

# 糖尿病视网膜病变中 Gas6/MerTK/GPX4 信号通路参与铁诱导的细胞死亡的作用研究

邓里, 李灵, 岳江, 刘政群, 银娟萍, 蔡小丽

[长沙市第四医院(湖南师范大学附属长沙医院)眼科, 长沙 410006]

**摘要** 目的 探讨糖尿病视网膜病变(DR)中配体生长停滞特异性蛋白6(Gas6)/Mer酪氨酸激酶(MerTK)信号通路参与铁诱导的细胞死亡的作用。方法 人视网膜色素上皮细胞(ARPE-19)分为对照组、HG组、HG+sh-Gas6组和HG+Gas6组。将细胞暴露于25 mmol/L D-葡萄糖用于模拟体外高血糖(HG)环境。对照组暴露于20 mmol/L甘露醇+5.5 mmol/L葡萄糖环境。将大鼠随机分为正常对照组、DR组、DR+Gas6组,每组20只。通过腹腔内注射STZ溶液建立DR模型。通过细胞计数检测试剂盒-8(CCK-8)评估细胞增殖。通过流式细胞术测量脂质活性氧(ROS)水平,并通过生化测定丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平来评估铁死亡。通过Western blot法分析Gas6、MerTK蛋白表达情况。结果 与HG组相比,HG+Gas6组细胞活力、SOD、GSH-Px水平显著增加( $P < 0.05$ ),脂质-ROS、MDA水平显著降低( $P < 0.05$ );HG+sh-Gas6组细胞活力、SOD、GSH-Px水平显著降低( $P < 0.05$ ),脂质-ROS、MDA水平显著增加( $P < 0.05$ )。此外,HG+Gas6组细胞中谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)蛋白表达较HG组显著增加( $P < 0.05$ ),HG+sh-Gas6组细胞中GPX4蛋白表达较HG组显著减少( $P < 0.05$ )。与对照组相比,DR组大鼠的平均视网膜神经纤维层厚度显著降低( $P < 0.05$ ),DR+Gas6组则较DR组显著增加( $P < 0.05$ )。此外,DR+Gas6组视网膜色素上皮(RPE)组织中MDA、铁水平显著降低( $P < 0.05$ ),GSH水平和Gas6、MerTK、GPX4蛋白表达显著增加( $P < 0.05$ )。结论 HG处理通过抑制Gas6/MerTK信号通路,加速GPX4的清除,诱导ARPE-19细胞的铁死亡和细胞生长抑制。此外,通过上调DR大鼠视网膜组织中Gas6/MerTK信号表达,减轻RPE组织中铁死亡和氧化应激,并有助于恢复视网膜平均视网膜神经纤维层厚度。

**关键词** 糖尿病视网膜病变;配体生长停滞特异性蛋白6;Mer酪氨酸激酶;铁死亡;大鼠

**中图分类号** R 587.2

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2024)10-1777-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.10.012

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是导致失明的主要原因之一<sup>[1]</sup>。视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelium, RPE)位于视网膜神经上皮层和脉络膜布鲁赫膜之间,其功能异常可能导致视力下降甚至失明,特别是在DR的发病机制中<sup>[2]</sup>。近年来,氧化应激被认为是RPE细胞退化和随后视力丧失的关键风险因素<sup>[3]</sup>。研究<sup>[4]</sup>表明,铁死亡在氧化应激下RPE细胞死亡中可能起主要作用。然而,目前关于DR中RPE细胞铁死亡的直接或间接诱导机制仍不清楚。Mer酪氨酸激酶(Mer tyrosine kinase, MerTK)已被证实参与RPE细胞吞噬作用的精细调节<sup>[5]</sup>。研究<sup>[6]</sup>表明,暴露于高糖环境(high-glucose, HG)的RPE细胞中MerTK的表达明显降低,通过加入MerTK的配体生长停滞特异性蛋

白6(growth arrest-specific 6, Gas6)激活MerTK信号,改善了RPE细胞的吞噬功能。研究<sup>[7]</sup>表明氧化应激也是导致MerTK裂解和损害的主要原因。因此,HG诱导的MerTK裂解和损害是否驱动氧化应激所致的PRE细胞铁死亡值得进一步研究。该研究分析了Gas6/MerTK信号通路在HG处理诱导ARPE-19细胞的铁死亡和细胞生长抑制中的作用,并进一步构建DR大鼠模型验证体外发现。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂与仪器** Z-VAD-FMK、3-甲基腺嘌呤(3-MA)和ferrostatin-1(Fer-1)购自美国Sigma-Aldrich公司,pLKO.1、psPAX2、pMD2G质粒购自美国Addgene公司,lipofectamine 2000购自美国Invitrogen公司,pcDNA3.1载体购自美国Life Technology公司,靶向Gas6(sh-Gas6)的慢病毒和Gas6过表达质粒(Gas6)购自上海吉玛制药技术有限公司,丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶

2024-07-03 接收

基金项目:湖南省卫生健康委科研计划项目(编号:D202307026842)

作者简介:邓里,男,副主任医师;

蔡小丽,女,副主任护师,通信作者,E-mail:329317314@

qq.com

(glutathione peroxidase, GSH-Px) 商业试剂盒购自南京建成生物工程研究所有限公司, FerroOrange、C11-BODIPY 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, FAC-SCanto™ II 购自美国 BD Biosciences 公司, 完全裂解缓冲液、GAPDH、Gas6、MerTK、谷胱甘肽过氧化酶 4 (glutathione Peroxidase 4, GPX4)、HRP-conjugated IgG 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司, Bicinchoninic Acid 蛋白质测定试剂盒、12% SDS-PAGE 购自上海 Beyotime Biotechnology 公司, 聚偏二氟乙烯膜、化学发光流体购自美国 Millipore 公司, CCK-8 溶液购自日本 Dojindo Molecular Technologies 公司, 苏木精和伊红染色试剂盒购自美国 BOSTER 公司, 光学显微镜购自日本 Olympus 公司, Phoenix Micron IV 视网膜成像显微镜购自美国 Phoenix 公司。

**1.2 细胞** 人视网膜色素上皮细胞 (adult retinal pigment epithelial cell 19, ARPE-19) 维持在 Dulbecco 氏改良 Eagle 培养基/营养混合物 F-12 中, 该混合物含有 10% 胎牛血清、青霉素 (90 U/ml) 和链霉素 (0.09 mg/ml)。细胞在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 和 95% O<sub>2</sub> 的潮湿环境中生长。

**1.3 细胞培养** 将 ARPE-19 细胞接种到 6 孔板 (2 × 10<sup>5</sup> 个/孔) 中, 并静置 12 h。分别用 10 μmol/L Z-VAD-FMK、5 mmol/L 3-甲基腺嘌呤 (3-MA) 和 5 μmol/L ferrostatin-1 (Fer-1) 培养 ARPE-19 细胞, 然后用 25 mmol/L 葡萄糖 (high glucose, HG) 培养 48 h 用于模拟体外 HG 环境<sup>[8]</sup>。对于对照, 将细胞在浓度为 25 mmol/L 甘露醇 + 5.5 mmol/L 葡萄糖培养。

为了测试 HG 环境对 ARPE-19 细胞中 Gas6/MerTK 蛋白表达的影响, 将细胞暴露于 HG 环境 0、12、24、48 h, 收集细胞用于 Gas6/MerTK 的表达分析。

为了测试 Gas6/MerTK 信号通路 HG 诱导的细胞生长抑制和铁死亡影响, 将细胞分为对照组、HG 组、HG + sh-Gas6 组和 HG + Gas6 组。其中, HG + sh-Gas6 组和 HG + Gas6 组在暴露于 HG 环境前 24 h 分别采用 sh-Gas6 或 Gas6 过表达质粒转染细胞, 然后将细胞暴露于 HG 环境 24 h。

**1.4 慢病毒介导的 RNA 干扰** 将靶向 Gas6 的 RNAi 寡聚体克隆到经 AgeI/EcoRI 消化的 pLKO.1 质粒中。干扰位点为: sh-Gas6 #1 (1689-1707 位), GGAGAGAAGCUUCAAGAATT; sh-Gas6 #2 (位置 2864-2882), CAUGGUUAUAACAUAATT。为了生产慢病毒, 该实验使用 lipofectamine 2000 用 shRNA 构建体加上包装质粒 psPAX2 和 pMD2G 转导 293T 细胞, 然后在 48 ~ 72 h 后收集含有病毒的上清液。

将 Gas6 cDNA 克隆到 pcDNA3.1 载体中, 以构建 Gas6 过表达质粒 (Gas6)。然后使用 lipofectamine 2000 将质粒转导 ARPE-19 细胞。

**1.5 MDA、SOD 和 GSH-Px 的测定** 采用商业试剂盒测定细胞和大鼠 RPE 组织中 MDA、SOD 和 GSH-Px 水平。

**1.6 细胞内脂质过氧化和铁离子检测** 使用 FerroOrange 和 C11-BODIPY 测定法分别检测细胞内总铁离子和脂质活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平。将细胞在含有 10 μmol/L FerroOrange 或 10 μmol/L C11-BODIPY 的培养基中孵育 1 h, 然后通过胰蛋白酶收获并与 PBS 加 1% BSA 混合。通过荧光显微镜拍摄细胞内 FerroOrange 荧光成像。通过 FACSCanto™ II 流式细胞术检测脂质 ROS 水平。

**1.7 Western blot 分析** 对大鼠 RPE 组织或 ARPE-19 细胞进行 Western blot 分析。用完全裂解缓冲液匀浆大鼠视网膜或细胞。裂解物在 4 °C 下以 15 000 r/min 离心 10 min。用 Bicinchoninic Acid 蛋白质测定试剂盒测定蛋白质浓度。将 30 μg 蛋白质加载到凝胶的每个泳道上, 通过 12% SDS-PAGE 分离, 然后转移到聚偏二氟乙烯膜。将膜与不同的第一抗体在 4 °C 孵育过夜, 然后与相应的第二抗体孵育。在暗室中将化学发光流体均匀地滴在膜的表面上, 最后, 使用 Bio-rad ChemiDoc 触摸成像系统观察膜。使用的抗体如下: GAPDH (1 : 10 000)、Gas6 (1 : 1 000)、MerTK (1 : 500)、GPX4 (1 : 1 000)、HRP-conjugated IgG (1 : 8 000)。

**1.8 CCK-8 测定** 将细胞悬浮液加入 96 孔板中, 并在 37 °C 和 5% CO<sub>2</sub> 下孵育。然后加入 10 μl CCK-8 溶液。继续孵育 4 h 后, 在 450 nm 处测量吸光度。使用各组的平均吸光度 (OD) 计算相对细胞生长率, 如下: 细胞生长速率 = 治疗组 OD / 对照组 OD × 100%。

**1.9 动物模型的建立和实验程序** 该研究的动物实验部分根据 ARVO《动物在眼科和视觉研究中的应用声明》进行, 并经该院伦理委员会批准 (批准号: 201062)。体质量 (200 ± 20) g 的雄性 SD 大鼠购自长沙市天勤生物技术有限公司, 饲养在温度 (23 ± 1) °C, 相对湿度 40% ~ 50%, 昼夜交替 12 h 的环境中, 自由获取食物和水。将大鼠随机分为对照组 (n = 20), DR 组 (n = 20), DR + Gas6 组 (n = 20)。除对照组外, 其他组腹腔内注射 STZ 溶液, 并选取 STZ 给药 72 h 后随机抽取血糖水平 > 16.67 mmol/L 的大鼠用于实验<sup>[9]</sup>。DR + Gas6 组在糖尿病 8 周时通过眼科手术显微镜下使用 Hamilton 注射器缓慢

注射 1  $\mu\text{l}$  的 Gas6 过表达质粒,以避免眼底血管。在第 12 周时,大鼠安乐死,摘除眼睛,仔细分离 RPE 下方的神经视网膜。通过在 37  $^{\circ}\text{C}$  下酶促消化 30 min 和机械剥离将 RPE 细胞与其他结构分离<sup>[9]</sup>。用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 进一步解离细胞 5 min,并使用血细胞仪计数。对于组织学分析,并将眼睛浸入 4% 多聚甲醛中 48 h、通过分级乙醇溶液脱水并包埋在石蜡中。样品被分成 5  $\mu\text{m}$  厚度,并采用苏木精和伊红染色试剂盒进行染色。在 200 倍放大率的光学显微镜下进行观察。

**1.10 光谱域光学相干断层扫描 (spectral domain optical coherence tomography, SD-OCT) 成像** 用阿托品滴眼液治疗大鼠 5 ~ 10 min 以扩张瞳孔。在每个角膜上滴一滴氧氟沙星眼膏以防止干燥。使用 Phoenix Micron IV 视网膜成像显微镜以视神经头为中心的环形扫描模式扫描大鼠视网膜的图像,并对相同位置的 20 个图像进行平均以消除伪影。Phoenix 软件量化了视网膜神经纤维层 (retinal nerve fiber layer, RNFL) 的平均厚度。

**1.11 统计学处理** 使用 SPSS 25.0 进行统计分析。数据表示为至少 3 次独立实验的  $\bar{x} \pm s$ 。使用单向方差分析 (ANOVA) 和事后 Bonferroni 多重比较检验来分析和比较组间差异。 $P < 0.05$  认为差异有统

计学意义。

## 2 结果

**2.1 HG 对 ARPE-19 细胞铁死亡和 Gas6/MerTK 表达影响** 为了确定 HG 诱导的细胞生长抑制是否是由铁死亡引起的,用 Z-VAD-FMK (半胱天冬酶抑制剂),3-甲基腺嘌呤 (自噬抑制剂,3-MA) 和铁抑制剂素-1 (铁死亡抑制剂,Fer-1) 处理 ARPE-19 细胞,然后用 HG 处理。3-MA 对 HG 诱导的细胞生长抑制作用改善不明显;然而,用 Z-VAD-FMK 和 Fer-1 处理 ARPE-19 细胞部分逆转了 HG 诱导的细胞生长抑制 ( $F = 8.92, P < 0.05$ ) (图 1A)。这些数据表明,细胞凋亡和铁死亡可能参与了 HG 暴露诱导的细胞生长抑制。此外,在 HG 处理 12 h 后,脂质 - ROS、MDA 水平显著增加 ( $P < 0.05$ ),并且在 24 h 和 48 h 后进一步升高 ( $F = 22.73, 30.62, P < 0.05$ ),而 SOD、GSH-Px 水平均以时间依赖的方式下降 ( $F = 28.92, 17.81, P < 0.05$ ) (图 1B-1E)。接下来测试了 Gas6/MerTK 在 ARPE-19 细胞铁死亡中的潜在作用,通过 Western blot 分析确定 HG 对 Gas6/MerTK 表达的影响。在 HG 处理 12 h 后,ARPE-19 细胞中 Gas6、MerTK 蛋白的水平降低,并且在 24 h 和 48 h 时仍处于较低水平 (图 1F)。

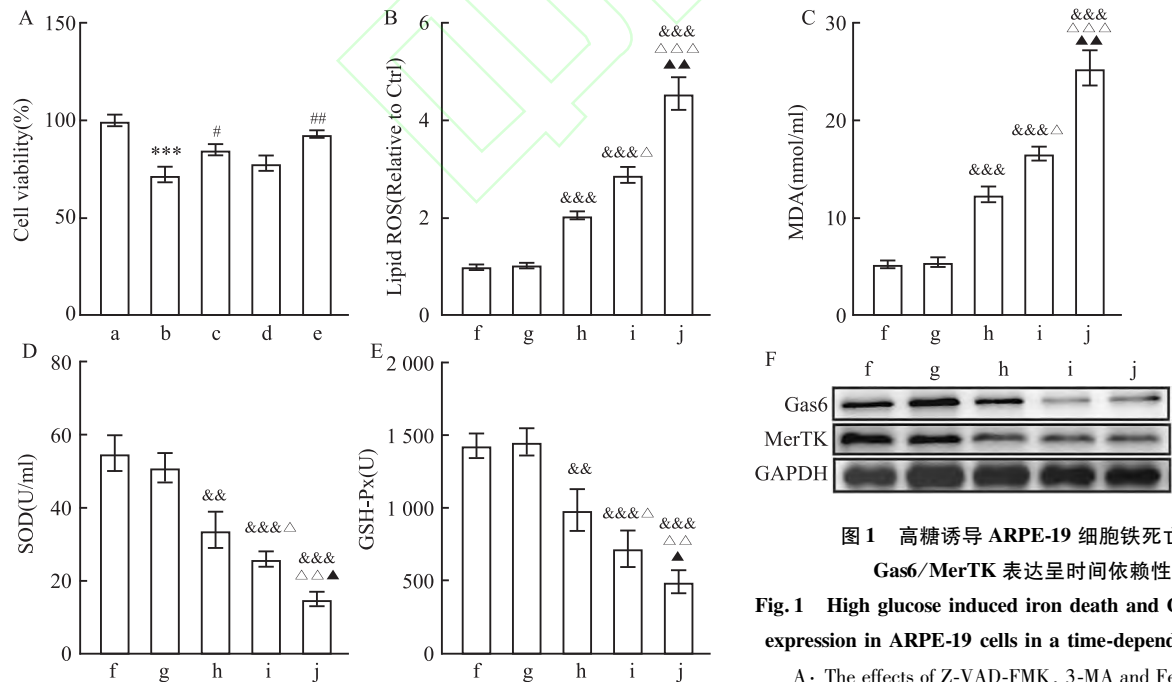


图 1 高糖诱导 ARPE-19 细胞铁死亡和 Gas6/MerTK 表达呈时间依赖性

Fig. 1 High glucose induced iron death and Gas6/MerTK expression in ARPE-19 cells in a time-dependent manner

A: The effects of Z-VAD-FMK, 3-MA and Fer-1 on the viability of ARPE-19 cells were measured by CCK-8 assay; B-E: The levels of lipid-ROS, MDA, SOD and GSH-Px in cells were evaluated at 0, 12, 24 and 48 h after culture; F: Western blot was used to analyze the expression changes of Gas6/MerTK protein in ARPE-19 cells; a: Ctrl group; b: HG group; c: HG + Z-VAD-FMK group; d: HG + 3-MA group; e: HG + Fer-1 group; f: Ctrl group; g: HG-0 h group; h: HG-12 h group; i: HG-24 h group; j: HG-48 h group; \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs Ctrl group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$  vs HG group; &&  $P < 0.01$ , &&&  $P < 0.001$  vs HG-0 h group;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ ,  $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$  vs HG-12 h group;  $\blacktriangle P < 0.05$ ,  $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$  vs HG-24 h group.



**2.2 Gas6 上调和下调对 HG 诱导的细胞生长抑制和铁死亡的影响** 与用对照载体 (Vector) 转导的细胞相比,用表达 Gas6 的慢病毒 (Gas6) 转导 ARPE-19 细胞导致 Gas6、MerTK 蛋白过表达 (图 2A)。与用对照 shRNA (sh-NC) 转导的细胞相比,sh-Gas6 导致 ARPE-19 细胞中 Gas6、MerTK 蛋白表达下调,其中 sh-Gas6-#1 敲低效果更显著 (图 2B)。与 HG 组相比,HG + Gas6 组细胞活力、SOD、GSH-Px 水平显著增加 ( $P < 0.05$ ),脂质-ROS、MDA 水平显著降低 ( $P < 0.05$ );HG + sh-Gas6 组细胞活力、SOD、GSH-Px 水平显著降低 ( $F = 8.92、17.61、11.24, P <$

$0.05$ ),脂质-ROS、MDA 水平显著增加 ( $F = 19.03、16.54, P < 0.05$ ) (图 2C-2G)。通过用铁橙对细胞进行染色以检测亚铁离子,与 HG 组相比,HG + Gas6 组细胞中橙色荧光显著减少 ( $P < 0.05$ ),HG + sh-Gas6 组细胞中橙色荧光显著增加 ( $F = 21.66, P < 0.05$ ) (图 2H)。此外,HG + Gas6 组细胞中 GPX4 蛋白表达较 HG 组增加,HG + sh-Gas6 组细胞中 GPX4 蛋白表达较 HG 组减少 (图 2I)。

**2.3 RSL3 刺激逆转 Gas6 对 HG 刺激的 ARPE-19 细胞的铁死亡的保护作用** 施用 RSL3 (一种铁死亡激动剂) 可通过使 GPX4 失活来增加细胞铁死亡。

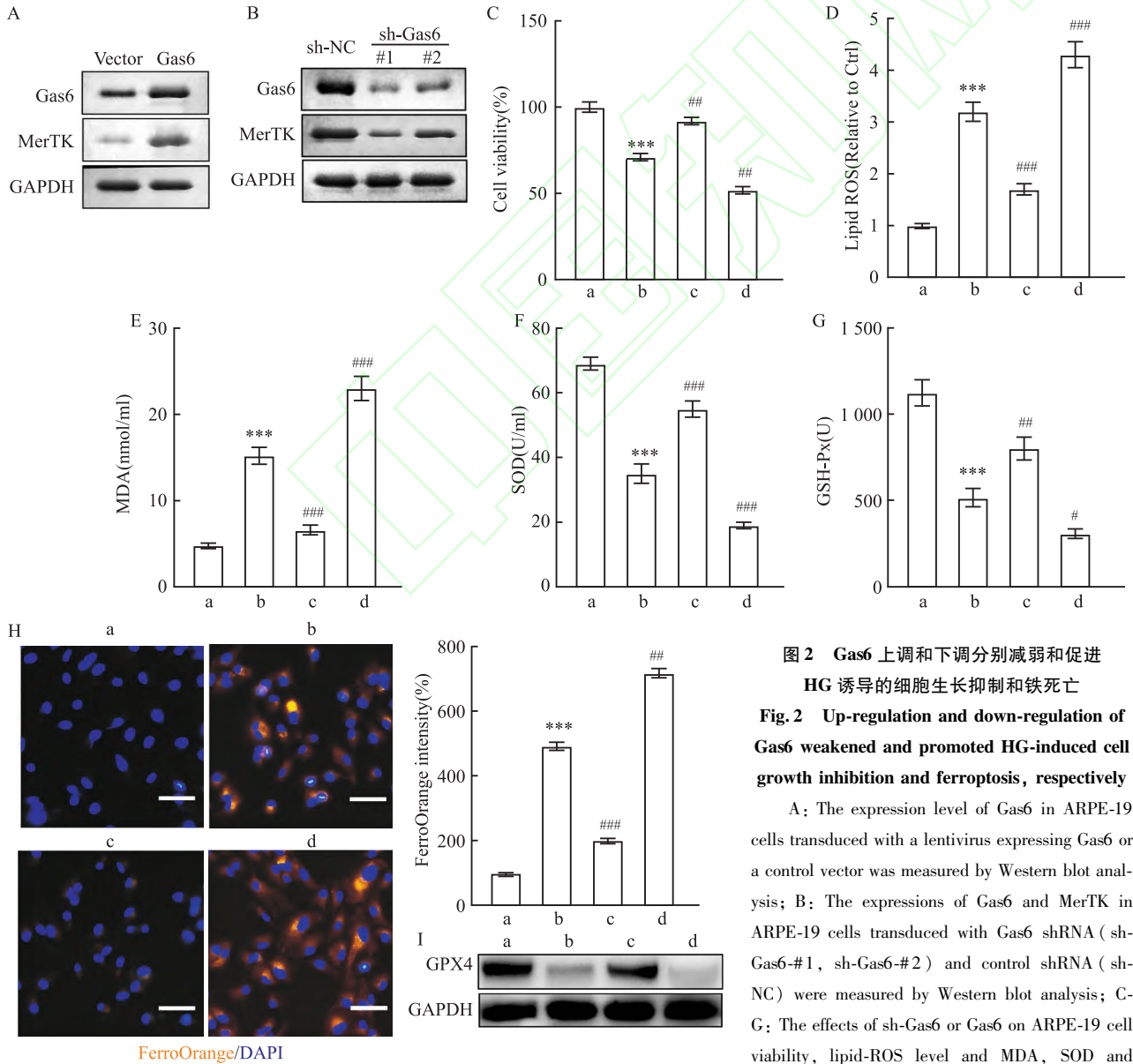


图 2 Gas6 上调和下调分别减弱和促进 HG 诱导的细胞生长抑制和铁死亡

Fig. 2 Up-regulation and down-regulation of Gas6 weakened and promoted HG-induced cell growth inhibition and ferroptosis, respectively

A: The expression level of Gas6 in ARPE-19 cells transduced with a lentivirus expressing Gas6 or a control vector was measured by Western blot analysis; B: The expressions of Gas6 and MerTK in ARPE-19 cells transduced with Gas6 shRNA (sh-Gas6-#1, sh-Gas6-#2) and control shRNA (sh-NC) were measured by Western blot analysis; C-G: The effects of sh-Gas6 or Gas6 on ARPE-19 cell viability, lipid-ROS level and MDA, SOD and GSH-Px level; H: The ferrous ion level in cells was evaluated by iron orange staining  $\times 200$ ; I: The level of GPX4 protein in cells was evaluated by Western blot; a: Ctrl group; b: HG group; c: HG + Gas6 group; d: HG + sh-Gas6 group; \*\*\*  $P < 0.001$  vs Ctrl group; #  $P < 0.05$ , ###  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$  vs HG group.

Figure 2 A: The expression level of Gas6 in ARPE-19 cells transduced with a lentivirus expressing Gas6 or a control vector was measured by Western blot analysis; B: The expressions of Gas6 and MerTK in ARPE-19 cells transduced with Gas6 shRNA (sh-Gas6-#1, sh-Gas6-#2) and control shRNA (sh-NC) were measured by Western blot analysis; C-G: The effects of sh-Gas6 or Gas6 on ARPE-19 cell viability, lipid-ROS level and MDA, SOD and GSH-Px level; H: The ferrous ion level in cells was evaluated by iron orange staining  $\times 200$ ; I: The level of GPX4 protein in cells was evaluated by Western blot; a: Ctrl group; b: HG group; c: HG + Gas6 group; d: HG + sh-Gas6 group; \*\*\*  $P < 0.001$  vs Ctrl group; #  $P < 0.05$ , ###  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$  vs HG group.

接下来,通过施用 RSL3 抑制 ARPE-19 细胞中 GPX4 表达,探讨 GPX4 是否参与 Gas6 对 HG 诱导铁死亡的保护作用。与 HG + Gas6 组相比,HG + Gas6 + RSL3 组 ARPE-19 细胞的细胞活力、GPX4 蛋白表达显著降低 ( $F = 6.74, P < 0.05$ ),脂质-ROS 表达、亚铁离子水平显著升高 ( $F = 11.56, 13.81, P < 0.05$ ) (图 3)。

**2.4 Gas6 对 DR 大鼠视网膜铁死亡的影响** 12 周时,在 STZ 诱导 DR 大鼠模型中观察到较低的体质量和较高的血糖水平 ( $F = 8.72, 31.57, P < 0.001$ )。组织学分析显示,对照组未见充盈扩张的血管,视网膜组织结构正常,层次清晰,细胞排列紧密有序。DR 组大鼠的视网膜组织排列松散和紊乱,结构不清晰,毛细血管扩张。以上数据说明成功诱导 DR。DR + Gas6 组大鼠的视网膜组织排列松散和紊乱程度减轻,结构清晰(图 4A-4C)。与对照组相比,DR 组大鼠的平均视网膜神经纤维层厚度显著降低 ( $P < 0.05$ ),DR + Gas6 组则较 DR 组显著增加 ( $F = 15.07, P < 0.05$ ) (图 4D)。此外,DR + Gas6 组 RPE 组织中 MDA、铁水平显著降低 ( $F = 8.31, 7.44, P < 0.05$ ),GSH 水平 ( $F = 7.02, P < 0.05$ ) 和 Gas6、MerTK、GPX4 蛋白表达显著增加(图 4E-4H)。

### 3 讨论

RPE 细胞在维持视网膜毛细血管的完整性方面起着重要的作用。其在糖尿病中的功能障碍会导致血液渗漏,从而促进 DR 的发生和恶化。使用 HG 模拟的 DR 细胞损伤模型,该研究表明铁死亡可能参与了 HG 暴露诱导的细胞生长抑制,表现为脂质活性氧增加和铁死亡特异性生物标志物的上调/下调。该研究表明 HG 诱导的 Gas6/MerTK 裂解和损害参与了氧化应激所致的 PRE 细胞铁死亡。吞噬作用是 RPE 细胞的基本功能之一,由细胞表面受体 MerTK 调节<sup>[2]</sup>。RPE 细胞功能障碍是几种糖尿病性眼病的原因。这些研究扩展了目前对糖尿病 RPE 细胞功能障碍的理解,并为预防和缓解 DR 提供了一种新的、有希望的治疗策略。

在哺乳动物的视网膜中,光感受器外段(photo-receptor outer segment fragments, POS)的不完全吞噬溶酶体消化导致难消化蛋白质和脂质在 RPE 细胞中形成脂褐素会对 RPE 细胞生存力和功能有害<sup>[10]</sup>。RPE 细胞的 POS 吞噬作用机制是一种特殊形式的传出细胞作用,目前认为 Mertk 功能缺失导致 POS 吞噬作用异常相关<sup>[6]</sup>。此外,MerTK 的完全

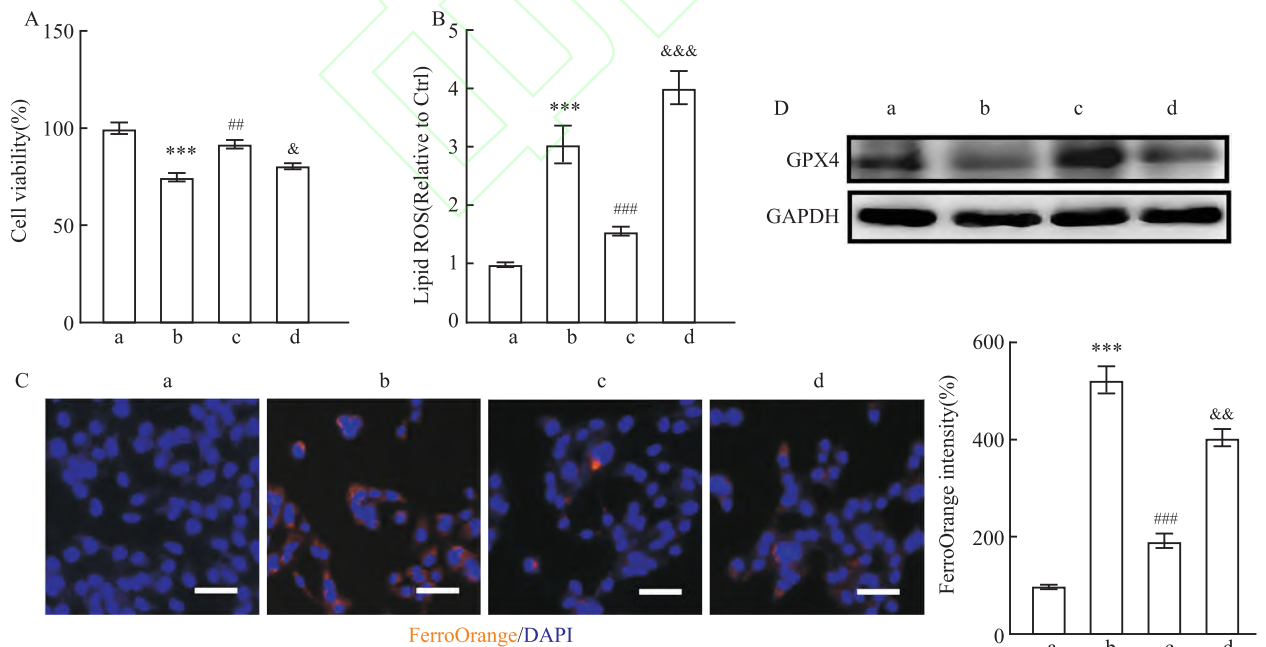


图 3 RSL3 刺激逆转 Gas6 对 HG 刺激的 ARPE-19 细胞的铁死亡的保护作用

Fig.3 RSL3 stimulation reverses the protective effect of Gas6 on ferroptosis of ARPE-19 cells stimulated by HG

A: CCK-8 test was used to measure cell proliferation; B: The level of lipid-reactive oxygen species was evaluated by flow cytometry; C: The ferrous ion level in cells was evaluated by iron orange staining  $\times 200$ ; D: The level of GPX4 protein was measured by Western blot analysis; a: Ctrl group; b: HG group; c: HG + Gas6 group; d: HG + Gas6 + RSL3 group; \*\*\*  $P < 0.001$  vs Ctrl group; ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$  vs HG group; &  $P < 0.05$ , &&  $P < 0.01$ , &&&  $P < 0.001$  vs HG + Gas6 group.

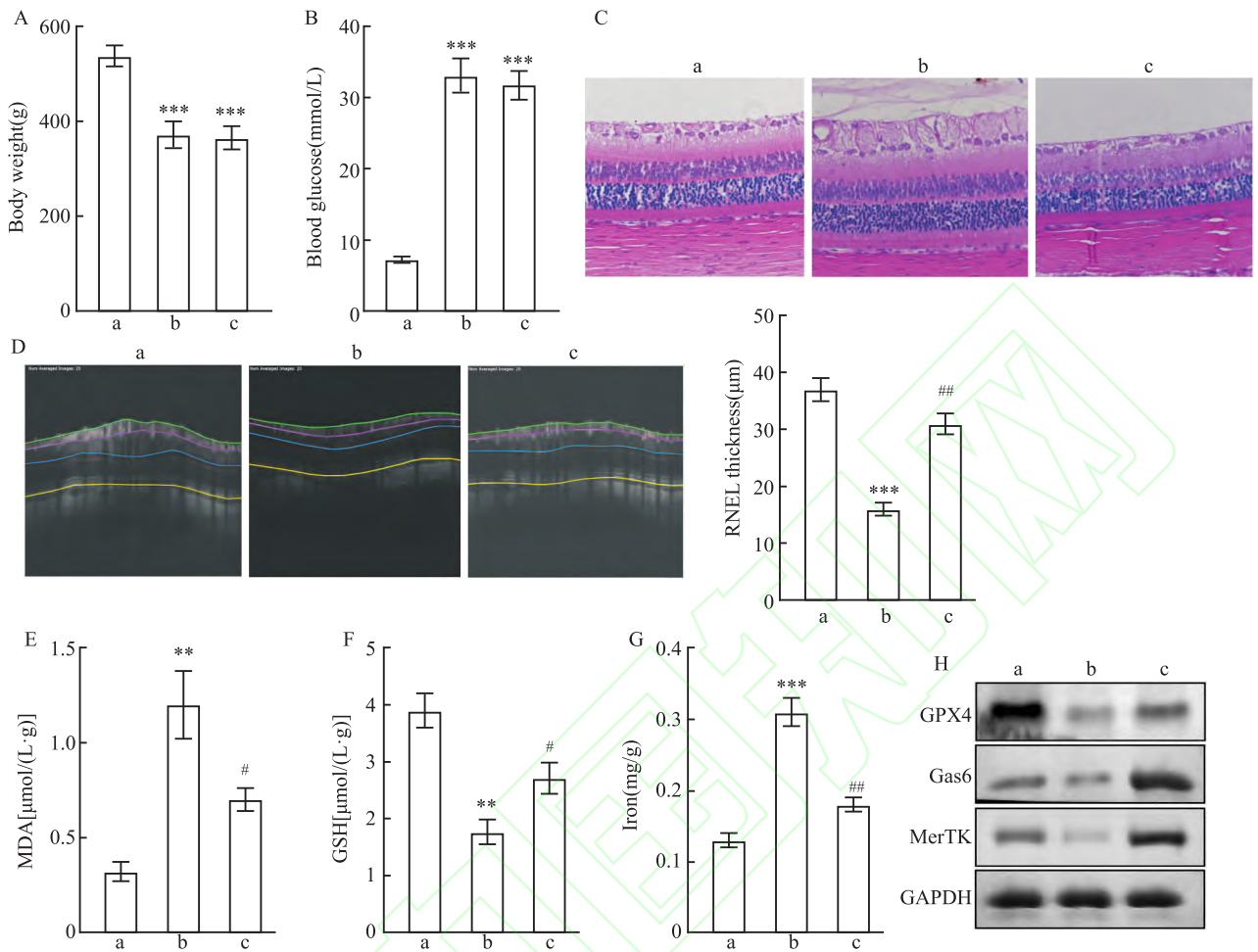


图4 Gas6减轻DR大鼠视网膜铁死亡

Fig. 4 Gas6 reduced retinal ferroptosis in DR rats

A, B: The body mass and blood sugar of rats in each group at 12 weeks; C: Hematoxylin and eosin staining of retina tissue of rats in each group at 12 weeks  $\times 100$ ; D: Quantitative analysis of representative OCT images and average retinal nerve fiber layer (RNFL) thickness of each group of rats at 12 weeks along a circle with a circumference of 3 600  $\mu\text{m}$  centered on the retinal optic disc  $\times 100$ ; E-G: MDA, GSH and iron analysis kit were used to determine the levels of MDA, GSH and iron in RPE tissue; H: Western blot was used to analyze the expression of Gas6, MerTK and GPX4 proteins in RPE; a: Ctrl group; b: DR group; c: DR + Gas6 group; \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs Ctrl group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs DR group.

激活也需要其细胞外配体的参与,蛋白 S 和 Gas6 与体内 RPE 吞噬作用中 MerTK 的功能有生理相关性<sup>[11]</sup>。该研究中,在 HG 处理的 ARPE-19 细胞中 Gas6/MerTK 表达呈时间依赖性降低,并且 Gas6 上调和下调分别促进和减弱 ARPE-19 细胞中 MerTK 表达,这与先前的报道一致,提示 Gas6/MerTK 在 ARPE-19 细胞铁死亡中的潜在作用。

目前,关于铁死亡介导糖尿病相关的 RPE 程序性死亡中的作用十分有限。ROS 积累是铁死亡的一个重要标志,它由铁依赖性芬顿反应触发,并导致脂质过氧化<sup>[4]</sup>。该研究显示 HG 刺激 ARPE-19 细胞的铁死亡,表明至少有两种不同的程序性死亡途径,凋亡和铁死亡,平行作用于降低 ARPE-19 细胞

增殖和诱导糖尿病细胞死亡。因此,除了靶向凋亡,抑制铁死亡的策略可以作为治疗 DR 的潜在治疗策略。此外,考虑到以前的研究已经确定了 HG 诱导其他细胞类型的铁死亡<sup>[12]</sup>,了解 HG 诱导的铁死亡的分子机制将在未来具有广泛的意义和应用。

GPX4 是唯一一种从细胞中清除脂质过氧化物的酶;因此,GPX4 的缺乏或下调是铁死亡的常见机制<sup>[13]</sup>。GPX4 通过减少脂质过氧化物的产生来抑制铁死亡。在药理学上,GPX4 的抑制或降解可直接引发铁死亡<sup>[14]</sup>。病理生理学上,HG 刺激 Sirt3 的过度表达,进而激活 AMPK-mTOR 途径并抑制 GPX4<sup>[15]</sup>。为了了解 Gas6/MerTK 信号通路如何促进 HG 诱导的铁死亡的潜在机制,观察到在 HG 治

疗过程中, Gas6/MerTK 表达水平的改变直接影响 GPX4 的表达。GPX4 表达在用 Gas6 转导的细胞中显著升高,而在用 sh-Gas6 转导的细胞中,GPX4 表达降低。此外,对 DR 大鼠模型的进一步分析显示 Gas6 治疗促进大鼠 RPE 组织中 GPX4 蛋白表达,并降低 MDA、铁水平。

综上所述,该研究表明 HG 处理通过抑制 Gas6/MerTK 信号通路,加速 GPX4 的清除,诱导 ARPE-19 细胞的铁死亡和细胞生长抑制。此外,通过上调 DR 大鼠视网膜组织中 Gas6/MerTK 信号表达,减轻 RPE 组织中铁死亡和氧化应激,并有助于恢复视网膜平均视网膜神经纤维层厚度。该研究补充了 DR 诱导 RPE 死亡的机制基础,有助于加强对 DR 发病机制的理解。

### 参考文献

[1] Tonade D, Kern T S. Photoreceptor cells and RPE contribute to the development of diabetic retinopathy[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2021, 83: 100919. doi:10.1016/j.preteyeres.2020.100919.

[2] Si Z, Zheng Y, Zhao J. The role of retinal pigment epithelial cells in age-related macular degeneration: phagocytosis and autophagy [J]. *Biomolecules*, 2023, 13 (6): 901. doi: 10.3390/biom13060901.

[3] Liu J X, Ma D Y, Zhi X Y, et al. MiR-125b attenuates retinal pigment epithelium oxidative damage *via* targeting Nrf2/HIF-1 $\alpha$  signal pathway[J]. *Exp Cell Res*, 2022, 410(1): 112955. doi: 10.1016/j.yexcr.2021.112955.

[4] Yang M, Tsui M G, Tsang J K W, et al. Involvement of FSP1-CoQ10-NADH and GSH-GPx-4 pathways in retinal pigment epithelium ferroptosis[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(5): 468. doi: 10.1038/s41419-022-04924-4.

[5] Puddu A, Ravera S, Panfoli I, et al. High glucose impairs expression and activation of MerTK in ARPE-19 cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 1144. doi:10.3390/ijms23031144.

[6] Bermúdez V, Tenconi P E, Echevarría M S, et al. Targeting phospholipase D pharmacologically prevents phagocytic function

loss of retinal pigment epithelium cells exposed to high glucose levels[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 11823. doi:10.3390/ijms231911823.

[7] Liu Y, Lan L, Li Y, et al. N-glycosylation stabilizes MerTK and promotes hepatocellular carcinoma tumor growth[J]. *Redox Biol*, 2022, 54: 102366. doi:10.1016/j.redox.2022.102366.

[8] Zhang Y, Li T, Cai X, et al. Sirt5-mediated desuccinylation of OPTN protects retinal ganglion cells from autophagic flux blockade in diabetic retinopathy[J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 63. doi:10.1038/s41420-022-00861-5.

[9] Zhang Y, Wu N, Li Q, et al. Neuroprotective effect of the somatostatin receptor 5 agonist L-817, 818 on retinal ganglion cells in experimental glaucoma[J]. *Exp Eye Res*, 2021, 204: 108449. doi:10.1016/j.exer.2021.108449.

[10] Mercau M E, Akalu Y T, Mazzoni F, et al. Inflammation of the retinal pigment epithelium drives early-onset photoreceptor degeneration in MerTK-associated retinitis pigmentosa [J]. *Sci Adv*, 2023, 9(3): eade9459. doi:10.1126/sciadv.ade9459.

[11] Cerna-Chavez R, Rozanska A, Poretti G L, et al. Retinal pigment epithelium exhibits gene expression and phagocytic activity alterations when exposed to retinoblastoma chemotherapeutics [J]. *Exp Eye Res*, 2023, 233: 109542. doi: 10.1016/j.exer.2023.109542.

[12] Ma H, Wang X, Zhang W, et al. Melatonin suppresses ferroptosis induced by high glucose *via* activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway in type 2 diabetic osteoporosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 9067610. doi:10.1155/2020/9067610.

[13] Lee J, Roh J L. Targeting GPX4 in human cancer: implications of ferroptosis induction for tackling cancer resilience [J]. *Cancer Lett*, 2023, 559: 216119. doi:10.1016/j.canlet.2023.216119.

[14] Zhai F G, Liang Q C, Wu Y Y, et al. Red ginseng polysaccharide exhibits anticancer activity through GPX4 downregulation-induced ferroptosis [J]. *Pharm Biol*, 2022, 60(1): 909-14. doi:10.1080/13880209.2022.2066139.

[15] Han D, Jiang L, Gu X, et al. SIRT3 deficiency is resistant to autophagy-dependent ferroptosis by inhibiting the AMPK/mTOR pathway and promoting GPX4 levels [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(11): 8839-51. doi:10.1002/jcp.29727.

## The role of Gas6/MerTK/GPX4 signal pathway in iron-induced cell death in diabetic retinopathy

Deng Li, Li Ling, Yue Jiang, Liu Zhengqun, Yin Juanping, Cai Xiaoli

[Dept of Ophthalmology, Changsha Fourth Hospital (Changsha Medical Hospital Affiliated with Hunan Normal University), Changsha 410006]

**Abstract Objective** To investigate the role of growth arrest-specific 6 (Gas6)/Mer tyrosine kinase (MerTK) signaling pathway in ferroptosis in diabetes retinopathy (DR). **Methods** Human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19) were divided into control group, HG group, HG + sh-Gas6 group, and HG + Gas6 group. Cells were



exposed to 25 mmol/L D-glucose for simulating an *in vitro* hyperglycemic (HG) environment. The control group was exposed to a 20 mmol/L mannitol + 5.5 mmol/L glucose environment. Rats were randomly divided into normal control group, DR group, and DR + Gas6 group, with 20 rats in each group. A DR model was established by intraperitoneal injection of STZ solution. Cell proliferation was evaluated using the cell count kit 8 (CCK-8) assay. Lipid reactive oxygen species (ROS) levels were measured by flow cytometry, and levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GSH-Px) were measured by biochemical assays to evaluate iron death. The expression of Gas6 and MerTK proteins was analyzed by Western blot. **Results** Compared with HG group, the cell viability, SOD, GSH-Px levels in HG + Gas6 group increased significantly ( $P < 0.05$ ), while the levels of lipid-ROS and MDA decreased significantly ( $P < 0.05$ ). In HG + sh-Gas6 group, the cell viability, SOD and GSH-Px levels decreased significantly ( $P < 0.05$ ), while the levels of lipid-ROS and MDA increased significantly ( $P < 0.05$ ). In addition, the expression of GPX4 protein in HG + Gas6 group was significantly higher than that in HG group ( $P < 0.05$ ), and the expression of GPX4 protein in HG + sh-Gas6 group was significantly lower than that in HG group ( $P < 0.05$ ). Compared with the control group, the average thickness of retinal nerve fiber layer in DR group significantly decreased ( $P < 0.05$ ), while that in DR + Gas6 group increased significantly ( $P < 0.05$ ). In addition, the levels of MDA and iron in retinal pigment epithelium (RPE) tissues of DR + Gas6 group decreased significantly ( $P < 0.05$ ), while the levels of GSH and the expressions of Gas6, MerTK and GPX4 proteins increased significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** HG treatment accelerates the clearance of GPX4 by inhibiting the Gas6/MerTK signaling pathway, inducing ferroptosis and cell growth inhibition in ARPE-19 cells. In addition, up-regulating the expression of Gas6/MerTK signal in DR rat retina can alleviate ferroptosis and oxidative stress in RPE tissue, and help to restore the average retinal nerve fiber layer thickness.

**Key words** diabetic retinopathy; growth arrest-specific 6; Mer tyrosine kinase; ferroptosis; rat

**Fund program** Scientific Research Project of Hunan Provincial Health Commission (No. D202307026842)

**Corresponding author** Cai Xiaoli, E-mail:329317314@qq.com

(上接第 1776 页)

diet, an augmentation in BPA concentration corresponded with a decline in the expression of miR-122-5p and miR-143-3p. Conversely, within the high-fat diet cohort, enhanced BPA concentrations were associated with increased expressions of these microRNAs. Pearson correlation analysis disclosed a significant positive correlation between the expression of miR-122-5p and miR-143-3p and the level of IL-10 in the standard diet group ( $P < 0.01$ ). In the high fat diet group, the expression level of miR-122-5p was positively correlated with the concentration of IL-6 ( $P < 0.05$ ), and the expression level of miR-143-3p was negatively correlated with the concentration of IL-10 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** BPA can induce the occurrence and progression of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) by regulating the expression of miR-122-5p and miR-143-3p and regulating the levels of inflammatory factors IL-6 and IL-10.

**Key words** nonalcoholic fatty liver disease; bisphenol A; miR-122-5p; miR-143-3p; inflammatory factors

**Fund programs** Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (No. 2023MS08026); Health Science and Technology Project of Inner Mongolia Autonomous Region (No. 202201430); Youth Innovative Talent Project of Baotou (No. YFYRC-QCRC-2023001); Graduate Student Research Innovation Project of Baotou Medical College (No. bycx2023022)

**Corresponding author** Zhang Yonghong, E-mail:zhangyonghonggogo@163.com