[文章编号] 1671-587X(2026)04-0963-14 DOI:10.13481/j.1671-587X.20260409

红景天苷对糖尿病大鼠视网膜神经节细胞保护作用的生物信息学分析及体内外实验验证

李俊奇[1,2]，姜佳韵[3,4]，左中夫[1,2]，于洪丹[1,2]
（1. 锦州医科大学基础医学院解剖学教研室，辽宁 锦州 121001；2. 辽宁省糖尿病感知功能障碍重点实验室，辽宁 锦州 121001；3. 锦州医科大学第一临床医学院神经病学系，辽宁 锦州 121001；4. 辽宁省阜新市第二人民医院神经内科，辽宁 阜新 123000）

[摘 要] **目的：**探讨红景天苷（SAL）对大鼠视网膜神经节（RG）细胞的保护作用，并阐明其可能的作用机制。**方法：**将30只SPF级雄性SD大鼠随机分为对照组、糖尿病组和SAL组。除对照组外，其余大鼠腹腔注射链脲佐菌素（STZ）建立糖尿病模型。光学相干断层扫描（OCT）实验检查各组大鼠视网膜厚度，HE染色观察各组大鼠视网膜形态表现。使用300 mmol·L^{-1}葡萄糖建立高糖诱导的RG细胞损伤模型，细胞计数试剂盒8（CCK-8）法评估RG细胞活性和数量，流式细胞术检测RG细胞中活性氧（ROS）水平。生物信息学分析筛选出与SAL可能相互作用的核心靶点，实时荧光定量PCR（RT-qPCR）法检测RG细胞中核心靶点的mRNA表达水平。蛋白对接预测SAL保护高糖诱导的RG细胞损伤相关性最高的核心靶点，Western blotting法检测各组细胞中谷胱甘肽过氧化物酶4（Gpx4）和核因子（红细胞衍生2）相关因子2（Nfe2l2）蛋白表达水平，验证关键蛋白对RG细胞的作用机制。**结果：**OCT检测，与对照组比较，糖尿病组大鼠视网膜厚度明显变薄（$P<0.05$），证明糖尿病视网膜病变大鼠造模成功；与糖尿病组比较，SAL组大鼠视网膜厚度增加（$P<0.05$）。HE染色，糖尿病组大鼠视网膜各层分界不清，出现大量空泡，RG细胞大量丢失；SAL组大鼠视网膜神经节细胞排列整齐，细胞核形态正常。CCK-8法和显微镜观察，与对照组比较，高糖组细胞活性降低（$P<0.05$），细胞数量减少（$P<0.05$）；与高糖组比较，SAL组细胞活性和数量增加（$P<0.05$）。流式细胞术检测，与对照组比较，高糖组RG细胞中ROS水平明显升高；与高糖组比较，SAL组细胞中ROS水平明显降低。生物信息学分析筛选出与SAL高度相关的10个Hub基因，分别为哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（MTOR）、半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶3（CASP3）、缺氧诱导因子1（HIF1A）、沉寂信息调节因子1（SIRT1）、Toll样受体4（TLR4）、热休克蛋白家族A成员5（HSPA5）、核因子（红细胞衍生2）相关因子2（NFE2L2）、一氧化氮合酶3（NOS3）、半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶8（CASP8）和核苷酸结合寡聚结构域样受体蛋白3（NLRP3）。RT-qPCR法验证了其mRNA表达。蛋白对接，SAL保护高糖诱导的RG细胞损伤相关性最高的核心靶点为NFE2L2。Western blotting法检测，与对照组比较，高糖组细胞中Nfe2l2蛋白表达水平升高（$P<0.05$），Gpx4蛋白表达水平降低（$P<0.05$）；与高糖组比较，沉默Nfe2l2组和SAL组细胞中Nfe2l2蛋白表达水平降低（$P<0.05$），Gpx4蛋白表达水平升高（$P<0.05$）。**结论：**SAL处理可增加糖尿病大鼠视网膜厚度，减轻视网膜组织损伤，提升RG细胞活性，降低细胞中ROS水平，对糖尿病大鼠视网膜具有保护作用，其机制可能与SAL下调Nfe2l2表达有关。

[收稿日期] 2025-08-11 [录用日期] 2025-12-25
[基金项目] 辽宁省科技厅自然科学基金资助计划项目（2023-MS-312）；2024年大学生创新创业训练计划项目（202410160012）
[作者简介] 李俊奇（1995—），女，辽宁省本溪市人，助教，医学硕士，主要从事糖尿病视网膜病变的机制方面的研究。
[通信作者] 于洪丹，实验师（E-mail：yuhongdan1116@126.com）

©《吉林大学学报（医学版）》编辑部，开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。
© Editorial Board of Journal of Jilin University（Medicine Edition）. Open access under CC BY-NC-ND license.

[关键词] 红景天苷；糖尿病；视网膜神经节细胞；生物信息学；氧化应激
[中图分类号] R774.1 [文献标志码] A

Bioinformatics analysis and *in vitro* and *in vivo* experimental verification on protective effect of salidroside on retinal ganglion cells in diabetic rats

LI Junqi[1,2], JIANG Jiayun[3,4], ZUO Zhongfu[1,2], YU Hongdan[1,2]
(1. Department of Anatomy, School of Basic Medical Sciences, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, China; 2. Key Laboratory of Diabetes Perception Dysfunction of Liaoning Province, Jinzhou 121001, China; 3. Department of Neurology, First Clinical Medical School, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, China; 4. Department of Neurology, Second People's Hospital, Fuxin City, Liaoning Province, Fuxin 123000, China)

ABSTRACT **Objective**: To discuss the protective effect of salidroside (SAL) on rat retinal ganglion (RG) cells, and to clarify its possible mechanism. **Methods**: A total of 30 SPF-grade male SD rats were randomly divided into control group, diabetes group and SAL group. Except for control group, the remaining rats were intraperitoneally injected with streptozotocin (STZ) to establish diabetes models. Optical coherence tomography (OCT) was used to detect retinal thickness of rats in various groups; HE staining was used to observe the morphological manifestations of retina in rats in various groups. The high glucose-induced RG cell injury model was established with 300 mmol·L^{-1} glucose. Cell counting kit-8 (CCK-8) method was used to evaluate the activity and quantity of RG cells; flow cytometry was used to detect reactive oxygen species (ROS) level in RG cells. Bioinformatics analysis was performed to screen the core targets that may interact with SAL. Real-time fluorescence quantitative PCR(RT-qPCR) method was used to detect the mRNA expression levels of core targets in RG cells. Protein docking was used to predict the core target with the highest correlation with SAL in protecting high glucose-induced RG cell injury; Western blotting method was used to detect the expression levels of glutathione peroxidase 4 (Gpx4) and nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nfe2l2) proteins in the cells in various groups, so as to verify the mechanism of key proteins on RG cells. **Results**: The OCT results showed that compared with control group, the retinal thickness of the rats in diabetes group was significantly thinned ($P<0.05$), which confirmed the successful establishment of diabetic retinopathy model; compared with diabetes group, the retinal thickness of the rats in SAL group was increased ($P<0.05$). The HE staining results showed that the boundaries of each retinal layer in diabetes group were unclear, a large number of vacuoles appeared, and RG cells were massively lost; retinal ganglion cells in SAL group were arranged neatly with normal nuclear morphology. The CCK-8 and microscopic observation results showed that compared with control group, the cell activity and cell quantity in high glucose group were decreased ($P<0.05$); compared with high glucose group, the cell viability and cell quantity in SAL group were increased ($P<0.05$). The flow cytometry results showed that compared with control group, the ROS level in RG cells of high glucose group was significantly increased; compared with high glucose group, the ROS level in cells of SAL group was significantly decreased. A total of 10 Hub genes highly associated with SAL were screened out by bioinformatics analysis, namely mammalian target of rapamycin (MTOR), cysteine-aspartic protease 3 (CASP3), hypoxia-inducible factor 1A (HIF1A), sirtuin 1 (SIRT1), toll-like receptor 4 (TLR4), heat shock protein family A member 5 (HSPA5), nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NFE2L2), nitric oxide synthase 3 (NOS3), cysteine-aspartic protease 8 (CASP8) and nucleotide-binding oligomerization

domain-like receptor protein 3（NLRP3）. The mRNA expression of the above genes was verified by RT-qPCR method. The protein docking results indicated that NFE2L2 was the core target with the highest correlation with SAL in protecting high glucose-induced RG cell injury. The Western blotting results showed that compared with control group, the expression level of Nfe2l2 protein in the cells ($P<0.05$) in high glucose group was increased and the expression level of Gpx4 protein was decreased ($P<0.05$); compared with high glucose group, the expression level of Nfe2l2 protein in the cells in Nfe2l2 silencing group and SAL group was decreased ($P<0.05$) and the expression level of Gpx4 protein was increased ($P<0.05$). **Conclusion**: SAL treatment increases retinal thickness, alleviates retina tissue damage, enhances RG cell viability and reduces intracellular ROS levels in diabetic rats, and exerts a protective effect on the retina of diabetic rats. Its mechanism may be related to the down-regulation of Nfe2l2 expression by SAL.

KEYWORDS Salidroside; Diabetes; Retinal ganglion cell; Bioinformatics; Oxidative stress

糖尿病（diabetes mellitus，DM）是全球最常见的代谢紊乱性疾病之一，发病率和患病率急剧增加[1]。糖尿病视网膜病变（diabetic retinopathy，DR）是DM的一种公认的微血管并发症，是全世界失明的主要原因之一[2]。研究[1]显示：2021年全球20～79岁人群的DM患病率约为10.5%（5.366亿人），到2045年将升到12.2%（7.832亿人）。在DM的早期阶段，复杂的神经元、神经胶质细胞和微血管异常会逐渐破坏视网膜功能。视网膜神经节（retinal ganglion，RG）细胞是最早从视网膜分化出来的神经元，在视觉信号的感知、处理和传输中至关重要，是视网膜中唯一将视觉信息传向大脑的神经元，占视网膜神经组织的绝大部分。研究[3-5]显示：RG细胞是DR早期受到影响的第一批细胞，其丢失和轴突变性是常见的病理变化。然而，其潜在分子机制仍有待探讨。

铁死亡是一种铁依赖性的调节性细胞死亡形式，其发生通常由抑制谷胱甘肽（glutathione，GSH）生物合成或直接抑制谷胱甘肽过氧化物酶4（glutathione peroxidase 4，GPX4）的小分子所诱导[6-7]。铁离子可催化活性氧（reactive oxygen species，ROS）在质膜异常累积，促使多不饱和脂肪酸（polyunsaturated fatty acids，PUFAs）磷脂发生过氧化，造成细胞膜损伤与功能障碍[8]。研究[9]显示：DR大鼠视网膜组织和外周血氧化应激水平升高，GPX4表达和GSH/GSSG比值降低，视网膜组织出现明显损伤，但铁死亡抑制剂Fer-1抑制了这一现象。

红景天苷（salidroside，SAL）是一种传统中药的有效活性成分，具有显著的抗炎[10]、抗氧化[11]、降血糖[12]等多重药理作用，并具有显著的神经保护作用。研究[13]显示：SAL在神经退行性疾病、心血管疾病、DM、癌症等多种疾病的治疗中具有潜在应用价值。SAL可通过激活抗氧化应激通路，有效抑制过氧化氢诱导的视网膜色素上皮细胞和视网膜内皮细胞凋亡[14]。然而，SAL在糖尿病大鼠模型中对视网膜病变的保护作用尚未完全阐明，其潜在的作用靶点及相关分子机制，尤其是在高糖环境下对RG细胞损伤的影响机制仍有待深入研究。

本研究主要通过生物信息学方法预测出与SAL高度相关的靶蛋白，结合体内外实验验证，探讨SAL对DR模型RG细胞的保护作用，确定相关基因变化。本研究结果将进一步丰富对DR发病机制的预防认识，并为SAL在DR治疗中的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物、细胞、主要试剂和仪器 30只SPF级雄性SD大鼠，体质量（180±20）g，5只SPF级新生2～5 d的SD大鼠乳鼠，购自北京华阜康生物科技股份有限公司，实验动物生产许可证号：SCXK（京）2019-0008，实验动物使用许可证号：SYXK（辽）2019-0007。红景天苷购自大连美伦生物有限公司，链脲佐菌素（streptozotocin，STZ）购自美国Sigma公司，复方托吡卡胺滴眼液购自长春迪瑞制药有限公司，0.25%胰蛋白酶购自美国Hyclone公司，胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）购自澳大利亚BI公司，1%青-链霉素购自美国Hyclone公司，Lipofectamine 2000转染试剂购自美国赛默飞公司，沉默Nfe2l2质粒购自天津舍为斯生物技术有限公司，增强型细胞计数试剂盒8

（cell counting kit-8，CCK-8）购自上海尚宝科技有限公司，ROS检测试剂盒购自美国Abcam公司，总mRNA提取试剂盒和cDNA合成试剂盒购自北京天根生化科技有限公司，实时荧光定量PCR（Real-time fluorescence quantitative PCR，RT-qPCR）试剂盒购自美国赛默飞公司，RT-qPCR引物购自北京华大基因科技有限公司，NF-E2相关因子2（NF-E2-related factor 2，NFE2L2）、GPX4、β-肌动蛋白（β-actin）和Brn-3a的一抗以及对应的二抗均购自美国Abcam公司。血糖仪购自美国强生公司，RT-qPCR仪购自美国Bio-Rad公司，细胞微孔板检测系统（Cytation 5）购自美国BioTek公司，冰冻切片机购自德国徕卡公司，流式细胞仪购自美国ACEA公司，光学相干断层扫描（optical coherence tomography，OCT）仪购自德国海德堡公司。

1.2 DM大鼠模型的制备、分组和药物处理 选用30只SPF级雄性SD大鼠。所有动物实验均通过锦州医科大学伦理委员会审批，伦理审批编号：20250054。实验开始之前适应性喂养1周后，禁食12 h，称量空腹体质量，并计算每只大鼠所需的STZ量（65 mg·kg^{-1}），一次性注射于大鼠腹腔中，以诱导DM模型。以空腹血糖浓度≥16.7 mmol·L^{-1}并持续1周以上视为DM大鼠造模成功，并用于后续实验。动物实验分为正常对照组、DM组和SAL组。其中，DM组和SAL组大鼠均制备DM模型。SAL组大鼠每天接受SAL（50 mg·kg^{-1}）灌胃治疗4周。对照组和DM组大鼠则腹腔注射等量的生理盐水。

1.3 RG细胞培养、鉴定、分组和处理 取5只SPF级新生2～5 d的SD大鼠乳鼠，实验操作遵循锦州医科大学动物伦理委员会审查批准，伦理审查编号：240027。在无菌条件下，于冰上迅速取出乳鼠眼球，在显微镜下剥离视网膜组织，移入无菌EP管中。加入胰蛋白酶，37 ℃消化20 min。消化结束后，加入含体积分数为10% FBS的培养基终止消化。静置后弃上清，用磷酸盐缓冲盐水（phosphate-buffered saline，PBS）缓冲液清洗组织块2次。加入DMEM/F12完全培养基，轻柔吹打制成单细胞悬液，经200目细胞筛过滤，收集滤液，1 000 r·min^{-1}离心5 min，弃上清，重悬细胞备用。加入等量的DMEM/F12完全培养基，置于37 ℃、体积分数为5% CO_2的培养箱中培养。培养5 d后，用质量分数为4%的多聚甲醛固定细胞15 min，质量分数为0.1%的Triton X-100透化10 min，体积分数为5%的山羊血清封闭30 min。加入RG细胞特异性标志蛋白抗体Brn-3a，4℃孵育过夜。PBS缓冲液冲洗后，加入相应二抗，室温避光孵育1 h。DAPI染核5 min。封片后于荧光显微镜下观察并采集图像。将上述原代培养的RG细胞在含有体积分数为10% FBS、体积分数为1%青-链霉素的DMEM完全培养基中培养，并置于37℃、体积分数为5% CO_2培养箱中。细胞实验分组为：①正常对照组；②高糖（high glucose，HG）组（只加入300 mmol·L^{-1}葡萄糖诱导6 h，用含体积分数为10% FBS的DMEM/F12继续培养48 h）；③红景天苷＋HG组（首先加入浓度为300 mmol·L^{-1}葡萄糖进行诱导处理6 h，然后再加入红景天苷药物与含体积分数为10% FBS的DMEM/F12的混合液继续培养48 h）。使用Image J软件进行细胞计数，首先导入待分析的图片，将其转换为黑白图像，然后使用“Analyze”→“Analyze Particles”功能，得到的结果中“Count”即为细胞数。

1.4 OCT观察大鼠视网膜厚度 对各组大鼠进行OCT测量。为保证大鼠不动，采用腹腔注射戊巴比妥钠溶液10 g·L^{-1}（0.6 mL·100 L^{-1}）麻醉大鼠。用复方托品酰胺滴眼液扩大大鼠瞳孔，用羟基葡聚糖滴眼液保持角膜湿润。然后将大鼠置于角膜接触镜前，调整光线角度进行眼底摄影和OCT检查。所有图像以视盘间隔拍摄，使用Image J软件测量视网膜厚度。

1.5 HE染色观察各组大鼠视网膜组织病理形态表现 视网膜冰冻切片在自来水下冲洗3次（5 min·次$^{-1}$）后，苏木精染色5 min，用水冲洗3次（5 min·次$^{-1}$），伊红染色1 min，梯度乙醇脱水，二甲苯清洗，中性胶封片。通过显微镜观察大鼠视网膜织病理形态表现。

1.6 CCK-8法检测各组RG细胞活性 RG细胞接种于96孔细胞培养板中，密度为1×10^{4}个·mL^{-1}，每组3孔。在每个孔中加入200 μL细胞悬液，在37 ℃、体积分数为5% CO_2的培养箱中培养。待细胞浓度达到80%后，每孔加入CCK-8细胞活性检测试剂，孵育2 h，采用酶标仪在450 nm波长处测定吸光度（A）值。每个细胞重复3孔，用A值进行统计分析。细胞活性＝（实验组A值－空白组A值）/（对照组A值－空白组A值）×100%。

1.7 DCFH-DA荧光探针法检测各组RG细胞中ROS水平 将RG细胞均匀铺至6孔板中，设空白管，待细胞浓度达80%时，按照细胞实验的分组进行处理。PBS缓冲液清洗2次，胰酶消化细胞并转移至标记好的1.5 mL EP管中。1 200 r·min^{-1}常温离心5 min，弃上清。避光条件下，按2 μL DCFH-DA原液与3 mL无血清培养基比例配制探针液，混匀备用。空白管加入1 mL无血清培养基，其余管加入1 mL探针液，重悬细胞后37℃避光孵育20 min。离心（1 200 r·min^{-1}，5 min）弃上清，用1 mL预冷PBS缓冲液洗涤细胞2次，全程避光。最终以500 μL冷PBS缓冲液重悬细胞，流式细胞术检测阳性细胞百分率，代表各组RG细胞中ROS水平。

1.8 与SAL作用相关的靶点的筛选和交集靶点的选取 分别以“Retinal Ganglion Cells”和“High Glucose”为关键词，在GeneCards（https://www.genecards.org/）数据库中检索并获取相关靶点文件，使用中药系统药理学数据库及分析平台（Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology，TCMSP）以及GeneCards数据库检索、去重并获取SAL的靶点。绘制Venn图，获取Retinal Ganglion Cells、High Glucose和SAL的共存交集靶点。

1.9 蛋白质-蛋白质相互作用（protein-protein interaction，PPI）网络的构建和核心靶点的筛选 将交集基因导入STRING数据库（https://cn.string-db.org/），限定物种为Homo sapiens，检索并构建PPI网络。网络图中节点代表靶点，节点之间的相互作用通过边来表示。随后将PPI导出的tsv格式文件导入Cytoscape 3.10.2软件，使用其cytoHubba插件对网络相互作用关系进行拓扑分析，筛选出前10个关键靶标。

1.10 富集分析 在Java环境中，分别依次安装activePerl.exe file、org.Hs.eg.db、DHGE、clusterProfiler、pathView Enrichplot文件后，使用R语言4.1.3及脚本go-kegg对共同靶点进行基因本体（Gene Ontology，GO）功能富集分析和京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）信号通路富集分析，其中GO功能富集分析分别输出生物过程、细胞组分和分子功能3个方面各前10位结果，KEGG信号通路富集分析输出前20位结果。

1.11 RT-qPCR法检测各组RG细胞中目的基因mRNA表达水平 使用TRIzol从CON组、HG组和SAL组的RG细胞中提取总RNA。采用RT-qPCR法检测细胞中*MTOR*、*CASP3*、*HIF1A*、*SIRT1*、*TLR4*、*HSPA5*、*NFE2L2*、*NOS3*、*CASP8*和*NLRP3* mRNA的表达水平。RT-qPCR扩增方案：95℃ 30 s，最多40个循环，95 ℃、5 s，60 ℃、34 s。使用$2^{-\triangle\triangle Ct}$方法计算各目的基因mRNA的表达，每个基因的引物列见表1。

表1 RT-qPCR的引物

Tab.1 RT-qPCR primers

Gene	Sense primer	Anti-sense primer
GAPDH	GTGGCAAAGTGGAGATTGTTG	CGTTGAATTTGCCGTGAGTG
HIF1A	TCTCAGAATGAAGTGTACCCT	GTGCAGTGCAATACCTTCC
CASP3	AACTCTTCATCATTCAGGCCT	CCATATCATCGTCAGTTCCAC
NFE2L2	GCATTTCGCTGAACACAA	CTCTTCCATTTCCGAGTCA
CASP8	GTGAAAAACTGTGTTTCCT	CAGTCAGGATGGTGAGAAT
HSPA5	GAGGAGGACAAGAAGGAGG	CTTGAATACACCGACGCAG
MTOR	ATGGCAGGGGACACTTT	CACGGAGAACGAGGACA
NLRP3	AGACATGGGACTCAAGCTC	CTGCAGTTGTCTAACTCCAG
NOS3	GACATTGAGATCAAAGGACTGC	GTAGAGATGGTCCAGTTGGG
STRT1	ACACAAAATCCAGCAACTCAGC	ATTGCTTTCCTTCCACTGCAC
TLR4	CAGTACAACCAGATCCGCT	CCAGGTACAGCTCTTCCAG

1.12 与铁死亡相关的靶点的筛选和交集靶点的选取 氧化应激不仅引发脂质过氧化产物的堆积，其诱导的铁死亡更能进一步损害细胞功能，产生更多ROS，从而形成一个自我损伤的恶性循环[6, 15]。以“Ferroptosis”为关键词，在GeneCards数据库中检索并获取相关靶点文件，收集整理经RT-qPCR验证SAL处理高糖诱导的RG细胞损伤的7个发生变化的核心靶点。绘制Venn图，获取

Ferroptosis和核心靶点的共存交集靶点。蛋白互作网络的构建和核心靶点的筛选方法同1.9。

1.13 蛋白对接 GPX4是铁死亡的关键终止酶[16]。分别以“GPX4”“NFE2L2”“SIRT1”“HSPA5”“HIF1A”和“TLR4”为关键词在Alphafold（https://alphafold.com/）数据库中检索并获取相关pbd格式的蛋白质数据。将GPX4-NFE2L2、GPX4-SIRT1、GPX4-HSPA5、GPX4-HIF1A和GPX4-TLR4上传至HDOCK（http://hdock.phys.hust.edu.cn/）以及HADDOCK（https://rascar.science.uu.nl/haddock2.4/），通过刚性对接和柔性对接的方式预测这5对蛋白质的复合物模型，选择ΔG kcal·mol^{-1}值最为显著的cluster，使用Pymol（1.0.0.0）进行可视化。

1.14 siRNA转染及分组 细胞培养方法同“1.3”。转染前一天将RG细胞均匀铺至6孔细胞培养板中，待细胞浓度达80%时，进行转染实验。将其分为正常对照组、HG组、高糖＋红景天苷组（HG＋SAL组）、高糖＋沉默Nfe2l2组（HG＋si-Nfe2l2组）和正常＋沉默Nfe2l2组（CON＋si-Nfe2l2组）。实验采用沉默Nfe2l2质粒。按照质粒说明书（转染质粒与转染试剂体积比为1∶1），将RG细胞饥饿2 h后，用Lipofectamine 2000试剂转染。6 h后，用含有体积分数为10% FBS的DMEM/F12培养基替换细胞。分别将沉默Nfe2l2质粒的细胞用300 mmol·L^{-1}高糖处理6 h，再将沉默*Nfe2l2*质粒的细胞置于正常培养基中培养，用SAL处理48 h。通过Western blotting实验检测转染效果。

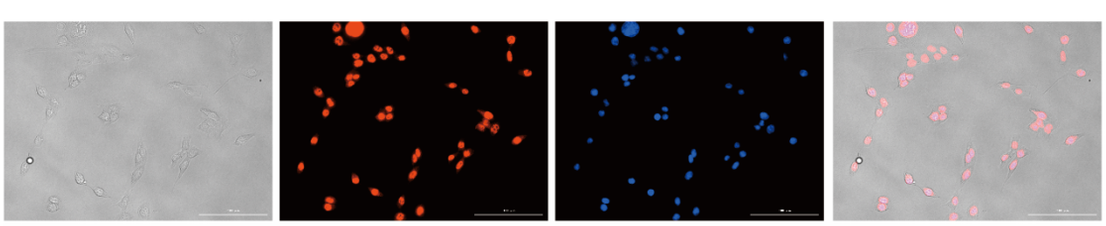
1.15 Western blotting法检测各组RG细胞中相关蛋白表达水平 处理后的细胞在4 ℃下裂解30 min，然后离心。收集上清液，用二辛可宁酸检测法（bicinchoninic acid assay，BCA）蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度。制备的样品在质量分数为10%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）凝胶上分离，然后转移到聚偏二氟乙烯膜（polyvinylidene fluoride，PVDF）膜上，用质量分数为5%的牛血清白蛋白在TBST中阻断。用一抗进行蛋白印迹。用含吐温的Tris缓冲盐溶液（tris-buffered saline with tween，TBST）洗涤3次，与二抗室温孵育2 h。用增强型化学发光增强化学发光法（enhanced chemiluminescence，ECL）系统检测蛋白质条带。目的蛋白表达水平＝目的蛋白条带灰度值/内参蛋白（β-actin）条带灰度值。

1.16 统计学分析 采用GraphPad Prism 9软件进行统计学分析。各组细胞数量和活性，视网膜厚度，细胞中*Mtor*、*Casp3*、*Hif1a*、*Sirt1*、*Tlr4*、*Hspa5*、*Nfe2l2*、*Nos3*、*Casp8*、*Nlrp3* mRNA表达水平以及Gpx4和Nfe2l2蛋白表达水平经Shapiro-Wilk检验均符合正态分布，以$\bar{x}\pm s$表示。多组间样本均数比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用SNK-q检验。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 原代RG细胞鉴定 荧光显微镜下可见Brn-3a特异性表达于RG细胞中（红色荧光），DAPI着染细胞核（蓝色荧光），并在同一视野高倍镜下大部分细胞呈红蓝双色着染。见图1。

2.2 各组RG细胞数量和活性 与对照组比较，HG组RG细胞的活性明显降低（$P<0.05$），细胞数量大幅度减少（$P<0.05$）。与HG组比较，加入SAL后，RG细胞的数量和活性明显升高（$P<0.05$）。见图2。

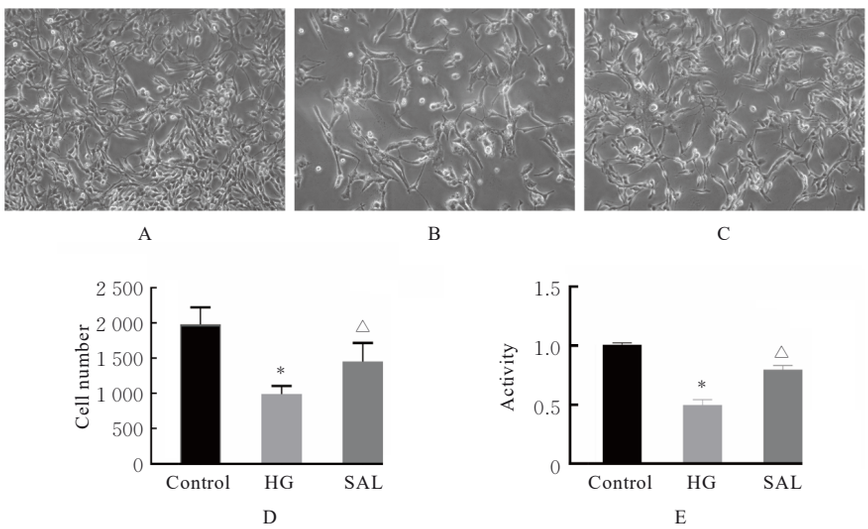


Lane 1: Bright field of RG cells; Lane 2: RG cells stained with Brn-3a; Lane 3: RG cells stained with DAPI; Lane 4: Merged image.

图1 原代RG细胞鉴定

Fig. 1 Identification of primary RG cells

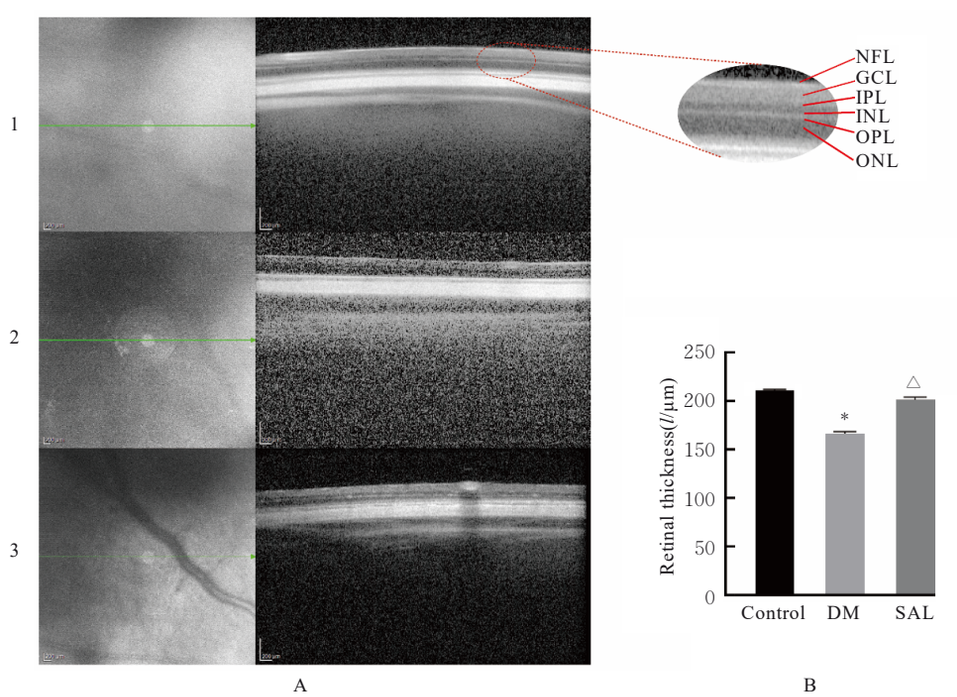
2.3 各组大鼠视网膜厚度 OCT检查发现：对照组大鼠视网膜形态学特征正常。与对照组比较，DM组大鼠的神经节细胞层厚度和内膜边界核心层均明显变薄（$P<0.05$）。与DM组比较，SAL组大鼠神经节细胞层厚度、内膜边界核心层、外形态学层均增厚（$P<0.05$）。见图3。



A：Control group；B：HG group；C：SAL group. *$P<0.05$ *vs* control group；△$P<0.05$ *vs* HG group.

图2 各组RG细胞的明场（A～C）及SAL作用后RG细胞数（D）与活性（E）

Fig. 2 Bright-field images of RG cells in various groups (A－C) and number (D) and activity (E) of RG cells after treated with salidroside

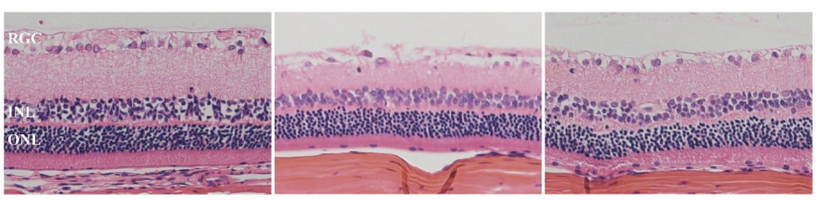


Lane 1：Control group；Lane 2：DM group；Lane 3：SAL group. NFL：Nerve fiber layer；GCL：Ganglion cell layer；IPL：Inner plexiform layer；INL：Inner nuclear layer；OPL：Outer plexiform layer；ONL：Outer nuclear layer. *$P<0.05$ *vs* control group；△$P<0.05$ *vs* HG group.

图3 各组大鼠视网膜图像（A）和直条图（B）

Fig. 3 Retinal images(A) and histogram(B) of rats in various groups

2.4 各组大鼠视网膜组织病理形态表现 HE染色结果显示：对照组大鼠视网膜节细胞层、内核层和外核层分界清晰，结构完整，细胞排列整齐且紧密，胞核形态正常；DM组大鼠视网膜节细胞层、内核层和外核层分界不清，内界膜水肿，神经纤维层断裂，神经节细胞层出现大量空泡，内外核层细胞密度明显减少，细胞排列疏松，间隙增大，部分细胞核固缩；SAL组大鼠视网膜神经节细胞排列整齐，细胞核形态正常。见图4。



A:Control group; B:DM group; C:SAL group.

图4 各组大鼠视网膜形态表现(HE，×100)

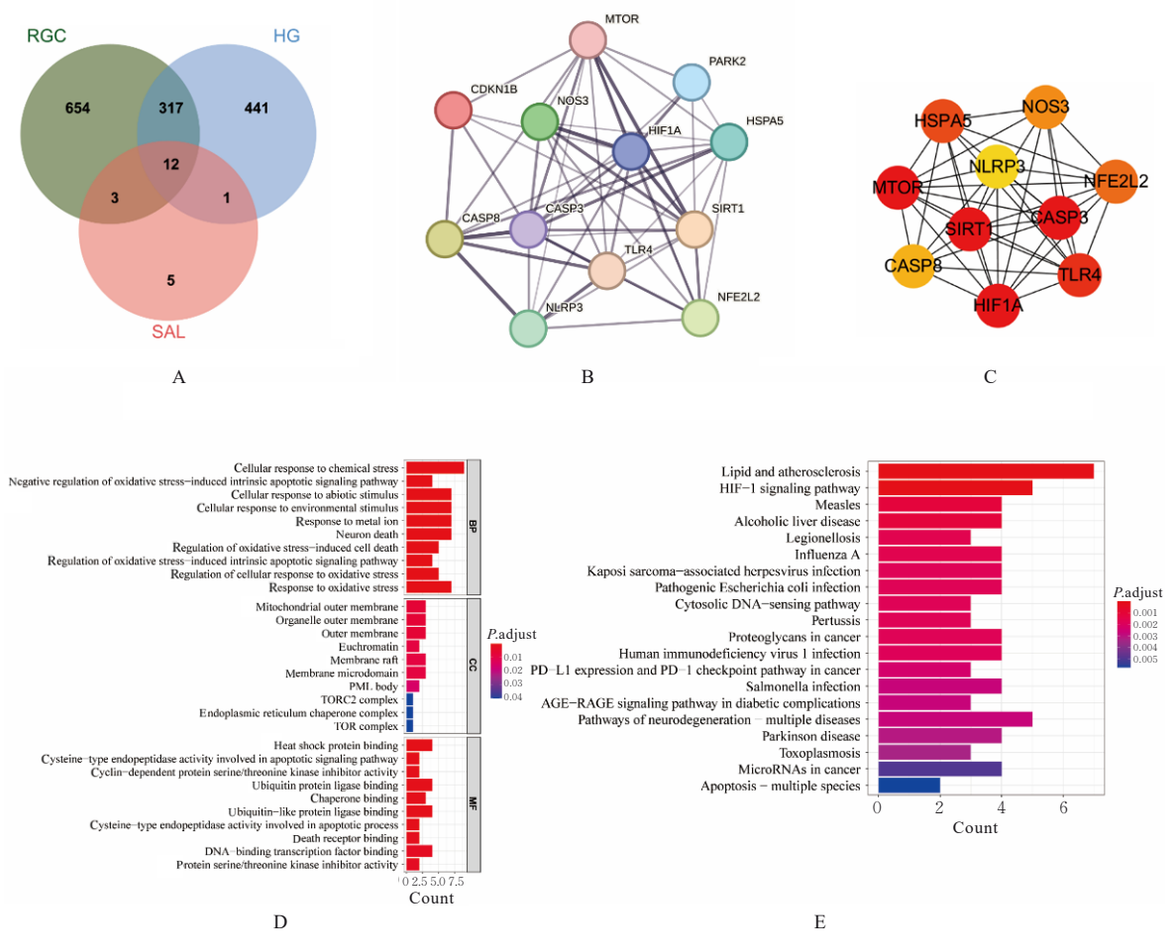
Fig. 4 Morphology of retina of rats in various groups (HE，×100)

2.5 SAL处理高糖诱导的RG细胞损伤的潜在靶点与通路 通过筛选条件Relevance score＞20筛选得到Retinal Ganglion Cells共计986个靶点，筛选条件Relevance score＞10筛选得到HG共计771个靶点，SAL共计21个靶点。通过使用微生信平台的Venn Diagrams工具取得最终三者交集12个靶点。使用STRING网站进行对最终交集靶点进行PPI分析和PPI network构建，其中12个靶点之间存在相互作用关系，共计51条互作关系。同时，使用Cytoscape 3.10.2内置插件cytohubba以MCC算法为基础鉴定了top10核心靶蛋白，按照排名依次是MTOR、CASP3、HIF1A、SIRT1、TLR4、HSPA5、NFE2L2、NOS3、CASP8、NLRP3。为了富集最终交集靶点的功能和通路，使用Metascape数据库对这12个靶点分别进行KEGG信号通路富集分析和GO功能富集分析。GO功能分析结果按照P值从小到大筛选，显示BP主要富集在氧化应激诱导细胞死亡的调控、氧化应激诱导的内源性凋亡信号通路的调控、细胞对氧化应激反应的调节和氧化应激反应等功能；CC主要富集在线粒体外膜、细胞器外膜、外层薄膜、薄膜筏和膜微区等功能；MF主要富集在半胱氨酸型内肽酶活性与凋亡信号通路、细胞周期蛋白依赖蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂活性和半胱氨酸型内肽酶活性与凋亡过程等功能。KEGG信号通路分析结果按照P值从小到大筛选前20条通路，显示大部分基因主要富集在HIF-1信号通路、酒精性肝病、DM并发症中的AGE-RAGE信号通路、帕金森病和细胞多种凋亡等通路。见图5。说明SAL可能作用于MTOR、CASP3、HIF1A、SIRT1、TLR4、HSPA5、NFE2L2、NOS3、CASP8和NLRP3蛋白，通过HIF-1信号通路、酒精性肝病、DM并发症中的AGE-RAGE信号通路、帕金森病和细胞多种凋亡等通路，抑制氧化应激，减少RG细胞损伤。

2.6 各组RG细胞中ROS水平 流式细胞术检测结果显示：与对照组（1.27%）比较，HG组RG细胞中ROS水平（96.30%）明显升高；与HG组比较，SAL组细胞中ROS水平（25.58%）有效降低。见图6。说明SAL可以降低高糖诱导的RG细胞中活性氧水平。

2.7 与SAL作用高度相关的核心靶点基因表达水平 RT-qPCR法检测结果显示：与对照组比较，HG组细胞中*Casp3*、*Hif1a*、*Tlr4*和*Nfe2l2*的mRNA表达水平升高（$P＜0.05$），*Sirt1*、*Hsap5*和*Nos3* mRNA表达水平降低（$P＜0.05$）。与HG组比较，SAL组细胞中*Casp3*、*Hif1a*、*Tlr4*和*Nfe2l2* mRNA表达水平降低（$P＜0.05$），*Sirt1*、*Hsap5*和*Nos3* mRNA表达水平升高（$P＜0.05$）。见图7。

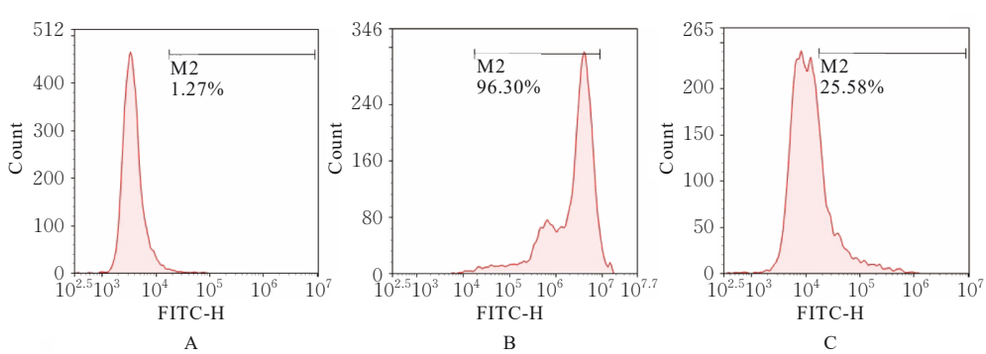
2.8 SAL处理HG诱导的RG细胞损伤的相关性最显著靶点 Ferroptosis共计1866个靶点，RT-qPCR实验验证发生变化的核心靶点有7个。通过使用微生信平台的Venn Diagrams工具取得最终三者交集5个靶点。使用STRING网站进行对最终交集靶点进行PPI分析和PPI network构建，其中5个靶点之间存在相互作用关系，共计10条互作关系。同时，使用Cytoscape 3.10.2内置插件cytohubba



A B C D E

图5 SAL处理HG诱导的RG细胞损伤的潜在靶点的韦恩图(A)、PPI网络图(B)、MCC核心靶点(C)、GO功能富集图(D)、KEGG信号通路富集图(E)

Fig. 5 Venn diagram (A), PPI network diagram (B), MCC core target (C), GO functional enrichment diagram (D), and KEGG signaling pathway enrichment diagram (E) of potential targets for salidroside in treatment of RG cell injury induced by HG

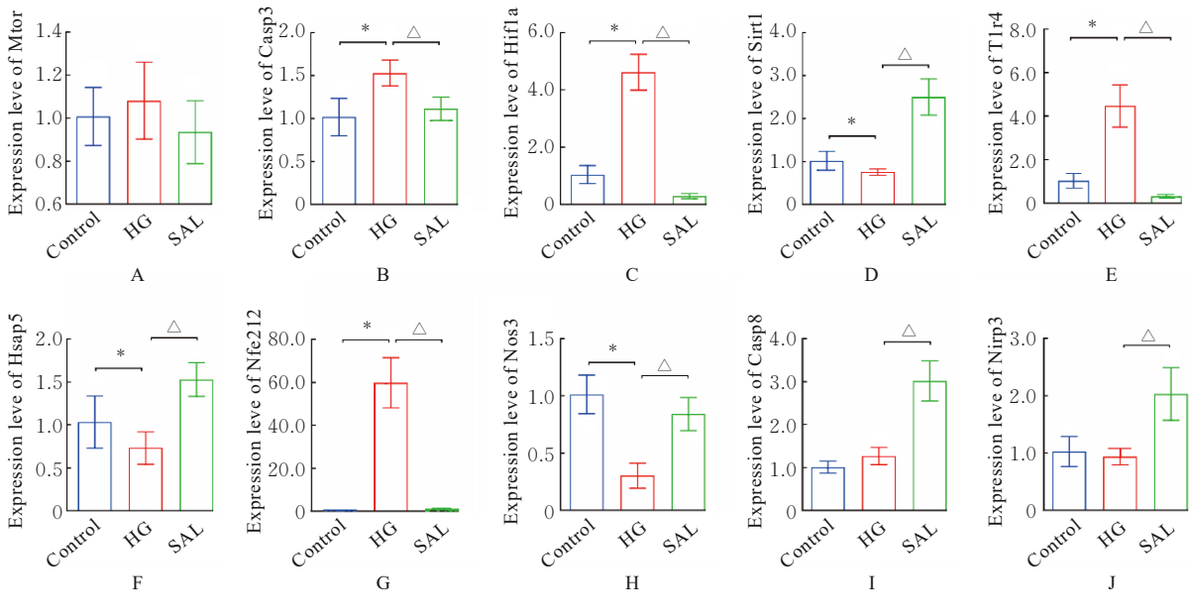


A:Control group; B:HG group; C:SAL group.

图6 各组RG细胞中ROS水平

Fig. 6 Levels of ROS in RG cells in various groups

以MCC算法为基础鉴定了top5核心靶蛋白，按照排名依次是NFE2L2、SIRT1、HSPA5、HIF1A和TLR4。蛋白对接中ΔG kcal·mol^{-1}值最为显著的cluster是GPX4-NFE2L2。对其进行可视化分析后发现：GPX4的ASP-162、ASP-148、LYS-123残基可以与NFE2L2的ARG-499、ARG-503、ASP-



A：Mtor；B：Casp3；C：Hif1a；D：Sirt1；E：T1r4；F：Hsap5；G：Nfe212；H：Nos3；I：Casp8；J：Nirp3. *P<0.01；△P<0.01.

图 7 RT-qPCR 法验证 SAL 处理 HG 诱导的 RG 细胞损伤的核心靶点

Fig. 7 Core targets of salidroside in treatment of RG cell injury induced by HG verificated by RT-qPCR method

500 残基形成氢键相互作用，从而实现二者的稳定结合。见图 8。

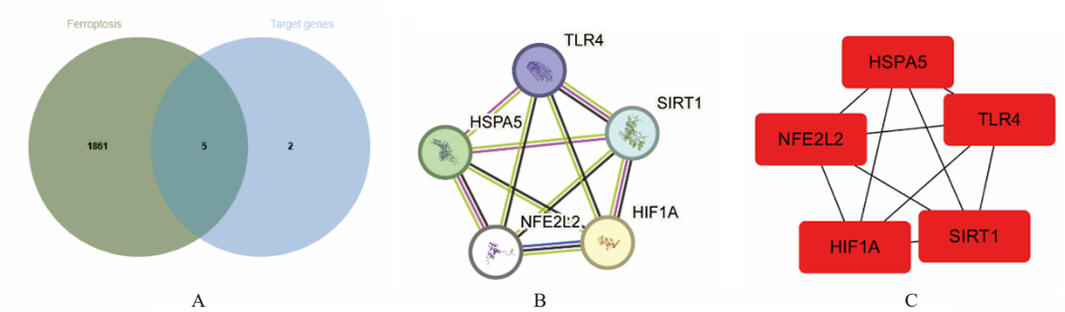
2.9 各组 RG 细胞中 Gpx4 和 Nfe2l2 蛋白表达水平 Western blotting 法检测结果显示：与对照组比较，对照＋si-Nfe2l2 组细胞中 Nfe2l2 蛋白表达水平明显降低（P<0.05）；HG 组细胞中 Nfe2l2 蛋白表达水平明显升高（P<0.05），Gpx4 蛋白表达水平明显降低（P<0.05）。与 HG 组比较，SAL 组细胞中 Nfe2l2 蛋白表达水平降低（P<0.05），Gpx4 蛋白表达水平升高（P<0.05）；在 HG 条件下沉默 Nfe2l2 表达后，细胞中 Nfe2l2 蛋白表达水平降低（P<0.05），Gpx4 蛋白表达水平升高（P<0.05）。见图 9。

3 讨 论

DR 是 DM 的一种微血管并发症，是 DM 患者失明的主要原因[17-18]。DR 的主要病理生理学是高血糖引起的各种变化，包括视网膜毛细血管基底膜增厚、视网膜血管通透性增加、组织缺血以及各种血管活性物质的释放，导致新生血管形成。视网膜神经变性也发生在 DR 的发病机制中，同时也参与了 DR 中发生的微血管疾病，主要包括细胞死亡和神经胶质改变[19-20]。RG 细胞是一种位于视网膜内表面的神经元，其长轴突将视网膜与大脑连接起来，并将视觉信息投射到大脑[21]。本研究中的 OCT 实验以及 HE 染色结果显示，糖尿病组的大鼠视网膜厚度明显变薄，提示 DR 大鼠造模成功；同时 HE 染色发现，DR 大鼠视网膜的 RG 细胞层的细胞出现明显丢失。

氧化应激已被证实是 DR 发病机制的关键因素之一。氧化应激既可能导致高血糖引起的代谢异常，也可由高血糖引起的代谢异常引起，主要包括多元醇途径和己糖胺途径的通量增加、蛋白激酶 C 亚型的过度激活以及晚期糖基化终产物的积累[22-23]。ROS 的过度积累会诱导线粒体损伤、细胞凋亡、炎症、脂质过氧化以及视网膜的结构和功能改变[24]。红景天是一种生长在高海拔地区的多年生草本植物，在东亚地区已有数千年的使用历史，用于治疗心肺疾病和脑病[25-26]。红景天提取物中的主要成分 SAL 是一种具有抗氧化应激、抗炎和降脂等生物活性的黄酮类化合物。本研究中的流式细胞术实验结果显示：与正常对照组比较，HG 组 RG 细胞中 ROS 水平明显升高；经过 SAL 干预后，高糖诱导的 RG 细胞中 ROS 水平明显降低，提示 SAL 可以降低 RG 细胞中 ROS 水平，减少 RG 细胞丢失。

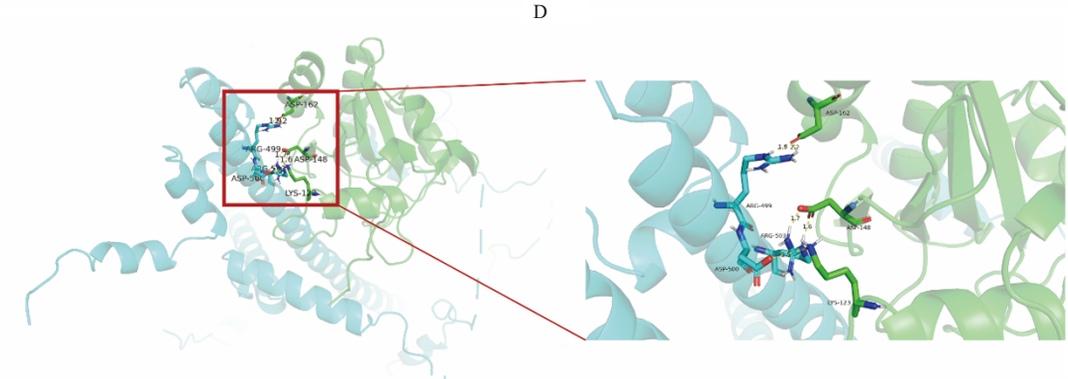
本研究通过生物信息学分析筛选出 10 个与 SAL 高度相关的基因，分别是 *MTOR*、*CASP3*、



A B C



D



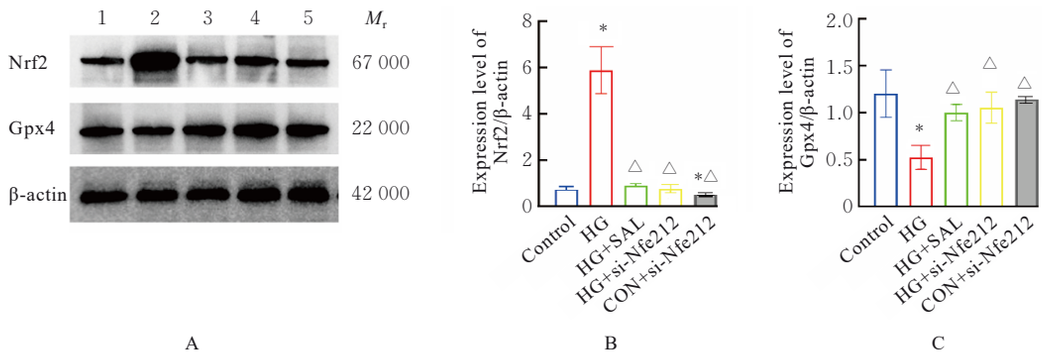
E

Lane 1: GPX4-NFE2L2; Lane 2: GPX4-SIRT1; Lane 3: GPX4-HSPA5; Lane 4: GPX4-HIF1A; Lane 5: GPX4-TLR4.

图8 SAL处理HG诱导的RG细胞损伤的相关性最高靶点韦恩图(A)、PPI网络图(B)、MCC核心靶点(C)、各组蛋白对接分析结果(D)和NFE2L2表达(E)

Fig. 8 Venn diagram (A), PPI network diagram (B), core target of MCC (C), protein docking analysis results (D), and NFE2L2 expression (E)

HIF1A、*SIRT1*、*TLR4*、*HSPA5*、*NFE2L2*、*NOS3*、*CASP8*、*NLRP3*。其中，*NFE2L2*作为细胞抗氧化防御系统的核心调节因子，是SAL发挥抗氧化作用最关键的可能靶点之一。其激活能启动下游多种Ⅱ相解毒酶和抗氧化蛋白的转录，直接增强细胞对氧化应激的抵抗能力[27]。SIRT1作为一



Lane 1: Control group; Lane 2: HG group; Lane 3: HG＋SAL group; Lane 4: HG＋si-Nfe2l2 group; Lane 5: Control ＋si-Nfe2l2. $^{*}P<0.05$ *vs* control group; $^{\triangle}P<0.05$ *vs* HG group.

图 9　各组 RG 细胞中 Nfe2l2 和 Gpx4 蛋白表达电泳图（A）及直条图（B，C）

Fig. 9　Electrophoregram(A) and histograms (B, C) of expressions of Nfe2l2 and Gpx4 proteins in RG cells in various groups

种 NAD^+ 依赖的去乙酰化酶，参与调节细胞代谢、应激反应和衰老过程[28-29]。SAL 可能通过激活 SIRT1，促进线粒体功能并抑制氧化应激诱导的细胞损伤，从而发挥神经保护作用。CASP3 与 CASP8 作为细胞凋亡执行过程中的关键蛋白酶，其分别是内源性与外源性凋亡通路的核心[30-31]。SAL 可能通过抑制 CASP8 的活化及后续 CASP3 的剪切，有效阻断氧化应激诱导的细胞凋亡过程。这些靶基因共同构成 SAL 可能的作用网络，参与调控氧化应激、凋亡及炎症等多条通路，为阐明 SAL 的神经保护机制提供了重要线索。RT-qPCR 结果显示：SAL 可显著下调高糖诱导的 RG 细胞中 *Casp3*、*Hif1a*、*Tlr4* 和 *Nfe2l2* mRNA 表达水平，同时上调 *Sirt1*、*Hspa5* 和 *Nos3* mRNA 表达水平，并降低 ROS 水平。鉴于氧化应激与铁死亡密切相关[6, 15]，整合差异表达基因与铁死亡通路进行生物信息学分析，筛选出 NFE2L2、SIRT1、HSPA5、HIF1A 和 TLR4 五个关键靶点；蛋白对接进一步表明，NFE2L2 与铁死亡核心抑制酶 GPX4 结合亲和力最高[16]。Western blotting 结果显示：沉默 HG 诱导的 RG 细胞中 *Nfe2l2* 的表达可以显著提高铁死亡关键终止酶 Gpx4 表达。NFE2L2 是调控抗氧化反应的关键转录因子。在正常生理状态下，其与 Keap1 结合而保持稳定；当氧化应激发生时，NFE2L2 被激活并转入细胞核，通过结合 ARE 启动 *GPX4*、*HO-1* 等抗氧化基因的表达，从而维持氧化还原稳态，保护细胞免受损伤[32]。氧化应激与铁死亡通过正反馈环路相互促进。高糖环境下过量 ROS 在游离 Fe^{2+} 催化下经 Fenton 反应生成羟基自由基，攻击细胞膜多不饱和脂肪酸，引发脂质过氧化，这是铁死亡的核心[6]。而脂质过氧化产物又可损伤线粒体等细胞器，进一步加剧 ROS 积累，形成恶性循环[15]。更重要的是，氧化应激会削弱抗铁死亡防御体系，尤其是耗竭 GSH 或抑制 GPX4 活性[16]，从而加速铁死亡进程。本研究 Western blotting 法检测结果显示：SAL 可下调 HG 作用下 Nfe2l2 蛋白表达水平。这一现象看似与 NFE2L2 作为抗氧化保护因子的传统认知相悖，实则可能反映了一种“通路正常化”调节机制。研究[33-34]发现：在持续 HG 应激下，长期高水平 ROS 可能导致 NFE2L2 通路发生反馈性失调、功能耗竭或异常激活，反而削弱其下游保护效应（如 GPX4 表达）。本研究结果提示：SAL 可能通过直接清除 ROS 或调控上游信号通路，减轻细胞氧化负担，使 NFE2L2 系统从紊乱状态恢复至生理稳态，从而间接维持 GPX4 等关键效应分子的功能，有效抑制铁死亡。因此，在 HG 环境中，氧化应激作为始动因素，通过诱发脂质过氧化并破坏细胞抗氧化防御体系，共同驱动 RG 细胞发生铁死亡，而 SAL 通过靶向该恶性循环的起始环节，即缓解氧化应激，发挥神经保护作用。

本研究中，基因与蛋白的命名遵循国际惯例。基因符号 *NFE2L2* 指代人类基因，而 *Nfe2l2* 指代大鼠基因。其编码的蛋白分别称为 NRF2（人）和 Nrf2（大鼠）。鉴于本研究主要在大鼠模型和细胞中进行，文中在描述具体实验数据时使用 *Nfe2l2* 和 Nrf2，而在进行一般性机制论述或引用人类临床研究时，则使用 *NFE2L2* 和 NRF2，以准确反映物种来源并符合学术规范[35]。

综上所述，本研究通过生物信息学分析筛选出与SAL高度相关的10个靶基因（*MTOR*、*CASP3*、*HIF1A*、*SIRT1*、*TLR4*、*HSPA5*、*NFE2L2*、*NOS3*、*CASP8*、*NLRP3*）及实验验证揭示了SAL能改善DM大鼠视网膜厚度，减轻视网膜损伤，提高RG细胞活性，降低细胞中活性氧水平，其机制可能与抑制*Nfe2l2*表达有关。

利益冲突声明：

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明：

李俊奇参与论文选题、实验操作和论文撰写，姜佳韵参与实验数据收集及整理，于洪丹参与实验监督和指导，李俊奇和姜佳韵参与数据统计学分析，于洪丹和左中夫参与实验规划指导、数据核查及论文审校。

[参考文献]

[1] SUN H, SAEEDI P, KARURANGA S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045 [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2022, 183: 109119.

[2] KOUR V, SWAIN J, SINGH J, et al. A review on diabetic retinopathy[J]. Curr Diabetes Rev, 2024, 20(6): e201023222418.

[3] SOHN E H, VAN DIJK H W, JIAO C H, et al. Retinal neurodegeneration may precede microvascular changes characteristic of diabetic retinopathy in diabetes mellitus[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(19): E2655-E2664.

[4] BIKBOVA G, OSHITARI T, BABA T, et al. Mechanisms of neuronal cell death in AGE-exposed retinas - research and literature review[J]. Curr Diabetes Rev, 2017, 13(3): 280-288.

[5] EL-FAYOUMI D, BADR ELDINE N M, ESMAEL A F, et al. Retinal nerve fiber layer and ganglion cell complex thicknesses are reduced in children with type 1 diabetes with No evidence of vascular retinopathy [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2016, 57(13): 5355-5360.

[6] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. Cell, 2012, 149(5): 1060-1072.

[7] LEI G, MAO C, YAN Y L, et al. Ferroptosis, radiotherapy, and combination therapeutic strategies[J]. Protein Cell, 2021, 12(11): 836-857.

[8] ZHOU R P, CHEN Y, WEI X, et al. Novel insights into ferroptosis: Implications for age-related diseases[J]. Theranostics, 2020, 10(26): 11976-11997.

[9] ZHANG J F, QIU Q H, WANG H Y, et al. TRIM46 contributes to high glucose-induced ferroptosis and cell growth inhibition in human retinal capillary endothelial cells by facilitating GPX4 ubiquitination [J]. Exp Cell Res, 2021, 407(2): 112800.

[10] YANG D W, KANG O H, LEE Y S, et al. Anti-inflammatory effect of salidroside on phorbol-12-myristate-13-acetate plus A23187-mediated inflammation in HMC-1 cells[J]. Int J Mol Med, 2016, 38(6): 1864-1870.

[11] YUAN Y, WU S J, LIU X, et al. Antioxidant effect of salidroside and its protective effect against furan-induced hepatocyte damage in mice[J]. Food Funct, 2013, 4(5): 763-769.

[12] SHATI A A, ALFAIFI M Y. Salidroside protects against diabetes mellitus-induced kidney injury and renal fibrosis by attenuating TGF-β1 and Wnt1/3a/β-catenin signalling[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2020, 47(10): 1692-1704.

[13] ZHANG X M, XIE L, LONG J Y, et al. Salidroside: a review of its recent advances in synthetic pathways and pharmacological properties [J]. Chem Biol Interact, 2021, 339: 109268.

[14] TAN C B, GAO M, XU W R, et al. Protective effects of salidroside on endothelial cell apoptosis induced by cobalt chloride[J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32(8): 1359-1363.

[15] YANG W S, STOCKWELL B R. Ferroptosis: death by lipid peroxidation[J]. Trends Cell Biol, 2016, 26(3): 165-176.

[16] URSINI F, MAIORINO M. Lipid peroxidation and ferroptosis: The role of GSH and GPx4[J]. Free Radic Biol Med, 2020, 152: 175-185.

[17] BELI E, YAN Y Q, MOLDOVAN L, et al. Restructuring of the gut microbiome by intermittent fasting prevents retinopathy and prolongs survival in *db/db* mice[J]. Diabetes, 2018, 67(9): 1867-1879.

[18] WONG T Y, CHEUNG C M G, LARSEN M, et al. Diabetic retinopathy[J]. Nat Rev Dis Primers, 2016, 2: 16012.

[19] SIMÓ R, STITT A W, GARDNER T W. Neurodegeneration in diabetic retinopathy: does it really matter?[J]. Diabetologia, 2018, 61(9): 1902-1912.

[20] VILLARROEL M, CIUDIN A, HERNÁNDEZ C, et al. Neurodegeneration: an early event of diabetic retinopathy[J]. World J Diabetes, 2010, 1(2): 57-64.

[21] CARELLI V, LA MORGIA C, VALENTINO M L, et al. Retinal ganglion cell neurodegeneration in mitochondrial inherited disorders[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1787(5): 518-528.

[22] KOWLURU R A, CHAN P S. Oxidative stress and diabetic retinopathy[J]. J Diabetes Res, 2007, 2007: 043603.

[23] HAMMES H P. Diabetic retinopathy: hyperglycaemia, oxidative stress and beyond[J]. Diabetologia, 2018, 61(1): 29-38.

[24] KANG Q Z, YANG C X. Oxidative stress and diabetic retinopathy: Molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications[J]. Redox Biol, 2020, 37: 101799.

[25] YANG S X, WANG L S, ZENG Y, et al. Salidroside alleviates cognitive impairment by inhibiting ferroptosis *via* activation of the Nrf2/GPX4 axis in SAMP8 mice[J]. Phytomedicine, 2023, 114: 154762.

[26] HUANG X Y, ZOU L Z, YU X M, et al. Salidroside attenuates chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension *via* adenosine A2a receptor related mitochondria-dependent apoptosis pathway[J]. J Mol Cell Cardiol, 2015, 82: 153-166.

[27] YAMAMOTO M, KENSLER T W, MOTOHASHI H. The KEAP1-NRF2 system: a thiol-based sensor-effector apparatus for maintaining redox homeostasis[J]. Physiol Rev, 2018, 98(3): 1169-1203.

[28] LEONARD G. Franklin H. Epstein lecture: sirtuins, aging, and medicine[J]. N Engl J Med, 2011, 364(23): 2235-2244.

[29] HAIGIS M C, SINCLAIR D A. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance[J]. Annu Rev Pathol, 2010, 5: 253-295.

[30] MCILWAIN D R, BERGER T, MAK T W. Caspase functions in cell death and disease[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013, 5(4): a008656.

[31] BRENTNALL M, RODRIGUEZ-MENOCAL L, DE GUEVARA R L, et al. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis[J]. BMC Cell Biol, 2013, 14: 32.

[32] GHAREGHOMI S, HABIBI-REZAEI M, ARESE M, et al. Nrf2 modulation in breast cancer [J]. Biomedicines, 2022, 10(10): 2668.

[33] ZHONG Q, MISHRA M, KOWLURU R A. Transcription factor Nrf2-mediated antioxidant defense system in the development of diabetic retinopathy[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54(6): 3941-3948.

[34] INGOLD I, BERNDT C, SCHMITT S, et al. Selenium utilization by GPX4 is required to prevent hydroperoxide-induced ferroptosis[J]. Cell, 2018, 172(3): 409-422.e21.

[35] YATES A D, ACHUTHAN P, AKANNI W, et al. Ensembl 2020[J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48(D1): D682-D688.