转染组 SIRT1、PINK1、Parkin、LC3 II/I 蛋白相对表达量低于高糖+阿克苷组, p62 蛋白相对表达量高于高糖+阿克苷组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。正常对照组、高糖组、高糖+阿克苷组、高糖+阿克苷+BafA1 组 GFP/mRFP 荧光强度分别为 0.22 ± 0.10 、 0.72 ± 0.04 、 0.43 ± 0.06 、 0.61 ± 0.04 , 总体比较差异有统计学意义($F = 33.68$, $P < 0.001$), 其中高糖组 GFP/mRFP 荧光强度高于正常对照组和高糖+阿克苷组, 高糖+阿克苷+BafA1 组 GFP/mRFP 荧光强度高于高糖+阿克苷组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。 **结论** 阿克苷通过激活 SIRT1 促进 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬, 从而减轻高糖诱导的 ARPE-19 细胞氧化应激与线粒体损伤。

【关键词】 糖尿病视网膜病变; 阿克苷; 线粒体自噬; PINK1/Parkin; SIRT1

基金项目: 国家自然科学基金(82360211, 82360210, 82360206); 云南省科技厅重大科技专项计划(202302AA310026); 云南省高层次科技人才及创新团队选拔专项-技术创新人才培养对象项目(202405AD350028); 云南省“兴滇英才支持计划”医疗卫生人才(RLMY20250011); 云南省医学学科带头人项目(D-2024051)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20260330-00144

Ameliorative effect of acteoside on high glucose-induced oxidative stress and mitochondrial damage by modulating SIRT1-mediated mitophagy in RPE cells

Shen Shuhong, Li Yan, Ma Jia, Chen Qianbo, Xi Xiaoting

Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China

Corresponding author: Xi Xiaoting, Email: xi_xiao_ting@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the regulatory effect and molecular mechanism of acteoside on oxidative stress and mitochondrial damage in high glucose-induced human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19). **Methods** ARPE-19 cells were divided into normal control group, mannitol group, high-glucose group, high-glucose+Mito-TEMPO (reactive oxygen species [ROS] scavenger) group, high-glucose+acteoside group, high-glucose+acteoside+BafA1 (autophagy inhibitor) group, high-glucose+acteoside+EX-527 (sirtuin 1 [SIRT1] inhibitor) group, and high-glucose+acteoside+si-SIRT1 transfection group. After corresponding treatments according to grouping, the cell viability of different groups was detected using cell counting kit-8; adenosine triphosphate (ATP) content was measured with an ATP level assay kit; mitochondrial membrane potential was detected via JC-1 staining; mitochondrial ROS level was determined by MitoSOX Red staining; autophagic flux was assessed using



mRFP-GFP-LC3 dual fluorescence labeling; the relative expression levels of SIRT1, PINK1, Parkin, LC3 II/I and p62 proteins were examined by Western blot. **Results** The cell viability, ATP content and mitochondrial membrane potential were significantly lower and the mitochondrial ROS level was significantly higher in the high-glucose group than those in the normal control group, mannitol group and high-glucose+acteoside group (all $P < 0.05$). The cell viability, ATP content and mitochondrial membrane potential were higher and the mitochondrial ROS level was lower in the high-glucose+acteoside group than those in the high-glucose+acteoside+EX-527 group and high-glucose+acteoside+si-SIRT1 transfection group and all differences were statistically significant (all $P < 0.05$). The cell viability and ATP content were significantly lower in the high-glucose group than in the high-glucose+Mito-TEMPO group (both $P < 0.05$). The relative expression levels of PINK1 and Parkin proteins in the high-glucose group were significantly lower than those in the normal control group, mannitol group and high-glucose+acteoside group, whereas the relative expression levels of LC3 II/I and p62 proteins in the high-glucose group were significantly higher than those in the normal control group and mannitol group (all $P < 0.05$). The relative expression levels of LC3 II/I and p62 proteins were higher in the high-glucose group than in the normal control group (both $P < 0.05$). The relative expression level of LC3 II/I protein in the high-glucose+acteoside group was higher than that in the high-glucose group but lower than that in the high-glucose+acteoside+BafA1 group (both $P < 0.05$). The relative expression level of p62 protein in the high-glucose+acteoside group was lower than that in the high-glucose group and high-glucose+acteoside+BafA1 group (both $P < 0.05$). The relative expression levels of SIRT1, PINK1, Parkin and LC3 II/I proteins were higher and the relative expression level of p62 protein was lower in the high-glucose+acteoside group than in the high-glucose+acteoside+EX-527 group and high-glucose+acteoside+si-SIRT1 transfection group (all $P < 0.05$). The GFP/mRFP fluorescence intensities of the normal control group, high-glucose group, high-glucose+acteoside group and high-glucose+acteoside+BafA1 group were 0.22 ± 0.10 , 0.72 ± 0.04 , 0.43 ± 0.06 and 0.61 ± 0.04 , respectively, with a statistically significant overall difference ($F = 33.68$, $P < 0.001$). The GFP/mRFP fluorescence intensity was higher in the high-glucose group than in the normal control group and high-glucose+acteoside group, and higher in the high-glucose+acteoside+BafA1 group than in the high-glucose+acteoside group, with statistically significant differences (all $P < 0.05$). **Conclusions** Acteoside alleviates high glucose-induced oxidative stress and mitochondrial damage in ARPE-19 cells by activating SIRT1 to promote PINK1/Parkin-mediated mitophagy.

[Key words] Diabetic retinopathy; Acteoside; Mitophagy; PINK1/Parkin; SIRT1

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82360211, 82360210, 82360206); Major Science and Technology Special Project of Yunnan Provincial Department of Science and Technology (202302AA310026); Special Project for Selection of High-level Scientific and Technological Talents and Innovation Teams in Yunnan Province-Training Object Project for Technological Innovation Talents (202405AD350028); Yunnan "Xingdian Talents" Support Program for Medical and Health Talents (RLMY20250011); Yunnan Provincial Leader in Medical Disciplines (D-2024051)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20260330-00144

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病常见且重要的致盲性微血管并发症之一,随着糖尿病患者人数持续增加,其疾病负担不断上升^[1-3]。目前临床多以控制代谢、抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)治疗、激光光凝以及玻璃体切割术为主要干预手段,但普遍存在疗效有限、患者依从性差等问题^[4],仍需明确DR的关键病理机制并开发针对性的药物。早期研究提示,线粒体功能障碍是DR发生和发展的关键早期机制之一^[5]。此外,线粒体功能障碍可增加DR发生风险^[6]。因此,明确线粒体功能障碍在DR中的作用机制至关重要。

阿克苷是云南苦丁茶的主要活性成分,具有抗炎、抗氧化及神经保护等功效^[7],其在代谢性疾病、神经系统疾病及肿瘤等领域的治疗作用已被广泛报道^[8]。本课题组前期研究发现,阿克苷能减轻链脲佐

菌素诱导的DR小鼠视网膜损伤,并通过抗氧化作用抑制高糖环境下的视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞损伤,揭示了阿克苷在DR中的治疗作用^[9]。此外,在神经系统中,阿克苷可通过激活NRF2促进线粒体自噬从而抑制铁死亡,改善帕金森病多巴胺能神经元损伤^[10]。然而,阿克苷能否通过调控线粒体功能障碍缓解DR,目前尚无报道。

PINK1/Parkin是维持细胞线粒体稳态的关键信号通路,该通路受损可导致损伤线粒体堆积及过量活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成,并诱导细胞损伤^[11]。研究显示,高糖诱导可促进ROS生成,并通过抑制PINK1/Parkin通路阻碍线粒体自噬,进而加剧RPE细胞损伤,而过表达PINK1/Parkin可减弱这一损伤效应,揭示了激活该通路具有治疗DR的作用^[12]。此外,在代谢功能障碍相关脂肪性肝病的研究中,阿



克昔可激活 PINK1/Parkin 以恢复线粒体自噬稳态,改善大鼠脂代谢失衡^[13],但其调控 PINK1/Parkin 的上游分子机制尚不清楚。沉默信息调节因子(sirtuin 1, SIRT1)是一种 NAD⁺依赖性去乙酰化酶,被认为是 PINK1/Parkin 通路的重要调控因子,已有研究表明过表达 SIRT1 可促进 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬^[14]。此外,高糖诱发的氧化应激是 RPE 细胞功能障碍和死亡的重要原因,而 RPE 细胞在维持正常视功能方面至关重要。ARPE-19 细胞经诱导分化后可表达 RPE 特异性标志物,因此,其被广泛用于构建 DR 体外细胞模型^[15]。基于上述研究背景,本研究以 ARPE-19 细胞为研究载体,探讨阿克昔能否通过激活 SIRT1 促进 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬,从而缓解 DR 相关线粒体功能障碍,为其在 DR 中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源及培养 ARPE-19 细胞系购于中国科学院细胞库。使用 ARPE-19 细胞完全培养基,于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中进行培养。待细胞生长至对数生长期且细胞融合度达 80% 时,进行后续实验。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM 细胞完全培养基(C6088C)、胰蛋白酶(C0205)、Triton X-100(ST1723)、BCA 蛋白定量试剂盒(P0011)、JC-1 染色试剂盒(C2003S)、线粒体超氧化物试剂盒(S0061S)、ECL 化学发光试剂盒(P0018S)(上海碧云天生物技术有限公司);DAPI(ID22502,北京索莱宝科技有限公司);细胞计数试剂盒 8(cell counting kit-8, CCK-8)(96992,美国 Sigma-Aldrich 公司);三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)水平测定试剂盒(A095-1-1,南京建成生物工程研究所);阿克昔(HY-N0021)、Mito-TEMPO(HY-112879)、BafA1(HY-100558)、EX-527(HY-15452)(美国 MedChemExpress 公司);编码人源 mRFP-GFP-LC3-嘌呤霉素抗性基因的慢病毒(上海吉玛制药技术有限公司);PINK1 抗体(PA1-16604)、Parkin 抗体(702785)(美国 Invitrogen 公司);LC3B 抗体(ab192890)、p62 抗体(ab109012)、β-actin 抗体(ab6276)(英国 Abcam 公司);SIRT1 抗体(sc-135792,美国 Santa Cruz Biotechnology 公司);山羊抗兔 IgG(H+L)抗体、山羊抗鼠 IgG(H+L)(31460/31430,美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。荧光显微镜(德国 Leica 公司);低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司);凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司);细胞培养箱、酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞分组及处理 取处于对数生长期的 ARPE-19 细胞,将其分为正常对照组、甘露醇组和高糖组,分别使用 5.5 mmol/L 葡萄糖、5.5 mmol/L 葡萄糖+27.5 mmol/L 甘露醇和 33 mmol/L 葡萄糖培养 48 h。为明确线粒体 ROS 在高糖诱导细胞损伤中的作用,在高糖处理 ARPE-19 细胞前,先用 100 μmol/L 线粒体靶向 ROS 清除剂 Mito-TEMPO 预处理 1 h^[16]。为探究阿克昔对高糖诱导的细胞氧化应激与线粒体功能障碍的影响,使用 40 μmol/L 阿克昔预处理 ARPE-19 细胞 6 h^[9],再进行高糖处理。为明确阿克昔对高糖诱导的 ARPE-19 细胞自噬通量的影响,在阿克昔与高糖培养基处理细胞后,使用 75 nmol/L 自噬抑制剂 BafA1^[17]继续培养 4 h。此外,为明确阿克昔是否通过激活 SIRT1 驱动 PINK1/Parkin 调控的线粒体自噬,细胞先使用含 10 μmol/L SIRT1 抑制剂 EX-527^[18]的正常糖培养基预处理 24 h,随后再进行高糖诱导及阿克昔干预。对于 siRNA 转染,使用 Lipofectamine 3000 试剂将阴性对照 si-NC 或 si-SIRT1 转染到 ARPE-19 细胞中。

1.2.2 CCK-8 法检测各组细胞活力值 取 ARPE-19 细胞悬液,以每孔 100 μl、5×10³ 个/孔接种于 96 孔板,在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。待细胞完成分组干预后,每孔加入 CCK-8 溶液 10 μl,避光孵育 2 h,采用酶标仪测定 450 nm 处吸光度值。

1.2.3 ATP 水平测定试剂盒测定 ATP 含量 收集各组细胞,离心半径约 8.7 cm,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,向沉淀细胞中加入 300 μl 冷双蒸水,置于冰水浴中匀浆破碎,将细胞匀浆液于沸水浴中加热 10 min,取出涡旋 1 min,参照试剂盒说明书操作表,依次加入各工作液反应,采用酶标仪测定 636 nm 处吸光度值,计算各组 ATP 含量。

1.2.4 JC-1 染色检测各组线粒体膜电位 待细胞完成分组干预后,吸除 24 孔板中细胞培养液,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤细胞。加入 1 ml 细胞培养基及 1 ml JC-1 染色工作液,充分混匀后继续培养 20 min。孵育结束后吸除上清,使用 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次,加入 2 ml 细胞培养基,于荧光显微镜下观察并分析。采用 ImageJ 软件分析图像荧光强度,以红色荧光(JC-1 聚集体)/绿色荧光(JC-1 单体)的荧光强度比值反映线粒体膜电位水平。

1.2.5 MitoSOX Red 染色检测线粒体 ROS 含量 待细胞完成分组干预后,参照试剂盒说明书,吸除 6 孔板中细胞培养液, PBS 洗涤后,加入 1 ml MitoSOXTM Red 染色工作液,在细胞培养箱中 37℃ 孵育 30 min,弃上清,

PBS洗涤后于荧光显微镜下观察并拍照。使用ImageJ软件定量分析各组荧光强度。以正常对照组荧光强度为基准,对检测结果进行标准化校正。

1.2.6 mRFP-GFP-LC3 双荧光标记检测自噬通量 将细胞以 1×10^5 个/孔接种于24孔板,培养24 h后更换为含慢病毒的培养基(滴度 1×10^8 TU/ml,感染复数=3)孵育6 h。转染72 h后利用嘌呤霉素筛选稳定阳性细胞株,待细胞完成分组干预后使用激光共聚焦显微镜观察并拍照。其中,GFP与mRFP共定位的黄色荧光斑点代表自噬体,仅mRFP单独显色的红色荧光斑点代表自噬溶酶体。采用ImageJ软件分析GFP/mRFP的荧光强度比值来评估自噬通量。

1.2.7 Western blot法检测各组各蛋白表达量 收集各组ARPE-19细胞并提取总蛋白,采用BCA试剂盒测定蛋白浓度,等量蛋白样品经SDS-PAGE电泳分离后转印至PVDF膜,封闭液室温封闭。将膜分别浸入PINK1(1:500)、Parkin(1:1000)、LC3B(1:2000)、p62(1:1000)、SIRT1(1:1000)、 β -actin(1:5000)一抗稀释液,4℃孵育过夜。洗膜后加入对应二抗稀释液(1:4000),室温下孵育1 h;漂洗后滴加ECL化学发光试剂进行显影,采用ImageJ软件分析蛋白条带灰度值,以 β -actin为内参,计算各目的蛋白相对表达量。

1.3 统计学方法

采用GraphPad Prism 10.0软件进行统计分析。计量资料经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Tukey检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞活力值、ATP含量、线粒体功能相关指标和自噬相关蛋白表达量比较

正常对照组、甘露醇组和高糖组细胞活力值、ATP含量、线粒体膜电位和ROS含量总体比较差异均有统计学意义($F=310.80, 548.90, 41.53, 364.70$, 均 $P < 0.001$),其中高糖组细胞活力值、ATP含量、线粒体膜电位均明显低于正常对照组和甘露醇组,线粒体ROS含量明显高于正常对照组和甘露醇组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图1,表1)。

各组PINK1、Parkin、LC3 II/I、p62蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义($F=51.46, 32.74, 42.81, 29.10$,

均 $P < 0.001$),其中高糖组PINK1、Parkin蛋白相对表达量均明显低于正常对照组和甘露醇组,LC3 II/I、p62蛋白相对表达量均明显高于正常对照组和甘露醇组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图2,表2)。

2.2 抑制线粒体ROS后各组细胞活力值和ATP含量比较

正常对照组、高糖组和高糖+Mito-TEMPO组细胞活力值分别为 $(99.97 \pm 5.30)\%$ 、 $(51.51 \pm 4.09)\%$ 、 $(78.91 \pm 4.69)\%$,ATP含量分别为 (222.30 ± 8.56) 、 $(61.52 \pm$

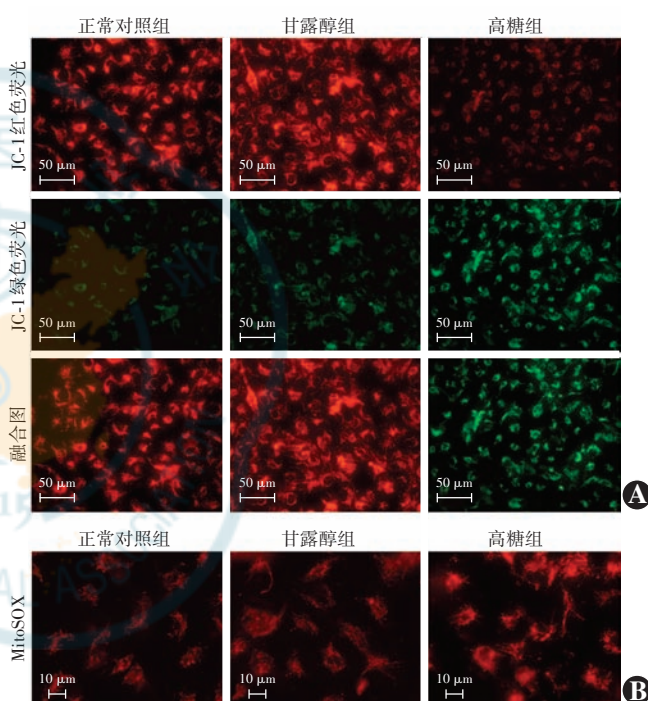


图1 各组JC-1和MitoSOX染色图 A:JC-1染色图($\times 400$,标尺=50 μm) B:MitoSOX染色图($\times 1000$,标尺=10 μm)

Figure 1 JC-1 and MitoSOX staining images of each group A: JC-1 staining image ($\times 400$, scale bar=50 μm) B: MitoSOX staining image ($\times 1000$, scale bar=10 μm)

表1 各组细胞活力值、ATP含量、线粒体功能比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of cell viability, ATP content and mitochondrial function among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	细胞活力值(%)	ATP含量($\mu\text{mol/g prot}$)	线粒体膜电位	线粒体ROS含量
正常对照组	3	100.00 $\pm$ 5.59	220.70 $\pm$ 13.92	4.24 $\pm$ 0.74	1.00 $\pm$ 0.13
甘露醇组	3	100.40 $\pm$ 4.49	225.70 $\pm$ 13.75	4.51 $\pm$ 0.82	1.10 $\pm$ 0.19
高糖组	3	53.50 $\pm$ 3.44 ^{ab}	59.72 $\pm$ 7.46 ^{ab}	0.27 $\pm$ 0.07 ^{ab}	4.50 $\pm$ 0.21 ^{ab}
F值		310.80	548.90	41.53	364.70
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与甘露醇组比较,^b $P < 0.05$ (单因素方差分析,Tukey检验) ATP:三磷酸腺苷;ROS:活性氧

Note: Compared with the normal control group, ^a $P < 0.05$; compared with the mannitol group, ^b $P < 0.05$ (One-way ANOVA, Tukey test) ATP: adenosine triphosphate; ROS: reactive oxygen species

5.56)、(139.00±9.58)μmol/g prot, 总体比较差异均有统计学意义($F=238.60$ 、 890.20 , 均 $P<0.001$), 其中高糖组细胞活力值和ATP含量均明显低于正常对照组和高糖+Mito-TEMPO组, 差异均有统计学意义(均 $P<0.001$)(图3)。

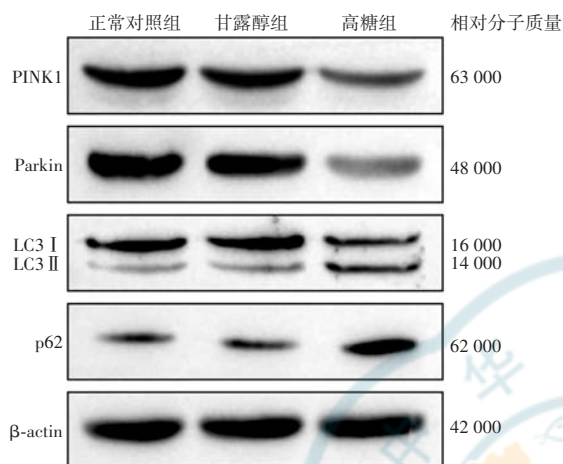


图2 各组自噬相关蛋白表达电泳图

Figure 2 Electrophoretogram of autophagy-related protein expression in each group

表2 各组自噬相关蛋白相对表达量比较($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of relative expression levels of autophagy-related proteins among different groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	PINK1蛋白	Parkin蛋白	LC3 II / I 蛋白	p62蛋白
正常对照组	3	0.71±0.04	1.00±0.06	0.46±0.06	0.54±0.04
甘露醇组	3	0.66±0.07	0.88±0.10	0.52±0.11	0.55±0.07
高糖组	3	0.31±0.04 ^{ab}	0.43±0.10 ^{ab}	1.05±0.08 ^{ab}	0.82±0.04 ^{ab}
F值		51.46	32.74	42.81	29.10
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与甘露醇组比较,^b $P<0.05$ (单因素方差分析,Tukey检验)

Note: Compared with the normal control group, ^a $P<0.05$; compared with the mannitol group, ^b $P<0.05$ (One-way ANOVA, Tukey test)

2.3 阿克昔处理后各组细胞活力值、ATP含量、线粒体功能相关指标比较

正常对照组、高糖组、高糖+阿克昔组细胞活力值、ATP含量、线粒体膜电位和ROS含量总体比较差异均有统计学意义($F=273.60$ 、 385.50 、 45.16 、 74.47 , 均 $P<0.001$), 其中高糖组细胞活力值、ATP含量、线粒体膜电位均明显低于正常对照组和高糖+阿克昔组, 线粒体ROS含量明显高于正常对照组和高糖+阿克昔组, 差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)(图4, 表3)。

2.4 自噬抑制剂处理后各组自噬相关蛋白和自噬通量比较

正常对照组、高糖组、高糖+阿克昔组、高糖+阿克昔+BafA1组PINK1、Parkin、LC3 II / I、p62蛋白相对表

达量总体比较差异均有统计学意义($F=17.56$ 、 27.02 、 114.10 、 32.54 , 均 $P<0.001$), 其中高糖组PINK1、Parkin蛋白相对表达量均低于正常对照组和高糖+阿克昔

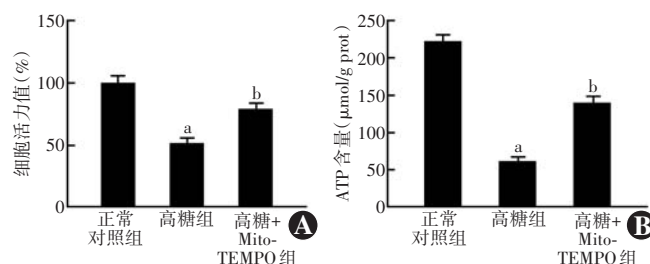


图3 抑制线粒体ROS后各组细胞活力值和ATP含量比较 A: 各组细胞活力值比较 $F=238.60$, $P<0.001$. 与正常对照组比较, ^a $P<0.001$; 与高糖组比较, ^b $P<0.001$ (单因素方差分析, Tukey 检验; $n=3$) B: 各组ATP含量比较 $F=890.20$, $P<0.001$. 与正常对照组比较, ^a $P<0.001$; 与高糖组比较, ^b $P<0.001$ (单因素方差分析, Tukey 检验; $n=3$) ROS: 活性氧; ATP: 三磷酸腺苷

Figure 3 Comparison of cell viability and ATP content among different groups after inhibiting mitochondrial ROS A: Comparison of cell viability $F=238.60$, $P<0.001$. Compared with the normal control group, ^a $P<0.001$; compared with the high-glucose group, ^b $P<0.001$ (One-way ANOVA, Tukey test; $n=3$) B: Comparison of ATP content $F=890.20$, $P<0.001$. Compared with the normal control group, ^a $P<0.001$; compared with the high-glucose group, ^b $P<0.001$ (One-way ANOVA, Tukey test; $n=3$) ROS: reactive oxygen species; ATP: adenosine triphosphate

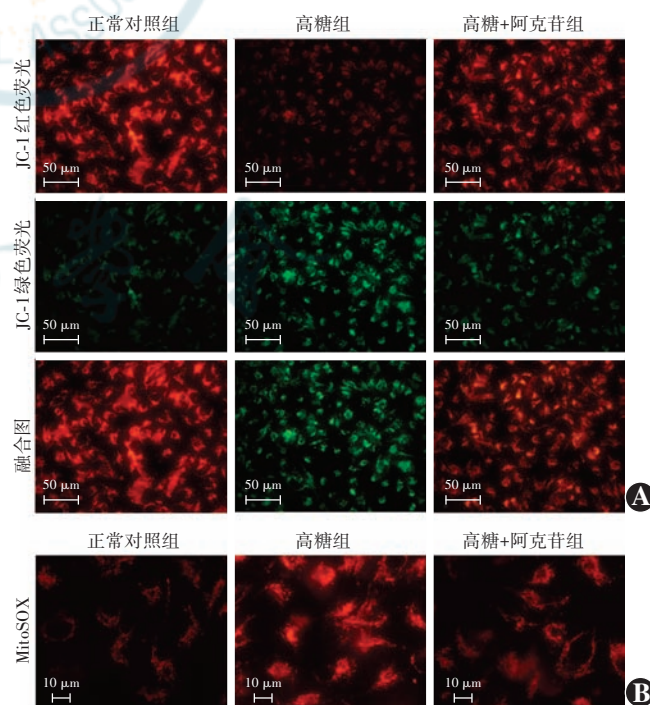


图4 阿克昔处理后各组JC-1和MitoSOX染色图 A: JC-1染色图($\times 400$, 标尺=50 μm) B: MitoSOX染色图($\times 1\,000$, 标尺=10 μm)

Figure 4 JC-1 and MitoSOX staining images of each group after acteoside treatment A: JC-1 staining image ($\times 400$, scale bar=50 μm) B: MitoSOX staining image ($\times 1\,000$, scale bar=10 μm)



表3 阿克苷处理后各组细胞活力值、ATP含量和线粒体功能比较($\bar{x}\pm s$)Table 3 Comparison of cell viability, ATP content, and mitochondrial function among different groups after acteoside treatment ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	细胞活力值(%)	ATP含量($\mu\text{mol/g prot}$)	线粒体膜电位	线粒体ROS含量
正常对照组	3	100.00 $\pm$ 5.65	223.20 $\pm$ 16.71	4.11 $\pm$ 0.78	1.00 $\pm$ 0.12
高糖组	3	49.81 $\pm$ 4.61 ^a	61.15 $\pm$ 8.10 ^a	0.30 $\pm$ 0.11 ^a	3.88 $\pm$ 0.44 ^a
高糖+阿克苷组	3	81.03 $\pm$ 3.19 ^b	156.90 $\pm$ 10.97 ^b	1.53 $\pm$ 0.35 ^b	1.62 $\pm$ 0.27 ^b
F值		273.60	385.50	45.16	74.47
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与高糖组比较,^b $P<0.05$ (单因素方差分析,Tukey检验)
ATP:三磷酸腺苷;ROS:活性氧

Note: Compared with the normal control group, ^a $P<0.05$; compared with the high-glucose group, ^b $P<0.05$ (One-way ANOVA, Tukey test) ATP: adenosine triphosphate; ROS: reactive oxygen species

组,高糖组 LC3 II/I、p62 蛋白相对表达量高于正常对照组,高糖+阿克苷组 LC3 II/I 蛋白相对表达量高于高糖组,低于高糖+阿克苷+BafA1 组,高糖+阿克苷组 p62 蛋白相对表达量低于高糖组和高糖+阿克苷+BafA1 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)(图 5,表 4)。正常对照组、高糖组、高糖+阿克苷组、高糖+阿克苷+BafA1 组 GFP/mRFP 荧光强度分别为 0.22 ± 0.10 、 0.72 ± 0.04 、 0.43 ± 0.06 、 0.61 ± 0.04 ,总体比较差异有统计学意义($F=33.68$, $P<0.001$),其中高糖组 GFP/mRFP 荧光强度高于正常对照组和高糖+阿克苷组,高糖+阿克苷+BafA1 组 GFP/mRFP 荧光强度高于高糖+阿克苷组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)(图 6)。

2.5 SIRT1 抑制剂处理后各组细胞活力值、ATP 含量、线粒体功能相关指标和自噬相关蛋白及 SIRT1 蛋白表达量比较

正常对照组、高糖组、高糖+阿克苷组、高糖+阿克苷+EX-527 组细胞活力值、ATP 含量、线粒体膜电位和 ROS 含量总体比较差异均有统计学意义($F=206.00$ 、 560.50 、 146.20 、 79.35 , 均 $P<0.001$),其中高糖+阿克苷+

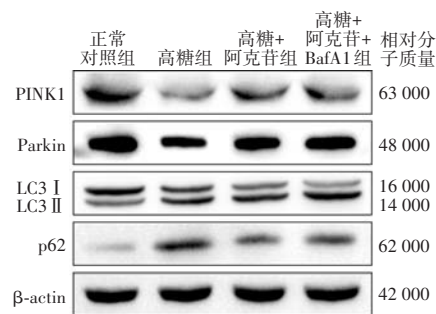


图5 自噬抑制剂处理后各组自噬相关蛋白表达电泳图

Figure 5 Electrophoretogram of autophagy-related protein expression in each group after treatment with autophagy inhibitors

表4 自噬抑制剂处理后各组自噬相关蛋白相对表达量比较($\bar{x}\pm s$)Table 4 Comparison of relative expression levels of autophagy-related proteins among different groups after treatment with autophagy inhibitors ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	PINK1 蛋白	Parkin 蛋白	LC3 II/I 蛋白	p62 蛋白
正常对照组	3	0.86 $\pm$ 0.03	1.23 $\pm$ 0.08	0.80 $\pm$ 0.09	0.33 $\pm$ 0.06
高糖组	3	0.34 $\pm$ 0.08 ^a	0.73 $\pm$ 0.07 ^a	1.16 $\pm$ 0.05 ^a	0.85 $\pm$ 0.10 ^a
高糖+阿克苷组	3	0.61 $\pm$ 0.12 ^b	0.94 $\pm$ 0.05 ^b	1.46 $\pm$ 0.10 ^b	0.43 $\pm$ 0.03 ^b
高糖+阿克苷+BafA1 组	3	0.56 $\pm$ 0.09	0.98 $\pm$ 0.07	2.46 $\pm$ 0.18 ^c	0.59 $\pm$ 0.07 ^c
F值		17.56	27.02	114.10	32.54
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与高糖组比较,^b $P<0.05$;与高糖+阿克苷组比较,^c $P<0.05$ (单因素方差分析,Tukey检验)

Note: Compared with the normal control group, ^a $P<0.05$; compared with the high-glucose group, ^b $P<0.05$; compared with the high-glucose+acteoside group, ^c $P<0.05$ (One-way ANOVA, Tukey test)

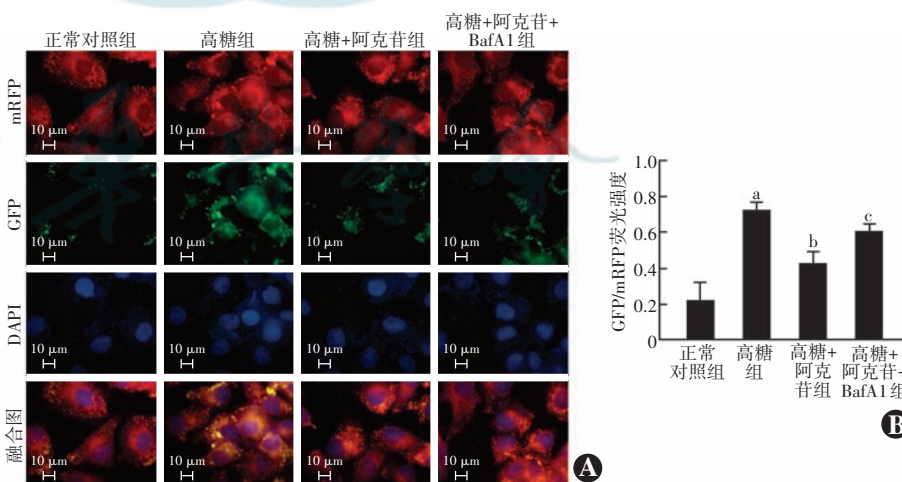


图6 自噬抑制剂处理后各组自噬通量比较 A:各组 mRFP-GFP-LC3 双荧光染色图(mRFP-GFP $\times 1\,000$, 标尺=10 μm) B:各组 GFP/mRFP 荧光强度比较 $F=33.68$, $P<0.001$ 。与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与高糖组比较,^b $P<0.05$;与高糖+阿克苷组比较,^c $P<0.05$ (单因素方差分析,Tukey 检验; $n=3$)

Figure 6 Comparison of autophagy flux among different groups after treatment with autophagy inhibitors A: mRFP-GFP-LC3 dual fluorescence staining images of each group (mRFP-GFP $\times 1\,000$, scale bar=10 μm) B: Comparison of GFP/mRFP fluorescence intensity among different groups $F=33.68$, $P<0.001$. Compared with the normal control group, ^a $P<0.05$; compared with the high-glucose group, ^b $P<0.05$; compared with the high-glucose+acteoside group, ^c $P<0.05$ (One-way ANOVA, Tukey test; $n=3$)

EX-527 组细胞活力值、ATP 含量、线粒体膜电位均低于高糖+阿克苷组,线粒体 ROS 含量高于高糖+阿克苷组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 7,表 5)。

各组 SIRT1、PINK1、Parkin、LC3 II / I、p62 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义($F=26.65, 13.92, 18.49, 80.02, 28.92$, 均 $P < 0.01$),其中高糖+阿克苷+EX-527 组 SIRT1、PINK1、Parkin、LC3 II / I 蛋白相对表达量低于高糖+阿克苷组, p62 蛋白相对表达量高于高糖+阿克苷组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 8,表 6)。

2.6 si-SIRT1 转染后各组细胞活力值、ATP 含量、线粒体功能相关指标和自噬相关蛋白及 SIRT1 蛋白表达量比较

正常对照组、高糖组、高糖+阿克苷组、高糖+阿克苷+si-SIRT1 转染组细胞活力值、ATP 含量、线粒体膜电位和 ROS 含量总体比较差异均有统计学意义($F=208.10, 272.30, 173.60, 29.60$, 均 $P < 0.001$),其中高糖+阿克苷+si-SIRT1 转染组细胞活力值、ATP 含量、线粒体膜电位均低于高糖+阿克苷组,线粒体 ROS 含量高于高糖+阿克苷组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 9,表 7)。

各组 SIRT1、PINK1、Parkin、LC3 II / I、p62 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义($F=115.00, 56.67, 40.42, 64.82, 71.25$, 均 $P < 0.001$),其中高糖+阿克苷+si-SIRT1 转染组 SIRT1、PINK1、Parkin、LC3 II / I 蛋白相对表达量均低于高糖+阿克苷组, p62 蛋白相对表达量高于高糖+阿克苷组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 10,表 8)。

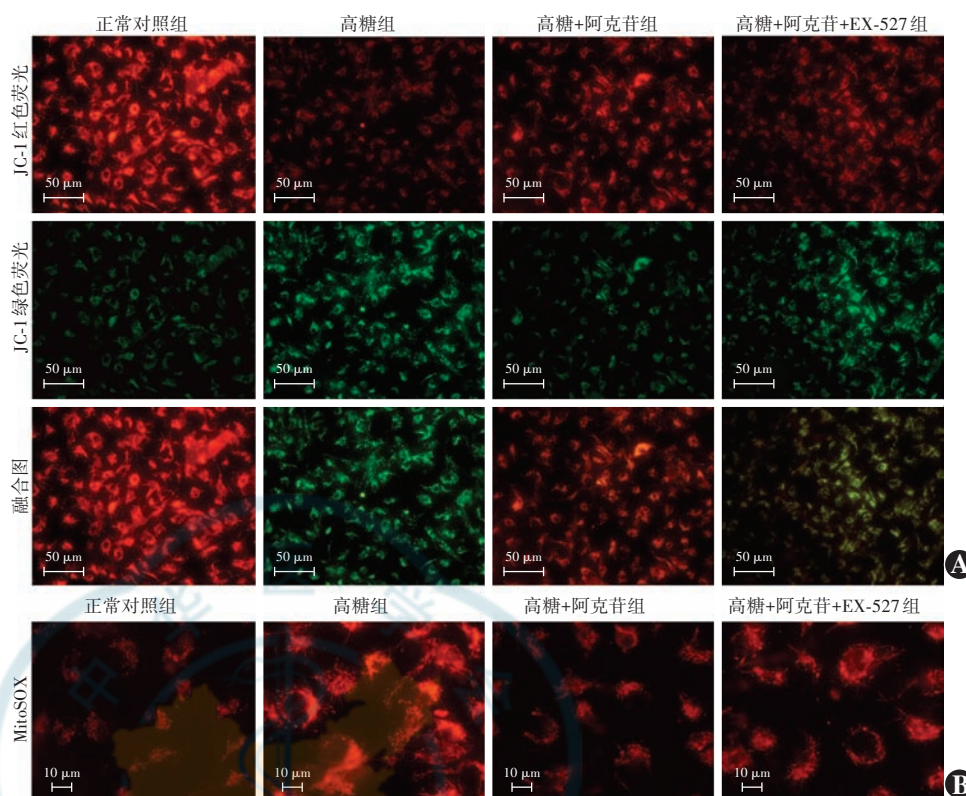


图 7 SIRT1 抑制剂处理后各组 JC-1 和 MitoSOX 染色图 A: JC-1 染色图($\times 400$, 标尺=50 μm) B: MitoSOX 染色图($\times 1000$, 标尺=10 μm) SIRT1: 沉默信息调节因子

Figure 7 JC-1 and MitoSOX staining images of different groups after SIRT1 inhibitor treatment A: JC-1 staining image ($\times 400$, scale bar=50 μm) B: MitoSOX staining image ($\times 1000$, scale bar=10 μm) SIRT1: sirtuin 1

表 5 SIRT1 抑制剂处理后各组细胞活力值、ATP 含量和线粒体功能比较($\bar{x} \pm s$)
Table 5 Comparison of cell viability, ATP content, and mitochondrial function among different groups after treatment with SIRT1 inhibitors ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	细胞活力值(%)	ATP 含量($\mu\text{mol/g prot}$)	线粒体膜电位	线粒体 ROS 含量
正常对照组	3	100.00 $\pm$ 5.86	219.70 $\pm$ 9.02	3.70 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.34
高糖组	3	50.52 $\pm$ 4.77 ^a	60.27 $\pm$ 8.80 ^a	0.29 $\pm$ 0.04 ^a	6.41 $\pm$ 0.54 ^a
高糖+阿克苷组	3	81.97 $\pm$ 3.26 ^b	152.80 $\pm$ 10.52 ^b	1.90 $\pm$ 0.38 ^b	2.60 $\pm$ 0.43 ^b
高糖+阿克苷+EX-527 组	3	64.75 $\pm$ 3.52 ^c	90.13 $\pm$ 7.21 ^c	0.80 $\pm$ 0.17 ^c	4.51 $\pm$ 0.48 ^c
F 值		206.00	560.50	146.20	79.35
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与高糖组比较,^b $P < 0.05$;与高糖+阿克苷组比较,^c $P < 0.05$ (单因素方差分析, Tukey 检验) SIRT1: 沉默信息调节因子; ATP: 三磷酸腺苷; ROS: 活性氧

Note: Compared with the normal control group, ^a $P < 0.05$; compared with the high-glucose group, ^b $P < 0.05$; compared with the high-glucose+acteoside group, ^c $P < 0.05$ (One-way ANOVA, Tukey test) SIRT1: sirtuin 1; ATP: adenosine triphosphate; ROS: reactive oxygen species

3 讨论

DR 发病机制复杂,涉及氧化应激、炎症、微血管损伤等多种病理过程^[19],其中线粒体作为细胞能量代谢及 ROS 生成的主要细胞器,在 DR 高糖微环境中可发生功能紊乱^[20]。Lam 等^[21]在 db/db 糖尿病小鼠模型中发现,其神经视网膜功能下降同时伴随线粒体功能

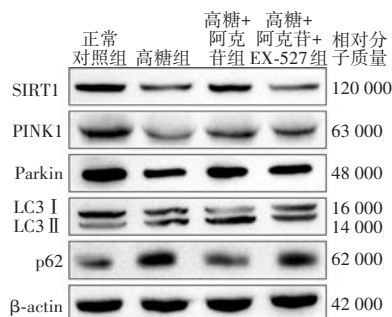


图8 SIRT1抑制剂处理后各组SIRT1蛋白和自噬相关蛋白表达电泳图 SIRT1:沉默信息调节因子

Figure 8 Electrophoretogram of SIRT1 protein and autophagy-related protein expression in each group after SIRT1 inhibitor treatment

SIRT1: sirtuin 1

表6 SIRT1抑制剂处理后各组SIRT1蛋白和自噬相关蛋白相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)
Table 6 Comparison of relative expression levels of SIRT1 protein and autophagy-related proteins among different groups after treatment with SIRT1 inhibitors ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	SIRT1 蛋白	PINK1 蛋白	Parkin 蛋白	LC3 II / I 蛋白	p62 蛋白
正常对照组	3	0.90±0.12	0.92±0.17	1.19±0.10	0.64±0.08	0.28±0.08
高糖组	3	0.43±0.09 ^a	0.45±0.01 ^a	0.66±0.09 ^a	1.04±0.06 ^a	0.88±0.13 ^a
高糖+阿克苷组	3	0.66±0.08 ^b	0.71±0.08 ^b	0.96±0.13 ^b	1.71±0.12 ^b	0.49±0.03 ^b
高糖+阿克苷+EX-527组	3	0.32±0.04 ^c	0.53±0.05 ^c	0.72±0.04 ^c	1.16±0.06 ^c	0.71±0.05 ^c
F 值		26.65	13.92	18.49	80.02	28.92
P 值		<0.001	0.0015	<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与高糖组比较,^b $P<0.05$;与高糖+阿克苷组比较,^c $P<0.05$ (单因素方差分析,Tukey 检验) SIRT1:沉默信息调节因子

Note: Compared with the normal control group, ^a $P<0.05$; compared with the high-glucose group, ^b $P<0.05$; compared with the high-glucose+acteoside group, ^c $P<0.05$ (One-way ANOVA, Tukey test)

SIRT1: sirtuin 1

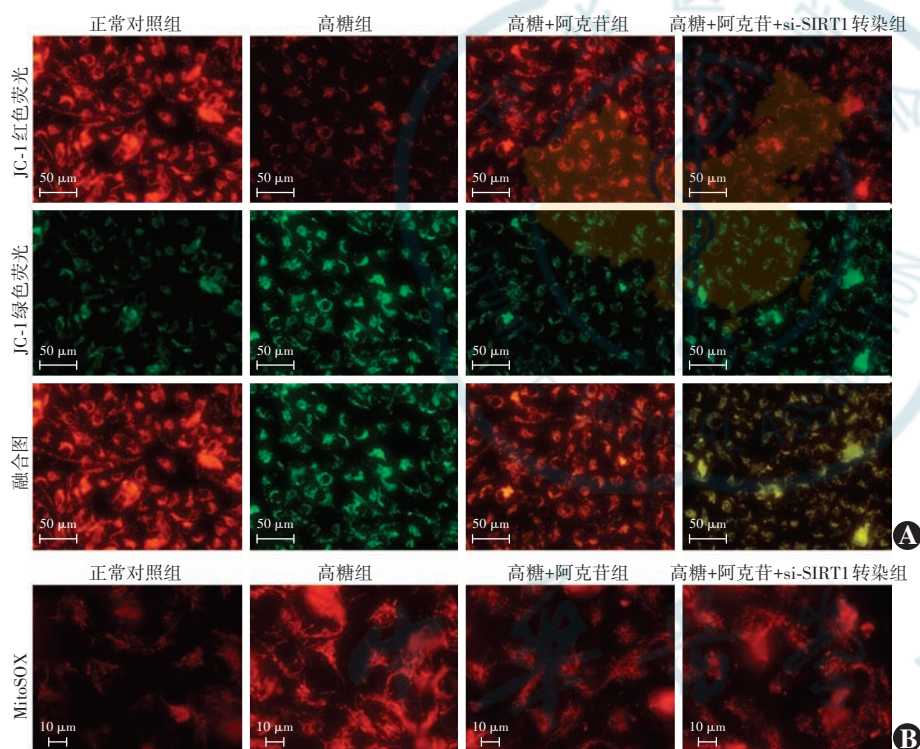


图9 si-SIRT1转染后各组JC-1和MitoSOX染色图 A:JC-1染色图($\times 400$,标尺=50 μm) B: MitoSOX染色图($\times 1000$,标尺=10 μm) SIRT1:沉默信息调节因子

Figure 9 JC-1 and MitoSOX staining images of different groups after si-SIRT1 transfection
A: JC-1 staining image ($\times 400$, scale bar=50 μm) B: MitoSOX staining image ($\times 1000$, scale bar=10 μm) SIRT1: sirtuin 1

减弱,且这些退变先于血管病变,提示线粒体功能障碍可能是DR发生的早期驱动因素。高糖诱导的ARPE-19细胞线粒体功能障碍还可通过触发铁死亡加剧细胞损伤^[22]。既往研究揭示了线粒体功能障碍在DR发病机制中的重要作用,本研究进一步证明高糖诱导可显著降低ATP生成和线粒体膜电位,促进线粒体ROS积累,同时PINK1和Parkin表达下调,LC3-II/I比值及p62水平升高,提示线粒体自噬受损

并伴随自噬通量障碍。线粒体ROS清除剂Mito-TEMPO能够部分逆转上述损伤,表明氧化应激在高糖诱导的线粒体功能障碍中发挥关键作用。

研究表明,阿克苷在多种眼部疾病中具有治疗作用。如在青光眼模型中,阿克苷可抑制视网膜神经节细胞自噬性凋亡,缓解青光眼导致的视神经萎缩^[23-24]。此外,Xi等^[25]研究发现,阿克苷可通过抑制Müller细胞的反应性增殖缓解DR病变。本课题组前期亦证实,阿克苷可通过调控NRF2通路减轻高糖诱导的RPE细胞氧化应激损伤^[9]。本研究进一步证实阿克苷可以减轻线粒体损伤。与以往研究不同,本研究聚焦于阿克苷的潜在作用靶点PINK1/Parkin通路,深入探讨阿克苷对ARPE-19细胞的保护作用。

PINK1/Parkin通路是线粒体质量控制的核心机制,在调控ROS稳态、ATP生成及线粒体动力学等方面发挥重要作用^[11]。高糖条件下RPE细胞中PINK1/Parkin通路明显受抑,同时伴随线粒体自噬功能减弱,而激活该通路可通过增强自噬减轻细胞凋亡^[26]。因此,D'Amico等^[27]提出,靶向PINK1/Parkin通路可能是DR预防及治疗的新靶点。值得注意的是,在慢性疲劳综合征及代谢性疾病中,阿克苷已被证实可通过上调PINK1/Parkin表达增强线粒体自

表7 si-SIRT1转染后各组细胞活力值、ATP含量和线粒体功能比较($\bar{x}\pm s$)
Table 7 Comparison of cell viability, ATP content, and mitochondrial function among different groups after si-SIRT1 transfection ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	细胞活力值 (%)	ATP 含量 ($\mu\text{mol/g prot}$)	线粒体膜电位	线粒体 ROS 含量
正常对照组	3	100.00 $\pm$ 6.34	224.60 $\pm$ 15.38	3.90 $\pm$ 0.35	1.00 $\pm$ 0.21
高糖组	3	48.88 $\pm$ 4.04 ^a	59.98 $\pm$ 7.74 ^a	0.32 $\pm$ 0.05 ^a	5.73 $\pm$ 1.00 ^a
高糖+阿克昔组	3	81.66 $\pm$ 4.46 ^b	156.20 $\pm$ 14.69 ^b	1.81 $\pm$ 0.24 ^b	2.47 $\pm$ 0.55 ^b
高糖+阿克昔+si-SIRT1转染组	3	64.37 $\pm$ 2.76 ^c	108.00 $\pm$ 11.88 ^c	0.52 $\pm$ 0.05 ^c	3.91 $\pm$ 0.56 ^c
F 值		208.10	272.30	173.60	29.60
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与高糖组比较,^b $P<0.05$;与高糖+阿克昔组比较,^c $P<0.05$ (单因素方差分析,Tukey 检验) SIRT1:沉默信息调节因子;ATP:三磷酸腺苷;ROS:活性氧

Note: Compared with the normal control group, ^a $P<0.05$; compared with the high-glucose group, ^b $P<0.05$; compared with the high-glucose+acteoside group, ^c $P<0.05$ (One-way ANOVA, Tukey test) SIRT1: sirtuin 1; ATP: adenosine triphosphate; ROS: reactive oxygen species

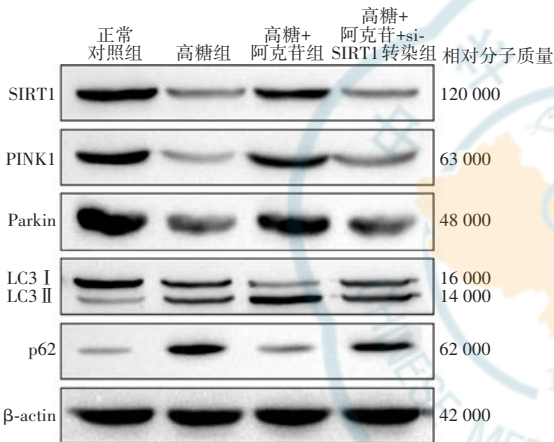


图10 si-SIRT1转染后各组SIRT1蛋白和自噬相关蛋白表达电泳图 SIRT1:沉默信息调节因子

Figure 10 Electrophoretogram of SIRT1 protein and autophagy-related protein expression in each group after si-SIRT1 transfection SIRT1: sirtuin 1

噬从而发挥治疗作用^[13,28]。然而,在高糖诱导的ARPE-19细胞中,阿克昔如何影响PINK1/Parkin进而调控线粒体自噬的机制仍不明确。基于此,本研究进一步探讨阿克昔对高糖诱导ARPE-19细胞线粒体自

噬障碍的影响。结果显示,阿克昔可显著上调PINK1、Parkin表达,降低p62水平,促进线粒体自噬并恢复自噬通量,进一步添加BafA1后减弱了阿克昔的保护作用,提示阿克昔可通过促进PINK1/Parkin介导的线粒体自噬改善高糖诱导的ARPE-19细胞损伤。

SIRT1作为Sirtuin家族核心成员,可通过去乙酰化多种底物蛋白调控细胞代谢、炎症反应及细胞命运等生理过程^[29]。Mishra等^[30]研究表明,SIRT1是DR进展

的保护性因子。青蒿琥酯通过激活SIRT1介导的自噬改善大鼠DR病变^[31]。此外,SIRT1是PINK1/Parkin介导的线粒体自噬的核心上游正向调控因子。例如,人参皂苷Rg1可通过激活SIRT1/PINK1/Parkin轴介导的线粒体自噬,改善心脏重构^[32]。Corbi等^[33]发现,饲喂含阿克昔补充剂饲料的家兔,其心脏和肝脏中SIRT1活性显著高于对照组家兔,提示阿克昔可能通过调控SIRT1通路发挥生物学效应。基于上述分析,本研究推测阿克昔可能通过作用于SIRT1-PINK1/Parkin分子通路,调控ARPE-19细胞的线粒体自噬过程。本研究通过添加SIRT1抑制剂EX-527或敲低SIRT1进行干预,结果显示抑制SIRT1表达可显著削弱阿克昔的保护作用,表现为细胞活力值、ATP含量、线粒体膜电位降低及ROS积累,PINK1/Parkin表达下降,自噬通量受阻,证实了阿克昔通过激活SIRT1介导的PINK1/Parkin通路发挥保护作用。本研究明确了阿克昔在DR治疗中潜在的新型分子机制。

综上所述,本研究表明,阿克昔可通过激活SIRT1信号通路,促进PINK1/Parkin介导的线粒体自噬,从而

缓解高糖诱导的ARPE-19细胞氧化应激与线粒体损伤。然而,本研究仍存在一定局限性。首先,SIRT1激活PINK1/Parkin的具体分子机制未来还需进一步探究。其次,本研究仅基于ARPE-19细胞和高糖模型,而DR是多细胞参与的复杂炎症性与血管紊乱性疾病。因此,未来应纳入其他细胞,如视网膜血管内皮细胞或胶质细胞,

表8 si-SIRT1转染后各组SIRT1蛋白和自噬相关蛋白相对表达量比较($\bar{x}\pm s$)
Table 8 Comparison of the relative expression levels of SIRT1 protein and autophagy-related proteins among different groups after si-SIRT1 transfection ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	SIRT1 蛋白	PINK1 蛋白	Parkin 蛋白	LC3 II / I 蛋白	p62 蛋白
正常对照组	3	1.00 $\pm$ 0.09	0.95 $\pm$ 0.10	1.19 $\pm$ 0.11	0.47 $\pm$ 0.09	0.36 $\pm$ 0.06
高糖组	3	0.41 $\pm$ 0.03 ^a	0.39 $\pm$ 0.05 ^a	0.49 $\pm$ 0.06 ^a	1.07 $\pm$ 0.20 ^a	0.93 $\pm$ 0.05 ^a
高糖+阿克昔组	3	0.77 $\pm$ 0.02 ^b	0.86 $\pm$ 0.04 ^b	1.04 $\pm$ 0.12 ^b	2.02 $\pm$ 0.14 ^b	0.45 $\pm$ 0.05 ^b
高糖+阿克昔+si-SIRT1转染组	3	0.38 $\pm$ 0.02 ^c	0.53 $\pm$ 0.02 ^c	0.52 $\pm$ 0.07 ^c	1.15 $\pm$ 0.08 ^c	0.81 $\pm$ 0.07 ^c
F 值		115.00	56.67	40.42	64.82	71.25
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与高糖组比较,^b $P<0.05$;与高糖+阿克昔组比较,^c $P<0.05$ (单因素方差分析,Tukey 检验) SIRT1:沉默信息调节因子

Note: Compared with the normal control group, ^a $P<0.05$; compared with the high-glucose group, ^b $P<0.05$; compared with the high-glucose+acteoside group, ^c $P<0.05$ (One-way ANOVA, Tukey test) SIRT1: sirtuin 1



进一步探索多细胞参与的复杂病理过程,以更全面地阐明DR的发病机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 谌姝宏:实施研究、采集数据、分析/解释数据、统计分析、起草文章;李燕、马嘉:酝酿和设计实验、对文章的知识性内容作批评性审阅并给予指导;陈前波:分析/解释数据、对文章的知识性内容作批评性审阅并给予指导;席晓婷:酝酿和设计实验、对文章的知识性内容作批评性审阅及定稿

参考文献

- [1] Chen Y, Tang S, Huang Y, et al. Global burden of blindness or visually impairment attributable to diabetic retinopathy in the adults aged 70 years and older, 1990—2021: results from the global burden of disease study in 2021[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2025, 226:112383. DOI: 10.1016/j.diabres.2025.112383.
- [2] Tarasiewicz D, Conell C, Gilliam LK, et al. Quantification of risk factors for diabetic retinopathy progression[J]. *Acta Diabetol*, 2023, 60(3): 363–369. DOI: 10.1007/s00592-022-02007-6.
- [3] Bhatwadekar AD, Shughoury A, Belamkar A, et al. Genetics of diabetic retinopathy, a leading cause of irreversible blindness in the industrialized world[J]. *Genes (Basel)*, 2021, 12(8): 1200. DOI: 10.3390/genes12081200.
- [4] Sadikan MZ, Abdul Nasir NA. Diabetic retinopathy: emerging concepts of current and potential therapy[J]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2023, 396(12): 3395–3406. DOI: 10.1007/s00210-023-02599-y.
- [5] Kowluru RA. Diabetic retinopathy: mitochondrial dysfunction and retinal capillary cell death[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7(11–12): 1581–1587. DOI: 10.1089/ars.2005.7.1581.
- [6] Bek T. Mitochondrial dysfunction and diabetic retinopathy[J]. *Mitochondrion*, 2017, 36:4–6. DOI: 10.1016/j.mito.2016.07.011.
- [7] Xi X, Ma J, Chen Q, et al. Acteoside attenuates hydrogen peroxide-induced injury of retinal ganglion cells via the CASC2/miR-155/mTOR axis[J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(1): 5. DOI: 10.21037/atm-21-5630.
- [8] Zhang FK, Jia KX, Wang H, et al. Acteoside as a rising star for clinical treatment: current fundamental research and future outlooks[J]. *J Integr Med*, 2026, 24(1): 7–23. DOI: 10.1016/j.joim.2025.08.007.
- [9] 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.
- [10] Han Z, Wang B, Wen YQ, et al. Acteoside alleviates lipid peroxidation by enhancing Nrf2-mediated mitophagy to inhibit ferroptosis for neuroprotection in Parkinson's disease[J]. *Free Radic Biol Med*, 2024, 223:493–505. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2024.07.018.
- [11] Narendra DP, Youle RJ. The role of PINK1-Parkin in mitochondrial quality control[J]. *Nat Cell Biol*, 2024, 26(10): 1639–1651. DOI: 10.1038/s41556-024-01513-9.
- [12] Zhang Y, Xi X, Mei Y, et al. High-glucose induces retinal pigment epithelium mitochondrial pathways of apoptosis and inhibits mitophagy by regulating ROS/PINK1/Parkin signal pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 111:1315–1325. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.01.034.
- [13] Cong M, Qi X, Sun H, et al. Acteoside ameliorates hepatic steatosis and liver injury in MASLD mice through activation of PINK1/Parkin-related mitophagy markers[J]. *Nutrients*, 2025, 18(1): 118. DOI: 10.3390/nu18010118.
- [14] Wei X, Xiong X, Wang P, et al. SIRT1-mediated deacetylation of FOXO3 enhances mitophagy and drives hormone resistance in endometrial cancer[J]. *Mol Med*, 2024, 30(1): 147. DOI: 10.1186/s10020-024-00915-7.
- [15] Sukboon P, Phumsuay R, Promkum C, et al. Mulberry extract mitigates glucose-induced oxidative injury in differentiated ARPE-19 cells by enhancing antioxidant defense: implications for diabetic retinopathy [J/OL]. *Food Sci Nutr*, 2025, 13(5): e70180[2026–03–18]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/40330202>. DOI: 10.1002/fsn3.70180.
- [16] Park C, Cha HJ, Kim MY, et al. Phloroglucinol attenuates DNA damage and apoptosis induced by oxidative stress in human retinal pigment epithelium ARPE-19 cells by blocking the production of mitochondrial ROS[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(12): 2353. DOI: 10.3390/antiox11122353.
- [17] Sun Y, Zheng Y, Wang C, et al. Glutathione depletion induces ferroptosis, autophagy, and premature cell senescence in retinal pigment epithelial cells[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(7): 753. DOI: 10.1038/s41419-018-0794-4.
- [18] Chen W, Lin B, Xie S, et al. Naringenin protects RPE cells from NaIO₃-induced oxidative damage *in vivo* and *in vitro* through up-regulation of SIRT1[J]. *Phytomedicine*, 2021, 80:153375. DOI: 10.1016/j.phymed.2020.153375.
- [19] Li H, Liu X, Zhong H, et al. Research progress on the pathogenesis of diabetic retinopathy[J]. *BMC Ophthalmol*, 2023, 23(1): 372. DOI: 10.1186/s12886-023-03118-6.
- [20] Wu Y, Zou H. Research progress on mitochondrial dysfunction in diabetic retinopathy[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(11): 2250. DOI: 10.3390/antiox11112250.
- [21] Lam CH, Zou B, Chan HH, et al. Functional and structural changes in the neuroretina are accompanied by mitochondrial dysfunction in a type 2 diabetic mouse model[J]. *Eye Vis (Lond)*, 2023, 10(1): 37. DOI: 10.1186/s40662-023-00353-2.
- [22] Li Y, Xu W, Zhao G, et al. TRAP1 improves diabetic retinopathy by preserving mitochondrial function[J]. *Clin Ophthalmol*, 2025, 19: 2343–2362. DOI: 10.2147/OPTH.S521660.
- [23] Chen Q, Xi X, Zeng Y, et al. Acteoside inhibits autophagic apoptosis of retinal ganglion cells to rescue glaucoma-induced optic atrophy[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(8): 13133–13140. DOI: 10.1002/jcb.28586.
- [24] Xi X, Chen Q, Ma J, et al. Acteoside protects retinal ganglion cells from experimental glaucoma by activating the PI3K/AKT signaling pathway via caveolin 1 upregulation[J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(6): 312. DOI: 10.21037/atm-22-136.
- [25] Xi X, Liu X, Chen Q, et al. Acteoside relieves diabetic retinopathy through the inhibition of Müller cell reactive hyperplasia by regulating TXNIP and mediating Kir4.1 channels in a PI3K/Akt-dependent manner [J/OL]. *PLoS One*, 2024, 19(12): e0312565[2026–03–22]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/39689088>. DOI: 10.1371/journal.pone.0312565.
- [26] Huang L, Yao T, Chen J, et al. Effect of Sirt3 on retinal pigment epithelial cells in high glucose through Foxo3a/PINK1-Parkin pathway mediated mitophagy[J]. *Exp Eye Res*, 2022, 218:109015. DOI: 10.1016/j.exer.2022.109015.
- [27] D'Amico AG, Maugeri G, Magrì B, et al. Targeting the PINK1/Parkin pathway: a new perspective in the prevention and therapy of diabetic retinopathy[J]. *Exp Eye Res*, 2024, 247: 110024. DOI: 10.1016/j.exer.2024.110024.
- [28] Zhang S, Gong F, Liu J, et al. A novel PHD2 inhibitor acteoside from *Cistanche tubulosa* induces skeletal muscle mitophagy to improve cancer-related fatigue[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 150: 113004. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113004.
- [29] Yang Y, Liu Y, Wang Y, et al. Regulation of SIRT1 and its roles in inflammation[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 831168. DOI: 10.3389/fimmu.2022.831168.
- [30] Mishra M, Duraisamy AJ, Kowluru RA. Sirt1: a guardian of the development of diabetic retinopathy[J]. *Diabetes*, 2018, 67(4): 745–754.



DOI: 10.2337/db17-0996.

[31] Li L, Chen J, Zhou Y, et al. Artesunate alleviates diabetic retinopathy by activating autophagy via the regulation of AMPK/SIRT1 pathway[J]. Arch Physiol Biochem, 2023, 129(4): 943-950. DOI: 10.1080/13813455.2021.1887266.

[32] Guan S, Xin Y, Ding Y, et al. Ginsenoside Rg1 protects against cardiac remodeling in heart failure via SIRT1/PINK1/Parkin-mediated mitophagy[J/OL]. Chem Biodivers, 2023, 20(2): e202200730[2026-03-26]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36639922>. DOI: 10.1002/

cbdv.202200730.

[33] Corbi G, Conti V, Komici K, et al. Phenolic plant extracts induce sirt1 activity and increase antioxidant levels in the rabbit's heart and liver[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 2731289. DOI: 10.1155/2018/2731289.

(收稿日期:2026-03-30 修回日期:2026-07-31)

(本文编辑:施晓萌 骆世平)

· 病例报告 ·

多模态影像评估陈旧性视网膜分支静脉阻塞合并视盘有髓神经纤维 1 例

姚牧笛 刘倩 颜标

上海交通大学医学院附属第一人民医院眼科 眼和视光疾病国家临床医学研究中心,上海 200080

通信作者:颜标,Email:yanbiao@sjtu.edu.cn

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金资助(YG2025ZD04);上海市卫生健康委员会协同创新集群项目(2024CXJQ02)

Multimodal imaging evaluation of long-standing branch retinal vein occlusion combined with myelinated retinal nerve fibers: a case report

Yao Mudi, Liu Qian, Yan Biao

Department of Ophthalmology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, National Clinical Research Center for Eye Diseases, Shanghai 200080, China

Corresponding author: Yan Biao, Email: yanbiao@sjtu.edu.cn

Fund program: Fundamental Research Funds for the Central Universities (YG2025ZD04); Shanghai Municipal Health Commission

Collaborative Innovation Cluster Project (2024CXJQ02)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20260403-00157

患者男,54岁,因左眼脉络膜血管瘤于上海交通大学医学院附属第一人民医院就诊,检查过程中发现右眼眼底病变。既往高血压病史3年,血压控制在140/90 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)。否认糖尿病及其他全身慢性病史,否认眼部手术及外伤史。眼科检查:最佳矫正视力右眼1.0,左眼0.2。眼压右眼16.1 mmHg,左眼15.8 mmHg。双眼前节检查未见明显异常。右眼眼底照相显示:视盘部可见乳白色、羽毛状边缘的高反射病灶,遮盖部分视网膜血管,符合视盘有髓神经纤维(myelinated retinal nerve fibers, MNF)特征;视网膜下方静脉迂曲扩张,可见散在的点片状出血,局部静脉管壁呈现明显的血管鞘化,并伴有迂曲绕行的侧支循环血管形成,提示陈旧性视网膜分支静脉阻塞(branch retinal vein occlusion, BRVO)改变(图1)。右眼多模态影像检查:荧光素眼底血管造影(fundus fluorescence angiography, FFA)静脉期可见MNF引起的遮蔽荧光,视盘周围及视网膜下方血管走行扭曲,下方血管可见大片无灌注区;造影晚期可见明显的强荧光渗漏及异常新生血管膜(neovascular membrane, NVM)形成的团块状高荧光(图2)。光学相干断层扫描血管成像(optical coherence tomography angiography, OCTA)显示视网膜下方浅层血流网中存在异常的新生血管血流信号,并伴有大面积无灌注区,提示BRVO继发视网膜新生血管形成(图3)。光学相干断层扫描(optical coherence tomography, OCT)显示视网膜结构紊乱,结合OCTA同一解剖位点处的异常血流信号,证实突破视网膜内界膜的局限性高反射团块为新生血管,其依附于

局部粘连的玻璃体后界膜支架生长(图4)。诊断:(1)右眼陈旧性BRVO继发视网膜新生血管;(2)右眼视盘有髓神经纤维;(3)左眼脉络膜血管瘤;(4)高血压。针对FFA提示的右眼下方无灌注区行视网膜激光光凝术(光斑直径300 μ m,曝光时间200 ms,功率140 mW)。术后嘱患者控制血压。患者左眼脉络膜血管瘤与右眼病变无明确全身性关联,属偶发共存,已另行给予干预。术后1年复诊,眼底照相可见右眼视网膜下方大范围陈旧性激光斑,排列规整,原新生血管及出血病灶较前吸收,未见新增出血及渗出(图5),提示右眼眼底病情稳定。

讨论:视盘MNF是由于少突胶质细胞异位进入视网膜导致神经纤维髓鞘化而形成的先天性发育异常。该病变通常静止且不影响视力,但当病灶肥厚或合并血管性病变时,则可导致视功能损害^[1]。本病例的特殊之处在于患者同一眼底区域同时存在MNF、陈旧性BRVO及继发的NVM。多模态影像技术(特别是OCT和OCTA)突破了MNF的物理遮蔽,精准评估了其下方隐匿的缺血区域及继发的NVM。本病例提示,MNF可能作为一种解剖学基础,在高血压等系统性危险因素的诱导下,参与了视网膜慢性缺血及其代偿性新生血管形成的复杂病理过程。此外,患者左眼首诊发现的脉络膜血管瘤经评估与右眼病变无明确系统性病因关联,属偶发共存,这也提示在临床诊治中需坚持双眼全面排查的原则。

文献报道多关注MNF所导致的弱视或近视,虽有MNF伴发血管异常的报道,但明确合并静脉阻塞的病例极为罕见^[2-3]。